

ساخت و بررسی خواص فیزیکی و سلولی فیلم های نانوکامپوزیتی بر پایه پلی ال-لاکتیک اسید حاوی نانولوله های کربنی هپارینه شده جهت استفاده در ترمیم ضایعات عصب

شکوفه مونسى راد^۱، محمد تقى خراسانى^{۲*}، مرتضى دليرى جوبارى^۳

۱- دکتری تخصصی، گروه بیومتریال، دانشکده مهندسی پزشکی، واحد علوم و تحقیقات، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران

۲- دانشیار، گروه بیومتریال، پژوهشگاه پلیمر و پتروشیمی ایران، تهران، ایران

۳- استادیار، گروه زیست فناوری دام و آبریان، پژوهشگاه ملی مهندسی ژنتیک و زیست فناوری، تهران، ایران

*عهده دار مکاتبات: M.Khorasani@ippi.ac.ir

(تاریخ دریافت: ۱۳۹۵/۰۳/۳۱، تاریخ پذیرش: ۱۳۹۵/۰۸/۰۷)

چکیده: هدف از انجام این تحقیق، ساخت فیلم های نانوکامپوزیتی بر پایه پلی ال-لاکتیک اسید حاوی نانولوله های کربنی جهت استفاده در ترمیم ضایعات عصب است. برای ساخت فیلم های نانوکامپوزیتی از روش تبخیر حلال و برای دستیابی به پخش مطلوب نانولوله کربنی در زمینه نیز از امواج فرا صوتی و عمل هپارینه کردن نانولوله ها استفاده شد. اثر پارامترهای مختلف: نوع و در صد نانولوله کربنی، روی مورفولوژی فیلم ها با استفاده از میکروسکوپی الکترونی روبشی بررسی شد. چگونگی پخش و توزیع نانولوله های کربنی در زمینه با استفاده از میکروسکوپی الکترونی عبوری بررسی شد. برای بررسی میزان آب دوستی فیلم ها از اندازه گیری زاویه تماس با آب و برای اندازه گیری بارسطحی از آزمون زتا پتانسیل استفاده شد. مطالعات درون تنی نیز به مدت دو هفته با استفاده از کشت سلول های P19 موشی و تمایز آنها به سلول های عصبی بر روی فیلم ها انجام شد و با استفاده از میکروسکوپی الکترونی روبشی و آزمون ایمونوفلوئورسانس مورد بررسی قرار گرفت. نتایج مطالعات مربوط به فیلم ها حاکی از خواص مطلوب فیلم های حاوی نانولوله کربنی هپارینه شده جهت استفاده در ترمیم بافت عصب و قابلیت این فیلم ها برای تمایز و رشد سلول های عصبی می باشد.

واژه های کلیدی:

ترمیم عصب، نانولوله کربنی، پلی ال-لاکتیک اسید، هپارین.

۱- مقدمه

مشخصی داشته باشند، می توانند در هدایت و رشد نورون ها که خود هادی الکتریسیته هستند، مفید باشند. در طی چند دهه گذشته، چندین گروه تحقیقاتی نانولوله کربنی را به عنوان گزینه بسیار مناسبی برای استفاده در شبیه سازی و روش های کلینیکی در مان ضایعات عصبی ارزیابی کردند که این به دلیل بار الکتریکی ای منفی و توانایی بالقوه آنها برای برقراری ارتباط

تحقیقات زیادی در مورد نحوه ترمیم ضایعات اعصاب صورت گرفته است که هدف مشترک همه آنها جهت دهی به ترمیم آکسون ها و رشته های عصبی است، به طوریکه بتوانند به نحوی مطلوب به انتهای بریده شده عصب برسند. بعد از هر آسیب عصبی بازگشت به کارکرد اولیه معمولاً غیر ممکن می شود. پژوهشگران عقیده دارند زیست موادی که خواص الکتریکی

موضوع می تواند باعث ایجاد مشکلات زیادی از جمله جذب پروتئین های پلازما توسط نانولوله ها، ایجاد لخته خون و توده شود [۲۶]. خون سازگاری نانولوله های کربنی را می توان با هپارینه کردن آنها به طور قابل توجهی بالا برد [۱۳]. هپارین یک گلوکز آمین شدیداً سولفاته و دارای بار الکتریکی منفی است و در ساخت وسایل ماکروسکوپی خون سازگار مورد استفاده قرار می گیرد [۲۷]. همچنین به دلیل اینکه هپارین در ساختار خارج سلول نیز وجود دارد، نانولوله کربنی هپارینه شده توسط ماکروفاژها شناسایی نشده و از نظر ایمنی مشکل چندانی ایجاد نمی کند. از طرف دیگر، هپارین می تواند مشابه ماتریس خارج سلولی عمل کرده و باعث افزایش چسبندگی سلول، رشد و زنده ماندن سلول ها و تمایل آنها به تشکیل بافت شود [۲۶].

مطالعه حاضر ابتدا به ساخت فیلم های نانو کامپوزیتی با استفاده از سیستم سه جزئی پلی ال-لاکتیک اسید/۱ و ۴ دی اکسان/ نانولوله کربنی تک دیواره و چند دیواره و بررسی خواص فیزیکی و سلولی آن می پردازد. پلی ال-لاکتیک اسید به دلیل خصوصیات مطلوب از جمله زیست سازگاری، زیست تخریب پذیری و نیز غیرسمی بودن محصولات حاصل از تخریب آن، مورد توجه است. برای ساخت فیلم ها از روش تبخیر حلال استفاده شد. در ادامه کار پس از هپارینه کردن نانولوله های کربنی چند دیواره، فیلم های نانو کامپوزیتی مشابه با فیلم های قبلی با استفاده از نانولوله های هپارینه شده و پلی ال-لاکتیک اسید ساخته شدند. پس از ساخت این فیلم ها خصوصیات فیزیکی آنها مطالعه و با فیلم های قبلی مقایسه شد. در مطالعه سلولی نیز کشت سلول های اختصاصی بافت عصبی بر روی فیلم ها انجام شد و مورد بررسی قرار گرفت.

۲- مواد و روش انجام تحقیق

۲-۱- مواد

در این تحقیق از پلی ال-لاکتیک اسید (PLLA)^۱ با نام تجاری RESOMER L 210 S خریداری شده از شرکت بوهرینگر^۲ آلمان، و ۱ و ۴-دی اکسان^۳ خریداری شده از شرکت مرک به

دوباره بین سلول های عصبی بعد از آسیب دیدگی است [۱]. در نانو کامپوزیت های پلیمر/نانولوله کربنی، درجه موفقیت در دستیابی به خواص مطلوب نانولوله مستلزم عوامل گوناگونی از جمله درصد نانولوله، درجه پراکندگی و چگونگی چسبندگی نانولوله به زمینه پلیمری است [۱-۶]. به دلیل نیروهای واندروالس قوی که بین نانولوله های کربنی وجود دارد، ممانعت از آگلومره شدن نانولوله ها کاری بسیار دشوار و در عین حال مهم است [۷-۱۱]. آگلومره شدن نانولوله ها دلیل اصلی افت خواص مکانیکی [۵، ۸-۱۰] و الکتریکی [۱۱] در بسیاری از نانو کامپوزیت ها است. این آگلومره ها علاوه بر اینکه واکنش پذیری و خصوصیات شیمیایی سطح نانولوله ها را تحت تاثیر قرار می دهد، باعث ایجاد سمیت سلولی نیز می شوند [۷، ۱۲-۱۴]. روش های گوناگون فیزیکی و شیمیایی برای جلوگیری از چسبندگی بین نانولوله ها استفاده شده است که از جمله آنها می توان به روش های استفاده از تابش امواج فرا صوتی، نیروی برشی و فشاری بالا [۱۵-۱۸] و نیز روش های اصلاح فیزیکی اشاره کرد [۱۳]. در روش استفاده از تابش امواج فرا صوتی، امواج از تبدیل ولتاژ خطی به موج مکانیکی به وجود آمده و توسط یک پروب به داخل سیال هدایت می شود تا ذرات آگلومره شده را از هم جدا کند [۲، ۱۹].

به دلیل اهمیت مساحت سطحی در بحث سمیت [۱۳، ۱۹] و سازگاری نانولوله های کربنی در حلال، اصلاح سطح نانولوله ها می تواند اثر مطلوبی در پراکندگی آنها در ماتریس و نیز زیست سازگاری آنها داشته باشد [۲۰]. برای عامل دار کردن سطح نانولوله ها، گروه های آلی آب دوست متنوعی از جمله آمینو اسیدها، آرجنین-گلایسین-آسپارتیک اسید-سرین، گلوکز آمین [۲۱]، هپارین [۲۲]، پلی اتیلن گلیکول [۲۳] و سایر پروتئین های پلاسمای انسانی [۲۴] مورد استفاده قرار گرفته اند [۲۵].

با توجه به اینکه ثابت شده است که نانولوله های کربنی زیست تخریب پذیر نیستند، وجود آنها در خون اجتناب ناپذیر است [۱۳] و به دلیل خون سازگاری کم نانولوله های کربنی این

شد [۲۸].

۲-۳- آماده سازی فیلم های نانو کامپوزیتی پلی ال-لاکتیک اسید/نانولوله کربنی

محلول های پلیمری با غلظت ۵ wt/vol تهیه شد. برای این منظور پلیمر پس از وزن شدن، در حجم معینی از ۴۱ دی اکسان با حرارت دادن توسط استیرر و مگنت در دمای ۷۰°C حل شد تا محلول همگن و یکنواختی به دست آمد. درصدهای مختلف نانولوله کربنی تک دیواره، چند دیواره و چند دیواره هیپارینه شده شامل (۱، ۲/۵، ۵٪ Wt.) با استفاده از دستگاه اولتراسوند هموژنایزر و به مدت ۱۵ دقیقه برای هر نمونه، در محلول های پلیمری پراکنده شدند. در این مدت زمان دستگاه با توان ۸۰ وات و با پالس های ۰/۷ ثانیه به ۰/۷ ثانیه کار می کرد و برای جلوگیری از تبخیر حلال، پروب دستگاه و همچنین ظرف حاوی سوسپانسیون با کیسه یخ خنک شدند. برای به دست آوردن یک فیلم یکنواخت و از بین بردن حباب های محلول، برای مدتی سوسپانسیون ها در دمای ۶۰°C بدون حرکت نگهداری شدند. محلول های تهیه شده در پتری دیش هایی که در جای مسطح قرار داده شده بود، به آرامی ریخته شدند، تا حبابی وارد آن نشود. روی پتری دیش ها با کاغذ آلومینیومی که در آن سوراخ هایی ریز و کنار هم به طور یکنواخت ایجاد شده بود، پوشانده شد تا حلال به آرامی از سطح فیلم ها تبخیر شده و از ناصاف شدن سطح فیلم ها جلوگیری شود. نمونه ها در دمای محیط (۲۵°C) قرار داده شدند تا حلال به تدریج تبخیر شود.

