

Synthesis of Polyurethane/Hyaluronic acid/Royal Jelly Electrospun Scaffold and Evaluating its Properties for Wound Healing

Mehdi Movahedi¹,
Azadeh Asefnejad²,
Mohammad Rafienia³,
Mohammad Taghi Khorasani⁴

¹ PhD in Biomaterials, Department of Biomedical Engineering, Science and Research Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran

² Assistant Professor, Department of Biomedical Engineering, Science and Research Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran

³ Professor, Department of Biomaterials, Tissue Engineering and Nanotechnology, School of Advanced Medical Technologies, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, Iran

⁴ Associate Professor, Iran Polymer and Petrochemical Institute, Tehran, Iran

(Received August 1, 2020 ; Accepted October 11, 2020)

Abstract

Background and purpose: Studies showed that biocompatible and biodegradable materials in tissue engineering can be used to heal wounds. The aim of this study was to fabricate polyurethane/royal jelly/hyaluronic acid scaffold with suitable biological properties for wound healing using electrospinning method.

Materials and methods: In this applied experimental study, to make a nanofiber scaffold, 10% by weight/weight of polyurethane was dissolved at room temperature for 2 hours. Then, royal jelly (in different ratios) and hyaluronic acid (1% by w/w) were added to the polyurethane solution and electrospinning was performed. For biological evaluation, in vitro and finally in vivo analyses were performed.

Results: Polyurethane scaffold containing 1% w/w of hyaluronic acid and 6% w/w of royal jelly was fabricated by electrospinning method. Scanning electron microscope images showed bead-free uniform fibers. The diameter of scaffold fibers was 546.8 nm. The contact angle of the scaffold was 51.61° indicating the hydrophilic properties of the scaffold. Moreover, the scaffold did not show any toxicity. Royal jelly improved cell proliferation and increased the cell adhesion of the scaffold. In the in vivo analysis, the wound healing process in the presence of the prepared scaffold was 92.21% after 14 days.

Conclusion: Electrospun polyurethane scaffold containing 1% w/w of hyaluronic acid and 6% w/w of royal jelly was studied for the first time and in vitro and in vivo studies showed that this scaffold can be a suitable candidate in skin tissue engineering and wound healing.

Keywords: polyurethane, hyaluronic acid, royal jelly, skin tissue engineering

J Mazandaran Univ Med Sci 2021; 30 (192): 1-11 (Persian).

* **Corresponding Author: Mohammad Rafienia** - School of Advanced Medical Technologies, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, Iran (E-mail: m_rafienia@med.mui.ac.ir)

ساخت و ارزیابی خواص نانوالیاف الکتروریسی شده پلی یورتان و هیالورونیک اسید و ژل رویال در ترمیم زخم پوست

مهدی موحدی¹
آزاده آصف نژاد²
محمد رفیعی نیا³
محمد تقی خراسانی⁴

چکیده

سابقه و هدف: مطالعات نشان می‌دهد از مواد زیست سازگار و زیست تخریب پذیر در مهندسی بافت می‌توان برای بهبود زخم بهره گرفت. هدف از انجام این پژوهش ساخت داربست پلی‌یورتان و ژل رویال و هیالورونیک اسید با روش الکتروریسی، برای دست یافتن به داربستی است که در محیط برون تن و درون تن دارای ویژگی‌های مناسب بیولوژیکی برای درمان زخم باشد.

مواد و روش‌ها: در این مطالعه تجربی - کاربردی، برای ساخت داربست نانوالیافی، ابتدا 10 درصد وزنی/وزنی پلی‌یورتان در دمای محیط به مدت 2 ساعت حل شد. ژل رویال در نسبت‌های مختلف و هیالورونیک اسید (1 درصد وزنی/وزنی) به محلول پلی‌یورتان اضافه و الکتروریسی انجام شد. به منظور ارزیابی بیولوژیکی، آزمون برون تن و در نهایت آزمون درون تن انجام گرفت.

یافته‌ها: داربست پلی‌یورتان با محتوی 1 درصد وزنی هیالورونیک اسید و 6 درصد وزنی ژل رویال به روش الکتروریسی ساخته شد. تصاویر میکروسکوپ الکترونی روبشی الیافی یکنواخت و بدون گره نشان داد. قطر الیاف داربست 546/8 نانومتر به دست آمد. زاویه تماس داربست 51/61 درجه بود که نشان می‌دهد داربست خاصیت آبدوستی دارد. از نظر تست سمیت نیز داربست سمیتی نشان نداد. ژل رویال تکثیر و چسبندگی سلولی داربست بهبود بخشید. در آزمون درون تن، روند بهبود زخم در حضور داربست تهیه شده، پس از 14 روز 92/21 درصد ارزیابی شد.

استنتاج: داربست الکتروریسی شده پلی‌یورتان با محتوی 1 درصد وزنی هیالورونیک اسید و 6 درصد حجمی ژل رویال برای اولین بار مورد مطالعه قرار گرفت و نتایج حاصل از مطالعات برون تن و درون تن این مطالعه نشان می‌دهد این داربست می‌تواند کاندیدای مناسبی برای مهندسی بافت پوست و بهبود زخم باشد.

