لیزر در پزشکی ۱۳۹۹/ دوره ۱۷ / شماره ۴ / صفحات ۲۹-۲۱.

مقاله پژوهشی

سنتز، ساختار و مشخصه‌یابی نوری هیدروژل ژلاتین جهت مهندسی بافت پوست

سونا زارع[۱]
رحیم احمدی[۲*]
عبدالرضا محمدنیا[۳]
محمدعلی نیلفروش‌زاده[۴]
مینو محمودی[۵]

۱- گروه زیست‌شناسی واحد همدان، دانشگاه آزاد اسلامی، همدان، ایران.

۲- گروه زیست‌شناسی واحد همدان، دانشگاه آزاد اسلامی، همدان، ایران.

۳- مرکز تحقیقات بیماری‌های مزمن تنفسی، پژوهشکده سل و بیماری‌های ریوی، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، تهران، ایران..

۴- مرکز تحقیقات پوست و سلول‌های بنیادی، دانشگاه‌علوم‌پزشکی تهران، تهران، ایران.

۵- گروه زیست‌شناسی واحد همدان، دانشگاه آزاد اسلامی، همدان، ایران.

نویسندهٔ‌مسئول: دکتر رحیم احمدی
آدرس پستی: دانشگاه آزاد اسلامی واحد همدان، همدان، ایران
پست الکترونیکی:
drrahahmadi@yahoo.com
شماره تماس: ۰۲۱-۳۴۴۸۱۰۰۰

خلاصه

مقدمه: در سال‌های اخیر تعداد بیمارانی که از زخم‌های مزمن پوستی رنج می‌برند، افزایش یافته است. فرآورده‌های بیولوژیکی از قبیل ژلاتین از روش‌های درمانی جدید برای درمان زخم‌های پوستی مطرح شده‌اند، گرچه تهیه و طراحی این مواد با چالش‌هایی روبه‌رو است. هدف از مطالعهٔ حاضر بررسی کارآیی و مشخصه‌یابی هیدروژل تهیه‌شده بر پایهٔ ژلاتین جهت اهداف مهندسی بافت پوست می‌باشد.

روش بررسی: طی این مطالعهٔ تجربی، هیدروژل با استفاده از آنزیم ترنس‌گلوتامیناز میکروبی کراس‌لینک شد. خواص شیمیایی هیدروژل با پراش پرتوی ایکس و خواص فیزیکی هیدروژل با میکروسکوپ الکترونی رویشی بررسی شد. همچنین مشخصهٔ جذب و بازتاب هیدروژل به روش طیف‌سنجی نوری ثبت گردید. داده‌ها با استفاده از آمار توصیفی تجزیه و تحلیل شدند.

یافته‌ها: هیدروژل با غلظت ۱۰ درصد دارای دانسیتهٔ مطلوب و افزایش بلورینگی بود. یافته‌های بررسی میکروسکوپ الکترونی رویشی نشان دادند هیدروژل تهیه‌شده دارای منافذ کوچک، پیوندهای عرضی بیشتر و قوی‌تر کوالانسی بود. براساس طیف‌های جذبی نوری در محدودهٔ مرئی - مادون قرمز، هیدروژل سنتزشده دارای پیک جذب در حدود طول موج ۹۵۰ نانومتر بود.

نتیجه‌گیری: سنتز هیدروژل ژلاتین با روش آنزیمی در شرایط مطلوب می‌تواند سبب تولید هیدروژل با مشخصه‌های مناسب به هدف استفاده در مهندسی ترمیم بافت پوست را داشته باشد.

واژه‌های کلیدی: سنتز ژلاتین، خواص شیمیایی، مشخصهٔ جذبی، پیوندهای عرضی

مقدمه

مهندسی بافت که یکی از روش‌های برجسته در پزشکی نوین و یک رشتهٔ پژوهشی در حال رشد سریع می‌باشد[۱]. با درک بهتر از ساختار، زیست‌شناسی سلولی، فیزیولوژی و تکنیک‌های کشت سلول و ترکیب آن‌ها در مهندسی بافت ممکن است گزینه‌های درمانی جدید برای بیماران نیازمند به ترمیم یا جایگزینی اعضا ارائه شود. قاعدهٔ کلی، جداسازی سلول‌ها از یک نمونهٔ بافت به منظور گسترش آن در محیط کشت و کشت آن‌ها برروی زیست‌مواد تشکیل‌دهندهٔ داربست در شرایط آزمایشگاهی می‌باشد تا یک ساختار بافت زنده قبل از پیوند به فرد بیمار تشکیل شود. این بافت‌ها در محیط بیوشیمیایی و بیومکانیکی مناسب پتانسیل کامل خود را به دست می‌آورند و مانند یک بافت طبیعی عمل می‌کنند[۲]. روش مهندسی بافت مزایای عمده‌ای نسبت به پیوند سنتی ارگان دارد. بافت‌هایی که با نیاز بیمار به دقت مطابقت دارند می‌توانند از یک نمونهٔ بافت قابل دست‌یابی نوسازی شوند. علاوه بر این ساختار جدید باید بتواند بدون این که عوارض موضعی در فرد اهداکننده ایجاد کند، حداقل واکنش ایمنی را در بدن بیمار برانگیزد. این موضوع موجب محدودیت‌های مختلفی در روش‌های پیوند بافت می‌شود[۳].

