

## پوشش‌دهی ژلاتین-کیتوسان روی داربست پلی‌کاپرولاکتون سوپرامولکولی و بررسی تأثیر آن بر رفتار سلولهای فیبروبلاست موشی

سارا خادمی خالدي<sup>۱</sup>، پروین شکرالهی<sup>۲\*</sup>، مژگان زندی<sup>۲</sup> و شیوا ایرانی<sup>۱</sup>

<sup>۱</sup> تهران، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد علوم و تحقیقات تهران، دانشکده علوم پایه، گروه زیست‌شناسی

<sup>۲</sup> تهران، پژوهشگاه پلیمر و پتروشیمی ایران، گروه بیومتریال

تاریخ پذیرش: ۹۳/۱۰/۶

تاریخ دریافت: ۹۳/۷/۲۱

### چکیده

علم مهندسی بافت در کنار علم پزشکی به احیاء و ترمیم بافتها و اندامهای آسیب دیده می‌پردازد. داربست به عنوان جزء اصلی مهندسی بافت تعریف می‌گردد. در این پژوهش از روش اصلاح سطح داربست نانولیفی پلی‌کاپرولاکتون سوپرامولکولی (Sp-PCL) برای بهبود حداثات زیست‌ماده-سلولهای فیبروبلاست بهره‌برده شد. هدف مطالعه بررسی اثر اصلاح سطحی با ژلاتین-کیتوسان بر رفتار سلولهای فیبروبلاست روی داربست Sp-PCL تهیه شده با روش الکتروریسندگی است. بدین منظور نانوالیاف SP-PCL توسط روش الکتروریسندگی تهیه شدند. نانوالیاف تهیه شده با استفاده از آمیزه ژلاتین-کیتوسان پوشش داده شد. مورفولوژی نانوالیاف تهیه شده توسط SEM بررسی گردید و آزمون زیست‌سازگاری بر روی آنها انجام شد. برای بررسی فعالیت سلولی بر روی نانوالیاف آزمون MTT انجام گرفت. برای بررسی حیات سلولی روی داربست، رنگ آمیزی DAPI مورد استفاده قرار گرفت. نتایج حاصل از بررسی میکروسکوپی رشد سلول در کنار داربست نشان داد که داربست زیست‌سازگاری مناسبی دارد. علاوه بر این، نتایج بررسی فعالیت متابولیکی سلولها بر روی داربست با استفاده از تست MTT نشان داد که پوشش سطحی نانوالیاف SP-PCL با آمیزه ژلاتین-کیتوسان به طور معنی‌داری ( $P < 0.05$ ) تکثیر سلولی را نسبت به کنترل افزایش داده و همچنین این افزایش معنی‌دار تا روز هفتم ادامه داشته است. آزمایشات نشان داد که نانوالیاف الکتروریسی شده SP-PCL پوشیده شده با آمیزه ژلاتین-کیتوسان به دلیل شباهت به شبکه نانولیفی ECM طبیعی، بستر مناسبی برای چسبندگی، و تکثیر سلولهای فیبروبلاستی فراهم کرد.

واژه‌های کلیدی: مهندسی بافت، نانوالیاف، آمیزه ژلاتین-کیتوسان، PCL سوپرامولکولی

\* نویسنده مسئول، تلفن: ۰۹۱۲۵۳۴۸۶۱۰، پست الکترونیکی: p.shokrolahi@ippi.ac.ir

### مقدمه

علاوه بر عملکردهای حیاتی، پوست به طور پیوسته در حال جوان‌سازی خود و انجام فرآیندهای ترمیم زخمهاست (۱۶). این اندام به عنوان خارجی‌ترین عضو بدن در معرض انواع جراحات و صدمات قرار دارد. بهبود زخم فرآیندی بسیار پیچیده است که شامل آسیبهای شدید بافتی (سوختگی)، نواقص پوستی (زخمهای قدیمی و کهنه) و یا شرایط مادرزادی و بیماریها می‌باشد (۱۴).

پوست به عنوان خارجی‌ترین اندام بدن انسان حدود ۱۶ درصد از وزن بدن را تشکیل داده و سطحی در حدود ۱/۸ مترمربع را پوشانده است و چون حصار بدن را در برابر محیط بیرون از بدن محافظت می‌نماید و با تنظیمات حرارتی نقش اساسی در حفظ مایعات بدن که عملکردی حیاتی است ایفاء می‌نماید (۷).

فعال، توانایی جذب و یکپارچه شدن در جایگاه پیوند می‌باشد، است (۶). این ویژگیها در چسبندگی، تکثیر و تمایز سلولی مؤثرند. انتخاب روش مناسب برای تولید داربست یکی از موارد کلیدی موفقیت در مهندسی بافت است. نانوالیاف الکتروریسی شده به دلیل منافذ اتصالی، تراوایی بالا و ناحیه سطحی وسیع می‌تواند تماس بین سلولها و داربستها را افزایش داده و تبادل مواد مغذی و متابولیسمی را بهبود بخشد. در مهندسی بافت پوست از مواد طبیعی و مصنوعی متفاوتی برای تولید داربست همانند کلاژن، کیتوسان، ژلاتین، هیالورونیک اسید، پلی کاپرولاکتون، پلی لاکتیک اسید استفاده شده است. پلیمرهای سنتزی ویژگیهای برتری از لحاظ مکانیکی نسبت به پلیمرهای طبیعی دارند و به آسانی دارای قابلیت اصلاح ویژگیهای ناکارآمد ذاتی پلیمر می‌باشند (۱۵). امروزه به دلیل اهمیت زیاد محیط زیست، پلیمرهای زیست تخریب پذیر بسیار مورد توجه قرار گرفته اند از جمله این پلیمرها می‌توان به پلی کاپرولاکتون اشاره نمود که پلیمری خطی و آب‌گریز است و یک پلی آلیفاتیک نیمه کریستالی به شمار می‌رود. پلی کاپرولاکتون توسط میکروارگانسیم‌ها به آرامی در محیط تخریب می‌شود. 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 گسترده‌ای در مهندسی بافت کاربرد دارد. یکی از معایب مهم پلی کاپرولاکتون عدم وجود گروههای عاملی بر سطح زنجیرهای پلیمری می‌باشد که آن را به پلیمری هیدروفوب تبدیل کرده است. قابلیت تر شدن و میزان آب دوستی تارهای نانولیفی در مهندسی بافت در ایجاد یک کشت سلولی مناسب و یکنواخت در سه بعد مؤثر است.

اخیراً، استفاده از پلی‌کاپرولاکتون سوپرامولکولی به عنوان یک زیست ماده مناسب مهندسی بافت در بسیاری از زمینه‌های مهندسی بافت مورد ارزیابی قرار گرفته است. از جمله شکرالهی و همکاران، مؤثر بودن کامپوزیت این ماده با

راهکارهای مختلفی جهت درمان آسیبهای پوستی به کاربرده می‌شود که شامل استفاده از بافتهای جایگزین است که این بافتها از سایر اندامهای شخص آسیب دیده تأمین می‌شود و یا از افراد یا از بافتهای موجودات دیگر استفاده می‌شود که البته در بسیاری از موارد به دلیل عدم پذیرش سیستم ایمنی، امکان پیوند از یک فرد به فرد دیگر وجود ندارد. بنابراین باتوجه به مشکلاتی که در زمینه احیاء و ترمیم بافت آسیب دیده وجود دارد مهندسی بافت به عنوان یک راه کار نوین و امید بخش مورد استفاده قرار گرفته است.

