Archive of SID

طراحی و ساخت نانو هیدروژلهای سه‌بعدی بر پایه پپتیدهای خود آراینده جهت مهندسی بافتهای نرم

الهه روشنی یساقی[۱]، مجید تقدیر[۲]، محمدعلی شکرگزار[۳] و حسین نادری منش[۱،۲]***

[۱] تهران، دانشگاه تربیت مدرس، دانشکده علوم زیستی، گروه نانو بیوتکنولوژی

[۲] تهران، دانشگاه تربیت مدرس، دانشکده علوم زیستی، گروه بیوفیزیک

[۳] تهران، انستیتو پاستور ایران، بخش بانک سلولی

تاریخ دریافت: ۹۴/۶/۱ تاریخ پذیرش: ۹۴/۸/۱۵

چکیده

هیدروژلهای تزریقی ازجمله مواد مناسب در مهندسی بافتهای نرم هستند. امروزه یکی از اهداف بیولوژی سنتزی، طراحی و تولید زیست مواد هیدروژل شونده است که ضمن داشتن ویژگیهای فیزیکی مناسب قادر به خودآرایی درجا در شرایط درون تنی باشند. پپتیدهای دوگانه دوست گروهی از این مواد هستند. شبیه‌سازی هرچه بهتر ماتریکس خارج سلولی بافتهای نرم با هیدروژلهای حاصل از خودآرایی پپتیدهای دوگانه‌دوست، مستلزم بهینه‌سازیهای زیستی، شیمیایی و فیزیکی است. در این تحقیق هدف ساخت هیدروژلهای سه‌بعدی نانوکامپوزیتی با خواص زیستی و مکانیکی متفاوت است که طی فرآیند هم‌آرایی و تنها با تغییر نسبت پپتید دوگانه‌دوست و دو مشتق زیست فعال آن، به وجود آمده باشند. برای بهینه نمودن فرآیند هم‌آرایی و بررسی اثرات احتمالی ناشی از وجود توالیهای مختلف زیست فعال بر ویژگیهای هم‌آرایه‌های نهایی از روشهای طیف‌سنجی همچون FTIR و CD در کنار روشهای میکروسکوپی مانند TEM و AFM استفاده‌شده است. نتایج به‌دست‌آمده حاکی از آن است که نه‌تنها مقادیر هر یک از مولکولها در هم‌آرایی بلکه درصد آب‌گریزی و آب‌دوستی بخش زیست فعال آنها نیز بر قدرت و جهت‌گیری پیوندهای هیدروژنی، میانکنشهای بین فیبری و پایداری نهایی هیدروژلها مؤثر است. بنابراین می‌توان بدون تغییر در بخشهای اصلی تشکیل‌دهنده مولکولهای دوگانه‌دوست و تنها با طراحی هم‌آراییهای مناسب میان این مولکولها و مشتقاتشان به هیدروژلهایی با خواص متفاوت رسید.

واژه‌های کلیدی: پپتید دوگانه‌دوست، خودآرایی، هم‌آرایی، هیدروژل، نانوفیبر، خواص مکانیکی

* نویسنده مسئول، تلفن: ۰۲۱۸۲۸۸۴۴۱۰، پست الکترونیکی: naderman@modares.ac.ir

** نویسنده مسئول، تلفن:۰۲۱۶۶۴۹۲۵۹۵، پست الکترونیکی: mashokrgozar@pasteur.ac.ir

مقدمه

هیدروژلهای تزریقی ازجمله مواد مناسب در مهندسی بافتهای نرم هستند. این مواد ازنظر محتوای آبی شبیه بافتهای نرم بوده و ضمن محصور کردن (Entrapment) همگن سلولها شرایط مناسبی را برای تبادل مناسب متابولیتها، گازها و مواد مغذی برای آنها فراهم می‌کنند. از مزایای این مواد می‌توان به توانایی ژل شدن در محل (In situ)، پر کردن ناحیه صدمه‌دیده و اتصال مناسب با آن بدون نیاز به بخیه زدن، زیست سازگاری (Biocompatibility) و زیست تخریبی (Biodegradability) اشاره کرد (۱۴ و ۲۰). در دهه گذشته مواد و مشتقات طبیعی و مصنوعی متعددی برای تولید هیدروژلهای قابل تزریق در مهندسی بافتهای نرم

www.SID.ir

Archive of SID

استفاده‌شده‌اند. پلیمرهای طبیعی هرچند زیست سازگار و زیست تخریب بوده و دارای پیامهای مناسب رشد سلولها هستند ولی استفاده از آنها همواره با محدودیتهایی همچون پاسخهای ایمنی احتمالی و تخریب سریع در شرایط درون تنی (In vivo) همراه بوده است. پلیمرهای مصنوعی نیز با وجود آنکه محدودیتهای پلیمرهای طبیعی را از نظر سرعت تخریب بالا ندارند ولی فاقد هرگونه پیام مناسب برای رشد و تکثیر سلولی بوده و امکان بروز پاسخهای ایمنی پس از استفاده از این هیدروژلهای مصنوعی وجود دارد (۲۰). اما امروزه با ایجاد زمینه مطالعاتی میان‌رشته‌ای جدیدی تحت عنوان بیولوژی سنتزی (Synthetic biology)، طراحی و تولید مواد جدیدی که خواص مناسب هر دو نوع پلیمرهای طبیعی و مصنوعی را در خود داشته باشند، رشد فزاینده‌ای داشته است (۴). به عنوان مثال از این زیست مواد جدید می‌توان به پپتیدهای دوگانه‌دوست (Peptide amphiphiles) اشاره کرد. پپتیدهای دوگانه‌دوست گروهی از بیومواد باقابلیت خودآرایی (Self-assembly) هستند که در حضور محلولهای آبی آرایه‌های فیبری با ابعاد نانومقیاس ایجاد می‌کنند. به عبارتی همان‌طور که از تعریف خودآرایی قابل استنباط است این مواد با قرار گرفتن در شرایط خاص و بدون اعمال نیروی بیرونی تنها با برقراری پیوندهای غیر کوالان همچون میانکنشهای آب‌گریز، واندروالسی، یونی و هیدروژنی قادرند به ساختارهای فوق مولکولی (Supramolecularstructures) منظمی سازمان‌دهی شوند. کلیه اعضای این بیومواد دارای یک دم غیر پپتیدی و یک سر پپتیدی هستند. بخش دمی اغلب شامل یک آلکیل (۱۰ تا ۲۲ کربنه) بوده و بخش سری خود دارای زیربخشهایی است که هرکدام بسته به وظیفه‌ای که در مولکول نهایی ایفا می‌کنند دارای ویژگیهای منحصر به فرد فیزیکی-شیمیایی هستند (۵). دم آلکیلی وظیفه تأمین ویژگی آب‌گریزی در مولکول را به عهده دارد و طی فرآیند خودآرایی بخش مرکزی نانو فیبرها را تشکیل می‌دهد. زیر بخشهای پپتیدی به ترتیب نزدیکی به دم آلکیلی شامل یک توالی اسیدآمینه‌ای آب‌گریز و تکرار کوتاهی از یک اسیدآمینه باردار است. اولین بخش پپتیدی به دلیل آب‌گریز بودن ضمن افزایش خاصیت آب‌گریزی کل مولکول در تشکیل ساختار صفحات بتا بین‌مولکولی مشارکت می‌کند و نقش بسیار مهمی را در هدایت شکل نانو ساختار نهایی از وزیکول به فیبر بر عهده دارد، بخش اسیدآمینه‌های باردار در انحلال بهتر مولکول در محیط آبی مؤثر است ضمن اینکه آغاز خودآرایی با غربال بارهای این ناحیه همراه است. البته لازم به ذکر است در مشتقات زیست فعال (Bioactive derivatives) این مولکولها دو جزء پپتیدی دیگر به بخشهای یادشده اضافه می‌شود که شامل ترادفی از اسیدآمینه‌های کوچک با انعطاف‌پذیری بالا و نهایتاً بخش زیست فعال است. توالی اسیدآمینه‌ای با انعطاف‌پذیری بالا به‌عنوان رابط (Linker) عمل کرده و ضمن اتصال بخش زیست فعال (Bioepitope) به دیگر بخشهای مولکول از اثرات احتمالی و ممانعتهای فضایی بخش زیست فعال بر تشکیل ساختار صفحات بتا جلوگیری می‌کند. آخرین بخش شامل توالی زیست فعال است که نوع ترادف اسیدآمینه‌ای آن بسته به هدف و نوع بافت موردنظر تعیین می‌شود و می‌تواند شامل مشتقات توالیهای متصل شونده به گیرنده‌های سطح سلول، توالیهای نماینده فاکتورهای رشد یا پروتئینهای حیاتی ماتریکس خارج سلولی و یا توالیهای متصل شونده به این مواد باشد (۵، ۶، ۷ و ۱۱). در دهه گذشته مکانیسم خودآرایی و هیدروژل شدن این بیومواد مشخص‌شده است. خودآرایی در این مولکولها با قرار گرفتن در محیطهای آبی و در حضور نمکهای چند ظرفیتی یا تغییرات pH به‌عنوان غربالگرهای (Screeners) نیروهای دافعه بین‌مولکولی، آغازشده و با برقراری برهمکنشهای آب‌گریز بخشهای آلکیلی و تشکیل ساختارهای دوم بتا بین‌مولکولی، هیدروژلی با بافت نانو فیبری (Nano-fibrillar texture) حاصل می‌شود (۳، ۵، ۱۶ و ۲۴). امروزه یکی از مسائل قابل‌توجه در این زمینه بررسی اثرات هم‌آرایی (-Co

