



## مقاله پژوهشی

# بررسی زیست‌سازگاری داربست PLA پوشش داده شده با لاپونیت بر روی سلول‌های بنیادی مزانشیمی مغز استخوان انسان

زهرا عرفا<sup>۱</sup>، شیوا ایرانی<sup>۱\*</sup>، علی زمانیان<sup>۲</sup>، هادی بخشی<sup>۳</sup>، حبیب نیکوکار<sup>۴</sup>، به آفرید قلندری<sup>۵</sup>

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

۲- گروه بیومواد، پژوهشکده فناوری نانو و مواد پیشرفته، پژوهشگاه مواد و انرژی، کرج، ایران

۳- پژوهشکده سیستم‌های پلیمری عامل، موسسه فرانهورفر برای تحقیقات پلیمری کاربردی، پوتسدام، آلمان

۴- مرکز تحقیقات نانو تکنولوژی پزشکی و مهندسی بافت، پژوهشکده علوم تولید مثل یزد، دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی درمانی شهید صدوقی یزد، یزد، ایران

۵- گروه نانوتکنولوژی پزشکی، واحد علوم و تحقیقات، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران

\*مسئول مکاتبات: s.irani@sbiau.ac.ir

تاریخ پذیرش: ۱۴۰۰/۰۱/۲۱

تاریخ دریافت: ۱۳۹۹/۱۱/۱۸

## چکیده

مهندسی بافت استخوان رویکردی امیدوارانه جهت توسعه درمان‌های مناسب جدید برای رفع آسیب‌های بافت استخوانی است. یکی از اهداف مهم در این رشته، ساخت داربست‌هایی با تقلید از ماتریکس خارج سلولی است. هدف از این مطالعه تولید داربست پلی‌لاکتیک اسید/لاپونیت (PLA/LAP) و بررسی رفتار سلول‌های بنیادی مزانشیمی مغز استخوان انسانی (hBMSCs) بر روی آن بود. ابتدا داربست PLA به روش الکتروریسی ساخته شد و سپس LAP با غلظت ۰/۸ درصد وزنی (LAP0.8%) بر روی آن پوشش داده شد. مورفولوژی داربست توسط میکروسکوپ الکترونی روبشی (SEM) و طیف‌سنجی پراش انرژی پرتو ایکس (EDX)، ساختار شیمیایی آن توسط طیف‌سنجی ATR-FTIR و میزان آبدوستی داربست با آزمون زاویه تماس آب بررسی شد. نهایتاً زیست‌سازگاری داربست و بقای سلولی توسط تست MTT، بر روی سلول‌های hBMSC انجام شد. نتایج حاصل از مورفولوژی داربست نشان‌دهنده پوشش‌دهی موفق LAP0.8% بر روی داربست PLA بود. همچنین، سطح آبدوستی داربست PLA پس از پوشش‌دهی با LAP بهبود یافت. زیست‌سازگاری داربست تا ۲۴ ساعت بعد از کشت سلولی و بقای سلول‌های hBMSC تا ۷۲ ساعت پس از کشت ( $p \leq 0.001$ ) تایید شد. از نتایج بدست آمده در این تحقیق به نظر می‌رسد که داربست PLA/LAP0.8% بدلیل حفظ زیست‌سازگاری و بقای سلولی که بواسطه حضور یون‌های موجود در نانوذره LAP است، می‌تواند کاندیدای مناسبی برای برنامه‌های مهندسی بافت استخوان باشد.

کلمات کلیدی: پلی‌لاکتیک اسید، لاپونیت، الکتروریسی، مهندسی بافت، استخوان.

## مقدمه

از این تحولات، آسیب بافتی و اختلال در عملکرد عادی آنها می‌باشد. بافت استخوانی از این امر مستثناء

بدن انسان از اندام‌ها و بافت‌های مختلفی تشکیل شده است که با افزایش سن دارای تحولاتی می‌شود. یکی

پلی لاکتیک اسید (polylactic acid, PLA) بیشترین توجه را به عنوان داربست در مهندسی بافت استخوان بخود جلب کرده است که می‌تواند بصورت اشکال نانوفیبر، نانوکامپوزیت، نانوذرات، میکروسفر، پارچه-های نانوفیبری چندلایه و ورق‌های نانویی مورد استفاده قرار گیرد (۱۱). این پلیمر، یک پلی استر آلیفاتیک آبگریز است که توسط سازمان غذا و داروی آمریکا برای کاربردهای مختلف پزشکی و بالینی مورد تأیید قرار گرفته است (۱۸، ۵۸). به راحتی قابل پردازش است و بدلیل تولید آن از منابع تجدیدپذیری چون برنج و گندم و ذرت، بصورت متابولیت‌های طبیعی قابل تجزیه است. نیز، میزان تخریب آن با زمان بهبودی بافت‌های آسیب دیده انسان مطابقت دارد. از PLA نه تنها به دلیل ویژگی‌های مکانیکی مشابه بافت هدف، بلکه به دلیل فعل و انفعالات بیولوژیکی خوب با سلول‌های میزبان هنگام کاشت، برای بازسازی استخوان استفاده می‌شود (۱۱). در مبحث مهندسی بافت استخوان، Yao و همکاران، نشان دادند که حضور PLA همراه با نانوفیبرهای پلی کاپرو لاکتون (polycaprolactone, PCL) جهت ساخت داربست PCL/PLA، بطور قابل توجهی سبب تمایز استخوانی سلول‌های hBMSC در *in vitro* و تشکیل استخوان در داخل بدن شد (۵۸). Shen و همکاران گزارش دادند که وجود کیتوسان در داربست کیتوسان/PLA، ویژگی‌های مکانیکی و آبدوستی پلیمر PLA را بهبود بخشیده و همچنین تکثیر و تمایز سلول‌های hBMSC را باعث شد (۴۳).

یکی از رویکردهای ساخت داربست PLA در مهندسی بافت استخوان، روش الکترورسی (electrospinning) است (۱۴، ۲۵، ۵۸). این روش، روشی ساده، همه کاره و مقرون بصره برای ساخت داربست‌هایی با مورفولوژی مشابه ماتریکس خارج سلولی و نانوفیبرهایی با قطر میکرون تا نانومتر است

نیست؛ بطوریکه تنها در آمریکا سالانه شاهد میلیون‌ها شکستگی و عمل پیوند استخوان جهت رفع این آسیب‌ها هستیم (۲۱). غالباً، ترمیم آسیب‌های استخوانی بطور خودبخودی است. اما در آسیب‌های بزرگ استخوانی دخالت پزشک مورد نیاز است (۶). راهکارهای پزشکی جهت رفع این آسیب‌های بزرگ می‌تواند استفاده از پیوند بافت خودی (autograft) یا غیرخودی (allograft) باشد (۴۷، ۴۹). پیوند بافت خودی به عنوان استاندارد طلایی برای درمان نقص استخوانی است. این روش اگرچه روشی موفقیت‌آمیز است، اما با در دسترس بودن محدود مواد مواجه است. روش پیوند بافت غیرخودی، گزینه دیگری است که شامل پیوند از یک اهدا کننده است، اما ممکن است رد سیستم ایمنی و انتقال پاتوژن را ایجاد کند (۱۷).

یکی از روش‌های امیدوار کننده جهت جایگزین این پیوندها، مهندسی بافت است (۳۸). مهندسی بافت استخوان (Bone Tissue Engineering, BTE) یکی از رشته‌های تحقیقاتی است که به طور فزاینده ای رو به رشد است و هدف نهایی آن توسعه درمان‌های مناسب جدید برای رفع آسیب‌های بافت استخوانی است (۴۱). این روش یک فرآیند پیچیده و پویا است که با بکارگیری سلول‌های استخوان ساز آغاز شده و به دنبال آن تکثیر، تمایز و تشکیل ماتریکس همراه با بازسازی استخوان انجام می‌شود (۲۹). یکی از رویکردها در مهندسی بافت استخوان شامل ترکیبی از سلول‌ها و داربست‌های سه‌بعدی است. برای بازسازی موفق بافت استخوان، داربست باید به گونه ای طراحی شود که به عنوان آنالوگ ماتریکس خارج سلولی (Extra Cell Matrix, ECM) عمل کند و یک ساختار سه‌بعدی را برای رشد سلول و بافت جدید در *in vivo* یا *in vivo* فراهم کند (۴۱، ۴۷).

مهندسی بافت، از کاربردهای پزشکی LAP می‌توان به سیستم انتقال دارو، تصویربرداری زیستی و پزشکی بازساختی اشاره نمود (۹، ۴۸).

هدف از این مطالعه، ساخت داربست الکترورسی شده PLA و پوشش‌دهی آن با LAP 0.8% و سپس بررسی قابلیت این داربست جهت برنامه‌های مهندسی بافت استخوان می‌باشد.

