

Use of skin tissue engineering for developing a novel approach for creation of a skin substitute by chitosan and gelatin immobilization on silicone film

Hamid Aboutaleb Kadkhodaeian(Ph.D.)^{1,2}, Amir Salati(Ph.D.)^{1,3} and Mojtaba Ansari(Ph.D.)⁴

1.Nervous System Stem Cells Research Center, Semnan University of Medical Sciences, Semnan, Iran.

2.Department of Anatomical Sciences, School of medicine, Semnan University of Medical Sciences, Semnan, Iran.

3.Department of Tissue Engineering and Applied Cell Sciences, School of Medicine, Semnan University of Medical Sciences, Semnan, Iran.

4. Department of Biomedical Engineering, University of Meybod, Meybod, Yazd,Iran, Tel: E-Mail: amir.salati@yahoo.com

ABSTRACT

Background and Aim: Nowadays, the tissue-engineered products have shown promising effect in the treatment of different skin-related damages such as wounds and deep burns. The nature of the surfaces of these substitutes plays a key role in the interaction between tissue and biomaterials. Before biomedical applications, modification of the surface of these materials is important.

Material and Methods: In this study, acrylic acid in different concentrations were grafted on silicone (after activating the surface of silicone film by two step plasma method). Then, chitosan and gelatin at different concentrations were immobilized on the samples. Then, surface characterization and properties were evaluated by ATR-FTIR and contact angle (sessile drop method). Finally, we evaluated cell attachment, cell spreading and the number of L929 cells.

Result: The results showed that the amount of grafted acrylic acid on silicone film was significantly influenced by acrylic acid monomer concentrations. Also the presence of the graft was verified by ATR-FTIR. The results also demonstrated that increased concentrations of acrylic acid and chitosan led to increased rate of surface hydrophilia. Cell attachment, spreading, and cell number onto silicone films treated by immobilization of chitosan and gelatin, were more in comparison to other samples.

Conclusion: Due to its high biocompatibility, the tissue-engineered skin product can be used as a skin replacement in various skin wounds and burns.

Keywords: Skin tissue engineering, Chitosan , Gelatin , Silicone , Surface modification

Received: Oct 02, 2018 **Accepted:** Dec 26, 2018

How to cite the article:

Aboutaleb Kadkhodaeian H, Salati A, Ansari M. Use of skin tissue engineering for developing a novel approach for creation of a skin substitute by chitosan and gelatin immobilization on silicone film. SJKU 2018; 23 (6): 72-88.

Copyright © 2018 the Author (s). Published by Kurdistan University of Medical Sciences. This is an open access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution-Non Commercial License 4.0 (CCBY-NC), where it is permissible to download, share, remix, transform, and buildup the work provided it is properly cited. The work cannot be used commercially without permission from the journal.

استفاده از مهندسی بافت پوست به منظور دستیابی به روشی نوین جهت ساخت یک جایگزین پوستی با استفاده از تثبیت کیتوسان و ژلاتین بر روی فیلم سیلیکونی

حمید ابوطالب کدخداییان (Ph.D)^۱، امیر سلاطی (Ph.D)^۲ و مجتبی انصاری (Ph.D)^۳

۱. مرکز تحقیقات سلول‌های بنیادی سیستم عصبی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی سمنان، سمنان، ایران

۲. گروه علوم تشریح، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی سمنان، سمنان، ایران

۳. گروه مهندسی بافت و علوم سلولی کاربردی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی سمنان، سمنان، ایران، تلفن ۳۳۶۵۴۱۶۲ - ۰۲۳

Email: amir.salati@yahoo.com

۴. دانشکده مهندسی پزشکی، دانشگاه میبد، میبد، ایران

چکیده:

زمینه و هدف: امروزه محصولات مهندسی بافت نویدبخش درمان ضایعات پوستی از قبیل زخم‌ها و سوختگی‌های عمیق است. ماهیت سطوح این جایگزین‌ها نقشی کلیدی در برهمکنش بین بافت و زیست مواد ایفا می‌کند و اصلاح سطح برای این مواد قبل از کاربردهای پزشکی دارای اهمیت فراوانی است. هدف مطالعه حاضر طراحی و ساخت یک جایگزین پوستی با تکنیک‌های مهندسی بافت است.

روش بررسی: در این مطالعه، ابتدا پس از فعال کردن سطح فیلم سیلیکونی با روش پلاسمای دو مرحله‌ای، اکریلیک اسید در غلظت‌های مختلف بر روی فیلم سیلیکونی پیوند زده شد. سپس کیتوسان و ژلاتین با درصدهای مختلف بر روی نمونه‌ها تثبیت شدند. خواص سطح به وسیله طیف‌سنجی تبدیل فوریه مادون قرمز^۱ و سنجش زاویه تماس ارزیابی شد. در پایان چسبندگی، پخش شوندگی و تعداد سلول‌های L929 بر روی نمونه‌ها مطالعه شد.

یافته‌ها: نشان داده شد که میزان اکریلیک اسید پیوند زده شده بر روی فیلم سیلیکونی به طور چشمگیری تحت تأثیر غلظت مونومر اکریلیک اسید است. همچنین وجود این پیوند با روش طیف‌سنجی تبدیل فوریه مادون قرمز به اثبات رسید. نتایج نشان داد که میزان آبدوستی سطح با افزایش میزان کیتوسان و غلظت اکریلیک اسید بیشتر می‌شود. همچنین چسبندگی سلولی و میزان رشد سلول بر روی فیلم سیلیکونی طراحی شده با مقادیر بهینه، به مراتب بیشتر از سایر نمونه‌ها بود.

نتیجه‌گیری: مطابق با نتایج به‌دست آمده پوست مصنوعی طراحی شده به دلیل زیست سازگاری بالا، برای کاربردهای ترمیم زخم و سوختگی بسیار مناسب است.

کلیدواژه: مهندسی بافت پوست، کیتوسان، ژلاتین، سیلیکون، اصلاح سطح

وصول مقاله: ۹۷/۷/۱۰ اصلاحیه نهایی: ۹۷/۱۰/۲ پذیرش: ۹۷/۱۰/۵

مقدمه

پوست نقش مهمی را در سلامت انسان‌ها دارد و نقص در آن می‌تواند مشکلات عمده‌ای را در روند طبیعی فیزیولوژی بدن ایجاد نماید (۱). همچنین وسیع‌ترین، نازک‌ترین و درعین‌حال در دسترس‌ترین عضو بدن محسوب می‌گردد (۱). این ارگان به دلایل مختلف از جمله دلایل آناتومیک (حد فاصل درون و بیرون بدن)، در معرض بیشترین آسیب در مقایسه با دیگر اعضا و بافت‌ها است (۲)، که به دلیل اهمیت آن، روش‌های گسترده‌ای برای ترمیم آن مطرح است. یکی از مهم‌ترین این روش‌ها، استفاده از جایگزین‌های پوستی است که با روش‌های مهندسی بافت پوست طراحی و ساخته می‌شوند (۳). مزیت این جایگزین‌های پوستی در مقایسه با پیوندهای پوستی، نداشتن محدودیت منابع و عدم وجود واکنش‌های ایمنی است (۴). امروزه استفاده از پلیمرهای زیست سازگار نظیر سیلیکون به دلیل خواص زیستی مناسب، جهت کاربردهای مهندسی بافت و همچنین جایگزین‌های پوستی بسیار مورد توجه است (۵، ۶). ماهیت سطوح این جایگزین‌ها نقشی کلیدی در برهمکنش بین بافت و زیست مواد ایفا می‌کند و اصلاح سطح برای این مواد، قبل از کاربردهای پزشکی دارای اهمیت فراوانی است (۷، ۸). پیوند مونومرهای آبدوست مانند ۲- هیدروکسی اتیل متاکریلات^۱، اکریل آمید^۲ و اکریلیک اسید^۴ بر روی سطح سیلیکون می‌تواند خواص آن را در جهت کاربردهای مهندسی بافت پوست بهبود ببخشد (۹، ۱۰). پلی اکریلیک اسید نوعی هیدروژل است که خاصیت تورم در آب را دارد، هیدروژل‌ها خواص فیزیکی شبیه به بافت‌های انسانی را داشته و سازگاری بافتی خوبی را نشان می‌دهند. مهم‌ترین عیب هیدروژل‌ها خواص مکانیکی ضعیف آن‌ها پس از تورم است. برای برطرف کردن این عیب، معمولاً یک هیدروژل بر روی یک پلیمر

HEMA^۲
AAm^۳
AAc^۴

زمینه که دارای خواص مکانیکی مناسب است، پیوند می‌گردد. پیوند دوتایی کربن-کربن در ساختار اکریلیک اسید به آسانی به پلیمرها متصل می‌گردد. علاوه بر این، ماده زمینه‌ای می‌تواند بعد از پلیمریزاسیون پیوندی نیز بر خواص فیزیکی و شیمیایی خود باقی بماند. همه این مزایا اکریلیک اسید را یک ماده شیمیایی معمول مورد استفاده در پلیمریزاسیون پیوندی می‌نماید (۱۱). این پیوندزنی با روشی تحت عنوان «پیوند زنی با استفاده از عملیات دومرحله‌ای پلاسمای اکسیژن» صورت می‌پذیرد (۱۲). این روش شامل دو مرحله است. تابش پلاسما برای اولین بار برای فعال کردن سطح و مرحله دوم جهت پلیمریزاسیون انجام می‌پذیرد. برخی از مزایای فرآیند پلیمریزاسیون پیوندی توسط عملیات دومرحله‌ای پلاسما نسبت به روش پلیمریزاسیون پیوندی از طریق القاء پلاسمایی را می‌توان به صورت زیر بیان نمود (۱۲): الف) زمان کوتاه‌تر پلیمریزاسیون، ب) عدم نیاز به کنترل pH محلول منومری در هنگام عملیات پیوندزنی، ج) عدم نیاز به اکسیژن زدایی محلول قبل از واکنش، د) مقدار بیشتر پلیمر پیوندی در سطح، ز) ایجاد سطوح اصلاح شده یکنواخت تر.

