

مقاله پژوهشی

بررسی پتانسیل داربست چاپ سه‌بعدی پلی‌کاپرولاکتون پوشش داده شده با بیوسرامیک‌ها در تکثیر و تمایز استخوانی سلول‌های بنیادی مزانشیمی بافت چربی انسانی

نسرین فاضلی^۱، احسان عارفیان^۲، شیوا ایرانی^۱، عبدالرضا اردشیری لاجیمی^۳، احسان سید جعفری اولیائی نژاد^{۴*}

۱- گروه زیست‌شناسی، دانشکده فناوری‌های همگرا، واحد علوم و تحقیقات، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران

۲- گروه میکروبیولوژی، دانشکده زیست‌شناسی، پردیس علوم، دانشگاه تهران، تهران، ایران

۳- مرکز تحقیقات سلول‌های بنیادی در مجاری ادراری و تناسلی، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، تهران، ایران

۴- گروه بیوتکنولوژی، پردیس علوم، دانشگاه تهران، تهران، ایران

*مسئول مکاتبات: seyedjafari@ut.ac.ir

تاریخ پذیرش: ۱۴۰۲/۰۲/۱۰

تاریخ دریافت: ۱۴۰۱/۱۲/۰۸

DOI: 10.22034/ascij.2023.1981349.1472

چکیده

در سال‌های اخیر، تمرکز تحقیقات در زمینه مهندسی بافت روی تهیه مواد و روش‌های آماده‌سازی داربست‌ها قرار دارد. چاپ سه‌بعدی، یک فناوری نوظهور است که می‌تواند با دقت و سرعت، داربست‌های مهندسی بافت استخوان را با اشکال و ساختارهای خاص آماده کند. از متداول‌ترین روش‌های چاپ سه‌بعدی، روش مدل‌سازی رسوب ذوب شده (FDM) است، مواد مورد استفاده در این روش پلیمرهایی مانند پلی‌کاپرولاکتون (PCL) می‌باشند. در این مطالعه داربست‌های چاپ سه‌بعدی PCL ساخته شدند و با توجه به طبیعت آب‌گریز و غیر استئوژنیک پلی‌کاپرولاکتون، سطح داربست‌ها با محلول ۱٪ از بیوسرامیک‌های هیدروکسی آپاتیت (HA) و شیشه زیست‌فعال (BG) پوشش داده شد. اصلاح سطح داربست‌های PCL جهت افزایش آب دوستی و بهبود چسبندگی سلولی صورت گرفت. تصاویر میکروسکوپ الکترونی، آنالیز طیف‌سنجی پراش انرژی پرتو X و نقشه برداری از عناصر سطح داربست‌ها، پوشش مناسب داربست‌های چاپ سه‌بعدی PCL با بیوسرامیک‌های هیدروکس آپاتیت و شیشه زیست‌فعال را تایید کرد. زیست‌سازگاری داربست PCL/HA/BG، زنده مانی و چسبندگی سلول‌ها بر روی داربست‌ها با کاشت سلول‌های بنیادی مزانشیمی چربی انسانی (hAMSCs) و به وسیله آزمون MTT و تصاویر میکروسکوپ الکترونی بررسی شد. همچنین پتانسیل داربست‌های PCL/HA/BG در تمایز استخوانی hAMSCs توسط آزمون‌های اندازه‌گیری فعالیت آلکالین فسفاتاز و رنگ‌آمیزی ایمونوسیتوشیمی بررسی شد. نتایج نشان داد که داربست سه‌جزئی PCL/HA/BG از رشد، تکثیر و تمایز استخوانی hAMSCs حمایت کرده است، بنابراین داربست مذکور می‌تواند کاندیدای مناسبی برای کاربردهای مهندسی بافت استخوان باشد.

کلمات کلیدی: مهندسی بافت استخوان، چاپ سه‌بعدی، پلی‌کاپرولاکتون، هیدروکسی آپاتیت، شیشه زیست‌فعال

مقدمه

استخوان قادر به ترمیم و بازسازی خودش در آسیب‌های کوچک می‌باشد اما پیوند مورد نیاز برای صدمات بزرگ استخوانی همراه با چالش‌های کلینیکی است (۹). در حال حاضر اصلی‌ترین پیوندهای استخوان شامل پیوندهای اتوگرفت، آلوگرفت و پیوند استخوان مصنوعی می‌باشد. در بین روش‌های فوق،

(۷، ۱۷، ۳۰). فن‌آوری‌های چاپ سه‌بعدی که در حال حاضر برای ساخت داربست‌های استخوانی استفاده می‌شوند شامل: Fused Deposition Modeling (FDM)، Stereolithography (SLA) و Electron Beam Melting (EBM) می‌باشند (۳۲). روش مدل-سازی رسوب ذوب شده (FDM) فناوری است که رشته‌ها یا گلوله‌های مواد در یک مخزن ذوب می‌شوند و مواد در همان زمان تحت کنترل یک کامپیوتر از طریق یک نازل سه‌بعدی با اطلاعات مشخص روی صفحه دستگاه قرار می‌گیرند. پس از سرد شدن سریع، یک لایه از سطح مقطع تشکیل می‌شود. پس از تشکیل لایه اول، صفحه دستگاه به اندازه ضخامت یک لایه پایین می‌آید، سپس لایه دوم تشکیل می‌شود و تا زمانی که داربست به طور کامل شکل گیرد، این روند ادامه دارد. مواد مورد استفاده در این روش، معمولاً پلیمرهایی با قابلیت انقباض حرارتی مانند پلی‌کاپرولاکتون، پلی‌آمید، پلی‌استر، پلی‌کربنات، پلی‌اتیلن و پلی‌پروپیلن و موارد مشابه می‌باشند (۱۵). روش مدل‌سازی رسوب ذوب شده به دلیل اینکه نیازی به حلال ندارد و داربستی با استحکام مکانیکی مناسب ایجاد می‌کند، به طور متداول در ساخت داربست‌های مهندسی بافت استخوان به کار می‌رود (۵). پلی‌کاپرولاکتون پلیمری مصنوعی و زیست‌تخریب‌پذیر است که به دلیل زیست‌سازگاری، پایداری، سهولت دست‌کاری و تایید سازمان غذا و داروی آمریکا (FDA) معمولاً در مهندسی بافت استخوان به کار می‌رود. با این حال طبیعت آب‌گریز و غیر استئوژنیک آن، چسبندگی و زیست‌فعالی سلولی را هنگام کاشت سلول کاهش می‌دهد (۳۳). اضافه کردن هیدروکسی آپاتیت به ماتریکس PCL، به عنوان یک رویکرد موثر در بهبود چسبندگی سلولی به دلیل افزایش آب دوستی مطابق

پیوند آلوگرفت و پیوند استخوان مصنوعی مستعد رد شدن از طرف سیستم ایمنی میزبان می‌باشند. در مقایسه با سایر منابع استخوانی، استخوان اتوگرفت ایده‌آل‌ترین ماده برای درمان آسیب‌های استخوانی است، اما منبع استخوان اتولوگ محدود است و نیاز به آسیب ثانویه به بیماران می‌باشد، بنابراین روش اتوگرفت نمی‌تواند نیازهای بالینی را برطرف کند (۲۰، ۲۳). مهندسی بافت ایده جدیدی برای این مشکل ارائه داده است. نقطه شروع اولیه مهندسی بافت استخوان دست‌یابی به ترمیم و بازسازی استخوان با استفاده از القای استئوژنز به جای استفاده از صرفاً جایگزین‌ها می‌باشد (۱۲). در مهندسی بافت استخوان، با این که روش‌های سنتی مانند الکترورسی، ریخته‌گری محلول و غیره به نتایج رضایت‌بخشی دست یافته‌اند، اما کنترل دقیق ساختار منافذ در روش‌های سنتی به دست نمی‌آید و همچنین شکل ساختاری آن را نمی‌توان با ساختار آناتومیکی نقص استخوان مطابقت داد، به طوری‌که آماده‌سازی ایمپلنت‌های شخصی‌سازی شده با روش‌های سنتی امکان‌پذیر نیست (۱۴، ۲۷). در سال‌های اخیر، با مطالعه عمیق مهندسی بافت استخوان، تمرکز تحقیقات روی تهیه مواد داربست‌ها و روش‌های آماده‌سازی آنها قرار گرفته است. تکنولوژی چاپ سه‌بعدی می‌تواند این کمبودها را جبران کند، بنابراین به طور سریع برای ساخت داربست گسترش یافته است. اولین فناوری چاپ سه‌بعدی توسط Emanuel Sachs از MIT در سال ۱۹۸۹ به عنوان نوعی فناوری نمونه‌سازی سریع گزارش شد. در حال حاضر تحقیق روی فناوری چاپ سه‌بعدی در درمان نقایص استخوانی نتایج خوبی را به همراه داشته است (۲۸). داربست‌های استخوانی که با فناوری چاپ سه‌بعدی تهیه شده‌اند می‌توانند ساختار آناتومی استخوان را بازبایی کنند و داربستی با منافذ کنترل شده ایجاد کنند

