DOI: 10.22122/jims.v37i521.10746 Published by Vesnu Publications

مجله دانشکده پزشکی اصفهان سال سی و هفتم/شماره‌ی ۵۲۱/هفته‌ی اول خرداد ۱۳۹۸

تاریخ دریافت: ۱۳۹۷/۱۱/۲۷ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۸/۱/۲۱ تاریخ چاپ: ۱۳۹۸/۳/۱

مشخصه‌یابی داربست کامپوزیتی نانوالیاف پلی‌کاپرولاکتون/ ماتریکس خارج سلولی جهت کاربرد در مهندسی بافت

سحر قصوری[۱]، محسن ستایش‌مهر[۲]، اصغر طاهری کفرانی[۳]، پریسا دهقانی[۴]، علی والیانی[۵]

مقاله پژوهشی

چکیده

مقدمه: نانوالیاف الکتروریسی شده، پتانسیل قابل توجهی در افزایش کارآمدی مناسب داربست‌ها جهت مهندسی بافت غضروف نشان داده‌اند. افزودن ماتریکس بدون سلول به داربست‌های نانوالیاف به منظور شبیه‌سازی محیط خارج سلولی طبیعی در مهندسی بافت تأثیر مثبت دارد. هدف از انجام این مطالعه، الکتروریسی پلی‌کاپرولاکتون/ماتریکس خارج سلولی Poly(ε-caprolactone)/Extracellular matrix یا PCL/ECM) و بررسی رفتار مکانیکی و بیولوژیکی آن برای کاربرد در مهندسی بافت است.

روش‌ها: داربست‌های پلی‌کاپرولاکتون و پلی‌کاپرولاکتون/ماتریکس خارج سلولی با الکتروریسی شدن ۱۰ درصد وزنی/حجمی محلول پلی‌کاپرولاکتون و پلی‌کاپرولاکتون/ماتریکس خارج سلولی با حلال‌های دی‌کلرومتان و دی‌متیل سولفوکسید آماده شد. برای بررسی بقا و تکثیر سلول‌های بنیادی مشتق شده از بافت چربی انسان در داربست، از روش MTT استفاده شد. برای بررسی ریخت‌شناسی (Morphology)، پایداری و خواص سطح داربست از روش‌های میکروسکوپ الکترونی روبشی، آزمون استحکام کششی، جذب آب و اندازه‌گیری زاویه‌ی تماس استفاده شد.

یافته‌ها: در داربست الکتروریسی شده‌ی پلی‌کاپرولاکتون/ماتریکس خارج سلولی، میزان آب‌دوستی، جذب آب و استحکام کششی نسبت به داربست الکتروریسی شده‌ی پلی‌کاپرولاکتون افزایش معنی‌داری را نشان داد. میزان تخلخل در داربست PCL/ECM کاهش و قطر الیاف افزایش داشت. همچنین، زیستایی و تزاید سلول‌ها در داربست PCL/ECM در روز هفتم نیز افزایش معنی‌داری را نشان داد.

نتیجه‌گیری: نتایج این مطالعه، نشان داد که افزودن ماتریکس خارج سلولی به داربست پلی‌کاپرولاکتون، موجب بهینه شدن خواص داربست حاصل، جهت مهندسی بافت می‌شود.

واژگان کلیدی: مهندسی بافت، نانوالیاف، پلی‌کاپرولاکتون، ماتریکس خارج سلولی

ارجاع: قصوری سحر، ستایش‌مهر محسن، طاهری کفرانی اصغر، دهقانی پریسا، والیانی علی. **مشخصه‌یابی داربست کامپوزیتی نانوالیاف پلی‌کاپرولاکتون/ ماتریکس خارج سلولی جهت کاربرد در مهندسی بافت.** مجله دانشکده پزشکی اصفهان ۱۳۹۸؛ ۳۷ (۵۲۱): ۳۰۲-۲۹۶

مقدمه

بافت غضروف به علت ظرفیت بازسازی اندک و عدم خون‌رسانی، توانایی بازسازی کمی دارد. امروزه، مهندسی بافت رویکرد قابل قبولی را برای بیماران با نقص‌های غضروفی مختلف ارایه می‌دهد (۱). مهندسی بافت، در سه بخش سلول، داربست و عامل رشد متمرکز شده است. داربست یک ساختار سه بعدی برای رشد سلولی با حفظ عملکرد متمایز کنندگی آن را فراهم می‌کند. چندین ساختار زیست سازگار و زیست تخریب پذیر از جمله پلی‌لاکتیک اسید، پلی‌کاپرولاکتون، پلی‌گلیکولیک اسید، کلاژن I فیبرین و ماتریکس غضروف بدون سلول در مهندسی بافت غضروف به کار برده شده است (۲). ماتریکس غضروف بدون سلول، به دلیل ساختار منحصر به فرد متشکل از ترکیبات طبیعی غضروف، سازگاری قابل توجهی را