از طرفی دیگر مطالعات مختلف نشان می‌دهد که ترکیب پلیمرهای طبیعی ژلاتین و کیتوسان، چسبندگی و پهن شوندگی سلول‌های مختلف بر روی سطح را افزایش می‌دهد و موجب ترغیب رشد سلولی می‌شود (۱۳-۱۸). پلیمرهای طبیعی توانایی قابل توجهی به عنوان یک زیست ماده در حوزه مهندسی بافت از جمله جایگزین‌های بافتی دارند. موادی شامل پلیمرهای زیست سازگار سطوح حمایتی را برای تثبیت مولکول‌های فعال از نظر زیست‌شناسی و سلول‌های زنده تدارک می‌نمایند. همچنین چسبندگی سلولی، زیست سازگاری و تخریب زیستی عالی دارند (۱۹، ۲۰). امروزه مشخص شده است که خواص سطحی زیست ماده واکنش‌های میان ماده محیط زیستی را رقم می‌زنند. در حوزه مهندسی بافت، مواد پلیمری، سطحی را برای تثبیت

مواد و روش ها

مواد. مواد مصرفی در انجام آزمایش ها همگی از گرید آزمایشگاهی بودند. اکریلیک اسید، اسید استیک، اسید کلریدریک، کربودی ایمید محلول در آب و ژلاتین از شرکت Merck® تهیه گردید. کیتوسان از شرکت کیتوتک تهیه شد. سلول های فیروبلست L929 از انستیتو پاستور ایران تهیه شد. همچنین سیلیکون (پلی دی متیل سیلوکسان) از نوع بیومدیکال -MDX4 SILASTIC® 4210 مورد استفاده قرار گرفت. این الاستومر محصولی دوجزئی و جریان پذیر است که پس از ترکیب در دمای اتاق یا دماهای بالاتر پخت می شود. جزء الاستومری از دی متیل سیلوکسان، سیلیکای تقویت شده و یک کاتالیزور پلاتینی تشکیل شده است. جزء دوم یعنی عامل پخت از دی متیل سیلوکسان، یک بازدارنده و یک عامل پخت شبکه ای کننده سیلیکونی تشکیل شده است.

تجهیزات. دستگاه پلاسمای Emiteck مدل K 1050X، دستگاه تعیین زاویه تماس Kruss مدل LBI02، دستگاه اسپکتروفتومتر مادون قرمز تبدیل فوری به روش بازتابش کلی تضعیف شده Brucker مدل equinox 55 و ترازوی دیجیتالی دقیق با دقت ۱۰ میکروگرم، از وسایل مورد استفاده در این مطالعه بود.

پیوندزنی اکریلیک اسید بر روی سیلیکون با استفاده از عملیات دو مرحله ای پلاسمای اصلاح سطح فیلم های سیلیکونی با روش «پیوند زنی اکریلیک اسید با استفاده از عملیات دو مرحله ای پلاسمای اکسیژن» انجام شد. این روش شامل دو مرحله است. همچنین در هر دو مرحله گاز اکسیژن برای تولید پلاسمای به کار گرفته شد (۱۲). فرمول شیمیایی پیوندزنی به شرح زیر است (شکل ۱).

تهیه محلول اسیداکریلیک. محلول آبی اکریلیک اسید بعد از خالص سازی به وسیله تقطیر خلأ با درصدهای مختلف

مولکول های فعال از نظر زیستی و سلول های زنده ایجاد می کنند (۱۹).

به طور معمول در طراحی و ساخت جایگزین های پوستی، خواص سطحی و زیستی مواد مورد استفاده و تعامل آن با بافت پوست جزو پارامترهای اصلی در نظر گرفته می شود. با ترکیب مواد پلیمری مختلف که هریک به تنهایی دارای خواص مناسب زیستی جهت کاربردهای مهندسی بافت پوست می باشند، می توان به خواص مناسب تری جهت این کاربرد دست پیدا نمود. تاکنون این خواص بر روی ترکیب کیتوسان و ژلاتین به صورت هم زمان که با روش پلاسمای دومرحله ای بر روی سیلیکون پیوند زده شده باشد مورد بررسی قرار نگرفته است.

اگر به این موضوع دقت شود که امروزه پیوندهای پوستی با در نظر گرفتن مشکلات عدیده شان نظیر محدودیت در تأمین آن و همچنین واکنش های ایمنی که از طرف فرد میزبان انجام می گیرد، به خوبی نمی تواند پاسخگوی مشکلات بیمارانی بسیار باشد که قسمتی از پوست خود را به دلیل آسیب های ناشی از بیماری، سوختگی، تصادف و ... از دست می دهند، انجام این مطالعه و ساخت جایگزین پوستی با استفاده از تکنیک های مهندسی بافت زمانی اهمیت می یابد. امروزه با توسعه تکنیک ها و ترکیبات نوین مواد زیست سازگار و همچنین تلفیق این روش ها با استفاده از موادی که باعث افزایش رشد و تکثیر سلول های پوست می شوند می توان جایگزین های پوستی را بر پایه اصول مهندسی بافت پوست طراحی نمود که نیاز بیماران به پیوندهای پوستی به حداقل ممکن برسد.

ما در این مطالعه تلاش داریم با استفاده از پلیمر سنتزی سیلیکون و پلیمرهای طبیعی کیتوسان و ژلاتین که همگی خواص زیستی بالایی دارند و همچنین با بهره گیری از تکنیک های مختلف اصلاح سطح و مهندسی بافت، جایگزین پوستی را طراحی و بسازیم که هم خواص زیست سازگار مناسب از خود نشان دهد و هم بستری جهت چسبندگی، رشد و تکثیر سلول های فیروبلست باشد.

° TSPT

(۰/۵۰-۰/۶۰-۰/۷۰-۰/۸۰-۰/۹۰٪) با استفاده از آب دیونیزه تهیه گردید.

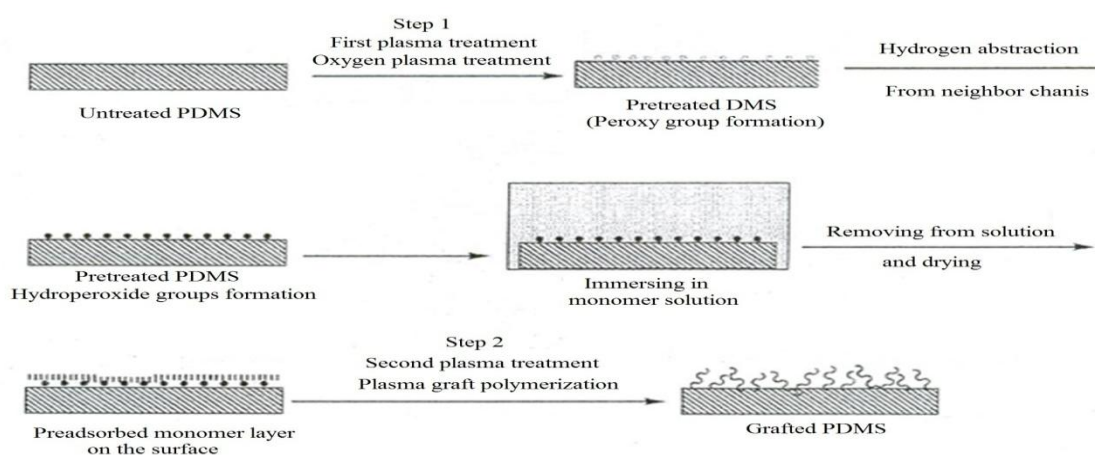
پیش تابش پلاسما. در این مرحله فیلم‌های سیلیکونی به ابعاد میکرومتر ۳۰۰ × میلی متر ۴۰ × میلی متر ۳۰ به منظور پیش تابش با پلاسمای اکسیژن در محفظه واکنش دستگاه پلاسما قرار گرفتند. خلأ اعمالی در تمام آزمایش‌ها ۰/۶ میلی بار بود. کلیه نمونه‌ها با توان ۶۰ وات دستگاه پیش تابش شدند. زمان تابش پلاسما ۳۵ ثانیه و دمای محفظه پلاسما در هنگام آزمایش ۱۸۰ درجه سانتی گراد بود. سپس فیلم‌های پلاسما دیده در محلول آبی منومرهای اکریلیک اسید در دمای اتاق به مدت ۱۰ دقیقه قرار داده شدند. سپس نمونه‌ها از محلول خارج شده و در دمای ۴۰ درجه سانتی گراد به مدت ۵ دقیقه خشک شدند.

