پوشش‌دهی ژلاتین-کیتوسان روی داربست پلی کاپرولاکتون سوپرامولکولی و بررسی تأثیر آن بر رفتار سلولهای فیبروبلاست موشی

سارا خادمی خالدی[۱]، پروین شکرالهی[۲*]، مژگان زندی[۲] و شیوا ایرانی[۱]

[۱] تهران، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد علوم و تحقیقات تهران، دانشکده علوم پایه، گروه زیست شناسی

[۲] تهران، پژوهشگاه پلیمر و پتروشیمی ایران، گروه بیومتریال

تاریخ دریافت: ۹۳/۷/۲۱ تاریخ پذیرش: ۹۳/۱۰/۶

چکیده

علم مهندسی بافت در کنار علم پزشکی به احیاء و ترمیم بافتها و اندامهای آسیب دیده می پردازد. داربست به عنوان جزء اصلی مهندسی بافت تعریف می گردد. در این پژوهش از روش اصلاح سطح داربست نانولیفی پلی کاپرولاکتون سوپرامولکولی (Sp-PCL) برای بهبود حدفاصل زیست ماده-سلولهای فیبروبلاست بهره برده شد. هدف مطالعه بررسی اثر اصلاح سطحی با ژلاتین -کیتوسان بر رفتار سلولهای فیبروبلاست روی داربست Sp-PCL تهیه شده با روش الکتروریسندگی است. **بدین منظور** نانوالیاف SP-PCL توسط روش الکتروریسندگی تهیه شدند. نانوالیاف تهیه شده بااستفاده ازآمیزه ژلاتین کیتوسان پوشش داده شد. مورفولوژی نانواالیاف تهیه شده توسط SEM بررسی گردید وآزمون زیست سازگاری برروی آنها انجام شد. برای بررسی فعالیت سلولی بر روی نانوالیاف آزمون MTT انجام گرفت. برای بررسی حیات سلولی روی داربست، رنگ آمیزی DAPI مورد استفاده قرارگرفت. نتایج حاصل از بررسی میکروسکوپی رشد سلول درکناردارست نشان دادکه داربست زیست سازگاری مناسبی دارد. علاوه براین، نتایج بررسی فعالیت متابولیکی سلولها برروی داربست با استفاده از تست MTT نشان داد که پوشش سطحی نانوالیاف SP-PCL با آمیزه ژلاتین-کیتوسان به طور معنی داری($P < ۰,۰۵$) تکثیر سلولی را نسبت به کنترل افزایش داده و همچنین این افزایش معنی دارتا روز هفتم ادامه داشته است. آزمایشات نشان دادکه نانوالیاف الکتروریسی شده SP-PCL پوشیده شده باآمیزه ژلاتین-کیتوسان به دلیل شباهت به شبکه نانولیفی ECM طبیعی، بسترمناسبی برای چسبندگی، و تکثیرسلولهای فیبروبلاستی فراهم کرد.

واژه های کلیدی: مهندسی بافت، نانوالیاف ،آمیزه ژلاتین کیتوسان، PCL سوپرامولکولی

* نویسنده مسئول، تلفن: ۰۹۱۲۵۳۴۸۶۱۰ ، پست الکترونیکی:p.shokrolahi@ippi.ac.ir

مقدمه

پوست به عنوان خارجی ترین اندام بدن انسان حدود ۱۶ درصد از وزن بدن را تشکیل داده و سطحی درحدود ۱/۸ مترمربع را پوشانده است وچون حصاری بدن را در برابر محیط بیرون ازبدن محافظت می نماید و با تنظیمات حرارتی نقش اساسی در حفظ مایعات بدن که عملکردی حیاتی است ایفاء می نماید (۷).

علاوه بر عملکردهای حیاتی، پوست به طور پیوسته درحال جوان سازی خود و انجام فرآیندهای ترمیم زخمهاست (۱۶). این اندام به عنوان خارجی ترین عضو بدن درمعرض انواع جراحات و صدمات قراردارد. بهبود زخم فرآیندی بسیار پیچیده است که شامل آسیبهای شدیدبافتی (سوختگی)، نواقص پوستی (زخمهای قدیمی وکهنه) و یا شرایط مادرزادی و بیماریها می باشد (۱۴).

راهکارهای مختلفی جهت درمان آسیبهای پوستی به کاربرده می شود که شامل استفاده از بافتهای جایگزین است که این بافتها از سایراندامهای شخص آسیب دیده تأمین می شود و یا از افراد یا از بافتهای موجودات دیگر استفاده می شود که البته در بسیاری ازموارد به دلیل عدم پذیرش سیستم ایمنی، امکان پیوند از یک فرد به فرد دیگر وجود ندارد. بنابراین باتوجه به مشکلاتی که در زمینه احیاء وترمیم بافت آسیب دیده وجود دارد مهندسی بافت به عنوان یک راه کار نوین وامید بخش مورد استفاده قرار گرفته است.

مهندسی بافت با به حالت طبیعی برگرداندن عملکرد از طریق انتقال جایگزینهای زیستی است که برای انجام مهندسی بافت موفق باید اطلاعات کاملی از ساختار، ویژگیهای مکانیکی، بیولوژی سلولی/مولکولی ودر نهایت عملکرد خاص بافت مورد نظر داشت. فرآیندهایی که برای این منظور مورد استفاده قرار می گیرند سبب تولید بافت مناسب برای پیوند در شرایط آزمایشگاهی می شوند که شامل، فناوری سلول ،فناوری ساخت داربست وفناوری کاشت وترکیب در محیط برون تنی (in vivo) می باشد. تکنولوژی ساخت داربست برشناسایی، طراحی وساخت داربستهای سه بعدی برای شرایط برون و یا درون تنی (in vivo و یا in vitro) تمرکزدارد. توجه به فراهم آوری ریز محیط سه بعدی مشابه آنچه دربافت طبیعی به واسطه نانوالیاف موجود در ماتریکس خارج سلولی(ECM) فراهم می شود موجب تولید داربستهای مهندسی شده با تقلیدی از ماتریکس خارج سلولی خواهد بود. بنابراین طراحی داربستهایی از مواد زیستی به عنوان یکی از اهداف مهندسی بافت به شمارمی رود. موفقیت نهایی یک داربست وابسته به ویژگیهای سطحی آن که شامل زیست سازگاری، آب دوستی وتوپوگرافی سطحی مناسب جهت انتقال بهینه اکسیژن و مواد زائد، یکپارچگی بافتی ومکانیکی ، شیمی سطح مناسب ازنظر pH و یا جهت القای مسیرهای انتقال پیام، ذخیره ورها سازی مولکولهای زیست فعال، توانایی جذب ویکپارچه شدن درجایگاه پیوند می باشد، است (۶). این ویژگیها در چسبندگی، تکثیر و تمایزسلولی مؤثرند. انتخاب روش مناسب برای تولید داربست یکی از موارد کلیدی موفقیت در مهندسی بافت است. نانوالیاف الکتروریسی شده به دلیل منافذ اتصالی، تراوایی بالا وناحیه سطحی وسیع می تواند تماس بین سلولها وداربستها را افزایش داده وتبادل مواد مغذی ومتابولیسمی را بهبود بخشد. در مهندسی بافت پوست از مواد طبیعی ومصنوعی متفاوتی برای تولید داربست همانند کلاژن، کیتوسان، ژلاتین، هیالورونیک اسید، پلی کاپرولاکتون، پلی لاکتیک اسید استفاده شده است. پلیمر های سنتزی ویژگیهای برتری از لحاظ مکانیکی نسبت به پلیمرهای طبیعی دارند وبه آسانی دارای قابلیت اصلاح ویژگیهای ناکارآمد ذاتی پلیمر می باشند (۱۵). امروزه به دلیل اهمیت زیاد محیط زیست، پلیمرهای زیست تخریب پذیر بسیار مورد توجه قرار گرفته اند از جمله این پلیمرها می توان به پلی کاپرولاکتون اشاره نمود که پلیمری خطی و آب گریز است و یک پلی استر آلیفاتیک نیمه کریستالی به شمار می رود. پلی کاپرولاکتون توسط میکروارگانیسم ها به آرامی در محیط تخریب می شود. این پلیمر به علت خواص فیزیکی عالی، در دسترس بودن و زیست سازگاری ذاتی، ماده‌ای مناسب برای مصارف پزشکی و کشاورزی به حساب می‌آید و به شکل گسترده‌ای در مهندسی بافت کاربرد دارد. یکی از معایب مهم پلی کاپرولاکتون عدم وجود گروههای عاملی بر سطح زنجیرهای پلیمری می باشد که آن را به پلیمری هیدروفوب تبدیل کرده است. قابلیت تر شدن و میزان آب دوستی تارهای نانولیفی در مهندسی بافت در ایجاد یک کشت سلولی مناسب و یکنواخت در سه بعد مؤثر است.

