



Fabrication and Characterization of Collagen Nanofiber/Fibroin Silk Scaffolds for Corneal Tissue Engineering

Shaghayegh Zargar ¹, Azadeh Asefnejad ^{2*}, Mahmoud Azami ³, Mehdi Farokhi ³

¹ Ph. D. Student., Department of Medical Engineering, Science and Research Branch, Islamic Azad University, Tehran, Tehran, Iran

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

³ Associate Professor, Department of Tissue Engineering, Faculty of Advanced Medical Technologies, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, Tehran, Iran

*Corresponding Author's Email: asefnejad@srbiau.ac.ir (A. Asefnejad)

Paper History:

Received: 2021-12-31

Revised in revised form: 2022-03-08

Scientific Accepted: 2022-03-18

Keywords:

Nanofiber Scaffold,
Collagen/Silk Fibroin,
Epidermal Growth Factor

Abstract Recently, corneal transplantation has been proposed as an effective treatment for irreversible corneal damage which facilitates access to healthy corneas; however, lack of allografts made the treatment subject to many limitations in medicine. In this regard, this study aimed to produce multilayer nanofiber scaffolds for corneal epithelial layer tissue engineering with scaffold compounds of fibroin silk/collagen-EGF. The samples were first prepared and identified from the perspective of engineering and biology applications. The results of this study showed that an alternative tissue with a suitable thickness and structure of nanofibers with suitable engineering and biological properties was successfully prepared. In addition, a scaffold was prepared in this research for tissue engineering of the corneal epithelial layer based on silk fibroin and collagen containing aloe vera and epithelial growth factor as the contributing factors and stimuli for better corneal repair. For this purpose, nanofiber three-layer scaffolds were prepared by a combination of electrospinning and electrospray methods characterized by engineering features, such as Scanning Electron Microscope (SEM), to study the degradability for their weight loss, water contact angle, and growth factor. Release as well as static and dynamic mechanical properties were also investigated. Biological characteristics such as cell binding and scaffold differentiation potential were further explored. The results of this study showed the successful preparation of an alternative with a suitable thickness and structure of nanofibers with suitable engineering and biological properties. The obtained results confirmed the production of a proper scaffold with suitable thickness and nanofiber structure. Therefore, the prepared product could potentially be used as a suitable alternative for repairing the damaged corneal epithelial layer.



<https://doi.org/10.30501/jamt.2022.320220.1203>

URL: https://www.jamt.ir/article_146959.html

1. INTRODUCTION

The corneal epithelium surface is the first barrier against the external environment, and when a part of the epithelial layer is damaged by physical, chemical, inflammatory, autoimmune, and genetic changes, the integrity of the underlying layers of the cornea will be lost which in turn leads to opacity in the cornea due to the lack of blood supply and disruption of the spontaneous regeneration of the corneal epithelium layer and Limbal Stem Cells (LSC). This condition may lead to complete blindness in the patients diagnosed with stem cell deficiency in the limbus region [1-4]. The main objective of this research was to fabricate a scaffold as a suitable alternative for the tissue engineering of the corneal epithelial layer with a nanofiber microstructure consisting of collagen and silk fibroin as a base structure reinforced with Epidermal Growth Factor (EGF) [5-6]. For this purpose, a three-layer nanofiber scaffold was prepared by a combination of electrospinning and electrospraying methods and characterized by bioengineer and biological methods. The obtained results showed the success in preparing a

replacement with an appropriate thickness and nanofiber structure with mechanical and biological properties suitable for corneal epithelium application [7-9]. This tissue has an excellent cell viability and adhesion on the surface of this scaffold and proper growth factor release. Therefore, the prepared product can potentially be used as a suitable replacement for repairing the damaged cornea.

2. MATERIALS AND METHODS

In this research, silk fibroin from silkworm was obtained according to the instructions given in the previously published article [9, 10]. To this end, first, the larvae were removed from the silkworm cocoons and boiled in an aqueous solution of Na₂CO₃ with the salt concentration of 0.02 M at a temperature of 80 °C for 40 minutes. Then, the fibers were boiled for two and three times. The samples were then washed with distilled water for 30 minutes. The degummed silk fibers were dried for at least 12 hours. In the next step, the degummed fibers were dissolved in suitable dissolution conditions in a 9.3 M LiBr aqueous solution at the

Please cite this article as: Zargar, Sh., Asefnejad, A., Azami, M., Farokhi, M., "Fabrication and characterization of collagen nanofiber/fibroin silk scaffolds for corneal tissue engineering", *Journal of Advanced Materials and Technologies (JAMT)*, Vol. 11, No. 3, (2022), 15-30. (<https://doi.org/10.30501/jamt.2022.320220.1203>).



temperature 70 °C and dissolution time of three hours. The obtained solution was dialyzed for two days in a cellulose dialysis tube containing distilled water until the above salt molecules were removed from the structure and dried using a freeze dryer. The used collagen was extracted from the Achilles tendon according to the published research [9, 10].

3. RESULTS AND DISCUSSION

The obtained results for different types of samples revealed that the pure collagen, aloe vera, and fibroin samples extracted in this study were used to effectively produce the scaffolds and ensure their chemical nature. Electrospinning technique is known as the most common laboratory method for producing all kinds of polymer nanofibers. The stress-strain diagram obtained from the mechanical properties for different types of nanofiber scaffolds was also presented. Based on these results, the yield stress obtained from different samples ranged from 2.85 to 11.5 MPa, and elastic modulus from 280 MPa to 1250 MPa, indicating the composition of the fabricated materials as well as cross-linking. The cross-linked silk fibroin sample was characterized by the utmost mechanical properties while the non-cross-linked fibroin/collagen/aloe vera sample had the lowest values. Therefore, the obtained results confirmed that addition of collagen and aloe vera decreased the mechanical properties while the cross-linking of each sample up to three times increased the strength and elastic modulus of the samples. In the final product, the yield strength elastic modulus of the cross-linked fibroin/collagen/aloe vera sample were about 5.3 MPa and 625 MPa, respectively.

4. CONCLUSION

In this study, the designed scaffold was prepared for corneal epithelial layer based on silk fibroin and collagen containing aloe vera and vascular growth factor as the supporting and stimulating factors for better corneal repair. For this purpose, a three-layer nanofiber scaffold was prepared based on a combination of electrospinning and electrospaying methods. The samples were then characterized using Scanning Electron Microscopy (SEM), degradability investigation based on weight loss, water contact angle, growth factor release, and static-dynamic mechanical properties. Biological behaviour such as cell attachment, cell viability, and differentiation potential of the scaffold

were also studied. The obtained results from this research confirmed the successful preparation of a suitable sample with nanostructure nanofiber characterized by engisufficient biological properties. Therefore, the prepared product can potentially be used as a suitable candidate to repair the damaged cornea.

5. ACKNOWLEDGEMENT

The authors of the article are grateful for the valuable guidance of the professors at Islamic Azad University and their supports throughout this research.

REFERENCES

1. Ma, X. -Y., Bao, H. -J., Cui, L., Zou, J., "The graft of autologous adipose-derived stem cells in the corneal stroma after mechanic damage", *PLOS ONE*, Vol. 8, No. 10, (2013), e76103. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0076103>
2. Borene, M. L., Barocas, V. H., Hubel, A., "Mechanical and cellular changes during compaction of a collagen-sponge-based corneal stromal equivalent", *Annals of Biomedical Engineering*, Vol. 32, No. 2, (2004), 274-283. <https://link.springer.com/article/10.1023/B:ABME.0000012747.97620.3a>
3. Lin, H., Li, W., Dong, N., Chen, W., Liu, J., Chen, L., Yuan, H., Geng, Z., Liu, Z., "Changes in corneal epithelial layer inflammatory cells in aqueous tear-deficient dry eye", *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, Vol. 51, No. 1, (2010), 122-128. <https://doi.org/10.1167/iovs.09-3629>
4. Holan, V., Javorkova, E., "Mesenchymal stem cells, nanofiber scaffolds and ocular surface reconstruction", *Stem Cell Reviews and Reports*, Vol. 9, No. 5, (2013), 609-619. <https://doi.org/10.1007/s12015-013-9449-0>
5. Rodríguez-Vázquez, M., Vega-Ruiz, B., Ramos-Zúñiga, R., Saldaña-Koppel, D. A., Quiñones-Olvera, L. F., "Chitosan and its potential use as a scaffold for tissue engineering in regenerative medicine", *BioMed Research International*, (2015), 1-15. <https://doi.org/10.1155/2015/821279>
6. Ciolino, J. B., Dohlman, C. H., "Biologic keratoprosthesis materials", *International Ophthalmology Clinics*, Vol. 49, No. 1, (2009), 1. <https://doi.org/10.1097/IIO.0b013e3181924904>
7. Griffith, M., Harkin, D. G., "Recent advances in the design of artificial corneas", *Current Opinion in Ophthalmology*, Vol. 25, No. 3, (2014), 240-247. <https://doi.org/10.1097/ICU.0000000000000049>
8. Altman, G. H., Diaz, F., Jakuba, C., Calabro, T., Horan, R. L., Chen, J., Lu, H., Richmond, J., Kaplan, D. L., "Silk-based biomaterials", *Biomaterials*, Vol. 24, No. 3, (2003), 401-416. [https://doi.org/10.1016/S0142-9612\(02\)00353-8](https://doi.org/10.1016/S0142-9612(02)00353-8)
9. Hazra, S., Nandi, S., Naskar, D., Guha, R., Chowdhury, S., Pradhan, N., Kundu, S. C., Konar, A., "Non-mulberry silk fibroin biomaterial for corneal regeneration", *Scientific Reports*, Vol. 6, No. 1, (2016), 1-13. <https://doi.org/10.1038/srep21840>
10. Surjushe, A., Vasani, R., Saple, D. G., "Aloe vera: A short review", *Indian Journal of Dermatology*, Vol. 53, No. 4, (2008), 163-166. <https://doi.org/10.4103/0019-5154.44785>



مقاله کامل پژوهشی

ساخت و مشخصه‌یابی داربست‌های نانوالیاف کلاژن/فیبروئین ابریشم برای مهندسی بافت قرنیه

شقایق زرگر^۱، آزاده آصف‌نژاد^{۲*}، محمود اعظمی^۳، مهدی فرخی^۴^۱ دانشجوی دکتری، گروه مهندسی پزشکی، دانشکده علوم و فناوری‌های پزشکی، واحد علوم و تحقیقات، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، تهران، ایران^۲ استادیار، گروه مهندسی پزشکی، دانشکده علوم و فناوری‌های پزشکی، واحد علوم و تحقیقات، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، تهران، ایران^۳ دانشیار، گروه مهندسی بافت، دانشکده فناوری‌های نوین پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی تهران، تهران، تهران، ایران

چکیده در این مطالعه، داربست‌های نانوالیاف، در چند لایه، برای کاربرد مهندسی بافت لایه پوششی (اپیتلیال) قرنیه با فیبروئین/کلاژن/آلوئه‌ورا ساخته و ارزیابی شدند. داربست‌های نانوالیاف، برای مهندسی بافت لایه پوششی قرنیه، بر پایه فیبروئین ابریشم و کلاژن حاوی آلوئه‌ورا و فاکتور رشد پوشش، به‌منزله عوامل تقویت‌کننده و محرک در ترمیم بهتر قرنیه، ساخته شدند. بدین منظور، داربست‌های سه‌لایه نانوالیافی با ترکیبی از روش‌های الکتروریسی و الکتروپاشش و با مشخصه‌یابی به‌کمک میکروسکوپ الکترونی روبشی (SEM)، بررسی کاهش وزن، زاویه تماس آب و فاکتور رشد تهیه شدند. رهایش، آزادسازی و خواص مکانیکی ایستای داربست‌ها نیز بررسی شدند. ویژگی‌های زیستی مانند اتصال سلولی، زنده ماندن سلول و قابلیت تمایز داربست نیز ارزیابی شدند. نتایج این مطالعه نشان داد که می‌توان، به این طریق، محصولی تهیه کرد که جایگزینی مناسب با ضخامت و ساختار نانوالیافی با خواص مهندسی و زیستی برای ترمیم لایه پوششی آسیب‌دیده قرنیه باشد.

