

## مقاله پژوهشی

## بررسی رفتار سلول‌های MG63 بر روی داربست‌های سه‌بعدی پلی‌کاپرولاکتون و

## پلی‌کاپرولاکتون/کلاژن برای بازسازی استخوان

زهرا ابراهیمی<sup>۱</sup>، شیوا ایرانی<sup>۱</sup>، عبدالرضا اردشیری لاجیمی<sup>۲</sup>، احسان سیدجعفری<sup>۳\*</sup>

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

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

۳- گروه زیست فناوری، پردیس علوم، دانشگاه تهران، تهران، ایران

\*مسئول مکاتبات: seyedjafari@ac.ut.ir

تاریخ پذیرش: ۱۴۰۱/۱۲/۲۴

تاریخ دریافت: ۱۴۰۱/۱۰/۲۶

DOI: 10.22034/ascij.2023.1980337.1470

## چکیده

چاپ سه‌بعدی داربست‌ها در دمای پایین نویدبخش زیادی برای ساخت جایگزین‌های مصنوعی پیوند استخوان با عملکرد بیشتر نسبت به تکنیک‌های سنتی است. یکی از امیدوارکننده‌ترین استراتژی‌ها در مهندسی بافت استخوان روی توسعه داربست‌های biomimetic متمرکز شده است. داربست‌ها با پایه سرامیک با توانایی استئوژنیک و خواص مکانیکی، کاندیدای امیدوارکننده‌ای برای ترمیم استخوان هستند. هدف از این مطالعه متناسب‌سازی انعطاف‌پذیری و خاصیت القای استخوان داربست سه‌بعدی پلی‌کاپرولاکتون (PCL) تهیه شده با روش مدل رسوب ذوب شده (FDM)، با استفاده از تلفیق کلاژن (COL) به عنوان پلیمر طبیعی همراه با پلیمر مصنوعی و بررسی رفتار سلول‌های MG63 بر روی آن بود. بعد از تهیه داربست، از آزمون‌های میکروسکوپ الکترونی روبشی (SEM)، طیف سنجی پراش انرژی ایکس (EDX) و طیف‌سنجی ATR-FTIR استفاده شد. پس از گذشت ۱،۷،۱۴ روز، بررسی روند استخوان‌سازی سلول‌های در تیمارهای مختلف، با استفاده از رنگ‌آمیزی آلیزارین‌رد و فعالیت آکالین فسفاتاز (ALP) صورت گرفت. همچنین عدم سمیت داربست‌ها برای اطمینان از تکثیر سلول‌ها توسط آزمون MTT مورد بررسی قرار گرفت. از مشاهده زیر میکروسکوپ، مشخص شد که داربست‌های مهندسی بافت منافذ مربعی شکل را به طور یکنواخت توزیع و بهم متصل کرده‌اند. داربست PCL/COL تفاوت معنی‌داری را از لحاظ قابلیت بقا نسبت به داربست PCL تنها در محیط تمایزی نشان داد ( $P \leq 0.0001$ ). نتایج ارزیابی فعالیت ALP در داربست PCL/COL به طور معنی‌داری بالاتر از داربست PCL بدون پوشش و کنترل بود ( $P \leq 0.0001$ ). نتایج بدست آمده در این تحقیق نشان داد استفاده از داربست PCL به همراه COL می‌تواند به عنوان محیط مناسبی به منظور تکثیر و تمایز سلول‌های MG63 در نظر گرفته شود. بنابراین، داربست کامپوزیت PCL/COL که توسط چاپگر FDM تهیه شده‌اند، بدلیل بقای سلولی بواسطه COL است، می‌تواند کاربرد وسیع‌تری در مهندسی بافت استخوان داشته باشد.

کلمات کلیدی: پلی‌کاپرولاکتون، کلاژن، سلول‌های بنیادی، داربست سه‌بعدی، مهندسی بافت استخوان

## مقدمه

این، سیتوکین‌ها به گیرنده‌های سطح سلول متصل می‌شوند و سیگنال‌های خارج سلولی را به داخل سلول منتقل می‌کنند تا تکثیر و تمایز سلولی را تنظیم کند و تشکیل ECM را افزایش دهد (۱۷، ۲۰، ۵۰).

پلیمرهای مصنوعی به طور گسترده در مهندسی بافت برای ساخت داربست استفاده می‌شود. طیف گسترده‌ای از پلیمرها مانند پلی (اسید لاکتیک) (PLA)، پلی (اسید لاکتیک-کولیک) (PLGA)، پلی‌کاپرولاکتون (PCL) به همراه پلیمرهایی مانند COL طبیعی، ژلاتین، در مهندسی بافت استخوان استفاده می‌شوند (۱۱). در میان تمام پلیمرهای مصنوعی PCL، کاندیدای بالقوه برای مهندسی بافت استخوان است که در بسیاری از مطالعات مورد استفاده قرار گرفته است، زیرا خواص مکانیکی آن با بافت طبیعی مطابقت دارد و پایداری شیمیایی خوبی دارد، زیست سازگار است و سرعت تخریب آن آهسته است. اما در مقایسه با بافت استخوانی، به دلیل ماهیت نیمه‌بلوری آب‌گریز (هیدروفوبیک)، دارای عملکرد ضعیف و انعطاف‌پذیری کم می‌باشد. اخیراً تلاش‌های زیادی در جهت اصلاح این عیوب و افزایش عملکرد PCL صورت گرفته که بتوان نیاز مکانیکی مهندسی بافت سخت را برآورده کند و در مقابل کاشت‌های طولانی مدت و ترشح کنترل شده عملکرد بهتری داشته باشد. به همین دلیل برای بهبود خواص شیمیایی و فیزیکی با بیومتریال‌های دیگر ترکیب می‌گردد (۴۴، ۳۶، ۶). ترکیب PCL با پلیمرهای طبیعی مانند ژلاتین یا COL یکی از روش‌هایی است که در حال حاضر برای بهبود سازگاری سلول استفاده می‌شود (۳).

COL یک پلیمر طبیعی است که یک سوم پروتئین بدن انسان را تشکیل می‌دهد، بنابراین استفاده از آن بدلیل ظرفیت بالا برای تقویت اتصال سلول، تکثیر و

آسیب دیدگی استخوان یک بیماری فراگیر است که معمولاً در اثر عفونت‌ها، تصادفات، تخریب پاتولوژیک، تروما و ناتوانی‌های مادرزادی ایجاد می‌شود (۳۳). امروزه در بسیاری از جوامع تعداد جراحی برای ترمیم یا جایگزینی استخوان آسیب دیده ناشی از تخریب پاتولوژیک یا تغییر شکل مادرزادی در بافت افزایش یافته است. پیوند به عنوان یک الگو برای پرکردن شکاف‌های ایجاد شده توسط نقص استخوان عمل می‌کند و باعث بازسازی استخوان می‌شود. در سراسر جهان، سالانه بیش از ۲/۲ میلیون نفر به دلیل مشکلات مرتبط با استخوان، تحت پیوند استخوان قرار می‌گیرند. با این حال، پیوند موفقیت آمیز استخوان به دلیل رد ایمنی، آلودگی و کمبود اهداکنندگان به دلیل تقاضای بالای پزشکی مختل می‌شود (۱۳). بنابراین، مهندسی بافت می‌تواند یک راه حل خوب و جایگزین برای ترمیم بافت استخوانی باشد (۱۰، ۳۲).

مهندسی بافت استخوان نیازمند طراحی یک داربست با ساختار فیزیکی و مقاومت مکانیکی مناسب برای رشد و بازسازی بافت جدید است. علاوه بر مقاومت مکانیکی، ویژگی‌های فیزیکی داربست برای تقلید از ماتریس خارج سلول (ECM) و تخلخل مناسب برای اتصال و رشد و تکثیر سلول و میزان جذب و تخریب قابل کنترل می‌باشد (۲۳).

اکثر رویکردهای مهندسی بافت برای ترمیم نقاط آسیب دیده به سلول‌های کاشت شده متکی هستند. تولید مقادیر زیادی از فاکتورهای رشد و اجزای ECM در طی تکثیر سلول‌های کاشت شده، انعطاف‌پذیری داربست را افزایش می‌دهد و باعث چسبندگی سلول، تمایز، تکثیر، مهاجرت سلول‌های پیش‌ساز اتولوگ و تشکیل بافت استخوانی معدنی می‌شود، در نتیجه ترمیم بافت بیشتر می‌شود. علاوه بر

تمایز سلول در مهندسی بافت سابقه طولانی دارد (۷). COL را می‌توان از منابع مختلف استخراج و خالص کرد. COL خصوصیات ایمنی‌زایی کم، ساختار متخلخل، نفوذپذیری خوب، سازگاری زیستی و تجزیه زیستی را ارائه می‌دهد. داربست‌های COL به دلیل این خواص عالی به طور گسترده در مهندسی بافت مورد استفاده قرار گرفته‌اند. با این حال، خواص مکانیکی ضعیف داربست‌های COL کاربرد آنها را تا حدی محدود می‌کند. برای رفع این نقص، داربست‌های COL را می‌توان با روش‌های شیمیایی یا فیزیکی یا با پلیمرهای طبیعی/سنتتیک یا مواد معدنی اصلاح کرد. در این حالت، پلیمر مصنوعی پشتیبانی مکانیکی از ساختار را انجام می‌دهد، در حالی که COL در سطح و داخل داربست‌ها سیگنال‌های شناسایی سلول را فراهم می‌کند، که برای رشد سلول بسیار مهم است.

