

ساخت و بررسی ویژگی‌های داربست اسفنجی دولایه ساخته شده از نانوسلولز برای مهندسی بافت

چکیده

هدف از این مطالعه ساخت داربست دولایه حاوی نانوالیاف سلولز/پلی‌وینیل الکل (CNF/PVA) برای ارزیابی قابلیت استفاده آن در مهندسی بافت پوست بوده است. یک روش پیوسته برای اضافه کردن لایه‌ها با دو غلظت مختلف از پلیمرها توسط روش خشک کردن انجمادی مورد استفاده قرار گرفت. آنالیز FE-SEM نشان داد که داربست‌های بدست آمده تخلخل به هم‌پیوسته و اندازه منافذی دارند که در غلظت کمتر پلیمرها، افزایش می‌یابند. همچنین داربست‌ها براساس جذب آب، ویژگی‌های مکانیکی و آزمون MTT طبقه‌بندی شدند. غلظت کمتر پلیمرها، جذب آب را افزایش و مقاومت مکانیکی را کاهش داد. نتایج MTT نیز نشان داد که این داربست‌های نانوفیبری می‌توانند نیازمندی‌های لازم برای استفاده در مهندسی بافت را داشته باشند.

واژگان کلیدی: داربست دولایه، نانوالیاف سلولز (CNF)، مهندسی بافت پوست، خشک‌کن انجمادی.

رباب غفاری^۱
 مهدی جنوبی^{۲*}
 کاظم دوست‌حسینی^۳
 لیلا محمدی امیرآباد^۴

^۱ دانشجوی دکتری گروه علوم و مهندسی صنایع چوب و کاغذ، دانشکده منابع طبیعی، دانشگاه تهران، کرج، ایران

^۲ دانشیار گروه علوم و مهندسی صنایع چوب و کاغذ، دانشکده منابع طبیعی، دانشگاه تهران، کرج، ایران

^۳ استاد گروه علوم و مهندسی صنایع چوب و کاغذ، دانشکده منابع طبیعی، دانشگاه تهران، کرج، ایران

^۴ دانشگاه مارکویت، دانشکده دندانپزشکی، میلوآکی، آمریکا

مسئول مکاتبات:

mehdi.jonoobi@ut.ac.ir

تاریخ دریافت: ۱۳۹۷/۰۹/۱۷

تاریخ پذیرش: ۱۳۹۸/۰۱/۱۰

مقدمه

مهندسی بافت یک موضوع میان‌رشته‌ای است که اصول مهندسی و علوم زیستی را در راستای توسعه‌ی جایگزین‌های بیولوژیکی برای بازسازی، حفظ یا بهبود عملکرد بافت یا ارگان بدن انسان به کار می‌گیرد [۱]. در مهندسی بافت سلول‌ها غالباً در یک ساختار مصنوعی قرار داده یا کاشته می‌شوند، که این ساختارها قادر به تقلید و حمایت بافت سه بعدی هستند. این ساختار "داربست" نامیده می‌شود که در هر دو شرایط بیرون^۱ و داخل^۲ بدن به کار می‌رود. داربست‌های سه بعدی برای انطباق سلول-

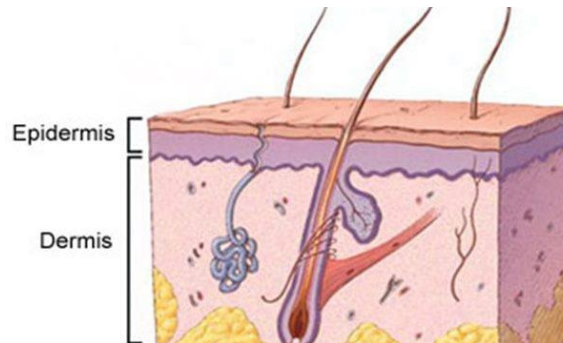
ها، جهت‌دهی رشد سلول و بازسازی بافت‌های سه بعدی با ساختمان و عملکرد مناسب ساخته می‌شوند. همچنین داربست‌ها باید شامل ویژگی‌های زیر باشند: غیر سمی، زیست سازگاری، مقاومت مکانیکی مناسب، نرخ زیست تخریب‌پذیری متناسب با نرخ بازسازی بافت، و محصولات حاصل از زیست تخریب‌پذیری نباید اثرات منفی روی بافت‌ها و ارگان‌های اطراف داشته باشند [۲، ۳]. هر بافت ویژگی‌های بیولوژی، مکانیکی و فیزیکی شامل شکل و اندازه منحصر به فرد دارد. برای بهبود و جهت‌دهی رفتار سلول، داربست باید بتواند این ویژگی‌های منحصر به فرد را القا کند. بنابراین هر داربست براساس ویژگی‌های بافت هدف طراحی می‌شود. پوست بافتی با دولایه معمول درم و

¹ in vitro

² in vivo

کراتینوسایت با ساختار سنگ فرشی و تخلخل کمتر برای تشکیل مانع محافظتی در برابر میکروارگانیسم‌های بیماری‌زای محیطی می‌باشد.

اپیدرم است (شکل ۱). درم مملو از فیبروبلاست لایه ضخیم‌تر پایینی با انعطاف‌پذیری و تخلخل بیشتر است. اپیدرم لایه نازک بالایی پوست است که حاوی



شکل ۱- دو لایه فوقانی (اپیدرم و درم) بافت پوست.

