



# Injectable Thermosensitive Hydrogel (Chitosan/Gelatin/ $\beta$ -Glycerol Phosphate) Reinforced with Polyaniline/Carboxylated Carbon Nanotube/Gelatin Containing Stem Cells for Cardiac Tissue Engineering

Maryam Kazemi <sup>1</sup>, Faraz Chogan <sup>1</sup>, Ali Hossein Rezayan <sup>1,2\*</sup>, Rouhollah Mehdivavaz Aghdam <sup>3</sup>, Seyed Hossein Ahmadi Tafti <sup>4</sup>

<sup>1</sup> M. Sc Student., Department of Life Science Engineering, Faculty of New Sciences and Technologies, University of Tehran, Tehran, Tehran, Iran

<sup>2</sup> Associate Professor, Department of Life Science Engineering, Faculty of New Sciences and Technologies, University of Tehran, Tehran, Tehran, Iran

<sup>3</sup> Assistant Professor, School of Metallurgy and Materials Engineering, University of Tehran, Tehran, Tehran, Iran

<sup>4</sup> Professor, Tehran Heart Center, Tehran University of Medical Science, Tehran, Tehran, Iran

\*Corresponding Author's Email: [ahrezayan@ut.ac.ir](mailto:ahrezayan@ut.ac.ir) (A. H. Rezayan)

## Paper History:

Received: 2022-01-12

Revised in revised form: 2022-04-24

Scientific Accepted: 2023-01-29

## Keywords:

Chitosan/Gelatin,  
PAni/c-MWNT,  
Thermosensitive Conductive  
Hydrogels,  
Cardiac Tissue Engineering

**Abstract** Injectable hydrogels that mimic heart tissues can be considered a promising perspective towards the future developments of cardiac tissue engineering. This study aims to fabricate an injectable, thermosensitive hydrogel consisting of chitosan/gelatin/glycerol phosphate. Due to their unique electro-conductivity characteristic, hydrogels can provide a suitable environment to accelerate cardiac cell proliferation. Polyaniline/multi-walled carboxylated carbon nanotube (PAni/c-MWNT) was prepared using Sodium Dodecyl Sulfate (SDS) emulsion. To prevent the interaction between the PAni/c-MWNT nanocomposite and hydrogel, the nanocomposite was coated with gelatin to form polyaniline/carboxylated carbon nanotube/gelatin (PAni/c-MWNT/G). The PAni/c-MWNT/G nanocomposite was then dispersed to provide electrical signals throughout the hydrogel. The gelation time, gel temperature, and mechanical properties of the hydrogel were measured using a rheometer. FTIR spectroscopy results revealed that the interaction between the aniline and c-MWNT/G could change the position of the quinone and benzene peaks. The conductivity of hydrogel-containing nanocomposite was found to be higher than that of c-MWNT and PAni. Scanning Electron Microscopy (SEM) confirmed the uniform distribution of PAni/c-MWNT/G nanocomposite throughout the hydrogel. The degradation rate of conductive hydrogel is lower than that of pure hydrogel. The MTT assay test showed the biocompatibility of the cell-hydrogel. Finally, Mesenchymal Stem Cells (MSCs) were cultured in the hydrogels for 14 days. Cell adhesion, cell viability, and proliferation were also examined. This study utilized PAni/c-MWNT/G, for the first time, to enhance the electro-conductivity of chitosan/gelatin/glycerol phosphate hydrogel. This conductive thermosensitive injectable hydrogel can be used to regenerate cardiac tissue and other electroactive tissues.



<https://doi.org/10.30501/jamt.2023.311513.1199>

URL: [https://www.jamt.ir/article\\_166486.html](https://www.jamt.ir/article_166486.html)

## 1. INTRODUCTION

Tissue engineering is an emerging topic in medical engineering that has shown great promise to develop biological substitutes for damaged tissues, implants, and prostheses. Biomaterials play an important role in tissue engineering. For instance, polymeric scaffolds have attracted much attention due to their unique properties including high surface-to-volume ratio, high porosity with very small pore size, biodegradability, and suitable mechanical properties [1, 2]. One of the most important challenges in preparing a scaffold for heart regeneration is ensuring its ability to transmit electrical pulses between heart cells. A variety of methods have been investigated so far to produce a steerable scaffold. In research, scaffolds based on chitosan, fibrin, and polycaprolactone are usually used for heart reconstruction [2, 3]. Polyaniline is a conductive polymer that is generally characterized by three structures. Formation of nanocomposite materials by mixing carbon nanotubes

with a polymer matrix is a suitable method for enhancing the properties of these materials [4, 5]. The present study investigated the design, fabrication, and evaluation of the injectable polymer scaffolds containing mesenchymal cells optimized with nanocomposites to increase their conductivity.

## 2. MATERIALS AND METHODS

In this study, first, carboxylated Multi-Walled Nanotubes (MWNTs) were prepared based on the instructions given in the previous research. Then, polyaniline-carboxylated carbon nanotube nanocomposite was prepared through the emulsion method. In addition, SDS was used as an emulsifier/doped agent and followed by adding ammonium persulfate to the mixture, the polymerization reaction started. Chitosan/gelatin and beta-glycerol phosphate gel were prepared in the next step. Subsequently, PAni/c-MWNT nanocomposite was

Please cite this article as: Kazemi, M., Chogan, F., Rezayan, A. H., Mehdivavaz Aghdam, R., Ahmadi Tafti, S. H., "Injectable thermosensitive hydrogel (chitosan/gelatin/ $\beta$ -glycerol phosphate) reinforced with polyaniline/carboxylated carbon nanotube/gelatin containing stem cells for cardiac tissue engineering", *Journal of Advanced Materials and Technologies (JAMT)*, Vol. 11, No. 2, (2022), 71-87. (<https://doi.org/10.30501/jamt.2023.311513.1199>).



added to chitosan/gelatin gel, and the final product was prepared [6-8]. Finally, FTIR, sample electrical conductivity, rheological properties, morphology, water absorption, hydrogel degradability, cell viability, and cell adhesion were investigated to evaluate the composite structure and properties.

### 3. RESULTS AND DISCUSSION

Since the gelation process in hydrogel depends on the interaction between the glycerol phosphate salt and protonated chitosan, salt concentration was investigated as one of the effective factors in this process. The results indicated that upon increasing the salt concentration, the solution pH would increase while the gelation time would decrease. A solution of 2.5 % (w/v) of chitosan, 0.8 % (w/v) of gelatin, and 7 % (w/v) of glycerol phosphate was prepared, considering the gelling time (3 minutes) and an acceptable cost of this system for injection in the desired place. FTIR spectral analysis confirmed the interaction between polyaniline and carbon nanotubes that ultimately increased the electrical conductivity in PANi/c-MWNT [9]. The conductivity of the nanocomposite was 65-70 % higher than that of polyaniline, thus having a significantly increased conductivity compared to the carbon nanotube. To date, no study has utilized PANi/c-MWNT/G nanocomposite as a material for scaffold conductivity and as a conductive material in chitosan/gelatin/glycerol phosphate injection gel for making conductive scaffold and application in cardiac pacemaker area. According to the results from different research studies, the value of internal longitudinal and transverse cell conductivity was in the range of 0.36-0.6 S/cm, and that of longitudinal and transverse external conductivity of the cell in the range of 0.24-0.62 S/cm [10]. Fabrication of scaffold with the weight percentage of 7 % by bringing the conductivity value close to 0.7 S/cm provided the conditions for the growth and regeneration of the heart cells. Examination of the rheological properties of the samples showed that after placing the sample in the rheometer and raising the temperature, it would be gelled at 32 °C. The gelatin in this gel intensifies the hydrogen bonds between the chains, helps the chitosan chains come closer to each other, and ultimately leads to the gel formation. Analysis of nanocomposite distribution by SEM confirms that nanotubes are well distributed throughout the scaffold. The observations also showed the porous structure of the scaffold with interconnected holes. The study of hydrogel degradation showed that the degradation rate of the pure scaffold was faster than that of the conductive scaffold. While 60 % of the hydrogel had been destroyed after four weeks, the conductive scaffold had a lower degradability rate, i.e., only 25 % weight reduction. The results from the scaffold water absorption capacity showed that the water absorption rate was quite fast in the first 20 minutes. However, after that time, the rate of water absorption capacity decreased. The biocompatibility of chitosan/gelatin hydrogel has been proven in other reports using different cell lines. This study investigated the biocompatibility of chitosan/gelatin scaffold containing PANi/c-MWNT/G nanocomposite on HUVEC cells (NCBI C554). In this study, as in previous

studies, no significant difference was found between the viability of cells in the sample and control groups. The adhesion test results confirmed that the system supports adhesion, proliferation, and cell growth. The results showed that the cells were well placed on the scaffold that ensured their proper adhesion and morphology with the control condition.

### 4. CONCLUSION

In this research, an injectable temperature-sensitive hydrogel composed of chitosan and gelatin was combined with PANi/c-MWNT/G nanocomposite and investigated to be applied in the cardiac pacemaker fields. In addition to the electrical conductivity, both gelation time and structural analysis were investigated. According to the results from the PANi/c-MWNT nanocomposite investigation, this nanocomposite, as a generator of conductive electrical currents, can create a new path for use in the field of heart tissue.

### 5. ACKNOWLEDGEMENT

This study was a master's thesis. All the people related to this work in University of Tehran are thanked and appreciated.

### REFERENCES

- Peng, Z., Shen, Y., "Study on biological safety of polyvinyl alcohol/collagen hydrogel as tissue substitute (I)", *Polymer-Plastics Technology and Engineering*, Vol. 50, No. 3, (2011), 245-250. <https://doi.org/10.1080/03602559.2010.531438>
- Meyer, U., Handschel, J., Wiesmann, H. P., Meyer, T. eds., *Fundamentals of Tissue Engineering and Regenerative Medicine*, Vol. 1, Springer Berlin, Heidelberg, (2009). <https://doi.org/10.1007/978-3-540-77755-7>
- Spinks, G. M., Shin, S. R., Wallace, G. G., Whitten, P. G., Kim, I. Y., Kim, S. I., Kim, S. J., "A novel "dual mode" actuation in chitosan/polyaniline/carbon nanotube fibers", *Sensors and Actuators, B: Chemical*, Vol. 121, No. 2, (2007), 616-621. <https://doi.org/10.1016/j.snb.2006.04.103>
- Jiang, Q., Fu, G., Xie, D., Jiang, S., Chen, Z., Huang, B., Zhao, Y., "Preparation of carbon nanotube/polyaniline nanofiber by electrospinning", *Procedia Engineering*, Vol. 27, (2012), 72-76. <https://doi.org/10.1016/j.proeng.2011.12.426>
- Ding, L., Li, Q., Zhou, D., Cui, H., An, H., Zhai, J., "Modification of glassy carbon electrode with polyaniline/multi-walled carbon nanotubes composite: Application to electro-reduction of bromate", *Journal of Electroanalytical Chemistry*, Vol. 668, (2012), 44-50. <https://doi.org/10.1016/j.jelechem.2011.12.018>
- Cheng, Y. -H., Yang, S. H., Su, W. Y., Chen, Y. C., Yang, K. C., Cheng, W. T. K., Wu, S. C., Lin, F. H., "Thermosensitive chitosan-gelatin-glycerol phosphate hydrogels as a cell carrier for nucleus pulposus regeneration: An in vitro study", *Tissue Engineering Part A*, Vol. 16, No. 2, (2010), 695-703. <https://doi.org/10.1089/ten.tea.2009.0229>
- Cheng, Y. H., Yang, S. H., Lin, F. H., "Thermosensitive chitosan-gelatin-glycerol phosphate hydrogel as a controlled release system of ferulic acid for nucleus pulposus regeneration", *Biomaterials*, Vol. 32, No. 29, (2011), 6953-6961. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2011.03.065>
- Yang, K. C., Wu, C. C., Cheng, Y. H., Kuo, T. F., Lin, F. H., "Chitosan/gelatin hydrogel prolonged the function of insulinoma/agarose microspheres in vivo during xenogenic transplantation. in transplantation proceedings", *Elsevier*, Vol. 40, No. 10, (2008), 3623-3626. <https://doi.org/10.1016/j.transproceed.2008.06.092>
- Oroojalian, F., Jahanafrooz, Z., Chogan, F., Rezayan, A. H., Malekzade, E., Rezaei, S. J. T., Nabid, M. R., Sahebkar, A., "Synthesis and evaluation of injectable thermosensitive pentablock copolymer hydrogel (PNIPAAm-PCL-PEG-PCL-PNIPAAm) and star-shaped poly (CL- CO- LA)-b-PEG for

