



# ترمیم عصب سیاتیک آسیب دیده در مدل حیوانی موش صحرایی با استفاده از کانال‌های پلیمری ساخته شده با پلیمر پلی - ال - لاکتیک اسید / نانولوله کربنی / نانوفیبرهای ژلاتین دارای بربرین

مرتضی علی‌زاده<sup>۱</sup>، آنه‌محمد یاپنگ‌غراوی<sup>۲</sup>، مهدی میرزایی<sup>۲</sup>، مجید صالحی<sup>۳\*</sup>

۱- گروه مهندسی بافت، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی شاهرود، شاهرود، ایران.

۲- دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی شاهرود، شاهرود، ایران.

۳- مرکز تحقیقات سلامت جنسی و باروری، دانشگاه علوم پزشکی شاهرود، شاهرود، ایران.

تاریخ دریافت: ۱۴۰۰/۰۸/۲۲، تاریخ پذیرش: ۱۴۰۰/۰۹/۲۸

## چکیده

**مقدمه:** مهندسی بافت با استفاده از سلول، داربست و فاکتور رشد محیط مناسبی برای ترمیم، جایگزینی یا بازسازی بافت آسیب دیده ایجاد می‌کند. داربست‌ها نقش ECM بافت طبیعی را بازی کرده و از رشد و تمایز سلول‌ها حمایت می‌کنند. روش الکتروریسی روشی سریع و کارآمد است که امکان ساخت داربست‌های نانوفیبری را فراهم می‌آورد. جداسازی فازی نیز روشی سریع و کم هزینه بوده و نیاز به ابزار کمتری دارد.

**مواد و روش‌ها:** در مطالعه‌ی حاضر بعد از به‌دست آوردن شرایط بهینه مؤثر در فرآیند الکتروریسی و جداسازی فازی، از پلیمر ژلاتین برای سنتز نانوفیبر و از پلیمر PLA و نانولوله کربنی چند دیواره برای ساخت کانال‌های متخلخل و نانوفیبری حاوی بربرین استفاده و با آزمون‌های مختلف مورد ارزیابی قرار گرفت.

**نتایج:** نتایج آزمون‌های مشخصه‌یابی در محیط خارج بدن نشان‌دهنده مناسب بودن کانال‌های حاوی PLA/MWCNTs/نانوفیبر ژلاتین با بربرین بود. آزمون‌های عملکردی (که شامل SFI، Hot plate test) و آزمون‌های بافت‌شناسی از عصب بازسازی شده شامل رنگ‌آمیزی H&E و نیز آزمون‌های بافت‌شناسی از عضله گاستروکنمیوس پای معیوب (H&E) و همچنین وزن عضله گاستروکنمیوس پای معیوب بیانگر بهبود چشمگیر در موش‌های دریافت‌کننده بربرین در مقایسه با گروه کنترل منفی و گروه‌های فاقد بربرین بود.

**نتیجه‌گیری:** توانایی ساخت کاندوت‌های متخلخل - نانوفیبری از پلیمرهای PLA و ژلاتین با تکنیک جداسازی فازی/الکتروریسی امکان استفاده از آنها را در مهندسی بافت عصب محیطی فراهم می‌کند.

**واژه‌های کلیدی:** الکتروریسی، جداسازی فازی، کانال متخلخل - نانوفیبری، سلول‌های شوان.

\*نویسنده مسئول: شاهرود، دانشگاه علوم پزشکی شاهرود، دانشکده پزشکی، تلفن: ۰۲۳-۳۲۳۹۵۰۵۴، شماره: ۰۲۳-۳۲۳۹۵۰۰۹، Email: msalehi.te1392@gmail.com

**ارجاع:** علی‌زاده مرتضی، یاپنگ‌غراوی آنه‌محمد، میرزایی مهدی، صالحی مجید. ترمیم عصب سیاتیک آسیب دیده در مدل حیوانی موش صحرایی با استفاده از کانال‌های پلیمری ساخته شده با پلیمر پلی - ال - لاکتیک اسید / نانولوله کربنی / نانوفیبرهای ژلاتین دارای بربرین. مجله دانش و تندرستی در علوم پایه پزشکی ۱۴۰۰؛ ۱۶(۴): ۶۲-۵۱.

## مقدمه

صدمه عصب محیطی باعث اختلال در عملکرد حسی، حرکتی و خودمختار عصب صدمه دیده می‌گردد (۱). ترمیم و پر کردن فاصله ایجاد شده بین قسمت پروگزیمال و دیستال عصب قطع شده یکی از چالش‌های موجود بر سر راه روش‌ها و راهکارهای جراحی می‌باشد (۲). اگرچه پیوند عصب اتوگرفت به‌عنوان استاندارد طلایی برای ترمیم و بازسازی می‌باشد اما دارای محدودیت‌ها و معایبی چون عدم دسترسی بودن عصب، اختلال عملکرد ناحیه عصب‌دهنده و عدم تطابق در اندازه می‌باشد (۳ و ۴). محدودیت‌های موجود در استفاده از عصب اتوگرفت باعث تشویق محققان در زمینه توسعه دستاوردهای دیگر برای بازسازی عصب محیطی شد. به‌منظور حل مشکل محدودیت استفاده از عصب اتوگرفت، تعدادی از کانال‌های عصبی (Neural conduits) مصنوعی سنتز و استفاده شده است. انتخاب نوع زیست‌مواد یکی از مراحل مهم در طراحی کانال‌های زیست تخریب‌پذیر و غیرتخریب‌پذیر می‌باشد. به همین منظور مواد زیست تخریب‌پذیر و غیر تخریب‌پذیر مورد بررسی قرار گرفته که از این میان مواد غیرتخریب‌پذیر مناسب نیست زیرا این مواد دارای عوارضی چون فشار مزمن بر عصب در طی بازسازی عصب، نیاز به جراحی ثانویه جهت خارج‌سازی کانال عصبی پیوند شده و همچنین خطر بالای ایجاد نوروما می‌باشد (۵ و ۶). تا به حال چندین نوع ماده زیست سازگار، زیست تخریب‌پذیر و نیز چندین روش ساخت کانال عصبی معرفی شده است. از میان این مواد می‌توان به پلی‌استرها اشاره کرد که از مهمترین آنها: پلی‌لاکتیک اسید (PLA)، پلی-گلیکولیک اسید (PGA)، پلی-کاپرولاکتون (PCL) و پلی-لاکتیک-کو-گلیکولیک اسید (PLGA) (۷) می‌باشند. پلی-لاکتیک اسید (PLA)، یک پلی‌استر آلیفاتیک زیست تخریب‌پذیر بوده که به‌دلیل زیست سازگاری و ویژگی مکانیکی مطلوب در حوزه زیست پزشکی استفاده زیادی دارد (۸). اما به‌دلیل کمبود محل‌های فعال جهت چسبیدن سلولی استفاده از این پلیمر به تنهایی، محدود شده است (۹). در بیشتر مطالعات جهت افزایش چسبیدن و بهبود عملکرد سلول به داربست، از مولکول‌های ماتریکس خارجی سلولی استفاده کرده‌اند. ژلاتین یک بیوپلیمر طبیعی است که از هیدرولیز اسیدی یا بازی کلاژن حیوانی به‌دست آمده و تقریباً دارای ویژگی بیولوژیکی شبیه کلاژن می‌باشد (۱۰). برای افزودن ژلاتین به داربست استراتژی اصلی شامل واردسازی نانوفیبرهای ژلاتین است. چنین فیبرهایی با ابعاد کوچک از نظر فیزیکی از ویژگی‌های ساختاری مولکول‌های ماتریکس خارج سلولی طبیعی تقلید می‌کند (۱۱). قبل از رگزایی کانال عصبی، نیاز است که مواد غذایی به ناحیه بازسازی شونده از طریق

انتشار منتشر شود. داربست‌های کامپوزیتی متخلخل ساخته شده با روش جداسازی فازی دارای نفوذپذیری بالا به مواد غذایی بوده و بنابراین یک محیط مناسب برای ترمیم فراهم می‌کنند (۱۲). یکی از ویژگی‌های جذاب روش جداسازی فازی نسبت به سایر روش‌های قدیمی تشکیل شبکه متخلخل با تخلخل بهم پیوسته بوده که قطر و ساختار این تخلخل‌ها به راحتی قابل کنترل می‌باشد (۱۳).

