

ساخت داربست نانو کامپوزیتی کیتوسان/پلی وینیل الکل/نانولوله کربنی/شیشه زیست فعال برای مهندسی بافت عصب

سارا نیکبخت کتولی^۱، علی دوست محمدی^{۱*} و فریبا اسماعیلی^۲

۱- گروه مهندسی مواد، دانشکده فنی مهندسی، دانشگاه شهرکرد

۲- گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه اصفهان

(دریافت مقاله: ۱۳۹۳/۰۷/۲۱ - دریافت نسخه نهایی: ۱۳۹۴/۰۴/۳۱)

چکیده - هدف از این پژوهش ساخت نانوالیاف الکتروریسی شده کیتوسان (CS)/پلی وینیل الکل (PVA) حاوی نانولوله کربنی (CNT) و نانوذرات شیشه زیست فعال (BG) (در مقادیر ۵ و ۱۰ درصد وزنی) برای کاربردهای مهندسی بافت عصب بود. شکل، ساختار و خواص مکانیکی نانوالیاف کامپوزیتی ریسیده شده، به ترتیب با استفاده از میکروسکوپ الکترونی روبشی (SEM) و آزمون‌های سنجش خواص مکانیکی مشخص شد. در آزمون کشت سلولی برون‌تنی، سلول‌های بنیادی کارسینوما جینی (رده P19) بر روی داربست الکتروریسی شده کشت داده شد. نتایج نشان داد که وجود نانولوله کربنی و نانوذرات شیشه زیست فعال بر شکل نانوالیاف کیتوسان/پلی وینیل الکل تأثیر چندانی نمی‌گذارد. بیشترین استحکام کششی (۷/۹ مگاپاسکال) در نمونه کامپوزیتی با ۵ درصد وزنی نانوذرات شیشه زیست فعال، مشاهده شد. هم‌چنین نتایج این پژوهش نشان داد که نانولوله‌های کربنی و نانوذرات شیشه زیست فعال ترکیب‌شده در داربست‌های نانوالیاف کیتوسان/پلی وینیل الکل با قطر نانومتری و تخلخل بالا می‌تواند ضمن تأمین خواص مکانیکی مناسب، بستر مناسب برای رشد سلولی را نیز فراهم کند و به‌طور بالقوه گزینه‌ای بسیار مناسب برای استفاده در مهندسی بافت عصب باشد.

واژگان کلیدی: نانوالیاف، کامپوزیت، نانولوله کربنی، نانوذرات شیشه زیست فعال، الکتروریسی

Fabrication of Chitosan/Poly (vinyl alcohol)/Carbon Nanotube/Bioactive Glass Nanocomposite Scaffolds for Neural Tissue Engineering

S. Nikbakht Katouli¹, A. Doostmohammadi^{1*} and F. Esmaeili²

1- Department of Materials Engineering, Faculty of Engineering, University of Shahrekord, Shahrekord, Iran

2- Department of Biology, Faculty of Science, University of Isfahan, Isfahan, Iran

* مسئول مکاتبات پست الکترونیکی: alidm14@ma.iut.ac.ir

Abstract: The aim of this study was to fabricate carbon nanotube (CNT) and bioactive glass nanoparticles (BG) (at levels of 5 and 10 wt%) incorporated electrospun chitosan (CS)/polyvinyl alcohol (PVA) nanofibers for potential neural tissue engineering applications. The morphology, structure, and mechanical properties of the formed electrospun fibrous mats were characterized using scanning electron microscopy (SEM) and mechanical testing, respectively. In vitro cell culture of embryonal carcinoma stem cells (P19) were seeded onto the electrospun scaffolds. The results showed that the incorporation of CNTs and BG nanoparticles did not appreciably affect the morphology of the CS/PVA nanofibers. The maximum tensile strength (7.9 MPa) was observed in the composite sample with 5 %wt bioactive glass nanoparticles. The results suggest that BG and CNT-incorporated CS/PVA nanofibrous scaffolds with small diameters, high porosity, and promoted mechanical properties can potentially provide many possibilities for applications in the fields of neural tissue engineering and regenerative medicine.

Keywords: Nanofibers, Composite, Carbon nanotube, Bioactive glass nanoparticles, Electrospinning

۱- مقدمه

ریسندگی بالا از مهمترین دلایل استفاده این پلیمرها در ساخت داربست‌های مهندسی بافت عصب است [۵، ۶]. از مهمترین الزامات یک داربست مهندسی بافت، دارا بودن خواص مکانیکی مناسب است به گونه‌ای که تاب تحمل تنش‌های استاتیکی و دینامیک محیط سیال بدن را داشته باشد. داربست‌های مهندسی بافت عصب نیز از این مهم مستثنی نیستند [۱]. از میان انبوهی از مواد نانومتری که هر کدام توانایی بالایی به منظور استفاده در سیستم‌های میکرو-نانو دارند، نانولوله‌های کربنی^۵ از اهمیت و جایگاه ویژه‌ای برخوردارند. خواص قابل توجه نانولوله‌های کربنی از قبیل رسانندگی بالا، استحکام مکانیکی، چگالی کم و پایداری بالا سبب شده است که در سال‌های اخیر مورد توجه پژوهشگران قرار بگیرند. از این میان، رسانندگی بالا و استحکام مکانیکی خوب، استفاده از آن‌ها در داربست‌های مهندسی بافت عصب را گسترش داده است. بسیاری از خواص نانولوله‌های کربنی به طبیعت پیوندهای بین اتم‌های کربن مربوط است. اخیراً توجه دانشمندان به این قابلیت نانولوله‌ها جلب شده است که همانند داربست‌های طبیعی بافتی محتوی کلاژن، می‌توانند به عنوان داربست برای رشد سلول‌های روی آن‌ها مورد استفاده قرار بگیرند. احتمالاً ایده اولیه از آن‌جا منشأ می‌گیرد که نانولوله‌ها هنگام تولید به صورت رشته‌هایی درهم آرایش می‌یابند که به آن شکل ماکارونی اطلاق می‌شود. این حالت مشابه وضعیت کلاژن‌ها در مایع خارج سلولی است [۸]. دانشمندان دریافته‌اند که نانولوله‌های کربنی تک جداره بافته نشده^۶ دارای خاصیت داربستی بیشتری نسبت به دیگر انواع هستند. در این حال قابلیت تکثیر و چسبندگی سلولی نیز افزایش

