

Wet electrospinning of 3D nanofiber poly(lactic) acid scaffolds for tissue engineering applications: Fabrication and characterization

Sadegh Ghorbani^{1*}, Taghi Tiraihi^{2*}, Masoud Soleimani³, Shahram Pour Beiranvand¹

1- M.Sc., Department of Anatomical Sciences, Faculty of Medical Sciences, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran

2- Professor, Department of Anatomical Sciences, Faculty of Medical Sciences, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran

3- Associated Professor, Department of Hematology, Faculty of Medical Sciences, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran

**Corresponding Address: Postal Code: 1411713116, Department of Anatomical Sciences, Faculty of Medical Sciences, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran
Email: Takialtr@modares.ac.ir*

Received: 15/Oct/2017, Accepted: 11/Jun/2017

Abstract

Objective: Tissue engineering, as an interdisciplinary field, assists cell therapy by using scaffolds, cells, and growth factors since 30 years ago. Cells isolated from the body should be supported by a scaffold which could mimic the function and structure of natural extracellular matrix (ECM). To accomplish this goal, we have fabricated and characterized synthetic wet electrospun poly(lactic) acid (PLA) scaffolds.

Methods: The PLA polymer was used at various concentrations (10%, 13%, 15%, 17%, 20% w/v) with a novel architecture produced by a wet-electrospinning process for tissue engineering applications. In the wet electrospinning method, we used an aqueous solution of sodium hydroxide (NaOH) as the coagulation bath. Then, we characterized the biocompatibility and morphology of these scaffolds by the MTT assay and SEM, respectively.

Results: The data collected from the characterization of scaffolds and in vitro human Wharton's jelly-derived stem cells/scaffold culture showed that the 15% w/v of PLA with high porosity was the best polymer concentration in terms of cell attachment and proliferation.

Conclusion: Electrospinning PLA at the 10% or 20% w/v concentrations was difficult. Additionally, they could not provide a favorable matrix for cell proliferation and attachment. However, the results have suggested that the novel nanofiber fabrication system would be very useful for the structure control of 3D nanofiber fabrics.

Keywords: Scaffolds, Poly(lactic) acid, Tissue engineering, Wet electrospinning

Pathobiology Research, Vol. 20 (2017), No.2, Pages: 49-61

الکتروریسی مرطوب داربست‌های نانوفیبری سه بعدی پلی لاکتیک اسید (PLA) برای کاربردهای مهندسی بافت: ساخت و مشخصه‌یابی

صادق قربانی^۱، تقی طریحی^{۲*}، مسعود سلیمانی^۳، شهرام پور بیرانوند^۱

۱- کارشناس ارشد، گروه علوم تشریح، دانشکده علوم پزشکی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران

۲- استاد، گروه علوم تشریح، دانشکده علوم پزشکی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران

۳- دانشیار، گروه هماتولوژی، دانشکده علوم پزشکی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران

*آدرس نویسنده مسئول: ایران، تهران، کدپستی: ۱۴۱۷۱۳۱۱۶، دانشگاه تربیت مدرس، دانشکده علوم پزشکی، گروه علوم تشریح

Email: Takialtr@modares.ac.ir

دریافت مقاله: ۹۵/۰۷/۲۳

پذیرش مقاله: ۹۶/۰۳/۲۱

چکیده

هدف: مهندسی بافت حدود ۳۰ سال است که با استفاده و ترکیب داربست‌ها، سلول‌های سالم و عوامل رشد به کمک سلول درمانی آمده است. ساخت داربست‌های زیست سازگار و زیست تجزیه پذیر شبیه به ماتریکس طبیعی بدن از اساسی ترین بخش‌های آن است. در این مطالعه با استفاده از روش الکتروریسی مرطوب، داربست‌های صنعتی پلی لاکتیک اسید با ساختار سه بعدی، ساخته و ارزیابی شد.

مواد و روش‌ها: فیبرهای پلی لاکتیک اسید در غلظت‌های ۱۰، ۱۳، ۱۵، ۱۷، ۲۰ درصد حجمی/وزنی، با روش الکتروریسی مرطوب، داخل حمام انعقادی حاوی آب مقطر دیونیزه/سدیم هیدروکساید وارد شد و داربست‌ها شکل گرفتند. سپس آزمون‌های میکروسکوپ الکترونی روبشی، MTT، میزان زیست تخریب پذیری و میزان تخلخل آن‌ها انجام شد. **نتایج:** نتایج به دست آمده از تعامل داربست و سلول‌های مزانشیمی ژله وارتون انسانی در عکس‌های میکروسکوپ الکترونی روبشی نشان داد که خود فیبرها نیز، دارای تخلخل‌های بسیار زیادی در اندازه نانو هستند که علت آن، حضور مولکول‌های آب و سدیم هیدروکساید در بین مولکول‌های فیبرهای رسیده شده است. این تخلخل‌های زیاد در داخل و بین فیبرها، باعث افزایش خصوصیت چسبندگی و رشد سلول‌ها به داربست شد.

نتیجه‌گیری: نتایج این پژوهش نشان داد که داربست‌های تولید شده در غلظت ۱۰ درصد حجمی/وزنی و پایین‌تر از آن و ۲۰ درصد حجمی/وزنی و بالاتر از آن، علاوه بر دشواری در مراحل ریسندگی آن‌ها، خواص شیمیایی و مکانیکی مناسبی را برای چسبندگی سلول و تکثیر آن‌ها ندارند و بهترین غلظت از پلیمر پلی لاکتیک اسید برای تولید داربست‌های سه بعدی به روش الکتروریسی مرطوب، ۱۵ درصد حجمی/وزنی است. بررسی نتایج نشان داد که سیستم جدید الکتروریسی مرطوب می‌تواند برای کنترل ساختار نانوفیبرها در داربست‌های سه بعدی بسیار مفید باشد.

کلیدواژگان: داربست‌های زیستی، پلی لاکتیک اسید، مهندسی بافت، الکتروریسی مرطوب

پژوهش‌های آسیب شناسی زیستی، دوره ۲۰، شماره ۲، تابستان ۱۳۹۶، صفحات: ۴۹-۶۱

کاربرد ندارند. بنابراین نقش داربست‌ها در این میان، حیاتی است. داربست‌ها باعث هدایت سلول‌ها به سمت رشد، تکثیر، تمایز و ساخت ماتریکس سلولی طبیعی می‌شوند تا شکل‌گیری بافت‌های مورد نیاز و کاربردی تسهیل شود [۷]. این داربست‌های زیستی باید متخلخل، زیست سازگار، زیست تخریب‌پذیر باشند. همچنین باید با سلول‌ها به صورت مثبتی واکنش داشته باشند، یعنی باعث چسبندگی سلول‌ها به آن‌ها و رشد، مهاجرت و تمایز سلول‌ها و حفظ عملکرد مناسب آن‌ها شوند [۸].

