مجله علوم پزشکی مدرس: آسیب‌شناسی زیستی
دوره ۱۲، شماره ٤: از ۵۹-٦۹
زمستان ۱۳۸۸

ساخت نانوکامپوزیت کیتوزان/پلی‌وینیل الکل- نانولوله‌های کربنی برای ترمیم بافت عصبی

فاطمه متقی‌طلب[۱]، وحید متقی‌طلب[۲]، مهدی فرخی[۳]، نسیم امیرعلیان[٤]، علی اسلامی‌فر[۵]، محمدعلی شکرگزار[٦*]

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- کارشناس ارشد، پارک علم و فناوری گیلان، رشت، ایران
۵- استادیار، گروه تحقیقات بالینی، انستیتو پاستور ایران، تهران، ایران
۶- دانشیار، بخش بانک سلولی ایران، انستیتو پاستور ایران، تهران، ایران

دریافت مقاله: ۸۸/۰۹/۲۵ پذیرش مقاله: ۸۸/۱۰/۱۶

چکیده

هدف: امروزه با پیشرفت‌های فراوانی که در زمینه مهندسی بافت عصبی حاصل شده است، لزوم به‌کارگیری روش‌های نوین برای ساخت و به‌کارگیری موادی با ساختارهای ترکیبی می‌تواند گامی مهم در راستای ترمیم ضایعات سیستم عصبی به‌شمار آید. در این مطالعه، نانوکامپوزیت‌های کیتوزان/پلی‌وینیل الکل- نانولوله‌های کربنی به‌عنوان داربست انتخاب شد.

مواد و روش‌ها: برای تولید داربست‌های کیتوزان/پلی‌وینیل الکل- نانولوله‌های کربنی با ساختار و ریخت‌شناسی مناسب از روش الکتروریسی استفاده شد. از طیف‌سنجی رامان و میکروسکوپ الکترونی روبشی برای تعیین ساختار شیمیایی و فیزیکی داربست‌های الکتروریسی شده استفاده شد. سپس میزان زیست‌سازگاری داربست‌ها توسط آزمون‌های زیستی MTT و قرمز خنثی بررسی شد.

نتایج: نتایج کسب شده بیانگر آن است که نانوکامپوزیت‌های کیتوزان/پلی‌وینیل الکل- نانولوله‌های کربنی دارای خصوصیات ساختاری و ریختی مناسب برای رشد سلول‌های طبیعی مشتق از مغز انسان است. به دلیل زیست‌سازگاری مناسب داربست، سلول‌ها قادرند با حفظ ساختار طبیعی خود به‌خوبی روی داربست رشد کرده و از شرایط مطلوبی برخوردار باشند.

نتیجه‌گیری: نانوکامپوزیت‌های کیتوزان/پلی‌وینیل الکل- نانولوله‌های کربنی به دلیل زیست‌سازگاری و خواص ساختاری مناسب، امکان رشد سلول‌های عصبی طبیعی مشتق از مغز انسان را فراهم می‌کند.

کلیدواژگان: مهندسی بافت عصبی، کیتوزان، پلی‌وینیل الکل، نانولوله‌های کربنی، الکتروریسی

۱- مقدمه

امروزه از داربست‌های قابل کشت در درمان بسیاری از بیماری‌های مرتبط با سیستم عصبی مرکزی (Central Nervous System: CNS) از جمله پارکینسون (Parkinson's disease)، آلزایمر (Alzheimer's disease) و آسیب‌های وارده به مغز (Traumatic Brain Injury: TBI) استفاده می‌شود [۱]. درمان رایجی که برای این‌گونه از

*نشانی مکاتبه: تهران، انستیتو پاستور ایران، بخش بانک سلولی ایران، کدپستی: ۱۳۱٦۹٤۳۵۵۱
Email: mshokrgozar@pasteur.ac.ir