واژه‌های کلیدی: پلی‌یورتان، هیالورونیک اسید، ژل رویال، مهندسی بافت پوست

مقدمه

ترمیم یا جایگزینی بافت آسیب دیده همواره از دغدغه‌های اصلی دانشمندان بوده است. در بحث سوختگی‌ها وسعت و عمق زخم به همراه سن بیمار تعیین کننده میزان مرگ و میر می‌باشد (1). به علاوه در

E-mail: m_rafienia@med.mui.ac.it

مؤلف مسئول: محمد رفیعی نیا - اصفهان: دانشگاه علوم پزشکی اصفهان

1. دکترای بیومتریال، گروه مهندسی پزشکی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم و تحقیقات تهران، ایران

2. استادیار، گروه مهندسی پزشکی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم و تحقیقات، تهران، ایران

3. استاد، گروه بیومتریال، دانشکده فناوری های نوین، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، ایران

4. دانشیار، پژوهشگاه پلیمر و پتروشیمی ایران، تهران، ایران

تاریخ دریافت: 1399/5/11 تاریخ ارجاع جهت اصلاحات: 1399/5/13 تاریخ تصویب: 1399/7/20

سوختگی‌هایی که کل ضخامت پوست را دربر می‌گیرند، عناصر تجدیدکننده به‌طور کامل از دست رفته‌اند و امکان بازسازی پوست میسر نیست و حتی با مش‌های پوستی اتوگرافت، محل‌های اهدا برای پوشش‌دهی کامل در زخم‌های شدید کافی نیستند. پوست مهندسی شده به خصوص در موارد سوختگی بیش از 4 سانتی‌متر برای بستن و درمان زخم، جایگزین گرفت‌های پوستی قدیمی شده است (2). امروزه مهندسی بافت مهم‌ترین ابزار دانشمندان در تولید بافت‌ها و پروتزهای جایگزین برای ترمیم یا جایگزینی بافت آسیب دیده هستند (3). در این راستا نانوفناوری و به‌طور ویژه الکتروریسی به عنوان فناوری تولید نانو الیاف به دلیل ایجاد داربست‌های سه بعدی و متخلخل با مقیاس نانو که بسیار شبیه به ماتریس خارج سلولی بافت طبیعی می‌باشند، بسیار مورد توجه قرار گرفته‌اند (4). نانو الیاف با داشتن ویژگی‌های منحصر به فرد، قابلیت ایجاد مسیری مناسب برای دریافت و فرستادن علائم زیست‌شیمیایی دارند. بدین ترتیب سلول‌های فیبروبلاست را به لایه پوست رویی جذب کرده و این سلول‌ها اجزای اصلی ماتریس خارج سلولی طبیعی را ترشح می‌کنند. افزون بر این ویژگی‌ها، ساختارهای نانولیفی برای چسبندگی و تکثیر سلولی بسیار مناسب هستند (5). علاوه بر اهمیت ایجاد ساختار مناسب مشابه با ماتریس خارج سلولی، نوع زیست‌مواد پلیمری استفاده شده در تولید داربست‌های نانولیفی نیز از اهمیت بسیاری برخوردار است (6).

به‌طور کلی یک غشای پوستی ایده‌آل مهندسی بافت باید توانایی کنترل از دست رفتن مایعات و ایجاد رطوبت در محل زخم، جلوگیری از ایجاد عفونت، انقباض‌ها و اسکارها را داشته باشد (7).

در سال‌های اخیر از خواص هیالورونیک اسید به منظور تسریع و بهبود زخم‌های مزمن استفاده شده است و نتایج امیدوارکننده‌ای گزارش شده است و مشکلات ترمیم زخم برخی از زخم‌های حاد را که ممکن است به مزمن تبدیل شوند، برطرف کرده است (8,9).

هیالورونیک اسید به‌طور طبیعی پلیمر با خواص ویسکوالاستیک و رئولوژی (Rheology) منحصر به فردی است. ترشح هیالورونیک اسید سنتز را بر روی غشای سلولی و به‌طور مستقیم به‌فضای خارج سلولی انجام می‌دهند و هیالورونیک اسید قابلیت انجام سه فرآیند بیولوژیکی را دارد:

گسترش فضای خارج سلولی از طریق خواص جذب رطوبت، تعامل با چند مولکول خارج سلولی به شکل ماتریکس خارج سلولی و فعال‌کردن مسیرهای پیام‌رسانی داخل سلولی از طریق گیرنده‌های سطح سلول.

این عملکردهای بیولوژیکی ایجاد نقش پیچیده‌ای از اسید هیالورونیک در ترمیم بافت می‌کنند که باعث انجام تعدادی از فرآیندها مانند مهاجرت سلولی، تکثیر سلولی، سازماندهی ماتریس بافت گرانوله و آنژیوژن (Angiogenesis) در بهبود زخم می‌شوند (10).

در واقع هیالورونیک اسید در هر مرحله از بهبود زخم نقش ایفا می‌کند. در مرحله التهابی، هیالورونیک اسید مهاجرت سلولی (فیبروبلاست‌ها، لنفوسیت‌ها و نوتروفیل) در محل ضایعات از طریق خواص رئولوژی آن فعال می‌کند. هیالورونیک اسید نیز تنظیم التهاب را با تولید سایتوکاین‌های پیش التهابی و تحریک رگرایی بر عهده دارد. در طی مرحله گرانوله شدن، هیالورونیک اسید با مهاجرت و تکثیر فیبروبلاست، سنتز کلاژن و تکثیر سلول‌های اندوتلیال در تسریع مکانیزم ترمیم نقش دارد. مطالعات متعدد نشان داده‌اند که مصرف موضعی هیالورونیک اسید به‌طور قابل توجهی افزایش روند بهبود را تسریع می‌کند (11,12). از این رو با توجه به اهمیت هیالورونیک اسید در این مطالعه از این پلیمر طبیعی بهره گرفته شده است.

