



مطالعات بالینی بر روی وب نانولیفی مخلوط کیتوسان پلی وینیل الکل و بررسی اثرات بهبود زخم بر مدل حیوانی

چکیده

در این مطالعه وب نانولیفی مخلوط کیتوسان-پلی وینیل الکل (CS/PVA) در نسبت ۲۵/۷۵ CS/PVA توسط روش الکتروریسی تهیه شد. تصاویر SEM نشان دهنده نانوالیافی با قطر متوسط 150 ± 22 نانومتر و مرفولوژی یکنواخت و بدون دانه تسبیحی می باشد. به منظور بررسی چگونگی اثر داربست های نانولیفی حاصل بر التیام زخم های گرد تمام عمق، مطالعات بالینی بر پوست پشت ۸ سر موش صحرائی انجام شد. نتایج ماکروسکوپی حاصل از اندازه گیری سطح زخم در زمان های مورد نظر (۲، ۷ و ۱۲ روز) نشان دهنده بهبود بسیار بهتر ظاهر زخم های پوشش یافته با داربست کیتوسانی نسبت به زخم های کنترل در مدت زمان یکسان می باشد. به منظور بررسی روند ترمیم زخم به صورت میکروسکوپی آزمایشات پاتولوژی بر نمونه زخم های صورت پذیرفته و معیارهای رشد اپیتلیال، کلاژن زایی و آرایش کلاژنی، ضخامت بافت جوانه ای و فاکتور کلی بهبود بررسی شده است. نتایج پاتولوژی نشان دهنده بهبود بسیار سریع تر و کامل تر زخم های پوشش یافته با داربست نانولیفی حاصل در مقایسه با زخم های کنترل است.

عادلہ قلی پور کنعانی^۱، سید ہژیر بہرامی^۱

مقدمه

ترمیم یا جایگزینی بافت آسیب دیده همواره از دغدغه های اصلی دانشمندان علم بیولوژی بوده است. در این راستا مهندسی بافت ابزار کارآمدی برای نیل به این هدف است. اساس مهندسی بافت بر پایه سه جزء اصلی بافت های بیولوژیک یعنی سلول، ماتریکس خارج سلولی و سیگنال می باشد. بنابراین ایجاد یک داربست از بیومواد زیست سازگار مناسب به صورت لیاف یا فیبریل های نانویی که قابلیت تقلید ساختار ماتریکس خارج سلولی طبیعی را داشته باشد یکی از مهمترین مسائلی است که دانشمندان آن را در نظر می گیرند. در این راستا نانوالیاف کلاژنی معمول ترین داربست ها در مهندسی بافت می باشند، اما به دلیل دشواری استخراج و همچنین نگهداری هزینه بر کلاژن امروزه استفاده از سایر پلیمرهای طبیعی با ساختار شبیه به کلاژن مانند کیتین، کیتوسان، ژلاتین و ... بسیار مورد توجه قرار گرفته است [۱]. کیتوسان

یک پلی ساکارید خطی طبیعی است که به عنوان معمول ترین مشتق کیتین، به دلیل حلالیت عالی در حلال های آلی و تعدادی حلال معدنی و خواص بی نظیر زیستی و ضد میکروبی حاصل از گروه های آمین آزادش بسیار مورد توجه دانشمندان قرار گرفته است. ساختار گلوکز آمینوگلایکانی کیتوسان به دلیل شباهت به ساختار کلاژنی فیبریلی ماتریس خارج سلولی طبیعی بدن یکی از ویژگی های منحصر به فرد این پلیمر می باشد. با تلفیق این ویژگی با ساختار نانوالیاف، وب نانولیفی حاصله یک ساختار شبیه سازی شده از ECM طبیعی است که می تواند به عنوان یک داربست بیولوژیک در مصارف مهندسی بافت و ... مورد استفاده قرار گیرد [۲ و ۳]. به دلیل ویسکوزیته ذاتی بالا و همچنین دافعه بارهای هم نام به دلیل پلی کاتیون بودن این پلیمر در محیط اسیدی، الکتروریسی آن در وزن مولکولی بالا اغلب امکان پذیر نیست. به منظور سهولت الکتروریسی از یک پلیمر

آبدوست دیگر مانند پلی اتیلن اکساید یا پلی وینیل الکل به صورت مخلوط با آن استفاده می شود.

