



# E-Design and Fabrication of 3D-Printed Polycaprolactone/Poly Lactic-co-Glycolic Acid Hybrid Scaffold Containing Alginate Nanoparticles for Cartilage Tissue Engineering Applications

Babak Pourmollaabbassi <sup>1</sup>, Hamid Mahdavi <sup>2\*</sup>, Shahrokh Shojaee <sup>3</sup>, Hossien Salehi Rozveh <sup>4</sup>, Ali Valiani <sup>4</sup>

<sup>1</sup> Ph. D. Student, Department of Biomedical Engineering, Central Tehran Branch, Islamic Azad University, P. O. Box:13185/768, Tehran, Tehran, Iran

<sup>2</sup> Assistant Professor, Department of Novel Drug Delivery Systems, Iran Polymer and Petrochemical Institute, Tehran, Tehran, Iran

<sup>3</sup> Assistant Professor, Department of Biomedical Engineering, Central Tehran Branch, Islamic Azad University, P. O. Box:13185/768, Tehran, Tehran, Iran

<sup>4</sup> Associate Professor, Department of Anatomical and Molecular Biology Sciences, School of Medicine, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, Isfahan, Iran

\*Corresponding Author's Email: [h.mahdavi@ippi.ac.ir](mailto:h.mahdavi@ippi.ac.ir) (H. Mahdavi)

## Paper History:

Received: 2021-12-29

Revised in revised form: 2022-02-06

Scientific Accepted: 2022-03-05

## Keywords:

3D Printing,  
Alginate,  
Polycaprolactone,  
Polylactic Acid,  
Tissue Engineering

**Abstract** The most important strategy in tissue engineering is the relationship between the three components of biomaterials, living cells, and biologically active molecules suitable for tissue regeneration. To be clinically effective, these environments must replicate, as closely as possible, the main characteristics of the native Extracellular Matrix (ECM) on a cellular scale. Tissue engineering is generally employed to create hybrid scaffolding to support cartilage tissue regeneration using fabrication 3D printing techniques. The current study designed a three-dimensional scaffold using FDA-approved Polycaprolactone/Poly Lactic-co-Glycolic Acid (PCL/PLGA) polymers. Then, 40 and 45 (w/w) alginate nanoparticles were added to the bio-ink to improve the printability, mechanical properties, and biocompatibility of the scaffolds. Finally, 3D-printed scaffolds were evaluated using mechanical properties, surface hydrophilicity, water absorption, biodegradability, surface morphology, and cell viability. The results showed that increasing the percentage of alginate nanoparticles in the bio-ink would increase the percentage of porosity, surface hydrophilicity, mechanical properties, cell viability, and printability. In addition, water absorption and compression modules of PCL/PLGA 3D-printed scaffolds containing 45 % alginate were optimized, compared to those of other groups, hence used as bio-ink in 3D printing of scaffolds in tissue engineering defects.



<https://doi.org/10.30501/jamt.2023.321697.1206>

URL: [https://www.jamt.ir/article\\_167936.html](https://www.jamt.ir/article_167936.html)

## 1. INTRODUCTION

During the past two decades, different techniques in tissue engineering such as extracting cells from new cell sources, synthesis of advanced biomaterials and biocopying, and discovery of new drugs and medical development in the field of biological structural constructions led to the discovery of new treatment solutions in order to repair and regenerate the damaged tissue [1-2]. According to the conducted studies, not only can chondrocytes maintain their phenotype after seeding on 3D-printed scaffolds, but they significantly enhance articular cartilage regeneration [3]. In tissue engineering, additive manufacturing techniques were used to achieve structures with open and regular porosity, high structural complexity, and flexible designs [4-5].

In this research, for the first time, composite bio-ink based on synthetic polymer materials PCL, PLGA, and natural polymer of alginate nanoparticles were used for extrusion-based 3D printing in order to obtain optimal properties for 3D-printed scaffolds.

## 2. MATERIALS AND METHODS

To prepare and optimize the bio-inks that are suitable for 3D printing scaffolds, PCL was dissolved in three ml of chloroform and mixed using a magnetic stirrer for an hour. PLGA was added to the solution and mixed for two hours at 35 °C to obtain a homogeneous polymer solution. Alginate nanoparticles with the weight percentages of 40 % and 45 % (w/w) were added as fillers to the base polymer composition. Specifications of the 3D-printed scaffolds are as follows: side length = 20 mm (12 strands, distance between strands 1 mm) and total height = 5 mm (25 layers, 300 μm/layer). Different inks were ejected through a nozzle with an inner diameter of 420 μm. The movement speed of the nozzle head and the dose speed of the ink output were 1.85 mms<sup>-1</sup> and 0.0099 mms<sup>-1</sup>, respectively.

## 3. RESULTS AND DISCUSSION

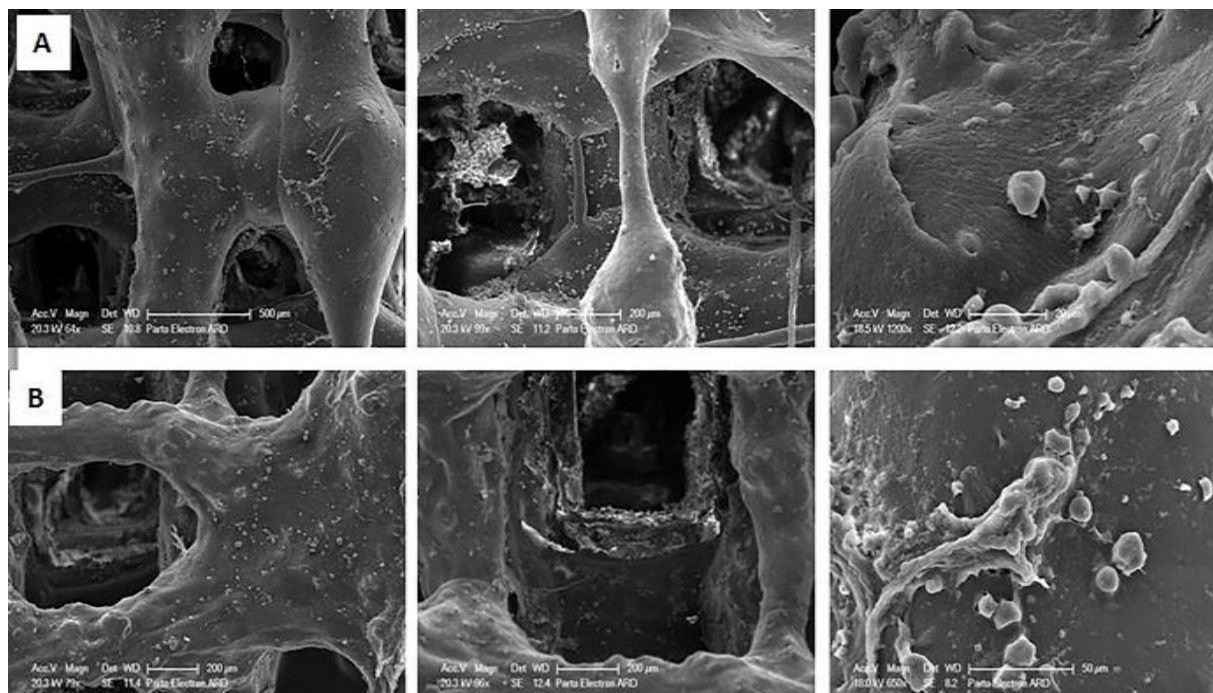
Figure 1 depicts the SEM images of chondrocytes attached to the 3D printed scaffolds on Day 7 of cell study. Chondrocytes adhere well to the surface of

Please cite this article as: Pourmollaabbassi, B., Mahdavi, H., Shojaee, Sh., Salehi Rozveh, H., Valiani, A., "E-Design and fabrication of 3D-printed polycaprolactone/poly lactic-co-glycolic acid hybrid scaffold containing alginate nanoparticles for cartilage tissue engineering applications", *Journal of Advanced Materials and Technologies (JAMT)*, Vol. 11, No. 3, (2022), 57-74. (<https://doi.org/10.30501/jamt.2023.321697.1206>).



PPA40 and PPA45 scaffolds and formed elongated cell pike. However, the cell adhesion to the surface of the scaffold containing 45 % alginate nanoparticles significantly increased, compared to the scaffolds containing 40 % alginate nanoparticles. The adhesion and elongation of chondrocytes during the cell culture study confirm the optimal porosity percentage and appropriate distance between the filament size and mesh network which allows the cells to bridge the filament, considering that large mesh spacing and size negatively

affect the cell growth [6]. According to the results obtained from the morphological view of chondrocytes, this level of cell attachment can be attributed to the appropriate level of hydrophilicity of the scaffolds which leads to the interaction between the scaffold and cell surface and creates suitable conditions for the formation of receptors due to the presence of hydrophilic functional groups. The cell surface is 3D printed in the direction of connecting chondrocyte cells to the surface of scaffolds [6].



**Figure 1.** SEM images of the adhesion and morphology of chondrocytes on 3D printed scaffolds: (a) image of scaffold surface containing 40 % alginate nanoparticles, and (b) image of scaffold surface containing 45 % alginate nanoparticles

#### 4. CONCLUSION

Fabrication of PCL/PLGA scaffolds containing 45 % alginate shows the optimal water absorption and compression modules that can be used as a bio-ink in the 3D printing of scaffolds in tissue engineering defects. According to the findings, increasing the percentage of alginate nanoparticles in the bio-ink would in turn increase the percentage of porosity, surface hydrophilicity, mechanical properties, cell viability, and printability.

#### 5. ACKNOWLEDGEMENT

The authors would like to express their gratitude to Dr. Mohsen Satash Mehr, a member of the Faculty of New Technologies in Medicine, Isfahan University of Medical Sciences for their sincere efforts to provide equipment for the advancement of this research work.

#### REFERENCES

- Melchels, F. P. W., Domingos, M. A. N., Klein, T. J., Malda, J., Bartolo, P. J., Huttmacher, D. W., "Additive manufacturing of tissues and organs", *Progress in Polymer Science*, Vol. 37, No. 8,

(2012), 1079-1104.

<https://doi.org/10.1016/j.progpolymsci.2011.11.007>

- Ranga, A., Lutolf, M. P., "High-throughput approaches for the analysis of extrinsic regulators of stem cell fate", *Current Opinion in Cell Biology*, Vol. 24, No. 2, (2012), 236-244. <https://doi.org/10.1016/j.ceb.2012.01.006>
- Conoscenti, G., Schneider, T., Staelzel, K., Pavia, F. C., Brucato, V., Goegele, C., La Carrubba, V., Schulze-Tanzil, G., "PLLA scaffolds produced by thermally induced phase separation (TIPS) allow human chondrocyte growth and extracellular matrix formation dependent on pore size", *Materials Science and Engineering: C*, Vol. 80, (2017), 449-459. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2017.06.011>
- Setayeshmehr, M., Esfandiari, E., Hashemibeni, B., Tavakoli, A. H., Rafienia, M., Samadi Kuchaksaraei, A., Moroni, L., Joghataei, M. T., "Chondrogenesis of human adipose-derived mesenchymal stromal cells on the [devalitized costal cartilage matrix/poly (vinyl alcohol)/fibrin] hybrid scaffolds", *European Polymer Journal*, Vol. 118, (2019), 528-541. <https://doi.org/10.1016/j.eurpolymj.2019.04.044>
- Chua, C. K., Leong, K. F., An, J., "Introduction to rapid prototyping of biomaterials", *Rapid Prototyping of Biomaterials*, Woodhead Publishing, (2020), 1-15. <https://doi.org/10.1016/B978-0-08-102663-2.00001-0>
- Szymański, T., Mieloch, A. A., Richter, M., Trzeciak, T., Florek, E., Rybka, J. D., Giersig, M., "Utilization of carbon nanotubes in manufacturing of 3D cartilage and bone scaffolds", *Materials*, 2020 Jan;13(18):4039. <https://doi.org/10.3390/ma13184039>



مقاله کامل پژوهشی

طراحی و ساخت داربست هیبرید چاپ سه بعدی

پلی کاپرولاکتون/پلی لاکتیک - کو - گلیکولیک اسید حاوی نانوذرات آلژینات به منظور  
به کارگیری در مهندسی بافت غضروف

بابک پورملاعباسی<sup>۱</sup>، حمید مهدوی<sup>۲\*</sup>، شاهرخ شجاعی<sup>۳</sup>، حسین صالحی رزوه<sup>۴</sup>، علی والیانی<sup>۴</sup>

<sup>۱</sup> دانشجوی دکتری، گروه مهندسی پزشکی، دانشکده فنی و مهندسی، واحد تهران مرکزی، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، تهران، ایران

<sup>۲</sup> استادیار، گروه سامانه‌های نوین دارورسانی، پژوهشگاه بسپار و پتروشیمی ایران، تهران، تهران، ایران

<sup>۳</sup> استادیار، گروه مهندسی پزشکی، دانشکده فنی و مهندسی، واحد تهران مرکزی، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، تهران، ایران

<sup>۴</sup> دانشیار، گروه علوم تشریحی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، اصفهان، ایران

تاریخچه مقاله:

ثبت اولیه: ۱۴۰۰/۱۰/۰۸

دریافت نسخه اصلاح شده: ۱۴۰۰/۱۱/۱۷

پذیرش علمی: ۱۴۰۰/۱۲/۱۴

کلیدواژه‌ها:

چاپ سه بعدی،

آلژینات،

پلی کاپرولاکتون،

پلی لاکتیک اسید،

مهندسی بافت

**چکیده** مهم‌ترین راهبرد در مهندسی بافت، ارتباط بین سه جزء زیست‌ماده، یاخته‌های زنده و مولکول‌های فعال

زیستی به منظور ساخت محیط‌های نسخه‌برداری شده از شرایط بافت آسیب‌دیده و سپس ترویج بافت با هدف ترمیم

و بازسازی است. برای اثرگذاری بالینی، این محیط‌ها باید تا حد امکان ویژگی‌های اصلی ماتریس خارج یاخته‌ای

(ECM) را در مقیاس یاخته‌ای تکرار کنند. مهندسی بافت توانسته است داربست‌های هیبریدی را برای حمایت از

بازسازی بافت غضروف با استفاده از روش‌های چاپ سه بعدی طراحی کند. در این مطالعه، داربست‌های سه بعدی با

استفاده از پلی کاپرولاکتون/پلی لاکتیک - کو - گلیکولیک اسید (PCL/PLGA) مورد تأیید FDA طراحی شدند. در ادامه،

نانوذرات آلژینات با غلظت‌های ۴۰ و ۴۵ (درصدوزنی)، به منظور بهبود چاپ پذیری، خواص مکانیکی و بررسی

زیست‌سازگاری داربست‌ها، به جوهر زیستی اضافه شد. در نهایت، داربست‌های چاپ سه بعدی، براساس خواص

مکانیکی، میزان آب دوستی سطح، میزان جذب آب، زیست‌تخریب پذیری، ریخت‌شناسی سطوح و میزان مانایی

یاخته‌ای ارزیابی شدند. نتایج نشان داد که افزایش درصد نانوذرات آلژینات در جوهر زیستی سبب افزایش درصد

تخلخل‌ها، آب دوستی سطح، افزایش خواص مکانیکی، مانایی یاخته و قابلیت چاپ پذیری می‌شود. همچنین، نتایج

نشان داد که جذب آب و مدول فشاری در داربست‌های PCL/PLGA چاپ سه بعدی حاوی ۴۵ درصد نانوذرات

آلژینات، بهینه‌تر از گروه‌های دیگر است و این جوهر زیستی می‌تواند در چاپ سه بعدی داربست‌های به کاررفته برای

رفع نواقص مهندسی بافت استفاده شود.