www.SID.ir

Archive of SID

assembly) یک پپتید دوگانه‌دوست با مشتقات زیست فعال متفاوت خود بر ویژگیهای فیزیکی، شیمیایی و زیستی نانو کامپوزیتهای حاصله است. چنین مطالعاتی نه‌تنها مبدع روشی نوین در تولید نانو مواد جدید هستند بلکه گامی مؤثر در توسعه فناوری پپتیدهای دوگانه‌دوست در شبیه‌سازی زیستی هر چه‌بهتر ماتریکس خارج سلولی (Extra cellular matrix) جهت فرآیندهای ترمیمی یا مهندسی بافت به شمار می‌روند. داده‌های بسیاری بر این نکته تأکید دارند که فارغ از اثرات مؤثر حضور و دانسیته توالیهای زیست فعال مناسب، همخوانی خواص مکانیکی داربست با ماتریکس خارج سلولی ناحیه صدمه‌دیده نیز یکی از فاکتورهای بسیار مؤثر در تعیین سرنوشت سلولها و تنظیم رفتارهایی همچون تکثیر، مهاجرت و تمایز آنها است (۸، ۹، ۱۰، ۱۲، ۱۵، ۱۷ و ۱۹). بنابراین در طراحی یک ماتریکس خارج سلولی مصنوعی بر پایه پپتیدهای دوگانه-دوست به‌عنوان یک نانو داربست (Nano-scaffold) سه‌بعدی، ضمن توجه به بهینه‌سازی خواص زیستی این هیدروژل بسته به بافت هدف، باید به همخوانی مؤلفه‌های مکانیکی آن نیز توجه ویژه داشت. هدفی که از طرق مختلفی چون تغییر ساختار شیمیایی پپتیدهای دوگانه-دوست، استفاده از نسبتهای مختلف مشتقات زیست فعال آنها به‌عنوان واحدهای هم‌آراینده و تغییر شرایط خودآرایی محقق می‌شود (۵ و ۲۳). در بررسی حاضر با بهینه‌سازی شرایط هم- آرایی یک پپتید دوگانه‌دوست و دو مشتق زیست فعال آن و تغییر نسبتهای اجزاء مشارکت‌کننده در این فرآیند به نانو کامپوزیتهایی بهینه ازنظر شرایط زیستی و مکانیکی جهت مهندسی بافتهای نرم پرداخته شده است. داده‌های حاصل نشان می‌دهند، غلظت یونهای نمکی در بافر ژل کننده (Gelation buffer) و تغییر مقادیر هرکدام از پپتیدهای دوگانه‌دوست می‌توانند بر ویژگیهای ساختار نهایی خودآرای (Assembly) مؤثر بوده و بر خواص مکانیکی هیدروژل نهایی تأثیر به سزایی داشته باشند.

مواد و روشها

مواد: رزین وانگ (Wang resin) و کلیه اسیدهای آمینه از شرکت BACHEM (سویس) تهیه شد. تمامی حلالهای آلی شامل دی متیل فرآمید (Dimethylformamide, DMF)، بنزو تریازولیل تترامتیل اورانیوم تترافلوروبورات (O-(Benzotriazol-1-yl)-N,N,N′,N′-tetramethyluronium tetrafluoroborate, TBTU)، دی ایزو پروپیل اتیل امین (N,N-Diisopropylethylamine, DIEA)، متیل پیرولیدون (N-Methyl-2-pyrrolidone, NMP)، پایپریدن (Piperidine)، تری فلوئورواستیک اسید (Trifluoroacetic acid, TFA)، تری ایزو پروپیل سیلان (Triisopropylsilane, TIS)، دی اتیل اتر (Diethyl ether)، اتانول، ایزوپروپانول، استونیتریل (Acetonitrile) و موادی مثل نین هیدرین (Ninhydrin) آمونیوم هیدروکسید، سدیم هیدروکسید، پالمتیک اسید (Plamitic acid) و نمکهای کلریدی سدیم، پتاسیم و کلسیم از شرکت Merck (آلمان) خریداری شد.

ساخت پپتیدهای دوگانه‌دوست: ساخت پپتیدهای دوگانه-دوست به صورت دستی بر اساس روش فاز جامد (Solid-phase methodology) بر روی رزین وانگ انجام شد. به طور خلاصه، در گام اول رزین سه بار به مدت پنج دقیقه در حلال آلی دی متیل فرم آمید قرار داده شد تا کاملاً متورم (Swelled) شود. سپس رزین متورم شده سه بار به مدت پنج دقیقه با محلول پایپریدین ۲۰ درصد (حجمی حجمی در دی متیل فرم آمید) تحت تیمار قرار گرفت تا عامل Fmoc محافظت‌کننده گروههای آمین آن برداشته شود. در مرحله بعد رزین بی‌حفاظ شده (Deprotected resin) به مدت چهل دقیقه در مجاورت محلول اتصال (Coupling solution) قرار گرفت. محلول اتصال شامل اسیدآمینه حفاظت‌شده با Fmoc، محلولهای آلی TBTU (۱ مولار در حلال دی متیل فرم آمین) و DIEA (۰/۴ مولار در حلال دی متیل فرم آمین) است که به ترتیب در مقادیر

www.SID.ir

Archive of SID

چهار برابر مکانهای فعال رزین، ۰/۹۵ و ۲/۵ برابر مقدار اسیدآمینه با یکدیگر مخلوط شده‌اند. اتصال اسیدآمینه‌های بعدی تا آخرین اسیدآمینه طبق روش ذکرشده انجام شد. لازم به ذکر است پس از پایان هر مرحله حذف Fmoc و اتصال اسیدآمینه، رزین ابتدا با حلال دی متیل فرم آمید سه بار به مدت ۵ دقیقه شستشو شد و مقدار بسیار اندکی از آن تحت آزمون کایسر (kaiser) قرار گرفت. در صورت موفقیت‌آمیز بودن هرکدام از فرآیندهای مذکور به ترتیب رزینها رنگهای آبی و زرد را نشان می‌دادند. آلکیله کردن پپتیدهای ساخته‌شده بعد از تأیید حذف Fmoc از آخرین اسیدآمینه آنها انجام شد. این فرآیند مشابه مرحله اتصال اسیدهای آمینه است و محلول اتصال آن نیز با همان نسبتهای ذکرشده تهیه گردید. با این تفاوت که در این محلول به جای اسیدآمینه از پالمتیک اسید استفاده شد. با منفی شدن نتیجه آزمون کایسر اتصال اسید چرب به آخرین اسیدآمینه تأیید شد. جهت جدا کردن رزین از پپتیدهای دوگانه‌دوست، رزین مرحله قبل به مدت ۲/۵ تا ۳ ساعت در مجاورت کوکتل هضم (Cleaving couctel) قرار گرفت. محتوای این کوکتل شامل تری فلوئورو استیک اسید: تری ایزو پروپیل سیلان: آب ($TFA:TIS:H_20$) است که با نسبتهای ۲/۵: ۲/۵: ۹۵ با یکدیگر مخلوط شده‌اند. پس از جداسازی، محلول پپتید دوگانه‌دوست تا رسیدن به نقطه ابری (Cloudy point) و حذف تری فلوئورواستیک اسید، در دستگاه خلأ چرخان (Rotary evaporator) قرار داده شد. محلول باقی‌مانده بعد از مخلوط شدن با دی اتیل اتر سرد به مدت یک شب در دمای ۲۰- درجه سانتی گراد قرار داده شد تا پپتیدهای دوگانه‌دوست به‌خوبی رسوب کنند. مخلوط حاصل به مدت ۱۰ دقیقه در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد و ۲۰۰۰g سانتریفیوژ شده و سه بار با دی اتیل اتر سرد شستشو داده شد و برای انحلال رسوب پپتید دوگانه‌دوست حاصل در آب pH آن با کمک آمونیوم هیدروکسید به ۹ رسانده شد. تخصیص پپتیدهای دوگانه-دوست ساخته‌شده توسط دستگاه HPLC (Agilent, Inc. Model 1100) انجام گرفت. بافرهای HPLC شامل آب و استونیتریل بود که به هرکدام به میزان ۰/۱ درصد حجمی آمونیوم هیدروکسید اضافه شد. جمع‌آوری نمونه در طول‌موج جذبی ۲۲۰ نانومتر انجام شد. محصول نهایی توسط طیف‌سنجی جرمی (Mass spectrometry) تأیید شد.