ژل رویال یکی از محصولات جانبی زنبور عسل است که در تحقیقات متعددی به عنوان ماده ترمیم‌کننده و آنتی‌باکتریال به کار رفته است. تجویز موضعی ژل رویال به‌طور قابل توجهی باعث افزایش اجزای ماتریکس خارج سلولی در فاز اولیه ترمیم می‌شود (13,14).

پلی یورتان، پلیمری سنتزی است که کاربردهای زیادی در ساخت زخم پوش ها دارد. پلی یورتان استحکام کششی مناسب دارد و محیط را نیز مرطوب نگه می دارد (15). همچنین پلی یورتان به عنوان یک سد در برابر باکتری ها نیز عمل می کند و عبور اکسیژن مناسبی دارد (16).

تا کنون هیچ مطالعه ای مبنی بر ساخت داربست الکتروریسی شده حاوی ژل رویال و هیالورونیک اسید بر روی ترمیم بافت پوست و پانسمان ها انجام نشده است و هدف از این پژوهش ساخت پانسمان الکتروریسی شده بر پایه پلی یورتان به منظور جلوگیری از عفونت زخم و ترمیم بافت است. به این منظور از پلیمر سنتزی پلی یورتان و پلیمر طبیعی هیالورونیک اسید که دارای خواص زیستی، تخریب پذیری و چسبندگی مناسبی می باشد، استفاده شد و از ژل رویال نیز در تهیه این داربست بهره گرفته شد. پانسمان مورد مطالعه به روش الکتروریسی تهیه گردید. برای بررسی مورفولوژی داربست از میکروسکوپ الکترونی روبشی استفاده شد. از آزمون زاویه تماس برای ارزیابی خاصیت آبدوستی داربست های الکتروریسی شده و از آزمون MTT برای بررسی تکثیر سلولی استفاده گردید و در نهایت آزمون حیوانی برای بررسی ترمیم زخم در مدت زمان مشخص انجام شد.

مواد و روش ها

این مطالعه تجربی - کاربردی با کد اخلاق IR.MUI.REC.1396.3.846 مورد تایید قرار گرفته است. به منظور ساخت محلول الکتروریسی ابتدا 10 درصد وزنی/وزنی پلی یورتان (PU) در حلال (THF/DMF(50:50) در دمای محیط به مدت 2 ساعت حل شده است. سپس، 0/5 درصد وزنی/وزنی از هیالورونیک اسید (HA) در DMF با نسبت 1:1 به محلول فوق افزوده گردید. در ادامه ژل رویال (RJ) را در نسبت 3، 6 و 8 درصد وزنی/وزنی به محلول HA-PU به مدت 4 ساعت افزوده

گردید تا محلولی با ویسکوزیته بالا و کاملاً یکنواخت تهیه شود. محلول در سرنگ تعبیه شده و به صورت افقی در دستگاه الکتروریسی قرار گرفت. الکتروریسی نمونه ها، تحت ولتاژ 18 کیلوولت و سرعت جریان 1 میلی لیتر بر ساعت انجام گردید. همچنین فاصله سرسنگ تا جمع کننده 20 سانتی متر در نظر گرفته شد.

روش های شناسایی

1- میکروسکوپ الکترونی روبشی (SEM)

برای بررسی مورفولوژی داربست های پلیمری از نظر اندازه تخلخل ها، ارتباط درونی آن ها و مشخص شدن قطر الیاف، نمونه هایی با ابعاد $1 \times 1 \text{ cm}^2$ آماده و با طلا پوشش دهی و توسط میکروسکوپ الکترونی روبشی (SEM) تصاویر آن تهیه شد.

2- آزمون زاویه تماس با قطره آب

به منظور بررسی آبدوستی داربست ها از سیستم اندازه گیری زاویه تماس، استفاده شد. نمونه در اندازه 12 mm^2 بریده و روی یک پایه نگهدارنده قرار داده شد و دوربین (VCA Optima, AST Inc) ساخت کشور آمریکا) رو به روی آن تنظیم شد. مقدار 2 ml آب مقطر در یک سرنگ جای داده شده و سرنگ به طور عمود بر سطح داربست در بالای آن آماده شد. قطرات آب در 5 نقطه مختلف از سطح نمونه ها با میکروسرنگ قرار داده شدند (یک قطره آب مقطر به حجم حدود $2 \mu\text{l}$ روی فیلم قرار گرفت). شکل قطره روی سطح با استفاده از دوربین مزبور پس از گذشت 30 ثانیه روی فیلم ثبت شده و زاویه تماس قطره با سطح، اندازه گیری شد. نتایج بر اساس میزان متوسط پنج اندازه گیری در نقاط مختلف هر داربست بود.

3- آزمون سنجش سمیت سلولی

آزمون سمیت سنجی مطابق استاندارد ISO10993-5 انجام شد. سپس نمونه های داربست تهیه شده، در محیط

و در نهایت در الکل 100 درصد به منظور تصویربرداری با میکروسکوپ الکترونی روبشی نگهداری شد.

مطالعه درون تن

در مطالعه درون تن، از موش صحرایی نر بالغ نژاد ویستار در محدوده وزنی 200 تا 250 گرم استفاده شد. برای حصول اطمینان از عدم وجود هر گونه عفونت در بدن، حیوانات به خوبی مورد معاینه قرار گرفتند. موش‌های صحرایی در اتاق حیوانات با شرایط مناسب، درجه حرارت 22 ± 2 درجه سانتی گراد، رطوبت نسبی 40 تا 60 درصد و سیکل 12 ساعته روشنایی-تاریکی در شبانه روز در قفس‌های آلومینیومی جداگانه نگهداری شدند و تغذیه آن‌ها با حبه‌های (pellet) مخصوص حیوانات آزمایشگاهی و آب آشامیدنی لوله کشی صورت گرفت.

