

## جراحی ترمیمی کانال عصبی با داربست هدایت عصبی خودتحریک به منظور

### رشد و تکثیر سلول‌های شبه عصبی PC12

دکتر حمیده جاویدی\*، دکتر مهدی موحدی\*\*

چکیده:

**زمینه و هدف:** تاکنون مطالعات مختلف در راستای طرح روش‌های گوناگون برای ساخت کانال عصبی با هدف ترمیم بافت عصبی انجام شده است. هدف از این مطالعه، جراحی ترمیمی عصب با ساخت کانال هدایت عصبی با هدف خاصیت خودتحریکی است. در این مطالعه، کانال پلی کاپرولاکتون [Polycaprolactone- (PCL)] و پلی وینیدیلین فلوراید [Polyvinylidene Fluoride- (PVDF)]، در ترکیب با نانوذرات پلی آنیلین/گرافن [Polyaniline Graphene- (PAG)] و ژلاتین با رویکرد الکتروریسی دوطرفه و هم‌زمان تهیه شد. در این روش کانال هدایت عصبی خودتحریک‌شونده با خاصیت پیزوالکتریک و هدایت الکتریکی به منظور رشد و تکثیر سلول‌های شبه عصبی PC12 طراحی شده است.

**مواد و روش‌ها:** در ابتدا محلول‌های حاوی 13 درصد وزنی حجمی پلی کاپرولاکتون و 19 درصد وزنی حجمی پلی وینیدیلین فلوراید در حلال مشترک دی متیل فرمامید [Dimethylformamide- (DMF)] و استون، هر کدام به‌صورت مجزا حل شد و سپس هر دو محلول با هم مخلوط شدند. در مرحله بعد، 28 درصد وزنی حجمی محلول ژلاتین در آب مقطر و اسید استیک، حل شد و نانوذرات پلی آنیلین/گرافن با درصدهای 0 و 1 و 2 و 3 وزنی حجمی در محلول ژلاتین به‌صورت همگن ترکیب شدند و سپس فرآیند الکتروریسی دوطرفه و هم‌زمان انجام گرفت. برای بررسی مورفولوژی الیاف از میکروسکوپ الکترونی روبشی [Scanning Electron Microscope- (SEM)] استفاده شد. برای تشخیص میزان بهینه از نانوذرات پلی آنیلین/گرافن به منظور هدایت عصبی، هدایت الکتریکی و خواص پیزوالکتریک داربست‌های ساخته‌شده بررسی شد و همچنین میزان درصد زنده‌مانی رده سلولی فنوکروسیتوما (PC12) بر داربست محاسبه شد. داده‌ها به‌صورت میانگین  $\pm$  انحراف معیار (Mean  $\pm$  SD) محاسبه شد. سطح معنادار اختلافات  $P < 0.05$  مشخص شد.

**یافته‌ها:** با استفاده از نرم‌افزار Graph Pad 9 و آزمون One Way ANOVA، داده‌ها با سه بار تکرار هر آزمون به دست آمده‌اند. نتایج نشان داد که با افزایش درصد نانوذرات پلی آنیلین/گرافن تا 2 درصد وزنی، میزان هدایت الکتریکی و ولتاژ خروجی افزایش یافت، اما در غلظت 3 درصد وزنی میزان هدایت الکتریکی و همچنین ولتاژ خروجی کاهش یافت. مشاهدات میکروسکوپ الکترونی روبشی نشان داد که میانگین قطر نانوالیاف تا غلظت 2 درصد وزنی کاهش یافت، اما در غلظت 3 درصد وزنی از نانوذرات پلی آنیلین/گرافن قطر نانوالیاف افزایش یافت. همچنین تخریب زیستی داربست‌های الکتروریسی نشان داد که افزایش نانوذرات سبب کاهش میزان تخریب پذیری شد.

**نتیجه‌گیری:** در جراحی ترمیمی عصب وجود پلی کاپرولاکتون و ژلاتین به همراه نانوذره پلی آنیلین/گرافن باعث افزایش هدایت عصبی شد و همچنین استفاده از پلی وینیدیلین فلوراید در داربست الکتروریسی شده سبب بهبود خاصیت خودتحریکی در کانال هدایت عصبی خواهد شد که می‌تواند بستر مناسب برای رشد و تکثیر سلولی بافت عصب شود و از این رو احتمال موفقیت در جراحی را به بیشترین میزان خود می‌رساند.

واژه‌های کلیدی: جراحی عصب، کانال هدایت عصبی، خاصیت خودتحریک، نانوذره، مشخصه‌های مکانیکی، پلی آنیلین/گرافن

نویسنده پاسخگو: دکتر مهدی موحدی

تلفن: 03133317983

E-mail: dr.mehdimovahedi@gmail.com

\* محقق، گروه مهندسی پزشکی، گرایش بیومتریال، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد علوم تحقیقات تهران

\*\* استادیار گروه مهندسی پزشکی، گرایش بیومتریال، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان

تاریخ وصول: 1402/08/20

تاریخ پذیرش: 1402/12/07

## زمینه و هدف

در سال‌های اخیر، مهندسی بافت جایگزین مؤثر برای ترمیم بافت آسیب‌دیده با استفاده از مواد پلیمری برای رشد و تکثیر سلول‌ها در نظر گرفته شده است.<sup>1,2</sup> طراحی داربست برای ارائه بستر مناسب برای چسبندگی، رشد و تکثیر سلولی از اهمیت بالایی برخوردار است.<sup>3,4</sup> در ایجاد بستر مناسب برای بهبود تکثیر سلولی، استفاده از کانال هدایت عصبی با ویژگی خود برانگیختگی ساختاری مناسب برای ارتقاء رفتار زیستی است که بتواند سیستم مشابه رشته‌های عصبی ایجاد کند.<sup>5</sup> این سیستم طراحی شده با قابلیت تنظیم بر اساس میزان آسیب وارد شده به بافت مورد نظر توانایی بازسازی بافت عصب را بدون نیاز به عمل جراحی مجدد فراهم می‌کند.<sup>6,7</sup> در سال‌های اخیر رویکرد الکتروروسی به‌عنوان یکی از روش‌های ساخت داربست مقرون‌به‌صرفه برای طراحی داربست مشابه ماتریس خارج سلولی (ECM) برای بازسازی و ترمیم بافت تبدیل شده است. لازم به ذکر است که در این روش ساخت داربست از پلیمرهای طبیعی و مصنوعی استفاده می‌شود.<sup>8</sup> پلی کاپرولاکتون یک پلیمر زیست سازگار و زیست تخریب پذیر است.<sup>9,10</sup> ساختار نیمه بلوری و آب‌گریز آن، به‌عنوان یک ماده اصلی در ساخت داربست مهندسی بافت مورد توجه قرار گرفته است.<sup>11,12</sup> استفاده از پلیمر ژلاتین طبیعی به دلیل آب‌دوستی بالا سبب بهبود چسبندگی سلولی خواهد شد که به‌عنوان یک ماده با قابلیت ارتقاء خواص داربست‌های پایه پلی کاپرولاکتون بسیار مورد توجه قرار گرفته است.<sup>12,13</sup> اما مهم‌ترین عیب خواص مکانیکی پایین و سرعت تخریب بالا است. گلو تار آلد هید (GTA) و ژنیپین از جمله Cross-Linker متداول می‌باشند که با ایجاد اتصالات و تشکیل ساختار مشبک سبب رفع خواص مذکور خواهند شد.<sup>14,15</sup> از سوی دیگر، پلیمرهایی سبب القاء رسانایی الکتریکی خواهند شد که شامل پلی پیرول (PPY) و پلی آنیلین (PANI) که سبب افزایش بازسازی عصب می‌شود، می‌باشند.<sup>16,17</sup> همچنین، نانوذرات پلی آنیلین / گرافن که مقاومت شیمیایی، حرارتی و رسانایی الکتریکی قابل توجهی به همراه دارند، برای ساخت داربست یک کاندید مناسب می‌باشند.<sup>7,9,18</sup> اثر هم‌افزایی با ساختارهای پیروالکتریک و ذرات رسانا در نانوالیاف گرافن با ورق اتم  $sp^2$  در زمینه‌های بیولوژیکی و الکتریکی قابل ایجاد است. تولید نانوکامپوزیت حاوی نانوذرات پلی آنیلین/گرافن از سوی دیگر رسانایی بهتر را در مقایسه با

