

ساخت و ارزیابی خواص سطحی و زیست تخریب پذیری داربست نانو فیبری پلی کاپرولاکتون / کراتین حاوی نانولوله کربن برای کاربرد در مهندسی بافت استخوان

ویدا حقیقی^۱، محبوبه محمودی^{۲*}، مرجان میرحاج^۱
(تاریخ دریافت: ۱۳۹۸/۰۶/۲۸، ش ص ۳۰-۱۵، تاریخ پذیرش: ۱۳۹۹/۰۲/۰۹)

چکیده

طراحی داربست‌هایی با ساختار فیزیکی مناسب با امکان چسبندگی و تکثیر سلول‌ها به سطح در بازسازی و ترمیم بافت استخوان نقش مؤثری ایفا می‌کنند. در این تحقیق، داربست پلی کاپرولاکتون/ کراتین/ نانولوله کربن به روش الکتروریسی جهت کاربرد در مهندسی بافت استخوان ساخته شد و تأثیر نانولوله‌های کربن (CNT) بر رشد سلول‌های استخوانی مورد ارزیابی قرار گرفت. برای دستیابی به این هدف، مورفولوژی سطح، درصد تخلخل، سطح ویژه، خواص مکانیکی و گروه‌های عاملی موجود در داربست‌ها به ترتیب با میکروسکوپ الکترونی روبشی (SEM)، روش جابجایی مایع، تست BET، آزمون استحکام کششی و طیف‌سنجی مادون قرمز تبدیل فوریه (FTIR) مورد بررسی قرار گرفت. به دلیل حضور نانولوله‌های کربن در نانوالیاف، میانگین قطر الیاف در داربست بدون CNT نسبت به داربست حاوی CNT از مقدار ۱۳۸ nm به ۷۵ nm کاهش و مقدار سطح ویژه نانوالیاف حاوی CNT افزایش یافت. اندازه تخلخل داربست حاوی CNT، ۶۸۰ μm محاسبه گردید که میزان مناسبی برای رشد و تکثیر سلول‌های استخوانی می‌باشد. رفتار تخریب‌پذیری داربست‌ها با قرار دادن نمونه‌ها برای ۶ هفته در محلول PBS ارزیابی گردید که ۵۰٪ تخریب در داربست حاوی نانولوله کربن مشاهده شد. همچنین، درصد زنده‌مانی سلول‌ها با آزمون MTT و چسبندگی سلول‌های استخوانی بر روی سطح داربست‌ها با میکروسکوپ SEM ارزیابی شد. حضور نانولوله‌های کربن و کراتین در داربست، سبب افزایش رشد و تکثیر سلول‌های استخوانی شد. بنابراین نتایج حاصل از این مطالعه، داربست پلی کاپرولاکتون/ کراتین/ نانولوله کربن را داربستی مناسب جهت کاربرد در مهندسی بافت استخوان معرفی می‌کند.

واژه‌های کلیدی: مهندسی بافت استخوان، کراتین، نانولوله کربن، داربست، الکتروریسی.

^۱ - کارشناسی ارشد، گروه مهندسی پزشکی، واحد یزد، دانشگاه آزاد اسلامی، یزد، ایران

^۲ - دانشیار، گروه مهندسی پزشکی، واحد یزد، دانشگاه آزاد اسلامی، یزد، ایران

*-نویسنده مسئول مقاله: m.mahmoodi@iauyazd.ac.ir

پیشگفتار

در بین بافت‌های بدن، استخوان پتانسیل بالایی برای بازسازی مجدد دارد. ضایعات استخوانی کوچک توسط فرآیندهای خودبه‌خودی بدن بازسازی می‌شوند؛ ولی ضایعات بزرگ، بدون مداخلات پزشکی قادر به ترمیم نمی‌باشند. راهکارهای مختلفی از جمله کاربرد گرافت‌های استخوانی (اتوگرافت، آلوگرافت، زنوگرافت) و استفاده از داربست‌های استخوانی تهیه شده بر اساس اصول مهندسی بافت جهت ترمیم ضایعات استخوانی به کار رفته است [۱].

سال‌های متمادی از گرافت‌های استخوانی جهت درمان ضایعات استخوانی استفاده شده است؛ اما امروزه استفاده از آن‌ها به دلیل وجود محدودیت در کاربردشان کاهش یافته است. محدودیت در برداشت بیوپسی^۱ احتمال عدم ترمیم ضایعه‌ای که از آنجا بیوپسی تهیه شده، التهاب و زمان طولانی برای بهبود فرد دهنده همراه خطر انتقال عوامل بیماری‌زا از فرد دهنده به فرد گیرنده و نیز تحریک سیستم ایمنی فرد میزبان، همگی عواملی هستند که متخصصان ارتوپدی را در کاربرد گرافت‌ها برای درمان بیماران، دچار تردید کرده است [۲]. در تکنیک مهندسی بافت از سلول برای بازسازی بافت استفاده می‌شود. مهندسی بافت در تلاش است که ارتباط ساختار و عملکرد را در بافت طبیعی و آسیب‌دیده شناسایی نموده و با توجه به اصلاح سطح و بالک بیومتریال، برهم‌کنش سلول و بافت را کنترل نماید [۳]. چالش‌های مهندسی و بیولوژیکی مهندسی بافت در سه جزء اساسی سلول، داربست و فاکتور رشد متمرکز شده است. در مهندسی بافت به‌کارگیری سلول به همراه داربست برای بازسازی عیوب استخوانی تاکنون به‌طور موفقیت‌آمیزی در کاربردهای کلینیکی استفاده شده است [۴]. در مهندسی بافت سلول‌ها در داربست کشت داده می‌شوند. جنس داربست‌های مهندسی بافت از پلیمرهای مصنوعی، طبیعی و سرامیک‌ها می‌باشد. بافت در محیط برون تنی در روی داربست به‌عنوان بستری زیست‌تقلید از ماتریس خارج سلولی که نقش مهمی در چسبندگی، رشد و تکثیر سلول‌ها دارند، رشد کرده و سپس در محل آناتومیکی صحیح در بدن کاشته می‌شود [۵]. تاکنون مواد مختلفی برای داربست‌ها و گرافت‌های استخوانی مورد تحقیق و استفاده قرار گرفته است. با این حال پلیمرها و

سرامیک‌ها به ترتیب بیش‌ترین مطالعات را به خود اختصاص داده‌اند؛ اما ایده استفاده از کامپوزیت‌ها نیز همواره مطرح بوده است و به نتایج امیدوارکننده‌تری نیز منجر شده است. چراکه بافت استخوان نیز خود یک کامپوزیت طبیعی است [۶]. پلیمرهای طبیعی به‌تنهایی استحکام کافی جهت ساخت داربست‌های مهندسی بافت را ندارند و با ترکیب پلیمر مصنوعی با پلیمر طبیعی، علاوه بر افزایش استحکام مکانیکی، عملکرد بیولوژیکی مطلوبی ایجاد می‌گردد. در مورد مهندسی بافت استخوان، مواد مورد استفاده باید دارای ویژگی‌هایی از جمله تحریک استخوان‌سازی و خواص مکانیکی مشابه با بافت استخوان به‌منظور جلوگیری از پدیده حفاظت تنشی و واجذب استخوان باشند [۷].

کراتین به‌عنوان یک پلیمر طبیعی با خواص آبدوستی، زیست‌تخریب‌پذیری و زیست‌سازگاری مناسب در مهندسی بافت کاربرد فراوان دارد. کراتین با دارا بودن بیش از ۳۰ فاکتور رشد و سیتوکین در مورفوژنز نقش دارد که در میان بسیاری از آن‌ها می‌توان به پروتئین مورفولوژیکی استخوان (BMP4)، فاکتور رشد انتقال β (TGF- β) و فاکتور رشد عصب (NGF) اشاره کرد. ساختار متخلخل داربست کراتین با ارتباط داخلی بالا اجازه نفوذ سلول به داخل داربست را می‌دهد و رشد عالی سلول را می‌دهد [۸]. استفاده از کراتین در داربست مهندسی بافت استخوان برای افزایش چسبندگی و تکثیر سلول‌ها مؤثر می‌باشد. اگرچه کاربرد کراتین به‌عنوان بیومواد مورد توجه قرار گرفته است؛ اما کراتین به دلیل تورم بالا در محیط‌های آبی و استحکام مکانیکی کم در کاربردهای زیست‌پزشکی که نیاز به استحکام مکانیکی در محیط آبی می‌باشد، دارای محدودیت است. برای رفع این مشکل، کراتین به‌صورت کامپوزیت با پلیمرهای مصنوعی از جمله پلی‌کاپرولاکتون (PCL) و سرامیک‌ها در کاربردهای پزشکی مورد استفاده قرار می‌گیرد [۹]. کراتین مشتق شده از پشم و موی انسان نشان دارای نقوش اتصال سلول مانند لوسین-اسپارتیک اسید والین (LDV) و گلوتامیک اسید اسپارتیک اسید-سرین و RGD می‌باشد که قادر به حمایت از چسبندگی سلولی است [۱۰].

