

طراحی داربست هیبریدی متخلخل برپایه چندسازه PEPC اصلاح شده با کیتوسان به منظور کاربرد در مهندسی بافت نرم: بررسی شباهت‌های ساختاری و رفتار زیست‌مکانیکی

آزاده ایزدیاری^۱، مازیار شریف‌زاده بائی^{۲*}، سعید حیدری کشل^۳ و عظیم اکبرزاده‌خیابوی^۴

۱. دانشجوی دکتری، گروه مهندسی شیمی دانشگاه آزاد اسلامی، واحد آیت ... املی، آمل، ایران
۲. دانشیار گروه مهندسی شیمی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد آیت ... املی، آمل، ایران
۳. استادیار گروه مهندسی بافت و علوم سلولی کاربردی، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، تهران، ایران
۴. استاد گروه نانوبیوتکنولوژی، انستیتو پاستور ایران، تهران، ایران

دریافت: اسفند ۱۳۹۷، بازنگری: تیر ۱۳۹۸، پذیرش: مرداد ۱۳۹۸

چکیده: امروزه، مهندسی بافت به‌عنوان یکی از روش‌های درمانی مؤثر برای ترمیم بافت‌های نرم و سخت شناخته می‌شود. اگرچه که طراحی بسترهایی که پیروی‌کننده الگوی رشد سلول و عملکرد زیست‌مکانیکی بافت هستند، چالشی مهم در این زمینه به‌حساب می‌آیند. در پژوهش حاضر، به‌منظور بررسی نقش ترکیب بسپارهای طبیعی و مصنوعی در پیروی محیط‌های زیستی، داربست‌های متخلخل PEPC (PEG/PCL) و PCP (PEG/کیتوسان/PCL) با روش خشک‌کردن انجمادی طراحی شد. سپس، ویژگی فیزیکوشیمیایی، مکانیکی و زیستی داربست‌های یاد شده با دیگر داربست‌های طراحی شده (کیتوسان، PEG و PCL) مورد مقایسه و بررسی قرار گرفت. نتایج نشان داد که ترکیب بسپارها (طبیعی/مصنوعی)، نقش اصلی را در ایجاد میکرومحیط متخلخل و کشسانی مشابه با بستر خارج سلولی بافت ایفا می‌کند. به‌طوری که، داربست هیبریدی PCP در مقایسه با داربست چندسازه PEPC، تخلخل بیشتر (با قطر منافذ کمتر) و مدول کشش مشابه با بافت نرم (۵/۱۱ MPa) را ارائه داد. افزون بر آن، حضور کیتوسان در داربست PCP منجر به افزایش تورم‌پذیری، کنترل سرعت تخریب و بهبود رشد سلولی (۹۶٪) نسبت به سایر گروه‌ها شد. بنابراین، به نظر می‌رسد داربست هیبریدی PCP، از طریق پیروی رفتارهای زیست‌مکانیکی و ساختاری بافت‌های نرم مانند پوست، رباط، بافت اندوتلیال و عروق خونی، می‌تواند نقش مهمی را در بازسازی بافت ایفا کند.

واژه‌های کلیدی: مهندسی بافت نرم، بسپارهای طبیعی، داربست‌های هیبریدی، میکرومحیط متخلخل

مقدمه

فعالیت‌های بسیاری می‌تواند منجر به آسیب چنین بافت‌هایی شود. صدمات بافت‌های نرم به‌صورت آسیب‌هایی در پوست، عضله، تاندون‌ها، رباط‌ها، اعصاب، رگ‌های خونی و ... شناخته می‌شوند.

بافت نرم، به بافت‌هایی نسبت داده می‌شود که پیونددهنده، احاطه‌کننده و یا حمایت‌کننده از سایر اندام‌های بدن هستند. از این رو،

چندسازه و هیبریدی، وجود طیف گسترده‌تر ابعاد اجزای مخلوط در مواد چندسازه است، درحالی‌که هیبریدها به‌طور معمول به اجزای تشکیل‌دهنده در سطح نانو/میکرومتری یا مولکولی اشاره دارند. بنابراین، قابلیت بیشتری را در کاربردهای بازسازی محیطی و/یا تحویل دارو در محیط‌های یک‌بعدی، دو بعدی و سه بعدی دارند [۷]. از این‌رو، به نظر می‌رسد که داربست‌های جدید هیبرید-چندسازه ویژگی تقویت شده همراه با مزایای بیشتری نسبت به دو داربست دیگر را فراهم آورند [۸]. این نکته می‌تواند در ساخت داربست‌های ترمیم‌کننده بافت‌های سخت و نرم مهم باشد [۹]. در این زمینه می‌توان به انواع داربست‌های چندسازه مانند n-HA/PGS-g-M ترکیبی از پلی‌گلیسرول سباتات (Poly-glycerol sebacate) و هیدروکسی‌آپاتیت (hydroxyapatite) پیوند داده شده با مالئیک انیدرید (maleicanhydride) [۱۰]، ترکیبی از پلی‌کاپرولاکتون و تری‌کلسیم فسفات (polycaprolactone-tricalciumphosphate) [۱۱] و پلی‌کاپرولاکتون/هیدروکسی‌آپاتیت چندلایه (polycaprolactone/hydroxyapatite) [۱۲] اشاره کرد که برای کاربرد در بافت‌های سخت مانند استخوان طراحی شده‌اند. افزون بر آن، داربست‌های هیبریدی تهیه شده از هیدروکسی‌آپاتیت همراه با بسپارهای طبیعی و مصنوعی [۱۳] و یا داربست‌های هیبرید-چندسازه مبتنی بر بستر خارج سلولی [۱۴] نیز می‌توانند در ترمیم استخوان، غضروف و ... مورد استفاده قرار گیرند.

امروزه از روش‌های مهندسی بافت و پزشکی بازساختی^۳ در ترمیم بسیاری از بافت‌ها مانند عصب، دریچه‌های قلب، استخوان، تاندون، رباط‌ها، پوست و ... استفاده می‌شود [۶، ۱۵ تا ۱۷]. نکته مهم، طراحی بستری مشابه با بافت هدف است که الگوهای ساختاری، زیستی و زیست‌مکانیکی^۴ آن را دنبال کرده و از نظر تعاملات سلول/داربست همانند بافت طبیعی عمل کند. در این زمینه انتخاب نوع بسپار به کاررفته در بستری جایگزین بافت که به شکل داربست‌های دو یا سه بعدی و هیدروژل‌ها طراحی می‌شوند، بسیار حائز اهمیت است [۱۸ تا ۲۱]. در این راستا، پژوهش‌ها نشان

این موارد نه شکستگی هستند، که آسیب بافت سخت مانند استخوان را شامل شوند، و نه آسیب‌دیدگی اندام‌های درونی مانند مغز، قلب، معده و روده‌ها هستند. شایع‌ترین این صدمات ناشی از آسیب حاد بافت به علت پارگی‌ها، جداشدگی‌ها و خراشیدگی‌ها هستند که به‌طور معمول به دلیل عدم تشکیل بستر خارج سلولی (ECM)^۱ منظم، ترمیم بافت نرم به‌خوبی انجام نمی‌شود و منجر به تشکیل انواع بدشکلی‌ها در زخم^۲، کوتاهی تاندون، نازکی رباط، چسبندگی بافت‌ها و ... می‌شود [۱ و ۲]. بنابراین، لزوم تشکیل بستر خارج سلولی منظم برای جلوگیری از بدشکلی و نیز ترمیم بافت نرم همراه با بازسازی کامل آن امری اجتناب‌ناپذیر است، که امروزه مهندسی بافت به دلیل قابلیت بالا در درمان انواع بیماری‌ها و صدمه‌های فیزیکی وارد شده به عضو، یکی از بهترین گزینه‌ها در این زمینه بشمار می‌رود [۳]. در حقیقت مهندسی بافت با تلفیق علوم مهندسی مانند بسیار، شیمی، فیزیک و پزشکی در کنار علوم زیستی قادر به حفظ حالت پایدار بافت و بهبود عملکرد آن و یا جایگزین کردن عضو آسیب دیده با بسترهای بسیاری طراحی شده برای بازسازی کامل بافت است [۴ تا ۶]. طراحی چنین بسترهایی با توجه به کاربرد داربست در بافت مورد نظر و مواد سازنده بستر، می‌تواند به فرم‌های هیبریدی، چندسازه و یا هیبرید-چندسازه باشد. شایان ذکر است، چندسازه‌ها به‌عنوان مواد دو یا چند جزء تعریف می‌شوند که براساس مواد بستر، به چندسازه‌های بسیاری، چندسازه‌های سرامیکی، چندسازه‌های کربنی و چندسازه‌های فلزی تقسیم‌بندی شده و ویژگی فیزیکی و شیمیایی متفاوت از یکدیگر را نشان می‌دهند. درحالی‌که، یک ماده هیبریدی ترکیب ساده‌ای از اجزای متفاوت نیست بلکه پس از ترکیب اجزای چند عاملی، تشکیل شده و به‌طور معمول ویژگی جدیدی را ایجاد می‌کند. قابل توجه است که، این ویژگی را می‌توان با ویژگی‌های شیمیایی و فیزیکی ویژه اجزای سازنده، ساختار و روابط بین اجزای متفاوت طراحی کرد. در نتیجه می‌توان گفت نوع بسپارهای سازنده ترکیب‌های هیبریدی و هیبرید-چندسازه نقش مهمی را در ویژگی‌ها و کاربردهای آن‌ها ایفا می‌کنند. نکته مهم دیگر در مواد

1. Extra Cellular Matrix 2. Scar 3. Regenerative medicine 4. Mechanobiology

از کیتوسان خالص به‌عنوان داربست به‌دلیل ویژگی کاتیونی این پلی‌ساکارید، گرانروی بالای آن در محلول و تعاملات ویژه بین مولکول‌ها، چالش برانگیز است، داربست‌های هیبریدی/چندسازه به‌دست آمده از این پلی-ساکارید طبیعی، از دید ریختی بسیار شبیه با بستر خارج سلولی بوده و تخلخل ایده‌آلی را به داربست تحمیل می‌کنند تا فضای کافی برای رشد سلول فراهم و حداقل مانعت به نفوذ عوامل رشد ایجاد شود [۳۵ و ۳۶]. افزون بر آن، گروه‌های عاملی هیدروکسیل و آمین در کیتوسان به‌عنوان پل ارتباطی با بسپارهای مصنوعی عمل کرده و سبب افزایش پیوندهای متقابل در داربست‌های چندسازه/هیبریدی می‌شوند. همچنین، کیتوسان گزینه مناسبی برای اصلاح ساختار بسترهایی هستند که محدودیت استفاده از دیگر زیست‌بسپارها (مانند کلاژن) برای بهبود ویژگی‌های زیستی آن‌ها وجود دارد [۳۷ و ۳۸]. پلی‌ساکارید دیگر در این زمینه هیالورونیک اسید^۶ است که به‌عنوان یک مولکول پیام‌رسان یا مخبره‌کننده^۷ نقش کلیدی را در بازسازی بافت از طریق ارتباط با گیرنده‌های سطح سلولی ایفا می‌کند [۳۹ تا ۴۱]. با این حال، هزینه بالای این پلی-ساکارید محدودیت اصلی در استفاده از آن است.

