[۷] Costa-Junior E, Barbosa-Stacioli E, Mansur A,Vasconcelos W, Mansur H. Preparation and characterization of chitosan/poly (vinylalcohol) chemically crooslinked blends for biomedical application. Carbohydr Polymer ۲۰۰۸; ٦٥(۳): ۲٤۳-٥٦.
[۸] Tian, H., Tang, Z., Zhuang, X., Chen, X., Jing, X. ۲۰۱۲. Biodegradable synthetic polymers: Preparation, functionalization and biomedical application. Progress in Polymer Science, ۳۷: ۲۳۷– ۲۸۰
[۹]. Y. Ikada, Challenges in tissue engineering, J R Soc interface,۳, ٥۸۹-٦۰۱(۲۰۰٦).
[۱۰] Agarwal S, Wendroff JH, Greiner A. Use of electrospinning technique for biomedical applications. J Polymer ۲۰۰۸; ٤۹(۲٦): ٥٦۰۳-۲۱.
[۱۱] He, L,. Liao, S,. Quan, D,. Ma, k,. Chan, C,. Ramakrishna, S,. Lu, J,. Synergistic effects of electrospun PLLA fiber dimension and pattern on neonatal mouse cerebellum C۱۷.۲ stem cells. Acta Biomaterialia ۲۰۱۰, ٦: ۲۹٦۰– ۲۹٦۹.

بررسی زیست سازگاری سلول های بنیادی عصبی بر روی نانوداربست پلیمری

وحیده میری۱، دکتر اسداله اسدی۱، دکتر محمد قاسم گل محمدی۲، دکتر محسن سقا۲

۱-گروه زیست شناسی، دانشگاه محقق اردبیلی، اردبیل، ۲- گروه آناتومی، دانشگاه علوم پزشکی اردبیل، اردبیل

*Vahidehmiri۹۰@yahoo.com,*asad.asady@gmail.com,m.golmohammadi@aruma.ac.ir, *m.sagha@aruma.ac.ir*

چکیده

مهندسی بافت علمی چند منظوره است که علوم مهندسی و پزشکی را به یکدیگر مربوط میکند.هدف عمده مهندسی بافت،گرفتن سلول از یک منبع سلولی و رشد وتوسعه آن در خارج از بدن و سپس انتقال آن به داخل بدن میباشد.داربستها به عنوان تقلیدی از ماتریکس خارج سلولی در داخل بدن،نقش مهمی در مهندسی بافت ایفا میکنند.ماتریکس خارج سلولی درداخل بدن دارای اجزایی در مقیاس نانومتر میباشد. بنابراین اساسا داربستهای نانو الیاف، محیط بهتری برای چسبندگی،تکثیر وعملکرد سلولها نسبت به داربستهای معمولی دارند.در این پژوهش از سلول های بنیادی عصبی جدا شده از ناحیه ی تحت بطنی مغز موش بالغ استفاده گردید. نانو پلیمر پلی ـ ال لاکتیک اسید (PLLA) به عنوان داربست انتخاب شد. بر ای تولید نانو داربست پلیمری PLLA با ساختار و ریخت شناسی مناسب از روش الکتروریسی استفاده شد. سپس میزان زیست سازگاری داربست توسط آزمون زیستی MTT بررسی شد. نتایج کسب شده بیانگر آن بود که نانو داربست پلیمری PLLA دارای خصوصیات ساختاری و ریختی مناسب برای رشد سلو ل های بنیادی عصبی، طبیعی مشتق شده از ناحیه ی تحت بطنی مغز موش بالغ می باشد.

واژه‌های کلیدی: مهندسی بافت ، نانو داربست، الکتروریسی.