<https://doi.org/10.30501/jamt.2023.321697.1206>

URL: [https://www.jamt.ir/article\\_167936.html](https://www.jamt.ir/article_167936.html)

۱- مقدمه

داروهای جدید و توسعه در زمینه ساخت‌های سازه‌ای زیستی)

سبب شده است راهکارهای درمانی جدیدی برای ترمیم و

بازسازی بافت آسیب‌دیده کشف شوند [۱-۲]. راهکارهای

درمانی حاضر در زمینه مهندسی بافت<sup>۱</sup> و پزشکی ترمیمی یا

طی دو دهه گذشته، به کارگیری روش‌های گوناگون در

حوزه مهندسی بافت (نظیر استخراج یاخته از منابع یاخته‌ای

جدید، سنتز زیست‌مواد پیشرفته و نسخه‌برداری زیستی، کشف

<sup>۱</sup> Tissue Engineering

\*عهده دار مکاتبات: حمید مهدوی

نشانی: ایران، تهران، تهران، پژوهشگاه بسپار و پتروشیمی ایران، گروه سامانه‌های نوین دارورسانی، تلفن: ۰۲۱-۴۸۶۶۲۵۰۷، دورنگار: -

پیام‌نگار: [h.mahdavi@ippi.ac.ir](mailto:h.mahdavi@ippi.ac.ir)

روی داربست‌های چاپ سه‌بعدی حفظ کنند، می‌توانند بازسازی غضروف مفصلی را نیز میزان چشمگیری افزایش دهند [۱۴]. در مهندسی بافت، از روش‌های ساخت افزایشی برای دستیابی به سازه‌هایی با تخلخل باز و منظم، پیچیدگی ساختاری بالا و طرح‌های انعطاف‌پذیر استفاده می‌شود [۱۵-۱۶]. در سال‌های اخیر، به روش‌های ساخت افزایشی، به‌مثابه یکی از روش‌های ساخت داربست‌ها با پیچیدگی‌های ساختاری سه‌بعدی، در مهندسی بافت توجه شده است. قابلیت کنترل لایه‌های داخلی و خارجی از یک لایه به لایه بعدی، دقت و سرعت بالا در اجرای کار، استفاده از شبیه‌سازی‌های رایانه‌ای و انعطاف‌پذیری در اجرای شکل‌های داربست‌ها از مهم‌ترین ویژگی‌های چاپ سه‌بعدی شناخته شده است [۱۷-۱۸]. چاپگرهای سه‌بعدی می‌توانند این ساختارهای سه‌بعدی را از طریق کنترل جوهرهای حاوی فلزات، بسپارها، سرامیک‌ها یا چندسازه‌ها<sup>۱۱</sup> تشکیل دهند [۱۹]. داربست‌های چاپ سه‌بعدی، از طریق کنترل ریخت‌شناسی درشت‌تخلخل<sup>۱۲</sup>‌ها، سبب تسریع تبادل مواد مغذی و تأثیر فراوان در رشد و بقای یاخته‌ها می‌شوند [۲۰]. در چاپ سه‌بعدی، تکرارپذیری و بهره‌وری برای کاربردهای مهندسی بافت بسیار حیاتی است، زیرا معمولاً مجموعه‌ای از نمونه‌ها باید با زیست‌سازگاری بالا برای شرایط برون‌تنی<sup>۱۳</sup> و درون‌تنی<sup>۱۴</sup> آماده شوند [۲۱]. بر این اساس، چاپ سه‌بعدی برون‌ریزی<sup>۱۵</sup> روشی است که از طریق آن، جوهرهای زیستی، با اعمال فشار کنترل‌شده بر بستر پایه<sup>۱۶</sup>، از یک نازل خارج می‌شوند [۲۲]. در چاپ سه‌بعدی برون‌ریزی، باید الیاف سه‌بعدی برای چاپ ارزیابی و بهینه‌سازی شوند تا گرانروی جوهر زیستی و شارش‌شناسی<sup>۱۷</sup> بسپار (بررسی جریان و تغییر شکل جوهر زیستی تحت تأثیر تنش اعمال‌شده) در جهت چاپ سه‌بعدی با تفکیک‌پذیری بالا امکان‌پذیر شود. همچنین، محلول‌های بسپاری گران‌رو<sup>۱۸</sup> یا گران‌روی‌کشسانی<sup>۱۹</sup> دارای دمای عملیاتی‌اند

بازساختی<sup>۱</sup> در سه گروه دسته‌بندی می‌شوند: ۱) درمان بر مبنای یاخته، ۲) درمان با داربست‌های بدون یاخته و ۳) کاشت سازه‌های حاوی یاخته [۳].

مهم‌ترین راهبرد در مهندسی بافت، ارتباط بین سه جزء زیست‌ماده، یاخته‌های زنده و مولکول‌های فعال زیستی به‌منظور ساخت محیط‌های سنتزی و نسخه‌برداری‌شده از شرایط بافت آسیب‌دیده و سپس ترویج بافت با هدف ترمیم و بازسازی است. به‌منظور تأثیرگذاری بالینی، چنین محیط‌هایی باید نزدیک به محیط نسخه‌برداری‌شده از ماتریس خارج یاخته‌ای<sup>۲</sup> (ECM) و در مقیاس‌های یاخته‌ای باشند [۴-۷]. آسیب‌های غضروف مفصلی که از افزایش سن، ضربه، آماس مفصل<sup>۳</sup> و سایر بیماری‌های سوخت‌وسازی<sup>۴</sup> نشأت می‌گیرند، زندگی بیمار را تحت تأثیر قرار می‌دهند. غضروف که بافتی همبند به‌شمار می‌رود، به‌دلیل نداشتن عصب و عروق، به‌راحتی بازسازی نمی‌شود. برای پیشگیری از آسیب‌های غضروف مفصلی و درمان آن‌ها، راهکارهایی مانند ریزشکستگی<sup>۵</sup>، مفصل‌سازی<sup>۶</sup>، ساپنده، دبریدمان آرتروسکوپی<sup>۷</sup> و روش‌های ترمیمی کاشت یاخته غضروفی خودپیوندینه<sup>۸</sup> پیشنهاد می‌شود [۸-۹]. البته، هریک از راهکارهای درمانی یادشده محدودیت‌هایی دارند، از جمله نقص در ساختار غضروف و ضعیف‌شدن بافت غضروف در طول زمان [۱۰]. برای مثال، پیوند یاخته‌غضروفی<sup>۹</sup>، با وجود نتایج مثبت، به اهداکننده نیاز دارد و جراحی از طریق فرایند تهاجمی و آسیب ثانویه، به‌طور کلی آسیب در مقیاس بزرگ، انجام می‌شود [۱۱-۱۲]. در دهه‌های گذشته، مهندسی بافت، از طریق کنترل معماری داربست‌های چاپ سه‌بعدی و با استفاده از یاخته‌های بنیادی میان‌آکنه‌ای<sup>۱۰</sup> در دسترس، فاکتورهای رشد و ارتباط مناسب بین آن‌ها، راهکارهایی نزدیک به کاربردهای بالینی ارائه کرده است [۱۳]. مطالعات نشان می‌دهند که یاخته‌های غضروفی، نه‌تنها می‌توانند شکل ظاهری خود را پس از کاشت

<sup>11</sup> Composite

<sup>12</sup> Macroporous

<sup>13</sup> In vitro

<sup>14</sup> In vivo

<sup>15</sup> Extrusion

<sup>16</sup> Stage

<sup>17</sup> Rheology

<sup>18</sup> Viscous

<sup>19</sup> Viscoelastic

<sup>1</sup> Regenerative Medicine

<sup>2</sup> Extraellular Matrix

<sup>3</sup> Arthritis

<sup>4</sup> Metabolic

<sup>5</sup> Microfracture

<sup>6</sup> Arthroplasty

<sup>7</sup> Arthroscopic Debridement

<sup>8</sup> Autologous

<sup>9</sup> Chondrocyte

<sup>10</sup> Mesenchymal

فعال به PLGA پاسخ می‌دهند و سطح مواد را تخریب می‌کنند [۴۳-۴۶]. داربست PCL/PLGA<sup>۱۰</sup> دارای استحکام مکانیکی، پایداری ساختاری و تکثیر یاخته‌ای مناسب برای بازسازی بافت است [۴۷]. نتایج نشان داده‌اند که ساختارهای چاپ سه‌بعدی با استفاده از PP، در طول ۱۴ روز کشت یاخته‌ای، می‌توانند در بهبود رفتار یاخته‌ای در درازمدت بسیار تأثیرگذار باشند [۴۸-۵۰].

آلژینات بسیاری طبیعی است که به دلیل کنترل نسبتاً بالا بر تشکیل ساختارهای بسیار متخلخل که انتشار مولکول‌های بزرگ در داخل و خارج از آب‌ژل<sup>۱۱</sup> را تسهیل می‌کنند، کاربرد گسترده‌ای در مهندسی بافت دارد [۵۱-۵۴]. آلژینات ویژگی‌های زیستی مطلوبی دارد و می‌تواند بسیار متورم شود. همچنین، محیطی سه‌بعدی پدید می‌آورد که از آن طریق می‌تواند آب فراوانی را در خود نگه دارد. علاوه بر این، آلژینات می‌تواند تکثیر و تمایز یاخته‌های فاکتورهای رشد مشابه بافت‌های زیستی را تسهیل کند [۵۵-۵۶]. آلژینات آب‌زلی است که هنگام ایجاد ساختار سه‌بعدی یکنواخت، در کنترل پارامترهای چاپ سه‌بعدی محدودیت‌هایی دارد. به‌عنوان مثال، آلژینات، در غلظت‌های بسیار بالا، موجب عملکردهای زیستی پایین‌تر می‌شود و در غلظت‌های بسیار پایین، یکپارچگی ساختاری سازه‌ها را به‌خطر می‌اندازد. محدودیت دیگر آلژینات این است که هنگام بارگذاری مکانیکی، شکنندگی بالا و خاصیت ارتجاعی کمی دارد [۵۷-۵۹]. برای حل این مشکلات، آب‌ژل‌هایی مانند آلژینات باید با بسپارهای مصنوعی مانند PCL و PLGA ادغام شوند [۶۰]. کوندو<sup>۱۲</sup> و همکاران نشان داده‌اند که داربست‌های چاپ سه‌بعدی PCL/Alginate، که حاوی یاخته‌غضروفی و فاکتور رشد TGFβ هستند، سبب سنتز ماتریس خارج یاخته‌ای (ECM) و ترشح گلیکوزآمینوگلیکان<sup>۱۳</sup> (GAG) بالا می‌شوند و واکنش مطلوبی از خود نشان می‌دهند [۶۱].

هدف از این مطالعه، در گام اول، بررسی و رسیدن به درصد غلظت‌های بهینه از جوهر زیستی نانوچندسازه‌ای متشکل

[۲۳-۲۴]. چاپ سه‌بعدی برون‌ریزی مبتنی بر محلول<sup>۱</sup> (SBE) برای چاپ بسپارهای مصنوعی مانند پلی - ال - لاکتید اسید<sup>۲</sup> (PLLA)، پلی‌کاپرولاکتون<sup>۳</sup> (PCL) و پلی‌لاکتیک کو - گلیکولیک اسید<sup>۴</sup> (PLGA) و بسپارهای طبیعی مانند آلژینات<sup>۵</sup> و کیتوسان<sup>۶</sup> استفاده شده است [۲۵-۲۶]. پلی‌کاپرولاکتون یکی از معروف‌ترین بسپارهای مصنوعی مورد تأیید FDA برای کاربردهای مهندسی بافت است [۲۷]. این بسپار در بیشتر حلال‌های آلی دارای استحکام مکانیکی بالا، زیست‌تخریب‌پذیری<sup>۷</sup>، زیست‌سازگاری<sup>۸</sup>، نقطه ذوب پایین (۶۰ درجه سلسیوس)، حلالیت مناسب و قابلیت شکل‌دهی با روش‌های گوناگون است [۲۸-۲۹]. قابلیت چاپ سه‌بعدی، انجماد سریع پس از برون‌ریزی، زیست‌سازگاری و استحکام مکانیکی مناسب، دلیل اصلی انتخاب پلی‌کاپرولاکتان (PCL) برای ساخت الیاف سه‌بعدی است [۳۰]. با این حال، سازه‌های چاپ سه‌بعدی مبتنی بر PCL دارای محدودیت‌هایی مانند نرخ تخریب آهسته پس از کاشت [۳۱]، عملکرد زیستی محدود در بازسازی بافت‌های نرم [۳۲]، تخلخل محدود، زبری سطح و استحکام پایین در کاربردهای داربست‌های بافت غضروف‌اند [۳۳]. به‌منظور غلبه بر محدودیت‌های اشاره‌شده، پلی‌کاپرولاکتان را می‌توان با بسپارهای طبیعی یا مصنوعی مانند کلاژن [۳۴]، کیتوسان [۳۵]، پلی‌لاکتیک - کو - گلیکولیک اسید (PLGA) چندسازه کرد [۳۶]. ذرات غضروف [۳۸] دارای ترکیبات بسیاری، با استفاده از ماتریس‌های یاخته‌زدایی‌شده مانند زیرمخاط روده (dSIS) [۳۷]، قابلیت چاپ را بهبود می‌بخشند، در ریخت‌شناسی داربست نیز تأثیر می‌گذارند [۳۸]. PLGA که بسپاری مصنوعی است، به دلیل زیست‌سازگاری و تخریب زیستی مناسب و همچنین پشتیبانی از چسبندگی و تکثیر یاخته‌ای، کاربرد گسترده‌ای در زیست‌پزشکی دارد [۳۹-۴۱]. PLGA مورد تأیید FDA و غیرسمی است، اما انتشار محصولات اسیدی ناشی از تخریب مانند لاکتات می‌تواند به التهاب موضعی بینجامد [۴۲]. مطالعات نشان می‌دهند که درشت‌خوارها<sup>۹</sup> به‌طور

<sup>8</sup> Biocompatibility

<sup>9</sup> Macrophage

<sup>10</sup> PCL/PLGA

<sup>11</sup> Hydrogel

<sup>12</sup> Kundu

<sup>13</sup> Glycosaminoglycan

<sup>1</sup> Solution Based Extrusion

<sup>2</sup> Poly-L-Lactic Acid

<sup>3</sup> Polycaprolactone

<sup>4</sup> Poly Lactic-co-Glycolic Acid

<sup>5</sup> Alginate

<sup>6</sup> Chitosan

<sup>7</sup> Biodegradation

به‌دست آمدن پودری به اندازه نانو، در آسیاب گلوله‌ای (FRITSCH, FP4, USA) با سرعت ۴۲۵ دور در دقیقه و سرعت ۲۱۲ دور در دقیقه، به مدت سه ساعت و نیم قرار داده شدند و سپس، از داخل اندازه غربال ۱۵۰ میکرون عبور داده شدند.

