مجله دانشکده پزشکی اصفهان
سال سی و چهارم/شماره‌ی ۳۸۸/هفته‌ی چهارم مرداد ماه ۱۳۹۵

تاریخ دریافت: ۱۳۹۵/۲/۱۲
تاریخ پذیرش: ۱۳۹۵/۴/۲۰

تهیه‌ی داربست نانوالیاف فیبرین/پلی وینیل الکل به روش الکتروریسی جهت کاربرد در مهندسی بافت

علی والیانی[۱]، علی صمدی[۲]، بتول هاشمی بنی[۳]، محمد رفیعی‌نیا[۴]

مقاله پژوهشی

چکیده

مقدمه: امروزه، نانو کامپوزیت‌های پلیمری زیست تخریب پذیر، با دارا بودن خواص مکانیکی و زیست سازگاری مناسب، از اهمیت ویژه‌ای در مهندسی بافت برخوردار هستند. هدف از انجام این مطالعه، ساخت و ارزیابی داربست نانوکامپوزیتی فیبرین/پلی‌وینیل الکل به روش الکتروریسی و زیستایی سلولی بر روی آن می‌باشد.

روش‌ها: داربست نانو کامپوزیتی فیبرین/پلی‌وینیل الکل، با مقدار ۲۸/۵ درصد وزنی فیبرین نسبت به پلیمر، با روش الکتروریسی تهیه شد. درصد تخلخل داربست با استفاده از نرم‌افزار Matlab و شکل تخلخل‌ها، پراکندگی آن‌ها و اندازه‌ی نانوالیاف توسط میکروسکوپ الکترونی روبشی مشخص شدند. آزمون جذب آب و اندازه‌گیری زاویه‌ی تماس انجام شد. همچنین، برای ارزیابی زیستایی سلول بر روی داربست از سلول‌های بنیادی مشتق از چربی انسانی استفاده شد.

یافته‌ها: میانگین اندازه‌گیری قطر الیاف داربست فیبرین/پلی‌وینیل الکل الکتروریسی شده، ۵۰۰ نانومتر به دست آمد. متوسط اندازه‌ی تخلخل در نمونه‌ی تهیه شده ۷/۱ میکرومتر و تخلخل ۸۳/۸۱ درصد به دست آمد. همچنین، میانگین زاویه‌ی تماس ۳۱/۷۱ درجه و میانگین جذب آب ۲۴ ساعته، ۶۸/۵ درصد بود. آزمون بررسی زیستایی سلول اختلاف معنی‌داری را نسبت به گروه‌های شاهد نشان داد.

نتیجه‌گیری: با توجه به نتایج این مطالعه، می‌توان از داربست الکتروریسی شده‌ی فیبرین/پلی‌وینیل الکل در مهندسی بافت غضروف و عصب استفاده کرد.

واژگان کلیدی: نانوالیاف، فیبرین، الکتروریسی، داربست

ارجاع: والیانی علی، صمدی علی، هاشمی بنی بتول، رفیعی‌نیا محمد. **تهیه‌ی داربست نانوالیاف فیبرین/پلی وینیل الکل به روش الکتروریسی جهت کاربرد در مهندسی بافت.** مجله دانشکده پزشکی اصفهان ۱۳۹۵؛ ۳۴ (۳۸۸): ۷۴۴-۷۳۷

مقدمه

مهندسی بافت (Tissue engineering)، یک رویکرد چند رشته‌ای برای مشکل حیاتی پزشکی نوین و عرضه‌ی بافت و اندام برای پیوند است. در این روش درمانی، سعی برآن است که با ادغام علم مهندسی مواد و علوم زیستی، بافت یا اندامی کارآمد تولید شود تا بتوان از آن برای جایگزینی بافت‌ها یا اندام‌های آسیب دیده استفاده کرد. چالش‌های زیستی و فنی در مهندسی بافت، در سه بخش سلول، داربست و سیستم بیوراکتور متمرکز شده است. داربست در مهندسی بافت، به عنوان جایگزین محیط خارج سلولی عمل می‌کند و باید زیست سازگار (Biocompatible) و زیست تخریب پذیر (Biodegradable) باشد، ساختاری سه بعدی (3 Dimensional) ایجاد کند و امکان رشد و نفوذ سلول‌ها و جابه‌جایی گازها و مواد غذایی را فراهم کند. همچنین، توانایی جذب پروتئین‌ها و تجزیه‌ی سریع را بعد از عمل پیوند بافت داشته باشد تا بافت جدید بتواند به سرعت رشد کند (۲-۱).

داربست‌های به کار برده شده در مهندسی بافت، به عنوان زیر مجموعه‌ای از مواد زیستی در دو دسته‌ی طبیعی و مصنوعی قرار دارند. فیبرین، یکی از داربست‌های طبیعی است که مکانیزم منحصر به فرد پلیمریزه شدن آن، این امکان را فراهم می‌کند که زیر ساختی نرم در شرایط فیزیولوژیک شکل بگیرد. با کنترل زمان ژلاتینی شدن آن و همچنین، با ایجاد تنوع در شرایط واکنش بین فیبرینوژن و ترومبین، می‌توان خواص داربست را تغییر داد (۳).