کانال‌های عصبی مهندسی شده با دارا بودن عناصر مختلف باعث تقویت بازسازی عصبی و پیشبرد رشد آکسونی می‌گردند. تلاش‌های زیادی در جهت بهبود کارایی کانال عصبی در مقایسه با عصب اتوگرفت انجام شده است. کانال‌های عصبی هادی دارای اثرات بالایی در بازسازی عصبی در مقایسه با کانال‌های غیرهادی می‌باشند (۱۴). برای دستیابی به این هدف واردسازی نانولوله‌های کربنی (CNT) به کانال‌ها پیشنهاد شده است (۱۵). ویژگی الکتریکی و مکانیکی عالی نانولوله‌ها آنها را وسیله مفید برای مهندسی بافت عصب کرده است (۱۶). تحقیقات اخیر نشان‌دهنده اثرات مناسب سوسترهای CNT در رشد عصب در محیط خارج بدن می‌باشند (۱۷). اما مکانیسم دقیقی که CNT باعث رشد شبکه نورونی می‌شود ناشناخته مانده است. لووات و همکاران نشان دادند که سوسترهای CNT قادرند رشد دندریتی، چسبندگی سلولی، انتقال سیگنال و تشکیل مدار نورونی را بهبود بخشند (۱۸). بنابراین در ساخت کانال‌های عصبی هادی، به‌نظر می‌رسد که CNTها وسیله مناسبی برای استفاده باشد. وجود اجزای ماتریکس خارج سلولی (ECM)، سلول‌های حمایت‌کننده و عوامل حمایت‌کننده رشد عصبی در کانال عصبی باعث افزایش سرعت ترمیم ناحیه صدمه دیده می‌شود. در سیستم عصبی محیطی، سلول‌های شوان (SCs) با تولید و ترشح فاکتورهای نوروتروفیک و اجزای ماتریکس خارج سلولی باعث افزایش بازسازی عصب می‌شوند (۱۹). همچنین نشان داده شده که فاکتورهای مهارکننده مهاجرت یا تکثیر سلول‌های شوان مانع از بازسازی و ترمیم عصب محیطی می‌شوند (۲۰). بنابراین افزایش پاسخ سلول‌های شوان یک استراتژی مهم در جهت بازسازی عصبی موفقیت‌آمیز است. در رابطه با این قضیه، نشان داده شده که تزریق بربرین می‌تواند باعث افزایش پیشبرد تکثیر و فعالیت سلول‌های شوان و بهبود رشد آکسونی در ناحیه صدمه دیده عصب شود (۲۱). در این تحقیق با تحویل بربرین از طریق بارگذاری آن بر روی کانال عصبی هادی، انتظار بازسازی عصبی مناسب را داریم.

## مواد و روش‌ها

کلیه مواد پلیمری و پودری از شرکت سیگما و همچنین تمامی حلال‌ها از شرکت مرک خریداری شد. تولید نانوفیبرهای ژلاتین (GNFs) با روش الکترووریسی

اندازه‌گیری زاویه تماسی نمونه‌ها

برای بررسی میزان آبدوستی کاندوئیت‌ها، زاویه تماس قطره آب با سطح داربست اندازه‌گیری و میانگین آن گزارش شد. دستگاه مورد استفاده جهت اندازه‌گیری زاویه تماسی KRUSS G10 ساخت کشور آلمان بود.

اندازه‌گیری pH محیط حین تخریب داربست

pH محیط حاوی کاندوئیت‌های زیست تخریب‌پذیر مورد بررسی قرار گرفت. در اینجا محیط مورد استفاده شامل نرمال سالین با pH حدود ۶/۷۰ بود. نمونه‌ها با اندازه ۲ cm<sup>2</sup> در ۲ cm<sup>2</sup> و ضخامت ۳ mm به شکل مربع بریده شدند. دستگاه مورد استفاده برای اندازه‌گیری pH محیط، دستگاه pH متر مدل inolab pH 720 ساخت آلمان بود.

اندازه‌گیری weight loss داربست

برای اندازه‌گیری میزان weight loss کاندوئیت‌ها نمونه‌ها در داخل محیط‌های حاوی نرمال سالین قرار داده شد و میزان weight loss داربست از طریق فرمول زیر محاسبه گردید:

$$w0 \text{ weight loss} = (W(0) - W1) / W0 \times 100$$

وزن نمونه خشک اولیه، w1 وزن نمونه خشک ثانویه پس از خارج کردن از محیط می‌باشد (نمونه‌ها در اندازه ۳ cm در ۳ cm به شکل مربع بریده شدند). ضمناً محیط هر هفته تعویض و با محیط تازه جایگزین شد.

اندازه‌گیری میزان ویژگی‌های مکانیکی (مقاومت کششی)

برای اندازه‌گیری ویژگی مکانیکی (مقاومت کششی) کاندوئیت‌های متخلخل - نانوفیبری، از دستگاه تست کشش مدل Instron ۵۵۶۶ ساخت کشور آمریکا-انگلیس استفاده شد. در اینجا نمونه‌ها به شکل مستطیل با اندازه ۸۰ mm طول، عرض ۱۰ mm و ضخامت ۵ mm برید شدند.

درصد تخلخل کاندوئیت‌ها

برای به دست آوردن درصد تخلخل کاندوئیت‌های ساخته شده از روش Liquid displacement استفاده شد. برای محاسبه آن از فرمول زیر استفاده می‌شود:

$$\text{Porosity} = (v_{-}(1) - v_{-}(3)) / (v_{-}(2) - v_{-}(3)) \times 100$$

لازم به ذکر است که محلول استفاده شده در این روش اتانول ۹۶٪ می‌باشد. در این فرمول v1 حجم اتانول اولیه، v2 حجم اتانول به اضافه داربست و v3 حجم اتانول ثانویه پس از خروج داربست از داخل ظرف می‌باشد.

بررسی هدایت الکتریکی کاندوئیت‌ها

جهت بررسی میزان هدایت الکتریکی کاندوئیت‌های عصبی از دستگاه Two point probe ساخت کشور تایوان ( Good Will Instrument, New Taipei City, Taiwan) استفاده شد. در

محلول ژلاتینی ۴۰ درصد وزنی/حجمی به وسیله حل کردن پودر ژلاتین (نوع B گاوی) در اسید استیک ۷۵ درصد بر روی مگنت استیرر در دمای ۴۰ درجه سانتی‌گراد آماده شد. محلول آماده شده ژلاتین در داخل سرنگ ۱۰ سی‌سی با قطر سرسوزن گیج ۱۸ کشیده و بر روی پمپ سرنگی دستگاه الکتروویسی با مشخصات دستگاهی ولتاژ ۱۸ کیلوولت و فاصله سرسوزن تا درام ۱۵ سانتی‌متر قرار داده شد. در این مطالعه سرعت تزریق محلول پلیمری نیم سی‌سی در ساعت و دمای داخل دستگاه ۲۵ درجه سانتی‌گراد تنظیم شد. در مرحله بعد نانوفیبرهای اسپین شده از روی درام برداشته و در تانک نیتروژن مایع جهت فریز شدن و خرد شدن گذاشته شد. در نهایت فیبرها از تانک خارج، خرد شده سپس با بخار محلول گلو تار آل‌دئید ۲۰٪ به مدت ۶ ساعت کراس لینک گردیدند.

تولید کاندوئیت توسط روش جدایی فازی القا شده به وسیله دما

در مرحله اول نانولوله‌های کربنی فانکشنال (دارای گروه‌های عاملی COOH)، (با قطر حدود ۹ نانومتر و طول ۱/۵ میکرومتر) با نسبت وزنی ۱ درصد وزنی پلیمر پایه (PLA)، را در داخل حلال ۱ و ۴ - دی اکسان ریخته، سپس به مدت یک ساعت روی استیرر هم خورد. در مرحله بعد این محلول به مدت سه ساعت در داخل اولتراسوند قرار داده شد تا کامل دیسپرس شود. سپس پلیمر PLA با غلظت ۳٪ وزنی/حجمی به داخل محلول همگن MWCNTs اضافه و به مدت ۶ ساعت روی استیرر هم خورد و سپس نانوفیبرهای ژلاتینی خرد شده به محلول PLA/MWCNTs اضافه و به مدت یک ساعت در داخل حمام اولتراسوند قرار داده شد (مقدار نانوفیبر وارد شده در محلول به اندازه ۱۰ درصد وزنی پلیمر PLA بود). سپس بربرین با غلظت ۱٪ وزن پلیمر به محلول اضافه و محلول هموزن PLA/MWCNTs/GNFs-Beri با دمای ۴۰ °C بلافاصله به فریزر ۸۰ °C - منتقل تا محلول حاصله فریز شود. محلول فریز شده به مدت ۷۲ ساعت در داخل فریزدرایر گذاشته شد تا حلال کاملاً خارج شود. در مرحله بعدی کاندوئیت خشک شده را به وسیله دستگاه واتر جت به صورت کاندوئیت‌هایی با طول ۱۴ میلی‌متر، قطر بیرونی ۳ میلی‌متر و قطر داخلی ۱ میلی‌متر برش داده شد.

