

بررسی زیست‌سازگاری نانوکامپوزیت کیتوزان/پلی‌وینیل الکل برای تکثیر سلول‌های عصبی

فاطمه متقی طلب^۱، وحید متقی طلب^۲، مهدی فرخی^۳، علی اسلامی فر^۴، محمدعلی شکرگزار^{۵*}

۱- دانشجوی کارشناسی ارشد، گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم پایه، واحد علوم و تحقیقات، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران

۲- استادیار، گروه مهندسی نساجی، دانشکده فنی، دانشگاه گیلان، رشت، ایران

۳- کارشناس ارشد، بخش بانک سلولی ایران، انستیتو پاستور ایران، تهران، ایران

۴- استادیار، گروه تحقیقات بالینی، انستیتو پاستور ایران، تهران، ایران

۵- دانشیار، بخش بانک سلولی ایران، انستیتو پاستور ایران، تهران، ایران

پذیرش مقاله: ۸۸/۰۸/۱۷

دریافت مقاله: ۸۸/۰۷/۱۲

چکیده

هدف: مهندسی بافت، علمی میان رشته‌ای است که اساس آن مبتنی بر به‌کارگیری داربست‌های پلیمری برای شکل‌گیری سه‌بعدی بافت است. از این داربست‌ها به‌عنوان ماتریکس خارج سلولی سنتتیک برای چسبندگی سلول‌ها، تکثیر و تمایز سلولی استفاده می‌شود. مواد زیستی مورد استفاده در مهندسی بافت می‌بایست از ترکیب شیمیایی، ساختار فیزیکی و عملکرد زیستی مناسب برخوردار باشند. در پروژه حاضر، ترکیب کیتوزان/پلی‌وینیل الکل به‌عنوان داربست برای ترمیم بافت عصبی انتخاب شده است.

مواد و روش‌ها: برای تولید داربست‌های کیتوزان/پلی‌وینیل الکل با استحکام مکانیکی و ریخت‌شناسی مناسب در کاشت و تکثیر سلول‌های عصبی U373 از روش الکترووریسی استفاده شد. روش الکترووریسی نسبتاً ساده بوده و می‌توان به‌وسیله آن الیافی به فرم لایه نازک بی‌بافت تولید کرد. پس از آن میزان زیست‌سازگاری داربست با استفاده از آزمون‌های زیستی و ارزیابی میزان چسبندگی سلولی مورد بررسی قرار گرفت.

نتایج: نتایج کسب شده نمایانگر آن هستند که نانوکامپوزیت کیتوزان/پلی‌وینیل الکل با نسبت ۱۵/۸۵ ضمن تأمین ریخت‌شناسی و استحکام مکانیکی لازم، امکان رشد سلول‌های عصبی U373 به فضای درونی ماده زیستی و جایگزینی آن‌ها را در طول زمان و به‌صورت کنترل شده فراهم می‌کند. بدین ترتیب شرایط لازم برای رشد و توسعه سلولی و همچنین جدا شدن از بافت رشد یافته فراهم می‌شود.

نتیجه‌گیری: با استفاده از نانوکامپوزیت کیتوزان/پلی‌وینیل الکل به دلیل زیست‌سازگاری مناسب و عدم سمیت، امکان رشد سلول‌های U373 و اتصال مناسب آن‌ها به نانوکامپوزیت برای ترمیم آسیب وارده به اعصاب محیطی فراهم می‌شود.

کلیدواژگان: مهندسی بافت، نانوکامپوزیت، کیتوزان، پلی‌وینیل الکل، الکترووریسی

۱- مقدمه

روش‌های ریزجراحی (Microsurgical) موفقیت لازم حاصل نمی‌شود [۱]. امروزه، استفاده از مهندسی بافت روزنه‌ای

برای ترمیم آسیب وارده به اعصاب محیطی به فرایندهای بالینی مختلفی نیاز است که در برخی از موارد با وجود

*نشانی مکاتبه: تهران، انستیتو پاستور ایران، بخش بانک سلولی ایران، صندوق پستی: ۱۳۱۸۵-۱۶۶۷

زمینه‌های مختلف پزشکی بهره گرفت. PVA دارای خصوصیات آب‌دوستی مناسب بوده و قابلیت بالایی در تشکیل فیبر دارد [۵]. تاکنون از روش‌های متعددی برای تولید داربست‌های پلیمری با خصوصیات ساختاری و مکانیکی متفاوت استفاده شده است که در این بین می‌توان به روش‌های خشک کن انجمادی (Freeze-drying) و حذف نمک (Salt leaching) اشاره نمود. در روش‌های ذکر شده با استفاده از محلول‌های پلیمری، داربست‌هایی در اندازه‌های مختلف از سانتی‌متر تا میکرومتر تهیه می‌شود. امروزه با پیشرفت‌هایی که در علم نانوتکنولوژی حاصل شده است، سعی بر آن است که استفاده از داربست‌های نانو جایگزین مدل‌های قدیمی‌تر شود. در همین راستا می‌توان از روش‌های مختلفی بهره گرفت که روش الکتروریسی (Electrospinning) از جمله رایج‌ترین روش‌ها است. الکتروریسی، تکنیک ریسندگی الیاف است که وابسته به نیروهای الکتروستاتیکی بوده و برای تولید الیاف با قطرهایی در محدوده نانو و میکرومتر مورد استفاده قرار می‌گیرد. این تکنیک به‌عنوان یک روش ساده، پیشرفت‌های زیادی را در زمینه تولید الیاف از محلول‌های پلیمری یا مذاب داشته است [۶]. اصول کار به این صورت است که با قرار دادن یک الکتروود در محلول پلیمری و الکتروود دیگر در صفحه جمع‌کننده یا متصل کردن آن به زمین، یک پتانسیل الکتریکی بین قطره پلیمری یا مذاب تشکیل شده در نوک سوزن و صفحه جمع‌کننده الیاف اعمال می‌شود. وقتی میدان الکتریکی اعمال شده به کشش سطحی قطره غلبه پیدا کند، یک جریان پلیمری باردار از قطره نوک سوزن خارج می‌شود. کنترل مسیر جریان باردار به وسیله میدان الکتریکی صورت می‌پذیرد. جریان خارج شده به‌خاطر وجود نیروهای دافعه بین بارهای موجود در جریان پلیمری دچار ناپایداری خمشی شده و درازتر و نازک‌تر می‌شود تا به اندازه نانومتر می‌رسد؛ سپس روی یک صفحه جمع‌کننده قرار گرفته و به حالت جامد در می‌آید [۳، ۷].

