

ساخت بسترهایی از پلیمر PLGA با دو روش الکتروریسی و انجماد - خشک کن به منظور مهندسی بافت

نجمه سلامیان^۱، شیوا ایرانی^۱ Ph.D.، سید محمد اطمیابی^۲ Ph.D.*، مژگان زندی^۳ Ph.D.، سید مهدی سعید^۳ Ph.D.

۱- گروه زیست شناسی، دانشکده علوم پایه، واحد علوم و تحقیقات تهران، دانشگاه آزاد اسلامی

۲- گروه فناوریهای نوین، بخش پایلوت بیوتکنولوژی، انستیتو پاستور ایران

۳- گروه بیومتریال، پژوهشگاه پلیمر و پتروشیمی ایران،

* پست الکترونیک نویسنده مسئول: atyabi@pasteur.ac.ir, mohammadatyabi@yahoo.com

تاریخ پذیرش: ۱۳۹۲/۲/۱۰

تاریخ دریافت: ۱۳۹۱/۶/۱۶

چکیده

هدف: در این پژوهش اهمیت روش ساخت بستری از پلیمر PLGA با ساختار نانو به روش الکتروریسی و روش انجماد-خشک کن مورد مقایسه و ارزیابی قرار گرفت. به همین منظور اثر نانوتوپوگرافی بر تکثیر سلولی بر روی نانوفیبرهای تهیه شده در سه سرعت جمع کننده با یکدیگر مقایسه شد.

مواد و روش‌ها: بسترهایی از PLGA با روش انجماد خشک کن و الکتروریسی تهیه گردید. مورفولوژی ساختارها توسط میکروسکوپ الکترونی، بررسی شد. جهت سنجش فعالیت سلولی، سلول‌های فیبروبلاست موشی بر روی ساختارها کشت داده شد و با آزمون MTT بررسی گردید.

نتایج: تصاویر میکروسکوپ الکترونی نشان داد، با افزایش سرعت چرخش جمع کننده، میزان نظم فیبرها افزایش یافت. تست MTT ($p < 0.05$)، در ۲۴ ساعت مشخص کرد که بسترهای PLGA تهیه شده به روش انجماد-خشک کن با ایجاد ساختاری متخلخل، چسبندگی مناسبی برای سلول فراهم کرده است. با ادامه کشت به مدت ۴۸ و ۷۲ ساعت به طور معناداری قابلیت زنده ماندن سلول بر روی نانوفیبرهای PLGA متناسب با افزایش نظم آنها افزایش یافت. این قابلیت بر روی ساختار PLGA انجماد-خشک کن تغییر چندانی نداشت.

نتیجه گیری: نتایج حاصل بیانگر عمل کرد بهتر سلول بر روی نانوفیبر ساخته شده از PLGA به روش الکتروریسی شده نسبت به روش انجماد-خشک کن بود. علاوه بر این، نانوفیبر منظم به عنوان یک فاکتور مثبت در حمایت از رشد سلول عمل می‌کند به نظر می‌رسد ساختار آن به ماتریکس خارج سلولی طبیعی بسیار نزدیک است.

واژگان کلیدی: مهندسی بافت، نانوفیبر، الکتروریسی، PLGA، انجماد-خشک کن

مقدمه

یکی از مشکلات بزرگ که علم پزشکی از دیرباز با آن درگیر بوده است، ارائه درمانی قطعی برای بازسازی بافت‌های از کار افتاده و یا معیوب می‌باشد. در حال حاضر تکنیک‌های مهندسی بافت بر اساس کشت سلول بر روی داربست توسعه یافته است. مهندسی بافت با طراحی و ساخت یک داربست با ساختار فیزیکی مناسب به دنبال ایجاد شرایطی است که امکان چسبندگی سلول‌ها به داربست، مهاجرت سلولی، تکثیر سلولی، تمایز سلولی، و در نهایت رشد و جایگزینی بافت جدید را ایجاد کند (۱، ۲ و ۳). در یک بافت، سلول‌ها با ماتریکس خارج سلولی احاطه شده‌اند که با یک شبکه طبیعی از نانو فیبرهای منظم تعریف شده است. این نانو ساختار سه بعدی دارای مولکول‌های متفاوتی است که با گیرنده‌های موثر در چسبندگی سلول از جمله اینتگرین‌ها بر هم کنش می‌دهند و با پشتیبانی از سلول، رفتارهای سلولی را هدایت می‌کند. این رفتارها نتیجه واکنش سلول-ماتریکس خارج سلولی و به دنبال آن واکنش سلول-سلول و سلول با فاکتورهای حمایت کننده از رشد سلول است (۴ و ۵). تحقیقات انجام شده در زمینه شناسایی فاکتورهایی که در سرنوشت سلولی نقش دارند، حاکی از آن است که بیان مولکول‌های دخیل در چسبندگی سلولی و نیز اجزای ماتریکس خارج سلولی، در ایجاد یک محیط منحصر به فرد که قادر به تولید سیگنال‌های تنظیمی-القایی باشد، ضروری است (۶). اینتگرین‌ها از اصلی‌ترین گیرنده‌های سطح سلول می‌باشد که از اهمیت ویژه‌ای برخوردارند و در اتصالات سلول-ماتریکس خارج سلولی نقش اساسی دارند (۶، ۷، ۸ و ۹). اتصال و چسبندگی اولین و ضروری‌ترین رفتار یک سلول در مواجهه با ریزمحیط قرار گرفته در آن می‌باشد. یافته‌های حاصل از مطالعه ماتریکس خارج سلولی طبیعی در بافت، یک نقشه برداری (توپوگرافی) با جهت‌گیری منظم و مشخص را برای نانوفیبرهای موجود در آن نشان می‌دهند که هم‌راستا با عمل کرد آن بافت است (۸). در این میان وجود بسترهایی که نقشی مشابه ماتریکس خارج سلولی را ایفا می‌کنند اهمیت زیادی دارد، چرا که وظیفه نگهداری سلول‌ها و شکل‌دهی به رفتار آن‌ها را بر عهده دارد (۹). بنابراین برای آن که یک بستر مهندسی شده دقیقاً همان عمل ماتریکس خارج سلولی طبیعی را انجام دهد، باید همان ساختار نانوفیبری (نانوتوپوگرافی) و سه بعدی را داشته باشد. اولین بار در سال ۱۹۱۱ هاریسون تاثیر توپوگرافی در رفتار سلول را مطرح کرد. بسترهای نانوتوپوگراف با فراهم آوردن ساختار قابل تنظیمی،

خصوصاً در کنترل تمایز سلول‌های بنیادی مناسب عمل می‌کنند (۱۰). پیشرفت فناوری نانو در سال‌های اخیر امکان طراحی و مهندسی مواد زیستی جدید را فراهم کرده است. نانوتکنولوژی با ورود خود به عرصه‌های مختلف علمی تحول شگرفی را در شاخه‌های مختلف زیستی از جمله مهندسی بافت بوجود آورده است (۱۱).