#### مواد و روش‌ها

**الکترورسی داربست PLA:** جهت تهیه داربست PLA با ۱۵ درصد وزنی، از دستگاه الکترورسی مدل CO881007NYI، ساخت شرکت نانو ساختار آسیا استفاده شد. ابتدا پلیمر PLA (Sigma-Aldrich, Germany)، گرانولی با اندازه ۳ میلی‌متر و بر طبق ASTM D1238، سرعت جریان مذاب آن (MFR) در ۲۱۰ درجه سانتی‌گراد و ۲/۱۶ کیلوگرم برابر با ۶ گرم بر ۱۰ دقیقه، در حلال حاوی کلروفورم/دی میتل فرمامید (Merck, Germany) با نسبت ۹ به ۱ حجمی/حجمی حل شد. محلول بدست آمده به سرنگ ۱۰ میلی لیتری متصل به سوزنی با قطر داخلی ۰.۲ میلی‌متر منتقل شد. فرایند الکترورسی با ولتاژ ۱۶ کیلوولت، سرعت تزریق ۰.۵ میلی‌لیتر بر ساعت و به فاصله ۱۵ سانتی‌متری از سوزن تا صفحه جمع‌کننده آلومینیومی، به مدت ۳ ساعت انجام شد.

**پوشش‌دهی داربست PLA با LAP 0.8%:** جهت تهیه محلول LAP با غلظت ۰/۸ درصد وزنی، پودر LAP (BYK Additives, Germany) همراه با پلی-اتیلن اکساید (polyethylene oxide, PEO) با وزن مولکولی ۱۰<sup>۶</sup> گرم بر مول (Sigma-Aldrich, Germany) به آب دیونیزه افزوده شدند و به مدت ۲۴ ساعت و در دمای اتاق بر روی استیرر همزده شدند. داربست الکترورسی شده PLA به ابعاد ۰/۵ در ۰/۵ سانتی‌متر مربع برش داده شد و در ۱ میلی‌لیتر از

(۲۵، ۵۳، ۵۸). در سال‌های اخیر از داربست‌های الکترورسی شده به طور گسترده‌ای در مهندسی بافت استفاده شده است (۲۵). همچنین به دلیل داشتن سطح خاص و تخلخل مناسب، بستری برای اتصال، رشد و انتقال مواد حیاتی برای تکثیر سلولی را فراهم می‌آورد (۲۵، ۴۴). لاپونیت (Laponite RD, LAP) یک سیلیکات معدنی با فرمول  $Na_{0.7}^{+}[(Si_8Mg_{5.5}Li_{0.3})O_{20}(OH)_4]_{10.7}$  و از خانواده خاک رس می‌باشد که متشکل از واحدهای لایه‌ای مشخص بوده که در آن، دو ورق سیلیس چهار ضلعی یک ورق هشت ضلعی حاوی  $Mg^{2+}$  را می‌پوشانند (۱۰، ۲۸، ۴۸). این نانو ذره معمولاً با یک پیوند فیزیکی یا کووالانسی به پلیمر کراس‌لینک شده و جهت تولید داربست استفاده می‌شود (۴۷). در محیط آبی، LAP بصورت ذرات قرصی شکلی با ضخامت حدود ۱ نانومتر و قطر حدود ۲۵ نانومتر در می‌آید که دارای بارهای منفی در سطح و بارهای مثبت در لبه‌های خود هستند، به طوری که دافعه بین بارهای منفی، سبب پایداری پراکنش آنها می‌شود (۸، ۲۸). به تازگی، LAP توجه زیادی را به دلیل خواص فیزیکی و شیمیایی عالی خود و همچنین ایده آل بودن در فرایند مهندسی بافت استخوان به خود جلب کرده است (۴۷). گزارش شده است که LAP می‌تواند تمایز استخوانی سلول‌های hBMSC را در غیاب هر گونه عامل القاء استخوان‌سازی، انجام دهد (۲۸). این توانایی به دلیل نقش یون‌های آن در مسیر سیگنال‌دهی تمایز است (۴۶، ۴۸، ۴۹). همراهی LAP با پلیمرها باعث تغییر ویژگی آنها چون هیدراتاسیون، انحلال و خواص مکانیکی می‌شود. از طرفی، توانایی اتصال، تمایز و استخوان‌سازی سلول‌های کشت داده شده بر روی داربست‌ها با غلظت LAP در ارتباط است؛ بطوریکه اگر غلظت LAP تا حد معینی افزایش یابد، توانایی‌های ذکر شده در استخوان‌سازی افزایش می‌یابد (۴۷). علاوه بر

با دستگاه اندازه‌گیری زاویه تماس (DataPhysics, Germany) اندازه‌گیری شد.

**کشت سلولی:** سلول‌های hBMSC از بانک سلولی انستیتو پاستور ایران تهیه شدند. این سلول‌ها در محیط کشت DMEM (Gibco, Canada) دارای ۱۰٪ سرم جنین گاوی (FBS, Gibco, Canada) و ۱٪ محلول آنتی بیوتیک پنی سلین-استرپتومایسین (Gibco, Canada) در انکوباتور با CO<sub>2</sub> به میزان ۵٪ و دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد کشت داده شدند.

**آزمون زیست‌سازگاری داربست:** جهت بررسی زیست‌سازگاری داربست‌ها، ابتدا، هر دو طرف داربست‌ها با اشعه ماوراء بنفش به مدت ۲۰ دقیقه استریل شد. پس از سومین پاساژ، سلول‌ها با محلول تریپسین ۰.۲۵٪ (Gibco, Canada) تریپسینه شدند و بصورت سوسپانسیون سلولی در محیط کشت در آمدند. میزان ۱۰<sup>۴</sup> سلول به هر چاهک پلیت کشت سلولی ۴۸ خانه‌ای حاوی داربست افزوده شد و پلیت‌ها در انکوباتور با CO<sub>2</sub> به میزان ۵٪ و دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند. چاهک حاوی سوسپانسیون سلولی، اما بدون داربست، به عنوان کنترل انتخاب شد. پس از طی ۲۴ ساعت از کشت سلولی، سلول‌ها توسط میکروسکوپ معکوس (Olympuse IX53, Japan) بررسی گردیدند.

**بررسی بقای سلولی:** بررسی بقای سلول‌های کشت داده شده بر روی داربست‌ها، از طریق سنجش فعالیت آنزیم دهیدروژناز میتوکندریایی سلول‌های زنده، با تست MTT ارزیابی شد. پس از سومین پاساژ، سلول‌های کف فلاسک با محلول تریپسین ۰.۲۵٪ تریپسینه شدند و بصورت سوسپانسیون سلولی در محیط کشت در آمدند. میزان ۱۰<sup>۴</sup> سلول به هر چاهک پلیت کشت سلولی ۴۸ خانه‌ای حاوی داربست استریل شده افزوده شد و پلیت‌ها در انکوباتور با CO<sub>2</sub> به میزان ۵٪ و دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند. چاهک

محلول آب دیونیزه/اتانول (۱ به ۱ حجمی/حجمی) به مدت ۲ ساعت در دمای اتاق قرار گرفت. داربست‌های برش خورده سه مرتبه با آب دیونیزه شسته و در ۰/۵ میلی‌لیتر از محلول LAP0.8% به مدت ۱ ساعت در دمای اتاق غوطه‌ور شدند. جهت حذف محلول LAP0.8% اضافی بر روی آنها، عمل شستن با آب دیونیزه مجدداً انجام شد و داربست‌ها به مدت ۲۴ ساعت درون آون خلاء با دمای ۴۵ درجه سانتی‌گراد خشک شدند. نهایتاً، داربست‌های پوشش داده شده، با آب دیونیزه سه مرتبه شسته و مجدداً به مدت ۲۴ ساعت در آون خلاء در دمای ۴۵ درجه سانتی‌گراد خشک شدند.