به‌طور معمول از فرایند اتصال عرضی (Cross linking) با ترکیبات شیمیایی همچون گلو تار آلدئید برای افزایش مقاومت مکانیکی نانوکامپوزیت (Nano-composite) پس از

جدید از علم نوین را برای ترمیم بافت عصبی ایجاد کرده است. مهندسی بافت به‌عنوان علمی بین رشته‌ای با هدف توسعه مواد زیست‌سازگار و زیست‌تخریب‌پذیر و با دیدگاه بهبود عملکرد بافت‌های طبیعی، توجه بسیاری از متخصصین علوم مهندسی و پزشکی را به خود جلب نموده است [۲]. هدف اصلی مهندسی بافت، استفاده از جایگزین‌های زیستی مناسب برای ترمیم بافت آسیب دیده و احیای فعالیت طبیعی آن است [۳]. در این میان، ظهور و گسترش علوم و فناوری نانو موجب شده است تا راه‌کارهای مؤثری برای ساخت داربست‌های سه‌بعدی با پایه نانوکامپوزیت پلیمرهای زیست‌تخریب‌پذیر/زیست‌سازگار به‌وجود آید. علت استفاده از داربست، ایجاد محیطی مناسب و مشابه ماتریکس خارج سلولی (Extracellular Matrix: ECM) است که به سبب آن حمایت فیزیکی و تحریک شیمیایی لازم برای رشد سلول جدید فراهم می‌شود [۲].

اولین قدم در طراحی داربست‌های قابل استفاده در مهندسی بافت عصبی، انتخاب ترکیب مناسب است. بدین منظور می‌توان از طیف وسیعی از پلیمرهای طبیعی و سنتتیک استفاده نمود [۱]. در این مطالعه، ترکیب کیتوزان/پلی‌وینیل الکل (Chitosan/poly(vinyl alcohol): CS/PVA) به‌عنوان داربست انتخاب شده است. کیتوزان پلیمری خطی با ساختاری ساکاریدی است که از هیدرولیز پلیمر طبیعی کیتین (Chitin) به‌دست می‌آید. به دلیل وجود گروه‌های آمینی در کیتوزان، این پلیمر دارای خصوصیات منحصر به فردی است که از آن جمله می‌توان به قابلیت زیستی، غیرسمی بودن و سازگاری با سلول‌ها و بافت‌ها اشاره نمود. با این وجود به دلیل نامناسب بودن پاره‌ای از خصوصیات فیزیکی این پلیمر از جمله قابلیت کششی و قابلیت ارتجاعی (Elasticity)، استفاده از کیتوزان در برخی از زمینه‌های مهندسی بافت با محدودیت‌هایی مواجه است [۲، ۴]. از این رو می‌بایست برای ارتقای خصوصیات فیزیکی و شیمیایی آن از ترکیب کیتوزان و نوعی پلیمر سنتتیک همچون PVA استفاده شود. از PVA به دلیل نرخ زیست‌سازگاری/زیست‌تخریب‌پذیری مناسب، می‌توان در

دستیابی به ضخامت مناسب داربست که قابل جدا کردن از صفحه جمع‌کننده باشد به حدود ۵ ساعت وقت نیاز است.

۲-۲- عصاره‌گیری از داربست‌های الکترورسی شده

عصاره‌گیری از داربست‌ها برای بررسی غیرمستقیم زیست‌سازگاری آن‌ها بر طبق استاندارد ISO 10993-5 انجام گرفت. کلیه نمونه‌های کامپوزیتی با سطح مقطع ۱ سانتی‌متر مربع در ۱ میلی‌لیتر محیط کشت (RPMI 1640) غوطه‌ور شده و برای بررسی میزان زیست‌پذیری سلول‌ها در روزهای ۳، ۷ و ۱۴ در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد انکوبه شدند.

۲-۳- کشت سلول

رده سلولی U373 (Human Glioblastoma-Astrocytoma) بانک سلولی ایران) در محیط کشت RPMI 1640 و غلظت ۱۰ درصد FBS (Fetal Bovine Serum) (Sigma-Aldrich) (آمریکا) و ۱ درصد مخلوط آنتی‌بیوتیکی پنی‌سیلین-استرپتومایسین (Penicillin-Streptomycin) (GIBCO) کشت داده شده و در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد و ۵ درصد CO_2 انکوبه شد. سلول‌ها پس از ۴-۸ بار پاساژ دادن مورد استفاده قرار گرفتند.