پیوند زنی از طریق پلیمریزاسیون پلاسمایی. در دومین مرحله از عملیات دو مرحله‌ای پلاسما، فیلم‌های پیش تابش شده توسط پلاسما که روی آن‌ها پوشیده شده از منومرهای فعال اکریلیک اسید بود، مجدداً تحت تابش پلاسمای اکسیژن

قرار گرفتند. در این مرحله نیز مانند مرحله قبل از خلأ ۰/۶ میلی بار و توان ۶۰ وات دستگاه استفاده گردید ولی زمان تابش دهی به مدت ۳ دقیقه در نظر گرفته شد. سپس به منظور خارج کردن منومرهای واکنش نکرده احتمالی و هموپلیمرهای باقیمانده در سطح نمونه‌های پیوند زده شده، این نمونه‌ها به مدت ۷۲ ساعت با آب دوبار تقطیر شستشو داده شدند. مقدار پلیمر پیوند شده با استفاده از رابطه زیر محاسبه گردید:

$$\frac{W_g - W_0}{A} = \text{میزان پیوند (میکرو گرم / مجذور سانتی متر)}$$

که در آن W_g وزن فیلم پیوند زده شده در حالت خشک، W_0 وزن اولیه فیلم سیلیکونی (وزن فیلم سیلیکونی قبل از پیوند زنی) و A مساحت فیلم پیوند زده شده است (شکل ۱).



شکل ۱. پیوند زنی اکریلیک اسید بر روی سیلیکون با استفاده از عملیات دو مرحله‌ای پلاسما

آبی کربودی ایمید^۸ با غلظت ۱۰ میلی گرم بر میلی لیتر به مدت ۳۰ دقیقه و در دمای ۴ درجه سانتی گراد قرار داده شدند و سپس در محلول ۰/۰۰۱ مولار اسید کلریدریک شست و شو داده شدند.

مرحله تثبیت. فیلم های فعال شده در محلول های مختلف حاوی درصد های متفاوت کیتوسان و ژلاتین قرار داده شده و به مدت ۲۴ ساعت در دمای اتاق (برای نمونه با ۱۰۰٪ کیتوسان در دمای ۴ درجه سانتی گراد) نگهداری گردیدند تا تثبیت بیوپلیمرها انجام پذیرد. نمونه ها بعد از خروج از محلول ها، در محلول ۰/۰۰۱ مولار اسید کلریدریک شست و شو داده شدند. آنالیز سطوح به دست آمده در هر مرحله توسط سه روش اندازه گیری (اندازه گیری زاویه سطح تماس و طیف سنجی مادون قرمز) انجام پذیرفت.

استریلیزاسیون. نمونه ها قبل از استفاده برای انجام کشت سلولی فیرو بلاست، ضد عفونی شدند. به این منظور نمونه ها ابتدا در محلول آبی اتانل ۷۰ درصد به مدت ۱۲ ساعت فروبرده شدند و بعد از آن و قبل از انجام عملیات کشت سلولی، به مدت ۱۲ ساعت در داخل آب دیونیزه استریل، قرار داده شدند.

کشت سلولی و رنگ آمیزی: به منظور ارزیابی سمیت سلولی نمونه های اصلاح شده و همچنین بررسی رفتار سلولی بر روی این سطوح از آزمون کشت سلولی استفاده شد. در این آزمایش ها سلول های فیرو بلاست L-۹۲۹ موش که از بانک سلولی انستیتو پاستور ایران تهیه شده بود، مورد استفاده قرار گرفت. برای کشت سلولی از محیط RPMI-۱۶۴۰ حاوی ۱۰ میکروگرم بر میلی لیتر سرم گاوی، پنی سیلین با غلظت ۱۰۰ IU بر میلی لیتر و همچنین استرپتومایسین با غلظت ۱۰۰ میکروگرم بر میلی لیتر استفاده گردید. (۲۱). از هر فیلم سیلیکونی اصلاح نشده و اصلاح شده ی مختلف دو نمونه مشابه به ابعاد ۱ سانتی متر × ۱ سانتی متر تهیه شده و در داخل پتری دیش قرار داده شده، سپس فیکس گردید. پس از آن ۵

تعیین زاویه تماس. زاویه های تماس استاتیک به روش قطره سسایل^۶ اندازه گیری شدند. بدین منظور نمونه ها به مدت ۳۰ روز در آب دیونیزه نگهداری شده و سپس کاملاً خشک گردیده و برای اندازه گیری زاویه تماس از قطرات آب برای ۵ نقطه از سطح استفاده گردید. میانگین مقادیر اندازه گیری شده در ۵ نقطه متفاوت برای هر نمونه ثبت گردید.

طیف سنجی تبدیل فوریه مادون قرمز. به منظور شناسایی سطح نمونه های اصلاح شده، طیف مادون قرمز نمونه ها، قبل و بعد از اصلاح با استفاده از یک دستگاه طیف سنجی تبدیل فوریه مادون قرمز به روش بازتابش کلی تضعیف شده^۷ به دست آمد.

تثبیت کیتوسان و ژلاتین و آنالیز سطح. کیتوسان و ژلاتین با واسطه پلی اکریلیک اسید پیوندی بر سطح سیلیکون در طی مراحل ذیل تثبیت گردیدند. فرمول شیمیایی آن به شرح زیر است (شکل ۲). نحوه تثبیت کیتوسان و ژلاتین روی سطح پلی دی متیل سیلوکسان پیوند خورده با اکریلیک اسید (کیتوسان و ژلاتین) فقط یک مرحله استخلاف نشان داده شده است.

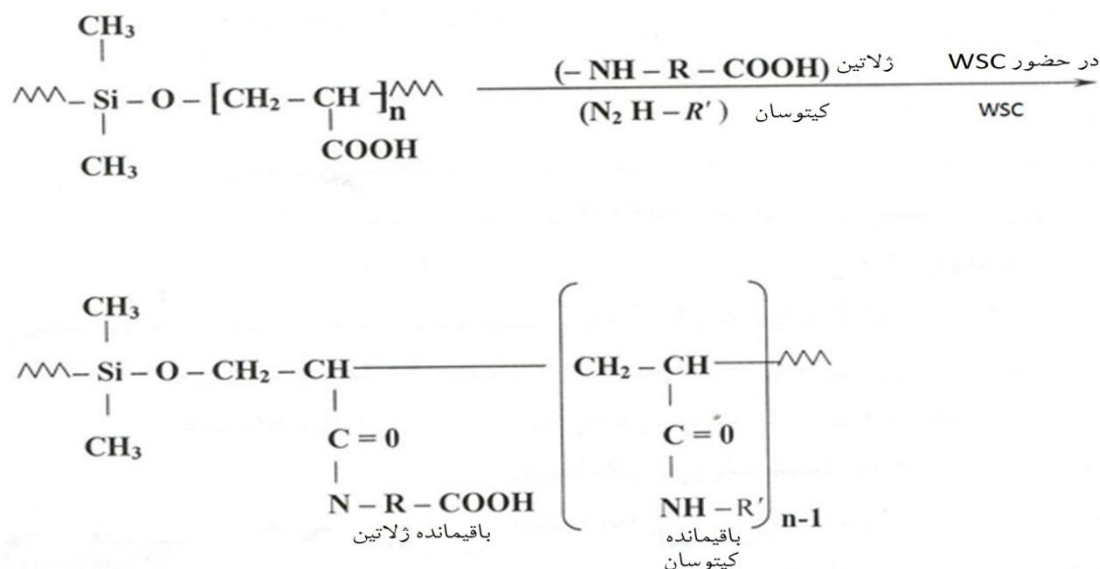
تهیه محلول کیتوسان و ژلاتین با درصد های مختلف. محلول کیتوسان و ژلاتین هر دو با غلظت ۱ میلی گرم بر میلی لیتر در محلول آبی اسید استیک (۶ میکرو لیتر در میلی لیتر ۱۰ آب) با $\text{pH} = 3/5$ به طور جداگانه تهیه گردیدند و به مدت ۷۲ ساعت در دمای ۴ درجه سانتی گراد برای محلول کیتوسان و دمای اتاق برای محلول ژلاتین بر روی یک همزن قرار داده شدند. سپس محلول های کیتوسان و ژلاتین با نسبت های ذیل از محلول های اولیه تهیه گردیدند. (۰-۱۰۰، ۲۰-۸۰، ۴۰-۶۰، ۶۰-۴۰)

