آماده‌سازی و بررسی آزمایشگاهی دو نوع داربست کامپوزیتی دارای ژلاتین برای کاربردهای مهندسی بافت‌های سخت

دکتر هانیه نوجه دهیان[۱]- دکتر مریم ترشابی[۱]- دکتر فهیمه سادات طباطبایی[۱†]

۱- استادیار گروه آموزشی زیست مواد دندانی، دانشکده دندانپزشکی، دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی درمانی شهید بهشتی، تهران، ایران

Preparation and in vitro evaluation of 2 composite scaffolds containing Gelatin for hard tissueengineering applications

Hanieh Nojehdehyan[1], Maryam Torshabi[1], Fahimeh Sadat Tabatabaei[1†]

1† Assistant Professor, Department of Dental Biomaterials, School of Dentistry, Shahid Beheshti University of Medical Sciences, Tehran, Iran (f.tabatabaei@sbmu.ac.ir)

Background and Aims: Until now, different types of scaffolds are presented for hard tissue engineering and the research continues to find the best scaffold. The aim of this study was to prepare scaffolds using two types of composite materials, ChitosanTriCalcium Phosphate (C/TCP) and ChitosanTriCalcium Phosphate/ HydroxyApatite (C/TCP/ HA) and to add either 10% or 20% gelatin to compare their influence on swelling ratio of the scaffolds and on their affinities towards Dental Pulp Stem Cells (DPSCs).

Materials and Methods: Composite scaffolds containing 10 or 20 percent of gelatin were prepared by freezedrying method. To determine the percentage of water absorption, swelling ratio studies were performed. Cell attachment and cell viability of the composite scaffolds were studied using Scanning Electron Microscopy (SEM) and MTT (dimethyl-thiazol-diphenyltetrazolium bromide) assay. Data were analyzed using ANOVA and Turkey's post hoc test. A P-value of <0.05 was considered to be statistically significant.

Results: The C/TCP scaffold and scaffolds containing 20% gelatin showed good swelling character. The macroporous composite scaffolds exhibited different pore structures. The biological response of DPS cells on C/TCP scaffold, C/TCP scaffold containing 20% gelatin, and C/TCP/HA scaffold was superior in terms of cell attachment, proliferation, and spreading compared to the other scaffolds ($P<0.05$).

Conclusion: Considering the limitations of this invitro studies, the results demonstrated that enhanced gelatin content in the C/TCP scaffolds do not improve initial cell adhesion and proliferation of the DPSCs on these scaffolds.

Key Words: Chitosan, Gelatin, Hydroxyapatite, Tricalcium phosphate, Scaffold

Journal of Dental MedicineTehran University of Medical Sciences 2014;27(3):152-60

† مولف مسوول: تهران، ولنجک، بلوار دانشجو، دانشکده دندانپزشکی، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، گروه آموزشی زیست مواد دندانی
تلفن: ۰۹۱۲۶۹۸۷۴۸۱ نشانی نشانی الکترونیک: f.tabatabaei@sbmu.ac.ir

Archive of SID
www.SID.ir

چکیده

زمینه و هدف: تاکنون انواع مختلفی از داربست‌ها در مهندسی بافت‌های سخت معرفی شده‌اند و تحقیقات در جهت شناسایی بهترین داربست‌های ممکن همچنان ادامه دارد. هدف از این تحقیق بررسی اثر افزودن درصدهای مختلف ژلاتین به دو نوع داربست کیتوسان بتا تری کلسیم فسفات و کیتوسان بتا تری کلسیم فسفات هیدورکسی آپاتیت، بر روی مورفولوژی و میزان جذب آب داربست‌ها و همچنین چسبندگی و درصد حیات سلول‌های بنیادی پالپ دندان بر روی داربست‌ها بود.

روش بررسی: داربست‌های حاوی درصدهای مختلف ژلاتین به روش خشکاندن انجمادی تهیه شد. سپس به منظور تعیین میزان جذب آب در داربست‌ها از تست نسبت تورم استفاده شد. چسبندگی سلول‌ها و درصد حیات سلول‌ها بر روی داربست‌ها با استفاده از میکروسکوپ الکترونی روبشی و تست MTT (dimethyl-thiazol-diphenyltetrazolium bromide) مورد بررسی قرار گرفت. از آزمون‌های آماری واریانس یک طرفه (ANOVA) و پس آزمون Tukey جهت مقایسه نتایج استفاده شد و P<۰/۰۵ معنی‌دار درنظر گرفته شد.

یافته‌ها: داربست C/TCP و داربست‌های حاوی ۲۰٪ ژلاتین میزان تورم خوبی را نشان دادند. ساختار تخلخل‌های متفاوتی در داربست‌ها مشاهده شد. چسبندگی، تکثیر و شکل سلول‌های بنیادی پالپ دندان بر روی داربست‌های C/TCP، C/TCP حاوی ۲۰٪ ژلاتین و C/TCPHA در مقایسه با سایر داربست‌ها به طور معنی‌داری بیشتر بود (P<۰/۰۵).

نتیجه‌گیری: براساس نتایج این مطالعه و با درنظر گرفتن محدودیت‌های مطالعات آزمایشگاهی، افزودن ژلاتین به داربست‌های C/TCP و C/TCPHA باعث افزایش چسبندگی و پرولیفراسیون سلول‌های بنیادی پالپ دندان بر روی این داربست‌ها نخواهد شد.

