مجله دانشکده پزشکی اصفهان
سال سی و سوم/شماره ۳۵۲/هفته چهارم آبان ماه ۱۳۹٤

تاریخ دریافت: ۱۳۹۴/۳/۲۹
تاریخ پذیرش: ۱۳۹۴/۷/۶

تأثیر تثبیت RGD بر زیست‌سازگاری داربست اکسید سلولز برای مهندسی بافت استخوان

مظفر محمودی[۱]، دکتر علی صمدی کوچکسرایی[۲]، دکتر محمدرضا نعیمی جمال[۳]، سعید سامانی[۴]، مختار یعقوبی[۵]

مقاله پژوهشی

چکیده

مقدمه: از کارافتادگی بافت‌های انسانی ناشی از انواع آسیب‌دیدگی‌ها، یکی از پرهزینه‌ترین و جدی‌ترین مشکلات در سلامت انسان است و اثر مستقیم بر کیفیت زندگی دارد. مهندسی بافت، به عنوان یک استراتژی مبتنی بر داربست، از جمله حوزه‌های تحقیقاتی امیدوار کننده‌ای است که می‌تواند علاوه بر فراهم کردن بافت و ارگان برای پیوند، چشم‌انداز جدیدی را برای درمان بیماران باز کند. دانشمندان حوزه‌های مختلف کوشیده‌اند تا با وظیفه‌مند کردن داربست، به تعاملات سطحی سلول‌های خاص دست یابند.

روش‌ها: پودر سلولز با استفاده از گاز NO_2 اکسید شد و داربست متخلخل به روش پرس خشک آماده گردید. پپتید RGD به سطح داربست متصل گردید تا یک داربست هیبریدی ساخته شود. داربست با FTIR (Fourier transform infrared spectroscopy) و میکروسکوپ الکترونی روبشی (SEM یا Scanning electron microscope) مشخصه‌یابی شد و زیست‌سازگاری آن با استفاده از آزمون MTT [3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide] ارزیابی گردید. نتایج FTIR، اکسیداسیون سلولز و تشکیل پیوند بین سطح داربست و RGD را تأیید کرد. ریزساختار متخلخل با اندازه‌ی تخلخل مناسب نیز به تأیید SEM رسید.

یافته‌ها: آنالیز سلولز اکسید شده با FTIR، حاکی از اکسیداسیون موفق پودر و اتصال پپتید RGD به آن از طریق گروه‌های کربوکسیل بود. اندازه‌ی حفرات داربست نیز برای ورود سلول‌ها مناسب بود. با اندازه‌گیری فعالیت متابولیکی سلول‌ها با استفاده از آزمون MTT مشخص گردید که تثبیت RGD بر سطح داربست، اثر قابل توجهی بر تکثیر سلولی داشته است.

نتیجه‌گیری: ساختار متخلخل و زیست‌سازگاری زیاد، از مزایای داربست هیبریدی ساخته شده بود. اکسیداسیون سلولز، شرایط مناسبی را برای تثبیت RGD بر سطح داربست و در نتیجه، بهبود زیست‌سازگاری آن فراهم کرد. به علاوه، وجود حفرات با اندازه‌ی مناسب برای ورود استئوبلاست‌ها، داربست را کاندیدای خوبی برای مهندسی بافت استخوان کرد.

واژگان کلیدی: اکسید سلولز، پپتید RGD، مهندسی بافت

ارجاع: محمودی مظفر، صمدی کوچکسرایی علی، نعیمی جمال محمدرضا، سامانی سعید، یعقوبی مختار. **تأثیر تثبیت RGD بر زیست‌سازگاری داربست اکسید سلولز برای مهندسی بافت استخوان.** مجله دانشکده پزشکی اصفهان ۱۳۹۴؛ ۳۳ (۳۵۲): ۱۶۰۶-۱۵۹۷

۱- مربی، گروه رادیولوژی، دانشکده‌ی پیراپزشکی، دانشگاه علوم پزشکی کردستان، سنندج، ایران
۲- استادیار، گروه مهندسی بافت، دانشکده‌ی فن‌آوری‌های نوین پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی ایران، تهران، ایران
۳- دانشیار، گروه شیمی آلی، دانشکده‌ی شیمی، دانشگاه علم و صنعت ایران، تهران، ایران
۴- دانشجوی دکتری، گروه مهندسی بافت، دانشکده‌ی فن‌آوری‌های نوین، دانشگاه علوم پزشکی تهران، تهران، ایران
۵- مربی، گروه اتاق عمل، دانشکده‌ی پرستاری و مامایی، دانشگاه علوم پزشکی کردستان، سنندج، ایران
نویسنده‌ی مسؤول: مظفر محمودی
Email: mzffrmahmoodi@gmail.com

مقدمه

از کارافتادگی بافت‌های انسانی ناشی از انواع آسیب‌دیدگی‌ها، یکی از پرهزینه‌ترین و جدی‌ترین مشکلات در سلامت انسان است و اثر مستقیم بر کیفیت زندگی دارد. هر چند که از راهبردهای مختلفی نظیر پیوند بافت‌های اتوژنیک و آلوژنیک برای برطرف کردن مشکلات استفاده شده است، اما کمبود اعضای اهدایی و لزوم سرکوب ایمنی در تمام عمر، از جمله مشکلات پیوند عضو است. به علاوه، بافت منتقل شده نمی‌تواند کارایی بافت طبیعی را ارایه دهد (۱).

