



Production of Polyvinyl/Alcohol/Chitosan/Carbon Nanotubes by Electrospinning Method for Skin Scaffold Application

Zeinab Niknam

Dept. of Materials Science and Engineering, Shiraz University, Shiraz, Iran.

Seyed Mojtaba Zebarjad *

Dept. of Materials Science and Engineering, Shiraz University, Shiraz, Iran.

Kamal Janghorban

Dept. of Materials Science and Engineering, Shiraz University, Shiraz, Iran.

Seyedeh Sara Hashemi

Burn and Wound Healing Research Center, Shiraz University of Medical Sciences, Shiraz, Iran.

Abstract

This study investigates the production of ternary composite fibers made from polyvinyl alcohol (PVA), chitosan (Cs), and carbon nanotubes (CNT) through the electrospinning method, highlighting their significance in tissue repair and the advantageous properties of electrospun scaffolds for skin applications. Initially, a series of fiber samples from the PVA/Cs blend were created with varying weight ratios of PVA to Cs (0.75/1, 1/1, 1.5/1, 2.5/1, 2.8/1). The morphology and diameter of the fibers were analyzed using scanning electron microscopy (SEM), leading to the identification of the optimal PVA/Cs blend at a ratio of 2.8/1. Subsequently, carbon nanotubes were incorporated into this optimized blend at weight ratios of 0.5%, 1%, and 2%. To enhance the samples' stability in aqueous environments, chemical crosslinking was performed using glutaraldehyde (GA) vapor. SEM images confirmed the production of uniform fibers with the addition of CNT. Biocompatibility assessments through cell culture on the scaffolds revealed an increase in cell viability in samples containing 0.5% and 1% CNT.

Keywords: chitosan, CNT, polyvinyl alcohol, skin scaffold

Received: 07/April/2025

Accepted: 31/May/2025

eISSN: -----

ISSN: -----

* Corresponding Author: mojtabazebarjad@shirazu.ac.ir

ساخت کامپوزیت پلی‌وینیل الکل/کیتوسان/نانولوله‌ی کربنی تولیدشده به روش الکتروریسی جهت استفاده به‌عنوان داربست پوستی

زینب نیکنام

کارشناس ارشد، بخش مهندسی مواد، دانشگاه شیراز، شیراز، ایران.

سید مجتبی زبرجد *

استاد، بخش مهندسی مواد، دانشگاه شیراز، شیراز، ایران.

کمال جانقربان

استاد، بخش مهندسی مواد، دانشگاه شیراز، شیراز، ایران.

سیده سارا هاشمی

استادیار مرکز تحقیقات سوختگی و ترمیم زخم، دانشگاه علوم پزشکی شیراز، شیراز، ایران.

چکیده

نظر به اهمیت پلی‌وینیل الکل (PVA)، کیتوسان (Cs) و نانولوله‌ی کربنی (CNT) در ترمیم بافت‌های آسیب‌دیده و خواص مطلوب داربست‌های الکتروریسی در تولید داربست پوستی، در این تحقیق، تولید الیاف کامپوزیت سه‌تایی PVA/Cs/CNT با استفاده از روش الکتروریسی بررسی گردید. بدین منظور، ابتدا یک‌سری نمونه‌های فیبری از ترکیب PVA/Cs با نسبت‌های وزنی مختلف PVA به Cs (0.75/1, 1/1, 1.5/1, 2.5/1, 2.8/1) با روش الکتروریسی ساخته شد. مورفولوژی و قطر الیاف، به‌وسیله‌ی تصاویر میکروسکوپ الکترونی روبشی (SEM) بررسی شد و بهترین ترکیب PVA/Cs (2.8/1) به دست آمد. سپس نانولوله‌ی کربنی با نسبت‌های مختلف ۱ و ۲ درصد وزنی به ترکیب بهینه اضافه شد. به‌منظور استحکام‌بخشی به نمونه‌ها در محیط‌های آبی، پیوند عرضی شیمیایی به‌وسیله‌ی بخار گلو تارالدهید (GA) ایجاد شد. تصاویر SEM، نشان‌دهنده‌ی تولید الیاف یکنواخت در حضور CNT بود. ارزیابی زیست‌سازگاری به‌وسیله‌ی کشت سلولی روی داربست‌ها، افزایش زنده‌مانی سلول‌ها بر روی نمونه‌های حاوی ۱ و ۲ درصد وزنی CNT را نشان داد.

کلیدواژه‌ها: پلی‌وینیل الکل، کیتوسان، نانولوله‌ی کربنی، داربست پوستی

مقدمه

کیتوسان^۱، یک پلیمر طبیعی، زیست سازگار، غیر آنتی ژن، غیر سمی، دارای عاملیت زیستی و ضد باکتریایی است. این پلیمر، اخیراً توجه بسیاری را برای کاربردهای مختلف زیست دارویی به علت خصوصیات ذاتی مفیدش، به خود جلب کرده است. به کار بردن کیتوسان در داربست پوست به علت فعالیت ضد باکتریایی اش، برای بهبود زخم مفید به نظر می‌رسد (۱). پلی وینیل الکل^۲، یک پلیمر مصنوعی است که خواص ذاتی آن منجر به تسهیل فرایند الکتروریسی شده و علاوه بر آن آب دوست، زیست سازگار و زیست تجزیه پذیر هم هست؛ بنابراین، گزینه‌ی مناسبی برای همراهی کیتوسان به نظر می‌رسد. همچنین نانولوله‌ی کربنی، خواص بی نظیر مکانیکی و الکتریکی را به کامپوزیت می‌بخشد. اگرچه کاربرد نانو ساختارهای کربنی در زمینه‌های پلیمری برای اهداف پزشکی به طور وسیعی مورد مطالعه قرار گرفته است (۲)؛ اما تولید ساختارهای دوبعدی، کمتر بررسی شده و شامل استفاده از پلیمرهای طبیعی مانند کیتوسان، ژلاتین، ابریشم، آلژینات و یا کلاژن می‌باشد. به منظور برطرف کردن دو عیب عمده‌ی داربست‌های نانولوله‌ی کربنی خالص (که عبارت از سمیت بالای آن و تردی بیش از حد است)، ترکیب نانولوله‌ی کربنی با کامپوزیت‌های پلیمری به عنوان یک استراتژی معمول استفاده می‌شود. در این راستا، از نانولوله‌ی کربنی، به عنوان تقویت کننده برای بهبود خواص فیزیکی و مکانیکی مانند استحکام، انعطاف پذیری و هدایت الکتریکی، یا برای دست یابی به گروه‌های عاملی جدید استفاده می‌شود (۲).

