ISSN: 2476-6917; Modares Journal of Biotechnology. 2019;10(4):593-599

Evolution of M13 Bacteriophage and RGD Peptide Effects on Induction of Angiogenesis and Regenerative Potential of Mouse Primary Lymph Node Fibroblasts

ARTICLE INFO

Article Type
Original Research

Authors
Safari Z.[1] *MSc,*
Soudi S.[2] *PhD,*
Zavaran Hosseini A.[2] *PhD,*
Bardania H.[3] *PhD,*
Sadeghizadeh M.*[1] *PhD*

How to cite this article
Safari Z, Soudi S, Zavaran Hosseini A, Bardania H, Sadeghizadeh M. Evolution of M13 Bacteriophage and RGD Peptide Effects on Induction of Angiogenesis and Regenerative Potential of Mouse Primary Lymph Node Fibroblasts. Modares Journal of Biotechnology. 2019;10(4):593-599.

[1]Genetics Department, Biological Sciences Faculty, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran
[2]Immunology Department, Medicine Faculty, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran
[3]Cellular & Molecular Research Center, Yasuj University of Medical Sciences, Yasuj, Iran

***Correspondence**
Address: Tarbiat Modares University, Nasr Bridge, Jalal-Al-Ahmad Highway, Tehran, Iran. Postal Code: 1411713116
Phone: +98 (21) 82884409
Fax: -
sadeghma@modares.ac.ir

Article History
Received: December 20, 2018
Accepted: January 26, 2019
ePublished: December 21, 2019

ABSTRACT

Aims One of the most important regenerative medical purposes is the production of alternative tissues with proper function. Fibroblast cells are one of the most important types of cells in the repair process that also play a role in the formation of blood vessels. Stimulation of fibroblastic cells requires the appearance of external signals to begin the proliferation and recall of other cells, as well as angiogenesis. The aim of this study was to investigate the effects of M13 in combination with RGD peptide on fibroblastic cells.

Materials and Methods For this study, M13 bacteriophage was first amplified and isolated. Then RGD peptide was synthesized and purified. Then, isolated mouse fibroblastic cells were culture on surfaces coated with M13 bacteriophage, bacteriophage M13 and RGD, gelatin, and surfaces without coated as a control for 48 hours. MTT assay was used to measure the proliferation and survival of cells, and then the expression of FGF-2, TGF-β1 and VEGF-A genes was measured by real-time PCR.

Findings The results of this study showed that the M13 and RGD bacteriophage increased cell proliferation and the fibroblast cell survival rate. In addition, expression of FGF-2, TGF-β1 and VEGF-A genes in cultured fibroblasts on the M13 and RGD bacteriophages surface increased significantly.

Conclusion Our research showed that scaffolds of M13 bacteriophage and RGD peptide are nontoxic and bio-compatible so they can be a suitable candidate for induction of repair and angiogenesis in tissue engineering.

Keywords Fibroblast; Bacteriophage M13; RGD peptide; Tissue Engineering

CITATION LINKS

[1] Chemisorbed poly (propylene sulphide)-based copolymers resist biomolecular ... [2] Surface engineering approaches to micropattern surfaces for cell-based ... [3] The extracellular matrix as a cell survival ... [4] The extracellular matrix guides the orientation of the cell division ... [5] Regional fibronectin and collagen fibril co-assembly directs cell proliferation and microtissue ... [6] Extracellular matrix revisited: Roles in tissue ... [7] Extracellular-matrix-based and Arg-Gly-Asp–modified photopolymerizing hydrogels for cartilage tissue ... [8] Decoration of RGD-mimetic porous scaffolds with engineered and devitalized extracellular matrix for adipose tissue ... [9] Engineering of M13 bacteriophage for development of tissue engineering ... [10] Enhanced cartilage tissue engineering by sequential exposure of chondrocytes to FGF-2 during 2D expansion and BMP-2 during 3D ... [11] Biological response to a synthetic ... [12] Transforming growth factor-β in stem cells and tissue ... [13] Angiogenic growth factor synergism in a murine tissue engineering model of angiogenesis and ... [14] Delivery of basic fibroblast growth factor (bFGF) from photoresponsive hydrogel ... [15] Reproducible isolation of lymph node stromal cells reveals site-dependent differences in fibroblastic reticular ... [16] RGD-peptides for tissue engineering of articular ... [17] Genetically engineered nanofiber-like viruses for tissue regenerating ... [18] Engineered phage nanofibers induce ... [19] Fabrication of engineered M13 bacteriophages into liquid crystalline films and fibers for directional growth and encapsulation of ... [20] Wound healing: An ... [21] Melanoma-stroma interactions: Structural and functional ... [22] Modulation of proliferation and differentiation of human bone marrow stromal cells by fibroblast growth factor 2: Potential implications for tissue engineering of tendons and ... [23] Bone marrow mesenchymal stem cells and TGF-β signaling in bone ... [24] TGF-β-induced epithelial to mesenchymal ...

Copyright© 2019, TMU Press. This open-access article is published under the terms of the Creative Commons Attribution-NonCommercial 4.0 International License which permits Share (copy and redistribute the material in any medium or format) and Adapt (remix, transform, and build upon the material) under the Attribution-NonCommercial terms.

بررسی اثر باکتریوفاژ M13 و پپتید RGD در القای آنژیوژنز و پتانسیل ترمیم سلول‌های فیبروبلاستی غدد لنفی موشی

زهره سفری MSc
گروه ژنتیک، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران
سارا صعودی PhD
گروه ایمنولوژی، دانشکده پزشکی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران
احمد زواران‌حسینی PhD
گروه ایمنولوژی، دانشکده پزشکی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران
حسن بردانیا PhD
مرکز تحقیقات سلولی و مولکولی، دانشگاه علوم پزشکی یاسوج، یاسوج، ایران
مجید صادقی‌زاده* PhD
گروه ژنتیک، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران

چکیده

اهداف: یکی از مهم‌ترین اهداف پزشکی بازساختی، تولید بافت‌های جایگزین با عملکرد صحیح است. سلول‌های فیبروبلاستی یکی از مهم‌ترین انواع سلول‌ها در فرآیند ترمیم هستند که در تشکیل عروق خونی نیز نقش دارند. تحریک سلول‌های فیبروبلاستی برای شروع تکثیر و فراخوان دیگر سلول‌ها و همچنین آنژیوژنز نیاز به سیگنال‌های بیرونی مناسب دارد. هدف از مطالعه حاضر بررسی اثرات باکتریوفاژ M13 در ترکیب با پپتید RGD روی سلول‌های فیبروبلاستی است.