مشخصه‌یابی کاندوئیت‌های عصبی

تهیه تصاویر میکروسکوپ الکترونی روبشی (SEM)

کاندوئیت‌های متخلخل-نانوفیبری به دست آمده در تکه‌های کوچک به قطر ۵ میلی‌متری بریده شدند. پس از ۲۵۰ ثانیه پوشش‌دهی با طلا، مورفولوژی کاندوئیت‌های متخلخل - نانوفیبری به دست آمده و با دستگاه میکروسکوپ الکترونی روبشی بررسی شدند. در این تصاویر، کاندوئیت‌ها از نظر مورفولوژی و اندازه منافذ مورد بررسی قرار گرفتند.

برداشته شد. برای موش‌های دریافت‌کننده داربست، کاندوئیت به اندازه ۱۴ میلی‌متر تعبیه شد به طوری که ۲ میلی‌متر از هر انتهای کاندوئیت انتهای عصب را در بر می‌گرفت و در نهایت ضایعه به طول ۱۰ میلی‌متر بجای ماند. در پایان کاندوئیت توسط نخ بخیه ۶/۰ قابل جذب جنس پلی‌گلیکولات به اپی‌نوریوم عصب ناحیه پروگزیمال و دیستال بریده شده، بخیه شد. شکل ۱ نشان‌دهنده جراحی و پیوند کاندوئیت در پای موش می‌باشد.



شکل ۱- تصویر جراحی عصب سیاتیک

آزمون ایندکس عملکرد سیاتیک (SFI)

آزمون SFI برای همه گروه‌ها در بازه‌های زمانی ۴، ۸ و ۱۲ هفته پس از جراحی انجام شد. برای انجام این آزمون از روش Dijkstra et al (۲۲) استفاده شد که در اینجا دالانی به طول ۴۳ سانتی‌متر، عرض ۸/۷ سانتی‌متر و ارتفاع ۵/۵ سانتی‌متر طراحی شد. در مرحله بعد کف دالان با کاغذ میلی‌متری یا کاغذ نقشه کشی پوشانده و انتهای دالان توسط جعبه تاریک گردید. سپس پنجه پای سالم با رنگ آبی و پنجه پای معیوب با رنگ قرمز رنگ شد و موش در ابتدای دالان گذاشته شد تا مسیر را تا انتهای تاریک دالان بییابد. معادله شماره ۱ مقدار عددی SFI که بیانگر عملکرد عصب سیاتیک موش می‌باشد محاسبه شد. در اینجا PL نشانگر اندازه فاصله لبه پروگزیمال پا تا نوک انگشت سوم بوده، IT نشانگر اندازه فاصله بین انگشت دوم تا انگشت سوم، و TS نشانگر اندازه فاصله بین انگشت اول تا انگشت پنجم می‌باشد.

$$SFI = -38.3 [(EPL-NPL) / NPL] + 109.5 [(ETS-NTS) / NTS] - 8.8$$

بررسی الکترومیوگرافی

۱۲ هفته بعد از جراحی، تست الکترومیوگرافی برای تمامی موش‌ها انجام شد. برای انجام این کار ابتدا حیوانات با استفاده از تزریق داخل

کاندوئیت‌های ساخته شده به دلیل وجود نانولوله‌های کربنی چند دیواره با غلظت کم انتظار افزایش هدایت الکتریکی وجود دارد. برای اندازه‌گیری هدایت الکتریکی، کاندوئیت‌ها کاملاً خشک شدند و در مرحله بعد شدت جریان الکتریکی ثابت در حد ۰/۵ میلی‌آمپر در دمای ثابت از طریق یکی از الکترودها به انتهای یکی از کاندوئیت‌ها اعمال و توسط پروب دوم ثبت گردید.

ارزیابی میزان بقا (viability) سلول‌های شوان با روش MTT سلول‌های شوان در محیط کشت DMEM حاوی ۱۰٪ (v/v) سرم جنین گاوی FBS، ۱۰۰ واحد در میلی‌لیتر پنی‌سیلین و ۱۰۰ میلی‌گرم در میلی‌لیتر استرپتومایسین در انکوباتور دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد با ۵ درصد CO<sub>2</sub> برای کشت سلول گذاشته شد. کاندوئیت‌ها در داخل پلیت ۹۶ خانه قرار گرفت و با تابش نور فرابنفش (۲۵۴ نانومتر) از هر دو طرف به مدت ۳۰ دقیقه استریل شدند. سپس سلول‌ها به تعداد ۷۰۰۰ سلول به ازای هر داربست بر روی کاندوئیت‌ها کاشته شدند. سمیت سلولی کاندوئیت‌ها با استفاده از روش MTT ارزیابی شد. سلول‌های موجود در چاهک‌های بدون کاندوئیت به عنوان کنترل مثبت در نظر گرفته شدند. مقادیر جذب توسط یک الایزایدر در ۵۷۰ نانومتر خوانده شد.

ملاحظات اخلاقی

کمیته اخلاق دانشگاه علوم پزشکی شاهرود مطالعات و آزمایشات حیوانی را تأیید (کد اخلاق: IR.SHMU.REC.1397.024) و مطالعات بر طبق دستورالعمل دانشگاه انجام شد.

استفاده از کاندوئیت‌ها جهت ترمیم ضایعه عصب سیاتیک موش صحرایی

در این مطالعه ۱۸ سر موش صحرایی نر نژاد wistar با سن سه ماه و وزن ۲۵۰-۲۸۰ گرم بر اساس اصول کمیته اخلاق دانشگاه علوم پزشکی شاهرود تحت درمان قرار گرفتند (کد اخلاق: IR.SHMU.REC.1397.024). موش صحرایی به‌طور رندوم به سه گروه که در هر گروه شش موش وجود داشت تقسیم شد. این گروه‌ها شامل: (۱) گروه کنترل منفی (موش‌های دارای ضایعه عصبی بدون مداخله جراحی)، (۲) گروه دریافت‌کننده کاندوئیت حاوی PLA، (۳) گروه دریافت‌کننده کاندوئیت حاوی PLA/CNT/GNF+ Beri بودند. جهت انجام جراحی، حیوانات با استفاده از تزریق داخل صفاقی ترکیب کتامین/ زایلازین (۱۰۰ میلی‌گرم کتامین و ۶ میلی‌گرم زایلازین به ازای هر کیلوگرم وزن موش) بیهوش شدند. در مرحله بعد اندام تحتانی سمت چپ به‌وسیله محلول آنتی‌سپتیک ضد عفونی و توسط شان جراحی پوشانده شد. سپس پوست و عضله ناحیه ران توسط تیغ جراحی برش داده و عصب سیاتیک به اندازه ۱۰ میلی‌متر قطع و

و بلافاصله وزن شد. در نهایت میزان وزن مرطوب عضله گاستروکنمیوس با استفاده فرمول زیر محاسبه شد. "وزن از دست رفته عضله گاستروکنمیوس (%)" = "۱" - "میزان وزن عضله پای جراحی شده" / "میزان وزن عضله پای جراحی نشده"  $\times 100$  بافت‌شناسی

رنگ‌آمیزی هماتوکسیلین - ائوزین عضله ۱۲ هفته پس از جراحی حیوانات تحت تأثیر کلروفورم قربانی شدند، عضله گاستروکنمیوس خارج و یک برش از عرض عضله داده شد. سپس عضله برش خورده به صورت عرضی در داخل پارافرمالدئید ۴٪ گذاشته شد. در مرحله بعد بافت عضله با میکروتوم به ضخامت ۵  $\mu\text{m}$  برش زده شد. لام‌های آماده شده با هماتوکسیلین - ائوزین رنگ و در زیر میکروسکوپ نوری مشاهده شد.

رنگ‌آمیزی هماتوکسیلین - ائوزین عصب ۱۲ هفته پس از جراحی، عصب بازسازی شده ناحیه گرفت خارج و در داخل پارافرمالدئید ۴٪ گذاشته شد. در مرحله بعد بافت عصب از ناحیه دیستال عصب بازسازی شده به وسیله میکروتوم با ضخامت ۵  $\mu\text{m}$  برش عرضی زده شد. لام‌های آماده شده با هماتوکسیلین - ائوزین رنگ‌آمیزی و در زیر میکروسکوپ نوری مشاهده شد.

#### تجزیه و تحلیل آماری

نتایج از نظر آماری به وسیله نرم‌افزار Prism 8.2.1 آزمون One way Anova تجزیه و تحلیل و آزمون تعقیبی Tukey انجام شد در نهایت نتایج به صورت میانگین  $\pm$  انحراف استاندارد بیان شد. در تمامی بررسی‌ها،  $P > 0.05$  از نظر آماری معنادار (Significant) در نظر گرفته شد.