۲-۴- خصوصیت‌شناسی

۲-۴-۱- بررسی ریخت‌شناسی نانوفیبرهای CS/PVA

ریخت‌شناسی نانوفیبرهای حاصل از روند الکترورسی با استفاده از میکروسکوپ الکترونی روبشی (Scanning Electron Microscope: SEM, Zeiss, آلمان) تعیین شد. کلیه نمونه‌ها ابتدا با لایه‌ای از طلا پوشانده شده و سپس عکس‌های مربوط با اعمال ولتاژ ۲۰ کیلوولت تهیه شدند.

۲-۴-۲- بررسی خصوصیات مکانیکی داربست CS/PVA

قابلیت کششی نانوفیبرهای CS/PVA با استفاده از دستگاه کششی تک‌محوری (EMCI DL 3000, برزیل) محاسبه شد.

الکترورسی استفاده می‌شود. در پروژه حاضر، از تیمار حرارتی نانوکامپوزیت CS/PVA بدون انجام فرایند اتصال عرضی با ترکیبات شیمیایی برای افزایش مقاومت مکانیکی استفاده شده است که بدین ترتیب آثار سمی ناشی از استفاده از ترکیبات شیمیایی بر میزان رشد و تکثیر سلولی تعدیل می‌شود. لازم به ذکر است که تا به امروز از داربستی با شرایط ذکر شده برای رشد و تکثیر سلول‌های عصبی استفاده نشده است. از آنجایی که بحث پذیرش سطح کامپوزیت‌ها به وسیله سلول‌ها از اهمیت بالایی برخوردار است و در حقیقت بیانگر زیست‌سازگاری و میزان هدایت‌پذیری نمونه‌های کامپوزیتی است، پس از بررسی ساختاری و ریخت‌شناختی داربست و میزان مقاومت مکانیکی آن از آزمون‌های زیستی برای ارزیابی اتصال و رشد سلول‌ها بر سطح کامپوزیت استفاده شده است [۸-۱۰].

۲- مواد و روش‌ها

۲-۱- ساخت داربست نانوفیبری CS/PVA با

استفاده از روش الکترورسی

برای ساخت غشای نانوفیبری کیتوزان طی روند الکترورسی، ۰/۲ گرم کیتوزان [پودر، وزن مولکولی متوسط، درجه استیلاسیون ۸۰ درصد، (Sigma-Aldrich، آمریکا)] به مدت ۳ ساعت در دمای اتاق در ۰/۸ میلی‌لیتر اسید استیک با چرخش ملایم حل شد تا محلول ۳ درصد یکنواختی ایجاد شود. در زمان مشابه، ۰/۵ گرم PVA [درجه هیدرولیز ۸۰ درصد، درجه پلیمریزاسیون ۲۵۰۰، (Sigma-Aldrich، آمریکا)] نیز در ۴/۲ میلی‌لیتر آب دی‌یونیزه به مدت ۴ ساعت در دمای ۸۰ درجه سانتی‌گراد تحت چرخش آهسته قرار گرفت تا محلول ۱۲ درصد و یکنواختی ایجاد شود. سپس محلول کیتوزان و PVA با درصدهای حجمی ۱۵/۸۵، ۲۵/۷۵ و ۳۰/۷۰ با هم مخلوط شدند. الکترورسی پس از حذف کامل حباب از محلول پلیمری، تحت اعمال ولتاژ ۲۰ کیلوولت و فاصله ۲۰ سانتی‌متر بین نوک سوزن و صفحه جمع‌کننده انجام شد. برای

این دستگاه به ۵۰ سلول باردار مجهز بوده و سرعت پیستون در ۵ میلی‌متر در هر ثانیه تنظیم شده بود. مقدار میانگین تنش و کرنش در لحظه پارگی با توجه به مقدار کنترل تعیین شد. با توجه به استاندارد (ASTM D882-02 (2002)، فیبرهای الکتروریسی شده در قطعات 4×60 میلی‌متر (طول \times عرض) تهیه شدند. میزان تنش و کرنش برای هر نمونه ۳ بار تکرار شده و مقدار میانگین آن محاسبه شد.

محیط کشت به مدت ۴ ساعت روی سطح کامپوزیت‌ها ریخته شدند. پس از این مدت، ۲ میلی‌لیتر محیط RPMI 1640 و ۱۰ درصد FBS به هریک از خانه‌های پلیت ۲۴ خانه‌ای افزوده شده و برای بررسی در روزهای ۱، ۳، ۷ و ۱۴ در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد و ۵ درصد CO_2 انکوبه شدند. در هریک از روزهای ذکر شده، سلول‌ها با استفاده از محلول ۲۵ درصد تریپسین/EDTA (Trypsin/ethylenediaminetetraacetic acid) (Sigma-Aldrich، آمریکا) در نمک بافری فسفات (Phosphate Buffered Saline: PBS) ($pH=7.4$) از کف پلیت جدا و سپس با محیط کشت شستشو داده شدند. پس از تهیه سوسپانسیون سلولی در ۰/۲ درصد محلول تریپان بلو (Trypan blue) (۱:۱، حجمی/حجمی)، تعداد سلول‌های زنده با استفاده از میکروسکوپ نوری (Zeiss، آلمان) محاسبه شد.