ایجاد زخم

به منظور ایجاد زخم ابتدا موش‌ها توسط تزریق درون صفاقی مخلوط کتامین 75 میلی گرم بر کیلوگرم و زایلازین 10 میلی گرم بر کیلوگرم بیهوش شدند. سپس موهای پشت حیوان کوتاه گردید، سپس برشی به قطر یک سانتی‌متر در شرایط غیر عفونی بعد از آغشته کردن پوست با محلول بتادین، به کمک قیچی ایجاد شد.

گروه‌های آزمایشی

جهت بررسی تاثیرات داربست ساخته شده به 3 گروه آزمایشی و یک گروه کنترل نیاز بود. هر گروه شامل 6 رت بود. پانسمان‌های الکترورسی شده را بر روی زخم قرار داده و با پارچه‌ای به شکل لباس آن را کاملاً پوشانیدیم. به‌طوری که رت‌ها نتوانند آن را باز کنند (تصویر شماره 1). برای گروه اول از پانسمان پلی یورتان جهت درمان استفاده شد. در گروه کنترل نیز زخم ایجاد گردید بدون آن که داربستی بر روی آن قرار بگیرد و روند بهبود زخم مورد مطالعه قرار گرفت.

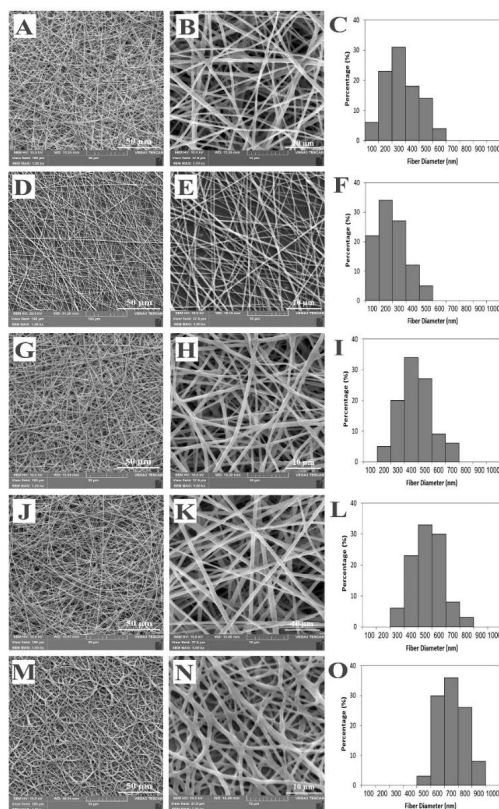
کشت DMEM غوطه‌ور شدند. در این پژوهش از سلول‌های فیبروبلاست L929 استفاده شد. این سلول‌ها به صورت کشت چسبنده از بانک سلولی انسیتو پاستور تهران تهیه و تکثیر شدند. فیبروبلاست‌های تهیه شده به محیط DMEM غنی شده با 10 درصد FBS، ال‌گلوتامین 1 درصد، پنی‌سیلین G و استرپتومایسین انتقال داده شد و در انکوباتور با شرایط 5 درصد گاز دی‌اکسید کربن در دمای 37 درجه به مدت 3 هفته نگهداری گردید. ضمن اینکه هر 2 روز یک بار تعویض محیط کشت صورت گرفت تا سلول‌ها به تراکم 80 درصد برسند. در پاساژ سوم سلول‌ها تریپسین شدند. سپس تعداد 10^5 سلول درون پلیت 24 خانه حاوی داربست‌های تهیه شده به مدت 5 روز درون انکوباتور نگهداری گردید. سپس سلول‌ها، 2 بار به وسیله PBS شسته شدند تا سلول‌های مرده خارج شوند. در فواصل زمانی 1، 4 و 7 روز بعد از کشت، آزمون MTT به منظور ارزیابی زنده ماندی (میزان بقا) سلول‌ها انجام شد. در هر نقطه زمانی، پس از تخلیه محیط کشت و شستشو با PBS، حدود 400 میکرولیتر محیط کشت همراه با 40 میکرولیتر محلول (MTT 5 میلی گرم بر میلی‌لیتر) به هر چاهک کشت اضافه گردید. سپس به مدت 4 ساعت در انکوباتور در دمای 37 درجه سانتی گراد نگهداری شد. بعد از آن، محیط کشت به آرامی تخلیه شد و به منظور انحلال فرمازان، 200 میکرولیتر دی‌متیل سولفوکساید (DMSO)، به چاهک افزوده شد. جذب نوری در طول موج 540 نانومتر خوانده شد.

ارزیابی چسبندگی سلولی

جهت بررسی چسبندگی و مورفولوژی سلول‌ها بر روی داربست‌ها، بعد از 7 روز انکوباسیون نمونه‌ها، محیط کشت از روی آن‌ها تخلیه شد و جهت تثبیت سلول‌های چسبیده محلول گلوترآلدئید 4 درصد به مدت 30 دقیقه بر روی نمونه‌ها ریخته شد. سپس با الکل 50، 70، 90 و 100 درصد شستشو صورت گرفت.

می‌دهد. در همه نمونه‌های مورد بررسی الیاف بدون گره خوردگی بر روی فویل آلومینیوم جمع‌آوری شده‌اند. همچنین با استفاده از نرم‌افزار Image J قطر الیاف محاسبه گردید.