مهندسی بافت با به حالت طبیعی برگرداندن عملکرد از طریق انتقال جایگزینهای زیستی است که برای انجام مهندسی بافت موفق باید اطلاعات کاملی از ساختار، ویژگیهای مکانیکی، بیولوژی سلولی/مولکولی و در نهایت عملکرد خاص بافت مورد نظر داشت. فرآیندهایی که برای این منظور مورد استفاده قرار می‌گیرند سبب تولید بافت مناسب برای پیوند در شرایط آزمایشگاهی می‌شوند که شامل، فناوری سلول، فناوری ساخت داربست و فناوری کاشت و ترکیب در محیط برون تنی (in vivo) می‌باشد. تکنولوژی ساخت داربست بر شناسایی، طراحی و ساخت داربستهای سه بعدی برای شرایط برون و یا درون تنی (in vivo و یا in vitro) تمرکز دارد. توجه به فراهم آوری ریز محیط سه بعدی مشابه آنچه در بافت طبیعی به واسطه نانوالیاف موجود در ماتریکس خارج سلولی (ECM) فراهم می‌شود موجب تولید داربستهای مهندسی شده با تقلیدی از ماتریکس خارج سلولی خواهد بود. بنابراین طراحی داربستهایی از مواد زیستی به عنوان یکی از اهداف مهندسی بافت به شمار می‌رود. موفقیت نهایی یک داربست وابسته به ویژگیهای سطحی آن که شامل زیست سازگاری، آب دوستی و توپوگرافی سطحی مناسب جهت انتقال بهینه اکسیژن و مواد زائد، یکپارچگی بافتی و مکانیکی، شیمی سطح مناسب از نظر pH و یا جهت القای مسیرهای انتقال پیام، ذخیره و رها سازی مولکولهای زیست

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 می‌شود (۱). ژلاتین به دلیل دارا بودن سکانس شبه RGD (لیگاند بسیاری از اینتگرین‌های سلولی) در بهبود اتصال سلول به داربست مؤثر بوده و ترکیب آن با کیتوسان به برانکس لیگاندهای اینتگرین RGD در ساختار و ایجاد بستر مناسب برای کشت سلول کمک می‌کند. هدف از این مطالعه بررسی تکثیر سلول‌های فیبروبلاست بر روی داربست SP-PCL تهیه شده با روش الکترورسی است که با آمیزه ژلاتین-کیتوسان پوشش داده شده است.

### مواد و روشها

**تهیه داربست:** داربست‌های مورد استفاده در این تحقیق با استفاده از روش الکترورسی‌سندگی تهیه شدند. برای این منظور از دستگاه CO881007NYI ساخت شرکت نانو ساختار آسیا کشور ایران استفاده شد. این دستگاه مجهز به یک جمع‌کننده دوار با ضخامت 70 mm و پهنای 50 mm می‌باشد. برای تهیه داربست هدف در این مطالعه محلول ۴۰ درصد از SP-PCL که در سامانه حلال حاوی اسید فرمیک و اسید استیک به صورت محلول درآمده است، استفاده شد. نانوالیاف در بازه زمانی ۲ ساعت جمع‌آوری شدند که سرعت جمع‌آوری نمونه‌ها 8.8 mm/sec بود و با چرخش ۲۵۰ rpm نمونه‌های نانوالیاف جمع‌آوری شد. فاصله سوزن تزریق تا داربست ۲۰ cm بوده و در ولتاژ ۲۰ kV این فرآیند انجام شده است. برای بهبود ویژگی‌های آب دوستی سطح داربست‌های استفاده شده در این تحقیق، از پوشش‌دهی با آمیزه ژلاتین (گاوی)-وزن مولکولی ۴۰۰۰۰- (۵۰۰۰۰-آلدریچ)-کیتوسان (۷۵-۸۵ درصد داسیله-وزن مولکولی متوسط-آلدریچ) استفاده شد. به دلایلی که قبلاً ذکر شد، نسبت ژلاتین به کیتوسان ۸۰ به ۲۰ انتخاب شد.

**استریل نمودن داربست‌ها:** در این بررسی ابتدا نمونه‌ها به مدت ۵ ساعت در PBS استریل قرار گرفتند و سپس ۴۰ دقیقه

آپاتایت را در حمایت از تکثیر سلول‌های مزانشیمی نشان داده‌اند (۱۳).

با توجه به آب‌گریزی پلی‌کاپرولاکتون، توزیع یکنواخت سلول بر روی تارهای نانوالیاف متخلخل دشوار می‌باشد در حالی که آب دوستی تارهای نانوالیافی در چسبندگی سلول‌ها به سطح آن بسیار مؤثر است به طوری که در ترمیم بافت آسیب دیده بسیار حائز اهمیت است (۲).

در میان روش‌های رایج بهبود خواص سطحی می‌توان به روش پوشش دهی با پلیمرهای آب دوست اشاره کرد. در این پوشش دهی سطح با آمیزه ژلاتین-کیتوسان استفاده شد که یکی از روش‌های نوین برای بهبود ویژگی‌های سطحی داربست‌های تهیه شده می‌باشد. بر اساس نتایج برخی تحقیقات اخیر، آمیزه‌های ژلاتین-کیتوسان که نسبت اجزای آمیزه در آن ۸۰-۲۰ است به خوبی از تکثیر سلول‌های مینسک و فیبروبلاست پوست حمایت می‌نمایند. در همین حال، این آمیزه‌ها خواص مکانیکی قابل قبول داشته و افت خواص مکانیکی آنها در شرایط درون تنی با سرعت قابل قبولی اتفاق افتاده و در نتیجه می‌تواند برای اهداف مهندسی بافت مورد استفاده قرار گیرد (۱۱ و ۱۲).

به همین دلیل در این پژوهش از آمیزه ژلاتین-کیتوسان با نسبت وزنی ۸۰-۲۰ برای پوشش دهی داربست نانولیفی SP-PCL استفاده شد.

