ساخت و مشخصه‌یابی داربست الکتروریسی شده پلی‌کاپرولاکتون / پلی‌وینیل الکل حاوی عصاره آلوئه‌ورا برای مهندسی بافت استرومای قرنیه

سیده مهسا میرمحمدی*، دکتر احمد رمضانی سعادت‌آبادی**، دکتر آزاده آصف‌نژاد***
دکتر علی عبداللهی****

چکیده:

زمینه و هدف: به دلیل بیماری‌های قرنیه و مشکلات در خصوص پیوند قرنیه آلوگرافت که شامل کمبود قرنیه باکیفیت و همچنین رد بافت پیوندی توسط سیستم ایمنی در بازه‌ی پنج سال است، ساخت قرنیه با کمک فناوری جدید از اهمیت بالایی برخوردار است. در این پژوهش، پلیمر پلی‌کاپرولاکتون به همراه پلی‌وینیل الکل حاوی عصاره آلوئه‌ورا استفاده شد تا داربست الکتروریسی با خواص مشابه با بافت هدف تهیه شود.

مواد و روش‌ها: برای تعیین مورفولوژی داربست‌های الکتروریسی شده از میکروسکوپ الکترونی روبشی استفاده شد. به‌منظور تعیین خواص فیزیکی داربست‌های الکتروریسی شده، میزان شفافیت، آب‌دوستی، جذب آب و تخریب‌پذیری آن‌ها بررسی شد. همچنین خواص مکانیکی داربست‌ها مورد بررسی قرار گرفت. در راستای بررسی گروه‌های عملکردی داربست‌ها از طیف‌سنجی مادون‌قرمز تبدیل فوریه استفاده شد. از سلول‌های استرومای قرنیه، جهت بررسی سمیت سلولی و چسبندگی به سطح داربست‌ها انجام گردید.

یافته‌ها: نتایج میکروسکوپ الکترونی روبشی نشان داد که با افزودن عصاره آلوئه‌ورا، قطر الیاف در داربست پلی‌کاپرولاکتون و پلی‌وینیل الکل از 423 به 214 نانومتر کاهش می‌یابد. نتایج حاصل از آزمون زاویه تماس، جذب آب و تخریب‌پذیری نشان داد که با افزودن پلی‌وینیل الکل و عصاره آلوئه‌ورا میزان آب‌دوستی و تخریب‌پذیری داربست‌های الکتروریسی افزایش یافت. نتایج حاصل از آزمون انتقال نور نشان داد که با افزودن مقدار پلی‌وینیل الکل و عصاره آلوئه‌ورا، میزان انتقال نور داربست الکتروریسی پلی‌کاپرولاکتون از 14/7 به 74/14 درصد در داربست پلی‌کاپرولاکتون و پلی‌وینیل الکل حاوی عصاره آلوئه‌ورا افزایش می‌یابد. نتایج حاصل از تست‌های مکانیکی نشان داد که با افزودن پلی‌وینیل الکل و آلوئه‌ورا، مدول یانگ داربست‌های الکتروریسی نسبت به داربست پلی‌کاپرولاکتون افزایش یافت.

نتیجه‌گیری: نتایج نشان داد افزودن پلی‌وینیل الکل و عصاره آلوئه‌ورا به پلی‌کاپرولاکتون باعث بهبود خواص مکانیکی، فیزیکی، شیمیایی و همچنین سبب بهبود چسبندگی و رفتار سلولی شد.

واژه‌های کلیدی: *الکتروریسی، الیاف هم‌راستا، استرومای قرنیه، پلی‌کاپرولاکتون، پلی‌وینیل الکل، عصاره آلوئه‌ورا*

* کارشناسی ارشد مهندسی پزشکی، دانشکده علوم و فناوری‌های پزشکی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم و تحقیقات
** استاد گروه مهندسی شیمی نفت، دانشگاه صنعتی شریف
*** استادیار گروه بیومواد، مهندسی پزشکی، واحد علوم تحقیقات، دانشگاه آزاد اسلامی
**** دانشیار گروه جراحی عمومی، دانشگاه آزاد اسلامی علوم پزشکی، بیمارستان بوعلی

تاریخ وصول: 1400/08/08
تاریخ پذیرش: 1401/01/20

نویسندهٔ پاسخگو: دکتر احمد رمضانی سعادت آبادی
تلفن: 02166165401
E-mail: ramazani@sharif.edu

زمینه و هدف

انواع مختلف بیماری‌های مرتبط با چشم مانند دیستروفی و زخم و یا نازک شدن قرنیه می‌تواند احتمال اختلالات استرومای قرنیه که دومین دلیل شایع نابینایی است را افـزایش دهد. طبق آمار سازمان جهـانی بهداشت، 7 درصد از جمعیت جهان از بیماری‌های مرتبط با قرنیه رنج می‌برند.[1]

با نگاه دقیق‌تر به ساختار قرنیه، این لایه از سطح چشم با ضخامت حدود 500 میکرومتر از 3 لایه اصلی اپیتلیوم، استروما و اندوتلیوم تشکیل شده است.[2] استروما (حدود 90 درصد حجم قرنیه) به دلیل عملکرد به عنوان چهارچوب قرنیه، نقش مهمی در حفظ ساختار و انتقال نور به عهده دارد.[3] استروما که تقریباً از 200-300 لایه تشکیل شده، شامل الیاف هم‌راستای کلاژن است.[4] طبق مطالعات بالینی، برای عبور نور کامل از ساختار قرنیه که به میزان شفافیت ساختار بستگی دارد، هم‌راستایی کاملاً یکنواخت الیاف کلاژن استروما پارامتر اصلی است که در غیر این صورت منجر به اختلال در عملکرد قرنیه خواهد شد. یکی از شایع‌ترین و اصلی‌ترین علت بروز اختلال در عملکرد قرنیه، قوز قرنیه است که در این بیماری ساختار قرنیه تحت تأثیر قرار خواهد گرفت. در این بیماری با تغییر شکل قرنیه از حالت گنبدی به مخروطی باعث ضعف در بینایی خواهد شد.[2] مشاهدات نشان می‌دهد که قوز قرنیه باعث سطح بالای آپوپتوز کراتوسیت‌های استرومای قرنیه و همچنین کاهش جرم استروما می‌شود که به‌موجب کاهش جرم، تأثیرات ناشی از تغییر در میزان کلاژن ساختار و برهم خوردن معماری استروما سبب می‌شود.[2] اولین درمان نازک شدن استرومایی توسعه‌یافته، استفاده از پیوند لایه‌ای قرنیه است؛ اما این درمان نکات منفی مختلفی دارد که شامل رد بافت پیوندی، نارسایی و ضعیف شدن بینایی به دلیل امکان صورت پذیرفتن آستیگماتیسم بعد از عمل در رابطه با تنش‌های صورت گرفته توسط بخیه بافت پیوندی است. علاوه بر این، امکان دسترسی به بافت قرنیه اهدا شونده با کیفیت مناسب نیز محدود است.[5]

به‌عنوان روش جایگزین برای دستیابی به رویکردی برای مقابله با معایب پیوند بافت آلوگرافت قرنیه، مهندسی بافت موردتوجه قرار گرفته شد. مهندسی بافت استراتژی جدیدی را برای درمان‌های پزشکی با به‌کارگیری جایگزین‌های بیولوژیک برای ترمیم و بازسازی بافت‌های بیمار یا آسیب دیده، با استفاده از زیست مواد و با به‌کارگیری یا بدون استفاده از سلول‌های پیش‌ساز جاندار، فراهم می‌کند.[6] در این رویکرد با هدف دستیابی به یک بستر ایده‌آل و همچنین بهره گرفتن از سلول‌های ساکن بافت مورد نظر و القاء هدف با کمک فاکتورهای رشد لازم، سعی در رسیدن به یک محیط ایده‌آل برای بازسازی بافت مورد نظر در محیط داخل بدن شده است.[7] با این‌حال، استرومای قرنیه ساختار منحصر به فرد را شامل می‌شود و لازم به ذکر است که تاکنون محققان در رسیدن به ساختار مشابه با استرومای قرنیه که شفافیت و مقاومت مکانیکی موردنظر را به همراه داشته باشد، موفق نبوده‌اند.[8]

رویکرد الکتروریسی با استفاده از پلیمر مصنوعی و یا طبیعی یکی از روش‌های امیدوارکننده برای تقلید از معماری ماتریس خارج سلولی (ECM) در مهندسی بافت است.[9] تحقیقات صورت گرفته نشان می‌دهد، داربست الکتروریسی شده با بهره گرفتن از الیاف هم‌راستا، یک بستر ایده‌آل برای افزایش برهمکنش سلول / داربست در خصوص سلول‌های کراتوسیت استرومای قرنیه (اتصال سلولی، تکثیر و مهاجرت) است و این بستر می‌تواند مناسب‌ترین حالت برای رشد طولانی مدت بافت استرومای قرنیه باشد.[4]

علاوه بر این، مواد مورد استفاده در ساخت داربست مهندسی بافت قرنیه باید زیست‌سازگاری، خواص مکانیکی و انتقال نور مشابه با بافت هدف و تخریب‌پذیری آهسته و پیوسته را به همراه داشته باشد که با نسبت بهینه‌ای از اجزای زیست فعال، بدون مشاهده تأثیرات سمی با هدف بهبود رشد سلول مورد استفاده قرار خواهد گرفت.[10]

اخیراً مطالعاتی در مورد استفاده از آلوئه‌ورا در مهندسی بافت قرنیه انجام شده است. آلوئه‌ورا به دلیل اجزای زیست فعال که شامل خواص ضدعفونی‌کننده، ضدقارچ، آنتی‌اکسیدان، ضد التهاب، ضد باکتری و خاصیت بهبود زخم است از جذابیت بالایی برخوردار است. مطالعات نشان داده است که استفاده از این ماده به دلیل خواص منحصربه‌فرد آن، باعث ترمیم زخم و رشد بافت آسیب دیده خواهد شد.

در مطالعات اخیر که در مهندسی بافت قرنیه از عصاره آلوئه‌ورا استفاده شد به‌خوبی ثابت کرد که تأثیر به‌خصوص در عملکرد آنتی اکسیدان، نفوذپذیری اکسیژن، افزایش زیست تخریب‌پذیری و همچنین عملکرد ویژه‌ای در بهبود تکثیر سلولی و بازسازی نشان داده است. بر اساس مطالعات قبلی، عصاره آلوئه‌ورا هیچ‌گونه سمیت سلولی از خود نشان نداده و مزیت دیگر آن‌که از لحاظ اقتصادی مقرون به صرفه است.[11] بنابراین، ساخت بستر ایده‌آل با رفتار قابل پیش‌بینی با بهره‌گیری از عصاره آلوئه‌ورا بسیار توصیه شده است.

