

Investigation of the Dynamic Culture Medium on Proliferation and Differentiation of Mesenchymal Stem Cells after Culturing on Electrospun PCL and PCL-nHA Nanofibers

Mohammad Vazirzadeh¹, Sameereh Hashemi-Najafabadi^{2*}, Masoud Soleimani³, Maliheh Yaghoobi⁴

- 1- M.Sc., Department of Biomedical Engineering, Faculty of Chemical Engineering, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran
- 2- Assistant Professor, Department of Biomedical Engineering, Faculty of Chemical Engineering, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran
- 3- Associated Professor, Department of Hematology, Faculty of Medical Sciences, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran
- 4- Ph.D. Candidate, Department of Biotechnology, Faculty of Chemical Engineering, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran

*Corresponding Address: P.O.Code: 1411713116, Department of Biomedical Engineering, Faculty of Chemical Engineering, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran
Email: s.hashemi@modares.ac.ir

Received: 26/May/2014, Accepted: 06/Sep/2014

Abstract

Objective: More similarity to in vivo may help to increase the proliferation and differentiation of cells at in vitro culture. The present study has investigated the effect of a dynamic culture medium and nano hydroxyapatite (nHA) presence on proliferation and differentiation of mesenchymal stem cells (MSCs) to bone cells using electrospun polycaprolactone (PCL) scaffolds.

Methods: We prepared PCL and PCL-nHA scaffolds by electrospinning. After static culturing of the scaffolds with MSCs, the scaffolds, were divided into two groups of static and dynamic cultures. The dynamic culture scaffolds were placed on a shaker. Cell proliferation and differentiation at days 3, 7 and 14 were investigated by MTT, and the calcium and alkaline phosphatase assays.

Results: The obtained results from the MTT assay on day 14 showed an increase of 1.1 times in cell proliferation in the dynamic culture compared to the static culture. During this period, the calcium content produced by cells in the dynamic culture at day 14 were 1.23 times higher for PCL scaffolds and 1.46 times higher for PCL-nHA scaffolds compared to the static culture. Alkaline phosphatase levels for the dynamic state PCL scaffold were 1.24 times more and for PCL-nHA scaffolds were 1.28 times more compared to the static culture at day 14.

Conclusion: The obtained results from dynamic culture, showed higher proliferation and differentiation of stem cells to bone for both PCL and PCL-nHA scaffolds compared to the static culture. The amount of cell proliferation and differentiation in the scaffolds that contained nHA was more than scaffolds that did not have nHA.

Keywords: Electrospinning, Mesenchymal Stem Cells, Polycaprolactone, Nanohydroxyapatite, Dynamic Medium

Modares Journal of Medical Sciences: *Pathobiology*, Vol. 17 (2014-2015), No. 4, Pages: 63-73

مطالعه محیط کشت پویا بر رشد و تمایز سلول‌های بنیادی مزانشیمی پس از کشت روی نانو الیاف الکتروریسی شده پلی‌کاپرولاکتون و پلی‌کاپرولاکتون - نانو هیدروکسی آپاتیت

محمد وزیرزاده^۱، سمیره هاشمی نجف آبادی^{۲*}، مسعود سلیمانی^۳، ملیحه یعقوبی^۴

۱- کارشناسی ارشد، گروه زیست پزشکی، دانشکده مهندسی شیمی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران

۲- استادیار گروه زیست پزشکی، دانشکده مهندسی شیمی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران

۳- دانشیار گروه خون شناسی، دانشکده پزشکی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران

۴- دانشجوی دکتری تخصصی، گروه بیوتکنولوژی، دانشکده مهندسی شیمی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران

*آدرس نویسنده مسئول: تهران، کدپستی: ۱۴۱۷۱۳۱۱۶، دانشگاه تربیت مدرس، دانشکده مهندسی شیمی، گروه زیست پزشکی
Email: s.hashemi@modares.ac.ir

