Journal of Ardabil University of Medical Sciences

Vol.14, No.3, Autumn 2014, Pages 217-228

Synthesis and Surface Modification of Polycaprolactone Nanofibers for Tissue Engineering

Sharifi Ferdoey F[1], Irani S*[1], Zandi M[2], Soleimani M[3]

[1]Department of Biology, School of Basic Sciences, Sciences and Research Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran
[2] Department of Biomaterial, Iran Polymer and Petrochemical Institute, Tehran, Iran
[3] Department of Hematology, Faculty of Medical Sciences, Tarbiat Modarres University, Tehran, Iran

*Corresponding Author: Tel: +982144865777 Fax:+982144856777 E-mail: s.irani@srbiau.ac.ir

Received: 11 Nov 2013 Accepted: 9 May 2014

ABSTRACT

Background & objectives: The main goal of tissue engineering is regeneration and restoration of damaged tissues and organs, besides being used in medicine. Scaffolds are the main segments for tissue engineering, and plasma surface modification is one of the modern methods used for surface modification on polymer scaffolds. The aim of this study was to evaluate the effect of nano-fibers with different densities on fibroblasts' behavior besides the plasma surface modification.

Methods: Poly Ɛ-Caprolactone nano-fibers (PCL) were developed by an electro-spinning technique at different collecting times. These nano-fibers were then modified by oxygen plasma. Cellular attachment to the nano-fiber and their morphology were evaluated using scanning electron microscope (SEM) and cellular activities were also studied by 3-[4,5-dimethylthiazol- 2-yl]-2,5 diphenyltetrazolium bromide (MTT). Scaffold biocompatibility test was assessed using inverted microscope.

Results: Scanning electron microscope images of nano-fibers showed that increase in time of spinning has significantly heighten fiber density, on the other hand plasma surface modification of nano-fibers had significant effects on their respective biocompatibilities. The result of cell culture showed that nano-fiber could support the cellular growth and replication by developing 3-dimensional topography.

Conclusion: Our results showed that increase in time of spinning and using plasma surface modification of nano-fibers by oxygen plasma would result in providing surface with the highest similarity to the extracellular matrix.

Keywords: Nano-fiber, Surface Modification, Electrospun, Polycaprolactone

[Downloaded from jarums.arums.ac.ir on 2024-07-23]

تهیه و اصلاح سطح نانوفیبرهای پلی کاپرولاکتون با پلاسما بمنظور بررسی رفتار سلول فیبروبلاست

فرشته شریفی فردوئی[۱]، شیوا ایرانی*[۱]، مژگان زندی[۲]، مسعود سلیمانی[۳]

[۱] گروه زیست شناسی، دانشکده علوم پایه، واحد علوم و تحقیقات تهران، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران [۲] گروه بیومتریال، پژوهشگاه پلیمر و پتروشیمی ایران، تهران، ایران [۳] گروه هماتولوژی، دانشکده علوم پزشکی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران

*نویسنده مسئول. تلفن: ۰۲۱٤٤۸٦٥۷۷۷ فاکس: ۰۲۱٤٤۸٦٥۷۷۷ پست الکترونیک: s.irani@srbiau.ac.ir

چکیده

زمینه و هدف: علم مهندسی بافت در کنار علم پزشکی به احیا و ترمیم بافت ها و اندام های آسیب دیده می پردازد. داربست به عنوان بخش اصلی برای مهندسی بافت تعریف می گردد که از روش نوین اصلاح سطحی با استفاده از پلاسما برای تعدیل ویژگی های سطحی آن بهره برده می شود. هدف از این مطالعه بررسی رفتار سلول فیبروبلاستی بر روی داربست های پلی کاپرولاکتون تهیه شده با روش الکتروریسندگی بوده که تحت اصلاح سطحی با پلاسمای اکسیژن قرار گرفته است.

روش کار: نانوفیبرهای پلی کاپرولاکتون توسط روش الکتروریسندگی در دو بازه زمانی مختلف ریسندگی جمع آوری شده و سطح نانوالیاف با استفاده از پلاسمای اکسیژن اصلاح گردید. مورفولوژی داربست و اتصال سلولی توسط میکروسکوپ الکترونی روبشی تعیین شد. سپس بمنظور تائید زیست سازگاری داربست با استفاده از میکروسکوپ معکوس مورد بررسی قرار گرفت. درصد زنده ماندن سلول بر روی داربست با استفاده از روش ارزیابی فعالیت حیاتی سلول (MTT) مطالعه شد.

یافته ها: تصاویر حاصل از میکروسکوپ الکترونی روبشی نشان می دهد با افزایش زمان ریسندگی تراکم الیاف بطور معنی داری افزایش یافته است. نتایج کشت سلول نیز بیانگر آنست که نانوالیاف اصلاح سطح شده با پلاسما توانایی حمایت از رشد و تکثیر سلولی بواسطه ی ایجاد نانوتوپوگرافی سه بعدی را دارند.

نتیجه گیری: نتایج این تحقیق نشان می دهد که با افزایش زمان ریسندگی و استفاده از پلاسمای اکسیژن بر روی سطح، بستری با بالاترین تشابه به ماتریکس خارج سلولی فراهم می شود.