از مهم‌ترین الزامات یک داربست مهندسی بافت، دارا بودن خواص مکانیکی مناسب است که قابلیت تحمل

¹-Biopsie

سلولی و خواص مکانیکی داربست را جهت کاربرد در مهندسی یافت استخوان افزایش می‌دهد [۱۷]. همچنین، اویفیوسی و همکاران [۱۸]، افزایش رشد و تکثیر سلول‌های استئوبلاست با رده سلولی hFOB1.۳ در تماس با سطح داربست هیدروکسی‌آپاتیت / نانولوله کربن را نشان دادند. در تحقیقی، داربست نانو کامپوزیتی کیتوسان / پلی‌وینیل‌الکل / نانولوله کربن / شیشه زیست فعال جهت کاربرد در مهندسی بافت مورد بررسی قرار گرفت. نتایج این پژوهش نشان داد که نانولوله‌های کربن و نانوذرات شیشه زیست فعال ترکیب شده در داربست‌های نانوالیاف کیتوسان / پلی‌وینیل‌الکل با قطر نانومتری و تخلخل بالا می‌تواند ضمن تأمین خواص مکانیکی مناسب، بستر مناسب برای رشد سلول‌ها را نیز فراهم کند [۱۹]. در گزارشی دیگر محققین، نانو کامپوزیت پلی‌پروپیلن فومرات / نانولوله کربن را برای ساخت داربست‌های متخلخل با خواص مکانیکی مناسب در مهندسی بافت استخوان مورد ارزیابی قرار دادند. آن‌ها ۴۰٪ افزایش مدول فشاری را در داربست‌های حاوی CNT با ۸۰٪ تخلخل نسبت به داربست‌های بدون CNT مشاهده کردند و این افزایش خواص مکانیکی در داربست را به حضور CNT نسبت دادند [۲۰].

با مروری بر گزارش‌های اخیر، مشاهده می‌گردد که تحقیقات کمی در مورد داربست‌های نانوالیاف کراتین و تقویت خواص آن با بیوسرامیک‌ها انجام گرفته است. بنابراین، در این مطالعه داربست‌های پلی‌کاپرولاکتون / کراتین / نانولوله کربن به روش الکترورسی ساخته شد و خواص و زیست سازگاری آن‌ها جهت کاربرد در مهندسی بافت استخوان مورد بررسی قرار گرفت.

مواد و روش‌ها

در این تحقیق کراتین با درجه خلوص ۹۸٪ و اندازه ذرات ۳۰ nm، پلی‌کاپرولاکتون (MV= 70-90KD)، سدیم دو سیل سولفات (SDS) و نانولوله کربن چند دیواره سدیم (MWCNT) با قطر کوچک‌تر از ۰/۴ نانومتر از شرکت Sigma-Aldrich خریداری شد. همچنین، جهت انجام آزمون‌های زیست سازگاری، گلو تار آلدهید از شرکت

تنش‌های استاتیک و دینامیک محیط سیال بدن را داشته باشد. خواص قابل توجه نانو لوله کربن (CNT) از قبیل رسانندگی بالا، استحکام مکانیکی، چگالی کم و پایداری بالا کاربرد آن را در داربست‌های مهندسی بافت گسترش داده است. نانو لوله‌های کربن صفحاتی از اتم‌های کربن هستند که درون قسمتی غلتک مانند حرکت می‌کنند. CNT به علت داشتن سطح ویژه زیاد و استحکام ۵ برابر فولاد به‌عنوان تقویت‌کننده مکانیکی در سنتز داربست‌های کامپوزیتی و نانوالیاف کاربرد دارد [۱۱]. همچنین، رسانندگی بالا و استحکام مکانیکی خوب CNT، کاربرد آن‌ها را در داربست‌های مهندسی بافت استخوان گسترش داده است. خواص الکتریکی فوق‌العاده نانومواد کربنی موجب انتقال سیگنال‌های سلولی، افزایش ارتباط سلولی و فعالیت سلولی می‌شود [۱۲]. اخیراً توجه دانشمندان به این قابلیت نانولوله‌های کربن جلب شده است که دارای ساختاری مشابه داربست‌های طبیعی بافتی محتوی کلاژن می‌باشند. نانولوله‌ها هنگام تولید به‌صورت رشته‌هایی درهم آرایش یافته شکل می‌گیرند و از ساختار سه‌بعدی پروتئین‌های موجود در بافت خارج سلولی تقلید می‌کنند که این حالت مشابه وضعیت کلاژن‌های موجود در مایع خارج سلولی می‌باشد [۱۳]. بارگذاری CNT در الیاف الکترورسی شده، سبب افزایش هدایت الکتریکی و گستردگی سلول‌ها در سطح داربست و تحریک تولید α -اکتین و تروپونین می‌گردد [۱۴]. تحقیقات نشان داده است که سلول‌ها بر روی سطحی با ساختاری با ابعاد نانو دارای اتصال و گسترش بهتری می‌باشند، بنابراین طراحی داربست‌های نانوالیاف با روش الکترورسی می‌تواند کمک بزرگی در راه رسیدن به این اهداف باشد [۱۵].

در مطالعه‌ای، داربست نانوالیاف ژلاتین / پلی‌کاپرولاکتون به روش الکترورسی^۱ جهت بازسازی استخوان ساخته شد و تمایز استئوژنیک^۲ با روش رنگ‌آمیزی آلیزارین رد و رسوب کلسیم به دلیل حضور ژلاتین که نقش مؤثری در چسبندگی اینتگرین ایفا می‌کند و باعث چسبندگی سلول‌ها بر روی سطح داربست می‌گردد، مشاهده گردید [۱۶]. در گزارشی مشاهده گردید که حضور CNT در داربست‌های پلی‌کاپرولاکتون / نانولوله کربن، تکثیر، تمایز

³-Human Osteoblast Cells Line

¹.Electrospinning

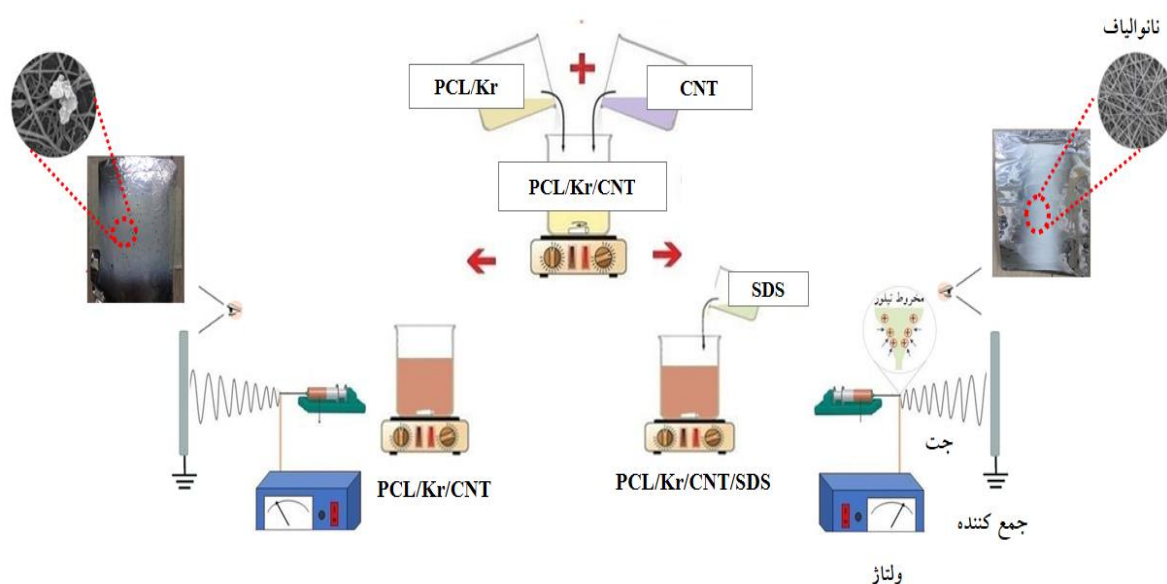
²-Osteogenic Differentiation

اضافه گردید. CNT در سوسپانسیون ایجاد شده نامحلول می‌باشد، بنابراین به منظور یکنواخت شدن محلول، سدیم دو سیل سولفات (SDS) با غلظت ۱٪ وزنی نسبت به حلال به محلول PCL/Kr/CNT اضافه گردید و سوسپانسیون برای ۱۵ دقیقه با دستگاه آلتراسونیک پروبی (Top Sonics-ایران) هموژنایز گردید و محلول PCL/Kr/CNT برای تزریق به دستگاه الکترورسی جهت ساخت داربست آماده شد. داربست‌های نانوالیاف پلی‌کاپرولاکتون، پلی‌کاپرولاکتون/کراتین و پلی‌کاپرولاکتون/کراتین/نانولوله کربن با روش الکترورسی (KYKY-SBC-12-2200) ساخته شدند. در شکل ۱ مراحل ساخت داربست‌ها مشاهده می‌شود. محلول آماده شده در سرنگ با قطر سوزن ۰/۶ mm و طول ۴ cm قرار داده شد و با تنظیم پارامترهای دستگاه با نرخ تغذیه ۰/۱ ml/h، ولتاژ ۲۰ Kv و فاصله کلکتور تا نوک سوزن ۱۰ cm الکترورسی نمونه‌ها انجام گرفت.

Sigma-Aldrich و سرم جنین گاوی (FBS)^۱ و محیط کشت DMEM-F12 از شرکت Gibco تهیه شد.

