DOI: 10.48305/jims.v41.i714.0226

مجله دانشکده پزشکی اصفهان | سال چهل و یکم/شماره‌ی ۷۱٤/هفته‌ی دوم خرداد ۱٤۰۲

تاریخ دریافت: ۱۴۰۲/۱۰/۶ | تاریخ پذیرش: ۱۴۰۲/۲/۱۶ | تاریخ چاپ: ۱۴۰۲/۳/۱۴

ساخت و ارزیابی نانوداربست کتیرا/ پلی کاپرولاکتان غنی شده با سیلیمارین، حاوی سلول‌های دندانی جهت کاربرد در مهندسی بافت

رضا نجفی[۱]، اسداله اسدی[۲]، صابر زهری[۳]، آرش عبدالملکی[۴]

مقاله پژوهشی

چکیده

مقدمه: مهندسی بافت، مجموعه‌ای از روش‌هایی است که می‌تواند بافت‌های آسیب دیده را با بافت طبیعی یا مصنوعی جایگزین یا ترمیم کند. کتیرا، یک پلیمر طبیعی است که خواص بیولوژیکی عالی مانند تجزیه‌ی زیستی و توانایی زیست‌سازگاری دارد. سیلیمارین از نظر بیوشیمیایی دارای خواص پاک‌کننده و آنتی‌اکسیدانی است و همچنین اثرات ضد التهابی دارد. هدف از این مطالعه، تولید نانوداربست پلی کاپرولاکتان (Polycaprolactone) PCL /کتیرا/ سیلیمارین و بررسی زیست سازگاری سلول‌های دندانی بر روی آن می‌باشد.

روش‌ها: به منظور تهیه‌ی نانوداربست پلی کاپرولاکتان/کتیرا و بارگذاری سیلیمارین بر روی آن، محلول پلی‌کاپرولاکتان ۷ درصد (حل شده در استیک اسید)، محلول کتیرا ۰/۷ درصد وزنی و محلول سیلیمارین با غلظت ۰/۹ درصد وزنی مخلوط شد، سپس توسط دستگاه الکتروریسی داربست تهیه شد. مورفولوژی داربست توسط میکروسکوب الکترونی روبشی (Scanning electron microscope) SEM و ساختار شیمیایی داربست توسط طیف‌سنجی FTIR مورد ارزیابی قرار گرفت.

یافته‌ها: بررسی مورفولوژی داربست و ساختار شیمیایی آن نشان‌دهنده‌ی تخلخل مناسب داربست پلی کاپرولاکتان و بارگذاری موفق سیلیمارین بر روی داربست بود. زیست سازگاری داربست ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت بعد از کشت سلول‌های دنتال مورد بررسی قرار گرفت که نتایج نشان‌دهنده افزایش زنده‌مانی سلول‌ها و اتصال مناسب سلول‌ها بر روی داربست بود.

نتیجه‌گیری: نتایج حاصل از این پژوهش نشان داد که بارگذاری سیلیمارین بر روی داربست پلی کاپرولاکتان/کتیرا باعث افزایش توان تکثیر و زنده‌مانی سلول‌های دندانی می‌شود. از این‌رو این داربست می‌تواند کاندید مناسبی برای مهندسی بافت باشد.

واژگان کلیدی: پلی کاپرولاکتان؛ سیلیمارین؛ مهندسی بافت؛ کتیرا؛ الکتروریسی؛ سلول دنتال

ارجاع: نجفی رضا، اسدی اسداله، زهری صابر، عبدالملکی آرش. **ساخت و ارزیابی نانوداربست کتیرا/ پلی کاپرولاکتان غنی شده با سیلیمارین، حاوی سلول‌های دندانی جهت کاربرد در مهندسی بافت.** مجله دانشکده پزشکی اصفهان ۱۴۰۲؛ ۴۱ (۷۱۴): ۲۳۳-۲۲۶

مقدمه

نانوالیاف حاصل از پلیمرهای زیست سازگار دارای برنامه‌های کاربردی آینده‌نگر در زیست پزشکی، شامل پانسمان زخم (۱)، رهایش دارو، داربست مهندسی بافت می‌باشد. خواص منحصر به فرد نانوالیاف، مانند نسبت سطح به حجم بالا (۲)، به اندازه‌ی منافذ مناسب (۳)، تخلخل نفوذپذیر، اکسیژن بالا و سهولت ساخت، آن‌ها را چنین مواد کاربردی ساخته است. الکتروریسی یکی از انعطاف‌پذیرترین و ساده‌ترین تکنیک‌هایی است که امکان تولید الیاف با قطرهای مختلف از ده‌ها نانومتر تا چند میکرومترا را فراهم می‌کند (٤، ٥). صمغ کتیرا (Tragacanth)، یک پلیمر طبیعی شناخته شده است که به دلیل خواص بیولوژیکی عالی مانند تجزیه‌ی زیستی، توانایی زیست‌سازگاری، ضدباکتری و بهبود زخم را دارد از ساقه‌ها و شاخه‌های گونه‌ی گون آسیایی به دست می‌آید. GT یک کربوهیدرات پیچیده، ناهمگن و آنیونی با پایداری ساختاری برجسته در برابر

۱- دانشجوی دکتری، گروه زیست‌شناسی، دانشکده‌ی علوم، دانشگاه محقق اردبیلی، اردبیل، ایران

۲- دانشیار، گروه زیست‌شناسی، دانشکده‌ی علوم، دانشگاه محقق اردبیلی، اردبیل، ایران

۳- استاد، گروه زیست‌شناسی، دانشکده‌ی علوم، دانشگاه محقق اردبیلی، اردبیل، ایران

۴- دانشیار، گروه بیوفیزیک، دانشکده‌ی فناوری‌های نوین، دانشگاه محقق اردبیلی، اردبیل، ایران

نویسنده‌ی مسؤول: اسداله اسدی: دانشیار، گروه زیست‌شناسی، دانشکده‌ی علوم، دانشگاه محقق اردبیلی، اردبیل، ایران

