

بررسی میزان اتصال و رشد سلولهای فیروبلاست انسانی بر روی بستر تهیه شده از

ترکیبات پلیمری (مت) آکریلاتی.



مسلم صدقی^۱، حسین نادری منش^{۱*} و مسعود سلیمانی^۲

^۱ ایران، تهران، دانشگاه تربیت مدرس، دانشکده علوم زیستی، گروه بیوفیزیک/نانوبیوتکنولوژی

^۲ ایران، تهران، دانشگاه تربیت مدرس، دانشکده علوم پزشکی، گروه هماتولوژی

تاریخ پذیرش: ۹۶/۱۱/۱۶

تاریخ دریافت: ۹۶/۹/۱۱

چکیده

نیاز روز افزون به مواد مناسب برای کشت سلول و کاربردهای بالینی پژوهشگران علوم مواد و به عبارت درست تر زیست مواد را بر آن داشته است که در جستجوی مواد زیست سازگار و بهینه نوینی برای کشت سلول باشند، بسترهای مورد استفاده در سامانه های کشت سلول باید علاوه بر زیست سازگاری، ویژگیهای فیزیکی- شیمیایی مناسبی برای اتصال و رشد سلول، عدم القای تمایز خود به خودی سلولهای بنیادی و نیز قابلیت سازگاری با انواع مختلفی از سلولها را داشته باشد. در میان انبوهی از زیست مواد موجود، پلیمرهای ترکیبی آکریلاتی و متاکریلاتی از نظر کنترل فرآیند ساخت و نیز ویژگیهای مکانیکی، فیزیکی و شیمیایی از جمله موادی هستند که قابلیت استفاده در بسیاری از سیستمهای کشت سلول را دارند. در پژوهش حاضر ترکیبی از چندین مونومر آکریلاتی به منظور بررسی میزان اتصال و رشد سلولهای فیروبلاست انسانی مورد ارزیابی قرار گرفتند.

نتایج به دست آمده مؤید این موضوع بود که برخی از این ترکیبات پلیمری از نظر اتصال و رشد، بستر بسیار مناسبی برای کشت و تکثیر سلول بوده و از نظر درجه آب دوستی در حد مطلوبی قرار دارند. همچنین بسترهای مورد مطالعه از نظر ذاتی به سبب دارا بودن گروههای عاملی متعدد برخلاف بسترهای سنتی همچون پلی استایرن، برای اتصال کوالان دیگر مولکولها به ویژه بیومولکولها مناسب بوده و برای مطالعه و بررسی اثر حضور آنها در تماس با سلولها بستری بسیار مناسب خواهد بود.

واژه های کلیدی: پلی(مت) آکریلات، اتصال سلول، بستر کشت سلول.

* نویسنده مسئول، تلفن: ۸۲۸۸۴۴۱۰، پست الکترونیکی: naderman@modares.ac.ir

مقدمه

باید مکان مناسبی را برای اتصال و رشد سلول فراهم سازند، این مهم در مطالعات بسیاری مورد بررسی قرار گرفته و تأیید شده است که ویژگیهای توپوگرافیک سطح، اتصال و رشد سلول را متأثر از خود می سازد. (۴، ۵، ۷، ۸ و ۱۰) همچنین مواد مورد استفاده در کشت سلول و آزمایشات بالینی باید سمی نبوده و غیرمحلول در آب و پایدار باشند (۹).

در این مطالعه نقش ترکیبات مونومری مختلف آکریلاتی و متاکریلاتی در تهیه پلیمری مرکب به عنوان بستری برای

در سالهای اخیر نیاز زیست شناسان و متخصصین بالینی به مواد مناسب برای کاربردهای آزمایشگاهی و درون بدن همچون پروتزها و استنتهای قلبی و یا بسترهای مورد استفاده در کشت سلولهای بنیادی به منظور تکثیر مؤثر آنها، جامعه علوم مواد و پلیمر را به چالش کشانده است (۱۱). مطالعه شیمی سطح موادی که برای رشد سلولها مورد استفاده قرار گرفته اند از اهمیت بالایی برخوردار است (۹).

بسترهای مناسب کشت سلول علاوه بر زیست سازگاری

شرایط آب دوستی در ایجاد شرایط فیزیکی- شیمیایی مناسب اتصال سلول نقش دارد.

پیش‌تر می و همکارانش ترکیبی از چندین مونومر آکریلاتی برای تهیه بستری مناسب برای کشت سلولهای بنیادی پرتوان انسانی را مورد استفاده قرار دادند و ارتباط بین میزان سختی (Stiffness) و توانایی تشکیل کلنی سلولهای بنیادی پرتوان مورد بررسی قرار دادند. نتایج این مطالعات نشان می‌دهد که پلیمرهایی که زاویه تماس آب آنها متعادل بود (بین ۶۵ تا ۸۰ درجه) و جزء دسته مونومرهایی با چندین گروه آکریلاتی ساخته شده بودند بیشترین میزان تشکیل کلنی را از خود نشان دادند (۶ و ۱۱).

مواد و روشها

مواد و ابزار آزمایشگاهی: مونومر های هیدروکسی اتیل متاکریلات (HEMA)، ۲-کربوکسی اتیل آکریلات (-2-CEA)، تترائیلن گلیکول دی متاکریلات (TEGDMA) همگی از شرکت سیگا-آلدريج™ (Sigma-Aldrich™) خریداری گردید. همچنین آغازگرهای نوری ایرگاکور Bis (2,4,6-trimethylbenzoyl-) ۸۱۹ (phenylphosphineoxide) و داروکور ۱۱۷۳ (-2-Hydroxy-2-methyl-1-phenyl-propan-1-one) نیز از شرکت سیگما-آلدريج تهیه گردید. پلیتهای کشت سلول مورد استفاده در این پژوهش از شرکت SPL کره جنوبی تهیه گردید. اتانول ۲۰۰-پروف مورد استفاده از شرکت سیگما-آلدريج™ تهیه گردید.

هوخست ۳۳۳۴۲ و رسازورین سدیم (معرف تست آلامار آبی (Alamarblue®)) به منظور انجام تستهای سلولی از شرکت سیگما تهیه گردید. دستگاه پخت فرابنفش تزریق نیتروژن (Nitrogen Purged UV Chamber) مورد استفاده در این پژوهش توسط محقق ساخته شد و در پروسه ثبت اختراع قرار دارد، همچنین دستگاه ATR-FTIR مورد

رشد سلول مورد بررسی قرار گرفت. هر چند پیش از این انواع مختلفی از مواد به عنوان بستر کشت سلول مورد ارزیابی قرار گرفته شده اند در مقایسه با آنها پلیمرهای مرکب (مت) آکریلاتی قابلیت‌های منحصر به فردی از خود نشان می‌دهند. پلیمرهای مرکب آکریلاتی علاوه بر ویژگیهای ذکر شده شفاف بوده، به حرارت مقاوند و در تماس با محیط آبی قابلیت تشکیل هیدروژل دارند. آکریلاتها همچنین زیست موادهایی با قابلیت تنظیم ویژگیهای فیزیکی هستند که به طور متداول مورد استفاده قرار می‌گیرند (۱۲).

در این مطالعه ۴ نوع مونومر آکریلاتی به دو گروه HEMA و NVP تقسیم شدند. هر گروه شامل ۳ مونومر بودند که تنها مونومر اول آنها با یکدیگر تفاوت دارد. این دو گروه خود شامل ۹ ترکیب با نسبت مختلف از سه مونومر تشکیل دهنده خود هستند.