داربست‌های مورد استفاده در مهندسی بافت از نظر منشأ مواد تشکیل دهنده آن‌ها به دو دسته کلی طبیعی و مصنوعی تقسیم می‌شوند [۹]. پلی لاکتیک اسید (Polylactic acid: PLA) یک نوع پلیمر مصنوعی است که به علت خاصیت مکانیکی و کشسانی ایده‌آل آن، در ترمیم استخوان‌ها، سیستم رهایش دارو، زخم پوش‌ها و کاربردهای پزشکی دیگر استفاده می‌شود [۱۰]. زیست تخریب‌پذیری این پلیمر که یکی از شاخصه‌های مهم آن است، در دمای اتاق حدود ۶۰ روز به طول می‌انجامد اما در بدن موجود زنده و تحت تأثیر آنزیم‌های تولید شده از بدن جاندار، این زمان به نصف کاهش می‌یابد [۱۱].

یک داربست ایده‌آل در مهندسی بافت، خصوصیات بیوشیمیایی بافت هدف را دارد و با فراهم نمودن چسبندگی سلولی، رشد، مهاجرت، تمایز و پایداری فنوتیپ هم برای سلول‌های درون‌زا و هم سلول‌های پیوندی، نقش میزبان را ایفا می‌کند. ظهور نانو فناوری امکانات فراوانی را برای تولید شرایط مشابه ریزمحیط طبیعی سلول‌ها فراهم نموده است. داربست‌های نانو فیبری برای چنین هدفی بسیار مناسب است، چون ابعادی مشابه اجزای ماتریکس خارج سلولی دارد و از ساختمان فیبری آن‌ها تقلید می‌کند، بنابراین برای سازمان‌یابی، حیات و عملکرد سلولی مناسب است. داربست‌های نانو فیبری در عین حال که ذاتاً متخلخل است و نسبت سطح به حجم بالایی دارد، دارای خصوصیات توپوگرافی (Topographic characteristics) بسیار متنوعی نیز هست که مشوق

مهندسی بافت حیطه‌ای چند رشته‌ای است که با تلفیق علوم زیستی، پزشکی، مهندسی و علوم بالینی قصد بر حفظ حالت پایدار بافت‌ها یا بهتر کردن عملکرد بافت هدف یا جایگزین کردن عملکرد زیستی بافت/عضو را دارد [۱-۳]. این علم از زمان‌های دور، حتی قبل از تعریف رسمی آن، کاربرد داشته است. به عنوان مثال در رُم باستان از دندان‌های مصنوعی برای درمان دندان‌های آسیب دیده استفاده می‌کردند یا در هندوستان قدیم از پیوندهای پوستی برای درمان آسیب‌دیدگی‌ها استفاده می‌نمودند. در اواخر دهه ۱۹۸۰ بعد از اعلان سازمان غذا و دارو در مجاز دانستن استفاده از داروی سیکلوسپورین (Cyclosporine) (سال ۱۹۸۳) به منظور جلوگیری از پس زدن پیوندها، موضوع پیوند عضو به صورت ناگهانی افزایش پیدا کرد [۴]. کمبود بافت‌های اهدایی در دسترس، هزینه‌بر بودن آن‌ها، مشکل بودن روش‌ها و مراقبت‌های پیچیده از بافت یا عضو پیوند زده شده موجب شد تا در سال ۱۹۸۵ اصطلاح رسمی مهندسی بافت به شکل امروزی توسط دکتر فونگ (Fung) مطرح شود و از سال ۱۹۸۷ به طور رسمی تحقیقات در این حیطه آغاز شد [۵]. سه جزء کلیدی در مهندسی بافت وجود دارد که عبارتند از: ۱- استفاده از سلول‌های جدا شده سالم به منظور حفظ عملکردهای مناسب بافت یا سلول‌های آسیب دیده، ۲- استفاده از موادی مانند عوامل رشد یا عوامل دیگر مورد نیاز سلول به منظور تولید و ایجاد بافت‌های مورد نیاز، ۳- رشد سلول‌ها روی داربست‌های ۳ بُعدی [۶].

هنگامی که آسیب ایجاد شده به یک بافت یا عضو کوچک باشد، می‌توان آن نقص را با استفاده از سلول‌های جدا شده و عوامل مؤثر بر رشد و تمایز آن‌ها، ترمیم کرد. اما برای مهندسی بافت‌ها در مقیاس بزرگ‌تر، این دو راهبرد به‌خاطر این‌که سلول‌ها اغلب در داخل ساختارهای مصنوعی هم به صورت درون تنی و هم برون تنی کاشت یا جای داده می‌شوند تا قادر به تقلید و حمایت از ساختار بافت سه بعدی باشند، به تنهایی

آماده سازی محلول الکترورسی

ابتدا ۱۰، ۱۳، ۱۵، ۱۷، ۲۰ درصد حجمی/وزنی از پودر PLA را به همراه حلال کلروفرم داخل بشر ریخته و روی همزن مغناطیسی (Stirrer) با سرعت ۶۰۰ دور در دقیقه به مدت ۸ ساعت قرار داده شد تا محلول شفاف و همگن شد. به منظور ساخت داربست های بهینه فیبری PLA، از محلول های آماده شده در سرنگ ۱۰ سی سی ریخته شد و داخل پمپ سرنگ قرار داده شد. در این مطالعه از یک حمام انعقادی حاوی آب مقطر/سدیم هیدروکساید (NaOH) با $\text{pH}=13$ متصل به سیم نول [زمین (Earth)] منبع تغذیه، به جای صفحه جمع کننده استفاده شد [۱۷].

الکترورسی داربست ها در دمای اتاق، بر اساس پارامترهای بهینه انجام شد: سرعت پمپ تزریق: ۳/۴ میلی لیتر در دقیقه - ولتاژ اعمال شده: ۱۸ کیلو ولت - فاصله بین نوک سوزن و حمام انعقادی: ۱۲ سانتی متر در نظر گرفته شد.

پس از اتمام مرحله الکترورسی، داربست ها از حمام انعقادی خارج شد و پس از خشک شدن کامل آن، به مدت یک شبانه روز در دمای ۴ درجه سانتی گراد زیر صفر قرار داده شد.