Email: asad.asady@gmail.com

حرارت و اسیدیته است (۶، ۷). حدود ۶۰ تا ۷۰ درصد وزن کتیرا را اسید تراگاکانتیک یا باسورین تشکیل می‌دهد که به صورت مخلوطی از نمک‌های Ca، Mg و K وجود داشته و نامحلول در آب است. قسمت خنثی در کتیرا، تراگاکانتین نام دارد که محلول در آب می‌باشد. محلول‌ها و باسورین مجموعه‌ای از اسیدهای متوکسیلات در آب نامحلول هستند، قسمت دیگر کتیرا می‌باشد که متورم می‌شود و به صورت ژل یا محلول ویسکوز در می‌آید (۸، ۹). سیلیمارین که از گیاه Silybum marianum (L.) استخراج می‌شود، حاوی مخلوطی از فلاونولیگنان‌های فعال و فلاونوئیدها است. از لحاظ تاریخی، سیلیمارین برای درمان طیف وسیعی از بیماری‌های کبدی استفاده شده است. فلاونولیگنان‌ها و فلاونوئیدهای اصلی در سیلیمارین به عنوان ترکیباتی شناخته شده‌اند که دارای فعالیت‌های دارویی زیادی هستند (۱۰). از نظر بیوشیمیایی، سیلیمارین دارای خواص پاک‌کننده و آنتی‌اکسیدانی است که در برابر رادیکال‌های آزاد عمل می‌کند (۱۱). همچنین اثرات ضدالتهابی (۱۲) دارد. سیلیمارین (۷۰ تا ۸۰ درصد)، عمدتاً از شش فلاونولیگنان زیر تشکیل شده است، سیلیبین (سیلیبین A و B)، ایزوسیلیبین (ایزوسیلیبین A و B)، سیلی‌کریستین، ایزوسیلی کریستین، سیلیدیانین و سیلیمونین و سایر فلاونوئیدها مانند تاکسیفولین، کورستین، دی هیدروکمپفرول، کامپفرول، آپیژنین، نارینگین، اریودکتیول و کریزواریول که در ترکیب سیلیمارین وجود دارد. باقیمانده‌ی سیلیمارین (۲۰ تا ۳۰ درصد) از ترکیباتی تشکیل شده است که شامل ۵ و ۷-دی هیدروکسی کرومون، دهیدروکنیفریل الکل، (۶۰ درصد اسید لینولئیک، ۳۰ درصد، اسید اولئیک، ۹ درصد اسید پالمیتیک)، توکوفرول، استرول‌ها (کلسترول، کامپسترول، استیگماسترول و سیتوسترول)، قندها (آرابینوز، رامنوز، زایلوز و گلوکز) و پروتئین‌ها است (۱۳-۱۵). سیلیمارین به دلیل خواص ضدالتهابی و فعالیت آنتی‌اکسیدانی خود به خوبی شناخته شده است، اما همچنین مجموعه‌ای از فعالیت‌های بیولوژیکی و دارویی مثبت مانند تحریک سنتز پروتئین، محافظت از قلب، محافظت عصبی، نوروتروفیک و تعدیل سیستم ایمنی را اعمال می‌کند. سیلیمارین همچنین اثرات ضدسرطانی در رده‌های سلولی سرطان انسان، و به ویژه در متابولیسم کبد، بازسازی سلولی در آسیب سمی کبد اعمال می‌کند. سیلیمارین فعالیت ضددیابتی را نشان می‌دهد و اثرات کاهش چربی خون و ضد فیبروتیک در بیماری التهابی مزمن کبدی نیز دارد (۱۶).

مطالعات متعددی برای تعیین اثرات آنتی‌اکسیدانی و ضدالتهابی سیلیمارین و همچنین خواص بیولوژیکی و دارویی سیلیمارین در درمان کبد انجام شده است (۱۷). در مطالعه‌ی دیگری، سیلیمارین و بخش پلی فنلی سیلیمارین به تنهایی مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت تا مشخص شود که کدام یک از این دو بر جذب کلسترول در موش‌هایی که قبلاً با رژیم غذایی کلسترول بالا HCD (High-cholesterol diet) تغذیه شده بودند، تأثیر می‌گذارد. نتایج نشان داد که هر دو مؤثر بوده و علاوه بر آن میزان VLDL (Very low-density lipoprotein)، کلسترول و تری‌اسیل گلیسرول را در کبد کاهش دادند. با این حال، سیلیمارین، اما نه بخش پلی‌فنلی سیلیمارین، HDL (High-density lipoprotein) را به طور قابل توجهی افزایش داد (۱۸). در نهایت، در مطالعه‌ای با موش‌های صحرایی هیپرتری‌گلیسریدمی ارثی، سیلیبین به طور قابل توجهی سطح گلوکز و انسولین را کاهش داد (۱۹). یکی دیگر از مدل‌های دیابت، فعالیت محافظت سلولی سیلیمارین در برابر آپوپتوز کاردیومیوسیت ناشی از دیابت را بررسی کرد. پس از اینکه حیوانات به مدت ده روز با سیلیمارین (۱۲۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم در روز) تحت درمان قرار گرفتند، سطح گلوکز به حالت عادی بازگشت و بازسازی سلول‌های بتا پانکراس را نشان داد (۲۰). با توجه به اینکه تاکنون گزارشی مبنی بر کاربرد داربست کتیرا/ پلی کاپرولاکتان غنی شده با سیلیمارین در مهندسی سلول‌های دنتال مشاهده نشده است. مطالعه‌ی حاضر در نظر دارد که با روش الکتروریسی، نانو داربست زیست تخریب‌پذیر کتیرا PCL/ بارگذاری شده با سیلیمارین را تهیه کرده و بعد از بررسی ساختار شیمیایی و مورفولوژی آن، عدم سمیت و زیست‌سازگاری داربست روی سلول‌های دنتال را جهت کاربرد در مهندسی بافت بررسی کند.