بیماری‌ها وجود دارد، استفاده از بافت‌های سالم اطراف بافت آسیب دیده برای ترمیم است [۲، ۳]؛ ولی به دلیل عوارض ناشی از این‌گونه روش‌ها از جمله شیوع بیماری در اثر عفونت‌های پس از اعمال جراحی، محققان مختلف درصدد استفاده از علم میان‌رشته‌ای مهندسی بافت عصبی برای تولید جایگزین‌های زیستی مناسب برآمدند. با وجود پیشرفت‌های فراوانی که در زمینه تولید داربست‌های زیست‌سازگار برای تکثیر انواع سلول‌های موجود در بافت‌های مختلف حاصل شده است، ساخت داربستی که قادر باشد کلیه شرایط ماتریکس خارج سلولی (Extracellular matrix: ECM) طبیعی را در CNS به‌طور مصنوعی ایجاد کند، هنوز با مشکلات بی‌شماری روبه‌روست. امروزه از نانومواد مختلف با خواص مکانیکی و فیزیکی متفاوت برای ساخت داربست استفاده می‌شود. نانومواد ساختارهایی با اندازه ۱ تا ۱۰۰ نانومتر است [٤، ٥]؛ در صورت طرح‌ریزی مناسب قادر است خصوصیات فیزیکی و شیمیایی منحصر به فردی را ارایه دهد که به سبب آن می‌توان از آن به‌عنوان تکنولوژی پیشگام در طیف وسیعی از مصارف زیست‌پزشکی بهره گرفت [۲]. داربست‌های متشکل از نانومواد مختلف قادر است شرایطی را همچون ECM از حیث ساختار، ترکیب شیمیایی و خصوصیات مکانیکی برای رشد سلول فراهم آورد [٦، ۷]. بنابراین، می‌بایست از روشی مناسب برای مهندسی بهینه این مواد استفاده نمود. تاکنون از روش‌های متعددی همچون الکتروریسی (Electrospinning)، خودتجمعی (Self-assembly) و جداسازی فازی (Phase separation) با درجات موفقیّت مختلف برای طرح‌ریزی نانوفیبرها استفاده شده است [٤، ۸، ۹]. با این وجود، الکتروریسی یکی از مؤثرترین روش‌ها در این راستا است. اصول کار در فرآیند الکتروریسی بدین گونه است که با قرار دادن یک الکترود در محلول پلیمری و قرار دادن الکترود دیگر در صفحهٔ 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 به‌وسیلهٔ میدان الکتریکی صورت می‌پذیرد. جریان خارج شده به علت وجود نیروهای دافعه بین بارهای موجود در جریان پلیمری دچار ناپایداری خمشی شده و درازتر و نازک‌تر می‌شود و به اندازه نانومتر می‌رسد؛ سپس روی یک وسیلهٔ جمع‌کننده قرار گرفته و به حالت جامد در می‌آید. کامپوزیت نانومواد حداقل متشکل از دو بخش مجزا است که دارای خصوصیاتی برتر از هر یک از اجزای تشکیل دهنده است [۱۰، ۱۱]. در این مطالعه، ترکیب پلیمری کیتوزان/پلی‌وینیل الکل به‌عنوان داربست انتخاب شده است. کیتوزان (مشتق داستیله شده کیتین) پلی‌ساکاریدی با بار خالص منفی است که دارای گروه‌های عاملی هیدروکسیل و آمین بوده که در آن واحدهای تکراری D- گلوکز آمین توسط پیوندهای β- ۱ و ٤ با هم مرتبط است. کیتوزان ترکیبی غیرسمی، زیست‌تخریب‌پذیر و ضدّ باکتری است. با این وجود، به دلیل قدرت مکانیکی و الاستیسیته (Elasticity) اندک، استفاده از آن در مصارف زیست‌پزشکی و مهندسی بافت محدود می‌شود [۱، ۷]. بدین سبب محققان درصدد استفاده از ترکیب کیتوزان و یک پلیمر سنتتیک برای ساخت نانوفیبرهایی با خواص بهینه برآمدند. در این مطالعه، از پلی‌وینیل الکل (Polyvinyl alcohol: PVA) به علت سمی و سرطان‌زا نبودن و خواص زیستی مناسب در ترکیب با کیتوزان استفاده شده است. ساختارهای نانوفیبری کیتوزان پلی‌وینیل الکل (Chitosan/PVA: CS/PVA) به دلیل خواص مکانیکی مناسب و زیست‌سازگاری مطلوب، ترکیباتی مناسب برای تولید نانوکامپوزیت محسوب می‌شود [۷، ۹]. تا به امروز از ترکیب پلیمری CS/PVA با اتصالات متقاطع (Crosslinking) در تحقیقات مختلفی از جمله بررسی میزان تکثیر سلول‌های فیبروبلاستی کبدی میمون (VERO) [۱۲]، سلول‌های

فیبروبلاستی (PC12) [۷]، ترمیم زخم و پوست [۱۳، ۱٤] استفاده شده است. با این وجود، در مهندسی بافت عصبی به داربست‌هایی نیاز است که با وجود داشتن ساختار فیزیکی و شیمیایی مناسب، از پایداری مطلوب نیز برخوردار باشد. به همین دلیل در این مطالعه از نانولوله‌های کربنی تک جداره (Single-walled carbon nanotube: SWNT) به دلیل خواص منحصر به فرد آن‌ها، برای تقویت پایداری نانوکامپوزیت‌های مذکور استفاده شده است. SWNT یکی از مناسب‌ترین ترکیبات برای تولید کامپوزیت‌های ترکیبی است. SWNT دارای خصوصیات مکانیکی و نسبت سطح به حجم بالا است [۱۵-۱۷]. SWNT پلیمرهای کربنی خالص است که در آن‌ها اتم‌های کربن توسط پیوندهای لاتیک (Lattic) با سه کربن مجاور خود اتصال کووالان برقرار کرده است که بدین سبب قادر است پایداری و قدرت مکانیکی داربست را با حفظ انعطاف‌پذیری افزایش دهد [۸، ۱۸، ۱۹]. لازم به ذکر است که در مطالعات مختلفی، از خواص منحصر به فرد SWNT برای ردیابی سلولی و نشان‌دار کردن آن‌ها [۱۵]، تولید ردیاب‌های نوری [۲۰]، تولید ترکیبات تباینی MRI (Magnetic Rsonance Imaging) استفاده شده است [۲۱-۲۳]. همچنین در تحقیقات بی‌شماری نیز استفاده ازنانوفیبرهای PVA/SWNT برای ساخت حس‌گرهایی با قابلیت الکتریکی و حرارتی بهینه گزارش شده است [۲٤، ۲۵]. در این مطالعه، گزینش نانوفیبر CS/PVA-SWNT به‌عنوان داربست برای تکثیر سلول‌های عصبی بر مبنای بهره‌گیری از زیست‌سازگاری مطلوب ترکیب CS/PVA و پایداری مولکولی و شیمیایی SWNT است. قابل توجه است که تا به امروز از نانوفیبرهای الکتروریسی شده CS/PVA-SWNT در مصارف مختلف مهندسی بافت استفاده نشده است. بدین سبب در این تحقیق، خواص ساختاری، ریختی و میزان زیست‌سازگاری نانوکامپوزیت CS/PVA-SWNT برای رشد و تکثیر سلول‌های عصبی طبیعی مشتق از مغز انسان بررسی شده است.