در راستای هدف از درمان شخصی، فناوری چاپ سه‌بعدی (3D) به دلیل مزیت آن در فرآیند ساخت سریع، دقیق و کنترل پذیر بودن بسیار مورد استفاده در مهندسی بافت استخوان است (۳۰).

تکنیک‌های تولید پیشرفته مانند 3D Printing می‌توانند معماری و ساختار منافذ را بطور دقیق کنترل کنند و در واقع Custom designed تولید کنند. داربست‌های بافت کنترل شده توسط کامپیوتر، بر بسیاری از محدودیت‌های جاری غلبه می‌کنند (۱۹). از مزایای داربست‌های 3D Printing، امکان ایجاد هندسه‌های پیچیده، تخلخل و کشت همزمان چندین سلول و ترکیبی از عوامل رشد است (۱۲). فناوری چاپ سه‌بعدی انواع مختلفی دارد، از جمله مدل‌سازی رسوب ذوب شده (FDM)، ظاهر لیتوگرافی استریو (SLA)، تفکیک لیزری انتخابی (SLS)، تولید اجسام چند لایه (LOM)، تولید ریخته‌گری بدون الگو (PCM) و غیره. در

فرآیند چاپ سه‌بعدی اجسام به کمک مدل دیجیتالی با قرارگیری لایه لایه مواد روی هم از بسترهای پودر، مایع یا جامد ساخته می‌شوند. از پایین شروع به ساختن می‌کند و هر لایه تازه به لایه قبلی چسبیده و در نتیجه سازه‌ای با افزایش اندازه ایجاد می‌شود. 3D Printing با روش FDM یکی از روش‌های نمونه‌سازی سریع پرینت سه‌بعدی است که از گرما برای ساخت داربست استفاده می‌کند و امکان ایجاد داربست‌های سه‌بعدی زیست‌سازگار را فراهم می‌کند و می‌توان سلول‌ها را روی آن‌ها کاشت که نشان‌دهنده دستیابی به موفقیت در مهندسی بافت، به ویژه در زمینه بازسازی بافت استخوانی می‌باشد (۱۹).

Zhang و همکارانش در مطالعه‌ای گزارش دادند که داربست PCL/COL محیط مناسبی برای چسبندگی و رشد سلول فراهم می‌کند (۵۱).

هدف از این مطالعه داشتن یک داربست مناسب با خواص مهمی مانند القای استخوان‌زایی و زیست‌سازگار بود. در همین راستا، داربست PCL توسط چاپگر سه‌بعدی با روش FDM به عنوان یک بستر پشتیبان چاپ شد. به منظور بررسی تجزیه و تحلیل چسبندگی و گسترش سلول بر روی داربست‌های تهیه شده، از سلول‌های شبه استئوبلاست MG63 استفاده شد. سپس به ارزیابی توانایی تکثیر، بقا و تمایز سلول‌ها به رده استخوانی بر روی داربست سه‌بعدی PCL بدون پوشش و داربست کامپوزیت PCL/COL، به صورت مجزا پرداخته شد.

#### مواد و روش‌ها

##### روش ساخت داربست

**3D Printing با روش FDM:** ابتدا مدل‌ها به وسیله نرم افزار 2016 solidworks طراحی شده و به کمک کامپیوتر کنترل کننده دستگاه پرینتر سه‌بعدی، نمونه‌ها ساخته شدند. جهت ساخت داربست PCL

۵٪ در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد کشت داده شدند. ابتدا داربست‌های آماده شده در کف پلیت‌های ۲۴ خانه به مدت ۱ ساعت در معرض اتانول ۷۰٪ قرار گرفتند و ۳ بار با PBS استریل شسته شده و سپس هر طرف داربست به مدت ۲۰ دقیقه در معرض اشعه UV قرار گرفت. سپس قبل از کشت سلول‌ها روی داربست جهت اطمینان از عدم آلودگی و همچنین تسهیل چسبندگی سلولی تست استریلیته انجام شد. بدین منظور داربست‌های استریل شده داخل محیط کشت سلولی به مدت ۲۴ ساعت در داخل انکوباتور قرار داده شدند. بعد از گذشت یک روز با کنترل کردن عدم تغییر رنگ، کیفیت محیط کشت و مشاهدات میکروسکوپ معکوس (Olympuse IX53, Japan) از عدم آلودگی داربست‌ها اطمینان حاصل شد.

**سمیت سلولی و زنده ماندن سلول:** سمیت سلولی داربست‌ها از نظر کمی با روش MTT در روزهای ۳، ۷، ۱۴ مورد بررسی قرار گرفت. پس از سومین پاساژ، سلول‌ها با محلول تریپسین ۰/۲۵٪ (Gibco, Canada) تریپسینه شدند و بصورت سوسپانسیون سلولی در محیط کشت درآمدند. سپس  $2 \times 10^6$  سلول‌های شبه استئوبلاست MG63، به هر چاهک پلیت ۲۴ خانه محتوی داربست‌های استریل افزوده شد. MG63 با همان تراکم بدون وجود داربست در چاهک جداگانه به عنوان گروه کنترل کشت شد. ابتدا داربست‌ها ۲ بار با PBS استریل شسته شد و به مقدار مورد نیاز از محیط کشت MTT (Sigma-Aldrich, Germany) که شامل ۹۰٪ محیط کشت کامل و ۱۰٪ محلول MTT می‌باشد ساخته شد. محلول MTT با غلظت (۵ میلی‌گرم در میلی‌لیتر، ۳۰۰ میکرولیتر) روی داربست‌ها را پوشاند و به مدت ۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه انکوبه شدند. بعد از طی مدت زمان لازم محلول MTT با ۳۰۰ میکرولیتر

۱ گرم PCL (با وزن مولکولی ۸۰,۰۰۰ دالتون) (Sigma-Aldrich, Germany) در سرنگ فلزی دستگاه پریتر سه‌بعدی ریخته شد و سپس سرنگ مربوطه در جایگاه مخصوص قرار گرفت. در این نوع داربست، قطر به صورت ثابت و برابر ۱/۵ میلی‌متر می‌باشد.

**پوشش‌دهی داربست با COL:** با غوطه‌ور کردن داربست‌های PCL در سوسپانسیون COL حل شده در اسید استیک ۰/۰۵ مولار به مدت یک شب، داربست‌های PCL/COL بدست آمد. پس از آن، سازه‌ها در هوای اتاق خشک شدند (۴۷).

**مشخصه‌یابی داربست‌ها:** برای بررسی مورفولوژی داربست‌ها و یکنواخت بودن سطح آنها از میکروسکوپ الکترونی روبشی استفاده شد. به این منظور داربست‌ها با فیلم طلا ۱۰ نانومتری جهت انعکاس الکترون‌های تابیده شده پوشش‌دهی شد. تصاویر SEM با ولتاژ ۱۵ کیلوولت به وسیله میکروسکوپ الکترونی روبشی (SEM, MIRA3/ TESCAN, Czech Republic) تهیه شد. جهت تعیین عناصر سطحی داربست‌ها آنالیز طیف‌سنجی پراش انرژی پرتو ایکس (EDX, MIRA3/ TESCAN, Czech Republic) انجام شد. همچنین طیف‌سنجی FTIR, AVATAR / ATR-FTIR (Thermo, USA) برای داربست‌های PCL و PCL/COL در محدوده طول موج ۵۰۰ تا ۴۰۰۰ بر سانتی‌متر بررسی شد.