۱ـ مقدمه

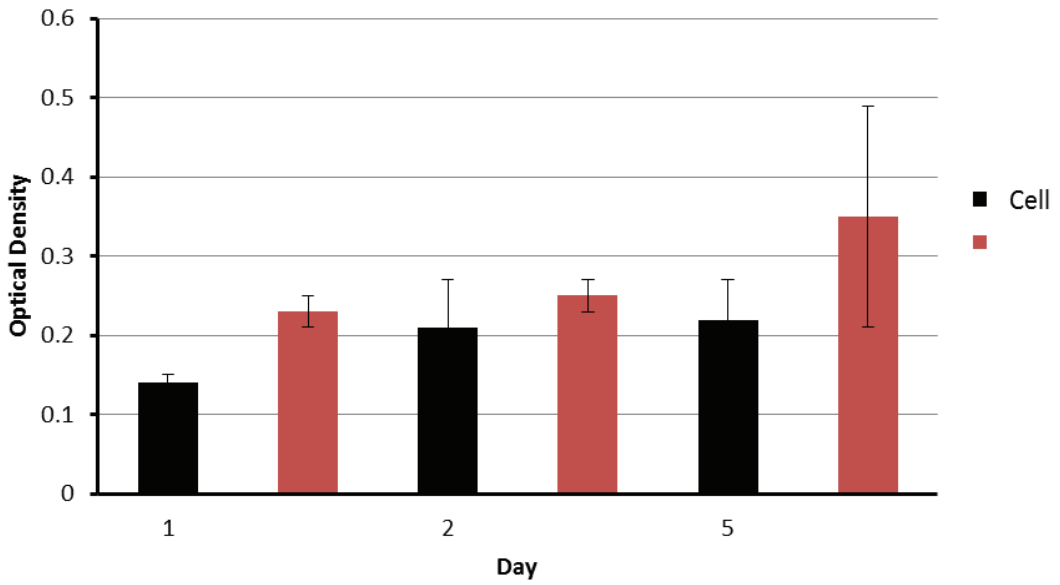
امروزه با پیشرفت های فراوانی که در زمینه مهندسی بافت عصبی حاصل شده است، لزوم به کارگیری روش های نوین برای ساخت و به کارگیری موادی با ساختارهای ترکیبی می تواند گامی مهم در راستای ترمیم ضایعات سیستم عصبی به شمار آید(۱). بنابراین به منظور تسهیل بازسازی عصب بسیاری از روش های درمانی مورد توجه قرار گرفته است(۲). هدف عمده مهندسی بافت گرفتن سلول از یک نمونه کوچک بافت از بدن بیمار و رشد و توسعه آن در خارج از بدن و سپس گذاشتن آن در داخل بدن می باشد .کشت و رشد سلول بر روی بستری که ماتریکس خارج سلولی در داخل بدن را شبیه سازی میکند و داربست نامیده میشود، انجام میگیرد. بنابراین داربست های مورد استفاده در مهندسی بافت به عنوان تقلیدی از ماتریکس خارج سلولی نقش مهمی دارا می باشد. در این زمینه داربست های قابل کشت در درمان بسیاری از بیماری های سیستم عصبی مرکزی از جمله پارکینسون، (Parkinson's disease) آلزایمر(Alzheimer's disease) و آسیب های وارده به مغز(Traumatic Brain Injury: TBI) به کار برده می شود(۱). با وجود پیشرفت های فراوانی که در زمینه تولید داربست های زیست سازگار برای تکثیر انواع سلو ل های موجود در بافت های مختلف حاصل شده است، ساخت داربستی که قادر باشد کلیه شرایط ماتریکس طبیعی را در Extracellular) matrix: ECM)خارج سلولی به طور مصنوعی ایجاد کند ، هنوز با مشکلات بیشماری روبه رو است(۳). امروزه از نانومواد مختلف با خواص مکانیکی وفیزیکی متفاوت برای ساخت داربست استفاده می شود. نانومواد در صورت ، ساختارهایی با اندازه ۱ تا ۱۰۰ نانومتر است که در صورت طرح ریزی مناسب قادر است خصوصیات فیزیکی شیمیایی مناسبی ارایه دهد(۴). تحقیقات انجام شده نشان میدهد که در سیستمهای زنده،ماتریکس خارج سلولی نقش مهمی در کنترل رفتار سلول ها بازی می کند و بنابر این از اهمیت زیادی برخوردار است . داربست های متشکل از نانو مواد قادر هستند شرایطی همچون ماتریکس خارج سلولی از لحاظ ساختار و ترکیب شیمیایی برای رشد سلول فراهم آورند. داربست ایده آل باید به طور مثبت با سلول ها واکنش دهد که این واکنش شامل چسبندگی سلول ها، رشد، مهاجرت و تمایز سلول ها می باشد. برای طراحی و ساخت نانو داربست های مناسب از روش های متعددی همچون الکتروریسی(Electroespinning)، خود تجمعی(Self-assembly) و جدایی فاز(Phase separation) استفاده می شود(۵، ۶). با این وجود الکتروریسی یکی از موثرترین روش ها در این راستا می باشد، که از مزایای این روش میتوان به بسیار ساده بودن ، قابل کنترل بودن، اقتصادی بودن و تکرار پذیری آن اشاره کرد. همچنین یکی از مزایایی که این روش نسبت به سایر روش های تولید نانوالیاف دارد این است که در این روش قطر الیاف و طرز قرارگیری و آرایش الیاف به میزان زیادی تحت کنترل است و به پارا مترهای پروسه بستگی دارد(۷،۶). لازم به ذکر است تهیه ی داربست متخلل و زیست پذیر یکی از دشوارترین بخش های مهندسی بافت به شمار می آید چرا که این داربست ضمن آن که بایداز خواص فیزیکی و مکانیکی مناسب برخودار باشد باید ریز ساختار منحصر به فردی داشته باشد. به طور کلی یک داربست ایده آل برای کاربردهای مهندسی بافت باید دارای خصوصیات زیر باشد: زیست سازگار باشد، زیست تخریب پذیر باشد، دارای خواص مکانیکی مناسب جهت نگه داری ساختار بافت داشته باشد و همچنین داربست های مورد استفاده باید دارای درصد تخلخل بالایی باشد(۸، ۹).

