یازدهمین کنگره ملی سراسری
فناوریهای نوین در حوزه توسعه پایدار ایران
11th National Congress of
the New Technologies in Sustainable Development of Iran
senaconf.ir

بررسی خواص و روش های ساخت داربست های چندلایه به منظوراستفاده در مهندسی بافت

مریم کیانی خراجی [۱]، حمید حیدرزاده درزی [۲]

[۱] دانشگاه حکیم سبزواری، دانشکده نفت و پتروشیمی، سبزوار، maryam.kiani750@gmail.com
[۲] دانشگاه حکیم سبزواری، دانشکده نفت و پتروشیمی، سبزوار، h.heydarzadeh@hsu.ac.ir

چکیده

هدف اصلی مهندسی بافت و پزشکی بازساختی، حفظ ویا بهبود بافت آسیب دیده وعملکرد اندام است. برای این منظور داربستی از زیست مواد با خواص مشخص ساخته می شود که می تواند جایگزین داربست طبیعی بدن گردد. به طور کلی داربست هایی که در مهندسی بافت به کار می روند باید دارای خصوصیاتی از جمله خواص مکانیکی مناسب برای الگوبرداری از شرایط محیط بدن، سازگاری زیستی مناسب با بافت مورد نظر، قابلیت پیام دهی مناسب برای هدایت رشد بافت و جلوگیری از رد پیوند باشند. همچنین برای تغذیه رسانی مناسب سلول، دفع ضایعات سلولی به خارج داربست و تشکیل مناسب ماتریس خارج سلولی جدید باید شبکه متخلخل به هم پیوسته با درصد تخلخل مطلوب داشته باشند. طراحی داربست، ترکیبات مواد و عملکرد آنها از زمینه های مهم تحقیق در مورد داربست های مهندسی بافت هستند. در داربست هایی با ساختمان ساده تنها یک یا چند ماده به صورت تک لایه وجود دارد ولی در داربست های پیچیده از چند ماده در لایه های متعدد استفاده می شود. داربست های چند لایه از قرار گرفتن لایه های متوالی روی هم تشکیل می شوند و کاربردهای متنوعی برای مهندسی بافت دارند. داربست های چند لایه امکان بهره مندی از لایه های مختلف با خواص متفاوت را می دهند. در این تحقیق روش های ساخت داربست های چند لایه از مواد مختلف و همچنین خواص فیزیکی، مکانیکی و زیستی آنها برای کاربرد در مهندسی بافت مورد بررسی قرار گرفته است.

واژه‌های کلیدی

داربست های چند لایه، مهندسی بافت، خواص فیزیکی و مکانیکی، خواص زیستی

۱. مقدمه

یکی ازمسائل اصلی مهندسی بافت تهیه یک داربست مناسب است. داربست های طراحی شده باید زیست سازگار و زیست تخریب پذیر بوده و با پشتیبانی از چسبندگی و تکثیر سلول، قادر به تولید یک ماتریس خارج سلولی (ECM) باشند. داربست ها همچنین باید دارای تخلخل مناسب جهت انتقال مورد نظر از مواد مغذی و پسماند سلولی را داشته باشند تا حمل ونقل مواد مغذی را افزایش دهند. همچنین جهت سازگاری بهتر با بافت میزبان باید خواص مکانیکی آنها مشابه بافت محل مورد نظر باشد. برای برآورده کردن این الزامات، که یک سطح و یک ساختار متخلخل سه بعدی بهم پیوسته می باشد ضروری است. پلیمرهای طبیعی به دلیل برهمکنش بهتر با انواع مختلف سلول و عدم سمیت آنها، مواد مناسبی برای تولید داربست محسوب می شوند. با این حال، پلیمرهای مصنوعی عموما ارزان‌تر هستند و با عامل دار شدن شیمیایی اجازه می‌دهند تا علیرغم پاسخ ایمنی به چسبندگی سلول کمک کنند. پلیمرهای مصنوعی متداول مورد استفاده برای سنتز داربست عبارتند از: پلی ال-لاکتیک اسید (PLLA) ، پلی گلیکولیک اسید (PGA) ، پلی کاپرولاکتان (PCL) و پلی لاکتیک-کو-گلیکولیک اسید (PLGA). کامپوزیت ها با پلیمرهای طبیعی نیز با آب دوستی، اتصال سلولی و زیست تخریب پذیری بهتر در دسترس هستند. از پلیمرهای طبیعی متداول مورد استفاده میتوان به کیتوزان، آلژینات، کلاژن، ژلاتین، فیبروئین ابریشم و گلیکوزامینوگلیکان (GAGs) و غیره اشاره نمود [۱].