چالش مهندسان بافت، بهینه ساختن داربست یا سیستم‌های مناسب جهت جداسازی، تکثیر و تمایز سلول‌های مورد نظر است تا بتواند رشد هماهنگ و سه‌بعدی بافت را پیش ببرد. برای موفقیت در این زمینه فراهم‌سازی محیطی مشابه با نیچ طبیعی موجود زنده لازم به نظر می‌رسد تا از این طریق، شرایط رشد و فعالیت سلول به طور طبیعی فراهم گردد. این امر فاکتورهای شیمیایی و فیزیکی وسیعی را دربرمی‌گیرد که شامل برهمکنش‌های فیزیکی (ماکرومولکول‌های نامحلول مثل کلاژن)، شیمیایی (ماکرومولکول‌های محلول مثل سایتوکاین‌ها) و همکنش سلول - سلول و پروتئین با سلول‌های مجاور تقسیم می‌باشند. مواد بیولوژیک و مصنوعی هر دو در طب ترمیم و مهندسی بافت از نقش مهمی برخوردارند. این ترکیبات سبب تولید ریزمحیط‌هایی می‌شوند که مشابه ماتریکس خارج سلولی عمل می‌کنند و تمایز و شکل‌زایی بافت هدف را هدایت می‌کند[٤].

به طور کلی داربست‌های به کار برده‌شده در مهندسی بافت باید دارای خصوصیات زیر باشند: ۱) قدرت مکانیکی مناسب جهت تقلید از شرایط موجود زنده را داشته باشند. البته لازم به ذکر است که خواص مکانیکی داربست در مهندسی بافت‌های سخت از اهمیت بیشتری برخوردار است، ۲) اندازه و درصد تخلخل، روش ساخت داربست و خواص مواد تشکیل‌دهندهٔ آن از عوامل مؤثر بر خواص مکانیکی داربست هستند[۱]. درصد تخلخل و اندازهٔ تخلخل مشخصهٔ مهم داربست‌های مهندسی بافت هستند که با افزایش درصد تخلخل نسبت سطح به حجم افزایش می‌یابد و درنتیجه امکان رشد، تکثیر و توزیع یکنواخت سلول‌ها در داربست مهیا می‌شود. اندازهٔ تخلخل نیز بایستی مقدار بهینه‌ای تعریف شود زیرا اگر تخلخل‌ها خیلی ریز باشند سلول‌های زنده و ماتریکس خارج سلولی با مسدود کردن منافذ و تخلخل‌ها موجب توقف فرآیند رگ‌زایی و درنتیجه شکست عملکرد داربست می‌شوند و از سوی دیگر افزایش اندازهٔ تخلخل‌ها، تضعیف خواص مکانیکی داربست را به همراه خواهد داشت، ۳) زیست‌سازگار و زیست‌تخریب‌پذیر باشند[۱]. مدت زمان تخریب داربست تعیین‌کنندهٔ طول عمر آن است، به طوری که عمر داربست بایستی کمی طولانی‌تر از مدت‌زمان ترمیم بافت باشد. به عبارتی سرعت تشکیل بافت سریع‌تر از سرعت تخریب داربست باشد. عوامل مختلفی بر سرعت تخریب اثر می‌گذارد که برخی از این عوامل عبارتند از ترکیبات شیمیایی، ساختار فضایی، شرایط محیطی، درصد تخلخل و نظم زنجیره‌ها[۲] ٤) داربست‌های مهندسی بافت می‌بایست علاوه بر تخلخل، دارای شبکهٔ متخلخل مرتبط به هم باشند تا اعمال تغذیهٔ سلول، دفع ضایعات سلولی به خارج داربست، تشکیل ماتریکس خارج سلولی و رگ‌زایی فراهم شود، ۵) توانایی فراهم‌سازی سیگنال‌های شیمیایی مناسب جهت رشد بافت و ممانعت از رد واکنش‌های ایمنی را داشته باشد[۵]، ٦) پاسخ‌های توکسیک را تحریک نکند. عدم زیست‌سازگار بودن داربست‌ها سبب التهاب مزمن و منجر به رد یا نکروز بافت می‌شود. بر همین اساس ترجیح داده می‌شود که در مهندسی بافت از داربست‌های زیست‌تخریب‌پذیری استفاده شود که خود و محصولات حاصل از تخریب آن سمی نباشند[۵]، ۷) قابلیت استریل شدن را داشته باشند[۵]، ۸) قادر به ایجاد برهمکنش‌های اختصاصی با سایر سلول‌ها باشد[٦].

هیدروژل‌ها شبکه‌های پلیمری سه‌بعدی با اتصالات عرضی هستند که قابلیت جذب بسیار زیاد آب یا سیالات زیستی را دارند. این ترکیبات بدون انحلال می‌توانند مقدار زیادی آب جذب کنند. هیدروژل‌ها به روش شیمیایی، آنزیمی یا فیزیکی شبکه‌ای می‌شوند. توجه روزافزون به هیدروژل‌های فیزیکی به دلیل راحتی نسبی فرآیند و

نبود شبکه‌ساز در سنتز آن‌ها است، در حالی که انواع شیمیایی آن به‌دلیل استحکام مکانیکی خوب مورد توجه هستند[۷].

