

## مقاله پژوهشی

## بررسی برون تنی داربست بر پایه پلی کاپرولاکتون/پلی هیدروکسی بوتیرات والرات در مهندسی بافت استخوان

وحید خیری ملاقاسم<sup>۱</sup>، آزاده آصف‌نژاد<sup>۲\*</sup>، محمدرضا نورانی<sup>۳</sup>، وهاب‌الدین گودرزی<sup>۳</sup> و محمدرضا کلائی<sup>۴</sup>

۱- گروه مهندسی پزشکی، واحد تهران-جنوب، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران

۲- گروه مهندسی پزشکی، واحد علوم و تحقیقات، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران

۳- گروه مهندسی بافت، مرکز تحقیقات نانو بیوتکنولوژی، دانشگاه علوم پزشکی بقیه الله (عج)، تهران، ایران

۴- دانشکده مهندسی شیمی-پلیمر، واحد تهران-جنوب، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران

۵- مرکز تحقیقات نانو، واحد تهران-جنوب، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران

تاریخ ثبت اولیه: ۱۴۰۱/۰۶/۱۸، تاریخ دریافت نسخه اصلاح شده: ۱۴۰۱/۰۹/۲۹، تاریخ پذیرش قطعی: ۱۴۰۱/۱۲/۱۵

### چکیده

در این مطالعه به منظور دستیابی به داربست‌های با خواص مطلوب از نقطه نظرهای خواص مکانیکی و زیستی، با بکارگیری پلیمرهای PCL و PHBV به مهندسی بافت استخوان پرداخته شده است. برای ساخت داربست‌ها از روش الکتروریسی به صورت هسته-پوسته استفاده شده است. پلی کاپرولاکتون پلیمر هسته و PHBV پلیمر پوسته را تشکیل داده است. نتایج خواص مکانیکی نمونه‌ها نشان داد که افزودن گرافن اکسید سبب بهبود قابل توجه خواص الاستیک داربست‌ها بخصوص مدول الاستیک تا ۶۱/۱۴ MPa و استحکام کششی تا ۳/۲۴ MPa شده است. نتایج آزمون سمیت سلولی با روش MTT، به خوبی نشان داد که نمونه‌ها در مقایسه با نمونه کنترل برای زمان‌های ۱، ۳، ۵ و ۷ روز زنده‌مانی سلولی بهتری داشته که نشان از چسبندگی و رشد سلولی مناسب بر روی داربست‌های ساخته شده بوده است. همچنین به منظور ارزیابی توانمندی داربست‌ها در تمایز سلولی از آزمون فعالیت آلکالین فسفاتاز (ALP) استفاده شد و میزان ALP نمونه‌ها در روز ۷، ۱۴ و ۲۱ از کشت سلولی مورد بررسی قرار گرفت که نتایج حاکی از افزایش میزان ALP تا روز ۱۴ بخصوص برای نمونه BS3 بوده است که موید صحت تمایز سلول‌ها بوده است. همچنین از آزمون رنگ‌آمیزی آلزارین قرمز (ARS) برای تایید تمایز سلولی و معدنی شدن داربست‌ها استفاده شد، که این آزمون هم فرآیند معدنی شدن برای نمونه‌ها را نشان داد.

**واژه‌های کلیدی:** داربست، مهندسی بافت استخوان، هسته-پوسته، گرافن اکسید، کلسیم فسفات.

### ۱- مقدمه

برای بدن تامین می‌کند. مهندسی بافت استخوان یک رشته نوظهور است که هدف آن مبارزه با محدودیت‌های درمان‌های مرسوم بیماری‌های استخوانی است. نقایص استخوانی یکی از علل اصلی ناتوانی در بیماران مسن است که

استخوان به عنوان دومین عضو پیوندی رایج در جهان شناخته شده است که استحکام، سختی و درجه مشخصی از الاستیسته

\* **عهده‌دار مکاتبات:** آزاده آصف‌نژاد

نشانی: تهران، دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم و تحقیقات، گروه مهندسی پزشکی

تلفن: ۰۲۱-۴۰۴۴۸۳۲۹، دورنگار: ۰۲۱-۲۲۵۷۳۰۷۷، پست الکترونیکی: asefnejad@srbiau.ac.ir

است که استخوان به عنوان یک بافت دینامیک محسوب می شود [۸،۹]. خصوصیات داربست باید طوری باشد که زیست سازگاری لازم را تامین کنند. همچنین باید خواص مکانیکی مناسبی داشته باشد تا تنش محیطی درستی را برای بافت تازه شکل گرفته اطراف داربست فراهم آورد. مورفولوژی سطحی آن باید طوری باشد که اجازه ورود مواد مغذی را به سلول بدهد و خواص شیمیایی مناسب برای اتصال به سلول ها را داشته باشد. خواص مورد نیاز برای کاربرد داربست در مهندسی بافت زیست تجزیه پذیری، غیر سمی بودن و زیست سازگاری آن است. فقدان هر یک از این خواص می تواند کاربرد داربست را با مشکل روبرو کند، به همین دلیل ساخت داربست مناسب همواره یکی از مهم ترین چالش های مهندسی بافت است [۱۰]. خواص سطحی داربست هم از لحاظ شیمیایی و هم از لحاظ توپوگرافی سطح، می تواند اتصال سلولی و تکثیر آن را تحت تأثیر قرار دهد. از مهم ترین ویژگی یک داربست مهندسی بافت استخوان، زیست سازگاری آن است. یک داربست ایده آل با قرار گرفتن در محیط بدن نباید سبب التهاب شود یا به عنوان یک ماده سمی عمل کند. اگر چنین باشد سبب مرگ سلولی و وخیم تر شدن وضعیت ضایعه خواهد شد. تمامی اجزاء و محصولات مواد داربست شامل منومرها، آغازگر، مواد اتصال دهنده عرضی، حلال ها و مواد حاصل از تجزیه شدن آن ها باید زیست سازگار باشد [۱۰،۱۱].

الکتروریسی یک روش منحصربفرد برای تولید الیاف با قطرهایی در مقیاس زیر میکرومتر و یا نانومتری است. این روش شامل فرآیندی است که در آن محلول و یا مذاب پلیمری تحت اعمال ولتاژ بالا کشیده و به الیاف ظریف تبدیل می شود [۱۲]. الکتروریسی هسته-پوسته، یک روش پیچیده تولید نانوالیاف با ساختار آرایش یافته هسته (مغزی) و پوسته است. در این روش ریسندۀ هم محور به این صورت طراحی شده است که یک سرنگ کوچکتر (داخلی) به صورت هم مرکز در داخل یک سرنگ بزرگتر (بیرونی) قرار می گیرد. سوزن بیرونی به مخزن محتوی محلول پوسته و سوزن داخلی

منجر به کاهش کیفیت زندگی می شود [۱،۲]. انواع مختلفی از نقایص استخوان با چالش های عمده ای که سطح بالینی با آن مواجه است ایجاد شده اند که منجر به تقاضای بالایی برای مواد ترمیم استخوان می شود. مهندسی بافت استخوان بر استراتژی های درمانی جایگزین برای کاهش کاستی های درمان های بالینی فعلی (مانند عفونت، آسیب های عروقی، رد سیستم ایمنی، درد مزمن ناحیه اهداکننده و عوارض) با استفاده از ترکیب علم مواد، اصول مهندسی و زیست شناسی تمرکز می کند [۳-۵، ۱۳]. امروزه با پیشرفت علم و توسعه فناوری و مهندسی پزشکی در بکارگیری زیست مواد برای ترمیم بافت های آسیب دیده، ایده بازسازی بافت های آسیب دیده و از دست رفته به واقعیت تبدیل شده است. رشد و توسعه زیست مواد در این بخش سبب بوجود آمدن شاخه ای در مهندسی پزشکی به نام مهندسی بافت گردید. در مهندسی بافت ابتدا یک ماده متخلخل به عنوان بستر خارج سلولی یا داربست برای رشد سلول ها تهیه شده و سپس عوامل رشد بر روی آن قرار می گیرد. پس از رشد مناسب سلول ها، داربست از محیط آزمایشگاه به درون بدن موجود زنده و بافت آسیب دیده منتقل می شود. سپس به تدریج رگ ها به داربست نفوذ می کنند تا بتوانند سلول ها را تغذیه نمایند. در بافت های نرم بدن، داربست تخریب شده و بافت جدید جایگزین آن می شود ولی در بافت های سخت، می توان از موادی بهره گرفت که لزوماً تخریب پذیر نباشند [۶،۷]. وظیفه بافت استخوان محافظت مکانیکی از بدن بوده و منبع عمده ای از مواد معدنی کلسیمی همچون هیدروکسی آپاتیت و مغز استخوان که مولد سلول های خونی بوده می باشد. سلول های استخوانی شامل انواع محافظ، استئوبلاست، استئوسیت و سلول های مخرب استخوان یعنی استئوکلاست ها هستند. استئوبلاست ها سلول هایی هستند که مسئول سنتز و ذخیره فاز معدنی استخوان و بنا بر این معدنی کردن ماتریس خارج سلولی هستند. استئوکلاست ها، استخوان ذخیره شده را می فرسایند، در حالی که استئوبلاست ها بطور مداوم استئویدها و مواد معدنی را جایگزین می کنند. به همین دلیل

