

## ساخت و آرزيبابی پانسمان دو لايه پلی يورتان - نانوالیاف ژلاتين / پلی کاپرولاکتون به منظور کاربرد در مهندسی بافت پوست

مهندس آيسان هدايت نظری\*، دکتر مهدی موحدی\*\*، مهندس مهيار ناصری\*

### چکیده:

**زمينه و هدف:** عفونت یکی از علل اصلی تأخير در ترميم زخم است. علاوه بر عفونت، در برخی زخم‌های مزمن نظير زخم ديابتي به دليل کاهش آنژیوژنز، ترميم زخم به کندی صورت می‌گیرد. بدین منظور پانسمان دولايه متشکل از نانوالیاف ژلاتين / پلی کاپرولاکتون و فيلم پلی يورتان می‌تواند راهکاری مناسب به منظور تسريع ترميم زخم باشد.

**مواد و روش‌ها:** به منظور ساخت پانسمان دولايه پلی يورتان - نانوالیاف پلی کاپرولاکتون و ژلاتين، در ابتدا پلی يورتان با نسبت 12% وزنی - حجمی را در تتراهیدروفوران / دی متیل فرمامید روی همزن مغناطیسی قرار داده می‌شود. بعد از تشکیل محلول یکنواخت، به منظور تهیه فیلم به روش ریخته‌گری حلال، محلول بر روی قالب‌های تفلون شکل دهی می‌شود. سپس محلول پلیمری پلی کاپرولاکتون / ژلاتين در دمای محیط و با غلظت 10% وزنی تهیه شده و در نهایت الیاف به صورت تصادفی بر روی فیلم پلی يورتان ساخته شده ریسیده می‌شود.

**یافته‌ها:** مورفولوژی پانسمان دولايه به وسیله میکروسکوپی الکترونی روبشی مورد بررسی قرار گرفت. آزمون‌هایی نظير جذب آب، تخریب برون‌تن، خواص مکانیکی (کرنش شکست و استحکام کششی)، زاویه تماس و سمیت سلولی انجام شد. آزمون زاویه تماس برای نانوالیاف پلی کاپرولاکتون و پلی کاپرولاکتون / ژلاتين به ترتیب 114 و 44 درجه اندازه‌گیری شد. استحکام کششی برای داربست دو لايه 4/46 مگاپاسکال و کرنش شکست به طور میانگین 330 درصد گزارش شد. آزمون سمیت سلولی نشان داد که نمونه‌ها سمیت ندارند. همچنین سلول‌های فیبروبلاست، چسبندگی مناسبی روی پانسمان نشان دادند.

**نتیجه‌گیری:** نتایج بررسی‌ها نشان داد که پانسمان دو لايه می‌تواند راهکاری مناسب جهت درمان زخم‌های عفونی ديابتي و مهندسی بافت پوست باشد.

واژه‌های کلیدی: پلی يورتان، ژلاتين، پلی کاپرولاکتون، مهندسی بافت پوست

نویسندهٔ پاسخگو: دکتر مهدی موحدی

تلفن: 03133317983

E-mail: [dr.mehdimovahedi@gmail.com](mailto:dr.mehdimovahedi@gmail.com)

\* کارشناسی ارشد مهندسی بافت، دانشکده علوم و فناوری‌های پزشکی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد علوم و تحقیقات

\*\* استادیار گروه مهندسی پزشکی، دانشکده فنی مهندسی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد شهرکرد

تاریخ وصول: 1399/05/29

تاریخ پذیرش: 1400/02/01

## زمینه و هدف

پوست بزرگترین اندام منفرد بدن است و به عنوان سد دفاعی بین بدن انسان و محیط اطراف عمل می‌کند و اندام‌های تحت پوشش خود را از میکروارگانیزم‌ها و پاتوژن‌ها حمایت می‌کند. پوست یک عضو زنده است هر چند فوقانی‌ترین لایه آن لایه شاخی (استراتوم کورنیوم) و روپوست (اپیدرم) بوده که سطح پوست را تشکیل می‌دهند و متشکل از سلول‌های زنده و مرده هستند و در هر فرد حدود 30 هزار عدد از این سلول‌ها در هر دقیقه ریزش می‌کنند. با این وجود سلول‌های زنده پوست دائماً در قسمت زیرین روپوست تولید شده تا جایگزین این سلول‌ها گردند. در زیر روپوست، درم قرار گرفته که حاوی عروق خونی، پایانه‌های عصبی و غدد می‌باشد. لایه‌ای از چربی در زیر درم قرار می‌گیرد و به عنوان یک عایق، ضربه گیر و منبع انرژی عمل می‌کند.<sup>1</sup>

کمبود بافت اهدایی برای پیوند پوست و بحث بازسازی سریع پوست همواره یکی از دغدغه‌های بشر بوده است. این مساله به خصوص در سوختگی‌های وسیع که بافت پیوندی از خود فرد فراهم نیست، بیشتر اهمیت می‌یابد. امروزه مشخص شده است که استفاده از غشاهای تولید شده با روش مهندسی بافت پوست گزینه مناسب‌تری نسبت به سایر روش‌ها در مواجهه با سوختگی‌های وسیع یا سوختگی‌های تمام ضخامت و هم‌چنین حوادث ناگهانی از قبیل تصادفات یا برق‌گرفتگی می‌باشد.<sup>2</sup>

مهندسی بافت و پزشکی احیاکننده، ترکیبی از زیست‌شناسی تکاملی، علوم زیستی و مهندسی می‌باشند که تلاش می‌کنند مشکلات بالینی را حل نمایند. مهندسی بافت در سال 1988 به عنوان کاربرد از قوانین و روش‌های مهندسی به همراه زیست‌شناسی سلولی و تکاملی به منظور درک اساسی از روابط تابع ساختار در بافت‌های پستانداران نرمال و پاتولوژیک؛ و توسعه جایگزین‌های بیولوژیک برای بازگرداندن، حفظ و یا بهبود عملکرد بافت تعریف شد.<sup>3</sup> افزایش دانش سلول‌های بنیادی، داربست‌ها و سیگنال‌ها با برهمکنش‌های ماتریس خارج سلولی ساخت پوست به کمک مهندسی بافت را ممکن می‌سازد. جایگزین‌های سنتزی پوست که با تکنولوژی مهندسی بافت تولید شدند به طور بالینی 25 سال است که به کار می‌روند و در طول این مدت توسعه یافته‌اند. بیشتر بیومتریال‌هایی که کاربرد کلینیکی پیدا کردند، بر پایه کلاژن طبیعی یا عصاره کلاژن هستند.

