

## Sulfonated polyethersulfone nanofibers as new scaffold for regenerative medicine applications

Zohreh Daraeinejad<sup>1</sup>, Iman Shabani<sup>1,\*</sup>

1- Department of Biomedical Engineering, Amirkabir University of Technology (Tehran Polytechnic), Tehran, Iran.

### Abstract

Modifying physicochemical properties of polymers through functionalization is a practical approach in the preparation of tissue engineering scaffolds. The aim of present research is to sulfonate polyethersulfone and to improve its biocompatibility in order to regulating cell behaviors. Sulfonated polyethersulfone with different degrees of sulfonation were prepared using three different concentrations of chlorosulfonic acid as the sulfonating agent. The degree of sulfonation was investigated quantitatively and qualitatively. The electrospun nanofibers were fabricated by prepared polymers afterward. Morphological properties, contact angle, and porosity of nanofibrous scaffolds were studied. The adhesion, growth and proliferation of cultured mesenchymal stem cells on the scaffolds were investigated. Polyethersulfone was sulfonated with three molar percentages of 14.2, 22.1, and 30.1, based on the titration results. The scanning electron microscopic images of nanofibers showed that polyethersulfone nanofibers at a concentration of 25% W/V had a uniform and beadless structure. The diameter size distribution of sulfonated polyethersulfone nanofibers was uniform with a flow rate of 0.09 ml/h. Sulfonation significantly changed many properties of the final scaffold. The water contact angle decreased from 130° to 117°, 108°, and 100°, after sulfonation. The diameter of nanofibers decreased from 391 nm to 192 nm, 140 nm, and 121 nm. Cell studies showed that sulfonation of polyethersulfone nanofibers improves adhesion, and increases the growth and proliferation of stem cells. However, the degree of sulfonation must remain at an optimal level. As a result sulfonation is a suitable method to improve the properties of synthetic polymers such as polyethersulfone for biological applications.

### Keywords

Sulfonation, Polyethersulfone, Nanofibrous Scaffold, Regenerative Medicine

### Article history:

Received: 16-11-2023

Accepted: 19-02-2024

### Corresponding author:

\* [shabani@aut.ac.ir](mailto:shabani@aut.ac.ir)

## نانوالیاف پلی‌اتر سولفون سولفونه شده به عنوان داربست جدید برای کاربردهای پزشکی بازساختی

زهره دارائی نژاد<sup>۱</sup>، ایمان شعبانی<sup>۱\*</sup>

۱- دانشکده مهندسی پزشکی، دانشگاه صنعتی امیرکبیر، تهران، ایران، صندوق پستی ۱۵۸۷۵

تاریخ دریافت:

۱۴۰۲/۰۸/۲۵

تاریخ پذیرش:

۱۴۰۲/۱۱/۳۰

چکیده

اصلاح ویژگی‌های فیزیکی-شیمیایی پلیمرها از طریق عامل‌دار کردن، یک رویکرد کاربردی در تهیه داربست‌های مهندسی بافت است. هدف این پژوهش، سولفونه کردن پلی‌اتر سولفون و بهبود زیست‌سازگاری آن برای تنظیم رفتارهای سلولی است. با استفاده از سه غلظت متفاوت کلروسولفونیک اسید به عنوان عامل سولفونه کننده، پلی‌اتر سولفون با درجه سولفونه شدن مختلف تهیه شد. درجه سولفونه شدن به صورت کمی و کیفی بررسی شد. سپس پلیمرهای تهیه شده به روش الکتروریسی به صورت نانوالیاف شکل‌دهی شدند. خواص شکل‌شناسی، زاویه تماس و تخلخل داربست‌های نانولیفی مورد مطالعه قرار گرفت. در نهایت، چسبندگی و رشد و تکثیر سلول‌های بنیادی مزانشیمی کشت شده روی داربست‌ها بررسی شد. طبق نتایج آزمون تیتراسیون، پلی‌اتر سولفون با سه درصد مولی ۱۴/۲، ۲۲/۱ و ۳۰/۱ سولفونه شد. تصاویر میکروسکوپ الکترونی روشی نانوالیاف نشان داد که نانوالیاف پلی‌اتر سولفون در غلظت ۲۵ % W/V ساختاری یکنواخت و بدون دانه دارد و توزیع اندازه قطر نانوالیاف پلی‌اتر سولفون سولفونه شده با نرخ جریان ۰/۰۹ ml/h به صورت یکنواخت است. سولفونه شدن بسیاری از خواص داربست نهایی را به صورت قابل توجهی تغییر داد. زاویه تماس آب پس از سولفونه شدن از ۱۳۰° به ۱۱۷°، ۱۰۸° و ۱۰۰° کاهش یافت. قطر نانوالیاف از ۳۹۱ nm به ۱۹۲ nm، ۱۴۰ nm و ۱۲۱ nm کاهش یافت. مطالعات سلولی نشان دادند که سولفونه کردن نانوالیاف پلی‌اتر سولفون باعث بهبود چسبندگی و افزایش رشد و تکثیر سلول‌های بنیادی می‌شود؛ اما درجه سولفونه شدن باید در یک حد بهینه‌ای بماند. طبق نتایج، سولفونه کردن روش مناسبی برای بهبود خواص پلیمرهای مصنوعی مثل پلی‌اتر سولفون برای کاربردهای زیستی است.

سولفونه کردن، پلی‌اتر سولفون، داربست نانولیفی، پزشکی بازساختی

واژگان کلیدی

## ۱- مقدمه

داربست‌های نانولیفی کاربرد گسترده‌ای در زمینه مهندسی پزشکی و به ویژه مهندسی بافت و پزشکی بازساختی دارند. ساختار ماتریس خارج سلولی طبیعی بدن به صورت نانولیفی است [۱]. علاوه بر این، نسبت طول به عرض بالای ساختارهای نانولیفی، خواص ویژه‌ای به داربست می‌دهد که منجر به تنظیم رفتارهای سلولی از جمله چسبندگی، رشد و تکثیر، مهاجرت و تمایز می‌شود [۲]. یکی از رایج‌ترین، کم‌هزینه‌ترین و آسان‌ترین روش‌های تهیه داربست‌های نانولیفی روش الکتروریسی است. انواع پلیمرهای طبیعی و مصنوعی را می‌توان با روش الکتروریسی به صورت نانوالیاف شکل‌دهی کرد [۳].

اخیراً محققان علاقه زیادی به پلیمر ترموپلاستیک پلی اترسولفون (Polyether sulfone (PES)) با گروه‌های تکراری فینیل و سولفون در زنجیر اصلی نشان داده‌اند. پلی اترسولفون پلیمر زیست‌سازگار تخریب‌ناپذیری است که عمدتاً از آن برای کاربرد در غشاهای همودیالیز، فیلتراسیون و طراحی بیوراکتورها استفاده می‌شود. مدت اندکی است که این پلیمر توجه محققان را برای استفاده در مهندسی بافت جلب کرده است [۴، ۵]. پلی اترسولفون خواص شیمیایی، حرارتی و مکانیکی فوق‌العاده‌ای دارد. Unger و همکاران از غشاهای پلی اترسولفون برای بررسی رشد و تکثیر سلولی استفاده کردند. گزارشات آن‌ها زیست‌سازگاری این پلیمر و حمایت آن از رشد و تکثیر سلول‌ها را نشان می‌داد [۶]. Lin و همکاران با استفاده از الکتروریسی گاز/اجت موفق به ساخت نانوالیاف پلی اترسولفون شدند [۷]. پس از آن، گروه‌های تحقیقاتی مختلفی به الکتروریسی این پلیمر پرداختند و از آن به عنوان داربست‌های مهندسی بافت استفاده نمودند [۸]. Joseph و همکاران از نانوالیاف پلی اترسولفون برای تکثیر و افزایش جمعیت سلول‌های بنیادی خون بند ناف استفاده کردند. طبق گزارشات آن‌ها پلی اترسولفون بیومتریال مناسبی برای کاربرد به عنوان داربست کشت سلول می‌باشد [۹]. ما در مطالعات قبلی خود اصلاحات مختلفی روی نانوالیاف پلی اترسولفون انجام دادیم تا ویژگی‌های این پلیمر را برای کاربردهای مهندسی بافت ارتقا دهیم. در این مطالعات، با تنظیم پارامترهای موثر بر الکتروریسی، نانوالیاف سه‌بعدی پلی اترسولفون تهیه شدند و بهبود نفوذ سلولی در داربست سه‌بعدی حاصل نشان داده شد [۴]. همچنین از طریق ترکیب پلی اترسولفون با پلی آنیلین، تخلخل، آبدوستی و رسانایی نانوالیاف نهایی بهبود داده شد [۱۰، ۱۱]. به طور کلی علاقه محققان برای استفاده از پلی اترسولفون ناشی از ویژگی‌های جالبی است که در این پلیمر به چشم می‌خورد. پایداری اکسیداتیو،

گرمایی، مکانیکی و هیدرولیتیکی از جمله ویژگی‌های مورد توجه پلی اترسولفون می‌باشد [۱۲].

علاوه بر این‌ها، پلی اترسولفون خواص فیزیکی منحصر به فردی دارد و رسانایی پروتونی اندک این پلیمر، آن را کاندیدای مناسبی برای غشاهای پلی الکترولیتی کرده است. پلی اترسولفون بعد از سولفون شده برای کاربردهای تبادلگر یونی استفاده می‌شود [۱۳]. از پلی اترسولفون سولفون شده می‌توان به عنوان حاملی برای رهائش انواع یون‌ها و یا داروهای یونی استفاده کرد. اخیراً قابلیت نانوالیاف پلی اترسولفون سولفون شده به عنوان داربست تبادلگر یون کلسیم برای تمایز استخوانی سلول‌های بنیادی مورد ارزیابی قرار گرفته است. همچنین، سولفون کردن پلی اترسولفون به عنوان یک روش اصلاحی باعث تنظیم ویژگی‌های فیزیکی-شیمیایی این پلیمر می‌شود. سولفون شدن، باعث افزایش آبدوستی پلیمر آبریز پلی اترسولفون و بهبود چسبندگی و برهم‌کنش‌های سلولی با آن می‌گردد [۱۴].