۱- استادیار، گروه علوم تشریحی، دانشکده‌ی پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران
۲- دانشجوی کارشناسی ارشد، گروه علوم تشریحی، دانشکده‌ی پزشکی و کمیته‌ی تحقیقات دانشجویی، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران
۳- دانشیار، گروه علوم تشریحی، دانشکده‌ی پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران
۴- دانشیار، مرکز تحقیقات بیوسنسور، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران
نویسنده‌ی مسؤول: محمد رفیعی‌نیا
Email: rafie_med@yahoo.com

فیبرین، به عنوان یک داربست خوب و تطبیق پذیر برای تعداد زیادی از کاربردهای مهندسی بافت (کاربردهای قلبی- عروقی، کبد، پوست، استخوان و غضروف) استفاده شده است. برهم‌کنش بین سلول‌ها و ماتریکس خارج سلولی، پاسخ ضد التهابی، ترمیم زخم و رگ‌زایی، از خواص ذاتی فیبرین می‌باشد (۵-۴). فیبرین، همچنین به عنوان یک ماده‌ی پوشاننده‌ی عروق استفاده می‌شود و در عمل رگ‌زایی نقش دارد (۷-۶).

فیبرین، با وجود مزایای پیش‌گفته، دارای معایبی از جمله خواص مکانیکی ضعیف است که آن را برای کاربرد در مهندسی بافت به عنوان یک داربست ایده‌آل محدود می‌کند (۹-۸).

برای بهبود خواص داربست فیبرینی، می‌توان فیبرین را با کمک فرایند الکتروریسی (Electro spinning) به صورت نانوالیاف درآورد. مواد در اندازه‌ی نانو، خواص متفاوتی از خود نشان می‌دهند. با تبدیل فیبرین به نانوالیاف فیبرین، تخلخل داربست بیشتر می‌شود و باعث افزایش چسبندگی سلولی و همچنین، تبادل بهتر مواد بین سلول و محیط کشت یا مایع میان بافتی می‌گردد که انتظار می‌رود باعث افزایش زیستایی و تزاید سلول‌ها نسبت به داربست فیبرین شود. همچنین، داربست‌های تهیه شده به روش الکتروریسی، بعد از پیوند به صورت پویا (Dynamic) تغییر می‌کنند و به سلول‌ها، امکان ساخت ماتریکس بین سلولی و جابه‌جایی برای ساخته شدن کامل بافت جدید را می‌دهند. الکتروریسی، یک روش ساده و انعطاف پذیر برای تولید داربست‌های طبیعی و مصنوعی با قابلیت تغییر در قطر، جهت الیاف و تخلخل داربست می‌باشد که با تغییر در پارامترهای ریسندگی صورت می‌گیرد (۱۰).

امروزه، مزیت استفاده از نانوتکنولوژی در تولید الیاف نانو به واسطه‌ی دارا بودن خواص مهم و ویژه‌ای نظیر تراکم پایین، افزایش سطح به حجم و تخلخل بالا، بر کسی پوشیده نیست. پلی‌وینیل الکل (PVC یا Polyvinyl alcohol)، یک پلیمر مصنوعی است که از پلی‌وینیل استات طی فرایند هیدروکسی شدن جزیی یا کامل مشتق شده است. این پلیمر، زیست سازگار، محلول درآب و زیست تخریب پذیر می‌باشد. همچنین، غیر سمی و غیر حساسیت‌زا بودن آن، باعث کاربرد گسترده‌ی آن در مهندسی بافت و فرایند الکتروریسی شده است (۱۱، ۹).

در مطالعه‌ی Christman و همکاران، از داربست فیبرینی برای انتقال سلول‌ها به محل ضایعه‌ی قلبی در اثر سکته استفاده شد و نتایج رضایت‌بخشی به دست آمد (۱۲). Humphrey و همکاران، نشان دادند که فیبرین، تمایز سلول های تروفوبلاست انسانی را افزایش و آپوپتوز سلولی را کاهش می دهد (۱۳). Ravichandran و همکاران، داربست الکتروریسی شده‌ی فیبرین/پلی گلیسرول سباکیت را ساختند و از آن، برای مهندسی بافت میوکارد استفاده کردند و نتایج رضایت‌بخشی به دست آوردند (۱۴). بر اساس مطالعات Perumcherry و همکاران، نتایج قابل قبولی در الکتروریسی فیبرین و کشت سلول‌های بنیادی مشتق از بند ناف بر روی آن به دست آمد و پیشنهاد شد خواص مکانیکی داربست فیبرین تقویت شود (۱۵، ۸). در این پژوهش، ساخت و ارزیابی خواص داربست نانو کامپوزیتی فیبرین/پلی‌وینیل الکل به روش الکتروریسی انجام شد و زیستایی سلول‌های بنیادی مشتق از چربی انسانی بر روی آن مورد بررسی قرار گرفت.

روش‌ها

تهیه‌ی فیبرینوژن

برای تهیه‌ی فیبرینوژن، کیسه‌ی کرایو از سازمان انتقال خون ایران تهیه و به آزمایشگاه منتقل و پس از استریل شدن، محتویات آن که شامل فیبرینوژن است، به لوله‌ی فالکون ۵۰ سی‌سی منتقل شد و جهت استفاده در دمای ۲۰- درجه‌ی سانتی‌گراد نگهداری شد.

