Research article

Available in: http://jips.ippi.ac.ir

Iran. J. Polym. Sci. Technol. (Persian),
Vol. 33, No. 5, 419-433
December 2020- January 2021
ISSN: 1016-3255
Online ISSN: 2008-0883
DOI: 10.22063/JIPST.2020.1764

Optimization of Polyurethane Scaffolds by Taguchi Design of Experiments for Vascular Tissue Engineering Applications

Maryam Nezadi[1*], Hamid Keshvari[1], and Maryam Yousefzadeh[2]

1. Biomaterial and Tissue Engineering Group, Department of Biomedical Engineering,
2. Nanofibers and Electrospinning Lab., Department of Textile Engineering; Amirkabir University of Technology, P.O. Box 15875-4413, Tehran, Iran

Received: 15 March 2020, accepted: 5 September 2020

ABSTRACT

Hypothesis: Vascular tissue engineering offers innovative solutions to the vascular replacement problems, especially low diameter grafts. Electrospinning is a cost-effective and versatile method for producing tissue engineering scaffolds. Although this method is relatively simple, but at theoretical level the interactions between process parameters and their influence on fiber morphology are not yet fully understood. In this paper, the aim was to find the optimal electrospinning parameters to obtain the smallest fiber diameter by Taguchi's methodology for vascular tissue engineering applications.

Methods: The scaffolds were produced by electrospinning of a polyurethane solution in dimethylformamide. Polymer concentration and process parameters were considered as effective factors. Taguchi's L9 orthogonal design was applied to the experiential design. Optimal conditions were determined using the signal-to-noise (S/N) ratio with Minitab 17 software. The morphology of the nanofibers was studied by an SEM. Then, human umbilical vein endothelial cells (HUVECs) were cultured on the optimal scaffolds to investigate cellular toxicity of the scaffolds and cell adhesion.

Findings: The analysis of experiments showed that polyurethane concentration was the most significant parameter. An optimum combination to reach the smallest diameters was obtained at 12 wt% polymer concentration, 16 kV of the supply voltage, 0.1 mL/h feed rate and 15 cm tip-to-distance. The average diameter of the nanofibers was predicted in the range of 242.10 to 257.92 nm at a confidence level of 95%. The optimum diameter of the nanofibers was experimentally 258±30 nm, which is in good agreement with the estimated value of the Taguchi's methodology. Cell viability was also reported to be 88.59% and the cells showed good adhesion to the scaffold. These scaffolds can show promising results in mimicking the extracellular matrix and thus in vascular tissue engineering.

Keywords:
vascular tissue engineering,
electrospinning,
polyurethane,
Taguchi's methodology,
optimization

(*)To whom correspondence should be addressed.
E-mail: nezadi@aut.ac.it

Please cite this article using:
Nezadi M., Keshvari H., and Yousefzadeh M., Optimization of Polyurethane Scaffolds by Taguchi Design of Experiments for Vascular Tissue Engineering Applications, *Iran. J. Polym. Sci. Technol. (Persian)*, **33**, 419-433, 2021.

مقاله پژوهشی

بهینه‌سازی داربست‌های پلی‌یورتانی با طراحی آزمون تاگوچی برای کاربردهای مهندسی بافت عروق

قابل دسترس در نشانی: http://jips.ippi.ac.ir

مریم نزادی[1*]، حمید کشوری[1]، مریم یوسف‌زاده[2]

تهران دانشگاه صنعتی امیرکبیر، صندوق پستی ۴۴۱۳-۱۵۸۷۵:
۱- دانشکده مهندسی پزشکی، گروه بیومتریال و مهندسی بافت، ۲- دانشکده مهندسی نساجی، آزمایشگاه نانوالیاف و الکتروریسی

مجله علوم و تکنولوژی پلیمر،
سال سی‌وسوم، شماره ۵،
صفحه ۴۳۳-۴۱۹، ۱۳۹۹
ISSN: 1016-3255
Online ISSN: 2008-0883
DOI: 10.22063/JIPST.2020.1764

دریافت: ۱۳۹۸/۱۲/۲۵، پذیرش: ۱۳۹۹/۶/۱۵

چکیده

فرضیه: مهندسی بافت عروق، راهکارهای نوآورانه‌ای برای حل مشکلات جایگزین‌های عروقی به‌ویژه با قطر کم ارائه می‌دهد. الکتروریسی روشی کاربردی و ارزان برای تولید داربست‌های مهندسی بافت است. اگرچه این روش به‌نسبت ساده است، اما از نظر برهم‌کنش‌های میان پارامترهای فرایندی و اثر آن‌ها بر شکل‌شناسی الیاف هنوز کاملاً مشخص نیست. در این مطالعه، هدف تعیین متغیرهای بهینه به‌منظور دست‌یابی به کمترین قطر الیاف با روش تاگوچی برای کاربردهای مهندسی بافت عروق است.

روش‌ها: داربست‌های پلی‌یورتانی در دی‌متیل‌فرمامید با فرایند الکتروریسی تهیه شدند. غلظت پلیمر و پارامترهای فرایندی به‌عنوان عامل‌های مؤثر درنظر گرفته شدند. با کمک آرایه L9 روش تاگوچی، طراحی آزمون انجام و شرایط بهینه‌سازی الکتروریسی با استفاده از نسبت علامت به نوفه (S/N) به‌کمک نرم‌افزار Minitab 17 تعیین شد. شکل‌شناسی الیاف با میکروسکوپی الکترونی پویشی بررسی شد. افزون بر آن، سلول‌های اندوتلیال ورید بند ناف انسان (HUVEC) به‌منظور بررسی سمیت سلولی و چسبندگی سلولی روی داربست‌های بهینه کشت شد.

یافته‌ها: تحلیل آزمون‌ها نشان داد، غلظت پلی‌یورتان اثرگذارترین پارامتر است. شرایط بهینه برای تولید الیاف، با غلظت ٪۱۲ وزنی پلیمر، ولتاژ ۱۶ kV، فاصله ۱۵cm بین جمع‌کننده و نازل و سرعت تغذیه ۰/۱ mL/h به‌دست آمد. با روش تاگوچی میانگین قطر الیاف در محدوده ۲۴۲/۱۰ nm تا ۲۵۷/۹۲ nm با سطح اطمینان ٪۹۵ پیش‌بینی شد. قطر الیاف در این شرایط از نظر تجربی نیز ۲۵۸±۳۰ nm بود که با مقدار تخمین زده‌شده با این روش مطابقت خوبی داشت. همچنین، زنده‌مانی سلول‌ها ٪۸۸/۵۹ گزارش شد و سلول‌ها چسبندگی مناسبی به داربست نشان دادند. بنابراین، داربست‌ها تهیه‌شده نتایج امیدوارکننده‌ای در تقلید ماتریس خارج سلولی و در نتیجه مهندسی بافت عروق نشان دادند.

واژه‌های کلیدی

مهندسی بافت عروق،
الکتروریسی،
پلی‌یورتان،
روش تاگوچی،
بهینه‌سازی

* مسئول مکاتبات، پیام‌نگار:
nezadi@aut.ac.ir

مقدمه

از سال‌ها پیش تاکنون بیماری‌های قلبی عروقی رشد فزاینده‌ای داشته و افزون بر اثر بر سلامت مردم، بر اقتصاد جهانی نیز اثرگذار بوده‌اند. مطابق با گزارش سازمان جهانی بهداشت انتظار می‌رود، حدود ۲۳/۳ میلیون نفر در سال ۲۰۳۰ جان خود را در اثر بیماری‌های قلبی عروقی از دست بدهند. از شایع‌ترین بیماری‌های عروقی، بیماری گرفتگی رگ‌های قلب است. با وجود پیشرفت‌های اخیر در جراحی پلاستیک رگ‌های خونی (angioplasty) با بالن، استفاده از استنت و مداخل‌های جراحی، اما هنور به‌عنوان مهم‌ترین علت اصلی مرگ‌ومیر در کشورهای غربی به‌شمار می‌آیند [۱،۲]. استاندارد طلایی در جراحی عروق، استفاده از عروق طبیعی بدن به‌عنوان جایگزین است. خودپیوندزنی، به‌ویژه با استفاده از ورید صافن (saphenous vei) شریان پستانی داخلی (internal mammary arteries) ایده‌آل‌ترین جایگزین‌های زیستی برای درمان گرفتگی عروق است. اما، در حدود یک سوم از بیماران، به‌دلیل مبتلابودن آن‌ها به بیماری‌های گردش خون نمی‌توان از عروق خود آن‌ها استفاده کرد. بنابراین نیازمند پیوندهای جایگزین هستند [۲،۳]. کشف مواد سنتزی به‌عنوان جایگزین‌های محتمل به توسعه پلیمرهایی نظیر پلی‌اتیلن‌ترفتالات (داکرون) و پلی‌تترافلوئوراتیلن (تفلون) منجر شده است. داکرون و تفلون برای جایگزین‌های عروقی با قطر داخلی mm ۶ عملکرد خوبی داشتند. اما، برای جراحی پیوند عروق کرونر کمتر از mm ۵ نتایج بالینی چندان امیدوارکننده‌ای نشان نداده‌اند [۳].

در سال‌های اخیر مهندسی بافت راهکار جالبی برای ایجاد جایگزین‌های عروقی معرفی کرده است. مهندسی بافت، شکل‌گیری بافت در چارچوب زیست‌مهندسی بوده و مفاهیمی شامل درک نحوه عملکرد سلول‌ها، ساختار ماتریس خارج سلولی و دانش کافی درباره ساخت داربست‌ها برای ایجاد محیطی مناسب برای چسبندگی و نگه‌داری سلول‌هاست. استفاده از داربست‌های حمایت‌کننده برای بافت رگ می‌تواند سبب تولید رگ‌هایی با خواص مشابه با بافت‌های طبیعی بدن شود [۵-۳]. با وجود این، مهندسی بافت با چالش‌های شایان توجهی نیز روبه‌رو است. یکی از این چالش‌ها ایجاد آستر اندوتلیومی با خواص ضدلخته در لایه داخلی رگ است [۶].

گستره‌ای از مواد طبیعی و سنتزی برای مهندسی بافت عروق به‌کار گرفته می‌شوند [۷،۸]. از این میان، پلی‌یورتان به‌عنوان الاستومر انعطاف‌پذیر، خواصی مشابه با عروق خونی دارد. خواص فیزیکی، استحکام کششی و انطباق خوب پلی‌یورتان باعث شده که در ۵۰ سال اخیر این پلیمر در کاربردهای عروقی به‌کار گرفته شود [۹،۱۰]. این پلیمر می‌تواند رفتار مکانیکی مشابه با الاستین موجود در عروق طبیعی را تقلید کند [۹]. Annis و همکاران [۱۱] پیشگامان مطالعه درباره پروتزهای عروقی الاستومر به‌دست‌آمده از پلی‌یورتان‌ها بودند

روش‌های مختلفی برای ساخت داربست‌های مهندسی بافت وجود دارد که الکتروریسی از موفق‌ترین آن‌هاست. در این روش از میدان الکتروستاتیک با ولتاژ زیاد برای تولید ساختارهای لیفی استفاده می‌شود. این روش، بدین دلیل که ساختاری بسیار شبیه به ماتریس خارج سلولی (ECM) فراهم کرده امکان رشد و تمایز سلول‌ها را تقویت می‌کند. از ویژگی‌های شایان توجه در داربست‌های الکتروریسی درصد تخلخل زیاد، پیوستگی کامل خلل‌وفرج‌ها و نسبت سطح به حجم زیاد است که چسبندگی و رشد مناسب سلولی را در پی دارد [۱۴-۱۲].