مشخصه یابی داربست ها

تهیه تصاویر میکروسکوپ روبشی

داربست ها در تکه های کوچک 10×10 میلی متری بریده شدند و توسط چسب کربنی روی نگهدارنده نمونه در میکروسکوپ روبشی (SEM) (Seron Technology, AIS2100، کره جنوبی) چسبانده شدند. پس از ۳ دقیقه پوشش دهی با طلا (به ضخامت ۳۶ نانومتر) توسط دستگاه پوشش دهنده طلا، ریخت شناسی داربست ها با دستگاه میکروسکوپ الکترونی روبشی بررسی شد.

تخمین میزان درصد تخلخل داربست ها

زیست مواد های متخلخل در کاربردهای مانند داربست های مهندسی بافت، سیستم های رهایش کنترل شده دارو، غشاهای

چسبندگی و تکثیر سلولی است. علاوه بر این؛ تنوع ساختارها در داربست ها عملکرد سلولی را تحت تأثیر قرار می دهد [۱۲]. نانوفیبرهای پلیمری با روش های متفاوتی مثل کشیدن (Drawing)، ساخت الگو (Template Synthesis)، جداسازی فازی، خودآرایی و الکترورسی ساخته می شود. با توسعه نانو فیبرها امکان ساخت داربست هایی فراهم شده است که به طور بالقوه می تواند معماری بافت طبیعی انسان در مقیاس نانو را تقلید کند. نسبت بالای سطح به حجم نانو فیبرها به همراه ساختمان میکرو متخلخل آن ها چسبندگی، تکثیر، مهاجرت و تمایز را که از ویژگی های مطلوب کاربرد مهندسی بافت هست را فراهم می کند. در دهه گذشته سیستم های نانو فیبری به عنوان داربست های بالقوه برای مهندسی بافت مورد توسعه و تحقیق قرار گرفته است [۱۳، ۱۴].

روش الکترورسی (Electrospinning) اولین بار حدود ۷۰ سال پیش طراحی شد اما طی ۱۰ سال اخیر به علت آسان و ارزان بودن آن کاربرد بسیاری پیدا کرده است. در این روش فیبرهایی با قطر ۳ نانومتر تا ۵ میکرومتر و با طولی به درازای چند کیلومتر نیز قابلیت تولید دارد. در این روش هم داربست های تک پلیمری و هم کامپوزیتی (Composite scaffolds) ساخته شده است اما طراحی ساختار منافذ به صورت سه بعدی در این روش بسیار مشکل است. برای حل این موضوع روش جدید الکترورسی مرطوب (Wet electrospinning) برای ساخت ساختارهای سه بعدی کنترل شده از نانوفیبر با ترکیب الکترورسی و سیستم مرطوب به کار گرفته شد [۱۵]. از مزایای این روش می توان به کم هزینه بودن و آسان بودن آن به همراه تولید داربست های متخلخل سه بعدی بسیار خوب، اشاره نمود [۱۶].

مواد و روش ها

این مطالعه طی نامه ای به شماره ۵۲۵/۸۵۵ در تاریخ ۹۵/۰۲/۱۲ به تأیید کمیته اخلاق پزشکی دانشگاه تربیت مدرس رسیده است.

شد. سپس به مدت ۳۰ دقیقه در معرض اشعه ماورای بنفش قرار گرفت و سپس داربست‌ها به پلیت و ظروف کشت مورد نظر در شرایط استریل انتقال داده شد [۲۱-۲۳].

ارزیابی میزان بقای سلول‌های بنیادی مزانشیمی

ژله وارتون انسانی روی داربست‌ها با روش

MTT

اساس MTT [3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-] diphenyltetrazolium bromide احیا و شکسته شدن کریستال‌های زرد رنگ تترازولیوم (Tetrazolium) به وسیله آنزیم سوکسینات دهیدروژناز (Succinate dehydrogenase) و تشکیل کریستال‌های آبی رنگ و نامحلول فورمازان (Formazan) است. سوکسینات دهیدروژناز از آنزیم‌های چرخه تنفسی میتوکندریایی است، بنابراین رنگ تولید شده، معرف میزان فعالیت این آنزیم است که به نوبه خود نشان دهنده زنده بودن سلول به دلیل دارا بودن میتوکندری فعال است. ابتدا داربست‌های مورد نظر به صورت دیسک‌های ۶ میلی متری بریده و استریل شد. سپس در کف پلیت‌های ۹۶ خانه قرار گرفت و روی آن‌ها ۵۰۰۰ سلول بنیادی مزانشیمی ژله وارتون انسانی (Human wharton's jelly mesenchymal stem cells) پاساژ ۴ (تهیه شده از مرکز تحقیقاتی سلولی بن یاخته، تهران) به مدت ۱، ۳ و ۷ روز کشت داده شد. سپس محلول استوک MTT-10X با غلظت ۵ میلی گرم/میلی لیتر در محیط کشت RPMI (Roswell Park Memorial Institute medium) بدون فنل قرمز (Phenol red) تهیه شد، در زمان‌های مقرر، محیط کشت داربست‌ها برداشته شد، ۱۵۰ میکرولیتر از محلول MTT آماده به کار، روی داربست‌ها ریخته شد و به مدت ۴ ساعت انکوبه شد. پس از آن، محلول MTT از روی داربست‌ها برداشته شد و ۱۰۰ میکرولیتر DMSO (Dimethyl sulfoxide) روی آن‌ها ریخته شد، و بعد از ایجاد کریستال‌های بنفش رنگ در کمتر از ۱۰ دقیقه میزان جذب نور توسط دستگاه قرائت گراییزا

دیالیزی و فیلترهای دستگاه‌های اکسیژن رسان و بسیاری از موارد دیگر دارای اهمیت است. برای اندازه‌گیری میزان تخلخل داربست‌ها، از روش جابه‌جایی مایع (Liquid displacement) استفاده شد. ابتدا داربست‌ها با وزن یکسان به اندازه‌های ۳×۳ سانتی متر بریده شد. سپس به مدت ۱۲۰ دقیقه داخل اتانول ۹۶ درصد قرار داده شد و میزان تخلخل داربست‌ها پس از آن طبق فرمول زیر محاسبه شد [۱۸، ۱۹]. در این فرمول V_0 حجم اتانول اولیه و V_1 حجم اتانول به اضافه داربست و V_3 حجم اتانول ثانویه پس از خروج داربست از داخل ظرف است.