کلمات کلیدی: نانوالیاف، اصلاح سطحی، الکتروریسندگی، پلی کاپرولاکتون

دریافت: ۹۲/۸/۲۰ **پذیرش:** ۹۳/۲/۱۹

مقدمه

پوست به عنوان بزرگترین اندام در بدن انسان ۱۶٪ از وزن بدن را تشکیل داده و سطحی در حدود ۱/۸ متر مربع را پوشانده است[۱]. در کنار انجام تمامی عملکردهای حیاتی، پوست بطور پیوسته در حال بازسازی و احیا خود و انجام فرآیندهای مربوط به ترمیم زخم ها می باشد[۲]. بهبود زخم می تواند مسئله ای چندجانبه در حوزه های مختلف درمان باشد که شامل: آسیب های شدید بافتی (سوختگی)، نواقص پوستی (زخمهای قدیمی و کهنه) و یا شرایط مادرزادی و بیماری ها است[۳]. درمان هایی که تا کنون برای ترمیم بافت پوست مورد استفاده قرار گرفته است شامل استفاده از بافت پوست بدن شخص بیمار و یا استفاده از بافت های بدن افراد و یا حتی موجودات دیگر است؛ اما بدلایل عدم توانایی درترمیم خودبخودی بافت های آسیب دیده و همچنین عدم پذیرش سیستم ایمنی، امکان پیوند از یک فرد به فرد دیگر به راحتی صورت نمی گیرد. با توجه به مشکلات موجود، علم مهندسی بافت، به عنوان راه کاری نوین و امید بخش مطرح می باشد. این رشته بر بهبود جانشین های زیستی برای ترمیم،

[Downloaded from jarums.arums.ac.ir on 2024-07-23]

نگهداری و بهبود بافت و عملکرد عضو تمرکز یافته است[٤].

فرایندهایی که در مهندسی بافت انجام می شود بر سه جزءِ فناوری سلول، فناوری ساخت داربست و فناوری کاشت و ترکیب در محیط *in vivo* استوار است. در بین عوامل مهم و موثر، روش تهیه داربست یکی از موارد تاثیر گذار در موفقیت مهندسی بافت می باشد. در طراحی و ساخت داربست توجه به آماده سازی ریز محیط سه بعدی مشابه آنچه در بافت طبیعی بواسطه ی ماتریکس خارج سلولی (ECM[1]) پیام، ذخیره و رهاسازی مولکولهای فعال، توانایی جذب و یکپارچه شدن در جایگاه پیوند را داشته باشد، می باشد[۶]. انتخاب روش مناسب برای تولید داربست یکی از موارد کلیدی است. نانوالیاف الکتروریسی شده بدلیل منافذ اتصالی، تراوایی بالا و ناحیه سطحی وسیع می تواند تماس بین سلولها و داربست ها را افزایش داده و تبادل مواد مغذی و متابولیسمی را بهبود بخشد. تاکنون در مهندسی بافت پوست از مواد طبیعی و مصنوعی متفاوتی برای تولید داربست همانند کلاژن، کیتوسان، ژلاتین، هیالورونیک اسید، پلی لاکتیک اسید و پلی کاپرولاکتون استفاده شده است. پلیمرهای مصنوعی بدلیل دارا بودن قابلیت اصلاح ویژگی های نامناسب ذاتی پلیمر به پلیمر طبیعی برتری دارند[۷]. اصلاح سطح با استفاده از پلاسما یکی از روشهای نوین در جهت بهبود ویژگی های سطحی داربست می باشد. پلاسما یک گاز بسیار داغ یونیده است، گازی چنان داغ که برخوردهای شدید گرمایی همه یا بیشتر اتمهای آن را به یونهای مثبت و الکترونها تفکیک می کند. دانشمندان پلاسما را حالت چهارم ماده می نامند. در واقع با افزایش انرژی جنبشی در حالت گازی ماده پلاسما شکل می گیرد[۸]. هدف از این مطالعه بررسی رفتار سلول فیبروبلاستی بر روی نانوالیاف پلی کاپرولاکتون (PCL) تهیه شده با روش الکتروریسی شده در دو بازه زمانی مختلف که تحت اصلاح سطحی پلاسمای اکسیژن قرار گرفته است می باشد.

[1] Extracellular Matrix

روش کار

تهیه داربست: برای تهیه داربست مورد استفاده در این مطالعه PCL در غلظت ۱۳٪ در حلال حاوی اسید فرمیک و اسید استیک بصورت محلول تهیه شد. محلول حاصله بوسیله ی سرنگ ۵ میلی لیتری با سر سرنگی دارای قطر ۰/٤ میلی‌متر با سرعت تزریق ml/h ۰/۱ با فاصله ۱۵۰ میلی متر از ورقه ی آلومینیوم تزریق شد. برای تهیه نانوالیاف الکتروریسی شده از دستگاه CO881007NYI ساخت شرکت نانو ساختار آسیا، کشور ایران در پژوهشگاه پلیمر و پتروشیمی استفاده گردید. نانوالیاف ها در ۲ بازه زمانی ۷۰ و٤۰ دقیقه جمع آوری شده که سرعت جمع آوری نمونه ها mm/sec ۵ می باشد که با چرخش ۲۵۰rpm نمونه‌های نانوالیاف جمع اوری شدند.

اصلاح سطحی پلاسمایی: برای بهبود ویژگی آبدوستی سطح نانوالیاف از اصلاح سطحی داربست با پلاسمای گاز اکسیژن بهره برده شد. پلاسما با استفاده از دستگاه Electronic Diener مدل نانو، ساخت کشور آلمان به مدت ۵ دقیقه با فشار ۰/٤ میلی بار، قدرت ۱۰٪ بر روی نانوالیاف اعمال گردید.

اندازگیری زاویه تماسی: بمنظور تائید آبدوستی نانوالیاف اصلاح سطح شده، قبل و بعداز اعمال پلاسما زاویه تماسی با استفاده از آب مقطر اندازگیری شد.

تعیین شیمی سطحی: شیمی سطحی نانوالیاف PCL پس از اعمال پلاسمای اکسیژن بر روی نمونه نانوالیاف با ٤۰ دقیقه زمان ریسندگی با استفاده از

[Downloaded from jarums.arums.ac.ir on 2024-07-23]

روش ATR-FTIR[1] تعیین شد. طیف در بین بازه cm^{-1} ۴۰۰۰ - ۴۰۰ cm^{-1} با وضوح ۴ cm^{-1} اندازگیری گردید.

کشت سلول: در این پژوهش سلول های فیبروبلاست موشی (L929) از انستیتو پاستور ایران تهیه گردید. سلول های تهیه شده در محیط کشت RPMI[2] که حاوی ۱۰٪ سرم (FBS) بوده در انکوباتور با قابلیت تزریق CO_2 به مقدار ۵٪ و رطوبت ۹۵٪ در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد نگهداری شدند. سپس در ۳ بازه زمانی ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت بر روی نانوالیاف PCL کشت داده شدند.