۱- دانشجوی کارشناسی ارشد، گروه علوم تشریح، دانشکده‌ی پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران
۲- دانشجوی دکتری، گروه مهندسی بافت، دانشکده‌ی فن‌آوری‌های نوین پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی ایران، تهران، ایران
۳- استادیار، گروه زیست‌فن‌آوری، دانشکده‌ی علوم و فن‌آوری نوین، دانشگاه اصفهان، اصفهان، ایران
۴- گروه زیست‌فن‌آوری، دانشکده‌ی علوم و فن‌آوری نوین، دانشگاه اصفهان، اصفهان، ایران
۵- استادیار، گروه علوم تشریح، دانشکده‌ی پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران
نویسنده‌ی مسؤول: علی والیانی
Email: valiani@med.mui.ac.ir

برای رشد کندروسیت‌ها نشان داده است (۳). این ماتریکس، باعث رشد، بقا و تمایز سلول‌ها می‌شود (۴).

به طور فرضی، ماتریکس غضروف بدون سلول ممکن است یک داربست کامل برای مهندسی بافت غضروف باشد. به کار بردن این ترکیب در داربست، می‌تواند باعث رشد و تمایز سلول‌ها با غضروف شود (۵). با توجه به خواص زیست سازگاری و زیست تخریب پذیری مناسب داربست‌های مصنوعی، امروزه استفاده‌ی بیشتری از آن‌ها می‌شود. پلی‌کاپرولاکتون، به عنوان یک پلی‌استر آلیفاتیک مصنوعی برای کاربردهای زیست پزشکی مورد تأیید Food and Drug Administration (FDA) قرار گرفته است (۶).

استفاده از سلول‌های بنیادی بافت چربی در بازسازی بافت آسیب دیده‌ی غضروف، به علت پتانسیل تمایزی کندروژنیک آن‌ها اهمیت بسیاری دارد (۷). تمایز سلول‌های بنیادی بافت چربی انسانی به رده‌ی کندروژنیک می‌تواند توسط داربست‌های نانوفیبری پلی‌کاپرولاکتون هدایت شود (۲). الیاف الکتروریسی شده، پتانسیل بالایی را به عنوان یک اصل برای ساخت داربست‌های مهندسی بافت، نشان داده‌اند (۸). علاوه بر این، ترکیب ماتریکس غضروف با پلیمر مصنوعی به روش الکتروریسی، فواید هر دو نوع مواد طبیعی و مصنوعی را در بر می‌گیرد. همچنین، خواص مکانیکی دلخواه را برای بافت فراهم می‌کند (۹). با این حال، تکنیک ساندویچ با استفاده از هیدروژل فیبرین و الیاف الکتروریسی منجر به نفوذ سلولی کامل در سراسر داربست و افزایش خواص مکانیکی می‌شود (۱۰-۹، ۱).

هدف از انجام این مطالعه، ساخت و ارزیابی داربست کامپوزیتی پلی‌کاپرولاکتون/ماتریکس غضروف الکتروریسی شده بود و زیستایی سلول‌های بنیادی مشتق از بافت چربی انسان بر روی آن مورد بررسی قرارگرفت.

روش‌ها

نحوه‌ی ساخت داربست هیبریدی پلی‌کاپرولاکتون/ماتریکس خارج سلولی:

پس از تهیه ی پودر غضروف از شرکت بافت ایرانیان، ابتدا آسیاب و سپس به ذرات نانو (۴۰۰ نانومتر) تبدیل شد. برای تهیه‌ی داربست، محلول پلیمری ۱۰ درصد وزنی/حجمی پلی‌کاپرولاکتون (Sigma, USA) با وزن مولکولی ۸۰/۰۰۰ در حلال دی‌کلرومتان حل شد و به مدت یک شبانه‌روز بر روی همزن مغناطیسی قرار داده شد. سپس، سوسپانسیون غضروف ۱ درصد در حلال دی‌متیل سولفوکسید (Sigma, USA)، به محلول پلیمری حاصل اضافه و به مدت ۲ ساعت بر روی همزن مغناطیسی قرار داده شد. آن گاه، تحت پارامترهای مختلفی نظیر ولتاژ ۱۸ کیلوولت، سرعت تزریق ۰/۵ میلی‌لیتر/ساعت و فاصله ی نوک سوزن تا جمع کننده ۱۲/۵ سانتی‌متر، فرایند الکتروریسی انجام گردید (۱۱).

