

Nanofibrous Scaffolds based on Poly(caprolactone)/Chitosan/ Poly(vinyl alcohol) Blend for Skin Tissue Engineering

Adeleh Gholipour-Kanani^{1*}, Seyed Hajir Bahrami¹, Mohammad Taghi Joghataie²,
and Ali Samadikuchaksaraei^{3,4}

1. Textile Engineering Department, Amirkabir University of Technology, P.B.Box: 15875-4413,
Tehran, Iran

2. Anatomy Group, Medical Faculty, Iran University of Medical Science, Tehran, Iran

3. Department of Medical Biotechnology, Faculty of Allied Medicine, Iran University of Medical
Sciences, Tehran, Iran

4. Cellular and Molecular Research Center, Iran University of Medical Sciences, Tehran, Iran

Received 15 January 2013, accepted 22 May 2013

ABSTRACT

Nowadays, blending of natural and synthetic polymers has attracted a considerable interest in tissue engineering for reaching desirable properties. In this study, blend nanofibrous scaffolds were electrospun from poly(caprolactone)/chitosan/poly(vinyl alcohol) blend solutions in 2: 1: 1.5 mass ratio. SEM results showed that uniform and bead-less nanofibers with 136 ± 21 nm average diameter were obtained from electrospun poly(caprolactone)/chitosan/poly(vinyl alcohol) blend solutions. Tensile strength test and contact angle measurement demonstrated that addition of PCL led to higher mechanical and physical properties of the resulting web. As a result, addition of PCL in the blend supported the web physical integration in aqueous media of body. Fibroblast cells were cultured on nanofibrous webs to investigate web biocompatibility. The biological results showed appropriate biological properties for the produced nanofibrous webs. Tissue engineered scaffolds were prepared by seeding mesenchymal stem cells on half of the scaffolds. In vivo studies were carried out to investigate the effect of scaffolds on healing of excisional cutting wounds created on the back of the rats. From pathological studies, wounds treated with scaffolds (both acellular and cell-seeded ones) showed better healing compared with control specimens. The results showed that wounds acquired complete healing by the scaffolds within 10-day of post operation, while control wounds achieved healing after 15 days of post surgery operation. It is notable that, cell-seeded-scaffold-treated-wounds showed best healing process due to stem cells ability for collagen regeneration.

Keywords:

poly(caprolactone),
chitosan,
nanofibrous scaffolds,
tissue engineering,
wound healing

(*)To whom correspondence should be addressed.

E-mail: gholipour@aut.ac.ir

تولید داربست‌های نانولیفی بر پایه پلی‌کاپرولاکتون - کیتوسان - پلی‌وینیل الکل برای مهندسی بافت پوست

عادلہ قلی‌پور کنعانی^{۱*}، سیدہزیر بهرامی^۱، محمدتقی جغتائی^۲، علی صمدی کوچکسرای^{۳،۴}

۱- تهران، دانشگاه صنعتی امیرکبیر، دانشکده مهندسی نساجی، صندوق پستی ۴۴۱۳-۱۵۸۷۵

۲- تهران، دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی و درمانی ایران، دانشکده پزشکی، گروه آناتومی

۳- تهران، دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی و درمانی ایران، دانشکده پیراپزشکی، گروه بیوتکنولوژی

۴- تهران، دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی و درمانی ایران، مرکز تحقیقات سلولی و مولکولی

دریافت: ۹۱/۱۰/۲۶، پذیرش: ۹۲/۳/۱

چکیده

امروزه استفاده از مخلوط پلیمرهای طبیعی و سنتزی در تولید داربست‌های زیستی به دلیل قابلیت دستیابی به ویژگی‌های مطلوب، بسیار مورد توجه پژوهشگران قرار گرفته است. در این پژوهش، داربست‌های نانولیفی مخلوط پلی‌کاپرولاکتون - کیتوسان - پلی‌وینیل‌الکل از مخلوط مخلوط پلیمرها با نسبت ۲ : ۱ : ۵/۱ به روش الکتروریسی تهیه شد. بررسی‌های میکروسکوپ الکترونی نشان‌دهنده دستیابی به نانوالیافی با قطر متوسط 136 ± 21 nm و شکل‌شناسی بسیار یکنواخت بدون دانه‌تسبیحی است. آزمون‌های استحکام کششی و اندازه‌گیری زاویه تماس روی شبکه نانولیفی نشان می‌دهد، اضافه شدن پلی‌کاپرولاکتون سبب بهبود خواص مکانیکی و فیزیکی شبکه حاصل می‌شود. به عنوان یک نتیجه، افزودن پلی‌کاپرولاکتون به مخلوط سبب حفظ تمامیت فیزیکی شبکه حاصل در محیط آبی بدن شده است. برای بررسی مقدار زیست‌سازگاری و بررسی خواص زیستی داربست تولید شده، سلول‌های فیبروبلاست روی نمونه‌های مدنظر کشت داده شدند. نتایج آزمون‌های زیستی نشان‌دهنده سلول‌سازگاری بسیار عالی داربست‌های نانولیفی حاصل بوده است. در بحث مهندسی بافت، روی نیمی از داربست‌ها، سلول‌های بنیادی مزانشیمی بند ناف انسانی کاشته شده است. برای بررسی چگونگی اثربخشی داربست‌های حاصل در ترمیم زخم، مطالعات بالینی بر پوست پشت موش‌های صحرایی با بررسی ترمیم زخم‌های برشی تمام عمق انجام شده است. نتایج پاتولوژی نشان‌دهنده اثربخشی بسیار مناسب داربست‌های نانولیفی در مقایسه با نمونه‌های کنترل (بدون داربست) است. زخم‌های ترمیم شده با داربست در روز دهم پس از جراحی به حد نهایی ترمیم رسیدند، درحالی‌که زخم‌های گروه کنترل پس از ۱۵ روز به این حد ترمیم دست یافتند. همچنین، اثر بهبود داربست‌های با سلول بنیادی در مقایسه با داربست‌های بدون سلول به دلیل قابلیت کلاژن‌سازی سلول‌های بنیادی بهتر بوده است.

واژه‌های کلیدی

پلی‌کاپرولاکتون،
کیتوسان،
داربست‌های نانولیفی،
مهندسی بافت،
ترمیم زخم

* مسئول مکاتبات، پیام‌نگار:
gholipour@aut.ac.ir

مقدمه

ترمیم یا جایگزینی بافت آسیب دیده همواره از دغدغه های اصلی دانشمندان علم زیست شناسی بوده است. امروزه، مهندسی بافت مهم ترین ابزار دانشمندان در تولید بافت ها و پروتزه های جایگزین برای ترمیم یا جایگزینی بافت آسیب دیده است. در این راستا، نانو فناوری و به طور ویژه الکترو رسی به عنوان فناوری تولید نانوالیاف به دلیل ایجاد داربست های سه بعدی و متخلخل با مقیاس نانو که بسیار شبیه به ماتریس خارج سلولی (extra cellular matrix, ECM) بافت طبیعی است، بسیار مورد توجه دانشمندان قرار گرفته است [۱، ۲]. نانوالیاف با داشتن ویژگی های منحصر به فرد، قابلیت ایجاد مسیری مناسب را برای دریافت و فرستادن علائم زیست شیمیایی دارد، بدین ترتیب سلول های فیرو بلاست را به لایه پوست رویی جذب کرده و این سلول ها اجزای اصلی ماتریس خارج سلولی طبیعی را ترشح می کنند. افزون بر این ویژگی، ساختار های نانولیفی برای چسبندگی و تکثیر سلولی بسیار مناسب است [۳].