۲-۴-۳- بررسی غیرمستقیم زیست‌سازگاری نانوکامپوزیت‌های CS/PVA

میزان زیست‌پذیری سلول‌های کشت داده شده بر نانوکامپوزیت‌های CS/PVA با استفاده از نمک ۳- (۴ و ۵- دی‌متیل تریازول-۲-۷-۱-۲-۵- دی‌فنیل تترازولیم برماید: MTT) (3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide: MTT) (Sigma-Aldrich، آمریکا) بررسی شد. ابتدا مقدار 2×10^4 سلول U373 در پلیت ۹۶ خانه‌ای کاشته شده و در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد و ۵ درصد CO_2 به مدت ۲۴ ساعت انکوبه شدند. پس از این مدت، عصاره تهیه شده از داربست‌ها جایگزین محیط کشت موجود در خانه‌های پلیت شد. پس از ۲۴ ساعت انکوباسیون، عصاره داربست از خانه‌های پلیت خارج و محلول MTT به هریک از آن‌ها اضافه شد. پس از ۴ ساعت انکوباسیون در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد، محلول MTT خارج شده و محلول ایزوپروپانول به هریک از خانه‌ها افزود شد و پس از ۱۵ دقیقه انکوباسیون مجدد، با استفاده از میکروپلیت‌های الایزا (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay: ELISA) میزان جذب در ۵۷۰ نانومتر تعیین شد.

۲-۴-۵- بررسی ریخت‌شناسی سلول‌های کاشته شده روی نانوفیبرهای CS/PVA

ریخت‌شناسی سلول‌های کاشته شده روی نانوفیبرهای CS/PVA با استفاده از SEM بررسی شد. سلول‌های U373 با چگالی 2×10^4 روی سطح نانوکامپوزیت‌های موجود در پلیت ۲۴ خانه‌ای کاشته شدند. پلیت‌ها در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد و ۵ درصد CO_2 به مدت ۷ روز انکوبه شدند. پس از این زمان، نمونه‌ها در پارافرمالدئید ۴ درصد به مدت ۱۵ دقیقه تثبیت شده و در غلظت‌های مختلف اتانول (۵۰-۱۰۰ درصد حجمی/حجمی) آبزدایی شدند. سپس، نمونه‌ها برای خشک شدن در زیر هود قرار داده شده و بدین ترتیب برای مشاهده با SEM آماده شدند.

۲-۴-۶- آنالیز آماری

کلیه داده‌های کمی با استفاده از نرم‌افزار SPSS نسخه ۱۴ مورد ارزیابی آماری قرار گرفتند. آزمون آماری استفاده شده در این مطالعه، آزمون پارامتریک آنووا (ANOVA) بود. در ضمن سطح معنی‌داری در سطح $P < 0.05$ تعیین شد.

۲-۴-۴- بررسی میزان چسبندگی سلولی بر نانوکامپوزیت‌های CS/PVA

برای ارزیابی میزان چسبندگی سلولی، 2×10^4 سلول به ازای هر نمونه روی سطح کامپوزیت‌های CS/PVA کاشته شد. برای ایجاد چسبندگی اولیه، سلول‌ها به همراه میزان اندکی از

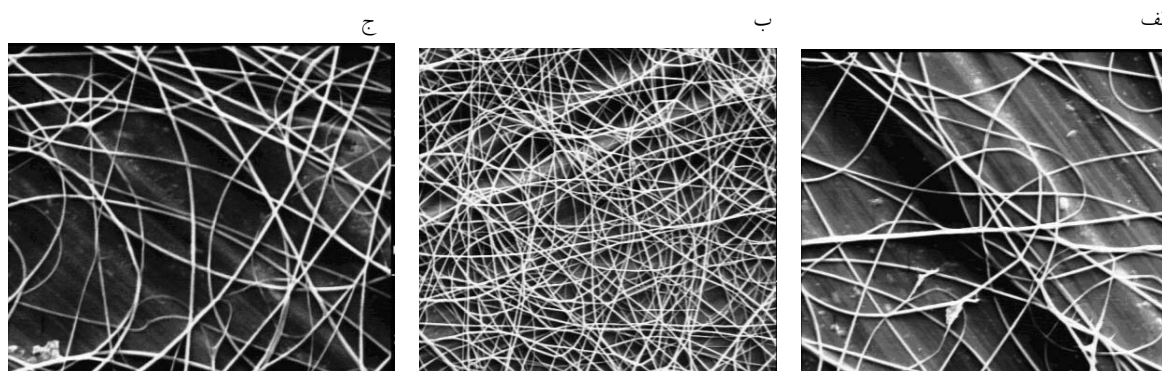
۳- نتایج

۳-۱- ارزیابی ریخت‌شناسی نانوکامپوزیت

CS/PVA

برای ارزیابی اتصال و رشد سلول‌ها بر سطح کامپوزیت، از سطوح نمونه‌ها به کمک SEM تصویربرداری می‌شود. نتایج حاصل از میکروسکوپ الکترونی بیانگر تشکیل ساختارهای پیوسته و یکنواخت در نانوکامپوزیت CS/PVA است که فاقد

دانه بوده و از قطر یکنواختی برخوردارند. این مسأله تأیید کننده این مطلب است که غلظت‌های انتخاب شده دارای چسبندگی (Viscosity) کافی بوده و زنجیرهای پلیمری درگیری خوبی با یکدیگر داشته‌اند که منجر به عدم تشکیل دانه در نانوفیبرها شده است (شکل ۱). با این وجود، میزان یکنواختی در نانوکامپوزیت CS/PVA با نسبت ۱۵/۸۵ به مراتب بیشتر از سایر داربست‌های CS/PVA است ولی هیچ‌گونه اختلاف معنی‌داری بین آن‌ها وجود ندارد.