داربست‌های آبیونی به عنوان نوع جدیدی از بیومتریال‌ها معرفی شده‌اند که برهم‌کنش خوبی با سلول‌ها برقرار می‌کنند. وجود گروه‌های فسفات و فسفات در داربست باعث شبیه‌سازی ماتریس خارج سلولی طبیعی استخوان می‌شود. این گروه عاملی در داربست‌های مهندسی بافت استخوان بسیار پرکاربرد است [۱۵]. علاوه بر آن، گروه‌های سولفات و سولفات گروه عاملی موجود در گلیکوزآمینوگلیکان‌ها و پروتئوگلیکان‌ها هستند. استفاده از پلیمرهای حاوی این گروه‌های عاملی ماتریکس خارج سلولی را شبیه‌سازی می‌کند و تاثیر چشمگیری بر چسبندگی و رشد و تکثیر سلولی می‌گذارد [۱۶].

بر اساس اطلاعات به دست آمده، مطالعه‌ای روی تاثیر سولفون شدن بر خواص نانوالیاف پلی اترسولفون برای کاربردهای زیستی صورت نگرفته است. در این پژوهش، پلی اترسولفون از طریق سولفون کردن عاملدار شد و سپس به روش الکتروریسی، داربست‌های نانولیفی بر پایه پلی اترسولفون و پلی اترسولفون سولفون شده تهیه شد. اثر سولفون شدن بر خواص فیزیکی-شیمیایی داربست‌های نانولیفی و برهم‌کنش سلول‌های بنیادی با داربست‌ها مورد بررسی قرار گرفت.

## ۲- تجربیات

### ۲-۱- مواد و روش‌ها

برای سولفون کردن پلی اترسولفون (Mw=58,000 Da، BSAF) از سولفوریک اسید (Merck) و کلروسولفونیک اسید (Merck) استفاده شد. در فرآیند الکتروریسی، حلال

سولفونه کردن پلی اترسولفون استفاده شد و بقیه شرایط برای همه نمونه‌ها یکسان در نظر گرفته شد (دما  $5^{\circ}\text{C}$  و زمان ۱۲ ساعت). نمونه‌های تهیه شده  $S_1$ ،  $S_2$  و  $S_3$  نامگذاری شدند.

### ۲-۱-۲- تهیه نانوالیاف پلی اترسولفون به روش الکتروریسی

برای تهیه نانوالیاف پلی اترسولفون (P)، محلول‌های ۲۴ %w/v، ۲۵ %w/v و ۲۶ %w/v با انحلال مقدار مشخصی پلی اترسولفون در حلال دی‌متیل فرماید آماده شد. الکتروریسی پلی اترسولفون با ولتاژ ۲۰ kV، نرخ جریان ۰/۷ mL/h و با فاصله نازل تا جمع‌کننده ۱۵ cm انجام شد [۱۸].

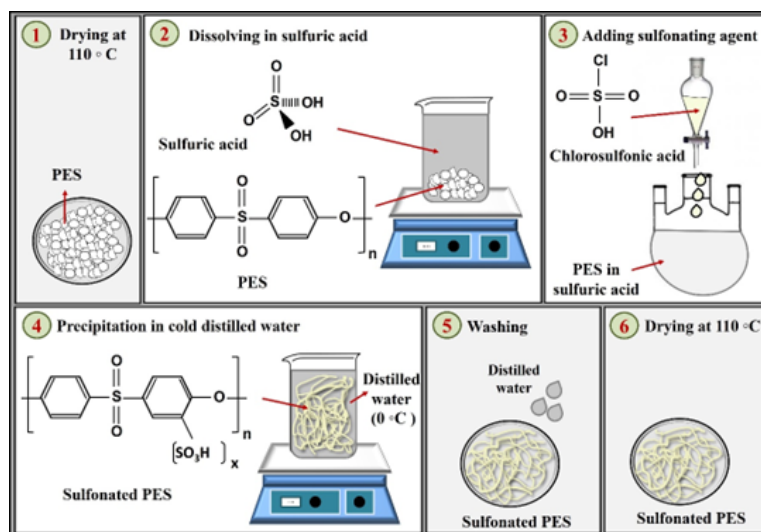
### ۲-۱-۳- تهیه نانوالیاف پلی اترسولفون سولفونه شده به روش الکتروریسی

برای تهیه نانوالیاف پلی اترسولفون سولفونه شده ( $S_1$ ،  $S_2$  و  $S_3$ )؛ محلول ۲۵ %w/v ( $S_{1-3}$ )، با انحلال مقدار مشخصی پلی اترسولفون سولفونه شده در حلال دی‌متیل فرماید آماده شد. فرآیند الکتروریسی  $S_{1-3}$  با ولتاژ ۲۰ kV و با فاصله نازل تا جمع‌کننده ۱۶ cm انجام شد. برای تهیه نانوالیاف یکنواخت و بدون دانه، نرخ جریان به عنوان پارامتر متغیر در نظر گرفته شد و با سه نرخ جریان ۰/۲ mL/h، ۰/۱۵ mL/h و ۰/۰۹ mL/h نانوالیاف  $S_3$  الکتروریسی شدند. در نهایت برای سایر داربست‌ها، نرخ جریان ۰/۰۹ mL/h به عنوان پارامتر بهینه در نظر گرفته شد. الکتروریسی تمام داربست‌ها با سوزن ۲۱ و در دمای  $25-29^{\circ}\text{C}$  انجام شد. مراحل تهیه داربست‌های نانولیفی در شکل

دی‌متیل فرماید (Merck) به کار برده شد. برای مطالعات سلولی از اتانول (مجللی)، ایزوپروپانول (Merck)، محیط کشت DMEM (Gibco)، سرم جنین گاوی (Gibco)، پودر MTT (Sigma)، پنیسیلین/استرپتومایسین (ایده زیست)، تریپسین (ایده زیست) و محلول نمک بافر فسفات (ایده زیست) استفاده شد.

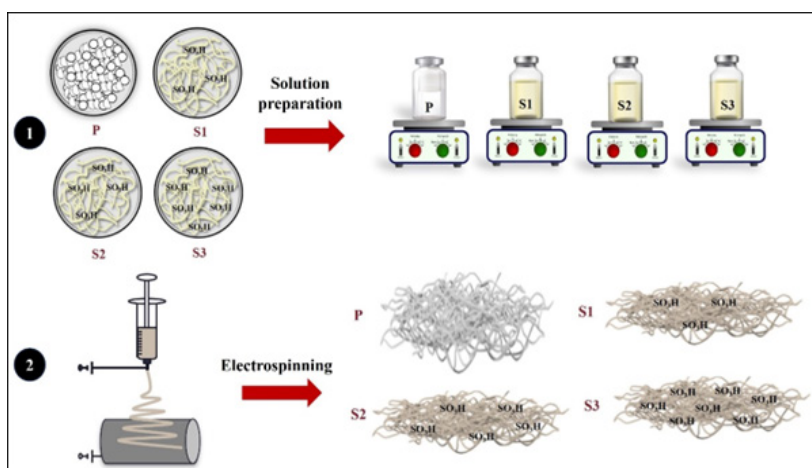
### ۲-۱-۱- تهیه پلی اترسولفون سولفونه شده

فرآیند سولفونه کردن پلی اترسولفون مشابه با روش به کار برده شده در مطالعه قبلی ما [۱۷] انجام شد. به اختصار، ۲۰ g از پلی اترسولفون خشک در ۱۰۰ mL سولفوریک اسید غلیظ (۹۸%) حل شد. محلول به دست آمده تا  $5^{\circ}\text{C}$  خنک شد. سپس عامل سولفونه کننده، کلروسولفونیک اسید، به صورت قطره‌ای به محلول پلیمر در حال به هم خوردن روی همزن مغناطیسی اضافه شد. در حین انجام فرآیند، محفظه واکنش تحت گاز بی اثر نیتروژن قرار داشت. پس از ۱۲ ساعت، محلول پلیمر سولفونه شده به تدریج درون یک ظرف حاوی آب مقطر خنک ( $0^{\circ}\text{C}$ ) که در حال به هم خوردن شدید بود ریخته شد. پلیمر رسوب شده به وسیله کاغذ صافی جدا شد و برای خنثی شدن pH و خارج شدن اسیدهای اضافه چندین مرتبه با آب مقطر شسته شد. در نهایت، پلی اترسولفون سولفونه شده (S) به مدت ۲۴ ساعت در آون خلأ با دمای  $110^{\circ}\text{C}$  خشک شد. مراحل فرآیند سولفونه شدن پلی اترسولفون در شکل ۱ نشان داده شده است. نماد x در تصویر نشان‌دهنده درجه سولفونه شدن پلیمر است. زمان واکنش و مقدار عامل سولفونه کننده، تعیین کننده درجه سولفونه شدن هستند. در این پژوهش، از سه مقدار مختلف عامل سولفونه کننده (۵ mL، ۸ mL و ۱۱ mL) برای



شکل ۱. مراحل سولفونه کردن پلی اترسولفون.

Figure 1. Steps of polyethersulfone sulfonation.



شکل ۲. مراحل تهیه نانوالیاف P و S<sub>1-3</sub>.

Figure 2. Steps of P and S<sub>1-3</sub> nanofibers preparation.

گرفت. طیف‌سنجی در محدوده  $4000 \text{ cm}^{-1}$  تا  $500 \text{ cm}^{-1}$  و با قدرت تفکیک  $1 \text{ cm}^{-1}$  انجام شد.