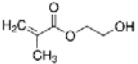
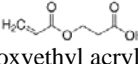
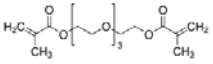
گروه HEMA شامل سه مونومر هیدروکسی اتیل متاکریلات (HEMA)، ۲-کربوکسی اتیل آکریلات (-2-CEA) و تترائیلن گلیکول دی متاکریلات (TEGDMA) است و گروه NVP شامل ۱-وینیل ۲-پیرولیدون (NVP) بوده، دو پلیمر دیگر آن مشابه با گروه اول است. نسبتهای این سه مونومر در ۹ حالت مختلف تهیه گردید و از آنجا که مونومر سوم نقش ارتباط دهنده (crosslinker) و مونومر دوم نقش حامل گروه کربوکسیل و نیز مونومر اول به عنوان مونومر آب دوست (hydrophil) در این گروه حضور دارد تغییرات در مقادیر و نسبتهای این سه مونومر تأثیر مهمی در خواص فیزیکی- شیمیایی بستر پلیمری نهایی به جای می‌گذارد. همچنین وجود گروه عاملی کربوکسیلیک در یکی از مونومر ها امکان استفاده از بستر نهایی به عنوان پایه ای مناسب به منظور اتصال مولکولهای زیستی همچون پپتیدهای مشتق شده از ECM را ممکن می‌سازد (۱۲). این گروه عاملی همچنین به دلیل ایجاد

متاکریلات با دو مونومر دیگر که شامل ۲-کربوکسی اتیل آکریلات و تترا اتیلن گلیکول دی متاکریلات بودند در نسبت‌های مختلف (۹ حالت) ترکیب شده سپس با دو آغازگر نوری با نسبت ۳ درصد حجمی- حجمی مخلوط گردیده و نهایتاً به منظور رقیق سازی در دو حالت ۲ درصد حجمی- حجمی و ۱۰ درصد حجمی- حجمی با اتانول ۲۰۰-پروف ترکیب شده و برای پوشش سازی کف پلیت و فلاسک کشت سلول به کار برده شد. به همین صورت نیز ترکیبات گروه NVP تهیه شدند، نسبت‌های تهیه شده شامل ۹ حالت مختلف برای گروه HEMA و ۹ حالت مختلف برای گروه NVP بود و درصد های نهایی این مخلوطها در اتانول نیز شامل دو حالت ۲ درصد در اتانول و ۱۰ درصد در اتانول بوده که در مجموع ۳۶ حالت مختلف پلیمری را شامل گردید. ترکیبات گروه HEMA به ترتیب Poly(meth)acrylate (PMA01-PMA09) و ترکیبات گروه NVP به ترتیب PMA11-PMA19 نام گرفتند. از این پس در تمامی نمودارها نام گذاری به همین صورت خواهد بود.


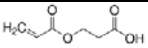
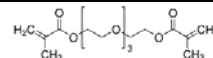
استفاده ساخت شرکت ترمو-فیشر Nicolet™ iSTM 50 و نیز دستگاه زاویه تماس ساخت شرکت دیتا فیزیکس (Dataphysics™) بوده است. همچنین از دستگاه Cytation3 ساخت کمپانی بیوتک (BioTek™) به منظور انجام تست اتصال و سمیت سلول استفاده گردید. همچنین به منظور انجام تستهای آماری آنالیز واریانس دو طرفه (Two-way ANOVA) و تست مقایسه چندگانه توکی (Tukey) از نرم افزار GraphPad Prism™ 7.0 استفاده شد.

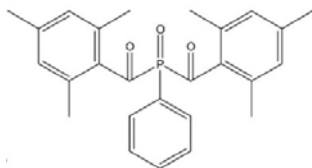
تهیه بسترهای پلیمری: بسترهای پلیمری مورد استفاده همگی از ترکیب ۴ مونومر آکریلاتی در دو گروه سه تایی تهیه شدند (جدولهای ۱ و ۲)، هر گروه از یک مونومر آب دوست، یک مونومر حامل گروه کربوکسیلیک و یک مونومر به عنوان ارتباط دهنده تشکیل شده بودند. در گروه اول از مونومر هیدروکسی اتیل متاکریلات (HEMA) و در گروه دوم از مونومر n-وینیل پیرولیدون (NVP) به عنوان مونومر آب دوست استفاده شد، دیگر مونومرهای دو گروه با هم یکسان بودند، در گروه اول مونومر هیدروکسی اتیل

جدول ۱

ترکیبات PMA			
شماره PMA	مونومر آب دوست (% حجم)	مونومر کربوکسیل دار (% حجم)	مونومر اتصال دهنده (% حجم)
PMA 01	 Hydroxyethyl methacrylate (80)	 2-Carboxyethyl acrylate (20)	 Tetra[ethylene glycol] dimethacrylate (3)
PMA 02	Hydroxyethyl methacrylate (80)	2-Carboxyethyl acrylate (20)	Tetra[ethylene glycol] dimethacrylate (10)
PMA 03	Hydroxyethyl methacrylate (80)	2-Carboxyethyl acrylate (30)	Tetra[ethylene glycol] dimethacrylate (6)
PMA 04	Hydroxyethyl methacrylate (70)	2-Carboxyethyl acrylate (20)	Tetra[ethylene glycol] dimethacrylate (10)
PMA 05	Hydroxyethyl methacrylate (70)	2-Carboxyethyl acrylate (20)	Tetra[ethylene glycol] dimethacrylate (3)
PMA 06	Hydroxyethyl methacrylate (70)	2-Carboxyethyl acrylate (30)	Tetra[ethylene glycol] dimethacrylate (10)
PMA 07	Hydroxyethyl methacrylate (50)	2-Carboxyethyl acrylate (20)	Tetra[ethylene glycol] dimethacrylate (30)
PMA 08	Hydroxyethyl methacrylate (50)	2-Carboxyethyl acrylate (30)	Tetra[ethylene glycol] dimethacrylate (20)
PMA 09	Hydroxyethyl methacrylate (50)	2-Carboxyethyl acrylate (50)	Tetra[ethylene glycol] dimethacrylate (30)

جدول ۲

ترکیبات PMA			
شماره PMA	مونومر آب دوست (% حجم)	مونومر کربوکسیل دار (% حجم)	مونومر اتصال دهنده (% حجم)
PMA 11	 1-Vinyl-2-pyrrolidinone (80)	 2-Carboxyethyl acrylate (20)	 Tetra[ethylene glycol] dimethacrylate (3)
PMA 12	1-Vinyl-2-pyrrolidinone (80)	2-Carboxyethyl acrylate (20)	Tetra[ethylene glycol] dimethacrylate (10)
PMA 13	1-Vinyl-2-pyrrolidinone (80)	2-Carboxyethyl acrylate (30)	Tetra[ethylene glycol] dimethacrylate (6)
PMA 14	1-Vinyl-2-pyrrolidinone (70)	2-Carboxyethyl acrylate (20)	Tetra[ethylene glycol] dimethacrylate (10)
PMA 15	1-Vinyl-2-pyrrolidinone (70)	2-Carboxyethyl acrylate (20)	Tetra[ethylene glycol] dimethacrylate (3)
PMA 16	1-Vinyl-2-pyrrolidinone (70)	2-Carboxyethyl acrylate (30)	Tetra[ethylene glycol] dimethacrylate (10)
PMA 17	1-Vinyl-2-pyrrolidinone (50)	2-Carboxyethyl acrylate (20)	Tetra[ethylene glycol] dimethacrylate (30)
PMA 18	1-Vinyl-2-pyrrolidinone (50)	2-Carboxyethyl acrylate (30)	Tetra[ethylene glycol] dimethacrylate (20)
PMA 19	1-Vinyl-2-pyrrolidinone (50)	2-Carboxyethyl acrylate (50)	Tetra[ethylene glycol] dimethacrylate (30)

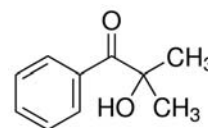


Bis(2,4,6-trimethylbenzoyl)-phenylphosphineoxide (Irgacure 819)

تصویر ۲

گروه NVP کاملاً شبیه گروه HEMA بوده با این تفاوت که مونومر n- وینیل پیرولیدون جایگزین مونومر هیدروکسی متیل متآکریلات گردید. به این ترتیب دو گروه مونومری بوجود آمد که با توجه به اینکه ۹ حالت مختلف مونومری و نهایتاً ۲ درصد متفاوت مخلوط نهایی برای این دو گروه در نظر گرفته شد، در مجموع ۴ پلیت ۹۶ خانه هر کدام ۷۲ خانه (۸ تکرار برای هر حالت) به علاوه ۸ تکرار برای حالت TCP در کل ۲۹۶ خانه با روش رسوبدهی (casting) پوشش داده شد. ساختار مونومرها و نیز آغازگرهای نوری به کار رفته در این آزمایش در جدولهای ۱ و ۲ قابل مشاهده است.