پلی آنیلین که یک پلیمر ذاتاً رسانا است نشان داده است.<sup>19</sup> استفاده از نانوذرات پلی آنیلین/گرافن در کاربردهایی که نیاز به القاء هدایت الکتریکی دارند یک گزینه مناسب است.<sup>20,21</sup> پلی وینیدیلین فلوراید یک پلیمر با انعطاف پذیری بالا و از نظر شیمیایی بی‌اثر است. همچنین دارای خواص پیروالکتریک است.<sup>20,22</sup>

امروزه تلاش‌های زیادی برای افزایش عملکرد پلی وینیدیلین فلوراید انجام شده است و آن را مشهورترین پلیمر پیروالکتریک آلی<sup>20,22</sup> می‌دانند، زیرا فاز  $\beta$  یکی از چهار فاز در این ماده است که می‌تواند الکتریسیته ایجاد کند. در ساختار این پلیمر، دوقطبی‌ها لحظه‌ای موازی هستند. با اعمال فشار مکانیکی، میدان الکتریکی ایجاد می‌کند.<sup>16,23</sup> اخیراً، ویژگی پیروالکتریک پلی وینیدیلین فلوراید با نانوذرات افزایش یافته است و نتایج نشان‌دهنده افزایش ولتاژ خروجی نانوالیاف است.<sup>16,23</sup>

هدف در این تحقیق ساخت بستری مناسب و مشابه با ساختار عصب، با داشتن ویژگی هدایت الکتریکی و همچنین خاصیت خودتحریکی به منظور رشد و تکثیر سلول‌های شبه عصبی فتوکروسیتوما بوده است.