۲-۴- بررسی توسط میکروسکوپی الکترونی روبشی^۲

برای بررسی مورفولوژی سطح و پشت فیلم ها از میکروسکوپی الکترونی روبشی مدل TESCAN-VEGAI استفاده شد. سطح نمونه های مربوطه به وسیله طلا پوشش داده شدند و سپس مشاهدات انجام گرفت.

۲-۵- بررسی توسط میکروسکوپی الکترونی عبوری^۸

عنوان حلال پلیمر، نانولوله کربنی چند دیواره (MWCNT)^۴ با قطر داخلی ۸-۱۵ nm و طول ۵۰ μm و نانولوله کربنی تک دیواره (SWCNT)^۵ با قطر خارجی ۱-۲ nm و طول ۵-۳۰ μm ساخت کشور چین و خریداری شده از شرکت نوترینو در ایران استفاده شد. از هیپارین سدیم (۵۰۰۰ IU/m) خریداری شده از شرکت داروسازی ابوریحان در ایران برای هیپارینه کردن نانولوله کربنی چند دیواره و جهت انجام آزمون های کشت سلول از سلول های P1۹ موشی خریداری شده از انیستیتو پاستور ایران استفاده شد.

۲-۲- هیپارینه کردن نانولوله کربنی چند دیواره

به طور خلاصه، عمل هیپارینه کردن نانولوله های کربنی چند دیواره با طی مراحل زیر انجام شد: برای ایجاد گروه های اسیدی به روی نانولوله های کربنی چند دیواره (MWCNT-COOH)، از مخلوط اسید سولفوریک/اسید نیتریک (۴۰ ml، ۱:۳ v/v، برای ۰/۱ gr نانولوله) و جهت انجام واکنش آسیلاسیون، از محلول تیونیل کلراید/دی متیل فورمامید خشک (۴۰ ml، ۱:۲۰ v/v) استفاده شد. محصول نهایی این مرحله MWCNT-COCl می باشد. در ادامه کار مقدار ۲۵ ml تری اتیلن تترا آمین به MWCNT-COCl اضافه شد. بعد از گذشت ۴ روز از شروع واکنش، برای جدا شدن آمین های اضافی از سیستم، عمل شستشو توسط ۱ لیتر اتانول انجام شد. رسوب سیاه رنگ (-MWCNT-NH₂) به مدت ۴۸ ساعت در دمای اتاق درون دسیکاتور قرار گرفت تا کاملاً خشک شود. برای دستیابی به MWCNT-NH₃⁺ از محلول ۰/۱ مولار اسید هیدروکلریک و برای اتصال یونی هیپارین به جامد سیاه رنگ حاصل، از هیپارین (۷۰ میلی گرم برای ۰/۱ gr نانولوله) استفاده شد. برای بررسی و اطمینان از وجود گروه های عاملی بعد از انجام واکنش، از سطح نمونه های نانولوله کربن در دو حالت خالص و هیپارینه شده و همچنین خود هیپارین مصرفی خریداری شده توسط دستگاه FTIR، مدل NEXUS 870 طیف FTIR گرفته شد. برای بررسی فعالیت هیپارین، تست اندازه گیری زمان ترموپلاستین نسبی فعال شده (APTT)^۶ روی نانولوله کربنی قبل و بعد از هیپارینه کردن انجام

عملیات کشت به صورت استاتیک و با کنترل تمامی پارامترهای محیطی و عملیاتی شامل اتمسفر محیط، دما، فشار، PH و غلظت مواد موجود در محیط کشت انجام شد: رده سلولی P₁₉ از انستیتو پاستور ایران با کد C422 خریداری و با روش رودنیکی و مک بورنی تا زمان رسیدن تعداد سلول‌ها به تعداد Cell/ml 5×10^5 کشت و نگهداری شد [۲۹]. برای تمایز سلول‌ها به سلول‌های عصبی، آن‌ها به روی ظروف باکتریولوژی ۱۰۰ mm محتوی محیط کشت MEM(GIBCO)، ۱۰٪ سرم گاوی (FBS) و $0.3 \mu\text{Mol}$ رتیونیک اسید^{۱۴} منتقل شدند. کشت سلول تا روز چهارم ادامه داده شد و هر ۴۸ ساعت یک بار محیط کشت تعویض گردید. در این مدت یکسری اجتماعات^{۱۵} سلولی تشکیل شد. تجمعات سلولی با روش مکانیکی جدا گردیده و روی ظرفهای ویژه کشت سلول حاوی فیلم‌ها و در محیط بدون رتیونیک اسید قرار داده شد و کشت به همین روال تا روز چهاردهم ادامه یافت. در طول دوره کشت به منظور مشاهده روند رشد و تمایز سلول‌ها از میکروسکوپی نوری استفاده شد (ظروف کشت فاقد فیلم به عنوان کنترل منفی جهت نشان دادن رشد سلول‌ها انتخاب شدند). برای تثبیت سلول‌های رشد یافته بر روی فیلم‌ها، پس از روز چهاردهم ابتدا محیط کشت به آرامی تخلیه شده و فیلم‌ها به مدت ۵ دقیقه شستشو داده شدند تا سلول‌های مرده حذف شوند. سپس محلول گلو تار آلدئید^{۱۶} ۷/۷٪/۵٪ به هر خانه اضافه شده و به مدت ۲ ساعت در دمای محیط قرار داده شدند. در ادامه شستشوی نمونه‌ها با فسفات بافر سالین (PBS)^{۱۷} به مدت ۵ دقیقه، و دهیدراته کردن نمونه‌ها با غوطه‌وری آنها در یک سری محلول اتانول-آب با ۵۰٪/V/S، ۶۰، ۷۰، ۸۰، ۹۰ و ۱۰۰ به مدت ۵ دقیقه در هر الکل انجام شد. سپس با PBS آن‌هم به مدت ۵ دقیقه شستشو داده شدند. برای خشک شدن نهایی، فیلم‌ها به مدت ۲۴ ساعت در دمای محیط قرار گرفتند. برای مشاهده رشد و تمایز سلول‌ها به سلول‌های عصبی بر روی فیلم‌های کشت سلولی شده از میکروسکوپ الکترونی روبشی و نوری استفاده شد. برای اثبات تمایز سلول‌های P₁₉ بر روی نمونه‌ها، آزمون ایمونوفلوئورسانس بر روی

برای مشاهده و بررسی چگونگی پراکنده شدن نانولوله‌های کربنی هپارینه شده و هپارینه نشده در ماتریس پلی‌ال-لاکتیک اسید از میکروسکوپی الکترونی عبوری مدل EM 900 استفاده شد. برای انجام این مشاهدات، آماده سازی نمونه‌ها (برش نمونه‌ها به ضخامت ۸۰ nm) توسط تیغه الماس مدل OMU3, Reicher انجام شد. به منظور حفاظت سطح نمونه‌ها در برابر پرتوافکنی الکترون‌ها، سطوح برش داده شده توسط کربن به مدت ۷ دقیقه پوشش داده شدند.

۲-۶- اندازه‌گیری زاویه تماس^۱ با آب

برای بررسی میزان آب دوستی فیلم‌های پلیمری و نانوکامپوزیتی از اندازه‌گیری زاویه تماس با آب استفاده شد. در انجام اندازه‌گیری زاویه تماس، ۳ نقطه از هر نمونه توسط دستگاه مستقر در دانشگاه صنعتی شریف و به روش قطره چسبیده^{۱۰} آزمایش شد و میانگین زوایای به دست آمده به عنوان زاویه تماس با آب فیلم مربوطه در نظر گرفته شد.

۲-۷- پتانسیل زتا^{۱۱}

بارسطحی فیلم پلیمری و نیز فیلم‌های نانوکامپوزیتی حاوی نانولوله کربنی چند دیواره هپارینه شده و هپارینه نشده با استفاده از دستگاه Electro Kinetic Analyzer اندازه‌گیری شد. برای این منظور از محلول ۰/۰۰۱ مولار کلرید پتاسیم به عنوان الکترولیت استفاده شد. جهت اندازه‌گیری بار سطحی هر نمونه، باید این میزان را نسبت به نمونه مرجع که پلی متیل متاکریلات است، اندازه گرفت. بنابراین قطعه پلی متیل متاکریلات در داخل دستگاه قرار داده شد و میزان بار سطحی آن تعیین و سپس بار سطحی نمونه‌ها اندازه‌گیری شد. برای به دست آوردن بار سطحی واقعی هر نمونه، بار سطحی نمونه پلی متیل متاکریلات از دو برابر بار سطحی اندازه‌گیری شده برای آن نمونه کم شد. عدد به دست آمده به عنوان بار سطحی نمونه گزارش شد.

۲-۸- مطالعات سلولی (برون تنی^{۱۲})

عکس برداری قرار گرفتند.