کلید واژه‌ها: کیتوسان، ژلاتین، هیدروکسی آپاتیت، تری کلسیم فسفات، داربست

وصول:۹۳/۰۱/۱۸ اصلاح نهایی:۹۳/۰۸/۲۰ تأیید چاپ:۹۳/۰۸/۲۲

مقدمه

مهندسی بافت حیطه جدیدی در علم زیستمواد دندانی است که با هدف بازسازی بافت‌های تخریب شده فک و دهان و صورت به شکل گسترده‌ای در حال پیشرفت است. داربست‌ها یکی از اجزای کلیدی مهندسی بافت هستند که در فرایند ترمیم و شکل‌گیری محیطی مانند ماتریکس خارج سلولی نقش مهمی را ایفا می‌کنند. تاکنون انواع مختلفی از داربست‌های (اسکافولد) طبیعی، مصنوعی، سرامیکی، پلیمری و کامپوزیتی معرفی شده‌اند و تحقیقات در جهت شناسایی بهترین داربست‌های ممکن همچنان ادامه دارد (۱). از میان مواد طبیعی، ژلاتین و کیتوسان به علت در دسترس بودن و نیز هزینه کمتر مورد توجه بیشتری قرار گرفته‌اند (۲). کیتوسان یک پلی ساکارید طبیعی است که از داستیلاسیون کیتین به دست می‌آید و از آنجا که پس از تجزیه شدن توسط آنزیم‌های بدن به محصولات غیرسمی تبدیل می‌شود، ماده‌ای مطلوب به شمار می‌آید (۳). کیتوسان به علت استئواینداکتیو بودن و نیز خاصیت آنتی باکتریال در مهندسی بافت‌های سخت مورد توجه قرار گرفته است (۴) اما به دلیل خواص مکانیکی ضعیف، ترکیب آن با پلیمرهای طبیعی دیگری مانند ژلاتین و یا سرامیک‌هایی مانند تری کلسیم فسفات و هیدروکسی آپاتیت در بعضی از تحقیقات توصیه شده است (۵). از طرف دیگر ژلاتین یک پروتئین مشتق از کلاژن است که مشخص شده در چسبندگی اولیه سلول‌ها نقش مهمی را ایفا می‌کند (۶). با توجه به طبیعت آنیونی ژلاتین و طبیعت کاتیونی کیتوسان، و جاذبه بین این پلیمرهای باردار، امکان تشکیل داربست توسط این مواد براحتی وجود دارد. امروزه از ژلاتین به عنوان یک کاندیدای مناسب برای ترکیب با کیتوسان یاد می‌شود (۷) و همانطور که پیشتر گفته شد، در مهندسی بافت‌های سختی مثل استخوان و دندان، اضافه نمودن سرامیک‌هایی مانند تری کلسیم فسفات و هیدروکسی آپاتیت به منظور بهبود خصوصیات مکانیکی و مشابهت بیولوژیکی با استخوان و دندان طبیعی، نیز ضروری بنظر می‌رسد (۸). بنابراین ترکیب ژلاتین با مواد دیگر مانند کیتوسان، بتا تری کسیم فسفات (βTCP) و هیدروکسی آپاتیت در مطالعات مختلف مورد بررسی قرار گرفته است (۱۲۹).

سرامیک‌های کلسیم فسفات، به علت ترکیب شیمیایی مشابه با اجزای غیر آلی استخوان و دندان، در بازسازی این بافت‌ها مورد استفاده قرار می‌گیرند (۱۳،۱۴). در داخل بدن بر روی سطح این مواد، لایه‌ای آپاتیتی شبه استخوان تشکیل می‌شود که در هنگام استفاده از سایر زیستموادها قابل مشاهده نمی‌باشد (۱۵). هیدروکسی آپاتیت (HA) به عنوان زیستموادی استئوکنداکتیو، غیرسمی و غیرالتهابی شناخته شده است (۱۶). از طرف دیگر بتا تری کلسیم فسفات (βTCP) نیز ماده‌ای

Archive of SID

www.SID.ir

زیست فعال و زیست تخریب‌پذیر است که سرعت تخریب آن ۱۰ برابر هیدروکسی آپاتیت می‌باشد (۱۷).

در این مطالعه، درصدهای مختلفی از ژلاتین به دو نوع داربست کیتوسان بتا تری کلسیم فسفات و کیتوسان بتا تری کلسیم فسفات هیدورکسی آپاتیت اضافه شد. از آنجا که سلول‌های بنیادی پالپ دندان، به عنوان یکی از کاندیداهای مناسب در مهندسی بافت استخوان شناسایی شده‌اند (۱۸)، این تحقیق با هدف بررسی اثرات درصدهای مختلف ژلاتین بر روی مورفولوژی و میزان جذب آب داربست ها و همچنین مورفولوژی، چسبندگی و درصد حیات (تکثیر و بقا) سلول‌های بنیادی پالپ دندان بر روی داربست‌ها انجام شد.

روش بررسی

۱- مواد

در این مطالعه، پودر کیتوسان (به صورت تجاری با درجهٔ deacetylation (DD) ۹۰٪ و وزن مولکولی متوسط) (Cat number: 448877) و پودر ژلاتین از شرکت سیگما تهیه شدند. بتا تری کلسیم فسفات و هیدروکسی آپاتیت (HA) از Merck آلمان فراهم شدند.