اندازه‌گیری درصد بهبود زخم مساحت زخم اندازه‌گیری شد و با استفاده از معادله شماره 1 درصد زخم و درصد بهبودی ارزیابی شد. جهت اندازه‌گیری طول زخم از نرم‌افزار Image J استفاده شد.



تصویر شماره 2: تصاویر SEM سطح داربست‌های الکتروپرسی شده، (A-C) داربست PU، (D-F) داربست PU-HA، (G-I) داربست PU-HA/3%RJ، (J-L) داربست PU-HA/8%RJ، (M-O) داربست PU-HA/6%RJ

قطر الیاف در نمونه‌های PU، PU-HA، PU-HA/3%RJ، PU-HA/6%RJ و PU-HA/8%RJ به ترتیب قطر 175/2، 208/4، 423/3، 546/8 و 926/3 نانومتر مشاهده شده است. به منظور بررسی میزان ترشوندگی سطح داربست‌ها، آزمون زاویه تماس انجام شد. با توجه به تصویر شماره 3، تصاویر و نمودار زاویه قطره آب با سطح داربست در آزمون زاویه تماس با افزودن



تصویر شماره 1: قرار دادن داربست الکتروپرسی شده بر روی زخم سطحی ایجاد شده و پوشاندن آن در یکی از گروه‌های مورد آزمایش

معادله شماره 1:

$$\text{درصد زخم} = \frac{\text{مساحت زخم در روز آخر}}{\text{مساحت زخم در روز اول}} \times 100$$

X: روزی که مساحت زخم اندازه‌گیری شده است.

سپس نتایج به دست آمده در گروه‌های آزمایشی و گروه‌های کنترل با یکدیگر مقایسه شدند. داده‌ها به صورت انحراف معیار $\pm$ میانگین (Mean $\pm$ SD) به دست آمد و برای تحلیل آماری از نرم‌افزار SPSS (ویرایش 16) استفاده گردید و از آزمون آماری واریانس یک طرفه (ANOVA) استفاده شد. سطح معنی دار بودن اختلافات با $P < 0/05$ محاسبه گردید.

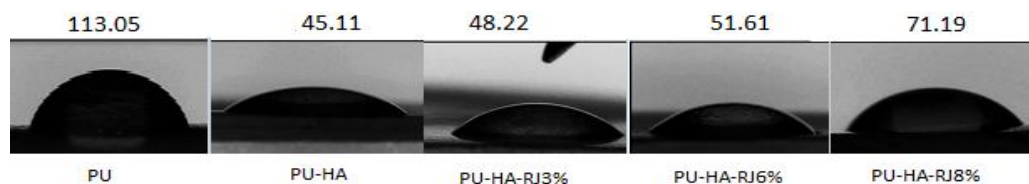
یافته‌ها

ساختار داربست‌ها توسط میکروسکوپ الکترونی روبشی مورد بررسی قرار گرفت. تصویر شماره 2، الیاف کاملاً یکدست و تخلخل‌های باهم مرتبط را، نشان

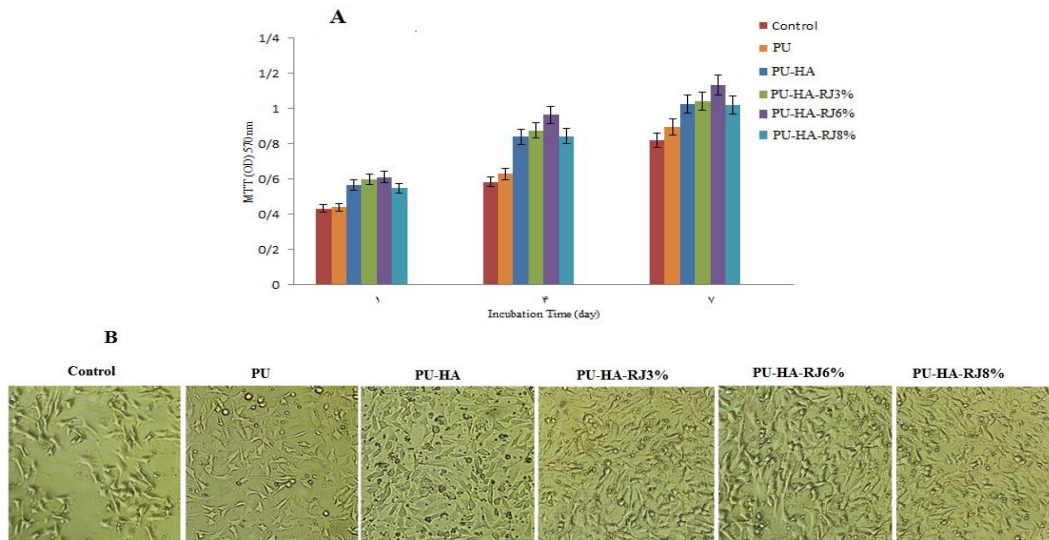
هیالورونیک اسید و ژل رویال، سلول‌ها بر روی داربست نمونه PU/HA/6% RJ به‌طور معناداری بیش‌تر از نمونه کنترل و نمونه پلی‌یورتان خالص زنده مانده‌اند ($P < 0/05$) و داربست‌های حاوی ژل رویال، نمونه PU-HA/8%RJ علی‌رغم حضور ژل رویال بیش‌تر، درصد زنده ماندن سلول کمی کاهش یافته است. از این رو در بررسی چسبندگی سلولی تنها چسبندگی و رشد سلول‌ها در نمونه PU/HA/6% RJ در روز چهارم مورد بررسی قرار گرفت و اختلاف چسبندگی این داربست با نمونه حاوی پلی‌یورتان خالص در تصاویر SEM پس از 4 روز از کشت سلولی نشان داده شده است. همان‌طور که در تصویر شماره 5 مشخص شده است سلول‌های فیبروبلاست به‌خوبی با الیاف داربست اتصال برقرار کرده‌اند.

