Archive of SID

مقاله اصیل

مطالعه چسبندگی و تکثیر سلول بنیادی مزانشیمی مغز استخوان انسانی روی داربست نانوفیبری پلی کاپرولاکتون/ ژلاتین تغییر داده شده با پپتید RGD

علی مطاع[1]، عباس صاحبقدم‌لطفی[2*]، جلال برزین[3]، محمد معصومی[4]، مصطفی حاتم[4]، بهزاد ادیبی[1]

۱- دانشجوی دکتری تخصصی، گروه بیوشیمی بالینی، دانشکده علوم پزشکی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران
۲- استاد، گروه بیوشیمی بالینی، دانشکده علوم پزشکی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران
۳- دانشیار، گروه زیست- مواد، پژوهشگاه پلیمر و پتروشیمی، تهران، ایران
۴- استادیار، پژوهشگاه ملی مهندسی ژنتیک و زیست فناوری، تهران، ایران

*آدرس نویسنده مسئول: ایران، تهران، کدپستی: ۱٤۱۱۷۱۳۱۱٦، دانشگاه تربیت مدرس، دانشکده علوم پزشکی، گروه بیوشیمی بالینی
Email: lotfi_ab@modares.ac.ir

دریافت مقاله: ۹۱/۰۹/۲۱ پذیرش مقاله: ۹۲/۰۲/۱۷

چکیده

هدف: در این مطالعه پپتیدی حاوی توالی RGD از منشأ کلاژن IV معرفی شده است که دارای خصوصیات چسبندگی و تکثیری است. این پپتید روی داربست نانوفیبری پلی کاپرولاکتون/ ژلاتین تثبیت شد و چسبندگی و تکثیر سلول‌های بنیادی مزانشیمی مغز استخوان انسانی روی داربست تغییر داده شده توسط پپتید بررسی شد.

مواد و روش‌ها: داربست نانوفیبری پلی کاپرولاکتون/ ژلاتین توسط الکتروریسی سنتز و پپتید مورد نظر توسط روش سنتز پپتید در فاز جامد ساخته شد. این پپتید توسط پیوند شیمیایی روی داربست پلی کاپرولاکتون/ ژلاتین تثبیت شد. داربست‌های طبیعی و تغییر یافته توسط میکروسکوپ الکترونی نگاره و طیف مادون قرمز بررسی شد. چسبندگی و تکثیر سلول‌های بنیادی مزانشیمی مغز استخوان انسانی روی داربست طبیعی و داربست تغییر داده شده توسط آزمون MTT بررسی شد.

نتایج: تصاویر میکروسکوپ الکترونی نگاره نشان داد که داربست‌های نانوفیبری الکتروریسی شده دارای ریخت‌شناسی یکنواخت با قطر ۳۸±۱۹۰ نانومتر است. تغییر معنی‌داری در ریخت‌شناسی داربست قبل و بعد از تثبیت پپتید مشاهده نشد. نتایج طیف مادون قرمز نشان داد که پپتید با موفقیت روی داربست تثبیت شده است. براساس نتایج MTT مطالعات سلولی نشان داد که تثبیت پپتید روی داربست، چسبندگی سلول به داربست را در تمام زمان‌های مطالعه شده بهبود می‌بخشد. همچنین نشان داده شد که تثبیت پپتید منجر به افزایش قدرت تکثیر سلول‌ها روی داربست فعال شده با پپتید در مقایسه با داربست طبیعی و پلیت کشت سلولی می‌شود.

نتیجه‌گیری: پپتید RGD ساخته شده و تثبیت شده روی داربست نانوفیبری می‌تواند در کاربردهای مختلفی که نیاز به چسبندگی سلولی است استفاده شود و همچنین داربست ساخته شده و فعال شده با پپتید مورد نظر را می‌توان در مهندسی بافت مورد استفاده قرار داد.

کلیدواژگان: سلول بنیادی مزانشیمی، پپتید RGD، نانوفیبر، داربست

مجله علوم پزشکی مدرس: آسیب شناسی زیستی، دوره ۱۶، شماره ۱، بهار ۱۳۹۲، صفحات: ۷۵-۸۷

www.SID.ir

Archive of SID

مقدمه

در سال‌های اخیر محدوده وسیعی از مواد پلیمری زیستی (Biomaterials) با خصوصیات متعدد برای مهندسی زیستی و مهندسی بافت استفاده شده است. این زیست- مواد باید دارای خصوصیات زیست- تخریب‌پذیری (Biodegradability)، زیست- سازگاری (Biocompatibility) و زیست- فعالی (Bioactivity) مناسبی باشد [۱]. داربست ماتریکس خارج سلولی از مولکول‌های ساختاری و عملکردی همانند پروتئین‌های کلاژن (Collagen)، فیبرونکتین (Fibronectin)، لامینین (Laminin) و پروتئوگلیکان‌ها (Proteoglycan) ساخته شده است. این ماتریکس توسط سلول‌های موجود در هر بافتی ساخته و ترشح می‌شود. ترکیب ماتریکس خارج سلولی تأثیر چشمگیری بر رفتار سلولی مانند رشد، تکثیر، بقا، تمایز، مهاجرت و چسبندگی سلولی دارد؛ به همین دلیل استفاده از ماکرومولکول‌های ماتریکس خارج سلولی در مطالعات سلولی و ساخت زیست- مواد بسیار کاربرد دارد. ساختار زیست- مواد نیز دارای اهمیت خاصی بوده و بر میانکنش بین سلول و ماتریکس خارج سلولی تأثیر دارد [۲]. میان‌کنش بین سلول و ماتریکس در رفتارهای سلولی مانند چسبندگی، تکثیر و تمایز اهمیت دارد [۳]. چسبندگی سلولی اولین رویداد در پاسخ سلول به زیست ماده است [٤]. بسیاری از این زیست مواد دارای خصوصیات زیست- تخریب‌پذیری مناسب و خصوصیات مکانیکی قابل قبول هستند [٥]. یکی از موارد چالش‌زا در مورد زیست- مواد پلیمری مانند پلی کاپرولاکتون در کاربردهای زیست پزشکی این است که خصوصیات زیست- فعالی و زیست- مقلدی (Biomimetic) لازم برای میانکنش با سلول کشت شده را ندارد [٦]. راه‌کارهایی که می‌توان با استفاده از آن‌ها خصوصیات زیست- مقلدی چنین زیست موادی را بهبود بخشید، شامل تغییر این مواد با هیبرید کردن آن‌ها با ترکیبات زیست- فعال یا تثبیت موتیف‌های (Motifs) زیست فعال برای افزایش و کنترل میانکنش بین سلول‌ها و زیست- مواد صناعی است [۷].

