نانو تکنولوژی

بررسی تاثیر داربست نوین تهیه شده از هیالورونیک اسید جهت

ترمیم بافت های آسیب دیده بر رشد سلول های آمنیون

شایان شفیعی نژاد، سهیلا سلحشور کردستانی*

چکیده

با پیشرفت های صورت گرفته در زمینه مهندسی بافت، عرصه های جدیدی از روش های ترمیم اعضای آسیب دیده بدن ایجاد شده است. به منظور ترمیم بافت های آسیب دیده روش های زیادی توسعه پیدا نموده اند که با استفاده از این روش ها فرایند ترمیم نیز صورت می پذیرد و عملکرد این بافت ها تا حد زیادی به حالت اولیه بازمی گردد. به منظور بهبود فرایند های موجود، سعی نمودیم تا با استفاده از علوم مهندسی بافت میزان ترمیم را افزایش دهیم. جهت بررسی کارایی داربست های تهیه شده، از سلول های آمنیون به عنوان دسته سلول های مورد نظر استفاده نمودیم. در میان این سلول ها مقدار قابل ملاحظه ای سلول های تمایز نیافته غیر رویانی نیز وجود دارد که مطالعات اخیر نشان داده است این سلول ها توانایی تمایز یافتن به گونه های مختلف سلولی را دارند که این گونه ها شامل سلول های مغز، کبد، استخوان و پوست می باشند. در این راستا نیازمند طراحی نوعی از داربست های مهندسی بافت بودیم تا با قرار دادن این گونه سلول ها بر روی آن امکان فراهم نمودن شرایط رشد آنها و شکل گیری بافت و همچنین تامین عملکرد های بافت مورد نظر ایجاد شود. برای رسیدن به این هدف از بیوپلیمر هیالورونیک اسید برای طراحی داربست استفاده نموده و تاثیر حضور این بیو پلیمر در محیط کشت سلول ها را مورد بررسی و مطالعه قرار دادیم. در این مطالعه تلاش کردیم تا غلظت مناسبی از ماده که سبب رشد بهتر سلول ها می شود را تعیین کنیم. بدین ترتیب رهایش ماده از داربست به محیط بیولوژیک تعیین می گردد.

هدف نهایی در این تحقیق طراحی سامانه ای نوین که متشکل از داربست های مهندسی بافت ساخته شده از نانو ذرات هیالورونیک اسید و با امکان رهایش کنترل شده جرم به منظور فراهم نمودن شرایط بهینه رشد سلول های آمنیون و ایجاد بافت جایگزین تعیین گردید. بدین منظور تاثیر حضور هیالورونان را بر کیفیت رشد این سلول ها بررسی نمودیم و با مطالعه بر روی ۳۰ زن باردار و مایع آمنیون گرفته شده از آنها به بررسی چگونگی رشد این سلول ها در حضور هیالورونیک اسید پرداختیم. نتایج حاصل از این تحقیق نشان داد که بکار گیری غلظت مناسبی از این ماده در محیط کشت می توان میزاند رشد سلول ها را تا ۴۰٪ افزایش دهد.

مقدمه

بر اساس تحقیقات انجام شده که اخیرا در دانشگاه‌های ویک فارست و هاروارد صورت گرفته است، نشان داده شده است که مایع آمنیون منبعی سرشار از سلول های تمایز نیافته غیر رویانی می باشد. این سلول ها نشان داده اند که توانایی تمایز یافتن به گونه های مختلفی از سلول ها از جمله مغز، کبد و استخوان و پوست را دارند. بر این اساس توانایی تکثیر و تمایز این سلول ها به سلول هایی از پیش تعیین شده مانند سلول های پوست، قدمی مهم در علم مهندسی بافت محسوب میگردد. بر این اساس در این پروژه سعی گردیده است تا با بکار گیری بیوپلیمرها توانایی تکثیر این سلول ها را افزایش دهیم. در این راستا میبایست از یک چهار چوب برای قرار گیری سلول ها بهره برد که در اصطاح به این گونه چهار چوب ها که از پیچیدگی های زیادی برخوردار است داربست گفته می شود. داربست های مهندسی بافت می بایست مکانی مناسب برای رشد سلول ها فراهم نمایند. بطور معمول در این موارد از فاکتورهای رشد برای تسریع فرایند رشد سلول ها استفاده می گردد. باید توجه داشت که در طراحی داربست‌های مهندسی بافت حضور ماده بکار گرفته شده در داربست نیز می تواند نقش بسزایی بر رشد سلول ها داشته باشد. با این وجود در اغلب مطالعاتی که تاکنون انجام گرفته تنها بر زیست سازگاری مواد به کار رفته و عدم نقش منفی داربست بر سلول ها تأکید