- 
- wound healing applications", *Journal of Cellular Biochemistry*, Vol. 120, No. 10, (2019), 17194-17207. <https://doi.org/10.1002/jcb.28980>
10. Chogan, F., Mirmajidi, T., Rezayan, A. H., Sharifi, A. M., Ghahary, A., Nourmohammadi, J., Kamali, A., Rahaie, M., "Design, fabrication, and optimization of a dual function three-layer scaffold for controlled release of metformin hydrochloride to alleviate fibrosis and accelerate wound healing", *Acta Biomaterialia*, Vol. 113, (2020), 144-163. <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2020.06.031>



## مقاله کامل پژوهشی

## هیدروژل تزریقی حساس به دما (کیتوسان/ژلاتین/بتا-گلیسرول فسفات) بهینه‌شده با نانوکامپوزیت پلی‌آنیلین/نانولوله کربن کربوکسیله/ژلاتین حاوی سلول‌های بنیادی در مهندسی بافت قلب

مریم کاظمی<sup>۱</sup>، فراز چوگان<sup>۱</sup>، علی حسین رضایان<sup>۲\*</sup>، روح‌الله مهدی‌نواز اقدام<sup>۳</sup>، سیدحسین احمدی تفتی<sup>۴</sup>

<sup>۱</sup> دانشجوی کارشناسی ارشد، گروه مهندسی علوم زیستی، دانشکده علوم و فنون نوین، دانشگاه تهران، تهران، ایران

<sup>۲</sup> دانشیار، گروه مهندسی علوم زیستی، دانشکده علوم و فنون نوین، دانشگاه تهران، تهران، ایران

<sup>۳</sup> استادیار دانشکده مهندسی متالورژی و مواد، دانشگاه تهران، تهران، ایران

<sup>۴</sup> استاد، مرکز تحقیقات بیمارستان قلب تهران، دانشگاه علوم پزشکی تهران، تهران، ایران

## تاریخچه مقاله:

ثبت اولیه: ۱۴۰۰/۱۰/۲۲

دریافت نسخه اصلاح‌شده: ۱۴۰۱/۰۲/۰۴

پذیرش علمی: ۱۴۰۱/۱۱/۰۹

## کلیدواژه‌ها:

کیتوسان/ژلاتین،

پلی‌آنیلین/نانولوله کربن

هیدروژل رسانا حساس به دما،

مهندسی بافت قلب

**چکیده** هیدروژل تزریقی که خواص عضله قلب را داشته باشد، چشم‌انداز مهمی در مهندسی بافت قلب است. هدف از این تحقیق، ساخت داربست هیدروژلی قابل تزریق و حساس به دمای کیتوسان/ژلاتین و گلیسرول فسفات است که دارای خواص هدایت‌پذیری و رسانایی باشد تا بتواند با انتقال پالس‌های الکتریکی موجب تسریع در فرایند رشد سلول‌های قلبی و ایجاد بافت قلبی شود. ابتدا نانوکامپوزیت پلی‌آنیلین/نانولوله کربن چنددیواره کربوکسیله (PAni/c-MWNT) سنتز شد. برای جلوگیری از واکنش نانوکامپوزیت PAni/c-MWNT با هیدروژل، نانوکامپوزیت با ژلاتین واکنش داده و به شکل PAni/c-MWNT/G درآمد. سپس نانوکامپوزیت PAni/c-MWNT/G در سراسر زمینه کیتوسان ژلاتین به‌منظور ارائه نشانه‌های الکتریکی پراکنده شد. دما و زمان ژل شدن و ویژگی‌های مکانیکی هیدروژل با استفاده از رئومتر اندازه‌گیری شد. طیف FTIR نشان داد برهم‌کنش بین آنیلین و نانولوله کربن موقعیت پیک‌های کنون و بنزن را تغییر داده است. هدایت‌پذیری نانوکامپوزیت در مقایسه با پلیمرهای خالص بیشتر می‌باشد. تصاویر میکروسکوپ الکترونی، توزیع یکنواخت نانوکامپوزیت را در سراسر داربست تأیید کرد. نرخ تخریب داربست رسانا نسبت به داربست خالص کمتر می‌باشد. نتایج آزمایش MTT نشان‌دهنده زیست‌سازگاری هیدروژل با سلول‌ها بود. هیدروژل حاوی سلول‌های بنیادی مزانشیمی به مدت ۱۴ روز کشت داده شد. در این مطالعه برای اولین بار، از نانوکامپوزیت پلی‌آنیلین/نانولوله کربن کربوکسیله/ژلاتین (PAni/c-MWNT/G) به‌منظور افزایش هدایت‌پذیری ژل تزریقی کیتوسان/ژلاتین/گلیسرول فسفات برای ساخت داربست رسانا استفاده شده است. این هیدروژل تزریقی رسانا را می‌توان برای بازسازی بافت قلب و همچنین دیگر بافت‌های الکترواکتیو مورد استفاده قرار داد.



<https://doi.org/10.30501/jamt.2023.311513.1199> URL: [https://www.jamt.ir/article\\_166486.html](https://www.jamt.ir/article_166486.html)

## ۱- مقدمه

است. نخستین کاربرد تجاری مهندسی بافت، ساخت پوست مصنوعی برای درمان سوختگی در سال ۱۹۹۰ بود [۱]. مهندسی بافت بر این استوار است که سلول‌ها می‌توانند از یک بیمار جدا شده، سپس جمعیتشان در یک محیط کشت تکثیر یافته و بر

مهندسی بافت یک موضوع نوظهور در مهندسی پزشکی است که در ساخت جایگزین‌های زیستی برای بافت‌های آسیب‌دیده، ایمپلنت‌ها و پروتزها امید فوق‌العاده‌ای ایجاد کرده

\*عهده دار مکاتبات: علی حسین رضایان

نشانی: ایران، تهران، تهران، دانشگاه تهران، دانشکده علوم و فنون نوین، گروه مهندسی علوم زیستی، تلفن: ۰۲۱-۸۶۰۹۳۳۱۸، دورنگار: -

پیام‌نگار: [ahrezayan@ut.ac.ir](mailto:ahrezayan@ut.ac.ir)

(Pu-AP-PCL)، نشان داد که خواص مکانیکی و شیمیایی آن به گونه‌ای است که کشت سلول‌های قلب را امکان‌پذیر می‌کند [۶].

یکی از مهم‌ترین چالش‌ها در تهیه داربست برای بازسازی قلب، توانایی انتقال پالس‌های الکتریکی بین سلول‌های قلبی است. در حقیقت، داربست باید هدایت‌پذیر باشد. روش‌های مختلفی برای ایجاد داربست هدایت‌پذیر مورد بررسی قرار گرفته است؛ از جمله ترکیب با پلیمرهای هادی مثل پلی‌آنیلین [۷].

پلی‌آنیلین یک پلیمر رساناست که به‌طور کلی دارای سه ساختار می‌باشد:

$(C_6H_4N)_n$  پرنیگرانیلین<sup>۸</sup> که به رنگ زرشکی یا بنفش است.

$(C_6H_4NH)_n$  لوکومرالدین<sup>۹</sup> که بی‌رنگ و شفاف است.

$([C_6H_4NH]_2[C_6H_4N]_2)_n$  امرالدین<sup>۱۰</sup> که به رنگ سبز تیره و لجنی می‌باشد.

آنیلین تنها در حالت Pernigraniline به‌صورت پایدار است و در این ساختار هدایت‌پذیر نیست. برای این‌که توانایی هدایت‌پذیری پیدا کند، نیاز دارد تا ساختار منظمی از دو ساختار Pernigraniline و Leucoemeraldine به‌طور مرتب در کنار هم و به‌طور مساوی قرار گیرد تا تبدیل به Emeraldine شود. برای این‌که بتوان این ساختار را در آنیلین ایجاد کرد باید فرایند پلیمریزاسیون صورت گیرد تا پلی‌آنیلینی با رسانایی بالا تشکیل شود که در ادامه توضیح داده خواهد شد. تشکیل مواد نانوکامپوزیتی از طریق اختلاط نانولوله‌های کربنی با زمینه پلیمری یک روش جالب برای افزایش خواص مواد است؛ زیرا نتیجه این ترکیب ممکن است باعث به‌وجود آمدن ویژگی‌های منحصر به فرد از نانولوله‌ها شود [۸ و ۹]. در بسیاری از تحقیقات نانوکامپوزیت‌های مختلفی از نانولوله همراه با پلیمرهای رسانا مانند گرافن، آنیلین، پلی‌فنیلین و نیلن، پلی‌اتیلن دی‌اکسیفن مورد بررسی قرار گرفته‌اند [۱۰]. یکی از روش‌هایی که برای تهیه نانوکامپوزیت PANi/MWNT مورد بررسی قرار گرفته و نتیجه مطلوب داشته است، ساخت نانوکامپوزیت هسته-پوسته می‌باشد. در این نانوکامپوزیت، نانولوله‌های کربنی نقش هسته را

روی یک ماتریس برون‌سلولی تخریب‌پذیر طبیعی یا مصنوعی که داربست نامیده می‌شود، کاشته شوند. سپس داربست به‌عنوان بافت جایگزین جدید، به بیمار پیوند زده می‌شود. ساخت داربست‌ها با مشخصات بهینه شامل ابعاد، نرخ تخریب، تخلخل و میکروساختار به‌سهولت در داربست‌های پلیمری قابل حصول است. زیست‌مواد نقش مهمی در مهندسی بافت ایفاء می‌کنند. داربست‌های پلیمری به‌واسطه خواص منحصر به فردشان از جمله نسبت سطح به حجم بالا، تخلخل بالا با اندازه حفرات بسیار کوچک، زیست‌تخریب‌پذیری و خواص مکانیکی مناسب، توجه زیادی را به خود جلب کرده‌اند [۲].

تحقیقاتی نیز در این زمینه انجام شده است. در تحقیقی، داربست براساس کیتوسان طراحی شد که خواصی مشابه عضله قلب داشت و از نانوتیوب کربن‌ها برای افزایش هدایت الکتریکی استفاده شده بود [۳]. هیوانگ<sup>۱</sup> و همکارانش در تحقیقاتی ویژگی‌های سه نوع داربست را برای سلول‌های قلبی مورد بررسی قرار دادند. در این تحقیق سه پلیمر زیستی فیبرین، ماتریژل و کلاژن بررسی شد. نتایج حاصل از این مطالعه نشان داد که زیست‌بسپارها باعث افزایش رگ‌زایی در مقایسه با نمونه کنترل بافر نمک فسفات می‌شوند [۴]. یی لیانگ<sup>۲</sup> و همکارانش (۲۰۱۳) از سلول‌های بنیادی برای بازسازی قلب استفاده کردند. به‌منظور ارزیابی اثر رسانایی الکتریکی داربست کامپوزیتی زیست‌سازگار در تعدیل تمایز سلول‌های قلبی، از سلول‌های بنیادی مزانشیمی انسانی استفاده شد. نتایج نشان داد سلول‌های بنیادی مزانشیمی انسانی ( $hMSCs^3$ ) کشت داده‌شده بر روی لایه‌های رسانای الکتریکی داربست پلی‌لاپرولاکتون/نانولوله کربنی ( $PLC/CNT^4$ )، تنظیم بیشتری بر روی اپی‌ژنتیک و پروتئین دارند [۵]. در سال ۲۰۱۵، بهیرایی و همکارانش تحقیق بر روی بافت قلب را مورد بررسی قرار دادند. آن‌ها موفق به ساخت داربست الکترواکتیو با منافذ به‌هم‌پیوسته و تخلخل کنترل‌شده با استفاده از مخلوطی از PEG و ذرات نمک در یک روش شستشو و ریخته‌گری شدند. این داربست الکترواکتیو متشکل از پلی‌یوراتان<sup>۵</sup> حاوی آنیلین پتامر<sup>۶</sup> با پلی‌کاپرولاکتون<sup>۷</sup>

<sup>6</sup> Aniline Pentamer (AP)

<sup>7</sup> Polycaprolactone (PCL)

<sup>8</sup> Pernigraniline

<sup>9</sup> Leucoemeraldine

<sup>10</sup> Emeraldine

<sup>1</sup> Huang

<sup>2</sup> Yi Liang

<sup>3</sup> Human Mesenchymal Stem Cells

<sup>4</sup> Polycaprolactone/Carbon Nanotube

<sup>5</sup> Polyurethane

پلی‌آنیلین از طریق پلیمریزاسیون شیمیایی به روش امولسیون تولید گردید [۲۱].