الکتروریسی (Electrospinning) یک روش ساده با بازده بالا برای تولید نانوفیبرهای هیبرید با تخلخل بالا و سطح تماس بالا برای تقلید از الگوی نانوی ماتریکس خارج سلولی برای کنترل رفتار سلولی است [۲]. در سال‌های اخیر کوشش‌های فراوان منجر به تولید داربست‌های نانوفیبری پلیمری با استفاده از الکتروریسی برای کاربردهای زیست- پزشکی شده است [۸، ۹].

هیبرید کردن زیست مواد با ترکیبات زیست- فعالی مانند ژلاتین (Gelatin) [۱۰، ۱۱]، کلاژن [۱۲، ۱۳]، فیبرویین (Fibroin) [١٤] در بسیاری از مطالعات برای تعدیل خصوصیات زیست- تقلیدی مواد پلیمری برای بسیاری از کاربردها استفاده شده است. تثبیت پپتیدهای شناساگر سلول روی زیست- مواد [۱۵، ١٦] یا آمفی‌فیل‌های (Amphiphile) پپتیدی [۱۷، ۱۸] شیمی سطح زیست- مواد را بهبود بخشیده است. میانکنش‌های سلول- سلول و سلول- ماتریکس به واسطه گیرنده‌های چسبندگی سلولی انجام می‌شود. خانواده اینتگرین (Integrin) در بین وسیع‌ترین گروه‌ها در گیرنده‌های سلولی قرار دارد. این گیرنده‌ها نه تنها در اتصال سلول بلکه در بسیاری از فرآیندهای دیگر همانند تکثیر، تمایز، هوموستاز (Homeostasis) و غیره دخالت دارد [۱۹]. توالی RGD یکی از توالی‌های غالب شناساگر سلولی است که در بسیاری از پروتئین‌های ماتریکس خارج سلولی وجود دارد [۲۰]. نشان داده شده است که تقریباً نیمی از خانواده اینتگرین‌ها از طریق توالی RGD به پروتئین‌های ماتریکس متصل می‌شود. بنابراین پپتیدهای RGD یکی مؤثرترین پپتیدها برای بهبود چسبندگی سلولی به سطح زیست- مواد است.

در این مطالعه یک پپتید RGD جدید از منشأ کلاژن نوع IV معرفی و این پپتید روی سطح داربست نانوفیبری Polycaprolactone/Gelatin Nanofibrous) PCL/Gel Scaffold) تثبیت شده است. ساختار و ریخت‌شناسی (Morphology) نانوفیبرها توسط میکروسکوپ الکترونی نگاره (Scanning Electron Microscope: SEM) ارزیابی و داربست تغییر داده شده توسط طیف سنجی مادون قرمز تبدیل فوریه (Fourier Transform Infrared Spectroscopy:

www.SID.ir

Archive of SID

FTIR) بررسی شده است. همچنین چسبندگی و تکثیر سلول‌های بنیادی مزانشیمی مغز استخوان روی داربست مطالعه شده است.

مواد و روش‌ها

ساخت داربست

برای ساخت داربست هیبرید نانوفیبری پلی کاپرولاکتون/ ژلاتین (PCL/Gel) از روش الکتروریسی استفاده شد. برای این کار ابتدا محلول ۱۰ درصد وزنی/ حجمی از PCL گرانوله و Gel پودری در حلال تری فلوروواتانول (Tetrafluoroethanol: TFE) به صورت جداگانه تهیه شد. به این منظور هرکدام از این مواد با حلال مخلوط شده و به مدت ٢٤ ساعت در حرارت آزمایشگاه مخلوط شد. پس از آن محلول‌های همگن به نسبت ۱ به ۱ با هم مخلوط شده و محلول حاصل برای الکترواسپین تهیه شد.

به منظور الکتروریسی، محلول PCL/Gel در درون سرنگ ۱۰ میلی‌لیتری با سر سوزن شماره ۲۰ ریخته شد و در دستگاه الکتروریسی قرار داده شد. الکتروریسی با ولتاژ ۲۵ کیلوولت انجام شد. نانوفیبرها روی جمع کننده استوانه‌ای چرخان که در فاصله ۱۵ سانتی‌متری از سر سوزن قرار داشت و روی آن صفحه آلومینیومی کشیده شده بود، جمع‌آوری شد. سرعت چرخش جمع کننده ۲۵۰ دور در دقیقه بود.

پس از سنتز اولیه نانوفیبرها نمونه‌ای از آن به‌منظور بررسی سنتز نانوفیبرها برای تهیه تصاویر SEM تهیه شد. پس از تهیه تصاویر SEM، سنتز مجدد نانوفیبرها ادامه یافت تا ضخامت نانوفیبرها به اندازه مورد نظر برسد.

سنتز پپتید حاوی توالی RGD

برای سنتز پپتید حاوی توالی RGD از روش سنتز پپتید در فاز جامد استفاده شد. در این مطالعه پپتید روی بستر جامد Rink-amide-MBHA با ظرفیت بارگیری تئوری ۰/۵۵ میلی‌مول بر گرم سنتز شد. تمام محاسبات سنتز پپتید براساس ظرفیت بارگیری تئوری انجام شد. در مرحله سنتز پپتید از اسیدهای آمینه استانداردی که دارای گروه‌های محافظ مناسب بود استفاده شد. در هر مرحله به مقدار ٤ اکی‌مولار ظرفیت بارگیری از اسید آمینه مورد نظر استفاده شد. برای برداشت گروه‌های محافظ در هر مرحله از پیپریدین (Piperidine) ۲۰ درصد در دی متیل فرمامید استفاده شد. برای اتصال هر اسید آمینه در هر مرحله از معرف اتصالی HBTU (O-Benzotriazole-N, N, N', N'-tetramethyl-uronium-hexafluoro-phosphate) به میزان ۹۸ درصد بارگیری کل و دی ایزوپروپیل اتیل آمین (N,N-Diisopropylethylamine: DIEA) به میزان ۲/۵ اکی‌مولار بارگیری کل استفاده شد. برای بررسی اتصال اسید آمینه و همچنین بررسی برداشت گروه‌های محافظتی در هر مرحله آزمون کایزر (Kaiser Test) به کار رفت. به این منظور پس از هر مرحله اتصال اسید آمینه و برداشت گروه محافظتی، مقداری از رزین برداشته شد و بعد از شستشو با ایزوپروپانول، چند قطره محلول کایزر به رزین اضافه شد و به مدت ۲ دقیقه در دمای ۹۵ درجه سانتی‌گراد انکوبه شد. پس از سنتز پپتید در فاز جامد روی رزین مورد نظر، رزین توسط متانول خالص ۲ بار شستشو و در خلأ خشک شد. پس از خشک شدن، پپتید سنتز شده توسط تری فلورواستیک اسید (Trifluoroacetic Acid) ۹۵ درصد، تری ایزوپروپیل سیلان (Triisopropylsilane) ۲/۵ درصد و آب مقطر ۲/۵ درصد به مدت ۲ ساعت از رزین جامد جدا شد و با استفاده از دی اتیل اتر سرد رسوب داده شد. پس از رسوب‌گیری و شستشو، پپتید سنتز شده در مقداری آب حل شده و لیوفیلیزه (Lyophilised) شد. میزان خلوص و کیفیت پپتید سنتز شده توسط کروماتوگرافی HPLC (High-Performance Liquid Chromatography) آنالیزی با ستون C18 توسط گرادیان فاز متحرک آب و استونیتریل (Acetonitrile) بررسی شد. سپس پپتید سنتز شده، براساس روش به دست آمده از کروماتوگرافی آنالیزی توسط کروماتوگرافی با مقیاس بالا خالص سازی شد. برای بررسی خلوص پپتید به دست آمده دوباره از HPLC آنالیزی استفاده