چالش‌های بالینی در استفاده از بیومتریال‌ها شامل مسائل ایمنی اعم از زیست سازگاری و عدم سمیت، تخریب پذیر بودن یا نبودن آن و در صورت تخریب پذیری، نوع محصولات تخریب و طریقه دفع آنها، توانایی ایجاد بستر مناسب برای کاشت سلول‌ها و بهبود نرخ رگ‌زایی و... می‌باشد.<sup>4,2</sup>

مهمترین مشخصه یک ماده در درمان به کمک مهندسی بافت، تخریب پذیری آن می‌باشد که پلیمرهای بسیاری در این راستا استفاده شده‌اند. پلیمرهای طبیعی زیست تخریب پذیر مانند کلاژن، کایتوسان، الاستین، فیبرونکتین که بستری زیست سازگار شبیه به ماکرومولکول‌های بدن را فراهم می‌آورند و هم‌چنین پلیمرهای سنتزی از قبیل پلی گلایکولیک اسید، پلی لاکتیک اسید، پلی کاپرولاکتون، پلی ونیل الکل، پلی ونیل پیرولیدون و پلی اتیلن گلیکول که در ترمیم و بازسازی پوست استفاده شده‌اند.<sup>5</sup>

ژلاتین یکی از پلیمرهای طبیعی است که خواص منحصر به فردی مانند آبدوستی، فعالیت سطحی، قابلیت تشکیل ژل و کنترل گرانی دارد، ولی خواص مکانیکی آن بسیار ضعیف است و به سرعت تخریب می‌شود و پایداری ابعادی خود را از دست می‌دهد. این پلیمر طبیعی با پلیمر سنتزی زیست تخریب پذیر مانند پلی کاپرولاکتون (PCL) که دارای خواص مکانیکی و شیمیایی کنترل پذیر در کاربردهای ترمیمی است، می‌تواند گزینه مناسبی برای ساخت غشاهای پوستی به منظور جلوگیری از عفونت و از دست رفتن مایعات بدن و ایجاد سد محافظتی انتخابی بر روی زخم و در نهایت ترمیم و بازسازی پوست باشد.<sup>6</sup>

پلی کاپرولاکتون پلیمری سنتزی است که کاربردهای بسیار متنوعی را در مهندسی بافت داشته است و محققان از این پلیمر برای ساخت داربست به منظور مهندسی بافت پوست بهره برده‌اند.

به طور کلی یک غشای پوستی ایده‌آل مهندسی بافت باید توانایی کنترل از دست رفتن مایعات و ایجاد رطوبت در محل زخم، جلوگیری از ایجاد عفونت، انقباض‌ها و اسکارها را داشته باشد.<sup>7</sup> به این منظور باید سازه‌های تخلخل‌های غشاء از سطح بدن بیمار به سمت محیط خارج از بدن، کاهش یابد و این باید در صورتی اتفاق بیفتد که ارتباط بین تخلخل‌ها حفظ شود. یک غشاء مناسب برای کاربرد در مهندسی بافت پوست باید در تماس با سطح بدن بیمار تخلخلی در حدود 150 میکرومتر داشته باشد که این مقدار، برای ورود

### مشاهده مورفولوژی

جهت بررسی مورفولوژی الیاف، یک دست بودن، قطر حفرات و مرتبط بودن تخلخل‌ها به یکدیگر از دستگاه SEM KYKY-EM (3200) استفاده شد. بدین منظور نمونه‌ها در ابعاد  $1 \times 1$  سانتی‌متر مربع بریده شدند و به مدت 5 دقیقه با طلا پوشش داده شدند و تحت ولتاژ 26 کیلوولت و جریان 1 میلی‌آمپر تصویربرداری انجام گردید.

همچنین برای اندازه‌گیری قطر الیاف و عرض تخلخل‌ها از نرم افزار Image J استفاده شد.

### طیف‌سنجی با پرتو مادون قرمز به روش تبدیل فوریه

به منظور شناسایی ماده و تعیین گروه‌های عاملی متفاوت در ساختار شیمیایی از آزمون FTIR استفاده گردید. دستگاه بکار رفته در محدوده طیف 400 تا 4000 سانتی‌متر به توان منفی یک مورد بررسی قرار گرفته است. این آزمایش در دانشگاه صنعتی اصفهان با استفاده از دستگاه Jasco (ساخت ژاپن، مدل FTIR-6000) انجام شد.

### آزمون سنجش خواص مکانیکی

آزمون سنجش خواص مکانیکی بر اساس استاندارد ASTM D 882-10 انجام گرفت. در این آزمون، دستگاه کشش یا همان استحکام‌سنج ساخت کشور آمریکا با مدل instron 5566 به کار گرفته شد. نوارهای پانسمان دولایه به طول 100 میلی‌متر و عرض 20 میلی‌متر بریده شد. نمونه‌ها در فک‌های مربوطه قرار گرفتند. فک‌ها با سرعت 5 میلی‌متر بر دقیقه از هم فاصله می‌گیرند تا هنگامی که پانسمان‌ها دچار پارگی شوند. این آزمون برای 3 نمونه تکرار گردید تا مقدار میانگین و انحراف معیار بدست آید.

### بررسی زاویه تماس

به منظور ارزیابی شیمی سطح پانسمان‌های تهیه شده، از تست زاویه تماس استفاده شد. بدین منظور یک قطره آب با حجم 4 میکرولیتر بر روی سطح نمونه با حداقل سه بار تکرار آزمایش ریخته شد و تصاویر از وضعیت قطره آب بر روی سطح نمونه ثبت شد. سپس تصویر حاصل مورد بررسی قرار گرفته و زاویه تماس اندازه‌گیری می‌شود.

سلول‌های فیبروبلاست درم و کراتینوسیت‌ها که از مهم‌ترین سلول‌های پوستی به شمار می‌روند، مناسب است و در تماس با محیط خارجی و هوا تخلخلی در حدود 50-20 میکرومتر دارا باشد که این سایز تخلخل باعث جلوگیری از ورود گرد و غبار و آلودگی‌ها می‌شود و همچنین از دست رفتن مایعات بدن را کنترل می‌کند که در نهایت به ایجاد رطوبت در محل زخم کمک شایانی می‌شود.<sup>8</sup>

با توجه به مطالب ذکر شده در این پژوهش هدف ساخت و ارزیابی پانسمان دولایه پلي يورتان - ژلاتین/پلي کاپرولاکتون (PCI) می‌باشد که بتواند با تخلخل مناسب، رطوبت زخم را حفظ کند و از نفوذ باکتری به زخم جلوگیری کرده و به ترمیم و بازسازی زخم کمک کند.

