



توسعه داربست نانولیفی پلی یورتان برای مهندسی بافت واژن

نجمه دهقان منشادی^۱، محسن هادی زاده^۱، سعید فتاحی^{۲*}، سید محمد مشتاقیون^۲، حبیب نیکوکار^۳

۱- دانشکده مهندسی نساجی، پردیس فنی و مهندسی، دانشگاه یزد، یزد، ایران

۲- گروه زیست شناسی، پردیس علوم، دانشگاه یزد، یزد، ایران

۳- مرکز تحقیقات نانو تکنولوژی پزشکی و مهندسی بافت، پژوهشکده علوم تولید مثل یزد، دانشگاه علوم پزشکی شهید صدوقی، یزد، ایران

مقاله پژوهشی اصیل

چکیده

مقدمه

فقدان یا عدم تشکیل واژن در اثر اختلالات هورمونی و تمایز جنسی در دوران جنینی، عوارض ناشی از ضربه، آسیب های لگنی، عفونت های تخریب کننده، سرطان و اختلالات دوجنسی از جمله موارد شایعی هستند که نیاز به جراحی ترمیمی و بازسازی سیستم تناسلی زنانه را تشدید می نمایند. هدف از این مطالعه ارزیابی داربست پلی یورتان الاستومر الکترورسی شده در ایجاد بستری مناسب برای اتصال و تکثیر سلول های اپی تلیال جهت ترمیم و مهندسی بافت واژن می باشد.

مواد و روش ها

ابتدا داربست های پلی یورتان الاستومر به روش الکترورسی ساخته شد. خواص فیزیکی و شیمیایی داربست ها مشخصه یابی شد. سپس موفولوژی، فعالیت متابولیکی، تکثیر و بیان سایتوکراتین سلول های اپی تلیال استخراج شده از بافت واژن انسان، روی داربست های پلی یورتان بترتیب با میکروسکوپ الکترونی روبشی (SEM)، آزمون متیل ترازولوم (MTT)، رنگ آمیزی هماتوکسیلین-آئوزین (H&E) و فلورسنت مورد بررسی قرار گرفت.

یافته ها

قطر نانوالیاف پلی یورتان و درصد تخلخل داربست به ترتیب 322 ± 176 نانومتر و 80 ± 2 درصد بود. بعد از گذشت ۱۲۰ روز از زمان تخریب، میانگین کاهش وزن داربست ۲/۳ درصد شد. همچنین در تصویر SEM تمامیت ساختاری الیاف حفظ شده ولی نقاط سفید کوچک روی نانوالیاف دیده شد. تصاویر میکروسکوپی SEM، آزمون MTT و رنگ آمیزی H&E چسبندگی، زنده ماندی و رشد سلول های اپی تلیال روی داربست را نشان دادند. در نهایت بیان سایتوکراتین این سلول ها روی داربست نانوالیاف پلی یورتان با رنگ آمیزی فلورسنت تایید شد.

نتیجه گیری

نتایج این پژوهش نشان داد که داربست نانولیفی پلی یورتان الاستومر PC-3575A از قابلیت های منحصر به فردی برای مهندسی بافت واژن برخوردار است.

کلیدواژه ها

داربست نانولیفی، پلی یورتان، مهندسی بافت، سلول های اپی تلیال، واژن.

تاریخ دریافت: ۱۳۹۹/۰۲/۰۲

تاریخ پذیرش: ۱۳۹۹/۰۶/۲۹

*نویسنده مسئول: سعید فتاحی،

دانشکده مهندسی نساجی، دانشگاه یزد

تلفن: ۰۳۵۳۱۲۳۲۵۶۰

پست الکترونیک:

sfattahi@yazd.ac.ir



مقدمه

هدف اصلی در مهندسی بافت، طراحی و ایجاد ساختار مشابه ساختار طبیعی یک بافت در بدن موجود زنده، به منظور ترمیم آسیب‌ها و ضایعات بافتی است. زمانی که به بافت آسیبی وارد می‌شود ممکن است بافت آسیب دیده، با استفاده از سلول‌های بنیادین خود که دارای توان خودسازی هستند، آسیب را ترمیم کند. اما در صورتی که گسترده جراحات به گونه‌ای باشد که سبب از بین رفتن سلول‌های بنیادین آن بافت شود، به دلیل از دست رفتن قدرت ترمیم خود به خودی بافت، می‌توان با استفاده از امکانات آزمایشگاهی و با بهره‌گیری از مهندسی بافت، بافت آسیب دیده را ترمیم کرد (۱).

فقدان یا عدم تشکیل واژن یکی از عوارض بدو تولد است که در یک مورد از هر ۴۰۰۰ تولد زنده دختر مشاهده می‌شود. این عارضه از دلایل اصلی عدم قاعدگی اولیه بوده و در اثر اختلالات هورمونی و تمایز جنسی در دوران جنینی اتفاق می‌افتد (۲-۵). همچنین عوارض ناشی از ضربه، آسیب‌های لگنی، عفونت‌های تخریب‌کننده، سرطان و اختلالات دوجنسی نیز از جمله موارد شایعی هستند که نیاز به جراحی ترمیمی و بازسازی سیستم تناسلی زنانه را تشدید می‌نمایند (۶-۸). شایع‌ترین روش جراحی برای بازسازی بافت واژن، واژینوپلاستی هست که با مواد متعدد مانند غشای آمنیوتیک، پروتئوم و ماتریس‌های فاقد سلول مشتق شده از پوست انجام می‌شود (۹-۱۱). مشکل اصلی در این موارد کمبود یا فقدان بافت مناسب و کافی خودی برای بازسازی آسیب موجود می‌باشد. استفاده از مهندسی بافت جهت ایجاد و بازسازی واژن بهترین و تنها گزینه قابل اعتماد بدین منظور می‌باشد (۱۲).

در سال‌های اخیر نانوالیاف توجه بسیاری از پژوهشگران را به خود جلب کرده است. این مواد به خاطر ابعاد در مقیاس

نانومتری خواص جالبی از قبیل سطح مخصوص بسیار بزرگ، انعطاف‌پذیری و کارایی مکانیکی بسیار بالا را در مقایسه با بسیاری از مواد شناخته شده دارا می‌باشند (۱۳). الکتروریسی به عنوان یک ابزار نوظهور و قدرتمند برای ایجاد الیاف در مقیاس نانو با ویژگی‌های منحصر به فرد مواد نانو ساختار می‌باشد. در این تکنیک مواد مختلف از جمله پلیمرهای محلول یا مذاب به الیافی با قطر چند میکرومتر تا چند نانومتر تبدیل می‌شوند. اصل حاکم بر این روش، اعمال کشش بالا بر جریان جت یک محلول پلیمری به کمک بارهای الکتریکی است. نانو الیاف در پزشکی کاربردهای مختلف دارد. از جمله این کاربردها در مهندسی بافت می‌باشد که از ماتریس‌های نانولیفی به عنوان داربست برای رشد سلول استفاده می‌شود (۱۴-۱۶).