۳- نتایج و بحث

۳-۱- هیپارینه شدن نانولوله کربنی

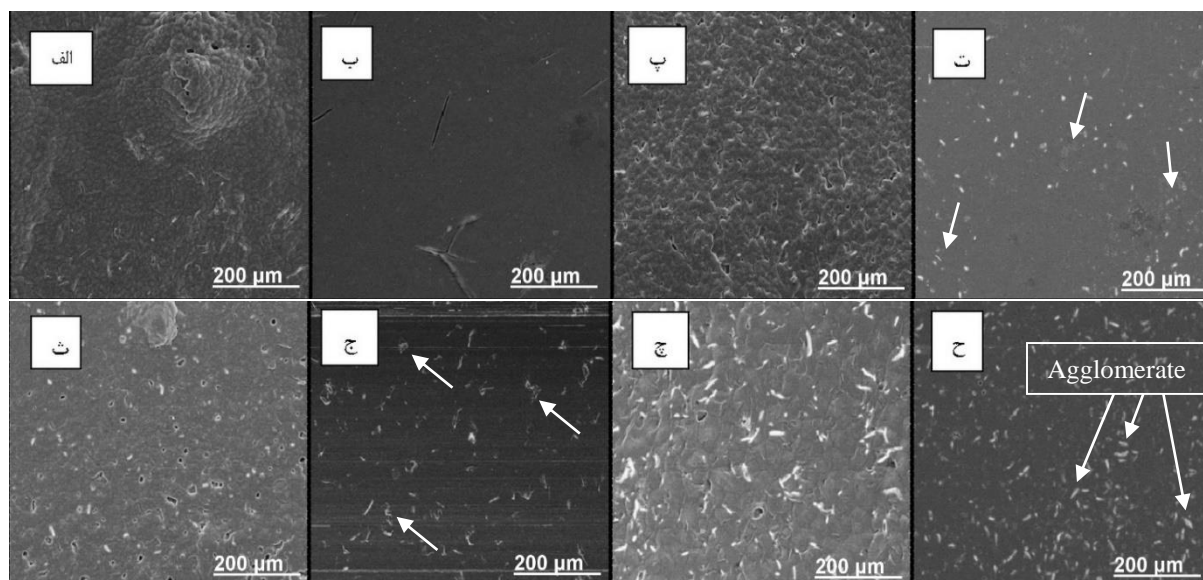
نتیجه آزمون APTT [۲۸] نشان داد که با هیپارینه کردن نانولوله مدت زمان لخته شدن خون در حضور نانولوله کربنی افزایش پیدا کرده و خون سازگاری نانولوله بیشتر می شود که این به دلیل حضور هیپارین می باشد. پیک های ظاهر شده در طیف گرفته شده توسط آنالیز مادون قرمز از نانولوله کربنی چند دیواره، هیپارین و نانولوله کربنی چند دیواره هیپارینه شده [۲۸] نیز هیپارینه شدن نانولوله های کربنی چند دیواره را تایید کرد.

۳-۲- نتایج به دست آمده از مطالعات مورفولوژیکی

فیلم های نانو کامپوزیتی پلی ال-لاکتیک اسید/نانولوله کربنی

در شکل (۱) تصاویر میکروسکوپی الکترونی روبشی گرفته شده از سطح و نیز سطح زیرین (سطح در تماس با پتری دیش) μm فیلم های پلیمری و نانو کامپوزیتی پلی ال-لاکتیک اسید و نانولوله کربنی چند دیواره نشان داده شده است.

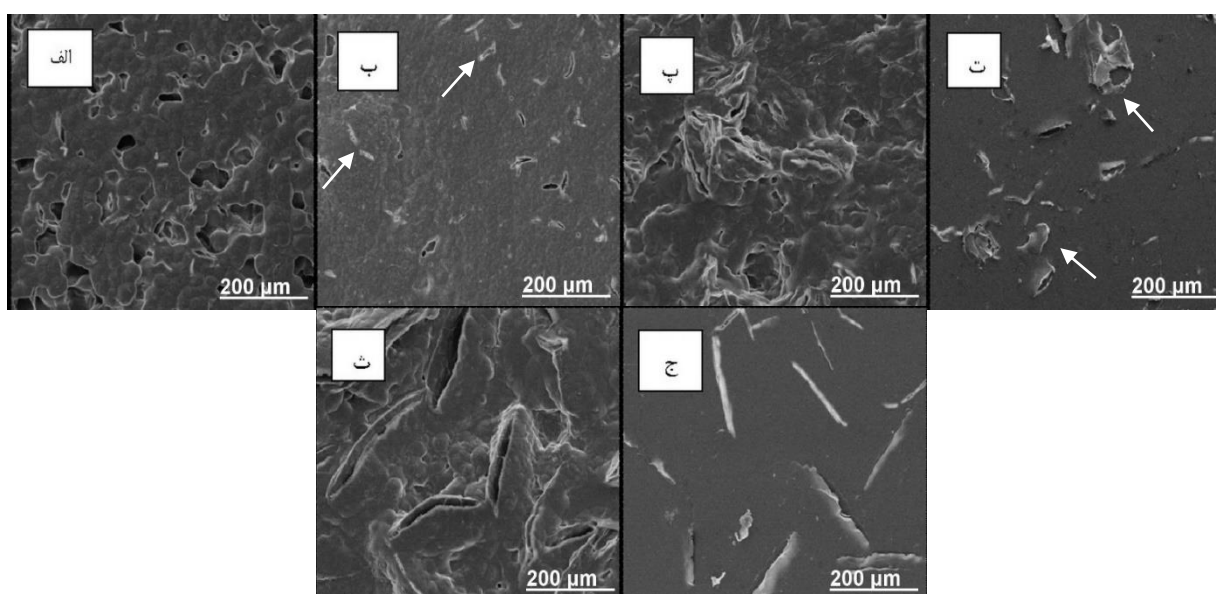
آنها انجام گرفت. برای انجام این آزمون مراحل آماده سازی و اصلاح سلولهای P₁₉ تا روز هشتم مانند مراحل کشت سلول می باشد. در روز هشتم کشت سلول، پس از خارج کردن محیط کشت، نمونه ها به درون ظروف پوشش داده شده با ژلاتین منتقل گردیدند. سپس سلولهای چسبیده شده درون نمونه ها مستقیماً با ۴٪ پارا فرم آلدئید در محلول PBS به مدت ۳۰ دقیقه در دمای اتاق تثبیت شدند. نمونه ها به وسیله PBS در سه مرحله و هر بار به مدت ۵ دقیقه شسته شدند. به منظور افزایش قابلیت نفوذ پذیری، سلولها تحت ۱٪ تریتون-۱۸ رقیق شده با PBS به مدت ۴۵ دقیقه قرار گرفتند. سلولها به وسیله ۵٪ FBS در PBS به مدت ۵ ساعت، بلوکه شده و سپس به مدت یک شب در دمای ۴ °C تحت آنتی بادی Map-2^{۱۹} (۱:۱۰۰) قرار گرفتند. شستشوی سلولها در سه مرحله و هر بار به مدت ۱۵ دقیقه با PBS انجام شد و در دمای اتاق و در مکانی تاریک و به دور از نور، تحت آنتی بادی ایمونوگلوبولین نوع ۲^۰G (IgG) به مدت ۱ ساعت و پس از آن استرپتاویدین^{۲۱}، آن هم به مدت ۱ ساعت قرار گرفتند. ظروف و نمونه های درون آن سه بار با PBS به مدت ۵ دقیقه شسته شو شدند. این مرحله نیز در مکانی تاریک و به دور از نور انجام شد. سپس سلولها با میکروسکوپ نوری تحت مشاهده و



شکل (۱): تصاویر میکروسکوپی الکترونی روبشی: (الف، پ، ت و ج): سطح و (ب، ت، ج و ح): سطح زیرین فیلم های: (الف و ب): پلیمری و (پ-ح): نانو کامپوزیتی پلی ال-لاکتیک اسید و نانولوله کربنی چند دیواره با درصد وزنی متفاوت از نانولوله: (پ و ت): ۱٪، (ث و ج): ۲/۵٪ و (چ و ح): ۵٪

فوق العاده مستعد به کلوخه‌ای شدن و به هم چسبیدن هستند. با زیاد کردن درصد نانولوله، مقدار این تجمعات افزایش یافته است. با مشاهده تصاویر گرفته شده از سطح نمونه‌ها نیز این آگلومره‌ها در فیلم‌های شامل نانولوله کربنی دیده می‌شود، اما شدت این تجمعات از سطح زیرین آن نمونه‌ها کمتر است. در شکل (۲) نیز تصاویر میکروسکوپی الکترونی روبشی گرفته شده از سطح و نیز سطح زیرین فیلم‌های نانوکامپوزیتی پلی‌ال-لاکتیک اسید و نانولوله کربنی تک دیواره نشان داده شده است.

همان طور که در این تصاویر مشاهده می‌شود، با اضافه کردن نانولوله به زمینه پلیمری، به دلیل تمایل شدید نانولوله‌ها به تجمع، مقدار زیادی نانولوله‌های آگلومره شده و رسوب کرده در سطح زیرین نمونه‌ها مشاهده می‌شود. نمونه‌هایی از این تجمعات با پیکان سفید رنگ در تصاویر مشخص شده‌اند. همان طور که قبلاً نیز گفته شد، در این فیلم‌ها آگلومره شدن نانولوله‌های کربنی به دلیل وجود نیروی واندوالس بین آن‌ها است. به خصوص اینکه نانولوله‌های استفاده شده فاقد گروه‌های عاملی بوده و در هنگام ساخت آن‌ها نیز از هیچ سورفکتانتی استفاده نشده است و بنابراین



شکل (۲): تصاویر میکروسکوپی الکترونی روبشی: (الف، ب و ت و ج): سطح زیرین فیلم‌های نانوکامپوزیتی پلی‌ال-لاکتیک اسید و نانولوله کربنی تک دیواره با درصد وزنی متفاوت از نانولوله: (الف و ب): ۱٪، (ب و ت): ۲/۵٪ و (ت و ج): ۵٪