کیتوسان به دلیل ویژگی‌های زیست‌سازگاری و فعالیت ضدباکتریایی آن، انتخاب مناسبی برای کاربردهای متنوع مهندسی بافت می‌باشد. می‌توان خواص مکانیکی و یا بیولوژیکی وزیست‌فعال کیتوسان را از طریق ترکیب آن با مواد فعال بیولوژیکی دیگر، همچون هیدروکسی آپاتیت و ژلاتین بهبود بخشید. ژلاتین به علت ویژگی‌هایی از قبیل افزایش چسبندگی، مهاجرت، تکثیر و تمایز سلولی، زیست‌سازگاری بالا و زیست‌تخریب پذیری به عنوان ماده‌ای زیستی برای ساخت داربست مهندسی بافت استفاده می‌شود. ژلاتین ساده‌ترین نوع پروتئین طبیعی با وزن

سطح فورمازان ایجاد شده متناسب با تعداد سلولهای زنده می‌باشد. شدت رنگ ایجاد شده توسط یک آزمون رنگ سنجی ساده توسط اسپکتروفتومتر در طول موج ۶۳۰ نانومتر (OD ۶۳۰) خوانده می‌شود. به این منظور، از سلولهای فیروبلاست موشی، به تعداد  $10^4$  سلول در هر چاهک، پلیت ۲۴ خانه (برای ۲۴، ۴۸، ۷۲ ساعت) و ۶ خانه (برای ۷ روز) محتوی داربستهای استریل قرار داده شدند. کشت سلول تا ۷۲ ساعت ادامه داده شد و هر ۲۴ ساعت و سپس هفتمین روز میزان تکثیر سلولها بر روی داربست با استفاده از آزمون MTT سنجیده شد. بدین منظور از دستگاه ELISA reader (Bio Tek ELx800) استفاده شد. Cell viability به صورت درصد نسبت نمونه به کنترل محاسبه گردید. نتایج توسط نرم افزار SPSS، آنالیز واریانس (آزمون ANOVA) در سطح معنی داری  $P < 0,05$  تحلیل شد.

**رنگ آمیزی DAPI:** به منظور بررسی میزان سلولهای زنده 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 می‌گیرد. از جمله اهداف این نوع رنگ آمیزی: مطالعه چرخه سلولی، تعیین شاخص میتوز در یک ارگانسیم یا شمارش سلولها و باکتریها می‌باشد.

بعد از رنگ آمیزی سلولها با DAPI با استفاده از میکروسکوپ فلورسانس از سلولها تصویر تهیه و مورد بررسی قرار گرفت. در این بررسی به تعداد  $4 \times 10^4$  سلول به درون هر یک از چاهکها از پلیت ۲۴ خانه استریل منتقل شدند. پس از گذشت ۷۲، ۴۸، ۲۴ ساعت از انتقال سلولها بر روی داربستها، داربستها از پلیت استریل به درون داربست دیگر منتقل شدند.

سپس با بافر فسفات سالین (PBS) ۱ درصد، به مدت ۱۰ دقیقه در حجمی به اندازه ۱ ml قرارداد شدند، این کار

(۲۰ دقیقه هر روز) با اشعه UV استریل شدند. بدین ترتیب که پس از تهیه داربستها با استفاده از روش الکترورسی و قراردادن در PBS داربستها در ابعاد  $1 \text{ cm}^2$  برش خورده و هر دو سوی داربست با اشعه UV استریل شد. لازم به ذکر است هر طرف داربستها به مدت ۲۰ دقیقه در معرض اشعه UV قرار گرفتند. بعد از استریل نمودن داربستها با اشعه UV در شرایط استریل (زیر هود لامینار) درون پلیتهای ۲۴ خانه استریل قرار گرفتند.

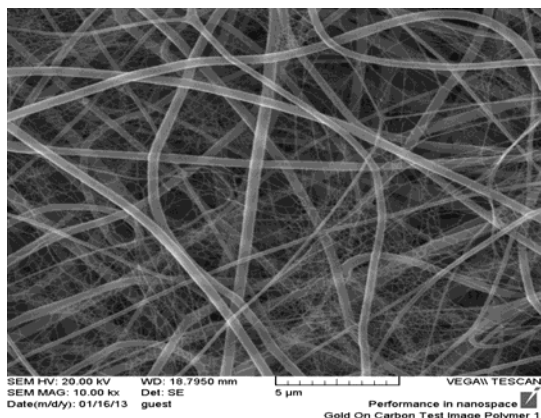
**کشت سلول:** در این پژوهش سلولهای فیروبلاست موشی (1929) از انستیتو پاستور ایران تهیه گردیدند. سلولهای تهیه شده در محیط کشت RPMI که حاوی ۱۰ درصد سرم (FBS) بوده در انکوباتور با قابلیت تزریق  $\text{CO}_2$  به مقدار ۵ درصد و رطوبت ۹۵ درصد در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد نگهداری شدند.

**بررسی ساختار نانوالیاف با استفاده از میکروسکوپ الکترونی:** پس از تهیه داربست، برای بررسی و مشاهده مورفولوژی داربست تهیه شده با روش الکترورسی با استفاده از دستگاه VEGA/TESCANII ساخت کشور بلژیک موجود در پژوهشگاه پلیمر ایران تصاویری تهیه شد.

**آزمون زیست سازگاری: آزمون بررسی فعالیت و میزان زنده ماندن سلول بر روی داربست (MTT).** در این آزمون میزان فعالیت آنزیم دهیدروژناز میتوکندریایی سلولهایی که زنده و فعال هستند مورد مطالعه قرار می‌گیرند. MTT، نمک محلول در آب تترازیلیوم برماید است. محلول بافر MTT تحت تأثیر آنزیم های دهیدروژناز موجود در میتوکندری سلولهای زنده احیاء می‌شود و به فورمازون نامحلول بنفش رنگ تبدیل می‌گردد. پودر MTT محصول شرکت Sigma-Aldrich، انگلستان می‌باشد.

این ترکیب در DMSO محلول می‌شود. از آنجایی که سلولهای مرده قادر به تبدیل MTT به فورمازان نیستند،

برای مدت زمان ۲۴ ساعت سلولها در تراکم  $10^4 \times 4$  بر روی نانوالیاف پوشش داده شده با آمیزه ژلاتین-کیتوسان در شرایط انکوباتور  $CO_2$ ، رطوبت ۹۵ درصد و در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد کشت داده شدند.



شکل ۱- میکروگراف SEM از داربست نانولیفی الکتروریسی شده

#### SP-PCL قبل از کشت سلول

تصاویر به دست آمده از میکروسکوپ معکوس نشان دهنده مورفولوژی کشیده سلولها به سمت داربست می باشد. در نتیجه می توان گفت نانوالیاف PCL الکتروریسی شده پوشش داده شده با آمیزه ژلاتین-کیتوسان زیست سازگاری مناسبی دارد. (شکل ۲). پس از انجام آزمون زیست سازگاری به منظور تأیید فعالیت حیاتی سلول ورشد و تکثیر سلولها بر روی نانوالیاف مورد استفاده از آزمون MTT استفاده شد. آزمون MTT در ۴ بازه زمانی ۲۴، ۴۸، ۷۲ ساعت و ۷ روز انجام شد و در ادامه نتایج حاصل از آزمون MTT به صورت نمودار در ۴ بازه زمانی ۲۴ ساعت تا ۷۲ ساعت و ۷ روز با ۳ بار تکرار برای هر نمونه در یک نمودار ارائه گردید (نمودار ۱).

**بررسی و تأیید حضور و زنده ماندن سلول بر روی نانوالیاف:** به منظور بررسی و تأیید حضور زنده ماندن میزان سلولها بر روی داربست از رنگ آمیزی DAPI استفاده شد. با استفاده از میکروسکوپ فلورسانس تصاویری تهیه شد (شکل ۳). تصاویر نشان می دهد که هسته سلولها بر

۲ بار تکرار شد. سپس داربستها به مدت ۱۰ دقیقه در محلول پارافرمالدئید ۴ درصد قرار داده و دوباره با PBS عمل شستشو انجام گردید در مرحله بعد از محلول تریتون ۰/۱ درصد به مدت ۵ دقیقه استفاده شد. سپس دوباره با PBS شست و شو داده و در ادامه به مقدار چند قطره رنگ DAPI به مدت ۵ دقیقه به داربستها افزوده شد و دوباره با PBS دو بار عمل شستشو انجام گرفت. باید توجه شود تا زمان بررسی با میکروسکوپ فلورسنت نمونه ها را در تاریکی و PBS نگهداری شوند.