مواد و روش‌ها: برای این مطالعات، ابتدا باکتریوفاژ M13 تکثیر و جداسازی شد. سپس پپتید RGD سنتز و خالص‌سازی شد در ادامه سلول‌های فیبروبلاستی جداسازی‌شده از موش، روی سطوح پوشش داده‌شده با باکتریوفاژ M13، باکتریوفاژ M13 و RGD، ژلاتین و سطوح کنترل به‌مدت ۴۸ساعت کشت داده شد. سپس برای اندازه‌گیری میزان تکثیر و بقای سلول‌ها تست MTT صورت گرفت و پس از آن میزان بیان ژن‌های *FGF-2*، *TGF-β1* و *VEGF-A* به‌وسیله واکنش زنجیره‌ای پلیمراز در زمان واقعی (Real-Time PCR) اندازه‌گیری شد.

یافته‌ها: نتایج مطالعه حاضر نشان داد که سطح باکتریوفاژ M13 و RGD موجب افزایش تکثیر سلولی و میزان زنده‌ماندن سلول‌های فیبروبلاست گشته است. علاوه بر این، بیان ژن‌های *FGF-2*، *TGF-β1* و *VEGF-A* در سلول‌های فیبروبلاست کشت داده‌شده روی سطح باکتریوفاژ M13 و RGD به‌طور معنی‌دار افزایش یافت.

نتیجه‌گیری: تحقیق حاضر نشان داد که داربست‌هایی از جنس باکتریوفاژ M13 و پپتید RGD به‌دلیل عدم سمیت و زیست‌سازگاربودن می‌توانند کاندید مناسبی برای القای ترمیم و آنژیوژنز در مهندسی بافت باشند.

کلیدواژه‌ها: فیبروبلاست، باکتریوفاژ M13، پپتید RGD و مهندسی بافت

تاریخ دریافت: ۱۳۹۷/۹/۲۹
تاریخ پذیرش: ۱۳۹۷/۱۱/۶
*نویسنده مسئول: sadeghma@modares.ac.ir

مقدمه

ساخت و طراحی مواد زیستی در بسیاری از زمینه‌های فناوری از جمله داروها، بیوسنسورها و داربست‌های مهندسی بافت از اهمیت زیادی برخوردار است. مدل‌های تعریف‌شده تا به امروز در مقیاس میکرو و نانو توسعه یافته است. به‌تازگی مواد زیستی مانند پپتیدها، پلیمرها یا پروتئین‌های ماتریکس برای ساخت داربست‌ها مورد استفاده قرار گرفته است[1, 2].

در بدن، اکثر سلول‌ها روی ماتریکس خارج سلولی (ECM) رشد می‌کنند. این ماتریکس شامل پروتئین‌های فیبری و گلیکوآمینوگلیکان‌ها است و یک محیط ضروری برای زنده‌ماندن سلول‌ها فراهم می‌کند. ECM روی رفتارهای سلولی مانند چسبندگی سلولی، تکثیر و تمایز از طریق سیگنال‌های بیوشیمیایی یا فیزیکی تاثیر می‌گذارد و محیط میکروتیک سه‌بعدی را فراهم می‌کند که موجب رشد سلولی می‌شود[3-5].

اخیراً تلاش‌های زیادی برای ایجاد یک ECM مصنوعی برای مهندسی بافت در حال انجام است. برای این امر از پلیمرها و مواد زیستی زیست‌تخریب‌پذیر با سازگاری عالی، خواص فیزیکی و شیمیایی مناسب استفاده شده است[6]. پروتئین‌های چسبنده مانند فیبرونکتین و لامینین نقش مهمی در چسبندگی و تکثیر سلولی ایفا می‌کنند. به‌طور کلی، بسیاری از سلول‌های پستانداران به‌وسیله ارتباط مستقیم بین گیرنده پروتئین خود با پروتئین‌های موجود روی داربست به ECM متصل می‌شوند. فاکتور اصلی فیبرونکتین ماتریکس برای اتصال سه پپتید آرژنین- گلاسین- اسیدآسپارتیک (RGD) به کار می‌رود. بنابراین ماتریکس‌های دارای پپتیدهای RGD می‌توانند به چسبندگی و رشد صحیح سلول‌ها کمک کنند، همچنین باعث می‌شوند که سلول‌های متصل به آنها دارای عملکرد صحیح باشند[7, 8].

مطالعات اخیر در زمینه مهندسی بافت و ساخت داربست‌ها به سمت استفاده از داربست‌های زیستی پیش رفته است زیرا به‌دلیل طبیعی‌بودن این داربست‌ها، پاسخ سیستم ایمنی بدن به آنها بسیار کمتر است. باکتریوفاژ M13، یک ویروس باکتریایی با شکل نانوفیبری است و از این رو هیچ ضرری برای سلول‌های پستانداران ندارد. مطالعات قبلی نشان داده است که باکتریوفاژ M13 می‌تواند بسیاری از پروتئین‌های مورد نظر ما را به‌صورت ژنتیکی یا شیمیایی روی سطح خود داشته باشد. علاوه بر این، باکتریوفاژهای M13 به‌علت ویژگی ساختاری خود می‌توانند به‌راحتی به‌عنوان نانوفیبر در کنار هم شکل گیرند و به‌صورت دو یا سه‌بعدی مورد استفاده قرار گیرند. پیشرفت‌های اخیر در شناسایی نانومواد عملیاتی، باکتریوفاژ را به‌عنوان یک فرصت جدید در زمینه مهندسی پزشکی معرفی کرده است[9].