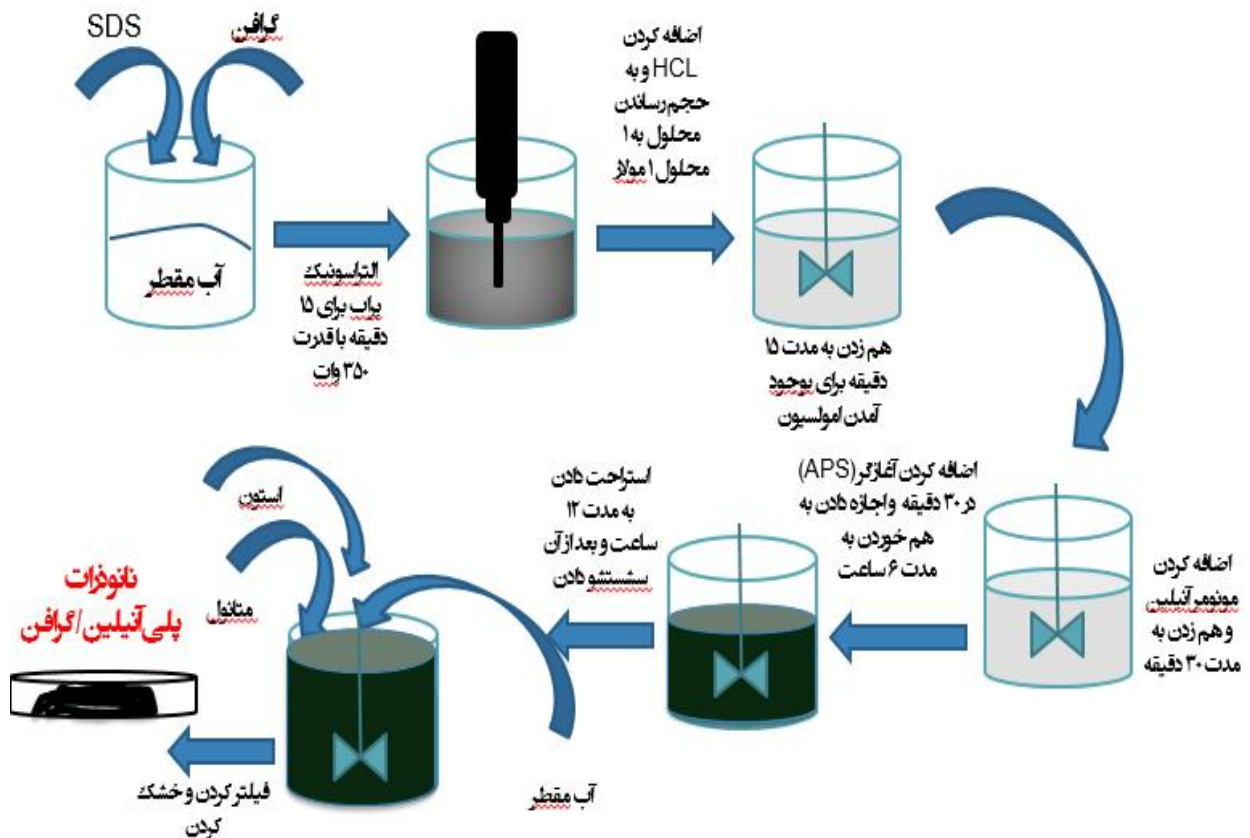
## مواد و روش‌ها

### روش سنتز نانوکامپوزیت پلی آنیلین-گرافن

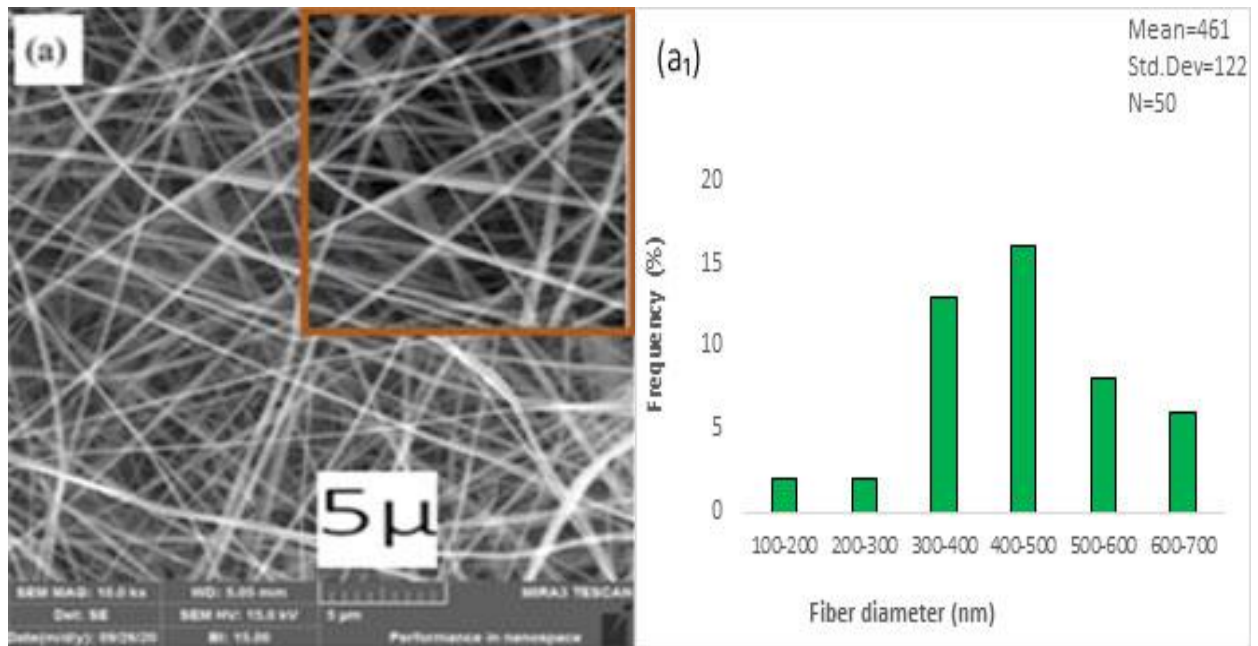
در این پروژه برای دستیابی به نانوکامپوزیت پلی آنیلین-گرافن از روش سنتز پلیمریزاسیون - امولسیون استفاده شده که روش پیشنهادی بنی اسدی و همکارانش<sup>14</sup> است. آن‌ها با استفاده از پلیمریزاسیون امولسیونی و اضافه کردن گرافن به پلی آنیلین رسانایی این ماده را از 2 زیمنس بر سانتی‌متر به 7 زیمنس بر سانتی‌متر افزایش دادند. روش کار به این صورت است که گرافن را به میزان 5% وزنی مونومر آنیلین (مونومر آنیلین 0/745 گرم است) به بشر حاوی 70 میلی‌لیتر آب اضافه می‌کنیم. سپس از دستگاه هم زن مافوق صوت برای توزیع هر چه بهتر گرافن استفاده کردیم که به مدت 15 دقیقه مخلول درون دستگاه قرار گرفت. سپس سدیم دودسیل سولفات (Sodium Dodecyl Sulfate- SDS) به میزان 5/746 گرم به مخلوط اضافه شد. هیدروکلریک اسید (HCL) را برای جلوگیری از خوردگی پراب همزن اضافه نکردیم و بعد از این

و سپس سبز تیره تغییر می‌کند که نشان می‌دهد پلیمریزاسیون آغاز شده است. بعد از این مرحله محلول 6 ساعت درون حمام یخ قرار گرفته و هم چنان تحت محیط گاز آرگون توسط هم زن مکانیکی هم خورد تا واکنش پلیمریزاسیون تکمیل شود. سپس سیستم بدن این که هم بخورد ولی تحت محیط گاز آرگون به مدت 12 ساعت گذاشته شد تا واکنش پلیمریزاسیون کامل شود. بعد از این مدت به محلول مقدار 100 میلی‌لیتر اتانول اضافه شد تا پلیمر آن رسوب کند. این رسوب با کاغذ صافی که قطر حفرات آن 500 نانومتر بود و با اتانول و آب چندین بار شسته شد تا سدیم دودسیل سولفات و مونومرهای باقی‌مانده در آن حذف شود و رنگ ماده خروجی از کاغذ صافی از رنگ زرد به بی‌رنگ تغییر کند. پلیمر نهایی برای جلوگیری از چسبیدن ذرات، دوباره داخل آب مقطر اضافه شد تا بعداً از آن استفاده شود. شماتیک فرآیند را نشان می‌دهد<sup>24</sup> (تصویر 1).

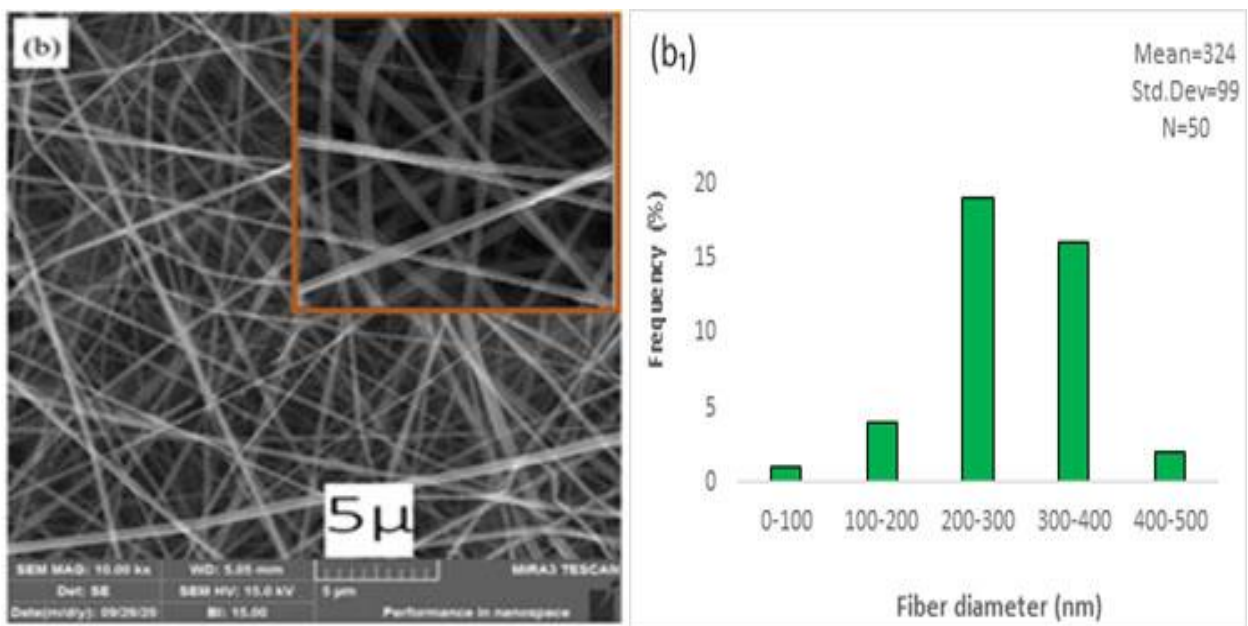
مرحله با اضافه کردن 20 میلی‌لیتر هیدروکلریک اسید به محلول حجم آن به 90 میلی‌لیتر رسید به طوری که هم‌زمان غلظت هیدروکلریک اسید داخل محلول 1 مولار شد. این محلول را داخل رآکتور که داخل حمام یخ بود قرار داده و با هم‌زن مکانیکی با دور 350 دور در دقیقه هم خورد تا رنگ محلول به شیری‌رنگ تبدیل شد. این تغییر رنگ نشان‌دهنده این است که سوسپانسیون حاوی گرافن در هیدروکلریک اسید تشکیل شده است. 0/745 مونومر آنیلین (مونومر نباید به رنگ سیاه و اکسید شده باشد) به سوسپانسیون اضافه شد و به مدت 30 دقیقه تحت گاز آرگون (برای اکسیژن‌زدایی چون اکسیژن از عوامل متوقف‌کننده این پلیمریزاسیون است) هم زده شد. سپس به میزان 0/913 گرم آغازگر آمونیوم پرسولفات (APS) را که درون 10 میلی‌لیتر اسید 1 مولار حل کرده و با پمپ سرنگی در مدت 30 دقیقه به محلول اضافه کردیم. در این مدت رنگ محلول به آبی روشن