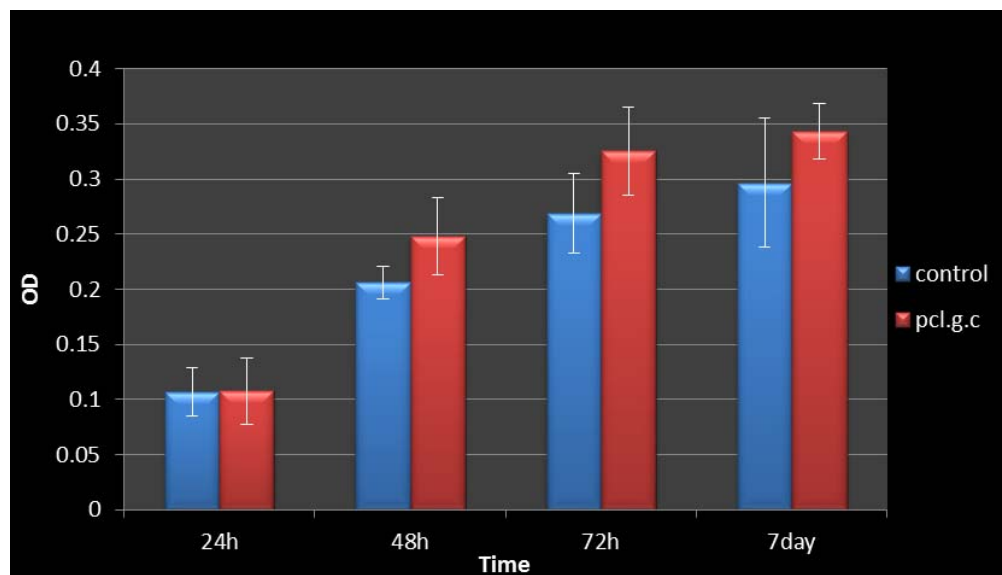
## نتایج

**تهیه نانوالیاف:** در این تحقیق نانوالیاف پلی کاپرولاکتون با روش الکتروریسندگی تهیه شدند. یکی از مشخصات داربستهای تهیه شده با استفاده از پلیمر SP-PCL ویژگی آب گریزی این پلیمر است، که برای استفاده از این پلیمر به عنوان داربست در مهندسی بافت عاملی محدود کننده محسوب می شود. در این تحقیق، به منظور تعدیل و اصلاح این مشخصه از آمیزه ژلاتین-کیتوسان بهره برده شد. اعمال آمیزه ژلاتین-کیتوسان بر سطح نانوالیاف PCL موجب آب دوست شدن نانوالیاف شده است. پوشش به روش محلولی روی سطح داربستها اعمال شد. سپس، نمونه ها تحت خلاء برای مدت ۱۲ ساعت در دمای محیط خشک شدند.

**بررسی ساختار نانوالیاف:** پس از تهیه داربست، برای بررسی و مشاهده مورفولوژی داربستهای الکتروریسی شده، تصاویری از سطح یاف تهیه شد (شکل ۱). همانطور که در شکل مشاهده می شود الیاف دارای سطح صاف، فاقد دانه تسبیح، و به قطر ۴۰۰-۵۰۰ nm هستند.

**زیست سازگاری نانوالیاف:** یکی از مشخصه های بسیار مهم در داربست جهت استفاده در مهندسی بافت وجود زیست سازگاری است. برای تأیید زیست سازگاری نانوالیاف PCL الکتروریسی شده در بازه زمانی ۲ ساعت

روی نانوالیاف پوشش داده شده با آمیزه ژلاتین کیتوسان سالم بوده است.



نمودار ۱- نتایج حاصل از آزمون MTT. مقایسه میزان رشد سلولها بر روی داربستها با یکدیگر

(۱) کنترل مثبت (بدون داربست). (۲) داربست نانوالیاف

این آزمون با سطح معنی داری  $P < 0.05$  با آنالیز ANOVA انجام شد

## بحث

ویژگیهای شاخص و مهم در ماتریکس خارج سلولی فراهم آوری شرایطی مناسب جهت تبادل و تعامل سلولها با یکدیگر و با محیط اطرافشان می گردد که آب دوستی و وجود نانوتوپوگرافی مناسب می تواند در این راستا باشد. وجود ویژگی آب دوستی در ECM موجب تسهیل در نقل و انتقال گازها، مواد مغذی و زائد در تمامی سطوح سلولی می شود از سوی دیگر وجود ویژگی نانوتوپوگرافی تأثیر به سزایی در القای مسیرهای دخیل در پیام رسانی در شکل گیری فنوتیپ و سرنوشت سلول دارد (۴ و ۸). با توجه به اینکه ECM شبکه ای از نانوالیاف پیچیده و منظم می باشد و نیز تأثیر محیط نانوتوپوگرافی بر القای مسیرهای پیام رسانی دخیل در شکل گیری فنوتیپ و سرنوشت سلول نقش به سزایی دارد، داربستهای تولید شده از نانوالیاف در سالهای اخیر مورد توجه قرار گرفته است (۴ و ۹).

