Archive of SID

بررسی رفتار سلولهای فیبروبلاست بر نانوالیاف پلی کاپرولاکتون سوپرامولکولی (sPCL) پوشیده شده با ژلاتین

زهرا شاکری شمیرانی[۱]، مژگان زندی*[۲]، پروین شکرالهی[۲]، شیوا ایرانی[۱]

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

۲. گروه بیومتریال، پژوهشگاه پلیمر و پتروشیمی، تهران، ایران.

* **عهده دار مکاتبات:** تهران، پژوهشگاه پلیمر و پتروشیمی ایران، گروه بیومتریال.

Email: m.zandi@ippi.ac.ir

چکیده

زمینه: مهندسی بافت به توانایی بالقوه بدن برای ساخت عضو و بافت نو اطلاق می‌شود. داربست‌ها ساختارهایی مبتنی بر مواد موجود در ماتریکس خارج سلولی است. روند استفاده از داربست ها در مهندسی بافت و پزشکی ترمیمی به سرعت رو به افزایش است و برای بهبود کیفیت آن از مواد و ساختار هایی شبیه به بافت هدف استفاده می کنند. در این تحقیق از پلی کاپرولاکتون سوپرامولکول (sPCL)، پوشش داده شده با ژلاتین استفاده شد. پوشیده شدن (sPCL) با ژلاتین روشی جهت بهبود خواص سطحی پلیمر و زیستی، همانند ویژگی آبدوستی و زیست سازگاری سطح پلیمر نسبت به پلیمر خالص می باشد. این مطالعه به بررسی رفتار سلولی فیبروبلاست بر روی نانوالیاف (sPCL) پوشیده شده با ژلاتین،می پردازد.

روش ها: نانوالیاف (sPCL) به روش الکتروریسی تهیه و توسط ژلاتین پوشیده شدند، نتایج حاصل از طیف سنجی FTIR نشان دهنده پوشیده شدن (sPCL) با ژلاتین است، همچنین مورفولوژی داربست ها با میکروسکوپ الکترونی روبشی (SEM) بررسی شد. پس از کشت سلول های فیبروبلاست موشی بر روی داربست، ارزیابی فعالیت سلولی بواسطه ی آزمون MTT و برای تأیید حضور سلول ها بر روی نانوالیاف از رنگ آمیزی DAPI استفاده شد.

یافته ها: نتایج حاصل از کشت سلول های فیبروبلاست موشی نشان داد که نانوالیاف با ایجاد توپوگرافی سه بعدی می توانند از رشد و تکثیر سلولی حمایت کرده و از سوی دیگر پوشیده شدن نانوالیاف sPCL با ژلاتین بر روی زیست سازگاری آنها تأثیر بسزایی داشته است. در ضمن نمودار حاصل از تست MTT نتایج زیست سازگاری را تأیید کرد.

نتیجه گیری: پوشیده شدن نانوالیاف sPCL با ژلاتین موجب بهبود ویژگی سطحی و بروز رفتار سلولی مناسب می شود.

کلیدواژه ها: مهندسی بافت، نانوالیاف، پلی کاپرولاکتون، سوپرامولکول، ژلاتین، فیبروبلاست رده سلولی L929.

مقدمه:

پوست به عنوان وسیع ترین اندام در بدن، ٪۱۶ از وزن کل بدن را تشکیل می دهد[۱]. هدف از مهندسی بافت پوست، ترمیم بافت پوست از طریق روش های بیولوژیکی مانند استفاده از سلول ها و بکارگیری ابزارهای مصنوعی مؤثر و زیست مواد مناسب برای طراحی داربست می باشد. هدف نهایی احیا و بازسازی بافت آسیب دیده است، به طوری که هر دو ویژگی ساختاری و عملکردی قبل

www.SID.ir

Archive of SID

از آسیب را برگرداند. امروزه مهندسی بافت راه حلی امید بخش برای ترمیم و بازسازی بافت های آسیب دیده می باشد[۲].

فرآیندهای اصلی و مرکزی در مهندسی بافت بر سه جز: فناوری سلول، فناوری ساخت داربست، فناوری کاشت و ترکیب در محیط درون تنی (in vivo) استوار است. پس می توان گفت که داربست باید از لحاظ ساختاری و عملکرد بیولوژیک، تقلیدی از ماتریکس خارج سلولی طبیعی باشد و بیش از آن هر دو اصطلاح ترکیب شیمیایی و ساختار فیزیولوژیکی را فراهم کند. البته بیش از هر چه فراهم کننده ی حمایت فیزیکی برای سلول است. در ضمن داربست فراهم کننده بستری با لیگاندهای اختصاصی برای اتصال و مهاجرت سلولی و تنظیمات تکثیر و عملکرد سلولی آن برای عوامل مختلف رشد است[۳].

در واقع داربستی که سلول بر روی آن قرار می گیرد باید دارای ویژگی هایی همچون: زیست سازگاری (Biocompatibility)، زیست تخریب پذیری (Biodegradable)، آبدوستی، غیر سمی بودن، ذخیره و رهاسازی مولکول های فعال، یکپارچگی بافتی و استحکام مکانیکی مطلوب، داشتن ویژگی های مناسب شیمیایی و فیزیکی در جهت تأمین نیاز بافت هدف، هماهنگی جهت انتشار مواد غذایی و گازها و همچنین توانایی جذب و یکپارچه شدن در جایگاه پیوند را فراهم کند[۴]. انتخاب روش مناسب برای تولید داربست یکی از موارد کلیدی در موفقیت در مهندسی بافت است.

روش الکتروریسی (Electrospinning) با تولید نانوالیافی که دارای نانوتوپوگرافی سطحی، تراکم و در نهایت ساختار دوبعدی مناسب می باشد، روشی کارآمد در جهت تولید بستر برای مهندسی بافت است. با توجه به قابلیت تغییرعوامل دخیل در روش الکتروریسندگی همانند: تغییر در غلظت محلول، سرعت چرخش جمع کننده، زمان جمع کنندگی، غلظت خروجی، جریان نیروی الکتریکی بکار رفته و فاصله بین نازل و جمع کننده می توان مورفولوژی، تراوایی و اندازه منافذ، قطر الیاف و تراکم الیاف تهیه شده را تغییرداد[۵].