علاوه بر اهمیت ایجاد ساختار مناسب مشابه با ماتریس خارج سلولی، نوع زیست مواد پلیمری استفاده شده در تولید داربست های نانولیفی نیز از اهمیت بسیاری برخوردار است. پلیمر های طبیعی مانند کیتین، کیتوسان و کلاژن، به دلیل خواص زیستی بسیار مناسب همچون قابلیت های زیست چسبندگی، زیست سازگاری و ضد میکروبی بسیار مورد توجه پژوهشگران قرار دارند. کیتوسان پلی ساکاریدی خطی متشکل از دو بخش دی استیل شده $(\beta-1-4)$ -D-گلوکوز آمین و استیل دار شده (N-استیل -D-گلوکوز آمین) است که به شکل تصادفی نسبت به هم قرار گرفته اند. منشأ این پلیمر، اجزای اصلی پوسته آبزیانی چون میگو و خرچنگ یا دیواره قارچ هاست.

آمین های کیتوسان در محیط اسیدی تبدیل به آمین نوع چهارم شده و کیتوسان به یک پلی کاتیون تبدیل می شود. این ویژگی موجب محلول بودن کیتوسان در آب و زیست چسبندگی بودن آن می شود. بنابراین، کیتوسان انتقال دارو های قطبی را از سطح اپیتلیال (epithelial) آسان تر می سازد. به دلیل زیست سازگاری، زیست تخریب پذیری و ضد میکروب بودن آن اغلب در کاربردهای پزشکی استفاده می شود [۴]. کیتوسان پلیمری آبدوست است، اما به دلیل وزن مولکولی زیاد و گرانیروی ذاتی زیاد به پلیمر آبدوست دیگری برای کاهش گرانیروی محلول نیاز دارد. همچنین، کیتوسان در محیط اسیدی خاصیت پلی کاتیونی دارد و در میدان الکتریکی سبب از هم گسستگی زنجیر های مجاور می شود، به گونه ای که امکان الکترو رسی آن به تنهایی وجود ندارد.

پلی وینیل الکل به عنوان جزء دوم در میان زنجیر های کیتوسان قرار

می گیرد و مانع از دفع بار های هم نام و از هم گسستگی زنجیر های کیتوسان می شود. بدین ترتیب، این ترکیب قابلیت الکترو رسی کیتوسان را افزایش می دهد. از طرفی، به دلیل قابلیت زیستی مناسب پلی وینیل الکل مانعی در کاربرد پزشکی کیتوسان ایجاد نمی کند. اما در این میان، قابلیت الکترو رسی و خواص فیزیکی - مکانیکی ضعیف آنها در محیط های زیستی تا حدودی کاربردهای این مواد را محدود کرده است [۵].

به منظور ارتقای قابلیت الکترو رسی به طور عمده از پلیمر های آبدوستی چون پلی وینیل الکل (PVA) و پلی اتیلن اکسید (PEO) به شکل مخلوط با این پلیمر های طبیعی استفاده می شود، این موضوع منجر به افزایش آبدوستی شبکه نانولیفی و کاهش قابلیت حفظ تمامیت فیزیکی شبکه در محیط های آبی زیستی می شود. در این راستا، در بسیاری از موارد از عوامل ایجاد اتصال عرضی برای کاهش مقدار آبدوستی استفاده می شود. اما، این مواد بسیار سمی اند و کنترل مقدار تشکیل اتصال عرضی نیز مسئله ای دشوار است. در این راستا، استفاده از پلیمر آبریز سنتزی به عنوان جزء سوم در مخلوط می تواند راه گشا باشد [۶، ۷].

اخیرا کوشش های بسیاری در زمینه تولید داربست های نانولیفی مخلوط چند پلیمر به ویژه مخلوط پلیمر های طبیعی و مصنوعی برای مصارف زیست پزشکی انجام شده است. اما، درباره مخلوط کیتوسان و پلی کاپرولاکتون بیشتر مطالعات روی فیلم، غشا [۸] یا الیاف ترریسی شده [۹، ۱۰] آنها انجام شده و مطالعات بسیار کمی روی الکترو رسی مخلوط مدنظر انجام شده است.

در زمینه الکترو رسی مخلوط پلی کاپرولاکتون-کیتوسان، Shalumon و همکاران [۱۱] موفق به ساخت داربست نانولیفی شدند که در آن غلظت کیتوسان (CS) از ۰/۵٪ تا ۲٪ متغیر و غلظت PCL برابر با ۶٪ در نظر گرفته شده بود. همچنین در بررسی های زیستی، داربست مدنظر اتصال و انتشار سلولی خوبی را با سلول های مختلف از جمله سلول فیرو بلاست L929 نشان داده است. آنها با استناد به این آزمون ها بیان کردند، داربست حاضر می تواند گزینه ایده آلی برای مهندسی بافت پوست و استخوان باشد [۱۲].

در این پژوهش، به جای استفاده از عامل ایجاد اتصال عرضی پلی کاپرولاکتون به کار رفته است که پلیمری آبریز و زیست سازگار است. داربست های نانولیفی مخلوط از الکترو رسی محلول های مخلوط پلی کاپرولاکتون - کیتوسان - پلی وینیل الکل تولید شدند. خواص فیزیکی - مکانیکی و شکل شناسی داربست های حاصل بررسی شد. برای بررسی مقدار زیست سازگاری آزمون کشت سلولی با سلول های فیرو بلاست روی داربست ها انجام شده است. پس

الکل با نسبت ۲ (PCL): ۱ (Cs): ۱/۵ (PVA) روی پمپ سرنگ قرار داده شد و سرعت خروج ۱ mL/h روی دستگاه تنظیم شد. فاصله نازل تا جمع کننده (ورق آلومینیومی ۱۵×۲۱۵ cm) به اندازه ۱۵ cm در نظر گرفته شد. ولتاژ ۱۵ kV به دو سر الکتروود متصل به نازل و جمع کننده اعمال شد. بدین ترتیب، محلول تحت الکترورسی قرار گرفت و شبکه بی بافت نانولیفی روی صفحه جمع کننده جمع آوری شد.

بررسی های شکل شناسی

در این آزمون از میکروسکوپ الکترونی پویشی (SEM) مدل XL 30 ساخت شرکت Philips هلند برای شناسایی و مشاهده ساختار نانولیفی نمونه های تهیه شده و همچنین چگونگی شکل شناسی و قرارگیری سلول ها روی شبکه های نانولیفی استفاده شده است.

آزمون تعیین زاویه تماس (آب دوستی)

آب دوستی شبکه با اندازه گیری زاویه تماس آن با آب مقطر معین شد. شبکه نانولیفی در اندازه ۱۲ mm² بریده و روی یک پایه نگه دارنده قرار داده شد که دوربین رقمی سونی مدل SSC-DC318P color video camera روبه روی آن تنظیم شده است. مقدار ۲ mL آب مقطر در یک سرنگ جای داده شده و سرنگ به طور عمود بر سطح شبکه در بالای آن آماده شد. یک قطره آب مقطر به حجم حدود ۲ µL روی شبکه قرار گرفت. شکل قطره روی سطح با استفاده از دوربین مزبور پس از گذشت ۳ s از قرار گرفتن قطره روی شبکه ثبت شده و زاویه تماس قطره با سطح اندازه گیری شد.