پذیرش مقاله: ۹۳/۰۶/۱۵

دریافت مقاله: ۹۳/۰۳/۰۵

چکیده

هدف: شباهت بیشتر به محیط درون تنی به افزایش تکثیر و تمایز سلول‌ها در شرایط برون تنی کمک می‌کند. در این مطالعه اثر محیط کشت پویا و وجود نانو ذرات هیدروکسی آپاتیت بر تکثیر و تمایز سلول‌های بنیادی مزانشیمی به سلول‌های استخوانی با استفاده از داربست‌های الکتروریسی شده پلی‌کاپرولاکتون بررسی شده است. **مواد و روش‌ها:** ابتدا داربست‌های پلی‌کاپرولاکتون و پلی‌کاپرولاکتون-نانو هیدروکسی آپاتیت به روش الکتروریسی تهیه شد. پس از کشت ایستای داربست‌ها با سلول‌های بنیادی مزانشیمی، داربست‌ها در یک دوره ۱۴ روزه در دو گروه کشت ایستا و پویا تقسیم شدند. داربست‌های کشت پویا روی هم‌زن قرار گرفتند. تکثیر و تمایز سلول‌ها در روزهای ۳، ۷ و ۱۴، با آزمایش‌های MTT، کلسیم و آلکالین فسفاتاز بررسی شد.

نتایج: نتایج به دست آمده از بررسی MTT داربست‌ها در روز ۱۴، افزایش ۱/۱ برابری میزان تکثیر سلول‌ها را در کشت پویا نسبت به ایستا نشان داد. همچنین طی این دوره، میزان کلسیم تولیدی توسط سلول‌ها برای داربست‌های پلی‌کاپرولاکتون و پلی‌کاپرولاکتون-نانو هیدروکسی آپاتیت در حالت پویا نسبت به ایستا در روز ۱۴، به ترتیب ۱/۲۳ و ۱/۴۶ برابر بود. در بررسی فعالیت آنزیم آلکالین فسفاتاز، میزان فعالیت برای داربست‌های پلی‌کاپرولاکتون و پلی‌کاپرولاکتون-نانو هیدروکسی آپاتیت در حالت پویا نسبت به ایستا در روز ۱۴، به ترتیب ۱/۲۴ و ۱/۲۸ برابر بود. **نتیجه‌گیری:** نتایج حاصل از کشت پویا، تکثیر و تمایز بیشتر سلول‌های بنیادی به استخوانی را برای هر دو نوع داربست پلی‌کاپرولاکتون و پلی‌کاپرولاکتون-نانو هیدروکسی آپاتیت نسبت به ایستا نشان داد. همچنین میزان تکثیر و تمایز سلولی در داربست‌های حاوی نانو هیدروکسی آپاتیت بیشتر از داربست‌های بدون آن بود.

کلیدواژگان: الکتروریسی، سلول‌های بنیادی مزانشیمی، پلی‌کاپرولاکتون، نانو هیدروکسی آپاتیت، محیط کشت پویا

مجله علوم پزشکی مدرس: آسیب شناسی زیستی، دوره ۱۷، شماره ۴، زمستان ۱۳۹۳، صفحات: ۶۳-۷۴

گروه‌های فعال، یون‌ها و انواع مواد در مقیاس نانو ایجاد می‌کند [۴-۶].

یکی از روش‌های تولید داربست در مهندسی بافت، الکتروریسی (Electrospinning) است. الکتروریسی روشی بسیار ساده و ارزان برای تولید داربست با خواص مکانیکی مطلوب و تخلخل بالا است. در این روش محلول پلیمری یا مذاب پلیمر از داخل سرنگ با اعمال فشار توسط پمپ، روی سطح جمع‌کننده پاشیده می‌شود. با استفاده از دو الکترود و با اعمال یک ولتاژ بالا بین سوزن سرنگ یا نازل و صفحه جمع‌کننده، حلال پلیمر تبخیر شده و روی صفحه جمع‌کننده، داربست متخلخلی از پلیمر شکل می‌گیرد. قطره پلیمری در هنگام خروج از سوزن، به دلیل ولتاژ بالا به صورت رشته کشیده می‌شود. بار الکتریکی سبب کشیده شدن قطره خروجی می‌شود [۴-۹].