۲- مواد و روش‌ها

۲-۱- ساخت غشای نانوفیبری CS/PVA-SWNT با استفاده از روش الکتروریسی

برای ساخت داربست‌های نانوفیبری CS/PVA-SWNT طی روند الکتروریسی، ۰/۰٦ گرم کیتوزان (پودر، وزن مولکولی متوسط، درجه استیلاسیون ۸۰ درصد، (Sigma-Aldrich)، آمریکا) را در ۲ میلی‌لیتر اسید استیک ۳ درصد به‌مدت ۲ ساعت در دمای اتاق حل کرده تا محلول ۲ درصد و یکنواخت کیتوزان ایجاد شود. سپس ۰/۰۰۳ گرم SWNT (Sigma-Aldrich، آمریکا) به محلول کیتوزان افزوده شد و به‌مدت ۲ تا ۵ دقیقه تحت سونیکاسیون (Sonication) با درجه فزون‌سازی ۲۵ هرتز و دمای اتاق قرار گرفت تا ذرات چسبنده و معلق SWNT با نسبت‌های ۷ درصد، ۱۰ درصد، ۱۲ درصد ایجاد شود. علت استفاده از SWNT با درصدهای ذکر شده به دلیل قابلیت الکتروریسی پلیمرها است. در زمان مشابه، ۱/۲ گرم PVA (درجه هیدرولیز ۸۰ درصد، درجه پلیمریزاسیون ۲۵۰۰، (Sigma-Aldrich)، آمریکا) در ۲۰ میلی‌لیتر آب دی‌یونیزه به‌مدت ۲ ساعت در دمای ۸۰ درجه سانتی‌گراد تحت چرخش آهسته قرار گرفت تا محلول ۱۲ درصد آن تولید شود. سپس محلول کیتوزان ترکیب شده با SWNT با ۵ میلی‌لیتر ازمحلول PVA با نسبت ۲۵/۷۵ مخلوط شد. پس از حذف کامل حباب‌ها از محلول پلیمری، الکتروریسی در شرایط سرعت ۱۰ میلی‌لیتر/ساعت، ولتاژ ۲٤ ولت و فاصله ۱۰ سانتی‌متر از نوک سوزن تا صفحه جمع‌کننده اعمال شد.

۲-۲- عصاره‌گیری از داربست‌های الکتروریسی شده

از داربست‌های CS/PVA-SWNT طبق استاندارد ISO 10993-5 [۲٦] عصاره تهیه شد تا برای بررسی

غیرمستقیم زیست‌سازگاری داربست از آن‌ها استفاده شود. برای این منظور، داربست‌ها در اندازه‌هایی با سطح مقطع ۱ سانتی‌متر مربع در ۱ میلی‌لیتر از محیط کشت RPMI-1640، غوطه‌ور و برای بررسی میزان زیست‌پذیری سلول‌ها در روزهای ۳، ۷ و ۱٤ در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد و ۵ درصد CO_2 انکوبه شد.

۲-۳- جداسازی و کشت سلول‌های عصبی طبیعی مشتق از مغز انسان

پژوهش حاضر به تأیید کمیته اخلاق پزشکی انستیتو پاستور رسید. قطعاتی از کورتکس مغز طبیعی انسان ضمن رعایت اصول اخلاق پزشکی توسط پزشک متخصص با جراحی بیمار مبتلا به تومور مغزی تهیه شد. کلیه بافت‌ها مشتق از لوب پیشانی بود. بافت مربوط به قطعات ۰/۵ میلی‌متری تقسیم شد و پس از ۵ بار شستشو با محلول نمک بافری فسفاته (Phosphate Buffered Saline: PBS) در محیط کشت DMEM (Sigma-Aldrich، آمریکا) حاوی ۱۰ درصد سرم گاوی جنینی (Fatal Bovine Serum: FBS)، ۱۰۰ واحد/میلی‌لیتر پنی‌سیلین (Penicillin) (GIBCO)، ۱۰۰ میکروگرم/میلی‌لیتر استرپتومایسین (Streptomycin) (GIBCO)، ۵ میکروگرم/میلی‌لیتر L- گلوتامین (Sigma-Aldrich، آمریکا) و ۱۰ نانوگرم/میلی‌لیتر فاکتور رشد فیبروبلاستی (Fibroblast Growth Factor: bFGF) (Sigma-Aldrich، آمریکا) تیمار و در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد و ۵ درصد CO_2 انکوبه شد. پس از حدود دو هفته سلول‌ها از بافت‌های تهیه شده خارج و پس از ٤ تا ۵ بار پاساژ دادن، استفاده شد.

۲-٤- تعیین خصوصیات

۲-٤-۱- بررسی ریخت‌شناسی نانوکامپوزیت CS/PVA-SWNT

ریخت‌شناسی نانوفیبرهای حاصل از روند الکتروریسی با استفاده از میکروسکوپ الکترونی روبشی (Scanning Electron Microscopy: SEM) (Zeiss، آلمان) تعیین شد. میکروسکوپ به طیف‌سنج تفرقی انرژی (Dispersive Energy Spectrometer: DES) متصل بود. ابتدا ورقه فلزی که نانوالیاف روی آن جمع‌آوری شده بود، به قطعات ۱×۱ سانتی‌متر برش داده شد و قبل از بررسی توسط میکروسکوپ، با لایه‌ای از طلا پوشانده شد. عکس‌ها در ولتاژ ۲۰ کیلوولت تهیه شد.

۲-٤-۲- بررسی ساختار مولکولی نانوکامپوزیت CS/PVA-SWNT

ساختار مولکولی نانوکامپوزیت CS/PVA-SWNT را می‌توان با استفاده از طیف‌سنجی رامان (Raman spectroscopy) با تغییر طول موج ایجاد شده از ارتعاشات مولکولی تعیین کرد [۲۷]. بدین سبب امکان ثبت تغییرات ساختاری ماکرومولکول‌ها با حفظ ماهیت طبیعی مولکول هدف فراهم می‌شود. طیف‌های رامان توسط دستگاه طیف‌سنج Almega Thermo Nicolet Dispersive با وضوح ٤ (متر$^{-1}$) در هر سانتی‌متر تهیه شد. در منبع لیزر از لیزر Nd:YLF هم‌ساز ثانویه ۵۳۲ نانومتری استفاده شد تا از ایجاد پیام‌های فلورسانس اضافی در طیف رامان جلوگیری شود.