$$\text{تخلخل (درصد)} = \frac{V_1 - V_3}{V_2 - V_3} \times 100$$

اندازه‌گیری میزان تخریب پذیری داربست‌ها

برای اندازه‌گیری میزان تخریب‌پذیری داربست‌های ساخته شده با پلیمر PLA در غلظت‌های گوناگون، ابتدا داربست‌ها در اندازه ۱×۱ سانتی متر بریده شدند و داخل محیط FBS ۱۰ درصد/DMEM ۹۰ درصد (Fetal bovine serum/ Dulbecco's Modified Eagle's Medium) به مدت ۲۱ روز قرار داده شد و محیط آن هر سه روز تعویض شد [۲۰]. برای اندازه‌گیری وزن داربست‌ها، بعد از خشک شدن کامل آن‌ها در شرایط خلأ، از ترازوی دیجیتال آزمایشگاهی استفاده شد. میزان تغییرات وزن داربست‌ها در روزهای ۷، ۱۴ و ۲۱ با فرمول زیر اندازه‌گیری شد که در این فرمول W_0 وزن نمونه خشک اولیه و W_1 وزن نمونه خشک ثانویه بعد از خارج نمودن نمونه از محیط کشت است.

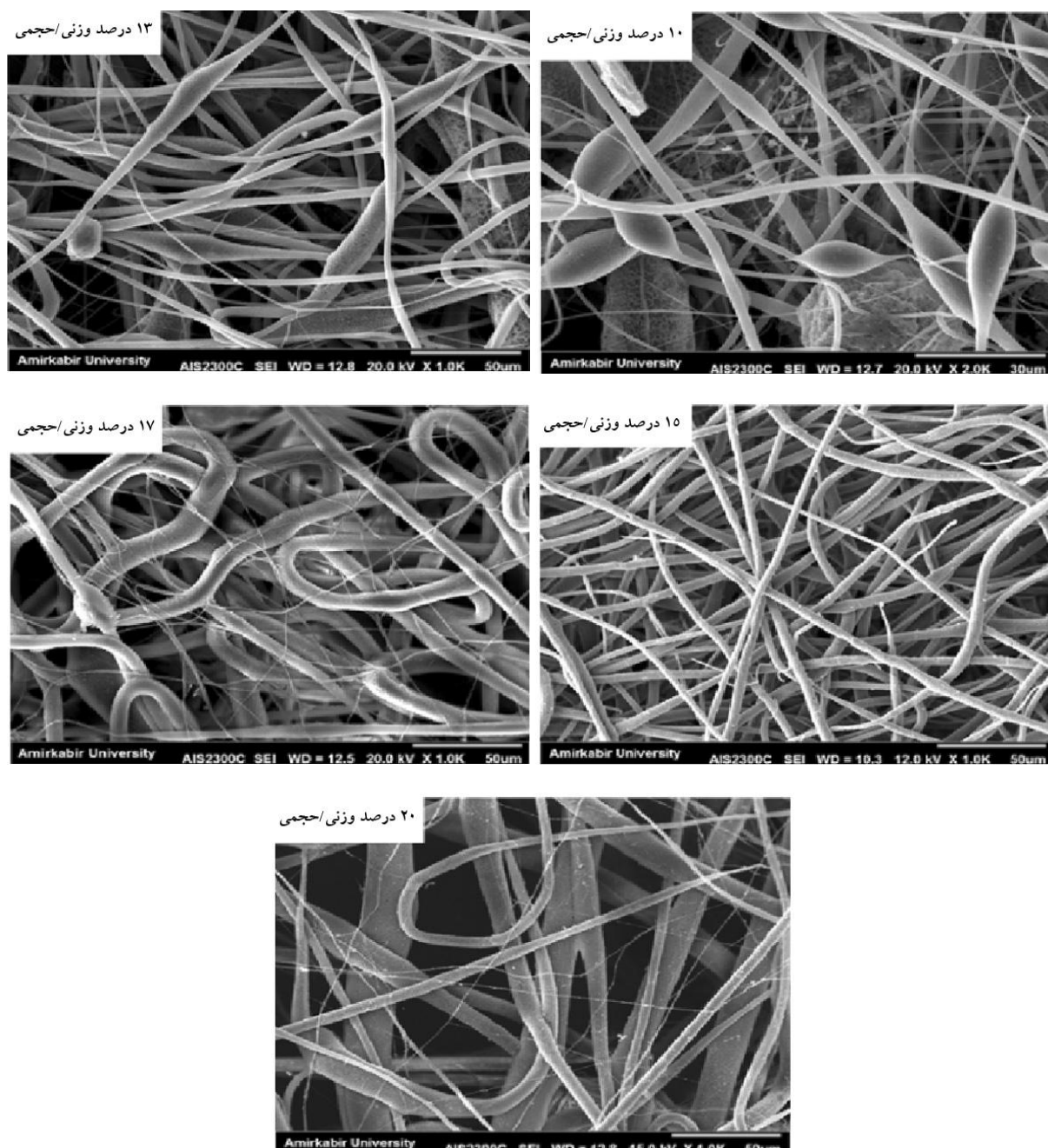
$$\text{کاهش وزن (درصد)} = \frac{W_0 - W_1}{W_0} \times 100$$

استریل نمودن داربست‌ها

برای استریل نمودن داربست‌ها، ابتدا در زیر هود داخل یک پلیت ۶ سانتی متری استریل قرار داده شد. در مرحله بعد، توسط اتانول ۷۰ درصد در سه نوبت و هر بار ۳۰ دقیقه شستشو داده

(ELISA Reader) (Biochrom Anthos 2020، آلمان) و در طول موج ۵۷۰ نانومتر بررسی شد. میزان رشد سلول‌ها بر

اساس میانگین جذب نور داربست‌ها محاسبه و نمودار آن رسم شد.



شکل ۱ تصاویر SEM از داربست‌های الکتروریسی شده PLA به روش الکتروریسی مرطوب در غلظت‌های مختلف

می‌شود که در غلظت حجمی/وزنی ۲۰ افزایش قطر فیبرها مشخص است. نکته قابل توجه این است که الکتروریسی داربست‌های فیبری PLA در روش مرطوب، با غلظت‌های حجمی/وزنی پایین‌تر از ۱۰ به علت کاهش کشش سطحی و غلظت‌های حجمی/وزنی بالاتر از ۲۰ به علت لخته شدن پلیمر در نوک سوزن قابل اجرا نبود. از نتایجی که در بررسی تصاویر SEM این داربست‌ها به دست آمد، مشخص شد که غلظت حجمی/وزنی ۱۵ پلیمر PLA به علت داشتن فیبرهای با قطر در حد نانو و میکرون و نداشتن مهره در ساختار خود، بهترین غلظت برای الکتروریسی آن‌ها با روش خشک و مرطوب است. همچنین، چسبندگی سلول‌های مزانشیمی ژله وارتون انسانی روی داربست در شکل ۲ به خوبی قابل مشاهده است.