۲- تهیه داربست‌های کیتوسان بتا تری کلسیم فسفات/ژلاتین (C/βTCP/G)

به منظور تهیه محلول ۲٪ کیتوسان، ۰/۲ گرم از پودر کیتوسان توسط محلول اسید استیک به حجم ۱۰ سی سی رسانده شد، سپس در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد مقادیر ۱۰ و ۲۰ درصد ژلاتین به این محلول اضافه شد و مقداری از کیتوسان نیز به عنوان گروه کنترل فاقد ژلاتین حفظ شد. پس از ۲۴ ساعت، TCP (به نسبت مساوی با فاز پلیمری) به محلول فوق افزوده شد (جدول ۱) و پس از یک شبانه روز قرار دادن بر روی همزن مغناطیسی (IKA, Germany)، محلول گلوتارآلدهید به عنوان شبکه‌ای کننده به میزان لازم، قطره قطره به مخلوط اضافه شد. سپس مخلوط در چاهک‌های پلیت ۲۴ خانه ریخته شده و به فریزر ۲۰ درجه به مدت یک شبانه روز منتقل شد تا کاملاً منجمد شود. درنهایت، مواد فریز شده بمنظور جداسازی فاز مایع و جامد و خروج حلال به روش تصعید، توسط فریزدرایر (ALPHA 12, Matin Christ, Germany) لیوفیلیزه شدند. داربست‌های آماده شده به منظور حذف اسید با محلول ۲٪ وزنی سدیم هیدروکساید در اتانول شستشو داده شدند. پس از شستشو با آب دیونیزه، به منظور حذف بقایای گلوتارآلدهید از محلول ۲٪ وزنی سدیم بروهیدراید استفاده شد. پس از شستشو با آب دیونیزه، داربست‌ها مجدداً فریز درای شده و تا زمان آزمایش تحت خلا نگهداری شدند.

۳ - تهیه داربست‌های کیتوسان بتا تری کلسیم فسفات هیدورکسی آپاتیت/ ژلاتین (C/βTCPHA/G)

فرایند آماده‌سازی این داربست‌ها نیز مشابه روند فوق بود با این توضیح که نسبت بتا تری کلسیم فسفات و هیدروکسی آپاتیت ۱۱ می‌باشد. ترکیب داربست‌های آماده شده در جدول ۱ نشان داده شده است.

جدول ۱- ترکیبات انواع داربست‌های آماده شده (مقادیر در ۱۰۰ میلی‌لیتر*)

انواع داربست‌ها*	کیتوسان (C) (گرم)	تری کلسیم فسفات (TCP) (گرم)	ژلاتین (G) (گرم)	هیدروکسی آپاتیت (HA) (گرم)
C/TCP	۲	۲		
C/TCP/10G	۱/۸	۲	۰/۲	
C/TCP/20G	۱/۶	۲	۰/۴	
C/TCPHA	۲	۱		۱
C/TCPHA/10G	۱/۸	۱	۰/۲	۱
C/TCPHA/20G	۱/۶	۱	۰/۴	۱

www.SID.ir

۴- بررسی میزان تورم

به منظور تعیین درصد جذب آب با استفاده از تست نسبت تورم، همه نمونه‌ها قبل از غوطه‌ور شدن در فسفات بافر سالین (PBS) (دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد) وزن شدند. سپس پس از ۲۴ ساعت، نمونه‌ها از مدیا خارج شده و پس از خشک شدن آب سطحی، دوباره با استفاده از ترازوی دیجیتالی با دقت ۰/۱ میلی گرم (Sartorius, Germany) وزن شدند. درنهایت نسبت تورم از فرمول زیر به دست آمد:

$$\text{نسبت تورم} = (W_f - W_i) / W_i$$

که در آن W_i وزن اولیه داربست‌ها و W_f وزن آن‌ها پس از غوطه‌وری می‌باشد. در هر گروه از داربست‌ها، ۳ نمونه مورد آزمایش قرار گرفت و مقادیر میانگین داده ها استفاده شد.

۵- آماده‌سازی داربست‌ها برای کاشت سلولی

داربست‌ها توسط اتانول ۷۰٪ به مدت ۳ ساعت استریل شده و سپس سه بار با بافر فسفات سالین (PBS) (Gibco, USA) شستشو داده شده و در نهایت قبل از کاشت سلول‌ها در زیر لامینار هود خشک شدند.

۶- کاشت سلول‌ها بر روی داربست‌ها

سلول‌های بنیادی پالپ دندان که قبلاً با روش‌های مختلف فلوسایتومتری و تمایز سلولی مورد شناسایی قرار گرفته بودند از آزمایشگاه بیولوژی سلولی و مولکولی دانشکده دندانپزشکی دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی به دست آمد. این سلول‌ها به فلاسک کشت سلولی (SPL, South Korea) حاوی DMEM (Gibco, USA)، ۱۰٪ FBS (Gibco, USA)، و ۱٪ آنتی بیوتیک پنی سیلین (100 unit/ml) استرپتومایسین (100 µg/ml) (Gibco, USA)، منتقل گردید و در انکوباتور (Memmert, Germany) با دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد، CO_2 ۵٪ و رطوبت ۹۵٪ انکوبه شد. سلول‌های پاساژ چهارم پس از اینکه درون فلاسک به تراکم سلولی ۸۰٪ (فاز لگاریتمی رشد سلولی) رسیدند، با استفاده از آنزیم تریپسین ۰/۲۵٪ (Sigma, USA) از کف ظرف جدا شده و شمارش سلول‌ها با استفاده از لام نئوبار انجام شد. درنهایت سوسپانسیون سلولی حاوی یک میلیون سلول در میلی لیتر محیط کشت سلولی بر روی داربست‌های استریل قرار داده شده در پلیت‌های کشت سلولی ۲۴ خانه (SPL, South Korea) منتقل شد (n=۷ در هر گروه که یک نمونه از هر گروه برای بررسی مورفولوژی استفاده شد و ۶ نمونه از هر گروه برای بررسی تکثیر مورد استفاده قرار گرفت). سپس پلیت‌های مورد نظر به انکوباتور با دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد، CO_2 ۵٪ و رطوبت ۹۵٪ منتقل شدند.