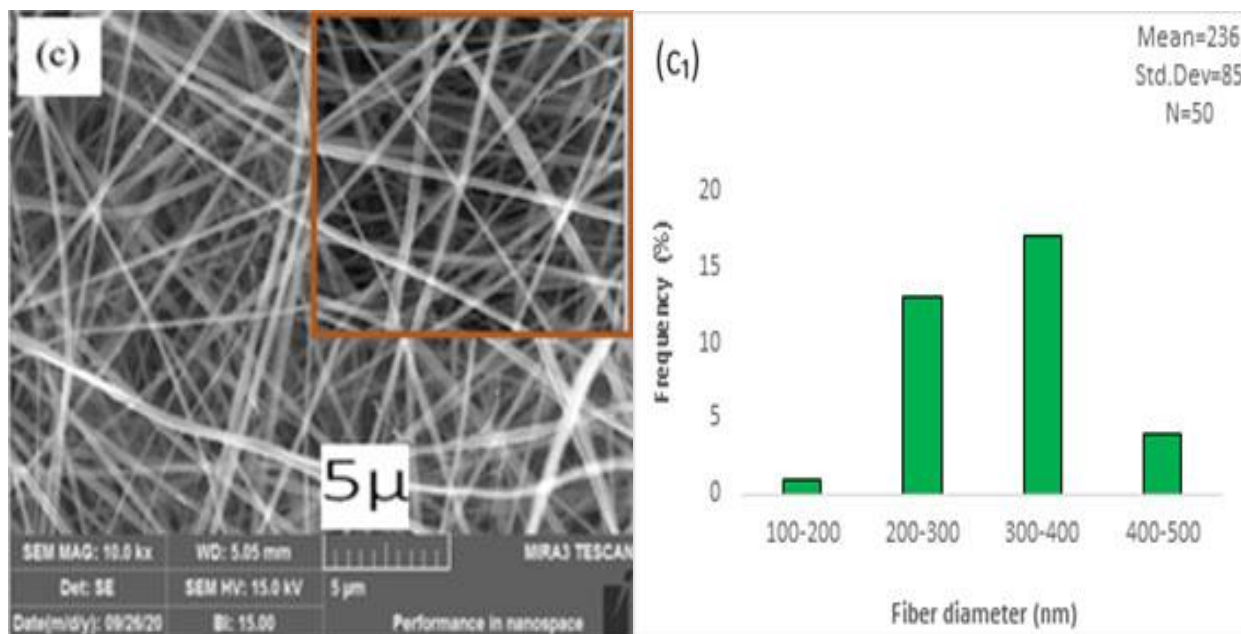
تصویر 1- ساخت کانال هدایت عصبی به روش الکتروریسی



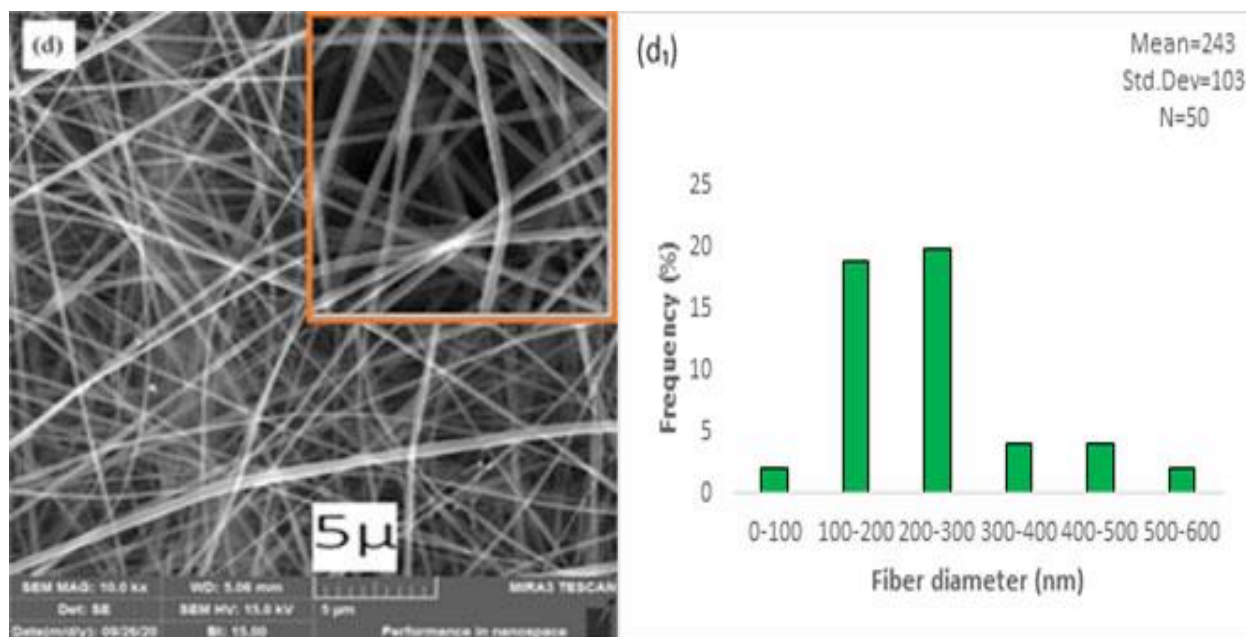
تصویر 2 a



تصویر 2 b



تصویر 2 c



تصویر 2- تصویربرداری با میکروسکوپ روبشی با غلظت‌های مختلف (0 و 1 و 2 و 3 درصد پلی آنیلین/گرافن) (a,b,c,d)، اندازه‌گیری قطر نانوالیاف داربست‌های الکتروریسی شده با غلظت‌های مختلف (0 و 1 و 2 و 3 درصد پلی آنیلین/گرافن) (a<sub>1</sub>,b<sub>1</sub>,c<sub>1</sub>,d<sub>1</sub>).