بررسی آب‌دوستی داربست و تعیین زاویه‌ی تماس (Water contact angle):

برای انجام آزمون آب‌دوستی، داربست در اندازه‌ی ۲ × ۲ سانتی‌متر مربع تهیه و روی یک پایه‌ی نگهدارنده قرار داده شد. سپس، با دستگاه اتوماتیک (KSV Can 200, Finland) زاویه‌ی تماس بین قطره‌ی آب و خط تراز (Base line) در سمت راست و چپ قطره اندازه‌گیری شد. اگر زاویه ی θ بین خط تراز و قطره‌ی آب ۳۰-۰ درجه باشد، آب‌دوستی سطح نمونه زیاد و اگر بین ۹۰-۳۰ درجه باشد، آب‌دوستی نمونه متوسط و چنانچه بیشتر از ۹۰ درجه باشد آب‌دوستی نمونه کم است (۱۲).

بررسی میانگین جذب آب داربست:

برای بررسی میانگین جذب آب، داربست‌ها در ابعاد ۱ میلی‌متر مربع تهیه و وزن خشک آن‌ها اندازه‌گیری شد. سپس، به مدت ۲۴ ساعت داخل آب‌مقطر قرار داده شدند و پس از آن، نمونه‌ها با استفاده از کاغذ صافی خشک شدند و مقدار وزن تر آن باکمک ترازوی دیجیتال (ژاپن) سنجش و درصد جذب آب طبق رابطه ی زیر محاسبه گردید. در این رابطه، W معادل وزن تر داربست و W0 معادل وزن خشک داربست می‌باشد.

رابطه‌ی ۱) میانگین جذب آب نمونه = (W-W0/W0) × ۱۰۰

بررسی خصوصیات مکانیکی داربست:

به منظور بررسی تأثیر افزودن ماتریکس خارج سلولی بر خواص مکانیکی داربست پلی‌کاپرولاکتون با ماتریکس خارج سلولی و بدون ماتریکس خارج سلولی که با ضخامت یکسان الکتروریسی شدند، از مت‌های الکتروریسی شده، سه نمونه‌ی مستطیل شکل با ابعاد ۵ × ۳۰ میلی‌متر مربع بریده و از فویل آلومینیومی جدا شد. خواص مکانیکی این نمونه‌ها، با سرعت ۱ میلی‌متر/دقیقه و بارگذاری سلول (Load cell) ۲۰ نیوتن توسط دستگاه (Hounsfield, H25KS) مطابق با استاندارد ASTM D882 اندازه‌گیری شد و منحنی تنش-کرنش نمونه‌ها رسم گردید. منحنی تنش-کرنش کششی، از نشان دادن داده‌های استحکام کششی روی محور عمودی نمودار و نشان دادن درصد کشش روی محور افقی نمودار حاصل شد.

بررسی‌های ریخت‌شناسی و تعیین میانگین اندازه و درصد تخلخل داربست:

یکی از بهترین روش‌ها برای تعیین کیفیت نانوالیاف و بررسی خواص سطحی و اندازه‌گیری قطر الیاف، میکروسکوپ الکترونی روبشی (Scanning electron microscope یا SEM) است (۱۴). برای این کار، از میکروسکوپ الکترونی روبشی مدل EVO-ZEISS استفاده گردید. با استفاده از تصاویر میکروسکوپ الکترونی و نرم‌افزار Image-j (نسخه‌ی 1.44P)، میانگین اندازه‌ی قطر نانوالیاف و میانگین اندازه‌ی تخلخل‌ها محاسبه

گردید. همچنین، با به کارگیری نرم‌افزار Matlab (نسخه ی 7.8.0) درصد تخلخل داربست محاسبه شد و با استفاده از الگوریتم‌های موجود، تصاویر واکاوی گردید (۱۴).