مهندسی بافت^۱ در مهندسی پزشکی به منظور ترمیم و جایگزینی عملکرد بافت‌ها و ارگان‌های آسیب دیده یا از بین رفته، مطرح بوده و گسترش یافته است. ترمیم بافت عصبی یک درمان گرانبها در سلامت انسان به شمار می‌رود، چرا که ارتباط مستقیم با کیفیت زندگی بشر دارد. این مسئله کاملاً روشن است که سیستم اعصاب مرکزی^۲ (CNS) در انسان بالغ به دنبال آسیب دیدگی یا جراحت، قادر به ترمیم و بازسازی خود نیست [۱، ۲]. اخیراً مهندسی بافت یک روش درمانی جدید را به عنوان جایگزینی برای روش سنتی پیوند، ارائه کرده است که شامل استفاده از بیومواد پلیمری یا کامپوزیتی به همراه سلول‌ها یا بدون آن‌ها است. پلیمرها می‌توانند به عنوان داربست برای تأمین چسبندگی سلول، نگهداری و تمایز سلول بدون آنکه تمایز سلول‌ها را به تأخیر بیندازد، به کار روند [۳]. پلی وینیل الکل^۳ به عنوان یک پلیمر زیست سازگار و آب دوست با ویژگی‌های پایداری شیمیایی و گرمایی مناسب و نیز استحکام کششی و انعطاف‌پذیری بسیار خوب شناخته می‌شود [۴، ۵]. کیتوسان^۴ یک پلیمر خطی با ساختار ساکاریدی است و از هیدرولیز پلیمر طبیعی کیتین به دست می‌آید [۶]. هم‌چنین کیتوسان یکی از پلیمرهای زیست تخریب‌پذیر و زیست سازگار با بدن انسان و دارای ویژگی‌های خاص است که این پلیمر را برای بسیاری از زمینه‌های زیستی، پزشکی، دارورسانی و ژن درمانی مناسب نموده است [۷]. از کامپوزیت‌های پلیمری کیتوسان و پلی وینیل الکل در مهندسی بافت عصب استفاده شده است [۱، ۴-۷]. نرخ تخریب‌پذیری مناسب، خواص مکانیکی قابل قبول و قابلیت

چشم‌گیری دارد [۹]. مهم‌ترین دستاورد پژوهشگران در این زمینه، کشت استئوبلاست‌ها روی نانولوله‌هاست که در مقاله‌ای توسط پژوهشگران دانشگاه کالیفرنیا در سال ۲۰۰۶ منتشر شد و توجه زیادی را به‌خود جلب کرد. این یافته راه را برای به‌کارگیری نانولوله‌ها در ترمیم آسیب‌های سلولی باز می‌کند. پیش از این نیز اتصالات محکم استئوبلاست‌ها^۷ به داربست نانولوله‌ای شکل گرفته در حین کشت به اثبات رسیده بود [۱۰، ۱۱]. یافته دیگری که توسط پژوهشگران دانشگاه کالیفرنیا اعلام شده است، احتمال به‌کارگیری نانولوله‌ها در ترمیم ضایعات نخاعی است. در این حال حضور نانولوله‌ها در محیط موجب هدایت رشد آکسونی می‌شود [۱۲].

بیوسرامیک‌ها از جمله گروه‌های معروف و مورد علاقه در میان بیومواد به‌شمار می‌روند. از جمله مزایای عمده این مواد نسبت به بیومواد فلزی و پلیمری، مقاومت به خوردگی بالا، زیست‌سازگاری و خواص زیست‌فعال مناسب است [۱۳]. در میان همه مواد زیست‌فعال، بهترین رفتار زیست‌فعال متعلق به شیشه‌های زیست‌فعال^۸ است که در برگزیده گروهی از ترکیب‌های شیشه هستند که در زمان کوتاهی با بافت، پیوند برقرار می‌کنند. اولین گزارش از بررسی‌های درون‌تنی شیشه‌های زیست‌فعال در سال ۱۹۷۱ به‌چاپ رسید [۱۴]. قطعات یکپارچه از جنس شیشه‌های زیست‌فعال بیوگلاس 45S5 در استخوان ران موش صحرایی قرار داده شدند و نه تنها هیچ‌گونه اثر التهابی ایجاد نکردند، بلکه اتصال قابل توجهی نیز با بافت استخوانی اطراف خود ایجاد کردند [۱۵]. در برخی مقالات به قابلیت شیشه زیست‌فعال در ترمیم بافت نرم و احتمال تأثیر آن بر بافت‌هایی نظیر بافت عصبی اشاره شده است. این در حالی است که تاکنون گزارشی در این زمینه منتشر نشده است [۱۶، ۱۷].

نانوالیاف انتخاب مناسبی برای ایفای نقش ماتریکس خارج سلولی طبیعی در شرایط آزمایشگاهی هستند. در سال‌های اخیر نانوالیاف الکتروورسی شده، به‌دلیل نزدیک بودن ساختار آن‌ها با ساختار فیبری بافت‌های بدن و ماتریکس خارج سلولی و

هم‌چنین سطح مؤثر بالا برای چسبندگی و رشد سلول‌ها، مورد توجه زیادی قرار گرفته‌اند و مطالعات بر روی این داربست‌ها بسیار گسترش یافته است. روش ریسندگی الکتریکی پرکاربردترین روش ساخت نانوالیاف است. در ریسندگی الکتریکی محدودیتی برای نوع پلیمر وجود ندارد و برای انواع پلیمرها به‌کار می‌رود [۱۸]. الکتروورسی^۹ روش ساده‌ای است که به‌عنوان یکی از بهترین روش‌های تولید نانو الیاف شناخته شده است. این روش که اولین بار در سال ۱۹۳۴ توسط فورمهال گزارش شد، با استفاده از بار الکتریکی، تشکیل الیاف پلیمری روی جسم هدف را کنترل می‌کند [۱۹].

در سال‌های اخیر پژوهشگران به استفاده از نانولوله‌های کربنی و نقش آن‌ها در داربست‌های مهندسی بافت عصب به‌عنوان یک جزء رسانا و هدایت‌کننده‌های سیگنال‌های عصبی اشاره کرده‌اند [۱]. در این پژوهش، ساخت نانوکامپوزیت کیتوسان/پلی وینیل الکل/نانولوله کربنی/شیشه زیست‌فعال با خواص زیستی و مکانیکی ارتقا یافته، برای مهندسی بافت عصب مورد توجه قرار گرفت. هم‌چنین علاوه بر نانولوله‌های کربنی و با توجه به قابلیت شیشه‌های زیستی در ترمیم بافت‌های نرم [۱۳، ۱۷]، از نانوذرات شیشه به‌عنوان تقویت‌کننده خواص مکانیکی و ارتقا‌دهنده زیست‌فعال استفاده شد.

۲- مواد و روش پژوهش

۲-۱- تهیه محلول‌های پیش‌ساز داربست

۲-۱-۱- تهیه محلول پلی وینیل الکل (PVA)

مقدار معین از آب مقطر روی دستگاه هم‌زن قرار گرفت تا دمای آن به ۸۰ درجه سانتی‌گراد برسد. سپس پودر پلی وینیل الکل (PVA, Hydrolyzed, Merck, 99%, 72000 Mw) به آب اضافه شد. محلول حاصل روی دستگاه هم‌زن مغناطیسی قرار گرفت تا زمانی که محلول هم‌گن حاصل شود. مدت زمان هم‌خوردن بستگی به مدت زمان لازم تا رسیدن به یک محلول هم‌گن داشت که حدود یک تا سه ساعت به طول انجامید.

۲-۱-۲- تهیه محلول کیتوسان/ پلی وینیل الکل/ نانولوله کربنی (CS/PVA/CNT)

ابتدا ۰/۰۵ گرم کیتوسان (Sigma 28191 from Crab Shell) به مدت ۱۰ دقیقه با همزن آلتراسونیک هم زده شد. محلول حاصل سپس به مدت ۱۰ ساعت روی همزن مغناطیسی برای تهیه محلولی یکنواخت قرار داده شد. پس از آماده شدن محلول مورد نظر، محلول PVA آماده شده به نسبت ۷۵/۲۵ (PVA/CS) به آن اضافه شد و به مدت ۱ ساعت هم زده شد. سپس ۰/۰۰۵ گرم نانولوله کربنی (CNT) (Supplied by Nurrino, Purity: 98%) در محلول ۰/۳ اسید استیک به مدت ۲۰ دقیقه با دستگاه همزن آلتراسونیک هم زده، به محلول کیتوسان/ پلی وینیل الکل اضافه شد.