همکاران (۲۰۱۷) داربست‌های دولایه با استفاده از روش الکترورسی ساختند. یک لایه از پلی‌کاپرو لاکتون یا ترکیب پلی‌کاپرو لاکتون/سلولز استات (به ترتیب PCL و PCL/CA) به عنوان حامی مکانیکی، و لایه‌ی دیگر ترکیبی از کیتوسان/پلی‌اتیلن اکساید (CHI/PEO) به عنوان پوشش اولیه‌ی زخم ساخته شد [۱۰].

پلیمرهای طبیعی به علت شباهتشان به ماتریکس سلولی، تطبیق‌پذیری شیمیایی، عملکرد بیولوژی خوب و تعاملات درونی سلولی، یکی از جذابترین گزینه‌ها برای مهندسی بافت هستند. سلولز فراوانترین ترکیب آلی بدست آمده از توده زیستی است. سلولز به علت ماهیت میکروفیبریلی، ویژگی‌های مکانیکی عالی دارد [۱۱] و به همین دلیل عمدتاً به عنوان عامل تقویت کننده در پلیمرها استفاده می‌شود. اخیراً به دلیل افزایش تقاضا برای محصولات زیست سازگار و دوستدار محیط زیست، سلولز در تنوع گسترده‌ای از کاربردها استفاده شده است. سلولز به علت پخش‌شوندگی در آب و تجزیه‌پذیری در طبیعت توسط آنزیم‌های میکروبی یا قارچی، تجزیه‌پذیری محدود در بافت‌های انسان و حیوان [۱۲]، جاذب رطوبت و غیر سمی بودن، یک ماده خام بالقوه در زمینه پزشکی زیستی است. در پوشش زخم‌های مزمن یا بازسازی بافت پوست، سلولز به علت توانایی جذب آب و نگهداری مقدار زیاد آب، یک محیط مرطوب برای بهترین درمان ایجاد می‌کند.

PVA یک پلیمر زیستی نیمه بلوری، حلال در آب، زیست تخریب‌پذیر، غیر سمی، آبدوست و ارزان با مقاومت

در دهه اخیر چندین مطالعه در زمینه ساخت داربست‌ها با انواع مختلف سلول، ویژگی‌های بیولوژی و مکانیکی، ترکیبات [۴، ۵] و میکروساختارها شامل گرادیان مورفولوژی (تخلخل یا اندازه منافذ) پیوسته یا جدا برای بازسازی تنوعی از بافت‌های چندلایه انجام شده است [۶-۸]. این ساختار دولایه‌ای داربست‌ها در مهندسی بافت پوست می‌تواند لایه اپیدرم نازک متراکم روی لایه درم ضخیم پرتراکم را تقلید کند. لایه متراکم چنین داربست-هایی مانع از دست دادن آب شده و از اینرو محیط مناسبی برای انتقال مواد غذایی و فاکتورهای رشد به سلول‌ها را فراهم می‌کنند. همچنین لایه ضخیم‌تر و کم تراکم داربست‌ها، مقلد لایه درم پوست، قادر به جذب ترشحات زخم بوده و خطر عفونت را کاهش می‌دهد.

Hurtado و همکاران (۲۰۱۶) ویژگی‌های سایشی-مکانیکی^۱ بلوک‌های برپایه‌ی PVA را در پیاده‌سازی یک مدل پوست دولایه^۲ (2LSM) ارزیابی کردند. آنها بلوک-هایی از PVA خالص و PVA ترکیب شده با سلولز (PVA Cell-) با استفاده از چرخه‌های انجماد/ذوب ساختند و ویژگی‌های مکانیکی را با استفاده از تحلیل مکانیکی دینامیک (DMA) و آزمون خزش بررسی کردند. در این مطالعه همچنین ویژگی‌های سطح و هیدراتاسیون 2LSM ارزیابی شد و نتایج نشان دهنده‌ی یک گرادیان هیدراتاسیون قابل مقایسه با پوست بود [۹]. Trinca و

¹ Tribo-mechanical properties

² 2-layered skin model

مرحله‌ای) [۱۸] تنها با کنترل غلظت پلیمر با صرف حداقل زمان و انرژی ساخته شده است. توانایی کنترل ترکیب مواد، اندازه منافذ و تخلخل در هر لایه همراه با ساختار یک پارچه لایه از مزایای دیگر این روش است. نتایج طبقه‌بندی و زیست سازگاری این داربست‌ها گزارش می‌شود.

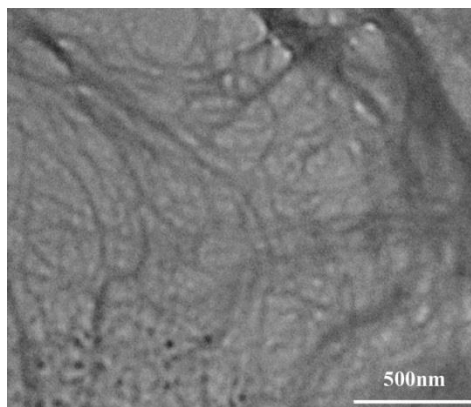
مواد و روش‌ها

مواد

نانوالیاف سلولز استفاده شده در این مطالعه از شرکت نانونوین پلیمر در ایران خریداری شد. پلی‌ونیل الکل (PVA) ($M_v=145,000 \text{ g/mol}$) از شرکت Merck KGaA (Darmstadt, Germany) تهیه گردید. رزین پلی‌آمید ایپی-کلروهیدرین (PAE) با نام تجاری Kymene™ (CAS No.) در این مطالعه استفاده شد. تمام مواد شیمیایی با بالاترین خلوص و برای محلول سازی از آب مقطر استفاده شد. ساختار و اندازه نانوالیاف سلولز با استفاده از میکروسکوپ الکترونی انتقالی (TEM)، Hitachi H-7 100، مطالعه شد. با توجه به تصویر TEM نانوالیاف سلولز جدا شده، نانوالیاف در مقیاس نانو می‌باشند (شکل ۲). قطر الیاف در بازه‌ی ۴۰ تا ۷۰ نانومتر و طول آن‌ها در حدود چندین میکرومتر تخمین زده شد.

