

Effect of Plasma Treatment on Cell Culture in Poly Lactic Glycolic Acid Nanofibrous Scaffold

ARTICLE INFO

Article Type

Original Research

Authors

Zamani F.¹ PhD,
Merati A.A.^{*2} PhD,
Latifi M.³ PhD,
Ghanbari Alanagh H.⁴ PhD,
Nadipour R.³ MSc

How to cite this article

Zamani F, Merati A A, Latifi M, Ghanbari Alanagh H, Nadipour R. Effect of Plasma Treatment on Cell Culture in Poly Lactic Glycolic Acid Nanofibrous Scaffold. Modares Journal of Biotechnology. 2018;9(4):635-641.

¹Hazrat-e Masoumeh University, Qom, Iran

²"Advanced Textile Materials & Technologies Research Institute" and "Nano-fibrous Structures Department, Textile Engineering Faculty", Amirkabir University of Technology, Tehran, Iran

³Nano-fibrous Structures Department, Textile Engineering Faculty, Amirkabir University of Technology, Tehran, Iran

⁴Medical Nanotechnology Department, Advanced Technologies in Medicine Faculty, Tehran University of Medical Science, Tehran, Iran

*Correspondence

Address: Textile Engineering Faculty, Amirkabir University of Technology, NO. 424, Hafez Street, Tehran, Iran.
Postal Code: 1591634311
Phone: +98 (21) 64542626
Fax: +98 (21) 66495038
merati@aut.ac.ir

Article History

Received: January 22, 2017

Accepted: September 6, 2017

ePublished: December 21, 2018

ABSTRACT

Aims Tissue engineering and replacement of damaged tissue in medical science is very important and more effective than person-to-person transplantation. Therefore, the production of scaffolds from natural and synthetic polymers with desirable properties to reproduce damaged tissues is increasing. The aim of the present study was to investigate the effect of plasma treatment on contact angle or hydrophilicity of poly-lactic glycolic acid nanofibrous scaffolds and cell culture efficiency.

Materials & Methods In the present experimental research, two types of solvents such as pure chloroform and the chloroform 80% and dimethyl formaldehyde 20% were used for electrospinning solution. The level of electrospun scaffolds was corrected by plasma technology; then, the African green monkey kidney (VERO) cells were cultured on them. The raw or non-treated electrospun scaffold was compared with that of plasma treated in hydrophilicity and cell culture viewpoints. To compare the hydrophilicity of scaffolds, the contact angle of them was measured.

Findings The samples treated with plasma show lower contact angle and consequently higher hydrophilicity. C=O and C-O groups increased in the plasma-treated samples in comparison with those of raw samples. Plasma scaffold level correction improved the adhesion, growth, and proliferation of cells compared to non-treated scaffolds.

Conclusion The contact angle of the plasma-treated samples is significantly reduced. Plasma treatment can increase the hydrophilicity of poly-lactic glycolic acid nanofibrous scaffolds, and cell adhesion and growth on plasma-treated scaffolds is better than cell growth and proliferation on non-treated scaffolds.

Keywords Hydrophilicity; Nanofibers; Biopolymers; Poly-lactic glycolic acid; Plasma; Cell culture

CITATION LINKS

[1] Nanofibrous scaffolds based on poly (caprolactone)/chitosan/poly (vinyl alcohol) blend for skin tissue engineering [2] Tissue engineered poly (caprolactone)-chitosan-poly (vinyl alcohol) nanofibrous scaffolds for burn and cutting wound healing [3] Electrospun poly (ε-caprolactone)/gelatin nanofibrous scaffolds for nerve tissue engineering [4] Effect of nanoporous fibers on growth and proliferation of cells on electrospun poly (ε-caprolactone) scaffolds [5] The influence of surface nanoroughness of electrospun PLGA nanofibrous scaffold on nerve cell adhesion and proliferation [6] Surface modification of electrospun PVDF/PAN nanofibrous layers by low vacuum plasma treatment [7] The effects of plasma treated electrospun nanofibrous poly (ε-caprolactone) scaffolds with different orientations on mouse embryonic stem cell proliferation [8] Oxygen-plasma-modified biomimetic nanofibrous scaffolds for enhanced compatibility of cardiovascular implants [9] Effects of fiber density and plasma modification of nanofibrous membranes on the adhesion and growth of HaCaT keratinocytes [10] Micro- and nanoscale structures for tissue engineering constructs [11] Electrospinning: Applications in drug delivery and tissue engineering [12] Application of plasma surface modification techniques to improve hemocompatibility of vascular grafts: A review [13] Towards a methodology for the effective surface modification of porous polymer scaffold [14] Comparison of Nitrogen-Carbonation processes by active touring and the common method of Low-alloy Steel DIN 1/6582 [15] Plasma technologies for textiles [16] Plasma surface modification of biodegradable polymers: A review [17] Effect of oxygen plasma on surface properties and biocompatibility of PLGA films [18] Effect of oxygen plasma treatment on surface charge and wettability of PVC blood bag—In vitro assay [19] Characterization of surface property of poly (lactide-co-glycolide) after oxygen plasma treatment [20] African green monkey kidney (vero) cells provide an alternative host cell system for influenza A and B viruses [21] An introduction to electrospinning and nanofibers [22] Attitude on spectroscopy

تأثیر فرآیند اصلاح سطح پلاسما بر کشت سلول در داربست نانولیفی پلی‌لاکتیک-گلیکولیک-اسید

فاطمه زمانی PhD

دانشگاه حضرت معصومه، قم، ایران

علی اکبر مرآتی * PhD

"پژوهشکده مواد و فناوری‌های پیشرفته در نساجی" و "گروه ساختارهای نانولیفی، دانشکده مهندسی نساجی"، دانشگاه صنعتی امیرکبیر، تهران، ایران

مسعود لطیفی PhD

گروه ساختارهای نانولیفی، دانشکده مهندسی نساجی، دانشگاه صنعتی امیرکبیر، تهران، ایران

حسین قنبری‌الانق PhD

گروه نانوفناوری پزشکی، دانشکده فناوری‌های نوین پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی تهران، تهران، ایران

فاطمه نادپور MSc

گروه ساختارهای نانولیفی، دانشکده مهندسی نساجی، دانشگاه صنعتی امیرکبیر، تهران، ایران

چکیده

اهداف: مهندسی بافت و جایگزینی بافت‌های آسیب‌دیده در علم پزشکی بسیار حایز اهمیت و نسبت به پیوند عضو از شخصی به شخص دیگر کارآمدتر است، بنابراین تولید داربست از پلیمرهای طبیعی و مصنوعی با خصوصیات مطلوب به‌منظور بازسازی بافت‌های آسیب‌دیده گسترش روزافزونی دارد. هدف پژوهش حاضر بررسی تأثیر فرآیند پلاسما بر زاویه تماس یا آب‌دوستی داربست نانولیفی پلی‌لاکتیک-گلیکولیک-اسید و کیفیت کشت سلول در آن بود.