خواص فیزیکی- شیمیایی پپتیدهای دوگانه‌دوست: خواص فیزیکی- شیمیایی بخش پپتیدی پپتیدهای دوگانه-دوست با استفاده از نرم‌افزار(Protean (DNASTAR, Inc. مورد بررسی قرارگرفته شد. خواص ارائه‌شده شامل تعیین توزیع بارهای مثبت یا منفی و متوسط آنها در هر پپتید و تعیین بخشهای آب‌گریز، سطحی و منعطف هر پپتید به ترتیب بر اساس درصد آب‌گریزی، احتمال تمایل قرارگیری آنها در سطح و انعطاف‌پذیری ترادف اسیدآمینه‌ای آن، می‌باشد.

تهیه هیدروژل: محتوای، توالی و بار هرکدام از پپتیدهای دوگانه‌دوست مورد آزمایش در جدول ۱ آورده شده است. در این بررسی سه نوع محلول پپتیدی با غلظت نهایی یکسان ۱/۴ درصد وزنی/حجمی ولی با محتوای متفاوتی از هر سه نوع پپتید دوگانه‌دوست تهیه شد. برای آماده‌سازی این محلولها ابتدا محلول حاوی هر پپتید به طور جداگانه در ظروف شیشه‌ای تهیه‌شده و سپس با توجه به جدول ۲ با یکدیگر مخلوط شد. نکته قابل‌توجه آنکه به خاطر ماهیت اسیدی پپتیدهای‌دوگانه دوست مورداستفاده در این بررسی، به‌محض اضافه کردن پودر آنها به آب با pH خنثی، pH محلول سریعاً و به شدت اسیدی شده و پپتیدها رسوب می‌کردند. بنابراین برای رسیدن به یک محلول شفاف پپتیدی مقداری محلول نیم مولار سدیم هیدروکسید به صورت قطره‌قطره به محلول اضافه گردید تا با رسیدن pH به حدود ۷/۵-۸ محلولهای پپتید دوگانه‌دوست موردنظر فراهم شود. فرآیند هم‌آرایی این مولکولهای پپتیدی و ایجاد هیدروژل با اضافه کردن بافر ژل کننده (بافر

www.SID.ir

Archive of SID

فسفات حاوی مقدار مناسبی نمک کلرید کلسیم) به محلول پپتیدی و انکوباسیون (Incubation) آن در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد به مدت ۳۰ دقیقه انجام شد.

جدول ۱- توالی و بار پپتیدهای دوگانه‌دوست

پپتیدهای دوگانه‌دوست	توالی	بار
پپتید دوگانه‌دوست اول	$C_{H3}(CH_2)_{14}CO.V_3A_3E_3$	-۴
پپتید دوگانه‌دوست دوم	$C_{H3}(CH_2)_{14}CO.V_3A_3E_3G_3K_3RGDFK$	-۱
پپتید دوگانه‌دوست سوم	$HSNGLPLG_3E_3A_3V_3(K)\text{-}CO(CH2)_{14}CH_3$	-۲

بار کلی محلولهای پپتید دوگانه‌دوست مورداستفاده در هر هیدروژل (در pH=۸-۷/۵) در جدول ۲ آورده شده است. بنا بر محاسبات تئوری می‌تواند یک یون کلسیم به ازای هر دو بار منفی محلول پپتیدی جهت غربال بار آن در نظر گرفته شود. هرچند این محاسبات به لحاظ تئوری منطقی و صحیح به نظر می‌رسد اما شاید در عمل احتساب یک یون به ازاء هر دو بار منفی نتیجه مطلوبی ندهد. بنابراین غلظت تئوری یون کلسیم مورد نیاز با فرض اینکه هر یون کلسیم می‌تواند با دو بار منفی میانکنش دهد و یا به خاطر ممانعتهای فضایی مولکول نتواند همزمان با دو بخش آن ارتباط برقرار کند به ترتیب ۲۰ یا ۴۰ میلی مولار محاسبه شد. اما در عمل برای به دست آوردن غلظت بهینه نمک کلرید کلسیم در بررسی حاضر فرآیند ژل شدن هیدروژلهای طراحی‌شده در حضور بافر فسفات (Phosphate buffer saline,PBS) حاوی غلظتهای ۲۵، ۴۰، ۶۰ و ۸۰ میلی مولار کلرید کلسیم مورد بررسی قرار داده شد.

جدول ۲- مقادیر وزنی حجمی پپتیدهای دوگانه‌دوست و بار کلی محلول پپتید دوگانه‌دوست هر هیدروژل

پپتیدهای دوگانه‌دوست / هیدروژل ها	پپتید دوگانه‌دوست اول (میلی‌گرم در ۱۰۰ میکرو لیتر)	پپتید دوگانه‌دوست دوم (میلی‌گرم در ۱۰۰ میکرو لیتر)	پپتید دوگانه‌دوست سوم (میلی‌گرم در ۱۰۰ میکرو لیتر)	بار کلی (pH=۸-۷/۵)
خودآرایی پپتید دوگانه‌دوست اول	۱/۴	-	-	-۴۵/۰۴
هم‌آرایی ۱	۱/۱	۰/۲	۰/۱	-۳۹/۷۹
هم‌آرایی ۲	۰/۹۹	۰/۴	۰/۱	-۳۶/۸۲
هم‌آرایی ۳	۱	۰/۲	۰/۲	-۳۷/۲۳

تعیین خصوصیات هیدروژلها: صحت ساخت پپتیدها و تخلیص آنها از طریق HPLC و طیف‌سنجی جرمی تأیید شد. اما به‌منظور بررسی خصوصیات هیدروژلهای تهیه‌شده از روشهای مختلفی دیداری مانند آزمون ویال واران (Inverted vial) و رنگ هیدروژل، روشهای طیف‌سنجی همچون طیف‌سنجی تبدیل فوریه فروسرخ (Fourier Transform Infrared Spectroscopy, FTIR) و دورنگ نمایی حلقوی (Circular Dichroism,CD)، و روشهای میکروسکوپی مانند میکروسکوپ الکترونی عبوری (Transmission Electron Microscopy, TEM) و

www.SID.ir

Archive of SID

میکروسکوپ نیروی اتمی (Atomic Force Microscopy, AFM) استفاده شد.

آزمون ویال واران و رنگ هیدروژل: روش ویال واران ازجمله روشهای شهودی معتبری است که از آن به منظور تعیین شرایط بهینه تشکیل هیدروژل استفاده شد. در این روش پس از اتمام فرآیند ساخت هیدروژلها در شرایط مورد بررسی، ویالها واران شدند. اگر شرایط آزمایش مناسب بود و فرآیند ژل شدن به‌خوبی صورت پذیرفته باشد با واران نمودن ویال، ژل در ته ظرف باقی می‌ماند ولی در غیر این صورت محتوای ویال که حاوی محلول پپتیدی و عامل ژل شونده است بر روی دیواره‌ها روان می‌شد. در ضمن علاوه بر جمع‌آوری داده‌های آزمون مربوطه طی همین بررسی بر اساس شفافیت و کدورت ژلهای تولیدشده داده شهودی تکمیلی دیگری نیز به دست آمد.

طیف‌سنجی تبدیل فوریه فروسرخ (FTIR): جهت تأیید تشکیل ساختار دوم صفحات بتا در حین خودآرایی از دستگاه FTIR با مدل IR100 استفاده شد. آماده‌سازی نمونه جهت تهیه طیف FTIR شامل مراحل زیر است. پس از اتمام مراحل تهیه هیدرژل، نمونه‌های به‌دست‌آمده لیوفلیزه شد. سپس همراه با نمک بروميد پتاسیم به فرم قرص درآورده شد و داده‌های هر نمونه در محدوده اعداد موجی ۴۰۰۰ تا $۴۰۰cm^{-1}$ جمع‌آوری شد. این کار سه تکرار شد.

طیف‌سنجی دورنگ نمایی حلقوی (CD): از این آزمون جهت بررسی تشکیل ساختار صفحات دوم بتا که تأییدی بر القاکننده بودن شرایط اعمال‌شده در فرآیند هم‌آرایی و ژل شدن است استفاده شد. داده‌های این بخش با استفاده از دستگاه JASCO J-715 (J-715 CD spectrometer, JASCO Inc., Easton, MD) در دمای اتاق، با کووت کوارتز ۱ میلی‌متری، سرعت روبش ۱۰۰ نانومتر بر دقیقه و دامنه طول‌موج روبش ۱۸۵ تا ۲۵۰ نانومتر با فواصل ۰/۱ نانومتر به دست آمد. آماده‌سازی هر سه هیدروژل به صورت مستقیم در کووت انجام شد و پس از اتمام زمان انکوباسیون در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد نمونه‌ها برای خوانش آماده شدند. این کار سه بار تکرار شد و پیش از رسم طیفهای مربوطه اثر ضمیمه بافر از آنها کسر شد.