استخوان به عنوان یک نانوکامپوزیت از بافت‌های مهم و حیاتی بدن به شمار می‌آید (۲). بسیاری از صدمات استخوانی مانند شکستگی‌ها، به علت وجود قابلیت ساخت مجدد در این بافت با درمان معمولی به خوبی مداوا می‌شوند (۱)؛ هر چند که فرایند ترمیم آن در بسیاری از آسیب‌ها و بیماری‌ها مانند ضربات، تصادفات و خوردگی‌های ناشی از تومورهای سرطانی، به طور کامل انجام نمی‌گیرد و رفع این مشکل نیازمند عمل جراحی می‌باشد (۲). همچنین، پیوندها، جایگزین‌ها یا کاشتنی‌های استخوانی برای کمک به بهبودی در شکستگی‌های وسیع و تغییر شکل‌های مادرزادی استخوان، ضروری می‌باشند (۱).

از مواد سنتزی و طبیعی مختلفی نظیر فلزات، سرامیک‌ها، پلی‌مرها و یا کامپوزیت آن‌ها برای ساخت کاشتنی‌ها استفاده شده است. پلی‌مرها، بر خلاف فلزات و سرامیک که فاقد زیست‌تخریب پذیری هستند و فرایند پذیری آن‌ها نیز سخت است، به علت ترکیب شیمیایی و ساختارشان، انعطاف پذیری زیادی در طراحی دارند. همچنین، می‌توان تخریب‌پذیری در یک محیط بیولوژیک را با طراحی مولکولی در آن‌ها ایجاد کرد (۳). به طور معمول، فعالیت زیستی و عملکرد اسکلتی مواد جایگزین استخوان، به دو ویژگی مهم یعنی تولید یک لایه‌ی آپاتیت روی سطح در شرایط فیزیولوژیک و تحریک چسبندگی، رشد و تمایز سلول‌های استخوانی مربوط می‌شود (۴).

کاشت موفق یک پلی‌مر به عنوان یک زیست‌ماده، نیازمند زیست‌سازگاری، زیست‌تخریب پذیری و داشتن مراکز عملکردی مناسب برای اصلاح خاصیت تخریب پذیری است. پلی‌مر و محصولاتش باید غیرسمی و غیر ایمنی‌زا باشند و به طور مؤثر در بدن متابولیزه شوند (۵). یکی از مشکلات پلی‌مرهای مورد استفاده در پزشکی، تعامل ناکافی بین پلی‌مر و سلول‌ها است که در In vivo منجر به واکنش‌های جسم خارجی مانند التهاب، عفونت، شل شدن غیر عفونی، صدمه دیدن موضعی بافت، کپسوله شدن کاشتنی، ترومبوز و آمبولی می‌شود (۶).

با در نظر گرفتن مشکلات ناشی از مواد غیربیولوژیک مانند عفونت، فقدان زیست‌سازگاری و طول عمر محدود، سلول‌های بنیادی و مهندسی بافت به حوزه‌های تحقیقاتی مهم و امیدوار کننده‌ای تبدیل شده‌اند که ممکن است علاوه بر فراهم کردن بافت و عضو برای پیوند، چشم انداز جدیدی را برای درمان بیماران باز کنند.

در راهبردهای مهندسی بافت مبتنی بر داربست، جزء کلیدی داربست است که به عنوان قالبی برای تعاملات سلول‌ها و تشکیل ماتریس خارج سلولی (ECM یا Extra cellular matrix) عمل می‌کند و حمایت ساختاری را برای بافت شکل گرفته فراهم می‌سازد. داربست از ساکن شدن، مهاجرت، رشد و

تمایز سلولی حمایت می‌کند و اغلب توسعه‌ی بافت لازم را هدایت می‌کند یا به عنوان یک حامل انتقال دارو عمل می‌نماید (۱). ساختار متخلخل با تخلخل‌های به هم متصل، وجود گروه‌های عاملی مناسب در سطح برای برهم‌کنش‌های سلولی، زیست‌تخریب پذیری یا خاصیت زیست‌جذبی، خواص مکانیکی کافی، محصولات حاصل از تخریب غیر سمی و سهولت ساخت، از جمله ویژگی‌های مهم و کلیدی برای یک داربست ایده‌ال هستند (۷).

ثابت شده است که هر چه اتصال و چسبندگی سلول به سطح قوی‌تر و بهتر باشد، از فعال شدن مسیر مرگ برنامه‌ریزی شده‌ی سلولی جلوگیری می‌شود (۹-۸). پاسخ سلول به زیست‌ماده‌ها از طریق تماس مستقیم بین سلول و زیست‌ماده نیست؛ بلکه از طریق لایه‌های تشکیل شده در سطح زیست‌ماده کنترل می‌گردد. این لایه‌ها، بلافاصله در تماس با محیط فیزیولوژیک و از طریق جذب غیر اختصاصی پروتئین‌های ECM تشکیل می‌شوند. شناسایی بیومولکولی ماده توسط سلول‌ها، اغلب به کمک پپتیدهایی انجام می‌گیرد که سلول قادر است به آن‌ها اتصال یابد. این پپتیدها به شکل زنجیره‌های بلند پروتئین‌های ECM یا به شکل توالی‌های پپتیدی کوتاه مشتق شده از پروتئین‌های ECM هستند (۱).