نکته مهم در به‌کارگیری بسپارهای طبیعی عدم استحکام مکانیکی بستر و سرعت تخریب بالای آن‌ها است که منجر به ساخت داربست‌ها و هیدروژل‌های هیبریدی یا چندسازه‌های ترکیبی می‌شود [۱۷ و ۴۲]. در این پژوهش، یک داربست هیبریدی از بسپارهای طبیعی و مصنوعی برای بهبود ویژگی‌های داربست در کاربردهای مهندسی بافت نرم ساخته شد. بنابراین، PCL و PEG به‌عنوان بسپارهای مصنوعی ایده‌آل و مهم در این زمینه انتخاب شدند و به‌صورت چندسازه بسپاری در کنار کیتوسان به‌منظور اصلاح ویژگی‌های زیستی و ساختاری، به شکل داربست هیبریدی متخلخل طراحی شدند. در حقیقت، ارتباط‌های ساختار آمینوپلی‌ساکاریدی-کاتیونی در کیتوسان با بسپارهای مصنوعی گفته شده، شرایط مناسبی را برای ترمیم بافت‌های آسیب‌دیده که محیط آنیونی دارند، فراهم و با بهبود پیام‌های زیستی روند

می‌دهد که بسپارهای مصنوعی مانند پلی‌کاپرولاکتون (PCL)^۱ به دلیل استحکام ساختاری اولیه (ویژگی مکانیکی مناسب) و حفظ تمامیت فیزیکی در محیط آبی بدن به‌دلیل ویژگی آب‌گریزی^۲ [۱۷ و ۲۲]، می‌تواند به‌عنوان بستر جایگزین در بافت‌های نرم مؤثر باشد [۲۳ و ۲۴]. همچنین، داربست‌های ساخته شده از بسپار یاد شده قادرند از چسبندگی احتمالی بافت که در زمان ترمیم طبیعی رخ می‌دهد، جلوگیری کرده و به‌عنوان عامل مهم در پیشگیری از بدشکلی و کاهش خطرات ناشی از چسبندگی بافت‌های نرم مانند تاندون، عصب و رگ‌های خونی عمل کند [۲۴ تا ۲۶]. افزون بر آن، پلی‌اتیلن گلیکول (PEG)^۳ بسپار دیگری است که به دلیل عدم سمیت و ویژگی آب‌دوستی^۴ در علوم مهندسی بافت و پزشکی حائز اهمیت است [۲۷]. همچنین، این بسپار به‌عنوان ماده^۵ ساختاری بی‌اثر و عامل افزایش پیوند بین بسپارهای سازنده برای طراحی انواع داربست‌ها و هیدروژل‌های مهندسی شده در طب بازساختی عمل کرده و در صورت پیوند با پلی‌ساکارید‌ها یا پپتیدها، عامل القای پیام‌های زیستی منحصر به فرد بر بستر بسپاری خواهد بود [۱۷ و ۲۸]. همچنین، این بسپار با اصلاح ویژگی آب‌دوستی داربست‌های هیبریدی یا چندسازه طراحی شده، ویژگی فیزیکی مناسبی را در بسترهای بسپاری فراهم می‌سازد.

به طور کلی باید گفت، استفاده از بسپارهای مصنوعی اجازه کنترل با توانایی بالا بر ویژگی ساختاری مانند استحکام مکانیکی، تخلخل، تخریب و جذب آب را می‌دهد. با این حال، این مواد از محیط خارج سلولی طبیعی بافت (ECM) و عملکرد آن پیروی نمی‌کند [۲۹] و در صورت پیوند با بسپارهای طبیعی قادر به القای شرایط زیستی هستند. بنابراین، پژوهشگران بر این باورند که وجود عامل تحریک‌کننده محیط خارج سلولی در اهداف مهندسی بافت ضروری است [۳۰ تا ۳۲]. در این راستا، می‌توان به بسپار طبیعی کیتوسان اشاره کرد که به‌دلیل ویژگی‌های زیست‌سازگاری، زیست‌تخریب‌پذیری، عدم سمیت حتی در تخریب‌های آنزیمی و فعالیت ضدباکتریایی، یکی از پرطرفدارترین بسپارها در مهندسی بافت‌های نرم و سخت بشمار می‌رود [۳۲ تا ۳۴]. اگرچه استفاده

1. Poly-Caprolactone 2. Hydrophobic 3. Poly-Ethylene Glycol 4. Hydrophilic 5. Material 6. Hyaluronic Acid 7. Signaling

بازسازی بافت را تند می‌کند.

در این پژوهش، از روش خشک کردن انجمادی^۱ استفاده شد، چراکه کیتوسان نوعی الکترولیت طبیعی است که منجر به افزایش رسانایی الکتریکی و چگالی بارهای سطحی محلول بسیاری می‌شود. از این رو، جریان خروجی از نوک سوزن به دلیل وجود نیروهای دافعه بین بارهای موجود در جریان بسیاری دچار ناپایداری خمشی بیشتر می‌شود (نسبت به زمانی که این پلی‌ساکارید در محلول حضور ندارد). بنابراین، روش‌هایی مانند الکتروریسی به دلیل مشکلات مربوط به قابلیت فرایندپذیری این پلی‌ساکارید (حلالیت کم، گرانروی و تنش سطحی بالا)، چالش برانگیز است و منجر به شکستگی یا عدم پیوستگی ایفای بسیاری می‌شود و از نظر مکانیکی داربستی غیرایده‌آل را ایجاد می‌کند [۴۳ و ۴۴]. پس از طراحی و آماده‌سازی داربست، مشخصات فیزیکوشیمیایی، مکانیکی و زیستی آن برای بررسی شباهت‌های داربست مذکور به بافت‌های نرم مورد بررسی قرار گرفت.

بخش تجربی

موا

کیتوسان با وزن مولکولی متوسط^۲ (۲۳۴ کیلو دالتون) و درجه دی‌استیلاسیون ۹۵٪، پلی‌اتیلن گلیکول و پلی‌کاپرولاکتون به ترتیب با میانگین وزن مولکولی عددی^۳ (M_n) ۶۰۰۰ و ۴۵۰۰۰، ۱-اتیل-۳- (۳-دی‌متیل‌آمینوپروپیل) کربودی‌ایمید هیدروکلرید (EDC)^۴، ان-هیدروکسی‌سوکسینامید (NHS)^۵، نمک ترازولین-۳- (۴ و ۵-دی‌متیل‌تيازول-۲-یل) ۲ و ۵-دی‌فنیل‌تترازولیم برومید (MTT)^۶ و دی‌متیل سولفوکسید (DMSO)^۷، از کمپانی سیگما-آلدریج خریداری شدند. همچنین، محیط کشت DMEM^۸ و FBS^۹ برای آزمون زیستی نیز از شرکت گیبکو (Gibco, Massachusetts, USA) تهیه شد. آنزیم لیزوزیم و پادزیست پنی‌سیلین / استرپتومایسین نیز از شرکت سیگما آلدریج خریداری شد.

دستگاه‌ها

به منظور ریخت‌شناسی و بررسی ویژگی مکانیکی، شیمیایی و ترشوندگی داربست‌های متخلخل، دستگاه میکروسکوپ الکترونی روبشی (SEM) مدل XL30 ESEM, Philips, Germany، دستگاه کشش مکانیکی مدل 1446 Zwick/Roell، طیف‌سنج فرسرخ تبدیل فوریه (FTIR) مدل ALPHA, Bruker, Germany و دستگاه زاویه‌سنج نیم‌اتوماتیک مدل CAG-10, JIAN، به ترتیب مورد استفاده قرار گرفتند. همچنین، دستگاه‌های pH متر مدل H1 2213 pH/ORD HANNA Instrument و طیف‌سنج مدل ۱۶۰۱ (ساخت شرکت shimadzu ژاپن) نیز به ترتیب برای تنظیم pH داربست‌ها در کشت سلولی و اندازه‌گیری مقدار جذب در آزمون زنده‌ماندن سلول استفاده شدند.

روش تهیه محلول‌های بسیاری

به منظور ساخت محلول‌های PCL و PEG به ترتیب با غلظت‌های ۳ و ۱۰ درصد وزنی حجمی (w/v)، حلال‌های استیک اسید ۷۰٪ و آب مقطر استفاده شدند. دو محلول بسیاری یادشده به مدت ۲۴ ساعت بر همزن مغناطیسی قرار گرفتند تا طی فرایند هم‌زدن محلول‌هایی همگن به دست آید. لازم به یادآوری است دمای لازم برای رسیدن به محلول یکنواخت برای PCL و PEG به ترتیب ۴۵ و ۲۵ °C در نظر گرفته شد. محلول کیتوسان (۵ w/v) با حل کردن این پلی‌ساکارید در استیک اسید ۰/۵ مولار، در مدت ۸ ساعت در دمای اتاق به دست آمد.

تهیه داربست بسیاری

به منظور رسیدن به داربستی متخلخل با مقاوت مکانیکی و ویژگی آب‌دوستی مناسب و کمترین مقدار سمیت (حتی در زمان تخریب داربست)، محلول‌های بسیاری با نسبت حجمی ۱ : ۲ : ۱/۵ (PEG : Chitosan : PCL = PCP) با یکدیگر مخلوط شدند. لازم به یادآوری است، به منظور بهبود تعامل بین بسیاری، NHS و EDC به عنوان جفت‌کننده در ایجاد پیوند کووالانسی (فعال‌کننده گروه‌های

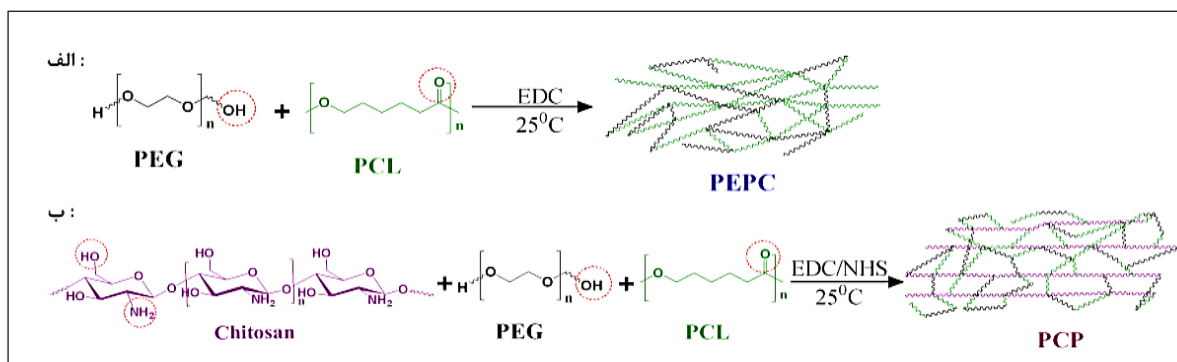
1. Freeze-drying 2. Weight average molecular weight 3. Number average molecular weight 4. 1-Ethyl-3-[3-dimethylaminopropyl]carbodiimide hydrochloride (EDC)
5. N-hydroxysuccinimide 6. Tetrazolium salt 3-(4, 5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide 7. Dimethyl sulfoxide
8. Dulbecco's Modified Eagle Medium 9. Fetal Bovine Serum

تصاویر میکروسکوپ الکترونی روبشی (SEM) برای بررسی ریخت‌شناسی داربست، اندازه حفره‌ها و برآورد کیفی تخلخل، دستگاه میکروسکوپ الکترونی روبشی مورد استفاده قرار گرفت. به منظور دستیابی به تصاویر با وضوح بالا، تمام داربست‌ها با لایه‌ی نازکی از طلا پوشش داده و تصویربرداری در ولتاژ شتاب‌دهنده ۲۰kV انجام شد. در نهایت، اندازه حفره‌های داربست با نرم‌افزار Clemex Vision پیش‌بینی شد.