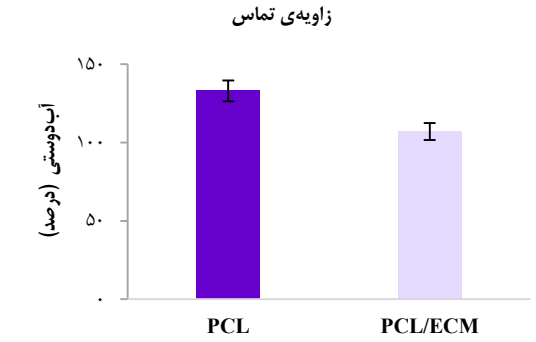
استخراج سلول‌های بنیادی از بافت چربی: بافت چربی زیر جلدی ناحیه‌ی شکم، از سه بیمار با رضایت کتبی به دست آمد و بعد از انتقال به آزمایشگاه کشت سلول و تحت شرایط استریل زیر هود کلاس II به قطعات چند میلی‌متری بریده شد و سپس، با محلول Phosphate buffered saline (PBS) (Sigma, USA) شستشو شد. سپس، آنزیم کلاژناز نوع I (Sigma, USA) به میزان ۱ میلی‌گرم به ازای هر گرم بافت چربی اضافه شد و در دمای ۳۷ درجه‌ی سانتی‌گراد به مدت ۵۰ دقیقه انکوبه گردید. پس از اطمینان از تجزیه‌ی کامل، آنزیم با محیط کشت Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) خنثی شد. سپس، محلول بافتی سانتریفیوژ شد و رسوب سلولی به دست آمده با محیط کشت ترکیب شده و در فلاسک‌های T25 منتقل و در انکوباتور ۳۷ درجه ی سانتی‌گراد با ۵ درصد CO_2 و رطوبت نسبی کشت داده شد. محیط کشت بعد از ۲۴ ساعت تعویض و پس از آن، هر سه روز یک بار انجام شد و از سلول‌های پاساژ سوم برای بررسی زیستایی سلولی استفاده گردید.

فرایند انجام روش 3-[4, 5-dimethylthiazol-2-yl]-2, 5- diphenyl Tetrazolium bromide (MTT): برای انجام این روش، محیط کشت چاهک‌های پلیت ۹۶ خانه حاوی داربست‌های محتوی سلول فیبرین/پلی‌کاپرولاکتون و فیبرین/پلی‌کاپرولاکتون/ماتریکس خارج سلولی، تخلیه و دو مرتبه با PBS شستشو داده شدند. سپس، به میزان ۱۵۰ میکرولیتر DMEM خالص به هر چاهک اضافه و ۱۵ میکرولیتر محلول MTT نیز اضافه شد. پلیت به مدت ۴ ساعت در انکوباتور CO_2 با دمای ۳۷ درجه‌ی سانتی‌گراد قرار داده شد. سپس، این مایع تخلیه و ۱۵۰ میکرولیتر دی‌متیل سولفوکسید (Sigma) به چاهک‌ها اضافه گردید و دو ساعت در تاریکی و دمای اتاق قرار داده شد. دی متیل سولفوکسید با حل کردن کریستال‌های فورمازان رنگ ارغوانی تولید می‌کند. در انتها، ۱۰۰ میکرولیتر از هرچاهک را به پلیت ۹۶ خانه منتقل و میزان جذب نوری (Optical density یا OD) با دستگاه Enzyme linked immunosorbent assay reader (ELISA reader) (Hyperion MPR4) و طول موج ۵۷۰ نانومترخوانده شد. این روش، در روزهای اول، سوم و هفتم برای دو گروه انجام و به صورت سه بار تکرار صورت گرفت (۱۵).

رابطه‌ی ۲) Viability (٪) = OD Treat/OD Control × ۱۰۰

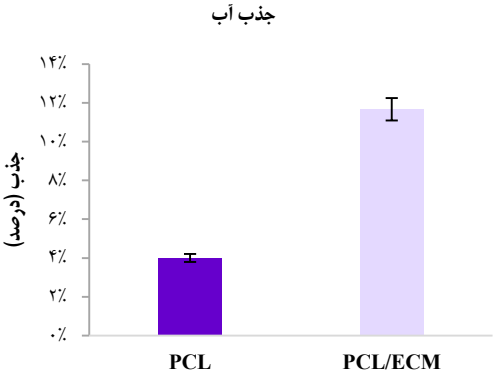
یافته‌ها

آب‌دوستی داربست با اندازه‌گیری زاویه‌ی تماس قطره‌ی آب با سطح نمونه محاسبه شد. این زاویه، برای داربست پلی‌کاپرولاکتون ۱۳۲ درجه و برای داربست پلی‌کاپرولاکتون/ماتریکس خارج سلولی ۱۰۷ درجه بود (شکل ۱).