مکانیکی خوب است [۱۳، ۱۴]. علاوه بر این PVA ویژگی الاستیک و انعطاف‌پذیر [۱۵] دارد که منجر به کاربرد آن در مهندسی بافت پوست مخصوصاً در لایه درم، می‌شود. همچنین حضور گروه‌های هیدروکسیل زیاد در هردوی PVA و CNF پیوندهای هیدروژنی بین مولکولی و درون مولکولی تشکیل خواهد داد که باعث بهبود ثبات و سازگاری و پخش CNF و PVA می‌شود.

روش‌های زیادی برای آماده سازی داربست‌های متخلخل سه بعدی وجود دارد، شامل: اسفنج شدن گازی، چاپ سه بعدی، جداسازی فاز حرارتی، شستشوی نمک، الکتروریسی و خشک کردن انجمادی. خشک کردن انجمادی به علت کارایی آن برای محلول‌های آبی، معمولاً برای داربست‌های برپایه‌ی مواد زیستی طبیعی استفاده می‌شود. در این روش عواملی مانند کسر حجمی فاز پخش شده، غلظت پلیمر، وزن مولکولی و رشد کریستال‌های یخ طی فرایند بر تخلخل و اندازه منافذ تأثیر می‌گذارد [۱۶]. در این مطالعه ما برای ساخت داربست متخلخل دولایه (دو خلخل مختلف) از نانوالیاف سلولز/پلی ونیل الکل (CNF/PVA) از روش خشک کردن انجمادی استفاده شده است. با توجه به اینکه داربست‌های دولایه عمدتاً برای بازسازی بافت استخوان استفاده می‌شود [۱۷]، هدف مطالعه حاضر شبیه‌سازی دولایه پوست، اپیدرم و درم، با استفاده از داربست دولایه است. برای اولین بار در این تحقیق داربست دولایه را به شیوه کاملاً پیوسته (یک



شکل ۲- تصویر TEM نانوالیاف سلولز.

¹ Gas foaming

² Porogen

ساخت داربست

استوانه فلزی با قطر ۴۰ میلی‌متر ثابت شد. استوانه تا یک سوم ارتفاع آن در نیتروژن مایع قرار داده و سپس مخلوط-های آماده شده داخل لوله تفلونی ریخته شد. با انتقال سرما توسط استوانه فلزی، مخلوط‌ها به تدریج از کف به سطح منجمد می‌شوند. مخلوط‌های یخ زده در خشک کن انجمادی (ALPHA 1-2 LD CHRIST) به مدت ۴۸ ساعت تا رسیدن به یک داربست کاملاً خشک، خشک شدند. همچنین برای تکمیل فرایند پیوند عرضی، داربست‌های بدست آمده به آن خلأ در دمای ۵۰ °C برای ۲۴ ساعت منتقل شدند.

سوسپانسیون‌های آبی از نانوالیاف سلولز (CNF) در دو غلظت مختلف، ۰/۴ w/v% (CNF1) و ۱/۴ w/v% (CNF2) تهیه شد. برای ساختن ترکیبات CNF/PVA، محلول‌های PVA در دو غلظت ۰/۱ w/v% (PVA1) و ۰/۳۵ w/v% (PVA2) به هرکدام از سوسپانسیون‌های CNF1 و CNF2، به ترتیب، اضافه شدند. ترکیبات CNF/PVA (N1 و N2، جدول ۱) در دمای اتاق همزده شده و سپس پیوند دهنده عرضی PAE به مقدار ۲ w/v% (براساس وزن خشک CNF) به آنها اضافه شد. یک لوله تفلونی با قطر ۳۰ میلی‌متر روی سطح عرضی یک

جدول ۱- کدگذاری نمونه‌ها.

گروه	لایه شبیه‌سازی شده	غلظت CNF (wt%)	غلظت PVA (wt%)
N1	درم	۰/۴ (CNF1)	۰/۱ (PVA1)
N2	اپیدرم	۱/۴ (CNF2)	۰/۳۵ (PVA2)