رفتار تورم‌پذیری داربست

بررسی رفتار تورم‌پذیری به منظور بررسی ویژگی آب‌دوستی داربست‌های خشک‌شده انجام شد. به طور خلاصه، ابتدا داربست‌های خشک شده با قطر ۱۰mm و ضخامت تقریبی ۵mm وزن شدند (Wd). پس از آن، تمام داربست‌ها در محلول نمکی بافر فسفات (PBS) با pH برابر با ۷٫۴ غوطه‌ور شدند و برای ۲۴ ساعت در گرم‌خانه (۳۷ °C) قرار گرفتند. لازم به یادآوری است، در فواصل زمانی ۱، ۳، ۵، ۷، ۱۴ و ۲۴ ساعت داربست‌ها از گرم‌خانه خارج و پس از گرفتن آب اضافی، وزن آن‌ها اندازه‌گیری شد (W_t). برای محاسبه مقدار تورم‌پذیری و آب‌دوستی داربست‌های متخلخل، از معادله ۱ استفاده شد [۴۵]. داده‌ها برای هر داربست با ۳ بار (n=۳، mean ± SD) تکرار محاسبه شد.

OH- و NH- برای تشکیل پیوند، به ترتیب با ۲۰wt% و ۱۰wt% نسبت به حجم کل محلول‌های PCL و PEG، ابتدا به‌طور جداگانه به آن‌ها افزوده و پس از ۱۵ دقیقه هم‌زدن بر همزن مغناطیسی، سه محلول با نسبت حجمی یاد شده به صورت قطره قطره به یکدیگر افزوده شدند. سپس، فرایند هم‌زدن برای این محلول سه‌تایی به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۲۵ °C ادامه یافت. افزون بر آن، به منظور بررسی اثر کیتوسان و نقش ترکیب بسیارها بر ویژگی مکانیکی، زیستی و فیزیکی داربست‌ها، محلول دوتایی شامل PEG : PCL (PEPC) (۱/۵ : ۱ v/v) و محلول‌های تک‌بسیاری نیز همانند روش بالا تهیه شد. ارتباطها بین زنجیره‌های بسیاری و چگونگی تشکیل پیوند در شکل ۱ نشان داده شده است. پس از آن، محلول‌های بسیاری به‌صورت جداگانه با سرنگ یک میلی‌لیتری و سوزن نارنجی با قطر ۳۲ گیج در پلیت‌های ۲۴ خانه، به صورت رفت و برگشتی و با سرعت تقریبی ثابت، تزریق شدند. سپس، هر پنج پلیت شامل محلول‌های تک بسیاری (کیتوسان، PCL و PEG)، دو بسیاری (PEPC) و سه بسیاری (PCP)، به مدت ۲۴ و ۴۸ ساعت در یخچال به‌ترتیب در دماهای ۲۰- و ۸۰- °C قرار گرفتند. در نهایت چاهک‌های حاوی محلول‌های یخ‌زده در هر پلیت با پارافیلیم پوشش داده شده و برای رسیدن به داربست‌های متخلخل، به مدت ۴۸ ساعت در دستگاه خشک‌کن انجامی خشک شدند.



شکل ۱ طرحواره تشکیل ساختار داربست‌های چندسازه PEPC (الف) و هیبریدی PCP (ب) از طریق تعاملات شیمیایی بین زنجیره‌های بسیاری و پیوندهای هیدروژنی احتمالی (گروه‌های شرکت‌کننده در واکنش با دایره قرمز مشخص شده است).

1. standard deviation

$$(۱) \text{ درصد تورم داربست} = [(W_t - W_d) / W_d] \times 100$$

(KBr) به قرص تبدیل شدند. با تبخیر کلروفرم در 40°C ، نمونه‌ها خشک و برای طیف‌گیری وارد دستگاه شدند.

تخریب‌پذیری آنزیمی داربست

سرعت تخریب داربست‌ها، با آزمون تخریب لیزوزیم، در مدت ۱۴ روز بررسی شد. برای این منظور، داربست‌ها با وزن خشک W_i درون پلیت‌های ۲۴ خانه حاوی یک میلی‌لیتر از محلول PBS و $500 \mu\text{g/ml}$ آنزیم لیزوزیم غوطه‌ور شدند. پلیت‌ها به مدت ۱۴ روز داخل گرم‌خانه با دمای 37°C قرار گرفتند. شایان ذکر است، در روزهای ۴، ۷، ۱۰ و ۱۴، داربست‌ها از محیط تخریب خارج و پس از شستشو با PBS، به مدت ۱۲ ساعت با دستگاه خشک‌کن انجمادی خشک و پس از وزن‌شدن (W_t)، دوباره به پلیت‌های حاوی محیط تخریب منتقل شدند و در گرم‌خانه قرار گرفتند. سرعت تخریب داربست‌ها در شرایط آنزیم، با معادله ۲ پیش‌بینی شد $[n=3, \text{mean} \pm \text{SD}]$. [۴۶]

آزمون زاویه تماس آب (WCA)^۱

مقدار ترشوندگی^۲ داربست‌های طراحی‌شده از راه اندازه‌گیری زاویه تماس آب با سطح داربست، با دستگاه زاویه‌سنج نیم‌اتوماتیک (CAG-10, JIAN) محاسبه شد. برای این کار، یک قطره ($2 \mu\text{l}$) از آب مقطر به صورت عمود با سرنگ نصب‌شده بر دستگاه، بر سطح داربست‌های خشک با ابعاد $7 \times 7 \text{ mm}^2$ چکانده شد. فرایند ترشوندگی داربست‌ها از طریق یک دوربین دیجیتال (با سرعت بالا و دقت 0.1° ثانیه) ثبت و تصاویر زاویه تماس آب با سطح داربست از طریق نرم‌افزار تحلیل تصویر محاسبه شد. در نهایت، میانگین زاویه تماس آب برای هر داربست گزارش شد ($n=3$).

$$(۲) \text{ درصد تخریب} = [(W_i - W_t) / W_i] \times 100$$

کشت سلولی و بررسی زیست‌سازگاری داربست

بررسی مقدار سمیت و زیست‌سازگاری داربست‌های خشک‌شده، با آزمون زنده‌ماندن سلول بر داربست محاسبه شد. ابتدا داربست‌ها با الکل ۷۰٪ سترون و به‌منظور تنظیم pH با محیط کشت DMEM شسته شدند (۳ بار). در نهایت، برای حذف هر گونه آلودگی، تمام داربست‌ها به مدت ۴۵ دقیقه تحت پرتو UV سترون شدند. پس از آن، داربست‌ها درون پلیت ۲۴ خانه قرار گرفته و سلول‌های فیبروبلاست پوست انسانی (HDF)^۳ خریداری شده از بانک سلولی انستیتو پاستور ایران با کد C646 به مقدار $1 \times 10^6 \text{ cell/well}$ بر آن‌ها کاشته شده و با محیط کشت DMEM حاوی FBS (۱۵٪) و پنی‌سیلین/استرپتوماسین ($1000 \text{ U/ml} / 100 \text{ U/ml}$) پوشش داده شدند. نمونه‌ها برای ۲۴ و ۴۸ ساعت در گرم‌خانه 37°C قرار گرفتند. پس از این مدت، $20 \mu\text{l}$ محلول MTT (با غلظت اولیه 2.5 mg/ml) به هر چاهک افزوده و ۴ ساعت دیگر گرم‌خانه 37°C قرار گرفتند. سپس، محیط حذف و سلول‌ها در DMSO ($100 \mu\text{l}$) حل شدند. در نهایت، مقدار جذب در طول موج 572 nm با دستگاه طیف‌سنجی اندازه‌گیری و

آزمون کشش مکانیکی

برای بررسی استحکام ساختار و تعیین ویژگی کشسانی داربست، آزمون کشش با دستگاه اندازه‌گیری ویژگی مکانیکی زوئیک انجام شد. از این‌رو، داربست‌های خشک ($1.0 \times 5 \times 2 \text{ mm}^3$) در دمای 25°C بین دو فک دستگاه ثابت و محلول PBS بر آن اسپری شد. این آزمون با وزنه ۵۰ نیوتنی و سرعت کشش 5 mm/min اندازه‌گیری شد. در نهایت، مدول یانگ و مقدار ازدیاد طول داربست‌ها با روش استاندارد ASTM D 638-10 محاسبه شدند ($n=5, \text{mean} \pm \text{SD}$).

طیف‌سنجی فرورسرخ تبدیل فوریه (FTIR)

بررسی ویژگی‌های شیمیایی داربست‌ها و ارتباط بین بسپارها با طیف‌سنجی FTIR انجام شد. از این‌رو، ابتدا داربست‌ها به‌طور جداگانه در کلروفرم حل و سپس با افزودن پودر برمید پتاسیم

1. Water Content Angele 2. Wettability 3. Human Dermal Fibroblasts

و محلول هیبریدی PCP هستند. مطابق با واکنش الف، زمانی که PCL و PEG با یکدیگر ترکیب می‌شوند، EDC به‌عنوان عامل پیونددهنده گروه‌های OH- (در ساختار PEG) و C=O- (در ساختار PCL) عمل می‌کند. این فرایند، زنجیره‌های ساده‌ی PEPC را تشکیل می‌دهد. اما زمانی که کیتوسان در محلول وارد می‌شود (واکنش ب)، ابتدا EDC به گروه‌های کربوکسیل PCL متصل شده و یک استر ناپایدار را تشکیل می‌دهد. سپس، با افزودن NHS (به مقدار ۱۰%wt نسبت به حجم کل محلول PEG)، به محلول ۳ تایی، EDC جای خود را به NHS می‌دهد و یک ترکیب نیم‌پایدار تشکیل می‌شود. در نهایت، NHS در حضور زنجیره‌های آمینی کیتوسان، از گروه‌های کربوکسیل PCL جدا شده و پیوند آمیدی (یک پیوند کووالانسی) را ایجاد می‌کند. افزون بر پیوندهای گفته شده، پیوندهای هیدروژنی و C-O-C نیز در ساختار PCP وجود دارند که می‌تواند به‌ترتیب از پیوند گروه‌های آمینی کیتوسان با PEG و پیوند گروه‌های OH- و C=O- در PCL و PEG باشد.

بررسی ساختار و ریخت‌شناسی داربست‌ها

یکی از ویژگی‌های مهم داربست‌های مهندسی بافت، پیروی از ساختار میکرومتخلخل بستر خارج سلولی است تا سلول‌ها بتوانند با توجه به نشان‌های ساختاری و شبکه‌های متخلخل موجود، ارتباط مناسبی را با داربست و سایر سلول‌ها داشته باشند. چراکه، وجود تخلخل مناسب با اندازه منافذ کنترل شده، عاملی مهم برای چسبندگی اولیه سلول به داربست، انتشار یکتواخت اکسیژن در کل شبکه ساختاری و انتقال مواد مغذی به سلول است. یک داربست مهندسی بافت با توجه به کاربرد آن در بافت‌های متفاوت، اندازه منافذ متفاوتی دارد که بسیار یا بسیارهای سازنده آن نقش مهمی را در این زمینه ایفا می‌کنند. همچنین، وجود گروه‌های آب‌دوست یا آب‌گریز در ساختار بسیار، ریخت‌داربست را تحت تاثیر قرار داده و اندازه منافذ و درصد تخلخل را به‌طور موثری کنترل می‌کند. در این راستا، به‌منظور ریخت‌شناسی داربست‌های طراحی شده و نقش ترکیب بسیارها در کاهش اندازه منافذ و شباهت داربست به

درصد زنده ماندن سلول با معادله ۳ محاسبه شد. لازم به یادآوری است، محیط بدون داربست به‌عنوان گروه کنترل انتخاب شد.

$$(3) \text{ درصد زنده ماندن سلول} = (OD_{\text{sample}}/OD_{\text{control}}) \times 100$$

تحلیل آماری

آزمایش‌ها با ۳ بار تکرار (n=۳) انجام و نتایج به‌صورت میانگین همراه با انحراف استاندارد (mean±SD) گزارش شد. تحلیل داده‌ها با روش تحلیل واریانس یک طرفه (one-way ANOVA) و آزمون پارامتریک Dunnett t-tests و Scheffe's post hoc در نرم‌افزار SPSS24 و با ضریب اطمینان $p < 0.001$ انجام شد. برای رسم نمودارها نیز از نرم‌افزار GraphPad Prism 6 Demo استفاده شد.