اثر ترمیم زخم داربست‌های پلی‌یورتان-هیالورونیک اسید و ژل رویال بر روی موش صحرایی نر بالغ نژاد ویستار مورد مطالعه قرار گرفت (زخم به صورت سطحی ایجاد گردید). در تصویر شماره 4، مشاهده می‌شود سطح زخم در گروه‌های تحت درمان با داربست پلی‌یورتان در روز اول با سطح زخم در گروه کنترل برابر است. اما در روزهای 7 و 14، این اختلاف معنی‌دار می‌باشد ($P < 0/05$). بیش‌ترین اختلاف سطح بهبود زخم، در روز هفتم و چهاردهم بین گروه تحت درمان با داربست PU و گروه PU-HA-6%RJ وجود دارد (تصویر شماره 6).

هیالورونیک اسید و ژل رویال در داربست الکترورسی شده پایه پلی‌یورتان، باعث تغییرات زاویه تماس در بین 48 درجه تا 113 درجه می‌باشد. همان‌طور که در شکل مشاهده می‌شود، با افزودن هیالورونیک اسید به پلی‌یورتان (PU-HA)، مقدار آبدوستی داربست بیش‌تر شده و زاویه تماس از 113 درجه به 45 درجه کاهش می‌یابد. افزایش مقدار ژل رویال بدلیل افزایش خاصیت هیدروفوبیک زاویه تماس افزایش پیدا می‌کند (زاویه تماس PU/HA/3%RJ، PU/HA/6% RJ و PU/HA/8% RJ به ترتیب 48/22، 51/61 و 71/19 درجه بوده است). در پژوهش حاضر حداکثر زاویه تماس مشاهده شده در بین نمونه‌های حاوی ژل رویال و هیالورونیک اسید، متعلق به نمونه PU/HA/8% RJ به میزان 71/19 درجه می‌باشد که می‌توان این اختلاف معنادار با دیگر نمونه‌ها را به افزایش مقدار ژل رویال در ساختار نسبت داد ($P < 0/05$). برای بررسی تکثیر سلول‌ها بر روی داربست‌ها از آزمون MTT استفاده شد. به منظور بررسی سمیت داربست‌ها، سلول‌های L929 به مدت 7 روز در مجاورت داربست پلی‌یورتان، و داربست‌های حاوی ژل رویال و هیالورونیک اسید قرار گرفتند. همان‌طور که در تصویر شماره 4، ملاحظه می‌گردد، سلول‌ها بر روی داربست حاوی هیالورونیک اسید نسبت به داربست الکترورسی شده پلی‌یورتان خالص و نمونه کنترل رشد بهتری داشته‌اند و نتایج تست MTT نشان می‌دهد در بین نمونه‌های حاوی



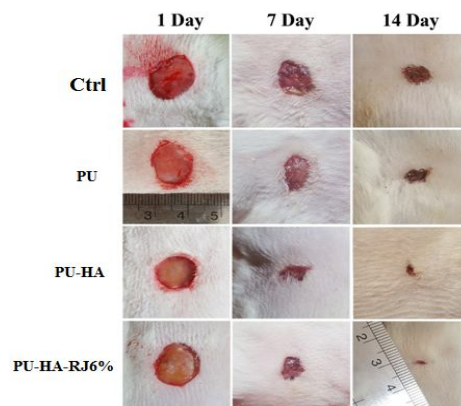
تصویر شماره 3: تصاویر زاویه قطره آب با سطح داربست در تست زاویه تماس



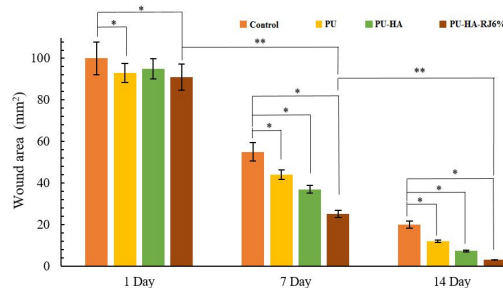
تصویر شماره 4: (A) نمودار نتایج حاصل از سنجش MTT، میزان رشد سلول‌ها بر روی داربست‌ها در مقایسه با یکدیگر بعد از 1، 4 و 7 روز از کشت سلولی، (B) تصاویر میکروسکوپ نوری از رشد سلول‌های L929 بر روی داربست‌های الکتروپرسی شده و نمونه کنترل در روز 4.