مواد و روش‌ها: در پژوهش تجربی حاضر ابتدا نانوالیاف پلی‌لاکتیک-گلیکولیک-اسید، با استفاده از حلال‌های کلروفرم خالص و مخلوط کلروفرم ۸۰٪- دی‌متیل‌فرم‌امید ۲۰٪ الکترورسی شدند. سطح داربست‌های الکترورسی‌شده با فناوری پلاسما اصلاح، سپس سلول کلیه میمون سبز آفریقای (VERO) روی آنها کشت داده شد. مقایسه داربست‌های ساده تولیدشده، از نظر میزان آب‌دوستی و تکثیر سلول، با داربست‌های اصلاح‌شده توسط فرآیند پلاسما صورت گرفت. به‌منظور مقایسه آب‌دوستی نمونه‌ها، زاویه تماس آب آنها اندازه‌گیری شد.

یافته‌ها: نمونه‌های اصلاح‌شده به روش پلاسما کاهش مطلوبی در زاویه تماس آب داشتند و آب‌دوستی بهتری از خود نشان دادند. طیف گروه‌های C=O و C-O در نمونه‌های اصلاح‌شده با پلاسما نسبت به نمونه‌های خام افزایش یافت. اصلاح سطح داربست با پلاسما موجب بهبود چسبندگی، رشد و تکثیر سلول‌ها نسبت به داربست‌های ساده شد.

نتیجه‌گیری: زاویه تماس نمونه‌های اصلاح‌شده با پلاسما کاهش چشمگیری دارد. فرآیند پلاسما می‌تواند موجب افزایش آب‌دوستی داربست‌های نانولیفی پلی‌لاکتیک-گلیکولیک-اسید شود و چسبندگی و رشد سلول روی داربست‌های اصلاح‌شده با پلاسما بهتر از رشد و تکثیر سلول بر داربست‌های ساده است.

کلیدواژه‌ها: آب‌دوستی، نانوفیبر، پلی‌مرهای زیستی، پلی‌لاکتیک-گلیکولیک-اسید، پلاسما، کشت سلول

تاریخ دریافت: ۱۳۹۵/۱۱/۰۳

تاریخ پذیرش: ۱۳۹۶/۰۶/۱۵

*نویسنده مسئول: merati@aut.ac.ir

مقدمه

مهندسی بافت و جایگزینی بافت‌های آسیب‌دیده در علم پزشکی بسیار حایز اهمیت و نسبت به پیوند عضو از شخصی به شخص دیگر کارآمدتر است. بنابراین تولید داربست از پلیمرهای طبیعی و مصنوعی با خصوصیات مطلوب به‌منظور بازسازی بافت‌های آسیب‌دیده گسترش روزافزونی دارد.

در مهندسی بافت سلول‌ها روی داربست قرار گرفته و درون محیط کشت رشد داده می‌شوند. ماتریس خارج سلولی هر بافت با بافت دیگر متفاوت است و بنابراین خواص داربست مورد استفاده در مهندسی بافت نیز باید متناسب با بافت مورد نظر تغییر کند [1-4].

مواد مورد استفاده در تهیه داربست‌ها می‌تواند طبیعی، مصنوعی یا معدنی باشد که باید زیست‌سازگار و زیست‌تخریب‌پذیر باشند. یکی دیگر از خصوصیات لازم برای داشتن یک داربست مناسب آب‌دوستی است. آب‌دوستی سطح سبب چسبندگی و رشد بهتر سلول روی داربست می‌شود. پلیمرهای طبیعی مانند کلاژن، کیتوسان و غیره آب‌دوستی مناسبی دارند، اما اغلب پلیمرهای مصنوعی آب‌دوستی لازم برای کاربرد در مهندسی بافت را ندارند.

پلیمر مصنوعی پلی‌لاکتیک-گلیکولیک-اسید یک کوپلیمر زیست‌تخریب‌پذیر و زیست‌سازگار حاصل از گلیکولیک و لاکتیک است که در مهندسی بافت کاربرد فراوانی دارد. این پلیمر خواص مکانیکی مناسب برای فرآیند کشت دارد. این پلیمر در مقایسه با پلیمرهای طبیعی آب‌دوستی لازم را به‌منظور رشد سلول ندارد. آب‌گریزی این پلیمر سبب عدم چسبندگی مناسب سلول به سطح داربست ساخته‌شده از آن می‌شود. روش‌های مختلفی برای افزایش آب‌دوستی پلیمرهای آب‌گریز مانند پوشش‌دهی با ذرات آب‌دوست، مخلوط‌کردن با سطح فعال‌های غیریونی آب‌دوست، ایجاد ناهمواری در سطح، افزایش تخلخل لایه، پلاسما و غیره وجود دارد [5-9]. در این پژوهش حاضر سعی بر آن بود که با فرآیند پلاسما، آب‌دوستی سطح داربست‌های نانولیفی الکترورسی‌شده پلی‌لاکتیک-گلیکولیک-اسید را افزایش داد تا بدین‌طریق امکان بهبود رشد و تکثیر سلول فراهم شود.

روش‌های مختلفی برای تولید داربست‌های نانولیفی وجود دارد که الکترورسی به‌دلیل سادگی نسبی، انطباق‌پذیری با کاربردهای گوناگون، توانایی تولید الیاف در ابعاد نانومتری، قابل کنترل بودن، تکرارپذیری، مقرون‌به‌صرفه بودن، از اهمیت ویژه‌ای برخوردار است [10، 11]. در پژوهش حاضر، از این روش برای تولید

داربست‌های نانولیفی استفاده شد.

فرآیند پلاسما می‌تواند موجب پاک‌سازی سطح از آلودگی‌های احتمالی، بهبود چسبندگی سطح، افزایش انرژی سطحی (یا ترشوندگی)، بهبود زیست‌سازگاری، کاهش اصطکاک سطح، رسوب‌زدایی از سطح و عامل‌دارکردن سطح شود [2، 12، 13]. پلاسمای سرد برای اصلاح سطحی مواد حساس به حرارت مانند پلیمرهای زیست‌تخریب‌پذیر مناسب است [14]. پلاسما موجب ایجاد گروه‌های فعال روی سطح پلیمر شده که پس از واکنش با اکسیژن گروه‌های کربونیل، کربوکسیل و هیدروکسیل روی سطح ایجاد می‌کنند. در این میان نانوالیاف به‌دلیل آن که سطح مخصوص آنها بیشتر است نسبت به اصلاح سطحی پلاسما حساس‌تر هستند. باید توجه شود که خصوصیات ایجادشده توسط فرآیند پلاسما در سطح دایمی نیست [15، 16].