در این میان نانوفیبرها پتانسیل بالایی در ترمیم بافت نشان داده‌اند (۱۲). روش‌های مختلفی برای ساخت نانوفیبر وجود دارد که در سال‌های اخیر روش الکترورسی با چسبندگی جایگاه ویژه‌ای را به خود اختصاص داده است. روش الکترورسی با داشتن سرعت زیاد، ایجاد سطح مخصوص بالا، تخلخل مناسب برای تکثیر و چسبندگی سلول‌ها، کنترل پذیری بالای فرآیند، تنوع در شکل و مواد پلیمری قابل مصرف، توجه محققین را به خود جلب کرده است (۱۲، ۱۳، ۱۴، ۱۵ و ۱۶). فرآیند الکترورسی در ساده‌ترین شکل شامل یک نازل برای خروج محلول پلیمری، دو الکتروود، یک منبع تغذیه DC با تامین ولتاژ در دامنه کیلو ولت و یک جمع کننده الیاف است. اغلب نانوفیبرهای تولید شده توسط الکترورسی به فرم یک شبکه بافته نشده جمع‌آوری می‌شوند که معمولاً فیبرهایی با جهت‌گیری تصادفی و ویژگی مکانیکی ضعیف حاصل می‌شود. ماتریکس خارج سلولی شبکه‌ای از نانوفیبرهای پیچیده منظم و مشخص است. با توجه به تاثیر توپوگرافی محیط بر القای مسیرهای پیام رسانی دخیل در فونوتیپ سلول، نانوفیبرها، قادرند محیطی مشابه با بدن را فراهم آورند (۱۷، ۱۸ و ۱۹). PLGA (کوپلیمر لاکتیک اسید و گلیکولیک اسید) از پلیمرهای زیستی متعلق به خانواده پلی آلفا هیدروکسی استرها می‌باشند (۲۰) که برای ساخت داربست‌های سنتزی در مهندسی بافت از آن استفاده می‌گردد. رفتار و میزان تخریب پذیری کوپلیمر PLGA قابل کنترل است. همچنین می‌توان ویژگی‌های مکانیکی آن را بر اساس بافت مورد نظر تنظیم نمود. این ویژگی مزیت اصلی این پلیمر و دلیل کاربرد آن در پزشکی است. غیرسمی بودن و تخلخل از دیگر ویژگی‌های این پلیمر می‌باشد که از دلایل کاربرد آن در مهندسی بافت است (۲۱، ۲۲، ۲۳ و ۲۴). در این پژوهش PLGA به‌عنوان پلیمر سازنده بسترها انتخاب شد و دو بستر، شامل نانوفیبر PLGA با روش الکترورسی و دیگری بستر PLGA، با روش انجماد-خشک کن (freeze-drying) (۲۵ و ۲۶)، تهیه گردید. برای سنجش اثر جهت‌گیری و چرخش الیافها نسبت به یکدیگر و اثر آن بر قابلیت زنده ماندن سلول، نانوفیبرهای الکترورسی در سه

سلولی طبیعی، نقش اساسی در مهندسی بافت ایفا کنند. بر همین اساس در این پژوهش اهمیت روش ساخت بستری از پلیمر PLGA با ساختار نانو به روش الکترورسی و روش انجماد-خشک کن مورد مقایسه و ارزیابی قرار گرفت. به همین منظور اثر نانوتوپوگرافی بر تکثیر سلولی بر روی نانوفیبرهای تهیه شده در سه سرعت جمع کننده با یکدیگر مقایسه شد.

مقایسه مورفولوژی ساختارها و نیز جهت گیری الیافها نسبت به یکدیگر در بسترهای الکترورسی شده، پس از پوشش آنها با لایه‌ای از طلا، با میکروسکوپ الکترونی اسکنینگ (Hitachi S3000N) در ولتاژ ۱۵ کیلو ولت انجام شد.

کشت سلول: فلاسک های ۲۵ سانتی متر مربعی حاوی سلول فیبروبلاستی L929 از انستیتو پاستور ایران خریداری شد. این سلولها در محیط RPMI-1640 (Roswell Park Memorial Institute-1640 Medium) (Gibco) حاوی ۱۰ درصد سرم حیوانی (Gibco) و محلول آنتی-بیوتیک آنتی-مایکوتیک ۱۰۰x (Sigma)، ۱۰۰۰۰ واحد پنی‌سیلین، ۱۰ میلی گرم استرپتومایسین و ۲۵ میکروگرم آمفوتریسین در هر میلی لیتر، در انکوباتور CO₂ با رطوبت ۹۵ درصد دمای ۳۷ درجه سانتی گراد نگهداری شد و محیط کشت سلول هر ۴۸ ساعت تعویض شد.

بررسی زیست سازگاری بسترها: به منظور بررسی زیست سازگاری بسترها زمانی که تراکم سلولهای فیبروبلاست L929 در فلاسک کشت سلول به حد قابل قبول رسید، با استفاده از محلول تریپسین ۰/۲۵ درصد (Gibco)، پس از ۱ تا ۵ دقیقه سلولها از ظرف کشت سلول جدا شده و پس از شمارش با لام نئوبار، تعداد ۱۰^۴ سلول به هر چاهک، در پلیت ۲۴ خانه که از قبل نمونه‌های استریل ۱ سانتی متر مربع در آن قرار داشت، منتقل شد. برای استریل کردن، نمونه‌ها در اندازه‌های یک در یک سانتی متر بریده شد و درون ظرفهای استریل قرار داده شد و سپس هر دو سمت نمونه‌ها به مدت ۲۰ دقیقه در معرض اشعه UV قرار گرفت. روند رشد و تکثیر سلولی بر روی نمونه‌های مورد آزمایش با میکروسکوپ معکوس (Bell: INV-100 FL) مشاهده و عکسبرداری شد.