هیدروکسی آپاتیت و نانویوشیشه برای تهیه داربست استخوانی استفاده کردند. نتایج آن‌ها نشان داد که نمونه‌های نانوالیاف PCL/PHBV حاوی نانوذرات هیدروکسی آپاتیت و نانویوشیشه از چسبندگی پروتئین و همچنین فعالیت سلولی بالاتری در مقایسه با نمونه‌های خام برخوردار هستند. همچنین Yao و همکاران [۱۸] نشان دادند که نانوالیاف‌های ساخته شده از پلی کاپرولاکتون و پلی لاکتیک اسید با نسبت ۴ به ۱ با هدف ساخت داربست دارای قطر در محدوده ۱۲۰ تا ۹۰۰ نانومتر بوده است. برای ساخت نانوالیاف‌های ساخته شده از آلیاژ PCL/PLA در درصدهای وزنی ۷، ۸، ۹ و ۱۰ درصد وزنی با نسبت PCL به PLA ذکر شده در بالا استفاده شد. در مطالعه He و همکاران [۱۹] از روش الکترورسی هم محور برای ساخت نانوالیاف‌های هسته-پوسته بر پایه پلی کاپرولاکتون/ژئین جهت ترمیم بافت استفاده کردند. در ساخت نانوالیاف‌های ذکر شده از داروی مترونیدازول به همراه PCL به عنوان جزء هسته نانوالیاف استفاده. در مطالعه Aidun و همکاران [۲۰] انجام فعالیت فیزیوشیمیایی و بیولوژیکی داربست بر پایه پلی کاپرولاکتون/کیتوسان/کلاژن حاوی ۰،۵/۳ و ۶ درصد وزنی گرافن اکسید مورد ارزیابی قرار گرفت. نتایج نشان داد که با افزایش میزان GO، فعالیت استوژنیک داربست‌ها نیز افزایش می‌یابد. نتایج آن‌ها نشان داد ضمن اینکه با افزایش گرافن اکسید، زیست‌سازگاری نمونه‌ها افزایش پیدا می‌کند، فعالیت‌های سلولی هم بهبود قابل توجهی یافته است. نتایج رنگ آمیزی آلزارین قرمز برای نمونه‌ها نشان داد که با افزایش میزان گرافن اکسید تا ۳ و ۶ درصد وزنی، تا حد قابل توجهی رسوب کلسیم که نشان دهنده فرآیند معدنی شدن است برای دوره زمانی ۷ و ۱۴ روزه افزایش پیدا کرده است.

در تحقیقی که توسط Shuai و همکاران [۲۱] انجام گرفت گرافن اکسید اصلاح شده با نانومیله‌های هیدروکسی آپاتیت در ساخت داربست‌هایی از جنس PLLA استفاده شد و نتایج نشان داد که خواص زیستی مکانیکی داربست‌ها بهبود قابل توجهی داشته است. Ali و همکاران [۲۲] به بررسی تاثیر

به محلول پلیمری یا مایع با مولکول‌های کوچک نظیر روغن معدنی که هسته محسوب می‌شوند، ضمیمه می‌گردند، و این در حالی است که هر کدام از سرنگ‌ها به پمپ‌های جداگانه وصل هستند. ریز قطره‌های متشکل از پوسته و هسته در لبه نازل هم محور تشکیل می‌شود و با افزایش ولتاژ مخروط تیلور در نوک سوزن شکل می‌گیرد و سپس به واسطه نیروی الکترواستاتیک، نازک شدن جت هسته-پوسته اتفاق می‌افتد [۱۳].

Kramschuster و Trung [۱۴] از ترکیب دو روش قالبگیری تزریقی میکروسلولی و سنگشویی (leaching) برای ساخت داربست متخلخل با حفرات به هم پیوسته استفاده کردند. آن‌ها پلی لاکتیک اسید، ذرات نمکی و پلی وینیل الکل را به وسیله اکسترودر دو ماریچ ترکیب کردند و سپس به درون قالب‌های میکروسلولی تزریق کردند. آن‌ها با آلیاژسازی PLA زیست تخریب پذیر و PVA محلول در آب موفق به تولید یک داربست متخلخل با حفرات به هم پیوسته شدند. در مطالعه‌ای که توسط Meng و همکاران [۱۵] انجام شد، نانوالیاف کامپوزیتی بر پایه PHBV و ژلاتین بصورت کو-الکترورسی تهیه کردند. نانوالیاف‌های تولید شده در محدوده ۴۰۰ تا ۱۰۰۰ nm بوده است. نتایج MTT نشان داد که نانوالیاف ژلاتین/PHBV در مقایسه با نانوالیاف PHBV و فیلم PHBV از زنده ماندن سلولی بالاتر برخوردار بوده است. در مطالعه Zhang و همکاران [۱۶] آن‌ها از الکترورسی PHBV، پلی (DL-( $\alpha$ ,  $\beta$ )-اسپارتیک اسید (PAA) و هیدروکسی آپاتیت (HA) برای ساخت داربست در مهندسی بافت استخوان استفاده کردند. نتایج ارزیابی بیولوژیکی برون تنی نشان داد که داربست‌های بر پایه نانوالیاف PHBV/PAA/HA از سطح زیست‌سازگاری بالایی برخوردار بوده و محیطی مناسب برای رشد و فعالیت‌های سلول‌های استئوبلاست بوده است. نتایج SEM نشان داد که لیاف‌های ساخته شده، یکدست و فاقد بخش‌های مهره‌ای شکل (bead) بوده است. در مطالعه Shalumon و همکاران [۱۷]، از الکترورسی پلی کاپرولاکتون/کیتوسان و نانوذرات

درصد وزنی PCL در ترکیبی از دی متیل فراماید و کلروفرم با نسبت ۱ به ۴ حل شده و به مدت ۱۶ ساعت در دمای محیط بر روی هم‌زن مغناطیسی قرار داده شد. برای اضافه کردن گرافن اکسید به محلول هسته، نانوذرات در مقداری DMF و کلروفرم اضافه شده و به منظور ایجاد یک پراکنش یکنواخت به کمک حمام مافوق صوت به مدت ۳۰ دقیقه التراسونیک گردید. قابل ذکر است که مقدار پلیمر تعیین شده و نسبت حلال‌ها بر اساس اطلاعات اولیه حاصل از مقالات [۲۴، ۲۵] و سعی و خطا آزمایشگاهی تعیین شده است. نکته قابل توجه در تعیین ترکیب درصد حلال‌ها، معیار قرار دادن پارامتر حلالیت حلال ترکیبی بوده است [۲۶]. پس از دستیابی به یک ترکیب یکنواخت، این ماده به محلول PCL اضافه گردید. همچنین کلسیم فسفات در ترکیب درصد‌های مورد نظر مطابق با جدول ۳-۲، پس از ۳۰ دقیقه التراسونیک به محلول PHBV اضافه گردید. برای ارزیابی خواص مکانیکی نمونه‌ها نمونه‌های نانوالیاف تهیه شده ابتدا در ابعاد  $20 \times 10 \text{ mm}^2$  تهیه شدند و سپس بوسیله دستگاه Universal test machine (SANTAM STM-20) در نرخ کرنش  $10 \text{ mm/min}$  و در دمای اتاق مورد ارزیابی قرار گرفت. مدول الاستیک، استحکام کششی و ازدیاد طول تا نقطه پارگی مورد بررسی قرار گرفت. قابل ذکر است نتایج گزارش شده حاصل میانگین سه بار تکرار آزمون برای هر نمونه بوده است. آزمون بر اساس استاندارد ASTM D638 انجام شد. برای تعیین مورفولوژی نمونه‌ها، در ابتدا نمونه‌های نانوالیاف در ابعاد  $1 \times 1 \text{ cm}^2$  تهیه شده و بروی نگهدارنده قرار داده شدند و با دستگاه تحت فرآیند پوشش‌دهی با طلا (K500, Emitech, UK) به مدت ۵۰ s قرار گرفتند. پس از آن به منظور ارزیابی مورفولوژی نمونه‌ها، آزمون FESEM با دستگاه SIGMA VP (Zeiss, Oberkochen, Germany) در ولتاژ  $15 \text{ kV}$  و بزرگنمایی ۱۰ برابر مورد بررسی قرار گرفتند. ارزیابی آبدوستی و اندازه‌گیری انرژی آزاد سطح نمونه‌ها از آزمون اندازه‌گیری زاویه تماس آب با بکارگیری دستگاه OCA 15 plus (dataphysics company, Germany) با

گرفتن اکسید و گرافن اکسید کاهش یافته بر روی میکروساختار و خواص مکانیکی داربست‌های کامپوزیتی بر پایه کیتوسان/هیدروکسی آپاتیت/زایلین پرداختند و نتایج نشان داد که نمونه‌های حاوی GO و RGO فرآیند معدنی شدن استخوان در آن‌ها بهتر صورت پذیرفته است و همچنین فعالیت آلکالین فسفاتاز بهتری نسبت به سایر نمونه‌ها داشته‌اند. در مطالعه دیگر که توسط Aslam-khan و همکاران [۲۳] انجام شد تاثیر نانوذرات هیدروکسی آپاتیت و گرفتن اکسید بر روی خواص مکانیکی داربست‌های بر پایه سلولز باکتریایی و بتا گلوکان ( $\beta$ -glucan) مورد بررسی قرار گرفت که نتایج مورفولوژی و تخلخل نشان از بهبود ساختار نمونه‌ها بوده که نهایتاً سبب تقویت خواص مکانیکی نمونه‌ها گردید.