## ۲-۲-۱- نانولوله کربن کربوکسیله

برای تولید نانوکامپوزیت پلی‌آنیلین/نانولوله کربن، نیاز به نانولوله عامل‌دار شده می‌باشد. برای تهیه نانولوله کربن کربوکسیله، نانولوله درون یک بشر که درون حمام یخ قرار دارد و مجهز به همزن است، ریخته شد. سپس به ترتیب مقادیر مشخصی از نیترات سدیم و اسیدسولفوریک به مخلوط در حال هم‌خوردن اضافه گردید. پرمگنات پتاسیم به آرامی به مخلوط فوق اضافه شد؛ درحالی‌که دما زیر ۲۰ درجه سلسیوس نگه‌داشته شد. بعد از این ۵ دقیقه هم‌خوردن، حمام یخ برداشته شده و مجموعه به مدت ۳۰ دقیقه در دمای ۳۰ درجه سلسیوس حرارت‌دهی شد. سپس آب‌مقطر به آرامی به مجموعه اضافه شد و مخلوط به مدت ۱۵ دقیقه دیگر حرارت‌دهی گردید. در ادامه مخلوط آب‌مقطر و محلول آب‌اکسیژنه ۳۰ درصد با دمای ۶۰ درجه سلسیوس به منظور کاهش پرمگنات پتاسیم باقی‌مانده به مخلوط اضافه شد (عدم مشاهده حباب نشان‌دهنده کاهش کامل پرمگنات پتاسیم است). نانولوله کربوکسیله‌شده با استفاده از دستگاه سانتریفیوژ با دور ۷۲۰۰ دور بر دقیقه بعد از ۱۵ دقیقه جدا و در نهایت پودر حاصل به وسیله آب‌گرم شسته شد تا pH آن به حدود ۷ (خنثی) برسد. پودر حاصل درون آب‌مقطر ریخته شد و به مدت ۱۵ دقیقه با استفاده از دستگاه فراصوت هم‌زده شد تا کیفیت مناسب حاصل شود. سپس نمونه به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۸۰ درجه سلسیوس در آون خلأ قرار داده شد تا خشک شود [۲۰ و ۲۱].

## ۲-۲-۲- کامپوزیت پلی‌آنیلین-نانولوله کربن

تولید نانوکامپوزیت پلی‌آنیلین-نانولوله کربن کربوکسیله به روش تولید امولسیون می‌باشد. در ابتدا یک محلول امولسیون متشکل از ۷۶۵/۵ گرم SDS و ۸۰ میلی‌لیتر اسیدکلریدریک یک مولار، تهیه شد و مقدار ۰/۱۴۶ گرم از c-MWNT براساس وزن مونومر اولیه تهیه‌شده، به وسیله دستگاه فراصوت در سوسپانسیون به مدت ۳۰ دقیقه پخش شد. سپس ۲/۳۲ گرم از آنیلین که در حمام آب یخ بوده و سرد گشته بود، به سوسپانسیون اضافه شد؛ درحالی‌که مخلوط بر روی همزن مغناطیسی با دور

داشته و در مرکز قرار می‌گیرند و پلیمر آنیلین سطح آن‌ها را کامل پوشش داده و مانند پوسته، کل هسته را احاطه می‌کند. این نانوکامپوزیت به علت ساختار خود دارای ویژگی‌های مناسب برای کاربردهای خاص است [۱۳-۱۱]. در این مقالات از نانوکامپوزیت PANi/c-MWNT/G استفاده نشده است. تاکنون فقط از کامپوزیت پلی‌آنیلین و نانولوله کربن استفاده شده است؛ ولی در این تحقیق، ابتدا ژلاتین به هیدروژل تزریقی کیتوسان/گلیسرول فسفات اضافه شد و سپس با تبدیل آن به کیتوسان/ژلاتین/گلیسرول فسفات برای تولید هیدروژل تزریقی رسانا استفاده شد. برای جلوگیری از واکنش نانوکامپوزیت PANi/c-MWNT با هیدروژل، نانوکامپوزیت با ژلاتین واکنش داده و به شکل PANi/c-MWNT/G درآمد. مولکول‌های ژلاتین به منظور بهبود استحکام مکانیکی و خواص ژل شدن، به هیدروژل‌های حساس به دمای کیتوسان/بتا-گلیسرول فسفات C/GP اضافه شد. PANi/c-MWNT/G در سراسر زمینه کیتوسان/ژلاتین به منظور ارائه نشانه‌های الکتریکی پراکنده شد. در مطالعه حاضر و در راستای کارهای پژوهشی تیم تحقیقاتی ما در حوزه مهندسی بافت و همچنین بررسی کاربرد نانومواد در حوزه تشخیص و درمان بیماری‌ها [۱۷-۱۴]، طراحی، ساخت و ارزیابی داربست‌های پلیمری قابل تزریق حاوی سلول‌های مزانشیمی بهینه‌شده با نانوکامپوزیت‌ها برای افزایش هدایت‌پذیری بررسی شد.

## ۲- مواد و روش تحقیق

### ۲-۱- مواد

از اسید استیک ۹۶ درصد (شناسه ۲۴۲۸۵۳؛ شرکت سیگما آلدریج)، سدیم دودسیل سولفات (L3771؛ شرکت سیگما) و آنیلین (شناسه ۲۴۲۲۸۴؛ سیگما) استفاده شد. پلیمرها از جمله ژلاتین و کیتوسان از شرکت سیگما و تمامی حلال‌های مورد استفاده دیگر در این پژوهش از شرکت مرک بود.

### ۲-۲- روش‌ها

ابتدا مونومر آنیلین تهیه‌شده، به منظور خالص‌سازی به وسیله دستگاه تقطیر خلأ، دو بار تقطیر شد تا رنگ آن از قرمز تیره به شفاف (بی‌رنگ) تغییر کند. مونومر تقطیرشده قبل از مصرف، تحت گاز آرگون، درون یخچال نگهداری شد.

محلول بتا-گلیسرول فسفات ( $\beta$ -GP) تهیه شده و در درون حمام آب یخ قرار داده شد تا به دمایی حدود ۴ درجه سلسیوس برسد. زمانی که مخلوط و محلول به تعادل دمایی رسیدند، محلول آبی بتا-گلیسرول فسفات به صورت قطره قطره در حالتی که مخلوط توسط همزن مغناطیسی هم زده می‌شد، اضافه شد. بعد از اتمام کار مخلوط به مدت ۱۵ دقیقه روی همزن قرار گرفت [۲۶-۲۴].

#### ۲-۲-۴- کامپوزیت پلی‌آنیلین/نانولوله کربن کربوکسیله/ژلاتین (PAni/c-MWNT/G)

به منظور ساخت کامپوزیت پلی‌آنیلین/نانو لوله کربن کربوکسیله/ژلاتین ابتدا ۶۴۰ میلی‌گرم از SDS در هیدروکلریک اسید یک مولار روی همزن مغناطیسی با دور بالا به مدت ۲۰ دقیقه حل شده، سپس ۰/۱۵ گرم از نانوکامپوزیت PAni/c-MWNT تهیه شده در مرحله قبل به محلول اضافه شد و به مدت ۴۰ دقیقه در درون دستگاه فراصوت قرار گرفت. مقدار ۶۰ میلی‌گرم ژلاتین در آب دوبار تقطیر شده روی همزن، با دمای ۴۰ درجه سلسیوس به مدت ۳۰ دقیقه کاملاً حل شده و ژلاتین حل شده به آرامی و در حال هم‌زدن به محلول اضافه شد. سپس به مدت ۳۰ دقیقه در درون دستگاه فراصوت قرار داده شد. بعد از پایان فرایند، مخلوط به مدت ۲۴ ساعت در حالت سکون قرار گرفت تا جداسازی انجام شود.

نانوکامپوزیت ته‌نشین شده از محلول جدا و سپس با آب مقطر شسته شد. با استفاده از دستگاه سانتریفیوژ با دور ۱۰۰۰۰ دور در دقیقه، به مدت ۱۵ دقیقه نانوکامپوزیت جدا شد. این فرایند سه مرتبه تکرار گردید و در نهایت نانوذرات PAni/c-MWNT/G به دست آمده در آن خلأ در دمای ۶۰ درجه سلسیوس به مدت ۲۴ ساعت قرار گرفتند [۲۷].

#### ۲-۲-۵- اضافه کردن نانوکامپوزیت PAni/c-MWNT/G به ژل کیتوسان/ژلاتین

در ادامه برای تهیه ژل، مقدار مشخصی از PAni/c-MWNT/G تهیه شده در ۸ میلی‌لیتر استیک اسید ۰/۱ مولار اضافه گردید و مخلوط به مدت یک ساعت درون دستگاه فراصوت قرار داده شد تا PAni/c-MWNT/G به طور کامل درون اسید استیک توزیع شود. سپس ۲۰۰ میلی‌گرم کیتوسان به مخلوط اضافه و به مدت ۱۲ ساعت روی همزن، هم زده شد تا

بالا در حال هم خوردن بود. در نهایت محلول تهیه شده از ۵/۷ گرم از APS و اسیدکلریدریک یک مولار به صورت قطره‌ای به سوسپانسیون اضافه شد؛ در این حالت، مجموعه بر روی همزن مغناطیسی در حال هم خوردن با توان بالا بود. بعد از اضافه کردن آمونیوم پرسولفات به مجموعه، با گذشت ۱ ساعت، رنگ محلول از سیاه به سبز تیره تغییر پیدا کرد که نشان‌دهنده شروع واکنش پلیمریزاسیون می‌باشد. مجموعه به مدت ۶ ساعت هم‌زده شد. سپس بدون هم خوردن اضافی به مدت ۲۴ ساعت باقی ماند تا واکنش پلیمریزاسیون کامل شود. بعد از گذشت ۲۴ ساعت مقدار زیادی اتانول (استون) اضافه شد تا پلیمر تولید شده رسوب کند. رسوب پلی‌آنیلین حاصل با استفاده از دستگاه سانتریفیوژ، با قدرت ۷۲۰۰ دور بر دقیقه جداسازی شد. سپس چندین بار توسط استون شستشو داده شد [۱۲ و ۲۲].

در این تحقیق از SDS به عنوان عامل امولسیون/دوپ-کننده (doped) استفاده شده است. در این روش نیز نسبت مولی مونومر به اکسند ۲ و در ضمن نسبت مولی مونومر به SDS نیز ۰/۴ در نظر گرفته شد. نسبت مولی اخیر با توجه به بهینه رسانش الکتریکی پلی‌آنیلین تولید شده به دست آمده است [۱۱، ۱۲، ۲۲ و ۲۳].

#### ۲-۲-۳- اضافه کردن نانوکامپوزیت PAni/c-MWNT به ژل کیتوسان/ژلاتین

برای ساخت داربست‌های رسانا، درصد های وزنی مشخصی از نانوکامپوزیت PAni/c-MWNT به ۸ میلی‌لیتر استیک اسید ۰/۱ مولار اضافه و مخلوط فوق به مدت یک ساعت درون دستگاه فراصوت قرار گرفت تا PAni/c-MWNT به طور کامل درون اسید استیک توزیع شود. سپس ۲۰۰ میلی‌گرم کیتوسان اضافه شده و به مدت ۱۲ ساعت با استفاده از همزن مغناطیسی با دور بالا، هم زده شد تا مخلوط یکنواختی حاصل شود. در ادامه مقدار ۶۰ میلی‌گرم ژلاتین به مخلوط فوق اضافه گردید و عملیات هم‌زدن به مدت ۶ ساعت دیگر در دمای ۴۰ درجه سلسیوس ادامه داشته تا مخلوط کاملاً یکنواختی به دست آید. مخلوط به دست آمده در اتوکلاو با دمای ۱۳۵ درجه سلسیوس و زمان ۲۵ دقیقه به منظور استریل کردن قرار داده شد. مخلوط به دست آمده در حمام آب یخ قرار گرفت تا به دمای حدود ۴ درجه سلسیوس برسد. میزان ۷ درصد وزنی به حجمی

سلسیوس به مخلوط فوق اضافه شد. در زمان اضافه شدن محلول، مخلوط توسط همزن مغناطیسی هم زده می‌شد. بعد از اتمام کار، مخلوط به مدت ۱۵ دقیقه روی همزن قرار گرفت تا مخلوط یکنواختی به دست آید [۲۶-۲۴]. جدول (۱) ترکیب اجزای نمونه‌های مورد مطالعه را نشان می‌دهد. نمونه‌ها شامل چهار هیدروژل C/G/GP به صورت خالص و چهار هیدروژل C/G/GP همراه با نانوکامپوزیت PANi/c-MWNT/G با درصد‌های مختلفی از گلیسرول فسفات می‌باشند.

