فصلنامه مواد و فناوری‌های پیشرفته

Journal Homepage: www.jamt.ir

MERC

مقاله کامل پژوهشی

# افزایش زیست‌کانی‌سازی سلول‌های بنیادی و جذب پروتئین‌های ماتریکس خارج سلولی روی سطح داربست زیست‌فعال تقویت‌شده با نانولوله‌های کربنی چنددیواره کربوکسیل‌دار

مرجان میرحاج [۱]، محبوبه محمودی [۲*]، سیدامیر میرافضلی [۳]، منصور علیزاده [۳]، محمدرضا توکلی [۱]

[۱] دانشجوی دکتری، گروه مهندسی پزشکی، دانشگاه صنعتی اصفهان ، اصفهان، اصفهان، ایران

[۲] دانشیار، گروه مهندسی پزشکی، واحد یزد، دانشگاه آزاد اسلامی، یزد، یزد، ایران

[۳] کارشناسی ارشد، گروه مهندسی پزشکی، واحد یزد، دانشگاه آزاد اسلامی، یزد، یزد، ایران

**تاریخچه مقاله:**

ثبت اولیه: ۱٤۰۰/۰۱/۲۲

دریافت نسخهٔ اصلاح‌شده: ۱٤۰۰/۰۲/۱۱

پذیرش علمی: ۱٤۰۰/۰٤/۰٦

انتشار: ۱٤۰۱/۰۱/۲۷

**کلیدواژه‌ها:**

نانولوله کربن چنددیواره،

تمایز سلولی،

سلول بنیادی مزانشیمی،

داربست استخوان،

زیست‌کانی‌سازی

**چکیده** مهندسی بافت، با ارائه داربست‌هایی با قابلیت تحریک استخوان‌سازی، بستری مناسب را برای بازسازی و ترمیم بافت‌های استخوانی آسیب‌دیده فراهم می‌کند. در این مطالعه، داربست‌های پلی‌کاپرولاکتون (داربست A)، پلی‌کاپرولاکتون/کراتین (داربست B) و پلی‌کاپرولاکتون/کراتین تقویت‌شده با نانولوله‌های کربنی چنددیواره کربوکسیل‌دار (MWCNT-COOH) (داربست C)، به روش الکتروریسی، ساخته و تمایز استئوژنیک (Osteogenic) سریع سلول‌های بنیادی مزانشیمی و زیست‌کانی‌سازی در داربست‌ها بررسی شد. زیست‌فعالی داربست‌ها، با طیف‌سنجی پراش انرژی پرتو ایکس (EDS) و پلاسمای جفت شده القایی-طیف‌سنجی نشر نوری (ICP-OES) و جذب پروتئین‌های ماتریکس خارج سلولی، با کیت سنجش پروتئین BCA ارزیابی شد. همچنین، تأثیر COOH-MWCNT بررسوب کلسیم در روی سطح داربست‌ها در دو مقطع زمانی ۷ و ۱٤ روز، بررسی شد. شکل‌گیری لایه هیدروکسی آپاتیت روی سطح داربست C، قابلیت استخوان‌زایی و زیست‌فعالی عالی داربست را نشان داد. میزان جذب پروتئین روی سطح داربست‌های B و C، به‌ترتیب، ۳۲ و ٤۳ میکروگرم بر میلی‌متر مکعب اندازه‌گیری شد که نشانه رشد و تکثیربیشتر سلول‌های مزانشیمی در داربست C نسبت به داربست B بود. همچنین، رسوب بالا کلسیم روی سطح داربست C ، تمایز سلول‌های بنیادی مزانشیمی (Mesenchymal stem cells differentiate) به سلول های استخوانی را در داربست نشان داد. نتایج این پژوهش نشان داد که داربست پلی‌کاپرولاکتون/کراتین تقویت‌شده با MWCNT-COOH، دارای زیست‌فعالی و آب‌دوستی عالی و تمایز استئوژنیک سلول‌های بنیادی مزانشیمی بوده و می‌تواند گزینه مناسبی برای کاربرد در مهندسی بافت استخوان باشد.

https://doi.org/10.30501/jamt.2021.278619.1164 URL: https://www.jamt.ir/article_130850.html

**Original Research Article**

Journal of Advanced Materials and Technologies (JAMT): Vol. 10, No. 4, (Winter 2022), 89-106

# Enhanced Biomineralization of Stem Cells and Adsorption of Extracellular Matrix Proteins on Bioactive Scaffold Reinforced with Carboxylated Multi-

*عهده دار مکاتبات

**نشانی:** ایران، یزد، یزد، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد یزد، گروه مهندسی پزشکی، **تلفن:** ۰۳۵-۳۱۸۷۱۰۰۰، **دورنگار:** ۰۳۵-۳۸۲۱٤۸۱۰

**پیام نگار:** m.mahmoodi@iauyazd.ac.ir

Please cite this article as: Mirhaj, M., Mahmoodi, M., Mirafzali, S. A., Alizadeh, M., Tavakoli, M. R., "Enhanced biomineralization of stem cells and adsorption of extracellular matrix proteins on bioactive scaffold reinforced with carboxylated multi-walled carbon nanotubes", ***Journal of Advanced Materials and Technologies (JAMT)***, Vol. 10, No. 4, (2022), 89-106. (https://doi.org/10.30501/jamt.2021.278619.1164).

2783-0829/© 2022 The Author(s). Published by MERC.
This is an open access article under the CC BY license (https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/).

# Walled Carbon Nanotubes

**Marjan Mirhaj [1], Mahboobeh Mahmoodi [2*], Seyed Amir Mirafzali [3], Mansoor Alizadeh [3], Mohammadreza Tavakoli [1]**

[1] *Ph. D. Student, Department of Biomedical Engineering, Isfahan University of Technology, Isfahan, Isfahan, Iran*
[2] *Associate Professor, Department of Biomedical Engineering, Yazd Branch, Islamic Azad University, Yazd, Yazd, Iran*
[3] *M. Sc., Department of Biomedical Engineering, Yazd Branch, Islamic Azad University, Yazd, Yazd, Iran*

***Paper History:***
Received: 2021-04-11
Revised in revised form: 2021-05-01
Scientific Accepted: 2021-06-27
Published: 2022-04-16

***Keywords:***
Multi-Walled Carbon Nanotubes,
Cell Differentiation,
Mesenchymal Stem Cell,
Bone Scaffold,
Biomineralization

**Abstract** Tissue engineering creates a suitable substrate for the regeneration and repair of damaged bone tissue by providing scaffolds with the ability to stimulate bone formation. In this study, polycaprolactone (PCL) scaffold (scaffold A), PCL/keratin (Kr) scaffold (scaffold B), and PCL/Kr scaffold reinforced with carboxylated multi-walled carbon nanotubes (MWCNT-COOH) (scaffold C) were fabricated by electrospinning method and rapid osteogenic differentiation of mesenchymal stem cells and biomineralization on the scaffolds surface were evaluated. The bioactivity of scaffolds was investigated using energy dispersive x-ray spectroscopy (EDS) and inductively coupled plasma-optical emission spectroscopy (ICP-OES) and extracellular matrix proteins adsorption on the surface of scaffolds were also evaluated by BCA assay kit. Moreover, the effect of MWCNT-COOH on calcium deposition in the scaffolds were studied on days 7 and 14 of culture. The formation of hydroxyapatite layer on the scaffold C indicated the excellent osteoproductivity and bioactivity of scaffold. The amount of protein adsorption on the surface of scaffolds B and C was measured to be 32 μg/mm$^3$ and 43 μg/mm$^3$, respectively, which showed an increase in mesenchymal stem cells proliferation on the surface of scaffold C compared to the scaffold B. Also, high calcium deposition on the surface of scaffold C indicated mesenchymal stem cells differentiate into osteoblasts on the surface of scaffold. Therefore, the results of this study demonstrated that the PCL/Kr scaffold reinforced with MWCNT-COOH with excellent bioactivity, high protein adsorption, and osteogenic differentiation of mesenchymal stem cells can be a suitable candidate for bone tissue engineering applications.

https://doi.org/10.30501/jamt.2021.278619.1164 URL: https://www.jamt.ir/article_130850.html

## ۱- مقدمه

مهندسی بافت، دانش طراحی و ساخت بافت جدید برای بازیابی عملکرد بافت‌های ازدست‌رفته است که چندین دهه، مورد توجه پژوهشگران بوده است. سلول بنیادی و داربست، دو جزء اصلی مهندسی بافت هستند [۱]. سلول‌های مزانشیمی[۱] (MSCs)، به‌عنوان سلول‌های بنیادی چندتوانی[۲] [۲]، قابلیت تمایز از سلول‌های استئوبلاست، کندروبلاست، سلول‌های چربی [۳]، کاردیومیوسیت‌ها [٤] و سلول‌های بتای لوزالمعده[۳] را دارد [٥ و ٦]. سلول‌های مزانشیمی، از بافت‌های مختلف بزرگسال مانند بافت چربی [۷]، مغز استخوان [۸]، پالپ دندان [۹] و بافت جفت [۱۰] استخراج می‌شود. سلول‌های مزانشیمی مشتق‌شده از بافت چربی[٤]، پتانسیل بالایی برای ترمیم و بازسازی بافت‌های آسیب‌دیده دارند. تمایز سلول‌های بنیادی مزانشیمی[٥] به استئوبلاست، با بیان نشانگرهای[٦] خاص، مانند استئوپروژیتور[۷]، سنتز کلاژن و کانی‌سازی ماتریکس خارج سلولی[۸] (ECM) قابل تشخیص است [۱٤-۱۱]. در پدیده تمایز سلول‌های بنیادی مزانشیمی به سلول‌های استخوانی، عوامل محیطی و شیمیایی مختلفی از جمله دگزامتازون[۹]، اسید اسکوربیک[۱۰] و بتاگلیسرول فسفات[۱۱] اثرگذارند. اسید اسکوربیک، ترشح کلاژن توسط سلول‌های مزانشیمی در حال تکثیر را افزایش می‌دهد. بتاگلیسرول فسفات، به‌عنوان منبعی غنی از فسفات آلی، در کانی‌سازی ماتریکس خارج سلولی مؤثر است [۱٥ و ۱٦]. داربست، جزء دیگر مهندسی بافت است که بستری موقت را برای رشد و تکثیر سلول و محیطی مناسب را برای تسهیل چسبندگی و رشد و تمایز سلول فراهم می‌کند [۱]. بنابراین، ساخت داربست مناسب با ویژگی‌های مورد انتظار، از اهداف مهم پژوهشگران مهندسی بافت است. بسیاری از پژوهشگران، برای تولید داربست‌های نانوالیاف، روش الکتروریسی را به‌کار برده‌اند [۱۷]. داربست‌های نانوالیاف با نسبت سطح به حجم کم الیاف الکتروریسی‌شده، قابلیت حمل دارو، رشد و تکثیر مناسب و تمایز سلول‌ها را دارند [۲۰-۱۸]. انتخاب و طراحی مواد زیستی[۱۲] چالش‌برانگیز است. زیست‌مواد، برای ساخت داربست، علاوه بر زیست‌سازگاربودن، باید خواص مکانیکی، شیمیایی و تخریب‌پذیری بهینه داشته باشد [۲۱]. همچنین،

[1] Mesenchymal Stem Cells
[2] Multipotent
[3] Pancreatic β Cells
[4] Adipose Tissue-Derived Stem Cells
[5] Mesenchymal Stem Cells Differentiate
[6] Markers
[7] Osteoprogenitor
[8] Extracellular Matrix
[9] Dexamethasone
[10] Ascorbic Acid
[11] Beta-Glycerol Phosphate
[12] Biological