پلی‌وینیل الکل خواص بالقوه‌ای دارد. پلی‌وینیل الکل یک ماده قابل‌اطمینان در کاربردهای مهندسی بافت معرفی شده است.[12] پلی‌وینیل الکل برای کاربردهای مهندسی بافت استرومای قرنیه در نظر گرفته شده است، زیرا این ماده تخریب‌پذیری قابل کنترل، استحکام مکانیکی مطلوب، زیست‌سازگاری عالی و شفافیت را در ساخت بستر سلولی سبب خواهد شد.[13]

با این‌حال، چالش اصلی در استفاده از پلی‌وینیل الکل با رویکرد الکتروریسی خواص مکانیکی پایین و عدم شکل‌گیری الیاف مطلوب است.[14] پلی‌کاپرولاکتون، یک پلی‌استر آلیفاتیک زیست‌تخریب‌پذیر است که به دلیل قابلیت الکتروریسی بالا، بسیار مناسب و شناخته شده در این رویکرد به شمار می‌رود که توجه بسیار زیادی را به خود جلب کرده است. همچنین، پلی‌کاپرولاکتون که پلیمری زیست‌سازگار است، مزیت‌هایی از قبیل محدوده گسترده از کنترل‌پذیر بودن ساختار، خواص مکانیکی قابل‌کنترل و قیمت پایین را شامل می‌شود. با این‌حال، پلی‌کاپرولاکتون یک پلیمر آب‌گریز است که به دلیل تمایل پایین به برهم‌کنش با سلول‌های میزبان نیازمند اصلاح است.[15] ترکیب بهینه از پلیمر طبیعی و سنتزی باعث خواهد شد تا داربستی با خواص مورد قبول در زیست‌سازگاری، میزان انتقال نور و خواص مکانیکی نسبت به حالت تک آن‌ها حاصل شود.[16]

در این پژوهش، با هدف ساخت داربست الکتروریسی پلی‌کاپرولاکتون به همراه پلی‌وینیل الکل حاوی نسبت‌های مختلف عصاره آلوئه‌ورا برای مهندسی بافت استرومای قرنیه صورت خواهد پذیرفت. برای ارزیابی اثر افزودن پلی‌وینیل الکل و عصاره آلوئه‌ورا به داربست الکتروریسی پلی‌کاپرولاکتون، خواص فیزیکی، شیمیایی و مکانیکی مورد ارزیابی قرار خواهند گرفت. علاوه بر این، تأثیر افزودن پلی‌وینیل الکل و عصاره آلوئه‌ورا در چسبندگی و تکثیر سلولی بر روی داربست پلی‌کاپرولاکتون مورد بررسی قرار گرفته شد.

مواد و روش‌ها

این مطالعه یک مطالعه پژوهشی است که در آن 3 نمونه ساخته شد و خواص فیزیکی، شیمیایی و بیولوژیکی آن مورد ارزیابی قرار گرفت. در این مطالعه هر آزمون برای هر نمونه 3 بار تکرار گردید. در این پژوهش برای ساخت داربست کامپوزیتی، از ترکیب پلیمر مصنوعی پلی‌کاپرولاکتون، پلیمر پلی‌وینیل الکل و عصاره آلوئه‌ورا استفاده شد. در ابتدا، برای استخراج عصاره آلوئه‌ورا، بعد از جداکردن پوست گیاه آلوئه‌ورا، ژل شفاف به همراه آب دیونیزه شسته خواهد شد تا مایع زرد رنگ حذف شود. در ادامه، ژل آلوئه‌ورا به تکه‌های 2-3 سانتیمتری همگن بریده شده و در مرحله بعد، به‌منظور جداسازی قسمت حلال از غیر حلال سانتریفیوژ شد. ماده حاصل با قرار گرفتن در حجم معادل سه برابر اتانول به مدت 24 ساعت و دمای محیط قرار گرفت. در ادامه، به مدت 15 دقیقه در دمای 4 °C با سرعت 12000 دور در دقیقه سانتریفیوژ و آماده استفاده برای ساخت داربست مورد نظر گردید.

در ادامه، برای ساخت داربست الکتروریسی پلیمر پلی‌وینیل الکل درون آب دیونیزه در دمای 80 درجه سانتی‌گراد در مدت زمان 2 ساعت همگن شد. در ادامه، این ترکیب با عصاره آلوئه‌ورا و غلظت 10% وزنی / حجمی درون آب دیونیزه شده در دمای 80 درجه سانتی‌گراد در مدت زمان 2 ساعت همگن شد. به دنبال آن پلی‌کاپرولاکتون در نسبت حجمی 2/1 از حلال‌های دی متیل فرمامید / دی کلرو متان به‌صورت جداگانه در بازه زمانی 3 ساعت حل شد، محلول حاصل به محلول پلی‌وینیل الکل و پلی‌وینیل الکل / عصاره آلوئه‌ورا اضافه و پارامترهای بهینه الکتروریسی تعیین و الیاف ریسیده شدند. پارامترهای بهینه الکتروریسی بعد از مشاهده لام زیر میکروسکوپ به ترتیب ولتاژ 16 کیلوولت، فاصله نوک سوزن تا صفحه جمع‌کننده 30 سانتی‌متر، سرعت جریان 0/5 میلی‌لیتر بر ساعت، غلظت محلول 10% وزنی / حجمی و سرعت چرخش صفحه جمع‌کننده برابر با 120 دور در دقیقه در نظر گرفته شد. در ادامه به‌منظور خروج باقی مانده حلال و آب اضافی درون

ساختار، داربست‌های به‌دست آمده، به مدت 24 ساعت در دمای 30 درجه سانتی‌گراد درون آون خلأ وارد شد.

مشاهده مورفولوژی

به‌منظور بررسی ساختار و قطر الیاف، میکروسکوپ الکترونی روبشی (SEM, TESCAN-Vega 3, Czech Republic) با ولتاژ 20 کیلوولت برای مشاهده الیاف در بزرگنمایی‌های مختلف استفاده شد. با توجه به اینکه نمونه‌هایی که با میکروسکوپ الکترونی روبشی مورد بررسی قرار می‌گیرند باید دارای هدایت الکتریکی باشند، آماده‌سازی نمونه‌ها با نشاندن لایه نازکی از طلا با ضخامت 100 آنگستروم انجام شد که نمونه‌ها دارای هدایت الکتریکی شده، الکترون‌های سطحی دفع و وضوح تصاویر بهبود یافت. جهت مشاهده مورفولوژی داربست‌ها، نمونه‌ها در ابعاد 1 × 1 سانتیمتر بریده شده و به مدت 5 دقیقه با طلا پوشش داده شدند و تحت ولتاژ 20 کیلوولت و جریان 1 میلی‌آمپر تصویربرداری انجام شد.

بعد از مشاهده الیاف توسط SEM، از تصاویر حاصل برای ارزیابی میزان تخلخل و همچنین میزان هم‌راستایی الیاف استفاده شد. Image J نرم‌افزاری مفید برای بررسی خصوصیات الیاف است که برای محاسبه میزان هم‌راستایی می‌توان از آن بهره گرفت. استفاده از نرم‌افزار Image J امکان تشخیص میزان هم‌راستایی الیاف را با تفکیک رنگ‌آمیزی الیاف نسبت به زاویه الیاف امکان‌پذیر کرده است. همچنین هم‌راستایی الیاف با توزیع آن در زاویه خاص قابل‌تشخیص است. برای بررسی درصد تخلخل داربست‌های الکتروریسی شده، از نرم‌افزار MATLAB (Wayne Rasband, National Institute of Health, USA), استفاده شد. در این بررسی با استفاده از دو تصویر در مکان‌های مختلف نمونه ارزیابی صورت پذیرفت.

ارزیابی میزان انتقال نور

به‌منظور بررسی میزان انتقال نور، داربست‌های الکتروریسی بریده شده و به مدت 24 ساعت در چاهک‌های پلیت 96 خانه که با محلول فسفات بافرسالین (PBS) پر شده است برای نفوذ کامل محیط مایع به داخل ساختار، قرار گرفتند. ارزیابی میزان انتقال نور داربست‌ها توسط اسپکتروفوتومتری (BioTek, Winooski, VT, USA) صورت پذیرفت. برای بررسی میزان انتقال نور توسط داده‌های حاصل از دستگاه، از معادله 3-1 استفاده شد.

$$T\ (\%) = 10\text{-}A \times 100 \quad \text{(معادله 3-1)}$$

در این معادله، T میزان انتقال نور و A میزان جذب نور توسط داربست‌ها است.

آزمون سنجش خواص مکانیکی

برای بررسی میزان استحکام کششی داربست‌های الکتروریسی شده، داربست‌ها در ابعاد 2 میلی‌متر 10×20 بریده شده و درون قاب‌های مخصوص قرار داده شدند. پس از جداسازی از فویل آلومینیومی قطر نمونه‌های داربست‌ها نیز با کولیس به ترتیب 120 میکرومتر اندازه‌گیری شد. سپس خواص مکانیکی نمونه‌ها در دستگاه آزمون کشش با سرعت فک 10 میلیمتر / دقیقه در دمای اتاق ثبت شد. برای هر داربست، 3 نمونه کشش آماده گردید. آزمون توسط دستگاه سنتام با حداکثر نیروی 10 نیوتن انجام شد.

طیف‌سنجی با پرتو مادون‌قرمز به روش تبدیل فوریه

تعیین گروه‌های عاملی با استفاده از روش اسپکتروسکوپی فروسرخ با تبدیل فوریه (FTIR, Nicolet, NEXUS 670, USA) جهت ارزیابی تعیین ساختار و اندازه‌گیری گونه‌های شیمیائی انجام شد. در این دستگاه تابش فروسرخ به نمونه تابیده شده، مقداری از این انرژی توسط نمونه جذب و مقداری عبور می‌کند، در پایان مسیر باریکه نور به یک آشکارساز می‌رسد و با مقایسه شدت نور اولیه با نور رسیده شده به آشکارساز درنهایت نتیجه آنالیز به‌صورت طیف جذبی یا عبوری نمونه در صفحه‌نمایش نشان داده می‌شود. داده‌های حاصل اطلاعات جامع در خصوص شناسایی کیفی و کمی ترکیبات آلی حاوی نانوذرات، تعیین نوع گروه عاملی و پیوندهای موجود در مولکول‌های مواد را ارائه خواهند داد. این بررسی در طول موج‌های 400-4000 cm^{-1} برای شناسایی گروه‌های عاملی پلی‌کاپرولاکتون، پلی‌وینیل الکل و عصاره آلوئه‌ورا انجام شد.

بررسی زاویه تماس

پارامتر اصلی در این پژوهش تغییر در میزان پلیمرهای مصنوعی (پلی‌کاپرولاکتون و پلی‌وینیل الکل) و طبیعی (عصاره آلوئه‌ورا) است و این مواد تأثیر مستقیم بر آب‌دوستی داربست‌ها دارد، محاسبه این پارامتر ضروری به نظر میاید. برای محاسبه مقدار آب‌دوستی داربست‌ها از دستگاه اندازه‌گیری زاویه تماس (مدل **50-XCA**) استفاده شد. زاویه تماس با آب یکی از پارامترهای مهم در تشخیص میزان چسبندگی سلول‌ها است. به این منظور برای هر نمونه 4 - 3 بار قطره گذاری انجام شد. حجم هر قطره 4 میکرولیتر بوده و 10 ثانیه پس از گذاشتن قطره تصویر آن ثبت شد.

آزمون جذب آب

جهت بررسی میزان جذب آب داربست‌ها از آزمون جذب آب استفاده شد. بدین منظور، ابتدا وزن خشک نمونه‌ها اندازه‌گیری شد (W_d)، سپس داربست‌ها در محلول نمک بافر فسفات (**PBS**) غوطه‌ور شدند. در این مرحله در 4 بازه زمانی 3، 24، 48 و 72 ساعت داربست‌ها مجدداً وزن شدند (W_t). در ادامه از معادله (3 – 2) درصد جذب آب نمونه‌ها به دست آمد. لازم به ذکر است این آزمون برای 3 نمونه تکرار گردید تا مقدار میانگین و انحراف معیار به دست آید.

$$U\ (\%) = \frac{W_t - W_d}{W_d} \times 100 \quad \text{(معادله 3-2)}$$

آزمون تخریب‌پذیری

از محلول بافرسالین فسفات (**PBS**) برای تشخیص میزان زیست‌تخریب‌پذیری داربست‌ها استفاده می‌شود. داربست‌های نانوکامپوزیتی پلی‌کاپرولاکتون و همچنین داربست‌های پلی‌کاپرولاکتون/ پلی‌وینیل الکل و پلی‌کاپرولاکتون/ پلی‌وینیل الکل/ عصاره آلوئه‌ورا، با روش غوطه‌وری در بافرسالین فسفات در دمای 37°C و pH= 7/4 بررسی شدند. به‌این‌ترتیب که برای هر نوع داربست تعداد 3 نمونه با ابعاد 10×10 میلیمتر مربع در محلول **PBS** غوطه‌ور شده و در ادامه درون انکوباتور قرار گرفتند. به همین منظور از رابطه (3-3) درصد وزن از دست رفته داربست‌ها محاسبه می‌شود.

$$\Delta W\ (\%) = \frac{W_0 - W_d}{W_0} \times 100 \quad \text{(معادله 3-3)}$$

در این رابطه، W_0 وزن اولیه نمونه است و W_d وزن داربست در دوره‌های مشخص است. تخریب در بازه 3 ماه مورد بررسی خواهد شد.