برای بررسی شکل‌شناسی داربست‌های نانولیفی پس از الکتروریسی و همچنین شکل‌شناسی سلول‌ها پس از مطالعات سلولی از تصویربرداری با میکروسکوپ الکترونی روبشی (Seron Technologies-AIS2100) استفاده شد. نمونه‌ها پیش از تصویربرداری توسط یک لایه طلا پوشش داده شدند و تصاویر با ولتاژ تسریعی  $15 \text{ kV}$  و بزرگ‌نمایی‌های مختلف تهیه شدند. برای بررسی تخلخل داربست‌ها نانولیفی از روش نفوذ مایع استفاده شد. داربست‌های دایره‌ای تهیه شدند و وزن داربست‌های خشک اندازه‌گیری شد. سپس داربست‌ها داخل اتانول  $100\%$  قرار داده شدند و بعد از  $24$  ساعت از اتانول خارج شدند. با دستمال کاغذی اتانول اضافه آن‌ها خشک شد و بلافاصله وزن آن‌ها اندازه‌گیری شد. درصد تخلخل با استفاده از معادله زیر محاسبه شد.

$$P\% = V_{\text{EtOH}} / (V_{\text{EtOH}} + V_s) \times 100$$

$V_{\text{EtOH}}$  = تفاوت وزن داربست بعد و قبل از غوطه‌وری / چگالی اتانول

$V_s$  = وزن داربست / چگالی داربست

برای بررسی میزان آبدوستی-آبگریزی نمونه‌ها، زاویه تماس آب با سطح نمونه‌ها اندازه‌گیری شد. برای این کار، مقدار  $10 \mu\text{L}$  آب روی سطح نمونه‌ها (فیلم و نانوالیاف) قرار گرفت و بعد از  $10$  ثانیه تصویر قطره آب قرار گرفته روی سطح گرفته شد. سپس با استفاده از نرم افزار Image J، زاویه تماس قطره آب با سطح اندازه‌گیری شد. برای هر نمونه سه مرتبه این فرآیند تکرار شد. در نهایت زاویه تماس به صورت میانگین به همراه انحراف معیار گزارش شد.

۲ نشان داده شده است.

## ۲-۲- مشخصه‌یابی‌های فیزیکی-شیمیایی و شکل‌شناسی

برای تعیین درجه سولفونه شدن نمونه‌های S<sub>1-3</sub> از روش تیتراسیون استفاده شد. برای این کار، ابتدا حدود  $0.5 \text{ g}$  از هر نمونه به مدت  $20$  ساعت در  $50 \text{ mL}$  محلول سدیم هیدروکسید  $0.1$  نرمال غوطه‌ور شد و مخلوط حاضر با استفاده از یک لرزاننده به هم خورد. سپس پلیمر موجود در مخلوط با استفاده از کاغذ صافی جدا شد و  $20 \text{ mL}$  از محلول صاف شده حاصل، با هیدروکلریک اسید  $0.1$  نرمال و در حضور فنل فتالین تیترا شد. به این ترتیب درجه سولفونه شدن با اندازه‌گیری تغییر غلظت محلول سدیم هیدروکسید اولیه و با استفاده از معادله زیر تعیین شد [۱۹]. به منظور کاهش خطا و افزایش صحت نتایج مربوط به آزمون تیتراسیون، هر نمونه سه بار مورد آنالیز قرار گرفت و میانگین مقادیر به دست آمده گزارش شد.

$$DS(\%) = [(0.232M \times V) / (W - 0.08M \times V)] \times 100$$

$V$  حجم سدیم هیدروکسید در پایان تیتراسیون (mL) غلظت سدیم هیدروکسید (M) و  $W$  وزن نمونه‌های S<sub>1-3</sub> (g) است. ویسکوزیته محلول‌های پلیمری (پلی اترسولفون و سه نمونه پلی اترسولفون سولفونه شده) با ویسکومتر اندازه‌گیری و با یکدیگر مقایسه شد. تغییر ویسکوزیته اطلاعات مفیدی در مورد تخریب زنجیرهای پلیمری به دست می‌دهد.

به منظور نشان دادن سولفونه شدن پلی اترسولفون، آزمون طیف‌سنجی مادون قرمز با استفاده از تبدیل فوریه (ATR-FTIR) (EQUINOX 55-Beruker) مورد استفاده قرار

## ۲-۳- مطالعات سلولی

هر یک از داربست‌های الکترورسی شده با استفاده از سوراخ‌کن به شکل دایره‌هایی با قطر ۱/۵ cm بریده شدند. سپس داربست‌ها کف پلیت قرار داده شدند و اتانول ۷۰٪، روی آن‌ها ریخته شد. پس از ۱۵ دقیقه اتانول خارج شد و داربست‌ها چند مرتبه با محلول نمک بافر فسفات شسته شدند تا اتانول باقیمانده از درون آن‌ها خارج شود. در نهایت پلیت زیر هود بیولوژیک قرار داده شد و به مدت ۳۰ دقیقه تحت تابش اشعه فرابنفش قرار گرفت.

برای مطالعات سلولی این پژوهش، از سلول‌های بنیادی مزانشیمی مشتق از بافت چربی انسانی استفاده شد. سلول‌های بنیادی در فلاسک‌های کشت سلول پلی‌استایرن در محیط کشت DMEM همراه با ۱۰٪ سرم جنین گاوی و ۱٪ آنتی بیوتیک پنیسیلین/استرپتومایسین در انکوباتور با دمای ۳۷ °C و ۵٪ دی‌اکسید کربن نگهداری شدند. با تکثیر سلول‌ها و رسیدن جمعیت سلولی به تراکم در حدود ۹۰-۸۰ درصد، سلول‌ها پاساژ داده شدند و در فواصل میان دو پاساژ در صورت نیاز محیط کشت تعویض گردید.

برای بررسی اثر داربست‌های تهیه شده بر چسبندگی، پهن‌شوندگی و شکل‌شناسی سلول‌ها از تصویربرداری میکروسکوپ الکترونی روبشی استفاده شد. در ابتدا سلول‌های بنیادی با چگالی ۲۵۰۰۰ سلول به همراه ۵۰۰ میکرولیتر محیط کشت کامل بر روی داربست‌ها قرار گرفتند و در بازه مورد نظر در انکوباتور نگهداری شدند. پس از گذشت ۲۴ ساعت، نمونه‌ها تثبیت و آگیری شدند و در نهایت تصویربرداری انجام شد. برای تثبیت نمونه‌ها ابتدا هر نمونه به مدت ۱ ساعت در معرض گلوآرالدهید ۲/۵٪ قرار گرفت، سپس گلوآرالدهید خارج شد و نمونه‌ها با غلظت‌های مدرج اتانول به ترتیب ۱۰٪، ۳۰٪، ۵۰٪، ۷۰٪، ۹۰٪ و ۹۶٪ آگیری شدند و در نهایت با جریان هوا خشک شدند. به منظور بررسی شکل سلول‌ها، میزان نفوذ آن‌ها به داخل داربست و رشد و تکثیر آن‌ها، تصویربرداری ۷ روز پس از کشت سلول‌ها نیز انجام شد. تمام مراحل تثبیت سلول‌ها در روز ۷ نیز تکرار شد.

برای بررسی زنده‌مانی و تکثیر سلول‌های کشت شده روی داربست‌ها از آزمون MTT به صورت مستقیم استفاده شد. در ابتدا سلول‌ها با چگالی ۲۵۰۰۰ سلول روی داربست‌ها و کف پلیت ۲۴ خانه (به عنوان کنترل) منتقل شدند و ۵۰۰ میکرولیتر محیط کشت حاوی سرم و آنتی بیوتیک به هر چاهک افزوده شد و ظروف کشت در انکوباتور قرار گرفتند. محیط کشت تقریباً هر ۲-۳ روز تعویض شد. در روزهای ۱، ۳، ۵ و ۷ بعد از کشت سلول‌ها آزمون MTT جهت ارزیابی زنده‌مانی و میزان تکثیر انجام شد. برای این منظور، ابتدا محیط کشت روی سلول‌ها برداشته شد و

۲۲۵ میکرولیتر محلول DMEM به همراه ۲۵ میکرولیتر محلول نمک MTT حل شده در محلول نمک بافر فسفات با غلظت ۴ mL/mg به هر چاهک اضافه شد. در ادامه نمونه‌ها به مدت ۴ ساعت درون انکوباتور قرار داده شدند. سپس محلول نمک MTT از روی سلول‌ها برداشته شد. ۲۵۰ میکرولیتر محلول ایزوپروپانول به هر یک از چاهک‌ها اضافه شد تا بلورهای فورمازان تشکیل شده حل شوند. در نهایت ۱۰۰ میکرولیتر از محلول به ظرف کشت ۹۶ خانه منتقل شد و شدت رنگ ارغوانی در طول موج ۵۷۰ nm به وسیله دستگاه خوانشگر الیزا (Elx800-BioTek) خوانده و نتایج ثبت شد. نرخ جذب در این طول موج به عنوان معیار سنجش زنده‌مانی و رشد و تکثیر سلول‌ها در نظر گرفته شد.

## ۲-۴- آنالیزهای آماری

تمامی آنالیزهای کمی با سه بار تکرار انجام شد و عدد نهایی به صورت میانگین به همراه انحراف معیار گزارش شد. نرم‌افزار Excel و نرم‌افزار SPSS (تحلیل واریانس یک طرفه) برای تحلیل‌های آماری مورد استفاده قرار گرفت و سطح تفاوت معنی‌دار در  $P > 0.05$  تعریف شد.

## ۳- نتایج و بحث

## ۳-۱- بررسی درجه سولفونه شدن پلی‌اترسولفون با

## تیتراسیون

برای بررسی درجه سولفونه شدن نمونه‌ها، از تیتراسیون استفاده شد. نتایج حاصل از آزمون تیتراسیون در جدول ۱ قابل مشاهده است. درجه سولفونه شدن به سه عامل بستگی دارد که شامل زمان واکنش، غلظت عامل سولفونه کننده و دمای واکنش است. افزایش زمان واکنش، باعث افزایش درجه سولفونه شدن می‌گردد؛ اما از یک زمانی به بعد نرخ سولفونه شدن کاهش می‌یابد. افزایش دمای واکنش، درجه سولفونه شدن را افزایش می‌دهد اما دمای بالا می‌تواند باعث تخریب زنجیر پلیمر شود [۲۰]. به همین دلیل در این مطالعه، دمای پایین (۵ °C) برای واکنش در نظر گرفته شد. در این پژوهش، برای تهیه انواع پلی‌اترسولفون سولفونه شده، از سه غلظت مختلف عامل سولفونه کننده استفاده شد و دما و زمان برای هر سه نمونه یکسان بود. همانطور که انتظار می‌رفت با افزایش غلظت عامل سولفونه کننده، درجه سولفونه شدن پلی‌اترسولفون افزایش یافت.