استحکام کششی

در این آزمون، دستگاه کشش (استحکام سنج) Instron مدل 5566 ساخت انگلستان به کار گرفته شد. ابتدا شبکه ها در اندازه های برابر به شکل مستطیلی با ابعاد ۶۰×۱۰ mm برش داده شدند و در فک های مربوط به الیاف (به دلیل ضخامت کم لایه ها) قرار داده شدند. فک ها با سرعت ۲ mm/min از هم فاصله می گیرند تا زمانی که پارگی اتفاق بیفتد [۱۳]. در این آزمون خواص الیاف و آرایش هندسی آنها و درگیری بین الیاف معین کننده خواص شبکه نانولیفی است.

کشت سلولی

رشد سلول ها در محیط آزمایشگاه را اصطلاحاً کشت سلولی می نامند. سلول های فیرو بلاست L929 دم موش مطابق با استاندارد ASTM F813 استفاده شدند. تعداد سلول های کشت شده روی نمونه ها ۹×۱۰^۴ سلول

از تعیین مقدار زیست سازگاری، داربست ها به دو شکل با سلول (سلول های بنیادی مزانشیمی) و بدون سلول برای ترمیم زخم های برشی تمام عمق بر زخم های ایجاد شده بر پوست پشت موش های صحرایی به کار برده شدند. به منظور بررسی روند ترمیم زخم، سه زمان ۵، ۱۰ و ۱۵ روز برای برداشت نمونه ها در نظر گرفته شد. نمونه های برداشت شده تحت بررسی های پاتولوژی قرار گرفتند.

تجربی

مواد

پلی کاپرولاکتون با وزن مولکولی ۸۰ کیلودالتون از شرکت Sigma-Aldrich خریداری شد. کیتوسان با وزن مولکولی زیاد (۱۰۰۰ کیلودالتون) از شرکت کیتوتک تهیه شد. پلی وینیل الکل، استیک اسید و سایر مواد شیمیایی مورد نیاز از شرکت Merck خریداری شد.

دستگاه ها و روش ها

تهیه محلول ها

محلول پلی کاپرولاکتون ۱۰٪ از حل کردن پلیمر در حلال استیک اسید ۹۰٪ تهیه شد. محلول ۵٪ کیتوسان در استیک اسید ۸۰٪ و محلول ۱۰٪ پلی وینیل الکل نیز در آب مقطر تهیه شد. سه محلول مدنظر برای به دست آوردن نسبت ۱/۵:۱/۲ جرمی پلی کاپرولاکتون-کیتوسان-پلی وینیل الکل با هم مخلوط شدند. بدین منظور، حجم مدنظر از پلی کاپرولاکتون در یک ظرف قرار گرفت و هم زمان محلول با همزن مغناطیسی همزده شد. سپس، به آرامی حجم مدنظر از محلول کیتوسان و سپس حجم محاسبه شده از محلول پلی وینیل الکل به ظرف اضافه شد، در زمان اختلاط، محلول با همزن مغناطیسی همزده می شد. پس از تهیه محلول مخلوط با نسبت مدنظر محلول برای الکترورسی داخل سرنگ منتقل شد.

الکترورسی

دستگاه الکترورسی شامل منبع ولتاژ قوی ۴۰-۰ kV، دو الکتروود مثبت و منفی که الکتروود مثبت به نازل و منفی به صفحه جمع کننده متصل می شود. صفحه جمع کننده ساکن (ورق آلومینیومی با اندازه ۱۵×۱۵ cm)، پمپ سرنگ رقمی (ATOM Medical Corp)، مدل 1235N ساخت ژاپن، با حداقل سرعت تزریق ۰/۱ mL/h، سرنگ ۲۰ mL پلاستیکی و نازل (سر سرنگ Spinal با اندازه ۲۰-۱۹ guage) است. سرنگ حاوی محلول مخلوط پلی کاپرولاکتون-کیتوسان-پلی وینیل

روز داربست ها برداشته و در محل زخم کاشته شدند. داربست هایی که به همراه سلول در بدن حیوان قرار می گیرند داربست های مهندسی بافت شده هستند، به عبارت دیگر عملیات مهندسی بافت روی آنها انجام شده است.

جراحی و ایجاد زخم های برشی

داربست های نانولیفی در دو حالت با سلول و بدون آن برای بررسی روند ترمیم زخم های مختلف برشی گرد تمام عمق بر پشت موش های صحرایی به کار برده شدند. در مطالعات بالینی درون بطن (in vivo)، تمام آزمون ها توسط کمیته اخلاق مرکز قلب دانشگاه تهران تأیید شده است. همه موش ها تحت مراقبت های انسانی در حیوان خانه با تنظیم دمای $22 \pm 2^\circ\text{C}$ و رطوبت $50-60\%$ مطابق با مرجع ۱۴ نگهداری شدند. برای انجام عمل های جراحی هریک از موش ها با مقدار مناسبی از 50 mg/kg کتامین و 5 mg/kg زایلازین بیهوش می شوند. سپس، موهای پشت موش تراشیده شده و پوست با بتادین سترون و آماده عمل می شود. در پشت هر موش هم زخم کنترل (بدون پوشش با داربست حاصل) و هم زخم آزمون (پوشیده شده با داربست حاصل) ایجاد می شود. شکل ۱، نحوه ایجاد زخم و پوشش آن با داربست نانولیفی را نشان می دهد.

برای این مطالعه دوازده سر موش صحرایی نر بالغ (sprague dawley rats) با وزن متوسط $250 \pm 50 \text{ g}$ استفاده شدند. شش سر موش به منظور بررسی اثر داربست بدون سلول (در ۳ زمان برداشت و در هر زمان ۲ سر موش) و شش سر موش برای بررسی اثر داربست با سلول بر بهبود زخم برشی استفاده شدند. در بررسی اثر ترمیم، بر پشت هر موش دو زخم یکی به عنوان کنترل (بدون داربست) و دیگری به عنوان آزمون (با داربست) ایجاد شد. برای ایجاد زخم دایره ای به قطر 1 cm از پوست پشت موش به شکل تمام عمق و با استفاده از تیغ و

بود. این سلول ها پیش از کشت سلولی در محیط رشد RPMI - 1640 به همراه پنی سیلین، 100 IU/mL استرپتوسین و 10% سرم جنینی گوساله (FCS) نگهداری شدند. نمونه ها پس از سترون سازی، در درون پلیت کشت سلولی از جنس پلی استیرین قرار داده شد. در هر خانه 1 mL از تعلیق سلولی شامل 90000 سلول ریخته شد. یک خانه از آن نیز به عنوان شاهد منفی (بدون نمونه) نگه داشته شد. آنگاه پلیت ها به مدت 72 h در انکوباتور CO_2 ، 5% کربن دی اکسید، رطوبت 95% و دمای 37°C قرار داده شدند.

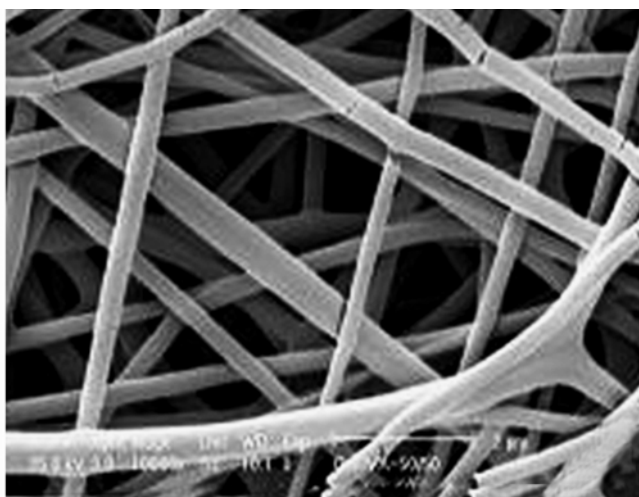
برای انجام آزمون های کشت سلولی، دستگاه انکوباتور CO_2 مدل NB-203L ساخت شرکت N-BioTek، INC به کار گرفته شد. پس از آن، محلول تعلیق از درون تک تک خانه های پلیت خارج شد و نمونه ها به ترتیب در الکل های 50 ، 70 ، 80 و 96% هر کدام به مدت 10 min نگه داشته شدند تا سلول ها ثابت شوند.