مهندسی بافت برای ساخت بافت مناسب، نیاز به داربستی با ساختار فیزیکی ومکانیکی مناسب دارد،که امکان چسبندگی سلول ها به آن، رشد وتکثیر سلولی، مهاجرت ونفوذ سلول به داربست، دست یابی به مورفولوژی خاص و در نهایت ایجاد بافت جدیدی را فراهم کند که بتواند جایگزین بافت آسیب دیده درون بدن گردد. در کشت سلول ها بر روی داربست های نانوکامپوزیتی پارامترهای متعددی همچون: جنس ماتریکس و نوع پرکننده، تکنیک ساختن داربست، اندازه قطر داربست و ویژگی های سطح تشکیل دهنده داربست، نقش دارند که در طی سالیان اخیر محققین به طور گسترده ای آنها را مورد مطالعه و بررسی قرار داده اند.

امروزه به دلیل اهمیت زیاد محیط زیست، پلیمرهای زیست تخریب پذیر بسیار مورد توجه قرار گرفته اند از جمله ی این پلیمرها می توان به پلی کاپرولاکتون اشاره نمود که پلیمری خطی و آبگریز است و یک پلی استر آلیفاتیک نیمه کریستالی به شمار می رود. پلی کاپرولاکتون توسط میکروارگانیسم ها به آرامی در محیط تخریب می شود. این پلیمر به علت خواص فیزیکی عالی، در دسترس بودن و زیست سازگاری ذاتی، ماده‌ای مناسب برای مصارف پزشکی و کشاورزی به حساب می‌آید و به شکل گسترده-ای در مهندسی بافت کاربرد دارد. یکی از معایب مهم پلی کاپرولاکتون عدم وجود گروه‌های عاملی بر سطح زنجیرهای پلیمری می باشد که آن را به پلیمری هیدروفوب تبدیل کرده است. با توجه به آبگریزی پلی کاپرولاکتون، توزیع یکنواخت سلول بر روی تارهای نانوالیاف متخلخل دشوار می باشد، در حالی که آبدوستی تارهای نانوالیافی در چسبندگی سلول ها به سطح آن بسیار موثر است به طوریکه در ترمیم بافت آسیب دیده بسیار حائز اهمیت است. قابلیت تر شدن و میزان آبدوستی تارهای نانولیفی در مهندسی بافت در ایجاد یک کشت سلولی مناسب و یکنواخت در سه بعد مؤثر است.

www.SID.ir

Archive of SID

اخیرا، استفاده از پلی‌کاپرولاکتون سوپرامولکولی به عنوان یک زیست ماده مناسب مهندسی بافت در بسیاری از زمینه های مهندسی بافت مورد ارزیابی قرار گرفته است. از جمله شکرالهی و همکاران، مؤثر بودن کامپوزیت این ماده با آپاتایت را در حمایت از تکثیر سلول های مزانشیمی نشان داده‌اند[۶].

در میان روش های رایج بهبود خواص سطحی می توان به روش پوشش دهی با پلیمرهای ابدوست اشاره کرد. در اینجا از پوشش دهی سطح با ژلاتین استفاده شد، که یکی از روش های نوین برای بهبود ویژگی های سطحی داربست های تهیه شده می باشد.

ژلاتین به علت ویژگی هایی از قبیل افزایش چسبندگی،مهاجرت، تکثیر و تمایز سلولی، زیست سازگاری بالا و زیست تخریب پذیری به عنوان ماده ای زیستی برای ساخت داربست مهندسی بافت استفاده می شود. ژلاتین ساده ترین نوع پروتیین طبیعی با وزن مولکولی بالاست که از تجزیه گرمایی، و یا تخریب فیزیکی و شیمیایی کلاژن، جزء تشکیل دهنده بافتهای اتصالی حیوانات از جمله پوست، استخوان و تاندون تهیه می شود[۷]. ژلاتین به دلیل دارا بودن سکانس شبه RGD (لیگاند بسیاری از اینتگرین های سلولی) در بهبود اتصال سلول به داربست مؤثر بوده است.

هدف از این مطالعه بررسی رفتار سلول فیبروبلاست، از جمله چسبندگی، رشد و تکثیر، نفوذ سلول ها در منافذ داربست و مورفولوژی خاص سلول، بر روی نانوالیاف sPCL (Poly-caprolactone supramolecular) پوشیده شده با ژلاتین، می باشد.

مواد و روش ها:

تهیه داربست:

داربست های پلی کاپرولاکتون سوپرامولکولی مورد استفاده در این تحقیق با استفاده از روش الکتروریسی تهیه شد. برای این منظور از دستگاه CO881007NYI ساخت شرکت نانو ساختار آسیا کشور ایران که در پژوهشگاه پلیمر و پتروشیمی موجود است استفاده شد. این دستگاه مجهز به یک جمع کننده استوانه ای دوّار با طول ۷۰ mm و قطر ۵۰ mm می باشد. برای تهیه داربست هدف در این مطالعه محلول ٪ ۴۰ PCL در سامانه حلال اسید فرمیک / اسید استیک تهیه شد. نانوالیاف در بازه زمانی ۲ ساعت در شرایطی که سرعت چرخش جمع ۲۵۰rpm بوده، جمع آوری شدند. فاصله سوزن تزریق تا داربست ۲۰ cm بوده که در ولتاژ ۲۰Kv این فرایند انجام شده است. داربست های تهیه شده با استفاده از پلیمر (sPCL) آبگریزند، که در این پژوهش برای برطرف شدن این عامل محدود کننده پوشش ژلاتین به روش فیزیکی و غوطه وری در محلول ژلاتین صورت گرفت. سپس، نمونه ها تحت خلا به مدت ۱۲ ساعت در دمای محیط خشک شدند.

بررسی ساختار نانو الیاف با استفاده از میکروسکوپ الکترونی: یکی از روش های مناسب برای مشاهده ساختار نانو الیاف و بررسی مورفولوژی ان ها استفاده از میکروسکوپ الکترونی است. با بررسی میکرئوگرام های تهیه شده، تشکیل نانولیف، بدون مهره بودن الیاف و تشکیل بسترهای نانولیفی تایید می شود. در این مطالعه، پس از تهیه داربست برای بررسی و مطالعه مورفولوژی داربست، از دستگاه میکروسکوپ الکترونی روبشی VEGA/TESCANII ساخت کشور بلژیک موجود در پژوهشگاه پلیمر و پتروشیمی ایران استفاده شد.

اصلاح سطحی داربست: برای بهبود ویژگی آبدوستی سطح داربست های استفاده شده در این تحقیق، از اصلاح سطحی داربست با ژلاتین استفاده شد.

