

The Effect of Electrical Stimulation on Growth and Proliferation of Neural Cells Using Conductive Nanofibrous Scaffolds

Fatemeh Zamani^{1*}, Mohammad Amani-Tehran², and Houra Farkhondehnia²

1. Hazrate Masoumeh University, Postal Code: 3736175514, Qom, Iran
2. Department of Textile Engineering, Amirkabir University of Technology,
P.O. Box: 15875-4413, Tehran, Iran

Received: 30 May 2018, accepted: 28 November 2018

ABSTRACT

Hypothesis: Nowadays, the use of scaffolds in tissue engineering to repair and regenerate human lesions, including nervous injuries has been widely considered. Also, nanofibrous scaffolds due to their structural similarity with the extracellular matrix (ECM) in the body are found to be suitable substrates for cell growth. Therefore, the main focus of the present work is on the production of conductive nanofibrous scaffolds for neural cell culture and their electrical stimulation performance.

Methods: Two biocompatible polymers including polycaprolactone (PCL) and poly(lactic-co-glycolic acid) (PLGA) were used as main materials, and polyaniline (PANI) was applied as a conductive polymer to create conductivity in the substrates. After determination and optimization of the electrospinning process factors, 4 types of nanofibrous scaffolds with 4 levels of conductive polymer (0%, 1%, 10% and 18%) were prepared. To investigate the effect of scaffolds' conductivity and electrical stimulation on the nerve cells behavior, a plate with steel electrodes was designed to apply electrical field to the scaffolds during cell culture experiments.

Findings: SEM, Dino-Lite digital microscopy, Potentiostat-Galvanostat and 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) assay were used to study the properties of scaffolds including hydrophilicity, conductivity, fiber diameter and the results of cell culture. By investigation of the physical properties of the scaffolds it was shown that increasing the amount of PANI in scaffolds causes significant drop in the fiber diameter and hydrophilicity. In cell culture experiment, shape and proliferation of nerve cells were studied. MTT assay and SEM images showed that electrical stimulation, proportional to the amount of polyaniline, enhanced neurite outgrowth compared to the scaffolds that were not subjected to electrical stimulation. Furthermore, proliferation of cells on conductive scaffolds (by 10% v/w of PANI) increased and subsequently the cell proliferation decreased with increasing conductive polymer content due to its toxicity.

(*)To whom correspondence should be addressed.

E-mail: fzamani@hmu.ac.ir

Keywords:

electrospun nanofibrous scaffold,
electrical stimulation,
conductive polymer,
nerve cell culture,
electrical conductivity

Please cite this article using:

Zamani F., Amani-Tehran M., and Farkhondehnia H., The Effect of Electrical Stimulation on Growth and Proliferation of Neural Cells Using Conductive Nanofibrous Scaffolds, *Iran. J. Polym. Sci. Technol. (Persian)*, 31, 427-434, 2019.

اثر تحریک الکتریکی بر رشد و تکثیر سلول‌های عصبی با استفاده از داربست‌های نانولیفی رسانا

فاطمه زمانی^{۱*}، محمد امانی تهران^۲، حورا فرخنده‌نیا^۲

۱- قم، دانشگاه حضرت معصومه (س)، کد پستی ۳۷۳۶۱۷۵۵۱۴

۲- تهران، دانشگاه صنعتی امیرکبیر، دانشکده مهندسی نساجی، صندوق پستی ۱۵۸۱۷۵-۴۴۱۳

دریافت: ۱۳۹۷/۳/۹، پذیرش: ۱۳۹۷/۹/۷

مجله علوم و تکنولوژی پلیمر،

سال سی و یکم، شماره ۵،

صفحه ۴۳۴-۴۲۷، ۱۳۹۷

ISSN: 1016-3255

Online ISSN: 2008-0883

DOI: 10.22063/JIPST.2019.1611

چکیده

فرضیه: امروزه استفاده از داربست‌ها در مهندسی بافت برای ترمیم و بازسازی انواع ضایعات بدن از جمله ضایعات عصبی بسیار مورد توجه قرار گرفته است. همچنین، استفاده از داربست‌های نانولیفی به دلیل تشابه ساختاری با ماتریس خارج سلولی بدن، بستر مناسبی برای رشد سلول‌هاست. بر این اساس، محور پژوهش حاضر بر پایه تولید داربست‌های نانولیفی رسانا برای کشت سلول‌های عصبی و اعمال تحریک الکتریکی بر آن‌هاست.

روش‌ها: از دو پلیمر زیست‌سازگار پلی‌کاپرولاکتون (PCL) و پلی(لاکتیک-کو-گلیکولیک اسید) (PLGA) به عنوان ماده اصلی داربست و از پلیمر رسانای پلی‌آنیلین برای ایجاد رسانندگی در داربست‌ها استفاده شد. پس از تعیین و بهینه‌سازی مجموعه عوامل اثرگذار فرایند الکتروریسی بر خواص داربست، چهار نوع داربست نانولیفی آرایش‌یافته با چهار سطح پلیمر رسانا (۰، ۱، ۱۰ و ۱۸٪) تهیه شد. برای بررسی اثر رسانندگی داربست‌ها و تحریک الکتریکی بر رفتار سلول‌های عصبی، صفحه‌ای شامل الکترودهای فولاد زنگ‌نزن طراحی و تولید شد تا اعمال میدان الکتریکی به داربست‌ها حین آزمون‌های کشت سلولی را ممکن سازد.