پیشینه‌ی پژوهش

در یک پژوهش، سلول‌های فیرو بلاست موش به وسیله‌ی عامل دار کردن نانولوله‌ها با گروه‌های عاملی کربوکسیل بر روی شبکه‌ای از نانولوله‌ها کشت داده شدند. شبکه‌ی کربنی به دلیل غیر سمی بودن، می‌تواند به عنوان یک بافت زیست سازگار برای ترمیم یا تقویت بافت استفاده شود. رسانایی الکتریکی نانو کامپوزیت حاوی نانو ساختار کربنی نیز یک ویژگی مفید برای هدایت رشد سلولی است؛ چون می‌تواند با هدایت الکتریکی، پروسه‌ی بهبود زخم را سرعت دهد (۲). واگنر و همکاران^۳ (۳) و همکارانش، یک داربست رسانا با تخلخل‌های میکرونی شامل کیتوسان و نانولوله‌ی کربنی چند دیواره تولید کردند. سرد کردن کنترل شده‌ی محلول تادمای 20°C در ۸ دقیقه، منجر به تولید کامپوزیتی با ۹۷٪ تخلخل در جهات مختلف شد. الیواز^۴ و همکارانش، با به کارگیری تکنیک ریخته گری انجمادی، موفق به تولید داربست با کامپوزیت کیتوسان/نانولوله‌ی کربنی چند دیواره با تخلخل ۹۲٪ برای کاربردهای مهندسی بافت شدند (۴). در پژوهشی، رشد سلول‌های استخوانی بر روی نانو کامپوزیت PLLA^۵/MWNT^۶ تحت اعمال جریان الکتریکی متناوب، مورد مطالعه قرار گرفت (۵). نتایج، نشان داد که تکثیر سلول‌ها و میزان ته نشین شدن کلسیم برون سلولی^۷ بر روی نانو کامپوزیت در مقایسه با نمونه‌ی کنترل، افزایش یافته است. در تحقیقی دیگر، سمیت نانولوله‌ی کربنی در کامپوزیت SWCNT/PPF مورد مطالعه قرار گرفت و نتایج هیچ گونه سمیت سلولی را برای این کامپوزیت نشان نداد. به نظر می‌رسد که طبیعت گروه عاملی در سطح نانولوله‌ی کربنی، نقش مهمی را در پخش شدن خوب آن در پلیمر زمینه و انجام واکنش با سلول‌ها ایفا می‌کند. عامل دار کردن با گروه کربوکسیلیک، سطح جوانه زنی مناسبی را برای تشکیل پوشش‌های مشابه زیستی فراهم می‌کند (۶).

1. chitosan
2. polyvinyl alcohol
3. Wagner et al.
4. Elivaz
5. polylactic acid
6. multiwall nanotube
7. extra-cellular calcium

گوپتا و همکاران^۱ (۷) و همکارانش، در یک پژوهش، داربست‌هایی از جنس کیتوسان تقویت‌شده با نانولوله‌های کربنی چنددیواره را مورد بررسی قرار دادند و مشاهده کردند که سلول‌های هیپوکمپال^۲ عصبی موش، قابلیت بالایی برای زنده ماندن بر روی این داربست‌ها دارند که فاکتور بسیار مهمی در تقویت پتانسیل این داربست‌ها برای بازسازی عصبی به دلیل تأمین خواص مکانیکی و الکتریکی است. در مطالعات دیپان و میسرا^۳ (۸) و همکارش، تحقیقاتی به منظور بررسی عملکرد بیولوژیکی داربست کیتوسان اصلاح‌شده با نانولوله‌ی کربنی و جذب پروتئین توسط آن صورت گرفت. آنالیز مقایسه‌ای از واکنش‌های بین سلول و بستر داربست، بین نمونه‌ی کیتوسان اصلاح‌شده با نانولوله‌ی کربنی و نمونه‌ی اصلاح‌نشده، نشان از افزایش قابل ملاحظه‌ی اعمال بیولوژیکی در حضور نانولوله‌ی کربنی داشت. این تحقیق، همچنین نشان داد که در داربست‌های اصلاح‌شده با نانولوله‌ی کربنی، جذب پروتئین افزایش می‌یابد؛ به طوری که موجب رشد زیست فعالی و اعمال بیولوژیکی می‌شود (۸). بنی‌اسدی و مشایخان^۴ (۹)، داربست رسانای متخلخلی را با اضافه کردن نانوذرات پلی آنیلین/گرافن (PAG) به زمینه‌ی کیتوسان/ژلاتین، به منظور بررسی پتانسیل کامپوزیت ساخته‌شده در بازسازی اعصاب آسیب‌دیده ساختند. تأثیر میزان PAG بر خواص مختلفی از داربست، مورد بررسی قرار گرفت و نتایج، نشان داد که رسانایی الکتریکی و خواص مکانیکی، به نسبت افزایش نانوذرات PAG افزایش یافت. این در حالی بود که تخلخل، نرخ تورم و زیست‌تخریب‌پذیری، کاهش یافتند. به علاوه، زیست‌سازگاری با آزمون چسبندگی و تکثیر سلول‌ها به وسیله‌ی میکروسکوپ الکترونی روبشی و آزمون MTT بر روی داربست‌های تهیه‌شده، انجام گشت. این تحقیق، نشان داد که استفاده از یک داربست رسانای کیتوسان/ژلاتین/PAG به عنوان یک داربست مناسب با رسانایی، خواص مکانیکی و زیست‌سازگاری مناسب، می‌تواند برای کاربردهای بیومدیکال و مهندسی بافت مورد استفاده قرار بگیرد (۹). با توجه به اظهارات صورت گرفته در خصوص خواص مفیدی که نانولوله‌ی کربنی به انواع داربست‌های ساخته‌شده برای بافت‌های مختلف بدن اضافه می‌کند (مانند افزایش چسبندگی سلول‌ها به آن، پراکندگی بیشتر سلول‌ها، ایجاد سطح مناسب جوانه‌زنی و افزایش تکثیر سلولی و همچنین عدم استفاده از این نانولوله در تحقیقات انجام‌شده بر داربست‌های پوستی)، در تحقیق حاضر، به بررسی تأثیر وجود نانولوله‌ی کربنی در این نوع داربست‌ها پرداخته شده است. همچنین به دلیل خواص ویژه کیتوسان مانند زیست تجزیه‌پذیری، زیست سازگاری و تمایل آن برای واکنش با بافت‌های زنده و پلی وینیل الکل به دلیل خواص مطلوبی که به الکترورسی این ترکیب می‌بخشد، در پروژه‌ی حاضر به بررسی امکان استفاده از ترکیب این سه ماده در تولید داربست‌های پوستی پرداخته شده است.