کشت سلول: در این پژوهش سلول های فیبروبلاست موشی L929 در فلاسک های ml ۴۵ که پاساژ اول را طی کرده بودند از انستیتو پاستور ایران تهیه شدند. سلول های تهیه شده در محیط کشت RPMI 1640 (محصول شرکت Gibco که حاوی L -گلوتامین و $NaHCO_3$ می باشد) که حاوی ٪۱۰سرم گاوی جنینی (FBS) Fetal bovine serum (محصول شرکت Gibco) بوده در انکوباتور با قابلیت

www.SID.ir

Archive of SID

تزریق CO_2 به مقدار ٪۵ و رطوبت ٪ ۹۵ در دمای $37\,^{\circ}C$ نگهداری شدند.

آزمون زیست سازگاری: در ابتدا باید مشخص شود که داربست های تهیه شده دارای مشخصه زیست سازگاری برای استفاده در مهندسی بافت باشند. بدین منظور پس از استریل نمودن داربست ها با اشعه UV، بر روی پلیت ۲۴ خانه تثبیت شده و سلول ها در تراکم ۴×۱۰^۴ بر روی نانوالیاف پوشش داده شده با ژلاتین در شرایط انکوباتور Co_2، رطوبت ٪۹۵ و در دمای $37^{\circ}C$ کشت داده شدند. پس از گذشت ۲۴ ساعت از کشت سلول ها با استفاده از میکروسکوپ معکوس تمایل رشد سلول ها در مجاورت داربست مورد سنجش قرار گرفت.

بررسی سلول ها با استفاده از میکروسکوپ معکوس: در تمامی مراحل کشت سلولی باید به طور روزانه وضعیت سلول ها به وسیله ی میکروسکوپ معکوس مشاهده و بررسی شده و از آن تصاویری تهیه گردد.

آزمون بررسی فعالیت و میزان زنده ماندن سلول بر روی داربست (MTT): در آزمون انجام شده میزان فعالیت سلولی و زنده بودن سلول ها مورد مطالعه قرار گرفت. در این آزمون میزان فعالیت آنزیم دهیدروژناز میتوکندریایی سلول هایی که زنده و فعال هستند مورد مطالعه قرار می گیرند. MTT ، نمک محلول در آب تترازولیوم بروماید است. (پودرMTT، محصول شرکت Sigma-Aldrich ، انگلستان). محلول بافر MTTتحت تأثیر آنزیم های دهیدروژناز موجود در میتوکندری سلول های زنده احیاء شده و به فورمازون نامحلول بنفش رنگ تبدیل می گردد. پودرMTT محصول شرکت-Sigma Aldrich، انگلستان می باشد. این ترکیب در DMSO (Dimethyl Sulfoxide) (محصول شرکت Sigma، آلمان) محلول می شود. از آنجایی که سلول های مرده قادر به تبدیل MTT به فورمازان نیستند، سطح فورمازان ایجاد شده متناسب با تعداد سلول های زنده می باشد. شدّت رنگ ایجاد شده با انجام یک آزمون رنگ سنجی ساده توسط اسپکتروفتومتر در طول موج ۵۷۰ نانومتر(OD 570) خوانده می شود. به این منظور، از سلول های فیبروبلاست موشی، به تعداد $۱۰^۴$ سلول در هر چاهک، پلیت ۲۴ خانه محتوی داربست های استریل قرار داده شد. کشت سلول تا ۷۲ ساعت ادامه داده شد و هر ۲۴ ساعت (۲۴، ۴۸، و ۷۲ ساعت) و همچنین هفتمین روز میزان تکثیر سلول ها بر روی داربست با استفاده از آزمون MTT سنجیده شد.

بدین منظور ازدستگاه (Bio Tek ELx800) ELISA reader استفاده شد. میزان فعالیّت سلولی و زنده بودن سلول ها به روش MTT محاسبه گردید .نتایج توسط نرم افزار SPSS ، آنالیز واریانس (آزمونANOVA) در سطح معنی داری $P < ۰/۰۵$ تحلیل شد.

رنگ آمیزی دی آمینو فنیل ایندول (DAPI): به منظور بررسی میزان تکثیر سلولی بر روی داربست از این رنگ آمیزی استفاده میشود. DAPI مخفف دی آمینو فنیل ایندول بوده که رنگی فلورسانس جهت رنگ آمیزی DNA مورد استفاده قرار می گیرد. از جمله اهداف این نوع رنگ آمیزی : مطالعه چرخه سلولی، تعیین شاخص میتوز در یک ارگانیسم یا شمارش سلول ها و باکتری ها می باشد. بعد از رنگ آمیزی سلول ها با DAPI با استفاده از میکروسکوپ فلورسانس از سلول ها تصویرتهیه و مورد بررسی قرار می گیرد. در این بررسی به تعداد ۴×۱۰^۴ سلول به درون هر یک از چاهک ها از پلیت ۲۴ خانه استریل منتقل شد. پس از گذشت ۴۸،۲۴ و۷۲ ساعت از انتقال سلول ها بر روی داربست ها، داربست ها از پلیت استریل به درون پلیت دیگری منتقل می شود. سپس با بافر فسفات سالین (PBS) ٪ ۱، به مدت min ۱۰ در حجمی به اندازه ml ۱ قرار میدهیم، اینکار را ۲ بار تکرار می نماییم. سپس داربست ها را به مدت min ۱۰ در محلول پارافرم آلدئید ٪ ۴ قرار می دهیم. دوباره با PBS عمل شستشو را انجام می دهیم. در مرحله بعد از محلول تریتون ٪ ۱ به مدت min ۵ استفاده می شود. سپس دوباره با PBS شستشو داده و در ادامه به مقدار چند

www.SID.ir

Archive of SID

قطره رنگ DAPI به مدت min ۵ به داربست ها می افزاییم و دوباره با PBS دو بار عمل شستشو را انجام داده می شود. باید توجه شود تا زمان بررسی با میکروسکوپ فلورسنت نمونه ها را در تاریکی و PBS نگهداری می شود.

یافته ها:

میکروسکوپ الکترونی روبشی (SEM):

پس از تهیه داربست ها، جهت بررسی و مشاهده مورفولوژی داربست های تهیه شده با روش الکتروریسی از میکروگراف تهیه شده با SEM در پژوهشگاه پلیمر و پتروشیمی ایران، تصاویر تهیه شد. قطر نانو الیاف حدود ۲۲±۴۷۰ است (شکل۱).

