

مقاله پژوهشی

الکترورسی ژلاتین با غلظت بالا و اتصال عرضی آن از طریق واکنش میلارد برای کاربرد در ساخت داربست‌های مهندسی بافت

نوشین زندی^۱، محمد علی شکرگزار^۲، الناز تمجید^۳ و عبدالرضا سیم‌چی^{۴*}

۱- پژوهشکده علوم و فناوری نانو، دانشگاه صنعتی شریف، تهران، ایران

۲- بانک سلولی ایران، انستیتو پاستور ایران، تهران، ایران

۳- دانشکده نانویوتکنولوژی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران

۴- دانشکده مهندسی و علم مواد، دانشگاه صنعتی شریف، تهران، ایران

تاریخ ثبت اولیه: ۱۳۹۸/۰۷/۱۹، تاریخ دریافت نسخه اصلاح شده: ۱۳۹۸/۰۹/۲۸، تاریخ پذیرش قطعی: ۱۳۹۸/۱۰/۲۷

چکیده

در این مطالعه، با استفاده از افزودن حلال آلی غیر پروتونی دی متیل فراماید (DMF) با هدف کاهش کشش سطحی محلول ژلاتینی با غلظت بالا (۲۰ wt.%) و همچنین کاهش مقدار حلال اسیدی استفاده شد. با تغییر نسبت سه نوع حلال آب/دی متیل فراماید/فرمیک اسید، مقدار بهینه این حلال‌ها برای انجام الکترورسی محلول ژلاتین تعیین شد. تصاویر FESEM نشان داد که اندازه متوسط الیاف ژلاتینی در شرایط بهینه در حدود 122 ± 35 nm است. تصاویر FESEM الیاف پس از اتصال عرضی، تشکیل ساختار شبکه‌ای را نشان داد. بررسی پایداری ساختار الیاف الکترورسی شده در زمان‌های ۷، ۱۴ و ۲۱ روز پس از قرار گرفتن در محیط کشت سلول (DMEM) نشان داد که الیاف الکترورسی شده پس از اتصال عرضی می‌توانند پایدار بمانند در صورتی که قبل از اتصال عرضی حتی در اثر برخورد بخار آب کاملاً تخریب شدند. همچنین بررسی تخریب دمایی الیاف الکترورسی شده در حضور گلوکز به عنوان عامل اتصال دهنده عرضی نشان داد که در دمای 450°C مقدار ۳۹/۴۹٪ از وزن اولیه نمونه باقی می‌ماند و این در حالی است که مقدار نمونه باقیمانده در این دما برای الیاف بدون اتصال عرضی تنها ۴/۸٪ است.

واژه‌های کلیدی: ژلاتین، گلوکز، نانوالیاف، واکنش میلارد، الکترورسی، داربست.

۱- مقدمه

عنوان مهندسی بافت را بوجد آورده است. برای ایجاد یک بافت زنده به داربست مناسب نیاز است تا بتوان سلول‌ها را به سمت تشکیل بافت مورد نظر هدایت کند [۱، ۲]. بنابراین گروه‌های تحقیقاتی مختلفی با طراحی داربست‌های سلولی برای ایجاد بافت زنده در جهت پیشرفت در این زمینه تلاش می‌کنند. داربست‌ها می‌توانند طبیعی، مصنوعی یا ترکیبی از

روش‌های مختلف پیوند بافت با هدف ترمیم عملکرد بافت آسیب دیده استفاده گسترده‌ای پیدا کرده است. با این وجود، بروز مشکلاتی از جمله پس زده شدن، عفونت، شکستگی و جابجایی بافت در طول زمان نیاز به یک راه‌حل جدید تحت

* عهده‌دار مکاتبات: عبدالرضا سیم‌چی

نشانی: تهران، دانشگاه صنعتی شریف، دانشکده مهندسی و علم مواد

تلفن: ۰۲۱-۶۶۱۶۵۲۲۶، دورنگار: ۰۲۱-۶۶۱۶۰۰۵۷، پست الکترونیکی: simchi@sharif.edu

این دو باشند. پس از کاشت آن داخل بدن، سلول‌های زنده می‌توانند به داخل داربست مهاجرت کنند و به سلول‌های کاملاً تمایز یافته مورد نظر تبدیل شوند. در مهندسی بافت در ابتدا یک ساختار متخلخل به عنوان بافت ماتریکس خارج سلولی (ECM) یا داربست برای رشد سلول‌ها تهیه شده و سپس عوامل رشد بر روی آن قرار می‌گیرد. پس از رشد مناسب سلول‌ها در فضای تخلخل‌ها، داربست از محیط آزمایشگاه به درون بدن موجود زنده منتقل می‌شود [۳،۴].

در سال‌های اخیر مشخص شده است که نانوالیاف الکتروریسی شده پلیمری پتانسیل بالایی به عنوان مواد پوشاننده برای ترمیم زخم دارند. این مواد دارای تخلخل بالایی هستند که حاوی منافذ از درون به هم پیوسته می‌باشند و آنها را به ساختاری مناسب برای مواد ترشح شده از زخم تبدیل می‌کند [۵]. منافذ کوچک و نسبت سطح به حجم بالای آنها مانع از هجوم میکروارگانیسم‌ها شده و به خشک شدن زخم کمک می‌کند. به علاوه، مواد ضد باکتریایی و سایر عوامل درمانی می‌توانند در ساختار الیاف پلیمری وارد شوند و نانوالیاف‌های تابعی را تولید کنند [۶].

