بررسی رفتار سلول‌های کندروسیت برروی هیدروژل‌های پلی‌وینیل الکل شبکه‌ای شده با زنجیرهای یورتانی

شاهین بنکدار[i]؛ شهریار حجتی امامی[ii]؛ محمدعلی شکرگزار[iii]؛ سید امیرهوشیار احمدی[iv]

چکیده

هیدروژل‌های پلی‌ونیل الکلی به کمک زنجیرهای دی‌ایزوسیاناتی با سه نوع جرم مولکولی مختلف (۱۶۸، ۲۴۰۰ و ۶۰۰۰ گرم بر مول) شبکه‌ای شدند تا از برتری‌های فیزیکی- شیمیایی هر دو جزء هیدروژل پلی‌وینیل الکل و گروه یورتان بهره برده شود. از طیف‌نگاری مادون قرمز، به منظور تأیید تشکیل یورتان و حذف قله ایزوسیانات در $۲۲۷۰ cm^{-1}$ استفاده شد. با افزایش طول زنجیر شبکه‌ای کننده، درصد جذب آب از ۴۵۰ درصد برای پلی‌وینیل الکل تا ۱۲۰ درصد کاهش یافت و استحکام کششی از ۳۴ مگا پاسکال به ۵۴ مگا پاسکال افزایش نشان داد. زنده بودن سلول‌ها با آزمون ۳-(۴،۵- دی‌متیل‌تیازول ۲-)-۲،۵-دی‌فنیل تترازولیوم بروماید برروی سلول‌های کندروسیت جداسازی شده از خرگوش بررسی شد. علاوه براین مقدار پروتئوگلیکان ترشح شده از سلول‌ها در مجاورت نمونه‌ها، به کمک رنگ‌آمیزی با دی‌متیل متیلن بلو تعیین گردید که بالاترین مقدار ترشح مربوط به نمونه ۳ بود. مورفولوژی کروی سلول‌های جداسازی شده برروی نمونه‌ها به کمک میکروسکوپ الکترونی (SEM) تأیید شد. در انتها می‌توان چنین نتیجه‌گیری کرد که شبکه‌ای شدن پلی‌وینیل الکل به کمک زنجیرهای پلی‌یورتانی (۶۰۰۰ گرم بر مول) می‌تواند انتخاب مناسبی برای جایگزینی غضروف طبیعی باشد.

کلمات کلیدی : هیدروژل پلی‌وینیل الکل، یورتان، کندروسیت، جایگزین غضروفی، زیست‌سازگاری

Evaluation of Chondrocyte Behavior on Polyvinyl Alcohol Hydrogels Crosslinked by Urethane Chains

Shahin Bonakdar, Shahriar Hojjati Emami, Mohammad Ali Shokrgozar, Seyed Amir Hoshiar ahmadi

ABSTRACT

Polyvinyl alcohol (PVA) hydrogels were crosslinked by different molecular weight of diisocyanate chains (168, 2400 and 6000 g/mol) in order to profit from the physical-chemical advantages of both PVA hydrogels and urethane groups. Fourier transform infrared spectroscopy employed to confirm urethane formation and the absence of the isocyanate peaks (NCO) at 2270 cm^{-1}. With increasing crosslinker chain length, water uptake reduced from 450% for PVA to 120% and the ultimate tensile strength increased from 34 MPa to 54 MPa. The cell viability evaluated by 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) assay on rabbit isolated chondrocytes. In addition, the amounts of proteoglycan secreted by cells in the vicinity of the samples were assessed by dimethyl methylene blue staining protocol which confirmed the highest level for sample 3. The spherical morphology of the isolated cells on the samples verified with scanning electron microscopy (SEM). It can be concluded that crosslinking of the PVA with polyurethane chains (6000 g/mol) may consider as a suitable candidate for natural cartilage replacement.

KEYWORDS : Polyvinyl alcohol hydrogel, Urethane, Chondrocyte, Cartilage replacement, Biocompatibility

[i] دانشجوی دکتری دانشگاه صنعتی امیرکبیر، دانشکده مهندسی پزشکی Email: shahinbonakdar@yahoo.com

[ii] استادیار دانشگاه صنعتی امیرکبیر، دانشکده مهندسی پزشکی Email: semami@aut.ac.ir

[iii] دانشیار انستیتو پاستور ایران، بانک سلولی Email: mashokrgozar@pasteur.ac.ir

[iv] دانشجوی کارشناسی ارشد دانشگاه امیرکبیر، دانشکده مهندسی پزشکی Email: eng_ahooshiar@yahoo.co.uk

۱- مقدمه

غضروف مفصلی بافت همبندی است که وظیفه تحمل بار و کاهش اصطکاک بین مفاصل را برعهده دارد. روش‌های بسیاری برای ترمیم آسیب‌های غضروفی پیشنهاد شده است که هیچ‌کدام از آنها تاکنون موفق به بازسازی کامل بافت غضروف انسان نشده‌اند [۱]. از جمله روش‌های مورد مطالعه باید به جایگزینی کامل غضروف با پروتزهای آلوگرافت، اتوگرافت، مواد مصنوعی یا ترکیبی از آنها اشاره نمود]۲]. مهندسی بافت یکی از زمینه‌های جدید علمی است که با بهره‌گیری از اصول مهندسی و دانش پزشکی، جایگزین‌های بیولوژیکی برای بافت‌های آسیب‌دیده ارائه می‌کند. این جایگزین‌ها شامل ترکیبی از سلول‌ها، مواد و عوامل محرک است [۳]. مهمترین سلول‌های مورد استفاده در تحقیقات غضروفی شامل سلول‌های بنیادی مزانشیمالی و کندروسیت‌های جداسازی شده از بافت هستند [۴]، [۵]. برای ترمیم آسیب‌های غضروفی نیز مواد مختلفی پیشنهاد شده است که از آن جمله می‌توان به پلی‌گلیکولیک اسید، پلی‌وینیل الکل، کایتوسان، آلجینات سدیم و پلی‌یورتان‌ها اشاره کرد [۳]. بافت غضروف بدون رگ است و تغذیه سلول‌های درون آن به کمک ساختار هیدروژلی و پدیده نفوذ انجام می‌شود. به این دلیل هیدروژل‌ها اهمیت زیادی در ترمیم آسیب‌های غضروفی دارند [۶]. هیدروژل‌ها شبکه‌های به هم پیوسته پلیمری بوده که در محیط‌های آبی حداقل به میزان ۲۰٪ وزن اولیه خود متورم می‌شوند [۷].