زیست سازگاری نانو الیاف:

یکی از مشخصه های مهم در رابطه با داربست ها جهت استفاده در مهندسی بافت وجود زیست سازگاری است. بدین ترتیب برای تائید زیست سازگاری نانوالیاف پلی کاپرولاکتون سوپرامولکولی (sPCL) پوشیده شده با ژلاتین، سلول ها را در تراکم $۱۰^۴ \times ۴$ برای مدت زمان ۲۴ ساعت در شرایط انکوباتور CO_2 به مقدار٪۵ و رطوبت ٪۹۵ در دمای ۳۷^oC کشت داده شدند. تصاویر بدست آمده از میکروسکوپ معکوس نشان دهنده کشیده شدن سلول ها به سمت نانو الیاف می باشد. این بررسی زیست سازگار بودن داربست ها برای سلول ها و حفظ حیات سلولی را تأیید می کند (شکل۲).

بررسی روزانه سلول ها با استفاده از میکروسکوپ معکوس:

در تمامی مراحل کشت سلولی باید به طور روزانه وضعیت سلول ها به وسیله ی میکروسکوپ معکوس مشاهده و بررسی شده و از آن تصاویری تهیه گردد. (شکل۳).

بررسی درصد زنده ماندن سلول ها:

به منظور تأیید فعالیت و رشد و تکثیر سلول ها بر روی نانو الیاف مورد استفاده، از آزمون MTT استفاده شد. تغییر میزان رشد سلول ها در کنار داربست ها، از روز اول تا روز سوم (۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت) و هفتمین روز کشت، نشان داده شده است و در ادامه نتایج حاصل از آزمون MTT به صورت نمودار در بازه های زمانی مربوطه در یک نمودار رسم گردید (نمودار ۱).

بحث:

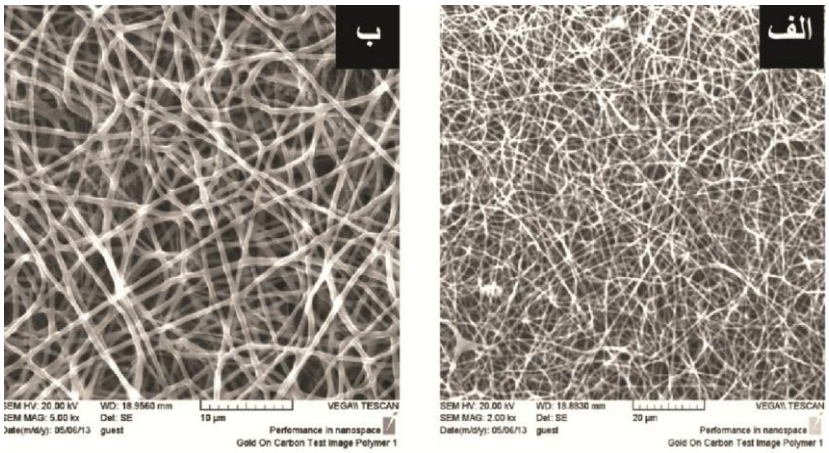
نتیجه این پژوهش نشان داد که نانوالیاف پلی کاپرولاکتون سوپرامولکول پوشیده شده با ژلاتین شرایط مناسبی برای رشد سلول های فیبروبلاست موشی فراهم کرده و توانسته است رشد سلولی تا ۷ روز را حمایت کند. بنابراین می تواند به عنوان یک مدل مناسب داربست به منظور مهندسی بافت به کار آید.

در سال ۲۰۰۹، در تحقیق انجام شده توسط Chung و همکاران از فیلم PCL استفاده شد. فیلم PCL به دلیل نداشتن ساختار سه بعدی توانایی فراهم آوری فضایی مشابه به ساختار ECM طبیعی را نداشته و در نتیجه سلول ها قادر به بروز رفتار سلولی مناسب بر روی آن نبوده اند[۸].

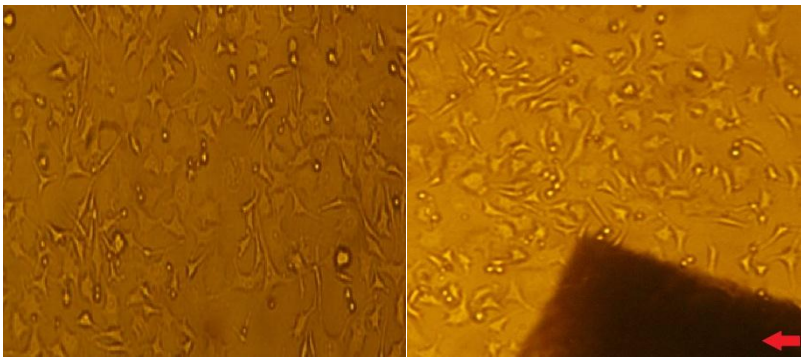
در مطالعه ی انجام شده در سال ۲۰۱۲ توسط Kumer و همکاران به منظور استفاده از نانوالیاف PCL که دارای ساختار دو بعدی می باشند، از روش ریسندگی شکل آزاد (Freeform fabricate) استفاده شد. داربست تهیه شده بدلیل نداشتن ساختار سه بعدی و ویژگی های سطحی مناسب، توانایی حمایت لازم از سلول کشت شده جهت بروز رفتار مناسب سلولی را نداشت[۹].

www.SID.ir

Archive of SID



شکل ۱. الف: تصویر SEM داربست های نانولیفی الکتروریسی شده PCL سوپرامولکولی قبل از کشت سلول (بزرگنمایی ۲۰)، ب: بزرگنمایی بالاتر (بزرگنمایی ۱۰).