بررسی ساختار نانوالیاف با استفاده از میکروسکوپ الکترونی: بمنظور بررسی تفاوت موفولوژی نانوالیاف تهیه شده در ۲ بازه ی زمانی مختلف الکتروریسندگی با استفاده از دستگاه VEGA/TESCANΠ ساخت کشور بلژیک در پژوهشگاه پلیمر ایران تصاویر تهیه شد.

تست 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 استفاده از اشعه UV بر روی پلیت ۲۴ خانه تثبیت شده و سلول ها در تراکم ۴×۱۰^{۴} بر روی داربست ها منتقل گردید. پس از گذشت ۲۴ ساعت از انتقال سلول ها بر روی نانوالیاف با استفاده از میکروسکوپ معکوس تمایل سلول ها به داربست مورد سنجش قرار گرفت.

تست بررسی فعالیت و میزان زنده ماندن سلول بر روی داربست (MTT): در این تست میزان فعالیت آنزیم دهیدروژناز میتوکندریایی سلول هایی که زنده و فعال هستند مورد مطالعه قرار گرفتند. به این منظور، از سلولهای فیبروبلاست موشی، به تعداد ۴×۱۰^{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 میزان تکثیر سلول ها بر روی داربست با استفاده از روش MTT مقایسه شد. فعالیت و زنده ماندن سلول ها بر روی نانوالیاف به صورت درصد نسبت نمونه به کنترل محاسبه گردید.

تهیه میکروگراف میکروسکوپ الکترونی پس از کشت سلول: پس از کشت سلول بر روی نانوالیاف برای تائید وجود سلول بر روی داربست با استفاده از میکروسکوپ روبشی VEGA/TESCANΠ ساخت کشور بلژیک موجود در پژوهشگاه پلیمر ایران تصاویری تهیه شد.

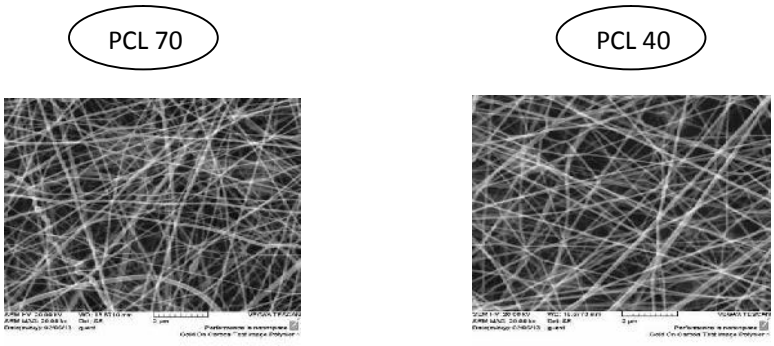
آنالیز آماری: داده های بدست آمده برای بررسی اهمیت آماری با استفاده از برنامه One-Way ANOVA مورد تحلیل آماری قرار گرفت. نتایج توسط نرم افزار SPSS، آنالیز واریانس (آزمون ANOVA) در سطح معنی داری $P<۰/۰۵$ تحلیل شد.

یافته ها

تهیه نانوالیاف: در این تحقیق از نانوالیاف پلی کاپرولاکتون با روش الکتروریسندگی استفاده شد. با تغییر در زمان جمع کنندگی نانوالیاف هایی با تراکم های مختلف تولید شد. با افزایش زمان جمع کنندگی تراکم نانوالیاف نیز افزایش یافت که بدنبال این تغییر زبری سطحی از مقیاس میکرو به ماکرو تغییر می یابد. تفاوت در تراکم الیاف بوضوح در تصاویر حاصل از میکروسکوپ روبشی قابل مشاهده است (شکل۱).

[1] Fourier-transformation Infrared Technique
[2] Roswell Park Memorial Institute

[Downloaded from jarums.arums.ac.ir on 2024-07-23]



شکل ۱. میکروگراف SEM از داربست های نانوفیبری الکتروریسی شده PCL قبل از کشت سلول. افزایش تراکم و زبری داربست با افزایش زمان الکتروریسی قابل مشاهده است. به ترتیب از راست به چپ زمان های الکتروریسندگی از ٤٠ دقیقه به ۷۰ دقیقه افزایش یافته است.

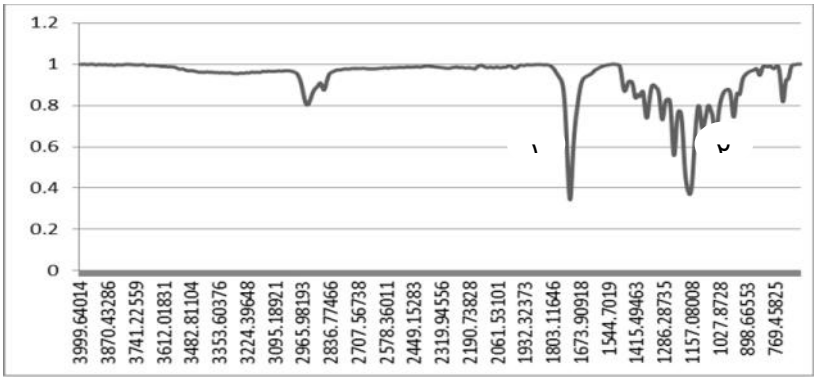
زاویه تماسی: با توجه به ویژگی آبگریزی ذاتی پلیمر PCL، قبل و بعد از اعمال پلاسمای اکسیژن بر روی نانوالیاف PCL بمنظور تائید آبدوست شدن نانوالیاف زاویه تماسی با استفاده از آب مقطر اندازگیری گردید (جدول۱).

با توجه به نتایج بدست آمده، زاویه تماسی اندازگیری شده صفر بوده است در حالی که زاویه تماسی قبل از اصلاح سطحی ۵±۱۲۲ می باشد که بیانگر آبدوست شدن نانوالیاف اصلاح سطح شده است.