کاشت سلول بنیادی روی داربست

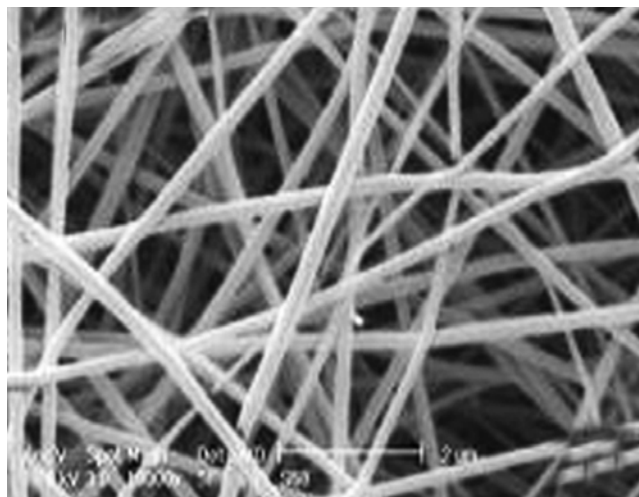
سلول بنیادی به سلولی گفته می شود که قابلیت خودنوسازی و تمایز به سلول های دیگر را داشته باشد. در این پژوهش، سلول های مزانشیمی بند ناف از نوزاد تازه به دنیا آمده به روش سزارین در بیمارستان افضل پور کرمان پس از کسب رضایت از مادر تهیه شد. برای جداسازی سلول ها و کشت اولیه آن، قطعات ماتریس بندناف به پتری دیش ها منتقل و 1 mL محیط کشت DMEM/F12 حاوی 20% سرم جنین گاوی، 100 IU/mL پنی سیلین و $50 \text{ } \mu\text{g/mL}$ استرپتومایسین سولفات به هر ظرف اضافه شد. پس از مشاهده جوانه های سلولی، قطعات ژله وارتون از محیط خارج و سلول های بنیادی در محیط کشت قرار داده شدند. داربست ها پس از سترون سازی با تابش پرتوهای UV داخل پلیت 24 خانه گذاشته شد. روی هر نمونه، تعداد 2000 سلول در $50 \text{ } \mu\text{L}$ محیط کشت کشت داده شد. پس از گذشت ۳



شکل ۱- (الف) چگونگی ایجاد زخم برشی تمام عمق، (ب) آماده سازی زخم و (ج) قراردادن داربست نانولیفی روی زخم آزمون.



(ب)



(الف)

شکل ۲- تصویر SEM شبکه نانولیفی: (الف) پلی کاپرولاکتون - کیتوسان - پلی وینیل الکل و (ب) کیتوسان - پلی وینیل الکل (ولتاژ ۱۵ kV، فاصله ۱۵ cm و سرعت خروج ۱ mL/h)، $\times 10000$.

آمده است. همان طور که در این شکل مشاهده می شود، نانوالیاف سه جزئی به شکل شبکه ای به هم پیوسته با شکل شناسی یکنواخت بدون دانه تسیبی ایجاد شده اند. قطر متوسط نانوالیاف سه جزئی حاصل حدود 136 ± 21 nm بوده و توزیع قطری به دلیل وجود پلی کاپرولاکتون در مخلوط نسبتاً پهن است. نانوالیاف حاصل از شبکه دوجزئی کیتوسان - پلی وینیل الکل دارای شکل شناسی بدون دانه تسیبی و یکنواخت با قطر متوسط 180 ± 32 nm است. همان طور که مشاهده می شود، در شبکه سه جزئی نسبت به دوجزئی با افزودن پلی کاپرولاکتون به مخلوط، نانوالیافی با قطر متوسط کمتری حاصل شده است.

برای بررسی چگونگی تغییرات خواص مکانیکی و فیزیکی با افزایش پلی کاپرولاکتون، نتایج استحکام کششی و آبدوستی شبکه سه جزئی پلی کاپرولاکتون - کیتوسان - پلی وینیل الکل در این پژوهش (شکل ۲- الف) با شبکه نانولیفی کیتوسان - پلی وینیل الکل (۱ به ۱/۵) (شکل ۲- ب) در مرجع ۱۵ با هم مقایسه شده اند.

قیچی جراحی جدا شد (شکل ۱). شبکه های نانولیفی به شکل بدون سلول و با سلول بنیادی مزانشیمی با دقت روی زخم های آزمون قرار گرفتند. سپس، کل پشت موش با استفاده از گاز سترون پوشش داده شد. برای زخم برشی سه زمان برداشت ۵، ۱۰ و ۱۵ روز در نظر گرفته می شود. در هر زمان با استفاده از تزریق یک جای 100 mg/kg سدیم تیوپتال موش های مدنظر کشته شدند. نمونه های زخم کنترل و آزمون از پشت آنها جدا شده و در فرمالین قرار داده شدند تا در آزمون های پاتولوژی استفاده شوند.

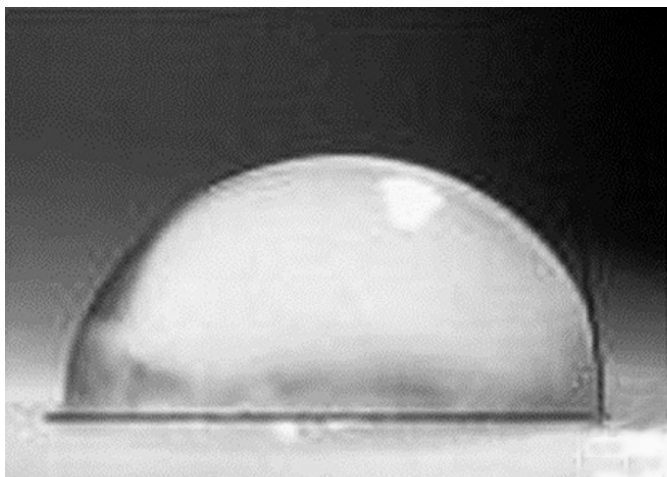
نتایج و بحث

نتایج شکل شناسی و فیزیکی مکانیکی داربست حاصل

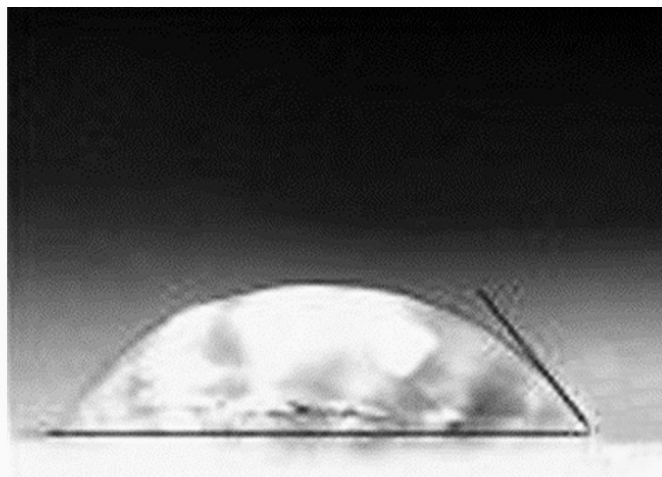
تصویر SEM شبکه نانولیفی مخلوط پلی کاپرولاکتون - کیتوسان - پلی وینیل الکل و کیتوسان - پلی وینیل الکل (۱ به ۱/۵) در شکل ۲

جدول ۱- استحکام کششی شبکه های کیتوسان - پلی وینیل الکل و پلی کاپرولاکتون - کیتوسان - پلی وینیل الکل.