تاریخچه مقاله:

ثبت اولیه: ۱۴۰۰/۱۰/۱۰

دریافت نسخه اصلاح‌شده: ۱۴۰۰/۱۲/۱۷

پذیرش علمی: ۱۴۰۰/۱۲/۲۷

کلیدواژه‌ها:

داربست نانوالیافی، کلاژن/فیبروئین ابریشم، فاکتور رشد رپوستی

doi: <https://doi.org/10.30501/jamt.2022.320220.1203> URL: https://www.jamt.ir/article_146959.html

۱- مقدمه

زیرین قرنیه از بین می‌رود و بر اثر توقف خون‌رسانی و اختلال در بازسازی خودبه‌خودی لایه پوشش قرنیه و یاخته بنیادی لیمبال^۳ (LSC)، کدورت در قرنیه پدید می‌آید. این اتفاق حتی ممکن است به نابینایی در بیماران مبتلا به بیماری نقص یاخته بنیادی ناحیه لیمبوس^۴ (لکه زرد) بینجامد [۱]. براساس آمارهای سازمان بهداشت جهانی، هر ساله، حدود ۳۸ میلیون نابینایی رخ می‌دهد که بیشتر از ۲۵ درصد آن مربوط به قرنیه است [۲]. اختلال قرنیه معمولاً بر اثر التهاب، ضربه^۵، سوختگی‌های شیمیایی یا حرارتی، بیماری‌های سامانه‌ای و همچنین بر اثر

قرنیه سالم یکی از علائم بینایی چشم است. سطح قرنیه در قدرت انکساری چشم بسیار تأثیرگذار است. از این رو، سامانه بینایی، بدون شفافیت در ساختار قرنیه، نمی‌تواند عملکرد درست و مناسبی داشته باشد. سطح پوشش (اپیتلیوم)^۱ قرنیه نخستین سد در برابر محیط بیرونی است و هنگامی که بخشی از لایه پوششی^۲ توسط انواع عوامل فیزیکی، شیمیایی، التهابی، خودایمنی و تغییرات ژنتیکی آسیب می‌بیند، تمامیت لایه‌های

^۱ Epithelium^۲ Epithelial Layer^۳ Limbal Stem Cell (LSC)^۴ Limbus^۵ Trauma

*عهده دار مکاتبات: آزاده آصف‌نژاد

نشانی: تهران، تهران، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد علوم و تحقیقات، دانشکده علوم و فناوری‌های پزشکی، گروه مهندسی پزشکی، تلفن: ۰۲۱-۴۴۸۶۹۸۲۷

دورنگار: -

پیام‌نگار: asefnejad@srbiau.ac.ir

ترمیم قرنیه باید ویژگی‌هایی نظیر ساختار دوبعدی (صفحه‌ای)، انعطاف‌پذیری همراه با استحکام مکانیکی مناسب، قابلیت جذب رطوبت، شفافیت، تخلخل، عبوردهی مناسب اکسیژن و سرعت تخریب‌پذیری مناسب داشته باشد [۱۱].

برای دستیابی به چنین ساختارهایی، تاکنون، دو راهبرد کلی به‌کار گرفته شده است: استفاده از غشاهای طبیعی فراوری‌شده نظیر غشاهای طبیعی شده و استفاده از ساختارهای دوبعدی تهیه‌شده با روش‌های مهندسی متداول در مهندسی بافت. در خصوص راهبرد اول، می‌توان به مطالعات پژوهشگرانی اشاره کرد که سلول‌های اندوتلیال^۶ قرنیه را روی غشا کشت کردند. نتایج این پژوهش‌ها نشان داده است که این داربست به سلول‌های اندوتلیال آسیب می‌زند [۱۲]. در مطالعات دیگری که از پرده درون‌شامه‌ای استفاده شد، اثربخشی آن روی سلول‌های اندوتلیال نسبت به کشت روی سطح ظروف کشت پلی‌استایرنی نشان داده شده است [۶، ۷ و ۱۳]. بایود^۷ و همکارانش، در سال ۲۰۱۲، از بافت بی‌یاخته‌ای^۸ گاو در پژوهش خود استفاده کردند که نتایج آن موفقیت‌آمیز بود [۱۴ و ۱۵].

ماتریس‌های آب‌زلی^۹، هنگام کاربرد در این سامانه‌ها، قابلیت چشمگیری از خود نشان داده‌اند، اما محدودیت‌هایی مانند استحکام مکانیکی ناکافی و نداشتن قابلیت بخیه زدن نیز در آن‌ها دیده شده است. از این‌رو، برای دستیابی به ساختار مناسب‌تر در بسیاری از مطالعات، از نوعی ساختار دوبعدی، متشکل از نانوالیاف با عارضه‌نگاری^{۱۰} و تخلخل‌هایی در اندازه نانو، بهره گرفته شده است. پژوهش‌ها نشان می‌دهد نانوالیاف توانایی شبیه‌سازی ماتریس برون‌یاخته‌ای^{۱۱} (ECM) را دارند و یاخته‌های بنیادی روی سطح نانوالیاف بهتر رشد می‌کنند [۲]. هدف از انجام این پژوهش، ساخت داربستی مناسب، برای کاربرد در مهندسی بافت لایه پوششی قرنیه با ساختاری نانوالیافی متشکل از کلاژن و فیبروئین ابریشم است. این داربست، ساختاری به‌شمار می‌رود که با فاکتور رشد روپوستی

اختلالات آسیب‌شناسی^۱ بافت‌های مجاور پدید می‌آید که در نهایت می‌تواند به بینایی آسیب‌بزند یا موجب نابینایی شود [۳]. اولین انتخاب برای درمان این بیماران کراتوپلاستی یا پیوند قرنیه^۲ است. اما، امروزه، کمبود اهداکننده قرنیه و افزایش تقاضا برای پیوند قرنیه به بحرانی جهانی تبدیل شده است. از طرفی، افزایش تعداد جراحی‌های لیزیک باعث کاهش کیفیت قرنیه‌های اهدایی‌ای شده است که قابلیت پیوند ندارند. به‌علاوه، حتی در بهترین حالت، عوارض ایمنی‌شناسی پیوند و عفونت و التهاب پس از پیوند، عدم انطباق عصبی، عدم تطابق با سلول‌های پوششی و همچنین عدم چسبندگی مناسب با سلول‌های اطراف مطرح می‌شوند [۴-۶]. از این‌رو، ضرورت استفاده از جایگزین‌های مناسب برای ترمیم و درمان بافت قرنیه بیمار احساس می‌شود. برای مثال، غشای درون‌شامه‌ای انسانی^۳ (HAM) یکی از جایگزین‌هایی است که علی‌رغم قابلیت چشمگیر در کاهش التهاب و کمک به التیام زخم و از بین بردن علائم فیبروتیک^۴، ممکن است با مشکلاتی مانند در دسترس نبودن، تفاوت در کیفیت غشاهای درون‌شامه‌ای به دلیل تفاوت سن و سلامت اهداکنندگان، احتمال خطر آلودگی و انتقال بیماری‌های عفونی و تغییرات زیستی بین بافت‌های دهنده و گیرنده همراه باشد [۷-۹]. روش درمانی دیگر، برای ترمیم و درمان بافت قرنیه، استفاده از قرنیه مصنوعی است که این روش نیز با مشکل عدم انطباق کاراندازشناختی^۵ همراه است [۱۰-۱۱]. روش دیگر، در درمان آسیب‌های قرنیه، استفاده از قرنیه ساخته‌شده با زیست‌سازگاری و بازدهی زیستی بیشتر با استفاده از مهندسی بافت است [۳]. هدف اصلی مهندسی بافت در ترمیم بافت آسیب‌دیده یا از بین رفته و احیای فعالیت طبیعی آن، استفاده از جایگزین‌های زیستی مناسب است [۲ و ۹]. بر این اساس، با به‌کارگیری مواد زیستی مناسب با بافت موردنظر، داربست‌هایی موقتی، برای حمایت و هدایت سلول‌ها، به‌منظور تشکیل بافت جدید ساخته می‌شوند. بنابراین، طراحی مناسب، انتخاب ماده اولیه و روش ساخت داربست، در این حوزه، بسیار مهم است [۱۰]. با توجه به ساختار قرنیه طبیعی، داربست مناسب برای

⁷ Bayyoud

⁸ Acellular

⁹ Hydrogel

¹⁰ Topography

¹¹ Extracellular Matrix (ECM)

¹ Pathologic

² Cornea Transplant (Keratoplasty)

³ Human Amniotic Membrane (HAM)

⁴ Fibrotic

⁵ Physiological

⁶ Endothelial

سطحی، قرارگیری در محلول آب و الکل و پس از شست‌وشو با آب یون‌زدایی شده، در محلول حاوی آنزیم کلاژناز، در دمای ۴ درجه سلسیوس، به مدت ۷۲ ساعت، روی لرزاننده^۸ قرار گرفتند. پس از آن، ژل به دست آمده، به مدت ۶۰ دقیقه، در گریزانه‌ای^۹ با دور ۱۲۰۰۰ قرار گرفت. مایع گریز داده شده، در دمای منفی ۸۰ درجه سلسیوس، به مدت ۲۴ ساعت نگهداری شد. در انتها، محلول منجمد شده، با استفاده از خشک‌کن انجمادی، به مدت ۴۸ ساعت، خشک شد. کلاژن به دست آمده نهایتاً، در دمای منفی ۲۰ درجه سلسیوس، برای استفاده‌های بعدی، در فریزر نگهداری شد. به منظور استخراج عصاره آلوئه‌ورا، ابتدا برگ‌ها از بدنه اصلی گیاه جدا و سپس به خوبی با آب شسته و در نهایت خشک شدند. سپس، پوسته سبز خارجی با دقت از ژل میانی گیاه جدا شد تا ژل سفید خالص، تا جایی که ممکن است، از قسمت میانی برگ خارج شود. سپس، هر ۱۰۰ سی سی از ژل استخراج شده با مقدار برابری از اتر شیمیایی و آب یون‌زدایی شده مخلوط شد و داخل خشکانه^{۱۰} ریخته و به مدت یک ساعت، داخل خشکانه مرتب همزده شد تا ژل به دست آمده کاملاً باز و یک دست شود و مخلوط سه فاز به دست آید. در مرحله بعد، ژل باز شده با دقت از خشکانه خارج و داخل بشر ریخته شد (به طوری که مخلوط آب و اتر در خشکانه باقی ماند). سپس، ژل به دست آمده، به مدت ۸ ساعت، روی گرم‌کن^{۱۱} با دمای حدود ۴۷ درجه سلسیوس، به منظور همگن‌سازی و یک دست شدن، قرار داده شد و عصاره به دست آمده در دمای منفی ۲۰ درجه سلسیوس منجمد و سپس با خشک‌کن انجمادی خشک شد تا در مراحل بعدی استفاده شود.