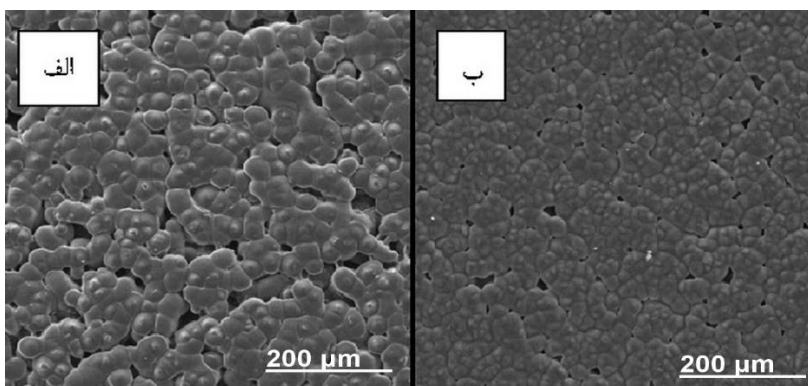
۱۰۰ تا ۵۰۰ لوله می‌شود (قطر بسته ۰/۲ تا ۱ میکرون) [۳۰]. سطح فیلم‌های شامل نانولوله کربنی تک دیواره نیز در مقایسه با سطح فیلم‌های شامل نانولوله کربنی چند دیواره بسیار ناهمگن تر است و آن نیز به دلیل همگن نبودن ویسکوزیته محلول پلیمری (قبل از تبخیر حلال و تشکیل فیلم) در قسمت‌های مختلف آن به دلیل پخش غیر همگن نانولوله‌ها در آن می‌باشد که منجر به تشکیل چنین ساختاری بعد از خروج حلال شده است. این ناهمگونی سطح در نمونه‌های شامل ۲/۵ و ۵ درصد وزنی نانولوله کربنی

همان طور که مشاهده می‌شود، اندازه آگلومره‌های تشکیل شده از نانولوله‌های کربنی در این فیلم‌ها بسیار بزرگتر از فیلم‌های شامل نانولوله کربنی چند دیواره می‌باشد و این به دلیل پخش و نیز توزیع ناهمگن تر نانولوله‌های کربنی تک دیواره در مقایسه با چند دیواره به دلیل تمایل بیشتر آن‌ها به چسبیدن به هم می‌باشد. نانولوله‌های کربنی تک دیواره تمایل دارند به صورت موازی با یکدیگر و بسیار نزدیک به هم برای افزایش برهمکنش خود جهت گیری کنند که این امر منجر به تشکیل بسته‌هایی شامل

های شامل نانولوله کربنی چند دیواره نیز حفرات ظاهر شده‌اند اما در مقایسه با فیلم‌های شامل نانولوله‌های کربنی تک دیواره، این حفرات بسیار ریزتر بوده و پخش آنها در سطح فیلم یکنواخت‌تر است. تصاویر میکروسکوپی الکترونی روبشی گرفته شده از سطح و نیز سطح زیرین فیلم نانو کامپوزیتی پلی ال-لاکتیک اسید و نانولوله کربنی چند دیواره هپارینه شده در شکل (۳) نشان می‌دهد که اصلاح نانولوله‌های کربنی چند دیواره به وسیله هپارین باعث شده است که پخش فیلر در ماتریس پلیمری به طور قابل توجهی بهبود پیدا کند.

شدیدتر است. قسمت‌هایی از سطح فیلم‌ها که به صورت حفره دیده می‌شوند، قسمت‌هایی هستند که ویسکوزیته محلول در آن نقاط بسیار کم بوده و قسمت اعظم آن را حلال تشکیل داده و بعد از خروج حلال به صورت حفره باقی مانده‌اند. هر چه محلول پلیمری همگن‌تر و پخش و توزیع نانولوله‌های کربنی در آن بهتر باشد، این حفرات به جا مانده از خروج حلال ریزتر بوده و توزیع آنها در سطح فیلم یکنواخت‌تر است.

در نمونه‌های شامل نانولوله کربنی تک دیواره این حفرات کاملاً آشکار بوده و در فیلم شامل ۵ درصد وزنی نانولوله تک دیواره، این حفرات به صورت ترک در سطح فیلم ظاهر شده‌اند. در فیلم



شکل (۳): تصاویر میکروسکوپی الکترونی روبشی: (الف): سطح و (ب): سطح زیرین فیلم نانو کامپوزیتی پلی ال-لاکتیک اسید و ۲/۵٪ نانولوله کربنی چند دیواره هپارینه شده

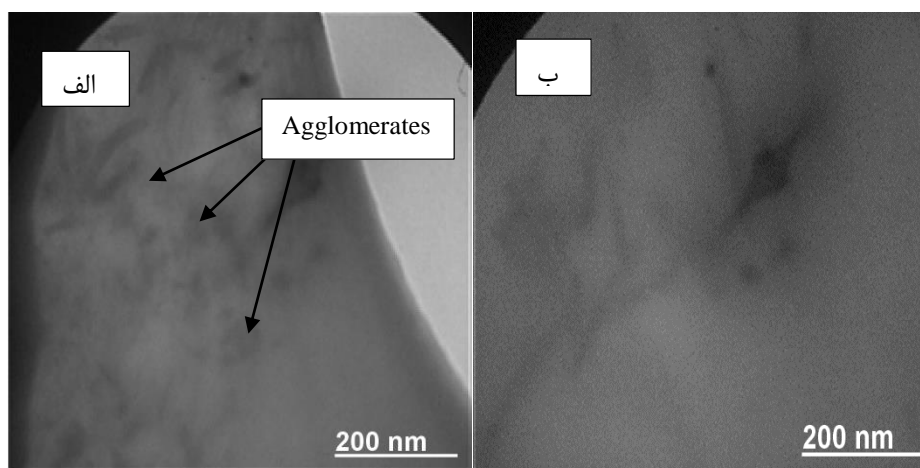
می‌یابد [۲۸]. همچنین همان‌طور که از مقایسه تصاویر الف در شکل‌های (۱) و (۳) مشخص است، مورفولوژی سطح فیلم نانو کامپوزیتی PLLA/HMWCNT بسیار زبرتر از مورفولوژی سطح فیلم پلیمری PLLA می‌باشد که سطحی نسبتاً صاف از خود نشان داد و دلیل آن می‌تواند ویسکوزیته بالای محلول‌های حاوی نانولوله کربنی در مقایسه با محلول پلیمری خالص باشد. استفاده از نانوپلیمرهای پیشرفته به عنوان زمینه در مهندسی عصب با توجه به این مسئله ساده که نانو ساختاری که از نظر ابعادی نزدیک به ماتریس برون سلولی داشته باشد، در چسبندگی، مهاجرت و تکثیر سلولی مفید خواهد بود و پیش‌بینی می‌شود به دلیل زبری سطح بیشتر، تکثیر سلولی بر روی فیلم‌های حاوی

این پخش به صورت پایدار بوده و بر خلاف فیلم‌های ساخته شده با نانولوله کربنی خالص، در طی فرآیند انجماد، جدایش فازی بین نانولوله‌ها و محلول پلیمری ایجاد نشده و در نتیجه باعث کاهش فیلر در سطح زیرین نمونه شده است. این نتیجه شاید به این دلیل باشد که با هپارینه کردن نانولوله‌ها، نانولوله به صورت ذرات با بار منفی در آمده و به دلیل نیروی دافعه الکترواستاتیکی که به واسطه این بار منفی به وجود می‌آید، همراه با محلول پلیمری به صورت یک سیستم کلونیدی در آمده و نانولوله‌ها در محلول همدیگر را دفع کرده و معلق می‌مانند. از طرفی به دلیل خاصیت آب دوستی هپارین، ماهیت آب‌گریز نانولوله‌ها، آب دوست‌تر شده و امتزاج‌پذیری نانولوله‌ها و محلول پلیمری افزایش

گسترده تر قابل مشاهده است (نمونه‌هایی از این تجمعات با پیکان سیاه رنگ در تصاویر مشخص شده‌اند). شدت تجمعات نانولوله‌های کربنی در این حالت به قدری زیاد است که در مقیاس میکرومتری (در تصاویر میکروسکوپی الکترونی روبشی) نیز قابل رویت بود. اما تجمعات نانولوله کربنی هپارینه شده فقط در مقیاس نانومتری قابل مشاهده است. طول نانولوله‌های کربنی در هر دو حالت در مقایسه با نانولوله‌های کربنی خریداری شده کوتاه تر است و دلیل آن شکسته شدن نانولوله‌ها در حین تابش امواج فراصوتی بوده و دور از انتظار نبود.

نانولوله کربنی چند دیواره هپارینه شده بهتر از PLLA خالص باشد. نتایج مطالعه انجام شده در زمینه مشابه این مطلب را تایید می‌کند [۳۱].

در شکل (۴) نیز تصاویر میکروسکوپی الکترونی عبوری از فیلم‌های نانو کامپوزیتی پلی ال-لاکتیک اسید/ نانولوله کربنی چند دیواره نشان داده شده است. همان طور که مشاهده می‌شود، پخش نانولوله‌ها در فیلم ساخته شده با نانولوله کربنی هپارینه شده بهتر بوده و شدت تجمعات نانولوله‌ها در آن کمتر است. در حالیکه در فیلم ساخته شده با نانولوله کربنی خالص تجمعات نانولوله‌ها به شکل آگلومره‌های سیاه رنگ و به صورت



شکل (۴): تصاویر میکروسکوپی الکترونی عبوری از فیلم‌های نانو کامپوزیتی پلی ال-لاکتیک اسید و ۲/۵٪ WT. نانولوله کربنی چند دیواره: (الف): نانولوله کربنی خالص و (ب): نانولوله کربنی هپارینه شده

اسیدهایی با جرم مولکولی کمتر از خود نشان می‌دهد. از طرفی دیگر زیاد بودن طول زنجیره‌های پلیمری باعث کاهش تحرک زنجیره‌های پلیمری شده و به همین دلیل زنجیره‌های پلیمری که باید با آب تماس و برهمکنش داشته باشند و ذرات آب را روی سطح کشیده و زاویه تماس را کاهش دهند، نمی‌توانند درست انجام وظیفه کنند و در نتیجه زاویه تماس بیشتر از حد مورد انتظار می‌باشد.