میکروسکوپ الکترونی عبوری (TEM): جهت اطمینان از ساختار نانو فیبری بافت هیدروژلها و تعیین ابعاد دقیق این نانو ساختار توسط میکروسکوپ Philips CM30، تصاویری از نمونه‌ها در شرایط رقیق بر روی گرید مسی با پوشش کربن (carbon-coated copper grid) و اندازه مش (Mesh) ۳۰۰ اینچ در ولتاژ ۱۵۰ کیلووات تهیه شد. روش قطره (Droplet method) برای تهیه نمونه‌ها استفاده شد. در این روش هیدروژلها پس از استراحت به مدت یک‌شب در دمای اتاق به هدف پیر شدن (Aging) با آب پانزده بار رقیق شدند. ۱۰ میکرو لیتر از هر نمونه بر سطح کدر گرید قرار داده شد و پس از گذشت حدوداً یک دقیقه و اطمینان از جذب سطحی نمونه توسط گرید، ۱۰ میکرو لیتر از رنگ اورانیل استات (uranyl acetate) (یک درصد وزنی حجمی در آب) به آن اضافه شد و درنهایت رطوبت اضافی توسط کاغذ صافی به‌آرامی از گوشه گرید حذف گردید.

میکروسکوپ نیروی اتمی (AFM): خواص مکانیکی هیدروژلها با کمک میکروسکوپ نیروی اتمی (model nano wizard II, JPK, Germany) با تیپ کانوایکال و ثابت فنر ۰/۱۲ N/m اندازه‌گیری شد. بعد از تهیه هر سه هیدروژل، ظرف حاوی هیدروژل با بافر فسفات پر شد به‌طوری‌که نوک تیپ برای برقراری تماس با نمونه درون محلول قرار گیرد. مدول یانگ (Yung modulus) هر نمونه بر اساس معادله زیر و با انطباق (Fitting) داده‌های نمودار انحراف کنتیلور در مقابل جابجایی پیزو بر مدل conic Hertz به دست آمد. در این معادله ν ضریب پواسان است و مقدار آن معمولاً ۰/۵ در نظر گرفته می‌شود، F نیروی

www.SID.ir

Archive of SID

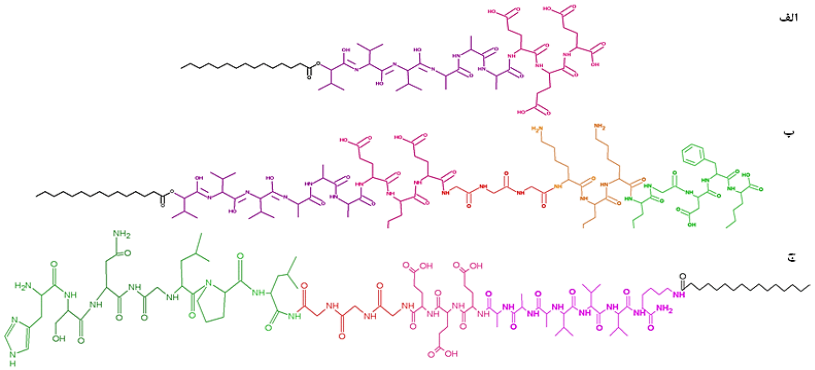
اعمالی، δ میزان فرورفتگی نمونه و α نیم زاویه راس مخروط است.

$$E = \frac{F(1-\nu^2)\pi}{2\delta^2 \tan\alpha}$$

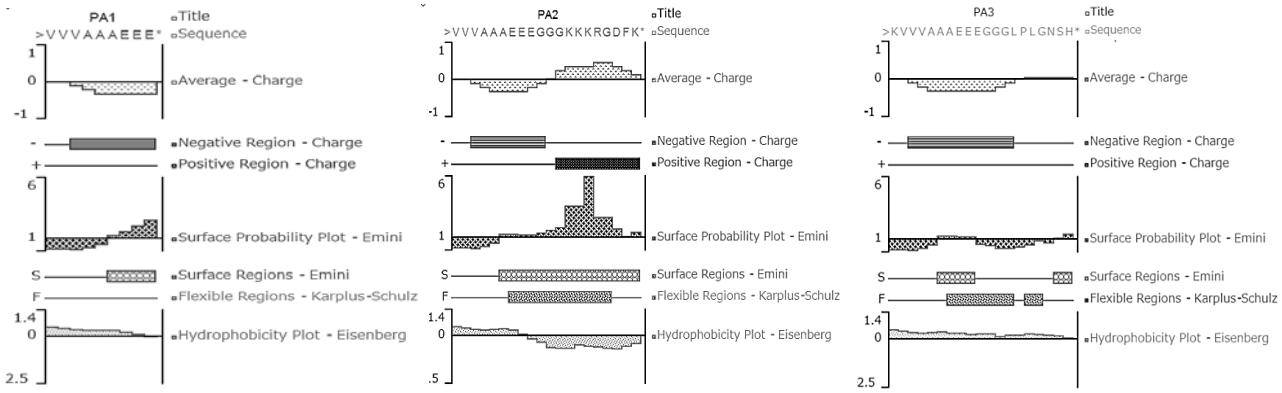
نتایج

خواص فیزیکی- شیمیایی پپتیدهای دوگانه‌دوست:

ساختار مولکولی و خواص فیزیکی- شیمیایی بخشهای پپتیدی پپتید دوگانه‌دوست اول و دو مشتق زیست فعال آن در شکل های ۱ و ۲ آورده شده است. مؤلفه‌های مورد بررسی نشان می‌دهند که بار نهایی کلیه پپتیدها منفی بوده و در ناحیه منعطف آنها تجمع یافته است و بنابراین به لحاظ تئوری این احتمال وجود دارد که هر دو بار منفی آنها می‌تواند با یک یون کلسیم به‌طور همزمان غربال شود. ناحیه تشکیل‌دهنده بخش زیست فعال پپتید دوگانه‌دوست دوم بیشتر از اسیدآمینه‌های باردار تشکیل‌شده و به قرارگیری در سطح، برقراری میانکنشهای الکتروستاتیک و پلهای نمکی تمایل دارد. بخش اعظم ترادف زیست فعال پپتید دوگانه‌دوست سوم ماهیت آب گریز داشته و احتمالاً به دلیل عدم تمایل به در معرض بودن با محیط در میانکنشهای آب‌گریز مشارکت خواهند کرد.



شکل ۱- ساختار شیمیایی الف) پپتید دوگانه‌دوست اول فاقد هرگونه بخش زیست فعال ب) پپتید دوگانه‌دوست دوم دارای بخش زیست فعال متصل شونده به گیرنده اینتگرین ج) پپتید دوگانه‌دوست سوم دارای بخش زیست فعال متصل شونده به فاکتور رشد TGF-β. در تصاویر رنگ‌های سیاه، بنفش، صورتی، قرمز، نارنجی و سبز به ترتیب معرف دم آلکیلی، بخش تشکیل‌دهنده ساختار بتا، توالی اسیدآمینه‌ای باردار، اتصال‌دهنده، ترادف تکراری اسیدآمینه لیزین و بخش ریست فعال است.



شکل ۲- مقایسه توصیفی خواص فیزیکی و شیمیایی پپتیدهای دوگانه‌دوست (با استفاده از نرم‌افزار protean)

www.SID.ir

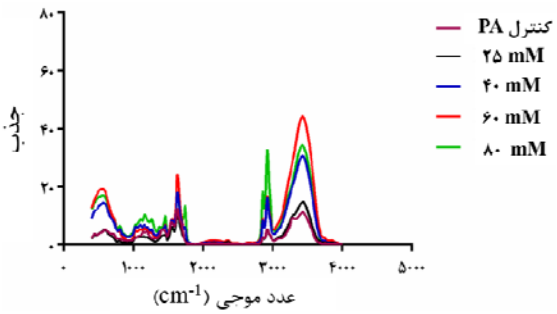
Archive of SID

آزمون ویال واران و رنگ هیدروژل: نتایج این آزمون برای شرایط اعمال‌شده در جدول ۳ آورده شده است. همان‌طور که مشهود است رفتار ژل شدن محلولهای پپتیدهای دوگانه‌دوست در غلظتهای مختلف یون کلسیم با مقادیر محاسبه‌شده این یون بدون توجه به رنگ ژلهای تولیدشده تا حدودی مطابقت دارد و ژل شدن در دو غلظت نمکی ۲۵ و ۴۰ میلی مولار مشهود است اما با توجه به کدورت هیدروژلها در این دو غلظت نمکی به نظر می‌رسید بهترین شرایط برای ژل شدن در غلظتهای ۶۰ و ۸۰ میلی مولار یون کلسیم به‌دست‌آمده است.