ارزیابی چسبندگی سلولی

داربست‌ها در فسفات بافرسالین شامل 100 **U/ml** پنی‌سیلین، 50 $\mu g/mL$ جنتامایسین، 2/5 $\mu g/mL$ آمفوتریسین ب و 50 $\mu g/mL$ اریتروماسین غوطه‌ور شدند. سلول‌های کراتوسیت در نسبت 50:50 حجمی/حجمی **DMEM/F12** در 5% **CO2** و دمای محیط (37°C) کشت داده شدند. سوسپانسیون سلول‌های کراتوسیت در دانسیته 105×2 به داربست‌ها اضافه خواهد شد. برای مشاهده چسبندگی سلول‌ها، در بازه زمانی 4 روز، پس از آبگیری الکلی، نمونه‌ها برای تصویربرداری با میکروسکوپ الکترونی روبشی آماده شدند. بدین منظور، نمونه‌های کشت با استفاده از فسفات بافرسالین شسته شده و در محلول گلوتار آلدهید 2% به مدت 2 ساعت، سلول‌ها روی سطح تثبیت شدند. سپس جهت آبگیری نمونه‌ها در محلول اتانول 70، 80، 90 و 100% (هر کدام به مدت یک ساعت) قرار گرفته و خشک شدند. نهایتاً توسط میکروسکوپ الکترونی روبشی از نمونه‌ها تصویربرداری شد.

آزمون سمیت سلولی

در این پژوهش، آزمون **MTT** به‌منظور ارزیابی سمیت، میزان بقاء و تکثیر سلول‌های کراتوسیت بر روی داربست‌های الکتروریسی انجام شد. نمونه‌ها در سه پلیت 24 خانه قرار داده شدند. بدین ترتیب محیط کشت و سلول‌ها به مدت 24 ساعت در انکوباتور 37°C قرار گرفت. پس از 24 ساعت، ابتدا مایع رویی را خارج کرده و سپس با محلول فسفات بافرسالین دو بار شستشو داده شد. در ادامه پس از شمارش سلولی، به هر پلیت 15 هزار سلول اضافه شده و به مدت 10 تا 20 دقیقه داخل انکوباتور قرار داده شد تا به داربست‌ها بچسبند.

سپس 1 سانتیمتر مکعب محیط کشت به هر خانه اضافه شده و داخل انکوباتور قرار داده شد. هر سه روز محیط کشت تعویض شد. در این مرحله جهت انجام آزمون MTT، ابتدا مایع رویی تخلیه شده و دو بار با فسفات بافرسالین شستشو داده شده و سپس 400 میکرولیتر محیط بر روی هر خانه پلیت اضافه شد و به دنبال آن 40 میکرولیتر محلول MTT اضافه گردید. پس‌ازآن پلیت‌ها به مدت 4 - 3 ساعت در داخل انکوباتور 37°C گذاشته شده و پس از اتمام زمان انکوباسیون، محیط کشت به‌آرامی تخلیه شد. 400 میکرولیتر محلول DMSO به هر خانه پلیت اضافه و پس از پیپت کردن، پلیت‌ها را به مدت 15 دقیقه تا 3 ساعت (بسته به سرعت کنده شدن سلول‌ها) در محیط تاریک قرار داده شد. پس از آن 100 میکرولیتر از هر نمونه به پلیت 96 خانه انتقال یافت و با استفاده از دستگاه الایزاریدر در طول موج 540 نانومتر بر اساس فورمازان احیاشده، شدت جذب نوری خوانده شد. این آزمون با 3 تکرار و در بازه‌های زمانی 1، 2 و 3 روز صورت پذیرفت.

در انتها، میزان زنده‌مانی سلول‌ها با استفاده از معادله 3-4 محاسبه شد.

$$\text{میزان زنده‌مانی سلول‌ها (درصد)} = \frac{\text{میانگین داده‌های نمونه‌ها}}{\text{میانگین داده‌های کنترل}} \times 100 \quad \text{(معادله 3-4)}$$

روش تحلیل آماری

در این مطالعه پژوهشی، برای توصیف متغیرهای کمی دارای توزیع نرمال از میانگین و انحراف معیار (حدود اطمینان 95 درصد) استفاده شد. همچنین متغیرهای کیفی بر اساس تعداد و درصد توصیف شدند. تحلیل داده‌های با استفاده از نرم‌افزار SPSS نسخه 16 و توسط آزمون ANOVA یک‌طرفه بررسی شد. جهت مقایسه هر نمونه با نمونه‌ی کنترل از آزمون تعقیبی Turkey استفاده شد. لازم به ذکر است در تمامی تحلیل‌ها مقدار $P < 0/05$ به‌عنوان سطح معناداری در نظر گرفته شده است.

یافته‌ها

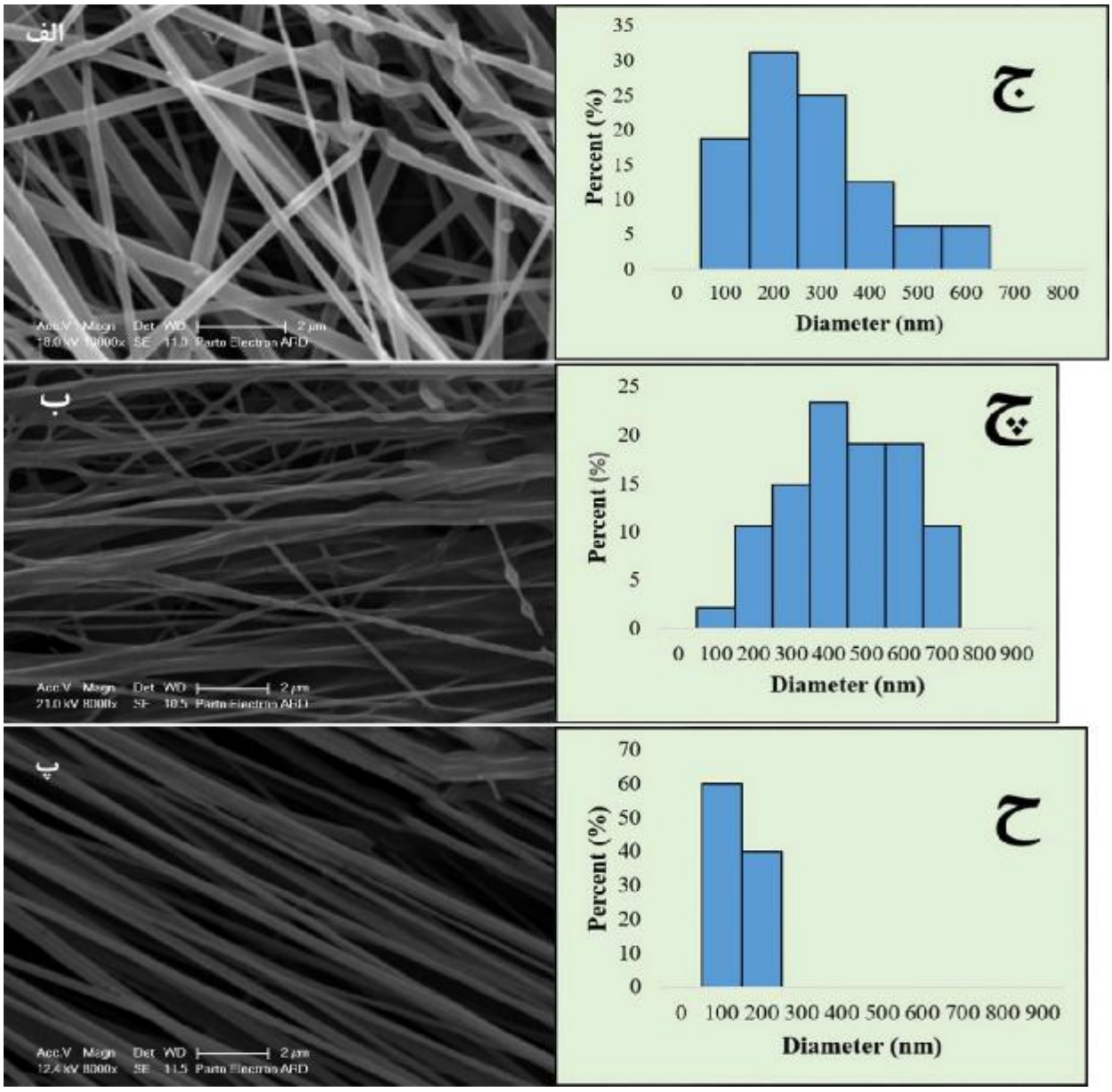
مشاهده مورفولوژی

برای دستیابی به داربست الکتروریسی شده دارای الیاف یکنواخت و بدون ساختار دانه تسبیح، پارامترهای دستگاه باید به‌گونه‌ای بهینه شود تا شاهد ساختار یکنواخت برای رسیدن به بهترین خواص مورد انتظار شود.[17] در ابتدا با اشاره به تصویر 1، تصویر میکروسکوپی معماری داربست پلی‌کاپرولاکتون را نشان می‌دهد. در ادامه با توجه به اهمیت اتصالات درونی داربست برای برهمکنش‌های سلولی (عبور اکسیژن و مواد غذایی) اندازه تخلخل‌ها با استفاده از نرم‌افزار Image J مورد بررسی قرار گرفت. همچنین با استفاده از نرم‌افزار MATLAB درصد تخلخل (جدول 1) به دست آمده است. با افزودن عصاره آلوئه‌ورا در محلول حاوی پلی‌کاپرولاکتون و پلی‌وینیل الکل، میانگین قطر الیاف روند کاهشی پیدا می‌کند که به دلیل کاهش ویسکوزیته محلول است. به‌طوری‌که می‌توان مشاهده کرد با اندازه‌گیری 30 لیف به‌طور تصادفی، این مقدار به 86±214 نانومتر کاهش داشت.