ساخت داربست نانوالیاف

جهت تهیه محلول پلی‌کاپرولاکتون/کراتین (PCL/Kr) [۲۱]، ابتدا محلول کراتین و PCL به‌طور جداگانه آماده گردید. کراتین در حلال اسید استیک و اسید فرمیک به نسبت (۳:۱) به مدت ۱ h و PCL در حلال اسید استیک و اسید فرمیک به نسبت (۳:۱) به مدت ۲۴h توسط همزن مغناطیسی به‌طور جداگانه حل گردید. سپس دو محلول آماده‌شده با نسبت (۳:۲) توسط همزن مغناطیسی برای مدت‌زمان ۲۰ دقیقه مخلوط شدند. جهت آماده‌سازی محلول پلی‌کاپرولاکتون/کراتین/نانولوله کربن (PCL/Kr/CNT)، ابتدا CNT با غلظت ۱٪ در حلال اسید استیک و اسید فرمیک با نسبت (۳:۱) توسط همزن مغناطیسی به مدت ۱ h حل گردید و به محلول PCL/Kr



شکل ۱- نمایی از ساخت داربست نانوالیاف به روش الکترورسی

¹-Fetal Bovine Serum

ایران) استفاده شد. آزمون در دمای 70°C و فشار 0.88 اتمسفر انجام گرفت [۲۱]. ابتدا، با عبوردهی گاز هلیوم از نمونه برای ۲۰ دقیقه، ناخالصی‌ها از حفره‌های سطح نمونه خارج شد. سپس، نمونه‌ها در معرض حجم معینی از گاز نیتروژن قرار گرفت تا سطح نمونه از گاز اشباع گردد و عمل جذب رخ دهد. با متراکم شدن گاز درون حفره‌های موجود بر سطح نمونه می‌توان ساختار حفره‌ها را ارزیابی و توسط رابطه گازها (PVT) مقدار گاز جذب شده محاسبه کرد. سپس در مرحله آخر، از آب با دمای محیط برای خروج گاز نیتروژن از نمونه‌ها استفاده شد تا با کاهش تدریجی فشار گاز، تبخیر از سطح صورت گیرد و عمل واجذب گاز رخ دهد. سپس توسط نمودار جذب و واجذب گاز، سطح ویژه نمونه محاسبه گردید.

بررسی زیست‌تخریب‌پذیری داربست‌ها

به‌منظور آنالیز میزان زیست‌تخریب‌پذیری داربست‌ها، نمونه‌ها توسط ترازوی دیجیتالی با دقت ۴ رقم اعشار توزین گردید. سپس در محلول PBS غوطه‌ور و برای مدت‌زمان یک تا شش هفته در دمای 37°C در انکوباتور (INB400) قرار داده شد. سپس نمونه‌ها از درون ظرف بیرون آورده شد و با آب دو بار تقطیر شسته و پس از خشک شدن درون آون خلأ، وزن شدند. درصد تخریب‌پذیری نمونه‌ها با رابطه (۲) محاسبه گردید [۲۲].

$$\text{تخریب پذیری} = \frac{(W_0 - W_t)}{W_0} \times 100 \quad (2)$$

که در آن W_0 وزن اولیه و W_t وزن نمونه پس از بازه‌های زمانی مشخص می‌باشد.

بررسی خواص مکانیکی کششی داربست‌ها

خواص مکانیکی نمونه‌ها توسط دستگاه تست استحکام (Zwick Universal Testing Machinn-1446-60) بررسی شد. ابتدا، داربست‌هایی به ابعاد $150 \times 10 \times 60$ میلی‌متر تهیه شد و بر روی نگهدارنده کاغذی چسبانده شد. سپس قاب کاغذی بین دو فک دستگاه با فاصله ۴ سانتی‌متر از یکدیگر قرار داده شد و کشش با نیروی ۱۰N و سرعت ۱۰ mm/min اعمال و نمودار تنش/کرنش رسم گردید.

مشخصه‌یابی داربست‌ها

میکروسکوپ الکترونی روبشی

به‌منظور ارزیابی ساختار و قطر الیاف از میکروسکوپ الکترونی روبشی (SEM-KYKY-EM3200-چین) استفاده شد. ابتدا نمونه‌ها با طلا پوشش دهی و سپس تصویربرداری شدند و با استفاده از نرم‌افزار MIP میانگین قطر الیاف اندازه‌گیری شد.

طیف‌سنجی مادون قرمز تبدیل فوریه (FTIR)

گروه‌های عاملی و پیوندهای تشکیل‌شده در نمونه‌ها توسط FTIR شناسایی گردید. برای انجام این آزمون نمونه‌ها با KBr خالص مخلوط و به‌صورت قرص نازک شکل‌دهی شدند. سپس توسط دستگاه FTIR قله‌های جذب پرتو IR در عدد موج‌های در محدوده $4000-400$ cm^{-1} مشاهده و نوع پیوندها با بررسی عدد موج قله‌ها مشخص گردید.

بررسی تخلخل نانو داربست‌ها

با روش جابه‌جایی مایع میزان تخلخل داربست‌ها محاسبه گردید. ابتدا داربست با وزن اولیه (W_i) به مدت ۲۴ ساعت در داخل یک استوانه مدرج حاوی اتانول ($\rho = 0.789 \text{g/cm}^3$) با حجم V_1 غوطه‌ور شد. پس از اندازه‌گیری حجم V_2 (حجم داربست و حجم اتانول)، داربست از درون استوانه مدرج حاوی اتانول خارج گردید و حجم اتانول باقی‌مانده در استوانه مدرج V_3 نامیده شد. بنابراین، حجم کل داربست برابر با $V_2 - V_3$ می‌باشد. با اندازه‌گیری W_i و وزن نهایی داربست (W_f)، حجم منافذ از رابطه $W_f - W_i / \rho_{\text{Ethanol}}$ بدست می‌آید و مقدار درصد تخلخل داربست توسط رابطه (۱) محاسبه می‌گردد. در این آزمون تعداد تکرار سه در نظر گرفته شد و نتایج به‌صورت میانگین \pm انحراف از معیار گزارش گردید.

$$\varepsilon = \frac{(W_f - W_i / \rho)}{v_2 - v_3} \times 100 \quad (1)$$

اندازه‌گیری سطح ویژه نمونه‌ها

برای اندازه‌گیری سطح ویژه داربست‌ها از BET (Brunauer-Emmett-Teller) (ET/TPR-TPD9105) استفاده شد.

بررسی زیست‌سازگاری داربست‌ها

آماده‌سازی نمونه‌ها

درصد زنده‌مانی سلول‌های استخوانی بر روی داربست‌ها با روش MTT (Methyl Thiazol Tetrazolium) ارزیابی شد. ابتدا نمونه‌ها بر روی کاورهای شیشه‌ای به‌طور عمودی الکتروریسی شدند. سپس، کاورهای شیشه‌ای الکتروریسی شده درون ظرف کشت سلول قرار داده شد و به مدت ۵ روز تحت تابش پرتوگاما با توان ۲۵ کیلوگری استریل شد. در این مطالعه از روش تماس مستقیم به‌منظور بررسی سمیت و تکثیر سلول‌ها استفاده شد.

آزمون MTT

جهت بررسی سمیت سلولی داربست‌ها از سلول استخوانی رده سلولی MG-63 (NCBI C555) موجود در بانک سلولی انستیتو پاستور ایران استفاده شد. پس از دفیز کردن، سلول‌ها به فلاسک حاوی محیط کشت RPMI حاوی ۱۰٪ سرم جنین گاو (FBS) انتقال داده شد و در انکوباتور (Memmert-GMBH) با شرایط رطوبت ۹۰٪ و غلظت CO₂ ۵٪ در دمای ۳۷ °C قرار گرفت و هر سه روز یک‌بار محیط کشت تعویض گردید. جهت بررسی سمیت سلول‌های در تماس با داربست‌ها، تعداد ۱×۱۰^۴ سلول به همراه ۱۰۰ میکرولیتر محیط کشت بر روی هر یک از داربست‌ها قرار گرفته در چاهک‌های ظرف کشت ریخته شد و در انکوباتور قرار داده شد. در این آزمون، سه چاهک حاوی سلول و محیط کشت بدون حضور داربست به‌عنوان کنترل منفی در نظر گرفته شد.

پس از گذشت سه روز محیط کشت روی نمونه‌ها خارج گردید و ۵۰۰ میکرولیتر MTT با غلظت ۰/۵ mg/mL در هر چاهک ریخته شد و به مدت ۴ ساعت در انکوباتور قرار گرفت. پس از گذشت ۴h محلول روی سلول‌ها تخلیه شد و ایزوپروپانول به آن‌ها اضافه گردید تا بلورهای بنفش‌رنگ ایجاد شده حل شود. برای حل شدن بهتر رسوب MTT، پلیت به مدت ۱۵ دقیقه بر روی دستگاه شیکر قرار گرفت و در ادامه رسوب حل شده به ظرف کشت سلول ۹۶ خانه منتقل شد و مقدار غلظت ماده حل شده در ایزوپروپانول با دستگاه الیزاریدر (پیش‌تاز طب مدل Avecina) در طول موج ۵۷۰ nm محاسبه شد. چاهک دارای سلول‌های بیش‌تر، چگالی نوری بالاتری نسبت به چگالی نوری مربوط

به چاهک با سلول کم‌تر را نشان می‌دهد. درصد زنده‌مانی سلول‌ها از رابطه (۳) محاسبه می‌شود [۲۳].

$$(3) \quad \text{چگالی نوری نمونه} (\%) = \frac{\text{چگالی نوری کنترل}}{\text{چگالی نوری نمونه}} \times 100$$

بررسی چسبندگی سلولی

جهت بررسی چسبندگی سلول‌ها بر روی سطح داربست، نمونه‌های استریل شده با ۲×۱۰^۴ سلول در حجم ۱۰۰ میکرولیتر بر روی هر یک از داربست‌های قرارگرفته در چاهک‌های ظرف کشت ریخته شد و ۴h در انکوباتور قرار داده شد. پس از چسبیدن سلول‌ها، مقداری محیط کشت شامل FBS ۱۰٪ به هر چاهک اضافه گردید. بعد از گذشت ۲۴h محیط کشت روی نمونه‌ها خارج گردید و نمونه‌ها با بافر فسفات (PBS) شستشو شدند. برای تثبیت بیولوژیکی سلول‌ها از گلوآرالدهید به‌عنوان تثبیت‌کننده استفاده شد. نمونه‌های حاوی تثبیت‌کننده برای ۲h در یخچال نگهداری شدند. سپس ماده تثبیت‌کننده خارج گردید و نمونه‌ها دو بار با آب دو بار تقطیر و الکل‌های ۵۰٪، ۶۰٪، ۷۰٪، ۸۰٪ و ۹۶٪ شستشو شدند. بعد از تثبیت سلول‌ها بر روی سطح نمونه‌ها، جهت مشاهده چسبندگی سلول‌ها، سطح نمونه‌ها با میکروسکوپ الکترونی روبشی (SEM) تصویربرداری شد.