روش تحقیق

مواد مصرفی

کیتوسان با وزن مولکولی ۱۰۰۰ kDa و درجه دی استیلاسیون ۸۵٪ از شرکت کیتوتک تهیه شد. پلی وینیل الکل (با وزن مولکولی ۷۲ kDa) و اسید استیک خالص از شرکت مرک خریداری شد. تمامی مواد بدون خالص سازی مورد استفاده قرار گرفتند.

تجهیزات آزمایشگاهی

دستگاه الکتروریسی شامل یک منبع ولتاژ قوی ۴۰-۰ kV، دو الکتروود مثبت و منفی که الکتروود مثبت به نازل و منفی به صفحه جمع کننده متصل می شود، یک صفحه جمع کننده ساکن (فویل آلومینیومی با اندازه ۱۵ cm × ۱۵ cm)، یک پمپ سرنگ دیجیتال



(ATOM Medical Corp) مدل ۱۲۳۵N ساخت کشور ژاپن، با حداقل نرخ تزریق ۰/۱ ml/h سرنگ ۲۰ ml پلاستیکی، نازل (سر سرنگ اسپینال^۲ با اندازه ۱۹-۲۰ guage) می‌باشد. به منظور بررسی مرفولوژی نانوالیاف حاصله از میکروسکوپ الکترونی SEM مدل XL ۳۰ ساخت شرکت فیلیپس کشور هلند استفاده شده است. دوربین دیجیتال برای عکس برداری از سطح نمونه و نرم‌افزار Image J برای اندازه‌گیری مساحت زخم مورد استفاده گرفته است. همچنین در مطالعات پاتولوژی از میکروسکوپ Olympus AXV۰ برای مشاهده و عکس برداری لام‌ها استفاده شده است.

روش‌های انجام آزمایشات

تهیه وب نانولیفی

ابتدا محلول‌های کیتوسان ۵٪ در اسیداستیک ۲٪ و پلی‌وینیل الکل ۱۰٪ در آب مقطر به طور جداگانه تهیه شدند و سپس با نسبت ۲۵ به ۷۵ جرمی کیتوسان به PVA با هم مخلوط و هم زده شدند. وب‌های نانولیفی کیتوسان/پلی‌وینیل الکل که از طریق الکتروریسی محلول کیتوسان PVA/ در شرایط ۱۵kV، فاصله ۱۵cm و نرخ خروج ml/hr ۵،۰ در مطالعات پیشین [۵] تهیه شد مورد استفاده قرار گرفتند.

جراحی

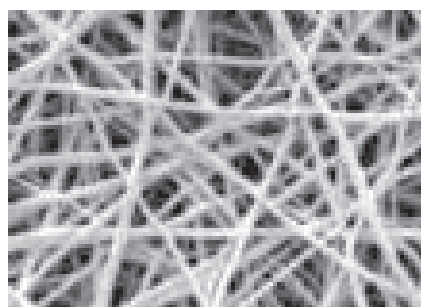
هشت سر موش بالغ نر (Sprague Dawley rat) با میانگین وزنی 250 ± 50 گرم برای این مطالعه انتخاب شدند و در دمای $22 \pm 2^\circ C$ و رطوبت ۶۰-۵۰٪ در قفس‌های پلاستیکی نگهداری شدند. برای آغاز عمل جراحی موش‌ها را با تزریق 50 mg/kg کتامین 5 mg/kg بیهوش نموده و موهای پشت آنها را تراشیده و با بتادین استریل شدند. زخم تمام عمق گرد با قطر ۱ cm توسط تیغ و قیچی جراحی بر روی پوست پشت موش‌ها ایجاد شدند. به منظور بررسی چگونگی روند ترمیم زخم مدت زمان برداشت ۲، ۵، ۷ و ۱۲ روز برای نمونه‌ها تعیین گردید [۷ و ۸]. در پشت هر حیوان چهار زخم ایجاد شد که دو زخم به عنوان کنترل (بدون هیچ گونه پوشش زخم) و دو زخم به عنوان تست (همراه با زخم‌بندهای نانولیفی $2 \text{ cm} \times 2 \text{ cm}$) در نظر گرفته شد. وب‌های