پلی‌کاپرولاکتون (Polycaprolactone: PCL) پلیمری زیست‌سازگار (Biocompatible) با نقطه ذوب پایین، حدود ۶۰ درجه سانتی‌گراد است. برای افزایش زیست‌سازگاری، آن را با موادی چون نشاسته و هیدروکسی آپاتیت (Hydroxyapatite: HA) ترکیب می‌کنند تا قیمت آن کاهش یافته و زیست‌تخریب‌پذیری (Biodegradability) آن افزایش یابد. آب‌گریزی از خواص منفی PCL است، اما در اثر آب‌کافت (Hydrolysis) اتصال‌های استری در داخل بدن، می‌تواند تخریب شود. داربست‌های ساخته شده از PCL، خواص مطلوبی را برای تحمل بار در کاربردهای مهندسی بافت استخوان نشان می‌دهد. آن‌ها با سرعت آهسته‌تر تخریب شده، شدت واکنش تخریب ساختاری تنها ۷ درصد طی یک دوره شش ماهه در شرایط درون تنی (In vivo) دارد و حمایت مکانیکی را برای یک دوره حفظ می‌کند. HA ماده معدنی است که در ترکیب بافت استخوان وجود دارد. نانوهیدروکسی آپاتیت (Nano-Hydroxyapatite: nHA) سبب افزایش استحکام نانو الیاف PCL، بهبود خواص مکانیکی، زیست‌سازگاری، افزایش سرعت تخریب و همچنین تحریک

با وجود توانایی سامانه اسکلت انسانی برای بازسازی خود، ناپیوستگی‌های باقی مانده از شکستگی‌ها، یک چالش عمده بالینی است که سبب می‌شود نیاز به پیوند استخوان برای اصلاح نقص ایجاد شود. بر این اساس، استخوان به دومین پیوند بافت در جهان تبدیل شده است. در حال حاضر، استفاده از بافت‌های پیوندی استخوان از خود بیمار یا هم‌نوع، پاسخ‌گوی افزایش تقاضای بالینی برای پیوند استخوان نیست. مشکلات اساسی از قبیل دسترسی محدود و جراحی محلی بافت اهدا شده خودی، خطر انتقال عوامل بیماری‌زا با پیوند هم‌نوع و نبود امکان بازسازی با استفاده از جایگزین‌های مصنوعی وجود دارد. برای برطرف کردن کمبودهای موجود در بافت پیوندی استخوان و برآورده ساختن نیازهای بالینی، راه‌کار مهندسی بافت برای توسعه پیوندهای مهندسی شده بافت استخوان، به منظور دستیابی به ظرفیت بالای ترمیم استخوان دنبال شده است. مهندسی بافت برای تسهیل رشد و ترمیم یا جایگزینی بافت آسیب‌دیده، از ترکیب زیست‌مواد (Biomaterials) به عنوان داربست، سلول‌ها و مولکول‌های زیست‌فعال کمک می‌گیرد [۱-۳].

داربست‌های سه‌بعدی، یک سازه حمایتی موقت برای تکثیر سلولی فراهم می‌کند. همچنین سبب تشکیل شبکه برون سلولی (Extra Cellular Matrix: ECM) و به دنبال آن، توسعه رگ‌ها و رشد استخوان، حفاظت از فروپاشی بافت منطقه نقص، تهاجم بافت رشته‌ای و القای تکثیر و تمایز سلول‌های استخوانی می‌شود [۴].