در گذشته بیشتر از پلاسمای اکسیژن خالص به‌منظور اصلاح سطحی کوپلیمر پلی‌لاکتیک-گلیکولیک-اسید با پلاسما استفاده می‌شد. به‌عنوان مثال حصیرسی و همکاران پلاسمای اکسیژن در فشار پایین را برای اصلاح پلی‌لاکتیک-گلیکولیک-اسید به نسبت ۵۰/۵۰ به کار بردند و افزایش آب‌دوستی قابل توجهی را مشاهده کردند [17]. زاویه تماس آب این پلیمر پس از اعمال پلاسما از ۶۷ درجه به ۳۸ درجه کاهش یافت. طیف‌سنجی فتوالکترون اشعه

سطحی نانوالیاف از دستگاه طیف‌سنجی مادون قرمز (ATR-FTIR؛ نکسوس؛ ایالات متحده) استفاده شد. قله‌های ایجاد شده در طیف بیانگر گروه‌های موجود در سطح پلیمر هستند. با مقایسه طیف حاصل از نانوالیاف پلی‌لاکتیک‌گلیکولیک/اسید قبل و بعد از اصلاح با پلاسما تغییرات در گروه‌های سطح داربست نانولیفی بررسی شد.

زاویه تماس قطره آب با سطح داربست نانولیفی برای تمام نمونه‌ها اندازه‌گیری شد. برای این کار دوربین مدل DinoCaptureplus2.0 (دینولايت؛ هلند) به کار رفت. قطره به حجم ۵ میکرولیتر روی نمونه قرار گرفت و با دوربین تصویر برداری آن روی نمونه‌ها ثبت شد. سپس با استفاده از تصویر قطره و نرم‌افزار DinoCapture 2.0 زاویه تماس نمونه‌ها اندازه‌گیری شد.

برای مشاهده تأثیر اصلاح داربست‌های نانولیفی پلی‌لاکتیک‌گلیکولیک/اسید توسط پلاسما روی روند رشد سلول، سلول کلیه میمون سبز آفریقایی (VERO؛ موسسه تحقیقات واکسن و سرم‌سازی رازی؛ کرج؛ ایران) تهیه شد و روی نمونه‌های خام و اصلاح شده با پلاسما کشت داده شد. این سلول نسبت به شرایط محیط بسیار حساس است و نسبت به کوچک‌ترین تغییرات واکنش نشان می‌دهد [20]. به همین دلیل این سلول برای مقایسه نمونه‌ها انتخاب شد. برای این کار ابتدا نمونه‌های خام شسته و سپس تحت فرآیند پلاسما قرار گرفتند. تمام نمونه‌های خام و اصلاح شده با پلاسما برای میکروبی‌زدایی با اشعه فرابنفش استریل شدند. به‌منظور شست‌وشوی نمونه‌ها، آنها دوبار (هر بار به مدت ۲۰ دقیقه) در اتانول ۳۰٪ قرار گرفتند و برای بار سوم در الکل ۷۰٪ شسته شدند.

تعداد ۲۰۰۰ سلول VERO روی تمامی داربست‌ها کشت داده شد. تعداد برابری سلول (۲۰۰۰) بر کف محیط کشت فلاسک ۷۵ سانتی‌متر مربع و بدون داربست کشت داده شدند. محیط کشت سلول DMEM شامل بی‌کربنات سدیم (NaHCO_3)، آب دی‌یونیزه شده، فاکتور رشد سرم جنین گاوی (FBS) و محلول پنی‌سیلین به‌عنوان ضد عفونی‌کننده به کار رفت. سلول‌ها پس از کشت به‌وسیله آنزیم تریپسین از کف فلاسک جدا شدند.

دو روز پس از کشت، با استفاده از روش رنگ‌سنجی MTT میزان زنده ماندن و تکثیر سلول‌ها بر هر داربست مشخص شد. در این روش، ابتدا سلول‌ها شسته، سپس ۳۰۰ میکرولیتر ماده MTT به هر نمونه اضافه شد و نمونه‌ها به مدت ۴ ساعت در انکوباتور قرار گرفتند. طی این مدت در نمونه بلورهای آبی‌رنگ فورمازان تشکیل می‌شود. پس از گذشت ۴ ساعت ماده MTT خارج و ۳۰۰ میکرولیتر ایزوپروپانول اضافه شد. پس از ۳۰ دقیقه بلورهای فورمازان حل و محلول حاصل به پلیت ۹۶ تایی منتقل شد.

به‌منظور بررسی میزان زنده ماندن سلول بر داربست‌ها، تست MTT انجام شد، همچنین برای مشاهده میزان چسبندگی سلول بر سطح داربست تصاویر میکروسکوپ نوری و میکروسکوپ الکترونی تهیه شدند. میزان زنده ماندن سلول به‌وسیله رابطه $V = \frac{MS}{MC} * 100$ محاسبه شد، در این رابطه، MS میانگین (پنج تکرار) نتایج MTT هر نمونه، MC میانگین (پنج تکرار) نتایج MTT نمونه کنترل و V درصد زنده ماندن سلول است.

جذب نور محلول با دستگاه الیزاریدر مورد سنجش قرار گرفت.

ایکس نمونه اصلاح شده با پلاسما ی اکسیژن، به وضوح نشان داد که بعد از اعمال پلاسما، اکسیژن بر سطح نمونه حضور دارد. کاهش زاویه تماس و چسبندگی اکسیژن بر سطح نمونه به‌طور مشابه در پژوهش خراسانی و همکاران که از پلاسما ی اکسیژن در دمای پایین بر پلی‌لاکتیک‌گلیکولیک/اسید به نسبت ۵۰/۵۰ استفاده کردند، نیز مشاهده شد [18]. وان و همکاران در سال ۲۰۰۴ تأثیر پلاسما ی اکسیژن را روی فیلم پلی‌لاکتیک‌گلیکولیک/اسید بررسی کردند. نتایج پژوهش‌های آنها نشان داد که نمونه‌های فیلم پلیمر اصلاح شده به مدت ۲ و ۱۰ دقیقه، کاهش زاویه تماس را نشان دادند [19]. تأثیر فرآیند پلاسما بر افزایش آب‌دوستی سطوح نانولیفی PLGA که سطح ویژه و تخلخل بسیار بالایی دارند تاکنون بررسی نشده است.