۲-٤-۳- بررسی غیرمستقیم زیست‌سازگاری نانوکامپوزیت CS/PVA-SWNT

۲-٤-۳-۱- سنجش MTT

در این مطالعه، میزان زیست‌پذیری سلول‌ها به‌صورت غیرمستقیم بررسی شد. در این روش، از نمک MTT (3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide) (Sigma-Aldrich، آمریکا) به‌عنوان سوبسترا استفاده شده است [۷، ۹، ۱۲]. ابتدا $۱×۱۰^{٤}$ سلول عصبی طبیعی مشتق از مغز انسان در پلیت ۹٦ خانه‌ای در محیط کشت DMEM

کشت داده شد. پس از ۲٤ ساعت انکوباسیون، محیط کشت سلول با عصاره‌های روزهای ۳، ۷ و ۱٤ نانوکامپوزیت CS/PVA-SWNT جایگزین شد. پس از ۲٤ ساعت انکوباسیون مجدد، عصاره‌های داربست خارج و نمک MTT به سلول‌ها افزوده شد. پس از ٤ ساعت انکوباسیون در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد، محلول MTT خارج و محلول ایزوپروپانول به هریک از چاهک‌های پلیت اضافه شد. پس از ۱۵ دقیقه انکوباسیون مجدد، میزان جذب با استفاده از میکروپلیت‌های الایزا (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay: ELIZA) در ۵۷۰ نانومتر تعیین شد. لازم به ذکر است که چاهک‌های پلیت ۹٦ خانه‌ای بدون عصاره نانوکامپوزیت (Thermoplastic starch: TPS) به‌عنوان کنترل در نظر گرفته شد. همچنین از نانوفیبرهای CS/PVA نیز به‌عنوان نمونه کنترل داربست استفاده شد.

۲-٤-۳-۲- سنجش قرمز خنثی (Neutral red)

کلیه مراحل در این روش مشابه سنجش MTT است با این تفاوت که در مرحله سوم به جای نمک MTT از محلول قرمز خنثی استفاده می‌شود [۲٦]. پس از ٤ ساعت انکوباسیون سلول‌ها در این محلول، محلول عصاره‌گیری با ترکیب اسید استیک گلاسیال ۱ درصد، اتانول ۵۰ درصد، آب دی‌یونیزه ٤۹ درصد جایگزین محلول قرمز خنثی شد. پس از ۱۵ دقیقه انکوباسیون مجدد در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد، میزان جذب در ۵۷۰ نانومتر تعیین شد. در این سنجش نیز چاهک‌های پلیت ۹٦ خانه‌ای بدون عصاره نانوکامپوزیت (TPS) به‌عنوان کنترل در نظر گرفته شد. همچنین از نانوفیبرهای CS/PVA نیز به‌عنوان نمونه کنترل داربست استفاده شد.

۲-٤-٤- بررسی ریخت‌شناسی سلول‌های کاشته شده روی نانوکامپوزیت CS/PVA-SWNT

برای بررسی ریخت‌شناسی سلول‌های کاشته شده روی نانوکامپوزیت CS/PVA-SWNT از SEM استفاده شد. ابتدا ۵×۱۰^{٤} سلول عصبی طبیعی مشتق از مغز انسان در محیط DMEM حاوی ۱۰ درصد FBS و ۱۰ نانوگرم/میلی‌لیتر bFGF کشت شد. پس از ۷ روز انکوباسیون سلول‌ها در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد و ۵ درصد CO_2، محیط کشت سلول‌ها خارج شد و سلول‌ها به‌مدت ۱۵ دقیقه در پارافرمالدئید ٤ درصد قرار گرفت. سپس نمونه‌ها برای خشک شدن زیر هود قرار گرفته و برای مشاهده با SEM آماده شد.

۲-۵- آنالیز آماری

کلیه داده‌های کمی با استفاده از نرم‌افزار SPSS نسخه ۱٤ ارزیابی آماری شد. آزمون آماری مورد استفاده در این مطالعه آزمون آنووا (ANOVA) بود و $P<۰/۰۵$ به‌عنوان سطح معنی‌داری تعیین شد. علت استفاده از این آزمون آماری توانایی این روش در مقایسه سه متغیر به‌طور هم‌زمان است.

۳- نتایج

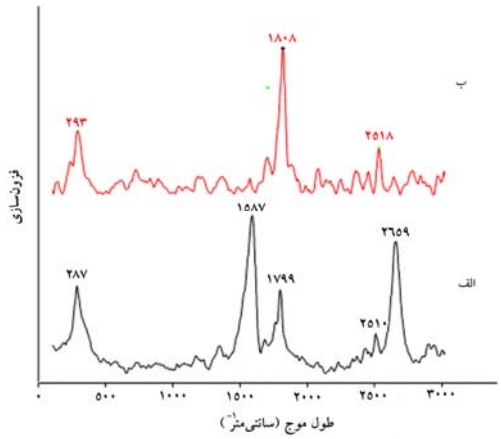
۳-۱- ارزیابی ریخت‌شناسی نانوکامپوزیت CS/PVA-SWNT

شکل ۱ نمایانگر تصاویر SEM نانوکامپوزیت CS/PVA با مقادیر مختلف SWNT است. تصاویر نشانگر ساختارهای ریختی مشابه در نمونه‌های CS/PVA با نسبت‌های پلیمری و اتصالات عرضی مدور مختلف است. هر چقدر که محتوای SWNT در نانوکامپوزیت CS/PVA افزایش می‌یابد، میزان درگیری و اتصالات عرضی بین پلیمرهای تشکیل دهنده داربست کاهش پیدا کرده و بدین سبب از میزان یکنواختی ساختار کاسته می‌شود. لازم به ذکر است که میزان یکنواختی و ایجاد اتصالات عرضی در نانوکامپوزیت CS/PVA با ۷ درصد SWNT نسبت به سایر نانوکامپوزیت‌ها به‌مراتب بیشتر است.