روش‌ها

تهیه‌ی نانوداربست: نانوداربست‌های مورد استفاده در این مطالعه با استفاده از روش الکتروریسی تهیه شدند. برای این منظور از دستگاه الکتروریسی فناوران نانو ساخت ایران استفاده شد که این دستگاه مجهز به یک جمع‌کننده‌ی دوار با ضخامت ۷۰ mm و پهنای ۵۰ mm می‌باشد. به طور خلاصه برای تهیه‌ی داربست در این مطالعه، محلول ۷ درصد پلی کاپرو لاکتان که در حلال حاوی اسید استیک و اسید فرمیک به صورت محلول در آمده بود با محلول سیلیمارین که دارای غلظت وزنی ۰/۹ درصد بود و همچنین با محلول کتیرا ۰/۷ درصد غلظت وزنی مخلوط شده توسط همزن مغناطیسی به مدت ۲۰ دقیقه مخلوط گردید و به منظور یکنواخت شدن محلول، سدیم دو دسیل سولفات SDS (Sodium dodecyl sulfate) با غلظت ۱ درصد وزنی نسبت به حلال به محلول اضافه شد. سپس سوسپانسیون به مدت ۲۰ دقیقه با دستگاه اولتراسونیک هموژنایز گردید و برای ساخت نانو الیاف در دستگاه الکتروریسی قرار داده شد. نانوالیاف در بازه‌ی زمانی ۵ ساعت جمع‌آوری شدند که سرعت جمع‌آوری نمونه‌ها ۱ میلی‌لیتر در ساعت بود و با چرخش ۲۵۰ rpm نمونه‌های

نانوالیاف جمع‌آوری شد. فاصله‌ی سوزن تزریق تا داربست ۱۵ cm و در ولتاژ ۲۰kV این فرایند انجام شد.

بررسی ریخت‌شناسی و فراساختار نانوداربست: برای بررسی مورفولوژی و اندازه‌گیری قطر الیاف از میکروسکوپ الکترونی روبشی (Scanning electron microscope) SEM استفاده شد. ابتدا نمونه‌ها با طلا پوشش‌دهی شده و تصویربرداری انجام شد.

بررسی ساختار شیمیایی نانوداربست‌ها: جهت تشخیص ساختار شیمیایی داربست تهیه شده، از طیف‌سنجی FTIR استفاده شد. بدین منظور طیف FTIR در محدوده‌ی طول موج CM-1 400-4000 توسط دستگاه طیف‌سنج SHIMADZU ساخت کشور ژاپن تهیه شد.

آماده‌سازی و استریل نمودن داربست پیش از کشت سلول: پیش از کشت سلول، داربست‌های تهیه شده به قطعات ۱ سانتی‌متر مربع بریده شده و در داخل چاهک‌های پلیت ۲۴ خانه قرار داده شدند. داربست‌های داخل چاهک دوبار و هر بار به مدت ۱۰ دقیقه توسط بافر PBS حاوی آنتی‌بیوتیک پنی‌سیلین/ استرپتوماسین شستشو داده شدند. سپس داربست‌ها زیر هود به مدت ۲۰ دقیقه زیر اشعه UV قرار گرفتند.

کشت سلول: در این پژوهش سلول‌های دنتال از انیستیتو پاستور ایران تهیه گردیدند. سلول‌های تهیه شده در محیط کشت DMEM (محصول شرکت Gibco، انگلستان) حاوی ۱۰ درصد سرم جنین گاوی (محصول شرکت Gibco، انگلستان) و ۱۰۰ واحد بر میلی‌لیتر آنتی‌بیوتیک پنی سیلین- استرپتومایسین (محصول شرکت Gibco، انگلستان) کشت داده شد و در انکوباتور در دمای ۳۷ درجه و ۵ درصد CO2 قرار داده شدند.

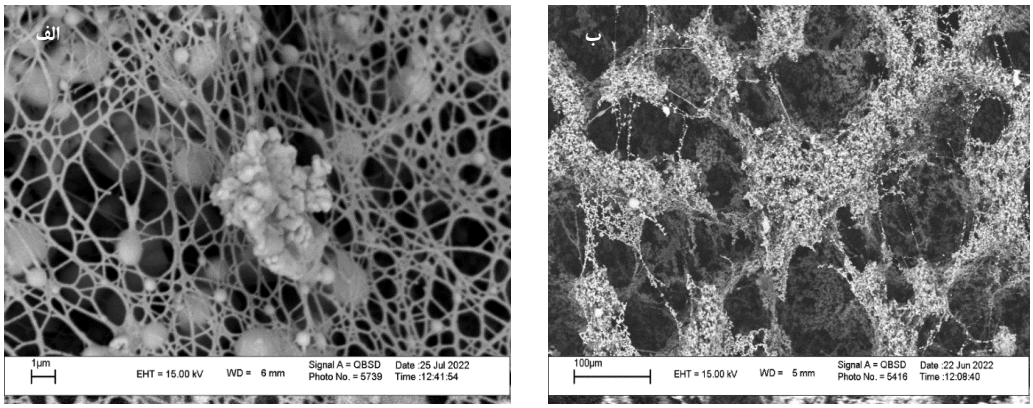
بررسی زیست‌سازگاری داربست: پس از استریل کردن داربست‌ها، تعداد ۵۰۰۰۰ سلول دنتال بر روی هر یک از آن‌ها کشت داده شد و برای بررسی زنده‌مانی سلول‌ها بر روی داربست و گروه شاهد (سلول بدون داربست) آزمون MTT در بازه‌های زمانی ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت پس از کشت سلول‌ها انجام شد. بطور خلاصه، در این روش، به ترتیب ابتدا ۲۰ میکرو لیتر از محلول MTT به هر یک از چاهک‌های پلیت ۹۶خانه اضافه شد و به مدت چهار ساعت در دمای ۳۷ درجه در محیط تاریک انکوبه گردید. در گام بعدی سلول‌ها و کریستال‌های رنگی با اضافه کردن ۲۰۰ میکرو لیتر از DMSO بصورت محلول درآمدند و میزان جذب نوری آن‌ها در طول موج ۵۷۰ نانومتر در دستگاه Elisa خوانده شد (۲۱، ۲۲).

بررسی اتصال سلول‌ها بر روی داربست: پس از استریل کردن داربست‌ها، تعداد ۵۰۰۰۰ سلول دنتال بر روی هر یک از داربست‌ها در پلیت ۲۴ خانه در بازه‌های زمانی ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت کشت داده شد (بدلیل اینکه ۲۴ ساعت طول می‌کشد تا سلول‌ها بطور کامل روی داربست بچسبند و تا ۷۲ ساعت می‌توانند روی داربست رشد کرده و رشدشان بیشتر شود ولی بعد از ۷۲ ساعت بدلیل کمتر بودن سطح داربست برای رشد، از ۷۲ ساعت به بعد زیستایی سلول‌ها کاهش پیدا می‌کند). سپس نمونه داربست حاوی سلول فیکس شدند و پس از طی مراحل خشک کردن نمونه‌ها به منظور بررسی اتصال سلول‌ها به داربست توسط میکروسکوپ الکترونی SEM تصویربرداری شدند.

