مجله علمی پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی شهید صدوقی یزد
دوره بیست و نهم، شماره نهم، آذر ۱۴۰۰
تاریخ دریافت:۱۳۹۹/۰۴/۳۰
تاریخ پذیرش:۱۳۹۹/۰۷/۲۰

بررسی رشد سلول‌های بنیادی جنینی تمایزیافته بر روی بستر پلیمری متخلخل بهینه شده با استفاده از سیستم فازی

صالحه شاهمرادی[۱]، فاطمه یزدیان*[۱]، امین جانقربانی[۲]، لیلا ستاریان[۳]، فرناز بهروزی[۳]، فاطمه تابنده[۴]، بی‌بی فاطمه حقیرالسادات[۵]

مقاله پژوهشی

مقدمه: تخریب ماکولار بر اثر افزایش سن یکی از بیماری‌های شبکیه است که در آن سلول‌های رنگدانه اپی‌تلیوم تخریب شده و منجر به نابینایی می‌شود. درمان‌های موجود تنها به کاهش فرآیند پیشرفت بیماری منجر می‌شود. در این مطالعه، سلول‌های بنیادی جنین انسانی تمایزیافته به سلول‌های اپیتلیوم رنگدانه شبکیه چشم بر روی یک داربست پلی‌کاپرولاکتون کشت داده شدند.

روش بررسی: بهینه‌سازی قطر داربست‌های تولیدی به روش الکتروریسی، با استفاده از روش فازی برای نخستین بار انجام گرفت. به منظور بهبود چسبندگی و تکثیر سلولی، پارامترهای مربوط به روش هیدرولیز قلیایی بهینه شد و سطح آب‌گریز داربست اصلاح گردید. پس از انجام آنالیزهای آزمایشگاهی، سلول‌ها بر روی گروه‌های مختلف داربست کشت داده شدند. آنالیزهای in vivo صورت گرفت و رشد سلول‌ها بر روی داربست‌ها مشاهده شد.

نتایج: پارامترهای بهینه برای داربست براساس مدل فازی به ترتیب ۱۸/۱ کیلوولت برای ولتاژ، ۰/۰۷ گرم بر میلی‌لیتر برای غلظت محلول و ۱۱۵ نانومتر برای قطر داربست به‌دست آمد. پارامترهای زمان غوطه‌ور ساختن داربست در محلول قلیایی و غلظت به ترتیب ۹۷ دقیقه و ۳/۷ مولار، اندازه‌گیری شد. داربست اصلاح سطح شده درصد تخریب‌پذیری و جذب آب بالاتری داشت. نتایج آزمون MTT بر روی داربست‌ها نشان داد که گروه داربست با اصلاح‌سطح بیشترین میزان زنده‌مانی و تکثیر سلولی را پس از گذشت هفت روز داراست. نتایج حاصل از تصاویر میکروسکوپ الکترونی روبشی این یافته را پس از گذشت حدود دو ماه تایید کرد. علاوه‌بر این، نتایج آزمون ایمونوسیتوشیمی نشان دادند که سلول‌ها پس از گذشت این زمان، ماهیت RPE و اپیتلیومی بودن خود را حفظ کردند.

نتیجه‌گیری: براساس نتایج به دست آمده، داربست هیدرولیزشده بستر مناسبی برای تکثیر سلول است و می‌تواند گزینه مناسبی برای درمان AMD باشد.

واژه‌های کلیدی: تخریب ماکولار بر اثر سن، پلیمر، رنگدانه شبکیه چشم، منطق فازی

ارجاع: شاهمرادی صالحه، یزدیان فاطمه، جانقربانی امین، ستاریان لیلا، بهروزی فرناز، تابنده فاطمه، حقیرالسادات بی‌بی فاطمه. **بررسی رشد سلول‌های بنیادی جنینی تمایزیافته بر روی بستر پلیمری متخلخل بهینه شده با استفاده از سیستم فازی**. مجله علمی پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی شهید صدوقی یزد ۱۴۰۰؛ ۲۹ (۹): ۲۲-۴۱۰۶.

۱- گروه علوم‌زیستی، دانشکده علوم و فناوری‌های نوین، دانشگاه تهران، تهران، ایران.
۲- گروه بیوفناوری، پردیس علوم و فناوری‌های نوین، دانشگاه سمنان، سمنان، ایران.
۳-گروه سلول‌های بنیادی و زیست‌شناسی تکوینی، پژوهشکده علوم سلولی، موسسه رویان، تهران، ایران.
۴- گروه بیوتکنولوژی صنعتی و محیط زیست، پژوهشگاه ملی مهندسی ژنتیک و بیوتکنولوژی، تهران، ایران.
۵- گروه نانوبیوتکنولوژی، دانشگاه علوم‌پزشکی و خدمات بهداشتی درمانی شهید صدوقی یزد، یزد، ایران.
*(نویسنده مسئول)؛ تلفن: ۰۹۱۲۸۲۶۷۶۸۶، پست الکترونیکی: yazdian@ut.ac.ir، صندوق پستی: ۶۶۱۹-۱۴۱۵۵

[Downloaded from jssu.ssu.ac.ir on 2026-11-21]

[DOI: 10.18502/ssu.v29i9.7911]

مقدمه

تخریب ماکولار در اثر افزایش سن یکی از بیماری‌های شبکیه مرتبط با سن است که منجر به نابینایی می‌شود (۱،۲). در این بیماری سلول‌های اپی‌تلیوم رنگدانه شبکیه –لایه سلولی که از گیرنده‌های نوری محافظت می‌کند و بر روی غشای بروخ قرار گرفته است- به صورت برگشت‌ناپذیر تخریب می‌شوند (۶-۳). این سلول‌ها وظایف مهمی از جمله ایجاد برهمکنش بین گیرنده‌های حساس به نور بخش‌های خارجی، فراهم‌کردن یون و مواد غذایی و انتقال متابولیت‌های درون سلولی را به عهده دارند. بنابراین درمان این بیماری از اهمیت خاصی برخوردار است (۷). علم مهندسی بافت، علمی است که در آن بسیاری از بیماری‌های انسان به کمک روش‌هایی چون کشت سلول‌ها درمان می‌شوند. به منظور کشت سلول‌ها در خارج از بدن موجود زنده، نیاز به محیطی است که حداکثر شباهت با بدن موجود زنده را داشته باشد. این محیط‌ها که تحت عنوان "داربست" از آن‌ها یاد می‌شود، خود تحت تاثیر پارامترهایی هستند که بسته به روش تولید، با هم تفاوت دارند (۸). داربست‌ها وظایف مهمی در درمان برخی از بیماری‌ها مانند برقراری ارتباط موثر سلول‌ها، چسبندگی، رشد و مهاجرت سلولی دارند. بنابراین ساخت بهترین داربست، از اهمیت برخوردار است (۹). یکی از روش‌های ساخت داربست، روش الکتروریسی است که در آن ماده مورد نظر، که جنس داربست را تشکیل می‌دهد، در حلال مناسبی حل شده و توسط دستگاه مربوطه رسیده می‌شود. پارامترهایی چون ولتاژ دستگاه، فاصله سر سوزنی که محلول از آن خارج می‌شود تا صفحه جمع‌کننده، دبی محلول خروجی از سرنگ، غلظت ماده حل‌شونده در محلول اولیه در چگونگی تشکیل داربست نقش دارند (۸). پلیمری که به عنوان داربست در مهندسی بافت استفاده می‌شود، باید دارای ویژگی‌هایی چون زیست‌سازگاری، زیست‌تخریب‌پذیری، ضخامت مناسب، استحکام لازم برای عمل پیوند، چسبندگی کافی، تکثیر سلولی و تخلخل مناسب باشد (۱۰). یکی از کاربردهای به کارگیری داربست‌ها، استفاده از آن‌ها در درمان سلول‌های از بین رفته در بیماری Age Macular Degeneration (AMD) و Retinitis Pigmentosa (RP) مربوط به شبکیه چشم می‌باشد. روش پیشنهادی برای درمان این دو بیماری، کشت سلول‌های Retinal Pigment Epithelium (RPE) بر روی آن‌ها و جایگزینی سلول‌های سالم با سلول‌های تخریب شده بیمار است (۱۱). پلی‌لاکتیک کوگلایکولیک اسید (PLGA) و پلی ال‌لاکتیک اسید (PLLA) دو پلیمر سنتزی هستند که در سال ۲۰۰۵ به‌عنوان بستری جهت حمایت از سلول‌های D ۴۰۷ استفاده شدند و نهایتاً شکل سنگفرش سلول‌های RPE را به‌خود گرفتند. در همین راستا، محققان با انتخاب نسبت ۲۵:۷۵ از پلیمرهای PLLA:PLGA توانستند داربستی نازک و با تخلخل بالا تهیه کرده و به‌عنوان داربست بهینه ارائه دهند. اما از آن‌جایی که این داربست‌ها با روش ریخته‌گری حلال ساخته شدند، ضخامت آن‌ها بیش از ۱۵۰ میکرومتر بود، بنابراین سدی ضخیم برای ارتباط RPE و گیرنده‌های نوری محسوب شد که می‌تواند به لایه بیرونی شبکیه آسیب زده و آن را از بین ببرد. این در حالی است که ضخامت مناسب داربست ایده‌آل برای قرارگرفتن به جای غشای بروخ کمتر از ده میکرومتر است (۱۲). هم‌چنین این دو ماده به دلیل برخی محصولات حاصل از تخریبشان، در مواردی زیست‌سازگار نیستند و موجب هجوم سلول‌های ایمنی مانند ماکروفاژها می‌شوند (۱۳). در سال ۲۰۱۲ کریستینسن و همکاران اصلاح سطح‌های مختلفی بر روی داربست‌های Polycaprolactone (PCL) انجام دادند. این بسترها بر روی چشم‌های ۲۸خوک در فضای زیر شبکیه پیوند زده شدند و پس از ۶ هفته مشاهده، بافت‌شناسی آن صورت‌گرفت. مشاهده شد که در میان سه نوع داربست مشتق شده از PCL (نانوسیم‌های کوتاه PCL، PCL الکتروریسی شده و داربست‌های یک‌دست PCL)، نانوسیم‌های کوتاه PCL بهترین گزینه در پیوند RPC هستند (۱۴). آردان و همکاران در سال ۲۰۱۹ با کشت سلول‌های RPE بر روی دو بستر – غشاهای نانولوله‌ای و داربست‌های پلی‌استر تجاری- و انجام آزمایش‌های ایمونوسیتوشیمی و real-time PCR دریافتند که سلول‌ها بر روی غشاهای نانو لوله‌ای بلوغ بهتر و میزان زنده‌مانی