یافته‌ها: خواص داربست‌ها شامل آبدوستی، رسانندگی، قطر الیاف و نیز نتایج کشت سلول با میکروسکوپی الکترونی پویشی، میکروسکوپی رقمی، دستگاه Atulab و آزمون MTT بررسی و ارزیابی شد. نتایج حاصل از بررسی خواص فیزیکی داربست‌ها بیانگر آن است که با افزایش مقدار پلی‌آنیلین، قطر الیاف و آبدوستی داربست‌ها به‌طور معناداری کاهش می‌یابد. در آزمون‌های مربوط به کشت سلولی، شکل و مقدار تکثیر سلول‌های عصبی بررسی شد. تصاویر SEM حاصل نشانگر کشیدگی بیشتر سلول‌ها در نمونه‌های تحریک‌شده است و با افزایش مقدار پلی‌آنیلین این کشیدگی افزایش می‌یابد. همچنین با اعمال میدان الکتریکی، تکثیر سلول‌های عصبی روی داربست‌های رسانای دارای پلی‌آنیلین (تا مقدار ۱۰٪ وزنی) افزایش یافته و پس از آن با افزایش پلیمر رسانا به علت ایجاد سمیت، تکثیر سلول‌ها کاهش یافته است.

واژه‌های کلیدی

داربست نانولیفی
الکتروریسی‌شده،
تحریک الکتریکی،
پلیمر رسانا،
کشت سلول عصبی،
رسانندگی الکتریکی

* مسئول مکاتبات، پیام‌نگار:

fzamani@hmu.ac.ir

مقدمه

امروزه در سراسر جهان شمار زیادی از افراد به دلیل ابتلا به بیماری‌هایی که در اثر آسیب‌رسیدن به بافت عصب به وجود آمده است، در رنج و سختی به سر می‌برند. از میان آسیب‌های وارد شده به بافت عصب، آسیبی است که به بافت نخاع وارد می‌شود و بیش از همه باعث رنجش بیمار می‌شود. ترمیم بافت عصب به دلیل اهمیت شایان توجه آن در زندگی بشر، می‌تواند راهکار درمانی بی‌نظیری باشد. اخیراً تمرکز دانشمندان برای ترمیم ضایعات عصبی بر مهندسی بافت و استفاده از داربست‌ها قرار گرفته است [۱-۳].

روش‌های مختلفی برای تولید داربست از مواد طبیعی و مصنوعی ارائه شده است. الکترورسی شیوه‌ای است که در کاربردهای مختلف پزشکی مانند تهیه زخم‌پوش و رهایش دارو به کار گرفته شده است [۴-۷]. الکترورسی افزون بر تولید آسان ساختار لیفی، نسبت زیاد سطح به حجم الیاف و ساختار متخلخل لایه، به دلیل تولید لایه‌های نانولیفی با ساختار مشابه با ماتریس خارج سلولی بدن (ECM) روش مناسبی برای تولید این داربست‌هاست [۸-۱۰].

تحریک الکتریکی روش مؤثری برای افزایش زوائد عصب است. این موضوع، استفاده از پلیمرهای رسانا را برای تهیه داربست‌های استفاده‌شده در مهندسی بافت مورد توجه پژوهشگران قرار داده است. با استفاده از داربست‌های رسانا، اعمال تحریک الکتریکی به سلول‌های عصبی در مهندسی بافت امکان‌پذیر می‌شود. بدین دلیل، استفاده از پلیمرهای رسانا در مهندسی بافت در سال‌های اخیر بسیار اهمیت یافته است [۱۱-۱۳].

پلیمرهای رسانا، پلیمرهایی هستند که پیوند π و الکترون‌های آزاد در پیکره زنجیر آن‌ها وجود دارند. طی فرایند دوپه‌شدن، زنجیر پلیمری به حالت اکسایش یا کاهش درمی‌آید و دارای بارهای مثبت یا منفی می‌شود که در نتیجه پلیمر خاصیت رسانایی الکتریکی پیدا می‌کند. فرایند دوپه‌شدن شامل انتقال بار از مولکول دوپه‌کننده به زنجیر پلیمری است. این فرایند باعث تغییر پلیمر از حالت نارسانا به حالت رسانا می‌شود. به عبارت دیگر بدون انجام عملیات دوپه‌شدن، پلیمرهای رسانا فاقد خاصیت رسانایی هستند [۱۴].

بزرگ‌ترین مشکل پلیمرهای رسانا در کاربردهای پزشکی تخریب‌ناپذیری آن‌ها در داخل بدن است. برای برطرف کردن این مشکل، دانشمندان با آمیختن پلیمرهای رسانا و پلیمرهای زیست‌تخریب‌پذیر، کامپوزیتی شامل پلیمرهای رسانا با خاصیت زیست‌تخریب‌پذیری تهیه کردند [۱۵]. پلی‌پیرول، پلی‌آنیلین و پلی‌تیوفن مهم‌ترین پلیمرهای رسانای استفاده‌شده در کاربردهای پزشکی هستند که زیست‌سازگاری آن‌ها به‌طور گسترده بررسی شده

است [۱۶-۱۴].