نتیجه‌ها و بحث

برای بازسازی بافتی خاص، داربستی با همان عملکرد ویژه نیاز است. این نکته به‌دلیل وجود تفاوت‌هایی بین انواع سلول‌ها در بافت‌های متفاوت بدن و ریز محیط طبیعی است. از این‌رو، تعیین ویژگی مکانیکی، شیمیایی و زیستی داربست‌های مهندسی بافت، بسیار مهم است. در این میان انتخاب نوع بسیار سازنده، نقش کلیدی را در شباهت داربست طراحی شده به بافت هدف (از نظر ویژگی‌های ساختاری، فیزیکی‌شیمیایی و زیست مکانیکی) ایفا می‌کنند. بنابراین، در این مطالعه، برای داربست‌های طراحی شده این ویژگی‌ها بررسی شد تا مشخص شود هر داربست بیشترین شباهت را به کدام بافت نرم داشته است. پیش از بررسی ویژگی‌های گفته شده، چگونگی شکل‌گیری داربست‌های PEPC و PCP (شکل ۱) توضیح داده می‌شود.

بررسی فرایند پیوند بسیارها

دو محلول چندسازه و هیبریدی PEPC و PCP با افزودن عوامل پیونددهنده ساخته شدند (شکل ۱). واکنش‌های الف و ب به‌ترتیب نشان‌دهنده چگونگی تشکیل محلول چندسازه PEPC

نشان می‌دهد که داربست‌های PCP و کیتوسان به دلیل شباهت به ریخت بافت پوست برای رشد سلول‌های فیبروبلاست پوست انسانی ($125-20 \mu\text{m}$) [۴۸] و اختصاص PCP برای سلول‌های اندوتلیال (زیر $80 \mu\text{m}$) [۴۹] مناسب است. همچنین، به دلیل تشابه اندازه منافذ این دو داربست به گستره رشد سلول‌های عضله صاف عروقی (60 تا $150 \mu\text{m}$) [۵۰]، در صورت بهینه‌سازی شبکه ساختاری، می‌تواند به‌عنوان یکی از گزینه‌های مناسب در مهندسی بافت قلب مطرح شوند. اندازه منافذ برای داربست‌های PCL و PEPC بیشتر در گستره رشد سلول‌های بافت سخت مانند سلول‌های استخوان ساز (استئوبلاست) [۲] و غضروفی (100 تا $500 \mu\text{m}$) قرار داشته و به دلیل وجود گره‌های کوچک، ساختار مشابه آن‌ها را پیروی می‌کنند [۵۱ و ۵۲].

بررسی روند جذب آب

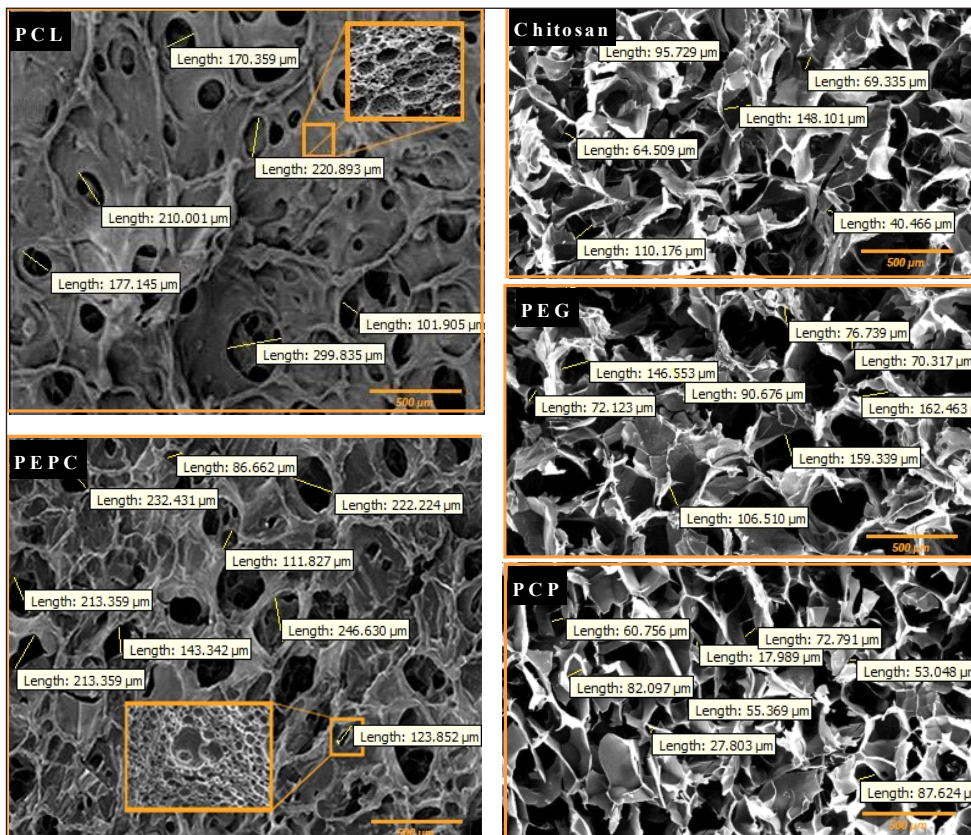
آب‌دوستی از دیگر ویژگی‌های مهم در داربست‌های مهندسی بافت است. چرا که شرایط رشد سلول در چنین محیطی افزایش یافته و ترمیم بافت سریع انجام می‌شود. از این‌رو، داربست‌هایی که توانایی بهتری در نگه‌داری آب و تورم‌پذیری دارند، گزینه‌های درمانی مناسب‌تری در مهندسی بافت به حساب می‌آیند.

شکل ۳ روند جذب آب و تورم‌پذیری داربست‌ها را در مدت ۲۴ ساعت نشان می‌دهد. همان‌طور که مشاهده می‌شود، بالاترین مقدار جذب آب مربوط به داربست کیتوسان است که می‌تواند به دلیل وجود گره‌های هیدروکسیل (-OH) در ساختار این پلی‌ساکارید باشد [۵۳]. البته تورم‌پذیری داربست PCP نیز تفاوت چندانی با داربست گفته‌شده نداشت ($p > 0.001$) که دلیل آن را می‌توان به افزایش ارتباط بین زنجیره‌های بسیاری و تشکیل شبکه متخلخل در داربست PCP نسبت داد. لازم به یادآوری است، روند جذب آب برای این دو داربست نیز مشابه بود. در حقیقت گره‌های آب‌دوست کیتوسان با وزن مولکولی پایین، عامل اصلی جذب بالای آب برای داربست‌های PCP و کیتوسان هستند. در خصوص داربست PEG باید گفت طول

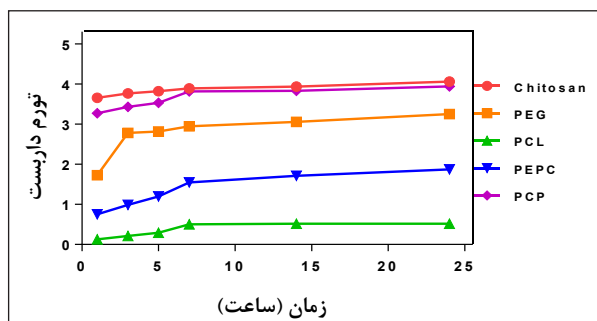
بافت‌های نرم، تصاویر میکروسکوپ الکترونی روبشی بررسی شد. همان‌طور که شکل ۲ نشان می‌دهد، بسپارهایی که در ساختار خود گره‌های آب‌دوست بیشتری دارند، از تخلخل بالاتر و اندازه منافذ کمتر برخوردارند (Chitosan, PEG, PCP). یکی از دلایل این نتیجه به کارگیری روش انجماد برای شکل‌گیری داربست‌ها دانست. هنگام ورود محلول بسپاری منجمد شده به دستگاه خشک‌کن انجمادی، آب یخ‌زده مستقیم به فاز گاز تبدیل و منجر به تشکیل منافذ کوچکتر در شبکه‌ی داربست می‌شود [۴۷]. بین داربست‌های حاوی بسپارهای آب‌دوست نیز تفاوت‌هایی در مقدار تخلخل و اندازه منافذ وجود دارد. به طوری که، اندازه‌های منافذ که با نرم‌افزار Clemex Vision به دست آمده، نشان‌داد داربست هیبریدی PCP دارای بیشترین تخلخل و کمترین گستره برای اندازه حفره‌ها را دارد (حدود 18 تا $88 \mu\text{m}$). پس از آن، داربست‌های کیتوسان و PEG به ترتیب با دامنه منافذ 40 تا 150 و 70 تا $160 \mu\text{m}$ قرار دارند که تخلخل کمتری را نسبت به داربست PCP نشان می‌دهند. از این‌رو، به نظر می‌رسد افزون بر وجود گره‌های آب‌دوست در زنجیره‌های بسپاری، طراحی چندسازه‌های هیبریدی نیز به دلیل تشکیل شبکه‌های ساختاری ناشی از ارتباط زنجیره‌ها و پیوندهای هیدروژنی، نقش مهمی را در کاهش اندازه منافذ دارند. کمترین تخلخل و بزرگ‌ترین اندازه حفره (حدود 100 تا $300 \mu\text{m}$) مربوط به داربست تک بسپار PCL بود که به دلیل وجود دامنه‌های آب‌گریز در ساختار آن است. با افزودن PEG و تشکیل پیوندهای جدید با عامل‌های پیوندی EDC و NHS، مقدار تخلخل در داربست چندسازه PEPC بهبود یافت. بنابراین، انتخاب نوع بسپار و ترکیب آن‌ها به صورت چندسازه/هیبرید عاملی مهم در افزایش تخلخل و کنترل اندازه منافذ است، چراکه وجود زنجیره‌های آب‌دوست و آب‌گریز در بسپارهای طبیعی و مصنوعی می‌تواند به شبکه‌ای شدن همگن داربست کمک کرده و تخلخل آن را به طور یکنواخت بهبود بخشد تا داربستی دقیق مشابه با ریخت بافت هدف طراحی شود. مقایسه نتایج این بررسی با اندازه بهینه برای رشد سلول‌ها

PCL نیز به دلیل وجود گروه های آب گریز در طول زنجیره های بسیاری، تورم پذیری کمتری نسبت به سه گروه یادشده داشتند. همچنین، این گروه ها مانعی برای جذب آب در ساعات اولیه از آزمون تورم برای دو داربست یاد شده بودند.