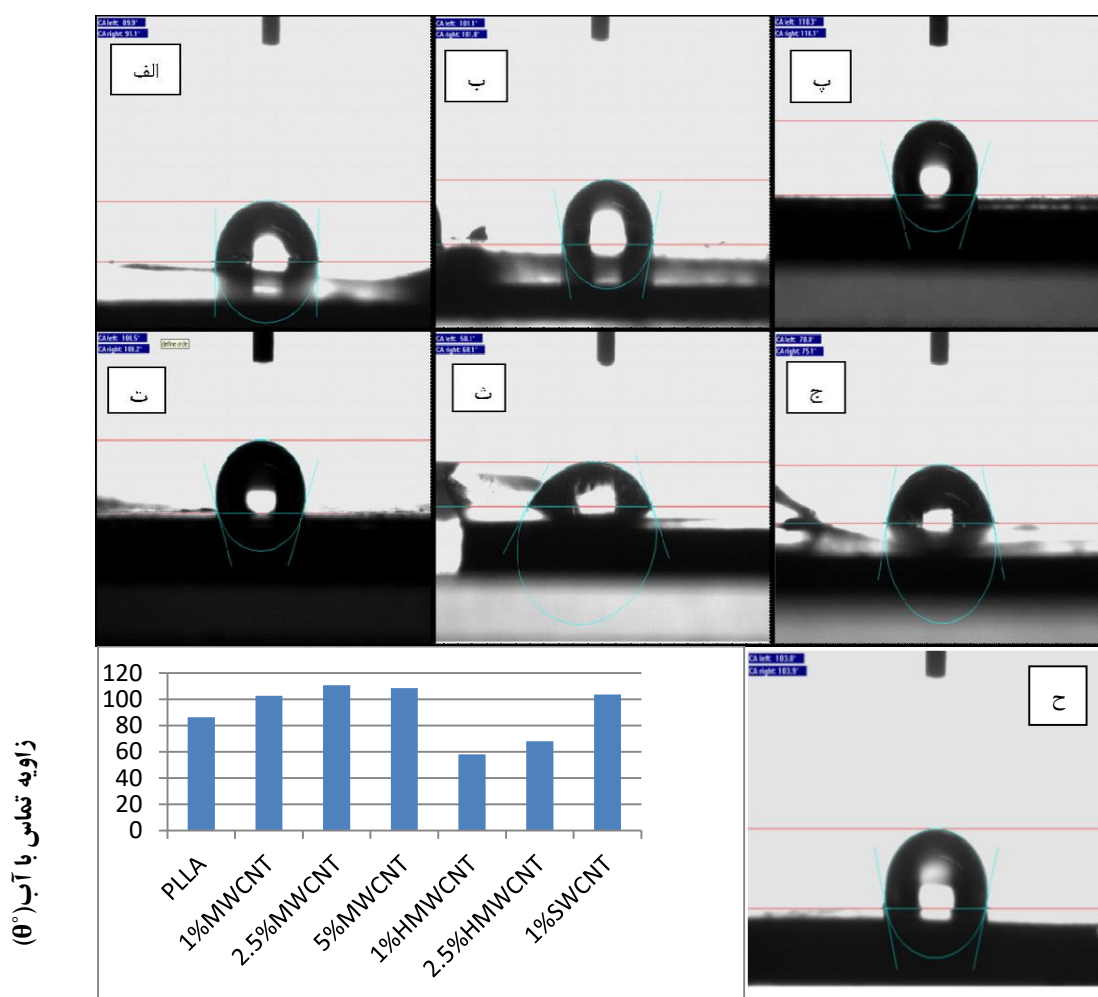
با اضافه کردن نانولوله کربنی مقاومت در برابر آب نمونه‌ها افزایش می‌یابد. نانولوله‌های کربنی کاملاً آب‌گریز بوده و در تماس با آب خیس خورده نمی‌شوند [۳۳-۳۵]. نانولوله کربنی

۳-۳- زاویه تماس

در شکل (۵) تصاویر گرفته شده از زوایای تماس با آب سطح فیلم‌ها و نیز نمودار تغییرات زاویه تماس با آب فیلم‌های پلیمری و نانو کامپوزیتی PLLA/CNT نشان داده شده است. پلی لاکتیک اسید پلیمری است که دارای گروه‌های آب‌دوست استری است و باید مقدار کمی رفتار آب دوستی از خود نشان دهد [۳۲]. پلی لاکتیک اسیدی که در این تحقیق استفاده شده است، به دلیل بالا بودن جرم مولکولی آن و در نتیجه زیاد بودن طول زنجیره‌های پلیمری و ممانعت فضایی که ایجاد می‌کنند، مولکول‌های آب را دفع کرده و رفتار آب دوستی کمتری نسبت به پلی لاکتیک

کربنی و مهاجرت آن‌ها به سطح، می‌تواند انرژی سطحی بین فیلم و آب را کاهش داده و در نتیجه این کاهش، زاویه تماس کم شده و با توجه به معادله یانگ آب دوستی افزایش می‌یابد [۳۶].

که در این تحقیق استفاده شد، دارای گروه های عاملی کربوکسیلیک اسید بود که باعث شد از شدت آبرگریزی آنها کم شود. حضور این گروه های عاملی آب دوست روی سطح نانولوله



شکل (۵): تصاویر گرفته شده از زوایای تماس با آب: (الف): فیلم پلیمری و (ب-ج): فیلم های نانوکامپوزیتی شامل پلیمر و نانولوله کربنی: (ب): 1 MWCNT، (پ): 2/5 % MWCNT، (ت): 5 % MWCNT، (ث): 1 % HMWCNT، (ج): 2/5 % HMWCNT، (چ): 1 % SWCNT و (ح): نمودار تغییرات زاویه تماس با آب فیلم های پلیمری و نانوکامپوزیتی PLLA/CNT

از فیلم حاوی 5٪ نانولوله کربنی می‌باشد که این نتیجه نیز نشان دهنده پخش بهتر نانولوله‌ها در میزان 2/5٪ نانولوله کربنی می‌باشد.

هیچ‌گونه مهاجرت نانولوله‌ها باعث کاهش قابل ملاحظه زاویه تماس در نمونه‌های ساخته شده در شرایط یکسان شد. هپارین یک گلیکوزآمینو گلیکان بسیار سولفات‌ه بوده و تمایل زیادی به جذب

از طرفی دیگر، به دلیل پخش نامناسب نانولوله‌های کربنی در پلیمر و ایجاد آگلومره و در نتیجه یکنواخت نبودن سطح فیلم‌ها، تخلخل سطحی بیشتری در فیلم‌های دارای نانولوله کربنی ایجاد شده و حضور هوا در این تخلخل‌ها نیز باعث افزایش زاویه تماس می‌شود. همان‌طور که در نمودار رسم شده در شکل ۴ نیز قابل مشاهده است، زاویه تماس فیلم حاوی 2/5٪ نانولوله کربنی بیشتر

پیش بینی می‌شود فیلم‌های نانوکامپوزیتی ساخته شده در این تحقیق که حاوی نانولوله کربنی چند دیواره هپارینه شده هستند، با توجه به اینکه زاویه تماس با آب نزدیک به مقدار بهینه گفته شده برای چسبندگی سلولی دارند، برای برهمکنش مطلوب با سلول مناسب باشند.

۳-۴- ارزیابی پتانسیل زتا

مقدار بار سطحی اندازه‌گیری شده توسط دستگاه زتا پتانسیل در جدول (۱) آورده شده است.

جدول (۱): مقدار بار سطحی بدست آمده توسط دستگاه پتانسیل زتا برای

فیلم‌های پلیمری و نانوکامپوزیتی PLLA/CNT

نمونه	پتانسیل زتا (mv)
PLLA	-۷/۲۵
PLLA/ ۱% MWCNT	-۲۳/۵
PLLA/ ۲/۵% MWCNT	-۲۹/۱۴
PLLA/ ۵% MWCNT	-۲۵/۹
PLLA/ ۱% HMWCNT	-۳۳/۸۳
PLLA/ ۲/۵% H MWCNT	-۳۹/۹۴

همان‌طور که مشاهده می‌شود، میزان بار سطحی پلیمر خالص mv -۷/۲۵ است و با افزودن نانولوله کربنی به آن، مقدار بار سطحی منفی‌تر شده است. حضور بار منفی در اثر ورود نانولوله‌های کربنی چند دیواره را می‌توان به وجود گروه‌های کربوکسیک و هیدروکسیل بر روی سطح نانولوله کربنی چند دیواره به عنوان دهنده الکترون نسبت داد.

منفی‌تر بودن بار سطحی در فیلم حاوی ۲/۵٪ نانولوله کربنی چند دیواره نسبت به فیلم حاوی ۵٪ نانولوله کربنی چند دیواره را می‌توان به وقوع اثر هم‌افزایی^{۲۲} (بهترین امتزاج‌پذیری و برهمکنش بین نانولوله کربنی و محلول پلیمری) نسبت داد که در نتیجه آن، پخش بهتر نانولوله‌ها در زمینه پلیمری و نیز برهمکنش بیشتر نانولوله‌ها با زنجیره‌های پلیمری فراهم می‌شود. در فیلم‌های شامل ۵٪ نانولوله کربنی چند دیواره، به دلیل آگلومره شدن بخش بزرگی از نانولوله‌ها، عوامل سطحی آن در فضای داخل

آب دارد [۳۷]. از طرفی مشاهده شد که با افزایش درصد نانولوله هپارینه شده از شدت آب دوستی کاسته شد. این نتیجه می‌تواند به این دلیل باشد که با افزایش درصد نانولوله هپارینه شده، ویسکوزیته محلول به دلیل افزایش درصد نانولوله افزایش یافته و سرعت حرکت زنجیره‌های پلیمری کاهش پیدا می‌کند. در نتیجه قبل از یکنواخت شدن سطح فیلم پس از ریختن در ظرف، حلال تبخیر شده و فیلم تشکیل می‌شود. بنابراین روی سطح صاف نبوده و دارای خلل و فرج‌هایی است که حضور هوا در این مکان‌ها باعث کاهش شدت آب دوستی شده است.