پلی‌پیرول در کاربردهایی از قبیل رهایش دارو، بازسازی عصب و ساخت زیست‌حسگرها به کار گرفته شده است [۱۷]. مطالعات اخیر، استفاده از پلی‌آنیلین در مهندسی بافت در شرایط درون‌تنی و برون‌تنی را نشان می‌دهد [۲۰-۱۷، ۱۱]. پلی‌لاکتیک-کو-گلیکولیک اسید (PLGA) و پلی‌کاپرولاکتون (PCL) نیز از نظر زیست‌سازگاری و زیست‌تخریب‌پذیری بررسی و در مهندسی بافت استفاده شده‌اند. در PLGA با تغییر نسبت لاکتیک به گلیکولیک اسید می‌توان خواص مکانیکی و سرعت تجزیه پلیمر را کنترل کرد. PCL در شرایط محیط پایدارتر است و سرعت تجزیه آهسته آن باعث شده تا PCL بیش از آنکه به‌عنوان زیست‌پلیمر استفاده شود، مصرف بیشتری به‌عنوان کاشتینه و در رهایش کنترل‌شده و بلندمدت دارو داشته باشد. اما، به علت اینکه PCL انعطاف‌پذیری زیادی دارد، می‌تواند بر نقص PLGA از نظر شکنندگی و ازدیاد طول کم آن غلبه کند [۲۱، ۹، ۳].

بر اساس مطالعات انجام‌شده خواص شیمیایی، فیزیکی و الکتریکی داربست، بر مهندسی بافت عصب اثرگذار است [۱۹]. در مهندسی بافت عصب، تحریک الکتریکی روش مؤثری برای افزایش زوائد‌های عصب است. این موضوع، استفاده از پلیمرهای رسانا را برای تهیه داربست‌های مصرفی در مهندسی بافت مورد توجه پژوهشگران قرار داده است.

نانوالیاف الکترورسی‌شده آرایش‌یافته نیز نقش بسزایی در بهبود عملکرد سلول‌های مختلف مانند استخوان، عصب، ماهیچه، رگ و قلب داشته‌اند [۲۲، ۲۱، ۱۱]. بنابراین، پژوهش حاضر به منظور تولید داربست زیست‌سازگار با قابلیت تحریک‌پذیری الکتریکی برای بررسی اثر تحریک الکتریکی بر رشد و تکثیر سلول‌های عصبی انجام شده است. برای دستیابی به این هدف، چند نوع داربست با درصدهای مختلف پلی‌آنیلین الکترورسی شدند. سلول‌ها به‌طور مستقیم روی داربست‌ها کشت و تحت تحریک الکتریکی واقع شدند. در پژوهش‌های گذشته، ضمن تولید لایه‌های نانولیفی رسانا از ترکیب پلی‌آنیلین با پلیمرهای زیست‌سازگار مختلف، از دستگاه دوکاونده‌ای برای تحریک الکتریکی سلول‌های عصبی استفاده شده است [۱۵، ۱۱]. اما، در پژوهش حاضر ضمن تعیین داربست زیست‌سازگار و رسانای بهینه برای ایجاد بهترین حالت رشد، تکثیر و کشیدگی در سلول عصبی، دستگاه چهارکاونده‌ای برای اعمال تحریک الکتریکی بر سلول‌ها، طراحی و ساخته شد تا بر خلاف دستگاه‌های دوکاونده‌ای میدان الکتریکی یکنواخت‌تر و نیز گسترده‌تری به همه سلول‌های کشت‌شده اعمال شود.

تجربی

DinoCapture تعیین شد. بررسی رسانندگی الکتریکی نمونه‌ها به کمک دستگاه Potentiostat-Galvanostat مدل Autolab 302N ساخت آلمان (Metrohm AG) انجام شد. برای تعیین آب‌دوستی و رسانندگی، هر آزمون پنج مرتبه تکرار شد.

آماده‌سازی نمونه‌ها و کشت سلولی

نمونه‌ها (از هر نمونه پنج تکرار) متناسب با اندازه چاهک‌های پلیت ۲۴ تایی کشت سلول برش خورده و پس از سترون شدن با PBS و پرتو UV تحت کشت سلول‌های عصبی A-172 با چگالی ۱۰۰۰۰ سلول در هر چاهک قرار گرفتند. در نهایت، پنج روز پس از کشت و نگاه‌داری در شرایط مشابه بدن (درون انکوباتور Memmert ساخت آلمان با دمای ۳۷°C و ۵٪ CO₂) نمونه‌ها برای بررسی تکثیر و مشاهده شکل‌شناسی سلول‌ها آماده شدند. برای مشاهده شکل‌شناسی سلول‌های کشت‌شده، پس از شست‌وشوی داربست‌ها با PBS، با استفاده از گلو تار آلد هید ۲/۵٪ به مدت ۳۰ min سلول‌ها روی داربست تثبیت شدند. رشد و تکثیر سلول‌ها روی داربست با استفاده از آزمون MTT بررسی شد. پنج روز پس از کشت سلول، برای شمارش سلول‌های زنده چسبیده روی سطح داربست، نمونه‌ها با PBS شسته شده و در تماس با محلول MTT (۵ mg/ml) به مدت ۴ h درون انکوباتور نگاه‌داری شدند. سپس، محلول خارج شده و DMSO برای انحلال ذرات آبی رنگ فورمازن جایگزین شد. در نهایت، غلظت محلول حاصل که بیانگر چگالی سلول است با استفاده از دستگاه ELISA ساخت سوئیس در طول موج ۵۷۰ nm اندازه‌گیری شد.