**استریل نمودن داربست:** سلول‌های شبه استئوبلاست MG63 از مرکز ذخایر ژنتیکی و زیستی ایران خریداری شد. سلول‌های MG63 در محیط کشت DMEM (Gibco, Canada) همراه با ۱۰٪ سرم جنین گاوی (FBS, Gibco, Canada) و ۱٪ استرپتومایسین پنی‌سیلین (BioIDEA, Iran) در دستگاه انکوباتور با رطوبت ۹۵٪، CO<sub>2</sub> به میزان

رنگ‌آمیزی آلزارین‌رد: بعد از گذشت ۷ و ۱۴ روز به منظور اثبات تمایز سلول‌های MG63 به رده استخوانی این تست انجام شد. آلزارین‌رد یک ترکیب آلی است که به طور اختصاصی ماتریکس معدنی شده را در سلول‌ها به رنگ قرمز رنگ‌آمیزی می‌کند. به طوری که شدت رنگ‌پذیری بافت با میزان مواد معدنی موجود روی داربست‌ها ارتباط مستقیم دارد. سلول‌های پاساژ ۳ در پلیت ۲۴ خانه حاوی محیط القاکننده تمایز به استخوان (KiaZist) کشت داده شدند. دوبار در هفته محیط تعویض شد و پس از گذشت ۷ و ۱۴ روز تمایز سلول‌ها با روش رنگ‌آمیزی آلزارین‌رد (Sigma-Aldrich, Germany) بررسی شد. بعد از خارج کردن محیط کشت موجود در چاهک‌ها، داربست‌ها ۲ بار با بافر PBS شستشو داده شد. سپس برای تثبیت سلول‌ها از محلول پارا فرمالدهید ۱۰٪ استفاده گردید و به مدت ۳۰ دقیقه در دمای اتاق باقی ماند. محلول پارافرمالدهید از چاهک‌ها خارج شده و با آب مقطر دو بار تقطیر داربست‌ها شستشو داده شد و محلول آلزارین‌رد به اندازه‌ای که روی داربست‌ها را بپوشاند اضافه گردید. پلیت‌های حاوی داربست به مدت ۴۵ دقیقه در تاریکی و در دمای اتاق نگهداری و سپس محلول رنگ‌آمیزی خارج شد. در نهایت ۴ مرتبه با آب مقطر شستشو داده شد تا رنگ اضافی که باقی مانده، خارج گردد. سپس بافر PBS اضافه می‌گردد. در انتها نمونه‌ها با میکروسکوپ فازکتراسست بررسی و نتایج ارزیابی می‌گردد. رسوب ماتریکس مینرالیزه به رنگ نارنجی در پلیت سلولی حاکی از تمایز سلول‌های MG63 به سلول‌های استئوبلاست است.

بررسی فعالیت آنزیم آلکالین فسفاتاز (ALP): در این مطالعه، میزان فعالیت آنزیم ALP،  $2 \times 10^6$  سلول MG63 کشت شده بر روی داربست‌های PCL و PCL/COL موجود در چاهک‌های پلیت ۲۴ خانه، در

DMSO (Gibco, Canada) جایگزین شد و برای حل شدن بلورهای فورمازان پلیت‌ها به مدت ۲۰ دقیقه روی شیکر در دمای اتاق قرار داده شدند. با کمک دستگاه الیزاریدر (Awareness, Technology Inc., USA) چگالی نوری (OD) نمونه‌ها در ۵۷۰ نانومتر خوانده شد. برای هر گروه، ۳ بار تکرار گذاشته شد.

بررسی مورفولوژی و اتصال سلول به داربست‌ها با میکروسکوپ الکترونی FE-SEM: جهت بررسی اتصال و تکثیر سلول‌ها،  $2 \times 10^6$  سلول MG63 به روی داربست‌های PCL و PCL/COL موجود در چاهک‌های پلیت ۲۴ خانه، کاشت شد. پس از ۷ روز کشت سلولی روی داربست‌ها برای مشاهده آنها و همچنین چسبندگی سلولی، نمونه‌ها برای مشاهده با میکروسکوپ SEM آماده شدند. محیط کشت روی داربست‌ها خارج شد. سطح داربست سه مرتبه با PBS شستشو داده شد. پس از شستشوی سلول‌ها با PBS، به منظور فیکس نمودن سلول‌های کشت‌شده بر روی داربست از گلو تار آلدهید ۲/۵ درصد به مدت ۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد استفاده شد و سرانجام در محلول‌های گرادیانی اتانول ۶۰، ۷۰، ۸۰، ۹۰ و ۱۰۰٪ هر کدام به مدت ۱۰ دقیقه آگیری شدند. سپس داربست‌های حاوی سلول در آون خلا خشک شدند. به منظور افزایش هدایت الکتریکی سطح نمونه‌ها و وضوح بیشتر تصاویر، پیش از تصویربرداری لایه نازکی از طلا به روش پوشش‌دهی پاششی پاشیده شد تا سطح نمونه‌ها رسانا گردد.

بررسی روند تمایز سلول‌های شبه استئوبلاست MG63 به استخوان: هدف از این مرحله بررسی تمایز سلول‌های شبه استئوبلاست MG63 به استخوان بود. بررسی روند استخوان‌سازی سلول‌ها در تیمارهای مختلف، با استفاده از رنگ‌آمیزی آلزارین‌رد و تست ALP صورت گرفت.

طی سه بازه زمانی ۱، ۷ و ۱۴ روز نسبت به نمونه کنترل مورد مقایسه قرار گرفت. یک چاهک دارای سلول‌های MG63 همراه با محیط کشت کامل (DMEM) به عنوان کنترل در نظر گرفته شد. کیت ALP شرکت پارس آزمون شامل دو محلول R1 و R2 می‌باشد که باید به نسبت ۱:۴ مخلوط شدند. به منظور ارزیابی آنزیم فسفاتاز، سوپرناتانت سلولی را برداشته و سپس فعالیت آنزیم با استفاده از کیت که حاوی سوبسترای این آنزیم به نام پارا نیترو فنیل بررسی شد. آنزیم ALP، واکنش تبدیل پارا-نیترو فنیل فسفات (P-Nitro phenyl phosphate) بی‌رنگ را به پارا-نیترو فنیل زرد رنگ کاتالیز می‌کند. فعالیت آنزیم (IU/L) بر میزان کلی پروتئین (mg/dl) نرمالیزه می‌شود. کیت توتال پروتئین شرکت پارس آزمون برای بدست آوردن میزان پروتئین کل استفاده شد. با اندازه‌گیری میزان جذب نوری نیترو فنیل تشکیل شده در طول موج ۴۵۰ نانومتر مقدار ALP تعیین می‌شود. تعداد تکرار نتایج ۳ مرتبه در نظر گرفته شد.

**آنالیز آماری:** تجزیه و تحلیل آماری و مقایسه سطح معنی‌داری بین نمونه‌های مورد مطالعه با استفاده از تحلیل واریانس دوطرفه (two-way ANOVA) در نرم‌افزار 9 Graph pad prism (Graphpad Software Inc., San Diego, CA, USA) انجام گردید. هر آزمون سه مرتبه تکرار شد.

### نتایج

**ساخت داربست:** در این تحقیق ابتدا داربست ۴ لایه PCL با استفاده از دستگاه پریتر سه‌بعدی و روش FDM ساخته شد. در این تحقیق، به منظور تعدیل و اصلاح سطح داربست‌های PCL از COL بهره برده شد.

**بررسی مورفولوژی داربست‌ها:** تصاویر SEM داربست‌های سه‌بعدی PCL تولید شده با معماری

بسیار کنترل شده‌ای را ارائه می‌دهد (شکل ۲). داربست PCL بدون پوشش سطح نسبتاً صافی را نشان می‌دهد. با این حال، می‌توان مشاهده کرد که داربست‌های PCL کوت شده با COL دارای چین و چروک جزئی روی سطح بوده و COL با موفقیت بر روی سطح داربست‌های PCL قرار گرفته است (شکل ۲). در مقایسه تصاویر داربست‌های PCL/COL با سطوح داربست‌های PCL بدون پوشش انقباض کمی در اندازه حفره‌ها در سطح داربست‌های کامپوزیت مشاهده می‌شود که در نتیجه غوطه وری داربست‌ها در سوسپانسیون COL می‌باشد. طیف‌سنجی EDX جهت شناسایی عناصر سطحی داربست‌های ذکر شده استفاده شد (شکل ۲). داربست‌های PCL فقط دارای دو عنصر سازنده خود یعنی C و O بود؛ اما داربست‌های PCL/COL، علاوه بر دو عنصر ذکر شده، دارای عنصر Na بودند. نتایج طیف‌سنجی ATR-FTIR برای داربست‌های PCL و PCL/COL در شکل ۳ نشان داده شده است. معمولاً آمید COLI در محدوده  $1665-1550\text{ cm}^{-1}$  مشاهده می‌شود که مربوط به کشش C=O است و نوار COL آمید II در محدوده  $1530-1545\text{ cm}^{-1}$  قرار دارد که مربوط به کشش NH همراه با کشش CN است. در نمونه‌های ما PCL با پیوند عرضی، آمید I در  $1660\text{ cm}^{-1}$  و آمید II به ترتیب در  $1548\text{ cm}^{-1}$  ظاهر شدند (۲۵). بنابراین، واضح است که COL با موفقیت با اتصال عرضی با استفاده از GA بر روی نانوالیاف PCL بی‌حرکت شده است.