هدف پژوهش حاضر بررسی تأثیر فرآیند پلاسما بر زاویه تماس یا آب‌دوستی داربست نانولیفی پلی‌لاکتیک‌گلیکولیک/اسید و کیفیت کشت سلول در آن بود.

مواد و روش‌ها

در پژوهش تجربی حاضر ابتدا شرایط بهینه الکتروریسی به دست آمد. سپس داربست‌های نانولیفی الکتروریسی شده مورد آزمایش قرار گرفتند. به‌منظور الکتروریسی داربست نانولیفی از کلروفرم و دی‌متیل‌فرم‌آمید (مرک؛ آلمان) و پلی‌لاکتیک‌گلیکولیک/اسید (بوه‌رینگر؛ آلمان) استفاده شد. با توجه به پژوهش‌های صورت گرفته [5]، محلول ۳٪ جرمی-حجمی پلی‌لاکتیک‌گلیکولیک/اسید (با نسبت ۸۰/۲۰) با ویسکوزیته ذاتی ۵۰۹ دسی‌لیتر بر گرم به‌منظور الکتروریسی انتخاب شد. محلول‌های حاصل در ولتاژ ۲۰ کیلوولت و سرعت جمع‌کننده ۰/۲ متر بر ثانیه با نرخ تغذیه ۰/۲۵ و ۰/۵ میلی‌لیتر بر ساعت و فاصله الکتروریسی ۱۰ و ۱۵ سانتی‌متر الکتروریسی و پس از مقایسه محدوده قطری حاصل شده، بهترین نمونه‌ها برای فرآیند پلاسما انتخاب شدند. برای تصویربرداری نانوالیاف، میکروسکوپ الکترونی مدل XL30 (فیلیپس؛ هلند) به کار رفت. نمونه‌های نانوالیاف تولید شده به مدت ۱۲۰ ثانیه و تحت جریان ۱۰ میلی‌آمپر با طلا پوشش داده شدند. تصویر میکروسکوپ الکترونی آنها تحت ولتاژ ۱۵ کیلوولت تهیه و سپس با استفاده از نرم‌افزار measurement studio 2013 قطر نانوالیاف از روی تصاویر اندازه‌گیری شد.

در محلول بخشی از نمونه‌ها (C1، C2 و C3) فقط حلال کلروفرم و در نمونه‌های دیگر (D1، D2 و D3) ترکیب کلروفرم ۸۰٪- دی‌متیل‌فرم‌آمید ۲۰٪ به کار رفت. نمونه‌های الکتروریسی شده توسط دستگاه پلاسما از نوع DC پالسی (پلاسما فن‌امین؛ ایران) تحت فرآیند پلاسما قرار گرفته و اصلاح شدند. در پژوهش حاضر نمونه با حلال کلروفرم خام (GR)، نمونه با حلال کلروفرم ۸۰٪- دی‌متیل‌فرم‌آمید ۲۰٪ خام (DR)، نمونه با حلال کلروفرم اصلاح شده با پلاسما (GP) و نمونه با حلال کلروفرم ۸۰٪- دی‌متیل‌فرم‌آمید ۲۰٪ اصلاح شده با پلاسما (DP) به کار رفتند.

طبق پژوهش‌های قبلی گازهای اکسیژن و آرگون برای بهبود آب‌دوستی مناسب بودند، اما از آنجایی که امکان تخریب سطحی پلیمر با گاز اکسیژن بیشتر بود و امکان کنترل دما با دستگاه پلاسما ی کاربردی در پژوهش حاضر وجود نداشت، گاز آرگون برای انجام فرآیند تکمیل با پلاسما انتخاب شد. برای شناسایی گروه‌های

اعداد حاصل از جذب میزان زنده ماندن سلول‌ها را نشان داد. در این روش میزان سلول‌های فعال با رنگ ایجاد شده رابطه مستقیم دارد. در نهایت، با استفاده از تصاویر میکروسکوپ الکترونی میزان چسبندگی و رشد سلول بر هر داربست مورد بررسی قرار گرفت.

یافته‌ها

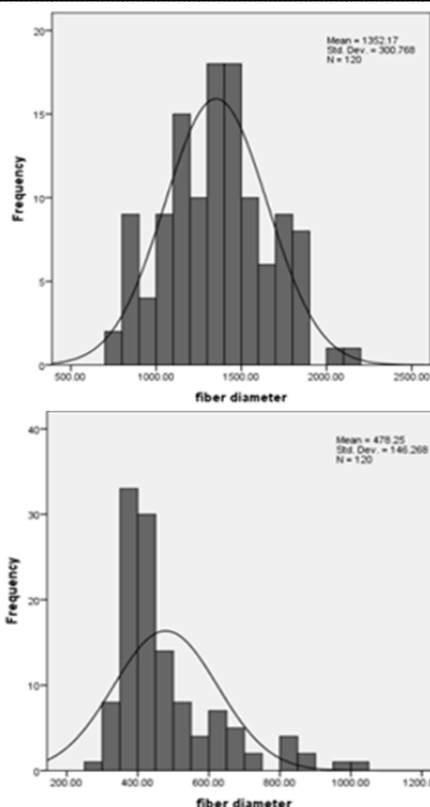
قطر الیاف تولید شده با استفاده از حلال کلروفرم ۸۰٪- دی‌متیل‌فرماید ۲۰٪ کمتر از نمونه با حلال کلروفرم خالص بود. با توجه به میانگین قطر الیاف و توزیع قطری الیاف، نرخ تغذیه ۲۵/۰ میلی‌لیتر بر ساعت و فاصله ۱۰ سانتی‌متر شرایط بهینه برای تولید نانوالیاف بود. داربست‌ها با شرایط الکتروریسی بهینه فوق و با سرعت جمع کننده ۰.۲ متر بر ثانیه تولید شدند (جدول ۱).

در شکل ۱ و نمودار ۱ نیز نمونه‌هایی از تصاویر میکروسکوپ الکترونی و توزیع قطری نانوالیاف الکتروریسی شده قابل مشاهده است.