گروه HEMA شامل سه مونومر هیدروکسی اتیل متاکریلات (مونومر شماره ۱)، ۲-کربوکسی اتیل آکریلات (مونومر شماره ۲) و تترا اتیلن گلیکول دی متاکریلات (TEGDMA) به همراه ۲ آغازگر نوری بیس (۲،۴،۶-تری متیل بنزویل)-فنیل فسفاین اکساید (Irgacure 819) و ۲-هیدروکسی-۲-متیل پروپیونون (Darocur 1173) (تصویر ۱،۲) هر کدام از این دو آغازگر با غلظت نیم درصد وزنی-وزنی نسبت به مخلوط نهایی آکریلاتی تهیه شدند. میزان آغازگرهای نوری در ترکیبات تهیه شده برای همه ترکیبات یکسان در نظر گرفته شد تا تنها متغیر آزمایش خود ترکیبات مونومری و نسبت آنها با همدیگر و نیز رقت آنها در اتانول باشد.



2-Hydroxy-2-methylpropiophenone (Darocur 1173)

تصویر ۱

مدت زمان ۲۴ ساعت در انکوباتور کشت سلول در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد و CO₂ ۵ درصد کشت داده شده و سپس با استفاده از رنگ فلورسنت هوست ۳۳۳۴۲ هسته سلولهای زنده رنگ آمیزی شد و نهایتاً با دستگاه Cytation3 در طول موج تحریک ۳۵۰ نانومتر و طول موج تابش ۴۶۱ نانومتر با gain=100 خوانده شد. نتایج در نمودارهای ۳-الف و ب قابل ملاحظه است.

همچنین به منظور بررسی رشد و تکثیر بلند مدت و عدم سمیت سلولی، تست آلامار بلو (Alamarblue) انجام شد. به این منظور محلول ۰/۰۲ درصد (غلظت نهایی) از نمک رسازورین سدیم شرکت سیگما آلد ریچ در بافر فسفات سالین تهیه گردید، این غلظت از نمک مذکور به منظور انجام تست سمیت سلولی و زنده مانی سلولهای جانوری مناسب است (۱۲). سپس سلولهای کشت داده شده بر روی پلیمر را پس از گذشت زمانهای ۳ و ۵ روز از انکوباتور خارج کرده و پس از حذف محیط رویی محلول رسازورین سدیم را به آن افزوده و به مدت ۴ ساعت در انکوباتور قرار داده تا ترکیب مذکور توسط سلولهای زنده و محیط احیاءکننده آنها احیاء گردد و ترکیب رسوفورین سدیم که شدیداً فلورسنت است تولید کند. پس از گذشت زمان مذکور با استفاده از دستگاه Cytation3 و با طول موج تحریک ۵۴۵ نانومتر و طول موج تابش ۵۹۵ نانومتر و gain=100 پلیتها خوانده شدند. داده های حاصل از تستهای زنده مانی و تکثیر سلولی توسط نرم افزار گراف-پد به روش آنالیز واریانس دوطرفه و تست مقایسه چندگانه توکی مورد تحلیل قرار گرفت، مقادیر در قالب نمودارهای روزهای اول، سوم و پنجم ارائه گردیده است.

نتایج

نتایج تست زاویه تماس: از بین ترکیباتی پلی آکریلاتی مورد آزمایش در تست تکثیر سلولی ۸ ترکیب از نتایج روز سوم انتخاب شدند. این ترکیبات میزان رشد سلول را در حد قابل توجهی نسبت به کنترل (TCP) حفظ کردند.

پوشش سازی ترکیبات آکریلاتی با قرار دادن ۰/۵ - ۲۰ میکرولیتر از محلول نهایی مونومری در کف پلیت ۹۶ خانه قرار گرفت. محلول آکریلاتی حاصل سپس به مدت ۵-۹۰ دقیقه درون دسیکاتور (یا زیر هود فیوم (fume hood)) قرار گرفت تا حلال آن به طور کامل تبخیر گردد. حضور حلال به علت اختلال در پلیمریزاسیون مانع روند پلیمریزه شدن می گردد.

پس از تبخیر حلال، نمونه تحت تابش پرتو فرابنفش با توان تابشی حدوداً 2 mW/cm² قرار گرفت، این فرآیند با حفظ دمای واکنش در دمای اتاق کنترل گردید. پلیتهای حاصل سپس به مدت ۴۸ ساعت درون آب دوبار یونیزه بر روی همزن مغناطیسی شستشو شدند تا مونومرهای احتمالی شرکت نکرده در واکنش از آن خارج گردند.

پس از شست و شوی پلیتها، آنها در دمای اتاق خشک شدند و برای انجام تستهای سلولی به مدت ۶۰ دقیقه تحت تابش پرتو فرابنفش یونیزان درون هود لامینار قرار گرفته و پس از آن تا زمان کشت سلول تحت شرایط استریل نگهداری شدند.

کشت سلول: به منظور بررسی اتصال و زیست پذیری سلولی بر روی بسترهای آکریلاتی، ابتدا پلیتهای ۹۶ خانه که تحت پوشش پلیمر به شرح فوق قرار گرفته بودند انتخاب گردیدند. پلیتها تحت پرتو فرابنفش استریلیزه شده و قبل از کشت سلول با PBS یکبار شسته شدند. سلولهای فیروبلست انسانی (HFF) پرایمری پاساژ ۵ تهیه گردید. و با محیط DMEM high Glc. و سرم گاوی ۱۰ درصد کشت داده شد. سپس درون پلیتهایی که با پلیمر پوشش دهی و استریل شده بودند کاشته شدند. برای پلیتهای ۹۶ خانه روزهای اول تا پنجم بین ۵۰۰۰ تا ۳۰۰۰ سلول در هر خانه کاشته شد. برای بررسی تست اتصال سلولی، ۲ دسته پلیمری HEMA و NVP طبق توضیح قبلی به همراه کنترل TCP در ۴ پلیت ۹۶ خانه در دو غلظت ۲ و ۱۰ درصد استفاده شد. آزمایش اتصال سلول و رشد کوتاه مدت در

و نیز PMA03 با PMA13 در جایگزین شدن هیدروکسی اتیل متاکریلات توسط N-وینیل پیرولیدون است و حتی نسبت پلیمری یکسانی دارند. از این رو تفاوت‌های موجود در زاویه تماس قطره آب در این ترکیبات پلیمری حاصل از همین جایگزینی است. نکته دیگر اختلاف معنی دار زاویه تماس برای ترکیب PMA01 در دو حالت ۲ درصد و ۱۰ درصد آن است، که در این مورد نشان‌دهنده رابطه معکوس ضخامت پلیمر بر خیس شونده‌گی (Wettability) بستر است (جدول ۳). زوایای تماس ترکیبات آکریلاتی مختلف که جزئیات آن در جدول ۱ آمده است.