تغییرات و اصلاحات بیوشیمیایی را می‌توان به کمک تکنیک‌های مختلف مانند جذب فیزیکی به سطح (از طریق پیوندهای واندروالسی، آب‌گریز یا نیروهای الکتروستاتیکی) و یا اتصالات شیمیایی به صورت اتصال مولکول هدف به سطح جامد از طریق پیوند کووالانسی انجام داد (۴). برای بهبود زیست‌مواد، تلاش‌هایی صورت گرفته است که از آن جمله می‌توان به جذب سطحی پروتئین‌های غیراختصاصی، ارتقای جذب سطحی پروتئین‌های اختصاصی، به‌سازی ماده با تثبیت توالی‌های قابل شناسایی توسط سلول برای دستیابی به تعامل کنترل شده بین سلول و زیرلایه‌ی سنتزی اشاره کرد (۶).

لیگاندهای زیست‌فعال مانند پپتیدها و پلی‌ساکاریدها را می‌توان برای ترغیب چسبندگی سلولی خاص، به سطح جذب کرد، به صورت کووالانسی به سطح پیوند زد و یا درون توده‌ی ماده گنجاند (۱). دانشمندان حوزه‌های مختلف کوشیده‌اند تا با وظیفه‌مند کردن پلی‌مرها به تعاملات سطحی سلول‌های خاص دست یابند. در آغاز، این مواد با پروتئین‌های ویژه‌ای از جمله فیبرونکتین،کلاژن یا لامینین پوشش داده شدند. با این حال، استفاده از پروتئین‌ها از نقطه‌نظر کاربردهای پزشکی دارای معایبی است. با شناسایی توالی‌های قابل شناسایی توسط سلول به شکل پپتیدهای کوچک و تثبیت آن‌ها روی سطح، می‌توان بر این مشکلات غلبه کرد (۶).

RGD، تری‌پپتیدی متشکل از سه اسید آمینه‌ی آرژنین (Arg)- گلیسین (Gly)- آسپارتیک اسید (Asp)، مؤثرترین و رایج‌ترین زنجیره‌ی پپتیدی است که موجب بهبود چسبندگی سلولی بر سطح و نیز اتصال سلول به سلول مجاور می‌شود. RGD توسط Pierschbacher و Ruoslahti، به عنوان کوچک‌ترین پپتید مؤثر در چسبندگی سلولی در فیبرونکتین شناسایی شد (۱۰). وزن مولکولی آن ۳۴۶/۳ g/mol است و دارای فرمول مولکولی $C_{۱۲}H_{۲۲}N_۶O_۶$ می‌باشد (۶). عامل فون‌ویلبراند، لامنین، استئوپونتین، تناسینو سیالوپروتئین استخوانی از جمله مکان‌های قرارگیری RGD هستند که همگی آن‌ها از پروتئین‌های موجود در

غشای سلول‌های زنده می‌باشند. این تری‌پپتید، از یک طرف سبب افزایش اتصال سلول به فیبرونکتین و از طرف دیگر، سبب بهبود چسبندگی سلول می‌شود (۱۱).

RGD نه تنها می‌تواند به طور مؤثری چسبندگی سلولی را تحریک کند؛ بلکه می‌تواند به طور اختصاصی رده‌های سلولی خاصی را تحت تأثیر قرار دهد و پاسخ‌های سلولی اختصاصی را برانگیزاند (۶). این پپتیدها را می‌توان به صورت کووالانسی از طریق گروه‌های هیدروکسیل، آمین یا کربوکسیل به پلی‌مر متصل کرد (۱).

پلی‌مرهای ستزی و طبیعی متعددی برای ساخت داربست برای بازسازی استخوان مورد مطالعه قرار گرفته‌اند. صرف نظر از جنبه‌های اقتصادی و محیطی، ویژگی‌های دیگر مانند زیست‌تخریب پذیری، سمیت کم، هزینه‌ی ساخت کم، هزینه‌ی انهدام کم و تجدید پذیری، باعث افزایش توجه به پلی‌مرهای طبیعی شده است. البته خواص مکانیکی ناکافی این پلی‌مرها که محلول هستند یا سریع تخریب می‌شوند، به همراه افت احتمالی خواص بیولوژیکی طی تولید، اغلب باعث عدم امکان استفاده از آن‌ها به عنوان ماده‌ی داربست منحصر به فرد می‌شود (۱).

پلی‌ساکاریدها خواص عالی مانند عدم سمیت، تجدید پذیری، انحلال پذیری در آب و پایداری در برابر تغییرات pH دارند. اما پایداری حرارتی، مکانیکی و شیمیایی کم از نقایص این مواد است (۱). سلولز و مشتقات آن که جزء پلی‌ساکاریدها محسوب می‌شوند، یکی از گروه‌های مهم از پلی‌مرهای زیست‌تخریب پذیر طبیعی هستند که در مهندسی بافت مورد استفاده قرار گرفته‌اند. ساختار کریستالی و همچنین وزن مولکولی بالای آن نیز خواص منحصر به فردی به آن داده است (۳).