۲. روش های ساخت داربست

داربست های چند لایه از قرار گرفتن لایه های متوالی روی هم تشکیل می شوند و کاربردهای متنوعی برای مهندسی بافت دارند. از مزیت های مهم داربست های چند لایه می توان به چسبندگی وتکثیر و مهاجرت سلولی بهتر اشاره کرد [۲]. روش های متعدد و متنوعی در ساخت داربست های چند لایه مورد استفاده قرار می گیرد. از جمله تکنیک های متداول، و پرکابرد روش الکتروریسی است که در آن از تکنیک های فناوری نانو در ساخت داربست ها استفاده می شود. تکنیک های دیگر شامل روش حرارتی ناشی ازجداسازی فاز ، فروشویی ذره ای وقالب گیری حلال، خشک کردن انجمادی، الکتروریسی-لیوفیلیزاسیون و امولسیون-الکتروریسی متوالی می باشند [۳]. داربست های چند لایه با مواد و تکنیک مختلف قابل تهیه می باشند که نمونه هایی از آنها در جدول ۱ با ذکر کاربرد گزارش شده است.

جدول ۱. روش تهیه داربست های چند لایه با مواد مختلف وکاربرد آن ها

منبع	مواد	کاربرد	روش ساخت داربست
[۴]	هیدروکسی اپاتیت- پلی کاپرولاکتان	استخوان	الکتروریسی
[۵]	پلی آمید-کلاژن/ ان-استیل سیستئین	زخم پوش	الکتروریسی
[۶]	کلاژن-پلی آمید	زخم پوش	الکتروریسی- لیوفیلیزاسیون
[۷]	کلاژن-هیدروکسی اپاتیت-هیالورونیک اسید	غضروف	خشک کردن انجمادی

۳. خواص مکانیکی، فیزیکی و زیستی داربست های چندلایه

۳,۱. خواص مکانیکی داربست های چند لایه

رافائل وهمکاران داربست دولایه پلی کاپرولاکتان (PCL) -سلولز استات(CA) / کیتوزان (CHI) -پلی اتیلن اکساید (PEO) را با روش الکتروریسی تهیه کردند. خواص مکانیکی داربست های طراحی شده برای درمان زخم های پوستی باید با خود پوست مطابقت داشته باشد. با این حال، معمولا زیست سازگاری مناسب و فعالیت بیولوژیکی نیز از اهمیت بسزایی نسبت به خواص مکانیکی برخوردار هستند. زخم پوش علی رغم داشتن هر دو ویژگی مذکور باید بتواند از دست دادن آب در محل زخم را کنترل کند. استحکام کششی، مدول یانگ، و نفوذ بخار آب برای داربست پلی کاپرولاکتان-سلولز استات-کیتوزان-پلی اتیلن اکساید در جدول ۲ ارائه شده است. بر اساس نتایج خواص مکانیکی داربست های تهیه شده با نیازهای پوست معمولی مطابقت دارد. وجود استات سلولز در لایه‌های پلی کاپرولاکتان-سلولز استات به طور موفقیت‌آمیزی استحکام کششی و مدول یانگ داربست‌ها را افزایش داد[8] .

جدول ۲. استحکام کششی، مدول یانگ، ازدیاد طول در شکست و نرخ نفوذ بخار آب برای پوست انسان و داربست های تولید شده در حالت های هیدراتاسیون مختلف [۸] .