شکل ۱ تصاویر SEM از نانوکامپوزیت‌های CS/PVA-SWNT تهیه شده به‌روش الکتروریسی؛ **الف)** نانوکامپوزیت‌های CS/PVA با محتوای SWNT ۷ درصد، **ب)** نانوکامپوزیت‌های CS/PVA با محتوای SWNT ۱۰ درصد، **ج)** نانوکامپوزیت‌های CS/PVA با محتوای SWNT ۱۲ درصد، بزرگنمایی: ۲۰۰۰ ×

۳-۲- ارزیابی ساختار مولکولی نانوکامپوزیت CS/PVA-SWNT

از طیف‌سنجی رامان برای تعیین ساختار مولکولی نانوکامپوزیت CS/PVA قبل و پس از افزودن SWNT استفاده شد. SWNT دارای سه قله برجسته SWNT در فرکانس کوتاه ۲۰۰~ سانتی‌متر$^{-1}$، فرکانس متوسط ۱۶۰۰ سانتی‌متر$^{-1}$ و فرکانس بالای ۲۶۰۰ سانتی‌متر$^{-1}$ در طیف رامان است. نمودار ۱- الف نشانگر اثر رامان نانوفیبرهای CS/PVA-SWNT است. همان‌گونه که در شکل مشخص است، اثر رامان مربوط با نانوفیبرهای CS/PVA-SWNT دارای طیف تقویت‌شده‌ای نسبت به طیف نانوفیبر CS/PVA به‌تنهایی است (نمودار ۱- ب).



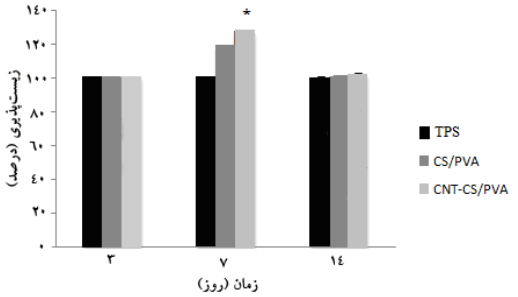
نمودار ۱ طیف رامان نانوکامپوزیت‌های CS/PVA-SWNT؛ **الف)** قبل از افزودن SWNT، **ب)** پس از افزودن SWNT

۳-۳- ارزیابی زیست‌سازگاری نانوکامپوزیت CS/PVA-SWNT

۳-۳-۱- سنجش MTT

میزان زیست‌پذیری سلول‌ها در این سنجش بر مبنای قدرت کاهش آنزیم میتوکندریایی در سلول‌های عصبی طبیعی مشتق از مغز، تعیین شد. همان‌گونه که در نمودار ۲ مشخص است، میزان زیست‌سازگاری این سلول‌ها روی نانوکامپوزیت CS/PVA-SWNT نسبت به گروه کنترل TPS که ۱۰۰ درصد در نظر گرفته شده است، به‌مراتب بیشتر است. با توجه به نمودار، حداکثر رشد و تکثیر سلولی روی نانوکامپوزیت‌های CS/PVA و CS/PVA-SWNT در روز هفتم حاصل شده است و تفاوت معنی‌داری از لحاظ آماری بین رشد سلول‌ها روی نانوکامپوزیت CS/PVA-SWNT و گروه کنترل در روز هفتم مشاهده می‌شود. همچنین لازم به ذکر است

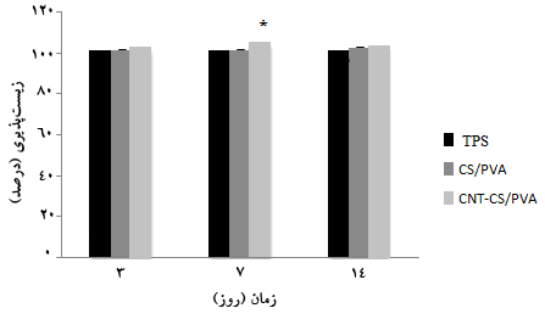
که میزان رشد سلول‌ها روی نانوکامپوزیت CS/PVA نیز در حد گروه کنترل TPS بوده و تفاوت معنی‌داری از لحاظ آماری بین رشد سلول‌ها روی نانوکامپوزیت CS-PVA و CS/PVA-SWNT وجود ندارد.



نمودار ۲ نتایج زیست‌پذیری سلول‌های رشدیافته روی نانوکامپوزیت‌های CS/PVA-SWNT حاصل از سنجش MTT. همان‌گونه که در شکل مشخص است میزان رشد سلول‌ها روی داربست CS/PVA-SWNT نسبت به هر دو گروه کنترل بالاتر است. همچنین در روز هفتم تفاوت معنی‌داری از لحاظ آماری بین رشد سلول‌ها روی داربست CS/PVA-SWNT و گروه کنترل (TPS) دیده می‌شود که با علامت ستاره * مشخص شده است.