www.SID.ir

Archive of SID

شد و همچنین برای بررسی درستی سنتز پپتید، از طیف سنجی کروماتوگرافی مایع- اسپکترومتری جرمی (Liquid Chromatography– Mass Spectrometry: LC-MS) استفاده شد.

ایجاد اتصالات متقاطع در داربست هیبرید نانوفیبری

برای پایدارسازی نانوفیبرها، اتصال متقاطع بین آن‌ها ایجاد شد. در این مطالعه برای ایجاد پیوندهای متقاطع بین نانوفیبرها از کربودی ایمید (Carbodiimide) محلول در آب N- اتیل دی کربو دی ایمید (N- Ethylcarbodiimide: EDC) و N- هیدروکسی سوکسینیمید (N- Hydroxysuccinimide: NHS) استفاده شد. این ماده برای ایجاد اتصال متقاطع مناسب است زیرا نوعی پیوند ایجاد می‌کند که شبیه پیوندهای موجود در پروتئین‌ها در رشته‌های ژلاتین است.

برای ایجاد اتصال متقاطع، ابتدا محلول ۲۵۰ میلی‌مولار EDC و ۱۰۰ میلی‌مولار NHS ساخته شد. داربست نانوفیبری مورد نظر به مدت ۱ ساعت در این محلول قرار داده شد. پس از این مدت با استفاده از آزمون نینهیدرین (Ninhydrin Test) واکنش اتصال متقاطع بررسی شد. پس از آن قسمتی از داربست نانوفیبری در محیط خلأ خشک شد و از آن تصویر SEM تهیه شد و باقیمانده داربست بدون انجام هیچ تیماری در مرحله بعد استفاده شد.

تثبیت پپتید روی داربست

برای افزایش خواص اتصال سلول به نانوفیبرها پپتید سنتز شده دارای توالی RGD روی نانوفیبرها تثبیت شد. به همین منظور دوباره از ترکیبات جفت کننده گروه‌های کربوکسیل و آمین استفاده شد. ابتدا داربست نانوفیبری در اندازه‌های بریده شده تحت تأثیر EDC و NHS قرار گرفت. پس از شستشو، داربست مورد نظر در محلول حاوی پپتید با غلظت ۱ میکرومول در هر میلی‌لیتر قرار داده شد و به مدت ۲٤ ساعت در حرارت آزمایشگاه انکوبه شد. پس از انجام واکنش اتصال، داربست در خلأ خشک شد.

تأیید تثبیت پپتید روی داربست

برای تأیید تثبیت پپتید روی نانوفیبرها آزمون FTIR انجام شد. به این منظور طیف مادون قرمز قطعه کوچکی از داربست فعال شده در محدوده ٦۰۰ تا $4000 cm^{-1}$ گرفته شده و وجود پیوندهای C-I کششی در محدوده ۸۰۰ بررسی شد.

بررسی‌های ریخت‌شناختی (SEM)

تصاویر SEM برای بررسی سنتز داربست نانوفیبری و بررسی شکل ظاهری داربست قبل و بعد از تثبیت پپتید تهیه شد. به این منظور این داربست‌ها با طلا پوشش داده شد و تصاویر SEM با ولتاژ ۱۰ کیلو ولت تهیه شد. قطر فیبرها با استفاده از نرم‌افزار پردازش تصویر (Image J، آمریکا) بررسی شد.

مطالعات سلولی

برای بررسی تأثیر تثبیت پپتید روی دابست بر چسبندگی سلولی و همچنین تکثیر سلولی، سلول‌های مزانشیمی مغز استخوان انسانی (Human Bone Marrow Stem Cells: hBMSC) روی داربست‌های مورد نظر کشت داده شدند. به منظور بررسی چسبندگی سلولی، داربست نانوفیبری فعال نشده و فعال شده با پپتید به وسیله پانچ به اندازه چاهک‌های پلیت ۹٦ خانه بریده شد. قبل از انجام آزمون چسبندگی داربست نانوفیبری توسط اتانول ۷۰ درصد به مدت ۳۰ دقیقه استریل شد و پس از آن داربست‌های بریده شده به دقت داخل چاهک‌های پلیت گذاشته شد و توسط نور فرابنفش به مدت ۱۵ دقیقه دیگر استریل شد. پس از تهیه سوسپانسیون سلولی سلول‌های مزانشیمی، تعداد ۵۰۰۰ سلول به هر چاهک اضافه شد. آزمون MTT برای بررسی چسبندگی سلولی، ۱، ۲، ۳ و ٤ ساعت پس از اضافه کردن سلول‌ها انجام شد. به این منظور پس از گذشت

www.SID.ir

Archive of SID

زمان مذکور محیط کشت داخل چاهک‌ها خارج شد و محیط کشت حاوی ۱۰ درصد نمک MTT به هر چاهک اضافه شد و پلیت به مدت ٤ ساعت در انکوباتور انکوبه شد. پس از آن محیط کشت خارج شده و به میزان ۱۰۰ میکرولیتر DMSO (Dimethyl sulfoxide) به هر چاهک اضافه شد. پس از ۱۵ دقیقه میزان جذب نوری هر چاهک در طول موج ۵۷۰ نانومتر سنجیده شد.