تهیه‌ی ترومبین

برای تهیه‌ی ترومبین، کیسه‌ی پلاسمای تازه منجمد شده (Fresh frozen plasma) به آزمایشگاه منتقل و استریل شد. محتویات آن (پلاسما) به فالکون‌های ۵۰ سی‌سی منتقل و به ازای هر فالکون، یک ویال ۱۰ سی‌سی آمپول گلوکونات کلسیم (سینا دارو، ایران) اضافه شد و به مدت ۹۰ دقیقه انکوبه گردید. سپس، با شتاب ۱۲۰۰ دور در دقیقه سانتریفیوژ و مایع رویی که حاوی ترومبین بود، استخراج و در دمای ۲۰- درجه‌ی سانتی‌گراد جهت استفاده نگهداری شد (۱۶).

تهیه‌ی محلول پلی‌وینیل الکل (PVA)

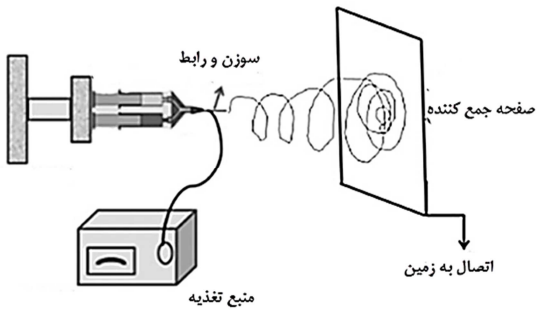
پودر پلی‌وینیل الکل (Merck73000w، آلمان) خریداری شد. پودر Polyvinyl alcohol (PVA) در مقادیر متفاوتی از آب آنالار (Milli-Q®) حل شد و غلظت‌های مختلف (۴، ۸، ۱۰ و ۱۲ درصد) وزنی/وزنی محلول، الکتروریسی و یکنواختی شکل الیاف زیر میکروسکوپ نوری (Olympus، ژاپن) بررسی شد. در نهایت، محلول ۱۲ درصد(وزنی/وزنی) که با حل کردن ۶ گرم پودر پلی‌وینیل الکل در ۴۴ گرم آب آنالار تهیه شده بود، به عنوان غلظت بهینه‌ی پلی‌وینیل الکل انتخاب شد و در ساخت داربست کامپوزیتی به کار رفت.

فرایند الکتروریسی داربست کامپوزیتی فیبرین/پلی‌وینیل الکل

برای استفاده از دستگاه الکتروریسی، نازل جدید و یک رابط شیشه‌ای به شکل حرف Y طراحی و ساخته شد. برای جلوگیری از واکنش زود هنگام (قبل از تشکیل نانوالیاف) بین فیبرینوژن و ترومبین، هر کدام از محلول‌ها بدون رقیق‌سازی و به صورت جداگانه و به مقدار

مساوی از هر کدام (۰/۸سی‌سی) در ۲ سی‌سی محلول پلی‌وینیل الکل (۱۲ درصد) ریخته شد و با همزن مغناطیسی به مدت ۳ ساعت همگن گردید. سپس، در دو سرنگ جداگانه کشیده شد. دو سرنگ با استفاده از رابط Y شکل، مطابق با شکل ۱، به هم متصل شد و یک سوزن با نوک صاف شده (18 Gauge) در انتهای رابط قرار گرفت.

جهت انجام الکتروریسی، فاصله‌ی سوزن تا صفحه‌ی جمع کننده، ۲۰-۱۰ سانتی‌متر و ولتاژ ۲۰۰۰۰-۱۵۰۰۰ ولت بود. سپس، نمونه‌های تهیه شده (نانو وب) جهت انجام شبکه کردن (Cross-link) به مدت ۳ ساعت داخل دسیکاتور همراه با ۱۰ سی‌سی از محلول گلوتار آلدهید (Merck، آلمان) ۲۵ درصد قرار گرفتند. بلافاصله پس از آن، نمونه‌ها داخل آون خلأ با دمای ۱۰۰ درجه‌ی سانتی‌گراد و فشار ۱۰ میلی‌بار قرار داده شدند. بعد از ۲۴ ساعت، نمونه‌ها از آون خارج و در یخچال در دمای ۴ درجه‌ی سانتی‌گراد نگهداری شدند.



شکل ۱. تصویر شماتیک فرایند الکتروریسی. دو سرنگ توسط یک رابط شیشه‌ای مشترک به یک سوزن وصل شده‌اند.

بررسی‌های ریخت‌شناسی و تعیین میانگین اندازه و درصد تخلخل داربست

یکی از بهترین روش ها برای مشاهده و مطالعه‌ی مورفولوژی نانوالیاف، بررسی خواص سطحی و اندازه گیری قطر الیاف، میکروسکوپ الکترونی روبشی (Environmental scanning electron microscope یا SEM) است. حتی با وجود ابداع تکنیک‌های جدید آنالیز تصویر، می‌توان اندازه‌ی تخلخل و درصد تخلخل داربست را با پردازش تصاویر حاصل از میکروسکوپ الکترونی تعیین نمود (۱۷). برای شناسایی و مشاهده‌ی الیاف الکتروریسی شده از میکروسکوپ الکترونی روبشی (مدل XL,30) ساخت شرکت Philips هلند استفاده شد. نمونه‌ها قبل از تهیه‌ی تصویر با لایه‌ی نازکی از طلا پوشش داده شدند. سپس، با استفاده از تصاویر میکروسکوپ الکترونی، میانگین اندازه‌ی قطر نانو الیاف و میانگین اندازه‌ی تخلخل‌ها، از نرم‌افزار Image-j (نسخه‌ی 1.44P) و برای محاسبه‌ی درصد تخلخل داربست، از نرم‌افزار Matlab (نسخه‌ی 7.8.0) استفاده شد و با استفاده از الگوریتم‌های موجود، آنالیز تصاویر انجام شد (۱۸).