۷- بررسی مورفولوژی داربست‌ها و سلول‌های کاشته شده بر روی آن‌ها

مورفولوژی داربست‌ها قبل از کاشت سلول‌ها و ۲۴ ساعت بعد از کاشت سلول‌ها با استفاده از میکروسکوپ الکترونی روبشی (SEM) (VEGA, TESCAN Czech Republic) مورد بررسی قرار گرفت. به این منظور، داربست‌ها با محلول گلوتارآلدهید ۲/۵٪ آماده‌سازی شده در بافر کاکودیلات (Merck, Gemany) فیکس شده و پس از سه بار شستشو با آب دیونیزه، از محلول اسمیوم ۱٪ (TAAB, UK) و درنهایت درصدهای مختلف الکل (۳۰، ۵۰، ۷۰، ۹۰، ۹۵ و ۱۰۰ درصد) به منظور آبگیری استفاده شد. سپس نمونه‌ها با استفاده از (Polaron, UK) coater توسط طلا پوشیده شده و با میکروسکوپ الکترونی مورد بررسی کیفی قرار گرفتند.

۸- بررسی تکثیر و بقا سلولی

به منظور تعیین تعداد سلول‌ها بر روی هر داربست از تست کمی MTT (dimethyl-thiazol-diphenyltetrazolium bromide) استفاده شد. در ۲ بازه زمانی ۲۴ و ۷۲ ساعت، داربست‌های کشت داده شده با سلول به پلیت ۲۴ خانه جدید منتقل شده و با بافر PBS استریل (Gibco, USA) شستشو داده شدند. محلول MTT باغلظت ۵ میلی گرم در میلی لیتر در غلظت نهایی ۱۰٪ با محیط کشت تازه فاقد سرم FBS رقیق شده و به هر چاهک پلیت کشت سلولی اضافه شد. سپس پلیت ها به مدت ۳ ساعت درون انکوباتور با دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد و رطوبت ۹۸٪ و CO_2 ۵٪ قرار داده شدند. در این مدت

Archive of SID
www.SID.ir

زمان، سلول‌های زنده و دارای متابولیسم فعال، قادرند توسط آنزیم سوکسینات دهیدروژناز میتوکندری، محلول زرد رنگ MTT را به کریستال‌های نامحلول ارغوانی رنگ فورمازان احیا کنند. پس از ۳ ساعت انکوباسیون، محیط روی سلول‌ها به آرامی خارج شده و میزان ۱۰۰ میکرولیتر حلال DMSO (Dimethyl-Sulfoxide) (Gibco, USA) برای حل شدن کریستال‌های فورمازان به هر چاهک اضافه شد. میزان جذب نوری (OD) رنگ حاصله در هر نمونه که رابطه مستقیم با تعداد سلول‌های فعال ازنظر متابولیکی دارد، توسط دستگاه الایزا ریدر (Anthos 2020, Austria) در طول موج ۵۷۰ نانومتر با فیلتر رفرانس ۶۲۰ نانومتر اندازه‌گیری شد. درصد حیات سلولی (%Viability) از تقسیم میانگین جذب نوری هر گروه مورد آزمایش بر میانگین جذب نوری گروه کنترل (گروه C/TCP) ضربدر عدد ۱۰۰ به دست آمد.

۹ آنالیز آماری

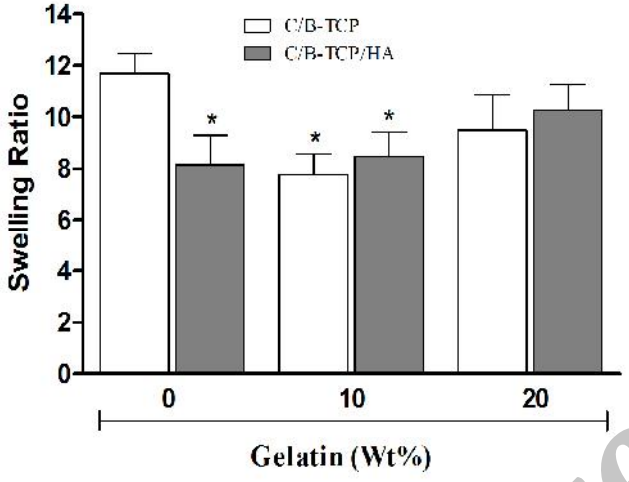
داده‌ها به صورت میانگین±انحراف معیار (Mean±SD) به دست آمده و جهت آنالیز آماری اعداد از نرم‌افزار GraphPad Prism V.5، آزمون آماری واریانس یک طرفه (ANOVA) و پس آزمون Tukey جهت مقایسه دو بدوی گروه‌ها استفاده شد. سطح معنی‌دار بودن اختلافات با PValue کوچک‌تر از ۰/۰۵ (P<۰/۰۵) محاسبه گردید.

یافته‌ها

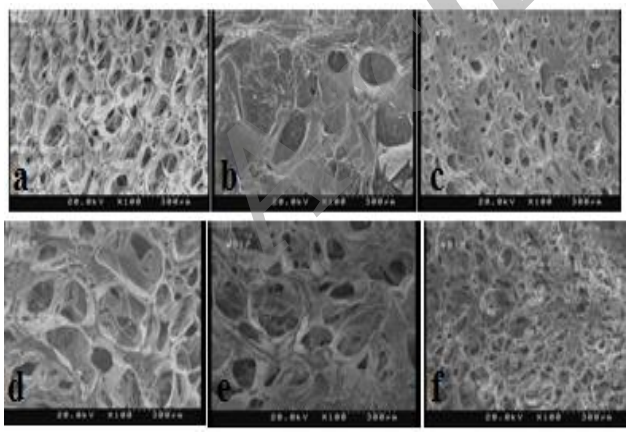
نسبت تورم

نسبت تورم در داربست متشکل از کیتوسان و تری کلسیم فسفات (C/TCP)، ۱۱/۷±۰/۸ به دست آمد، اضافه کردن ۱۰٪ ژلاتین به این داربست باعث کاهش معنی‌دار تورم شد (۷/۶±۰/۸) (P=۰/۰۰۱۰) و اضافه نمودن میزان ۲۰٪ ژلاتین به این داربست هرچند که باعث کاهش نسبت تورم شد (۹/۳±۰/۰۵) اما این کاهش در مقایسه با داربست فاقد ژلاتین معنی‌دار نبود (P=۰/۱۱۴).