تحریک الکتریکی سلول‌ها در شرایط برون‌تنی

برای بررسی اثر تحریک الکتریکی بر رشد سلول‌های عصبی کشت‌شده روی داربست نانولیفی، میدان الکتریکی یکنواخت طراحی شد. یک پایه شامل چهار الکترود فولادی در هر چاهک پلیت قرار داده شد. بدین ترتیب، نمونه‌ها در میدان الکتریکی ۱۰۶/۲۵ mV/mm، به مدت ۱ h در شرایط سترون شدن قرار گرفتند.

تحلیل آماری

نتایج به دست آمده با استفاده از آزمون ANOVA و نرم‌افزار SPSS در سطح اطمینان ۹۵٪ تحلیل شدند.

نتایج و بحث

پس از آزمون‌های متعدد شرایط بهینه برای تولید داربست نانولیفی

مواد

در این پژوهش، از پلی (لاکتیک-co-گلیکولیک اسید) با گرانی ۸۵/۱۵ dL/g (PLGA, LA/GA: Boehringer Ingelheim)، پلی‌کاپرولاکتون (PCL) با وزن مولکولی ۸۰۰۰۰ و پلی‌آنیلین (PANI) با وزن مولکولی ۵۰۰۰۰۰ (باز امرالدین) محصول Sigma-Aldrich استفاده شد. همچنین، از دی‌متیل فرمامید و کلروفرم ساخت Merck، کامفور سولفونیک اسید (CSA) شرکت Sigma-Aldrich، گلو تار آلد هید محصول Merck و محلول ۳- (۵،۴-دی‌متیل تیاژول-۲-ایل)-۵،۲-دی‌فنیل تترازولیوم برمید (MTT) ساخت Sigma برای تولید داربست و انجام آزمون‌های سلولی استفاده شد. رده سلولی A-172 با منشأ انسانی برای بررسی اثر تحریک الکتریکی بر رشد و تکثیر سلول‌های عصبی از بانک سلولی انستیتو پاستور ایران تهیه شد.

دستگاه‌ها و روش‌ها

آماده‌سازی داربست‌های رسانا با الیاف آرایش‌یافته

محلول پلیمری ۵٪ وزنی-حجمی از انحلال (۷۵/۲۵) PLGA/PCL، در حلال کلروفرم به دست آمد. محلول رسانای پلی‌آنیلین نیز از انحلال ترکیب پلی‌آنیلین و کامفور سولفونیک اسید (CSA/PANI:1.5) در مخلوط ۲:۳ حلال کلروفرم-DMF پس از ۲۴ h قرار گرفتن روی همزن مغناطیسی آماده شد. سپس، با اضافه کردن مقادیر مختلف محلول پروتون‌دار شده PANI به محلول پلیمری PLGA/PCL، ترکیب ۰، ۱، ۱۰ و ۱۸٪ وزنی-حجمی PLGA/PCL/PANI تهیه شد. محلول حاصل به مدت ۱ h، پیش از الکتروریزی در دمای معمولی روی همزن قرار گرفت. برای انجام فرایند الکتروریزی از پمپ سرنگ KD Scientific Inc، KDS 100 ساخت آمریکا با سرعت ۰/۵ mL/h استفاده شد. ولتاژ لازم و فاصله ریسندگی به ترتیب روی ۲۰ kV و ۲۰ cm تنظیم شد. برای به دست آوردن الیاف آرایش‌یافته از درام جمع‌کننده با سرعت دوران ۱۲ rpm استفاده شد.

بررسی ساختار داربست

پس از پوشش‌دهی داربست‌های نانولیفی با طلا، از میکروسکوپ الکترونی پویشی (SEM) مدل XL30 ساخت شرکت Philips با ولتاژ ۱۵ kV برای مشاهده ساختار داربست‌ها استفاده شد. متوسط قطر الیاف هر یک از نمونه‌ها با نرم‌افزار Image J ۱۲۰ اندازه‌گیری شد. برای بررسی مقدار آب‌دوستی لایه‌های نانولیفی، زاویه تماس داربست با آب با استفاده از میکروسکوپ رقمی Dino-Lite ساخت تایوان و نرم‌افزار

جدول ۱- پارامترهای مختلف در داربست‌ها.

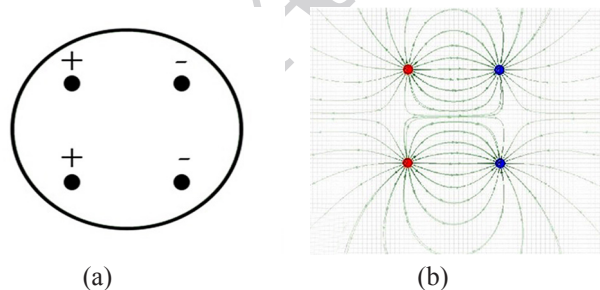
Table 1. Various parameters in scaffolds.

Scaffolds coding	PANI %	Electrode [B]	Stimulation [C]
A1B1C1	0	-	-
A2B1C1	1	-	-
A3B1C1	10	-	-
A4B1C1	18	-	-
A1B2C2	0	+	+
A2B2C2	1	+	+
A3B2C2	10	+	+
A4B2C2	18	+	+
A3B2C1	10	+	-

نمونه‌ها کاهش می‌یابد. همچنین مشاهدات نشان می‌دهد، با افزایش مقدار پلی‌انیلین از ۱٪ به ۱۸٪ قطر الیاف نیز از $763/48 \pm 31/88$ nm به $511/59 \pm 34/46$ nm کاهش یافته است.