[Downloaded from jssu.ssu.ac.ir on 2026-11-21]

[DOI: 10.18502/ssu.v29i9.7911]

طولانی‌تری دارند (۱۵). در سال ۲۰۲۰ از داربست پلی‌دی‌متیل‌سیلوکسان ساخته شده به روش پوشش‌دهی دورانی و لیتوگرافی، برای کشت سلول‌های بنیادی چندتوانی مشتق شده از RPE استفاده شد. در پژوهش لین و همکاران که با هدف درمان AMD انجام گرفت، با انجام آنالیزهای متعددی چون بیان ژن مشخص شد که این گزینه می‌تواند درمان مناسبی برای بیماری AMD باشد (۱۶). در پژوهشی دیگر، از داربست سویا برای تمایز سلول‌های بنیادی استفاده شد. نتایج حاصل از این مطالعه نشان داد که داربست به‌کاررفته، بستری مناسب برای رشد و تمایز این سلول‌ها در جهت درمان AMD می‌باشد (۱۷). در مطالعه‌ای دیگر که به منظور معرفی بستری مناسب برای درمان این بیماری صورت گرفت، از یک هیبرید زیستی چند لایه سه بعدی از جنس فیبرویین ابریشم برای کشت سلول‌های مختلفی چون سلول‌های بنیادی مزانشیمی و سلول‌های رنگدانه شبکیه چشم استفاده شد. نتایج به دست آمده حاکی از تولید شبکیه مشابه با شبکیه واقعی بود (۱۲). PCL یک طبیعت شیمیایی آب‌گریز دارد، بنابراین آب‌دوستی سطح کم است و هنگام برهمکنش با سیالات بیولوژیکی، از تکثیر و چسبندگی سلولی جلوگیری می‌کند. پس نیازمند ترکیب با ماده‌ای است که خواص آن را بهبود بخشد. در سال ۲۰۱۴ پژوهشی بر روی بهبود آب‌دوستی و اصلاح سطح با گروه‌های کاربردی مختلف PCL انجام شد. لوکا و همکاران نشان دادند که روش‌های شیمیایی چون آمینولیز و هیدرولیز می‌توانند باعث تغییراتی در ویژگی‌های PCL شوند. برای پی‌بردن به بهترین نتیجه میان فرآیندهای موثر، فیلم PCL در سه محلول مختلف سود ۱۰ مولار (برای معرفی گروه عاملی اسیدی)، پتاسیم‌هیدورکسید ۱۰ مولار (برای تغییر شیمی و ساختار فیلم) و هگزامتیلن‌دی‌آمین ۱۰٪ قرار گرفت. فیلم‌های PCL هیدرولیز شده، افزایش چشم‌گیری در آب‌دوستی و زیست‌سازگاری نشان دادند، درحالی‌که توپوگرافی سطح ثابت بود. هم‌چنین بر اثر آمینولیز مدول‌یانگ کاهش داشت که سبب بهبود تخریب این ماده شد. بر اثر هیدرولیز و آمینولیز،گروه‌های عاملی اسیدی و آمینی روی سطح PCL قرار گرفتند. این گروه‌ها به‌عنوان واکنش‌های تخریبی برای نزدیک‌کردن شرایط به محیط بدن در طول تخریب‌زیستی شناخته می‌شوند. واکنش اول منجر به تشکیل گروه‌های کربوکسیلیک و هیدروکسیلیک روی سطح فیلم PCL شده، در حالیکه در واکنش دوم، تشکیل پیوندهای آمیدی و گروه‌های آمینی روی سطح مشاهده شد (۱۸). تاثیر اصلاح سطح داربست‌های PCL روی خواص آن‌ها توسط کاسورن و همکاران در سال ۲۰۱۳ بررسی‌شد. در این تحقیق، ابتدا داربست‌های PCL در دو مرحله هیدرولیز شدند: قبل و پس از ساخت داربست با استفاده از تکنیک فشار بالای فوق بحرانی کربن‌دی‌اکسید (که به ترتیب به‌صورت pre-HPCL و post-HPCL نشان داده می‌شوند). پس از آن هر دو داربست توسط روش پلاسما به‌منظور بهبود آب دوستی، اصلاح سطح شدند. مورفولوژی سطح، ترشوندگی و ترکیب شیمیایی همه داربست‌های PCL به‌ترتیب توسط SEM، اندازه‌گیری زاویه تماس آب و XPS آنالیز شدند. مشاهده شد که پس از هیدرولیز و پلاسما سطح داربست‌ها از حالت بسیار نرم و صاف، به شکل زبر تغییر یافت. حالت pre-HPCL نسبت به post-HPCL دارای زبری و زاویه تماس کم‌تری بود. زمانی که از پلاسما نیز استفاده شد، زاویه تماس برای داربست pre-HPCL به صفر و آب دوستی به حداکثر مقدار خود رسید (۱۹). در سال ۲۰۱۴ از ترکیب مواد پلی‌کاپرولاکتون، ژلاتین و فیبروین ابریشمی با غلظت ۲۵٪ وزنی در حلال فرمیک‌اسید برای ساخت غشای متشکل از نانوفیبرهای مناسب سلول‌های RPE استفاده شد. نتایج حاصل از این پژوهش نشان داد که داربست تولید شده، رشد و تکثیر سلول‌های RPE را بدون برانگیختن واکنش التهابی سلول‌ها، افزایش می‌دهد. با این‌حال در این مطالعه، پارامترهای مربوط به الکتروریسی ثابت در نظر گرفته شد، بنابراین بررسی شرایط بهینه حاصل از درصد ترکیبات مختلف مواد استفاده شده برای داربست انجام‌گرفت (۲۰). برای غلبه بر محدودیت‌های PCL در سال ۲۰۱۸ رحمانی و همکاران از ترکیب این پلیمر با ژلاتین استفاده کردند و پس از انجام آزمایش‌های متعدد به نسبت بهینه ترکیب این دو ماده دست یافتند. هم‌چنین برای آزمایش صحت نسبت بهینه به‌دست

[Downloaded from jssu.ssu.ac.ir on 2026-11-21]

[DOI: 10.18502/ssu.v29i9.7911]

آمده، سلول‌های RPE را بر روی داربست الکتروریسی از ترکیب PCL و ژلاتین کشت داده و تحلیل‌های مختلفی انجام دادند و به نتایج خوبی دست یافتند (۲۱). در مطالعه‌ای دیگر بر روی داربست‌های PCL، شاهمرادی و همکاران از اصلاح سطح به روش هیدرولیز قلیایی برای کشت سلول‌ها و تشکیل لایه RPE بهره گرفتند و با توجه به آنالیزهای سلولی نظیر MTT، ایمونوسیتوشیمی و مشاهده سلول بر روی داربست پس از گذشت زمان با استفاده از SEM داربست بهینه را انتخاب کردند (۷). با توجه به اینکه برخی‌از پلیمرهای مورد استفاده دارای مقاومت مکانیکی پایین هستند و یا پس از تخریب مواد سمی تولید می‌کنند، در این مطالعه از پلیمر پلی‌کاپرولاکتون استفاده شد. این پلیمر دارای خواصی نظیر غیرسمی بودن مواد حاصل از تخریب آن، حلالیت خوب در حلال‌های آلی، زیست‌سازگاری مناسب، آنتی ژنیسیته پایین، فرآیندپذیری ساده و آسان می‌باشد (۲۲). دو حلال انتخابی برای این پلیمر کلروفرم و دی‌متیل‌فرمامید بودند که نیاز دستیابی به محلول مناسب برای الکتروریسی را فراهم کردند. با توجه به اینکه قطر نانوالیاف تولیدی از جمله پارامترهای مهم در کشت سلول روی داربست است (۲۳)، ابتدا از طریق نرم‌افزار Design Expert طراحی آزمایش‌ها انجام گرفت و سپس شرایط بهینه با کمک سیستم فازی و روش پاسخ سطح به‌دست آمد. سیستم‌های فازی که بر اساس یک منطق فازی و چند مقدار صورت می‌گیرد به عنوان تقریب‌گرهای عام معرفی شده‌اند که قابلیت مدلسازی هر سیستمی را دارا بوده و می‌تواند توصیف کننده روابط بین ورودی‌ها و خروجی‌های یک سیستم پیچیده باشد. برای هر متغیر مستقل مساله مورد بررسی چند تابع عضویت در نظر گرفته می‌شود که این با اعمال مقادیر اندازه‌گیری شده به این توابع عضویت، درجه تعلق به هر تابع عضویت به صورت زیر عددی بین ۰ تا ۱ تعیین می‌شود. بر خلاف تابع عضویت در مجموعه‌های غیرفازی که هر مقدار تنها می توانست یکی از دو مقدار صفر یا یک را اختیار کند، در تابع عضویت مجموعه فازی هر عضو می تواند هر مقدار حقیقی را در بازه ۰ تا ۱ داشته باشد که به آن درجه عضویت در مجموعه فازی گفته می‌شود. در منطق و سیستم‌های فازی از توابع عضویت فازی به متغیر زبانی تعبیر شده است که برای توصیف ورودی‌ها و خروجی‌ها در سیستم‌های فازی به کار گرفته می شود. متغیرهای معمولی به صورت عددی و دقیق تعریف می‌شوند. اما متغیرهای زبانی از کلمات و جملات ساخته شده‌اند که دقت آن‌ها از اعداد کمتر و دارای ابهام است. این متغیرهای زبانی ابزاری برای توصیف ویژگی‌های سیستم‌های پیچیده و یا سخت تعریف هستند. یک سیستم فازی ارتباط بین ورودی خروجی مساله مورد نظر را براساس یک مجموعه قواعد اگر- آن‌گاه و ماشین استنتاج فازی مدل می‌کند و در نهایت خروجی این قواعد در طی فرآیند نافازی‌سازی به صورت یک عدد حقیقی بیان می‌شود. معمولاً در سیستم‌های فازی برای بهینه‌سازی طراحی بخش‌های مختلف مانند مراکز توابع عضویت و ابتدا و انتهای آن از روش‌های یادگیری مبتنی بر داده استفاده می‌کنند. در این مطالعه از سیستم فازی ANFIS برای مدل‌سازی رابطه بین پارامترهای الکتروریسی و قطر الیاف بهره‌گرفته شده است. در این سیستم به منظور دستیابی به نگاشت بهینه بین جفت های ورودی و خروجی، این پارامترها با استفاده از جفت داده‌های ورودی و خروجی تعلیم و الگوریتمی که بر اساس گرادیان خطا می باشد، تغییر کرده و بهینه می شوند. پس از انتخاب شرایط بهینه حاصل از سیستم فازی به عنوان داربست مناسب، کشت سلول‌ها و آزمایش‌های مختلف بر روی آن صورت گرفت. هدف پایانی در این پژوهش به دست آوردن داربستی با شرایط بهینه است که برای رشد سلول‌های RPE در درمان بیماری AMD استفاده خواهد شد.