## ۳-۲- بررسی ویسکوزیته محلول‌های پلیمری

کلروسولفونیک اسید یک عامل سولفونه کننده بسیار قوی است

فروسرخ بررسی شد. طیف‌های فروسرخ مربوط به نمونه‌های P و S<sub>1-3</sub> در شکل ۳ نشان داده شده است. در هر چهار طیف، پیک‌های مربوط به پیوندهای موجود در پلی اترسولفون مشاهده شد. کشش حلقه آروماتیک در عدد موجی ۱۲۳۸ cm<sup>-1</sup>، کشش پیوندهای C-C در ۱۴۸۶ cm<sup>-1</sup>، کشش حلقه بنزن در ۱۵۸۵ cm<sup>-1</sup>، کشش پیوندهای C-O در ۱۱۰۵ cm<sup>-1</sup> و کشش گروه‌های SO<sub>2</sub><sup>-</sup> در عدد موجی‌های ۱۳۲۰ cm<sup>-1</sup> و ۱۲۹۵ cm<sup>-1</sup> مشاهده شد [۱۱]. یک پیک اضافه در طیف‌های S<sub>1-3</sub> نسبت به P در عدد موجی ۱۰۲۵ cm<sup>-1</sup> وجود دارد که مربوط به ارتعاشات کششی متقارن گروه‌های SO<sub>3</sub>H- اضافه شده به زنجیر پلیمر است [۱۴]. هم‌چنین انتظار می‌رفت که ارتعاشات کششی نامتقارن گروه‌های SO<sub>3</sub>H- در محدوده ۱۱۸۰ cm<sup>-1</sup> مشاهده شود؛ اما به دلیل هم‌پوشانی با پیک‌های P این پیک مشاهده نشد. سایر محققان نیز گزارشات مشابهی را ارائه کرده‌اند [۲۴]. بر اساس حضور پیک مربوط به گروه سولفونیک اسید در طیف‌های مربوط به S<sub>1-3</sub> می‌توان نتیجه گرفت که واکنش سولفونه شدن پلی اترسولفون با موفقیت انجام شده است.

### ۳-۴- شکل‌شناسی نانوالیاف

تصاویر میکروسکوپ الکترونی روبشی و نمودار توزیع قطر نانوالیاف P در شکل ۴ آورده شده است. نانوالیاف P با سه محلول با غلظت‌های ۲۴ %w/v، ۲۵ %w/v و ۲۶ %w/v الکترورسی شدند. همانطور که در تصویر مشخص است، در غلظت ۲۴ %w/v نانوالیاف همراه با دانه به دست آمد. اما در غلظت‌های

که ممکن است در حین سولفونه کردن، زنجیرهای پلیمر را دچار تخریب کند. با بهینه‌سازی شرایط فرآیند سولفونه کردن مانند کاهش دمای واکنش و افزودن تدریجی عامل سولفونه کننده، از تخریب زنجیرهای پلیمر جلوگیری می‌شود. از جمله اثرات تخریب زنجیرهای پلیمر، کاهش وزن مولکولی پلیمر و در نتیجه کاهش ویسکوزیته محلول است [۲۱].

ویسکوزیته محلول‌های پلیمری در جدول ۲ گزارش شده است. مطابق نتایج به دست آمده، سولفونه شدن پلیمر باعث افزایش ویسکوزیته محلول شده است و با افزایش درجه سولفونه شدن، ویسکوزیته افزایش یافته است. سولفونه شدن پلیمر با افزوده شدن گروه‌های قطبی به زنجیر پلیمر همراه است، در نتیجه باعث افزایش برهم‌کنش بین زنجیرهای پلیمر می‌گردد. این افزایش برهم‌کنش، حرکت زنجیرها را سخت‌تر می‌کند و در نتیجه ویسکوزیته محلول پلیمر افزایش می‌یابد. به طور کلی پس از فرآیند سولفونه کردن، اگر ویسکوزیته محلول پلیمر کاهش یابد نشان دهنده تخریب زنجیر پلیمر است. اما اگر ویسکوزیته محلول پلیمر افزایش یابد نشان‌دهنده این است که افزایش ویسکوزیته ناشی از افزوده شدن گروه‌های سولفونیک اسید بر کاهش ویسکوزیته ناشی از تخریب زنجیرها غلبه دارد. در نتیجه واکنش‌های تخریبی حین فرآیند سولفونه کردن به خوبی کنترل شده است [۲۲].

### ۳-۳- بررسی سولفونه شدن پلی اترسولفون با طیف‌سنجی فروسرخ

سولفونه شدن پلی اترسولفون به صورت کیفی با طیف‌سنجی

جدول ۱. درجه سولفونه شدن سه نمونه.

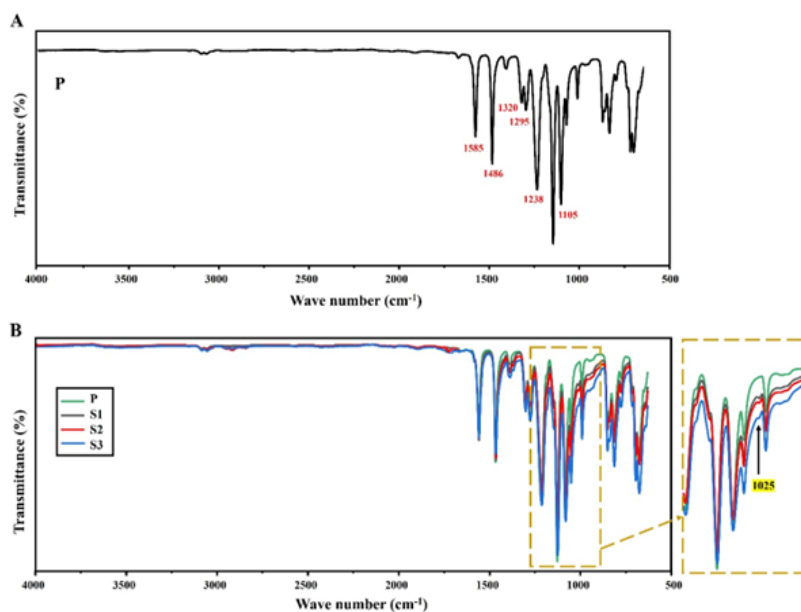
Table 1. Sulfonation degree of the three samples.

Sample	Amount of sulfonating agent (mL)	Degree of sulfonation (Mole percent)
S <sub>1</sub>	5	14.2±0.4
S <sub>2</sub>	8	22.1±0.3
S <sub>3</sub>	11	30.1±0.7

جدول ۲. ویسکوزیته محلول‌های پلی اترسولفون و سه نمونه پلی اترسولفون سولفونه شده.

Table 2. Viscosity of polyethersulfone and three sulfonated polyethersulfone solutions.

Sample	P	S <sub>1</sub>	S <sub>2</sub>	S <sub>3</sub>
Viscosity (cP)	2160	2266	2386	2491



شکل ۳. طیف فرسوخ نمونه‌های P و S<sub>1-3</sub>.  
 Figure 3. ATR-FTIR spectrum of P and S<sub>1-3</sub> samples.

و نرخ جریان آهسته‌تر باشد احتمال پاشش کاهش می‌یابد [۲۶]. از طرفی نرخ جریان، مدت زمان الکتروریسی و بازدهی کار را تعیین می‌کند و در حد امکان ترجیح داده می‌شود که از نرخ جریان بالاتر استفاده شود تا در مدت زمان کوتاه‌تری داربست با ضخامت مطلوب تهیه شود. به این منظور، ابتدا محلول S<sub>3</sub> با سه نرخ جریان ۰/۲ ml/h، ۰/۱۵ ml/h و ۰/۰۹ ml/h الکتروریسی شد تا نرخ جریان بهینه مشخص شود. از آنجایی که درصد سولفونه شدن در S<sub>3</sub> از همه بیشتر است، در نتیجه شرایط بهینه برای S<sub>3</sub> و S<sub>2</sub> نیز مطلوب بود.

قطر نانوالیاف S<sub>3</sub> با سه نرخ جریان ۰/۲ ml/h، ۰/۱۵ ml/h و ۰/۰۹ ml/h به ترتیب معادل عددهای ۲۵۵±۱۹۱ nm، ۲۲۱±۱۰۸ nm و ۱۲۱±۲۹ nm مشخص است که توزیع قطر نانوالیاف با نرخ جریان ۰/۰۹ ml/h مطلوب است. همانطور که در شکل ۵ مشاهده می‌شود، در نرخ جریان بالاتر از ۰/۰۹ ml/h، قطر نانوالیاف غیر یکنواخت شده است و نانوالیاف فرصت کافی برای کشیده شدن پیدا نکردند و در بعضی نواحی افزایش قطر شدیدی داشتند. پس از تعیین شرایط بهینه، محلول‌های S<sub>2</sub> و S<sub>1</sub> نیز الکتروریسی شدند و نانوالیاف یکنواخت و بدون دانه و با توزیع اندازه قطر مناسب حاصل شد.

بر اساس تصاویر میکروسکوپ الکترونی روبشی شکل ۶، قطر نانوالیاف S<sub>3</sub>، S<sub>2</sub> و S<sub>1</sub> به ترتیب برابر با ۱۲۱±۲۹ nm، ۱۴۰±۳۷ nm و ۱۹۲±۴۵ nm است. سولفونه شدن باعث کاهش قطر

نانوالیاف یکنواخت، استوانه‌ای شکل و ۲۵ %w/v و ۲۶ %w/v بدون دانه حاصل شد. به طور کلی در الکتروریسی پلی‌اتر سولفون، غلظت محلول تاثیر بسیار زیادی بر شکل‌شناسی نانوالیاف نهایی می‌گذارد. تغییر یک درصدی در غلظت محلول پلی‌اتر سولفون تغییر چشمگیری در قطر نانوالیاف ایجاد می‌کند. معمولاً افزایش دمای محیط می‌تواند الکتروریسی در غلظت‌های پایین‌تر را میسر کند [۲۵]. قطر نانوالیاف در غلظت‌های ۲۵ %w/v و ۲۶ %w/v به ترتیب معادل ۳۹۱±۹۱ nm و ۴۹۶±۹۱ nm بود که نشان دهنده کاهش چشمگیر قطر نانوالیاف در حد ۱۰۰ nm است. در این پژوهش غلظت ۲۵ %w/v به عنوان غلظت بهینه برای تهیه نانوالیاف P انتخاب شد.