### نتایج

تجزیه و تحلیل نتایج مربوط به کاندوئیت‌های سنتز شده با روش الکتروروسی / جداسازی فازی

مورفولوژی کاندوئیت‌های سنتز شده

مورفولوژی کاندوئیت‌های سنتز شده، بوسیله تصویربرداری SEM بررسی شد. شکل ۳A تصویر SEM از کاندوئیت دارای بربرین می‌باشد، شکل نشان‌دهنده وجود ساختار متخلخل-نانوفیبری با تخلخل بهم پیوسته و اندازه مناسب تخلخل برای مهندسی بافت عصب می‌باشد. شکل ۳B تصویر کاندوئیت ۲۴ ساعت پس از کشت سلول‌های شوان می‌باشد. طبق نتایج به دست آمده می‌توان گفت که روش ذکر شده باعث ایجاد یک ساختار سه بعدی با تخلخل بالا می‌شود. تخلخل بالا و قطر مناسب، اجازه تشکیل و رشد مؤثر عروق خونی مانند مویرگ‌ها و وریدها را به داخل کاندوئیت داده که همین

صفاقی ترکیب کتامین / زایلازین (کتامین ۶۰mg/kg) و زایلازین (۶mg/kg) به ازای هر کیلوگرم وزن موش) بیهوش شدند. در مرحله بعد ناحیه مورد جراحی شیو و با استفاده از بتادین ضد عفونی و سپس برش داده شد طوری که ابتدا و انتهای عصب کاملاً نمایان و نیز پوست عضله گاستروکنمیوس کنار زده شد. سپس الکتروود تحریک‌کننده در ناحیه پروگزیمال عصب برش داده شده قرار گرفت. در مرحله بعد با اعمال شدت تحریک حدود ۳-۵ میلی‌آمپر، پتانسیل عمل عضله گاستروکنمیوس (CMAP) به وسیله الکتروود سوزنی و یک الکتروود کلاهیکی بر روی عضله گاستروکنمیوس و مفصل زانو، ثبت شد. در اینجا الکتروود زمینی (ground elec-trode) که از جنس فولاد ضدزنگ می‌باشد به داخل عضله شکم وارد شد (۲۳). شکل ۲ انجام آزمون EMG بر روی پای جراحی شده موش پس از ۱۲ هفته را نشان می‌دهد.



شکل ۲- انجام آزمون EMG بر روی پای جراحی شده رت آزمون صفحه داغ (HPT) جهت بررسی بهبود عملکرد حسی این آزمون جهت بررسی میزان حساسیت حیوان به درد ایجاد شده در اثر گرما انجام شد. برای این کار ۱۲ هفته بعد از جراحی موش‌ها در داخل فضای استوانه‌ای با انتهای باز که کف این استوانه بر روی صفحه داغ شده (با دمای ۵۶°C) قرار داشت، گذاشته شدند. به محض اینکه حیوان پنجه پای جراحی شده را بلند کرد و یا لیس زد زمان ثبت شد.

اندازه‌گیری وزن مرطوب عضله گاستروکنمیوس

در پایان هفته چهاردهم پس از جراحی، حیوانات تحت تأثیر ماده شیمیایی کلروفورم قربانی شدند. پس از کنارزدن کامل پوست از روی عضله گاستروکنمیوس، عضله ذکر شده از بافت و استخوان اطراف جدا

تغییرات pH به مدت ۸ هفته هر دو هفته در محیط نرمال سالیین با pH حدود ۷/۲ اندازه‌گیری شد. تخریب هیدرولیتیک پیوندهای استری در PLA باعث تولید مواد غیرسمی اسید لاکتیک شده که همین اسید لاکتیک باعث کاهش چشمگیر مقدار pH از ۷/۲ به ۶/۳ بعد از دو هفته شد. با افزودن نانولوله کربنی و نانوفیبر ژلاتینی میزان تغییرات pH آهسته تر شد طوری که در کاندوئیت‌های حاوی ژلاتین/بربرین میزان pH بعد از دو هفته به ۶/۶۹ کاهش یافت. بنابراین طبق نتایج به‌دست آمده تفاوت معناداری بین pH محیط حاوی PLA و محیط حاوی PLA/CNT/ GNF/ Beri دیده نشد. طبق مطالعه انجام شده حضور ژلاتین و گروه‌های آمینوی آن باعث افزایش pH در حین تخریب می‌شود که همین امر مانع از افت شدید pH حین تخریب PLA می‌شود (به‌دلیل خنثی شدن اسیدیته محیط توسط گروه‌های آمینوی ژلاتین). طبق نتایج به‌دست آمده حضور نانوفیبر ژلاتین مانع از افت شدید pH حین تخریب می‌شود. بنابراین اسیدیته محیط کاهش یافته باعث کاهش واکنش‌های التهابی طی استفاده از کاندوئیت‌های PLLA می‌شود (۲۵).

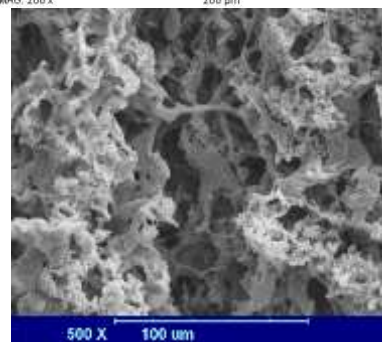
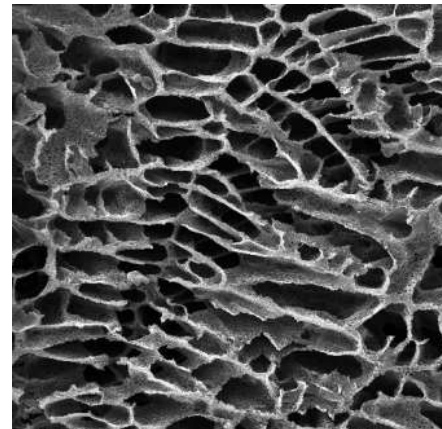
اندازه‌گیری میزان از دست دادن وزن کاندوئیت

سرعت تخریب کاندوئیت‌ها در محیط خارج بدن از طریق گذاشتن کاندوئیت‌ها در داخل ۵ میلی لیتر نرمال سالیین به‌دست آمد. درصد از دست دادن وزن بر اساس فرمول محاسبه شد. میزان WL کاندوئیت‌های PLA خالص بعد از ۶۰ روز در حد  $1/19 \pm 5/6$  بوده که این نتیجه بیانگر تخریب بسیار آهسته PLA می‌باشد. دلیل این تخریب آهسته را می‌توان به آگریزی بالای PLA نسبت داد. با واردسازی نانولوله کربنی و نانوفیبرهای ژلاتینی افزایش چشمگیر در تخریب کاندوئیت در روز ۳۰ و ۶۰ ام مشاهده شد ( $P < 0/05$ ). دلیل این امر را می‌توان به افزایش آبدوستی و افزایش انرژی پیوندی کاندوئیت PLA/MWCNTs/GNFs ربط داد.

اندازه‌گیری ویژگی مکانیکی (مقاومت کششی) کاندوئیت‌ها

کاندوئیت‌های عصبی باید دارای یک ویژگی مکانیکی مناسب جهت تعدیل نیروهای وارده از بافت‌های اطراف به عصب طی بازسازی باشند. در صورتی که کاندوئیت دارای سفتی بالا باشد، ممکن است که یک فشار مداوم به عصب بازسازی شونده وارد کرده و در نهایت بازسازی دچار مشکل شود. همچنین در صورتی که کاندوئیت بسیار نرم باشد و حمایت مکانیکی کافی را نداشته باشد در این حالت ممکن است که دستکاری کاندوئیت حین جراحی مشکل بوده و نیز کاندوئیت دچار کلاپس شده و در نهایت رشد عصب دچار اختلال شود (۲۶). طبق نتایج به‌دست آمده با واردسازی و انتشار یکسان نانولوله کربنی و

باعث بقاء سلول‌های نفوذ کرده به داخل کاندوئیت می‌شود. از طرف دیگر ساختار نانوفیبری (نانوفیبر ژلاتینی) وارد شده در ساختار سه بعدی فوق باعث تقلید از ساختار نانویی ماتریکس خارج سلولی طبیعی بدن شده که همین ساختار نانویی موجب افزایش تمایل چسبندگی سلول‌ها به داربست می‌شود (۲۲).