روش

هدف از این تحقیق، تولید داربست پوستی بر پایه‌ی کیتوسان/پلی وینیل الکل/نانولوله‌ی کربنی به روش الکترورسی است. در جدول ۱، مواد استفاده‌شده در این تحقیق آورده شده است.

1. Gupta et al.
2. hypocampal
3. Depan & Misra
4. Baniasadi & Mashayekhan

جدول ۱. مشخصات مواد استفاده‌شده در این پژوهش

نام ماده	ترکیب شیمیایی	شرکت سازنده	کاربرد
کیتوسان	$(C_6H_{11}NO_4)_8$	Sigma Aldrich	زمینه داربست
پلی‌وینیل‌الکل	$(C_2H_4O)_n$	Merck	زمینه داربست
استیک اسید	CH_3COOH	Carl Roth	حلال
نانولوله‌ی کربنی	-	Neutrino	تقویت‌کننده
آب مقطر	-	زلال طب شیمی	حلال

مهم‌ترین مرحله در تولید داربست به روش الکتروریسی، مرحله‌ی تهیه‌ی محلول است که در ادامه به‌طور مختصر شرح داده می‌شود.

ساخت محلول شماره‌ی ۱: محلول ۱۰٪ وزنی پلی‌وینیل‌الکل و استیک اسید ساخته شد. بدین منظور، مقدار ۵ g پودر PVA به تدریج به ۵۰ ml محلول ۷۰٪ وزنی استیک اسید (۳۵ ml استیک اسید + ۱۵ ml آب) که به دمای $80^{\circ}C$ رسیده است، اضافه می‌شود؛ در حالی که بر روی همزن مغناطیسی هم زده می‌شود. بعد از حدود ۲ ساعت، انحلال کامل شده و به‌صورت محلول بی‌رنگ و همگنی درمی‌آید.

ساخت محلول شماره‌ی ۲: مراحل قبل برای کیتوسان تکرار شد؛ با این تفاوت که محلول کیتوسان ۷٪ وزنی بود؛ یعنی ۳/۵ g پودر کیتوسان در ۵۰ ml استیک اسید ۷۰٪ وزنی حل شد. محلول همگن کیتوسان نیز بعد از حدود ۴ ساعت هم زدن با همزن مغناطیسی در دمای محیط به دست آمد.

پراکنده کردن نانولوله‌های کربنی در محلول، مرحله‌ی بسیار مهمی از آماده‌سازی محلول است و بر پراکندگی نانولوله‌ها در کامپوزیت نهایی و خواص حاصل از آن تأثیر مستقیم می‌گذارد. نانولوله‌های کربنی، در ۲/۵ ml آب مقطر ابتدا با همزن مغناطیسی هم زده شدند. بهترین میزان پراکندگی نانولوله‌ها در محلول، با قرار دادن بشر حاوی نانولوله‌های کربنی در حمام آلتراسونیک در سه بازه‌ی ۱۵ دقیقه‌ای حاصل شد. نانولوله‌های پراکنده‌شده در آب مقطر، بلافاصله پس از خروج از حمام آلتراسونیک با محلول مورد نظر مخلوط شده و عملیات همگن‌سازی به مدت ۱۵ دقیقه به‌وسیله‌ی همزن مغناطیسی انجام شد.

نهایتاً سه مورد بالا با نسبت‌های مشخص با هم مخلوط شدند (طبق جدول ۲) تا نمونه‌های مختلف مورد آزمایش با نسبت‌های وزنی متفاوت ترکیبات به دست آیند.

جدول ۲. نحوه‌ی آماده‌سازی محلول‌های مختلف

شماره محلول	نسبت PVA/Cs	روش ساخت محلول پلیمری (محلول ۲ + محلول ۱)
۱	0.75/1	2.6 ml + 5 ml
۲	1/1	3.5 ml + 5 ml
۳	1.5/1	2.6 ml + 2.5 ml
۴	2.5/1	4.4 ml + 2.5 ml
۵	2.8/1	3.4 ml + 1.7 ml
۶	PVA خالص	5 ml محلول ۱

در ادامه، داربست لیفی با نسبت‌های پلیمری مطابق با جدول ۲ تولید شده و نمونه‌ی بهینه از بین آن‌ها انتخاب شد. نانولوله‌های کربنی با نسبت‌های وزنی (نانولوله به محلول) ۰/۵، ۱ و ۲٪، به محلول بهینه اضافه گردید و پس از ۱۵ دقیقه همگن‌سازی با همزن مغناطیسی محلول‌های نهایی آماده شد.

برای الکتروریسی محلول‌ها، از دستگاه نانو آزما دارای منبع ولتاژ قوی (۴۰ kV) ساخت کشور ایران استفاده شد. محلول تهیه شده در سرنگ‌های ۵ میلی لیتری ریخته شد. سوزن سرنگ به الکتروود مثبت و استوانه‌ی جمع کننده‌ی الیاف به الکتروود منفی متصل شد. قطر سوزن (۰/۷ mm gauge) و فاصله نوک سوزن تا جمع کننده در تمام آزمایشات ۱۵ cm در نظر گرفته شد. همچنین نرخ خروج محلول از نازل ۰/۶ ml/h و سرعت چرخش استوانه‌ی ۱۰۰ rpm و ولتاژ ۱۸ kV انتخاب شد. دمای انجام الکتروریسی، دمای محیط و زمان تولید الیاف برای نمونه‌های نهایی با توجه به استفاده از هر دو پمپ دستگاه، ۴ ساعت بود. در هر آزمایش، به منظور جمع آوری شبکه‌ی لیفی حاصل، یک فویل آلومینیومی روی جمع کننده پیچیده شده و پس از اتمام الکتروریسی فویل از روی استوانه برداشته می شد. الیاف از روی فویل با دقت برداشته شده و به مدت ۲۴ ساعت در دمای محیط خشک و برای بررسی مورفولوژی و انجام تست‌های دیگر نگهداری شدند.