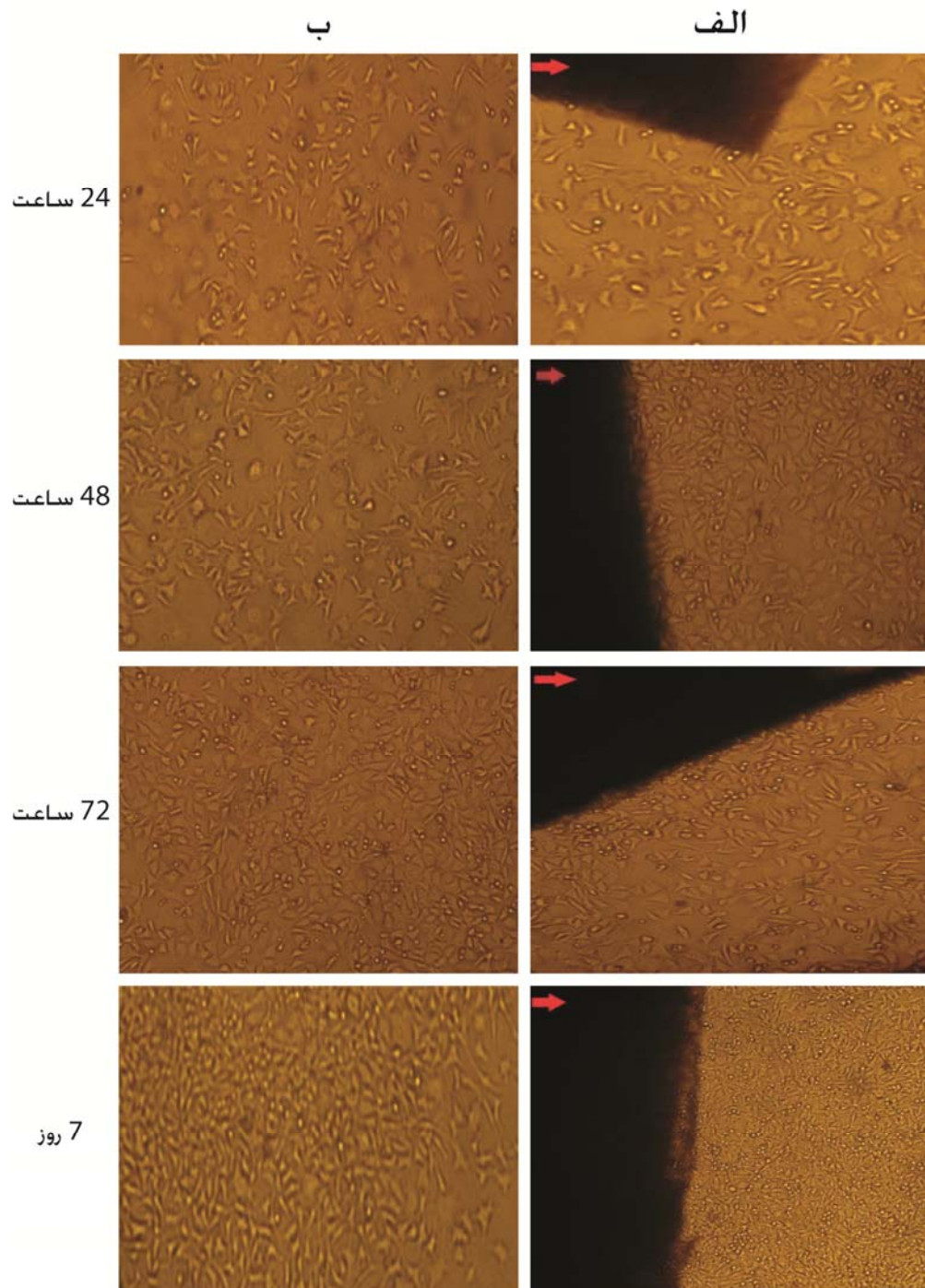
در مطالعه انجام شده توسط Kumer و همکاران به منظور استفاده از نانوالیاف PCL که دارای ساختار سه بعدی باشند از روش ریسندگی شکل آزاد (Freeform fabricate)

مهندسی بافت یا "طب احیا" یک حوزه میان رشته ای، از رشته های زیست شناسی، مهندسی، علم مواد و پزشکی بوده که بر توسعه جانشینی زیستی برای ترمیم، نگهداری و بهبود بافت و عملکرد عضو تمرکز یافته است (۸). هدف از مهندسی بافت ترمیم بافت از طریق به کارگیری ابزار بیولوژیکی مثل سلولها با ابزار های سنتتیک مؤثر مانند زیست مواد، برای طراحی داربست می باشد. در بافت تکامل یافته یک جاندار، سلولها در ریز محیطهای سه بعدی قرار می گیرند و اطرافشان به وسیله سلولهای دیگر و ECM احاطه می شود رفتار سلولی پاسخی ترکیبی از رخدادهای پیام رسانی متعددی بوده که در اثر برهمکنش سلولهای مجاور با یکدیگر، با مولکولهای محلول و با ECM اتفاق می افتد (۵).

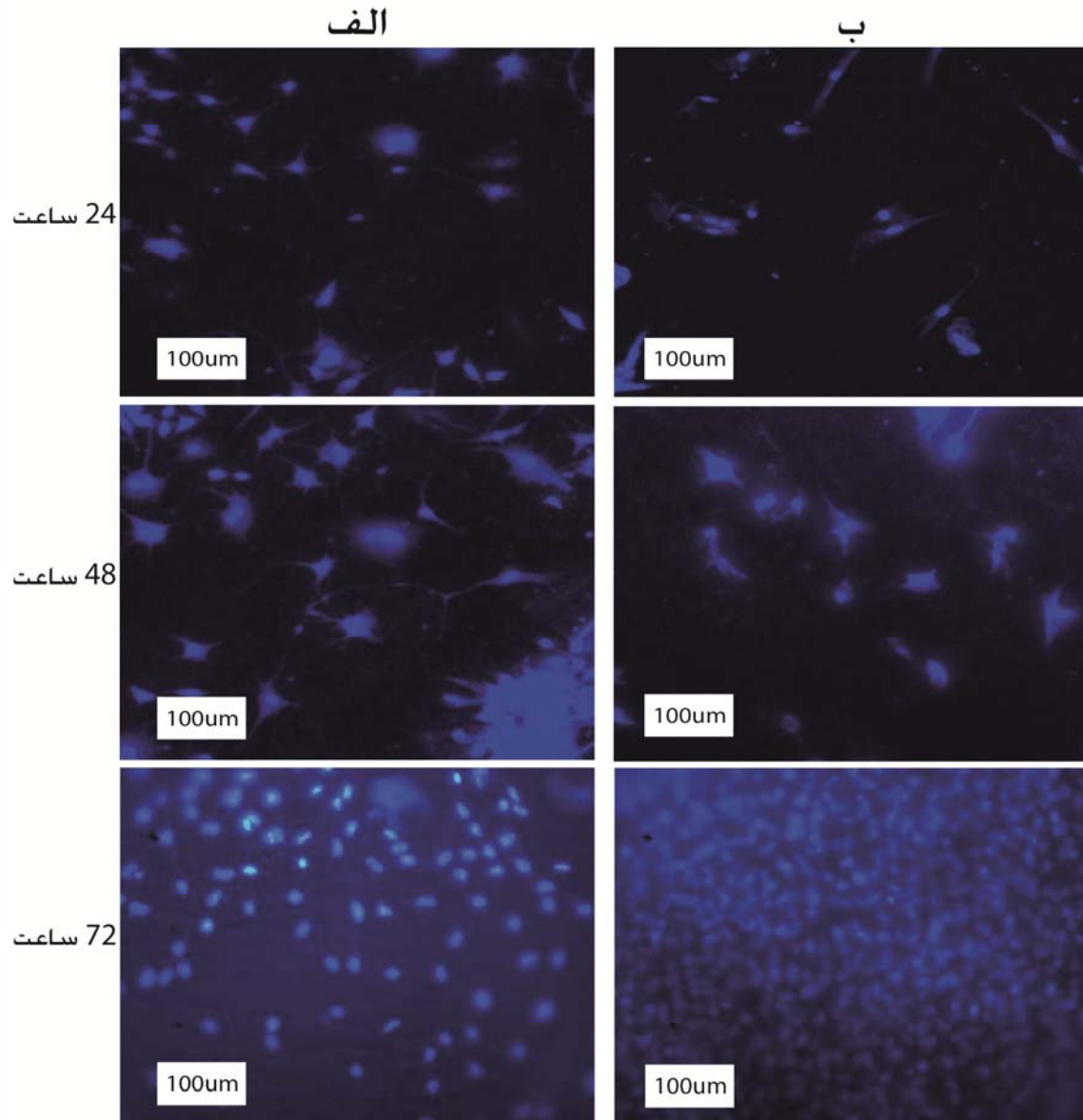
داربست در مهندسی بافت در واقع باید تقلیدی از ماتریکس خارج سلولی طبیعی موجود در بدن باشد. یکی از

سلول کشت شده جهت بروز رفتار مناسب سلولی را نداشت (۹).