بحث

قطر الیاف داربست‌های حاوی ژل رویال از نمونه‌های بدون ژل رویال، بیش‌تر است. نتایج نشان می‌دهد با افزودن هیالورنیک اسید قطر الیاف تا حدودی افزایش می‌یابد اما این تغییر تفاوت معناداری با نمونه پلی‌یورتانی ندارد. در حالی که با اضافه کردن غلظت‌های مختلف ژل رویال، ویسکوزیته محلول بیش‌تر شده، قطر الیاف نیز افزایش یافته است. به عبارتی می‌توان گفت ویسکوزیته یکی از اثرگذارترین پارامترهای الکتروپرسی در قطر الیاف می‌باشد که در نتیجه ویسکوزیته بالا الیاف با قطر بزرگ‌تر به دست می‌آید و پلیمرهای با وزن مولکولی بالا به دلیل افزایش ویسکوزیته در طول مسیر ریسندهی عموماً مشکل ریسندهی دارند که می‌تواند به دلیل تبخیر حلال باشد (17). ویسکوزیته محلول حاوی 8 درصد ژل رویال بالا بوده و در نتیجه آن، الیاف مورفولوژی مناسبی نداشته‌اند. به همین دلیل این نمونه، شرایط را برای یک داربست ایده آل فراهم نمی‌کند. با همین دلیل شرایط را برای یک داربست ایده آل فراهم نمی‌کند. با توجه به نتایج تست زاویه تماس می‌توان



تصویر شماره 5: تصاویر مقایسه‌ای اثر بهبودی زخم در گروه‌های مختلف الکتروپرسی شده،



تصویر شماره 6: نمودار روند بهبود زخم‌های ایجاد شده

گفت حضور هیالورونیک اسید در ساختار داربست به آن خاصیت هیدروفیلی بخشیده است. در واقع هیالورونیک اسید بدلیل داشتن گروه عاملی آبدوست (هیدروکسیل، کربوکسیلیک اسید، آمین) خواص هیدروفیلی داربست را تشدید می کند (18,19). اگرچه با اضافه شدن ژل رویال از خاصیت آبدوستی داربست کم شده است ولی با توجه به زاویه تماس داربست الکترورسی شده پلی یورتان خالص، باز هم داربست از خاصیت هیدروفیلی برخوردار است. نتیجه تست سمیت MTT به دست آمده از این تحقیق، هیچ سمیتی برای درصدهای 3 درصد، 6 درصد و 8 درصد ژل رویال نشان نداده است و نتایج بدست آمده از نمودار مربوط به تست MTT، افزایش رشد و تکثیر سلول ها را در حضور هیالورونیک اسید و ژل رویال نشان می دهد. در این مطالعه بررسی چسبندگی سلولی روی داربست های حاوی هیالورونیک اسید و ژل رویال صورت گرفت و اتصال و تکثیر سلول های فیبروبلاست بر روی داربست PU-HA/6%RJ نسبت به تکثیر سلول ها بر روی داربست الکترورسی شده PU، به معنای رفتار سلولی مناسب ارزیابی گردید ($P < 0/05$) و سلول های L929 رشد خوبی داشته اند. در مطالعه ای که Lian و همکارانش بر روی داربست الکترورسی شده ژلاتین - هیالورونیک اسید انجام دادند مشخص شد سلول های L929، بر روی داربست حاوی ژلاتین و هیالورونیک اسید رشد چشمگیری نسبت به داربست الکترورسی شده ژلاتین داشته اند (20). پس از کشت سلولی در روز چهارم، تصاویر میکروسکوپ نوری داربست ها مورد بررسی قرار گرفت (تصویر شماره 3B). این تصاویر به خوبی نشان می دهند، که در همه نمونه های الیاف الکترورسی شده، سلول های فیبروبلاست به صورت مطلوبی نسبت به کنترل رشد کرده اند. در نهایت سلول ها در داربست PU-HA/6%RJ که شامل هیالورونیک اسید و ژل رویال (6 درصد وزنی) بوده است، رشد بیش تری داشته و توانسته بستر مناسبی برای رشد سلول های فیبروبلاست فراهم کنند.

این نتایج نشان می دهد سلول های فیبروبلاست به خوبی با الیاف داربست اتصال برقرار کرده اند و همچنین نفوذ سلول های فیبروبلاست به داخل داربست حاوی ژل رویال به خوبی انجام شده است. که این مساله می تواند کاربرد این نوع داربست ها را در مهندسی بافت پوست امیدبخش تلقی کند.

در مطالعات درون تن در روز چهاردهم در گروه سوم که حاوی هیالورونیک اسید و ژل رویال 6 درصد بوده است، روند بهبود زخم 92/21 درصد ارزیابی شد. درحالی که در گروه کنترل و داربست PU به ترتیب 69/43 و 60/52 درصد است. همچنین روز هفتم درصد بهبودی زخم در گروه PU-HA/6%RJ بیش تر از گروه تحت درمان با داربست PU و داربست PU-HA و گروه کنترل است که بیش ترین اختلاف معنی دار بین این گروه ها در روز چهاردهم بعد از جراحی دیده می شود. البته علاوه بر اثر ژل رویال، اثر هیالورونیک اسید نیز در بهبود زخم مشهود است. در مطالعات متعددی به ویژگی قدرت ترمیم زخم در بستر زخم ژل رویال و هیالورونیک اسید اشاره شده است. Uppal و همکاران گزارش نموده اند که استفاده از هیالورونیک اسید بر روی سرعت اپی تلیزاسیون زخم و همچنین عروق زایی جدید در موضع موثر است (21). Park و همکارانش، اثر تسریع کننده بهبودی زخم را در اثر مصرف ژل رویال بر روی پوست بیان نموده اند، آن ها نشان داده اند که ژل رویال باعث افزایش سرعت ساخت کلاژن شده و بهبودی زودتر حاصل شده است (22,23).

با توجه به ارزیابی های انجام شده در محیط برون تن و درون تن، می توان نتیجه گرفت داربست PU-HA/6%RJ پتانسیل بهره گیری در مهندسی بافت پوست را دارد.

سپاسگزار

این تحقیق با حمایت دانشکده علوم و

اصفهان انجام شد که بدین وسیله از زحمات ایشان تقدیر و تشکر به عمل می آید.