فاکتور رشد تغییردهنده بتا- ۱که به اختصار TGF-β1 و فاکتور رشد فیبروبلاست- ۲ که به اختصار FGF-2 نامیده می‌شود، در تکثیر فیبروبلاست‌ها، تحریک تولید کلاژن، الاستین و سنتز فیبرونکتین نقش اساسی دارند[10].

در مطالعات گذشته نشان داده شده است که TGF-β1 و FGF-2 پس از آسیب بافتی، در شرایط "*محیط زنده*" افزایش بیان داشته و همچنین این عوامل رشد در استرومای موضعی که در آن آسیب اتفاق افتاده است، موجب افزایش مهاجرت سلول‌ها می‌شوند. بررسی این عوامل رشد در "*محیط زنده*" نشان داده است[11, 12] که آنها در

تنظیم سنتز مولکول‌های ماتریکس نقش دارند و برای مراحل اولیه و بهبود زخم حیاتی هستند[13, 14].

بخش بزرگی از تحقیقات در زمینه مهندسی بافت با هدف طراحی استراتژی‌هایی برای بهبود پتانسیل آنژیوژنیک بافت‌های مهندسی‌شده با استفاده از داربست‌های زیستی، انجام شده است. یکی از فاکتورهای مهم رگ‌زایی فاکتور رشد اندوتلیال عروقی (VEGF_A) است. داربست‌هایی که باعث افزایش بیان این فاکتور توسط سلول‌های فیبروبلاستی و اندوتلیالی شوند می‌توانند رگ‌زایی به سمت بافت مهندسی‌شده را افزایش دهند که این امر منجر به پایداری بافت مورد نظر در بدن خواهد شد.

با توجه به این که باکتریوفاژ M13 قابلیت‌هایی مانند عدم سمیت و خودتجمعی دارد و همچنین وجود پپتید RGD موجب افزایش اتصال سلول‌ها به سطح می‌شود. برای افزایش رشد و تحریک آنژیوژنز و افزایش قابلیت ترمیم سلول‌های فیبروبلاستی این ماده زیستی انتخاب شد.

مواد و روش‌ها

تکثیر و جداسازی باکتریوفاژ M13: باکتریوفاژهای M13 با توجه به پروتکل استاندارد، تکثیر و جداسازی شدند. باکتری TG1 *E. coli* در ۵۰۰میلی‌لیتر محیط کشت ytx۲ کشت داده شد و زمانی که باکتری‌ها به مرحله میانی ورودی رشد خود رسیدند (فاز لگاریتمی) از انکوباتور خارج و سپس با یک‌میلی‌لیتر باکتریوفاژ M13 وحشی ($PFU/m\ ۱۰^{۳}$) آلوده شد. کشت‌ها به‌مدت ٦ساعت در دمای ۳۷°C (تکان‌دادن ۲۵۰ دور) انکوبه و سپس به‌مدت ۳۰دقیقه به میزان ۸۰۰۰g سانتریفیوژ شدند تا سلول‌های باکتریایی حذف شدند. درنهایت، باکتریوفاژها به‌وسیله سانتریفوژ با دور ۲۰۰۰۰g به‌مدت ۱۵۰دقیقه جمع‌آوری شدند. رسوب فاژ حاصل در محلول فسفات بافر (PBS؛ گیبکو، ایالات متحده) حل و غلظت باکتریوفاژ جداشده به روش اسپکتروفتومتری با استفاده از طول موج ۲٦۹نانومتر تعیین شد.

تایید باکتریوفاژ M13 به‌وسیله میکروسکوپ الکترونی (TEM): برای تجزیه و تحلیل TEM، ۲۰میلی‌لیتر از محلول باکتریوفاژ M13 روی یک شبکه مس مجهز به کربن ۳۰۰مش (AGS160-3) قرار گرفت و سپس شبکه با ۲٪ اورانیل‌استات رنگ‌آمیزی شد. پس از رنگ‌آمیزی، شبکه با آب مقطر استریل شست‌وشو داده شد. عکس‌برداری از نمونه‌ها توسط میکروسکوپ الکترونی گذاره مدل EM10C (شرکت Zeiss؛ آلمان) با ولتاژ ۸۰کیلوولت صورت گرفت.

سنتز و تایید ساختار پپتید RGD: پپتید (RGD) با دنباله (GGGRGDS) به‌صورت دستی روی فاز جامد با استفاده از رزین ۲کلروتری‌کلرید به‌عنوان ماده جامد، با توجه به استاندارد ۹-(Fmoc) فلورومتوکسی‌کربونیل شیمی سنتز شده است. ترکیب اسیدهای آمینه با استفاده از HATU و DIEA، به‌عنوان واکنش‌های اتصال و پیپریدین برای فرآیند محافظت از ضایعات تهیه شد. واشرهای بین اتصال و حفاظت از دی‌اکسیدکربن با استفاده از دی‌متیل‌فرمالید (DMF) و N- متیل‌پیرولیدون (NMP) صورت گرفت. کارآیی کوپلینگ با استفاده از آزمون کینز نین هیدرین بررسی شد. جداسازی پپتید سنتزی نهایی از رزین به‌مدت ۲ساعت با استفاده از کوکتیل شکسته حاوی تری‌فلوئور اسیدهای اسید (TFA)، آب و تری‌ایزوپروپیل سالین (TIPS) و حذف رزین توسط فیلتراسیون صورت گرفت. برای خلوص پپتید، RGD آماده‌شده در دی‌اتیل سرد و یخ خشک به‌مدت ۲۴ساعت رسوب داده شد. وزن مولکولی پپتید توسط اسپکترومتری مدل LC-MS (Agilent Technology Series) تایید شد.