اخیراً، استفاده از پلی‌کاپرولاکتون سوپرامولکولی به عنوان یک زیست ماده مناسب مهندسی بافت در بسیاری از زمینه های مهندسی بافت مورد ارزیابی قرار گرفته است. از جمله شکرالهی و همکاران، مؤثر بودن کامپوزیت این ماده با

آپاتایت را در حمایت از تکثیر سلولهای مزانشیمی نشان داده‌اند (۱۳).

با توجه به آب گریزی پلی کاپرولاکتون، توزیع یکنواخت سلول بر روی تارهای نانوالیاف متخلخل دشوار می باشد در حالی که آب دوستی تارهای نانوالیافی در چسبندگی سلولها به سطح آن بسیار مؤثر است به طوری که در ترمیم بافت آسیب دیده بسیار حائز اهمیت است (۲).

در میان روشهای رایج بهبود خواص سطحی می توان به روش پوشش دهی با پلیمرهای آب دوست اشاره کرد. در این پوشش دهی سطح با آمیزه ژلاتین_کیتوسان استفاده شد که یکی از روشهای نوین برای بهبود ویژگیهای سطحی داربستهای تهیه شده می باشد. بر اساس نتایج برخی تحقیقات اخیر، آمیزه های ژلاتین-کیتوسان که نسبت اجزای آمیزه در آن ۸۰-۲۰ است به خوبی از تکثیر سلولهای مینسک و فیبروبلاست پوست حمایت می نمایند. در همین حال، این آمیزه ها خواص مکانیکی قابل قبول داشته و افت خواص مکانیکی آنها در شرایط درون تنی با سرعت قابل قبولی اتفاق افتاده و در نتیجه می تواند برای اهداف مهندسی بافت مورد استفاده قرار گیرد (۱۱ و ۱۲).

به همین دلیل در این پژوهش از آمیزه ژلاتین-کیتوسان با نسبت وزنی ۸۰-۲۰ برای پوشش دهی داربست نانولیفی SP-PCLاستفاده شد.

کیتوسان به دلیل ویژگیهای زیست سازگاری و فعالیت ضدباکتریایی آن، انتخاب مناسبی برای کاربردهای متنوع مهندسی بافت می باشد. می توان خواص مکانیکی و یا بیولوژیکی وزیست فعالی کیتوسان را از طریق ترکیب آن با مواد فعال بیولوژیکی دیگر، همچون هیدروکسی آپاتیت و ژلاتین بهبود بخشید. ژلاتین به علت ویژگیهایی از قبیل افزایش چسبندگی، مهاجرت، تکثیر و تمایز سلولی، زیست سازگاری بالا و زیست تخریب پذیری به عنوان ماده ای زیستی برای ساخت داربست مهندسی بافت استفاده می شود. ژلاتین ساده ترین نوع پروتیین طبیعی با وزن مولکولی بالاست که از تجزیه گرمایی، و یا تخریب فیزیکی و شیمیایی کلاژن، جزء تشکیل دهنده بافتهای اتصالی حیوانات از جمله پوست، استخوان و تاندون تهیه می شود (۱). ژلاتین به دلیل دارا بودن سکانس شبه RGD (لیگاند بسیاری از اینتگرین های سلولی) در بهبود اتصال سلول به داربست مؤثر بوده وترکیب آن با کیتوسان به براکنش لیگاندهای اینتگرین RGD در ساختار و ایجاد بستر مناسب برای کشت سلول کمک می کند. هدف از این مطالعه بررسی تکثیر سلولهای فیبروبلاست بر روی داربست SP-PCL تهیه شده با روش الکتروریسی است که با آمیزه ژلاتین-کیتوسان پوشش داده شده است.

مواد و روشها

تهیه داربست: داربستهای مورد استفاده در این تحقیق با استفاده از روش الکتروریسندگی تهیه شدند. برای این منظور از دستگاه CO881007NYI ساخت شرکت نانو ساختار آسیا کشور ایران استفاده شد.این دستگاه مجهز به یک جمع کننده دوار با ضخامت 70 mm و پهنای 50 mm می باشد. برای تهیه داربست هدف در این مطالعه محلول ۴۰ درصد از SP-PCL که در سامانه حلال حاوی اسید فرمیک و اسید استیک به صورت محلول درآمده است، استفاده شد. نانوالیاف در بازه زمانی ۲ ساعت جمع آوری شدند که سرعت جمع آوری نمونه ها 8.8 mm/sec بود و با چرخش ۲۵۰ rpm نمونه های نانوالیاف جمع آوری شد. فاصله سوزن تزریق تا داربست ۲۰ cm بوده و در ولتاژ kV ۲۰ این فرآیند انجام شده است. برای بهبود ویژگیهای آب دوستی سطح داربستهای استفاده شده در این تحقیق، از پوشش‌دهی با آمیزه ژلاتین(گاوی-وزن مولکولی ۴۰۰۰۰-۵۰۰۰۰-آلدریچ)-کیتوسان(۷۵-۸۵ درصد دآسیله- وزن مولکولی متوسط-آلدریچ) استفاده شد. به دلایلی که قبلاً ذکر شد، نسبت ژلاتین به کیتوسان ۸۰ به ۲۰ انتخاب شد.