محققان بسیاری از هیدروژل‌های پلی‌وینیل الکل (PVA) برای تهیه غضروف مصنوعی [۸]، [۹]، منیسک زانو [۱۰]، یا دیسک بین مهره‌ای [۱۱]-[۱۳] بهره برده‌اند. کوبایاشی (kobayashi) و همکارانش [۱۴]، از PVA نوعی جایگزین منیسک تهیه نمودند و آن‌را به مدت ۲ سال در بدن ۵ خرگوش قرار دادند که از نظر خواص مکانیکی و زیست‌سازگاری نتایج مناسبی بدست آمد. در تحقیقات دیگر از پلی‌وینیل الکل برای جایگزینی غضروف مفاصل بدن بهره برده شد [۱۵]-[۱۷]. از طرف دیگر پلی‌یورتان‌ها نیز به دلیل استحکام مکانیکی عالی، زیست‌سازگاری بالا و دامنه تغییر خواص متنوع در کاربردهای پزشکی مورد توجه زیادی هستند [۱۸]. تحقیقات بسیاری تاکنون در مدل‌های حیوانی مختلف صورت گرفته است و نشان داده‌اند که داربست‌های پلیمری برپایه پلی‌یورتان‌های زیست تخریب‌پذیر، باعث تسریع در تشکیل بافت غضروفی- لیفی شده و می‌توانند موجب ترمیم آسیب شوند [۱۹]-[۲۱]. اما این روش دارای مشکلاتی است. از جمله یکپارچگی کافی بین بافت و پلیمر برقرار نمی‌شود و در نتیجه بهبود ناقص انجام می‌گیرد.

PVA یک پلیمر خطی است و در حلال‌های قطبی نظیر آب و دی‌متیل سولفوکساید (DMSO) حل می‌شود. برای ایجاد ساختار شبکه‌ای در آن از روش‌های فیزیکی نظیر سرمایش و گرمایش متوالی یا تابش گاما و روش‌های شیمیایی شامل افزودن عوامل شبکه‌ای کننده بهره برده می‌شود [۲۲]. در این تحقیق هیدروژل‌های پلی‌وینیل الکل به کمک گروه‌های یورتانی شبکه‌ای شده تا ضمن بهره‌مندی از خواص هیدروژلی پلی‌وینیل الکل، خصوصیات شیمیایی گروه‌های یورتانی به ترکیب افزوده شود. برای مقایسه تأثیر طول زنجیر عامل شبکه‌ای‌ساز بر خواص پلیمر نهایی، از هگزا متیلن دی‌ایزوسیانات و پلی‌کاپرولاکتون دی‌ال با وزن مولکولی‌های ۵۳۰ و ۲۰۰۰ گرم بر مول استفاده شد. در انتها رفتار کندروسیت‌های جداسازی شده از جنبه نرخ تکثیر و ترشح پروتئوگلیکان‌ها برروی آنها بررسی گردید.

۲- مواد و روش‌ها

پلی‌وینیل الکل (PVA) با جرم مولکولی ۷۲۰۰۰، هگزامتیلن دی‌ایزوسیانات (HMDI) و دی‌متیل سولفوکساید (DMSO) از شرکت Merck و پلی‌کاپرولاکتون دی‌ال (PCL) با جرم مولکولی ۵۳۰ و ۲۰۰۰ از شرکت Aldrich تهیه گردید. پیش از استفاده پلی‌وینیل الکل و پلی‌کاپرولاکتون دی‌ال به مدت ۲۴ ساعت تحت آون خلاء در دمای ۸۰°C قرار گرفتند تا آب‌گیری شوند. سایر مواد به همان شکل اولیه استفاده شدند.

۲-۱- آماده‌سازی نمونه‌ها

برای تهیه پیش‌پلیمر یورتانی ابتدا یک مول پلی‌کاپرولاکتون دی‌ال درون راکتور واکنش سه دهنه در دی‌متیل سولفوکساید (۱۰٪) حل شد و سپس دو مول هگزامتیلن دی‌ایزوسیانات محلول در دی‌متیل سولفوکساید (۱۰٪) به صورت قطره قطره به آن افزوده گردید. دمای واکنش ۷۰ درجه سانتی‌گراد، سرعت همزن ۴۰۰ دور در دقیقه بود و واکنش تحت اتمسفر نیتروژن خنثی به مدت ۱۰ ساعت ادامه یافت. برای هر نمونه محلول ۱۲ درصد پلی‌وینیل الکل در دی‌متیل سولفوکساید (دمای ۹۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۴ ساعت) تهیه شد. سپس محلول حاوی عامل شبکه‌ای‌ساز (به نسبت مولی ۱۲ به ۱) به آن افزوده پس از سی ثانیه همزدن درون قالب ریخته شد. برای خروج حلال باقیمانده، نمونه‌ها به مدت یک هفته درون آون با دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد قرار گرفتند. در جدول (۱) مقادیر مربوط به عوامل شبکه‌ای‌ساز مورد بررسی آورده شده است. برای تعیین وزن مولکولی پیش‌پلیمر یورتانی به‌دست آمده از دستگاه

کروماتوگرافی نفوذ ژل (پژوهشگاه پتروشیمی و پلیمر ایران) مدل Agilent ۱۱۰۰، حلال تترا هیدروفوران (Merck) به عنوان فاز متحرک و استاندارد پلی‌استایرن برای رسم منحنی مشخصه با سرعت ۱ میلی‌لیتر بر دقیقه استفاده شد.