### مواد و روش‌ها

به منظور ساخت پانسمان دو لایه پلي يورتان - نانوالیاف پلي کاپرولاکتون و ژلاتین، در ابتدا پلي يورتان با نسبت 12% وزنی - حجمی را در تتراهیدروفوران / دی‌متیل فرمامید با نسبت 50:50 و به مدت 3 ساعت روی همزن مغناطیسی قرار داده می‌شود تا کاملاً حل شود. بعد از تشکیل یه محلول یکنواخت، به منظور تهیه فیلم به روش ریخته‌گری حلال بعد از خارج شدن حباب‌های هوای داخل محلول فیلم بر روی قالب‌های تفلون مقاوم به حرارت (پلي تترا فلورو اتیلن) با ضخامت کمتر از 500 میکرومتر در ابعاد  $100 \times 100$  میلی‌متر شکل‌دهی می‌شود. این محلول در شرایط کاملاً مسطح ریخته شده و تا زمان خشک شدن در دمای اطاق قرار داده می‌شوند پس از خشک شدن کامل، فیلم‌ها از داخل قالب جدا می‌شوند.

محلول پلیمری پلي کاپرولاکتون / ژلاتین با نسبت 1 به 1 در حلال تترافلوروئورواتیلن در دمای محیط و با غلظت 10% وزنی با نرخ 0/5 میلی‌لیتر بر ساعت و فاصله 12 سانتی‌متر تا جمع‌کننده و ولتاژ 180 کیلوولت الکتروریسی می‌شود. در این روش پمپ تزریق افقی قرار می‌گیرد و سپس به سر سرنگ 23 گیج وصل و در نهایت جهت القای بار به محلول درون سرنگ، قطب مثبت منبع تغذیه را بدان وصل می‌شود. روبروی سرنگ نیز ورقه‌ای از فویل آلومینیوم بر روی کالکتور قرار می‌گیرد که بر روی فویل فیلم پلي يورتانی ساخته شده متصل می‌شود که قطب منفی منبع تغذیه به آن وصل می‌شود. در نهایت الیاف به صورت تصادفی بر روی فیلم پلي يورتان ساخته شده رسیده می‌شود.

## آزمون جذب آب

به منظور اندازه‌گیری میزان جذب آب نمونه‌ها مطابق استاندارد ASTM-D-5964، نمونه‌ها به صورت مربع‌هایی با ابعاد 1×1 سانتی‌متر مربع بریده شدند و سپس به مدت 24 ساعت درون آب دیونیزه شده در انکوباتور با دمای 37 درجه سانتی‌گراد قرار گرفتند. سپس با استفاده از رابطه زیر، جذب آب اندازه‌گیری شد.

$$\text{Swelling ratio} = [(w_w - w_d) / w_d] \times 100\%$$

$w_w$  وزن نمونه در حالت خیس شده و  $w_d$  وزن نمونه در حالت خشک است. نمونه‌های غوطه‌ور شده قبل از اندازه‌گیری وزن آن‌ها به مدت 5 دقیقه روی کاغذ صافی قرار گرفتند.<sup>9</sup>

## آزمون سمیت سلولی

برای بررسی میزان سمیت سلولی داربست‌ها از سلول‌های فیبروبلاست انسانی استفاده گردید. فیبروبلاست‌های تهیه شده به محیط DMEM غنی شده با 10% FBS، 1% ال گلوتامین، پنی‌سیلین G و استرپتومایسین انتقال داده شد و در انکوباتور با شرایط 5% گاز دی اکسید کربن در دمای 37 درجه به مدت 3 هفته نگهداری گردید. ضمن اینکه هر 2 روز یکبار تعویض مدیوم صورت گرفت تا سلول‌ها به تراکم 80% برسند. در پاساژ سوم سلول‌ها تریپسین شدند. سپس تعداد 105 سلول درون پلیت 24 خانه حاوی داربست‌های تهیه شده به مدت 5 روز درون انکوباتور نگهداری گردید. سپس سلول‌ها دوبار به وسیله PBS شسته شدند تا سلول‌های مرده خارج شوند. در مرحله بعد 20 میکرولیتر ماده MT به هر خانه پلیت افزوده شد. سپس سلول‌ها به مدت 4 ساعت درون انکوباتور قرار داده شدند و ارزیابی سمیت سلولی به وسیله کلریمتری صورت گرفت. در واقع نمک تترازولیوم که نمک زرد رنگی است، به وسیله آنزیم‌های میتوکندری احیاء می‌شود و به فرمازان آبی رنگ غیر محلول تبدیل می‌گردد. برای محلول کردن فرمازان 200 میکرولیتر دی متیل سولفوکساید به هر چاهک اضافه می‌شود. در نهایت میزان جذب نور در 540 نانومتر اندازه‌گیری گردید. در این مطالعه درصد سلول‌های زنده نسبت به گروه کنترل (کف پلیت) سنجیده شد.<sup>10</sup>

## ارزیابی چسبندگی سلولی

جهت بررسی چسبندگی و مورفولوژی سلول‌ها بر روی داربست‌های حاوی دارو و بدون دارو، بعد از 5 روز انکوباسیون نمونه‌ها، محیط کشت از روی آن‌ها تخلیه شد و جهت تثبیت سلول‌های چسبیده محلول گلو تار آلدئید 4 درصد به مدت 30 دقیقه روی نمونه‌ها ریخته شد. در ادامه به وسیله الکل با درصدهای 50، 70، 90 و 100 درصد شستشو صورت گرفت. سپس چسبندگی سلولی به وسیله میکروسکوپ الکترونی روبشی مورد ارزیابی قرار گرفت.

## روش تحلیل آماری

کلیه آزمون‌ها بر روی جوامع آماری با حجم نمونه 3 تکرار انجام شده است و تمامی داده‌ها به صورت میانگین  $\pm$  انحراف معیار گزارش شدند. آزمون آنووا - یکطرفه جهت بررسی و مقایسه نتایج بین گروهی با سطح معناداری بر  $P < 0/05$  در نظر گرفته شد. تمامی محاسبات آماری با SPSS نسخه 17 انجام شد.