برنامه ImageJ اندازه‌گیری شد. همچنین یک روش جایگزینی مایع می‌تواند برای محاسبه تخلخل باز استفاده شود [۱۹]. برای این منظور اتانول، مایعی که حلال داربست‌ها نیست، در آزمایش‌ها استفاده شد. داربست‌ها در استوانه مدرج حاوی حجم مشخصی (V₁) از اتانول به مدت ۵ دقیقه (تا زمان حذف کامل حباب‌های هوا داخل نمونه) غوطه‌ور شدند. حجم کلی اتانول همراه با داربست به عنوان V₂ در نظر گرفته شد. سپس داربست‌ها به آرامی بیرون آورده شدند و حجم اتانول باقیمانده به عنوان V₃ یادداشت شد. سرانجام تخلخل با فرمول زیر محاسبه شد:

$$\text{Porosity (\%)} = [(V_3 - V_1) / (V_3 - V_2)] \times 100 \quad (2)$$

ویژگی‌های مکانیکی

مقاومت فشاری (معادله ۳)، مدول الاستیک خطی (بانگ) و تغییر طول در ناحیه شکست داربست‌های استوانه‌ای شکل با قطر حدود ۲۷ میلی‌متر و طول ۱۴ میلی‌متر (با تکرار ۳ نمونه) با دستگاه آزمون Sun 2500 (GALDABINI 1890) طبق استاندارد ASTM 685-91 با لودسل ۱ kN و سرعت ۲ میلی‌متر بر دقیقه با فشاری تا ۲۰٪ ارتفاع نمونه‌ها انجام و مطالعه شدند.

طبقه‌بندی داربست

دانسیتته و جذب آب

دانسیتته از تقسیم وزن به حجم داربست‌های استوانه‌ای شکل بدست آمد. آزمون جذب آب برپایه تفاوت بین وزن مرطوب و خشک داربست‌ها اندازه‌گیری شد (معادله ۱).

$$\text{Water uptake (\%)} = [(W_1 - W_0) / W_0] \times 100 \quad (1)$$

طوری که W₀ وزن خشک و W₁ وزن داربست‌ها بعد از غوطه‌وری در آب مقطر بعد از دوساعت در دمای اتاق است.

ریخت‌شناسی

تصویر مقطع عرضی داربست‌ها با استفاده از یک میکروسکوپ الکترونی نشر میدانی (FE-SEM) با مدل MIRA2 TESCAN در ولتاژ ۱۵ kV مورد بررسی قرار گرفت. نمونه‌های آماده شده توسط چسبهای نواری دوطرفه رسانا روی پلیت‌های مسی ثابت شده و با طلا پوشش داده شدند.

تخلخل و اندازه منافذ

برای اندازه‌ی منافذ، روی تصاویر SEM متوسط اندازه منافذ حداقل برای ۴۰ منفذ در هر نمونه با استفاده از

آنالیز آماری

نتایج با استفاده از برنامه SPSS ver. 16 در قالب طرح کاملاً تصادفی تحلیل شدند. داده‌ها به صورت میانگین \pm انحراف معیار گزارش شده و مقایسه با تحلیل واریانس یک طرفه (one-way ANOVA) همراه با آزمون Tukey در سطح اطمینان ۹۵٪ انجام شد.

نتایج و بحث

ساخت داربست

اسفنج نانوسلولزی دولایه به عنوان داربست برای مهندسی بافت پوست به صورت کاملاً پیوسته با روش خشک کردن انجمادی برای اولین بار ساخته شد. همانطور که قبلاً گفته شد، غلظت پلیمر یکی از عواملی است که روی تخلخل و اندازه منافذ تأثیر می‌گذارد. همچنین روش مذکور، انجماد تدریجی از کف تا سطح، برخلاف روش‌های پیشین زمان و انرژی لازم برای ساخت یک اسفنج با دو یا چند تخلخل مختلف را بسیار کم می‌کند. شکل ۳ عکس-های دیجیتال داربست‌های دولایه CNF/PVA را نشان می‌دهد.

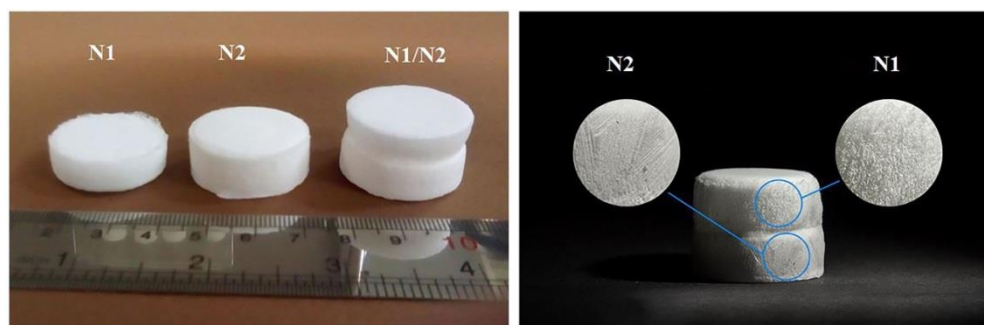
$$K = F/A$$

(۳)

طوری که K مقاومت فشاری، F حداکثر بار (N) و A سطح مقطع عرضی نمونه (mm^2) می‌باشد.

زیست‌سازگاری

قابلیت زیستی سلول‌های فیبروبلاست روی داربست‌های ساخته شده با استفاده از آزمون MTT مورد بررسی قرار گرفت. به طور خلاصه، ۱۰۰۰ سلول در هر داربست استریل شده (با قطر ۵ میلی-متر و ارتفاع ۳ میلی-متر) کاشته شد. گروه سلولی کاشته شده روی هر خانه از پلیت ۹۶ خانه به عنوان گروه کنترل در نظر گرفته شد. بعد از ۱ و ۳ روز سلول‌ها با ۱۰۰ میکرولیتر از محلول رنگی MTT (۰/۵ میلی گرم بر میلی لیتر، Sigma-Aldrich, Cat.R8755) انکوبه شدند. پس از ۳ ساعت از انکوبه شدن، محلول رنگی خارج و بلورهای فورمازان در سلول‌ها در ۱۰۰ میکرولیتر DMSO حل شدند. سپس، محلول‌ها با استفاده از دستگاه ELISA (BioTek) در ۵۷۰ نانومتر آنالیز شدند.