۲-۱-۳- تهیه محلول کیتوسان/ پلی وینیل الکل/ نانولوله کربنی/ شیشه زیست فعال (CS/PVA/CNT/BG)

مراحل آماده سازی این محلول مشابه با روش محلول قبلی بود با این تفاوت که پس از هم خوردن کیتوسان، به ترتیب مقادیر ۰/۰۰۲۵ و ۰/۰۰۵ گرم شیشه زیست فعال (۵٪ و ۱۰٪ وزنی) به محلول اضافه شد. سپس محلول به مدت ۱۰ دقیقه با همزن آلتراسونیک به خوبی هم زده شد. پس از آن محلول PVA (آماده سازی مشابه روش قبلی) به محلول اصلی اضافه شد.

۲-۲- ساخت داربست

برای ساخت داربست از روش الکتروریسی (فناوران نانومقیاس) استفاده شد. هر یک از محلول های مورد نظر در سرنگ های ۲ یا ۵ میلی لیتری قرار داده شد. سپس سرنگ ها در داخل دستگاه الکتروریسی قرار گرفتند. آزمون های متعددی برای یافتن پارامترهای مناسب برای به دست آوردن نانوالیاف مورد نظر با کمترین گره (بید) ممکن انجام شد. پس از انجام این آزمون ها، فاصله نوک سرنگ تا صفحه جمع کننده ۱۱ تا ۱۲ سانتی متر و سرعت خروج محلول از سرنگ ۰/۴ میلی لیتر بر ساعت انتخاب شد. سرعت بالاتر از این مقدار باعث ایجاد گره و سرعت

پایین تر از این مقدار به دلیل کند شدن خروج محلول از سرنگ باعث گرفتگی سر سرنگ می شد. هم چنین تعداد دور صفحه جمع کننده برای دستیابی به نانو الیافی موازی و هم محور و مناسب برای بافت عصب، در حدود ۲۷۰۰-۲۸۰۰ دور در دقیقه به کار برده شد. با اعمال ولتاژ مثبتی حدود ۷/۷ و ولتاژی منفی حدود ۳/۲ کیلوولت محلول مورد نظر به مدت ۳ الی ۴ ساعت در داخل دستگاه الکتروریسی قرار گرفت تا نانو الیاف مورد نظر بر روی فویل آلومینیومی رسیده شود. نانو الیاف رسیده شده به مدت ۲ تا ۳ روز زیر هود در دمای محیط قرار گرفت تا حلال موجود تبخیر شود. پس از آن، نانو الیاف از روی فویل آلومینیومی جدا شد. به منظور انجام هر چه بهتر آزمون های بعدی، صفحه الیاف رسیده شده در ابعاد کوچک تر بریده شد و بر روی لام های شیشه ای که به اندازه ی یک سلول پلیت بریده شده بود، چسبانده شد. برای افزایش استحکام و مقاومت مکانیکی نانو کامپوزیت های CS/PVA/CNT و CS/PVA/CNT/BG فرایند ایجاد اتصالات عرضی توسط بخار گلو تار آلدهید (GA, Merck, 25%) انجام شد. انجام این عملیات برای حفظ انسجام و یکنواختی ساختار بستر الکتروریسی شده لازم است. برای این کار، ۱۰ میلی لیتر گلو تار آلدهید با ۴۰ میلی لیتر اتانول مخلوط شد تا محلول ۵ درصدی گلو تار آلدهید به دست آید. نانوالیاف به مدت ۲۴ ساعت در معرض بخار این محلول قرار گرفتند و سپس در انکوباتور نگهداری شدند.

۲-۳- ارزیابی نانو الیاف CS/PVA/CNT و CS/PVA/CNT/BG به کمک میکروسکوپ الکترونی روبشی گسیل میدانی (FESEM)

به منظور ارزیابی داربست ها و بررسی ساختار و قطر الیاف رسیده شده، از میکروسکوپ الکترونی روبشی گسیل میدانی مدل (MIRA3 TESCAN) استفاده شد. پس از الکتروریسی محلول ها و انجام اتصال عرضی تعدادی از نمونه ها، قطعاتی از فویل های اتصال عرضی شده و نشده برای تهیه تصاویر

میکروسکوپ الکترونی برش داده شدند. قطعه کوچکی از داربست با طلا پوشش داده شد و بر روی پایه نگهدارنده نمونه قرار گرفت.

۲-۴- آزمون سنجش خواص مکانیکی

آزمون سنجش خواص مکانیکی بر اساس استاندارد ASTM D638، از نمونه‌ها با ضخامت $0.01-0.02$ میلی‌متر به ترتیب برای داربست‌های CS/PVA/CNT/BG و CS/PVA/CNT با استفاده از دستگاه کشش (1446-zwick) در شرایط محیط و با سرعت کششی ۵ میلی‌متر بر دقیقه انجام شد.

۲-۵- آزمون سنجش سمیت سلولی

آزمون سمیت سنجی مطابق استاندارد ISO10993-5 انجام شد. عملیات سترون کردن نمونه‌های داربست با غوطه‌وری در اتانول ۷۰٪ انجام گرفت. سپس نمونه‌های داربست نانوکامپوزیتی تهیه شده، در محیط کشت DMEM غوطه‌ور شدند.

در این پژوهش از سلول‌های بنیادی کارسینوما جینی (رده P19) استفاده شد. این سلول‌ها به صورت کشت چسبده از بانک سلولی انسیتو پاستور تهران تهیه و تکثیر شدند. سلول‌ها با چگالی اولیه ۵۰۰۰ سلول در هر محفظه، در یک صفحه ۲۴ محفظه‌ای (TCPS) در معرض محیط کشت حاوی نمونه‌ها قرار گرفتند. در فواصل زمانی صفر، ۲۴، ۷۲ و ۹۶ ساعت بعد از کشت، آزمون MTT به منظور ارزیابی زیست‌پذیری (میزان بقا) سلول‌ها انجام شد. در هر نقطه زمانی، پس از تخلیه مدیوم و شستشو با PBS، حدود ۴۰۰ میکرولیتر مدیوم همراه با ۴۰ میکرولیتر محلول MTT (۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر) به هر چاهک کشت اضافه شد. سپس به مدت ۴ ساعت در انکوباتور در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد نگهداری شد. سپس مدیوم به آرامی تخلیه شد و به منظور انحلال فرمازان، ۲۰۰ میکرو لیتر دی متیل سولفوکساید (DMSO) (Dimethylsulfoxide, Merck) به چاهک افزوده شد. جذب

نوری در طول موج ۵۷۰ نانومتر خوانده شد. روند مشابهی نیز برای سلول‌های بنیادی در محیط کشت بدون نمونه‌های داربست به‌عنوان نمونه کنترل مثبت انجام شد. از آزمون واریانس یک طرفه (ANOVA) برای بررسی نتایج بهره گرفته شد ($p < 0.05$).