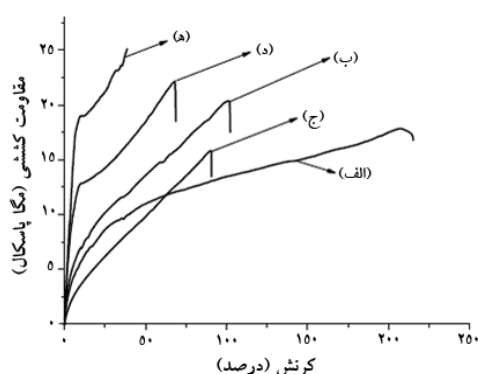


شکل ۱ تصاویر SEM از نانوفیبرهای الکترورسی شده CS/PVA؛ الف) نانوفیبر CS/PVA با نسبت ۳۰/۷۰، ب) نانوفیبر CS/PVA با نسبت ۲۵/۷۵، ج) نانوفیبر CS/PVA با نسبت ۱۵/۸۵. همان‌گونه که در تصاویر مشخص است، ساختارهایی پیوسته و یکنواخت از نانوکامپوزیت‌های CS/PVA ایجاد شده است که فاقد دانه بوده و از قطر یکنواختی برخوردارند. (بزرگنمایی: $\times 2000$).

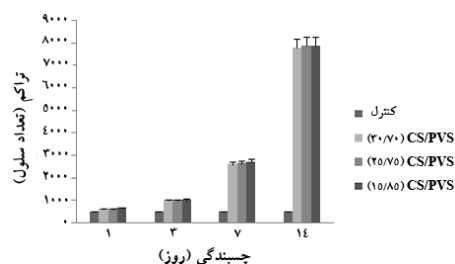
۳-۲- ارزیابی خصوصیات مکانیکی نانوکامپوزیت

CS/PVA

قابلیت تطبیق‌پذیری روش الکترورسی امکان بهینه‌سازی خواص داربست از جمله خصوصیات مکانیکی ساختار فیبری را فراهم می‌سازد. شکل ۲ نمایانگر قابلیت مکانیکی نانوفیبر CS/PVA است. برطبق نتایج کسب شده، مشخص شده است که میزان قدرت مکانیکی نانوفیبر CS/PVA از نظر مقداری مابین میزان قدرت مکانیکی هریک از فیبرهای تشکیل شده کیتوزان و PVA خالص طی روند الکترورسی است. همان‌گونه که در شکل مشخص است، میزان مقاومت مکانیکی نانوفیبر CS/PVA با نسبت ۱۵/۸۵ در مقایسه با سایر نسبت‌ها مطلوب‌تر است.



شکل ۲ خصوصیات مکانیکی نانوکامپوزیت CS/PVA؛ الف) PVA خالص، ب) CS/PVA با نسبت ۱۵/۸۵، ج) CS/PVA با نسبت ۲۵/۷۵، د) CS/PVA با نسبت ۳۰/۷۰، ه) CS خالص

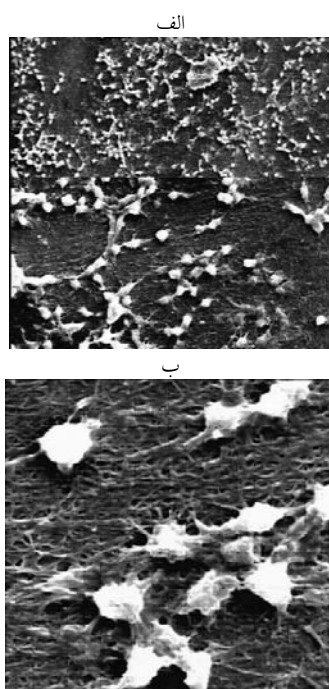


شکل ۴ چسبندگی سلول‌های U373 روی نانوکامپوزیت CS/PVA؛ بیشترین میزان تکثیر سلولی در روز ۱۴ حاصل شده است.

۳-۵- ارزیابی ریخت‌شناسی سلول‌های کاشته

شده روی نانوفیبر CS/PVA

شکل ۵ نمایانگر تصاویر SEM از سلول‌های U373 رشد یافته روی نانوفیبر CS/PVA است. شواهد موجود بیانگر آن است که سلول‌ها به‌خوبی در میان نانوفیبرها نفوذ کرده و شبکه سه‌بعدی مناسبی از سلول‌ها ایجاد شده است. شبکه سلولی ایجاد شده بیانگر حفظ خصوصیات ریخت‌شناختی سلول طی فرایند کاشت است.

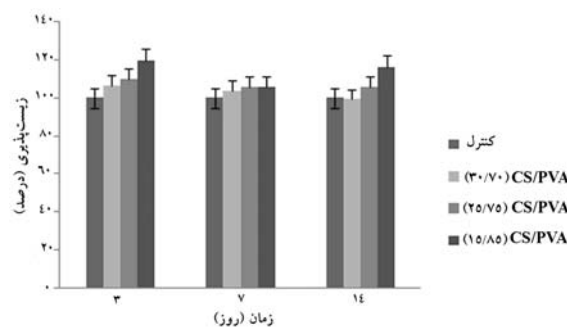


شکل ۵ تصاویر SEM از سلول‌های U373 رشد یافته روی نانوفیبر CS/PVA؛ سلول‌ها به‌خوبی در میان نانوفیبرها نفوذ کرده و شبکه سه‌بعدی مناسبی از سلول‌ها ایجاد شده است. (بزرگنمایی: $\times 2000$).