۲-۲- ساخت داربست نانوالیافی

داربست طراحی شده در این مطالعه، طی سه مرحله فرایند الکترورسی، الکتروپاشش و مجدداً الکترورسی تهیه شد. این مراحل شامل الکترورسی یک لایه فیبروئین/کلاژن (یک بار

(اپیدرمال)^۱ (EGF) و آلوئین^۲ موجود در عصاره آلوئه‌ورا، به منزله عوامل کمک‌کننده و تحریک‌کننده برای ترمیم بهتر قرنیه، تقویت می‌شود. بدین منظور، داربست سه لایه نانوالیافی با ترکیبی از روش‌های الکترورسی^۳ و الکتروپاشش^۴ تهیه و با روش‌های مهندسی و زیستی مشخصه‌یابی شد. نتایج به دست آمده از این پژوهش نشان داد که تهیه جایگزینی با ضخامت مناسب و ساختار نانوالیافی، با خواص مکانیکی و زیستی و ویژگی‌هایی نظیر زنده‌مانی و چسبندگی سلولی بسیار عالی روی سطح این داربست و رهایش مناسب فاکتور رشد، با موفقیت همراه بوده است. بنابراین، محصول تهیه شده می‌تواند جایگزین بالقوه مناسبی برای ترمیم قرنیه آسیب دیده باشد.

۲- مواد و روش تحقیق

۲-۱- استخراج فیبروئین ابریشم، کلاژن و عصاره آلوئه‌ورا

در این مطالعه، بر اساس مقاله رضوانی و همکاران [۱۶]، فیبروئین ابریشم از پيله کرم ابریشم استخراج شد. بدین منظور، ابتدا، کرمینه‌ها^۵ از درون پيله‌های کرم ابریشم خارج شدند و پيله‌ها درون محلول آبی کربنات سدیم (Na_2CO_3)، با غلظت نمک ۰/۰۲ مولار، در دمای ۸۰ درجه سلسیوس و به مدت ۴۰ دقیقه جوشانده شدند. سپس، الیاف، دو تا سه مرتبه و هر بار به مدت ۳۰ دقیقه، با آب مقطر شسته شدند. الیاف ابریشم صمغ‌زدایی شده، حداقل به مدت ۱۲ ساعت، خشک شدند. در مرحله بعد، فیبرهای صمغ‌زدایی شده در شرایط مناسب انحلال، شامل محلول آبی برمید لیتیم (LiBr) ۹/۳ مولار، دمای ۷۰ درجه سلسیوس و زمان انحلال ۳ ساعت، حل شدند. محلول به دست آمده، به مدت دو روز، داخل لوله تراکافت^۶ سلولزی حاوی آب مقطر تراکافت شد تا مولکول‌های نمک از ساختار خارج شود و سپس با استفاده از خشک‌کن انجمادی^۷، خشک و آماده استفاده در مراحل بعدی شد. کلاژن مورد استفاده در این مطالعه از تاندون آشیل بر اساس پژوهش‌های قبلی، استخراج شد [۱۵-۱۸]. نمونه‌های دریافتی تاندون، پس از تمیزکاری

⁷ Freeze Dryer

⁸ Shaker

⁹ Centrifuge

¹⁰ Desiccator

¹¹ Heater

¹ Epidermal Growth Factor

² Aloin

³ Electrospinning

⁴ Electrospray

⁵ Larvae

⁶ Dialysis

سلیسیوس قرار گرفتند و سپس، با خشک‌کن انجمادی، فرایند خشک‌شدن، به مدت شش ساعت، انجام شد. الکتروریسی لایه سوم (کلاژن/فیبروئین)، بدون آلوده‌ورا، روی دو لایه قبلی که رهایش فاکتور رشد اضافه‌شده به لایه دوم را کنترل می‌کرد، انجام گرفت. برای این کار، فرایند لایه اول، به مدت نیم ساعت، تکرار شد.

۲-۳-۳- مشخصه‌یابی مواد و داربست‌های نانوالیافی

۲-۳-۱- ارزیابی پیوندهای شیمیایی به کمک آزمون طیف‌سنجی تبدیل فوریه زیرقرمز (FTIR)

آزمون طیف‌سنجی تبدیل فوریه زیرقرمز^۴ (FTIR)، برای شناسایی ماهیت پیوند و گروه‌های عاملی در داخل ترکیبات استخراج‌شده و همچنین الیاف به‌دست‌آمده از فرایند الکتروریسی انجام شد. برای این منظور، مواد آزمایش‌شده با پتاسیم برمید^۵ (KBr) مخلوط و سپس، تحت فشار، قرص موردنظر تهیه شد. طیف‌سنجی با قدرت تفکیک روبش cm^{-1} در محدوده عدد موجی دستگاه طیف‌سنج زیرقرمز و ناحیه میانی طیف IR، یعنی cm^{-1} ۴۰۰۰-۴۰۰، انجام شد.

۲-۳-۲- بررسی ریخت‌شناسی به کمک میکروسکوپ الکترونی روبشی (SEM)

به‌منظور بررسی ریخت‌شناسی داربست، از میکروسکوپ الکترونی روبشی^۶ (FESEM; Quanta 200F, U.S.) استفاده شد. به‌منظور آماده‌سازی نمونه‌ها، ابتدا، داربست موردنظر روی یک پایه قرار گرفت. سپس، پوششی از طلا روی آن اعمال شد و نهایتاً، با استفاده از میکروسکوپ در بزرگ‌نمایی‌های گوناگون، مشاهده شد.

۲-۳-۳- مطالعه خواص مکانیکی در حالت ایستا و پویا

از آزمون خواص مکانیکی ایستا برای تعیین مدول و استحکام کششی داربست استفاده شد. بدین‌منظور، طبق استاندارد (ASTM D882-02 (2002)، داربستی در ابعاد 10×30

بدون عصاره و یک بار با عصاره)، سپس الکتروپاشش فاکتور رشد روپوستی با فیبروئین حاوی EDC/NHS^۱ و نهایتاً الکتروریسی مجدد لایه کلاژنی بود. برای الکتروریسی لایه اول (فیبروئین/کلاژن)، ابتدا محلول ۸ درصد وزنی فیبروئین ابریشم در اسید فرمیک ۹۸ درصد، به مدت ۶ ساعت، روی همزن مغناطیسی^۲، با سرعت ۸۰۰ دور در دقیقه، در دمای محیط تهیه شد. همچنین، محلول ۱۶ درصد وزنی کلاژن در اسید استیک ۳۸ درصد، به مدت ۲ ساعت، روی همزن مغناطیسی، با سرعت ۶۰۰ دور در دقیقه، در دمای محیط تهیه شد. سپس، ۴ سی‌سی محلول فیبروئین در اسید فرمیک با نرخ ۰/۳ سی‌سی در دقیقه و ولتاژ ۲۰ کیلوولت و ۲ سی‌سی محلول کلاژن در اسید استیک به‌دست‌آمده با نرخ ۰/۱ سی‌سی در دقیقه و ولتاژ ۱۲ کیلوولت، به‌صورت دوناژله، هم‌زمان، در فاصله ۱۵ سانتی‌متر از صفحه جمع‌کننده، الکتروریسی شد. نسبت مقدار فیبروئین به کلاژن، در این لایه، ۳ به ۱ در نظر گرفته شد. نمونه‌های تهیه‌شده در این مرحله، شامل دو دسته با عصاره و بدون عصاره آلوده‌ورا بودند. برای به‌دست‌آوردن صفحه الکتروریسی‌شده حاوی عصاره آلوده‌ورا، پس از انحلال کامل فیبروئین، محلول یک درصد وزنی عصاره آلوده‌ورا به محلول فیبروئین در اسید فرمیک افزوده و به مدت دو ساعت همزده شد. سپس، ۴ سی‌سی محلول حاوی عصاره با نرخ ۰/۳ سی‌سی در دقیقه و ولتاژ ۲۲ کیلوولت و ۲ سی‌سی محلول کلاژن در اسید استیک با نرخ ۰/۱ سی‌سی در دقیقه و ولتاژ ۱۲ کیلوولت، به‌صورت دوناژله، هم‌زمان، در فاصله ۱۵ سانتی‌متر از صفحه جمع‌کننده، الکتروریسی شد. محلول EDC، به نسبت ۴ به ۱ (به‌ازای هر میلی‌گرم بر میلی‌لیتر فاکتور رشد، ۰/۴ میلی‌گرم EDC و ۰/۱ میلی‌گرم NHS در سی‌سی)، در آب یون‌زدایی‌شده تهیه شد. سپس ۰/۲ سی‌سی محلول EDC با محلول کلاژن، فیبروئین و فاکتور رشد، هم‌زمان، با دور ۲۰۰ دور در دقیقه همزده و مخلوط شد و بلافاصله روی لایه اول الکتروریسی‌شده با ولتاژ ۴ کیلوولت و فاصله ۱۰ سانتی‌متر و نرخ جریان یک سی‌سی بر ساعت، با دور ۲۰۰ دور در دقیقه، به مدت نیم ساعت، الکتروپاشش شد. بلافاصله، صفحات الکتروپاشش‌شده در یخ‌زن^۳ با دمای منفی ۷۰ درجه

^۴ Fourier Transform Infrared Spectroscopy

^۵ Potassium Bromide

^۶ Scanning Electron Microscope

^۱ 1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimide/N-hydroxysuccinimide

^۲ Magnetic Stirrer

^۳ Freezer

به‌منظور بررسی میزان حیات سلول‌ها روی داربست از آزمون MTT استفاده شد. در این آزمون، حیات سلول‌ها براساس پارامترهای سوخت‌وسازی^۸ مثل احیای MTT بررسی می‌شود. MTT تترازولیوم^۹ زردرنگ محلول در آب است که سلول‌های زنده آن را به ماده‌ای نامحلول در آب، به‌صورت بلورهای بنفش به نام فورمازان^{۱۰}، تبدیل می‌کنند. فورمازان در DMSO حل و مقدار آن، با روش طیف‌نورسنجی و دستگاه خوانش میکروپلیت^{۱۱}، در طول موج ۶۰۰-۵۰۰ نانومتر، اندازه‌گیری شد. برای بررسی سمیت سلولی، نانوالیاف ساخته‌شده توسط الکتروریسی همراه با رده سلولی پوشش قرنیه و غلظت ۱۰۰۰۰ سلول در هر چاهک در ۱۰۰ میکرولیتر محیط کشت قرار گرفتند و به‌مدت ۲۴ ساعت، در گرم‌خانه^{۱۲} کشت شدند. سپس، نانوالیاف، با غلظت‌های گوناگون، رقیق‌سازی و به‌مدت ۴۸ ساعت نگهداری شدند. درنهایت، ظرف از گرم‌خانه خارج و محیط حاوی نانوالیاف و سلول‌ها، با استفاده از PBS، شسته شد. در مرحله بعد، محلول MTT با غلظت ۰/۵ درصد، به میزان ۲۰ میکرولیتر، به هر ظرف اضافه شد و به‌مدت ۴ ساعت، مجدداً در گرم‌خانه کشت شد. پس از ۴ ساعت، میزان ۱۰۰ میکرولیتر DMSO به محلول اضافه شد و میزان جذب آن، در مقایسه با گروه کنترل، توسط دستگاه خوانش گر میکروپلیت خوانده شد. کیفیت اتصال سلول‌ها روی سطح داربست با کمک SEM بررسی شد. پس از کاشتن سلول‌ها روی داربست‌ها و قرارگیری در محیط کشت، به‌مدت ۲ روز، برای آماده‌سازی، محیط کشت سلول‌ها خارج و داربست‌های حاوی سلول با نمک فسفات با خاصیت بافری، به‌مدت ۵ دقیقه، شست‌وشو و با پارافرمالدئید^{۱۳} ۰/۴ درصد، به‌مدت یک ساعت، محکم شدند. سپس، نمونه‌ها با الکل ۳۰، ۵۰، ۷۰، ۸۰، ۹۰ و ۱۰۰ درصد (هرکدام به میزان ۱۰ دقیقه) آب‌گیری و با پوشش نانومتری طلا پوشانده و توسط SEM بررسی شدند.

