

فرآیندهای نوین در مهندسی مواد

ma.iaumajlesi.ac.ir

ساخت و مشخصه‌یابی داربست هسته-پوسته کیتوسان/ پلی‌کاپرولاکتون حاوی فیبرین غنی از پلاکت با روش الکتروریسی هم‌محور برای کاربرد در پزشکی

امیرعباس رستگار^۱، محبوبه محمودی^{۲*}، محمد میرجلیلی^۳، نوید نصیری زاده^۴

۱- دانشجو دکتری، دانشکده مهندسی نساجی و پلیمر، واحد یزد، دانشگاه آزاد اسلامی، یزد، ایران.

۲- دانشیار، دانشکده مهندسی پزشکی، واحد یزد، دانشگاه آزاد اسلامی، یزد، ایران.

۳- استاد، دانشکده مهندسی نساجی و پلیمر، واحد یزد، دانشگاه آزاد اسلامی، یزد، ایران.

۴- دانشیار، دانشکده مهندسی نساجی و پلیمر، واحد یزد، دانشگاه آزاد اسلامی، یزد، ایران.

* : m.mahmoodi@iauyazd.ac.ir

اطلاعات مقاله	چکیده
دریافت: ۱۳۹۹/۰۷/۰۳	فیبرین غنی از پلاکت (PRF) یک ماتریس فیبرینی طبیعی حاوی پلاکت و فاکتورهای رشد موجود در خون می‌باشد که ترمیم بافت‌های استخوانی را تسریع می‌بخشد. در این مطالعه، داربست پلی‌کاپرولاکتون/ کیتوسان (داربست A) و داربست هسته-پوسته پلی‌کاپرولاکتون/ کیتوسان حاوی PRF (داربست B) به ترتیب با روش الکتروریسی تک محور الکتروریسی هم محور ساخته شدند و مورد مشخصه‌یابی قرار گرفتند. مورفولوژی سطح و اندازه قطر الیاف، میزان تخلخل، خواص مکانیکی و گروه‌های عاملی موجود بر روی سطح داربست‌ها به ترتیب با میکروسکوپ الکترونی روبشی (SEM) و میکروسکوپ الکترونی عبوری (TEM)، روش جابه‌جایی مایع، دستگاه سنجش استحکام و طیف‌سنجی IR (FTIR) ارزیابی گردید. اندازه میانگین قطر الیاف داربست B در مقایسه با داربست A از مقدار ۱۷۹ nm به ۱۶۰ nm کاهش یافت. همچنین، حضور کیتوسان حاوی PRF در هسته با تشکیل پیوند هیدروژنی با پلی‌کاپرولاکتون در پوسته در داربست B سبب ایجاد داربستی با خواص مکانیکی عالی و مدول الاستیک ۴۰ MPa گردید. زیست‌سازگاری و چسبندگی سلول‌های استخوانی بر روی سطح داربست‌ها با روش MTT مورد بررسی قرار گرفت. به دلیل حضور PRF، رشد و چسبندگی سلول‌های استخوانی بر روی سطح داربست B در مقایسه با داربست A افزایش یافت؛ بنابراین با توجه به نتایج به دست آمده از این تحقیق، داربست هسته-پوسته حاوی PRF می‌تواند پیشنهاد مناسبی جهت کاربرد در پزشکی باشد.
کلید واژگان:	
مهندسی بافت استخوان	
کیتوسان	
فیبرین غنی از پلاکت	
الکتروریسی هم محور	
داربست نانوالیاف	

Fabrication and Characterization of Chitosan/ Polycaprolactone Core-Shell Nanofiber Scaffold Containing Platelet-Rich Fibrin by Coaxial Electrospinning Method for Biomedical Applications

AmirAbbas Rastegar¹, Mahboobeh Mahmoodi^{2*}, Mohammad Mirjalili³, Navid Nasirizadeh⁴

1- Ph.D. Student, Department of Textile and Polymer Engineering, Yazd Branch, Islamic Azad University, Yazd, Iran.

2- Associate Professor, Department of Biomedical Engineering, Yazd Branch, Islamic Azad University, Yazd, Iran.

3- Full Professor, Department of Textile and Polymer Engineering, Yazd Branch, Islamic Azad University, Yazd, Iran.

4- Associate Professor, Department of Textile and Polymer Engineering, Yazd Branch, Islamic Azad University, Yazd, Iran.

* m.mahmoodi@iauyazd.ac.ir

Article Information

Original Research Paper

Doi:

10.30495/apme.2021.1910486.2014

Keywords:

Bone Tissue Engineering

Chitosan

Platelet-Rich Fibrin

Coaxial Electrospinning

Nanofiber Scaffold

Abstract

Platelet-rich fibrin (PRF) is a natural fibrin matrix containing platelets and growth factors in the blood that increases the bone tissue repair. In this study, polycaprolactone/chitosan (scaffold A) and polycaprolactone/chitosan core-shell scaffold containing PRF (scaffold B) were fabricated by uniaxial electrospinning and coaxial electrospinning methods, respectively and were characterized. Surface morphology, fiber diameter, porosity, mechanical properties, and functional groups on the scaffolds surface were evaluated by scanning electron microscope (SEM) and transition electron microscopy (TEM), displacement liquid method, tensile strength test, and fourier transform infrared (FTIR) spectroscopy, respectively. The average fibers diameter of the scaffold B decreased to 160 nm as compared to 179 nm for the scaffold A. Also, the presence of chitosan containing PRF in the core with the formation of hydrogen bonding with polycaprolactone in the shell of the scaffold B caused a scaffold with excellent mechanical properties and elastic modulus 40 MPa. Cell viability and adherence of bone cells on the surface scaffolds were evaluated via MTT assay. Due to the present of PRF in the scaffold B, the bone cells growth and cells adhesion on the surface of scaffold B increased compared to the scaffold A. Therefore, according to the results of this study, the core-shell scaffold containing PRF can be a good suggestion for use in biomedical applications.

برای ارجاع به این مقاله از عبارت ذیل استفاده نمایید:

Please cite this article using:

AmirAbbas Rastegar, Mahboobeh Mahmoodi, Mohammad Mirjalili, Navid Nasirizadeh, Fabrication and characterization of chitosan/ polycaprolactone core-shell nanofiber scaffold containing platelet-rich fibrin by coaxial electrospinning method for biomedical applications, New Process in Material Engineering, 2021, 15(2), 49-63.

۱- مقدمه

مهندسی بافت استخوان روشی است که باهدف بازگرداندن بافت‌های ازدست رفته یا ناقص در اثر آسیب، کهولت سن، ناهنجاری مادرزادی یا عفونت کاربرد دارد [۱]. ۲۰۰ میلیون نفر در سراسر جهان درگیر نقایص استخوانی می‌باشند. روش‌های معمول برای درمان آسیب‌های استخوانی شامل کاشت ایمپلنت، پیوند استخوان، جراحی و دارودرمانی می‌باشد. چون بسیاری از بافت‌های استخوانی و غضروفی فاقد رگ‌های خونی می‌باشند، ترمیم نقایص بزرگ استخوانی با روش‌های مذکور به‌کندی انجام می‌گیرد؛ بنابراین، یافتن روشی مناسب برای درمان و ترمیم عیوب استخوانی ازجمله تحقیقات پراهمیت می‌باشد. داربست‌های مهندسی بافت استخوان نقش مهمی در ترمیم استخوان دارند. هدف مهندسی بافت استخوان تقلید از ساختار و عملکرد ماتریس خارج سلولی استخوان طبیعی (ECM) است که یک محیط سه‌بعدی را برای بهبود چسبندگی، تکثیر، تمایز و داشتن خصوصیات فیزیکی مناسب برای بازسازی استخوان فراهم کند [۲]. داربست ایده‌آل باید زیست‌تخریب‌پذیر، زیست‌سازگار، زیست‌فعال، هدایت‌کننده رشد و تکثیر استخوان^۱ و تحریک‌کننده استخوان^۲ باشد. داربست‌های استخوان با مواد بیولوژیکی و مواد افزودنی مانند داروها، فاکتورهای رشد (GFs) و سلول‌های بنیادی در بازسازی و ترمیم استخوان به کار می‌روند [۳].