هدف این مطالعه دستیابی به داربست استخوانی نانوالیاف هسته-پوسته PHBV-PCL با داشتن خواص مطلوب مکانیکی و زیستی که همواره به عنوان چالش داربست‌های استخوانی مطرح می‌شود بوده است. برای دستیابی به هدف ذکر شده، برای نخستین بار نانوذرات پرکننده اکسید گرافن و کلسیم فسفات  $\text{CaPO}_4$  به ساختار هسته-پوسته اضافه شده است. از اکسید گرافن به دلیل خواص بسیار خوب مکانیکی در هسته نانوالیاف و از کلسیم فسفات به خاطر خاصیت فوق‌العاده زیستی و قابلیت معدنی‌سازی (mineralization) در پوسته نانوالیاف‌های تولیدی با ساختار هسته-پوسته استفاده شده است. ارزیابی برون تنی نمونه‌های ساخته شده نشان داد که نمونه‌های حاصله از خاصیت زیستی و استخوان‌سازی مطلوبی برخوردار بوده است.

## ۲- فعالیت‌های تجربی

برای تهیه محلول مورد نظر پوسته نانوالیاف، ۱۸ درصد وزنی PHBV در ترکیبی از دی متیل فراماید و کلروفرم با نسبت ۱ به ۴ حل شده و به مدت ۱۶ ساعت در دمای محیط بر روی هم‌زن مغناطیسی قرار داده شد. در سوی دیگر همچون محلول پوسته، به منظور تهیه محلول هسته نانوالیاف، ۱۲

میلی مولار و آسکروویک اسید بی فسفات ۵۰ میکروگرم بر میلی لیتر بوده است انتقال داده شد و انکوبه گردید و پس از گذشت ۱، ۳، ۵ و ۷ روز از زمان کشت سلولی در محیط کشت مورد نظر، سلول‌ها با PBS شسته شده و سپس محلول MTT با غلظت ۵ mg/ml به هر کدام از چاهک‌ها اضافه شد و به مدت ۲۴ h و در ۳۷ °C در یک جو دارای ۸۵ درصد رطوبت و ۵ درصد دی اکسید کربن انکوبه گردید. پس از این مرحله، محلول رویی به آرامی جدا شده و ۱۰۰ میکرولیتر DMSO به بلورهای فرمازان باقیمانده در هر چاهک اضافه شد و در نهایت چگالی نوری هر نمونه توسط یک دستگاه خوانشگر (Biotech, Germany) در طول موج ۵۷۰ nm ثبت گردید.

برای بررسی تمایز سلولی استوژنیک، سلول‌های کشت داده شده بر روی داربست‌ها در بازه‌های زمانی ۷، ۱۴ و ۲۱ روزه، فعالیت ALP نمونه‌ها با بکارگیری کیت ALP مورد بررسی قرار گرفت. برای این منظور ابتدا سلول‌ها با محلول PBS تحت شستشو قرار گرفتند. سپس در محلول بافر لیز کننده (Triton-x100 0/05%, MgCl<sub>2</sub> 1 mM, Tric HCl 10mM, pH=7.5) قرار داده شد و سپس با سرعت ۱۲۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفیوژ گردید. سپس ۰/۱ میلی لیتر از محلول رویی با ۰/۵ میلی لیتر پارا-نیتروفنیل فسفات (PNP) و ۰/۵ میلی لیتر بافر آلکالین ترکیب شدند. سپس به مدت ۱ ساعت انکوبه گردید و پس از آن ۱ میلی لیتر محلول سود ۰/۰۲ نرمال به عنوان متوقف کننده به آن اضافه شد و در نهایت چگالی نوری نمونه‌ها در طول موج ۵۷۰ nm توسط خوانشگر الایزا شرکت بایوتک آلمان مورد بررسی قرار گرفت. میزان پروتئین موجود در محلول رویی به کمک روش برادفورد و با استفاده از سرم آلبومین گاوی به عنوان استاندارد اندازه‌گیری شد. قابل ذکر است که فعالیت آنزیم آلکالین فسفاتاز در نمونه سلولی لیز شده و بر اساس غلظت مساوی از پروتئین در حضور نیتروفنیل فسفات به عنوان سوبسترا و با استفاده از کیت اندازه‌گیری آلکالین فسفاتاز انجام شد.

به جهت تعیین میزان معدنی شدن سلولی از این روش استفاده

روش قطره ساکن استفاده شد. در این آزمون از یک میکروسرنگ برای اعمال یک قطره ۵ میکرولیتری از آب مقطر بر روی سطح نمونه‌ها استفاده شد. زاویه تماس گزارش شده حاصل ۵ مرتبه اندازه‌گیری زاویه تماس از نقاط مختلف نمونه بوده است. همچنین برای اندازه‌گیری انرژی آزاد سطح از معادله Young-Dupre استفاده شد.

$$\Delta G = (1 + \cos\theta)\gamma_L^T \quad (1)$$

در این رابطه  $\theta$  زاویه تماس آب با سطح نمونه بوده و  $\gamma$  کشش سطحی آب در ۲۰ °C که برابر ۷۲ mJ/m<sup>2</sup> می‌باشد. برای سنجش زیست تخریب‌پذیری نمونه‌های داربستی، نمونه‌ها در ابعاد (تقریباً ۱\*۱ cm<sup>2</sup>) و جرم مشخص در محلول PBS حاوی غلظت ۴ میلی گرم بر لیتر لیزوزوم به عنوان عامل تخریب کننده در دمای ۳۷ °C انکوبه شدند. محلول لیزوزوم هر هفته یکبار به منظور بهبود کارایی تعویض می‌شد. در زمان‌های تعیین شده نمونه‌ها از محلول تخریب کننده خارج شده و در یک آون خلاء در دمای ۶۰ °C و به مدت ۲۴ ساعت خشک گردید. در نهایت جرم نمونه‌ها قبل و بعد از آزمون اندازه‌گیری شد تا میزان کاهش جرم نمونه‌ها مورد مطالعه قرار گیرد.

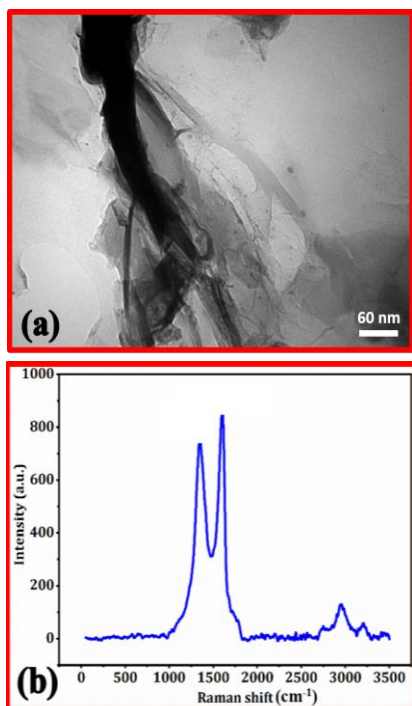
به منظور ارزیابی زیست‌سازگاری داربست‌های ساخته شده، از آزمون زنده‌مانی سلولی با روش MTT در دوره‌های زمانی کشت سلولی ۱، ۳، ۵ و ۷ روزه انجام شد. برای این منظور داربست‌ها به داخل یک میکروپلیت ۴۸ چاهک قرار داده شد و پانچ گردید. سپس فرآیند استریل کردن به مدت ۲۰ ثانیه با پرتوی UV برای هر دو طرف نمونه‌ها انجام شد و با محلول اتانول ۷۰ درصد به مدت نیم ساعت ادامه پیدا کرد و سپس الکل حذف و داربست‌ها با PBS شستشو داده شدند و یک شبانه روز داخل انکوباتور در ۳۷ درجه سانتی‌گراد انکوبه شدند. پس از آن سلول‌ها به میکروپلیت که حاوی محیط کشت DMEM حاوی ۱۰٪ سرم جنین گاوی (FBS)، دکزامتازون با غلظت ۱۰<sup>-۷</sup> مولار، بتاگلیسرول فسفات ۱۰

$\text{cm}^{-1}$ ) قرار گرفته است که تایید کننده ساختار گرافن اکسید می باشد. پیک های D و G در ساختار گرافن اکسید به هیبرید  $\text{sp}^2$  اتصالات کربن ارتباط داده می شود [۲۹،۳۰]. علاوه بر جایگاه پیک های D و G، شدت آن ها نیز از اهمیت ویژه ای برخوردار است.  $I_D/I_G$  یکی از ابزارهای بررسی نقص در ساختار GO به حساب می آید [۳۰]. در این مطالعه این نسبت ۰/۹۵ بدست آمد. به دلیل شرایط اکسیداسیونی که در فرآیند تولید گرافن اکسید وجود دارد معمولاً این نسبت به دلیل متاثر شدن از نانوصفحه ها کمتر از گرافن می باشد. همچنین حضور پیک های 2D و D+G در ساختار گرافن اکسید نشان دهنده نقص هایی در ساختار صفحه ای گرافن اکسید بوده که می توان آنرا به فرآیند اکسیداسیون و حضور گروه های کربوکسیلیک اسید و هیدروکسیل در ساختار گرافن اکسید ارتباط داد [۳۱]. بنابراین انتظار می رود که خصیصه نانوصفحه ای گرافن اکسید در کنار گروه های عاملی قطبی آن سبب بهبود پخش پذیری و توزیع آن در بستر پلی کاپرولاکتون شود که در نهایت سبب تقویت خواص مکانیکی نانوالیاف ها می شود.