فعال کردن پلی اکریلیک اسید پیوند شده بر سیلیکون. جهت فعال کردن گروه های کربوکسیلیک در پلی اکریلیک اسید پیوندی، نمونه هایی به ابعاد ۱ سانتی متر × ۱ سانتی متر از فیلم های پلیمری پیوند شده با پلی اکریلیک اسید در محلول

WSC^۸Sessile drop^۶
ATR^۷

نسخه ۳۳ محاسبه گردید. بدین منظور از ۳ ناحیه متفاوت در سطح هر نمونه عکس برداری گردید. تحلیل آماری. با استفاده از نرم افزار SPSS نسخه ۱۶، پس از رعایت پیش فرض های آماری، داده های به دست آمده در مطالعه با آزمون آماری تحلیل کوواریانس چندمتغیره MANCOVA و یک متغیره ANCOVA تجزیه و تحلیل شدند. سطح معناداری ۰/۰۵ در نظر گرفته شد.

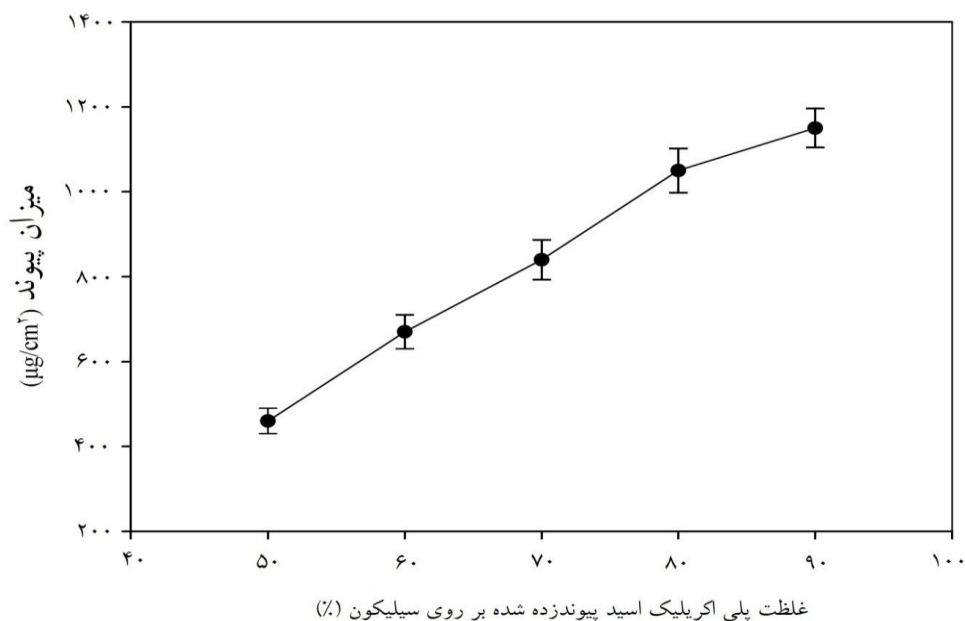
میلی لیتر از سوسپانسیون حاوی سلول روی آن ها ریخته شد و به همراه نمونه کنترل به مدت ۱۲، ۴۸ و ۷۲ ساعت در انکوباتور نگهداری شدند. سپس نمونه ها از محیط کشت خارج گردیده و با محلول PBS شستشو داده شدند. به منظور ثبوت نمونه ها هر کدام در اتانول به مدت ۵ دقیقه قرار گرفتند. بعد از انجام این کار فیکساسیون صورت پذیرفت. سپس تعداد و سطح سلول های چسبیده در سطح نمونه ها با استفاده از عکس های گرفته شده با میکروسکوپ نوری در بزرگمایی ۴۰۰ با استفاده از نرم افزار Image Pro Plus



شکل ۲. تثبیت کیتوسان و ولایتین بر روی سیلیکون

ملاحظه می شود که با افزایش غلظت اکریلیک اسید و به تبع آن افزایش احتمال واکنش های مورد نظر بر روی سطح، میزان پلیمر پیوند زده شده بر روی سیلیکون بیشتر می شود.

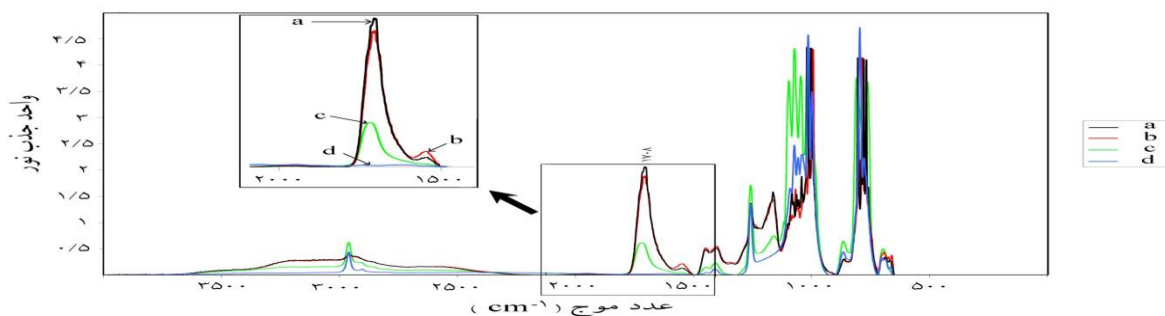
نتایج
مقدار پلیمر پیوندی بر روی سطح سیلیکون: جهت پی بردن به میزان اکریلیک اسید پیوند زده شده بر روی سطح می بایست میزان پیوند را برای غلظت های مختلف اکریلیک اسید محاسبه نمود که نتایج آن در شکل ۳ دیده می شود.



شکل ۳. میزان اکریلیک اسید پیوندی بر روی سطح سیلیکون با روش پلاسمای دو مرحله ای

مربوط به فیلم های سیلیکون، قبل و بعد از تابش پلاسمای اکسیژن و همچنین نمونه های اصلاح شده با هم مقایسه شده اند.

طیف سنجی. نتایج حاصل از طیف های تبدیل فوریه مادون قرمز نمونه های سیلیکونی اصلاح شده، وجود پلیمر پیوندی را در سطح سیلیکون اثبات نمود. در شکل ۴. طیف های

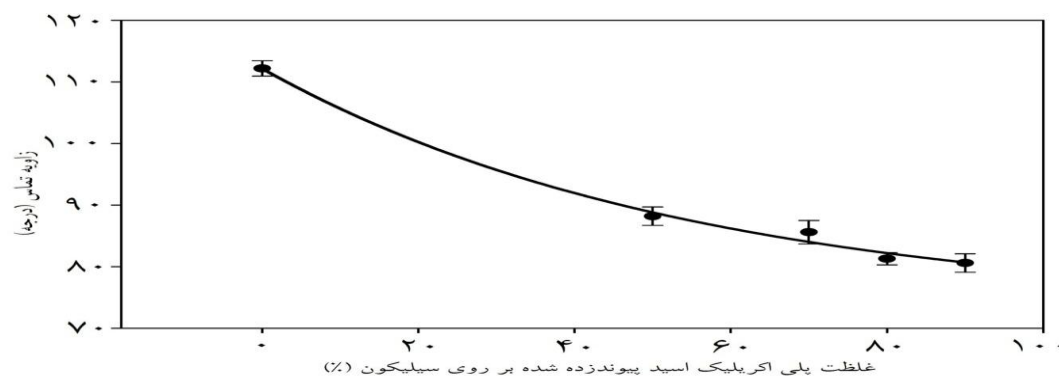


شکل ۴. اثر غلظت اکریلیک اسید پیوندزده شده بر روی سیلیکون به وسیله پلاسمای

اکریلیک اسید با غلظت (a: ۹۰٪، b: ۷۰٪، c: ۵۰٪) و d: سیلیکون

یک سطح نسبتاً صاف است که با پیوند پلی اکریلیک اسید به صورت سطح ناصاف و گرانوله درمی آید که با افزایش میزان پلیمر پیوندی بر روی سطح این زبری روندی افزایشی می یابد.