در بخش آزمون‌های سلولی نمونه‌ها در دو گروه با و بدون تحریک الکتریکی بررسی شدند. بدین ترتیب، چهار گروه از داربست‌ها برای مطالعات سلولی آماده شدند. پارامترهای مختلفی که در آزمون تحریک الکتریکی بررسی شدند، در **جدول ۱** آمده است.

برای تولید میدان الکتریکی یکنواخت در داخل داربست، کاونده چهار نقطه‌ای طراحی و ساخته شد. در دستگاه ساخته‌شده چهار الکترود از جنس فولاد زنگ‌نزن به فاصله $0/8$ cm از یکدیگر به شکل مربع واقع شدند. **شکل ۲** (a) ترتیب قطب‌های الکترود را نشان می‌دهد. میدان الکتریکی یکنواخت $106/25$ mV/mm برای تحریک سلول‌های کشت‌شده روی داربست به مدت ۱ h به‌کار گرفته شد. در دستگاه

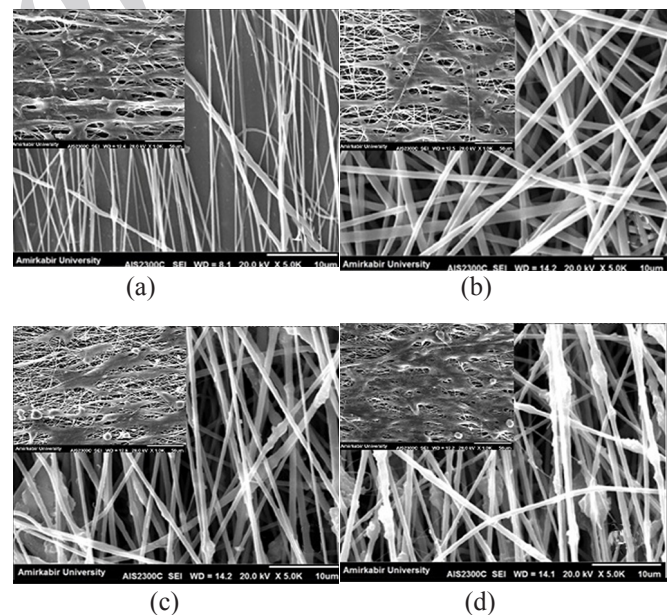


شکل ۲- (a) ترتیب قطب‌های الکترودها در هر چاهک و (b) میدان الکتریکی میان چهار الکترود.

Fig. 2. (a) The order of poles of electrodes in every well and (b) electrical field between four electrodes.

آمیزه پلیمرهای زیست‌فعال و پلیمر رسانا از لحاظ ترکیب پلیمری بهینه و نیز از نظر تنظیمات فرایند الکتروریسی مهیا شد. چهار نوع داربست شامل ۴٪ وزنی مختلف از پلی‌انیلین (۰، ۱، ۱۰ و ۱۸٪) با الیاف کاملاً آرایش‌یافته الکتروریسی شد. با توجه به مطالعات پیشین گروه پژوهشی فعلی، بهترین نتیجه کشت سلول عصبی از لحاظ مقدار تکثیر و نیز از نظر شکل‌شناسی سلولی متعلق به داربست‌های نسبتاً آرایش‌یافته با ساختار معین است [۲۲]. از این‌رو، در مطالعه حاضر همه نمونه‌ها به‌صورت تقریباً آرایش‌یافته با سرعت 6 m/s تولید شدند. تصاویر SEM مربوط به داربست‌های تولیدشده در **شکل ۱** نشان داده شده است.

برای بررسی اثر وجود PANI بر رسانندگی آمیزه پلیمری، نمونه‌ها در چهار غلظت مختلف از PANI (۰، ۱، ۱۰ و ۱۸٪) تهیه شدند. رسانندگی با استفاده از روش دو کاونده‌ای با دستگاه Autolab 302N به‌دست آمد. بر اساس نتایج به‌دست آمده، رسانایی نمونه‌ها به‌تدریج از $0/17 \times 10^{-4} \pm 0/05$ S/cm به $0/32 \times 10^{-4} \pm 0/09$ S/cm متناسب با افزایش غلظت PANI افزایش می‌یابد. همچنین، با افزایش مقدار پلی‌انیلین، زاویه تماس آب در آن‌ها تغییر می‌یابد و آب‌دوستی



شکل ۱- تصاویر SEM داربست‌های تولیدی با درصد‌های مختلف پلی‌انیلین (a) ۰٪، (b) ۱٪، (c) ۱۰٪ و (d) ۱۸٪ و تصاویر کشت سلول در حالت بدون تحریک به ترتیب با بزرگ‌نمایی ۵۰۰۰ و ۱۰۰۰.

Fig. 1. SEM images of scaffolds with different percentages of PANI (a) 0%, (b) 1%, (c) 10% and (d) 18%, and cell culture in a non-stimulating state, with a magnification of 5000 and 1000, respectively.

جدول ۲- نتایج آزمون MTT.

Table 2. Results of MTT assay.

Test conditions	PANI (%)			
	0	1	10	18
	MTT Results			
With stimulation	0.709±0.086	0.806±0.048	0.780±0.102	0.542±0.074
Stimulated modified data	0.889±0.048	0.986±0.048	0.960±0.102	0.722±0.074
Without stimulation	0.658±0.066	0.761±0.048	0.613±0.039	0.496±0.113

شکل ۳ نشان داده شده است. درصد بهبود تکثیر سلول‌ها نیز در جدول ۳ آمده است.