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

برای انجام آزمون آب‌دوستی، داربست در اندازه‌ی ۱۲ میلی‌متر مربع بریده و روی یک پایه‌ی نگه دارنده، قرار داده شد. سپس، با دستگاه اتوماتیک (Pendent drop IFT measurement apparatus-CA-ES10) اندازه‌گیری زاویه تماس انجام گرفت و زاویه‌ی بین قطره‌ی آب و سطح تراز در سمت راست و چپ قطره، اندازه‌گیری شد. اگر زاویه‌ی θ بین خط تراز (Base line) و قطره‌ی آب بین ۳۰-۰ درجه باشد، آب‌دوستی سطح نمونه زیاد است. اگر زاویه‌ی θ بین ۹۰-۳۰ درجه باشد، آب‌دوستی نمونه متوسط و اگر زاویه‌ی θ بیشتر از ۹۰ درجه باشد، آب‌دوستی نمونه کم است (۱۰).

بررسی میانگین جذب آب داربست

برای بررسی میانگین جذب آب، داربست‌ها در ابعاد ۱ میلی‌متر مربع بریده شدند و وزن خشک آن‌ها اندازه‌گیری گردید. سپس، به مدت ۲۴ ساعت داخل آب مقطر قرار داده شدند و پس از طی زمان مناسب، نمونه‌ها به وسیله‌ی کاغذ صافی خشک شدند و مقدار وزن تر آن‌ها با کمک ترازوی چهار رقم اعشار (اند، ژاپن) سنجش و سپس درصد جذب آب با رابطه‌ی ۱ محاسبه گردید. در این رابطه، W معادل وزن تر داربست و W0 معادل وزن خشک داربست می‌باشد.

رابطه‌ی ۱) $X\ (W-W0/W0)\ 100$ = میانگین جذب آب نمونه

استخراج سلول‌های بنیادی از بافت چربی

بافت چربی زیر جلدی ناحیه‌ی شکم، از ۳ 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. سپس، با محلول فسفات بافر سالین (PBS یا Phosphate buffered saline) (Sigma-Aldrich, USA) شستشو و بافت همبندی و عروق خونی آن جدا شد. آن گاه، آنزیم کلاژناز نوع I (Sigma-Aldrich, USA) به میزان ۱ میلی‌گرم به ازای هر گرم بافت چربی اضافه شد و در دمای ۳۷ درجه‌ی سانتی‌گراد به مدت ۵۰ دقیقه انکوبه شد. پس از اطمینان از تجزیه‌ی کامل، هم حجم آنزیم محیط کشت (DMEM) Dulbecco's modified eagle's medium (Sigma-Aldrich, USA) جهت خنثی‌سازی آنزیم به آن اضافه شد. سپس، محلول بافتی سانتریفیوژ شد و رسوب سلولی به دست آمده، با محیط کشت ترکیب شد و به فلاسک‌های T25 منتقل و در انکوباتور ۳۷ درجه‌ی سانتی‌گراد با ۵ درصد CO_2 و رطوبت نسبی

کشت داده شد. برای تخلیه‌ی سلول‌های مرده و اضافی، محیط کشت بعد از ۲۴ ساعت تعویض شد و پس از آن، هر سه روز یک بار این کار انجام شد و سلول‌های پاساژ دوم برای بررسی زیستایی سلولی روی داربست‌ها مورد استفاده قرار گرفتند.

کشت سلول بر روی داربست‌ها

۱) داربست لخته‌ی فیبرینی

برای کشت سلول‌های بنیادی مشتق از چربی، ابتدا ۳۰۰ میکرولیتر ترومبین در یک چاهک (پلیت ۲۴ خانه) ریخته شد. سپس، 10^4 سلول به آن اضافه شد و جهت همگن‌سازی سلول درون داربست، عمل پیپتینگ انجام گرفت و پس از آن، ۳۰۰ میکرولیتر فیبرینوژن به آن اضافه گردید و به مدت ۱۰ دقیقه جهت تشکیل لخته، پلیت بی‌حرکت گذاشته شد. سپس، ۱/۵ سی‌سی محیط کشت DMEM حاوی ۱۵ درصد Fetal bovine serum (FBS) (Gibco) و ۱ درصد Penicillin/Streptomycin (Gibco) به آن اضافه شد. پلیت به داخل انکوباتور ۳۷ درجه‌ی سانتی‌گراد با ۵ درصد CO_2 و رطوبت نسبی ۷۰ درصد منتقل شد و آزمون‌های بررسی زیستایی و تکثیر سلولی در روزهای سوم و هفتم انجام شدند.