نتایج

ریخت‌شناسی داربست‌ها

ریخت‌شناسی داربست‌های ساخته شده با پلیمر PLA خالص با روش الکتروریسی مرطوب وسیله تصاویر SEM به دست آمد. همان‌طور که در شکل ۱ مشاهده می‌شود، الکتروریسی PLA خالص در غلظت‌های مختلف، تفاوت‌هایی در اندازه فیبرها، میزان مهره‌ها و همچنین تخلخل آن‌ها دارند. همان‌طوری که مشاهده شد، داربست‌های PLA با غلظت حجمی/وزنی ۱۰ فیبرهای خوبی نداشتند و دارای مهره‌های بیشماری در ساختار میکروسکوپی خودشان بودند. همچنین با توجه به تصاویر به دست آمده مشخص شد که با افزایش غلظت پلیمر، اندازه قطر فیبرهای آن‌ها بزرگ‌تر



شکل ۲ تصویر SEM از چسبندگی سلول مزانشیمی ژله وارتون بر داربست PLA الکتروریسی شده در غلظت ۱۵ درصد حجمی/وزنی

حجمی/وزنی به ۲۰ درصد حجمی/وزنی همراه با افزایش قطر الیاف، درصد تخلخل نسبتاً کاهش پیدا کرد که دلیل این کاهش را می‌توان در ارتباط با افزایش قطر الیاف و وجود مهره در الیاف دانست. طبق اطلاعات جدول ۱، غلظت ۱۵ درصد حجمی/وزنی از پلیمر PLA برای ساخت داربست‌های الکتروریسی شده، براساس میزان تخلخل آن‌ها، بهترین غلظت

درصد تخلخل داربست‌ها

بر طبق اطلاعات به دست آمده از این آزمون و مطابقت با تصاویر SEM، مشخص شد با افزایش غلظت پلیمر از ۱۰ درصد حجمی/وزنی به ۱۵ درصد حجمی/وزنی، درصد تخلخل داربست‌های فیبری افزایش و اندازه فیبرها کاهش پیدا کرده است اما با افزایش غلظت از ۱۵ درصد

است و نسبت به بقیه گروه‌ها تفاوت معنی‌داری داشت ($P < 0.05$).

جدول ۱ میزان تخلخل داربست‌های PLA با روش Liquid displacement

درصد تخلخل به روش جابه جایی مایع	غلظت کلی محلول (درصد وزنی)
49.4 ± 1.8	۱۰/۰
79.3 ± 3.2	۱۳/۰
88.2 ± 2.4	۱۵/۰
74.2 ± 1.7	۱۷/۰
69.4 ± 2.6	۲۰/۰

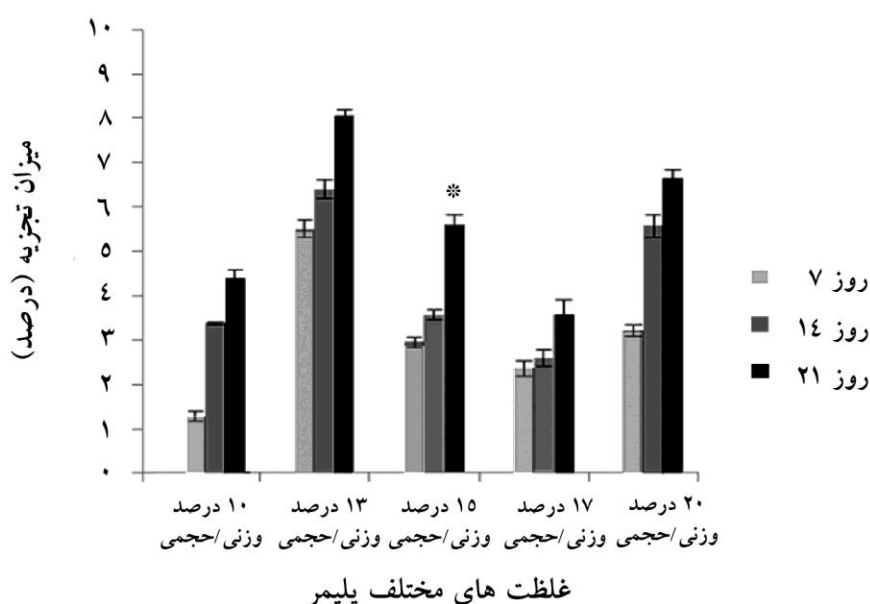
میزان تخلخل داربست‌های ساخته شده با روش الکتروریسی مرطوب؛ ($P < 0.05$ / میانگین داده‌ها $\pm SE$)

اندازه‌گیری میزان تخریب (Weight Loss)

داربست‌ها

طبق نتایج به‌دست آمده از این آزمایش که در شکل ۳ نمایش داده شده است، معلوم شد در داربست‌هایی که دارای فیبرهای منظم و یکنواخت و در اندازه‌های نانو است میزان سرعت تخریب نسبت به داربست‌های با فیبرهای میکرونی و

دارای مهره‌های متعدد، سریع‌تر است. از آن‌جایی که داربست ایده‌آل برای کاربردهای مهندسی بافت، داربستی است که میزان تخریب آن در بدن جاندار با میزان ساخته شدن ماتریکس خارج سلولی طبیعی بافت مورد نظر در تناسب باشد، پیش‌بینی بر آن است که طبق نتایج حاصل شده از آزمایش‌های دیگر، داربست ساخته شده با غلظت ۱۵ درصد حجمی/وزنی با روش الکتروریسی مرطوب، بهترین گزینه بین نمونه‌های دیگر باشد.