برای انجام موفق فرایند الکتروریسی لازم است، عامل‌های مرتبط با محلول و فرایند الکتروریسی (ولتاژ اعمال‌شده سرعت تغذیه و فاصله نازل تا جمع‌کننده) به‌درستی تنظیم شوند. به‌عبارت دیگر، کنترل این عامل‌ها می‌تواند به تولید الیاف بدون نقص، با توزیع یکنواخت، قطر و شکل‌شناسی دلخواه منجر شود. از آنجا که تمام این عامل‌ها باید مطابق با سامانه پلیمر–حلال تنظیم شوند. بنابراین، بهینه‌کردن سامانه پلیمر–حلال چالش مهمی برای رسیدن به بهترین نتیجه است [۱۵]. به‌دلیل آنکه آزمایش‌کردن تمام حالت‌ها و شرایط متغیر برای دست‌یابی به نمونه‌ای مطلوب، کاری زمان‌بر و پرهزینه است، استفاده از روش بهینه‌سازی می‌تواند مدت زمان آزمایش را کاهش داده و پیش‌بینی نظری از اثر عامل‌های موجود ارائه دهد. طراحی آزمون روش قوی است که می‌تواند اثر عامل‌های مهم و شرایط مطلوب در صنعت و تولید را مشخص کند [۱۶،۱۷]. روش‌های بی‌شمار آماری در طراحی آزمون به‌کار گرفته می‌شوند که هر یک مزایا و معایبی دارند. روش تاگوچی یکی از انواع طراحی آزمون است که برای تعیین شرایط بهینه و ترتیب اثرگذاری عامل‌های موجود، اهمیت ویژه‌ای یافته است. این روش ترکیبی از روش‌های آماری و محاسباتی است و در مطالعات تجربی به‌کار می‌رود. مهم‌ترین مشخصه این روش اقتصادی‌بودن آن برای ارزیابی فرایندهای پیچیده است. این روش قابلیت آن را دارد که در سامانه‌هایی به‌کار رود که مطالعه عامل‌هایی با سطح‌های مختلف مدنظر است و به انجام تعداد زیادی آزمون برای دست‌یابی به شرایط بهینه نیاز است (مانند الکتروریسی). روش تاگوچی این قابلیت را دارد که با اطمینان زیاد، تعداد آزمون، زمان اجرا، هزینه و احتمال خطا را در دست‌یابی به پاسخ مطلوب کاهش دهد [۱۸،۱۹]. همچنین، قابلیت بررسی اثر متقابل میان فاکتورها و نیز انجام آزمون‌ها به‌طور موازی را دارد. در نهایت، پاسخ سامانه را حتی در حالت بهینه آن، که هنوز آزمایشی در آن شرایط انجام نشده، با تقریب مناسبی پیش‌بینی می‌کند [۲۰،۲۱].

از آنجا که ECM طبیعی بافت‌ها، ساختار سه‌بعدی الیافی دارد که اندازه الیاف آن حدود ۵۰ nm تا ۵۰۰ nm است [۲۴-۲۲]. بنابراین، مهندسی بافت در پی دست‌یابی به الیافی با قطری نزدیک به ECM است. از سوی دیگر، نانوالیاف و شکل‌شناسی آن‌ها اثر شایان توجهی بر چسبندگی سلولی ایفا می‌کند. Wei و همکاران [۲۵] داربست‌های الکتروریسی‌شده از جنس ژلاتین-پلی‌کاپرولاکتون و کلاژن-پلی‌کاپرولاکتون را برای مهندسی بافت عروق مقایسه کردند. میانگین قطر الیاف برای این دو داربست به‌ترتیب ۱۲۰ ±۳۸۹/۹ و ۹۷ nm ±۳۰۱/۸ به‌دست آمد که هر دو گروه برای کاربردهای عروقی مناسب ارزیابی شدند. مطالعات زیادی نیز درباره الکتروریسی پلی‌یورتان انجام شده است [۳۳-۲۶،۱۳،۱۰،۹]. Zhou و همکاران [۲۶] اثر پارامترهای فرایندی شامل ولتاژ، سرعت تغذیه و نیز غلظت پلیمر را بر شکل‌شناسی پلی‌یورتان‌های دارای حافظه بررسی کردند. اما تاکنون مطالعه‌ای درباره بهینه‌سازی عامل‌های مؤثر بر این فرایند انجام نشده است. طراحی الگوی بهینه می‌تواند اثر عامل‌ها بر شکل‌شناسی نانوالیاف را به‌طور دقیق بررسی کند و مؤثرترین عامل برای دست‌یابی به شکل‌شناسی‌های دلخواه را تعیین کند.

نکته مهم دیگر در بحث داربست‌های مهندسی بافت عروق بحث خون‌سازگاری آن‌هاست. رویکردهای بسیاری برای افزایش خون‌سازگاری عروق مطرح است. توسعه لایه سلول اندوتلیال (درون پوشه‌ای) که مشابه با لایه اندوتلیوم عروقی چسبنده باشد و نیز در برابر تنش برشی جریان خون مقاومت کند، از مؤثرترین این راهکارها به‌شمار می‌آید [۳۴]. اندوتلیال‌کردن (پوشش‌یافتن موضع باز با سلول‌های اندوتلیال) دوباره پیوندهای عروقی، پیش‌نیاز اساسی برای مقابله با تشکیل لخته خون است. داربست ایده‌آل باید شرایط را برای چسبندگی و تکثیر سلول‌های اندوتلیال فراهم کند تا قابلیت تقلید از ECM عروق را داشته باشد. عامل‌های زیادی از جمله شیمی پلیمر، خواص مکانیکی و توپوگرافی سطح بر پاسخ سلول‌ها اثرگذارند [۳۵]. در مطالعه حاضر تمرکز بر خواص سطحی است. از آنجا که سلول‌های اندوتلیال اندازه‌ای حدود ۵ μm تا ۱۳ μm دارند و قطر اجزای داخل سلولی مانند رشته‌های میانی به حدود ۱۰ nm می‌رسد [۳۶] دست‌یابی به این ابعاد با فرایند الکتروریسی امکان‌پذیر است.

بنابراین در پژوهش حاضر، هدف ساخت داربست‌های نانولیفی تهیه‌شده از پلی‌یورتان با روش الکتروریسی و ایجاد تغییرات در سطح و شکل‌شناسی آن است، به‌گونه‌ای که بیشترین مقدار چسبندگی سلول‌های اندوتلیال به این بستر فراهم شود. برای دست‌یابی به این هدف، ابتدا با نرم‌افزار Minitab 17 و به‌کمک طراحی آزمون با روش تاگوچی، شرایط بهینه برای تولید الیاف پلی‌یورتان مشخص شد. سپس، داربست‌ها تهیه شدند و رفتار سلول‌های اندوتلیال عروق بند ناف انسان (HUVEC) در پاسخ به این سطح‌ها بررسی شد.

تجربی

مواد

نمونه تجاری پلی‌یورتان (PU) گرمانرم بر پایه پلی‌استر با چگالی ۱۲۰۰ kg/m³ (Desmopan, ۳۴۸۵A kg/m³) از شرکت Bayer آلمان خریداری شد. از N،N-دی‌متیل‌فرمامید (DMF) با وزن مولی ۱۰/۷۳ g/mol، محصول شرکت Merck به‌عنوان حلال استفاده شد. تجهیزات و مواد لازم برای کشت سلول شامل گلوتارآلدهید و ایزوپروپیل الکل برای ثبت سلول‌های کشت داده شده و محلول ۳-(۵،۴-دی‌متیل‌تیازول-۲-ایل)-۵،۲-دی‌فنیل‌تترازولیوم برمید (MTT) از شرکت Merck تهیه شد. برای انجام آزمون‌های سلولی از رده سلولی HUVEC (سلول‌های اندوتلیال ورید ناف انسان) و محیط کشت DMEM-F12 (Dulbecco's Modified Eagle's medium) استفاده شد.

دستگاه‌ها

همزن مغناطیسی مدل MR Hei-Standard ساخت شرکت Heldolph آلمان، دستگاه الکتروریسی مونتاژشده در دانشگاه صنعتی امیرکبیر با پمپ تزریق مدل Ms-2200 ساخت شرکت Medifusion آمریکا، منبع تأمین ولتاژ مدل HV50P OC با توان خروجی ۵۰ kV ساخت شرکت فناوران نانومقیاس ساخت ایران، میکروسکوپ رقمی مدل AM4515 ساخت شرکت Dino-lite تایوان، میکروسکوپ الکترونی پویشی (SEM) مدل AIS-2100 ساخت شرکت Seron Technology کره جنوبی، انکوباتور CO_2 مدل INC108 شرکت Memmert آلمان، هود جریان آرام نوع II، مدل BSC126 ساخت شرکت ایرانی Beasat، دستگاه مرکزگریز مدل 3-16PK ساخت شرکت Sigma آلمان، میکروسکوپ نوری معکوس مدل INV-2 ساخت شرکت BEL ایتالیا، خوانش‌گر پلیت مدل Elx 808 ساخت شرکت BioTekElISA reader آمریکا و دستگاه UV ساخت شرکت فرایند پردیس سینا به‌کار گرفته شدند.

روش‌ها

نمونه محلول‌های پلیمر با حل‌کردن مقدارهای مختلف پلی‌یورتان (PU) در حلال DMF تهیه شدند. سپس، محلول‌ها به‌مدت ۲۴ h با

همزن مغناطیسی در ۲۵°C برای حل شدن کامل پلی‌یورتان همزده شدند تا اینکه محلول‌های PU-DMF همگن به‌دست آمد.