۳-۳-۲- سنجش قرمز خنثی (Neutral Red)

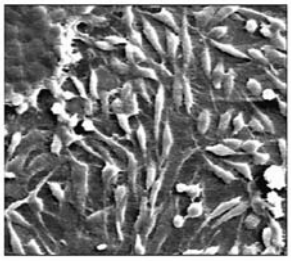
در این سنجش، میزان فعالیت متابولیک سلول‌ها با استفاده از میزان فعالیت متابولیک سلول‌ها در لیزوزوم تعیین شد. محلول قرمز خنثی توسط سلول‌های زنده جذب می‌شود. همان‌گونه که در نمودار ۳ مشخص است، حداکثر رشد سلولی روی نانوکامپوزیت‌های CS/PVA و CS/PVA-SWNT در روز هفتم حاصل شده است و تفاوت معنی‌داری از لحاظ آماری مابین آن‌ها مشاهده نمی‌شود. این در حالی است که در روز هفتم تفاوت معنی‌داری از لحاظ آماری بین رشد سلول‌ها روی نانوکامپوزیت CS/PVA-SWNT و گروه کنترل TPS دیده می‌شود. بدین ترتیب نتایج سنجش قرمز خنثی نتایج کسب شده در سنجش MTT را تأیید می‌کند. این امر بیانگر زیست‌سازگاری مطلوب نانوکامپوزیت CS/PVA-SWNT برای به‌کارگیری در مصارف مختلف زیست‌پزشکی است.



نمودار ۳ نتایج زیست‌پذیری سلول‌های رشدیافته روی نانوکامپوزیت‌های CS/PVA-SWNT حاصل از سنجش قرمز خنثی؛ همان‌گونه که در شکل مشخص است میزان رشد سلول‌ها روی داربست نسبت به گروه‌های کنترل بالاتر می‌باشد. همچنین در روز هفتم تفاوت معنی‌داری از لحاظ آماری بین رشد سلول‌ها روی داربست CS/PVA-SWNT و گروه کنترل (TPS) دیده می‌شود (با علامت ستاره * مشخص شده است. نتایج حاصل از این سنجش نتایج مربوط به سنجش MTT را تأیید می‌کند که این نشانگرسمی نبودن و زیست‌سازگاری مناسب داربست انتخاب شده می‌باشد.

۳-٤- ارزیابی ریخت‌شناسی سلول‌های کاشته شده روی نانوکامپوزیت CS/PVA-SWNT

شکل ۲ نمایانگر رشد مناسب سلول‌های عصبی طبیعی مشتق از مغز انسان روی نانوکامپوزیت CS/PVA-SWNT است. همان‌گونه که در شکل مشخص است، سلول‌ها ساختار ریختی طبیعی خود را پس از کاشته شدن روی داربست حفظ کرده و بر مبنای بافتی که درصدد ترمیم آن است، بر روی سطح داربست نفوذ می‌کند.



شکل ۲ تصویر SEM از سلول‌های عصبی طبیعی مشتق از مغز انسان رشدیافته روی نانوکامپوزیت‌های SWNT/CS-PVA؛ همان‌گونه که در شکل مشخص است سلول‌ها با حفظ ریخت‌شناسی طبیعی خود روی سطوح داربست رشد یافته‌اند. بزرگنمایی: × ۲۰۰۰

٤- بحث

امروزه با وجود پیشرفت‌های چشمگیری که در روش‌های ریزجراحی حاصل شده است، درمان آسیب‌های وارده به CNS همچنان با مشکلات بی‌شماری مواجه است [۱]. به‌همین دلیل دانشمندان بر آن شدند که از داربست‌های قابل کاشت در محل عصب آسیب دیده استفاده نمایند. در این حالت، نتایجی مشابه نتایج جراحی اتوگرافت (Autograft surgery) حاصل می‌شود؛ با این تفاوت که مراحل درمان بیماری با موفقیت و سرعت بیشتری صورت می‌پذیرد [۱۹، ۲۸]. طی سال‌های گذشته، استفاده از داربست‌های الکتروریسی شده در زمینه‌های مختلف مهندسی بافت رواج زیادی پیدا کرده است. از این داربست‌ها در مهندسی بافت عضلانی قلب، عضله اسکلتی، بافت عصبی و مهندسی سلول‌های بنیادی استفاده شده است [۱، ۳]. رواج استفاده از داربست‌های الکتروریسی شده به دلیل خصوصیات منحصر به فرد آن‌ها از جمله نسبت سطح به حجم بالا برای چسبندگی و تکثیر سلولی است که بدین سبب می‌توانند شرایطی همچون ECM ایجاد کنند [٤، ٥]. نانولوله‌های کربنی (SWNT) به دلیل اندازه کوچک (در حد ۱-۱۰ نانومتر) و پایداری شیمیایی و ساختاری بالا یکی از محتمل‌ترین مواد مورد استفاده در مصارف زیست‌پزشکی همچون مهندسی بافت محسوب می‌شود [۱۵]. با ترکیب SWNT با CS/PVA می‌توان از خواص منحصر به فرد نانولوله‌های کربنی در تولید نانوکامپوزیت‌های قابل استفاده در مصارف زیست‌پزشکی بهره گرفت. یکی از مهم‌ترین مواردی که استفاده از نانولوله‌های کربنی را دشوار می‌سازد، توزیع و پراکندگی نامناسب آن در ساختار نانوکامپوزیت می‌باشد. منفردسازی SWNT از توده‌های اولیه به دلیل پیوندهای واندروالس فراوان و درگیری فیزیکی ذرات آن بسیار دشوار است. در این مطالعه، برای برطرف کردن مشکل فوق، از روش اولتراسونیکاسیون استفاده شد که باعث تولید محلول‌های پلیمری CS/SWNT با پراکندگی یکنواخت شد [۱۱، ۱۷]. اولتراسونیکاسیون در حذف سریع و کامل حباب‌های گازی از محلول، تسریع واکنش‌های شیمیایی بین اجزای پلیمری، افزایش نرخ انتشار مواد موجود در محلول و پراکندگی یکنواخت ذرات دخیل است [۲۸، ۲۹]. همان‌گونه که در نتایج SEM مشخص است، با افزایش محتوای SWNT در ساختار نانوکامپوزیت CS/PVA، میزان اتصالات عرضی مدور و یکنواختی ساختار کاهش پیدا می‌کند. در این‌جا می‌توان اظهار کرد که زنجیره‌های پلیمری در ساختار هیدروژلی نانوکامپوزیت CS/PVA، پیش از افزودن SWNT، ارتباط فیزیکی مناسبی با یکدیگر داشتند. با این وجود، پس از افزایش SWNT ساختار به‌مراتب متراکم‌تری با بار الکتریکی بالا ایجاد شده است. در حقیقت با افزایش نانوذرات SWNT به ماتریکس CS/PVA، میزان بار الکتریکی خالص نانوکامپوزیت CS/PVA افزایش می‌یابد. فرضیه ما بر آن استوار است که به دام افتادن نانوذرات SWNT در ماتریکس CS/PVA منجر به تعدیل ساختار ریختی و تخلخل نانوکامپوزیت می‌شود. همان‌گونه که از نتایج طیف رامان نانوکامپوزیت CS/PVA قبل و پس از افزودن SWNT بر می‌آید، به وضوح مشخص است که قله‌های شاخص ترکیب پلیمری CS/PVA در اثر افزایش SWNT به سمت طول موج‌های پایین‌تر گرایش دارد. طول موج‌های کوتاه‌تر و در نتیجه، فرکانس‌های پایین‌تر تأیید کننده آن است که ساختار پلیمری CS/PVA-SWNT به انرژی بیشتری برای ارتعاشات مولکولی نیاز دارد. بدین ترتیب، پایداری مولکولی و شیمیایی این ترکیب افزایش پیدا می‌کند.