نوع شبکه نانولیفی	بیشینه بار (CN)	کرنش کششی (%)	استحکام کششی (MPa)
کیتوسان - پلی وینیل الکل (۱ : ۱/۵)	$81/25 \pm 2$	$11 \pm 1/5$	$1/705 \pm 0/002$
پلی کاپرولاکتون - کیتوسان - پلی وینیل الکل (۱ : ۱/۵)	$52/66 \pm 3$	$2/22 \pm 1$	$1/853 \pm 0/005$



(ب)

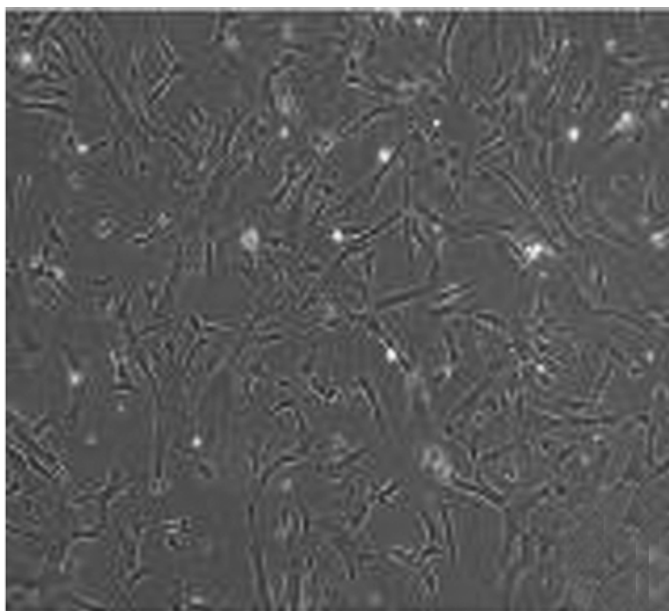


(الف)

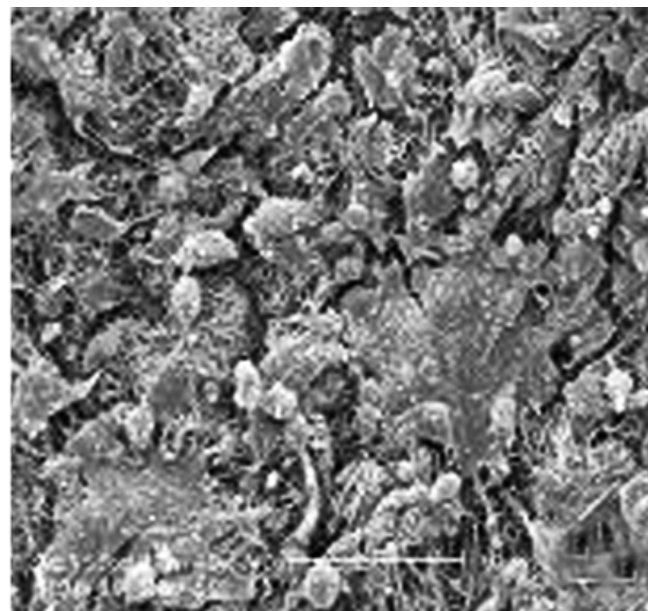
شکل ۳- تصاویر زاویه تماس قطره آب با شبکه‌ها: (الف) کیتوسان - پلی وینیل الکل و (ب) پلی کاپرولاکتون - کیتوسان - پلی وینیل الکل.

آبدوستی شبکه‌های نانولیفی مخلوط با اندازه‌گیری زاویه تماس قطره آب معین شد. به‌طور معمول، سطوح آبدوست زاویه تماس بین صفر تا 30° ایجاد می‌کنند و سطوح با خاصیت آبدوستی کمتر زاویه تماس تا 90° نشان می‌دهند. شکل ۳، نشان‌دهنده نحوه قرارگیری قطره آب روی شبکه‌های کیتوسان - پلی وینیل الکل (شکل ۳ - الف)، پلی کاپرولاکتون - کیتوسان - پلی وینیل الکل (شکل ۳ - ب) پس از

نتایج استحکام کششی شبکه‌های مخلوط دو و سه جزئی در جدول ۱ آمده است. همان‌طور که در این جدول دیده می‌شود، با افزایش پلی کاپرولاکتون به کیتوسان - پلی وینیل الکل استحکام کششی شبکه حاصل افزایش می‌یابد. این افزایش می‌تواند به دلیل مناسب بودن خواص مکانیکی پلی کاپرولاکتون و نیز ایجاد پیوندهای شیمیایی بین پلیمرهای مخلوط با یکدیگر باشد.



(ب)



(الف)

شکل ۴- (الف) تصویر SEM مربوط به چگونگی رشد و قرارگیری سلول‌های فیروبلست روی داربست پلی کاپرولاکتون - کیتوسان - پلی وینیل الکل پس از گذشت ۷۲ h از کشت سلول و (ب) تصویر میکروسکوپ نوری از نحوه قرارگیری سلول‌های بنیادی مزانشیمی روی داربست مخلوط سه جزئی.

جدول ۲ - مساحت زخم های اندازه گیری شده پس از گذشت ۵، ۱۰ و ۱۵ روز از عمل جراحی.

نمونه	اندازه زخم			
	اولیه	روز پنجم	روز دهم	روز پانزدهم
کنترل	$78/5 \pm 0/01$	$68/2 \pm 0/22$	$52/18 \pm 0/4$	$25/9 \pm 0/35$
داربست بدون سلول	$78/5 \pm 0/01$	$50/4 \pm 0/17$	$29/5 \pm 0/27$	$13/1 \pm 0/12$
داربست با سلول	$78/5 \pm 0/01$	$44/0 \pm 0/24$	$21/11 \pm 0/23$	۰

می دهد. در شکل ۴ - الف شکل شناسی و برهم کنش بین سلول ها و داربست نانولیفی به خوبی مشاهده می شود. سلول های فیبروبلاست به خوبی روی داربست پلی کاپرولاکتون - کیتوسان - پلی وینیل الکل اتصال برقرار کرده و گسترده شده اند و یک شکل شناسی نرمال را ایجاد کرده اند. به دلیل آرایش یافتگی تصادفی نانوالیاف در شبکه بی بافت، سلول ها در تمام جهات سطح شبکه و در راستای جهت نانوالیاف رشد داشته اند. نتایج نشان می دهد، افزایش PCL با وجود کاهش مقدار آبدوستی شبکه، اما کاهش شدیدی در خواص زیستی شبکه مخلوط مشاهده نمی شود. به عبارت دیگر، افزایش PCL سبب حفظ تمامیت فیزیکی شبکه در محیط آبی شده و قابلیت های زیستی را نیز حفظ کرده است.