انجام آزمون پیزوالکتریک و اندازه‌گیری ولتاژ با دستگاهی که دارای دو پراب بوده و به دو سر نمونه با اندازه  $1 \times 2$  سانتی‌متری که با ورق نازک آلومینیوم پوشانده شده بود، متصل شده و بازوی مکانیکی با وارد آوردن ضربه به نمونه میزان ولتاژ ایجادشده را اسیلوسکوپ دستگاه نمایش داده شده است. برای آزمون سمیت سلولی MTT مطابق استاندارد Iso109935 انجام شده است. نمونه به صورت کانال با سطح مقطعی به شعاع  $0/4$  سانتی‌متر آماده شده‌اند. بعد برای استریل کردن داربست‌ها ابتدا با الکل 70% و سپس با الکل گرادپانی (60% و 70% و 80% و 90%) و در انتها با الکل مطلق شستشو داده شده و بعد از آن با اشعه ماوراء بنفش سه بار استریل شده است. آن‌ها در محیط کشت DMEM قرار داده شدند. سلول‌های فئوکروسیتوما را از مرکز ذخایر سلول ایران تهیه شد. سلول‌ها با چگالی اولیه 5000 سلول در هر محفظه در محفظه 24 خانه در محیط کشت قرار داده شد. آزمون برای روزهای 1 و 3 انجام شده است. در روزهای مشخص‌شده، پس از تخلیه محیط کشت به همراه 40 میکرولیتر MTT (5 میلی‌گرم بر میلی‌لیتر) به هر چاهک اضافه شد. سپس به مدت 4 ساعت در انکوباتور در دمای 37 درجه سانتی‌گراد نگهداری شد. بعد از آن محیط به آرامی تخلیه شد و به منظور انحلال فرمازان 200 میلی‌لیتر دی‌متیل سولفوکساید (Dimethylsulfoxide - DMSO) به چاهک افزوده شد. جذب نوری در طول موج 540 نانومتر خوانده شد. جهت بررسی چسبندگی و مورفولوژی سلول‌ها بر روی کانال‌ها، بعد از 7 روز انکوباسیون نمونه‌ها، محیط کشت از روی آن‌ها تخلیه شد و جهت تثبیت سلول‌های چسبیده محلول گلو تارآلدهید 4 درصد به مدت 30 دقیقه بر روی نمونه‌ها ریخته شد. سپس با الکل (60 و 70 و 80 و 90) درصد شستشو صورت گرفت و در نهایت در الکل 100% به منظور تصویربرداری با میکروسکوپ الکترونی روبشی نگهداری گردید. داده‌ها به صورت انحراف معیار ( $Mean \pm SD$ ) به دست‌آمده و برای تحلیل آماری از نرم‌افزار Graph Pad9 و آزمون One Way ANOVA استفاده شد. سطح معنی‌دار بودن اختلافات با  $P < 0.005$  محاسبه گردید.

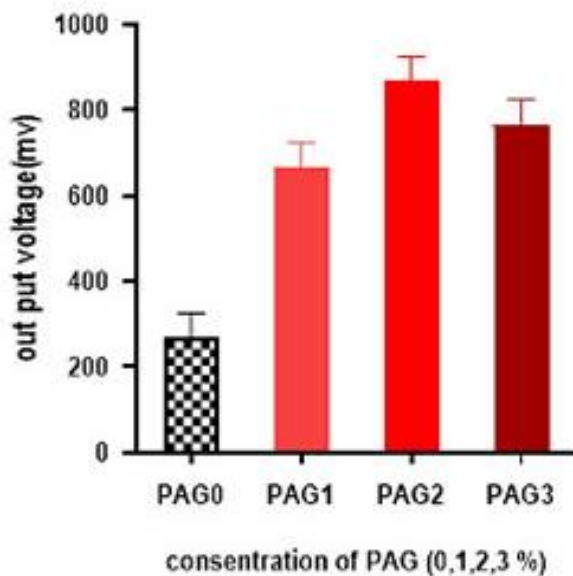
#### یافته‌ها

تصویربرداری با میکروسکوپ الکترونی روبشی انجام شد و اندازه‌گیری میانگین قطر نانوالیاف با نرم‌افزار Image J صورت پذیرفت. میانگین محاسبه‌شده برای کانال‌ها با

بعد از سنتز پلی‌آنیلین-گرافن برای ریسیدن الیاف نانوپلیمری از دستگاه الکتروریسی دو نازل (دو طرفه) شرکت نانواژما (ایران) استفاده کردیم. برای آماده‌سازی محلول‌ها برای دو سرنگ که در دستگاه الکتروریسی قرار می‌گیرد، ابتدا محلول پلیمری حاوی پلی‌کاپرولاکتون و پلی‌وینیدیلین فلوراید را آماده کردیم. برای این کار از 13% درصد حجمی پلی‌کاپرولاکتون و از 19% پلی‌وینیدیلین فلوراید استفاده شده است. برای محلول سرنگ 1 از حلال‌های مشترک استون و دی‌متیل فرمامید استفاده شد؛ و حلال‌ها بعد از مخلوط شدن با هم به صورت حجمی (50:50)، استفاده شده‌اند. پلی‌کاپرولاکتون را به صورت جداگانه در حلال مشترک به مدت 6 ساعت حل شده است. به صورت هم‌زمان پلی‌وینیدیلین فلوراید را با حلال مشترک حل شد. بعد دو محلول به دست آمده را با هم مخلوط کرده و دوباره به مدت 24 ساعت بر روی هم‌زن حرارتی (Heater Stirrer) هم خورد. برای سرنگ 2 ژلاتین را در آب مقطر و اسید استیک (40:60) به مدت یک ساعت هم زده شد. قبل از الکتروریسی، نانوکامپوزیت (پلی‌آنیلین/گرافن) را با دستگاه التراسوند به صورت پراکنده درآورده و با درصد‌های غلظت مختلف (0 و 1 و 2 و 3) به محلول ژلاتین اضافه شده است. با هر غلظت از پلی‌آنیلین/گرافن یک بار الکتروریسی دو طرفه انجام شده است. برای سرنگ شماره یک که حاوی پلی‌کاپرولاکتون و پلی‌وینیدیلین فلوراید است فاصله نوک سوزن تا کلکتور 15 سانتی‌متر و سرعت کلکتور را 250 دور در دقیقه و ولتاژ را بین 9 تا 11 ولت و دبی سرنگ را  $0/1$  سانتی‌متر مکعب بر ساعت در نظر گرفتیم. برای سرنگ شماره دو که حاوی ژلاتین و نانوذره است فاصله نوک سوزن تا کلکتور 15 سانتی‌متر و سرعت کلکتور را 250 دور در دقیقه و ولتاژ را بین 12 تا 14 ولت و دبی سرنگ را  $0/1$  سانتی‌متر مکعب بر ساعت در نظر گرفتیم. بعد از ریسیدن الیاف، نانوالیاف را که بر روی کلکتور دستگاه الکتروریسی جمع‌آوری شده را بر روی میله‌ای به صورت رول درآورده شد. برای بررسی مورفولوژی و هم‌چنین قطر نانوالیاف، داربست با غلظت‌های (0 و 1 و 2 و 3 درصد پلی‌آنیلین/گرافن) را به قطعه‌های  $2 \times 2$  سانتی‌متری آماده کرده (برای هر نمونه سه بار تکرار) و با طلا پوشش‌دهی شده و با میکروسکوپ الکترونی روبشی تصاویر آن تهیه شده است. آزمون هدایت الکتریکی به وسیله اسیلوسکوپ چهار پراب صورت پذیرفته است و میزان هدایت الکتریکی داربست‌ها محاسبه شده است. برای

درصد از نانوذره پلی آنیلین/گرافن کاهش ولتاژ خروجی مشاهده شده است (تصویر 2).