و شیشه زیست‌فعال صورت گرفت. پتانسیل داربست‌های PCL/HA/BG در رشد، چسبندگی و تمایز سلول‌های بنیادی مزانشیمی چربی انسانی با تصاویر میکروسکوپ الکترونی و آزمون‌های MTT، اندازه‌گیری فعالیت آنزیم آلکالین فسفاتاز و میزان بیان استئوکلسین بررسی شد.

مواد و روش‌ها

چاپ سه‌بعدی داربست: در این تحقیق از دستگاه چاپ سه‌بعدی (Omid Afarinan Mohandesi) Repetier (Ayande, Bio FabX2, Iran) و نرم‌افزار Repetier Host V2.1.3, 2011_2018 برای ساخت داربست‌ها استفاده شد. گلوله‌های جامد PCL (Sigma, Aldrich, Germany) درون محفظه دستگاه ریخته و ذوب شدند و به‌صورت یک رشته با قطر ثابت جهت چاپ سه‌بعدی با روش FDM از نازل خارج شدند. رشته‌های پلیمر به‌صورت لایه لایه با جهت‌گیری ۹۰ درجه نسبت به لایه قبلی جهت ساخت داربست با منافذ کنترل‌شده، روی صفحه دستگاه قرار گرفتند. داربست‌های چهار لایه و دایره‌ای شکل به ابعاد (ارتفاع) ۰/۸ - (قطر) ۱۵ میلی‌متر با مشخصات زیر ساخته شدند: قطر نازل ۰/۵ میلی‌متر، ضخامت هر لایه ۰/۲ میلی‌متر، فاصله بین هر دو رشته ۰/۳ میلی‌متر و سرعت چاپ ۲ میلی‌متر/ثانیه و دمای چاپ ۱۱۰°C تنظیم شد (شکل ۱).

اصلاح سطح داربست‌ها: برای افزایش آب‌دوستی سطح داربست‌های PCL، تیمار پلاسما به‌وسیله یک دستگاه تولیدکننده پلاسما (Diener Electronics, Nagold, Germany) با فرکانس ۹۰GHz انجام شد. گاز اکسیژن خالص با فشار ۰/۱mbar به داخل محفظه واکنش به مدت ۳ دقیقه هدایت شد. سپس محلول ۱٪ از ذرات هیدروکسی آپاتیت (NikCeram Razi, Iran) و شیشه زیست‌فعال (NikCeram Razi, Iran) در آب

با تحقیقات گذشته، در نظر گرفته می‌شود (۱۵، ۲۹). پلی کاپرولاکتون همچنین در ترکیب با ذرات هیدروکسی آپاتیت به‌عنوان ماتریکس چاپ سه‌بعدی برای آماده‌سازی داربست استفاده می‌شود، در این نوع داربست، PCL باعث انعطاف‌پذیری و هیدروکسی آپاتیت استحکام و زیست‌فعالی داربست را فراهم می‌کند. اگرچه که سیستم ترکیبی پلی کاپرولاکتون/هیدروکسی آپاتیت دارای کمبودهایی است (۲۱). هیدروکسی آپاتیت با فرمول $(Ca_5(PO_4)_3(OH))$ به‌عنوان جز اصلی معدنی طبیعی استخوان است و خصوصیات زیست‌فعالی عالی، زیست‌سازگاری، هدایت استخوانی، عدم سمیت و خصوصیات غیرالتهابی از خود نشان می‌دهد. هیدروکسی آپاتیت بسیار سخت است و نرخ تخریب آن در داخل بدن بسیار آهسته است و به همین دلیل همراه با پلیمرهای طبیعی و یا مصنوعی برای ساخت داربست استفاده می‌شود (۳۱). همچنین شیشه‌های زیست‌فعال به‌عنوان موادی با خاصیت هدایت‌کننده و القاکننده استخوان شناخته شده اند و به‌عنوان استاندارد طلایی در مهندسی بافت استخوان شناخته شده اند (۲۵). شیشه‌های زیست‌فعال بعد از قرار گرفتن در مایع بیولوژیکی، هیدروکسی آپاتیت زیست‌فعال تولید می‌کنند که به بافت‌های بیولوژیکی متصل شده و استخوان‌سازی را بهبود می‌بخشند. معایب شیشه زیست‌فعال، استحکام کم و شکنندگی آن است (۱۰). مطالعات زیست‌فعالی و زیست‌سازگاری در شرایط آزمایشگاهی، اثرات مفید شیشه‌های زیست‌فعال را در تمایز استخوانی سلول‌های بنیادی بافت چربی انسان نشان داده است (۴). در این مطالعه، داربست‌های چاپ سه‌بعدی پلی-کاپرولاکتون با روش مدل‌سازی رسوب ذوب شده (FDM) ساخته شد. سپس اصلاح سطح داربست‌های پلی کاپرولاکتون با بیوسرامیک‌های هیدروکسی آپاتیت

آبگیری و سپس خشک شدند. در نهایت نمونه‌ها با ۲۰A طلا پوشش داده شده و با میکروسکوپ الکترونی روبشی (FEI ESEM QUANTA 200, USA) در ولتاژ ۲۵ KV مشاهده و تصویربرداری شدند.

ارزیابی زیست‌سازگاری داربست‌ها : سمیت داربست چاپ سه‌بعدی PCL/HA/BG در مقایسه با گروه کنترل (TCPs) با کشت سلول‌های بنیادی مزانشیمی چربی انسانی به وسیله آزمون MTT ارزیابی شد. محلول بافر MTT تحت تأثیر آنزیم‌های دهیدروژناز موجود در میتوکندری سلول‌های زنده احیاء شده و به فورمازون نامحلول بنفش‌رنگ تبدیل می‌گردد، این ترکیب در DMSO محلول می‌شود. از آنجایی که سلول‌های مرده قادر به تبدیل MTT به فورمازون نیستند، سطح فورمازان ایجاد شده متناسب با تعداد سلول‌های زنده می‌باشد. شدت رنگ ایجاد شده توسط یک آزمون رنگ‌سنجی ساده توسط الیزا ریدر خوانده می‌شود. برای انجام این آزمون، داربست‌های استریل شده در پلیت‌های کشت ۲۴ خانه قرار داده شدند و با تعداد $10^4 * 2$ سلول در هر سانتیمتر مربع کاشت شدند. در گروه کنترل سلول‌ها روی کف پلیت بدون داربست کشت شدند. سلول‌ها در شرایط 37°C و CO_2 ۵ درصد انکوبه شدند. محلول MTT (۵ ml) (Sigma, USA) (mg/ml in DMEM) به هر خانه، بعد از ۱، ۴ و ۷ روز بعد از کاشت سلول، اضافه شد. هر پلیت به مدت ۳ ساعت در 37°C انکوبه شد تا محلول MTT توسط آنزیم دهیدروژناز میتوکندریایی سلول‌های زنده به کریستال‌های فرمازان تبدیل شود. مایع رویی حذف شد و مقدار ۲ ml DMSO (Merck, USA) جهت تجزیه آبی تیره فرمازان داخل سلولی اضافه شد. برای سلول‌های کشت شده در TCPs نیز روش مشابه بکار برده شد. نتایج OD با استفاده از یک اسپکتروفوتومتر (Biotek Instruments, USA) در طول موج ۵۷۰ nm خوانده

دو بار یونیزه شده، تهیه شد، برای انحلال بیشتر نانوذرات، محلول به مدت ۲۰ دقیقه در حمام اولتراسونیک (Woson, china) در دمای 37°C قرار گرفت. داربست‌های پلازما شده به مدت چندین روز در محلول ۱٪ هیدروکسی آپاتیت و شیشه زیست فعال غوطه‌ور شدند تا ذرات بیوسرامیک روی سطح داربست‌ها کاملاً رسوب کنند. در نهایت پس از خشک شدن، داربست‌های PCL/HA/BG آماده شدند که بعد از استریل شدن با UV و اتانول، جهت انجام آزمایشات در مقایسه با گروه کنترل (بدون داربست) استفاده شدند.