جدول (۱): مشخصات نمونه‌های تهیه شده

نمونه	عامل شبکه‌ای ساز	نسبت وزنی[۱]	جرم مولکولی عامل (g/mol)
۱	HMDI	۰/۰۲۸	۱۶۸
۲	PCL 530 + HMDI	۰/۴۱	۲۴۰۰
۳	PCL 2000 + HMDI	۱	۶۰۰۰

۱- نسبت وزن عامل شبکه‌ای کننده به پلی‌وینیل الکل

۲-۲- روش‌های شناسایی و ارزیابی

طیف‌نگاری مادون قرمز به کمک دستگاه Nicolet ۶۷۰۰ در محدوده $4000-4000 cm^{-1}$ با وضوح $2cm^{-1}$ با استفاده از پودر KBr انجام گرفت (مجتمع آزمایشگاهی دانشگاه آزاد واحد علوم و تحقیقات). اندازه‌گیری میزان جذب آب نمونه‌ها بر اساس استاندارد ASTM D۵۷۰ انجام شد. درصد افزایش وزنی جذب آب نمونه‌ها پس از ۱۰۰ ساعت قرارگیری در آب، در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد بطور میانگین محاسبه شد. بدین منظور ابتدا نمونه‌ها توزین شده، به آنها آب اضافه گردید و سپس در فواصل زمانی مشخص وزن حالت متورم آنها اندازه‌گیری شد تا به حالت تعادل برسند. مقدار جذب آب نمونه‌ها مطابق با رابطه (۱) مشخص گردید.

$$\text{درصد جذب آب} = \frac{W_t - W_0}{W_0} \times 100 \qquad (1)$$

که در آن W_t وزن ثانویه و مرطوب نمونه‌ها و W_d وزن اولیه و خشک نمونه‌ها است.

از دستگاه HCT ۲۵-۴۰۰ Zwick/Roell, Germany (دانشکده مهندسی پزشکی، دانشگاه صنعتی امیرکبیر) برای تعیین خواص مکانیکی نمونه‌ها استفاده شد. تجزیه و تحلیل اطلاعات بدست آمده به کمک نرم‌افزار ToolKit۹۸ انجام پذیرفت. ابتدا قطعات دمبلی شکل مطابق با استاندارد ASTM D۶۳۸ نمونه ۵ تهیه گردید. برای انجام آزمایش کشش نمونه‌ها در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد و با سرعت ۱ میلی‌متر بر دقیقه تحت کشش قرار گرفتند و مقادیر نهایی استحکام کششی و درصد تغییر طول تا نقطه شکست آنها محاسبه گردید. برای بررسی رفتار ویسکوالاستیک، نمونه‌ها تحت تأثیر بارگذاری سیکلی با فرکانس ۱ هرتز و مدت زمان ۳۶۰۰ ثانیه قرار گرفتند. نتایج بدست آمده به کمک نرم‌افزار ToolKit۹۸ تجزیه و تحلیل شد و مقادیر تانژانت دلتا و مدول دینامیکی آنها محاسبه گردید.

۲-۳- جداسازی کندروسیت‌های خرگوشی

کندروسیت‌های خرگوشی از قسمت انتهایی غضروف ران خرگوش دو ساله سفید نیوزیلند با رعایت اصول اخلاقی جدا شد. بافت غضروفی درون محیط کشت DMEM به محل جداسازی منتقل گردید. سپس بافت با محیط کشت شستشو و به تکه‌های کوچک تقسیم شد. ابتدا به مدت یک ساعت در آنزیم تریپسین و سپس به مدت ۲۴ ساعت تحت تأثیر آنزیم کلاژناز نوع II درون انکوباتور قرار گرفت. پس از آن سوسپانسیون سلولی از فیلتر عبور داده شد تا قطعات غضروفی احتمالی جدا شود. سپس به مدت ۵ دقیقه در دور ۱۱۰۰ دور در دقیقه سانتریفوژ گردید و پلت سلولی بدست آمده پس از شستشو با PBS در محیط کشت DMEM/Ham's F۱۲ حاوی FBS (۱۰٪) وارد شد مورفولوژی سلول‌های بدست آمده کاملاً گرد بود و برای استفاده‌های بعدی و افزایش تعداد سلول‌ها به فلاسک کشت سلولی منتقل شدند.

۲-۴- تصاویر سلولی

ارزیابی تصاویر سلول‌ها به کمک میکروسکوپ نوری و الکترونی انجام شد. برای بررسی چسبندگی و مورفولوژی سلول‌ها، ابتدا تعداد 5×10^2 سلول برروی سطح نمونه استوانه‌ای به قطر ۸ میلی‌متر و ضخامت ۰/۵ میلی‌متر قرار گرفتند و پس از گذشت ۱۴ روز، سلول‌ها به کمک محلول حاوی ۲ گرم پارافرم‌آلدئید، ۱۰ میلی‌لیتر محلول گلوتارآلدئید ۲۵ درصد و ۲۰ میلی‌لیتر بافر کاکودیلیت ۰/۲ مولار تثبیت شدند. سپس آبگیری از نمونه‌ها به کمک الکل‌های ۱۰، ۳۰، ۵۰، ۷۰، ۸۰، ۹۰، ۹۵ و ۱۰۰ درصد هرکدام ۵ دقیقه انجام گرفت. در پایان نمونه‌ها به کمک طلا پوشش‌دهی شدند و با استفاده از دستگاه میکروسکوپ الکترونی Phillips, XL-۳۰ (دانشگاه صنعتی امیرکبیر، دانشکده مهندسی معدن و متالورژی) تصاویر الکترونی تهیه شد.

۲-۵- عصاره‌گیری از نمونه‌ها

به منظور تعیین نرخ تکثیر سلول‌ها، فرایند عصاره‌گیری براساس استاندارد ایزو ۵-۱۰۹۹۳ انجام شد که طی آن به هر نمونه با سطح مقطع ۰/۵ ± ۳/۵ سانتی‌متر مربع مقدار یک میلی‌لیتر محیط کشت افزوده گردید. سپس در فواصل زمانی مشخص محیط خارج شد و به سلول‌ها اضافه گردید. مقدار مشخصی محیط کشت نیز به عنوان شاهد در نظر گرفته شد.