مخلوط یکنواختی حاصل گردد. سپس ۶۰ میلی‌گرم ژلاتین به ترکیب اضافه شده تا کاملاً حل شود. ترکیب به دست آمده در حمام آب یخ قرار داده شد تا به دمای پایین حدود ۴ درجه سلسیوس برسد. مقدار ۶۴۰ میلی‌گرم نمک بتا-گلیسرول فسفات در ۲ میلی‌لیتر آب مقطر حل شده و محلول نیز درون حمام آب یخ قرار داده شد تا به دمایی حدود ۴ درجه سلسیوس برسد. زمانی که محلول و مخلوط به تعادل دمایی رسیدند، محلول آبی بتا-گلیسرول فسفات به صورت قطره‌ای در دمای ۴ درجه

جدول ۱. ترکیب اجزای نمونه‌های مورد مطالعه

ردیف	نماد	(درصد وزنی) PANi/c-MWNT/G	درصد GP (درصد وزنی به جمی)
۱	GP3NC0	۰	۳
۲	GP5NC0	۰	۵
۳	GP7NC0	۰	۷
۴	GP9NC0	۰	۹
۵	GP3NC7	۷	۳
۶	GP5NC7	۷	۵
۷	GP7NC7	۷	۷
۸	GP9NC7	۷	۹

#### ۲-۲-۶- زمان ژل شدن

زمان ژل شدن توسط آزمایش لوله معکوس تعیین شد. به‌طور خلاصه ۱ میلی‌لیتر از محلول آماده در ویال‌های شیشه‌ای به وسیله سرنگ ریخته شد. ویال در حمام آب بن‌ماری (۳۷ درجه سلسیوس) قرار گرفت. نقطه ژل شدن با چرخش لوله و میزان سیالیت تعیین شد. بررسی نمونه‌ها، هر ۳۰ ثانیه انجام می‌شد. تمام لوله‌ها قطر یکسان داشته و زاویه چرخش و شرایط آزمایش برای تمام نمونه‌ها یکسان بود. زمانی که نمونه بعد از وارونگی در لوله جریان پیدا نمی‌کرد، به‌عنوان زمان ژل شدن محاسبه می‌شد. نمونه‌ها در سه دسته و تحت شرایط محیطی مشابه مورد بررسی قرار گرفتند [۲۸].

#### ۲-۲-۸- هدایت الکتریکی نمونه

هدایت الکتریکی نمونه با استفاده از پروب چهار نقطه استاندارد اندازه‌گیری شد. برای بررسی مناسب، نمونه‌هایی از سه نوع ماده هادی PANi، MWNT و PANi/c-MWNT با درصد‌های وزنی ۱، ۳، ۵، ۷ و ۹ ساخته شد تا نتایج، مورد مقایسه و بررسی قرار گیرند. فیلم‌های نازکی از نمونه‌ها روی لام‌های شیشه‌ای پوشش داده شد. اسلایدهای شیشه‌ای در دمای ۳۷ درجه سلسیوس به مدت ۲۴ ساعت قرار داده شدند تا کاملاً خشک شوند. هدایت الکتریکی نمونه‌ها، با استفاده از ابزار مقاومت ورق نمونه‌ها با عبور یک جریان ثابت از پروب بیرونی و اندازه‌گیری ولتاژ از طریق پروب درونی به دست می‌آید.

#### ۲-۲-۷- طیف‌سنج فرسرخ

به‌منظور بررسی ساختار شیمیایی نانوکامپوزیت‌های ساخته شده، از طیف‌سنجی فرسرخ در محدوده طول موج  $4000-500 \text{ cm}^{-1}$  در دمای ۲۵ درجه سلسیوس با استفاده از دستگاه Shimadzu-FTIR spectrometer استفاده شد [۱۴].

#### ۲-۲-۹- ارزیابی رئولوژیکی

ارزیابی رئولوژیکی هیدروژل‌ها، با استفاده از دستگاه رئومتر مدل Physica (MCR501, Anton Paar, Germany) در یک صفحه موازی با بسامد ۱ هرتز انجام شد. تغییرات مدول



ساعته برای مدت زمان ۳، ۷، ۱۰، ۱۴، ۲۱ و ۳۰ روز، وزن نمونه‌ها اندازه‌گیری شد. محیط کشت Minimum Essential Medium (Alpha MEM)، فرمولاسیون بسیار پیچیده‌ای با حضور اسیدهای آمینه، ویتامین‌ها، اسید لیپوئیک و پیروات دارد. این محیط برای رشد طیف وسیعی از سلول‌ها از قبیل کراتینوسیت‌ها و آستروسیت، برای رشد و تکثیر سلول‌های Alpha MEM های اولیه موش و سلول‌های ملانومای انسان بکار می‌رود. همچنین، برای محیط مغز استخوان و سلول‌های آمینوتیک (هم در محیط کشت‌های تک‌لایه و هم شناور) مناسب است. برای محاسبه نرخ تخریب‌پذیری هیدروژل از فرمول زیر استفاده می‌شود.

$$\text{Degradation rate (\%)} = (W_i - W_d) / W_i \times 100 \quad (2)$$

$W_i$  و  $W_d$  به ترتیب وزن خشک اولیه و وزن داربست تخریب‌شده پس از خشک کردن مجدد است.

#### ۲-۲-۱۳- ارزیابی‌های سلولی در شرایط برون‌تنی<sup>۲</sup>

در این پژوهش از سلول HUVEC (NCBI C554) خریداری شده از بانک سلولی انستیتو پاستور ایران جهت تکثیر، انجام آزمونهای سلولی و ارزیابی زیست‌سازگاری داربست استفاده شد. به منظور بررسی سمیت نمونه‌ها و تأثیر آنها بر رشد و تکثیر سلول‌ها، فرایند عصاره‌گیری براساس استاندارد ایزو ۱۰۹۹۳-۵ انجام شد که طی آن به هر نمونه استریل به‌ازای هر ۵ میلی‌گرم داربست، مقدار یک میلی‌لیتر محیط کشت اضافه شد. در ادامه پلیت‌های حاوی داربست و محیط کامل برای جلوگیری از آسیب سلولی، در انکوباتور خالی از سلول قرار گرفتند. به ازای هر نمونه ۸ پلیت آماده شد. حجم مشابهی از محیط کشت نیز به‌عنوان شاهد در نظر گرفته شد. جهت بررسی میزان سمیت/تکثیر سلولی از آزمون دی‌متیل تیازول-دی‌فنیل تترازولیوم بروماید (MTT<sup>3</sup>) استفاده شد.

#### ۲-۲-۱۴- آزمون چسبندگی سلولی

به منظور انجام آزمون چسبندگی سلولی، تعداد ۲۰۰۰۰ سلول HUVEC (NCBI C554) بر روی هیدروژل استریل شده

برشی ذخیره  $G'$  و مدول برشی اتلافی  $G''$  با قرار دادن نمونه در صفحه موازی دستگاه رثومتر و بالا بردن دما از ۲۵ تا ۴۵ درجه سلسیوس با نرخ ۰/۵ درجه سلسیوس بر دقیقه برای دو نمونه GP7NA7 و GP7NC0 محاسبه شد. همچنین این آزمایش برای این دو نمونه در دمای ثابت ۳۷ درجه سلسیوس با متغیر زمان، مورد بررسی قرار گرفت.

#### ۲-۲-۱۰- تصاویر میکروسکوپ الکترونی روبشی گسیل میدانی<sup>۱</sup> FESEM

برای بررسی ساختار داربست‌ها، نمونه درون خشک‌کن خلأ خشک و سپس درون نیتروژن مایع شکسته شد. سطح شکسته با استفاده از طلا پوشش داده شد و تصاویر FESEM از سطح مقطع شکست تهیه شد. از نرم‌افزار ImageJ به منظور تعیین اندازه حفرات از روی تصاویر SEM استفاده شد.

#### ۲-۲-۱۱- آزمون جذب آب

خواص آبدوستی داربست می‌تواند بر روی چسبندگی و مهاجرت سلولی مؤثر باشد. بدین منظور میزان تورم داربست به‌عنوان معیاری از آبدوستی آنها اندازه‌گیری شد. بدین منظور ابتدا داربست درون خشک‌کن خلأ کاملاً خشک و سپس توزین گردید ( $W_d$ ). داربست خشک درون محلول PBS در دمای ۳۷ درجه سلسیوس قرار داده شد و بعد از گذشت مدت‌زمان مشخص (۱۵ ساعت- تا زمان رسیدن به عدد ثابت)، از محلول خارج شد. آب سطحی آن کاملاً خشک و دوباره توزین گردید ( $W_s$ ). نسبت تورم ( $Q_m$ ) که عبارت است از نسبت وزن آب جذب‌شده به وزن داربست طبق رابطه زیر محاسبه شد:

$$Q_m (\%) = (W_s - W_d) / W_d \times 100 \quad (1)$$

#### ۲-۲-۱۲- آزمون تخریب‌پذیری هیدروژل

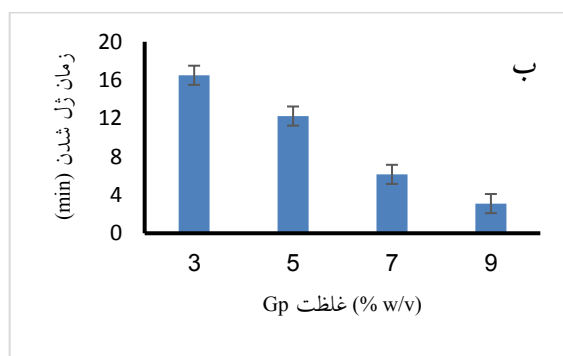
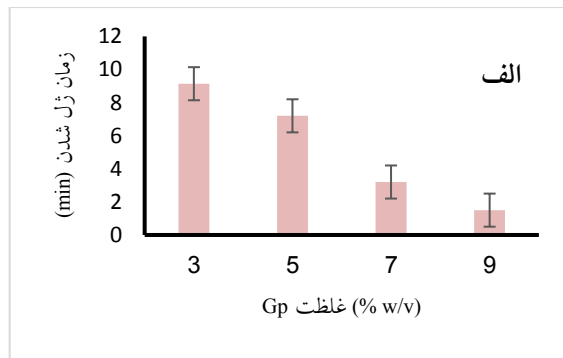
به منظور اندازه‌گیری نرخ تخریب‌پذیری هیدروژل، ابتدا سه نمونه از هر گروه با وزن مشخص ۸۰ میلی‌گرم تهیه شد و سپس نمونه‌ها در ۳ میلی‌لیتر از محیط کشت مدیوم آلفا (alpha-MEM, Gibco, 3256) غوطه‌ور شدند و در بازه‌های زمانی ۱۲

<sup>3</sup> 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-Diphenyltetrazolium Bromide

<sup>1</sup> Field Emission Scanning Electron Microscope

<sup>2</sup> In Vitro

موردنظر دارد. تزریق‌پذیری این سامانه توسط عبور از سرنگ با سوزن یا گیج ۲۱ نشان داده شد. باینکه با افزایش درصد ژلاتین می‌توان زمان ژل شدن سامانه در دمای طبیعی بدن را کاهش داد و بدین ترتیب از مقدار گلیسرول فسفات کمتری استفاده کرد تا از محدوده مجاز هم کمتر استفاده شود؛ اما غلظت‌های بالاتر این پلیمر منجر به افزایش گرانروی محلول نهایی و در نتیجه تزریق دردناک شده و پیشنهاد نمی‌شود [۲۹].