ژلاتین یک زیست‌پلیمری محصول هیدرولیز جزئی کلاژن است که به خاطر خواص زیست‌سازگاری، زیست‌تخریب‌پذیری، غیرسمی بودن و نداشتن مواد سرطان‌زا در ساختار خود به طور گسترده در کاربردهای زیستی، پزشکی و داروسازی مورد استفاده قرار می‌گیرد[۸]. در صورتی که نیاز به بستر سه‌بعدی و ساختار داربست سلولی باشد، می‌توان ژلاتین را با استفاده از روش‌های مختلف به صورت اسفنج متخلخل سه‌بعدی تبدیل کرد. اسفنج متخلخل ژلاتین بستر مناسبی برای قرارگیری و رشد سلول‌ها ایجاد می‌کند تا بتوانند به آن چسبیده و رشد کنند. برای ساخت این بسترهای سه‌بعدی می‌توان از پیوندهای دائمی کووالانسی یا موقت هیدروژنی استفاده کرد[۷].

تکنیک‌های بررسی و اثبات ماهیت داربست‌ها و نیز بررسی کارآیی آن‌ها به منظور استفاده در مهندسی بافت و اهداف درمانی از مهم‌ترین مسایل روز در کار با داربست‌ها می‌باشد. در این راستا گرچه روش‌های متداولی جهت اثبات کارآیی و ماهیت آن‌ها وجود دارد[۹و۱۰]، اما هنوز هم روش‌های مختلفی ارائه می‌شود[۱۱]. در همین راستا، دستیابی به تکنیک‌های مؤثر و معمول و قابل اعتماد به منظور شناسایی و ارزیابی داربست‌ها که بتوان از آن‌ها در مراکز آزمایشگاهی به خوبی و با اطمینان استفاده نمود از ارزش فوق‌العاده‌ای برخوردار است، گرچه هنوز هم پس از گذشت سالیان متمادی این تکنیک‌ها گاهی به خوبی جواب نمی‌دهند و یا با نتایج ضد و نقیضی همراه هستند که سبب بروز تناقض‌های جدی میان محققان شده است[۱۲].

با توجه به کاربردهای بالقوهٔ داربست‌های طبیعی و سنتتیک در حوزهٔ بالینی[۱۳] و نیز با توجه به اینکه ژلاتین یکی از مهم‌ترین پلیمرهای طبیعی است که به راحتی در دسترس می‌باشد و همچنین از آنجا که سلول‌های بنیادی به یک داربست که نقش انتقال‌دهنده برای آن‌ها را بازی کند، نیاز دارند[۱٤] و از طرفی با توجه به این امر که روش‌های متعددی جهت ارزیابی ساختار داربست وجود دارد، پژوهش حاضر به بررسی کارآیی و مشخصه‌یابی هیدروژل تهیه‌شده بر پایهٔ ژلاتین به ویژه براساس طیف‌سنجی می‌پردازد تا بدان وسیله امکان استفاده از این تکنیک‌ها جهت اهداف مهندسی بافت فراهم گردد.

روش بررسی

ساخت هیدروژل

ژلاتین (Type A, Sigma, USA) در غلظت ۱۰ و ۷ درصد وزنی/ حجمی (w/v) تهیه شد و به بن‌ماری با دمای ۵۰ درجهٔ سانتی‌گراد به مدت زمان ۳۰ دقیقه منتقل شد. برای ایجاد اتصالات عرضی (کراسلینکر) بین رشته‌های ژلاتین از آنزیم ترنس‌گلوتامیناز میکروبی (Bomei, China) استفاده شد. این آنزیم (enzyme activity >100 U per gram) با غلظت ۱۰ درصد در بافر PBS تهیه و فیلتر شد. ٤۰ میکرولیتر آنزیم به ازای هر سی‌سی ژلاتین اضافه شد و پس از مخلوط کردن آرام این دو به مدت ۲٤ ساعت به انکوباتور منتقل شد تا پیوندهای عرضی زنجیره‌های ژلاتین ایجاد شود. جهت نمونهٔ کنترل از هیدروژلی که با روش فیزیکی یا گرما سردی (Thermal-Cooling) آماده شده بود، استفاده شد. برای این منظور محلول آماده‌شدهٔ ژلاتین به ظرف مورد نظر انتقال و در دمای ٤ درجهٔ سانتی‌گراد قرار داده‌شد. هیدروژل تهیه‌شده در دستگاه فریزدرایر (خشک‌کن انجمادی) با پارامترهای فاز Freezing به مدت ۱۰ دقیقه، فاز Main drying به‌مدت ۳ ساعت و فاز Final drying به مدت ۵ ساعت قرارداده‌شد تا محصول فریزدرای شود.