اثر افزایش نانولوله کربنی تک دیواره بر زاویه تماس با آب در فیلم‌های نانوکامپوزیتی مشابه افزایش نانولوله کربنی چند دیواره بود. نانولوله کربنی چند دیواره دارای حجم بیشتری نسبت به نانولوله کربنی تک دیواره می‌باشد و همچنین بهتر در محلول پلیمری پخش می‌شود. حجم بیشتر و نیز برهمکنش بهتر با پلیمر باعث افزایش بیشتر آب‌گریزی می‌شود. از طرفی دیگر به دلیل پخش نامطلوب‌تر نانولوله‌های کربنی تک دیواره نسبت به چند دیواره، سطح فیلم‌های آن از یکنواختی کمتری برخوردار بوده و به دلیل هوایی که در فضاهای خالی محبوس می‌شود، آب‌گریزی بیشتری از خود نشان می‌دهد. با توجه به مشابه بودن تاثیر افزایش این دو نوع نانولوله بر روی زاویه تماس می‌توان نتیجه گرفت که برآیند این دو اثر تقریباً صفر می‌باشد.

چندین پژوهش در مورد تناسب میان چسبندگی سلولی و میزان تنش سطحی مولکول‌های آب در سطح مواد (میزان آب دوستی یا آب‌گریزی سطح) توسط محققین انجام شده و مقدار بهینه‌ای را گزارش کرده‌اند که در این مقدار بهینه، قطبیت متوسط سطحی متناسب با حداکثر چسبندگی سلولی می‌باشد. سطوح مختلف می‌توانند بر اساس تنش چسبندگی سطحی آب، برهمکنش با پروتئین‌های سرم فیزیولوژیک و توانایی در پشتیبانی از چسبیدن سلول‌ها به گروه‌های مختلف تقسیم‌بندی شوند.

با توجه به اینکه زاویه ترشوندگی ۶۵ درجه به عنوان مرز میان سطوح آب دوست و آب‌گریز تعریف شده است [۳۸-۴۰]،

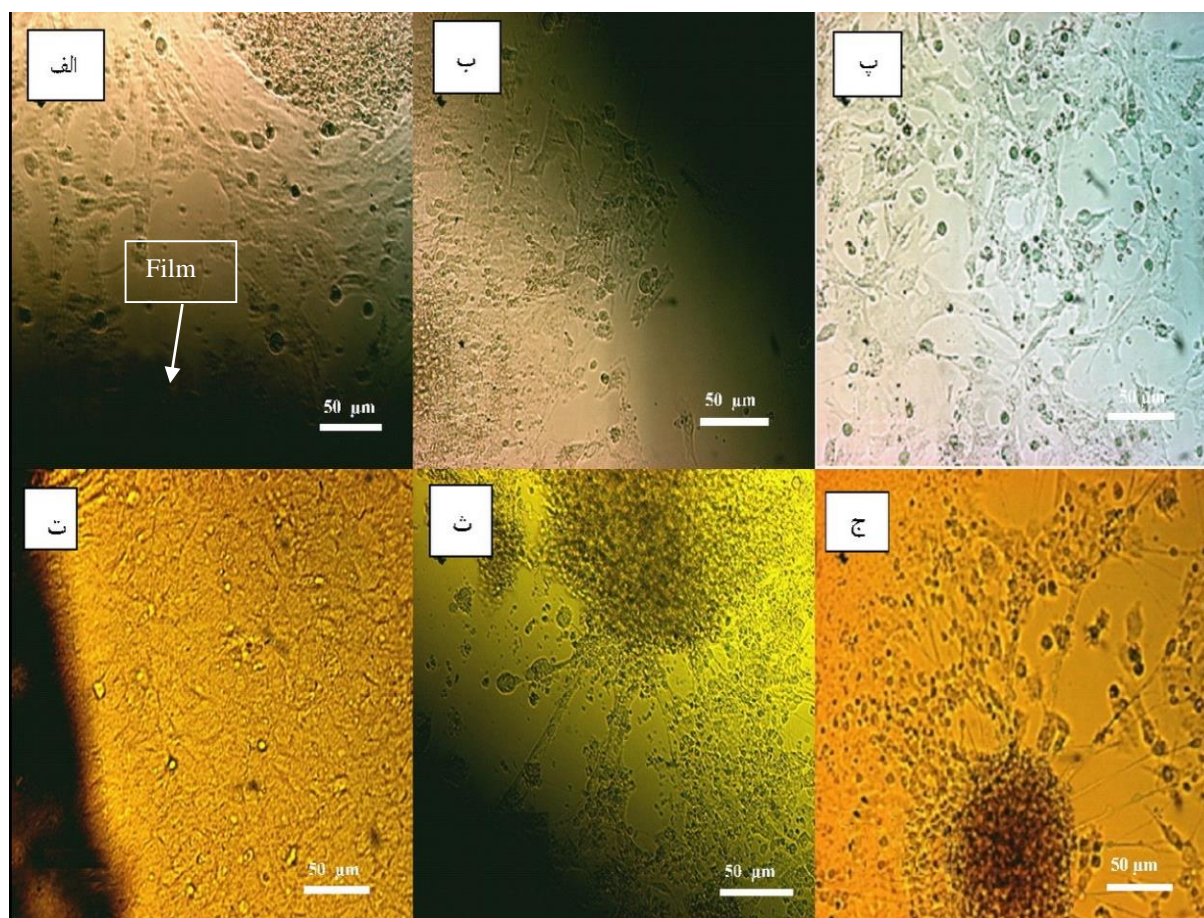
سطح علاوه بر اینکه در اثر نیروی دافعه الکترواستاتیکی باعث پخش مطلوب نانولوله‌ها در زمینه پلیمری می‌شود، زیست‌سازگاری بیشتری را نیز به همراه خواهد داشت.

۳-۵- نتایج به دست آمده از مطالعات سلولی

تصاویر گرفته شده توسط میکروسکوپی نوری از مجاورت فیلم‌ها و نیز نمونه کنترل (سطح پللیت فاقد فیلم) بعد از ۴ و ۱۴ روز کشت در شکل (۶) نشان داده شده است.

آگلومرها محبوس شده و در نتیجه فعالیت سطحی کمتری از خود نشان می‌دهد.

پتانسیل زتا مربوط به فیلم‌های حاوی نانولوله کربنی چند دیواره هپارینه شده از فیلم‌های حاوی نانولوله کربنی هپارینه نشده نیز منفی تر بود که می‌توان دلیل آن را وجود گروه‌های سولفات در هپارین دانست که اکسیژن زیاد در ساختار آن باعث می‌شود بار منفی اطراف آن زیاد باشد. در حقیقت هپارین بیشترین بار منفی را در بین مولکول‌های زیستی شناخته شده دارد. افزایش بار منفی



شکل (۶): تصاویر میکروسکوپی نوری مجاورت: (الف): فیلم پلیمری بعد از ۴ روز، (ب): فیلم نانوکامپوزیتی PLLA/۵% HMWCNT بعد از ۴ روز، (پ): نمونه کنترل بعد از ۴ روز، (ت): فیلم پلیمری بعد از ۱۴ روز، (ث): فیلم نانوکامپوزیتی PLLA/۵% HMWCNT بعد از ۱۴ روز و (ج): نمونه کنترل بعد از ۱۴ روز کشت

فیلم نفوذ کرده‌اند، دیده می‌شود. در تصاویر گرفته شده در روز چهاردهم مشاهده می‌شود که اتصالات سلولی گسترده‌تری از

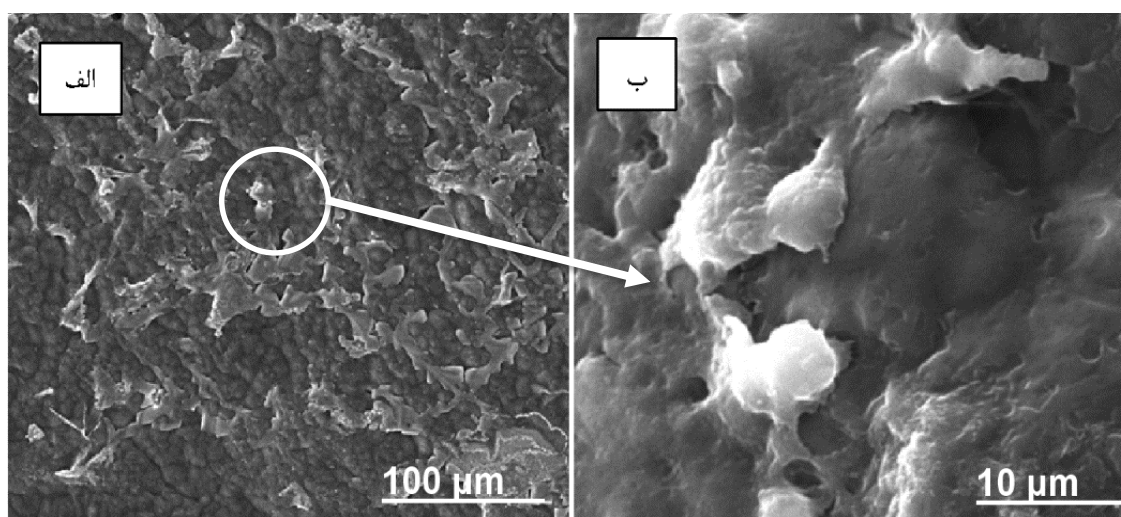
همان طور که مشاهده می‌شود، از روز چهارم تجمعات سلولی و نیز رشته‌هایی که از درون تجمع سلولی به اطراف و نیز به طرف

سلول‌ها که نشان دهنده اثر درصد نانولوله یا مورفولوژی فیلم باشد، دیده نشد [۴۱].

در شکل (۷) تصاویر میکروسکوپی الکترونی روبشی از برهمکنش P_{۱۹} موشی تمایز یافته با سطح فیلم نانوکامپوزیتی PLLA/۲/۵/HMWCNT بعد از ۱۴ روز کشت نشان داده شده است. لازم به ذکر است که به دلیل یکرنگی ایجاد شده ناشی از پوشش طلائی که روی سلول‌ها و سطح داده شده است، تشخیص سلول از زبری سطح فیلم کار دشواری می‌باشد. با دقت در این تصاویر مشاهده می‌شود که سلول‌ها از اتصال خوبی به سطح فیلم برخوردار هستند و پاهای کاذب سلول‌ها که باعث اتصال سلول به زمینه می‌شوند، به وضوح دیده می‌شوند.