بررسی قابلیت زنده ماندن سلول: میزان سلولهای زنده و فعال روی بسترها با سنجش میزان فعالیت آنزیم میتوکندریایی، توسط سنجش MTT تعیین شد. پس از جدا کردن سلولها از

سرعت چرخش متفاوت جمع کننده، تهیه شد. تغییر سرعت چرخش جمع کننده یکی از عوامل موثر در فرآیند الکترورسی است که برای به دست آوردن فیبرهایی با جهت گیری‌های مختلف اعمال می‌شود (۲۷، ۲۸ و ۲۹). این پژوهش با هدف بررسی اهمیت شیوه ساخت بسترهای مناسب مهندسی بافت و نقش آن‌ها در تکثیر سلول انجام شد. برای تهیه بسترها از پلیمر PLGA به روشهای الکترورسی و انجماد-خشک کن انجام شد.

مواد و روش‌ها

ساخت بستر

تهیه نانوفیبرهای الکترورسی: نانوفیبرهای PLGA با روش الکترورسی تهیه شدند. جهت ساخت، از دستگاه الکترورسی مدل CO881007NYI ساخت شرکت نانو ساختار آسیا کشور ایران که در پژوهشگاه پلیمر و پتروشیمی ایران موجود است، استفاده شد. محلول PLGA با نسبت (۱: گلیکولیک اسید به لاکتیک اسید (mol wt 30,000-60,000, Sigma) با غلظت ۲۰ درصد در حلال ترکیبی دی متیل فرمامید/ کلروفرم با نسبت ۱ به ۳ تهیه شد. ولتاژ دستگاه ۲۰ کیلوولت، فاصله بین سوزن (آند) تا جمع کننده لیف (کاتد)، ۱۵ سانتی متر و سرعت پمپ شدن محلول پلیمر به نوک سوزن ۱ میلی لیتر بر ساعت تعبیه شد. برای تهیه فیبرهای منظم و تصادفی از یک جمع کننده استوانه‌ای پوشیده شده با ورقه آلومینیومی با ضخامت ۵۰ سانتی متر با سرعت چرخش قابل تنظیم استفاده گردید. بنابراین فرآیند الکترورسی در سه شرایط متفاوت انجام شد که در هر سه مورد، تمام متغیرهای ذکر شده ثابت بود به جز، سرعت چرخش جمع کننده که در سه میزان ۲۵۰، ۱۳۷۵ و ۲۵۰۰ دور بر دقیقه تنظیم شد. سرعت چرخش جمع کننده مستقیماً بر اندازه و مورفولوژی فیبرها موثر است.

تهیه بستر با روش انجماد - خشک کن: محلول ۱۲ درصد PLGA در حلال تترافلوئوراتانول (TFE) تهیه شد سپس محلول حاصل به یک پلیت که کف آن با یک ورقه آلومینیومی پوشیده شده بود انتقال یافت. پلیت به فریزر با دمای ۳۰- درجه سانتی گراد منتقل شد و پس از انجماد کامل محلول، به مدت ۲ تا ۳ روز در محیط خلا قرار گرفت. ساختار تهیه شده در یخچال با دمای ۴ درجه سانتی گراد نگهداری شد.

بررسی با میکروسکوپ الکترونی: نانوفیبرها می‌توانند با فراهم کردن محیطی سه بعدی در تقلید از ماتریکس خارج

نتایج

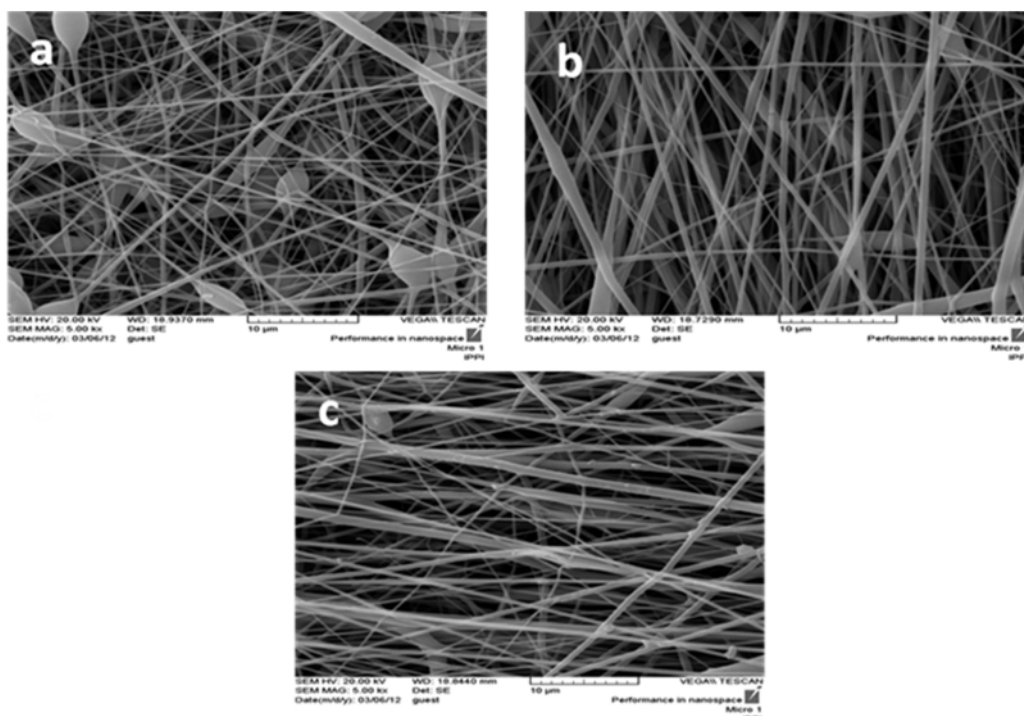
میکروسکوپ الکترونی

به منظور بررسی تاثیر روش ساخت بسترها بر ساختار آن‌ها و تاثیر تغییر سرعت جمع کننده الیاف در فرآیند الکتروریسی بر مورفولوژی نانوفیبر با استفاده از میکروسکوپ الکترونی تصاویری تهیه گردید. نتایج نشان داد که با افزایش سرعت چرخش جمع کننده، میزان نظم فیبرها نیز افزایش یافته است (شکل ۱). همچنین ساختار متخلخل بستر تهیه شده به روش انجماد-خشک‌کن در شکل ۲ دیده می‌شود.