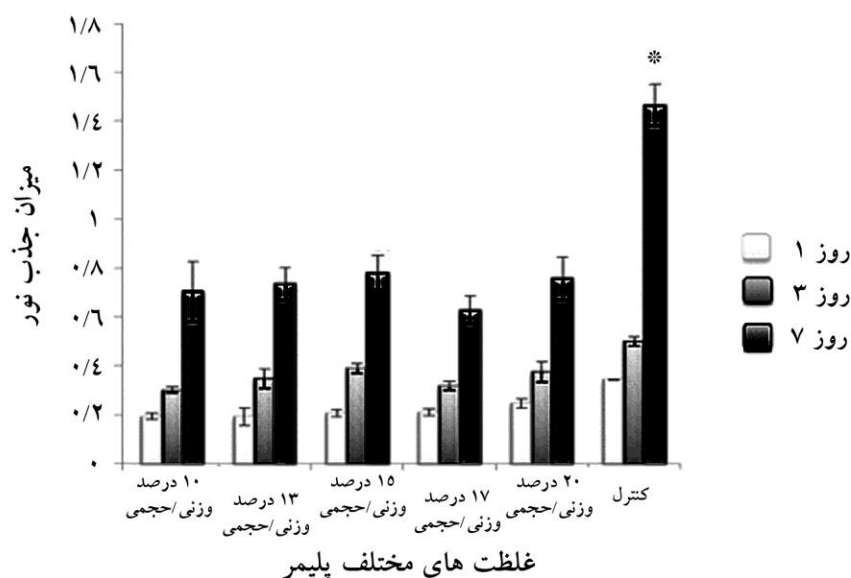
شکل ۳ نتایج حاصل از میزان درصد تخریب داربست‌های PLA الکتروریسی شده در غلظت‌های مختلف؛ غلظت PLA ۱۵ درصد حجمی/وزنی (*) تفاوت معنی‌داری با دیگر غلظت‌های این گروه دارد ($P < 0.05$) (میانگین داده‌ها $\pm SE$).

معنی دار نبود. همچنین، طبق اطلاعات حاصل شده از این آزمون، رشد و بقای سلول‌ها در محیط دو بعدی فاقد داربست طی روزهای مورد مطالعه، نسبت به گروه‌های حاوی داربست‌های PLA به صورت معنی داری بیشتر بود ($P < 0.05$). علت این امر، به خاطر صناعی بودن پلیمر پلی لاکتیک اسید و خاصیت آب‌گریزی زیادی آن است که باعث می‌شود سلول‌ها به خوبی به آن اتصال پیدا نکنند و همچنین در اثر تجزیه این پلیمر و اسیدی شدن محیط کشت سلول، از میزان رشد و بقای سلول کاسته شود. نتیجه کلی از این آزمون منطبق با آزمون‌های دیگر نشان داد که بهترین غلظت برای ساخت داربست‌های فیبری PLA با روش الکتروریسی مرطوب، ۱۵ درصد حجمی/وزنی است.

بررسی بقای سلول‌های مزانشیمی ژله و ارتون

بر روی داربست‌های PLA با MTT

برای بررسی اثر سمیت داربست‌ها روی سلول‌های مزانشیمی ژله و ارتون، این سلول‌ها به مدت ۱، ۳ و ۷ روز روی داربست‌های استریل PLA الکتروریسی شده در غلظت‌های گوناگون کشت داده شدند. سپس با کمک آزمون MTT، میزان بقای سلول‌ها ارزیابی شدند. نتایج به دست آمده طبق شکل ۴ نشان داد، سلول‌های بنیادی مزانشیمی ژله و ارتون روی داربست‌های ساخته شده به خوبی رشد نموده‌اند. در داربست‌های با غلظت ۱۵ درصد حجمی/وزنی از پلیمر PLA، بقا و رشد این سلول‌ها طی روزهای ۱، ۳ و ۷ نسبت به گروه‌های دیگر بیشتر بود، اما این اختلاف



شکل ۳ بررسی کمی میزان اثر سمیت داربست PLA در غلظت‌های مختلف بر بقای سلول‌های مزانشیمی ژله و ارتون انسانی در روزهای ۱، ۳ و ۷ بعد از کشت، با روش MTT؛ میزان بقای سلول‌های مزانشیمی روی این داربست‌ها در روز ۷ نسبت به روزهای ۱ و ۳ بیشتر بوده است ولی در مقایسه با گروه کنترل (*) به طور معنی داری کمتر بوده است ($P < 0.05$). در بین انواع درصد‌های PLA، غلظت ۱۵ درصد حجمی/وزنی نسبت به غلظت‌های دیگر بهتر بود اما این اختلاف معنی دار نبود. (میانگین داده‌ها $\pm$ SE)

بحث

محیط سه بعدی برای رشد و تمایز سلول‌ها، بر اساس فراساختار بافت مورد نظر است. برای رشد سلول‌ها در یک محیط سه

یکی از عوامل مهم در بحث مهندسی بافت، ایجاد یک

بعدی شبیه به ماتریکس خارج سلولی طبیعی بدن، از داربست‌های زیست سازگار استفاده می‌شود [۲۴]. روش‌های متعددی برای تولید این داربست‌ها وجود دارد که از جمله آن‌ها می‌توان به فاقد سلول نمودن بافت‌های انسان و موجودات دیگر، یا ساخت آن‌ها توسط روش‌های مهندسی شده اشاره نمود. تاکنون تحقیقات بیشماری برای طراحی و تولید یک بستر مناسب شبیه به ماتریکس خارج سلولی طبیعی بافت‌های مختلف بدن انجام شده است. یکی از اجزای مشترک در ماتریکس خارج سلولی بدن بین اکثر بافت‌ها، وجود الیاف کلاژنی و کلیکوپروتئینی و پروتئوگلیکانی در اندازه‌های نانو و میکرون است [۲۵]. این فیبرها باعث می‌شود که نسبت سطح به حجم افزایش یابد و سلول‌های به خوبی به آن‌ها متصل شوند. برای تولید داربست‌های نانوفیبری روش‌های گوناگونی وجود دارد. الکتروریسی یکی از روش‌های آسان و کارآمد ساخت این داربست‌ها است که به صورت عمده در حال استفاده است. داربست‌هایی که با این روش تولید می‌شوند به علت داشتن فیبرهایی در حد نانو و نیز داشتن نسبت سطح به حجم زیاد، گزینه مناسبی به عنوان بستری جایگزین ماتریکس خارج سلولی طبیعی بدن در موارد مهندسی بافت است [۲۶]. از پلیمرهای طبیعی و مصنوعی مختلفی به منظور الکتروریسی داربست‌ها استفاده شده است [۲۷]. پارامترهای مختلفی از جمله؛ نرخ تغذیه، میزان ولتاژ، غلظت محلول‌ها و نیز فاصله بین نوک نازل و صفحه جمع‌کننده بر میزان اندازه فیبرها و تخلخل داربست و کیفیت آن‌ها، در روش الکتروریسی مؤثر است [۲۸].