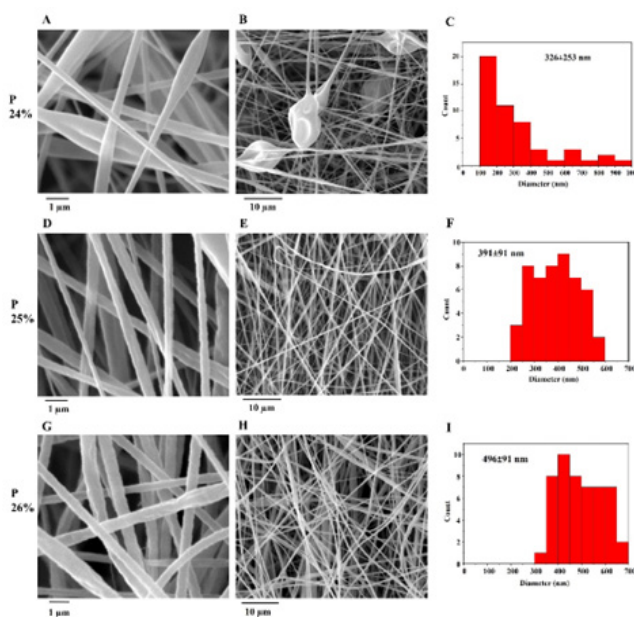
تصاویر میکروسکوپ الکترونی روبشی و نمودار توزیع قطر نانوالیاف S<sub>1-3</sub> در شکل ۵ و ۶ آورده شده است. غلظت محلول پلی‌اتر سولفون سولفونه شده برای الکتروریسی ۲۵ %w/v (مشابه نمونه بهینه P) در نظر گرفته شد؛ اما نرخ جریان بهینه سازی شد تا از پاشش محلول و ایجاد قطره جلوگیری شود. وجود گروه‌های سولفونیک اسید در محلول‌های S<sub>1-3</sub> باعث بالا رفتن رسانایی محلول می‌شود. رسانایی بالا منجر به ایجاد دافعه الکترواستاتیک بسیار قوی در محلول پلیمری می‌گردد. با افزایش حجم قطره موجود در نوک سوزن، نیروهای هم‌چسبی و ویسکوالاستیک نمی‌توانند مولکول‌های قطره را کنار یکدیگر نگه دارند و در نتیجه پاشش قطره رخ می‌دهد. هرچه مقدار قطره سر سوزن کمتر باشد

و نمک‌ها بر افزایش رسانایی محلول الکتروریسی و کاهش قطر نانوالیاف را گزارش کرده‌اند [۲۷, ۲۸].

### ۳-۵- تخلخل

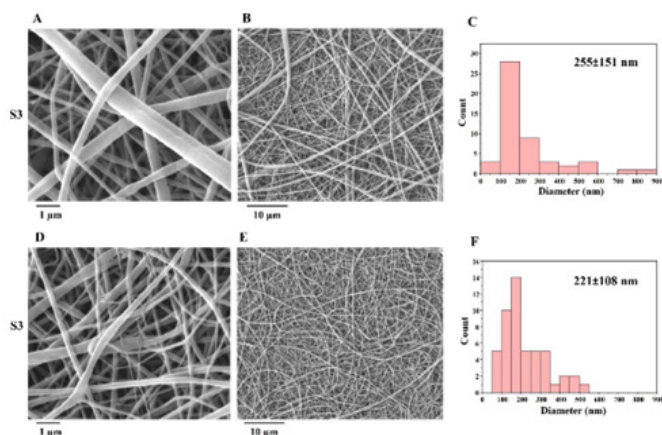
درصد تخلخل داربست‌های نانولیفی در شکل ۷ گزارش شده است. طبق نمودار با افزایش درجه سولفونه شدن پلی اترسولفون، درصد تخلخل نانوالیاف کاهش یافته است. به نظر می‌رسد دلیل

نانوالیاف شده و با افزایش درصد سولفونه شدن کاهش قطر شدیدتر شده است. علت این امر تاثیر گروه‌های سولفونیک اسید بر رسانایی محلول الکتروریسی است. همانطور که گفته شد، سولفونه شدن پلیمر باعث افزایش رسانایی محلول و نیروهای الکترواستاتیکی می‌شود. به این ترتیب نیروهای کششی و خمشی بیشتری بر جت الکتروریسی وارد می‌گردد و این امر منجر به افزایش مسیر جت و کاهش قطر نانوالیاف می‌گردد. مطالعات گوناگونی اثر عوامل یونی



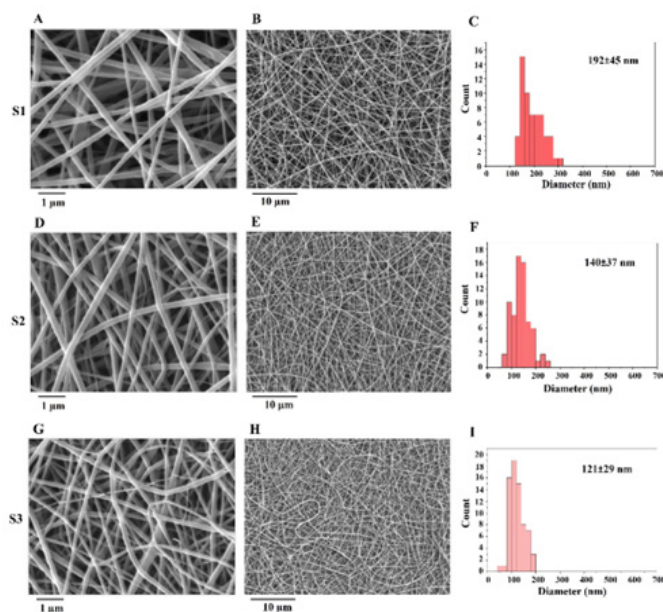
شکل ۴. تصاویر میکروسکوپ الکترونی روبشی در دو بزرگنمایی  $30000 \times$  و  $5000 \times$  و نمودار توزیع قطر نانوالیاف P در غلظتهای (A-C) ۲۴ w/v% (D-F) ۲۵ w/v% و (G-I) ۲۶ w/v%.

Figure 4. Scanning electron microscope images at two magnifications;  $\times 30000$  and  $\times 5000$ , and the diameter distribution diagram of P nanofibers in different concentrations: A-C) 24 w/v%, D-F) 25 w/v% and G-I) 26 w/v%.



شکل ۵. تصاویر میکروسکوپ الکترونی روبشی در دو بزرگنمایی  $30000 \times$  و  $5000 \times$  و نمودار توزیع قطر نانوالیاف S<sub>3</sub> با نرخ جریان‌های (A-C) ۰.۲ ml/h و (D-F) ۰.۱۵ ml/h.

Figure 5. Scanning electron microscope images at two magnifications;  $\times 30000$  and  $\times 5000$ , and diameter distribution diagram of S<sub>3</sub> nanofibers with flow rates of A-C) 0.2 ml/h and D-F) 0.15 ml/h.



شکل ۶. تصاویر میکروسکوپ الکترونی روبشی در دو بزرگنمایی  $30000 \times$  و  $5000 \times$  نمودار توزیع قطر نانوالیاف (A-C)  $S_1$ ، (D-F)  $S_2$ ، و (G-I)  $S_3$ . نرخ جریان تمام نمونه‌ها  $0.09 \text{ ml/h}$  است.

Figure 6. Scanning electron microscope images at two magnifications;  $\times 30000$  and  $\times 5000$ , and diameter distribution diagram of A-C)  $S_1$ , D-F)  $S_2$ , and G-I)  $S_3$  nanofibers. The flow rate of all samples is  $0.09 \text{ ml/h}$ .

زاویه تماس آب نشان داده می‌شود. در شکل ۷ زاویه تماس آب با نمونه‌های فیلمی و نانوالیاف نشان داده شده است. پلی‌اتر سولفون یک پلیمر آبگریز است که با سولفونه شدن، آبدوستی آن افزایش یافته است. طی فرآیند سولفونه کردن، گروه‌های آبدوست سولفونیک اسید به زنجیرهای آبگریز پلی‌اتر سولفون متصل می‌شوند و این امر باعث افزایش آبدوستی می‌گردد. با افزایش درجه سولفونه شدن، میزان آبدوستی افزایش می‌یابد [۳۳]. علاوه بر شیمی سطح، میزان تخلخل و قطر نانوالیاف نیز بر آبدوستی/آبگریزی سطح اثر می‌گذارد. مشابه ویژگی برگ نیلوفر آبی، هرچه تخلخل و ناهمواری سطح بیشتر باشد، سطح آبگریزتر می‌شود [۳۴]. با افزایش درجه سولفونه شدن نانوالیاف، قطر و میزان تخلخل آن‌ها کاهش می‌یابد. به همین دلیل، یکی دیگر از عواملی که باعث می‌شود نمونه P نسبت به نمونه‌های سولفونه شده آبگریزتر باشد کاهش تخلخل و قطر نانوالیاف در نمونه‌های  $S_1$ ،  $S_2$  و  $S_3$  است. این روند در نمونه‌های سولفونه شده نیز قابل مشاهده است. به این ترتیب که با افزایش درجه سولفونه شدن و کاهش تخلخل و قطر نانوالیاف، آبدوستی نمونه‌ها بیشتر شده است. سولفونه شدن یکی از روش‌های اصلاح سطح و حجم پلیمر به شمار می‌رود و در نتیجه اثرات زیادی بر خواص پلی‌اتر سولفون می‌گذارد. به همین دلیل باید متناسب با کاربرد مورد نظر این اصلاح صورت بگیرد. هدف این پژوهش، سولفونه کردن پلی‌اتر سولفون برای بهبود

آن کاهش شدید قطر نانوالیاف باشد. Soliman و همکاران عنوان کردند که تخلخل و اندازه منافذ در داربست‌های الکترونیسی شده عمدتاً به قطر نانوالیاف و میزان فشردگی آن‌ها بستگی دارد. این گروه تحقیقاتی نشان داد که اندازه حفرات و میزان تخلخل با کاهش قطر نانوالیاف کاهش می‌یابد [۲۹]. در داربست‌های نانولیفی با قطر لیاف بسیار کم، با استفاده از روش‌های گوناگونی مثل افزایش دمای موضعی برای تبخیر سریع حلال [۳۰]، سونیکاسیون [۳۱]، کف‌زایی با گاز [۳۲] و ... می‌توان میزان تخلخل داربست را افزایش داد.