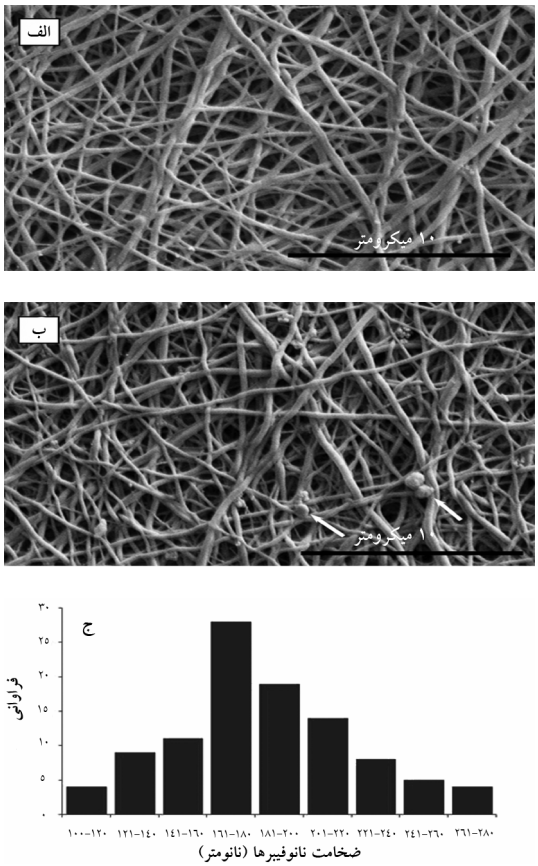
تجزیه و تحلیل آماری

تجزیه و تحلیل آماری توسط نرم‌افزار SPSS نسخه ۱۷ انجام شد. تمام آزمایش‌های کشت سلولی به صورت سه تکراری انجام شد. مقادیر میانگین و انحراف معیار از میانگین برای تجزیه و تحلیل داده‌های چسبندگی و تکثیر سلولی استفاده شد. برای مقایسه مقادیر میانگین در داربست‌های مختلف آزمون آنالیز واریانس یک طرفه (One- way Analysis of Variance: ANOVA) به‌کار رفت. مقادیر P کمتر از ۰/۰۵ با فاصله اطمینان ۹۵ درصد از لحاظ آماری معنی‌دار در نظر گرفته شد.

نتایج

ساخت داربست و بررسی‌های ریخت‌شناختی (SEM)

داربست هیبرید نانوفیبری PCL/Gel با موفقیت ساخته شد. نانوفیبرهای ساخته شده شکل یکنواختی داشت و هیچ دانه‌ای در طول نانوفیبرها مشاهده نشد. همچنین قطر نانوفیبرها نیز یکنواخت و اندازه آن‌ها ۳۸ ± ۱۹۰ نانومتر بود (شکل ۱ الف). برای افزایش مقاومت مکانیکی و همچنین جلوگیری از آب‌گیری ژلاتین در داربست نانوفیبری، در این داربست اتصالات متقاطع ایجاد شد. نتایج نشان داد که ریخت‌شناسی نانوفیبرها پس از ایجاد اتصالات متقاطع تغییر قابل توجهی نداشت و اندازه نانوفیبرها تقریباً ثابت بود (شکل ۱ ب).



شکل ۱ تصاویر SEM مربوط به ریخت‌شناسی نانوفیبرها (الف) قبل و (ب) بعد از تثبیت پپتید روی داربست؛ همان‌طور که در شکل مشاهده می‌شود، تغییر محسوسی در شکل و ریخت‌شناسی نانوفیبرها پس از ایجاد اتصال متقاطع و تثبیت پپتید مشاهده نمی‌شود. (ج) توزیع اندازه نانوفیبرها که توسط نرم‌افزار پردازش تصویر Image J بررسی شده‌است. خط مقیاس: ۱۰ میکرومتر

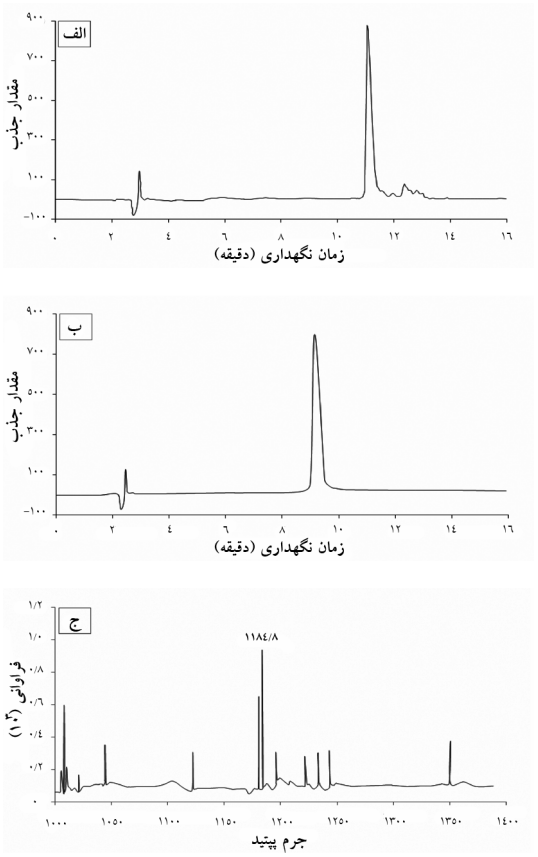
ساخت پپتید حاوی توالی RGD

پپتید حاوی توالی RGD با توالی -KKGPRGDPG-F(4-I) با جرم مولکولی تئوریک تقریباً ۱۱۸۳ با موفقیت ساخته شد. پس از سنتز پپتید خام، خلوص آن با HPLC آنالیزی بررسی شد (شکل ۲). پس از ارزیابی اولیه توسط کروماتوگرافی، برای خالص‌سازی پپتید از کروماتوگرافی تولیدی با مقیاس بالا (سیستم کروماتوگرافی Agilent 1260) استفاده شد. پس از انجام خالص‌سازی دوباره کروماتوگرافی آنالیزی انجام شد که خلوص پپتید بیش از ۹۵ درصد به دست آمد (شکل ۲). برای

www.SID.ir

Archive of SID

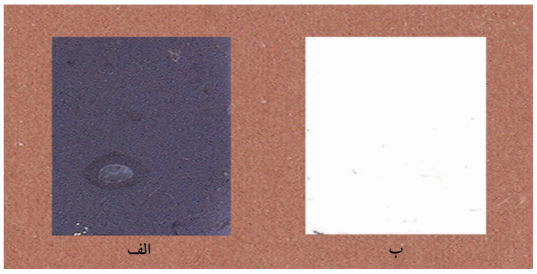
تأیید درستی ساخت پپتید نیز اسپکترومتری جرمی (LC-MS) انجام شد. نتایج MS یک قله (Peak) واضح در ناحیه ۱۱۸٤/۸ نشان داد که درستی ساخت پپتید را تأیید می‌کند (شکل ۲).