نانولیفی حاصله پیش از قرارگیری بر روی زخم‌های تست توسط اشعه یو-وی استریل شدند. در هر زمان برداشت، دو سر موش به وسیله تزریق 100 mg/kg سدیم تیوپنتال قربانی شده سپس زخم‌های تمام عمق از بدن موش خارج و در فرمالدهید ۱۰٪ برای تحقیقات پاتولوژی فیکس شدند. همه نمونه‌ها با رنگ هماتوکسیلین و اتوزین برای بررسی روند ترمیم زخم رنگ‌آمیزی و مورد مطالعه قرار گرفتند. تمامی مطالعات بالینی توسط کمیته اخلاق مرکز قلب تهران مورد تأیید قرار گرفتند.

نتایج و بحث

مرفولوژی وب نانولیفی

با توجه به این که در مطالعات پیشین ما [۵] وب نانولیفی کیتوسان - پلی‌وینیل الکل با نسبت‌های متفاوت مورد الکتروریسی قرار گرفت و مرفولوژی



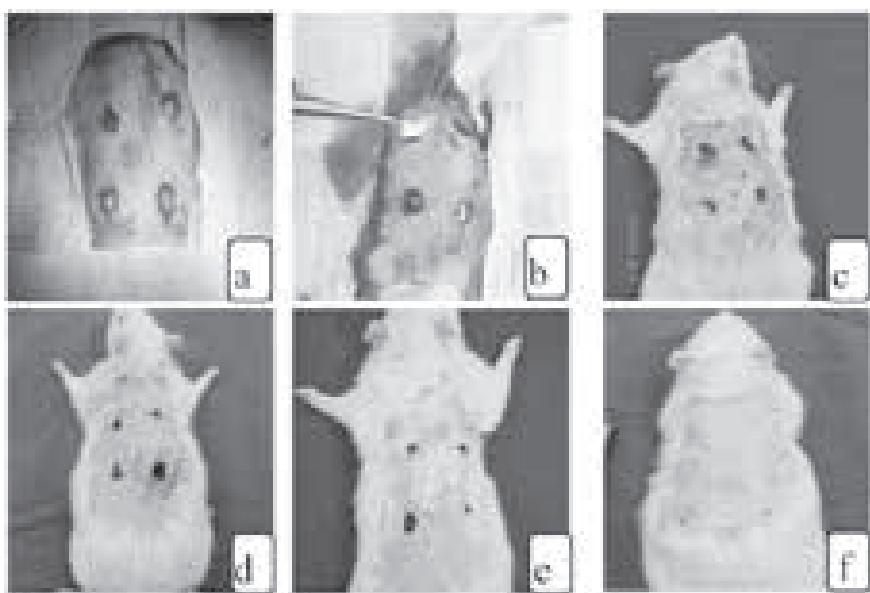
شکل ۱. تصویر SEM وب نانولیفی کیتوسان-پلی‌وینیل الکل در نسبت ۲۵-۷۵؛ $\times 10000$

بهینه در نسبت ۲۵ به ۷۵ کیتوسان به PVA حاصل شد از این نسبت برای مطالعات بعدی استفاده شده است. همانطور که در شکل ۱ مشاهده می‌نماید وب نانولیفی با مرفولوژی یکنواخت و بدون دانه تسبیحی از الکتروریسی محلول مخلوط کیتوسان PVA- حاصل شده است. ساختار سه‌بعدی و متخلخل ایجاد شده به دلیل حضور فیبریل‌های در مقیاس نانو با قطر متوسط 22 ± 150 نانومتر قادر به شبیه‌سازی ساختار ECM طبیعی می‌باشد.