## یافته‌ها

### مشاهده مورفولوژی

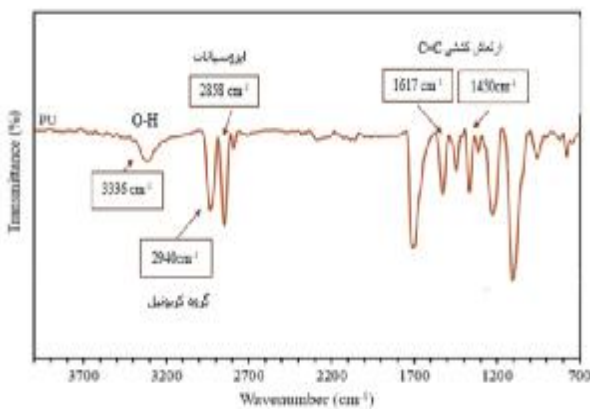
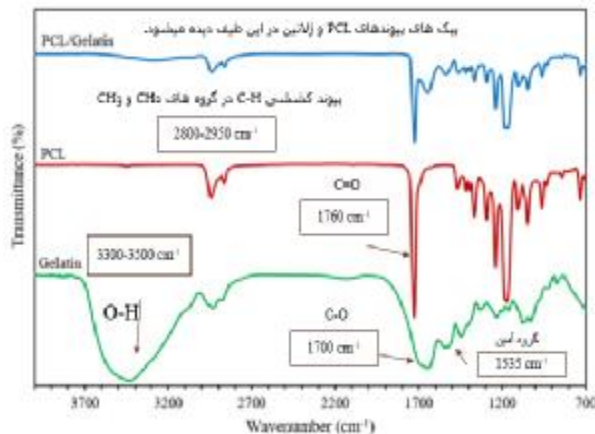
از میکروسکوپ الکترونی روبشی به منظور بررسی ساختار فوم‌های پلی‌یورتانی و همچنین نانوالیاف ژلاتین / پلی کاپرولاکتون الکتروریسی شده روی فوم پلی‌یورتانی استفاده شد. در تصویر و جدول 1، نشان داده شده است، قطر الیاف الکتروریسی شده PCI، 427 نانومتر می‌باشد که با ورود ژلاتین به ساختار داربست در فرایند الکتروریسی قطر الیاف به 325 نانومتر رسید.

جدول 1- اندازه قطر الیاف داربست‌های الکتروریسی شده

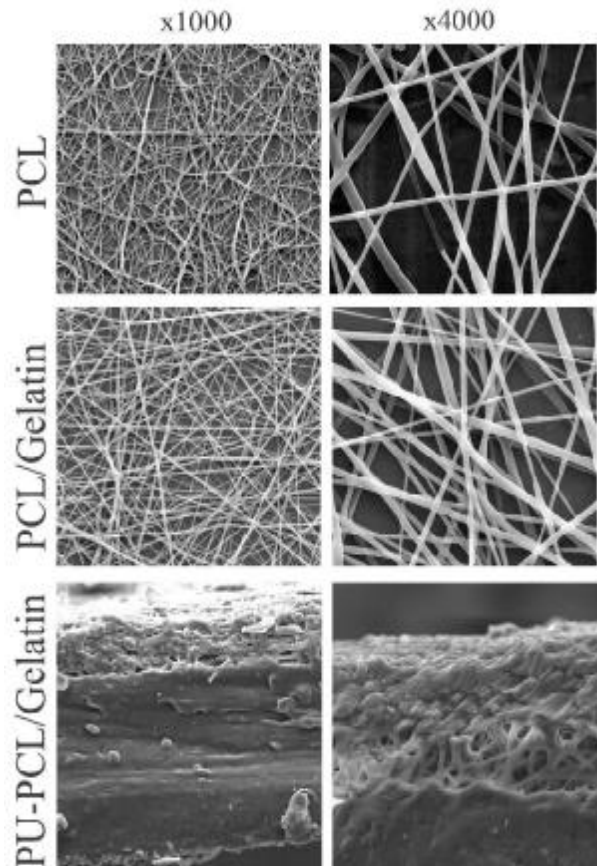
نمونه‌ها	کمینة قطر الیاف (نانومتر)	بیشینه قطر الیاف (نانومتر)	انحراف از معیار $\pm$ میانگین (نانومتر)
PCI	76/259	21/632	29/33 $\pm$ 79/325
Gelatin PCI /	03/213	57/612	64/18 $\pm$ 380/427

## طیف‌سنجی با پرتو مادون قرمز به روش تبدیل فوریه

این آزمون به منظور تایید ماهیت مواد شیمیایی به کار رفته را نشان می‌دهد. تصویر 2 آزمون FTIR را برای لایه پلی‌یورتان نشان می‌دهد. پیک‌های مشخصه برای پلیمر پلی‌یورتان مربوط به پیوندهای N-H اورتان، ارتعاش نامتقارن 2CH، لرزش متقارن 3CH، ارتعاش کششی گروه ایزوسیانات، باندهای کششی کربونیل اورتان، پیوند دومین آمیدی اورتان به ترتیب در طول موج‌های مشخص شده 3322، 2940، 2858، 2350، 1713، 1529 سانتی‌متر به توان منفی یک مشاهده گردیدند. همچنین جذب پیوند O-H- ترکیبات فنولی در 3336 سانتی‌متر به توان منفی یک مشاهده شد. همچنین جذب در طول موج‌های 1496، 1617 و 1450 سانتی‌متر به توان منفی یک مربوط به پیوند کششی C=C مربوط به حلقه اروماتیک مشاهده گردید.<sup>11</sup>



تصویر 2- نمودار FTIR پلی‌یورتان و ژلاتین / PCL



تصویر 1- تصویر میکروسکوپ الکترونی روشی نانوالیاف PCL / Gelatin و PCL / Gelatin و داربست دو لایه PU-PCL / Gelatin

در جدول 2 درصد تخلخل داربست‌های الکتروریسی شده گزارش شده است. درصد تخلخل داربست‌های PCL و PCL/Gelatin بالای 80% درصد است و همچنین تخلخل پانسمان‌ها در لایه سوم بیشتر از 20% می‌باشد.

جدول 2- درصد تخلخل پانسمان‌های الکتروریسی PCL و PCL/Gelatin در لایه‌های اول و دوم و سوم

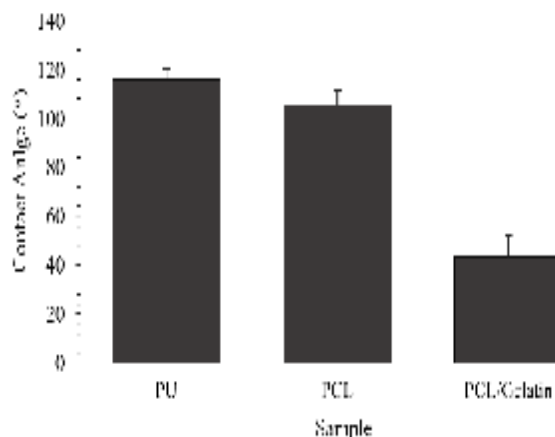
نمونه‌ها	درصد تخلخل اول (%)	درصد تخلخل دوم (%)	درصد تخلخل لایه سوم (%)
PCL	83	52	23
Gelatin PCL / n	85	54	25

جدول 3- خواص مکانیکی داربست‌های تهیه شده

کد نمونه	کرنش کششی درصد	استحکام کششی (MPa)
PCL/Gelatin	40±14/278	4/0±0/16
PU	340±39/157	5/55±0/09
PU-PCL/Gelatin	330±748/91	4/46±0/08

### بررسی زاویه تماس

تصویر 4 زاویه تماس داربست‌های PU، PCL و PCL/Gelatin می‌باشد. در ابتدا زاویه تماس داربست PCL و PU به ترتیب 114 و 118 می‌باشد که با حضور ژلاتین در ساختار داربست به 44 رسیده است.