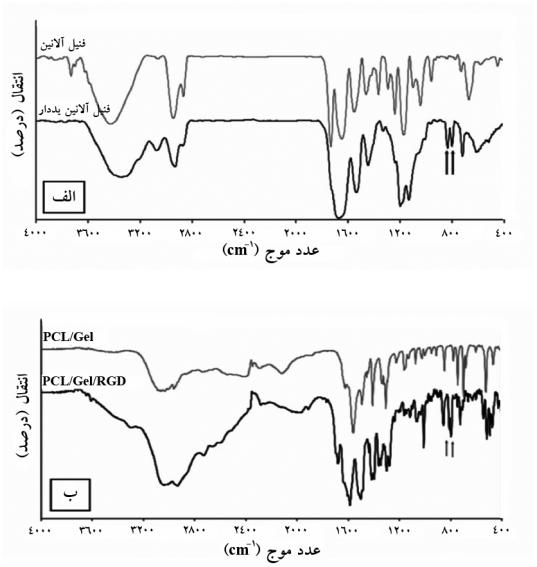
شکل ۲ کروماتوگرام مربوط به (الف) پپتید خام و (ب) پپتید خالص شده. پس از خالص‌سازی توسط کروماتوگرافی تهیه‌ای، ناخالصی‌های موجود در محصول پپتید خام برطرف شده و خلوص پپتید به بیش از ۹۸ درصد رسید. (ج) طیف اسپکترومتری جرمی مربوط به پپتید ساخته شده که قله مربوط به جرم پپتید (m/z) در ۱۱۸٤ مشخص است.

ایجاد اتصالات متقاطع در داربست هیبرید نانوفیبری

در بررسی ایجاد اتصالات متقاطع در داربست از آزمون نینهیدرین کیفی استفاده شد. همان‌طور که مشاهده می‌شود آزمون نینهیدرین قبل از ایجاد اتصالات متقاطع مثبت بوده و داربست به رنگ بنفش در آمده است ولی پس از ایجاد اتصالات متقاطع داربست آزمون نینهیدرین منفی بوده و داربست به رنگ سفید مشاهده می‌شود (شکل ۳).



شکل ۳ آزمون نینهیدرین برای بررسی ایجاد اتصالات متقاطع (الف) قبل و (ب) بعد از ایجاد اتصالات متقاطع؛ قبل از ایجاد اتصال متقاطع گروه‌های آمین موجود در داربست آزاد بوده و با نینهیدرین واکنش می‌دهد که ایجاد رنگ می‌کند در صورتی که پس از ایجاد اتصال متقاطع گروه‌های آمین آزاد نبوده و واکنشی صورت نمی‌گیرد.



شکل ٤ (الف) طیف FTIR مربوط به استانداردهای فنیل آلانین و فنیل آلانین یددار که در فنیل آلانین یددار قله مربوط به پیوندهایی کششی C-I در ناحیه نزدیک $800\ cm^{-1}$ کاملاً مشخص است. (ب) طیف FTIR مربوط به داربست‌های PCL/Gel و PCL/Gel فعال شده با RGD. که قله مربوط به پیوندهای کششی C-I در ناحیه نزدیک $800\ cm^{-1}$ کاملاً مشهود است.

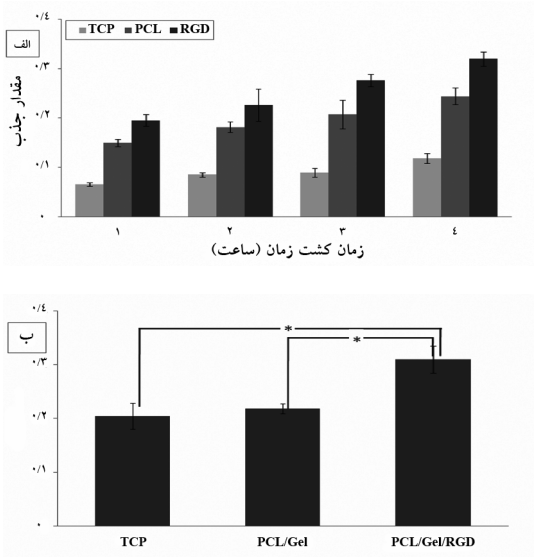
تأیید تثبیت پپتید

نتایج FTIR برای تأیید تثبیت پپتید روی داربست در شکل

www.SID.ir

Archive of SID

٤ نـشان داده شـده اسـت. بـرای تأییـد تثبیـت پپتیـد از طیـف استاندارد فنیل آلانین و فنیل آلانین ید دار استفاده شد. در طیف فنیل آلانین ید دار دو قله مـشخص در $^{-1}$cm ۷۹۸ و $^{-1}$cm ۸۱۲ به وضوح قابل مشاهده است کـه ایـن دو قلـه را مـی‌تـوان بـه حضور ید در مولکول فنیل آلانین ید دار نسبت داد. این دو قله در طیف FTIR مربوط بـه داربـست PCL/Gel وجـود نـدارد ولی در طیف مربوط به داربست فعال شده با پپتید، قلـه اول در ناحیه $^{-1}$cm ۷۹۸ قابـل مـشاهده اسـت. قلـه دوم نیـز بـا کمـی جابه‌جایی در ناحیه $^{-1}$cm ۸٤۰ به وضوح قابل مشاهده است.



شکل ۵ (الف) نمودار مربوط به آزمون MTT برای بررسی چسبندگی سلولی پس از کشت سلول‌های MSC روی داربسـت‌هـای PCL/Gel و PCL/Gel فعال شده با پپتید در زمان‌های ۱، ۲، ۳ و ٤ ساعت، (ب) نمـودار مربـوط بـه آزمون MTT برای بررسی تکثیر سلولی پس از کشت سلول‌های MSC روی داربست‌های PCL/Gel و PCL/Gel فعال شده با پپتید پـس از ۷۲ سـاعت، میزان چسبندگی (P<۰/۰۵) و تکثیر (P<۰/۰۵) سلول‌ها روی داربست فعـال شده به وضوح بسیار بیشتر از داربست فعال نشده و پلیت کشت سلول است.

مطالعات سلولی

نتایج آزمـون MTT (3-(4,5-dimethythiazol-. 2-yl)-2, 5-diphenyl tetrazolium bromide) در شـکل ۵ نـشان داده شده است. در این آزمون، شدت رنگ تولید شـده ارتبـاط مستقیم با تعداد سلول‌های زنده اتصال یافته بـه داربـست دارد. هر چه اتصال بیشتر باشد، شدت رنگ ایجـاد شـده نیـز بیـشتر است. همان‌طور که در نمودار شکل ۵ نـشان داده شـده اسـت، شدت رنگ ایجاد شده در داربست فعال شده با پپتیـد در تمـام زمان‌های مورد نظر بیشتر از داربست فعال نشده و پلیت کشت سلول است (P<۰/۰۵). این شکل نشان می‌دهد که چـسبندگی سلولی روی پلیت کشت سلولی در زمان‌های مختلـف تفـاوت چندانی ندارد ولی چسبندگی سلولی روی داربست PCL/Gel و همچنین PCL/Gel فعال شده با پپتید با گذشت زمان حالت پیشرونده‌ای دارد. این نتایج همچنین نشان مـی‌دهـد کـه میـزان چسبندگی سلول به داربست فعال شده با پپتید بـسیار بیـشتر از دو گروه دیگر است (P<۰/۰۵). نتایج آزمون تکثیر سلولی پس از کشت سلول‌ها به مدت ۷۲ ساعت نیـز نـشان داد کـه میـزان تکثیر سلول‌ها روی داربست فعال شده با پپتید بـسیار بیـشتر از پلیت کشت سلولی و داربست فعال نشده است (P<۰/۰۵).