	Tensile strength (MPa)	Young's modulus (GPa)	Elongationat break (%)	Thickness (mm)	WVP (gm^{-2} day^{-1})
Human skin	2–16	6–40	70–77	-	204/260–5400
PCL + CHI/PEO	1.47 ± 0.09	10.2 ± 1.4	>500	0.35 ± 0.04	729 ± 4
PCL/CA + CHI/PEO	1.77 ± 0.14	15.1 ± 1.1	433 ± 58	0.37 ± 0.03	743 ± 13
PCL + CHI/PEO (PBS)	1.51 ± 0.11	7.3 ± 0.2	>500	0.32 ± 0.02	-
PCL/CA + CHI/PEO (PBS)	1.66 ± 0.08	12.7 ± 1.5	>500	0.36 ± 0.01	-

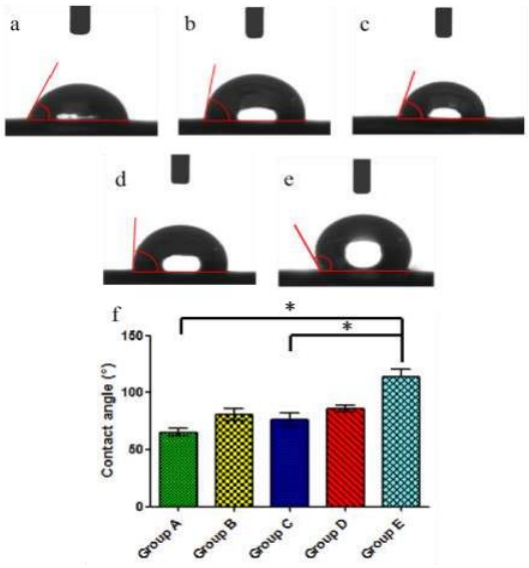
* PBS: محلول فسفات بافر

۳،۲. خواص فیزیکی داربست های چند لایه

۳،۲،۱. ترشوندگی

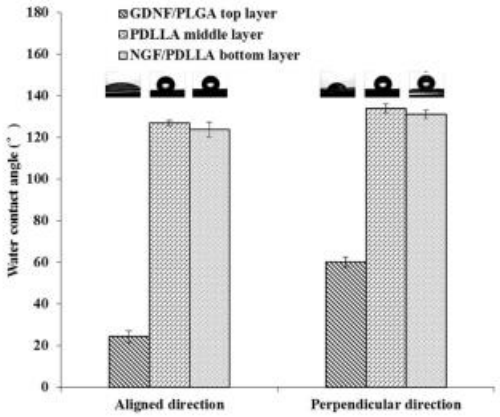
ترشوندگی داربست به عنوان یکی از خصوصیات کلیدی است و نقش مهمی در برهمکنش داربست-سلول و همچنین تخریب پذیری داربست دارد. جایئو چن و همکارانش داربست چند لایه PLGA - پلی وینیل پیرولیدون(PVP) - پلی اتیلن اکسید(PEO) با غلظت های مختلف پلیمر تهیه کرده و خواص مختلف آن را مورد بررسی قرار دادند. محلول ٪۱۵ w/v PLGA به عنوان محلول پایینی و مخلوط ٪۱۲w/v پلی وینیل پیرولیدون و پلی اتیلن اکسید به عنوان لایه سطحی استفاده شد. نسبت جرمی متفاوت از PVP در مقابل PEO در لایه سطحی به ترتیب برابر ۱/۰۸ به ۰/۱۲، ۰/۹۶ به ۰/۲۴ و ۰/۸۴ به ۰/۳۶گرم استفاده شد. بدین ترتیب گروه های متفاوت از داربست بر حسب ترکیبات مورد بررسی قرار گرفتند. ترکیبات گروه های مورد آزمایش عبارتند از: الف) الکتروریسی تک لایه گروه A (نسبت جرمی ۰/۹۶ به ۰/۲۴ از PVP به PEO)، گروه E (PLGA)، ب) الکتروریسی چند لایه PLGA/PVP+PEO گروه B (نسبت ۱/۰۸ به ۰/۱۲ PVP به PEO)، گروه C (نسبت ۰/۹۶ به ۰/۲۴ PVP به PEO) و گروه D (نسبت ۰/۸۴ به ۰/۳۶ PVP به PEO). میزان آبدوستی داربست با لایه های متفاوت مورد بررسی قرار گرفته و نتایج در شکل ۱ نشان داده شده است. بر اساس نتایج زوایای تماس داربست های گروه های A، B، C، D و E به ترتیب برابر °۶۴/۶۷±۴/۵۵، °۸۰/۱۲±۵/۱۰، °۷۵/۰۰±۴/۶۷، °۸۶/۷۱±۳/۴۵ و °۱۱۳/۱۴±۵/۲۷ مشاهده شد. در مقایسه با زوایای تماس در گروهE، زوایای تماس سه گروه از نمونه‌های الکتروریسی چندلایه به طور