مشخصه‌یابی داربست‌ها: به منظور بررسی مورفولوژی سطح داربست‌ها، نمونه داربست PCL/HA/BG با طلا به ضخامت ۹ nm پوشش داده شد. از میکروسکوپ الکترونی روبشی (FeSEM, Mira3, Tescan, Czech Republic) جهت مشاهده مورفولوژی سطح داربست و نانوذرات هیدروکسی آپاتیت و شیشه زیست‌فعال در سطح داربست در بزرگنمایی‌های مختلف با یک ولتاژ شتاب‌دهنده ۱۵ kV استفاده شد. همچنین بررسی عناصر سطح داربست با آنالیز طیف پراش انرژی پرتو X (EDS) و نقشه‌یابی عناصر موجود در داربست PCL/HA/BG به وسیله میکروسکوپ الکترونی صورت گرفت.

بررسی چسبندگی سلولی داربست‌ها: برای مطالعه چسبندگی سلول‌ها روی داربست‌های چاپ سه‌بعدی PCL/HA/BG، آن‌ها با تعداد $10^4 * 2$ سلول بنیادی مزانشیمی بافت چربی انسانی در هر سانتی‌متر مربع کشت شدند. در روزهای ۷ و ۱۴ بعد از کاشت سلول، ساختارهای داربست/سلول با گلو تار آلدئید (۲/۵ (w/v) (Merck, USA) ثابت شدند و بعد چندین بار با PBS شستشو داده شدند. پس از آن نمونه‌ها با یک سری شیب افزایش غلظت اتانول

شد. ساعت در انکوباتور گذاشته شدند. از هر ویال ۱۰۰ لاندا به پلیت‌های ۹۶ خانه منتقل شد و در نهایت جذب نوری نمونه‌ها در طول موج ۴۰۵ نانومتر (Biotek Instrument, USA) خوانده شد.

ایمونوسیتوشیمی: به منظور بررسی پروتئین استنوکلکسین در سلول، ایمونوسیتوشیمی انجام شد. ابتدا تعداد 10^4 * ۲ سلول روی داربست‌های PCL/HA/BG و TCPs (کنترل) کشت شدند. پس از ۲۱ روز از دوره تمایزی نمونه‌ها جهت آزمون ایمونوسیتوشیمی آماده شدند. ابتدا سلول‌ها در دمای یخچال به مدت ۲۰ دقیقه با پارافرمالدئید ۴٪ (Merck, USA) ثابت شدند و سپس در دمای اتاق به مدت ۵ دقیقه قرار گرفتند. سلول‌ها با PBS شستشو داده شدند و به مدت ۳۰ دقیقه در تربتون (X-100) ۰/۳ قرار داده شدند. تربتون غشای سلولی را به آنتی‌بادی‌ها نفوذپذیر می‌کند. سرم بز ۱۰٪ به مدت نیم ساعت اضافه شد. پروتئین‌های سرم بز باعث می‌شود محل‌های غیراختصاصی آنتی‌ژن پوشیده شود و مانع واکنش‌های غیراختصاصی می‌شود. سلول‌ها به مدت یک‌شب در آنتی‌بادی اولیه (Biorbyte, UK) رقیق شده به نسبت ۱ به ۱۰۰ PBS و دمای ۴ درجه قرار گرفتند. سپس به مدت یک ساعت در معرض آنتی‌بادی ثانویه (Biorbyte, UK) با رقت ۱ به ۲۰۰ PBS، در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد و در تاریکی قرار گرفتند. در نهایت پس از سه بار شستشو با PBS، با میکروسکوپ فلورسنت (LABOMED, USA) مشاهده شدند.

آنالیز آماری: آزمایشات این تحقیق به صورت سه بار تکرار انجام شد و نتایج با نرم‌افزار GraphPad Prism، 8.4.3 و Two Way ANOVA آنالیز شدند. میزان معنی داری $p < 0/05$ در نظر گرفته شد.

تمایز استخوانی سلول‌های بنیادی: توانایی القای تمایز استخوانی داربست‌های چاپ سه‌بعدی PCL/HA/BG با کشت سلول‌های hMSCs با تراکم 10^4 * ۲ سلول در هر میلی‌متر مربع تحت شرایط محیط استئوژنیک (محیط کشت DMEM, FBS ۱۰ درصد، دگزامتازون ۷-۱۰ مولار، بتاگلیسروفسفات ۱۰ میلی‌مولار، اسید آسکوربیک ۰/۲ میلی‌مولار) به مدت ۲۱ روز صورت گرفت.

اندازه‌گیری فعالیت آلكالین فسفاتاز: در آزمایش‌های مهندسی بافت استخوان، اندازه‌گیری میزان آلكالین فسفاتاز، پیش‌بینی‌کننده خوبی برای میزان معدنی شدن بافت جدید است. برای بررسی فعالیت آلكالین فسفاتاز، با استفاده از بافر ریپا، کل پروتئین‌های سلول‌های بنیادی کشت‌شده روی TCPها و داربست‌های PCL/HA/BG در روزهای ۷، ۱۴ و ۲۱ طی دوره تمایزی استخراج شدند. ابتدا محیط کشت از پلیت‌ها خارج شد و داربست‌ها به میکروتیوپ‌ها منتقل شدند و سپس به هر کدام ۲۰۰ میکرولیتر بافر PIPA (Sigma, USA) اضافه شد. چاهک مربوط به TCP (کنترل بدون داربست) از محیط کشت خالی شد و به آن محلول ریپا اضافه شد و با نوک سمپلر سلول‌های چسبیده به کف پلیت جدا شدند. سوسپانسیون سلولی به میکروتیوپ جداگانه منتقل شد. میکروتیوپ‌ها هر کدام به مدت ۲ دقیقه ورتکس و سپس به مدت ۵ دقیقه با دور ۱۲۰۰ g سانتریفوژ شدند. مایع رویی جدا شد و مطابق دستورالعمل کیت پارس آزمون (Pars Azmun, Iran) محلول‌ها آماده شدند. در میکروتیوپ‌های کوچک ۵۰۰ μl از معرفتی که تهیه شد و ۲۰ لاندا از سوسپانسیون سلولی ریخته شد. میکروتیوپ‌ها با فویل پوشیده شدند و به مدت ۳



شکل ۱- داربست چاپ سه‌بعدی پلی‌کاپرولاکتون با ابعاد ۱۵ * ۰/۸ میلی‌متر

نتایج

اکسیژن، سدیم، سیلیس، فسفات و کلسیم را در داربست PCL/HA/BG نشان داد و اصلاح سطح داربست با هیدروکسی آپاتیت و شیشه زیست‌فعال تایید کرد (شکل ۲ ه). درصد وزنی عناصر موجود در داربست مذکور در جدول ۱ آمده است.

بررسی چسبندگی سلولی روی داربست: مورفولوژی و چسبندگی hAMSCs روی داربست PCL/HA/BG در روزهای هفتم و چهاردهم بعد از کاشت سلول‌ها روی داربست، نشان داد که داربست PCL/HA/BG از رشد و چسبندگی سلول‌ها حمایت کرده است (شکل ۴).