(ب) (الف)

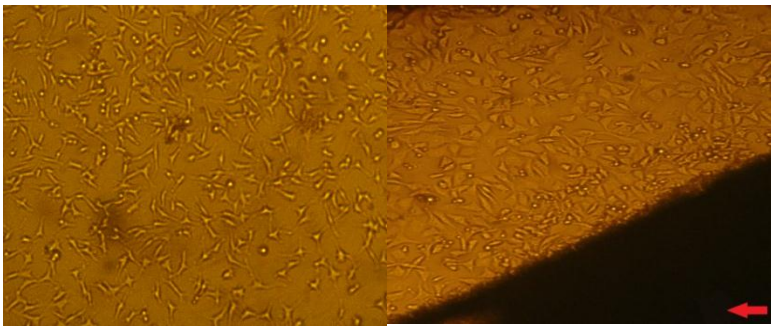
شکل ۲. تصاویر میکروسکوپ معکوس جهت بررسی چسبندگی سلول و حفظ حیات سلولی در کنار داربست در ۲۴ ساعت پس از کشت.
الف) کنترل مثبت (کف پلیت بدون داربست)، ب) کشت سلول ها بر روی داربست با گذشت ۲۴ ساعت از زمان کشت. ناحیه تیره رنگ که با پیکان نشان داده شده، داربست است. بزرگ نمایی ۱۰۰ x).

www.SID.ir

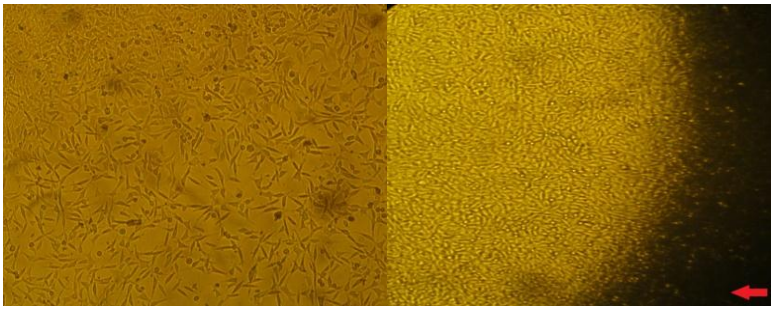
Archive of SID

(الف) (ب)

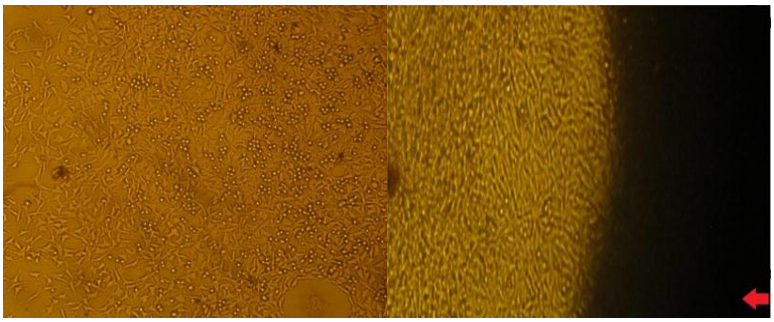
۴۸ ساعت



۷۲ ساعت



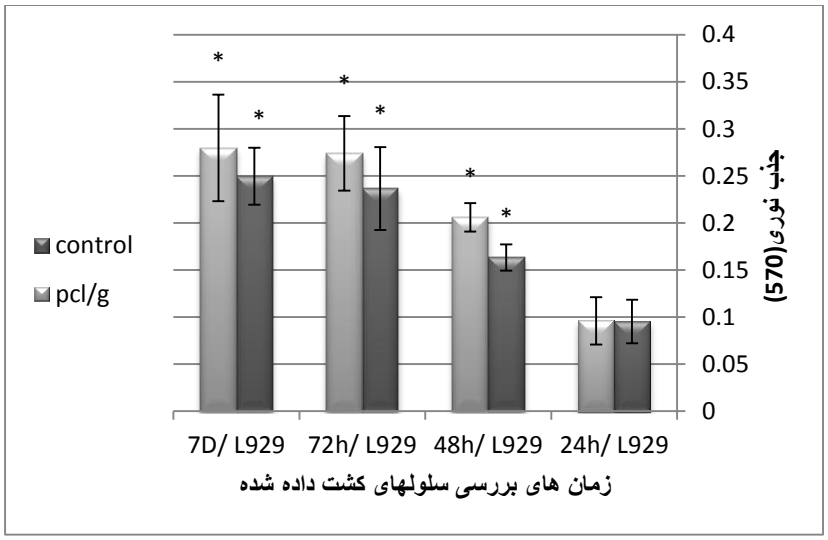
۷ روز



شکل ۳. تصاویر تهیه شده از رشد سلول ها در کنار داربست ها و افزایش میزان رشد با گذشت زمان از ۴۸ ساعت تا ۷ روز پس از کشت. الف) کنترل مثبت (کف پلیت بدون داربست). ب) رشد سلول ها در کنار داربست ها با گذشت زمان. (ناحیه تیره رنگ داربست بوده که با پیکان نشان داده شده است. بزرگ نمایی X ۱۰۰).

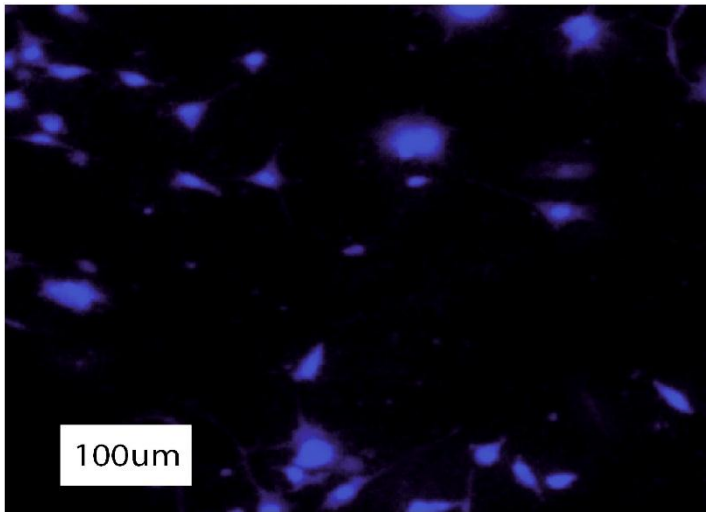
www.SID.ir

Archive of SID



نمودار ۱. نتایج حاصل از آزمون MTT در ۴ بازه زمانی. مقایسه میزان رشد سلول ها بر روی داربست ها با یکدیگر. (n=۳)
رنگ مشکی: کنترل مثبت (بدون داربست). رنگ خاکستری: رشد سلول ها در کنار داربست پلی کاپرولاکتون سوپرامولکولی پوشیده شده با ژلاتین. این آزمون با سطح معنی داری $P < ۰/۰۵$ با آنالیز ANOVA انجام شد. Error Bar بیانگر SD میباشد.