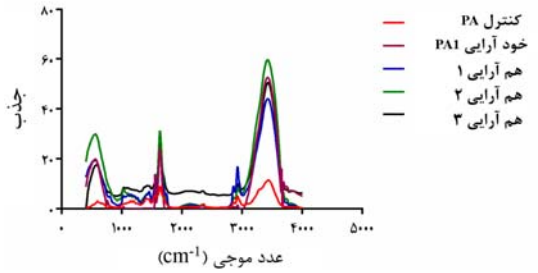
جدول ۳- بار محاسباتی محلولهای پپتیدی نهایی هر هیدروژل و رفتار هرکدام در غلظت‌های مختلف از نمک کلرید کلسیم

۸۰ میلی مولار	۶۰ میلی مولار	۴۰میلی مولار	۲۵ میلی مولار	بار محاسباتی	هیدروژل ها
ژل شفاف	ژل شفاف	ژل شیری‌رنگ	ژل شیری‌رنگ	-۴۵/۰۴	خودآرایی پپتید دوگانه‌دوست اول
ژل شفاف	ژل شفاف	ژل شیری‌رنگ	ژل شیری‌رنگ	-۳۹/۷۹	هم‌آرایی اول
ژل شفاف	ژل شفاف	ژل شیری‌رنگ	محلول گران‌رو	-۳۶/۸۲	هم‌آرایی دوم
ژل شفاف	ژل شفاف	ژل شیری‌رنگ	محلول گران‌رو	-۳۷/۲۳	هم‌آرایی سوم

طیف‌سنجی تبدیل فوریه فروسرخ (FTIR): از این آزمون جهت تأیید تشکیل ساختار دوم صفحات بتا استفاده شد. طیف FTIR مربوط به هم‌آرایی اول تحت شرایط نمکی مختلف در شکل ۳ آمده است. همچنین طیف FTIR کلیه هیدروژلهای تهیه‌شده در غلظت نمکی ۶۰ میلی مولار در شکل ۴ نمایش داده‌شده است. در هر دو شکل، وجود دو پیک در محدوده‌های ۱۶۳۰ و ۱۵۵۰ cm^{-1} تأییدکننده تشکیل ساختار صفحات بتا موازی است و پیک cm^{-1} 2919 نشانگر تجمع و بسته‌بندی محکم دمهای آلکیلی در مرکز ساختار فوق مولکولی هم آراینده می‌باشد. ضمناً باند آمیدی A که مربوط به پیوند هیدروژنی است و باید در محدوده ۳۲۲۵-۳۲۸۰ cm^{-1} مشاهده شود در کلیه نمونه‌ها با یک جابه جایی در ناحیه ۳۴۰۰ cm^{-1} قابل‌رؤیت است. با احتساب کلیه موارد ذکرشده همان‌طور که از شکل ۳ و ۴ قابل استنتاج است همه شرایط اعمال‌شده می‌توانند باعث آغاز و پیش برد فرآیند هم‌آرایی و تشکیل ساختار صفحات بتا در محلولهای آبی پپتید دوگانه‌دوست شوند در ضمن مشاهده پیکهای اختصاصی این ساختار دوم حتی در نمونه کنترل که فقط شامل محلول پپتید دوگانه‌دوست است، آغاز تشکیل پیش تجمعهای ساختار صفحات بتا را تأیید می‌کند.



شکل ۳- طیف FTIR محلولهای پپتیدی هم-آرایی اول در غلظتهای مختلف نمکلی بافر ژل کننده. محلول پپتید دوگانه‌دوست هم-آرایی اول در بافر ژل کننده فاقد کلرید سدیم به‌عنوان کنترل در نظر گرفته شد.



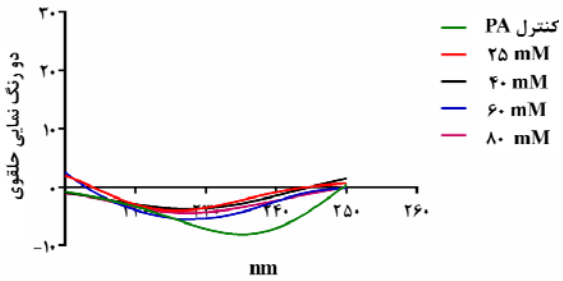
شکل ۴- طیف FTIR هیدروژلهای مورد بررسی در غلظت نمکی ۶۰ میلی مولار بافر ژل کننده. محلول پپتید دوگانه‌دوست در بافر ژل شونده فاقد کلرید کلسیم به‌عنوان کنترل در نظر گرفته شد

طیف‌سنجی دورنگ نمایی حلقوی (CD): تعیین ساختار دوم با کمک روش CD ضمن تأیید داده‌های روش FTIR

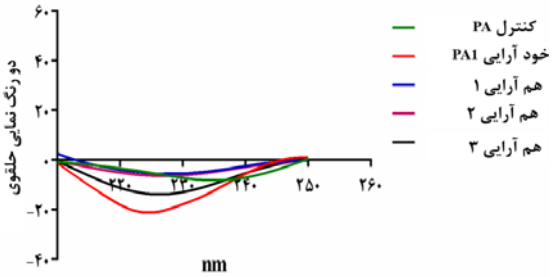
www.SID.ir

Archive of SID

معیار کمی‌تری از این نتایج را در اختیار قرار می‌دهد. داده‌های به‌دست‌آمده از هم‌آرایی اول در غلظتهای مختلف نمکی و کلیه هیدروژلهای تولیدشده در غلظت ۶۰ میلی مولار به ترتیب در شکل های ۵ و ۶ آورده شده است. نتایج هم‌آرایی ها در کلیه شرایط اعمال‌شده بدون استثنا نسبت به پیک شاخص صفحات بتا که در ۲۱۸nm قرار دارد دارای جابجایی‌های مکانی هستند. و تنها بسته به شرایط اعمال‌شده شامل تنوع غلظت نمکی یا مقادیر مولی متفاوت مولکولهای پپتیدی این جابه جایی مقادیر متفاوتی را نشان می‌دهد. با توجه به شکل ۶ کمترین جابه جایی به ترتیب مربوط به غلظت ۶۰ میلی مولار است. بر اساس نتایج شکل ۶ نیز کمترین جابه‌جایی در شرایط نمکی یکسان ۶۰ میلی مولار مربوط به هیدروژل حاصل از خودآرایی پپتید دوگانه‌دوست اول است هیدروژلهای حاصل از هم‌آرایی دوم، هم‌آرایی سوم و هم‌آرایی اول در مراتب بعدی قرار دارند.

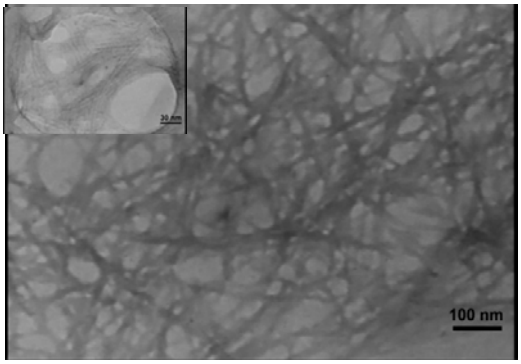


شکل ۵- طیف CD محلولهای پپتیدی هم‌آرایی اول در غلظتهای مختلف نمکی بافر ژل کننده. محلول پپتید دوگانه‌دوست هم‌آرایی اول در بافر ژل کننده فاقد کلرید سدیم به‌عنوان کنترل در نظر گرفته شد.



شکل ۶- طیف CD هیدروژلهای مورد بررسی در غلظت نمکی ۶۰ میلی مولار بافر ژل کننده. محلول پپتید دوگانه‌دوست در بافر ژل شونده فاقد کلرید کلسیم به‌عنوان کنترل در نظر گرفته شد

میکروسکوپ الکترونی عبوری (TEM): در تصاویر به‌دست‌آمده از هیدروژلهای رنگ‌آمیزی شده با اورانیل استات ساختارهای نانوفیبری با ابعاد ۸-۱۰ نانومتر (شکل ۷) مشاهده می‌شوند. سطح نانو فیبرها در کلیه تصاویر سیاه و مرکز آنها به رنگ سفید است که با توجه به ماهیت باردار رنگ به‌کاربرده شده در رنگ‌آمیزی و اتصال انتخابی آن به مکانهای باردار می‌توان این‌گونه استنباط کرد که بخش زیست فعال پپتیدهای دوگانه‌دوست طی فرآیند خودآرایی در سطح نانو فیبرها قرارگرفته و بخش مرکزی آنها از تجمع دمهای آلکیلی به وجود آمده است.