نتایج آزمون های بالینی

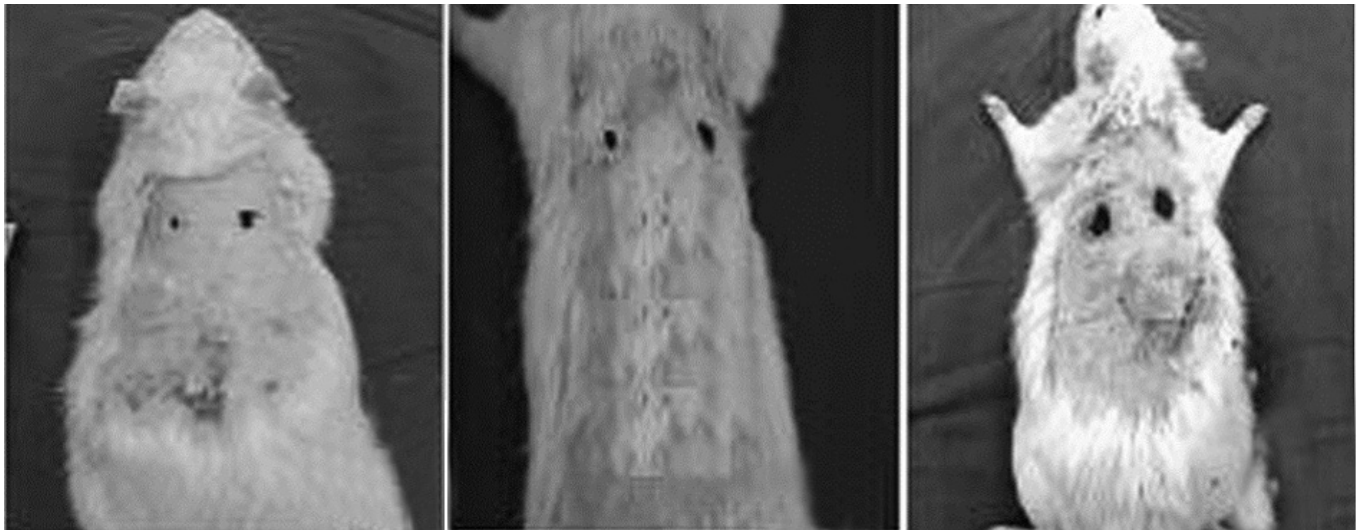
بررسی های ماکروسکوپی

برای بررسی روند ظاهری بهبود زخم، مساحت زخم ها با توجه به

۳ s است. شبکه مخلوط کیتوسان - پلی وینیل الکل به دلیل آبدوستی ذاتی زاویه تماس $2 \pm 43/8$ را ایجاد می کند. همان طور که از شکل ۳ - ب پیداست، با افزودن PCL به شبکه مخلوط مقدار آبدوستی مخلوط کمتر شده و زاویه تماس به حدود 80° افزایش می یابد. از آنجا که اندازه زاویه تماس همچنان زیر 90° است، می توان انتظار داشت که آبدوستی نسبتاً مناسب شبکه های مخلوط پلی کاپرولاکتون - کیتوسان - پلی وینیل الکل موجب حفظ قابلیت های زیستی مخلوط کیتوسان - پلی وینیل الکل می شود. افزون بر این، به دلیل کاهش آبدوستی تمامیت شبکه در محیط های زیستی آبی حفظ می شود و خواص مکانیکی بهتری می یابد. برای بررسی قابلیت زنده ماندن، رشد و تکثیر سلول ها روی داربست تهیه شده، سلول های فیبروبلاست L929 دم موش در محیط کشت روی داربست کشت شده اند. شکل ۴ - الف، SEM حاصل از شکل شناسی سلول های فیبروبلاست و شکل ۴ - ب تصویر میکروسکوپ نوری شکل شناسی سلول های بنیادی مزانشیمی بند نافی را پس از گذشت ۷۲ h از کشت سلولی روی داربست نشان

جدول ۳ - معیارهای مدنظر بهبود در بررسی پاتولوژی و نحوه کدگذاری آنها.

معیار	کد	یک (۱)	دو (۲)	سه (۳)	چهار (۴)
اپتلیال سازی		بسیار ضعیف	ضعیف	متوسط	کامل
ضمائم پوستی و بافت جوانه ایی		بدون ضمايم و با بافت جوانه بسیار ظریف	بدون ضمايم و با بافت جوانه متوسط	با ضمايم و بافت جوانه متوسط	با ضمايم و بافت جوانه ضخیم
کلاژن سازی و نوع نظم آن		بسیار ضعیف و با فیبریل های خیلی نازک	ضعیف و با فیبریل های مشخص	متوسط و بخشی باندلی ولی نامنظم	کامل و با باندل های منظم کلاژنی
ترمیم زخم		همراه با التهاب زیاد و ترمیم بسیار ضعیف	همراه با التهاب و ترمیم متوسط	التهاب بسیار کم و ترمیم نسبتاً خوب	ترمیم کامل



(الف)

(ب)

(ج)

شکل ۵- تصاویر ترمیم زخم برشی (زخم سمت چپ پشت هر موش مربوط به زخم با داربست و سمت راست زخم کنترل است) در روزهای مختلف پس از عمل و پانسمان با زخم بند نانولیفی: (الف) ۵ روز، (ب) ۱۰ روز و (ج) ۱۵ روز.

قالب گیری، برش، تهیه لام و لکه گذاری قرار گرفتند. لام های تهیه شده از مقاطع عرضی زخم به وسیله میکروسکوپ Olympus AX70 مشاهده و عکس برداری شدند. تصاویر هیستوشیمیایی حاصل از لکه گذاری هماتوکسیلین-ائوزین (H&E) زخم های برشی گرد بدون داربست (کنترل) و با داربست بدون سلول و با داربست با سلول در زمان های ۵، ۱۰ و ۱۵ روز در شکل ۶ نشان داده شده است.

در روز پنجم نمونه های کنترل حاوی مقدار زیادی فیبرین و دلمه بوده و کلاژن سازی در حد صفر و بسیار ضعیف است. اپیتلیال سازی نیز انجام نشده و در مجموع روند ترمیم بسیار ضعیف و در حد هیچ است. این درحالی است که در نمونه با داربست، کلاژن سازی ضعیف با فیبریل های نامنظم، بافت جوانه ای نسبتاً متوسط بدون ضمام پوستی و اپیتلیال سازی ضعیف روی زخم دیده می شود و در مجموع روند ترمیم ضعیف با شماره ۱ است. در زخم های پوشش یافته با داربست با سلول، کلاژن سازی متوسط با فیبریل های زیاد دیده می شود و لایه اپیتلیال با ضخامت کم روی تمام زخم ایجاد شده است.

در روز دهم، نمونه کنترل حاوی مقدار زیادی کلاژن فیبریلی است و لایه اپیتلیال فقط در حاشیه زخم دیده می شود. در نمونه دارای داربست نانولیفی بدون سلول، کلاژن سازی در حد متوسط و با شماره ۲ دیده می شود. در این نمونه، ضمام پوستی در این نمونه دیده نمی شود، لایه اپیتلیال کامل بوده و روند بهبود نسبتاً خوب با شماره ۲ تا ۳ است. درحالی که در نمونه های داربست با سلول، کلاژن سازی خوبی به همراه باندل های نامنظم دیده می شود. نکته جالب توجه در این