**زیست‌سازگاری داربست‌ها:** میزان زنده‌مانی سلول‌های MG63 بر روی سطح داربست‌های تهیه شده در نمودار رسم شده در شکل ۴ مشاهده می‌شود. میزان زنده‌مانی سلول‌ها در حضور COL در داربست PCL/COL به طور معنی‌داری بالاتر از داربست‌های

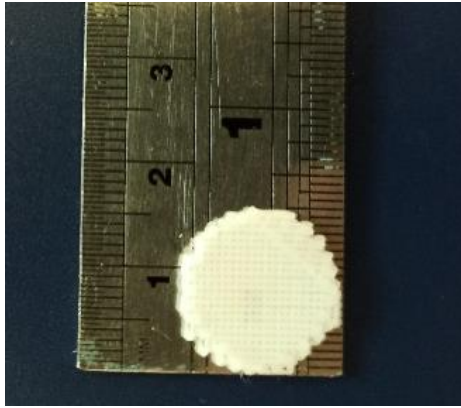
شدت رنگ قرمز-نارنجی بیشتر مشاهده شد که به دلیل رسوب بیشتر کلسیم در سطح داربست PCL/COL بود و همچنین افزایش تمایز سلول‌های MG63 به سلول‌های استئوبلاست را تایید کرد. وجود رنگ قرمز-نارنجی بیشتر در داربست PCL/COL به دلیل حضور COL است که با مطالعات مشابهی که در زیر توضیح داده شده مطابقت دارد.

**بررسی آنزیم ALP:** نتیجه ارزیابی فعالیت ALP در روزهای ۱، ۷ و ۱۴ در شکل ۷ نشان داده شده است. میزان فعالیت این آنزیم در استخوان در هنگام فرآیند کلسیمی شدن ماتریکس استخوانی توسط سلول‌های استئوبلاست به مقدار زیادی بالا می‌رود. ترشح آنزیم ALP به عنوان یک مارکر برای تخمین میزان فعالیت استئوبلاست‌ها در تماس با داربست‌های مهندسی بافت ارزیابی می‌شود (۲۱، ۲۸). داربست PCL/COL میزان فعالیت ALP سلول‌ها را در روز ۱۴ به طور معنی‌داری بیشتر از روز ۷ نشان داد. در روز ۱۴، فعالیت ALP در داربست PCL/COL به طور معنی‌داری بیشتر از داربست PCL بدون پوشش و کنترل بود. نتایج این مطالعه نشان داد که حضور COL در داربست منجر به افزایش فعالیت ALP و افزایش تمایز سلول‌های MG63 به سلول‌های استخوانی می‌شود. بنابراین، وجود COL در داربست PCL/COL را می‌توان دلیل هدایت بیشتر رشد سلول‌های استخوانی نسبت به نمونه کنترل و PCL بدون پوشش و در نتیجه تمایز سلول‌های MG63 به سلول‌های استخوانی دانست. بنابراین با توجه به تخلخل و آب‌دوستی مناسب سطح و تمایز سلول‌های MG63 به سلول‌های استخوانی در داربست PCL/COL می‌توان این داربست را به عنوان گزینه‌ای مناسب برای استفاده در مهندسی بافت استخوان معرفی نمود.

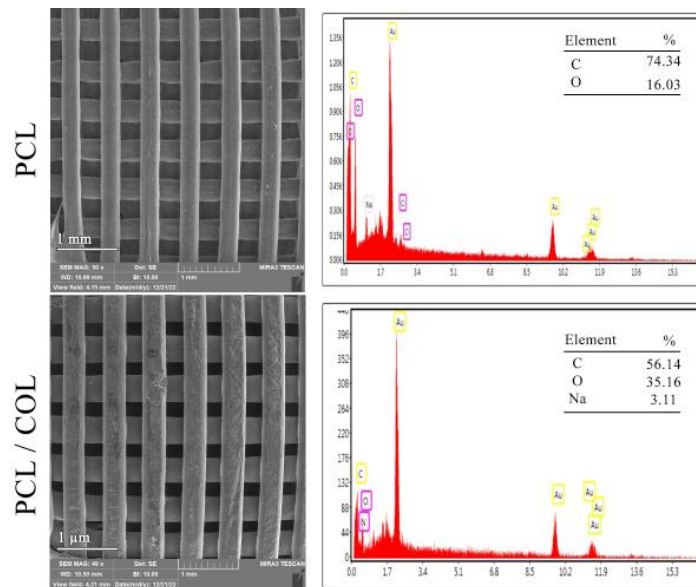
PCL و نمونه کنترل می‌باشد و حضور COL سبب افزایش رشد و تکثیر سلول‌ها می‌گردد.

**بررسی مورفولوژی و اتصال سلول به داربست‌ها با میکروسکوپ FE-SEM:** مورفولوژی، چسبندگی سلول‌های MG63 کشت‌شده روی داربست‌های PCL و PCL/COL پس از گذشت ۷ روز با میکروسکوپ FE-SEM بررسی شد (شکل ۵). نتایج نشان داد که سلول‌ها، بر روی داربست‌های PCL و PCL/COL به خوبی چسبیده و تکثیر یافتند و ارتباط سلول با سلول و سلول-داربست به خوبی انجام شده است. پوشش داربست‌ها با COL اتصالات سلولی را حمایت می‌کند.

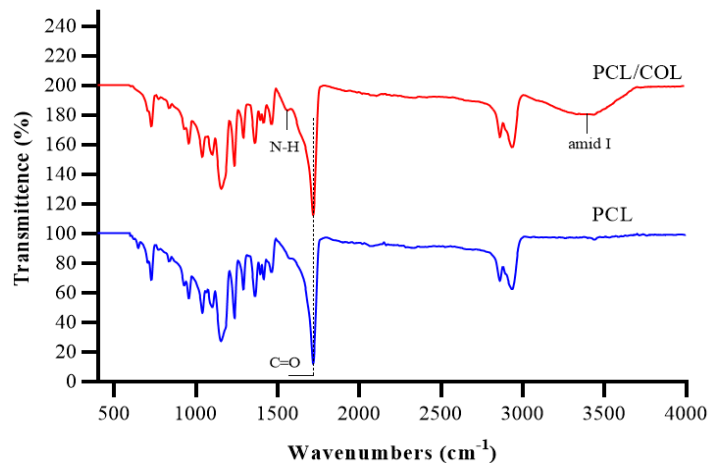
**بررسی تمایز سلول‌های بنیادی با رنگ‌آمیزی آلیزارین‌رد:** مثبت بودن رنگ آمیزی قرمز آلیزارین دلیلی بر تشکیل ندول کلسیمی در ماتریکس سلولی و تمایز سلول‌های شبه استئوبلاست MG63 به سلول‌های استئوبلاست است (۲). رسوب کلسیم نشانه مینرالیزاسیون در سلول‌های استخوانی می‌باشد که با استفاده از رنگ آلیزارین‌رد به رنگ قرمز-نارنجی قابل مشاهده است (۱۵، ۳۹، ۴۹). در این مطالعه، کشت تمایزی به مدت ۱۴ روز انجام گرفت و وقوع تمایز با رنگ‌آمیزی آلیزارین‌رد ارزیابی گردید. شکل ۶ نتایج رنگ‌آمیزی آلیزارین‌رد در روی سطح نمونه‌ها را نشان می‌دهد. در شکل ۶ (الف) نمونه کنترل در روز ۷ مشاهده می‌شود که سلول‌های MG63 تحت تمایز قرار نگرفته و پس از رنگ‌آمیزی با آلیزارین‌رد رنگ قرمز ظاهر نمی‌گردد. عدم رنگ‌آمیزی سطح نمونه، نشانه عدم حضور کلسیم در سطح می‌باشد، بنابراین تمایز سلولی رخ نداده است. رنگ‌آمیزی آلیزارین‌رد روی سطح داربست PCL/COL در مقایسه با داربست PCL بدون پوشش و نمونه کنترل در روز ۱۴ در شکل ۶ (ب) با



شکل ۱- داربست ۴ لایه PCL پرینت شده

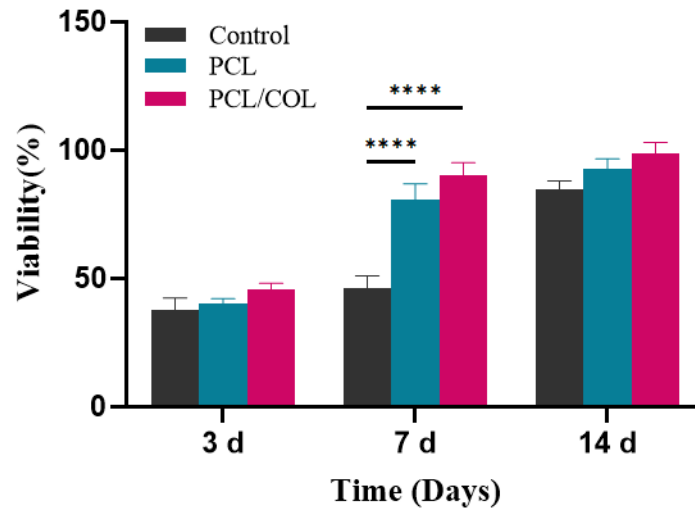


شکل ۲- تصاویر داربست‌های PCL و PCL/COL. داربست PCL بدون پوشش سطح نسبتاً صافی را نشان می‌دهد اما سطح داربست PCL/COL دارای چین و چروک می‌باشد.