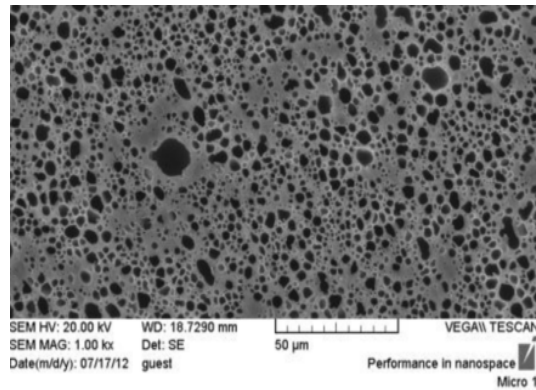
زیست سازگاری بسترها

نتایج حاصل از کشت سلول بر روی نانوفیبرهای الکتروریسی شده و بسترهای تهیه شده به روش انجماد-خشک‌کن با میکروسکوپ معکوس معمولی مشاهده و مورد بررسی قرار گرفت. (شکل ۳). در مورد هر چهار نمونه جهت‌گیری و تمایل سلول‌ها به سمت آن‌ها مشاهده گردید که بیانگر زیست سازگار خوب ساختارها می‌باشد.

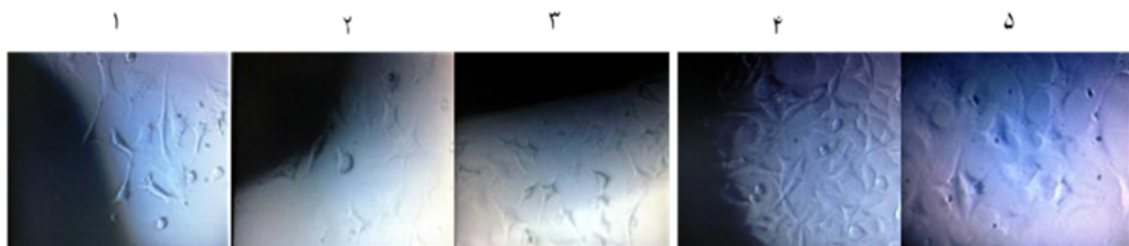
کف فلاسک با محلول تریپسین ۰/۲۵ درصد، شمارش انجام شد و تعداد 10^4 سلول به هر چاهک، در پلیت ۲۴ خانه محتوی بسترهای استریل منتقل شد. کشت سلول تا ۷۲ ساعت ادامه یافت و هر ۲۴ ساعت میزان تکثیر سلول‌ها بر روی بسترها با استفاده از تست MTT سنجیده شد. بدین‌صورت که پس از خارج کردن محیط کشت، ۱۰۰ میکرولیتر محلول MTT (Sigma)، (۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر در PBS) (یا محلول بافر فسفات نمکی ۱x و ۹۰۰ میکرولیتر محیط کشت تازه محتوی ۱۰ درصد سرم به هر چاهک از پلیت ۲۴ خانه اضافه شد و به مدت ۳ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد نگهداری شد. سپس محیط کشت حاوی محلول MTT با دقت خارج شد و جهت حل کردن کریستال‌های فورمازان ۱۰۰ میکرولیتر دی متیل سولفوکساید (DMSO) به هر چاهک اضافه گردید و به مدت ۱۵ دقیقه در تاریکی نگهداری شد. میزان جذب نوری در طول موج ۵۷۰ nm (λ Ref: ۶۳۰ nm) توسط دستگاه ELISA reader (BioTek ELx800) خوانده شد. قابلیت زنده ماندن سلول‌ها به صورت درصد نسبت نمونه به کنترل محاسبه گردید. نتایج توسط نرم افزار SPSS، آنالیز واریانس (ANOVA) در سطح معنی‌داری $p < 0.05$ تحلیل شد.



شکل ۱: میکروگراف الکترونی از نانوفیبر الکتروریسی شده PLGA: تاثیر سرعت چرخش جمع کننده در نظم و جهت‌گیری نانوفیبرهای الکتروریسی در این شکل قابل مشاهده است. به ترتیب با افزایش سرعت چرخش جمع کننده از (a) ۲۵۰ mrp به (b) ۱۳۷۵ و (c) ۲۵۰۰ نظم فیبرها افزایش یافته است. نانوفیبر (a) در مقایسه با نانوفیبر (c) دارای جهت‌گیری تصادفی و نامنظمی است (bar: 10µm).



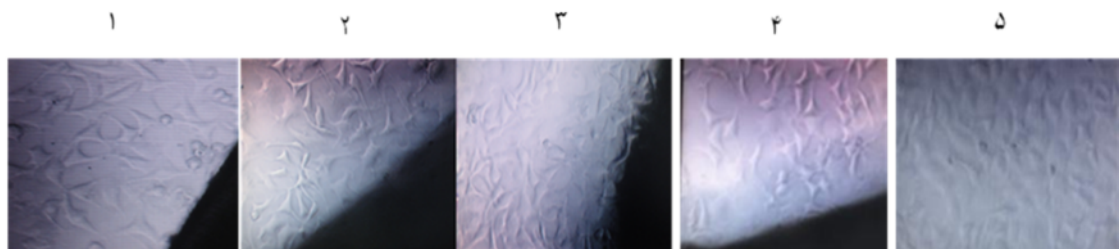
شکل ۲: میکروگراف الکترونی از بستر تهیه شده به روش انجماد-خشک کن سلول (bar: 50 μm)



شکل ۳: تصاویر تهیه شده از رشد سلول در کنار بسترها پس از گذشت ۲۴ ساعت (۱) نانوفیبرهای الکتروریسی rpm (۲، ۲۵۰ rpm (۳، ۱۳۷۵ rpm (۴، ۲۵۰۰ rpm (۵) کنترل مثبت (بدون بستر) مناطق تیره رنگ در تصاویر بسترها هستند. این تصاویر به منظور تایید زیست سازگاری بسترهای ساخته شده از پلیمر PLGA تهیه شد.