شکل ۳- عکس‌های دیجیتال داربست‌های CNF/PVA، N1: لایه با تخلخل بیشتر (شبیه‌سازی شده برای لایه درم)، N2: لایه با تخلخل کمتر (شبیه‌سازی شده برای لایه اپیدرم) و N1/N2: دو لایه با تخلخل مختلف روی هم.

¹ incubated
² Formazan crystals

طبقه‌بندی داربست

دانسیته و جذب آب

دانسیته و جذب آب داربست‌ها برای هر لایه در جدول ۲ خلاصه شده است. افزایش غلظت منجر به افزایش دانسیته شد. جذب آب برای داربست‌ها در مهندسی بافت، نه فقط برای مورفولوژی بلکه برای رشد سلول‌ها، و جابجایی مواد غذایی و مواد زاید بسیار مهم است. داربست‌های ساخته شده از پلیمرهای با غلظت کمتر اندازه منافذ بزرگتری دارند که فضای بیشتری برای جذب آب فراهم می‌کنند (جدول ۲). جذب آب بیشتر داربست‌های با ترکیب CNF/PVA می‌تواند به دلیل پیوند هیدروژنی قوی و وان دروالس بین زنجیره‌های پلیمر و مولکول‌های آب باشد [۲۰]. این پیوندهای قوی ظرفیت بیشتری برای جذب آب و واکنشیدگی پلیمرها در آب را بدون هیچ‌گونه انحلال یا از هم پاشیدگی ایجاد می‌کنند. لایه‌ی پایینتر داربست در تماس مستقیم با زخم پوست است، بنابراین ظرفیت بیشتر جذب در این لایه می‌تواند عملکرد مایع بدن و انتقال مواد غذایی به سلول‌ها و جذب مواد زاید در محل زخم را بهبود دهد.

ریخت‌شناسی

داربست‌های متخلخل CNF/PVA با روش خشک کردن انجمادی ساخته شدند. مشاهده این داربست‌ها با

میکروسکوپ الکترونی نشر میدانی (FE-SEM)، تخلخل با ساختار اتصال درونی خوب با منافذ باز را نشان داد (شکل ۴). غلظت زیاد پلیمرها منجر به یک لایه متراکم (N2) شد که تخلخل و اندازه منافذ آن کمتر از لایه N1 است ($p < 0.05$).

تخلخل و اندازه منافذ

در ساخت داربست‌ها تخلخل یکی از مهمترین ویژگی‌هاست. زیرا دو پارامتر مهم نفوذ سلول در داربست و تکثیر آن وابسته به تخلخل داربست‌ها هستند. غلظت کمتر منجر به تخلخل بیشتر در لایه N1 (۹۵٪/۳۲) شد (جدول ۲)، که می‌تواند مشابه لایه درم عمل کند. غلظت بیشتر پلیمرها در لایه بالایی داربست (لایه N2) با دانسیته بیشتر منجر به تخلخل و اندازه منافذ کمتر شده و می‌تواند مشابه لایه اپیدرم پوست عمل کند. تخلخل و اندازه منافذ لایه N2 به ترتیب ۸۸٪/۵۳ و ۳٪/۶ ± ۱۹/۷۲ میکرومتر است (شکل ۴). این لایه با منافذ کوچکتر با جلوگیری از از دست دادن آب در لایه‌های پایینتر می‌تواند محیط مرطوب مناسبی برای سلول‌ها ایجاد کند. علاوه بر این کراتینوسایت‌ها، سلول‌های اصلی این لایه، در لایه N2 باقی مانده و ساختار سنگ‌فرشی به عنوان یک مانع فیزیکی در برابر نفوذ میکروارگانیسم‌ها به محل زخم را ایجاد می‌کنند.

جدول ۲- ویژگی‌های فیزیکی داربست‌های CNF/PVA.

گروه	دانسیته (gr.cm^{-3})	جذب آب (%)	تخلخل (%)
N1	۰/۰۰۶	۵۲۳۷	۹۵/۳۲
N2	۰/۰۱۸	۴۱۰۸	۸۸/۵۳