تصویر 4- نمودار زاویه تماس داربست‌های PU، PCL و PCL/Gelatin

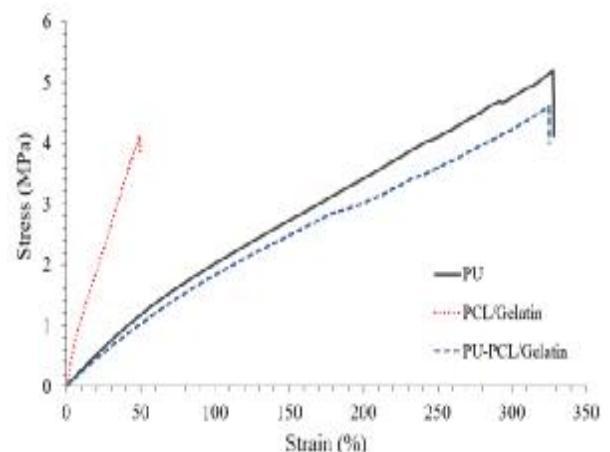
### ارزیابی جذب آب پانسمان

تجمع آگزودا در محل زخم باعث کلونیزاسیون باکتری شده و مراحل ترمیم را به تعویق می‌اندازد. بنابراین یک ویژگی مهم پانسمان جذب آگزودای زخم است. در آنالیز جذب آب برای نمونه داربست‌های PU، PCL/Gelatin و داربست دو لایه PU-PCL/Gelatin به ترتیب 250، 350 و 387 درصد بدست آمد (تصویر 5).

با توجه به استفاده از ژلاتین در ساختار، انتظار می‌رفت پیوندهای N-H و C-N به وضوح مشاهده شود. پیک‌های مشخصه باندها و گروه‌های عاملی به صورت، باند (OH) در حوالی 3300 تا 3500، باند (CH, CH2, CH3) در حوالی 2800 تا 2950، باند (NH 2) در حوالی 11535 سانتی‌متر به توان منفی یک، باند کربونیل (C=O, C-O) در حوالی 1700 تا 1760 است.

### بررسی خواص مکانیکی داربست

جدول 3 خواص مکانیکی داربست‌های نانوالیاف داربست‌های PU، PCL/Gelatin و PU-PCL/Gelatin را نشان می‌دهد. استحکام کششی داربست PU، PCL/Gelatin و PU-PCL/Gelatin به ترتیب 5/55، 4/00 و 4/46 مگاپاسکال است و کرنش کششی این داربست‌ها به ترتیب برابر 340٪، 40٪ و 330٪ می‌باشد (تصویر 3).

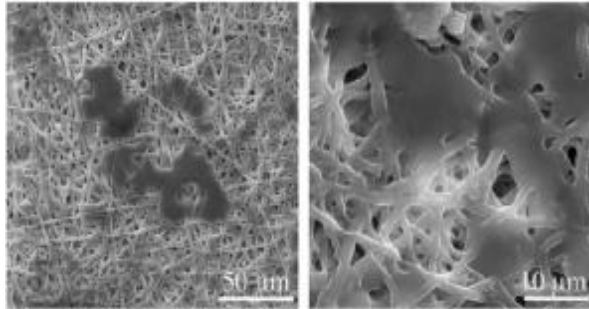


تصویر 3- نمودار تنش-کرنش لایه PU، داربست الکتروریسی شده PCL/Gelatin و داربست دو لایه PU-PCL/Gelatin

خاصیت آبگریزی و آبدوستی داربست‌های الکتروریسی شده دارای تأثیر زیادی در کاربرد نهایی نانوالیاف در مهندسی بافت دارد. به عبارت دیگر، نانوالیاف هیدروفیل باعث افزایش چسبندگی و تکثیر سلولی در مقایسه با نانو فیبرهای آبگریزی می‌شوند که فاقد مکان‌های سطحی کافی برای تعامل با سلول‌ها هستند.

سلول‌های و تکثیر سلول‌های L 929 در داربست الکتروریسی PCL/Gelatin بالاست.

تصاویر SEM داربست‌ها در روز سوم پس از کشت سلولی مورد بررسی قرار گرفت. همانطور که در تصویر 7 مشخص شده است، سلول‌های فیبروبلاست به خوبی با الیاف داربست اتصال برقرار کرده‌اند و پهن‌شدگی به وضوح قابل مشاهده شده است.

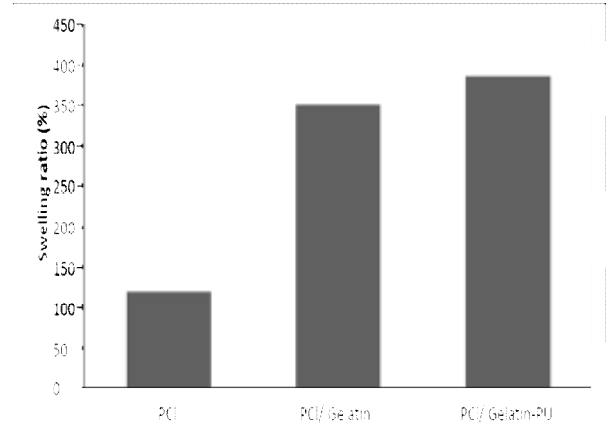


تصویر 7- تصویر میکروسکوپ الکترونی سلول‌های کشت داده شده روی داربست دو لایه PU-PCI/Gelatin