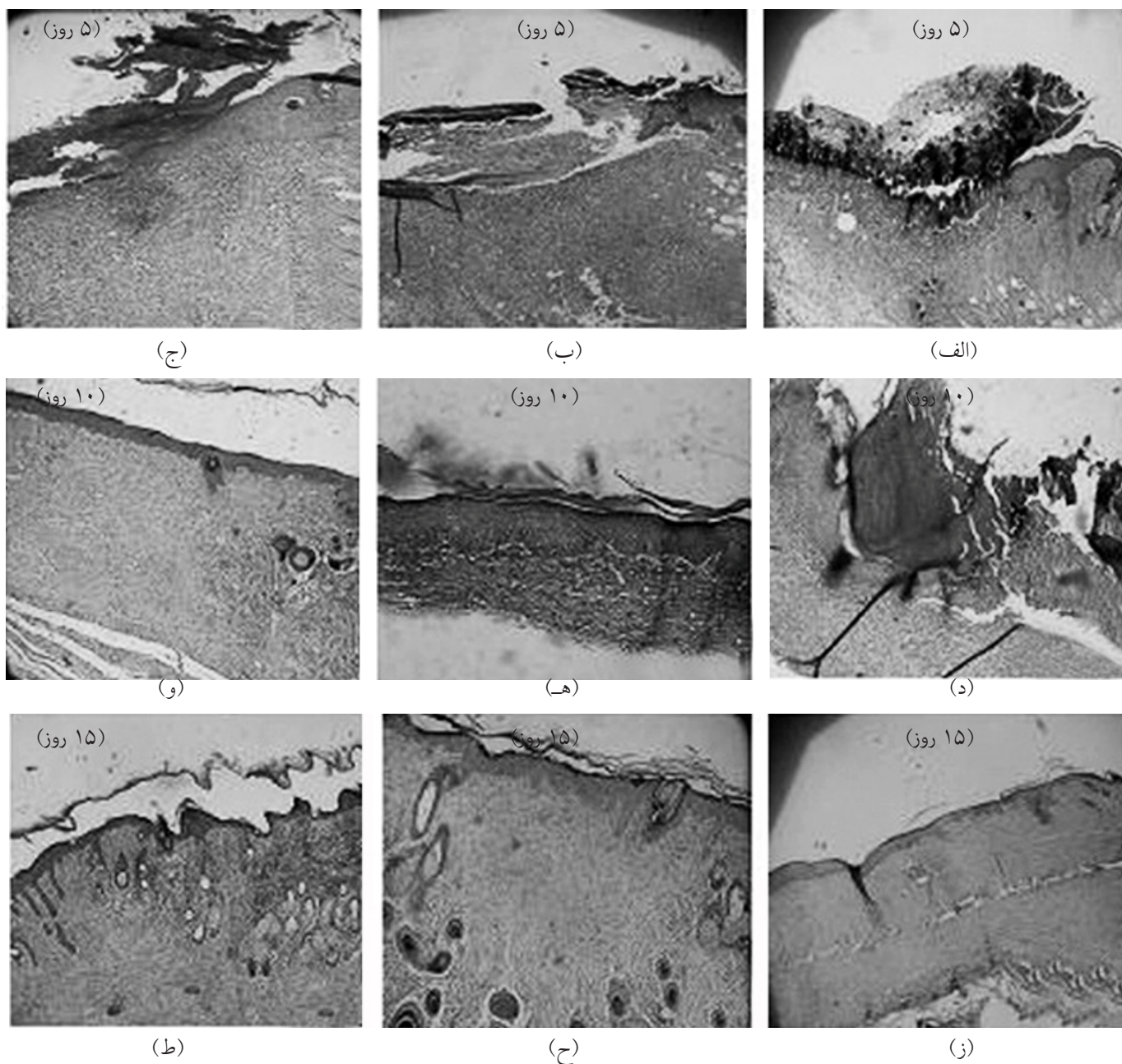
نوع داربست به کار گرفته شده و زمان برداشت بافت اندازه گیری شده است. این کار با استفاده از تصاویر رقمی تهیه شده از زخم ها انجام شد (شکل ۵). هرچه مساحت زخم در یک زمان مشخص کوچک تر باشد، نشان دهنده بهبود بهتر زخم است. مساحت گزارش شده از هر زخم در هر زمان، مساحت متوسط از چهار زخم است.

مساحت زخم های اندازه گیری شده میانگین چهار مرتبه اندازه گیری است. در جدول ۲، این مقادیر برای زخم های کنترل و زخم های پوشش داده شده با داربست بدون سلول و با سلول پس از گذشت ۵، ۱۰ و ۱۵ روز از عمل جراحی گزارش شده است. همان طور که مشاهده می شود، در روز پانزدهم پس از جراحی در نمونه دارای داربست با سلول هیچ اثری از زخم و اسکار دیده نشده و ترمیم به طور کامل انجام شده است. همچنین، در همان روز نمونه دارای داربست بدون سلول اندازه زخمی حدود نصف اندازه زخم کنترل در این روز را نشان می دهد.

بررسی های میکروسکوپی (نتایج پاتولوژی)

برای بررسی روند ترمیم زخم معیارهای اپیتلیال سازی (epithelialization)، وجود ضمام پوستی (skin appendages)، کلاژن سازی و نوع نظم آن و عامل کلی ترمیم زخم در این پژوهش مدنظر قرار گرفتند که طبق جدول ۳ و با توجه به مرجع ۱۶ کدگذاری شده اند.

پس از اتمام جراحی و گذشت مدت زمان های معین شده، نمونه های کنترل و آزمون از بدن حیوان خارج و در عملیات آماده سازی،



شکل ۶- تصاویر هیستوشیمیایی از زخم برشی تمام عمق در: (الف، د، ز) نمونه های کنترل، (ب، ه، ح) نمونه های با داربست و (ج، و، ط) نمونه های با داربست با سلول در روزهای مختلف پس از عمل جراحی.

کامل باندلی منظم به همراه ضمام پوستی دیده می شود که در سرتاسر سطح زیر زخم کشیده شده است. ترمیم به گونه ای انجام شده که زخم همانند یک بافت نرمال دیده می شود.

به طور کلی، ترمیم زخم در نمونه با داربست نانولیفی مخلوط پلی کاپرولاکتون - کیتوسان - پلی وینیل الکل از روز دهم در مرحله تکمیلی ترمیم قرار داشته و در روز پانزدهم با ایجاد ضمام پوستی به حد نهایی ترمیم رسیده است. این درحالی است که ترمیم در

نمونه وجود ضمام پوستی چون فولیکول های مویی در حاشیه و لبه زخم است. همچنین، لایه اپیتلیال کامل است و روند ترمیم زخم بسیار خوب تلقی می شود.

در روز پانزدهم در نمونه دارای داربست نانولیفی مخلوط، کلاژن سازی در حد متوسط انجام شده است و ضمام پوستی دیده می شود. همچنین، اپیتلیال سازی کامل و روند کلی ترمیم زخم خوب با شماره ۳ تا ۴ است. در نمونه حاوی داربست با سلول، کلاژن سازی

جدول ۴- معیارهای کدگذاری شده با توجه به نتایج پاتولوژی برای نمونه های کنترل و نمونه های حاوی داربست بدون سلول و با سلول در روزهای مختلف پس از عمل جراحی.