رنگ آمیزی دی آمینو فنیل ایندول (DAPI):



شکل ٤. تصویر میکروسکوپ فلورسنت با رنگ آمیزی DAPI ، پس از گذشت ۴۸ ساعت از کشت سلول های فیبروبلاستی بر روی داربست پلی کاپرولاکتون سوپرا مولکول پوشیده شده با ژلاتین.

www.SID.ir

Archive of SID

Zhao و همکارانش در سال ۲۰۰۶، در مطالعه ی تحقیقی انجام شده، تکثیر سلول های فیبروبلاست های موش را بر روی داربست PCL و PCL پوشش داده شده با ژلاتین بررسی کردند[۱۰]. در این بررسی نیز همانند نتیجه بدست آمده در پروژه تحقیقاتی انجام شده رشد و تکثیر سلول ها بر روی داربست sPCL پوشیده شده با ژلاتین بیشتر بوده است.

کاظم نژاد و همکاران در سال ۲۰۰۷ به بررسی پتانسیل تمایز سلول های بنیادی مزانشیمی hBMSCs (Human bone marrow derived mesenchymal stem cells) مشتق شده از مغز استخوان به سلول های کبدی بر روی یک داربست سه بعدی نانو لیفی بر پایه پلی کاپرولاکتون (PCL)، کلاژن و پلی تر سولفون PES (Polyethersulfone) پرداختند، که نانوالیاف به روش الکتروریسی آماده شد. تمایز سلول های کبدی بیشتر با نشان دادن بیان آلبومین، AFP و سیتوکراتین - ۱۹ (CK- 19) در سطوح mRNA در سلول های تمایز یافته تایید شد، در نتیجه داربست های مهندسی شده برای نگهداری از سلول های کبدی مناسب برای پیوند را امیدوار کننده دانستند[۱۱].

قاسمی مبارکه و همکاران در سال ۲۰۰۸ از نانوالیاف PCLکه با استفاده از روش الکتروریسی تهیه شده بود استفاده نمودند. نانوالیاف به سه صورت، اصلاح شده با پلاسمای هوا، ترکیب PCL با کلاژن برای تهیه نانوالیاف وPCL بدون اعمال تغییری جهت کشت سلول بنیادی برای تمایز به بافت عصب مورد استفاده قرار گرفت. در این تحقیق نیز رشد و تکثیر سلولی بر روی نانوالیاف PCL/Gelatin از کنترل مثبت بیشتر است[۱۲]، که موافق با نتیجه ای است که در پروژه تحقیقاتی انجام شده بدست آمد.

در سال ۲۰۰۹ توسط Tı̆glı، داربست های لیفی پلی کاپرولاکتون (PCL) و PCL/ژلاتین که عامل رشد اپیدرمی (EGF) روی آن تثبیت شدند به منظور درمان زخم آماده شد. داربست ها به روش الکتروریسی ساخته شدند و عواملی که روی فرآیند الکتروریسی اثر دارند، بهینه سازی شد. کشت سلول های فیبروبلاست L929 موش روی هر دو داربست PCL و PCL/ ژلاتین که EGF روی آن ها تثبیت شده بود به منظور بررسی اثر EGF در گسترش و تکثیر سلول ها انجام شد. در داربست های PCL/ ژلاتین که EGF روی آن ها تثبیت شده بود سرعت رشد و تکثیر سلول های اولیه در مقایسه با داربست های PCL که EGF روی آن ها تثبیت شده بود بیشتر و سریع تر بوده است. در نتیجه داربست های PCL / ژلاتین که EGF روی آن ها تثبیت شده بود می تواند به طور بالقوه به عنوان داربست های جدیدی برای مهندسی بافت پوست به کار گرفته شود[۱۳]، که نتیجه فوق مشابه نتیجه پروژه تحقیقاتی انجام شده است.

حاجیعلی و همکارانش در سال ۲۰۱۱ بر روی الکتروریسی داربست های نانولیفی PGA / ژلاتین و کاربرد بالقوه آنها در مهندسی بافت عروقی مطالعه کردند. ژلاتین را با پلی گلایکولیک اسید PGA در نسبت های مختلف (۰، ۱۰،۳۰، و٪۵۰ وزنی) مخلوط و الکتروریسی شد. برای ارزیابی زیست سازگاری، سلول های اندوتلیال سیاهرگ نافی انسان و شریان بند ناف سلول های عضلات صاف انسان در این داربست ها کشت داده شدند، و چسبندگی سلولی و زنده بودن آن ها مورد بررسی قرار گرفت. درنتیجه در این مطالعه ادغام ژلاتین خواص بیولوژیکی و مکانیکی PGA را بهبود می‌بخشد و ساخت داربست هایی امیدوار کننده برای مهندسی بافت عروقی اند[۱۴]، که این نتایج همانند نتیجه بدست آمده از رشد و تکثیر سلولی بر روی داربست های نانولیفی PCL سوپرامولکول پوشیده شده با ژلاتین در پروژه تحقیقاتی انجام شده است.

معروف و همکاران در سال ۲۰۱۱، در مطالعه خود بر روی بررسی خواص فیزیکوشیمیایی داربست کامپوزیتی کیتوسان- ژلاتین- هیدروکسی آپاتیت تهیه شده به روش خشکاندن انجمادی اینگونه بیان کردند که با توجه به ساختار کامپوزیتی استخوان طبیعی، با طراحی مواد کامپوزیتی پلیمر- سرامیک می توان

www.SID.ir

Archive of SID

داربستی ایده آل برای مهندسی بافت استخوان به منظور افزایش خواص مکانیکی، بیولوژیکی وفیزیکی به دست آورد. نتایج این پژوهش نشان داد که این داربست به دلیل شباهت داشتن به ساختار استخوان و همچنین دارا بودن تخلخل های مناسب، می تواند در کاربردهای مهندسی بافت استخوان به کار گرفته شود[15]، که مشابه پروژه تحقیقاتی انجام شده کشت سلول های فیبروبلاستی موش بر روی داربست های نانولیفی sPCL پوشیده شده با ژلاتین به روش الکتروریسی است.