### بحث و نتیجه‌گیری

به طور کلی یک غشای پوستی ایده‌آل مهندسی بافت باید توانایی کنترل از دست رفتن مایعات و ایجاد رطوبت در محل زخم، جلوگیری از ایجاد عفونت، انقباض‌ها و اسکارها را داشته باشد.<sup>12</sup> به این منظور باید سایز تخلخل‌های غشاء از سطح بدن بیمار به سمت محیط خارج از بدن کاهش یابد و این باید در صورتی اتفاق بیفتد که ارتباط بین تخلخل‌ها حفظ شود. یک غشاء مناسب برای کاربرد در مهندسی بافت پوست باید در تماس با سطح بدن بیمار تخلخلی در حدود 150 میکرومتر داشته باشد که این مقدار، برای ورود سلول‌های فیبروبلاست درم و کراتینوسیت‌ها که از مهم‌ترین سلول‌های پوستی به شمار می‌روند، مناسب است و در تماس با محیط خارجی و هوا تخلخلی در حدود 20-50 میکرومتر دارا باشد که این سایز تخلخل باعث جلوگیری از ورود گرد و غبار و آلودگی‌ها می‌شود و همچنین از دست رفتن مایعات بدن را کنترل می‌کند که در نهایت به ایجاد رطوبت در محل زخم کمک شایانی می‌شود.<sup>13</sup>

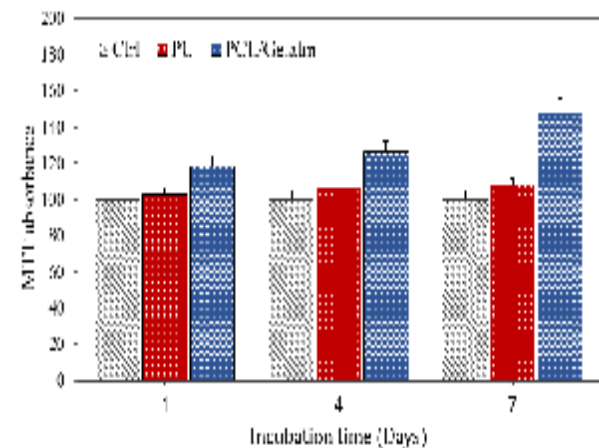
در این مطالعه با حضور ژلاتین در ترکیب PCL/Gelatin محلول رقیق‌تر شده و با کاهش غلظت قطر الیاف کاهش می‌یابد. انتظار می‌رود با کاهش قطر الیاف، تخلخل داربست



تصویر 5- نمودار جذب آب داربست‌های PCL و PCL/Gelatin و داربست دو لایه PCL/Gelatin-PU

### ارزیابی سمیت سلولی و چسبندگی سلولی

در این بخش نتیجه آزمون MTT بررسی شد. تصویر 6 میانگین مقدار MTT را در گروه‌های کنترل، برای لایه PU و داربست الکتروریسی PCL/Gelatin را در روزهای 1، 4 و 7 نشان می‌دهد.



تصویر 6- آزمون سمیت سلولی برای لایه PU و داربست الکتروریسی PCL/Gelatin

یکی از نتایج حاصل از انجام تست MTT این است که هیچ‌گونه سمیتی در پانسمان‌های تولید شده وجود ندارد. در این مطالعه داربست‌های لایه PU و داربست الکتروریسی PCL/Gelatin نسبت به نمونه کنترل سلول‌های زنده بیشتری مشاهده شده است. در واقع میزان زنده بودن

بیشتر داربست و کمتر شدن زاویه تماس شده است. بالا بودن جذب آب داربست می‌تواند به دو علت باشد:

1. زنجیره‌های مولکول ژلاتین دارای تعداد زیادی گروه‌های آبدوست است که می‌توانند آبدوست بودن آن را ارتقا دهند.

2. نانوالیاف الکتریکی دارای سطح بالایی از نسبت سطح به حجم و تخلخل زیاد می‌باشد که می‌تواند جذب آب را برای جابجایی هوا در منافذ تسهیل کند.<sup>17</sup>

با توجه به نتایج به دست آمده از این آنالیز به نظر می‌رسد توانایی جذب آگزودای پانسماں دولابه برای کاربرد در آزمون‌های بالینی مناسب است.<sup>18</sup>

در واقع میزان زنده بودن سلول‌های و تکثیر سلول‌های در داربست الکترورسی PCL/Gelatin بالاست و این به دلیل خواص دو پلیمر PCL و ژلاتین می‌باشد. اگرچه داربست الکترورسی شده پلی کاپرولاکتون سطحی آگریز دارد ولی ژلاتین پلیمری طبیعی است که دارای سطحی آبدوست می‌باشد و ساختاری شبیه کلاژن‌های موجود در ماتریس خارج سلولی دارد و نتایج حاصل نشان می‌دهد نانوالیاف الکترورسی شده PCL/Gelatin سمیتی نداشته و بستری مناسب را برای رشد سلول‌ها فراهم نموده است. مطالعات گواتام و همکارانش نشان می‌دهد هم افزایی این دو پلیمر در کنار هم موجب برهمکنش گروه کربوکسیل PCL، آمینو ژلاتین می‌گردد که نتیجه آن میزان زنده ماندن بالای سلول در تست MTT می‌شود.<sup>19</sup> افزایش رشد سلول‌ها نشان‌دهنده سلول‌سازی پانسماں دولابه است.

این پژوهش به خوبی نشان داده است دو پلیمر سنتزی پلی کاپرولاکتون و پلیمر طبیعی ژلاتین در کنار هم می‌تواند بستر مناسبی را برای رشد و تکثیر سلول‌های 929 L فراهم کنند. به عبارتی پلیمر پلی کاپرولاکتون توانسته خواص مکانیکی مناسبی برای داربست فراهم کند و ژلاتین خاصیت آبدوستی به داربست بخشیده است. در نتیجه می‌توان گفت داربست الکترورسی شده PCL/Gelatin پتانسیل لازم را برای چسبندگی، رشد و تکثیر سلولی دارا می‌باشد.

الکترورسی شده افزایش یابد که در این صورت با افزایش درصد تخلخل رشد و تکثیر سلولی بهتر اتفاق می‌افتد. از این رو حضور ژلاتین در ساختار نانوالیاف الکترورسی شده و تأثیر آن در کاهش قطر لیاف می‌تواند مهم باشد.