طراحی داربست‌های بافت سخت و نرم، دارای ویژگی‌های متفاوت‌اند. برای مثال، داربست‌های طراحی‌شده برای بافت‌های سخت باید هدایت استخوانی[1]، تحریک استخوان‌زایی[2]، استخوان‌سازی و یکپارچه‌شدن با استخوان[3] را افزایش دهند [۲۲ و ۲۳]. طراحی بسترهای زیستی با خواص مطلوب می‌تواند نقش مهمی در ترمیم بافت استخوان داشته باشد. کاربرد چندسازه‌ها[4] در ساخت داربست‌های استخوانی مورد توجه پژوهشگران است؛ چراکه بافت استخوان، خود چندسازه‌ای طبیعی است [۲٤]. نانولوله‌های کربنی[5] (CNTs)، دارای خواص مکانیکی عالی، چگالی کم، پایداری بالا، خواص الکتریکی و گرمایی بی‌نظیری هستند [۲۵ و ۲٦]. خواص الکتریکی فوق‌العاده نانومواد کربن موجب انتقال سیگنال‌های سلولی می‌شود و ارتباط سلولی و فعالیت سلولی را افزایش می‌دهد. نانولوله‌های کربنی، هنگام تولید، به‌صورت رشته‌هایی درهم آرایش می‌یابند و شکل می‌گیرند و از ساختار سه‌بعدی پروتئین‌های موجود در بافت خارج سلولی تقلید می‌کنند که این حالت، مشابه وضعیت کلاژن‌ها در مایع خارج سلولی است [۳۰-۲۷]. نانولوله‌های کربنی، نانوذراتی با ساختارهای حلقوی توخالی و متشکل از اتم‌های کربن‌اند که با توجه به تعداد لایه‌های گرافیتی، به سه دسته نانولوله‌های کربنی تک‌جداره، نانولوله‌های کربنی دودیواره و نانولوله‌های کربنی چند دیواره[6] (MWCNTs) تقسیم می‌شوند [۳۱]. بسیاری از پژوهشگران گزارش کرده‌اند که CNTs، بدون سمّیت، وارد سلول می‌شوند و بارهای مختلف مولکولی زیستی را به سلول منتقل می‌کنند [۳۲]. بااین‌حال، جنبه‌های منفی CNTs نیز گزارش شده است که نانولوله‌های غیرعامل‌دار برای سلول‌ها و حیوانات، سمّیت ایجاد می‌کنند [۳۳] نانولوله‌های کربن بدون عامل و با سطح آب‌گریز در سلول جمع می‌شوند و با اتصال به گونه‌های مختلف زیستی از جمله پروتئین‌ها، از طریق فعل‌وانفعالات آب‌گریزی، با سلول‌ها ارتباط برقرار می‌کنند و سبب سمّیت سلولی می‌شوند [۳۲ و ۳٤]. با افزودن گروه‌های کربوکسیل‌دار یا الکل‌دار به دیواره و انتهای نانولوله‌های کربن، این نانولوله‌ها به MWCNT عامل‌دار (MWCNT-COOH) تبدیل می‌شوند که دارای سمّیت سلولی نیستند [۳۵]. همچنین، عملکرد زیستی سطح نانولوله‌های کربنی با کربوهیدرات‌ها یا پپتیدها سبب بهبود زیست‌سازگاری و زیست‌فعالی در داربست می‌شود [۳٦]. بارگذاری CNTs در الیاف الکتروریسی‌شده، هدایت الکتریکی، بقای سلولی، گستردگی سلول‌ها در سطح و تحریک تولید α-اکتین و تروپونین را افزایش می‌دهد [۳۷]. همچنین، حضور CNTs در داربست‌های مهندسی بافت، موجب افزایش میزان آلکالین فسفاتاز، کلسیم، استئوپنتین [۳۸]، مواد معدنی و هیدروکسی آپاتیت روی سطح داربست‌ها می‌شود که نشانه تمایز سلول‌ها از سلول‌های استخوانی است [۳۹]. اویفوسی[7] و همکاران [٤۰]، افزایش رشد و تکثیر سلول‌های استئوبلاست روی سطح چندسازه هیدروکسی آپاتیت CNTs/(HA) را گزارش دادند. مشابه این پژوهش، افزایش چسبندگی سلول‌ها روی سطح داربست CNTs/آلژینات در مقایسه با داربست بدون CNTs، مشاهده شد [۳۱]. بنابراین، با چندسازه‌ای[8] کردن CNTs با بسپار[9]های مصنوعی و طبیعی می‌توان داربست‌هایی با خواص مناسب برای کاربرد در مهندسی بافت استخوان تهیه کرد. کراتین (Kr)، یک زیست‌بسپار[10] طبیعی با خواص فیزیکی، شیمیایی و زیستی مناسب در پزشکی است که توجه پژوهشگران را به خود جلب کرده است. کراتین استخراج‌شده از مو دارای توانایی ذاتی برای خودسامانی[11] و چندسازه‌ای‌شدن در درون داربست‌های متخلخل و نانوالیاف است [٤۱]. زیست‌ماده کراتین مشتق‌شده از پشم و موی انسان دارای نقوش اتصال سلول، مانند لوسین-اسپارتیک اسید والین[12] (LDV) و گلوتامیک اسید اسپارتیک اسید-سرین[13] و RGD[14] است که می‌تواند از چسبندگی سلولی حمایت کند [٤۳-٤۱]. بنابراین، حفظ فعالیت زیستی در Kr می‌تواند مزایایی برای کنترل عملکردهای زیستی خاص در انواع

[1] Osteoconduction
[2] Osteoinduction
[3] Osteointegration
[4] Composites
[5] Carbon Nanotube
[6] Multi-Walled Carbon Nanotubes
[7] Oyefusi
[8] Composite
[9] Polymer
[10] Biopolymer
[11] Self-Assembly
[12] Leucine-Aspartic Acid-Valine
[13] Glutamic Acid-Aspartic Acid-Serine
[14] Arginyl-Glycyl-Aspartic Acid

کاربردهای مهندسی بافت داشته باشد [٤۱]. در پژوهش قبلی ما [٤٤]، داربست پلی‌کاپرولاکتون /کراتین/ هیدروکسی آپاتیت، به روش الکتروریسی، به‌منظور کاربرد در مهندسی بافت استخوان، ساخته شد. نتایج به‌دست‌آمده نشان داد که با حضورکراتین و HA در داربست، تمایز سلول‌های MSCs افزایش می‌یابد. با توجه به گزارش‌های اخیر، مشخص شد که مطالعات کمی در خصوص زیست‌کانی‌سازی، جذب پروتئین‌های ماتریکس خارج سلولی و تمایز سلول‌های بنیادی مزانشیمی به سلول‌های استخوانی روی سطح داربست‌های مهندسی بافت برپایه کراتین تقویت‌شده با نانولوله‌های کربنی چند دیواره کربوکسیل‌دار، انجام شده است. در این مطالعه، داربست‌های پلی‌کاپرولاکتون/ کراتین حاوی MWCNT-COOH، به روش الکتروریسی، برای کاربرد در مهندسی بافت استخوان ساخته شد و زیست‌فعالی و جذب پروتئین، زیست‌سازگاری، تمایز سلول‌های بنیادی مزانشیمی به سلول‌های استخوانی توسط رسوب کلسیم و رنگ‌آمیزی آلیزارین قرمز[1] بررسی شد.

## ۲- مواد و روش انجام آزمون‌ها

### ۲-۱- مواد

در این پژوهش، کراتین، با درجه خلوص ۹۸ درصد و اندازه ذرات ۳۰ نانومتر، PCL (وزن مولکولی 70-90 KD)، سدیم دودسیل سولفات (SDS) و MWCNT از شرکت سیگما-آلدریچ (Sigma–Aldrich) خریداری شدند. همچنین، گلوتارآلدهید و L اسکوربیک اسید ۲-فسفات، دگزامتازون و بتاگلیسرول فسفات از شرکت سیگما-آلدریچ تهیه شدند. سرم جنین گاوی (FBS)، محیط کشت DMEM-F12، آنزیم کلاژناز، بافر لیزکننده گلبول‌های قرمز، بافر نمک فسفات[2] (PBS) نیز از شرکت گیبکو (Gibco) خریداری شدند.

### ۲-۲- ساخت داربست نانوالیاف

به‌منظور تهیه محلول پلی‌کاپرولاکتون/ کراتین (PCL/Kr) [٤٤]، کراتین و پلی کاپرولاکتون در اسید استیک:اسید فرمیک به نسبت ۳:۱، به‌ترتیب، به‌مدت ۱ ساعت و ۲٤ ساعت، با همزن مغناطیسی، به‌طور جداگانه، حل شدند. محلول‌های آماده‌شده، با نسبت ۳:۲، توسط همزن مغناطیسی مخلوط شدند. به‌منظور آماده‌سازی محلول پلی‌کاپرولاکتون/ کراتین/ نانولوله‌های کربنی چند دیواره کربوکسیل‌دار (PCL/Kr/ MWCNT-COOH)، ابتدا، MWCNT-COOH با غلظت ۱ درصد در حلال اسید استیک و اسید فرمیک با نسبت ۳:۱، توسط همزن مغناطیسی، به‌مدت ۱ ساعت، حل و به محلول PCL/Kr اضافه شد. ازآنجایی‌که CNT در تعلیقه[3] ایجادشده حل نمی‌شوند، به‌منظور یکنواخت‌شدن محلول، SDS با غلظت ۱ درصد وزنی نسبت به حلال، به محلول PCL/Kr/CNT اضافه و تعلیقه با دستگاه پروب فراصوت[4] (Top Sonics-ایران) همگن‌ساز[5] و محلول PCL/Kr/ MWCNT-COOH، به‌منظور ساخت داربست، برای تزریق به دستگاه الکتروریسی آماده شد. داربست‌های نانوالیاف پلی‌کاپرولاکتون، پلی‌کاپرولاکتون/ کراتین و پلی‌کاپرولاکتون/ کراتین/ نانولوله‌های کربنی چند دیواره کربوکسیل‌دار به روش الکتروریسی (KYKY-SBC-12-2200) ساخته شدند. الکتروریسی نمونه‌ها توسط محلول آماده شده در سرنگ و با تنظیم پارامترهای دستگاه با نرخ تغذیه ۰/۱ میلی‌لیتر در ساعت، ولتاژ ۲۰ کیلووات و فاصله جمع‌کننده تا نوک سوزن ۱۰ سانتی‌متر، انجام شد. در این پژوهش، داربست پلی‌کاپرولاکتون، پلی‌کاپرولاکتون/ کراتین و پلی‌کاپرولاکتون/ کراتین تقویت‌شده با نانولوله‌های کربنی چنددیواره کربوکسیل‌دارشده، به‌ترتیب، داربست A، B و C نام‌گذاری شدند.

### ۲-۳- مشخصه‌یابی داربست‌ها

#### ۲-۳-۱- بررسی ریخت‌شناسی سطح داربست‌ها

بررسی ریخت‌شناسی سطح داربست‌ها و اندازه گیری قطر الیاف، توسط میکروسکوپ الکترونی روبشی نشر میدانی[6] (FESEM) مدل Quanta450 FEG انجام گرفت. بدین‌منظور، ابتدا، نمونه‌ها با طلا پوشش داده شدند و سپس، تصویربرداری انجام شد و توسط نرم‌افزار ImageJ، میانگین قطر متوسط

[1] Alizarin Red
[2] Phosphate-Buffered Saline
[3] Suspension
[4] Ultrasonic Probe
[5] Homogenizer
[6] Field Emission Scannig Electron Microscope

الیاف اندازه‌گیری شد. همچنین، برای بررسی حضور MWCNT-COOH در نانوالیاف، از تصویربرداری میکروسکوپ الکترونی عبوری[1] (TEM) مدل EM208S PHILIPS استفاده شد.

### ۲-۳-۲- اندازه‌گیری آب‌دوستی

میزان ترشوندگی سطح داربست‌ها به‌وسیله آزمون زاویه تماس آب با سطح داربست‌ها اندازه‌گیری شد. برای اندازه‌گیری زاویه تماس، ۵ قطره آب، روی سطح داربست با اندازه ۱×۲ سانتی‌متر مربع قرار داده شد و ۳ ثانیه بعد با استفاده از دوربین (XCA-50) تصویربرداری شد و با نرم‌افزار Digimizer بررسی شد.

### ۲-۳-۳- بررسی زیست‌فعالی داربست‌ها و آزمون ICP-OES

محلول شبیه‌سازی‌شده بدن انسان[2] (SBF)، محلولی است با غلظت یونی نسبتاً مشابه با پلاسمای خون که تحت شرایط دمایی pH فیزیولوژیکی بدن، نگهداری می‌شود. به‌منظور پیوند مناسب درون کاشتنی‌های فلزی با استخوان، شکل‌گیری لایه آپاتیت شبیه استخوان روی سطوح درون کاشت، اهمیت ویژه‌ای دارد [٤٥]. با مصرف‌شدن یون‌های کلسیم و فسفات موجود در محلول SBF، جوانه‌های آپاتیت روی سطح زیست‌مواد شروع به رشد می‌کنند. تشکیل لایه آپاتیت روی سطح زیست‌مواد به حداقل ۷ روز زمان نیاز دارد [٤٦]. در پژوهش حاضر، برای بررسی زیست‌فعالی داربست‌ها، از محلول SBF استفاده شد. بررسی زیست‌فعالی در شرایط آزمایشگاهی، با غوطه‌وری داربست‌های ساخته‌شده در ۵ میلی‌لیتر SBF، در مقطع زمانی ۷، ١٤ و ۲۸ روز بررسی شد. داربست‌های ساخته‌شده در SBF غوطه‌ور و در دمای ۳۷ درجه سلسیوس نگهداری شدند. پس از آن، نمونه‌ها سه بار با آب دو بار تقطیر[3] (DI) شسته و به‌مدت ٢٤ ساعت، در خلأ خشک شدند و وزن آن‌ها اندازه‌گیری شد. ریخت‌شناسی داربست‌ها با میکروسکوپ FESEM (Quanta 450 FEG) بررسی شد. برای تعیین توزیع عناصر روی سطح داربست‌ها و اندازه‌گیری میزان درصد وزنی عناصر موجود در سطح، به‌ترتیب از طیف‌سنجی پراش انرژی پرتو ایکس[4] (EDS) و تحلیل نقشه‌ای[5] آن استفاده شد. بررسی زیست‌فعالی ماده، از طریق اندازه‌گیری میزان کاهش مقدار کلسیم موجود در محلول SBF انجام شد. کلسیم موجود در محلول SBF با تشکیل رسوب کلسیم-فسفات (Ca-P) روی سطح داربست‌ها کاهش می‌یابد [٤۷ و ٤۸]. بنابراین، برای تأیید زیست‌فعالی داربست‌ها، پس از خارج‌سازی داربست‌ها از محلول SBF، آنالیز عنصری، از طریق پلاسمای جفت شده القایی-طیف‌سنجی نشر نوری[6] (ICP-OES) (اپتیما ۷۳۰۰، شلتون، ایالات متحده امریکا) از محلول SBF، انجام و نرخ کاهش کلسیم در روزهای ۷، ١٤ و ۲۸ بررسی شد.