پلی‌یورتان‌ها ابتدا در دهه ۱۹۴۰ برای کاربردهای صنعتی استفاده شدند، اما توسعه پلیمرهای زیست‌سازگار تا دهه ۱۹۶۰ آغاز نشد. پلی‌یورتان‌ها از آن موقع تاکنون یکی از معروف‌ترین گروه‌های بیومواد کاربردی در مصارف پزشکی بوده‌اند. سختی، دوام، زیست‌سازگاری و زیست‌پایداری پاره‌ای از ویژگی‌هایی هستند که پلی‌یورتان‌ها را برای دامنه وسیعی از اجزای قابل پیوند دراز مدت، جالب توجه نموده‌اند (۱۷). پلی‌یورتان‌ها در اساس با استفاده از یک دی‌ایزوسیانات، یک دیول و یک عامل گسترش زنجیره به عنوان مواد اولیه، سنتز می‌شوند. اگرچه استفاده از دی‌ایزوسیانات‌های حلقوی و خطی هر دو مرسوم می‌باشد، اما سرطان‌زایی احتمالی ترکیبات آروماتیک به استفاده بیشتر از ایزوسیانات‌های آلیفاتیک منجر شده است؛ زیرا فرآورده‌های نهایی تخریب آنها به احتمال زیاد غیرسمی است (۱۸). در پژوهشی که توسط De Filippo و همکارانش انجام شد، امکان استفاده سلول‌های اپی‌تلیال و ماهیچه‌ای صاف واژن روی داربست پلی‌گلایکولیک اسید (PGA) برای



که دارای حرکت دورانی و رفت و برگشتی با سرعت ۳۰۰ دور بر دقیقه بود، جمع‌آوری گردید.

بررسی خواص شیمیایی و فیزیکی داربست‌های لوله‌ای پلی‌یورتان

ساختار داربست‌های الکتروریسی شده توسط میکروسکوپ الکترونی روبشی (SEM) بررسی شد. سپس قطر ۱۰۰ لیف به‌طور تصادفی در هر تصویر SEM با نرم‌افزار Image J اندازه‌گیری و میانگین گرفته شد. از طیف سنجی ATR-FTIR، جهت تشخیص ساختار شیمیایی داربست‌های الکتروریسی شده استفاده شد. دامنه طول موج‌های FTIR (Equinox 55، بروکر، آلمان) از ۶۰۰ تا ۴۰۰۰ cm^{-1} بود. به‌منظور اندازه‌گیری درصد تخلخل، در ابتدا داربست‌ها در ابعاد ۱×۱ سانتیمتر مربع بریده و وزن شد. ضخامت نمونه‌ها با دستگاه میکرومتر با دقت ۰/۰۰۱ اندازه‌گیری شد. سپس دانسیته ظاهری داربست‌ها محاسبه شد (فرمول ۱). در نهایت درصد تخلخل داربست‌ها با فرمول (۲) محاسبه گردید (۲۱). درصد تخلخل سه نمونه اندازه‌گیری و میانگین آماری آن محاسبه شد. (دانسیته بالک پلی‌یورتان: $1/15 \text{ gr/cm}^3$)

$$۱. (\text{ضخامت} \times \text{عرض} \times \text{طول}) / (\text{وزن داربست با ابعاد } 1 \times 1)$$

$$\text{سانتیمترمربع} = (\text{gr/cm}^3) = \text{دانسیته ظاهری}$$

$$۲. ۱۰۰ \times ((\text{دانسیته بالک} / \text{دانسیته ظاهری}) - ۱) = \text{درصد}$$

تخلخل داربست

آزمایشات تخریب‌پذیری مطابق با استاندارد ASTM F1635-11 انجام شد. داربست‌ها در ابعاد ۲×۲ سانتی‌متر مربع برش داده و وزن شد. سپس نمونه‌ها در فالكون‌های ۱۰ میلی‌لیتر، حاوی ۵ میلی‌لیتر PBS با PH ۷/۴، در آون شیکردار با سرعت ۵۰ rpm/min و ۵۰ درجه حرارت ۳۷ °C جهت شبیه‌سازی محیط هیدرولیتیک قرار گرفتند. به‌منظور ارزیابی تخریب‌پذیری داربست‌های الکتروریسی پلی‌یورتان در زمان‌های ۷، ۱۴، ۲۸، ۶۰ و ۱۲۰ روز، نمونه‌ها را از

مهندسی بافت واژن در داخل بدن شانزده خرگوش بررسی شد (۱۲). در پژوهشی دیگر Raya-Rivera و همکارانش، از داربست‌های سه بعدی زیست تخریب‌پذیر برای بازسازی واژن استفاده کردند (۱۹). توسط Sartoneva و همکارانش، یک داربست متخلخل با بایوپلیمر جدید کوپلیمر پلی‌ال‌لاکتیک پلی‌کاپرولاکتون برای مهندسی بافت واژن به صورت آزمایشگاهی ارزیابی شد (۲۰).

با توجه به اینکه در مطالعات انجام گرفته، تاکنون گزارشی مبنی بر کاربرد داربست‌های نانوالیاف پلی‌یورتان به منظور بازسازی بافت واژن مشاهده نشده است، رسیدن به هدف مذکور در این پژوهش مدنظر قرار گرفت. ابتدا داربست‌های پلی‌یورتان از نوع پلی‌آلیفاتیک الاستومر با روش الکتروریسی تولید و از نظر فیزیکی و شیمیایی مشخصه‌یابی شدند. سپس زنده‌مانی، چسبندگی و تکثیر سلول‌های اپی‌تلیال استخراج شده از بافت واژن انسانی روی آنها مورد مطالعه قرار گرفت.

مواد و روش‌ها

مواد و شرایط فرآیند الکتروریسی

به‌منظور ساخت داربست، محلول پلیمر پلی‌یورتان آلیفاتیک Carbothane PC-3575A (Lubrizol، آمریکا) با درصد وزنی ۱۰٪ در حلال تری‌فلوئورو استیک اسید (TFA) (Merck، آلمان) به مدت ۲ ساعت در دمای اتاق روی همزن مغناطیسی جهت الکتروریسی تهیه شد. سپس محلول از طریق یک سرنگ ۲/۵ میلی‌لیتری متصل به پمپ قابل تنظیم به یک سوزن فلزی با گیج ۲۱ تزریق شد. نانوالیاف تولیدی بر روی یک سیلندر فلزی طراحی شده به‌عنوان جمع‌کننده دستگاه الکتروریسی با قطرهای مختلف برای مهندسی بافت‌های مختلف لوله‌ای جمع‌آوری گردید. شرایط بهینه الکتروریسی عبارت بودند از: فاصله نازل تا جمع‌کننده ۱۳ سانتیمتر؛ ولتاژ ۱۸ کیلوولت؛ نرخ تغذیه به نازل ۰/۱ میلی‌لیتر بر ساعت. نانوالیاف تولیدی بر روی جمع‌کننده‌ای



محیط مذکور بیرون آورده و شست‌وشو داده و بعد از ۲۴ ساعت قرار دادن در دسیکاتور وزن شدند. میانگین سه تکرار برای هر نمونه محاسبه شد و ملاک مقایسه قرار گرفت. همچنین تغییرات شکل نانوالیاف در دوره‌های مذکور، توسط SEM بررسی گردید.