بررسی بقای سلولی: از آزمون MTT جهت بررسی بقای سلول‌ها روی داربست PCL/HA/BG و عدم سمیت داربست مذکور برای رشد سلول‌های hMSCs استفاده شد. نتایج نشان دهنده حفظ بقای سلول‌ها تا روز هفتم بود. بنابراین عدم سمیت داربست PCL/HA/BG و زنده ماندن سلول‌ها تا روز هفتم پس از کشت سلول روی داربست تایید شد (شکل ۵).

بررسی فعالیت آنزیم آلکالین فسفاتاز (ALP): فعالیت آنزیم ALP، یکی از مهم‌ترین نشانگرهای

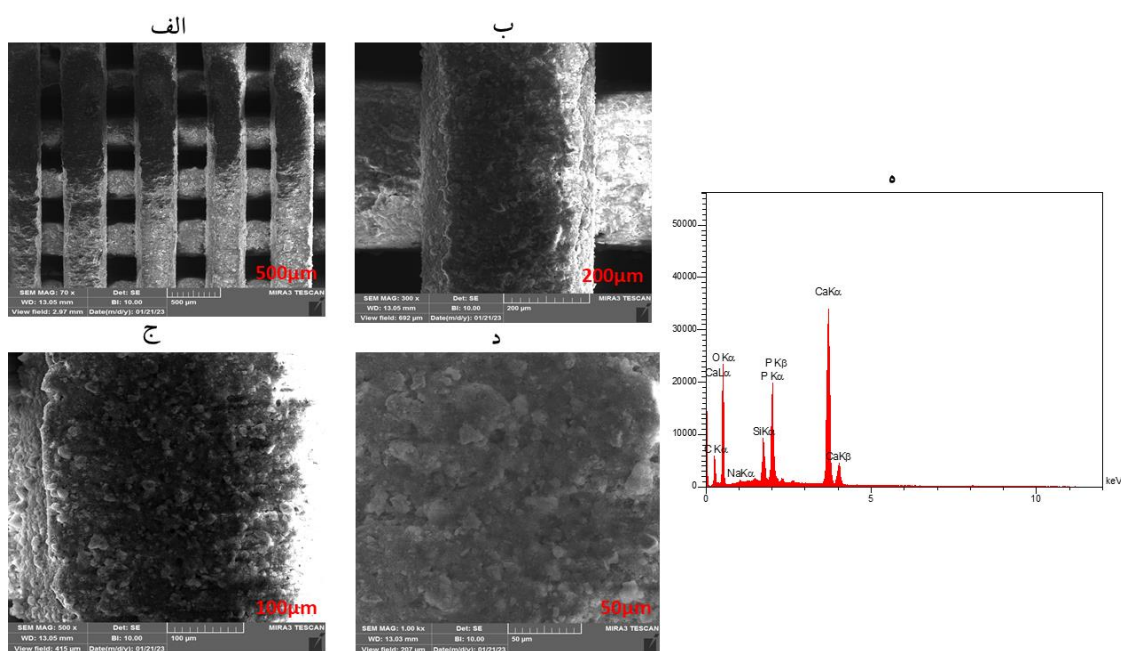
مشخصه‌یابی داربست: مورفولوژی سطح داربست PCL/HA/BG توسط FeSEM تصویربرداری و آنالیز شد (شکل ۲: الف-د). داربست PCL/HA/BG در مقیاس نانو دارای سطحی ناهموار بود که نشان دهنده پوشش داربست چاپ سه‌بعدی PCL با بیوسرامیک‌های هیدروکسی آپاتیت و شیشه زیست‌فعال بود. در بزرگنمایی کم، لایه‌های منظم و تراز شده داربست دیده شدند و در بزرگنمایی‌های بالا، مورفولوژی نانوذرات مشاهده شدند. آنالیز تصاویر نشان داد که در داربست PCL/HA/BG میانگین اندازه منافذ ۰/۲۶۹ میلی‌متر و میانگین اندازه لایه‌ها ۰/۳۵ میلی‌متر بود. همچنین نقشه‌یابی عناصر سطح داربست PCL/HA/BG با میکروسکوپ الکترونی، حضور عناصر مربوط به پلی‌کاپرولاکتون (C,O)، هیدروکسی آپاتیت (Ca,P) و عناصر مربوط به شیشه زیست‌فعال (Na,Si) را نشان داد. در نتیجه پوشش مناسب داربست پلی‌کاپرولاکتون با بیوسرامیک‌های هیدروکسی آپاتیت و شیشه زیست‌فعال تایید شد (شکل ۳: الف-ح). آنالیز طیف-سنجی پراش اشعه X (EDS)، حضور عناصر کربن،

ایمونوسیتوشیمی: به منظور تأیید بیان استئوکلسین در سطح پروتئین، آزمون ایمونوسیتوشیمی با استفاده از آنتی‌بادی استئوکلسین برای سلول‌های کشت شده روی داربست PCL/HA/BG و گروه کنترل بدون داربست در روز ۲۱ دوره تمایزی انجام شد. رنگ‌آمیزی استئوکلسین، بیان مثبت آن را در هر دو گروه مورد آزمایش نشان داد، اما در گروهی که سلول‌ها روی داربست چاپ سه‌بعدی PCL/HA/BG کشت شده بودند، درصد بیان بالاتری از استئوکلسین نسبت به کنترل مشاهده شد.

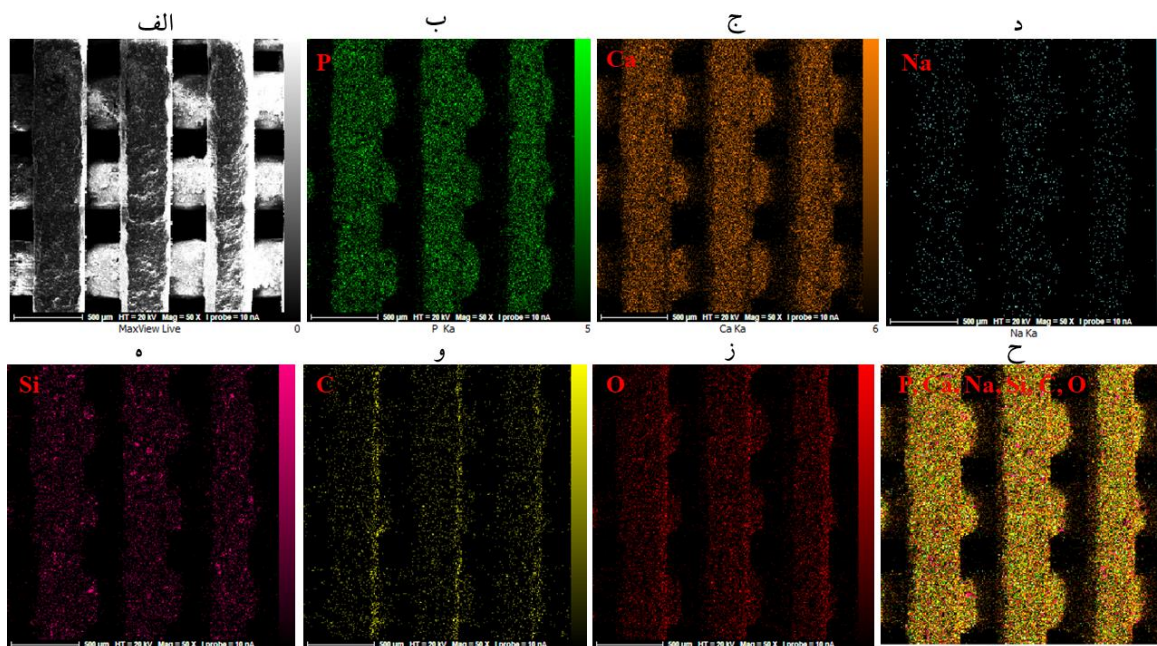
ابتدایی استئوژنیک است. بنابراین از سنجش فعالیت ALP برای ارزیابی توانایی استئوژنیک hMSCs در روزهای ۴، ۷، ۱۴ پس از القای تمایز استخوانی در داربست PCL/HA/BG و گروه کنترل استفاده شد. همان‌طور که در شکل ۶ مشاهده می‌شود، افزایش قابل‌توجهی در فعالیت این آنزیم در طول مدت آزمایش در سلول‌های کشت شده روی داربست در مقایسه با گروه کنترل مشاهده شد. در هر دوره زمانی میزان فعالیت این آنزیم در گروه PCL/HA/BG نسبت به گروه کنترل با اختلاف معنی‌داری بالاتر بود ($P < 0.001$).