جهت گیری به سمت نانوفیبرهای الکتروریسی تهیه شده در ۱۳۷۵ و ۲۵۰۰ دور در دقیقه مشاهده شد، در مقابل نانو فیبر الکتروریسی rpm (۲۵۰ و پس از آن بستر انجماد-خشک کن، کاهش رشد و جهت گیری را نشان دادند. در ۷۲ ساعت پس از کشت، در مقایسه با روز دوم، سلولها بر روی تمام بسترها بجز بستر انجماد-خشک کن افزایش تکثیر را نشان دادند. نتایج مقایسه بسترها با یکدیگر در روز سوم مشابه روز دوم بود.

افزایش میزان رشد سلول بر روی بسترها در ۷۲ ساعت پس از کشت در شکل ۴ نشان داده شده است. با توجه به تصاویر به دست آمده از میکروسکوپ معکوس، در ۲۴ ساعت پس از انتقال سلول بر روی بسترها، تمایل و رشد سلولها به سمت بسترها دیده شد که این میزان برای بسترهای انجماد-خشک کن بیشتر بود. پس از ۴۸ ساعت، در مقایسه با روز اول، جهت گیری و تکثیر سلولها در نانوفیبرها به طور چشم گیری افزایش یافت. در مقایسه نمونهها با یکدیگر، بیشترین میزان رشد سلول و

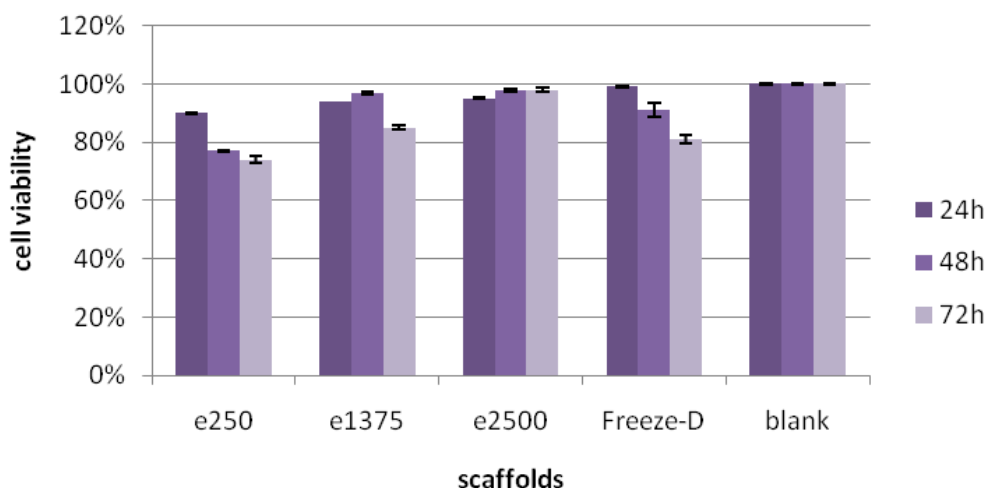


شکل ۴: تصاویر تهیه شده از رشد سلول بر روی بسترها پس از کشت ۷۲ ساعت. (۱) نانوفیبرهای الکتروریسی rpm (۲، ۲۵۰ rpm (۳، ۱۳۷۵ rpm (۴، ۲۵۰۰ rpm (۵) کنترل مثبت (بدون بستر) مناطق تیره رنگ در تصاویر بسترها هستند.

است، در مقایسه بسترها با یکدیگر بیشترین درصد زنده ماندن سلول بر روی بستر مربوط به نانو فیبرهای rpm (۱۳۷۵ و ۲۵۰۰ بود (نمودار ۱).

نتایج سنجش MTT

نتایج حاصل از تست MTT تایید کننده تصاویر به دست آمده از میکروسکوپ معکوس بود. همانطور که در نمودار یک مشخص



نمودار ۱: نتایج حاصل از سنجش MTT میزان رشد سلول‌ها بر روی بسترها در مقایسه با یکدیگر: (۱) نانوفیبر الکتروریسی (۲۵۰ rpm، ۲)، (۳) ۲۵۰ rpm، (۴) بستر انجماد خشک کن، (۵) کنترل مثبت (بدون بستر). این آزمون در سطح معناداری $p < 0.05$ با آنالیز ANOVA انجام شد.

بحث

در ایجاد رفتار مناسب از سلول موفق‌تر عمل می‌کند. پس از مطالعات هاریسون در سال ۱۹۱۱ که تاثیر شکل و ساختار محیط بر سرنوشت سلول بنیادی جنینی را نشان داد، Curtis و همکاران، نقش توپوگرافی بر روی سلول‌های اندوتلیال، اپی‌تلیال و فیبروبلاستی را برای اولین بار مطرح کردند (۳۲). تحقیقات بعدی در این زمینه نیز حاکی از آن بود که انواع سلول‌ها از جمله، فیبروبلاست‌ها، استئوبلاست‌ها، نورون‌ها و سلول‌های بنیادی مزانشیمی، اساساً به نانوتوپوگرافی پاسخ می‌دهند (۳۳). در تمامی این مطالعات آنچه حائز اهمیت است این است که، پاسخ‌های سلول تحت تاثیر توپوگرافی است و اخیراً نقش نانوتوپوگرافی در مقایسه با میکروتوپوگرافی به‌عنوان یک فاکتور اساسی دخیل در رفتار سلول محسوب می‌گردد (۳۴). امروزه در میان بیومواد مورد بحث، نانوفیبر الکتروریسی مورد توجه ویژه قرار گرفته‌اند. اجزای مختلف بافت‌های بدن به شکل نانو ساختارهای منظم هستند و تاثیر آن بر فنوتیپ سلول به نظر می‌رسد که نانوفیبر منظم و مرتب شده می‌باشد. این مورد علاوه بر سازگاری بیشتر با بافت‌های بدن، در ایجاد مسیرهای پیام‌رسانی سلولی مهم تر می‌باشند (۳۵ و ۳۶). برای مثال، مطالعه انجام شده در زمینه نقش نانوفیبرهای منظم بر عمل کرد سلول توسط Zi و همکاران، تمایز بیشتر سلول‌های بنیادی تاندون انسانی را بر روی نانوفیبرهای منظم PLA (پلی لاکتیک اسید) نشان داد (۳۷). همچنین مطالعاتی با هدف بررسی تاثیر توپوگرافی با استفاده از سلول‌های استئوبلاستی و فیبروبلاستی انجام شده است (۳۸، ۳۹ و ۴۰). Xie و همکاران (۴۱) نشان