روش بررسی

پلی‌کاپرولاکتون (دانسیته ۱/۱۳۵ گرم بر سانتی‌متر مکعب و جرم مولکولی ۸۰ کیلودالتون و دمای ذوب ۶۰ درجه سلسیوس) به شکل پولک، کلروفرم و دی‌متیل فرمامید از شرکت سیگما- آلدریچ تهیه شدند. سلول‌های بنیادی جنین انسان تمایز یافته Human embryonic stem cells (hESC) به عنوان سلول‌های رنگدانه شبکیه چشم استفاده شدند. این سلول‌ها با استفاده از یک پروتکل جدید و موثر که شامل افزودن پیاپی ناگین، فاکتور

[Downloaded from jssu.ssu.ac.ir on 2026-11-21]
[DOI: 10.18502/ssu.v29i9.7911]

رشد فیبروبلاست، اسید رتینوییک و خارپشت صوتی بود، تمایز یافتند و مورفولوژی سلول‌های رنگدانه شبکیه چشم و مارکرهای مولکولی ویژه را از خود نشان دادند (۲۴).

ساخت داربست‌ها و بهینه‌سازی آن‌ها بر اساس قطر داربست به منظور به دست آوردن محلول یکنواخت، PCL در مخلوط حلال‌های کلروفرم: دی‌متیل‌فرمامید ۲:۸ به مدت ۴ ساعت در دمای اتاق بر روی همزن مغناطیسی قرار گرفت. کلروفرم مایع بی‌رنگی است که با فرمول شیمیایی $CHCl_3$ شناخته می‌شود و یکی از حلال‌های رایج پلی‌کاپرولاکتون می‌باشد. دی‌متیل‌فرمامید نیز یک حلال قطبی با نقطه جوش بالاست و دارای فرمول شیمیایی C_3H_7NO است. دو حلال به کار رفته در این پژوهش اختلالی در آزمایش‌ها ایجاد نمی‌کنند (۲۵). با توجه به اینکه نیاز به داربستی مناسب برای رشد سلول‌های RPE احساس می‌شود، یافتن شرایط بهینه برای بستر مورد استفاده پس از انجام آزمایش‌ها چالشی کلیدی است. بنابراین پس از طراحی آزمایش‌ها و یافتن قطر کمینه نانوالیاف تولیدی، بهینه‌سازی شرایط با استفاده از سیستم فازی و روش پاسخ سطح صورت گرفت. با توجه به آن‌که دو پارامتر ولتاژ دستگاه و غلظت محلول اولیه بیشترین تاثیر را بر روی قطر نانوفیبرها دارند، این دو پارامتر به‌عنوان متغیر در آزمایش‌ها درنظر گرفته شدند (۲۶). سایر پارامترهای دستگاه ثابت بودند که مقادیر آن‌ها در جدول ۱ گزارش شده است: آزمایش‌های مربوطه با استفاده از نرم‌افزار Design Expert در قالب ۹ آزمایش طراحی‌شدند. پس از انجام تمامی آزمایش‌ها، عکس‌های مربوط به هر نمونه توسط میکروسکوپ الکترونی روبشی Scanning Electron Microscope (SEM) گرفته و با استفاده از نرم‌افزار ImageJ قطرهای نانوفیبرهای تولیدی مشخص شد (۲۷). از آنجایی که داربست‌های با قطر کمتر برای کشت سلول مناسب هستند، ملاک برای تعیین داربست بهینه با استفاده از منطق فازی، کم‌بودن قطر داربست در نظر گرفته شد.

مدل‌سازی فازی

در این مقاله با استفاده از ANFIS به مدل‌سازی رابطه میان متغیرهای ولتاژ دستگاه و غلظت محلول اولیه به عنوان ورودی مدل و قطر محلول به عنوان خروجی مدل پرداخته شد. ساختار ANFIS را مشابه با شکل (۱) می توان به صورت یک شبکه پنج لایه تطبیق‌پذیر در نظر گرفت: برای سادگی فرض می‌کنیم که سیستم فازی ۲ ورودی و یک خروجی داشته باشد و پایگاه قواعد آن دارای ۲ قاعده فازی به صورت زیر باشد که در آن خروجی هر قاعده یک تابع قطعی از ترکیب خطی ورودی‌ها است و مقدم قواعد بر اساس مجموعه‌های فازی و متغیرهای زبانی برای هر یک از متغیرها بیان می‌شود:

$$Rule\ 1: If\ x\ is\ A_1\ and\ y\ is\ B_1\ then\ f_1$$
$$= p_1x + q_1y$$
$$+ r_1 Rule\ 2: If\ x\ is\ A_2\ and\ y\ is\ B_2\ then\ f_2$$
$$= p_2x + q_2y + r_2$$

با استفاده از الگوریتم یادگیری تلفیقی ابتدا پارامترهای خطی که همان پارامترهای تالی قواعد هستند را با استفاده از تخمین حداقل مربعات خطا تعیین کرده و سپس بعد از محاسبه خطا با پس انتشار خطا بر اساس الگوریتم گرادیان کاهشی، پارامترهای توابع عضویت لایه‌های داخلی شبکه که همان پارامترهای مقدم قواعد هستند تخمین زده می‌شوند.

مدل‌سازی پاسخ سطح با استفاده از نرم‌افزار Design Expert

پس از واردکردن اطلاعات به‌دست آمده در نرم‌افزار مربوطه، تصویر سه بعدی مربوط به داده‌ها، رابطه تئوری ارائه شده توسط نرم‌افزار و شرایط بهینه برای هر دو حلال پیش‌بینی شد.

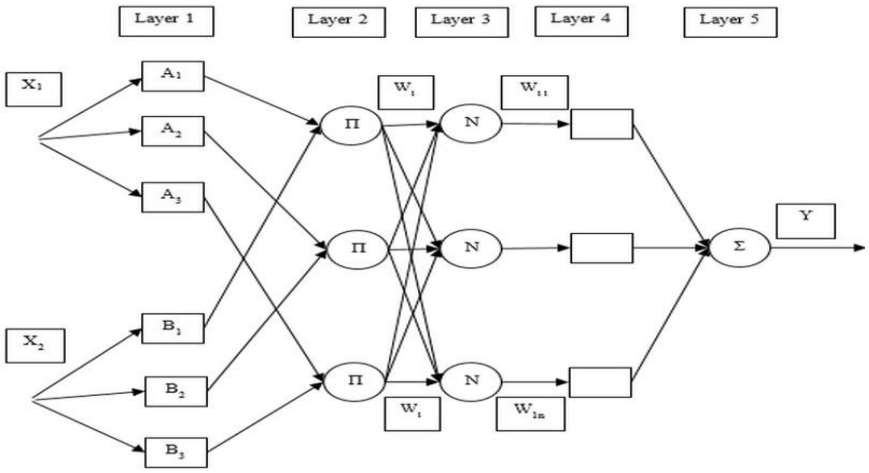
تعیین مدل فازی قطر داربست بر اساس ولتاژ و غلظت محلول

برای تعیین مدل فازی قطر داربست براساس غلظت محلول و ولتاژ بایستی کل فضای تغییرات توام این دو متغیر به صورت داده‌های ورودی تعیین گردد. به این منظور بازه تغییرات این دو متغیر به‌ترتیب به صورت [۰/۱۵- ۰/۰۵] گرم PCL بر میلی‌لیتر حلال و [۲۰- ۱۰] کیلوولت در نظر گرفته شد. در نهایت از طریق دو روش فازی و پاسخ سطح، رابطه بین دو پارامتر متغیر انتخابی و قطر نانوالیاف به دست آمد و R-squared هر دو حاصل شد. مطابق با شکل ۲، روش فازی دارای R-square یک است که نتیجه قابل قبولی می‌باشد و

[Downloaded from jssu.ssu.ac.ir on 2026-11-21]

[DOI: 10.18502/ssu.v29i9.7911]

داربست بهینه برای ادامه فرآیند آزمایشگاهی با استفاده از این روش به دست آمد. شرایط بهینه که براساس کمینه قطر نانوالیاف تولیدی به دست آمد، در جدول ۲ مشاهده می‌شود.