این مطالعه دارای کد اخلاق به شماره (IR.UMA.REC.1401.022) از دانشگاه محقق اردبیلی می‌باشد.

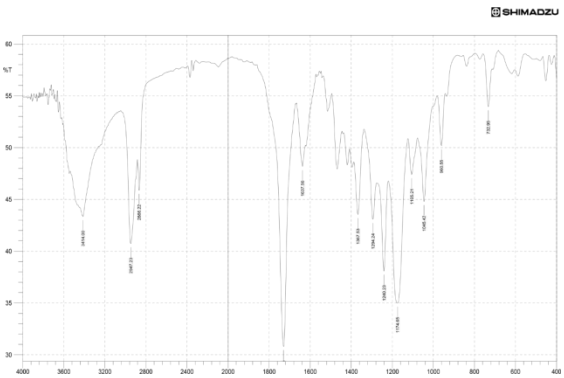
یافته‌ها

بررسی ریخت‌شناسی و فراساختار نانو داربست: نتایج حاصل از فراساختار داربست‌ها و ارزیابی قطر الیاف توسط تصاویر میکروسکوپ الکترونی روبشی (SEM) نشان داد که داربست‌ها در مقیاس نانو (۴۰ الی ۵۰ نانومتر) تهیه شده‌اند، همچنین ارزیابی خواص سطحی داربست‌ها نشان‌دهنده‌ی تخلخل مناسب جهت رشد و اتصال سلول‌ها بر روی داربست می‌باشد (شکل ۱).



شکل ۱. الف) تصاویر SEM از داربست الکتروریسی شده سیمیمارین/PCL/کتیرا بعد از کشت سلول،
ب) داربست سیمیمارین/PCL/کتیرا بدون سلول دارای سطح صاف و تخلخل مناسب برای کشت سلول می‌باشد.

بررسی ساختارشیمیایی نانوداربست‌ها توسط طیف‌سنجی FTIR:
همانطور که در شکل ۲ نشان داده شده است به طور کلی طیف جذبی پلی کاپرولاکتان دارای سه پیک شاخص در اعداد موج cm-1 ۱۷۳۰، ۲۸۶۵، ۲۹۴۷ می‌باشد که به ترتیب نشان‌دهنده‌ی وجود ارتعاش کششی پیوندهای C = O– و ارتعاش پیوندهای CH2– می‌باشد. از پیک‌های شاخص سیلیمارین در اعداد طول موج cm-1، ۱۰۴۳، ۱۱۰۳، ۱۲۴۲ نشان‌دهنده‌ی ارتعاش پیوندهای C-O-، ۱۷۳۱ نشان‌دهنده‌ی COOH– کربوکسیلیک اسید، CM-1 ۱۵۰۸ نشان‌دهنده‌ی C = C آروماتیک و ۳۴۴۲ مربوط به کشش O-H– در ساختار سیلیمارین قابل تشخیص می‌باشد که نشان‌دهنده‌ی پوشش‌دهی مناسب نانوداربست پلی کاپرولاکتان با سیلیمارین است (۲۳، ۲۴).

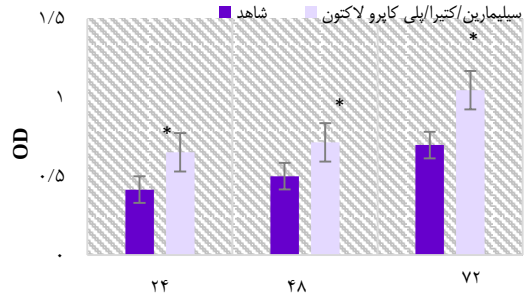


شکل ۲. طیف‌سنجی FTIR نانوداربست PCL/سیلیمارین/کتیرا

زیست‌سازگاری نانو داربست: نتایج حاصل از رشد و تکثیر سلول‌ها بر روی نانوداربست در سه بازه‌ی زمانی ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت پس ازکشت سلول‌ها نشان داد که زنده‌مانی سلول‌ها در نانوداربست پلی کاپرو لاکتان/کتیرا حاوی سیلیمارین نسبت به گروه شاهد (سلول بدون داربست) به طور معنی‌داری افزایش یافته است. همچنین نانوداربست هیچ گونه سمیتی بر روی سلول‌های کشت شده نداشت (شکل ۳). علاوه بر این، بررسی اتصال و چسبندگی سلول‌ها بر روی داربست نشان داد که سلول‌ها بطور یکنواخت توزیع شده و بدلیل تخلخل مناسب بطور کامل به داربست متصل شده و بر روی آن گسترش یافته‌اند (شکل ۱- الف).

بحث

در بافت تکامل یافته‌ی یک جاندار، سلول‌ها در محیط‌های ریز سه‌بعدی قرار می‌گیرند و اطرافشان به وسیله‌ی سلول‌های دیگر و ECM احاطه می شود رفتار سلولی پاسخی ترکیبی از رخدادهای پیام‌رسانی متعددی بوده که در اثر برهمکنش سلول‌های مجاور با یکدیگر، با مولکول‌های محلول و با ECM اتفاق می‌افتد (۲۵، ۲۶). با توجه به اینکه ECM شبکه‌ای از نانوالیاف پیچیده و منظم می‌باشد و نیز تأثیر محیط نانوتوپوگرافی بر القای مسیرهای پیام‌رسانی دخیل در شکل‌گیری فنوتیپ و سرنوشت سلول نقش به سزایی دارد، داربست های تولید شده از نانوالیاف در سال‌های اخیر مورد توجه قرار گرفته است (۲۷). در این مطالعه، پلیمر پلی کاپرولاکتون و کتیرا به عنوان ماده‌ی سازنده‌ی داربست به روش الکتروریسی انتخاب شد. این پلیمر یک پلیمر خطی و آب‌گریز است و به علت خواص فیزیکی عالی، در دسترس بودن و زیست سازگار بودنش، ماده‌ی مناسبی برای مصارف پزشکی به حساب می‌آید و به شکل گسترده‌ای در مهندسی بافت کاربرد دارد.



شکل ۳. نتایج حاصل از تست MTT، میزان زنده‌مانی سلولی داربست، پلی کاپرو لاکتون/کتیرا/سیلیمارین و گروه شاهد (سلول بدون داربست) پس از ۷۲ ساعت از کشت سلولی (سه بار تکرار). داده‌ها به صورت میانگین ± انحراف استاندارد نمایش داده شده است. برای مقایسه‌ی بین گروه‌ها از آزمون تعقیبی Tukey استفاده گردید و تفاوت آماری معنی‌داری در مقایسه با گروه شاهد به صورت P < ۰/۰۵ * تعریف شده است.