ارزیابی خواص شیمیایی هیدروژل با پراش پرتوی ایکس (XRD)

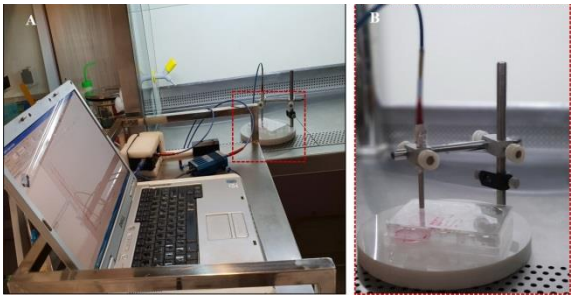
هدف از این کار تجزیهٔ کیفی، کمی و ساختاری مواد بلوری هیدروژل ژلاتین بود. جهت این کار، جهت پودر کردن هیدروژل فریز درای‌شده فقط ضربهٔ فیزیکی کافی نبود. قرار دادن هیدروژل ژلاتین در نیتروژل مایع سبب انجماد آن و پذیرفتن آسان‌تر ضربات فیزیکی بود. در یک هاون، نیتروژن مایع ریخته شد و با استفاده از هاون و ضربات فیزیکی کاملاً به صورت پودر درآمد و سپس تحت آزمون طیف‌سنجی با پراش پرتوی ایکس قرار گرفت.

ارزیابی خواص فیزیکی هیدروژل با میکروسکوپ الکترونی رویشی (SEM)

هدف از این کار، بررسی خواص فیزیکی سطحی هیدروژل از جمله تخلخل‌سنجی و ساختار منافذ بود. جهت آماده‌سازی نمونه سطح هیدروژل توسط یک لایهٔ ۱۰ نانومتری از مادهٔ رسانا مانند طلا پوشیده شد. پوشش ایجادشده در این مرحله، نقش لایهٔ محافظ را ایفا کرد و تحت تصویربرداری با دستگاه SEM قرار گرفت.

طیف‌سنجی بازتابی هیدروژل

با استفاده از سیستم طیف‌سنجی نوری مجهز به فیبر نوری (Ocean optics, USB2000) طیف‌های نوری جذب هیدروژل ثبت گردید. به منظور مطالعهٔ طیفی از یک منبع نور هالوژن – تنگستن در ناحیهٔ طیفی مرئی با طول موج ۱۰۰۰– ٤۰۰ نانومتر استفاده شد. نور منبع توسط فیبر نوری به نمونه‌های مورد ارزیابی هیدروژل ارسال و جمع‌آوری شد (شکل ۱).

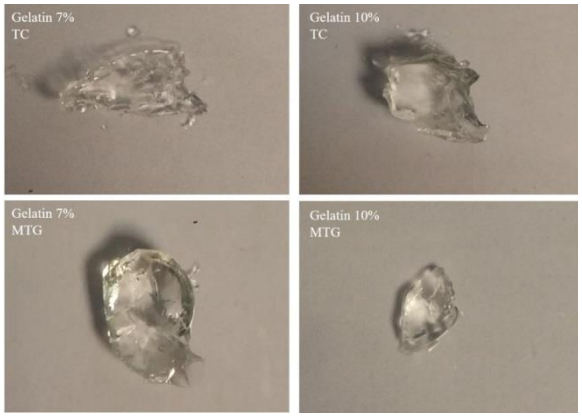


شکل۱: در ساختار طیف‌سنجی بازتابی پخشی از یک منبع نور هالوژن-تنگستن (Ocean Optics)در ناحیهٔ طول مرئی – فروسرخ نزدیک ۱۰۰۰ – ۴۰۰ نانومتر استفاده شده است. مطابق با شکل ۱ نور بازتابی پخشی، توسط یک فیبر نوری بر پایهٔ یک پروب دوطرفه جمع‌آوری می‌شود. پروب بازتابی(QR400-VIS-NIRprobe) از شش فیبر تابش‌کنندهٔ نور و یک فیبر مرکزی جمع‌کننده تشکیل شده است. نور پراکنده‌ای که توسط فیبر مرکزی جمع‌آوری می‌شود، به عنوان ورودی به یک طیف‌سنج نوری (USB2000,OceanOptics) ارسال می‌گردد. اطلاعات ارسال‌شده توسط کامپیوتر به صورت تابعی از طول موج قابل ملاحظه هستند و اطلاعات به صورت اعداد قابل پردازش و بررسی است

یافتـه‌ها

ساختار و مورفولوژی هیدروژل ژلاتین

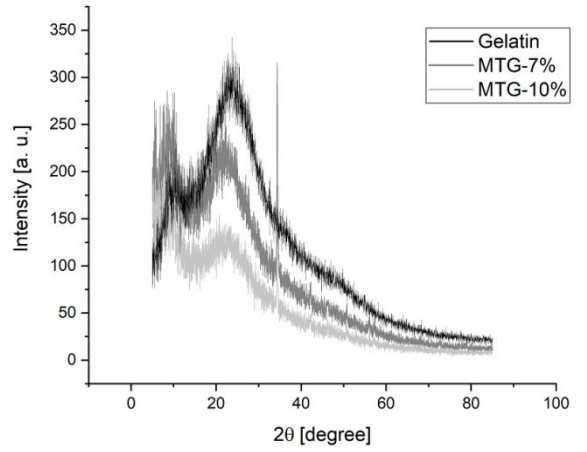
نتایج نشان داد هیدروژل تهیه‌شده با کراسلینکر ترنس‌گلوتامیناز نسبت به هیدروژل فاقد کراسلینکر قوام مناسب‌تری داشت و در دمای ۳۷ درجهٔ سانتی‌گراد ساختار خود را حفظ می‌کرد. براساس مشاهدات، هیدروژل تهیه‌شده به روش آنزیمی بستر مناسب‌تری جهت انتقال سلول‌ها به محل زخم یا دریافت‌کنندهٔ پیوند بود (شکل ۲).