شکل ۱: ساختار شبکه‌های ANFIS (لایه اول: فازی ساز، لایه دوم: لایه ضرب (محاسبه t-norm)، لایه سوم: لایه هنجارسازی،لایه چهارم لایه نافازی ساز، لایه پنجم: لایه محاسبه خروجی نهایی

جدول ۱: مقدار پارامترهای ثابت در ساخت داربست به روش الکتروریسی

دبی محلول خروجی از سرنگ (میلی‌لیتر محلول بر ساعت)	فاصله سر سوزن تا صفحه جمع‌کننده (سانتی‌متر)	دور درام (دور بر دقیقه)	دمای محلول (درجه سلسیوس)
۰/۷	۱۲	۷۰۰	۲۷

جدول ۲: شرایط بهینه ساخت داربست بر اساس روش فازی

ولتاژ (کیلوولت)	غلظت جرمی حجمی (گرم PCL بر میلی‌لیتر حلال)	قطر الیاف (نانومتر)
۱۸/۱	۰/۰۷	۱۱۵

ضخامت و تخلخل داربست بهینه ۱±۱۴ میکرومتر و ۸۴٪ به دست آمد.

[Downloaded from jssu.ssu.ac.ir on 2026-11-21]

[DOI: 10.18502/ssu.v29i9.7911]



شکل ۲: نمودار مقادیر پیش‌بینی شده بر حسب مقادیر آزمایشگاهی فرآیند الکتروریسی.

الف) روش پاسخ سطح و ب) روش فازی. روش فازی از دقت بالاتری برخوردار است و از شرایط بهینه حاصل از این روش برای ادامه آزمایش‌ها استفاده شد.

اصلاح سطح و بهینه‌سازی

از آنجایی که PCL یک پلیمر آب‌گریز است، برای بهبود چسبندگی سلولی و تکثیر آن‌ها نیاز به ویژگی آب‌دوستی است. هیدرولیز قلیایی یکی از راه‌های اصلاح سطح می‌باشد که در آن، پیوندهای استری هیدرولیز شده و گروه‌های کربوکسیلیک آب-دوست ایجاد می‌شود. به همین منظور، سدیم‌هیدروکسید در آب مقطر حل شد و محلول قلیایی به دست آمد. از آنجایی اصلاح سطح با استفاده از محلول قلیایی متاثر از پارامترهای مختلفی است، برای یافتن شرایط بهینه مربوط به دو پارامتر غلظت محلول قلیایی (با گستره غلظت بین ۲ تا ۷ مولار) و زمان در معرض قرار گرفتن داربست در محلول (بین ۴۰ تا ۱۶۰ دقیقه)، تعدادی آزمایش توسط RSM طراحی شد. در پایان داربست‌های بهینه شده برای رسیدن به pH هفت سه بار با آب مقطر شستشو داده شدند (۲۸). به منظور سنجش تاثیر اصلاح سطح، زاویه تماس آب با سطح داربست اندازه‌گیری شد. بدین ترتیب که قطره آب دیونیزه به حجم ۴ میکرولیتر بر روی سطح داربست اصلاح سطح شده چکانده شد و با دوربین مخصوص از سطح تماس آب و سطح تصویری ثبت و زاویه تماس محاسبه شد (۱۹).

اندازه‌گیری ضخامت، تخلخل و قطر داربست

برای اندازه‌گیری قطر و ضخامت داربست میکروسکوپ الکترونی روبشی (SEM) و نرم‌افزار Image J به کار گرفته شدند (۲۹). حجم داربست با استفاده از قطر و ضخامت محاسبه شد. ابتدا وزن داربست توسط ترازوی دیجیتالی تعیین گردید. سپس دانسیته (ρ_b) داربست از تقسیم جرم بر حجم آن به دست آمد. نهایتاً تخلخل با داشتن دانسیته PCL (ρ_p=1.145 g/cm^3) از رابطه زیر حاصل شد:

$$\varepsilon = 1 - \frac{\rho_b}{\rho_p} \quad (5)$$

میزان جذب آب

درصد جذب آب توسط داربست‌های ۱×۱ سانتی‌متر مربع با توجه به رابطه $\frac{w_2 - w_1}{w_1} \times 100$ که در آن w_1 و w_2 به ترتیب وزن داربست خشک و وزن داربست غوطه‌ور در Phosphate-(PBS) buffered saline است، به دست آمد (۳۰).

نرخ تخریب‌پذیری

میزان تخریب‌پذیری با غوطه‌ور ساختن داربست در محلول لیزوزیم و PBS (۱ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر)، نگهداری آن در انکوباتور در دمای ۳۷ درجه سلسیوس و اندازه‌گیری وزن خشک داربست در روزهای ۱، ۴، ۷، ۱۴، ۲۱ و ۲۸ به دست آمد (۳۱). ابتدا وزن داربست در روز صفر (قبل از قرارگیری در محلول) اندازه‌گیری شد (m_0). سپس در روزهای مشخص شده داربست‌ها ازمحلول خارج، سه بار با آب مقطر شستشو، خشک و توزین شدند (m_f). بنابراین میزان تخریب‌پذیری از تقسیم اختلاف وزن ثانویه و اولیه ($m_f - m_0$) بر وزن اولیه به دست آمد (۳۲).

سنجش زیست‌سازگاری داربست

در این پژوهش از سلول‌های بنیادی جنین انسانی که در مطالعه قبلی به سلول‌های شبکیه چشم تمایز یافته بودند، استفاده شد ZAHABI 2011. به منظور یافتن میزان زنده‌مانی سلول و تکثیر آن‌ها بر روی دو گروه داربست (داربست بدون اصلاح سطح Un-treated PCL (UPCL) و داربست با اصلاح

[Downloaded from jssu.ssu.ac.ir on 2026-11-21]

[DOI: 10.18502/ssu.v29i9.7911]

سطح هیدرولیز (Hydrolyzed PCL (HPCL)، ابتدا سلول‌های RPE تمایزیافته استریلیزه با دانسیته 5×10^4 سلول بر میلی‌لیتر قرار گرفت و ۲۰۰ میکرولیتر محیط تازه به آن افزوده شد. پس از زمان مشخص انکوباسیون، محیط کشت خارج شد و ۲۰۰ میکرولیتر MTT اضافه شد و به مدت ۳ تا ۴ ساعت درون انکوباتور قرار گرفت و به دلیل مصرف MTT توسط سلول‌های زنده، کریستال‌های بنفش فورمازان تشکیل شدند. سپس به هر داربست ۲۰۰ میکرولیتر محلول DMSO افزوده و بر روی شیکر در انکوباتور به مدت ۲۰ دقیقه قرار داده شد تا کریستال‌های فورمازان حل شوند و رسوب سلولی ته‌نشین شود. از هر چاهک ۱۰۰ میکرولیتر محلول در پلیت ۹۶ تایی ریخته و با استفاده از دستگاه الایزا، میزان جذب هر چاهک در طول موج ۵۷۰ نانومتر خوانده شد. این روند با سه بار تکرار و در روزهای اول، چهارم و هفتم انجام گرفت و میزان جذب هر چاهک قرائت گردید (۳۳).

میکروسکوپ الکترونی روبشی

برای تعیین مورفولوژی سلول روی داربست‌های مختلف پس از ۶۳ روز، محیط‌کشت خارج شد و داربست در ۲/۵ درصد گلوتارآلدهید به مدت دو ساعت قرار داده شد. سپس، گروه‌های مختلف داربست در سری محلول اتانول دهیدراته شده و در هوای محیط خشک شدند. در نهایت، داربست‌ها با طلا پوشش داده شده و در دستگاه SEM قرار گرفتند (۳۴).

ایمونوسیتوشیمی

پس از تهیه محلول‌های پارافرمالدهید ۸ درصد، محلول ۱ درصد از Triton X-۱۰۰ در بافر PBS (PBST) ۱ درصد: محلول A)، محلول ۱درصد BSA در ۱ درصد PBST (محلول B) و محلول ۱ درصد BSA در PBS آزمون ایمونوسیتوشیمی به روش زیر انجام گرفت. در ابتدا سلول‌ها از روی بسترها جدا شده و با استفاده از دستگاه Cell spin بر روی لامل قرار داده شدند. در ادامه، لامل‌ها در پلیت ۲۴ خانه قرار گرفتند و به هر چاهک ۵۰۰ میکرولیتر پارافرمالدهید ۴ درصد اضافه شد و به مدت ۵ دقیقه در دمای اتاق انکوبه شد. سپس پارافرمالدهید ۴ درصد خارج و پلیت خشک شد. پس از آن سلول‌ها دوبار با محلول PBS شستشو داده شدند. با هدف نفوذپذیری سلول‌ها، محلول A به مقدار ۳۰۰ میکرولیتر به پلیت اضافه شد و ۱۵ دقیقه در دمای اتاق نگهداری شد. پس از شستشوی سلول‌ها با PBS، محلول B به مقدار ۵۰۰ میکرولیتر به ئلیت اضافه شد و به مدت ۲۰ دقیقه در دمای اتاق نگهداری شد. سپس محلول خارج و سلول‌ها با PBS دو مرتبه شسته شدند. ۵۰۰ میکرولیتر آنتی‌بادی اولیه اضافه شد و به مدت یک شب در دمای ۴ درجه سلسیوس نگهداری شد. سپس محلول رویی تخلیه شد و سه بار با PBS شستشو داده شد. آنتی‌بادی ثانویه مشابه آنتی‌بادی اولیه تهیه گردید. با این تفاوت که از PBS/BSA یک درصد برا رقیق‌سازی استفاده شد. ۵۰۰ میکرولیتر آنتی‌بادی ثانویه اضافه گردید و در تاریکی و در دمای اتاق به مدت ۴۵ دقیقه قرار داده شد. در ادامه، آنتی‌بادی ثانویه خارج شد و محیط سلول‌ها سه مرتبه با PBS شستشو داده شدند. برای رنگ‌آمیزی هسته سلول‌ها در هر چاهک ۱۰ میکرولیتر محلول رنگ DAPI با غلظت ۲ میکروگرم بر میلی‌لیتر اضافه شد و ۱۰ دقیقه در دمای اتاق در تاریکی نگهداری شد. در پایان لامل‌های آماده‌شده زیر میکروسکوپ فلورسنت مشاهده شدند (۲۱).

تجزیه و تحلیل آماری

در این پژوهش، داده‌ها به صورت میانگین ± میانگین خطای استاندارد گزارش شده‌اند. همه آزمایش‌ها با سه بار تکرار صورت گرفته است. تحلیل‌های آماری داده‌های با استفاده از version 16 SPSS و تست Tukey انجام گرفت. مقدار P-Value کمتر از ۰/۰۵ به دست آمد.