استفاده شد. داربست تهیه شده به دلیل نداشتن ساختار سه بعدی و ویژگی‌های سطحی مناسب، توانایی حمایت لازم از



شکل ۲ - تصاویر میکروسکوپ معکوس ۲۴،۴۸، ۷۲ ساعت و ۷ روز پس از کشت سلول؛ الف) داربست SP-PCL پوشیده شده با آمیزه ژلاتین کیتوسان (نواحی تیره رنگ داربست که با پیکان نشان داده شده است، ب) کنترل مثبت (پلیت بدون داربست). (بزرگ نمایی ۱۰۰X)



شکل ۳ - تصویر میکروسکوپ فلورسنت با رنگ آمیزی DAPI؛ (الف) پس از گذشت ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت از کشت سلولهای فیبروبلاستی بر روی پلیت بدون داربست (کنترل)، (ب) پس از گذشت ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت از کشت سلولهای فیبروبلاستی بر روی داربست پلی کاپرولاکتون سوپرامولکولی پوشیده شده با آمیزه ژلاتین-کتوسان.

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 سلولها قادر به بروز رفتار سلولی مناسب بر روی آن نبوده اند.

در سال ۲۰۱۰، Yildirim و همکاران از پلی کاپرولاکتون سه بعدی تولید شده با استفاده از روش شکل دهی در خلا extrusion deposition (Precision) به عنوان داربست استفاده نمودند. داربست تولید شده فاقد شرایط مناسب جهت حمایت از سلولها برای بروز پاسخ مناسب سلولی بود (۱۷).



عالی، در دسترس بودن و زیست‌سازگار بودنش ماده مناسبی برای مصارف پزشکی به حساب می‌آید و به شکل گسترده‌ای در مهندسی بافت کاربرد دارد.

یکی از معایب آن عدم وجود گروه‌های عاملی بر سطح زنجیره‌های پلیمری می‌باشد که آن را به پلیمری هیدروفوب تبدیل کرده است. قابلیت ترشدن و میزان آب دوستی و بهای نانوالیافی در مهندسی بافت در ایجاد یک کشت سلولی مناسب و یکنواخت در سه بعد مؤثر است. با توجه به آب‌گریزی PCL ایجاد یک توزیع یکنواخت از کشت سلولی بر روی وب نانوالیاف متخلخل تشکیل شده از این پلیمرها دشوار می‌باشد. همچنین آب دوستی وب نانوالیافی در چسبندگی سلولها به سطح آن نیز مؤثر است که در ترمیم بافت آسیب دیده بسیار حائز اهمیت است. با وجود این مشخصات در مطالعات مختلف از ترکیب این پلیمر با ترکیبات و مواد مختلف در جهت تعدیل این مشخصه استفاده شده است.

در تمامی موارد ذکر شده در بالا تلاش در جهت افزوده شدن عوامل بیولوژیک و گروه‌های شیمیایی و یا فیزیکی به منظور فراهم کردن بستری مناسب در جهت ایجاد شرایط بهتر داربست‌های تهیه شده با PCL می‌باشد. به منظور اصلاح ویژگی آب‌گریزی داربست تهیه شده از پلیمر PCL سوپرامولکول با استفاده از روش الکتروروسی در این تحقیق از آمیزه ژلاتین-کیتوسان بهره برده شد.

بسترهایی که تحت عنوان داربست در مهندسی بافت استفاده می‌شوند باید توانایی واکنش با سلول در ابعاد سه بعدی و یا تسهیلگر ارتباط سه بعدی سلولها با یکدیگر و محیط اطرافشان باشند. پس می‌توان گفت که فراهم آوری این مشخصه توسط نانوالیاف برای سلولها فاکتور تعیین کننده برای موفقیت یا شکست داربست می‌باشد.

چسبندگی اولین رویدادی است که پس از انتقال سلولها بر روی نانوالیاف اتفاق می‌افتد و تست چسبندگی تعیین

روشهای مختلفی برای تهیه نانوالیاف وجود دارد که نانوالیاف با توجه به روشهای تولید مختلف دارای اندازه‌ها و اشکال متفاوتی هستند و هر یک برای کاربرد خاص مورد استفاده قرار می‌گیرند. روشهای رایج شامل کشش، قالب‌گیری، جداسازی فازی، خود آرایی و الکتروروسی بوده و به منظور تولید نانوالیاف برای مصارف زیست پزشکی مورد استفاده قرار می‌گیرد. در میان روشهای ذکر شده از روش الکتروروسی (electrospinning) برای تولید داربست در این تحقیق استفاده شده است. الکتروروسی روشی محبوب برای تولید داربستهای نانوالیاف می‌باشد. به دلیل شباهت زیاد داربست تولیدشده به ECM توسط این روش بیش از سایر روشها مورد توجه قرار گرفته است. نانوالیاف با فراهم آوری ویژگیهای مختلف توپوگرافی از قبیل: قطر، ترازبندی و فاصله میان الیاف به راحتی با تنظیم عوامل مؤثر در فرآیند الکتروروسی قابل تنظیم است (۵).

در کنار استفاده از روش ساخت انتخاب ماده سازنده داربست بخش حیاتی را در اطمینان یافتن از موفقیت مهندسی بافت پوست بازی می‌کند. مواد طبیعی و سنتتیک متفاوتی برای ساخت داربست از جمله PCL، PLL، کلاژن، فیبروئین ابریشم، کیتوسان و ژلاتین استفاده شده است. مانع اصلی در استفاده از پلیمرهای طبیعی خصوصیات مکانیکی ضعیف آنهاست. پلیمرهای سنتتیک مانند PCL، PLLA تحت تجزیه هیدرولیتیکی قرار می‌گیرند و فرآورده‌های حاصل از آنها در مسیر متابولیسی حذف می‌شوند. این پلیمرها ویژگیهای برتری از لحاظ مکانیکی نسبت به پلیمرهای طبیعی دارند و به آسانی قابلیت پردازش دارند (۱۵).

به همین دلیل در این مطالعه پلیمر پلی کاپرولاکتون سوپرامولکولی به عنوان ماده سازنده داربست برای تولید نانوالیاف به روش الکتروروسی انتخاب شد. این پلیمر یک پلیمر خطی و آب‌گریز است و به علت خواص فیزیکی

پس از کشت سلولها داری تفاوت چندانی در رفتار سلولی بر روی داربست PCL سوپرامولکول پوشیده شده با آمیزه ژلاتین-کیتوسان و کنترل مثبت قابل وجود ندارد که چنانچه گفته شدندشان دهنده عدم سمیت و زیست سازگاری داربست می باشد. اما با توجه به رشد چشمگیر سلولها بر روی داربست نسبت به کنترل مثبت پس از کشت سلول، می توان گفت داربست PCL سوپرا مولکول پوشیده شده با آمیزه ژلاتین-کیتوسان شرایطی مشابه ECM موجود در بافت طبیعی را فراهم کرده است و در بازه زمانی طولانی تر تا ۷ روز از رشد و تکثیر سلولی حمایت می کند.