بر اساس نتایج به دست آمده، بیشترین مقدار تکثیر در هر دو گروه با و بدون تحریک الکتریکی در نمونه‌های دارای ۱٪ پلی‌آنیلین حاصل شده است (که تفاوت معناداری با نمونه‌های ۱۰٪ ندارند) و کمترین مقدار در نمونه‌های دارای ۱۸٪ پلی‌آنیلین مشاهده می‌شود. این مسئله به علت درصد زیاد پلی‌آنیلین است که می‌تواند به ایجاد سمیت در محیط منجر شود. همان‌طور که مشاهده می‌شود، تحریک الکتریکی حتی در نمونه‌هایی که داربست رسانی نیست (۰٪ پلی‌آنیلین) نیز به بهبود تکثیر سلول‌ها منجر شده است. بیشترین مقدار افزایش در تکثیر سلول‌ها (۵۶٪) در اثر تحریک الکتریکی نسبت به نمونه‌های تحریک‌نشده، در غلظت ۱۰٪ پلی‌آنیلین مشاهده می‌شود.

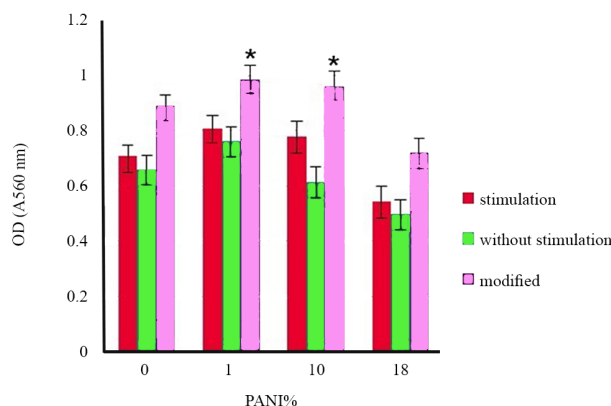
بررسی تصاویر SEM کشت سلولی نشان می‌دهد، تحریک الکتریکی به بهبود شکل و کشیدگی سلول‌های عصبی منجر شده است. در نمونه‌های تحریک‌شده تناسب خوبی بین درصد پلی‌آنیلین و مقدار کشیدگی سلول‌ها وجود دارد. از آنجا که سلول‌های عصبی در بدن چندان تولید نمی‌شوند، افزایش طول این سلول‌ها می‌تواند قابلیت خوبی در بازسازی ضایعات عصبی باشد. بیشترین مقدار کشیدگی در نمونه‌های دارای ۱۸٪ پلی‌آنیلین مشاهده شد. در حالی که تکثیر سلول‌ها به علت سمیت PANI در این نقطه کاهش یافته است. بنابراین نقطه بهینه را باید از نظر مقدار تکثیر و کشیدگی سلول‌ها تعیین کرد. بر اساس شکل ۴ و جدول ۳، نمونه دارای ۱۰٪

جدول ۳- درصد بهبود تکثیر سلول‌ها در مقایسه با نمونه تحریک‌نشده.

Table 3. The percentage of cell proliferation improvement compared to non-stimulated specimen.

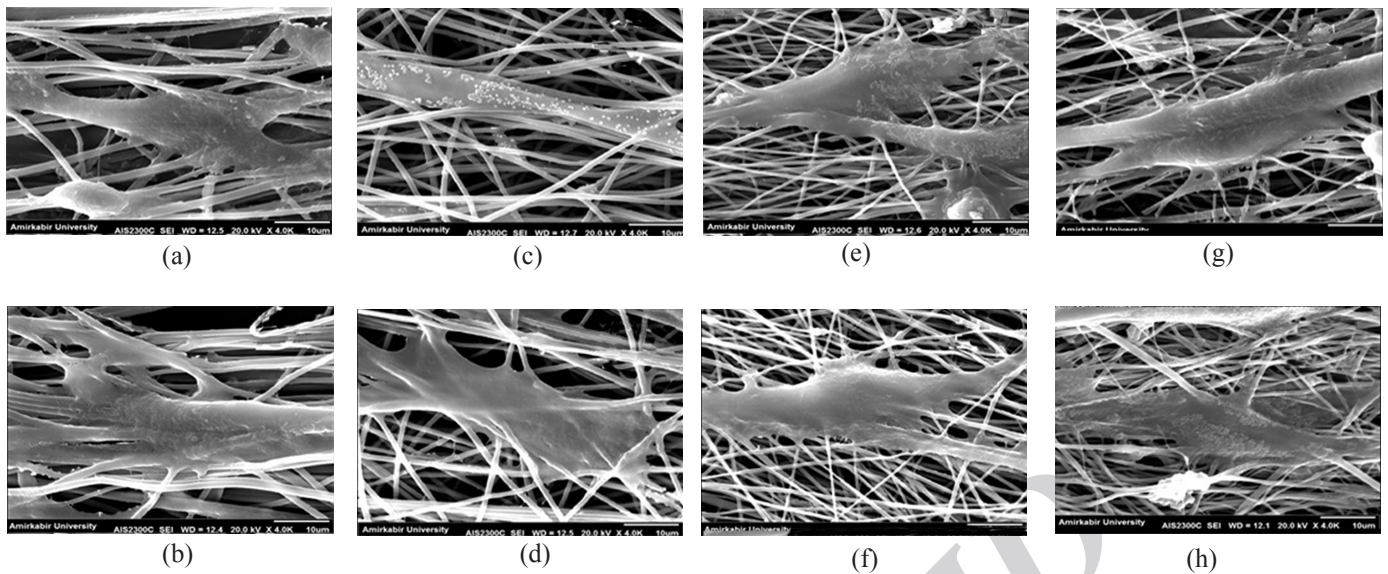
Stimulated specimen	PANI (%)			
	0	1	10	18
With electrode	7.7	6	27	9
Without electrode (modified)	35	29	56	45