جدول ۱. اندازگیری زاویه تماسی با استفاده از آب مقطر

ویژگی	نانوالیاف PCL اصلاح سطح نشده	نانوالیاف PCL اصلاح سطح شده با پلاسما بلافاصله بعد از درمان با پلاسما
زاویه تماسی	۵±۱۲۲	صفر

تعیین شیمی سطحی: نتایج بدست آمده از ATR-FTIR بصورت نمودار ۱ ارائه گردیده است. با توجه به نمودار دو پیک مربوط C=O در طیف نشری ۱۷۲۰ و در طیف نشری ۱٤۲۰ مر بوط به C-O-O مشاهده می گردد.

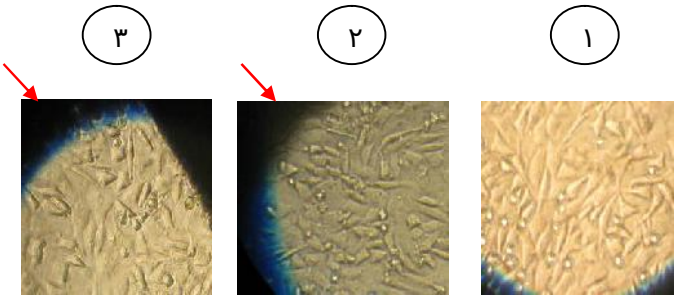


نمودار ۱. طیف نشری ATR-FTIR گرفته شده از نانوالیاف با ٤۰ دقیقه زمان ریسندگی پس از اصلاح سطحی با استفاده از پلاسمای اکسیژن.از چپ به راست عدد ۱ نشان دهنده ی پیک c=o و عدد ۲ نشان دهنده ی پیک c-o-o می باشد.

زیست سازگاری نانوالیاف: یکی از مشخصه های بسیار مهم در داربست جهت استفاده در مهندسی بافت وجود زیست سازگاری است. برای تائید زیست سازگاری نانوالیاف PCL الکتروریسی شده در دو

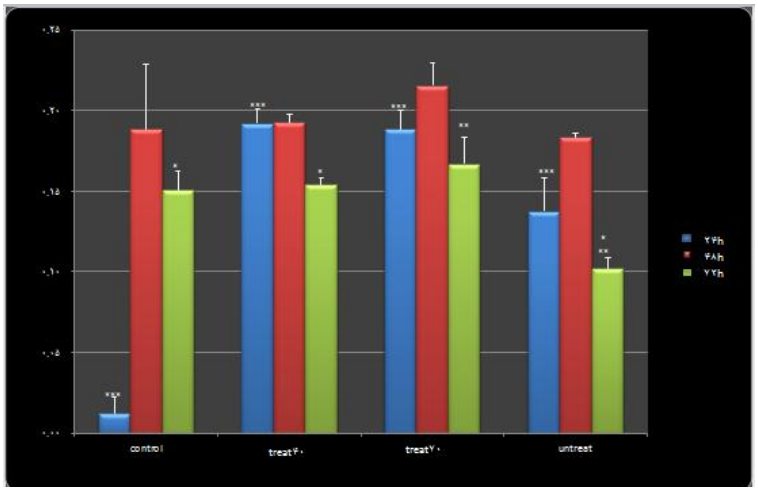
[Downloaded from jarums.arums.ac.ir on 2024-07-23]

بازه زمانی ۷۰ و ٤۰ دقیقه برای مدت زمان ۲٤ ساعت سلولها در تراکم ٤×١٠^{٤} بر روی نانوالیاف اصلاح شده با پلاسما کشت داده شدند. تصاویر بدست آمده از میکروسکوپ معکوس نشان دهنده‌ی مورفولوژی کشیده شده سلول ها به سمت داربست می باشد. در نتیجه می توان گفت نانوالیاف PCL الکتروریسی اصلاح شده با پلاسما زیست سازگاری مناسبی دارد (شکل۲).



شکل ۲. تصاویر حاصله از میکروسکوپ معکوس جهت بررسی چسبندگی در ۲٤ ساعت پس از کشت. ۱) کنترل مثبت(کف پلیت بدون داربست)، ۲) ٤۰ دقیقه، ۳) ۷۰ دقیقه. نواحی تیره رنگ بر روی تصویر داربست ها هستند، جهت گیری سلولها به سمت داربست ها در تصاویر حاکی از زیست سازگاری داربست ها می باشد.

بررسی فعالیت و میزان زنده ماندن سلول بر روی داربست (MTT):به منظور بررسی رشد و تکثیر سلول ها بر روی نانوالیاف مورد استفاده از آزمون MTT در ۳ بازه زمانی ۷۲،٤۸،۲٤ ساعت استفاده شد و نتایج حاصل بصورت نمودار ارائه گردید(نمودار۲).



نمودار ۲. نتایج حاصل از تست MTT. مقایسه میزان رشد سلولها بر روی داربست ها ۱) داربست نانو الیاف ۷۰ دقیقه زمان الکتروریسندگی. ۲) ٤۰ دقیقه الکتروریسندگی. ۳) کنترل مثبت (بدون داربست).٤) نانوالیاف اصلاح سطح نشده. این آزمون با آنالیز ANOVA انجام شد که با * سطح معنی داری۰/۰۵>p و * سطح معنی داری۰/۰۰۱>p نشان می دهد.**

بررسی حضور سلول بر روی نانوالیاف: بررسی مورفولوژی سلول بر روی نانوالیاف PCL اصلاح شده با پلاسما با استفاده از میکروسکوپ روبشی (SEM) انجام شد(شکل۳). تصاویر نشان دهنده ی مورفولوژی مناسب سلول بر روی نانوالیاف PCL اصلاح شده با پلاسما می باشد.

[Downloaded from jarums.arums.ac.ir on 2024-07-23]

شکل ۳. میکروگراف SEM از سلول فیبروبلاست موشی پس از ۷۲ ساعت کشت بر روی نانوالیاف PCL با ٤٠ دقیقه الکتروریسندگی اصلاح شده با پلاسما.