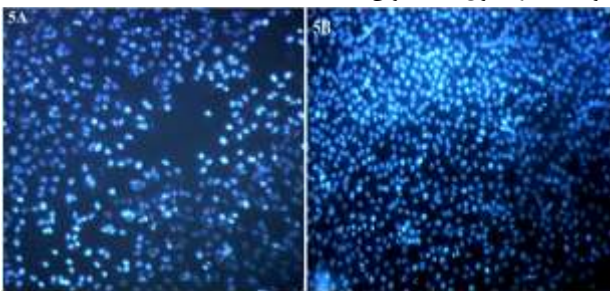


شکل ۳- A. نشان‌دهنده عکس SEM از کاندوئیت PLA/MWCNTs/GNFs- Beri و B. نشان‌دهنده عکس SEM از سلول‌های کشت داده شده بر روی کاندوئیت PLA/MWCNTs/GNFs- Beri بعد از ۲۴ ساعت کشت اندازه‌گیری زاویه تماس

زاویه تماس نمونه‌ها به‌وسیله روش زیسمن بررسی شد. PLA به‌دلیل زیست‌سازگاری بالا و عدم سمیت محصولات آزاد شده از آن حین تخریب، در مهندسی بافت بسیار استفاده می‌شود. اما به‌دلیل داشتن انرژی پیوندی پایین‌تر بخاطر وجود گروه متیل در ساختار، بسیار آگریز بوده و همین امر استفاده از آن را با محدودیت مواجه کرده است (۲۴). ما در این پروژه با وارد سازی نانولوله کربنی و نانوفیبر ژلاتینی باعث کاهش اندازه زاویه تماسی PLA از  $9/3 \pm 11/4$  به حدود  $6/41 \pm 6/45$  در کاندوئیت‌های PLA-CNT- GNF- Beri شدیم.

اندازه‌گیری میزان pH کاندوئیت حین تخریب

بررسی نتایج چسبندگی سلولی بر روی داربست طبق نتایج به دست آمده که در شکل ۵ نشان داده شده است، تعداد سلول‌های چسبیده بر روی کاندوئیت‌های PLLA/CNT/GNF/ Beri بیشتر از کاندوئیت حاوی PLA خالص می‌باشد که دلیل آن را می‌توان به وجود محل اتصال برای چسبندگی و تکثیر سلولی در کاندوئیت‌های حاوی GNF نسبت داد. چونکه نانوفیبرهای ژلاتینی به دلیل داشتن گروه‌های RGD باعث افزایش چسبیدن و تکثیر سلولی می‌شوند (۲۷). همچنین دلیل دیگر تعداد بیشتر سلول‌های چسبیده بر روی کاندوئیت‌های PLLA/CNT/GNF/ Beri می‌توان به اثر بربرین بر روی تکثیر سلول‌های شوان نسبت داد.



شکل ۵- نشان‌دهنده عکس DAPI از سلول‌های چسبیده بر روی کاندوئیت‌های PLLA/MWCNTs/GNFs-Beri و PLA/MWCNTs/GNFs-Beri

بررسی نتایج آزمون عملکرد عصب سیاتیک (SFI) ۱۲ هفته پس از جراحی گروه کنترل مثبت دارای متوسط SFI حدود  $2/31 \pm 5/71$  بود. مقدار SFI در تمامی گروه‌ها، به جز گروه کنترل مثبت، دارای بهبود معنادار ( $P < 0/05$ ) از هفته ۴ تا هفته ۸ و ۱۲ پس از جراحی بود. مقادیر متوسط SFI گروه کنترل منفی نشان‌دهنده بهبود خیلی کم عملکرد از هفته ۴ (مقدار  $2/16 \pm 85/90$ ) تا هفته ۸ ( $1/07 \pm 80/17$ ) و هفته ۱۲ ( $2/60 \pm 76/23$ ) پس از جراحی بود. کاندوئیت‌های PLLA/MWCNT/GNF/ Beri در مقایسه با گروه کنترل منفی و گروه فاقد بربرین دارای مقادیر SFI بالاتر ( $P < 0/05$ ) هستند که نشان‌دهنده اثرات چشمگیر درمانی بربرین در ترمیم عصب سیاتیک می‌باشد.

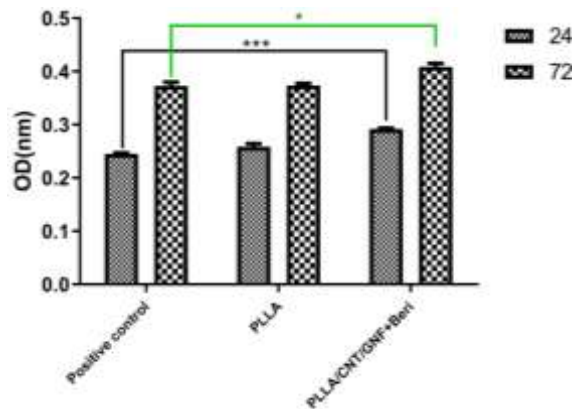
بررسی نتایج آزمون الکترومیوگرافی (EMG) نتیجه آزمون الکترومیوگرافی در شکل ۶ نشان‌دهنده میزان دامنه پتانسیل عمل عضله و بنابراین نشانگر عصب‌دهی مجدد عضله می‌باشد. نتایج این آزمون نشان‌دهنده تفاوت در دامنه پتانسیل عمل عضله بین گروه کنترل مثبت  $2/5 \pm 23/4$  و سایر گروه‌های مورد مطالعه می‌باشد. همچنین تفاوت در میزان پتانسیل عمل بین گروه کاندوئیت حاوی بربرین  $2/3 \pm 19/81$  با گروه کنترل منفی  $1/6 \pm 7/05$  و گروه کاندوئیت PLA  $2/9 \pm 12/03$  دیده می‌شود. بنابراین میزان

نانوفیبر ژلاتینی در ساختار کاندوئیت میزان مقاومت کششی PLA از  $4/61 \pm 2/17$  به  $6/34 \pm 3/64$  مگاپاسکال افزایش پیدا می‌کند.

بررسی نتایج درصد تخلخل داربست طبق نتایج، اندازه‌گیری درصد تخلخل کاندوئیت‌ها با روش جایگزینی مایع نشان‌دهنده مقدار  $8/22 \pm 83/23$  برای کاندوئیت PLA و مقدار  $8/50 \pm 81/01$  برای کاندوئیت PLA/MWCNTs/GNFs-Beri می‌باشد.

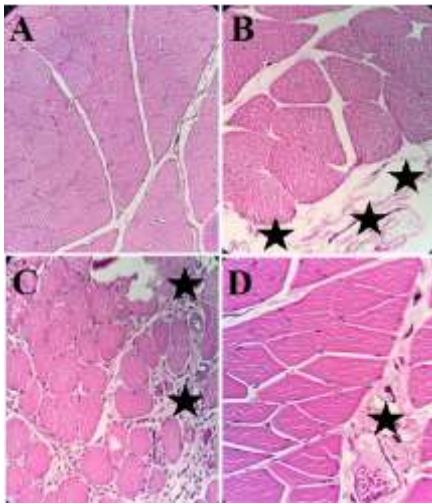
نتایج بررسی هدایت الکتریکی کاندوئیت‌ها هدایت الکتریکی کاندوئیت‌ها با استفاده از روش two point probe در دمای اتاق انجام شد. وارد کردن نانولوله‌های کربنی به داخل ساختار کاندوئیت در حد کمتر از ۳ درصد باعث افزایش سرعت هدایت الکتریکی کاندوئیت می‌شود. طبق نتایج به دست آمده می‌توان گفت که با افزودن نانولوله کربنی (به میزان ۱٪) به محلول PLA، هدایت الکتریکی آن به طور معناداری افزایش می‌یابد.

بررسی نتایج آزمون MTT بررسی نتایج آزمون MTT بیانگر این است که کاندوئیت‌ها (به جز کاندوئیت PLA خالص) دارای میزان بقاء سلولی بالای ۹۰ درصد بعد از ۲۴ ساعت پس از کشت سلولی هستند. شکل ۴ نشان‌دهنده نتایج آزمون MTT می‌باشد. دلیل بقاء بالای سلولی را می‌توان به اثر بربرین بر روی سلول‌های عصبی نسبت داد (۲۶). نتایج به دست آمده نشان که در ۲۴ ساعت بین گروه کنترل و PLA/MWCNT/GNF/ Beri تفاوت معنی‌داری وجود دارد ( $P < 0/002$ ) و بین گروه کنترل با PLA تفاوت معنی‌داری دیده نشد. نتایج به دست آمده نشان که در ۷۲ ساعت بین گروه کنترل و PLA/MWCNT/GNF/ Beri تفاوت معنی‌داری وجود دارد ( $P < 0/02$ ) و بین گروه کنترل با PLA تفاوت معنی‌داری دیده نشد.



شکل ۴- بررسی نتایج MTT

جهت بررسی بهبود عملکرد عصبی، رنگ آمیزی H&E عضله گاستروکنمیوس انجام شد. طبق شکل ۷ رنگ آمیزی H&E پس از ۱۲ هفته نشان دهنده این است که گروه کنترل مثبت دارای نشانه‌ای از آتروفی عضلانی نمی‌باشد. همچنین گروه‌های دارای پیوندهای کاندوئیت PLA/MWCNT/GNF-Beri دارای فیبرهای عضلانی منظم‌تر و متراکم‌تر بوده و نیز فضای بین فیبرها کمتر از گروه کنترل منفی و گروه دارای کاندوئیت PLA می‌باشند. از طرف دیگر نتایج بیانگر این می‌باشند که در عضله گاستروکنمیوس گروه کنترل منفی نسبت به سایر گروه‌ها، رشد فیبرهای کلاژنی، عروق خونی بیشتر و هیپرپلازی آدیپوسیتیک بین سلول‌های عضله دیده می‌شود و همچنین ارتباط بین فیبرهای عضلانی سست‌تر و فیبرها میزان آتروفی شدنشان بیشتر از گروه‌های دیگر است.