استریل نمودن داربستها: در این بررسی ابتدا نمونه ها به مدت ۵ ساعت در PBS استریل قرارگرفتند و سپس۴۰دقیقه

(۲۰دقیقه هررو) با اشعه UV استریل شدند. بدین ترتیب که پس از تهیه داربستها با استفاده از روش الکتروریسی و قراردادن درPBS داربستها در ابعادcm^2 ۱ برش خورده و هر دو سوی داربست با اشعه UV استریل شد. لازم به ذکر است هر طرف داربستها به مدت ۲۰ دقیقه در معرض اشعه UVقرار گرفتند. بعد از استریل نمودن داربستها با اشعه UV در شرایط استرل (زیر هود لامینار)درون پلیتهای ۲۴ خانه استریل قرار گرفتند.

کشت سلول: در این پژوهش سلولهای فیبروبلاست موشی (l929) از انستیتو پاستور ایران تهیه گردیدند. سلولهای تهیه شده در محیط کشت RPMI که حاوی ۱۰ درصد سرم (FBS)بوده در انکوباتور با قابلیت تزریق CO_2 به مقدار ۵ درصد و رطوبت ۹۵ درصد در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد نگهداری شدند.

بررسی ساختار نانوالیاف با استفاده از میکروسکوپ الکترونی: پس ازتهیه داربست، برای بررسی ومشاهده مورفولوژی داربست تهیه شده باروش الکتروریسی با استفاده از دستگاه VEGA/TESCANII ساخت کشور بلژیک موجود در پژوهشگاه پلیمر ایران تصاویری تهیه شد.

آزمون زیست سازگاری: آزمون بررسی فعالیت ومیزان زنده ماندن سلول بر روی داربست (MTT). در این آزمون میزان فعالیت آنزیم دهیدروژناز میتوکندریایی سلولهایی که زنده و فعال هستند مورد مطالعه قرار می گیرند MTT، نمک محلول در آب تترازولیوم برماید است .محلول بافر MTT تحت تأثیر آنزیم های دهیدروژناز موجود در میتوکندری سلولهای زنده احیاء می شود و به فورمازون نامحلول بنفش رنگ تبدیل می گردد. پودرMTT محصول شرکت Sigma-Aldrich، انگلستان می باشد.

این ترکیب در DMSO محلول می شود. از آنجایی که سلولهای مرده قادر به تبدیل MTT به فورمازان نیستند، سطح فورمازان ایجاد شده متناسب با تعداد سلولهای زنده می باشد .شدت رنگ ایجاد شده توسط یک آزمون رنگ سنجی ساده توسط اسپکتروفتومتر در طول موج ۶۳۰ نانومتر (۶۳۰ OD) خوانده می شود. به این منظور، از سلولهای فیبروبلاست موشی ، به تعداد $۱۰^۴$ سلول در هر چاهک، پلیت ۲۴ خانه (برای ۲۴، ۴۸، ۷۲ ساعت) و ۶ خانه (برای ۷ روز) محتوی داربستهای استریل قرار داده شدند. کشت سلول تا ۷۲ ساعت ادامه داده شد و هر ۲۴ ساعت وسپس هفتمین روز میزان تکثیر سلولها بر روی داربست با استفاده از آزمون MTT سنجیده شد.بدین منظور ازدستگاهELISA reader (Bio Tek ELx800)استفاده شد.

Cell viability به صورت درصد نسبت نمونه به کنترل محاسبه گردید.نتایج توسط نرم افزار SPSS، آنالیز واریانس (آزمون ANOVA)در سطح معنی داری$P < ۰,۰۵$ تحلیل شد.

رنگ آمیزی DAPI : به منظور بررسی میزان سلولهای زنده بر روی داربست از این رنگ آمیزی استفاده می شود. DAPI مخفف دی آمینو فنیل ایندول بوده که رنگی فلورسانس جهت رنگ آمیزی DNA مورد استفاده قرار می گیرد.از جمله اهداف این نوع رنگ آمیزی: مطالعه چرخه سلولی، تعیین شاخص میتوز در یک ارگانیسم یا شمارش سلولها و باکتریها می باشد.

بعد از رنگ آمیزی سلولها با DAPI با استفاده از میکروسکوپ فلورسانس از سلولها تصویرتهیه و مورد بررسی قرارگرفت.در این بررسی به تعداد $۱۰^۴ \times ۴$ سلول به درون هریک از چاهکها از پلیت ۲۴ خانه استریل منتقل شدند .پس از گذشت ۷۲،۴۸،۲۴ ساعت از انتقال سلولها بر روی داربستها، داربستها از پلیت استریل به درون داربست دیگر منتقل شدند.

سپس با بافر فسفات سالین (PBS) ۱ درصد، به مدت ۱۰دقیقه در حجمی به اندازه ml ۱ قرارداده شدند، این کار

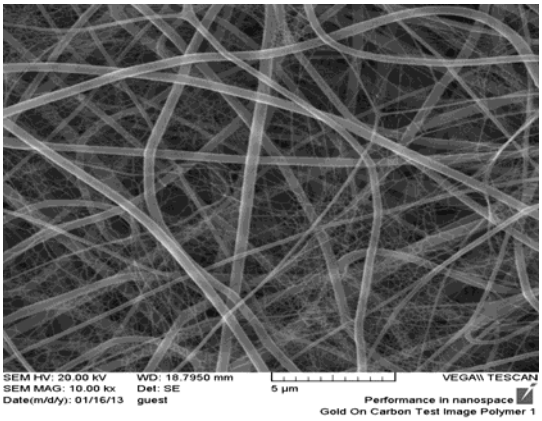
۲ بار تکرار شد. سپس داربستها به مدت ۱۰دقیقه در محلول پارافرمالدئید ۴ درصد قرار داده و دوباره با PBS عمل شستشو انجام گردید در مرحله بعد از محلول تریتون ۰/۱ درصد به مدت ۵ دقیقه استفاده شد. سپس دوباره با PBS شست وشو داده و در ادامه به مقدار چند قطره رنگ DAPI به مدت ۵ دقیقه به داربستها افزوده شد و دوباره با PBS دو بار عمل شستشو انجام گرفت. باید توجه شود تا زمان بررسی با میکروسکوپ فلورسنت نمونه ها را در تاریکی و PBS نگهداری شوند.

نتایج

تهیه نانوالیاف: در این تحقیق نانوالیاف پلی کاپرولاکتون با روش الکتروریسندگی تهیه شدند. یکی از مشخصات داربستهای تهیه شده با استفاده از پلیمر SP-PCL ویژگی آب گریزی این پلیمر است، که برای استفاده از این پلیمر به عنوان داربست در مهندسی بافت عاملی محدود کننده محسوب می شود. در این تحقیق، به منظور تعدیل واصلاح این مشخصه از آمیزه ژلاتین –کیتوسان بهره برده شد. اعمال آمیزه ژلاتین-کیتوسان بر سطح نانوالیاف PCL موجب آب دوست شدن نانوالیاف شده است. پوشش به روش محلولی روی سطح داربستها اعمال شد. سپس، نمونه ها تحت خلاء برای مدت ۱۲ ساعت در دمای محیط خشک شدند.

بررسی ساختار نانوالیاف: پس از تهیه داربست، برای بررسی و مشاهده مورفولوژی داربستهای الکتروریسی شده، تصاویری از سطح الیاف تهیه شد (شکل۱). همانطور که در شکل مشاهده می شود الیاف دارای سطح صاف، فاقد دانه تسبیح، و به قطر nm ۴۰۰-۵۰۰ هستند.