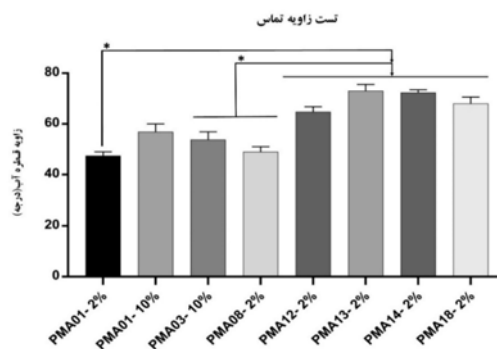
همان‌طور که در نمودار ۱ مشهود است PMA01 ۲ درصد، به میزان معناداری نسبت به PMA12-14 & PMA18 زاویه تماس کمتری داشته و طبیعتاً آب دوست تر است. همچنین PMA03، ۱۰ درصد و PMA08، ۲ درصد هر دو به طور معنی داری از PMA12-14 & PMA18 زاویه تماس کمتری داشته و آب دوست تر هستند. میزان آب دوستی هر ترکیب به طور مشخصی متأثر از گروه‌های عاملی در معرض آن است و PMA03 & 08 به دلیل دارا بودن مونومر HEMA به جای NVP بیشتر آب دوست هستند، همان‌طور که پیش‌تر گفته شد تنها تفاوت PMA08 با PMA18

جدول ۳- مقادیر زوایای تماس هشت ترکیب آکریلاتی.

شماره ترکیب	غلظت نهایی ترکیب	میانگین زاویه تماس	شماره ترکیب	غلظت نهایی ترکیب	میانگین زاویه تماس
الف	PMA08	۴۹,۰° ± ۲,۰°	ج	PMA12	۶۴,۸° ± ۲,۰°
ب	PMA01	۴۷,۵° ± ۱,۵°	چ	PMA13	۷۳,۱° ± ۲,۵°
پ	PMA01	۵۶,۹° ± ۳,۱°	ح	PMA14	۷۲,۴° ± ۱,۱°
ت	PMA03	۵۳,۸° ± ۳,۱°	خ	PMA18	۶۸,۱° ± ۲,۵°

گروه کربوکسیل مونومر ۲-کربوکسی اتیل آکریلات و یا گروه هیدورکسیل مونومر هیدروکسی اتیل متاکریلات (درمورد گروه دارای مونومر HEMA) مشتق شده باشد (۱۵).

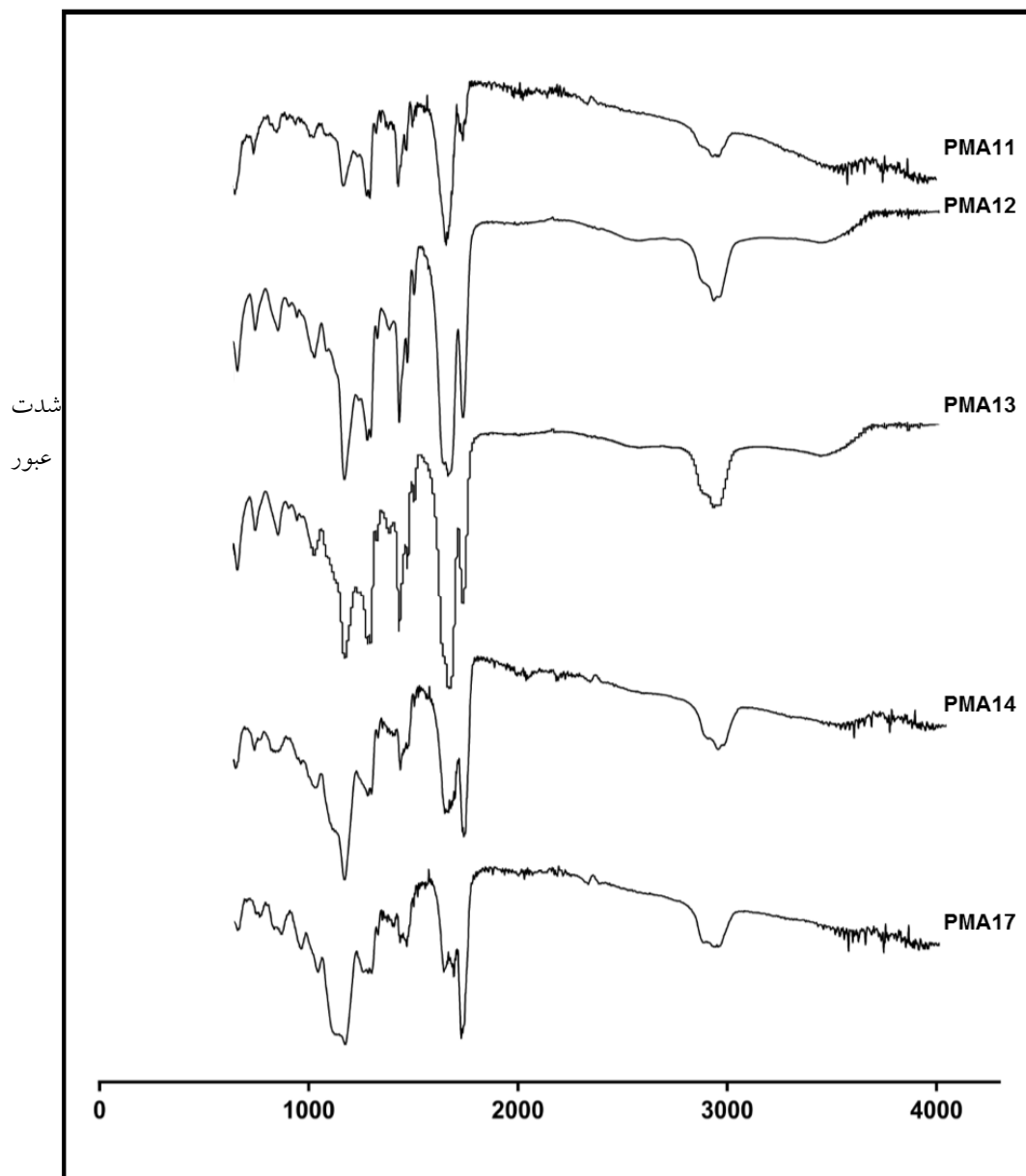
در حدود عدد موجی ۱۷۱۷ پیک مربوط به گروه کربونیل (-C=O) مشاهده می‌گردد که مربوط به گروه استری یا اسیدی (کربوکسیلیک اسیدی) است. البته سهم گروه‌های استری در این پیک بیشتر است ولی با این وجود این هر دو روی هم منطبق می‌شوند. همچنین پیک در حدود ناحیه 1425 cm^{-1} آمید نوع سه است که به علت حضور مونومر NVP قابل مشاهده است که در اصل حاصل کشش پیوند کربن-نیتروژن بوده و البته به علت رزونانس موجود روی پیوند مذکور در ملکول NVP حد واسط یگانه و دوگانه است (۱۴).



نمودار ۱

به منظور ارزیابی شکل‌گیری لایه پلیمری ترکیبات (پلی)آکریلاتی و نیز مقایسه تغییرات شیمیایی سطح در اثر تغییر دادن نسبت و نوع ترکیبات مونومری، اسپکتروسکوپی ATR-FTIR انجام گرفت (نمودار ۲).

نوارهای انتقالی (Transmittance) در 3400 cm^{-1} حضور گروه هیدورکسیل (OH) را نشان می‌دهد که می‌تواند از



نمودار ۲-ب- طیف های عبوری ATR-FTIR پنج ترکیب از دسته ترکیبات گروه NVP.