در داربست‌های حاوی کیتوسان، تری کلسیم فسفات و هیدروکسی آپاتیت (C/TCPHA) فاقد ژلاتین نسبت تورم ۸/۱±۱/۲ بود که کاهش معنی‌داری را نسبت به داربست C/TCP نشان می‌داد (P=۰/۰۰۴۱). با اضافه کردن ۱۰٪ ژلاتین نیز نسبت تورم ۸/۵±۱/۰ به دست آمد که باز هم نسبت به داربست C/TCP (کنترل) کاهش معنی‌داری را نشان داد (P=۰/۰۱۰۰) اما تفاوت معنی‌داری با داربست C/TCPHA فاقد ژلاتین نداشت (P=۰/۰۹۳۸). داربست C/TCPHA حاوی ۲۰٪ ژلاتین با نسبت تورم ۱۰/۳±۱/۰ تفاوت معنی‌داری با داربست‌های داربست C/TCP و C/TCPHA فاقد ژلاتین نداشت (P=۰/۷۹۴) (نمودار ۱).

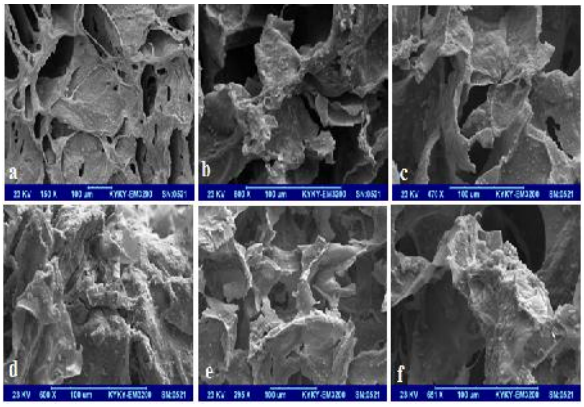


نمودار ۱- مقایسه نسبت تورم در داربست‌های مختلف مورد مطالعه پس از ۲۴ ساعت غوطه‌وری در آب دیونیزه *(P<۰/۰۵)



شکل ۲- عکس میکروسکوپ الکترونی روبشی از داربست‌های فاقد سلول. a) داربست C/TCP، b) داربست C/TCP/10G، c) داربست C/TCP/20G، d) داربست C/TCPHA، e) داربست C/TCPHA/10G، f) داربست C/TCPHA/20G.

www.SID.ir



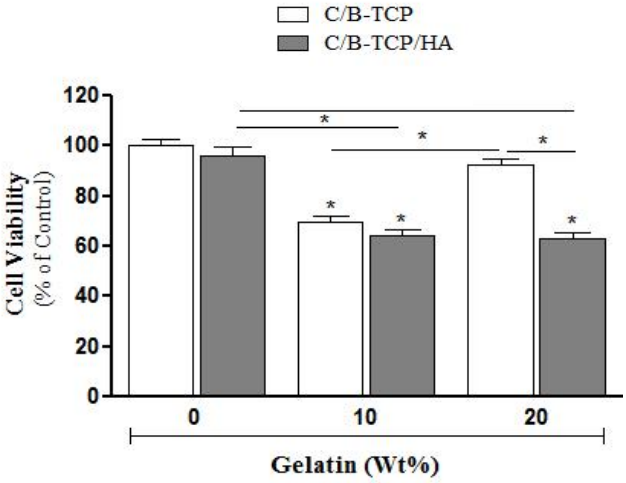
شکل ۳- عکس میکروسکوپ الکترونی روبشی از داربست‌ها پس از کاشت سلول. a) داربست C/TCP، b) داربست C/TCP/10G، c) داربست C/TCP/20G، d) داربست C/TCPHA، e) داربست C/TCPHA/10G، f) داربست C/TCPHA/20G.

مورفولوژی سلول‌ها بر روی داربست‌ها

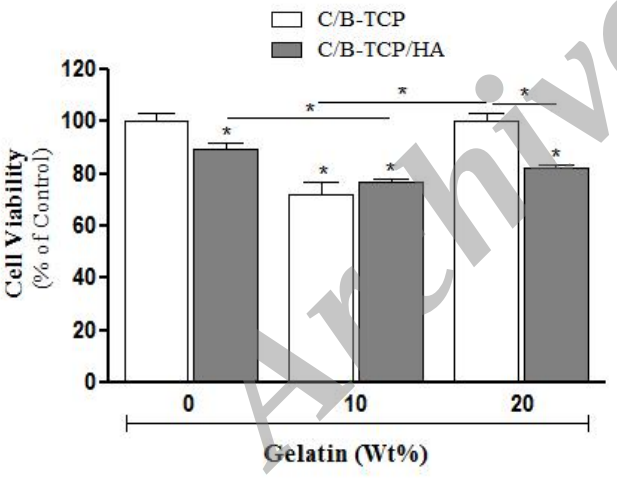
مناسب بودن داربست‌ها برای چسبندگی سلول‌ها و مورفولوژی داربست‌ها و سلول‌های چسبیده به آن‌ها از طریق میکروسکوپ الکترونی روبشی (SEM) بررسی شد (اشکال ۲ و ۳). کاهش سایز تخلخل‌ها در داربست‌های حاوی ۲۰٪ ژلاتین کاملاً مشهود بود. شکل سلول‌ها بر روی داربست‌های C/TCP، C/TCP/20G و C/TCPHA کاملاً کشیده با زواید سلولی بود درحالی که در داربست‌های C/TCP/10G، C/TCPHA/10G و C/TCPHA/20G تعداد سلول‌ها بسیار کم و شکل سلول‌ها کاملاً گرد بود.