شکل ۷- نمونه‌ای از تصویر میکروسکوپ الکترونی عبوری هیدروژل خودآراینده با بافت نانوفیبری

میکروسکوپ نیروی اتمی (AFM): نتایج مقاومت مکانیکی هیدروژلهای طراحی‌شده در غلظت ۶۰ میلی مولار نمک کلرید کلسیم در جدول ۴ آورده شده است. همان‌طور که از مقایسه داده‌ها مشهود است. اضافه کردن مشتقات زیست فعال پپتیدهای دوگانه‌دوست به‌عنوان اجزاء هم‌آرای، منجر به افزایش مقاومت مکانیکی هیدروژلها نسبت به هیدروژل ناشی از خودآرایی پپتید دوگانه‌دوست تنها می‌شود. هیدروژلهای هم‌آرای مختلف طراحی‌شده نیز بسته به مقادیر مورداستفاده از پپتیدهای دوگانه‌دوست دارای مقاومتهای مکانیکی مختلفی هستند. در این میان هیدروژل حاصل از هم‌آرایی سوم دارای بیشترین مقاومت مکانیکی است و هیدروژل هم‌آراییهای دوم و اول در مکانهای بعدی قرارگرفته‌اند.

www.SID.ir

Archive of SID

جدول ۴- مدول یانگ هیدروژلهای مختلف موردبررسی

مدول یانگ (پاسکال)	هیدروژل ها
۵۰۰	خودآرایی پپتید دوگانه‌دوست اول
۳۸۷۹	هم‌آرایی اول
۶۳۸۸	هم‌آرایی دوم
۶۳۳۸۴۵	هم‌آرایی سوم

بحث

همان‌طور که در مقدمه آمد نیروی غالب در محلول آبی پپتیدهای دوگانه‌دوست نیروی دافعه میان بارهای هم نام مولکولهای پپتیدی است که مانع از نزدیک شدن آنها به یکدیگر و تشکیل میانکنشهای آب‌گریز در دمهای آلکیلی و پیوندهای هیدروژنی بین بخشهای مشارکت‌کننده در تشکیل ساختار دوم بتا بین‌مولکولی می‌شود. اما با افزودن بافر ژل کننده و غربال بارهای پپتیدهای دوگانه‌دوست، این مولکولها به‌اندازه کافی به یکدیگر نزدیک شده، میانکنشهای مذکور برقرار و درنهایت طی فرآیند خودآرایی ساختارهای فوق مولکولی فیبری در مقیاس ۸ تا ۱۰ نانومتر تشکیل می‌شود. مطالعات بسیاری نقش تعیین‌کننده صفحات بتا بین‌مولکولی را در هدایت ساختار فوق مولکولی به فرم نهایی سیلندری (فیبری) تأیید می‌کنند (۵). بنابراین می‌توان جهت تعیین شرایط بهینه فرآیندهای خودآرایی یا هم‌آرایی میان این پپتیدها ضمن استفاده از روشهای شهودی مانند آزمون ویال واران و توجه به رنگ هیدروژلهای حاصل، تشکیل ساختارهای بتا را نشانه‌ای از ادامه فرآیند خودآرایی و تشکیل نانو ساختارهای فیبری دانست، و از آن به‌عنوان روش تأییدی دیگری در تعیین شرایط بهینه ساخت هیدروژلهای موردبررسی استفاده کرد (۲). با توجه به نتایج به‌دست‌آمده از آزمون ویال واران در بررسی غلظت یون کلسیم مناسب برای هم‌آرایی اول، محاسبات تئوری بار خالص با مشاهدات تجربی بدون در نظر گرفتن کدورت هیدرژلهای تولید شده، همخوانی دارد و این محلول پپتیدی در غلظت ۲۵ میلی مولار یون کلسیم مانند دیگر غلظتها، هیدروژل می‌شود. داده‌های FTIR مربوطه نیز نتایج آزمون ویال واران را تأیید کرده و نشان می‌دهد که یونهای کلسیم در کلیه این غلظتها می‌توانند القاکننده تشکیل ساختارهای بتا و در نتیجه هم‌آرایی محلولهای پپتیدی باشند. اما با توجه به رنگ هیدروژلها در غلظتهای مورد بررسی و با مفروض دانستن وجود رابطه مستقیم میان مقاومت مکانیکی هیدروژل و شفافیت آن (۲۲)، به نظر می‌رسد هیدروژلهای حاصل از غلظتهای محاسبه‌شده نسبت به هیدروژلهای غلظتهای ۶۰ و ۸۰ میلی مولار از مقاومت مکانیکی کمتری برخوردارند. با انطباق این داده‌ها با نتایج CD به‌دست‌آمده در شرایط مشابه بهترین شرایط نمکی غلظت ۶۰ میلی مولار است و کمترین جابه جایی را نسبت پیک اختصاصی ساختار صفحات بتا در ۲۱۸ نانومتر دارد. در گام بعدی جهت تعیین غلظت کمینه مطلوب برای دیگر هم‌آرایه‌های پپتید دوگانه‌دوست اول تنها به بررسی نتایج دو آزمون شهودی مذکور اکتفا شد. با توجه به نتایج به‌دست‌آمده غلظت ۶۰ میلی مولار برای این دو هم‌آرایی نیز منجر به تولید هیدروژلی شفاف می‌شود. بنابراین به نظر می‌رسد در محاسبه مقدار یون غربال کننده محلولهای پپتیدهای دوگانه‌دوست توجه صرف به بار آنها کافی نیست. زیرا در محلولهای آبی یونهای آزاد و پپتیدهای دوگانه‌دوست هر دو آبپوشی می‌شوند و زمانی این مولکولها و یونها می‌توانند با یکدیگر میانکنش دهند که مولکولهای آب از سطح آنها برداشته شوند. حذف لایه‌های آب با صرف انرژی همراه است که در مورد مولکولهای کوچکی مثل یونها و مولکولهای بزرگی مانند پپتیدهای دوگانه‌دوست به ترتیب به دلیل تراکم بالای لایه آب پوشی در اطرافشان و تمایل به ماندن در فرم آب پوشی شده، این فرآیند با صرف انرژی بیشتری نیز همراه است. بنابراین به نظر نمی‌رسد تمام یونهای کلسیمی که در محلول وجود دارند به غربال بارهای مولکولهای پپتید دوگانه‌دوست مشغول و یا موفق به انجام این فرآیند شوند (۲۲). بنا بر نتایج به‌دست‌آمده چنین