شکل ۱. الف) تغییرات زمان ژل شدن کیتوسان/ژلاتین با غلظت نمک گلیسرول فسفات (Gp) (تعداد تکرار=۳)، ب) تغییرات زمان ژل شدن کیتوسان/ژلاتین همراه با نانوکامپوزیت PANi/c-MWNT/G با غلظت ثابت ۷ درصد وزنی به حجمی از نمک گلیسرول فسفات (Gp) (تعداد تکرار=۳)

در این تحقیق برای بررسی اثر نانوکامپوزیت PANi/c-MWNT/G بر روی زمان ژل شدن، درصدهای وزنی مختلفی از نانوکامپوزیت در ژل مورد بررسی قرار گرفت. در هر گروه از نمونه‌ها، ۳، ۵، ۷ و ۹ درصد وزنی نسبت به کیتوسان از نانوکامپوزیت PANi/c-MWNT/G برای ساخت ژل مورد استفاده قرار گرفت.

با مقایسه شکل (۱-الف) و (۱-ب)، مشاهده شد که با اضافه کردن نانوکامپوزیت PANi/c-MWNT/G به ژل کیتوسان/ژلاتین/گلیسرول فسفات، زمان ژل شدن افزایش

کاشته شد و جهت چسبیدن سلول‌ها بر روی آن، داربست‌ها به مدت ۲۴ ساعت درون انکوباتور کشت سلولی با دمای ۳۷ درجه سلسیوس، حاوی ۵ درصد گاز دی‌اکسید کربن و ۹۰ درصد رطوبت، قرار داده شدند. پس از سپری شدن زمان یادشده، محیط کشت موجود در هر خانه از پلیت خارج گردید. جهت ثابت کردن سلول‌ها، ۱ میلی‌لیتر محلول حاوی ۱ درصد گلوتارآلدئید به مدت ۳۰-۲۰ دقیقه بر روی داربست‌ها ریخته شده و در دمای محیط نگهداری شدند. پس از طی زمان مذکور، محلول گلوتارآلدئید شسته و داربست‌ها دومرتبه با آب فوق‌خالص شسته شدند. در مرحله بعد جهت آگیری به ترتیب غلظت‌های مختلف الکل ۹۶، ۹۰، ۸۰، ۷۰، ۶۰ و ۵۰ درصد مورد استفاده قرار گرفت و در مرحله آخر داربست‌ها زیر هود خشک شدند. جهت بررسی ریخت‌شناسی سلول‌ها و همین‌طور اثبات چسبندگی آن‌ها به سطح داربست‌های آماده‌شده، از میکروسکوپ نوری و همچنین میکروسکوپ الکترونی رویشی استفاده شد. به‌منظور رسانایی الکتریکی، داربست‌ها توسط لایه‌های بسیار نازکی از طلا پوشش داده شدند [۱۴].

### ۳- نتایج و بحث

۳-۱- بررسی اثر غلظت نانوکامپوزیت PANi/c-MWNT/G/نمک گلیسرول فسفات بر زمان ژل شدن باتوجه به این‌که فرایند ژل شدن در هیدروژل، به برهم‌کنش نمک گلیسرول فسفات و کیتوسان پروتون‌دارشده بستگی دارد، غلظت نمک به‌عنوان یکی از عوامل مؤثر در این فرایند مورد بررسی قرار گرفت. در این آزمایش، غلظت‌های ۳، ۵، ۷ و ۹ درصد وزنی به حجمی نمک به محلول‌های کیتوسان/ژلاتین در اسیدکلریدریک ۰/۱ مولار تهیه شد. مقادیر افزوده شده نمک در محدوده مجاز انتخاب شد (کمتر از ۱۰ درصد وزنی به حجمی) تا سمیت ایجاد نکند. نتایج نشان می‌دهند که با افزایش غلظت نمک، pH محلول افزایش و زمان ژل شدن کاهش می‌یابد.

بر مبنای نتایج به‌دست‌آمده، تصمیم گرفته شد که در ادامه این پروژه، از محلول ۲/۵ درصد (وزنی به حجمی) کیتوسان و ۰/۸ درصد (وزنی به حجمی) ژلاتین و ۷ درصد (وزنی به حجمی) گلیسرول فسفات استفاده شود؛ چون این سامانه، زمان ژل شدن (۳ دقیقه) و گرانروی قابل قبولی برای تزریق در محل

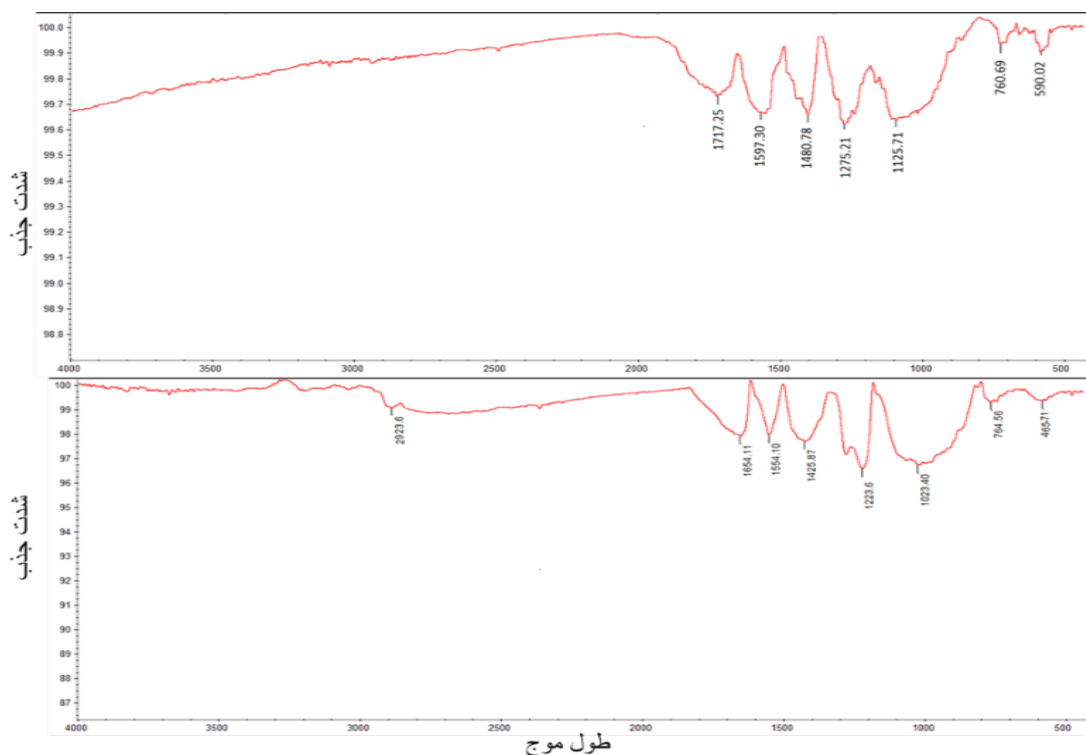
مربوط به پروتونه شدن اتم‌های نیتروژن حلقه‌های کینونی است و به‌عنوان نوار شبیه الکترونی شناخته می‌شود که معیاری برای درجه عدم استقرار الکترون‌هاست؛ به‌عبارت‌دیگر این پیک، پیک مشخصه رسانش پلی‌آنیلین می‌باشد. پیک ظاهر شده در طول موج  $590\text{ cm}^{-1}$  مربوط به گروه  $\text{SO}_3^-$  از مولکول SDS است که نشان‌دهنده موفقیت‌آمیز بودن عملیات داپ کردن پلی‌آنیلین است [۱۸-۲۰].

طیف مربوط به PANi/c-MWNT تفاوت‌های قابل توجهی را نسبت به پلی‌آنیلین نشان می‌دهد. در طیف مربوط به نانوکامپوزیت PANi/c-MWNT شدت پیک‌های کینون به بنزن بیشتر شده است و گویای این مطلب است که پلی‌آنیلین در این حالت نسبت به حلقه کینونی غنی‌تر شده است؛ به‌عبارت‌دیگر برهم‌کنش بین آنیلین و نانولوله کربن، ساختار حلقه کینونی را افزایش داده است. همچنین موقعیت پیک‌های کینون و بنزن تغییر کرده است. تفاوت دیگر، در مورد پیوند N-H در ناحیه  $2984\text{ cm}^{-1}$  می‌باشد. این پیک در نانوکامپوزیت پهن و قوی است؛ درحالی‌که در پلی‌آنیلین دیده نمی‌شود. علت این پیک، برهم‌کنش بین پلی‌آنیلین و نانولوله کربن می‌باشد که منجر به انتقال زنجیره شده است.

می‌یابد. در مقالات، نمونه مشابهی از این تحقیق که از نانوکامپوزیت PANi/c-MWNT/G استفاده شده باشد، یافت نشد؛ ولی در مقالاتی که از این ژل در حوزه دارورسانی استفاده شده بود، ترکیب انواع دارو با ژل باعث افزایش زمان ژل شدن می‌شود. به‌طورکلی اضافه شدن هر ماده پلیمری به ژل، باعث افزایش زمان ژل شدن می‌گردد [۳۰-۳۵].

### ۲-۳- طیف‌سنج فرسرخ

طیف FTIR<sup>۱</sup> مربوط به پلی‌آنیلین و نانوکامپوزیت PANi/c-MWNT در شکل (۲) نمایش داده شده است. پلی‌آنیلین پنج پیک اصلی را در طول موج‌های  $1597$ ،  $1480$ ،  $1275$ ،  $1125$  و  $760\text{ cm}^{-1}$  نشان داده است که با گزارش‌های محققین دیگر مطابقت خوبی دارد [۳۰-۳۴]. پیک‌های ظاهر شده در  $1597$  و  $1480\text{ cm}^{-1}$  مربوط به پیوند C-N حلقه بنزنی و کینونی است؛ به‌طوری‌که پیک ظاهر شده در  $1597\text{ cm}^{-1}$  مربوط به حلقه کینونی و پیک ظاهر شده در  $1480\text{ cm}^{-1}$  مربوط به حلقه بنزنی است. پیک ظاهر شده در  $1275$  و  $760\text{ cm}^{-1}$  به ترتیب مربوط به پیوند کششی C-N آمین‌های آروماتیک ثانویه و پیوند خمشی C-H آروماتیکی می‌باشد. پیک ظاهر شده در  $1125\text{ cm}^{-1}$



شکل ۲. طیف FTIR مربوط به الف) پلی‌آنیلین و ب) PANi/c-MWNT

<sup>۱</sup> Fourier Transform Infrared Spectrometer

قرار گرفتند. نتایج نشان دهنده بهبود هدایت‌پذیری نانوکامپوزیت تهیه‌شده در مقایسه با پلیمرهای خالص است. هدایت‌پذیری نانوکامپوزیت ۶۵ تا ۷۰ درصد از پلی‌آنیلین بیشتر شده و نسبت به نانولوله کربن افزایش قابل‌ملاحظه‌ای داشته است. تاکنون در هیچ مقاله‌ای از نانوکامپوزیت PANi/c-MWNT/G به‌عنوان ماده‌ای برای هدایت‌پذیری داربست و نیز به‌عنوان ماده هادی در ژل تزریقی کیتوسان/ژلاتین/گلیسرول فسفات برای ساخت داربست رسانا و کاربرد در ناحیه ضربان‌ساز قلبی استفاده نشده است. در جدول (۲) مقدار هدایت‌پذیری سلول‌های قلبی آورده شده است. با توجه به نتایج محققان مختلف می‌توان میزان هدایت داخلی طولی و عرضی سلولی را بین  $0.36-0.6$  S/cm و میزان هدایت خارجی طولی و عرضی سلولی را بین  $0.24-0.62$  S/cm در نظر گرفت [۳۲].

شدت و موقعیت پیک‌های دیگر نیز در نانوکامپوزیت نسبت به پلی‌آنیلین خالص تغییر یافته است. به‌عنوان مثال شدت پیک در  $1125 \text{ cm}^{-1}$  افزایش و هم انتقال یافته است. این افزایش در شدت پیک شبیه-الکترونی، نشان می‌دهد که برهم‌کنش بین پلی‌آنیلین و نانولوله کربنی، فرایند انتقال بار را تسهیل کرده و درجه عدم استقرار الکترونی مؤثر در زنجیره پلی‌آنیلین را افزایش داده است که در نهایت منجر به افزایش رسانش الکتریکی در PANi/c-MWNT شده است [۱۸]. این نتایج تطابق خوبی با نتایج رسانش الکترونی که در جلوتر بیان می‌شود، دارد.