پلیمریزاسیون و آزاد باقی ماندن آن است. در گروه NVP، وقتی غلظت مونومر NVP کم شود پیک گروه کربونیل (-C=O) مربوط به جزء آمیدی موجود در مونومر NVP نسبت به کربونیل استری یا اسیدی سهم کمتری خواهد داشت و از آنجایی که مونومر آب دوست HEMA با دارا بودن جزء استری جایگزین مونومر آب دوست NVP می شود، با کاهش سهم کربونیل آمیدی، سهم کربونیل استری

از دیگر نقاط مهم این طیف پیک مرتبط با عدد موجی $900-950\text{ cm}^{-1}$ است که مربوط به خمش باند وینیلی است (۱۴). صرف نظر از اینکه مونومر سر گروه HEMA باشد یا NVP، وقتی غلظت TEGDMA افزایش یابد یک باند تقریباً کوچک و خفیف در حدود عدد موج ۹۵۰ مشاهده می شود، به نظر می رسد علت ظهور این پیک عدم شرکت یکی از دو انتهای وینیلی مونومر TEGDMA در فرآیند

تقویت می‌گردد. این شباهت در بین دو دسته ۲ درصد و ۱۰ درصد از ترکیبات کو-پلیمری HEMA نیز به صورت واضحی قابل مشاهده است و در بین آنها نیز افزایش میزان مونومر ارتباط دهنده به طور معناداری در میزان اتصال و رشد سلولها مؤثر بوده است. هر چند در مورد گروه HEMA نسبت به گروه NVP این افزایش در اتصال و رشد سلولی به مراتب کمتر است.

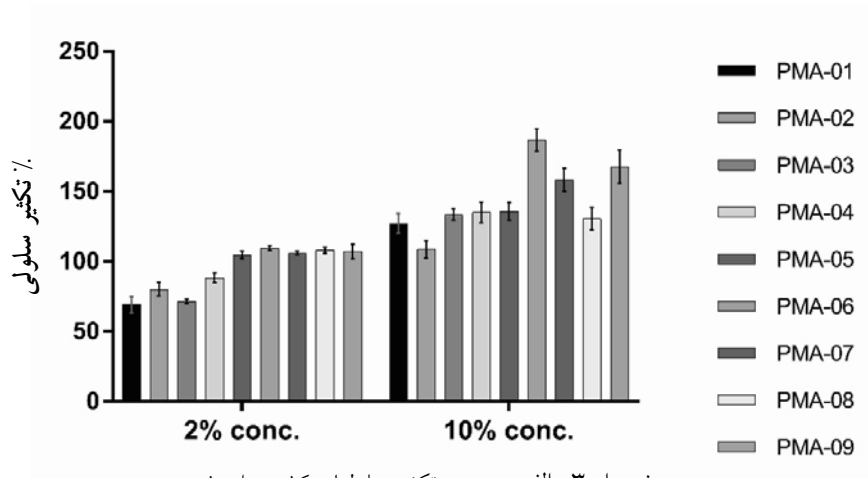
همان طور که در نمودار ۳ مشاهده می‌شود با افزایش نسبت مونومر ارتباط دهنده (TEGDMA) در PMA14 نسبت به PMA11-13 با افزایش اتصال و رشد سلولها مواجهه بوده است. در PMA16-19 نیز هرگاه سهم مونومر ارتباط دهنده نسبت به ترکیبات قبل از خود افزایش یابد به صورت معنی داری افزایش رشد سلول دیده می‌شود. البته در مورد نمودار ۳-الف که HEMA مونومر به عنوان مونومر آب دوست در ترکیب حاضر است اختلافها خیلی معنی دار نیست. با این حال تقریباً تمامی حالات ترکیبات HEMA نسبت به حالت کنترل از رشد قابل قبولی برخوردار بوده و حتی اتصال و رشد غلظت ۱۰ درصد از ترکیبات شرکت کرده در پلیمریزاسیون نسبت به حالت کنترل به صورت معنی داری بیشتر است.

با مقایسه نمودار رشد سلول در روز اول و سوم، و بررسی دو نمودار متناظر ترکیبات HEMA و NVP مشاهده گردید که تغییر در نسبت پلیمرها در ترکیب پلیمری به صورت معنی داری باعث ایجاد تفاوت در رشد سلول خصوصاً با گذشت زمان از روز اول تا سوم می‌گردد. این به نحوی است که به طور مثال در نمودار روز اول ترکیبات HEMA در ابتدا تفاوتها کمتر محسوس است و تنها در ترکیبات غلیظ تر (غلظت ۱۰ درصد) می‌توان تفاوت‌های حاصل از تغییر غلظت خصوصاً افزایش میزان مونومر ارتباط دهنده را مشاهده کرد. ولی در مورد ترکیبات NVP همان طور که پیش تر اشاره شد این تفاوتها واضح تر و مشخص و در عین حال با الگویی مشابه در هر دو غلظت ۲ درصد و

در این پیک بیشتر می‌شود. این موضوع مؤید انطباق سهم مونومرهای NVP و HEMA شرکت کرده در فرآیند پلیمریزاسیون با مقادیر مورد استفاده در ترکیبات مونومری است. نکته دیگری که در بررسی دقیق‌تر نمودار ATR-FTIR قابل مشاهده است این است که در حالتی که HEMA سرگروه ترکیبات مونومری است با تغییر نسبت و غلظت مونومرها، تغییرات زیادی روی الگوی پیکها دیده نمی‌شود، علت البته مشخص است، از آنجا که در این دسته مونومری گروههای عاملی مشابهی وجود دارد (متیل، کربوکسیل، هیدروکسیل و ..) وقتی نسبتهای این مونومرها دچار تغییر می‌شود تفاوت زیادی در ساختار پلیمر رخ نمی‌دهد و تنها سهم اشتراک گروههای عاملی در پیکها تغییرات جزئی می‌کند و الگوی نمودار نسبتاً دست نخورده باقی می‌ماند. در مورد گروه NVP به علت تفاوت زیاد خود مونومر NVP با دیگر مونومرها تغییرات اساسی در الگوی نمودار پدید می‌آید. حضور و همچنین تغییر در نسبت این مونومر به وضوح الگوی نمودار را تحت تأثیر خود قرار می‌دهد.

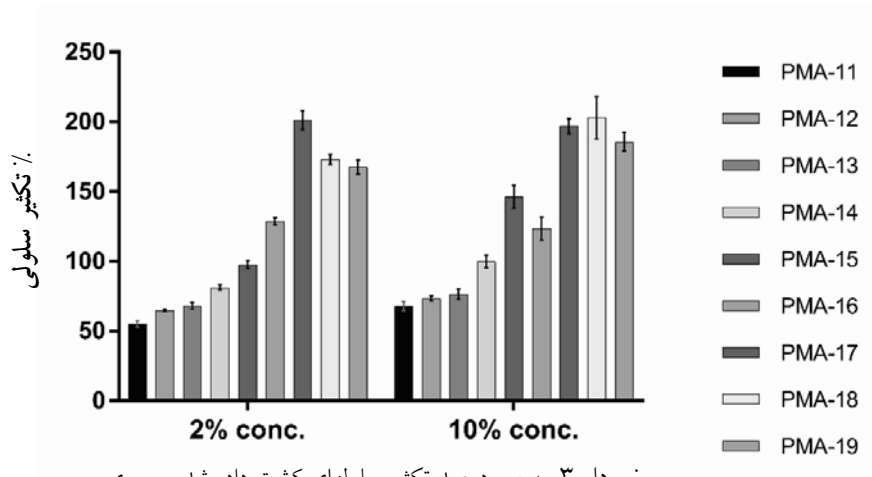
نتایج کشت سلول: همان گونه که در نمودار ۳ (الف و ب) آزمون اتصال و زنده‌مانی سلول قابل مشاهده است میزان اتصال و در نتیجه رشد سلولها در روز اول به طور میانگین بر روی برخی از سطوح گروه کو-پلیمری NVP بیشتر از سطوح پلیمری HEMA بوده است. و البته در گروه کو-پلیمری NVP نیز با افزایش میزان مونومر ارتباط دهنده (monomer Crosslinker) این میزان افزایش یافته است. در نمودار روز اول گروه NVP مشاهده شد که پلیمر حاصل از ترکیبات PMA17-19 میزان اتصال و رشد بسیار بیشتری-حتی نسبت به نمونه کنترل- داشته اند و البته تقریباً بین دو دسته ۲ درصد و ۱۰ درصد از این ترکیبات هم شباهت زیادی از نظر اتصال و رشد سلولها وجود دارد. با توجه به شباهت نسبتهای مونومری این دو دسته (۲ درصد و ۱۰ درصد) این فرضیه که نسبت بیشتر بالای مونومر ارتباط دهنده نقش در اتصال سلولها به بستر ایفا کرده باشد