نتایج مطالعات بالینی

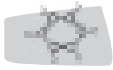
نتایج ماکروسکوپی (اندازه‌گیری سطح زخم)

در مطالعات ماکروسکوپی مساحت زخم‌ها در هر گروه با استفاده از نرم‌افزار Image J و تصاویر دیجیتال زخم‌ها اندازه‌گیری شده است. شکل ۲ نشان‌دهنده نحوه قرارگیری داربست‌های نانولیفی بر روی زخم‌های گروه تست (شکل ۲ (a & b)) و همچنین چگونگی ترمیم ظاهر زخم پس از گذشت زمان‌های ۲، ۵، ۷ و ۱۲ روز (شکل ۲ (c-f)) را نشان می‌دهد. همانطور که در شکل ۲ دیده می‌شود در روز ۱۲ پس از جراحی دیگر اثری از زخم در قسمت زخم‌های تست دیده نمی‌شود این در حالی است که همچنان مقداری اسکار در نمونه‌های کنترل دیده می‌شود.



شکل ۲. تصاویر مطالعات بالینی (a) ایجاد زخم گرد بر پشت موش، (b) قراردادی وب نانولیفی بر نمونه‌های تست (چپ بالا و راست پایین)، چگونگی بهبود زخم گرد (c) بعد از ۲ روز، (d) بعد از ۵ روز، (e) بعد از ۷ روز و (f) بعد از ۱۲ روز





کنترل زخم بعد از ۱۲ روز رو به بهبود می‌رود این در حالیست که نمونه‌های دارای وب نانولیفی کیتوسان - PVA بهبود کاملی را در روز ۷م نشان می‌دهد. به طور کلی این وب نانولیفی قابلیت کاربرد در مصارف پزشکی و پانسمان را دارا می‌باشد.

مراجع

- [1] Lanza, R.P., Langer, R., and Vacanti, J., Principles of Tissue Engineering, 2nd edition, New York, Academic Press, 2004.
- [2] Jayakumar, A., Prabakaran, M., Nair, S.V., Tamur, H., Novel chitin and chitosan nanofibers in biomedical applications, Biotechnol. Adv., 28, pp. 142-150, 2010.
- [3] Muzzarelli, R.A.A., Muzzarelli, C., Chitosan chemistry: relevance to the biomedical sciences, Adv. Polym. Sci., 186, pp. 151-209, 2005.
- [4] Min, B.M., Lee, S.W., Lim, J.N., You, Y., Lee, T.S., Kang, P.H., Park, W.H., Chitin and chitosan nanofibres: electrospinning of chitin and chitosan deacetylation of chitin nanofibers, Polymer, 45, pp. 7137-7142, 2004.
- [5] Gholipour, A., Bahrami, H., Nouri, M., Chitosan-Poly(vinyl alcohol) blend nanofibers: morphology, biological and antimicrobial properties, E-polymers, 133, pp. 1-12, 2009.
- [6] Trabucchi, E., Pallotta, S., Morini, M., Low molecular weight hyaluronic acid prevents oxygen free radical damage to granulation tissue during wound healing, Int. J. Tissue React., 24, pp. 65-71, 2002.
- [7] Sorg, B.S., Welch, A.J., Preliminary biocompatibility experiment of polymer film for laser assisted tissue welding, Lasers Surg. Med., 32, pp. 215-222, 2003.