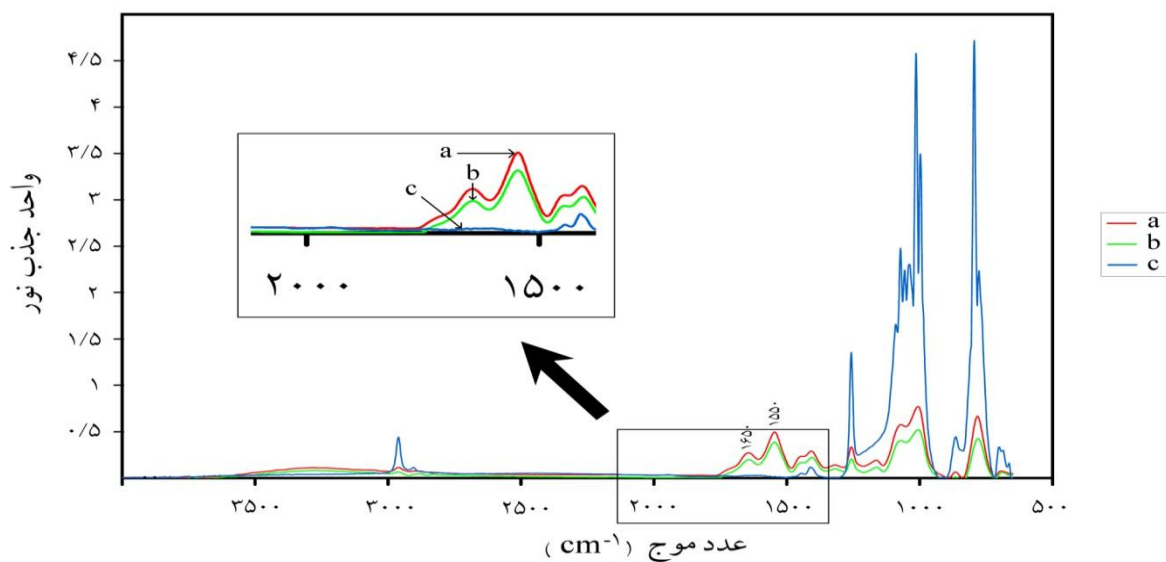
تعیین زاویه تماس. نتایج حاصل از اندازه گیری زاویه تماس استاتیک به روش قطره سسایل در نمونه های سیلیکونی اصلاح شده با منومرهای اکریلیک اسید، در مقادیر مختلف غلظت پلیمر پیوندی در شکل ۵. آمده است. سطح سیلیکون



شکل ۵. زاویه تماس نمونه های مختلف بر حسب غلظت اکریلیک اسید پیوند زده شده بر روی سطح سیلیکون

۱۵۵۰ و 1650 cm^{-1} به ترتیب نشانگر گروه های -NH_2 و -CO است. مقایسه این طیف با طیف سیلیکون، نشان دهنده حضور کیتوسان و ژلاتین بر سطوح است.

تثبیت کیتوسان و ژلاتین. کیتوسان و ژلاتین با درصدهای مختلف وزنی که ذکر شد، بر روی نمونه سیلیکونی پیوند شده با اکریلیک اسید تثبیت گردیدند. طیف سنجی. همان گونه که در شکل ۶. ملاحظه می شود، جذب باند اختصاصی مربوط به کیتوسان و ژلاتین در cm^{-1}

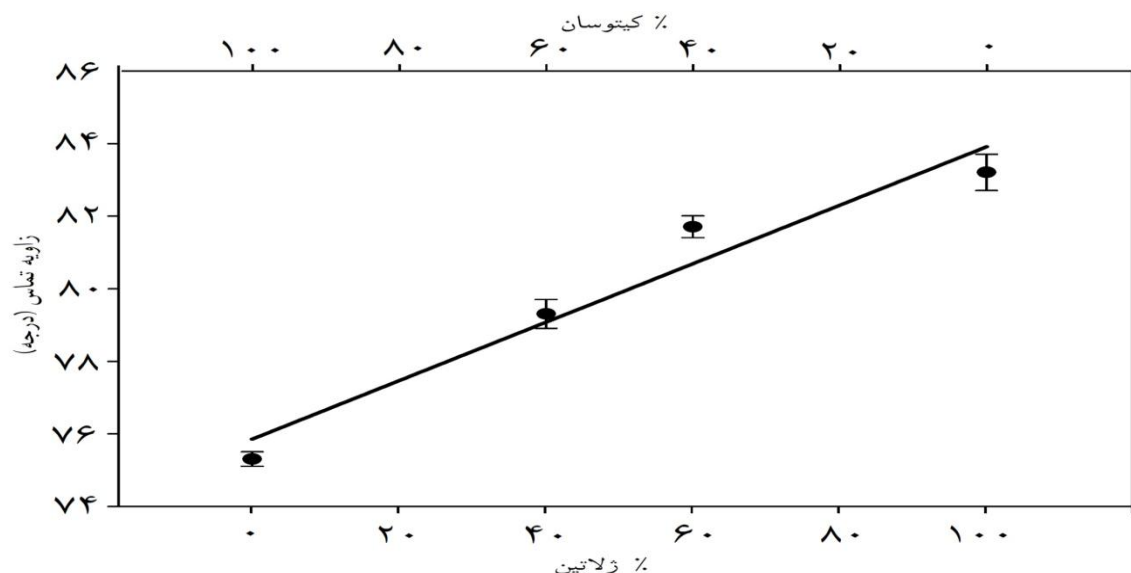


شکل ۶. طیف سنجی نمونه های تثبیت شده کیتوسان و ژلاتین

a: نمونه تثبیت شده با ۶۰٪ کیتوسان و ۴۰٪ ژلاتین، b: نمونه تثبیت شده با ۴۰٪ کیتوسان و ۶۰٪ ژلاتین، c: سیلیکون

افزایش زاویه تماس است که شکل ۷. به خوبی مؤید این مطلب است.

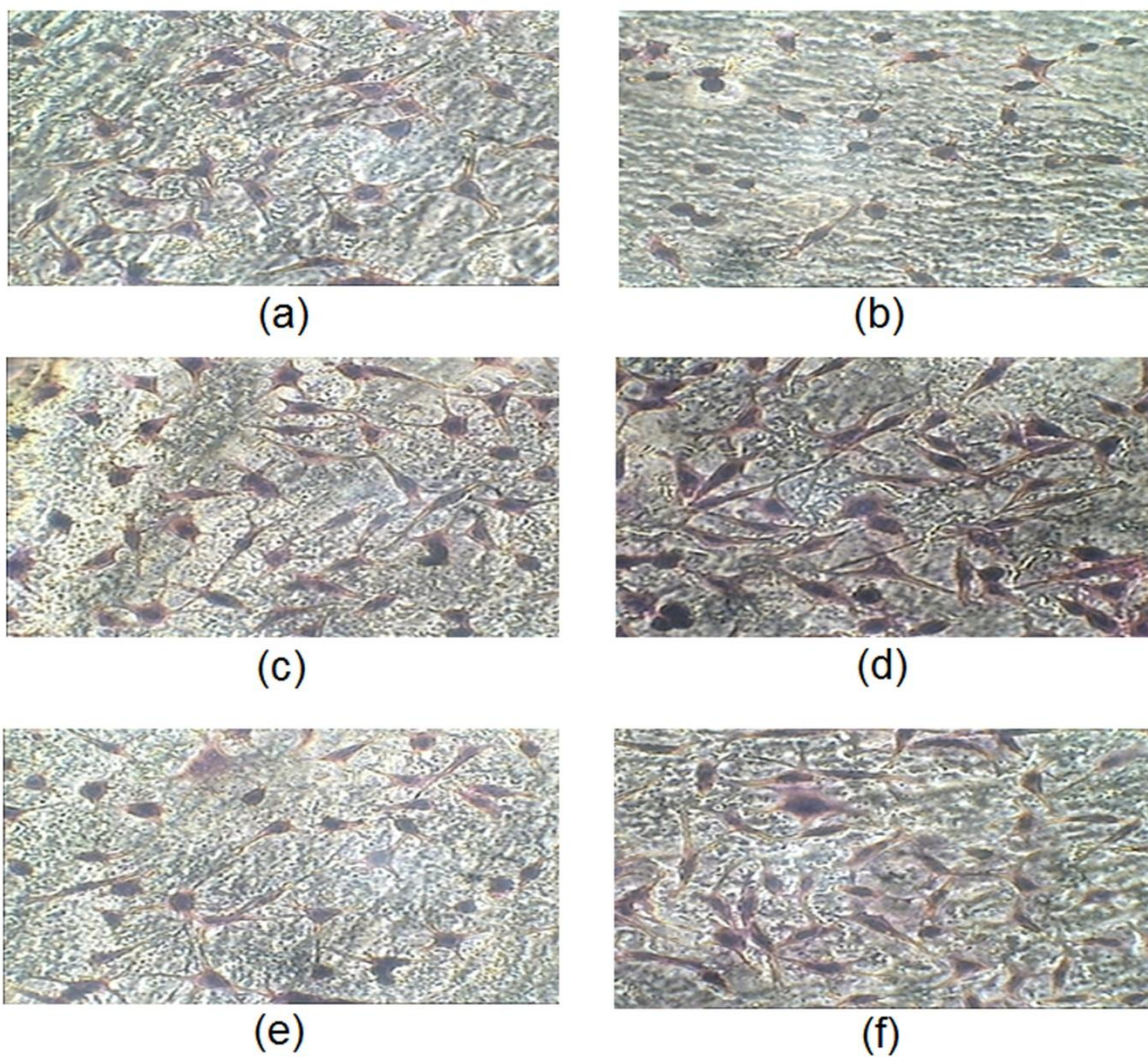
تعیین زاویه تماس. جهت بررسی زاویه سطح تماس قطره آب با چهار نمونه تثبیت شده ژلاتین و کیتوسان اندازه گیری شد. نتایج حاصل، نشان دهنده مرتبط بودن درصد ژلاتین با