۲-۶- بررسی تکثیر سلول‌ها

برای بررسی میزان تکثیر سلولی از آزمون دی متیل تیازل

دی‌فنیل تترازولیوم بروماید (MTT) استفاده شد. بدین ترتیب که ابتدا 1×10^4 سلول درون ظرف کشت سلولی ۹۶ چاهکی ریخته شد و سپس به مدت ۲۴ ساعت در انکوباتور ۳۷ درجه سانتی‌گراد قرار گرفت تا سلول‌ها به کف ظرف بچسبند. عصاره گرفته شده از هر نمونه به چاهک ظرف کشت افزوده شد و سلول‌ها برای مدت ۲۴ ساعت دیگر در مجاورت این عصاره‌ها قرار گرفتند. پس از آن محیط کشت خارج شد و ۱۰۰ میکرولیتر MTT با غلظت ۰/۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر به هر چاهک وارد شد. پس از گذشت ۴ ساعت محلول روی سلول‌ها خارج شد و دی‌متیل سولفوکساید به آن‌ها اضافه گردید. سپس مقدار غلظت ماده حل شده در دی‌متیل سولفوکساید در طول موج ۵۴۵ نانومتر محاسبه شد. چاهک دارای سلول‌های بیشتر چگالی نوری (OD) بالاتری نسبت به چاهک با سلول کمتر نشان می‌دهد.

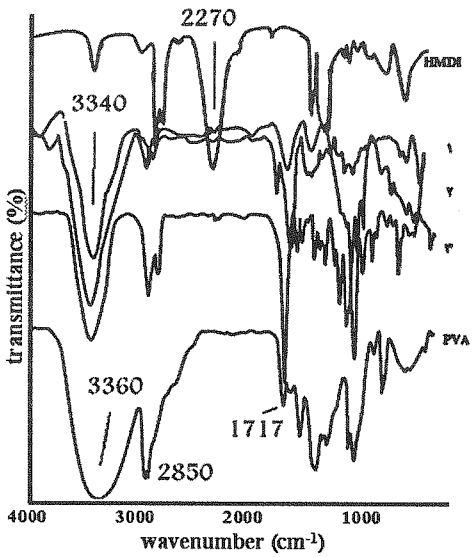
۲-۷- بررسی میزان ترشح گلیکوزآمینوگلیکان (GAG)

مقایسه میزان GAG آزاد شده از سلول‌ها به کمک رنگ‌آمیزی با دی‌متیل متیلن بلو (DMMB, Aldrich) انجام پذیرفت. ابتدا نمونه‌های استوانه‌ای به قطر ۸ میلی‌متر و ضخامت ۰/۵ میلی‌متر درون چاهک ظروف کشت سلولی قرار گرفتند و 5×10^3 سلول با دقت برروی سطح نمونه‌ها ریخته شد و پس از دو ساعت به آن ۱ میلی‌لیتر محیط کشت افزوده گردید. برای مقایسه میزان GAG ترشح شده توسط سلول‌ها، ۵۰۰ میکرولیتر محیط برداشته شده در روزهای ۳، ۷ و ۱۴ از هر چاهک همراه با ۱/۵ میلی‌لیتر آستون (Merck) به مدت ۲۴ ساعت به دمای $-20^\circ C$ منتقل شد. سپس نمونه‌ها به مدت ۳۰ دقیقه در دمای $4^\circ C$ با سرعت ۱۸۰۰ دور در دقیقه سانتریفوژ گردید. پس از خارج کردن محیط رویی و افزودن ۱۰۰ میکرولیتر آنزیم پاپاین (Aldrich، ۲۰μg/ml) فعال شده به کمک ال- سیستئین ۵ میلی‌مولار به محلول باقی‌مانده، نمونه‌ها به مدت ۱۶ ساعت در دمای $60^\circ C$ قرار گرفتند و در ادامه به مدت ۱۵ دقیقه برای حذف اثر آنزیم جوشانده شدند. محدوده استاندارد به کمک کندروایتین سولفات نوع C گرفته شده از کوسه (Aldrich) با غلظت‌های مشخص رسم گردید. نمونه‌ها به ظروف کشت ۹۶ خانه وارد شدند و به کمک دستگاه Eliza Reader مدل STAT FAX ۲۱۰۰ در طول موج ۵۴۵ نانومتر میزان جذب و مقدار کمی گلیکوزآمینوگلیکان موجود در محیط هر چاهک مشخص گردید.

۳- نتایج و بحث

۳-۱- طیف نگاری مادون قرمز

در شکل شکل (۱) طیف مادون قرمز نمونه‌های تهیه شده با طیف مربوط به هیدروژل پلی‌وینیل الکل مقایسه شده است. باندهای $3360cm^{-1}$، $2850-2940cm^{-1}$ و $1717cm^{-1}$ در طیف PVA، به ترتیب مربوط به کشش باند O-H، کشش C-H و استات باقیمانده است. قله $2270cm^{-1}$ مشخصه گروه ایزوسیانات (NCO) در طیف مربوط به HMDI است که پس از انجام واکنش شبکه‌ای شدن پلی‌وینیل الکل با زنجیرهای یورتانی، در نمونه‌های ۱، ۲ و ۳ دیده نمی‌شود. در طیف مربوط به نمونه‌های شبکه‌ای شده پلی‌وینیل الکل به کمک زنجیرهای پیش‌پلیمری یورتانی (نمونه‌های ۲ و ۳)، قله موجود در $1715cm^{-1}$ مربوط به حضور گروه‌های کربنیل (C=O) ناشی از پلی‌کاپرولاکتون دی‌ال است و نمونه ۳ شدت قله بیشتری را نسبت به نمونه ۲ نشان می‌دهد که بیانگر مقدار بیشتر این ماده در ترکیب است. علاوه بر آن قله دیده شده در $3347cm^{-1}-3340$ نیز نشانگر وجود گروه یورتان است [۲۳].

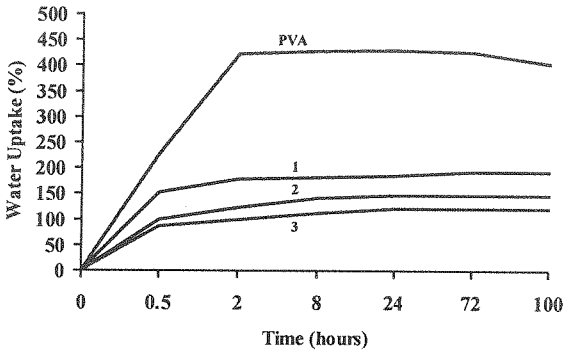


شکل (۱): طیف مادون قرمز مربوط نمونه‌های ۱، ۲، ۳ و PVA.