طراحی آزمون

Minitab نرم‌افزاری دقیق در حل مشکلات آماری و بهبود کیفیت مسائل مهندسی و ریاضیات است [۱۶]. روش تاگوچی رویکردی مهندسی برای انتخاب سطح‌های بهینه است و ترکیبی از شرایط را به‌جای تمام حالت‌ها (فاکتوریل کامل) بررسی می‌کند. در این روش عامل‌های که کیفیت نهایی نمونه را تحت تأثیر قرار می‌دهند با کمینه تکرار و آزمایش مطالعه می‌شوند [۱۶،۱۷]. در پژوهش حاضر، دو هدف مهم پی‌گیری شد. هدف اول، بررسی اثر سه سطح از چهار عامل غلظت پلیمر، ولتاژ اعمال‌شده، سرعت تغذیه و فاصله نازل تا جمع‌کننده بر قطر الیاف و پراکندگی آن‌ها بوده و هدف دوم بهینه‌سازی این عامل‌ها برای رسیدن به کمترین قطر بود. طراحی آزمون با سطح عامل‌های آن در جدول ۱ آمده است. ترکیبی از این عامل‌ها با سطح‌های متفاوت مطابق با آرایه متعامد L9 در جدول ۲ آمده است.

مطالعات پیشین نشان داد، قطر الیاف کمتر از میکرون (۵۰۰ nm) می‌تواند در ارتقای ECM مؤثر باشد و در محدوده الیاف کلاژنی قرار گیرد. بنابراین به‌نظر می‌رسد، الکتروریسی داربست‌های نانولیفی و استفاده از کمترین قطر برای بهبود رفتار سلول‌های اندوتلیال مؤثرتر است [۳۵،۳۷]. برای کاهش قطر الیاف در حدود تارچه‌های کلاژنی (۵۰ nm تا ۵۰۰ nm) و کاهش پراکندگی در فرایند الکتروریسی به استناد مقاله‌های مشابه [۱۵،۳۸]، نمونه بهینه ترکیبی از عامل‌های به‌کار رفته بر اساس، هر چقدر کوچک‌تر بهتر است، انتخاب شد. بدین ترتیب، نمونه‌ای به‌عنوان بهینه انتخاب می‌شود که قطر نانوالیاف و مقدار اختلاف در توزیع آن‌ها با توجه به معادله (۱) به کمینه مقدار ممکن رسیده باشد. منظور از کمترین قطر، کمترین قطر الیاف به‌دست‌آمده

جدول ۱- چهار عامل الکتروریسی و سطح‌های انتخاب‌شده در آرایه (L9) طراحی آزمون تاگوچی.

Table 1. Four factors and their levels selected in Taguchi's experimental design.

Factor	Symbol	Level		
		1	2	3
Polymer Concentration (wt %)	C	12	16	20
Voltage supplied (kV)	V	12	16	20
Distance between collector and tip (cm)	D	12	15	18
Flow rate (mL/h)	F	0.1	0.2	0.3

جدول ۲- طراحی متعامد آرایه L9 برای عامل‌ها و سطح‌های انتخاب‌شده.

Table 2. L9 orthogonal array design for selected factors and levels.

Run	Factors			
	PU (wt %)	Voltage (kV)	Distance (cm)	Flow rate (mL/h)
1	12	12	12	0.1
2	12	16	15	0.2
3	12	20	18	0.3
4	16	12	15	0.3
5	16	16	18	0.1
6	16	20	12	0.2
7	20	12	18	0.2
8	20	16	12	0.3
9	20	20	15	0.1

بدون دانه از پلیمر مربوط است:

$$\frac{S}{N} = -10\log\left(\frac{1}{n}\sum_{i=1}^{n} y_i^2\right) \quad (۱)$$

در این معادله، S/N نسبت علامت به نوفه، n تعداد آزمون‌ها و y قطر اندازه‌گیری‌شده نانوالیاف پلی‌یورتانی است [۱۵،۱۷،۳۹]

فرایند الکتروریسی پلی‌یورتان

برای الکتروریسی PU از حلال DMF استفاده شد. ابتدا با آزمون‌های مقدماتی و سعی و خطا پنجره عملکرد مطلوب برای تهیه محلول و غلظت پلیمر مشخص شد. پس از بررسی مشخص شد نمونه‌های تهیه‌شده با غلظت کمتر از ٪۱۲ از PU، دارای الیاف دانه‌دار بودند. در غلظت بیش از ٪۲۰ نیز به‌دلیل گرانروی زیاد محلول، فرایند انجام‌پذیر نبود. بنابراین، محدوده ٪۱۲ تا ٪۲۰ برای غلظت انتخاب شد و محلول‌ها مطابق با طراحی آزمون در غلظت‌های ۱۲، ۱۶، ٪۲۰ از PU در ۲ mL حلال DMF تهیه شدند و به‌مدت ۲۴ h در دمای محیط روی همزن مغناطیسی قرار گرفتند تا پلی‌یورتان به‌خوبی حل شود. فرایند الکتروریسی محلول‌های تهیه‌شده با دستگاه الکتروریسی مونتاژشده در دانشگاه صنعتی امیرکبیر مجهز به پمپ تزریق، منبع تأمین ولتاژ با توان خروجی ۵۰ kV و جمع‌کننده غلتکی با سرعت ۱۱۰۰ rpm انجام شد (شکل ۱). بدین ترتیب، محلول پلیمری درون سرنگ ۱ mL وارد شد و برای تزریق آن به سمت نازل سرنگ، روی پمپ دستگاه قرار گرفت.

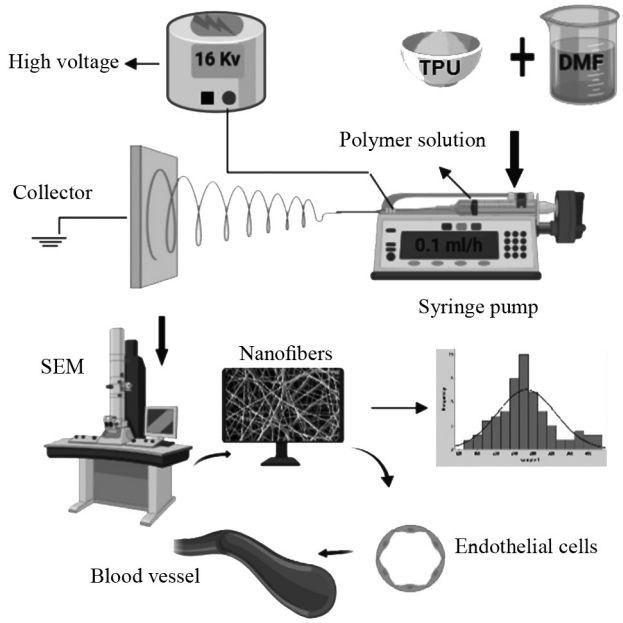
سوزن سرنگ به الکترود مثبت منبع با ولتاژ زیاد و الکترود منفی به صفحه جمع کننده متصل و با تنظیم شرایط فرایند (ولتاژ، سرعت تغذیه و فاصله نازل تا جمع‌کننده)، الکتروریسی انجام شد. الیاف تولیدشده با اعمال میدان الکتریکی روی جمع‌کننده گردان که به‌وسیله فویل آلومینیمی پوشانده شده بود، به‌مدت ۵ h جمع‌آوری شد. تمام فرایند الکتروریسی در دما ۲۵°C و ٪۳۵ رطوبت انجام شد.

بررسی شکل‌شناسی داربست‌ها

برای پیش‌کنترل روند انجام‌شده، داربست‌ها پس از الکتروریسی، ابتدا با میکروسکوپ رقمی مشاهده شدند. سپس، برای بررسی دقیق‌تر شکل‌شناسی داربست‌ها و قطر الیاف تشکیل‌شده از میکروسکوپ الکترونی پویشی (SEM) استفاده شد. نمونه‌های مربعی با اندازه ۰/۵×۰/۵ cm^2 از داربست‌ها بریده شدند و پیش از عکس‌برداری به‌مدت ۸۰ s در ولتاژ ۸۰ kV با طلا پوشش‌دهی شدند و پس از آن، بررسی با میکروسکوپ الکترونی پویشی انجام شد.

انتخاب نمونه بهینه

قطر نانوالیاف پلی‌یورتانی با شمارش تصادفی ۱۰۰ نانولیف از عکس‌های SEM به‌کمک نرم‌افزار Image J انجام شد. نمودار توزیع قطر الیاف و بررسی‌های آماری با نرم‌افزار Minitab 17 انجام شد. سپس، میانگین قطر به‌دست‌آمده به‌عنوان پاسخ در بخش طراحی آزمون وارد شد، نسبت S/N



شکل ۱- دستگاه الکتروریسی در مهندسی بافت عروق
Fig. 1 Electrospinning setup in vascular tissue engineering.

محاسبه و نمونه بهینه مشخص شد [۱۵]. پس از تعیین نمونه بهینه و عامل اثرگذار بر اندازه قطر، از نمونه داربست الکتروریسی‌شده بهینه پلی‌یورتان برای انجام آزمون‌های سلولی استفاده شد.

آماده‌سازی و سترون‌سازی داربست‌ها

پیش از شروع کشت سلولی روی داربست‌ها، سترون‌سازی موضوعی لازم است. برای سترون‌کردن داربست‌های الکتروریسی‌شده از دستگاه UV استفاده شد که از روش‌های رایج سترون‌سازی است و طبق مقاله‌ها به ساختار پلی‌یورتان آسیبی وارد نمی‌کند [۱۰،۴۰]. دو طرف قطعات بریده‌شده از داربست هر یک به‌مدت ۱ h در معرض پرتو UV قرار گرفتند و سترون شدند.

کشت سلول‌های HUVEC

از سلول‌های اندوتلیال ورید بند ناف انسان برای ارزیابی پاسخ داربست‌های پلی‌یورتانی نسبت به سلول‌های عروق خونی استفاده شد [۱۰]. سلول‌های HUVEC می‌توانند تقلیدکننده مناسبی از سلول‌های جدار اندوتلیومی عروق باشند [۴۰]. این سلول‌ها در فلاسک‌های ۲۲۵ cm ویژه کشت بافت، همراه با محیط کشت DMEM-F12 مغذی‌شده با ٪۱۰ FBS و ٪۱ آنتی‌بیوتیک پنی‌سیلین‌استرپتومایسین (Pen/Strep) کشت داده شدند (در هود جریان آرام). فلاسک‌ها در دمای ۳۷°C و ٪۵ از CO_2 درون انکوباتور قرار گرفتند و روزانه با عوض‌کردن محیط کشت و آلودگی احتمالی مایکوپلاسما بررسی شدند.

پس از اینکه درون فلاسک به تراکم سلولی ٪۸۰ (فاز لگاریتمی رشد سلولی) رسید، پاساژ (cell passage) داده شد، سپس، محیط کشت قبلی حذف و سپس با PBS شست‌وشو داده شد و ۱ mL آنزیم تریپسین به فلاسک اضافه شد و پس از ۱۵ min دوره نهفتگی، سلول‌ها از کف فلاسک جدا شدند. برای خنثی‌کردن آنزیم، محیط کشت جدید اضافه شد و سپس تعلیق سلولی درون فالکون (falcon) ریخته شد و با سرعت ۱۳۰۰ rpm به‌مدت ۵ min درون دستگاه مرکزگریز قرار گرفت. از این فلاسک‌ها برای بررسی زیست‌سازگاری و چسبندگی روی داربست‌های پلی‌یورتانی تولیدشده، استفاده شد.