شد. سلول ها پس از پایان ۲۱ روز با محلول FBS شسته شده و سپس به مدت ۱۵ دقیقه در دمای اتاق و در محلول فرمالدهید ۱۰ درصد تثبیت شدند. سپس میکروپلیت با رنگ آمیزی آلزارین قرمز رنگ آمیزی شد و به ۳۰ دقیقه نگه داشته شد و در آب دیونیزه شسته شد. کمی سازی نیز بر اساس پروتکل کیت مربوطه انجام شد. برای کمی کردن میزان معدنی شدن، مطابق پروتکل شرکت سازنده، ۴۰۰  $\mu\text{l}$  اسید استیک به هر کدام از چاهک های میکرو پلیت اضافه شد و برای ۳۰ دقیقه و در دمای  $37^\circ\text{C}$  تحت هم زدن، انکوبه گردید. در ادامه با استفاده از یک اسکرابر، سلول ها به آرامی از پلیت جدا شدند و همراه با اسید استیک به لوله میکرو سانتریفیوژ انتقال داده شدند و در مدت ۱۰ دقیقه در دمای  $85^\circ\text{C}$  نگه داشته شد. و پس از آن سریعاً منجمد شدند و پس از گذشت ۵ دقیقه در دور ۱۸۰۰۰ g و بمدت ۱۵ دقیقه سانتریفیوژ شدند. سپس ۴۰۰  $\mu\text{l}$  از محلول حاصل نمونه گیری شده و به یک لوله جدید انتقال یافت و پس از خنثی شدن pH با استفاده از هیدروکسید آمونیوم، ۱۵۰  $\mu\text{L}$  از آن به یک پلیت ۹۶ چاهکی انتقال یافت و سپس چگالی نوری در طول موج ۴۰۵ نانومتر مورد بررسی قرار گرفت.

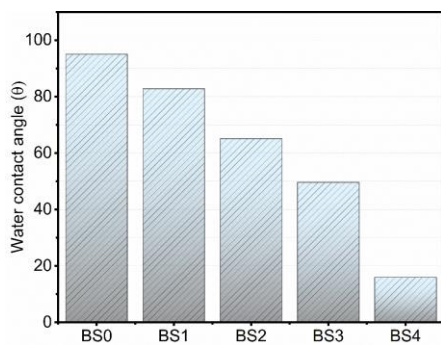
### ۳- نتایج و بحث

تصویر TEM (شکل ۱a) نتایج نشان از مناطق روشن و غیرشفاف در کنار ایجاد چین و چروک هایی بوده که براساس مراجع [۲۷،۲۸] تعیین کننده ساختار گرافن اکسید می باشد. ایجاد مناطق روشن در ساختار گرافن اکسید به مرحله اکسیداسیون ساخت گرافن اکسید ارتباط داد می شود. بنابراین مشاهده این نواحی در ساختار گرافن اکسید حضور گروه های عاملی اکسیژن دار را بر روی سطح نانوصفحات تایید می کند [۲۸]. از آزمون رامان به منظور ارزیابی ساختار گرافن اکسید استفاده شد. حضور دو پیک اصلی موسوم به پیک های D و G از مشخصه مواد کربنی به خصوص گرافن و گرافن اکسید می باشد. همانطور که در شکل ۱b مشخص شده است پیک D در  $1351 \text{ cm}^{-1}$  و پیک G در  $1593 \text{ cm}^{-1}$



شکل ۱: ارزیابی ساختار گرافن اکسید؛ (a) TEM و (b) طیف رامان.

به شدت افت پیدا کرده و به ۱۵/۹۸ درجه رسیده است که نشان دهنده تاثیر گرافن اکسید در آبدوست کردن سطح می باشد. از آنجایی که بر روی صفحات گرافن اکسید غلظت گروه های هیدروکسیل و کربوکسیلیک اسید زیاد است و از طرف دیگر به دلیل نانومتريک بودن این ذرات و میزان بالای نسبت سطح به حجم آن گروه های در دسترس قطبی همچون هیدروکسیل و کربوکسیلیک اسید به شکل قابل توجهی زیاد بوده و منجر به افزایش برهمکنش های دو قطبی شده که در نهایت سبب کاهش انرژی سطحی نیز می شود که باعث شده قطره آب سریعاً بر روی سطح پخش شود. انرژی آزاد سطح نیز در کنار زاویه تماس آب، دو پارامتری می باشد که به کمک آن می توان آبدوستی و آبگریزی سطح و قابلیت ترشوندگی آن ها را مورد بررسی قرار داد [۳۶]. در حقیقت همین انرژی آزاد سطح است که نقش تاثیر گذاری در چسبندگی سلول و شروع فعالیت آن بر روی داربست دارد. بطور کلی در موضوع چسبندگی انرژی سطح کافی، از ضروریات بستر مورد نظر در تماس با محیط مورد نظر است. در تماس با محیط های بیولوژیکی، انرژی آزاد سطحی تعیین کننده برهمکنش سطح با سلول یا بافت مورد نظر خواهد بود.



شکل ۲: نتایج زاویه تماس آب داربست ها.

خواص مکانیکی یکی دیگر از خصوصیات برجسته یک داربست مناسب در مهندسی بافت استخوان به حساب می آید. مدول الاستیک، استحکام کششی و ازدیاد طول تا نقطه پارگی را از معیارهای کاربردی و مهم در ارزیابی خواص مکانیکی پلیمرهای مورد استفاده در مهندسی بافت استخوان

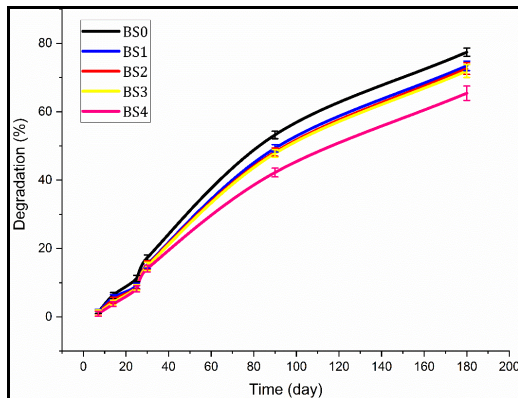
داشتن خواص سطح مناسب به منظور چسبندگی سلولی و رشد سلول بر روی آن یکی از الزامات مهندسی بافت است. انرژی آزاد سطح و ترشوندگی سطح از پارامترهای تاثیر گذار در چسبیدن سلول بر روی داربست می باشد. اندازه گیری زاویه تماس همواره به عنوان یک معیار پذیرفته شده در آبدوستی و آبگریزی سطح مطرح است [۳۲]. عموماً سطح با اندازه زاویه تماس بالاتر از ۹۰ درجه را به عنوان یک سطح آبگریز و سطح با اندازه زاویه تماس کمتر از ۹۰ درجه به عنوان یک سطح آبدوست دسته بندی می کنند [۳۳]. آبدوستی و انرژی سطح از موارد تاثیر گذار در چسبندگی سلولی بر روی سطح یک زیست پلیمر محسوب می شود. بر اساس مراجع برای اینکه یک سطح حداکثر میزان چسبندگی سلولی را از خود نشان دهد باید از سطح متوسطی از آبدوستی برخوردار باشد. در بعضی از مراجع زاویه تماس کمتر از ۶۰ درجه [۳۴] و در بعضی دیگر زاویه ۲۰ تا ۴۰ درجه [۳۵] به عنوان بهترین زاویه برای چسبندگی و رشد سلولی مطرح شده است. بطور کلی نانوالیاف ها به دلیل خصلت نانویی و تخلخل بالا دارای سطح آبدوستی بالایی هستند. نتایج این مطالعه نشان داد که نمونه BS0 دارای زاویه تماس ۹۵ بوده است که می توان آن را در گروه سطوح آبگریز دسته بندی کرد (شکل ۲). در صورتیکه برای نمونه BS1 که علاوه بر ترکیب درصد نمونه BS0 دارای ۰/۵ درصد وزنی گرافن اکسید در هسته و ۱ درصد وزنی کربنات کلسیم در پوسته نانوالیاف بوده و زاویه تماس آب به ثبت رسیده برای این نمونه ۸۲/۸ درجه بوده که از سطح آبدوستی بالاتری نسبت به نمونه BS0 برخوردار است. همانطور که در شکل ۲ مشخص شده است، با افزایش میزان کلسیم فسفات تا ۳ درصد وزنی برای نمونه BS2، زاویه تماس آب تا ۶۵/۱۲ درجه کاهش پیدا کرد که تاثیر کلسیم فسفات بر روی بهبود آبدوستی PCL/PHBV به وضوح قابل تشخیص است. اما برای نمونه های BS3 و BS4 که دارای ۱ و ۱/۵ درصد وزنی نانوذرات گرافن اکسید در هسته نانوالیاف بودند، زاویه تماس برای نمونه BS3، ۴۹/۶ درجه و برای نمونه BS4 زاویه تماس