با توجه به آب دوست بودن PVA و حلالیت کیتوسان در محیط اسیدی رقیق، داربست‌های حاصل در آب انحلال پذیری بالایی دارند و در محیط آبی به سرعت تخریب می شوند. به دلیل تماس مستقیم داربست پوستی با محیط آبی و نسبتاً اسیدی ناحیه‌ی زخم، این ویژگی مطلوب نیست و بالا بردن پایداری داربست به وسیله‌ی ایجاد اتصال عرضی، یک امر ضروری است. با توجه به اثربخشی بیشتر روش‌های شیمیایی، بخار گلو تارالدهید به عنوان عامل ایجاد اتصال عرضی انتخاب شد. بدین منظور، ۵ ml محلول آبی گلو تارالدهید ۴٪ در یک پتری دیش بدون در ریخته شد و در قسمت زیرین یک دسیکاتور قرار گرفت. سپس نمونه‌های جدا شده از فویل، درون دسیکاتور جاسازی شدند. لازم به ذکر است که دما، زمان، غلظت محلول گلو تارالدهید و فاصله‌ی نمونه‌ها از محلول، همگی عوامل بسیار تأثیر گذار بر مدت زمان و کیفیت انجام پیوند عرضی هستند و در این پژوهش با تکرار فراوان آزمایشات به پارامترهای مطلوب دست یافتیم. نهایتاً نمونه‌ها در محیط در بسته‌ی دسیکاتور، دمای محیط، زمان ۳ ساعت و فاصله‌ی حدود ۱۵ cm داخل دسیکاتور در معرض بخار گلو تارالدهید قرار گرفتند. پس از خروج، نمونه‌ها به مدت ۲۴ ساعت در دمای اتاق خشک شدند.

مورفولوژی و ساختار داربست‌های لیفی PVA/Cs و PVA/Cs/CNT، قبل و بعد از ایجاد اتصال عرضی به وسیله‌ی مدل Cambridge-S320 ساخت انگلستان با ولتاژ شتاب دهنده‌ی ۲۰ kV و فاصله‌ی کاری ۹-۱۲ mm مورد ارزیابی قرار گرفت. به دلیل نارسا بودن نمونه‌ها، قبل از تصویربرداری، یک لایه‌ی نازک از طلا به وسیله‌ی دستگاه Palaron SC 7640 روی نمونه‌ها پوشش داده شد.

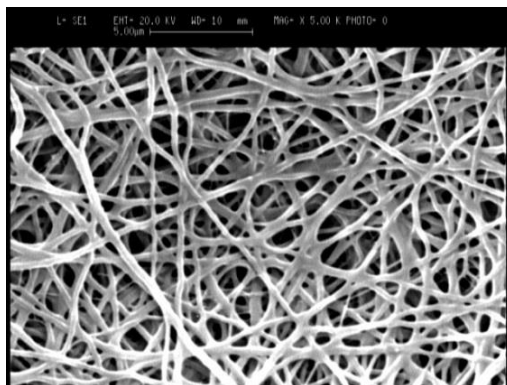
جهت آزمون زیست سازگاری، از روش کشت سلول‌های فیرو بلاست استفاده گردید. بدین منظور، از پوست ختنه‌ی نوزادان زیر یک سال با رضایت والدین، در شرایطی کاملاً استریل و بهداشتی، نمونه تهیه شد و نمونه‌ها در فالكون ۵۰ میلی لیتری حاوی آنتی مایکوتیک، آنتی بیوتیک پنی سیلین-استرپتومایسین و PBS ریخته شد. این فالكون، در مجاورت باکس یخ قرار داده گرفته و به مرکز تحقیقات سوانح سوختگی و ترمیم زخم امیرالمؤمنین منتقل شد. تمام مراحل جداسازی بافت از پوست مورد نظر، زیر هود لامینار و با استفاده از مواد و وسایل استریل انجام شد. برای جدا کردن سلول‌ها پس از استریل کردن هود، نمونه چندین بار با محلول PBS شستشو داده شد و با کمک تیغ اسکارپل و قیچی، چربی‌های زیر درم جدا شده و سپس نمونه‌ی مورد نظر، به قطعات خیلی ریز تقسیم گشت. این قطعات، در فالكون حاوی دیسپاز به مدت ۱۸ ساعت در یخچال نگه‌داری گردید. دیسپاز، باعث جدا شدن درم از اپیدرم می شود. سپس با محیط کشت RPMI حاوی سرم، آنزیم موجود در نمونه‌ی مورد نظر خنثی شده و با استفاده از تیغ اسکارپل و پنس طی چند مرحله اپیدرم (که شامل سلول‌های کراتینوسیت و ملانوسیت است)، از درم (که شامل سلول‌های فیرو بلاست است) جدا گردید. پس از این مرحله، درم به قطعات کوچک تر تقسیم شده و به آن کلاژناز I

اضافه شد و در فلاسک‌های کشت ۵۰ میلی‌لیتری کشت داده شد. آنگاه به مدت ۱۰ دقیقه در انکوباتور با دمای ۳۷ درجه‌ی سانتی‌گراد، دی‌اکسید کربن ۵٪ و رطوبت ۹۵٪ انکوبه شد. بعد از آن برای اینکه سلول‌ها کاملاً از هم جدا شوند، پیپتاژ کرده، سپس مجدداً با محیط کشت کامل خنثی‌سازی شد (برای خنثی‌سازی آنزیم، باید دو برابر آنزیم محیط کشت کامل اضافه شود) و بعد از فیلتر مش‌های ۷۰ میکرومتر عبور داده شد و درون یک فالكون ۵۰ میلی‌لیتری ریخته و با سرعت ۱۵۰۰ rpm به مدت ۵ دقیقه سانتریفیوژ شد. بعد از سانتریفیوژ، سلول‌های فیروبلاست در ته فالكون ته‌نشین شدند. مایع رویی را دور ریخته و پلیت سلولی که ۱ ml محیط کشت RPMI به آن اضافه شده، پیپتاژ نموده تا سلول‌های به‌هم‌چسبیده کاملاً از هم جدا شوند. سپس سلول‌ها را به فلاسک منتقل کرده و محیط کشت کامل به فلاسک حاوی سلول‌های فیروبلاست اضافه شد و در انکوباتور با دمای ۳۷ درجه‌ی سانتی‌گراد و دی‌اکسید کربن ۵٪ و رطوبت ۹۵٪ قرار داده شدند. پس از آن، سلول‌های کشت داده‌شده، هر سه روز یک بار تغذیه شدند. هنگامی که تراکم سلول‌های چسبیده به کف فلاسک به ۷۰ تا ۸۰ درصد رسید، پاساژ سلول‌ها با استفاده از محلول ۰.۲۵٪ Trypsin-EDTA انجام شد.