۳-۲- آزمون جذب آب

در شکل (۲) نتایج مربوط به جذب آب نمونه‌ها دیده می‌شود. پلی‌وینیل الکل به عنوان یک هیدروژل مقدار جذب آب بالا و نزدیک به ۴۵۰ درصد را نشان می‌دهد که پس از گذشت ۶۰ ساعت از شروع آزمایش دوباره وزن آن کاهش نشان می‌دهد. این امر شاید به دلیل شروع انحلال زنجیرهای پلی‌وینیل الکل است. نمونه‌های شبکه‌ای شده در طول این زمان

تخریبی را نشان نمی‌دهند. برخلاف ساختار پلی‌وینیل الکل، عامل شبکه‌ای ساز به عنوان یک عامل آبگریز شناخته می‌شود و حضور این عامل در ترکیب ضمن افزایش مقاومت پلی‌وینیل الکل به تخریب، باعث کاهش میزان جذب آب می‌شود. نمونه ۳ با بیشترین مقدار وزنی عامل شبکه‌ای ساز کمترین درصد تورم در آب (نزدیک ۱۰۰ درصد) را نشان می‌دهد. این مقدار جذب آب، در نزدیک میزان آب موجود در ساختار غضروف طبیعی است.



شکل (۲): نمودار جذب آب مربوط به نمونه‌های ۱، ۲، ۳ و PVA.

۳-۳- خواص مکانیکی

در جدول (۲) نتایج مربوط به خواص مکانیکی نمونه‌ها و مقایسه آنها با نمونه پلی‌وینیل الکل خالص دیده می‌شود. بالاترین میزان استحکام کششی مربوط به نمونه ۳ است. براساس مبانی تئوری رئولوژی انتظار می‌رود افزایش طول زنجیر عامل شبکه‌ای‌ساز این تحقیق به دلیل افزایش میزان صلبیت زنجیرها باعث کاهش تغییر طول تا نقطه شکست و افزایش استحکام پارگی شود [۲۴]. استفاده از هگزا متیلن دی‌ایزوسیانات برای شبکه‌ای کردن ساختار پلی‌وینیل الکل به دلیل سرعت بالای واکنش گروه ایزوسیانات با گروه‌های هیدروکسیل پلی‌وینیل الکل، نیازمند استفاده از مقادیر بیشتری حلال است تا فرصت کافی برای اختلاط دو ماده ایجاد گردد. از طرف دیگر از واکنش گروه‌های ایزوسیاناتی با مولکول‌های آب موجود در ترکیب پلی‌وینیل الکل و تولید گاز دی‌اکسید کربن، تخلخل‌ها و حفره‌های با ابعاد بسیار ریز ایجاد شده که می‌تواند بر خواص مکانیکی پلیمر نهایی تأثیر بگذارد [۲۵]. در تحقیق آگاروال (Agarwal) و همکارانش فوم‌های زیست‌سازگار و متخلخل پلی‌یورتانی از ترکیب لیزین دی‌ایزوسیانات و آب تهیه شد که ابعاد تخلخل‌ها متغیر و بین ۱۰ میکرومتر تا ۲ میلی‌متر گزارش شده است. این تخلخل‌ها در ضمن می‌توانند امکان رشد سلول‌ها به درون ساختار داربست را فراهم سازند [۲۶].

به منظور مقایسه خواص ویسکوالاستیک نمونه‌های مختلف با یکدیگر، پارامتر تانژانت دلتای حاصل از تست دینامیکی، مدنظر قرار گرفت. طبق تعریف تانژانت دلتا به صورت خارج قسمت نسبت مدول ظاهری الاستیک به مدول ظاهری ویسکوز ماده در نظر گرفته می‌شود [۲۷].

با توجه به اینکه افزایش تانژانت دلتا به معنای افزایش رفتار الاستیک در مقایسه با رفتار ویسکوز است، با توجه به جدول، دیده می‌شود در این نمونه‌ها، با افزایش عامل شبکه‌ای‌ساز، میزان مدول و تانژانت دلتا افزایش می‌یابد [۲۸]. این افزایش حاکی از رشد نسبت الاستیسیته نمونه‌ها در برابر ویسکوزیته آنان است. لذا می‌توان گفت بخش شبکه‌ای‌ساز در نمونه‌ها موجب بهبود بیشتر خواص الاستیک در مقایسه با خواص ویسکوز شده است. بنابراین با افزایش مقدار گروه شبکه‌ای‌ساز، ویسکوزیه ظاهری نمونه کاهش یافته و در پایان تانژانت دلتا افزایش می‌یابد که اثر این عامل را می‌توان در افزایش میزان مدول دینامیک نیز دید [۲۹].

همچنین روند مشابهی در نتایج حاصل از آنالیز مدول دینامیکی نمونه‌ها به‌دست آمده است. از آنجا که شرایط بارگذاری نمونه‌ها به منظور کاربرد در محیط بیولوژیک بدن انسان به صورت دینامیک است، لذا مقدار مدول دینامیکی در باربرداری و بارگذاری مد نظر قرار گرفته است. همانطورکه در جدول (۲) دیده می‌شود، میزان مدول دینامیکی نمونه‌ها با افزایش گروه شبکه‌ای‌ساز به آهستگی افزایش می‌یابد. افزایش مدول دینامیکی نشان‌دهنده درهم گره‌خوردگی بیشتر زنجیرهای PVA توسط زنجیرهای عامل شبکه‌ای ساز است. افزایش میزان پیوندهای بین زنجیرهای PVA، منجر به کاهش زمان پاسخ پلیمر به بارگذاری و باربرداری است که می‌توان آن‌را از جمله عوامل تاثیرگذار در این افزایش دانست. این مسئله در تحقیق دارویس (Darwis) نیز اشاره شده است که طی آن از پلی‌وینیل الکل برای تهیه دیسک بین مهره‌ای استفاده شد و درهم گره‌خوردگی زنجیر پلی‌وینیل الکل با عامل شبکه‌ای‌ساز، باعث افزایش استحکام کششی نمونه نهایی گردید [۳۰]. در مجموع می‌توان چنین عنوان کرد که بالاترین مقدار استحکام و مدول در هر دو بارگذاری استاتیک و دینامیک در بین تمام موارد مربوط به نمونه ۳ است.