ژلاتین پروتئینی است که از هیدرولیز پوست حیوانات بدست می‌آید و زیست پلیمری است که به راحتی در آب حل می‌شود. الیاف ژلاتین با قطر زیر میکرون می‌توانند محیط ECM را شبیه‌سازی کنند. این الیاف در مهندسی بافت به دلیل زیست‌سازگاری مطلوب، منشا بیولوژیکی، زیست تخریب پذیری و عدم پاسخدهی سیستم ایمنی بدن به صورت وسیعی استفاده می‌شود [۷]. خواص مکانیکی الیاف ژلاتینی را می‌توان با اتصال عرضی آنها بهبود بخشید [۸]. ژلاتین منبع متفاوت از کلاژن است که به دلیل قیمت پایین تر آن نسبت به کلاژن و دسترس پذیری آسان تر آن در مهندسی بافت استفاده می‌شود [۳،۹]. ژلاتین نسبت به کلاژن داربست‌های بهتری را برای مهندسی بافت فراهم می‌آورد که دلیل آن قیمت پایین تر، منشا طبیعی و خواص جذب و نگهداری آب است [۹]. علاوه بر این ژلاتین محلول در آب است و قابلیت اتصال عرضی را با روش‌های فیزیکی و شیمیایی دارد و بنابراین

می‌توان خواص مکانیکی الیاف الکتروریسی حاصل از آن را تنظیم کرد [۱۴-۱۰]. همانطور که گفته شد ژلاتین حلالیت بالایی در محلول‌های آبی دارد و بنابراین نیازمند اتصال عرضی است تا از حلالیت آن‌ها در محیط‌های بیولوژیکی جلوگیری شود [۱۲]. لذا از انواع مختلف روش‌های شیمیایی، فیزیکی و آنزیمی برای اتصال عرضی (Crosslinking) آن استفاده شده است. گلو تار آلدهید [۱۰]، ژنپین [۱۵] و EDC (1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl) carbodiimide hydrochloride) از جمله این عوامل اتصال دهنده شیمیایی پرکاربرد در این زمینه محسوب می‌شوند [۱۶]. مطالعات نشان داده است که اتصال عرضی الیاف ژلاتینی نه تنها سبب کاهش حلالیت می‌شود بلکه خواص مکانیکی و مدول برشی الیاف بر پایه ژلاتین را ارتقا می‌دهد [۱۷،۱۸].

گلوکز مزیت‌های زیادی مانند زیست‌سازگاری، غیرسمی بودن و به صرفه بودن از لحاظ اقتصادی نسبت به سایر مواد اتصال دهنده عرضی از طریق شیمیایی را دارد [۱۹]. برای اینکه گلوکز بتواند به صورت موثری به عنوان عامل اتصال دهنده عرضی استفاده شود باید به فرم خطی باشد در صورتی که حدود ۹۹٪ مولکول‌های گلوکز به شکل حلقه بسته هستند. قندها و آمینو اسیدها در دمای بالا از طریق واکنش میلارد برهمکنش می‌کنند. در واقع قابلیت حلالیت ژلاتین از طریق برقراری اتصال عرضی بین زنجیره‌های پلیمری صورت می‌گیرد. در حالی که اکثر اتصال دهنده‌های عرضی علاوه بر اینکه از قیمت بالایی برخوردار هستند، زیست‌سازگارترین نوع اینگونه مواد هم دارای درصدی از سمیت و اثرات منفی بر روی سلول می‌باشند. به عنوان مثال نشان داده شده است که EDC می‌تواند توانایی تکثیر فیبروبلاست‌ها را کاهش دهد [۲۰]. یکی دیگر از اتصال دهنده‌های عرضی گلو تار آلدهید است که به دلیل سرعت انجام اتصالات عرضی با گروه‌های آمین نوع اول، به صورت معمول در کارهای آزمایشگاهی مورد استفاده قرار می‌گیرد. در طول تخریب زیستی داربست، گلو تار آلدهید رهایش می‌یابد و ایجاد سمیت می‌کند [۱۵]. پرکاربردترین اتصال دهنده‌های

۲-۲- فرآیند الکترورسی

دستگاه الکترورسی محصول شرکت نانو آزما برای انجام فرآیند الکترورسی استفاده شد. محلول ژلاتین در مخلوطی از حلال‌های آب دیونیزه/فرمیک اسید/دی متیل فرمامید (W:FA:DMF) با تغییر نسبت حلال‌های مورد استفاده و در دمای محیط تهیه شد. ژلاتین ۲، ۵، ۱۰ و ۲۰ wt.% با ۵ wt.% گلوکز مخلوط شد و الکترورسی با تغییر ولتاژ، فاصله بین نازل و جمع کننده و همچنین سرعت تزریق مواد در دمای محیط به مدت ۵ ساعت انجام شد. درصدهای بالاتر گلوکز سبب شکنندگی الیاف الکترورسی حاصل می‌شود به همین دلیل مقدار ۵ wt.% جهت انجام اتصال عرضی استفاده شد.

۲-۳- اتصال عرضی الیاف الکترورسی شده ژلاتینی

الیاف الکترورسی شده به مدت ۳ h ساعت در رنج دمای $173 \pm 2^\circ \text{C}$ در داخل آون قرار داده تا عمل اتصال عرضی انجام شود. در نهایت الیاف از روی جمع کننده برداشته شد و برای مطالعات بعدی در داخل دسیکاتور نگهداری شد.