جداسازی و کشت سلول‌های فیبروبلاستی: ۵ سر موش بالب/سی ماده در سن ٦ تا ۸هفتگی (موسسه پاستور؛ ایران) خریداری و در آزمایشگاه حیوانات مطابق با دستورالعمل‌های کمیسیون اخلاقی دانشگاه تربیت‌مدرس، نگهداری شد. برای جداسازی فیبروبلاست غدد لنفاوی ابتدا موش‌ها را به‌وسیله کلروفرم کشته، سپس غدد لنفاوی زیرکشاله و زیربغل آنها خارج و با روش آنزیمی کلاژناز سلول‌های فیبروبلاستی جدا شدند و در فلاسک کشت در محیط DMEM-F12 (گیبکو؛ ایالات متحده)، با ۱۰٪ سرم جنین گاوی (FBS؛ گیبکو؛ ایالات متحده) و ۱٪ پنی‌سیلین/استرپتومایسین به‌مدت ۲۱ روز کشت و هر دو روز یک‌بار محیط آن تعویض شد.

تایید سلول‌های فیبروبلاست: تجزیه و تحلیل فنوتیپی سلول‌های جداشده با استفاده از روش فلوسیتومتری برای نشانگرهای $CD45^{+}$، $CD80^{+}$ و $CD31^{+}$ که در مطالعات قبلی به‌عنوان مارکرهای سطحی فیبروبلاست‌های لنفاوی شناخته شده‌اند[15]، مورد استفاده قرار گرفت. برای این تست ابتدا سلول‌های کشت داده‌شده، ترپسینه شد سپس با آنتی‌بادی‌های علیه CD45، CD80 و CD31 که همگی کونژوگه به رنگ فلورسنت FITC هستند به‌مدت ۲۰دقیقه انکوبه شدند، سپس بعد از دوبار شست‌وشو با PBS، نمونه‌ها با دستگاه فلوسایتومتری مدل BD FACS Canto II (BD Bioscience؛ ایالات متحده) در محدوده FL-1 با طول موج ۵۲۵نانومتر اندازه‌گیری شد و داده‌ها توسط نرم‌افزار Flowing software 2.4.1 آنالیز شدند.

سنجش تکثیر و بقا سلول‌ها به‌وسیله تست MTT: برای بررسی سازگاری بیولوژیکی باکتریوفاژ M13 ($۱۰^{۱۳}pfu/ml$) و پپتید RGD از تست MTT (استفاده از نمک ۳-(۴و۵-دی‌متیل‌تیازول-۲-ئیل)-۲و۵-دی‌فنیل تترازولیوم بروماید) استفاده شد. برای این تست پس از کشت سلول‌های فیبروبلاست در یک پلیت ۹۶خانه‌ای (۵×۱۰۳ سلول در هر خانه)، از محلول MTT (با غلظت ۵میلی‌گرم بر میلی‌لیتر)، ۲۰میکرولیتر به محیط کشت سلولی هر خانه اضافه و پلیت در دمای ۳۷°C انکوبه شد. پس از ٤ساعت، محیط رویی دور ریخته شد و ۲۰۰میکرولیتر دی‌متیل‌سولفوکسید (سیگماآلدریچ؛ ایالات متحده) به هر چاهک برای حل‌شدن بلورهای فورمازان اضافه شد و میزان رنگ بلورهای حل شده به‌وسیله دستگاه خوانش الایزا در طول موج ۵۴۰نانومتر (Biotek؛ ایالات متحده) اندازه‌گیری شد.

استخراج RNA و سنتز cDNA به‌منظور بررسی بیان ژن‌ها: بیان فاکتورهای مهم در تکثیر، ترمیم و رگ‌زایی فیبروبلاست‌ها که شامل FGF-2، TGF-β1، VEGF-A و GAPDH (به‌عنوان کنترل داخلی) در سطح mRNA در سلول‌های فیبروبلاستی پس از کشت روی سطوح باکتریوفاژ M13، باکتریوفاژ M13 با پپتید RGD، ژلاتین و کنترل، بعد از گذشت دو روز مورد بررسی قرار گرفت، برای این منظور RNA تام سلول‌های کشت داده‌شده با استفاده از محلول RiboX استخراج شد، غلظت و خلوص RNA استخراج‌شده توسط دستگاه نانودراپ مورد بررسی قرار گرفت، همچنین برای اطمینان از صحت RNA استخراج‌شده الکتروفورز نمونه در ژل آگارز انجام شد. به‌منظور سنتز cDNA مقدار یک‌میکروگرم از RNA تحت تیمار با آنزیم ترانسکریپتاز معکوس (RT؛ تاکارا) قرار گرفت. برای اطمینان از cDNA ساخته‌شده، با نمونه‌های cDNA ساخته‌شده واکنش زنجیره‌ای پلیمراز (PCR) از طریق پرایمرهای ژن خانه‌دار *GAPDH* انجام شد.

بررسی بیان ژن‌های *FGF-2*، *TGF-β1* و *VEGF-A* با استفاده از روش RT-PCR کمی: RT-PCR کمی از طریق دستگاه StepOne Real-Time PCR با استفاده از پرایمرهای طراحی‌شده برای این ژن‌ها و سایبرگرین انجام شد. توالی پرایمرها در جدول ۱ نمایش داده شده است. هر کدام از نمونه‌های مورد آزمایش (باکتریوفاژ M13، باکتریوفاژ M13 با پپتید RGD، ژلاتین) در سه تکرار زیستی مورد بررسی قرار گرفت. برنامه چرخش دمایی به‌صورت ۹۵°C به‌مدت ۱۰دقیقه، سپس ۴۰ سیکل ۹۵°C به‌مدت ۳۰ثانیه، ۶۲°C به‌مدت ۳۰ثانیه و ۷۲°C به‌مدت ۳۰ثانیه، درنهایت ۷۲°C به‌مدت ۱۰دقیقه است.