رفتار سلولی در یک بافت، پاسخ به مولکول‌های پیام می‌باشد که بر سطح سلول وارد می‌شوند و گیرنده‌های اختصاصی سطح سلول آن‌ها را دریافت می‌کنند و به دنبال آن آبشارهای پیامی ایجاد می‌شود. سه عامل مهم در ایجاد رفتار مناسب سلولی نقش دارد که عبارت است بر هم کنش سلول‌های مجاور با یکدیگر، مولکول‌های محلول همچون فاکتورهای رشد و با ماتریکس خارج سلولی. آگاهی از این پاسخ‌ها که اغلب توسط محیط نانوفیبری ایجاد می‌شود در طراحی بسترهای جدید در تقلید از ماتریکس خارج سلولی طبیعی اهمیت به‌سزایی دارد. ترکیب پیچیده از مولکول‌های مختلف ماتریکس خارج سلولی که سلول و بافت را احاطه کرده‌اند در تعیین میزان رشد سلول، تمایز سلول و مهاجرت سلول نقش دارند (۹ و ۱۰). به‌منظور راه‌اندازی مسیرهای پیام‌رسانی موثر برای بروز رفتار سلولی، طراحی داربست‌های زیستی و همچنین روش ساخت آنها، از اصلی‌ترین وظایف مهندسی بافت است (۲۹). اهمیت استفاده از داربست در بهینه سازی، بازسازی و ترمیم بافت هدف است به‌طوری که سلول‌های اولیه کاشته شده روی داربست شروع به تقسیم کرده و ناحیه لانه گزینی را پر می‌کنند. فاکتورهای اتصالی که داخل محیط داربست تجمع پیدا می‌کند، اتصال و مهاجرت سلول‌ها را افزایش داده و در نتیجه مدت زمان بازسازی و طول دوره ترمیم را کاهش می‌دهد (۳۰ و ۳۱). هرچقدر توپوگرافی یک داربست به شبکه نانوفیبری ماتریکس خارج سلولی طبیعی نزدیک‌تر باشد،

این پژوهش در کنار مطالعاتی که در گذشته انجام شده است، همگی موید آن است که، با اینکه علوم قرار گرفته در پشت فرآیند الکتروریسی هیچ یک ساده نیستند اما این روش بسیار ساده‌ای است که فقط به آزمایشگاه مجهز جهت رساندن الیاف به مقیاس نانو نیاز دارد. فیبرهایی با مورفولوژی‌های متفاوت و از مواد متفاوت می‌تواند به‌طور مستقیم و یا غیر مستقیم از الکتروریسی حاصل شوند. تنوع مواد قابل استفاده در این روش، تولید بستری با سطح مخصوص بسیار بالا و آسانی اتصال به سلول‌های بدن به دلیل داشتن ابعاد کوچکتر از سلول، وجود تخلخل مناسب و قابل تغییر (۴۴، ۴۵ و ۴۶)، محققین را بر آن داشته است که مطالعات خود را در زمینه کاربرد نانوفیبرهای الکتروریسی شده به‌منظور مهندسی بافت ادامه دهند.

نتیجه گیری

نتایج حاصل از کشت سلول بر روی نانوفیبرهای PLGA و فیبرهای PLGA تهیه شده به روش انجماد-خشک‌کن نشان داد که در ۲۴ ساعت اول کشت با توجه به ایجاد تخلخل بالا توسط روش انجماد-خشک‌کن چسبندگی بهتری نسبت به نانوفیبر داشت اما با ادامه کشت تا ۷۲ ساعت در مقابل نانوفیبر PLGA با توجه به نزدیکی ساختار آن به ماتریکس خارج سلولی طبیعی در ایجاد تکثیر سلولی عمل کرد بهتری را ارائه نمود.

تشکر و قدردانی

این تحقیق با حمایت مرکز تحقیقات مهندسی زیست فناوری دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم و تحقیقات تهران انجام شد که بدین وسیله از زحمات آنان تقدیر و تشکر به عمل می‌آید.

منابع

1. DM Y, Fisher JP. Polymeric Scaffolds for Tissue Engineering Applications. In: Tissue Engineering. (Bronzino, ed.) CRC Press, Boca Raton, FL. 2007; 8-1 - 8-18.
2. Belle. Tissue engineering, an overview. In: Belle, editor. Tissue Engineering: Current Perspectives: Birkhauser Verlag AG. 1993; 3- 15.
3. Yusop AH, Bakir AA, Shaharom NA, Abdul Kadir MR, et al. Porous biodegradable metals for hard tissue scaffolds. A review. Int J Biomater. 2012; 2012: 641430. 10 pages
4. Langer R, Vacanti J. Tissue engineering. Science. 1993; 260(5110): 920-926.

دادند که سلول‌های فیبروبلاست تاندون بر روی نانوفیبر PLGA به فرم تصادفی یک مورفولوژی نامنظم و بدون جهت‌گیری مشخصی را نشان می‌دهد. این در حالی است که سلول‌ها بر روی نانوفیبر PLGA تهیه شده در فرم منظم، مورفولوژی با جهت‌گیری مشخصی را در امتداد فیبرها نشان دادند. در مطالعه دیگری که توسط Lee و همکارانش (۴۲) انجام شد، نتایج مشابهی از رشد و تمایز سلول‌های PC12 بر روی فیبرهای منظم PPY-PLGA (Poly Pyrrole) در مقایسه با فرم نامنظم آن بدست آمد. در این مطالعات آنچه حائز اهمیت است این است که پاسخ‌های سلول تحت تاثیر توپوگرافی است و اخیرا نقش نانوتوپوگرافی در مقایسه با میکروتوپوگرافی به‌عنوان یک فاکتور اساسی دخیل در رفتار سلول محسوب می‌گردد (۴۳). نتایج حاصل از رشد سلول‌ها بر روی نانوفیبرهای PLGA در این پژوهش نیز، در جهت تایید پژوهش‌های انجام شده بود. یافته‌های حاصل از میکروسکوپ معکوس و نتایج تست MTT در این تحقیق نشان داد که بسترهای PLGA تهیه شده به‌روش انجماد-خشک‌کن به دلیل میزان تخلخل بالا، چسبندگی مناسبی برای سلول فراهم کرد به نحوی که در ۲۴ ساعت پس از کشت، در مقایسه با نانوفیبرهای PLGA الکتروریسی، قابلیت زنده ماندن سلول بیشتر بود، اما با ادامه کشت در ۴۸ و ۷۲ ساعت، به‌طور معنی‌داری درصد زنده ماندن سلول بر روی نانوفیبر PLGA الکتروریسی شده افزایش یافت، در حالی که این درصد بر روی نمونه‌های PLGA انجماد-خشک‌کن در طی این ۲ روز تغییر چندانی نکرد. نتایج به‌خوبی بیانگر این مسئله است که نانوفیبر PLGA در ایجاد رفتار سلولی مناسب عمل کرد بهتری داشت و با توجه به شباهت ساختاری آن به ماتریکس خارج سلولی طبیعی این انتظار هم وجود داشت. جهت بررسی محیط نانو فیبری بر روی رشد سلول روش انجماد-خشک‌کن هم استفاده شد. نتایج این مطالعه پیشنهاد می‌کند که نانوفیبرهای PLGA در مقایسه با PLGA انجماد-خشک‌کن می‌توانند در جهت ایجاد پاسخ سلولی مناسب به‌منظور مهندسی بافت عمل کرد بهتری داشته باشند. همچنین از میان نانوفیبرهای الکتروریسی شده، فیبر تهیه شده به فرم منظم (۲۵۰۰ دور در دقیقه)، نتایج مطلوب‌تری را نشان داد. که تائید کننده نتایج حاصل از پژوهش Xie و همکاران همچنین Lee و همکاران بود. آنان گزارش کردند نانو فیبرهای تهیه شده در فرم منظم نسبت به نامنظم باعث جهت‌گیری و رشد و تمایز سلول‌ها بر روی بستر بود.