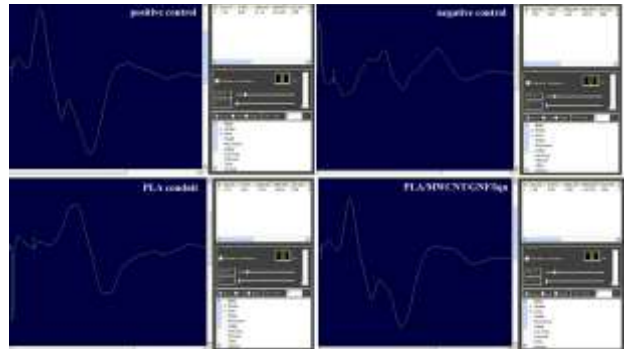


شکل ۷- نشان دهنده رنگ آمیزی H&E عضله گاستروکنمیوس (با بزرگنمایی ۴۰۰ برابر) دوازده هفته پس از جراحی گروه کنترل مثبت (A)، گروه کنترل منفی (B)، گروه کاندوئیت PLA (C)، گروه کاندوئیت PLA/MWCNT/GNF-Beri (D). فلش کوچک نشانگر فیبرهای عضلانی آتروفی شده، فلش بزرگ نشانگر اینترنالیزه شدن هسته و ستاره نشانگر هیپرپلازی کلاژنی می‌باشد.

بررسی نتایج رنگ آمیزی H&E عصب

در رنگ آمیزی H&E عصب شکل ۸ گروه PLA/MWCNT/GNF-Beri در مقایسه با گروه‌های کنترل منفی و PLA، فیبرهای عصبی دارای شکل نسبتاً طبیعی همراه با آکسون‌های مرکزی، فضای میلینی نسبتاً طبیعی، تعداد سلول‌های شوان فعال شده، عروق خونی، فضای لاملاز متسع شده، رشد بافت همبند کمتر شده و از دست دادن کانونی اندونوریوم و دژنراسیون واکوئولار نیز کمتر می‌باشد. در گروه کنترل منفی علاوه بر دژنره شدن شدید فیبرها، عدم انسجام آکسونی، ادم قابل توجه فیبر عصبی دیده می‌شود. از نظر درجه

عصب‌دهی عضله در گروه کاندوئیت حاوی بربرین بیشتر از سایر گروه‌ها بود.



شکل ۶- نشان دهنده EMG گروه‌های مورد مطالعه

نتایج آزمون صفحه داغ (HPL test) جهت بررسی بهبود رفلکس پس کشیدن

آزمون HPL جهت بررسی عملکرد حس درد می‌باشد. نتایج نشان دهنده عملکرد حس درد و رفلکس پس کشیدن به‌طور معناداری بعد از آسیب عصب سیاتیک تحت تأثیر قرار می‌گیرد (گروه کنترل مثبت در مقایسه با کنترل منفی،  $P < 0.005$ ). رت‌های موجود در گروه کنترل مثبت حدوداً بعد از ۴ ثانیه پنجه خود را از صفحه داغ کشیدند. طبق نتایج به‌دست آمده کلیه گروه‌های کاندوئیت پیوند شده دارای زمان رفلکس پس کشیدن کوتاه‌تری ( $P < 0.05$ ) نسبت به گروه کنترل منفی می‌باشند. از میان گروه‌های دریافت‌کننده پیوند، گروه‌های معنادار  $(10.7 \pm 1.7)$  در مقایسه با گروه کنترل منفی هستند.

نتایج اندازه‌گیری وزن مرطوب عضله گاستروکنمیوس از دست دادن وزن عضله گاستروکنمیوس به‌عنوان نتیجه‌ای از آسیب عصبی ایجاد شده می‌باشد و از روی همین می‌توان به‌طور غیرمستقیم به شدت آسیب عصب حرکتی پی برد (۲۸). در صورت عصب‌دهی مجدد عضله، آتروفی عضلانی متوقف خواهد شد (۲۹). بنابراین اندازه‌گیری وزن مرطوب عضله گاستروکنمیوس به‌عنوان معیاری از عصب‌دهی مجدد عضله می‌تواند باشد. نتایج نشان می‌دهد که گروه کنترل منفی از دست دادن وزن عضله نسبتاً معناداری  $(58.2 \pm 12.6)$  در مقایسه با گروه کاندوئیت‌های حاوی بربرین  $(11.8 \pm 2.5)$  دارد. میزان از دست دادن وزن عضله در گروه‌های مورد مطالعه به‌صورت زیر است:

Negative control >>>> PLA >> PLA/MWCNT/GNF-Beri

بررسی نتایج بافت‌شناسی

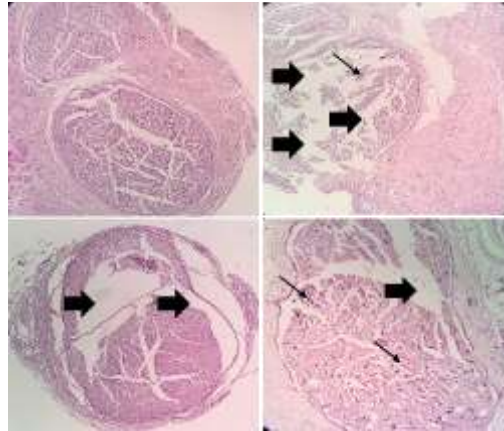
بررسی نتایج رنگ آمیزی H&E عضله گاستروکنمیوس



و سپس وارد محلول پلیمری کردیم و در نهایت جداسازی فازی انجام دادیم. دلیل استفاده از روش SLPS تخلخل بالای آن و در نتیجه نفوذ بسیار بالای مواد غذایی، اکسیژن و سلول به داخل کاندوئیت ساخته شده می‌باشد. از نتایج دیگر به دست آمده این بود که با افزایش غلظت پلیمر درصد تخلخل کاهش یافته ولی استحکام مکانیکی داربست افزایش می‌یابد. یافته‌ها نشان داد غلظت کلی محلول 3wt% دارای استحکام و نیز تخلخل مناسب برای کار ما می‌باشد. تصاویر SEM از کاندوئیت‌ها نشانگر تخلخل مناسب این داربست‌ها برای مهندسی بافت هستند. این ساختار میکروپوری برای افزایش میزان نفوذ سلول به کاندوئیت، تهیه اکسیژن و غذای کافی برای سلول‌ها بسیار مفید خواهد بود. در این مطالعه جهت افزایش استحکام کششی و فشاری داربست به ترتیب به محلول پلیمری PLA، نانوفیبرهای ژلاتین و نانولوله‌های کربنی افزوده شد. تجزیه و تحلیل نتایج زاویه تماس نشان داد که کاندوئیت حاوی PLA خالص دارای زاویه تماس بالاتر از سایر نمونه‌هاست و PLLA/CNT/GNF- Beri میزان متوسط اندازه زاویه تماس کاهش می‌یابد که دلیل آن را می‌توان به آبدوستی بیش از حد ژلاتین و نیز افزایش انرژی سطحی کاندوئیت‌های حاوی ژلاتین نسبت داد. در تجزیه و تحلیل pH مشخص شد که ترکیب پلیمری PLA/نانوفیبر ژلاتین افت pH آهسته‌تری را در مقایسه با داربست حاوی PLA خالص از خود نشان می‌دهند که دلیل آن را می‌توان به گروه عاملی NH<sub>2</sub> ژلاتین نسبت داد که با گروه‌های H<sup>+</sup> ناشی از تخریب PLA ترکیب شده و آن را خنثی می‌کند. نتایج به دست آمده از آزمون Weight loss بیان‌کننده این است که در حضور نانوفیبرهای ژلاتین، سرعت از دست دادن وزن کاندوئیت افزایش می‌یابد که دلیل آن را می‌توان به افزایش آبدوستی کاندوئیت نسبت داد. نتایج اندازه‌گیری متوسط اندازه منافذ و درصد تخلخل نشان‌دهنده کاهش اندازه منافذ و درصد تخلخل با افزایش غلظت کلی پلیمر و افزودن ژلاتین می‌باشد. که دلیل این را می‌توان به جمع شدن و تغییر شکل کاندوئیت پس از کراس لینک کردن ژلاتین نسبت داد. با این وجود تمامی کاندوئیت‌ها دارای تخلخل مناسب (>80%) جهت چسبندگی، رشد سلول و انتشار اکسیژن و مواد غذایی می‌باشند. نتایج آزمون کششی نشان داد که با افزودن نانوفیبر ژلاتین و نانولوله‌های کربنی، میزان مقاومت کششی کاندوئیت افزایش می‌یابد که همین مقاومت کششی بالا برای بخیه‌پذیری کاندوئیت مناسب است. آزمون هدایت الکتریکی مناسب بودن نمونه‌های حاوی MWCNT به مقدار 1٪ وزنی پلیمر را ثابت کرد. همچنین در این مطالعه با افزایش غلظت نانولوله کربنی به 3 درصد وزنی پلیمر، دیسپرشن یا پراکندگی (dispersion) نانولوله در محلول پلیمری کمتر شد که دلیل آن را می‌توان به تشکیل جزایر تجمع‌یافته نانولوله