با محاسبه درصد زنده ماندن (تصویر 3) سلول‌های فئوکروسیتوما بر روی کانال هدایت عصب، نتایج به دست آمده نیز نشان‌دهنده افزایش میزان زنده ماندن تا غلظت 2 درصد پلی آنیلین/گرافن، قابل مشاهده است که در 3 درصد پلی آنیلین/گرافن کاهش میزان زنده ماندن سلول‌ها بیان شده است. در تمامی نمونه‌ها درصد زنده ماندن سلول‌های شبه عصبی فئوکروسیتوما در روز سوم بیشتر از روز اول بوده است (تصاویر 3 و 4).



تصویر 3- اندازه‌گیری میزان ولتاژ خروجی

#### بحث

سیستم عصبی در بازسازی محدودیت‌هایی از جمله نقص آکسون با شکاف و آسیب‌دیدگی بیشتر از 5 میلی‌متر به‌کارگیری روش‌های آلوگرافت و اتوگرافت برای حل این مسئله چندین عیب به همراه دارد از جمله محدودیت بازسازی عصب و از دست رفتن عملکرد عضو. کانال عصبی به‌عنوان یک روش شناخته شده و ایده‌آل در نظر محققین است که می‌تواند سرعت بازسازی بافت عصبی را بهبود بخشد. یک کانال ایده‌آل دارای ویژگی‌هایی از جمله زیست‌سازگاری و زیست‌تخریب‌پذیری و زیست‌فعالی با خواص مکانیکی و فیزیکی مطلوب مد نظر است.

درصد‌های مختلف پلی آنیلین/گرافن  $PAG0=461\pm122$ ,  $PAG1=324\pm99$ ,  $PAG2=236\pm85$ ,  $PAG3=243\pm143$  این‌گونه محاسبه شده است. همان‌طور که مقادیر نشان می‌دهند، کاهش میانگین قطر نانوالیاف را تا 2 درصد شاهد بوده و افزایش میانگین را در نمونه  $PAG3$  که همان کانال با میزان 3 درصد نانوذره است را مشاهده می‌کنیم.

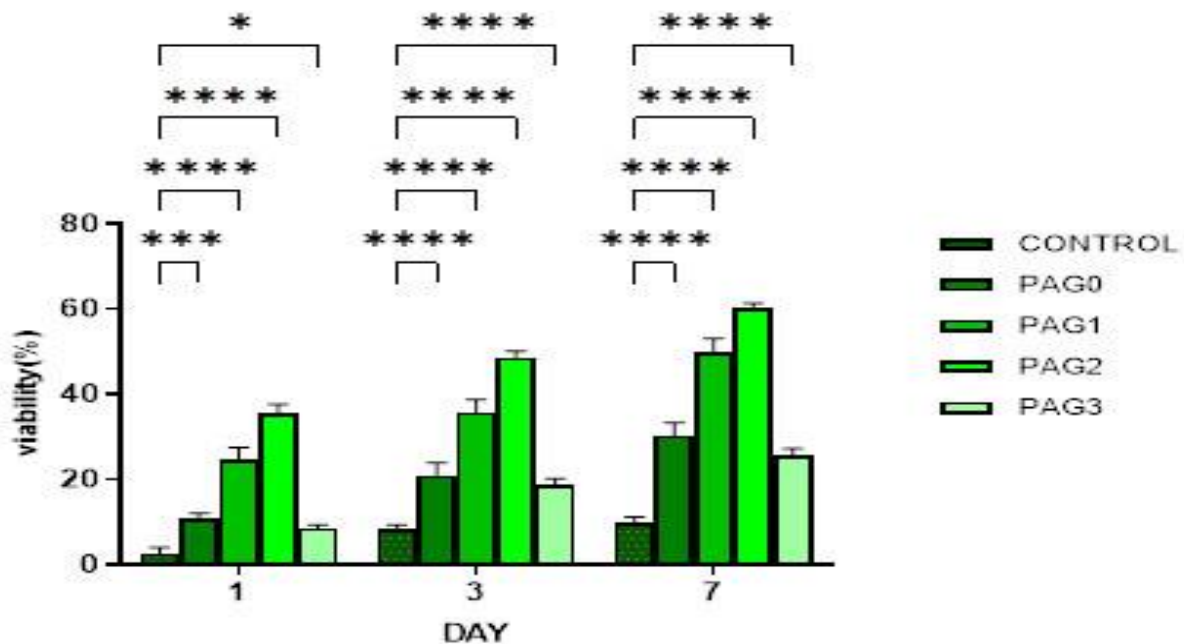
در نتیجه، اگرچه ضربان‌ساز معمولی توسط اکثر رادیولوژیست‌ها به‌خوبی شناخته شده است، دستگاه‌های ضربان‌ساز جدیدتر، از جمله دفیبریلاتورهای قلبی، می‌توانند با افزایش استفاده از آن‌ها شناخته‌تر شوند. برای رادیولوژیست‌ها مهم است که بتوانند این دستگاه‌ها را به‌درستی شناسایی کرده و جایگاه مورد انتظار و عوارض احتمالی آن‌ها را درک کنند تا به بهترین نحو گزارش‌های دقیق و مرتبط بالینی ارائه کنند. فناوری ضربان‌ساز، کیفیت زندگی افراد مبتلا به برادی‌کاردی شدید را بهبود بخشیده است. این فناوری به بلوغ رسیده و میزان شکست به اندازه‌ای کم است که بتوان آن را یک درمان بسیار ایمن در نظر گرفت. بیشترین مشکلات ضربان‌سازها در زندگی افراد مربوط به کنترل‌های دوره‌ای و جراحی تعویض آن‌هاست.

مقادیر به‌دست‌آمده برای آزمون هدایت الکتریکی برای کانال‌ها در جدول 1 گزارش شده است. همان‌طور که در جدول مشاهده می‌شود، افزایش هدایت الکتریکی را تا غلظت  $PAG2$  قابل مشاهده است، اما میزان هدایت در  $PAG3$  کاهش یافته است (جدول 1).

جدول 1- تست هدایت الکتریکی کانال‌ها

نمونه‌ها	P0	P1	P2	P3
هدایت الکتریکی	0	$5/5 \times 10^{-5}$	$7/6 \times 10^{-5}$	$6/7 \times 10^{-5}$

برای اندازه‌گیری میزان ولتاژ خروجی و مشاهده خاصیت پیزوالکتریک در نمونه‌ها نتایج در تصویر 2 گزارش شده است. مقادیر به‌دست آمده برای ولتاژ خروجی این‌گونه گزارش شده است.  $PAG0 = 300.13 \pm 41\text{mv}$ ,  $PAG1 = 700.06 \pm 20\text{mv}$ ,  $PAG2 = 900.13 \pm 32\text{mv}$ ,  $PAG3 = 800.26 \pm 15\text{mv}$ ,  $PCN2 = 1000.03 \pm 15\text{mv}$  در این آزمون افزایش میزان ولتاژ خروجی را تا 2 درصد نانوذره پلی آنیلین / گرافن مشاهده شده است که در مقدار 3



تصویر 4- اندازه‌گیری درصد زنده ماندن سلول‌های *PCI2* پس از گذشت 1 و 3 و 7 روز برای کانال‌های هدایت عصبی با غلظت‌های مختلف (0 و 1 و 2 و 3 درصد پلی‌آنیلین / گرافن)

همراه شدن آن با ژلاتین و به‌کارگیری ZnO جهت ایجاد خاصیت خودتحریکی در هسته و نانوکامپوزیت PAG هم در پوسته و هم در هسته تأمین‌کننده خاصیت الکتریکی در کانال است.