در روش الکتروریسی که از یک صفحه آلومینیومی (الکتروریسی خشک) به عنوان جمع‌کننده فیبرها استفاده می‌شود، داربست‌های ساخته شده به صورت ورقه‌ای دو بعدی هستند و تولید بستری سه بعدی با این روش به همراه تخلخل بالا دشوار است. برای ساخت داربست‌های زیست سازگار سه بعدی و با تخلخل بالا و چگالی پایین، در این مطالعه از روش جدید الکتروریسی مرطوب استفاده شد. از مزایای این روش

می‌توان به کم هزینه بودن و آسان بودن آن به همراه تولید داربست‌های متخلخل سه بعدی بسیار خوب، اشاره نمود. وان (Wan) و همکاران در سال ۲۰۰۸ به بررسی دی-ال-لاکتیک اسید پیوند زده شده روی کیتوزان برای ساخت داربست کوپلیمری PCLA [poly(chitosan-g-DL-lactic acid)] به وسیله روش الکتروریسی مرطوب پرداختند. داربست‌های از جنس PCLA با فیبرهای به اندازه میکرومتر و نانومتر با این روش ساخته شد. داربست‌های تشکیل شده منافذی با اندازه‌های ۱ میکرومتر تا ۳۰ میکرومتر از خود نشان دادند و میزان تخلخل این نوع داربست‌ها در غلظت‌های مختلف PCLA و مواد تشکیل دهنده حمام انعقادی، متفاوت بود که حداکثر تا ۸۰ درصد تخلخل در این نوع داربست‌ها دیده شد. در نهایت داده‌های جمع‌آوری شده در آزمایشگاه از سلول‌های فیروبلست خرگوش و داربست‌های تولید شده نشان داد که تفاوت اساسی در قابلیت زیستی، چگالی و توزیع فیروبلست‌های ساخته شده بین داربست‌های فیبری PCLA و داربست‌های فیبری کیتوزان خالص وجود ندارد [۲۹]. بعد از آن یوکویاما (Yokoyama) و همکاران در سال ۲۰۰۹ به وسیله ترکیب دو روش الکتروریسی و الکتروریسی مرطوب و استفاده از روش ارزان و کارآمد الکتروریسی مرطوب، داربست‌های اسفنجی سه بعدی از پلیمر [Poly (glycolic acid): PGA] با چگالی کنترل شده ساختند که در مقایسه با PGA های ساخته شده با روش الکتروریسی خشک دارای چگالی کمتر و تخلخل بیشتر بود [۱۵]. نتایج حاصل از مطالعه حاضر بر اساس مطالعات سایر محققین، نشان داد که تولید داربست‌های سه بعدی PLA ساخته شده با روش الکتروریسی مرطوب دارای تخلخل بالای ۸۰ درصد و دارای چگالی کم است. در این روش نیز که تا حدودی مانند روش الکتروریسی خشک است، به جای صفحه جمع‌کننده از یک حمام انعقادی حاوی محلول ضد انعقاد استفاده می‌شود. محلول پلیمری آماده شده بعد از تنظیمات دستگاه، به صورت فیبرهای در حد نانو به داخل حمام انعقادی وارد می‌شوند و به صورت لایه به لایه بر روی هم قرار می‌گیرند

مشخص شد که در غلظت‌های کمتر از ۱۰ درصد حجمی/وزنی، پلیمرها به علت غلظت پایین به صورت ذره پاشیده می‌شد و در غلظت‌های بالاتر از ۲۰ درصد حجمی/وزنی؛ به علت لخته شدن پلیمر در نوک نازل، نمی‌توان داربست‌های فیبری مناسبی را تولید نمود.

نتیجه‌ای که در این پژوهش به دست آمد، نشان داد که داربست‌های نانوفیبری پلی لاکتیک اسید تولید شده با روش جدید الکتروریسی مرطوب در محدود غلظتی مشخصی (۱۰-۲۰ درصد حجمی/وزنی) قابل الکتروریسی است. نتایج آزمون‌های انجام شده روی داربست‌های الکتروریسی شده با غلظت‌های مختلف و همچنین میزان رشد سلول‌های ژله وارتون انسانی بر این سلول‌ها نشان داد که بهترین غلظت از پلیمر PLA برای تولید این داربست‌های سه بعدی، ۱۵ درصد حجمی/وزنی است.

تشکر و قدردانی

این طرح با حمایت معاونت پژوهشی دانشکده پزشکی دانشگاه تربیت مدرس تهران، انجام شده است.

و داربستی سه بعدی را با ضخامت دلخواه و تخلخل بالا تولید می‌کنند. در این مطالعه، از یک پلیمر زیست سازگار و زیست تخریب پذیر مصنوعی بنام پلی لاکتیک اسید (PLA) به عنوان بستر اولیه استفاده شد. داربست‌های مورد نظر برای انتخاب غلظت بهینه، با غلظت‌های درصد حجمی/وزنی ۱۰، ۱۳، ۱۵، ۱۷، ۲۰ ساخته شد. آزمون‌های سلولی برای این داربست‌ها انجام و مشخص شد که بهترین غلظت برای ساخت این داربست‌ها در هر دو روش ۱۵ درصد حجمی/وزنی است که با نتایج مطالعات دیگر مطابقت داشت [۳۰، ۳۱].

نتیجه بسیار جالبی که در میان داربست‌های تولید شده با روش الکتروریسی مرطوب مشاهده شد، میزان تخلخل بالا در مقایسه با روش الکتروریسی مرسوم بود. تخلخل در این نمونه داربست‌ها هم در بین فیبرها و هم در داخل خود فیبرها وجود داشت که این تخلخل بالا در داخل فیبرها برای موارد مهندسی بافت و اتصال سلول‌ها و نیز رهایش دارو و هورمون‌ها بسیار اهمیت دارد که ساخت این چنین داربست‌هایی با تخلخل بالا و حالت ۳ بعدی آن‌ها با روش الکتروریسی مرطوب تاکنون انجام نشده بود. طبق یافته‌های دیگری که از این مطالعه به دست آمد

منابع

- [1] Humes HD, Buffington D, Westover AJ, Roy S, Fissell W, editors. Principles of tissue engineering. British Elsevier Inc; 2013; p: 3-33.
- [2] Lavik E, Langer R. Tissue engineering: current state and perspectives. Appl Microbiol Biotechnol 2004; 65(1): 1-8.
- [3] Sharp LA. Organ transplantation as a transformative experience: anthropological insights into the restructuring of the self. Med Anthropol Q 1995; 9(3): 357-89.
- [4] Heineken FG, Skalak R. Tissue engineering: a brief overview. J Biomech Eng 1991; 113(2): 111-2.
- [5] Ma PX. Scaffolds for tissue fabrication. Materials Today 2004; 7(5): 30-40.
- [6] Cheung HY, Lau KT, Lu TP, Hui D. A critical review on polymer-based bio-engineered materials for scaffold development. Composites Part B: Engineering 2007; 38(3): 291-300.
- [7] Tsang VL, Bhatia SN. Three-dimensional tissue fabrication. Adv Drug Deliv Rev 2004; 56(11): 1635-47.
- [8] Lee KY, Mooney DJ. Alginate: properties and biomedical applications. Prog Polym Sci 2012; 37(1): 106-126.
- [9] Bhattarai N, Li Z, Edmondson D, Zhang M.