Xiaoran و همکارانش در سال ۲۰۰۸ از الکترو ریسندگی برای ساخت داربست پلی کاپرولاکتون استفاده کردند. آنها سطوح یالیف را با ژلاتین و کلسیم فسفات پوشش دادند. اندازه گیری زاویه تماس آب و اسکن میکروسکوپ الکترونی، حضور ژلاتین و کلسیم فسفات را تأیید کرد (۱۱).

نتایج X-ray آنها نشان داد که رسوب فاز معدنی مخلوطی از دهیدرات کلسیم و فسفات (پیشرو به آپاتیت) و آپاتیت است. آنها اعتقاد داشتند که داربست متخلخل می تواند ساختار، ترکیب و عملکرد بیولوژیکی ماتریکس خارج سلولی استخوان را تقلید کند. آنها سلولهای Mc3T3-E1 Preosteoblast را بر روی این داربست کشت دادند که اتصال و تکثیر و مورفولوژی خوب سلولها بر روی داربست را مشاهده نمودند. میزان تکثیر سلولها بر روی داربست، پس از کشت به مدت ۷ روز به میزان قابل توجهی، بالاتر (۱/۹ برابر) از داربست فیبری پوشش نداده شده بود.

این نتایج نشان داد که سیستمهای ترکیبی شامل پلی کاپرولاکتون، ژلاتین و کلسیم فسفات می تواند به عنوان یک داربست مناسب برای مهندسی بافت استخوان باشد (۱۰).

کننده بخشی از سلول است که به سطح ماتریکس متصل می شود و در برابر شستشو مقاومت می کند.

بدین منظور پس از گذشت ۲۴ ساعت از انتقال سلولهای فیبروبلاستی بر روی نانوالیاف استریل شده با استفاده از اشعه UV زیست سازگاری و عدم سمیت نانوالیاف برای سلولهای فیبروبلاستی مورد بررسی قرار گرفت.

تصاویر تهیه شده با استفاده از میکروسکوپ معکوس پس از گذشت ۲۴ ساعت رشد مناسبی از سلولهای فیبروبلاستی را در کنار نانوالیاف نشان می دهند که تأیید کننده زیست سازگاری و عدم سمیت آن برای سلولها می باشند (شکل ۲).

بعد از انتقال سلولها بر روی نانوالیاف میزان رشد سلولی تا ۷۲ ساعت به صورت روزانه و سپس ۷ روز با استفاده از آزمون MTT مورد سنجش قرار گرفت. جذب نمونه ها با استفاده از دستگاه اسپکتوفتومتر در طول موج ۵۷۰ nm خوانده شد (نمودار ۱). بررسی رشد سلولها در کنار داربست در بازه های زمانی ذکر شده با استفاده از میکروسکوپ معکوس انجام شد.

با توجه به تصاویر تهیه شده با استفاده از میکروسکوپ معکوس پس از گذشت ۲۴ ساعت از انتقال سلولها بر روی داربست PCL سوپرامولکول پوشیده شده با آمیزه ژلاتین-کیتوسان تمایل سلولها به سمت داربستها بوده و سلولها بر روی نانوالیاف در مقایسه با کنترل، تقریباً مشابه یکدیگر بودند. با گذشت ۴۸ ساعت از کشت سلولها و مقایسه آن با روز اول و کنترل مثبت سلولها رشد چشمگیر تری را نشان می دهند. در روز سوم و یا ۷۲ ساعت پس از کشت سلولی و مقایسه آن با ۲۴ ساعت و ۴۸ ساعت و کنترل مثبت سلولها رشد بسیار چشمگیرتری را نشان می دهند. با گذشت ۷ روز از کشت سلول و مقایسه آن با روزهای قبل و کنترل مثبت رشد سلولها به طور معنی داری افزایش یافته است. نمودار تهیه شده با استفاده از آزمون MTT نتایج به دست آمده از تصاویر تهیه شده با میکروسکوپ معکوس را تأیید می نماید. با توجه به نمودارها در ۲۴ ساعت نخست

اینتگرین RGD در ساختار و ایجاد بستری که بیشترین شباهت را به ECM طبیعی بدن موجود زنده داشته باشد کمک می‌کند توانایی حمایت بیشتری از سلولهای کشت داده شده برای بروز پاسخ سلولی مناسب بر روی داربست را دارند (۳).

### نتیجه‌گیری

باتوجه به روشهای مختلفی که در تهیه داربست در مطالعات پیشین استفاده شده بود، به دلیل فراهم‌آوری محیطی دو بعدی و مشابه ECM طبیعی از روش الکتروسی برای تهیه داربست استفاده شد. از سوی دیگر جهت اصلاح ویژگی ذاتی آب‌گریزی موجود در پلیمر مصنوعی sPCL از آمیزه ژلاتین-کیتوسان بهره‌برده شد. در واقع اعمال پوشش آمیزه ژلاتین-کیتوسان بر سطح نانوالیاف، با بهبود ویژگی آب‌دوستی سطحی نانوالیاف این مشخصه ذاتی تعدیل و شرایط برای اتصال اولیه سلول بر سطح نانوالیاف بهبود یافته که در پی آن مهاجرت، رشد و تکثیر مناسب و بهتر سلولی بر روی نانوالیاف نسبت به کنترل مثبت فراهم گردید. همان‌طور که در نتایج نیز قابل مشاهده است نانوالیاف PCL سوپرامولکول پوشش داده شده با آمیزه ژلاتین-کیتوسان با تراکم بالاتر شباهت بیشتری به ECM طبیعی بدن داشته و توانایی بهتری در جهت حمایت از رشد و تکثیر سلولی از خود نشان داده است.

در سال ۲۰۱۳، شکراللهی و همکارانش، بر روی ارتباط بین خواص ساختاری بیوکامپوزیت‌های سوپرامولکولی و مقاومت مکانیکی آنها کار کردند. بیوکامپوزیت ترکیبی متشکل از هیدروکسی‌آپاتیت و SP-PCL در شرایط مختلف تهیه شد (PCL سوپرامولکولی بانانوذرات هیدروکسی‌آپاتیت اصلاح شد) و خواص مکانیکی، حرارتی و همچنین قابلیت زیست‌سازگاری و سمیت سلولی در شرایط آزمایشگاهی مورد بررسی قرار گرفت. نتایج با PCL سوپرامولکولی فاقد هیدروکسی‌آپاتیت مقایسه شد. نتایج نشان داد که اصلاح سطح با نانوذرات هیدروکسی‌آپاتیت منجر به بهبود استحکام کششی و مدول به ترتیب تا 3.6 و 2.2 برابر شد (۱۳).