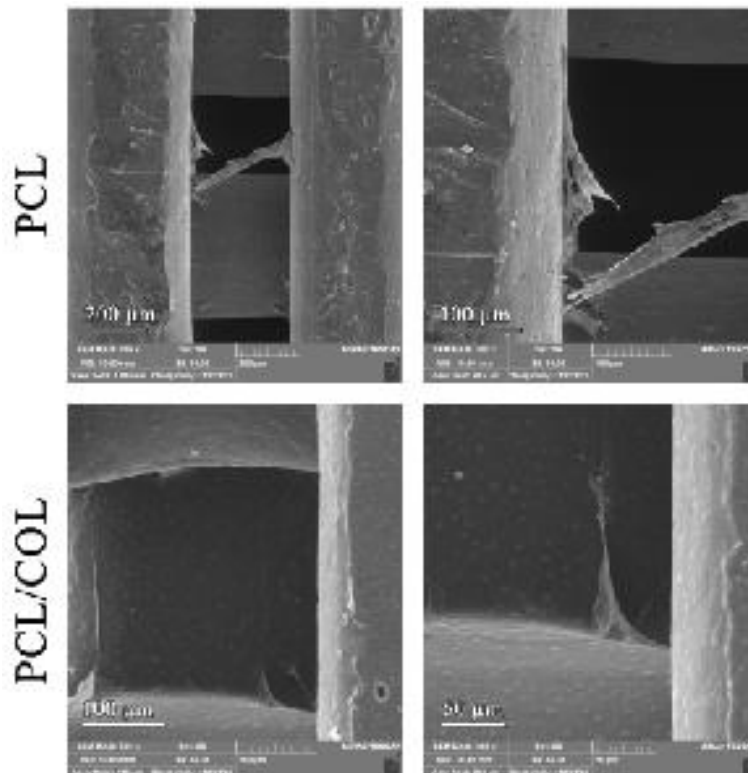


شکل ۳- نتایج طیف سنجی ATR-FTIR برای داربست‌های PCL و PCL/COL. نتایج، پوشش مناسب سطح داربست‌های PCL با COL را نشان داد.

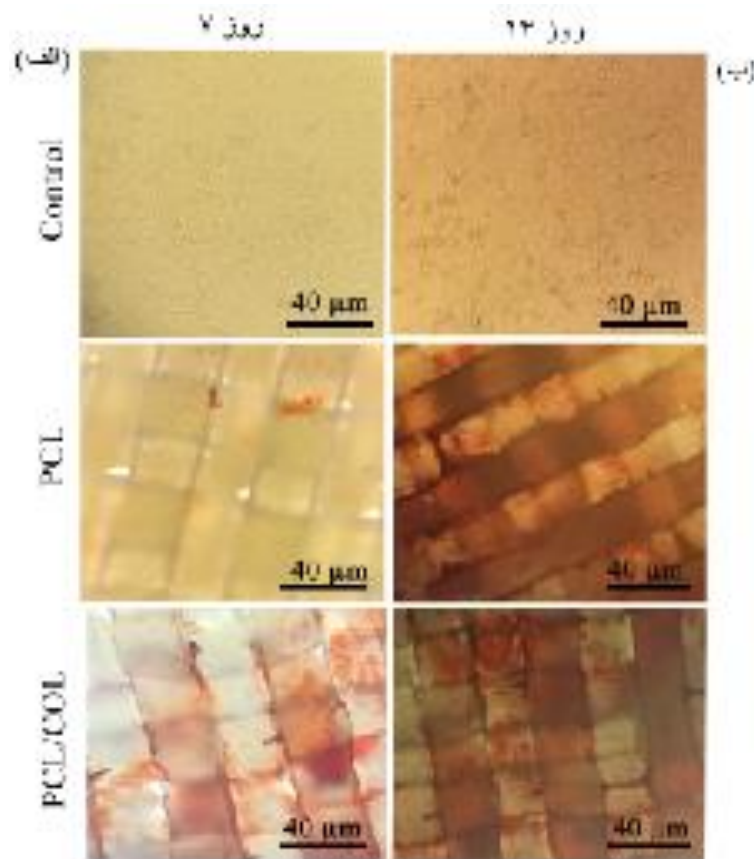




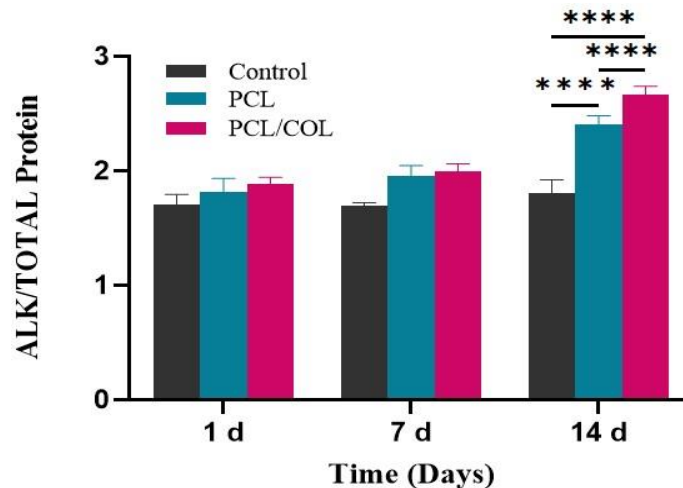
شکل ۴- نتایج حاصل از تست MTT پس از ۳، ۷ و ۱۴ روز از کشت (۱۰<sup>۶</sup> سلول) روی داربست‌های PCL، PCL/COL و مقایسه میزان بقای سلولی بین داربست‌های PCL، PCL/COL و گروه کنترل ( $p \leq 0/001$  با سه مرتبه تکرار). زنده ماندن و تکثیر سلولی در داربست‌های کامپوزیت PCL/COL به طور معنی‌داری بیشتر از داربست PCL خالص و کنترل می‌باشد ( $p \leq 0/0001$ ) و داربست PCL/COL سمیتی برای سلول‌های MG63 نداشت. تفاوت‌های آماری بین داربست‌های کامپوزیت و داربست PCL خالص و کنترل با ستاره نشان داده شده است (Two way ANOVA  $n = 3$ ).  $p \leq 0/0001$  \*\*\*\*،  $p < 0/001$  \*\*\*,  $p < 0/01$  \*\*,  $p < 0/05$  \*



شکل ۵- بررسی مورفولوژی، چسبندگی سلول‌های شبه استئوبلاست MG63 کشت داده شده روی داربست‌های PCL و PCL/COL توسط FE-SEM در روز ۷. هر ۲ نوع داربست اتصال و تکثیر را نشان دادند.



شکل ۶- (الف)، (ب) تصاویر میکروسکوپ نوری رنگ‌آمیزی آلیزارین‌رد بر روی سطح داربست‌ها در روز ۷ و ۱۴. تصاویر عدم تشکیل ماتریکس استخوانی در سلول‌های کنترل (عدم حضور مواد تمایزی استئوژنیک و رنگ‌آمیزی شده با آلیزارین‌رد)، نمای میکروسکوپی از تشکیل ماتریکس استخوانی (رنگ قرمز) در سلول‌های تحت شرایط تمایزی و رنگ‌آمیزی شده با آلیزارین‌رد. تصاویر به وضوح وجود گره‌های معدنی بیشتر را روی داربست‌های PCL/COL را در طول ۲۱ روز نشان می‌دهد.



شکل ۷- نتایج حاصل از تست ALP. مقایسه میزان آنزیم ALP بین داربست‌های PCL، PCL/COL و گروه کنترل در روزهای ۱، ۷ و ۱۴ (با سه مرتبه تکرار). داربست PCL/COL میزان فعالیت ALP سلول‌ها را در روز ۱۴ بالاتر از روز ۷ نشان داد. در روز ۱۴، فعالیت ALP در داربست PCL/COL به طور معنی داری بالاتر از داربست PCL بدون پوشش و کنترل بود ( $p \leq 0.0001$ ) (Two-way ANOVA,  $p \leq 0.0001$ , \*\*\*\*  $p < 0.0001$ , \*\*\*  $p < 0.001$ , \*\*  $p < 0.01$ , \*  $p < 0.05$ ).

## بحث

کاربردهای ایمپلنت است و تاکنون گزارش‌های موفقیت آمیزی از کاربرد آن در مهندسی بافت استخوان منتشر شده است (۸). با این حال، آب‌گریز بودن و خاصیت القای استخوان‌زایی ضعیف از مهمترین نقاط ضعف PCL است (۱۶). افزودن عوامل آلی یا معدنی استخوان‌ساز به PCL یک راه موثر برای افزایش زیست‌فعالی داربست است (۲۲). هر چقدر میزان شباهت ساختار داربست با ماتریکس خارج سلولی بیشتر باشد شانس موفقیت داربست در رفتار سلولی بیشتر است (۴۳). در این تحقیق COL، به عنوان پلیمر طبیعی که بقا و تکثیر MG63 را به طور قابل توجهی افزایش می‌دهد انتخاب شد (شکل ۴) (۳۷).