- Alginate-based nanofibrous scaffolds: Structural, mechanical, and biological properties. *Advanced Materials* 2006; 18(11): 1463-7.
- [10] Rao RU, Suman K, Rao VK, Bhanukiran K. Study of rheological and mechanical properties of biodegradable polylactide and polycaprolactone blends. *International Journal of Engineering Science and Technology (IJEST)* 2011; 3(8): 6259-65.
- [11] Gui-Bo Y, You-Zhu Z, Shu-Dong W, De-Bing S, Zhi-Hui D, Wei-Guo F. Study of the electrospun PLA/silk fibroin-gelatin composite nanofibrous scaffold for tissue engineering. *J Biomed Mater Res A* 2010; 93(1): 158-63.
- [12] Ramakrishna S, Fujihara K, Teo WE, Lim TC, Ma Z. *An introduction to electrospinning and nanofibers*. Singapore: World Scientific, 2005; p: 24-42.
- [13] Nain AS, Amon C, Sitti M. Proximal probes based nanorobotic drawing of polymer micro/nanofibers. *IEEE Transactions on Nanotechnology* 2006; 5(5): 499-510.
- [14] Vasita R, Katti DS. Nanofibers and their applications in tissue engineering. *Int J Nanomedicine* 2006; 1(1): 15-30.
- [15] Yokoyama Y, Hattori S, Yoshikawa C, Yasuda Y, Koyama H, Takato T, Kobayashi H. Novel wet electrospinning system for fabrication of spongyform nanofiber 3-dimensional fabric. *Materials Letters* 2009; 63(9-10): 754-6.
- [16] Kostakova E, Seps M, Pokomy P, Lukas D. Study of polycaprolactone wet electrospinning process. *eXPRESS Polymer Letters* 2014; 8(8): 554-64.
- [17] Naseri Nosar M, Salehi M, Ghorbani S, Pour Beiranvand S, Goodarzi A, Azami M. Characterization of wet-electrospun cellulose acetate based 3-dimensional scaffolds for skin tissue engineering applications: influence of cellulose acetate concentration. *Cellulose* 2016; 23(5): 3239-48.
- [18] Mohammadi Y, Mirzadeh H, Moztarzadeh F, Soleimani M, Jabbari E. Osteogenic differentiation of mesenchymal stem cells on novel three-dimensional poly(l-lactic acid)/chitosan/gelatin/b-tricalcium phosphate hybrid scaffolds. *Iranian Polymer Journal* 2007; 16(1): 57-69.
- [19] Ho ST, Hutmacher DW. A comparison of micro CT with other techniques used in the characterization of scaffolds. *Biomaterials* 2006; 27(8): 1362-76.
- [20] Jaklenec A, Hinckfuss A, Bilgen B, Ciombar DM, Aaron R, Mathiowitz E. Sequential release of bioactive IGF-I and TGF-beta 1 from PLGA microsphere-based scaffolds. *Biomaterials* 2008; 29(10): 1518-25.
- [21] Hiep NT, Lee BT. Electro-spinning of PLGA/PCL blends for tissue engineering and their biocompatibility. *J Mater Sci Mater Med* 2010; 21(6): 1969-78.
- [22] Dong Y, Liao S, Ngiam M, Chan CK, Ramakrishna S. Degradation behaviors of electrospun resorbable polyester nanofibers. *Tissue Eng Part B Rev* 2009; 15(3): 333-51.
- [23] Ma L, Gao C, Mao Z, Zhou J, Shen J, Hu X, Han C. Collagen/chitosan porous scaffolds with improved biostability for skin tissue engineering. *Biomaterials* 2003; 24(26): 4833-41.

- [24] Srouji S, Kizhner T, Suss-Tobi E, Livne E, Zussman E. 3-D Nanofibrous electrospun multilayered construct is an alternative ECM mimicking scaffold. *J Mater Sci Mater Med* 2008; 19(3): 1249-55.
- [25] Li WJ, Laurencin CT, Caterson EJ, Tuan RS, Ko FK. Electrospun nanofibrous structure: a novel scaffold for tissue engineering. *J Biomed Mater Res* 2002; 60(4): 613-21.
- [26] O'Brien FJ. Biomaterials & scaffolds for tissue engineering. *Materials Today* 2011; 14(3): 88-95.
- [27] Sell SA, Wolfe PS, Garg K, McCool JM, Rodriguez IA, Bowlin GL. The use of natural polymers in tissue engineering: a focus on electrospun extracellular matrix analogues. *Polymers* 2010; 2(4): 522-53.
- [28] Pham QP, Sharma U, Mikos AG. Electrospinning of polymeric nanofibers for tissue engineering applications: a review. *Tissue Eng* 2006; 12(5): 1197-211.
- [29] Wan Y, Cao X, Zhang S, Wang S, Wu Q. Fibrous poly(chitosan-g-DL-lactic acid) scaffolds prepared via electro-wet-spinning. *Acta Biomater* 2008; 4(4): 876-86.
- [30] Gómez-Pachón EY, Vera-Graziano R, Montiel Campos R, editors. Structure of poly (lactic-acid) PLA nanofibers scaffolds prepared by electrospinning. In: *conference series: Material Science Engineering*. IOP Publishing 2014; 59(1): 012003.
- [31] Lee JB, Jeong SI, Bae MS, Yang DH, Heo DN, Kim CH, Alsberg E, Kwon IK. Highly porous electrospun nanofibers enhanced by ultrasonication for improved cellular infiltration. *Tissue Eng Part A* 2011; 17(21-22): 2695-702.