ساخته شده جدید در مقایسه با نمونه متداول (دوکاونده‌ای) [۱۱،۲۳] میدان الکتریکی بر سطح گسترده‌ای از داربست وارد می‌شود. همچنین، میدان الکتریکی یکنواخت‌تری به همه سلول‌های کشت شده در وسط چاهک‌ها اعمال شد. این در حالی است که میدان اعمال شده در مرکز داربست‌ها با دستگاه‌های دوکاونده‌ای یکنواخت نبود. میدان الکتریکی اعمال شده در شکل ۲ (b) مشاهده می‌شود. برای اعمال میدان الکتریکی به سلول‌ها از الکترودهای فلزی استفاده شد. انتظار می‌رود، جسم خارجی زیست‌پذیری سلول‌ها را تحت تأثیر قرار دهد. بنابراین ابتدا لازم است، مقدار اثر منفی الکترودها بر زیست‌پذیری سلول‌ها محاسبه شود. بدین ترتیب، برای بررسی سمیت الکترودها آزمون طراحی شد. نتایج MTT کشت سلول بر دو داربست با ۱۰٪ پلی‌آنیلین در شرایط مختلف بررسی شد. در یک حالت زمانی نمونه دارای الکترودها است، اما تحت تحریک الکتریکی قرار نمی‌گیرد و در یک حالت زمانی، هیچ الکترودی در نمونه قرار ندارد. بنابراین، تفاوت بین مقادیر MTT این دو نمونه اثر منفی الکترودها را نشان می‌دهد و با اضافه کردن این مقدار به داده‌های تحریک‌شده می‌توان اثر منفی الکترودها را از بین برد و داده‌ها را اصلاح کرد. از این رو، مقدار ۰/۱۸ به همه داده‌ها اضافه می‌شود. نتایج آزمون MTT در جدول ۲ و



شکل ۳- اثر تحریک الکتریکی بر تکثیر سلول‌ها.

Fig. 3. The effect of electrical stimulation on cell proliferation.



شکل ۴- تصاویر SEM با بزرگ‌نمایی ۴۰۰۰ و شکل‌شناسی سلول‌های کشت‌شده روی داربست‌های: (g,e,c,a) تحریک‌شده الکتریکی و (h,f,d,b) تحریک‌نشده الکتریکی به ترتیب با افزایش غلظت PANI از ۰٪ به ۱۸٪: (a) A1B2C2، (b) A1B1C1، (c) A2B2C2، (d) A2B1C1، (e) A3B2C2، (f) A3B2C1، (g) A4B2C2، (h) A4B1C1.

Fig. 4. SEM images with a magnification of 4000 and the morphology of the cells grown on the: (a, c, e, g) electrically stimulated and (b, d, f, h) non- stimulated scaffolds (a) A1B2C2, (b) A1B1C1, (c) A2B2C2, (d) A2B1C1, (e) A3B2C2, (f) A3B2C1, (g) A4B2C2, and (h) A4B1C1 increased the concentration of PANI from 0% to 18%.

عصبی با استفاده از داربست‌های نانولیفی رسانای PLGA/PCL/PANI بررسی شد. همچنین، اهمیت غلظت پلی‌آنیلین و اثر آن بر تکثیر و کشیدگی سلول‌های عصبی تعیین شد. در نهایت مشخص شد، داربست زیست‌سازگار PLGA/PCL با داشتن ۱۰٪ PANI در میدان الکتریکی می‌تواند بهترین حالت رشد، تکثیر و کشیدگی سلول عصبی را ایجاد کند.

PANI می‌تواند با ارائه مقدار قابل قبولی از تکثیر و کشیدگی سلول نقطه بهینه آزمون باشد.

نتیجه‌گیری

در پژوهش حاضر اثر تحریک الکتریکی بر رشد و تکثیر سلول‌های

مراجع

1. Ahn H.S., Hwang J.Y., Kim M.S., Lee J.Y., Kim J.W., and Kim H.S., Carbon-nanotube-Interfaced Glass Fiber Scaffold for Regeneration of Transected Sciatic Nerve, *Acta Biomaterialia*, **13**, 324-334, 2015.
2. Chan K.M., Gordon T., Zochodne D.W., and Power H.A., Improving Peripheral Nerve Regeneration: from Molecular Mechanisms to Potential Therapeutic Targets, *Exp. Neurol.*, **261**, 826-835, 2014.
3. Zamani F., Amani-Tehran M., Latifi M., and Shokrgozar M.A., The Influence of Surface Nanoroughness of Electrospun PLGA Nanofibrous Scaffold on Nerve Cell Adhesion and Proliferation, *J. Mater. Sci. Mater. Med.*, **24**, 1551-1560, 2013.
4. Rahimi-Tanha N. and Nouri M., Core/Shell Nanofibers of Silk Fibroin/Polyvinyl Alcohol: Structure and Controlled Release Behavior, *Iran. J. Polym. Sci. Technol. (Persian)*, **30**, 473-488, 2018.
5. Baghersad S., Mansurnezhad R., Ghasemi- Mobarakeh L., Molahosseini H., and Morshed M., Coating of Silk Fabrics by PVA/Ciprofloxacin HCl Nanofibers for Biomedical Applications, *Iran. J. Polym. Sci. Technol. (Persian)*, **29**, 171-184, 2016.