نانوذرات، نانو کپسول‌ها و نانوالیاف‌ها به دلیل دارا بودن سطح ویژه و اندازه مناسب که بر خصوصیات فیزیکی و شیمیایی داربست‌ها تأثیر می‌گذارند، نقش کلیدی در ساخت داربست‌های مهندسی بافت ایفا کرده‌اند. نانوالیاف دارای خصوصیتی شامل راندمان بالای کپسوله کردن دارو، تخلخل زیاد، انعطاف‌پذیری مناسب [۴]، نسبت سطح به حجم بالا، ابعاد تخلخل فوق‌العاده و خواص مکانیکی عالی می‌باشند [۵]. نانوالیاف را می‌توان از روش‌های جداسازی فاز، سنتز قالب، خود مونتاژ، چرخش گریز از مرکز، ریسندگی مرطوب، چاپ ۳ بعدی و الکترووریسی تهیه کرد [۶]. در میان روش‌های

ساخت داربست، روش الکترووریسی هم محور با ساده‌ترین تجهیزات، مناسب‌ترین روش برای تولید نانوالیاف متخلخل به شمار می‌آید و می‌توان با تنظیم پارامترهای مؤثر بر فرایند، قطر الیاف را کنترل کرد [۷]. با کاربرد این تکنیک، می‌توان پروتئین‌ها، داروها، مواد غیرقابل الکترووریسی و فاکتورهای رشد را در الیاف هسته-پوسته کپسوله کرد [۸-۹]. روش الکترووریسی هسته-پوسته، مجهز به یک سوزن داخلی برای هسته و سوزنی برای پوسته می‌باشد که می‌تواند با ریساندن دو محلول مختلف به طور هم‌زمان، نانوالیاف ساختاری هسته پوسته را به راحتی آماده کند [۸]. عواملی نظیر نسبت ترکیب در پوسته و هسته، خواص شیمیایی و سرعت رهایش محلول از سرنگ بر ساختار هسته-پوسته نانوالیاف مؤثر می‌باشند [۱۰]. پلیمرها به تنهایی نمی‌توانند خواص مکانیکی مطلوب را برای کاربرد در استخوان فراهم کنند. به همین منظور از مواد کامپوزیتی برای ساخت داربست‌های مهندسی بافت استخوان با خواص مطلوب استفاده می‌گردد. کیتوسان (CS) به دلیل خواصی مثل عدم سمیت، زیست‌سازگاری بسیار عالی، زیست‌تخریب‌پذیری و خاصیت آنتی‌باکتریایی به‌طور گسترده در زمینه پزشکی و دارویی مورد استفاده قرار گرفته است. علاوه بر این موارد، خواص بیولوژیکی چون چسبندگی زیستی، آنتی‌باکتریال، کاهش دهنده التهاب و درد، آنتی‌اکسیدان و منعقد کننده خون آن را از دیگر پلیمرهای زیستی متمایز کرده است. همچنین الکترووریسی محلول اسیدی کیتوسان از متداول‌ترین روش‌های ساخت داربست‌های سه‌بعدی می‌باشد [۱۱].

اگرچه از معایب کیتوسان، خواص مکانیکی ضعیف آن می‌باشد که برای برطرف کردن این مشکل آن را با پلیمرهای مصنوعی و نانوذرات سرامیکی جهت کنترل خواص فیزیکی و بیولوژیکی به صورت کامپوزیت در پزشکی به کار می‌برند [۱۲]. همچنین، به دلیل خاصیت پلی‌کاتیونی کیتوسان که سبب نیروی دافعه و برهمکنش درون‌مولکولی در آن می‌شود، الکترووریسی کیتوسان به آسانی انجام نمی‌گیرد [۱۳]؛ بنابراین، برای سهولت الکترووریسی و کاهش برهمکنش درون‌مولکولی

اندوتلیال عروقی و گلیکوپروتئین‌هایی مانند ترومبوسپوندين ۱ است که ترمیم و بازسازی زخم را تسريع می‌بخشد [۱۹]. لوکوسیت‌هایی که در داربست PRF متراکم شده‌اند، نقش مهمی در انتشار عوامل رشد، فعالیت‌های آنتی‌باکتریال و بازسازی ماتریس خارج سلولی در طول ترمیم زخم دارند [۲۰].

پلاکت‌های موجود در PRF به تدریج غلظت بالایی از سیتوکین‌ها و فاکتورهای رشد از جمله فاکتور رشد مشتق از پلاکت (PDGF)؛ فاکتور رشد انسولین-۱ (IGF-1)؛ $TGF-\beta 1$ و فاکتور رشد اندوتلیال عروقی (VEGF) را آزاد می‌کنند که در رگ‌زایی و ترمیم نقایص استخوان مؤثر می‌باشند [۲۱]. همچنین، ساختار سه بعدی PRF می‌تواند به عنوان داربست مهندسی بافت مورد استفاده قرار گیرد که سبب افزایش مهاجرت و تکثیر سلولی می‌گردد [۲۲]. کاربرد PRF در ترمیم استخوان شامل مزایایی همچون آماده‌سازی ساده و تک مرحله‌ای و مقرون به صرفه، عدم تحریک واکنش ایمنی، تسريع ترمیم بافت به دلیل چهارچوب فیبرین طبیعی با فاکتورهای رشد درون آن، تسريع ترمیم پیوند استخوان و عدم نیاز به جراحی برای گرفتن استخوان از محل دیگر دارد [۲۳].

وانگ و همکاران، نانوالیاف هسته-پوسته پلی DL-لاکتیک اسید (PDLLA) / پلی بوتیرات ۳-هیدروکسی (PHB) و داروی دی‌متیل‌آگزالیل‌گلیسین (DMOG) را مورد بررسی قرار دادند. هدف این مطالعه افزایش خصوصیات مکانیکی فیبر با استفاده از هسته قوی‌تر و رهایش کنترل شده داروها از هسته بود [۲۴]. در مطالعه‌ای [۲۵]، نانوالیاف پلی‌کاپرولاکتون / کیتوسان با استفاده از فرآیند الکتروریسی ساخته شد. نتایج نشان داد که با افزودن کیتوسان به پلی‌کاپرولاکتون، آب دوستی و خواص مکانیکی داربست افزایش می‌یابد و رشد سلول‌ها بر روی سطح داربست‌های پلی‌کاپرولاکتون / کیتوسان ۴۸٪ بیشتر از داربست‌های پلی‌کاپرولاکتون می‌شود. جاجلا و همکاران [۲۶]، ساخت نانوالیاف کیتوسان-ژلاتین با روش الکتروریسی هسته-پوسته را گزارش کردند و نتایج نشان داد که وجود

بین گروه‌های آزاد آمین کیتوسان، این پلیمر با پلیمرهایی مانند کلاژن، پلی‌وینیل‌الکل، ژلاتین، پلی‌اتیلن اکسید و پلی‌کاپرولاکتون (PCL) الکتروریسی می‌گردد [۱۴]. PCL یک پلی‌استر ترموپلاستیک زیست تخریب‌پذیر، زیست سازگار و پرکاربرد در زمینه زیست مواد و مهندسی بافت به شمار می‌رود و مورد تأیید FDA می‌باشد. این پلیمر در مهندسی بافت به دلیل خواص انحلال‌پذیری زیاد در حلال‌های آلی، توانایی فرآیند شدن در دماهای پایین و محصولات فرعی غیر سمی حاصل از تخریب، الاستومری و ازدیاد طول بالا بسیار مورد استفاده قرار گرفته است [۱۵]. در تحقیقات مرتبط به مهندسی بافت، پلی‌کاپرولاکتون به صورت کامپوزیت با انواع پلیمرها و نانوذرات سرمایی مورد استفاده قرار گرفته است [۱۶]. همچنین، زیست‌سازگاری و سرعت تخریب پایین، پلی‌کاپرولاکتون را تبدیل به گزینه مناسبی برای ساخت داربست‌های مهندسی بافت استخوان کرده است. با این حال خواص مکانیکی ضعیف PCL، کاربرد این پلیمر را به‌تنهایی برای ساخت داربست‌های بافت سخت محدود کرده است. کاربرد پلی‌کاپرولاکتون در فرآیند الکتروریسی که سبب ایجاد الیاف با مقدار سطح به حجم بالا و در نتیجه افزایش برهمکنش‌های سلول-داربست می‌گردد را در مهندسی بافت حائز اهمیت کرده است [۱۷]. فیبرین غنی از پلاکت^۴ (PRF) توسط چوکرون و همکاران^۵، از خون بدون ترکیب شدن با ماده ضد انعقاد خون فراهم شد و به‌عنوان پلاکت متراکم نسل دوم که شامل پلاکت‌ها و فاکتورهای رشد به شکل غشاء فیبرین می‌باشد، معرفی گردید [۱۸]. PRF یک ماتریس فیبرینی طبیعی قوی را تشکیل می‌دهد که کنسانتره‌ای از تقریباً تمام پلاکت‌ها و فاکتورهای رشد موجود در خون است و دارای معماری پیچیده‌ای به‌عنوان یک ماتریس ترمیم‌کننده با خواص مکانیکی منحصربه‌فرد می‌باشد. PRF دارای شبکه فیبرینی متراکم با لکوسیت، سیتوکین، گلیکوپروتئین‌های ساختاری و همچنین عوامل رشدی مانند فاکتور رشد تغییردهنده $IL\beta 1$ ، فاکتور رشد مشتق از پلاکت، فاکتور رشد

دور در دقیقه به مدت زمان ۱۰ دقیقه هموژنایز شد و فیبرین غنی از پلاکت هموژن به دست آمد.

۲-۲- تهیه نانوذرات کیتوسان حاوی PRF

برای تهیه PRF کپسوله شده در نانوذرات کیتوسان (CS-PRF)، ۲۲ mg کیتوسان (CS) در محلول آبی اسید استیک ۱٪ حل گردید. سپس محلول هموژنایزر شده PRF به آن اضافه و محلول حاصل به مدت ۲ h با دور ۸۰۰ rpm در دمای ۴ °C همگن گردید. در مرحله بعد، ۲۰ mg محلول سدیم تری‌پلی فسفات (TPP) به عنوان سورفکتانت به محلول CS/PRF اضافه و محلول حاصل برای ۲۰ دقیقه در ۲۰۰۰ rpm سانتریفیوژ (Zenithlab-LC-04C) گردید.