**مشخصه یابی داربست‌ها:** جهت بررسی مورفولوژی داربست‌ها از میکروسکوپ الکترونی روبشی (SEM, MIRA3/ TESCAN, Czech Republic) استفاده شد. آنالیز طیف‌سنجی پراش انرژی پرتو ایکس (EDX, MIRA3/ TESCAN, Czech Republic) نیز جهت تعیین عناصر سطحی داربست‌ها انجام شد. داربست‌ها با فیلم طلای ۱۰ نانومتری پوشش داده شدند و در ولتاژ ۱۵ کیلوولت بررسی شدند. همچنین، میانگین قطر نانوفیبرهای هر داربست نیز توسط نرم-افزار ImageJ (ورژن 1.53a) تعیین شد. ساختار شیمیایی نانوذره LAP و PEO توسط طیف سنجی مادون قرمز (FTIR, AVATAR / Thermo, USA) در محدوده طول موج ۴۰۰ تا ۴۰۰۰ بر سانتی‌متر با وضوح ۴ بر سانتی‌متر بررسی شد. همچنین، طیف سنجی ATR-FTIR برای داربست‌های PLA و PLA/LAP0.8% در محدوده طول موج ۶۰۰ تا ۴۰۰۰ بر سانتی‌متر با وضوح ۴ بر سانتی‌متر بکار گرفته شد. جهت بررسی آبدوست بودن داربست‌ها از آزمون زاویه تماس آب استفاده شد. بطور تصادفی، ۵ میکرولیتر از آب دیونیزه بر روی سطح هر داربست در سه نقطه مختلف قرار گرفت و مقدار زاویه تماس آب

استفاده شد. همانطور که در شکل ۱ نشان داده شده است، هر دو داربست دارای نانوفیبری یکنواخت و بدون بید بودند. نانوفیبرهای داربست PLA دارای سطحی صاف با میانگین قطر  $290 \pm 610$  نانومتر داشتند که با پوشش‌دهی LAP0.8% بر روی آن، میانگین قطر نانوفیبر به  $340 \pm 840$  رسید. عناصر سطحی داربست‌ها نیز توسط آنالیز EDX مشخص شد (شکل ۱). داربست PLA فقط دارای دو عنصر سازنده خود یعنی C و O بود اما داربست پوشش‌دهی شده، علاوه بر دو عنصر ذکر شده، دارای عناصر Na، Mg و Si بود. اینها عناصر موجود در ساختار LAP هستند و این آنالیز، پوشش‌دهی موفق LAP0.8% بر روی داربست الکترورسی شده PLA را تایید کرد.

نتایج حاصل از بررسی ساختار شیمیایی LAP و PEO توسط طیف‌سنجی FTIR، در شکل ۲ نشان داده شده است. پیک‌های  $466$  مربوط به ارتعاش کششی گروه Si-O-Mg،  $658$  مربوط به ارتعاش خمشی گروه Mg-OH-Mg،  $1007$  مربوط به ارتعاش کششی گروه Si-O،  $1664$  مربوط به ارتعاش خمشی گروه H-O-H و  $3445$  مربوط به ارتعاش کششی گروه OH، از پیک‌های قابل تشخیص برای LAP بودند (۵۵). برای PEO پیک‌های  $842$  و  $956$  مربوط به ارتعاش گروه H-C-H،  $1101$  مربوط به کشش گروه C-O-C،  $1349$  و  $1466$  مربوط به خمش گروه C-H،  $2888$  مربوط به کشش گروه C-H و  $3442$  مربوط به کشش O-H، قابل تشخیص بودند (۱۹، ۳۹). همچنین، نتایج طیف‌سنجی ATR-FTIR برای داربست‌های PLA و PLA/LAP0.8% در شکل ۲ نشان داده شد. پیک‌های قابل تشخیص برای داربست PLA شامل  $1046$ ،  $1087$  و  $1184$  مربوط به ارتعاش گروه C-O،  $1359$  و  $1452$  مربوط به ارتعاش خمشی گروه C-H،  $1752$  مربوط به ارتعاش گروه C=O و

حاوی سوسپانسیون سلولی، اما بدون داربست، به عنوان کنترل انتخاب شد. پس از طی ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت از کشت سلولی، محیط کشت هر چاهک با ۲۰۰ میکرولیتر از محلول MTT (Sigma-Aldrich, Germany) (۵ میلی‌گرم در ۱ میلی‌لیتر بافر PBS) جایگزین شد و سلول‌ها به مدت ۲ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند. سپس، محلول MTT از هر چاهک خارج شد و ۴۰۰ میکرولیتر از محلول DMSO (Gibco, Canada) به سلول‌ها افزوده شد. پلیت‌ها به مدت ۱۵ دقیقه در ۳۷ درجه سانتی‌گراد قرار داده شدند تا بلورهای بنفش فورمازان حل شوند. سرانجام، چگالی نوری (OD) در ۵۷۰ نانومتر با استفاده از دستگاه الیزا ریدر (Awareness Technology Inc., USA) تعیین شد.

آنالیز آماری: از آزمون one-way ANOVA در نرم-افزار SPSS (version 22, SPSS Inc., USA) جهت تحلیل آماری نمونه‌های مورد مطالعه با سه مرتبه تکرار، در سطح معنی‌داری  $p \leq 0.05$  استفاده شد.

## نتایج

ساخت داربست: در این تحقیق، ابتدا، محلول LAP/PEO با غلظت ۰.۸ درصد وزنی تهیه شد. در اثر افزودن LAP و PEO به آب دیونیزه، مایع ژله‌مانندی بوجود آمد که نشان‌دهنده پیوند فیزیکی این دو ماده با هم بود. در مرحله بعد، جهت پوشش‌دهی داربست الکترورسی شده PLA با غلظت ۱۵ درصد وزنی، توسط LAP0.8%، داربست درون این محلول غوطه‌ور شد. داربست پوشش‌دهی شده PLA/LAP0.8% نامیده شد. این داربست در کنار داربست PLA خالص، جهت قابلیت آن در برنامه‌های مهندسی بافت استخوان بررسی گردید.

مشخصه‌یابی داربست‌ها: پس از تهیه داربست‌ها، جهت بررسی مورفولوژی آنها از میکروسکوپ SEM

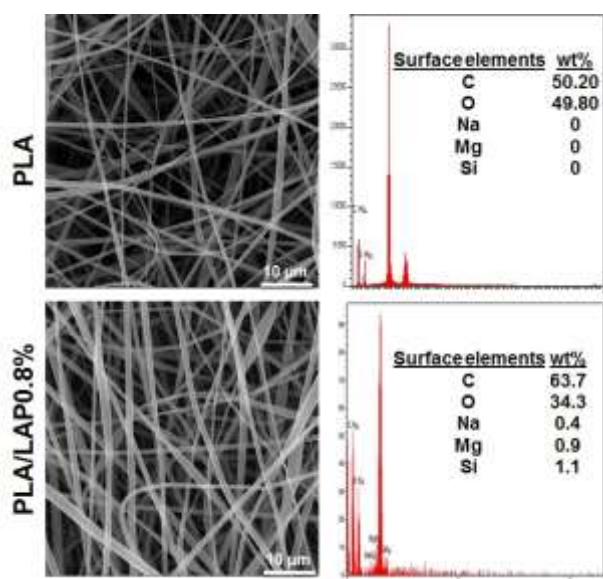
شد (شکل ۳). پس از ۲۴ ساعت از کشت سلولی، نتایج حاکی از رشد و جهت‌گیری سلول‌ها به سمت این داربست بود. بنابراین، می‌توان نتیجه گرفت که داربست PLA پوشش داده شده با LAP0.8% برای سلول زیست‌سازگاری و عدم سمیت مناسبی را دارد.

**بررسی بقای سلولی:** از تست MTT جهت بررسی بقای سلول‌ها بر روی داربست‌ها استفاده شد (شکل ۴). نتایج نشان‌دهنده حفظ بقای سلول‌ها بر روی هر دو داربست PLA و PLA/LAP0.8% در طی ۷۲ ساعت پس از کشت سلولی بود. اما، میزان بقای سلولی بر روی داربست PLA/LAP0.8% بطور معنی داری بالاتر از داربست PLA و گروه کنترل بود ( $p \leq 0/001$ ).

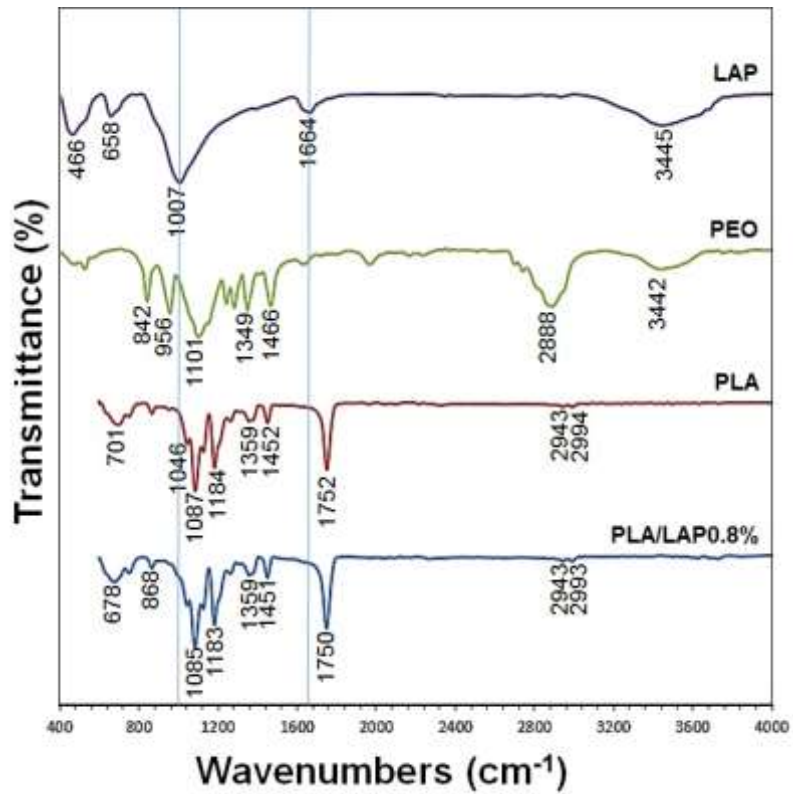
۲۹۴۳ و ۲۹۹۳ مربوط به کشش گروه C-H بودند (۲۵). در طیف داربست PLA/LAP0.8%، دو پیک شاخص LAP (۱۰۰۷ و ۱۶۶۴) شناسایی شد که نشان‌دهنده پوشش دهی موفق LAP0.8% بر روی داربست PLA بود.