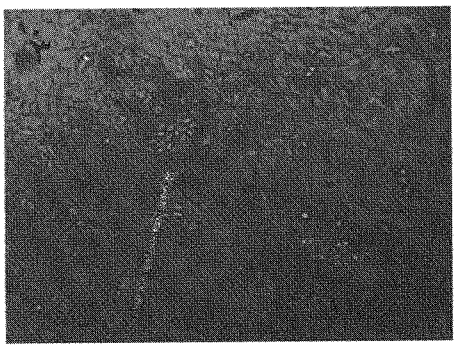
جدول (۲): استحکام کششی و درصد تغییر طول تا نقطه شکست.

نمونه	استحکام کششی (MPa)	تغییر طول تا نقطه شکست (٪)	مدول دینامیکی (N/mm)	تانژانت دلتا
PVA	۳۵/۳۳±۰/۸۳	۴۷۳/۶۸±۲۴/۲۱	۱۵۹/۷	۰/۳۹
۱	۱۴/۷۳±۰/۸۱	۲۱۹/۹۲±۳۶/۳۲	۳۱/۷۷	۰/۲۱
۲	۴۳/۰۵±۰/۸۶	۳۱۷/۴۲±۲۰/۵۲	۱۳۵/۳	۰/۳۳
۳	۵۴/۴۵±۱/۳۴	۲۷۸±۲۲/۶۷	۱۶۱/۲	۰/۴۹

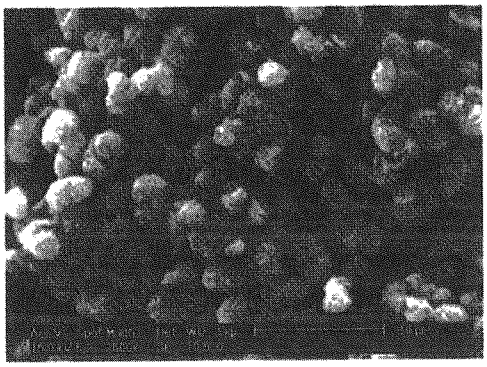
۳-٤- نتایج کشت سلولی

شکل (۳) کشت سلول‌های کندروسیت خرگوشی را پس از گذشت یک هفته در مجاورت نمونه‌ها و مقایسه آن با نمونه شاهد (ظرف کشت پلی‌استایرن) نشان می‌دهد. شکل (۴) تصویر میکروسکوپ الکترونی از رشد کندروسیت‌ها برروی نمونه ۳ را نشان می‌دهد. سلول‌ها ضمن حفظ مورفولوژی خود با یکدیگر نیز ارتباط برقرار کرده‌اند که حاکی از زیست‌سازگاری بالای نمونه است.

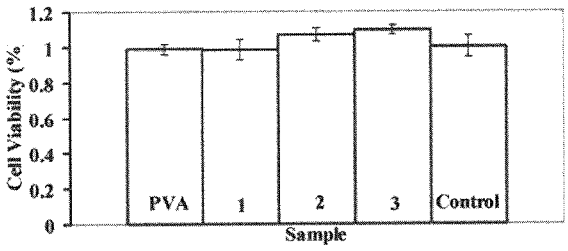
در شکل (۵) نتایج مربوط به آزمایش MTT و شکل (۶) نتایج مربوط به میزان ترشح GAG آورده شده است. تمامی نمونه‌ها زیست‌سازگاری بالایی نزدیک به نمونه شاهد را نشان می‌دهند. نمونه ۳ حاوی ترکیب پیش پلیمر پلی‌کاپرولاکتون دی‌ال ۲۰۰۰ گرم بر مول و هگزامتیلن دی‌ایزوسیانات بیشترین مقادیر از نظر تکثیر سلولی و ترشح GAG را به خود اختصاص داده است.



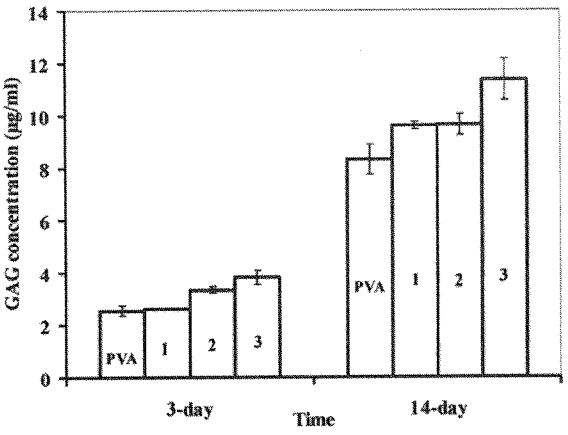
شکل (۳): تصاویر میکروسکوپ نوری مربوط به رشد سلول‌های کندروسیتی در مجاورت نمونه‌ها (بزرگنمایی ۱۰۰×).



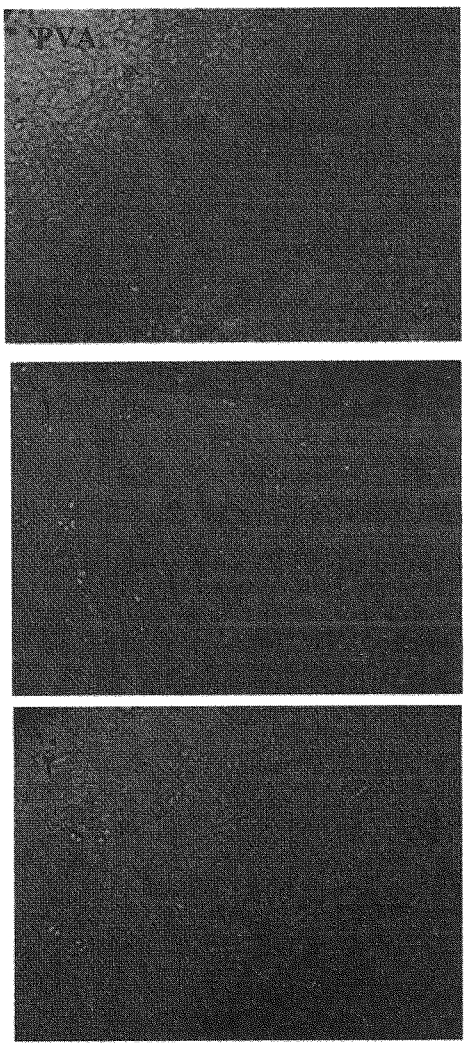
شکل (۴): تصویر میکروسکوپ الکترونی از سلول‌های کندروسیت برروی نمونه ۳ (بزرگنمایی ۲۵۰۰×).