در ساختار داربست‌های مهندسی بافت، استفاده از فناوری نانو الیاف اهمیت به‌سزایی پیدا کرده و پژوهشگران به روش‌های ساخت داربست با ساختار نانو روی آورده‌اند. ساختار نانو الیاف، خواصی چون نسبت سطح به حجم و انعطاف‌پذیری بسیار بالا را ایجاد می‌کند. مساحت سطح بسیار بالا، امکان تماس تعداد بیشتری از مولکول‌های سطح را با سلول‌ها فراهم می‌نماید، به‌گونه‌ای که توانایی بالایی برای اتصال یا رهاسازی

(Dulbecco's Modified Eagle Medium) DMEM

()

GIBCO) (Fetal Bovine Serum: FBS)

Sigma-) nHA PCL (

(Aldrich

β-) (Ascorbic Acid)

(Dexamethasone) (Glycerol Phosphate

(Sigma-Aldrich)

(Sodium Dodecyl Sulfate: SDS or NaDS)

[Triton (100x)] 100- (Glycerol)

Ethylene Glycol Tetraacetic)

(Acid: EGTA

) (Ethylenediaminetetraacetic Acid: EDTA)

Radio) (Sigma-Aldrich

(Immunoprecipitation Assay: RIPA

52/ 1747

94/2/6

PCL

]

[(T-Flask)

10

(Passage)

24

(Osteocytes)

(Osteoblasts)

(Biochemicals)

(Nitric Oxide)

[12-9]

(Prostaglandins)

(Bioreactors)

(In vitro)

[15-13]

HA

PCL

PCL-nHA PCL

nHA

()

4

PCL PCL-nHA

PCL-nHA PCL

3×10^4

20

FBS

10

DMEM

15

24

0/4

1

45

300

CO₂

5

37 (Incubator)

PCL

1

25 75

(Dimethylformamide: DMF)

FBS

10

DMEM

1

nHA

24

CO₂

5

6

1/5

PCL

12

DMEM

1/5

10)

FBS

10

UHP]

(Reactor)

(10)

(

0/4

[(Diener)

(

35)

Shaking)

30

(

N-Biotec Incubator

CO₂

12

CO₂

5

Scanning Electron)

(Philips) (Microscope: SEM

nHA

SEM

MTT

محیط کشت تمایزی از روی داربست‌ها، محلول ۱ درصد MTT [۵ میلی گرم تترازولیوم برماید (Tetrazolium Bromide) در محلول بافر فسفات (Phosphate Buffered Saline: PBS)] به همراه محیط کشت DMEM به میزان ۵۰۰ میکرو لیتر به هر داربست اضافه شد. داربست‌ها به مدت ۳ ساعت درون محیط تاریک گرمخانه ۵ درصد CO₂ قرار گرفت. پس از اتمام فرآیند، محلول MTT خارج شده و برای حل کردن بلورهای فورمازان (Formazan)، از محلول آلی دی‌متیل سولفوکسید (Dimethyl Sulfoxide: DMSO) استفاده شد. میزان کدورت محلول به دست آمده در طول موج ۵۴۵ نانومتر توسط دستگاه قرائت‌گر الایزا (ELISA Reader) اندازه‌گیری شد.

بررسی تمایز سلول‌ها به استخوان

آزمایش رسوب کلسیم

کلسیم تولید شده توسط سلول‌ها، به صورت رسوب روی داربست‌ها تشکیل می‌شود. برای بررسی میزان کلسیم تولیدی، از محلول تجاری شرکت پارس آزمون [حاوی کرسولفتالین (Cresolphthalein)] استفاده شد. ابتدا داربست‌های هر دو دسته به صورت مجزا، از محیط کشت خارج شد و با محلول بافر فسفات، به منظور حذف محیط کشت شسته شد. برای استخراج رسوب‌های نمکی معدنی، داربست‌ها توسط اسیدکلریدریک ۰/۶ نرمال شسته شد. سپس ۲۰ میکرو لیتر از این محلول به ۲۰۰ میکرو لیتر از محلول کیت اضافه شد. کدورت محلول در طول موج ۵۵۰ نانومتر اندازه‌گیری شد. با توجه به این‌که در ترکیب هیدروکسی آپاتیت نیز کلسیم وجود دارد، برای جلوگیری از دخالت این میزان در مقدار جذب کلسیم، تمام مراحل به صورت مشابه برای داربست‌های خالی بدون سلول نیز انجام گرفت، میزان کلسیم آن محاسبه شد و از مقدار جذب داربست‌های PCL-nHA حاوی سلول کسر شد.