بهبود و بازسازی مجدد، از نظر بافت شناسی (H&E) عصب به صورت زیر می‌باشد:

Negative >>> PLA PLA/MWCNT/GN- Beri >>>> control



شکل ۸- نشان‌دهنده رنگ‌آمیزی H&E عصب (با بزرگنمایی ۲۰۰ برابر) دوازده هفته پس از جراحی

گروه کنترل مثبت (A)، گروه کنترل منفی (B)، گروه کاندوئیت (C) PLA، گروه کاندوئیت PLA/MWCNT/GNF- Beri (D) فلش نشان‌دهنده عروق خونی، فلش ضخیم نشانگر دژنراسیون واکوئولار (واکوئلیزاسیون)

### بحث

نورون‌های عصبی نقش مهمی در کنترل حرکات بدن دارند. مهندسی بافت عصب می‌تواند نوید بخش ترمیم و جایگزینی عصب آسیب دیده غیرقابل بازگشت باشد. برای اینکه سلول‌های عصبی در کشت برون‌تنی به عصب کارآمد تبدیل شوند به فناوری‌هایی نیاز است که بتواند این سلول‌ها را به گونه‌ای هدایت کند که آرایش‌های سازمان‌یافته‌ای مانند مورفولوژی عصب طبیعی پیدا کند. داربست‌های مورد استفاده در مهندسی بافت عصب علاوه بر زیست سازگاری بایستی زیست تخریب‌پذیر نیز باشند. پلیمرهای مورد استفاده در این تحقیق PLA و ژلاتین بوده که دارای این ویژگی‌ها هستند. علاوه بر این داربست‌ها بایستی ویژگی‌های توپوگرافی منظم جهت انتظام عصب داشته باشند تا به تقلید از سازمان‌یابی عصب، تجمع آنها را در امتداد هم افزایش دهند. چنین نظمی از شرط‌های مهم برای تولید عصب کارآمد می‌باشد. کاندوئیت‌های متخلخل نانوفیبری ساخته شده از PLA/ژلاتین/نانولوله کربنی حاوی بربرین دارای این خصوصیات است. در این تحقیق نتایج حاصل از روش جداسازی فازی جامد-مایع نشان داد که دمای جداسازی فازی باعث ایجاد ساختار بسیار متخلخل می‌شود ولی ساختار نانوفیبری بدست نمی‌آید. برای رسیدن به این ساختار نانوفیبری ما نانوفیبرهای ژلاتین را با روش الکتروریسی سنتز

حیوانات بزرگتر (مثلاً میمون) استفاده و در پایان پس از اتمام بررسی‌های حیوانی می‌توان با در نظر گرفتن مسائل اخلاقی روی صدمه عصب سیاتیک انسانی بررسی کرد.

### تشکر و قدردانی

مطالعه حاضر توسط دانشگاه علوم پزشکی شاهرود با کد طرح ۹۷۱۶ حمایت شد. بدین‌وسیله از دانشگاه علوم پزشکی شاهرود برای حمایت از این پژوهش و معاونت پژوهشی برای اعطای گرنت تحقیقاتی به شماره ۹۷۱۶ قدرانی به‌عمل می‌آید.

### References

1. Burnett MG, Zager EL. Pathophysiology of peripheral nerve injury: a brief review. *Neurosurgical Focus* 2004;16:1-7. doi:10.3171/foc.2004.16.5.2
2. Muheremu A, Ao Q. Past, present, and future of nerve conduits in the treatment of peripheral nerve injury. *BioMed Research international* 2015;2015. doi:10.1155/2015/237507
3. Goulart CO, Martinez AM. Tubular conduits, cell-based therapy and exercise to improve peripheral nerve regeneration. *Neural Regeneration Research* 2015;10:565. doi:10.4103/1673-5374.155424
4. Li BB, Yin YX, Yan QJ, Wang XY, Li SP. A novel bioactive nerve conduit for the repair of peripheral nerve injury. *Neural Regeneration Research* 2016;11:150. doi:10.4103/1673-5374.175062
5. Kehoe S, Zhang XF, Boyd D. FDA approved guidance conduits and wraps for peripheral nerve injury: a review of materials and efficacy. *Injury* 2012;43:553-72. doi:10.1016/j.injury.2010.12.030
6. Yucel D, Kose GT, Hasirci V. Polyester based nerve guidance conduit design. *Biomaterials* 2010;31:1596-603. doi:10.1016/j.biomaterials.2009.11.013
7. Manavitehrani I, Fathi A, Badr H, Daly S, Negahi Shirazi A, Dehghani F. Biomedical applications of biodegradable polyesters. *Polymers* 2016;8:20. doi:10.3390/polym8010020
8. Auras RA, Lim LT, Selke SE, Tsuji H, editors. *Poly (lactic acid): synthesis, structures, properties, processing, and applications*. John Wiley & Sons; 2011 Mar 8.
9. Shalumon KT, Deepthi S, Anupama MS, Nair SV, Jayakumar R, Chennazhi KP. Fabrication of poly (l-lactic acid)/gelatin composite tubular scaffolds for vascular tissue engineering. *International Journal of Biological Macromolecules* 2015;72:1048-55. doi:10.1016/j.ijbiomac.2014.09.058
10. Hoque ME, Nuge T, Yeow TK, Nordin N, Prasad RG. Gelatin based scaffolds for tissue engineering-a review. *Polym Res J* 2015;9:15.
11. Lu W, Ma M, Xu H, Zhang B, Cao X, Guo Y. Gelatin nanofibers prepared by spiral-electrospinning and cross-linked by vapor and liquid-phase glutaraldehyde. *Materials Letters* 2015;140:1-4. doi:10.1016/j.matlet.2014.10.146
12. Akbarzadeh R, Yousefi AM. Effects of processing parameters in thermally induced phase separation technique on porous architecture of scaffolds for bone tissue engineering. *Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials* 2014;102:1304-15. doi:10.1002/jbm.b.33101
13. Liu X, Ma PX. Phase separation, pore structure, and properties of nanofibrous gelatin scaffolds. *Biomaterials* 2009;30:4094-103. doi:10.1016/j.biomaterials.2009.04.024
14. Zhang Z, Rouabhia M, Wang Z, Roberge C, Shi G, Roche P, Li J, Dao LH. Electrically conductive biodegradable polymer composite for nerve regeneration: electricity-stimulated neurite outgrowth and axon regeneration. *Artificial Organs* 2007;31:13-22. doi:10.1111/j.1525-1594.2007.00335.x

نسبت داد که در نهایت سرعت هدایت کاندوئیت به‌طور چشمگیری کاهش می‌یابد. بنابراین پراکندگی و انتشار منظم نانولوله در ماتریکس پلیمر نقش کلیدی در سرعت هدایت الکتریکی کاندوئیت دارد که این پراکندگی منظم احتمالاً در غلظت‌های پایین (حدود ۱٪) نانولوله در محلول پلیمری به‌دست می‌آید. آزمون MTT هم نشان‌دهنده چسبیدن و تکثیر سلول‌های شوان بر روی کاندوئیت‌های PLA و سایر کاندوئیت‌ها بوده و مناسب بودن این کاندوئیت‌ها برای مهندسی بافت عصب می‌باشد. از بین کاندوئیت‌ها، نمونه کاندوئیت حاوی بربرین دارای چسبندگی و بقاء بیشتر در سلول‌های شوان بیشتری می‌باشد. اما کاندوئیت حاوی PLA خالص بقاء سلولی کمتری را در مقایسه با کاندوئیت حاوی بربرین نشان داد که دلیل این امر را می‌توان به عدم اتصال مناسب سلولی بر روی کاندوئیت PLA به‌دلیل آبرگریزی بالای کاندوئیت و همچنین عدم وجود محل‌های اتصال (Binding site) مناسب برای اتصال سلول نسبت داد. همچنین می‌توان گفت که بربرین باعث افزایش تکثیر سلول‌های شوان می‌شود. که همین دلیلی بر تعداد سلول‌های بیشتر بر روی داربست حاوی بربرین می‌تواند باشد. ما به این نتیجه رسیدیم که کاندوئیت‌های کامپوزیتی ساخته شده همراه با بربرین دارای قدرت بالایی در ترمیم ضایعه ۱۰ میلی‌متری ایجاد شده در عصب سیاتیک موش صحرایی است. این نتایج کاملاً قابل انتظار بود دلیل اصلی این اثر را می‌توان به تحریک سلول‌های شوان توسط بربرین نسبت داد. بنابراین نتایج مطالعه درون تنی ما بیانگر بهبود معنادار گروه حاوی بربرین در مقایسه با سایر گروه‌های دریافت‌کننده کاندوئیت می‌باشد. در این مطالعه ما چندین آزمون را جهت ارزیابی عملکردی و بافت‌شناسی عصب آسیب دیده انجام دادیم. آزمون‌های عملکردی (شامل SFI, HPL, EMG) و بافت‌شناسی (H&E) نشان‌دهنده بهبود معنادار در عملکرد و بافت‌شناسی گروه دریافت‌کننده بربرین در مقایسه با سایر گروه‌های دریافت‌کننده کاندوئیت بود.