بحث

مهندسی بافت یا علم طب احیا بر خاسته از رشته های زیست شناسی، مهندسی، علم مواد و پزشکی بوده و در واقع دارای جایگاهی ویژه ای در حوزه ی میان رشته ای است. این رشته بر توسعه جانشین های زیستی برای ترمیم، نگهداری و بهبود بافت و عملکرد عضو تمرکز یافته است[٤]. رفتار سلولی در نتیجه ی پاسخ ترکیبی از پیام رسانی متعددی بوده که در اثر برهمکنش سلول های مجاور با یکدیگر، با مولکول های محلول و با ماتریکس خارج سلولی اتفاق می افتد [۹]. داربست در مهندسی بافت در واقع باید تقلیدی از ماتریکس خارج سلولی طبیعی موجود در بدن باشد. یکی از ویژگی های شاخص و مهم در ماتریکس خارج سلولی فراهم آوری شرایطی مناسب جهت تبادل و تعامل سلول ها با یکدیگر و با محیط اطرافشان می باشد که ویژگی های آبدوستی و نانوتوپوگرافی مناسب می تواند در تحقق این راستا مفید واقع شود. وجود ویژگی آبدوستی 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 تاثیر بسزایی در القای مسیرهای دخیل در پیام رسانی در شکل گیری فنوتیپ و سرنوشت سلول دارد [۱۰،٤]. جهت تامین نانوتوپوگرافی برای تسهیل و تعدیل تبادلات بهتر سلول با محیط اطراف مناسب است که داربست ها در مقیاس نانو تهیه شوند که تولید این داربست ها در سال های اخیر مورد توجه محققین قرار گرفته است. یلدیریم[1] و همکاران از پلی کاپرولاکتون سه بعدی تولید شده با استفاده از روش شکل دهی در خلا[2] به عنوان داربست استفاده نمودند. داربست تولید شده فاقد شرایط مناسب جهت حمایت از سلول ها برای بروز پاسخ مناسب سلولی بود[۱۱]. در مطالعه کومر[3] و همکاران به منظور استفاده از نانوفیبر هایی PCL که دارای ساختار سه بعدی باشند از روش ریسندگی شکل آزاد[4] 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 [۱۲]. امروزه سه روش رایج برای تهیه نانوالیاف که شامل الکتروریسندگی، خود سامانی و جدایی فازی است، مورد استفاده قرار می گیرد[۱۳]. روش الکتروریسندگی بدلیل قابلیت تغییر در پارامترهای دستگاهی، حلال و محیطی قابلیت تولید نانوالیاف با ویژگی های مورد نظر محققین را تامین می کند. در کنار استفاده از روش ساخت مناسب برای تهیه داربست، انتخاب ماده سازنده مناسب نیز بخش مهمی در اطمینان از موفقیت در مهندسی بافت خواهد بود. در مهندسی بافت پوست از مواد طبیعی و مصنوعی متفاوتی برای تولید داربست استفاده می شود. پلیمرهای مصنوعی ویژگی های برتری از لحاظ مکانیکی نسبت به پلیمرهای طبیعی دارند و به آسانی دارای قابلیت پردازش می باشند[۷]. در این مطالعه پلیمر پلی کاپرولاکتون (PCL) به عنوان ماده سازنده داربست برای تولید نانوالیاف به روش الکتروریسندگی انتخاب شد. اما

[1] Yildirim
[2] Precision Extrusion Deposition
[3] Kumer
[4] Freeform Fabricate

[Downloaded from jarums.arums.ac.ir on 2024-07-23]

بمنظور تعدیل ویژگی نامطلوب آبگریزی این پلیمر در تحقیقات مختلف از روشها و مواد مختلفی استفاده شده است. پرابهاکاران[1] و همکاران به منظور اصلاح سطحی بر روی داربست PCL تهیه شده به روش الکتروریسندگی از اعمال پلاسمای هوا استفاده کردند. در کنار داربست اصلاح شده با پلاسما به منظور مقایسه و بررسی تفاوت رفتار سلولی از داربست زیست ترکیبی که از ریسندگی کلاژن به همراه PCL تهیه شده بود نیز استفاده شد. در واقع اندازگیری زاویه تماسی در داربست های اصلاح شده با داربست بدون تغییر PCL، بیانگر بهبود ویژگی آبگریزی بواسطه ی افزایش گروه های اکسیژنی بر روی سطح داربست اصلاح شده با پلاسما می باشد. مورد دیگری که از پلاسما برای اصلاح سطحی ویژگی آبگریزی فیلم PCL استفاده شد در پروژه تحقیقی لی[2] و همکاران بوده که از پلاسمای سرد اتمسفری بهره برده شد. که به ٤ صورت $Ar+O_2$، $Ar+H_2$، $Ar+N_2$ و Ar بود. نتایج نشان داد که زاویه تماسی بطور معنی داری در پلاسمای حاوی اکسیژن کاهش یافته و بدلیل بهبود ویژگی آبدوستی، اتصال سلولی و در نتیجه رشد و تکثیر سلول ها بر روی فیلم PCL اصلاح شده با پلاسمای $Ar+O_2$ بیشتر از فیلم های دیگر بوده است[١٤]. یلدیریم و همکاران به منظور بررسی و مقایسه ی رفتار سلولی و تعیین بهترین مورد برای اصلاح سطحی داربست PCL از پلاسمای اکسیژن و پروتئین فیبرونکتین بطور جداگانه بر روی داربست های PCL و داربستی که تلفیقی از پلاسما-پروتئین بود استفاده نمودند. نتایج بدست آمده نشان می داد که با اعمال پلاسما ویژگی آبدوستی بطور معنی داری بهبود یافته است.اتصال سلولی بر روی داربست اصلاح شده با پلاسما تقریبا دو برابر داربست اصلاح نشده بوده است. اما نکته قابل ذکر این است که داربست اصلاح شده با پلاسما بعد از داربست تلفیقی پلاسما-پروتئین دارای بیشترین نرخ رشد و تکثیر سلولی بوده است[۱۱]. در تمامی موارد ذکر شده در بالا تلاش در جهت افزوده شدن عوامل بیولوژیک و گروه های شیمیایی و یا فیزیکی به منظور فراهم کردن بستری مناسب در جهت ایجاد شرایط بهتر داربست های تهیه شده با PCL می باشد. اما بطور بارزی مشخص شده تغییر در گروه های قطبی در تمامی روش های مورد استفاده مدنظر بوده است. با اعمال پلاسمای اکسیژن بر روی سطح، کل محتوی اکسیژنی بواسطه ی افزوده شدن گروه های کربوکسیل و کربونیل افزایش می یابد که این گروه ها بشدت قطبی بوده و حضور آنها سطح بالایی از قطبیت سطحی را فراهم می کند. تغییر در قطبیت سطح از طریق سهیم شدن در گروه های پیوند شده ی (C-C ,C-H) و مجموعه ی گروه های عملکردی حاوی اکسیژن (هیدروکسیل، کربونیل و کربوکسیل) بر روی سطح است (نمودار ۱). در نهایت برای بررسی اثر تراکم های مختلف نانوالیاف الکتروریسی شده از دو بازه زمانی ۷۰ و ٤۰ دقیقه استفاده گردید و بمنظور اصلاح ویژگی آبگریزی داربست تهیه شده از پلیمر پلی کاپرولاکتون از اصلاح سطح با استفاده از پلاسمای اکسیژن استفاده شد.از نانوالیاف پلی کاپرولاکتون (PCL) با زمان های مختلف ریسندگی قبل از نشاندن سلول بر روی آنها با استفاده از میکروسکوپ الکترونی روبشی (SEM) تصاویری تهیه شد که در شکل ۱ نشان داده شده است. در این تحقیق از قابلیت تغییر در پارامتر زمان جمع کنندگی در جهت تهیه نانوالیاف با تراکم های مختلف استفاده شد. همان طور که در شکل ۱ دیده می شود با افزایش زمان ریسندگی تراکم نانوالیاف و تخلخل موجود در نانوالیاف افزایش یافته که موجب فراهم اوری زبری سطحی از سایز میکرو به ماکرو شده است. بوجود آمدن زبری سطحی در سایز ماکرو سبب تشابه بیشتر نانوالیاف تهیه شده به ماتریکس خارج سلولی در بافت طبیعی شده و موجب بروز