جدول ۱: درصد وزنی عناصر موجود در داربست PCL/HA/BG (W%)

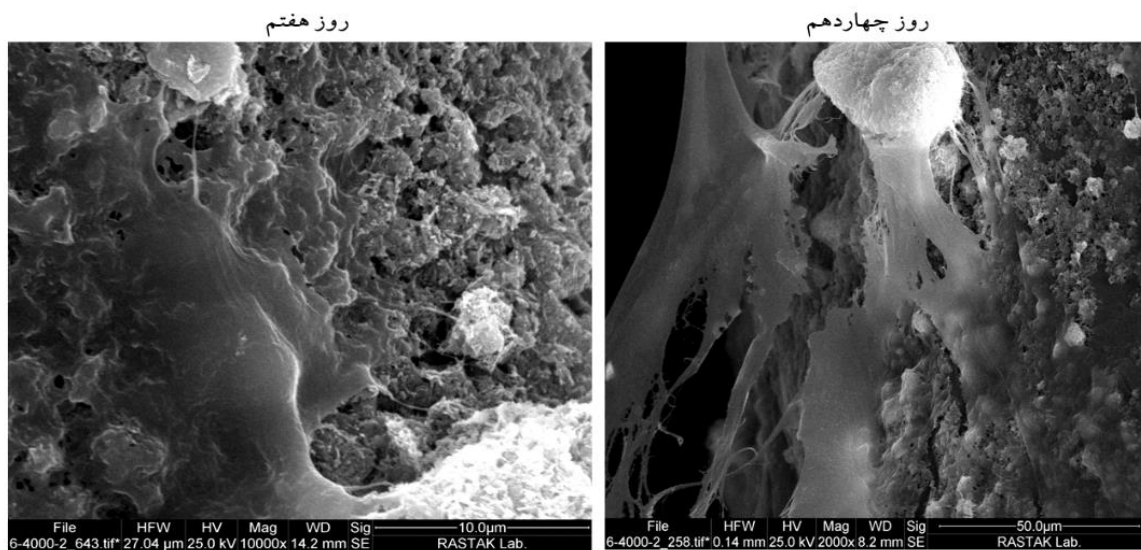
عناصر	Ca	P	Si	Na	O	C
درصد وزنی	25.29	۱۲/۸۹	۶/۳۰	۱/۹۸	۴۴/۷۵	۸/۷۹



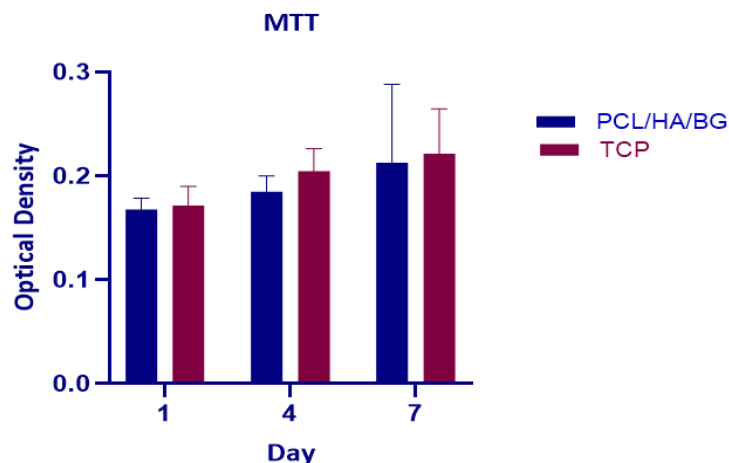
شکل ۲- تصاویر میکروسکوپ الکترونی (FeSEM) سطح داربست PCL/HA/BG با بزرگنمایی ۲۰۰ μm و ۵۰۰ μm (الف، ب). تصاویر نانوذرات در سطح داربست PCL/HA/BG با بزرگنمایی ۱۰۰ μm و ۵۰۰ μm (ج، د). آنالیز طیف سنجی پراش اشعه X (ه). نتایج، پوشش مناسب سطح داربست‌های PCL با HA و BG را ثابت کرد.



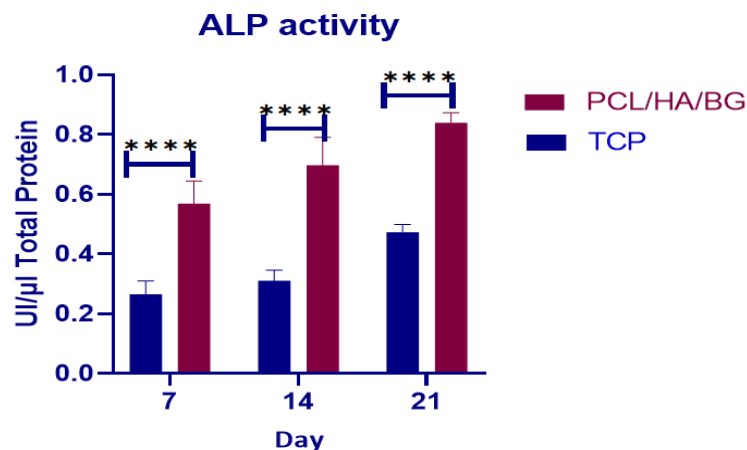
شکل ۳- تصاویر نقشه عناصر در سطح داربست PCL/HA/BG به وسیله میکروسکوپ الکترونی (FeSEM). الف: تصویر داربست PCL/HA/BG. ب-ز نقشه های عناصر P, Ca, Na, Si, C, O به ترتیب. ح: نقشه همه عناصر موجود. نتایج حضور عناصر مربوط به PCL, HA و BG را در سطح داربست PCL/HA/BG نشان داد.



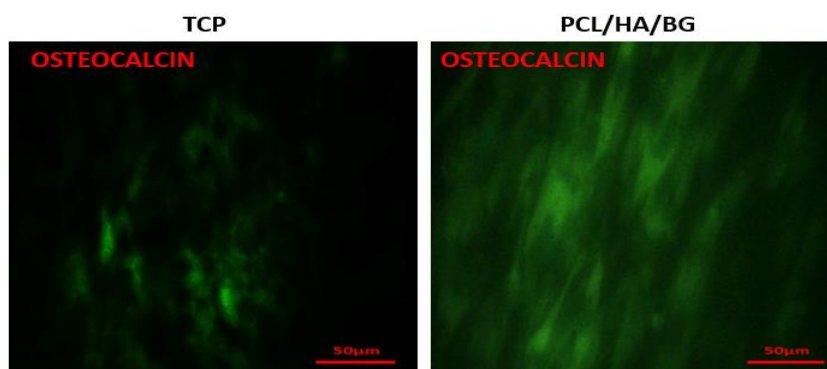
شکل ۴- چسبندگی سلول‌های hAMSCs روی داربست PCL/HA/BG در روز هفتم و چهاردهم پس از کاشت ۱۰۴ سلول. نتایج نشان داد که داربست PCL/HA/BG سطح مناسبی برای چسبندگی سلولی فراهم کرده است.



شکل ۵- نتایج حاصل از آزمون MTT در روزهای ۱، ۴، ۷ پس از کشت 10^4 * ۲ سلول، نتایج نشان داد که داربست PCL/HA/BG سمیتی برای سلول‌های hAMSCs نداشت



شکل ۶- بررسی فعالیت آلکالین فسفاتاز در روزهای ۱۴، ۷ و ۲۱ پس از القای تمایز استخوانی در داربست PCL/HA/BG و TCP (کنترل) با تراکم سلولی 10^4 * ۲. در هر دوره زمانی میزان فعالیت ALP در داربست PCL/HA/BG با اختلاف معنی داری بیشتر از گروه کنترل بود ($P < 0.001$). بیشترین میزان فعالیت آنزیم مربوط به سلول‌های کشت شده در داربست PCL/HA/BG و در روز ۲۱ بود.