ارزیابی آماری

مقایسه آماری داده‌های به‌دست‌آمده توسط روش t-student انجام شد. برای آزمون‌های انجام‌شده تعداد تکرار سه در نظر گرفته شد و نتایج به‌صورت میانگین ± انحراف از معیار گزارش گردید.

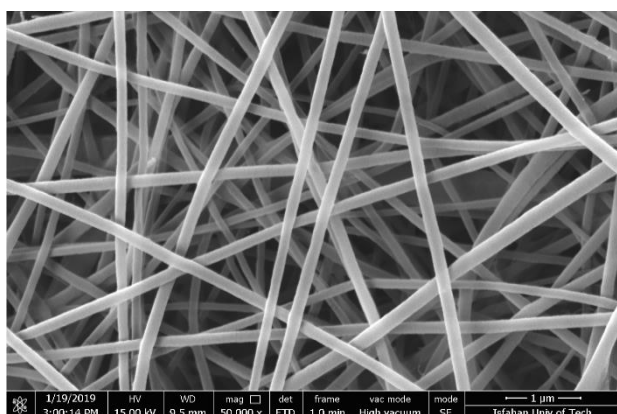
نتایج و بحث

داربست‌های سه‌بعدی بستری مناسب برای چسبیدن، تکثیر و تمایز سلول‌های استخوانی در مهندسی بافت می‌باشد. با روش الکتروریسی می‌توان داربست‌های نانوالیاف با نسبت سطح به حجم بسیار بالا، تخلخل قابل تنظیم، اشکال و ابعاد متفاوت دارای خواص مناسب جهت رشد و تمایز سلولی برای کاربرد در مهندسی بافت استخوان تهیه کرد. در این مطالعه داربست PCL/Kr/CNT با روش الکتروریسی جهت کاربرد در مهندسی بافت استخوان ساخته شد و مورد ارزیابی قرار گرفت.

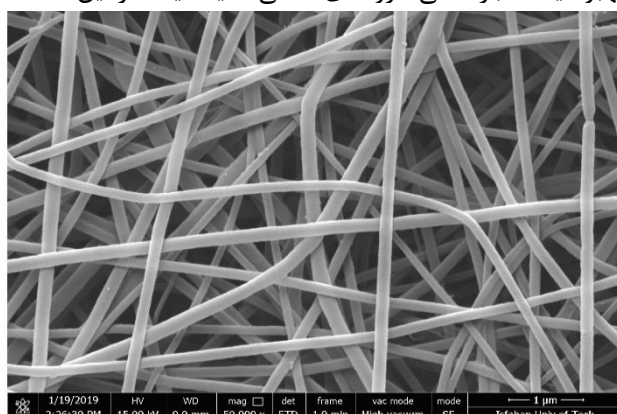
مورفولوژی و میکرو ساختار نانوالیاف

سبب افزایش هدایت الکتریکی محلول الکترورسی و در نتیجه کاهش قطر الیاف گردید. در این مطالعه جهت بهبود خواص مکانیکی و چسبندگی سلولی داربست PCL/Kr، نانولوله کربن با محلول PCL/Kr مخلوط و الکترورسی گردید. در هنگام الکترورسی، پرش قطره به علت ناهمگنی و چند فاز بودن محلول اتفاق می افتد [۲۶]. به منظور ایجاد پخش شونده مناسب نانولوله کربن در ماتریس پلیمری PCL/Kr/CNT و پخش شونده پایدار و یکنواخت نانولوله های کربن از SDS استفاده شد. مورفولوژی الیاف داربست PCL/Kr/CNT حاوی SDS با داربست PCL/Kr/CNT فاقد SDS در شکل ۳ مشاهده می گردد. نانوالیاف در داربست فاقد SDS به دلیل ناپایدار بودن محلول در هنگام الکترورسی، شکننده می باشند و نانولوله های کربن در سطح الیاف تجمع یافته اند؛ اما در داربست حاوی SDS نانولوله های کربن در داخل و خارج سطح الیاف، توزیع شده اند. نانوالیاف در داربست حاوی SDS به طور منظم به صورت کشیده و بدون قطره محلول با متوسط قطر الیاف 75 ± 18 nm مشاهده شدند. حضور سورفکتانت آنیونی مانند SDS سبب کاهش کشش سطحی که تأثیر مستقیم بر شکل گیری دانه و مهره بر روی الیاف دارد، می گردد و الیافی یکنواخت با قطر کم را ایجاد می کند. تحقیقات نشان داده است که سورفکتانتها از طریق برهم کنش های الکترواستاتیک، پیوند هیدروژنی و خاصیت آب گریزی که در محلول الکترورسی به وجود می آورند، منجر به تنظیم پارامترهای مهم در الکترورسی مانند ویسکوزیته، کشش سطحی محلول می شوند [۲۷].

شکل ۲ تصاویر میکروسکوپ SEM داربست PCL و داربست PCL/Kr را نشان می دهد. داربست تک جزئی PCL با اندازه قطر الیاف نسبتاً یکنواخت با متوسط اندازه 190 ± 31 nm مشاهده گردید. داربست PCL/Kr دارای الیافی با اندازه نسبتاً یکنواخت و با حداقل گره می باشد. با افزودن کراتین به محلول PCL، متوسط قطر الیاف الکترورسی شده از 190 ± 31 nm به 138 ± 15 nm کاهش یافت. با افزودن کراتین به محلول، مقاومت کمتری در برابر کشش محوری در هنگام تشکیل جت الکتریکی ایجاد می شود که منجر به کاهش قطر الیاف می گردد [۲۴]. هنگامی که از یک پلیمر غیر رسانا مانند PCL در الکترورسی استفاده می شود، پلیمر نمی تواند بارها را تا جمع کننده با خود حمل کند، بنابراین پلیمر به خوبی در میدان کشیده نمی شود. کراتین یک پلیمر قطبی است که شامل بسیاری از گروه های قطبی مانند گروه آمید و کربوکسیل می باشد. هنگامی که PCL با کراتین مخلوط می شود، منجر به افزایش هدایت الکتریکی محلول می گردد و محلول تا محل جمع کننده به خوبی در میدان کشیده می شود و در نتیجه، سبب کاهش قطر الیاف داربست PCL/Kr می شود [۹]. در تحقیقی مشابه [۲۵] داربست کراتین/ پلی کاپرولاکتون با روش الکترورسی برای ترمیم بافت استخوان توسط روش الکترورسی ساخته شد. با افزودن کراتین به داربست پلی کاپرولاکتون، قطر الیاف کاهش، آبدوستی افزایش و روند رشد سلولی و چسبندگی بهبود یافت. بار منفی گروه های عاملی اسید آمینه کراتین،



(ب)

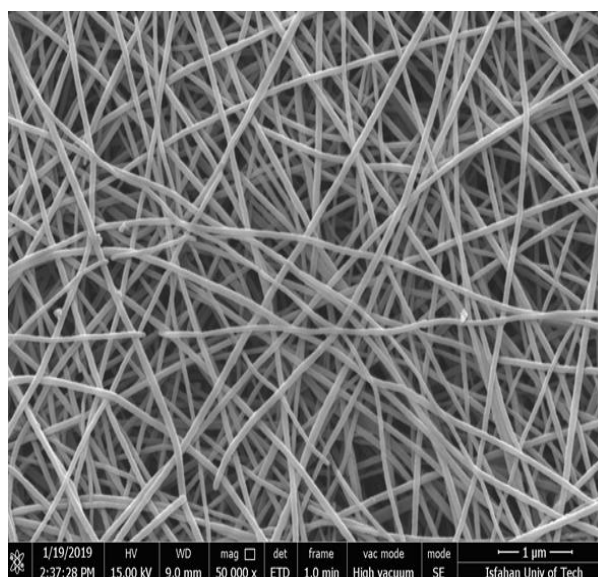


(الف)