بررسی زیست‌سازگاری نانوکامپوزیت اصلی‌ترین قدم در استفاده از ساختارهای پلیمری در مصارف زیست‌پزشکی است. در مطالعات مختلف مهندسی بافت از نانولوله‌های کربنی به‌عنوان ترکیبی سمی یاد می‌کنند [۲۷]. به‌عنوان مثال، پس از تیمار ماکروفاژهای لثه‌ای با نانولوله‌های کربنی مشخص شد که میزان سمیت سلولی، ۳۵ درصد افزایش پیدا کرده است [۳۰]. همچنین محققان در بررسی دیگری نشان دادند که غلظت‌های اندک و در حد ۰/۳ میکروگرم (سانتیمتر مربع) می‌تواند شدیداً از فاگوسیتوز ماکروفاژهای لثه‌ای جلوگیری کند [۳۱]. تعیین

خصوصیت (Characterization) مکانیسم مولکولی سمیت‌زایی نانولوله‌های کربنی در فیبروبلاست‌های انسانی نشان داد که بیان ژن در این سلول‌ها به غلظت نانولوله کربنی به‌کار رفته، وابسته است. بنابراین، استفاده از نانولوله‌های کربنی در مصارف زیست‌پزشکی وابسته به غلظت آن بوده و بنا به نوع مصرف آن در بافت‌های مختلف، متفاوت است [۳۲، ۳۳]. نتایج مربوط به بررسی زیست‌سازگاری داربست در این مطالعه نشانگر زیست‌پذیری مناسب سلول‌های عصبی طبیعی مشتق از مغز روی نانوکامپوزیت CS/PVA-SWNT و نبودن سمیت داربست مذکور در مقایسه با گروه‌های کنترل است. بنابراین، می‌توان نتیجه گرفت که غلظت نانولوله کربنی به‌کار رفته در ساختار نانوکامپوزیت CS/PVA مطلوب بوده و بدین سبب منجر به رشد و تکثیر مناسب سلول‌های عصبی طبیعی مشتق از مغز شده است. تصاویر میکروسکوپ الکترونی روبشی نیز قابلیت بالای رشد سلول‌های عصبی طبیعی مشتق از مغز انسان روی داربست‌های مورد نظر را تأیید می‌کند. با توجه به تصویر می‌توان به این نکته پی برد که سلول‌ها دارای زوایید سیتوپلاسمی و ریخت‌شناسی طبیعی بوده که اغلب به شکل کلونی‌های سلولی در آمده و با سلول‌های مجاور ارتباطات متقابلی را ایجاد نموده‌اند. این نتایج نشان می‌دهند که سلول‌های عصبی طبیعی نه تنها توانایی اتصال و تکثیر مناسب را روی نانوکامپوزیت CS/PVA-SWNT دارد بلکه به لحاظ ریخت‌شناسی نیز از شرایط طبیعی برخوردار است. به‌طور کلی و با توجه به نتایج، می‌توان نانوکامپوزیت CS/PVA-SWNT را به‌عنوان جایگزینی مناسب برای بافت‌های آسیب دیده CNS قلمداد نمود که با توجه به شرایط زیست‌سازگاری مناسب داربست‌های مذکور روی سلول‌های عصبی طبیعی مشتق از مغز انسان، از آن‌ها می‌توان برای ترمیم نقایص مادرزادی و آسیب‌های وارده به CNS استفاده نمود.

۵- تشکر و قدردانی

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

٦- 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] Matsumoto K, Sato C, Naka Y, Kitazawa A, Whitby RL, Shimizu N. Neurite outgrowths of neurons with neurotrophin-coated carbon nanotubes. J Biosci Bioeng 2007; 103(3): 216-20.

[3] Engel E, Michiardi A, Navarro M, Lacroix D, Planell JA. Nanotechnology in regenerative medicine: the materials side. Trends Biotechnol 2008; 26(1): 39-47.

[4] Khademhosseini A, Langer R, Borenstein J, Vacanti JP. Microscale technologies for tissue engineering and biology. Proc Natl Acad Sci USA 2006; 103(8): 2480-7.

[5] Ma PX. Biomimetic materials for tissue engineering. Adv Drug Deliv Rev 2008; 60(2): 184-98.

[6] 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.