نتایج میکروگراف SEM الیاف الکترورسی شده با تغییرات قطر بر اساس تغییرات غلظت PAG و همچنین نمودار خروجی ولتاژ و نمودار زنده‌مانی سلولی نشان‌دهنده این مطلب است که غلظت نانوکامپوزیت PAG 2 درصد بهینه بوده و همچنین بیان‌کننده معنی‌دار بودن تعاملات سلولی است. نتایج نشان می‌دهد با افزایش نانوذره در کانال هدایت عصبی، با غلظت‌های مختلف (0 و 1 و 2 و 3 درصد پلی‌آنیلین/گرافن) تا PAG2 کاهش میانگین قطر نانوالیاف را نشان می‌دهد؛ که در PAG3 افزایش میانگین قطر نانوالیاف مشاهده شد. نشان داده شد حضور نانوذره تا نمونه (2 درصد) است، باعث نازک شدن الیاف الکترورسی شده و همچنین ایجاد صافی و یکنواختی بیشتری در سطح کانال ایجاد کرده است.

بر اساس تحقیقات محققین، برای ساخت این کانال از پلیمرهای طبیعی و مصنوعی استفاده می‌شود. از بین پلیمرها پلی‌کاپرولاکتون یک پلیمر مصنوعی با آب‌گریزی و زیست‌تخریب‌پذیری بالا برای کانال مطلوب است. همراه شدن آن با ژلاتین که پلیمر طبیعی با آب‌دوستی بالا و چسبندگی سلولی بسیار مطلوب، نقص پلی‌کاپرولاکتون را رفع می‌کند.

با توجه به خاصیت خودتحریک‌شوندگی مد نظر برای کانال هدایت عصبی به‌کارگیری PVDF که یک پلیمر مصنوعی با آب‌گریزی بالا و در فاز  $\beta$  خود خاصیت پیزوالکتریک دارد و همراه شدن آن با نانوذرات ZnO می‌تواند اثر سینرژیک در خروجی ولتاژ داشته باشد، گزینه مناسبی است. کانال دو قسمتی هدایت عصبی که دارای جدار خارجی و هسته داخلی گزینه مناسبی است که برای دستیابی به پوسته خارجی روش الکترورسی دوطرفه و برای دستیابی به هسته داخلی به‌کارگیری هیدروژل متخلخل و متشکل از کیتوزان (Cs) با زیست‌فعالیت بالا و



است. نتایج به دست آمده نشان دهنده میزان بهینه 2 درصد نانوذره پلی آنیلین/گرافن است.

### نتیجه گیری

با توجه به نتایج به دست آمده از این پژوهش می توان گفت در جراحی عصب کانال هدایت عصبی خودتحریرک - شونده می تواند بستر مناسبی برای رشد و تکثیر سلول های شبه عصبی فئوکروسیتوما باشد. همچنین با به کارگیری میزان بهینه PAG2 هدایت الکتریکی مطلوب و همچنین درصد بقاء سلولی مناسبی را نتیجه گرفت و در نهایت جراحی هایی که در آن نیاز به ایجاد کانال عصب است با استفاده از این داربست توسط جراح شانس بالاتری در به دست آوردن موفقیت دارند.

آزمون هدایت الکتریکی نیز نشان دهنده افزایش هدایت الکتریکی و همچنین میزان ولتاژ خروجی (اندازه گیری خاصیت پیزوالکتریک) تا نمونه PAG2 است که در نمونه PAG3 کاهش میزان هدایت الکتریکی قابل مشاهده بوده است. آزمون سمیت سلولی نیز به همین ترتیب تا نمونه PAG2 نرخ زنده ماندن سلول های فئوکروسیتوما افزایش یافته اما در نمونه PAG3 کاهش درصد زنده ماندن سلول ها قابل مشاهده بود. در مقایسه با کار محمدی و همکارانش<sup>24</sup> به علت حضور پلی وینیدیلین فلوراید و ایجاد خاصیت خودتحریرک درصد زنده ماندن سلول ها افزایش یافته است. در تمامی آزمون ها روند افزایشی تا نمونه PAG2 مشاهده شد، که با افزایش بیشتر نانوذره پلی آنیلین/گرافن تا 3 درصد کاهش مشاهده شده است. که میزان بهینه برای نانوذره در این پژوهش 2 درصد نانوذره پلی آنیلین/گرافن

**Abstract:**

## Construction and Characterization of Polyphenylene Graphene / PVDF Self-Stimulated Neural Conduction Channels for the Growth and Proliferation of PC12-Like Neuronal Cells

*Javidi H. PhD<sup>\*</sup>, Movahedi M. PhD<sup>\*\*</sup>*

(Received: 11 Nov 2023      Accepted: 26 Feb 2024)

**Introduction & Objective:** So far, various studies have been carried out in order to design different methods for the construction of the nerve channel with the aim of repairing the nerve tissue. The purpose of this study is nerve repair surgery by making a nerve conductive channel with the aim of self-stimulation. In this study, polycaprolactone (PCL) and polyvinylidene fluoride (PVDF) channel, in combination with polyaniline/graphene nanoparticles (Polyaniline Graphene-PAG) and gelatin, was prepared by a two-way and simultaneous electrospinning approach.

**Materials & Methods:** At first, solutions containing 13% by volume of polycaprolactone and 19% by volume of polyvinylidene fluoride in the common solvent of dimethylformamide (Dimethylformamide - DMF) and acetone were dissolved separately, and then both solutions were mixed together. In the next step, 28 % by weight and volume of gelatin solution was dissolved in distilled water and acetic acid, and polyaniline/graphene nanoparticles with 0, 1, 2, and 3 percent by weight and volume were homogeneously mixed in the gelatin solution, and then two-way and simultaneous electrospinning process Was performed. Scanning Electron Microscope (SEM) was used to examine the morphology of the fibers. In order to determine the optimal amount of polyaniline / graphene nanoparticles for nerve conduction, electrical conductivity and piezoelectric properties of the fabricated scaffolds were investigated and also the survival percentage of pheocrocytoma cell line (PC12) on the scaffold was calculated. Data were calculated as mean  $\pm$  standard deviation (Mean  $\pm$  SD). The significant level of differences was determined to be ( $P < 0.05$ ).

**Results:** The results was showed that with increasing the percentage of polyaniline/graphene nanoparticles up to 2% by weight, the amount of electrical conductivity and output voltage increased, but at a concentration of 3% by weight, the amount of electrical conductivity and also the output voltage decreased. Scanning electron microscope observations showed that the average diameter of nanofibers decreased up to a concentration of 2% by weight, but at a concentration of 3% by weight of polyaniline/graphene nanoparticles, the diameter of nanofibers increased. Also, the biodegradation of electrospun scaffolds showed that the increase of nanoparticles caused a decrease in degradability.

**Conclusions:** In nerve repair surgery, the presence of polycaprolactone and gelatin along with polyaniline/graphene nanoparticle increased the nerve conduction and also the use of polyvinylidene fluoride in the electrospun scaffold will improve the self-stimulation property in the nerve conduction channel, which can be a suitable substrate for The growth and cell proliferation of the nerve tissue, and hence the probability of success in the surgery increases to its maximum extent.