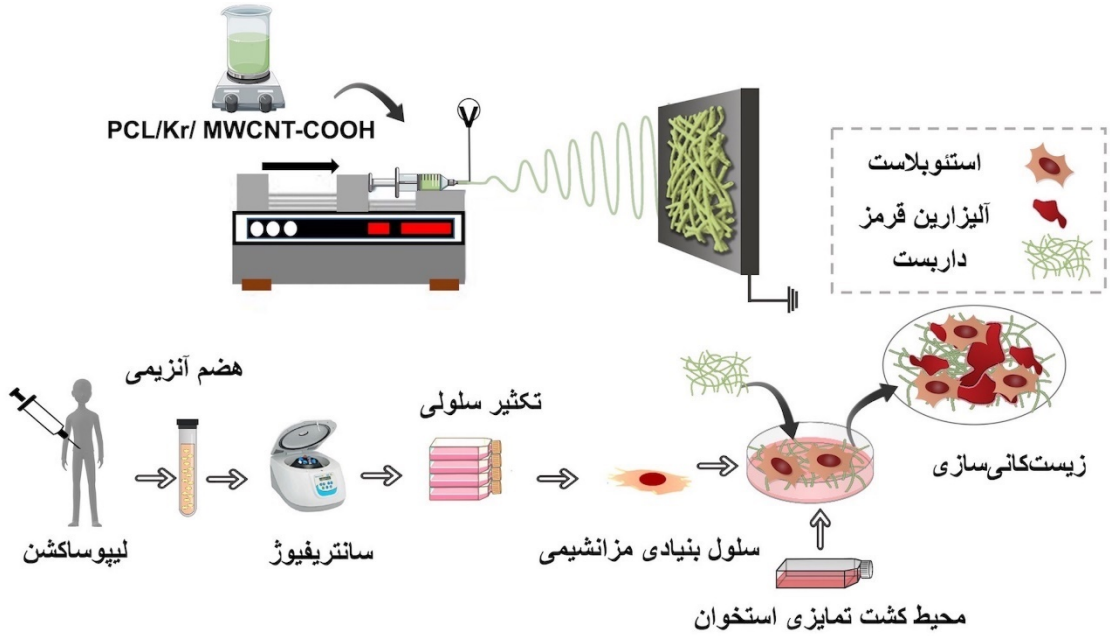
### ۲-۳-٤- بررسی زیست‌سازگاری داربست‌ها

#### ۲-۳-٤-۱- استخراج سلول‌های بنیادی مزانشیمی

سمّیت سلولی داربست‌ها، توسط سلول‌های بنیادی مزانشیمی استخراج‌شده از بافت چربی انسان (HMSCs) بررسی شد. برای استخراج سلول‌های بنیادی از بافت چربی گزینش‌شده، ابتدا، بافت چربی با محلول حاوی آنتی‌بیوتیک (بافر شست‌وشو با سه برابر غلظت- 3X) شست‌وشو و به تکه‌های ۲×۱ میلی‌متر مربع برش داده شد. سپس، تکه‌های بافت چربی شست‌وشوشده در آنزیم کلاژناز، یک ساعت، روی لرزاننده[7] قرار داده شد تا بافت کاملاً هضم شود. پس از هضم بافت، محلول حاصل از بافت، در شرایط ۱۳۰۰ دور بر دقیقه و ۵ دقیقه، تا زمان جداشدن سلول‌ها، سانتریفیوژ شد. محلول زیری حاصل از سانتریفیوژ، از فیلتر سلولی ۷۰ میکرونی عبور داده شد. سپس، برای ازبین‌بردن گلبول‌های قرمز موجود در محلول، از بافر لیزکننده گلبول قرمز استفاده شد. پس از استخراج سلول‌های بنیادی مزانشیمی از بافت چربی، سلول‌ها به فلاسک حاوی محیط کشت DMEM-F12 با ۱۰ درصد FBS انتقال داده شد و در گرم‌خانه[8] Memmert-

[1] Transmission Electron Microscope
[2] Simulated Body Fluid
[3] Deionized Water
[4] Energy Dispersive X-Ray Spectroscopy
[5] Mapping Analysis
[6] Inductively Coupled Plasma-Optical Emission Spectroscopy
[7] Shaker
[8] Incubator

(GMBH) با شرایط رطوبت ۹۰ درصد و غلظت ۵ درصد $CO_2$ در دمای ۳۷ درجه سلسیوس قرار گرفت و هر سه روز یک بار، محیط کشت تعویض شد (شکل ۱).




**شکل ۱**. طرحواره مراحل تهیه داربست PCL/Kr/ MWCNT-COOH و استخراج سلول‌های بنیادی HMSCs برای انجام آزمون تمایز سلول‌های بنیادی مزانشیمی به سلول‌های استخوانی

**۲-۳-٤-۲- آزمون MTT**

درصد زنده‌مانی سلول‌های HMSCs روی سطح داربست‌ها، به روش رنگ‌سنجی MTT[1] ارزیابی شد. ابتدا نمونه‌ها روی پوشش‌های شیشه‌ای، به‌طور عمودی، الکتروریسی شدند. سپس، پوشش‌های شیشه‌ای الکتروریسی‌شده درون ظرف کشت سلول قرار داده شدند و به‌مدت ۵ روز، تحت تابش پرتو گاما با توان ۲۵ کیلو گری استریل شدند. برای بررسی سمّیت سلول‌های HMSCs در تماس با داربست‌ها، $1\times10^4$ سلول با ۱۰۰ میکرولیتر محیط کشت DMEM-F12 حاوی ۱۰ درصد FBS روی هریک از داربست‌های قرارگرفته در چاهک‌های ظرف کشت، ریخته شد و سه روز، در گرم‌خانه با شرایط رطوبت ۹۰ درصد و غلظت ۵ درصد $CO_2$ در دمای ۳۷ درجه سلسیوس قرار داده شد. در این آزمون، سه چاهک ظرف کشت حاوی سلول و محیط کشت بدون حضور داربست، به‌عنوان کنترل منفی در نظر گرفته شدند. پس از گذشت سه روز، محیط کشتِ روی داربست‌ها خارج شد و ۵۰۰ میکرولیتر MTT با غلظت ۰/۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر، در هر چاهک ریخته شد و در گرم‌خانه قرار گرفت. پس از گذشت ٤ ساعت، محلول روی سلول‌ها تخلیه و ایزوپروپانول به آن‌ها اضافه شد تا بلورهای بنفش‌رنگ ایجادشده حل شوند. برای حل‌شدن بهتر رسوب MTT، ظرف، به‌مدت ۱۵ دقیقه، روی دستگاه شیکر قرار گرفت و در ادامه، رسوب حل‌شده به ظرف کشت سلول ۹٦ خانه‌ای منتقل شد و مقدار غلظت ماده حل‌شده در ایزوپروپانول با دستگاه الایزا ریدر[2] (پیشتاز طب مدل Avecina)، در طول موج ۵۷۰ نانومتر، محاسبه شد. چاهک‌های دارای سلول‌های بیشتر، جذب نوری بالاتری از چاهک‌های دارای سلول کمتر نشان دادند. درصد زنده‌مانی سلول‌ها از رابطه (۱) محاسبه شد [٤٤].

$$\text{درصد زنده مانی}\ (\%) = \frac{\text{جذب نوری داربست}}{\text{جذب نوری کنترل منفی}} \times 100 \qquad (1)$$

**۲-۳-٤-۳- بررسی چسبندگی سلول‌ها روی سطح داربست‌ها**

[1] Methyl Thiazol Tetrazolium

[2] Elisa Reader

به‌منظور بررسی چسبندگی سلول‌ها روی سطح داربست، نمونه‌های استریل‌شده با $1\times10^4$ سلول در حجم ۱۰۰ میکرولیتر، روی هریک از داربست‌های قرارگرفته در چاهک‌های ظرف کشت، ریخته و در گرم‌خانه قرار داده شدند. پس از سه روز، محیط کشت روی داربست‌ها خارج شد و داربست‌ها با PBS شست‌وشو شدند. برای تثبیت زیستی سلول‌ها روی سطح داربست‌ها، گلوتارآلدهید، به‌عنوان تثبیت‌کننده، روی داربست‌ها ریخته شد و سپس، نمونه‌ها در یخچال نگهداری شدند. پس از ۲ ساعت، ماده تثبیت‌کننده خارج شد و داربست‌ها دو بار با آب DI و الکل‌های ۵۰، ٦۰، ۷۰، ۸۰ و ۹٦ درصد شست‌وشو شدند. سپس، از سطح نمونه‌ها با میکروسکوپ FESEM به‌منظور مشاهده چسبندگی و ریخت‌شناسی سلول‌ها روی سطح داربست‌ها، تصویربرداری شد.

### ۲-۳-۵- بررسی جذب پروتئین روی سطح داربست‌ها

برای انجام آزمون جذب پروتئین روی سطح داربست‌ها، ابتدا، داربست‌ها به‌صورت نوارهایی با ضخامت ۱۵ میلی‌متر برش داده شدند و در چاهک‌های ۲٤ خانه‌ای قرار گرفتند. داربست‌ها در اتانول ۷۵ درصد غوطه‌ور شدند و سه مرتبه در محلول PBS، هربار به مدت ۱۵ دقیقه، شسته شدند. درحالی‌که مایعات باقی‌مانده توسط پیپت خارج می‌شدند، ۱ میلی‌لیتر محیط کشت DMEM با میزان گلوکز بالا حاوی ۱۰ درصد FBS و ۱۰۰ واحد بر میلی‌لیتر پنی‌سیلین و استرپتومایسین در هر خانه تزریق شد. داربست‌ها، پس از گرم‌خانه‌گذاری در ۳۷ درجه سلسیوس به‌مدت ٤ ساعت، سه مرتبه، با محلول PBS شسته شدند تا پروتئین‌های آزاد، پروتئین‌های با جذب ضعیف و همچنین محیط کشت باقی‌مانده حذف شوند. در مرحله بعد، داربست‌ها به یک ظرف ۲٤ خانه‌ای دیگر منتقل شدند و ۱ میلی‌لیتر محلول SDS به هر چاهک اضافه شد. سپس، ظرف حاوی داربست‌ها، به‌مدت ٤ ساعت، روی شیکر در ۳۷ درجه سلسیوس انکوبه[1] شد تا پروتئین‌های جذب‌شده روی سطح داربست جدا شوند. مقدار پروتئین موجود در محلول یا همان مقدار کل پروتئین‌های جذب‌شده، با استفاده از یک کیت سنجش پروتئین BCA (K812-1000, USA، BioVision Inc)، اندازه‌گیری شد. غلظت‌های شناخته‌شده از محلول‌های آلبومین سرم گاوی[2] (BSA)، به‌منظور واسنجی[3] آزمون رنگ‌سنجی، استفاده شد [٤۹].

### ۲-۳-٦- بررسی تمایز سلول‌های بنیادی

در پژوهش حاضر، برای نشان‌دادن تمایز سلول‌های بنیادی مزانشیمی به سلول‌های استخوانی، آزمون‌های رنگ‌آمیزی آلیزارین قرمز و اندازه‌گیری میزان کلسیم روی سطح داربست‌ها انجام شد. برای تکثیر سلول‌های HMSCs، سلول‌ها با محیط کشت DMEM+F12 حاوی ۱۰ درصد FBS، در گرم‌خانه با شرایط رطوبت ۹۰ درصد و غلظت ۵ درصد $CO_2$، در ۳۷ درجه سلسیوس، قرار داده شدند و محیط کشت، هر سه روز یک‌بار، تعویض شد. محیط کشت DMEM-F12 حاوی ۱۰ درصد FBS، ۱ میلی‌مول دگزامتازون، ۵۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر L- اسکوربیک اسید ۲-فسفات و ۱۰ میلی‌مول بتاگلیسرول فسفات، به‌عنوان محیط تمایزی، در آزمون‌ها به‌کار برده شد. چاهک‌های حاوی سلول HMSCs با محیط تمایزی فاقد داربست، به‌عنوان کنترل نیز در نظر گرفته شدند.

#### ۲-۳-٦-۱- رنگ‌آمیزی آلیزارین قرمز

به‌منظور مشاهده رسوب کلسیم روی سطح داربست‌ها که نشانه تمایز سلول‌های مزانشیمی به سلول‌های استخوانی است، از رنگ‌آمیزی آلیزارین قرمز استفاده شد. برای انجام رنگ‌آمیزی آلیزارین قرمز، ۵۰۰۰ سلول HMSCs، در حجم ۳۰۰ میکرولیتر محیط کشت DMEM+F12 شامل ۱۰ درصد FBS، روی هریک از داربست‌های استریل‌شده قرار داده و انکوبه شدند. پس از گذشت ۲٤ ساعت و اطمینان از چسبیدن سلول‌ها روی سطح داربست‌ها، مقدار ۱ میلی‌لیتر محیط کشت تمایزی به هریک از چاهک‌ها اضافه شد. محیط کشت هر چاهک، هر ٤ روز یک‌بار، خارج و محیط جدید به چاهک‌ها اضافه شد. بعد از ۱٤ روز، محیط روی داربست‌ها خارج شد و داربست‌ها، دو بار، با محلول ۰/۹ درصد NaCl شست‌وشو داده

[1] Incube

[2] Bovine Serum Albumin

[3] Calibration

شدند. سپس، سلول‌ها با گلوتارآلدهید ۱ درصد، ۲۰ دقیقه، تثبیت شدند و با محلول رنگی آلیزارین قرمز (۲ درصد، pH=٤/۲)، به‌مدت ٤٥ دقیقه، در دمای اتاق رنگ‌آمیزی شدند. درنهایت، نمونه‌ها با محلول NaCl شست‌وشو شدند و از سطح داربست‌ها با میکروسکوپ نوری (Hp31 ساخت کشور آلمان) تصویربرداری شد.

### ۲-۳-٦-۲- اندازه‌گیری رسوب کلسیم روی سطح داربست‌ها

رسوب کلسیم روی سطح داربست‌ها، با استفاده از کیت[1] سنجش کلسیم (پارس آزمون، تهران، ایران)، طی تمایز سلول‌های مزانشیمی به سلول‌های استخوانی، اندازه‌گیری شد. داربست رنگ‌آمیزی‌شده با آلیزارین قرمز، ابتدا، با PBS و سپس، با ۲۰۰ میکرولیتر هیدروکلریک اسید (HCL) ٦ درصد شست‌وشو داده شد. داربست‌ها به داخل چاهک‌ها منتقل شدند و در دمای اتاق، به‌مدت ٤۰ دقیقه، هم‌زده شدند. سپس، محلول رویی داربست‌ها، در دمای ٤ درجه سلسیوس، به‌مدت ۱٥ دقیقه، در ۱۲۰۰۰ دور در دقیقه، سانتریفیوژ شدند. میزان رسوب کلسیم، با استفاده از جذب نور، توسط دستگاه الایزاریدر، در طول موج ٥۷۰ نانومتر، اندازه‌گیری شد [٥۰].

### ۲-۳-۷- ارزیابی آماری

مقایسه آماری داده‌های به‌دست‌آمده با نرم‌افزار GraphPad Prism Version 8.0. و روش ANOVA انجام شد. برای آزمون‌های انجام‌شده، سه‌بار تکرار در نظر گرفته و نتایج به‌صورت میانگین ± انحراف از معیار گزارش شد.