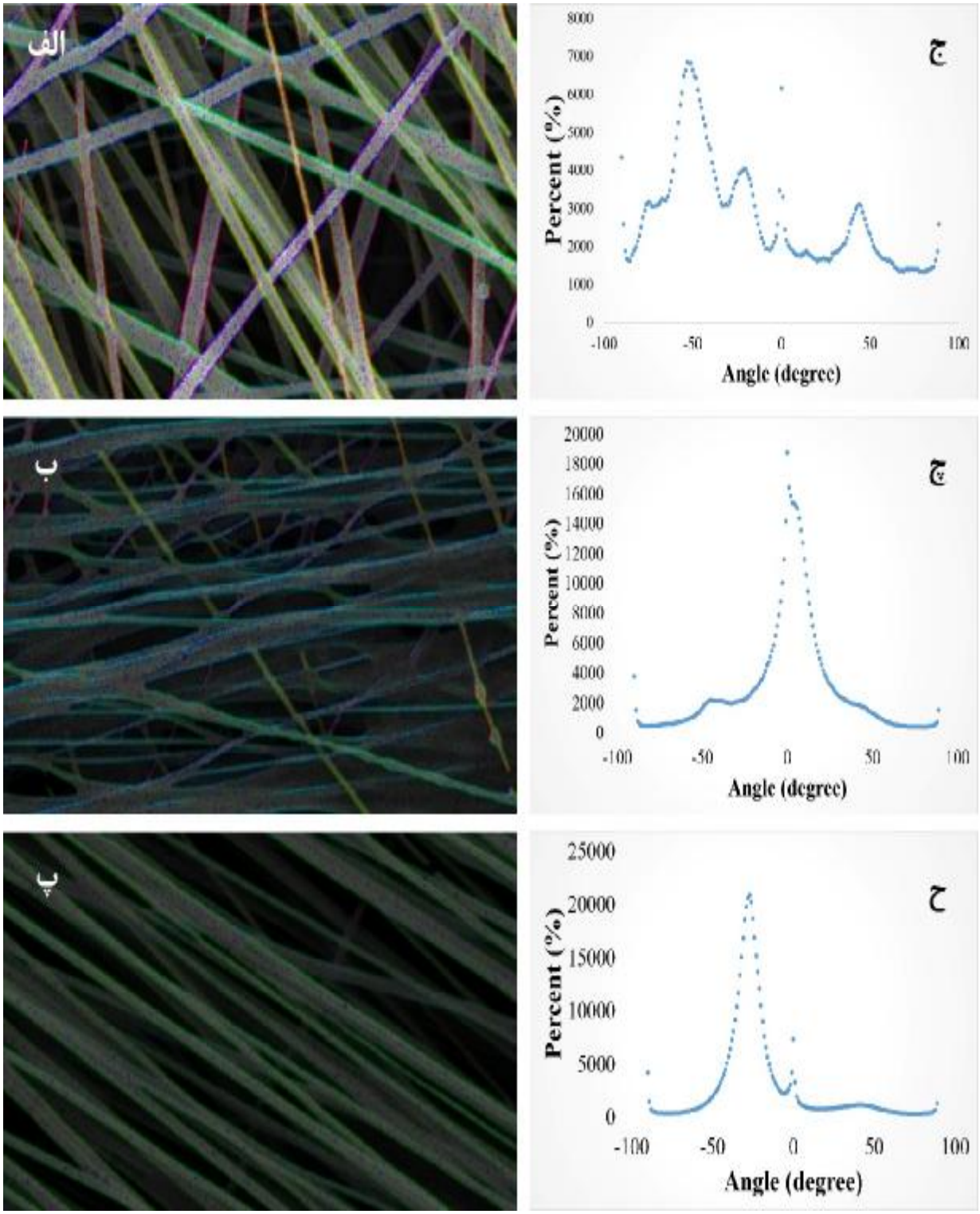
در این پژوهش، برای بررسی هم‌راستایی الیاف الکتروریسی شده از نرم‌افزار Image J استفاده شد که الیاف هم‌راستا با رنگ مشابه مشخص شدند. بر اساس مشاهدات داربست حاوی پلی‌کاپرولاکتون هم‌راستایی پایین را نشان داد (تصویر 2)، اما با افزودن پلی‌وینیل الکل میزان هم‌راستایی الیاف افزایش یافت. درحالی‌که پلی‌وینیل الکل به محلول افزوده می‌شود؛ باعث افزایش میزان هدایت الکتریکی خواهد شد. به‌عبارت دیگر، افزایش میزان هدایت الکتریکی باعث افزایش سرعت شکل‌گیری الیاف خواهد شد که در نتیجه الیاف هم‌راستا شکل خواهد گرفت.[21] همچنین تأثیر مثبت افزودن عصاره AV در افزایش هدایت الکتریکی و بهبود اختلاط‌پذیری محلول الکتروریسی است، میزان الیاف هم‌راستایی افزایش قابل‌توجهی را نمایش می‌دهد.[20]

جدول 1ـ میانگین اندازه تخلخل بر حسب میکرومتر، میانگین قطر الیاف بر حسب نانومتر و درصد تخلخل داربست‌های الکتروریسی پلی کاپرولاکتون، پلی کاپرولاکتون/پلی‌وینیل الکل و پلی کاپرولاکتون/پلی‌وینیل الکل/عصاره آلوئه‌ورا

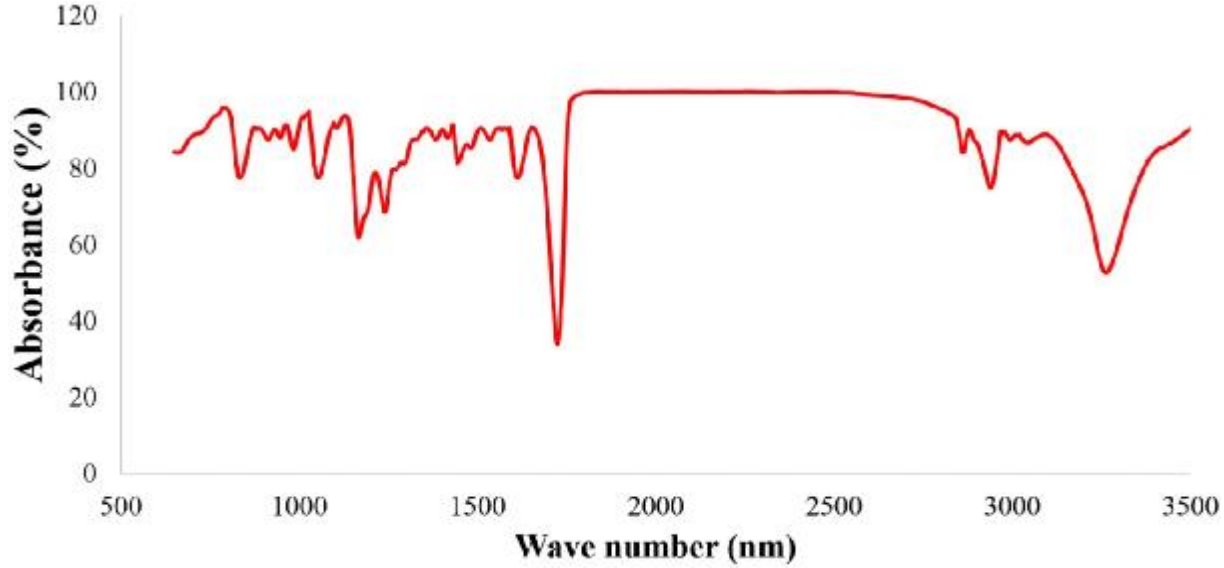
نمونه‌ها	درصد تخلخل	اندازه تخلخل‌ها (میکرومتر)	قطر الیاف (نانومتر)
پلی کاپرولاکتون	83/19	8/94 ± 4/851	423 ± 119
پلی کاپرولاکتون/ پلی‌وینیل الکل	83/52	4/43 ± 2/536	325 ± 86
پلی کاپرولاکتون/ پلی‌وینیل الکل/عصاره آلوئه‌ورا	87/52	5/43 ± 2/534	214 ± 86



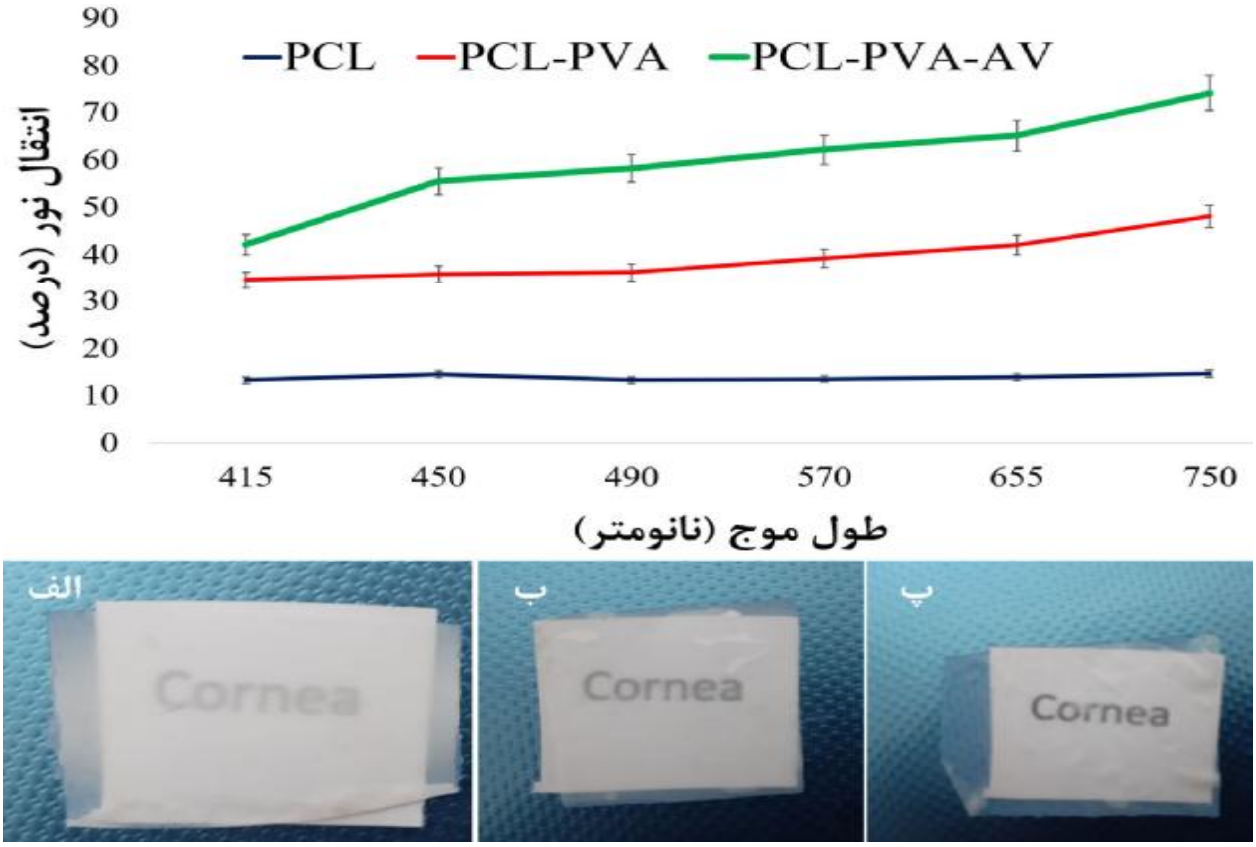
تصویر 1ـ تصویر میکروسکوپ الکترونی سلول‌های کشت داده شده روی داربست‌های الکتروریسی پلی کاپرولاکتون (الف و ج)، پلی کاپرولاکتون/ پلی‌وینیل الکل (ب و چ) و پلی کاپرولاکتون/ پلی‌وینیل الکل/ عصاره آلوئه‌ورا (پ و ح)