۲-۳- ساخت نانوالیاف به روش الکترورسی

جهت ساخت داربست A، PCL در حلال استیک اسید/اسید فرمیک با نسبت ۳:۱ حدود ۲۴ ساعت با همزن مغناطیسی حل گردید. کیتوسان در اسید استیک/اسید فرمیک به نسبت ۳:۱ به مدت ۱ ساعت حل شد. سپس، محلول پلی‌کاپرولاکتون و محلول کیتوسان با نسبت ۳:۲ با همزن مغناطیسی مخلوط شدند. نسبت ترکیبی با توجه به آزمون خطا و مشاهده شرایط پاشش محلول از سر سوزن و مطالعات پیشین [۲۷] نسبت ۳:۲ انتخاب گردید. برای الکترورسی، محلول در سرنگ با قطر ۰/۶ mm قرار داده شد و با تنظیم پارامترهای دستگاه با نرخ تغذیه ml/h ۰/۱ و ولتاژ ۱۹KV و فاصله کلکتور تا نوک سوزن الکترورسی (KYKY-SBC-12-2200) انجام گرفت. مراحل ساخت داربست هسته-پوسته پلی‌کاپرولاکتون/کیتوسان-PRF به روش الکترورسی هم‌محور در شکل ۱ مشاهده می‌شود. جهت ساخت داربست B دو محلول هسته و پوسته آماده سازی شد. برای تهیه محلول هسته، کیتوسان حاوی PRF با آب دوبار تقطیر به مدت ۱۲ h با همزن مغناطیسی حل گردید. محلول PCL در حلال استیک اسید/اسید فرمیک (۳:۱) به عنوان پوسته نانوالیاف آماده سازی شد. سپس، سرنگ حاوی محلول

کیتوسان در پوسته و ژلاتین در هسته نانوالیاف برافزایش رشد و تکثیر سلول‌ها مؤثر است. کیتوسان به دلیل ماهیت کاتیونی که سبب اتصال گلوگوزامینوگلیکان (GAG)، فاکتورهای رشد و پروتئین‌های با بار منفی در غشا سلول به سطح داربست و مینرالیزه شدن سطح داربست می‌گردد، باعث افزایش رشد و تکثیر سلول‌های استخوانی و ترمیم استخوان می‌شود. در مطالعه ای دیگر [۲۲]، تأثیر PRF بر رشد و تمایز سلول‌های بنیادی مزانشیمی به سلول‌های استخوانی و تجمع سلول‌های استخوان در اطراف ایمپلنت دندان سگ مورد بررسی قرار گرفت و بازسازی سریع استخوان در گروه حاوی PRF مشاهده گردید. بررسی‌های اخیر نشان داده است که تاکنون مطالعه‌ای بر روی تأثیر PRF بر بهبود عملکرد داربست هسته-پوسته پلی‌کاپرولاکتون/کیتوسان در تکثیر سلول‌های استخوانی صورت نگرفته است؛ بنابراین با توجه به تأثیر کیتوسان و PRF بر ترمیم استخوان، در این مطالعه داربست هسته-پوسته حاوی PRF با روش الکترورسی هم‌محور تهیه و مشخصه‌یابی شد.

۲- مواد و روش انجام آزمون‌ها

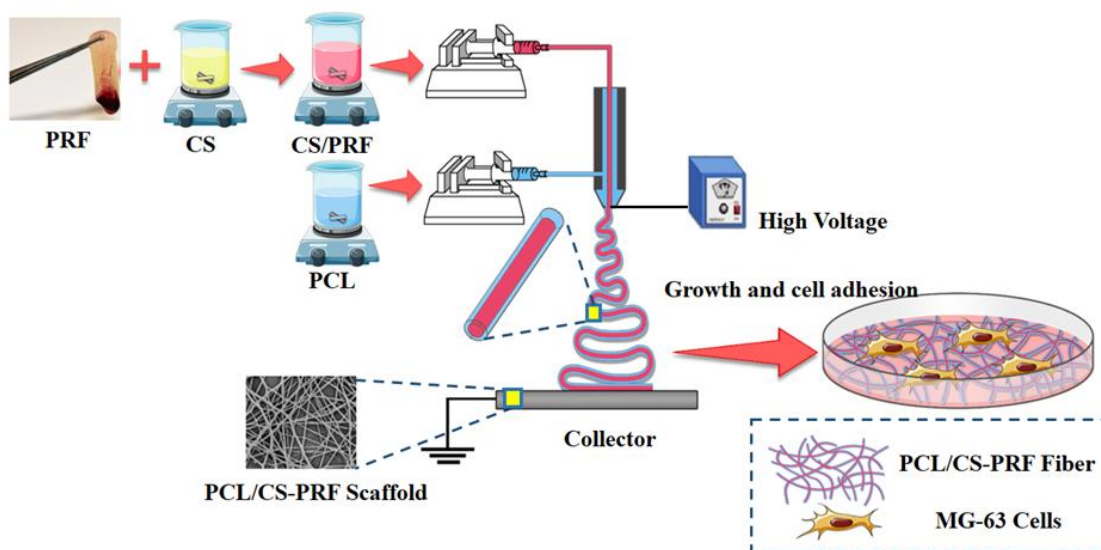
کیتوسان با وزن مولکولی متوسط (با درجه استیل‌زدایی ۸۵٪) و پلی‌کاپرولاکتون (MV-70-90KD) از شرکت Sigma-Aldrich خریداری شد. PRF از خون انسان استخراج گردید. اتانول، ایزوپروپانول، اسید استیک (1M) و اسید فرمیک (1M) از شرکت Merck آلمان خریداری شد. مواد مورد نیاز جهت انجام آزمون‌های کشت سلول شامل سرم گاوی (FBS)، F12-DMEM و RPMI 1640 Medium از شرکت Gibco تهیه شد.

۲-۱- تهیه PRF

جهت ساخت PRF با روش چوکرون [۱۸]، ۱۰ cc خون انسان در لوله آزمایش فاقد ماده ضد انعقاد خون قرار داده شد و با سرعت ۲۷۰۰ دور در دقیقه به مدت ۱۲ دقیقه سانتریفیوژ گردید. پس از سانتریفیوژ، ژل PRF از وسط لوله خارج و به محلول شبیه‌سازی شده با بدن (SBF) اضافه و با سرعت ۸۰۰

پوسته به شکل الیاف به سمت کلکتور کشیده می‌شود. باید توجه داشت که محلول پوسته قابلیت الکترورسی و تبدیل شدن به الیاف را دارد، درحالی‌که محلول هسته این توانایی را ندارد؛ بنابراین، قطره‌های محلول هسته که مطابق با طراحی این تحقیق در وسط مخزن رها می‌شوند، توسط الیاف پوسته احاطه شده و به سمت کلکتور هدایت و جمع‌آوری می‌گردند (شکل ۱) [۲۸].

پلی‌کاپرولاکتون و محلول کیتوسان-PRF هر کدام به طور جداگانه به درون نازل هسته و نازل پوسته قرار داده شدند و جهت الکترورسی به دو پمپ مجزا با دو نرخ تغذیه متصل گردیدند. نرخ تغذیه پوسته و قطر سرسوزن برای هسته و پوسته به ترتیب (۰/۳ ml/h و ۲۳G) و (۳ ml/h و ۱۶G) تنظیم شد. همچنین، فاصله سوزن تا کلکتور ۱۲cm و ولتاژ ۲۰Kv در نظر گرفته شد. جهت تشکیل الیاف هسته-پوسته، با اعمال ولتاژ، در ابتدا قطره‌ای از محلول پلی‌کاپرولاکتون در نوک سوزن پوسته تشکیل می‌گردد و مخروط تیلور شکل می‌گیرد. سپس در ولتاژ ۲۰ Kv یک جت سیال متشکل از پلیمر موجود در مخزن



شکل (۱): شماتیک تهیه نانوالیاف هسته- پوسته به روش الکترورسی هم‌محور و رشد و چسبندگی سلول‌های MG-63.

مسی با قطر ۳ میلی‌متر ریسیده شدند. شناسایی گروه‌های عاملی و پیوندهای تشکیل شده در داربست‌ها با (FTIR BRUKER-TENSOR27) انجام گرفت. قرص‌های نازکی از مخلوط نمونه‌ها با KBr^{۱۱} خالص تهیه شد و با دستگاه FTIR قله‌های جذب پرتو IR در محدوده ۴۰۰۰-۴۰۰ cm⁻¹ مشاهده و نوع پیوندها با بررسی عدد موج قله‌ها مشخص گردید.

۲-۴-۲- بررسی درصد تخلخل نانو داربست‌ها

جهت اندازه‌گیری درصد تخلخل داربست‌ها از روش جابه‌جایی مایع (قانون ارشمیدس) استفاده شد.

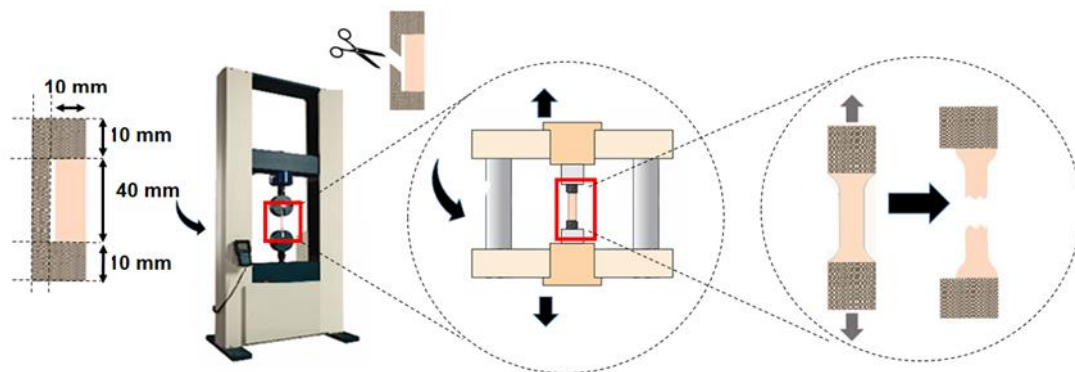
۲-۴-۲- مشخصه‌یابی داربست‌ها

۲-۴-۲-۱- مورفولوژی و ساختار نمونه‌ها

به منظور ارزیابی مورفولوژی سطح داربست‌ها و بررسی ساختار و قطر الیاف ریسیده شده از میکروسکوپ الکترونی روبشی (SEM KYXY-EM 3200) استفاده شد. برای تصویربرداری نمونه‌ها با طلا پوشش داده شدند. میانگین قطر متوسط الیاف توسط نرم‌افزار MIP اندازه‌گیری شد.