بیوشیمیایی با محیط بدن بیشتر بوده و کلاژن‌زایی در نمونه‌های تست همواره بیش از گروه کنترل بوده است. همچنین نحوه آرایش یافتگی کلاژن در لایه درم در گروه تست بعد از ۷ روز به صورت باندلی و منظم درآمد در حالیکه در این روز کلاژن‌های گروه کنترل اغلب به صورت فیبریلی و نامنظم دیده می‌شوند. و در نهایت در روز ۱۲ام به آرایش منظم باندلی تا حدودی دست یافته‌اند.

نتیجه‌گیری

داربست نانولیفی مخلوط کیتوسان - PVA با نسبت جرمی ۲۵ به ۷۵ با موفقیت الکترورسی شد. با توجه به نتایج مطالعات ماکروسکوپی و میکروسکوپی مشهود است که روند بهبود زخم توسط وب نانولیفی کیتوسان - PVA بسیار مطلوب بوده است. این امر می‌تواند به دو دلیل کلی باشد: الف) ساختار سه بعدی، شبکه‌ای و متخلخل داربست نانولیفی که سبب جذب چرک، رطوبت و خون و عبور و مرور عالی اکسیژن بر روی زخم و تسریع بهبود می‌گردد، ب) ساختار شیمیایی کیتوسان و خواص بیولوژیکی عالی آن همچون قابلیت سازگاری، زیست چسبندگی، ضد میکروبی و ... که سبب شبیه‌سازی محیط بیوشیمیایی بافت طبیعی و جذب فیبروبلاست به لایه درم و تسریع بهبود می‌شود. در واقع در نمونه‌های

جدول ۱ نیز نتایج حاصل از اندازه‌گیری مساحت زخم را که حاصل چهار بار اندازه‌گیری برای هر زخم است نشان می‌دهد. به طور کلی اندازه زخم در گروه کنترل در یک زمان یکسان همواره بزرگتر از گروه تست بوده است که نشان‌دهنده اثر مطلوب وب نانولیفی بر روند بهبود زخم می‌باشد.

نتایج میکروسکوپی (پاتولوژی)

نتایج پاتولوژی روزهای اولیه (۲ روز پس از عمل جراحی) نشان‌دهنده حضور لایه چرک، فیبرین و دلمه بر روی زخم کنترل است. این در حالیست که در همین روز داربست‌های نانولیفی متخلخل قادر به جذب چرک و رطوبت از روی زخم شده‌اند. این امر سبب عبور و مرور بهتر اکسیژن بر روی زخم و در نتیجه تسریع روند بهبود می‌گردد. از این رو نتایج پاتولوژی در تمامی مدت زمان‌های تعیین شده نشان‌دهنده رشد و بازسازی بهتر و سریع‌تر لایه اپیدرم و درم در گروه تست نسبت به گروه کنترل است. نتایج هیستوشیمیایی زخم‌های کنترل و تست پس از گذشت هفت روز از عمل جراحی در شکل ۳ دیده می‌شود. همانطور که مشاهده می‌نمایید بافت جوانه‌ای در هر دو گروه کنترل و تست تا روز ۷ام افزایش داشته است و به طور کلی روند در گروه تست بهتر از گروه کنترل بوده است. به دلیل ساختار شیمیایی کیتوسان امکان ایجاد سیگنال‌های

جدول ۱. مساحت اندازه‌گیری شده زخم‌های گرد در گروه‌های کنترل و تست

مساحت زخم تست (mm ²)	مساحت زخم کنترل (mm ²)	تست زمان و حالت
29.27 ± 4.24	78.2 ± 1.1	روز ۱
26.21 ± 4.29	68.2 ± 0.22	روز ۲
24.2 ± 4.24	62.94 ± 0.2	روز ۳
11.25 ± 0.25	25.94 ± 0.25	روز ۱۲

شکل ۳. هیستولوژی هماتوکسیلین - اتوزین بافت زخم گرد در روز ۷ام بعد از جراحی: (a) تست (b) کنترل، ۴۰X