قابل‌توجهی کاهش یافت. همچنین داربست چند لایه گروه C کمترین زاویه را نشان داد، که نشان می‌دهد PVP و PEO آب دوستی سطوح نانوالیاف پلی PLGA را بهبود می‌بخشد [۹] .



شکل ۱. a-e زوایای تماس داربست های ساخته شده و f نقشه آماری زوایای تماس داربست ها از هر گروه [۹].

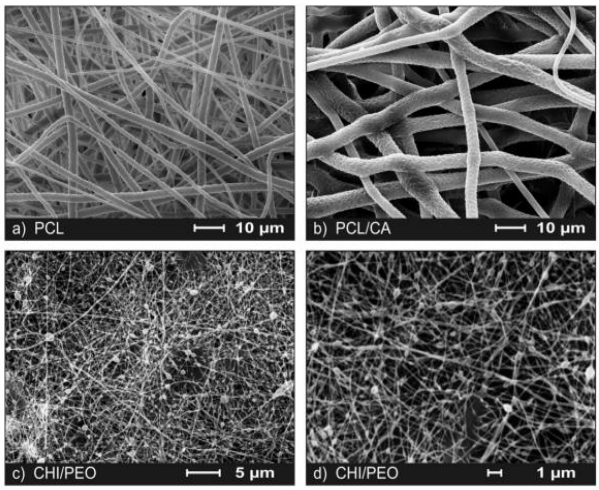
چائوی و همکاران داربست های فیبری چند لایه را با ترکیب الکتروریسی امولسیونی، الکتروریسی متوالی و الکتروریسی با سرعت بالا تهیه کردند. برای ساخت این داربست فاکتور رشد مشتق شده از رده سلولی گلیال (GDNF) و فاکتور رشد عصبی (NGF) در الیاف پلی لاکتیک-کو-گلیکولیک اسید (PLGA) و الیاف پلی L,D- لاکتیک اسید (PDLLA) گنجانده شد. لایه بالایی داربست از GDNF/PLGA، لایه میانی از PDLLA و لایه پایینی از NGF/PDLLA تهیه شد. ترشوندگی داربست توسط آزمون زاویه تماس آب در دو جهت افقی و عمودی اندازه گیری شد. میانگین زاویه تماس آب در جهت افقی به ترتیب برابر با ۲۴/۴، ۱۲۶/۹ و ۱۲۳/۷ درجه می باشد. زاویه تماس آب در جهت عمودی به ترتیب مقادیر ۶۰/۱، ۱۳۳/۹ و ۱۳۱ درجه را نشان داد. مورفولوژی قطرات آب روی لایه های متفاوت داربست در شکل ۲ نشان داده شده است. بالاترین زاویه تماس در هر دو جهت مربوط به لایه میانی PDLLA بوده و پایین ترین مقدار مربوط لایه بالایی متشکل از PLGA-GDNF می باشد. لایه بالایی PLGA-GDNF در مقایسه با لایه میانی PDLLA و لایه پایینی PDLLA-NGF بسیار آبدوست تر بود. همچنین قطر ضخیم تر الیاف در لایه میانی PDLLA در مقایسه با لایه زیرین NGF/PDLLA سبب ایجاد زاویه تماس آب بالاتری شد [۱۰].