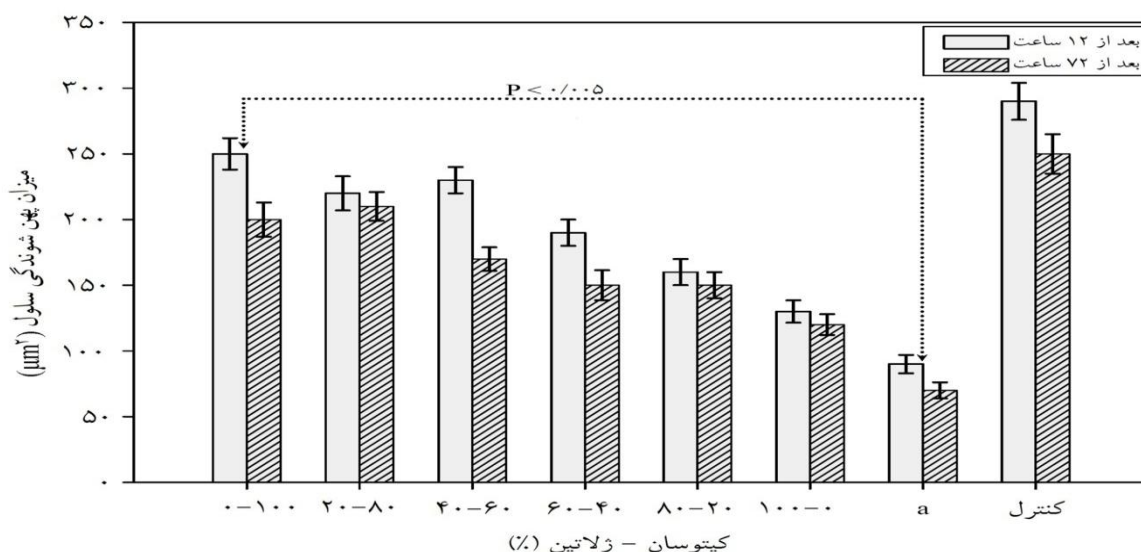
شکل ۷. میزان زاویه تماس در نمونه های تثبیت شده با کیتوسان و ژلاتین

به طور معنی داری بیش از نمونه های کیتوسانی تثبیت شده است و میزان پهن شدگی در نمونه های پلی اکریلیک اسید پیوندی بر سیلیکون بسیار کم است.

بررسی پهن شوندگی سلولی. اشکال ۸ و ۹. میزان پهن شوندگی سلول ها را نشان می دهد. همان گونه که دیده می شود میزان پهن شوندگی در نمونه های ژلاتینی تثبیت شده



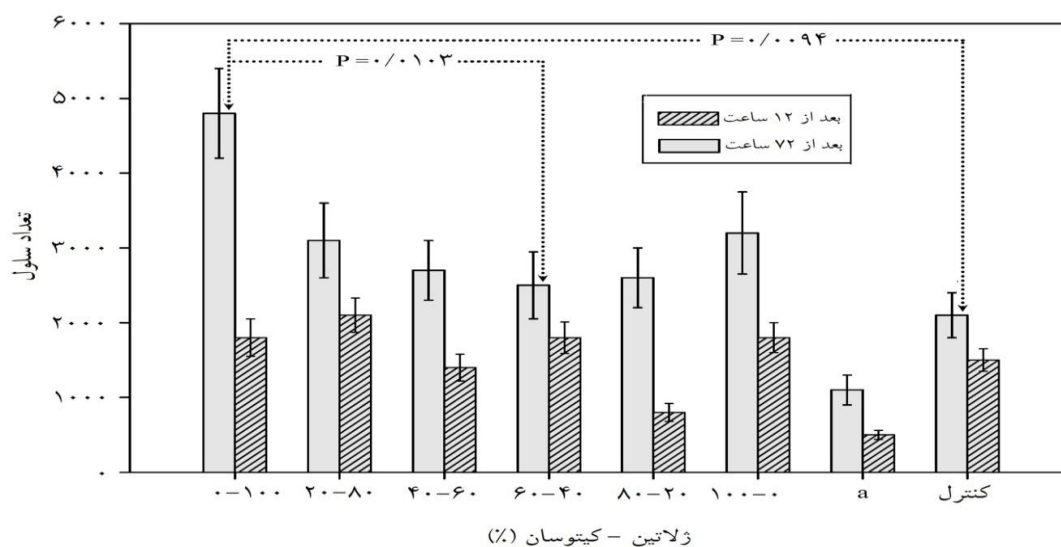
شکل ۸. تصاویر میکروسکوپ نوری با بزرگنمایی ۴۰۰: a: سیلیکون اصلاح نشده، b: سیلیکون با اکریلیک اسید پیوند زده شده، [c: ۱۰۰٪ کیتوسان، d: ۱۰۰٪ ژلاتین، e: ۸۰٪ کیتوسان و ۲۰٪ ژلاتین و f: ۲۰٪ کیتوسان و ۸۰٪ ژلاتین] تثبیت شده بر سیلیکون پیوند زده شده با اکریلیک اسید.



شکل ۹. میزان پهن شونده گی سلول ها بر روی سطوح مختلف. (a: اکریلیک اسید پیوندی بر سیلیکون)

بررسی چسبندگی. شکل ۱۰ تعداد سلول بر سطوح مختلف بعد از ۱۲ و ۷۲ ساعت را نشان می دهد. همان گونه که در کشت های ۱۲ ساعته دیده می شود، مقادیر سلول هم در نمونه های ژلاتینی تثبیت شده و هم در نمونه های کیتوسانی تثبیت شده با درصد های مختلف نسبت به کنترل قابل مقایسه است. برخلاف این سطوح، تعداد سلول های موجود بر

سطوح پلی اکریلیک اسید پیوندی با سیلیکون بسیار کمتر است. به دلیل آنکه گروه های کربوکسیلیک اسید موجود در اسید اکریلیک یک اثر منفی بر چسبندگی، تکثیر و رشد سلولی دارند (۲۲).



شکل ۱۰. تعداد سلول در کشت های ۱۲ و ۷۲ ساعته بر روی سطوح مختلف (a: اکریلیک اسید پیوندی بر سیلیکون)

با توجه به عدم گذشت زمان زیادی از کشت سلولی شاید بتوان تعداد سلول ها را بیش از تکثیر به چسبندگی آن ها بر سطح ارتباط داد. کیتوسان در مقایسه با ژلاتین چسبندگی سلول ها به سطح را افزایش می دهد؛ اما آنچه از شکل ۱۰ برمی آید این است که ظاهراً مخلوط کیتوسان و ژلاتین به نوعی اثر همدیگر را تضعیف می نمایند. به طوری که بیشترین میزان سلول در نمونه هایی قابل مشاهده است که کمترین مقادیر ترکیبی را دارند (نمونه های ۱۰۰٪ کیتوسان و ۱۰۰٪ ژلاتین). و همچنین در نمونه هایی که به صورت ترکیبی از کیتوسان و ژلاتین می باشند، تعداد سلول ها کاهش یافته است. این میزان در نمونه ی با درصد ترکیب ۶۰٪ ژلاتین - ۴۰٪ کیتوسان به پایین ترین میزان خود می رسد.

بررسی تکثیر سلولی. شکل ۱۰ میزان سلول های موجود بر سطح را بعد از ۷۲ ساعت نیز نشان می دهد. همان گونه که ملاحظه می شود، تعداد سلول ها در نمونه های حاوی بیوپلیمرهای تثبیت شده افزایش قابل ملاحظه ای نسبت به نمونه های حاوی پلی اکریلیک اسید پیوند شده بر سطح دارد. در نمونه های پلی اکریلیک اسید پیوندی بر سیلیکون افزایش کمتری در مقایسه با دیگر نمونه ها مشاهده می کنیم. همچنین تعداد سلول ها بر نمونه های حاوی ۱۰۰٪ کیتوسان نیز رشد بسیار خوبی از خود نشان داده اند.