کتیرا، پلیمری طبیعی است و از آن‌جا که بعضی از پلیمرهای طبیعی در ساختار ماتریس خارج سلولی وجود دارند، می‌توانند زیرساخت خوبی برای کاربرد در مهندسی بافت به دلیل چسبندگی سلولی خوب ایفا کنند. کتیرا، هیچ گونه اثر حساسیت‌زایی، جهش‌زایی، عامل نقص جنین، سرطان‌زایی و سمیت‌زایی روی بدن انسان ندارد و باعث ایجاد محیط مناسبی برای رشد سلول در آن می‌شود. کتیرا به دلیل درمان زخم و ترمیم بافت (میوفیبروبلاست) در مراحل بازسازی و ترمیم زخم مؤثر است. مواد فعال موجود در کتیرا (تراگاکانتین و باسورین) به سرعت به کلاژن‌سازی و مراحل ترمیم زخم کمک می‌کنند. کتیرا افزون بر خواص ترمیمی، بهبود زخم و خواص ضدمیکروبی قابلیت کنترل رهایش دارو از سامانه‌های دارورسانی را دارد (۲۸). همچنین، خواص ضدمیکروبی کتیرا برای زخم پوش‌ها و سامانه‌های ضدمیکروبی مؤثر است. همچنین از

سیلیمارین (خار مریم) برای بارگذاری استفاده شد که فلاونوییدی با اثرات متعدد از جمله اثر ضدسرطانی و خواص آنتی‌اکسیدانی می‌باشد. سیلیمارین عصاره‌ای است که از چندین ایزومر تشکیل شده که مهم‌ترین ماده‌ی موجود در این عصاره، سیلی بینین است و حدود ۸۰ درصد از این عصاره را شامل می‌شود (۲۹).

نتایج بدست آمده از میکروسکوپ الکترونی sem و تست MTT، نشان‌دهنده‌ی زیست‌سازگاری و عدم سمیت داربست پلی‌کاپرو لاکتان/کتیرا/ سیلیمارین و همچنین بقای سلولی معنی‌دار بر روی این داربست در مقایسه با کنترل بعد از کشت سلولی بود. همچنین مقایسه‌ی زیست‌سازگاری داربست پلی کاپرولاکتان/کتیرا با داربست پلی کاپرولاکتان/سیلیمارین نشان داد که بارگذاری سیلیمارین بر روی داربست پلی کاپرولاکتان باعث افزایش زیست‌سازگاری داربست می‌شود. یکی از ویژگی‌های عملی داربست‌ها برای استفاده در مهندسی بافت، چسبندگی سلولی است (۳۰، ۳۱). میکروگراف‌های SEM مطالعه‌ی ما نشان داد که سلول‌ها به خوبی به یکدیگر و به نانوداربست‌ها چسبیده‌اند و اتصال آن‌ها را تأیید می‌کنند. کتیرا، پلیمری طبیعی است و از آن‌جا که بعضی از پلیمرهای طبیعی در ساختار ماتریس خارج سلولی وجود دارند و هیچ گونه اثر حساسیت‌زایی، جهش‌زایی، عامل نقص جنین، سرطان‌زایی و سمیت‌زایی روی بدن انسان ندارد و باعث ایجاد محیط مناسبی برای رشد سلول در آن شده و باعث افزایش رشد سلول روی داربست می‌شود.

سیلیمارین (خار مریم)، فلاونوییدی است که اثرات متعددی از جمله اثر ضدسرطانی و خواص آنتی‌اکسیدانی را موجب می‌شود. در استرس اکسیداتیو آزادسازی ROS که شامل پراکسید هیدروژن (H_2O_2) و یون سوپراکسید (O_2^-) و نیتریک اکسید (NO^-) می‌باشند، موجب تغییرات در اجزای سلول و از جمله پراکسیداسیون لیپیدی و متعاقباً مرگ سلولی می‌گردد. سیلیمارین از جمله موادی است، که به نظر می‌رسد با کاهش میزان ROS بتوانند از مرگ سلولی پیشگیری نمایند و باعث افزایش رشد سلول‌های دنتال روی نانوداربست سنتزی می‌شود.

در پژوهشی نشان دادند که ساخت داربست‌های دو لایه با ترکیب نقره و سیلیمارین به عنوان داربستی جهت ترمیم ضایعات پوستی زیست‌سازگاری مناسبی را برای سلول‌های کشت شده بر روی داربست نشان داد. این زیست‌سازگاری به دلیل نقش آنتی‌اکسیدانی لایه‌ی نقره بر روی داربست می‌باشد که سبب کاهش استرس اکسیداتیو می‌گردد (۳۲). در کنار استفاده از روش ساخت انتخاب ماده‌ی سازنده داربست بخش حیاتی را در اطمینان یافتن از موفقیت مهندسی بافت پوست بازی می‌کند. مواد طبیعی و سنتتیک متفاوتی برای ساخت داربست ازجمله PLL، PCL، کلاژن، فیبروئین ابریشم، کیتوسان و ژلاتین استفاده شده است. مانع اصلی در استفاده از پلیمرهای طبیعی خصوصیات مکانیکی ضعیف آن‌هاست. پلیمرهای سنتتیک مانند، PLLA و PC تحت تجزیه هیدرولیتیکی قرار می‌گیرند و فرآورده‌های حاصل از آن‌ها در مسیر متابولیکی حذف می‌شوند. این پلیمرها ویژگی‌های برتری از لحاظ مکانیکی نسبت به پلیمرهای طبیعی دارند و به آسانی قابلیت پردازش دارند (۳۳).

در مطالعه‌ی دیگری نشان داده شد که آنتی‌اکسیدان‌هایی مانند سیلیمارین و کوارستین با ثبات بخشیدن به گانگلیوزیدهای غشایی، باعث تداوم غشاهای زیستی و افزایش توان حیاتی سلول‌ها شده‌اند. از طرفی عوامل کارسینوژن مانند آرسنیک، باعث ایجاد بدخیمی در سلول های پوست و القای استرس اکسیداتیو شده، که سیلیمارین تا حدودی با هر دو پدیده مقابله می‌کند (۳٤). سیلیمارین همچنین در سلول‌های PC12، باعث افزایش ترشح فاکتور رشد عصبی (NGF) شده و سبب افزایش حیات سلولی در محیط کشت گردیده است. علاوه بر این، نشان داده شده است که سیلیمارین در سلول‌های کشت شده باعث کاهش آپوپتوز می‌گردد (۳۵).