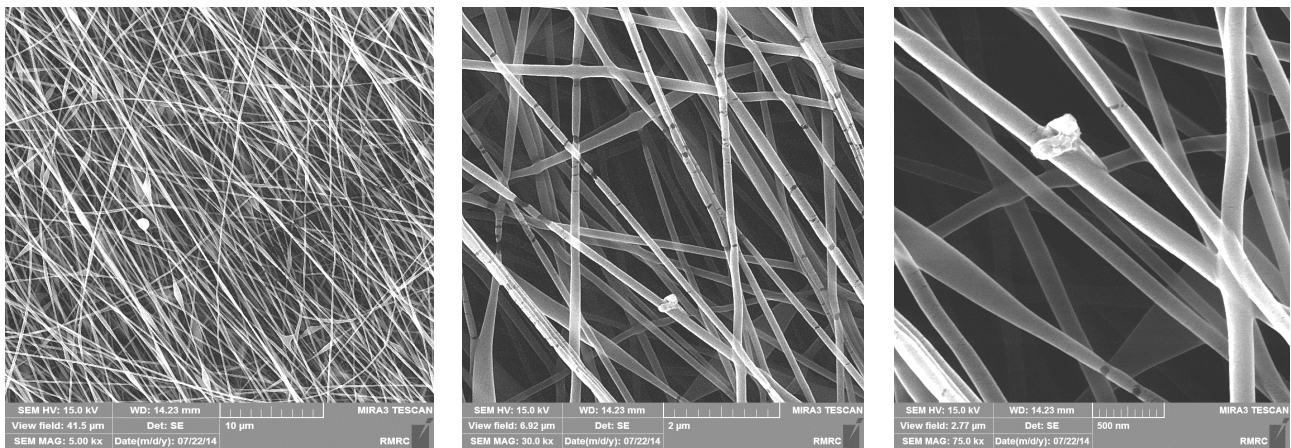
۳- تجزیه و تحلیل داده‌ها

۳-۱- ارزیابی نانو الیاف کیتوسان/ پلی وینیل الکل / نانولوله کربنی (CS/PVA/CNT) و کیتوسان/ پلی وینیل الکل / نانولوله کربنی (CS/PVA/CNT/BG) به کمک

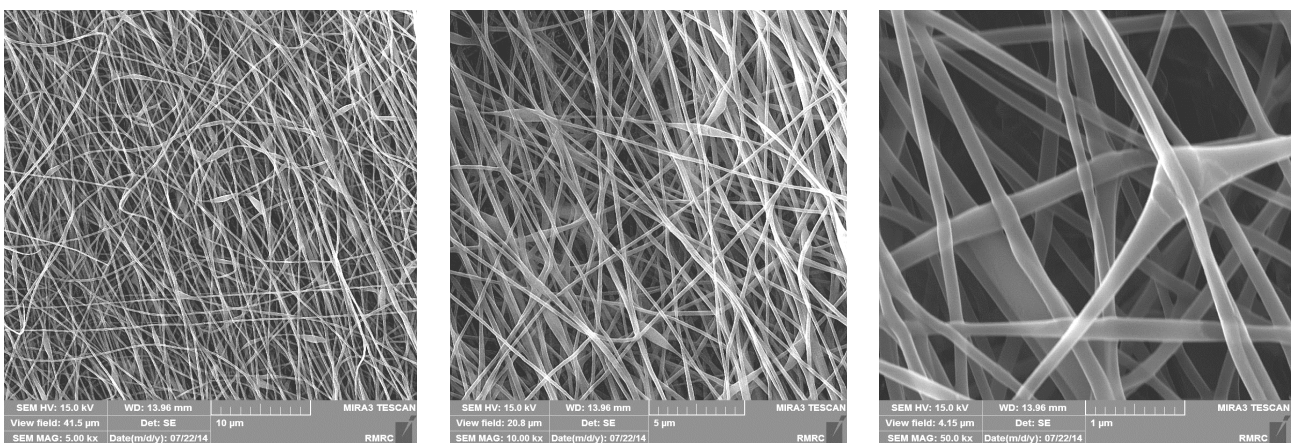
میکروسکوپ الکترونی روبشی گسیل میدانی (FESEM)

شکل‌های ۱ و ۲ تصاویر گرفته شده به کمک میکروسکوپ الکترونی گسیل میدانی از نانو الیاف اتصال عرضی نشده و اتصال عرضی شده نمونه داربست کامپوزیتی الکترونیسی شده کیتوسان/ پلی وینیل الکل / نانولوله کربنی را نشان می‌دهند. اندازه نانومتری الیاف رسیده شده در تصاویر میکروسکوپی به خوبی دیده می‌شود. قطر الیاف از ۸۰ تا ۲۵۰ نانومتر متغیر است. شکل و ظاهر الیاف اتصال عرضی شده، انسجام و پیوستگی ساختار نهایی را تأیید می‌کند. این امر، لزوم ایجاد اتصالات عرضی را در حصول خواص مکانیکی حداکثری نشان می‌دهد.

شکل‌های ۳ و ۴ تصاویر گرفته شده به کمک میکروسکوپ الکترونی گسیل میدانی از نانو الیاف اتصال عرضی نشده و اتصال عرضی شده نمونه داربست کامپوزیتی الکترونیسی شده کیتوسان/ پلی وینیل الکل / نانولوله کربنی / شیشه زیست فعال را نشان می‌دهند. تصور بر این است که دانه‌های بسیار ریز سفید رنگ، نانوذرات شیشه زیست فعال باشند. نتایج حاصل از میکروسکوپ الکترونی گسیل میدانی بیانگر تشکیل ساختارهای پیوسته و یکنواخت نانو کامپوزیت‌های کیتوسان/ پلی وینیل الکل / نانولوله کربنی و کیتوسان/ پلی وینیل الکل / نانولوله کربنی / شیشه زیست فعال است که فاقد دانه بوده و قطر تقریباً یکسانی دارند. این نتیجه تأیید کننده این مطلب است که