## ۲-۲- چاپ سه‌بعدی داربست‌ها

پلی‌کاپرولاکتون (Mn=45,000 g/mol, from Sigma-) و لاکتیک - کو - گلیکولیک (Aldrich (St. Louis, MO, USA)) برای تهیه و بهینه‌سازی جوهرهای زیستی مناسب برای داربست‌های چاپ سه‌بعدی، ابتدا، ۱/۰۵ گرم P در ۳ میلی‌لیتر کلروفرم حل شد؛ سپس این مواد، با استفاده از هم‌زن مغناطیسی، به مدت یک ساعت مخلوط شدند. ۰/۴۵ گرم PLGA به محلول P اضافه شد و این دو، به مدت ۲ ساعت، در دمای ۳۵ درجه سلسیوس با هم مخلوط شدند تا محلول بسپاری همگنی به‌دست آید. به‌منظور دستیابی به جوهر زیستی بهینه، نانوذرات آلژینات با درصدهای ۴۰ و ۴۵ درصد وزنی، به‌عنوان پرکننده، به ترکیب بسپاری پایه اضافه شد. درنهایت، جوهرهای زیستی چندسازه‌PP همراه با نانوذرات آلژینات، با استفاده از چاپگر سه‌بعدی محلول پایه برون‌ریزی (Abtin II، ایران)، چاپ سه‌بعدی شدند. سه گروه داربست متخلخل شامل P، 40 % PCL/PLGA/Alginate و (PPA40) و 45 % PCL/PLGA/Alginate (PPA45) تهیه شدند. نکته مهم این بود که تنظیمات چاپ سه‌بعدی مورداستفاده برای ساخت این داربست‌ها بهینه‌سازی شد و بهترین ساختار به‌دست آمد. مشخصات داربست‌های چاپ سه‌بعدی عبارت است از طول ضلع ۲۰ میلی‌متر (۱۲ رشته، فاصله بین رشته‌ها یک میلی‌متر) و ارتفاع کل ۵ میلی‌متر (۲۵ لایه، ۳۰۰ میکرومتر/لایه). جوهرهای گوناگون، از طریق نازلی با قطر داخلی ۴۲۰ میکرومتر، خارج شدند. سرعت حرکت سر نازل  $1/85 \text{ mms}^{-1}$  و سرعت چنده<sup>۵</sup> خروجی جوهر  $0/099 \text{ mms}^{-1}$  بود.

از PP است که دارای غلظت‌های گوناگون نانوذرات آلژینات به‌عنوان پرکننده طبیعی باشد و از ماتریس خارج یاخته‌ای غضروف برای چاپ سه‌بعدی داربست از طریق روش چاپ سه‌بعدی محلول مبتنی بر برون‌ریزی در دسترس‌تر و ارزان‌قیمت‌تر بهره برد؛ در گام دوم، دستیابی به ساختار پایه سه‌بعدی با تخلخل باز و به‌هم‌پیوسته است و در گام سوم، ارزیابی خواص فیزیکی، مکانیکی و مانایی یاخته داربست‌های چاپ سه‌بعدی است.

در مطالعات پیشین، از PP برای طراحی داربست‌های چاپ سه‌بعدی تحت دمای ذوبی استفاده شده، اما کاستی‌های مختلفی نیز از نظر خواص شیمی‌فیزیکی و زیستی وجود داشته‌اند [۶۲]. در این تحقیق، برای اولین بار، جوهر زیستی چندسازه‌ای، براساس مواد بسپاری مصنوعی PCL، PLGA و بسپار طبیعی به‌دست‌آمده از نانوذرات آلژینات، برای چاپ سه‌بعدی محلول مبتنی بر برون‌ریزی با هدف صورت‌بندی و بهینه‌سازی داربست‌های چاپ سه‌بعدی در مهندسی بافت غضروف استفاده شد.

## ۲- روش تحقیق

### ۲-۱- تهیه نانوذرات آلژینات

محلول آلژینات ۱/۵ درصد حجمی، با حل کردن پودر آلژینات (Sigma, 9005-38-3) در محلول کلرید سدیم ۰/۹ درصد، تهیه شد. برای از بین بردن آلاینده‌ها، محلول آلژینات از صافی<sup>۱</sup> با منافذ ۰/۲ میکرومتر عبور داده شد و سپس، با استفاده از هم‌زن مغناطیسی، به مدت ۲ ساعت، هم‌زده شد. به‌منظور تهیه دانه‌های آلژینات، تعلیق آلژینات سدیم، از طریق سوزن سنج<sup>۲</sup> ۲۳، به محلول ۱۰۲ میلی‌مولار  $\text{CaCl}_2$  منتقل شد (Merck, 10043-52-4). دانه‌های آلژینات، پس از ۱۵ دقیقه، دو بار، با محلول شور (سالین)<sup>۳</sup> ۰/۹ درصد شسته شدند [۶۳]. پس از آن، به مدت یک شبانه‌روز، در دمای منفی ۷۰ درجه سلسیوس قرار داده شدند و با استفاده از دستگاه خشک‌کن انجمادی (منیفولد، F.D-V-450)، خشک شدند تا آب کاملاً از آن‌ها خارج شود. درنهایت، برای تبدیل شدن به نانوذرات آلژینات و

<sup>4</sup> Lyophilize

<sup>5</sup> Dose

<sup>1</sup> Filter

<sup>2</sup> Needle Gauge

<sup>3</sup> Saline

### ۲-۳- خصوصیات داربست‌ها

تخریب ( $W_{Loss}$ ) به صورت زیر تعریف شد:

#### ۲-۳-۱- آزمون زاویه تماس

$$W_{Loss} \% = (W_0 - W_t) / W_0 \times 100 \quad (2)$$

زاویه تماس آب<sup>۱</sup> (WCA) داربست‌ها، با استفاده از زاویه تماس (CA-ES10)، اندازه‌گیری شد. در این اندازه‌گیری، از مدل نظریه کیسی - باکسر<sup>۲</sup> استفاده شد [۹۱]. سپس، قطره‌ای آب در بالای سطح داربست انداخته و پس از ۱۵ ثانیه، در دمای اتاق، از آن عکس گرفته شد. اندازه قطره حدود ۴ میکرولیتر و آزمایش ۴ بار تکرار شد.

#### ۲-۳-۴- آزمون طیف‌شناسی تبدیل فوریه زیرقرمز (ATR-FTIR)

با استفاده از طیف‌شناسی تبدیل فوریه زیرقرمز<sup>۶</sup> (ATR-FTIR) در طیف‌سنج JASCO-6300 FT-IR (ساخت ژاپن)، صفحه شیشه‌ای آزمایشگاهی بسیاری از همه گروه‌ها تهیه شد و طیف‌ها در محدوده ۳۵۰ تا ۴۰۰۰ عکس سانتیمتر<sup>-۱</sup> (cm<sup>-1</sup>) ثبت شدند.

#### ۲-۳-۲- ظرفیت جذب آب داربست‌ها

ظرفیت جذب آب داربست‌های چاپ سه‌بعدی نانوجندسازه‌ای، از طریق روشی که قبلاً گزارش شده بود، طبق استاندارد ASTM D570-98، اندازه‌گیری شد [۶۴]. به‌طور خلاصه، وزن خشک نمونه‌ها، با ۳ تکرار ( $W_d$ ) و با استفاده از ترازوی دیجیتال، تعیین شد. نمونه‌ها، در ۱۰ میلی‌لیتر سالیین بافر فسفات<sup>۳</sup> (PBS) (۱۰ میلی‌مولار، pH = ۷/۴)، در دمای ۳۷ درجه سلسیوس، در مقاطع زمانی مختلف (۱، ۷، ۱۴، ۲۴، ۴۸ ساعت) غوطه‌ور شدند. وزن خیس نمونه‌ها ( $W_w$ )، پس از برداشتن قطرات آب روی داربست‌ها با استفاده از کاغذ صافی، تعیین و ثبت شد. در نهایت، ظرفیت جذب آب ( $W_a$ ) با استفاده از رابطه زیر محاسبه شد:

#### ۲-۳-۵- آزمون پراکندگی نور پویا (DLS)

میزان توزیع اندازه نانوذرات آلژینات سدیم پراکنده در آب دو بار تقطیر، از طریق روش پراکندگی نور پویا<sup>۷</sup> (DLS) و با استفاده از دستگاه (HORIBA SZ-100، ژاپن) به دست آمد.

$$W_a \% = ((W_w - W_d) / W_d) \times 100 \quad (1)$$

#### ۲-۳-۶- خواص مکانیکی داربست‌های چاپ سه‌بعدی

نمونه‌های استوانه‌ای، با قطر ۳ میلی‌متر و ارتفاع ۵ میلی‌متر، توسط سوراخ‌کن بافت‌برداری تهیه شدند. سپس، به‌منظور تحلیل مدول فشاری داربست‌های چاپ سه‌بعدی، از دستگاه آزمایش مکانیکی (walter+bai, Switzerland) با بارسنج<sup>۸</sup> ۵۰ نیوتن در حالت خشک و در دمای اتاق استفاده شد. بار، به صورت عمودی و با سرعت ضربدری یک میلی‌متر در دقیقه، فشرده شد تا این‌که ضخامت اصلی داربست‌ها تا ۷۰ درصد کاهش یافت. سپس مدول فشار برای تمام گروه داربست‌های چاپ سه‌بعدی در کرنش فشاری ۱۰ درصد از شیب بخش خطی منحنی تنش - کرنش (n=3) محاسبه شد [۶۵-۶۸].

#### ۲-۳-۳- آزمون زیست تخریب پذیری

داربست‌ها، با استفاده از سوراخ‌کن بافت‌برداری<sup>۴</sup> ۲ میلی‌متری، بریده شدند. وزن اولیه نمونه‌ها ( $W_0$ ) اندازه‌گیری شد و در ۵ میلی‌لیتر PBS (۰/۰۱ مولار، pH = ۷/۴) و در دمای ۳۷ درجه سلسیوس در طول آزمایش، به مدت ۱۲ هفته، گرم‌خانه‌گذاری<sup>۵</sup> شدند. در پایان، از هر نقطه زمانی تخریب (هفتگی)، در هر گروه، ۳ نمونه (n=3) خارج و با آب مقطر کاملاً شسته شد و هریک، در دمای اتاق، با وزن ثابت ( $W_t$ ) در خلأ خشک شدند. درجه

#### ۲-۳-۷- ریخت‌شناسی و مطالعه سطحی

ویژگی‌های عارضه‌نگاشتی<sup>۹</sup> و اتصالات متخلخل داربست‌های چاپ سه‌بعدی PPA40 و PPA45 با استفاده از

<sup>6</sup> Fourier Transform Infrared Spectroscopy

<sup>7</sup> Dynamic Light Scattering

<sup>8</sup> Load Cell

<sup>9</sup> Topographic

<sup>1</sup> Water Contact Angle

<sup>2</sup> Cassie-Baxter

<sup>3</sup> Phosphate-Buffered Saline (PBS)

<sup>4</sup> Biopsy Punch

<sup>5</sup> Incubate



استفاده شد. محیط کشت ابتدا کشیده شد و به میزان ۴۰۰ میکرولیتر، در چاهک‌های مخصوص محلول MTT با غلظت ۰/۵ میکروگرم در میلی‌لیتر، در ظرف کشت ۲۴ چاهکی قرار گرفت (n=3). سپس، هر ظرف، در گرم‌خانه، با ۵ درصد CO<sub>2</sub> و در دمای ۳۷ درجه سلسیوس، به مدت ۴ ساعت گرم‌خانه‌گذاری شد. سپس، محلول MTT برداشته شد و یک میلی‌لیتر دی‌متیل سولفوکسید<sup>۷</sup> (DMSO) برای حل کردن بلورهای فورمازان در چاهک‌ها اضافه شد. در نهایت، پس از پیست کردن تعلیق هر داربست و انتقال ۱۰۰ میکرولیتر مایع رویی به ظرف ۹۶ چاهکی، شدت نوری، با طول موج ۵۷۰ نانومتر، توسط دستگاه خوانش رنگ<sup>۸</sup> ثبت شد. داده‌ها به صورت میانگین  $\pm$  انحراف معیار (SD) و از طریق معادله زیر گزارش شده‌اند [۷۷-۷۹]:

$$(۵) \quad \text{غلظت نوری جذب شده توسط سلول} \times 100 = \frac{\text{غلظت نوری گروه کنترل}}{\text{غلظت نوری گروه کنترل}} (\%) \text{ مانایی سلول}$$

#### ۱۰-۳-۲- چسبندگی و ریخت‌شناسی یاخته‌ای

به منظور بررسی چسبندگی و ریخت‌شناسی یاخته‌ای به سطوح دو گروه داربست چاپ سه‌بعدی PPA40 و PPA45، میزان  $10^5 \times 1$  یاخته‌غضروفی روی هر گروه داربست چاپ سه‌بعدی قرار گرفت و به مدت ۲۴ ساعت گرم‌خانه‌گذاری شدند. پس از حذف محیط کشت، داربست‌ها دو بار با PBS شست‌وشو و با محلول گلو تار آلدئید ۴ درصد تثبیت شدند. به منظور مشاهده چسبندگی و ریخت‌شناسی یاخته‌های غضروفی از طریق تصاویر SEM، داربست‌ها در محلول‌های الکلی درجه‌بندی شده قرار گرفتند و با استفاده از طلا پوشانده شدند.