بحث

در این مطالعه پپتید حاوی تـوالی RGD مـشتق از کـلاژن IV که دارای خصوصیات چسبندگی و تکثیـر سـلولی اسـت، ساخته شد. این پپتید به طور موفقیت‌آمیـزی بـر روی داربـست هیبرید نانوفیبری PCL\Gel تثبیت شد. تثبیت پپتید با اسـتفاده از پیوند شیمیایی و بدون تیمار شیمیایی پس از ایجاد اتـصالات متقاطع انجام شد تا چسبندگی hBMSC به داربـست افـزایش یافته و خاصیت تقلید زیستی داربست بهبود یابد.

مـاتریکس خـارج سـلولی از مـاکرومولکول‌هـای مختلفـی تشکیل شده است که پروتئین‌های کلاژن، لامینین و فیبرونکتین جزو فـراوان‌تـرین ایـن پـروتئین‌هـا محـسوب مـی‌شـود. ایـن پروتئین‌ها نقش ساختاری و عملکردی داشته و تأثیر مـستقیمی بر اکثر رفتارهای سلولی همانند رشد، تکثیر، مهاجرت و تمـایز دارد. استفاده از این مولکول‌های پروتئینی در مطالعات مهندسی بافت بسیار مورد توجه قرار گرفته است. با این حـال بـه دلیـل عدم دسترسی و هزینه بالا، استفاده از آن‌ها بسیار محدود است. به این دلیل استفاده از توالی‌های موجود در این پروتئین‌هـا کـه

www.SID.ir

Archive of SID

خاصیت چسبندگی دارد، بسیار متداول شده است.

ریخت‌شناسی و شیمی سطح داربست‌های مورد استفاده در مهندسی بافت و پزشکی بازیابی نیز تأثیر مهمی بر رفتار سلولی مانند چسبندگی، تکثیر، تمایز و میانکنش سلول با ماتریکس خارج سلولی دارد [۲۱]. یکی از موارد چالش‌زا در ارتباط با مواد پلیمری همانند PCL، میانکنش ناکافی و غیراختصاصی بین پلیمرها و سلول‌ها است [۲۲]. بسیاری از پلیمرهای صناعی همانند PCL آب‌گریز بوده و فاقد گروه‌های فعالی همانند هیدروکسیل، کربوکسیل، آمین و سولفات است. راهبردهای تغییر سطح بسیاری برای ایجاد چنین گروه‌های فعالی در سطح PCL توسعه یافته است.

از آنجایی‌که سطح PCL فاقد گروه‌های فعالی مانند آمین یا کربوکسیل است، به راحتی نمی‌توان آن را تغییر داد. هیدرولیز بازی و آمینولیز روش‌های مناسبی برای ایجاد این گروه‌های فعال هستند. با این حال استفاده از این روش‌ها خصوصیات ساختاری و ریخت‌شناختی نانوفیبرهای PCL را تغییر داده و می‌تواند به تشکیل نانوفیبرهای ناپایدار از لحاظ مکانیکی و ریخت‌شناختی منجر شود [۲۳]. برای تولید گروه‌های فعال، معمولاً PCL با مولکول‌های زیستی (Biomolecules) دیگری همانند کلاژن، الاستین، فیبرویین و پپتیدهای فعال کننده سطح مخلوط شده یا سطح آن با این مولکول‌های زیستی تغییر داده می‌شود. ژلاتین که از کلاژن مشتق می‌شود، بسیار ارزان بوده و می‌تواند برای حل این کمبود استفاده شود. بنابراین در این مطالعه PCL به صورت فیزیکی با ژلاتین مخلوط شد. محققان حاضر به این نتیجه رسیدند که داربست PCL/Gel هیبرید دارای اتصال متقاطع خصوصیات چسبندگی سلولی بهبود یافته‌ای دارد. این بهبود چسبندگی حاصل حضور گروه‌های بسیار فعال و قطبی ژلاتین بر سطح نانوفیبرهای الکتروریسی شده است. اثر PCL/Gel هیبرید بر رفتار سلولی در مطالعات قبلی بررسی شده است. نشان داده شده است که داربست نانوفیبری PCL/Gel می‌تواند تمایز سلول‌های بنیادی مخچه به سمت سلول‌های عصبی را افزایش دهد [۲٤]. داربست‌های هیبرید متشکل از PCL و کلاژن برای بازسازی عروق استفاده شده است. تیلمن (Tillman) و همکاران نشان داده‌اند که داربست‌های PCL/Col دارای قدرت و یکپارچگی بالایی در داخل بدن بوده و پاسخ ایمنی غیرطبیعی ایجاد نمی‌کند. این محققین چنین نتیجه گرفته‌اند که این داربست‌ها می‌تواند در موارد بالینی به کار برده شود [۲۵]. مک‌کلور (McClure) و همکاران از یک ماتریکس سه لایه برای تقلید از ساختار طبیعی رگ با استفاده از PCL، الاستین و کلاژن استفاده کرده‌اند. آن‌ها نتیجه گرفته‌اند که این پیوند سه لایه عروقی دارای خصوصیات کلی سرخرگ طبیعی است [۲٦]. ژلاتین به عنوان شکل واسرشت شدهٔ کلاژن در بسیاری از داربست‌های زیست- تخریب پذیر استفاده شده است. یکی از معایب ژلاتین به صورت ساده یا در ترکیب با سایر زیست- مواد، آب‌گیری آن در محیط آبی است. برای حل این مشکل می‌توان با استفاده از اتصال دهنده‌های شیمیایی مانند گلوتارآلدیید (Glutaraldehyde) و فرمالدیید (Formaldehyde) در ژلاتین اتصال متقاطع ایجاد کرد. با این حال نشان داده شده است که این اتصال دهنده‌ها در مقادیر بالا سمی هستند [۲۷] و ریخت‌شناسی داربست را نیز به هم می‌ریزند [۲۳]. EDC یک اتصال دهنده مؤثر است و پیوندهایی را ایجاد می‌کند که محصول جانبی غیر سمی داشته و پیوند خارجی در ژلاتین ایجاد نمی‌کند. نشان داده شده است که EDC به عنوان یک کربودی ایمید محلول در آب می‌تواند برای ایجاد اتصال متقاطع در ژلاتین استفاده شود. این ماده وقتی به صورت ترکیبی با اتانول استفاده شود از آب‌گیری ژلاتین حتی در فرآیند ایجاد اتصال متقاطع جلوگیری می‌شود.