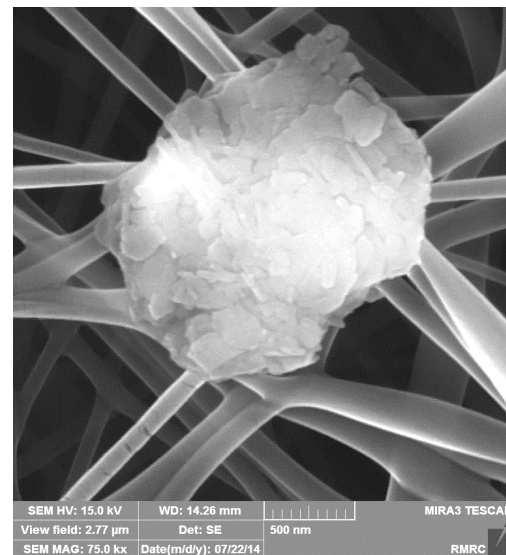
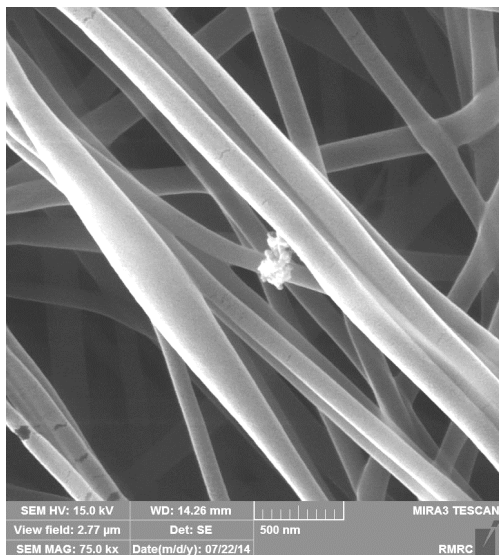
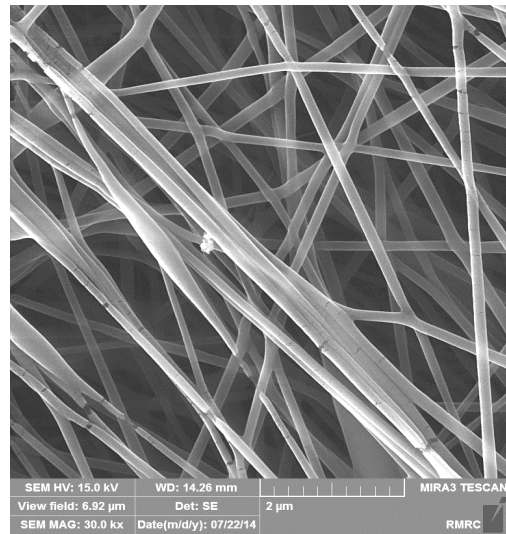
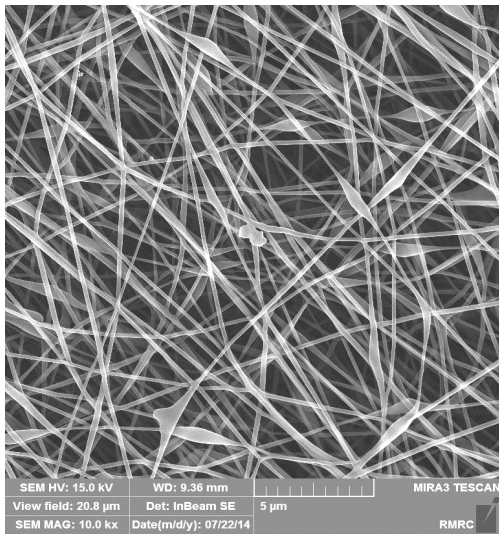
شکل ۱- تصاویر میکروسکوپ الکترونی گسیل میدانی از نمونه داربست نانوکامپوزیتی الکترونیسی شده کیتوسان/ پلی وینیل الکل / نانولوله کربنی اتصال عرضی نشده در بزرگ‌نمایی‌های مختلف



شکل ۲- تصاویر میکروسکوپ الکترونی گسیل میدانی از نمونه داربست نانوکامپوزیتی الکترونیسی شده کیتوسان/ پلی وینیل الکل / نانولوله کربنی اتصال عرضی شده در بزرگ‌نمایی‌های مختلف

به دلیل تورم نانو الیاف در طی فرایند اتصال عرضی بخار گلووتارآلدئید است. از این امر می‌توان نتیجه گرفت تخلخل نانو الیاف بعد از اتصال عرضی کاهش یافته است. این رفتار احتمالاً به دلیل همان افزایش قطر الیاف بعد از اتصال عرضی است که منجر به کاهش حجم حفره به مقدار اندک در ساختار الیاف می‌شود. هم‌چنین افزایش نسبت بیش‌تر پلی وینیل الکل نسبت به کیتوسان در زمینه کامپوزیتی در داربست‌ها، میزان زیست‌پذیری سلول را افزایش می‌دهد. گفتنی است که هیچ‌گونه تفاوت معناداری بین داربست‌ها با نسبت‌های مختلف کیتوسان به پلی وینیل الکل مشاهده نشده است [۲۰].

غلظت‌های انتخاب شده دارای گرانروی کافی است و هم‌چنین زنجیره‌های پلیمری موجود در هر دو نوع کامپوزیت درگیری خوبی با یکدیگر دارند و ترکیب یکنواختی در تمامی اجزاء کامپوزیت ایجاد شده است. عدم تشکیل دانه در نانوالیاف نیز به همین دلیل است. با توجه به تصاویر میکروسکوپ الکترونی از نانو الیاف بعد از اتصال عرضی با بخار گلووتارآلدئید و هم‌چنین افزودن شیشه زیست فعال، شکل نانوالیاف به‌طور محسوسی تغییر نکرده است. تنها اندکی افزایش قطر در نانوالیاف اتصال عرضی شده در هر دو نوع از نمونه‌ها به وجود آمده است. افزایش قطر لیف بعد از اتصال عرضی احتمالاً

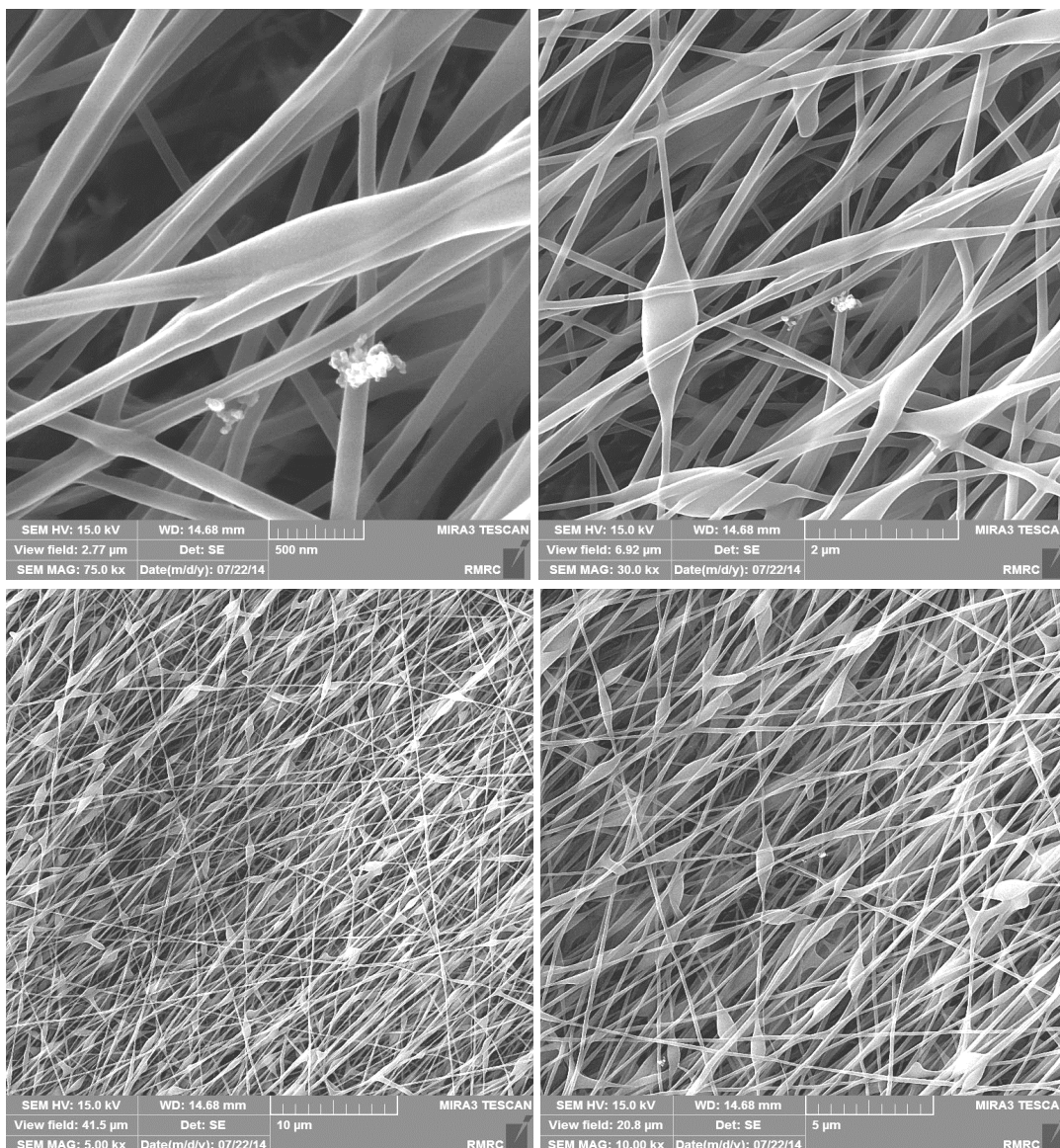


شکل ۳- تصاویر میکروسکوپ الکترونی گسیل میدانی از نمونه داربست نانوکامپوزیتی الکتروزیسی شده کیتوسان/ پلی وینیل الکل/ نانولوله کربنی/ شیشه زیست فعال اتصال عرضی نشده در بزرگ‌نمایی‌های مختلف