***Key Words: Neural Conduction Channel, Self-Excitation Property, Nanoparticles, Mechanical Properties***

\* *Researcher, Department of Medical Engineering, Biomaterial Orientation, Islamic Azad University, Science & Research Branch, Tehran, Iran*

\*\* *Assistant Professor, Department of Biomaterial Medical Engineering, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, Iran*

## References:

1. L. Ghasemi-Mobarakeh, M.P. Prabhakaran, M. Morshed, M.H. Nasr-Esfahani, S. Ramakrishna, Electrospun poly (epsilon-caprolactone) gelatin nanofibrous scaffolds for nerve tissue engineering, *Biomaterials* 29(34), (2008), 4532-9.
2. T. Jiang, E.J. Carbone, K.W.H. Lo, C.T. Laurencin, Electrospinning of polymer nanofibers for tissue regeneration, *Progress in Polymer Science* 46 (2015) 1-24.
3. J. Dulnik, D. Kołbuk, P. Denis, P. Sajkiewicz, The effect of a solvent on cellular response to PCL/gelatin and PCL/collagen electrospun nanofibres, *European Polymer Journal* 104 (2018), 147-156.
4. S. Khorshidi, A. Solouk, H. Mirzadeh, S. Mazinani, J.M. Lagaron, S. Sharifi, S. Ramakrishna, A review of key challenges of electrospun scaffolds for tissue-engineering applications, *Journal of tissue engineering and regenerative medicine* 10(9), (2016), 715-38.
5. Y. Cheng, Y. Xu, Y. Qian, X. Chen, Y. Ouyang, W.-E. Yuan, 3D structured self-powered PVDF/PCL scaffolds for peripheral nerve regeneration, *Nano Energy* 69 (2020), 104411.
6. S.-W. Peng, C.-W. Li, I.-M. Chiu, G.-J. Wang, Nerve guidance conduit with a hybrid structure of a PLGA microfibrillar bundle wrapped in a micro / nanostructured membrane, *Int J Nanomedicine* 12 (2017), 421-432.
7. M. Sarker, S. Naghieh, A.D. McInnes, D.J. Schreyer, X. Chen, Strategic Design and Fabrication of Nerve Guidance Conduits for Peripheral Nerve Regeneration, *Biotechnology journal* 13(7), (2018), e1700635.
8. Y. Wang, H. Tan, X. Hui, Biomaterial Scaffolds in Regenerative Therapy of the Central Nervous System, *BioMed research international* 2018 (2018), 7848901.
9. N.S. Binulal, A. Natarajan, D. Menon, V.K. Bhaskaran, U. Mony, S.V. Nair, PCL-gelatin composite nanofibers electrospun using diluted acetic acid-ethyl acetate solvent system for stem cell-based bone tissue engineering, *J Biomater Sci Polym Ed* 25(4), (2014), 325-340.
10. Y. Zhang, H. Ouyang, C.T. Lim, S. Ramakrishna, Z.M. Huang, Electrospinning of gelatin fibers and gelatin/PCL composite fibrous scaffolds, *Journal of biomedical materials research. Part B, Applied biomaterials* 72(1), (2005), 156-65.
11. S.Ö. Gönen, M.E. Taygun, S. Küçükbayrak, Effects of Electrospinning Parameters on Gelatin/Poly (ε-Caprolactone) Nanofiber Diameter, 38(5), (2015), 844-850.
12. M. Heidari, S.H. Bahrami, M. Ranjbar-Mohammadi, P.B. Milan, Smart electrospun nanofibers containing PCL/gelatin/graphene oxide for application in nerve tissue engineering, *Materials Science and Engineering: C* 103 (2019), 109768.
13. P.B. Malafaya, G.A. Silva, R.L. Reis, Natural-origin polymers as carriers and scaffolds for biomolecules and cell delivery in tissue engineering applications, *Advanced drug delivery reviews* 59(4-5) (2007), 207-33.
14. H. Baniasadi, S.A.A. Ramazani, S. Mashayekhan, Fabrication and characterization of conductive chitosan/gelatin-based scaffolds for nerve tissue engineering, *International journal of biological macromolecules* 74 (2015), 360-6.
15. J. Ratanavaraporn, R. Rangkupan, H. Jeeratawatchai, S. Kanokpanont, S. Damrongsakkul, Influences of physical and chemical crosslinking techniques on electrospun type A and B gelatin fiber mats, *International journal of biological macromolecules* 47(4), (2010), 431-8.
16. J. Huang, L. Lu, J. Zhang, X. Hu, Y. Zhang, W. Liang, S. Wu, Z. Luo, Electrical stimulation to conductive scaffold promotes axonal regeneration and remyelination in a rat model of large nerve defect, *PloS one* 7(6), (2012), e39526.
17. C.E. Schmidt, V.R. Shastri, J.P. Vacanti, R. Langer, Stimulation of neurite outgrowth using an electrically conducting polymer, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 94(17), (1997), 8948-53.
18. C. Merlini, G.M.d.O. Barra, S.D.A.d.S. Ramôa, G. Contri, R.d.S. Almeida, M.A. d'Ávila, B.G. Soares, Electrically Conductive Polyaniline-Coated Electrospun Poly(Vinylidene Fluoride) Mats, 2(14), (2015).
19. Q.V. Thi, S. Lim, E. Jang, J. Kim, N. Van Khoi, N.T. Tung, D. Sohn, Silica particles wrapped with poly(aniline-co-pyrrole) and reduced graphene oxide for advanced microwave absorption, *Materials Chemistry and Physics* 244 (2020), 122691.
20. M. Mohseni, A.R. S. A, F. H Shirazi, N.H. Nemati, Preparation and characterization of self-electrical stimuli conductive gellan based nano scaffold for nerve regeneration containing chopped short spun nanofibers of PVDF/MCM41 and polyaniline/graphene nanoparticles: Physical, mechanical and morphological studies, *International journal of biological macromolecules* 167 (2021), 881-893.
21. M. Yadollahi, S. Farhoudian, S. Barkhordari, I. Gholamali, H. Farhadnejad, H. Motasadizadeh, Facile synthesis of chitosan/ZnO bio-nanocomposite hydrogel beads as drug delivery systems, *International journal of biological macromolecules* 82 (2016), 273-278.
22. N. Abzan, M. Kharaziha, S. Labbaf, Development of three-dimensional piezoelectric polyvinylidene fluoride-graphene oxide scaffold by non-solvent induced phase separation method for nerve tissue engineering, *Materials & Design* 167 (2019), 107636.

23. M. Soleimani, S. Mashayekhan, H. Baniasadi, A. Ramazani, M. Ansarizadeh, Design and fabrication of conductive nanofibrous scaffolds for neural tissue engineering: Process modeling via response surface methodology, *Journal of biomaterials applications* 33(5), (2018), 619-629.
24. M. Mohammadi, A. Ramazani SaadatAbadi, S. Mashayekhan, R. Sanaei, Conductive multichannel PCL/gelatin conduit with tunable mechanical and structural properties for peripheral nerve regeneration, 137(40), (2020), 49219.