تکثیر و بقا سلول‌ها بر روی داربست‌ها

مناسب بودن داربست‌ها برای تکثیر سلول‌ها از طریق تست MTT بررسی شد. نتایج این تست در ۲۴ ساعت (نمودار ۲)، بیشترین میزان تکثیر را بر روی داربست‌های C/TCP و C/TCPHA فاقد ژلاتین نشان داد (۲/۷±۱۰۰/۰ و ۳/۲±۹۶/۲). البته داربست C/TCP حاوی ۲۰٪ ژلاتین نیز با درصد حیات سلولی ۲/۵±۹۲/۲ تفاوت معنی‌داری نسبت به این دوگروه نداشت (P=۰/۱۶۵). اما اضافه کردن ۱۰٪ ژلاتین به داربست‌های C/TCP باعث کاهش معنی‌دار تکثیر سلول‌ها نسبت به داربست فاقد ژلاتین شده بود (۲/۳±۶۹/۸) (P=۰/۰۰۹) همچنین اضافه نمودن ۱۰٪ و ۲۰٪ ژلاتین به داربست‌های C/TCPHA باعث کاهش معنی‌دار میزان تکثیر سلول‌ها شده بود (۲/۹±۶۴/۰ و ۲/۴±۶۲/۹) (P=۰/۰۰۹) هرچند که بین این دو گروه تفاوت معنی‌داری مشاهده نشد (P=۰/۱۴۲).



نمودار ۲- مقایسه درصد حیات سلول‌ها بر روی داربست‌های مختلف مورد مطالعه پس از ۲۴ ساعت مجاورت (P<۰/۰۵)*



نمودار ۳- مقایسه درصد حیات سلول‌ها بر روی داربست‌های مختلف مورد مطالعه پس از ۷۲ ساعت مجاورت (P<۰/۰۵)*

پس از ۷۲ ساعت مجاورت سلول‌ها با داربست‌ها (نمودار ۳)، بیشترین میزان تکثیر سلول‌ها مربوط به داربست‌های C/TCP و C/TCP حاوی ۲۰٪ ژلاتین بود (۳/۰±۱۰۰/۰). داربست حاوی ۱۰٪ ژلاتین همچنان کاهش معنی‌دار تکثیر سلول‌ها را نسبت به این دو داربست نشان می‌داد (۴/۷±۷۲/۳) (P=۰/۰۰۹). داربست

Archive of SID

www.SID.ir

C/TCPHA فاقد ژلاتین، پس از ۷۲ ساعت، کاهش معنی‌دار تکثیر سلول‌ها را نسبت به داربست C/TCP فاقد ژلاتین نشان داد (۸۹/۲±۲/۹) (P=۰/۰۲۳) و اضافه کردن ۱۰٪ ژلاتین نیز همچنان کاهش معنی‌دار تکثیر سلول‌ها را نسبت به داربست C/TCPHA فاقد ژلاتین نشان می‌داد (۷۶/۸±۱/۱) (P=۰/۰۰۸) اما این کاهش تکثیر در گروه حاوی ۲۰٪ ژلاتین هر چند که تفاوت معنی‌داری را با داربست C/TCP فاقد ژلاتین نشان داد (۸۱/۹±۱/۵) (P=۰/۰۰۹) اما نسبت به داربست C/TCPHA فاقد ژلاتین معنی‌دار نبود (P=۰/۰۸۶).

بحث و نتیجه‌گیری

نسبت تورم

در ارزشیابی زیستموادها برای کاربردهای مهندسی بافت، یکی از خصوصیات بسیار مهم، هیدروفیل بودن داربست است که باعث جذب آب مایعات بدن و انتقال مواد غذایی و متابولیت‌های سلولی می‌شود (۱۹). مطالعه TVL و همکاران نشان داد که افزایش غلظت ژلاتین باعث افزایش جذب آب می‌شود (۲۰) با اینحال نتایج مطالعه ما نشان داد که اضافه کردن ۱۰٪ ژلاتین به داربست‌های C/TCP باعث کاهش معنی‌دار تورم داربست شده و اضافه نمودن میزان ۲۰٪ ژلاتین تأثیر معنی‌داری بر میزان تورم ندارد. توجیه این امر می‌تواند به علت ماهیت هیدروفیل خود TCP باشد و به نظر می‌رسد که با اضافه نمودن ۱۰٪ ژلاتین به علت افزایش میزان کراس لینک در بین زنجیره‌ها، سایز تخلخل‌ها کاهش یافته و در نتیجه جذب آب نیز کاهش می‌یابد. در مطالعه Zheng و همکاران نیز گزارش شد که با افزایش درصد کیتوسان، سایز تخلخل‌ها کاهش می‌یابد (۳). البته افزایش درصد ژلاتین تا ۲۰٪، هرچند ممکن است باعث کاهش سایز تخلخل‌ها شود اما ماهیت هیدروفیل خود ژلاتین، اثر کاهش سایز تخلخل‌ها را خنثی کرده و به همین علت تفاوت معنی‌داری را با داربست فاقد ژلاتین نشان نمی‌دهد.

داربست‌های C/TCPHA، نسبت به C/TCP کاهش قابل‌توجه جذب آب را نشان دادند، اما اضافه کردن ۲۰٪ ژلاتین، باعث افزایش قابل‌توجه جذب آب در این داربست‌ها شد. به نظر می‌رسد که HA باعث کاهش خاصیت هیدروفیل داربست‌های C/TCP می‌شود اما افزودن ژلاتین تا ۲۰٪ می‌تواند این وضعیت را جبران نموده و جذب آب را افزایش دهد.