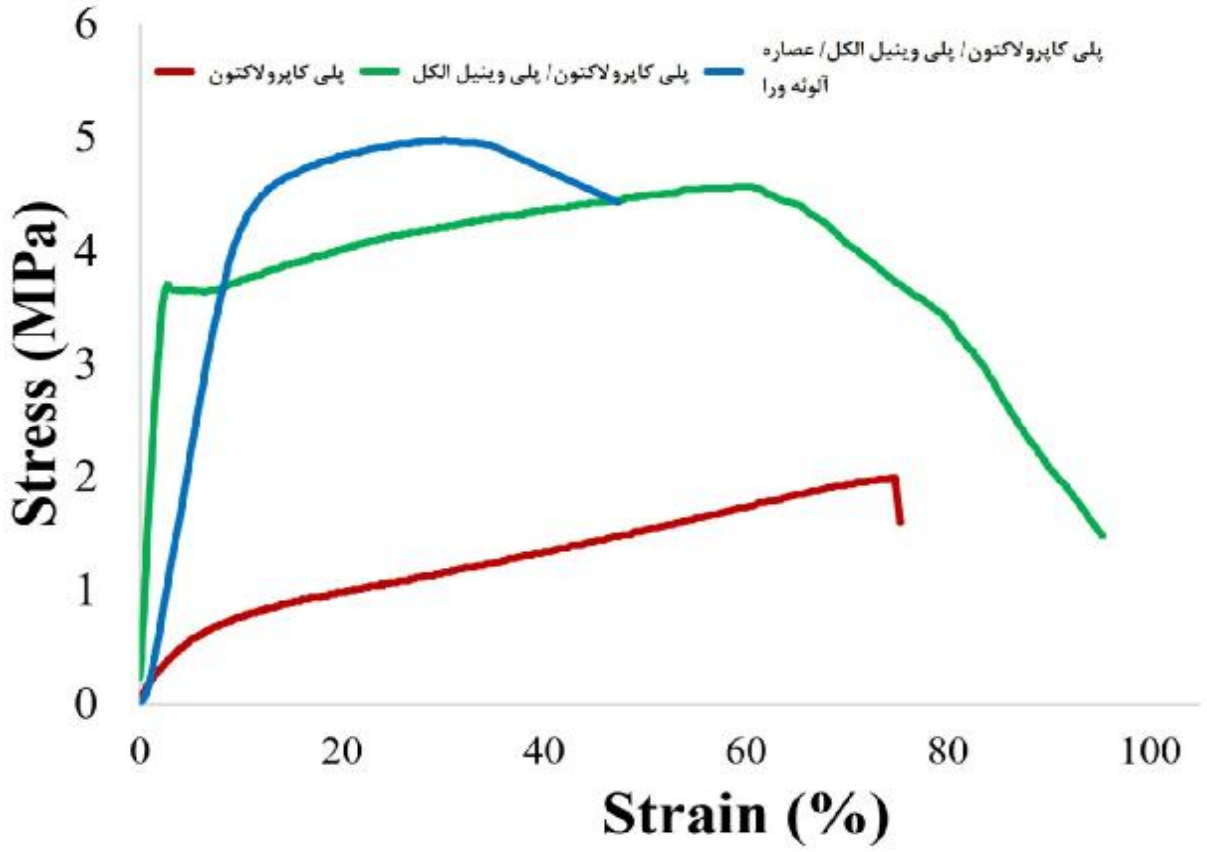
تصویر 2ـ بررسی میزان هم‌راستایی داربست‌های الکتروریسی پلی‌کاپرولاکتون (الف-ج)، پلی‌کاپرولاکتون / پلی‌وینیل الکل (ب-چ) و پلی‌کاپرولاکتون / پلی‌وینیل الکل / عصاره آلوئه‌ورا (پ-ح)



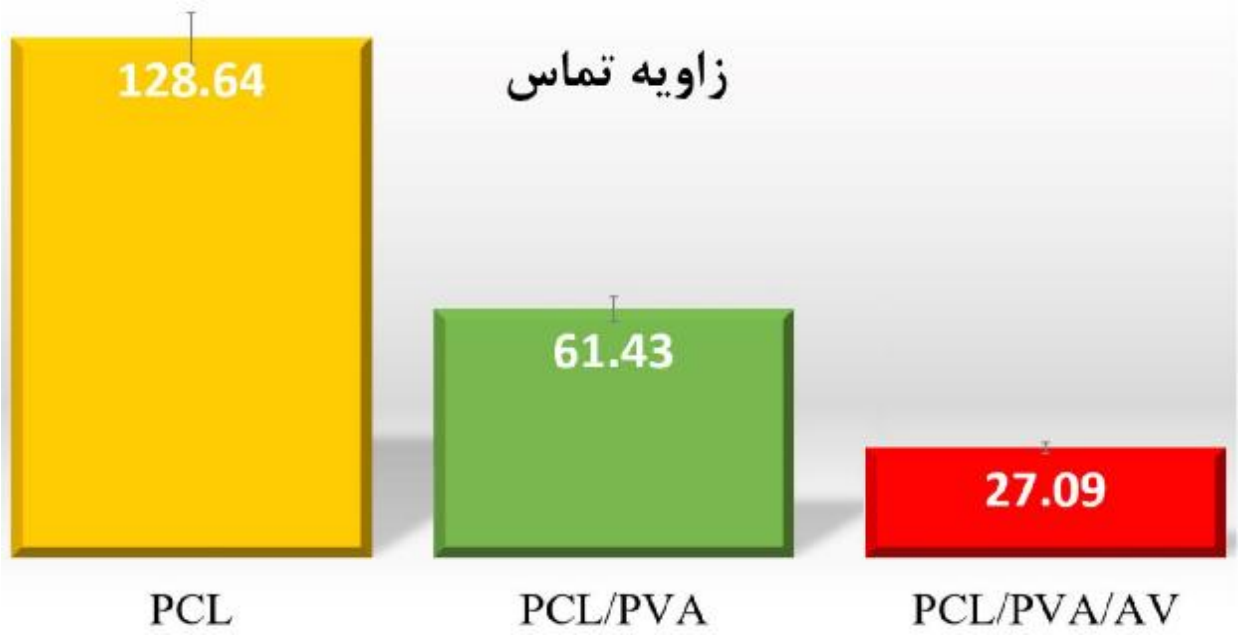
تصویر 3ـ نمودار FTIR پلی کاپرولاکتون / پلی‌وینیل الکل / عصاره آلوئه‌ورا



تصویر 4ـ بررسی و مقایسه میزان انتقال نور داربست‌های الکتروریسی، پلی کاپرولاکتون (الف)، پلی کاپرولاکتون/پلی‌وینیل الکل (ب)، پلی کاپرولاکتون/ پلی‌وینیل الکل/عصاره آلوئه‌ورا (پ)



تصویر 5ـ نمودار تنش - کرنش داربست‌های الکتروریسی شده



تصویر 6ـ نمودار زاویه تماس داربست‌های الکتروریسی

طیف‌سنجی با پرتو مادون‌قرمز به روش تبدیل فوریه

نتایج حاصل از طیف‌سنجی فروسرخ‌های مرتبط با نمونه‌های الکتروریسی حضور پلی‌وینیل الکل و عصاره آلوئه‌ورا در داربست پلیمری پلی‌کاپرولاکتون را اثبات کرد (تصویر 3).

میزان انتقال نور داربست‌ها

یکی از پارامترهای اصلی پیوند بافت قرنیه، شفافیت بهینه داربست است که در غیر این صورت تا زمان تخریب داربست بینایی به چشم باز نمی‌گردد که این شرایط ازلحاظ کلینیکی غیرقابل‌قبول است.[25] میزان انتقال نور از نمونه‌ها در تصویر 4 نشان داده شده است. داربست پلی‌کاپرولاکتون کدر است. در ادامه برای بهبود میزان انتقال نور نسبت‌های مختلف از پلی‌وینیل الکل و عصاره آلوئه‌ورا همراه با پلی‌کاپرولاکتون الکتروریسی شدند.

بررسی خواص مکانیکی داربست

از فاکتورهای مهمی که پیش از پیوند، جهت اطمینان از عملکرد مناسب باید مورد ارزیابی قرار خواهد گیرد خواص مکانیکی داربست‌ها است. از ویژگی‌های کلیدی در ساخت داربست استرومای قرنیه، خواص مکانیکی است که این خواص برای مهندسی بافت قرنیه از اهمیت بسیار زیادی برخوردار است.[3] بر اساس نتایج حاصل، داربست الکتروریسی پلی‌کاپرولاکتون استحکام کششی و مدول یانگ پایین‌تری نسبت به داربست کامپوزیتی پلی‌کاپرولاکتون / پلی‌وینیل الکل دارد. داربست پلی‌کاپرولاکتون خالص ناحیه کشسانی وسیع‌تری داشته و می‌تواند حد بیشتری از کشش را تحمل کند، اما در داربست کامپوزیتی کاهش ناحیه کشسان اتفاق افتاده درحالی‌که استحکام نهایی تحمل در نقطه شکست افزایش یافته و حالت تردتری را به دست آورده است. همچنین همان‌طور که در تصویر 5 شاهد درصد بالاتری در رابطه با کرنش در نقطه شکست و مدول یانگ هستیم. این مقایسه به‌خوبی نشان می‌دهد که پلی‌وینیل الکل قادر است خاصیت کشسانی خود را در استحکام بالاتر حفظ کند.[20] در حقیقت با افزودن پلی‌وینیل الکل میزان تحمل فشار داربست الکتروریسی افزایش یافته است.[27]

بررسی زاویه تماس

طبق مطالعات زیست مواد با خواص آب‌دوستی بالا سطح مطلوب برای چسبندگی و رشد سلولی را فراهم می‌کند.[14و18و28]

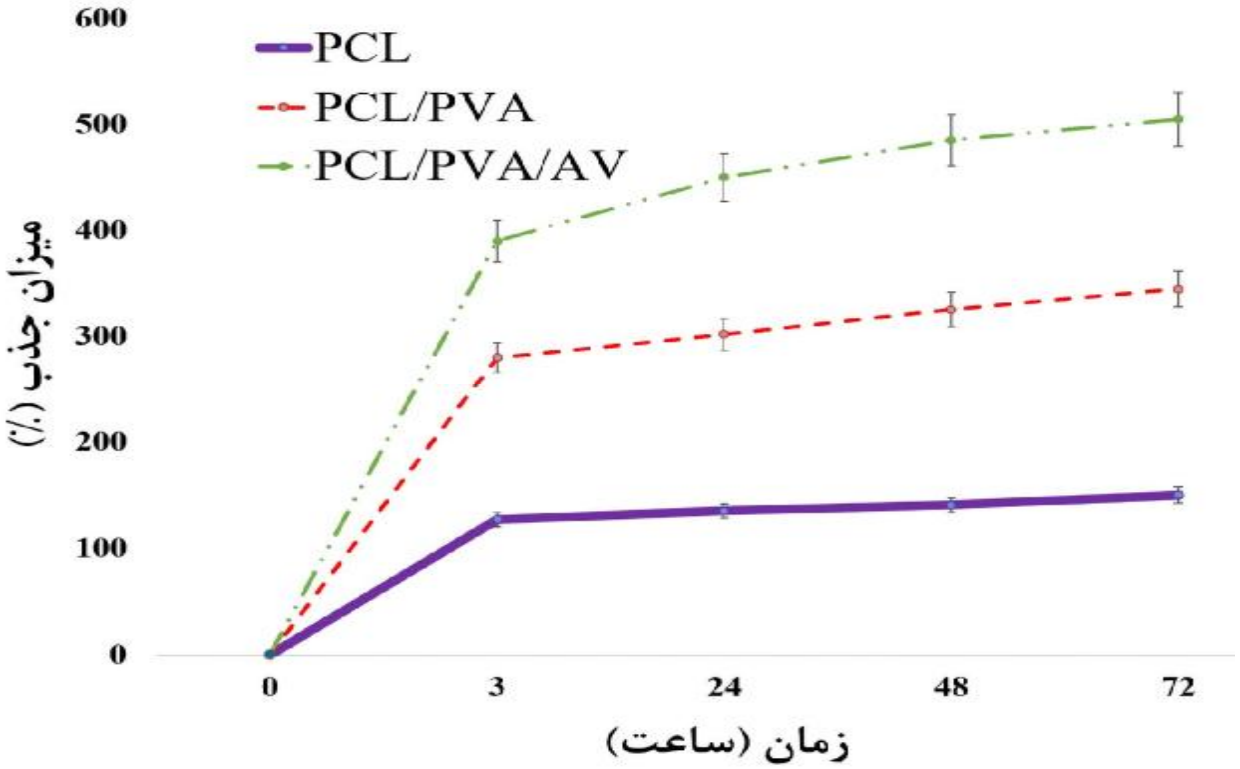
داربست پلی‌کاپرولاکتون با میانگین زاویه تماس 125/69 درجه آب‌گریز بوده که چسبندگی سلولی مناسبی نداشته و به‌تنهایی داربست مناسبی برای جایگزین بافتی نخواهد بود.[29] به‌منظور افزایش آب‌دوستی در این پژوهش از پلی‌وینیل الکل و عصاره آلوئه‌ورا استفاده شده است.[30] پلیمر پلی‌کاپرولاکتون یک پلیمر آب‌گریز است، اما برخلاف این پلیمر، پلی‌وینیل الکل و عصاره آلوئه‌ورا هر دو آب دوست هستند (تصویر 6).[26و31]