۱۰ درصد قابل مشاهده است (نمودار ۳-الف و ب).



نمودار ۳-الف - درصد تکثیر سلولهای کشت داده شده بر روی

پلیمرهای گروه HEMA در روز اول



نمودار ۳-ب - درصد تکثیر سلولهای کشت داده شده بر روی

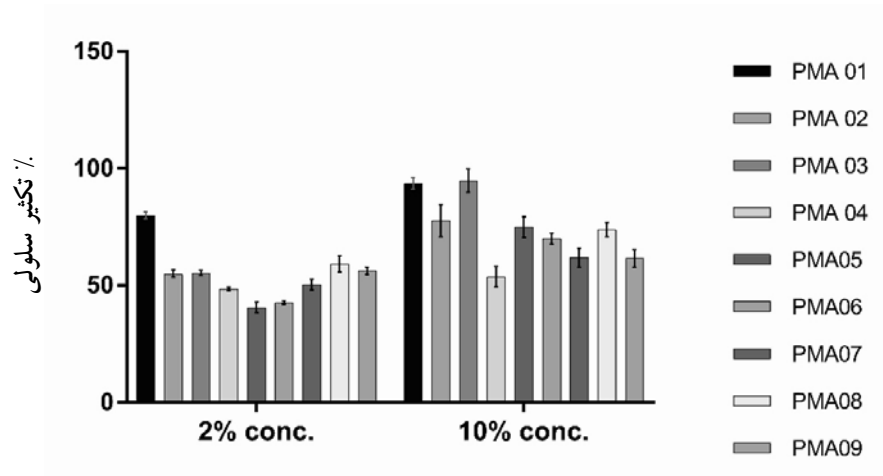
پلیمرهای گروه NVP در روز اول

است، هر چند اتصال اولیه سلولها بر روی این سطوح نسبت به ترکیب رقیب در روز اول تا حد قابل توجهی بیشتر بود، با این حال در روز سوم منحنی رشد سلولها شیب ملایم تری پیدا کرده است که نشان از اتصال اولیه مناسب اما سرعت رشد آرام تر است. با این حال به جز چند استثناء در تست روز سوم ترکیبات گروه NVP تا حدودی ترکیبات رقیب تر (۲ درصد) شانس بهتری برای

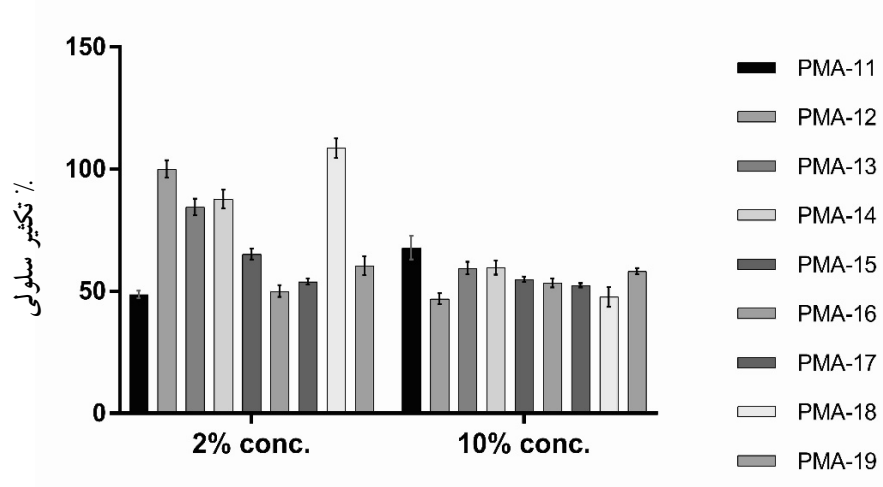
در مورد نمودارهای روز سوم (۴-الف و ب) نیز مشهود است که رشد سلولها در ترکیبات گروه HEMA در غلظت ۱۰ درصد ترکیبات بیشتر است که با توجه به ساختار هیدروژلی این ترکیبات (خصوصاً در غلظتهای بالاتر) و اتصال بیشتر سلول بر روی این غلظت از ترکیبات وجود و رشد سلولهای بیشتر در روز سوم نیز قابل انتظار بود.

ولی در مورد ترکیبات گروه NVP وضع کمی متفاوت تر

تکثیر سلولها هستند.



نمودار ۲-الف- درصد تکثیر سلولهای کشت داده شده بر روی پلیمرهای گروه HEMA در روز سوم



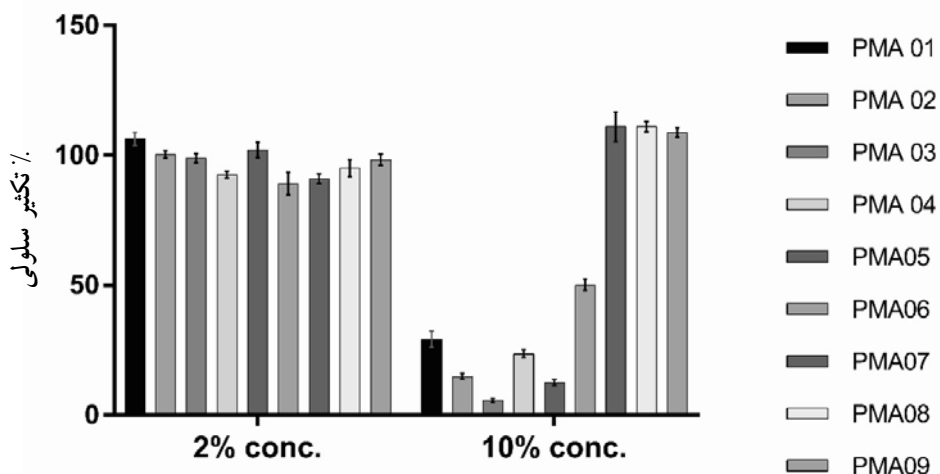
نمودار ۴-ب- درصد تکثیر سلولهای کشت داده شده بر روی پلیمرهای گروه NVP در روز سوم

کشت) اتصال بستر به کف پلیت تضعیف شده و پس از روز چهارم و پنجم دچار لایه لایه شدگی (delamination) از بستر می گردد. این موضوع باعث می شود که ترکیبات HEMA با غلظت ۱۰ درصد در روز پنجم با کاهش شدید تعداد سلول متصل به خود روبرو شوند، اما در این میان یک استثناء وجود دارد و آن هم ۳ ترکیب انتهایی نمودار