۳-۳- ارزیابی زیست‌سازگاری نانوفیبرهای

CS/PVA

نتایج به‌دست آمده نشانگر زیست‌سازگاری مناسب سلول‌ها در مجاورت عصاره داربست‌ها است. در مورد سلول‌های U373 بیشترین میزان تکثیر سلولی روی نانوکامپوزیت CS/PVA با نسبت ۱۵/۸۵ اتفاق افتاده است. تقریباً می‌توان گفت که با افزایش نسبت PVA به CS در داربست‌ها، میزان زیست‌پذیری سلولی هم افزایش پیدا کرده است. لازم به ذکر است که هیچ‌گونه تفاوت معنی‌داری ما بین داربست‌ها با نسبت‌های مختلف CS/PVA مشاهده نشده است (شکل ۳).



شکل ۳ زیست‌پذیری سلول‌های U373 روی نانوکامپوزیت CS/PVA؛ همان‌گونه که در شکل مشخص است، میزان زیست‌پذیری نانوکامپوزیت CS/PVA با نسبت ۱۵/۸۵ در مقایسه با سایر نانوکامپوزیت‌ها بیشتر است.

۳-۴- ارزیابی میزان چسبندگی سلولی بر نانو-

کامپوزیت‌های CS/PVA

نتایج مربوط به چسبندگی سلولی بر سطح داربست‌ها نشان داد که با افزایش زمان کشت، تکثیر سلولی افزایش پیدا کرده است؛ به‌طوری که بیشترین میزان تکثیر در روز ۱۴ و کمترین آن در روز ۱ اتفاق افتاده است. به‌طور کلی در این مطالعه، تکثیر سلولی روی داربست CS/PVA نسبت به گروه‌های کنترل بالاتر بوده است که این امر بیانگر مناسب بودن ساختار داربست تهیه شده برای اهداف مهندسی بافت است (شکل ۴).

۴- بحث

به‌طور معمول برای ترمیم آسیب وارده به اعصاب محیطی از فرایندهای بالینی مختلف استفاده می‌شود. با این وجود به دلیل محدودیت‌های موجود در روش ریزجراحی از جمله تشکیل زخم‌های گلیال و عدم فعالیت صحیح سلول‌های عصبی در محل پیوند، محققین بر آن شدند که از داربست‌های زیستی مناسب برای دستیابی به اهداف والاتر استفاده نمایند [۱۱]. داربست‌هایی در مهندسی بافت عصبی قابل استفاده هستند که قادر به پر کردن محل آسیب دیده باشند؛ ساختار مناسبی را پس از عمل پیوند ایجاد کرده و بدین سبب باعث کاهش پاسخ ایمنی در محل پیوند شوند [۱۲]. علت استفاده از داربست، ایجاد محیطی مناسب و مشابه ECM است که به سبب آن شرایط لازم برای ترمیم سلول‌های آسیب دیده فراهم می‌شود [۲]. در این مطالعه از میان طیف وسیع پلیمرهای قابل استفاده در مهندسی بافت عصبی، پلیمرهای کیتوزان و پلی‌وینیل الکل انتخاب شده‌اند [۱]. استفاده از ترکیب پلیمری دو ماده مذکور به علت تشکیل ساختار هیدروژلی (Hydrogel Structure) از اهمیت بی‌شماری برخوردار است و این به علت شباهت زیاد ساختار هیدروژل تشکیل شده به ترکیبات ECM و نرخ مناسب زیست‌تخریب‌پذیری آن است [۱۳، ۱۴]. لازم به ذکر است که استفاده از ترکیبات طبیعی ECM و مشتقات آن‌ها به‌عنوان داربست در مهندسی بافت مطلوب نیست. هدف از مهندسی بافت، تسریع ترمیم و تولید بافت در شرایط آزمایشگاهی است، در حالی که ایجاد بافت در حالت طبیعی به زمان بیشتری نیاز دارد [۲، ۱۵].

در گذشته تلاش‌های فراوانی برای ساخت فیبرهای کیتوزان به روش الکتروزیستی انجام گرفته است که جز در موارد اندکی موفقیت لازم حاصل نشده است. هانگ (Huang) و همکاران [۱۶] اولین گروهی بودند که توانستند نانوفیبرهای الکتروزیستی شده کیتوزان را از محلول اسید استیک تهیه نمایند. یکی از شرایط ضروری در به‌وجود آمدن فرایند الکتروزیستی، داشتن محلولی با وزن مولکولی و چسبندگی مناسب است. در

طول فرایند الکتروزیستی که جریان پلیمری خارج شده از نوک سوزن، تحت کشش ناشی از دافعه بین بارها قرار می‌گیرد، درگیری زنجیرهای مولکولی از پارگی جریان الکتروزیستی کشت دیده جلوگیری کرده و جریان پلیمری را به‌صورت پیوسته نگه می‌دارد؛ در نتیجه محلول‌های پلیمری قابلیت تشکیل فیبر در فرایند الکتروزیستی را ندارند. با افزایش غلظت محلول می‌توان میزان چسبندگی محلول را افزایش داد. در این حالت، در اثر بیشتر شدن درگیری زنجیرهای پلیمری میزان چسبندگی افزایش می‌یابد [۶، ۷]. کوه (Koh) و همکارانش [۸] نشان دادند که درگیری زنجیرهای پلیمری در به‌وجود آمدن دانه در نانوفیبرها یا پارگی جریان الکتروزیستی و تبدیل آن به قطرات کوچک اثر مهمی دارد. هرچند که داشتن چسبندگی مناسب برای فرایند الکتروزیستی ضروری است اما افزایش آن به مقدار خیلی زیاد، باعث مشکل شدن پمپاژ محلول از سوزن الکتروزیستی خواهد شد و ممکن است محلول قبل از شروع الکتروزیستی، در نوک سوزن خشک شود [۶]. برای ساخت نانوفیبرهای کیتوزان با استفاده از روش الکتروزیستی، می‌بایست به‌نحوی از ایجاد باندهای هیدروژنی جلوگیری کرد. یکی از موانع اصلی عدم تشکیل نانوفیبرهای کیتوزان در روند الکتروزیستی، ایجاد باندهای هیدروژنی است [۱۴] که می‌توان این امر را با افزایش محلول پلیمری ۱۲ درصد PVA به محلول ۳ درصد کیتوزان تعدیل کرد. PVA دارای خصوصیات آب‌دوستی مناسب بوده و قابلیت بالایی در تشکیل فیبر دارد. قابل ذکر است که برخی از پارامترهای تشکیل نانوفیبر CS/PVA از جمله وزن مولکولی کیتوزان و روند آمیختگی محلول‌های پلیمری کیتوزان و PVA بر میزان قدرت مکانیکی داربست‌ها تأثیرگذار است. وزن مولکولی پلیمر معرف طول زنجیرهای پلیمری بوده و با توجه به این‌که طول زنجیرها میزان درگیری زنجیرها در حلال را تعیین می‌کند، افزایش وزن مولکولی کیتوزان باعث افزایش چسبندگی شده و بدین ترتیب میزان پراکنش محلول پلیمری CS/PVA طی روند الکتروزیستی یکنواخت می‌شود [۱۷]. در این حالت، میزان استحکام مکانیکی فیبرهای CS/PVA حاصل شده بیشتر خواهد بود.