خاتمی و همکاران در سال ۲۰۱۲ بیان کردند که امروزه پرده آمنیون، به عنوان یک منبع با ارزش سلولی، کاربردهای فراوانی به ویژه در حیطه طب ترمیمی دارد. از سوی دیگر ایجاد بسترهای سه بعدی با ویژگی‌های مطلوب برای کشت سلول، که بسته به نوع سلول نیز می‌باشد، اهمیت زیادی پیدا کرده است. لذا این تحقیق با هدف طراحی بسترهای مناسب برای به کارگیری سلول‌های اپیتلیال پرده آمنیون در تحقیقات مهندسی بافت انجام شد. این مطالعه به صورت تجربی انجام پذیرفت. ابتدا داربست‌های سه بعدی کیتوزان و کیتوزان-ژلاتین با روش خشک کردن انجمادی در دماهای متفاوت (۲۰-، ۸۰-، ۱۹۶-) از مرحله پیش انجماد آماده‌سازی و سایز حفرات با میکروسکوپ الکترونی ارزیابی شد. نتایج نشان داد که داربست های کیتوزان- ژلاتین و کیتوزان با سایز حفرات بزرگ‌تر، باعث افزایش شانس اتصال سلول های اپیتلیال پرده آمنیون به بستر شده و از این رو می‌توانند به عنوان یک بستر ساخته شده از مواد طبیعی برای اهداف مهندسی بافت استفاده شوند[16]، که مشابه پروژه تحقیقاتی انجام شده سلول های فیبروبلاستی موش بر روی داربست های نانولیفی sPCL پوشیده شده با ژلاتین به روش الکتروریسی است.

Binulal و همکاران نیز در مطالعات خود در سال ۲۰۱۲، نرخ رشد و تکثیر سلولی را طی ۷ روز بر روی نانوالیاف PCL/Gelatin nanoparticles (nGs) نسبت به PCL نشان دادند، که طی روزهای ۱، ۳و ۵ افزایش نرخ رشد و تکثیر سلولی بر روی نانوالیاف PCL/Gelatin nanoparticles (nGs) نسبت به PCL نشان داده شده است[17]، که موافق بانتیجه‌ای است که در پروژه تحقیقاتی انجام شده بدست آمده.

در مطالعه Gautam و همکاران در سال ۲۰۱۳، بر روی ساخت و خواص داربست های نانولیفی ترکیبی PCL / ژلاتین برای برنامه های مهندسی بافت به روش الکتروریسی کار کردند. نتایج مثبت روش MTT و مقدار DNA سلول های L929 فیبروبلاست موش نشان داد که داربست ساخته شده از ترکیبی از پلیمر طبیعی (ژلاتین) و پلیمر مصنوعی (PCL) ممکن است به عنوان کاندیدای خوبی برای برنامه های کاربردی در مهندسی بافت باشد[18]، که این نتایج موافق با پروژه تحقیقاتی انجام شده است.

صفائی جوان و همکارانش در سال ۲۰۱۴، مطالعه رفتار بیولوژیکی داربست های نانولیفی الکتروریسی PCL پوشیده شده از ژلاتین برای سلول های فیبروبلاست انجام دادند. تجزیه و تحلیل ATR-FTIR نشان داد که ترکیب شیمیایی سطح نانوالیاف PCL توسط پوشش ژلاتین و در نتیجه افزایش تعداد گروه های آمین تحت تاثیر قرار گرفته. نتایج نشان داده که نانوالیاف PCL اصلاح شده خواص فیزیکی مناسبی به عنوان داربست های مصنوعی پلیمری در مهندسی بافت می باشند[19]، که موافق با پروژه تحقیقاتی انجام شده است. در این تحقیق نانوالیاف پلی کاپرولاکتون سوپرامولکول پوشیده شده با ژلاتین تهیه و رفتار سلول های فیبروبلاست موشی بر روی آن مورد بررسی قرار گرفت.

نتیجه گیری:

یکی از مشخصات داربست های تهیه شده با استفاده از پلیمر (sPCL) ویژگی آبگریزی این پلیمر است، که برای استفاده از این پلیمر به عنوان داربست در مهندسی بافت عاملی محدود کننده محسوب می شود. در این پژوهش اعمال ژلاتین بر سطح نانوالیاف (sPCL) موجب آبدوستی نانوالیاف شده است.

www.SID.ir

Archive of SID

به علاوه چسبندگی سلول با واسطه گیرنده های سطح سلولی خاص برای مولکول ها در ماتریکس خارج سلولی صورت می گیرد. بنابراین احتمال دارد که تکثیر با ترشح پروتئین های ماتریکس خارج سلولی و پروتئوگلیکانها توسط سلول ها سریعتر صورت گیرد. سلول ها از طریق گیرنده های خاص به ماتریکس اتصال می یابند و ترکیبات ماتریکس مانند فیبرونکتین یا کلاژن یا مشتقات آن مانند ژلاتین به اتصال محکمتر سلول ها و تکثیر آن کمک خواهد کرد.

همچنین واکنش متقابل سلول - بستر عمدتاً توسط اینتگرین ها میانجی گری می گردد که دارای رسپتورهایی برای مولکول های ماتریکس مانند فیبرونکتین، لامینین و کلاژن می باشند، ژلاتین نیز از مشتقات کلاژن است که به دلیل دارا بودن سکانس شبه RGD (لیگاند بسیاری از اینتگرین های سلولی) در بهبود اتصال سلول به داربست مؤثر بوده و در نتیجه موجب اتصال، مهاجرت و رشد و تکثیر مناسب سلول ها بر سطح نانوالیاف نسبت به نمونه کنترل شده است. این پژوهش نشان داد که نانوالیاف پلی کاپرولاکتون سوپرامولکولی پوشیده شده با ژلاتین به دلیل شباهت فراوان به ECM طبیعی بدن، شرایط مناسبی برای رشد سلول های فیبروبلاست موشی فراهم کرده و توانسته است رشد سلولی را حداقل تا ۷ روز حمایت کند. بنابراین می تواند به عنوان یک مدل مناسب داربست به منظور مهندسی بافت به کار آید.

Reference:

1. Keck M, Lumenta DB, Kamolz LP. Skin Tissue Engineering. In Dermal Replacements in General, Burn, and Plastic Surgery. Springer Vienna 2013; (3):13-25.

2. Krishnan R, Rajeswari R, Venugopal J, Sundarrajan S, Sridhar R, Shayanti M, et al. Polysaccharide nanofibrous scaffolds as a model for in vitro skin tissue regeneration. J Mater Sci Mater Med 2012; 23(6):1511-1519.

3. Ma Z, Kotaki M, Inai R, Ramakrishna S. Potential of nanofiber matrix as tissue-engineering scaffolds. Tissue Eng 2005; 11(1-2):101-109.

4. Jha BS, Colello RJ, Bowman JR, Sell SA, Lee KD, Bigbee JW, et al. Two pole air gap electrospinning: fabrication of highly aligned, three-dimensional scaffolds for nerve reconstruction. Acta Biomater 2011; 7(1):203-215.