زنجیره های بسیاری در PEG₆₀₀₀ عامل اصلی در افزایش تورم پذیری داربست بود. با این حال، مقدار تورم-پذیری آن نسبت به دو داربست یادشده، کاهش قابل توجهی را نشان داد ($p < 0.001$) این نتیجه می تواند به دلیل از هم-گسیختگی شبکه ساختاری داربست PEG و انحلال آن در آب باشد. داربست های PEPC و



شکل ۲ تصاویر میکروسکوپ الکترونی روبشی برای داربست های طراحی شده

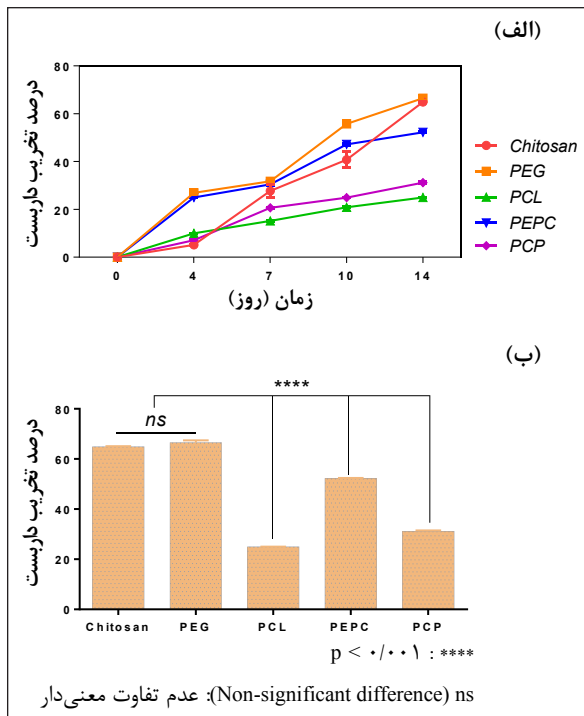


شکل ۳ روند جذب آب و مقدار تورم پذیری داربست ها در مدت ۲۴ ساعت

تخریب‌پذیری داربست‌ها

یکی از اهداف طراحی داربست‌های مهندسی شده، جایگزینی سلول‌های خودی بافت، هم‌زمان با تخریب داربست است. از این رو، داربست‌ها باید با توجه به مدت ترمیم بافت آسیب دیده، و تشکیل ECM، تخریب شوند. در حقیقت، مقدار تخریب داربست باید متناسب با نرخ بازسازی بافت جدید باشد [۵۴ و ۵۵].

در این پژوهش، با توجه به مقدار میانگین ترمیم بافت، مدت آزمون تخریب ۱۴ روز در نظر گرفته شد. روند تخریب‌پذیری در این مدت، برای تمام داربست‌ها در شکل ۴ مشاهده می‌شود. همان‌طور که نتایج نشان می‌دهد، سرعت تخریب‌پذیری داربست کیتوسان در روزهای اولیه آزمون، بسیار کم بوده است که علت اصلی آن درجه استیل‌زدایی بالا (۹۵٪) برای کیتوسان است (شکل ۴-الف). اما پس از ۴ روز و با نفوذ بیشتر محیط تخریب به ساختار شبکه داربست، روند کاهش جرم و سرعت تخریب افزایش یافت. با این حال، تخریب نهایی داربست کیتوسان در روز ۱۴، کمتر از داربست PEG بود (شکل ۴-ب). هر چند این تفاوت بسیار ناچیز است ($p > 0.001$) اما علت آن، به احتمال آب‌کافت سریع‌تر زنجیره‌های بسپاری PEG و حلالیت بیشتر شبکه‌ی این داربست در محیط تخریب است. کمترین مقدار تخریب نیز برای داربست PCL ثبت شد. هر چند که وجود گروه‌های آب‌گریز نقش اصلی را در این روند ایفا می‌کند اما وزن مولکولی PCL نیز عاملی مهم در کند شدن آب‌کافت شبکه داربست و تخریب آنزیمی است. نکته قابل توجه زمانی است که این بسپار در ترکیب با PEG منجر به تشکیل داربست چندسازه PEPC می‌شود. در حقیقت وجود PEG به دلیل زنجیره‌های آب‌دوست و حلالیت بالا، همچنین، در گیر شدن زنجیره‌های PCL در ساختار داربست، مقدار تخریب را تا حدود ۲ برابر افزایش می‌دهد. اما حضور کیتوسان و تشکیل داربست سه‌تایی PCP منجر به تخریب‌پذیری کمتر نسبت به داربست PEPC شد ($p < 0.001$). دلیل اصلی آن افزایش زنجیره‌های بسپاری و ارتباط بین مولکولی در ساختار داربست متخلخل PCP است که می‌تواند سرعت تخریب را به‌طور کنترل‌شده‌ای کاهش دهد.



شکل ۴ روند تخریب‌پذیری داربست‌های طراحی شده در طی ۱۴ روز (الف) و مقدار تخریب داربست‌ها پس از ۱۴ روز (ب)

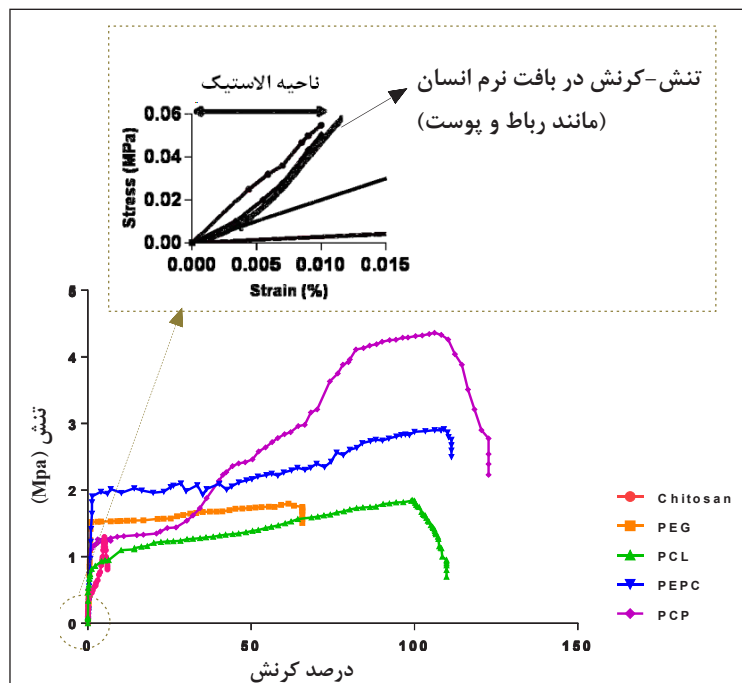
بررسی استحکام مکانیکی

استحکام کششی کنترل‌شده همراه با ویژگی کشسانی یا قابلیت ارتجاعی مناسب، از ویژگی‌های بی‌همتایی است که ساختار مکانیکی داربست را به بافت‌های نرمی مانند پوست، رگ‌ها، رباط‌ها، عضله‌های قلبی و ... نزدیک می‌سازد [۵۶]. از این رو، توجه به تشابه ویژگی‌ها مکانیکی در داربست‌های طراحی‌شده و بافت هدف، لازم به نظر می‌رسد. چرا که برخی بافت‌ها به دلیل عملکردی که در بدن دارند، باید ویژگی کشسانی بهتری نسبت به دیگر بافت‌های بدن داشته باشند [۵۷ و ۵۸]. بسترهایی که به‌عنوان جایگزین برای چنین بافت‌هایی انتخاب می‌شوند، باید از مدول بالاتری برخوردار باشند. این نکته در مورد استحکام کششی و روند منحنی تنش-کرنش نیز صادق است. جدول ۱ و شکل ۵ روند نمودار تنش کرنش و تغییرهای مدول و ازدیاد طول در نقطه شکست را برای همه داربست‌های طراحی‌شده در این بررسی نشان می‌دهد. همان‌طور که از نتایج مشخص است،

1. Elasticity

(۵ و ۵۶) [۵۹]. در حقیقت، دلیل اصلی این تشابه ترکیب بسپارهای طبیعی و مصنوعی و تشکیل شبکه‌ی ساختاری با مکان‌های پیوند بالا و پیوندهای هیدروژنی بیشتر نسبت به داربست PEPC است. افزونبر آن، نقش کیتوسان در افزایش ناگهانی مدول کشش داربست هیبریدی PCP نسبت به سایر گروه‌ها انکارناپذیر است به طوری که، نتایج آماری تفاوت معنی‌داری را برای مقدار مدول بین داربست‌های PCP و کیتوسان نشان نمی‌دهد ($p > 0.001$). همچنین، نتایج این بررسی نشان می‌دهد که داربست PCP به دلیل وجود کیتوسان و PEG به‌عنوان بسپارهای آبدوست، تخلخل بیشتری در شبکه خود دارد و مدول (گستره کشش) مناسب‌تری را برای کاربردهای مهندسی بافت‌های نرم ایجاد می‌کند (شکل ۵). همچنین، وجود PCL در این داربست هیبریدی، ساختاری مستحکم را ایجاد می‌کند که نتیجه آن افزایش گستره پلاستیک یا ازدیاد طول داربست است. بنابراین، به نظر می‌رسد چنین داربستی به دلیل پیروی از ویژگی زیست‌مکانیکی بافت نرم و انطباق نمودار تنش-کرنش آن در ناحیه الاستیک، می‌تواند جایگزین مناسبی برای بافت‌های نرم مانند پوست، رباط، بافت قریه، سینه، شریان‌ها و رگ‌های خونی و... باشد [۵۸ و ۵۹].

داربست PCL از مدول و انعطاف‌پذیری کمتری نسبت به سایر داربست‌ها برخوردار و گستره کشش آن کم است (جدول ۱). اما افزودن PEG به این بسپار منجر به افزایش ۶۹ درصدی مدول داربست PEPC نسبت به داربست PCL شده است. دلیل این افزایش در گستره کشش، بهبود شرایط آبدوستی داربست و تشکیل پیوندهای جدید بین دو بسپار است. به طوری که، این روند افزایشی در ازدیاد طول تا نقطه شکست داربست نیز دیده می‌شود که می‌تواند به دلیل زنجیره‌های لاستیکی PCL باشد. در حقیقت می‌توان گفت داربست چندسازه PEPC از دید ویژگی کشش و انعطاف‌پذیری مشابه با داربست تک‌بسپار PEG و از دید ویژگی پلاستیک یا ازدیاد طول نیز همانند داربست PCL عمل می‌کند ($p > 0.001$). از این رو، ترکیب این دو بسپار می‌تواند شرایط مکانیکی بهتری را برای داربست ایجاد کند (شکل ۵). از سوی دیگر، افزودن کیتوسان به داربست PEPC شرایط کششی و ازدیاد طول داربست PCP را حدود ۱۰٪ بهبود داده و مدول به‌طور چشمگیری افزایش یافته است (حدود ۳٫۵ برابر). به طوری که روند نمودار تنش-کرنش برای این داربست هیبریدی تشابه بالایی با روند نمودار یادشده در بافت‌های نرم انسانی دارد (شکل



شکل ۵ نمودار تنش-کرنش برای داربست‌های طراحی شده و مقایسه گستره کشش آن‌ها با بافت‌های نرم بدن مانند رباط و پوست (خط مشکی شکل [۵۹])

جدول ۱ بررسی عامل‌های استحکام کششی داربست‌ها: مقدار مدول الاستیک و ازدیاد طول (n=۵)

ردیف	عامل‌های مکانیکی	نام داربست				
		PCP	PEPC	PCL	PEG	Chitosan
		±SD میانگین	±SD میانگین	±SD میانگین	±SD میانگین	±SD میانگین
۱	مدول الاستیک (MPa)	۵/۱۱ ± ۱/۱۰	۱/۴ ± ۱/۰۴	۰/۴ ± ۱/۰۳	۱/۷ ± ۱/۰۸	۵/۴۸ ± ۱/۲۲
۲	درصد ازدیاد طول (تا نقطه شکست)	۱۲۲/۶۵ ± ۳/۳۶	۱۱۱/۴۰ ± ۲/۲۳	۱۰۹/۸۰ ± ۱/۵۸	۶۵/۶۴ ± ۳/۳۵	۶/۰۴ ± ۱/۰۸

حضور کیتوسان و ارتباط بیشتر زنجیره‌های بسپاری) نسبت به داربست PEPC با شدت کمتری ظاهر شده است. افزون بر آن، حضور نوارهایی در گستره ۱۵۶۰ تا 1640 cm^{-1} برای داربست PCP و تغییر فرکانس آن نسبت به داربست کیتوسان نشان از ارتباط گروه‌های آمینی و استری و تشکیل آمید نوع ۱ و ۲ در داربست PCP است (شکل ۶-IV).