۲-۴- تمایز یاخته‌های بنیادی لیمبال قرنیه به پوشش قرنیه

میلی‌متر مربع، تهیه و میزان استحکام کششی برای هر نمونه، ۳ بار، تکرار و مقدار میانگین آن محاسبه شد. برای اندازه‌گیری خواص مکانیکی داربست در حالت پویا، از آزمون تحلیل حرارتی مکانیکی پویا^۱ (DMTA) استفاده شد. شایان ذکر است که تمامی نتایج زیستی و مکانیکی ۳ بار تکرار شدند.

۲-۳-۴- مطالعه زیست تخریب پذیری

به‌منظور مطالعه میزان زیست تخریب پذیری^۲، داربست‌های ساخته‌شده در محیط نمک فسفات با خاصیت بافری^۳ (PBS) قرار داده شد و در فواصل زمانی مشخص تا شش هفته، تغییرات وزن با استفاده از ترازو ثبت شد. نمونه‌ها در ابتدای آزمایش وزن شدند و سپس، هر یک از آن‌ها، هر هفته، پس از این‌که از محلول خارج شدند، وزن شدند. غشاهای قبل از اندازه‌گیری، با استفاده از تاوان^۴، خشک شدند. درصد کاهش وزن نمونه‌ها از وزن به‌دست‌آمده، قبل و بعد از تخریب، با استفاده از فرمول زیر محاسبه شد.

$$\text{Weight loss (\%)} = (W_0 - W_1) / W_0 \times 100 \% \quad (1)$$

در این رابطه، W_1 و W_2 ، وزن نمونه‌ها قبل و بعد از تخریب می‌باشد.

۲-۳-۵- مطالعه رهایش فاکتور رشد پوشش از داربست‌های

نانوالیافی

میزان رهایش فاکتور رشد روپوستی از ساختار داربست‌های سنتز شده با استفاده از کیت الایزا^۵ و طیف‌نورسنج^۶ دیازبست شرکت داندال اندازه‌گیری شد. بدین‌منظور، ابتدا، منحنی واسنجی^۷ این ترکیب، در غلظت‌های گوناگون، رسم شد و میزان رهایش یافته از آن، طی ۲۴ و ۴۸ ساعت، در داخل محلول نمک فسفات با خاصیت بافری اندازه‌گیری شد.

۲-۳-۶- بررسی میزان سمیت و اتصال سلولی

⁸ Metabolic

⁹ Tetrazolium

¹⁰ Formazan

¹¹ Microplate Reader

¹² Incubator

¹³ Paraformaldehyde

¹ Dynamic Mechanical Thermal Analysis (DMTA)

² Biodegradability

³ Phosphate-Buffered Saline (PBS)

⁴ Vacuum Oven

⁵ ELISA Kit

⁶ Spectrophotometer

⁷ Calibration

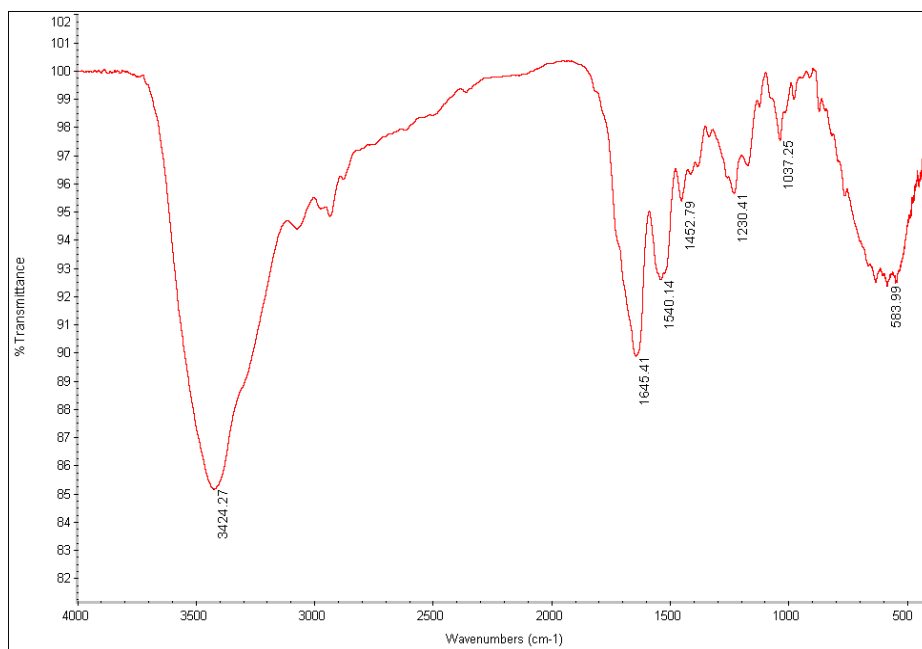
۲-۴-۱- روش تجزیه و تحلیل داده‌ها

نتایج این آزمایش، از نظر آماری، با استفاده از نرم‌افزار SPSS و آزمون تحلیل واریانس یک‌طرفه^۱ و آزمون توکی^۲، بررسی شدند. نتایج آماری با شاخص اختلاف $P < 0/05$ معنادار در نظر گرفته شدند.

۳- نتایج و بحث

نتایج به‌دست‌آمده برای انواع نمونه‌ها نشان داد که نمونه کلاژن، آلئوورا و فیبروئین خالص استخراج‌شده در این مطالعه،

برای تولید داربست‌های مدنظر و به‌منظور اطمینان از ماهیت شیمیایی آن‌ها، مناسب بوده است. روش الکترورسی به‌منزله متداول‌ترین روش آزمایشگاهی برای تولید انواع نانوالیاف بسپاری شناخته می‌شود. در طیف به‌دست‌آمده از نمونه‌های ترکیبی، دیده می‌شود که مجموع قله‌های ناشی از ترکیبات گوناگون در کنار یکدیگر قرار دارند و قله جدیدی که پیوند جدیدی را نشان دهد دیده نمی‌شود. بنابراین، می‌توان گفت که اختلاط رخ‌داده بین اجزا از نوع فیزیکی بوده است. نمودار FTIR این اختلاط شبکه‌ای^۳ در شکل ۱ نشان داده شده است.



شکل ۱. تحلیل نمودار FTIR که محور افقی مربوط به طول موج گروه عاملی و محور عمودی مربوط به شدت جذب گروه‌های عاملی به‌دست‌آمده از نمونه‌های گوناگون فیبروئین/کلاژن/آلئوورا/فاکتور رشد روپوستی شبکه‌ای

دادند که سلول‌های میان‌آکنه‌ای توانسته‌اند از نانوالیاف وارد سطح بینایی شوند [۱۶]. همچنین، او و دیگر پژوهشگران، پس از پژوهش‌هایی، به این نتیجه رسیدند که می‌توان داروهای گوناگونی را درون نانوالیاف وارد کرد؛ داروهای همچون کاهنده التهاب، سرکوب‌کننده ایمنی و همچنین فاکتورهای رشد که می‌توانند به موفقیت پیوند کمک کنند [۱۸]. کلاژن یکی از ترکیباتی است که برای مهندسی بافت قرنیه در مطالعات گوناگون استفاده شده است. در مطالعه‌ای که در سال ۲۰۰۷ انجام

در این روش، نانوالیاف پلیمری از جت یک سیال بر اثر اعمال یک میدان الکتریکی بین یک نازل و یک دستگاه جمع‌کننده نانوالیاف تشکیل می‌شود. بسپارهای طبیعی مثل کیتوسان، ژلاتین یا ترکیب هر دو یا بسپارهای مصنوعی مثل پلی‌وینیل‌الکل، پلی‌آمیدها، پلی‌لاکتیک اسید و پلی‌گلیکولیک اسید^۴ (PGA) با استفاده از روش الکترورسی به‌صورت نانوالیاف درآمده‌اند [۱۷]. هولن^۵ و همکارانش، با استفاده از سلول‌های میان‌آکنه‌ای^۶ نشان‌دارشده با PKH26 فلورسنت، نشان

⁴ PolyGlycolic Acid (PGA)

⁵ Holan

⁶ Mesenchymal Cells

¹ One-Way ANOVA

² Tukey

³ Crosslinked

است که می‌تواند حاملِ ورق‌های سلول‌های کشت‌شده پوشش در بازسازی پوشش قرنیه باشد [۲۸-۲۲].

در مطالعات بسیاری در کنار استفاده از غشاهای طبیعی، از انواع بسپارهای طبیعی و مصنوعی با ساختارهای دوبعدی با ضخامت کم برای ترمیم قرنیه استفاده شده است. براساس روش ساخت، به‌منظور تهیه ساختار دوبعدی بسپاری می‌توان از روش‌هایی نظیر ریخته‌گری لایه‌ای استفاده کرد که صفحه‌ای صاف، ولی بدون تخلخل، ایجاد می‌کند. برای مثال، در مطالعه‌ای، ژلاتین با کلاژن تغییر یافته پوشش داده شد که نتایج حاکی از بهبود کشت سلول‌های قرنیه بود [۱۳ و ۱۴]. ابریشم، بسپار دیگری بود که مادِن^۷ و همکارانش برای کشت سلول‌های اندوتلیال استفاده کردند. در پژوهش‌های دیگر، این ماده توسط اجزای ماتریس سلولی مثل کلاژن پوشش داده شد که کشت سلول‌ها را بهبود بخشید [۱۵]. کاوندی‌های^۸ گزارشگر فلورسنت فقط DNA حاوی توالی مکمل کاوند را می‌توانند تشخیص می‌دهند. بنابراین، استفاده از کاوند گزارشگر ویژگی‌های اختصاصی را شدیداً افزایش می‌دهد و انجام این روش را حتی در حضور dsDNA دیگر امکان‌پذیر می‌کند. با استفاده از برچسب‌های گوناگون رنگ، می‌توان از کاوندی‌های فلورسنت در روش‌های چندجزئی (هم‌تافت^۹) برای کنترل چندین توالی هدف در همان لوله استفاده کرد.