مشاهده هسته و پوسته الیاف با میکروسکوپ الکترونی عبوری (TEM PHILIPS-EM208S) انجام گرفت. برای تصویربرداری، نانوالیاف هسته- پوسته بر روی شبکه توری

ضخامت نانوالیاف به کمک دستگاه ضخامت سنج با دقت 0.01 mm در حدود 100 الی 200 میکرومتر اندازه‌گیری و نمونه‌هایی به ابعاد $60 \times 10 \times 2 \text{ mm}$ در جهت طولی بریده شد و بر روی قالب کاغذی چسبانیده شد و قاب کاغذی بین دو فک با فاصله 4 cm قرار گرفته و آزمون کشش با نیروی 10 N ، سرعت کشش 10 mm/min ، رطوبت 30% و دمای 23 ± 2 انجام گرفت و نمودار تنش - کرنش رسم گردید. مدول الاستیک (E) با معادله $E = \frac{\sigma}{\epsilon}$ محاسبه شد که در این رابطه σ تنش و ϵ کرنش می‌باشد. در شکل ۲، شماتیک مراحل انجام اندازه‌گیری استحکام کششی مشاهده می‌گردد.



شکل (۲): شماتیک مراحل انجام اندازه‌گیری استحکام کششی.

کشت RPMI به همراه 10% FBS منتقل کرده و سپس فلاسک در انکوباتور (INC246 - Memmert) در دمای 37°C ، رطوبت 90% و غلظت اکسیژن 5% قرار داده شد و محیط کشت هر 3 روز یک بار تعویض گردید. جهت بررسی میزان رشد و تکثیر سلول‌ها، ابتدا 1×10^4 سلول به همراه 100 میکرو لیتر محیط کشت بر روی هر یک از نمونه‌های قرار گرفته در چاهک پلیت کشت سلولی 12 چاهکی ریخته شد و سپس به مدت 4 h در انکوباتور 37°C قرار گرفت تا سلول‌ها به نمونه بچسبند. پس از اطمینان از چسبیدن سلول‌ها، مقدار مشخصی محیط کشت به هر چاهک اضافه شد و در هر پلیت 3 چاهک به‌عنوان کنترل در نظر گرفته شد. پس از گذشت 3 روز محیط روی

ابتدا مقداری اتانول ($\rho = 0.789 \text{ g/cm}^3$) در داخل یک استوانه مدرج با حجم V_1 اندازه‌گیری شد. سپس نمونه به مدت 5 دقیقه به حالت غوطه‌ور در اتانول نگه داشته شد و حجم داربست و حجم اتانول، به‌عنوان V_2 گزارش گردید. با خارج کردن داربست از درون استوانه مدرج، حجم اتانول باقی مانده در استوانه مدرج به‌صورت V_3 معرفی شد و حجم کل داربست از تفاوت v_2 و v_3 و مقدار متوسط درصد تخلخل داربست (ϵ) با معادله ۱ محاسبه گردید [۲۹].

$$\epsilon = (v_1 - v_3) / v_2 - v_3 \times 100 \quad (1)$$

۲-۴-۳- اندازه‌گیری استحکام کششی داربست‌ها

خواص مکانیکی نمونه‌ها با دستگاه آزمون استحکام Zwick (Universal Testing Machinn-1446-60) بررسی شد.

۲-۴-۴- بررسی زیست‌سازگاری داربست‌ها

۱-۴-۴-۲- آزمون MTT

درصد زنده‌مانی سلول‌های استخوانی بر روی داربست‌ها با روش MTT ارزیابی شد. ابتدا نمونه‌ها بر روی کاورهایی از جنس پلی استایرن با قطر 15 mm به‌طور عمودی الکترورسی گردید. کاورهای الکترورسی شده درون ظرف کشت سلول قرار داده شد و به مدت 5 روز تحت پرتو گاما با دوز 25 KGy استریل شد. به منظور بررسی سمیت و تکثیر سلول‌ها از آزمون تماس مستقیم استفاده شد. در این تحقیق از MG-63 (NCBI C555) گرفته شده از بانک سلولی انستیتو پاستور ایران استفاده شد. پس از ذوب کردن سلول‌های منجمد، آن‌ها را به فلاسک حاوی محیط

تکرار سه در نظر گرفته شد و نتایج به صورت میانگین \pm انحراف از معیار گزارش گردید.

۳- نتایج و بحث

در این تحقیق با روش الکترورسی هم‌محور، داربست هسته-پوسته حاوی PRF جهت کاربرد در مهندسی بافت استخوان ساخته شد و مورد ارزیابی قرار گرفت. نانوالیاف الکترورسی شده هم‌محور، قابلیت کاربرد بالایی در شبیه سازی داربست‌های بافتی طبیعی دارند و با بهره‌گیری از آن‌ها می‌توان استحکام مکانیکی و چسبندگی سلولی را در داربست بهبود داد. از کیتوسان در ساخت داربست به دلیل شباهت ساختاری آن با گلیکوزآمینو گلیکان (GAG) که یکی از اجزاء اصلی ماتریکس خارج سلولی (ECM) است، استفاده شد. کاربرد کیتوسان در ساخت داربست مهندسی بافت نقش بسیار مؤثری بر رشد و تکثیر و تمایز سلول‌های استئوبلاست دارد و سبب بیان استئوپوئیتین و کلاژن نوع I و کاهش استئوکلاست‌ها می‌شود [۳۱]. ولی نوآوری این مطالعه کاربرد PRF به‌عنوان حامل فاکتورهای رشد مناسب برای ترمیم استخوان بود. فاکتورهای اصلی تأثیرگذار بر ترمیم استخوان در PRF شامل، 12 BMP که منجر به استخوان سازی و افزایش تمایز، تکثیر و سنتز ماتریکس خارج سلولی می‌شود، 13 FGF که سبب القاء آپوپتوز استئوسیت‌های بالغ، جلوگیری از تحلیل استخوان و مانع آپوپتوز استئوبلاست نابالغ می‌شود [۳۲]، IGF، PDGF و VEGF که باعث افزایش تکثیر و تمایز استخوان می‌شوند [۳۳] و $TGF\beta$ که تأثیر مثبتی در تکثیر و تمایز سلول مزانشیمی به سلول‌های استخوانی دارد، می‌باشند [۳۴]. همچنین با ایجاد پیوند هیدروژنی بین کیتوسان در هسته و PCL در پوسته، رهایش پروتئین‌های PRF کنترل می‌گردد [۳۵].

۳-۱- مورفولوژی و میکرو ساختار نانوالیاف

در شکل ۳ (الف و ب) و (ج) به ترتیب تصاویر SEM و TEM داربست‌ها مشاهده می‌شود. داربست A دارای الیافی کشیده و اندازه نسبتاً یکنواخت و قطری در حدود

نمونه‌ها تا حد امکان خارج کرده و ۵۰۰ μ l محلول MTT با غلظت ۰/۵ mg/mL در هر چاهک ریخته شد و به مدت ۴h در انکوباتور قرار گرفت. پس از گذشت ۴ h محلول روی سلول‌ها خارج شد و ایزوپروپانول به آن‌ها اضافه گردید تا بلورهای بنفش‌رنگ ایجاد شده حل شود. برای حل شدن بهتر رسوب MTT، پلیت به مدت ۱۵ min بر روی دستگاه شیکر قرار گرفت و در ادامه رسوب حل شده به پلیت ۹۶ خانه منتقل شد و سپس مقدار غلظت ماده حل شده در ایزوپروپانول با استفاده از دستگاه الیزاریدر (پیش‌تاز طب مدل Avecina) در طول موج ۵۷۰ nm اندازه گیری شد و درصد زنده مانی سلول‌ها از رابطه ۳ محاسبه گردید [۳۰].

$$(۲) \quad \text{چگالی نوری نمونه} \times 100 = \frac{\text{درصد زنده مانی سلول‌ها}}{\text{چگالی نوری نمونه کنترل}}$$

۲-۴-۲- بررسی چسبندگی سلول‌ها

برای بررسی چسبندگی سلول‌ها، ابتدا نمونه‌های استریل شده در هر یک از چاهک‌های پلیت ۲۴ خانه‌ای استریل قرار داده شد. سپس مقدار ۲۰۰۰۰ سلول در حجم ۱۰۰ میکرو لیتر بر روی هر یک از نمونه‌ها ریخته شد و به مدت ۴ h در انکوباتور قرار گرفت و پس از چسبیدن سلول‌ها، مقدار مشخصی محیط کشت شامل ۱۰٪ FBS به هر چاهک اضافه شد. بعد از گذشت ۲۴ h، محیط کشت روی نمونه‌ها خارج و به مدت ۳۰ s با بفر فسفات PBS شستشو داده شد. سپس از گلو تار آلدئید ۲/۵٪ برای تثبیت زیستی سلول‌ها استفاده شد. پس از ۲ h نگهداری نمونه‌های حاوی مواد تثبیت کننده در یخچال، ماده تثبیت کننده خارج و نمونه‌ها دو بار با آب دیونیزه و الکل با غلظت‌های ۵۰٪، ۶۰٪، ۷۰٪، ۸۰٪ و ۹۶٪ شستشو داده شد. چسبندگی سلول‌ها بر روی سطح نمونه‌ها با میکروسکوپ الکترونی روبشی (SEM) بررسی شد.