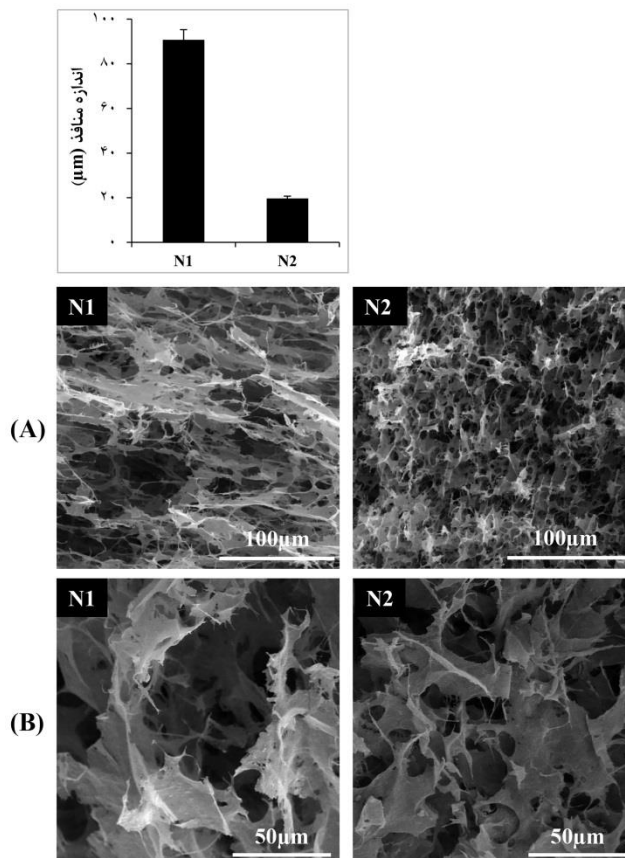
ویژگی‌های مکانیکی

ویژگی‌های مکانیکی داربست‌های ساخته شده برای شبیه‌سازی دو لایه‌ی بافت پوست باید با لایه‌های همسان پوست هماهنگ بوده و همچنین قادر به حفظ تمامیت داربست و حفاظت از سلول‌های کاشته شده در برابر هرگونه آسیبی باشد. مقاومت فشاری به شدت تحت تأثیر غلظت مواد است. داربست‌های ساخته شده با غلظت بیشتر پلیمر (لایه N2) دانسیته بیشتری داشته و منجر به مقاومت فشاری بیشتر (40 ± 220 kPa) نسبت به لایه N1

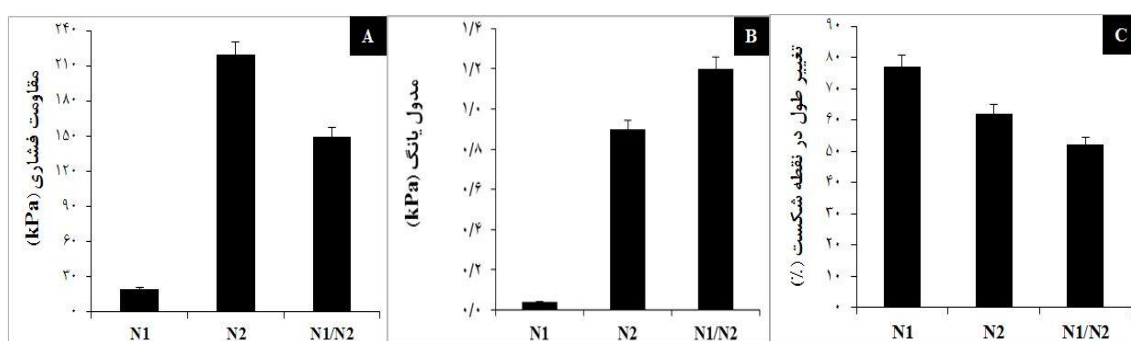
(6 ± 20 kPa) می‌شود ($p < 0.05$) (شکل ۵A). مقدار این مقاومت در داربست N1/N2 (10 ± 150 kPa) نتیجه اثر همزمان دولایه N1 و N2 است. یک ساختار با تخلخل خیلی زیاد (بیشتر از ۹۵٪) در زمان عملکرد دچار افت فشار می‌شود. یکی از عواملی که روی ویژگی‌های حرارتی-مکانیکی اسفنج‌ها اثر می‌گذارد تخلخل است، طوری که با افزایش تخلخل این ویژگی‌ها کاهش می‌یابند [۲۱]. شکل ۵B مدول یانگ در لایه N2 را نشان می‌دهد که خیلی بیشتر از این ویژگی در لایه N1 بود، به ترتیب 0.4 ± 0 و

با 0.09 ± 0.05 (p < ۰/۰۵). داربست با تخلخل و اندازه منافذ بیشتر (N1) ظرفیت بیشتری برای تغییر شکل ابعاد یکسان نمونه ($62 \pm 2/3$) دارد (شکل ۵C).

نسبت به لایه دیگر (N2) با تخلخل کمتر و با ابعاد یکسان نمونه ($62 \pm 2/3$) دارد (شکل ۵C).



شکل ۴- نمودار اندازه منافذ و تصاویر FE-SEM لایه‌های N1 و N2 داربست‌های CNF/PVA با دقت ۱۰۰ (A) و ۵۰ (B) میکرومتر.

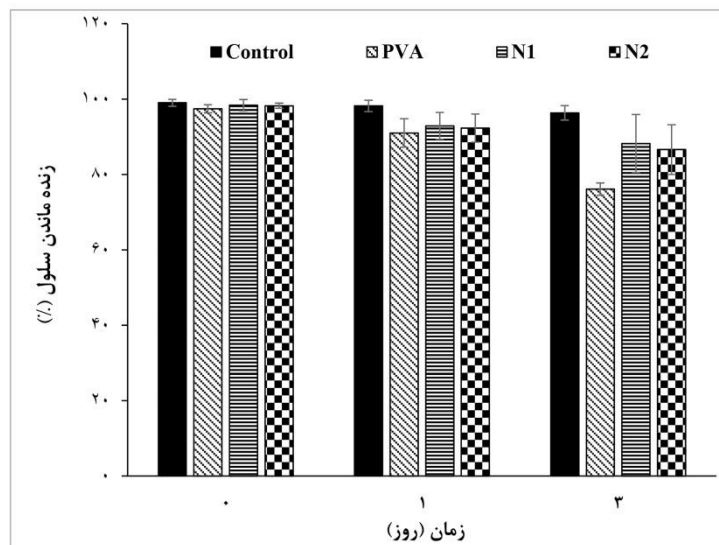


شکل ۵- ویژگی‌های مکانیکی داربست‌های CNF/PVA. (A) مقاومت فشاری، (B) مدول یانگ و (C) تغییر طول در نقطه شکست.