۲-۴- تصویربرداری میکروسکوپ الکترونی روبشی

ریزساختار الیاف الکترورسی شده ژلاتینی قبل و بعد از اتصال عرضی از طریق تصاویر میکروسکوپ الکترونی FESEM (MIRA3TESCAN-XMU) بررسی شد. برای این منظور لایه‌ای از الیاف الکترورسی شده به مدت ۵ دقیقه با مولفه‌های مشخص بر روی فویل آلومینیومی جمع‌آوری شدند، سپس با استفاده از دستگاه اسپاترینگ، لایه‌ای از طلا به ضخامت ۵ nm بر روی نمونه‌های الکترورسی شده نشانده شد تا هدایت الکتریکی نمونه‌ها برای انجام تصویربرداری تامین شود. تصاویر SEM با ولتاژ ۱۷ kV از نمونه‌ها انجام شد. شکل ۱ نحوه انجام فرآیند الکترورسی را نشان می‌دهد.

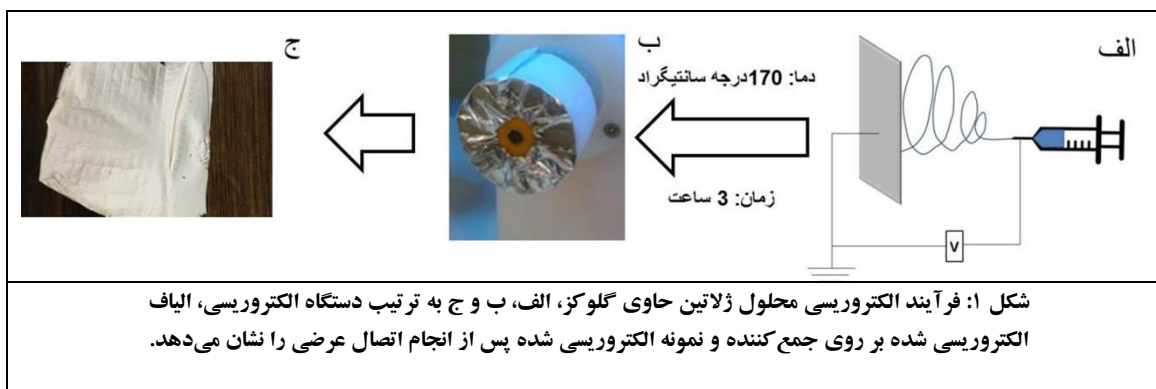
عرضی با مشکل ایجاد سمیت مواجه هستند بنابراین برای کاربردهای زیست پزشکی مناسب نیستند [۲۱]. حضور قندها می‌تواند ساختار فضایی پروتئین را تغییر داده و نتیجه آن واکنش میلارد است که موجب اتصال عرضی زنجیره‌های پلیمری می‌شود. بنابراین افزودن قند به داربست ژلاتینی می‌تواند به افزایش خواص مکانیکی الیاف از طریق کنترل اتصال عرضی عمل نماید [۲۲].

در این پژوهش الکترورسی ژلاتین با غلظت بالا در حلال آب و با حضور کمک حلال DMF و FA انجام شده است تا ساختار ژلاتین کمتر دستخوش تخریب شود و در عین حال این الیاف در دمای محیط الکترورسی شوند. شرایط مناسب برای مولفه‌های محلول مانند غلظت و همچنین مولفه‌های الکترورسی از جمله سرعت تزریق مواد، میزان ولتاژ و فاصله نازل تا جمع کننده بهینه شده است و پس از مشاهده نمونه‌های الکترورسی شده به صورت چشمی و سپس میکروسکوپ الکترونی عبوری، از طریق تصویربرداری FESEM و TEM بررسی شد. در نهایت کاهش حلالیت الیاف الکترورسی شده ژلاتینی از طریق اتصال عرضی توسط گلوکز بررسی شد. ریزساختار الیاف الکترورسی شده پس از اتصال عرضی بوسیله تصویربرداری FESEM مطالعه شد. در نهایت جهت بررسی اثر پایداری دمایی الیاف ژلاتینی پس از اتصال عرضی توسط گلوکز، از آزمون تخریب حرارتی (TG) استفاده شد.

۲- فعالیت‌های تجربی

۲-۱- مواد مصرفی

ژلاتین گاوی نوع A، D-گلوکز، فرمیک اسید و دی متیل فرمامید مصرف شدند. تمام مواد از شرکت سیگما آلدریج خریداری شدند.



شکل ۱: فرآیند الکترورسی محلول ژلاتین حاوی گلوکز، الف، ب و ج به ترتیب دستگاه الکترورسی، الیاف الکترورسی شده بر روی جمع کننده و نمونه الکترورسی شده پس از انجام اتصال عرضی را نشان می دهد.

۲-۵- تصویربرداری میکروسکوپ الکترونی عبوری (TEM)

برای تهیه تصاویر میکروسکوپ الکترونی عبوری از نانوالیاف، از میکروسکوپ مدل (Misonix, USA) استفاده شد. برای تهیه نمونه ابتدا الیاف به مدت ۲۰ ثانیه گرید مخصوص TEM الکترورسی شد و سپس از آن تصویر TEM گرفته شد.