توانایی ساخت کاندوئیت‌های متخلخل-نانوفیبری از پلیمرهای PLA و ژلاتین با تکنیک جداسازی فازی/الکترووریسی امکان استفاده از آنها را در مهندسی بافت عصب محیطی فراهم می‌کند. زیست سازگاری بالای این پلیمرها و تعاملات خوبی که سلول‌های شوان با این نانوفیبرها نشان داد، به آنها اجازه می‌دهد تا با بازی کردن نقش ماتریکس خارج سلولی، بستر مناسبی برای رشد و تکثیر سلول‌ها باشند. اما کاربرد نهایی این کاندوئیت‌ها مستلزم انجام آزمون‌های بیشتری است تا بیان مطلوب پروتئین‌های اختصاصی و عدم تغییرات ژنتیکی نامطلوب در سلول‌های رشدیافته بر روی کاندوئیت‌ها را مورد تأیید قرار دهد. در نهایت پس از انجام آزمون‌ها و تأیید عدم تغییر ژنتیکی در سلول‌ها، این کاندوئیت‌ها را می‌توان برای استفاده در

15. Arslantunali DA, Budak G, Hasirci VA. Multiwalled CNT-pHEMA composite conduit for peripheral nerve repair. *Journal of Biomedical Materials Research Part A* 2014;102:828-41. doi:10.1002/jbm.a.34727
16. Gupta P, Sharan S, Roy P, Lahiri D. Aligned carbon nanotube reinforced polymeric scaffolds with electrical cues for neural tissue regeneration. *Carbon* 2015;95:715-24. doi:10.1016/j.carbon.2015.08.107
17. Bosi S, Fabbro A, Cantarutti C, Mihajlovic M, Ballerini L, Prato M. Carbon based substrates for interfacing neurons: Comparing pristine with functionalized carbon nanotubes effects on cultured neuronal networks. *Carbon* 2016;97:87-91. doi:10.1016/j.carbon.2015.07.074
18. Lovat V, Pantarotto D, Lagostena L, Cacciari B, Grandolfo M, Righi M, Spalluto G, Prato M, Ballerini L. Carbon nanotube substrates boost neuronal electrical signaling. *Nano letters* 2005;5:1107-10. doi:10.1021/nl050637m
19. Belkas JS, Shoichet MS, Midha R. Peripheral nerve regeneration through guidance tubes. *Neurological Research* 2004;26:151-60. doi:10.1179/016164104225013798
20. Webber C, Zochodne D. The nerve regenerative microenvironment: early behavior and partnership of axons and Schwann cells. *Experimental Neurology* 2010;223:51-9. doi:10.1016/j.expneurol.2009.05.037
21. Li X, Gonias SL, Campana WM. Schwann cells express erythropoietin receptor and represent a major target for Epo in peripheral nerve injury *Glia* 2005;51:254-65. doi:10.1002/glia.20202
22. Dijkstra JR, Meek MF, Robinson PH, Gramsbergen A. Methods to evaluate functional nerve recovery in adult rats: walking track analysis, video analysis and the withdrawal reflex. *Journal of Neuroscience Methods* 2000;96:89-96. doi:10.1016/S0165-0270(99)00174-0
23. Zarbakhsh S, Moradi F, Joghataei MT, Bahktiari M, Mansouri K, Abedinzadeh M. Evaluation of the functional recovery in sciatic nerve injury following the co-transplantation of schwann and bone marrow stromal stem cells in rat. *Basic and Clinical Neuroscience* 2013;4:291.
24. Zhu X, Cui W, Li X, Jin Y. Electrospun fibrous mats with high porosity as potential scaffolds for skin tissue engineering. *Biomacromolecules* 2008;9:1795-801. doi:10.1021/bm800476u
25. Wang X, Song G, Lou T, Peng W. Fabrication of nano-fibrous PLLA scaffold reinforced with chitosan fibers. *Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition* 2009;20:1995-2002. doi:10.1163/156856208X396083
26. Panseri S, Cunha C, Lowery J, Del Carro U, Taraballi F, Amadio S, Vescovi A, Gelain F. Electrospun micro-and nanofiber tubes for functional nervous regeneration in sciatic nerve transections. *BMC Biotechnology* 2008;8:1-2.
27. Mashinchian O, Turner LA, Dalby MJ, Laurent S, Shokrgozar MA, Bonakdar S, Imani M, Mahmoudi M. Regulation of stem cell fate by nanomaterial substrates. *Nanomedicine* 2015;10:829-47. doi:10.2217/nmm.14.225
28. Evans PJ, Mackinnon SE, Best TJ, Wade JA, Awerbuck DC, Makino AP, Hunter DA, Midha R. Regeneration across preserved peripheral nerve grafts. *Muscle & Nerve: Official Journal of the American Association of Electrodiagnostic Medicine* 1995;18:1128-38. doi:10.1002/mus.880181009
29. Wang X, Hu W, Cao Y, Yao J, Wu J, Gu X. Dog sciatic nerve regeneration across a 30-mm defect bridged by a chitosan/PGA artificial nerve graft. *Brain* 2005;128:1897-910. doi:10.1093/brain/awh517



## Repair of Sciatic Nerve Damage Using Poly-L-Lactic Acid Polymer/Carbon Nanotubes /Gelatin Nanofiber with Berberine

Morteza Alizadeh (Ph.D.)<sup>1</sup>, Anneh Mohammad Gharravi (Ph.D.)<sup>2</sup>, Mehdi Mirzaii (Ph.D.)<sup>2</sup>, Majid Salehi (Ph.D.)<sup>1,3\*</sup>

1- Dept. of Tissue Engineering, School of Medicine, Shahroud University of Medical Sciences, Shahroud, Iran.

2- School of Medicine, Shahroud University of Medical Sciences, Shahroud, Iran.

3- Sexual Health and Fertility Research Center, Shahroud University of Medical Sciences, Shahroud, Iran.

**Received:** 13 November 2021, **Accepted:** 19 December 2021

### Abstract:

**Introduction:** Tissue engineering using scaffold, cells, and growth factor creates the appropriate environment to repair, replace, or regenerate of failure or damaged tissue. Scaffolds play the role of ECM of normal tissue and support cell growth and differentiation. Electrospinning is a fast and efficient method that makes it possible to make nanofiber scaffolds. Phase separation is also a fast and inexpensive method and requires fewer tools.

**Methods:** In the present study, after obtaining the optimal factors in electrospinning and phase separation process, from gelatin polymer for nanofiber synthesis and from poly-L-lactic acid polymer (PLLA) and multi-wall carbon nanotubes for making porous and nanofiber conduits containing berberine (Beri) was used and evaluated by various tests.

**Results:** The results of in vitro characterization tests indicated the suitability of channels containing PLA/MWCNTs / nanofiber gelatin with berberine. Functional tests (including SFI, Hot plate test) and histological tests are made of a nerve and muscle (including H&E staining) as well as weighing of gastrocnemius muscle. The defect showed a significant improvement in berberine-receiving rats compared with the negative control group and the berberine-free groups.

**Conclusion:** synthesis of porous and nanofiber conduits from gelatin and poly-L-lactic acid polymer with electrospinning and phase separation process provide potential use in peripheral nerve tissue engineering.

**Keywords:** Electrospinning, Porous conduit, Phase separation, Nanofiber, Schwann cells

Conflict of Interest: No

\*Corresponding author: M. Salehi, Email: msalehi.te1392@gmail.com

**Citation:** Alizadeh M, Gharravi A.M, Mirzaii M, Salehi M. Repair of sciatic nerve damage using poly-L-lactic acid polymer/carbon nanotubes /gelatin nanofiber with berberine. Journal of Knowledge & Health in Basic Medical Sciences 2022;16(4):51-62.