۲-۲- ارزیابی آزمون سنجش خواص مکانیکی

در شکل ۵ نمودارهای تنش- کرنش هر سه ترکیب کامپوزیتی نشان داده شده است. میزان تغییر استحکام کششی نمونه‌ها با افزودن درصدهای مختلف نانوذرات شیشه زیست فعال به خوبی قابل مشاهده است. حضور نانوذرات شیشه زیست فعال در ساختار داربست، از یک سو باعث افزایش فعالیت زیستی داربست و از سوی دیگر باعث تغییر در خواص مکانیکی آن خواهد شد. همان‌طور که نتایج نیز نشان می‌دهد، انعطاف پذیری

داربست در حضور ذرات شیشه اندکی کاهش و استحکام کششی آن اندکی افزایش یافته است. تأثیر نانوذرات شیشه در مقادیر مختلف متفاوت خواهد بود. با بررسی و مقایسه نمودارهای حاصله از سنجش خواص مکانیکی در نانوکامپوزیت کیتوسان/ پلی وینیل الکل/ نانولوله کربنی/ شیشه زیست فعال با ۵ و ۱۰ درصد وزنی می‌توان نتیجه گرفت که کامپوزیت دارای ۵ درصد وزنی شیشه زیست فعال، خواص مکانیکی بهتری نسبت به کامپوزیت



شکل ۴- تصاویر میکروسکوپ الکترونی گسیل میدانی از نمونه داربست نانوکامپوزیتی الکتروریسی شده کیتوسان/ پلی وینیل الکل/ نانولوله کربنی/ شیشه زیست فعال اتصال عرضی شده در بزرگنمایی‌های مختلف

۳-۳- تأثیر داربست نانوکامپوزیتی بر رشد و تکثیر

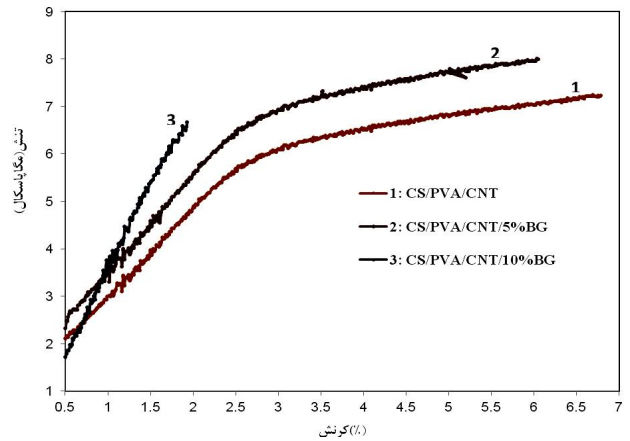
سلول‌های بنیادی (ارزیابی به روش MTT)

شکل‌های ۶ و ۷ نتایج آزمون MTT و میزان تکثیر، تراید و رشد سلول‌های بنیادی را در تماس با داربست‌های نانوکامپوزیتی کیتوسان/ پلی وینیل الکل/ نانولوله کربنی و کیتوسان/ پلی وینیل الکل/ نانولوله کربنی/ شیشه زیست فعال نشان می‌دهند. نتیجه‌ای که در نگاه اول می‌توان گرفت، رشد و افزایش تکثیر سلولی با گذشت زمان است که در مورد نمونه شاهد و هر

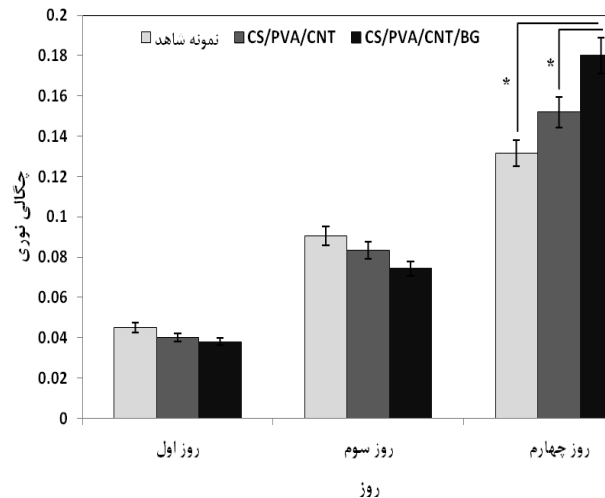
دارای ۱۰ درصد وزنی نانوذرات شیشه دارد، به‌طوری که در مقادیر بالاتر از ۵ درصد وزنی خواص مکانیکی داربست افت پیدا می‌کند. بنابراین می‌توان نتیجه گرفت که ۵ درصد وزنی شیشه زیست فعال درصد بهینه و مطلوب برای داربست مورد نظر است. به هر حال وجود این ذرات در ساختار داربست، ضمن ایجاد خاصیت زیست فعالی، خواص مکانیکی را نیز اندکی تحت تأثیر قرار داده است.

دو نمونه کامپوزیتی به وضوح مشاهده می‌شود. در روزهای اول و سوم تفاوت معنی‌داری میان تعداد سلول‌ها در نمونه‌های مختلف وجود نداشت (شکل‌های ۶ و ۷). تأثیر مستقیم داربست‌های نانوکامپوزیتی کیتوسان/ پلی وینیل الکل / نانولوله کربنی و کیتوسان/ پلی وینیل الکل / نانولوله کربنی / شیشه زیست فعال بر رشد و تکثیر سلول‌ها در روز چهارم به خوبی قابل مشاهده است. پس از گذشت چهار روز، تکثیر و رشد سلول‌های بنیادی بر روی داربست کیتوسان/ پلی وینیل الکل / نانولوله کربنی بیشتر از نمونه شاهد بود ($P < 0.05$). فراهم شدن یک بستر مناسب برای رشد سلول‌ها، مهمترین مؤثرترین دلیل افزایش رشد سلول‌ها در حضور داربست است. نتیجه جالب توجه این پژوهش، افزایش رشد و زیستایی سلول‌های بنیادی روی داربست دارای نانوذرات شیشه زیست فعال است. نتایج به خوبی نشان می‌دهد که تکثیر و زیستایی سلول‌های بنیادی در تماس با داربست نانوکامپوزیتی کیتوسان/ پلی وینیل الکل / نانولوله کربنی / شیشه زیست فعال از نمونه داربست نانوکامپوزیتی کیتوسان/ پلی وینیل الکل / نانولوله کربنی نیز بیشتر است. این برتری، به دلیل حضور نانوذرات شیشه زیست فعال در ترکیب کامپوزیت است. افزایش رشد سلولی در تماس با ذرات شیشه زیست فعال در پژوهش‌های پیشین نیز نشان داده شده است [۱۳، ۱۶، ۱۷، ۲۱-۲۳].