به حساب می‌آید [۳۷]. همانگونه که در جدول ۱ مشخص شده است چه با افزایش میزان گرافن اکسید در هسته و چه با افزایش میزان کلسیم فسفات در پوسته نانوالیاف شاهد افزایش مدول الاستیک، استحکام کششی و ازدیاد طول تا نقطه پارگی هستیم که همگی گویای بهبود خواص مکانیکی نمونه‌های اصلاح شده می‌باشد. در حقیقت از آنجایی که کلسیم فسفات و گرافن اکسید یک ماده الاستیک هستند، با افزایش میزان آن‌ها در ساختار نانوالیاف PCL/PHBV، شاهد تقویت فاز الاستیک پلیمر خواهیم بود. بنابراین برای یک ماده ویسکوالاستیک، با تقویت فاز الاستیک شاهد، افزایش مدول و بهبود خواص مکانیکی خواهیم بود. براساس جدول ۱ نمونه خام PCL/PHBV فاقد گرافن اکسید و کربنات کلسیم دارای  $1/53$  MPa استحکام کششی،  $24/20$  MPa مدول الاستیک و  $140/4$  درصد ازدیاد طول تا نقطه پارگی بوده است. برای نمونه BS1 که حاوی  $0/5$  درصد وزنی گرافن اکسید در هسته و  $1$  درصد وزنی کلسیم فسفات در پوسته بوده است استحکام کششی به  $2/11$  و مدول الاستیک به  $38/11$  MPa افزایش یافته است. همچنین ازدیاد طول تا نقطه پارگی به  $353/2$  درصد افزایش پیدا کرده است. با افزایش میزان کلسیم فسفات تا  $3$  درصد وزنی برای نمونه BS2، مجدداً شاهد افزایش مدول الاستیک و استحکام کششی به ترتیب تا  $54/2$  و  $2/49$  MPa بوده‌ایم که نشان از بهبود قابل توجه استحکام مکانیکی نمونه‌ها نسبت به نمونه مرجع (BS0) بوده است. ضمن اینکه برای نمونه BS2 شاهد کاهش ازدیاد طول تا نقطه پارگی به  $254/5$  درصد بوده‌ایم. ازدیاد طول تا نقطه پارگی به اتلاف و بخش ویسکوز پلیمر مربوط می‌شود بنابراین با تقویت محسوس فاز الاستیک به دلیل کوچک شدن بخش اتلاف پلیمر، کاهش ازدیاد طول تا نقطه پارگی منطقی به نظر می‌رسد. در مورد نمونه‌های BS3 و BS4 نیز همین روند افزایش استحکام مکانیکی به شکل محسوس‌تری مشاهده گردید. بطوریکه برای نمونه BS3 که حاوی  $1$  درصد وزنی گرافن اکسید در هسته نانوالیاف می‌باشد مدول الاستیک به  $52/89$  و استحکام کششی به

$2/90$  MPa رسیده است. برای همین نمونه ازدیاد طول تا نقطه پارگی افزایش محسوسی تا  $420/1$  درصد داشته است که گویای بهبود قابل توجه استحکام مکانیکی نمونه BS3 نسبت به سایر نمونه‌ها بوده است. برای نمونه BS4 با  $1/5$  درصد وزنی گرافن اکسید در هسته نانوالیاف شاهد افزایش مدول الاستیک و استحکام کششی تا  $61/14$  و  $3/24$  MPa بوده‌ایم که میزان بالاتری از استحکام نسبت به سایر نمونه‌ها می‌باشد ضمن اینکه برای این نمونه ازدیاد طول تا نقطه پارگی به  $258/7$  درصد کاهش پیدا کرده است که ناشی از سخت‌تر شدن نمونه به دلیل حضور نانوذرات گرافن اکسید و کلسیم فسفات در صدهای بالا بوده است. همانطور که پیش‌تر گفته شد نانوصفحات گرافن اکسید اتم‌های کربن هیبرید  $sp^2$  هستند که در یک لایه دو بعدی منظم شده‌اند. این ساختار صفحه‌ای منظم کربنی با ابعاد ضخامت نانومتری به شکل قابل توجهی سبب افزایش استحکام مکانیکی پلیمر پایه می‌شود. در واقع این شبکه منظم کربنی به عنوان فاز تقویت کننده عمل کرده که سبب افزایش سختی و استحکام پلیمر می‌شود [۳۸]. صفحات منظم گرافن اکسید با فاصله نانومتری از هم سبب شده که با افزایش نسبت سطح به حجم توزیع تنش به شکل کاملاً یکنواختی صورت پذیرد و به دلیل خاصیت الاستیسیته بالای این ماده خواص مکانیکی تا حد قابل توجهی افزایش یابد. پخش و توزیع یکنواخت نانوذرات در ماتریس پلیمری از اهمیت ویژه‌ای برخوردار است [۳۹]. گرافن اکسید به دلیل حضور گروه‌های قطبی از قبیل هیدروکسیل و کربوکسیلیک اسید، سبب شده تا پخش و توزیع خوبی در محیط‌های قطبی داشته باشد [۴۰]. در این مطالعه به دلیل استفاده از حلال‌هایی قطبی از قبیل DMF و کلروفرم، پخش پذیری و توزیع ذرات صفحه‌ای گرافن اکسید مطلوب بوده است. نکته قابل توجه در مورد خصلت قطبیت حلال‌ها و گرافن اکسید این بوده است که صفحات گرافن اکسید در واقع یک ماده آلی قطبی هستند و از طرف دیگر حلال‌های ذکر شده نیز از نوع اپروتیک آلی قطبی هستند که همین سازگاری سبب پخش و توزیع مناسب آن‌ها می‌شود. در



همچنان به عنوان گزینه مناسب تر نسبت به سایر نمونه‌ها مورد توجه قرار داد.



شکل ۳: نتایج زیست تخریب پذیری داربست‌ها.

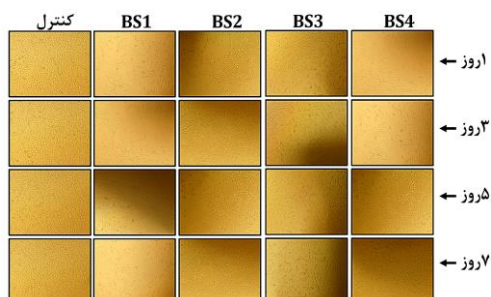
زیست‌سازگاری همواره به عنوان مهمترین فاکتور در توسعه ابزارهای مورد کاربرد در مهندسی پزشکی بخصوص داربست‌های مورد استفاده در مهندسی بافت به حساب می‌آید [۴۱]. آزمون سمیت سلولی با روش MTT یک روش پذیرفته شده به عنوان معیار زیست‌سازگاری زیست مواد در مهندسی پزشکی شناخته می‌شود [۴۲]. چسبیدن و رشد سلول بر روی بستر پلیمری از مهمترین فاکتورها در مهندسی بافت به منظور ارزیابی زیست‌سازگاری پلیمر مورد نظر است. چسبیدن سلولی به عوامل متعددی از قبیل شیمی سطح، آبدوستی و آبگریزی سطح، بار سطحی و ... بستگی دارد [۴۳]. یک سلول پس از چسبیدن بر روی بستر مورد نظر بایستی بتواند رشد کند و به حیات خود ادامه دهد. بررسی تغییر مورفولوژی سلول‌ها همواره به عنوان معیاری از زیست‌سازگاری مورد توجه است. شرایط رشد سلولی بایستی در نهایت منجر به تغییر مورفولوژی سلولی از حالت گرد شکل به رشد فیلوپدیال، شبکه ستوپلاسمی و گسترش سلولی شود [۴۴]. در این مطالعه زیست‌سازگاری نمونه‌ها در چهار بازه زمانی یک روزه، سه روزه، پنج روزه و هفت روزه مورد بررسی قرار گرفت و همانگونه که از شکل ۴ مشخص شده است در روز اول همه نمونه‌ها از زیست‌سازگاری حداکثری برخوردار هستند و پس از سه روز مجاورت نمونه‌ها با

چنین شرایطی حضور این نانوماده کربنی در بستر پلیمری PCL سبب تقویت بخش هسته نانوالیاف و بطور کلی محصول نهایی می‌شود.

جدول ۱: نتایج خواص مکانیکی داربست‌ها.