### ۳-۶- آبدوستی-آبگریزی داربست‌ها

اندازه‌گیری زاویه تماس آب با سطح نمونه روش مناسبی برای بررسی میزان آبدوستی-آبگریزی است. زاویه تماس آب با فیلم پلیمری اثر شیمی سطح بر آبدوستی را نشان می‌دهد و زاویه تماس آب با نانوالیاف اثر شکل شناسی و شیمی سطح را مشخص می‌کند. آبگریزی نمونه‌های نانولیفی از نمونه‌های فیلمی بیشتر است؛ زیرا سطح نانوالیاف در مقایسه با فیلم دارای تخلخل است و این سطح زبر و غیریکنواخت منجر به افزایش آبگریزی می‌گردد. همچنین، تفاوت آبدوستی/آبگریزی نمونه‌های مختلف در حالت فیلم بیشتر از حالت نانولیفی است؛ زیرا در حالت نانولیفی بخش قابل توجهی از سطح تخلخل‌ها با هوا پوشیده شده است و بیشتر اثر هوا بر

چسبندگی و رشد و تکثیر سلول‌ها بود. افزایش درجه سولفونه شدن باعث کاهش قطر نانوالیاف و افزایش آبدوستی می‌شود. از طرف دیگر، درصد بالای سولفونه شدن باعث حلالیت پلیاترسولفون در آب و اتانول می‌شود [۲۱]. از آنجایی که داربست برای کاربرد در محیط آبی تهیه می‌شود باید درصد سولفونه شدن به گونه‌ای تنظیم گردد که محلول در آب نشود. همچنین برای سترون‌سازی داربست‌ها معمولاً از اتانول ۷۰٪ استفاده می‌شود؛ در نتیجه عدم حلالیت در اتانول نیز باید در نظر گرفته شود. به این دلایل، سه درجه سولفونه شدن انتخاب شد تا تاثیر آن بر عوامل ذکر شده بررسی گردد و در نهایت درصد بهینه برای کاربردهای مهندسی بافت مشخص شود.

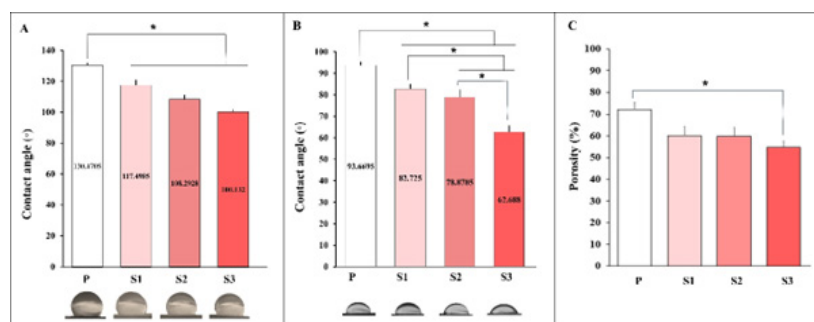
Chaterji و همکاران نشان دادند که استفاده از پلیمرهای آنیونی سولفونه شده بهبود چسبندگی و رشد و تکثیر سلول‌ها را به همراه دارد. گروه‌های سولفات در داربست، ماتریس خارج سلولی طبیعی بدن را شبیه‌سازی می‌کند. زیرا این گروه عاملی به صورت طبیعی در پروتئوگلیکان‌ها و گلیکوزآمینوگلیکان‌ها وجود دارد [۳۵]. Xiong و همکاران از ابریشم سولفونه شده برای ساخت داربست کامپوزیتی برای بازسازی بافت پوست استفاده کردند. آن‌ها نشان دادند که ابریشم سولفونه شده باعث بهبود رشد و تکثیر و چسبندگی سلول‌های فیبروبلاست می‌شود [۳۷].

در این پژوهش، برای بررسی درجه سولفونه شدن بر خواص داربست نهایی، پلی اترسولفون سولفونه شده با سه درجه سولفونه شدن مختلف تهیه شد. تاثیر درجه سولفونه شدن بر خواص مختلف داربست‌های  $S_{1-3}$  در بخش‌های قبلی شرح داده شد. به طور کلی با افزایش درجه سولفونه شدن، آبدوستی داربست‌ها افزایش می‌یابد و قطر نانوالیاف کاهش می‌یابد. مطابق نتایج MTT، رشد و تکثیر سلول‌ها در  $S_2$  از داربست‌های دیگر بهتر بود. در واقع درجه سولفونه شدن ۲۲٪ بهینه‌ترین حالت برای کارهای زیستی می‌باشد. با افزودن گروه‌های سولفونیک اسید به پلی اترسولفون بسیاری از

چسبندگی و رشد و تکثیر سلول‌ها بود. افزایش درجه سولفونه شدن باعث کاهش قطر نانوالیاف و افزایش آبدوستی می‌شود. از طرف دیگر، درصد بالای سولفونه شدن باعث حلالیت پلیاترسولفون در آب و اتانول می‌شود [۲۱]. از آنجایی که داربست برای کاربرد در محیط آبی تهیه می‌شود باید درصد سولفونه شدن به گونه‌ای تنظیم گردد که محلول در آب نشود. همچنین برای سترون‌سازی داربست‌ها معمولاً از اتانول ۷۰٪ استفاده می‌شود؛ در نتیجه عدم حلالیت در اتانول نیز باید در نظر گرفته شود. به این دلایل، سه درجه سولفونه شدن انتخاب شد تا تاثیر آن بر عوامل ذکر شده بررسی گردد و در نهایت درصد بهینه برای کاربردهای مهندسی بافت مشخص شود.

### ۳-۷- مطالعات سلولی

برای بررسی زیست‌سازگاری داربست‌های تهیه شده، رشد و تکثیر و چسبندگی سلول‌ها روی آن‌ها بررسی شد. آزمون MTT (به صورت مستقیم) برای بررسی اثر داربست‌های طراحی شده بر میزان اتصال و رشد و تکثیر سلول‌های کشت شده انجام شد. نتایج حاصل از این مطالعه در شکل ۸ نشان داده شده است. زنده‌مانی سلول‌ها در روز اول در همه نمونه‌ها تقریباً مشابه نمونه کنترل است و تفاوت معناداری به چشم نمی‌خورد که نشان می‌دهد هیچ یک از داربست‌های استفاده شده سمیت حاد ندارند. داربست P نسبت به سایر داربست‌ها آگریزی بیشتری دارد. در نتیجه انتظار می‌رود چسبندگی سلولی روی این داربست نسبت به سایر داربست‌ها کمتر باشد. همچنین، پلی اترسولفون یک پلیمر زیست خنثی است و عاملی برای تحریک رشد و تکثیر سلولی ندارد. در نتیجه، زنده‌مانی سلول‌ها روی نمونه P تقریباً مشابه گروه کنترل (TCP) است. در داربست‌های  $S_{1-3}$ ، وجود گروه‌های سولفونیک اسید منجر به



شکل ۷. A) درصد تخلخل داربست‌های نانولیفی، B) زاویه تماس آب با نمونه‌های فیلمی، C) زاویه تماس آب با نمونه‌های نانولیفی. نتایج به صورت میانگین به همراه انحراف معیار گزارش شده‌اند. ستاره (\*) نمایانگر تفاوت معنادار با  $P < 0.05$  است.

Figure 7. A) Water contact angle of film samples, B) Water contact angle of nanofibrous samples, C) Porosity percentage of nanofibrous scaffold folds. The results are reported as average with standard deviation. (\*) represents a significant difference with  $P < 0.05$ .

کمتر هستند. به نظر می‌رسد شوک ناشی از اسیدی بودن محیط اطراف داربست در نمونه  $S_3$  جمعیت سلول‌های چسبیده در روز ۱ را کاهش داده است. نکته قابل توجه دیگر نفوذ سلولی بیشتر در داربست P نسبت به داربست‌های  $S_{1-3}$  است. درصد تخلخل کمتر در داربست‌های  $S_{1-3}$  باعث شده است که سلول‌ها فقط در سطح قرار داشته باشند و نفوذ سلولی کمتر مشاهده می‌شود. اما در داربست P سلول‌ها در همان روز ۱ به داخل نفوذ کرده‌اند و برخی از نانوالیاف روی سطح سلول‌ها را گرفته‌اند.

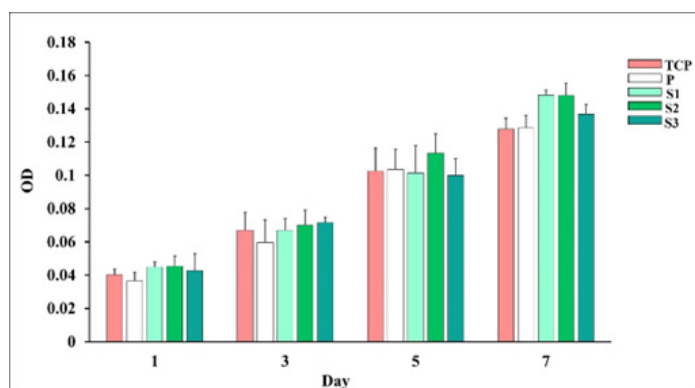
تصاویر سلول‌ها در روز ۷ در شکل ۱۰ نشان داده شده است. جمعیت بالای سلول‌ها در تصاویر نشان می‌دهد که تمام نمونه‌ها از رشد و تکثیر سلولی حمایت کرده‌اند و نسبت به روز ۱ جمعیت سلول‌ها چندین برابر شده است. جمعیت سلول‌ها روی داربست‌ها تقریباً با نتایج حاصل از آزمون MTT مطابق است و تصدیق کننده آن می‌باشد. جمعیت سلول‌ها روی داربست‌های  $S_2$  و  $S_1$  بیشتر از  $S_3$  است که بیانگر زیست‌سازگاری مناسب‌تر این دو داربست نسبت به  $S_3$  می‌باشد. درجه سولفونه شدن زیاد در داربست  $S_3$  باعث کاهش رشد و تکثیر روی این داربست نسبت به داربست‌های  $S_1$  و  $S_2$  با درجه سولفونه شدن کمتر شده است.