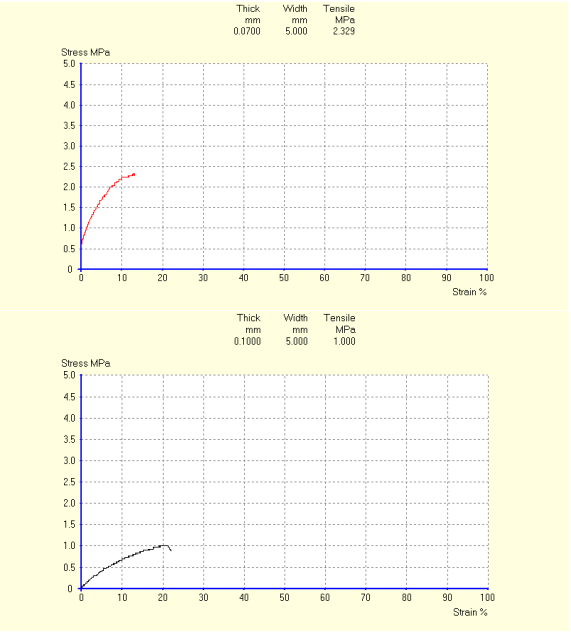
شکل ۱. میانگین زاویه‌ی تماس در داربست‌های Poly(ε-caprolactone) (PCL) و PCL/Extra cellular matrix (PCL/ECM)

میانگین جذب آب ۲۴ ساعته‌ی داربست پلی‌کاپرولاکتون ۴ درصد و داربست پلی‌کاپرولاکتون/ماتریکس خارج سلولی ۱۱/۷ درصد به دست آمد (شکل ۲).



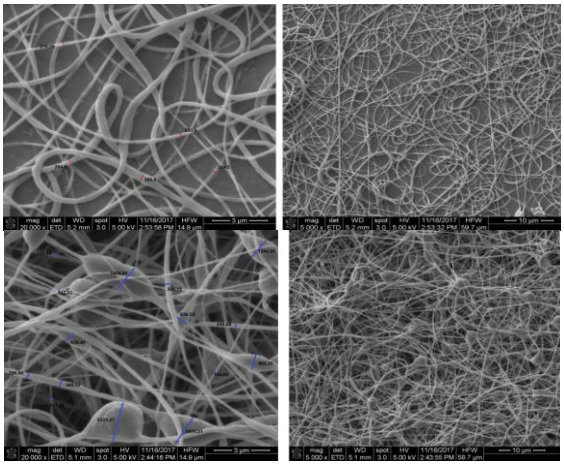
شکل ۲. میانگین جذب آب در داربست‌های Poly(ε-caprolactone) (PCL) و PCL/Extra cellular matrix (PCL/ECM)

مدول کشسانی (Elastic modulus) (مدول Young) در نمونه‌های حاوی ماتریکس خارج سلولی ۷۲/۶۳ مگاپاسکال و در نمونه‌های بدون ماتریکس ۲۴/۹۱ مگاپاسکال را نشان داد و استحکام کششی از ۰/۴۹ نیوتن در نمونه‌ی بدون ماتریکس خارج سلولی به ۰/۸۵ نیوتن در نمونه ی حاوی ماتریکس خارج سلولی افزایش یافت (شکل ۳).



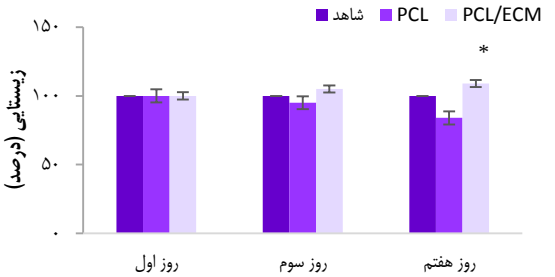
شکل ۳. میانگین استحکام مکانیکی در داربست‌های Poly(ε-caprolactone) (PCL) و PCL/Extra cellular matrix (PCL/ECM)

نتایج حاصل از تصاویر میکروسکوپ الکترونی نشان داد که میزان تخلخل و قطر الیاف به ترتیب برای داربست پلی کاپرولاکتون ۶۳ درصد و ۱۰۵ نانومتر و برای داربست پلی‌کاپرولاکتون/ ماتریکس خارج سلولی ۵۱/۱۷ درصد و ۲۶۵ نانومتر بود (شکل ۴).



شکل ۴. تصاویر میکروسکوپ الکترونی روبشی از داربست‌های Poly(ε-caprolactone) (PCL) و PCL/Extra cellular matrix (PCL/ECM) در دو بزرگنمایی ۵۰۰۰ × و ۲۰۰۰۰ ×

به منظور بررسی میزان فعالیت حیاتی یا زیستایی (Viability) و تکثیر (Proliferation) سلول‌های بنیادی پس از کاشت در داربست پلی‌کاپرولاکتون و ماتریکس خارج سلولی، روش MTT در روزهای اول، سوم و هفتم انجام شد. کشت تک لایه نیز به عنوان شاهد در نظر گرفته شد. بررسی نتایج در روز هفتم بیانگر این بود که اضافه نمودن ماتریکس حاصل از غضروف در داربست پلی‌کاپرولاکتون/ماتریکس خارج سلولی (۱۰۹ درصد) در مقایسه با داربست پلی‌کاپرولاکتون (۸۴ درصد) می‌باشد ($P < ۰/۰۵$) (شکل ۵).