از آنجا که درصد تخلخل همه داربست‌های PCL و PCL/Gelatin بالای 80% درصد است بر طبق مطالعات قبلی می‌توان گفت، این درصد تخلخل برای کاربردهای پوستی مناسب است. تخلخل داربست‌ها در لایه سوم بیشتر از 20% می‌باشد که نشان می‌دهد این تخلخل‌ها به هم ارتباط دارند.<sup>14,9</sup>

با وارد شدن ژلاتین استحکام کششی کاهش یافته و در مقابل کرنش شکست داربست‌ها افزایش یافت. در مطالعه‌ای که که ژنگ و همکارانش بر روی داربست‌های PCL/Gelatin انجام دادند نشان داد با افزایش نسبت ژلاتین استحکام کششی کاهش یافته است و از سوی دیگر انعطاف‌پذیری و تغییر طول آن افزایش می‌یابد. در واقع حضور ژلاتین موجب جدایی میکروفازی و غیرقابل تشخیص می‌شود که موجب گیر کردن کمتر زنجیره‌ها و برهمکنش ضعیف فیزیکی زنجیره‌های ساختاری پلیمری در بارگذاری می‌گردد.<sup>15</sup>

خاصیت آگریزی و آبدوستی داربست‌های الکترورسی شده دارای تأثیر زیادی در کاربرد نهایی نانوالیاف در مهندسی بافت دارد. به عبارت دیگر نانوالیاف هیدروفیل باعث افزایش چسبندگی و تکثیر سلولی در مقایسه با نانو فیبرهای آگریزی می‌شوند که فاقد مکان‌های سطحی کافی برای تعامل با سلول‌ها هستند.

در نتیجه هرچه میزان آبدوستی نانوالیاف بالاتر باشد، نانوالیاف بیشتر این پتانسیل را دارند که در برنامه‌های کاربردی پزشکی استفاده شوند. اندازه‌گیری زاویه تماس قطرات آب با داربست می‌تواند به عنوان معیار مناسبی برای تعیین آبدوستی / آگریزی در نظر گرفته شود.<sup>16</sup> می‌توان گفت PCL پلیمری سنتزی با خاصیت آگریز است. از آنجا که در ترکیب ژلاتین گروه‌های عاملی O-H و آمینی وجود دارد، با حضور ژلاتین در ساختار داربست ماهیت آن تغییر می‌کند، در واقع ژلاتین پلیمری طبیعی است که موجب آبدوستی

در رشد و تکثیر سلول‌های 929L به خوبی تأیید کرده است.

در این مطالعه، از الکتروریسی PCL/Gelatin بر روی فیلم پلی یورتان برای تهیه یک پانسمان دو لایه‌ای استفاده شده است. در این پانسمان، پلی یورتان به عنوان یک لایه بیرونی عمل می‌کند و از عبور باکتری‌ها و آلودگی‌های بیرونی جلوگیری کرده و امکان نفوذ اکسیژن را فراهم می‌سازد و از سوی دیگر نانوفیبرهای کامپوزیتی ژلاتین / PCI الکتروریسی شده به عنوان لایه داخلی پانسمان عمل کرده که وظیفه عملکردی شبیه ساختار ماتریس خارج سلولی دارد و به رشد و تکثیر سلول‌های فیبروبلاست و ترمیم زخم کمک می‌کند. پس از ارزیابی مشخصات پانسمان دو لایه تهیه شده و بررسی حضور گروه‌های عاملی ژلاتین و پلی کاپرولاکتون در ساختار و ارزیابی خواص بیولوژیکی و رفتارهای سلولی آن می‌توان گفت این پانسمان دو لایه پتانسیل لازم برای ترمیم زخم‌های عفونی و کاربرد در مهندسی بافت که فرایند آنژیوژنز در آن‌ها کاهش یافته است را دارد.

مطالعات نشان می‌دهد بهبود آبدوستی سطح داربست، باعث افزایش اتصال سلول، زنده ماندن، تکثیر و تعامل سلولی می‌شود. در مجموع، می‌توان نتیجه گرفت که پلیمرهای طبیعی چون ژلاتین در مهندسی بافت به دلیل فراهم کردن مساحت وسیعی برای اتصال و سلولی سلول‌ها، باعث تقویت فعالیت فیبروبلاست می‌شود. این رفتار سلولی داربست در برابر سلول‌های 929 L، با توجه به حضور ژلاتین مورد تأیید می‌باشد.<sup>20</sup>

در مطالعات قبلی که توسط یاو و همکارانش انجام شد، آنها با بررسی خواص فیزیک و شیمیایی داربست PCL/Gelatin نشان دادند این داربست می‌تواند کاندید بسیار مناسبی برای کاربردهای مهندسی بافت باشد.<sup>21</sup> از سوی دیگر لی و همکارانش در آزمایشی در محیط درون تن اثر پلی یورتان را به عنوان زخم پوش در بهبود ترمیم زخم مورد بررسی قرار دادند و دریافتند این پلیمر روند ترمیم زخم را تسریع کرده است.<sup>22</sup> در راستای این مطالعات، در پژوهش حاضر نیز آزمایشات برون تن استفاده از داربست دو لایه پلی یورتان - نانوالیاف ژلاتین/PCI اثر این پلیمرها را

**Abstract:**

## **Fabrication and Characterization of Bilayer Wound Dressing Polyurethane- Gelatin/ Polycaprolactone for Usage in Tissue Engineering**

*Hedayatnazari A. M.Sc<sup>\*</sup>, Movahedi M. P.hD<sup>\*\*</sup>, Naseri M. M.Sc<sup>\*</sup>*

(Received: 19 Aug 2020      Accepted: 21 April 2021)

**Introduction & Objective:** Infection is one of the main causes of delayed wound healing. In addition to infection, in some chronic wounds, such as diabetic wounds, the wound heals slowly due to reduced angiogenesis. For this purpose, a two-layer dressing consisting of gelatin / polycaprolactone nanofibers and polyurethane film can be a suitable solution to accelerate wound healing.

**Materials & Methods:** In order to make double-layer polyurethane - gelatin / polycaprolactone nanofiber dressing. Solution of Polyurethane (12% W/v) in tetrahydrofuran / dimethyl formamide is first placed on a magnetic stirrer. After the formation of a uniform solution, the solution is formed on Teflon molds in order to prepare a film by solvent casting. The polycaprolactone / gelatin polymer solution is then prepared at ambient temperature at a concentration of 10% by weight, and finally the fibers are spun randomly onto the fabricated polyurethane film.

**Results:** The morphology of the bilayer dressing was examined by scanning electron microscopy. Tests such as water absorption, mechanical properties (fracture strain and tensile strength), contact angle and cytotoxicity were performed. The contact angle test for polycaprolactone and polycaprolactone / gelatin nanofibers was measured at 114 and 44 degrees, respectively. Tensile strength for double-layer scaffolding was 4.46 MPa and fracture strain was reported at an average of 330%. Cytotoxicity test showed that the samples were not toxic. Fibroblast cells also showed good adhesion to the dressing.

**Conclusions:** The results of studies showed that double layer dressing can be a suitable solution for the treatment of diabetic infectious wounds also Skin Tissue Engineering.