ملاحظات اخلاقی

پروپوزال این تحقیق توسط دانشگاه علوم‌پزشکی شهید صدوقی یزد تایید شده است (کد اخلاق IR.SSU.MEDICINE.REC.1399.094)

نتایج

اصلاح سطح و بهینه‌سازی

پس از اصلاح سطح به روش هیدرولیز قلیایی مطابق با شرایط آزمایش‌های طراحی شده و اندازه‌گیری زاویه تماس مربوط به هر آزمایش، زمان قرارگیری داربست در محلول قلیایی و غلظت محلول قلیایی بر اساس حداقل زاویه تماس

[Downloaded from jssu.ssu.ac.ir on 2026-11-21]

[DOI: 10.18502/ssu.v29i9.7911]

بهینه شد که مقدار آن به ترتیب ۹۷ دقیقه و ۳/۷ مولار به‌دست آمد. زاویه تماس مربوط به دو گروه داربست (داربست بدون اصلاح سطح و داربست هیدرولیز شده در شرایط بهینه) با سه بار تکرار اندازه‌گیری شد (جدول ۳). همانطور که مشاهده می‌شود، هیدرولیز قلیایی منجر به کاهش چشمگیر زاویه تماس در مقایسه با داربست‌های UPCL شده است. به عبارت دیگر تغییر گروه‌های عاملی در فرآیند هیدرولیز، سبب آب‌دوستی و پخش شدن قطره آب بر روی سطح داربست می‌شود که تاثیر مطلوبی بر کشت و تکثیر سلول دارد.

جدول ۳: زاویه تماس آب برای دو گروه داربست (هیدرولیز داربست در شرایط بهینه صورت گرفته است)

گروه داربست	زاویه تماس تکرار اول	زاویه تماس تکرار دوم	زاویه تماس تکرار سوم
UPCL	۱۲۱	۱۱۷	۱۱۸
HPCL	۱۳	۱۴	۱۱

میزان جذب آب

مقدار آب جذب شده در دوگروه داربست در شکل ۳ آمده است. همانطور که مشاهده می‌شود، HPCL میزان جذب آب بالاتری دارد. به بیان دیگر اصلاح سطح منجر به افزایش قابلیت داربست در به دام انداختن آب می‌شود که نشان‌دهنده آب‌دوستی بالاتر نسبت به گروه UPCL است.

زیست‌تخریب‌پذیری

شکل ۴ نشان می‌دهد که اصلاح سطح داربست، وزن داربست را کاهش می‌دهد. هم‌چنین، نرخ تخریب داربست HPCL نسبت به داربست UPCL در مدت زمان ۲۸ روز افزایش بیشتری دارد.

ویژگی‌های نانولوله‌ها

مطابق با شکل ۵ مربوط به تصاویر SEM دو گروه داربست، ساختار رشته‌ها منظم است و بید مشاهده نمی‌شود. هم‌چنین، شکل ۵ (ب) نشان می‌دهد که اصلاح سطح داربست منجر به کاهش قطر نانوالیاف می‌شود که تاثیر مطلوبی بر رشد و تکثیر سلول دارد.

زیست‌سازگاری

به منظور بررسی میزان زنده‌مانی و تکثیر سلول‌ها بر روی داربست از آنالیز MTT استفاده شد. همانگونه که در شکل ۶ مشاهده می‌شود، رشد و تکثیر سلول‌ها در هر سه گروه (بر روی سطح پلیت، UPCL و HPCL) با گذشت زمان افزایش می‌یابد. سطح پلیت دارای کمترین میزان رشد سلولی است و UPCL میزان جذب نوری بین دو گروه TCP و HPCL دارد. اصلاح سطح داربست پلیمری تاثیر مستقیم و قابل‌توجهی بر رشد و تکثیر سلول‌های RPE دارد به طوری که میزان جذب نوری آن از دو گروه دیگر بالاتر است.

مورفولوژی سلول RPE بر روی داربست

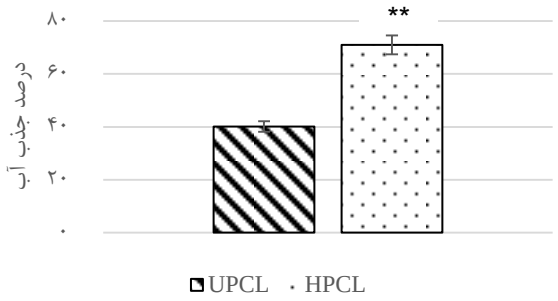
پس از گذشت ۶۳ روز از کشت سلول‌ها بر روی داربست مورفولوژی و چسبندگی سلول بر روی داربست‌ها مشاهده شد (شکل ۷). تنها بر روی گروه HPCL سلول وجود داشت (شکل ۷ الف) و سلولی بر روی UPCL مشاهده نشد. ساختار شش وجهی (شکل ۷ ب) و میکروویلی مربوط به سلول‌های RPE (شکل ۷ ج که با پیکان نشان داده شده‌اند) در تصاویر حاصل از SEM مشاهده می‌شود.

آنالیز ایمونوسیتوشیمی

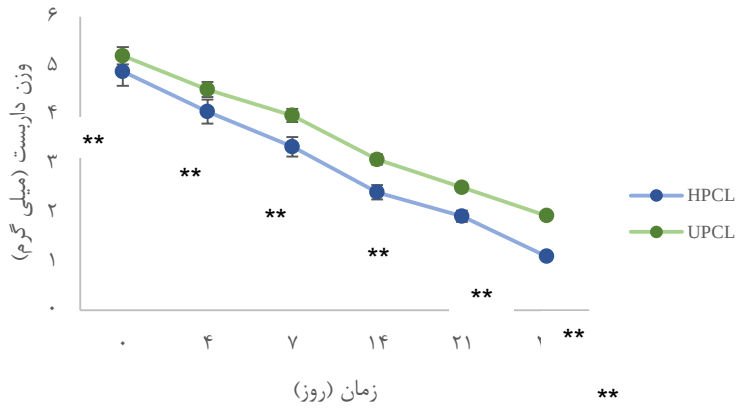
به منظور اثبات هویت سلول‌های اپیتلیوم رنگدانه شبکیه بر روی بستر گروه HPCL، بیان پروتئین‌های RPE۶۵ و سیتوکراتین ۸/۱۸ که به ترتیب مارکرهای اختصاصی سلول‌های RPE و اپیلتیومی هستند، مورد بررسی قرار گرفت. از آنجایی که پروتئین‌های RPE۶۵ در داخل وزیکول‌های درون سلولی و به صورت پراکنده در سیتوپلاسم وجود دارند، پس از انجام ICC این مارکر به صورت میکروزومال در داخل سیتوپلاسم مشاهده شدند. هم‌چنین، سیتوکراتین ۸/۱۸ به عنوان فیلامنت حد واسط در مل سیتوپلاسم به صورت رشته‌های طویل دیده شدند (شکل ۸).

[Downloaded from jssu.ssu.ac.ir on 2026-11-21]

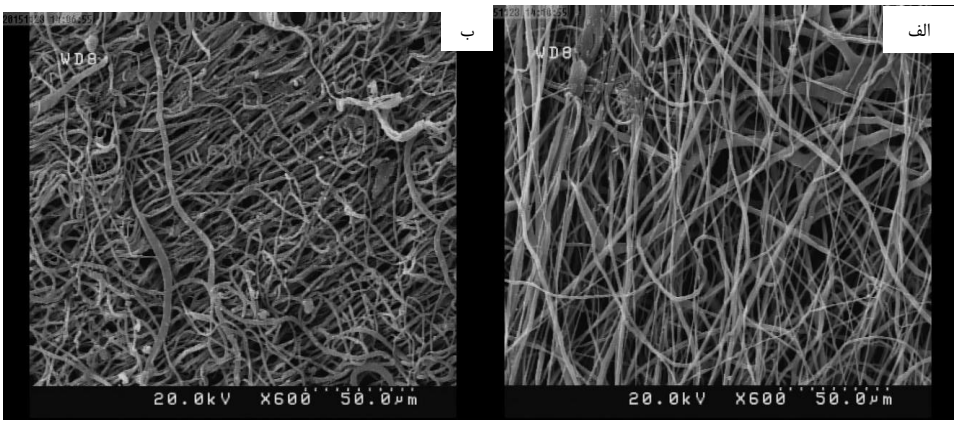
[DOI: 10.18502/ssu.v29i9.7911]



شکل ۳: درصد جذب آب توسط دو گروه داربست. اصلاح سطح داربست، افزایش ترشوندگی و آب‌دوستی آن را در پی دارد که موجب افزایش قدرت جذب آب توسط داربست می‌شود. تفاوت معنادار (**) بین دو گروه دیده می‌شود ($P <$۰/۰۰۱) .



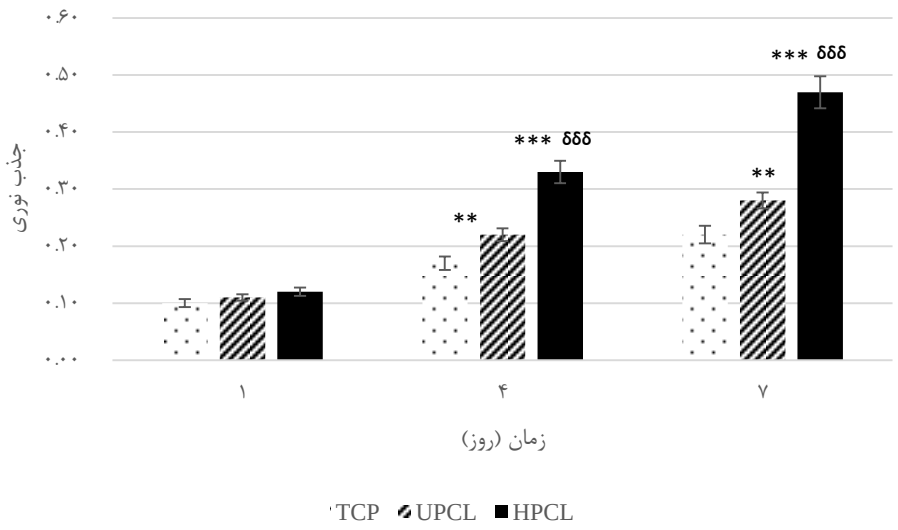
شکل ۴: نرخ زیست‌تخریب‌پذیری گروه‌های مختلف داربست. وزن داربست در طول ۲۸ روز کاهش یافته است. اصلاح سطح داربست، باعث افزایش سرعت زیست-تخریب‌پذیری می‌شود. تفاوت بین UPCL و HPCL در $P<$۰/۰۱ (**) معنادار است.