Corresponding author. Tel.: ۶۴۵۴۲۳۶۶; fax: ۶۶۴۶۸۱۸۶

E-mail addresses: s.shafiee@aut.ac.ir ; sskordestani@aut.ac.ir

شده است. حال آنکه با طراحی مناسب می توان در ساخت داربست از موادی بهره برد که به رشد سلول ها کمک نمایند. به عنوان مثال پلیمرهای طبیعی نظیر هیالورونیک اسید و پلی گلایکولیک اسید که در ترمیم زخم و موارد مربوط به نگهداری پوست کاربرد دارند می توانند به عنوان داربست به رشد سلول ها نیز کمک کنند. بنابراین به نظر می رسد بررسی نقش این مواد که استفاده از آنها به عنوان داربست پیش از این نیز مطرح بوده است مفید باشد.

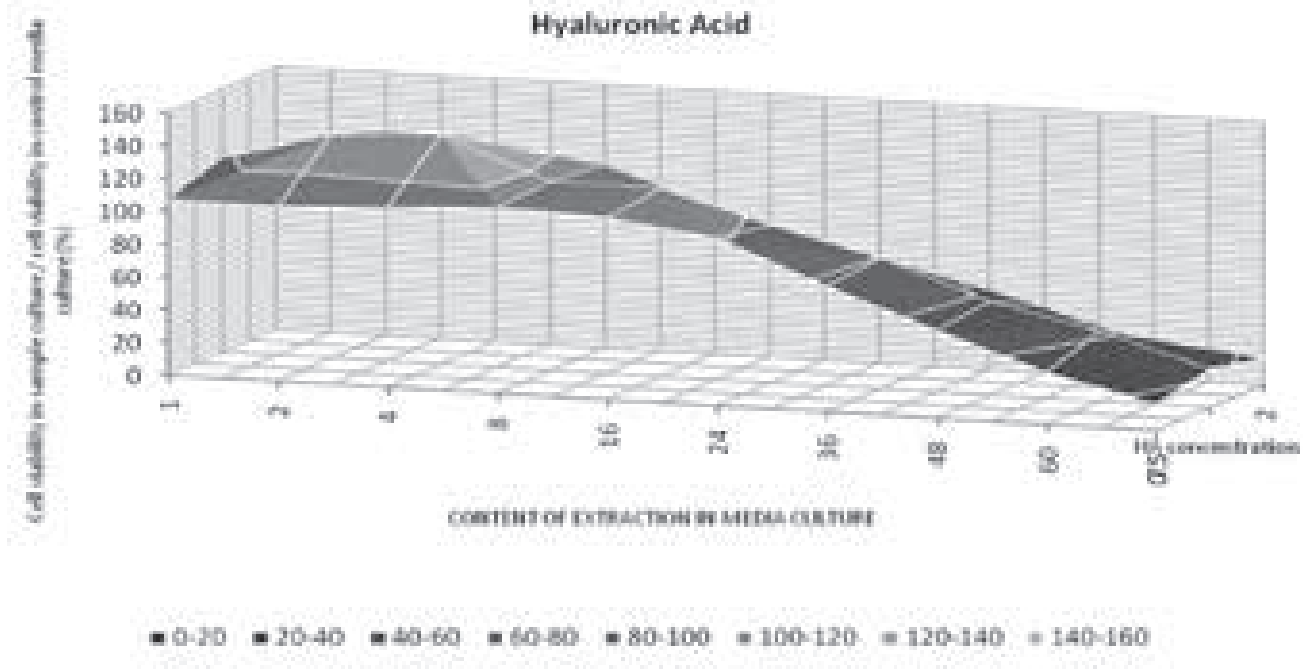
۲- بخش تجربی

مایع آمنیون دریافت شده از زنان باردار پس از سانتریفیوژ شدن به دو فاز مایع و جامد تقسیم شد. فاز جامد حاوی مقدار زیادی از آمنیوسایت ها می باشد که قسمت اعظم این سلول ها غیر زنده می باشند. سلول های زنده بجا مانده را در حضور غلظت های مختلفی از عصاره ذرات هیالورونیک اسید کشت دادیم. علاوه بر این در هر یک از غلظت های مورد آزمایش ۱۰ ترکیب درصد مختلف از عصاره و محیط کشت مورد بررسی قرار گرفت. پس از گذشت ۷ روز از آغاز کشت و نگهداری نمونه ها در انکوباتور ۳۷ درجه آنها را خارج نموده و برای بررسی میزان تاثیر گذاری هیالورونیک اسید بر میزان رشد سلول ها از تست MTT استفاده نمودیم.

۳- نتایج تجربی و بحث

پس از سه بار انجام تست MTT برای هر نمونه و محاسبه برایند نتایج حاصل، در مجموع برای هر یک از ترکیب درصد های مورد آزمایش ۳۰ مقدار از نسبت زنده بودن سلول ها در حضور هیالورونیک اسید نسبت به سلول های قرار گرفته در محیط کشت بدست آمده و با استفاده از نرم افزار SPSS به تحلیل نتایج حاصل از این مقادیر با روش های تحلیل واریانس و تحلیل همبستگی پرداختیم و در نهایت به نتایج زیر دست یافتیم.