۲) داربست نانو کامپوزیت فیبرین/پلی‌وینیل الکل

ابتدا داربست‌ها به وسیله‌ی اتانول (Merck) ۷۰ درصد و لامپ فرابنفش به مدت ۳ ساعت استریل و به داخل چاهک‌های پلیت ۲۴ خانه منتقل شدند. سلول‌ها تریپسینه شدند و بعد از شمارش، تعداد 10^4 سلول روی داربست منتقل شد و ۱/۵ سی‌سی محیط کشت به آن اضافه گردید. پلیت به داخل انکوباتور ۳۷ درجه‌ی سانتی‌گراد با ۵ درصد CO_2 و رطوبت نسبی منتقل شد و آزمون‌های بررسی زیستایی سلولی در روزهای سوم و هفتم انجام شدند.نا

بررسی زیستایی سلولی

برای بررسی زیستایی سلولی، از آزمون MTT [3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide] (Merck، آلمان) استفاده شد. ابتدا محیط کشت هر چاهک تخلیه و با ۱/۵ میکرولیتر PBS به ازای هر چاهک، دو مرتبه شستشو انجام شد. سپس، به هر چاهک ۴۰۰ میکرولیتر محیط کشت خالص و ۴۰ میکرولیتر محلول MTT اضافه شد. پلیت‌ها به مدت ۴ ساعت انکوبه شدند. پس از آن، محیط رویی تخلیه و ۴۰۰ میکرولیتر Dimethyl sulfoxide (DMSO) (Sigma-Aldrich, USA) به هر چاهک اضافه گردید و به مدت ۲ ساعت در تاریکی و دمای اتاق قرار داده شد (DMSO با حل کردن کریستال‌های فورامازان، رنگ بنفش تولید می‌کند). در انتها، ۱۰۰ میکرولیتر از محلول هر چاهک را به پلیت ۹۶ خانه منتقل و میزان جذب نوری (Optical density یا OD) آن‌ها با دستگاه Enzyme-linked immunosorbent assay reader (ELISA Reader) (Hyperion MPR_4) در طول موج ۵۷۰ نانومتر، در روزهای ۳ و ۷ خوانده شد و درصد زیستایی سلولی با رابطه‌ی ۲ محاسبه و نتایج با آزمون One-way ANOVA بررسی شد.

رابطه‌ی ۲) Viability (%) = OD Treat/OD Control X 100

یافته‌ها

نتایج بررسی ریخت‌شناسی داربست الکتروریسی شده

تصاویر SEM داربست کامپوزیتی در بزرگ‌نمایی‌های مختلف و در حالت‌های قبل و بعد از شبکه‌ای کردن (Cross-link) در شکل ۲ نشان داده شده است.

میانگین قطر الیاف الکتروریسی شده، ۵۰۰ نانومتر اندازه‌گیری شد. متوسط اندازه‌ی تخلخل در نمونه‌ی تهیه شده برابر با ۷/۱ میکرومتر به دست آمد. درصد تخلخل که با استفاده از نرم‌افزار آنالیز تصویر Matlab در بررسی از تصویر به دست آمد، برابر با ۸۳/۸۱ درصد بود. تمام اندازه‌گیری‌ها با ۳ بار تکرار انجام گرفت.

آب‌دوستی داربست با اندازه‌گیری زاویه‌ی تماس قطره‌ی آب با سطح نمونه، مشخص شد. دستگاه Pendent drop IFT measurement apparatus-CA-ES10 در این آزمایش به طور خودکار در هر ثانیه یک تصویر از قطره می‌گرفت و در هر عکس، میانگین زاویه‌ی مورد نظر را در سمت چپ و راست تصویر محاسبه می‌کرد که میانگین آن برابر با ۳۱/۷۱ درجه شد. میانگین جذب آب ۲۴ ساعته‌ی داربست، ۶۸/۵ درصد به دست آمد.