#### ۱۱-۳-۲- تحلیل آماری

تمام داده‌های آماری به صورت میانگین  $\pm$  انحراف معیار بیان شد. تجزیه و تحلیل آماری گروه‌های گوناگون داده‌ها با استفاده از آزمون تحلیل واریانس یک‌طرفه<sup>۹</sup> (ANOVA) و

میکروسکوپ الکترونی روبشی<sup>۱</sup> (SEM) JEOL JSM-5200 مشاهده شد. تحلیل‌ها همراه با مطالعات SEM انجام پذیرفت. یک داربست استوانه‌ای از هر گروه به طور تصادفی انتخاب و با میکروتوم<sup>۲</sup> از وسط بریده شد. این مقاطع با یک لایه نازک از طلا، با استفاده از دستگاه کندوپاش، به مدت ۵ دقیقه قبل از مشاهده با میکروسکوپ الکترونی روبشی، پوشانده شدند [۶۹-۷۰].

#### ۸-۳-۲- تحلیل اندازه حفره‌ها و درصد تخلخل

تخلخل داربست، با استفاده از اصل ارشمیدس، در آب دو بار تقطیر ارزیابی شد [۸۹]. به طور خلاصه،  $W_{sat}$  به معنای وزن داربست اشباع‌شده از آب و  $W_{dry}$  به معنای وزن خشک داربست است و  $W_{sus}$  وزن داربست معلق در آب را نشان می‌دهد (n=3). درصد تخلخل نیز از طریق زیر محاسبه شد:

$$(۴) \quad \text{درصد تخلخل} = \frac{(W_{sat} - W_{dry})}{(W_{sat} - W_{sus})} \times 100 \%$$

تجزیه و تحلیل اندازه منافذ، قطر رشته و فاصله بین رشته‌ها

توسط نرم‌افزار MATLAB انجام شد.

#### ۹-۳-۲- قابلیت مانایی یاخته‌ای روی داربست‌های چاپ سه‌بعدی

مانایی یا زنده ماندن<sup>۳</sup> یاخته‌های غضروفی، با استفاده از آزمون MTT<sup>۴</sup> و براساس استاندارد ISO-10993-5:2009، در روزهای ۱، ۳ و ۷ کشت یاخته‌ای، ارزیابی شد [۹۰]. داربست‌های چاپ سه‌بعدی به صورت استوانه‌ای برای کشت یاخته‌ای آماده شدند و با اتانول ۷۰ درصد و نور UV سترون<sup>۵</sup> شدند. داربست‌ها، به مدت یک شبانه‌روز، در محیط کشت قرار داده شدند. غضروف دنده‌ای انسان به دست آمده از مطالعه قبلی، مجدداً، از حالت انجماد خارج و برای کشت روی داربست‌ها عبور داده شد [۷۷]. محیط کشت DMEM<sup>۶</sup> کم گلوکز همراه با ۱۰ درصد FBS و  $100 \mu\text{g mL}^{-1}$  از پنی‌سیلین - استرپتومایسین

<sup>5</sup> Sterile

<sup>6</sup> Dulbecco's Modified Eagle Medium

<sup>7</sup> DiMethyl Sulfoxide

<sup>8</sup> ELISA device

<sup>9</sup> One-Way Analysis of Variance

<sup>1</sup> Scanning Electron Microscope

<sup>2</sup> Microtome

<sup>3</sup> Viability

<sup>4</sup> 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide



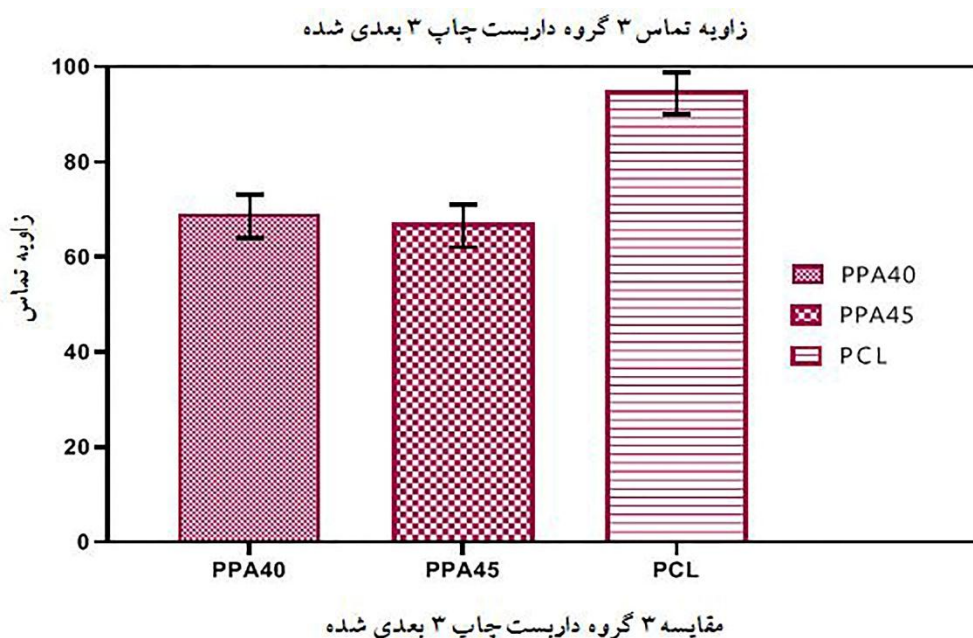
معنی دار است ( $p < 0/05$ ) (شکل ١). براساس داده‌های گزارش شده، زاویه تماس بسیار آب‌گریز PCL حدود ١١٨ است [٧١]. PLGA، به دلیل وجود واحدهای گلیکولیدی، آب‌گریزی کمتری دارد که آب‌دوست‌تر از واحدهای لاکتید در نظر گرفته می‌شود. وجود نانوذرات آلژینات ترکیب شده با PP موجب شده است آب‌دوستی داربست‌های چاپ سه‌بعدی PPA40 و PPA45 بیشتر از داربست P باشد؛ زیرا آلژینات سدیم باعث افزایش آب‌دوستی سطح می‌شود. همچنین، به دلیل بیشتر بودن غلظت آلژینات در داربست چاپ سه‌بعدی PPA45، در مقایسه با PPA40، میزان آب‌دوستی آن افزایش یافته است.

آزمون کمترین تفاوت معنی‌دار<sup>١</sup> (LSD) با استفاده از نرم‌افزار SPSS نسخه ١١/٥ انجام شد. مقادیر دارای  $p < 0/05$  از نظر آماری، معنادار در نظر گرفته شدند.

### ٣- نتایج و بحث

#### ٣-١- آزمون زاویه تماس

در شکل ١، نتایج به دست آمده از اندازه‌گیری WCA برای داربست‌های مختلف چاپ سه‌بعدی نشان داده شده‌اند. این نتایج نشان دادند که زاویه تماس P معادل  $93/94 \pm 4/41$ ، زاویه تماس PPA45 معادل  $67/30 \pm 3/78$  و زاویه تماس PPA40 معادل  $1/51 \pm 69/14$  است و تفاوت بین زوایای تماس داربست‌ها



شکل ١. زاویه تماس داربست‌های چاپ سه‌بعدی P، PPA45 و PPA40

داربست‌های چاپ سه‌بعدی نشان داده شده است. با اضافه شدن آلژینات و افزایش غلظت، جذب آب PPA45 بیشتر از PPA40 بود (شکل ٢). بنابراین، وجود نانو ذرات آلژیناتی می‌تواند محیط کشت را جذب و نفوذ مناسب مواد مغذی را تسهیل کند و زیست و بقای یاخته‌ها را افزایش دهد. توانایی جذب آب نهایی داربست با قابلیت اتصال به منافذ، تخلخل و کیفیت مواد داربست مرتبط است [٧٣]. علاوه بر این، سرعت بالای جذب آب در داربست PPA45 به واسطه افزایش درصد نانوذرات آلژینات انجام می‌شود. آب‌دوستی بالای داربست چاپ سه‌بعدی

#### ٣-٢- ظرفیت جذب آب داربست‌ها

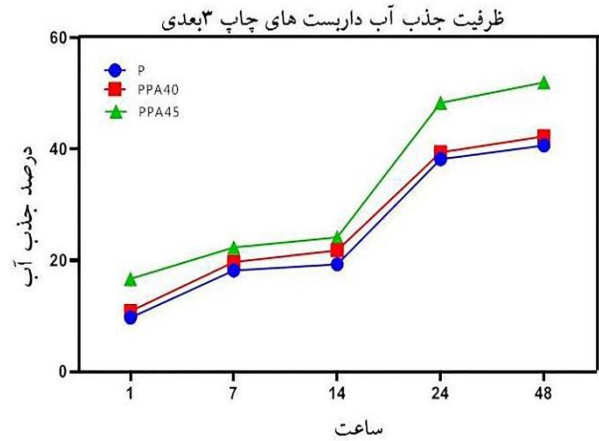
تجزیه زیستی عامل مهمی در ارزیابی بازسازی غضروف است. از آنجاکه ظرفیت جذب آب بیشتر می‌تواند به تجزیه زیستی بیشتر بینجامد، نانوذرات آلژینات، برای بهبود جذب آب و تجزیه زیستی داربست‌های سه‌بعدی، به داربست‌های بسیاری اضافه شدند. جذب آب عمدتاً عاملی اساسی در تخریب داربست در نظر گرفته می‌شود. همچنین، از سنجش جذب آب برای ارزیابی غیرمستقیم اتصال بین منافذ داربست‌های ساخته شده استفاده می‌شود [٧٢]. در شکل ٢، درصد جذب آب

<sup>1</sup> Least Significant Difference

### ۳-۳- آزمون زیست تخریب پذیری

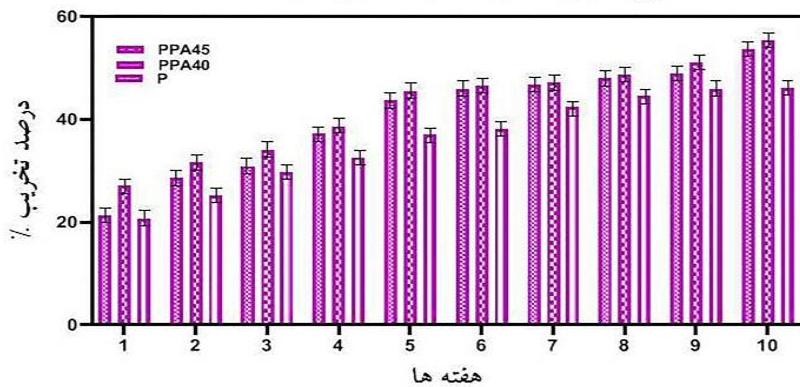
داربست‌های حاوی نانوذرات آلژینات ۴۵ درصد، در مقایسه با داربست‌های چاپ سه‌بعدی ۴۰ درصد و P، میزان تخریب بالاتری داشتند. از هفته اول تا هفته پنجم، داربست‌های حاوی نانوذرات آلژینات کاهش وزن چشمگیری را نشان دادند، در حالی که داربست‌های P به آرامی وزن کم کردند (شکل ۳). به همین ترتیب، در هفته نهم، کاهش وزن داربست‌ها با نانوذرات آلژینات تا هفته دهم تشدید شد. افزایش میزان تخریب در داربست‌های چاپ سه‌بعدی حاوی نانوذرات آلژینات، در مقایسه با داربست P، نشان می‌دهد که علاوه بر افزایش آب‌دوستی، پتانسیل بالای آن می‌تواند موجب کاربرد گسترده آن در مهندسی بافت غضروف شود. نانوذرات آلژینات، به دلیل تورم و جذب آب، می‌توانند به محیط کاراندام‌شناختی<sup>۱</sup> و رشد یاخته‌های غضروف و ترمیم آن کمک کنند ( $p < 0/0001$ ).

PPA45 به محیط اجازه می‌دهد تا به منافذ داخلی برسد و باعث انتشار آسان مواد مغذی و ترویج رشد و تکثیر یاخته‌ای، به‌ویژه در گروه نانوذرات آلژینات ۴۵ درصد شود ( $p < 0/0001$ ) [۷۴].