### ۳-۳- هدایت الکتریکی نمونه

در این تحقیق ژلهایی با درصدهای وزنی مختلف (۱، ۳، ۵، ۷ و ۹ درصد وزنی) از PANi/c-MWNT، c-MWNT و PANi برای بررسی میزان هدایت‌پذیری، مورد مقایسه

جدول ۲. میزان هدایت الکتریکی سلول‌های ناحیه‌های مختلف قلب [۳۲]

مرجع	رسانایی مؤثر ماکروسکوپی (عضله بطنی)					
	g <sub>il</sub>	g <sub>it</sub>	g <sub>el</sub>	G <sub>et</sub>		
Clerc, J. Physiol, 255:335	۰/۱۷	۰/۰۱۹	۰/۶۲	۰/۲۴		
Roberts et al., Circ Res, 44:701	۰/۲۸	۰/۰۲۶	۰/۲۲	۰/۱۳		
Roberts & Scher, Circ Res, 50:342	۰/۳۴	۰/۰۶۰	۰/۱۲	۰/۰۸۰		
پارامترهای ماکروسکوپی بافت						
	$\sigma_i$ (S/m)	$\sigma_e$ (S/m)	f	a ( $\mu\text{m}$ )	b ( $\mu\text{m}$ )	G ( $\mu\text{S}$ )
Roth, AnnBiomed Eng, 16:609	۱	۱	۰/۷	۱۰۰	۱۰	۳
Neu & Krassowska, 1993	۰/۴	۲	۰/۸۵	۱۰۰	۷/۵	۰/۰۵

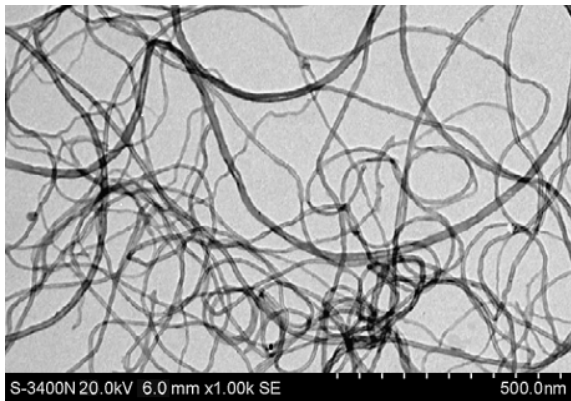
خواص مکانیکی و حساسیت دمایی نمونه GP7NC0 بررسی شد. نتایج نشان داد که نمونه GP7NC0 پس از قرار گرفتن در رئومتر و با بالا بردن دما، در دمای ۳۲ درجه سلسیوس ژل شد. ژلاتین موجود در این ژل سبب افزایش اتصالات هیدروژنی مابین زنجیره‌ای شده و زمینه را برای نزدیک شدن زنجیره‌های کیتوسان به هم و در نهایت به تشکیل ژل کمک می‌کند.

تغییرات مدول الاستیک  $G'$  و ویسکوز  $G''$  برای ژل GP7NC7 نیز در شکل (۴) آورده شده است؛ در ابتدا  $G'$  و  $G''$  مقادیر کوچک و ثابتی دارند و مدول ویسکوز تقریباً مقداری بیشتر از مدول الاستیک است. با افزایش دما در نقطه ژل شدن،

باتوجه به نتایج به‌دست‌آمده در شکل (۳)، ساخت داربست با میزان ۷ درصد وزنی با ایجاد هدایت‌پذیری نزدیک به  $0.7$  S/cm، شرایط را برای رشد و بازسازی سلول‌های قلبی فراهم آورد؛ در صورتی که استفاده از ۱۰ درصد وزنی از پلی‌آنیلین به‌تنهایی قادر به ایجاد این مقدار رسانایی نیست. در تحقیقی که توسط آنا و همکارانش صورت گرفت با اضافه نمودن ۲ درصد وزنی به حجمی به داربست تهیه‌شده از کیتوسان، توانستند هدایت‌پذیری نزدیک به  $0.4$  S/cm ایجاد کنند که در مقایسه با رسانایی نانوکامپوزیت تهیه شده بسیار کم است [۳۳ و ۳۴].

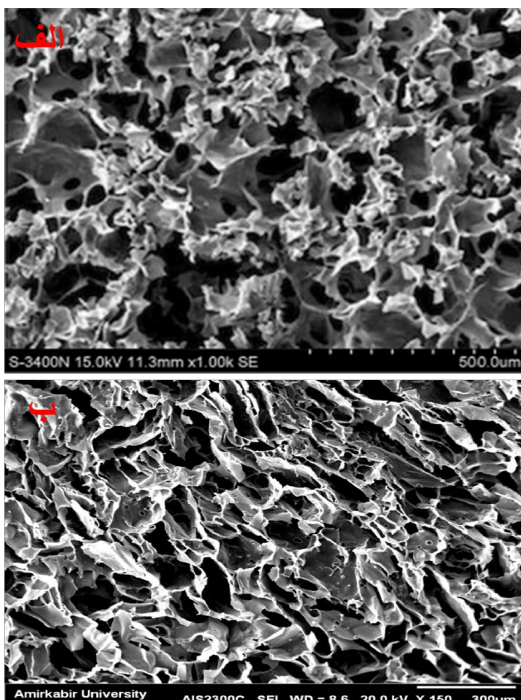
### ۳-۴- خواص رئولوژیکی نمونه‌ها

تجزیه و تحلیل توزیع نانوکامپوزیت PANi/c-MWNT/G به وسیله SEM مورد بررسی قرار گرفت. همان‌طور که در شکل (۵) مشاهده می‌شود، نانولوله‌ها در سراسر داربست به خوبی پخش شده‌اند.



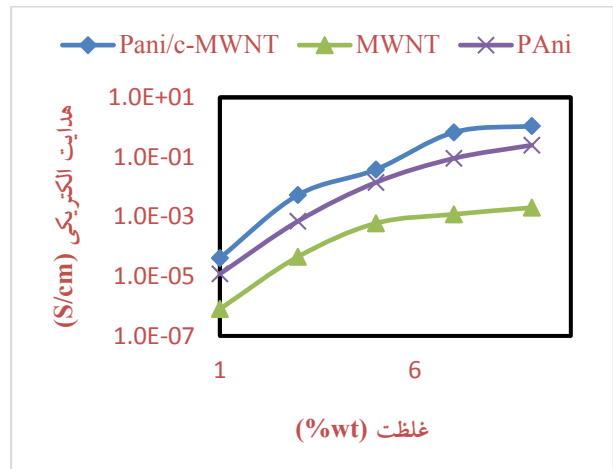
شکل ۵. تصویر SEM از توزیع نانوکامپوزیت در هیدروژل کیتوسان/ژلاتین

ساختار متخلخل داربست نمونه GP7NC7 به وسیله تصویر SEM مورد بررسی قرار گرفت. تصویر SEM از سطح مقطع شکست داربست ساخته شده با ۷ درصد وزنی از نانوکامپوزیت در شکل (۶) نشان داده شده است. همان‌طور که مشاهده می‌شود داربست دارای تخلخل با حفرات به هم متصل می‌باشد.

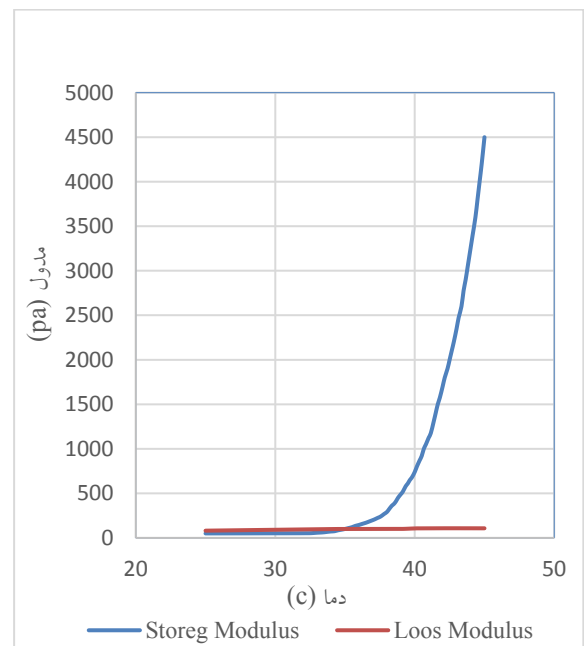


شکل ۶. تصاویر SEM از سطح مقطع شکسته داربست نمونه GP7NC7 (الف) بزرگنمایی ۵۰۰ و (ب) بزرگنمایی ۳۰۰ میکرومتر

مدول الاستیک بیشتر از مدول ویسکوز شده و به‌طور تدریجی افزایش پیدا می‌کند.



شکل ۳. هدایت الکتریکی PANi/c-MWNT و MWNT، PANi براساس غلظت C/G/GP-2NC



شکل ۴. تغییرات مدول برای نمونه GP7NC7 برحسب دما

تغییرات مدول الاستیک  $G'$  و ویسکوز  $G''$  در دمای ثابت ۳۷ درجه سلسیوس با گذشت زمان مورد بررسی قرار گرفت. نتایج نشان داد که محلول‌ها پس از رسیدن به دمای اتاق و قرار گرفتن در رئومتر، به ترتیب در ۲۲۱ و ۳۳۵ ثانیه در دمای ۳۷ درجه سلسیوس ژل می‌شوند.

۳-۵- بررسی شکل‌شناسی نانوکامپوزیت توسط میکروسکوپ الکترونی پویشی

## ۳-۶- تخریب هیدروژل

نتایج این مطالعه نشان می‌دهد که اضافه کردن پلیمر رسانای PANi/c-MWNT/G باعث افزایش ماندگاری داربست رسانا در محلول PBS به مدت طولانی‌تری می‌شود. از نتایج بالا می‌توان استنباط کرد که اختلاط نانوکامپوزیت با ژل، پایداری زیستی هیدروژل را افزایش می‌دهد.

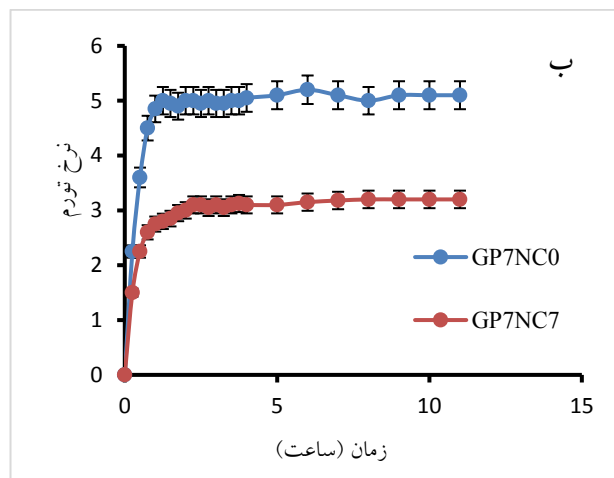
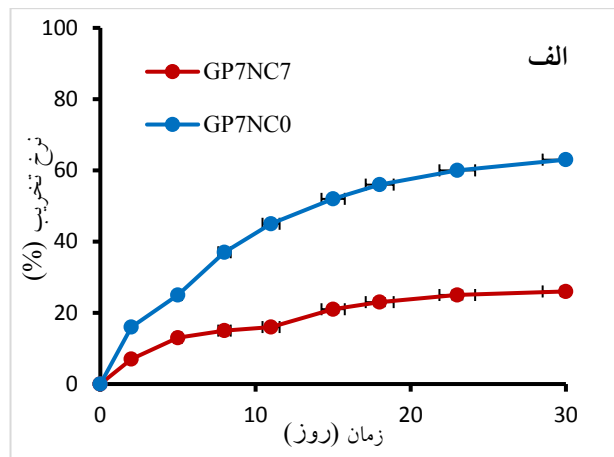
## ۳-۷- بررسی رفتار تورمی هیدروژل

نتایج ظرفیت جذب آب داربست به‌عنوان معیار آبدوستی آن‌ها در شکل (۷-ب) نشان داده شده است. همان‌طور که در دو نمونه GP7NC0 و GP7NC7 مشاهده می‌شود برای هر دو داربست، میزان جذب آب در ۲۰ دقیقه اول بسیار سریع است و بعد از آن میزان افزایش در ظرفیت جذب آب کاهش یافته است. تحقیقات پژوهشگران نشان داد که ظرفیت بالای جذب آب توسط کامپوزیت کیتوسان/ژلاتین ممکن است به دلیل ماهیت آبدوستی گروه‌های عاملی موجود در کیتوسان و ژلاتین باشد. همچنین علت کاهش جذب آب توسط نمونه حاوی نانوکامپوزیت PANi/c-MWNT/G، ماهیت آب‌گریز PANi است [۱۸، ۳۴ و ۲۶].