سلولز به علت وجود تعداد زیاد باندهای هیدروژنی از گروه‌های هیدروکسیل که زنجیره‌های سلولز را با هم نگه می‌دارند، بلوری است (۷). با اصلاح شیمیایی سلولز می‌توان مشتقاتی (سلولوزیک) با فرایند پذیری بهتر تولید کرد. به طورکلی، سلولوزیک‌ها دارای قابلیت بازتولید، بازیابی هستند و زیست‌سازگارند و می‌توانند در کاربردهای پزشکی مختلف استفاده شوند. Esterification و Etherification بر گروه‌های هیدروکسیل سلولز، پیوندهای یونی و رادیکالی، استیله کردن و اکسیداسیون، از دیگر روش‌های اصلاح شیمیایی هستند (۱۲).

اکسیداسیون سلولز باعث تغییر ساختار و بلورینگی می‌شود و بر خواص فیزیکی و شیمیایی اثر می‌گذارد (۷).اکسید سلولز (اکسی سلولز، OC) از جمله پلی‌مرهای نامحلول در آب است که از واکنش سلولز با عوامل اکسید کننده مانند گاز کلر، پراکسید هیدروژن، پراستیک اسید، دی‌اکسید کلر، دی‌اکسید نیتروژن، پرسولفات، پرمنگنات، دی‌کرومات سولفوریک اسید، هیپوکلریک اسید، هیپوهالیت یا پریودات ایجاد می‌شود. پودر به دست آمده از این طریق بسته به روش استفاده شده ممکن است حاوی عوامل کربوکسیلیک، آلدهید یا کتون و گروه‌های هیدروکسیل باشد (۱۲).

اگر چه سلولز و مشتقات آن توانایی هدایت رشد استخوان را دارند، اما فاقد خاصیت القای تشکیل استخوان هستند و نمی‌توانند تشکیل استخوان جدید در محل‌های بزرگ را تحریک کنند (۴-۳).

با در نظر گرفتن ویژگی‌های منحصر به فرد اکسید

سلولز و اثرات قابل توجه تثبیت RGD بر چسبندگی و تقسیم سلولی، تحقیق کنونی بر ساخت داربست OC و تثبیت RGD بر سطح آن تمرکز یافت. انتظار می‌رود بهبود خواص باعث شود تا ماده‌ی جدید برای کاربردهای بازسازی استخوان، مورد استفاده‌ی بیشتر قرار گیرد.

روش‌ها

اکسید سلولز با حرارت دادن پودر میکروکریستالی سلولز (۹۰ درصد <، Merck، USA) در ۳۸ °C به مدت ۱۳ ساعت و تحت جریان گاز NO_2 تهیه شد. سپس مقدار کافی از پودر به دست آمده با پلی‌متیل‌متاکریلات [PMMA یا Poly (methyl methacrylate)] (۹۰ درصد <، Sigma-Aldrich، USA) به عنوان حفره‌ساز با نسبت ۱:۱ مخلوط گردید و به صورت یک قرص دیسکی شکل به قطر ۱ cm و ضخامت ۳ mm تحت فشار ۲۵ MPa در آمد. اندازه‌ی ذرات PMMA حدود ۳۰۰–۶۰۰ µm بود. در ادامه، نمونه‌ها به مدت ۲۴ ساعت در دی‌کلرومتان (DCM یا Dichloromethane) (۹۰ درصد <، Merck، USA) قرار داده شدند تا PMMA شسته شود. در نهایت، نمونه‌ها خشک شدند.

برای جلوگیری از اتصال گروه‌های کربوکسیل و آمین در RGD به یکدیگر طی تثبیت آن روی سطح داربست، باید گروه‌های کربوکسیل، با Esterification محافظت می‌شدند. مقدار کافی از تیونیل‌کلراید ($SOCl_2$ یا Thionyl chloride) (۹۰ درصد <، Merck، USA) در اتانول مطلق حل شد و ۱ mmol از RGD (مرکز تحقیقات شیمی پپتید، دانشگاه خواجه نصیرالدین طوسی، ایران) به محلول اضافه شد و به مدت ۲۴ ساعت هم‌زده شد و سپس حلال با دستگاه تبخیر روتاری تبخیر و حذف شد.

سپس RGD در دی‌متیل‌فرمامید (DMF یا Dimethylformamide) (۹۰ درصد <، Merck، USA) حل شد و ۵۰ mg از TBTU (1-[bis(dimethylamino)methylene]-1H-benzotriazol-1-ium 3-oxide tetrafluoroborate) (۹۰ درصد <، Merck، USA) اضافه گردید و داربست‌ها به مدت ۷۲ ساعت در آن غوطه‌ور شدند.

برای فعال کردن مجدد گروه‌های کربوکسیل، هیبرید داربست–RGD به مدت ۲ ساعت در دمای اتاق در محلول ۰/۱ مولار NaOH (۹۰ درصد <، Merck، USA) قرار داده شد و سپس با آب دو بار تقطیر شده، شسته شد.

از FTIR (Equinox 55, Bruker, USA) در محدوده‌ی $400–4000\ cm^{-1}$ برای شناسایی گروه‌های کربوکسیل در OC، تشکیل پیوند بین داربست و RGD استفاده شد. شکل و اندازه‌ی تخلخل‌ها و پیوستگی آن‌ها نیز با میکروسکوپ الکترونی روبشی (SEM یا Scanning electron microscope) (Czech RepublicVEGA II, TESCAN) بررسی شد.