بررسی سمیت سلولی داربست‌ها با MTT

برای انجام مطالعات زیستی و بررسی نبود سمیت در نمونه‌ها آزمون MTT انجام شد. ابتدا تعلیقی از سلول‌های HUVEC در محیط کشت کاملاً ویژه (DMEM-F12+ FBS 10% + Pen/Strep 1%) تهیه شد و تعداد ۲۰ هزار سلول به‌همراه ۵۰۰ µm در هر خانه از پلیت ۲۴تایی، کشت داده شد. سپس، داربست‌های سترون‌شده چند مرتبه با PBS

شست‌وشو شده و در مجاورت سلول‌ها قرار داده شدند. پلیت مدنظر به انکوباتور با دمای ۳۷°C، ٪۵ از CO_2 و ٪۹۵ رطوبت منتقل شد. زمان نهفتگی برای این نمونه‌ها، ۲۴، ۴۸ و ۷۲ h درنظر گرفته شد و با شیوه مستقیم آزمون سمیت MTT روی نمونه‌ها انجام شد. طی زمان‌های تعیین‌شده، برای بررسی مقدار زنده‌مانی سلولی از محلول MTT استفاده شد. بدین ترتیب که ۱۰۰ µm از MTT با غلظت ۰/۵ mg/mL به هر حفره وارد می‌شود. طی زمان نهفتگی، محلول MTT با سوکسینات دهیدروژناز که یکی از آنزیم‌های چرخه تنفسی میتوکندری‌ها کاهش می‌یابد. کاهش و شکسته‌شدن این حلقه موجب تولید بلورهای بنفش‌رنگ فورمازان می‌شود که در زیر میکروسکوپ نوری معکوس به‌راحتی قابل تشخیص است. مقدار رنگ تولیدشده با تعداد سلول‌هایی که از نظر متابولیکی فعال هستند (سلول‌های زنده) رابطه مستقیم دارد. بلورهای فورمازان در آب نامحلول بوده و باید پیش از رنگ‌سنجی با ماده حلال آلی به‌حالت محلول درآیند. به همین دلیل، پس از گذشت ۴ h محلول روی سلول‌ها خارج شده و ایزوپروپانول به آن‌ها اضافه شد تا بلورهای بنفش رنگ ایجادشده حل شود. سپس، محلول مدنظر به پلیت ۹۶ خانه انتقال داده شد و جذب نوری آن در طول موج ۵۷۰ nm با خوانش‌گر پلیت ثبت شد. حفره‌های دارای سلول‌های زنده بیشتر، چگالی نوری (OD) بیشتری نسبت به حفره‌هایی با تعداد سلول زنده کمتر نشان می‌دهند. بدین ترتیب زنده‌مانی سلول‌ها با نمونه کنترل مقایسه شد [۴۱،۴۲].

بررسی چسبندگی سلول‌های HUVEC

برای بررسی چسبندگی سلول‌های HUVEC، قطعات داربست به‌شکل مربع‌هایی با ضلع ۱ cm روی لامل تهیه شدند و پس از سترون‌شدن، درون خانه‌های پلیت ۶خانه‌ای سه مرتبه با PBS شست‌وشو داده شدند. برای بهبود چسبندگی، نمونه‌ها به‌مدت ۳ h تحت نمونه DMEM-F12 (محیط کشت ویژه سلول‌های HUVEC) درون انکوباتور با ٪۵ CO_2 و دمای ۳۷°C قرار داده شدند. در مرحله بعد محیط کشت تخلیه شد و سلول‌ها در تراکم 1×10^4 سلول در ۲۰ µL با روش چکاندن روی داربست قرار داده شدند و پلیت دارای داربست به‌مدت ۳ h به‌منظور نفوذ کامل سلول‌ها درون داربست در انکوباتور قرار گرفت [۳۱]. سپس، ۵۰۰ µL محیط کشت کامل دارای DMEM-F12، ٪۱۰ FBS و آنتی‌بیوتیک (پنی‌سیلین – استرپتومایسین ٪۱) به محیط داربست اضافه شد. پس از ۲۴ h از کشت سلول‌ها، نمونه‌ها به‌مدت ۴۵ min درون محلول گلوتارآلدهید ٪۴ تثبت‌شده سپس با آب مقطر شست‌وشو داده شدند، پس از خشک‌شدن نمونه‌ها با طلا پوشش‌دهی شدند و برای مشاهده چسبندگی سلول‌ها با SEM از آن‌ها عکس‌برداری شد.

تحلیل‌های آماری

داده‌ها حداقل سه مرتبه تکرار و جمع‌آوری شدند. نتایج به‌طور میانگین همراه با انحراف معیار گزارش و مقایسه آماری میان نتایج گروه‌ها با آزمون t و ANOVA انجام شد. مقدارهای $P < ۰/۰۵$ به‌عنوان تفاوت معنادار درنظر گرفته شد.

نتایج و بحث

طراحی آزمون و فرایند الکتروریسی

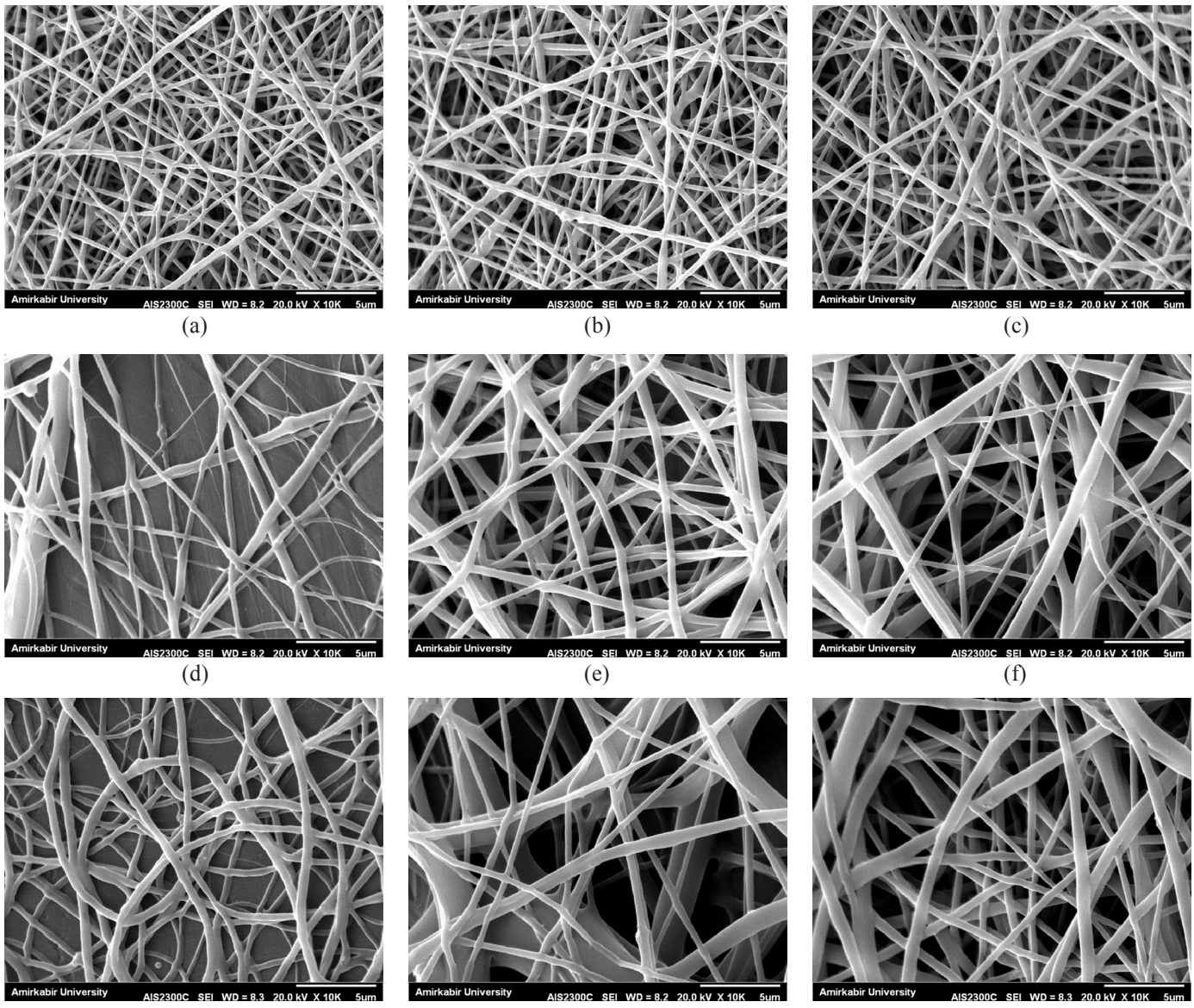
در ادامه، نتایج طراحی آزمون با روش تاگوچی برای انتخاب نمونه بهینه و فرایند الکتروریسی داربست‌ها توضیح داده می‌شود.

بررسی شکل‌شناسی الیاف پلی‌یورتان

انتخاب محدوده مناسب متغیرها (چهار عامل اصلی) برای پیداکردن بهترین پاسخ از نظر قطر الیاف، بخش مهم فرایند بهینه‌سازی برای تولید الیاف با شکل‌شناسی مناسب است. چهار عامل اصلی شامل غلظت، ولتاژ اعمال‌شده، فاصله نازل تا جمع‌کننده و سرعت تغذیه است که مطابق با طراحی آزمون و روش تاگوچی، از ترکیب حالت‌های آرایه متعامد (L9) تشکیل شده و نمونه‌ها مطابق با جدول ۲ تهیه شدند. شبکه‌های حاصل از نظر تشکیل‌شدن یا نشدن لیف و قطره با میکروسکوپ نوری و سپس میکروسکوپ الکترونی پویشی بررسی شدند. شکل ۲ عکس‌های SEM، ۹ نمونه از الیاف پلی‌یورتان الکتروریسی‌شده را نشان می‌دهد. شکل ۳ نیز نمودار توزیع فراوانی الیاف تشکیل‌شده به همراه میانگین و انحراف معیار قطر الیاف را نشان می‌دهد. مطابق با نمودارهای توزیع فراوانی، اندازه قطر الیاف در محدوده ۲۶۰ nm تا ۴۳۵ nm و با میانگین ۳۶۲ nm است. در بررسی اولیه نانوالیاف تولیدشده از پلی‌یورتان می‌توان دریافت، نمونه‌های ۱ تا ۳ کمترین مقدار قطر الیاف و یکنواختی بیشتری (انحراف معیار کوچک‌تر) را دارند. عامل مشترک در این سه نمونه، غلظت محلول است که کمترین مقدار غلظت یعنی ٪۱۲ وزنی را شامل می‌شود و در نمونه‌های بعدی افزایش مقدار غلظت سبب افزایش قطر و نایکنواختی الیاف تولیدشده می‌شود.