کشت سلول‌های اپی‌تلیال بر روی داربست پلی‌یورتان الکتروریسی

سلول‌های اپی‌تلیال استخراج شده از بافت واژن انسانی در محیط کشت DMEM/F12 با ۵٪ سرم جنین گاوی (FBS)، استرپتومایسین و ۱۰۰ میلی‌گرم در میلی‌لیتر پنی‌سیلین در یک فلاسک کشت سلول 25 cm^2 کشت داده شدند. سلول‌ها در ۵٪ CO_2 در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد به مدت ۶ روز انکوبه شدند. داربست‌های الکتروریسی شده که به طور متوسط ۲۰ میکرون ضخامت داشتند، بر روی کاور اسلیپ‌های دایره‌ای گذاشته شدند و در پلیت‌های ۲۴ چاهک قرار داده شدند. سپس نمونه‌ها برای استریل شدن، به مدت ۳۰ دقیقه تحت تابش ماوراء بنفش (UV) قرار گرفتند و یک بار با محلول بافر فسفات (PBS) شسته شدند. سلول‌های اپی‌تلیال با مخلوط ۲۵٪/۰٫۱٪ تریپسین حاوی ۱٪/۰٫۱٪ EDTA جدا شدند. سلول‌های جدا شده با سرعت ۱۰۰۰ دور در دقیقه به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفیوژ شدند. سپس با حجم اندکی از محیط کشت بصورت سوسپانسیون درآورده شد و با استفاده از لام نئوبار، شمارش سلولی در ۱۰ میکرولیتر سوسپانسیون انجام شد. سپس تعداد یکسان 1×10^5 سلول در میلی‌لیتر بر روی هر داربست کشت داده شد. محیط کشت سلول‌ها هر ۳ روز یکبار تعویض گردید.

بررسی عدم سمیت داربست با MTT assay

پس از ۳ و ۷ روز کشت سلول روی داربست‌های الکتروریسی، محیط کشت با ۴۰۰ میکرولیتر از محیط جدید جایگزین شد. سپس ۴۰ میکرولیتر محلول MTT (۵)

میلی‌گرم در ۱ میلی‌لیتر PBS) به هر چاهک اضافه شد. پس از ۳ ساعت انکوباسیون، محلول MTT با دقت برداشته شد و با ۴۴۰ میکرولیتر اسید-ایزوپروپانول (۱۰۰ میکرولیتر اسید هیدروکلریک ۰/۴ نرمال در ایزوپروپانول) جایگزین شد تا کریستال‌های آبی تیره حل شود. پس از گذشت ۲۰ دقیقه، ۲۰۰ میکرولیتر از محلول بدست آمده در پلیت ۴۸ خانه منتقل شد. در نهایت میزان جذب نوری در طول موج ۵۷۰ نانومتر توسط دستگاه میکروپلیت ریدر (StatFax-2100) اندازه‌گیری شد. شدت رنگ و میزان جذب نوری در این آزمون انعکاسی از تعداد سلول‌های زنده و فعال موجود در محیط است. از کشت سلول بدون حضور داربست به‌عنوان کنترل استفاده شد. همه موارد دارای پنج تکرار بوده و میانگین آماری تکرارها با هم مقایسه شد.

بررسی مورفولوژی، چسبندگی و تکثیر سلول‌ها روی داربست

بعد از گذشت ۷ روز از کشت سلول، داربست‌ها با PBS شست‌وشو داده شدند و با گلو تارآلدئید ۲/۵٪ به مدت ۲ ساعت فیکس گردید. سپس آب‌گیری با اتانول (۵۰٪، ۷۰٪، ۹۰٪ و ۱۰۰٪) انجام شد. داربست‌ها با طلا پوشش داده شد و چسبندگی سلولی با SEM ارزیابی شد.

بعد از ۳ و ۷ روز کشت سلول‌ها بر روی داربست‌ها، نمونه‌ها با PBS شست‌وشو داده شد. سپس نمونه‌ها با گلو تارآلدئید ۲/۵٪ به مدت ۲ ساعت تثبیت شد. نمونه‌ها ابتدا با همتوکسیلین رنگ‌آمیزی شده و یک بار با PBS به مدت ۵ دقیقه شست‌وشو داده شدند. سپس نمونه‌ها به مدت ۳ ثانیه در معرض الکل اسید قرار گرفتند. پس از شست‌وشو با PBS، نمونه‌ها با اتوزین رنگ‌آمیزی شدند. سپس نمونه‌ها با اتانول (۵۰٪، ۷۰٪، ۹۰٪ و ۱۰۰٪) دهیدراته شدند. تصاویر رنگ‌آمیزی H&E هسته سلول را به رنگ آبی و سیتوپلاسم به رنگ صورتی نشان می‌دهند.



رنگ آمیزی ایمونوفلورسنت سلول‌های اپی‌تلیال روی

داربست

به منظور بیان سایتوکراتین در سلول‌های اپی‌تلیال از رنگ آمیزی IF پس از گذشت ۷ روز از کشت سلول‌ها روی داربست‌های الکترورسی استفاده شد. ابتدا سلول‌ها با متانول ۱۰۰٪ سرد (C -20) تثبیت شدند. در ادامه برای به حداقل رساندن اتصالات غیر اختصاصی، نمونه‌ها به مدت ۳۰ دقیقه در معرض محلول BSA ۱٪ و ۲۲/۵ میلی‌گرم در میلی‌لیتر گلیسین در PBST (PBS و Tween 20 ۰/۱٪) قرار گرفتند. سپس سه بار با PBS و هر بار ۵ دقیقه شستشو داده شدند. سپس نمونه‌ها با آنتی‌بادی اولیه (AE1/AE3، ab86734، رقیق شده با نسبت ۱:۱۰۰ در BSA ۱٪) یک شبانه‌روز در دمای ۴ درجه سانتیگراد انکوبه شدند. داربست‌ها پس از شستشو با PBS، با آنتی‌بادی ثانویه (goat anti-mouse IgG، FITC، ab96879، رقیق شده با نسبت ۱:۱۰۰ در BSA ۱٪) به مدت ۲ ساعت در دمای اتاق در تاریکی انکوبه شدند. سپس DAPI برای رنگ‌آمیزی هسته سلول (آبی) به مدت ۳ دقیقه در تاریکی استفاده شد. پس از شستشو با PBS، داربست‌ها با PBS پوشانده شد و به وسیله میکروسکوپ فلورسنت (Olympus IX-71) بررسی شدند. آنتی‌بادی‌ها از شرکت Abcam آمریکا خریداری شدند.

آنالیز آماری

برای آنالیز آماری داده‌ها از نرم‌افزار Origin Lab Origin 8.0 (Inc., USA) استفاده شد. داده‌ها به صورت مقدار میانگین

± انحراف معیار بیان شدند. مقایسه آماری با Anova یکطرفه انجام گرفت. مقدار P کمتر از ۰/۰۵ برای معنی‌دار بودن گروه‌ها در نظر گرفته شد.