[1] Prabhakaran
[2] Lee

[Downloaded from jarums.arums.ac.ir on 2024-07-23]

رفتار سلولی مناسب تر می گردد. بسترهایی که تحت عنوان داربست در مهندسی بافت استفاده می شوند باید توانایی واکنش با سلول در ابعاد سه بعدی و یا تسهیلگر ارتباط سه بعدی سلولها با یکدیگر و محیط اطراف شان را داشته باشند. پس می توان گفت که فراهم آوری این مشخصه توسط نانوالیاف برای سلول ها فاکتور تعیین کننده برای موفقیت یا شکست داربست می باشد. نتایج بدست آمده از تست MTT و زیست سازگای در این مطالعه به خوبی تایید کننده ی این مهم می باشد. بعد از انتقال سلول ها بر روی نانوالیاف چسبندگی اولین واقعه ای است که رخ می دهد البته در کنار آن تعیین زیست سازگاری نانوالیاف تهیه شده نیز از اهمیت ویژه ای بر خوردار است. بدین منظور پس از گذشت ٢٤ ساعت از انتقال سلول های فیبروبلاستی بر روی نانوالیاف های استریل شده با استفاده از اشعه ی UV زیست سازگاری و عدم سمیت نانوالیاف برای سلول های فیبروبلاستی مورد بررسی قرار گرفت. تصاویر تهیه شده با استفاده از میکروسکوپ معکوس پس از گذشت ٢٤ ساعت رشد مناسبی از سلول های فیبروبلاستی را در کنار نانوالیاف نشان می دهند که تائید کننده زیست سازگاری و عدم سمیت آن برای سلولها می باشند (شکل۲). برای بررسی نرخ رشد و تکثیر سلول علاوه بر نانوالیاف های اصلاح سطح شده و کنترل مثبت (فاقد نانوالیاف)، از کنترل منفی (نانوالیاف اصلاح سطح نشده) نیز استفاده شد. با توجه به نمودارهای حاصل از تست MTT در ٢٤ ساعت نخست پس از کشت سلول ها تفاوت معنی داری بین رفتار سلولی بر روی نانوالیاف های PCL اصلاح شده با پلاسما، کنترل منفی و کنترل مثبت قابل مشاهده است. این نتیجه نشان دهنده ی تاثیر مستقیم اصلاح سطحی نانوالیاف با پلاسمای اکسیژن جهت بهبود ویژگی سطحی برای اتصال سلول ها بر روی نانوالیاف در مقایسه با کنترل مثبت می باشد. همچنین قابل ذکر است که اتصال اولیه بر روی کنترل منفی نیز بطور معنی داری بهتر از کنترل مثبت است اما از نانوالیاف اصلاح سطح شده اتصال اولیه و نرخ رشد و تکثیر کمتری را نشان می دهد. پس می توان گفت نانوالیاف طراحی شده دارای شرایط مناسبی جهت اتصال اولیه سلول می باشد اما استفاده از پلاسمای اکسیژن جهت اصلاح سطح موجب افزایش اتصال اولیه سلولی بر روی نانوالیاف شده است، بطوریکه بعد از اعمال پلاسما زاویه تماسی به صفر کاهش یافته که بیانگر آبدوست شدن سطح پس از اعمال پلاسما می باشد. روند صعودی در نرخ رشد سلولی در ٤٨ ساعت پس از کشت سلول ها همچنان ادامه داشته است. قابل توجه است که بر روی هر ۲ نانوالیاف PCL اصلاح شده با پلاسما نرخ رشد سلولی بالاتر از کنترل مثبت می باشد. اما با گذشت سه روز از کشت سلول ها نرخ رشد و تکثیر سلولی نسبت به روز گذشته روند کاهشی را نشان می دهد، اما لازم بذکر است که این روند کاهشی در رشد و تکثیر سلول ها بر روی نانوالیاف PCL با ۷۰ دقیقه زمان ریسندگی اصلاح شده با پلاسما بالاتر از نرخ رشد سلول ها در مقایسه با نانوالیاف دیگر، نمونه کنترل مثبت و کنترل منفی می باشد. پس می توان گفت نانوالیاف با ۷۰ دقیقه زمان ریسندگی و تراکم بیشتر نسبت به نانوالیاف با ٤٠ دقیقه زمان ریسندگی و کنترل منفی شرایطی مشابه به ECM موجود در بافت طبیعی را فراهم کرده و در بازه زمانی طولانی تر از رشد و تکثیر سلولی حمایت می کند (نمودار۲).