تحلیل و ارزیابی نتایج طراحی آزمون با روش تاگوچی

در روش تاگوچی از نسبت علامت به نوفه (S/N) برای محاسبه انحراف کیفیت از ارزش‌های مطلوب، استفاده می‌شود [۱۵]. در این مطالعه، ارزش S/N با نرم‌افزار آماری Minitab و مطابق اصل هر

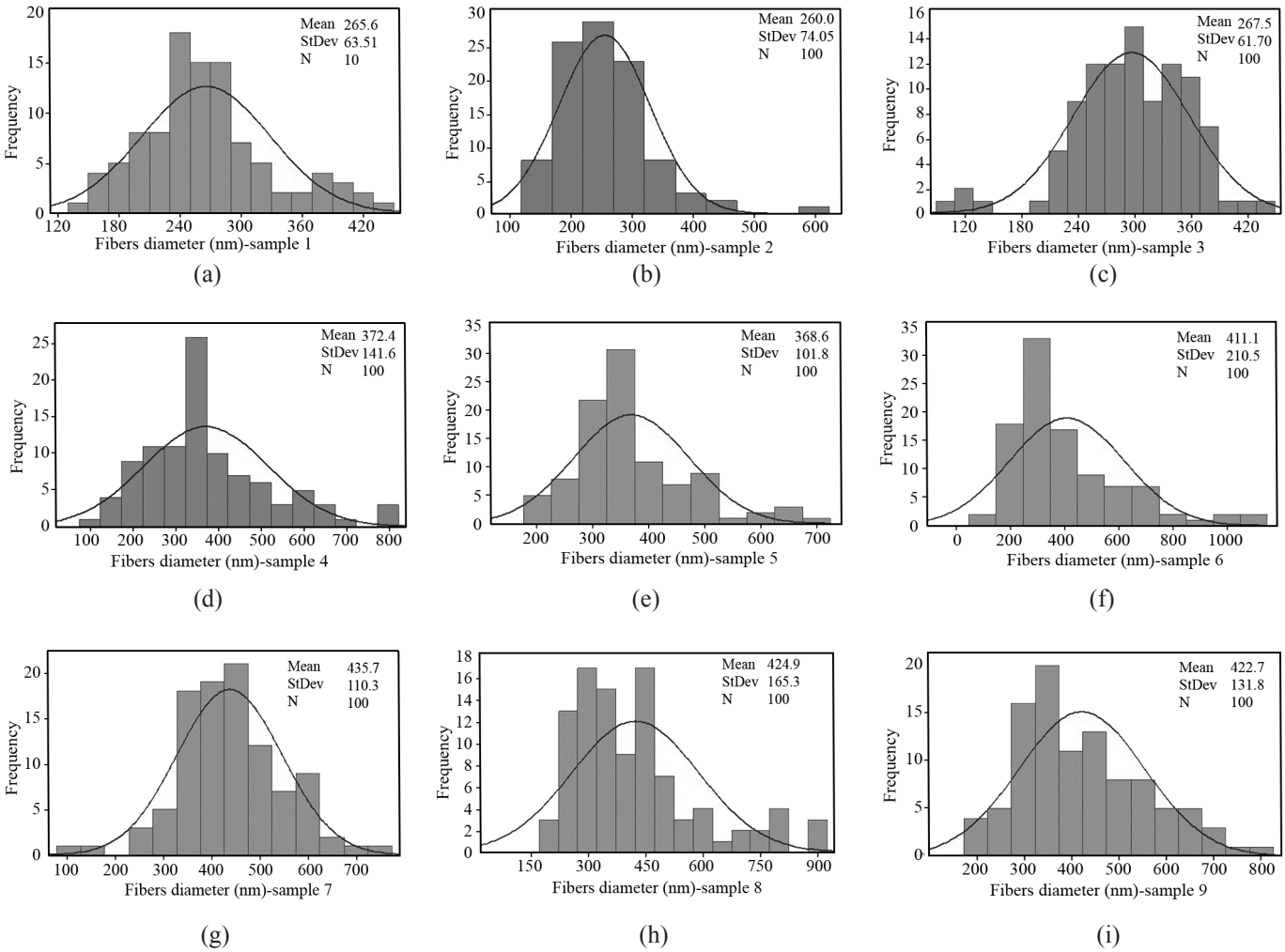


شکل ۲- ریزنگارهای SEM نانوالیاف پلی‌یورتان الکتروریسی‌شده مطابق با طراحی آزمون (همه مقیاس‌ها μm ۵ هستند).

Fig. 2 SEM micrographs of electrospun PU nanofibers used in DoE study (all scale bars represent 5 μm).

چقدر کوچک‌تر بهتر است و اطلاعات جدول ۳، محاسبه شد. بر اساس یافته‌های این جدول، نمونه ۷ با بیشترین مقدار قطر (۴۳۵±۱۱۰ nm) کوچک‌ترین مقدار S/N را دارد. اما، نمونه ۲ با کمترین قطر (۲۶۰± ۷۴ nm) بیشترین مقدار S/N را دارد. برای فهم اثر هر عامل و سطح آن بر پاسخ (قطر الیاف)، میانگین قطر الیاف و نسبت S/N برای سطح‌های مختلف هر عامل مطابق با جدول ۴ محاسبه شد.

بر اساس داده‌های جدول ۴ تفاوت مقدار بیشینه و کمینه ارزش‌های این سه سطح محاسبه شد. محدوده‌ای که بیشترین مقدار را به خود اختصاص داد، به‌عنوان مهم‌ترین و اثرگذارترین عامل بر قطر الیاف درنظر گرفته شد. مشخص شد، غلظت پلیمر (C) و ولتاژ اعمال‌شده (V) برای اصلاح قطر الیاف، اثر شایان توجهی دارند. در مقابل فاصله سوزن و جمع‌کننده (D) و سرعت تغذیه (F) به‌نسبت کم اهمیت‌تر هستند. نتایج نشان داد، غلظت پلی‌یورتان در محلول سبب افزایش گرانروی می‌شود و در نهایت قطر نانوالیاف پلی‌یورتانی را افزایش می‌دهد. همان‌طور که از عکس‌های SEM و یافته‌های جدول ۳ نیز مشخص است، محلول‌هایی که با غلظت کمینه (۱۲٪ از پلی‌یورتان) ساخته شدند، کمترین قطر و بیشترین یکنواختی را دارند. Horuz و



شکل ۳- توزیع فراوانی الیاف پلی‌یورتان الکتروریسی‌شده مطابق با طراحی آزمون.

Fig. 3. Frequency contribution of electrospun polyurethane fibers in the design of experiments.

همکاران در مطالعه‌ای با طراحی آزمون به بهینه‌سازی الیاف ژلاتینی پرداختند. در مطالعه آن‌ها، غلظت‌های ۲۰، ۵۰ و ٪۸۰ ژلاتین تهیه شد و سپس سه سطح برای ولتاژ، فاصله و سرعت تغذیه درنظر گرفته شد و الیاف صاف، بدون دانه و با توزیع یکنواخت حاصل شد. دو نمونه با بیشترین مقدار قطر، غلظت مشابه داشتند. نتایج حاکی از آن بود که با افزایش غلظت، قطر الیاف به‌طور معناداری افزایش یافت [۱۵]. نتایج نشان داد، ولتاژ اعمال‌شده، دومین عامل مؤثر بر قطر الیاف پلی‌یورتان است. قطر الیاف زمانی کوچک‌تر هستند که مقدار ولتاژ ۱۶ kV بود. به‌طور معمول، با افزایش مقدار ولتاژ، قطر الیاف کاهش یافت. اما، در نمونه‌های ۳ و ۶ با افزایش ولتاژ، قطر نیز افزایش یافت. اثر ولتاژ بر قطر الیاف در مطالعات همچنان بحث‌برانگیز است. در گروهی از پژوهش‌ها بیان شد، با افزایش مقدار ولتاژ اعمال‌شده، تشکیل جت شتاب می‌یابد و حجم بیشتری از پلیمر به سمت صفحه جمع‌کننده کشیده می‌شود که این مسئله به افزایش قطر الیاف منجر می‌شود [۴۳،۴۴]. از سوی دیگر، در برخی از مطالعات پیشنهاد شد، با ایجاد جریان الکتریکی قوی‌تر، محلول پلیمری بیشتر کشیده می‌شود و کاهش قطر الیاف اتفاق می‌افتد [۴۵،۴۶]

مطابق جدول‌های ۴ و ۵ سرعت تغذیه و فاصله نازل و صفحه جمع‌کننده، کمترین اثرگذاری را بر قطر الیاف پلی‌یورتانی دارند. انتظار می‌رود، با افزایش مقدار سرعت تغذیه، قطر الیاف نیز به‌دلیل خروج بیشتر مایع از نازل، افزایش یابد. فاصله نازل و جمع‌کننده اگرچه به‌عنوان کم‌اهمیت‌ترین عامل در قطر الیاف شناخته شده است. اما گفته می‌شود، اثر مشابه با ولتاژ نشان می‌دهد [۱۵]. در مطالعه حاضر، افزایش سرعت تغذیه و فاصله نیز سبب افزایش و نیز کاهش

جدول ۳- قطر الیاف پلی‌یورتان با انحراف معیار و نسبت‌های علامت به نوفه (S/N) بر اساس "هرچه کوچک‌تر، بهتر".

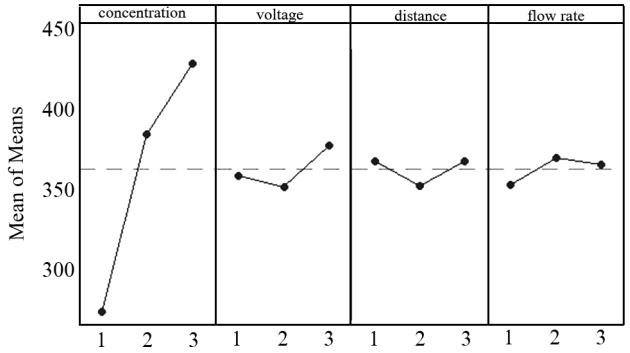
Table 3. Polyurethane fiber diameter with standard deviation and their corresponding signal-to-noise (S/N) ratios based on "smaller is better".

Run	Combination of factors	Average nanofiber diameter and standard deviation (nm)	S/N
1	C1V1D1F1	265±63	-48.48
2	C1V2D2F2	260±74	-48.29
3	C1V3D3F3	297±61	-49.46
4	C2V1D2F3	372±141	-51.42
5	C2V2D3F1	368±101	-51.33
6	C2V3D1F2	411±210	-52.27
7	C3V1D3F2	435±110	-52.78
8	C3V2D1F3	429±165	-52.56
9	C3V3D2F1	422±131	-52.52

قطر الیاف شده است که این اختلاف را می‌توان به وابسته‌بودن این عامل‌ها به پارامترهای اصلی (غلظت و ولتاژ اعمال شده) نسبت داد.