میزان حیات سلول‌ها، توسط تست MTT تعیین گردید. این روش، بر فعالیت آنزیم سوکسینات دهیدروژناز در میتو‌کندری سلول‌های زنده استوار است که محلول زردرنگ MTT را به کریستال‌های نامحلول فورمازان بنفش‌رنگ تبدیل می‌کند که می‌توان پس از حل کردن در DMSO با دستگاه الیزا ریدر سنجش نمود. برای این منظور، فلاسک T75 حاوی نمونه‌ی سلولی فیروبلاست را از انکوباتور خارج کرده و محیط رویی دور ریخته شد، سپس ۲ ml تریپسین اضافه کرده و به مدت ۳-۵ دقیقه در انکوباتور قرار داده شد تا سلول‌ها کاملاً از کف فلاسک جدا شوند. در ادامه، ۴ ml محیط کشت کامل اضافه شد تا آنزیم خنثی شود و پس از پیپتاژ نمونه به فالكون ۱۵ ml انتقال داده شده و به مدت ۵ دقیقه با سرعت ۱۵۰۰ rpm سانتریفیوژ شد. سپس مایع رویی خارج و پلیت سلولی با ۱ ml محیط کشت بدون سرم که به آن اضافه شد، پیپتاژ گشته تا سلول‌های به‌هم‌چسبیده، کاملاً از هم جدا شده و محلول یکنواختی ایجاد شود. در نهایت با تریپان بلو، سلول‌ها را شمارش کرده و ۱۰۰ μ l از نمونه‌ی سلولی همراه با محیط کشت در چاهک‌های پلیت ۹۶ خانه ریخته و یک روز در انکوباتور دارای شرایط ۳۷ درجه‌ی سانتی‌گراد، ۵٪ دی‌اکسید کربن و رطوبت ۹۵٪ نگه‌داری شد. پس از اتصال سلول‌ها به کف چاهک‌ها، محیط کشت رویی خارج شده و به آن DMSO به مقدار ۱۰۰ μ l افزوده شد. DMSO، سبب حل کردن کریستال‌های ارغوانی رنگ فورمازان می‌شود. برای اطمینان از حل شدن کریستال‌ها، پلیت در زیر میکروسکوپ نوری چک شد. بعد از شیک کامل پلیت، جذب نوری در طول موج ۵۷۰ nm با دستگاه الیزا ریدر (Bio Tek ELX 800) مورد سنجش قرار گرفت. اثر نسبت وزنی CNT روی زنده‌مانی سلول‌ها، به‌صورت سه تکرار مورد ارزیابی قرار گرفت و با کنترل مقایسه شد.

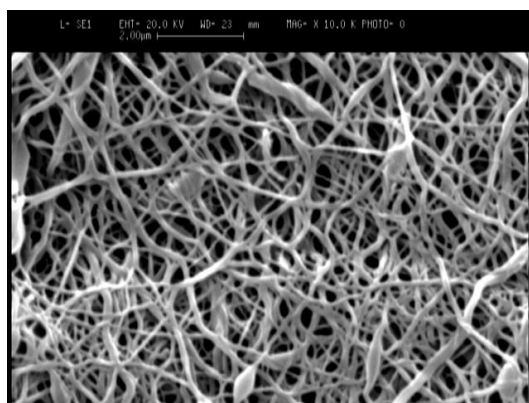
یافته‌ها

شکل ۱، تصویر SEM نمونه‌ی PVA/Cs را پس از ایجاد پیوندهای عرضی نشان می‌دهد. همان‌طور که مشاهده می‌شود، ساختار فیبری و متخلخل داربست‌ها پس از اتصال عرضی نیز حفظ شده است؛ با این تفاوت که در بعضی نقاط الیاف به هم پیوسته‌اند که می‌تواند به دلیل تورم شبکه در اثر تولید آب ناشی از پیوند عرضی باشد.



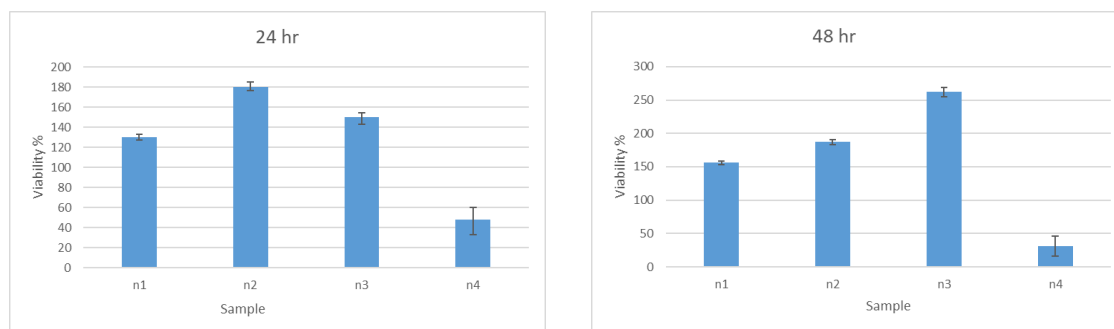
شکل ۱. تصویر SEM الیاف PVA/Cs الکتروریسی شده پس از ایجاد پیوند عرضی

شکل ۲، مورفولوژی الیاف الکتروریسی شده‌ی نمونه‌ی PVA/Cs/CNT با نسبت ۱٪ وزنی CNT پس از ایجاد پیوند عرضی را نشان می‌دهد. همان‌طور که دیده می‌شود، الیاف در این نمونه نیز متورم شده و در هم فرو رفته‌اند. در مقایسه با الیاف پیوند عرضی شده‌ی PVA/Cs، این الیاف از یکنواختی کمتری برخوردار هستند و در لابه‌لای آن‌ها مهره‌هایی دیده می‌شود که می‌تواند به دلیل تورم ناشی از انقباض و یا آگلومره‌های نانولوله‌های پوشیده‌شده با پلیمر باشند. لازم به ذکر است که پس از ایجاد اتصال عرضی نمونه‌ها، انقباض زیادی را تجربه می‌کنند و جمع می‌شوند؛ بنابراین، افزایش تعداد بیدها یا آگلومره‌ها نسبت به نمونه‌های اتصال عرضی نشده، امری کاملاً طبیعی است.