زمان (روز)	معیار نمونه	اپیتلیال سازی	ضمائم پوستی	کلاژن سازی	ترمیم زخم
۵	کنترل	۱	۱	۱	۱
	داربست بدون سلول	۱	۲	۱-۲	۱-۲
	داربست با سلول	۲	۲	۲	۲
۱۰	کنترل	۲	۲	۲	۲
	داربست بدون سلول	۴	۲	۲	۲-۳
	داربست با سلول	۴	۳	۳	۳
۱۵	کنترل	۴	۲	۲	۲-۳
	داربست بدون سلول	۴	۳	۳	۳-۴
	داربست با سلول	۴	۴	۴	۴

بالینی نشان دهنده اثر بسیار مطلوب داربست نانولیفی حاضر بر ترمیم زخم های برشی است. به طوری که داربست با سلول در روز پانزدهم پس از عمل جراحی، پوست را به خوبی و بدون به جای گذاشتن اثری از زخم یا اسکار ترمیم کرده است. نتایج پاتولوژی نیز مؤید همین موضوع است. تمام معیارهای مدنظر اعم از اپیتلیال سازی، کلاژن سازی و وجود ضمام پوستی در طول مدت زمان بهبود روند افزایشی دارد. این موضوع به ترتیب در زخم هایی که با داربست با سلول و سپس داربست بدون سلول پوشش یافته اند، بیشتر و سریع تر از نمونه های کنترل اتفاق افتاده است. به طوری که در روز پانزدهم پس از عمل جراحی، در حالی که نمونه های کنترل فقط به بهبودی در حدود بهبود داربست بدون سلول در روز دهم رسیده اند، نمونه دارای داربست با سلول همانند یک بافت نرمال دارای لایه اپیتلیال کامل و کلاژن هایی باندلی شکل و منظم شده است، همچنین، در این نمونه وجود ضمام پوستی همچون فولیکول های مو و غدد چربی در تمام سطح زیر زخم نشان دهنده بهبود کامل و همانندی با بافت نرمال است. به طور کلی می توان نتیجه گرفت، داربست نانولیفی پلی کاپرولاکتون - کیتوسان - پلی وینیل الکل داربست زیستی بسیار مناسبی برای ترمیم پوست است.

قدردانی

از بنیاد ملی نخبگان، صندوق حمایت از پژوهشگران و مرکز تحقیقات سلولی - مولکولی دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی درمانی ایران به دلیل حمایت از این پژوهش قدردانی می شود.

نمونه های کنترل حتی در روز پانزدهم نیز به خوبی نمونه های با داربست در روز دهم نبوده اند. همچنین، نتایج معیارهای کدگذاری شده با توجه به نوع نمونه (کنترل، داربست بدون سلول و داربست با سلول) در روزهای مختلف در جدول ۴ آمده است.

نتیجه گیری

در این پژوهش، داربست های مخلوط پلی کاپرولاکتون - کیتوسان - پلی وینیل الکل با نسبت ۱ - ۲ - ۱/۵ با موفقیت الکترورسی شدند. با افزودن پلی کاپرولاکتون به مخلوط کیتوسان - پلی وینیل الکل خواص مکانیکی شبکه بهبود یافته و مقدار آبدوستی آن کاهش یافت. با کاهش مقدار آبدوستی، قابلیت حفظ تمامیت فیزیکی شبکه داربست سه جزئی مدنظر در محیط آبی زیستی (مانند محیط زخم و ...) افزایش یافت. همچنین نتایج کشت سلولی نشان می دهد، مقدار آبدوستی شبکه تا اندازه ای کاهش یافته است که منجر به کاهش ویژگی های زیستی آن نشده است. سلول های فیروپلاست به خوبی روی داربست رشد کرده و پهن شدگی و چسبندگی مناسبی را با نانوالیاف نشان می دهند. به دلیل آرایش یافتگی تصادفی نانوالیاف سلول ها به خوبی در تمام جهات به خوبی گسترش یافته اند. نتایج کاشت سلول های مزانشیمی ژله وارتون بند نافی نیز نشان دهنده رشد و قرارگیری شکل شناسی مناسب سلول ها روی داربست مخلوط نانولیفی پلی کاپرولاکتون - کیتوسان - پلی وینیل الکل است. بررسی های میکروسکوپی نتایج

مراجع

1. Nair L.S. and Laurencin C.T., Biodegradable Polymers as Biomaterials, *Prog. Polym. Sci.*, **32**, 762-798, 2007.
2. Khil M.S., Cha D.I., Kim H.Y., Kim I., and Bhattarai N., Electrospun Nanofibrous Polyurethane Membrane as Wound Dressing, *Appl. Biomater.*, **67B**, 675-679, 2003.
3. Chen J.P., Chang G.Y., and Chen J.K., Electrospun Collagen/Chitosan Nanofibrous Membrane as Wound Dressing, *Colloid. Surf. A: Physicochem. Eng. Aspects*, **313-314**, 183-188, 2008.
4. Li L. and Hsieh Y.L., Chitosan Bicomponent Nanofibers and Nanoporous Fibers, *Carbohydr. Res.*, **341**, 374-381, 2006.
5. Bhattarai N., Edmondson D., Veisoh O., Matsen F.A., and Zhang M., Electrospun Chitosan-Based Nanofibers and Their Cellular Compatibility, *Biomaterials*, **26**, 6176-6184, 2005.
6. Gunn J. and Zhang M., Polyblend Nanofibers for Biomedical Applications: Perspectives and Challenges, *Trend. Biotechnol.*, **28**, 189-197, 2010.
7. Laurencin C.T., Ambrosio A.M.A., Borden M.D., and Cooper J.J.A., Tissue Engineering: Orthopedic Applications, *Annu Rev. Biomed. Eng.*, **1**, 19-25, 1999.
8. Sahoo S., Sasmal A., Nanda R., Phani A.R., and Nayak P.L., Synthesis of Chitosan-Polycaprolactone Blend for Control Delivery of Ofloxacin Drug, *Carbohydr. Polym.*, **79**, 106-113, 2010.
9. Malheiro V.N., Caridade S.G., Alves N.M., and Mano J.F., New Poly(ϵ -caprolactone)/Chitosan Blend Fibers for Tissue Engineering Applications, *Acta Biomater.*, **6**, 418-428, 2010.
10. Neves S.C., Moreira Teixeira L.S., Moroni L., Reis R.L., Van Blitterswijk C.A., Alves N.M., Karperien M., and Mano J.F., Chitosan/Poly(ϵ -caprolactone) Blend Scaffolds for Cartilage Repair, *Biomaterials*, **32**, 1068-1079, 2011.
11. Shalumon K.T., Anulekha K.H., Girish C.M., Prasanth R., Nair S.V., and Jayakumar R., Single Step Electrospinning of chitosan/Poly(Caprolactone) Nanofibers Using Formic Acid/Acetone Solvent Mixture, *Carbohydr. Polym.*, **80**, 413-419, 2010.
12. Shalumon K.T., Anulekha K.H., Chennazhi K.P., Tamura H., Nair S.V., and Jayakumara R., Fabrication of Chitosan/Poly(caprolactone) Nanofibrous Scaffold for Bone and Skin Tissue Engineering, *Int. J. Biolog. Macromol.*, **48**, 571-576, 2011.
13. Kim M.H., An H.W., Park K.O., Yeo S.I., Yang D.J., and Park G.B., Biological Evaluation of Biodegradable PCL-BCP/PCL Bi-Layered GBR Membrane, *Bioceramics*, **22**, 703-706, 2009.
14. Commission on Life Sciences, Institute of Laboratory Animal Resources; National Research Council, Guide for the Care and Use of Laboratory Animals, National Academy, Washington, 85-23, 1996.
15. Gholipour A., Bahrami S.H., and Samadi A., Morphological, Mechanical and Biological Properties of Novel PCL-Cs/PVA Multi Layer Nanofibrous Scaffolds, *Digest J. Nanomater. Biostat.*, **7**, 1437-1445, 2012.
16. Galeano M., Altavilla D., Cucinotta D., Russo G.T., Calò M., Bitto A., Marini H., Marini R., Adamo E.B., Seminara P., Minutoli L., Torre V., and Squadrito F., Recombinant Human Erythropoietin Stimulates Angiogenesis and Wound Healing in Genetically Diabetic Mouse, *Diabetes*, **53**, 2509-2517, 2004.