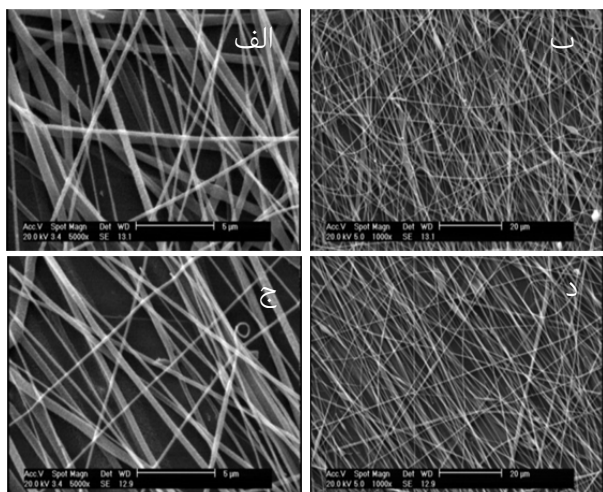
اصلاح سطحی الیاف با استفاده از فرآیند پلاسما تغییری در ظاهر الیاف ایجاد نکرد (شکل ۲).

جدول ۱) نرخ تغذیه، فاصله ریسندهی و میانگین آماری قطری نانوالیاف

نمونه	حلال	نرخ تغذیه (میلی‌لیتر بر ساعت)	فاصله ریسندهی (سانتی‌متر)	میانگین آماری قطری نانوالیاف (نانومتر)
C1	کلروفرم ۱۰۰٪	۰/۲۵	۱۰	۱۳۵۲/۰±۳۰۰/۰
C2	کلروفرم ۱۰۰٪	۰/۵	۱۰	۱۳۲۴/۰±۲۲۷/۰
C3	کلروفرم ۱۰۰٪	۰/۵	۱۵	۱۳۳۹/۰±۳۵۶/۰
D1	کلروفرم ۸۰٪- دی‌متیل‌فرم‌آمید ۲۰٪	۰/۲۵	۱۰	۴۷۸/۰±۱۴۶/۰
D2	کلروفرم ۸۰٪- دی‌متیل‌فرم‌آمید ۲۰٪	۰/۵	۱۰	۱۰۰۷/۰±۲۰۸/۰
D3	کلروفرم ۸۰٪- دی‌متیل‌فرم‌آمید ۲۰٪	۰/۵	۱۵	۳۸۱/۰±۶۳/۰

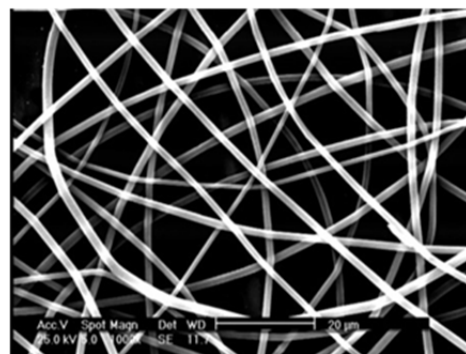


نمودار ۱) توزیع قطری نانوالیاف الکتروریسی شده؛ الف) نمونه C1، ب) نمونه D1

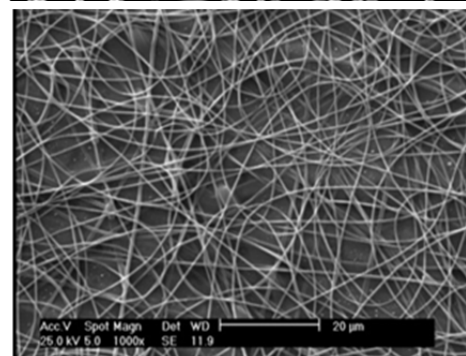


شکل ۲) تصاویر میکروسکوپ الکترونی نمونه D3؛ الف) نانوالیاف اصلاح نشده با بزرگ‌نمایی ۵۰۰۰×، ب) نانوالیاف اصلاح نشده با بزرگ‌نمایی ۱۰۰۰×، ج) نانوالیاف اصلاح شده با پلاسما با بزرگ‌نمایی ۵۰۰۰×، د) نانوالیاف اصلاح شده با پلاسما با بزرگ‌نمایی ۱۰۰۰×

با توجه به طیف ATR-FTIR گروه‌های اصلی ساختار پلی‌لاکتیک‌گلیکولیک‌اسید شناسایی شدند (نمودار ۲). پیوند C=O کششی کربونیل در طول موج ۱۷۵۶ نانومتر مشاهده شد. پیوند C-O کششی استری در محدوده طول موج ۱۳۰۰-۱۰۰۰ نانومتر در این طیف در طول موج‌های ۱۰۹۰ و ۱۱۳۰ و ۱۱۸۴ نانومتر نمایان شد. همچنین قله‌های ۱۴۵۲ و ۱۳۸۲ نانومتر به ترتیب بیانگر گروه‌های متیلن (CH₂) و متیل (CH₃) بودند. شدت قله پیوندهای C=O و C-O، در نمونه اصلاح شده با پلاسما آزمون افزایش قابل توجهی داشت.

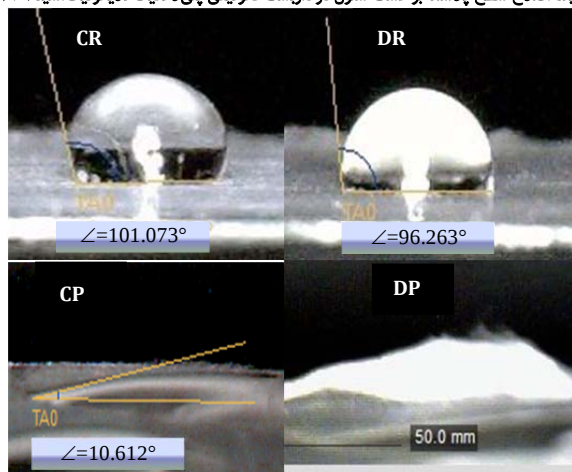


(الف)

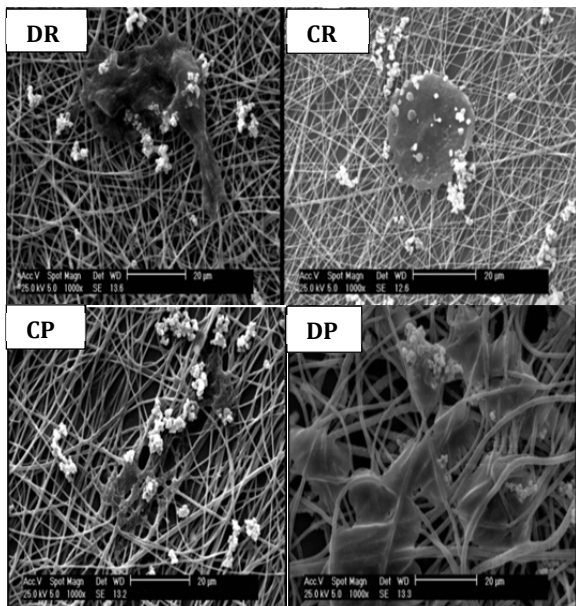


(ب)