#### ۴- نتیجه‌گیری

در این مطالعه، گروه‌های عاملی سولفون به زنجیر پلی‌اتر سولفون و با هدف اصلاح خواص این پلیمر اضافه شد. سپس با بهینه‌سازی پارامترهای الکتروسیسی، نانوالیاف بر پایه پلی‌اتر سولفون سولفونه شده تهیه شد. اثر درجه سولفونه شدن بر خواص فیزیکی-شیمیایی و برهم‌کنش سلول‌های بنیادی با داربست‌های نانولیفی مورد ارزیابی قرار گرفت. به طور کلی نشان داده شد که افزایش درجه سولفونه شدن باعث کاهش قطر نانوالیاف، کاهش تخلخل و افزایش آبدوستی داربست می‌گردد. اثرات سولفونه

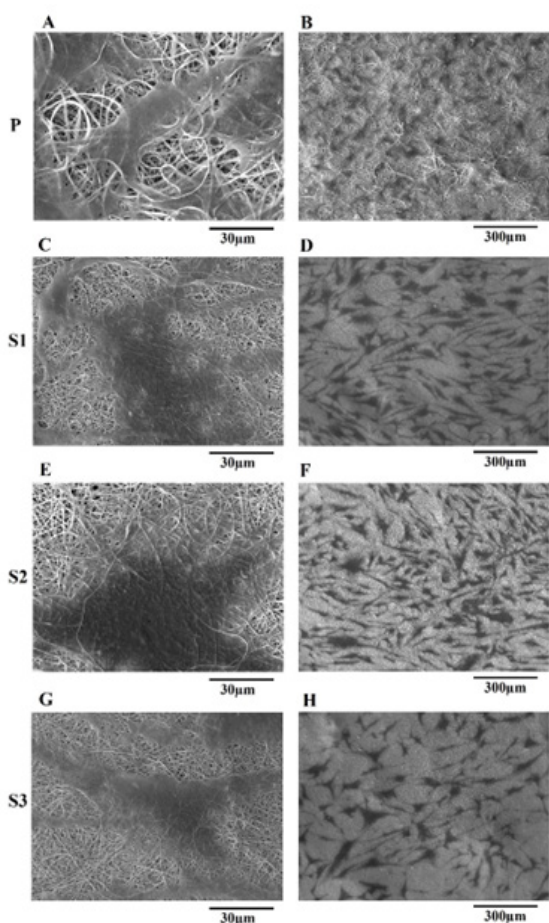
خواص آن بهبود می‌یابد؛ اما زیاد شدن گروه‌های اسیدی موجود در زنجیر پلیمر از یک حد مشخصی زیست‌سازگاری داربست را تحت تاثیر قرار می‌دهد. اگر درجه سولفونه شدن زیاد باشد، با قرار گرفتن داربست در محیط کشت می‌تواند محیط اطراف خود را اسیدی کند و به سلول‌ها آسیب برساند. به همین دلیل درجه سولفونه شدن باید در یک حالت بهینه‌ای باشد که هم خواص فیزیکی-شیمیایی داربست از جمله آبدوستی مناسب باشد و هم سمیتی برای سلول‌ها نداشته باشد. با اینکه  $S_3$  از رشد و تکثیر سلول‌ها حمایت کرده است و سمیت قابل توجهی نشان نداده است اما زنده‌مانی سلول‌ها در داربست  $S_3$  تقریباً در تمام روزها از داربست‌های  $S_1$  و  $S_2$  کمتر است. در مطالعات گزارش شده در مورد سایر پلیمرها نیز نشان داده شده است که افزایش درصد سولفونه شدن از یک حد بهینه‌ای باعث کاهش زیست‌سازگاری داربست می‌گردد [۳۸].

به منظور بررسی برهم‌کنش سلول‌ها با سطح داربست‌ها و مشاهده رشد و تکثیر آن‌ها، سلول‌های کشت شده روی داربست‌ها به ترتیب در روزهای ۱ و ۷ تثبیت شده و تصاویر میکروسکوپ الکترونی روبشی آن‌ها گرفته شد. تصاویر سلول‌ها در روز ۱ در شکل ۹ آمده است. در تمام تصاویر، سلول‌ها به خوبی پهن شده‌اند و به سطح نانوالیاف چسبیده‌اند که نشان‌دهنده برهم‌کنش خوب سلول‌ها با داربست‌های نانولیفی است. اما جمعیت سلول‌های چسبیده در داربست‌های مختلف، متفاوت است. جمعیت سلول‌ها در داربست‌های  $S_{1-3}$  بیشتر از P است. همانطور که قبل‌تر شرح داده شد، داربست‌های  $S_{1-3}$  به دلیل داشتن گروه سولفونیک اسید آبدوستی بیشتری نسبت به P دارند و به همین دلیل بیشتر از چسبندگی سلولی حمایت می‌کنند. اما در داربست  $S_3$  نسبت به  $S_1$  و  $S_2$  با وجود آبدوستی بیشتر، جمعیت سلول‌های چسبیده



شکل ۸. میزان اتصال و رشد و تکثیر سلول‌های بنیادی بر روی داربست‌ها و سطح TCP در مدت زمان ۱، ۳، ۵ و ۷ روز بعد از کشت سلول بر مبنای آزمون MTT. نتایج به صورت میانگین به همراه انحراف معیار گزارش شده‌اند.

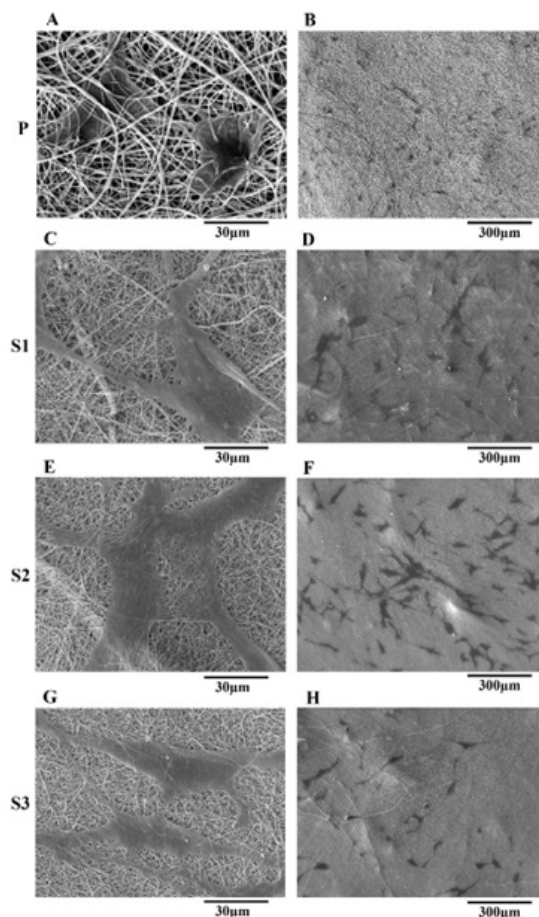
Figure 8. The rate of attachment and growth and proliferation of stem cells on the scaffolds and TCP surface during 1, 3, 5, and 7 days after cell culture based on MTT assay. The results are reported as average with standard deviation.



شکل ۱۰. تصاویر میکروسکوپ الکترونی روبشی سلول‌های کشت شده در سطح داربست‌های نانولیفی P، S<sub>1</sub>، S<sub>2</sub>، و S<sub>3</sub> با بزرگنمایی‌های ۲۰۰ × و ۲۰۰۰ ×. تصاویر ۷ روز پس از کشت سلول‌ها روی داربست گرفته شده است و نشان دهنده چسبندگی و رشد و تکثیر سلول‌ها می‌باشد.

**Figure 10.** Scanning electron microscope images of cells cultured on the surface of nanofibrous P, S<sub>1</sub>, S<sub>2</sub>, and S<sub>3</sub> scaffolds at two magnifications; ×2000 and ×200. Images are taken 7 days after cell culture and show cell attachment and growth and proliferation.

شدن بر خواص داربست، باعث بهبود چسبندگی سلولی و افزایش رشد و تکثیر سلول‌ها می‌شود. اما درجه سولفونه شدن باید در حد بهینه‌ای باقی بماند. افزایش درجه سولفونه شدن از یک حدی به بعد باعث کاهش زیست‌سازگاری داربست می‌گردد و ممکن است باعث آسیب به سلول‌ها بشود. داربست نانولیفی بر پایه پلی اترسولفون سولفونه شده پتانسیل بالایی برای کاربردهای مختلف مهندسی پزشکی از جمله مهندسی بافت و پزشکی بازساختی دارد.



شکل ۹. تصاویر میکروسکوپ الکترونی روبشی سلول‌های کشت شده در سطح داربست‌های نانولیفی P، S<sub>1</sub>، S<sub>2</sub>، و S<sub>3</sub> با بزرگنمایی‌های ۲۰۰ × و ۲۰۰۰ ×. تصاویر ۲۴ ساعت پس از کشت سلول‌ها روی داربست گرفته شده است و نشان‌دهنده چسبندگی سلولی می‌باشد.

**Figure 9.** Scanning electron microscope images of cells cultured on the surface of nanofibrous P, S<sub>1</sub>, S<sub>2</sub>, and S<sub>3</sub> scaffolds at two magnifications; ×2000 and ×200. Images are taken 24 hours after cell culture and show cell attachment.