شکل ۵. زیستایی داربست‌های Poly(ε-caprolactone) (PCL) و PCL/Extra cellular matrix (PCL/ECM) با روش MTT در روزهای اول، سوم و هفتم

* اختلاف معنی‌دار در گروه PCL/ECM نسبت به گروه PCL و شاهد در روز هفتم، $P < ۰/۰۵$

بحث

یکی از مهم‌ترین چالش‌هایی که در مهندسی بافت با آن روبه‌رو هستیم، استفاده از داربست مناسب است. پلی‌کاپرولاکتون، یک پلیمر مصنوعی است که ویژگی‌های مکانیکی ایده‌آل، اما میزان تخریب کمی دارد (۱۶). داربست الکتروریسی شده‌ی پلی‌کاپرولاکتون و ماتریکس غضروفی بدون سلول به عنوان یک داربست کامپوزیتی است که خواص مفید پلیمرهای مصنوعی و طبیعی را دارد. همچنین، این ذرات قادر به تسهیل تجزیه‌ی زیستی و سازگاری زیستی داربست می‌باشند (۱۳).

در مطالعه ی Xiao و همکاران، وجود ماتریکس غضروف باعث پایداری و افزایش تکثیر سلول ها شد (۱۷). نتایج آزمون MTT در مطالعه‌ی حاضر تأییدکرد که ترکیب نانوذرات غضروف به الیاف پلی‌کاپرولاکتون، موجب افزایش پایداری سلول‌ها و افزایش قابل توجهی در بقای سلول‌های بنیادی مشتق از بافت چربی در داربست‌های کامپوزیتی شده است که با مطالعه‌ی پیش‌گفته هم‌خوانی داشت و علت آن، وجود گلیکوزآمینوگلیکان و کلاژن نوع II در ماتریکس خارج سلولی غضروف بود که محیط مناسب و مشابه بدن را برای سلول‌ها فراهم کرد و توانست سلول‌ها را در محیط مناسبی حفظ کند.

Sreerekha و همکاران، از الیاف پلی‌کاپرولاکتون الکتروریسی شده استفاده کردند و داربستی با استحکام مکانیکی مناسب و تخلخل بالا ساختند که برای کاربردهای مهندسی بافت مناسب بود. یکی از

محدودیت‌های استفاده از پلی‌کاپرولاکتون در تولید بافت، مسأله‌ی آب‌گریزی آن است؛ چرا که داربست‌ها باید با سلول‌ها برهم‌کنش مثبت داشته باشند تا سبب افزایش عملکردهای چسبندگی، رشد، مهاجرت و تقسیم سلولی شوند. ایشان برای رفع مشکل آب‌گریزی داربست پلی‌کاپرولاکتون، از فیبرین استفاده کردند و نشان دادند که وجود فیبرین، باعث کاهش قابل توجه زاویه‌ی تماس و افزایش آب‌دوستی نمونه شد (۱۰).

نتایج حاصل از بررسی زاویه‌ی تماس، کاهش قابل توجه این زاویه را در داربست حاوی ذرات غضروف نشان داد. وجود ماتریکس غضروف در این مطالعه که حاوی گلیکوزآمینوگلیکان می‌باشد، همانند فیبرین باعث کاهش زاویه‌ی تماس و افزایش آب‌دوستی داربست شد. به طور کلی، در مهندسی بافت، داربستی که قابلیت خیس شدن بالایی داشته باشد، به علت تأثیر در چسبندگی اولیه و مهاجرت سلول‌ها اهمیت دارد (۱۸، ۱۰).

همچنین، مشاهده شد که داربست با نانوذرات غضروف توانایی جذب آب ۲۴ ساعته‌ی بیشتری دارد. در مطالعه‌ی Xiao و همکاران نیز که از ماتریکس غضروف استفاده کرده بودند، افزایش جذب آب داربست مشاهده شد و با یافته‌های مطالعه‌ی حاضر نیز هم‌خوانی داشت (۱۷). بنابراین، داربست‌های تشکیل شده از پلی‌کاپرولاکتون و ماتریکس غضروف، می‌توانند محیط کشت بیشتری را نسبت به داربست‌های مبتنی بر الیاف پلی‌کاپرولاکتون که در این مطالعه مورد بررسی قرار گرفته‌اند، حفظ کنند (۱۹). در این مطالعه، اختلاف در مدول Young بین دو نوع داربست مشاهده شد که ناشی از اختلافات در ویژگی های ترکیباتی است که در دو نوع داربست به کار رفته است و می‌تواند تأثیر پیوستن ذرات غضروف به الیاف پلی‌کاپرولاکتون را نشان دهد (۲۱-۲۰، ۸). نتایج این مطالعه نشان داد که این روش می‌تواند یک الگوی مناسب و امیدوار کننده‌ای را برای کشت سلولی و مهندسی بافت فراهم کند. همچنین، افزودن ماتریکس سلولی به داربست پلی‌کاپرولاکتون، موجب بهینه شدن خواص داربست حاصل، جهت مهندسی بافت می‌شود.