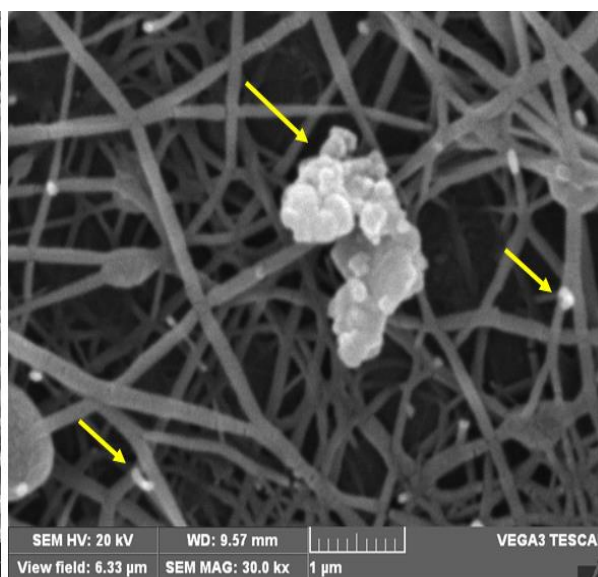
شکل ۲- تصاویر میکروسکوپ الکترونی روبشی داربست الف) PCL و ب) PCL/Kr

در شکل ۴، طیف FTIR کراتین، پلی‌کاپرولاکتون، نانولوله کربن و داربست‌ها در محدوده $4000 - 400 \text{ cm}^{-1}$ مشاهده می‌گردد. پیک‌های در عدد موج‌های 1696 cm^{-1} ، 1615 cm^{-1} و 1307 cm^{-1} معرف گروه‌های آمید نوع ۱ و ۲ و ۳ در کراتین می‌باشد [۳۰]. پیک‌های ارتعاشی ظاهر شده در عدد موج‌های 1725 cm^{-1} ، 1704 cm^{-1} ، 1178 cm^{-1} ، 1044 cm^{-1} و 2938 cm^{-1} که به ترتیب مرتبط به گروه‌های (C=O)، (C-O)، (C-O-C) و CH₂ ترانس و سیس در پلی‌کاپرولاکتون می‌باشند [۳۱]. طیف FTIR نانولوله کربن دارای پیوند C=C با عدد موج 1554 cm^{-1} می‌باشد [۳۲]. حضور پیک‌های معرف کراتین، پلی‌کاپرولاکتون، نانولوله کربن در داربست PCL/Kr/CNT دلایلی بر اثبات حضور تمام مواد در داربست بود و هیچ پیوند جدیدی در داربست مشاهده نشد.

با افزودن CNT به محلول PCL/Kr، غلظت و هدایت الکتریکی محلول پلیمری افزایش یافت [۲۸]. افزایش انباشتگی بار بر نیروهای چسبندگی غلبه می‌کند و نیروهای دافعه بارهای انباشته شده میان نانوالیاف تشدید می‌شود و به همین دلیل قطر نانوالیاف با افزودن CNT به محلول به میزان قابل توجهی کاهش می‌یابد. در روش الکتروریسی ویسکوزیته محلول باید در حدی باشد که وقتی جریان باریک و پرشتاب محلول پلیمری، نوک سوزن را در حین الکتروریسی ترک می‌کند، هم‌زمان که محلول پلیمر به‌طرف صفحه جمع‌کننده حرکت می‌کند، کشیده شود که با افزایش ویسکوزیته اثر متقابل بیش‌تری بین حلال و مولکول‌های پلیمر ایجاد می‌گردد. محلول وقتی تحت تأثیر بارهای الکتریکی کشیده می‌شود مولکول‌های حلال تمایل دارند تا در سرتاسر مولکول‌های پلیمر در هم رفته منتشر شوند. بنابراین مولکول‌های حلال برای اینکه تحت تأثیر کشش سطحی تجمع یابند، کاهش می‌یابند و هدایت الکتریکی را افزایش داده و باعث کاهش قطر الیاف می‌شوند [۲۹].

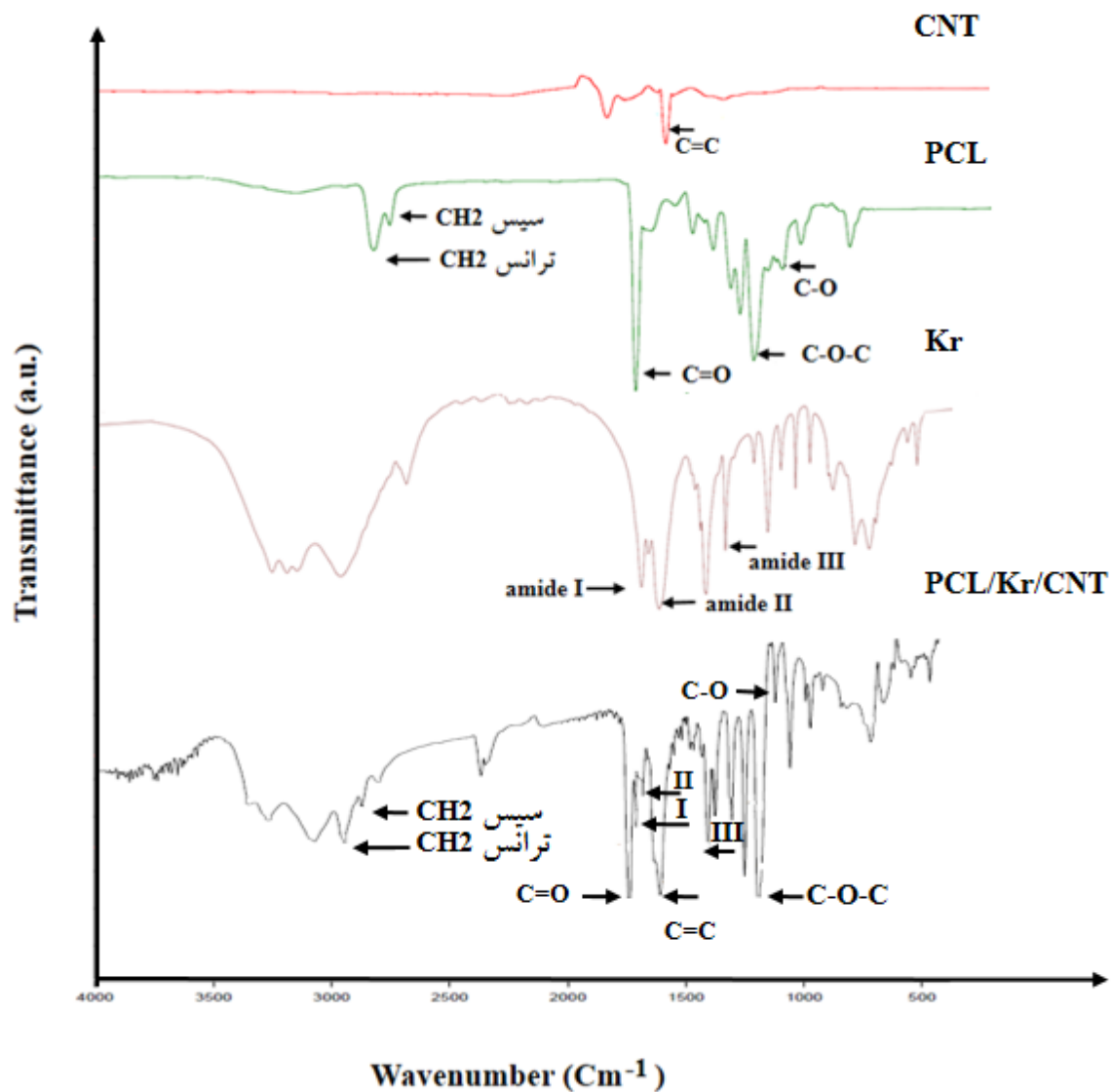


(ب)



(الف)

شکل ۳- تصاویر میکروسکوپ الکترونی روبشی داربست PCL/Kr/CNT (الف) بدون SDS، (ب) حاوی SDS (فلش‌های زرد رنگ نانولوله‌های کربن آگلورمره شده بر روی الیاف را نشان می‌دهند)



شکل ۴- طیف تبدیل فوریه نانولوله کربن، پلی کاپرولاکتون، کراتین و داربست PCL/Kr/CNT

آنالیز درصد تخلخل و اندازه تخلخل

افزایش یافت و متوسط اندازه تخلخل در داربست PCL/Kr و PCL/Kr/CNT به ترتیب $520 \mu\text{m}$ و $680 \mu\text{m}$ اندازه گیری شد. بنابراین با توجه به اینکه اندازه تخلخل مناسب برای مهندسی بافت استخوان در محدوده میکرون می باشد و تخلخل های کوچک امکان رگ زایی را در داربست فراهم نمی کنند [۳۴]، اندازه تخلخل در داربست های ساخته شده در این مطالعه برای مهندسی بافت مناسب می باشد.