شکل ۲. تصویر SEM الیاف PVA/Cs/CNT با نسبت جرمی ۱٪ وزنی CNT پس از ایجاد پیوند عرضی

آزمون MTT، به منظور تعیین میزان زنده‌مانی سلول‌ها و رشد آن‌ها بر روی داربست‌های تولیدشده در ۲۴ ساعت و ۴۸ ساعت پس از کشت سلول‌ها انجام شد. نتایج حاصل از این آزمون، در شکل‌های ۳ الف و ب آورده شده است. همان‌طور که در شکل ۳ دیده می‌شود، در روز اول، رشد و تکثیر سلول‌ها بر نمونه‌ی شماره‌ی ۴، از سه نمونه‌ی دیگر بیشتر بوده است. نتایج حاصل از آزمایش در روز دوم و سوم نیز همین مسئله را نشان می‌دهند. همچنین از مقایسه‌ی این سه نمودار، می‌توان دریافت که در همه‌ی نمونه‌ها رشد و تکثیر سلولی در روزهای اول تا سوم، روند افزایشی داشته است و در روز سوم نسبت به روز اول و دوم، تکثیر شده‌اند.

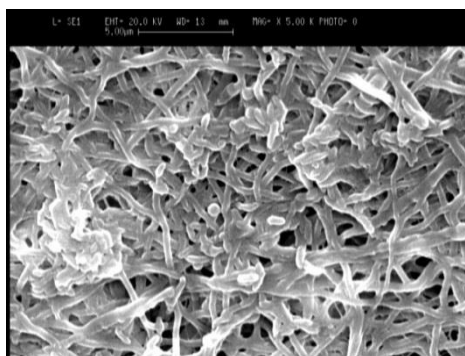


ب

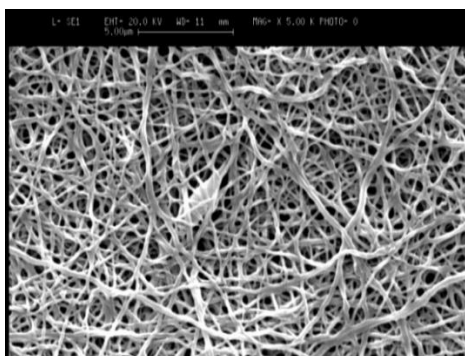
الف

شکل ۳. میزان زنده‌مانی سلول‌ها بر نمونه‌های ۱ تا ۴ (۰٪ تا ۲٪ وزنی CNT) بعد از ۴۸ ساعت (الف) ۲۴ ساعت (ب)

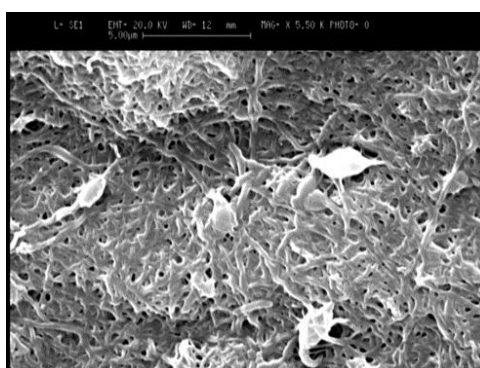
در شکل‌های ۴ تا ۱۵، تصاویر SEM چسبندگی سلول‌ها روی داربست‌ها نشان داده شده است.



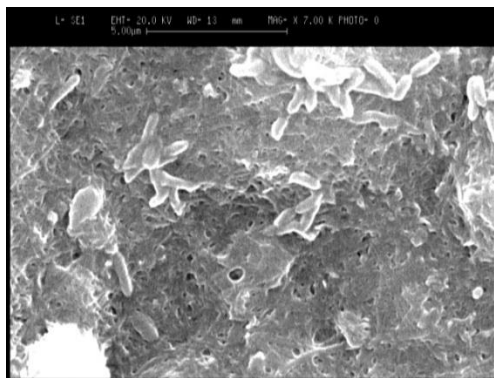
شکل ۴. تصویر SEM چسبندگی سلول‌ها بر نمونه‌ی PVA/Cs پس از ۲۴ ساعت



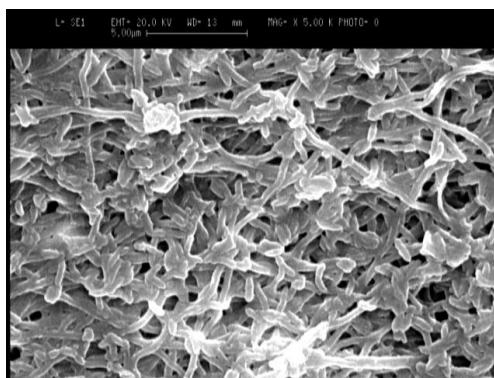
شکل ۵. تصویر SEM چسبندگی سلول‌ها بر نمونه‌ی PVA/Cs/CNT-0.5%wt پس از ۲۴ ساعت



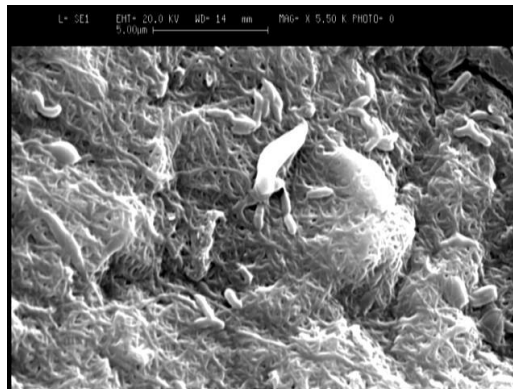
شکل ۶. تصویر SEM چسبندگی سلول‌ها بر نمونه‌ی PVA/Cs/CNT-1%wt پس از ۲۴ ساعت



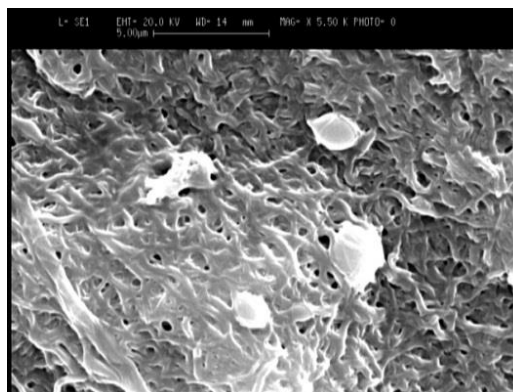
شکل ۷. تصویر SEM چسبندگی سلول‌ها بر نمونه‌ی PVA/Cs/CNT-2%wt پس از ۲۴ ساعت