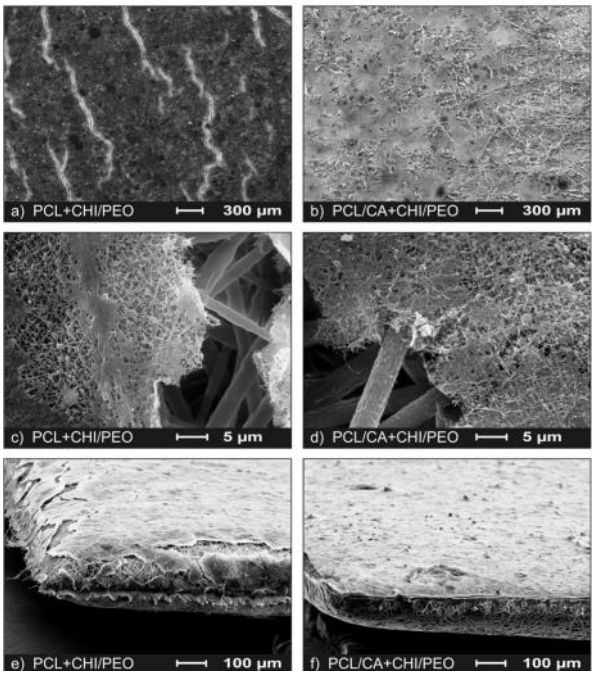
شکل ۲. زوایای تماس آب لایه های مختلف در جهات مختلف در داربست های فیبری سه لایه [۱۰].

۳،۲،۲. شکل شناسی

رافائل وهمکاران داربست دولایه PEO-CHI / CA-PCL را با استفاده از تکنیک الکتروریسی تولید کردندکه به ترتیب از یک لایه پلی CA-PCL تشکیل شده و به عنوان تکیه گاه مکانیکی عمل می کند ولایه دیگراز PEO-CHI تشکیل شده که نقش پانسمان اولیه زخم را ایفا می کند. قطر الیاف PCL وCA- PCL از ۱ تا ۴ میکرو مترمتغیر است در حالی که قطر الیاف PEO- CHI کوچکتر از ۲۰۰ میکرومتر است. همانطور که در شکل ۳ a و b مشاهده می شود، اختلاف قطر درالیاف PCL و CA-PCL وجود دارد (به ترتیب ۱/۶±۰/۷ و ۴/۴±۱/۰ میکرومتر برای الیاف PCL و CA-PCL). علاوه بر این، تفاوت در شکل فیبری را می توان مشاهده کرد به طوریکه سطح الیاف CA-PCL به طور قابل توجهی زبر تر به نظر میرسد. همانطور که در شکل 3d مشاهده می شود، قطر الیاف کیتوزان کمتر از ۲۰۰ میکرومتر است. شکل ۴ داربست های دولایهPEO-CHI/ PCL وCA- PCL / PEO-CHI را نشان می دهد. درشکل ۴ a و b شکاف های کوچکی در لایه PEO-CHI مشاهده می شود. همانطور که در شکل ۴ c و d نشان داده شده است، تفاوت قابل توجهی در قطر PCL یا CA- PCL در مقایسه با الیاف کیتوزان دیده می شود، تفاوت در عرض لایه ها را می توان به وضوح در شکل ۴ e و f مشاهده کرد. با توجه به شکل، این نوع داربست ها برای پانسمان ها مناسب هستند [۸].



شکل ۳. تصاویر SEM داربست های الکتروریسی شده: (a) الیاف پلی کاپرولاکتان ، (b) الیاف پلی کاپرولاکتان-سلولز استات و (c,d) الیاف کیتوزان- PEO [۸].