شکل ۱) نمونه‌هایی از تصاویر میکروسکوپ الکترونی و نمودار توزیع قطری نانوالیاف الکتروریسی شده؛ الف) نمونه C1، ب) نمونه D1



شکل ۳ زاویه تماس داربست‌های نانولیفی الکتروپرسی‌شده: نمونه با حلال کلروفرم خام (CR)، نمونه با حلال کلروفرم ۸۰٪ - دی‌متیل‌فرم‌آمید ۲۰٪ خام (DR)، نمونه با حلال کلروفرم اصلاح‌شده با پلاسما (CP)، نمونه با حلال کلروفرم ۸۰٪ - دی‌متیل‌فرم‌آمید ۲۰٪ اصلاح‌شده با پلاسما (DP)



شکل ۴ تصاویر میکروسکوپ الکترونی کشت سلول VERO روی داربست‌های نانولیفی الکتروپرسی‌شده (در این تصاویر رسوبات سفیدرنگی مشاهده می‌شود که احتمالاً منشأ آنها ناشی از آماده‌سازی نامناسب است)

بحث

هدف پژوهش حاضر بررسی تأثیر فرآیند پلاسما بر زاویه تماس یا آب‌دوستی داربست نانولیفی پلیلاکتیک-گلیکولیک-اسید و کیفیت کشت سلول در آن بود.

به‌منظور یافتن شرایط بهینه الکتروپرسی، نانوالیاف با شرایط مختلف تولید شدند و پس از بررسی توزیع قطری آنها شرایط بهینه براساس معیارهای مهندسی ساختارهای نانولیفی شامل شرایط پایدار فرآیند الکتروپرسی، ظرافت و یکنواختی حداکثری به دست آمد. لازم به ذکر است که این شرایط لزوماً از دیدگاه چسبندگی سلولی شرایط بهینه نخواهد بود. عوامل بررسی‌شده بر الکتروپرسی شامل فاصله ریسندگی، نرخ تغذیه و حلال بودند.

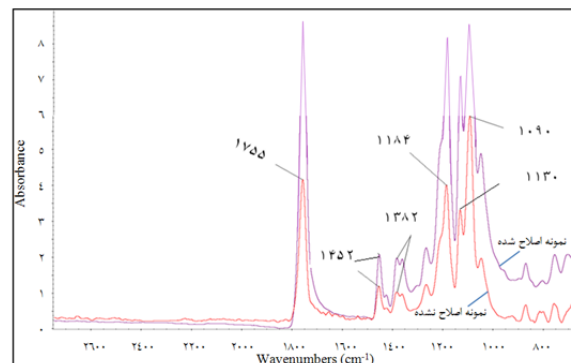
طبق نتایج پژوهش حاضر قطر الیاف تولیدشده با استفاده از حلال کلروفرم ۸۰٪ - دی‌متیل‌فرم‌آمید ۲۰٪ کمتر از نمونه با حلال کلروفرم خالص بود. علت این امر می‌تواند به دلیل تفاوت در ثابت

زاویه تماس در نمونه‌های اصلاح‌شده با پلاسما بسیار کوچک‌تر از نمونه‌های خام بود. در نمونه‌هایی که محلول الکتروپرسی با حلال کلروفرم خالص تهیه شده بود زاویه تماس از ۱۰۷ درجه برای نمونه خام به ۱۰ درجه برای نمونه اصلاح‌شده کاهش یافت. در نمونه‌هایی که محلول الکتروپرسی با حلال مخلوط کلروفرم ۸۰٪ - دی‌متیل‌فرم‌آمید ۲۰٪ تهیه شده بود زاویه تماس از ۹۳/۹ درجه برای نمونه خام به ۱۱/۹ درجه برای نمونه اصلاح‌شده کاهش یافت (شکل ۳).

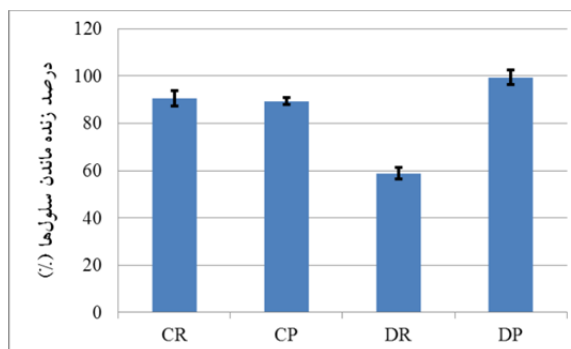
تغییر محسوسی در درصد زنده‌ماندن سلول روی داربست‌های نانوالیاف پلیلاکتیک-گلیکولیک-اسید الکتروپرسی‌شده با حلال کلروفرم خالص ۹۰/۵٪ و ۸۹/۴٪ به ترتیب برای داربست‌های خام و اصلاح‌شده با پلاسما مشاهده نشد (نمودار ۳)، اما درصد زنده‌ماندن سلول روی داربست‌های الکتروپرسی‌شده با حلال کلروفرم ۸۰٪ - دی‌متیل‌فرم‌آمید ۲۰٪ از ۵۸/۸٪ برای داربست‌های خام به ۹۹/۴٪ برای داربست‌های اصلاح‌شده با پلاسما افزایش یافت.

پایین‌بودن درصد زنده‌ماندن سلول در نمونه با حلال کلروفرم ۸۰٪ - دی‌متیل‌فرم‌آمید ۲۰٪ (DMF) نسبت به نمونه CR احتمالاً با سمیت بسیار شدید ناشی از حلال DMF در این نمونه ارتباط داشت. همچنین اختلاف بین نمونه‌های CR و نمونه DP مشاهده نشد، از طرف دیگر، بین نمونه‌های DR و DP اختلاف وجود داشت.

سلول در داربست‌های اصلاح‌شده با پلاسما نفوذ کرد و به‌خوبی بین الیاف قرار گرفت. اصلاح داربست‌های نانولیفی پلیلاکتیک-گلیکولیک-اسید با استفاده از فرآیند پلاسما، موجب بهبود چسبندگی سلول روی داربست شد (شکل ۴).