بهینه‌سازی پارمترهای فرایند الکتروریسی

ترکیب بهینه‌ای از عامل‌هایی که به‌واسطه آن‌ها الیافی با حداقل قطر حاصل می‌شود، با روش تاگوچی به‌دست آمد. شکل‌های ۴ و ۵ به‌ترتیب اثر هر عامل بر میانگین قطر الیاف و نسبت S/N را نشان می‌دهد. طبق داده‌های جدول ۴ و شکل‌های ۴ و ۵، سطح بهینه عامل‌ها (کمترین مقدار قطر) شامل غلظت ٪۱۲ پلی‌یورتان (C1)، ولتاژ اعمال‌شده ۱۶ kV (V2)، فاصله نازل تا صفحه جمع‌کننده



شکل ۴- نمودار اثر عامل بر میانگین قطر الیاف پلی‌یورتان الکتروریسی‌شده.

Fig. 4. Main effects plot for means of electrospun polyurethane fiber diameter.

۱۵ cm (D2) و سرعت تغذیه ۰/۱ mL/h (F1) است. نتایج پیش‌بینی‌شده نرم‌افزار (نسبت S/N) در شرایط بهینه برابر با ۰/۲۷۳±۴۷/۹۵۹- با سطح اطمینان ٪۹۵ است. با روش تاگوچی می‌توان قطر متوسط الیاف را در شرایط بهینه (Y_{exp}) و بدون انجام آزمون محاسبه کرد [۴۷]. روش محاسبه مطابق با معادله (۲) است:

$$Y_{exp} = (MSD)^{\frac{1}{2}} \quad (۲)$$

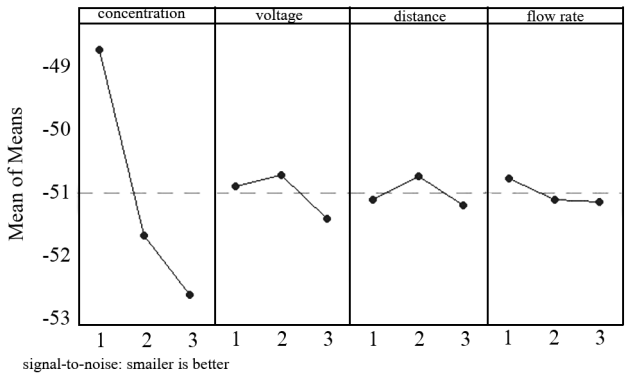
$$MSD = 10^{-[\text{expected result (S/N ratio) at optimum conditions}]/10}$$

از آنجا که نتیجه مورد انتظار نسبت S/N در شرایط مطلوب، ۰/۲۷۳ ± ۴۷/۹۵۹- با سطح اطمینان ٪۹۵ بود (کمترین و بیشترین ارزش به‌ترتیب ۴۸/۲۳۲- و ۴۷/۶۸۶- بود). بدین ترتیب میانگین انحراف استاندارد (MSD) مربوط به‌ترتیب از بیشترین و کمترین S/N برابر ۶۶۵۲۷/۳۱ و ۵۸۶۳۱/۸۱ است. در این مطالعه Y_{exp} در

جدول ۴- جدول پاسخ برای میانگین قطر الیاف پلی‌یورتان و مقدارهای S/N.

Table 4. Response table for means of PU fiber diameters and S/N values.

Level	Means of fiber diameters (nm)				Means of S/N values			
	C	V	D	F	C	V	D	F
1	274.36	357.9	367.2	352.36	-48.75	-50.89	-51.10	-50.78
2	384.1	351.23	351.7	368.93	-67.51	-50.73	-50.74	-51.12
3	427.76	377.1	367.33	364.93	-62.52	-42.51	-51.19	-51.15
Range	153.4	25.87	15.63	16.57	18.76	8.38	0.45	0.37
Ranke	1	2	4	3	1	2	3	4



شکل ۵- نمودار اثر عامل‌ها بر نسبت‌های علامت به نوفه (S/N) قطر الیاف پلی‌یورتان الکتروریسی‌شده.

Fig 5. Main effects plot for signal-to-noise (S/N) ratios of electrospun polyurethane fiber diameter.

سطح اطمینان ٪۹۵ باید در محدوده ۲۴۲/۱۰ nm تا ۲۵۷/۹۲ nm باشد. رابطه بین قطر و چهار متغیر (غلظت پلیمر، ولتاژ، فاصله نوک سوزن تا صفحه جمع‌کننده و سرعت تغذیه) با توجه به مطالعه (۳) در زیر آمده است. به‌کمک این معادله می‌توان قطر الیاف را در حالت بهینه پیش‌بینی کرد [۴۸]:

$$\eta = \overline{T} + (\overline{C1} - \overline{T}) + (\overline{V2} - \overline{T}) + (\overline{D2} - \overline{T}) + (\overline{F1} - \overline{T}) \qquad (۳)$$

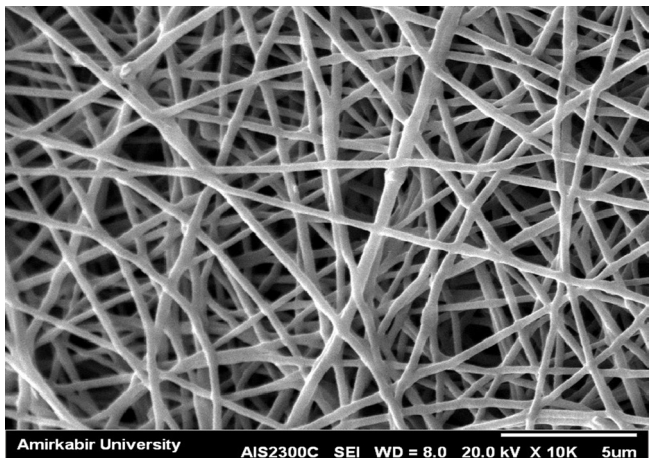
در این معادله، η میانگین قطر پیش‌بینی‌شده، $\overline{T}$ میانگین نتیجه ۹

آزمایش انجام‌شده و C1V2D2F1 میانگین پاسخ برای سطح‌های طراحی شده به‌تفکیک هر متغیر است. بر این اساس، قطر شرایط بهینه حدود ۲۴۲/۹۹ nm محاسبه شد که با مقدار پیش‌بینی شده از معادله (۲) یکسان است. مرحله بعد در روش تاگوچی، تأیید این پیش‌بینی با آزمایش تجربی است. بنابراین فرایند الکتروریسی با ترکیب بهینه‌ای از پارامترها (C1V2D2F1) انجام شد. شکل ۶ عکس‌های SEM با توزیع قطر نانوالیاف الکتروریسی به‌دست‌آمده را در شرایط بهینه نشان می‌دهد. میانگین قطر الیاف ۳۰ ± ۲۵۸ nm است که همخوانی خوبی با نتایج پیش‌بینی‌شده با نرم‌افزار دارد..

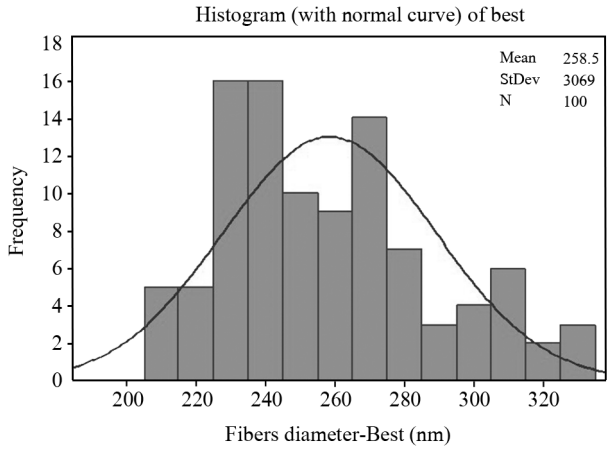
بررسی سمیت سلولی داربست‌ها با استفاده از MTT

بررسی زنده‌مانی سلول‌های HUVEC روی نانوالیاف پلیمری و ظرف کشت سلول (به‌عنوان گروه شاهد) با روش MTT انجام شد. پس از کشت سلول‌ها در بازه زمانی ۲۴، ۴۸ و ۷۲ h نتایج آزمون به‌دست آمد. شکل ۷ نمودار زنده‌مانی سلول‌ها را روی داربست و ظرف کشت نشان می‌دهد. نتایج بیانگر این است که پس از ۷۲ h از زمان کشت، مقدار زنده‌مانی سلول‌ها روی داربست ٪۸۸/۵۹ است. مقایسه مقدار زنده‌مانی نمونه‌ها با گروه شاهد تفاوت معناداری نشان نداد ($P > ۰/۰۵$). بنابراین نانوالیاف به‌دست‌آمده از پلی‌یورتان به‌طور نسبی زیست‌سازگارند، داربست غیرسمی و مناسبی را برای رشد سلول‌ها فراهم می‌کنند و سبب مرگ سلولی یا کنده‌شدن سلول‌ها از داربست نمی‌شوند.

Jing و همکاران [۱۰] داربست‌هایی از جنس پلی‌یورتان گرمانرم



(a)



(b)

شکل ۶- (a) عکس SEM نمونه بهینه با طراحی آزمون و (b) نمودار توزیع فراوانی میانگین قطر نانوالیاف PU الکتروریسی‌شده به‌دست‌آمده در شرایط بهینه (٪۱۲ PU، ۱۶ kV، ۰/۱ mL/h و ۱۵ cm).

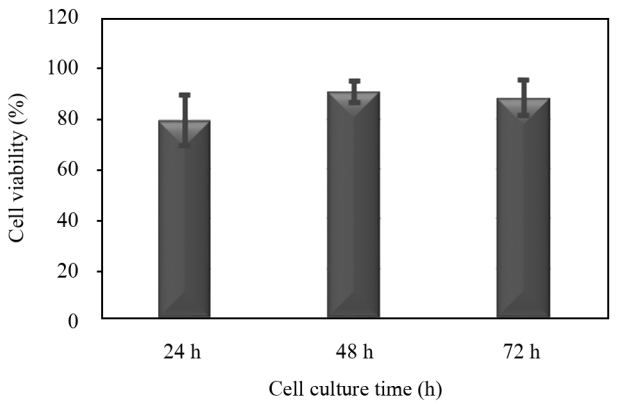
Fig. 6. (a) SEM image and (b) bar graph of diameter ranges of electrospun PU nanofibers obtained at ptimized conditions (12% PU, 16 kV, 0.1 mL/h, and 15 cm).