اندازه‌گیری فعالیت آلکالین فسفاتاز

آلکالین فسفاتاز (Alkaline Phosphatase: ALP) یکی

از مهم‌ترین فنوتایپ‌های (Phenotypes) سلول‌های استخوان ساز است. بنابراین توان استخوان‌سازی سلول‌های بنیادی مزانشیمی انسانی روی داربست‌ها، از طریق بررسی فعالیت آلکالین فسفاتاز ارزیابی شد. میزان فعالیت آنزیم آلکالین فسفاتاز در روزهای ۶ و ۱۴ با استفاده از کیت ALP پارس آزمون اندازه‌گیری شد. ابتدا محلول RIPA تهیه شد. برای تهیه محلول RIPA، محلول‌های زیر به صورت مجزا تهیه شد: محلول ۰/۰۱ میلی مولار EDTA (۰/۱۶۶ گرم EDTA در ۴۰ میلی لیتر آب) محلول ۰/۰۱ میلی مولار EGTA (۰/۱۵۲ گرم EGTA در ۴۰ میلی لیتر آب) محلول ۰/۱ مولار Tris-HCl (۰/۶۳ گرم Tris-HCl در ۴۰ میلی لیتر آب) و محلول ۱ مولار NaCl (۲/۳۴ گرم نمک در ۴۰ میلی لیتر آب). از هر یک از محلول‌های تهیه شده، حجم ۱۰ میلی لیتر درون یک بالن ۱۰۰ میلی لیتری ریخته شد و ۵ میلی لیتر گلیسرول، ۰/۱ گرم SDS و یک میلی لیتر تریتون به آن‌ها اضافه شد. در ادامه با افزودن آب، حجم محلول به ۱۰۰ میلی لیتر رسید.

برای اندازه‌گیری فعالیت آنزیم آلکالین فسفاتاز، ابتدا ۲۵۰ میکرو لیتر محلول RIPA به سلول‌های روی داربست‌ها اضافه شد. سپس ظرف یاد شده در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۰ دقیقه در ۱۵۰۰۰ دور بر دقیقه سانتریفوژ شد. از محلول رویی، ۱۰ میکرو لیتر برداشته و به ۱۰۰ میکرو لیتر از محلول کیت اضافه شد. در کیت ALP، آنزیم آلکالین فسفاتاز، واکنش تبدیل پارا-نیترو فنیل فسفات (P-Nitrophenylphosphate) بی‌رنگ را به پارا-نیترو فنیل زرد رنگ کاتالیز می‌کند. با اندازه‌گیری میزان جذب نوری نیترو فنیل تشکیل شده در طول موج ۴۰۵ نانومتر، مقدار آلکالین فسفاتاز تعیین می‌شود.

روش تحلیل آماری و ارزیابی نتایج

هر آزمایش حداقل سه بار در دو گروه شاهد (ایستا) و پویا تکرار شد. تجزیه و تحلیل آماری Student t-test برای مقایسه نتایج حاصل از آزمایش‌ها در نمونه‌های گروه آزمایش و شاهد که همزمان انجام شد، به کار گرفته شد. مقدار P کوچک‌تر از