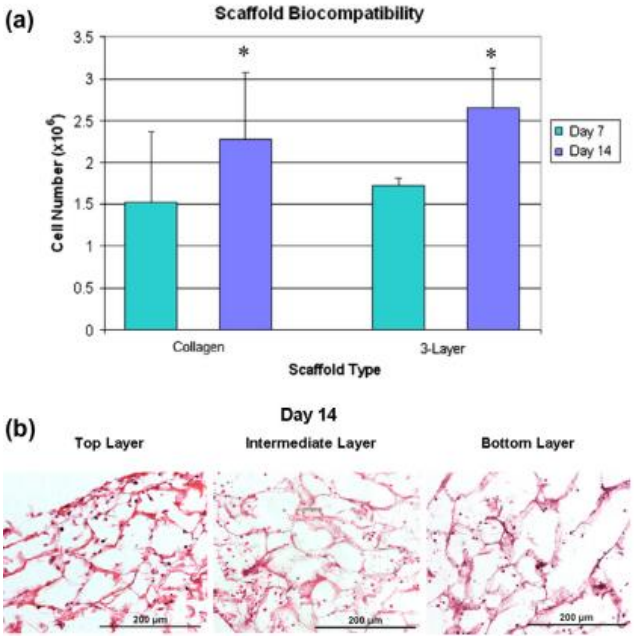
شکل ۴. تصاویر SEM داربست های دو لایه الکتروریسی شده [۸].

۳،۳. خواص زیستی داربست های چندلایه

۳،۳،۱. آنالیز سلولی

تانیا و همکارانش داربست کلاژن- هیدروکسی آپاتیت-هیالورونیک اسید را تهیه کردند وتجزیه و تحلیل آنالیز سلولی به منظور ارزیابی زیست سازگاری داربست، اتصال سلولی و توانایی سلول ها برای نفوذ از ساختار لایه ای داربست انجام شد. زیست سازگاری در داربست

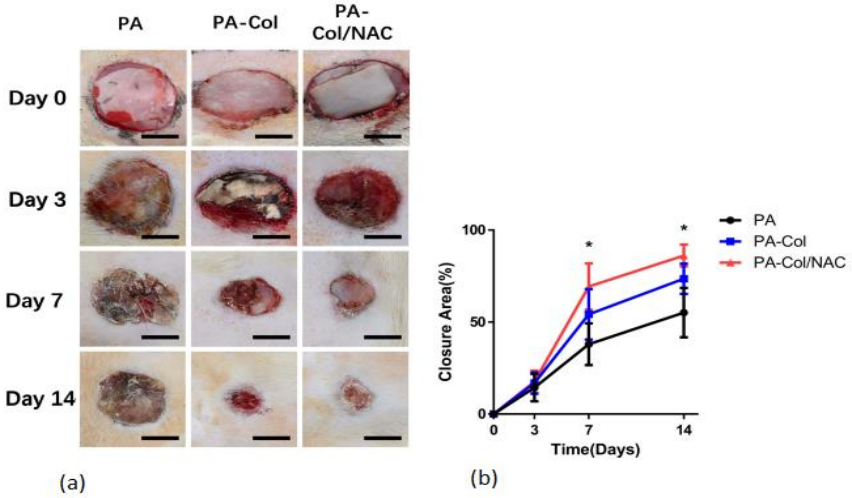
های سه لایه و داربست کنترل(فقط کلاژن) ارزیابی شد. شکل ۵ (a) تعداد سلول ها روی داربست های سه لایه در مقایسه با داربست کلاژن در روزهای ۷ و ۱۴ را نشان می دهد. بر اساس نتایج تفاوت زیادی در تعداد سلول بین دو این گروه در روز ۷ پس از کاشت مشاهده نشد. از طرف دیگر تعداد سلول ها از روز ۷ تا ۱۴ برای داربست سه لایه ۵۰ درصد نسبت به داربست کلاژن افزایش یافت. توانایی سلول ها برای تکثیر در داربست سه لایه نشان دهنده ماهیت زیست سازگاری داربست است. شکل ۵ (b) مقاطع عرضی داربست سه لایه پس از ۱۴ روز کشت آزمایشگاهی با سلول‌های پیش استئوبلاست موش را نشان می دهد که براساس رنگ آمیزی hematoxylin and eosin نفوذ سلول ها در سراسر ساختار داربست در این نقطه زمانی مشاهده شد. هسته های رنگ آمیزی شده با فلش نشان داده شده اند [۷].