5. Chen SS, Fitzgerald W, Zimmerberg J, Kleinman HK. Cell-cell and cell-extracellular matrix interaction regulate embryonic stem cell differentiation. *Stem Cells*. 2007; 25(3): 553–561.
6. Yarwood SJ, Woodgett JR. Extracellular matrix composition determines the transcriptional response to epidermal growth factor receptor activation. *PNAS*. 2001; 98(8): 4472–4477.
7. Andressen C, Adrian S, Fassler R. The contribution beta1 integrins to neuronal migration and differentiation depends on extracellular matrix molecules. *Eur J Cell Biol*. 2005; 84(12): 973–982.
8. Mruthyunjaya S, Manchanda R, Godbole R, Pujari R, et al. Laminin-1 induces neurite outgrowth in human mesenchymal stem cells in serum/differentiation factors-free conditions through activation of FAK–MEK/ERK signaling pathways. *Biochem Biophys Res Commun*. 2010; 391(1): 43–48.
9. Hynes R. Integrins: bidirectional, allosteric signaling machines. *Cell*. 2002; 110(6): 673–687.
10. Larsen M, Artym VV, Green JA, Yamada KM. The matrix reorganized: extracellular matrix remodeling and integrin signaling. *Curr Opin Cell Biol*. 2006; 18(5): 463–471.
11. Shi J, Votruba AR, Farokhzad OC, Langer R. Nanotechnology in Drug Delivery and Tissue Engineering: From Discovery to Applications. *Nano Lett*. 2010; 10(9): 3223–30.
12. Cunha C, Panseri S, Antonini S. Emerging nanotechnology approaches in tissue engineering for peripheral nerve regeneration. *Nanomedicine*. 2011; 7(1): 50–59.
13. Venugopal J, Ramakrishna S. Applications of Polymer Nanofibers in Biomedicine and Biotechnology. *Applied Biochemistry and Biotechnology*. 2005; 125(3): 147–156.
14. Frey MW. Electrospinning Cellulose and Cellulose Derivatives. *Polymer Reviews*. 2008; 48(2): 378–391.
15. Borge D, Daels N, De Vrieze S, Dejana P, et al. Performance assessment of electrospun nanofibers for filter applications. *Desalination*. 2009; 249(3): 942–948.
16. Liang D, Hsiao BS, Chu B. Functional electrospun nanofibrous scaffolds for biomedical applications. *Advanced Drug Delivery Reviews*. 2007; 59:1392–1412.
17. Tungprapa S, Puangparn T, Weerasombut M, Jangchud I, et al. Electrospun cellulose acetate fibers: effect of solvent system on morphology and fiber diameter. *Cellulose*. 2007; 14(6): 563–575.
18. Shaoping Z, Wee ET, Xiao Z, Beurman RW, et al. An aligned nanofibrous collagen scaffold by electrospinning and its effects on in vitro fibroblast culture. *J Biomed Mater Res A*. 2006; 79(3): 456–63.
19. Shaoping Z, Wee ET, Xiao Z, Roger B, et al. Formation of collagen–glycosaminoglycan blended nanofibrous scaffolds and their biological properties. *Biomacromolecules*. 2005; 6: 2998–3004.
20. Theron A, Zussman E, Yarin AL. Electrostatic field-assisted alignment of electrospun nanofibers. *Nanotechnology*. 2001; 12(3): 384.
21. Gunatillake P, Adhikari R. Biodegradable synthetic polymers for tissue engineering. *Eur Cell Mater*. 2003; 5: 1–16.
22. Shi G, Cai Q, Wang C, Lu N, et al. Fabrication and biocompatibility of cell scaffolds of poly (L-lactic acid) and poly (L-lactic-co-glycolic acid). *Polymers for advanced technologies*. 2002; 13(3-4): 227–232.
23. Baier Leach J, Bivens K, Patrick Cw, Jr, Schmidt C. Photocrosslinked hyaluronic acid hydrogels: natural, biodegradable tissue engineering scaffolds. *Biotechnol Bioengin*. 2003; 82: 578–89.
24. Athanasiou KA, Niederauer GG, Agrawal M. Sterilization, toxicity, biocompatibility and clinical applications of polylactic acid/polyglycolic acid copolymers. *Biomaterial*. 1996; 17(2): 93–102.
25. Xin X, Mohammad H, Mao Jeremy J. Continuing differentiation of human mesenchymal stem cells and induced chondrogenic and osteogenic lineages in electrospun PLGA nanofiber scaffold. *Biomaterials*. 2007; 28: 316–325.
26. Haugh MG, Murphy CM, O'Brien FJ. Novel freeze-drying methods to produce a range of collagen-glycosaminoglycan scaffolds with tailored mean pore sizes. *Tissue Eng Part C Methods*. 2010; 16(5): 887–94.
27. Schoof H, Apel J, Heschel I, Rau G. Control of pore structure and size in freeze-dried collagen sponges. *J Biomed Mater Res*. 2001; 58(4): 352–7.
28. Katta P, Alessandro M, Ramsier RD, Chase GG. Continuous electrospinning of aligned polymer nanofibers onto a wire drum collector. *Nano*. 2004; 4: 2215.
29. Sundaray B, Subramanian V, Natarajan TS, Xiang RZ, et al. Electrospinning of continuous aligned polymer fibers. *Appl. Phys. Lett*. 2004; 84(7): id. 1222.
30. Kwangsok Kim, Meiki Yu, Xinhua Z, Jonathan Ch, et al. Control of degradation rate and hydrophilicity in electrospun non-woven poly (d, l-