داربست‌های به‌کار گرفته شده علاوه بر داشتن ابعادی در حد نانومتر، بدون انجام فرایند اتصال عرضی، قادرند چسبیدن و رشد سلولی را تحریک نمایند که دستیابی به آن تا به امروز حاصل نشده بود. علت اتصال عرضی پلیمرها در ساختار داربست، ایجاد ساختاری یکنواخت است؛ این در حالی است که در مطالعه حاضر، همان‌گونه که در تصاویر SEM مشخص است، بدون اتصال عرضی پلیمرهای موجود در ساختار نانوکامپوزیت ساختاری یکنواخت و مناسب برای رشد و چسبندگی سلولی فراهم شده و عوارض ناشی از سمیت گلو تار آلذئید برای رشد سلولی تعدیل می‌شود.

با توجه به این‌که مهم‌ترین ضعف مواد زیستی که در حال حاضر برای ترمیم بافت عصبی به‌کار می‌روند، استحکام پایین و قابلیت هدایت ضعیف آن‌ها است [۱]، به‌نظر می‌رسد که به‌کارگیری ساختارهای نانوکامپوزیتی CS/PVA با توجه به نوع و شرایط بافت‌های عصبی، ضمن تأمین استحکام مکانیکی لازم، امکان رشد سلول‌های عصبی به فضای درونی ماده زیستی و جایگزینی آن‌ها در طول زمان و به‌صورت کنترل شده به‌نحوی که سرعت جذب ماده زیستی با سرعت ترمیم و التیام بافت متناسب باشد را فراهم نموده و زیست‌سازگاری مناسب آن منجر به تکثیر و چسبندگی سلول‌های U373 روی نانوکامپوزیت شده است. بدین ترتیب، امکان استفاده از نانوکامپوزیت CS/PVA به‌عنوان داربست در مهندسی بافت عصبی فراهم می‌شود. علاوه بر این، می‌توان با جایگزین کردن استفاده از داربست‌های پلیمری در ترمیم آسیب وارده به اعصاب محیطی، محدودیت‌های موجود در روش‌های بالینی را تعدیل کرد.

۵- تشکر و قدردانی

این تحقیق با حمایت مالی بانک سلولی ایران و پارک علم و فناوری گیلان انجام گرفته است. نویسندگان لازم می‌دانند که از حمایت مالی این مراکز تشکر و قدردانی نمایند. بدین‌وسیله از مساعدت‌های جناب آقای دکتر امان‌زاده و آقای رادفر و کلیه پرسنل بانک سلولی ایران سپاسگزاری می‌شود.

اندازه‌گیری و سنجش قابلیت حیات و رشد سلول‌ها در بسیاری از تحقیقات یک معیار بسیار ارزشمند به‌حساب می‌آید. استفاده از نمک‌های تترازولیوم روش مطمئن، بی‌خطر و دقیقی مبتنی بر عناصر رادیواکتیو به‌حساب می‌آید. نمک زرد رنگ، تترازولیوم (MTT) به‌وسیله سلول‌های زنده جذب شده و کریستال‌های بنفش رنگ نامحلول فرمازان (Formazan) تشکیل می‌گردند که با افزودن یک شوینده حل می‌شوند. این رنگ با روش‌های اسپکتروفتومتری قابل سنجش و اندازه‌گیری است. برای هر نوع سلول، یک رابطه خطی میان تعداد سلول‌ها و میزان جذب اندازه‌گیری شده وجود دارد که این رابطه امکان تعیین دقیق هرگونه تغییرات در میزان تکثیر سلول‌ها را فراهم می‌سازد [۱۸]. به‌طور کلی نتایج آزمون MTT نشان داد که با افزایش درصد PVA به ۸۵ درصد در داربست‌ها، میزان زیست‌سازگاری آن‌ها و در نتیجه میزان تکثیر سلولی به دلیل مطلوبیت ساختار داربست افزایش پیدا می‌کند. طبق نتایج حاصل از آنالیز آماری، میزان رشد و تکثیر در مورد نمونه‌هایی که دارای $P \text{ value} < 0/05$ باشند با اهمیت تلقی می‌شود که در مورد نانوکامپوزیت CS/PVA کلیه داده‌ها دارای مقادیر معنی‌داری نسبت به گروه کنترل بودند. بنابراین می‌توان نتیجه گرفت که نانوکامپوزیت CS/PVA از زیست‌سازگاری مطلوبی برای رشد سلول‌های عصبی U373 برخوردار است.