نمونه	استحکام کششی (MPa)	مدول الاستیک (MPa)	ازدیاد طول تا نقطه پارگی (%)
BS0	۱/۵۳	۲۴/۲۰	۱۴۰/۴
BS1	۲/۱۱	۳۸/۱۱	۳۵۳/۲
BS2	۲/۴۹	۵۴/۲	۲۵۴/۵
BS3	۲/۹۰	۵۲/۸۹	۴۲۰/۱
BS4	۳/۲۴	۶۱/۱۴	۲۵۸/۷

زیست تخریب پذیری یکی دیگر از پارامترهای مورد توجه در مهندسی بافت محسوب می‌شود. همانگونه که پیش تر اشاره شد، پلیمرهای استفاده شده در هسته و پوسته داربست‌ها به ترتیب پلی کاپرولاکتون و PHBV بوده‌اند که هر دو جزء پلیمرهای زیست تخریب پذیر محسوب می‌شوند. نتایج زیست تخریب پذیری نشان داد که در بین همه داربست‌ها، نمونه BS0 که از هیچ افزودنی در ساختار هسته-پوسته آن‌ها استفاده نشده بود از سرعت زیست تخریب پذیری به مراتب بالاتری نسبت به سایر نمونه‌ها برخوردار بوده است. همانگونه که از شکل ۳ نیز مشخص شده است، با افزایش میزان گرافن اکسید در هسته نمونه‌ها، سرعت تخریب پذیری نمونه‌ها کاهش پیدا می‌کند که این موضوع برای نمونه BS4 که بیشترین میزان گرافن اکسید را در ساختار خود داشته است بسیار محسوس تر است. همانطور که در شکل ۳ مشخص است پس از گذشت ۳ ماه شاهد بیش از ۴۰ درصد تخریب داربست‌ها بوده ایم و پس از گذشت زمان ۶ ماهه بیش از ۶۰ درصد نمونه‌ها تخریب شده است که به خصوص برای نمونه‌های BS0، BS1، BS2، BS3 این میزان تخریب به حدود ۷۰ درصد نیز رسیده است. بنابراین با توجه به خواص بسیار خوب نمونه BS3 از نظر خواص مکانیکی و نتایج حاصل از آزمون زیست تخریب پذیری، می‌توان این نمونه را



شکل ۴: نتایج OM از سلول‌های در مجاورت داربست‌ها.

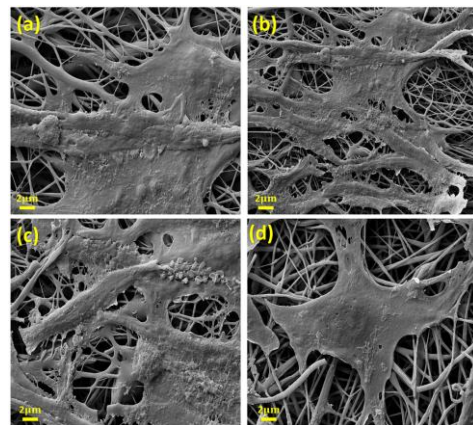
همانطور که پیشتر مطرح شد، هدف داربست فراهم کردن یک بستر مناسب برای فعالیت مطلوب سلولی می‌باشد. فعالیت مطلوب سلولی به معنی چسبیدن سلول به بستر و سپس رشد آن است. آزمون کشت سلولی و سپس بررسی داربست‌ها به کمک آزمون FESEM یکی از کارآمدترین روش‌ها به منظور ارزیابی فعالیت سلولی و زیست‌سازگاری داربست‌ها به حساب می‌آید. در این بخش نمونه‌های BS1، BS2، BS3 و BS4 مورد ارزیابی قرار گرفت. نتایج آزمون کشت سلولی نشان از چسبندگی مطلوب سلول‌ها و تغییر مورفولوژی آن‌ها برای همه نمونه‌ها بوده است (شکل ۵a-d) که گویای مناسب بودن داربست‌ها ساخته شده به عنوان یک بستر مناسب برای سلول‌ها می‌باشد. در صورتیکه که داربست‌ها از نظر خواص سطحی و زیستی شرایط مناسبی نداشته باشند، چسبندگی سلولی بر روی آن‌ها به سختی رخ می‌دهد و حتی در آن صورت شاهد رشد و تغییر مورفولوژی سلول‌ها نخواهیم بود. در صورتیکه که نتایج این بخش نشان داده که رشد و تغییر مورفولوژی سلول‌ها بر روی نمونه‌ها بصورت کاملاً پخش شده (Fully spread) بوده که موید برهمکنش مناسب سلول‌ها با بستر بوده است (شکل ۵). بطور کلی داربست‌های بر پایه نانوالیاف به دلیل نسبت سطح به حجم بسیار بالا دارای خواص زیستی و سطحی بهتری نسبت به داربست‌های فیلمی هستند. داربست‌های بر پایه نانوالیاف تقویت شده با نانوذرات کلسیم فسفات و گرافن اکسید در

سلول‌ها، همچنان زیست‌سازگاری بالای ۹۵ درصد برای همه نمونه‌ها مشاهده می‌شود. پس از مجاورت پنج روزه، اگرچه درصد زنده‌مانی سلولی برای نمونه‌ها مقداری کاهش پیدا کرده اما همچنان بالای ۸۵ درصد زنده‌مانی سلولی برای آن‌ها ثبت گردید. بررسی هفت روزه نمونه‌ها نیز نشان داد که همه نمونه‌ها تقریباً درصد زنده‌مانی سلولی مشابه تماس پنج روزه داشتند که موید تثبیت زیست‌سازگاری آن‌ها پس از یک هفته می‌باشد. همچنین از مقایسه نمونه‌های BS3 و BS4 با نمونه‌های BS1 و BS2، پس از بررسی هفت روزه مشخص شد که اگرچه همه آن‌ها از سطح زیست‌سازگاری مطلوبی برخوردار هستند اما درصد زنده‌مانی سلولی برای نمونه‌های BS2 و BS3 اندکی بیشتر از سایر نمونه‌ها بوده که بنظر می‌رسد حضور ذرات گرافن اکسید بخصوص برای نمونه BS3 به دلیل بهبود آبدوستی و بوجود آمدن شرایط مساعد برای چسبندگی و رشد سلولی، از میزان بالایی از زنده‌مانی سلولی برخوردار هستند. نتایج بدست آمده از این آزمون تایید می‌کند که نمونه‌های BS2 و BS3 که دارای زاویه تماس آب ۶۶/۷ و ۴۶/۹ و همینطور انرژی آزاد سطح ۱۰۱/۵۹ و ۱۲۲/۵۴ هستند، بهترین شرایط را برای چسبندگی و رشد سلولی دارند. در حقیقت سطوحی که آبگریزی زیادی دارند منجر به ایجاد برهمکنش‌های نامطلوب آبگریز با سلول و محیط میزبان می‌شود و مانعی بزرگ در برابر چسبیدن سلول بر روی سطح ایجاد می‌کند. از طرفی دیگر سطوحی که میزان آبدوستی بسیار بالایی دارند، یا به عبارت دیگر انرژی آزاد سطح خیلی زیادی دارند، باز هم محیطی مناسب برای چسبندگی و رشد سلولی نیستند. سلول بایستی بر روی یک سطح که زیست‌سازگاری مناسبی دارد بچسبند و پس از چسبندگی شروع به فعالیت خود کند در چنین شرایطی است که داربست مورد نظر می‌تواند میزبانی مناسب برای فعالیت‌های سلولی باشد.

میزان ALP برای روز ۲۱ گویای بالغ شدن سلول‌های رشد کرده می‌باشد. در حقیقت این کاهش بیانگر مسیر درست فرآیند استخوان سازی است. همچنین با مقایسه فعالیت ALP برای نمونه‌های مختلف و نمونه کنترل مشخص شد که میزان فعالیت ALP برای داربست‌ها بیشتر از نمونه کنترلی می‌باشد. نتایج نشان داد که میزان فعالیت ALP برای نمونه‌های BS2، BS3 و BS4 بیشتر از نمونه BS1 بوده است. بطوریکه برای نمونه‌های BS2 و BS3 بیشترین میزان ممکن بوده است. از آنجایی که رشد و فعالیت سلولی به شکل قابل توجهی به خصوصیات سطحی بستر مورد نظر ارتباط پیدا می‌کند، می‌توان اینگونه نتیجه‌گیری کرد که نمونه‌های BS2، BS3 و BS4 به دلیل آبدوستی و خصوصیات انرژی آزاد سطحی، بستر مناسبی برای فعالیت سلول‌ها هستند، هرچند که بنظر می‌رسد نمونه‌های BS2 و BS3 بهترین شرایط را برای رشد و فعالیت سلولی داشته‌اند.