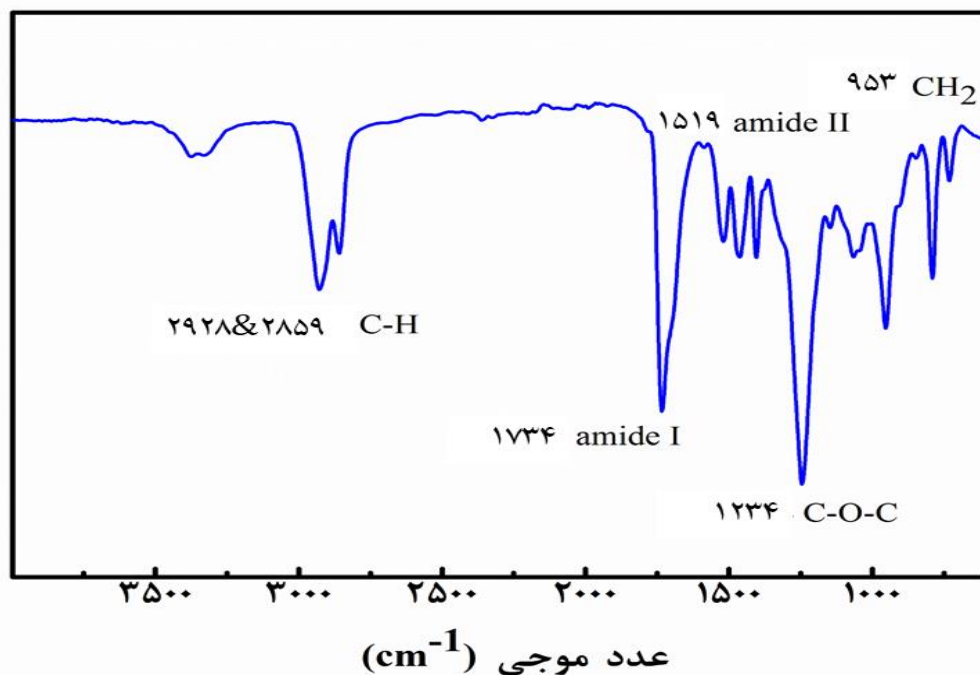
ملاحظات اخلاقی

سلول‌های اپی‌تلیال از نمونه بافت واژن بیمارانی که تحت عمل جراحی ترمیم پرولاپس ارگانه‌های لگنی (سیستوسل و رکتوسل) قرار گرفتند، پس از اخذ رضایت نامه آگاهانه تهیه شد. همچنین کد اخلاق (IR. SSU. RSI. REC 1396.33) از کمیته اخلاق دانشگاه علوم پزشکی یزد گرفته شد.

یافته‌ها

بررسی AT-FTIR داربست‌های پلی‌یورتان الکترورسی شده

به‌منظور تأیید وجود و ثبات پلی‌یورتان PC-3575A، در داربست‌های الکترورسی شده، آزمایش FTIR انجام گرفت. همانطور که در شکل ۱ مشاهده می‌شود، داربست پلی‌یورتان PC-3575A دارای باند جذبی در حدود ۲۹۲۸ cm⁻¹ و ۲۸۵۹ cm⁻¹ مربوط به ارتعاش نامتقارن و متقارن C-H بود. باندهای جذبی حدود ۱۷۳۴ cm⁻¹ و ۱۵۱۹ cm⁻¹ به ترتیب مربوط به (C=O) آمید I و (C-N) و (N-H) آمید II است. باندهای جذبی ۱۴۰۴ cm⁻¹ و ۱۴۶۲ cm⁻¹ مربوط به ارتعاش گروه‌های CH₂ بودند. باند جذبی در حدود ۱۲۳۴ cm⁻¹ مربوط به ارتعاش کششی CO و ارتعاش پیچشی اورتان در پلی‌اورتان بود. همچنین، پیک در ۹۵۳ cm⁻¹ به ارتعاش خمش گروه‌های CH₂ نسبت داده می‌شود.



شکل ۱- طیف FTIR داربست الکترورسی شده پلی یورتان

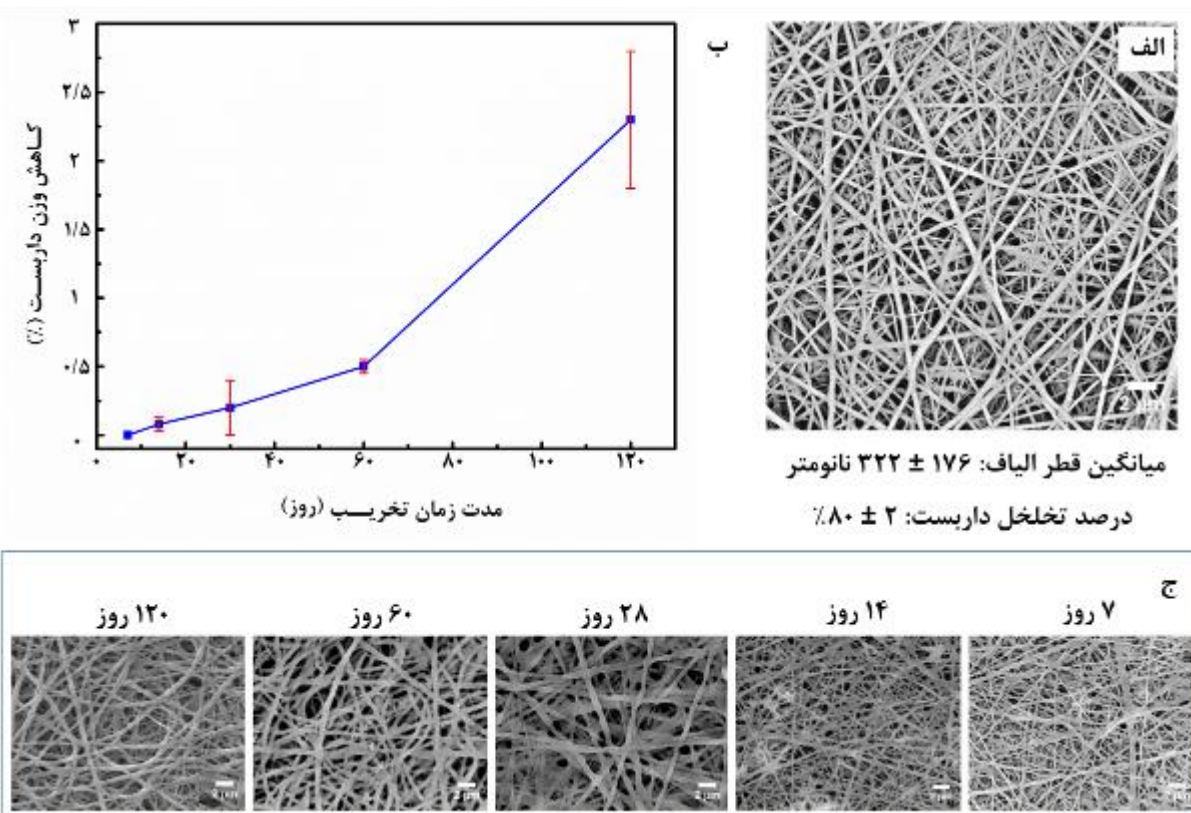
مدت فرآیند تخریب تا ۶۰ روز تقریباً ثابت است. بعد از گذشت ۱۲۰ روز میانگین کاهش وزن ۲/۳ درصد شد. تصویر SEM شکل ۲- ج نشان می‌دهد که در PC-3575A خالص به دلیل تورم، قطر الیاف افزایش یافته در حالیکه تمامیت ساختاری الیاف حتی بعد از ۱۲۰ روز تخریب در شرایط آزمایشگاهی حفظ شده است.

بررسی ساختار و درصد تخلخل داربست

شکل ۲- الف تصویر SEM نانوالیاف پلی یورتان را نشان می‌دهد. متوسط قطر الیاف و درصد تخلخل داربست PC-3575A به ترتیب، 322 ± 176 نانومتر و 80 ± 2 درصد بود.