زیست سازگاری نانوالیاف: یکی از مشخصه های بسیار مهم در داربست جهت استفاده در مهندسی بافت وجود زیست سازگاری است. برای تأیید زیست سازگاری نانوالیاف PCL الکتروریسی شده در بازه زمانی ۲ساعت برای مدت زمان ۲۴ ساعت سلولها در تراکم ۴×۱۰^{۴} بر روی نانوالیاف پوشش داده شده باآمیزه ژلاتین-کیتوسان در شرایط انکوباتور Co_2 ، رطوبت ۹۵ درصد و در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد کشت داده شدند.

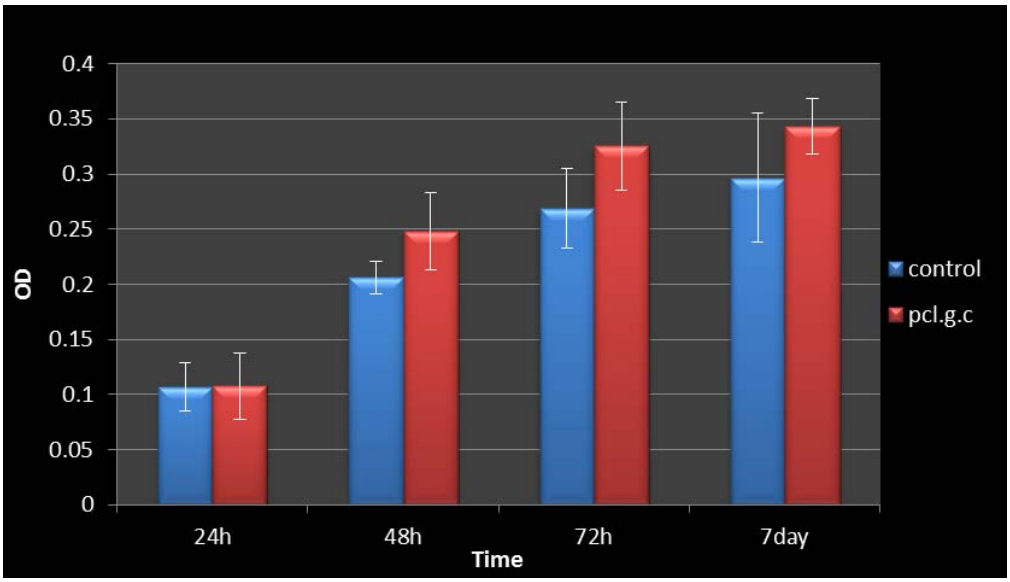


شکل ۱- میکروگراف SEM ازداربست نانولیفی الکتروریسی شده SP-PCLقبل ازکشت سلول

تصاویر به دست آمده از میکروسکوپ معکوس نشان دهنده مورفولوژی کشیده سلولها به سمت داربست می باشد. در نتیجه می توان گفت نانوالیاف PCL الکتروریسی شده پوشش داده شده با آمیزه ژلاتین-کیتوسان زیست سازگاری مناسبی دارد. (شکل۲). پس از انجام آزمون زیست سازگاری به منظور تأیید فعالیت حیاتی سلول ورشد وتکثیر سلولها بر روی نانوالیاف مورد استفاده از آزمون MTT استفاده شد. آزمون MTT در ۴بازه زمانی ۲۴،۴۸،۷۲ ساعت و ۷ روز انجام شد و در ادامه نتایج حاصل از آزمون MTT به صورت نمودار در ۴ بازه زمانی ۲۴ ساعت تا۷۲ ساعت و ۷ روز با ۳ بار تکرار برای هرنمونه در یک نمودار ارائه گردید(نمودار۱).

بررسی و تأیید حضور و زنده ماندن سلول بر روی نانوالیاف: به منظور بررسی و تأیید حضور وزنده ماندن میزان سلولها برروی داربست از رنگ آمیزی DAPI استفاد شد. با استفاده از میکروسکوپ فلورسانس تصاویری تهیه شد (شکل۳). تصاویر نشان می دهد که هسته سلولها بر

روی نانوالیاف پوشش داده شده با آمیزه ژلاتین کیتوسان سالم بوده است.



نمودار۱- نتایج حاصل از آزمون MTT . مقایسه میزان رشد سلولها بر روی داربستها با یکدیگر
۱) کنترل مثبت (بدون داربست). ۲)داربست نانوالیاف
این آزمون با سطح معنی داری۵ ۰/۰>P با آنالیز ANOVA انجام شد