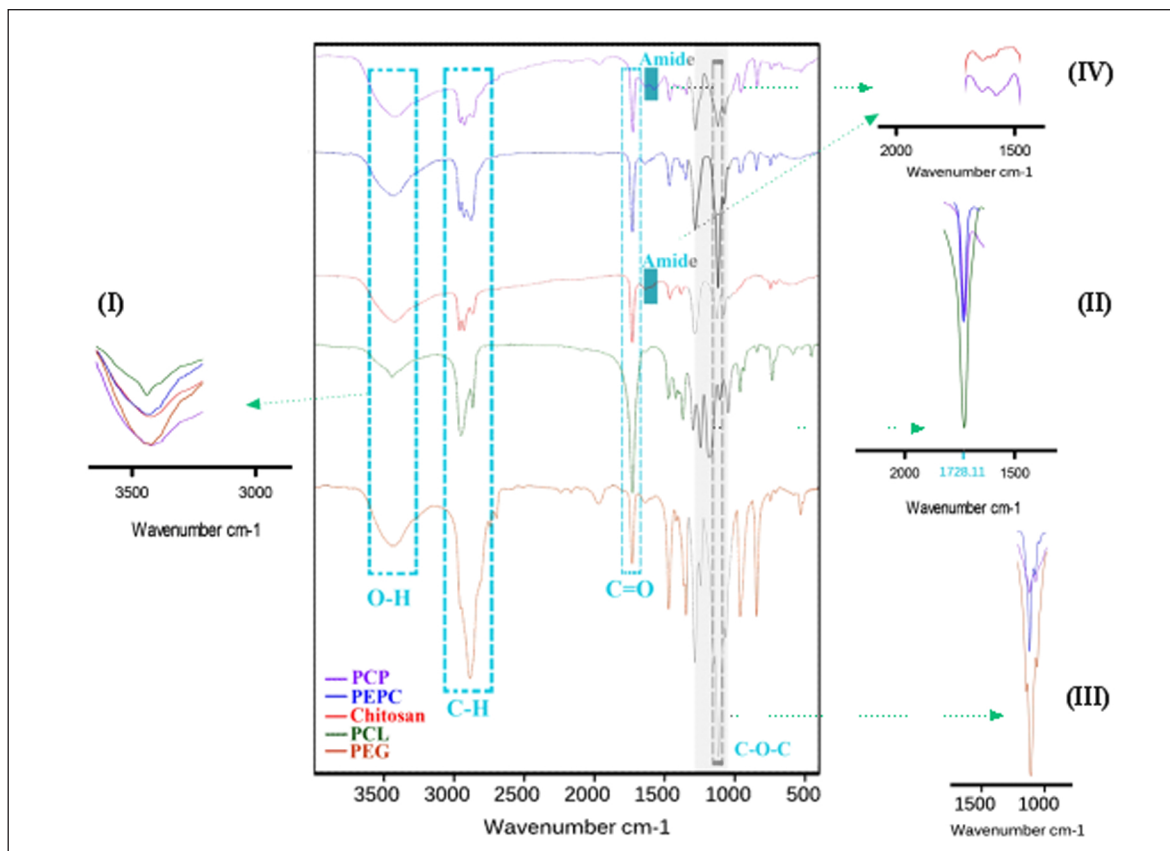
بررسی رفتار ترشوندگی و آزمون زاویه آب

آزمون ترشوندگی بر سطوح داربست‌های مهندسی بافت نقش مهمی برای رسیدن به بینشی عمیق در مورد فعالیت سطح (فیزیکی/شیمیایی)، مقدار چسبندگی نخست سلول، ریخت و ویژگی مکانیکی داربست دارد و شناسایی بسترهای آبدوست، بسیار آبدوست، کمتر آبدوست و آب‌گریز را محقق می‌سازد. چرا که، ویژگی یادشده به‌شدت به ویژگی آب‌گریزی یا آبدوستی داربست و مقدار تمایل سیال به پخش شدن بر سطح وابسته است [۶۰ و ۶۱]. شدت این تمایل با اندازه‌گیری زاویه تماس بین سطح جامد و مایع بیان می‌شود. شکل ۷، زاویه تماس داربست‌های متخلخل طراحی‌شده را نشان می‌دهد. همان‌طور که مشاهده می‌شود، بیشترین زاویه تماس آب مربوط به داربست PCL است (148 ± 125.34) که بیانگر رفتار آب‌گریزی بالا و ترشوندگی ضعیف آن است. کمترین زاویه تماس و بالاترین مقدار ترشوندگی نیز برای داربست کیتوسان (199 ± 59.63) است که دلیل آن را می‌توان به حضور گروه‌های آمینی و هیدروکسیل در شبکه ساختاری آن نسبت داد. همچنین، داربست PEG با زاویه تماس 158 ± 80.01 ترشوندگی متوسطی را نشان داد. در ادامه،

طیف‌سنجی FTIR

برای بررسی ارتباط شیمیایی بین زنجیره‌های بسپاری داربست‌ها، طیف FTIR تمام نمونه‌ها گرفته شد. این طیف‌ها در شکل ۶ نشان‌داده شده است. ظهور نوارهایی در گستره 3000 تا 3500 cm^{-1} نشان‌دهنده گروه‌های OH- کششی در داربست‌های بسپاری است (شکل ۶-I). هر چند که فرکانس ارتعاش و شدت نوارها متفاوت است که دلیل آن را می‌توان به تغییر ویژگی آبدوستی داربست نسبت داد. افزون بر آن، افزایش تعداد نوارهای مربوط به گروه کششی C-H (در گستره 2800 تا 3000 cm^{-1}) برای داربست‌های هیبریدی PCP و PEPC. نشان از افزایش ارتباط زنجیره‌های بسپاری نسبت به داربست‌های تک‌بسپار (کیتوسان، PEG, PCL) است. همچنین، نوار قوی در فرکانس 1728.11 cm^{-1} که مربوط به گروه استری C=O کششی برای طیف داربست PCL است، در داربست‌های هیبریدی دو و سه تایی (PEPC و PCP) به‌شدت کاهش یافته که به احتمال به دلیل پیوند به گروه‌های C-C-O یا تشکیل پیوندهای هیدروژنی است (شکل ۶-II). در ادامه، حضور نوارهای 1117.26 cm^{-1} و 1121.81 cm^{-1} به ترتیب در داربست‌های PEPC و PCP مربوط به گروه‌های کششی C-O-C است که ارتباط زنجیره‌های PEG را با PCL و کیتوسان توجیه می‌کند (شکل ۶-III). از این‌رو، شدت این نوار اتری در داربست PEG نسبت به دو داربست چندسازه/هیبریدی یادشده، افزایش قابل توجهی دارد.

همچنین، گستره وسیع 1070 تا 1290 cm^{-1} (نوار سبز شکل) به دلیل کشش گروه C-O به‌دست آمده از ارتعاش گروه‌های C-O، C-O-C و C-O-H است که در داربست PCP (به‌دلیل



شکل ۶ مقایسه طیف‌های FTIR داربست‌های هیبریدی (PCP و PEPC) و تک‌سپاری (Chitosan، PCL و PEG)

داربست PEG است. افزودن کیتوسان و تشکیل داربست سه‌تایی PCP نیز ویژگی ترشوندگی سطح این داربست هیبریدی را نسبت به PEPC افزایش داد و منجر به کاهش $35/83$ درصدی زاویه تماس آب شده است ($2728 \pm 67/82$). نتایج به‌روشنی نشان می‌دهد که ترشوندگی کم در داربست چندسازه PEPC، با حضور کیتوسان، به ترشوندگی بالا برای داربست هیبریدی PCP تبدیل می‌شود. شایان ذکر است، اگر چه زاویه تماس داربست‌های PCP و کیتوسان هر دو زیر 90° ($90^\circ < \theta < 90^\circ$) بود، اما زمان جذب قطره آب برای کیتوسان کمتر از PCP گزارش شد که نشان‌دهنده آب‌دوستی بیشتر کیتوسان و زاویه تماس کمتر آن نسبت به داربست PCP است.

تأثیر ترکیب بسپارهای طبیعی و مصنوعی بر ویژگی ترشوندگی سطح و سرعت جذب آب، بررسی شد. نتایج نشان داد که تشکیل داربست‌های چندسازه/هیبریدی دو و سه‌تایی، به دلیل ارتباط بین زنجیره‌های بسپاری و شکل‌گیری پیوندهای هیدروژنی، ویژگی ترشوندگی داربست‌ها را بهبود می‌بخشد. به‌طوری که، ترکیب PEG_{6000} و PCL منجر به کاهش حدود $15/67$ درصدی زاویه تماس آب برای داربست چندسازه PEPC نسبت به داربست PCL شد (زاویه تماس $1798 \pm 105/69$). دلیل این نتیجه، کاهش گروه‌های آب‌گریز در شبکه ساختاری داربست PEPC است. بدیهی است که زاویه تماس آب این داربست دو‌تایی به دلیل حضور بسپار PCL در شبکه ساختاری، بیشتر از زاویه تماس

در ۲۴ ساعت اول بیشترین مقدار رشد مربوط به داربست PCP است. اگرچه تفاوت معنی‌داری بین تمام گروه‌ها با گروه کنترل مشاهده نمی‌شود ($p < 0.001$). با این حال، تفاوت چشمگیری در مقدار زنده‌ماندن سلول بین داربست‌های PEPC و PCL وجود ندارد ($p > 0.001$) و کمترین مقدار رشد سلولی در این دو داربست مشاهده شد که می‌تواند به دلیل تخلخل و آب‌دوستی کمتر آن‌ها باشد [۶۳]. این نتایج، تاییدکننده آزمون زاویه تماس آب است.