یکی از نکات مهم در ساخت داربست برای مهندسی بافت استخوان، زیست‌سازگار داربست‌ها و پشتیبانی از چسبندگی و گسترش آ سلولی است، زیرا این ویژگی نقش مهمی در افزایش تکثیر سلولی، تمایز و تشکیل ماتریکس خارج سلولی دارد (۴۲). در این مطالعه بررسی مقایسه‌ای زیست‌سازگاری و عدم سمیت داربست‌های PCL و PCL/COL در طی روزهای ۷، ۱۴ و ۲۸ انجام شد. نتایج بدست آمده از تست MTT زیست‌سازگاری و عدم سمیت داربست PCL/COL و بقای سلولی معنی‌دار این داربست در مقایسه با داربست PCL و گروه کنترل را تایید کرد. حضور COL در داربست منجر به سمیت سلولی نشده است. نتایج نشان می‌دهد که این ماده زیست‌سازگار شرایط مشابهی را با ECM بافت استخوانی فراهم می‌کند و باعث تحریک رشد سلولی در داربست PCL/COL می‌شود. COL می‌تواند رسوب مواد معدنی را القا کند و سطح آن حاوی مکان‌هایی است که جذب استئوبلاست و رسوب مواد

استخوان، بخشی جدایی‌ناپذیر از اسکلت است، که در طول عمر تحت بازسازی ساختاری قرار می‌گیرد تا از اندام‌های داخلی محافظت کند. مزیت بزرگ بافت استخوان، ترمیم طبیعی و بازسازی طبیعی آن است (۵). از دست دادن بیش از حد استخوان در شرایطی مانند شکستگی، تصادف، انحطاط از افزایش سن و یا برداشتن پس از تومور، پیوند استخوان را برای بهبود و بازیابی قدرت ضروری می‌سازد. با استفاده از علم مهندسی بافت ساختارهای استخوان مانند را می‌توان برای ترمیم این ضایعات طراحی کرد (۸). داربست‌های کامپوزیتی زیست‌سازگار، تجزیه پذیر و القا کننده استخوان هستند تا هرگونه واکنش ایمنولوژیکی درون بدن را از بین ببرند. آنها اجازه اتصال مولکول‌های زیستی، مانند فاکتورهای رشد و عوامل رگ‌زایی را می‌دهند که عملکرد سلول را بهبود می‌بخشد و بازسازی بافت را تحریک می‌کند. داربست‌ها سرانجام تخریب می‌شوند و بافت تازه تشکیل شده فضای موجود را اشغال می‌کند (۹، ۱۳، ۲۹). فناوری‌های مختلف چاپ برای توسعه داربست‌های سه‌بعدی برای کاربردهای مهندسی بافت استخوان استفاده شده است که در بین انواع چاپ سه‌بعدی، FDM به دلیل هزینه کم و عملکرد آسان معمولاً مورد استفاده قرار می‌گیرد (۴، ۳۸، ۴۰). در فرایند FDM، مواد تأثیر بسزایی بر کیفیت و عملکرد محصولات چاپی دارند (۲۴، ۲۷، ۵۲). در این تحقیق پلیمر PCL به عنوان لایه پلیمری مناسب برای ساخت داربست PCL به روش FDM انتخاب شد. PCL یک پلیمر الاستیک است که داربست را انعطاف پذیر و الاستیک می‌کند. همچنین این پلیمر دارای قابلیت زیست‌تخریب‌پذیری، زیست‌سازگاری خوب و دارای مزیت اضافی تأیید FDA برای برای

و رفتار زیستی آن را بهبود بخشیده است. همچنین نتایج مطالعه COL تثبیت شده بر روی نانوالیاف PCL توسط Krithica و همکاران نشان داد که آب‌گریزی سطحی نانوالیاف PCL توسط COL کاهش یافته و تکثیر فیبروبلاست NIH 3T3 بر روی نانوالیاف PCL، اصلاح شده با COL بهتر بوده است (۲۵). Weingärtner و همکارانش، برای تعامل بهتر داربست سلولی، داربست‌های PCL چاپ سه‌بعدی را با COLI پوشش دادند. سپس سه نوع سلول مختلف بر روی داربست‌ها کشت داده شد. نتایج نشان داد پوشش داربست‌های PCL با COLI به طور قابل توجهی تعامل سلول-داربست را بهبود بخشید و چسبندگی سلول‌ها به سطح داربست را بهبود بخشید و در نتیجه رشد سلولی گسترده روی داربست مشاهده شد. تست‌های زیست‌سازگاری نشان داد که داربست‌های PCL/COLI برای استفاده با سلول‌ها مناسب هستند (۴۸). نتایج نشان داد که داربست متشکل از PCL و COL از تمایز سلول‌های MG63 تحت شرایط *in vitro* پشتیبانی می‌کند، که به طور غیرمستقیم نشان می‌دهد که داربست PCL چاپ شده سه‌بعدی با COLI تعبیه‌شده سازگاری زیستی رضایت‌بخشی را نشان می‌دهد. در این تحقیق، فعالیت ALP و رنگ‌آمیزی آلیزارین‌رد برای بررسی تمایز سلول‌های شبه استئوبلاست MG63 به سلول‌های استئوبلاست بر روی داربست‌های PCL و PCL/COL برای مدت زمان ۱۴ روز استفاده شد. تغییرات بیوشیمیایی مانند افزایش فعالیت آنزیم ALP، رنگ‌پذیری توسط آلیزارین‌رد و افزایش متابولیسم سلولی در سلول‌های MG63 بعد از تمایز به سلول‌های استئوبلاست نیز رخ می‌دهد. رسوب کلسیم با استفاده از تجزیه و تحلیل رنگ آمیزی آلیزارین‌رد مورد بررسی قرار گرفت. آلیزارین‌رد یک ترکیب آلی است که به طور

معدنی را افزایش می‌دهد. علاوه بر این، می‌تواند به طور موثر روند معدنی‌شدن را افزایش داده و استخوان جدید را در داربست مصنوعی کاشته شده ایجاد کند. این خواص ذاتی COL آن را به یک کاندیدای بالقوه برای مهندسی بافت تبدیل می‌کند (۲۶). He و همکارانش در مطالعه‌ای، داربست‌های متخلخل سه‌بعدی PLCL توسط فناوری LDM را ساختند. داربست PLCL/COLI با استفاده از تیمار قلیایی و پوشش COLI روی داربست PLCL تهیه شد. سنجش MTT نشان داد که تکثیر سلول‌های غضروفی مفصل خرگوش روی داربست PLCL/COLI بهتر از داربست PLCL خالص است (۱۸). آب‌دوستی سطحی یکی از ویژگی‌های مهم در بسترهای کشت در مهندسی بافت می‌باشد؛ زیرا رسوب پروتئین و اتصال سلول وابسته به آب‌دوستی داربست‌ها است (۴۵). گروه‌های PCL عمدتاً متیل و متیلن هستند که آب‌گریز هستند. بنابراین آب‌دوستی داربست PCL نسبتاً کم است. COL از مقدار زیادی گروه کربوکسیل و آمینو تشکیل شده است که هر دو عناصر آب‌دوست و زیست فعال عالی هستند (۱۸). در نتیجه وجود گروه‌های کربوکسیل و آمینو COL، آب‌دوستی داربست PCL بسیار بهبود می‌یابد. مهم‌تر از آن، وقتی سلول‌ها به سطح داربست می‌چسبند، گروه‌های آب‌دوست نیز می‌توانند مکان‌های بیشتری را برای چسبندگی سلول فراهم کنند و رفتار سلول و بازسازی بافت را تسهیل کنند (۱۱، ۳۱، ۴۶). نتیجه مطالعه حاضر نشان داد که داربست‌های PCL/COL خصوصیات چسبندگی سلولی بهبود یافته‌ای نسبت به داربست‌های PCL خالص دارند. این بهبود چسبندگی حاصل حضور گروه‌های بسیار فعال و قطبی COL بر سطح داربست PCL است. افزودن COL، همانطور که پیش‌بینی شده بود، داربست را به ECM شبیه‌تر کرده

اکستروود شده متخلخل سه‌بعدی توسط فناوری FDM همراه با MG63 را پیشنهاد می‌کند. در این مطالعه داربست‌های PCL ساخته شد و داربست‌های PCL/COL با پوشش COL روی داربست PCL تهیه شد. پس از پوشش COL، خاصیت آب‌دوستی و زیست‌سازگاری داربست PCL افزایش یافت. داربست‌های PCL اکستروود شده سه‌بعدی با این ساختار و منافذ موجود با هدف استخوان‌سازی برای تحویل متابولیت‌ها، فاکتورهای رشد و مهاجرت سلولی ساخته شدند. داربست PCL/COL را می‌توان یک داربست قابل قبول در مهندسی بافت دانست.