## ۳- نتایج و بحث

تمرکز اصلی داربست‌های مهندسی بافت استخوان بر بهبود خواص مکانیکی، زیست‌فعالی و رشد و تکثیر سلول‌ها روی سطح داربست است. داربست‌های نانوالیاف می‌توانند بستری مناسب برای چسبیدن، تکثیر و تمایز سلول‌های بنیادی به سلول‌های استخوانی در مهندسی بافت باشند. با روش الکتروریسی می‌توان داربست‌های نانوالیافی با نسبت سطح به حجم بسیار بالا، تخلخل قابل‌تنظیم و خواص مناسب برای رشد و تمایز سلول‌ها تهیه کرد [۲۲]. همچنین، حضور CNTs در الیاف الکتروریسی‌شده سبب افزایش هدایت الکتریکی، گستردگی سلول‌ها در سطح و تحریک تولید α-اکتین و تروپونین [۳۷]، فعالیت آلکالین فسفاتاز، کلسیم [۳۸]، مواد معدنی و هیدروکسی آپاتیت روی سطح داربست‌ها می‌شوند که نشانه تمایز سلول‌های بنیادی از سلول‌های استخوانی است [۳۹]. بنابراین، در پژوهش حاضر، زیست‌فعالی، جذب پروتئین و تمایز سلول‌های HMSCs به سلول‌های استخوانی روی سطح داربست PCL/Kr/ MWCNT-COOH بررسی و ارزیابی شد.

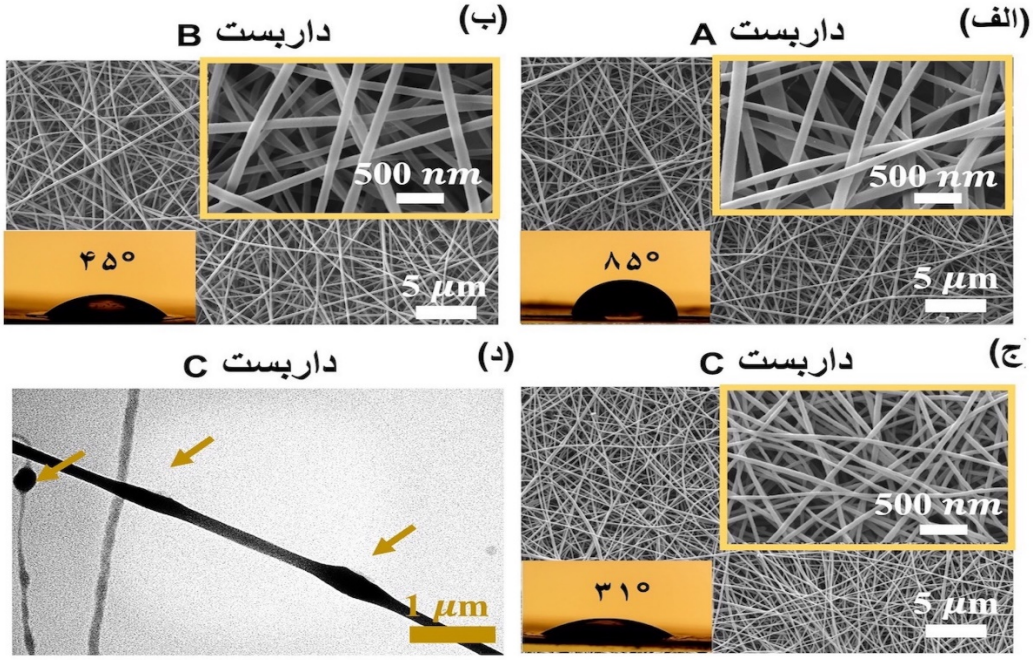
### ۳-۱- ریخت‌شناسی و آب‌دوستی سطح نانوالیاف

شکل ۲ (الف-ج)، تصاویر میکروسکوپ FESEM داربست‌های A، B و C را نشان می‌دهد. مشاهده شد که داربست A دارای اندازه قطر الیاف نسبتاً غیریکنواخت و متوسط اندازه ۲۱۰±٥۱ نانومتر و حاوی قطره است. داربست B دارای الیافی با اندازه نسبتاً یکنواخت و با حداقل گره است. با افزودن کراتین به محلول PCL، متوسط قطر الیاف الکتروریسی‌شده از ۲۱۰±٥۱ به ۱۲٥±۲٥ نانومتر کاهش یافت. همچنین، حضور کراتین در محلول الکتروریسی، هنگام تشکیل جت الکتریکی، مقاومت کمتری را در برابر کشش محوری ایجاد کرد که این دلیلی بر کاهش قطر الیاف داربست B در مقایسه با داربست A بود [٥۱]. هنگامی‌که از PCL به‌عنوان بسپاری غیررسانا در الکتروریسی استفاده می‌شود، بسپار نمی‌تواند بارها را تا جمع‌کننده با خود حمل کند. بنابراین، بسپار به‌خوبی در میدان کشیده نمی‌شود. درنتیجه، مخلوط‌کردن PCL با کراتین به افزایش هدایت الکتریکی محلول منجر، محلول تا محل جمع‌کننده به‌خوبی در میدان کشیده و سبب کاهش قطر الیاف داربست B می‌شود [٤۳]. در پژوهشی مشابه [٤٦]، داربست کراتین/ پلی‌کاپرولاکتون پوشش‌دهی‌شده با کلسیم فسفات، به روش الکتروریسی، برای ترمیم بافت استخوان ساخته شد. با افزودن کراتین به داربست پلی‌کاپرولاکتون، قطر الیاف کاهش، آب‌دوستی افزایش و روند رشد سلولی و چسبندگی بهبود یافت. در این مطالعه، به‌منظور بهبود خواص مکانیکی و افزایش زیست‌فعالی و چسبندگی

[1] Kit

سلول‌ها روی سطح داربست B، MWCNT-COOH با محلول B، مخلوط و الکتروریسی شد. نانوالیاف به‌صورت منظم، کشیده و بدون قطره، با متوسط قطر الیاف ۲۱±۱۰۰ نانومتر، مشاهده شدند. با افزودن MWCNT-COOH به محلول B، غلظت و هدایت الکتریکی محلول بسپاری افزایش یافت [۵۲]. افزایش انباشتگی بار، بر نیروهای چسبندگی غلبه می‌کند و نیروهای دافعه بارهای انباشته‌شده میان نانوالیاف، تشدید می‌شوند. به همین دلیل، قطر نانوالیاف، با افزودن MWCNT-COOH به محلول، کاهش قابل‌توجهی می‌یابد. در روش الکتروریسی، ویسکوزیته محلول باید در حدی باشد که وقتی جریان باریک و پرشتاب محلول بسپاری، نوک سوزن را حین الکتروریسی ترک می‌کند، هم‌زمان با حرکت محلول بسپار به‌سمت صفحه جمع‌کننده کشیده شود تا با افزایش ویسکوزیته، اثر متقابل بیشتری بین حلال و مولکول‌های بسپار ایجاد شود. وقتی محلول تحت تأثیر بارهای الکتریکی کشیده قرار می‌گیرد، مولکول‌های حلال تمایل دارند در سرتاسر مولکول‌های بسپار درهم‌رفته، منتشر شوند. بنابراین، مولکول‌های حلال، برای اینکه تحت تأثیر کشش سطحی تجمع یابند، کاهش می‌یابند و هدایت الکتریکی را افزایش می‌دهند و باعث کاهش قطر الیاف می‌شوند [۵۳].

شکل ۲ (الف –ج)، شکل قطره آب در تماس با داربست A، B و C را نشان می‌دهد. زاویه تماس داربست A، B و C، به‌ترتیب، ۸۵، ٤۵ و ۳۱ درجه اندازه‌گیری شد که نشان‌دهنده افزایش آب‌دوستی و ترشوندگی داربست حاوی MWCNT-COOH در مقایسه با داربست فاقد MWCNT-COOH است. کراتین از خانواده پروتئین‌ها و شامل گروه‌های آب‌دوست آزاد مانند آمین است. بنابراین، با افزودن کراتین به داربست، آب‌دوستی افزایش می‌یابد [٤۳]. همچنین، CNTs اصلاح‌شده با گروه عاملی COOH سبب افزایش آب‌دوستی و کاهش زاویه تماس داربست C می‌شوند [۳۲]. براساس مطالعات مشابه این پژوهش، با افزودن CNT به داربست PCL، زاویه تماس داربست کاهش می‌یابد [٥٤]. در مطالعه‌ای، پژوهشگران چندسازه کیتوسان با MWCNTs را با درصدهای مختلف به سیمان استخوان پلی‌متیل متاکریلات اضافه کردند. نتایج پژوهش‌های آن‌ها نشان داد که با افزودن MWCNTs به پلی‌متیل متاکریلات، زاویه تماس کاهش معنی‌داری می‌یابد [۵۵]. تصویر TEM داربست C، در شکل ۲(د) مشاهده می‌شود که حضور MWCNT-COOH در نانوالیاف پلی‌کاپرولاکتون/ کراتین را نشان می‌دهد.

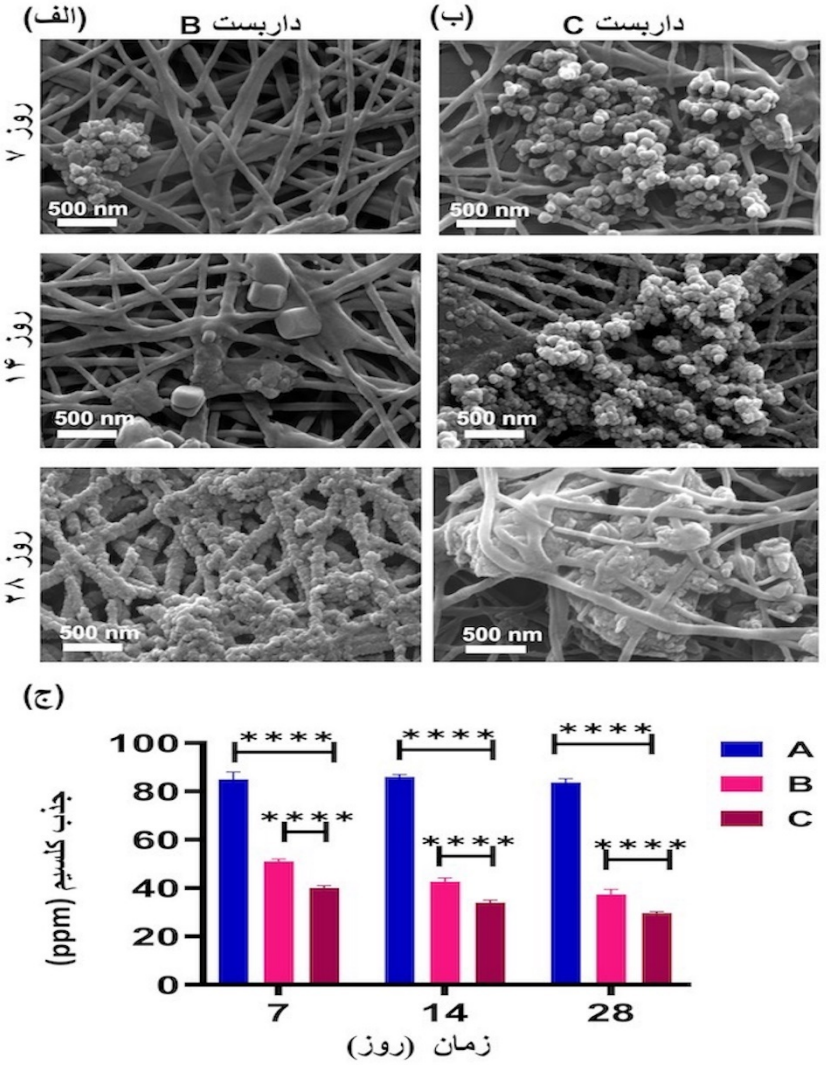



**شکل ۲.** الف–ج) تصاویر FESEM داربست‌های A، B و C در دو بزرگ‌نمایی متفاوت، میزان متوسط زاویه تماس و تصاویر قطره آب در تماس با داربست‌های A، B و C و د) تصویر TEM داربست C (فلش‌های زرد نشان‌دهنده حضور MWCNT-COOH در درون نانوالیاف‌اند)