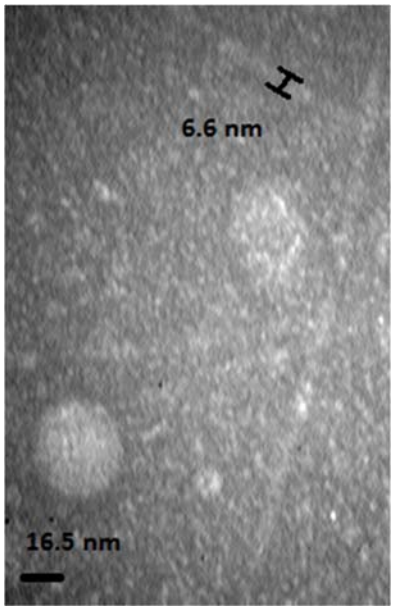
جدول ۱) پرایمرهای طراحی‌شده

ژن	پرایمر رفت	پرایمر معکوس
VEGF-A	GGAGATCCTTCGAGGAGCACTT	GGCGATTTAGCAGCAGATATAAGAA
TGF-β1	CGCAACAACGCCATCTATGAG	CACATGTTGCTCCACACTTGA
FGF-2	ATGGCAGCCGGGAGCATCACCCACG	TCAGCTCTTCGCAGACATTGGAAG
GAPDH	CCTGGAGAAACCTGCCAAGTA	GGCATCGAAGGTGGAAGAGT

آنالیز آماری: تجزیه و تحلیل‌های آماری در مطالعه حاضر توسط نرم‌افزار Prism GraphPad 6 انجام شد و داده‌ها به‌عنوان میانگین±خطای استاندارد معنی‌ها ارایه شده است. اختلاف معنی‌داری با روش دلتا- دلتا CT و آنالیز واریانس یک‌طرفه کمتر از ۰/۰۵ در نظر گرفته شد.

یافته‌ها

خصوصیات و سایز نانوساختارهای فاژ M13: نتایج حاصل از تصویربرداری TEM نشان داد که فاژهای جداشده، مورفولوژی معمول فاژ وحشی M13 با ابعاد ٦/٦نانومتر را از خود به نمایش گذاشته‌اند (شکل ۱).

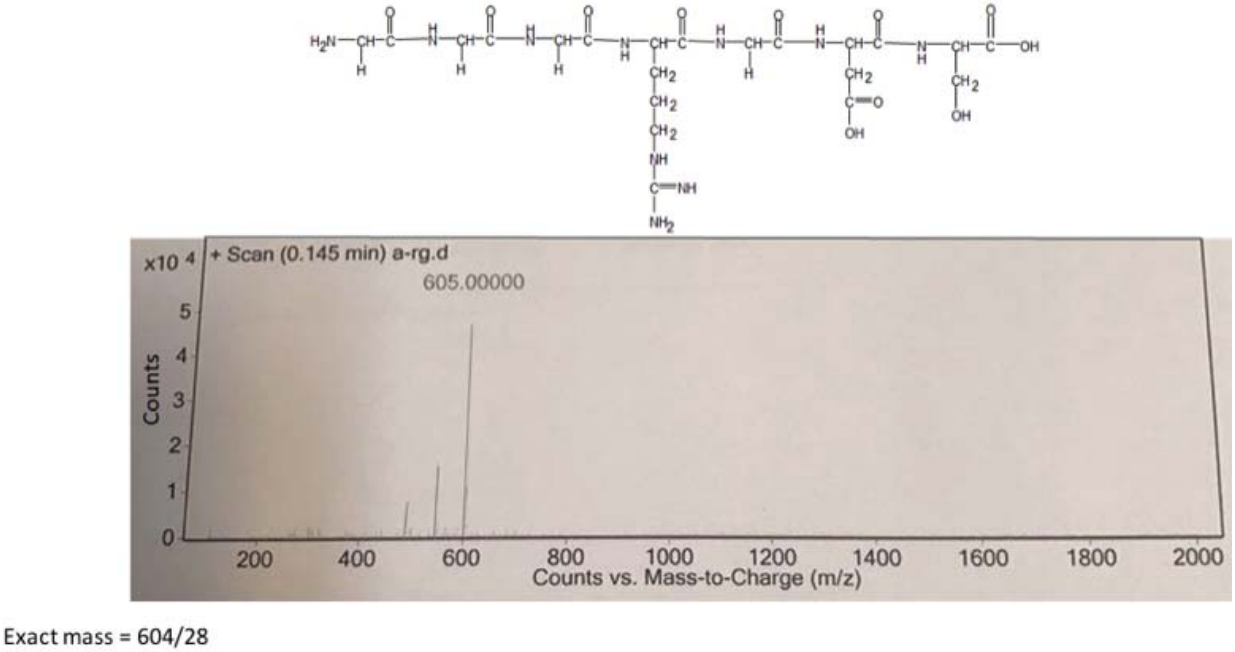


شکل ۱) باکتریوفاژ M13

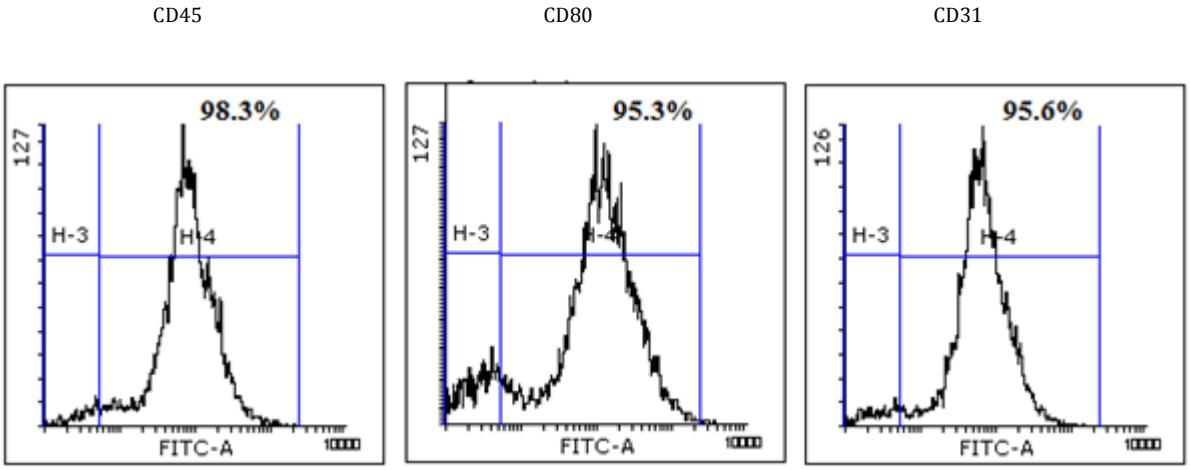
تایید ساختار و جرم پپتید RGD: پپتید RGD با استفاده از مواد شیمیایی Fmoc فاز جامد تهیه شد. پپتید RGD سنتزشده توسط تجزیه LC-MS با تعیین جرم دقیق پپتید تایید شد. شکل ۲ ساختار و طیف جرمی پپتید RGD را نشان می‌دهد. توزیع دقیق جرم (m/z) برای پپتید برابر با ٦٠٤/٢٨ بود، در حالی که جرم دقیق این ماده ۶۰۵ است (شکل ۲).