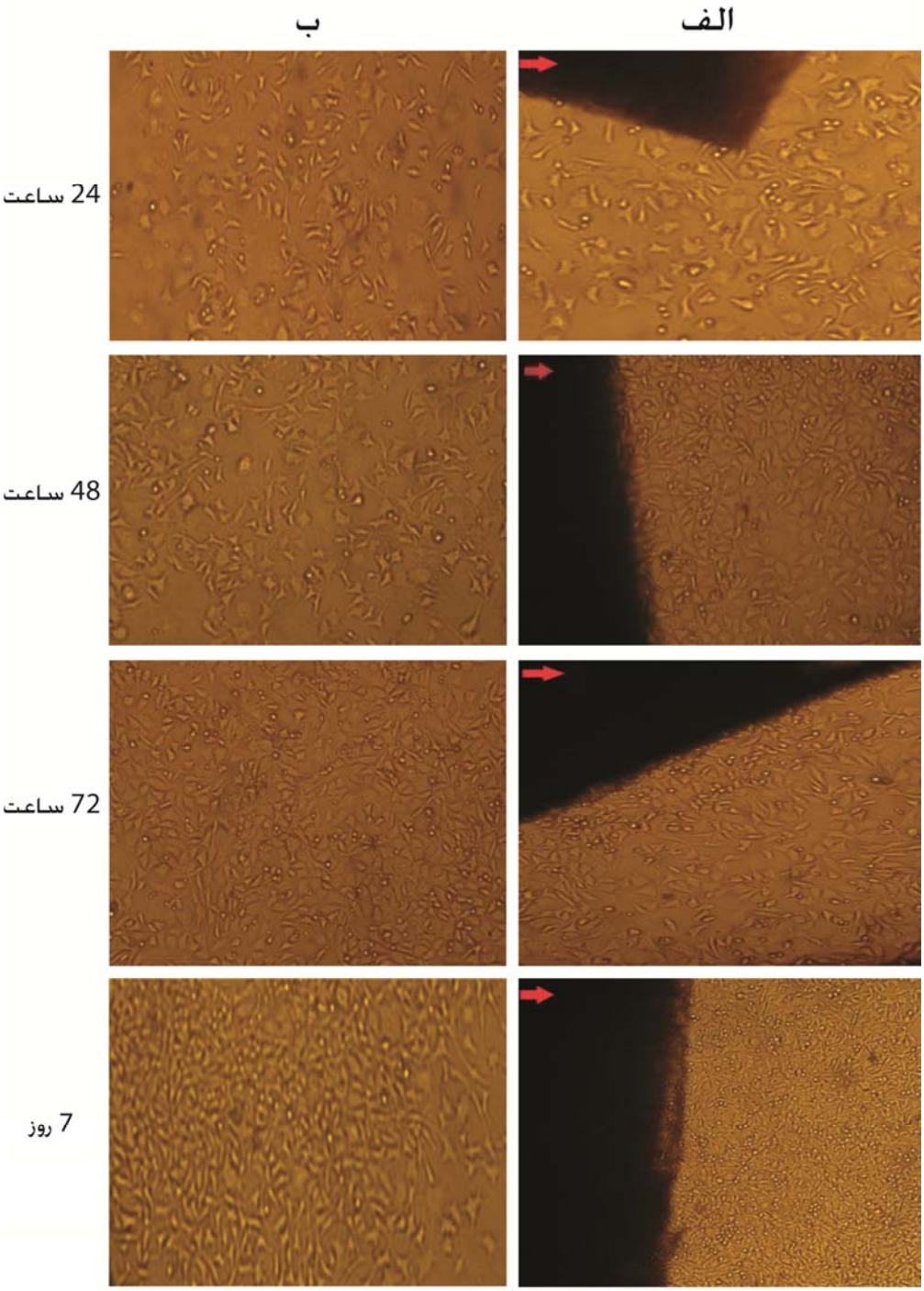
بحث

مهندسی بافت یا"طب احیا" یک حوزه میان رشته ای، ازرشته های زیست شناسی، مهندسی، علم مواد و پزشکی بوده که برتوسعه جانشینی زیستی برای ترمیم، نگهداری وبهبود بافت وعملکرد عضو تمرکزیافته است (۸). هدف ازمهندسی بافت ترمیم بافت از طریق به کارگیری ابزار بیولوژیکی مثل سلولها با ابزار های سنتتیک مؤثر مانند زیست مواد، برای طراحی داربست می باشد. در بافت تکامل یافته یک جاندار، سلولها در ریز محیطهای سه بعدی قرارمی گیرند واطرافشان به وسیله سلولهای دیگر و ECM احاطه می شود رفتار سلولی پاسخی ترکیبی ازرخدادهای پیام رسانی متعددی بوده که در اثر برهمکنش سلولهای مجاور با یکدیگر، با مولکولهای محلول و با ECM اتفاق می افتد (۵).

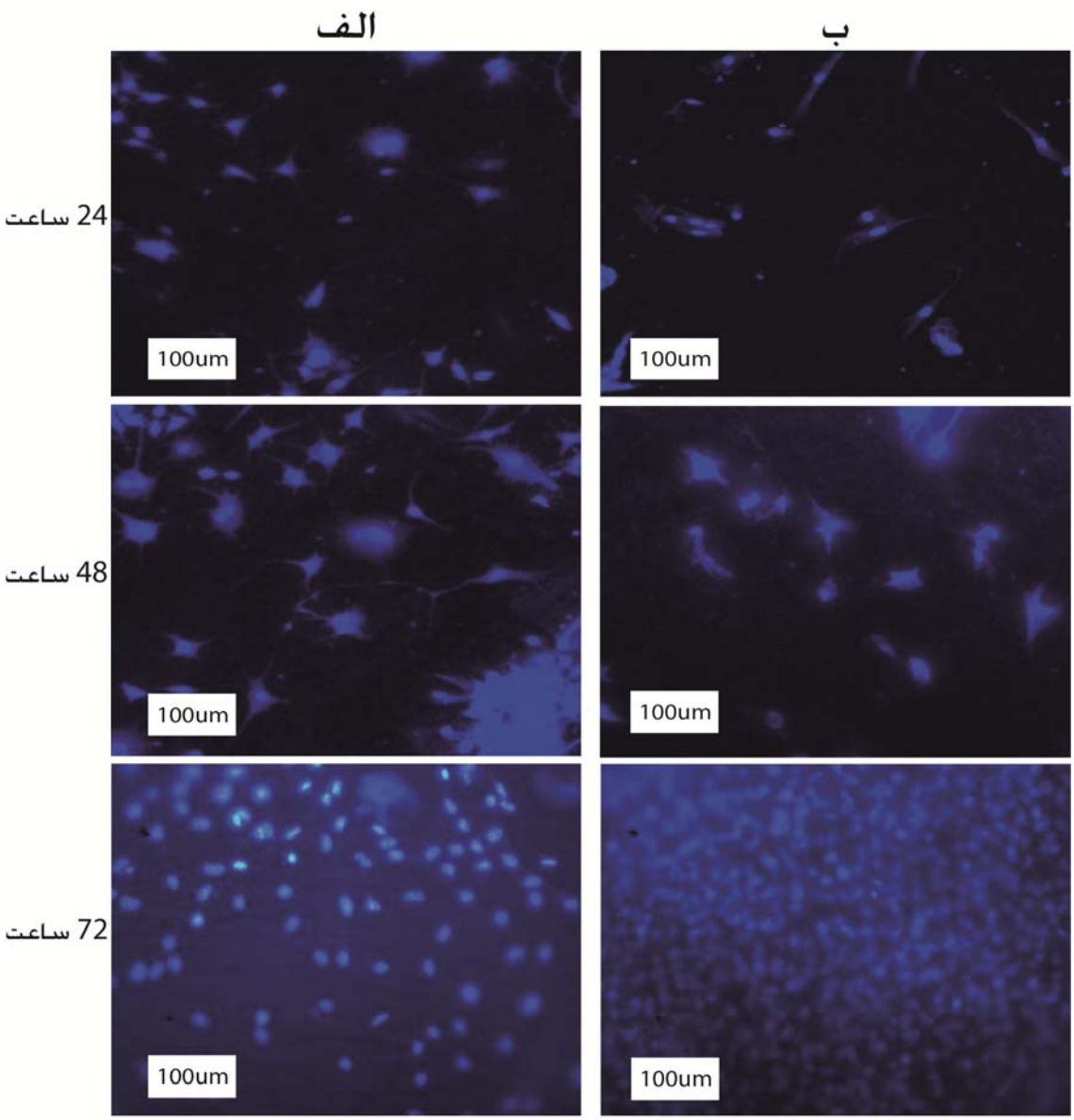
داربست در مهندسی بافت در واقع باید تقلیدی از ماتریکس خارج سلولی طبیعی موجود دربدن باشد. یکی از ویژگیهای شاخص ومهم در ماتریکس خارج سلولی فراهم آوری شرایطی مناسب جهت تبادل وتعامل سلولها با یکدیگر و با محیط اطرافشان می گردد که آب دوستی و وجود نانوتوپوگرافی مناسب می تواند در این راستا باشد. وجود ویژگی آب دوستی در ECM موجب تسهیل در نقل و انتقال گازها، مواد مغذی و زائد در تمامی سطوح سلولی می شود از سوی دیگر وجود ویژگی نانوتوپوگرافی تأثیر به سزایی در القای مسیرهای دخیل در پیام رسانی در شکل گیری فنوتیپ وسرنوشت سلول دارد (۴ و ۸). باتوجه به اینکه ECM شبکه ای از نانوالیاف پیچیده ومنظم می باشد و نیز تأثیر محیط نانوتوپوگرافی بر القای مسیرهای پیام رسانی دخیل در شکل گیری فنوتیپ وسرنوشت سلول نقش به سزایی دارد، داربستهای تولید شده از نانوالیاف در سالهای اخیر مورد توجه قرار گرفته است (۴ و ۹).