**۳-۲- بررسی زیست‌فعالی داربست‌ها**

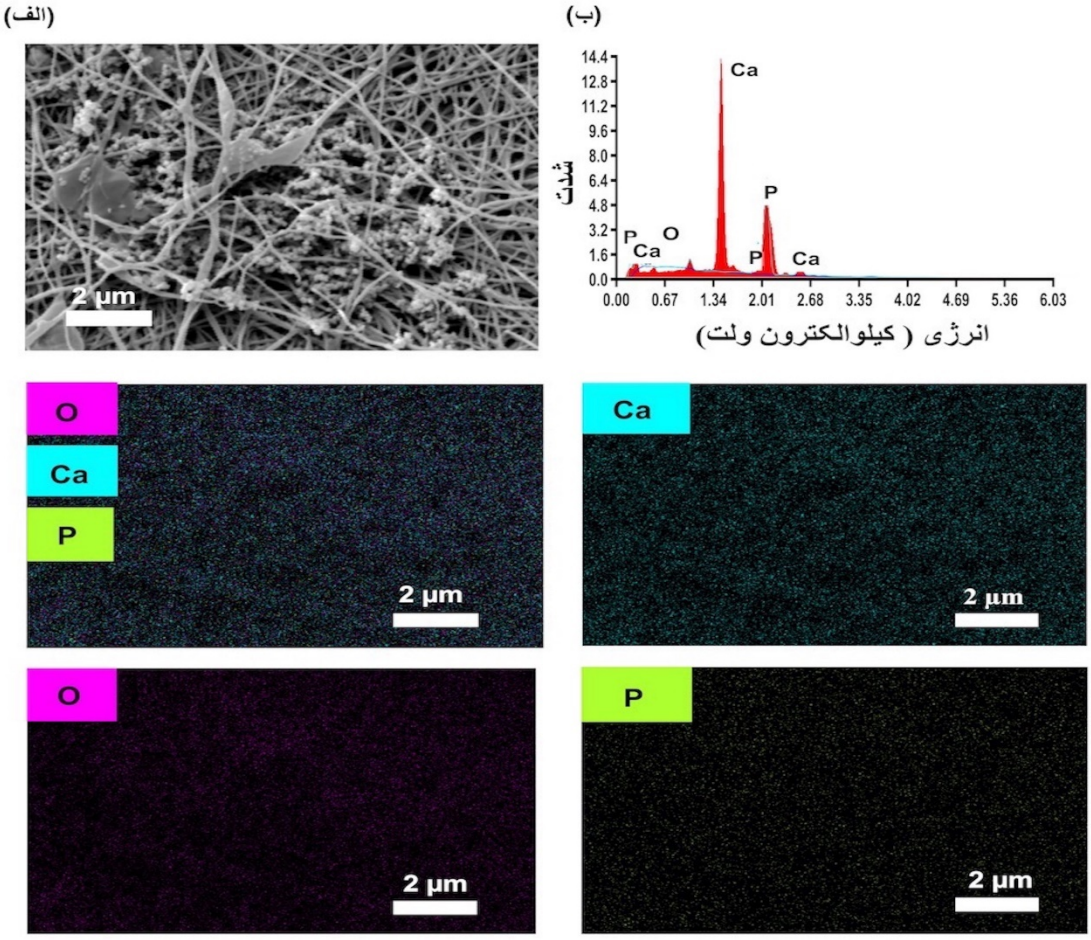
شکل‌گیری لایه آپاتیت شبیه استخوان و ایجاد زیست‌فعالی عالی روی سطح داربست‌های مهندسی بافت، برای ایجاد پیوند مناسب داربست با استخوان، اهمیت ویژه‌ای دارد [٥٦]. در شکل ۳ (الف و ب)، زیست‌فعالی داربست B و C، پس از غوطه‌وری در محلول SBF، در روزهای ۷، ۱٤ و ۲۸ مشاهده می‌شود. شکل‌گیری بلورهای آپاتیت روی سطح داربست C، در مقایسه با داربست B، پس از گذشت ۷، ۱٤ و ۲۸ روز بیشتر است، به‌طوری که لایه‌های آپاتیت سطح داربست حاوی MWCNT-COOH را کاملاً پوشانده است. افزایش زیست‌فعالی داربست C، در مقایسه با داربست B، می‌تواند عاملی برای افزایش خاصیت تحریک استخوان‌زایی و تمایز سلول‌های بنیادی مزانشیمی به سلول‌های استخوانی در داربست C باشد. حضور MWCNT-COOH در داربست C سبب افزایش آب‌دوستی سطح داربست می‌شود که جذب یون‌های کلسیم و فسفات و تشکیل بلورهای آپاتیت روی سطح داربست C را نشان می‌دهد [۳۲].

در شکل ۳(ج)، نتایج به‌دست‌آمده از آزمون ICP-OES در روزهای ۷، ۱٤ و ۲۸ مشاهده می‌شود. جذب کلسیم توسط داربست A در تمام روزها بسیار کم بود و تفاوت معناداری با داربست C داشت. داربست‌های B و C، مقادیر بالاتر کاهش کلسیم در SBF را نشان دادند و مشاهده شد که با گذشت زمان، میزان کاهش غلظت کلسیم در محلول بیشتر می‌شود. داربست حاوی MWCNT-COOH بیشترین جذب کلسیم از محلول SBF را در ۲۸ روز نشان داد و تفاوت معناداری با مقادیر جذب کلسیم در دو داربست B و C داشت.




**شکل ۳.** میکروگراف FESEM سطح داربست غوطه‌ورشده در محلول SBF در روزهای ۷، ۱٤ و ۲۸: الف) داربست B و ب) داربست C و ج) نمودار ICP-OES داربست‌های A، B و C (نتایج آزمون‌ها با سه‌بار تکرار و تحلیل آماری به‌صورت $p < 0.0001$ **** است)

تحلیل نقشه‌ای، توزیع یکنواخت عناصر Ca، P، C و O را روی سطح داربست C نشان می‌دهد (شکل ٤(الف)). در شکل ٤(ب)، آنالیز EDS داربست C و در جدول ۱ درصد وزنی عناصر در سطح داربست C مشاهده می‌شود. درصد وزنی کلسیم (۳٦/۳٦ درصد) و فسفر (۲۲/۱۱ درصد)، تشکیل بلورهای آپاتیت با نسبت استوکیومتری Ca/P=۱/٦٤ روی سطح داربست حاوی MWCNT-COOH را نشان می‌دهند که به نسبت استوکیومتری استخوان (۱/٦۷) بسیار نزدیک است.




**شکل ٤.** الف) میکروگراف تحلیل نقشه‌ای داربست C غوطه‌ورشده در محلول SBF در روز ۲۸ و ب) آنالیز EDS داربست C

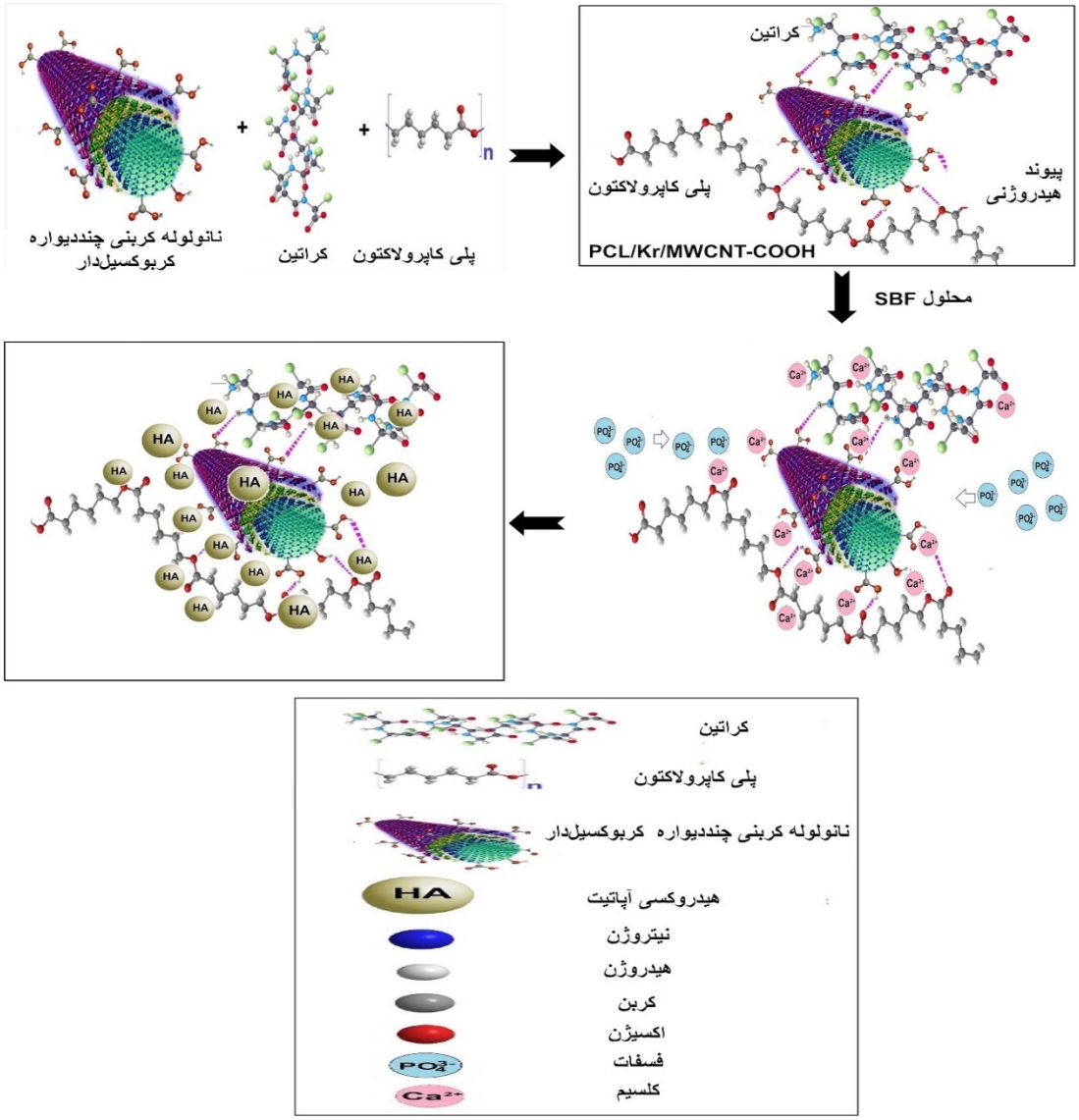
**جدول ۱.** آنالیز EDS و درصد وزنی و جرمی عناصر در سطح داربست C

| عناصر | درصد وزنی | درصد جرمی |
|---|---|---|
| کربن (C K) | ۲۱/۱۸ | ٤۷/۸۸ |
| اکسیژن (O K) | ۲۰/۳۵ | ۱۰/۱۱ |
| فسفر (P K) | ۲۲/۱۱ | ۱۲/۹۵ |
| کلسیم (Ca K) | ۳٦/۳٦ | ۲۹/۰٦ |
| جمع | ۱۰۰ | |

داسیلوا[1] و همکاران [۳۹]، داربست کلاژن/CNT را با روش خشک‌کردن انجمادی، برای بازسازی و ترمیم بافت استخوان تهیه کردند. نتایج پژوهش آن‌ها نشان داد که حضور CNTsباعث افزایش مواد معدنی و هیدروکسی آپاتیت روی سطح داربست‌ها می‌شود.

[1] Da Silva

شکل ۵، طرحواره سازوکار زیست‌فعالی داربست‌ها را در حضور کراتین و MWCNT-COOH نشان می‌دهد. برهم‌کنش شیمیایی بین گروه‌های عاملی کراتین و MWCNT-COOH با کلسیم و فسفر موجود در محلول SBF سبب جذب این یون‌ها روی سطح داربست C می‌شود. گروه‌های اسیدآمینه موجود در کراتین با بار منفی و گروه عاملی کربوکسیلیک در MWCNTs سبب جذب کلسیم با بار مثبت و نهایتاً تشکیل لایه آپاتیت روی سطح داربست می‌شود [٤٦، ۵۷ و ۵۸]. گروه عاملی کربوکسیلیک با جاذبه الکترواستاتیک باعث جذب یون کلسیم و سپس، یون فسفر می‌شود که این واکنش‌ها به جوانه‌زنی رسوبات آپاتیتی و رشد جوانه‌ها روی سطح داربست و پوشش‌دهی کامل سطح می‌انجامند. علاوه بر این، گروه‌های آمین با بار مثبت در کراتین می‌توانند با گروه‌های COOH در MWCNT پیوند یونی برقرار کنند و جذب یون‌های فسفات توسط یون‌های کلسیم و شکل‌گیری سریع آپاتیت را شتاب بیشتری بخشند [۵۵].




**شکل ۵.** طرحواره ساختار مولکولی، زیست‌فعالی و برهم‌کنش شیمیایی داربست C در محلول SBF

### ۳-۳- زیست‌سازگاری و جذب پروتئین

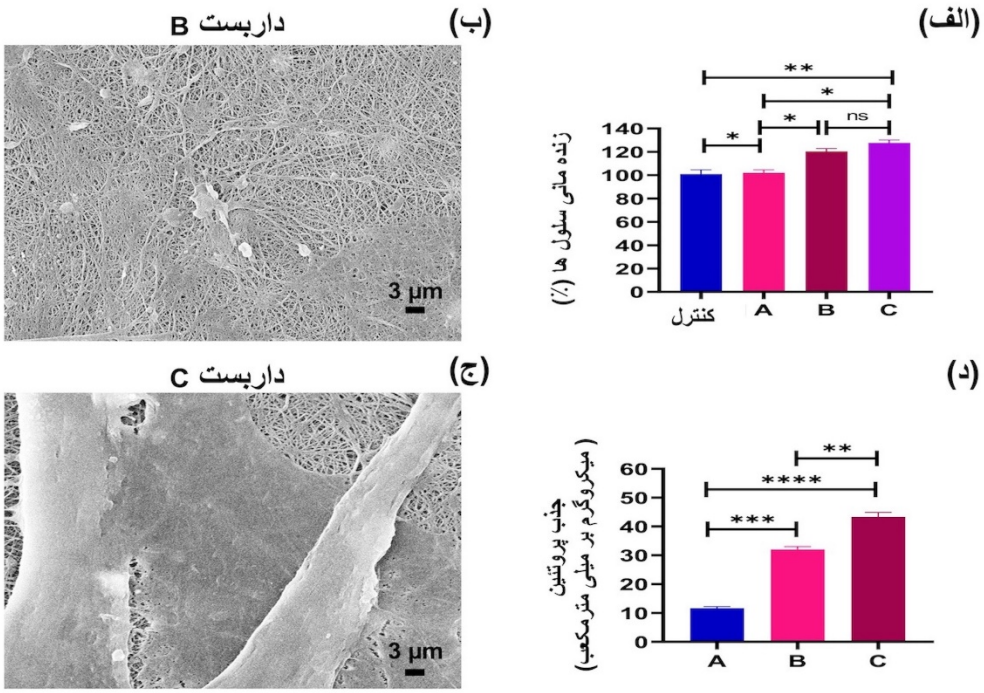
در شکل ٦(الف)، نمودار میزان زنده‌مانی و رشد سلول‌های HMSCs روی سطح داربست‌ها، بعد از سه روز کشت، مشاهده می‌شود. به‌دلیل حضور کراتین، زنده‌مانی سلول‌ها روی سطح داربست A و B، به‌ترتیب، از ۱۰۲ درصد به ۱۱۷ درصد افزایش یافت. در پژوهشی مشابه [٤٦]، حضور کراتین در داربست پلی‌کاپرولاکتون/ کراتین پوشش‌دهی‌شده با کلسیم فسفات، سبب افزایش آب‌دوستی سطح داربست شد که

دلیلی بر افزایش رشد و تکثیر و چسبندگی سلول‌ها روی سطح داربست بود. همچنین، در این پژوهش، گزارش شد که حضور اتصال سلولی LDV روی کراتین، می‌تواند در تحریک اینتگرین α4β1[1] واسطه و رشد و چسبندگی سلول‌ها مؤثر باشد. با افزایش MWCNT-COOH به داربست B، درصد زنده‌مانی سلول‌ها به مقدار ۱۲۳ درصد افزایش یافت که دارای تفاوت معناداری با مقادیر زنده‌مانی سلول‌ها روی سطح داربست‌های A و B بود. در مطالعه‌ای [۵۹]، رشد و تکثیر سلول‌ها روی سطح داربست PLGA /MWCNT ارزیابی شد. پژوهشگران، تشکیل فیلوپدیا[2] و پاهای کاذب سلول روی سطح داربست را به‌دلیل حضور MWCNTs گزارش کردند. سلول‌ها از طریق منافذ MWCNTs در داخل داربست مهاجرت و رشد می‌کنند و توسط پاهای کاذب با سلول‌های اطراف به‌راحتی ارتباط برقرار کرده و یک شبکه سلولی سه‌بعدی با حفظ محیطی شبیه به ساختار ECM را ایجاد می‌کنند [٦۰]. افزایش آب‌دوستی روی سطح داربست C، در مقایسه با داربست B، دلیلی دیگر بر افزایش رشد، تکثیر و چسبندگی سلول‌ها روی سطح داربست C بود. در شکل ٦(ب-ج)، چسبندگی سلول‌های HMSCs روی سطح داربست‌های B و C، بعد از سه روز کشت، مشاهده می‌شود. سلول‌ها روی سطح داربست حاوی MWCNT-COOH گسترده شدند و خوشه‌های سلولی را روی سطح نانوفیبرها تشکیل دادند.