پژوهشگران بسیاری زیست‌ماده فیبروئین ابریشم (SF) را به‌منزله بستری برای تکثیر، تمایز و رشد سلولی پوشش قرنیه در شرایط آزمایشگاهی برون‌تنی^{۱۰} در مقایسه با غشای درون‌شامه‌ای (AM) انسان ارزیابی کردند. آن‌ها نتیجه گرفتند که سلول‌های پوشش قرنیه می‌توانند با ظاهری سنگ‌فرشی و پراز میکروپرز، روی سطح، همراه با اتصالات گسترده با سلول‌های مجاور خود، به SF و AM بچسبند و تکثیر شوند. در مقایسه با AM، ویژگی‌های منحصر به فرد فیبروئین، از جمله شفافیت، تهیه آسان و عاری بودن ذاتی از انتقال بیماری، آن را به بستری مناسب برای ترمیم زخم و بافت مهندسی قرنیه تبدیل کرده است. فیبروئین ابریشم توانست از تکثیر و تمایز سلول‌های پوشش قرنیه

شد، تأثیر ژل‌های کلاژنی اصلاح‌شده با پپتید^۱ YIGSR (Tyr-Ile-Gly-Ser-Arg) بر رفتار سلول پوششی قرنیه بررسی شد. در این پژوهش، مشخص شد که افزودن YIGSR باعث افزایش چسبندگی و تکثیر سلول‌های پوششی قرنیه انسانی می‌شود [۱۹]. در پژوهش‌های دیگری، عملکرد کلاژن انسانی نوع یک و سه به‌منزله جایگزین کاشتینه‌های قرنیه، در سال ۲۰۰۸، با یکدیگر مقایسه شدند. نتایج حاکی از آن بود که هر دو کلاژن نو ترکیب شبکه‌ای، شاخص‌های انکساری ۱/۳۵ با وضوح اپتیکی داشتند که مشابه شاخص‌های انکساری قرنیه انسان بود. خواص شیمیایی و مکانیکی آن‌ها نیز مشابه خواصی بود که در انسان وجود دارد. همان‌طور که در معاینات فوندوس^۲ مشهود بود، شفافیت نوری نیز در هر دو کاشتینه حفظ شده بود. بنابراین، نتایج نشان دادند که هر دو نوع کاشتینه متشکل از کلاژن نوع یک و سه می‌توانند به‌طور ایمن و پایدار، با قرنیه‌های میزبان یکپارچه شوند و به‌طور بالقوه بی‌خطر و مؤثر، جایگزین‌های مناسبی برای ماتریس قرنیه در نظر گرفته شوند [۲۰]. در سال‌های اخیر، نوعی داربست ساخته‌شده از کلاژن نوع یک را که از دم موش به‌دست آمده به‌منزله بستری مناسب برای رشد و تمایز سلول‌های پوششی و کراتوسیت‌های زی‌داربست قرنیه^۳ معرفی کرده‌اند [۲۱]. استفاده از کلاژن نوع یک و تهیه داربست نانوالیافی از آن، با استفاده از روش الکتروریسی، در پژوهش برنا^۴ و همکارانش نیز مطرح شده است. نتایج حاکی از آن بود که ریخت‌شناسی نانوالیافی به‌دست آمده، با الیاف کلاژن نوع یک در قرنیه طبیعی مشابهت دارد [۲۱]. فیبروئین به‌دست آمده از کرم ابریشم نیز برای ساخت جایگزین‌های قرنیه، در مطالعات مختلف، بررسی شده است. هیگا^۵ و همکارانش، در سال ۲۰۱۲، کاربرد فیلم‌های فیبروئین ابریشم متخلخل با نفوذپذیری بالا و تهیه‌شده از طریق مخلوط کردن فیبروئین ابریشم و پلی‌اتیلن گلیکول^۶ (PEG) را بررسی کردند. سلول‌های پوشش جدا شده از پوشش لیمبال خرگوش روی فیلم‌های ساخته‌شده از فیبروئین ابریشم کاشته شدند. نتیجه این پژوهش نشان داد که فیلم متخلخل فیبروئین ابریشم ماده‌ای زیست‌سازگار و بسیار شفاف

⁶ PolyEthylene Glycol (PEG)

⁷ Madden

⁸ Probes

⁹ Multiplex

¹⁰ In Vitro

¹ Aminin-Derived Peptide

² Fundus Examination

³ Corneal Stromal Cells (keratocytes)

⁴ Borene

⁵ Higa

بود بهتر از گروهی بود که از آلوئه‌ورا استفاده نکرده بود [۲۹]. در پژوهشی دیگر، فیلم‌های فیبروئینی با نسبت‌های صفر، ۱، ۳ و ۵ درصد وزنی عصاره آلوئه‌ورا به فیبروئین ابریشم، برای بررسی رشد سلول‌های اندوتلیال قرنیه سنتز شد. نتایج به‌دست‌آمده در آزمون میزان چسبندگی سلولی و رشد سلول‌های اندوتلیال قرنیه روی فیلم‌های سنتز شده نشان داد در فیلم‌های ۱ و ۳ درصد وزنی، به ترتیب، گسترده‌گی سلولی افزایش یافت و چسبندگی و گسترده‌گی سلولی در فیلم‌های حاوی ۵ درصد وزنی آلوئه‌ورا، در مقایسه با دو گروه ذکر شده، کاهش یافت. در گزارش‌های به‌دست‌آمده از نتایج این پژوهش در شرایط آزمایشگاهی درون‌تنی^۶ نیز، فیلم حاوی ۳ درصد وزنی آلوئه‌ورا شفافیت و پایداری بیشتری از گروه‌های دیگر داشت [۳۰]. فاکتورهای رشد همواره به‌منزله یکی از اجزای مؤثر در مهندسی بافت شناخته می‌شوند. در بین فاکتورهای رشد متعددی که با ترمیم زخم ارتباط دارند، EGF و اعضای هم خانواده آن، در همه فازهای ترمیم، استفاده شده‌اند. این مواد سبب تحریک مهاجرت سلولی، تکثیر و سنتز غشای تحتانی و اجزای ماتریس برون‌سلولی می‌شوند و نرخ التیام را در زخم‌های قرنیه و پوست تسریع می‌بخشند [۳۱]. EGF، به‌منزله ترکیب کاراندام‌شناختی موجود در اشک، سبب افزایش تکثیر و تفکیک سلول‌های کراتوسیت و اندوتلیال قرنیه می‌شود و این امر تأثیر اساسی این فاکتور رشد در بازسازی پوشش قرنیه را نشان می‌دهد [۳۲].

۳-۱- ریخت‌شناسی داربست‌ها

بر اساس نتایج حاصل از SEM، می‌توان ریخت‌شناسی و اندازه و آرایش داربست‌های نانوالیافی به‌دست‌آمده از ترکیبات گوناگون را مطالعه کرد که تصویر شکل ۲ مورفولوژی ساختار الکترورسی شده را نشان داده است.

همان‌طوری که در تصویر زیر دیده می‌شود، ساختارهای نانوالیافی، یکنواخت و بدون مهره^۷، با توزیع تصادفی و با قطری بین ۱۰۰ تا ۳۰۰ نانومتر در نمونه یک‌لایه‌ای که شامل کلاژن/فیبروئین با آلوئه‌ورا و بدون آن است و همچنین در نمونه سه‌لایه‌ای که نهایتاً با فیبروئین/کلاژن پوشانده شده است، با

پشتیبانی و رُخ‌نمود^۱ پوشش مشخصه نرمال قرنیه را حفظ کند [۲۷-۲۳]. در مطالعه‌ای دیگر، پژوهشگران نشان دادند فیلمی که از فیبروئین ساخته شده محیطی مناسب با قابلیت تخریب‌پذیری آرام را برای بازسازی عصبی قرنیه انسان و رشد یاخته‌های بنیادی زی‌داربست قرنیه انسانی فراهم می‌کند [۲۶]. هزارا^۲ و همکارانش، پس از پژوهشی که درباره داربست‌های قرنیه ساخته‌شده از فیبروئین ابریشم انجام دادند، اعلام کردند که داربست‌های ابریشمی به‌راحتی ساخته می‌شوند و استحکام مناسبی دارند [۹]. در کنار استفاده از کلاژن و فیبروئین ابریشم به‌منزله ماده ساختاری در داربست قرنیه، از برخی عصاره‌های گیاهی برای بهبود عملکرد آن‌ها نیز استفاده شده است. عصاره به‌دست‌آمده از برگ‌های گیاه آلوئه‌ورا حاوی چندین ماده فعال دارویی از جمله پلی‌ساکاریدها، آنتراکینون، لکترین، سوپراکسید دیسموتاز، گلیکوپروتئین، ویتامین‌های A، C و E و مواد معدنی است که در بسیاری از پژوهش‌های انجام‌شده در زمینه التیام زخم، خواص ضدالتهابی و تسریع‌کننده روند بهبود زخم خوبی داشته است. یونگ^۳ و همکارانش موفق شدند داربست‌های فیلمی فوق‌العاده نازک و شفاف با ژل آلوئه‌ورا (AV) و فیبروئین ابریشم (SF) برای سلول‌های اندوتلیال قرنیه (CECs) بسازند. افزودن مقدار کمی ژل AV بقای سلولی را در داربست‌ها افزایش داد و عملکرد آن را به‌خوبی حفظ کرد. نتایج نشان داد فیلم‌های SF حاوی AV می‌تواند جایگزینی مناسب برای پیوند بافت قرنیه باشند [۲۷]. در مطالعه دیگری که کورتو^۴ و همکارانش، در سال ۲۰۱۴، در شرایط آزمایشگاهی برون‌تنی انجام دادند، پژوهشی درباره تأثیر آلوئه‌ورا در ترمیم و بسته‌شدن زخم قرنیه و فعالیت کلاژناز انجام دادند. نتایج آزمایش آن‌ها نشان داد که غلظت‌های پایین آلوئه‌ورا، از طریق کاهش شکل‌گیری بافت چندتارشوی^۵ و افزایش سرعت پوشش‌سازی قرنیه، تأثیر چشمگیری در بهبود زخم سطح قرنیه دارد [۲۸]. علاوه بر این، پژوهشگران، در سال ۲۰۱۵، تأثیر ژل آلوئه‌ورا را در تسهیل پوشش‌سازی مجدد قرنیه دارای سوختگی قلیایی در موش‌های سالم و دیابتی با هم مقایسه کردند که نتیجه آن بهبود روند پوشش‌سازی قرنیه در گروه نرمالی که از آلوئه‌ورا استفاده کرده

⁵ Fibrosis

⁶ In Vivo

⁷ Bead

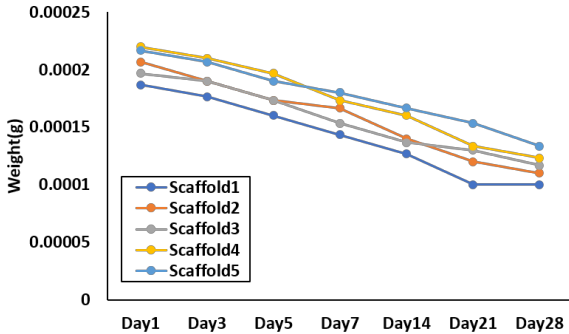
¹ Phenotype

² Hazra

³ Yung

⁴ Curto

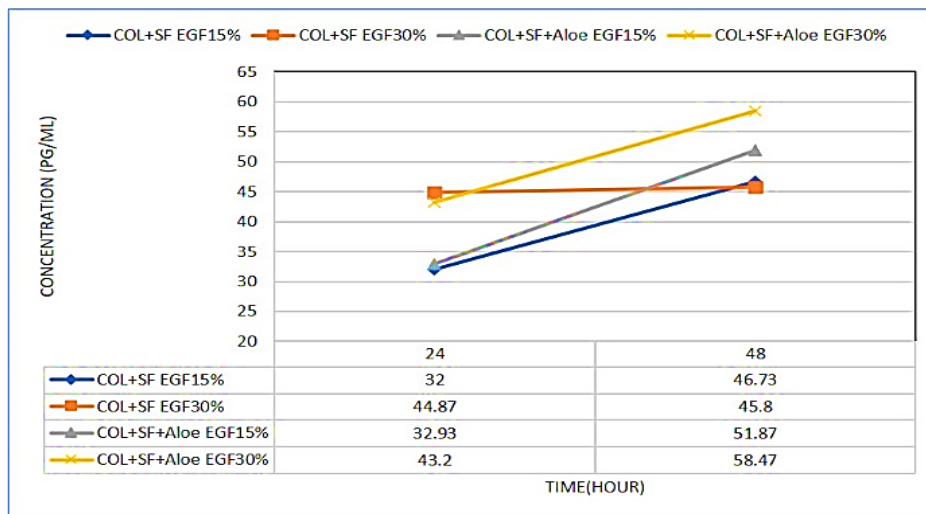
تقریباً یکسان است و با شیب نسبتاً مساوی کاهش می‌یابد. پس از گذشت ۴ هفته از شروع غوطه‌وری، تقریباً ۵۰ درصد از داربست‌ها تخریب شده است.