در مطالعه انجام شده توسط Kumer و همکاران به منظوراستفاده ازنانوالیاف PCL که دارای ساختارسه بعدی باشند از روش ریسندگی شکل آزاد (Freeform fabricate)

استفاده شد. داربست تهیه شده به دلیل نداشتن ساختار سه بعدی و ویژگیهای سطحی مناسب، توانایی حمایت لازم از سلول کشت شده جهت بروز رفتار مناسب سلولی را نداشت (۹).



شکل ۲ - تصاویر میکروسکوپ معکوس ۲۴،۴۸، ۷۲ ساعت و ۷روز پس از کشت سلول; الف) داربست SP-PCL پوشیده شده باآمیزه ژلاتین کیتوسان(نواحی تیره رنگ داربست که با پیکان نشان داده شده است، ب) کنترل مثبت (پلیت بدون داربست).(بزرگ نمایی ۱۰۰X)



شکل ۳ – تصویر میکروسکوپ فلورسنت با رنگ آمیزی DAPI ; الف) پس از گذشت ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت از کشت سلولهای فیبروبلاستی بر روی پلیت بدون داربست(کنترل)، ب) پس از گذشت ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت از کشت سلولهای فیبروبلاستی بر روی داربست پلی کاپرولاکتون سوپرامولکولی پوشیده شده باآمیزه ژلاتین-کیتوسان.

در سال ۲۰۱۰ ,Yildirim و همکاران از پلی کاپرولاکتون سه بعدی تولید شده با استفاده از روش شکل دهی در خلا (Precision) extrusion deposition به عنوان داربست استفاده نمودند. داربست تولید شده فاقد شرایط مناسب جهت حمایت از سلولها برای بروز پاسخ مناسب سلولی بود (۱۷).

درتحقیق انجام شده توسط Chung وهمکاران ازفیلم PCL استفاده شد. فیلم PCL به دلیل نداشتن ساختار سه بعدی توانایی فراهم آوری فضایی مشابه به ساختار ECM طبیعی را نداشته و در نتیجه سلولها قادر به بروز رفتار سلولی مناسب برروی آن نبوده اند.

روشهای مختلفی برای تهیه نانوالیاف وجود دارد که نانوالیاف با توجه به روشهای تولید مختلف دارای اندازه ها و اشکال متفاوتی هستند و هر یک برای کاربرد خاص مورد استفاده قرارمی گیرند. روشهای رایج شامل کشش، قالب گیری، جداسازی فازی، خود آرایی و الکتروریسی بوده و به منظور تولید نانوالیاف برای مصارف زیست پزشکی مورد استفاده قرارمی گیرد. درمیان روشهای ذکرشده ازروش الکتروریسی (electrospinning) برای تولید داربست در این تحقیق استفاده شده است. الکتروریسی روشی محبوب برای تولید داربستهای نانوالیاف می باشد. به دلیل شباهت زیاد داربست تولیدشده به ECM توسط این روش بیش از سایر روشها مورد توجه قرار گرفته است. نانوالیاف با فراهم آوری ویژگیهای مختلف توپوگرافی از قبیل: قطر، ترازبندی و فاصله میان الیاف به راحتی با تنظیم عوامل مؤثر در فرآیند الکتروریسی قابل تنظیم است (۵).

در کنار استفاده از روش ساخت انتخاب ماده سازنده داربست بخش حیاتی را در اطمینان یافتن ازموفقیت مهندسی بافت پوست بازی می کند. مواد طبیعی و سنتتیک متفاوتی برای ساخت داربست ازجمله PCL ، PLL ، کلاژن، فیبروئین ابریشم، کیتوسان و ژلاتین استفاده شده است. مانع اصلی دراستفاده ازپلیمرهای طبیعی خصوصیات مکانیکی ضعیف آنهاست. پلیمرهای سنتتیک مانند PCL ، PLLA تحت تجزیه هیدرولیتیکی قرار می گیرند و فرآورده های حاصل از آنها در مسیر متابولیکی حذف می شوند. این پلیمرها ویژگیهای برتری ازلحاظ مکانیکی نسبت به پلیمرهای طبیعی دارندوبه آسانی قابلیت پردازش دارند (۱۵).

به همین دلیل دراین مطالعه پلیمر پلی کاپرولاکتون سوپرامولکولی به عنوان ماده سازنده داربست برای تولید نانوالیاف به روش الکتروریسی انتخاب شد. این پلیمر یک پلیمر خطی و آب گریز است و به علت خواص فیزیکی عالی، در دسترس بودن و زیست سازگار بودنش ماده مناسبی برای مصارف پزشکی به حساب می آید و به شکل گسترده ای در مهندسی بافت کاربرد دارد.

یکی ازمعایب آن عدم وجود گروههای عاملی برسطح زنجیره های پلیمری می باشد که آن را به پلیمری هیدروفوب تبدیل کرده است. قابلیت ترشدن و میزان آب دوستی وبهای نانوالیافی در مهندسی بافت در ایجاد یک کشت سلولی مناسب و یکنواخت در سه بعد مؤثر است. باتوجه به آب گریزی PCL ایجاد یک توزیع یکنواخت ازکشت سلولی برروی وب نانوالیاف متخلخل تشکیل شده از این پلیمرها دشوار می باشد.همچنین آب دوستی وب نانوالیافی در چسبندگی سلولها به سطح آن نیز مؤثراست که درترمیم بافت آسیب دیده بسیارحائزاهمیت است. با وجود این مشخصات در مطالعات مختلف از ترکیب این پلیمر با ترکیبات و مواد مختلف در جهت تعدیل این مشخصه استفاده شده است.

در تمامی موارد ذکر شده در بالا تلاش در جهت افزوده شدن عوامل بیولوژیک و گروههای شیمیایی و یا فیزیکی به منظور فراهم کردن بستری مناسب در جهت ایجاد شرایط بهتر داربستهای تهیه شده با PCL میباشد. به منظوراصلاح ویژگی آب گریزی داربست تهیه شده از پلیمر PCL سوپرامولکول با استفاده از روش الکتروریسی در این تحقیق از آمیزه ژلاتین –کیتوسان بهره برده شد.

بسترهایی که تحت عنوان داربست در مهندسی بافت استفاده می شوند باید توانایی واکنش با سلول در ابعاد سه بعدی و یا تسهیلگر ارتباط سه بعدی سلولها با یکدیگر و محیط اطرافشان باشند. پس می توان گفت که فراهم آوری این مشخصه توسط نانوالیاف برای سلولها فاکتور تعیین کننده برای موفقیت یا شکست داربست می باشد .

چسبندگی اولین رویدادی است که پس ازانتقال سلولها برروی نانوالیاف اتفاق می افتد وتست چسبندگی تعیین

کننده بخشی ازسلول است که به سطح ماتریکس متصل می شود و در برابر شستشو مقاومت می کند.