سلول‌ها خارج شده و با دیگر سلول‌ها ارتباط برقرار کرده‌اند. نمونه‌های حاوی فیلم با نمونه کنترل از نظر رشد، پهن شدن سلول‌ها و گسترده شدن شبکه سلولی تفاوت چندانی نداشته و این نشان می‌دهد که حضور فیلم اثر سوئی بر فعالیت‌های زیستی سلول P_{۱۹} موشی نداشته و محصولات تخریب این نانوکامپوزیت بر متابولیسم سلولی اثر منفی ندارد. از طرف دیگر، در فیلم‌های نانوکامپوزیتی در مقایسه با فیلم پلیمری و نیز نمونه کنترل، تراکم سلولی کمی بیشتر مشاهده شد که به نظر می‌رسد نشان دهنده اثر حضور نانولوله‌های کربنی به لحاظ انتقال بار الکتریکی و برهمکنش خوب با نورون‌ها باشد که باعث گسترش سلول‌های عصبی در مجاورت فیلم‌ها شده‌اند.

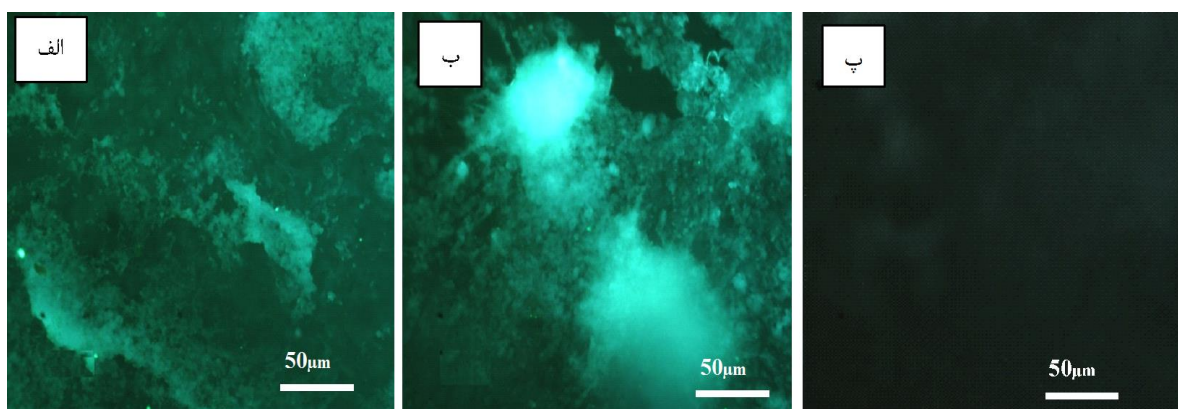
در بین نمونه‌های کشت شده در مجاورت فیلم‌های نانوکامپوزیتی PLLA/HMWCNT تفاوت چندانی در رشد



شکل (۷): تصاویر میکروسکوپی الکترونی روبشی از برهمکنش سلول‌ها با سطح فیلم نانوکامپوزیتی PLLA/۲/۵/HMWCNT کشت سلولی شده با بزرگنمایی: (الف): ۵۰۰ X و (ب): ۴۵۰۰ X

را ثابت می‌کند که سلول‌های P_{۱۹} موشی پس از طی مراحل کشت و اصلاح سلولی به خوبی به سلول‌های عصبی تمایز یافته‌اند. همچنین با توجه به تعداد زیاد نقاط سبز رنگ در تصویر، می‌توان نتیجه گرفت که تعداد سلول‌های P_{۱۹} موشی تمایز یافته به سلول عصبی زیاد است.

تصاویر سلول‌های نشانه گذاری شده با آنتی بادی Map-2 بعد از ۸ روز کشت در شکل (۸) نشان داده شده است. در این تصاویر، نقاط روشن به رنگ سبز فسفری مناطقی هستند که به واسطه وجود پروتئین Map-2 در برابر آنتی بادی ویژه خود واکنش مثبت نشان داده و توسط میکروسکوپی نوری (با لامپ UV) دیده شدند. وجود این پروتئین که ویژه سلول‌های عصبی است، این موضوع



شکل (۸): تصاویر میکروسکوپی نوری با لامپ UV از فیلم های نانو کامپوزیتی PLLA/۲/۵ HMWCNT: (الف و ب): بعد از ۸ روز کشت و (پ): بدون کشت سلول (نمونه کنترل)، بعد از انجام آزمون ایمونوفلوئورسانس

۴- نتیجه گیری

با توجه به اینکه گسترش نانو کامپوزیت های جدید با قابلیت هدایت و رشد بافت عصبی به منظور سرعت بخشیدن به ترمیم بافت عصبی در قسمت آسیب دیده در سیستم عصبی ضروری به نظر می رسد، در این مطالعه سعی بر این بود که قدمی در این راه برداشته شود. برای این منظور، پس از هیپارینه کردن نانولوله کربنی، فیلم های نانو کامپوزیتی با استفاده از پلیمر پلی ال-لاکتیک اسید و نانولوله های کربنی تک دیواره، چند دیواره و چند دیواره هیپارینه شده ساخته شدند و مورد مطالعه قرار گرفتند. مجموعه مطالعات انجام شده توسط میکروسکوپی الکترونی نشان دادند که پخش نانولوله های کربنی تک دیواره در زمینه پلیمری بسیار ناهمگن تر از نانولوله های کربنی چند دیواره با درصد مشابه بود. همچنین اصلاح نانولوله های کربنی چند دیواره با استفاده از هیپارین باعث بهبود پخش آنها در زمینه پلیمری شد. هیپارینه کردن نانولوله ها باعث کاهش قابل ملاحظه زاویه تماس و پتانسیل زتا در نمونه های تولید شده در شرایط یکسان شد. مجموعه آزمایش های کشت سلول و آزمون ایمونوفلوئورسانس نشان داد که فیلم های تهیه شده از پلی ال-لاکتیک اسید و نانولوله کربنی چند دیواره هیپارینه شده برای چسبندگی سلول های P₁₉ موشی، برقراری ارتباط بین سلول ها، تشکیل تجمعات سلولی و تمایز آنها به سلول های عصبی مناسب هستند.

۵- مراجع

- [1] O. Akhavan, E. Ghaderi, E. Abouei, S. Hatamie & E. Ghasemi, "Accelerated differentiation of neural stem cells into neurons on ginseng-reduced graphene oxide sheet", Carbon, Vol. 66, pp. 395-, 2014.
- [2] G. Gkikas, N. M. Barkoula & A. Paipetis, "Effect of dispersion conditions on the thermo-mechanical and toughness properties of multi walled carbon nanotubes-reinforced epoxy", Composites Part B: Engineering, Vol. 43, pp. 2697-2705, 2012.
- [3] F. H. Gojny, M. H. Wichmann, B. Fiedler, W. Bauhofer & K. Schulte, "Influence of nano-modification on the mechanical and electrical properties of conventional fibre-reinforced composites", Composites Part A: Applied Science and Manufacturing, Vol. 36, pp. 1525-1535, 2005.
- [4] H. Miyagawa & L. T. Drzal, "Thermo-physical and impact properties of epoxy nanocomposites reinforced by single-wall carbon nanotubes", Polymer, Vol. 45, pp. 5163-5170, 2004.
- [5] D. Shi, J. Lian, P. He, L. Wang, F. Xiao, L. Yang, M. J. Schulz & D. B. Mast, "Plasma coating of carbon nanofibers for enhanced dispersion and interfacial bonding in polymer composites", Applied Physics Letters, Vol. 83, pp. 5301-5303, 2003.
- [6] E. T. Thostenson & T. W. Chou, "Processing-

- [15] J. Gao, W. Li, H. Shi, M. Hu & R. K. Li, "Preparation, morphology, and mechanical properties of carbon nanotube anchored polymer nanofiber composite", *Composites Science and Technology*, Vol. 92, pp. 95-102, 2014.
- [16] J. Kathi & K. Rhee, "Surface modification of multi-walled carbon nanotubes using 3-aminopropyltriethoxysilane", *Journal of Materials Science*, Vol. 43, pp. 33-37, 2008.
- [17] S. Prolongo, M. Burón, M. Gude, R. Chaos-Morán, M. Campo & A. Urena, "Effects of dispersion techniques of carbon nanofibers on the thermo-physical properties of epoxy nanocomposites", *Composites Science and Technology*, Vol. 68, pp. 2722-2730, 2008.
- [18] Z. Z. Zhu, Z. Wang & H. L. Li, "Functional multi-walled carbon nanotube/polyaniline composite films as supports of platinum for formic acid electrooxidation", *Applied Surface Science*, Vol. 254, pp. 2934-2940, 2008.
- [19] M. S. Konsta-Gdoutos, Z. S. Metaxa & S. P. Shah, "Highly dispersed carbon nanotube reinforced cement based materials", *Cement and Concrete Research*, Vol. 40, pp. 1052-1059, 2010.
- [20] Y. Y. Huang & E. M. Terentjev, "Dispersion of carbon nanotubes: mixing, sonication, stabilization, and composite properties", *Polymers*, Vol. 4, pp. 275-2, 2012.
- [21] Nimmagadda, K. Thurston, M. U. Nollert & P. S. McFetridge, "Chemical modification of SWNT alters in vitro cell-SWNT interactions", *Journal of Biomedical Materials Research Part A*, Vol. 76, pp. 614-625, 2006.
- [22] S. Murugesan, T. J. Park, H. Yang, S. Mousa & R. J. Linhardt, "Blood compatible carbon nanotubes-nano-based neoproteoglycans", *Langmuir*, Vol. 22, pp. 3461-3463, 2006.
- [23] X. Chen, U. C. Tam, J. L. Czapinski, G. S. Lee, D. Rabuka, A. Zettl & C. R. Bertozzi, "Interfacing carbon nanotubes with living cells", *Journal of the structure-multi-functional property relationship in carbon nanotube/epoxy composites*", *Carbon*, Vol. 44, pp. 3022-3029, 2006.
- [7] L. Belyanskaya, S. Weigel, C. Hirsch, U. Tobler, H. F. Krug & P. Wick, "Effects of carbon nanotubes on primary neurons and glial cells", *Neurotoxicology*, Vol. 30, pp. 702-711, 2009.
- [8] Eitan, F. Fisher, R. Andrews, L. Brinson & L. Schadler, "Reinforcement mechanisms in MWCNT-filled polycarbonate", *Composites Science and Technology*, Vol. 66, pp. 1162-1173, 2006.
- [9] F. Inam, A. Heaton, P. Brown, T. Peijs & M. J. Reece, "Effects of dispersion surfactants on the properties of ceramic-carbon nanotube (CNT) nanocomposites", *Ceramics International*, Vol. 40, pp. 511-516, 2014.
- [10] J. Ning, J. Zhang, Y. Pan & J. Guo, "Surfactants assisted processing of carbon nanotube-reinforced SiO₂ matrix composites", *Ceramics International*, Vol. 30, pp. 63-67, 2004.
- [11] G. D. Zhan, J. D. Kuntz, J. E. Garay & A. K. Mukherjee, "Electrical properties of nanoceramics reinforced with ropes of single-walled carbon nanotubes", *Applied Physics Letters*, Vol. 83, pp. 1228-1230, 2003.
- [12] M. A. Herrero, L. Lacerda, A. Bianco, K. Kostarelos & M. Prato, "Functionalised carbon nanotubes: high biocompatibility with lack of toxicity", *International Journal of Nanotechnology*, Vol. 8, pp. 885-897, 2011.
- [13] M. C. Serrano, M. C. Gutiérrez & F. Del Monte, "Role of polymers in the design of 3D carbon nanotube-based scaffolds for biomedical applications", *Progress in Polymer Science*, Vol. 39, pp. 1448-1471, 2014.
- [14] P. Wick, P. Manser, L. K. Limbach, U. Dettlaff-Weglikowska, F. Krumeich, S. Roth, W. J. Stark & A. Bruinink, "The degree and kind of agglomeration affect carbon nanotube cytotoxicity", *Toxicology letters*, Vol. 168, pp. 121-131, 2007.