۲-۶- آزمون بررسی تخریب دمایی (TGA)

آزمون TGA نانوالیاف با استفاده از دستگاه آنالیز حرارتی (Universal Netzsch 204 F1 (Phoenix, AZ)) انجام شد. برای انجام این آزمون، ۵ میلی گرم از نمونه الیاف با سرعت $10^{\circ}\text{C}/\text{min}$ در محدوده دمایی $25-600^{\circ}\text{C}$ تحت گرمایش قرار داده شد.

۳- نتایج و بحث

در فرآیند الکترورسی الیاف ژلاتینی سعی شد تا از کمترین مقدار حلال اسیدی که احتمال تخریب زنجیره های پلیمری ژلاتین را فراهم می کند، استفاده شود. بنابراین محلول های متفاوتی که حاوی نسبت های مختلف از حلال های W:FA:DMF هستند، تهیه شد. ژلاتین به تنهایی در داخل حلال آب بعد از مدت زمان کوتاهی در دمای محیط (حدود 25°C) به صورت ژل درمی آید و کشش سطحی قطره تشکیل شده در سر نازل به اندازه ای است که امکان تشکیل

قطره پایدار برای انجام الکترورسی وجود ندارد. همانطور که در شکل (الف-ج) تصاویر FESEM حاصل از الکترورسی ژلاتین با غلظت های ۲، ۵، و ۱۰ wt.% در حلال آب نشان می دهد که در همه نمونه ها الیاف حاصل نشده است. غلظت بالاتر ژلاتین در آب (۲۰ wt.%) سریعاً به شکل ژل درآمده و امکان تهیه محلول در دمای محیط وجود ندارد. با استفاده از حلال های غیر پروتونی آلی مانند DMF می توان کشش سطحی محلول را تا حد زیادی کم کرد. اما مشکل ایجاد جت ناپایدار طی الکترورسی به دلیل گرانش بالای محلول اتفاق می افتد و سبب می شود که ساختار الیاف همزمان با پاشش اتفاق بیافتد که در شکل ۲د نشان داده شده است. از طرفی محلول پس از چند دقیقه نازل را مسدود می کند، در نتیجه محلول باید تا دمای حدود 40°C گرما داده شود تا انسداد نازل برطرف شود. برای حل این مشکل سعی شد کمترین مقدار FA برای تهیه محلول با قابلیت الکترورسی استفاده شود تا جت پایدار و ساختار الیاف بدون پاشش حاصل شود. ترکیب حلال برای نمونه های مختلف الکترورسی در جدول ۱ به ترتیب آمده است. نتایج حاصل از الکترورسی نشان می دهد که محلول ژلاتین و گلوکز در نسبت های متفاوت از حلال های (W:FA:DMF)، بهترین نسبت حجمی حلال به صورت ۵۰:۲۵:۲۵ است که الیاف الکترورسی شده یکدست و بدون پاشش در ساختار الیاف را حاصل می کند. بنابراین مخلوطی از حلال ها با نسبت حجمی ذکر شده برای تهیه الیاف الکترورسی شده بدون پاشش و

همزمان از FA و DMF سبب شده است که الیافی با میانگین قطر کمتر از ۲۰۰ nm حاصل شود که در شکل ۲ نشان داده شده است. تصویر TEM حاصل از الیاف الکترورسی شده در شرایط بهینه الکترورسی که در شکل (۲ح) نشان داده شده است، به وضوح تشکیل الیاف همگن را تایید می کند.

جدول ۱: ترکیب حلال در نمونه‌های مختلف الکترورسی شده.

نمونه	درصد وزنی ژلاتین (wt.%)	نسبت حجمی حلال‌ها (%) W:FA:DMF	نتیجه
۱	۲	۱۰۰:۰:۰	پاشش
۲	۵	۱۰۰:۰:۰	پاشش
۳	۱۰	۱۰۰:۰:۰	پاشش
۴	۲۰	۱۰۰:۰:۰	ژل شدن محلول و عدم امکان برای انجام الکترورسی در دمای محیط
۵	۲۰	۵۰:۰:۵۰	الیاف/پاشش
۶	۲۰	۲۵:۲۵:۵۰	الیاف کاملاً همگن