شکل۲: مورفولوژی هیدروژل ژلاتین به روش آنزیمی (mTG) و روش گرماسردی (T-C) (به عنوان نمونهٔ کنترل) در غلظت‌های ۷ و ۱۰ درصد

نتایج تست XRD (X-Ray Diffraction)

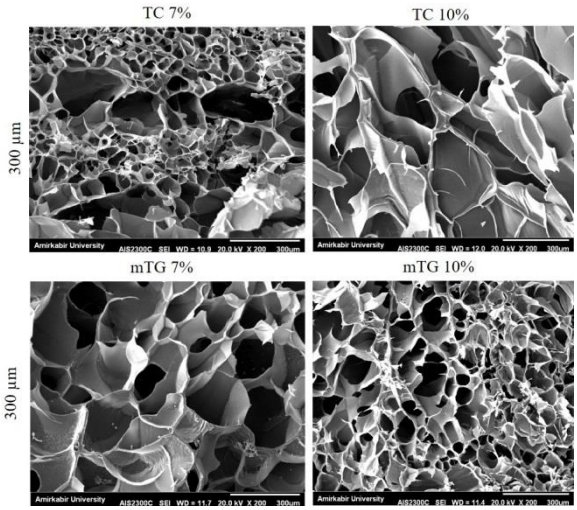
نتایج تست XRD نشان‌دهندهٔ پیک پهن $\theta 2$ در ناحیهٔ حدود ۲۰ تا ۳۰ درجه که معرف فاز آمورف هیدروژل ساخته‌شده با آنزیم بود.، در $\theta 2$ برابر ۵ درجه اختلاف بسیار واضحی بین پودر ژلاتین و هیدروژل ژلاتین وجود داشت که نشان‌دهندهٔ تغییر در ماهیت ساختاری بعد از ایجاد پیوندهای عرضی می‌باشد. تغییر ارتفاع در $\theta 2$ برابر ۲۰ درجه بین هیدروژل ناشی از غلظت ۷ درصد و ۱۰ درصد، نشان‌دهندهٔ متراکم بودن هیدروژل ناشی از غلظت ۱۰ درصد و درنتیجه افزایش بلورینگی این هیدروژل بود (نمودار ۱).



نمودار۱: نتایج XRD پودر ژلاتین، هیدروژل ۷ درصد کراسلینک‌شده (mTG-7%) و هیدروژل ۱۰ درصد کراسلینک‌شده (mTG-10%)

نتایج تست SEM

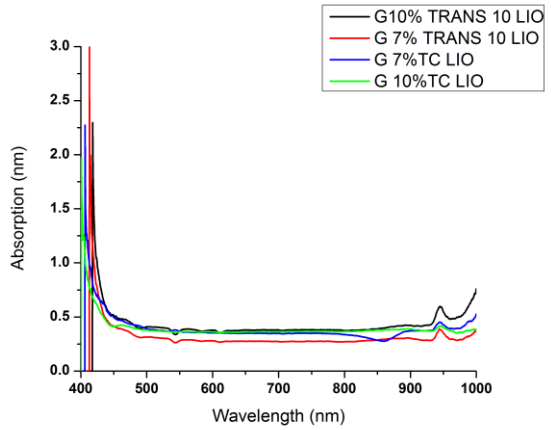
براساس نتایج تست SEM مشخص شد هیدروژل‌های ساخته‌شده با استفاده از روش آنزیمی در مقایسه با روش فیزیکی دارای منافذ کوچک‌تر می‌باشند و این نشان‌دهندهٔ ایجاد پیوندهای عرضی بیشتر و قوی‌تر کوالانسی در این هیدروژل‌ها می‌باشد. روش آنزیمی هیدروژل‌هایی با منافذ کوچک‌تر و ساختاری محکم‌تر ایجاد کرد. میانگین اندازهٔ منافذ در هیدروژل تهیه‌شده با روش آنزیمی با استفاده از ۷ و ۱۰ درصد ژلاتین به ترتیب حدود ۱۹/۸ و ۲۱۳/۵ میکرومتر بود. قطر دیوارهٔ منافذ در این هیدروژل حدود ۲/۹۸ میکرومتر بود. منافذ در هیدروژل تهیه‌شده با روش فیزیکی با استفاده از ۷ و ۱۰ درصد ژلاتین به ترتیب حدود ۲۲/۸ و ۲۴۰/۵ میکرومتر بود. قطر دیوارهٔ منافذ در این هیدروژل حدود ۳/۸۵ میکرومتر بود (شکل ۳).