فناوری های پزشکی، واحد علوم و تحقیقات تهران و دانشکده فناوری های نوین دانشگاه علوم پزشکی

References

1. Talikowska M, Fu X, Lisak G. Application of conducting polymers to wound care and skin tissue engineering: A review. *Biosensors and Bioelectronics* 2019; 135: 50-63.
2. Shevchenko RV, James SL, James SE. A review of tissue-engineered skin bioconstructs available for skin reconstruction. *J R Soc Interface* 2010; 7(43): 229-258.
3. Talikowska M, Fu X, Lisak G. Application of conducting polymers to wound care and skin tissue engineering: A review. *Biosensors and Bioelectronics*. 2019; 135: 50-63.
4. Nair LS, Laurencin CT. Biodegradable polymers as biomaterials. *Progress in Polymer Science* 2007; 32(8-9): 762-798.
5. Chen JP, Chang GY, Chen JK. Electrospun collagen/chitosan nanofibrous membrane as wound dressing. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects* 2008; 313: 183-188.
6. Ambekar RS, Kandasubramanian B. Advancements in nanofibers for wound dressing: A review. *European Polymer Journal* 2019; 117: 304-336.
7. Kamel RA, Ong JF, Eriksson E, Junker JP, Caterson EJ. Tissue engineering of skin. *Journal of the American College of Surgeons* 2013; 217(3): 533-555.
8. Hussein Y, El Fakharany EM, Kamoun EA, Loutfy SA, Amin R, Taha TH, et al. Electrospun PVA/hyaluronic acid/L-arginine nanofibers for wound healing applications: nanofibers optimization and in vitro bioevaluation. *International journal of biological macromolecules* 2020; 164: 667-676.
9. Liu S, Zhang Q, Yu J, Shao N, Lu H, Guo J, et al. Absorbable thioether grafted hyaluronic acid nanofibrous hydrogel for synergistic modulation of inflammation microenvironment to accelerate chronic diabetic wound healing. *Advanced Healthcare Materials* 2020; 9(11): 2000198.
10. Hoekstra D. Hyaluronan-modified surfaces for medical devices. *Medical Device and Diagnostic Industry* 1999; 21: 48-56.
11. AB Hamid N, Bakar ABA, Mohamed M. Phytochemical analysis and gc-ms profile of royal jelly from selected areas in malaysia. *Malayian Applied Biology* 2018; 47(3): 101-107.
12. Cho YS, Lee JW, Lee JS, Lee J, Yoon T, Kuroyanagi Y, et al. Hyaluronic acid and silver sulfadiazine-impregnated polyurethane foams for wound dressing application. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine* 2002; 13(9): 861-865.
13. Moon JH, Lee MY, Chung YJ, Rhee CK, Lee SJ. Effect of Topical Propolis on Wound Healing Process After Tonsillectomy: Randomized Controlled Study. *Clinical and experimental otorhinolaryngology* 2017; 11(2): 146-150.
14. Ramírez OJ, Alvarez S, Contreras Kallens P, Barrera NP, Aguayo S, Schuh CM. Type I collagen hydrogels as a delivery matrix for royal jelly derived extracellular vesicles. *Drug Delivery* 2020; 27(1): 1308-1318.
15. Sadeghianmaryan A, Karimi Y, Naghieh S, Sardroud HA, Gorji M, Chen X. Electrospinning of Scaffolds from the Polycaprolactone/

- Polyurethane Composite with Graphene Oxide for Skin Tissue Engineering. *Applied Biochemistry and Biotechnology* 2020; 191: 567-578.
16. Khodabakhshi D, Eskandarinia A, Kefayat A, Rafienia M, Navid S, Karbasi S, et al. In vitro and in vivo performance of a propolis-coated polyurethane wound dressing with high porosity and antibacterial efficacy. *Colloids and surfaces B, Biointerfaces* 2019; 178: 177-184 (Persian).
 17. Casper CL, Stephens JS, Tassi NG, Chase DB, Rabolt JF. Controlling surface morphology of electrospun polystyrene fibers: effect of humidity and molecular weight in the electrospinning process. *Macromolecules* 2004; 37(2): 573-578.
 18. Tan H, Chu CR, Payne KA, Marra KG. Injectable in situ forming biodegradable chitosan-hyaluronic acid based hydrogels for cartilage tissue engineering. *Biomaterials* 2009; 30(13): 2499-2506.
 19. Mao JS, Yin YJ, De Yao K. The properties of chitosan-gelatin membranes and scaffolds modified with hyaluronic acid by different methods. *Biomaterials* 2003; 24(9): 1621-1629.
 20. Lian Y, Yuan L, Ji L, Zhang K. Gelatin/hyaluronic acid nanofibrous scaffolds: biomimetics of extracellular matrix. *Acta Biochim Biophys Sin* 2013; 45(8): 700-703.
 21. Uppal R, Ramaswamy GN, Arnold C, Goodband R, Wang Y. Hyaluronic acid nanofiber wound dressing—production, characterization, and in vivo behavior. *Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials* 2011; 97B(1): 20-29.
 22. de Almeida EB, Cardoso JC, de Lima AK, de Oliveira NL, de Pontes Filho NT, Lima SO, et al. The incorporation of Brazilian propolis into collagen-based dressing films improves dermal burn healing. *Journal of Ethnopharmacology* 2013; 147(2): 419-425.
 23. Park HM, Hwang E, Lee KG, Han SM, Cho Y, Kim SY. Royal jelly protects against ultraviolet B-induced photoaging in human skin fibroblasts via enhancing collagen production. *Journal of Medicinal Food* 2011; 14(9): 899-906.