[7] Costa-Junior E, Barbosa-Stacioli E, Mansur A, Vasconcelos W, Mansur H. Preparation and characterization of chitosan/poly (vinyl alcohol) chemically crooslinked blends for biomedical application. Carbohydr Polymer 2008; 65(3): 243-56.

[8] Reneker DH, Chun I. Conducting polymer fibers of polyaniline doped with camphor-sulfonic acid. Nanotech 1996; 7: 216-30.

[9] Xiao-Jun H, Ge D, Zhi-Kang X. Preparation and characterization of stable chitosan nanofibrous membrane for lipase immobilization. Eur pol J 2007; 43(9): 3710-8.

[10] Agarwal S, Wendroff JH, Greiner A. Use of electrospinning technique for biomedical applications. J Polymer 2008; 49(26): 5603-21.

[11] Kumar AP, Depan D, Tomer NS, Singh RP. Nanoscale particles for polymer degredation ans and stabilization- Trends and future perspectives. Progress in Poly Sci 2009; 34(6): 479-515.

[12] Mansur H, Costa J, Mansur A, Barbosa-Stancioli. Cytocpmpatibility evaluation in cell-culture system of chemically crosslinked chitosan/PVA hydrogels. Mater Sci & Eng C 2009; 12: 132-40.

[13] Hollister J. Porous scaffold design for tissue engineering. Nature Mater 2005; 4: 518-24.

[14] Ignatova M, Starbova K, Markova N, Manolova N, Rahkov I. Electrospun nano-fibre mats with antibacterial properties from quaternised chitosan and poly(vinyl alcohol). Carbohyd Res 2006; 341(12): 2098-107.

[15] Harrison BS, Atala A. Carbon nanotube applications for tissue engineering. Biomaterials 2007; 28(2): 344-53.

[16] Monteiro-Riviere NA, Inman AO, Wang YY, Nemanich RJ. Surfactant effects on carbon nanotube interactions with human keratinocytes. Nanomedicine 2005; 1(4): 293-9

[17] Aliev AE. Bolometric detector on the basis of single-wall carbon nanotube/polymer composite. Infrared Phys and Tech 2008; 51(6): 541-5.

[18] Abarrategi A, Gutiérrez MC, Moreno-Vicente C, Hortigüela MJ, Ramos V, López-Lacomba JL, Ferrer ML, del Monte F. Multiwall carbon nanotube scaffolds for tissue engineering purposes. Biomaterials 2008; 29(1): 94-102.

[19] Gandhi M, Yang H, Shor L, Ko F. Post-spinning modification of electrospun nanofiber nanocomposites from Bombyx mori silk and carbon nanotubes. J Polymer 2009; 50(8): 1918-24.

[20] Cherukuri P, Bachilo SM, Litovsky SH, Weisman RB. Near-infrared fluorescence microscopy of single-walled carbon nanotubes in phagocytic cells. J Am Chem Soc 2004; 126(48): 15638-9.

[21] Gupta AK, Gupta M. Synthesis and surface engineering of iron oxide nanoparticles for biomedical applications. Biomaterilas 2005; 26(18): 3559-4021.

[22] Mornet S, Vasseur S, Grasset F, Duguet E. Magnetic nanoparticles design for medical diagnosis and therapy. J Mater Chem 2004; 14(14): 2161-75.

[23] Ballou B, Lagerholm BC, Ernst LA, Bruchez MP, Waggoner AS. Noninvasive imaging of quantum dots in mice. Bioconjug Chem 2004; 15(1): 79-86.

[24] Bartholome C, Miaudet P, Derre A, Maugey M, Roubeau O, Zakri C, Poulin P. Influence of surface finctionalization on the thermal and electrical properties on nanotube-PVA composites. Compo Sci and Tech 2008; 68: 2568-73.

[25] Shaffer M, Windle AH. Fabrication and characterization of carbon nanotube/poly (vinyl alcohol) composites. Adv Mater 1999; 11: 937.

[26] Ramires PA, Romito A, Cosentino F, Milella E. The influence of titania/hydroxyapatite composite coatings on in vitro osteoblasts behaviour. Biomaterials 2001; 22(12): 1467-74.

[27] Gong K, Yan Y, Zhang M, Su L, Xiong S, Mao L. Electrochemistry and electroanalytical applications of carbon nanotubes: a review. Anal Sci 2005; 21(12): 1383-93.

[28] Ducker TB, Hayes GJ. Peripheral nerve grafts: experimental studies in the dog and chimpanzee to define homograft limitations. J Neurosurg 1970; 32(2): 236–43.

[29] Koh HS, Yong T, Chan CK, Ramakrishna S. Enhancement of neurite outgrowth using nano-structured scaffolds coupled with laminin. Biomaterials 2008; 29(26): 3574-82.

[30] Peng Y, Chen Q. Ultrasonic-assisted fabrication of highly dispersed copper-multi-walled carbon nanotubes nanowires. J Colsurfs: Physicochem Eng Aspects 2009; 342(1-3): 132-5.

[31] Jia G, Wang H, Yan L, Wang X, Pei R, Yan T, Zhao Y, Guo X. Cytotoxicity of carbon nanomaterials: single-wall nanotube, multi-wall nanotube, and fullerene. Environ Sci Technol 2005; 39(5): 1378-83.

[32] Maynard AD, Baron PA, Foley M, Shvedova AA, Kisin ER, Castranova V. Exposure to carbon nanotube material: aerosol release during the handling of unrefined single-walled carbon nanotube material. J Toxicol Environ Health A 2004; 67(1): 87-107.

[33] Ding L, Stilwell J, Zhang T, Elboudwarej O, Jiang H, Selegue JP, Cooke PA, Gray JW, Chen FF. Molecular characterization of the cytotoxic mechanism of multiwall carbon nanotubes and nano-onions on human skin fibroblast. Nano Lett 2005; 5(12): 2448-64.