را برای مهندسی بافت عروق تهیه کردند. بر اساس نتایج آزمون MTT، زنده‌مانی سلول‌های فیبروبلاست 3T3 پس از سه روز، ٪۹۵ گزارش شد. همچنین نشان داده شد، داربست‌های الکتروریسی‌شده پلی‌یورتان می‌توانند بستر مناسبی برای رشد سلول‌ها فراهم کنند. Firoozi و همکاران [۴۰] نیز الکتروریسی پلی‌یورتان را برای ساخت دریچه‌های قلبی مطالعه کردند. بررسی زنده‌مانی سلول‌های HUVEC روی داربست‌های آن‌ها با دو روش MTT مستقیم (۷۲ h) و غیرمستقیم (۱۰ روز) انجام شد. تفاوت معناداری میان سلول‌های کشت‌شده روی داربست‌ها و ظرف کشت گزارش نشد. این نتایج نشان داد، ماده سمی محلول یا نامحلولی وارد محیط کشت نشده است و داربست‌ها زیست‌سازگاری مطلوبی داشتند.

بررسی چسبندگی سلول‌های HUVEC

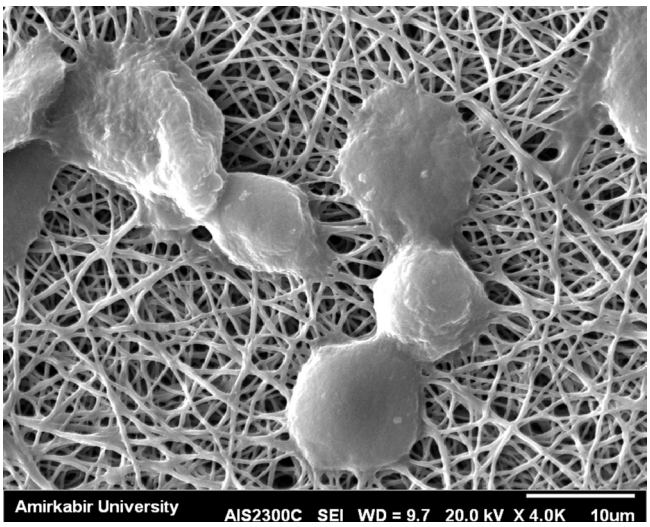
سلول‌های HUVEC برای بررسی مقدار چسبندگی روی داربست‌های پلی‌یورتانی انتخاب شدند تا قابلیت استفاده از این داربست‌ها در کاربردهای عروقی سنجیده شود. از آنجا که سلول‌های اندوتلیال سطح داخلی مجرای عروقی را می‌پوشانند و به‌طور مستقیم در تماس با جریان خون هستند، نقش بسیار اساسی را ایفا می‌کنند. آن‌ها مانع از لخته‌شدن خون می‌شوند و به حفظ سیالیت آن کمک می‌کنند، مانع از چسبندگی پلاکت‌ها و گلبول‌های سفید شده و سبب مقاومت رگ در برابر تنش برشی خون می‌شوند. در نهایت، سبب افزایش رشد سلول‌های ماهیچه‌ای صاف می‌شوند [۱۰،۴۹].

در مطالعه حاضر، برهم‌کنش HUVEC با داربست به‌کمک چسبندگی سلولی و بررسی تصویر میکروسکوپ الکترونی ارزیابی شد. همان‌طور که در عکس SEM شکل ۸ مشخص است، سلول‌ها



شکل ۷- بررسی زنده‌مانی سلول‌های HUVEC بر داربست PU.

Fig. 7. Evaluation of viability of HUVEC cells on PU scaffold.



شکل ۸- عکس SEM داربست پلی‌یورتانی پس از آزمون چسبندگی HUVEC.

Fig. 8. SEM image of the polyurethane scaffold after HUVEC adhesion test.

به‌مدت ۲۴ h، چسبندگی مناسبی به داربست نشان دادند. بدین ترتیب داربست بهینه طراحی آزمون، که قطر کمتر و توزیع همگن‌تری از نانوالیاف داشت، بستر مناسبی برای چسبندگی سلول‌های HUVEC فراهم کرد. ساختار ECM سلول‌ها، ساختاری با ابعاد نانومتر است. بنابراین قطرهای کوچک‌تر و شکل‌شناسی آن‌ها اثر شایان توجهی بر چسبندگی سلولی ایفا می‌کند. Chen و همکاران [۵۰] نیز در پژوهشی چسبندگی سلول‌های فیبروبلاست 3T3 را روی داربست‌های الکتروریسی‌شده از جنس پلی‌کاپرولاکتون بررسی کردند. نتایج حاکی از آن بود که سلول‌ها روی الیافی با قطر ۴۲۸ nm بسیار بهتر از الیاف با قطر بیشتر ۱/۶ mμ چسبیدند. در مطالعه دیگری نیز، اثر قطر نانوالیاف بر رشد و تمایز سلولی بررسی شد. Christopherson و همکاران [۵۱] نانوالیافی با قطرهای ۲۸۳، ۷۴۹ و ۱۴۵۲ nm از پلی‌اتر سولفون تهیه کردند. یافته‌ها نشان داد، بیشترین مقدار تمایز سلول‌های پیش‌ساز عصبی در کمترین قطر الیاف یعنی ۲۸۳ nm گزارش شده است. این مقدار در نانوالیاف با قطر ۷۴۹ nm، ٪۲۰ کاهش نشان داد

نتیجه‌گیری

از مطلوب‌ترین روش‌های خون‌سازگارکردن عروق، زیست‌تقلیدی از عروق طبیعی است. بدین ترتیب که مشابه با عروق بدن، لایه اندوتلیوم به‌صورت آستر، مجرای داخلی عروقی را بپوشاند تا مانع

از تجمع پلاکت و ایجاد لخته شود. تاکنون از روش‌های مختلفی برای اصلاح سطح استفاده شده است. اما مطالعات نشان داده است، سطحی‌هایی که می‌توانند توپوگرافی ECM را تقلید کنند، قابلیت بهبود رشد و تکثیر سلولی را دارند و در نهایت یکپارچگی و بازسازی بافت را افزایش می‌دهند. در پژوهش حاضر تغییر خواص سطحی و شکل‌شناسی الیاف و اثر آن بر چسبندگی سلولی بررسی شده است. الیاف پلی‌یورتان با روش الکتروریسی تولید و اثر مهم‌ترین پارامترهای فرایند (غلظت پلیمر، ولتاژ اعمال‌شده، فاصله سوزن تا جمع کننده و سرعت تغذیه) بر شکل‌شناسی این الیاف، از نظر آماری بررسی شد. از روش تاگوچی به‌عنوان برجسته‌ترین روش‌های طراحی آزمون برای بهینه‌سازی عامل‌های مهم الکتروریسی برای به‌دست آوردن کوچک‌ترین قطر الیاف استفاده شد. نتایج نشان داد، غلظت محلول مؤثرترین عامل در قطر الیاف است. کوچک‌ترین الیاف در کمترین غلظت محلول پلی‌یورتان (٪۱۲) به‌دست آمد. ولتاژ اعمال‌شده، نیز دومین عامل مؤثر بر قطر الیاف است. فاصله سوزن تا صفحه جمع‌کننده و سرعت تغذیه، اثر نسبتاً کمتری در فرایند الکتروریسی داشتند. شرایط برای تهیه نمونه بهینه شامل غلظت ٪۱۲ پلی‌یورتان، ولتاژ اعمال‌شده ۱۶ kV، فاصله نازل تا صفحه جمع‌کننده ۱۵ cm و سرعت تغذیه ۰/۱ mL/h بود. مشخص شد، با روش تاگوچی می‌توان میانگین قطر الیاف را در شرایط بهینه در محدوده ۲۴۲/۱۰ nm تا ۲۵۷/۹۲ nm با سطح اطمینان ٪۹۵ پیش‌بینی کرد. قطر نانوالیاف در شرایط بهینه از نظر تجربی برابر با ۲۵۸±۳۰ nm بود که با مقدار تخمین زده‌شده با نرم‌افزار مطابقت خوبی داشت. نبود سمیت سلولی در داربست‌های الکتروریسی‌شده با رشد سلول‌های HUVEC، تأیید شد. آزمون MTT وجود سلول‌های زنده (٪۸۸/۵۹) را پس از سه روز کشت سلولی روی داربست تأیید کرد. همچنین این سلول‌ها چسبندگی مناسبی بر سطح داربست نشان دادند و می‌توانند تفلیدکننده بستر اندوتلیومی داخل عروق تلقی شوند. این مطالعه می‌تواند با بررسی ساختارها به‌شکل لوله‌ای یا ایجاد ساختارهای دولایه، به گونه‌ای که لایه داخلی برای ایجاد چسبندگی مطلوب سلول اندوتلیال، متخلخل و آرایش‌یافته باشد و لایه خارجی به‌منظور افزایش استحکام مکانیکی، متراکم باشد، ادامه یابد.

قدردانی

از آزمایشگاه نانوالیاف و الکتروریسی دانشکده مهندسی نساجی دانشگاه صنعتی امیرکبیر و آزمایشگاه پژوهش‌های سلول‌های بنیادی و بانک سلولی انستیتو پاستور ایران برای فراهم‌کردن امکانات آزمایشگاهی این پژوهش، تشکر و قدردانی می‌شود.

مراجع

1. Benrashid E., McCoy C., Youngwirth L., Kim J., Mansor R., Otto J., and Lawson J., Tissue Engineered Vascular Grafts: Origins, Development, and Current Strategies for Clinical Application, Methods. **99**, 13-19, 2016.
2. Adipurnama I., Yang M.C., Ciach T., and Butruk-Raszeja B., Surface Modification and Endothelialization of Polyurethane for Vascular Tissue Engineering Applications: A Review, *Biomater. Sci*., **5**, 22-37, 2017.
3. Seifu D.G., Purnama A., Mequanint K., and Mantovani D., Small-Diameter Vascular Tissue Engineering, *Nat. Rev. Cardiol.,* **10**, 410-21. 2013.
4. Patterson C., The Ponzo Effect: Endothelial Progenitor Cells Appear on the Horizon, *Circulation,* **107**, 24, 2003.
5. Zhang W.J., Liu W., Cui L., and Cao Y., Tissue Engineering of Blood Vessel, *J. Cell Mol. Med.,* **11**, 945-957, 2007.
6. Duncan D.R. and Breuer C.K., Challenges in Translating Vascular Tissue Engineering to the Pediatric Clinic, *Vasc. Cell,* **3**, 1-23, 2011.
7. Ravi S. and Chaikof E.L., Biomaterials for Vascular Tissue Engineering, *Regen. Med.,* **5**, 107-120, 2010.
8. Rathore A., Cleary M., Naito Y., Rocco K., and Breuer C., Development of Tissue Engineered Vascular Grafts and Application of Nanomedicine, *Wiley Interdiscip. Rev. Nanomed. Nanobiotechnol.,* **4**, 257-272, 2012.
9. Ballarin F.M., Caracciolo P., Blotta E., Ballarian V., and Abraham G., Optimization of Poly(L-lactic acid)/Segmented Polyurethane Electrospinning Process for the Production of Bilayered Small-Diameter Nanofibrous Tubular Structures, *Mater. Sci. Eng. C*., **42**, 489-499, 2014.
10. Jing X., Mi H.Y., Salick M.R., Cordie T.M., Peng X.F., and Turng L.S, Electrospinning Thermoplastic Polyurethane/ Graphene Oxide Scaffolds for Small Diameter Vascular Graft

Applications, *Mater. Sci. Eng. C,* **49**, 40-50, 2015.