شکل ۷- بررسی بیان استئوکلسین در گروه PCL/HA/BG و گروه TCPs (کنترل) در روز ۲۱ دوره تمایزی و پس از کشت 10^4 * ۲ سلول. نتایج درصد بیان بیشتری از استئوکلسین را در سلول‌های کشت شده روی داربست PCL/HA/BG نسبت به گروه کنترل نشان داد.

بحث

در مورد آن‌ها گزارش شده است (۲۴). اصلاح سطح داربست PCL با سرامیک‌های هیدروکسی آپاتیت (HA)، شیشه زیست‌فعال (BG)، تری کلسیم فسفات (TCP) و سیلیکات کلسیم (CS) به‌عنوان مواد زیستی بر پایه کلسیم، فسفات و سیلیکات قادر به ایجاد پیوند مستقیم با استخوان‌های بدن بعد از کاشت هستند. پوشش دادن سطح داربست با سرامیک‌های زیستی با اثر بر روی سلول‌ها، باعث بهبود استخوان زایی می‌شود (۱۶). تحقیقات کمی در زمینه اصلاح پس از ساخت داربست‌ها به‌وسیله بیوسرامیک‌ها انجام شده است. به‌عنوان مثال Jaidev و همکارانش در سال ۲۰۱۹، گزارشی در مورد اصلاح سطح داربست‌های چاپ سه‌بعدی پلی لاکتیک اسید با فسفات کلسیم ارائه دادند. یافته‌های آن‌ها نشان داد که داربست‌های پوشش داده‌شده با کلسیم-فسفات نسبت به داربست‌های بدون پوشش، تکثیر، چسبندگی و تمایز استخوانی سلول‌های بنیادی مزانشیمی را بهبود بخشیدند (۱۳).

هدف از این تحقیق، ساخت داربست‌های چاپ سه‌بعدی مناسب برای ترمیم و بازسازی استخوان بود. در این مطالعه، PCL به دلیل استحکام مکانیکی و زیست‌سازگاری به‌عنوان زیست مواد جهت چاپ داربست با الگوی $0/90^\circ$ و منافذ مربع انتخاب شد (۱۹، ۲۲). پس از چاپ داربست‌های PCL، اصلاح سطح داربست‌های چاپ سه‌بعدی با پوشش دادن آن‌ها با نانوذرات هیدروکسی آپاتیت و شیشه زیست‌فعال صورت گرفت. پتانسیل داربست PCL/HA/BG در حمایت از رشد و تمایز استخوانی سلول‌های بنیادی مزانشیمی چربی انسانی در مقایسه با TCP (سلول‌های افشاندۀ شده روی ناحیه پلاستیک و بدون داربست) به‌عنوان کنترل از نظر بیولوژیکی و شیمیایی مقایسه شد.

شکستگی استخوان به دلایل مختلفی مانند سن، بیماری‌های متابولیکی، تصادف و تروما اتفاق می‌افتد (۲۲). هدف مهندسی بافت استخوان، تولید یک بافت استخوان کاربردی در شرایط آزمایشگاه است. از بین اجزای مهندسی بافت که شامل سلول، داربست و فاکتور رشد می‌باشد، داربست از رشد، تکثیر و چسبندگی سلولی حمایت می‌کند (۲۴). یک داربست مهندسی بافت می‌بایست ریز محیطی مناسب برای سلول‌ها فراهم کند. منافذ داربست باعث انتشار و نفوذ گازها و مواد غذایی به لایه‌های عمقی‌تر داربست می‌شود و در کل زنده‌مانی سلول‌ها را افزایش می‌دهد (۲). در بین روش‌های مختلف ساخت داربست، روش چاپ سه‌بعدی به‌عنوان یک روش مفید در ساخت داربست‌های مهندسی بافت در نظر گرفته می‌شود. تکنیک چاپ سه‌بعدی به دلیل سهولت استفاده، کنترل دقیق فرآیند ساخت و تولید محصولات با شکل، ساختار و خواص منحصربه‌فرد در زمینه زیست پزشکی موردتوجه قرار گرفته است (۲۶). در بین انواع روش‌های چاپ سه‌بعدی، مزایایی مانند راحتی روند کار و قیمت پایین باعث شده که روش FDM که از رشته‌ها یا گلوله‌های PCL، PLA و سایر پلی‌استرهای زیست سازگار و زیست‌تخریب‌پذیر استفاده می‌شود، برای ساخت داربست‌های مهندسی بافت استخوان به کار رود (۱۱). PCL یکی از بیشترین پلیمرهایی است که مطالعه شده است و ثابت شده است که از سلول‌های استخوانی پشتیبانی می‌کند، همچنین به دلیل زیست‌سازگاری آن، از طرف FDA (سازمان غذا و داروی آمریکا) مورد تأیید قرار گرفته است. علیرغم امتیازات آن، زیست‌فعالیت استخوانی و افینیتی سلولی این پلیمر مصنوعی ضعیف است و بعضی مشکلات تخریب، مشکلات مکانیکی و محیط سلولی اسیدی

و زیست مواد موجود در داربست سمیتی برای سلول‌ها نداشتند. پلی کاپرولاکتون از طرف سازمان غذا و داروی امریکا به دلیل این که واکنش‌های التهابی کمی از خود نشان می‌دهد مورد تایید قرار گرفته است. همچنین هیدروکسی آپاتیت و شیشه زیست‌فعال به دلیل خاصیت آب دوستی از رشد و چسبندگی سلولی حمایت کردند. همان‌طور که در سال ۲۰۲۰، Mondal و همکارانش اثر چسبندگی و تکثیر سلول‌های MG-63 را روی داربست‌های PLA پوشش داده‌شده با هیدروکسی آپاتیت بررسی کردند و نتایج نشان‌دهنده این بود که داربست PLA/HA سطحی مناسب برای چسبندگی و تکثیر سلول‌ها را فراهم کرده است (۲۲). همچنین عدم سمیت شیشه زیست‌فعال و اثر موثر آن در رشد سلول در مطالعات گذشته تایید شده است (۱، ۸، ۲۵).

توانایی هدایت استخوانی داربست PCL/HA/BG با استفاده از آزمایشات بیوشیمیایی مورد بررسی قرار گرفت. آنزیم ALP، شاخصی برای فعالیت استئوبلاستیک می‌باشد که تمایز سلول‌های بنیادی به فنوتیپ استئوبلاست را نشان می‌دهد. با توجه به نتایج به دست آمده، از هفته اول آزمایش تا هفته سوم، فعالیت آنزیم ALP در هر دو گروه PCL/HA/BG و کنترل روند افزایشی داشته است ولی این افزایش در گروه PCL/HA/BG نسبت به کنترل بسیار بیشتر بوده است. نتایج نشان داد که بیشترین مقدار آنزیم آلکالین فسفاتاز مربوط به روز ۲۱ دوره تمایزی و در داربست PCL/HA/BG بود که با گروه کنترل اختلاف معنی داری داشت ($P < 0.001$). هیدروکسی آپاتیت با تقویت فعالیت آلکالین فسفاتاز باعث بهبود استخوان زایی می‌شود و همچنین شیشه‌های زیست‌فعال در مایع بیولوژیک با تولید لایه‌های هیدروکسی آپاتیت محرک استئوژنیز هستند. پس انتظار می‌رفت که سلول‌های کشت شده روی داربست PCL/HA/BG

تصاویر میکروسکوپ الکترونی از داربست PCL/HA/BG لایه‌های منظم و تراز شده داربست‌ها را نشان داد و مشخص شد که اصلاح سطح داربست‌ها با بیوسرامیک باعث بسته شدن منافذ داربست‌ها نشده است زیرا وجود منافذ در داربست از نقطه‌نظر کاربردهای زیست پزشکی بسیار مهم می‌باشد، همان‌طور که کومار و همکارانش ثابت کردند که داربست‌های چاپ سه‌بعدی با منافذ باز در مقایسه با سایر داربست‌های پلیمری مانند فوم و الیاف از نظر رشد یکنواخت سلول در ضخامت داربست مناسب‌تر هستند (۱۸). بنابراین با غوطه‌ور کردن داربست‌های PCL در محلول حاوی بیوسرامیک‌ها، ذرات سرامیکی به‌خوبی روی سطح داربست را پوشانده بودند. آنالیز EDS و نقشه یابی عناصر سطح داربست PCL/HA/BG نیز نشان داد که ذرات هیدروکسی آپاتیت و شیشه زیست‌فعال به‌خوبی روی سطح داربست پلی کاپرولاکتون را پوشانده بودند. کریمی و گروهش از روش غوطه‌وری برای اصلاح سطح داربست الکترورسی پلی لاکتیک اسید با بیوسرامیک‌ها استفاده کردند (۱۶).