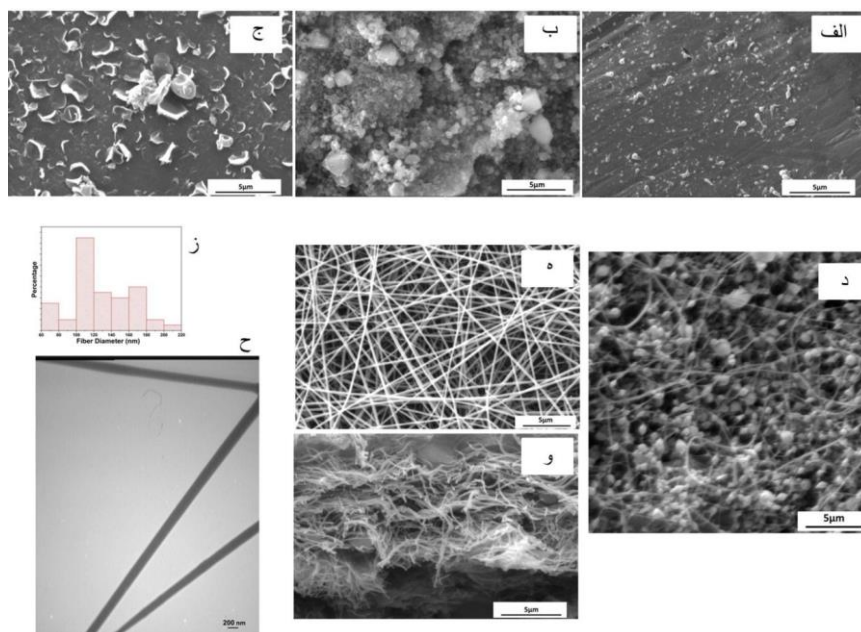
واکنش میلارد که بین قندها و آمینو اسیدها انجام می گیرد، مشخصه آن تغییر رنگ در ماده است که اصطلاحاً آن را "واکنش قهوه‌ای شدن میلارد" می گویند (شکل ۴) [۲۴]. شدت تغییر رنگ به درصد قند بستگی دارد به این صورت که با افزایش درصد قند، شدت رنگ قهوه‌ای شدیدتر می شود. همانطور که در شکل (۳الف و ب) نشان داده شده است، تغییر رنگ بسیار ملایمی که حاصل از انجام واکنش میلارد پس از اتصال عرضی الیاف مشاهده می شود. همانطور که در شکل (۳ج) نشان داده شده است، عملیات دمایی تاثیر قابل توجهی روی ساختار و تخلخل الیاف ندارد و این یکی از مزیت‌های استفاده از گلوکز نسبت به سایر تکنیک‌های اتصال دهنده عرضی است (به عنوان مثال برقراری اتصال بین زنجیره‌های پلیمری از طریق گلو تار آلدهید) که علاوه بر بروز سمیت سلولی، بر روی ریزساختار الیاف نیز ممکن است تغییراتی ایجاد کند [۱۵].

ایجاد بید در محدوده وسیعی از مولفه‌های دستگامی مانند ولتاژ، سرعت تزریق و فاصله تهیه شد.

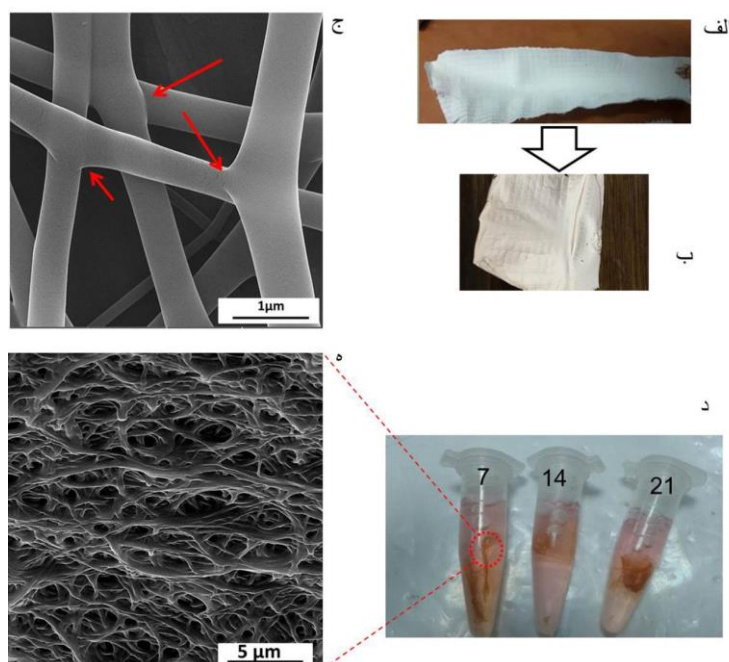
تصویر FESEM (شکل ۵) الیاف الکترورسی شده را در ترکیبی از حلال‌های ذکر شده را نشان می دهد که در ولتاژ ۱۷ کیلو ولت، سرعت تزریق ۰/۵ میلی لیتر بر ساعت و فاصله نازل تا جمع کننده ۱۲ cm انجام شده است. همچنین شکل (۲و) تصویری از مقطع عرضی الیاف را نشان می دهد. تصویر مقطع عرضی الیاف الکترورسی شده نشان دهنده ساختار دارای تخلخل بالا است و به صورت همگن در تمام بخش‌های زیرین لایه الیاف الکترورسی شده است. نمودار هیستوگرام (شکل ۲و) پراکندگی اندازه قطر نانوالیاف نشان می دهد. قطر متوسط الیاف در حدود 122 ± 35 nm است.

مطالعات زیادی بر روی الکترورسی ژلاتین صورت گرفته است. به عنوان مثال Aoki و همکارانش در مطالعه‌ای مشابه الیاف ژلاتین را در مخلوطی از حلال‌های آلی و آبی انجام دادند [۱۰]. نتایج تصاویر SEM نشان داده است که قطر متوسط الیاف الکترورسی شده ژلاتینی در ترکیبی از آب و DMF با نسبت ۵۰:۵۰ بیشتر از ۲۰۰ nm است. همچنین Gaudio و همکارانش در مطالعه‌ای ژلاتین با غلظت ۱۴ wt% را در مخلوطی از آب و استیک اسید الکترورسی کردند و الیافی با میانگین قطر ۲۲۰ نانومتر را بدست آوردند [۲۳].