بحث

در این مطالعه، نشان داده شد که میزان اکریلیک اسید پیوند زده شده بر روی فیلم سیلیکونی به طور چشمگیری تحت تأثیر غلظت مونومر اکریلیک اسید است. همچنین وجود این پیوند با روش طیف سنجی تبدیل فوریه مادون قرمز به اثبات رسید. نتایج نشان داد که میزان آبدوستی سطح با افزایش میزان کیتوسان و غلظت اکریلیک اسید بیشتر می شود. همچنین چسبندگی سلولی و میزان رشد سلول بر روی فیلم سیلیکونی طراحی شده با مقادیر بهینه، به مراتب بیشتر از

سایر نمونه ها بود که این نتایج به خوبی توسط مطالعات مشابه تأیید می شود (۹۱ و ۹۲).

کسب موفقیت در عملکرد جایگزین های پوست، به طور مشخص بر اساس چگونگی رفتار سلول و رشد بافت است که در این بین استفاده از یک زیست ماده که به خوبی بتواند خواص زیستی و مکانیکی بافت پوست را تأمین نماید ضروری به نظر می رسد. مهندسی بافت پوست نیازمند یک داریست زیست سازگار است که به خوبی بتواند رشد و تکثیر سلولی را ترغیب نماید (۲۳، ۲۴). خواص الاستومرهای سیلیکون از ویژگی های ذاتی آن ها یعنی پیوندهای قوی موجود در زنجیره، نیروهای درون مولکولی و بین مولکولی ضعیف تر و ساختار غیر آلی / آلی آن ناشی می گردد که برخی از این خواص عبارت اند از: مقاومت در محیط های مایع، خنثی بودن سطح از نظر فیزیولوژیکی، قابلیت عبور دهی بالای گاز (به ویژه اکسیژن) (۹). از دهه های پیش، سال های سیلیکون کاربردهای وسیعی در وسایل پزشکی یافته است. پژوهش های بسیاری نیز بر روی خواص این ماده از جمله میزان سمیت، استحکام، پاسخ بافتی و نفوذپذیری اکسیژن انجام گرفته است. گرچه سیلیکون به واسطه نرمی، استحکام و سازگاری زیستی خوب قبلاً برای جایگزین بافتی بکار رفته، ولی مشکلات جدی در زمانی که وسایل سیلیکونی برای مدت طولانی در بدن حیوانات کاشته می شوند، به وجود آمده است. این مشکلات شامل آسیب ناشی از اصطکاک مکانیکی با بافت و در نتیجه تشکیل بافت فیروزی متراکم در اطراف سیلیکون است. تغییر شیمیایی سطح سیلیکون بدون تغییر در خواص توده روش جایگزین برای کاهش این مسائل است (۲۵). لایه ی سیلیکونی با ضخامت و منافذ مناسب سد باکتریایی و جریان صحیح آب را در حدود اپی درم شکل داده و استحکام لازم برای دوختن را ایجاد می کند. در پوشش های چندلایه که مشخصات پوشش از مجموع خصوصیات لایه ها تأمین می گردد، لایه بالایی معمولاً از فیلم نازک الاستومر سیلیکون است که دارای خواص زیست

سلول های فیروبلست در سطوحی که دارای غلظت ژلاتین تثبیت شده بیشتری بود به طور معناداری بیش از سطوح دیگر بود. این موضوع در گزارش های قبلی نیز دیده می شود (۲۷). تکثیر سلولی یکی از عوامل مهم در فرآیند تشکیل بافت بر روی سطوح بیومتریال ها در هنگام کاشت آن ها در بدن است. به همین منظور کشت سلولی بعد از ۷۲ ساعت نیز مورد ارزیابی قرار گرفت و با کشت های ۱۲ ساعت مقایسه گردید. بدیهی است افزایش تعداد سلول های موجود بر روی سطوح مورد مطالعه نسبت به سطوح قبلی بیش از آنکه نمایانگر چسبندگی سلولی باشد، نمایشگر تکثیر سلولی است. اثر کیتوسان در تکثیر سلول های فیروبلست علی رغم شکل گرد و مدور و عدم گسترده گی (به خصوص در فاز رشد) به وضوح مؤثر است. سلول ها به طور کلی به زمینه های مصنوعی کشت به وسیله اتصال به پروتئین های ویژه ای که به سطح زمینه جذب شده اند، می چسبند. بهترین مولکول های چسبنده، ترکیبات ماتریکس خارج سلولی^۹ مانند فیبرونکتین، لامینین، پروتئوگلیکانها، الاستین و کلاژن ها می باشند. نشان داده شده که پهن شدگی سلول های فیروبلست برای پیشرفت سیکل سلولی و ورود به فاز رشد زمانی که به ماتریکس خارج سلولی متصل می شوند، لازم است (۲۸) که این موضوع مؤید نتایج این پژوهش است. نتایج آزمایش ها نشان داد که مولکول های کیتوسان تثبیت شده می توانند با ماتریکس خارج سلولی، گیرنده های اینگرین، یا دیگر گیرنده های سطح سلولی در منطقه محدود چسبیده شده واکنش نشان دهند. این واکنش باعث می شود که گیرنده های اینتگرین خوشه ای شوند، به گونه ای که برای تولید یک سیگنال جهت ورود سلول ها به مرحله رشد یا تحریک سنتز DNA، بدون ارتباط به شکل سلول کافی است (۲۸). کیتوسان به عنوان یک مرکز با بار مثبت عمل می کند و سطح خارجی غشاء سلول یک بار منفی دارد.

سازگاری مناسب و قابلیت بالای عبور بخار همراه با دوام و کشسانی مناسب است (۵). تحقیقات محدودی در پیوندزنی اسیداکریلیک بر سطوح پلیمری به منظور زیست سازگاری انجام شده است که شاید علت آن، پاسخ های مطلوب تر ۲- هیدروکسی اتیل متااکریلات و اکریل آمید به مسائل فوق بوده است. به نظر می رسد که گروه های کربوکسیلیک اسید موجود در اکریلیک اسید یک اثر منفی در چسبندگی، تکثیر و رشد سلولی داشته باشند و برخلاف گروه های آمینی که بهترین اثر مثبت را در این گونه رفتار سلولی دارند (۲۲). لی و همکارانش، پلیمریزاسیون پیوندی اکریلیک اسید بر روی سیلیکون را با استفاده از پلاسما انجام داده و اثرات زمان پلیمریزاسیون، غلظت منومر و میزان پراکساید را بر میزان پیوند بررسی نمودند (۲۶). در مطالعه حاضر نیز ملاحظه شد که با افزایش غلظت اکریلیک اسید میزان پیوند بر روی سطح بیشتر شد که دلیل اصلی آن می تواند افزایش احتمال واکنش های مورد نظر بر روی سطح باشد. طیف های مادون قرمز نمونه های سیلیکونی اصلاح شده (قبل و بعد از تثبیت کیتوسان و ژلاتین) در مقایسه با نمونه های پیش از اصلاح، وجود پلیمر پیوندی و بیوپلیمرهای تثبیت شده را در سطح سیلیکون اثبات نمود. وجود یک پیک پهن در حدود 3260 cm^{-1} در طیف نمونه پلاسما خورده در مقایسه با طیف سیلیکون اصلاح نشده، نشان دهنده تشکیل گروه های هیدروپراکسیدی پس از تابش پلاسما بر روی نمونه ها است. در طیف نمونه های پیوند داده شده با اکریلیک اسید در مقایسه با نمونه اصلاح نشده، یک پیک نسبتاً قابل ملاحظه را در حدود 1708 cm^{-1} می توان مشاهده نمود. از آنجایی که گروه کربونیل (C=O)، در عامل کربوکسیلیک اکریلیک اسید وجود دارد، می توان نتیجه گرفت که پیک مذکور در نتیجه پیک جذبی مربوط به گروه کربنیل است (۱۲). مقدار زاویه تماس نمونه های اصلاح شده، با افزایش مقدار پلیمر پیوندی با شیب نسبتاً زیاد کاهش یافت که می تواند به علت اضافه شدن گروه های آبدوست باشد (۹). میزان پهن شوندگی

واکنش الکتروستاتیکی میان سلول و زمینه کیتوسانی باعث گرد شدن سلول ها می شود. (۲۹).

اگرچه این پژوهش با محدودیت هایی نظیر عدم بررسی خواص مهم دیگری مانند خواص مکانیکی، بار سطحی و ... (به دلیل محدودیت منابع مالی و امکانات مورد نیاز) به همراه بود، با این حال به خوبی نشان داده شد که فیلم سیلیکونی که با استفاده از روش دو مرحله ای پلازما اصلاح سطح شد و اکریلیک اسید بر روی سطح آن پیوند زده شد و همچنین پلیمرهای طبیعی کیتوسان و ژلاتین بر روی آن تثبیت شدند، برای کاربردهای جایگزین های پوست و مهندسی بافت پوست بسیار مطلوب است. این جایگزین پوستی از نظر خصوصیات سطحی نظیر آبدوستی سطح و حضور گروه های عاملی روی سطح، دارای مزیت های بسیار زیادی در مقایسه با فیلم های سیلیکونی مرسوم است. چسبندگی، رشد و تکثیر سلول های فیروبلست به طور چشمگیری روندی افزایشی داشت.