شناسایی جمعیت فیبروبلاست‌ها: سلول‌های فیبروبلاست جداسازی‌شده از موش‌های ماده پس از کشت به‌وسیله آنتی‌بادی‌های anti-CD45-FITC، anti-CD31-FITC و anti-CD80-FITC رنگ‌آمیزی شد و با استفاده از فلوسایتومتری مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفتند. نتایج این مطالعه نشان داد که سلول‌های جداسازی‌شده به میزان ۹۵/۶٪ شاخص CD31، ۹۵/۳٪ شاخص CD80 و ۹۸/۳ شاخص CD45 از شاخص‌های ویژه سلول‌های فیبروبلاست غدد لنفاوی را در سطح خود بیان می‌کنند (نمودار ۱).

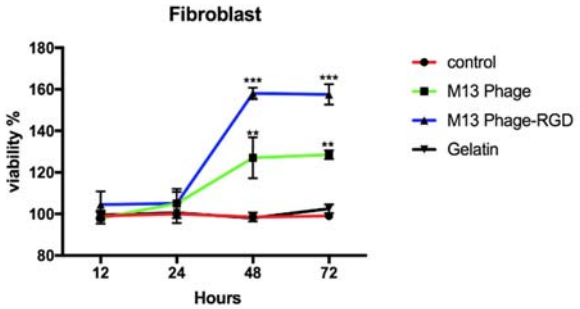
اثر باکتریوفاژ M13، باکتریوفاژ M13 با پپتید RGD، ژلاتین بر تکثیر و بقای سلول‌های فیبروبلاست: سلول‌های فیبروبلاست روی سطوح پلیت ۹۶خانه پوشش داده‌شده با باکتریوفاژ M13، باکتریوفاژ M13 با پپتید RGD، ژلاتین و کنترل با تراکم سلول‌های 5×10^3 در هر خانه کشت داده شد. پس از ۱۲، ۲۴، ۴۸ و ۷۲ساعت از کشت سلول‌ها، فعالیت میتوکندریایی فیبروبلاست‌ها در هر گروه آزمایشی با استفاده از آزمون MTT مورد بررسی قرار گرفت. نتایج حاصل از آزمون MTT نشان داد که سلول‌های فیبروبلاست در گروه‌های باکتریوفاژ M13، باکتریوفاژ M13 با پپتید RGD در ۴۸ و ۷۲ساعت افزایش تکثیر داشته‌اند ولی گروه ژلاتین با کنترل تفاوت معنی‌دار در هیچ یک از زمان‌ها نشان نداد. البته فعالیت میتوکندریایی فیبروبلاست‌ها در سطح باکتریوفاژ M13 با پپتید RGD بیشترین افزایش را نسبت به گروه‌های دیگر نشان داد (نمودار ۲).



شکل ۲) ساختار و توزیع جرم (m/z) پپتید RGD با تجزیه و تحلیل LC-MS



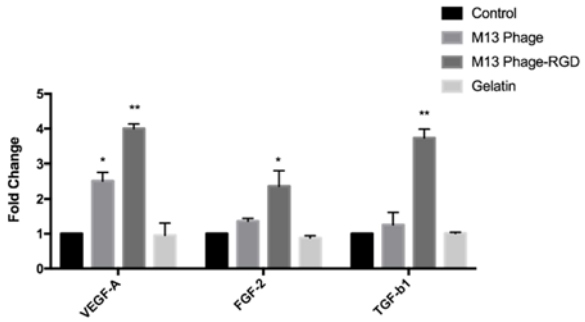
نمودار ۱) تجزیه و تحلیل فنوتیپی سلول‌های جداشده با استفاده از جریان فلوسایتومتری برای نشانگرهای، CD80، CD45 و CD31



نمودار ۲) تغییرات سطح بقا سلول‌های فیبروبلاست کشت داده‌شده روی سطوح باکتریوفاژ M13، باکتریوفاژ M13 با پپتید RGD، ژلاتین و گروه کنترل ***p<۰/۰۰۰۱؛ **p<۰/۰۱

اثر باکتریوفاژ M13، باکتریوفاژ M13 با پپتید RGD و ژلاتین بر بیان ژن‌های *FGF-2*، *TGF-β1* و *VEGF-A* در سلول‌های فیبروبلاست: برای بررسی اثرات باکتریوفاژ M13، باکتریوفاژ M13 با پپتید RGD، ژلاتین و سطوح کنترل بر بیان و ترشح عوامل رشد و تکثیر و آنژیوژنیک در سلول‌های فیبروبلاست در ۴۸ساعت، بیان mRNA ژن‌های *FGF-2*، *TGF-β1* و *VEGF*-A، توسط روش RT-PCR کمی اندازه‌گیری شدند. در نتایج به‌دست‌آمده مشخص شد که سطح باکتریوفاژ M13 با پپتید RGD به‌طور قابل توجهی بیان هر سه ژن را نسبت کنترل افزایش داده است. گروه باکتریوفاژ M13 ژن *TGF-β1* را به‌صورت معنی‌دار نسبت به کنترل افزایش داده

است و اما گروه کنترل بیان هیچ‌کدام از ژن‌ها را به نسبت کنترل تغییر نداده است. نتایج در نمودار ۳ نشان داده شده است.