بررسی زیست تخریب پذیری داربست

کاهش وزن نانوالیاف در هنگام تخریب در شکل ۲- ب نشان داده شده است. نمودار نشان می‌دهد که وزن داربست در



شکل ۲- الف) تصویر SEM از نانوالیاف پلی یورتان PC-3575A، ب) نمودار کاهش وزن داربست پلی یورتان در مدت زمان‌های مختلف تخریب، ج) تصاویر SEM از ساختار نانوالیاف پلی یورتان بعد از ۷، ۱۴، ۲۸، ۶۰ و ۱۲۰ روز از مدت زمان تخریب.

بررسی زنده‌مانی سلول‌های اپی‌تلیال روی داربست

تست MTT برای بررسی زنده‌مانی سلول‌های اپی‌تلیال روی داربست‌های نانوالیاف انجام شد. در شکل ۳-الف میزان جذب نوری خوانده شده در طول موج ۵۷۰ نانومتر برای سلول‌های کشت داده شده بر روی داربست از ۳ روز به ۷ روز، افزایش معنی‌داری داشت که حاکی از عدم سمیت داربست پلی یورتان است. البته این افزایش، اختلاف معنی‌داری با نمونه کنترل در روز هفتم نداشت.

بررسی چسبندگی و تکثیر سلول‌های اپی‌تلیال روی داربست

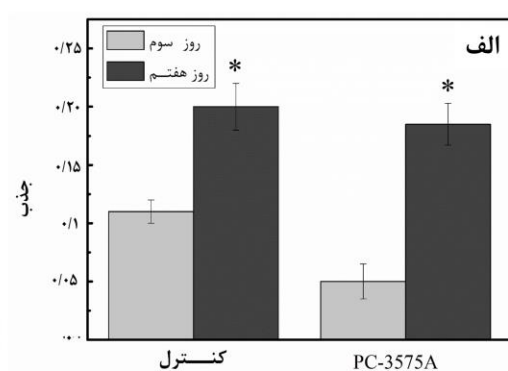
همانطور که از تصاویر SEM در شکل ۳-ب و ج با دو بزرگنمایی متفاوت مشخص است، ۱۰ روز پس از کشت،

سلول‌های اپی‌تلیال روی سطح داربست چسبندگی، تکثیر و رشد مطلوبی از خود نشان داده‌اند. در تصویر SEM (شکل ۳-ج) با بزرگنمایی بالاتر، چسبندگی و پهن‌شدگی یک سلول روی داربست به‌وضوح مشخص است. شکل ۳-د و ه رنگ‌آمیزی H&E را بعد از گذشت ۷ و ۱۴ روز از کشت سلولی برای داربست‌های پلی یورتان نشان می‌دهد. تصاویر رنگ‌آمیزی H&E هسته سلول را به رنگ آبی و سیتوپلاسم را به رنگ صورتی نشان می‌دهند. نسبت هسته به سیتوپلاسم سلول‌های بازال و پارابازال بافت واژن (سلول‌های خودزای اپی‌تلیال) زیاد است و رنگ‌آمیزی سلول‌ها در روز هفتم به دلیل بازوفیل بودن این سلول‌ها پررنگ‌تر به نظر می‌رسد. پس از گذشت ۱۴ روز از کشت، فنوتیپ اپی‌تلیال

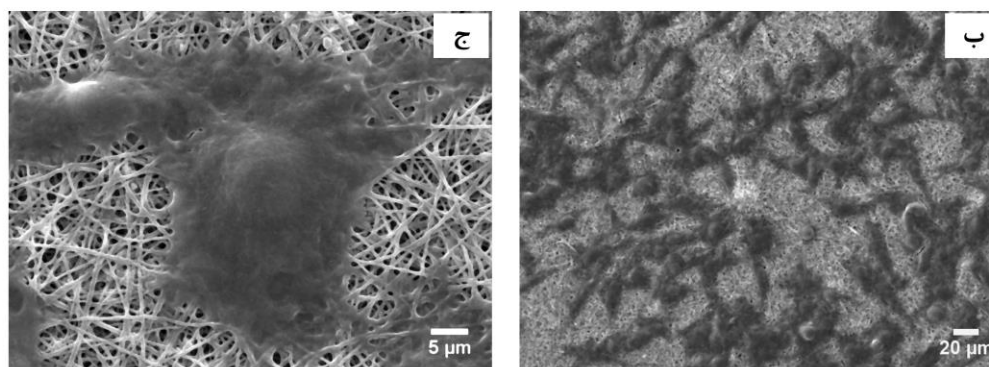


با مقایسه تعداد سلول‌ها بعد از گذشت ۷ و ۱۴ روز از کشت بسیار چشم‌گیر بوده و با نتایج SEM مطابقت دارد.

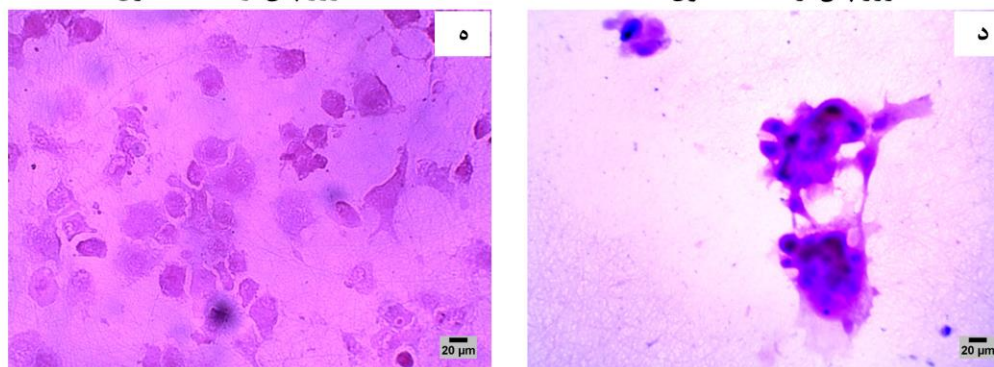
سنگ‌فرشی (چندوجهی) روی داربست نانوالیاف پلی‌یورتان مشاهده شد. همچنین اتصال و تکثیر سلول‌ها روی داربست



۱۰ روز پس از کشت سلول



۱۴ روز پس از کشت سلول



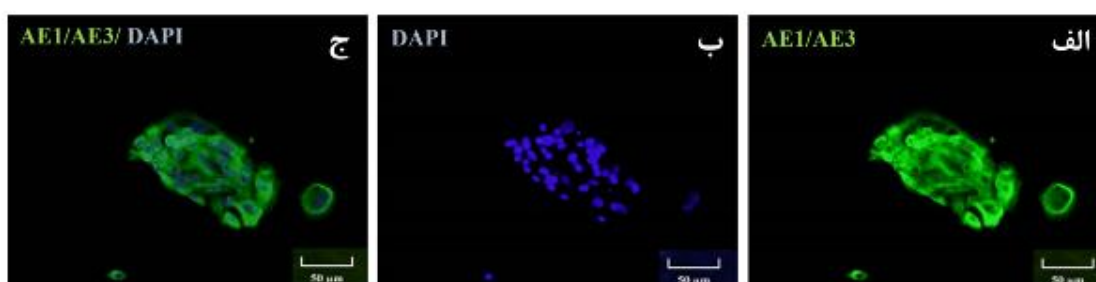
شکل ۳- الف) نتایج آزمون متابولیکی سلول‌ها (MTT assay)، ب و ج) تصاویر SEM سلول‌های اپی‌تلیال کشت داده شده روی داربست نانوالیاف PC-3575A پس از ۱۰ روز با دو بزرگنمایی متفاوت، د و ه) تصاویر رنگ‌آمیزی H&E سلول‌های اپی‌تلیال کشت داده شده روی داربست PC-3575A پس از ۷ و ۱۴ روز