ارزیابی جذب آب داربست‌ها

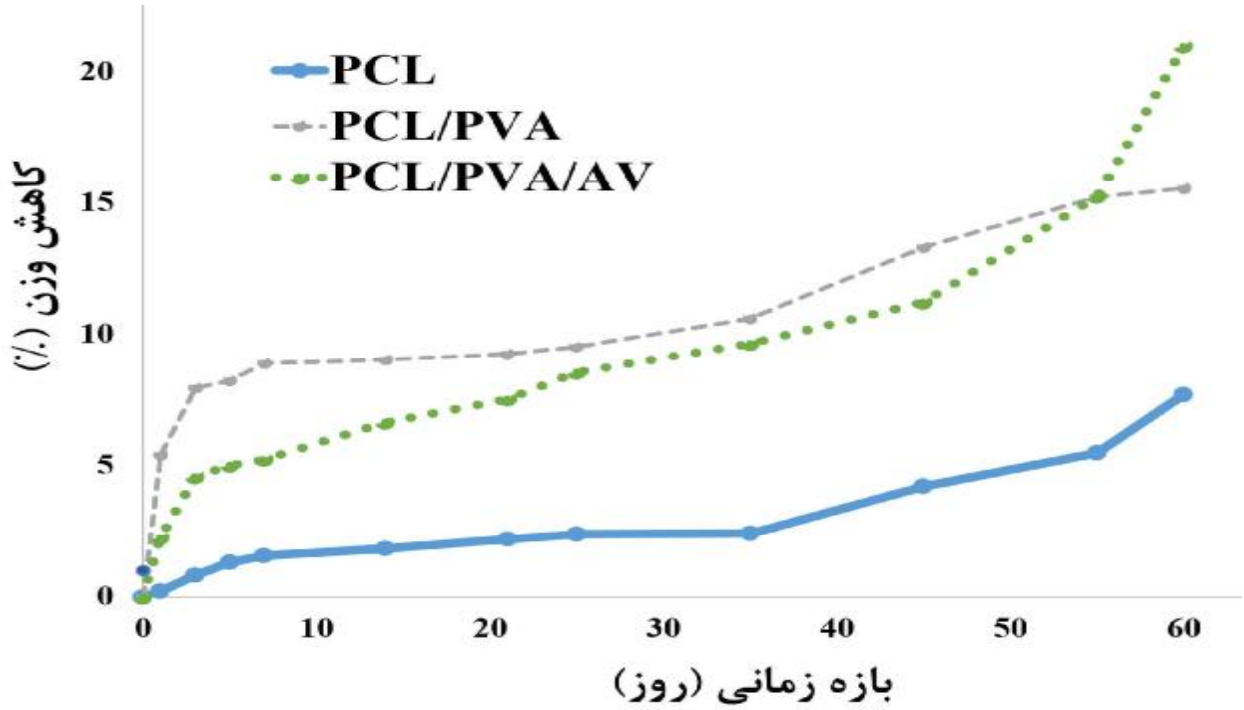
تصویر 7 اثر افزودن پلی‌وینیل الکل و عصاره آلوئه‌ورا را به پلی‌کاپرولاکتون خالص در جذب آب نشان می‌دهد. در ابتدا همان‌طور که در مبحث زاویه تماس با آب در خصوص آب‌گریز بودن پلی‌کاپرولاکتون گفته شد، در این نمودار نیز می‌توان جذب آب کمتر داربست پلی‌کاپرولاکتون نسبت به غشای پلی‌کاپرولاکتون - پلی‌وینیل الکل را مشاهده کرد.

بررسی تخریب‌پذیری

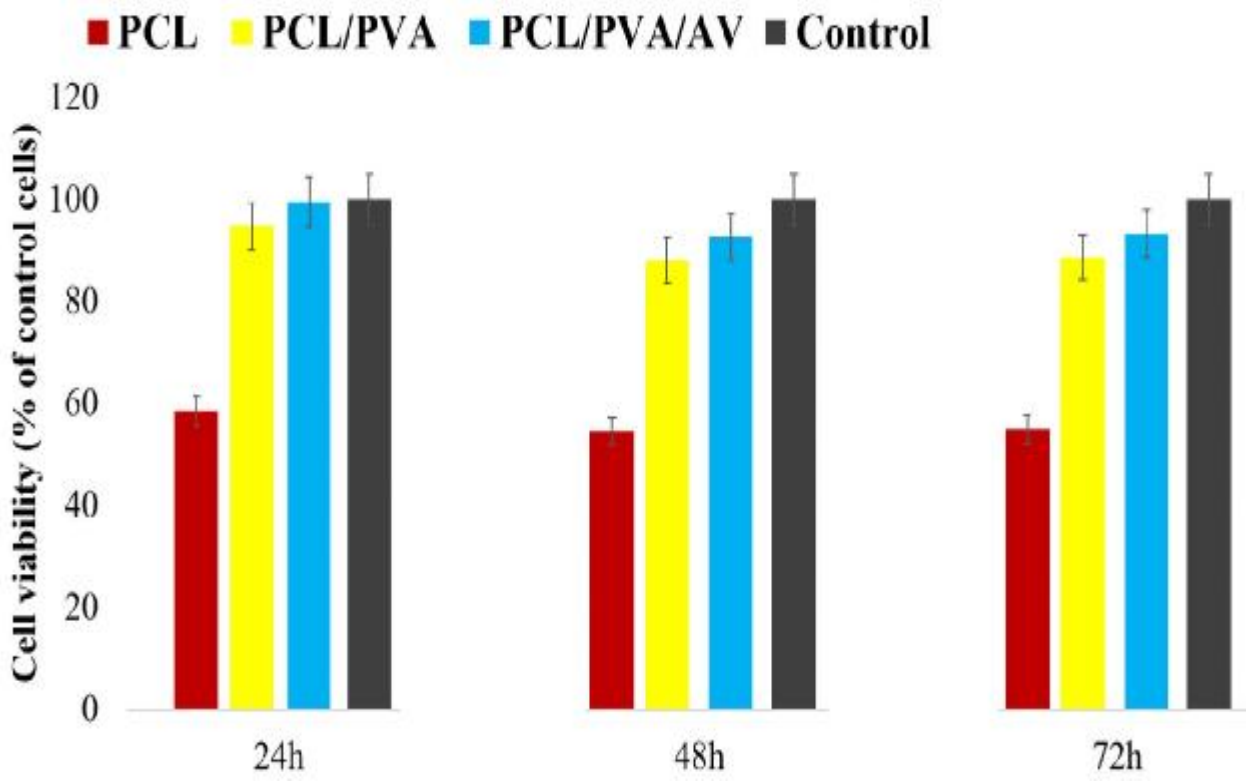
پس از قرارگیری داربست‌ها درون محلول شبیه‌ساز محیط بدن به مدت 60 روز، درصد کاهش وزن آن‌ها اندازه‌گیری شد و به صورت نمودار در تصویر 8 نمایش داده شده است. به‌طور کلی یک زیست ماده به‌منظور استفاده در مهندسی بافت و به‌ویژه بافت استرومای قرنیه، ابتدا باید در محل آسیب به‌خوبی موضع‌گیری و اتصال برقرار کند و سپس به آهستگی تخریب شود به‌طوری‌که خواص مکانیکی کاشتنی حفظ شود و بتواند فرایند بازسازی را حفظ و حمایت کند.[32]



تصویر 7ـ نمودار مقایسه جذب آب داربست‌های الکتروریسی شده



تصویر 8ـ مقایسه تخریب‌پذیری داربست‌های الکتروریسی شده



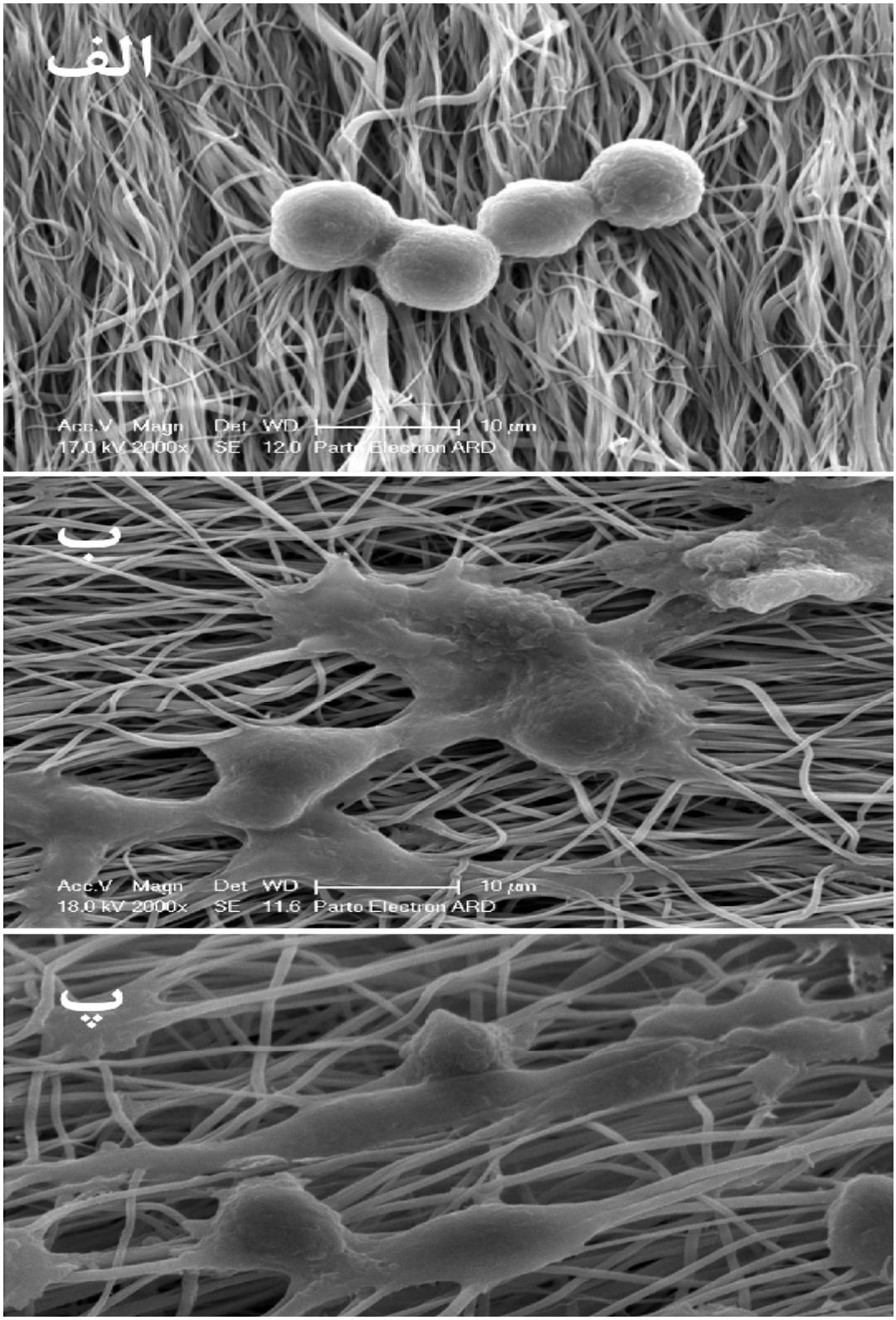
تصویر 9ـ آزمون سمیت سلولی برای داربست‌های الکتروریسی شده

پلی‌کاپرولاکتون به صورت خودی خـود سرعـت تخریب پایینی دارد (3-2 سال) که از طریق هیدرولیز تصادفی گـروه‌های استری اتفاق می‌افتد.[32-34] نمـودار نشان می‌دهـد، سرعت تخریب نمـونه‌ها بعد از حـدود 35 روز بیشتـر شده است؛ بنابراین می‌توان گفت داربست‌ها تا نزدیک به یک ماه ساختار خود را حفظ خواهند کرد.