شکل ۳. نمایش تغییرات وزن برحسب گرم نمونه‌های تهیه‌شده در آزمون تخریب برای پنج نمونه داربست بعد از ۲۸ روز

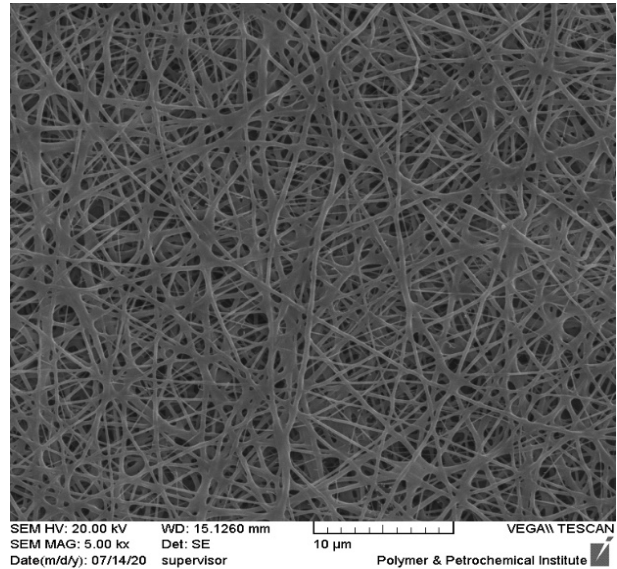
۳-۳- رهایش فاکتور رشد عروقی از داربست نهایی کلاژن/فیبروئین/آلوئه‌ورا/فاکتور رشد

غلظت فاکتور رشد عروقی افزوده‌شده به داربست نانوالیافی، در محیط اطراف، پس از کاشتینه‌شدن، بسیار مهم است. از این رو، میزان رهایش این ترکیب در محیط اطراف داربست، طی ۲۴ و ۴۸ ساعت، برای چهار نوع داربست با میزان افزودنی متفاوت فاکتور رشد (۱۵ و ۳۰ درصد)، با آلوئه‌ورا و بدون آن، مطالعه شد. در شکل ۴، نمودار تغییرات میزان EGF رهایش‌یافته، در ۲۴ و ۴۸ ساعت، نمایش داده شده است.



شکل ۴. نمودار تغییرات میزان فاکتور رشد و غلظت عروقی رهایش‌یافته از نمونه‌های گوناگون پس از ۲۴ و ۴۸ ساعت از غوطه‌وری در محیط شبیه‌سازی‌شده

موفقیت تشکیل شده‌اند. برای مطالعه نانوعارضه‌نگاری داربست‌های الیافی تهیه‌شده، از میکروسکوپ نیروی اتمی بهره گرفته شد.



شکل ۲. تصویر SEM داربست‌های نانوالیافی با ترکیب کلاژن-

فیبروئین ابریشم-فاکتور رشد

۳-۲- میزان تخریب

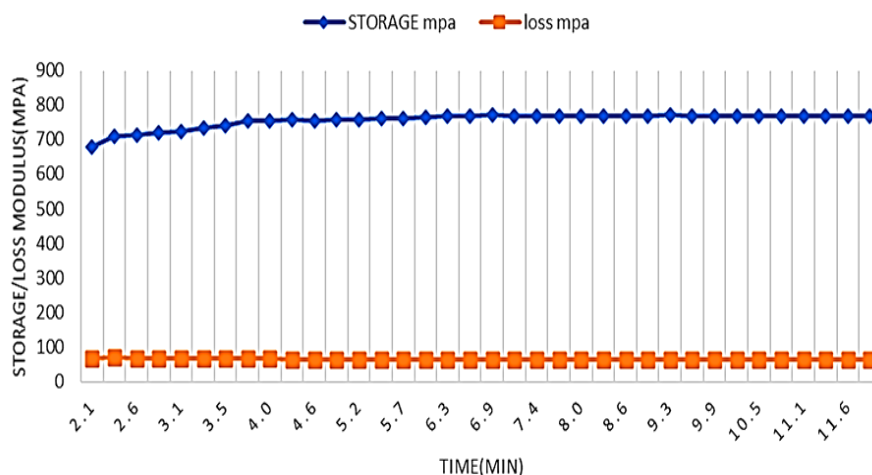
اندازه‌گیری میزان تخریب پنج نوع داربست تهیه‌شده در این مطالعه، از طریق سنجش تغییرات وزن نمونه‌ها طی ۲۸ روز انجام شد. در شکل ۳، نتایج به‌دست‌آمده از این مطالعه، به‌صورت نمودار تغییرات وزن، نشان داده شده است. همان‌طور که در این شکل دیده می‌شود، روند تغییرات برای همه انواع داربست‌ها

می‌کنند که افزودن کلاژن و آلئوئورا باعث افت خواص مکانیکی می‌شود و شبکه‌ای شدن هریک از نمونه‌ها، تا سه برابر، باعث افزایش استحکام و مدول الاستیک نمونه‌ها می‌شود. استحکام تسلیم محصول نهایی پیشنهادی در این مطالعه که همان نمونه فیبروئین/کلاژن/آلئوئورا شبکه‌ای است، برابر با $5/3$ و مدول الاستیکی آن برابر با 625 مگاپاسکال به دست آمد، درحالی‌که استحکام قرنیه طبیعی انسان، به صورت میانگین، برابر با $0/40 \pm 3/81$ و مدول الاستیکی در حدود 20 مگاپاسکال گزارش شده است. این امر نشان می‌دهد که محصول نهایی، از نظر مکانیکی، مقاومت لازم برای جایگزینی بافت قرنیه را دارد. علاوه بر ارزیابی خواص مکانیکی ایستا داربست منتخب تحت آزمون، خواص مکانیکی پویای حرارتی آن نیز بررسی شد. بدین منظور، داربست‌های کامل با ترکیب کلاژن/فیبروئین/آلئوئورا/EGF تهیه شده در این مطالعه، در حالت کششی با بسامد یک مگاهرتز و دمای ثابت استفاده شدند. در شکل ۵، نتیجه به دست آمده از این آزمون نمایش داده شده است. همان طوری که در شکل ۵ دیده می‌شود، مدول الاستیک تا بیش از ۸ برابر بالاتر از مدول ویسکوز است که این امر بر غلبه حالت جامد به ویسکوز در این محصول دلالت دارد و در طول زمان آزمون، هر دو مدول تقریباً یکسان بودند که از پایداری ماده در طول زمان حکایت می‌کند.

همان‌طور که در این نمودارها دیده می‌شود، داربست‌هایی که فاکتور رشد بیشتری دارند رهائش بیشتری از خود نشان می‌دهند. ضمن این‌که داربست‌های حاوی آلئوئورا، در مقایسه با نمونه‌های مشابه بدون آلئوئورا، باعث رهائش بیشتر فاکتور رشد شدند. محدوده رهائش تمام نمونه‌ها، در هر دو زمان ۲۴ و ۴۸ ساعت، بین ۳۰ تا ۶۰ نانوگرم بر میلی‌لیتر اندازه‌گیری شد. در این بین، نمونه‌هایی که ۳۰ درصد فاکتور رشد در ترکیشان وجود داشت غلظتی بین ۴۵ تا ۶۰ نانوگرم بر میلی‌لیتر در محیط اطراف رها کردند.

۳-۴- خواص مکانیکی داربست‌های تهیه شده

شکل ۵ نشان دهنده ی نمودار آزمون خواص مکانیکی پویا به دست آمده از آزمون خواص مکانیکی در حالت کشش، برای انواع گوناگون داربست‌های نانوالیافی نمایش داده شده است. براساس این نتایج، تنش تسلیم یا استحکام تسلیم به دست آمده از نمونه‌های گوناگون بین $2/85$ و $11/5$ مگاپاسکال و مدول یانگ بین 280 تا 1250 مگاپاسکال را نشان می‌دهد. ترکیب مواد سازنده و همچنین شبکه‌ای شدن یا نشدن، تأثیر چشمگیری در این مقادیر دارند. نمونه فیبروئین ابریشم شبکه‌ای، بیشترین خواص مکانیکی و نمونه فیبروئین/کلاژن/آلئوئورا شبکه‌ای نشده کمترین اعداد را داشته‌اند. بنابراین، نتایج تأیید



شکل ۵. نتایج به دست آمده از آزمون خواص مکانیکی مدول کاهش یافته و ذخیره شده بر حسب زمان بر حسب دقیقه

تهیه شده در این مطالعه شامل داربست فیبروئین ابریشم/کلاژن/فاکتور رشد عروقی ۱۵ است که اتصالات قوی یاخته‌های بنیادی لیمبال قرنیه به داربست الیاف را نشان می‌دهد.

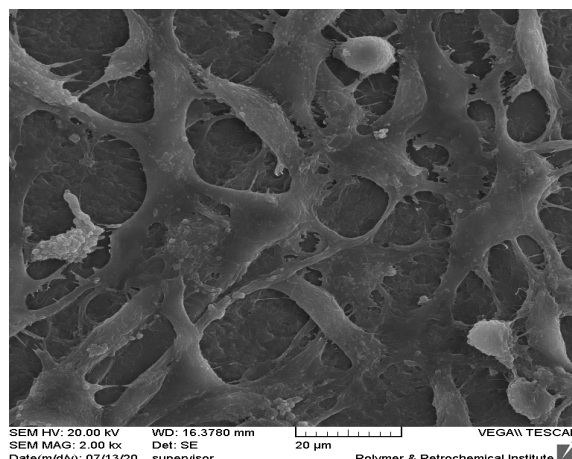
۳-۵- چسبندگی سلولی روی داربست‌های نانوالیافی توسط

SEM

شکل ۶، تصویر میکروسکوپ الکترونی رویشی به دست آمده از اتصال سلول‌ها روی انواع داربست‌های نانوالیافی

سلول‌های پوشش قرنیه انسان را تشکیل می‌دهند، در کشت‌های اولیه به صورت جمعیت ناخالص اند و نیز تعدادی سلول‌های اندوتلیال و خونی نیز در این کشت‌ها یافت می‌شوند، ولی در پاساژهای بعدی به صورت خالص درمی‌آیند. پُرگنه‌های خالص سلول‌های پوشش قرنیه، از لحاظ ریخت‌شناسی، شبیه به سلول‌های تارتنده‌ای^۳ و دوکی‌شکل هستند. به منظور اطمینان از ماهیت یاخته‌های بنیادی به دست آمده، از تحلیل یاخته‌سنجی شارشی استفاده شد. سلول‌های میان‌آکنه‌ای قرنیه به سلول‌های پوششی قرنیه روی داربست نانوالیافی را ارائه می‌دهد که در شکل ۷ نشان داده شده است. بدین منظور، سلول‌ها در سه گروه بدون تیمار، تیمار با محیط کشت تمایزی و سلول‌های کشت داده‌شده روی داربست به مدت ۲۱ روز، مطالعه و بررسی شدند. ضمن این‌که نمودارهای ستونی مربوط به چگالی سلولی نشان می‌دهند که چگالی گروه سلول‌های تیمار شده با محیط تمایزی یا رشد یافته روی داربست تهیه شده از چگالی سلول‌های گروه تیمار نشده کمتر است، غیرمستقیم نشان می‌دهند که این گروه‌ها در وضعیت تمایز هستند و رشد آن‌ها از سلول‌های تیمار شده با محیط تمایزی، عقب افتاده است. بنابراین، نتایج به دست آمده در این بخش، بر توانایی داربست تهیه شده در تمایز یاخته‌های بنیادی به سلول‌های پوششی دلالت دارد. داربست قرنیه انسانی برجسته‌ترین لایه قرنیه است که سازمانی منحصربه‌فرد از الیاف کلاژن با قطر یکنواخت و فاصله بین‌الیاف یکسان می‌باشد که حاوی بیش از ۲۰۰ تیغه^۴ کلاژنی فاقد سلول است. الیاف کلاژن، در مقیاس نانو، عمود بر تیغه‌های مجاور و به موازات یکدیگر چیده شده‌اند. مهندسی بافت قرنیه روشی مناسب و در حال رشد برای درمان نقایص قرنیه در نظر گرفته می‌شود [۲۰-۱۴]. طراحی داربست مناسب با خواص فیزیکی و شیمیایی مطلوب برای حمایت از سلول و بافت، اولین گام برای هرگونه کاربرد مهندسی بافت است. از مشکلات اصلی ساخت این ساختار در شرایط آزمایشگاهی، داشتن داربستی با استحکام مناسب با بافت طبیعی قرنیه است [۳۸-۳۳]. داربست‌های نانوالیاف زیست‌تخریب‌پذیر می‌توانند بهترین روش برای تقلید از ساختار قرنیه طبیعی، به منظور تهیه ساختاری مطلوب برای اتصال و تکثیر سلول، در نظر گرفته شوند؛ زیرا بافت نانوالیافی

بنابراین، به نظر می‌رسد همه انواع ترکیبات توانسته‌اند سطح مناسبی برای اتصال سلولی فراهم کنند، هرچند، در شکل ۶، مشاهده می‌شود که تجمع داربست‌های حاوی فاکتور رشد عروقی بیشتر از سلول‌هاست. در این تصویر، دیده می‌شود که اتصالاتی قوی بین یاخته‌های بنیادی لیம்பال قرنیه و داربست الیاف برقرار است. سلول‌ها به خوبی به این داربست‌ها متصل شده و روی آن گسترش و تکثیر یافته‌اند.