Peter و همکاران در مطالعه خود نشان دادند که نسبت تورم (Swelling) نقش مهمی در جذب سلول‌ها دارد و نمونه‌هایی که نسبت بالایی از تورم را نشان می‌دهند، احتمال چسبندگی و تکثیر سلولی بیشتری را نیز دارند (۸). در مطالعه ما نیز داربست C/TCP با بیشترین میزان تورم، بیشترین درصد تکثیر سلولی را نیز نشان داد.

مورفولوژی داربست‌ها و سلول‌های روی داربست‌ها

در این مطالعه کاهش سایز تخلخل‌ها در داربست‌های حاوی ژلاتین ۲۰٪ کاملاً مشهود بود. در مطالعه Zheng و همکاران نیز گزارش شد که با افزایش درصد کیتوسان، سایز تخلخل‌ها کاهش می‌یابد (۳). در مطالعه Isikli و همکاران که موروفولوژی سلول‌های Saos2 بر روی داربست‌های کیتوسان/ژلاتین، کیتوسان/ژلاتین دارای نانوهیدروکسی آپاتیت و کیتوسان/ژلاتین دارای هیدروکسی آپاتیت سینتر شده بررسی شد، پس از ۲۴ ساعت در همه داربست‌ها سلول‌ها به شکل گرد مشاهده شدند اما پس از ۷ روز، سلول‌ها کشیدگی بهتری پیدا کرده و به داخل تخلخل‌ها نفوذ کرده بودند (۲۱). در مطالعه حاضر در بعضی از داربست‌ها پس از ۲۴ ساعت چسبندگی مناسب سلول‌ها بر روی داربست و کشیدگی سلول‌ها کاملاً مشهود بود، درحالی که در داربست‌های حاوی HA و ژلاتین، چسبندگی مناسبی مشاهده نشد.

تست تکثیر سلولی بر روی داربست‌ها

مطالعات نشان داده‌اند که ژلاتین باعث افزایش چسبندگی سلول‌ها می‌شود (۶) با این حال نتایج مطالعه ما نشان داد که در ۲۴ ساعت، بیشترین میزان تکثیر سلولی بر روی داربست‌های C/TCP و C/TCPHA فاقد ژلاتین مشاهده می‌شود. با توجه به نتایج تست درصد جذب آب درمورد C/TCP و با در نظر گرفتن خاصیت هیدروفیل این ماده این امر کاملاً قابل توجیه است و به همین دلیل نیز با اضافه نمودن ۱۰٪ ژلاتین که باعث کاهش درصد تخلخل‌ها شده است، میزان چسبندگی سلول‌ها نیز کاهش یافته است. البته افزایش درصد ژلاتین تا ۲۰٪ (به خاطر خاصیت هیدروفیل زیاد ژلاتین) میزان چسبندگی سلول‌ها را تا حد داربست فاقد ژلاتین افزایش داده است. این

www.SID.ir
Archive of SID

وضعیت تا ۷۲ ساعت مجاورت سلول‌ها با داربست‌ها به همین شکل مشاهده می‌شود و تغییر معنی‌داری در وضعیت سلول‌ها پس از ۷۲ ساعت مشاهده نمی‌شود.

نتایج مطالعه ما نشان داد که اضافه نمودن HA به داربست‌ها در ۲۴ ساعت تفاوت معنی‌داری در چسبندگی سلول‌ها نسبت به داربست C/TCP فاقد ژلاتین ایجاد نمی‌کند. هر چند که میزان جذب آب در داربست C/TCPHA نسبت به داربست کمتر بود اما مطالعات نشان داده‌اند که خشونت بیشتر داربست‌های حاوی HA می‌تواند باعث چسبندگی اولیه مناسب سلول‌ها بر روی این داربست‌ها گردد (۲۲). اما مجاورت HA با سلول‌ها تا ۷۲ ساعت نسبت به داربست فاقد HA کاهش معنی‌داری را در تکثیر سلول‌ها نشان می‌دهد. علت این امر می‌تواند آزاد شدن یون‌های کلسیم و فسفات از داربست دارای HA و ایجاد محیط قلیایی پس از ۲۴ ساعت باشد که منجر به کاهش تکثیر سلول‌ها شده است (۸). افزودن ۱۰ و ۲۰ درصد ژلاتین به داربست‌های C/TCPHA، هرچند که در تست نسبت تورم باعث افزایش جذب آب شده بود، اما باتوجه به اینکه سرعت تجزیه داربست‌های کامپوزیتی با درصد بالای ژلاتین، بیشتر است (۲۳) و به تبع آن میزان یون‌های بیشتری از همان ابتدا در محیط آزاد می‌شوند، بنابراین در این داربست‌ها از همان شروع تماس سلول‌ها با داربست، به علت آزاد شدن بیشتر یون‌های کلسیم و فسفر و ایجاد محیط قلیایی تعداد سلول‌های بیشتری از بین خواهند رفت (۹).

هرچند که ژلاتین می‌تواند در بسیاری از داربست‌ها منجر به بهبود وضعیت داربست از نظر چسبندگی و تکثیر سلول‌ها شود، اما براساس نتایج این مطالعه و با درنظر گرفتن محدودیت‌های مطالعات آزمایشگاهی، افزودن ژلاتین به داربست‌های C/TCP و C/TCPHA تأثیر مطلوبی بر چسبندگی و پرولیفراسیون سلول‌ها بر روی این داربست‌ها نخواهد داشت. همچنین اضافه نمودن هیدروکسی آپاتیت به داربست‌های کیتوسان/بتا تری کلسیم فسفات، هرچند که در ۲۴ ساعت تفاوت محسوسی را در جذب و تکثیر سلول‌ها نشان نمی‌دهد، اما در دراز مدت (۷۲ ساعت) باعث کاهش تکثیر سلول‌ها می‌گردد.