## ۳-۸- آزمایش زیست‌سازگاری (MTT)

زیست‌سازگاری داربست تهیه‌شده از نمونه GP7NC7 و GP7NC0 با استفاده از آزمایش MTT در حالت برون‌تنی بعد از گذشت ۴ روز از کشت سلولی مورد بررسی قرار گرفت و نتایج در شکل (۸) نشان داده شده است. هدف از انجام آزمایش MTT بررسی زیست‌سازگاری داربست رسانای ساخته‌شده (مناسب بودن آن‌ها برای کشت سلولی) بود. زیست‌سازگاری هیدروژل کیتوسان/ژلاتین در گزارش‌های دیگران با استفاده از سلول‌های مختلف به اثبات رسیده است. در این مطالعه زیست‌سازگاری داربست کیتوسان/ژلاتین حاوی نانوکامپوزیت PANi/c-MWNT/G مورد بررسی قرار گرفت. نتایج بررسی زیست‌سازگاری نمونه در شکل (۸)، دانسیته نوری نمونه‌ها را نشان می‌دهد. ستون آبی نشان‌دهنده کشت بر روی هیدروژل کیتوسان/ژلاتین حاوی نانوکامپوزیت PANi/c-MWNT/G، ستون قرمز نشان‌دهنده کشت بر روی هیدروژل کیتوسان/ژلاتین و ستون خاکستری نشان‌دهنده محیط کشت تنهاست.

همان‌طور که در شکل (۷-الف) مشاهده می‌شود نرخ تخریب داربست خالص نسبت به داربست رسانا سریع‌تر است؛ به‌طوری‌که بعد از گذشت ۴ هفته ۶۰ درصد آن تخریب شده است؛ این درحالی است که داربست رسانا نرخ تخریب‌پذیری کمتری دارد و با ۷ درصد وزنی از نانوکامپوزیت، تنها ۲۵ درصد کاهش وزن را نشان می‌دهد که با سرعت قابل‌توجهی شروع شده است؛ به‌گونه‌ای که در هفته اول برای GP7NC7 و GP7NC0 به ترتیب ۱۳ و ۲۵ درصد کاهش وزن ثبت شده است. یانگ و همکارانش خواص زیست‌تخریب‌پذیری داربست تزریقی کیتوسان/ژلاتین را بررسی کردند. آن‌ها نشان دادند که داربست طی حدود ۱۶ هفته به‌طور کامل تجزیه می‌شود؛ البته میزان تجزیه شدن به مقدار ژلاتین، درصد گلیسرول فسفات و کریستالیزه کیتوسان نیز بستگی دارد [۲۶].

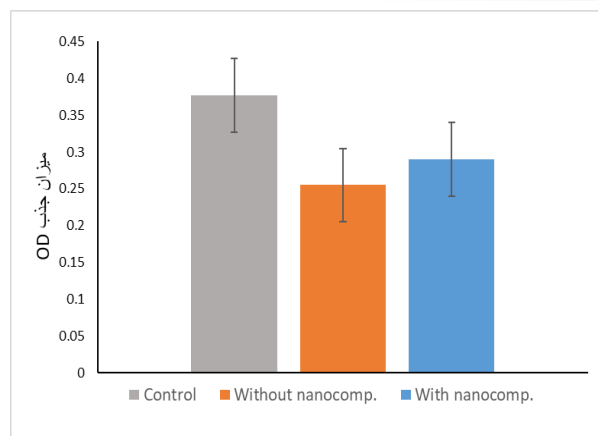


شکل ۷. الف) زیست‌تخریب‌پذیری دو نمونه GP7NC0 و

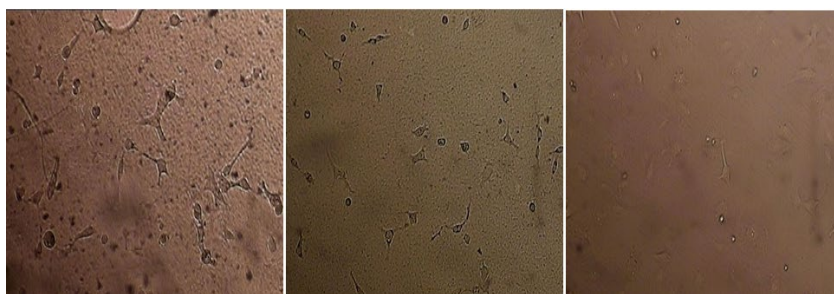
GP7NC7. ب) رفتار جذب آب داربست‌های ساخته‌شده در محلول PBS در دمای ۳۷ درجه سلسیوس

### ۳-۹- چسبندگی سلولی

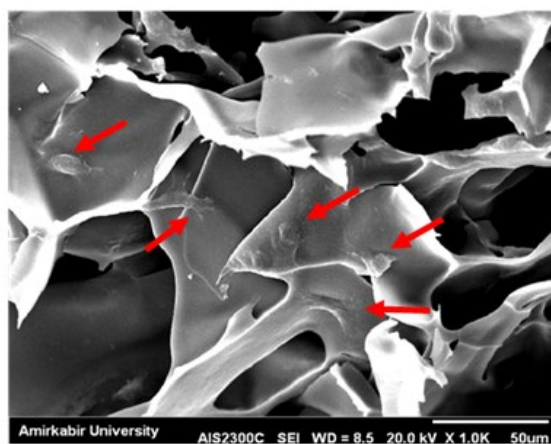
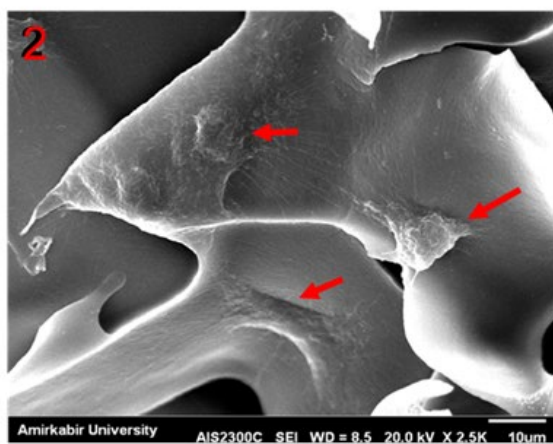
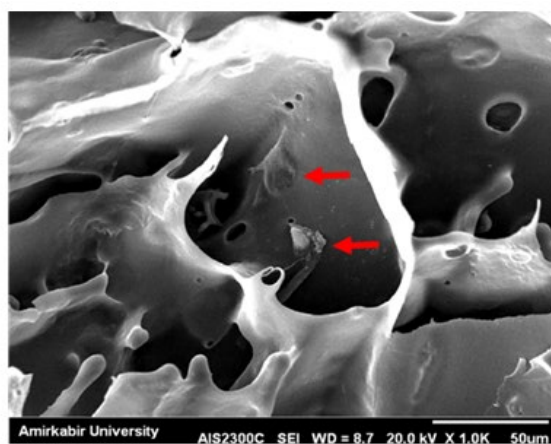
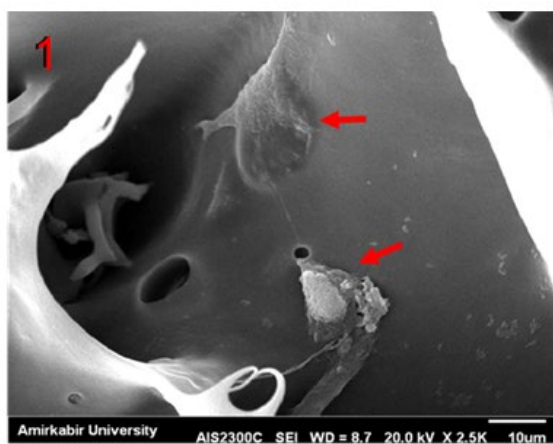
جهت بررسی ریخت‌شناسی سلول‌ها و همچنین اثبات چسبندگی آن‌ها به سطح داربست‌های آماده‌شده، از میکروسکوپ نوری (شکل ۹) و میکروسکوپ الکترونی روبشی (شکل ۱۰) استفاده شد [۳۶]. نتایج حاصل از آزمون چسبندگی در شکل (۱۰) مؤید این مطلب است که سامانه از چسبندگی، تکثیر و رشد سلولی حمایت می‌کند. نتایج نشان می‌دهد که سلول‌ها به‌خوبی بر روی داربست قرار گرفته‌اند و چسبندگی و ریخت‌شناسی مناسب را با حالت کنترل داشته‌اند.



شکل ۸. بررسی زیست‌سازگاری سه نمونه داربست



شکل ۹. تصاویر میکروسکوپ نوری از سطح نمونه‌های حاوی سلول



شکل ۱۰. تصویر میکروسکوپ الکترونی روبشی از سطح داربست‌ها (نمونه ۱: GP7NC0 با دو بزرگنمایی ۱۰ و ۵۰ میکرومتر نمونه ۲: GP7NC7 با بزرگنمایی ۱۰ و ۵۰ میکرومتر)

## ۴- نتیجه گیری

در این تحقیق هیدروژل حساس به دمای تزریقی مشکل از کیتوسان و ژلاتین با نانوکامپوزیت PANi/c-MWNT/G ترکیب شد و برای استفاده در ناحیه ضربان‌ساز قلب، مورد بررسی قرار گرفت. در این تحقیق علاوه بر هدایت الکتریکی، زمان ژل شدن نیز بررسی شد. نتایج حاصل از بررسی نانوکامپوزیت PANi/c-MWNT نشان داد که این نانوکامپوزیت به‌عنوان ایجادکننده جریان‌های الکتریکی رسانایی، می‌تواند مسیر نوینی را جهت استفاده در حوزه بافت قلبی ایجاد کند. در این تحقیق از کیتوسان و ژلاتین برای ساخت داربست هیدروژلی، به‌علت ویژگی‌های مناسب این دو پلیمر و کاربرد گسترده در مهندسی پزشکی، استفاده شد.

فعل و انفعالات الکترواستاتیکی کیتوسان، ژلاتین و گلیسرول فسفات، همچنین برهم‌کنش‌های آب‌گریزی و پیوندهای هیدروژنی بین زنجیره‌های کیتوسان، بر روی رفتار هیدروژل حساس به دما تأثیر می‌گذارد. از آنجایی که زمان ژل شدن یک هیدروژل تزریقی حساس به دما، یکی از مشخصه‌های مهم به‌حساب می‌آید، در این تحقیق این زمان مورد بررسی قرار گرفت. ژلاتین به‌علت ویژگی‌های ساختاری خود باعث افزایش استحکام و الاستیسیته داربست می‌شود. همچنین اضافه شدن ژل ژلاتین باعث کاهش زمان ژل شدن هیدروژل می‌شود. طبق بررسی‌های انجام‌شده زمان مناسب برای ژل شدن بعد از تزریق در ناحیه موردنظر، ۳ دقیقه زمان بهینه برای ژل شدن می‌باشد. با اضافه شدن نانوکامپوزیت به هیدروژل، به‌علت برهم‌کنش بین نانوکامپوزیت و ژل، زمان ژل شدن افزایش می‌یابد. بررسی‌ها و نتایج نشان داد که با افزودن ۷ درصد وزنی به حجمی از گلیسرول فسفات می‌توان ژلی با زمان ژل شدن ۳ دقیقه ایجاد کرد. به‌طورکلی این هیدروژل به‌علت تزریقی بودن استفاده آسان آن را فراهم می‌کند و نیازی به جراحی نیست. هیدروژل تزریقی حساس به دمای رسانا می‌تواند در مواردی مثل انفارکتوس قلبی و یا برای بافت‌های عصبی و دیگر کاربردهای مهندسی بافت مورد استفاده قرار گیرد.

از آنجایی که این هیدروژل حساس به دمای تزریقی برای اولین بار مورد بررسی و تحقیق گرفته است، پیشنهاد می‌شود، داربست ساخته‌شده در حضور سلول‌های ضربان‌ساز قلب مورد بررسی قرار گیرد. همچنین از این هیدروژل تزریقی رسانا برای

سلول‌های عصبی استفاده شود و روش تحریک الکتریکی به داربست رسانا ادغام گردد.

## ۵- سپاسگزاری

مطالعات انجام‌شده، در قالب پایان‌نامه کارشناسی ارشد، توسط پژوهشگران تهیه شد. از کلیه افراد مرتبط با این کار در دانشگاه تهران، تشکر و قدردانی می‌شود.