www.SID.ir

Archive of SID

پیشنهاد می‌شود که، برای محاسبه غلظت یون مورد نیاز نه‌تنها باید به روابط الکتروستاتیک بلکه به نیروهای آب پوشی و پایداری میانکنش یون و پپتید نیز توجه کرد. پس از یافتن غلظت بهینه ۶۰ میلی مولار برای تشکیل ساختارهای فوق مولکولی از هم‌آرایه‌های مورد بررسی از پپتید دوگانه‌دوست اول در مرحله بعدی مسئله پیش رو این است که آیا هیدروژلهای به‌دست‌آمده در عمل واقعاً دارای بافتی نانوفیبری هستند و در صورت داشتن چنین بافتی بخشهای زیست فعال موجود در مشتقات پپتیددوگانه دوست اول در چه بخشی از این نانو فیبرها قرار گفته‌اند. با توجه به مطالعات ریخت‌شناسی به‌دست‌آمده از تصویربرداری میکروسکوپ الکترونی عبوری از نمونه تیمار شده با اورانیل استات تشکل ساختارهای فوق مولکولی با ریخت‌شناسی کلی نانوفیبری در پی شرایط اعمال‌شده بر محلولهای پپتیدی تأیید شد. در ضمن با توجه به این نکته که اورانیل استات تنها به بخشهای آب‌دوست و اختصاصاً باردار تمایل داشته و طی اتصال رنگی سیاه به این بخشها می‌دهد، مشاهده الگوی سیاه و سفید در تمامی نمونه‌ها که به ترتیب مربوط به بخشهای سطحی و مرکزی نانو فیبرها است مؤید قرارگیری بخشهای باردار پپتید ازجمله بخش زیست فعال آن در سطح است. داده‌های ریخت‌شناسی حاضر با نتایج هارتگرینک (Hartgerink) و همکاران مطابقت دارد این گروه تأکید دارد تنها عامل تعیین‌کننده ژئومتری سیلندری نانو فیبرها در خودآراییهای حاصل از پپتیدهای دوگانه دوست، چهار اسیدآمینه مجاور دم آلکیلی هستند و این واحدهای ژل شونده بسیار سازگار بوده و در هم‌آرایی با دامنه وسیعی از مشتقات زیست فعال خود قادرند هیدروژلهایی با بافت نانوفیبری ایجاد کنند بدون آنکه هرگونه تغییر یا کاستی در ریخت‌شناسی خود آرایه‌های فوق مولکولی نهایی به وجود آید (۱۱). اما مسئله بعدی قابل‌تأمل این است که تغییرات به وجود آمده در مقادیر پپتید دوگانه‌دوست و مشتقاتش چه تأثیری بر خواص مکانیکی هیدروژلهای حاصله می‌گذارند. مطالعات انجام شده با میکروسکوپ نیروی اتمی حاکی از آن است که نه‌تنها هیدروژل حاصل از خودآرایی پپتید اول دارای خواص مکانیکی متفاوتی نسبت به انواع هیدروژلهای هم آراینده خود با مشتقات زیست فعالش است بلکه این هیدروژلها نیز خواص مکانیکی متفاوتی از خود بروز می‌دهند. همان‌طور که مطالعات اخیر جوآن (Juan) و همکاران نشان می‌دهد حتی اگر در تمام مشتقات پپتیدهای دوگانه دوست با گروههای زیست فعال متفاوت از ترادف اسیدآمینه‌ای یکسانی در نزدیک‌ترین بخش به دم آلکیلی استفاده شود، خواص مکانیکی هیدروژلهای حاصله در شرایط یکسان خودآرایی متفاوت خواهد بود (۱). مطالب ذکرشده ضمن تأیید داده‌های بررسی حاضر این سؤال را مطرح می‌کند که عامل مؤثر بر تفاوت رفتار مکانیکی هیدروژلهای حاصل چیست و چگونه می‌توان آن را به تغییرات اعمال‌شده نسبت داد. با توجه به گزارشها استاپ (Stupp) و همکاران مبنی بر اینکه تشکیل ساختار صفحات بتا در نزدیک‌ترین اسیدآمینه‌ها به دم آلکیلی صورت می‌گیرد و پیوندهای هیدروژنی میان آنها نقش بسیار مهمی در مقاومت مکانیکی آرایه‌های حاصل دارند. هیدروژلها ازنظر تشکیل این ساختار در غلظت بهینه ۶۰ میلی مولار یون کلسیم مورد بررسی قرار گرفتند هرچند در نگاه اول مشاهدات طیفهای FTIR هیدروژلهای مختلف هم‌آراینده و هیدروژل حاصل از خودآرایی پپتید اول کمک چندانی به حل مسئله نکرد و به‌جز یک جابجایی مکانی در باند آمید نوع A، تنها نشان‌دهنده تشکیل ساختارهای صفحات بتا در کلیه نمونه‌ها بود ولی با دقت در داده‌های CD به‌دست‌آمده در شرایط مشابه معلوم شد هرچند تمامی نمونه‌ها نسبت به مکان موجی ۲۱۸ نانومتر دارای جابه جایی مکانی هستند ولی میزان جابه جایی در آنها برابر نبوده و کمترین و بیشترین میزان جابه جایی به ترتیب در هیدروژل حاصل از خودآرایی پپتید اول و نمونه کنترل است و هیدروژلهای حاصل از هم‌آرایی در حدفاصل این دو شرایط

www.SID.ir

Archive of SID

قرارگرفته‌اند. با طرح این سؤال که چرا باوجود تأیید داده‌های FTIR مبنی بر تشکیل ساختارهای بتا در طیف‌های CD این هیدروژل ها یک جابجایی فاحش دیده می‌شود به نظر می‌رسد تفسیر طیف‌های CD و توجیه دلیل وجود مقادیر متفاوت جابجایی مکانی نسبت به پیک معیار ۲۱۸ نانومتر در کلیه طیف‌های CD این هیدروژل ها راه گشای حل مسئله باشد. با توجه به مستندات به‌دست‌آمده از هر دو مطالعه FTIR و CD که مؤید وجود پیش تجمعهایی در نمونه کنترل است (پدیده‌ای که به‌خوبی با مکانیسم رشد هسته پیشنهادشده برای فرآیند خودآرایی این نوع مولکولها مطابقت دارد (۱۸))، می‌توان بخشی از این جابه جایی را به حضور این پیش تجمعات و اثرات آنها بر پراکندگی نور در این دو روش طیف‌سنجی، نسبت داد اما با توجه به شواهدی مثل وجود حضور پیک $۲۹۰۰cm^{-1}$ در داده‌های FTIR که نشان‌دهنده تجمع و بسته‌بندی محکم زنجیره‌های آلکیلی است و با توجه به تصویر TEM به‌دست‌آمده که مؤید چینش این پپتیدهای دوگانه دوست به فرم نانوفیبری در حال رشد است، می‌توان سهم دیگری از این جابه جایی را به‌احتمال پراکندگی نور ناشی از رشد نانو فیبرها نسبت داد (۲۱). البته با استناد به وجود جابه جایی در مکان باند آمیدی A که معرف بلندتر شدن طول پیوندهای هیدروژنی شرکت‌کننده در ساختارهای صفحات بتا بوده می‌توان وقایع مولکولی فرآیند خودآرایی را این‌طور نیز مطرح کرد که، مولکولهای دوگانه دوست طی فرآیند هم‌آرایی به نانو فیبرهایی سازمان‌دهی می‌کنند که بخش مرکزی آنها از تجمع دمهای آلکیلی تشکیل‌شده و بخشهای مشارکت‌کننده در تشکیل ساختارهای بین‌مولکولی بتا در سطح آنها مستقر هستند که این آرایش صفحات در راستای طول نانو فیبرهای در حال رشد با پیچشی حول محور مرکزی نانو فیبر همراه است که منجر به افزایش طول پیوندهای پپتیدی خصوصاً در لبه‌های نانو فیبر می‌شود. با مقایسه میزان جابه جایی موجود در طیفهای CD هیدروژلهای هم‌آرایی و خودآرایی و افزایش این جابجایی در نمونه‌های حاصل از هم‌آرایی نسبت به خودآرایی می‌توان این‌گونه استنباط کرد که حضور مشتقات زیست فعال در فرآیند هم‌آرایی به دلیل وجود بخشهای زیست فعالشان احتمالاً منجر به ممانعت فضایی در سطح نانو فیبرها ازنظر آرایش پهلو به پهلوی آنها در طول نانو فیبر شده و منجر به قرارگیری این ساختارهای بتا با پیچشی در حول محور مرکزی نانو فیبرها می‌شود. بنابراین احتمالاً قطعه گم شده جورچین نوع چینش ساختارهای صفحات بتا بر روی نانو فیبرها است زیرا در عمل ایجاد پیچش مستلزم افزایش طول در پیوندهای هیدروژنی است که با جابه جایی باند آمیدی نوع A نیز مطابقت دارد. بنابراین همان‌طور که استاپ و همکاران اذعان داشته‌اند پیوندهای هیدروژنی نزدیک‌ترین اسیدآمینه‌ها به دم آلکیلی نقش بسیار مهمی در مقاومت مکانیکی هیدروژل حاصله دارند و مولکولهای خود آراینده ممکن است توسط توالیهای مختلف زیست فعالشان باعث تغییرات کوچکی در توپولوژی صفحات بتا شوند. تغییری که ممکن است اثرات توپولوژیکی آن طی فرآیند هم‌آرایی افزایش‌یافته و ریخت‌شناسی و خواص مکانیکی خود آرایه نهایی را تغییر دهد (۱۳). اما با توجه به این موضوع که رابطه مستقیمی میان افزایش طول پیوندهای هیدروژنی و کاهش قدرت آنها وجود دارد انتظار می‌رود مقاومت مکانیکی هیدروژلهای هم‌آراینده نسبت به هیدروژل پپتید دوگانه دوست اول کمتر باشد اما این مشاهدات حاضر عکس آن را تأیید می‌کنند. در توجیه این مشاهدات می‌توان به این نکته اشاره کرد که مقاومت مکانیکی هیدروژلهای نهایی تابعی از دو نوع میانکنش است. میانکنشهای درون فیبری که منجر به ساخت فیبرهای با مقاومت مطلوب می‌شود و میانکنشهای بین فیبری که منجر به اتصالات بین فیبرها شده و شبکه مستحکمی از نانو فیبرها را پدید می‌آورند (۶). با توجه به مستندات شکل ۲ در خودآرایی پپتید دوگانه دوست اول تنها میانکنش بین فیبری از نوع پل نمکی میان اسیدآمینه‌های گلوتامیک اسید است. اما در