شکل (۵): مقایسه نتایج آزمون MTT برای نمونه‌های ۱، ۲، ۳، PVA و مقایسه آن با نمونه شاهد.



شکل (۶): مقایسه مقادیر GAG ترشح شده از سلول‌ها در مجاورت نمونه‌های ۱، ۲، ۳، PVA.



به طورکلی گروه‌های یورتانی به دلیل تشابه زیاد به گروه‌های پروتئینی زیست‌سازگاری بالایی دارند. بنابراین هرچه مقدار این گروه در ترکیب پلیمر نهایی بیشتر باشد، انتظار بهبود پاسخ بیولوژیکی نیز می‌رود. علاوه براین پلی‌وینیل الکل یک هیدروژل محسوب می‌شود که به دلیل تشابه با خصوصیات بافت‌های بیولوژیکی، زیست‌سازگاری بالایی دارد و چسبندگی سلولی بالا و چسبندگی پروتئینی کمی را نشان می‌دهد. اما افزودن ترکیبات آبگریز نظیر پیش‌پلیمر یورتانی سنتز شده در این تحقیق، ضمن دارا بودن خصوصیات زیست‌سازگاری، باعث بهبود چسبندگی پروتئین‌ها به هیدروژل نهایی می‌شوند. رتنر (Ratner) عنوان کرده است که هرچه اتصال پروتئین به سطح محکم‌تر باشد، سلول‌ها بهتر می‌چسبند و سطوحی که در مقابل چسبیدن پروتئین‌ها مقاومت می‌کنند، چسبندگی سلولی کمتری دارند. در بیشتر موارد سطوح آب‌دوست در مقابل چسبیدن پروتئین‌ها مقاومت بیشتری نشان می‌دهند و سطوح آبگریز یک لایه پروتئین را به‌طور سطحی جذب می‌کنند [۳۱]. به نظر می‌رسد استفاده همزمان از ترکیبات آبگریز و آبدوست از نظر رفتار بیولوژیکی نتایج مناسبی را به همراه داشته است [۳۲].

٤- نتیجه‌گیری

در این تحقیق با هدف بهره‌گیری از خصوصیات دو ماده مختلف، هیدروژل‌های زیست‌سازگار برپایه پلی‌وینیل الکل تهیه و به کمک گروه‌های یورتانی با طول زنجیر متفاوت شبکه‌ای شدند. خواص فیزیکی و مکانیکی هیدروژل‌ها شامل جذب آب، استحکام کششی و مدول دینامیکی نمونه‌ها با یکدیگر مقایسه شدند. افزایش وزن مولکولی عامل شبکه‌ای ساز به دلیل افزایش درهم گره‌خوردگی زنجیرها، باعث کاهش جذب آب، افزایش استحکام و افزایش مدول دینامیکی نمونه‌ها گردید. بررسی تکثیر سلولی و ترشح پروتئوگلیکان‌ها توسط سلول‌های کندروسیت جداسازی شده حکایت از بهبود پاسخ سلول‌ها در حالت شبکه‌ای شده با گروه‌های یورتانی نسبت به پلی‌وینیل الکل خالص داشته است. این مسئله شاید به دلیل حضور هر دو عامل آب‌دوست و آبگریز در ترکیب باشد. ضمن اینکه گروه یورتان شباهت زیادی به گروه‌های آمینی در ترکیب پروتئین‌ها دارد.

٥- تقدیر و تشکر

نویسندگان مقاله وظیفه خود می‌دانند که از همکاران محترم بانک سلولی انستیتو پاستور ایران، جناب آقای دکتر امیر امان‌زاده، جناب آقای جلال‌الدین رادفر و جناب آقای شهرام آذری تشکر و قدردانی نمایند.

٦- مراجع

[۱] Wu, W.; Zhang, J.; Dong, Q.; Liu, Y.; Mao, T.; Chen, F.; "Platelet-rich plasma – A promising cell carrier for micro-invasive articular cartilage repair", Medical Hypotheses, Vol. 72 (4), p.p. 455-457, 2009.

[۲] Verli, D. M.; Warren, R. F.; Wickiewicz, T. L.; O'Brien, S. J.; "Current status of allograft meniscal transplantation", Clin Orthop., Vol. 303, p.p. 4-45, 1994.

[۳] Melrose, J.; Chuang, C.; Whitelock, J.; "Tissue engineering of cartilages using biomatrices", Journal of Chemical Technology and Biotechnology, Vol. 83, p.p. 444-463, 2008.

[۴] Chen, H. C.; Chang, Y. H.; Chuang, C. K.; Lin, C. Y.; Sung, L. Y.; Wang, Y. H.; Hu, Y. C.; "The repair of osteochondral defects using baculovirus-mediated gene transfer with de-differentiated chondrocytes in bioreactor culture", Biomaterials, Vol. 30 (4), p.p. 674-681, 2009.

[۵] Gunja, N. J.; Uthamanthil, R. K.; Athanasiou, K. A.; "Effects of TGF-β1 and hydrostatic pressure on meniscus cell-seeded scaffolds", Biomaterials, Vol. 30 (4), p.p. 565-573, 2009.

[۶] Appelman, T. P.; Mizrahi, J. H.; Seliktar, E. D.; "The differential effect of scaffold composition and architecture on chondrocyte response to mechanical stimulation", Biomaterials, Vol. 30 (4), p.p. 518-525, 2009.

[۷] Hoffman, A. S.; "Hydrogels for biomedical applications", Advanced Drug Delivery Reviews, Vol. 43, p.p. 3-12, 2002.