شکل ۲. ظرفیت جذب آب داربست‌های چاپ سه‌بعدی P، PPA45 و PPA40

### نرخ تخریب ۳ گروه داربست چاپ سه‌بعدی شده



شکل ۳. آزمون زیست تخریب پذیری داربست‌های چاپ سه‌بعدی P، PPA45 و PPA40

نانوذرات آلژینات، مربوط به گروه C-OH کششی است [۷۷]. حضور قله، در محدوده  $1365 \text{ cm}^{-1}$ ، در همه نمونه‌ها، تغییر شکل پیوند O-H ناشی از برهم‌کنش میان اجزای موجود در ساختار چندسازه و هم‌پوشانی با پیوند C-O کششی متقارن در این محدوده را نشان می‌دهد. قله‌های ضعیف، در محدوده  $1463-1468 \text{ cm}^{-1}$ ، در تمامی طیف‌ها، مربوط به پیوند نامتقارن کششی C=O و پیوند C-H (مربوط به گروه متیل) موجود در ساختار بسپارهای چندسازه‌اند [۷۸]. قله قوی، در  $1720 \text{ cm}^{-1}$ ، در تمامی طیف‌ها، پیوندهای استری موجود در ساختار بسپارهای چندسازه را نشان می‌دهد که با پیوند کششی C=O هم‌پوشانی

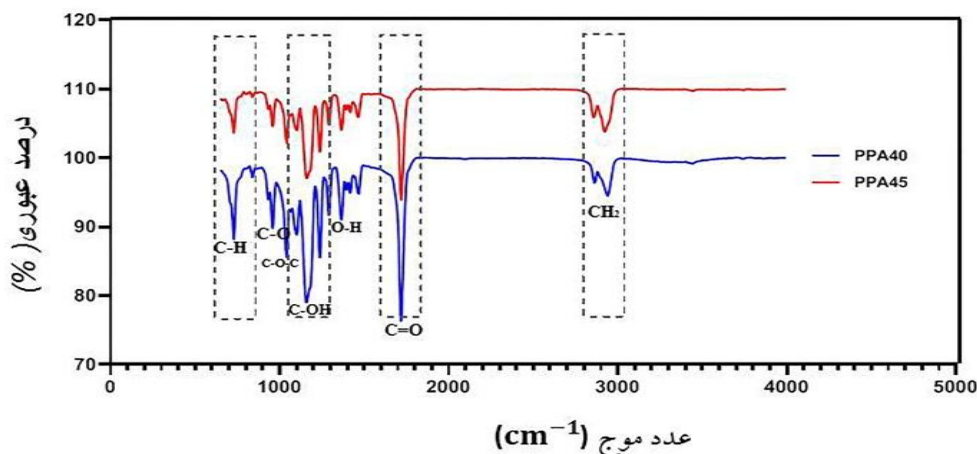
### ۳-۴- آزمون طیف‌شناسی تبدیل فوریه زیرقرمز (FTIR)

وجود قله، در محدوده  $727 \text{ cm}^{-1}$  در هر دو طیف، مربوط به پیوند C-H کششی است (شکل ۴). حضور قله در محدوده  $932-957 \text{ cm}^{-1}$  می‌تواند مربوط به پیوند C-O در ساختار PP و پیوند واحدهای مونورونیک و گلورونیک موجود در ساختار آلژینات باشد [۷۵]. حضور قله در محدوده  $1042 \text{ cm}^{-1}$  بیانگر پیوند C-O-C (اتری) کششی مربوط به پیوند گلورونیک و مونوریک در ساختار آلژینات و پیوند C-CH<sub>3</sub> ناشی از حضور PLGA در ساختار چندسازه است [۷۶]. قله نسبتاً قوی، در طول موج  $1157-1182 \text{ cm}^{-1}$ ، در نمونه حاوی ۴۰ و ۴۵ درصد

<sup>1</sup> Physiologic

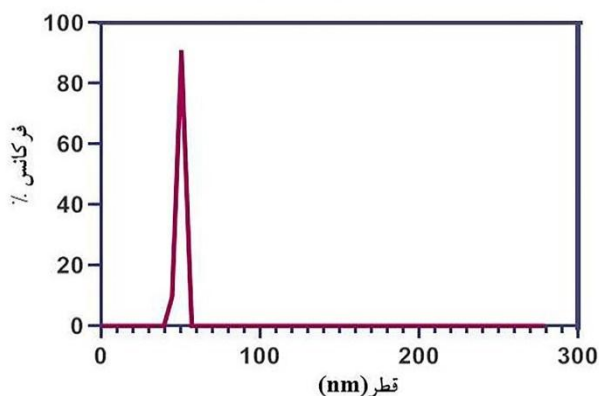
یافته است. حضور قله، در محدوده  $2937-2860 \text{ cm}^{-1}$ ، مربوط است [۷۹].  
به هم‌پوشانی پیوند متقارن کششی  $\text{CH}_2$  و پیوند کششی C-H

#### FTIR داربست‌های چاپ ۳ بعدی



شکل ۴. آزمون FTIR داربست‌های چاپ سه‌بعدی PPA40 و PPA45

#### DLS نانو ذرات آلژینات



شکل ۵. توزیع اندازه ذرات نانو ذرات آلژینات

#### ۳-۵- آزمون پراکندگی نور پویا (DLS)

در شکل ۵ که داده‌های حاصل از تجزیه و تحلیل DLS را نشان می‌دهد، اندازه نانو ذرات آلژینات در محیط آبی به دست آمده است. توزیع درصد وزنی حجمی نشانه حضور جمعیت ذرات با میانگین قطر  $67/9$  نانومتر ( $SD=2/6$  نانومتر) است. آب‌زل‌های نانوچندسازه‌ای در آب، با پیوندهای شیمیایی یا فیزیکی بسیاری در حضور نانو ذرات مربوطه، تهیه می‌شوند. نانو ذرات، در مقایسه با بسیاری، سبب بهبود خصوصیات چندسازه‌ها می‌شوند و می‌توانند مواد را به صورت لایه‌ای کنار هم قرار دهند [۸۰]. داربست‌های ساخته شده با نانو ذرات آلژینات چندشاخه<sup>۱</sup> نسبت به داربست‌های تنها بسیاری شده سبب افزایش خصوصیات شیمی فیزیکی داربست‌ها گردیده اند [۸۱]. وجود گروه‌های OH و COOH در ساختار آلژینات سبب می‌شود با زنجیره‌های بسیاری دیگر اتصال برقرار کنند [۸۲]. ادغام نانو ذرات کاربردی در ماتریس بسیاری آلی، نه تنها خواص مکانیکی، حرارتی، الکتریکی و نوری آب‌زل را افزایش می‌دهد، خواص زیستی در ژل نیز را بهبود می‌بخشد [۸۳]. بنابراین، گنجاندن نانو ذرات آلژینات، در این ماتریس، خواص داربست را بهبود بخشیده و زیست‌سازگاری و توانایی انتقال مواد مغذی را افزایش می‌دهد [۸۴].

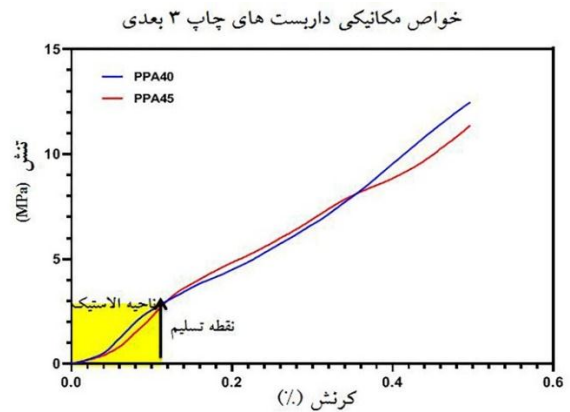
#### ۳-۶- خواص مکانیکی داربست‌های چاپ سه‌بعدی

در شکل ۶، خواص مکانیکی داربست‌های چاپ سه‌بعدی PPA40 و PPA45 ارزیابی شدند. خواص مکانیکی داربست‌های چاپ سه‌بعدی می‌توانند به ارتقای بذریابی یاخته و کیفیت رشد و تکثیر یاخته کمک کنند. برای مثال، وجود مدول فشاری برای تغییر خواص مکانیکی داربست ضروری است و به بازسازی موفق بافت منجر می‌شود [۸۵]. از مقایسه داربست‌ها با پرکننده‌های آلژینات ۴۵ و ۴۰ درصد، می‌توان دریافت که با افزایش مقدار آلژینات، مقاومت مکانیکی داربست نیز افزایش می‌یابد. مدول فشاری برای داربست‌های حاوی ۴۰ و ۴۵ درصد

<sup>1</sup> Hyperbranche

است. هرچه ابعاد به طرح ایده‌آل نزدیک‌تر باشند، پایداری ابعادی بیشتر است. در شکل ۷، ریخت‌شناسی سطح و مقطع برش‌داده‌شده داربست‌های چاپ سه‌بعدی چاپ‌پذیری با غلظت‌های ۴۰ و ۴۵ درصد نانوذرات آلژینات ارائه شده است. داربست‌های چاپ سه‌بعدی، با غلظت ۴۰ درصد آلژینات، چاپ‌پذیری ضعیفی از خود نشان دادند (شکل ۷ و ۸)؛ زیرا گرانروی کم و جمع‌شدگی زیاد و همگن‌نشدن آلژینات با جوهر بسیاری، ساختار گلوله‌گلوله‌شده (سوزن مسدودشده) و انسجام ساختاری در رشته‌ها، در مقطعی از زمان چاپ، رخ نداد. از طرفی، در تصاویر مقطع برش‌داده‌شده، فشرده‌شدن هر دو لایه چاپ‌شده در یکدیگر به‌خوبی مشهود است که این امر باعث کاهش ارتفاع لایه‌ها و کل داربست شده است. نتایج نشان دادند که داربست چاپ سه‌بعدی با غلظت ۴۵ درصد، گرانروی بالایی دارد و باعث ترکیب‌شدن مناسب جوهر بسیاری با پرکننده آلژینات با غلظت ۴۵ درصد نانوذرات آلژینات و چاپ یکنواخت رشته‌های حاصل از جوهر زیستی و درنهایت افزایش قابلیت چاپ‌پذیری می‌شود. در تصاویر مقطع برش‌داده‌شده با حضور پرکننده نانوذرات آلژینات ۴۵ درصد، فشرده‌گی هر دو لایه دیده نمی‌شود و داربست سه‌بعدی دارای بُعد مناسب همراه با استحکام نقاط اتصال بین رشته‌هاست (شکل ۷(c-d)).

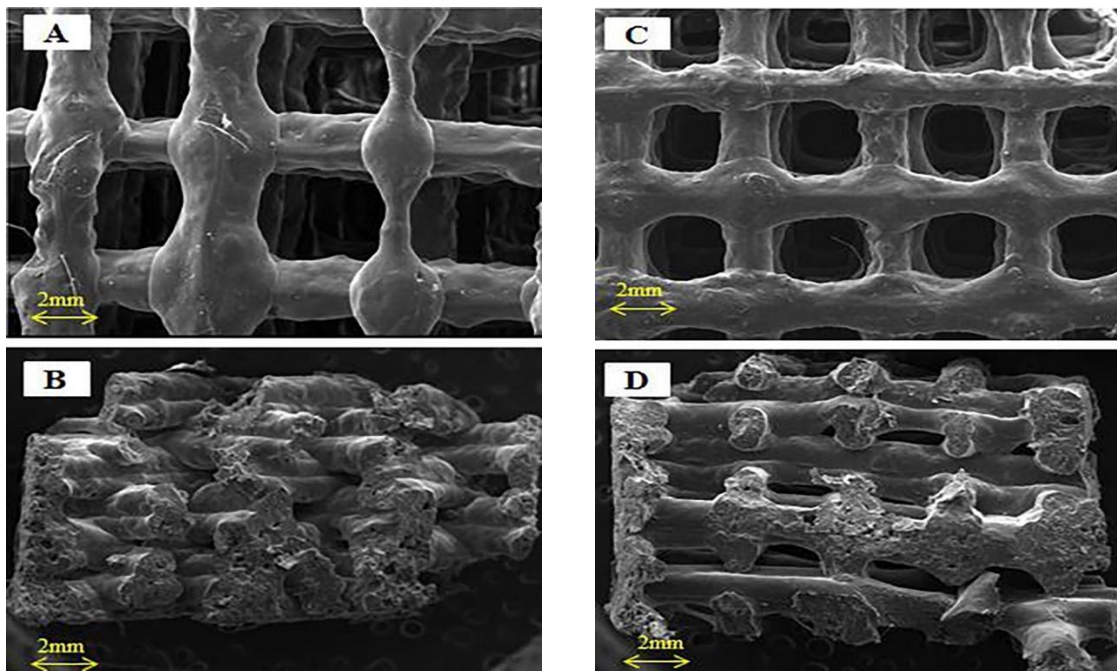
نانوذرات آلژینات، به‌ترتیب، ۰/۹۱۴۳ و ۰/۱۰۱۴ مگاپاسکال است (n=۳). خواص مکانیکی داربست‌های چاپ سه‌بعدی PPA45 بیشتر از داربست PPA40 است.



شکل ۶. منحنی‌های تنش-کرنش که داربست‌های چاپ سه‌بعدی را نشان می‌دهند

### ۳-۷- بررسی ریخت‌شناسی داربست‌های چاپ سه‌بعدی

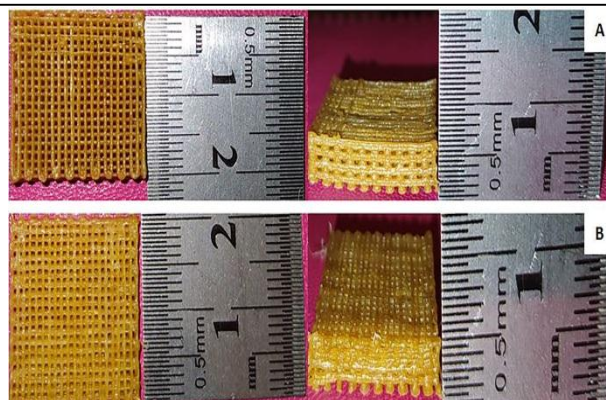
در شکل ۷، تصویر SEM داربست چاپ سه‌بعدی ارائه شده است. همچنین، قابلیت چاپ و پایداری ابعادی داربست‌ها با غلظت‌های ۴۰ و ۴۵ درصد نانوذرات آلژینات در این شکل قابل مشاهده است. قابلیت چاپ به معنای سهولت چاپ مواد، بدون گرفتگی یا جریان بالای مواد در طول چاپ است. ثبات ابعادی نیز به معنای شکل داربست‌های چاپ‌شده پس از چاپ



شکل ۷. تصاویر SEM از داربست‌های چاپ سه‌بعدی: تصویر از سطح داربست و مقطع برش‌داده‌شده حاوی ۴۰ درصد نانوذرات آلژینات (a-b) و تصویر از سطح داربست و مقطع برش‌داده‌شده حاوی ۴۵ درصد نانوذرات آلژینات (c-d)



مشخصات داربست‌های چاپ سه‌بعدی برای PP حاوی درصد‌های مختلف نانوذرات آلژینات با ساختارهای متخلخل و ریخت‌شناسی ساختاری نشان داده شده است. در چاپ سه‌بعدی داربست PPA40، فاصله و قطر رشته، قطر مش و درصد تخلخل، به ترتیب، ۶۸۰/۶۸، ۳۶۳/۸۶، ۶۳۲/۱۹ میکرومتر و ۴۷/۲۲ درصد بود. قطر رشته‌ها بسیار کمتر از قطر نازل (۴۲۰ میکرومتر) بود که ضعیف‌بودن دقت چاپ پایین و تنظیم نظم تخلخل‌ها را نشان می‌دهد. در داربست چاپ سه‌بعدی PPA45، فاصله و قطر رشته، قطر مشبک<sup>۱</sup> و درصد تخلخل، به ترتیب، ۶۴۲/۷۲، ۸۵/ و ۶۳۲/۱۹ میکرومتر و ۵۳/۲۳ درصد بود. چاپ با پرکننده نانوذرات آلژینات ۴۵ درصد دارای رشته‌های یکنواخت و صاف با قطری نزدیک به قطر نازل بود که بالابودن دقت و پایداری ساختاری را نشان می‌دهد.