همچنین نتایج کمی آزمون رنگ آمیزی آلیزارین قرمز (ARS) در شکل ۶b نشان داده شده است که بر این اساس، نمونه‌های BS2 و BS3 از نظر آهکی شدن بهترین نمونه‌ها برای کاربرد ذکر شده می‌باشند که در این بین نمونه BS3 عملکرد بهتری نسبت به نمونه BS2 داشته است. نتیجه آزمون ARS نیز ارتباط معناداری با نتایج MTT، ALP و حتی زاویه تماس و انرژی آزاد سطح داشته است. همچنین نمونه BS4 از نظر عملکرد ضعیف‌تر از نمونه‌های BS2 و BS3 بوده اما از نمونه BS1 عملکرد بهتری داشته است. نتایج بدست آمده بخوبی نشان داد که میزان فعالیت ALP حاصله بخصوص برای نمونه‌های BS2 و BS3 در مقایسه با کارهای مشابه صورت گرفته بر پایه نانوالیاف [۴۷، ۴۸] از عملکرد کاملاً بهتری برخوردار بوده است که این موضوع گویای آن است که علاوه بر نانو ساختار بودن داربست‌ها، حضور همزمان نانوذرات کلسیم فسفات و گرافن اکسید به ترتیب در پوسته و هسته نانوالیاف سبب تقویت خواص زیستی و استخوان سازی می‌شود.

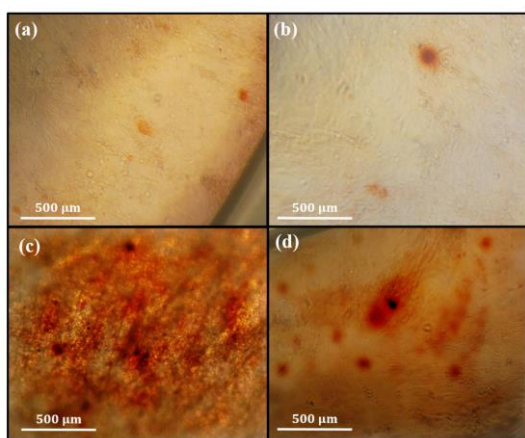
کنار خواص مکانیکی مطلوب به دلیل تخلخل بالا و خصلیت شیمی سطحی مناسب دارای خواص بسیار خوب زیستی نیز می‌باشند.



شکل ۵: تصاویر SEM از سلول‌های کشت داده شده بر روی داربست‌ها؛ (a) BS1، (b) BS2، (c) BS3 و (d) BS4.

فعالیت آنزیم آلکالین فسفاتاز از جمله شاخص‌های ارزیابی کمی روند تمایز استخوانی به حساب می‌آید. این آنزیم توسط سلول‌های استئوبلاست تولید می‌شود. ALP یکی از آنزیم‌ها بوده که بصورت طبیعی در بدن وجود دارد. زمانی که سلول‌های استخوانی فعال باشد و سبب رشد استخوانی شود، میزان این آنزیم افزایش می‌یابد [۴۵] تبدیل پارا-نیتروفنیل فسفات به پارا-نیتروفنول به عنوان معیاری از فعالیت آلکالین فسفاتاز در نظر گرفته می‌شود. ALP در حقیقت یک نوع آنزیم بوده که تاثیر بسیار زیادی بر تشکیل فرآیند استخوان سازی دارد. تاثیر ALP بخصوص در مراحل اولیه و مقدماتی استخوان سازی می‌باشد. بنابراین، همواره به عنوان یکی از شناساگرهای مهم جهت بررسی فرآیند استخوان سازی مورد بررسی قرار می‌گیرد [۴۶]. در این مطالعه فعالیت ALP داربست‌ها در بازهای زمانی ۷، ۱۴ و ۲۱ روزه مورد بررسی قرار گرفت. همانطور که در شکل ۵ مشخص شده است بیشترین میزان فعالیت ALP برای نمونه‌های مختلف برای روز ۱۴ ثبت شده است و پس از آن میزان فعالیت آن برای روز ۲۱ کاهش یافت (شکل ۶a). این کاهش

است بیشتر از نمونه کنترلی بوده است. در تطابق با نتایج آزمون فعالیت ALP، آزمون ARS نیز نشان داد که افزایش میزان کلسیم فسفات در ساختار نانوالیاف نقش موثری در رسوب کلسیم (معدنی شدن داربست) و رشد سلول‌های تمایز یافته دارد. همانگونه که از شکل‌های ۷c و ۷d مشخص شده است نمونه‌های BS2 و BS3 بیشترین میزان جذب رنگ آلیزارین قرمز را داشته‌اند که گویای معدنی شدن این نمونه‌ها بوده که به تمایز و بالغ شدن سلولی ارتباط پیدا می‌کند.

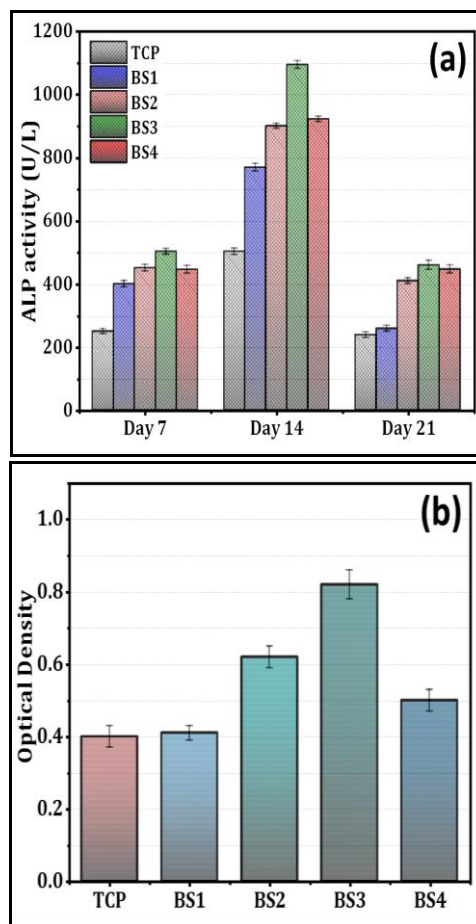


شکل ۷- تصاویر میکروسکوپ نوری حاصل از آزمون ARS از فعالیت معدنی شدن داربست‌ها؛ (a) نمونه کنترلی، (b) نمونه BS2، (c) نمونه BS3 و (d) نمونه BS4.

از نتایج بدست آمده در این مطالعه و مقایسه با تحقیقات پیشین [۵۱، ۵۰] می‌توان نتیجه گرفت زمانیکه از نانوذرات کلسیم فسفات در بستر PHBV استفاده می‌شود فعالیت معدنی شدن نمونه‌ها به شکل چشمگیری افزایش پیدا می‌کند که در فرآیند تولید استخوان بسیار حائز اهمیت است.

#### ۴- نتیجه گیری

خواص سطحی داربست‌های ساخته شده به کمک بررسی آبدوستی و آبگریزی سطح و انرژی آزاد سطح از طریق آزمون اندازه‌گیری زاویه تماس مورد ارزیابی قرار گرفت. این نتایج نشان داد که افزایش میزان کلسیم فسفات در پوسته و گرافن اکسید در هسته نانوالیاف منجر به کاهش اندازه زاویه



شکل ۶: نتایج آزمون‌های، (a) آلکالین فسفاتاز و (b) رنگ آمیزی آلیزارین قرمز.

آزمون رنگ آمیزی آلیزارین قرمز در حقیقت رسوب کلسیم در محیط کشت سلولی را نشان می‌دهد. کاربرد رنگ آمیزی آلیزارین قرمز برای مواقعی که تمایز استخوانی مدنظر است بسیار حائز اهمیت است. آلیزارین قرمز در واقع یک ترکیب آلی بوده که بطور اختصاصی بستر معدنی شده در سلول‌ها را به رنگ قرمز، رنگ آمیزی می‌کند. قابل ذکر است که در این آزمون شدت رنگ پذیری سلول‌ها با میزان مواد معدنی موجود در بستر آن ارتباط مستقیم دارد [۴۹]. این آزمون یکی از آزمون‌های بسیار مورد توجه در بررسی معدنی شدن داربست‌ها می‌باشد. این آزمون یکی از بررسی‌های بلوغ سلول‌های تمایز یافته نیز به حساب می‌آید. نتایج نشان داد که میزان کلسیم رسوب کرده و رشد سلولی برای نمونه‌های BS2، BS3 و BS4 که در شکل ۷b تا ۷d نشان داده شده