شریفی و همکاران در سال ۲۰۱٤، داربست PCL تحت درمان با پلاسما را به منظور بررسی تکثیر سلول های فیبروبلاست اصلاح کردند (از موش استفاده شد). نتایج نشان داد که داربست PCL اصلاح شده با پلاسما در مقایسه با داربست - PCL ژلاتین- کیتوزان، توانایی پشتیبانی کمتری از سلول‌های کشت شده را دارد (۳٦).

در یک مطالعه، Ranjbar-Mohammadi و همکاران در مقایسه با PCL خالص، افزودن GT منجر به کاهش زیادی قطر فیبر و تغییر مورفولوژی فیبر شد. داربست‌های تولید شده از ۷ درصد GT و ۲۰ درصد PCL مورفولوژی بهتری داشتند و ترکیب ۱/۵: ۳ (PCL/GT) با مقدار بالایی از GT برای آزمایش‌های بعدی انتخاب شد. سلول‌های فیبروبلاست انسانی و فیبروبلاست NIH 3T3 به خوبی روی داربست‌های PCL/GT چسبیده و تکثیر شدند. ماهیت آب دوستی نانوالیاف، رفتار تخریب، استحکام مکانیکی، مورفولوژی خوب سلول‌ها بر روی نانوالیاف PCL/GT و روش‌های ارزیابی سمیت سلولی نشان داد که این داربست‌ها بی‌خطر هستند و پتانسیل توسعه به‌عنوان داربست های پوستی یا چسب های پانسمان زخم را دارند (۳۷). سلول های بنیادی پالپ دندان انسانی (hDPSCs) از دندان‌های مولر سوم جدا شده و در مطالعات کشت سلولی مورد استفاده قرار گرفتند. در همه‌ی گروه ها، سلول ها ۱ روز پس از کشت به خوبی چسبیده بودند. گروه B14-10 افزایش اندکی از تکثیر را نسبت به گروه بدون (BG-NPs) پس از ۷ روز انکوباسیون نشان داد. فعالیت آلکالین فسفاتاز و مقدار کلسیم داخل سلولی به طور قابل توجهی ۱٤ روز پس از انکوباسیون با بالاترین مقادیر در گروه

B14-10 و B14-20 افـزایش یافـت (۳۸). نتـایج نشـان داد کـه سلول‌های جوانه‌های دندان موش‌های صحرایی کشت شـده، بـر روی داربست‌های زیست تخریب‌پذیر، در فک‌های میزبان موش‌هـای بـالغ کاشته شده و به مدت ۱۲ هفتـه رشـد کـرده‌انـد، تـاج‌هـای کوچـک، سازمان یافتـه و مهندسـی شـده زیسـتی، حـاوی عـاج، مینـا، پالـپ و بافت‌های رباط پریودنتال را تشکیل می‌دهند (۳۹).

سلول های پالپ دندان به سرعت روی کلاژن و ژلاتین چسـبیده و تکثیر شدند، اما کیتوزان به درستی از رشـد سـلول پشـتیبانی نکـرد. سلول های کاشته شده روی ژلاتین فعالیت ALP بالایی از خود نشـان دادند، اما نه به اندازه‌ی سلول‌های روی کلاژن. اوج بیـان mRNA ژن استئوکلسین (Osteocalcin) OCN از سـلول هـای رشـد یافتـه روی کلاژن زودتر پیدا شد (٤٠). داربست‌های بیـودنتین/ پلـی‌کـاپرولاکتون دارای حفره های یکنواخت بـه انـدازه‌ی ۵۵۰ میکرومتـر بـا اتصـالات متقابـل و مقاومـت فشـاری ٦/٥ مگاپاسـکال بودنـد. عـلاوه بـر ایـن، داربست های کامپوزیتی توانایی تشکیل آپاتیت خـوبی از خـود نشـان دادند و قادر بـه حمایـت از تکثیـر و تمـایز hDPCهـا بودنـد (٤١). استفاده از داربست‌های بیومتریال و سلول‌های بنیادی مـی‌توانـد بـرای بازسازی بافت پالـپ و بازیـابی شـادابی دنـدان ایمـن و قـوی باشـد. پلیمرهای طبیعی و مصنوعی دارای مزایا و محدودیت هـای مشخصـی هستند و آزمایش‌های in vitro و in vivo نتایج مثبتی بـرای اتصـال، تکثیر و رگ‌زایی سلولی ایجاد کرده‌اند. نوع ماده زیستی مورد اسـتفاده برای ساخت داربست نیز تمایز سلول های بنیـادی بـه ادنتوبلاسـت را تسهیل می‌کند و بیوشیمی حاصل از ترمیم بافت برای هر پلیمر و نـوع سلول مورد بحث قرار گرفت (٤٢).

نتیجه‌گیری

در مجمـوع، نتـایج بدسـت آمـده از میکروسـکوپ الکترونـی SEM و همچنـین تسـت MTT، زیسـت‌سـازگاری بـالای داربسـت پلی‌کاپرولاکتان/کتیرا/سـیلیمارین را نسـبت بـه گـروه شـاهد نشـان داد. بنابراین به نظر می‌رسـد کـه داربسـت پلـی‌کاپرولاکتان/کتیرا/سـیلیمارین می‌تواند کاندیدای امیدوارکننده‌ای برای کاربرد مهندسی بافت عصـبی بـه منظور ترمیم ضایعات عصبی باشد.

از محدودیت‌های این پژوهش می‌توان به عدم بررسی داربسـت در مدل‌های حیوانی اشاره کـرد. پیشـنهاد مـی‌شـود در مطالعـات بعـدی از نانوداربست پلی‌کاپرولاکتان حاوی سـیلیمارین جهـت تـرمیم ضـایعات عصبی در مدل حیوانی موش صحرایی استفاده شود

تشکر و قدردانی

نویسندگان مراتب تقدیر و تشکر خود را از دانشگاه محقق اردبیلی بـه دلیل حمایت مالی و فراهم آوردن تجهیزات اعلام می‌دارند.