شکل ۸. تصاویر از سطح و ارتفاع داربست‌های چاپ سه‌بعدی (A: PPA40-B: PPA45)

### ۳-۸- آنالیز اندازه حفره‌ها و درصد تخلخل

با تنظیم مناسب پارامترهای چاپ، ویژگی‌های ساختار داربست‌های سه‌بعدی مانند قطر رشته، اندازه منافذ و شکل منافذ بین رشته‌ها را می‌توان به‌خوبی حفظ کرد. این ویژگی‌ها برای رشد یاخته‌ای و بازسازی بافت بسیار مهم‌اند. در جدول ۱،

جدول ۱. تحلیل اندازه حفره‌ها و درصد تخلخل

نوع داربست	فاصله رشته‌ها	فاصله	قطر مش	درصد تخلخل (%)
PPA40	۶۸۰/۶۸ $\mu\text{m} \pm ۱۰۰/۸۶$	۳۶۳/۸۶ $\mu\text{m} \pm ۸۶/۶$	۶۳۲/۱۹ $\mu\text{m} \pm ۸۱/۵۳$	۴۷/۲۲ $\mu\text{m} \pm ۴/۲۳$
PPA45	۶۴۲/۷۲ $\mu\text{m} \pm ۶۴/۸۵$	۴۰۲/۸۵ $\mu\text{m} \pm ۶۳/۹۵$	۶۳۲/۴۳ $\mu\text{m} \pm ۴۴/۱۹$	۵۳/۲۳ $\mu\text{m} \pm ۵/۶۰$

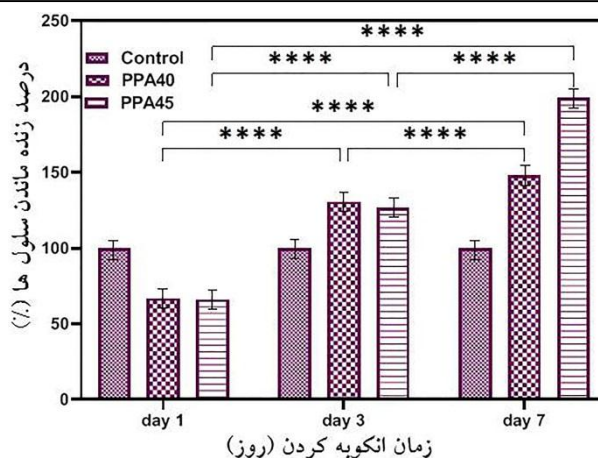
که چندسازه PP از بالاترین زنده‌ماندن یاخته پشتیبانی می‌کند [۸۸]. علاوه بر این، حضور  $\beta$ -d-مانورونیک اسید (واحد M) و اسید  $\alpha$ -L-گولورونیک (واحد G) و گروه‌های کربوکسیل مربوط به آلژینات می‌تواند موقعیت‌هایی را برای شناسایی و اتصال یاخته فراهم کند. حضور آلژینات در محیط کشت سبب تورم در سطح داربست شده و باعث می‌شود مواد مغذی به‌صورت کنترل‌شده در اختیار یاخته‌های غضروف قرار گیرند. از طرفی، می‌توان استنباط کرد که تورم ناشی از محیط کشت در تکثیر و رشد یاخته‌های غضروف‌ها مؤثر بوده است که این امر در داربست چاپ سه‌بعدی PPA45 مشهودتر از داربست چاپ سه‌بعدی PPA40 است ( $p < ۰/۰۰۰۱$ ). در این مطالعه، گروه کنترل در ته چاهک‌ها به‌ازای روزهای ۱، ۳ و ۷ از کشت و بدون داربست در نظر گرفته شد [۹۳].

### ۳-۹- مانایی یاخته روی داربست‌های چاپ سه‌بعدی

داربست چاپ سه‌بعدی در تسهیل چسبندگی، تکثیر و تمایز یاخته‌ای بسیار تأثیرگذار و مهم است [۸۶]. زیست‌سازگاری داربست‌های چاپ سه‌بعدی در شرایط آزمایشگاهی بررسی شد. آزمون MTT، پس از ۱، ۳ و ۷ روز زنده‌ماندن یاخته‌های غضروفی در داربست‌های چاپ سه‌بعدی با پرکننده نانوذرات آلژینات، با غلظت‌های ۴۰ و ۴۵ درصد، انجام شد (شکل ۹). درصد تخلخل داربست‌ها در چسبندگی و تکثیر یاخته‌ها بسیار اهمیت دارد [۸۷]. در این مطالعه، تمام غلظت‌های استفاده‌شده از نانوذرات آلژینات برای یاخته‌های غضروف، زیست‌سازگار بودند. حضور نانوذرات آلژینات با افزایش آب‌دوستی و رفتار چسبندگی یاخته و تکثیر بهتر یاخته‌ها رابطه مستقیم داشت، زیرا P ماده‌ای آب‌گریز است و از اتصال یاخته‌ای بالا پشتیبانی نمی‌کند. در این پژوهش، نشان داده شد

<sup>1</sup> Mesh

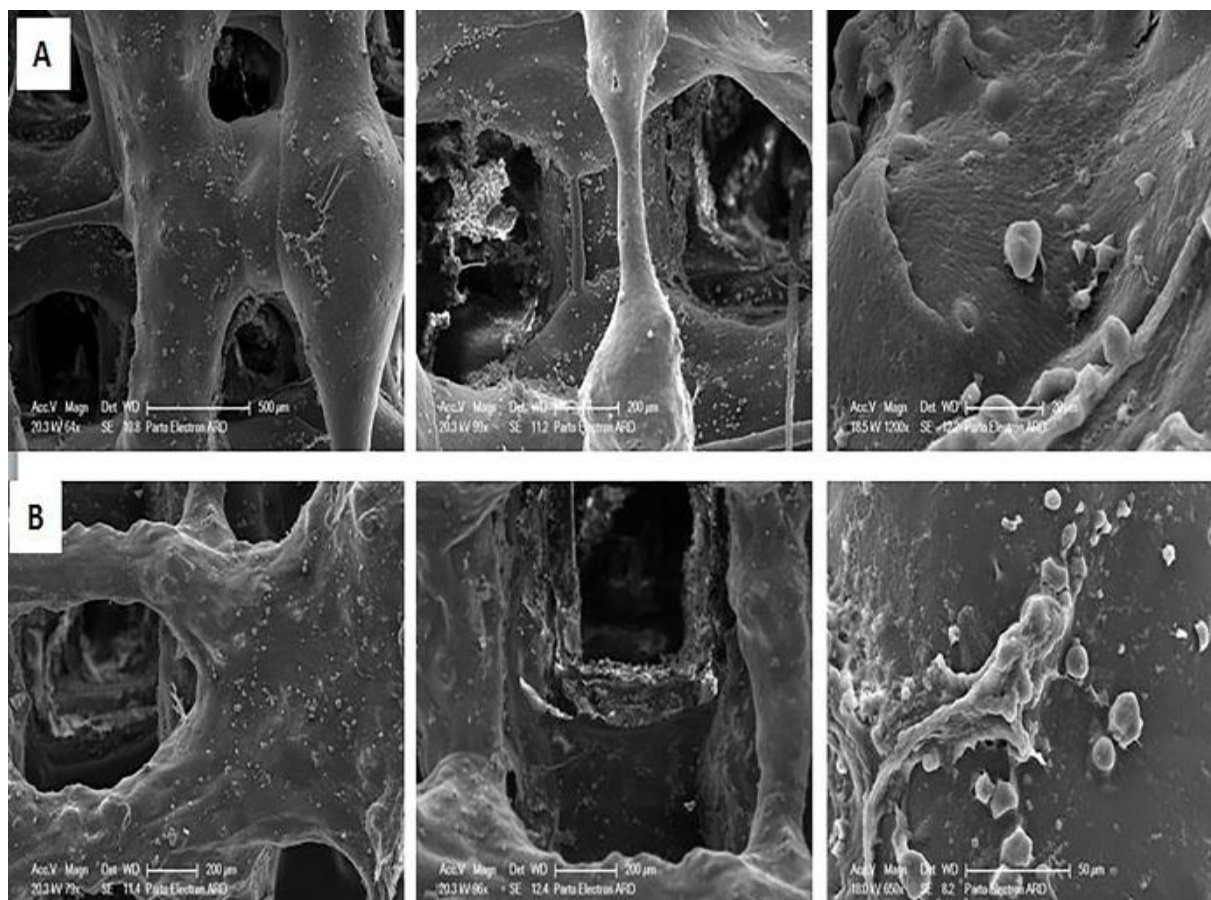
غضروفی به‌خوبی روی سطح داربست‌های PPA45 و PPA40 چسبیده و زوائد کشیده یاخته‌ای را تشکیل داده‌اند. با این حال، چسبندگی یاخته‌ای روی سطح داربست حاوی ۴۵ درصد نانوذرات آلژینات بیشتر از داربست‌های حاوی ۴۰ درصد نانوذرات آلژینات بود. چسبندگی و کشیدگی یاخته‌های غضروفی، در طول مطالعه کشت یاخته‌ای، درصد تخلخل مطلوب و فاصله مناسب بین اندازه رشته و شبکه مشبک‌ها را نشان می‌دهد که به یاخته‌ها اجازه می‌دهد روی رشته پل بزنند. اما، اگر فاصله و اندازه مشبک زیاد باشد، در رشد یاخته تأثیر منفی دارد [۹۲]. با توجه به نتایج به دست آمده از نمای ریخت‌شناسی یاخته‌های غضروفی، این سطح از اتصال یاخته‌ای را می‌توان به سطح مناسب آب‌دوستی داربست‌ها نسبت داد که به دلیل وجود گروه‌های عاملی آب‌دوست، می‌تواند به برهم‌کنش بین سطح داربست و سطح یاخته‌ای و ایجاد شرایط مناسب برای تشکیل گیرنده‌های سطح یاخته در جهت اتصال یاخته‌های غضروفی به سطح داربست‌های چاپ سه‌بعدی منجر شود [۹۲].



شکل ۹. مانایی یاخته در داربست‌های چاپ سه‌بعدی در ۱، ۳ و ۷ روز

### ۱۰-۳- چسبندگی و ریخت‌شناسی یاخته‌ای

تفاوت معناداری بین نتایج اتصال یاخته‌ای دو گروه داربست مشاهده شد. یاخته‌ها به شدت روی سطوح داربست سه‌بعدی چسبیدند. در شکل ۱۰، تصاویر SEM از یاخته‌های غضروفی متصل به داربست‌های چاپ سه‌بعدی، در روز هفتم مطالعه یاخته‌ای، ارائه شده است. با توجه به شکل ۹، یاخته‌های



شکل ۱۰. تصاویر SEM حاصل از چسبندگی و ریخت‌شناسی یاخته‌های غضروفی روی داربست‌های چاپ سه‌بعدی: تصویر از سطح داربست حاوی ۴۰ درصد نانوذرات آلژینات (A) و تصویر از سطح داربست حاوی ۴۵ درصد نانوذرات آلژینات (B)

## ۴- نتیجه‌گیری

در این مطالعه، داربست‌ها با غلظت‌های مختلف نانوذرات آلژینات ۴۰ و ۴۵ درصد، به‌عنوان پرکننده، چاپ سه‌بعدی شدند. با توجه به قابلیت چاپ این دو گروه از غلظت‌های آلژینات، می‌توان گفت که داربست‌های حاوی ۴۵ درصد نانوذرات آلژینات قابلیت چاپ بیشتری را از خود نشان دادند. به عبارت دیگر، چاپ آلژینات ۴۵ درصد، بدون گرفتگی نازل یا ازدست دادن ثبات ابعادی داربست، آسان‌تر بود. از طرفی، حضور نانوذرات آلژینات در کنار بسپارهای پایه به‌کاررفته سبب افزایش PP آب‌دوستی داربست شد. افزایش میزان تخلخل و یکنواخت شدن قطر رشته‌ها سبب حفظ ساختار داربست و به‌تبع آن، تأثیرگذاری در انتقال مواد مغذی به یاخته شد. با توجه به داده‌های به‌دست‌آمده از میزان جذب آب، تخلخل، آزمون مکانیکی و تکثیر یاخته‌های غضروفی، پرکننده ۴۵ درصدی نانوذرات آلژینات دارای مناسب‌ترین غلظت نانوذرات آلژینات به‌عنوان پرکننده در چاپ سه‌بعدی داربست بود. ارزیابی خواص مکانیکی داربست‌ها نشان داد که مقاومت فشاری داربست PPA45 بیشتر از داربست‌های 40 PPA و P است. به عبارت دیگر، داربست‌های ساخته‌شده مبتنی بر PPA45، زیست‌سازگارتر و برای ایجاد تکیه‌گاه مکانیکی و فراهم کردن زمان کافی برای بازسازی آسیب‌های بافت غضروف، مناسب‌تر بودند. داشتن استحکام مکانیکی کافی می‌توانست علاوه بر حمایت از تکثیر یاخته‌ای، در بیان و ترشح ماتریس خارج یاخته‌ای و ترمیم بافتی نیز اثرگذار باشد. با توجه به نتایج به‌دست‌آمده از داربست چاپ سه‌بعدی PPA45، می‌توان آن را برای مطالعات یاخته‌ای و بررسی رفتار یاخته‌ای در مطالعات آتی به‌کار برد. نتایج به‌دست‌آمده از تصاویر SEM سطح داربست‌ها، نشان داد که حضور ۴۵ درصدی نانوذرات آلژینات، علاوه بر افزایش انسجام رشته‌ها، در میزان نفوذ یاخته‌غضروفی‌ها به داخل تخلخل‌ها نیز اثر مثبتی داشته و زوائد یاخته‌ای بیشتر کشیده شده‌اند. همچنین، یاخته‌ای که ECM در آن ترشح می‌شود میزان تأثیر خصوصیات سطح در رفتار یاخته‌ای یاخته‌های غضروفی را نشان می‌دهد. وجود نقاط اتصال و پل زدن رشته‌ها سبب شد تا یاخته‌ها، پس از بذرپاشی در نقاط یادشده، به‌خوبی به هم بچسبند و ریخت‌شناسی کشیده‌ایی همراه با ترشح ECM را نشان دهند.