#### منابع

1. Abdal-hay A., Raveendran N. T., Fournier B., Ivanovski S. 2020. Fabrication of biocompatible and bioabsorbable polycaprolactone/magnesium hydroxide 3D printed scaffolds: Degradation and in vitro osteoblasts interactions. *Composites Part B: Engineering*, 197, 108158.
2. Abnosi M and Dehdehi L. 2012. Study of morphology and biochemistry of rat bone marrow mesenchymal stem cells before and after osteogenic differentiation: a comparative study. *J. of Cell and Tissue*, Vol. 3, pp. 103-111.
3. Alksne M., Kalvaityte M., Simoliunas E., Rinkunaite I., Gendviliene I., Locs J., Rutkunas V., Bukelskiene V. 2020. In vitro comparison of 3D printed polylactic acid/hydroxyapatite and polylactic acid/bioglass composite scaffolds: Insights into materials for bone regeneration. *J Mech Behav Biomed Mater*, <https://doi.org/10.1016/j.jmbbm.2020.103641>
4. Amiruddin H., Bin Abdollah M.F., Norashid N.A. 2019. Comparative study of the tribological behaviour of 3d-printed and moulded abs under lubricated condition, *Mater. Res. Express*, 6. 085328.

اختصاصی با یون‌های کلسیم در pH پایین متصل می‌شود، به طوری که شدت رنگ‌پذیری بافت با میزان مواد معدنی موجود در ماتریکس آن ارتباط مستقیم دارد (۲). بعد از ۱۴ روز، لکه‌های قرمز رنگ که نشان دهنده رسوب کلسیم بیشتر در داربست‌های PCL/COL بود، مشاهده شد. در مقابل، داربست‌های PCL رسوب کلسیم ضعیفی را نشان دادند.

نشانگر ALP برای شناسایی شروع کانی‌سازی استفاده می‌شود و در تشکیل آپاتیت کلسیم و فرآیند کلسیمی شدن ماتریکس استخوان و تولید پروتئین همراه با ماتریکس نقش دارد (۵، ۳۵). هیدرولیز استرهای فسفات توسط ALP منجر به افزایش کانی‌سازی ECM و تنظیم فاکتورهای تمایز سلولی پایین دست برای شروع تمایز استخوانی می‌شود (۱، ۱۴، ۴۱). بنابراین، اندازه‌گیری فعالیت آنزیم ALP را می‌توان ابزاری مؤثر برای اندازه‌گیری تمایز سلول‌های MG63 به دودمان استخوانی در نظر گرفت. نتایج فعالیت‌های ALP نرمال شده سلول‌های MG63 کشت داده شده بر روی داربست در شکل ۷، افزایش معنی دار فعالیت ALP به دلیل اثر COL را در داربست PCL/COL نشان داد.

Nguyen و همکاران فعالیت ALP و میزان رسوب کلسیم سلول‌های بنیادی مزانشیمی موش بر روی داربست‌های سه‌بعدی PCL در ترکیب با COL و AIGIDs مشتق از *Haliotis discus hannai* را بررسی کردند. نتایج نشان داد که فعالیت ALP و کانی‌سازی در PCL/AIGIDs/COL بیشتر از داربست PCL بود (۳۴).

#### نتیجه‌گیری

مطالعه حاضر یک استراتژی برای بدست آوردن بافت استخوان مانند با استفاده از داربست‌های PCL

13. Gandhimathi Ch., Jie Quek Y., Ezhilarasu H., Ramakrishna S., Bay B-H., and Srinivasan D.K. 2019. Osteogenic Differentiation of Mesenchymal Stem Cells with Silica-Coated Gold Nanoparticles for Bone Tissue Engineering. *Int. J. Mol. Sci.*, 20, 5135.
14. Gerdes S., Mostafavi A., Ramesh S. 2019. Process- Structure- Quality Relationships of 3D Printed PCL-Hydroxyapatite Scaffolds. *Tissue Eng Part A*. 26(5-6):279-291.
15. Gregory C. A., Gunn W. G., Peister A., and Prockop D. J. 2004. An Alizarin red-based assay of mineralization by adherent cells in culture: comparison with cetylpyridinium chloride extraction. *Analytical biochemistry*, Vol. 329, pp. 77-84.
16. Gómez-Cerezo N., Casarrubios L., Saiz-Pardo M., Ortega L., De Pablo D., Díaz-Güemes I., Portolés M. 2019. Mesoporous bioactive glass/ $\epsilon$ -polycaprolactone scaffolds promote bone regeneration in osteoporotic sheep. *Acta Biomaterialia*, 90, 393-402.
17. Haleem A., Javaid M., Khan RH., Suman R. 2020. 3D printing applications in bone tissue engineering. *Journal of Clinical Orthopaedics and Trauma*, 11: S118-S24.
18. He Y., Liu W., Guan L., Chen J., Duan L., Jia Z., et al. 2018. A 3D-printed PLCL scaffold coated with collagen type I and its biocompatibility. *BioMed research international*, 10, 1155.
19. Jammalamadaka U., Tappa K. 2018. Recent advances in biomaterials for 3D printing and tissue engineering. *Journal of functional biomaterials*, 9(1):22.
20. Jia L., Zhang Y., Ji Y., Li X., Xing Y., Wen Y., et al. 2019. Comparative analysis of lncRNA and mRNA expression profiles between periodontal ligament stem cells and gingival mesenchymal stem cells. *Gene*, 699:155-64.
5. Arab- Ahmadi S., Irani S., Bakhshi H., Atyabi F., Ghalandari B. 2021. Immobilization of carboxymethyl chitosan/laponite on polycaprolactone nanofibers as osteoinductive bone scaffolds. *Polymers for Advanced Technologies*, 32(2), 755-765.
6. Black CR., Goriainov V., Gibbs D., Kanczler J., Tare RS., Oreffo RO. 2015. Bone tissue engineering. *Current molecular biology reports*, 1(3):132-40.
7. Bishop ES., Mostafa S., Pakvasa M., Luu HH., Lee MJ., Wolf JM., et al. 2017. 3-D bioprinting technologies in tissue engineering and regenerative medicine: Current and future trends. *Genes & diseases*, 4(4):185-95.
8. Caetano, Guilherme Ferreira, Bártoło, Paulo Jorge, Domingos, Marco, Oliveira, Carolina Caliarı, Leite, Marcel Nani, & Frade, Marco Andrey Cipriani. (2015). Osteogenic Differentiation of Adipose-derived Mesenchymal Stem Cells into Polycaprolactone (PCL) Scaffold. *Procedia Engineering*, 110, 59-66.
9. Chocholata P., Kulda V., and Babuska V. 2019. Fabrication of Scaffolds for Bone-Tissue Regeneration. *Materials*, 12(4): p. 568.
10. Colazo JM., Evans BC., Farinas AF., Al-Kassis S., Duvall CL., Thayer WP. 2019. Applied Bioengineering in Tissue Reconstruction, Replacement, and Regeneration. *Tissue Engineering Part B: Reviews*, 25(4):259-90.
11. Dong Ch and Lv Y. 2016. Application of Collagen Scaffold in Tissue Engineering: Recent Advances and New Perspectives. *Polymers*.
12. Du X, Fu S, Zhu Y. 2018. 3D printing of ceramic-based scaffolds for bone tissue engineering: an overview. *Journal of Materials Chemistry B*, 4397-412:(27)6.

28. Liu Z., Tang Y., Kang T., Rao M., Li K., Wang Q., Quan C., Zhang C., Jiang Q., and Shen H. 2015. Synergistic effect of HA and BMP-2 mimicking peptide on the bioactivity of HA/PMMA bone cement, *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, Vol. 131, pp. 39-46.
29. Luo Z.; Yang Y.; Deng Y.; Sun Y.; Yang H.; Wei S. 2016. Peptide-incorporated 3D porous alginate scaffolds with enhanced osteogenesis for bone tissue engineering. *Colloids Surf. B Biointerfaces*, 143, 243–251.
30. Ma H., Feng C., Chang J., Wu C. 2018. 3D-printed bioceramic scaffolds: From bone tissue engineering to tumor therapy. *Acta biomaterialia*, 79:37-59.
31. Masuda H.T., Ishihara S., Harada I., Mizutani T., Ishikawa M., Kawabata K., et al. 2014. Coating extracellular matrix proteins on a (3-aminopropyl) triethoxysilanetreated glass substrate for improved cell culture. *Biotechniques*. 56(4):172–9.
32. Neumann R., Neunzehn J., Hinüber C., Flath T., Schulze F. P., Wiesmann H-P. 2019. 3D-printed poly-ε-caprolactone-CaCO<sub>3</sub>-biocompositescaffolds for hard tissue regeneration. *eXPRESS Polymer Letters*, Vol.13, No.1. 2–17.
33. Neves MI., Wechsler ME., Gomes ME., Reis RL., Granja PL., Peppas NA. 2017. Molecularly imprinted intelligent scaffolds for tissue engineering applications. *Tissue Engineering Part B: Reviews*. 23(1):27-43.
34. Oh G.W., Nguyen V.T., Heo S.Y., Ko S.C., Kim C.S., et al. 2021. 3D PCL/fish collagen composite scaffolds incorporating osteogenic abalone protein hydrolysates for bone regeneration application: in vitro and in vivo studies. *Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition*, 32(3), 355-371.
35. Orafa Z., Irani S., Zamanian, A., Bakhshi H., Nikukar H., et al. 2021.
21. Jaroszewicz J., Idaszek J., Choinska E., Szlajak K., Hyc H., Osiecka-Iwan A., Swieszkowski W and Moskalewski S. 2019. “Formation of calcium phosphate coatings within polycaprolactone scaffolds by simple, alkaline phosphatase based method”. *Materials Science and Engineering, C*, Vol. 96, pp. 319-328.
22. Khosravi A., Ghasemi-Mobarakeh L., Mollahosseini H., Ajallouei F., Masoudi Rad M., Norouzi M.R., Sami Jokandan M., Khoddami A., Chronakis L.S. 2018. Immobilization of silk fibroin on the surface of PCL nanofibrous scaffolds for tissue engineering applications. *Applied polymer*.
23. Klimek K and Ginalska G. 2020. Proteins and Peptides as Important Modifiers of the Polymer Scaffolds for Tissue Engineering Applications—A Review. *Polymers*.
24. Klippstein H., Sanchez A.D.D., Hassanin H., Zweiri Y., Seneviratne L. 2018. Fused deposition modeling for unmanned aerial vehicles (UAVS): a review, *Adv. Eng. Mater*, 20. 1700552.
25. Krithica N., Natarajan V., Madhan B., Sehgal PK., Mandal AB. 2011. Type I Collagen Immobilized Poly(caprolactone) Nanofibers: Characterization of Surface Modification and Growth of Fibroblasts., *Advance biomaterial.*, 14, No. 4.
26. Li Q., Lei X., Wang X., Cai Z., Lyu P., Zhang, G. 2019. Hydroxyapatite/collagen three-dimensional printed scaffolds and their osteogenic effects on human bone marrow-derived mesenchymal stem cells. *Tissue Engineering Part A*, 25(17-18), 1261-1271.
27. Ligon S.C., Liska R., Stampfl J., Gurr M., Mulhaupt R. 2017. Polymers for 3d printing and customized additive manufacturing, *Chem. Rev*, 117. 10212–10290.