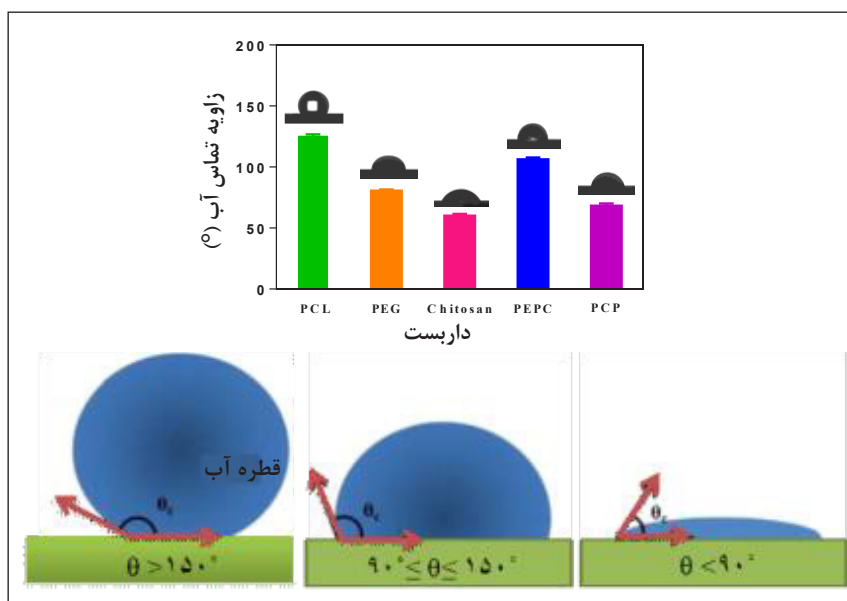
با افزایش زمان کشت، زنده‌ماندن سلول بر تمام داربست‌ها افزایش یافت (بیش از ۸۰٪). اگرچه که تفاوت معنی‌داری بین داربست PCP با سایر داربست‌ها مشاهده شد. به طوری که، تنها این داربست رشدی مشابه با گروه کنترل را نشان داد

($p > 0.001$) و می‌توان گفت مهمترین دلیل برای افزایش سازگاری زیستی داربست هیبریدی PCP، وجود همزمان سه بسیار است. به طوری که، حضور کیتوسان با ساختار پلی‌ساکاریدی و درجه استیل‌زدایی بالا منجر به افزایش چسبندگی اولیه سلول به داربست و بهبود ویژگی زیست‌سازگاری آن در مقایسه با سایر

در این زمینه بررسی‌های گوناگون نشان داده است که چسبندگی، رشد سلول‌ها در محیط‌های آب‌دوست، بسیار آسان‌تر از محیط‌های آب‌گریز (مانند PCL) یا بسیار آب‌دوست (مانند کیتوسان) است [۶۱]. از این رو، انتظار می‌رود که بیشترین و کمترین درصد زنده‌ماندن سلول به ترتیب بر داربست‌های PCP و PCL مشاهده شود.

بررسی رفتار زیست‌سازگاری

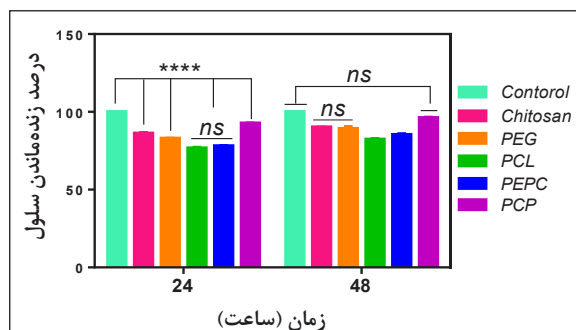
زیست‌سازگاری از مهمترین ویژگی‌های مورد نیاز برای داربست‌های مهندسی بافت به حساب می‌آید. در حقیقت، زیست‌سازگاری به معنای عدم پاسخ ایمنی یا التهابی در بدن است و چنانچه داربست طراحی شده، غیرسمی باشد، می‌توان از آن به‌عنوان گزینه درمانی مؤثر استفاده کرد [۶۲]. آزمون یادشده برای بررسی مقدار زنده‌ماندن سلول‌ها بر داربست‌های طراحی شده، به کارگرفته شد. همان‌طور که شکل ۸ نشان می‌دهد، نتایج آزمون MTT حاکی از رشد سلول بر تمام داربست‌ها است. با این حال،



شکل ۷ مقدار ترشوندگی و زاویه تماس آب با سطح داربست‌های طراحی شده (سرعت تصویر برداری ۱۰ فریم بر ثانیه (۰٫۱ s))

متخلخل هیبریدی PCP در مقایسه با داربست چندسازه PEPC، به دلیل افزایش ارتباط زنجیره‌های بسپاری و شبکه‌ای شدن بیشتر داربست، نه تنها ویژگی مکانیکی بهتری را نشان داد (ناحیه‌ی کشش مشابه با محیط‌های زیستی)، بلکه منجر به یکنواختی تخلخل در سطح داربست (به‌عنوان یکی از مشخصات بستر خارج سلولی) شد. وجود گروه‌های آب‌دوست کیتوسان و PEG با ایجاد ارتباط بیشتر بین زنجیره‌های بسپاری و افزایش پیوندهای هیدروژنی، عامل اصلی در شکل‌گیری چنین تخلخلی هستند. گرچه نقش روش تهیه داربست (خشک‌کردن انجمادی) نیز به‌دلیل آب‌دوستی ساختار آن انکارناپذیر بود. افزایش تورم‌پذیری داربست PCP به‌دلیل افزایش تخلخل‌های یکنواخت در سطح آن نسبت به سایر گروه‌های مورد مطالعه، شرایط را برای رشد سلولی مناسب می‌کرد. داربست PCP با تورم‌پذیری حدود ۴ برابری نسبت به حجم اولیه خود، هم راستا با کیتوسان عمل می‌کند. با این تفاوت که مقدار تخریب آن به‌تقریب مشابه با داربست PCL است و شرایط فیزیکی خود را در محیط آبی حفظ می‌کند. بررسی رفتار ترشوندگی داربست‌ها تایید کننده‌ی این مطلب بود. مقایسه نتایج مکانیکی این داربست با نمودار تنش- کرنش بافت نرم، الگوی به‌تقریب مشابهی را نشان داد. همچنین، اندازه منافذ و تخلخل داربست PCP مناسب رشد سلول‌های فیبروبلاست پوستی، اندوتلیال و عضله صاف عروقی بود. از این‌رو، به نظر می‌رسد با اعمال شرایط زیستی در روند کشت سلول (مانند استفاده از فاکتورهای رشد ویژه برای بقای سلول‌های خاص مانند رگ، کراتینوسیت و یا فیبروبلاست) و ایجاد محیط تمایزی خاص (مانند محیط تمایزی پوستی)، داربست گفته شده می‌تواند به طور ویژه منجر به ترمیم بافت مورد نظر (برای مثال، پوست) شود. با توجه به مقدار تورم‌پذیری، به نظر می‌رسد PCP گزینه مناسبی برای استفاده در مهندسی بافت پوست و تهیه پانسمان‌های زخم باشد. با این حال پژوهش بیشتری در این زمینه مورد نیاز است

داربست‌های مورد بررسی می‌شود که نتیجه آن ارتباط بهتر سلول- داربست است [۶۲]. همچنین، وجود PEG به‌عنوان بسپاری با ویژگی آب‌دوستی مناسب، عامل اصلی در افزایش پیوندهای متقابل بسپاری و تشکیل شبکه‌ای متخلخل برای PCP است که نقش کلیدی را برای بهبود انتقال مواد مغذی و ارتباط سلول- سلول (پیام‌دهی و مخابره‌های سلولی) ایفا می‌کند [۱۷ و ۲۷]. به‌طور مشابه، وجود PCL نیز منجر به حفظ تمامیت فیزیکی داربست در محیط کشت سلول می‌شود و مقاومت آن را در طول زمان کشت افزایش می‌دهد [۱۷ و ۲۲]. بنابراین، به نظر می‌رسد که داربست هیبریدی و متخلخل PCP به دلیل سطح بیشتر در دسترس سلول و تخلخل بالاتر، چسبندگی بهتر، بهبود اکسیژن‌رسانی و نفوذپذیری مواد مغذی، وضعیت زنده‌ماندن و رشد سلول را در مقایسه با دیگر گروه‌ها افزایش می‌دهند.



شکل ۸ وضعیت زنده‌ماندن و رشد سلول بر داربست‌های بسپاری پس از ۲۴ و ۴۸ ساعت

نتیجه‌گیری

در این پژوهش، داربست‌های متخلخل هیبریدی متشکل از چندسازه PEG/PCL و نیز شکل اصلاح‌شده آن با کیتوسان، با روش خشک‌کردن انجمادی، برای استفاده در مهندسی بافت نرم، طراحی شد. تشابه ویژگی داربست‌ها با بافت‌های نرم، بررسی شد. نتایج نشان داد که ترکیب بسپارهای طبیعی و مصنوعی، عامل مهمی در بهبود ویژگی‌های مکانیکی و فیزیکی داربست است و نقش اصلی را در ایجاد تشابه با ECM بافت دارد. داربست

مراجع

- [1] Li, W.; *J. Med. Biol. Eng.* 36, 285–307, 2016.
- [2] Daley, W.P.; Peters, S.B.; Larsen, M.; *J. Cell Sci.* 121, 255–64, 2008.
- [3] Furukawa, K.S.; "2016 International Symposium on Micro-NanoMechatronics and Human Science", Proceedings of a meeting held 28-30 November 2016, Nagoya, Japan, IEEE, Japan, 2017.
- [4] Caddeo, S.; Boffito, M.; Sartori, S.; *Front. Bioeng. Biotechnol.* 5, 1–22, 2017.
- [5] Chan, B.P.; Leong, K.W.; *Eur. Spine J.* 17, 467–479, 2008.
- [6] Samadikuchaksaraei, A.; *J. Neuroeng. Rehabil.* 4, 1–16, 2007.
- [7] Gu, H.; Liu, C.; Zhu, J.; Gu, J.; Wujcik, E.K.; Shao, L.; Wang, N.; Wei, H.; Scaffaro, R.; Zhang, J.; Guo, Z.; *Adv. Compos. Hybrid Mater.* 1, 1–5, 2018.
- [8] Bouhfid, N.; Raji, M.; Boujmal, R.; Essabir, H.; Bensalah, M.O.; Bouhfid, R.; Qaiss, A.K.; Numerical modeling of hybrid composite materials, in: "Modelling of Damage Processes in Biocomposites, Fibre-Reinforced Composites and Hybrid Composites", Chap. 5, Woodhead Publishing, U.K., 2019.
- [9] Pilia, M.; Guda, T.; Appleford, M.; *Biomed Res. Int.* 20, 1–15, 2013.
- [10] Wang, Y.; Sun, N.; Zhang, Y.; Zhao, B.; Zhang, Z.; Zhou, X.; Zhou, Y.; Liu, H.; Zhang, Y.; Liu, J.; *Sci. Rep.* 9, 7960, 2019.
- [11] Janarthanan, G.; Kim, I.G.; Chung, E.J.; Noh, I.; *Biomater. Res.* 23, 1-14, 2019.
- [12] Parmaksiz, M.; Elcin, A.E.; Elcin, Y.M.; *Mater. Sci. Eng. C. Mater. Biol. Appl.* 94, 788–797, 2019.
- [13] Zou, L.; Zhang, Y.; Liu, X.; Chen, J.; Zhang, Q.; *Colloids Surf. B. Biointerfaces.* 178, 222–229, 2019.
- [14] Setayeshmehr, M.; Esfandiari, E.; Rafienia, M.; Hashemibeni, B.; Taheri-Kafrani, A.; Samadikuchaksaraei, A.; Kaplan, D.L.; Moroni, L.; Joghataei, M.; *Tissue Eng. Part B Rev.* 18, 0245-0256, 2019.
- [15] Bagnaninchi, P.O.; Yang, Y.; El Haj, A.J.; Maffulli, N.; Bosch, U.; *Br. J. Sports Med.* 41, 10–22, 2007.
- [16] Sigal, I.R.; Grande, D.A.; Dines, D.M.; Dines, J.; Drakos, M.; *Regen. Eng. Transl. Med.* 2, 107–125, 2016.
- [17] Tang, X.; Thankappan, S.K.; Lee, P.; Fard, S.E.; Harmon, M.D.; Tran, K.; Yu, X.; *Nat. Synth. Biomed. Polym.* 31, 351–371, 2014.
- [18] Tan, H.; Marra, K.G.; *Materials* 3, 1746–1767, 2010.
- [19] Hanauer, N.; Latreille, P.L.; Alsharif, S.; Banquy, X.; *Curr. Pharm. Des.* 21, 1506–1516, 2015.
- [20] Bosworth, L.A.; Alam, N.; Wong, J.K.; Downes, S.; *J. Mater. Sci. Mater. Med.* 24, 1605–1614, 2013.
- [21] Norouzi, M.; Boroujeni, S.M.; Omidvarkordshouli, N.; Soleimani, M.; *Adv. Healthc. Mater.* 4, 1114–1133, 2015.
- [22] Wu, Q.; Li, L.; Wang, N.; Gao, X.; Wang, B.; Liu, X.; Qian, Z.; Wei, Y.; Gong, C.; *Int. J. Nanomedicine* 9, 727-734, 2014.
- [23] Alshomer, F.; Chaves, C.; Kalaskar, D.M.; *J. Mater.* 18, 1–17, 2018.
- [24] Chen, S.H.; Chen, C.H.; Shalumon, K.T.; Chen, J.P.; *Int. J. Nanomedicine.* 9, 4079–4092, 2014.
- [25] Liu, S.; Zhao, J.; Ruan, H.; Tang, T.; Liu, G.; Yu, D.; Cui, W.; Fan, C.; *Biomacromolecules.* 13, 3611–3619, 2012.