تأثیر تثبیت RGD بر فعالیت سلولی با کشت سلولی و آزمون MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide) بررسی گردید. سلول شبه استئوبلاستی انسانی رده‌ی SaOS-2 (مرکز تحقیقات سلولی و مولکولی، دانشگاه علوم پزشکی ایران، ایران) در محیط کشت FBS (Fetal bovine serume) ۱۰ درصد– DMEM (Dulbecco's modified eagle medium)

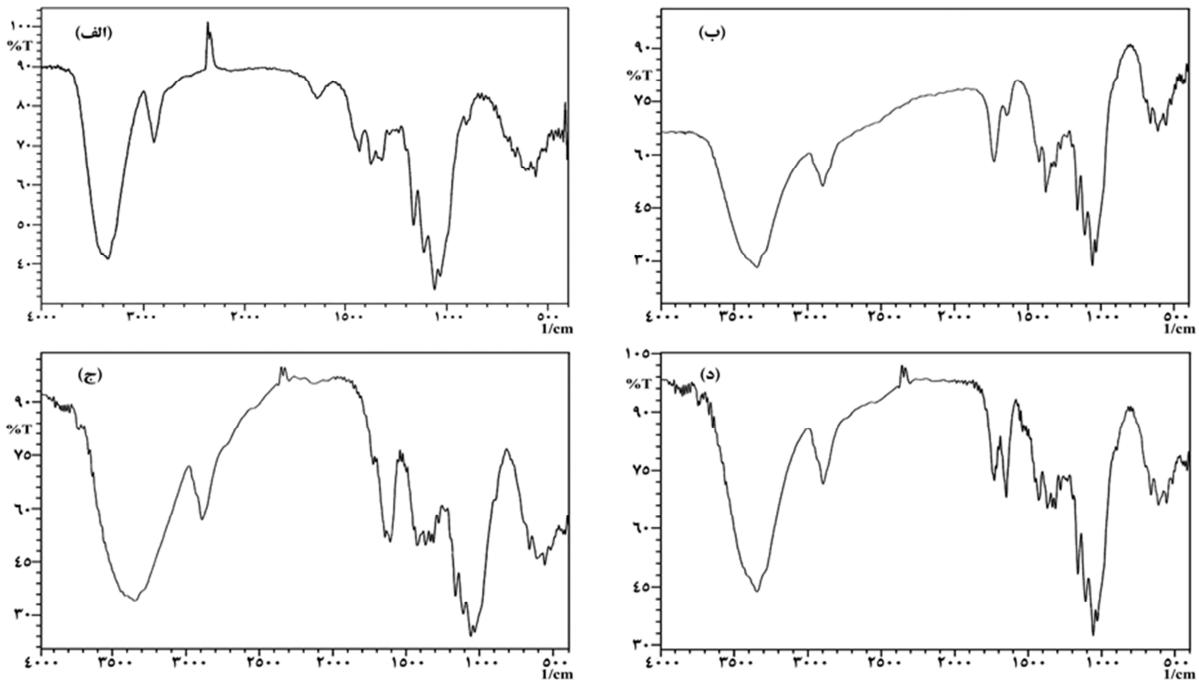
(Invitrogen, Germany) کشت داده شد و تعداد سلول‌های زنده با رنگ MTT تخمین زده شد. برای آزمون MTT، داربست‌ها با پرتو γ استریل شدند و ۱۰۰۰۰ سلول طبیعی در دمای ۳۷ °C و به مدت ۷۲ ساعت روی داربست کشت داده شدند.

پس از انکوباسیون، محیط کشت با ۱۵۰ µl محلول MTT (Sigma-Aldrich, USA) با غلظت ۰/۵ mg/ml جایگزین شد و سلول‌ها به مدت ۹۰ دقیقه انکوبه شدند. پس از انحلال فرمازان تشکیل شده با دی‌متیل سولفوکسید (DMSO یا Dimethyl sulfoxide) (Sigma-Aldrich، USA) مقدار ۱۰۰ µl از محلول به پلیت ۹۶ خانه منتقل و چگالی نوری (OD یا Optical density) در طول موج ۵۷۰ nm خوانده شد. چاهک بدون داربست به عنوان شاهد منفی در نظر گرفته شد.