References

1. Neamnark A, Sanchavanakit N, Pavasant P, Rujiravanit R, Supaphol P. In vitro biocompatibility of electrospun hexanoyl chitosan fibrous scaffolds towards human keratinocytes and fibroblasts. Eur Polym 2008; 44(7): 2060-7.
2. Abdelhady S, Honsy KM, Kurakula M. Electro spun-nanofibrous mats: a modern wound dressing matrix with a potential of drug delivery and therapeutics. J Eng Fibers Fabrics 2015; 10(4): 179-93.
3. Gouda M, Hebeish A, Aljafari AL. Synthesis and char-acterization of novel drug delivery system based on cellu-lose acetate electrospun nanofiber mats. J Ind Textile 2014; 43(3): 319-29.
4. Nawalakhe RG, Hudson SM, Mohamed Seyam AF, Waly AI, Abou-Zeid NY, Ibrahim HM. Development of electrospun iminochitosan for improved wound healing application. J Eng Fibers Fabrics 2012; 7(2): 47-55.
5. Han X, Xing Z, Si S, Yao Y, Zhang Q. Electrospun grape seed polyphe-nols/gelatin composite fibers contained silver nanoparticles as biomaterials. Fibers Polym 2014; 15(12): 2572-80.
6. Croisier F, Jérôme C. Chitosan-based biomaterials for tissue engineering. Eur Polym J 2013; 49(4): 780-92.
7. Arca HC, Senel S. Chitosan based systems for tissue engineering part 1: hard tissues. FABAD J Pharmaceut Sci 2008; 33(1): 35-49.
8. Rawdkuen S, Thitipramote N, Benjakul S. Preparation and functional characterisation of fish skin gelatin and com-parison with commercial gelatin. Food Sci Tech Int 2013; 48(5): 1093-102.
9. Nikoo M, Benjakul S, Ocen D, Yang N, Xu B, Zhang L, et al. Physical and chemical properties of gelatin from the skin of cultured Amur stur-geon. J Appl Ichthyol 2013; 29(5): 943-50.
10. Chambers CS, Holečková V, Petrásková L, Biedermann D, Valentová K, Buchta M, et al. The silymarin composition… and why does it matter. Food Res Int 2017; 100: 339-53.
11. Surai PF. Silymarin as a natural antioxidant: an overview of the current evidence and perspectives. Antioxidants 2015; 4: 204-47.
12. Lovelace ES, Wagoner J, MacDonald J, Bammler T, Bruckner J, Brownell J, et al. Silymarin suppresses cellular inflammation by inducing reparative stress signaling. J Nat Prod 2015; 78(8): 1990-2000.
13. Bijak M. Silybin, a major bioactive component of milk thistle (Silybum marianum L. Gaernt.)-chemistry, bioavailability, and metabolism. Molecules 2017; 22(11): 1942.
14. Kren V, Walterová D. Silybin and silymarin--new effects and applications. Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc Czech Repub 2005; 149(1): 29-41.
15. Wellington K, Jarvis B. Silymarin: a review of its

clinical properties in the management of hepatic disorders. BioDrugs 2001; 15: 465-89.
16. Javed S, Kohli K, Ali M. Reassessing bioavailability of silymarin. Altern Med Rev 2011; 16(3): 239-49.
17. Gillessen A, Schmidt HH. Silymarin as supportive treatment in liver diseases: a narrative review. Adv Ther 2007; 37(4): 1279-301.
18. Sobolová L, Škottová N, Večeřa R, Urbánek K. Effect of silymarin and its polyphenolic fraction on cholesterol absorption in rats. Pharmacol Res 2006; 53(2):104-12.
19. Poruba M, Kazdová L, Oliyarnyk O, Malinská H, Matusková Z, Di Angelo IT, et al. Improvement bioavailability of silymarin ameliorates severe dyslipidemia associated with metabolic syndrome. Xenobiotica 2015; 45(9):751-6.
20. Tuorkey MJ, El-Desouki NI, Kamel RA. Cytoprotective effect of silymarin against diabetes-induced cardiomyocyte apoptosis in diabetic rats. Biomed Environ Sci 2015; 28(1): 36-43.
21. Wang TT, Phang JM. Effects of estrogen on apoptotic pathways in human breast cancer cell line MCF-7. Cancer Res 1995; 55(12): 2487-9.
22. Kwon TW, Watts BM. Malonaldehyde in aqueous solution and its, role as a measure of lipid oxidation in foods. J Food Sci 2006; 29(3): 294-302.
23. Pandi M, Kumaran RS, Choi YK, Kim HJ, Muthumary J. Isolation and detection of taxol, an anticancer drug produced from Lasiodiplodia theobromae, an endophytic fungus of the medicinal plant Morinda citrifolia. African J Biotechnology 2011; 10(8): 1428-35.
24. Takashima Y, Saito R, Nakajima A, Oda M, Kimura A, Kanazawa T, et al. Spray-drying preparation of microparticles containing cationic PLGA nanospheres as gene carriers for avoiding aggregation of nanospheres. Int J Pharm 2007; 343(1-2): 262-9.
25. Abbaszadeh S, Asadi A, Zahri S, Abdolmaleki A, Mahmoudi F. Does phenytoin have neuroprotective role and affect biocompatibility of decellularized sciatic nerve scaffold? J Gene Cell and Tissue 2021; 8(1): e108726.
26. Barnes CP, Sell SA, Boland ED, Simpson DG, Bowlin GL. Nanofiber technology: designing the next generation of tissue engineering scaffolds. Adv Drug Deliv Rev 2007; 59(14): 1413-33.
27. Kumar G, Waters MS, Farooque TM, Young MF, Simon Jr CG. Freeform fabricated scaffolds with roughened struts that enhance both stem cell proliferation and differentiation by controlling cell shape. Biomaterials 2012; 33(16): 4022-30.
28. Ranjbar-Mohammadi M, Bahrami SH, Joghataei MT. Fabrication of novel nanofiber scaffolds from gum tragacanth/poly (vinyl alcohol) for wound dressing application: in vitro evaluation and antibacterial properties. Mater Sci Eng C Mater Biol Appl 2013; 33(8): 4935-43.
29. Christy PN, Basha SK, Kumari VS, Bashir AKH, Maaza M, Kaviyarasu K, et al. Biopolymeric nanocomposite scaffolds for bone tissue engineering applications-A review. J Drug Deliv Sci Technol 2020; 55: 101452.
30. Nasrollahi Nia F, Asadi A, Zahri S, Abdolmaleki A. Biosynthesis, characterization and evaluation of the supportive properties and biocompatibility of DBM nanoparticles on a tissue-engineered nerve conduit from decellularized sciatic nerve. Regen Ther 2020; 14: 315-21.
31. Abdolmaleki A, Ghayour MB, Zahri S, Asadi A, Behnam-Rassouli M. Preparation of acellular sciatic nerve scaffold and it's mechanical and histological properties for use in peripheral nerve regeneration [in Persian]. Tehran Univ Med J 2019; 10; 77(2): 115-22.
32. Shaik MM, Dapkekar A, Rajwade JM, Jadhav SH, Kowshik M. Antioxidant-antibacterial containing bi-layer scaffolds as potential candidates for management of oxidative stress and infections in wound healing. J Mater Sci Mater Med 2019; 30(1): 13.
33. Vance RJ, Miller DC, Thapa A, Haberstroh KM, Webster TJ. Decreased fibroblast cell density on chemically degraded poly-lactic-co-glycolic acid, polyurethane, and polycaprolactone. Biomaterials 2004; 25(11): 2095-103.
34. Kittur S, Wilasrusmee S, Pedersen WA, Mattson M, Straube-West K, Wilasrusmee C, et al. Neurotrophic and neuroprotective effects of milk thistle (Silybum marianum) on neurons in culture. J Mol Neurosci 2002; 18(3): 265-9.
35. Xiong S, Zhao Q, Rong Z, Huang G, Huang Y, Chen P, et al. hSef inhibits PC-12 cell differentiation by interfering with Ras-mitogen-activated protein kinase MAPK signaling. J Biol Chem 2003; 278(50): 50273-82.
36. Sharifi Ferdoey F, Irani S, Zandi M, Soleimani M. Synthesis and surface modification of polycaprolactone nanofibers for tissue engineering [in Persian]. J Ardabil Univ Med Sci 2014; 14(3): 217-28.
37. Ranjbar-Mohammadi M, Hajar Bahrami S. Development of nanofibrous scaffolds containing gum tragacanth/poly (ε-caprolactone) for application as skin scaffolds. Mater Sci Eng C Mater Biol Appl 2015; 48: 71-9.
38. Moonesi Rad R, Atila D, Akgün EE, Evis Z, Keskin D, Tezcaner A. Evaluation of human dental pulp stem cells behavior on a novel nanobiocomposite scaffold prepared for regenerative endodontics. Mater Sci Eng C Mater Biol Appl 2019; 100: 928-48.
39. Duailibi SE, Duailibi MT, Zhang W, Asrican R, Vacanti JP, Yelick PC. Bioengineered dental tissues grown in the rat jaw. J Dent Res 2008; 87(8): 745-50.
40. Kim NR, Lee DH, Chung PH, Yang HC. Distinct differentiation properties of human dental pulp cells on collagen, gelatin, and chitosan scaffolds. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod 2009; 108(5): e94-100.
41. HO CC, Fang HY, Wang B, Huang TH, Shie MY. The effects of Biodentine/polycaprolactone three-dimensional-scaffold with odontogenesis properties on human dental pulp cells. Int Endod J 2018; 51(Suppl 4): e291-300.
42. Jazayeri HE, Lee UM, Kuhn L, Fahimipour F, Tahriri M, Tayebi L. Polymeric scaffolds for dental pulp tissue engineering: A review. Dent Mater 2020; 36(2): e47-58.