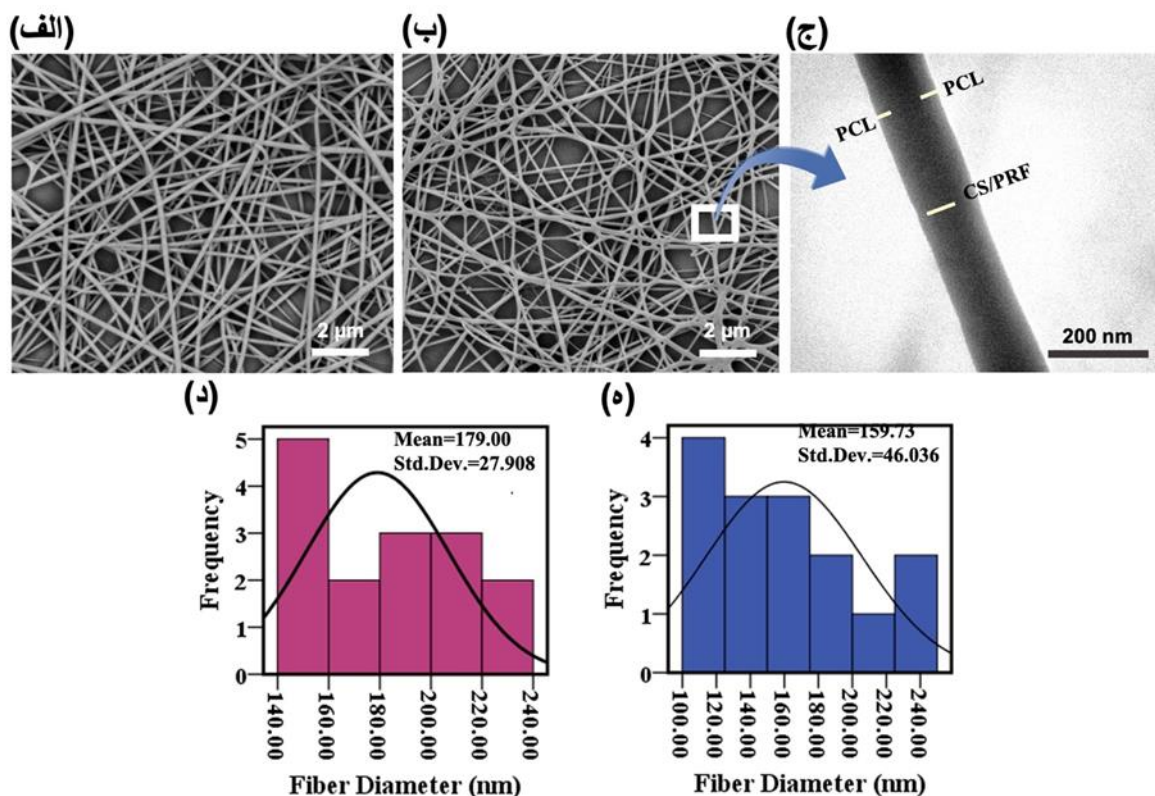
۲-۵- ارزیابی آماری

مقایسه آماری داده‌های به‌دست‌آمده توسط روش ANOVA انجام شد. برای آزمون‌های انجام شده تعداد

می‌باشد. از آنجایی که کیتوسان قابلیت الکترورسی ندارد با کامپوزیت کردن کیتوسان و پلی‌کاپرولاکتون می‌توان الیافی با سایز نانو و صاف تهیه کرد. مورفولوژی و قطر الیاف ساخته‌شده به روش الکترورسی به هدایت و ویسکوزیته محلول وابسته است و با تنظیم دو پارامتر مذکور، الیاف بدون عیب و دانه با ساختاری یکنواخت تهیه می‌گردد [۳۶]. با افزودن کیتوسان به محلول PCL، ویسکوزیته و هدایت الکتریکی محلول به دلیل خاصیت پلی‌الکترولیت کیتوسان به‌طور قابل‌توجهی افزایش می‌یابد. کیتوسان سبب افزایش انباشتگی بار الکتریکی می‌شود که بر نیروهای چسبندگی غلبه می‌کند و نیروهای دافعه بارهای انباشته شده در بین نانوالیاف تشدید گشته و این گونه قطر نانوالیاف کاهش می‌یابد [۳۷]. در این مطالعه جهت افزایش قدرت رشد سلول‌های استخوانی بر روی سطح داربست B تهیه شد. همچنین، ساخت داربست به روش هسته-پوسته با کاهش قطر الیاف سبب افزایش چسبندگی و رشد سلول‌ها بر روی سطح داربست می‌گردد [۳۸].

کیتوسان حاوی PRF به عنوان هسته و پلی‌کاپرولاکتون به عنوان پوسته توسط الکترورسی هم‌محور ساخته شد. میانگین قطر الیاف در داربست B $159 \pm 46 \text{ nm}$ اندازه‌گیری شد که از میانگین قطر الیاف در داربست A کمتر بود (شکل ۳ د و ه)). هدایت یونی متفاوت PCL در پوسته و کیتوسان حاوی PRF در هسته و افزایش رسانایی الکتریکی از عوامل مهم در کاهش قطر الیاف در داربست هسته-پوسته می‌باشد. همان‌طور که در مطالعه مشابه [۳۹] گزارش شده است، متوسط قطر نانوالیاف هسته-پوسته PLA/CS (پلی

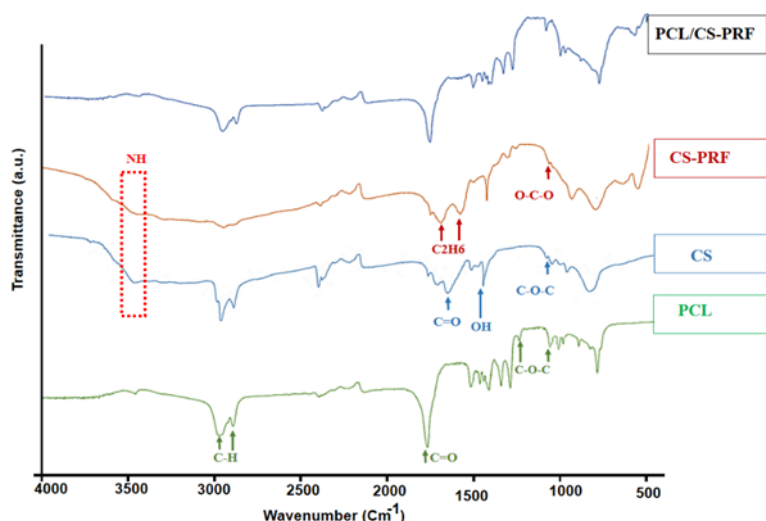
لاکتیک اسید (PLA) در هسته و CS در پوسته) در مقایسه با متوسط قطر نانوالیاف PLA بسیار کاهش یافت که علت این کاهش مرتبط به هدایت یونی مختلف محلول‌های PLA و CS بود. CS حاوی گروه‌های آمینی است که در یک حلال اسیدی از هدایت یونی بالایی برخوردار است و باعث افزایش چگالی بار جت در طی فرآیند الکترورسی می‌شود و در نهایت منجر به کاهش قطر الیاف هسته-پوسته می‌گردد [۴۰]. تصویر TEM داربست هسته-پوسته پلی‌کاپرولاکتون/کیتوسان-PRF تأییدی بر ساختار هسته-پوسته داربست B می‌باشد (شکل ۳ ج)). تصویر TEM داربست B، حضور کیتوسان حاوی PRF در هسته و پلی‌کاپرولاکتون در پوسته را نشان می‌دهد. چون چگالی کیتوسان حاوی PRF در هسته بالاتر از PCL در پوسته می‌باشد از این رو الکترون‌های کمتری از طریق هسته منتقل می‌شوند و این امر منجر به تیره‌تر شدن تصویر در قسمت میانی الیاف می‌گردد [۴۱]. یکی از چالش‌های مورد اهمیت در طراحی داربست‌های مهندسی بافت، میزان تخلخل و اندازه قطر الیاف جهت رشد و تکثیر سلول‌ها می‌باشد [۴۲]. میانگین درصد تخلخل داربست A و B به ترتیب ۶۸٪ و ۸۳٪ با روش جابه‌جایی مایع محاسبه شد که افزایش درصد تخلخل در داربست B به دلیل کاهش قطر الیاف بود [۴۳]؛ بنابراین با توجه به اینکه که وجود ۶۰-۹۰٪ تخلخل در داربست‌های استخوان را برای نفوذ سلول، تبادل گاز و مواد غذایی گزارش کرده‌اند، داربست B می‌تواند داربست مناسبی جهت کاربرد در مهندسی بافت استخوان باشد [۴۴].