بدین منظور پس از گذشت ۲۴ساعت از انتقال سلولهای فیبروبلاستی بر روی نانوالیاف استریل شده با استفاده از اشعه UVزیست سازگاری و عدم سمیت نانوالیاف برای سلولهای فیبروبلاستی مورد بررسی قرار گرفت.

تصاویر تهیه شده با استفاده از میکروسکوپ معکوس پس از گذشت ۲۴ ساعت رشد مناسبی از سلولهای فیبروبلاستی را در کنارنانوالیاف نشان می دهند که تأیید کننده زیست سازگاری و عدم سمیت آن برای سلولها می باشند (شکل۲).

بعد از انتقال سلولها بر روی نانوالیاف میزان رشد سلولی تا ۷۲ ساعت به صورت روزانه و سپس ۷ روز با استفاده از آزمون MTT مورد سنجش قرار گرفت .جذب نمونه ها با استفاده از دستگاه اسپکتوفتومتر درطول موج ۵۷۰ nm خوانده شد (نمودار ۱). بررسی رشد سلولها در کنار داربست در بازه های زمانی ذکر شده با استفاده از میکروسکوپ معکوس انجام شد.

با توجه به تصاویر تهیه شده با استفاده از میکروسکوپ معکوس پس از گذشت ۲۴ ساعت از انتقال سلولها بر روی داربستPCL سوپرامولکول پوشیده شده باآمیزه ژلاتین-کیتوسان تمایل سلولها به سمت داربستها بوده و سلولها بر روی نانوالیاف در مقایسه با کنترل، تقریباً مشابه یکدیگر بودند. با گذشت ۴۸ ساعت از کشت سلولها و مقایسه آن با روز اول و کنترل مثبت سلولها رشد چشمگیر تری را نشان می دهند. درروزسوم و یا ۷۲ ساعت پس از کشت سلولی و مقایسه آن با ۲۴ ساعت و ۴۸ ساعت و کنترل مثبت سلولها رشد بسیار چشمگیرتری را نشان می دهند. با گذشت ۷ روز از کشت سلول و مقایسه آن با روزهای قبل و کنترل مثبت رشد سلولها به طورمعنی داری افزایش یافته است. نمودار تهیه شده با استفاده ازآزمون MTT نتایج به دست آمده از تصاویر تهیه شده با میکروسکوپ معکوس را تأیید می نماید .با توجه به نمودارها در ۲۴ ساعت نخست پس از کشت سلولها داری تفاوت چندانی دررفتار سلولی بر روی داربستPCL سوپرامولکول پوشیده شده باآمیزه ژلاتین-کیتوسان و کنترل مثبت قابل وجود نداردکه چنانچه گفته شدنشان دهنده عدم سمیت وزیست سازگاری داربست می باشد. اماباتوجه به رشدچشمگیرسلولها برروی داربست نسبت به کنترل مثبت پس ازکشت سلول، می توان گفت داربست PCL سوپرا مولکول پوشیده شده با آمیزه ژلاتین-کیتوسان شرایطی مشابه ECM موجود در بافت طبیعی را فراهم کرده است و در بازه زمانی طولانی تر تا ۷ روز از رشد و تکثیر سلولی حمایت می کند.

Xiaoran و همکارانش در سال ۲۰۰۸ از الکترو ریسندگی برای ساخت داربست پلی کاپرولاکتون استفاده کردند. آنها سطوح الیاف را با ژلاتین و کلسیم فسفات پوشش دادند. اندازه گیری زاویه تماس آب و اسکن میکروسکوپ الکترونی، حضور ژلاتین و کلسیم فسفات را تأیید کرد (۱۱).

نتایج X-ray آنها نشان داد که رسوب فاز معدنی مخلوطی از دهیدرات کلسیم و فسفات (پیشرو به آپاتیت) و آپاتیت است. آنها اعتقاد داشتند که داربست متخلخل می تواند ساختار، ترکیب و عملکرد بیولوژیکی ماتریکس خارج سلولی استخوان را تقلید کند. آنها سلولهای Mc3T3-E1 Preosteoblast را بر روی این داربست کشت دادند که اتصال و تکثیر و مورفولوژی خوب سلولها بر روی داربست را مشاهده نمودند. میزان تکثیر سلولها بر روی داربست، پس از کشت به مدت ۷ روز به میزان قابل توجهی، بالاتر(۱/۹ برابر) از داربست فیبری پوشش نداده شده بود.

این نتایج نشان داد که سیستمهای ترکیبی شامل پلی کاپرولاکتون، ژلاتین و کلسیم فسفات می تواند به عنوان یک داربست مناسب برای مهندسی بافت استخوان باشد (۱۰).

در سال ۲۰۱۳، شکراللهی و همکارانش، برروی ارتباط بین خواص ساختاری بیوکامپوزیت های سوپرامولکولی ومقاومت مکانیکی آنها کار کردند. بیوکامپوزیت ترکیبی متشکل از هیدروکسی آپاتیت وSP-PCL درشرایط مختلف تهیه شد(PCL سوپرامولکولی بانانوذرات هیدروکسی آپاتیت اصلاح شد) وخواص مکانیکی، حرارتی وهمچنین قابلیت زیست سازگاری وسمیت سلولی درشرایط آزمایشگاهی مورد بررسی قرار گرفت. نتایج باPCL سوپرامولکولی فاقد هیدروکسی آپاتیت مقایسه شد. نتایج نشان داد که اصلاح سطح با نانوذرات هیدروکسی آپاتیت منجر به بهبود استحکام کششی و مدول به ترتیب تا 3.6 و 2.2 ۶ برابر شد (۱۳).

شریفی و همکارانش درسال۲۰۱۴ ازداربست PCL اصلاح شده باپلاسما به منظوربررسی تکثیر سلولهای فیبروبلاست موشی استفاده کردند. نتایج نشان دادکه داربست PCL اصلاح شده با پلاسما درمقایسه با داربست PCL پوشش داده شده با ژلاتین –کیتوسان توانایی حمایت کمتری از سلولهای کشت داده شده برای بروز پاسخ سلولی مناسب برروی داربست را دارند. داربست PCL پوشش داده شده باژلاتین-کیتوسان به دلیل آنکه کیتوسان با ایجاد اتصال متقاطع (Cross-Linek) موجب پایداری داربست شده وبه ایجاد حفرات همگن در ساختار کمک می کندو ژلاتین به دلیل دارا بودن سکانس شبه RGD (لیگاند بسیاری از اینتگرین های سلولی) در بهبود اتصال سلول به داربست مؤثر بوده وترکیب آن با کیتوسان به براکنش لیگاندهای اینتگرین RGD در ساختار وایجاد بستری که بیشترین شباهت رابه ECM طبیعی بدن موجود زنده داشته باشد کمک می کند توانایی حمایت بیشتری از سلولهای کشت داده شده برای بروز پاسخ سلولی مناسب برروی داربست را دارند (۳).