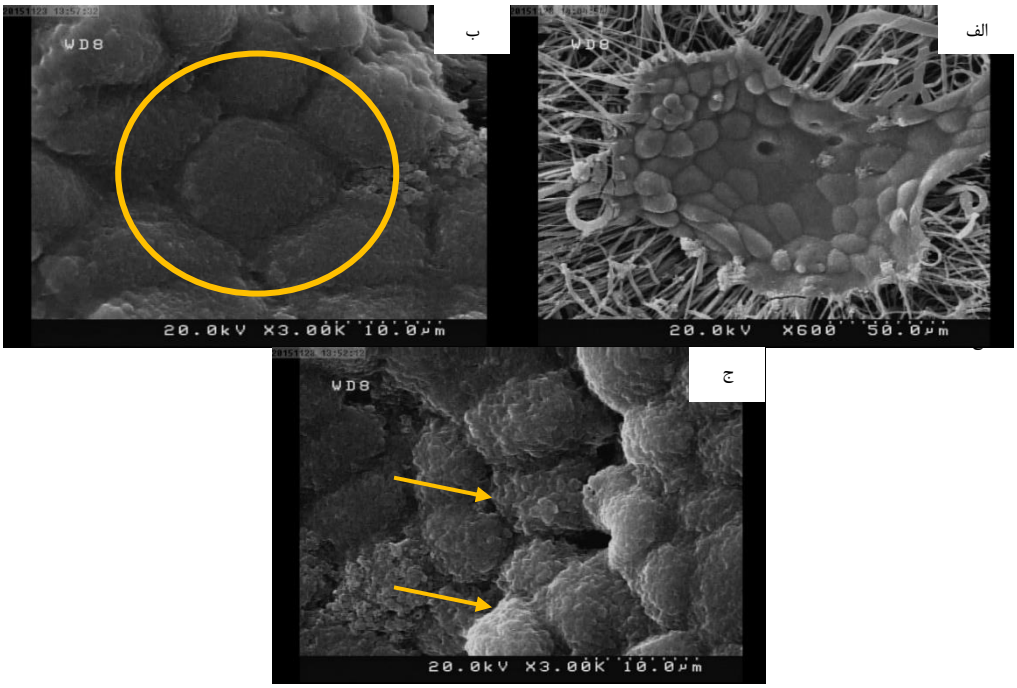
شکل ۵: تصاویر میکروسکوپ الکترونی روبشی الف) UPCL، ب) HPCL. در هیچ یک از گروه‌ها ساختار بید مشاهده نمی‌شود. اصلاح سطح منجر به کاهش قطر رشته‌ها می‌شود.

[Downloaded from jssu.ssu.ac.ir on 2026-11-21]

[DOI: 10.18502/ssu.v29i9.7911]



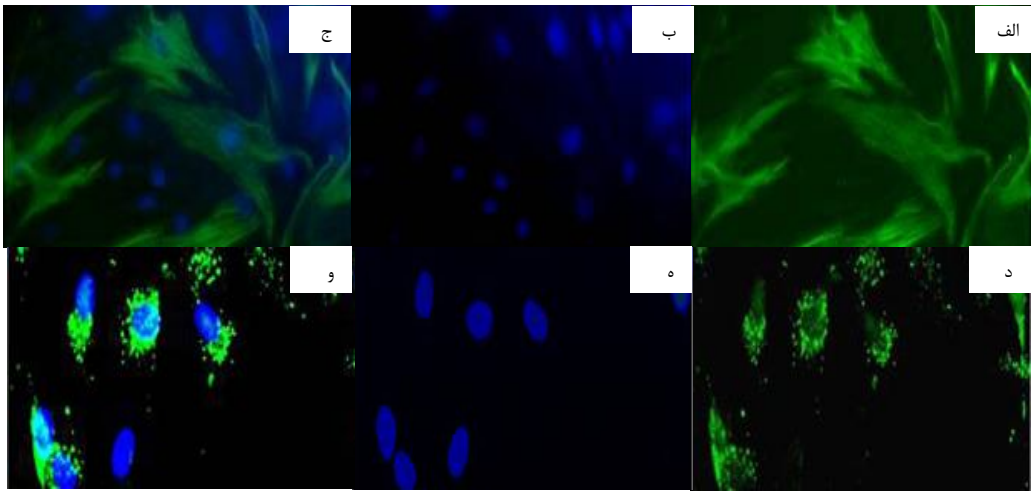
شکل ۶: آنالیز MTT داربست‌ها در زمان هفت روز. با گذشت زمان رشد و تکثیر سلولی در هر سه گروه افزایش می‌یابد. اصلاح سطح داربست تاثیر چشمگیری در زنده‌مانی و تکثیر سلولی دارد. تفاوت بین TCP و سایر گروه‌ها در $P<۰/۰۱$ (**) و $P<۰/۰۰۱$ (***) و هم‌چنین تفاوت بین UPCL و سایر گروه‌ها در $P<۰/۰۰۱$ ($\delta\delta\delta$) معنادار هستند.



شکل ۷: الف) مورفولوژی سلولی بر روی داربست HPCL، ب) ساختار شش وجهی سلول‌های RPE قابل مشاهده هستند و ج) میکروویلی روی سطح سلول‌های RPE بر روی داربست HPCL با پیکان مشخص شده‌اند.

[Downloaded from jssu.ssu.ac.ir on 2026-11-21]

[DOI: 10.18502/ssu.v29i9.7911]



شکل ۸: میکروسکوپ فلورسنس بیان پروتئین‌های سیتوکراتین ۸/۱۸ (الف - ج) و RPE۶۵ (د - و) توسط سلول‌های RPE موجود بر روی بستر گروه HPCL که توسط FITC (الف و د) و DAPI (ب و ه) رنگ‌آمیزی شده اند. تصاویر ادغام‌شده (الف) و (ب) در (ج) و (د) و (ه) در (و) دیده می‌شود.

بحث

پس از بهینه‌سازی داربست‌ها با استفاده از متغیرهای اثرگذار در ساخت داربست به روش الکتروریسی، قطر بهینه برای داربست ۱۱۵ نانومتر به دست آمد که در مقایسه با سایر مطالعات برای رشد سلول، مناسب است. ژانگ و همکاران از سه داربست PCL، PCL/Silk fibroin و PCL/Silk fibroin/gelatin برای کشت سلول‌های RPE استفاده کردند که به ترتیب دارای اندازه قطرهای ۱۵۷، ۱۵۴ و ۲۵۳ نانومتر بودند (۲۰). در مطالعه پارک و همکاران، میانگین قطر برای نانو رشته‌ها ۲ میکرومتر به دست آمد که برای درمان AMD مقدار بزرگی بود (۳۵) علاوه براین، تخلخل داربست با سایر داربست‌های مطالعات انجام شده، مقایسه گردید. مک‌هوگ و همکاران از پلی‌استر و PCL با تخلخل ۶۴ درصد و ۹۰ درصد به عنوان داربست استفاده کردند. آن‌ها دریافتند که داربست با تخلخل بالاتر تاثیر بیشتری در تکثیر سلولی و تعداد سلول پس از گذشت ۸ هفته از کشت سلول بر روی داربست دارد (۳۶). هم‌چنین، در بررسی که توسط ژانگ و همکاران انجام گرفت، تخلخل برای داربست‌های PCL، PCL/Silk fibroin و PCL/Silk fibroin/gelatin به ترتیب ۸۵، ۸۷ و ۹۰ درصد گزارش شد. به منظور ایجاد چسبندگی سلولی مناسب، زاویه تماس داربست PCL محاسبه و به کمک اصلاح سطح کاهش یافت. داربست PCL بدون اصلاح سطح زاویه تماس حدود ۱۱۸ درجه داشت که آب‌گریزی بالای آن را نشان می‌دهد (۲۰). عبدالوفا و همکاران تاثیر افزایش آب‌دوستی داربست پس از اصلاح‌سطح را با افزایش میزان به دام انداختن آب و به دنبال آن افزایش وزن داربست را در پژوهش خود نشان دادند (۳۷). بنابراین پس از یافتن شرایط بهینه روش هیدرولیزقلیایی برای رسیدن به حداقل زاویه تماس، سطح داربست‌ها اصلاح شد و زاویه تماس به حدود ۱۲ درجه رسید. گو و همکاران در بررسی خود که بر روی تاثیر اصلاح سطح هیدرولیز قلیایی بر روی داربست پلی ال-لالکتیک اسید انجام دادند، به نتیجه مشابه با این پژوهش دست یافتند. به طوری که میزان جذب آب توسط داربست اصلاح شده تفاوت قابل توجهی با داربست بدون اصلاح سطح داشت که حاکی از افزایش میزان آب‌دوستی آن‌هاست (۳۸). در این پژوهش نتایج نشان داد که اصلاح‌سطح باعث افزایش زیست‌تخریب‌پذیری داربست می‌شود. این یافته توسط سنت و همکاران در پژوهشی دیگر به تایید رسید. آن‌ها نشان دادند که اصلاح سطح داربست ترکیبی پلی‌گلیسرول سباسات: پلی‌کاپرولاکتون

[Downloaded from jssu.ssu.ac.ir on 2026-11-21]

[DOI: 10.18502/ssu.v29i9.7911]