در این بررسی ها مشخص گردید در صورت بکارگیری هیالورونیک اسید با غلظت /۱mg ml بیشترین تاثیر بر میزان رشد سلول ها حاصل میگردد. و در این غلظت با استفاده از ترکیب درصدهایی در بازه ۳٪ تا ۶٪ می توان بیش از ۴۰٪ بر میزان رشد سلول ها افزود.



شکل ۱- : مقایسه نتایج حاصل از تست MTT، نسبت سلول های زنده در حضور HA با غلظت های ۰,۵ mg/ml ۱,۰mg/ml و ۲,۰mg/ml به سلول های زنده در نمونه کنترل که تنها در حضور محیط کشت قرار داشتند.

پی‌نوشت:

دانشکده مهندسی پزشکی، دانشگاه صنعتی امیرکبیر (پلی تکنیک تهران)، تهران

منابع

1. Ma, Peter X., And Jennifer Elisseeff, Eds. Scaffolding In Tissue Engineering. New York: C R C P Llc, 2005.
2. Cell Culture Technology For Pharmacaeutical And Cell-Based Therapies:By Sadettin S. Ozturk, Wei-Shou Hu 2005 P:42
3. Bioreactors For Tissue Engineering: Principles, Design And Operation By Mohamed (Edt)
4. Gilding, D. K.; A. M. Reed (December 1979). "Biodegradable Polymers For Use In Surgery - Polyglycolic/Poly (Lactic Acid) Homo- And Copolymers: 1". Polymer 20: 1459–1464. Doi:10.1016/0032-3861(79)90009-0.
5. Yoshihara S, Kon A, Kudo D, Nakazawa H, Kakizaki I, Sasaki M, Endo M, Takagaki K., A Hyaluronan Synthase Suppressor, 4-Methylumbelliferone, Inhibits Liver Metastasis Of Melanoma Cells. Febs Lett 2005;579:2722–6. Pmid: ۱۵۸۶۳۳۱۵