در جدول ۱ میزان درصد تخلخل و اندازه تخلخل داربست ها مشاهده می گردد. داربست های ساخته شده با روش الکتروریسی دارای تخلخل بالاتر از ۸۰٪ می باشند که دستیابی به این درصد تخلخل در مهندسی بافت استخوان امری ضروری برای انتشار یکنواخت سلول ها در سرتاسر فضای داربست می باشد. متوسط درصد تخلخل از ۸۳٪ در داربست PCL/Kr به ۹۸٪ در داربست PCL/Kr/CNT

جدول ۱- میزان میانگین درصد تخلخل و اندازه متوسط تخلخل در داربست‌ها

نوع داربست	درصد تخلخل (%)	اندازه متوسط تخلخل (μm)
PCL/Kr	۸۳	۵۲۰±۱۸۰
PCL/Kr/CNT	۹۸	۶۸۰±۲۲۰

سطح ویژه داربست‌ها

متوسط سطح ویژه داربست PCL/Kr و PCL/Kr/CNT به ترتیب $5/98 \text{ m}^2/\text{g}$ و $15 \text{ m}^2/\text{g}$ محاسبه گردید (جدول ۲) که حضور نانولوله کربن در داربست PCL/Kr سبب افزایش سطح ویژه داربست شده است. میزان جذب و واجذب گاز در هر نمونه برابر می‌باشد. مقدار جذب گاز در داربست PCL/Kr/CNT سه برابر بیش‌تر از میزان جذب گاز در داربست PCL/Kr بود که نشان‌دهنده افزایش میزان تخلخل در داربست PCL/Kr/CNT می‌باشد. افزودن نانولوله کربن به داربست PCL/Kr سبب کاهش قطر الیاف و در نتیجه آن افزایش سطح ویژه الیاف می‌گردد [۳۵]. حضور CNT در الیاف سبب افزایش هدایت الکتریکی محلول پلیمری می‌شود و با افزایش هدایت الکتریکی، کشیدگی بیشتری بر جت محلول الکتروریسی اعمال می‌شود و الیاف با قطر کوچک‌تر ایجاد می‌گردد [۳۶، ۳۷]. بنابراین، سطح ویژه بالای داربست PCL/Kr/CNT منجر به همبندی مناسب با استخوان و دیگر بافت‌های بدن می‌گردد و با تخلخل زیاد، رشد بافت و ورود سلول‌ها و مواد مغذی به داربست انجام می‌گیرد و رشد و تکثیر مناسب بافت استخوانی رخ می‌دهد.

آنالیز رفتار زیست‌تخریب‌پذیری داربست‌ها

تخریب داربست نقش مهمی در فرآیند بازسازی بافت دارد؛ زیرا داربست باید در ابتدا پشتیبانی ساختاری را فراهم

نماید و به تدریج و بدون سمیت زایی هم‌زمان با بازسازی بافت تخریب گردد. میزان تخریب‌پذیری داربست PCL/Kr/CNT برای مدت زمان ۶ هفته در جدول ۳ مشاهده می‌گردد. در هفته اول داربست‌های PCL/Kr و PCL/Kr/CNT به ترتیب دارای میزان تخریب ۷٪ و ۹٪ و در هفته ۶ دارای تخریب به ترتیب ۲۷٪ و ۴۹٪ بودند. با توجه به گزارش‌های ارائه‌شده [۳۶، ۳۸، ۳۹]، مدت زمان تخریب‌پذیری داربست‌ها برای مهندسی بافت استخوان مناسب می‌باشد. کراتین به‌عنوان یک پروتئین محلول در آب با غوطه‌وری در PBS انتظار می‌رود به سرعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد در آب حل گردد. بنابراین با افزودن PCL به‌عنوان پلیمری مصنوعی بازمان تخریب‌پذیری مناسب [۹، ۳۸] به محلول حاوی ۱۰ تا ۳۰ درصد وزنی کراتین، سرعت تخریب نانوالیاف پس از غوطه‌وری در آب کاهش می‌یابد. مواد کربنی قابلیت تخریب‌پذیری داربست-های پلیمری را تنظیم می‌کنند. نتایج گزارش‌ها نشان داده است که حضور CNT باعث افزایش پایداری فیزیکی داربست پلیمری می‌شود و سرعت تخریب را تا حدودی کاهش می‌دهد [۴۰]. ولی با کاهش قطر و افزایش سطح ویژه و درصد تخلخل در داربست حاوی CNT تخریب‌پذیری در داربست حاوی CNT بیش‌تر از داربست بدون CNT رخ می‌دهد.

جدول ۲- میانگین مقادیر سطحی، جذب و واجذب گاز داربست‌ها

نمونه	سطح ویژه m ² /g	جذب سطحی	واجذب سطحی	محدوده کالیبراسیون
PCL/Kr	۵/۹۸۹	۰/۳۷	۰/۳۶	۶/۴۴
PCL/Kr/CNT	۱۵	۰/۷۵	۰/۷۳	۶/۴۵

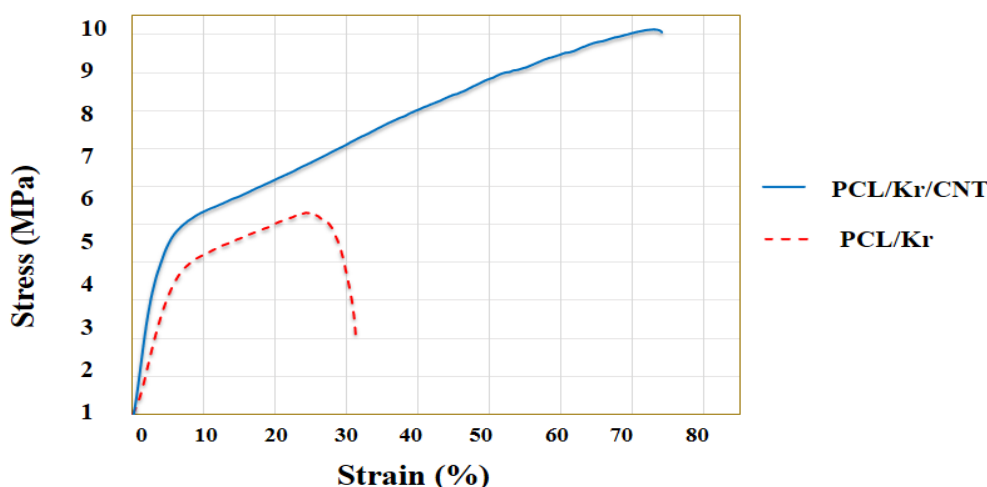
جدول ۳- تخریب پذیری داربست‌ها در زمان‌های متفاوت

نمونه	هفته اول (%)	هفته دوم (%)	هفته سوم (%)	هفته چهارم (%)	هفته پنجم (%)	هفته ششم (%)
PCL/Kr	۷±۱	۱۲±۲	۲۰±۱	۲۲±۳	۲۵±۴	۲۷±۲
PCL/Kr/CNT	۹±۲	۱۸±۱۳	۲۷±۲	۳۲±۲	۴۳±۵	۴۹±۴

بررسی استحکام کششی

داربست‌های پلیمری دارای استحکام مکانیکی کم می‌باشند، بنابراین به تنهایی نمی‌توانند بستری مناسب برای بازسازی بافت‌های استخوانی باشند. نانولوله‌های کربن دارای خاصیت مکانیکی از قبیل مدول الاستیک، استحکام کششی و سختی بالا می‌باشند. CNT دارای سفتی ذاتی بالا می‌باشد و مطالعات نشان داده است که با افزودن CNT به محلول پلیمری، سختی و استحکام کششی کامپوزیت به دلیل حضور پیوند قوی C-C در نانولوله کربن افزایش می‌یابد. بنابراین، نانولوله کربن می‌تواند استحکام مکانیکی داربست‌های حاوی کراتین را افزایش بدهد. در شکل ۵

نمودار تنش و کرنش و جدول ۴ مقدار مدول الاستیک و استحکام شکست داربست‌ها مشاهده می‌شود. مدول الاستیک در داربست PCL/Kr و PCL/Kr/CNT به ترتیب از $44/9 \pm 1$ MPa به $113/14 \pm 79$ MPa افزایش یافت که دارای اختلاف معنی‌دار می‌باشند ($P\text{-Value} < 0.05$). توزیع و پراکندگی یکنواخت CNT در ماتریس پلیمری، حضور مراکز تمرکز تنش را کاهش می‌دهد و افزایش سطح ویژه الیاف در داربست حاوی CNT، سبب افزایش برهمکنش بین نانولوله‌های کربن و زمینه پلیمری و انتقال تنش از ماتریس پلیمری به CNT می‌گردد. در نتیجه خواص مکانیکی داربست حاوی CNT افزایش یافت.



شکل ۵- نمودار تنش-کرنش داربست PCL/Kr/CNT و PCL/Kr

جدول ۴- نتایج استحکام کششی داربست‌ها

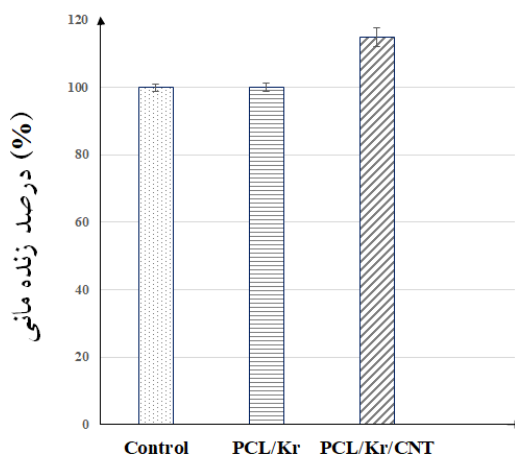
نمونه	مدول الاستیک (MPa)	تنش در نقطه شکست (MPa)	کرنش در نقطه شکست (%)
PCL/Kr	۴۴/۹±۱	۵/۳۰±۵	۲۴/۲۶±۱۷
PCL/Kr/CNT	۱۱۳/۱۴±۷۹	۱۰/۰۵±۷	۶۹/۷۱ ±۱۱