پرابهاکاران و همکاران از نانوفیبرهای PCL که با استفاده از روش الکتروریسندگی تهیه شده بود استفاده نمودند. نانوالیاف به سه صورت: اصلاح شده با پلاسمای هوا، ترکیب PCL با کلاژن برای تهیه نانوالیاف و PCL بدون اعمال تغییری جهت کشت سلول بنیادی برای تمایز به بافت عصب مورد استفاده قرار گرفت. زاویه تماسی بر روی ۳ نانوالیاف اندازگیری شد که زاویه تماسی پس از اعمال پلاسما همانند پروژه تحقیقاتی انجام شده صفر گزارش

[Downloaded from jarums.arums.ac.ir on 2024-07-23]

شده است. از سوی دیگر رشد و تکثیر سلولی بر روی نانوالیاف PCL اصلاح شده با پلاسما بیش از داربست های دیگر می باشد. البته قابل ذکر است که در این تحقیق نیز نرخ رشد و تکثیر سلولی بر روی نانوالیاف تعریف شده از کنترل مثبت کمتر است که مخالف با نتیجه ای است که در پروژه تحقیقاتی انجام شده، بدست آمد. زیرا نانوالیاف PCL اصلاح شده با پلاسمای بکار گرفته شده در این تحقیق نرخ رشد و تکثیر بیشتری بویژه بر روی نانوالیاف با ۷۰ دقیقه زمان ریسندگی نسبت به حالت کنترل را نشان می دهند[۱۵]. در مطالعه انجام شده توسط Lee و همکاران فیلم PCL با استفاده از پلاسمای اتمسفری که به ٤ صورت $Ar+H_2$, $Ar+N_2$, $Ar+O_2$, وAr مورد اصلاح سطحی قرار گرفت. نتایج تست های انجام شده بیانگر کاهش زاویه تماسی در ۳ مورد $Ar+N_2$, $Ar+O_2$ و Ar البته بیشترین کاهش در پلاسمای$Ar+O_2$ مشاهده شد. از سوی دیگر بیشترین زبری سطحی و بدنبال آن بالاترین نرخ اتصال سلولی و در نهایت رشد و تکثیر سلولی بر روی فیلم PCL اصلاح شده با پلاسما $Ar+O_2$ دیده می شود که نتایج بدست آمده در پروژه تحقیقی انجام شده را تائید می نماید[١٤]. در مقاله تحقیقاتی ارائه شده بوسیله یلدیریم و همکاران در سال ۲۰۱۰ از داربست PCL با دو مشخصه ی اصلاح با پلاسمای اکسیژن و پوشش با پروتئین فیبرونکتین استفاده شد. مطالعه انجام شده اتصال بیشتر سلول‌های استئوبلاست بر روی داربست اصلاح شده با پلاسما بیش از داربست های دیگر را نشان داد. نتیجه بدست آمده مشابه به نتیجه بدست آمده در پروژه تحقیقاتی انجام شده است زیرا با اصلاح سطحی نانوالیاف تهیه شده با پلاسما موجب بهبود ویژگی های سطحی داربست PCL شده و افزایش معنی داری در اتصال، رشد و تکثیر سلول های کشت شده بر روی هر دو نانوالیاف بویژه نانوالیاف با ۷۰ دقیقه زمان ریسندگی شده است [۱۱]. در مطالعه انجام شده توسط کومر و همکاران در سال ۲۰۱۲ از نانوفیبرهای PCL به دو صورت، دارای زبری سطحی و فاقد زبری سطحی استفاده شد. نتایج بدست آمده نشان داد که سلول های بنیادی کشت شده دارای قابلیت اتصال بالایی بر روی هر دو گروه نانوالیاف استفاده شده بودند اما بر روی نانوالیاف فاقد زبری بدلیل داشتن مورفولوژی کشیده، فاقد تطابق با مورفولوژی ایده آل سلولی در بافت طبیعی بوده است. در پروژه تحقیقی انجام شده نانوالیاف های PCL با دو زمان مختلف ریسندگی اصلاح شده با پلاسما و همچنین بدلیل زبری ایجاد شده بواسطه افزایش زمان ریسندگی توانایی فراهم آوری بستری مناسب برای اتصال سلولی را دارا بودند، همچنین سلول های کشت شده دارای مورفولوژی مناسبی بر روی نانوالیاف PCL اصلاح شده با پلاسما بوده و رشد و تکثیر بالایی بر روی نانوالیاف PCL بویژه بر روی نانوالیاف با ۷۰ دقیقه ریسندگی نسبت به نانوالیاف با ٤۰ دقیقه ریسندگی و کنترل مثبت و منفی نشان دادند[۱۲]. با توجه به نتایج بدست آمده در طی تحقیق انجام شده و مقایسه نتایج با داده های ارائه شده در مقالات مورد بررسی که در راستای تحقیق انجام شده بوده اند می توان گفت ساخت نانوالیاف با استفاده از روش الکتروریسندگی که دارای قابلیت تولید نانوالیاف با ویژگی های مورد نظر محققین می باشد، موجب تولید داربست هایی شده که دارای تفاوت در زمان ریسندگی بوده اند. در نتیجه با افزایش زمان ریسندگی از ٤۰ دقیقه به ۷۰ دقیقه تراکم نانوالیاف نیز افزایش یافته که سبب تغییر در ساختار سطحی نانوالیاف شده است. در واقع در ساختار سطحی نانوالیاف با ۷۰ دقیقه زمان ریسندگی تخلخل از سایز میکرو به ماکرو تغییر یافته که موجب افزایش زبری سطحی در نانوالیاف تولید شده است. اعمال پلاسمای اکسیژن که بمنظور اصلاح سطحی ویژگی آبگریزی نانوالیاف PCL موجب تعدیل این مشخصه و آبدوست شدن نانوالیاف گشته

[Downloaded from jarums.arums.ac.ir on 2024-07-23]

است. در نهایت می توان گفت با افزایش زمان ریسندگی از ٤٠ دقیقه به ۷۰ دقیقه و اصلاح سطحی با استفاده از پلاسمای اکسیژن بستری که بیشترین شباهت را به ECM طبیعی بدن موجود زنده داشت فراهم گردید که تست های تکمیلی از جمله تصویر تهیه شده با استفاده از میکروسکوپ الکترونی روبشی (SEM) نیز تائید کننده این نتیجه می باشند.