## ۵- سپاسگزاری

نویسندگان نهایت تشکر و قدردانی خود را از تلاش و زحمات جناب آقای دکتر محسن ستایش مهر، عضو هیئت علمی دانشکده فناوری‌های نوین در پزشکی دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اعلام می‌دارند.

## مراجع

- Melchels, F. P. W., Domingos, M. A. N., Klein, T. J., Malda, J., Bartolo, P. J., Huttmacher, D. W., "Additive manufacturing of tissues and organs", *Progress in Polymer Science*, Vol. 37, No. 8, (2012), 1079-1104. <https://doi.org/10.1016/j.progpolymsci.2011.11.007>
- Ranga, A., Lutolf, M. P., "High-throughput approaches for the analysis of extrinsic regulators of stem cell fate", *Current Opinion in Cell Biology*, Vol. 24, No. 2, (2012), 236-244. <https://doi.org/10.1016/j.ccb.2012.01.006>
- Khademhosseini, A., Langer, R., Borenstein, J., Vacanti, J. P., "Microscale technologies for tissue engineering and biology", *Proceedings of the National Academy of Sciences*, Vol. 103, No. 8, (2006), 2480-2487. <https://doi.org/10.1073/pnas.0507681102>
- Tuan, R. S., Boland, G., Tuli, R., "Adult mesenchymal stem cells and cellbased tissue engineering", *Arthritis Research and Therapy*, Vol. 5, No. 1, (2003), 1-14. <https://doi.org/10.1186/ar991>
- Newman, D. J., Cragg, G. M., "Natural products as sources of new drugs over the 30 years from 1981 to 2010", *Journal of Natural Products*, Vol. 75, No. 3, (2012), 311-335. <https://doi.org/10.1021/np200906s>
- Ma, P. X., "Biomimetic materials for tissue engineering", *Advanced Drug Delivery Review*, Vol. 60, No. 2, (2008), 184-198. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2007.08.041>
- Pereira, R. F., Barrias, C. C., Granja, P. L., Bartolo, P. J., "Advanced biofabrication strategies for skin regeneration and repair", *Nanomedicine*, Vol. 8, No. 4, (2013), 603-621. <https://doi.org/10.2217/nmm.13.50>
- Brittberg, M., "Cell carriers as the next generation of cell therapy for cartilage repair: A review of the matrix-induced autologous chondrocyte implantation procedure", *The American Journal of Sports Medicine*, Vol. 38, No. 6, (2010), 1259-1271. <https://doi.org/10.1177/0363546509346395>
- Bentley, G., Biant, L. C., Vijayan, S., Macmull, S., Skinner, J. A., Carrington, R. W., "Minimum ten-year results of a prospective randomised study of autologous chondrocyte implantation versus mosaicplasty for symptomatic articular cartilage lesions of the knee", *The Journal of Bone and Joint Surgery, British Volume*, Vol. 94, No. 4, (2012), 504-509. <https://doi.org/10.1302/0301-620X.94B4.27495>
- Adkisson IV, H. D., Martin, J. A., Amendola, R. L., Milliman, C., Mauch, K. A., Katwal, A. B., Seyedin, M., Amendola, A., Streeter, P. R., Buckwalter, J. A., "The potential of human allogeneic juvenile chondrocytes for restoration of articular cartilage", *The American Journal of Sports Medicine*, Vol. 38, No. 7, (2010), 1324-1333. <https://doi.org/10.1177/0363546510361950>
- Negrin, L., Kutscha-Lissberg, F., Gartlehner, G., Vecsei, V., "Clinical outcome after microfracture of the knee: A meta-analysis of before/after-data of controlled studies", *International Orthopaedics*, Vol. 36, No. 1, (2012), 43-50. <https://doi.org/10.1007/s00264-011-1364-x>
- Kreuz, P. C., Steinwachs, M. R., Erggelet, C., Krause, S. J., Konrad, G., Uhl, M., Südkamp, N., "Results after microfracture of full-thickness chondral defects in different compartments in the knee", *Osteoarthritis and Cartilage*, Vol. 14, No. 11, (2006), 1119-1125. <https://doi.org/10.1016/j.joca.2006.05.003>
- Xu, J., Fang, Q., Liu, Y., Zhou, Y., Ye, Z., Tan, W. S., "In situ ornamenting poly ( $\epsilon$ -caprolactone) electrospun fibers with different fiber diameters using chondrocyte-derived extracellular matrix for chondrogenesis of mesenchymal stem cells", *Colloids*



- "In vitro and animal study of novel nano-hydroxyapatite/poly ( $\epsilon$ -caprolactone) composite scaffolds fabricated by layer manufacturing process", *Tissue Engineering, Part A*, Vol. 15, No. 5, (2009), 977-989. <https://doi.org/10.1089/ten.tea.2008.0190>
29. Holländer, J., Genina, N., Jukarainen, H., Khajehian, M., Rosling, A., Mäkilä, E., Sandler, N., "Three-dimensional printed PCL-based implantable prototypes of medical devices for controlled drug delivery", *Journal of Pharmaceutical Sciences*, Vol. 105, No. 9, (2016), 2665-2676. <https://doi.org/10.1016/j.xphs.2015.12.012>
  30. Honarvar, A., Karbasi, S., Hashemibeni, B., Setayeshmehr, M., Kazemi, M., Valiani, A., "Effects of cartilage acellular solubilised ECM on physicochemical and biological properties of polycaprolactone/fibrin hybrid scaffold fabricated by 3D-printing and salt-leaching methods", *Materials Technology*, (2020), 1-9. <https://doi.org/10.1080/10667857.2020.1824148>
  31. Kwon, D. Y., Kwon, J. S., Park, S. H., Park, J. H., Jang, S. H., Yin, X. Y., Yun, J. H., Kim, J. H., Min, B. H., Lee, J. H., Kim, W. D., "A computer-designed scaffold for bone regeneration within cranial defect using human dental pulp stem cells", *Scientific Reports*, Vol. 5, No. 1, (2015), 1-6. <https://doi.org/10.1038/srep12721>
  32. Bonzani, I. C., George, J. H., Stevens, M. M., "Novel materials for bone and cartilage regeneration", *Current Opinion in Chemical Biology*, Vol. 10, No. 6, (2006), 568-575. <https://doi.org/10.1016/j.cbpa.2006.09.009>
  33. Kolan, K. C., Li, W., Althage, R. A., Semon, J. A., Day, D. E., Leu, M. C., "Solvent and melt based extrusion 3D printing of polycaprolactone bioactive glass composite for tissue engineering", *Proceedings of the 3rd International Conference on Progress in Additive Manufacturing*, Singapore, (2018), 14-17. <https://doi.org/10.25341/D4B018>
  34. Lin, K. F., He, S., Song, Y., Wang, C. M., Gao, Y., Li, J. Q., Tang, P., Wang, Z., Bi, L., Pei, G. X., "Low-temperature additive manufacturing of biomimic three-dimensional hydroxyapatite/collagen scaffolds for bone regeneration", *ACS Applied Materials & Interfaces*, Vol. 8, No. 11, (2016), 6905-6916. <https://doi.org/10.1021/acsami.6b00815>
  35. Lee, H., Kim, G., "Cryogenically fabricated three-dimensional chitosan scaffolds with pore size-controlled structures for biomedical applications", *Carbohydrate Polymers*, Vol. 85, No. 4, (2011), 817-823. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2011.04.001>
  36. Zhang, T., Zhang, H., Zhang, L., Jia, S., Liu, J., Xiong, Z., Sun, W., "Biomimetic design and fabrication of multilayered osteochondral scaffolds by low-temperature deposition manufacturing and thermal-induced phase-separation techniques", *Biofabrication*, Vol. 9, No. 2, (2017), 025021. <https://doi.org/10.1088/1758-5090/aa7078>
  37. Shi, L., Hu, Y., Ullah, M. W., Ou, H., Zhang, W., Xiong, L., Zhang, X., "Cryogenic free-form extrusion bioprinting of decellularized small intestinal submucosa for potential applications in skin tissue engineering", *Biofabrication*, Vol. 11, No. 3, (2019), 035023. <https://doi.org/10.1088/1758-5090/ab15a9>
  38. Ghosouri, S., Setayeshmehr, M., Taheri-Kafrani, A., Valiani, A., "Cartilage particles can promote chondrogenesis of adipose-derived stromal cells on poly ( $\epsilon$ -caprolactone)/fibrin hybrid constructs prepared via sandwich model", *Journal of Biomimetics, Biomaterials and Biomedical Engineering*, Vol. 47, (2020), 63-74. <https://doi.org/10.4028/www.scientific.net/JBBBE.47.63>
  39. Zhang, W., Ullah, I., Shi, L., Zhang, Y., Ou, H., Zhou, J., Ullah, M. W., Zhang, X., Li, W., "Fabrication and characterization of porous polycaprolactone scaffold via extrusion-based cryogenic 3D printing for tissue engineering", *Materials & Design*, Vol. 180, (2019), 107946. <https://doi.org/10.1016/j.matdes.2019.107946>
  40. Makadia, H. K., Siegel, S. J., "Poly lactic-co-glycolic acid (PLGA) as biodegradable controlled drug delivery carrier", *Polymers*, Vol. 3, No. 3, (2011), 1377-1397. <https://doi.org/10.3390/polym3031377>
  41. Kamaly, N., Yameen, B., Wu, J., Farokhzad, O. C., "Degradable controlled-release polymers and polymeric nanoparticles: mechanisms of controlling drug release", *Chemical Reviews*, Vol. 116, No. 4, (2016), 2602-2663. <https://doi.org/10.1021/acs.chemrev.5b00346>
  42. Gorji, M., Zargar, A., Setayeshmehr, M., Ghasemi, N., Soleimani, M., Kazemi, M., Hashemibeni, B., "Releasing and structural/mechanical properties of nano-particle/punica granatum (pomegranate) in poly (lactic-co-glycolic) acid/fibrin as nano-*and Surfaces B: Biointerfaces*, Vol. 197, (2021), 111374. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2020.111374>
  14. Conoscenti, G., Schneider, T., Stoelzel, K., Pavia, F. C., Brucato, V., Goegele, C., La Carrubba, V., Schulze-Tanzil, G., "PLLA scaffolds produced by thermally induced phase separation (TIPS) allow human chondrocyte growth and extracellular matrix formation dependent on pore size", *Materials Science and Engineering: C*, Vol. 80, (2017), 449-459. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2017.06.011>
  15. Setayeshmehr, M., Esfandiari, E., Hashemibeni, B., Tavakoli, A. H., Rafienia, M., Samadi Kuchaksaraei, A., Moroni, L., Joghataei, M. T., "Chondrogenesis of human adipose-derived mesenchymal stromal cells on the [devitalized costal cartilage matrix/poly (vinyl alcohol)/fibrin] hybrid scaffolds", *European Polymer Journal*, Vol. 118, (2019), 528-541. <https://doi.org/10.1016/j.eurpolymj.2019.04.044>
  16. Chua, C. K., Leong, K. F., An, J., "Introduction to rapid prototyping of biomaterials", *Rapid Prototyping of Biomaterials*, Woodhead Publishing, (2020), 1-15. <https://doi.org/10.1016/B978-0-08-102663-2.00001-0>
  17. Hong, S., Sycks, D., Chan, H. F., Lin, S., Lopez, G. P., Guilak, F., Leong, K. W., Zhao, X., "3D printing of highly stretchable and tough hydrogels into complex, cellularized structures", *Advanced Materials*, Vol. 27, No. 27, (2015), 4035-4040. <https://doi.org/10.1002/adma.201501099>
  18. Chen, L., Tang, X., Xie, P., Xu, J., Chen, Z., Cai, Z., He, P., Zhou, H., Zhang, D., Fan, T., "3D printing of artificial leaf with tunable hierarchical porosity for CO<sub>2</sub> photoreduction", *Chemistry of Materials*, Vol. 30, No. 3, (2018), 799-806. <https://doi.org/10.1021/acs.chemmater.7b04313>
  19. Berry, D. B., You, S., Warner, J., Frank, L. R., Chen, S., Ward, S. R., "A 3D tissue-printing approach for validation of diffusion tensor imaging in skeletal muscle", *Tissue Engineering, Part A*, Vol. 23, No. 17-18, (2017), 980-988. <https://doi.org/10.1089/ten.tea.2016.0438>
  20. Clark, E. A., Alexander, M. R., Irvine, D. J., Roberts, C. J., Wallace, M. J., Sharpe, S., Yoo, J., Hague, R. J., Tuck, C. J., Wildman, R. D., "3D printing of tablets using inkjet with UV photoinitiation", *International Journal of Pharmaceutics*, Vol. 529, No. 1-2, (2017), 523-530. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2017.06.085>
  21. Vaezi, M., Zhong, G., Kalami, H., Yang, S., "Extrusion-based 3D printing technologies for 3D scaffold engineering", *Functional 3D Tissue Engineering Scaffolds*, Woodhead Publishing, (2018), 235-254. <https://doi.org/10.1080/00914037.2020.1725764>
  22. Kirchmayer, D. M., Gorkin Iii, R., "An overview of the suitability of hydrogel-forming polymers for extrusion-based 3D-printing", *Journal of Materials Chemistry B*, Vol. 3, No. 20, (2015), 4105-4117. <https://doi.org/10.1039/C5TB00393H>
  23. Landers, R., Pfister, A., Hübner, U., John, H., Schmelzeisen, R., Mühlaupt, R., "Fabrication of soft tissue engineering scaffolds by means of rapid prototyping techniques", *Journal of Materials Science*, Vol. 37, No. 15, (2002), 3107-3116. <https://doi.org/10.1023/A:1016189724389>
  24. Trachtenberg, J. E., Placone, J. K., Smith, B. T., Piard, C. M., Santoro, M., Scott, D. W., Fisher, J. P., Mikos, A. G., "Extrusion-based 3D printing of poly (propylene fumarate) in a full-factorial design", *ACS Biomaterials Science & Engineering*, Vol. 2, No. 10, (2016), 1771-1780. <https://doi.org/10.1021/acsbomaterials.6b00026>
  25. Yang, G. H., Kim, M., Kim, G., "Additive-manufactured polycaprolactone scaffold consisting of innovatively designed microsized spiral struts for hard tissue regeneration", *Biofabrication*, Vol. 9, No. 1, (2016), 015005. <https://doi.org/10.1088/1758-5090/9/1/015005>
  26. Park, S., Kim, G., Jeon, Y. C., Koh, Y., Kim, W., "3D polycaprolactone scaffolds with controlled pore structure using a rapid prototyping system", *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, Vol. 20, No. 1, (2009), 229-234. <https://doi.org/10.1007/s10856-008-3573-4>
  27. Ulery, B. D., Nair, L. S., Laurencin, C. T., "Biomedical applications of biodegradable polymers", *Journal of Polymer Science, Part B: Polymer Physics*, Vol. 49, No. 12, (2011), 832-864. <https://doi.org/10.1002/polb.22259>
  28. Heo, S. J., Kim, S. E., Wei, J., Kim, D. H., Hyun, Y. T., Yun, H. S., Kim, H. K., Yoon, T. R., Kim, S. H., Park, S. A., Shin, J. W.,