شکل (۳): میکروگراف‌های SEM: (الف) داربست A و (ب) داربست B. (ج) تصویر TEM داربست B. توزیع اندازه قطر الیاف (د) داربست A و (ه) داربست B.

باند‌های جذبی کیتوسان را شامل می‌شود. OH و عدد‌های موجی در 1730 cm^{-1} و 1530 cm^{-1} مربوط به حلقه‌ی بنزن [۴۶] در PRF می‌باشد. در طیف FTIR داربست B تمام پیک‌های معرف مواد تشکیل دهنده داربست مشاهده می‌شود که دلیلی بر اثبات حضور تمام مواد اولیه سازنده در داربست‌های ساخته شده می‌باشد و هیچ گونه پیوند جدیدی ایجاد نگردیده است. باید توجه داشت که دامنه باند‌های جذبی مواد موجود در هسته داربست هسته-پوسته دارای شدت کم می‌باشد که دلیلی بر پوشش هسته با پلی‌کاپرولاکتون می‌باشد [۴۷].

در شکل ۴ طیف FTIR پلی‌کاپرولاکتون، کیتوسان، کیتوسان حاوی PRF و داربست B در محدوده 4000 cm^{-1} - ۴۰۰ مشاهده می‌گردد. پیک‌های ارتعاشی ظاهر شده در پلی‌کاپرولاکتون با عدد موج‌های 1170 cm^{-1} و 1240 cm^{-1} ، 1726 cm^{-1} ، 2865 cm^{-1} و 2945 cm^{-1} به ترتیب مرتبط به گروه‌های ارتعاشات کششی متقارن و نامتقارن (C-O-C)، (C=O) و C-H ترانس و سیس می‌باشد [۳۱]. پیک‌های ارتعاشی ظاهر شده در 1024 cm^{-1} ، 1400 cm^{-1} ، 1658 cm^{-1} و 3457 cm^{-1} به ترتیب مرتبط به گروه‌های C-O-C، ارتعاشات کششی OH، C=O و NH₂ در کیتوسان می‌باشند [۳۶، ۴۵]. طیف FTIR نمونه CS-PRF تمام

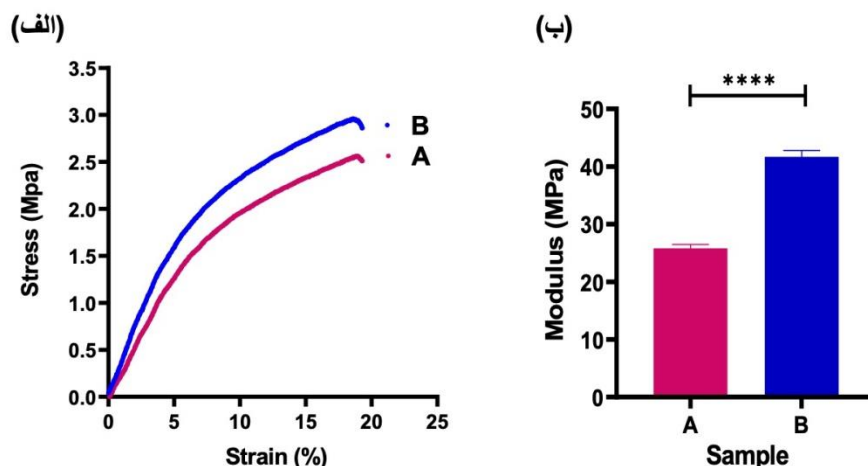


شکل (۴): طیف FTIR پلی‌کاپرولاکتون، کیتوسان، کیتوسان حاوی PRF و داربست B

۱/۵ برابر مدول الاستیک داربست B در مقایسه با داربست A به دلیل ایجاد پیوند هیدروژنی بین گروه‌های آمینی کیتوسان حاوی PRF در داخل هسته و گروه هیدروکسیلیک PCL در پوسته داربست هسته-پوسته B می‌باشد [۳۵]. دلیل دیگر افزایش استحکام کششی داربست هسته-پوسته، کاهش قطر الیاف در این داربست نسبت به قطر الیاف داربست A می‌باشد [۵۱]. در مطالعات مشابه [۴۷] گزارش شده است که مدول الاستیک الیاف هسته پوسته PCL در پوسته و پلی‌اتیلن گلیکول (PEG) / ژلاتین / پپتید (OGP)^{۱۴} در هسته در محدوده MPa ۴۸/۲۳ و MPa ۵۲/۳۳ (MPa) و برای آن دسته از الیافی که فاقد ساختار هسته پوسته بودند منجر به کاهش مدول الاستیک (۲۳/۱۳ MPa و MPa ۱۹/۵۶) اندازه گیری شد که نشان داد ساختار هسته پوسته بر افزایش مقاومت مکانیکی داربست تأثیرگذار می‌باشد. وانگ و همکاران [۲۴] نانوالیاف هسته-پوسته پلی (DL-لاکتیک اسید) (PDLLA) و پلی بوتیرات ۳-هیدروکسی حاوی دارو DMOG را مورد ارزیابی و مشخصه‌یابی قرار دادند. نتایج این تحقیق، نقش الیاف هسته-پوسته را برافزایش خصوصیات مکانیکی داربست نشان داد.

۲-۳- بررسی خواص مکانیکی داربست‌ها

داربست هسته پوسته باید دارای مقاومت مکانیکی نزدیک به بافت مورد نظر باشد و به اندازه کافی از لحاظ ساختاری جهت ترمیم بافت پایدار باشد [۴۸]. نانوالیاف کامپوزیتی با پشتیبانی مکانیکی لازم به‌عنوان داربست و افزایش تکثیر سلول‌های بنیادی مزانشیمی مغز استخوان در مطالعات برای ترمیم بافت استخوان مورد استفاده قرار گرفته اند [۴۹]. بزرگ‌ترین چالش در مبحث مهندسی بافت استخوان عدم مشابهت خواص مکانیکی داربست با بافت استخوان می‌باشد. تحقیقات نشان داده اند که داربست‌های ساخته شده با روش الکترووریسی هم‌محور دارای خواص مکانیکی بالاتری نسبت به داربست الکترووریسی شده تک‌محور هستند [۵۰]. در این روش با تقویت هسته الیاف و کاهش قطر الیاف خواص مکانیکی داربست افزایش می‌یابد. در شکل ۵ (الف و ب) نمودار تنش و کرنش و مدول الاستیک داربست‌ها مشاهده می‌شود. نتایج آزمون استحکام نشان داد که داربست B با ساختار هسته-پوسته دارای خواص مکانیکی بالاتری در مقایسه با داربست A می‌باشد. تنش در نقطه شکست در داربست B در مقایسه با داربست A از مقدار MPa ۲/۵±۳ به MPa ۲/۹۸±۲ افزایش یافت. مدول الاستیک برای داربست A و داربست B به ترتیب MPa ۲۵/۱۳±۳ و MPa ۴۰/۴۴±۵ محاسبه گردید. تفاوت معنادار

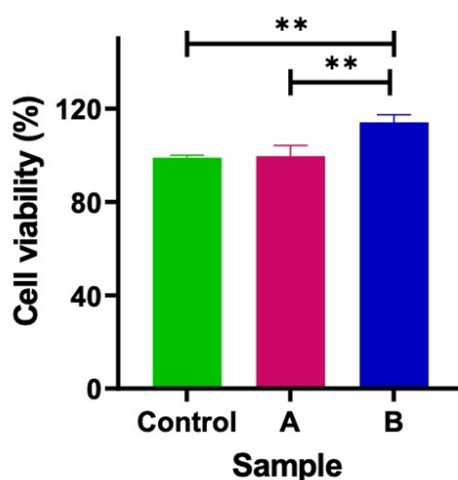


شکل (۵): خواص مکانیکی داربست‌ها: (الف) نمودار تنش- کرنش داربست‌های A و B و (ب) مدول الاستیک داربست‌های A و B. علامت ستاره معرف تحلیل آماری برای سه بار تکرار آزمون می‌باشد ($p < 0.0001$).

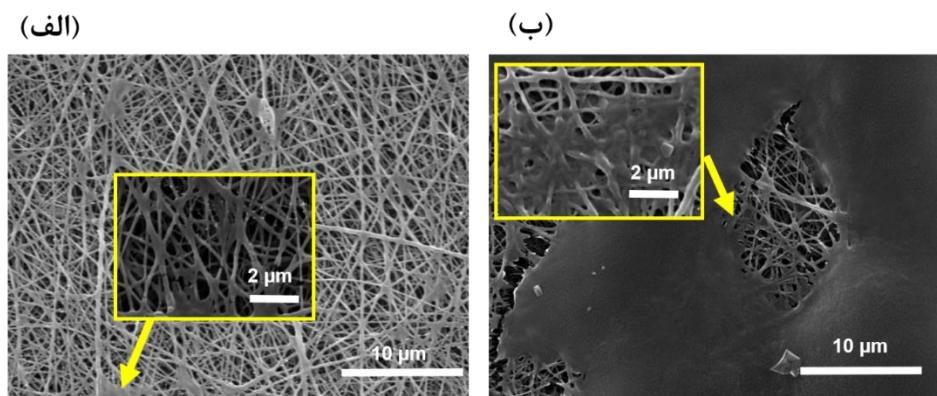
مشاهده گردید. همچنین حضور PRF در پوسته که سبب آزاد سازی سیتوکین‌ها می‌شود نیز دلیلی برافزایش رشد و تکثیر سلول‌های استخوانی می‌باشد [۵۲]. شکل ۷ (الف و ب) چسبندگی سلول‌های MG-63 بر روی سطح داربست A و B را پس از سه روز کشت نشان می‌دهد. سلول‌های MG-63 سطح بیشتری را روی داربست B در مقایسه با داربست A پوشانده است. حضور PRF در داربست هسته-پوسته که حامل سیتوکین‌ها و فاکتورهای رشد مانند PDGF، TGF- β 1 و VEGF می‌باشد، سبب افزایش رشد و تکثیر سلول‌ها گردیده است [۵۳].