شکل ۵. (a) تعداد سلول برای داربست های سه لایه در مقایسه با داربست های کلاژن در روزهای ۷ و ۱۴ (b) مقاطع عرضی داربست سه لایه [7].

۳،۳،۲. آنالیز حیوانی

جینفی وهمکاران داربست پلی آمید-کلاژن/ ان-استیل سیستئین را تهیه کردند واثرات داربست تهیه شده را بر مدل زخم یک موش صحرایی مورد بررسی قرار دادند. نماهای کلی زخم در مقاطع زمانی مختلف در شکل ۶ (a) نشان داده شده است. در ابتدا سه زخم بیضی شکل روی سطح پشتی بدن موش ایجاد کردند و با سه داربست مطابق با شکل ۶ (a) زخم ها را پوشش دادند. پس از بررسی روند بهبود زخم در روز های اول تغییرات خاصی مشاهده نشد. در روز هفتم داربست گروه پلی آمید-کلاژن/ ان-استیل سیستئین روند بهتری نسبت به داربست پلی آمید و پلی آمید-کلاژن داشته و مقایسه زخم ها در روز چهاردهم نشان می دهد که زخم گروه پلی آمید-کلاژن/ ان-استیل سیستئین تقریبا به طور کامل بهبود پیدا کرده است ودابست پلی آمید-کلاژن نیز نسبت به داربست پلی آمید روند بهبودی بهتری داشته است. برای تجزیه و تحلیل بیشتر منحنی در شکل ۶(b) رسم شده است. میزان بهبود زخم برای سه داربست قبل از روز ۳ تقریباً مشابه بود. در روز هفتم درصد بسته شدن زخم برای پلی آمید-کلاژن/ ان-استیل سیستئین، پلی آمید-کلاژن و پلی آمید به ترتیب برابر ۱۱/۴۷ ±۶۹/۳ ٪، ۱۲/۵۱ ±۵۴/۱۸ ٪ و ۱۰/۳۶ ±۳۷/۹۵ ٪ بدست آمده که داربست پلی آمید-کلاژن/ ان-استیل سیستئین نتایج بهتری نشان داد. همچنین در روز چهاردهم گروه پلی آمید-کلاژن/ ان-استیل سیستئین بهبود تقریباً کامل زخم را نشان داد (۵/۴۶ ± ۸۶/۱۷ ٪) درحالی که درصد بهبود زخم برای داربست های پلی آمید-کلاژن و پلی آمید به ترتیب برابر ۷/۴۶±۷۳/۵ ٪ و ۱۲/۲۴±۵۵/۱۵ ٪ بدست آمدند [۵].



شکل۶. نتایج آنالیز حیوانی داربست پلی آمید-کلاژن/ ان-استیل سیستئین [۵].

۴. نتیجه گیری

امروزه هدف اصلی استفاده از داربست های مهندسی بافت، بازسازی مجدد بافت های بدن است. انتخاب نوع و جنس داربست مهمترین بخش طراحی داربست می باشد به طوری که در نهایت جایگزین بافت آسیب دیده می گردد و انتظار می رود در همان سطح به فعالیت طبیعی خود ادامه دهد. برای ساخت نزدیک ترین داربست به بافت مورد نظر روش های مختلفی وجود دارد. در میان انواع روش های تولید داربست، روش های الکتروریسی و خشک کن انجمادی به علت فراهم نمودن تخلخل و استحکام مناسب مورد توجه قرار گرفته اند. با استفاده از لایه های متفاوت از داربست های مختلف در کنار هم به صورت یک داربست چند لایه می توان از خواص بهینه هر کدام در محل خود بهره برد. داربست های چند لایه به دلیل چسبندگی، تکثیر و مهاجرت سلولی بهتر کاربردهای متعددی در زمینه علوم پزشکی از جمله مهندسی بافت، سامانه های رهایش دارو، زخم پوش ها و غیره دارند. خواص فیزیکی، مکانیکی و زیستی از جمله فاکتورهای مهم برای تولید یک داربست چندلایه هستند. میزان مقاومت مکانیکی در داربست ها باید متناسب با بافت مورد نظر باشد و طوری محاسبه شود که ظرفیت مکانیکی لازم را با توجه به محل قرار گیری داشته باشد. همچنین داشتن تخلخل مناسب جهت بهبود انتقال مواد مغذی و پسماند و متعاقب آن تکثیر و مهاجرت سلولی از ویژگی های مهم برای تولید داربست های چندلایه است. ترشوندگی داربست به عنوان یکی دیگر از خصوصیات کلیدی است و نقش مهمی در برهمکنش داربست-سلول و تخریب پذیری داربست دارد و همچنین به طور مثال در تهیه زخم پوش ها با کنترل از دست دادن آب در محل پانسمان می تواند روند بهبود را تسریع کند.