5. Pramanik S, Pingguan-Murphy B, Osman NA. Progress of key strategies in development of electrospun scaffolds: bone tissue. Sci Technol Adv Mater 2012; 13(4): 043002.

6. Shokrollahi P, Mehmanchi M, Atai M, Omidian H, Shokrolahi F. Effect of interface on mechanical properties and biodegradation of PCL Hap supramolecular nano-composites. J Mater Sci Mater Med 2014; 25(1):23-35.

7. Zandi M. Gelatine. Iran Polymer. 2013. [Persian]

8. Chung TW, Wang SS, Wang YZ, Hsieh CH, Fu E. Enhancing growth and proliferation of human gingival fibroblasts on chitosan grafted poly (ε-caprolactone) films is influenced by nano-roughness chitosan surfaces. J Mater Sci Mater Med 2009; 20(1):397-404.

9. Kumar G, Waters MS, Farooque TM, Young MF, Simon CG. Freeform fabricated scaffolds with roughened struts that enhance both stem cell proliferation and differentiation by controlling cell shape. Biomaterials 2012; 33(16):4022-4030.

10. Zhao P, Jiang H, Pan H, Zhu K, Chen W. Biodegradable fibrous scaffolds composed of gelatin coated poly (ε-caprolactone) prepared by coaxial electrospinning. J Biomed Mater Res 2007; 83(2):372-382.

11. Kazemnejad S, Allameh A, Soleimani M, Gharehbaghian A, Mohammadi Y, Amirizadeh N, et al. Development of a novel three-dimensional biocompatible nanofibrous scaffold for the expansion and hepatogenic differentiation of human bone marrow mesenchymal stem cells. Iran J Biotechnol 2007; 5(4):201-211.

12. Ghasemi-Mobarakeh L, Prabhakaran MP, Morshed M, Nasr-Esfahani M. H, Ramakrishna S. Electrospun poly (ε-caprolactone)/gelatin nanofibrous scaffolds for nerve tissue engineering. Biomaterials 2008; 29(34):4532-4539.

13. Tığlı RS, Kazaroğlu NM, Mavış B, Gümüşderelioğlu M. Cellular behavior on epidermal

www.SID.ir

Archive of SID

growth factor (EGF)-immobilized PCL/gelatin nanofibrous scaffolds. J Biomater Sci Polym Ed 2011; 22(1-3):207-223.

14. Hajiali H, Shahgasempour S, Naimi-Jamal MR, Peirovi H. Electrospun PGA/gelatin nanofibrous scaffolds and their potential application in vascular tissue engineering. Int J Nanomedicine 2011; 6:2133.

15. Maruf N, Karim Agaloo F, Vahid Dastjerdi E, Nazarian H, Nojehdehyan H. Physicochemical evaluation of Chitosan-gelatin-Hydroxyapatite composite scaffold prepared by freez drying. J Dent Sch (Shahid Beheshti) 2012; 29:385-393 [Persian].

16. Khatami F, Niknejad H, Mosaffa N, Peirovi H. The effect of chitosan-gelatin scaffold pore size on amniotic epithelial cell attachment for use in tissue engineering. Pejouhesh 2012; 36(1):4-10 [Persian].

17. Binulal N. S, Natarajan A, Menon D, Bhaskaran V. K, Mony U, Nair S. V. Gelatin nanoparticles loaded poly (-caprolactone) nanofibrous semi-synthetic scaffolds for bone tissue engineering. Biomed Mater 2012; 7(6):065001.

18. Gautam S, Dinda A.K, Mishra N.C. Fabrication and characterization of PCL/gelatin composite nanofibrous scaffold for tissue engineering applications by electrospinning method. Mater Sci Eng 2013; 33(3):1228-1235.

19. Safaeijavan R, Soleimani M, Divsalar A, Eidi A, Ardeshirylajimi A. Biological behavior study of gelatin coated PCL nanofiberous electrospun scaffolds using fibroblasts. J Paramed Sci 2013; 5(1): 18-27.

www.SID.ir

Archive of SID

JCRPS Journal of Clinical Research in Paramedical Sciences, Vol 4, No 1, Spring 2015 Original Article

Study of Fibroblast cells Behavior on Supramolecular Polycaprolactone Nanofibers Coated with Gelatin

Zahra Shakeri Shemirani[1], Mojgan Zandi[2*], Parvin Shokrollahi[2], Shiva Irani[1].

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

2. Department of Biomaterial, Iran Polymer and Petrochemical Institute, Tehran, Iran.

***Corresponding Author:**
Tehran, Iran Polymer and Petrochemical Institute, Department of Biomaterial.

Email: m.zandi@ippi.ac.ir

Abstract

Background: Tissue engineering has the potential to create organ and tissue in the form of de novo. Scaffolds are based on structures existing in the extracellular matrix. The trend of successful use of scaffolds is growing rapidly in organ transplantation and in order to expedite such successful use, structures similar to the target tissue are to be used. The coverage of PCL with Gelatin is devised to enable the surface properties of polymer to have hydrophilicity and permeability.This study is to investigate the cell behavior towards Gelatin-coated poly-caprolactone supramolecular nanofibers polymer.

Methods: Poly-caprolactone supramolecular nanofibers were prepared by electrospinning method, and were coated with gelatin. Poly-caprolactone supramolecular covered with gelatin has been investigated by FTIR, and scaffolds morphology has been investigated by scanning electron microscope (SEM). L929 fibroblast cells have been cultured on scaffolds, and their cellular activity has been assessed first by MTT test and then has been stained with DAPI to confirm the presence of cells on the nanofibers.

Results: The results showed that L929 fibroblast cells, when cultured on nanofibers, such nanofibers can create three-dimensional topography to support the cell growth and cell proliferation, Gelatin-coated poly-caprolactone supramolecular nanofibers has had impact on their biocompatibility. Meantime, MTT assay has confirmed the biocompatibility of the resulting graph.

Conclusion: Gelatin- coated poly-caprolactone supramolecular nanofibers, leads to improved surface properties of polymer and to suitable cell behavior.

Keywords: Tissue Engineering, Nanofibers, Poly caprolactone, Supramolecular, Gelatin, Fibroblast L929 Cell line.

How to cite this article

Shakeri Shemirani Z, Zandi M, Shokrollahi P, Irani Sh. Study of Fibroblast cells Behavior on Supramolecular Polycaprolactone Nanofibers Coated with Gelatin. J Clin Res Paramed Sci 2015; 4(1):1-13.

www.SID.ir