(به نسبت دو به یک) به روش هیدرولیز قلیایی در محلول ۰/۱ میلی‌مولار دو برابر نرخ تخریب زیستی بالاتری نسبت به داربست بدون اصلاح سطح دارد (۳۹). با مقایسه مورفولوژی داربست قبل و بعد از اصلاح‌سطح مشخص شد که هیدرولیزقلیایی سبب کاهش قطر الیاف می‌شود که این امر در کشت سلولی موثر است. گایو و همکاران نیز نشان دادند که اصلاح‌سطح داربست پلی گلایکولیک اسید در محلول یک نرمال سدیم هیدروکسید، منجر به کاهش قطر الیاف داربست می‌شود. به‌طوری‌که یک رابطه خطی بین افزایش زمان هیدرولیز و کاهش قطر داربست وجود دارد (۴۰). پارک و همکاران با غوطه‌ور ساختن داربست PCL در محلول قلیایی سدیم هیدروکسید یک نرمال، به دنبال بررسی تاثیر اصلاح سطح داربست بر روی رشد سلول‌های استئوبلاست بودند. پس از گذشت زمان ۲۸ روز، نتایج حاصل از MTT نشان داد که اصلاح سطح داربست به روش هیدرولیز قلیایی تاثیر مطلوبی بر روی رشد سلول‌ها به دلیل افزایش آب‌دوستی و خاصیت ترشوندگی داشته است (۳۵). در مطالعه‌ای که در سال ۲۰۲۰ توسط لین و همکاران انجام گرفت، داربستی از جنس پلی‌دی‌متیل سیلوکسان برای کشت سلول‌های بنیادی پرتوانی تمایزیافته به سلول‌های رنگدانه شبکیه چشم تهیه شد. ارزیابی بیان ژن‌ها نشان داد که سلول‌های RPE رشد یافته بر روی بستر پلیمری مارکرهای ویژه RPE از جمله ZO-1 و PEDF را ازخود نشان دادند (۱۶). هم‌چنین، آزمون ایمونوسیتوشیمی برای سلول‌های RPE کشت داده شده بر روی داربست ترکیبی PCL و کیتوسان بیان مارکرهای RPE۶۵ و ZO-1 را نشان داد (۴۱). هم‌چنین رشد و کثیر سلول‌های hESC-RPE بر روی بستر پلیمری متخلخل پلی‌بوتیلن سوکسینات توسط کالجو و همکاران مورد بررسی قرار گرفت. این بسترها قابلیت جذب پروتئین و حفاظت از چسبندگی سلولی را داشتند که این ویژگی‌ها، آن‌ها را برای کشت سلول‌های مورد نظر مطلوب کرده است (۴۲). پس از بررسی سایر پژوهش‌های مشابه انجام شده، رشد سلول‌ها پس از ۶۳ روز بر روی HPCL بسیار مناسب بود در حالیکه سلولی بر روی داربست UPCL مشاهده نشد. این یافته، نشان‌دهنده برتری گروه HPCL بر UPCL از جهت مطلوب بودن برای زمان طولانی‌تر رشد سلول‌ها می‌باشد. به خصوص که نتایج ICC نیز بیان پروتئین‌های RPE ۶۵ و سیتوکراتین ۸/۱۸ که به ترتیب مارکرهای اختصاصی سلول‌های RPE و سلول‌های اپیتلیومی هستند، را تایید کرد.

نتیجه‌گیری

در این تحقیق، ابتدا با مقایسه دو روش فازی و پاسخ سطح، داربست بهینه با حداقل سطح الیاف تهیه شد. سپس با توجه به اینکه PCL طبیعتی آب گریز دارد، سطح آن به روش هیدرولیز قلیایی اصلاح شد و برای رسیدن به حداقل زاویه تماس بهینه گردید. آنالیزهای مختلف بر روی دو داربست UPCL و HPCL انجام گرفت. نتایج MTT حاکی از عدم سمیت داربست‌ها و رشد و تکثیر سلول‌ها به‌خصوص بر روی HPCL بود. در پایان سلول‌های RPE بر روی هر دو داربست کشت داده شدند. نتایج نشان داد که اصلاح سطح تاثیر مطلوبی بر روی رشد و تکثیر سلول‌ها دارد. در ادامه می‌توان با تغییر حلال، ترکیب PCL با سایر پلیمرها به منظور بهبود خواص برای کشت سلول، به کارگیری سایر روش‌های مختلف اصلاح‌سطح و هم‌چنین استفاده از دیگر روش‌های ساخت داربست و به کارگیری مطالعات In vivo تلاشی در جهت نتایج بهتر برای درمان این بیماری انجام داد.

حامی مالی: ندارد.

تعارض در منافع: وجود ندارد.

[Downloaded from jssu.ssu.ac.ir on 2026-11-21]

[DOI: 10.18502/ssu.v29i9.7911]

References:

1- Martin Df, Maguire Mg, Ying Gs, Grunwald Je, Fine Sl, Jaffe Gj. ***Ranibizumab and Bevacizumab for Neovascular Age-Related Macular Degeneration***. N Engl J Med 2011; 364(20): 1897-1908.

*2-*Thomas Bb, Zhu D, Zhang L, Thomas Pb, Hu Y, Nazari H, et al. ***Survival and Functionality of Hesc-Derived Retinal Pigment Epithelium Cells Cultured as a Monolayer on Polymer Substrates Transplanted in Rcs Rats***. Invest Ophthalmol Vis Sci 2016; 57(6): 2877-87.

*3-*Sorkio A, Porter Pj, Juuti-Uusitalo K, Meenan Bj, Skottman H, Burke Ga. ***Surface Modified Biodegradable Electrospun Membranes as a Carrier for Human Embryonic Stem Cell-Derived Retinal Pigment Epithelial Cells***. Tissue Eng - Part A 2015; 21(17-18): 2301-14.

*4-*Pennington Bo, Clegg Do. ***Pluripotent Stem Cell-Based Therapies in Combination with Substrate for the Treatment of Age-Related Macular Degeneration***. J Ocul Pharmacol Ther 2016; 32(5): 261-71.

*5-*Calejo Mt, Ilmarinen T, Jongprasitkul H, Skottman H, Kellomäki M. ***Honeycomb Porous Films as Permeable Scaffold Materials for Human Embryonic Stem Cell-Derived Retinal Pigment Epithelium***. J Biomed Mater Res - Part A 2016; 104(7): 1646-56.

*6-*Zadeh Ma, Khoder M, Al-Kinani Aa, Younes Hm, Alany Rg. ***Retinal Cell Regeneration Using Tissue Engineered Polymeric Scaffolds.*** Drug Discov Today 2019; 24(8): 1669-78.

*7-*Shahmoradi S, Yazdian F, Tabandeh F, Soheili Zs, Hatamian Zarami As, Navaei-Nigjeh M. ***Controlled Surface Morphology and Hydrophilicity of Polycaprolactone Toward Human Retinal Pigment Epithelium Cells***. Mater Sci Eng C 2017; 73: 300-9.

*8-*Ramakrishna S, Fujihara K, Teo We, Lim Tc, Ma Z. ***An Introduction to Electrospinning and Nanofibers.*** An Introduction to Electrospinning and Nanofibers 2005.

*9-*Carletti E, Motta A, Migliaresi C. ***Scaffolds for Tissue Engineering and 3d Cell Culture***. Methods Mol Biol (Clifton, N.J.) 2011; 695: 17-39.

*10-*Strauss O. ***The Retinal Pigment Epithelium in Visual Function***. Physiol Rev 2005; 85(3): 845-81.

*11-*Heller Jp, Martin Kr. ***Enhancing Rpe Cell-Based Therapy Outcomes for Amd: The Role of Bruch's Membrane.*** Transl Vis Sci Technol 2014; 3(3): 11.

*12-*Jemni-Damer N, Guedan-Duran A, Cichy J, Lozano-Picazo P, Gonzalez-Nieto D, Perez-Rigueiro J, et al. ***First Steps for the Development of Silk Fibroin-Based 3d Biohybrid Retina for Age-Related Macular Degeneration (Amd).*** J Neural Eng 2020; 17(5): 55003.

*13-*You Y, Min Bm, Lee Sj, Lee Ts, Park Wh. ***In Vitro Degradation Behavior of Electrospun Polyglycolide, Polylactide, And Poly(Lactide-Co-Glycolide).*** J Appl Polym Sci 2005; 95(2): 193-200..

*14-*Christiansen At, Tao Sl, Smith M, Wnek Ge, Prause Ju, Young Mj, et al. ***Subretinal Implantation of Electrospun, Short Nanowire, And Smooth Poly(E-Caprolactone) Scaffolds to the Subretinal Space of Porcine Eyes***. Stem Cells Int 2012; 1-8.

*15-*Ardan T, Zemanova L, Ellederova Z, Drutovič S,

[Downloaded from jssu.ssu.ac.ir on 2026-11-21]

[DOI: 10.18502/ssu.v29i9.7911]

Studenovská H, Popelka S, et al. ***Nanofibrous Membranes Reveal Better Properties for Culturing of Rpe Cells in Comparison with Commercial Scaffolds***. Acta Ophthalmol 2019.

16-Lin YY, Yang YP, Lai WY, Chien CS, Chen SJ, Hwang DK, et al**. *Development of Polydimethylsiloxane-Based Biomimetic Scaffolds with Cylinder Micropillars for Retinal Pigment Epithelial Cell Cultivation.*** J Chin Med Assoc 2020; 83(11): 1029-33.

17-Phelan Ma, Kruczek K, Wilson Jh, Brooks Mj, Drinnan Ct, Regent F, et al. ***Soy Protein Nanofiber Scaffolds for Uniform Maturation of Human Induced Pluripotent Stem Cell-Derived Retinal Pigment Epithelium***. Tissue Eng Part C Methods 2020; 26(8): 433-46.

18-De Luca Ac, Terenghi G, Downes S. ***Chemical Surface Modification of Poly-E-Caprolactone Improves Schwann Cell Proliferation For Peripheral Nerve Repair***. J Tissue Eng Regen Med 2014; 8(2): 153-63.