گلدشتاین (Goldstein) و همکارانش [۱۶] در مقایسه‌ای از انواع زیست‌واکنشگاه‌ها با هم و با کشت ایستا نشان دادند که میزان ALP تولیدی در محیط کشت جریان‌دار درون زیست‌واکنشگاه‌ها بیشتر از حالت ایستا است. میزان گسترش سلولی در این پژوهش، طی ۱۴ روز نتایج مشابهی را نشان می‌دهد. گلدشتاین این افزایش تعداد سلول‌ها را در کشت پویا نسبت به حالت ایستا به دلیل بهبود انتقال مواد مغذی به داخل داربست دانسته است. هدف این گروه از پژوهشگران، به حداکثر رساندن میزان گسترش سلولی و تمایز آن به فنوتیپ استخوانی بوده که این امر در زیست‌واکنشگاه‌های پرفیوژن و فلاسک همزن‌دار نسبت به حالت ایستا محقق شده است.

در این پژوهش، تأثیر تنش بر کشت سلول‌های بنیادی مزانشیمی روی داربست‌های نانو الیاف PCL و PCL-nHA بررسی شد و میزان اثرگذاری جریان در محیط کشت (ناشی از به هم خوردن محیط) بر تمایز و زنده ماندن سلول‌ها مطالعه شد. نتایج حاصل از این تحقیق نشان داد که وجود جریان در محیط کشت، سبب بهبود تکثیر و تمایز سلولی می‌شود. همچنین می‌توان نتیجه گرفت که برای افزایش میزان گسترش سلولی می‌توان از دو عامل جریان محیط کشت و مواد تحریک کننده تمایز مانند نانو ذرات HA استفاده کرد تا میزان سرعت تمایز سلولی را افزایش داد.

تشکر و قدردانی

لازم می‌دانیم که از حمایت و همکاری شرکت بن‌یاخته در اجرای این پژوهش تشکر و قدردانی نماییم.

جریان‌دار نسبت به حالت ایستا نشان می‌دهد. وجود تنش در محیط کشت، سبب افزایش تشکیل بلور کلسیم و فعالیت ALP در داربست‌های PCL و PCL-nHA نسبت به حالت ایستای داربست‌ها شده است. همچنین در بررسی آزمون‌های تمایزی، تأثیر مثبت ذرات nHA در ترکیب داربست PCL-nHA نسبت به داربست‌های PCL نشان داده شده است.

ژانگ و همکارانش [۹] به نتایج مشابهی مبتنی بر افزایش فعالیت استخوان‌سازی با بیان ALP درون زیست‌واکنشگاه‌ها دست یافتند. افزایش فعالیت ALP، نشان‌دهنده تمایز سلول‌های بنیادی مغز استخوان بر سطح لایه‌های داربست‌ها است. با توجه به این‌که بیشتر بافت‌های بدن، تحت تنش‌های خاصی قرار دارد و این تنش‌ها بر تمایز سلول‌های بنیادی به بافت مورد نظر تأثیرگذار است، می‌توان نتیجه گرفت که تنش‌های برشی موجود در محیط کشت، تأثیرگذاری به سزایی در تحریک و تمایز سلول‌های بنیادی مزانشیمی به سلول‌های استخوانی دارد.

ژانگ و همکاران [۱۰] در بررسی‌های مشابه کشت سلول‌های بنیادی بر داربست‌های سه‌بعدی درون زیست‌واکنشگاه چرخان دو محوری در مقایسه با کشت ایستا، افزایش بیان فعالیت آنزیم ALP را در طی دوره مشابه نشان دادند. همچنین در بررسی‌های مشابه برای تمایز استخوانی، میزان کلسیم رسوبی طی دوره ۲۸ روزه به میزان قابل ملاحظه‌ای نسبت به حالت ایستا افزایش پیدا کرده بود. ژانگ اثر این افزایش را در وجود جریان زیست‌واکنشگاه دانسته که این عامل سبب بهبود جریان سیال در داربست می‌شود و همچنین تنش‌های برشی حاصل از این نوع جریان سیال، تمایز سلولی را نسبت به حالت ایستا افزایش می‌دهد.