داری در قابلیت زیستی سلول با گروه شاهد بعد از ۱ و ۳ روز کشت وجود ندارد (شکل ۶). این نتایج مطابق با مطالعات قبلی در مورد زیست سازگاری داربست‌های برپایه‌ی CNF و PVA است [۲۲، ۲۳].

زیست سازگاری

زیست‌سازگاری داربست‌های CNF/PVA با روش MTT با فیبروبلاست کشت شده روی هردولایه‌ی داربست‌ها و همچنین روی پلیت ۹۶ خانه به عنوان گروه شاهد اندازه‌گیری شد. نتایج نشان داد هیچ تفاوت معنی-



شکل ۶- نتایج MTT فیبروبلاست‌های کاشته شده روی پلیت رشد بافت (گروه شاهد)، PVA و داربست‌های CNF/PVA (N1 و N2) بعد از ۱ و ۳ روز.

بستگی قوی بین اندازه‌ی منافذ با مقاومت فشاری نشان داد، به همین شکل مدول یانگ که برای داربست‌ها با قطر منافذ بزرگتر، عدد بزرگتری داشت. در داربست‌ها پیوند عرضی توسط پیوند دهنده عرضی PAE به خوبی و با حفظ ویژگی‌های بیولوژی مطلوب برقرار شده بود، طوری که آن‌ها شکل خود را بدون هیچ گونه تخریبی در آب حفظ کردند. طبقه بندی‌های داربست همراه با پاسخ بیولوژی بدست آمده از آزمون MTT می‌تواند پتانسیل روش و مواد مورد استفاده در این مطالعه را برای کاربرد در مهندسی بافت پوست تایید کند.

سپاسگزاری

نویسندگان این مقاله از دانشگاه تهران و ستاد فناوری نانو ایران برای حمایت مالی این پروژه قدردانی می‌کنند.

نتیجه‌گیری

روش خشک کردن انجمادی استفاده شده در این مطالعه، یک داربست مهندسی بافت جدید و کاملا یکپارچه برای بازسازی بافت پوست تنها از طریق کنترل غلظت پلیمرها تولید کرد. داربست CNF/PVA ساخته شده دولایه بالای پوست (اپیدرم و درم) را با دو تخلخل مختلف، به ترتیب ۸۸/۵۳ و ۹۵/۳۲٪ را تقلید کرده و تخلخل بسیار به هم پیوسته آن را تصاویر SEM تایید می‌کنند. همچنین مطالعه مورفولوژی داربست دولایه را با دو اندازه منافذ مختلف برای اپیدرم و درم، به ترتیب ۱۹/۷۲ و ۹۰/۷۱ میکرومتر، طبقه‌بندی می‌کند. نتایج جذب آب در تطابق با تخلخل و اندازه منافذ بودند. داربست‌های ساخته شده از غلظت کمتر پلیمرها، جذب آب بیشتری نسبت به داربست‌های ساخته شده با غلظت بیشتر آن‌ها داشتند. رفتار مکانیکی داربست‌ها یک هم-

منابع

- [1] Langer, R., and Vacanti, J.P., 1993. Tissue engineering. Science, 260:920-926.
- [2] Shi, G.X., Cai, Q., Wang, C.Y., Lu, N., Wang, S.G. and Bei, J.Z., 2002. Fabrication of cell scaffold of poly(L-lactic acid) and poly(L-lactic-co-glycolic acid) and biocompatibility. Polymers for Advanced Technologies, 13:227-232.
- [3] Yang, J., Wang, Y.Q., Tu, C.F., Cai, Q., Bei, J.Z. and Wang, S.G., 2003. Enhancing the cell affinity of macroporous poly (L-lactide) cell scaffold by a convenient surface modification method. Polymer International, 5:1892-1899.