19-Kosorn W, Thavornyutikarn B, Janvikul W. ***Effects of Surface Treatments of Polycaprolactone Scaffolds on their Properties***. Advanced Materials Res 2013; 747: 178-81.

20-Xiang P, Wu Kc, Zhu Y, Xiang L, Li C, Chen Dl, et al. ***A Novel Bruch's Membrane-Mimetic Electrospun Substrate Scaffold for Human Retinal Pigment Epithelium Cells***. Biomaterials 2014; 35(37): 9777-88.

21-Rahmani S, Tabandeh F, Faghihi S, Amoabediny G, Shakibaie M, Noorani B, et al. ***Fabrication and Characterization of Poly (E-Caprolactone)/Gelatin Nanofibrous Scaffolds for Retinal Tissue Engineering***. Int J Polym Mater Polym Biomater 2018; 67(1): 27-35.

22-Jiang T, Carbone Ej, Lo Kwh, Laurencin Ct**. *Electrospinning of Polymer Nanofibers for Tissue Regeneration***. Progress in Polymer Science 2015; 46: 1-24.

23-Lu Q, Wang X, Lu S, Li M, Kaplan Dl, Zhu H**. *Nanofibrous Architecture of Silk Fibroin Scaffolds Prepared with a Mild Self-Assembly Process***. Biomaterials 2011; 32(4): 1059-67.

24-Zahabi A, Shahbazi E, Ahmadieh H, Hassani Sn, Totonchi M, Taei A, et al. ***A New Efficient Protocol for Directed Differentiation of Retinal Pigmented Epithelial Cells from Normal and Retinal Disease Induced Pluripotent Stem Cells.*** Stem Cells Dev 2012; 21(12): 2262-72..

25-Qin X, Wu D. ***Effect of Different Solvents on Poly(Caprolactone)(Pcl) Electrospun Nonwoven Membranes.*** J Therm Anal Calorim 2012; 107(3): 1007-13.

26-Beachley V, Wen X. ***Effect of Electrospinning Parameters on the Nanofiber Diameter and Length***. Mater Sci Eng C 2009; 29(3): 663-8.

27-Ko Ym, Choi Dy, Jung Sc, Kim Bh. ***Characteristics of Plasma Treated Electrospun Polycaprolactone (Pcl) Nanofiber Scaffold for Bone Tissue Engineering***. J Nanosci Nanotechnol. 2015; 15(1): 192-5.

28-Shahmoradi S, Yazdian F, Tabandeh F, Hatamian AS**. *Investigation and Optimization of Effective Parameters in Fabrication of Scaffolds with Electrospinning for Using in Retina***. Int J Anal

[Downloaded from jssu.ssu.ac.ir on 2026-11-21]

[DOI: 10.18502/ssu.v29i9.7911]

Pharm Biomed Sci 2015; 4(7): 114-20.

29-Díaz E, Sandonis I, Valle Mb. ***In Vitro Degradation of Poly (Caprolactone)/Nha Composites***. J Nanomater 2014; 2014: 185.

30-Qi H, Ye Z, Ren H, Chen N, Zeng Q, Wu X, et al. ***Bioactivity Assessment of Plla/Pcl/Hap Electrospun Nanofibrous Scaffolds for Bone Tissue Engineering***. Life Sci 2016; 148: 139-44.

31-Zhou Zh, He Sl, Huang Tl, Liu Lh, Liu Qq, Zhao Ym, et al***. Degradation Behaviour and Biological Properties of Gelatin/Hyaluronic Acid Composite Scaffolds***. Mater Res Innov 2013; 17(6): 420-4.

32-Cummins Ka, Lee Kl, Cooper Ja. ***Quantification of Entrapped Model Protein Released during Electrospun Nanofiber Degradation.*** In: 2015 41st Annual Northeast Biomedical Engineering Conference, Nebec 2015; 2015: 1-2.

33-Gautam S, Dinda Ak, Mishra Nc. ***Fabrication and Characterization of Pcl/Gelatin Composite Nanofibrous Scaffold for Tissue Engineering Applications by Electrospinning Method***. Mater Sci Eng C 2013; 33(3): 1228-35.

34-Thumann G, Viethen A, Gaebler A, Walter P, Kaempf S, Johnen S, et al. ***The in Vitro and in Vivo Behaviour of*** Retinal ***Pigment Epithelial Cells Cultured on Ultrathin Collagen Membranes***. Biomaterials 2009; 30(3): 287-94.

35-Park Js, Kim JM, Lee Sj, Lee Sg, Jeong YK, Kim Se, et al. ***Surface Hydrolysis of Fibrous Poly(E-Caprolactone) Scaffolds for Enhanced Osteoblast Adhesion and Proliferation***. Macromol Res 2007; 15(5): 424-9.

36-Mchugh Kj, Tao Sl, Saint-Geniez M. ***Porous Poly(E-Caprolactone) Scaffolds for Retinal Pigment Epithelium Transplantation***. Investig Ophthalmol Vis Sci 2014; 55(3): 1754-62.

37-Abedalwafa M, Wang F, Wang L, Li C. ***Biodegradable Poly-Epsilon-Caprolactone (Pcl) for Tissue Engineering Applications: A Review***. Rev Adv Mater Sci 2013; 34: 123-40.

38-Guo C, Cai N, Dong Y. ***Duplex Surface Modification of Porous Poly (Lactic Acid) Scaffold***. Mater Lett 2013; 94: 11-4.

39-Sant S, Iyer D, Gaharwar Ak, Patel A, Khademhosseini A. ***Effect of Biodegradation and De Novo Matrix Synthesis on the Mechanical Properties of Valvular Interstitial Cell-Seeded Polyglycerol Sebacate–Polycaprolactone Scaffolds.*** Acta Biomater 2013; 9(4): 5963-73.

40-Gao J, Niklason L, Langer R. ***Surface Hydrolysis of Poly(Glycolic Acid) Meshes Increases the Seeding Density of Vascular Smooth Muscle Cells***. J Biomed Mater Res 1998; 42(3): 417-24.

41-Heiduschka P, Zimmermann Ja, Plagemann T, Stafiej P, Himmler M, Fuchsluger Ta, et al. ***Cultivation and Characterisation of Primary Retinal Pigment Epithelium Cells on Nanofibre Scaffolds***. Invest Ophthalmol Vis Sci 2019; 60(9): 3937.

42-Calejo Mt, Haapala A, Skottman H, Kellomäki M. ***Porous Polybutylene Succinate Films Enabling Adhesion of Human Embryonic Stem Cell-Derived Retinal Pigment Epithelial Cells (Hesc-Rpe).*** Eur Polym J 2019; 118: 78-87.

[Downloaded from jssu.ssu.ac.ir on 2026-11-21]

[DOI: 10.18502/ssu.v29i9.7911]

Journal of Shahid Sadoughi University of Medical Sciences
Vol 29| NO 9 | Dec 2021

Received: 20 July 2020
Accepted: 11 Oct 2020

Investigation of Differentiated Embryonic Stem Cells Growth on Optimized Porous Polymeric Bed with Fuzzy System

Saleheh Shahmoradi[1], Fatemeh Yazdian[*1], Amin Janghorbani[2], Leila Satarian[3], Farnaz Behroozi[3], Fatemeh Tabandeh[4], Bibi Fatemeh Haghirosadat[5]

Original Article

Introduction: Age-related macular degeneration (AMD) is one of the retina diseases in which retinal pigment epithelium cells are degraded and lead to blindness. Available treatments only slow down the progression of it. In this study, human embryonic stem cells (hESCs) differentiated into retinal pigment epithelium cells were cultured on a polycaprolactone scaffold.

Methods: The optimization of the diameter of the produced scaffolds by electrospinning method was done using the fuzzy method for the first time. To improve cell adhesion and proliferation, related parameters to alkaline hydrolysis method were optimized and hydrophobic surface of scaffold was modified. After *in vitro* analysis, cells were cultured on different groups of scaffolds. In vivo analyses were done and cells culture on scaffolds observed.

Results: The optimal parameters for the scaffold based on the fuzzy model were 18.1 kV for voltage, 0.07 g / ml for solution concentration and 115 nm for scaffold diameter, respectively. The immersion time of the scaffold in alkaline solution and concentration of solution were measured 97 min and 3.7 M, respectively. The treated scaffold had a higher degradation rate and water adsorption. MTT-Assay results showed that scaffolds with modified surfaces had a higher amount of cell viability and proliferation after 7 days. SEM image results confirmed this finding after almost two months. Additionally, the results of ICC test showed that after passing this time, cells kept their RPE and epithelium.

Conclusion: Based on the results, the hydrolyzed scaffold is a suitable substrate for cell proliferation and can be a good option for AMD treatment.

Keywords: Age-Related Macular Degeneration, Polymers, Retinal Pigment Epithelium, Fuzzy Logic.

Citation: Shahmoradi S, Yazdian F, Janghorbani A, Satarian L, Behroozi F, Tabandeh F, Haghirosadat B.B.F. **Investigation of Differentiated Embryonic Stem Cells Growth on Optimized Porous Polymeric Bed with Fuzzy System.** J Shahid Sadoughi Uni Med Sci 2021; 29(9): 4106-22.

[1]Department of Life Science Engineering, Faculty of New Sciences and Technologies, University of Tehran, Tehran, Iran.
[2]Department of Biotechnology, Faculty of New Sciences and Technologies, Semnan University, Semnan, Iran.
[3]Department of Stem Cells and Developmental Biology, Cell Science Research Center, Royan Institute for Stem Cell Biology and Technology, ACECR, Tehran, Iran.
[4]Department of Industrial Biotechnology and Environment, National Research Institute of Genetic Engineering and Biotechnology, Tehran, Iran.
[5]Nanobiotechnology, Department of Nanobiotechnology, Shahid Sadoughi University of Medical Sciences, Yazd, Iran
***Corresponding Author: Tell:** 09128267686**, email:** yazdian@ut.ac.ir

[Downloaded from jssu.ssu.ac.ir on 2026-11-21]

[DOI: 10.18502/ssu.v29i9.7911]