نمودار ۲ طیف مادون قرمز نمونه D3:Q طیف قرمز: نمونه اصلاح‌نشده، طیف بنفش: نمونه اصلاح‌شده با استفاده از پلاسمای آرگون



نمودار ۳ نمودار درصد زنده‌ماندن سلول‌ها روی داربست‌های نانولیفی الکتروپرسی‌شده

دی الکتریک دو حلال باشد. ثابت دی الکتریک کلروفرم ۴.۸ و دی متیل فرمامید ۳۶/۷۱ است. با افزایش ثابت دی الکتریک حلال، ناپایداری خمشی جت الکتروریسی نیز افزایش می یابد که منجر به افزایش محدوده شکل گیری الیاف و همچنین کاهش قطر الیاف بر اثر طولانی شدن مسیر جت می شود [18].

با توجه به میانگین قطر الیاف به دست آمده و توزیع قطری الیاف، نرخ تغذیه ۲۵/۰ میلی لیتر بر ساعت و فاصله ۱۰ سانتی متر شرایط بهینه برای تولید نانوالیاف بود. داربست ها با شرایط الکتروریسی بهینه فوق و با سرعت جمع کننده ۰/۲ متر بر ثانیه تولید شدند. برای بررسی تغییرات آب دوستی نانوالیاف الکتروریسی شده پس از اعمال پلاسما علاوه بر تست ATR-FTIR زاویه تماس نمونه ها نیز بررسی شد. با مقایسه طیف حاصل از نانوالیاف پلی لاکتیک گلیکولیک اسید قبل از اصلاح و پس از اصلاح با پلاسما گروه های عاملی تشکیل شده بر سطح الیاف مشخص شد. برای بررسی تغییرات ایجاد شده بر سطح الیاف طی فرآیند پلاسما تصاویر میکروسکوپ الکترونی نانوالیاف قبل و بعد از اصلاح پلاسما تهیه شدند. اصلاح سطحی الیاف با استفاده از فرآیند پلاسما تغییری در ظاهر الیاف ایجاد نکرد.

طیف ATR-FTIR برای نانوالیاف پلی لاکتیک گلیکولیک اسید قبل و بعد از اعمال پلاسما برای مدت ۲ دقیقه توسط آرگون فعال گرفته شد. ابتدا طیف ها نسبت به طول موج ۱۴۵۰ نانومتر که قله مرجع پلی لاکتیک گلیکولیک اسید است نرمالیزه شدند [21]. با توجه به طیف ATR-FTIR گروه های اصلی ساختار پلی لاکتیک گلیکولیک اسید شناسایی شدند. پیوند C=O کششی کربونیل که در محدوده طول موج ۱۸۲۰-۱۶۶۰ نانومتر با یک پیک قوی مشخص می شود [18]، در پژوهش حاضر در طول موج ۱۷۵۶ نانومتر مشاهده شد. پیوند C-O کششی استری در محدوده طول موج ۱۳۰۰-۱۰۰۰ نانومتر چند قله قوی ایجاد می کند که در این طیف در طول موج های ۱۰۹۰ و ۱۱۳۰ و ۱۱۸۴ نانومتر نمایان شد [22]. همچنین قله های ۱۴۵۲ و ۱۳۸۲ نانومتر به ترتیب بیانگر گروه های CH₃ و CH₂ بود.

با مقایسه طیف نمونه خام پلی لاکتیک گلیکولیک اسید و طیف نمونه اصلاح شده با پلاسما مشاهده شد که شدت قله پیوندهای C=O و C-O، در نمونه اصلاح شده با پلاسما آرگون افزایش قابل توجهی داشت.

نتایج اندازه گیری های زاویه تماس داربست های نانولیفی نشان داد که زاویه تماس در نمونه های اصلاح شده با پلاسما بسیار کوچکتر از نمونه های خام است. در نمونه هایی که محلول الکتروریسی با حلال کلروفرم خالص تهیه شدند زاویه تماس از ۱۰۷ درجه برای نمونه خام به ۱۰ درجه برای نمونه اصلاح شده کاهش یافت. این نتیجه می تواند به دلیل گروه های آب دوست ایجاد شده در اثر پلاسما روی سطح نمونه های اصلاح شده باشد.

تغییر محسوسی در درصد زنده ماندن سلول روی داربست های نانوالیاف پلی لاکتیک گلیکولیک اسید الکتروریسی شده با حلال کلروفرم خالص ۹۰/۵٪ و ۸۹/۴٪ به ترتیب برای داربست های خام و اصلاح شده با پلاسما مشاهده نشد. پایین بودن درصد زنده ماندن سلول در نمونه DR نسبت به نمونه CR احتمالاً به سمیت بسیار شدید ناشی از حلال DMF در این نمونه مربوط بود، زیرا تست MTT یک معیار اولیه سمیت سنجی نیز است. همچنین اختلاف بین نمونه های CR و CP وجود نداشت بدین معنی که فرآیند

پلاسما تاثیری بر درصد زنده ماندن سلول در این نمونه ها نداشت. از طرف دیگر اختلاف بین نمونه های DR و DP بدین معنی است که در شرایطی که میزان سمیت نمونه ها یکسان بود و تغییری نکرد، فرآیند پلاسما موجب افزایش درصد زنده ماندن سلول در نمونه های D شد.

سلول در داربست های اصلاح شده با پلاسما نفوذ کرد و به خوبی بین الیاف قرار گرفت. به بیان دیگر اصلاح داربست های نانولیفی پلی لاکتیک گلیکولیک اسید با استفاده از فرآیند پلاسما، سبب بهبود چسبندگی سلول روی داربست شد.

از محدودیت های مطالعه حاضر عدم امکان بررسی تاثیر پلاسما بر زبری سطح الیاف و فرآیند کشت سلول بود که برای کامل شدن این مطالعه مورد نیاز است. همچنین پیشنهاد می شود علاوه بر بررسی تاثیر سایر گازهای مختلف فرآیند پلاسما بر نانوالیاف و فرآیند کشت سلول، سایر روش های بهبود آب دوستی بررسی و با روش پلاسما مقایسه شود.

نتیجه گیری

زاویه تماس نمونه های اصلاح شده با پلاسما کاهش چشمگیری دارد. بنابراین فرآیند پلاسما می تواند موجب افزایش آب دوستی داربست های نانولیفی پلی لاکتیک گلیکولیک اسید شود. چسبندگی و رشد سلول روی داربست های اصلاح شده با پلاسما بهتر از رشد و تکثیر سلول بر داربست های ساده است و می توان از تکنیک اصلاح سطحی توسط پلاسما برای بهبود فرآیند رشد و تکثیر سلول بر داربست پلی لاکتیک گلیکولیک اسید استفاده کرد.