در این مطالعه، اثر داربست PCL/HA/BG روی چسبندگی، تکثیر و زنده‌مانی سلول‌ها در چندین نقطه زمانی بعد از کاشت سلول‌ها روی داربست به‌وسیله FeSEM و آزمون MTT نسبت به گروه کنترل بدون داربست سنجیده شد. عکس‌برداری از طریق FeSEM، چسبندگی بسیار عالی سلول‌ها روی داربست PCL/HA/BG را نشان داد. در روزهای ۷ و ۱۴ بعد از کاشت، سلول‌ها به‌صورت یک‌لایه روی سطح داربست‌ها دیده شدند، سلول‌ها با یکدیگر و با سطح داربست تعامل داشتند و به داخل منافذ داربست PCL/HA/BG نفوذ کرده بودند. در حقیقت لایه هیدروکسی آپاتیت و شیشه زیست‌فعال روی سطح پلیمر از چسبندگی و رشد سلولی حمایت کرده بودند

Doostmohammadi A.; Seyedjafari, E.; Soleimani, M. 2015. Enhanced osteoconductivity of polyethersulphone nanofibres loaded with bioactive glass nanoparticles in in vitro and in vivo models. *Cell Prolif.*, 48(4):455-464.

2. Billiet, T.; Gevaert, E.; De Schryver, T.; Cornelissen, M.; Dubruel, P. 2014. The 3D printing of gelatin methacrylamide cell-laden tissue-engineered constructs with high cell viability. *Biomaterials*, 35(1):49-62.

3. Chocholata, P.; Kulda, V.; Babuska, V. 2019. Fabrication of scaffolds for bone-tissue regeneration. *Materials*, 12(4):568.

4. Distler, T.; Fournier, N.; Grünwald, A.; Polley, C.; Seitz, H.; Detsch, R.; Boccaccini, A. R. 2020. Polymer-bioactive glass composite filaments for 3D scaffold manufacturing by fused deposition modeling: fabrication and characterization. *Frontiers in bioengineering and biotechnology*, 8:552.

5. Du, X.; Fu, S.; Zhu, Y. 2018. 3D printing of ceramic-based scaffolds for bone tissue engineering: an overview. *Journal of Materials Chemistry B*, 6(27):4397-4412.

6. Ebrahimi, Z.; Irani, S.; Ardeshirylajimi, A.; Seyedjafari, E. 2022. Enhanced osteogenic differentiation of stem cells by 3D printed PCL scaffolds coated with collagen and hydroxyapatite. *Sci. Rep.*, 12(1):1-15.

7. Eltorai, A. E.; Nguyen, E.; Daniels, A. H. 2015. Three-dimensional printing in orthopedic surgery. *Orthopedics*, 38(11): 684-687.

8. Feng, X.; Wu, Y.; Bao, F.; Chen, X.; Gong, J. 2019. Comparison of 3D-printed mesoporous calcium silicate/polycaprolactone and mesoporous Bioactive glass/polycaprolactone scaffolds for bone regeneration. *Microporous Mesoporous Mater.*, 278: 348-353.

9. Gao, G.; Schilling, A. F.; Yonezawa,

نسبت به کنترل میزان بیشتری از این آنزیم را تولید کند (۳, ۱۰). این نتیجه با یک سری از تحقیقات گذشته مطابقت دارد. Ma و Feng در سال ۲۰۱۹ به طور جداگانه ثابت کردند که حضور هیدروکسی آپاتیت و شیشه زیست‌فعال باعث افزایش فعالیت آنزیم آلکالین فسفاتاز می‌شود (۸, ۲۱).

رنگ‌آمیزی ایمنی برای بررسی سطح بیان استئوکلسین در سلول‌های کشت‌شده روی سطح PCL/HA/BG در مقایسه با گروه کنترل انجام شد. استئوکلسین توسط استئوبلاست‌ها به‌عنوان یک نشانگر تبدیلی استئوبلاستیک تولید می‌شود. بنابراین سطح بیان بالاتر استئوکلسین در داربست PCL/HA/BG نسبت به کنترل نشان داد که داربست سه‌جزئی مذکور در استخوان‌سازی موفق عمل کرده است؛ بنابراین حضور نانوذرات بیوسرامیکی روی سطح داربست باعث افزایش بیان استئوکلسین در داربست PCL شده است هم چنان‌که زهرا ابراهیمی مشابه این افزایش را در بیان استئونکتین به دست آورد (۶).

نتیجه‌گیری

در این مطالعه، داربست چاپ سه‌بعدی بر پایه پلی کاپرولاکتون ساخته شد. اصلاح سطح داربست‌ها با محلول ۱٪ ذرات هیدروکسی آپاتیت و شیشه زیست‌فعال صورت گرفت. نتایج به دست آمده زیست‌سازگاری و عدم سمیت داربست PCL/HA/BG را جهت سلول‌های hAMSC تایید کرد. همچنین داربست مذکور تمایز استخوانی سلول‌های بنیادی را بهبود بخشیده بود. بنابراین داربست PCL/HA/BG می‌تواند برای کاربردهای کلینیکی پیشنهاد شود.