ارزیابی سمیت سلولی و چسبندگی سلولی

به‌طورکلی آزمون MTT یکی از روش‌های رنگ‌سنجی متداول برای بررسی میزان سمیت مواد بر حیات سلول است. این مسئله با سنجش قدرت احیاء رنگ تترازولیوم (MTT) توسط آنزیم‌های سلولی و تبدیل آن به بلورهای فورمازان با رنگ بنفش مورد بررسی قرار می‌گیرد. در نتیجه فرایند احیا، بلورهای بنفش رنگ فورمازان تشکیل می‌شود. سپس این بلورها در حلال مناسب حل شده و به‌وسیله روش‌های اسپکتروفوتومتری مقدار سنجی می‌شوند. مقدار بلور فورمازان ایجاد شده می‌تواند نشان‌دهنده درصد سلول‌های زنده باشد. در مطالعه پیش رو، این آزمون بر روی سلول‌های کراتوسیت در بازه زمانی 24، 48 و 72 ساعت انجام شد که نتایج آن در نمودارهای تصویر 9 نشان داده شده است.

نتایج حاصل از میکـروسکوپ الکتـرونی روبشی (SEM) رشد سلـول‌ها بر روی داربست را پس از چهار روز کشت سلـولی به‌خوبی نشان می‌دهد (تصویر 10). در داربسـت پلی‌کاپرولاکتون / پلی‌وینیل الکل، همان‌طور که از تصاویر حاصل مشاهـده می‌شـود، میزان آب‌دوستی و افزودن پلی‌وینیل الکل و آلوئه‌ورا باعث شده است تا چسبندگی در داربست‌های الکتروریسی افزایش پیدا کند.



تصویر 10ـ تصویر میکروسکوپ الکترونی سلول‌های کشت داده شده روی داربست‌های الکتروریسی پلی کاپرولاکتون (الف)، پلی کاپرولاکتون/ پلی‌وینیل الکل (ب) و پلی کاپرولاکتون/ پلی‌وینیل الکل/ عصاره آلوئه‌ورا (پ)

بحث

با نگاه دقیق به ساختار استرومای قرنیه، این بافت از الیاف هم‌راستای کلاژن تشکیل شده است. داربست بدون نقص با الیاف کلاژن منظم، تأثیر بسزایی در تأمین قدرت مکانیکی و انتقال نور بهینه از بافت قرنیه دارد. 3 لایه استروما 80-85% از ضخامت قرنیه را تشکیل می‌دهد. انتقال نور از ویژگی‌های کلیدی این داربست است که طبق مطالعات صورت گرفته با تغییر و بر هم خوردن نظم الیاف، کاهش میزان انتقال نور و در ادامه ضعف در بینایی اتفاق خواهد افتاد.[3] با اندازه‌گیری قطر الیاف توسط نرم‌افزار Image J، میانگین قطر الیاف 119±423 نانومتر گزارش شد. تخلخل این داربست بین 90 - 80% اندازه‌گیری شد که برای بر هم‌کنش‌های غذایی و بین سلولی درصد قابل قبولی معرفی شده است.[18] در ادامه، با افزودن پلی‌وینیل الکل در محلول پلی‌کاپرولاکتون، میانگین قطر الیاف روند کاهشی پیدا می‌کند که به دلیل کاهش ویسکوزیته محلول است.[19] به‌طوری‌که می‌توان مشاهده کرد با اندازه‌گیری 30 لیف به‌طور تصادفی، این مقدار به 86±325 نانومتر کاهش داشت. همچنین، افزودن عصاره آلوئه‌ورا باعث افزایش هم‌راستایی الیاف به دلیل بهبود خاصیت الکتریکی محلول شده است.[20] پیک‌های خاص پلی‌کاپرولاکتون شامل 1 سانتیمتر - 2942 متعلق به پیوند کششی متقارن گروه عاملی C-H، 1-cm 1726 متعلق به گروه کربونیل کششی (C=O)، پیک‌های 1 سانتیمتر - 1462، 1415 و 1365 متعلق به گروه C-H کششی نامتقارن، 1 سانتیمتر - 1238 و 1164 مربوط به C-O-C کششی نامتقارن، 1 سانتیمتر - 1103 متعلق به O-C کششی قابل مشاهده است.[22] پیک‌های خاص پلی‌وینیل الکل که شامل پیوندها متقارن و نامتقارن گروه کششی CH2 در محدوده 1 سانتیمتر - 1461-1417 و 1 سانتیمتر - 2841-3000 است، قابل تشخیص است. همچنین پیک‌های در محدوده 1 سانتیمتر - 1750-1735، 1 سانتیمتر - 1141، 1 سانتیمتر - 1150-1085 متعلق به گروه‌های کربونیل، C-O و پیوند کششی C-O-C است.[23] همچنین پیک‌های خاص عصاره آلوئه‌ورا که شامل طیف جذب پیوند کششی فسفات، گروه آلیفاتیک C-H، پیوند کششی گروه CO کربونیل و پیوند کششی CC شامل وینیل اتر و آلوین به ترتیب در پیک‌های جذب 1 سانتیمتر - 1040، 2929، 1729 و 1575 قابل مشاهده است.[24]

بر اساس نتایج به دست آمده و مشاهدات حاصل از عکس‌برداری داربست‌ها عبور نور که به دلیل افزودن هیدراسیون داربست حاوی پلی‌وینیل الکل افزایش یافت و در ادامه با افزودن عصاره آلوئه‌ورا میزان انتقال نور افزایش چشم‌گیر داشت؛[26] بنابراین، استفاده از این ترکیب پلیمری می‌تواند بافتی با شفافیت مشابه بافت قرنیه ایجاد کرده و ضعف کدر بودن ذاتی پلی‌کاپرولاکتون را از بین ببرد. همچنین سعی در رسیدن به الیاف با میزان هم‌راستایی تأثیر بیشتری داشته و به شبیه‌تر شدن این بافت به بافت قرنیه کمک می‌کند. در بررسی خواص مکانیکی، داربست پلی‌کاپرولاکتون / پلی‌وینیل الکل حاوی عصاره آلوئه‌ورا استحکام بالاتری نسبت به داربست‌های پلی‌کاپرولاکتون/ پلی‌وینیل الکل دارند. افزودن عصاره آلوئه‌ورا به داربست منجر به افزایش استحکام نهایی داربست‌ها شده است. در نمونه حاوی آلوئه‌ورا، افزایش چشمگیر استحکام نهایی نسبت به بقیه نمونه‌ها اتفاق افتاده است که پتانسیل بالای آن را در انتقال و تحمل بخیه را اثبات می‌کند. همان‌طور که نتایج نشان می‌دهد، با افزودن پلی‌وینیل الکل در داربست آب‌دوستی نیز افزایش یافته است به‌طوری‌که به 61/43 درجه رسید. همچنین در داربست پلی‌کاپرولاکتون-پلی وینیل الکل حاوی عصاره آلوئه‌ورا به میانگین زاویه تماس 27/09 درجه رسید. تصویر زاویه تماس داربست‌های پلی‌کاپرولاکتون خالص، دوجزئی همراه با پلی‌وینیل الکل و در ادامه با افزودن عصاره آلوئه‌ورا، تغییر میزان آب‌دوستی/ آب‌گریزی به نسبت بهینه دوجزئی را نشان می‌دهد. با توجه به نمودار جذب آب، می‌توان دریافت که با افزودن پلی‌وینیل الکل، به دلیل آب‌دوستی بالای این پلیمر، جذب آب غشا افزایش یافت. با توجه به میزان جذب آب مشاهده می‌شود داربست‌های دارای پلی‌وینیل الکل و عصاره آلوئه‌ورا جذب آب قابل توجهی نسبت به داربست پلی‌کاپرولاکتون داشته‌اند که به دلیل آب‌دوست بودن پلیمر پلی‌وینیل الکل و عصاره آلوئه‌ورا است.[26,30,31]

همچنین در بین داربست‌های تهیه‌شده، همان‌طور که در بخش قبل توضیح داده شد، داربست پلی‌کاپرولاکتون به دلیل آب‌دوستی کمتری که نسبت به سایر نمونه‌ها داشت، سرعت تخریب پایین‌تری دارد. به همین دلیل برای افزایش تخریب‌پذیری پلی‌کاپرولاکتون آن را با پلیمر آب‌دوست (پلی‌وینیل الکل) با سرعت تخریب بیشتر، ترکیب می‌کنند تا در تخریب‌پذیری این دو تعادل برقرار شود.[33-35] در ادامه با افزودن عصاره آلوئه‌ورا، مشاهده شد که تخریب داربست الکتروریسی افزایش می‌یابد که دلیل اصلی افزایش تخریب‌پذیری، بهبود آب‌دوستی و نفوذ مولکول‌های آب به داخل داربست الکتروریسی شده است.[36] هر چند در ابتدا سرعت تخریب نمودار پایین است؛ اما در ادامه و بعد از گذشت 30 روز روند افزایش سرعت تخریب در هر سه نمونه سه‌جزئی، مشاهده می‌شود که زمان مناسب برای بازسازی و درمان بافت استرومای قرنیه است و حمایت کافی از بافت آسیب‌دیده و فراهم ساختن عملکرد مشابه تا زمان بازسازی کامل صورت می‌گیرد.[32و36] برای سلول‌های کراتوسیت در شکل نشان می‌دهد، همان‌طور که نتایج زیستی تمامی نمونه‌ها از روز اول تا سوم روند تقریباً یکسانی را طی کردند و درصد زیستی قابل قبولی را تا روز 3 نشان دادند. دراین‌بین در داربست الکتروریسی پلی‌کاپرولاکتون/ پلی‌وینیل الکل/ عصاره آلوئه‌ورا مناسب‌ترین محیط را برای رشد و تکثیر سلول‌های کراتوسیت فراهم کرد. در داربست پلی‌کاپرولاکتون به علت خاصیت آب‌گریزی سلول‌ها رشد و پخش شدن کافی از خود نشان ندادند. با افزودن پلی‌وینیل الکل و عصاره آلوئه‌ورا چسبندگی سلولی داربست‌ها افزایش یافته است و همچنین میزان تکثیر بیشتری را نشان داده‌اند. در نتیجه داربست‌های سه‌جزئی حاوی عصاره آلوئه‌ورا محیطی مناسب برای کاربردهای مهندسی بافت استرومای قرنیه می‌باشند.