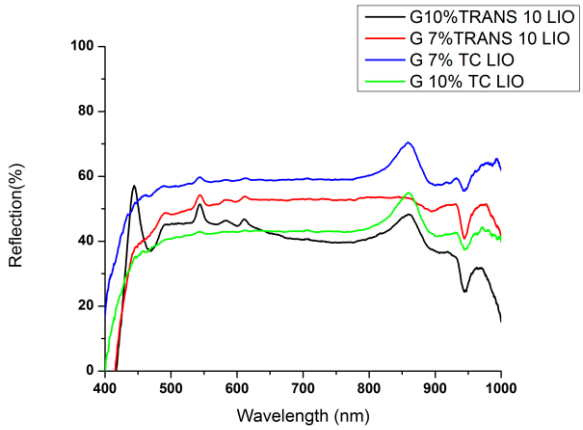
شکل۳: تصاویر SEM هیدروژل تهیه‌شده با روش آنزیمی (mTG) و روش گرماسردی (TC) با غلظت‌های ۷ و ۱۰ درصد

آنالیز طیف‌سنجی

براساس طیف‌های جذبی نوری در محدودهٔ مرئی - مادون قرمز نزدیک، هیدروژل‌های سنتزشده داری پیک جذب در حدود طول موج ۹۵۰ نانومتر بودند. به نظر می‌رسد براساس میزانی از آب که این هیدروژل‌ها دارا هستند، این پیک‌های جذب، قوی‌تر یا ضعیف‌تر نسبت به هم ارزیابی می‌شوند. ضمن اینکه به نظر می‌رسد به سمت طول موج‌های بلندتر از ۱۰۰۰ نانومتر جذب این هیدروژل‌ها در حال افزایش است که منطبق بر پیک جذب آب در ناحیهٔ مادون قرمز است (نمودار۲و۳).



نمودار۲: طیف جذبی هیدروژل تهیه‌شده با روش گرماسردی با غلظت ۷ درصد (TC 7%)، هیدروژل تهیه‌شده با روش گرماسردی با غلظت ۱۰ درصد (TC 10%)، هیدروژل تهیه‌شده با روش آنزیمی با غلظت ۷ درصد (mTG 7%)، هیدروژل تهیه‌شده با روش آنزیمی با غلظت ۱۰ درصد (mTG 10%) در محدودهٔ طول موج نور مرئی ۱۰۰۰-۴۰۰ نانومتر



نمودار۳: طیف بازتابی هیدروژل تهیه‌شده با روش گرماسردی با غلظت ۷ درصد (TC 7%)، هیدروژل تهیه‌شده با روش گرماسردی با غلظت ۱۰ درصد (TC 10%)، هیدروژل تهیه‌شده با روش آنزیمی با غلظت ۷ درصد (mTG 7%)، هیدروژل تهیه‌شده با روش آنزیمی با غلظت ۱۰ درصد (mTG 10%) در محدودهٔ طول موج نور مرئی ۱۰۰۰-۴۰۰ نانومتر

بحث

از بیومتریال ژلاتین در بالین و تحقیقات استفاده‌های بی‌شماری می‌کنند[۱۵]. در صورتی که نیاز به بستر سه‌بعدی جهت نگهداری سلول‌ها باشد، می‌توان ژلاتین را به شکل‌های مختلفی تبدیل کرد[۱٦]. اسفنج متخلخل ژلاتین بستر مناسبی برای قرارگیری و رشد سلول‌ها ایجاد می‌کند تا بتوانند به آن بچسبند و رشد کنند. برای ساخت این بسترهای سه‌بعدی می‌توان از پیوندهای دائمی کووالانسی یا موقت هیدروژنی استفاده کرد. با استفاده از مولکول‌های شیمیایی یا آنزیم‌های زیستی، پیوندهای عرضی کووالانسی کنترل‌شده‌ای بین زنجیرهای پلیمر ایجاد می‌شود تا به اصطلاح پلیمر سه‌بعدی و تثبیت شود. همچنین می‌توان با استفاده از پیوندهای هیدروژنی ایجادشده بین زنجیرهای مجاور در روش گرماسردی ژلاتین مایع را به ژل تبدیل کرد[۱۷].

ساختار سه‌بعدی، بستر پایدار و مستحکمی برای قرارگیری مواد، سلول‌ها و مولکول‌های زیستی فراهم می‌کند. عوامل ایجاد پیوند کووالانسی عرضی که برای ژلاتین مورد استفاده قرار می‌گیرد عبارتند از مولکول‌های شیمیایی گلوتارآلدهید، کربودی‌ایمین، جنیپین و آنزیم‌هایی همچون ترنس‌گلوتامیناز، تیروسیناز و هورسرادیش پروکسیداز. گلوتارآلدهید یکی از مواد معمول مورد استفاده برای ایجاد پیود عرضی در ژلاتین برای استفاده‌های بیولوژیک است[۱۸و۱۹]. مشکل اصلی استفاده از این ماده سمی بودن آن است که ممکن است به صورت واکنش‌نداده میان بافت ژلاتین سه‌بعدی‌شده باقی بماند و برای محیط سلولی اطراف خود ایجاد سمیت کند. گلوتارآلدهید با ایجاد پیوند شیمیایی ایمینی بین آمین آزاد موجود در اسیدآمینه‌های لیزین یا هیدروکسی لیزین زنجیر پلی‌پپتید کلاژن یا ژلاتین و گروه عاملی آلدئید در دو انتهای خود باعث ایجاد اتصال عرضی بین زنجیره‌های ژلاتین می‌شود.

از آنزیم ترنس‌گلوتامیناز به خاطر توانایی در ایجاد اتصالات عرضی در پروتئین‌ها بسیار استفاده می‌شود. این آنزیم واکنش جابه‌جایی آسیل بین گروه λ-کربوکسی‌آمید گلوتامین (دهندهٔ آسیل) و گروه ε-آمین لیزین (گیرندهٔ آسیل) را برای تشکیل ε-(λ-گلوتامینیل) لیزین بین دو زنجیر را کاتالیز می‌کند تا پیوند عرضی بین زنجیرهٔ پروتئین ایجاد شود. ژلاتین سه‌بعدی‌شده با استفاده از این آنزیم دارای زیست‌سازگاری خوبی می‌باشد[۱۸و۱۹].