***Key Words: Polyurethane, Gelatin, Polycaprolactone, Skin Tissue Engineering***

<sup>\*</sup> *Master of Science of Tissue Engineering, Department of Technologies, Science and Research Branch, Azad University, Tehran, Iran*

<sup>\*\*</sup> *Assistant Professor, Department of Biomedical Engineering, Shahrekord branch, Islamic Azad University, Shahrekord, Iran*

## References:

1. F. Groeber, M. Holeiter, M. Hampel, S. Hinderer, and K. Schenke-Layland, "Skin tissue engineering-in vivo and in vitro applications," *Advanced drug delivery reviews*, vol. 63, pp. 352-366, 2011.
2. Y.-F. Goh, I. Shakir, and R. Hussain, "Electrospun fibers for tissue engineering, drug delivery, and wound dressing," *Journal of Materials Science*, vol. 48, pp. 3027-3054, 2013.
3. S. Kishida, "Nanoscale biological and physical factors influence on myogenic differentiation of skeletal myoblasts," 2014.
4. B. Chevally and D. Herbage, "Collagen-based biomaterials as 3D scaffold for cell cultures: applications for tissue engineering and gene therapy," *Medical and Biological Engineering and Computing*, vol. 38, pp. 211-218, 2000.
5. G. D. Mogoşanu and A. M. Grumezescu, "Natural and synthetic polymers for wounds and burns dressing," *International journal of pharmaceutics*, vol. 463, pp. 127-136, 2014.
6. F. Han, Y. Dong, Z. Su, R. Yin, A. Song, and S. Li, "Preparation, characteristics and assessment of a novel gelatin-chitosan sponge scaffold as skin tissue engineering material," *International journal of pharmaceutics*, vol. 476, pp. 124-133, 2014.
7. R. A. Kamel, J. F. Ong, E. Eriksson, J. P. Junker, and E. J. Caterson, "Tissue engineering of skin," *Journal of the American College of Surgeons*, vol. 217, pp. 533-555, 2013.
8. T. W. Wang, H. C. Wu, Y. C. Huang, J. S. Sun, and F. H. Lin, "Biomimetic Bilayered Gelatin-Chondroitin 6 Sulfate-Hyaluronic Acid Biopolymer as a Scaffold for Skin Equivalent Tissue Engineering," *Artificial organs*, vol. 30, pp. 141-149, 2006.
9. P. Heydari, J. Varshosaz, A. Zargar Kharazi, and S. Karbasi, "Preparation and evaluation of poly glycerol sebacate/poly hydroxyl butyrate core-shell electrospun nanofibers with sequentially release of ciprofloxacin and simvastatin in wound dressings," *Polymers for Advanced Technologies*, vol. 29, pp. 1795-1803, 2018.
10. A. Eskandarinia, M. Rafienia, S. Navid, and M. Agheb, "Physicochemical, Antimicrobial and Cytotoxic Characteristics of Corn Starch Film Containing Propolis for Wound Dressing," *Journal of Polymers and the Environment*, vol. 26, pp. 3345-3351, 2018.
11. J. I. Kim, H. R. Pant, H. J. Sim, K. M. Lee, and C. S. Kim, "Electrospun propolis/polyurethane composite nanofibers for biomedical applications," *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl*, vol. 44, pp. 52-7, Nov 2014.
12. Kamel, R.A., et al., Tissue engineering of skin. *Journal of the American College of Surgeons*, 2013. 217(3): p. 533-555.
13. Wang, T.W., et al., Biomimetic Bilayered Gelatin-Chondroitin 6 Sulfate-Hyaluronic Acid Biopolymer as a Scaffold for Skin Equivalent Tissue Engineering. *Artificial organs*, 2006. 30(3): p. 141-149.
14. Y. C. Shin, D. M. Shin, E. J. Lee, J. H. Lee, J. E. Kim, S. H. Song, et al., "Hyaluronic Acid/PLGA Core/Shell Fiber Matrices Loaded with EGCG Beneficial to Diabetic Wound Healing," *Adv Healthc Mater*, vol. 5, pp. 3035-3045, Dec 2016.
15. Y. Zhang, H. Ouyang, C. T. Lim, S. Ramakrishna, and Z. M. Huang, "Electrospinning of gelatin fibers and gelatin/PCL composite fibrous scaffolds," *Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials: An Official Journal of The Society for Biomaterials, The Japanese Society for Biomaterials, and The Australian Society for Biomaterials and the Korean Society for Biomaterials*, vol. 72, pp. 156-165, 2005.
16. M. Heidari, H. Bahrami, and M. Ranjbar-Mohammadi, "Fabrication, optimization and characterization of electrospun poly (caprolactone) / gelatin / graphene nanofibrous mats," *Materials Science and Engineering: C*, vol. 78, pp. 218-229, 2017.
17. R. Shi, H. Geng, M. Gong, J. Ye, C. Wu, X. Hu, et al., "Long-acting and broad-spectrum antimicrobial electrospun poly ( $\epsilon$ -caprolactone) / gelatin micro/nanofibers for wound dressing," *Journal of colloid and interface science*, vol. 509, pp. 275-284, 2018.
18. D. Khodabakhshi, A. Eskandarinia, A. Kefayat, M. Rafienia, S. Navid, S. Karbasi, et al., "In vitro and in vivo performance of a propolis-coated polyurethane wound dressing with high porosity and antibacterial efficacy," *Colloids Surf B Biointerfaces*, vol. 178, pp. 177-184, Mar 6 2019.
19. S. Gautam, C.-F. Chou, A. K. Dinda, P. D. Potdar, and N. C. Mishra, "Fabrication and characterization of PCL/gelatin/chitosan ternary nanofibrous composite scaffold for tissue engineering applications," *Journal of materials science*, vol. 49, pp. 1076-1089, 2014.
20. M. Adeli-Sardou, M. M. Yaghoobi, M. Torkezadeh-Mahani, and M. Dodel, "Controlled release of lawsone from polycaprolactone/gelatin electrospun nano fibers for skin tissue regeneration," *International journal of biological macromolecules*, vol. 124, pp. 478-491, 2019.
21. Yao R, He J, Meng G, Jiang B, Wu F. Electrospun PCL/Gelatin composite fibrous scaffolds: mechanical

- properties and cellular responses. *Journal of Biomaterials science, Polymer edition*. 2016 Jun 12; 27(9): 824-38.
22. Li M, Chen J, Shi M, Zhang H, Ma PX, Guo B.

Electroactive anti-oxidant polyurethane elastomers with shape memory property as non-adherent wound dressing to enhance wound healing. *Chemical Engineering Journal*. 2019 Nov 1; 375: 121999.