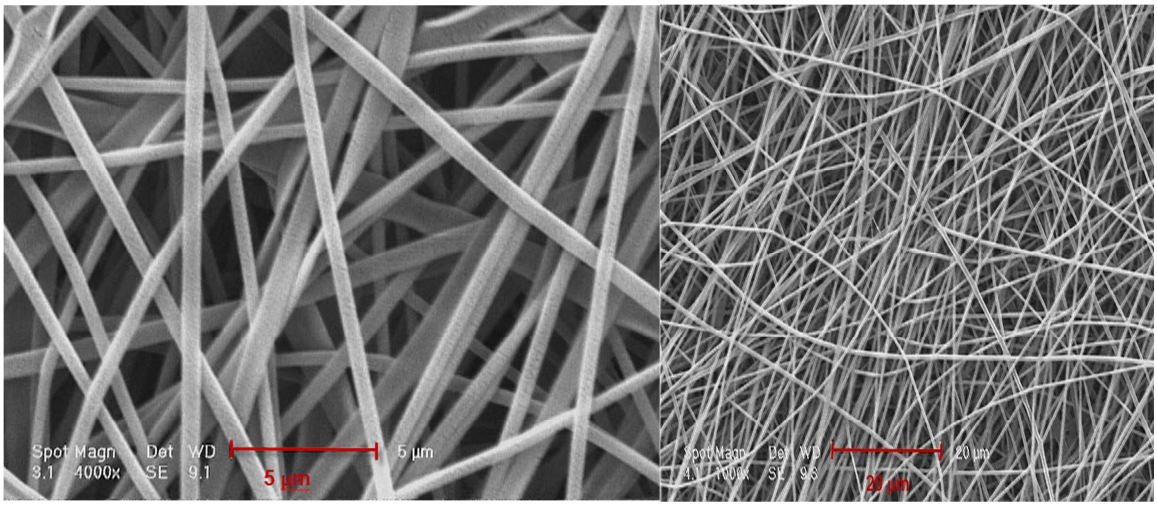
زیستایی سلولی

بعد از استخراج سلول‌های بنیادی (شکل ۳) و در روزهای سوم و هفتم پس از انتقال سلول‌ها روی داربست و استفاده از محلول MTT، میزان زیستایی و تکثیر سلول‌های بنیادی در گروه فیبرین نسبت به گروه شاهد، کاهش نشان داد که این کاهش، در روزهای سوم و هفتم معنی‌دار بود. در گروه فیبرین الکتروریسی شده، افزایش کمی در تعداد سلول‌ها و زیستایی آن مشاهده شد که این افزایش، از لحاظ آماری نسبت به گروه شاهد معنی‌دار نبود. در روزهای سوم و هفتم، گروه داربست فیبرین الکتروریسی شده نسبت به گروه فیبرین، افزایش در میزان زیستایی سلولی نشان داد که این افزایش، به لحاظ آماری در روز سوم معنی‌دار بود و در روز هفتم معنی‌دار نبود ($P \leq ۰/۰۵$) (شکل ۴).

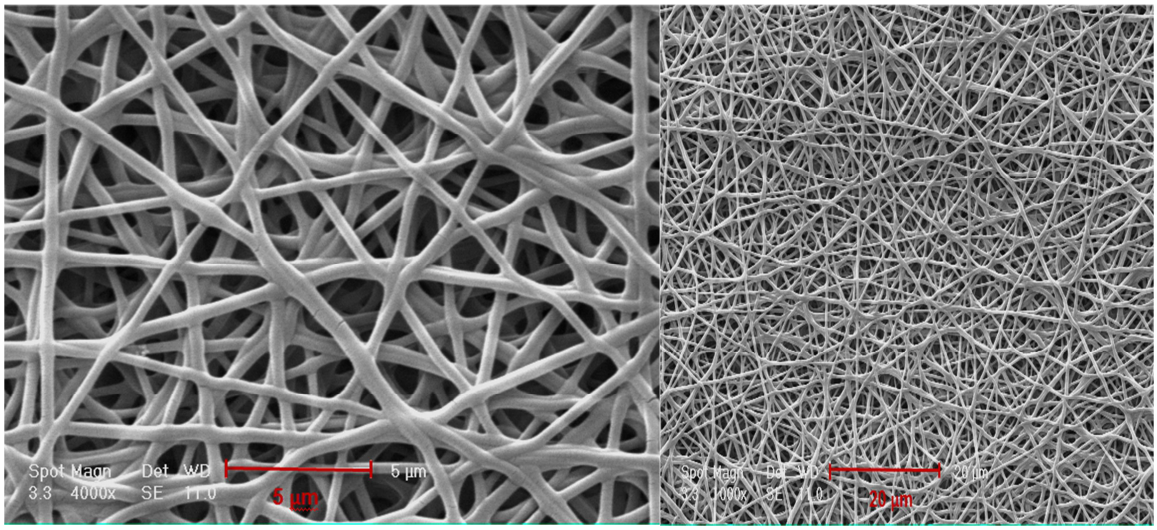
بحث

بزرگ‌ترین چالش موجود در مهندسی بافت، استفاده از داربست مناسب است. خواص داربست مورد استفاده در مهندسی بافت، باید

با خواص ماتریکس خارج سلولی بافت مورد نظر جهت مهندسی بافت شباهت زیادی داشته باشد.

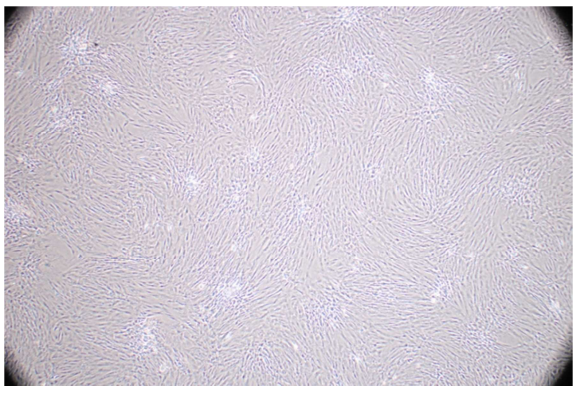


(الف)

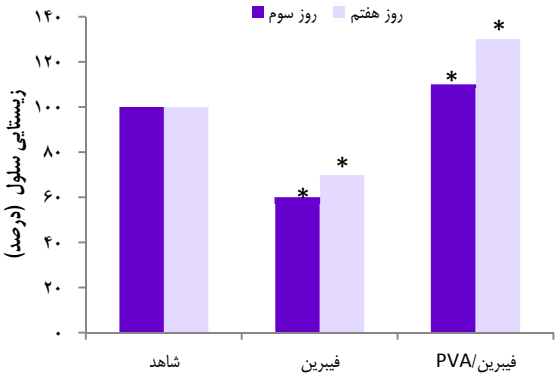


ب

شکل ۲. (الف) تصویر الیاف داربست نانو کامپوزیتی قبل از شبکه‌ای کردن، (ب) تصویر الیاف پس شبکه‌ای کردن (بزرگ‌نمایی ۱۰۰۰ و ۴۰۰۰ برابر)



شکل ۳. تصویر سلول‌های بنیادی مشتق از چربی (پاساژ دوم، میکروسکوپ معکوس با بزرگ‌نمایی ۱۰۰ برابر)



شکل ۴. نمودار نتایج آزمون زیستایی سلول در روزهای سوم و هفتم (*اختلاف معنی‌دار در گروه شاهد) ($P \leq ۰/۰۵$)

پلیمرهای طبیعی و مصنوعی زیادی برای ساخت داربست‌های کامپوزیتی مورد استفاده قرار گرفته‌اند که از میان آن‌ها پلی‌وینیل الکل به دلیل دارا بودن زیست سازگاری و زیست تخریب پذیری مناسب، ترجیح داده می‌شود و این خواص، با استفاده از کامپوزیت کردن پلیمر با فیبرین که یک پروتئین است، به شدت تقویت می‌گردد (۱۵-۱۴).