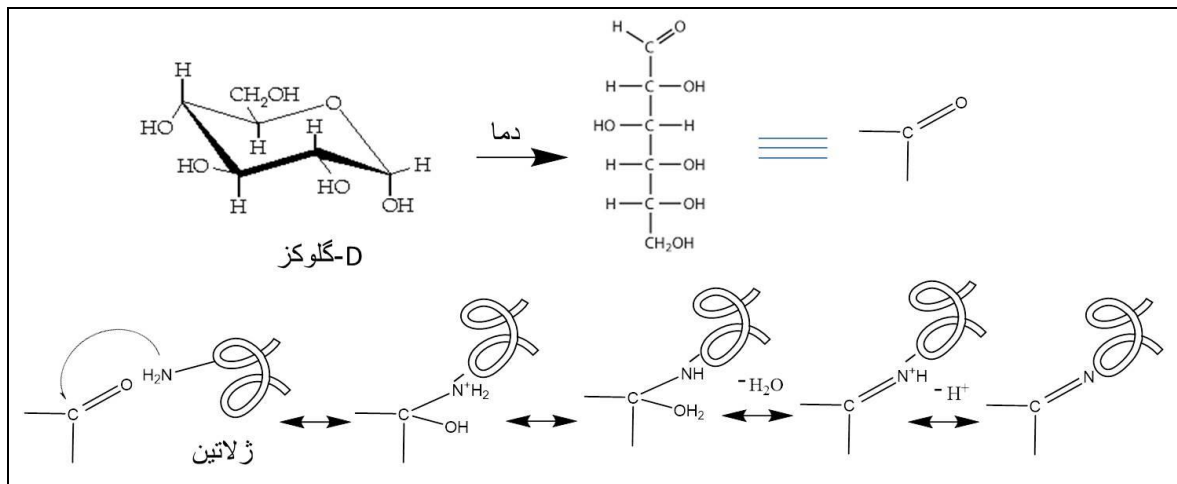
با توجه به اینکه در مطالعه حاضر از کمک حلال آلی غیر پروتونی استفاده شده است بنابراین، از شکل گیری پیوند هیدروژنی بین زنجیره‌های پلیمر ژلاتین تا حد زیادی جلوگیری به عمل می آید و این سبب پایدار ماندن حالت "سل" محلول ژلاتین می شود. از آنجا که برای الکترورسی محلول پلیمری، ولتاژ اعمال شده باید بر کشش سطحی محلول غلبه کند در نتیجه گرانشی بالای محلول علاوه بر آنکه سبب ایجاد الیاف با قطر میکرومتری می شود بلکه باعث جلوگیری از الکترورسی شدن راحت محلول می گردد. استفاده از حلال فرمیک اسید سبب کاهش گرانشی محلول پلیمری می شود. بنابراین اثر هم افزایی مربوط به استفاده



شکل ۲: تصاویر SEM و TEM نمونه‌های الکترورسی شده. الف، ب و ج به ترتیب تصویر SEM محلول ژلاتین در آب با غلظت‌های ۰٫۲، ۵ و ۱۰ wt.%، (د) الیاف الکترورسی شده ژلاتین ۲۰ wt.% در مخلوطی از آب و DMF با نسب حجمی ۵۰:۵۰ درصد، (ه) و (و) به ترتیب، الیاف الکترورسی شده در مخلوطی از حلال‌های W:FA:DMF با نسبت حجمی ۵۰:۲۵:۲۵ درصد و تصویر مقطع عرضی آن، (ز) نمودار پراکنده‌گی اندازه الیاف تولید شده و (ح) تصویر TEM الیاف در شرایط بهینه الکترورسی.



شکل ۳: اتصال عرضی الیاف الکترورسی شده با گلوکز، (الف و ب) به ترتیب تصویر الیاف الکترورسی شده قبل و بعد از اتصال عرضی است، (ج) تصویر FESEM الیاف بعد از اتصال عرضی، (د) الیاف الکترورسی شده داخل محیط کشت سلول به مدت ۷، ۱۴ و ۲۱ روز و (ه) FESEM الیاف الکترورسی شده بعد از قرار گرفتن در محیط کشت سلول.



شکل ۴: واکنش بین گروه کربونیل قندها با گروه آمین از آمینو اسید (مانند ژلاتین) [۲۵].

حاوی حلال‌های آبی هستند، یکی از چالش‌های بسیار مهم است. برای نشان دادن قابلیت گلوکز در ایجاد اتصال عرضی همانطور که در شکل (۳) نشان داده شده است، قبل از انجام اتصال عرضی کاملاً در آب حل ولی بعد از آن نامحلول است و به صورت پایدار داخل حلال باقی می‌ماند. تصویر FESEM الیاف الکتروریسی شده بعد از اتصال عرضی توسط گلوکز و قرار گرفتن در محیط کشت سلول به مدت ۲۴ ساعت در شکل (۴) نشان داده شده است. الیاف الکتروریسی شده ساختار شبکه‌ای خود را بعد از قرار گرفتن داخل محیط کشت حفظ می‌کنند.