۵- مراجع

- [1] G.Z. Tan, Y. Zhou, Electrospinning of biomimetic fibrous scaffolds for tissue engineering: a review, *International Journal of Polymeric Materials and Polymeric Biomaterials* 69(15) (2020) 947-960.
- [2] Z. Daraei-Nejad, I. Shabani, Conductive Nanofibrous Scaffolds for Tissue Engineering Applications: A Review, *Iran. J. Polym. Sci. Technol. (Persian)* 32 (2019) 189-210.
- [3] L. Muthukrishnan, An overview on electrospinning and its advancement toward hard and soft tissue engineering applications, *Colloid and Polymer Science* 300(8) (2022) 875-901.
- [4] I. Shabani, V. Haddadi-Asl, E. Seyedjafari, F. Babaeijandaghi, M. Soleimani, Improved infiltration of stem cells on electrospun nanofibers, *Biochemical and biophysical research communications* 382(1) (2009) 129-133.
- [5] S.M. Hashemi, S. Soudi, I. Shabani, M. Naderi, M. Soleimani, The promotion of stemness and pluripotency following feeder-free culture of embryonic stem cells on collagen-grafted 3-dimensional nanofibrous scaffold, *Biomaterials* 32(30) (2011) 7363-7374.
- [6] R. Unger, Q. Huang, K. Peters, D. Protzer, D. Paul, C. Kirkpatrick, Growth of human cells on polyethersulfone (PES) hollow fiber membranes, *Biomaterials* 26(14) (2005) 1877-1884.
- [7] Y. Lin, Y. Yao, X. Yang, N. Wei, X. Li, P. Gong, R. Li, D. Wu, Preparation of poly (ether sulfone) nanofibers by gas-jet/electrospinning, *Journal of Applied Polymer Science* 107(2) (2008) 909-917.
- [8] F. Babaeijandaghi, I. Shabani, E. Seyedjafari, Z.S. Naraghi, M. Vasei, V. Haddadi-Asl, K.K. Hesar, M. Soleimani, Accelerated epidermal regeneration and improved dermal reconstruction achieved by polyethersulfone nanofibers, *Tissue Engineering Part A* 16(11) (2010) 3527-3536.
- [9] M. Joseph, M. Das, S. Kanji, J. Lu, R. Aggarwal, D. Chakroborty, C. Sarkar, H. Yu, H.-Q. Mao, S. Basu, Retention of stemness and vasculogenic potential of human umbilical cord blood stem cells after repeated expansions on PES-nanofiber matrices, *Biomaterials* 35(30) (2014) 8566-8575.
- [10] Z. Daraeinejad, I. Shabani, Enhancing cellular infiltration on fluffy polyaniline-based electrospun nanofibers, *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology* 9 (2021) 641371.
- [11] Z. Daraeinejad, I. Shabani, Enhancing biocompatibility of polyaniline-based scaffolds by using a bioactive dopant, *Synthetic Metals* 271 (2021) 116642.
- [12] E. Seyedjafari, M. Soleimani, N. Ghaemi, M.N. Sarbolouki, Enhanced osteogenic differentiation of cord blood-derived unrestricted somatic stem cells on electrospun nanofibers, *Journal of Materials Science: Materials in Medicine* 22(1) (2011) 165-174.
- [13] S. Elakkiya, G. Arthanareeswaran, A. Ismail, D.B. Das, R. Suganya, Polyaniline coated sulfonated TiO<sub>2</sub> nanoparticles for effective application in proton conductive polymer membrane fuel cell, *European Polymer Journal* 112 (2019) 696-703.
- [14] I. Shabani, V. Haddadi-Asl, M. Soleimani, E. Seyedjafari, S.M. Hashemi, Ion-exchange polymer nanofibers for enhanced osteogenic differentiation of stem cells and ectopic bone formation, *ACS Applied Materials & Interfaces* 6(1) (2014) 72-82.
- [15] A.C. Wan, H.Q. Mao, S. Wang, S.H. Phua, G.P. Lee, J. Pan, S. Lu, J. Wang, K.W. Leong, Poly (phosphoester) ionomers as tissue-engineering scaffolds, *Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials: An Official Journal of The Society for Biomaterials, The Japanese Society for Biomaterials, and The Australian Society for Biomaterials and the Korean Society for Biomaterials* 70(1) (2004) 91-102.
- [16] R. Barbucci, A. Magnani, A. Chiumiento, D. Pasqui, I. Cangioli, S. Lamponi, Fibroblast cell behavior on bound and adsorbed fibronectin onto hyaluronan and sulfated hyaluronan substrates, *Biomacromolecules* 6(2) (2005) 638-645.
- [17] I. Shabani, M.M. Hasani-Sadrabadi, V. Haddadi-Asl, M. Soleimani, Nanofiber-based polyelectrolytes as novel membranes for fuel cell applications, *Journal of membrane science* 368(1-2) (2011) 233-240.
- [18] I. Shabani, V. Haddadi-Asl, M. Soleimani, E. Seyedjafari, F. Babaeijandaghi, N. Ahmadbeigi, Enhanced infiltration and biomineralization of stem cells on collagen-grafted three-dimensional nanofibers, *Tissue Engineering Part A* 17(9-10) (2011) 1209-1218.
- [19] J. Zhao, L. Sun, Q. Chen, H. Lu, J. Wang, Modification of cation exchange membranes with conductive polyaniline for electro dialysis applications, *Journal of Membrane Science* 582 (2019) 211-223.
- [20] N.A. Alenazi, M.A. Hussein, K.A. Alamry, A.M. Asiri, Modified polyether-sulfone membrane: A mini review, *Designed monomers and polymers* 20(1) (2017) 532-546.
- [21] D. Lu, H. Zou, R. Guan, H. Dai, L. Lu,

Sulfonation of polyethersulfone by chlorosulfonic acid, *Polymer Bulletin* 54 (2005) 21-28.

[22] F. Lufrano, G. Squadrito, A. Patti, E. Passalacqua, Sulfonated polysulfone as promising membranes for polymer electrolyte fuel cells, *Journal of Applied Polymer Science* 77(6) (2000) 1250-1256.

[23] Y. Gu, J. Zhang, X. Zhang, G. Liang, T. Xu, W. Niu, Three-dimensional printed Mg-doped  $\beta$ -TCP bone tissue engineering scaffolds: effects of magnesium ion concentration on osteogenesis and angiogenesis in vitro, *Tissue engineering and regenerative medicine* 16 (2019) 415-429.

[24] T. Tavangar, F.Z. Ashtiani, M. Karimi, Morphological and performance evaluation of highly sulfonated polyethersulfone/polyethersulfone membrane for oil/water separation, *Journal of Polymer Research* 27(9) (2020) 1-12.

[25] S. Shahgaldi, Z. Yaakob, M. Ghasemi, W.R. Wan Daud, D.J. Khadem, Investigation of the effect of electrospun polyethersulfone nanofibers in membrane, *Defect and Diffusion Forum, Trans Tech Publ*, 2011, pp. 607-612.

[26] O. Gil-Castell, D. Galindo-Alfaro, S. Sánchez-Ballester, R. Teruel-Juanes, J.D. Badia, A. Ribes-Greus, Crosslinked sulfonated poly (vinyl alcohol)/graphene oxide electrospun nanofibers as polyelectrolytes, *Nanomaterials* 9(3) (2019) 397.

[27] S. Zhang, A. Tanioka, H. Matsumoto, Nanofibers as novel platform for high-functional ion exchangers, *Journal of Chemical Technology & Biotechnology* 93(10) (2018) 2791-2803.

[28] V. Pillay, C. Dott, Y.E. Choonara, C. Tyagi, L. Tomar, P. Kumar, L.C. du Toit, V.M. Ndesendo, A review of the effect of processing variables on the fabrication of electrospun nanofibers for drug delivery applications, *Journal of Nanomaterials* 2013 (2013).

[29] S. Soliman, S. Sant, J.W. Nichol, M. Khabiry, E. Traversa, A. Khademhosseini, Controlling the porosity of fibrous scaffolds by modulating the fiber diameter and packing density, *Journal of Biomedical Materials Research Part A* 96(3) (2011) 566-574.

[30] I. Shabani, V. Haddadi-Asl, E. Seyedjafari, M. Soleimani, Cellular infiltration on nanofibrous scaffolds using a modified electrospinning technique, *Biochemical and biophysical research communications* 423(1) (2012) 50-54.

[31] M. Aghajanpoor, S. Hashemi-Najafabadi, M. Baghaban-Eslaminejad, F. Bagheri, S. Mohammad Mousavi, F. Azam Sayyahpour, The effect of increasing the pore size of nanofibrous scaffolds on the osteogenic cell culture using a combination of

sacrificial agent electrospinning and ultrasonication, *Journal of Biomedical Materials Research Part A* 105(7) (2017) 1887-1899.

[32] J. Jiang, M.A. Carlson, M.J. Teusink, H. Wang, M.R. MacEwan, J. Xie, Expanding two-dimensional electrospun nanofiber membranes in the third dimension by a modified gas-foaming technique, *ACS Biomaterials Science & Engineering* 1(10) (2015) 991-1001.

[33] V. Sabatini, S. Checchia, H. Farina, M.A. Ortenzi, Homogeneous synthesis and characterization of sulfonated polyarylethersulfones having low degree of sulfonation and highly hydrophilic behavior, *Macromolecular Research* 24 (2016) 800-810.

[34] Y. Dong, J. Kong, S.L. Phua, C. Zhao, N.L. Thomas, X. Lu, Tailoring surface hydrophilicity of porous electrospun nanofibers to enhance capillary and push-pull effects for moisture wicking, *ACS applied materials & interfaces* 6(16) (2014) 14087-14095.

[35] S. Chaterji, R.A. Gemeinhart, Enhanced osteoblast-like cell adhesion and proliferation using sulfonate-bearing polymeric scaffolds, *Journal of Biomedical Materials Research Part A: An Official Journal of The Society for Biomaterials, The Japanese Society for Biomaterials, and The Australian Society for Biomaterials and the Korean Society for Biomaterials* 83(4) (2007) 990-998.

[36] A. Ghaee, J. Nourmohammadi, P. Danesh, Novel chitosan-sulfonated chitosan-polycaprolactone-calcium phosphate nanocomposite scaffold, *Carbohydrate polymers* 157 (2017) 695-703.

[37] S. Xiong, X. Zhang, P. Lu, Y. Wu, Q. Wang, H. Sun, B.C. Heng, V. Bunpetch, S. Zhang, H. Ouyang, A gelatin-sulfonated silk composite scaffold based on 3D printing technology enhances skin regeneration by stimulating epidermal growth and dermal neovascularization, *Scientific reports* 7(1) (2017) 4288.

[38] S. Dimassi, N. Tabary, F. Chai, N. Blanchemain, B. Martel, Sulfonated and sulfated chitosan derivatives for biomedical applications: A review, *Carbohydrate polymers* 202 (2018) 382-396.