تشکر و قدردانی: از زحمات و همکاری سرکار خانم مهندس شیرین حاج حسن زاده، سرکار خانم مهندس منصوره ابر/هیمی و جناب آقای مهندس هادی رومی در آزمایشگاه پلاسما تشکر و قدردانی می شود.

تاییدیه اخلاقی: موردی از سوی نویسندگان گزارش نشد.

تعارض منافع: نویسندگان اعلام می دارند هیچ گونه تعارض منافی وجود ندارد.

سهم نویسندگان: فاطمه زمانی (نویسنده اول)، پژوهشگر کمکی/تحلیلیگر آماری (۲۰٪)؛ علی اکبر مرآتی (نویسنده دوم)، نگارنده مقدمه/نگارنده بحث (۲۰٪)؛ مسعود لطیفی (نویسنده سوم)، روش شناس (۲۰٪)؛ حسین قنبری آلانق (نویسنده چهارم)، روش شناس (۲۰٪)؛ فاطمه نادری پور (نویسنده پنجم)، پژوهشگر اصلی (۲۰٪)

منابع مالی: پژوهش حاضر منبع مالی نداشته است.

منابع

- 1- Gholipour-Kanani A, Bahrami H, Joghataie MT, Samadikuchaksaraei A. Nanofibrous scaffolds based on poly (caprolactone)/chitosan/poly (vinyl alcohol) blend for skin tissue engineering. Iran J Polymer Sci Technol. 2013;26(2):159-70. [Persian]
- 2- Gholipour-Kanani A, Bahrami H, Joghataie M, Samadikuchaksaraei A, Ahmadi-Taftie H, Rabbani S, et al. Tissue engineered poly (caprolactone)-chitosan-poly (vinyl alcohol) nanofibrous scaffolds for burn and cutting wound healing, IET Nanobiotechnol. 2014;8(2):123-31.
- 3- Ghasemi-Mobarakeh L, Prabhakaran MP, Morshed M, Nasr-Esfahani MH, Ramakrishna S. Electrospun poly (ε-

- 12- Solouk A, Brian GC, Mirzadeh H, Seifalian MA. Application of plasma surface modification techniques to improve hemocompatibility of vascular grafts: A review. *Biotechnol Appl Biochem*. 2011;58(5):311-27.
- 13- Safinia L, Datan N, Höhse M, Mantalaris A, Bismarck A. Towards a methodology for the effective surface modification of porous polymer scaffold. *Biomaterials*. 2005;26(36):7537-47.
- 14- Khoshdel N, Mahboobi F. Comparison of Nitrogen-Carbonation processes by active touring and the common method of Low-alloy Steel DIN 1/6582. Seminar on Surface Engineering and Heat Treatment. Tehran: Iranian Society of Science and Technology; 2006.
- 15- Shishoo R. Plasma technologies for textiles. 1st edition. Amsterdam: Elsevier; 2007.
- 16- Morent R, Nathalie DG, Tim D, Peter D, Christophe L. Plasma surface modification of biodegradable polymers: A review. *Plasma Proc Polym*. 2011;8(3):171-90.
- 17- Hasirci N, Endogan T, Vardar E, Kiziltay A, Hasirci V. Effect of oxygen plasma on surface properties and biocompatibility of PLGA films. *Surf Inter Anal*. 2010;42(6-7):486-91.
- 18- Khorasani MT, Mirzadeh H. Effect of oxygen plasma treatment on surface charge and wettability of PVC blood bag—In vitro assay. *Radi Physics Chem*. 2006;76(6):1011-6.
- 19- Wan Y, Qu X, Lu J, Zhu C, Wan L, Yang J, et al. Characterization of surface property of poly (lactide-co-glycolide) after oxygen plasma treatment. *Biomaterials*. 2004;25(19):4777-83.
- 20- Govorkova EA, Murti G, Meignier B, Taisne CD, Webster RG. African green monkey kidney (vero) cells provide an alternative host cell system for influenza A and B viruses. *J Virol*. 1996;70(8):5519-24.
- 21- Ramakrishna S. An introduction to electrospinning and nanofibers. Singapore: World Scientific; 2004.
- 22- Pavia D, Lompan G, Kariz J. Attitude on spectroscopy. Movasagh B, translator. Tehran: Elmi & Fani Press; 1993. [Persian]
- caprolactone)/gelatin nanofibrous scaffolds for nerve tissue engineering. *Biomaterials*. 2008;29(34):4532-9.
- 4- Jahanmard-Hoseinabadi F, Amani-Tehran M, Zamani F, Nematollahi M, Ghasemi-Mobarakeh L, Nasr-Esfahani MH. Effect of nanoporous fibers on growth and proliferation of cells on electrospun poly (ϵ -caprolactone) scaffolds. *Int J Polymeric Bio*. 2013;63(2):57-64.
- 5- Zamani F, Amani-Tehran M, Latifi M, Shokrgozar MA. The influence of surface nanoroughness of electrospun PLGA nanofibrous scaffold on nerve cell adhesion and proliferation. *J Mater Sci Mater Med*. 2013;24(6):1551-60.
- 6- Yalcinkaya F, Yalcinkaya B, Pazourek A, Mullerova J, Stuchlik M, Maryska J. Surface modification of electrospun PVDF/PAN nanofibrous layers by low vacuum plasma treatment. 2016;2016:Article ID 4671658, 9 pages.
- 7- Abbasi N, Soudi S, Hayati-Roodbari N, Dodel M, Soleimani M. The effects of plasma treated electrospun nanofibrous poly (ϵ -caprolactone) scaffolds with different orientations on mouse embryonic stem cell proliferation. *Cell J*. 2014;16(3):245-54.
- 8- Pappa AM, Karagkiozaki V, Krol S, Kassavetis S, Konstantinou D, Pitsalidis C, et al. Oxygen-plasma-modified biomimetic nanofibrous scaffolds for enhanced compatibility of cardiovascular implants. *Beilstein J Nanotechnol*. 2015;6:254-62.
- 9- Bacakova M, Lopot F, Hadraba D, Varga M, Zaloudkova M, Stranska D, et al. Effects of fiber density and plasma modification of nanofibrous membranes on the adhesion and growth of HaCaT keratinocytes. *J Biomater Appl*. 2015;29(6):837-53.
- 10- Desai TA. Micro- and nanoscale structures for tissue engineering constructs. *Med Eng Phys*. 2000;22(9):595-606.
- 11- Sill TJ, von Recum HA. Electrospinning: Applications in drug delivery and tissue engineering. *Biomaterials*. 2008;29(13):1989-2006.