۲-مواد و روشها

در این تحقیق پلیمر پلی-ال-لاکتیک اسید(PLLA)،از شرکت آلدریچ سیگما، MTTاز شرکت ایده زیست، کلروفرم و DMSOز شرکت مرک خریداری شد.

برای ساخت نانوفیبر PLLA طی روند الکتروریسی، پلیمر PLLA با ویسکوزیته ی ذاتی در حلال کلروفرم و DMF حل شده، محلول آماده در سرنگ ۵ میلی لیتری وارد شد. الکتروریسی یک منبع با ولتاژ بالا دارای درو الکترود می باشد که یک الکترود از آن به سوزن سرنگ و الکترود دیگر به سطح ورقه آلمینیومی متصل شدند. فاصله ی سوزن سرنگ با صفحه ی جمع کننده ۱۵ سانتی متر می باشد پس از آن تزریق آغاز شد که سرعت تزریق برابر ۴/. میلی متر در ساعت بود و ولتارژ واقعی ۱۵ کیلوولت برابر شد نانو الیاف تشکیل شده روی ورقه الومینیومی در صفحه ی جمع کننده جمع آوری شد. ساخت داربست در محیط ازمایشگاه با دمای ۲۵ درجه سانتی گراد و طی ساعت انجام گردید. سپس سصح داربست با تیمار پلاسما بهینه شد که تیمار پلاسما توسط گاز۲ CO با فشار ۴mbar/.به مدت ۴ دقیقه در دمای ۲۵ درجه با ژنراتور LF صورت گرفت(۱۰).

جهت آنجام آزمایشات کشت سلولی از سلول های بنیادی عصبی جدا شده از ناحیه ی تحت بطنی مغز موش بالغ استفاده گردید. نوروسفیرهای حاصل از تکثیر سلول های بنیادی عصبی با استفاده از Tripsin-EDTA، به صورت تک سلولی در آمدند و سپس با استفاده از تریپان بلو شمارش شدند. در این مطالعه زیست سازگاری سلول ها بر روی نانو داربست پلیمری به وسیله ی سنجش MTT بررسی شد. در این روش از نمک MTT (۳-(۴,۵-Dimethylthiazol-۲-yl)-۲,۵-diphenyltetrazolium bromide)، Bio Idea)، به عنوان سوبسترا استفاده شد. تست MTT یک رنگ سنجی می باشد که اساس آن احیا شدن و شکسته شدن کریستال های زرد رنگ تترازولیوم به وسیله ی انزیم سوکسینات هیدروژناز و تشکیل ابی رنگ نا محلول می باشد(۱۱). برای بررسی بقا و زیستایی، سلول ها با تراکم ۱×۱۰۴ همراه داربست، در محیط کشت NSA همراه ۵ درصد FBS کشت داده شدندو به عنوان گروه کنترل، یک سری از سلولها بر کف پلیتهای ۹۶ خانه و بدون حضور داربست ،کشت داده شدند و به انکوباتور با ۵ درصد CO۲ و دمای ۳۷ درجه سانتی گراد انتقال داده شدند. سپس ۱ روز، ۲ روز و ۵ روز بعد تست MTT انجام شد، به این صورت که محیط رویی سلول ها خارج گردید و سپس نمک MTT، به نسبت ۱:۱۰(MTT: محیط کشت) به سلول های کشت داده شده بر روی داربست اضافه گردید. پس از ۴ ساعت انکوباسیون در دمای ۳۷ درجه ی سانتی گراد، محلول MTT خارج و سپس محلول DMSO، به هر یک از چاهک های پلیت اضافه گردید. سپس سلول ها را به مدت ۱۰ دقیقه در سانتریفوژ با دور ۱۰۰rpm،قرار می دهیم و نهایتا میزان جذب با استفاده از میکروپلیت های الایزا در ۴۵۰ نانومتر تعیین شد.