به منظور تایید آب دوست بودن داربست‌ها، از آزمون زاویه تماس آب استفاده شد. این آزمون نشان داد که مقدار زاویه تماس آب داربست PLA برابر با  $1 \pm$  و در نتیجه داربستی آبگریز بود. پس از پوشش-دهی داربست PLA با LAP0.8%، میزان زاویه تماس آب به  $2 \pm 59$  رسید که بیانگر آبدوست شدن داربست PLA بود ( $p \leq 0/001$ ).

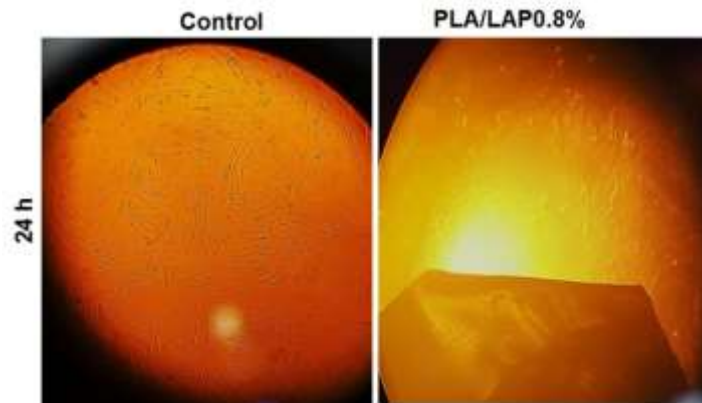
**بررسی زیست‌سازگاری داربست:** از میکروسکوپ معکوس جهت بررسی سلول‌های کشت داده شده بر روی داربست PLA/LAP0.8% و گروه کنترل استفاده



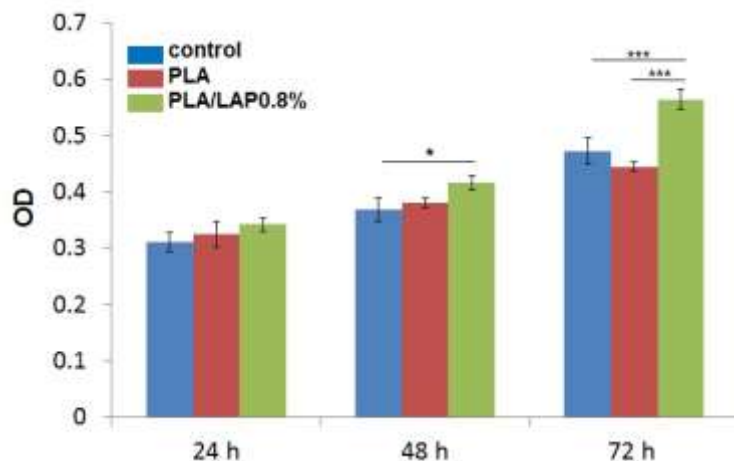
شکل ۱- تصاویر SEM (سمت چپ) و آنالیز EDX (سمت راست) داربست‌های PLA و PLA/LAP0.8%



شکل ۲- طیف سنجی FTIR برای LAP و PEO (بالا). طیف‌سنجی ATR-FTIR برای داربست‌های PLA و PLA/LAP0.8%



شکل ۳- تصاویر حاصل از میکروسکوپ معکوس جهت نشان دادن رشد و تایید زیست‌سازگاری سلول‌ها بر روی داربست PLA/LAP0.8% پس از ۲۴ ساعت از کشت سلولی.



شکل ۴- نتایج حاصل از تست MTT. مقایسه میزان بقای سلولی بین داربست‌های PLA، PLA/LAP0.8% و گروه کنترل پس از ۷۲ ساعت از کشت سلولی ( $p \leq 0.001$  با سه مرتبه تکرار).

## بحث

مباحث در مهندسی بافت و پزشکی بازساختی تولید داربست‌های سه‌بعدی مصنوعی با خصوصیات فیزیکی و شیمیایی مناسب می‌باشد تا بتوانند ماتریکس خارج سلولی طبیعی را تقلید کنند (۴۹). هر چقدر ساختار داربست با ماتریکس خارج سلولی شباهت بیشتری داشته باشد، شانس موفقیت داربست در رفتار سلولی نیز بیشتر است. بنابراین، داربست در مهندسی بافت مهم‌ترین نقش را دارد (۲).

در این تحقیق، ابتدا داربست PLA به روش الکتروریسی ساخته شد. PLA با فرمول شیمیایی  $(C_3H_4O_2)_n$  جزو خانواده پلیمرهای مصنوعی پلی آلفا هیدروکسی استرهای اشباع و مورد تایید سازمان غذا و دارو آمریکا است (۱۱، ۵۸). این پلیمر در مهندسی بافت استخوان بیشترین توجه را به خود جلب کرده است؛ زیرا می‌تواند به واحدهای سازنده طبیعی خود که لاکتیک اسید (۲- هیدروکسی پروپیونیک اسید،  $CH_3-CHOHCOOH$ ) است و در متابولیسم کربوهیدرات‌ها نقش دارند، تجزیه شود. میزان تخریب آن در بدن با زمان بهبودی بافت‌های آسیب دیده استخوانی مطابقت داشته، خواص حرارتی و مکانیکی

بافت استخوانی از اصلی‌ترین‌های سیستم اسکلتی بدن می‌باشد که دائما در معرض آسیب‌های مختلفی قرار دارد. با توجه به عملکرد مهم این بافت در بدن، هرگونه تغییر در ساختار آن، تعادل بدن و طبیعت زندگی فرد را تحت تاثیر قرار می‌دهد. در صورتیکه میزان آسیب بزرگ باشد، روش‌های مختلفی چون پیوند استخوان و ایمپلنت‌های فلزی جهت ترمیم استخوان استفاده می‌شود که هر کدام دارای معایبی هستند (۲). در نتیجه، مهندسی بافت استخوان به عنوان بستری نوید بخش، در سال‌های اخیر راهکارهای جدیدی را برای بازسازی و بهبود بافت‌های آسیب دیده یا از دست رفته ارائه داده است (۴۰). برتری مهندسی بافت استخوان نسبت به پیوند استخوان این است که بافت پیوندی در مهندسی بافت استخوان می‌تواند در خارج از بدن تولید شود و در این صورت، محدودیتی نداشته و امکان آسیب به بدن موجود زنده را نیز ندارد (۳۳). جهت دستیابی به نتیجه موفقیت آمیز در مهندسی بافت استخوان، پارامترهای بسیار مهم مانند سلول، فاکتور رشد و داربستی با قابلیت استخوان سازی باید مد نظر قرار گیرد (۳). یکی از مهمترین



پوشش داده شوند و برای کاربردهای مختلف مهندسی بافت استخوان آزموده شوند (۱۳، ۲۰، ۳۲). همچنین، *Kao* و همکاران، داربست‌های سه بعدی PLA را ساخته و پلی دوپامین (polydopamine, PDA) را بر روی آن پوشش دادند. نتایج نشان دهنده افزایش اتصال و تکثیر سلول‌های بنیادی مشتق شده از چربی انسانی (hADSCs) بر روی داربست‌های PDA/PLA بود (۲۳). نیز، *Kung* و همکاران، جهت ساخت داربست PLA-RGD-Glu-RGD، ابتدا سطح داربست PLA را با جت پلاسمای اتمسفری اصلاح نموده و سپس مولکول‌های گلوکان و RGD (-arginine) را بر روی آن پوشش دادند. آنها نشان دادند که این داربست برای تکثیر و تمایز سلول‌های MG63 مناسب بوده و اصلاح سطح و استفاده از این مولکول‌ها می‌تواند نسبت به روش‌های رایج اصلاح سطح با توانایی بیشتر برای کاربردهای مهندسی بافت استخوان، غالب باشد (۲۶).