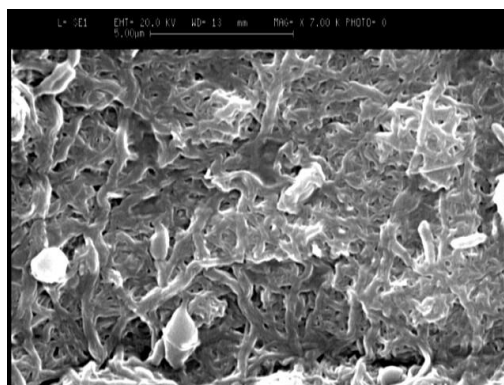
شکل ۸. تصویر SEM چسبندگی سلول‌ها بر نمونه‌ی PVA/Cs پس از ۴۸ ساعت



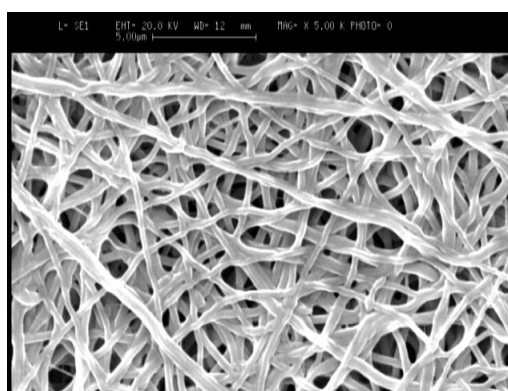
شکل ۹. تصویر SEM چسبندگی سلول‌ها بر نمونه‌ی PVA/Cs/CNT-0.5%wt پس از ۴۸ ساعت



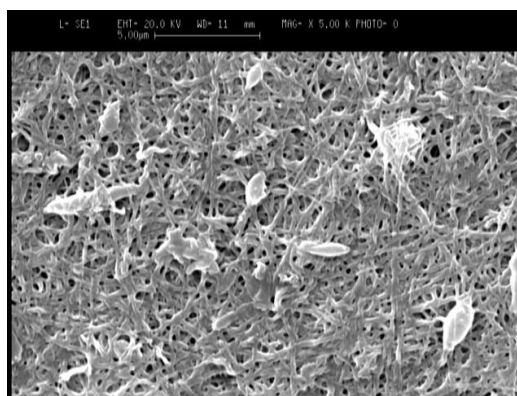
شکل ۱۰. تصویر SEM چسبندگی سلول‌ها بر نمونه‌ی PVA/Cs/CNT-1%wt پس از ۴۸ ساعت



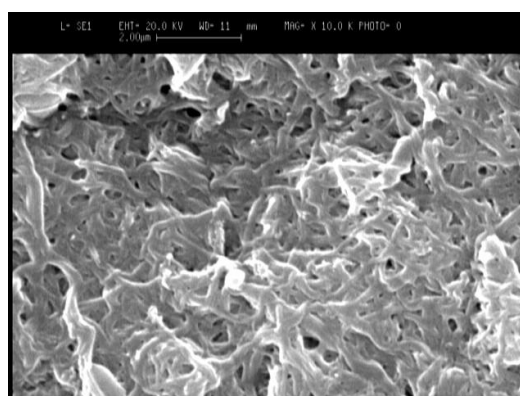
شکل ۱۱. تصویر SEM چسبندگی سلول‌ها بر نمونه‌ی PVA/Cs/CNT-2%wt پس از ۴۸ ساعت



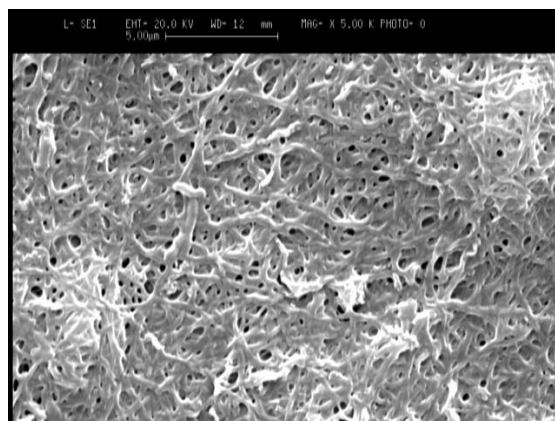
شکل ۱۲. تصویر SEM چسبندگی سلول‌ها بر نمونه‌ی PVA/Cs پس از ۷۲ ساعت