- [26] Ghasemi-Mobarakeh, L.; Prabhakaran, M.P.; Morshed, M.; Nasr-Esfahani, M.H.; Ramakrishna, S.; *Biomaterials* 29, 4532–4539, 2008.
- [27] Chen, S.L.; Fu, R.H.; Liao, S.F.; Liu, S.P.; Lin, S.Z.; Wang, Y.C.; *Cell Transplant.* 27, 275–284, 2018.
- [28] Raeber, G.P.; Lutolf, M.P.; Hubbell, J.A.; *Biophys. J.* 89, 1374–1388, 2005.
- [29] Yuksel, E.; *Semin. Plast. Surg.* 19, 261, 2005.
- [30] Reddy, R.; Reddy, N.; *J. Biomater. Sci. Polym. Ed.*; 29, 1667–1685, 2018.
- [31] Bressan, E.; Favero, V.; Gardin, C.; Ferroni, L.; Iacobellis, L.; Favero, L.; Vindigni, V.; Berengo, M.; Sivoletta, S.; Zavan, B.; *Polymers* 3, 509–526, 2011.
- [32] Stratton, S.; Shelke, N.B.; Hoshino, K.; Rudraiah, S.; Kumbar, S.G.; *Bioact. Mater.* 1, 93–108, 2016.
- [33] García, M.C.; Aldana, A.A.; Tártara, L.I.; Alovero, F.; Strumia, M.C.; Manzo, R.H.; Martinelli, M.; Jimenez-Kairuz, A.F.; *Carbohydr. Polym.* 175, 75–86, 2017.
- [34] Younes, I.; Rinaudo, M.; *Mar. Drugs.* 13, 1133–1174, 2015.
- [35] Huang, R.; Li, W.; Lv, X.; Lei, Z.; Bian, Y.; Deng, H.; Wang, H.; Li, J.; Li, X.; *Biomaterials.* 53, 58–75, 2015.
- [36] Shalumon, K.T.; Anulekha, K.H.; Chennazhi, K.P.; Tamura, H.; Nair, S.V.; Jayakumar, R.; *Int. J. Biol. Macromol.* 48, 571–576, 2011.
- [37] Du, T.; Chen, Z.; Li, H.; Tang, X.; Li, Z.; Guan, J.; Liu, C.; Du, Z.; Wu, J.; *Int. J. Biol. Macromol.* 82, 580–588, 2016.
- [38] Liu, X.; Dan, N.; Dan, W.; Gong, J.; *Int. J. Biol. Macromol.* 82, 989–997, 2016.
- [39] Volpi, N.; Schiller, J.; Stern, R.; Soltes, L.; *Curr. Med. Chem.* 16, 1718–1745, 2009.
- [40] Lam, J.; Truong, N.F.; Segura, T.; *Acta Biomater.* 10, 1571–1580, 2014.
- [41] Dicker, K.T.; Gurski, L.A.; Pradhan-Bhatt, S.; Witt, R.L.; Farach-Carson, M.C.; Jia, X.; *Acta Biomater.* 10, 1558–1570, 2014.
- [42] Klein, S.; Aung, T.; Haas, R.M.; Medved, F.; Schiller, S.M.; Felthaus, O.; Dolderer, J.H.; *Handchir. Mikrochir. Plast. Chir.* 50, 83–92, 2018.
- [43] Maeda, N.; Miao, J.; Simmons, T.J.; Dordick, J.S.; Linhardt, R.J.; *Carbohydr. Polym.* 102, 950–955, 2014.
- [44] Yong Lee, K.; Jeong, L.; Ok Kang, Y.; Lee, S.J.; Park, W.H.; *Adv. Drug Deliv. Rev.* 61, 1020–1032, 2009.
- [45] Park, Y.R.; Ju, H.W.; Lee, J.M.; Kim, D.K.; Lee, O.J.; Moon, B.M.; Park, H.J.; Jeong, J.Y.; Yeon, Y.K.; Park, C.H.; *Int. J. Biol. Macromol.* 93, 1567–1574, 2016.
- [46] Zhao, X.; Sun, X.; Yildirimer, L.; Lang, Q.; Lin, Z.Y. (William); Zheng, R.; Zhang, Y.; Cui, W.; Annabi, N.; Khademhosseini, A.; *Acta Biomater.* 49, 66–77, 2017.
- [47] Sachlos, E.; Czernuszka, J.T.; Gogolewski, S.; Dalby, M.; *Eur. Cells Mater.* 5, 29–40, 2003.
- [48] Loh, Q.L.; Choong, C.; *Tissue Eng. Part B Rev.*, 19, 485–502, 2013.
- [49] Salem, A.K.; Stevens, R.; Pearson, R.G.; Davies, M.C.; Tendler, S.J.B.; Roberts, C.J.; Williams, P.M.; Shakesheff, K.M.; *J. Biomed. Mater. Res.* 61, 212–217, 2002.
- [50] Zeltinger, J.; Sherwood, J.K.; Graham, D.A.; Müller, R.; Griffith, L.G.; *Tissue Eng.* 7, 557–572, 2001.
- [51] O'Brien, F.J.; Harley, B.A.; Yannas, I.V.; Gibson, L.J.; *Biomaterials.* 26, 433–441, 2005.
- [52] Verma, D.; Katti, K.S.; Katti, D.R.; *Philos. Trans. R. Soc. A Math. Phys. Eng. Sci.* 368,

- 2083–2097, 2010.
- [53] Rodríguez-Vázquez, M.; Vega-Ruiz, B.; Ramos-Zúñiga, R.; Saldaña-Koppel, D.A.; Quiñones-Olvera, L.F.; *Biomed Res. Int.* 15, 1–15, 2015.
- [54] Lee, S.H.; Lee, J.H.; Cho, Y.S.; *Tissue Eng. Regen. Med.* 11, 446–452, 2014.
- [55] Mahanani, E.S.; Herningtyas, E.H.; Bachtiar, I.; Ana, A.D.; *AIP Conf. Proc.* 1755, 1–8, 2016.
- [56] Vazquez, O.R.; Avila, I.O.; Díaz, J.C.S.; Hernandez, E.; *J. Res. Updat. Polym. Sci.* 4, 168–178, 2016.
- [57] Zhang, M.; Zheng, Y.P.; Mak, A.F.T.; *Med. Eng. Phys.* 19, 512–517, 1997.
- [58] Cox, T.R.; Erler, J.T.; *Dis. Model. Mech.* 4, 165–178, 2011.
- [59] Pal, S.; *Des. Artif. Hum. Joints Organs.* 97, 1–419, 2014.
- [60] Lin, Y.J.; Cai, Q.; Li, Q.F.; Xue, L.W.; Jin, R.G.; Yang, X.P.; *J. Appl. Polym. Sci.* 115, 3393–3400, 2010.
- [61] Menzies, K.L.; Jones, L.; *Optom. Vis. Sci.* 87, 387–399, 2010.
- [62] He, Y.; Lu, F.; *Stem Cells Int.* 16, 1–12, 2016.
- [63] Yin, H.M.; Qian, J.; Zhang, J.; Lin, Z.F.; Li, J.S.; Xu, J.Z.; Li, Z.M.; *Polymers* 8, 213–225, 2016.

Design of hybrid porous scaffold based on PEPC composite modified with chitosan to apply in soft tissue engineering: Evaluation of structural similarities and mechanobiological behavior

Azadeh Izadyari Aghmiuni¹, Mazyar Sharifzadeh Baei^{2,*}, Saeed Heidari keshel³, Azim Akbarzadeh Khiyavi⁴

1. PhD.student in Department of Chemical Engineering, Ayatollah Amoli Branch, Islamic Azad University, Amol, Iran.

2. Associate Prof. in Department of Chemical Engineering, Ayatollah Amoli Branch, Islamic Azad University, Amol, Iran.

3. Assistant Prof. in Department of Tissue Engineering and Applied Cell Science, Shahid Beheshti University of Medical Sciences, Tehran, Iran.

4. Proffesor of Nanobiotechnology, Department of Nanobiotechnology, Pasteur Institute of Iran, Tehran, Iran.

Recieved: February 2019, Revised: June 2019, Accepted: July 2019

Abstract: Nowadays, tissue engineering is known as one of the effective treatments to repair soft and hard tissues; although, the design of the substrates that mimic the cell growth pattern and mechanobiological function of tissue is a great challenge. In the present study, to evaluate the role of natural and synthetic polymers combination in mimicking biological environment, the porous scaffolds of PEPC (PEG/PCL), and PCP (PEG/Chitosan/PCL) were designed by the freeze-dried method. Then, the physicochemical, mechanical and biological properties of the mentioned scaffolds were evaluated and compared with those of designed scaffolds (Chitosan, PEG, PCL). The results showed that the combination of polymers (natural/synthetic) plays a major role in the formation of micro-porous media and extracellular matrix-like elasticity. So that, the PCP hybrid scaffold provided a higher porosity (with lower pores diameter) and elastic modulus of soft tissue-like (5.11 MPa), compared to PEPC composite scaffold. Moreover, the presence of chitosan in PCP scaffold led to an increase in the swelling, the control of degradation rate, and improvement of cell proliferation (96%) as compared to other groups. Therefore, it seems that PCP hybrid scaffold can play an important role in tissue regeneration via mimicking morphology and mechanobiological behaviors of soft tissues such as skin, ligament, endothelium, and blood vessels.

Keywords: Soft tissue engineering, Natural polymers, Hybrid scaffolds, Micro-porous media