نتیجه‌گیری

در این مطالعه، توانایی داربست الکتروریسی شده‌ی پلی‌کاپرولاکتون، پلی‌کاپرولاکتون/ پلی‌وینیل الکل و پلی‌کاپرولاکتون/ پلی‌وینیل الکل/ عصاره آلوئه‌ورا جهت رشد و تکثیر سلول‌های کراتوسیت در ناحیه‌ی استرومای قرنیه مورد ارزیابی قرار گرفت. این پژوهش در کنار مطالعاتی که پیش از آن انجام شده است نشان می‌دهد هرچند مطالعاتی در خصوص یافتن مسیر مناسب برای رویارویی با بیماری‌های چشمی و مخصوصاً قرنیه صورت گرفته است، اما در این روش دستیابی به پارامترهای بهینه در ساخت و مشخصه‌یابی یک بستر ایده‌آل برای کاربردهای ویژه بافت مورد نظر چالش‌برانگیز است و در راستای حل مشکلات مورد نظر، دانش کافی و تکنیک قابل قبول باید کسب شود؛ نکته قابل‌توجه این روش، تجهیزات آزمایشگاهی مناسب در راستای رساندن الیاف به مقیاس نانو، این روش را ساده و قابل‌دسترس کرده است. به‌گونه‌ای که با تسلط بر آن، امکان ایجاد الیاف با مورفولوژی‌های مشابه بستر بافت هدف، تولید بستری با سطح مخصوص بسیار بالا و آسانی اتصال به سلول‌های بدن به دلیل داشتن ساختاری زیست‌سازگار همراه با ابعاد کوچک‌تر از سلول و همچنین ایجاد تخلخل مناسب و قابل‌تغییر فراهم شده است. این ویژگی‌های در کنار تنوع بالای مواد قابل‌استفاده در این روش، محققین را بر آن داشته است که مطالعات خود را در این زمینه از مهندسی بافت ادامه دهند.

Abstract:

Fabrication and Characterization of Polycaprolactone / Polyvinyl Alcohol / Aloe Vera Extract Electrospun Scaffold for Corneal Stromal Tissue Engineering

Mirmohammadi S. M. M.Sc [*], *Ramazani Saadat Abadi A. PhD* [**], *Asefnejad A. PhD* [***]
Abdollahi A. MD [****]

(Received: 30 Oct 2021 Accepted: 9 April 2022)

Introduction & Objective: Due to corneal health problems with allograft corneal transplantation, which include a lack of highly quality of donated cornea as well as the rejection by the immune system over a period of five years, corneal reconstruction with the help of new technology is of great importance. In this study, different ratios of polycaprolactone with polyvinyl alcohol containing aloe vera extract were used to prepare an electrospinning scaffold with similar properties to the targeted tissue.

Materials & Methods: Scanning electron microscopy (SEM) was used to determine the morphology of electrospun scaffolds. In order to determine the physical properties of electrospun scaffolds, their transparency, hydrophilicity, water absorption and degradability were investigated. The mechanical properties of the scaffolding were also investigated. Fourier transform infrared (FTIR) was used to study the functional groups of scaffolds. To observe the biological properties, the prepared scaffolds were examined.

Results: The results of scanning electron microscopy showed that by addition of aloe vera extract, the diameter of the fibers in the polycaprolactone and polyvinyl alcohol scaffold decreased from 423 to 214 nm. The results of contact angle test, water absorption and degradability showed that with the addition of polyvinyl alcohol and aloe vera extract, the hydrophilicity and degradability of electrospin scaffolds were increased. The results of light transmission test also showed that with adding the amount of polyvinyl alcohol and aloe vera extract, the light transmission rate of polycaprolactone scaffolding from 14.7% to 74.14% in polycaprolactone and polyvinyl alcohol scaffolds containing aloe vera extract increases. The results of mechanical tests showed that with the addition of polyvinyl alcohol and aloe vera, the Young's modulus of electrospun scaffolds increased compared to polycaprolactone scaffold.

Conclusions: The results showed that the addition of polyvinyl alcohol to polycaprolactone and aloe vera improved adhesion and cellular behavior.

Key Words: Electrospinning, Aligned Fibers, Corneal Stroma, Polycaprolactone, Polyvinyl Alcohol, Aloe Vera Extract

[*] *Biomedical Engineering, Islamic Azad University, Science and Research Branch, Tehran, Iran*
[**] *Department of Chemical and Petroleum Engineering, Sharif University of Technology, Tehran, Iran*
[***] *Assistant Professor of Department Biomedical Engineering, Science and Research Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran*
[****] *Associate Professor of General Surgery, Islamic Azad University of Medical Sciences, Boali Hospital, Tehran, Iran*

References:

1. Chen, Z., et al., Biomaterials for corneal bioengineering. Biomedical Materials, 2018. 13(3): p. 032002.
2. Yousaf, S., et al., Scaffolds for corneal tissue engineering, in Handbook of Tissue Engineering Scaffolds: Volume Two. 2019, Elsevier. p. 649-67. 2.
3. Akter, F., Principles of Tissue Engineering, in Tissue engineering made easy. 2016, Elsevier. p. 3-16.
4. Wu, Z., et al., Engineering of corneal tissue through an aligned PVA / collagen composite nanofibrous electrospun scaffold. Nanomaterials, 2018: (2) 8 .p. 124.
5. Gain, P., et al., Global survey of corneal transplantation and eye banking. JAMA ophthalmology, 2016. 134(2): p. 167-173.
6. Alió, J.L., et al., Regenerative surgery of the corneal stroma for advanced keratoconus: 1-year outcomes. American journal of ophthalmology, 2019. 203: p. 53-68.
7. Janmohammadi, M. and M. Nourbakhsh, Electrospun polycaprolactone scaffolds for tissue engineering: a review. International Journal of Polymeric Materials and Polymeric Biomaterials, 2019. 68(9): p. 527-5, 39.
8. Ruberti, J.W. and J.D. Zieske, Prelude to corneal tissue engineering-gaining control of collagen organization. Progress in retinal and eye research, 2008. 27(5): p. 549-577.
9. Kong, B. and S. Mi, Electrospun scaffolds for corneal tissue engineering: A review. Materials, 2016. 9(8): p. 614.
10. Sattary, M., et al., Incorporation of nanohydroxyapatite and vitamin D3 into electrospun PCL/Gelatin scaffolds: The influence on the physical and chemical properties and cell behavior for bone tissue engineering. Polymers for Advanced Technologies, 2018. 29(1): p. 451-462.
11. Rahman, S., P. Carter, and N. Bhattarai, Aloe vera for tissue engineering applications. Journal of functional biomaterials, 2017. 8(1): p. 6.
12. Pham, Q.P., U. Sharma, and A.G. Mikos, Electrospinning of polymeric nanofibers for tissue engineering applications: a review. Tissue engineering, 2006. 12(5): p. 1197-1211.
13. Seyed, M.A. and K. Vijayaraghavan, Physicochemical characterization and bioactivity of an improved chitosan scaffold cross-linked with polyvinyl alcohol for corneal tissue engineering applications. Annual Research & Review in Biology, 2018: p. 1-16.
14. Saudi, A., et al., Design and fabrication of poly (glycerol sebacate)-based fibers for neural tissue engineering: Synthesis, electrospinning, and characterization. Polymers for Advanced Technologies, 2019. 30(6): p. 1427-1440.
15. Baradaran-Rafii, A., E. Biazar, and S. Heidari-Keshel, Cellular response of limbal stem cells on polycaprolactone nanofibrous scaffolds for ocular epithelial regeneration. Current eye research, 2016. 41(3): p. 326-333.
16. Salehi, A.O.M., et al., Use of Polycaprolactone in Corneal Tissue Engineering: A Review. Materials Today Communications, 2021: p. 102402.
17. Teo, W.E. and S. Ramakrishna, A review on electrospinning design and nanofibre assemblies. Nanotechnology, 2006. 17(14): p. R89.
18. Shirani, K., M.S. Nourbakhsh, and M. Rafienia, Electrospun polycaprolactone/gelatin/bioactive glass nanoscaffold for bone tissue engineering. International Journal of Polymeric Materials and Polymeric Biomaterials, 2019. 68(10): p. 607-615.
19. Nazeer, M.A., E. Yilgor, and I. Yilgor, Electrospun polycaprolactone/silk fibroin nanofibrous bioactive scaffolds for tissue engineering applications. Polymer, 201: 168. 9: p. 86-94.
20. Suganya, S., et al., Naturally derived biofunctional nanofibrous scaffold for skin tissue regeneration. International journal of biological macromolecules, 2014. 68: p. 135-143.
21. McClure, M., et al., Electrospinning-aligned and random polydioxanone–polycaprolactone–silk fibroin-blended scaffolds: geometry for a vascular matrix. Biomedical Materials, 2009. 4(5): p. 055010.
22. Shanmugavel, S., et al., Precipitation of hydroxyapatite on electrospun polycaprolactone/aloe vera/silk fibroin nanofibrous scaffolds for bone tissue engineering. Journal of biomaterials applications, 2014. 29(1): p. 46-58.
23. Shabannejad, M., et al., Fabrication and Characterization of Electrospun Scaffold Based on Polycaprolactone-Aloe vera and Polyvinyl Alcohol for Skin Tissue Engineering. Fibers and Polymers, 2020. 21(8): p. 1694-1703.
24. Carter, P., S.M. Rahman, and N. Bhattarai, Facile fabrication of aloe vera containing PCL nanofibers for barrier membrane application. Journal of Biomaterials science ,Polymer edition, 2016. 27(7): p. 692-708.
25. Young, T.-H., et al., Fabrication of a bioengineered corneal endothelial cell sheet using chitosan/polycaprolactone blend membranes. Colloids and Surfaces B: Biointerfaces, 2014. 116: p. 403-410.
26. Chen, J ,.et al., Electrospun nanofibrous SF/P (LLA-CL) membrane: a potential substratum for endothelial keratoplasty. International journal of nanomedicine, 2015. 10: p. 3337.
27. Fenbo, M., X. Xingyu, and T. Bin, Strontium chondroitin sulfate/silk fibroin blend membrane containing microporous structure modulates macrophage responses for guided bone regeneration. Carbohydrate polymers, 2019. 213: p. 266-275.

28. Saudi, A., et al., Promoting neural cell proliferation and differentiation by incorporating lignin into electrospun poly (vinyl alcohol) and poly (glycerol sebacate) fibers. Materials Science and Engineering: C, 2019. 104: p. 110005.
29. Amini, S., et al., Application of electrospun polycaprolactone fibers embedding lignin nanoparticle for peripheral nerve regeneration: In vitro and in vivo study. International Journal of Biological Macromolecules, 2020.
30. Li, L., et al., Electrospun poly (ε-caprolactone)/silk fibroin core-sheath nanofibers and their potential applications in tissue engineering and drug release. International journal of biological macromolecules, 2011. 49(2): p. 223-232.
31. Kim, D.K., B.R. Sim, and G. Khang, Nature-derived aloe vera gel blended silk fibroin film scaffolds for cornea endothelial cell regeneration and transplantation. ACS applied materials & interfaces, 2016. 8(24): p. 15160-15168.
32. Kim, J.I., J.Y. Kim, and C.H. Park, Fabrication of transparent hemispherical 3D nanofibrous scaffolds with radially aligned patterns via a novel electrospinning method. Scientific Reports: 2018 (1) 8. p. 1-13.
33. Abedalwafa, M., et al., Biodegradable poly-epsilon-caprolactone (PCL) for tissue engineering applications: a review. Rev. Adv. Mater. Sci, 2013. 34(2): p. 123-140.
34. Dwivedi, R., et al., Polycaprolactone as biomaterial for bone scaffolds: Review of literature. Journal of Oral Biology and Craniofacial Research, 2020. 10(1): p. 381-388.
35. Melke, J., et al., Silk fibroin as biomaterial for bone tissue engineering. Acta biomaterialia, 2016. 31: p. 1-16.
36. Baghersad, S., et al ,.Development of biodegradable electrospun gelatin/aloe-vera/poly (ε-caprolactone) hybrid nanofibrous scaffold for application as skin substitutes. Materials Science and Engineering: C, 2018. 93: p. 367-379.