شکل ۶. تصویر میکروسکوپی به دست آمده از چسبندگی و کیفیت اتصال سلول‌ها روی داربست کلاژن/فیبروئین/آلوه‌ورا/حاوی فاکتور رشد عروقی

۳-۶- میزان تکثیر و سمیت سلولی

به منظور بررسی سمیت احتمالی داربست نانوالیافی تهیه شده در این مطالعه، از آزمون MTT استفاده شد. در شکل ۷، نتایج حاصل از ارزیابی سمیت سلولی، بعد از یک روز کشت سلول نشان داده شده است. نتایج ارائه شده در شکل ۸ نشان می‌دهد که زنده‌مانی سلول‌ها در تمامی نمونه‌ها، از نمونه نانوالیافی شامل فیبروئین گرفته تا ترکیب آن با کلاژن، آلوه‌ورا و فاکتور رشد اندوتلیالی در دو درصد وزنی ۱۵ و ۳۰، بیش از ۸۵ درصد و در نتیجه، از این دیدگاه، قابل قبول است. اما براساس دیدگاه این آزمون، مشخص شد که زنده‌مانی نمونه حاوی فیبروئین/کلاژن با آلوه‌ورا و بدون آن بیشتر از بقیه نمونه‌هاست. براساس نتایج حاصل از یاخته‌سنجی شارشی^۱ یاخته‌های بنیادی لیம்பال قرنیه انسان، با توجه به این‌که این سلول‌ها درصد کمی از جمعیت

³ Fibroblastic

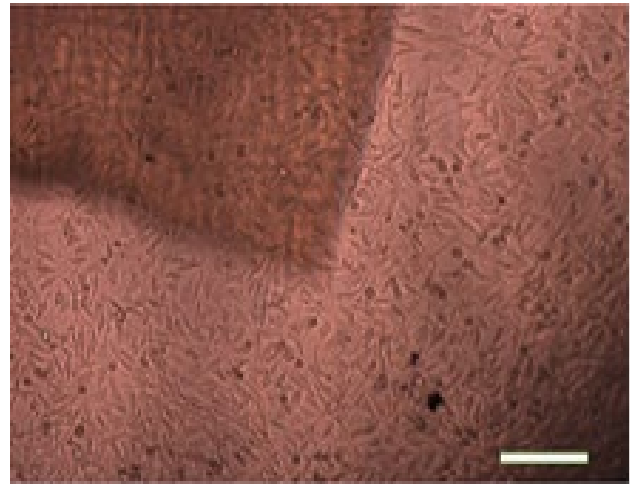
⁴ Lamella

¹ Flow Cytometry

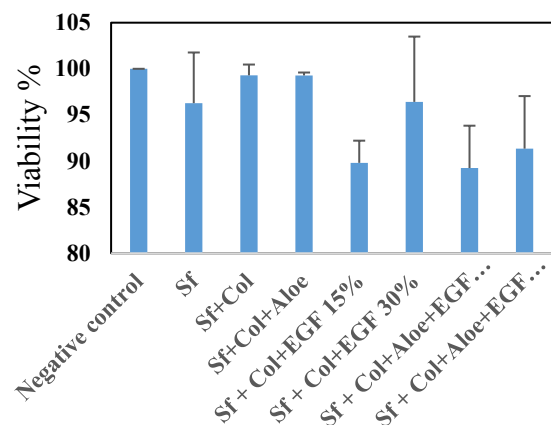
² Colony

نمونه‌های داربست نانوالیافی تهیه‌شده از ترکیب فیبروئین/کلاژن/آلوئه‌ورا/فاکتور رشد عروقی با استفاده از آزمون MTT نشان داده شده است. در بحث رهایش، فاکتور رشد عروقی بارگذاری‌شده در داخل داربست هم تأثیرگذار است. همان‌طوری که در نتایج این بخش مشاهده شد، غلظت فاکتور رشد رهایش‌یافته برای نمونه‌های ساخته‌شده بین ۳۰ تا ۶۰ نانوگرم بر میلی‌لیتر اندازه‌گیری شد. از طرفی، براساس گزارش‌های قبلی، در شرایط آزمایشگاهی برون‌تنی، میزان EGF موردنیاز برای رشتمان^۱ و مهاجرت سلول‌های پوششی قرنيه ۱۰ تا ۳۰ نانوگرم بر میلی‌لیتر است. این نتیجه نشان می‌دهد که مقدار فاکتور رشد رهایش‌یافته از داربست (حاوی ۱۵ درصد فاکتور رشد عروقی) در بازه مناسبی است و براساس گزارش‌های پیشین، اثربخشی مطلوبی را نشان می‌دهد. این اثربخشی در نتایج مربوط به اتصال سلولی نیز به‌خوبی مشخص است، به‌طوری‌که سلول‌های کشت‌یافته روی داربست‌های حاوی فاکتور رشد با چگالی بیشتری روی سطح اتصال یافتند و مشاهدات نشان دادند که سلول‌ها، روی داربست نانوالیافی فیبروئین تنها نیز، اتصال خوبی دارند. به‌علاوه، براساس آزمون MTT، زنده‌مانی سلول‌ها روی انواع داربست‌های ساخته‌شده در این مطالعه بسیار مناسب بود، به‌گونه‌ای که زنده‌مانی حداقل ۸۵ درصد مشاهده شد. در کنار ویژگی‌های مطلوب پیش‌بینی‌شده برای داربست مناسب با بازسازی قرنيه، می‌توان قابلیت تمایز یاخته‌های بنیادی قرنيه به سلول‌های پوششی را از ویژگی‌های مهم آن به‌شمار آورد. اگر این داربست بتواند بدون استفاده از محیط تمایزی، موجب تمایز سلول‌های پوششی شود، می‌تواند گزینه مناسبی برای جایگزینی قرنيه در نظر گرفته شود. همچنین، قابلیت تمایزی داربست تهیه‌شده در این مطالعه بررسی شد و نتایج به‌دست‌آمده نشان داد که داربست تهیه‌شده می‌تواند، حتی به‌تنهایی و بدون استفاده از محیط تمایزی، یاخته‌های بنیادی را به‌سمت تمایز به سلول‌های پوششی سوق دهد. بنابراین، از مجموع نتایج به‌دست‌آمده از روش‌های گوناگون ارزیابی ماده در این مطالعه، مشخص شد که داربست تهیه‌شده ویژگی‌های مطلوب موردنظر برای جایگزینی و بازسازی بافت قرنيه و همچنین قابلیت استفاده در این کاربرد را دارد. البته، به‌منظور اثبات عملکرد عملی این داربست، لازم

تولیدشده به این روش می‌تواند از شکل و عملکرد طبیعی ماتریس خارج‌سلولی تقلید کند [۲۶-۳۸].



شکل ۷. نتیجه میزان سمیت و میزان تکثیر با فیبروئین/کلاژن/عامل رشد



شکل ۸. نتیجه به‌دست‌آمده از آنالیز درصد زنده‌مانی سلول‌ها در مجاورت نمونه‌های داربست نانوالیافی تهیه‌شده از ترکیبات گوناگون شامل فیبروئین SF، فیبروئین/کلاژن SF+Col، فیبروئین/کلاژن/آلوئه‌ورا SF+Col+EGF و فیبروئین/کلاژن/آلوئه‌ورا/فاکتور رشد عروقی SF+Col+Aloe+EGF با توجه به این‌که زی‌داربست قرنيه، به‌طور طبیعی، حاوی ایاف کلاژن همسوست، الکترورسی کلاژن نوع I روش مناسبی برای دستیابی به این ساختار است، درحالی‌که ایاف تصادفی برای تقلید از لایه‌های پوششی و اندوتلیال مفیدند. در شکل ۸، نتایج به‌دست‌آمده از تحلیل زنده‌مانی سلول‌ها در مجاورت