متقی طلب و همکاران [۲۴] در سال ۲۰۰۹ و برای اولین بار در ایران، داربست کامپوزیتی کیتوسان/ پلی وینیل الکل / نانولوله کربنی را برای مهندسی بافت عصب معرفی کردند. رشد سلول‌های عصبی طبیعی مشتق از مغز انسان نیز روی داربست‌های تهیه شده بررسی و تأیید شد. پس از آن، لیائو و همکاران [۲۵] در سال ۲۰۱۱ داربست کامپوزیتی کیتوسان/ پلی وینیل الکل / نانولوله کربنی را به روش الکتروریسی ساختند. آن‌ها نشان دادند که سلول‌های L929 پاسخ و واکنش مناسبی به زمینه داربست از خود نشان می‌دهند. هم‌چنین تکثیر سلولی روی داربست‌های دارای نانولوله‌های کربنی بیشتر از داربست‌های بدون نانولوله بود. پژوهش حاضر ضمن تأیید



شکل ۵- نمودار تنش - کرنش نمونه داربست‌های نانوکامپوزیتی الکتروریسی شده: ۱: کیتوسان/ پلی وینیل الکل / نانولوله کربنی، ۲: کیتوسان/ پلی وینیل الکل / نانولوله کربنی / ۵ درصد وزنی شیشه زیست فعال و ۳: کیتوسان/ پلی وینیل الکل / نانولوله کربنی / ۱۰ درصد وزنی شیشه زیست فعال

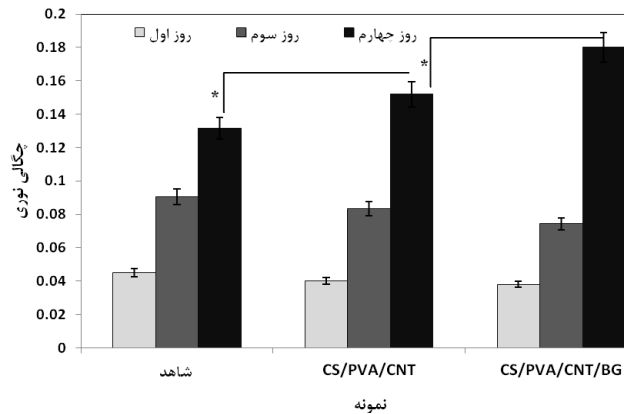


شکل ۶- مقایسه رشد سلول‌های بنیادی جنینی در سه بازه زمانی روی داربست‌های نانوکامپوزیتی کیتوسان/ پلی وینیل الکل / نانولوله کربنی و کیتوسان/ پلی وینیل الکل / نانولوله کربنی / شیشه زیست فعال. میانگین زیستایی سلولی (جذب نوری) و مقدار انحراف معیار در فواصل زمانی مختلف نشان داده شده است ($n=3$ و $p\text{-value} < 0.05$). علامت * نشان دهنده اختلاف معنادار میان دو گروه است.

فعالی، خواص مکانیکی را نیز اندکی تحت تأثیر قرار داده است. این نتیجه با نتایج سایر پژوهشگران نیز مطابقت دارد [۲۱-۲۳]. بررسی سازگاری زیستی داربست‌ها با سلول‌های بنیادی کارسینومای جنینی (رده P19) از این جهت حائز اهمیت است که در بسیاری از موارد، از داربست‌های مهندسی بافت عصب در جایی استفاده می‌شود که سلول‌های عصبی وجود ندارند و سلول‌های اولیه و بنیادی عصب نیاز به تکثیر و رشد دارند تا در مراحل بعدی به سلول‌های عصبی متمایز شوند [۲۶].

۴- نتیجه‌گیری

در این پژوهش نانوالیاف پلیمری کیتوسان/پلی وینیل الکل به روش الکترورسی تهیه شد. از نانولوله‌های کربنی و نانوذرات شیشه زیست فعال به عنوان اجزای تقویت کننده خواص زیستی و مکانیکی نانوکامپوزیت بهره گرفته شد. تصاویر میکروسکوپ الکترونی، حصول نانوالیاف کامپوزیتی را تأیید نمود. هم‌چنین نشان داده شد که نانوالیاف کامپوزیتی با ۵ درصد وزنی نانوذرات شیشه زیست فعال بیشترین استحکام کششی را داشت. افزون بر این تکثیر و زیستایی سلول‌های بنیادی کارسینومای جنینی (رده P19) در تماس با داربست‌های حاوی نانوذرات شیشه زیستی بیش‌تر از داربست‌های بدون شیشه بود. نتایج این پژوهش نشان داد داربست نانوکامپوزیتی الکترورسی شده کیتوسان/پلی وینیل الکل/نانولوله کربنی/شیشه زیست فعال می‌تواند ضمن تأمین خواص مکانیکی مناسب، بستر مناسب برای رشد سلولی را نیز فراهم کند و به‌طور بالقوه گزینه‌ای بسیار مناسب برای استفاده در مهندسی بافت عصب باشد.



شکل ۷- مقایسه رشد سلول‌های بنیادی جنینی روی داربست‌های نانوکامپوزیتی کیتوسان/ پلی وینیل الکل/ نانولوله کربنی و کیتوسان/ پلی وینیل الکل/ نانولوله کربنی/ شیشه زیست فعال. میانگین زیستایی سلولی (جذب نوری) و مقدار انحراف معیار در فواصل زمانی مختلف نشان داده شده است (n=۳ و p-value < ۰/۰۵). علامت * نشان‌دهنده اختلاف معنادار میان دو گروه است.

نتایج فوق، نشان داد که وجود نانو ذرات شیشه زیست فعال در داربست، ضمن افزایش استحکام کششی داربست‌ها، تکثیر و زیستایی سلولی را بازمه افزایش می‌دهد. حضور نانوذرات شیشه زیست فعال در ساختار داربست، از یک سو باعث افزایش فعالیت زیستی داربست و از سوی دیگر باعث تغییر در خواص مکانیکی آن خواهد شد. همان‌طور که نتایج نیز نشان داد، انعطاف پذیری داربست در حضور ذرات شیشه اندکی کاهش و استحکام فشاری آن افزایش یافته است. تأثیر ذرات شیشه در مقادیر مختلف متفاوت خواهد بود. به هر حال وجود این ذرات در ساختار داربست، ضمن ایجاد خاصیت زیست

واژه‌نامه

- | | | |
|---------------------------|--------------------|--------------------|
| 1. tissue engineering | 4. chitosan | 7. osteoblasts |
| 2. central nervous system | 5. carbon nanotube | 8. bioactive glass |
| 3. Poly Vinyl Alcohol | 6. non-woven | 9. electrospinning |

مراجع

1. Tresco, P.A., *Tissue Engineering Strategies for Nervous System Repair*, pp. 349-363, Progress in

Brain Research, Elsevier Science B.V, New York, 2000.