نمودار ۳) تغییرات بیان ژن در سلول‌های فیبروبلاست کشت داده‌شده روی سطوح باکتریوفاژ M13، باکتریوفاژ M13 با پپتید RGD، ژلاتین و گروه کنترل *p<۰/۰۵؛ **p<۰/۰۱

شکل

بحث

مطالعه حاضر نشان داد که احتمالاً باکتریوفاژ M13 دارای پپتید RGD می‌تواند توانایی ترمیم، تکثیر و آنژیوژنز را در سلول‌های فیبروبلاست افزایش دهد. در مطالعات گذشته نشان داده شده است که پپتید RGD توانایی افزایش فعالیت‌های سلولی از جمله چسبندگی سلولی، تکثیر و تمایز را دارد در نتیجه به‌طور گسترده‌ای برای طراحی مواد زیستی برای مهندسی بافت استفاده شده است[16]. همچنین نشان داده شده است که فاژ M13 دارای ویژگی‌های منحصربه‌فرد در مقایسه با سایر انواع نانوساختارها است، یکی از این ویژگی‌ها داشتن توانایی خودتجمعی است که با توجه به آن می‌توان از آن به‌عنوان یک بلوک ساختمانی برای ساخت نانوساختارهای ویژه استفاده کرد[17]. در مطالعات گذشته که روی تحریک آنژیوژنز فاژ M13 صورت گرفته، نشان داده است که این ماده زیستی توانایی تحریک رگ‌زایی را هم در شرایط "*محیط زنده*" و هم در شرایط "*درون شیشه*" را دارد[18]. در دیگر مطالعات نشان داده‌اند که داربست‌های سه‌بعدی و دوبعدی مبتنی بر فاژ دارای سازگاری مناسبی برای سلول‌های یوکاریوتی هستند. این داربست‌ها ویژگی‌های شیمیایی و فیزیکی مناسب منطبق بر الگوهای رشد سلول‌ها را نشان می‌دهند[19]. در مطالعه حاضر، مشخص شد که پپتید RGD و باکتریوفاژ M13 می‌توانند در القای ترشح فاکتورهای دخیل در فرآیند ترمیم بافت از فیبروبلاست‌ها موثر باشند. علاوه بر این، در این مطالعه مشخص شد که فاکتور M13 در ترکیب با پپتید RGD می‌تواند احتمالاً تکثیر، ترمیم و آنژیوژنز را بیشتر از فاژ M13 و ژلاتین افزایش دهد.

نتایج تحقیق حاضر نشان داده است که سطوح فاژ M13 و RGD بیش از گروه‌های فاژ M13، ژلاتین و سطوح کنترل تکثیر سلولی را تحت تاثیر قرار داده است. با استفاده از این مشاهدات، می‌توان فرض کرد که فاژ M13 در ترکیب با موتیف RGD قادر به افزایش قدرت ترمیم سلول‌های فیبروبلاستی از طریق افزایش و القای تکثیر سلولی آنها است. در مطالعات گذشته نشان داده‌اند که تکثیر سلول‌های فیبروبلاست، فرآیندی کلیدی در ترمیم و گسترش بافت به شمار می‌آیند[20].

در این پژوهش، افزایش بیان VEGF-A در سطح mRNA در گروه فاژ M13 و ترکیب فاژ M13 و RGD نشان داده شده است. در مطالعات گذشته نشان داده‌اند که فیبروبلاست‌ها یک منبع غنی از عوامل رشد برای تحریک خود و نیز برای فعال‌کردن انواع دیگر سلول‌ها هستند. فیبروبلاست‌های فعال دارای عوامل رشد آنژیوژنیک مانند VEGF هستند[21]. در مطالعه حاضر نشان داده شد که فیبروبلاست‌های کشت داده‌شده روی سطح پوشش داده‌شده با فاژ M13 و RGD دارای ترشح فاکتور رشد عروق بالاتری نسب به دیگر گروه‌ها هستند. همچنین بیان قابل توجه ژن‌های *FGF-2* و *TGF-β1* در سلول‌های فیبروبلاست کشت داده‌شده روی سطح فاژ M13 و RGD در این پژوهش نشان داده شده است. همان‌طور که در تحقیقات پیشین بیان شده است، فاکتور رشد فیبروبلاست (FGF) یک عامل رشد است که اثرات بالقوه بر ترمیم و بازسازی بافت‌ها دارد[22]. نقش‌های متعددی برای فاکتور TGF-β1 مشخص شده است، یکی از نقش‌های اصلی آن فراخواندن سلول‌های بنیادی ویژه ترمیم و بازسازی بافت‌ها است، بنابراین در روند ترمیم بافت بسیار مهم به شمار می‌آید[23, 24]. با توجه به نتایج به‌دست‌آمده از این پژوهش، می‌توان گفت که داربست‌های حاوی باکتریوفاژ M13 و پپتید RGD می‌توانند با افزایش بیان فاکتورهای FGF-2 و TGF-β1 از سلول‌های فیبروبلاستی موجب افزایش قدرت ترمیم و بازسازی بافت و از طریق افزایش VEGF-A باعث افزایش آنژیوژنز شوند. آنژیوژنز در تشکیل و ترمیم بافت‌ها فاکتور بسیار مهمی به شمار می‌آید. بنابراین استفاده از این نوع داربست‌ها در مهندسی بافت می‌تواند بسیار کارآمد باشد.

نتیجه‌گیری

عملکرد سلول‌های فیبروبلاستی به‌طور قابل توجهی با قرارگرفتن در معرض گروه فاژ M13 و RGD به نسبت دیگر گروه‌ها تغییر کرده است. نتایج ما نشان می‌دهد که فاژ M13 و RGD موجب افزایش پتانسیل تکثیر، مهاجرت و افزایش پتانسیل آنژیوژنیک سلول‌های فیبروبلاستی می‌شود. به‌طور خلاصه، این مطالعه مواد زیستی جدیدی را برای ساخت داربست‌های مهندسی بافت معرفی می‌کند که می‌توانند در زمینه ترمیم و بازسازی بافت بسیار مفید باشند.

تشکر و قدردانی: بدین‌وسیله از دانشگاه تربیت‌مدرس به‌دلیل فراهم‌کردن امکانات انجام تحقیق حاضر قدردانی می‌شود.

تاییدیه‌اخلاقی: موردی از سوی نویسندگان گزارش نشده است.