تشکر و قدردانی

این مقاله حاصل طرح پژوهشی مصوب معاونت پژوهشی دانشکده دندانپزشکی دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی به شماره ۹۶۶۰۹۲۱۱۳۹۱ می‌باشد.

منابع:

1 Tabatabaei FS, Motamedian SR, Gholipour F, Khosraviani K, Khojasteh A. Craniomaxillofacial Bone Engineering by Scaffolds Loaded with Stem Cells: A Systematic Review. J Dent Sch. 2012;30(2):113-30.

2 Yang C, Frei H, Rossi FM, Burt HM. The differential in vitro and in vivo responses of bone marrow stromal cells on novel porous gelatinalginate scaffolds. J Tissue Eng Regen Med. 2009;3(8):601-14.

3 Zheng JP, Wang CZ, Wang XX, Wang HY, Zhuang H, Yao KD. Preparation of biomimetic threedimensional gelatin/montmorillonitechitosan scaffold for tissue engineering. Reac& Func Polym. 2007;67(9):7808.

4 Krishna Rao K.SV, Chung I, Ha CS. Synthesis and characterization of poly(acrylamidoglycolic acid) grafted onto chitosan and its polyelectrolyte complexes with hydroxyapatite. React Func Polym. 2008;68(5):94353.

5 Tanner KE. Bioactive composites for bone tissue engineering. Proc Inst Mech Eng H. 2010 ;224(12):1359-72.

6 Lien SM, Ko LY, Huang TJ. Effect of pore size on ECM secretion and cell growth in gelatin scaffold for articular cartilage tissue engineering. Acta Biomater. 2009;5(2):670-9.

7 Huang Y, Onyeri S, Siewe M, Moshfeghian A, Madihally SV. In vitro characterization of chitosangelatin scaffolds for tissue engineering. Biomater. 2005;26(36):761627.

8 Peter M, Ganesh N, Selvamurugan N, Nair SV, Furuike T. Preparation and characterization of chitosangelatin/nanohydroxyapatite composite scaffolds for tissue engineering applications. Carbohydr Polym. 2010;80(3):68794.

9 Chou L, Marek B, Wagner WR. Effects of hydroxylapatite coating crystallinity on biosolubility, cell attachment efficiency and proliferation in vitro. Biomater. 1999;20(10):97785.

10 Chang CH, Lin FH, Lin CC, Chou CH, Liu HC. Cartilage tissue engineering on the surface of a novel gelatincalciumphosphate biphasic scaffold in a doublechamber bioreactor. J Biomed Mater Res B Appl Biomater. 2004;71(2):313-21.

11 Eser EA, Elçin YM, Pappas GD. Neural tissue engineering: adrenal chromaffin cell attachment and viability on chitosan scaffolds. Neurol Res. 1998;20(7):648-54.

12 Kim HW, Kim HE, Salih V. Stimulation of osteoblast responses to biomimetic nanocomposites of gelatinhydroxyapatite for tissue engineering scaffolds. Biomater. 2005;26(25):5221-30.

13 Zheng L, Yang F, Shen H, Hu X, Mochizuki C, Sato M, et al. The effect of composition of calcium phosphate composite

Archive of SID
www.SID.ir

scaffolds on the formation of tooth tissue from human dental pulp stem cells. Biomater. 2011;32(29):7053-9.

1**4** Neovius E, Engstrand T. Craniofacial reconstruction with bone and biomaterials: review over the last 11 years. J Plast Reconstr Aesthet Surg. 2010;63(10):1615-23.

15 Hollister SJ, Lin CY, Saito E, Schek RD, Taboas JM, Williams JM, et al. Engineer Craniofacial Scaffolds. Orthod Craniofac Res. 2005;8(3):162-73.

16 Manso M, Ogueta S, HerreroFernández P, Vázquez L, Langlet M, GarcíaRuiz J. Biological evaluation of aerosol-gel-derived hydroxyapatite coatings with human mesenchymal stem cells. Biomater. 2002;23(19):3985-90.

17 Yaszemski M. Evolution of bone transplantation: molecular, cellular and tissue strategies to engineer human bone. Biomater. 1996;17(2):175-85.

18 Li JH, Liu DY, Zhang FM, Wang F, Zhang WK, Zhang ZT. Human dental pulp stem cell is a promising autologous seed cell for bone tissue engineering. Chin Med Sci J. 2011;124(23):4022-8.

19 Hu Q, Li B, Wang M, Shen J. Preparation and characterization of biodegradable chitosan/hydroxyapatite nanocomposite rods via in situ hybridization: a potential material as internal fixation of bone fracture. Biomater. 2004;25(5):779-85.

20 TVL HB, Vidyavathi M, Kavitha K, Sastry TP. Preparation and Evaluation of ChitosanGelatin Composite Films for Wound Healing Activity. Trends Biomater Artif Organs. 2010;24(3):123-30.

21 Isikli C, Hasirci V, Hasirci N. Development of porous chitosangelatin/hydroxyapatite composite scaffolds for hard tissueengineering applications. J Tissue Eng Regen Med. 2012;6(2):135-43.

22 Zhao F, Grayson WL, Ma T, Bunnell B, Lu WW. Effects of hydroxyapatite in 3D chitosangelatin polymer network on human mesenchymal stem cell construct development. Biomater. 2006;27(9):1859-67.

23 Zhuang H, Zheng JP, Gao H, De Yao K. In vitro biodegradation and biocompatibility of gelatin/montmorillonitechitosan intercalated nanocomposite. J Mater Sci Mater Med. 2007;18(5):951-7.

Archive of SID

www.SID.ir