جذب پروتئین‌های چسبنده در سطح داربست‌ها، در رشد و تکثیر سلول‌ها و درنتیجه، در تشکیل بافت جدید استخوانی نقش اساسی دارد. برای ارزیابی میزان جذب پروتئین روی سطح داربست‌ها، محیط کشت گرم‌خانه‌گذاری داربست‌ها بررسی شد. در شکل ٦(د)، میزان پروتئین‌های جذب‌شده روی سطح داربست‌های A، B و C، پس از گرم‌خانه‌گذاری در محیط کامل به‌مدت ٤ ساعت، مشاهده می‌شود. جذب پروتئین‌های ماتریکس خارج سلولی روی سطح داربست‌های A، B و C، به‌ترتیب، ۱۱، ۳۲ و ٤۳ میکروگرم بر میلی‌متر مکعب اندازه‌گیری شد. غلظت پروتئین‌های جذب‌شده روی سطح داربست حاوی MWCNT-COOH، تقریباً ۱/۳ برابر بیشتر از غلظت پروتئین‌های روی سطح داربست B مشاهده شد. داربست C، دارای بالاترین مقدار جذب پروتئین بود که با جذب پروتئین روی سطح داربست‌های A و B تفاوت معناداری داشت. ترکیب شیمیایی و ویژگی‌های سطحی شامل نقشه‌برداری[3] سطح، آب‌دوستی، زبری، تخلخل و اندازه منافذ سطح داربست از جمله پارامترهایی هستند که در میزان جذب پروتئین‌های ماتریکس خارج سلولی روی سطح داربست‌های مهندسی بافت، نقش مهمی را ایفا می‌کنند [٦۱]. بنابراین، حضور MWCNT-COOH در داربست‌های نانوالیاف با افزایش آب‌دوستی، زبری و سطح ویژه داربست C سبب ترشح پروتئین‌های ماتریکس خارج سلولی و افزایش جذب پروتئین‌ها روی سطح داربست می‌شود. در مطالعه‌ای، نایاک[4] و همکاران [٦۲]، فیلم‌های نازک نانولوله‌های کربن اصلاح‌شده با زنجیره‌های مولکولی آب‌دوست پلی‌اتیلن گلیگول را برای کاربرد در مهندسی بافت استخوان ساختند. آن‌ها نشان دادند که ناهمواری سطح نمونه‌های حاوی CNTs، سبب افزایش جذب پروتئین‌ها روی سطح نمونه‌ها می‌شود. همچنین، در این پژوهش، تمایز سریع سلول‌های بنیادی مزانشیمی از سلول‌های استخوانی با بیان پروتئین‌هایی مانند BMP-2 مشاهده شد. کرودر[5] و همکاران [٦۳]، تمایز سلول‌های بنیادی مزانشیمی در داربست چندسازه‌ای پلی‌کاپرولاکتون/ نانولوله‌های کربن را بررسی کردند. در این مطالعه، تأثیر تحریک‌های الکتریکی بر تمایز سلول‌های مزانشیمی و جذب پروتئین‌ها روی سطح داربست بررسی شد. نتایج این پژوهش نشان داد که CNTs، با حفظ محیطی شبیه ساختار ECM، با تحریک و بدون تحریک الکتریکی، سبب افزایش رشد و چسبندگی سلول‌ها، تمایز سلولی و جذب پروتئین‌ها روی سطح داربست می‌شوند.

بنابراین، حضور نانولوله‌های کربن دارای گروه‌های عاملی آب‌دوست در داربست، دلیلی بر افزایش جذب پروتئین روی سطح داربست C در مقایسه با داربست‌های A و B بود. همچنین، داربست C می‌تواند نقطه چسبندگی کانونی در دسترس‌تری را برای گیرنده‌های غشای سلول فراهم کند و باعث ایجاد تعامل بین سلول‌ها و داربست شود.

[1] Integrin Alpha 4 Beta 1
[2] Filopodia
[3] Topography
[4] Nayak
[5] Crowder




**شکل ٦.** الف) نمودار زنده‌مانی سلول‌های HMSCs، پس از سه روز کشت روی نمونه کنترل و داربست‌های A، B و C، ب و ج) تصاویر SEM چسبندگی سلول‌های HMSCs، پس از ۳ روز کشت روی سطح داربست‌های B و C و د) نمودار جذب پروتئین‌های ماتریکس خارج سلولی روی سطح داربست‌های A، B و C (نتایج آزمون‌ها با سه‌بار تکرار و تحلیل آماری به‌صورت $****p < 0.0001$، $***p < 0.001$، $**p < 0.01$، $*p < 0.05$ و ns (ناچیز) است)

### ۳-٤- بررسی تمایز سلول‌های بنیادی HMSCs

سلول‌های بنیادی مزانشیمی از توان تمایز بالایی برخوردارند، به‌طوری که می‌توانند، تحت شرایط مناسب، از انواع مختلفی از سلول‌ها نظیر سلول‌های استخوانی، تمایز یابند [۱٥]. در کشت اولیه، HMSCs، با ظاهری شبیه سلول‌های فیبروبلاست یا دوکی‌شکل با هسته مشخص، رشد و تکثیر می‌یابند (شکل ۷(الف)). سلول‌های بنیادی مزانشیمی، پس از تمایز به سلول‌های استئوبلاست، دچار تغییرات ریخت‌شناسی از قبیل گردشدن سلول و تغییر موقعیت هسته در سیتوپلاسم می‌شوند. علاوه بر آن، در این سلول‌ها، تغییرات بیوشیمیایی شامل افزایش فعالیت آنزیم آلکالین فسفاتاز [٦٤]، افزایش غلظت کلسیم و افزایش سوخت‌وساز[1] سلولی نیز رخ می‌دهد [٦٥]. حضور بیومواد مانند MWCNT-COOH در نانوچندسازه‌ها و داربست ها نیزمی تواند سبب افزایش چسبندگی، زنده‌مانی سلول‌های بنیادی مزانشیمی و تمایز سلول‌های بنیادی گردد [٦۷]. در پژوهش حاضر، تمایز سلول‌های HMSCs به سلول‌های استخوانی روی داربست C، در دو مقطع زمانی ۷ و ١٤، با رنگ‌آمیزی آلیزارین قرمز و رسوب کلسیم بررسی شد.

### ۳-٤-۱- بررسی رنگ‌آمیزی آلیزارین قرمز

آلیزارین قرمز، ترکیبی آلی است که به‌طور اختصاصی ماتریکس معدنی‌شده را در سلول‌ها به رنگ قرمز رنگ‌آمیزی می‌کند، به‌طوری که شدت رنگ‌پذیری بافت با میزان مواد معدنی موجود در ماتریکس آن ارتباط مستقیم دارد. مثبت‌شدن رنگ‌آمیزی آلیزارین قرمز، دلیلی بر تشکیل نودول[2]های کلسیمی در ماتریکس سلول و تمایز سلول‌های مزانشیمی به استئوبلاست است [٦۸ و ٦۹]. رسوبات کلسیم، نشانه معدنی‌شدن در سلول‌های استخوانی است که با استفاده از رنگ آلیزارین قرمز، به رنگ قرمز-نارنجی قابل مشاهده است. در شکل ۷(ب)، تصویر میکروسکوپ نوری رنگ‌آمیزی آلیزارین قرمز روی سطح داربست C، در چهاردهمین روز،

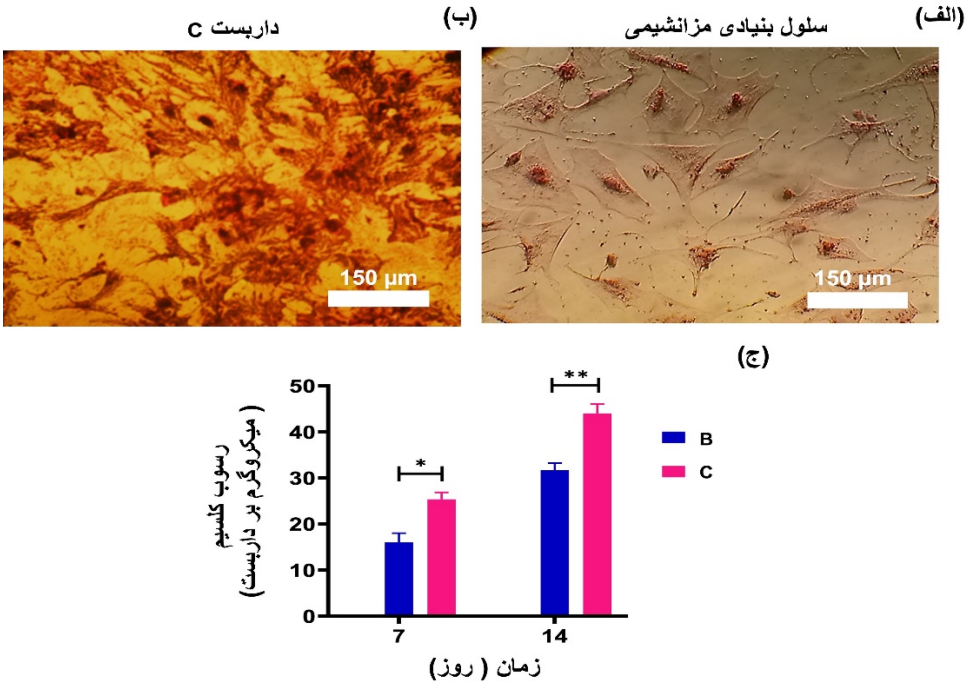
[1] Metabolism

[2] Nodule

مشاهده می‌شود. رنگ قرمز-نارنجی داربست‌ها نشان‌دهنده رسوب کلسیم روی سطح این داربست‌ها بوده و تأییدکننده تمایز HMSCs به سلول‌های استخوانی است. رنگ‌آمیزی در سطح داربست C بیشتر از سطح نمونه کنترل و داربست B مشاهده شد که نشانه افزایش شکل‌گیری نودول‌های کلسیم روی سطح داربست C است. میزان مختلف انباشته‌شدن π-π و ویژگی‌های الکترواستاتیک در MWCNTs بر میزان جذب پروتئین، تکثیر و تمایز سلولی اثرگذار است [۷۰]. CNTs دارای ساختاری مشابه با ساختار پروتئین‌های موجود در ECM هستند. بنابراین، محیطی مناسب برای رشد و تکثیر سلول‌ها و تحریک رسوب مواد معدنی استخوان روی سطح داربست تشکیل می‌دهند [۷۱-۷۳].

### ۳-٤-۲- سنجش میزان رسوب کلسیم

میزان کلسیم رسوب‌یافته روی سطح داربست‌های B و C، در روزهای ۷ و ۱٤، با دستگاه الایزا ریدر اندازه‌گیری شد (شکل ۷ (ج)). میزان کلسیم رسوب‌یافته در داربست‌های B و C، پس از گذشت ۷ روز، به‌ترتیب، ۱۸ میکروگرم بر داربست و۲۷ میکروگرم بر داربست بود که میزان این مقادیر، بعد از ۱٤ روز، به‌ترتیب، به ۳۳ میکروگرم بر داربست و ٤٦ میکروگرم بر داربست افزایش یافت. به‌دلیل حضور MWCNT-COOH، بالاترین میزان ماده معدنی و شکل‌گیری نودول‌های کلسیم در داربست C مشاهده شد که میزان رسوب، با داربست B، تفاوت معناداری داشت. مطابق پژوهش‌های مشابه [٦۳ و ۷٤]، حضور CNTs سبب بیان کلاژن نوع ۱، استئوکلسین و استئونکتین که نشانگرهای تمایز سلول‌های بنیادی به سلول‌های استخوانی هستند، می‌شود. بنابراین، با بررسی نتایج آزمون رسوب کلسیم می‌توان دریافت که داربست C دارای تمایز استئوژنیک سریع سلول‌های HMSCs است و می‌تواند به‌عنوان گزینه مناسبی برای کاربرد در مهندسی بافت استخوان و بازسازی استخوان معرفی شود.