در روش فیزیکی گرماسردی ابتدا دمای مخلوط ژلاتین را تا ۵۰ درجهٔ سانتی‌گراد بالا می‌برند تا پیوندهای هیدروژنی ساختار سه‌بعدی موجود در ژلاتین از بین برود و ساختار ژلاتین به صورت خطی تبدیل شود. در این دما پیوندهای هیدروژنی در ساختارهای آلفا و بتا از بین می‌رود. با سرد کردن تدریجی این مخلوط مایع پیوندهای جدیدی در دمای ۳۰ درجهٔ سانتی‌گراد بین زنجیره‌های مجاور ژلاتین به صورت مارپیچ‌های سه‌گانه ایجاد می‌شود.

در مطالعهٔ حاضر جهت بررسی ماهیت هیدروژل تهیه‌شده از نظر شیمیایی از روش پراش پرتوی ایکس استفاده شد و نتایج مبین این بودند که هیدروژل با غلظت ۱۰ درصد متراکم‌تر و درنتیجه بلورینگی این هیدروژل بیشتر بود. مطالعات قبلی انجام‌یافته درخصوص بررسی شیمیایی این نوع هیدروژل نیز همسو با نتایج تحقیق حاضر بود[۷و۱۸].

یکی دیگر از شاخص‌های تعیین ماهیت هیدروژل براساس تصاویر به دست آمده از میکروسکوپ الکترونی می‌باشد. نتایج این تحقیق نشان دادند اثر آنزیم ۱۰ درصد در ایجاد پیوندهای عرضی بین زنجیره‌های ژلاتین بیشتر از روش گرماسردی فیزیکی است. همچنین می‌توان نتیجه گرفت اثر غلظت ژلاتین بر روی اندازهٔ منافذ هیدروژل در روش آنزیمی بیشتر است. در روش آنزیمی اختلاف قابل توجهی بین اندازهٔ منافذ در هیدروژل‌های ساخته‌شده با غلظت‌های متفاوت وجود دارد. این اختلاف در هیدروژل‌های ساخته‌شده با روش فیزیکی بسیار بیشتر می‌باشد. دلیل این پدیده در هیدروژل‌های ساخته‌شده به روش فیزیکی کمتر شدن احتمال برخورد زنجیرها در هیدروژل با غلظت کمتر و کمتر شدن میزان پیوندهای هیدروژنی می‌باشد که درنتیجه هیدروژل با غلظت کمتر ژلاتین دارای پیوندهای عرضی بسیار کمتر و خواص فیزیکی بسیار ضعیف‌تری می‌باشد و عملاً برای استفاده در کشت بافت مناسب نمی‌باشند. مطالعات پیشین نیز نتایج حاصل از این پژوهش را تأیید نموده‌اند[۲۰و۲۱].

دیگر شاخص تعیین ماهیت هیدروژل براساس طیف‌های جذبی نوری در محدودهٔ مرئی- مادون قرمز نزدیک بود. نتایج طیف‌سنجی نشان داد که هیدروژل‌های سنتزشده دارای پیک جذب در حدود طول موج ۹۵۰ نانومتر هستند و براساس میزانی از آب که این هیدروژل‌ها دارا هستند، این پیک‌های جذب، قوی‌تر یا ضعیف‌تر نسبت به هم ارزیابی می‌شوند. ضمن اینکه به نظر می‌رسد به سمت طول موج‌های

بلندتر از ۱۰۰۰ نانومتر جذب این هیدروژل‌ها در حال افزایش است که منطبق بر پیک جذب آب در ناحیهٔ مادون قرمز است[۲۲و۲۳].

تحقیق حاضر در محدودهٔ بررسی ویژگی‌های شیمیایی، فیزیکی و طیف‌سنجی بازتابی این داربست هیدروژلی انجام گرفته است و تفسیر نتایج در این حیطه قابل تبیین می‌باشد. این تحقیق از نظر بررسی‌های بیولوژیک، مکانیکی و... با محدودیت‌هایی همراه است که امید است در آیندهٔ نزدیک امکان بررسی در سطوح وسیع‌تر جهت تصمیم‌گیری درخصوص کاربرد این هیدروژل ساده و مقرون-به‌صرفه به عنوان پانسمان ترمیم‌کنندهٔ زخم فراهم آید.

نتیجه‌گیری

در مجموع، نتایج این پژوهش نشان دادند که روش به کار رفته در این پژوهش یک روش مطمئن جهت تهیهٔ هیدروژل ژلاتین است و قابلیت آن را دارد تا به عنوان یک پانسمان بیولوژیک در ترمیم زخم مورد استفاده قرار گیرد.

تشکر و قدردانی

این مطالعه با پشتیبانی دانشگاه آزاد اسلامی واحد همدان، مرکز تحقیقات پوست و سلول‌های بنیادی دانشگاه علوم پزشکی تهران و گروه طیف‌سنجی زیستی آزمایشگاه فوتونیک مواد آلی و پلیمری پژوهشکدهٔ لیزر و پلاسمای دانشگاه شهید بهشتی تهران انجام گرفته است. بدین وسیله از پشتیبانی معنوی و حمایت‌های مالی این مراکز تقدیر و تشکر به عمل می‌آید.