شریفی و همکارانش در سال ۲۰۱۴ از داربست PCL اصلاح شده با پلازما به منظور بررسی تکثیر سلولهای فیبروبلاست موشی استفاده کردند. نتایج نشان داد که داربست PCL اصلاح شده با پلازما در مقایسه با داربست PCL پوشش داده شده با ژلاتین-کیتوسان توانایی حمایت کمتری از سلولهای کشت داده شده برای بروز پاسخ سلولی مناسب بر روی داربست را دارند. داربست PCL پوشش داده شده با ژلاتین-کیتوسان به دلیل آنکه کیتوسان با ایجاد اتصال متقاطع (Cross-Link) موجب پایداری داربست شده و به ایجاد حفرات همگن در ساختار کمک می‌کند و ژلاتین به دلیل دارا بودن سکانس شبه RGD (لیگاند بسیاری از اینتگرین‌های سلولی) در بهبود اتصال سلول به داربست مؤثر بوده و ترکیب آن با کیتوسان به براکنش لیگاندهای

### منابع

۳. شریفی، فردویی، ایرانی، شیوا، زندی، مزگان، سلیمانی، مسعود، ۱۳۹۳، تهیه و اصلاح سطح نانوالیاف پلی‌کاپرولاکتون با پلازما به منظور بررسی رفتار سلول فیبروبلاست، فصلنامه پزشکی و پیراپزشکی دانشگاه علوم پزشکی اردبیل، سال چهاردهم، شماره ۵۳، ۲۱۷-۲۲۸.

۱. زندی، مزگان، ۱۳۹۲، ژلاتین و کاربردهای آن. تهران، انجمن پلیمر ایران  
۲. قلی‌پور کنعانی، عادل، بهرامی، سیده‌زیر، جغتایی، محمدتقی، صمدی کوچکسرایبی، علی، ۱۳۹۲، تولید داربستهای نانولیفی بر پایه پلی‌کاپرولاکتون-کیتوسان-پلی‌ونیل‌الکل برای مهندسی بافت پوست، مجله علوم و تکنولوژی پلیمر، دوره ۲۶، شماره ۲.

4. Barnes, CP. Sell, SA. Boland, ED. Simpson, DG. Bowlin, GL. 2007. Nanofiber technology: Designing the next generation of tissue

engineering scaffolds. Advanced Drug Delivery Reviews. Volume 59:1413-1433.

5. He, L. Liao, S. Quan, D. Ma, K. Chan, C. Ramakrishna, S. Lu, J. 2010. Synergistic effects of electrospun PLLA fiber dimension and pattern on neonatal mouse cerebellum C17.2 stem cells. *Acta Biomaterialia*. Volume 6:2960–2969.
6. Jha, B.S. Colello, R.J. Bowman, J.R. Sell, S.A. Lee, K.D. et al, 2011. Two pole air gap electrospinning: Fabrication of highly aligned, three dimensional scaffolds for nerve reconstruction. *Acta Biomater*. Volume 7:203-15.
7. Keck, Maike. Lumenta, David Benjamin. Kamolz, Lars-Peter. 2013. *Skin Tissue Engineering*. Springer Vienna.
8. Kim, H.N. Jiao, A. Hwang, N.S. Kim, M.S. Kang, D.H. Kim, D.H. Suh, K.Y. 2012. Nanotopography-guided tissue engineering and regenerative medicine. *Adv Drug Deliv Rev*. Volume 65:389-402.
9. Kumar, Girish. Waters, Michael S. Farooque, Tanya M. Young, Marian F. Simon Jr, Carl G. 2012. Reform fabricated scaffolds with roughness struts that enhance both stem cell proliferation and differentiation by controlling cell shape. *Biomaterials*. Volume 33:4022-30.
10. Li, Xiaoran. Xie, Jingwei. Yuan Xiaoyan and Xia Younan. 2008. Coating Electrospun Poly( $\epsilon$ -caprolactone) Fibers with Gelatin and Calcium Phosphate and Their Use as Biomimetic Scaffolds for Bone Tissue Engineering. *Langmuir*. Volume 24:14145–14150.
11. Pezeshki-Modaress, M, et al. 2013. Cell-loaded gelatin/chitosan scaffolds fabricated by salt-leaching/lyophilization for skin tissue engineering: In vitro and in vivo study. *Journal of Biomedical Materials Research Part A*.
12. Raz, M, et al. 2014. Development of biomimetic gelatin–chitosan/hydroxyapatite nanocomposite via double diffusion method for biomedical applications. *International Journal of Materials Research* 105.5: 493-501, 102, 3908-3917.
13. Shokrollahi, P, Mehmanchi, M, Atai, M, Omidian, H, Shokrollahi, F. 2013. Effect of interface on mechanical properties and biodegradation of PCL HAp supramolecular nano-composites, *Mater Sci*, 5039-6.
14. Supp, D.M. Boyce, S T. 2005. Engineering skin substitutes: practices and potentials, *Clinic in Dermatology*. Volume 4:203-212.
15. Vance, R.J. Miller, D.C. Thapa, A. Haberstroh, K.M. Webster, T.J. 2004. Decreased fibroblast cell density on chemically degraded poly-lactic-co-glycolic acid, polyurethane, and poly caprolactone. *Biomaterials*. Volume 25:2095-2103.
16. Wong, David J. Chang, Howard. 2009. *Skin Tissue Engineering*. Stanford: StemBook.
17. Yildirim E.D, Besunder R, Papas D, Allen F, Gucer S, Sun W. 2010. Accelerated differentiation of osteoblast cells on polycaprolactone scaffolds driven by a combined effect of protein coating and plasma modification. *Biofabrication*. Volume 2:12-24.

## Gelatin-chitosan coating enhances L929 fibroblasts proliferation on supramolecular nano-fibrous scaffolds

Khademi S.<sup>1</sup>, Shokrollahi P.<sup>2</sup>, Zandi M.<sup>2</sup> and Irani Sh.<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Biology Dept., Faculty of Science, Azad University, Science and Research Unit, Tehran, I.R. of Iran

<sup>2</sup> Biomaterial Dept., Iran Polymer and Petrochemical Institute, Tehran, I.R. of Iran

### Abstract

The goal of tissue engineering is regeneration and restoration of damaged tissues and organs. Scaffolds are the main part of tissue engineering, and gelatin/chitosan surface modification is one of the proper methods for surface modification of polymer scaffolds. Evaluation of fibroblasts behavior on gelatin/chitosan coated supramolecular PCL (SP-PCL) was the aim of this study. SP-PCL nano-fibers were prepared by electrospinning. Morphology of the nano-fibrous mats was investigated using scanning electron microscopy. MTT assay was performed to examine cell activity on the nano-fibers. DAPI staining was carried out to evaluate cell viability. The SEM images of the cells onto the scaffold showed good biocompatibility of the scaffold. In addition, the MTT assay results showed a proper metabolic activity of cells on the scaffolds. The sPCL nano-fibrous mats coated with gelatin-chitosan blend show significantly ( $p < 0.05$ ) increased cells proliferation compared to control (tissue culture plate, TCP), and also this significant increased proliferation has been observed until the seventh day post seeding. The experiments showed that the nano-fibrous electrospun SP-PCL coated with gelatin/chitosan blend, provides a suitable environment for fibroblasts adhesion, and proliferation, possibly because of similarity to nano-fibrous natural ECM network.

**Key words:** Supramolecular polycaprolactone, tissue engineering, nano-fiber, gelatin/chitosan blend, surface modification.