نانوذره LAP، غیر سمی، خالص، کم هزینه و پردازش آسان است که نه تنها بعنوان ویژگی‌های بیولوژیکی بی نظیر خود بلکه به دلیل مزایای آن به عنوان نسل بعدی مواد زیست فعال محسوب می‌شود (۳۶). LAP را می‌توان با استفاده از پیوندهای کووالانسی و غیر کووالانسی کاربردی کرد. به عنوان مثال، گروه‌های سیلانول (silanol) موجود در لبه‌های آن می‌تواند برای عملکرد کووالانسی توسط واکنش با الکوکی سیلان‌ها (silanization) که دارای گروه‌های واکنشی اضافی مانند آمین‌های اولیه، متاکریلات‌ها، بنزوفنون‌ها و برم‌ها هستند، استفاده شوند. بر اساس این رویکرد، زنجیره‌های پلیمری حتی می‌توانند روی لبه‌های آن پیوند داده شوند. از سوی دیگر، عملکرد غیر کووالانسی LAP عمدتاً بر اساس فعل و انفعالات الکترواستاتیک است. این فعل و انفعالات بین مولکول‌های قطبی یا یون‌های موجود در محیط با

آن مانند بافت‌های استخوانی است و هنگام کاشتن با سلول‌های استخوانی میزان فعل و انفعالات بیولوژیکی خوبی دارد (۱۱).

داربست‌های تولیدی در مهندسی بافت استخوان باید دارای خصوصیات مهمی باشند. یکی از این خصوصیات داشتن ساختاری سه بعدی و متخلخل جهت اتصال، نفوذ، مهاجرت و تکثیر بیشترین تعداد سلول‌ها بر روی داربست و تسهیل در حمل و نقل مواد غذایی و اکسیژن به سلول‌ها می‌باشد (۳). امروزه روش‌های مختلفی جهت تولید داربست‌هایی با این خصوصیات وجود دارد که روش الکتروریسی یکی از آنهاست. به علت آسانی و کارآمد بودن و همچنین قابلیت تغییر پارامترهای دستگاهی، حلالی و محیطی، محققین به فراوانی از این روش استفاده می‌کنند. داربست‌های ساخته شده با روش الکتروریسی به علت دارا بودن فیبرهایی در مقیاس نانو و همچنین نسبت سطح به حجم زیاد، گزینه مناسبی به عنوان مقلد ماتریکس خارج سلولی در مهندسی بافت استخوان هستند (۱۵، ۴۲).

پس از ساخت داربست، LAP0.8% بر روی آن پوشش داده شد. سپس مشخصه یابی داربست‌ها و توانایی آنها در اتصال و تکثیر سلول‌های hBMSC جهت کاربرد در مهندسی بافت استخوان، بررسی گردید. در برهمکنش بین LAP و PEO، سطح LAP بستری را فراهم می‌کند که زنجیره‌های PEO می‌توانند بطور فیزیکی جذب آن شوند و نتیجتاً منجر به تشکیل اتصالاتی بین زنجیره‌های PEO و نهایتاً تشکیل شبکه LAP/PEO می‌شوند (۱). همچنین، بعد از پوشش‌دهی داربست PLA با LAP0.8%، بر همکنش‌های دو قطبی - دو قطبی بین گروه استر PLA و گروه اتر PEO ایجاد می‌شود (۳۵). تاکنون، عوامل زیست فعال مختلفی مانند هیالورونیک اسید، هپارین و پروتئین BMP-2 توانسته‌اند بر روی داربست PLA

بارهای منفی در سطوح یا بارهای مثبت در لبه‌های آن ایجاد می‌شود. این نوع تعامل می‌تواند به اندازه کافی قوی باشد به طوری که تشکیل ژل با مقاومت بالا امکان پذیر است (۴۸). *Gaharwar* و همکاران، خواص مکانیکی و بیولوژیکی نانوکامپوزیت‌های PEO حاوی LAP را مورد بررسی قرار دادند. آن‌ها ارتباط قوی بین غلظت LAP و خواص مکانیکی PEO را مشاهده نمودند که با افزایش غلظت LAP، داربست‌های هیدروژلی سفت و سخت با خواص مکانیکی قوی تری تولید شده در حالیکه در غلظت کم LAP، فیلم‌های بسیار قابل انعطاف به دست آمدند (۱۲).

یکی از موارد مهم در ساخت داربست که باید به آن توجه شود، خاصیت آبدوستی داربست می‌باشد (۳۴)، (۵۱). هنگام طراحی به عنوان داربست سلولی، PLA به تنهایی یا در ترکیب با سایر مواد زیست تخریب پذیر یک محیط عالی برای رشد سلول را فراهم می‌کند. با این حال، سطح آبریز PLA محدودیت کاربرد را فراهم می‌کند. به عنوان مثال، تغییراتی در داربست ایجاد خواهد شد که برای لنگر انداختن سلول‌ها مضر است؛ در نتیجه منجر به میل سلولی کم برای داربست شده و داربست می‌تواند پس از تماس مستقیم با مایعات بیولوژیکی، پاسخ التهابی را در میزبان زنده ایجاد کند. بنابراین، به منظور بهبودی خواص آبدوستی PLA، از پلیمرهای آب دوست مانند PEO، پلی وینیل الکل (poly vinyl alcohol, PVA) و پلی اتیلن گلیکول (polyethylene glycol, PEG) استفاده می‌شود (۵۶). در این تحقیق از PEO جهت آبدوست شدن PLA استفاده شد و میزان آبدوستی توسط آزمون زاویه تماس آب اندازه‌گیری شد. PEO، یک پلیمر مصنوعی است که با پلیمریزاسیون حلقه باز اتیلن اکساید تولید می‌شود (۵، ۴۵). به دلیل خواصی نظیر آب دوستی، تجزیه بیولوژیکی، زیست‌سازگاری و عدم سمیت، این پلیمر به طور گسترده‌ای در

کاربردهای پزشکی از جمله مهندسی بافت استفاده می‌شود (۴۵، ۵۷). آزمون زاویه تماس آب نشان داد که آب‌گریزی داربست PLA در اثر حضور PEO بهبود یافت. نیز، LAP هم به دلیل ویژگی آبدوستی خود که باعث تسهیل نفوذ مواد غذایی آبدوست و تنظیم پاسخ سلولی می‌شود، توانست نقشی در بهبود خاصیت آبریزی داربست PLA داشته باشد (۵۱). تاثیر این دو ماده در بهبودی آبریزی داربست‌ها قبلاً گزارش شده است (۲۷، ۳۰). علاوه بر موارد گفته شده در بالا، تاکنون، برای کاهش آب‌گریزی و تقویت اتصال سلول بر روی داربست PLA تلاش‌های زیادی صورت گرفته است. مثالی از این تلاش‌ها، تحقیقات *Park* و همکاران بود که از مسیرهای اصلاح سطح شیمیایی جهت رفع آب‌گریزی سطح داربست PLA استفاده کردند و داربست را تحت تیمار پلاسمای اکسیژن و اسید آکرلیک (AA) قرار دادند. نتایج بیانگر افزایش توانایی داربست PLA پیوند یافته با AA در حمایت از تکثیر سلول‌های فیبرو بلاست NIH-3T3 نسبت به داربست تیمار نشده بود (۳۱).

توانایی زیست‌سازگاری داربست با سلول جهت حمایت از فعالیت سلولی مانند توانایی برقراری پیام‌ها، ارتباطات سلولی و عدم تحریک سیستم ایمنی بدن از دیگر ویژگی‌های داربست مهندسی بافت استخوان می‌باشد (۳، ۲۲). بعد از کشت سلول‌ها بر روی داربست، اتصال سلولی اولین واقعه‌ای است که رخ می‌دهد. البته در کنار آن تعیین زیست‌سازگاری داربست‌های تهیه شده نیز مهم می‌باشد (۴۲). نتایج به دست آمده از تصاویر میکروسکوپ معکوس و تست MTT، زیست‌سازگاری و عدم سمیت داربست PLA/LAP0.8% پس از طی ۲۴ ساعت و متعاقباً، بقای سلولی معنی‌دار بر روی این داربست را در مقایسه با داربست PLA و گروه کنترل در طی ۷۲