بررسی چسبندگی و زنده‌مانی سلول‌ها

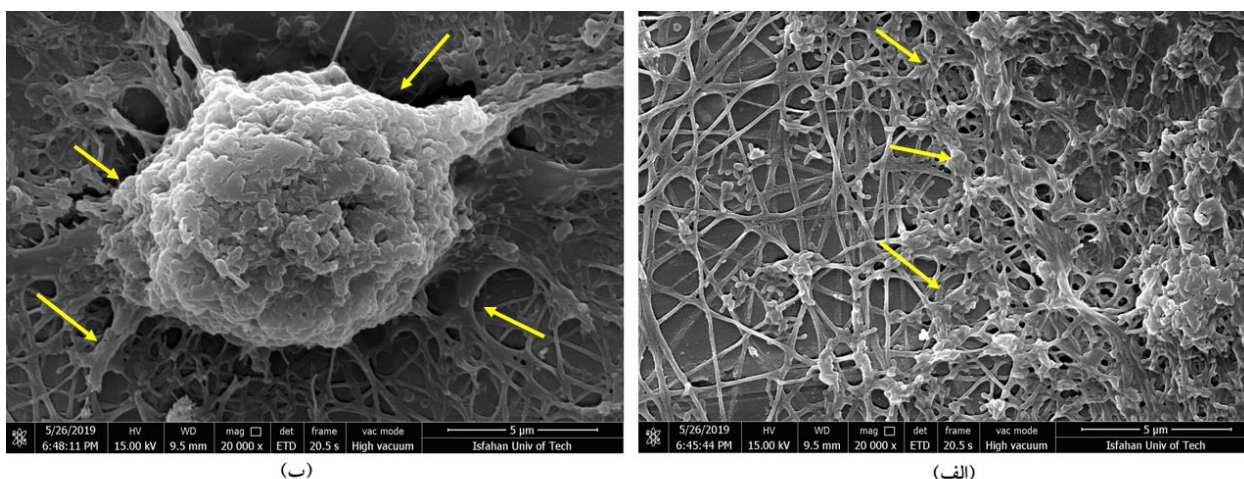
نمودار میزان زنده‌مانی و رشد سلول‌های MG-63 بر روی سطح داربست‌ها در شکل ۶ مشاهده می‌گردد. به دلیل افزایش درصد تخلخل در داربست PCL/Kr/CNT نسبت به داربست PCL/Kr، ۱۱۷٪ زنده‌مانی سلول‌ها در داربست حاوی CNT مشاهده گردید. در تحقیقی مشابه داربست کراتین/ پلی کاپرولاکتون برای ترمیم بافت استخوان با روش الکترورسی ساخته شد. با افزودن کراتین به داربست پلی کاپرولاکتون، قطر الیاف کاهش، آبدوستی افزایش و روند رشد سلولی و چسبندگی بهبود یافت. حضور اتصال سلولی LDV بر روی کراتین در تحریک اینتگرین واسطه $\alpha 4\beta 1$ و رشد و چسبندگی سلول‌ها مؤثر می‌باشد [۲۵]. چون CNT دارای هدایت حرارتی بالا می‌باشد که انرژی کافی در اطراف دیواره CNT ایجاد می‌گردد در پی آن منجر به جوانه‌زنی هیدروکسی‌آپاتیت و تشکیل کریستال‌های هیدروکسی‌آپاتیت بر روی سطح الیاف می‌گردد که بستری مناسب جهت رشد و تکثیر سلول‌های

استخوانی و اتصال سلول‌ها ایجاد می‌گردد [۳۳، ۴۱]. در مطالعه‌ای [۴۲] رشد و تکثیر سلول‌ها بر روی سطح داربست PLGA / MWCNT ارزیابی شد. آن‌ها فلوپدیا و پاهای کاذب سلول را در سطح داربست حاوی CNT مشاهده کردند. سلول‌ها از طریق منافذ CNT در داخل داربست مهاجرت و رشد می‌کنند و توسط فلوپدیا و پاهای کاذب با سلول‌های اطراف به راحتی ارتباط برقرار کرده و یک شبکه سلولی سه‌بعدی را ایجاد می‌کنند.

شکل ۷ چسبندگی سلول‌های MG-63 بر روی سطح داربست‌ها بعد از سه روز کشت را نشان می‌دهد. سلول‌ها بر روی سطح هر دو داربست گسترده و پهن شده‌اند. البته در روی سطح داربست PCL/Kr هنوز نقاطی بدون سلول مشاهده می‌شود؛ ولی سلول‌ها بر روی تمام سطح داربست حاوی CNT پهن شده‌اند. تحقیقات نشان داده است که نه تنها ترکیب شیمیایی داربست بلکه میزان تخلخل و اندازه تخلخل داربست بر رفتار سلولی در محیط کشت مؤثر می‌باشد [۲۳].



شکل ۶- میزان زنده‌مانی سلول‌های MG-63 پس از ۳ روز کشت بر روی سطح داربست‌ها



شکل ۷- تصاویر میکروسکوپ الکترونی روبشی چسبندگی سلول‌های MG-63 پس از ۳ روز کشت بر روی سطح داربست‌ها (الف) PCL/Kr و (ب) PCL/Kr/CNT فلش‌های زرد رنگ، پهن شونده سلول‌ها را بر روی الیاف را نشان می‌دهند

MG-63 فراهم کند. به دلیل حضور نانولوله کربن در داربست، زمان تخریب داربست افزایش یافت و با توجه به اینکه استخوان به زمان طولانی برای بازسازی نیاز دارد، این داربست می‌تواند گزینه مناسبی برای مهندسی بافت استخوان باشد.

قدردانی

نویسندگان از مرکز تحقیقات نانو دانشگاه صنعتی اصفهان و انسیتوپاستور تهران تشکر و قدردانی می‌کنند.

References:

1- D. Tang, RS. Tare, LY. Yang, DF. Williams, KL. Ou and RO. Oreffo, "Biofabrication of bone tissue: approaches, challenges and translation for bone regeneration", *Biomaterials*, Vol.83, pp.363-82, 2016.

2- HT. Lu, TW. Lu, CH. Chen and FL. Mi, "Development of genipin-crosslinked and fucoidan-adsorbed nano-hydroxyapatite/hydroxypropyl chitosan composite scaffolds for bone tissue engineering", *International journal of biological macromolecules*, Vol. 128, pp. 973-84, 2019.

نتیجه‌گیری

در این تحقیق، داربست پلی‌کاپرولاکتون/کراتین/نانولوله کربن با روش الکترونی ساختی شده و تأثیر نانولوله‌های کربن بر خواص سطحی، مکانیکی و بیولوژیکی داربست مورد بررسی قرار گرفت. از نتایج آزمون‌ها مشاهده گردید که با افزودن نانولوله کربن و SDS به داربست PCL/Kr، کاهش قطر الیاف و افزایش درصد تخلخل و استحکام کششی در داربست رخ می‌دهد. همچنین، درصد تخلخل و سطح ویژه مناسب داربست PCL/Kr/CNT می‌تواند بستری عالی برای رشد و چسبندگی سلول‌های

3- A. Sonoda, N. Nitta, S. Ohta, A. Nitta-Seko, S. Morikawa, Y. Tabata, M. Takahashi and K. Murata, " Controlled release and antitumor effect of pluronic F127 mixed with cisplatin in a rabbit model", *Cardiovascular and interventional radiology*, Vol. 33, pp. 135-42, 2010.

۴- م. مظفری، ن. جوهری و م.ح. فتحی، "داربست کامپوزیتی پلی‌کاپرولاکتون-هیدروکسی آپاتیت: بررسی تأثیر درصد ذرات هیدروکسی آپاتیت و مقایسه ذرات با سایز نانومتری و میکرومتری و اثر آن‌ها بر خواص مکانیکی و زیست‌تخریب‌پذیری داربست" فصلنامه علمی-پژوهشی

مواد نوین، سال ۵ شماره ۲۰، ص ۱۴۲-۱۳۱، تابستان ۱۳۹۴.

5-S. Deepthi, J. Venkatesan, SK. Kim, JD. Bumgardner and R. Jayakumar, "An overview of chitin or chitosan/nano ceramic composite scaffolds for bone tissue engineering", International journal of biological macromolecules, Vol 93, pp. 1338-53, 2016.

6- M. Martina and DW. Hutmacher, "Biodegradable polymers applied in tissue engineering research: a review", Polymer International, Vol. 56 , pp.145-57, 2007.

7- Y. Yan, H. Chen, H. Zhang, C. Guo, K. Yang, K. Chen, R. Cheng, N. Qian, N. Sandler, YS. Zhang and H. Shen, "Vascularized 3D printed scaffolds for promoting bone regeneration", Biomaterials, Vol. 190, pp. 97-110, 2019.

8- D. Shen, X. Wang, L. Zhang, X. Zhao, J. Li, K. Cheng and J. Zhang, "The amelioration of cardiac dysfunction after myocardial infarction by the injection of keratin biomaterials derived from human hair", Biomaterials, Vol. 32, pp. 9290-9, 2011.

9- Y. Li, Y. Wang, J. Ye, J. Yuan and Y. Xiao, "Fabrication of poly (ϵ -caprolactone)/keratin nanofibrous mats as a potential scaffold for vascular tissue engineering" ,Materials Science and Engineering: C, Vol. 68, pp.177-83, 2016.

10- P. Kakkar, S. Verma, I. Manjubala and B. Madhan, "Development of keratin–chitosan–gelatin composite scaffold for soft tissue engineering" ,Materials Science and Engineering: C, Vol. 45, pp. 343-7, 2014.