نتیجه گیری

در این مطالعه یک پوشش چندلایه پوستی متشکل از سیلیکون، به عنوان لایه خارجی و دو پلیمر ژلاتین و کیتوسان، به عنوان لایه داخلی، طراحی و ساخته شد. جهت تحقق این امر اکریلیک اسید بعد از فعال نمودن سطح سیلیکون بوسیله پلازما، روی سیلیکون پیوند داده شد و دو پلیمر ژلاتین و کیتوسان بر روی نمونه ها از طریق پیوند کووالان گروه های فعال کربوکسیلیک پلی اکریلیک اسید تثبیت گردیدند. در این راستا غلظت های مختلفی از

اکریلیک اسید با درصدهای معین جهت دستیابی به غلظت ایده آل، بر روی سطح سیلیکون با استفاده از روش دو مرحله ای پلازما پیوند زده شد. همچنین برای رسیدن به درصد ترکیبی مطلوب کیتوسان و ژلاتین، ترکیبات مختلفی از این دو پلیمر بر روی سطح سیلیکون پیوند داده شده با اکریلیک اسید، تثبیت شد. در پایان پس از بررسی این تثبیت، به منظور ارزیابی زیستی این پوشش ها آزمون های کشت سلول انجام گرفت و میزان چسبندگی، پهن شوندگی و تکثیر سلولی به تفکیک نمونه های مختلف اصلاح شده در مقایسه با کنترل به صورت کمی مطالعه شد که نتایج این ارزیابی حاکی از زیست سازگاری مناسب نمونه های مختلف جهت کاربرد در مصارف ترمیمی و جایگزینی پوست دارد. پوست مصنوعی طراحی شده به دلیل زیست سازگاری بالا، برای کاربردهای ترمیم زخم و سوختگی بسیار مناسب است. نظر به نتایج به دست آمده می توان هر کدام از این پوشش ها را که با شرایط مختلف پیوندزنی و تثبیت، طراحی و ساخته شده اند را برای استفاده در زخم های مختلف پوستی با شرایط و مشخصات متفاوت به کار برد.

تشکر و قدردانی

نویسندگان مقاله بابت حمایت های مالی و فکری مرکز تحقیقات سلول های بنیادی سیستم عصبی کمال تشکر را دارند.

Reference

1. Kanitakis J. Anatomy, histology and immunohistochemistry of normal human skin. *Eur J Dermatol* 2002;12:390-9.
2. McGrath J, Uitto J. Anatomy and organization of human skin. *Rook's Textbook of Dermatology*. 8 ed nd. 2010:1-53.
3. Debels H, Hamdi M, Abberton K, Morrison W. Dermal matrices and bioengineered skin substitutes: a critical review of current options. *Plast Reconstr Surg Glob Open* 2015;3:e284.
4. Wells A, Nuschke A, Yates CC. Skin tissue repair: Matrix microenvironmental influences. *Matrix Biol* 2016;49:25-36.
5. Bleasdale B, Finnegan S, Murray K, Kelly S, Percival SL. The use of silicone adhesives for scar reduction. *Adv Wound Care (New Rochelle)* 2015;4:422-30.
6. Chaudhari AA, Vig K, Baganizi DR, Sahu R, Dixit S, Dennis V, et al. Future prospects for scaffolding methods and biomaterials in skin tissue engineering: a review. *Int J Mol Sci* 2016;17: E1974.
7. Chu PK, Chen J, Wang L, Huang N. Plasma-surface modification of biomaterials. *Mater Sci Eng R Rep* 2002;36:143-206.
8. Korotcenkov G. Structure and surface modification of porous silicon. *Handbook of Gas Sensor Materials*: Springer, 2014; 373-84.
9. Abbasi F, Mirzadeh H, Katbab AA. Bulk and surface modification of silicone rubber for biomedical applications. *Polym Int* 2002;51:882-8.
10. Bodas DS, Desai SM, Gangal S. Deposition of plasma-polymerized hydroxyethyl methacrylate (HEMA) on silicon in presence of argon plasma. *Appl Surf Sci* 2005;245:186-90.
11. Boyce ST, Kagan RJ, Yakuboff KP, Meyer NA, Rieman MT, Greenhalgh DG, et al. Cultured skin substitutes reduce donor skin harvesting for closure of excised, full-thickness burns. *Ann Surg* 2002;235:269-79.
12. Karkhaneh A, Mirzadeh H, Ghaffariyeh A. Simultaneous graft copolymerization of 2hydroxyethyl methacrylate and acrylic acid onto polydimethylsiloxane surfaces using a two step plasma treatment. *J Appl Polym Sci* 2007;105:2208-17.
13. Dutta PK. Chitin and chitosan for regenerative medicine: Springer; 2016.
14. Karimpour A, Talebpour Amiri F, Ghaffari E, Alizadeh A, Jamalpour Z, Mirhosseini M, et al. Growth and Chondrogenic Differentiation of Mesenchymal Stem Cells Derived from Human Adipose Tissue on Chitosan Scaffolds. *JBUMS* 2016;18:32-8. [In Persian]
15. Lu B, Wang T, Li Z, Dai F, Lv L, Tang F, et al. Healing of skin wounds with a chitosan-gelatin sponge loaded with tannins and platelet-rich plasma. *Int J Biol Macromol* 2016;82:884-91.
16. Pandey AR, Singh US, Momin M, Bhavsar C. Chitosan: Application in tissue engineering and skin grafting. *J Polym Res* 2017;24:125.
17. Salati A, Ahangari G, Keshvari H, Sanati MH. Modeling the effect of autoreactive T-cells on oligodendrocytes in multiple sclerosis patients using chitosan/gelatin nanofibrous scaffolds. *Biointerface Res Appl Chem* 2016;6:1214-21.
18. Salati A, Keshvari H, Ahangari G, Sanati MH. Process parameters optimization for tissue engineered chitosan/gelatin nanofibrous scaffolds. *Biointerface Res Appl Chem* 2016;6:1208-13.
19. Lee EJ, Kasper FK, Mikos AG. Biomaterials and Tissue Engineering. *Ann Biomed Eng* 2014;42:323-7.

20. Manjilli H, Danafar H, Sharafi A. Assessment of biodegradability and cytotoxicity of mPEG-PCL diblock copolymers and PCL-PEG-PCL tri block copolymers on HEK293 cells. *SJKU* 2017;22:113-25. [In Persian]
21. Zhao M, Wang X, Yu J. Preparation and characterization of poly (ethylene terephthalate) copolyesters and fibers modified with sodium-5-sulfo-bis-(hydroxyethyl)-isophthalate and poly (ethylene glycol). *J Text I* 2016;107:1284-95.
22. Wen F, Lau CCS, Lim J, Liao Y, Teoh SH, Chong MSK. Surface modification of polymers for tissue engineering applications: arginine acts as a sticky protein equivalent for viable cell accommodation. *ACS Omega* 2018;3:4242–51.
23. Kang X, Xie Y, Powell HM, Lee LJ, Belury MA, Lannutti JJ, et al. Adipogenesis of murine embryonic stem cells in a three-dimensional culture system using electrospun polymer scaffolds. *Biomaterials* 2007;28:450-8.
24. Prabhakaran MP, Vatankhah E, Ramakrishna S. Electrospun aligned PHBV/collagen nanofibers as substrates for nerve tissue engineering. *Biotechnol Bioeng* 2013;110:2775-84.
25. Desmet T, Morent R, Geyter ND, Leys C, Schacht E, Dubruel P. Nonthermal plasma technology as a versatile strategy for polymeric biomaterials surface modification: a review. *Biomacromolecules* 2009;10:2351-78.
26. Lee YM, Shim JK. Plasma surface graft of acrylic acid onto a porous poly (vinylidene fluoride) membrane and its riboflavin permeation. *J Appl Polym Sci* 1996;61:1245-50.
27. Huang Y, Onyeri S, Siewe M, Moshfeghian A, Madihally SV. In vitro characterization of chitosan–gelatin scaffolds for tissue engineering. *Biomaterials* 2005;26:7616-27.
28. García AJ. Get a grip: integrins in cell–biomaterial interactions. *Biomaterials* 2005;26:7525-9.
29. Choi EY, Moon SH. Characterization of acrylic acid-grafted PP membranes prepared by plasma-induced graft polymerization. *J Appl Polym Sci* 2007;105:2314-20.