بررسی بیان سایتوکراتین در سلول‌های اپی‌تلیال روی داربست

برای تأیید منشأ اپی‌تلیال، بیان سایتوکراتین به عنوان نشانگر خاص سلول‌های اپی‌تلیال (شکل ۴-الف) با آنتی‌بادی فلورسنت AE1/AE3 Pan-cytokeratine به رنگ سبز، در ۷ روز بعد از کشت سلول روی داربست‌های

پلی‌یورتان ارزیابی شد. همچنین از رنگ فلورسنت DAPI به عنوان نشانگر هسته‌ای سلول‌ها (رنگ آبی، شکل ۴-ب) استفاده شد که تراکم سلولی روی سطح داربست را نشان می‌دهد. شکل ۴ نشان دهنده بیان بالای سایتوکراتین در سلول‌های سطح داربست است که ماهیت اپی‌تلیال سلول‌ها را تأیید می‌کند.



شکل ۴- تصاویر ایمونوفلورسنت سلول‌های اپی‌تلیال بافت واژن در داربست پلی‌یورتان PC-3575A بعد از گذشت ۷ روز از کشت. الف: AE1/AE3: آنتی‌بادی اختصاصی سلول‌های اپی‌تلیال (رنگ سبز)، ب: DAPI: رنگ فلورسنت اختصاصی هسته (رنگ آبی)، ج: همپوشانی AE1/AE2/DAPI

بحث

بازسازی بافت واژن با استفاده از جراحی چالش برانگیز است و مستعد مشکلات پس از عمل می‌باشد. انواع بافت‌ها مانند گرفت‌های پوستی و بافت روده‌ای برای بازسازی بافت واژن استفاده شده است. اما گزارشات حاکی از آن است که بافت واژن تشکیل شده مستعد بدخیمی و سرطان بودند که احتمالاً از بافت پیوندی نشأت گرفته است (۲۲). توسعه روزافزون عمل‌های جراحی ترمیمی اختلالات دو جنسی، پیشرفت‌های تشخیص و درمان سرطان و افزایش کیفیت زندگی، تعداد بیماران نیازمند به روش‌های درمانی ایمن و کارا را برای ناهنجاری‌های واژینال افزایش خواهد داد (۲۳). با وجود این چالش‌ها توسعه تکنیک‌های جدید درمانی از اهمیت ویژه‌ای برخوردار است. در مطالعات قبلی، مواد طبیعی و سنتزی برای مهندسی بافت واژن بررسی شده

است (۶، ۱۲، ۱۹، ۲۰). بطور معمول، بایو مواد طبیعی زیست‌سازگاری و چسبندگی سلولی بالایی دارند اما تحریک سیستم ایمنی را بدنبال دارند. مواد سنتزی در مقایسه با بایومواد طبیعی زیست‌سازگاری کمتری دارند اما تولید این مواد در مقیاس زیاد نسبتاً آسان است و خواص مکانیکی آن‌ها نیز قابل کنترل می‌باشد. De Filippo و همکاران از داربست پلی‌گلایکولیک اسید برای بازسازی واژن در مدل خرگوش استفاده کردند. بعد از شش ماه، بافت طبیعی واژن شکل گرفته بود (۶). در پژوهشی دیگر Raya-Rivera و همکاران، از داربست‌های سه بعدی زیست‌تخریب‌پذیر برای بازسازی واژن ۴ بیمار فاقد این بافت در رده سنی ۱۳ تا ۱۸ سال استفاده کردند. در طی ۸ سال پیگیری، این بافت با ساختار طبیعی تشکیل شد (۱۹). توسط Sartoneva و همکاران، یک داربست متخلخل از کوپلیمر پلی‌ال‌لاکتیک



پلی کاپرولاکتون برای مهندسی بافت واژن به صورت آزمایشگاهی ارزیابی شد. نتایج نشان داد که این داربست، زیست سازگاری خوبی دارد و می تواند پتانسیل بالقوه ای برای مهندسی بافت واژن باشد (۲۰). علیرغم وجود گزارش های فوق، مطالعات اندکی در زمینه مهندسی بافت واژن انجام گرفته است.

در این تحقیق به منظور بررسی قابلیت نانوالیاف پلی یورتان الکترورسی شده به عنوان جایگزین ماتریکس خارج سلولی بافت پوششی واژن، به کشت سلول های اپی تلیال جدا شده از واژن بر روی این داربست های نانولیفی در عدم حضور هرگونه فاکتور رشد پرداخته است. قطر نانوالیاف و درصد تخلخل داربست پلی یورتان به ترتیب 176 ± 322 نانومتر و 2 ± 80 درصد بود (شکل ۲-الف). نایکخواختی قطری می تواند یک مزیت باشد. از یک سو نانوالیاف ظریف به طور مؤثر سطح را افزایش می دهند و ممکن است برای چسبندگی و تکثیر سلول مطلوب باشند (۲۴، ۲۵). از طرف دیگر افزایش قطر الیاف باعث افزایش اندازه حفرات و افزایش درصد تخلخل می شود که در مهاجرت و نفوذپذیری سلول ها نقش مهمی دارند (۲۶). بنابراین یک داربست ایده آل باید توازنی میان چسبندگی و نفوذ سلولی با توجه به نوع سلول فراهم آورد. تخلخل بین ۶۰ تا ۹۰ درصدی داربست برای استفاده در مهندسی بافت مناسب است که تخلخل داربست های پلی یورتان الکترورسی شده در این محدوده است (۲۱). درصد تخلخل داربست متخلخل ارائه شده توسط Sartoneva و همکاران برای بازسازی بافت واژن 4 ± 65 درصد گزارش شده (۲۰) که ۱۵٪ کمتر از درصد تخلخل نانوالیاف داربست مورد مطالعه این پژوهش است.

تخریب پذیری مواد از ویژگی های مهم داربست های مهندسی بافت است. میزان تخریب داربست نانوالیاف باید مطابق با میزان رشد و توسعه بافت باشد (۲۷). برای پلیمرهای