- American Chemical Society, Vol. 128, pp. 6292-629, 2006.
- [32] Liu, Q., et al., "Preparation, properties and cytotoxicity evaluation of a biodegradable polyester elastomer composite", *Polymer Degradation and Stability*, Vol. 94, No. 9, pp. 1427-1435, 2009.
- [33] G. D. Guerra, N. Barbani, M. Gagliardi, E. Rosellini & C. Cristallini, "Chitosan-based macromolecular biomaterials for the regeneration of chondroskeletal and nerve tissue", *International Journal of Carbohydrate Chemistry*, Vol. 2011, 2011
- [34] K. Takahashi, R. Shizume, K. Uchida & H. Yajima, "Improved blood biocompatibility of composite film of chitosan/carbon nanotubes complex", *Journal of biorheology*, Vol. 23, pp. 64-71, 2009.
- [35] Z. Yang, Z. Cao, H. Sun & Y. Li, "Composite films based on aligned carbon nanotube arrays and a poly (N-isopropyl acrylamide) hydrogel", *Advanced Materials -Deerfield Beach THEN Weinheim*, Vol. 20, pp. 2201-2205, 2008.
- [36] S. Stankovich, D. A. Dikin, G. H. Dommett, K. M. Kohlhaas, E. J. Zimney, E. A. Stach, R. D. Piner, S. T. Nguyen & R. S. Ruoff, "Graphene-based composite materials", *Nature*, Vol. 442, pp. 282-286, 2006.
- [37] B. Rai, L. Grøndahl & M. Trau, "Combining chemistry and biology to create colloidally stable bionanohydroxyapatite particles: toward load-bearing bone applications", *Langmuir*, Vol. 24, pp. 7744-7749, 2008.
- [38] E. A. Vogler, "Structure and reactivity of water at biomaterial surfaces", *Advances in colloid and interface science*, Vol. 74, pp. 69-117, 1998.
- [39] م. ر. فروغی، س. کرباسی، ر. ابراهیمی کهریزسنگی و ع. سعادت، "ارزیابی خواص فیزیکی داربست کامپوزیت نانو کریستال هیدروکسی آپاتیت / پلی هیدروکسی بوتیرات برای کاربرد در مهندسی بافت استخوان"، فصلنامه علمی - پژوهشی فرآیندهای نوین در مهندسی مواد، شماره ۲، صفحه ۶۰-۵۱، تابستان ۱۳۹۱.
- [40] م. ار سطویی و ع. دوست محمدی، "ساخت و مشخصه یابی داربست تیتانیومی متخلخل پوشش داده شده با آکرامانیت"، فصلنامه علمی -
- [24] E. B. Malarkey, K. A. Fisher, E. Bekyarova, W. Liu, R. C. Haddon & V. Parpura, "Conductive single-walled carbon nanotube substrates modulate neuronal growth", *Nano letters*, Vol. 9, pp. 264-268, 2008.
- [25] T. Crouzier, A. Nimmagadda, M. U. Nollert & P. S. McFetridge, "Modification of single walled carbon nanotube surface chemistry to improve aqueous solubility and enhance cellular interactions", *Langmuir*, Vol. 24, pp. 13173-13181, 2008.
- [26] T. J. Park, Y. S. Kim, T. Hwang, P. Govindaiah, S. W. Choi, E. Kim, K. Won, S. H. Lee & J. H. Kim, "Preparation and characterization of heparinized multi-walled carbon nanotubes", *Process Biochemistry*, Vol. 47, No. 1, pp. 113-118, 2012.
- [27] R. Linhardt & I. Capila, "Heparin-protein interactions", *Angew. Chem., Int. Ed.*, Vol. 41, pp. 390-412, 2002.
- [28] S. H. Mounesi Rad, M. T. Khorasani, & M. Daliri Joupari, "Preparation of HMWCNT/PLLA nanocomposite scaffolds for application in nerve tissue engineering and evaluation of their physical, mechanical and cellular activity properties", *Polymers for Advanced Technologies*, Vol. 27, No. 3, pp. 325-338, 2015.
- [29] M. Rudnicki, "Cell culture methods and induction of differentiation of embryonal carcinoma cell lines, Teratocarcinomas and embryonic stem cells: a practical approach", pp. 19-49, 1987.
- [30] Thess, R. Lee, P. Nikolaev, H. Dai, P. Petit, J. Robert, C. Xu, Y. H. Lee, S. G. Kim & A. G. Rinzler, "Crystalline ropes of metallic carbon nanotubes", *Science-AAAS-Weekly Paper Edition*, Vol. 273, pp. 483-487, 1996.
- [31] X. Y. Xu, X. T. Li, S. W. Peng, J. F. Xiao, C. Liu, G. Fang, K. C. Chen & G. Q. Chen, "The behaviour of neural stem cells on polyhydroxyalkanoate nanofiber scaffolds", *Biomaterials*, Vol. 31, pp. 3967-3975, 2010.

پژوهشی فرآیندهای نوین در مهندسی مواد، شماره ۲، صفحه ۹۸-۸۷، تابستان ۱۳۹۶.

- [41] Y. Luo, S. Wang, M. Shen, R. Qi, Y. Fang, R. Guo, H. Cai, X. Cao, H. Tomás & M. Zhu, "Carbon nanotube-incorporated multilayered cellulose acetate nanofibers for tissue engineering applications", Carbohydrate polymers, Vol. 91, pp. 419-427, 2013.

۶- پی نوشت

- [1] Poly (L- lactic acid)
- [2] Bohringer
- [3] 1,4 Dioxane
- [4] Multi-walled carbon nanotubes
- [5] Single-walled carbon nanotubes
- [6] An activated partial thromboplastin time
- [7] Scanning Electron Microscopy
- [8] Transmission Electron Microscopy
- [9] Contact angle
- [10] Sessile drop
- [11] Zeta potential
- [12] In-vitro
- [13] Fetal ovine serum
- [14] Retinoic acid
- [15] Aggregate
- [16] Glutaraldehyde
- [17] Phosphate Buffered Saline
- [18] Triton-X
- [19] Microtubule associated protein-2
- [20] Immunoglobulin G
- [21] Streptavidin
- [22] Synergy effect

Preparation and evaluation of physical and cellular activity properties of poly (L-lactic acid) heparinized multiwall carbon nanotube nanocomposite films for application in nerve regeneration

Shokoufeh Mounesi Rad ¹, Mohammad Taghi Khorasani^{2*}, Morteza Daliri Joupari ³

1- Ph. D, Department of Biomedical Engineering, Sciences and Researches Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran

2- Associate Professor, Biomaterial Department of Iran Polymer and Petrochemical Institute, Tehran, Iran

3- Assistant Professor, National Research Center for Genetic Engineering and Biotechnology, Tehran, Iran

*Corresponding author: M.Khorasani@ippi.ac.ir

Abstract

The objective of this study was to prepare crystalline poly (L-lactic acid) (PLLA)/multiwall carbon nanotube (MWCNT) nanocomposite films using solvent vaporization method, for nerve regeneration applications. Ultrasonic energy and heparinization of MWCNTs were used in order to effective dispersion of the carbon nanotube in the PLLA matrix. The effect of fundamental system parameters including carbon nanotube types and concentrations on morphology of the films was studied by Scanning Electron Microscopy (SEM). Transmission Electron Microscopy (TEM) was carried out for characterization of nanotubes' dispersion in PLLA. Contact angle and zeta potential measurements were used to investigate the hydrophilicity and negative surface charge of the films. In vitro studies were also conducted by using murine P₁₉ cell line as a suitable model system to analyze neuronal differentiation over a 2-week period. SEM and immunofluorescence staining were used to confirm the cells attachment and differentiation on the films. Obtained results indicate that films containing heparinized multiwall carbon nanotubes (HMWCNTs) were quite acceptable for nerve regeneration and enhanced the nerve cell differentiation and proliferation.

Key words: Nerve regeneration, Carbon Nanotubes, Poly (L-lactic acid), Heparin.

Journal homepage: ma.iaumajlesi.ac.ir

Please cite this article using:

Shokoufeh Mounesi Rad, Mohammad Taghi Khorasani, Morteza Daliri Joupari, Preparation and evaluation of physical and cellular activity properties of poly (L-lactic acid)/ heparinized multiwall carbon nanotube nanocomposite films for application in nerve regeneration, in Persian, New Process in Material Engineering, 2018, 12(3), 103-119.