به منظور بررسی اثر اتصال عرضی پلیمر ژلاتین توسط گلوکز، رفتار تخریب حرارتی نمونه الیاف اتصال عرضی داده شده و بدون اتصال عرضی مورد مطالعه قرار گرفت. نمودار مربوط به تخریب حرارتی الیاف ژلاتینی در محدوده دمایی بین ۲۵ °C تا ۶۰۰ °C که در حضور گاز نیتروژن انجام شد که در شکل (۵) نشان داده شده است. پدیده‌هایی از قبیل حذف آب موجود در نمونه‌ها، تخریب مواد و همچنین خاکستر باقیمانده از مواد در طول فرآیند تخریب دمایی برای هر دو نمونه تحت مطالعه اتفاق می‌افتد. پدیده‌های تخریب دمایی برای نمونه‌های اتصال عرضی داده شده توسط گلوکز و بدون اتصال عرضی، مشابه است اما نمونه الیاف بدون

همچنین نشان داده شده است که استفاده از این نوع اتصال دهنده سبب ایجاد پایداری بلند مدت داخل محیط آبی نمی‌شود مگر اینکه از غلظت‌های خیلی بالا استفاده شود که آن هم با مشکل ایجاد سمیت مواجه می‌شود [۲۶]. علاوه بر این از اتصال دهنده‌های دیگری که زیست‌سازگاری بالاتری دارند در مطالعات مختلف بررسی شده‌اند که نتایج حاصل از آن‌ها نشان داده است الیاف الکتروریسی شده پس از قرار گرفتن در داخل محیط آبی در همدیگر نفوذ می‌کنند و شکل الیاف از بین می‌رود [۲۷، ۲۸].

واکنش میلارد و اتصالات مولکولی بین زنجیره‌های پلیمری، باعث اتصال الیاف در تماس با همدیگر می‌شود. تشکیل این اتصالات باعث می‌شود الیافی که قبل از واکنش میلارد به اصطلاح به شکل غیر یافته شده بودند، اکنون این اتصالات شبکه‌ای را ایجاد کرده و ساختار حاصل به جای حل شدن داخل آب، ساختار متخلخل آن مولکول‌های آب را داخل خود جذب کنند.

ژلاتین زیست پلیمری محلول در آب است و هنگامی که به شکل نانو ساختار (الیاف) درمی‌آید به دلیل افزایش نسبت سطح به حجم ساختار حاصل، حجم بالایی از مولکول‌های آب جذب سطح شده و حلالیت بسیار بالا می‌رود، بنابراین کنترل قابلیت انحلال الیاف ژلاتینی در کاربردهای زیستی که

بطور خلاصه استفاده از گلوکز به عنوان عامل اتصال دهنده عرضی پلیمر ژلاتین مزیت‌های زیر را دارد:

- برقراری اتصال عرضی کوالانسی و امکان تهیه الیاف الکتروریس ژلاتینی غیرمحلول در داخل حلال‌های آبی
- حذف خطر سمیت اتصال دهنده‌های متداول مانند گلوکز آلدهید
- اضافه نمودن قدرت آنتی اکسیدانی به داربست حاصل از الیاف الکتروریسی شده

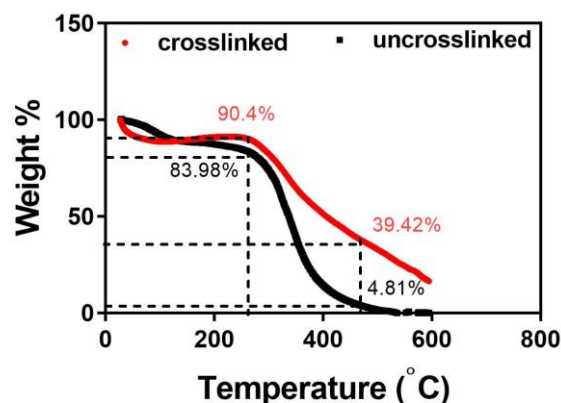
۴- نتیجه گیری

در این مطالعه، الیاف ژلاتینی در ترکیبی از حلال‌های آبی و آلی تهیه شد. بهترین ترکیب از حلال به صورت نسبت حجمی ۲۵:۲۵:۵۰ از W:FA:DMF است که تصاویر FESEM و TEM از الیاف نشان داد که الیافی یکنواخت و بدون هیچگونه پاشش و تشکیل بید با قطر متوسط حدود ۱۱۲±۳۵ nm تشکیل می‌شوند. اتصال عرضی الیاف الکتروریسی شده توسط مولکول‌های گلوکز و از طریق واکنش قهوه‌ای شدن میلارد انجام شد. اتصال عرضی با انجام پیوند کوالانسی بین زنجیره‌های ژلاتینی سبب پایداری الیاف الکتروریسی شده در محیط کشت سلول شود. تصویر SEM الیاف الکتروریسی شده پس از انجام واکنش میلارد (دمای ۱۷۰ °C، مدت زمان ۳ ساعت)، اتصال بین زنجیره‌های ژلاتینی باعث می‌شود که الیاف در محل تماس به یکدیگر به هم متصل شوند و تشکیل یک شبکه نامحلول در آب را بدهد. نتیجه آزمون تخریب حرارتی نیز افزایش پایداری الیاف ژلاتینی را در حضور گلوکز نشان می‌دهد. ایجاد اتصال عرضی توسط مولکول‌های گلوکز به صورتی است که ریزساختار الیاف را تغییر نمی‌دهد.

مراجع

- [1] S.J. Hollister, *Nature materials*, **4**, 2005, 518.
- [2] I. Jun, H.S. Han, J. Edwards, H. Jeon, *International Journal of Molecular Sciences*, **19**, 2018, 745.
- [3] M.S. Shoichet, *Macromolecules*, **43**, 2009, 581.