تخریب پذیر، تخریب در ۴ مرحله اتفاق می افتد: جذب آب؛ کاهش خواص مکانیکی (استحکام و مدول)؛ کاهش جرم مولکولی؛ کاهش وزن (۲۸). به دلیل آب گریز بودن پلی یورتان PC-3575A، میزان تخریب داخل داربست به کندی و آهسته اتفاق می افتد. بنابراین کاهش وزن داربست در مدت فرآیند تخریب تا ۶۰ روز تقریباً ناچیز است (شکل ۲-ب). بعد از گذشت ۱۲۰ روز میانگین کاهش وزن ۲/۳ درصد شد ($P < 0.05$). مقدار ناچیز کاهش جرم، ثبات نسبی خواص مکانیکی داربست را به همراه دارد و تمامیت ساختاری آن را در طول ترمیم بافت تضمین می کند (۲۹). تصاویر SEM (شکل ۲-ج) نیز نشان می دهد که با گذشت زمان قطر نانوالیاف پلی یورتان به دلیل تورم افزایش یافته، اما تمامیت ساختاری الیاف حتی بعد از ۱۲۰ روز تخریب در شرایط آزمایشگاهی حفظ شده است. هر چند قابلیت ترشوندگی سطح برای اتصال سلول به داربست برای بیشتر سلول ها ضروری است و منجر به چسبندگی سلول ها، تکثیر و زنده ماندن آنها می شود. چسبندگی و رشد سلول ها روی داربست به تعادل آب دوستی و آب گریزی داربست وابسته است؛ با این حال، هنگامی که داربست به طور کامل توسط مایع مرطوب شود، مکان های متعددی در سطح مواد آب گریز برای چسبندگی سلول فراهم می شود (۳۰). در مطالعات قبلی برای مهندسی بافت واژن از پلیمرهای پلی گلایکولیک اسید و کوپلیمر پلی آل لاکتیک پلی کاپرولاکتون که به ترتیب، به نسبت آب دوست و آب گریز هستند استفاده شده است ولی میزان تخریب پذیری پلیمرهای به کار برده شده بررسی نشده است (۶، ۱۲، ۲۰). با توجه به نتایج آزمون MTT (شکل ۳-الف)، رشد سلول های اپی تلیال روی داربست های پلی یورتان از ۳ به ۷ روز افزایش چشمگیری داشت ($P < 0.05$). رشد سلول ها پس از ۷ روز کشت، اختلاف معنی داری با نمونه کنترل نداشت.



روند افزایشی نشان‌دهنده این است که داربست‌های نانوالیاف پلی‌یورتان می‌توانند بستر مناسبی جهت چسبندگی، تکثیر و مهاجرت سلول‌ها باشند و اثر سمیت روی سلول‌های اپی‌تلیال ندارند. در مطالعات قبلی تعداد سلول اولیه روی داربست‌های مختلف 1×10^7 سلول اپی‌تلیال همراه فاکتور رشد بود (۱۹) ولی تعداد سلول گذاشته شده بر روی داربست در این تحقیق تنها 1×10^5 سلول و بدون فاکتور رشد بود. گابریل و همکاران نیز داربست‌های زیست‌سازگار پلی‌یورتان نسبت به سلول‌های فیبروبلاست را برای کاربردهای مهندسی بافت معرفی کردند (۳۱). همانطور که در شکل ۳-ب و ج مشخص است سلول‌ها روی سطح داربست چسبندگی، پهن‌شدگی و رشد مطلوبی را از خود نشان داده‌اند. همچنین پس از ۱۴ روز از کشت سلول‌ها روی داربست، فنوتیپ سلول‌های اپی‌تلیال سنگ‌فرشی که چندوجهی هستند به‌خوبی مشاهده می‌گردد (شکل ۳-ه).

سیتوکراتین‌ها پروتئین‌هایی از جنس کراتین می‌باشند که حاوی رشته‌های واسطه بوده که در اسکلت سلولی داخل سیتوپلاسمی در بافت‌های اپی‌تلیال حضور دارند. سلول‌های اپی‌تلیال به شدت سائتوکراتین را روی داربست بیان کردند (شکل ۴). این نتایج مطابق با نتایج گزارش شده توسط Raya-Rivera و Sartoneva بود (۱۲، ۱۹). قابل ذکر است

آزمایشات درون تنی داربست نانوالیاف پلی‌یورتان برای بررسی دقیق‌تر عملکرد این داربست در ترمیم و بازسازی بافت واژن در مدل حیوانی در حال انجام است. مطالعات اخیر، ترکیب پلیمرهای طبیعی و مصنوعی را برای بهبود خواص زیستی داربست‌های مهندسی بافت به کار برده‌اند (۲۴، ۳۲)؛ بنابراین پیشنهاد می‌شود که تأثیر افزودن یک پلیمر طبیعی بر چسبندگی و تکثیر سلولی روی داربست‌های هیبریدی پلی‌یورتان بررسی گردد.

نتیجه‌گیری

یافته‌های این تحقیق، داربست پلی‌یورتان الاستومر Carbothane PC-3575A را به‌عنوان یک داربست بالقوه با ویژگی‌های منحصر به فرد برای مهندسی بافت واژن معرفی می‌نماید.

تشکر و قدردانی

نویسندگان این پژوهش از حمایت‌های مادی و معنوی حوزه معاونت پژوهشی دانشگاه یزد، پژوهشکده علوم تولید مثل یزد (شماره گرنت ۵۶۶۰) و صندوق حمایت از پژوهشگران و فناوران کشور (گرنت ۹۶۰۰۴۶۴۰) تشکر و قدردانی می‌نمایند.

تعارض منافع

هیچ گونه تعارض منافع توسط نویسندگان بیان نشده است.

References

1. Song L, Baksh D, Tuan RS. Mesenchymal stem cell-based cartilage tissue engineering: cells, scaffold and biology. *Cytotherapy*. 2004;6(6):596-601.
2. Aittomaki K, Eroila H, Kajanoja P. A population-based study of the incidence of Mullerian aplasia in Finland. *Fertil Steril*. 2001;76(3):624-5.
3. Kimberley N, Hutson JM, Southwell BR, Grover SR. Vaginal agenesis, the hymen, and associated anomalies. *J Pediatr Adolesc Gynecol*. 2012;25(1):54-8

4. Morley GW, Lindenauer SM. Pelvic exenterative therapy for gynecologic malignancy: an analysis of 70 cases. *Cancer*. 1976;38(1 SUPPL):581-6.
5. Oppelt P, Renner SP, Kellermann A, Brucker S, Hauser GA, Ludwig KS, et al. Clinical aspects of Mayer-Rokitansky-Kuester-Hauser syndrome: recommendations for clinical diagnosis and staging. *Hum Reprod*. 2006;21(3):792-7.
6. De Filippo RE, Bishop CE, Filho LF, Yoo JJ, Atala A. Tissue engineering a complete vaginal replacement from a small biopsy of autologous tissue. *Transplantation*. 2008;86(2):208-14.
7. Habek D, Kulas T. Nonobstetrics vulvovaginal injuries: mechanism and outcome. *Arch Gynecol Obstet*. 2007;275(2):93-7.
8. Wefer J, Sekido N, Sievert KD, Schlote N, Nunes L, Dahiya R, et al. Homologous acellular matrix graft for vaginal repair in rats: a pilot study for a new reconstructive approach. *World J Urol*. 2002;20(4):260-3.
9. Ding J-X, Zhang X-y, Chen L-m, Hua K-Q. Vaginoplasty using acellular porcine small intestinal submucosa graft in two patients with Meyer-von-Rokitansky-Küster-Hauser syndrome: a prospective new technique for vaginal reconstruction. *Gynecologic and obstetric investigation*. 2013;75(2):93-6.
10. Morton KE, Dewhurst CJ. Human amnion in the treatment of vaginal malformations. *Br J Obstet Gynaecol*. 1986;93(1):50-4.
11. Zhou JH, Sun J, Yang CB, Xie ZW, Shao WQ, Jin HM. Long-term outcomes of transvestibular vaginoplasty with pelvic peritoneum in 182 patients with Rokitansky's syndrome. *Fertil Steril*. 2010;94(6):2281-5.
12. De Filippo RE, Yoo JJ, Atala A. Engineering of vaginal tissue in vivo. *Tissue Eng*. 2003;9(2):301-6.
13. Ma Z, Kotaki M, Inai R, Ramakrishna S. Potential of nanofiber matrix as tissue-engineering scaffolds. *Tissue engineering*. 2005;11(1-2):101-9.
14. Li D, Xia Y. Electrospinning of Nanofibre: Reinventing of Wheel? *Advanced Materials*. 2004;16(14):1151-70.
15. Prabhakaran M, Ghasemi-Mobarakeh L, Ramakrishna S. Electrospun Composite Nanofibers for Tissue Regeneration. *Journal of Nanoscience and Nanotechnology*. 2011;11(4):3039-57.
16. Yang F, Murugan R, Wang S, Ramakrishna S. Electrospinning of nano/micro scale poly(L-lactic acid) aligned fibers and their potential in neural tissue engineering. *Biomaterials*. 2005;26(15):2603-10.
17. Oertel G. *Polyurethane Handbook*. Berlin: Hanser Gardner; 1994.
18. Lendlein A, Sisson A. *Handbook of Biodegradable Polymers* Wiley-VCH; 2011.
19. Raya-Rivera AM, Esquiliano D, Fierro-Pastrana R, Lopez-Bayghen E, Valencia P, Ordorica-Flores R, et al. Tissue-engineered autologous vaginal organs in patients: a pilot cohort study. *Lancet*. 2014;384(9940):329-36.
20. Sartoneva R, Kuismanen K, Juntunen M, Karjalainen S, Hannula M, Kyllönen L, et al. Porous poly-l-lactide-co-ε-caprolactone scaffold: a novel biomaterial for vaginal tissue engineering. *Royal Society open science*. 2018;5(8):180811.