- lactide) nanofiber scaffolds for biomedical applications. *Biomaterials*. 2003; 24(27): 4977–4985.
31. Ushida T, Tateishi T. Scaffold Design for Tissue Engineering. *Macromolecular Bioscience*. 2002; 2: 67-77.
32. Curtis A, Wilkinson C. Topographical control of cells. *Biomaterials*. 1997;18 (24): 1573-1583.
33. Curtis ASG, Gadegaard N, et al. Cells react to nanoscale order and symmetry in their surroundings. *IEEE Transactions on Nanobioscience*. 2004; 3(1): 61-65.
34. Dalby MJ, Riehle MO, Johnstone H, Affrossman S, et al. In vitro reaction of endothelial cells to polymer demixed nanotopography. *Biomaterials*. 2002; 23: 2945–2954.
35. Young Y, Seung JL, Byung-Moo M, Won Ho P. Effect of Solution Properties on Nanofibrous Structure of Electrospun Poly (lactic- co-glycolic acid). *Journal of Applied Polymer Science*. 2006; 99(3): 1214–1221.
36. Buckley CT, O'Kelly KU. Regular scaffold fabrication techniques for investigations in tissue engineering In: *Topics in Biomechanical Engineering*, TCD (Eds Prendergast PJ, McHugh PE). 2004; 147-166.
37. Zi Y, Xiao Ch, Jia Lin Ch, Wei Liang Sh, et al. The regulation of tendon stem cell differentiation by the alignment of nanofibers. *Biomaterials*. 2010; 31: 2163–2175.
38. Biggs MJ, Richards RG, Gadegaard N, et al. Interactions with nanoscale topography: adhesion quantification and signal transduction in cells of osteogenic and multipotential lineage. *Journal of Biomedical Materials Research A*. 2009; 91(1): 195–208.
39. Dalby MJ, Gadegaard N, Wilkinson CDW. The response of fibroblasts to hexagonal nanotopography fabricated by electron beam lithography. *Journal of Biomedical Materials Research A*. 2008; 84(4): 973–979.
40. Li WJ, Laurencin CT, Catterson EJ, Tuan RS, et al. Electrospun nanofibrous structure: a novel scaffold for tissue engineering. *J Biomed Mater Res* 2002; 60(4): 613–621.
41. Xie J, Li X, Lipner J, Manning CN, et al. Aligned-to-random" nanofiber scaffolds for mimicking the structure of the tendon-to-bone insertion site. *Nanoscale*. 2010; 2(6): 923-6.
42. Lee JY, Bashur CA, Goldstein AS, Schmidt CE. Polypyrrole-coated electrospun PLGA nanofibers for neural tissue applications. *Biomaterials*. 2009; 30(26): 4325-4335.
43. Geblinger D, Addadi L, Geiger B. Nanotopography sensing by osteoclasts. *Journal of Cell Science*. 2010; 123(9): 1503–1510.
44. Lee MR, Kwon KW, Jung H, et al. Direct differentiation of human embryonic stem cells into selective neurons on nanoscale ridge/groove pattern arrays. *Biomaterials*. 2010; 31: 4360–4366.
45. Sumit P, Belinda P, Gunguan-Murphy Noor Azuan Abu Osman. Progress of key strategies in development of electrospun scaffolds: bone tissue. *Sci. Technol. Adv. Mater*. 2012; 13(4): 043002 (13pp).
46. Chung S, Ingle NP, Montero GA, Kimc SH, et al. Bioresorbable elastomeric vascular tissue engineering scaffolds via melt spinning and electrospinning. *Acta Biomaterialia*. 2010. 6(6): 1958-67.

Preparation of PLGA Substrate Nanostructures Through Electrospinning and Freeze Drying For Tissue Engineering

Salamian N. M.Sc.¹, Irani Sh. Ph.D.¹, Atyabi SM. Ph.D.*², Zandi M. Ph.D.³,
Saeed SM. Ph.D.³

1. Department of Biology, Science and Research Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran

2. Department of Pilot Biotechnology, Pasteur Institute of Iran, Tehran, Iran

3. Department of Biomaterial, Iranian Polymer and Petrochemical Institute, Tehran, Iran

* Email corresponding author: atyabi@pasteur.ac.ir, mohammadatyabi@yahoo.com

Received: 6 Sep. 2012

Accepted: 30 Apr. 2013

Abstract

Aim: In this study we were investigated the importance of the preparation method of the substrate based on PLGA polymer by electrospinning and freeze-drying method. To investigate the effect of nanotopography on cell behavior, the prepared nanofibers were compared with each other in three speeds of the collector.

Material & Methods: PLGA substratums were made by electrospinning and freeze-dying. The morphology of the structures was compared by use of the Scanning electron microscope images. Mouse fibroblast cells (L929 cell line) were seeded on substrates to determine the cell viability and followed by MTT assay.

Results: Scanning electron microscope images showed that, by increasing the speed of collector, the nanofibrous orientation increased. MTT assay ($p < 0.05$) showed in 24 h that PLGA substrates prepared by freeze-drying method were provided the appropriate attachment for the cell by producing a porous structure. Cell viability was significantly increased on the PLGA nanofibers with increase of fibers regularity after 48 and 72 h cell culture. This feature did not change on freeze-drying substrate.

Conclusion: The findings were indicated that electrospun PLGA nanofibers had the better performance to provide cell behavior. It was expected because of similarity to the structure of the natural extracellular matrix. It seems that aligned fibers acted as a positive factor to support cell proliferation.

Keywords: Tissue engineering, Nanofiber, Electrospinning, PLGA, Freeze dryer