11- ZM. Mahdieh, V. Mottaghtalab, N. Piri and AK. Haghi, "Conductive chitosan/multi walled carbon nanotubes

electrospun nanofiber feasibility" Korean Journal of Chemical Engineering, Vol. 29, pp. 111-9, 2012.

12- TH. Kim, T. Lee, W. El-Said and JW. Choi, "Graphene-based materials for stem cell applications", Materials, Vol. 8, pp. 8674-90, 2015.

13- S. Sotiropoulou and NA. Chaniotakis, "Carbon nanotube array-based biosensor", Analytical and Bioanalytical Chemistry, Vol. 375, pp.103-5, 2003.

14- Y. Liu, J. Lu, G. Xu, J. Wei, Z. Zhang and X. Li, "Tuning the conductivity and inner structure of electrospun fibers to promote cardiomyocyte elongation and synchronous beating", Materials Science and Engineering: C, Vol. 69, pp.865-74, 2016.

15- B. Subia, J. Kundu and SC. Kundu, Biomaterial scaffold fabrication techniques for potential tissue engineering applications., Tissue engineering, p.141, india, 2010.

16- K. Ren, Y. Wang, T. Sun, W. Yue, H. Zhang, " Electrospun PCL/gelatin composite nanofiber structures for effective guided bone regeneration membranes", Materials Science and Engineering: C, Vol. 78, pp. 324-32, 2017.

17- W. Wang, B. Huang, JJ. Byun and P. Bartolo, " Assessment of PCL/carbon material scaffolds for bone regeneration", Journal of the mechanical behavior of biomedical materials, Vol. 93, pp. 52-60, 2019.

18- A. Oyefusi, O. Olanipekun, GM. Neelgund, D. Peterson, JM. Stone, E. Williams, L. Carson, G. Regisford and A. Oki, " Hydroxyapatite grafted carbon nanotubes and graphene nanosheets: Promising bone implant materials", Spectrochimica Acta Part A: Molecular

and Biomolecular Spectroscopy, Vol.132, pp. 410-6, 2014.

۱۹- س. نیکبخت کتولی، ع. دوست محمدی و ف. اسماعیلی، "ساخت داربست نانوکامپوزیتی کیتوسان/پلی وینیل الکل/نانولوله کربنی/شیشه زیست فعال برای مهندسی بافت عصب"، نشریه علمی پژوهشی مواد پیشرفته در مهندسی، سال ۳۵ شماره ۱، ص ۳۵-۴۶، بهار ۱۳۹۵.

20- ED. Yildirim, X. Yin, K. Nair and W. Sun, " Fabrication, characterization, and biocompatibility of single- walled carbon nanotube- reinforced alginate composite scaffolds manufactured using freeform fabrication technique, Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials: An Official Journal of The Society for Biomaterials, The Japanese Society for Biomaterials, and The Australian Society for Biomaterials and the Korean Society for Biomaterials, Vol. 87, pp. 406-14, 2008.

۲۱- م. میرحاج، م. محمودی و ع. شیانی، " بررسی تاثیر نانوذرات هیدروکسی آپاتیت بر خواص نانوالیاف کراتین جهت کاربرد در مهندسی بافت، " سال ۳۶ مواد پیشرفته در مهندسی، سال ۳۶ شماره ۴، ص ۴۵-۵۷، زمستان ۱۳۹۶..

22- FM. Ghorbani, B. Kaffashi, P. Shokrollahi, E. Seyedjafari and A. Ardeshirylajimi, " PCL/chitosan/Zn-doped nHA electrospun nanocomposite scaffold promotes adipose derived stem cells adhesion and proliferation", Carbohydrate polymers, Vol. 118, pp.133-42, 2015.

23- S. Gorgieva, L. Girandon and V. Kokol, " Mineralization potential of cellulose-nanofibrils reinforced gelatine scaffolds for promoted calcium deposition by mesenchymal stem cells", Materials Science and Engineering: C, Vol. 73 , pp. 478-89, 2017.

24- Y. Esparza, A. Ullah, Y. Boluk and J. Wu, " Preparation and characterization of thermally crosslinked poly (vinyl alcohol)/feather keratin nanofiber scaffolds", Materials & Design, Vol. 5, pp.133:1-9, 2017.

25- X. Zhao, YS. Lui, CK. Choo, WT. Sow, CL. Huang, KW. Ng, LP. Tan, JS. Loo, " Calcium phosphate coated Keratin-PCL scaffolds for potential bone tissue regeneration", Materials Science and Engineering: C, Vol. 49, pp.746-53, 2015.

26- H. Fong, I. Chun and DH. Reneker, " Beaded nanofibers formed during electrospinning", Polymer, Vol. 40, pp. 4585-92, 1999.

27- C. Kriegel, KM. Kit, DJ. McClements and J. Weiss, "Influence of surfactant type and concentration on electrospinning of chitosan-poly (ethylene oxide) blend nanofibers", Food Biophysics, Vol. 4, pp. 213-28, 2009.

28- MA. Shokrgozar, F. Mottaghitalab, V. Mottaghitalab and M. Farokhi, "Fabrication of porous chitosan/poly (vinyl alcohol) reinforced single-walled carbon nanotube nanocomposites for neural tissue engineering", Journal of biomedical nanotechnology, Vol. 7, pp. 276-84, 2011.

29- G. Salimbeygi, K. Nasouri, AM. Shoushtari, R. Malek and F. Mazaheri, "Fabrication of polyvinyl alcohol/multi-walled carbon nanotubes composite electrospun nanofibres and their application as microwave absorbing material", Micro & Nano Letters, Vol.8, pp. 455-9, 2013.

30- M. Boakye, N. Rijal, U. Adhikari and N. Bhattarai, "Fabrication and characterization of electrospun PCL-MgO-keratin-based composite nanofibers for biomedical applications", Materials, Vol. 8,

pp.4080-95, 2015.

31- RA. Ahmed, AM. Fekry and RA. Farghali, "A study of calcium carbonate/multiwalled-carbon nanotubes/chitosan composite coatings on Ti-6Al-4V alloy for orthopedic implants", *Applied Surface Science*, Vol. 285, pp. 309-16, 2013.

32- K. Wang, J. Pang, L. Li, S. Zhou, Y. Li and T. Zhang, " Synthesis of hydrophobic carbon nanotubes/reduced graphene oxide composite films by flash light irradiation" , *Frontiers of Chemical Science and Engineering*, Vol. 12, pp. 376-82, 2018.

33- M. Zarei and S. Karbasi, " Evaluation of the effects of multiwalled carbon nanotubes on electrospun poly (3-hydroxybutyrate) scaffold for tissue engineering applications. *Journal of Porous Materials*", Vol. 25, pp. 259-72, 2018.

34- Y. Mohammadi, H. Mirzadeh, FE. Moztarzadeh, M Solmeymani, Jabari E. "Design and fabrication of biodegradable porous chitosan/gelatin/tricalcium phosphate hybrid scaffolds for tissue engineering", *Iranian journal of journal of polymer science and technology (Persian)*, Vol. 20, pp. 297-308, 2007.

35- FL. Huang, QQ. Wang, QF. Wei, WD. Gao, HY. Shou and SD. Jiang, "Dynamic wettability and contact angles of poly (vinylidene fluoride) nanofiber membranes grafted with acrylic acid", *Express Polymer Letters*, Vol.4, pp. 551-558, 2010.

36- ZX. Meng, W. Zheng, L. Li and YF. Zheng, "Fabrication and characterization of three-dimensional nanofiber membrane of PCL-MWCNTs by electrospinning", *Materials Science and Engineering: C*, Vol. 30, pp. 1014-21, 2010.

37- K. Saeed, SY. Park, HJ. Lee, JB. Baek and WS. Huh, "Preparation of electrospun nanofibers of carbon nanotube/polycaprolactone nanocomposite", *Polymer*, Vol. 47, pp. 8019-25, 2006.

38- A. Edwards, D. Jarvis, T. Hopkins, S. Pixley and N. Bhattarai, " Poly (ϵ -caprolactone)/keratin- based composite nanofibers for biomedical applications", *Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials*, Vol. 103, pp. 21-30, 2015.

39- G. Liao, S. Jiang, X. Xu and Y. Ke, "Electrospun aligned PLLA/PCL/HA composite fibrous membranes and their in vitro degradation behaviors", *Materials Letters*, Vol. 82, pp. 159-62, 2012.

40- JN. Mackle, DJ. Blond, E. Mooney, C. McDonnell, WJ. Blau, G. Shaw, FP. Barry, JM. Murphy and V. Barron, "In vitro characterization of an electroactive carbon- nanotube- based nanofiber scaffold for tissue engineering", *Macromolecular bioscience*, Vol. 11, pp. 1272-82, 2011.

41- AS. Khan, AN. Hussain, L. Sidra, Z. Sarfraz, H. Khalid, M. Khan, F. Manzoor, L. Shahzadi, M. Yar and IU. Rehman, "Fabrication and in vivo evaluation of hydroxyapatite/carbon nanotube electrospun fibers for biomedical/dental application", *Materials Science and Engineering:C*, Vol. 80, pp. 387-96, 2017.

42- H. Zhang, " Electrospun poly (lactic-co-glycolic acid)/multiwalled carbon nanotubes composite scaffolds for guided bone tissue regeneration", *Journal of Bioactive and Compatible Polymers*, Vol. 26, pp. 347-62, 2011.