## مراجع

- Peng, Z., Shen, Y., "Study on biological safety of polyvinyl alcohol/collagen hydrogel as tissue substitute (I)", *Polymer-Plastics Technology and Engineering*, Vol. 50, No. 3, (2011), 245-250. <https://doi.org/10.1080/03602559.2010.531438>
- Meyer, U., Handschel, J., Wiesmann, H. P., Meyer, T. eds., *Fundamentals of Tissue Engineering and Regenerative Medicine*, Vol. 1, Springer Berlin, Heidelberg, (2009). <https://doi.org/10.1007/978-3-540-77755-7>
- Martins, M., Eng, G., Caridade, S. G., "Electrically conductive chitosan/carbon scaffolds for cardiac tissue engineering", *Biomacromolecules*, Vol. 15, No. 2, (2014), 635-643. <https://doi.org/10.1021/bm401679q>
- Huang, N. F., Yu, J., Sievers, R., Li, S., Lee, R. J., "Injectable biopolymers enhance angiogenesis after myocardial infarction", *Tissue Engineering*, Vol. 11, No. 11-12, (2005), 1860-1866. <https://doi.org/10.1089/ten.2005.11.1860>
- 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 ( $\epsilon$ -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>
- Baheiraei, N., Yeganeh, H., Ai, J., Gharibi, R., Ebrahimi-Barough, S., Azami, M., Vahdat, S., Baharvand, H., "Preparation of a porous conductive scaffold from aniline pentamer-modified polyurethane/PCL blend for cardiac tissue engineering", *Journal of Biomedical Materials Research, Part A*, Vol. 103, No. 10, (2015), 3179-3187. <https://doi.org/10.1002/jbm.a.35447>
- Spinks, G. M., Shin, S. R., Wallace, G. G., Whitten, P. G., Kim, I. Y., Kim, S. I., Kim, S. J., "A novel "dual mode" actuation in chitosan/polyaniline/carbon nanotube fibers", *Sensors and Actuators, B: Chemical*, Vol. 121, No. 2, (2007), 616-621. <https://doi.org/10.1016/j.snb.2006.04.103>
- Jiang, Q., Fu, G., Xie, D., Jiang, S., Chen, Z., Huang, B., Zhao, Y., "Preparation of carbon nanotube/polyaniline nanofiber by electrospinning", *Procedia Engineering*, Vol. 27, (2012), 72-76. <https://doi.org/10.1016/j.proeng.2011.12.426>
- Ding, L., Li, Q., Zhou, D., Cui, H., An, H., Zhai, J., "Modification of glassy carbon electrode with polyaniline/multi-walled carbon nanotubes composite: Application to electro-reduction of bromate", *Journal of Electroanalytical Chemistry*, Vol. 668, (2012), 44-50. <https://doi.org/10.1016/j.jelechem.2011.12.018>
- Blanchet, G. B., Fincher, C. R., Gao, F., "Polyaniline nanotube composites: A high-resolution printable conductor". *Applied Physics Letters*, Vol. 82, No. 8, (2003), 1290-1292. <https://doi.org/10.1063/1.1553991>
- Kondawar, S. B., Deshpande, M. D., Agrawal, S. P., "Transport properties of conductive polyaniline nanocomposites based on carbon nanotubes", *International Journal of Composite Materials*, Vol. 2, No. 3, (2012), 32-36. <https://doi.org/10.5923/j.comaterials.20120203.03>
- Jeevananda, T., Kim, N. H., Heo, S. B., Lee, J. H., "Synthesis and characterization of polyaniline-multiwalled carbon nanotube nanocomposites in the presence of sodium dodecyl sulfate", *Polymers for Advanced Technologies*, Vol. 19, No. 12, (2008), 1754-1762. <https://doi.org/10.1002/pat.1191>



- pulposus regeneration: An in vitro study", *Tissue Engineering, Part A*, Vol. 16, No. 2, (2010), 695-703. <https://doi.org/10.1089/ten.tea.2009.0229>
25. Cheng, Y. H., Yang, S. H., Lin, F. H., "Thermosensitive chitosan-gelatin-glycerol phosphate hydrogel as a controlled release system of ferulic acid for nucleus pulposus regeneration", *Biomaterials*, Vol. 32, No. 29, (2011), 6953-6961. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2011.03.065>
  26. Yang, K. C., Wu, C. C., Cheng, Y. H., Kuo, T. F., Lin, F. H., "Chitosan/gelatin hydrogel prolonged the function of insulinoma/agarose microspheres in vivo during xenogenic transplantation. in transplantation proceedings", *Elsevier*, Vol. 40, No. 10, (2008), 3623-3626. <https://doi.org/10.1016/j.transproceed.2008.06.092>
  27. Haider, S., Park, S. Y., Saeed, K., Farmer, B. L., "Swelling and electroresponsive characteristics of gelatin immobilized onto multi-walled carbon nanotubes", *Sensors and Actuators, B: Chemical*, Vol. 124, No. 2, (2007), 517-528. <https://doi.org/10.1016/j.snb.2007.01.024>
  28. Dizaji, B. F., Azerbaijan, M. H., Sheisi, N., Goleij, P., Mirmajidi, T., Chogan, F., Irani, M., Sharafian, F., "Synthesis of PLGA/chitosan/zeolites and PLGA/chitosan/metal organic frameworks nanofibers for targeted delivery of Paclitaxel toward prostate cancer cells death", *International Journal of Biological Macromolecules*, Vol. 164, (2020), 1461-1474. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2020.07.228>
  29. Saladin, K. S., Miller, L., *Anatomy & Physiology*, New York, WCB/McGraw-Hill, (1998), 1248.
  30. Kempe, S., Metz, H., Bastrop, M., Hvilsom, A., Contri, R. V., Mäder, K., "Characterization of thermosensitive chitosan-based hydrogels by rheology and electron paramagnetic resonance spectroscopy", *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, Vol. 68, No. 1, (2008), 26-33. <https://doi.org/10.1016/j.ejpb.2007.05.020>
  31. Zhao, Q. S., Ji, Q. X., Xing, K., Li, X. Y., Liu, C. S., Chen, X. G., "Preparation and characteristics of novel porous hydrogel films based on chitosan and glycerophosphate", *Carbohydrate Polymers*, Vol. 76, No. 3, (2009), 410-416. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2008.11.020>
  32. Roth, B. J., "The electrical conductivity of tissues", *The Biomedical Engineering Handbook*, Second Edition., 2 Volume Set, edited by Bronzino, J. D., Boca Raton, CRC Press, (2000).
  33. Fathinejad, J. H., Javidfar, M. R., "Study on effect of aluminum nitrate on conductivity properties of hydrogel nanocomposite based on acrylic acid/CNTs", *Journal of Advanced Materials and Technologies (JAMT)*, Vol. 7, No. 2, (2018), 57-61. <https://doi.org/10.30501/jamt.2018.91467>
  34. Malekimusavi, H., Ghaemi, A., Masoudi, G., Chogan, F., Rashedi, H., Yazdian, F., Omidi, M., Javadi, S., Haghirsadat, B. F., Teimouri, M., Faal Hamedani, N., "Graphene oxide-l-arginine nanogel: A pH-sensitive fluorouracil nanocarrier", *Biotechnology and Applied Biochemistry*, Vol. 66, No. 5, (2019), 772-780. <https://doi.org/10.1002/bab.1768>
  35. Cheng, Y. H., Hung, K. H., Tsai, T. H., Lee, C. J., Ku, R. Y., Chiu, A. W. H., Chiou, S. H., Liu, C. J. L., "Sustained delivery of latanoprost by thermosensitive chitosan-gelatin-based hydrogel for controlling ocular hypertension", *Acta Biomaterialia*, Vol. 10, No. 10, (2014), 4360-4366. <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2014.05.031>
  36. Manafi, S., Mirjalili, F., Joughehdoust, S., "Synthesis of FAp, Forsterite, and FAp/Forsterite nanocomposites by sol-gel method", *Advanced Ceramics Progress*, Vol. 6, No. 2, (2020), 35-42. <https://doi.org/10.30501/acp.2020.109549>
  13. Zhang, X., Zhang, J., Liu, Z., "Tubular composite of doped polyaniline with multi-walled carbon nanotubes", *Applied Physics A*, Vol. 80, No. 8, (2005), 1813-1817. <https://doi.org/10.1007/s00339-003-2491-z>
  14. Chogan, F., Mirmajidi, T., Rezayan, A. H., Sharifi, A. M., Ghahary, A., Nourmohammadi, J., Kamali, A., Rahaie, M., "Design, fabrication, and optimization of a dual function three-layer scaffold for controlled release of metformin hydrochloride to alleviate fibrosis and accelerate wound healing", *Acta Biomaterialia*, Vol. 113, (2020), 144-163. <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2020.06.031>
  15. Mirmajidi, T., Chogan, F., Rezayan, A. H., Sharifi, A. M., "In vitro and in vivo evaluation of a nanofiber wound dressing loaded with melatonin", *International Journal of Pharmaceutics*, Vol. 596, (2021), 120213. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2021.120213>
  16. Basiri, Z., Rezayan, A. H., Akbari, B., Aghdam, R. M., Tafti, H. A., "Developing new synthetic biomimetic nanocomposite adhesives: Synthesis and evaluation of bond strength and solubilization", *Reactive and Functional Polymers*, Vol. 127, (2018), 85-93. <https://doi.org/10.1016/j.reactfunctpolym.2018.04.004>
  17. Abbasizadeh, N., Rezayan, A. H., Nourmohammadi, J., Kazemzadeh-Narbat, M., "HHC-36 antimicrobial peptide loading on silk fibroin (SF)/hydroxyapatite (HA) nanofibrouscoated titanium for the enhancement of osteoblast and bactericidal functions", *International Journal of Polymeric Materials and Polymeric Biomaterials*, Vol. 69, No. 10, (2019), 629-639. <https://doi.org/10.1080/00914037.2019.1596913>
  18. Oroojalian, F., Jahanafrooz, Z., Chogan, F., Rezayan, A. H., Malekzade, E., Rezaei, S. J. T., Nabid, M. R., Sahebkar, A., "Synthesis and evaluation of injectable thermosensitive pentablock copolymer hydrogel (PNIPAAm-PCL-PEG-PCL-PNIPAAm) and star-shaped poly (CL- CO- LA)-b-PEG for wound healing applications", *Journal of Cellular Biochemistry*, Vol. 120, No. 10, (2019), 17194-17207. <https://doi.org/10.1002/jcb.28980>
  19. Farboudi, A., Mahboobnia, K., Chogan, F., Karimi, M., Askari, A., Banihashem, S., Davaran, S., Irani, M., "UiO-66 metal organic framework nanoparti- cles loaded carboxymethyl chitosan/poly ethylene oxide/polyurethane core- shell nano fibers for controlled release of doxorubicin and folic acid", *International Journal of Biological Macromolecules*, Vol. 150, (2020), 178-188, <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2020.02.067>
  20. Singh, C., Srivastava, S., Ali, M. A., Gupta, T. K., Sumana, G., Srivastava, A., Mathur, R. B., Malhotra, B. D., "Carboxylated multiwalled carbon nanotubes based biosensor for aflatoxin detection", *Sensors and Actuators, B: Chemical*, Vol. 185, (2013), 258-264. <https://doi.org/10.1016/j.snb.2013.04.040>
  21. Kar, P., Choudhury, A., "Carboxylic acid functionalized multi-walled carbon nanotube doped polyaniline for chloroform sensors", *Sensors and Actuators, B: Chemical*, Vol. 183, (2013), 25-33. <https://doi.org/10.1016/j.snb.2013.03.093>
  22. Wu, T. M., Lin, Y. W., Liao, C. S., "Preparation and characterization of polyaniline/multi-walled carbon nanotube composites", *Carbon*, Vol. 43, No. 4, (2005), 734-740. <https://doi.org/10.1016/j.carbon.2004.10.043>
  23. Wu, J., Su, Z. G., Ma, G. H., "A thermo-and pH-sensitive hydrogel composed of quaternized chitosan/glycerophosphate", *International Journal of Pharmaceutics*, Vol. 315, No. 1-2, (2006), 1-11. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2006.01.045>
  24. Cheng, Y. H., Yang, S. H., Su, W. Y., Chen, Y. C., Yang, K. C., Cheng, W. T. K., Wu, S. C., Lin, F. H., "Thermosensitive chitosan-gelatin-glycerol phosphate hydrogels as a cell carrier for nucleus