نتیجه گیری

باتوجه به روشهای مختلفی که در تهیه داربست در مطالعات پیشین استفاده شده بود، به دلیل فراهم آوری محیطی دو بعدی ومشابه ECM طبیعی از روش الکتروریسی برای تهیه داربست استفاده شد. از سوی دیگرجهت اصلاح ویژگی ذاتی آب گریزی موجود در پلیمر مصنوعی sPCL از آمیزه ژلاتین-کیتوسان بهره برده شد. در واقع اعمال پوشش آمیزه ژلاتین-کیتوسان بر سطح نانوالیاف، با بهبود ویژگی آب دوستی سطحی نانوالیاف این مشخصه ذاتی تعدیل وشرایط برای اتصال اولیه سلول بر سطح نانوالیاف بهبود یافته که در پی آن مهاجرت، رشد و تکثیر مناسب و بهتر سلولی بر روی نانوالیاف نسبت به کنترل مثبت فراهم گردید. همان طور که در نتایج نیز قابل مشاهده است نانوالیاف PCLسوپرامولکول پوشش داده شده با آمیزه ژلاتین-کیتوسان با تراکم بالاتر شباهت بیشتری به ECM طبیعی بدن داشته وتوانایی بهتری در جهت حمایت از رشد وتکثیر سلولی از خود نشان داده است.

منابع

۱. زندی،مژگان،۱۳۹۲،ژلاتین وکاربردهای آن.تهران،انجمن پلیمرایران

۲. قلی پور کنعانی، عادله، بهرامی، سیدهژیر، جغتایی، محمدتقی، صمدی کوچکسرایی، علی، ۱۳۹۲، تولید داربستهای نانولیفی بر پایه پلی کاپرولاکتون-کیتوسان-پلی ونیل الکل برای مهندسی بافت پوست، مجله علوم و تکنولوژی پلیمر، دوره۲۶، شماره۲.

۳. شریفی، فردویی، ایرانی، شیوا، زندی، مژگان، سلیمانی، مسعود، ۱۳۹۳، تهیه و اصلاح سطح نانوالیاف پلی کاپرولاکتون با پلاسما به منظور بررسی رفتار سلول فیبروبلاست، فصلنامه پزشکی و پیراپزشکی دانشگاه علوم پزشکی اردبیل، سال چهاردهم، شماره ۵۳، ۲۱۷-۲۲۸.

4. Barnes,CP. Sell, SA. Boland, ED. Simpson, DG. Bowlin, GL. 2007. Nanofiber technology: Designing the next generation of tissue engineering scaffolds. Advanced Drug Delivery Reviews.Volume 59:1413-1433.

5. He, L. Liao, S. Quan ,D. Ma, K. Chan, C. Ramakrishna, S. Lu, J. 2010.Synergistic effects of electrospun PLLA fiber dimension and pattern onneonatal mouse cerebellum C17.2 stem cells. Acta Biomaterialia.Volume 6:2960–2969.

6. Jha,B.S. Colello,RJ. Bowman,JR. Sell,SA.Lee,KD.et al,2011.Two pole air gap electrospinning: Fabrication of highly aligned,three dimensial scaffolds for nerve reconstruction. Acta Biomater. Volume 7:203-15.

7. Keck, Maike. Lumenta, David Bnjamin.Kamolz, Lars-Peter.2013.Skin Tissue Engineering.Springer Vienna.

8. Kim ,HN. Jiao, A. Hwang, NS. Kim ,MS. Kang ,DH. Kim, DH. Suh, KY. 2012. Nanotopography-guided tissue engineering and regenerative medicine. Adv Drug Deliv Rev.Volume 65:389-402.

9. Kumar, Girish. Waters,Michael S. Farooque,Tanya M.Young, Marian F.Simon Jr, Carl G.2012.Frreform fabricated scaffolds with roughness struts that enhance both stem cell proliferation and differation by controlling cell shap.Biomaterials.Volume33:4022-30.

10. Li ,Xiaoran . Xie, Jingwei . Yuan Xiaoyan and Xia Younan .2008. Coating Electrospun Poly(ε-caprolactone) Fibers with Gelatin and Calcium Phosphate and Their Use as Biomimetic Scaffolds for Bone Tissue Engineering. Langmuir. Volume24:14145–14150.

11. Pezeshki-Modaress, M, et al. 2013 .Cell-loaded gelatin/chitosan scaffolds fabricated by salt-leaching/lyophilization for skin tissue engineering: In vitro and in vivo study. Journal of Biomedical Materials Research Part A .

12. Raz, M, et al.۲۰۱۴. Development of biomimetic gelatin–chitosan/hydroxyapatite nanocomposite via double diffusion method for biomedical applications. International Journal of Materials Research 105.5: 493-501, 102, 3908-3917.

13. Shokrollahi, P , Mehmanchi, M, Atai, M, Omidian, H, Shokrolahi, F.2013. Effect of interface on mechanical properties and biodegradation of PCL HAp supramolecular nano-composites, Mater Sci, 5039-6.

14. Supp, DM. Boyce,S T. 2005. Engineering skin substitutes: practices and potentials, Clinic in Dermatology .Volume 4:203-212.

15. Vance, RJ. Miller, DC. Thapa, A. Haberstroh, KM.Webster, TJ.2004. Decreased fibroblast cell density on chemically degraded poly-lactic-co-glicolic acid,polyurethane,and poly caprolactone. Biomaterials.Volume25:2095-2103.

16. Wong, David J.Chang, Howard.2009.Skin Tissue Engineering.stanford: StemBook.

17. Yildirim E.D, Besunder R, Papas D, Allen F,Guceri S,Sun W. 2010. accelerated differentiation of osteoblast cells on polycaprolactone scaffolds driven by a combined effect of protein coating and plasma modification. Biofabrication. . Volume 2:12-24.

Gelatin-chitosan coating enhances L929 fibroblasts proliferation on supramolecular nano-fibrous scaffolds

Khademi S.[1], Shokrollahi P.[2], Zandi M.[2] and Irani Sh.[1]

[1] Biology Dept., Faculty of Science, Azad University, Science and Research Unit, Tehran, I.R. of Iran

[2] Biomatherial Dept., Iran Polymer and Petrochemical Institute,Tehran, I.R. of Iran

Abstract

The goal of tissue engineering is regeneration and restoration of damaged tissues and organs. Scaffolds are the main part of tissue engineering, and gelatin/chitosan surface modification is one of the proper methods for surface modification of polymer scaffolds. Evaluation of fibroblasts behavior on gelatin/chitosan coated supramolecular PCL (SP-PCL) was the aim of this study. SP-PCL nano-fibers were prepared by electrospinning. Morphology of the nano-fibrous mats was investigated using scanning electron microscopy MTT assay was performed to examine cell activity on the nano-fibers. DAPI staining was carried out to evaluate cell viability. The SEM images of the cells onto the scaffold showed good biocompatibility of the scaffold. In addition, the MTT assay results showed a proper metabolic activity of cells on the scaffolds The sPCL nano-fibrous mats coated with gelatin-chitosan blend show significantly ($p<0.05$) increased cells proliferation compared to control(tissue culture plate, TCP), and also this significant increased proliferation has been observed until the seventh day post seeding. The experiments showed that the nano-fibrous electrospun SP-PCL coated with gelatin/chitosan blend, provides a suitable environment for fibroblasts adhesion, and proliferation, possibly because of similarity to nano-fibrous natural ECM network.

Key words: Supramolecular polycaprolactone, tissue engineering,nano-fiber, gelatin/chitosan blend, surface modification.