تعارض منافع: نویسندگان اعلام می‌کنند که هیچ تعارض منافعی وجود ندارد.

سهم نویسندگان: زهره سفری (نویسنده اول)، نگارنده مقدمه/پژوهشگر اصلی/تحلیلگر آماری (۳۰%)؛ سارا صعودی

(نویسنده دوم)، روش‌شناس/نگارنده بحث (۲۰%)؛ احمد زواران‌حسینی (نویسنده سوم)، روش‌شناس/نگارنده بحث (۲۰%)؛ حسن بردانیا (نویسنده چهارم)، پژوهشگر کمکی (۱۵%)؛ مجید صادقی‌زاده (نویسنده پنجم)، پژوهشگر کمکی (۱۵%)

منابع مالی: موردی از سوی نویسندگان گزارش نشده است.

منابع

1- Bearinger JP, Terrettaz S, Michel R, Tirelli N, Vogel H, Textor M, et al. Chemisorbed poly (propylene sulphide)-based copolymers resist biomolecular interactions. Nat Mater. 2003;2(4):259-64.
2- Falconnet D, Csucs G, Grandin HM, Textor M. Surface engineering approaches to micropattern surfaces for cell-based assays. Biomaterials. 2006;27(16):3044-63.
3- Meredith Jr JE, Fazeli B, Schwartz MA. The extracellular matrix as a cell survival factor. Mol Biol Cell. 1993;4(9):953-61.
4- Théry M, Racine V, Pépin A, Piel M, Chen Y, Sibarita JB, et al. The extracellular matrix guides the orientation of the cell division axis. Nat Cell Biol. 2005;7(10):947-53.
5- Sevilla CA, Dalecki D, Hocking DC. Regional fibronectin and collagen fibril co-assembly directs cell proliferation and microtissue morphology. PloS One. 2013;8(10):e77316.
6- Kim Y, Ko H, Kwon IK, Shin K. Extracellular matrix revisited: Roles in tissue engineering. Int Neurourol J. 2016;20(Suppl 1):S23-9.
7- Kim HD, Heo J, Hwang Y, Kwak SY, Park OK, Kim H, et al. Extracellular-matrix-based and Arg-Gly-Asp–modified photopolymerizing hydrogels for cartilage tissue engineering. Tissue Eng Part A. 2015;21(3-4):757-66.
8- Rossi E, Guerrero J, Aprile P, Tocchio A, Kappos EA, Gerges I, et al. Decoration of RGD-mimetic porous scaffolds with engineered and devitalized extracellular matrix for adipose tissue regeneration. Acta Biomater. 2018;73:154-66.
9- Jin HE, Lee SW. Engineering of M13 bacteriophage for development of tissue engineering materials. In: Wege Ch, Lomonossoff GP, editors. Virus-derived nanoparticles for advanced technologies. New York: Springer; 2018. pp. 487-502.
10- Martin I, Suetterlin R, Baschong W, Heberer M, Vunjak-Novakovic G, Freed LE. Enhanced cartilage tissue engineering by sequential exposure of chondrocytes to FGF-2 during 2D expansion and BMP-2 during 3D cultivation. J Cell Biochem. 2001;83(1):121-8.
11- Trinkaus-Randall V, Nugent MA. Biological response to a synthetic cornea. J Control Release. 1998;53(1-3):205-14.
12- Xu X, Zheng L, Yuan Q, Zhen G, Crane JL, Zhou X, et al. Transforming growth factor-β in stem cells and tissue homeostasis. Bone Res. 2018;6:2.
13- Rophael JA, Craft RO, Palmer JA, Hussey AJ, Thomas GPL, Morrison WA, et al. Angiogenic growth factor synergism in a murine tissue engineering model of angiogenesis and adipogenesis. Am J Pathol. 2007;171(6):2048-57.
14- Andreopoulos FM, Persaud I. Delivery of basic fibroblast growth factor (bFGF) from photoresponsive hydrogel scaffolds. Biomaterials. 2006;27(11):2468-76.
15- Fletcher AL, Malhotra D, Acton SE, Lukacs-Kornek V, Bellemare-Pelletier A, Curry M, et al. Reproducible isolation of lymph node stromal cells reveals site-dependent differences in fibroblastic reticular cells. Front Immunol. 2011;2:35.
16- Jeschke B, Meyer J, Jonczyk A, Kessler H, Adamietz P, Meenen NM, et al. RGD-peptides for tissue engineering of articular cartilage. Biomaterials. 2002;23(16):3455-63.
17- Merzlyak A, Indrakanti Sh, Lee SW. Genetically engineered nanofiber-like viruses for tissue regenerating materials. Nano Lett. 2009;9(2):846-52.
18- Yoo SY, Shrestha KR, Jeong SN, Kang JI, Lee SW. Engineered phage nanofibers induce angiogenesis. Nanoscale. 2017;9(43):17109-17.
19- Chung WJ, Merzlyak A, Lee SW. Fabrication of engineered M13 bacteriophages into liquid crystalline films and fibers for directional growth and encapsulation of fibroblasts. Soft Matter. 2010;6(18):4454-9.
20- Zielins ER, Atashroo DA, Maan ZN, Duscher D, Walmsley GG, Hu M, et al. Wound healing: An update. Regen Med. 2014;9(6):817-30.
21- Ruiter D, Bogenrieder T, Elder D, Herlyn M. Melanoma-stroma interactions: Structural and functional aspects. Lancet Oncol. 2002;3(1):35-43.
22- Hankemeier S, Keus M, Zeichen J, Jagodzinski M, Barkhausen T, Bosch U, et al. Modulation of proliferation and differentiation of human bone marrow stromal cells by fibroblast growth factor 2: Potential implications for tissue engineering of tendons and ligaments. Tissue Eng. 2005;11(1-2):41-9.
23- Crane JL, Cao X. Bone marrow mesenchymal stem cells and TGF-β signaling in bone remodeling. J Clin Invest. 2014;124(2):466-72.
24- Xu J, Lamouille S, Derynck R. TGF-β-induced epithelial to mesenchymal transition. Cell Res. 2009;19(2):156-72.