[۸] Kobayashi, M.; Oka, M.; "Characterization of a polyvinyl alcohol-hydrogel artificial articular cartilage prepared by injection molding", Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition, Vol. 15 (6), p.p. 741-751, 2004.

[۹] Bodugoz-Senturk, H.; Macias, C. E.; Kung, J. H.; Muratoglu, O. K.; "Poly(vinyl alcohol)–acrylamide hydrogels as load-bearing cartilage substitute", Biomaterials, Vol. 30 (4), p.p. 589-596, 2009.

[۱۰] Choi, J.; Bodugoz-Senturk, H.; Kung, H. J.; Malhi, A. S.; Muratoglu, O. K.; "Effects of solvent dehydration on creep resistance of poly(vinyl alcohol) hydrogel", Biomaterials, Vol. 28, p.p. 772-780, 2007.

[۱۱] Oka, M.; Gen, S.; Ikada, Y.; Okimatsu, H.; "Artificial intervertebral disc", US Patent No. 5458643, 1995.

[۱۲] Darwisa, D.; Stasicac, P.; Razzakb, M. T.; Rosiak, J. M.; "Characterization of poly(vinyl alcohol) hydrogel for prosthetic intervertebral disc nucleus", Radiation Physics and Chemistry, Vol. 63 (3-6), p.p. 539-542, 2002.

[۱۳] Li, Y.; Gao, J.; Liu, G.; Gu, Z.; Ma, Y.; Xue, H.; "Swelling characterization of poly (vinyl alcohol) hydrogel for prosthetic intervertebral disc nucleus", Vol. 22 (5), p.p. 995-8, 2005.

[۱۴] Kobayashi, M.; Chang, Y. S.; Oka. M.; "A two year in vivo study of polyvinyl alcohol-hydrogel (PVA-H) artificial meniscus", Biomaterials, Vol. 26 (16), p.p. 3243-8, 2005.

[۱۵] Zheng-Qiu, G.; Jiu-Mei, X.; Xiang-Hong, Z.; "The development of artificial articular cartilage PVA-hydrogel", Biomed Mater Engng, Vol. 8, p.p. 75-81, 1998.

[۱۶] Swieszkowski, W.; Ku, D. N.; Berseec, H. E. N.; Kurzydlowski, K. J.; "An elastic material for cartilage replacement in an arthritic shoulder joint", Biomaterials, Vol. 27, p.p. 1534-1541, 2006.

[۱۷] Brindle, T.; Nyland, J.; Johnson, D. L.; "The Meniscus: Review of Basic Principles with Application to Surgery", Journal of Athletic Training, Vol. 36 (2), pp. 160–169, 2001.

[۱۸] Szycher, M.; Handbook of Polyurethanes, CRC Press, New York, 1999.

[۱۹] Buma, P.; Ramrattan, N. N.; van Tienen, T. G.; Veth, R. P. H.; "Tissue engineering of the meniscus", Biomaterials, Vol. 25, p.p. 1523-1532, 2004.

[۲۰] Buckwalter, J. A.; Mankin, H. J.; "Articular Cartilage Repair and Transplantation", Arthritis & Rheumatism, Vol. 41 (8), p.p. 1331-1342, 1998.

[۲۱] Van Tienen, T. G.; Heijkants, R. G.; de Groot, J.; Pennings, H. A. J.; Poole, A. R.; Veth, R. P.; Buma, P.; "Presence and mechanism of knee articular cartilage degeneration after meniscal reconstruction in dogs", Osteoarthritis Cartilage, Vol. 11, p.p. 78-84, 2003.

[۲۲] Stauffer, S. R.; Peppas, N. A.; "Poly(vinyl alcohol) Hydrogels Prepared by Freezing-thawing Cyclic Processing", Polymer, Vol. 33, p.p. 3932-3936, 1992.

[۲۳] Wu, Q.; Yoshino, T.; Sakabe, H.; Zhang, H.; Isobe, S.; "Chemical modification of zein by bifunctional polycaprolactone (PCL)", Polymer, Vol. 44, p.p. 3909-3919, 2003.

[۲۴] Rao, M. A.; Rheology of fluid and semisolids, 1st ed., An Aspen pub., Maryland, p.p. 319-368, 1999.

[۲۵] Guelcher, S. A.; Patel, V.; Gallacher, K. M.; Connolly, S.; Didier, J. E.; Doctor, J. S.; Hollinger, J. O.; "Synthesis and In Vitro Biocompatibility of Injectable Polyurethane Foam Scaffolds", Mary Ann Liebert, Inc., Tissue Engineering, Vol. 12 (5), p.p. 1247-1259, 2006.

[۲۶] Zhang, J. Y.; Beckman, E. J.; Piesco, N. P.; Agarwal, S.; "A new peptide-based urethane polymer: synthesis, biodegradation, and potential to support cell growth in vitro", Biomaterials, Vol. 21, p.p. 1247-1258, 2000.

[۲۷] Gross, B.; Mathematical structure of the Theories of Viscoelasticity, Hermann, Paris, 1953.

[۲۸] Malkin, A. Y.; Rheology Fundamentals, Chemtech pub., p.p. 250-258, 1994.

[۲۹] Lim, K. K.; Cohen, P. E.; Tschoegl, N. W.; Multicomponent Polymer Systems, ACS, Washington, 1971.

[۳۰] Darwis, D.; Stasica, P.; Razzak, M. T.; Rosiak, J. M.; "Characterization of poly(vinyl alcohol) hydrogel for prosthetic intervertebral disc nucleus", Radiation Physics and Chemistry, Vol. 63, pp. 539-542, 2002.

[۳۱] Ratner, B.; Hoffman, A. S.; Schoen, F.J.; Lemons, J. E.; Biomaterial science, an introduction to materials in medicine, Academic Press, New York, p. 197, 2004.

[۳۲] Mahmood, T. A.; Miot, S.; Frank, O.; Martin, I.; Riesle, J.; Langer, R.; Van Blitterswijk, C. A.; "Modulation of Chondrocyte Phenotype for Tissue Engineering by Designing the Biologic-Polymer Carrier Interface", Biomacromolecules, Vol. 7 (11), p.p. 3012-3018, 2006.