2. Li, W.J., Shanti, R.M. and Tuan, R.S., "Electro Spinning Technology for Nanofibrous Scaffold in Tissue Engineering", *Cell Biology*, Vol. 45, pp. 136-177, 2007.
 3. Thomson, R.C., Shung, A.K., Yaszemski, M.J. and Mikos, A.G., "Polymer Scaffold Processing", in *Principles of Tissue Engineering*, Editors: Lanza R.P, Langer R. and Vacanti J.P., San Diego, Academic Press, Vol. 23, pp. 251-261, 2000.
 4. Lee, J.S., Choi, K.H., Ghim, H.D., Kim, S.S., Chun, D.H., Kim, H.Y. and Lyoo, W.S., "Role of Molecular Weight of Atactic Poly (Vinyl Alcohol) (PVA) in Structure and Properties of PVA Nanofabric Prepared by Electrospinning", *Journal of Applied Polymer Science*, Vol. 93, pp. 1638-1646, 2004.
 5. Naebe, M., Lin, T., Tian, W., Dai, L. and Wang, X., "Effect of MWNT Nanofillers on Structure and Properties of PVA Electrospun Nanofibres", *Nanotechnology*, Vol. 18, pp. 1-8, 2007.
 6. Jayakumar, R., New, N., Tokura, S. and Tamura, H., "Sulfated Chitin and Chitosan as Novel Biomaterials", *International Journal of Biology Macromolecule*, Vol. 40, No. 3, pp. 175-181, 2007.
 7. Khora, E. and Young, L., "Implantable Application of Chitin and Chitosan", *Journal of Biomaterials*, Vol. 24, pp. 2339-2349, 2003.
 8. Sotiropoulou, S. and Chaniotakis, N.A., "Nanotube Biosensors", *Anal. of Bioanalytical Chemistry*, Vol. 375, pp. 103, 2003.
 9. Jie, M., Li, S., Jie, M., Hua, K., Guangjin, Z., Chaoying, W., Lianghua, X., Sishen, Xand, Haiyan, X., "Using single-walled Carbon Nanotubes Nonwoven Films as Scaffolds to Enhance Long-Term Cell Proliferation In Vitro", *Journal of Biomedical Materials Research*, Vol. 2, pp. 298-306, 2005.
 10. Zanello, L., Zhao, B., Hu, H. and Haddon, C.R., "Bone Cell Proliferation on Carbon Nanotubes", *Nano Letters*, Vol. 2, pp. 32-41, 2006.
 11. Julian, H.G., Milo, M.S. and Molly, M.S., "Nanofibrous Materials for Tissue Engineering", *Journal of Experimental Nanoscience*, Vol. 1, pp. 1-8, 2006.
 12. Zhang, X., Prasad, S., Niyogi, S., Ozkan, M. and Ozkan, C.S., "Guided Neurite Growth on Patterned Carbon Nanotubes", *Nanotechnology*, Vol. 14, pp. 304-307, 2005.
 13. Fathi, M.H., Doostmohammadi, A., "Preparation and Characterization of Sol-Gel Bioactive Glass Coating for Improvement of Biocompatibility of Human Body Implant", *Materials Science and Engineering A*, Vol. 474, pp. 128-133, 2008.
 14. Jianli, L. and Xigeng, M., "Sol-Gel Derived Bioglass as a Coating Material for Porous Alumina Scaffolds", *Ceramics International*, Vol. 30, pp. 1781-1785, 2004.
 15. Silver, I.A., Deas, J. and Erecinska, M., "Interactions of Bioactive Glasses with Osteoblasts in Vitro: Effect of 45S5 Bioglass, and 58S and 77S Bioactive Glasses on Metabolism, Intracellular Ion Concentrations and Cell Viability", *Biomaterials*, Vol. 22, pp. 175-185, 2001.
 16. Rahaman, M.N., Day, D.E., Bal, B.S., Fu, Q., Jung, S.B., Bonewald, L.F. and Tomsiac, A.P., "Bioactive Glass in Tissue Engineering", *Acta Biomateriala*, Vol. 7(6), pp. 2355-2373, 2011.
 17. Hench, L.L. and Greenspan, D., "Interactions between Bioactive Glass and Collagen: A Review and New Perspectives", *Journal of the Australian Ceramic Society*, Vol. 49(2), pp. 1-40, 2013.
 18. Lee, T.C. and Niederer, P., "Scaffolds & Surfaces. In: Basic Engineering for Medics and Biologists", *An ESEM Primer on Engineering for Medicine*, Vol. 39, pp. 152-187, 2010.
 19. Sill, T.J. and Von Recum, H.A., "Electrospinning: Application in Drug Delivery and Tissue Engineering", *Biomaterials*, Vol. 29, pp. 1989-2006, 2008.
۲۰. متقی طلب، ف.، متقی طلب، و.، فرخی، م.، اسلامی فر، ع. و شکرگزار، م.، "بررسی زیست سازگاری نانو کامپوزیت کیتوسان/پلی وینیل الکل برای تکثیر سلول‌های عصبی"، *مجله علوم پزشکی مدرس: آسیب شناسی زیستی*، دوره ۱۲، شماره ۳: ص.ص. ۵۱-۶۰، پاییز ۱۳۸۸.
۲۱. کوهی، م.، مرشد، م.، ورشوساز، ژ. و فتحی، م.، "تهیه نانوالیاف کامپوزیتی پلی کاپرولاکتون/پلی اتیلن گلیکول حاوی نانوذرات شیشه زیست فعال و ارزیابی خواص مکانیکی و زیست فعالی"، *هشتمین کنفرانس ملی مهندسی نساجی ایران*، یزد، ۱۳۹۱.
۲۲. قمی، ح.، فتحی، م.ح. و ادریس، ح.، "تأثیر ترکیب شیمیایی بر روی خواص مکانیکی و زیست فعالی فوم‌های کامپوزیتی نانوساختار تولید شده از جنس هیدروکسی آپاتیت و شیشه زیست فعال"، *پنجمین همایش مشترک انجمن مهندسين متالورژی و جامعه ریختگی ایران*، ۱۳۹۱.
۲۳. کودهی، م.، قانع‌زاده، ف.، امیری، ا. و ایمانی فولادی، ع.، "ساخت و بهینه‌سازی کانال هدایت عصبی ژلاتین/نانوشیشه زیستی جهت ترمیم عصب محیطی"، *مجله علمی دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی درمانی همدان*، شماره ۲۱، ص.ص. ۳۳-۳۹، ۱۳۹۳.

۲۴. متقی طلب، ف.، متقی طلب، و.، فرخی، م.، امیرعلیان، ن.، اسلامی فر، ع. و شکرگذار، م.ح.، "ساخت نانوکامپوزیت کیتوزان/ پلی وینیل الکل - نانولوله کربنی برای ترمیم بافت عصبی"، *مجله علوم پزشکی مدرس: آسیب شناسی*، دوره ۱۲، شماره ۴، ص.ص. ۶۹-۵۹، ۱۳۸۸.

25. Liao, H., Qi, R., Shen, M., Cao, X., Guo, R., Zhang, Y. and Shi, X., "Improved Cellular Response on Multiwalled Carbon Nanotube-Incorporated Electrospun Polyvinyl Alcohol-Chitosan Nanofibrous Scaffolds", *Colloid and Surfaces B: Biointerfaces*, Vol. 84, pp. 528-535, 2011.

۲۶. آبنوسی، م.ح.، مهدیه نجفآبادی، م.، سلیمانی مهرنجانی، م.، مومنی، ح. و صفراآبادی، ف.، "ساخت داربست طبیعی از عصب سیاتیک و ارزیابی توانایی زیستی سلول‌های بنیادی مزانشیم مغز استخوان موش صحرائی کاشته شده بر روی آن"، *مجله علمی- پژوهشی سلول و بافت*، جلد ۱، شماره ۱، ص.ص. ۴۳-۵۲، ۱۳۸۹.