LAP است (۱۲، ۴۷، ۵۱). مطالعات زیادی بر روی LAP همراه با پلیمر های مختلف صورت گرفته است که پتانسیل استفاده LAP در مهندسی بافت استخوان را تایید میکنند. مطالعات *Gaharwar* و همکاران بر روی کشت سلول های hMCS در *in vitro* نشان داد که افزایش غلظت LAP باعث افزایش اتصال و تکثیر سلول ها شده است. این نتایج نشان داد که نانوکامپوزیت های مبتنی بر LAP زیست فعال بوده و می توانند در طیف وسیعی از کاربردهای بیوتکنولوژی و زیست پزشکی مانند ماتریکس های تزریقی، پوشش های زیست پزشکی و تحویل دارو استفاده شوند (۱۲). *Wang* و همکاران، تولید داربستی از PLGA حاوی LAP را جهت تمایز سلول های hMSC به استخوان گزارش کردند. این داربست با روش الکترورسی ساخته شد. آن ها نشان دادند که دو داربست PLGA خالص و PLGA-LAP قادر به ایجاد تمایز سلول ها در محیط استئوژنیک می باشند. به طور قابل ملاحظه ای، داربست PLGA-LAP میتواند این تمایز را در محیط کشت، بدون هیچ عامل القاء کننده ای که عمدتاً به علت نقش قابل ملاحظه ی یون های  $Si^{4+}$  و  $Mg^{2+}$  در LAP می باشد، انجام داده و این داربست میتواند داربست مفیدی در مهندسی بافت استخوان باشد (۵۱). نتایج آزمایشات *Tao* و همکاران، بر تکثیر سلول های بنیادی مغز استخوان خرگوش (rBMC) در *in vitro* نشان داد که افزودن LAP (۵ و ۱۰ درصد وزنی نسبت به ژلاتین، GC-Lap5٪ و GC-Lap10٪) موجب تسریع در تکثیر این سلول ها شد، اما GC-Lap15٪ باعث مهار آن گشت. علاوه بر این، GC-Lap10٪ باعث افزایش تمایز استخوانی این سلول ها در مقایسه با داربست GC و GC-Lap5٪ شد (۴۷). *Tang* و همکاران، ساخت داربست های نانو کامپوزیتی LAP با پلی بوتیلن سوکسینات poly (butylene succinate, PBSu) به روش casting-

ساعت پس از کشت سلولی تایید کرد. حضور LAP در ساختار داربست منتج به زیست سازگاری و بقای سلولی می شود. این ماده زیست سازگار که مورد تایید سازمان غذا و دارو آمریکا می باشد، در مقادیر pH بین ۷/۳ تا ۸/۴، یون های موجود در ساختار خود چون  $Na^+$ ،  $Mg^{2+}$ ،  $Li^+$  و  $Si(OH)_4$  که مشابه محصولات تخریبی شیشه های زیست فعال می باشند و یون های مهم در اتصال و تکثیر سلولی بشمار می روند را به محیط کشت آزاد می کند (۱۶، ۲۴، ۴۷). پروتئین های سلولی مانند ویبرونکتین و فیبرونکتین به راحتی می توانند بر سطح LAP جذب و منتج به اتصال سلولی بر سطح داربست شوند (۳۶). حضور یون های  $Mg^{2+}$  در LAP و تعامل آن ها با پروتئین های خانواده اینتگرین (اینتگرین های  $\alpha 5\beta 1$  و  $\beta 1$  متعلق به رسپتور فیبرونکتین) باعث اتصال سلول به داربست است (۲۴، ۴۷). همچنین گزارش شده است که یون های  $Si^{4+}$  در اتصال، تکثیر و تمایز سلول های hMSC نقش دارند (۵۹). البته PLA هم ویژگی زیست سازگاری و عدم سمیت برای سلول را دارد؛ اما بدلیل خاصیت آبگریز بودن آن، تمایل سلولی بر روی آن کمتر است (۱۱، ۵۶).

در مهندسی بافت استخوان، LAP مورد توجه ویژه ای است؛ زیرا دارای ترکیبات شیمیایی مشابه شیشه های زیست فعال است (۳۶). مطالعات نشان داد که نانوکامپوزیت های بر پایه خاک رس چون LAP می توانند به طور همزمان دوام، مقاومت مکانیکی، پایداری حرارتی، ویژگی های سطحی و زیست سازگاری را بهبود بخشند؛ بنابراین، آن ها می توانند برای کاربردهای مختلف مهندسی بافت مورد استفاده قرار گیرند (۷). نیز، گزارش شده است که LAP می تواند تمایز استخوانی سلول های hBMC را در محیط کشت بدون هیچ القا گر تمایز استخوانی القا کند که این امر بواسطه یون های موجود در ساختار

القایی تحریک استخوان سازی عمل کنند (۴). Wang و همکاران، برای اولین بار داروی آموکسی سیلین را درون LAP انکپسوله نموده و این ترکیب را با نانوفیبرهای PLGA الکترورسی کرده تا داربست نانوفیبری PLGA/LAP/AMX شکل گیرد. آنها نشان دادند که فعالیت ضد میکروبی این آنتی بیوتیک درون این داربست، جهت مهار رشد باکتری استافیلوکوکوس اورئوس به مراتب بیشتر از خود آنتی بیوتیک خالص بود. همچنین، داربست PLGA/LAP/AMX نشان-دهنده زیست سازگاری خوب برای سلول‌های PIEC بود. نتیجتاً، این داربست نانوفیبری ممکن است در مهندسی بافت و علم دارویی کاربردهای متنوعی را پیدا کند؛ به جهت اینکه LAP به عنوان یک حامل دارویی مورد استفاده قرار گرفته است. زیرا فضای بین لایه‌های LAP می‌تواند برا پوشش‌دهی موثر دارو با ظرفیت نگهداری بالا استفاده شود (۵۲). Peng و همکاران، ابتدا، LAP را برای پوشش دهی آنتی بیوتیک تتراسایکلین مورد استفاده قرار دادند. سپس نانو ذرات LAP بارگذاری شده با دارو با PLA مخلوط تا غشاء متخلخل دارویی ایجاد شود. نتایج نشان داد که انتشار این دارو به ساختار فیزیکی غشای PLA بستگی داشته و حضور LAP به طور موثری موجب تسریع انتشار اولیه آن شد. مهمتر از همه، غشاء TCH/LAP/PLA دارای زیست سازگاری مناسب بوده و فعالیت قابل توجه آنتی‌باکتریایی بر روی استافیلوکوکوس اورئوس را نشان داد که توان بالقوه آن را در بهبود زخم و مهندسی بافت استخوان تایید می‌کند (۳۷). Zao و همکاران، فیلم‌های کامپوزیتی LAP-PLA را به روش حل کردن PLA درون ۱،۴- دیوکسان، دی کلرو متان و کلروفرم و سپس افزودن LAP به آن تهیه کردند. نتیجه‌ها نشان داد که فیلم‌های کامپوزیتی همگن و صاف با ۱، ۴- دیوکسان بهتر تهیه شد. آنالیز ترموگرامتری و مطالعات

particulate leaching در دو نوع ۱۵ و ۳۰ درصد وزنی نسبت به LAP را برای مهندسی بافت استخوانی هدف قرار دادند. نتایج نشان دهنده وجود منافذی با اندازه ۲۰۰-۴۰۰ میلی متر و تخلخل حدود ۷۰ درصد برای داربست‌ها، افزایش جذب آب، تجزیه پذیری و قابلیت معدنی‌سازی آپاتیت داربست‌ها با افزایش محتوای LAP بود. آنها نشان دادند که ویژگی‌های سطحی (از جمله زبری، آبدوست بودن، رهائش یون‌ها، تشکیل آپاتیت و غیره) داربست‌ها نقش مهمی در تسهیل پاسخ‌های سلولی سلول‌های MC3T3-E1 (مانند اتصال، تکثیر و تمایز) دارند (۴۶). Wang و همکاران، داربست‌های نانوفیبری PCL-LAP را به روش الکترورسی برای مهندسی بافت استخوان تولید نمودند. نتایج بر روی رده سلولی MC3T3-e1 نشان دهنده ی افزایش خواص کششی نانوفیبر در غلظت‌های کم LAP، بی تأثیری ترکیب LAP بر روی زیست سازگاری و القای استخوان سازی از داربست حاوی LAP بهتر از نمونه‌های خالص در *in vitro* بود. نیز، توانایی قابل توجه در تشکیل استخوان‌های نابجا (ectopic) توسط نانوفیبرهای غنی شده با LAP نسبت به نمونه‌های نانوفیبری PCL خالص در *in vivo* بر روی موش‌های SD از دیگر نتایج بود (۵۴). عرب احمدی و همکاران، داربست الکترورسی شده PCL پوشش داده شده با CMC و LAP را جهت تمایز سلول‌های hBMSC در مهندسی بافت استخوان بررسی نمودند. آنها نشان دادند که در مقایسه با داربست PCL خالص، پوشش دهی داربست PCL با CMC و LAP باعث افزایش اتصال، تکثیر و تمایز استخوانی سلول‌ها شد که با افزایش رسوب کلسیم، فعالیت آلکالین فسفاتاز و بیان ژن استئونکتین مشخص شد. بنابراین، داربست‌های ساخته شده می‌توانند به عنوان یک بستر مناسب برای حمایت از تکثیر و تمایز سلول‌های بنیادی به استخوان، بدون هیچ گونه عامل