21. Vatankhah E, Prabhakaran MP, Semnani D, Razavi S, Morshed M, Ramakrishna S. Electrospun tectophilic/gelatin nanofibers with potential for small diameter blood vessel tissue engineering. *Biopolymers*. 2014;101(12):1165-80.
22. Grosse A, Grosse C, Lenggenhager D, Bode B, Camenisch U, Bode P. Cytology of the neovagina in transgender women and individuals with congenital or acquired absence of a natural vagina. *Cytopathology*. 2017;28(3):184-91.
23. Arcelus J, Bouman WP, Van Den Noortgate W, Claes L, Witcomb G, Fernandez-Aranda F. Systematic review and meta-analysis of prevalence studies in transsexualism. *Eur Psychiatry*. 2015;30(6):807-15.
24. Sadeghi A, Moztarzadeh F, Aghazadeh Mohandesi J. Investigating the effect of chitosan on hydrophilicity and bioactivity of conductive electrospun composite scaffold for neural tissue engineering. *Int J Biol Macromol*. 2019;121:625-32.
25. Gnani S, Fornasari BE, Tonda-Turo C, Ciardelli G, Zanetti M, Geuna S, et al. The influence of electrospun fibre size on Schwann cell behaviour and axonal outgrowth. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl*. 2015;48:620-31.
26. Ameer JM, Pr AK, Kasaju N. Strategies to Tune Electrospun Scaffold Porosity for Effective Cell Response in Tissue Engineering. *J Funct Biomater*. 2019;10(3).
27. Lv J, Chen L, Zhu Y, Hou L, Liu Y. Promoting epithelium regeneration for esophageal tissue engineering through basement membrane reconstitution. *ACS applied materials & interfaces*. 2014;6(7):4954-64.
28. von Burkersroda F, Schedl L, Gopferich A. Why degradable polymers undergo surface erosion or bulk erosion. *Biomaterials*. 2002;23(21):4221-31.
29. Patrick Jr C, Zheng B, Johnston C, Reece GP. Long-term implantation of preadipocyte-seeded PLGA scaffolds. *Tissue engineering*. 2002;8(2):283-93.
30. Lins LC, Wianny F, Livi S, Hidalgo IA, Dehay C, Duchet-Rumeau J, et al. Development of Bioresorbable Hydrophilic-Hydrophobic Electrospun Scaffolds for Neural Tissue Engineering. *Biomacromolecules*. 2016;17(10):3172-87.
31. Gabriel LP, Rodrigues AA, Macedo M, Jardini AL, Maciel Filho R. Electrospun polyurethane membranes for Tissue Engineering applications. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl*. 2017;72:113-7.
32. Semitela Â, Girão AF, Fernandes C, Ramalho G, Bdikin I, Completo A, Marques PA. Electrospinning of bioactive polycaprolactone-gelatin nanofibres with increased pore size for cartilage tissue engineering applications. *Journal of Biomaterials Applications*. 2020 Jul 7:088532822094019



Development of polyurethane nanofibers scaffold for vaginal tissue engineering

Dehghan Manshadi N¹, Hadizadeh M¹, Fattahi S^{1*}, Moshtaghioun S², Nikukar H³

1. Textile Department, Faculty of Engineering, Yazd University, Yazd, Iran.

2. Department of Biology, Faculty of Science, Yazd University, Yazd, Iran.

3. Medical Nanotechnology and Tissue Engineering Research Center, Yazd Reproductive Sciences Institute, Shahid Sadoughi University of Medical Sciences, Yazd, Iran.

Original Article

Received: 21 Apr 2020

Accepted: 19 Sep 2020

***Corresponding Author:**Saeid Fattahi &
Textile Department, Faculty
of Engineering, Yazd
University, Yazd, Iran.

TEL: 03531232560

Email: sfattahi@yazd.ac.ir

A B S T R A C T

Introduction

Vaginal reconstruction is the choice medical approach in many congenital abnormalities, injuries, or cancers. Reconstructive techniques applying non-vaginal tissues can be associated with more complications. In special situations such as dilatation failure or large defects, surgical vaginoplasty is recommended. In this regard, the main challenge is the lack of sufficient native tissue to reconstruct the organ.

Materials and Methods

Nanofibrous scaffolds of elastomeric polyurethane (PU) were fabricated by electrospinning. The physical and chemical properties of the scaffolds were characterized. The toxicity and biocompatibility of each scaffold were evaluated by the MTT (3-(4, 5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide) assay using human vaginal epithelial cells (HVECs). Cell homing, proliferation and cytokeratins expression was evaluated on the scaffolds by scanning electron microscopy (SEM), Hematoxylin & Eosin (H&E), and fluorescent staining, respectively.

Results

Polyurethane nanofibers diameter and porosity of scaffold were 322 ± 176 nm and $80\% \pm 2\%$, respectively. After 120 days of degradation, the average weight loss of the scaffold was 2.3%. The SEM image also preserves the structural integrity of the fibers but shows small white dots on the nanofibers. SEM microscopy images, MTT assay and H&E staining showed adhesion, viability and proliferation of epithelial cells on the scaffold. Finally, the cytokeratine expression of these cells was confirmed by fluorescent staining on the polyurethane nanofibers scaffold.

Conclusion

The results showed that PC-3575A polyurethane nanofibers scaffold has good potential for vaginal tissue engineering.

Keywords

Nanofiber scaffold, Polyurethane, Tissue engineering, Epithelial cells, Vagina

► Please cite this article as: Dehghan Manshadi N, Hadizadeh M, Fattahi S, Moshtaghioun S, Nikukar H. Development of polyurethane nanofibers scaffold for vaginal tissue engineering. J Neyshabur Univ Med Sci 2021;9(1):28-41.