www.SID.ir

Archive of SID

حالتهای هم‌آرایی ضمن تقویت این مؤلفه به دلیل حضور پپتید دوگانه دوست دوم میانکنشهای آب‌گریز نیز به‌واسطه پپتید دوگانه دوست سوم به مجموع میانکنشها افزوده می‌شود. بنابراین منطقی به نظر می‌رسد شبکه میانکنشهای بین فیبر غنی‌تر و قوی‌تری در هیدروژلهای ناشی از هم-آرایی نسبت به هیدروژل ناشی از خودآرایی پپتید دوگانه دوست اول برقرار باشد. ضمناً در پاسخ به این مسئله که چرا مقاومت مکانیکی هم‌آراییهای مختلف نیز با یکدیگر متفاوت است باید بار دیگر به دو مؤلفه میانکنشهای درون فیبری و بین فیبری مؤثر بر مقاومت مکانیکی هیدروژلها اشاره کرد. همان‌طور که با توجه با داده‌های FTIR و CD مشهود است هم‌آراییهای اول، دوم و سوم به ترتیب ازنظر طول پیوندهای هیدروژنی و درنتیجه میزان پیچش ساختارهای بتا حول محور مرکزی نانو فیبر در مراتب اول، دوم و سوم قرارگرفته‌اند و بنابراین منطقی به نظر می‌رسد از میان این سه هم‌آرایی، فیبرهای ایجادشده در هم‌آرایی سوم به ترتیب دارای پایداری بیشتری نسبت به هم‌آراییهای دوم و اول دارند. این مطالعه نشان داد نوع، قدرت و ژئومتری میانکنشهایی که در سطح مولکولی رخ می‌دهد تعیین‌کننده ویژگیهایی نهایی هیدروژلهای حاصله است (۶ و ۲۲). و بنابراین با دست ورزی میانکنشها در این سطح می‌توان هیدروژلهایی با خواص زیستی و مکانیکی مطلوب برای کاربردهایی پزشکی مختلف ایجاد کرد. به‌طور مثال با توجه به زیست فعال بودن پپتیدهای مشارکت‌کننده در تشکیل هیدروژلهای این پژوهش می‌توان آنها را برای کاربردهای مهندسی بافتهای نرم پیشنهاد کرد زیرا ضمن تأمین مؤلفه‌های زیستی لازم مقاومت مکانیکی این هیدروژلها می‌تواند تداعی‌کننده این ویژگی در بافتهای نرم باشد.

سپاسگزاری

این بررسی بدون مساعدتهای علمی و دوستانه خانم‌ها دکتر بهناز اشتری، شراره تودد و ندا سرای گرد افشاریی و آقایان بهزاد ادیب، حسن بردانیا، رامین امیدوار و علیرضا نادری سهی این‌گونه به انجام نمی‌رسید.

منابع

1. Anderson, J.M., et al., Modulating the gelation properties of self-assembling peptide amphiphiles. ACS nano, 2009. 3(11): p. 3447-3454.
2. Beniash, E., et al., Self-assembling peptide amphiphile nanofiber matrices for cell entrapment. Acta biomaterialia, 2005. 1(4): p. 387-397.
3. Carvajal, D., et al., Physical properties of hierarchically ordered self-assembled planar and spherical membranes. Soft Matter, 2010. 6(8): p. 1816-1823.
4. Cavalli, S., F. Albericio, and A. Kros, Amphiphilic peptides and their cross-disciplinary role as building blocks for nanoscience. Chemical Society Reviews, 2010. 39 :(۱)p. 241-263.
5. Cui, H., M.J. Webber, and S.I. Stupp, Self-assembly of peptide amphiphiles: From molecules to nanostructures to biomaterials. Peptide Science, 2010. 94(1): p. 1-18.
6. Dagdas, Y.S., et al., Interfiber interactions alter the stiffness of gels formed by supramolecular self-assembled nanofibers. Soft Matter, 2011. 7(7): p. 3524-3532.
7. Dehsorkhi, A., V. Castelletto, and I.W. Hamley, Self-assembling amphiphilic peptides. Journal of Peptide Science, 2014. 20(7): p. 453-467.
8. Falvo D'Urso Labate, G.V.U., A Tissue Engineering product development pathway. 2012, Politecnico di Torino.
9. Frydrych, M., et al ,.Biomimetic poly (glycerol sebacate)/poly (L-lactic acid) blend scaffolds for adipose tissue engineering. Acta Biomaterialia, 2015.
10. Goktas, M., et al., Self-Assembled Peptide Amphiphile Nanofibers and PEG Composite Hydrogels as Tunable ECM Mimetic Microenvironment. Biomacromolecules, 2015.
11. Hartgerink, J.D., E. Beniash, and S.I. Stupp, Peptide-amphiphile nanofibers: a versatile scaffold for the preparation of self-assembling

www.SID.ir

Archive of SID

materials. Proceedings of the National Academy of Sciences, 2002. 99(8): p. 5133-5138.

12. Jing, J., et al., Type, density, and presentation of grafted adhesion peptides on polysaccharide based hydrogels control pre-osteoblast behavior and differentiation. Biomacromolecules, 2015.

13. Jung, J.P., J.Z. Gasiorowski, and J.H. Collier, Fibrillar peptide gels in biotechnology and biomedicine. Peptide Science, 2010. 94(1): p. 49-59.

14. Liu, J., et al., Self-Assembly-Peptide Hydrogels as Tissue-Engineering Scaffolds for Three-Dimensional Culture of Chondrocytes in vitro. Macromolecular bioscience, 2010. 10(10): p. 1164-1170.

15. Mandal, B.B., et al., High-strength silk protein scaffolds for bone repair. Proceedings of the National Academy of Sciences, 2012. 109(20): p. 7699-7704.

16. Matson, J.B., R.H. Zha, and S.I. Stupp, Peptide self-assembly for crafting functional biological materials. Current Opinion in Solid State and Materials Science, 2011. 15(6): p. 225-235.

17. Miserez, A., J.C. Weaver, and O. Chaudhuri, Biological materials and molecular biomimetics–filling up the empty soft materials space for tissue engineering applications. Journal of Materials Chemistry B, 2015. 3(1): p. 13-24.

18. Niece, K.L., et al., Modification of gelation kinetics in bioactive peptide amphiphiles. Biomaterials, 2008. 29(34): p. 4501-4509.

19. Pashuck, E.T., H. Cui, and S.I. Stupp, Tuning supramolecular rigidity of peptide fibers through molecular structure. Journal of the American Chemical Society, 2010. 132(17): p. 6041-6046.

20. Segers, V.F. and R.T. Lee, Local delivery of proteins and the use of self-assembling peptides. Drug discovery today, 2007. 12(13): p. 561-568.

21. Steim ,J.M. and S. Fleischer, Aggregation-induced red shift of the Cotton effect of mitochondrial structural protein. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 1967. 58(4): p. 1292.

22. Stendahl, J.C., et al., Intermolecular forces in the self-assembly of peptide amphiphile nanofibers. Advanced Functional Materials, 2006. 16(4): p. 499-508.

23. Sur, S., et al., Epitope topography controls bioactivity in supramolecular nanofibers. Biomaterials Science, 2015.

24. Velichko, Y.S., S.I. Stupp, and M.O. de la Cruz, Molecular simulation study of peptide amphiphile self-assembly. The journal of physical chemistry B, 2008. 112(8): p. 2326-2334.

www.SID.ir

Archive of SID

Design and synthesis of self-assembled peptide based on three dimensional nano hydrogels for soft tissue engineering

Roshani yasaghi E.[1], Taghdir M.[2], Shokrgozar M.A.[3] and Naderimanesh H.[1,2]

[1] Nanobiotechnology Dept., Faculty of Biological Sciences, Tarbiat Modares University, Tehran, I.R. of Iran

[2] Biophysics Dept., Faculty of Biological Sciences, Tarbiat Modares University, Tehran, I.R. of Iran

[3] Cell Bank Center, Pasture Institute, Tehran, I.R. of IRAN

Abstract

Injectable hydrogels are among the most applicable materials in soft tissue engineering. Synthetic biology is been applied to design and produce new hydrogel biomaterials with suitable mechanical properties and in situ gel formation capability in in vivo conditions. Amphiphiles peptides are one mostly used group of these biomaterials. Biological, chemical and mechanical optimizations are necessary for a good soft tissue ECM simulation based on hydrogels. The aim of this work is to construct a novel three-dimensional nano-composite hydrogels with different mechanical and biological properties. The Spectroscopic and microscopic methods consisting of CD, FTIR, TEM, and AFM are used for optimization of the co-assembly process and to assess the probable effects of bio-epitope segments in final properties of co-assembled hydrogels. Our results show that not only the amount of each peptide but also hydrophobicity and the volume of bio-epitope segments affect the strength and geometry of hydrogen bonds, inter-febrile interactions, and final stability of hydrogels. These data suggest that it is possible to produce different hydrogels without major alterations in the main parts of peptide amphiphiles just by designing right combination of mixed peptide amphiphiles and their bio-derivatives.

Key words: amphiphile peptide, self-assembly, co-assembly, nano-fiber, mechanical properties

www.SID.ir