نتیجه گیری

با توجه به روشهای مختلفی که در تهیه داربست در مطالعات پیشین استفاده شده بود، بدلیل فراهم آوری محیطی سه بعدی و مشابه ECM طبیعی از روش الکتروریسندگی برای تهیه داربست استفاده شد. از سوی دیگر ایجاد بستری در مقیاس نانو همراه با تغییر در پارامتر زمان جمع کنندگی در زمان ریسندگی نانوالیاف، موجب فراهم آوری نانوتوپوگرافی بر روی سطح نانوالیاف با ۷۰ دقیقه زمان ریسندگی نسبت به ٤٠ دقیقه زمان ریسندگی شده است، در تخلخل ایجاد شده بر روی سطح نانوالیاف با ۷۰ دقیقه زمان ریسندگی سایز منافذ ایجاد شده از میکرو به ماکرو تغییر یافته است که منجر به تشابه بالایی با ECM طبیعی می گردد. از سوی دیگر جهت اصلاح ویژگی ذاتی آبگریزی موجود در پلیمر مصنوعی PCL از اصلاح سطحی نانوالیاف با پلاسمای اکسیژن بهره برده شد. در واقع با افزایش گروه های اکسیژنی ناشی از اصلاح سطحی با پلاسمای اکسیژن بر روی سطح نانوالیاف الکتروریسی شده که دارای نانوتوپوگرافی، 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 با ۷۰ دقیقه زمان ریسندگی نسبت به نانوالیاف با ٤٠ دقیقه زمان ریسندگی و کنترل مثبت و منفی فراهم گردید. همانطور که در نتایج نیز قابل مشاهده است نانوالیاف PCL اصلاح شده با پلاسمای اکسیژن 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.

References

1- Keck M, Lumenta DB, Kamolz LP. Skin tissue engineering. Lumenta DB, Kamolz LP. Dermal replacements in general, burn, and plastic surgery. New York. Springer Vienna. 2013: 13-25.

2- Wong DJ, Chang H. Skin tissue engineering. Gurley KA, Alvarado AS. StemBook. 4nd ed. Stanford. Stanford University. 2009:2-4.

3- Supp DM, Boyce ST. Engineering skin substitutes: practices and potentials. Clinic in Dermatology. 2005 July(4): 203-212.

4- Kim HN, Jiao A, Hwang NS, Kim MS, Kang DH, Kim DH, et al. Nanotopography-guided tissue engineering and regenerative medicine. Adv Drug Deliv Rev. 2012 Jul-Aug;(65) :389-402.

5- Zhu X, Cui W, Li X, Jin Y. Electrospun fibrous mats with high porosity as potential scaffolds for skin tissue engineering. Biomacromolecules. 2008 May; (9):1795-1801.

6- Jha BS, Colello RJ, Bowman JR, Sell SA, Lee KD. Two pole air gap electrospinning: fabrication of highly aligned, three dimensional scaffolds for nerve reconstruction. Acta Biomater. 2011Aug;(7): 203-15.

7- Vance RJ, Miller DC, Thapa A, Haberstroh KM. Decreased fibroblast cell density on chemically degraded poly-lactic-co-glicolic acid, polyurethane, and poly caprolactone. Biomaterials. 2004 Oct;(25): 2095-2103.

8- Ghoranneviss m, Sari AH. Plasma physics, 2nd ed. Tehran. Islamic Azad University, 1386:15-31.

[Downloaded from jarums.arums.ac.ir on 2024-07-23]

9- Cunha C, Panseri S, Antonini S. Emerging nano techonolgy approaches in tissue engineering for peripheral nerve regeneration. Nanomedicine. 2011 April; (7): 50-9.
10- Barnes CP, Sell SA, Boland ED, Simpson DG. Nanofiber technology: Designing the next generation of tissue engineering scaffolds. Adv Drug Deliv Rev. 2007 Oct; (59):1413-1433.
11- Yildirim ED, Besunder R, Papas D, Allen F, Guceri S, Sun W. Accelerated differentiation of osteoblast cells on polycaprolactone scaffolds driven by a combined effect of protein coating and plasma modification. Biofabrication. 2010 Oct;(2):12-24.
12- Kumar G, Waters M S, Farooque TM, Young MF, Carl GSJ. Freeform fabricated scaffolds with roughness struts that enhance both stem cell proliferation and differentiation by controlling cell shap. Biomaterials. 2012 Feb; (33): 4022-30.
13- Pramanik S, Pingguan-Murphy B, Azuan A. Progress of key strategies in development of electrospun scaffolds: bone tissue. Sci Technol Adv Mater. 2012 April; (13): 1045-55.
14- Lee Hyun UK, Sul Jeong Y, Young jong S, Young Park S, Seong Bae J, Gyu Kim H, et al. Role of reactive gas in atmospheric plasma for cell attachment and proliferation on biocompatible poly caprolactone film. Applied Surface Science. 2008 Nov;(254): 5700-05.
15- Prabhakaran MP, Venugopal J, Chan Casey K, Ramakrishna S. Surface modified elctrospun nanofibrous scaffolds for nerve tissue engineering. Nanotechnology. 2008 Oct;(19):8-15.

[Downloaded from jarums.arums.ac.ir on 2024-07-23]