در نمودار های روز پنجم (نمودار ۵- الف و ب) نکته مهمی روی می دهد، چنانچه پیش تر ذکر شد ترکیبات پلیمری HEMA ساختاری هیدروژل مانند ایجاد می کنند، حال با توجه به اینکه با افزایش غلظت این ترکیبات ضخامت این لایه پلیمری افزایش می یابد و نیز با گذشت روزهای مجاورت این بستر با محیطهای آبی (محیط

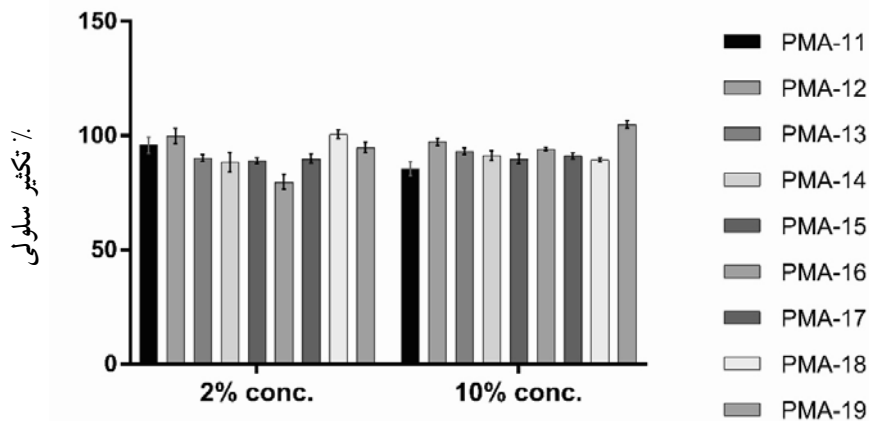
آنها همچون ترکیبات متناظرشان در گروه ترکیبات رقیق تر (۲درصد) مانده و حتی کمی بیشتر است. در مورد نمودار ۵-ب یعنی ترکیبات گروه NVP در روز پنجم تقریباً به طور یکسانی شاهد رشد سلولی کامل در بیشتر ترکیبات بوده و جز استثنائاتی می توان گفت رشد سلولها بین این ترکیبات تفاوت معنی داری ندارد.

یعنی PMA07-PMA09 هستند که نسبت مونومر ارتباط دهنده در آنها افزایش دو چندانی می یابد، این ترکیبات به علت دارا بودن مونومر ارتباط دهنده بیشتر نسبت به شش ترکیب قبل خود در گروه ترکیبات غلیظ تر (۱۰درصد) توانستند کماکان در روز پنجم هم از لایه لایه شدن و جداسدن از کف پلیت رهایی یابند و طبیعتاً تعداد سلولهای



نمودار ۵-الف- درصد تکثیر سلولهای کشت داده شده بر

روی پلیمرهای گروه HEMA در روز پنجم



نمودار ۵-ب- درصد تکثیر سلولهای کشت داده شده

بر روی پلیمرهای گروه NVP در روز پنجم

جدول ۴- مقادیر انحراف از معیار نمودارهای ۴۳ و ۵ برای درصد تکثیر سلولهای کشت داده شده بر روی ترکیبات پلیمری.

	روز اول		روز سوم		روز پنجم	
	غلظت ۲٪	غلظت ۱۰٪	غلظت ۲٪	غلظت ۱۰٪	غلظت ۲٪	غلظت ۱۰٪
PMA-01	۲,۸۷	۶۸,۳	۰,۶۷	۱,۲۴	۱,۲۸	۱,۶
PMA-02	۴۶,۲	۳,۱۲	۰,۷۶	۳,۴۵	۰,۷۷	۰,۵۲
PMA-03	۰,۸۲	۲,۰۶	۰,۵۲	۲,۵	۰,۹	۰,۳۹
PMA-04	۱,۷۴	۳,۷	۰,۳۸	۲,۱۶	۰,۶۴	۰,۷
PMA-05	۱,۲۴	۳,۱۵	۱,۱	۲,۲۱	۱,۵	۰,۵۳
PMA-06	۰,۸۱	۳,۹۹	۰,۳۹	۱,۱۱	۲,۱۴	۱,۰۸
PMA-07	۰,۶۲	۴,۱	۱,۱۵	۱,۹۹	۰,۹۷	۲,۸۵
PMA-08	۱,۱۶	۴	۱,۷۴	۱,۵۴	۱,۶۴	۱,۰۴
PMA-09	۵۴,۲	۵,۹	۰,۷۹	۱,۸۳	۱,۰۷	۰,۹
PMA-11	۱,۱۲	۱,۷۲	۰,۷۳	۲,۴۳	۱,۸	۱,۵۵
PMA-12	۰,۵	۰,۹۳	۱,۷۷	۱,۱۳	۱,۶۶	۰,۸۱
PMA-13	۱,۱۴	۱,۸۵	۱,۶۸	۱,۲۸	۰,۷۲	۰,۷۵
PMA-14	۰,۸۶	۲,۳۴	۱,۹	۱,۴۷	۲,۱۲	۱,۰۵
PMA-15	۱,۴۷	۴,۱۶	۱,۱۴	۰,۵۶	۰,۶۷	۱,۰۳
PMA-16	۱,۳۸	۴,۱	۱,۲۱	۰,۹۴	۱,۶۲	۰,۴
PMA-17	۳,۲۹	۲,۷۸	۰,۶۶	۰,۴۲	۱,۰۲	۰,۶۵
PMA-18	۱,۶۴	۷,۵۵	۱,۹۶	۱,۹۸	۰,۸۸	۰,۴۷
PMA-19	۲,۴۴	۳,۳۹	۱,۸۸	۰,۶۸	۱,۱۴	۰,۸۱

HEMA تا حدودی برگ برنده آنها در مقابل ترکیبات

رقیب است. در پایان به نظر می‌رسد به کارگیری ترکیبات با درصد بالاتر مونومر ارتباط دهنده به منظور استحکام و پایداری بیشتر بستر مفید باشد و البته از نظر ایجاد امکان اتصال بهتر سلول نیز مؤثر خواهد بود.

هر چند رشد و تکثیر سلولها بر روی بیشتر بسترهای پلی آکریلاتی خصوصاً تا انتهای روز سوم قابل قبول بوده و حتی در موارد بسیاری نسبت به حالت کنترل از تکثیر و رشد بیشتری هم برخوردار بوده است با این حال همان طور که ملکومیان و همکارانش اشاره کرده اند رقتهای کمتر ترکیبات پلیمری خصوصاً در دسته HEMA از لایه لایه شدن بستر در روزهای سوم به بعد جلوگیری کرده و در این مطالعه نیز این مورد به وضوح مشاهده گردید (۱۰)

بحث و نتیجه گیری

غالب ترکیبهای پلیمری دارای مقاومت مکانیکی مناسبی از نظر حفظ بستر مناسب برای اتصال و رشد سلول هستند، همچنین این پلیمرهای ترکیبی دارای گروههای عاملی مناسب برای برهمکنش با سطح سلول و ایجاد ویژگیهای فیزیکی- شیمیایی مناسب برای اتصال سلول هستند. ترکیبات (مت)آکریلاتی برای تکثیر سلول به خوبی ترکیبات تجاری کشت سلول هستند و حتی در برخی موارد از نظر زنده مانی و تکثیر سلولی بهتر از مواد مرسوم در ظروف کشت سلول سنتی عمل می کنند. (۳)

در مورد ترکیبات NVP اتصال مناسب ترکیبات با پلیت، یکپارچگی بستر و عدم وجود مشکل لایه لایه شدن از نقاط قوت این ترکیب است، اگرچه شفافیت ترکیبات گروه

شدن بستر استفاده گردد. علاوه بر این با افزایش مونومر ارتباط دهنده، گروههای عاملی کربوکسیل بیشتری برای برهمکنشهای آب دوست به نفع اتصالات سلولی در دسترس است. گروههای عاملی اینچنین همان طور که در تحقیقات پیشین اشاره شده علاوه بر ایجاد محیطی مناسب برای اتصال و لنگراندازی سلولی، قابلیت قرارگیری به عنوان بستر اتصالی برای فاکتورهای تغذیه ای و تحریک رشد و تمایز سلول را نیز دارند که این امکان کاستن مکملهای محلول در محیط کشت را نیز فراهم می کند (۱ و ۲).