DOI: *10.48305/jims.v41.i714.0226*

Journal of Isfahan Medical School **Vol. 41, No. 714, 2nd Week, June 2023**

Received: 27.12.2022 Accepted: 06.05.2023 Published: 04.06.2023

Fabrication and Evaluation of Silymarin-Enriched Tragacanth / Polycaprolactone Nanoscaffold Containing Dental Cells for Use in Tissue Engineering

Reza Najafi[1], Asadollah Asadi[2], Saber Zahri[3], Arash Abdolmaleki[4]

Original Article

Abstract

Background: Tissue engineering is a set of methods that can replace or repair damaged tissues with natural or artificial tissue. Tragacanth is a natural polymer that has excellent biological properties such as biodegradability and biocompatibility. Silymarin biochemically has cleansing and antioxidant properties and also has anti-inflammatory effects. The aim of this study is the production of polycaprolactone (PCL) / tragacanth / silymarin nanoscaffold and to investigate the biocompatibility of dental cells on it.

Methods: To create a polycaprolactone /tragacanth nanoscaffold and add silymarin to it, acetic acid was used to dissolve 7 percent of the polycaprolactone, 0.7 weight percent of the tragacanth solution, and 0.9 percent of the silymarin solution. The scaffold was then created using an electrospinning machine. Scanning electron microscope (SEM) analysis and FTIR analysis were used to analyze the scaffold's chemical structure and shape, respectively.

Findings: The scaffold's correct porosity and the successful loading of silymarin on it were revealed by analyzing the scaffold's morphology and chemical composition. The biocompatibility of the scaffold was investigated 24, 48 and 72 hours after the cultivation of dental cells, and the results showed an increase in cell viability and proper attachment of cells on the scaffold.

Conclusion: The findings of this study demonstrated that silymarin loading on the polycaprolactone/catira scaffold improves dental cell proliferation and survival. This scaffold may therefore be a good choice for tissue engineering.

Keywords: Polycaprolactone; Silymarin; Tissue engineering; Tragacant**;** Electrospinning; Dental cells

Citation: Najafi R, Asadi A, Zahri S, Abdolmaleki A. **Fabrication and Evaluation of Silymarin-Enriched Tragacanth / Polycaprolactone Nanoscaffold Containing Dental Cells for Use in Tissue Engineering.** J Isfahan Med Sch 2023; 41(714): 226-33.

1- PhD Candidate, Department of Biology, School of Science, University of Mohaghegh Ardabili, Ardabil, Iran
2- Associate professor, Department of Biology, School of Science, University of Mohaghegh Ardabili, Ardabil, Iran
3- Professor, Department of Biology, School of Science, University of Mohaghegh Ardabili, Ardabil, Iran
4- Associate professor, Department of Biophysics, School of Advanced Technologies, University of Mohaghegh Ardabili, Ardabil, Iran
Corresponding Author: Asadollah Asadi, Associate professor, Department of Biology, School of Science, University of Mohaghegh Ardabili, Ardabil, Iran; Email: asad.asady@gmail.com