۵. منابع

[1] Tovar, C.D.G., Castro, J.I., Valencia, C.H., Porras D.P.N., Hernandez, J.H.M., Valencia, M.E., Velásquez, J.D., Chau, M.N., 2019. Preparation of Chitosan/Poly(Vinyl Alcohol) Nanocomposite Films Incorporated with Oxidized Carbon Nano-Onions (Multi-Layer Fullerenes) for Tissue-Engineering Applications, Biomolecules, 684.

[2] Liu, Q., Jia, H., Ouyang, W., Mu, Y., Wu, Z., 2021. Fabrication of Antimicrobial Multilayered Nanofibrous Scaffolds-Loaded Drug via Electrospinning for Biomedical Application, Frontiers in Bioengineering and Biotechnology, 9:755777.

[3] R Scaffaro, R., Lopresti, F., Botta, L., Rigogliuso, S., Ghersi, G., 2015. Preparation of three-layered porous PLA/PEG scaffold: relationship between morphology, mechanical behavior and cell permeability, journal of the mechanical behavior of biomedical materials, 8–20.

[4] Sathy, B.N., Mony, U., Menon, D., Baskaran V.K., Nair, S., 2015. Bone Tissue Engineering with Multilayered Scaffolds— Part I: An Approach for Vascularizing Engineered Constructs In Vivo, Tissue Engineering - Part A, 2480.

[5] Hou, J., Chen1, L., Zhou, M., Li, J., Liu, J., Fang, H., Zeng, Y., Sun, J., Wang, Z., 2020. Multi-Layered Polyamide/Collagen Scaffolds with Topical Sustained Release of N-Acetylcysteine for Promoting Wound Healing, International Journal of Nanomedicine, 1349–1361.

[6] Vakilian, S., Jamshidi-adegani, F., Al Yahmadi, A., Al-Broumi, M., Ur Rehman, N., Anwar, M., Alam, K., Al-Wahaibi, N., Shalaby, A., Alyaqoobi, S., Al-Harrasi, A., Mustafa, K., Al-Hashmi, S., 2021. A competitive nature-derived multilayered scaffold based on chitosan and alginate, for full-thickness wound healing, Carbohydrate Polymers, 117921.

[7] Levingstone, T.J., Matsiko, A., Dickson, G.R., O'Brien, F.J., Gleeson, J., 2014. A biomimetic multi-layered collagen-based scaffold for osteochondral repair, Acta Biomaterialia, 1996-2004.

[8] Trinca, R.B., Westin, C.B., da Silva, J.A.F., Moraes, A.M., 2017. Electrospun multilayer chitosan scaffolds as potential wound dressings for skin lesions, European Polymer Journal, 88 .161–170.

[9] Chen, J., Li, X., Liu1, Q., Wu, Y., Shu, L., He, Z., Ye, C., Ma. M., 2018. Fabrication of multilayered electrospun poly(lactic-co-glycolic acid)/polyvinyl pyrrolidone + poly(ethylene oxide) scaffolds and biocompatibility evaluation, Journal of Biomedical Materials Research Part A, 1-81.

[10] Liu, C., Li, X., Xu, F., Cong, H., Li, Z., Song, Y., Wang, M., 2018. Spatio-temporal release of NGF and GDNF from multi-layered nanofibrous bicomponent electrospun scaffolds, Journal of Materials Science: Materials in Medicine, 102.