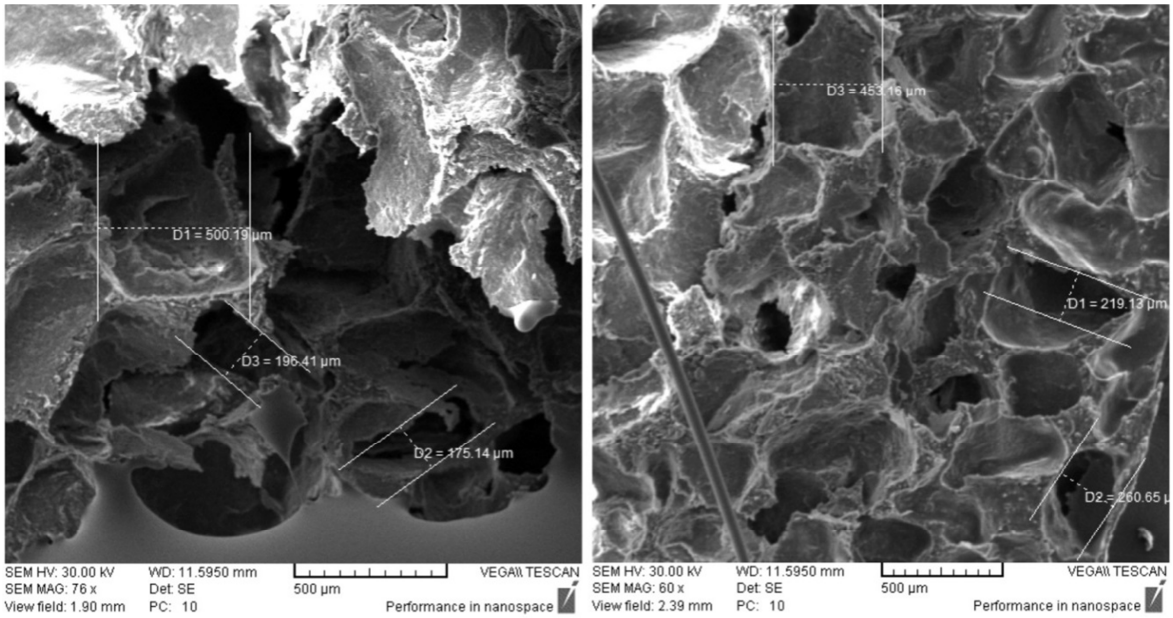
برای تصحیح جذب MTT یا فرمازان توسط داربست، وزن یکسان از داربست برای نمونه‌های OC و OC-RGD به نمونه‌های شاهد در زمان افزودن MTT اضافه و آزمون MTT و محاسبات مربوط به آن ۵ بار تکرار شد. آزمون One-way ANOVA در سطح ضریب اطمینان ۹۵ درصد (P = ۰/۰۵۰) و در نرم‌افزار SigmaPlot نسخه‌ی 11.0 (Systat Software, Inc.) برای تجزیه و تحلیل داده‌ها مورد استفاده قرار گرفت.

یافته‌ها

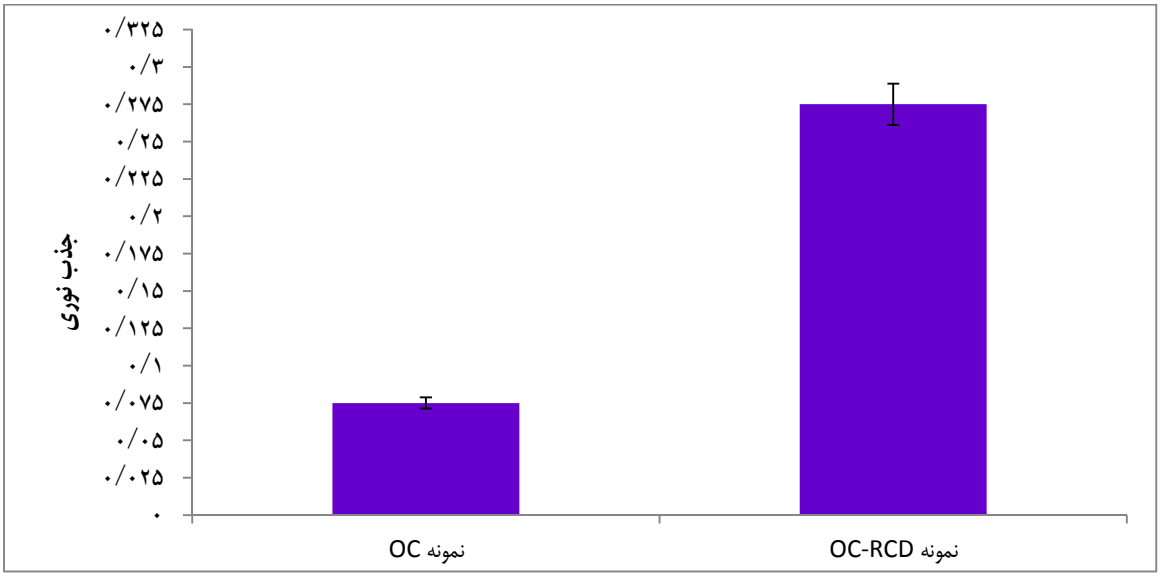
شکل ۱ طیف FTIR پودر سلولز طبیعی، پودر اکسید شده و هیبرید OC-RGD را نشان می‌دهد. شکل ۲ نیز مقطعی از داربست هیبریدی متخلخل (نمونه‌ی OC-RGD) را نشان می‌دهد. در شکل ۳، چگالی نوری نمونه‌های OC و OC-RGD نشان داده شده است.



شکل ۱. طیف FTIR (Fourier transform infrared spectroscopy). الف) سلولز، ب) اکسید سلولز، ج) هیبرید OC-RGD قبل از فعال کردن RGD، د) هیبرید OC-RGD بعد از فعال کردن RGD



شکل ۲. تصویر میکروسکوپ الکترونی روبشی از مقاطع مختلف داربست هیبریدی (OC-RGD) متخلخل



شکل ۳. نتیجه‌ی آزمون MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide) سلول‌های استئوبلاست کشت داده شده روی داربست. داده‌ها به صورت mean ± SD آمده‌اند (n = ۵، P < ۰/۰۰۱)