#### منابع

1. Agrawal S.K., Sanabria-DeLong N., Tew G.N., Bhatia S.R. 2008. Nanoparticle-reinforced associative network hydrogels. *Langmuir*, 24(22): 13148-13154.
2. 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]
3. Aliakbari Ghavimi S., Solati Hashjin M., Ebrahimzadeh M.H. 2011. An introduction on tissue engineering. *Iranian Journal of Orthopaedic Surgery*, 9(4): 185-190. [In Persian]
4. 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.
5. Arya A., Sharma A.L. 2017. Insights into the use of polyethylene oxide in energy storage/conversion devices: a critical review. *Journal of Physics D: Applied Physics*, 50(44): 443002.
6. Ataie M., Solouk A., Bagheri F., Seyed Jafari E. 2017. Regeneration of musculoskeletal injuries using mesenchymal stem cells loaded scaffolds. *Tehran University Medical Journal TUMS Publications*, 75(4): 241-250. [In Persian]
7. Atrian M., Kharaziha M., Emadi R., Alihosseini F. 2019. Silk-LAPONITE® fibrous membranes for bone tissue engineering. *Applied Clay Science*, 174: 90-99.
8. Bagheri Marandi G., Baharlou M. 2012. Synthesis of hydrogel nanocomposites of acrylamide-itaconic acid using laponite and study of crystal violet dye adsorption. *Iran. Journal of Polymer Science and Technology*, 24(6): 505-514. [In Persian]

استحکام کششی نشان داد که پایداری حرارتی و استحکام کششی PLA با افزودن LAP بهبود یافته. بررسی SEM نشان داد که تخلخل فیلم های کامپوزیتی، یکنواخت و ساختار شبکه بیشتر و فشرده-تر از فیلم PLA خالص است. در نتیجه، LAP به عنوان عامل پیچیده می تواند خواص مکانیکی و پایداری حرارتی PLA را بهبود بخشد (۶۰). Wang و همکاران، استراتژی برای توسعه نانو هیبریدهای پایدار LAP همراه با داربست PEG-PLA توسط فرایند خود ترکیبی، جهت تحویل داروی دوکسوروبیسین (DOX) را نشان دادند. این حامل ها توانستند به طور موثری دارو را بارگذاری و رفتار رهایش دارو را به طور مداوم نشان دهند. نیز در *in vitro* بر روی رده سلولی CAL-72 موثر بوده و قابلیت ضد سرطانی قابل توجهی نسبت به سلول را داشتند. نتیجتاً، ویژگی های نانو هیبریدهای LAP/PEG-PLA، چون زیست-سازگاری خوب، پایداری فیزیولوژیکی عالی، ویژگی رهایش حساس به pH و بهبود فعالیت ضدسرطان، آنها را به یک پلت فرم امیدوار کننده برای تحویل سایر عوامل درمانی تبدیل کرد (۵۰).

#### نتیجه گیری

در این تحقیق، جهت ساخت داربست PLA/LAP0.8%، داربست PLA به روش الکتروریسی ساخته و LAP0.8% بر روی آن پوشش داده شد. نتایج بدست آمده، زیست سازگاری، عدم سمیت و تقلید از ماتریکس خارج سلولی این داربست را برای سلول های hBMSC تایید کرد؛ در نتیجه سلول ها توانستند بر روی این داربست تکثیر یافته و بقای خود را حفظ کنند. بنابراین بنظر می رسد که داربست PLA/LAP0.8% می تواند کاندیدای امیدوارکننده ای برای برنامه های مهندسی بافت استخوان باشد.

- improved anticancer efficacy. *Acta Biomaterialia*, 10(1): 300-307.
17. Gouma P.I., Ramachandran K. 2008. Electrospinning for bone tissue engineering. *Recent patents on nanotechnology*, 2(1): 1-7.
18. Grémare A., Guduric V., Bareille R., Heroguez V., Latour S., L'heureux N., Fricain J.C., Catros S., Le Nihouannen D., 2018. Characterization of printed PLA scaffolds for bone tissue engineering. *Journal of Biomedical Materials Research Part A*, 106(4): 887-894.
19. Hegazy D.E., Mahmoud G.A. 2014. Radiation synthesis and characterization of polyethylene oxide/chitosan-silver nanocomposite for biomedical applications. *Arabian Journal of Nuclear Science and Application*, 47(2): 1-14.
20. Ilie C., Stinga G., Iovescu A., Purcar V., Anghel D.F., Donescu D. 2010. The influence of nonionic surfactants on the carbopol-peg interpolymer complexes. *Revume Roumaine Chimie*, 55(7): 409-417.
21. Imani S.M., Rabiee S.M., Moazami Goudarzi A., Dardel M. 2017. Investigation of the mechanical properties of the porous scaffolds used in bone tissue engineering by means of micromechanical modeling. *Modares Mechanical Engineering*, 17(9): 397-408. [In Persian]
22. Jalali Jahromi, A., Mirhosseini, M., Molla Hoseini, H., Nikukar, H. 2020. A Review on Commonly Used Scaffolds in Tissue Engineering for Bone Tissue Regeneration. *SSU Journals*, 28(1): 2235-2254. [In Persian]
23. Kao C.T., Lin C.C., Chen Y.W., Yeh C.H., Fang H.Y., Shie M.Y. 2015. Poly (dopamine) coating of 3D printed poly (lactic acid) scaffolds for bone tissue engineering. *Materials Science and Engineering: C*, 56: 165-173.
24. Kerativitayanan P., Tatullo M., Khariton M., Joshi P., Perniconi B., Gaharwar A.K. 2017. Nanoengineered
9. Becher T.B., Braga C.B., Bertuzzi D.L., Ramos M.D., Hassan A., Crespilho F.N., Ornelas C. 2019. The structure–property relationship in LAPONITE® materials: from Wigner glasses to strong self-healing hydrogels formed by non-covalent interactions. *Soft Matter*, 15(6): 1278-1289.
10. Castro-Aguirre E., Auras R., Selke S., Rubino M., Marsh T. 2018. Impact of nanoclays on the biodegradation of poly (lactic acid) nanocomposites. *Polymers*, 10(2): 202.
11. Fattahi F.S., Khoddami A., Avinc O. 2019. Poly (lactic acid)(PLA) nanofibers for bone tissue engineering. *Journal of Textiles and Polymers*, 7 (2): 47-64.
12. Gaharwar A.K., Kishore V., Rivera C., Bullock W., Wu C.J., Akkus O., Schmidt G. 2012. Physically crosslinked nanocomposites from silicate-crosslinked PEO: mechanical properties and osteogenic differentiation of human mesenchymal stem cells. *Macromolecular Bioscience*, 12(6): 779-793.
13. Gao A., Liu F., Xue L., 2014. Preparation and evaluation of heparin-immobilized poly (lactic acid)(PLA) membrane for hemodialysis. *Journal of Membrane Science*, 452: 390-399.
14. Gao Y., Shao W., Qian W., He J., Zhou Y., Qi K., Wang L., Cui S., Wang R. 2018. Biomaterialized poly (l-lactic-co-glycolic acid)-tussah silk fibroin nanofiber fabric with hierarchical architecture as a scaffold for bone tissue engineering. *Materials Science and Engineering*, 84: 195-207.
15. Ghorbani S., Tirahi T., Soleimani M., Pour Beiranvand S. 2017. Wet electrospinning of 3D nanofiber poly (lactic) acid scaffolds for tissue engineering applications: Fabrication and characterization. *Pathobiology Research*, 20(2): 49-61. [In Persian]
16. Gonçalves M., Figueira P., Maciel D., Rodrigues J., Qu X., Liu C., Tomás H., Li Y. 2014. pH-sensitive Laponite/doxorubicin/alginate nanohybrids with