ایجاد اتصال متقاطع در داربست توسط EDC مستلزم فعال شدن گروه کربوکسیل انتهای کربوکسیل، گروه کربوکسیل زنجیره جانبی آسپارتات و گلوتامات و تشکیل پیوند آمیدی و جفت شدن آن‌ها با گروه آمین لیزین است. در حقیقت EDC/NHS باعث تشکیل اتصالات متقاطع داخل مولکولی و بین مولکولی در ژلاتین می‌شود [۲۳]. گروور (Grover) و همکاران نشان داده‌اند که ایجاد اتصالات متقاطع در داربست‌های ژلاتینی می‌تواند استحکام مکانیکی آن را بهبود

www.SID.ir

Archive of SID

بخشیده و مقاومت تخریبی آن را تعدیل نماید که باعث فراهم نمودن داربست‌هایی با یکپارچگی ساختاری بالا می‌شود [۲۹].

در این مطالعه پپتید مورد نظر بلافاصله پس از ایجاد اتصالات متقاطع تثبیت شد تا با استفاده از گروه‌های فعال شده کربوکسیل اضافی، پپتید از انتهای آمین بر روی داربست تثبیت شود. نشان داده شده است که ژلاتین نسبت به گروه آمین (لیزین) تقریباً ۱۲ درصد گروه کربوکسیل (گلوتامات و آسپارتات) اضافی دارد [۳۰]. بنابراین زمانی که در ژلاتین به مقداری اتصال متقاطع ایجاد شود که آزمون نینهیدرین منفی شود، تقریباً تمام گروه‌های آمین با گروه‌های کربوکسیل جفت شده‌است و گروه‌های کربوکسیل اضافی را می‌توان برای تثبیت پپتید و فعال‌سازی بیشتر استفاده کرد. برای تثبیت پپتید مورد نظر یا سایر بیومولکول‌ها راهبردهای متفاوتی استفاده می‌شود؛ به این منظور در پپتید ساخته شده دو گروه لیزین گنجانده شد تا پپتید از طریق گروه آمین زنجیره جانبی با گروه‌های کربوکسیلی که در مرحله ایجاد اتصال متقاطع فعال شده‌است، جفت شود. به دلیل این‌که پپتید ترکیب مشابهی با ژلاتین دارد، باید یک گروه فنیل آلانین تغییر یافته برای تأیید تثبیت پپتید روی داربست استفاده می‌شد. یافته‌های FTIR تثبیت پپتید روی داربست را تأیید می‌کنند.

نتایج تأیید کرد که تثبیت پپتید روی داربست، چسبندگی و تکثیر hBMSC را به طور قابل توجهی افزایش می‌دهد. مشخص شده است که تثبیت موتیف‌های چسبندگی، شیمی سطح زیست مواد را بهبود می‌بخشد. طی سال‌های اخیر تعداد زیادی از پپتیدهای حاوی توالی RGD با توالی‌های متفاوت از منشاء پروتئین‌های ECM (Extracellular Matrix Proteins) ساخته شده است [۲۲]. این پپتیدهای روی چندین پلیمر و توسط روش‌های فیزیکی و شیمیایی مختلف تثبیت شده‌است. نشان داده شده است که تثبیت پپتیدهای حاوی توالی RGD روی زیست مواد نانوفیبری چسبندگی سلولی و میانکنش سلول- ماتریکس را بهبود می‌بخشد [۳۱-۳۲]. ژانگ (Zhang) و همکاران میانکنش hBMSC با داربست منفذدار تغییر داده شده با RGD را مطالعه کرده‌اند. آن‌ها نشان داده‌اند که تثبیت RGD روی داربست PCL اتصال hBMSC و توزیع آن روی داربست را بهبود می‌بخشد. آن‌ها همچنین دریافته‌اند که مسیرهای انتقال پیام با واسطه اینتگرین‌ها توسط تغییر داربست با RGD فعال شده و افزایش می‌یابد. نشان داده شده است که فعال شدن این مسیرها منجر به بقاء و رشد سلول می‌شود [۳۳].

نتایج بررسی‌های چسبندگی سلولی نشان داد که داربست PCL/Gel تغییر داده شده با پپتید طراحی شده قدرت چسبندگی بهتری نسبت به داربست PCL/Gel طبیعی دارد و می‌توان آن را برای تغییر سطح زیست موادی که قدرت چسبندگی پایینی دارد به کار برد. تثبیت پپتید همچنین اثر قابل توجهی بر تکثیر سلول‌های کشت داده شده داشت که این توانایی در تولید زیست موادی که برای پزشکی بازتوانی استفاده می‌شود، بسیار اهمیت دارد.

دراین مطالعه یک پپتید جدید حاوی توالی RGD از منشأ کلاژن نوع IV سنتز شده و روی داربست فعال شده PCL/Gel تثبیت شد. یک نشانگر ید برای ردیابی تثبیت پپتید در توالی استفاده شد. برای تأیید خصوصیات چسبندگی سلولی، از آزمون MTT استفاده شد. نتایج نشان داد که تثبیت پپتید بر داربست با موفقیت انجام شده است و پپتید تثبیت شده می‌تواند چسبندگی و تکثیر سلولی را افزایش دهد. با در نظر گرفتن نتایج این مطالعه، تغییر داربست PCL/Gel توسط این پپتید جدید سازگاری زیستی و قابلیت استفاده از این داربست را در کشت سلول‌های بنیادی و مهندسی بافت را افزایش می‌دهد.

تشکر و قدردانی

این مقاله مستخرج از رساله دکتری رشته بیوشیمی بالینی که با حمایت‌های مالی دانشکده علوم پزشکی دانشگاه تربیت مدرس انجام شده است.

www.SID.ir

Archive of SID

منابع

[1] Hench LL, Polak JM. Third-generation biomedical materials. Science 2002; 295(5557): 1014-7.

[2] Stevens MM, George JH. Exploring and engineering the cell surface interface. Science 2005; 310(5751): 1135-8.

[3] Hunt JA. Regenerative medicine: Materials in a cellular world. Nat Mater 2008; 7(8): 617-8.

[4] Geiger B, Spatz JP, Bershadsky AD. Environmental sensing through focal adhesions. Nat Rev Mol Cell Biol 2009; 10(1): 21-33.

[5] Peña J, Corrales T, Izquierdo-Barba I, Doadrio AL, Vallet-Regí M. Long term degradation of poly(3-caprolactone) films in biologically related fluids. Polym Degrad Stab 2006; 91: 1424-32.

[6] Elbert DL and Hubbell JA. Surface Treatments of Polymers for Biocompatibility. Annu Rev Mater Sci 1996; 26: 294-365.