بحث

اکسیداسیون سلولز باعث تغییرات مهمی در طیف FTIR آن، از جمله ظهور باند قوی در $1700–1750\ cm^{-1}$ و تغییر در محدوده‌ی $1150–1430\ cm^{-1}$ و $2800–3000\ cm^{-1}$ می‌شود (۱۳). سلولز اکسید شده مانند سلولز، بسیار زیست‌سازگار (۵) و پلی‌مری زیست تخریب‌پذیر است. افزایش تعداد گروه‌های کربوکسیلی آب‌دوست باعث بهبود زیست‌تخریب پذیری OC می‌شود (۶). شدت باند $1700–1800\ cm^{-1}$ با مقدار کربوکسیل،

نسبت مستقیم دارد. کاهش شدت پیک در cm^{-1} ۱۴۳۰ و cm^{-1} ۳۰۰۰-۲۸۰۰ (شکل ۱- ب) نشان‌دهنده‌ی افزایش مقدار کربوکسیل است. به علاوه، تخریب و در نتیجه کاهش نظم ساختاری، باعث محو شدن باندهای جذبی در cm^{-1} ۱۱۶۰-۱۰۳۰ و cm^{-1} ۱۴۳۰-۱۱۶۰ خواهد شد (۱۳).

در شکل ۱- ب پیک cm^{-1} ۱۷۳۵ به وضوح دیده می‌شود که به گروه کربوکسیل تعلق دارد. با Esterification و تبدیل گروه کربوکسیل به کربوکسی متیل، گروه‌های آمین RGD با گروه‌های کربوکسیل داربست واکنش می‌دهند و باعث اتصال RGD به سطح از طریق پیوند کووالانسی می‌شوند. پیک مربوط به گروه کربوکسیل (cm^{-1} ۱۷۳۵) در طیف OC-RGD (شکل ۱- ج) در اثر تشکیل پیوند بین گروه کربوکسیل سطح داربست و گروه آمین در RGD محو خواهد شد. فعال کردن مجدد RGD باعث تغییر گروه کربوکسی‌متیل در RGD محافظت شده به گروه کربوکسیل می‌شود و در نتیجه، بار دیگر یک پیک در حدود cm^{-1} ۱۷۳۵ ظاهر خواهد شد (شکل ۱- د).

ویژگی‌های سطح مانند مورفولوژی، آب‌دوستی، انرژی سطحی و بار سطحی، اثرات مهمی بر چسبندگی، مهاجرت، حفظ فنوتیپ سلولی و انتقال سیگنال درون سلولی در شرایط In vitro دارند. ساختار ماکروسکوپی و میکروسکوپی داربست به میزان قابل توجهی بر حیات، رشد و تکثیر سلول‌ها اثر می‌گذارد. همچنین، بیان ژن‌ها نیز تحت تأثیر قرار خواهد گرفت.

حضور مقدار زیاد تخلخل در داربست، باعث می‌شود تعداد سلول‌های بیشتری بتوانند به درون داربست وارد شوند و تبادل مواد غذایی و زاید راحت‌تر انجام شود. هر چند که افزایش تخلخل، می‌تواند باعث کاهش استحکام مکانیکی شود، اما داربست دارای تخلخل‌های گسترده و به هم متصل (اغلب بیشتر از ۹۰ درصد) علاوه بر فراهم کردن سطح و ساختار متخلخل برای تحریک رشد سلول‌ها به درون داربست در In vitro، فضای لازم برای رگ‌زایی مجدد در In vivo را هم فراهم می‌کند.

اندازه‌ی تخلخل نیز باید مناسب سلول‌های استئوبلاستی باشد تا سلول‌ها بتوانند وارد داربست شوند. در بازسازی استخوان، حفرات با اندازه‌ی ۴۰۰-۲۰۰ µm مناسب تشخیص داده شده است (۱). طبق شکل ۲، اندازه‌ی تخلخل‌ها در حدود ۳۵۰-۳۰۰ µm است که برای سلول‌های استئوبلاست با اندازه‌ی ۳۰-۲۰ µm مناسب است. انتظار می‌رود داربست بتواند حمایت خوبی برای تجمع سلول‌ها و در نتیجه رشد و تکثیر آن‌ها فراهم کند.

چون با آزمون MTT فعالیت متابولیکی سلول‌ها اندازه‌گیری می‌شود، نتیجه‌ی به دست آمده را می‌توان به تعداد سلول‌های زنده ربط داد. بر اساس داده‌های شکل ۳، تثبیت RGD بر سطح داربست اثر قابل توجهی ($P < ۰/۰۰۱$) بر تکثیر سلول‌های استئوبلاست و در نتیجه زیست‌سازگاری داربست داشت. در مجموع، می‌توان چنین گفت که داربست هیبریدی ساخته شده با داشتن ویژگی‌های مناسب ساختاری و بیولوژیکی، می‌تواند به عنوان جایگزین بافت صدمه دیده با هدف کمک به بازسازی استخوان در نظر گرفته شود.

تشکر و قدردانی

از زحمات و راهنمایی‌های فراوان جناب آقای دکتر

سعید بلالایی ریاست محترم مرکز تحقیقات شیمی پپتید دانشگاه خواجه نصیرالدین طوسی سپاسگزاری می‌گردد.