۳-۳- بررسی چسبندگی و زنده‌مانی سلول‌ها

در شکل ۶ میزان زنده‌مانی و رشد سلول‌های استئوبلاست بارده سلولی MG-63 (NCBI C555) بر روی سطح داربست‌های A و B نشان داده شده است. میزان زنده‌مانی سلول‌ها در روی سطح هر دو داربست بیش از صد درصد مشاهده شد که نشانه زیست سازگاری عالی هر دو داربست می‌باشد. رشد و تکثیر سلول‌ها بر روی سطح داربست B در مقایسه با داربست A و کنترل دارای تفاوت معناداری بود ($P < 0.01$). به دلیل ساختار هسته-پوسته و درصد تخلخل بیشتر در داربست B نسبت به داربست A، بیشترین میزان رشد و تکثیر زنده‌مانی سلول‌ها در مقایسه با داربست A



شکل (۶): میزان زنده‌مانی سلول‌ها پس از ۳ روز کشت سلول‌ها بر روی سطح داربست‌های A و B. علامت ستاره معرف تحلیل آماری برای سه بار تکرار آزمون می‌باشد ($p < 0.01$).



شکل (۷): میکروگراف‌های SEM سلول‌های MG-63 پس از سه روز کشت بر روی سطح: (الف) داربست A و (ب) داربست B. فلش‌های زرد رنگ، سلول‌ها را نشان می‌دهند.

۴- نتیجه گیری

در این مطالعه، داربست B با استفاده از روش الکتروسی هم محور ساخته شد و تأثیر PRF بر میزان رشد و تکثیر سلول‌های استخوانی و خواص مکانیکی داربست‌ها بررسی گردید. افزودن PRF به داربست پلی‌کاپرولاکتون/ کیتوسان منجر به کاهش قطر الیاف و افزایش درصد تخلخل در مقایسه با داربست پلی‌کاپرولاکتون/ کیتوسان شد. استحکام کششی داربست B نسبت به داربست A به دلیل پیوند هیدروژنی بین هسته و پوسته و همچنین کاهش قطر الیاف افزایش یافت. نتایج آزمون MTT نشان‌دهنده زیست‌سازگاری و تکثیر بالای سلول‌های استخوانی بر روی سطح داربست B نسبت به داربست A بود. با فعال شدن PRF و رهایش سیتوکین‌ها و فاکتورهای رشد موجود در PRF، رشد و چسبندگی سلول‌های استخوانی افزایش یافت؛ بنابراین با توجه به یافته‌های این تحقیق، داربست B را می‌توان جهت کاربرد در ترمیم بافت‌های استخوانی معرفی کرد.

۵- قدردانی

نویسندگان مراتب قدردانی خود را از مرکز تحقیقات نانو دانشگاه صنعتی اصفهان و انستیتو پاستور تهران جهت همکاری با محققان این پژوهش ابراز می‌نمایند.

۶- مراجع

- [1] E. Venugopal, K. S. Sahanand, A. Bhattacharyya & S. Rajendran, S., "Electrospun PCL nanofibers blended with Wattakaka volubilis active phytochemicals for bone and cartilage tissue engineering", *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine*, vol. 21, 2019.
- [۲] م. کلانتری، م. محمودی و م. میرحاج، "تأثیر نانو ذرات هیدروکسی آپاتیت بر تمایز سلول‌های بنیادی مزانشیمی به سلول‌های استخوانی در داربست‌های پلی‌کاپرولاکتون/کراتین/هیدروکسی آپاتیت"، *فرآیندهای نوین در مهندسی مواد (مهندسی مواد مجلسی)*، دوره ۱۴، بهار ۱۳۹۹.
- [3] H. Qu, H. Fu, Z. Han & Y. Sun, "Biomaterials for bone tissue engineering scaffolds: a review", *RSC advances*, vol. 9, no. 45, 2019.
- [4] A. K. Mitra, K. Cholkar & A. Mandal, eds., "Emerging nanotechnologies for diagnostics, drug delivery and medical devices", William Andrew, 2017.
- [5] R. Nayak, R. Padhye, I. L. Kyratzis, Y. B. Truong & L. Arnold, "Recent advances in nanofibre fabrication techniques", *Textile Research Journal*, vol. 82, no. 2, 2012.
- [6] M. Najafiasl, S. Osfouri, R. Azin & S. Zaeri, "Alginate-based electrospun core/shell nanofibers containing dexpanthenol performed well in-vitro: A candidate for wound dressing", *Journal of Drug Delivery Science and Technology*, vol. 57, 2020.
- [7] M. Rafiei, E. Jooybar, M. J. Abdekhodaie & M. Alvi, "Construction of 3D fibrous PCL scaffolds by coaxial electrospinning for protein

- Biomaterials, and The Australian Society for Biomaterials, vol. 46, no. 1, 1999.
- [17] S. Hong & G. H. Kim, "Electrospun polycaprolactone/silk fibroin/small intestine submucosa composites for biomedical applications", *Macromolecular Materials and Engineering*, vol. 295, no. 6, 2010.
- [18] J. Choukroun & A. Fabien, Christian Schoeffler, and A. P. R. F. Vervelle. "Une opportunité en parodontologie: le PRF", *Implantodontie*, vol. 42, no. 55, 2001.
- [19] Y. K. Hsu, S. Y. Sheu, C. Y. Wang, M. H. Chuang, P. C. Chung, Y. S. Luo, J. J. Huang, F. Ohashi, H. Akiyoshi & T. F. Kuo, "The effect of adipose-derived mesenchymal stem cells and chondrocytes with platelet-rich fibrin releasates augmentation by intra-articular injection on acute osteochondral defects in a rabbit model", *The Knee*, vol. 25, no. 6, 2018.
- [20] V. Gassling, J. Hedderich, Y. Açil, N. Purcz, J. Wiltfang & T. Douglas, "Comparison of platelet rich fibrin and collagen as osteoblast-seeded scaffolds for bone tissue engineering applications", *Clinical Oral Implants Research*, vol. 24, no. 3, 2013.
- [21] Y. W. Eom, J. E. Oh, Lee, S. K. Baik, K. J. Rhee, H. C. Shin, Y. M. Kim, C. M. Ahn, J. H. Kong, H. S. Kim K. Y. Shim, "The role of growth factors in maintenance of stemness in bone marrow-derived mesenchymal stem cells", *Biochemical and biophysical research communications*, vol. 445, no.1, 2014.
- [22] L. Ding, S. Tang, P. Liang, C. Wang, P. F. Zhou & L. Zheng, "Bone regeneration of canine peri-implant defects using cell sheets of adipose-derived mesenchymal stem cells and platelet-rich fibrin membranes", *Journal of Oral and Maxillofacial Surgery*, vol. 77, no. 3, 2019.
- [23] Y. J. Jee, "Use of platelet-rich fibrin and natural bone regeneration in regenerative surgery", *Journal of the Korean Association of Oral and Maxillofacial Surgeons*, vol. 45, no. 3, 2019.
- [24] C. Wang, K. W. Yan, Y. D. Lin & P. C. Hsieh, "Biodegradable core/shell fibers by coaxial electrospinning: processing, fiber characterization, and its application in sustained drug release", *Macromolecules*, vol. 43, no. 15, 2010.
- delivery", *Materials Science and Engineering: C*, vol. 113, 2020.
- [8] P. Chen, L. Liu, J. Pan, J. Mei, C. Li & Y. Zheng, "Biomimetic composite scaffold of hydroxyapatite/gelatin-chitosan core-shell nanofibers for bone tissue engineering", *Materials Science and Engineering: C*, vol. 97, 2019.
- [9] J. Baek, E. Lee, M. K. Lotz & F. D D'Lima, "Bioactive proteins delivery through core-shell nanofibers for meniscal tissue regeneration", *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine*, vol. 23, 2020.
- [10] N. R. Tanha & M. Nouri, "Core/Shell Nanofibers of Silk Fibroin/Polyvinyl Alcohol: Structure and Controlled Release Behavior", *Iran. J. Polym. Sci. Technol.(Persian)*, vol. 30, 2018.
- [11] M. Matinfar, A. S. Mesgar & Z. Mohammadi, "Evaluation of physicochemical, mechanical and biological properties of chitosan/carboxymethyl cellulose reinforced with multiphasic calcium phosphate whisker-like fibers for bone tissue engineering", *Materials Science and Engineering: C*, vol. 100, 2019.
- [12] T. Mohan, S. Hribernik, R. Kargl & K. Stana-Kleinschek, "Nanocellulosic materials in tissue engineering applications Cellulose—fundamental aspects and current trends", Rijeka: InTech; 2015.
- [13] R. Sedghi & A. Shaabani, "Electrospun biocompatible core/shell polymer-free core structure nanofibers with superior antimicrobial potency against multi drug resistance organisms", *Polymer*, vol. 101, 2016.
- [14] M. Kong, X. G. Chen, K. Xing & H. J. Park, "Antimicrobial properties of chitosan and mode of action: a state of the art review", *International journal of food microbiology*, vol. 144, no. 1, 2010.
- [15] ن. کوپائی و ا. کارخانه، "بررسی خصوصیات مکانیکی و بیولوژیکی داربست مهندسی بافت بر پایه پلی کاپرولاکتون عامل دار و پلی اتیلن گلایکول دی آکریلات تقویت شده با ذرات هیدروکسی آپاتیت"، *فرآیندهای نوین در مهندسی مواد (مهندسی مواد مجلسی)*، دوره ۱۲، پاییز ۱۳۹۷.
- [16] P. X. Ma & R. Zhang, "Synthetic nano-scale fibrous extracellular matrix", *Journal of Biomedical Materials Research: An Official Journal of The Society for Biomaterials, The Japanese Society for*