[7] Hubbell JA. Bioactive biomaterials. Curr Opin Biotechnol 1999; 10(2): 123-9.

[8] Jahani H, Kaviani S, Hassanpour-Ezatti M, Soleimani M, Kaviani Z, Zonoubi Z. The effect of aligned and random electrospun fibrous scaffolds on rat mesenchymal stem cell proliferation. Cell J 2012; 14(1): 31-8.

[9] Eslaminejad MB, Bagheri F, Zandi M, Nejati E, Zomorodian E. Study of Mesenchymal Stem Cell Proliferation and Bone Differentiation on Composite Scaffolds of PLLA and Nano Hydroxyapatite with Different Morphologies. Cell Journal (Yakhteh) 2011; 12(4):469-76.

[10] Zhang Y, Ouyang H, Lim CT, Ramakrishna S, Huang ZM. Electrospinning of gelatin fibers and gelatin/PCL composite fibrous scaffolds. J Biomed Mater Res B Appl Biomater 2005; 72(1): 156-65.

[11] Chong EJ, Phan TT, Lim IJ, Zhang YZ, Bay BH, Ramakrishna S, Lim CT. Evaluation of electrospun PCL/gelatin nanofibrous scaffold for wound healing and layered dermal reconstitution. Acta Biomater 2007; 3(3): 321-30.

[12] Choi JS, Lee SJ, Christ GJ, Atala A, Yoo JJ. The influence of electrospun aligned poly(epsilon-caprolactone)/collagen nanofiber meshes on the formation of self-aligned skeletal muscle myotubes. Biomaterials 2008; 29(19): 2899-906.

[13] Zhang YZ, Venugopal J, Huang ZM, Lim CT, Ramakrishna S. Characterization of the surface biocompatibility of the electrospun PCL-collagen nanofibers using fibroblasts. Biomacromolecules 2005; 6(5): 2583-9.

[14] Wang S, Zhang Y, Yin G, Wang H, Dong Z. Electrospun Polylactide/Silk Fibroin–Gelatin Composite Tubular Scaffolds for Small-Diameter Tissue Engineering Blood Vessels. J Appl Polym Sci 2009; 113: 2675-82.

[15] Jo S, Engel PS and Mikos AG. Synthesis of poly(ethylene glycol)-tethered poly(propylene fumarate) and its modification with GRGD peptide. Polymer. 2000; 41(21): 7595-604.

[16] Quirk RA, Chan WC, Davies MC, Tendler SJ, Shakesheff KM. Poly(L-lysine)-GRGDS as a biomimetic surface modifier for poly(lactic acid). Biomaterials 2001; 22(8): 865-72.

www.SID.ir

Archive of SID

[17] Andukuri A, Kushwaha M, Tambralli A, Anderson JM, Dean DR, Berry JL, Sohn YD, Yoon YS, Brott BC, Jun HW. A hybrid biomimetic nanomatrix composed of electrospun polycaprolactone and bioactive peptide amphiphiles for cardiovascular implants. Acta Biomater 2011; 7(1): 225-33.

[18] Tambralli A, Blakeney B, Anderson J, Kushwaha M, Andukuri A, Dean D, Jun HW. A hybrid biomimetic scaffold composed of electrospun polycaprolactone nanofibers and self-assembled peptide amphiphile nanofibers. Biofabrication 2009; 1(2): 025001.

[19] van der Flier A, Sonnenberg A. Function and interactions of integrins. Cell Tissue Res 2001; 305(3): 285-98.

[20] Ruoslahti E. RGD and other recognition sequences for integrins. Annu Rev Cell Dev Biol 1996; 12: 697-715.

[21] Massumi M, Abasi M, Babaloo H, Terraf P, Safi M, Saeed M, Barzin J, Zandi M, Soleimani M. The effect of topography on differentiation fates of matrigel-coated mouse embryonic stem cells cultured on PLGA nanofibrous scaffolds. Tissue Eng Part A 2012; 18(5-6): 609-20.

[22] Hersel U, Dahmen C, Kessler H. RGD modified polymers: biomaterials for stimulated cell adhesion and beyond. Biomaterials 2003; 24(24): 4385-415.

[23] Zhang YZ, Venugopal J, Huang ZM, Lim CT, Ramakrishna S. Crosslinking of the electrospun gelatin nanofibers. Polymer 2006; 47(8): 2911-7.

[24] Ghasemi-Mobarakeh L, Prabhakaran MP, Morshed M, Nasr-Esfahani MH, Ramakrishna S. Electrospun poly (epsilon-caprolactone)/ gelatin nanofibrous scaffolds for nerve tissue engineering. Biomaterials 2008; 29(34): 4532-9.

[25] Tillman BW, Yazdani SK, Lee SJ, Geary RL, Atala A, Yoo JJ. The in vivo stability of electrospun polycaprolactone-collagen scaffolds in vascular reconstruction. Biomaterials 2009; 30(4): 583-8.

[26] McClure MJ, Sell SA, Simpson DG, Walpoth BH, Bowlin GL. A three-layered electrospun matrix to mimic native arterial architecture using polycaprolactone, elastin, and collagen: a preliminary study. Acta Biomater 2010; 6(7): 2422-33.

[27] Sisson K, Zhang C, Farach-Carson MC, Chase DB, Rabolt JF. Evaluation of cross-linking methods for electrospun gelatin on cell growth and viability. Biomacromolecules 2009; 10(7): 1675-80.

[28] Tomihata K, Ikada Y. Cross-linking of gelatin with carbodiimides. Tissue Eng 1996; 2(4): 307-13.

[29] Grover CN, Cameron RE, Best SM. Investigating the morphological, mechanical and degradation properties of scaffolds comprising collagen, gelatin and elastin for use in soft tissue engineering. J Mech Behav Biomed Mater 2012; 10: 62-74.

[30] Songchotikunpan P, Tattiyakul J, Supaphol P. Extraction and electrospinning of gelatin from fish skin. Int J Biol Macromol 2008; 42(3): 247-55.

[31] Irvine DJ, Ruzette AV, Mayes AM, Griffith LG. Nanoscale clustering of RGD peptides at surfaces using comb polymers. 2. Surface

www.SID.ir

Archive of SID

segregation of comb polymers in polylactide. Biomacromolecules 2001; 2(2): 545-56.

[32] Park KH. Arg-Gly-Asp (RGD) sequence conjugated in a synthetic copolymer bearing a sugar moiety for improved culture of parenchymal cells (hepatocytes). Biotechnol Lett 2002; 24: 1401-6.

[33] Zhang H, Lin CY, Hollister SJ. The interaction between bone marrow stromal cells and RGD-modified three-dimensional porous polycaprolactone scaffolds. Biomaterials 2009; 30(25): 4063-9.

www.SID.ir