¹ Mitosis

6. Ciolino, J. B., Dohlman, C. H., "Biologic keratoprosthesis materials", *International Ophthalmology Clinics*, Vol. 49, No. 1, (2009), 1. <https://doi.org/10.1097/HIO.0b013e3181924904>
7. Griffith, M., Harkin, D. G., "Recent advances in the design of artificial corneas", *Current Opinion in Ophthalmology*, Vol. 25, No. 3, (2014), 240-247. <https://doi.org/10.1097/ICU.0000000000000049>
8. Altman, G. H., Diaz, F., Jakuba, C., Calabro, T., Horan, R. L., Chen, J., Lu, H., Richmond, J., Kaplan, D. L., "Silk-based biomaterials", *Biomaterials*, Vol. 24, No. 3, (2003), 401-416. [https://doi.org/10.1016/S0142-9612\(02\)00353-8](https://doi.org/10.1016/S0142-9612(02)00353-8)
9. Hazra, S., Nandi, S., Naskar, D., Guha, R., Chowdhury, S., Pradhan, N., Kundu, S. C., Konar, A., "Non-mulberry silk fibroin biomaterial for corneal regeneration", *Scientific Reports*, Vol. 6, No. 1, (2016), 1-13. <https://doi.org/10.1038/srep21840>
10. Surjushe, A., Vasani, R., Saple, D. G., "Aloe vera: A short review", *Indian Journal of Dermatology*, Vol. 53, No. 4, (2008), 163-166. <https://doi.org/10.4103/0019-5154.44785>
11. Atiba, A., Wasfy, T., Abdo, W., Ghoneim, A., Kamal, T., Shukry, M., "Aloe vera gel facilitates re-epithelialization of corneal alkali burn in normal and diabetic rats", *Clinical Ophthalmology*, Vol. 9, (2015), 2019-2026. <http://dx.doi.org/10.2147/OPHTH.S90778>
12. Maurice, D. M., "The structure and transparency of the cornea", *The Journal of Physiology*, Vol. 136, No. 2, (1957), 263-286. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.1957.sp005758>
13. Peterson, J. L., Ceresa, B. P., "Epidermal growth factor receptor expression in the corneal epithelium", *Cells*, Vol. 10, No. 9, (2021), 2409. <https://doi.org/10.3390/cells10092409>
14. Bayyouf, T., Thaler, S., Hofmann, J., Maurus, C., Spitzer, M. S., Bartz-Schmidt, K. U., Szurman, P., Yoeruek, E., "Decellularized bovine corneal posterior lamellae as carrier matrix for cultivated human corneal endothelial cells", *Current Eye Research*, Vol. 37, No. 3, (2012), 179-186. <https://doi.org/10.3109/02713683.2011.644382>
15. Madden, P. W., Lai, J. N., George, K. A., Giovenco, T., Harkin, D. G., Chirila, T. V., "Human corneal endothelial cell growth on a silk fibroin membrane", *Biomaterials*, Vol. 32, No. 17, (2011), 4076-4084. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2010.12.034>
16. Rezvani, M., Alahgholizadeh, E., Roshangar, L., "Synthesis of a macroporous glass-ceramic scaffold containing fluorapatite crystalline phase for bone substitutes", *Advanced Ceramics Progress*, Vol. 6, No. 3, (2020), 47-54. <https://doi.org/10.30501/acp.2020.113603>
17. Last, J. A., Thomasy, S. M., Croasdale, C. R., Russell, P., Murphy, C. J., "Compliance profile of the human cornea as measured by atomic force microscopy", *Micron*, Vol. 43, No. 12, (2012), 1293-1298. <https://doi.org/10.1016/j.micron.2012.02.014>
18. Khalid, H., Iqbal, H., Zeeshan, R., Nasir, M., Sharif, F., Akram, M., Irfan, M., Khan, F. A., Chaudhry, A. A., Khan, A. F., "Silk fibroin/collagen 3D scaffolds loaded with TiO₂ nanoparticles for skin tissue regeneration", *Polymer Bulletin*, Vol. 78, No. 12, (2020), 7199-7218. <https://doi.org/10.1007/s00289-020-03475-y>
19. Yonesi, M., Garcia-Nieto, M., Guinea, G. V., Panetos, F., Pérez-Rigueiro, J., González-Nieto, D., "Silk fibroin: An ancient material for repairing the injured nervous system", *Pharmaceutics*, Vol. 13, No. 3, (2021), 429. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics13030429>
20. Sadtler, K., Sing, A., Wolf, M. T., Wang, X., Pardoll, D. M., Elisseeff, J. H., "Design clinical translation and immunological response of biomaterials in regenerative medicine", *Nature Reviews Materials*, Vol. 1, No. 7, (2016), 1-17. <https://doi.org/10.1038/natrevmats.2016.40>
21. Michelacci, Y. M., "Collagens and proteoglycans of the corneal extracellular matrix", *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, Vol. 36, No. 8, (2003), 1037-1046. <https://doi.org/10.1590/S0100-879X2003000800009>
22. Huo, Y., Jiang, B., Zheng, X., Chen, W., Xie, X., "Epidermal growth factor protects against ultraviolet damage in human corneal epithelial cells through inhibiting autophagy", *International Journal of Clinical Experimental Pathology*, Vol. 9, No. 9, (2016), 9008-9017. <https://e-century.us/files/ijcep/9/9/ijcep0022386.pdf>
23. Shoulders, M. D., Raines, R. T., "Collagen structure and stability", *The Annual Review of Biochemistry*, Vol. 78, (2009), 929-958. <https://doi.org/10.1146/annurev.biochem.77.032207.120833>

است داربست مدنظر به صورت درون تنی به کار برده شود.

۴- نتیجه گیری

در این مطالعه، داربستی برای مهندسی بافت لایه پوششی قرنیه بر پایه فیبروئین ابریشم و کلاژن حاوی آلوئه‌ورا و فاکتور رشد عروقی به منزله عوامل کمک‌کننده و تحریک‌کننده برای ترمیم بهتر قرنیه تهیه شد. برای این منظور، داربست سه‌لایه نانوالیافی با ترکیبی از روش الکتروریسی و الکتروپاشش تهیه و با مشخصه‌یابی‌های مهندسی نظیر SEM، بررسی تخریب‌پذیری از روی کاهش وزن، زاویه تماس آب، رهائش فاکتور رشد و خواص مکانیکی ایستا و پویا و مشخصه‌یابی‌های زیستی نظیر اتصال سلولی، زنده‌مانی سلول‌ها و پتانسیل تمایزی داربست بررسی شد. نتایج این پژوهش نشان داد که تهیه جایگزین، با ضخامت مناسب، ساختار نانوالیافی و خواص مهندسی و زیستی مناسب برای این کاربرد موفقیت‌آمیز بوده است. بنابراین، محصول تهیه‌شده می‌تواند جایگزین بالقوه و مناسبی برای ترمیم قرنیه آسیب‌دیده در نظر گرفته شود

۵- سپاسگزاری

نویسندگان مقاله از راهنمایی‌های ارزنده استادان دانشگاه آزاد، واحد علوم و تحقیقات که در تهیه این پژوهش حمایت بی‌دریغی داشتند، بی‌نهایت قدردان و سپاسگزارند.

مراجع

1. Ma, X. -Y., Bao, H. -J., Cui, L., Zou, J., "The graft of autologous adipose-derived stem cells in the corneal stroma after mechanical damage", *PLOS ONE*, Vol. 8, No. 10, (2013), e76103. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0076103>
2. Borene, M. L., Barocas, V. H., Hubel, A., "Mechanical and cellular changes during compaction of a collagen-sponge-based corneal stromal equivalent", *Annals of Biomedical Engineering*, Vol. 32, No. 2, (2004), 274-283. <https://link.springer.com/article/10.1023/B:ABME.0000012747.97620.3a>
3. Lin, H., Li, W., Dong, N., Chen, W., Liu, J., Chen, L., Yuan, H., Geng, Z., Liu, Z., "Changes in corneal epithelial layer inflammatory cells in aqueous tear-deficient dry eye", *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, Vol. 51, No. 1, (2010), 122-128. <https://doi.org/10.1167/iovs.09-3629>
4. Holan, V., Javorkova, E., "Mesenchymal stem cells, nanofiber scaffolds and ocular surface reconstruction", *Stem Cell Reviews and Reports*, Vol. 9, No. 5, (2013), 609-619. <https://doi.org/10.1007/s12015-013-9449-0>
5. Rodríguez-Vázquez, M., Vega-Ruiz, B., Ramos-Zúñiga, R., Saldaña-Koppel, D. A., Quiñones-Olvera, L. F., "Chitosan and its potential use as a scaffold for tissue engineering in regenerative medicine", *BioMed Research International*, (2015), 1-15. <https://doi.org/10.1155/2015/821279>

- (2000), 2506-2513. <https://iovs.arvojournals.org/article.aspx?articleid=2162181>
32. Akter, F., "Principles of tissue engineering" *Tissue engineering made easy*, Academic Press, (2016), 3-16. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-805361-4.00002-3>
 33. Esmaeilzadeh, J., Hesarakhi, S., Borhan, S., "In vivo assessments of the poly (d/l) lactide/polycaprolactone/bioactive glass nanocomposites for bioscrews application", *Advanced Ceramics Progress*, Vol. 7, No. 3, (2021), 17-22. <https://doi.org/10.30501/ACP.2021.286695.1061>
 34. Khalili, A., Naeimi, F., Fakhrizadeh, A. A., "Electrodeposited hydroxyapatite/graphene oxide/zirconia oxide composite coatings: Characterization and antibacterial activity", *Advanced Ceramics Progress*, Vol. 6, No. 4, (2020), 8-14. <https://doi.org/10.30501/acp.2020.233349.1037>
 35. Holan, V., Javorkova, E., Trosan, P., "The growth and delivery of mesenchymal and limbal stem cells using copolymer polyamide 6/12 nanofiber scaffolds", *Corneal Regenerative Medicine*, Springer, (2013), 187-199. https://doi.org/10.1007/978-1-62703-432-6_13
 36. Oyegoke, T., Obadijah, E., Adah, F., Oguche, J. E., Timothy, G. T., Mantu, I. A., Ado, A. D., "Trends of progress in setting up biorefineries in developing countries: A review of bioethanol exploration in Nigeria", *Journal of Renewable Energy and Environment (JREE)*, Vol. 9, No. 1, (2021), 35-50. <https://doi.org/10.30501/jree.2021.278037.1197>
 37. Aydrum, R., Haji Agha Alizade, H., Rasouli, M., Shadidi, B., "Simplex centroid mixture design for optimizing and promoting the anaerobic co-digestion performance of sheep blood and cheese whey", *Journal of Renewable Energy and Environment (JREE)*, Vol. 8, No. 3, (2021), 8-15. <https://doi.org/10.30501/jree.2021.251583.1151>
 38. Derakhshani, A., Hesarakhi, S., Nezafati, N., Azami, M., "Fabrication and evaluation of physical and biological properties of hydroxyethyl cellulose/hyaluronic acid-based scaffolds used for second-degree (partial-thickness) burns wounds healing", *Journal of Advanced Materials and Technologies (JAMT)*, Vol. 9, No. 4, (2021), 35-46. <https://doi.org/10.30501/jamt.2021.226575.1086>
 24. Higa, K., Takeshima, N., Moro, F., Kawakita, T., Kawashima, M., Demura, M., Shimazaki, J., Asakura, T., Tsubota, K., Shimmura, S., "Porous silk fibroin film as a transparent carrier for cultivated corneal epithelial sheets", *Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition*, Vol. 22, No. 17, (2012), 2261-2276. <https://doi.org/10.1163/092050610X538218>
 25. Teichmann, J., Valtink, M., Nitschke, M., Gramm, S., Funk, R. H., Engelmann, K., Werner, C., "Tissue engineering of the corneal endothelium: A review of carrier materials", *Journal of Functional Biomaterials*, Vol. 4, No. 4, (2013), 178-208. <https://doi.org/10.3390/jfb4040178>
 26. Kong, B., Mi, S., "Electrospun scaffolds for corneal tissue engineering: A Review", *Materials*, Vol. 9, No. 8, (2016), 614. <https://doi.org/10.3390/ma9080614>
 27. Merrett, K., Fagerholm, P., McLaughlin, C. R., Dravida, S., Lagali, N., Shinozaki, N., Watsky, M. A., Munger, R., Kato, Y., Li, F., Marmo, C. J., Griffith, M., "Tissue-engineered recombinant human collagen-based corneal substitutes for implantation: performance of type I versus type III collagen", *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, Vol. 49, No. 9, (2008), 3887-3894. <https://doi.org/10.1167/iovs.07-1348>
 28. Curto, E. M., Labelle, A., Chandler, H. L., "Aloe vera: An in vitro study of effects on corneal wound closure and collagenase activity", *Veterinary Ophthalmology*, Vol. 17, No. 6, (2014), 403-410. <https://doi.org/10.1111/vop.12163>
 29. Bardag-Gorce, F., Oliva, J., Wood, A., Niihara, H., Makalinao, A., Sabino, S., Pan, D., Thropay, J., Sota, H., Niihara, Y., "Microarray analysis of oral mucosal epithelial cell sheet", *Tissue Engineering and Regenerative Medicine*, Vol. 10, No. 6, (2013), 362-370. <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0002939405009104>
 30. Connon, C. J., Nakamura, T., Quantock, A. J., Kinoshita, S., "The persistence of transplanted amniotic membrane in corneal stroma", *American Journal of Ophthalmology*, Vol. 141, No. 1, (2006), 190-192. <https://doi.org/10.1016/j.ajo.2005.08.027>
 31. Koizumi, N., Fullwood, N. J., Bairaktaris, G., Inatomi, T., Kinoshita, S., Quantock, A. J., "Cultivation of corneal epithelial cells on intact and denuded human amniotic membrane", *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, Vol. 41, No. 9,