References

1. Puppi D, Chiellini F, Piras AM, Chiellini E. Polymeric materials for bone and cartilage repair. Prog Polym Sci 2010; 35(4): 403-40.
2. Standring S. Gray's anatomy: The anatomical basis of clinical practice. 40th ed. London, UK: Churchill Livingstone; 2008.
3. Zadegan S, Hossainalipour M, Ghassai H, Rezaie HR, Naimi-Jamal MR. Synthesis of cellulosenanohydroxyapatite composite in 1-n-butyl-3-methylimidazolium chloride. Ceram Int 2010; 36(8): 2375-81.
4. Bartouilh de Taillac L, Porte-Durrieu MC, Labrugere C, Bareille R, Amedee J, Baquey C. Grafting of RGD peptides to cellulose to enhance human osteoprogenitor cells adhesion and proliferation. Compos Sci Technol 2004; 64(6): 827-37.
5. Khil M, Kim H, Kang Y, Bang H, Lee D, Doo J. Preparation of electrospun oxidized cellulose mats and theirin vitro degradation behavior. Macromol Res 2005; 13(1): 62-7.
6. Hersel U, Dahmen C, Kessler H. RGD modified polymers: biomaterials for stimulated cell adhesion and beyond. Biomaterials 2003; 24(24): 4385-415.
7. Verma V, Verma P, Ray P, Ray AR. 2, 3-Dihydrazone cellulose: Prospective material for tissue engineering scaffolds. Mater Sci Eng C 2008; 28(8): 1441-7.
8. Haubner R, Gratias R, Diefenbach B, Goodman SL, Jonczyk A, Kessler H. Structural and functional aspects of RGD-containing Cyclic pentapeptides as highly potent and selective integrin α V β 3 antagonists. J Am Chem Soc 1996; 118(32): 7461-72.
9. Stupack DG, Puente XS, Boutsaboualoy S, Storgard CM, Cheresh DA. Apoptosis of adherent cells by recruitment of caspase-8 to unligated integrins. J Cell Biol 2001; 155(3): 459-70.
10. Pierschbacher MD, Ruoslahti E. Cell attachment activity of fibronectin can be duplicated by small synthetic fragments of the molecule. Nature 1984; 309(5963): 30-3.
11. Pfaff M. Recognition sites of RGD-dependent integrins. In: Eble JA, editor. Integrin-ligand interaction. New York, NY: Springer; 1997. p. 101-21.
12. Kamel S, Ali N, Jahangir K, Shah M, El-Gendy AA. Pharmaceutical significance of cellulose: A review. Express Polym Lett 2008; 2(11): 758-78.
13. Zimnitsky DS, Yurkshtovich TL, Bychkovsky PM. Synthesis and characterization of oxidized cellulose. Polym Chem 2004; 42(19): 4789-91.

Journal of Isfahan Medical School
Received: 19.06.2015
Vol. 33, No. 352, 4th Week, November 2015
Accepted: 28.09.2015

Effect of RGD Immobilization on Biocompatibility of Oxidized Cellulose Scaffold in Bone Tissue Engineering

Mozaffar Mahmoodi MSc[1], Ali Samadi-Kuchaksaraei PhD[2], Mohammad Reza Naimi-Jamal PhD[3], Saeed Samani PhD[4], Mokhtar Yaghubi[5]

Original Article

Abstract

Background: Human tissue failures caused by different damages or injuries are the most serious and costly problems in health care and have direct effect on life quality. Tissue Engineering, as a scaffold-based strategy, provides promising research field and may offer innovative viewpoints to treat diseases. Scientists in various fields have tried to functionalize polymers to achieve special surface cell interactions.

Methods: Cellulose powder was oxidized with NO_2 gas and the porous scaffold was fabricated via dry pressing. RGD peptide was immobilized on the surface of scaffold via grafting to make a hybrid scaffold. The hybrid scaffold was characterized by FTIR (Fourier transform infrared spectroscopy) and SEM (Scanning electron microscope) and its biocompatibility was examined through MTT [3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide] assay.

Findings: FTIR results proved oxidization of cellulose and bonding between scaffold surface and RGD. Porous microstructure having suitable size was confirmed via SEM. The results of MTT showed significant increase of viable cells on hybrid scaffold.

Conclusion: Porous structure and high biocompatibility were benefits of prepared hybrid scaffold. Cellulose oxidation can present suitable condition for RGD immobilization caused to enhance biocompatibility. In addition, existing pores in good size conditioned hybrid scaffold to engineer bone tissue.

Keywords: Cellulose, Oxidized-RGD peptide, Tissue engineering

Citation: Mahmoodi M, Samadi-Kuchaksaraei A, Naimi-Jamal MR, Samani S, Yaghubi M. **Effect of RGD Immobilization on Biocompatibility of Oxidized Cellulose Scaffold in Bone Tissue Engineering.** J Isfahan Med Sch 2015; 33(352): 1597-606

1- Instructor, Department of Radiology, School of Paramedical Sciences, Kurdistan University of Medical Sciences, Sanandaj, Iran
2- Assistant Professor, Department of Tissue Engineering, School of Advanced Technologies in Medicine, Iran University of Medical Sciences, Tehran, Iran
3- Associate Professor, Department of Organic Chemistry, School of Chemistry, Iran University of Science and Technology, Tehran, Iran
4- PhD Student, Department of Tissue Engineering, School of Advanced Technologies in Medicine, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, Iran
5- Instructor, Department of Operating Room, School of Nursing and Midwifery, Kurdistan University of Medical Sciences, Sanandaj, Iran
Corresponding Author: Mozaffar Mahmoodi MSc, Email: mzffrmahmoodi@gmail.com