باتوجه به تصاویر میکروسکوپ الکترونی، الیاف دارای ظاهری یکنواخت و بدون دانه (Bead) بودند که نشان دهنده‌ی الکتروریسی موفق داربست کامپوزیتی فیبرین/پلی‌وینیل الکل می‌باشد و با یافته‌های Ravichandran و همکاران که داربست کامپوزیتی فیبرین/پلی‌گلیسرول سباکیت را الکتروریسی کردند و به الیافی بدون دانه با میانگین قطر ۴۰۰ نانومتر (مطابق با قطر الیاف الکتروریسی شده در مطالعه ی حاضر) دست یافتند (۱۴). همچنین، Perumcherry و همکاران، میانگین قطر الیاف ۵۰۰ نانومتر را از الکتروریسی فیبرین به دست آوردند که با یافته‌های این پژوهش مطابقت دارد (۱۵).

آزمون زاویه‌ی تماس نیز نشان دهنده‌ی آب‌دوستی بالای داربست کامپوزیتی است. میانگین زاویه‌ی قطره‌ی آب با داربست فیبرین/پلی‌وینیل الکل، از میانگین زاویه‌ی قطره آب با داربست فیبرین الکتروریسی شده در مطالعه‌ی Ravichandran و همکاران (۱۴) -۷۱ درجه- کمتر بود که نشان دهنده ی آب‌دوستی بهتر داربست طراحی شده در مطالعه ی حاضر است. اندازه‌گیری میانگین درصد تخلخل، نشان دهنده‌ی تخلخل بالای داربست می‌باشد. داربستی با تخلخل بالا، امکان تبادل بهتر مواد و چسبندگی بیشتر برای سلول‌ها را ایجاد می‌کند؛ در نتیجه، باعث افزایش زیستایی سلولی می‌گردد (۸).

Ravichandran و همکاران، جهت بررسی زیستایی سلولی، از سلول‌های بنیادی مزانشیمی مشتق از خون بند ناف جنینی استفاده کردند و تفاوت معنی‌داری را در گروه‌های کشت شده با داربست فیبرینی الکتروریسی شده مشاهده نمودند (۱۴) که با یافته‌های مطالعه‌ی حاضر مطابقت داشت و تفاوت معنی‌داری بین گروه‌های داربست لخته‌ی فیبرینی، داربست کامپوزیتی فیبرین/پلی‌وینیل الکل الکتروریسی شده و گروه کشت تک لایه مشاهده گردید. این تفاوت، ممکن است به علت چسبندگی بهتر سلول بر روی سطح نانوالیاف و همچنین، تبادل بهتر مواد (به علت وجود منافذ در داربست) بین سلول با محیط کشت نسبت به سلول‌های درون لخته و کشت تک لایه باشد؛ چرا که کشت تک لایه، به صورت دو بعدی است و در کشت لخته‌ی فیبرینی نیز سلول‌های موجود در مرکز لخته، امکان تبادل کافی مواد مغذی را با محیط کشت پیدا نمی‌کنند، اما در داربست الکتروریسی شده، سلول‌ها بین شبکه‌ی تور مانندی از الیاف به دام می‌افتند. این شبکه‌ی تور مانند، تک تک سلول‌ها را کنار یکدیگر نگه می‌دارد؛ در حالی که تمام سطح هر سلول با محیط کشت در ارتباط است. این عمل، مانند کارکرد ماتریکس خارج سلولی طبیعی در بدن موجود زنده می‌باشد (۸). در انتها، پیشنهاد می‌شود با افزودن نانو مواد به داربست کامپوزیتی، خواص مکانیکی آن‌ها را بهبود بخشید و از آن‌ها به عنوان داربست سلولی برای تمایز بافت غضروفی استفاده گردد و یا داربست به صورت جهت‌دار الکتروریسی شود و از آن، جهت تمایز بافت عصبی استفاده گردد.

تشکر و قدردانی

این مقاله برگرفته از پایان‌نامه‌ی کارشناسی ارشد علی صمدی به شماره‌ی طرح پژوهشی ۳۹۴۹۱۷ مصوب معاونت پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی اصفهان می‌باشد. نویسندگان، از این معاونت جهت حمایت مالی پژوهش حاضر، سپاسگزاری می‌نمایند.