تشکر و قدردانی

این مقاله برگرفته از طرح پژوهشی به شماره‌ی ۳۹۶۵۲۱ می‌باشد. نویسندگان این مقاله از معاونت پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی اصفهان برای حمایت مالی از انجام این پژوهش تشکر و قدردانی می‌نمایند.

References

1. Xue J, Feng B, Zheng R, Lu Y, Zhou G, Liu W, et al. Engineering ear-shaped cartilage using electrospun fibrous membranes of gelatin/polycaprolactone. Biomaterials 2013; 34(11): 2624-31.
2. Holmes B, Fang X, Zarate A, Keidar M, Zhang LG. Enhanced human bone marrow mesenchymal stem cell chondrogenic differentiation in electrospun constructs with carbon nanomaterials. Carbon 2016; 97: 1-13.
3. Conconi MT, De Coppi P, Di Liddo R, Vigolo S, Zanon GF, Parnigotto PP, et al. Tracheal matrices, obtained by a detergent-enzymatic method, support in vitro the adhesion of chondrocytes and tracheal epithelial cells. Transpl Int 2005; 18(6): 727-34.
4. Bosnakovski D, Mizuno M, Kim G, Takagi S, Okumura M, Fujinaga T. Chondrogenic differentiation of bovine bone marrow mesenchymal stem cells (MSCs) in different hydrogels: influence of collagen type II extracellular matrix on MSC chondrogenesis. Biotechnol Bioeng 2006; 93(6): 1152-63.
5. Gong YY, Xue JX, Zhang WJ, Zhou GD, Liu W, Cao Y. A sandwich model for engineering cartilage with acellular cartilage sheets and chondrocytes. Biomaterials 2011; 32(9): 2265-73.
6. Eyrich D, Brandl F, Appel B, Wiese H, Maier G, Wenzel M, et al. Long-term stable fibrin gels for cartilage engineering. Biomaterials 2007; 28(1): 55-65.
7. Fang HW. Human acellular cartilage matrix powders as a biological scaffold for cartilage tissue engineering with synovium-derived mesenchymal stem cells. J Biomed Mater Res A 2014; 102(7): 2248-57.
8. Garrigues NW, Little D, Sanchez-Adams J, Ruch DS, Guilak F. Electrospun cartilage-derived matrix scaffolds for cartilage tissue engineering. J Biomed Mater Res A 2014; 102(11): 3998-4008.
9. He X, Feng B, Huang C, Wang H, Ge Y, Hu R, et al. Electrospun gelatin/polycaprolactone nanofibrous membranes combined with a coculture of bone marrow stromal cells and chondrocytes for cartilage engineering. Int J Nanomedicine 2015; 10: 2089-99.
10. Sreerekha PR, Menon D, Nair SV, Chennazhi KP. Fabrication of fibrin based electrospun multiscale composite scaffold for tissue engineering applications. J Biomed Nanotechnol 2013; 9(5): 790-800.
11. Gibson M, Beachley V, Coburn J, Bandinelli PA, Mao HQ, Elisseeff J. Tissue extracellular matrix nanoparticle presentation in electrospun nanofibers. Biomed Res Int 2014; 2014: 469120.
12. Rutledge GC, Fridrikh SV. Formation of fibers by electrospinning. Adv Drug Deliv Rev 2007; 59(14): 1384-91.
13. Neshati Z, Bahrami AR, Eshtiagh-Hosseini H, Matin MM, Housaindokht MR, Tabari T, et al. Evaluating the biodegradability of Gelatin/Siloxane/Hydroxyapatite (GS-Hyd) complex in vivo and its ability for adhesion and proliferation of rat bone marrow mesenchymal stem cells. Cytotechnology 2012; 64(5): 485-95.
14. Ghasemi-Mobarakeh L, Semnani D, Morshed M. A

novel method for porosity measurement of various surface layers of nanofibers mat using image analysis for tissue engineering applications. J Appl Polym Sci 2007; 106(4): 2536-42.