11. Annis D., Bornat A., Edwards R.O., Higham A., Loveday B., and Wilson J., An Elastomeric Vascular Prosthesis, *Trans .Am. Soc. Artif. Intern. Organs,* **24**, 214, 1987.
12. Trachtenberg J.E., Kurtis K.F., and Mikos A.G., *Polymer Scaffold Fabrication, Principles of Tissue Engineering,* Lanza R., Langer R., and Vacanti J. (Eds.), Elsevier, London, 4th ed. Chapt. **22**, 423-440, 2014.
13. Hasan A., Memic A., Annabi N., Hossain M., Paul A., Dokmeci M.R., Dehghani F., and Khademhosseini A., Electrospun Scaffolds for Tissue Engineering of Vascular Grafts, *Acta Biomater.,* **10**, 11-25, 2014.
14. Abel S.B., Ballarin F.M., and Abraham G., Combination of Electrospinning with Other Techniques for the Fabrication of 3D Polymeric and Composite Nanofibrous Scaffolds with Improved Cellular Interactions, *Nanotechnology,* **31***,* 1-38*,* 2020.
15. Horuz T.İ. and Belibağlı K.B., Production of Electrospun Gelatin Nanofibers: An Optimization Study by Using Taguchi's Methodology, *Mater. Res. Express,* **4**,1-9, 2017.
16. Mohammad Khanlou H., Electrospinning of Polymethyl Methacrylate Nanofibers: Optimization of Processing Parameters Using the Taguchi Design of Experiments, *Text. Res. J.,* **85**, 356-368, 2015.
17. Albetran H., Dong Y., and Low I.M., Characterization and Optimization of Electrospun TiO_2/PVP Nanofibers Using Taguchi Design of Experiment Method, *J. Asian Ceram. Soc.,* **3**, 292-300, 2015.
18. Mortazavi S.M.A., Ebrahimi N., and Hasan Ajili S., Investigation and Optimization of Mechanical and MorphologicalProperties of a Three-component PP/PU/EVA Blend Using TaguchiExperimental Design, *Iran. J. Polym. Sci. Technol. (Persian),* **19**, 91-99, 2006.
19. Nazir A., *Modelling and Optimization of Electrospun Materials for Technical Applications*, PhD Thesis, Université de Haute Alsace-Mulhouse, National Textile University, Pakistan, 2016.
20. Navarchian M.H. and Mousazadeh S., The Effects of Reaction Variables on SolutionPolymerization of Vinyl Acetate and MolecularWeight of Poly(vinyl alcohol) Using Taguchi Experimental Design, *Iran. J. Polym. Sci. Technol. (Persian),* **22**, 341-351, 2009.
21. Kamelaei E. and Farbodi M., Preparation of Antibacterial Polyvinylchloride/ZnO Nanocomposite with Improved Mechanical Properties Using Taguchi Experimental Design, *Iran. J. Polym. Sci. Technol. (Presian),* **28**, 373-383, 2015.
22. Ethier C.R. and Simmons C.A., *Introductory Biomechanics: From Cells to Organisms*, Cambridge University, 2007.
23. Awad N.K., Niu H., Ali U., Morsi Y., and Lin T., Electrospun Fibrous Scaffolds for Small-Diameter Blood Vessels: A Review, *Membranes,* **8**, 1-15, 2018.
24. Barnes C.P., Sell S.A., Boland E.D., Simpson D.G., and Bowlin G.L., Nanofiber Technology: Designing the Next Generation of Tissue Engineering Scaffolds, *Adv. Drug Deliv. Rev.,* **59**, 1413-1433, 2007.
25. Fu W., Liu Z., Feng B., Hu R., He X., Wang H., Yin M., Huang H., Zhang H., and Wang W., Electrospun Gelatin/PCL and Collagen/PLCL Scaffolds for Vascular Tissue Engineering, *Int. J. Nanomed.,* **9**, 23-35, 2014.
26. Zhuo H., Hu J., Chen S., and Yeung L., Preparation of Polyurethane Nanofibers by Electrospinning, *J. Appl. Polym. Sci.,***109**, 406-411, 2008.
27. Kim S.E., Heo D.N., Lee J.B., and Kim J., Electrospun Gelatin/Polyurethane Blended Nanofibers for Wound Healing, *Biomed. Mater.,* **4**, 044106, 2009.
28. Banuškevičiūtė A., Adomavičiūtė E., Milašius R., and Stanys S., Formation of Thermoplastic Polyurethane (TPU) Nano/Micro Fibers by Electrospinning Process Using Electrode with Tines, *Mater. Sci.,* **17**, 287-292, 2011.
29. Karakaş H., *Sarac A.C.*, Polat T., Budak E.G., Bayram S., Dag N., and Jahangiri S., Polyurethane Nanofibers Obtained by Electrospinning Process, *Int. J. Biolog., Biomolecul., Agric. Food Biotechnol. Eng.,* **7**, 177-180, 2013.
30. Nirmala R., Jeon K.S., and Kim H.Y., Preparation and Characterization of Copper Oxide Particles Incorporated Polyurethane Composite Nanofibers by Electrospinning, *Ceram. Int.,* **39**, 9651-9658, 2013.
31. Jia, L., Prabhakaran M.P., Qin X., and Ramakrishna S., Guiding the Orientation of Smooth Muscle Cells on Random and Aligned Polyurethane/Collagen Nanofibers, *J. Biomater. Appl.,* **29**, 364-377, 2014.
32. Tetteh G., Khan A.S., Delaine-smith R.M., Reilly G.C., and Rehman I.U., Electrospun Polyurethane/Hydroxyapatite Bioactive Scaffolds for Bone Tissue Engineering: The Role of Solvent and Hydroxyapatite Particles, *J. Mech. Behav. Biomed. Mater.,* **39**, 95-110, 2014.
33. Zhu W., Castro N.J., Cheng X., Keidar M., and Zhang L.G., Cold Atmospheric Plasma Modified Electrospun Scaffolds with

Embedded Microspheres for Improved Cartilage Regeneration, *PLOS ONE,* **10**, 2015.

34. Chong D., Luminal Surface Engineering, Micro and Nanopatterning: Potential for Self Endothelialising Vascular Grafts?, *Eur. J. Vasc Endovasc Surg.,* **47**, 566-576, 2014.
35. Rüder C., Sauter T., Kratz K., Haase T., Peter J., Jung F., Lendlein A., and Zohlnofer D., Influence of Fibre Diameter and Orientation of Electrospun Copolyetheresterurethanes on Smooth Muscle and Endothelial Cell Behaviour, *Clin. Hemorheol. Microcric,* **55**, 513-522, 2013.
36. Garipcan B., Maenz S., Pham T., and Settmacher., U., Image Analysis of Endothelial Microstructure and Endothelial Cell Dimensions of Human Arteries–A Preliminary Study, *Adv. Eng. Mater.,* **13**, B54-B57, 2011.
37. Noriega S.E., Hasanova G.I., Schneider M.J., Larsen G.F., and Subramanian A., Effect of Fiber Diameter on the Spreading, Proliferation and Differentiation of Chondrocytes on Electrospun Chitosan Matrices, *Cells. Tissues. Organs.,* **195**, 207-221, 2012.
38. Albetran H., Dong Y., and Low I.M., Characterization and Optimization of Electrospun TiO_2/PVP Nanofibers Using Taguchi Design of Experiment Method, *J. Asian Ceram. Soc.,* **3**, 292-300, 2015.
39. Brzeska J., Heimowska A., Sikorska W., Jasińska-Walc L., Kowalczuk M., and Rutkowska M., Chemical and Enzymatic Hydrolysis of Polyurethane/Polylactide Blends, *Int. J. Polym. Sci.,* **2015**, 2015.
40. Firoozi S., Derkhshan M.A., Karimi R., Rashti A., Negahdari B., Faridi Majidi R., Mashghi S., and Ghanbari H., Fabrication and Characterization of Nanofibrous Tricuspid Valve Scaffold Based on Polyurethane for Heart Valve Tissue Engineering, *Nanomed. Res. J.,* **2**, 131-141, 2017.
41. Wang F., *Culture of Animal Cells: A Manual of Basic Technique*, Springer, 2006.
42. Chiono V., Mozetic P., Boffito M., Sartori S., Gioffredi E., Silvestri A., Rainer A., Giannitelli S.M., Trombetta M., Nurzynska D., Meglio F.D., Castaldo C., Miraglia R., Mintagnani S., and Ciardelli G., Polyurethane-based Scaffolds for Myocardial Tissue Engineering, *Interface Focus,* **4**, 2014.
43. Demir M.M., Yilgor I., Yilgor E., and Erman B., Electrospinning of Polyurethane Fibers, *Polymer,* **43**, 3303-3309, 2002.
44. Zhang, C., Youan X., Wu L., Han Y., and Sheng J., Study on Morphology of Electrospun Poly(vinyl alcohol) Mats, *Eur. Polym. J.,* **41**, 423-432, 2005.
45. Yuan X., Zhang Y., Dong C., and Sheng J., Morphology of Ultrafine Polysulfone Fibers Prepared by Electrospinning, *Polym. Int.,* **53**, 1704-1710, 2004.
46. Bhardwaj N. and Kundu S.C., Electrospinning: A Fascinating Fiber Fabrication Technique, *Biotechnol. Adv.,* **28**, 325-347, 2010.
47. Saligheh O., Khajavi R., Yazdanshenas M., and Rashidi A., Fabrication and Optimization of Poly(vinyl alcohol)/Zirconium Acetate Electrospun Nanofibers Using Taguchi Experimental Design, *J. Macromol. Sci. B,* **54**, 1391-1403, 2015.
48. Chamoli S., A Taguchi Approach for Optimization of Flow and Geometrical Parameters in a Rectangular Channel Roughened with V Down Perforated Baffles, *Case Stud. Therm. Eng.,* **5**, 59-69, 2015.
49. Sankaran K.K., Subramanian A., Uma M.K., and Sethuraman S., Nanoarchitecture of Scaffolds and Endothelial Cells in Engineering Small Diameter Vascular Grafts, *Biotechnol. J.,* **10**, 96-108, 2015.
50. Chen M., Patra P.K., Warner S.B., and Bhowmick S., Role of Fiber Diameter in Adhesion and Proliferation of NIH 3T3 Fibroblast on Electrospun Polycaprolactone Scaffolds, *Tissue Eng.,* **13**, 579-587, 2007.
51. Christopherson G.T., Song H., and Mao H.Q., The Influence of Fiber Diameter of Electrospun Substrates on Neural Stem Cell Differentiation and Proliferation, *Biomaterials,* **30**, 556-564, 2009.