References

1. George M, Abraham TE. Polyionic hydrocolloids for the intestinal delivery of protein drugs: alginate and chitosan--a review. J Control Release 2006; 114(1): 1-14.
2. Rabie A, Esfandiari E, Fesharaki M, Sanaie M, Aminmansur B, Hashemibeni B. Access to a three dimentional osteoblasts culture originating human carvaria in Iran. J Isfahan Med Sch 2010; 27(102): 777-87. [In Persian].
3. Weisel JW. Fibrinogen and fibrin. Adv Protein Chem 2005; 70: 247-99.
4. 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.
5. Le Nihouannen D, Guehennec LL, Rouillon T, Pilet P, Bilban M, Layrolle P, et al. Micro-architecture of calcium phosphate granules and fibrin glue composites for bone tissue engineering. Biomaterials 2006; 27(13): 2716-22.
6. Prasad CK, Muraleedharan CV, Krishnan LK. Bio-mimetic composite matrix that promotes endothelial cell growth for modification of biomaterial surface. J Biomed Mater Res A 2007; 80(3): 644-54.
7. Sreerekha PR, Krishnan LK. Cultivation of endothelial progenitor cells on fibrin matrix and layering on dacron/polytetrafluoroethylene vascular grafts. Artif Organs 2006; 30(4): 242-9.
8. 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.

9. Agarwal S, Wendorff JH, Greiner A. Use of electrospinning technique for biomedical applications. Polymer 2008; 49(26): 5603-21.
10. Rutledge GC, Fridrikh SV. Formation of fibers by electrospinning. Adv Drug Deliv Rev 2007; 59(14): 1384-91.
11. Teo WE, Ramakrishna S. A review on electrospinning design and nanofibre assemblies. Nanotechnology 2006; 17(14): R89-R106.
12. Christman KL, Vardanian AJ, Fang Q, Sievers RE, Fok HH, Lee RJ. Injectable fibrin scaffold improves cell transplant survival, reduces infarct expansion, and induces neovasculature formation in ischemic myocardium. J Am Coll Cardiol 2004; 44(3): 654-60.
13. Humphrey RG, Smith SD, Pang L, Sadovsky Y, Nelson DM. Fibrin enhances differentiation, but not apoptosis, and limits hypoxic injury of cultured term human trophoblasts. Placenta 2005; 26(6): 491-7.
14. Ravichandran R, Venugopal JR, Sundarrajan S, Mukherjee S, Sridhar R, Ramakrishna S. Expression of cardiac proteins in neonatal cardiomyocytes on PGS/fibrinogen core/shell substrate for Cardiac tissue engineering. Int J Cardiol 2013; 167(4): 1461-8.
15. Perumcherry SR, Chennazhi KP, Nair SV, Menon D, Afeesh R. A novel method for the fabrication of fibrin-based electrospun nanofibrous scaffold for tissue-engineering applications. Tissue Eng Part C Methods 2011; 17(11): 1121-30.
16. Yang SH, Wu CC, Shih TT, Chen PQ, Lin FH. Three-dimensional culture of human nucleus pulposus cells in fibrin clot: comparisons on cellular proliferation and matrix synthesis with cells in alginate. Artif Organs 2008; 32(1): 70-3.
17. Vallet-Regi M, Romero AM, Ragel CV, LeGeros RZ. XRD, SEM-EDS, and FTIR studies of in vitro growth of an apatite-like layer on sol-gel glasses. J Biomed Mater Res 1999; 44(4): 416-21.
18. 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.

Journal of Isfahan Medical School

Vol. 34, No. 388, 4th Week, August 2016

Received: 01.05.2016

Accepted: 10.07.2016

Preparation of Fibrin/Poly Vinyl Alcohol Electrospun Nanofibers Scaffold for Tissue Engineering Applications

Ali Valiani[1], Ali Samadi[2], Batool Hashemibeni[3], Mohammad Rafienia[4]

Original Article

Abstract

Background: Nowadays, the biodegradable polymer nano-composites have particular importance in tissue engineering because of mechanical properties and good biocompatibility. The aim of this study was to design and evaluate nano-composite fibrin/polyvinyl alcohol (PVA) scaffold using electrospinning method and cell viability on it.

Methods: Nano-composite scaffold fibrin/PVA were prepared by electrospinning method while 28.5% of the polymer was formed of fibrin. The porosity of the scaffolds was calculated via scanning electron microscopy by using "Matlab" software and porosity morphology, their distribution and size of the nanofibers. Water absorption test and contact angle measurement were performed. Also, human adipose-derived stem cells were used for cell viability evaluation on scaffolds.

Findings: The mean diameter of electrospun fibrin/PVA scaffold was measured 500 nm. The average pore size and porosity of the prepared sample was 1.7 micrometers and 83.81%, respectively. The average contact angle was 31.71 degrees and 24-hour average water absorption was measured 68.5%. Evaluation test of the cell viability has a significant difference compared to control groups.

Conclusion: The results of this study show that electrospun scaffolds fibrin/PVA can be used in cartilage and nerve tissue engineering.

Keywords: Nano-fibers, Fibrin, Electrospinning, Scaffold

Citation: Valiani A, Samadi A, Hashemibeni B, Rafienia M. **Preparation of Fibrin/Poly Vinyl Alcohol Electrospun Nanofibers Scaffold for Tissue Engineering Applications.** J Isfahan Med Sch 2016; 34(388): 737-44.

1- Assistant Professor, Department of Anatomical Sciences, School of Medicine, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, Iran
2- MSc Student, Department of Anatomical Sciences, School of Medicine AND Student research Committee, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, Iran
3- Associate Professor, Department of Anatomical Sciences, School of Medicine, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, Iran
4- Associate Professor, Biosensor Research Center, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, Iran
Corresponding Author: Mohammad Rafienia, Email: rafie_med@yahoo.com