- تماس، افزایش انرژی آزاد سطح و افزایش آبدوستی شده است. هم کلسیم فسفات و هم گرافن اکسید به دلیل ماهیت آبدوستی بالا و همچنین خاصیت نانوذره بودن، قابلیت بالایی در افزایش آبدوستی سطح داربست‌های نانوالیافی داشته است. خواص زیستی اعم از زیست‌سازگاری، تمایز سلولی و بررسی قابلیت معدنی شدن توسط آزمون‌های MTT، ALP و ARS مورد بررسی قرار گرفت. آزمون MTT عدم سمیت نمونه‌ها را پس از بازه زمانی ۷ روزه اثبات کرد و مشخص شد که نمونه‌ها در این مدت زنده‌مانی سلولی بالای ۸۰ درصد داشته‌اند. از طرف دیگر آزمون ALP، که نشان دهنده تمایز سلولی می‌باشد، نشان داد که نمونه‌های BS2 و BS3 بالاترین میزان تمایز سلولی را در بین سایر نمونه‌ها داشته است. همچنین در تایید آزمون ALP، آزمون ARS نیز مشخص کرد که نمونه BS2 و BS3 بیشترین میزان معدنی شدن را در بین سایر نمونه‌ها داشته‌اند. از مجموع آزمون‌های اندازه‌گیری زاویه تماس و آزمون‌های زیستی مشخص گردید که نمونه‌هایی که دارای اندازه زاویه تماس ۴۹ و ۶۵ درجه هستند فعالیت زیستی قابل توجهی نسبت به سایر نمونه‌ها دارند. بنابراین با توجه به مجموع نتایج حاصله مشخص شد که به ترتیب نمونه‌های BS1، BS2، BS3، BS4 و BS1 بهترین نمونه‌ها برای استفاده در مهندسی بافت هستند.
- مراجع**
- [1] G. Tang, Z. Liu, Y. Liu, J. Yu, X. Wang, Z. Tan, X. Ye, *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, **9**, 2021.
  - [2] B.D. Boyan, C.H. Lohmann, J. Romero, Z. Schwartz, *Clinics in Plastic Surgery*, **26**, 1999, 629.
  - [3] B. Tan, Q. Tang, Y. Zhong, Y. Wei, L. He, Y. Wu, J. Wu, J. Liao, *International Journal of Oral Science*, **13**, 2021, 1.
  - [4] H. Wei, J. Cui, K. Lin, J. Xie, X. Wang, *Bone Research*, **10**, 2022, 1.
  - [5] R.F. Canadas, S. Pina, A.P. Marques, J.M. Oliveira, R.L. Reis, 2016. Cartilage and bone regeneration: How close are we to bedside?
  - [6] Y. Tabata, *Tissue Engineering*, **9**, 2003, 5.
  - [7] L. Zhang, T.J. Webster, *Nano Today*, **4**, 2009, 66.
  - [8] M.J. Olszta, X. Cheng, S.S. Jee, R. Kumar, Y.Y. Kim, M.J. Kaufman, E.P. Douglas, L.B. Gower, *Materials Science and Engineering: R: Reports*, **58**, 2007, 77.
  - [9] S.D. Tan, T.J. Vries, A.M. Kuijpers-Jagtman, C.M. Semeins, V. Everts, J. Klein-Nulend, *Bone*, **41**, 745.
  - [10] H. Wang, Y. Li, Y. Zuo, J. Li, S. Ma, L. Cheng, *Biomaterials*, **28**, 2007, 3338.
  - [11] G.H. Kim, *Biomedical Materials*, **3**, 2008, 025010.
  - [12] S. Chung, N.P. Ingle, G.A. Montero, S.H. Kim, M.W. King, *Acta Biomaterialia*, **6**, 2010, 1958.
  - [13] S.H. Shin, O. Purovdorj, O. Castano, J.A. Planell, H.W. Kim, *Journal of Tissue Engineering*, **3**, 2012, 2041.
  - [14] A. Kramschuster, L.S. Turng, *Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials*, **92**, 366.
  - [15] W. Meng, Z.C. Xing, K.H. Jung, S.Y. Kim, J. Yuan, I.K. Kang, S.C. Yoon, H.I. Shin, *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, **19**, 2799.
  - [16] S. Zhang, M.P. Prabhakaran, X. Qin, S. Ramakrishna, *Journal of Biomaterials Applications*, **29**, 2015, 1394.
  - [17] K.T. Shalumon, S. Sowmya, D. Sathish, K.P. Chennazhi, S. V. Nair, R. Jayakumar, *Journal of Biomedical Nanotechnology*, **9**, 2013, 430.
  - [18] Q. Yao, J.G. Cosme, T. Xu, J.M. Miszuk, P.H. Picciani, H. Fong, H. Sun, *Biomaterials*, **115**, 2017, 115.
  - [19] M. He, H. Jiang, R. Wang, Y. Xie, C. Zhao, *Journal of Colloid and Interface Science*, **490**, 2017, 270.
  - [20] A. Aidun, A. Safaei Firoozabady, M. Moharrami, A. Ahmadi, N. Haghhighipour, S. Bonakdar, S. Faghihi, *Artificial Organs*, **43**, 2019, E264.
  - [21] C. Shuai, B. Peng, P. Feng, L. Yu, R. Lai, A. Min, *Journal of Advanced Research*, **35**, 2022, 13.
  - [22] A. Ali, A. Hasan, Y.S. Negi, *International Journal of Biological Macromolecules*, **197**, 2022, 1.
  - [23] M.U.A. Khan, S. Haider, A. Haider, S.I. Abd Razak, M.R.A. Kadir, S.A. Shah, A. Javed, I. Shakir, A.A. Al-Zahrani, *Arabian Journal of Chemistry*, **14**, 2021, 102924.
  - [24] A.D. Dalgic, D. Atila, A. Karatas, A. Tezcaner, D. Keskin, *Materials Science and Engineering: C*, **100**, 2019, 735.
  - [25] B. Bal, I.B. Tugluca, N. Koc, I.A. Isoglu, *Materials Research Express*, **6**, 2019, 065411.
  - [26] R. Dehghan, J. Barzin, *Polymer Testing*, **85**, 2020, 106438.
  - [27] J. Wu, Z. Lin, X. Weng, G. Owens, Z. Chen, *Chemosphere*, **246**, 2020, 125700.
  - [28] S. Jaworski, M. Wierzbicki, E. Sawosz, A. Jung, G. Gielerek, J. Biernat, H. Jaremek, W. Lojkowski, B. Woźniak, J. Wojnarowicz, L. Stobinski, *Nanoscale Research Letters*, **13**, 2018, 1.
  - [29] L. Xu, L. Cheng, *Journal of Nanomaterials*, **15**, 2013, 1.
  - [30] H. Chong, G. Gao, G. Li, *New Journal of Chemistry*, **44**, 2018, 704.
  - [31] X. Diez-Betriu, S. Alvarez-Garcia, C. Botas, P. Alvarez, J. Sánchez-Marcos, C. Prieto, R. Menendez, A. De Andres, *Journal of Materials Chemistry C*, **1**, 2013, 6905.
  - [32] M. Tschapek, *Zeitschrift für pflanzenernährung und Bodenkunde*, **147**, 1984, 137.
  - [33] L. Gao, T.J. McCarthy, *Langmuir*, **24**, 9183.
  - [34] Y. Tamada, Y. Ikada, *Polymer*, **34**, 1983, 2208.
  - [35] K. Webb, V. Hlady, P.A. Tresco, *Journal of Biomedical Materials Research*, **41**, 1983, 422.
  - [36] J. Alam, M. Alhoshan, A.K. Shukla, A. Aldalbah, F.A.A. Ali, *European Polymer Journal*, **120**, 2019, 109219.
  - [37] E.N. Bolbasov, L.V. Antonova, K.S. Stankevich, A. Ashrafov, V.G. Matveeva, E.A. Velikanova, Y.I. Khodyrevskaya, Y.A. Kudryavtseva, Y.G. Anissimov, S.I. Tverdokhlebov, L.S. Barbarash, *Applied Surface Science*, **398**, 2017, 63.
  - [38] M.M. Shokrieh, M. Esmkhani, H.R. Shahverdi, F. Vahedi, *Science of Advanced Materials*, **5**, 2013, 260.
  - [39] K. Nawaz, M. Ayub, N. Ul-Haq, M.B. Khan, M.B., M.B. Khan Niazi, A. Hussain, *Polymer Composites*, **37**, 1572.
  - [40] R. Dehghan, J. Barzin, *Journal of Membrane Science*, **620**, 2021, 118878.
  - [41] K.H. Hussein, K.M. Park, K.S. Kang, H.M. Woo, *Materials Science and Engineering: C*, **67**, 2016, 766.
  - [42] J.V. Meerloo, G.J. Kaspers, J. Cloos, *Springer*, 2011, 237.
  - [43] S. Bertazzo, W.F. Zambuzzi, D.D. Campos, C.V. Ferreira, C.A. Bertran, *Clinical Oral Implants Research*, **21**, 2010, 1411.
  - [44] R. Rajaraman, D.E. Rounds, S.P.S. Yen, A.N.D.A. Rembaum, *Experimental Cell Research*, **88**, 1974, 327.

- [48] S.C. Miranda, G.A. Silva, R.C. Hell, M.D. Martins, J.B. Alves, A.M. Goes, *Archives of oral Biology*, **56**, 2021, 1.
- [49] H. Paul, *Arthritis & Rheumatism: Official Journal of the American College of Rheumatology*, **26**, 1983, 191.
- [50] M. Kouhi, M. Fathi, M.P. Prabhakaran, M. Shamanian, S. Ramakrishna, *Applied Surface Science*, **457**, 2018, 616.
- [51] K.M. Sajesh, K. Kiran, S.V. Nair, R. Jayakumar, *Composites Part B: Engineering*, **99**, 2016, 445.
- [45] J.L. Cordell, B.R. Falini W.N. Erber A.K. Ghosh, Z.A. Abdulaziz, S. MacDonald, K.K. Pulford, H.A. Stein, D.Y. Mason, *Journal of Histochemistry & Cytochemistry*, **32**, 1984, 219.
- [46] M.A. Tabatabai, J.M. Bremner, *Soil Biology and Biochemistry*, **1**, 2020, 301.
- [47] A. Safaei Firoozabady, A. Aidun, R. Kowsari-Esfahan, A. Allahyari, *Journal of Tissues and Materials*, **2**, 2017, 1.