شکل ۱۳. تصویر SEM چسبندگی سلول‌ها بر نمونه‌ی PVA/Cs/CNT-0.5%wt پس از ۷۲ ساعت



شکل ۱۴. تصویر SEM چسبندگی سلول‌ها بر نمونه‌ی PVA/Cs/CNT-1%wt پس از ۷۲ ساعت



شکل ۱۵. تصویر SEM چسبندگی سلول‌ها بر نمونه ی PVA/Cs/CNT-2%wt پس از ۷۲ ساعت

بحث و نتیجه گیری

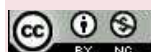
در این پژوهش، در جهت ساخت داربست‌های الکتروریسی شده ی PVA/Cs/CNT با کمترین میزان قطر الیاف، سعی شده است. پس از یافتن نمونه ی بهینه ی PVA/Cs، نانولوله ی کربنی با نسبت‌های جرمی مختلف به آن افزوده شد و خواص داربست حاصل، مورد ارزیابی قرار گرفت. نتیجه ی حاصل، نشان می‌دهد که نسبت وزنی پلیمرها و ولتاژ اعمال‌شده، دو پارامتر بسیار تأثیرگذار بر مورفولوژی الیاف حاصل هستند. افزودن CNT به کامپوزیت، اثری بر روی یکنواختی الیاف نداشت؛ اما موجب ظهور تعدادی پید در الیاف شد. کشت سلولی و تست MTT، مبین تأثیر مثبت نانولوله‌های کربنی بر رشد و تکثیر سلول‌ها بودند و نمونه ی حاوی ۱٪ وزنی CNT، بهترین خواص زیستی را نشان داد. این نتایج، نشان‌دهنده ی غیرسمی بودن داربست‌های تولیدشده برای سلول‌های فیرو بلاست انسانی است؛ بنابراین، گروه‌های سمی آلدئید، در ساختار باقی نمانده‌اند و نانولوله ی کربنی موجود در کامپوزیت هم به دلیل اتصال به پلیمرها و درگیر شدن در کامپوزیت، هیچ‌گونه سمیتی تولید نکرده است. در حقیقت اتصال عرضی PVA و کیتوسان با گلو تار آلدئید، شامل واکنش گروه‌های هیدروکسیل PVA و گروه‌های آمینوی آزاد کیتوسان با گروه آلدئید گلو تار آلدئید است. پس از ایجاد پیوندهای عرضی، نمونه‌ها زرد رنگ می‌شوند که این تغییر رنگ، در اثر ایجاد پیوند $CH=N$ بین گروه‌های آمینوی کیتوسان و آلدئید گلو تار آلدئید است. به علاوه، شبکه، به میزان قابل توجهی انقباض یافته و الیاف در هم فرو می‌رود و در این شرایط، سلول‌ها روی داربست‌ها نه تنها زنده ماندند، بلکه تکثیر هم یافتند؛ و این روند افزایشی، نشان‌دهنده ی تأثیر مثبت داربست بر سلول‌ها است. دلیل دیگر چسبندگی و تکثیر خوب سلول‌ها روی داربست‌ها را می‌توان شباهت ساختار تولیدشده با ماتریکس خارج سلولی دانست. همچنین نانولوله‌های کربنی با گروه عاملی کربوکسیل و کیتوسان، به دلیل ماهیت پلی کاتیونی‌اش، پتانسیل بالایی برای جذب پروتئین‌ها و ماتریکس خارج سلولی دارای بار منفی دارند. علاوه بر آن، CNTها می‌توانند در سطح الیاف ناهمواری ایجاد کنند که آن هم موجب چسبندگی بیشتر سلول‌ها می‌شود. به دلیل نسبت بالای سطح به حجم و تخلخل زیاد، مهاجرت و تکثیر سلولی افزایش یافته و مواد مغذی و همچنین محصولات زائد می‌توانند بین سلول و محیط اطرافشان انتقال یابند. همان‌طور که ملاحظه می‌شود، پس از یک روز کشت سلولی، سلول‌ها بر روی هر چهار نمونه پراکنده شده‌اند؛ اما نمونه ی CNT-1%wt، نشان‌دهنده ی بیشترین میزان جذب سلول‌ها است. پس از پایان دو روز، هر سه نمونه ی دارای نانولوله، چسبندگی بالای سلول‌ها را نشان دادند و اختلاف آن‌ها با نمونه ی PVA/Cs در جذب سلول بیشتر شد. در روز سوم، نمونه‌های ۱٪ و ۲٪ وزنی CNT پیشرفت قابل ملاحظه‌ای از نظر چسبندگی سلول‌ها داشتند. گذشته از مقایسه ی نمونه‌های CNTدار در جذب سلولی، نتیجه ی مسلم، تأثیر مثبت این نانولوله بر زیست سازگاری داربست‌های

ساخته شده است. علت این امر علاوه بر آنچه در بالا آورده شد، می‌تواند افزایش رسانایی الکتریکی داربست در حضور CNT باشد. مطالعات فراوانی در این زمینه صورت گرفته که نشان‌دهنده تأثیر مثبت رسانایی الکتریکی داربست بر تکثیر سلولی هستند (۷). گفته شده که در زمان ایجاد زخم در پوست، در ناحیه‌ی آسیب‌دیده، یک اختلاف پتانسیل ضعیف تولید می‌شود که می‌تواند به انتقال سیگنال‌های الکتریکی که سلول‌ها برای بهبود زخم ردوبدل می‌کنند، کمک کند. یک داربست پوستی با خاصیت رسانایی الکتریکی، می‌تواند این عمل را در سطح پوست تسریع بخشد و به بهبود زخم کمک کند.

منابع

1. Doulabi AH, Mirzadeh H, Imani M, Samadi N. Chitosan/polyethylene glycol fumarate blend film: Physical and antibacterial properties. *Carbohydrate Polymers*. 2013 Jan 30;92(1):48-56.
2. Saito N, Usui Y, Aoki K, Narita N, Shimizu M, Hara K, Ogiwara N, Nakamura K, Ishigaki N, Kato H, Taruta S. Carbon nanotubes: biomaterial applications. *Chemical Society Reviews*. 2009;38(7):1897-903.
3. Wagner HD, Lourie O, Feldman Y, Tenne R. Stress-induced fragmentation of multiwall carbon nanotubes in a polymer matrix. *Applied Physics Letters*. 1998 Jan 12;72(2):188-90.
4. Yannas IV, Burke JF. Design of an artificial skin. I. Basic design principles. *Journal of Biomedical Materials Research*. 1980 Jan;14(1):65-81.
5. Ajayan PM, Zhou OZ. Applications of carbon nanotubes. *Carbon Nanotubes: Synthesis, Structure, Properties, and Applications*. 2001 Mar 9:391-425.
6. Wang SF, Shen L, Zhang WD, Tong YJ. Preparation and mechanical properties of chitosan/carbon nanotubes composites. *Biomacromolecules*. 2005 Nov 14;6(6):3067-72.
7. Gupta P, Sharan S, Roy P, Lahiri D. Aligned carbon nanotube reinforced polymeric scaffolds with electrical cues for neural tissue regeneration. *Carbon*. 2015 Dec 1;95:715-24.
8. Depan D, Misra RD. The interplay between nanostructured carbon-grafted chitosan scaffolds and protein adsorption on the cellular response of osteoblasts: structure–function property relationship. *Acta Biomaterialia*. 2013 Apr 1;9(4):6084-94.
9. Baniasadi H, Mashayekhan S. Fabrication and characterization of conductive chitosan/gelatin-based scaffolds for nerve tissue engineering. *International Journal of Biological Macromolecules*. 2015 Mar 1;74:360-6.

استناد به این مقاله: نیکنام، زینب، زبرجد، سید مجتبی، جانقربان، کمال، و هاشمی، سیده سارا. (۱۴۰۴). ساخت کامپوزیت پلی‌وینیل الکل/کیتوسان/نانولوله‌ی کربنی تولیدشده به روش الکتروریسی جهت استفاده به‌عنوان داربست پوستی. فصلنامه پیشرفت‌های مهندسی در حوزه پزشکی و مواد، (۱۱)، ۱۸-۶.



Journal of Recent Advancements in Material Science and Biomedical Engineering is licensed under a Creative Commons Attribution-NonCommercial 4.0 International License.