- [4] Scaffaro, R., Lopresti, F., Botta, L., Rigogliuso, S. and Ghersi, G., 2016. Preparation of three-layered porous PLA/PEG scaffold: relationship between morphology, mechanical behavior and cell permeability. *Journal of the Mechanical Behavior of Biomedical Materials*, 54:8-20.
- [5] Gillette, B.M., Rossen, N.S., Das, N., Leong, D., Wang, M., Dugar, A. and Sia, S.K., 2011. Engineering extracellular matrix structure in 3D multiphase tissues. *Biomaterials*, 32:8067-8076.
- [6] Kim, Y.B. and Kim, G., 2012. [Functionally graded PCL/ \$\beta\$ -TCP biocomposites in a multilayered structure for bone tissue regeneration](#). *Applied Physics A*, 108:949-959.
- [7] Bai, H., Wang, D., Delattre, B., Gao, W., De Coninck, J., Li, S. and Tomsia, A.P., 2015. Biomimetic gradient scaffold from ice- templating for self-seeding of cells with capillary effect. *Acta Biomaterial*, 20:13-119.
- [8] Algul, D., Sipahi, H., Aydin, A., Kelleci, F., Ozdatli, S. and Yener, F.G., 2015. Biocompatibility of biomimetic multilayered alginate– chitosan/ β -TCP scaffold for osteochondral tissue. *International Journal of Biological Macromolecules*, 79:363-369.
- [9] Hurtado, M.M., de Vries, E.G., Zeng, X. and van der Heide, E., 2016. A tribo-mechanical analysis of PVA-based building-blocks for implementation in a 2-layered skin model. *Journal of the mechanical behavior of biomedical materials*, 62: 319-332.
- [10] Trinca, R.B., Westin, C.B., Da Silva, J.A.F. and Moraes, Â.M., 2017. Electrospun multilayer chitosan scaffolds as potential wound dressings for skin lesions. *European Polymer Journal*, 88:161-170.
- [11] Sehaqui, H., Morimune, S., Nishino, T. and Berglund, L.A., 2012. Stretchable and strong cellulose nanopaper structures based on polymer-coated nanofiber networks: an alternative to nonwoven porous membranes from electrospinning. *Biomacromolecules*, 13:3661-3667.
- [12] Miyamoto, T., Takahashi, S.I., Ito, H., Inagaki, H. and Noishiki, Y., 1989. Tissue biocompatibility of cellulose and its derivatives. *Biomedical Materials Research*, 23:125-133.
- [13] Kanimozhi, K., Basha, S.K. and Kumari, V.S., 2016. Processing and characterization of chitosan/PVA and methylcellulose porous scaffolds for tissue engineering. *Materials Science and Engineering*, 61:484-491.
- [14] Zarekhalili, Z., Bahrami, S.H., Ranjbar-Mohammadi, M. and Milan, P.B., 2017. Fabrication and characterization of PVA/Gum tragacanth/PCL hybrid nanofibrous scaffolds for skin substitutes. *International Journal of Biological Macromolecules*, 94:679-690.
- [15] Karimi, A., Navidbakhsh, M. and Beigzadeh, B., 2014. A visco-hyperelastic constitutive approach for modeling polyvinyl alcohol sponge. *Tissue and Cell*, 46:97-102.
- [16] Chen, G., Ushida, T. and Tateishi, T., 2002. Scaffold design for tissue engineering. *Macromolecular Bioscience*, 2:67-77.
- [17] Ibrahim, N.S., Krishnamurthy, G., Raghavendran, H.R.B., Puvaneswary, S., Min, N.W. and Kamarul, T., 2013. Novel HA-PVA/NOCC bilayered scaffold for osteochondral tissue-engineering applications– Fabrication, characterization, in vitro and in vivo biocompatibility study. *Materials Letters*, 113:25-29.
- [18] Levingstone, T.J., Matsiko, A., Dickson, G.R., O'Brien, F.J. and Gleeson, J.P., 2014. A biomimetic multi-layered collagen-based scaffold for osteochondral repair. *Acta Biomaterialia*, 10:1996-2004.
- [19] Nazarov, R., Jin, H.J. and Kaplan, D.L., 2004. Porous 3-D scaffolds from regenerated silk fibroin. *Biomacromolecules*, 5:718-726.
- [20] van der Linden, H.J., Herber, S., Olthuis, W. and Bergveld, P., 2003. Stimulus-sensitive hydrogels and their applications in chemical (micro) analysis. *Analyst*, 128:325-331.
- [21] Mane, S., 2016. Effect of porogens (type and amount) on polymer porosity: a review. *Canadian Chemical Transaction*, 4:210-225.
- [22] Tang, C.M., Tian, Y.H. and Hsu, S.H., 2015. Poly (vinyl alcohol) nanocomposites reinforced with bamboo charcoal nanoparticles: Mineralization behavior and characterization. *Materials*, 8:4895-4911.
- [23] Mou, K., Li, J., Wang, Y., Cha, R. and Jiang, X., 2017. 2, 3-Dialdehyde nanofibrillated cellulose as a potential material for the treatment of MRSA infection. *Journal of Materials Chemistry*, 5:7876-7884.

Fabrication of bilayer nanocellulosic aerogel scaffold and evaluation of its properties intended for tissue engineering

Abstract

This study aimed to fabricate the bilayer scaffold containing nanocellulose/poly (vinyl) alcohol (CNF/PVA) and evaluating its potential use as a mimic for skin tissue engineering. A continuous process of layer addition with two different concentrations of polymers by freeze-drying technique was used. FE-SEM analysis indicated that the obtained scaffolds had interconnected porosity and pore size, which increased in lower concentration of polymers. The scaffolds were also characterized by water uptake, mechanical properties and MTT assay. Lower concentration of polymers increased water uptake and decreased mechanical strength. The MTT assay results showed that these nanofibrous scaffolds meet the requirement as a material for tissue engineering.

Keywords: bilayer scaffold, cellulose nanofiber (CNF), skin tissue engineering, freeze-drying.

R. Ghafari¹
M. Jonoobi^{2*}
K. Doosthoseini³
L. Mohammadi Amirabad⁴

¹ Ph.D. Student, Department of wood and paper science and technology, Faculty of natural resources, University of Tehran, Karaj, Iran

² Associate Prof., Department of wood and paper science and technology, Faculty of natural resources, University of Tehran, Karaj, Iran

³ Professor, Department of wood and paper science and technology, Faculty of natural resources, University of Tehran, Karaj, Iran

⁴ Marquette University, School of Dentistry, Milwaukee, WI, USA

Corresponding author:
mehdi.jonoobi@ut.ac.ir

Received: 2018/12/08
Accepted: 2019/03/30