اتصالات عرضی به صورت چشمگیری تخریب بیشتری را نسب به نمونه اتصال عرضی شده در زمان مشابه نشان می‌دهد. در واقع نمونه اتصال عرضی داده شده تحت دمای بالاتری شروع به تخریب می‌کند. نتایج این آزمون نشان می‌دهد که در دمای ۲۲۰ °C، نمونه الیاف اتصال عرضی داده شده حدود ۹/۶٪ از وزن شان تخریب شده است در حالی که نمونه فاقد اتصالات عرضی تخریبی معادل ۱۶/۲٪ از وزن اولیه نمونه را داشته است. در نهایت در دمای ۴۵۵ °C برای نمونه بدون اتصال عرضی ۴/۸٪ از نمونه باقیمانده است و نمونه تقریباً به صورت کامل تخریب شده است و اما نمونه الیاف اتصال عرضی داده شده در این دما ۳۹/۴۲٪ از وزن اولیه خود را دارد. این نتایج نشان می‌دهد که انجام اتصالات عرضی به صورت چشمگیری تخریب دمایی نمونه را کاهش داده است.



شکل ۵: منحنی تخریب حرارتی الیاف الکتروریسی شده حاوی اتصال عرضی توسط گلوکز و بدون اتصال عرضی.

همچنین مشخص شده است که محصولات حاصل از واکنش میلارد می‌تواند در تشکیل مواد آنتی اکسیدان قوی مانند زنجیره‌های رادیکالی، گیر انداختن اکسیژن‌های فعال و همچنین بالا بردن توان مقاومت محصولات غذایی در برابر اکسید شدن شرکت کند [۱۴،۲۴]. میزان قدرت آنتی اکسیدانی محصولات حاصل از واکنش میلارد به مدت زمانی که تحت عملیات گرمایی قرار می‌گیرد وابسته می‌باشد.

- [16] C.M. Ofner, W.A. Bubnis, *Pharmaceutical Research*, **13**, 1996, 1821.
- [17] L. Yang, C.F. Fittie, K.O. van der Werf, M.L. Bennink, P.J. Dijkstra, J. Feijen, *Biomaterials*, **29**, 2008, 955.
- [18] Y. Zhang, J. Venugopal, Z.M. Huang, C.T. Lim, S. Ramakrishna, *Polymer*, **47**, 2006, 2911.
- [19] N. Davidenko, *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, **27**, 2016, 14.
- [20] M. Amri, *Bio-medical Materials and Engineering*, **24**, 2014, 1715.
- [21] A. Liguori, *Scientific Reports*, **6**, 2016, 38542.
- [22] K. Siimon, H. Siimon, M. Jarvekulg, *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, **26**, 2015, 37.
- [23] C. Del Gaudio, *Biomaterials*, **34**, 2013, 7754.
- [24] Q. Liu, J. Li, B. Kong, P. Li, X. Xia, *International Journal of Dairy Technology*, **67**, 2014, 220.
- [25] M.N. Lund, C.A. Ray, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **65**, 2017, 4537.
- [26] M. Skotak, S. Noriega, G. Larsen, A. Subramanian, *Journal of Biomedical Materials Research Part A*, **95**, 2010, 828.
- [27] K. Sisson, C. Zhang, M.C. Farach-Carson, D.B. Chase, J.F. Rabolt, *Biomacromolecules*, **10**, 2009, 1675.
- [28] S. Zhang, *Journal of Biomedical Materials Research Part A*, **90**, 2009, 671.
- [4] N. Celikkin, C. Rinoldi, M. Costantini, M. Trombetta, A. Rainer, W. Swieszkowski, *Materials Science and Engineering: C*, **78**, 2017, 1277.
- [5] A. Azarniya, E. Tamjid, N. Eslahi, A. Simchi, *International Journal of Biological Macromolecules*, **134**, 2019, 280.
- [6] J. Lin, C. Li, Y. Zhao, J. Hu, L.M. Zhang, *ACS applied materials & interfaces*, **4**, 2012, 1050.
- [7] M. Uehara, *Scientific Reports*, **9**, 2019, 6535.
- [8] J. Zhan, P. Lan, *Journal of Research Updates in Polymer Science*, **1**, 2013, 59.
- [9] M. Ramalingam, E. Jabbari, S. Ramakrishna, *Micro and Nanotechnologies in Engineering Stem Cells and Tissues*, John Wiley & Sons, 2013.
- [10] H. Aoki, H. Miyoshi, Y. Yamagata, *Polymer Journal*, **47**, 2015, 267.
- [11] N. Choktaweasap, K. Arayanarakul, D. Aht-Ong, C. Meechaisue, P. Supaphol, *Polymer Journal*, **39**, 2007, 622.
- [12] J. Lee, J.J. Yoo, A. Atala, *Biomaterials*, **33**, 2012, 6709.
- [13] N. Nagiah, R. Johnson, R. Anderson, W. Elliott, W. Tan, *Langmuir*, **31**, 2015, 12993.
- [14] A. Higuchi, Q.D. Ling, S.T. Hsu, A. Umezawa, *Chemical Reviews*, **112**, 2012, 4507.
- [15] G. Niu, T. Criswell, E. Sapoznik, S. Lee, S. Soker, *J. Sci. Appl. Biomed.*, **1**, 2013, 1.