- orthopedic implant application. *Journal of Coatings Technology and Research*, 16(2), 477-489.
43. Salehi M., Ai J., Lotfi bakhshaiesh N., Irani S., Ebrahimi B.S. 2019. Evaluation of adhesion and viability of endometrial stem cells-derived osteoblast-like cells cultured on PLGA/HA scaffold. *Journal of Developmental Biology*, 11(1):1-14. [In Persian]
44. Sharifi F., Atyabi SM., Norouzian D., Zandi M., Irani S., Bakhshi H. 2018. Polycaprolactone/carboxymethyl chitosan nanofibrous scaffolds for bone tissue engineering application. *International journal of biological macromolecules*, 115:243-8.
45. Tao L., Zhonglong L., Ming X., Zezheng Y., Zhiyuan L., Xiaojun Z., Jinwu W. 2017. In vitro and in vivo studies of a gelatin/carboxymethyl chitosan/LAPONITE® composite scaffold for bone tissue engineering. *RSC advances*, 7(85), 54100-54110.
46. Teti A. 1992. Regulation of cellular functions by extracellular matrix. *J Am SocNephrol*, 2(10 Suppl): S83-7.
47. Wang T., Yang X., Qi X and Chaoyin Jiang. 2015. Osteoinduction and proliferation of bone-marrow stromal cells in three-dimensional poly ( $\epsilon$ -caprolactone)/hydroxyapatite/collagen scaffolds. *Journal of Translational Medicine*, 13:152.
48. Weingärtner L., Latorre S. H., Velten D., Bernstein A., Schmal H., Seidenstuecker M. 2021. The effect of collagen-i coatings of 3D printed pcl scaffolds for bone replacement on three different cell types. *Applied Sciences*, 11(22), 11063.
49. Zaminy A., Ragerdi Kashani I., Barbarestani M., Hedayatpour A., Mahmoudi R., and Vardasbi S. 2008. Melatonin influences the proliferative and
- Coating of laponite on PLA nanofibrous for bone tissue engineering application. *Macromolecular Research*, 29(3), 191-198.
36. Patil V. A., Masters K. S. 2020. Engineered collagen matrices. *Bioengineering*, 7(4), 163.
37. Pérez-Castrillo S., González-Fernández M.L., López-González M.E., Villar-Suárez V. 2018. "Effect of ascorbic and chondrogenic derived decellularized extracellular matrix from mesenchymal stem cells on their proliferation, viability and differentiation", *Annals of Anatomy-Anatomischer Anzeiger*, Vol. 220, pp. 60-69.
38. Pranzo D., Larizza P., Filippini D., Percoco G. 2018. Extrusion-based 3d printing of microfluidic devices for chemical and biomedical applications: a topical review. *Micromachines*, 9. 374.
39. Raghavendran H. R. B., Mohan S., Genasan K., Murali M. R., Naveen S. V., Talebian S., McKean R., and Kamarul T. 2016. Synergistic interaction of platelet derived growth factor (PDGF) with the surface of PLLA/Col/HA and PLLA/HA scaffolds produces rapid osteogenic differentiation. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, Vol. 139, pp. 68-78.
40. Rane K., Strano M. 2019. A comprehensive review of extrusion-based additive manufacturing processes for rapid production of metallic and ceramic part. *Adv. Manuf*, 7. 155-173.
41. Rashad A., Mohamed-Ahmed S., Ojansivu M., Berstad K., Yassin M. A., et al. 2018. Coating 3D printed polycaprolactone scaffolds with nanocellulose promotes growth and differentiation of mesenchymal stem cells. *Biomacromolecules*, 19(11), 4307-4319.
42. Rezk A.I., Mousa H.M., Lee J., Park, C. H., Kim, C.S. 2019. Composite PCL/HA/simvastatin electrospun nanofiber coating on biodegradable Mg alloy for



polycaprolactone/collagen fibrous scaffolds by electrospinning and their bioactivity. *Int. J. Biol. Macromol.* 76, 94-101

52. Yang W-F., Long L., Wang R., Chen D., Duan S., Xu F-J. 2018. Surface-modified hydroxyapatite nanoparticle-reinforced polylactides for three-dimensional printed bone tissue engineering scaffolds, *J. Biomed. Nanotechnol.* 14, 294-303.

differentiative activity of rat adipose-derived stem cells, *Yakhteh*, Vol. 10, pp. 25-32.

50. Zhang W., Zhu Y., Li J., Guo Q., Peng J., Liu S., et al. 2016. Cell-derived extracellular matrix: basic characteristics and current applications in orthopedic tissue engineering. *Tissue Engineering Part B: Reviews*, 22(3):193-207.

51. Zhang, Q.; Lv, S.; Lu, J.; Jiang, S.; Lin, L. 2015. Characterization of

## Investigating the Behavior of MG63 Cells on Polycaprolactone and Polycaprolactone/Collagen 3D Scaffolds for Bone Regeneration

Zahra Ebrahimi<sup>1</sup>, Shiva Irani<sup>1</sup>, Abdolreza Ardehshiry Lajimi<sup>2</sup>, Ehsan Seyed Jafari<sup>3\*</sup>

1- Department of Biology, School of Basic Science, Science and Research Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran.

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

3 -Department of Biotechnology, College of Science, University of Tehran, Tehran, Iran.

### Abstract

3D printing of scaffolds at low temperatures is very promising for making artificial bone graft alternatives with more performance than traditional techniques. One of the most promising strategies in bone tissue engineering has focused on the development of biomimetic scaffolds. Ceramic-based scaffolds with osteogenic ability and mechanical properties are promising candidates for bone repair. The aim of this study was to adapt the flexibility and increasing the effect of inducing osteogenesis of Polycaprolactone (PCL) scaffold prepared by fused deposition modeling (FDM) method, using the combination of Collagen (COL) as a natural polymer with synthetic polymer and to investigate the behavior of MG63 cells on it. After preparing the scaffold, scanning electron microscope (SEM), energy dispersive X-ray (EDX) and ATR-FTIR spectroscopy were used. After 1,7,14 days, the ossification process of MG63 cells in different treatments was performed using alizarin red staining and alkaline phosphatase activity. The non-toxicity of scaffolds was also evaluated by MTT assay to ensure cell proliferation. From under a microscope, it was found that tissue engineering scaffolds distributed and connected almost rectangular pores evenly. The PCL/COL scaffold showed a significant difference in terms of viability compared to the polycaprolactone scaffold only in the differential medium ( $P \leq 0.0001$ ). The results of evaluating ALP activity in PCL/COL scaffolds were significantly higher than uncoated PCL scaffolds and control ( $P \leq 0.0001$ ). The results of this study showed that the use of PCL/COL scaffold can be considered a suitable medium for proliferation and differentiation of MG63 cells in bone tissue engineering. Therefore, the PCL/COL composite scaffold prepared by FDM printer can be widely used in bone tissue engineering due to the cell survival by COL.

**Keywords:** Polycaprolactone, Collagen, Stem cells, 3D printing scaffolds, Bone tissue engineering