**شکل ۷.** الف) تصویر میکروسکوپی نوری سلول HMSCs ، ب) تصویر میکروسکوپ نوری رنگ‌آمیزی آلیزارین قرمز روی سطح داربست C در روز ۱٤ و ج) میزان کلسیم رسوب‌یافته روی سطح داربست‌های B و C، در روزهای ۷ و ۱٤ (تحلیل آماری برای سه‌بار تکرار آزمون تحلیل آماری به‌صورت $p < 0.05$* و $p < 0.01$** است)

## ٤- نتیجه‌گیری

در این پژوهش، داربست پلی‌کاپرولاکتون/ کراتین تقویت‌شده با MWCNT-COOH به روش الکتروریسی ساخته و تأثیر آن بر میزان تمایز سلول‌های بنیادی HMSCs به سلول‌های استخوانی بررسی شد. حضور MWCNT-COOH در داربست سبب کاهش قطر الیاف و افزایش آب‌دوستی

داربست شد. شکل‌گیری بلورهای آپاتیت روی سطح داربست حاوی MWCNT-COOH، پس از گذشت ۲۸ روز، نشان‌دهنده زیست‌فعالی عالی داربست بود. همچنین، چسبندگی و رشد مطلوب سلول‌های HMSCs روی داربست حاوی MWCNT-COOH، این داربست را به‌عنوان بستری مناسب و زیست‌سازگار در بازسازی استخوان معرفی کرد. حضور MWCNT-COOH در داربست به افزایش جذب پروتئین‌های ECM روی سطح داربست، در مقایسه با داربست پلی‌کاپرولاکتون/ کراتین، منجر شد که می‌تواند نقطه چسبندگی کانونی در دسترس‌تری را برای گیرنده‌های غشای سلول فراهم کند و باعث تعامل بین سلول‌ها و داربست‌ها شود. MWCNT-COOH، به‌واسطه جذب بیشتر پروتئین‌ها، موجب تسریع تمایز استئوژنیک سلول‌های بنیادی مزانشیمی شد. افزایش رسوب کلسیم روی سطح داربست PCL/Kr/MWCNT-COOH ، تمایز سریع HMSCs به سلول‌های استخوانی را نشان داد. بنابراین، یافته‌های پژوهش حاضر نشان می‌دهد که داربست PCL/Kr/MWCNT-COOH، با زیست‌کانی‌سازی، جذب زیاد پروتئین‌های ماتریکس خارج سلولی و تمایز استئوژنیک سریع سلول‌های HMSCs، می‌تواند انتخابی مناسب برای کاربرد در مهندسی بافت استخوان و بازسازی استخوان باشد.

## ۵- سپاسگزاری

نویسندگان از مرکز پژوهش‌های نانو، در دانشگاه صنعتی اصفهان و انستیتو پاستور تهران، تشکر و قدردانی می‌کنند.

## مراجع


1. Cassidy, J. W., "Nanotechnology in the regeneration of complex tissues", ***Bone and Tissue Regeneration Insights***, Vol. 5, (2014), BTRI. S12331. https://doi.org/10.4137/BTRI.S12331
2. Lin, H., Sohn, J., Shen, H., Langhans, M. T., Tuan, R. S., "Bone marrow mesenchymal stem cells: Aging and tissue engineering applications to enhance bone healing", ***Biomaterials***, Vol. 203, (2019), 96-110. https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2018.06.026
3. Kulterer, B., Friedl, G., Jandrositz, A., Sanchez-Cabo, F., Prokesch, A., Paar, C., Scheideler, M., Windhager, R., Preisegger, K. H., Trajanoski, Z., "Gene expression profiling of human mesenchymal stem cells derived from bone marrow during expansion and osteoblast differentiation", ***BMC Genomics***, Vol. 8, No. 1, (2007), 1-15. https://doi.org/10.1186/1471-2164-8-70
4. Li, X., Yu, X., Lin, Q., Deng, C., Shan, Z., Yang, M., Lin, S., "Bone marrow mesenchymal stem cells differentiate into functional cardiac phenotypes by cardiac microenvironment", ***Journal of Molecular and Cellular Cardiology***, Vol. 42, No. 2, (2007), 295-303. https://doi.org/10.1016/j.yjmcc.2006.07.002
5. Zanini, C., Bruno, S., Mandili, G., Baci, D., Cerutti, F., Cenacchi, G., Izzi, L., Camussi, G., Forni, M., "Differentiation of mesenchymal stem cells derived from pancreatic islets and bone marrow into islet-like cell phenotype", ***PloS One***, Vol. 6, No. 12, (2011), e28175. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0028175
6. Madhusoodan, A., Das, K., Mili, B., Kumar, K., Kumar, A., Saxena, A., Singh, P., Dutt, T., Bag, S., "In vitro proliferation and differentiation of canine bone marrow derived mesenchymal stem cells over hydroxyl functionalized CNT substrates", ***Biotechnology Reports***, Vol. 24, (2019), e00387. https://doi.org/10.1016/j.btre.2019.e00387
7. Huňáková, K., Hluchý, M., Špaková, T., Matejová, J., Mudroňová, D., Kuricová, M., Rosocha, J., Ledecký, V., "Study of bilateral elbow joint osteoarthritis treatment using conditioned medium from allogeneic adipose tissue-derived MSCs in Labrador retrievers", ***Research in Veterinary Science***, Vol. 132, (2020), 513-520. https://doi.org/10.1016/j.rvsc.2020.08.004
8. Nantavisai, S., Rodprasert, W., Pathanachai, K., Wikran, P., Kitcharoenthaworn, P., Smithiwong, S., Archasappawat, S., Sawangmake, C., "Simvastatin enhances proliferation and pluripotent gene expression by canine bone marrow-derived mesenchymal stem cells (cBM-MSCs) in vitro", ***Heliyon***, Vol. 5, No. 10, (2019), e02663. https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2019.e02663
9. Shen, C., Li, L., Feng, T., Li, J., Yu, M., Lu, Q., Li, H., "Dental pulp stem cells derived conditioned medium promotes angiogenesis in hindlimb ischemia", ***Tissue Engineering and Regenerative Medicine***, Vol. 12, No. 1, (2015), 59-68. https://doi.org/10.1007/s13770-014-9053-7
10. Kim, J., Ha, C., Rhim, J., Park, Y., Kim, M., Han, W., Lee, K., Lee, L., Park, H., "Different characteristics of MSC isolated from differentiated layers of chorionic membrane & trophoblastic layers of term placenta", ***Cytotherapy***, Vol. 20, No. 5, (2018), S43. https://doi.org/10.1016/j.jcyt.2018.02.109
11. Mueller, S. M., Glowacki, J., "Age-related decline in the osteogenic potential of human bone marrow cells cultured in three-dimensional collagen sponges", ***Journal of Cellular Biochemistry***, Vol. 82, No. 4, (2001), 583-590. https://doi.org/10.1002/jcb.1174
12. Rodríguez, J. P., Montecinos, L., Ríos, S., Reyes, P., Martínez, J., "Mesenchymal stem cells from osteoporotic patients produce a type I collagen-deficient extracellular matrix favoring adipogenic differentiation", ***Journal of Cellular Biochemistry***, Vol. 79, No. 4, (2000), 557-565. https://doi.org/10.1002/1097-4644(20001215)79:4<557::AID-JCB40>3.0.CO;2-H
13. Mao, A. S., Shin, J. W., Mooney, D. J., "Effects of substrate stiffness and cell-cell contact on mesenchymal stem cell differentiation", ***Biomaterials***, Vol. 98, No. (2016), 184-191. https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2016.05.004
14. Toupadakis, C. A., Wong, A., Genetos, D. C., Cheung, W. K., Borjesson, D. L., Ferraro, G. L., Galuppo, L. D., Leach, J. K., Owens, S. D., Yellowley, C. E., "Comparison of the osteogenic potential of equine mesenchymal stem cells from bone marrow, adipose tissue, umbilical cord blood, and umbilical cord tissue", ***American Journal of Veterinary Research***, Vol. 71, No. 10, (2010), 1237-1245. https://doi.org/10.2460/ajvr.71.10.1237
15. Pérez-Castrillo, S., González-Fernández, M., López-González, M., Villar-Suárez, V., "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, (2018), 60-69. https://doi.org/10.1016/j.aanat.2018.07.006
16. Wang, W., Li, G., Wang, J., Song, W., Luo, J., Meng, F., Zhang, Y., "Involvement of Rac1 in the micro/nano-topography sensing and osteogenic differentiation in bone marrow mesenchymal stem cells", ***Materials & Design***, Vol. 157, (2018), 402-411. https://doi.org/10.1016/j.matdes.2018.07.061
17. Sattary, M., Rafienia, M., Kazemi, M., Salehi, H., Mahmoudzadeh, M., "Promoting effect of nano hydroxyapatite and vitamin D3 on the osteogenic differentiation of human adipose-derived stem cells in polycaprolactone/gelatin scaffold

***Materials***, Vol. 25, No. 1, (2018), 259-272. https://doi.org/10.1007/s10934-017-0439-5

33. Liu, Z., Tabakman, S., Welsher, K., Dai, H., "Carbon nanotubes in biology and medicine: In vitro and in vivo detection, imaging and drug delivery", ***Nano Research***, Vol. 2, No. 2, (2009), 85-120. https://doi.org/10.1007/s12274-009-9009-8
34. Bianco, A., Kostarelos, K., Partidos, C. D., Prato, M., "Biomedical applications of functionalised carbon nanotubes", ***Chemical Communications***, Vol. 5, (2005), 571-577. https://doi.org/10.1039/B410943K
35. Harrison, B. S., Atala, A., "Carbon nanotube applications for tissue engineering", ***Biomaterials***, Vol. 28, No. 2, (2007), 344-353. https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2006.07.044
36. Pei, B., Wang, W., Dunne, N., Li, X., "Applications of carbon nanotubes in bone tissue regeneration and engineering: Superiority, concerns, current advancements, and prospects", ***Nanomaterials***, Vol. 9, No. 10, (2019), 1501. https://doi.org/10.3390/nano9101501
37. Liu, Y., Lu, J., Xu, G., Wei, J., Zhang, Z., Li, X., "Tuning the conductivity and inner structure of electrospun fibers to promote cardiomyocyte elongation and synchronous beating", ***Materials Science and Engineering: C***, Vol. 69, (2016), 865-874. https://doi.org/10.1016/j.msec.2016.07.069
38. Hirata, E., Uo, M., Takita, H., Akasaka, T., Watari, F., Yokoyama, A., "Multiwalled carbon nanotube-coating of 3D collagen scaffolds for bone tissue engineering", ***Carbon***, Vol. 49, No. 10, (2011), 3284-3291. https://doi.org/10.1016/j.carbon.2011.04.002
39. Da Silva, E. E., Della Colleta, H. H., Ferlauto, A. S., Moreira, R. L., Resende, R. R., Oliveira, S., Kitten, G. T., Lacerda, R. G., Ladeira, L. O., "Nanostructured 3-D collagen/nanotube biocomposites for future bone regeneration scaffolds", ***Nano Research***, Vol. 2, No. 6, (2009), 462-473. https://doi.org/10.1007/s12274-009-9042-7
40. Oyefusi, A., Olanipekun, O., Neelgund, G. M., Peterson, D., Stone, J. M., Williams, E., Carson, L., Regisford, G., Oki, A., "Hydroxyapatite grafted carbon nanotubes and graphene nanosheets: Promising bone implant materials", ***Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy***, Vol. 132, (2014), 410-416. https://doi.org/10.1016/j.saa.2014.04.004
41. Rouse, J. G., Van Dyke, M. E., "A review of keratin-based biomaterials for biomedical applications", ***Materials***, Vol. 3, No. 2, (2010), 999-1014. https://doi.org/10.3390/ma3020999
42. Kakkar, P., Verma, S., Manjubala, I., Madhan, B., "Development of keratin–chitosan–gelatin composite scaffold for soft tissue engineering", ***Materials Science and Engineering: C***, Vol. 45, No. (2014), 343-347. https://doi.org/10.1016/j.msec.2014.09.021
43. Li, Y., Wang, Y., Ye, J., Yuan, J., Xiao, Y., "Fabrication of poly (ε-caprolactone)/keratin nanofibrous mats as a potential scaffold for vascular tissue engineering", ***Materials Science and Engineering: C***, Vol. 68, (2016), 177-183. https://doi.org/10.1016/j.msec.2016.05.117
44. Mahmoodi, M., Kalantari, M., Mirhaj, M., "Effect of hydroxyapatite nanoparticles on differentiotion of mesenchymal stem cells into bone cells in polycaprolacton/keratin/hydroxyapatite scaffolds", ***Advanced Processes in Materials Engineering***, Vol. 14, No. 1, (2020), 55-71, (In Farsi). http://ma.iaumajlesi.ac.ir/article_667332_3b42ffbddf042f62e9589ad5dd795554.pdf?lang=en
45. Samanta, A., Takkar, S., Kulshreshtha, R., Nandan, B., Srivastava, R. K., "Hydroxyapatite stabilized pickering emulsions of poly (ε-caprolactone) and their composite electrospun scaffolds", ***Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects***, Vol. 533, (2017), 224-230. https://doi.org/10.1016/j.colsurfa.2017.09.001
46. Zhao, X., Lui, Y. S., Choo, C. K. C., Sow, W. T., Huang, C. L., Ng, K. W., Tan, L. P., Loo, J. S. C., "Calcium phosphate coated keratin–PCL scaffolds for potential bone tissue regeneration", ***Materials Science and Engineering: C***, Vol. 49, (2015), 746-753. https://doi.org/10.1016/j.msec.2015.01.084
47. Kim, H. M., Kishimoto, K., Miyaji, F., Kokubo, T., Yao, T., Suetsugu, Y., Tanaka, J., Nakamura, T., "Composition and structure of the apatite formed on PET substrates in SBF modified with various ionic activity products", ***Journal of Biomedical***

for bone tissue engineering", ***Materials Science and Engineering: C***, Vol. 97, (2019), 141-155. https://doi.org/10.1016/j.msec.2018.12.030