References:

1. Lanza R, Langer R, Vacanti JP, Atala A. Principles of tissue engineering: Academic press; 2020.

2. Spicer CD. Hydrogel scaffolds for tissue engineering: the importance of polymer choice. Polymer Chemistry. 2020; 11(2): 184-219.

3. Zhu J, Marchant RE. Design properties of hydrogel tissue-engineering scaffolds. Expert review of medical devices. 2011; 8(5): 607-26.

4. Agarwal G, Agiwal S, Srivastava A. Hyaluronic acid containing scaffolds ameliorate stem cell function for tissue repair and regeneration. International Journal of Biological Macromolecules. 2020.

5. Guilak F, Butler DL, Goldstein SA, Baaijens FP. Biomechanics and mechanobiology in functional tissue engineering. Journal of biomechanics. 2014; 47(9): 1933-40.

6. Taqvi S, Roy K. Influence of scaffold physical properties and stromal cell coculture on hematopoietic differentiation of mouse embryonic stem cells. Biomaterials. 2006; 27(36): 6024-31.

7. Jaipan P, Nguyen A, Narayan RJ. Gelatin-based hydrogels for biomedical applications. Mrs Communications. 2017; 7(3): 416-26.

8. Wang X, Ao Q, Tian X, Fan J, Tong H, Hou W. Gelatin-based hydrogels for organ 3D bioprinting. Polymers. 2017; 9(9): 401.

9. Lu L, Mikos AG. The importance of new processing techniques in tissue engineering. Mrs Bulletin. 1996; 21(11): 28-32.

10. Chen S-G, Ugwu F, Li W-C, Caplice NM, Petcu EB, Yip SP. Vascular Tissue Engineering: Advanced Techniques and Gene Editing in Stem Cells for Graft Generation. Tissue Engineering. 2020(ja).

11. Kwon H, Brown WE, Lee CA, Wang D, Paschos N, Hu JC. Surgical and tissue engineering strategies for articular cartilage and meniscus repair. Nature Reviews Rheumatology. 2019; 15(9): 550-70.

12. Benmassaoud MM, Gultian KA, DiCerbo M, Vega SL. Hydrogel screening approaches for bone and cartilage tissue regeneration. Annals of the New York Academy of Sciences. 2020; 1460(1): 25-42.

13. Liu SH, Zhang HG, Hu QX, Wang B, Li S, Zhang C. Development and Evaluation of Biomimetic 3D Coated Composite Scaffold for Application as Skin Substitutes. Macromolecular Materials and Engineering. 2020; 305(3): 1900848.

14. Koh J, Griffin DR, Archang MM, Feng AC, Horn T, Margolis M. Enhanced in vivo delivery of stem cells using microporous annealed particle scaffolds. Small. 2019; 15(39): 1903147.

15. Dosta P, Ferber S, Zhang Y, Wang K, Ros A, Uth N. Scale- up manufacturing of gelatin- based microcarriers for cell therapy. Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials. 2020.

16. Rodríguez-Rodríguez R, Espinosa-Andrews H, Velasquillo-Martínez C, García-Carvajal ZY. Composite hydrogels based on gelatin, chitosan and polyvinyl alcohol to biomedical applications: a review. International Journal of Polymeric Materials and Polymeric Biomaterials. 2020; 69(1): 1-20.

17. Van Hoorick J, Tytgat L, Dobos A, Ottevaere H, Van Erps J, Thienpont H. (Photo-) crosslinkable gelatin derivatives for biofabrication applications. Acta Biomaterialia. 2019; 97: 46-73.

18. Liu Y, Ng SC, Yu J, Tsai W-B. Modification and crosslinking of gelatin-based biomaterials as tissue adhesives. Colloids and Surfaces B: Biointerfaces. 2019; 174: 316-23.

19. Zhou M, Lee BH, Tan YJ, Tan LP. Microbial transglutaminase induced controlled crosslinking of gelatin methacryloyl to tailor rheological properties for 3D printing. Biofabrication. 2019; 11(2):025011.

20. Zhao Y, Sun Z. Effects of gelatin-polyphenol and gelatin–genipin cross-linking on the structure of gelatin hydrogels. International journal of food properties. 2017; 20(sup3): S2822-S32.

21. Rahali K, Ben Messaoud G, Kahn CJ, Sanchez-Gonzalez L, Kaci M, Cleymand F. Synthesis and characterization of nanofunctionalized gelatin methacrylate hydrogels. International Journal of Molecular Sciences. 2017; 18(12): 2675.

22. Babadi M, Mohajerani E, Ataie-Fashtami L, Zand N, Shirkavand A. Quantitative analysis of skin erythema due to laser hair removal: a diffusion optical spectroscopy analysis. Journal of lasers in medical sciences. 2019; 10(2): 97.

23. Shirkavand A, Farivar S, Mohajerani E, Ataie- Fashtami L, Ghazimoradi MH. Non-invasive Reflectance Spectroscopy for Normal and Cancerous Skin Cells Refractive Index Determination: An In Vitro Study. Lasers in surgery and medicine. 2019; 51(8): 742-50.