نتایج به‌دست آمده در مورد توانایی چسبیدن سلول‌ها بر روی داربست‌ها، نشان داد که تمامی سلول‌های مورد استفاده در این مطالعه، توانایی اتصال و در پی آن تکثیر سلولی را روی داربست CS/PVA دارند. به‌عبارت دیگر، این نانوکامپوزیت‌ها توانستند شرایط فیزیکی و شیمیایی مناسبی را برای چسبیدن سلول‌ها فراهم آورند. مطالعه‌ای که توسط نیمنمارک (Neammark) و همکاران [۱۹] صورت گرفت، نشان داد که نانوکامپوزیت H-Chitosan، چسبیدن سلول‌ها را بهبود می‌بخشد. همچنین کاستاجونیور (Costa-Junior) و همکاران در مطالعه دیگری نشان دادند که نانوکامپوزیت‌های CS/PVA دارای اتصال عرضی با گلو تار آلذئید دارای وضعیت مناسبی برای چسبیدن و رشد سلولی هستند [۱۴]. در مطالعه حاضر نیز

۶- منابع

- [1] Willerth SM, Sakiyama-Elbert SE. Approaches to neural tissue engineering using scaffolds for drug delivery. *Adv Drug Deliv Rev* 2007; 59(4-5): 325-38.
- [2] Khademhosseini A, Langer R, Borenstein J, Vacanti JP. Microscale technologies for tissue engineering and biology. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2006; 103(8): 2480-7.
- [3] Ma PX. Biomimetic materials for tissue engineering. *Adv Drug Deliv Rev* 2008; 60(2): 184-98.
- [4] Ignatova M, Starbova K, Markova N, Manolova N, Rashkov I. Electrospun nanofibre mats with antibacterial properties from quaternised chitosan and poly(vinyl alcohol). *Carbohydr Res* 2006; 341(12): 2098-107.
- [5] Duan B, Wu L, Li X, Yuan X, Li X, Zhang Y, Yao K. Degradation of electrospun PLGA-chitosan/PVA membranes and their cytocompatibility in vitro. *J Biomater Sci Polym Ed* 2007; 18(1): 95-115.
- [6] Sill TJ, von Recum HA. Electrospinning: applications in drug delivery and tissue engineering. *Biomaterials* 2008; 29(13): 1989-2006.
- [7] Agarwal S, Wendroff J, Greiner A. Use of electrospinning technique for biomedical applications. *J Polymer* 2008; 49(3): 5603-21.
- [8] Koh HS, Yong T, Chan CK, Ramakrishna S. Enhancement of neurite outgrowth using nanostructured scaffolds coupled with laminin. *Biomaterials* 2008; 29(26): 3574-82.
- [9] Oh SH, Kim JH, Song KS, Jeon BH, Yoon JH, Seo TB, Namgung U, Lee IW, Lee JH. Peripheral nerve regeneration within an asymmetrically porous PLGA/Pluronic F127 nerve guide conduit. *Biomaterials* 2008; 29(11): 1601-9.
- [10] Chew SY, Mi R, Hoke A, Leong KW. Aligned Protein-Polymer Composite Fibers Enhance Nerve Regeneration: A Potential Tissue-Engineering Platform. *Adv Funct Mater* 2007; 17(8): 1288-96.
- [11] Uebersax L, Mattotti M, Papaloizos M, Merkle HP, Gander B, Meinel L. Silk fibroin matrices for the controlled release of nerve growth factor (NGF). *Biomaterials* 2007; 28(30): 4449-60.
- [12] Pfister LA, Alther E, Papaloizos M, Merkle HP, Gander B. Controlled nerve growth factor release from multi-ply alginate/chitosan-based nerve conduits. *Eur J Pharm Biopharm* 2008; 69(2): 563-72.
- [13] Drury JL, Mooney DJ. Hydrogels for tissue engineering: scaffold design variables and applications. *Biomaterials* 2003; 24(24): 4337-51.
- [14] Costa-Junior E, Barbosa-Stacioli E, Mansur A, Vasconcelos W, Mansur H. Preparation and characterization of chitosan/poly (vinyl alcohol) chemically crosslinked blends for biomedical application. *Carbohydr Polymer* 2008; 65(3): 243-56.
- [15] Harrison BS, Atala A. Carbon nanotube applications for tissue engineering. *Biomaterials* 2007; 28(2): 344-53.
- [16] Huang XJ, Ge D, Xu ZK. Preparation and characterization of stable chitosan nanofibrous membrane for lipase immobilization. *Eurpolymj* 2007; 43(9): 3710-8.

- [17] Chuachamsai A, Lertviriyasawat S, Danwanichakul P. Spinnability and defect formation of chitosan/poly vinyl alcohol electrospun nanofibers. *Thammasat Int J Sci Tech* 2008; 13: 24-9.
- [18] Bose S, Darsell J, Kintner M, Hosick H, Bandyopadhyay A. Pore size and pore volume effects on alumina and TCP ceramic scaffolds. *Mater Sci Eng C* 2003; 23(4): 479-86.
- [19] Neamnark A, Sanchavanakit N, Pavasant P, Rujiravanit R, Supaphol P. In vitro biocompatibility of electrospun hexanoyl chitosan fibrous scaffolds towards human keratinocytes and fibroblasts. *Eur Polym J* 2008; 44(2): 2060-7.