15. Esfandiary E, Valiani A, Hashemibeni B, Moradi I, Narimani M. The evaluation of toxicity of carbon nanotubes on the human adipose-derived-stem cells in-vitro. Adv Biomed Res 2014; 3: 40.

16. Chang KY, Hung LH, Chu IM, Ko CS, Lee YD. The application of type II collagen and chondroitin sulfate grafted PCL porous scaffold in cartilage tissue engineering. J Biomed Mater Res A 2010; 92(2): 712-23.

17. Xiao T, Guo W, Chen M, Hao C, Gao S, Huang J, et al. Fabrication and in vitro study of tissue-engineered cartilage scaffold derived from wharton's jelly extracellular matrix. Biomed Res Int 2017; 2017; 5839071.

18. Arima Y, Iwata H. Effect of wettability and surface functional groups on protein adsorption and cell adhesion using well-defined mixed self-assembled monolayers. Biomaterials 2007; 28(20): 3074-82.

19. Lien SM, Ko LY, Huang TJ. Effect of pore size on ECM secretion and cell growth in gelatin scaffold for articular cartilage tissue engineering. Acta Biomater 2009; 5(2): 670-9.

20. Accardi MA, McCullen SD, Callanan A, Chung S, Cann PM, Stevens MM, et al. Effects of fiber orientation on the frictional properties and damage of regenerative articular cartilage surfaces. Tissue Eng Part A 2013; 19(19-20): 2300-10.

21. Croisier F, Duwez AS, Jerome C, Leonard AF, van der Werf KO, Dijkstra PJ, et al. Mechanical testing of electrospun PCL fibers. Acta Biomater 2012; 8(1): 218-24.

DOI: *10.22122/jims.v37i521.10746* *Published by Vesnu Publications*

Journal of Isfahan Medical School **Vol. 37, No. 521, 1st Week, June 2019**

Received: 16.02.2019 Accepted: 10.04.2019 Published: 22.05.2019

Characterization of Poly(ε-Caprolactone)/Extracellular Matrix Nanofibers Composite Scaffold for Tissue Engineering

Sahar Ghosouri[1], Mohsen Setayeshmehr [2], Asghar Taheri-Kafrani[3], Parisa Dehghani[4], Ali Valiani[5]

Original Article

Abstract

Background: Electrospun nanofibers have shown significant potential as an origin for forming cartilage tissue engineering scaffolds. Acellular extracellular matrices have been incorporated into nanofiber scaffolds to more closely replicate the extracellular niche. The aim of this study was to investigate the electrospinning of poly(ε-caprolactone)/extracellular matrix (PCL/ECM) and its mechanical and biological behavior for tissue engineering.

Methods: PCL and PCL/ECM scaffolds were prepared via electrospinning of the 10% (w/v) solution contain PCL and PCL/ECM by dichloromethane (DCM) and dimethylsulfoxide (DMSO) solutions. The MTT technique was used to study the survival and proliferation of human adipose-derived stem cells in scaffold. The morphology, stability, and scaffold surface properties were studied using scanning electron microscopy, tensile strength test, water absorption, and contact angle measurement.

Findings: The PCL/ECM electrospinning scaffold showed significant increase in hydrophobicity, water absorption, and tensile strength compared to PCL electrospinning scaffold. The porosity and diameter of the fibers in the scaffold had a relative reduction. Moreover, the viability and proliferation of cells on the seventh day showed a significant increase.

Conclusion: The results of this study showed that adding extracellular matrix to PCL scaffold improves the properties of the scaffold for tissue engineering.

Keywords: Tissue engineering**,** Nanofiber**s,** Poly(sigma-caprolactone), Extracellular matrix

Citation: Ghosouri S, Setayeshmehr M, Taheri-Kafrani A, Dehghani P, Valiani A. **Characterization of Poly(ε-Caprolactone)/Extracellular Matrix Nanofibers Composite Scaffold for Tissue Engineering.** J Isfahan Med Sch 2019; 37(521): 296-302.

1- MSc Student, Department of Anatomical Sciences, School of Medicine, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, Iran
2- PhD Student, Department of Tissue Engineering and Regenerative Medicine, School of Advanced Technologies in Medicine, Iran University of Medical Sciences, Tehran, Iran
3- Assistant Professor, Department of Biotechnology, School of Advanced Sciences and Technologies, University of Isfahan, Isfahan, Iran
4- Department of Biotechnology, School of Advanced Sciences and Technologies, University of Isfahan, Isfahan, Iran
5- Assistant Professor, Department of Anatomical Sciences, School of Medicine, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, Iran
Corresponding Author: Ali Valiani, Email: valiani@med.mui.ac.ir