منابع

- [1] Zhang ZY, Teoh SH, Hui JH, Fisk NM, Choolani M, Chan JK. The potential of human fetal mesenchymal stem cells for off-the-shelf bone tissue engineering application. *Biomaterials* 2012; 33(9): 2656-72.
- [2] Langer R, Vacanti JP. Tissue engineering. *Science* 1993; 260(5110): 920-6.
- [3] Zhang ZY, Teoh SH, Chong MS, Lee ES, Tan

- LG, Mattar CN, Fisk NM, Choolani M, Chan J. Neo-vascularization and bone formation mediated by fetal mesenchymal stem cell tissue-engineered bone grafts in critical-size femoral defects. *Biomaterials* 2010; 31(4): 608-20.
- [4] Yeatts AB, Fisher JP. Bone tissue engineering bioreactors: dynamic culture and the influence of shear stress. *Bone* 2011; 48(2): 171-81.
- [5] Venugopal J, Zhang YZ, Ramakrishna S. Fabrication of modified and functionalized polycaprolactone nanofibre scaffolds for vascular tissue engineering. *Nanotechnology* 2005; 16(10): 2138-42.
- [6] Zhang YZ, Venugopal J, Huang ZM, Lim CT, Ramakrishna S. Characterization of the surface biocompatibility of the electrospun PCL-collagen nanofibers using fibroblasts. *Biomacromolecules* 2005; 6(5): 2583-9.
- [7] Doustgani A. Manufacturing and investigation of multilayer nanofibers scaffolds for bone tissue engineering applications. PhD Thesis, Tehran: Tarbiat Modares University, 2012. (Persian)
- [8] Mohammadyar F. Scaffold manufacturing using PCL nanofibers coated by fibronectin and nHA for bone repairing using mesenchymal cells. M.Sc. Thesis, Tehran: Tarbiat Modares University, 2012. (Persian)
- [9] Zhang ZY, Teoh SH, Teo EY, Khoo Chong MS, Shin CW, Tien FT, Choolani MA, Chan JK. A comparison of bioreactors for culture of fetal mesenchymal stem cells for bone tissue engineering. *Biomaterials* 2010; 31(33): 8684-95.
- [10] Zhang ZY, Teoh SH, Chong WS, Foo TT, Chng YC, Choolani M, Chan J. A biaxial rotating bioreactor for the culture of fetal mesenchymal stem cells for bone tissue engineering. *Biomaterials* 2009; 30(14): 2694-704.
- [11] Pörtner R, Nagel-Heyer S, Goepfert C, Adamietz P, Meenen NM. Bioreactor design for tissue engineering *J Biosci Bioeng* 2005; 100(3): 235-45.
- [12] Janssen FW, Oostra J, Oorschot Av, van Blitterswijk CA. A perfusion bioreactor system capable of producing clinically relevant volumes of tissue-engineered bone: in vivo bone formation showing proof of concept. *Biomaterials* 2006; 27(3): 315-23.
- [13] Kim JW, Kim SY, Park SY, Kim YM, Kim JM, Lee MH, Ryu HM. Mesenchymal progenitor cells in the human umbilical cord. *Ann Hematol* 2004; 83(12): 733-8.
- [14] Korossis SA, Bolland F, Kearney JN, Fisher J, Ingham E. Bioreactors in Tissue Engineering. In: Ashammakhi N, Reis RL. *Topics in Tissue Engineering*. Volume 2, 2005; p: 145-54.
- [15] Wei G, Ma PX. Structure and properties of nano-hydroxyapatite/polymer composite scaffolds for bone tissue engineering. *Biomaterials* 2004; 25(19): 4749-57.
- [16] Goldstein AS, Juarez TM, Helmke CD, Gustin MC, Mikos AG. Effect of convection on osteoblastic cell growth and function in biodegradable polymer foam scaffolds. *Biomaterials* 2001; 22(11): 1279-88.