18. Lu, Y., Huang, J., Yu, G., Cardenas, R., Wei, S., Wujcik, E. K., Guo, Z., "Coaxial electrospun fibers: Applications in drug delivery and tissue engineering", ***Wiley Interdisciplinary Reviews: Nanomedicine and Nanobiotechnology***, Vol. 8, No. 5, (2016), 654-677. https://doi.org/10.1002/wnan.1391
19. Hosseini, S., Naderi-Manesh, H., Vali, H., Eslaminejad, M. B., Sayahpour, F. A., Sheibani, S., Faghihi, S., "Contribution of osteocalcin-mimetic peptide enhances osteogenic activity and extracellular matrix mineralization of human osteoblast-like cells", ***Colloids and Surfaces B: Biointerfaces***, Vol. 173, No. (2019), 662-671. https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2018.10.035
20. Subia, B., Kundu, J., Kundu, S., "Biomaterial scaffold fabrication techniques for potential tissue engineering applications", ***Tissue Engineering***, Intech Publisher, Chapter 7, 141, (2010). https://doi.org/ 10.5772/8581
21. De-Paula, M. M. M., Afewerki, S., Viana, B. C., Webster, T. J., Lobo, A. O., Marciano, F. R., "Dual effective core-shell electrospun scaffolds: Promoting osteoblast maturation and reducing bacteria activity", ***Materials Science and Engineering: C***, Vol. 103, (2019), 109778. https://doi.org/10.1016/j.msec.2019.109778
22. Rajzer, I., Rom, M., Menaszek, E., Pasierb, P., "Conductive PANI patterns on electrospun PCL/gelatin scaffolds modified with bioactive particles for bone tissue engineering", ***Materials Letters***, Vol. 138, (2015), 60-63. https://doi.org/10.1016/j.matlet.2014.09.077
23. Yan, Y., Chen, H., Zhang, H., Guo, C., Yang, K., Chen, K., Cheng, R., Qian, N., Sandler, N., Zhang, Y. S., "Vascularized 3D printed scaffolds for promoting bone regeneration", ***Biomaterials***, Vol. 190, (2019), 97-110. https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2018.10.033
24. Martina, M., Hutmacher, D. W., "Biodegradable polymers applied in tissue engineering research: A review", ***Polymer International***, Vol. 56, No. 2, (2007), 145-157. https://doi.org/10.1002/pi.2108
25. Mahdieh, Z. M., Mottaghitalab, V., Piri, N., Haghi, A. K., "Conductive chitosan/multi walled carbon nanotubes electrospun nanofiber feasibility", ***Korean Journal of Chemical Engineering***, Vol. 29, No. 1, (2012), 111-119. https://doi.org/10.1007/s11814-011-0129-y
26. Heikkilä, P., Harlin, A., "Electrospinning of polyacrylonitrile (PAN) solution: Effect of conductive additive and filler on the process", ***Express Polymer Letters***, Vol. 3, No. 7, (2009), 437-445. https://doi.org/10.3144/expresspolymlett.2009.53
27. Kim, T. H., Lee, T., El-Said, W. A., Choi, J. W., "Graphene-based materials for stem cell applications", ***Materials***, Vol. 8, No. 12, (2015), 8674-8690. https://doi.org/10.3390/ma8125481
28. Kumar, S., Chatterjee, K., "Comprehensive review on the use of graphene-based substrates for regenerative medicine and biomedical devices", ***ACS Applied Materials & Interfaces***, Vol. 8, No. 40, (2016), 26431-26457. https://doi.org/10.1021/acsami.6b09801
29. Tohidlou, M. H., Shafiei, S. S., Shiralipoor, F., "Preparation and evaluation of polycaprolactone/amine functionalized carbon nanotube electrospun nanocomposite scaffold containing mesenchymal stem cells for use in hard tissue engineering", ***Journal of Advanced Materials and Technologies***, Vol. 8, No. 4, (2020), 19-30. (In Farsi).https://doi.org/10.30501/jamt.2020.93226
30. Afzali, A., Mottagitalab, V., Afghahi, S. S., Jafarian, M., "The coating of composite nanoparticles of bafe12o19/MWCNT using silicon over nowowen substrtae for radar absorption in X and Ku band", ***Journal of Advanced Materials and Technologies (JAMT)***, Vol. 8, No. 4, (2020), 67-77 (In Farsi). https:/doi.org/10.30501/jamt.2020.104247
31. Singh, G., Gangacharyulu, D., Thakur, M., "An experimental study on thermophysical properties of multiwalled carbon nanotubes ", ***International Journal of Engineering***, Vol. 30, No. 8, (2017), 1223-1230. https:/doi.org/10.5829/ije.2017.30.08b.15
32. Zarei, M., Karbasi, S., "Evaluation of the effects of multiwalled carbon nanotubes on electrospun poly (3-hydroxybutirate) scaffold for tissue engineering applications", ***Journal of Porous***

48. Tavakoli, M., Karbasi, S., Soleymani Eil Bakhtiari, S., "Evaluation of physical, mechanical, and biodegradation of chitosan/graphene oxide composite as bone substitutes", ***Polymer-Plastics Technology and Materials***, Vol. 59, No. 4, (2020), 430-440. https://doi.org/10.1080/25740881.2019.1653467
49. Shafiei, S. S., Shavandi, M., Ahangari, G., Shokrolahi, F., "Electrospun layered double hydroxide/poly (ε-caprolactone) nanocomposite scaffolds for adipogenic differentiation of adipose-derived mesenchymal stem cells", ***Applied Clay Science***, Vol. 127, (2016), 52-63. https://doi.org/10.1016/j.clay.2016.04.004
50. Norouz, F., Halabian, R., Salimi, A., Ghollasi, M., "A new nanocomposite scaffold based on polyurethane and clay nanoplates for osteogenic differentiation of human mesenchymal stem cells in vitro", ***Materials Science and Engineering: C***, Vol. 103, (2019), 109857. https://doi.org/10.1016/j.msec.2019.109857
51. Esparza, Y., Ullah, A., Boluk, Y., Wu, J., "Preparation and characterization of thermally crosslinked poly (vinyl alcohol)/feather keratin nanofiber scaffolds", ***Materials & Design***, Vol. 133, (2017), 1-9. https://doi.org/10.1016/j.matdes.2017.07.052
52. Shokrgozar, M. A., Mottaghitalab, F., Mottaghitalab, V., Farokhi, M., "Fabrication of porous chitosan/poly (vinyl alcohol) reinforced single-walled carbon nanotube nanocomposites for neural tissue engineering", ***Journal of Biomedical Nanotechnology***, Vol. 7, No. 2, (2011), 276-284. https://doi.org/10.1166/jbn.2011.1284
53. Salimbeygi, G., Nasouri, K., Shoushtari, A. M., Malek, R., Mazaheri, F., "Fabrication of polyvinyl alcohol/multi-walled carbon nanotubes composite electrospun nanofibres and their application as microwave absorbing material", ***Micro & Nano Letters***, Vol. 8, No. 8, (2013), 455-459. https://doi.org/10.1049/mnl.2013.0381
54. Munz, M., Giusca, C. E., Myers-Ward, R. L., Gaskill, D. K., Kazakova, O., "Thickness-dependent hydrophobicity of epitaxial graphene", ***Acs Nano***, Vol. 9, No. 8, (2015), 8401-8411. https://doi.org/10.1021/acsnano.5b03220
55. Soleymani Eil Bakhtiari, S., Karbasi, S., Hassanzadeh Tabrizi, S. A., Ebrahimi-Kahrizsangi, R., Salehi, H., "Evaluation of the effects of chitosan/multiwalled carbon nanotubes composite on physical, mechanical and biological properties of polymethyl methacrylate-based bone cements", ***Materials Technology***, Vol. 35, No. 5, (2020), 267-280. https://doi.org/10.1080/10667857.2019.1678086
56. Wu, X., Walsh, K., Hoff, B. L., Camci-Unal, G., "Mineralization of biomaterials for bone tissue engineering", ***Bioengineering***, Vol. 7, No. 4, (2020), 132. https://doi.org/10.3390/bioengineering7040132
57. Guo, T., Yang, X., Deng, J., Zhu, L., Wang, B., Hao, S., "Keratin nanoparticles-coating electrospun PVA nanofibers for potential neural tissue applications", ***Journal of Materials Science: Materials in Medicine***, Vol. 30, No. 1, (2019), 9. https://doi.org/10.1007/s10856-018-6207-5
58. Atieh, M. A., Bakather, O. Y., Al-Tawbini, B., Bukhari, A. A., Abuilaiwi, F. A., Fettouhi, M. B., "Effect of carboxylic functional group functionalized on carbon nanotubes surface on the removal of lead from water", ***Bioinorganic Chemistry and Applications***, Vol. 2010, (2010). https://doi.org/10.1155/2010/603978
59. Zhang, H., "Electrospun poly (lactic-co-glycolic acid)/multiwalled carbon nanotubes composite scaffolds for guided bone tissue regeneration", ***Journal of Bioactive and Compatible Polymers***, Vol. 26, No. 4, (2011), 347-362. https://doi.org/10.1177/0883911511413450
60. Crowder, S. W., Liang, Y., Rath, R., Park, A. M., Maltais, S., Pintauro, P. N., Hofmeister, W., Lim, C. C., Wang, X., Sung, H. J., "Poly (ε-caprolactone)–carbon nanotube composite scaffolds for enhanced cardiac differentiation of human mesenchymal stem cells", ***Nanomedicine***, Vol. 8, No. 11, (2013), 1763-1776. https://doi.org/10.2217/nnm.12.204
61. Raucci, M., Alvarez-Perez, M., Giugliano, D., Zeppetelli, S., Ambrosio, L., "Properties of carbon nanotube-dispersed Sr-hydroxyapatite injectable material for bone defects", ***Materials Research***, Vol. 46, No. 2, (1999), 228-235. https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-4636(199908)46:2<228::AID-JBM12>3.0.CO;2-J
62. Nayak, T. R., Jian, L., Phua, L. C., Ho, H. K., Ren, Y., Pastorin, G., "Thin films of functionalized multiwalled carbon nanotubes as suitable scaffold materials for stem cells proliferation and bone formation", ***ACS Nano***, Vol. 4, No. 12, (2010), 7717-7725. https://doi.org/10.1021/nn102738c
63. Crowder, S. W., Liang, Y., Rath, R., Park, A. M., Maltais, S., Pintauro, P. N., Hofmeister, W., Lim, C. C., Wang, X., Sung, H. J., "Poly (ε-caprolactone)-carbon nanotube composite scaffolds for enhanced cardiac differentiation of human mesenchymal stem cells", ***Nanomedicine***, Vol. 8, No. 11, (2013), 1763-1776. https://doi.org/10.2217/nnm.12.204
64. Ino, K., Onodera, T., Kanno, Y., Suda, A., Kunikata, R., Matsue, T., Shiku, H., "Electrochemicolor imaging of endogenous alkaline phosphatase and respiratory activities of mesenchymal stem cell aggregates in early-stage osteodifferentiation", ***Electrochimica Acta***, Vol. 268, (2018), 554-561. https://doi.org/10.1016/j.electacta.2018.02.094
65. Jaroszewicz, J., Idaszek, J., Choinska, E., Szlazak, K., Hyc, A., Osiecka-Iwan, A., Swieszkowski, W., Moskalewski, S., "Formation of calcium phosphate coatings within polycaprolactone scaffolds by simple, alkaline phosphatase based method", ***Materials Science and Engineering: C***, Vol. 96, (2019), 319-328. https://doi.org/10.1016/j.msec.2018.11.027
66. Liu, Z., Tang, Y., Kang, T., Rao, M., Li, K., Wang, Q., Quan, C., Zhang, C., Jiang, Q., Shen, H., "Synergistic effect of HA and BMP-2 mimicking peptide on the bioactivity of HA/PMMA bone cement", ***Colloids and Surfaces B: Biointerfaces***, Vol. 131, No. (2015), 39-46. https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2015.04.032
67. Lin, C., Wang, Y., Lai, Y., Yang, W., Jiao, F., Zhang, H., Ye, S., Zhang, Q., "Incorporation of carboxylation multiwalled carbon nanotubes into biodegradable poly (lactic-co-glycolic acid) for bone tissue engineering", ***Colloids and Surfaces B: Biointerfaces***, Vol. 83, No. 2, (2011), 367-375. https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2010.12.011
68. Gregory, C. A., Gunn, W. G., Peister, A., Prockop, D. J., "An Alizarin red-based assay of mineralization by adherent cells in culture: Comparison with cetylpyridinium chloride extraction", ***Analytical Biochemistry***, Vol. 329, No. 1, (2004), 77-84. https://doi.org/10.1016/j.ab.2004.02.002
69. Zamini, A., Ragerdi, K. I., Barbarestani, M., Hedayatpour, A., Mahmoudi, R., Vardasbi, S., Shokrgozar, M. A., "Effects of melatonin on the proliferation and differentiation of rat adipose-derived stem cells", ***Indian Journal of Plastic Surgery,*** Vol. 41, No. 1, (2008), 8-14. https://doi.org/10.4103/0970-0358.41104
70. Lee, W. C., Lim, C. H. Y., Shi, H., Tang, L. A., Wang, Y., Lim, C. T., Loh, K. P., "Origin of enhanced stem cell growth and differentiation on graphene and graphene oxide", ***ACS Nano***, Vol. 5, No. 9, (2011), 7334-7341. https://doi.org/10.1021/nn202190c
71. Mccullen, S. D., Stevens, D. R., Roberts, W. A., Clarke, L. I., Bernacki, S. H., Gorga, R. E., Loboa, E. G., "Characterization of electrospun nanocomposite scaffolds and biocompatibility with adipose-derived human mesenchymal stem cells", ***International Journal of Nanomedicine***, Vol. 2, No. 2, (2007), 253. PMCID: PMC2673972, https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2673972/
72. Zhang, H., Chen, Z., "Fabrication and characterization of electrospun PLGA/MWNTs/hydroxyapatite biocomposite scaffolds for bone tissue engineering", ***Journal of Bioactive and Compatible Polymers***, Vol. 25, No. 3, (2010), 241-259. https://doi.org/10.1177/0883911509359486
73. Meng, J., Song, L., Meng, J., Kong, H., Zhu, G., Wang, C., Xu, L., Xie, S., Xu, H., "Using single-walled carbon nanotubes nonwoven films as scaffolds to enhance long-term cell proliferation in vitro", ***Journal of Biomedical Materials Research Part A***, Vol. 79, No. 2, (2006), 298-306. https://doi.org/10.1002/jbm.a.30787
74. Shi, X., Sitharaman, B., Pham, Q. P., Liang, F., Wu, K., Billups, W. E., Wilson, L. J., Mikos, A. G., "Fabrication of porous ultra-short single-walled carbon nanotube nanocomposite scaffolds for bone tissue engineering", ***Biomaterials***, Vol. 28, No. 28, (2007), 4078-4090. https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2007.05.033