منابع

1. Ardeshirylajimi A.; Farhadian S.; Jamshidi Adegani F.; Mirzaei S.; Soufi Zomorrod, M.; Langroudi, L.;

- improved osteogenic differentiation of adipose tissue- derived mesenchymal stem cells. *Journal of Biomedical Materials Research Part A*, 107(6):1284-1293.
17. Kim, J. W.; Lee, Y.; Seo, J.; Park, J. H.; Seo, Y. M.; Kim, S. S.; Shon, H. C. 2018. Clinical experience with three-dimensional printing techniques in orthopedic trauma. *J. Orthop. Sci.*, 23(2):383-388.
18. Kumar, G.; Tison, C. K.; Chatterjee, K.; Pine, P. S.; McDaniel, J. H.; Salit, M. L.; Young, M. F.; Simon Jr, C. G. 2011. The determination of stem cell fate by 3D scaffold structures through the control of cell shape. *Biomaterials*, 32(35):9188-9196.
19. Lee, S. J.; Lee, D.; Yoon, T. R.; Kim, H. K.; Jo, H. H.; Park, J. S.; Lee, J. H.; Kim, W. D.; Kwon, I. K.; Park, S. A. 2016. Surface modification of 3D-printed porous scaffolds via mussel-inspired polydopamine and effective immobilization of rhBMP-2 to promote osteogenic differentiation for bone tissue engineering. *Acta Biomater.*, 40:182-191.
20. Li, C.; Liu, D.; Zhang, Z.; Wang, G.; Xu, N. 2013. Triple point-mutants of hypoxia-inducible factor-1 α accelerate in vivo angiogenesis in bone defect regions. *Cell Biochem. Biophys.*, 67:557-566.
21. Ma, J.; Lin, L.; Zuo, Y.; Zou, Q.; Ren, X.; Li, J.; Li, Y. 2019. Modification of 3D printed PCL scaffolds by PVAc and HA to enhance cytocompatibility and osteogenesis. *RSC advances*, 9(10):5338-5346.
22. Mondal, S.; Nguyen, T. P.; Hoang, G.; Manivasagan, P.; Kim, M. H.; Nam, S. Y.; Oh, J. 2020. Hydroxyapatite nano bioceramics optimized 3D printed poly lactic acid scaffold for bone tissue engineering application. *Ceram. Int.*, 46(3): 3443-3455.
23. Seebach, C.; Henrich, D.; Wilhelm, K.; Barker, J.; Marzi, I. 2012. Endothelial progenitor cells improve directly and indirectly early vascularization of T.; Wang, J.; Dai, G.; Cui, X. 2014. Bioactive nanoparticles stimulate bone tissue formation in bioprinted three-dimensional scaffold and human mesenchymal stem cells. *Biotechnol. J.*, 9 (10): 1304-1311.
10. Gerhardt, L.-C.; Boccaccini, A. R. 2010. Bioactive glass and glass-ceramic scaffolds for bone tissue engineering. *Materials*, 3 (7): 3867-3910.
11. Grémare, A.; Guduric, V.; Bareille, R.; Heroguez, V.; Latour, S.; L'heureux, N.; Fricain, J. C.; Catros, S.; Le Nihouannen, D. 2018. Characterization of printed PLA scaffolds for bone tissue engineering. *Journal of Biomedical Materials Research Part A*, 106(4):887-894.
12. Guarino, V.; Ambrosio, L. 2010. Temperature-driven processing techniques for manufacturing fully interconnected porous scaffolds in bone tissue engineering. *Proceedings of the Institution of Mechanical Engineers, Part H: Journal of Engineering in Medicine*, 224(12):1389-1400.
13. Jaidev, L.; Chatterjee, K. 2019. Surface functionalization of 3D printed polymer scaffolds to augment stem cell response. *Materials & Design*, 161: 44-54.
14. Jang, J.-H.; Castano, O.; Kim, H.-W. 2009. Electrospun materials as potential platforms for bone tissue engineering. *Adv. Drug Del. Rev.*, 61(12):1065-1083.
15. Jensen, J.; Rölfing, J. H. D.; Svend Le, D. Q.; Kristiansen, A. A.; Nygaard, J. V.; Hokland, L. B.; Bendtsen, M.; Kassem, M.; Lysdahl, H.; Bünger, C. E. 2014. Surface- modified functionalized polycaprolactone scaffolds for bone repair: In vitro and in vivo experiments. *Journal of biomedical materials research Part A*, 102(9):2993-3003.
16. Karimi, Z.; Seyedjafari, E.; Mahdavi, F. S.; Hashemi, S. M.; Khojasteh, A.; Kazemi, B.; Mohammadi- Yeganeh, S. 2019. Baghdadite nanoparticle- coated poly l- lactic acid (PLLA) ceramics scaffold

29. Wei, Q.; Wang, Y.; Chai, W.; Zhang, Y.; Chen, X. 2017. Molecular dynamics simulation and experimental study of the bonding properties of polymer binders in 3D powder printed hydroxyapatite bioceramic bone scaffolds. *Ceram. Int.*, 43(16):13702-13709.
30. Xie, L.; Chen, C.; Zhang, Y.; Zheng, W.; Chen, H.; Cai, L. 2018. Three-dimensional printing assisted ORIF versus conventional ORIF for tibial plateau fractures: A systematic review and meta-analysis. *International Journal of Surgery*, 57:35-44.
31. Yuan, Q.; Qin, C.; Wu, J.; Xu, A.; Zhang, Z.; Liao, J.; Lin, S.; Ren, X.; Zhang, P. 2016. Synthesis and characterization of Cerium-doped hydroxyapatite/polylactic acid composite coatings on metal substrates. *Materials Chemistry and Physics*, 182:365-371.
32. Zhang, Q.; Zhou, J.; Zhi, P.; Liu, L.; Liu, C.; Fang, A.; Zhang, Q. 2023. 3D printing method for bone tissue engineering scaffold. *Medicine in Novel Technology and Devices*: 100205.
33. Zimmerling, A.; Yazdanpanah, Z.; Cooper, D. M.; Johnston, J. D.; Chen, X. 2021. 3D printing PCL/nHA bone scaffolds: Exploring the influence of material synthesis techniques. *Biomaterials Research*, 25(1): 1-12.
- mesenchymal stem cell-driven bone regeneration in a critical bone defect in rats. *Cell Transplant.*, 21(8):1667-1677.
24. Shahin-Shamsabadi, A.; Hashemi, A.; Tahriri, M.; Bastami, F.; Salehi, M.; Abbas, F. M. 2018. Mechanical, material, and biological study of a PCL/bioactive glass bone scaffold: Importance of viscoelasticity. *Materials Science and Engineering: C*, 90: 280-288.
25. Sultan, S.; Thomas, N.; Varghese, M.; Dalvi, Y.; Joy, S.; Hall, S.; Mathew, A. P. 2022. The Design of 3D-Printed Polylactic Acid-Bioglass Composite Scaffold: A Potential Implant Material for Bone Tissue Engineering. *Molecules*, 27(21):7214.
26. Wang, C.; Huang, W.; Zhou, Y.; He, L.; He, Z.; Chen, Z.; He, X.; Tian, S.; Liao, J.; Lu, B. 2020. 3D printing of bone tissue engineering scaffolds. *Bioactive materials*, 5 (1):82-91.
27. Wang, Q.; Wang, Q.; Wan, C. 2012. Preparation and evaluation of a biomimetic scaffold with porosity gradients in vitro. *An. Acad. Bras. Cienc.*, 84:9-16.
28. Wang, X.; Yan, Y.; Pan, Y.; Xiong, Z.; Liu, H.; Cheng, J.; Liu, F.; Lin, F.; Wu, R.; Zhang, R. 2006. Generation of three-dimensional hepatocyte/gelatin structures with rapid prototyping system. *Tissue Eng.*, 12(1):83-90.

Evaluation of the Potential of 3D Printed Polycaprolactone Scaffolds Coated with Bioceramics in the Proliferation and Osteogenic Differentiation of Human Adipose Tissue-derived Mesenchymal Stem Cells

Nasrin Fazeli¹, Ehsan Arefian², Shiva Irani¹, Abdolreza Ardeshiri Lajimi³, Ehsan Seyed Jafari Oliai-Najad^{4*}

1- Department of Biology, Faculty of Convergent Technologies, Science and Research Unit, Islamic Azad University, Tehran, Iran

2- Department of Microbiology, Faculty of Biology, Science Campus, University of Tehran, Tehran, Iran

3- Urogenital Stem Cell Research Center, Shahid Beheshti University of Medical Sciences, Tehran, Iran

4- Department of Biotechnology, Science Campus, University of Tehran, Tehran, Iran

Abstract

In recent years, the focus of researches in the field of tissue engineering has been on the preparation of scaffold materials and methods. 3D printing is an emerging technology that can accurately and quickly prepare bone tissue engineering scaffolds with specific shapes and structures. One of the most common 3D printing methods is fused deposition modeling (FDM), the materials used in this method are polymers such as polycaprolactone (PCL). In this study, 3D printed PCL scaffolds were made and due to the hydrophobic and non-osteogenic nature of PCL, the surface of the scaffolds was coated with a 1% solution of hydroxyapatite (HA) and bioactive glass (BG) bioceramics. Surface modification of PCL scaffolds was done to increase hydrophilicity and improve cell attachment. Field emission scanning electron microscope (FeSEM) images, Energy-dispersive X-ray spectroscopy (EDS) and mapping of the surface elements of the scaffolds confirmed the proper coating of PCL scaffolds with HA and BG bioceramics. The biocompatibility of PCL/HA/BG scaffolds and the cell viability and attachment on the surface of the scaffolds were investigated by seeding of human adipose mesenchymal stem cells (hAMSCs) and using MTT test and FeSEM images. Also, the potential of PCL/HA/BG scaffolds in osteogenic differentiation of hAMSCs was evaluated by alkaline phosphatase activity measurement test and immunocytochemical staining. The results showed that the three-component PCL/HA/BG scaffolds improved the proliferation and osteogenic differentiation of hAMSCs, so the PCL/HA/BG scaffolds can be a suitable candidate for bone tissue engineering applications.

Keywords: Tissue Engineering, 3D Printing, Polycaprolactone, Hydroxyapatite, Bioactive Glasses.