6. Norouzi M., Ghasemi-Mobarakeh L., and Morshed M., Fabrication of Antibacterial Poly(vinyl alcohol) Microfibers Mat for Wound Dressing Application, *Iran. J. Polym. Sci. Technol. (Persian)*, **29**, 15-25, 2016.
7. Nouri M., Mokhtari J., Salmani L., and Sadeghieh K., Electrospinning of Silk Fibroin/ β -Cyclodextrin Nanofibers for Controlled Drug Release, *Iran. J. Polym. Sci. Technol. (Persian)*, **29**, 89-100, 2016.
8. Zamani F., Amani-Tehran M., Latifi M., Shokrgozar M., and Zaminy A., Promotion of Spinal Cord Axon Regeneration by 3D Nanofibrous Core-Sheath Scaffolds, *J. Biomed. Mater. Res.*, **102A**, 506-513, 2014.
9. Abadi F.J.H., Amani-Tehran M., Zamani F., Nematollahi M., Ghasemi-Mobarakeh L., and Nasr-Esfahani M.H., Effect of Nanoporous Fibers on Growth and Proliferation of Cells on Electrospun Poly(ϵ -caprolactone) Scaffolds, *Int. J. Polym. Mat. Polym. Biomat.*, **63**, 57-64, 2014.
10. Mokhtari F., Salehi M., Zamani F., Hajiani F., Zeighami F., and Latifi M., Advances in Electrospinning: The Production and Application of Nanofibres and Nanofibrous Structures, *Text. Prog.*, **48**, 119-219, 2016.
11. Ghasemi-Mobarakeh L., Prabhakaran M.P., Morshed M., Nasr-Esfahani M.H., and Ramakrishna S., Electrical Stimulation of Nerve Cells Using Conductive Nanofibrous Scaffolds for Nerve Tissue Engineering, *Tissue Eng.*, **15A**, 3605-3619, 2009.
12. Pedrotty D., Koh J., Davis B., Taylor D.A., Wolf P., and Niklason L.E., Engineering Skeletal Myoblasts: Roles of 3-D Culture and Electrical Stimulation, *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.*, **288**, 1620-1626, 2005.
13. Dodel M., Nejad N.H., Bahrami S.H., Soleimani M., Amirabad L.M., and Hanaee-Ahvaz H., Electrical Stimulation of Somatic Human Stem Cells Mediated by Composite Containing Conductive Nanofibers for Ligament Regeneration, *Biologicals*, **46**, 99-107, 2017.
14. Shi G., Zhang Z., and Rouabhia M., The Regulation of Cell Functions Electrically Using Biodegradable Polypyrrole-Poly lactide Conductors, *Biomaterials*, **29**, 3792-3798, 2008.
15. Ghasemi-Mobarakeh L., Prabhakaran M., and Morshed M., Application of Conductive Polymers, Scaffolds and Electrical Stimulation for Nerve Tissue Engineering, *J. Tissue Eng. Regen. Med.*, **5**, 17-35, 2011.
16. Shi G., Rouabhia M., Meng S., and Zhang Z., Electrical Stimulation Enhances Viability of Human Cutaneous Fibroblasts on Conductive Biodegradable Substrates, *J. Biomed. Mater. Res.*, **84A**, 1026-1037, 2007.
17. Hopkins A.R., Rasmussen P.G., Characterization of Solution and Solid State Properties of Undoped and Doped Polyanilines Processed from Hexafluoro-2-propanol, *Macromolecules*, **29**, 7838-7846, 1996.
18. Bidez P.R., Li S., MacDiarmid A.G., Venancio E.C., Wei Y., and Lelkes P.I., Polyaniline, an Electroactive Polymer, Supports Adhesion and Proliferation of Cardiac Myoblasts, *J. Biomater. Sci., Polym. Ed.*, **17**, 199-212, 2006.
19. Zamani, F., Amani-Tehran M., Zaminy A., and Shokrgozar M., Conductive 3D Structure Nanofibrous Scaffolds for Spinal Cord Regeneration, *Fiber. Polym.*, **18**, 1874-1881, 2017.
20. Li M., Guo Y., Wei Y., MacDiarmid A.G., and Lelkes P.I., Electrospinning Polyaniline-Contained Gelatin Nanofibers for Tissue Engineering Applications, *Biomaterials*, **27**, 2705-2715, 2006.
21. Armentano I., Dottori M., Fortunati E., Mattioli S., and Kenny J., Biodegradable Polymer Matrix Nanocomposites for Tissue Engineering: A Review, *Polym. Degrad. Stabil.*, **95**, 2126-2146, 2010.
22. Zamani F., Latifi M., Amani-Tehran M., and Shokrgozar M.A., Effects of PLGA Nanofibrous Scaffolds Structure on Nerve Cell Directional Proliferation and Morphology, *Fiber. Polym.*, **14**, 698-702, 2013.
23. Santos N.M., Cicuéndez M., Holz T.V., Silva V.S., Fernandes A.J.S., and Vila M., Diamond-Graphite Nanoplatelet Surfaces as Conductive Substrates for the Electrical Stimulation of Cell Functions, *ACS Appl. Mater. Interfac.*, **9**, 1331-1342, 2017.