نمودار ۱ رشد سلول‌های اتصال یافته به داربست در روزهای ۱، ۲، و ۵.

نتیجه گیری

نمودار ۱ نشان می دهد که نانوداربست پلیمریPLLA (پلی-ال لاکتیک اسید)، به دلیل زیست سازگاری و خواص مکانیکی مناسب، بستر مناسبی جهت کشت و رشد سلول های بنیادی عصبی جدا شده از مغز موش بالغ را فراهم می کند.

منابع

[۱] Willerth SM, Sakiyama-Elbert SE.. Approaches to neural tissue engineering using scaffolds for drug delivery. Advanced Drug Deliv Reviews ۲۰۰۷; ۵۹(٤-٥): ۳۲٥-۳۸

[۲] Cao, H., Liu, Y., Chew, S.Y. The application of nanofibrous scaffolds in neural tissue engineering. Advanced Drug Delivery Reviews ۲۰۰۹, ٦۱:۱۰٥٥-۱۰٦٤

[۳] Khademhosseini A, Langer R, Borenstein J,Vacanti JP. Microscale technologies for tissus engineering and biology. Proc Natl Acad Sci USA ۲۰۰٦; ۱۰۳(۸): ۲٤۸۰-۷.

[٤] Ma PX. Biomimetic materials for tissue ngineering. Adv Drug Deliv Rev ۲۰۰۸; ٦۰(۲):۱۸٤-۹۸.

[٥] Reneker DH, Chun I. Conducting polymer fibers of polyaniline doped with camphorsulfonic acid. Nanotech ۱۹۹٦; ۷: ۲۱٦-۳۰.

[٦] Xiao-Jun H, Ge D, Zhi-Kang X. Preparation and characterization of stable chitosan Nanofibrous membrane for lipase immobilization. Eur pol J ۲۰۰۷; ٤۳(۹): ۳۷۱۰-۸.

[۷] Costa-Junior E, Barbosa-Stacioli E, Mansur A,Vasconcelos W, Mansur H. Preparation and characterization of chitosan/poly (vinylalcohol) chemically crooslinked blends for biomedical application. Carbohydr Polymer ۲۰۰۸; ٦٥(۳): ۲٤۳-٥٦.

[۸] Tian, H., Tang, Z., Zhuang, X., Chen, X., Jing, X. ۲۰۱۲. Biodegradable synthetic polymers: Preparation, functionalization and biomedical application. Progress in Polymer Science, ۳۷: ۲۳۷– ۲۸۰

[۹]. Y. Ikada, Challenges in tissue engineering, J R Soc interface,۳, ۵۸۹-۶۰۱(۲۰۰۶).
[۱۰] Agarwal S, Wendroff JH, Greiner A. Use of electrospinning technique for biomedical applications. J Polymer ۲۰۰۸; ۴۹(۲۶): ۵۶۰۳-۲۱.
[۱۱] He, L,. Liao, S,. Quan, D,. Ma, k,. Chan, C,. Ramakrishna, S,. Lu, J,. Synergistic effects of electrospun PLLA fiber dimension and pattern on neonatal mouse cerebellum C۱۷.۲ stem cells. Acta Biomaterialia ۲۰۱۰, ۶: ۲۹۶۰–۲۹۶۹.