و ۱۵). با این حال در بررسی نمودارهای رشد و تکثیر سلولی در روزهای پنجم و به ویژه در مورد گروه HEMA دیده می شود که افزایش مونومر ارتباط دهنده مانع لایه لایه شدن بستر در طولانی مدت گردیده و این خود نشان از عملکرد صحیح و مطابق انتظار این مونومر در تثبیت و پایدارسازی بستر دارد.

بنابراین با توجه به مشکل لایه لایه شدن ترکیبات HEMA با غلظت بالا، قطعاً توصیه می گردد در صورت به کارگیری این ترکیبات از غلظتهای بالای آن استفاده نشود، یا حداقل از غلظت مونومر ارتباط دهنده برای جلوگیری از کنده

منابع

- ۱- مهرابی، مریم، حسینخانی، سامان، جلیلی، سیروس، مصطفایی، علی، ۱۳۹۴، تمایز سلولهای بنیادی پوست انسان به سلولهای سازنده انسولین در محیط برون تن با استفاده از گلوکز و عصاره پانکراس ترمیمی، مجله پژوهشهای سلولی و مولکولی (مجله زیست شناسی ایران)، جلد ۲۸، شماره ۱
- ۲- نصیرنیا، حوری، قلمبران، محمدرضا، میمندی پور، امیر، بیات، منصور، ۱۳۹۴، بررسی امکان رشد سلولهای استخوانی (SAOS-2) روی داربستهای پوشش دار شده با نانوذرات کیتوسان-آلژینات، مجله پژوهشهای سلولی و مولکولی (مجله زیست شناسی ایران)، جلد ۲۸، شماره ۳
- 3- Fadeev A. G., Martin A. W., Melkounian Z., Shogbon C. B., Weber D. M., Weber J. L., Yue Z., (2013) Swellable (meth) acrylate surfaces for culturing cells in chemically defined media, US8530236 B2.
- 4- Gray, D. S., J. Tien and C. S. Chen (2003). "Repositioning of cells by mechanotaxis on surfaces with micropatterned Young's modulus." *J Biomed Mater Res A* 66(3): 605-614.
- 5- Higuchi, A., Q.-D. Ling, S. S. Kumar, Y. Chang, T.-C. Kao, M. A. Munusamy, A. A. Alarfaj, S.-T. Hsu and A. Umezawa (2014). "External stimulus-responsive biomaterials designed for the culture and differentiation of ES, iPS, and adult stem cells." *Progress in Polymer Science* 39(9): 1585-1613.
- 6- Higuchi, A., Q. D. Ling, Y. A. Ko, Y. Chang and A. Umezawa (2011). "Biomaterials for the feeder-free culture of human embryonic stem cells and induced pluripotent stem cells." *Chem Rev* 111(5): 3021-3035.
- 7- Jiang, X., R. Ferrigno, M. Mrksich and G. M. Whitesides (2003). "Electrochemical Desorption of Self-Assembled Monolayers Noninvasively Releases Patterned Cells from Geometrical Confinements." *Journal of the American Chemical Society* 125(9): 2366-2367.
- 8- Jiang, X., S. Takayama, X. Qian, E. Ostuni, H. Wu, N. Bowden, P. LeDuc, D. E. Ingber and G. M. Whitesides (2002). "Controlling Mammalian Cell Spreading and Cytoskeletal Arrangement with Conveniently Fabricated Continuous Wavy Features on Poly(dimethylsiloxane)." *Langmuir* 18(8): 3273-3280.
- 9- Lee, J. N., X. Jiang, D. Ryan and G. M. Whitesides (2004). "Compatibility of mammalian cells on surfaces of poly(dimethylsiloxane)." *Langmuir* 20(26): 11684-11691.
- 10- Mata, A., C. Boehm, A. J. Fleischman, G. Muschler and S. Roy (2002). "Growth of connective tissue progenitor cells on microtextured polydimethylsiloxane surfaces." *Journal of Biomedical Materials Research* 62(4): 499-506.
- 11- Mei, Y., K. Saha, S. R. Bogatyrev, J. Yang, A. L. Hook, Z. I. Kalcioğlu, S. W. Cho, M. Mitalipova, N. Pyzocha, F. Rojas, K. J. Van Vliet, M. C. Davies, M. R. Alexander, R. Langer, R. Jaenisch and D. G. Anderson (2010). "Combinatorial development of biomaterials for

- clonal growth of human pluripotent stem cells." *Nat Mater* 9(9): 768-778.
- 12- Melkounian, Z., J. L. Weber, D. M. Weber, A. G. Fadeev, Y. Zhou, P. Dolley-Sonneville, J. Yang, L. Qiu, C. A. Priest, C. Shogbon, A. W. Martin, J. Nelson, P. West, J. P. Beltzer, S. Pal and R. Brandenberger (2010). "Synthetic peptide-acrylate surfaces for long-term self-renewal and cardiomyocyte differentiation of human embryonic stem cells." *Nat Biotechnol* 28(6). 606-610.
- 13- Page, B., M. Page and C. Noel (1993). "A new fluorometric assay for cytotoxicity measurements in-vitro." *Int J Oncol* 3(3): 473-476.
- 14- Stuart, B. (2004). *Infrared spectroscopy : fundamentals and applications*, Chichester, West Sussex, England ; Hoboken, NJ : J. Wiley, [2004] ©2004.
- 15- Tajabadi, M., M. E. Khosroshahi and S. Bonakdar (2013). "An efficient method of SPION synthesis coated with third generation PAMAM dendrimer." *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects* 431(Supplement C): 18-26.

The evaluation of the attachment and proliferation of human fibroblast cells on poly(meth) acrylate surfaces

Sedghi M.¹, Naderimanesh H.¹ and Soleimani M.²

¹ Dept. of Nanobiotechnology/Biophysics, Faculty of Biological Science, Tarbiat Modares University, Tehran, I.R. of Iran

² Dept. of Hematology, Faculty of Medical Science, Tarbiat Modares University, Tehran, I.R. of Iran

Abstract

Growing demand for suitable material for cell culture and biomedical applications has been challenged biomaterial community to looking for compatible materials for cell culture uses. In addition of biocompatibility and having appropriate physical-chemical characteristics, cell culture surfaces should not induce spontaneous differentiation of stem cells and should be suitable with different kind of cells. Among the bulk of existing biomaterials, acrylate and methacrylate combinations of polymers in terms of manufacturing process control, as well as mechanical, physical and chemical properties, are substances that can be used in many cell culture systems. In the present study, a combination of several acrylate monomers was evaluated to determine the attachment and growth of human fibroblast cells. The results confirm the fact that some of these polymer compounds, in terms of cell attachment and growth, are a very suitable substrate for cell culture and expansion, and are in a good agreement with respect to degree of hydrophilicity. Also, the substrates due to having multiple functional groups, in contrast to traditional substrates such as polystyrene, are suitable for covalent binding to other molecules, especially biomolecules, and will be suitable for studying their effects in contact with cells.

Key words: poly(meth)acrylate, cell attachment, cell growth, cell culture substrate.