- [34] C. H. Kiernan, E. B. Wolvius, P. A. Brama & E. Farrell, "The immune response to allogeneic differentiated mesenchymal stem cells in the context of bone tissue engineering", *Tissue Engineering Part B: Reviews*, vol. 24, no. 1, 2018.
- [35] R. Najafi-Taher, M. A. Derakhshan, R. Faridi-Majidi & A. Amani, "Preparation of an ascorbic acid/PVA-chitosan electrospun mat: a core/shell transdermal delivery system", *RSC Advances*, vol. 5, no. 62, 2015.
- [36] D. M. Dos Santos, P. A. Chagas, I. S. Leite, N. M. Inada, S. R. De Annunzio, C. R. Fontana, S. P. Campana-Filho & D. S. Correa, "Core-sheath nanostructured chitosan-based nonwovens as a potential drug delivery system for periodontitis treatment", *International journal of biological macromolecules*, vol. 142, 2020.
- [37] F. M. Ghorbani, B. Kaffashi, P. Shokrollahi, E. Seyedjafari & A. Ardashirylajimi, "PCL/chitosan/Zn-doped nHA electrospun nanocomposite scaffold promotes adipose derived stem cells adhesion and proliferation", *Carbohydrate polymers*, vol. 118, 2015.
- [38] S. Surucu & H. T. Sasmazel, "Development of core-shell coaxially electrospun composite PCL/chitosan scaffolds", *International journal of biological macromolecules*, vol. 92, 2016.
- [39] T. T. T. Nguyen, O. H. Chung & J. PS. Park, "Coaxial electrospun poly (lactic acid)/chitosan (core/shell) composite nanofibers and their antibacterial activity", *Carbohydrate Polymers*, vol. 86, no. 4, 2011.
- [40] K. Fujihara, W. E. Teo, T. C. Lim, S. Ramakrishna & Z. "An introduction to electrospinning and nanofibers", National University of Singapore, USA, 2005.
- [41] J. Tang, Y. Liu, B. Zhu, Y. Su & X. Zhu, "Preparation of paclitaxel/chitosan co-assembled core-shell nanofibers for drug-eluting stent", *Applied Surface Science*, vol. 393, 2017.
- [42] J. L. Lowery, N. Datta & G. C. Rutledge, "Effect of fiber diameter, pore size and seeding method on growth of human dermal fibroblasts in electrospun poly (ϵ -caprolactone) fibrous mats", *Biomaterials*, vol. 31, no. 3, 2010.
- [43] J. M. Deitzel, J. Kleinmeyer, D. E. A. Harris & N. B. Tan, "The effect of processing variables on the
- [25] F. Chen, X. Li, X. Mo, C. He, H. Wang & Y. Ikada, "Electrospun chitosan-P (LLA-CL) nanofibers for biomimetic extracellular matrix", *Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition*, vol. 19, no. 5, 2008.
- [26] K. Jalaja, D. Naskar, S. C. Kundu & N. R. James, "Potential of electrospun core-shell structured gelatin-chitosan nanofibers for biomedical applications", *Carbohydrate polymers*, vol. 136, 2016.
- [27] W. Yang, J. Fu, D. Wang, T. Wang, H. Wang, S. Jin & N. He, "Study on chitosan/polycaprolactone blending vascular scaffolds by electrospinning", *Journal of Biomedical Nanotechnology*, vol. 6, no. 3, 2010.
- [29] A. L. Yarin, "Coaxial electrospinning and emulsion electrospinning of core-shell fibers", *Polymers for Advanced Technologies*, vol. 22, no. 3, 2011.
- [28] A. L. Yarin, "Coaxial electrospinning and emulsion electrospinning of core-shell fibers", *Polymers for Advanced Technologies*, vol. 22, no. 3, 2011.
- [29] O. Gryshkov, N. I. Klyui, V. P. Temchenko, V. S. Kyselov, A. Chatterjee, A. E. Belyaev, L. Lauterboeck, D. Iarmolenko B. Glasmacher, "Porous biomorphic silicon carbide ceramics coated with hydroxyapatite as prospective materials for bone implants", *Materials Science and Engineering: C*, vol. 68, 2016.
- [30] M. Mirhaj, M. Mahmoodi & A. Shybani, "Effect of Hydroxyapatite Nanoparticles on Properties of Keratin/Poly Caprolactone Nanofibers for Tissue Engineering", *Journal of Advanced Materials in Engineering (Esteghlal)*, vol. 36, no. 4, 2018.
- [31] N. P. Rijal, U. Adhikari, S. Khanal, D. Pai, J. Sankar & N. Bhattarai, "Magnesium oxide-poly (ϵ -caprolactone)-chitosan-based composite nanofiber for tissue engineering applications", *Materials Science and Engineering: B*, vol. 228, 2018.
- [32] M. Wu, G. Chen & Y. P. Li, "TGF- β and BMP signaling in osteoblast, skeletal development, and bone formation, homeostasis and disease", *Bone research*, vol. 4, 2016.
- [33] J. A. Siddiqui & N.C. Partridge, "Physiological bone remodeling: systemic regulation and growth factor involvement", *Physiology*, vol. 31, no. 3, 2016.

[52] Z. Wang, L. Han, T. Sun, W. Wang, X. Li & B. Wu, "Preparation and effect of lyophilized platelet-rich fibrin on the osteogenic potential of bone marrow mesenchymal stem cells in vitro and in vivo." *Heliyon*, vol. 5, no.10, pp. 2739, 2019

[53] J. S. Kim, M. H. Jeong, J. H. Jo, S. G. Kim & J. S. Oh, "Clinical application of platelet-rich fibrin by the application of the double J technique during implant placement in alveolar bone defect areas", *Implant dentistry*, vol. 22, no. 3, 2013.

۶- پی نوشت

[] Osteoconductive

[2] Osteoinductive

[3] Polycaprolactone

[4] Platelet-Rich Fibrin

[5] Choukroun

[6] Platelet-Derived Growth Factor

[7] Insulin-like Growth Factor

[8] Transforming Growth Factor β 1

[9] Vascular endothelial growth factor

[10] Dimethylolxalylglycine

[11] Potassium Bromide

[12] Bone Morphogenetic Protein

[13] Fibroblast Growth Factors

[14] Osteogenic Growth Peptide

morphology of electrospun nanofibers and textiles", *Polymer*, vol. 42, no. 1, 2001.

[44] M. Gong, C. Huang, Y. Huang, G. Li, C. Chi, J. Ye, W. Xie, R. Shi & L. Zhang, "Core-sheath micro/nano fiber membrane with antibacterial and osteogenic dual functions as biomimetic artificial periosteum for bone regeneration applications", *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine*, vol. 17, 2019.

[45] R. Sedghi, M. Gholami, A. Shaabani, M. Saber & H. Niknejad, "Preparation of novel chitosan derivative nanofibers for prevention of breast cancer recurrence." *European Polymer Journal*, vol. 123, 2020.

[46] J. Liu, K. Yue, L. Xu, J. Wu, Z. Chen, L. Wang, W. Liu & W. Lu, "Bonding performance of melamine-urea-formaldehyde and phenol-resorcinol-formaldehyde adhesive glulams at elevated temperatures", *International Journal of Adhesion and Adhesives*, vol. 98, 2020.

[47] M. M. M. De-Paula, S. Afewerki, B. C. Viana, T. J. Webster, A. O. Lobo & F. R. Marciano, "Dual effective core-shell electrospun scaffolds: Promoting osteoblast maturation and reducing bacteria activity", *Materials Science and Engineering: C*, vol. 103, 2019.

[48] F. J. O'brien, "Biomaterials & scaffolds for tissue engineering", *Materials today*, vol. 14, no. 3, 2011.

[49] R. Ravichandran, J. R. Venugopal, S. Sundarrajan, S. Mukherjee, R. Sridhar & S. Ramakrishna, "Expression of cardiac proteins in neonatal cardiomyocytes on PGS/fibrinogen core/shell substrate for Cardiac tissue engineering." *International journal of cardiology*, vol. 167, no. 4, 2013.

[50] Y. Lu, J. Huang, G. Yu, R. Cardenas, S. Wei, E. K. Wujcik & Z. Guo, "Coaxial electrospun fibers: applications in drug delivery and tissue engineering", *Wiley Interdisciplinary Reviews: Nanomedicine and Nanobiotechnology*, 8.5, 2016.

[51] I. K. Kwon, S. Kidoaki & T. Matsuda, "Electrospun nano-to microfiber fabrics made of biodegradable copolyesters: structural characteristics, mechanical properties and cell adhesion potential", *Biomaterials*, vol. 26, no. 18, 2005.