- Studies in Medical Sciences*, 25(11): 988-997. [In Persian]
32. Monnier A., Al Tawil E., Nguyen Q.T., Valleton J.M., Fatyeyeva K., Deschrevel B. 2018. Functionalization of poly (lactic acid) scaffold surface by aminolysis and hyaluronan immobilization: How it affects mesenchymal stem cell proliferation. *European Polymer Journal*, 107: 202-217.
33. Motamedian F.S.T.S.R., Khosraviani F.G.K., Khojasteh A. 2012. Craniomaxillofacial bone engineering by scaffolds loaded with stem cells: a systematic review. *Journal Dental School*, 30(2):115-131.
34. Nair B.P., Sindhu M., Nair P.D. 2016. Polycaprolactone-laponite composite scaffold releasing strontium ranelate for bone tissue engineering applications. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 143: 423-430.
35. Oliveira J.E., Moraes E.A., Marconcini J.M., C. Mattoso L.H., Glenn G.M., Medeiros E.S. 2013. Properties of poly (lactic acid) and poly (ethylene oxide) solvent polymer mixtures and nanofibers made by solution blow spinning. *Journal of Applied Polymer Science*, 129(6): 3672-3681.
36. Ordikhani F., Dehghani M., Simchi A. 2015. Antibiotic-loaded chitosan-Laponite films for local drug delivery by titanium implants: cell proliferation and drug release studies. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, 26(12): 1-12.
37. Peng Q., Xu, P., Xiao S. 2018. Porous Laponite/Poly (L-lactic acid) Membrane with Controlled Release of TCH and Efficient Antibacterial Performance. *Fibers and Polymers*, 19(3): 477-488.
38. Puppi D., Chiellini F., Piras A.M., Chiellini E. 2010. Polymeric materials for bone and cartilage repair. *Progress in polymer Science*, 35(4): 403-440.
39. Ramesh S., Yuen T.F., Shen C.J. 2008. Conductivity and FTIR studies on PEO-osteoinductive and elastomeric scaffolds for bone tissue engineering. *ACS Biomaterials Science and Engineering*, 3(4): 590-600.
25. Khakestani M., Jafari S.H., Zahedi P., Bagheri R., Hajiaghaee R. 2017. Physical, morphological, and biological studies on PLA/n HA composite nanofibrous webs containing E quisetum arvense herbal extract for bone tissue engineering. *Journal of Applied Polymer Science*, 134(39): p.45343.
26. Kung F.C., Kuo Y.L., Gunduz O., Lin C.C. 2019. Dual RGD-immobilized poly (L-lactic acid) by atmospheric pressure plasma jet for bone tissue engineering. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 178: 358-364.
27. Li H.L., Zhou G.X., Shan Y.K., Yuan M.L. 2013. The Mechanical Properties and Hydrophilicity of Poly (L-Lactide)/Laponite Composite Film. In *Advanced Materials Research*, 706: 340-343.
28. Li T., Liu Z.L., Xiao M., Yang Z.Z., Peng M.Z. Di Li C., Zhou X.J., Wang J.W. 2018. Impact of bone marrow mesenchymal stem cell immunomodulation on the osteogenic effects of laponite. *Stem Cell Research and Therapy*, 9(1): 100.
29. Li X., Wang L., Fan Y., Feng Q., Cui F.Z., Watari F. 2013. Nanostructured scaffolds for bone tissue engineering. *Journal of Biomedical Materials Research Part A*, 101(8): 2424-2435.
30. Loiola L.M., Más B.A., Duek E.A., Felisberti M.I. 2015. Amphiphilic multiblock copolymers of PLLA, PEO and PPO blocks: synthesis, properties and cell affinity. *European Polymer Journal*, 68: 618-629.
31. Miri V., Mansourizadeh F., Sagha M., Asadi A., Golmohammadi M.G. 2015. Fabrication and evaluation of the morphology, biodegradability, and chemical characteristics of the nano-fibrous scaffold poly-l-lactic-acid (plla) and its application in neural tissue engineering.

2018. LAPONITE® nanorods regulating degradability, acidic-alkaline microenvironment, apatite mineralization and MC3T3-E1 cells responses to poly (butylene succinate) based bio-nanocomposite scaffolds. *RSC Advances*, 8(20):10794-10805.
47. 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 hitosan/LAPONITE composite scaffold for bone tissue engineering. *RSC Advances*, 7(85): 54100-54110.
48. Tomás H., Alves C.S., Rodrigues J. 2018. Laponite®: A key nanoplatform for biomedical applications?. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine*, 14(7): 2407-2420.
49. Wang C., Wang S., Li K., Ju Y., Li J., Zhang Y., Li J., Liu X., Shi X., Zhao Q. 2014. Preparation of laponite bioceramics for potential bone tissue engineering applications. *PloS One*, 9(6): e99585.
50. Wang G., Maciel D., Wu Y., Rodrigues J., Shi X., Yuan Y., Liu C., Tomás H., Li Y. 2014. Amphiphilic polymer-mediated formation of laponite-based nanohybrids with robust stability and pH sensitivity for anticancer drug delivery. *ACS Applied Materials and interfaces*, 6(19): 16687-16695.
51. Wang S., Castro R., An X., Song C., Luo Y., Shen M., Tomás H., Zhu M., Shi X. 2012. Electrospun laponite-doped poly (lactic-co-glycolic acid) nanofibers for osteogenic differentiation of human mesenchymal stem cells. *Journal of Materials Chemistry*, 22(44): 23357-23367.
52. Wang S., Zheng F., Huang Y., Fang Y., Shen M., Zhu M., Shi X. 2012. Encapsulation of amoxicillin within laponite-doped poly (lactic-co-glycolic acid) nanofibers: preparation, characterization, and antibacterial activity. *ACS Applied Materials and Interfaces*, 4(11): 6393-6401.
- LiX [X: CF<sub>3</sub>SO<sub>3</sub><sup>-</sup>, SO<sub>4</sub><sup>2-</sup>] polymer electrolytes. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 69(2): 670-675.
40. Ranjbar M.M., Shaki H., Kargozar S. 2019. Fabrication of Nanofibrous Hybrid Scaffolds from Polylactic Acid-Graphene and Gelatin for Application in Bone Tissue Engineering. *Iranian Journal of Polymer Science and Technology*, 31 (6): 566-576. [In Persian]
41. Salerno A., Fernández-Gutiérrez M., del Barrio J.S.R., Domingo C. 2015. Bio-safe fabrication of PLA scaffolds for bone tissue engineering by combining phase separation, porogen leaching and scCO<sub>2</sub> drying. *The Journal of Supercritical Fluids*, 97: 238-246.
42. Sharifi F.F., Irani S., Zandi M., Soleimani M. 2014. Synthesis and surface modification of polycaprolactone nanofibers for tissue engineering. *Journal of Ardabil University of Medical Sciences (Jaums)*, 14 (3): 217-228. [In Persian]
43. Shen R., Xu W., Xue Y., Chen L., Ye H., Zhong E., Ye Z., Gao J., Yan Y. 2018. The use of chitosan/PLA nano-fibers by emulsion eletrospinning for periodontal tissue engineering. *Artificial Cells, Nanomedicine and Biotechnology*, 46(sup2): 419-430.
44. Silva T.N., Gonçalves R.P., Rocha C.L., Archanjo B.S., Barboza C.A.G., Pierre M.B.R., Reynaud F., de Souza Picciani P.H. 2019. Controlling burst effect with PLA/PVA coaxial electrospun scaffolds loaded with BMP-2 for bone guided regeneration. *Materials Science and Engineering: C*, 97: 602-612.
45. Suganya Bharathi B., Stalin T. 2019. Cerium oxide and peppermint oil loaded polyethylene oxide/graphene oxide electrospun nanofibrous mats as antibacterial wound dressings. *Materials Today Communications*, 21: 100664.
46. Tang L., Wei W., Wang X., Qian J., Li J., He A., Yang L., Jiang X., Li X., Wei J.



57. Xu Y., Zou L., Lu H., Kang T. 2017. Effect of different solvent systems on PHBV/PEO electrospun fibers. *RSC Advances*, 7(7): 4000-4010.
58. Yao Q., Cosme J.G., Xu T., Miszuk J.M., Picciani P.H., Fong H., Sun H. 2017. Three dimensional electrospun PCL/PLA blend nanofibrous scaffolds with significantly improved stem cells osteogenic differentiation and cranial bone formation. *Biomaterials*, 115: 115-127.
59. Zhai X., Hou C., Pan H., Lu W.W., Liu W., Ruan C. 2018. Nanoclay incorporated polyethylene-glycol nanocomposite hydrogels for stimulating in vitro and in vivo osteogenesis. *Journal of Biomedical Nanotechnology*, 14(4): 662-674.
60. Zhou G.X., Yuan M.W., Jiang L., Yuan M.L., Li H.L. 2013. The Preparation and Property Research on Laponite-Poly (L-Lactide) Composite Film. In *Advanced Materials Research*, 750: 1919-1923.
53. Wang S.D., Zhang S.Z., Liu H., Zhang Y.Z. 2014. Controlled release of antibiotics encapsulated in the electrospinning polylactide nanofibrous scaffold and their antibacterial and biocompatible properties. *Materials Research Express*, 1(2): 025406.
54. Wang Y., Cui W., Chou J., Wen S., Sun Y., Zhang H. 2018. Electrospun nanosilicates-based organic/inorganic nanofibers for potential bone tissue engineering. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 172: 90-97.
55. Xiong Z.Q., Li X.D., Fu F., Li Y.N. 2019. Performance evaluation of laponite as a mud-making material for drilling fluids. *Petroleum Science*, 16(4): 890-900.
56. Xu W., Shen R., Yan Y., Gao J. 2017. Preparation and characterization of electrospun alginate/PLA nanofibers as tissue engineering material by emulsion eletrospinning. *Journal of the Mechanical Behavior of Biomedical Materials*, 65: 428-438.