- Biomaterials*, Vol. 24, No. 22, (2003), 4023-4029. [https://doi.org/10.1016/S0142-9612\(03\)00295-3](https://doi.org/10.1016/S0142-9612(03)00295-3)
59. Maher, P. S., Keatch, R. P., Donnelly, K., Mackay, R. E., Paxton, J. Z., "Construction of 3D biological matrices using rapid prototyping technology", *Rapid Prototyping Journal*, (2009). <https://doi.org/10.1108/13552540910960307>
  60. Setayeshmehr, M., Esfandiari, E., Rafieinia, M., Hashemibeni, B., Taheri-Kafrani, A., Samadikuchaksaraei, A., Kaplan, D. L., Moroni, L., Joghataei, M. T., "Hybrid and composite scaffolds based on extracellular matrices for cartilage tissue engineering", *Tissue Engineering Part B: Reviews*, Vol. 25, No. 3, (2019), 202-224. <https://doi.org/10.1089/ten.teb.2018.0245>
  61. Kundu, J., Shim, J. H., Jang, J., Kim, S. W., Cho, D. W., "An additive manufacturing-based PCL-alginate-chondrocyte bioprinted scaffold for cartilage tissue engineering", *Journal of Tissue Engineering and Regenerative Medicine*, Vol. 9, No. 11, (2015), 1286-1297. <https://doi.org/10.1002/term.1682>
  62. Shim, J. H., Yoon, M. C., Jeong, C. M., Jang, J., Jeong, S. I., Cho, D. W., Huh, J. B., "Efficacy of rhBMP-2 loaded PCL/PLGA/ $\beta$ -TCP guided bone regeneration membrane fabricated by 3D printing technology for reconstruction of calvaria defects in rabbit", *Biomedical Materials*, Vol. 9, No. 6, (2014), 065006. <https://doi.org/10.1088/1748-6041/9/6/065006>
  63. Yildirim, E. D., Yin, X., Nair, K., Sun, W., "Fabrication, characterization, and biocompatibility of single-walled carbon nanotube-reinforced alginate composite scaffolds manufactured using freeform fabrication technique", *Journal of Biomedical Materials Research, Part B: Applied Biomaterials*, Vol. 87, No. 2, (2008), 406-414. <https://doi.org/10.1002/jbm.b.31118>
  64. Chen, W., Chen, S., Morsi, Y., El-Hamshary, H., El-Newhy, M., Fan, C., Mo, X., "Superabsorbent 3D scaffold based on electrospun nanofibers for cartilage tissue engineering", *ACS Applied Materials & Interfaces*, Vol. 8, No. 37, (2016), 24415-24425. <https://doi.org/10.1021/acsami.6b06825>
  65. Wolf, M. F., Coleman, K. P., Rankin, E. A., Lewerenz, G. M., "In vitro assessment of cell and tissue compatibility", *Biomaterials Science*, Academic Press, (2020), 851-868. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-816137-1.00057-X>
  66. Nikbakht, M., Karbasi, S., Rezayat, S. M., Tavakol, S., Sharifi, E., "Evaluation of the effects of hyaluronic acid on poly (3-hydroxybutyrate)/chitosan/carbon nanotubes electrospun scaffold: Structure and mechanical properties", *Polymer-Plastics Technology and Materials*, Vol. 58, No. 18, (2019), 2031-2040. <https://doi.org/10.1080/25740881.2019.1602645>
  67. Hashemibeni, B., Valiani, A., Esmaeli, M., Kazemi, M., Aliakbari, M., Iranpour, F. G., "Comparison of the efficacy of piacledine and transforming growth factor  $\beta$ 1 on chondrogenic differentiation of human adipose-derived stem cells in fibrin and fibrin-alginate scaffolds", *Iranian Journal of Basic Medical Sciences*, Vol. 21, No. 2, (2018), 212. <https://doi.org/10.22038/IJBMS.2018.24693.6136>
  68. Wang, K., Lin, S., Nune, K. C., Misra, R. D., "Chitosan-gelatin-based microgel for sustained drug delivery", *Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition*, Vol. 27, No. 5, (2016), 441-453. <https://doi.org/10.1080/09205063.2016.1143673>
  69. Nikbakht, M., Karbasi, S., Rezayat, S. M., "Biological evaluation of the effects of Hyaluronic acid on Poly (3-hydroxybutyrate) based electrospun nanocomposite scaffolds for cartilage tissue engineering application", *Materials Technology*, Vol. 35, No. 3, (2020), 141-151. <https://doi.org/10.1080/10667857.2019.1659535>
  70. Al-Afify, A. S., El-Akabawy, G., El-Sherif, N. M., El-Safty, F. E., El-Habiby, M. M., "Avocado soybean unsaponifiables ameliorates cartilage and subchondral bone degeneration in mono-iodoacetate-induced knee osteoarthritis in rats", *Tissue and Cell*, Vol. 52, (2018), 108-115. <https://doi.org/10.1016/j.tice.2018.05.001>
  71. Bastian, F., Stelzwiller, M. E., Kratochwill, K., Kasimir, M. T., Simon, P., Weigel, G., "IgG deposition and activation of the classical complement pathway involvement in the activation of human granulocytes by decellularized porcine heart valve tissue", *Biomaterials*, Vol. 29, No. 12, (2008), 1824-1832. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2008.01.005>
  72. Cho, Y. S., Hong, M. W., Quan, M., Kim, S. Y., Lee, S. H., Lee, S. J., Kim, Y. Y., Cho, Y. S., "Assessments for bone regeneration using the polycaprolactone SLUP (salt-leaching using powder) scaffold", *Journal of Biomedical Materials Research Part A*, Vol. composite scaffold", *Bratislavské Lekárske Listy*, Vol. 122, No. 1, (2021), 54-64. [https://doi.org/10.4149/blil\\_2021\\_007](https://doi.org/10.4149/blil_2021_007)
  43. Pouretezari, M., Sharifian, Z., Mardani, M., Valiani, A., Rarani, M. Z., Setayeshmehr, M., Eini, F., Hashemibeni, B., "Comparison of TGF- $\beta$ 3 and avocado/soybean unsaponifiable on chondrogenesis of human adipose-derived stem cells on poly (lactic-co-glycolic) acid/hyaluronic acid hybrid scaffold", *Iranian Journal of Basic Medical Sciences*, Vol. 24, No. 1, (2021), 24. <https://doi.org/10.22038/ijbms.2020.44409.10391>
  44. Rnjak-Kovacina, J., Weiss, A. S., "Increasing the pore size of electrospun scaffolds", *Tissue Engineering, Part B: Reviews*, Vol. 17, No. 5, (2011), 365-372. <https://doi.org/10.1089/ten.teb.2011.0235>
  45. Xia, Z., Huang, Y., Adamopoulos, I. E., Walpole, A., Triffitt, J. T., Cui, Z., "Macrophage-mediated biodegradation of poly (DL-lactide-co-glycolide) in vitro", *Journal of Biomedical Materials Research Part A*, Vol. 79A, No. 3, (2006), 582-590. <https://doi.org/10.1002/jbm.a.30853>
  46. Kim, S. S., Park, M. S., Jeon, O., Choi, C. Y., Kim, B. S., "Poly (lactide-co-glycolide)/hydroxyapatite composite scaffolds for bone tissue engineering", *Biomaterials*, Vol. 27, No. 8, (2006), 1399-1409. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2005.08.016>
  47. Sa, M. W., Kim, J. Y., "Effect of various blending ratios on the cell characteristics of PCL and PLGA scaffolds fabricated by polymer deposition system", *International Journal of Precision Engineering and Manufacturing*, Vol. 14, No. 4, (2013), 649-655. <https://doi.org/10.1007/s12541-013-0087-x>
  48. Kim, B. S., Jang, J., Chae, S., Gao, G., Kong, J. S., Ahn, M., Cho, D. W., "Three-dimensional bioprinting of cell-laden constructs with polycaprolactone protective layers for using various thermoplastic polymers", *Biofabrication*, Vol. 8, No. 3, (2016), 035013. <https://doi.org/10.1088/1758-5090/8/3/035013>
  49. Zhao, X., Lang, Q., Yildirim, L., Lin, Z. Y., Cui, W., Annabi, N., Ng, K. W., Dokmeci, M. R., Ghaemmaghami, A. M., Khademhosseini, A., "Photocrosslinkable gelatin hydrogel for epidermal tissue engineering", *Advanced Healthcare Materials*, Vol. 5, No. 1, (2016), 108-118. <https://doi.org/10.1002/adhm.201500005>
  50. Kim, M., Kim, G., "3D multi-layered fibrous cellulose structure using an electrohydrodynamic process for tissue engineering", *Journal of Colloid and Interface Science*, Vol. 457, (2015), 180-187. <https://doi.org/10.1016/j.jcis.2015.07.007>
  51. Fedorovich, N. E., Alblas, J., de Wijn, J. R., Hennink, W. E., Verbout, A. J., Dhert, W. J., "Hydrogels as extracellular matrices for skeletal tissue engineering: State-of-the-art and novel application in organ printing", *Tissue Engineering*, Vol. 13, No. 8, (2007), 1905-1925. <https://doi.org/10.1089/ten.2006.0175>
  52. Augst, A. D., Kong, H. J., Mooney, D. J., "Alginate hydrogels as biomaterials", *Macromolecular Bioscience*, Vol. 6, No. 8, (2006), 623-633. <https://doi.org/10.1002/mabi.200600069>
  53. Gasperini, L., Mano, J. F., Reis, R. L., "Natural polymers for the microencapsulation of cells", *Journal of the Royal Society Interface*, Vol. 11, No. 100, (2014), 20140817. <https://doi.org/10.1098/rsif.2014.0817>
  54. Slaughter, B. V., Khurshid, S. S., Fisher, O. Z., Khademhosseini, A., Peppas, N. A., "Hydrogels in regenerative medicine", *Advanced Materials*, Vol. 21, No. 32-33, (2009), 3307-3329. <https://doi.org/10.1002/adma.200802106>
  55. Jeon, O., Bouhadir, K. H., Mansour, J. M., Alsberg, E., "Photocrosslinked alginate hydrogels with tunable biodegradation rates and mechanical properties", *Biomaterials*, Vol. 30, No. 14, (2009), 2724-2734. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2009.01.034>
  56. Kundu, J., Shim, J. H., Jang, J., Kim, S. W., Cho, D. W., "An additive manufacturing-based PCL-alginate-chondrocyte bioprinted scaffold for cartilage tissue engineering", *Journal of Tissue Engineering and Regenerative Medicine*, Vol. 9, No. 11, (2015), 1286-1297. <https://doi.org/10.1002/term.1682>
  57. Khattak, S. F., Spataro, M., Roberts, L., Roberts, S. C., "Application of colorimetric assays to assess viability, growth and metabolism of hydrogel-encapsulated cells", *Biotechnology Letters*, Vol. 28, No. 17, (2006), 1361-1370. <https://doi.org/10.1007/s10529-006-9104-9>
  58. Kong, H. J., Smith, M. K., Mooney, D. J., "Designing alginate hydrogels to maintain viability of immobilized cells",

- nanocomposite hydrogels", *Advanced Healthcare Materials*, Vol. 5, No. 2, (2016), 193-197. <https://doi.org/10.1002/adhm.201500638>
84. Douglas, K. L., Piccirillo, C. A., Tabrizian, M., "Effects of alginate inclusion on the vector properties of chitosan-based nanoparticles", *Journal of Controlled Release*, Vol. 115, No. 3, (2006), 354-361. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2006.08.021>
85. Fernandes, C., Soares, D., Dhawan, V., Prabhu, P., "Nanostructured polymer scaffolds for tissue engineering technology", *Fundamentals of Nanoparticles*, Elsevier, (2018), 451-483. <https://doi.org/10.1016/B978-0-323-51255-8.00015-X>
86. O'Brien, F. J., "Biomaterials & scaffolds for tissue engineering", *Materials Today*, Vol. 14, No. 3, (2011), 88-95. [https://doi.org/10.1016/S1369-7021\(11\)70058-X](https://doi.org/10.1016/S1369-7021(11)70058-X)
87. Almeida, H. V., Eswaramoorthy, R., Cunniffe, G. M., Buckley, C. T., O'Brien, F. J., Kelly, D. J., "Fibrin hydrogels functionalized with cartilage extracellular matrix and incorporating freshly isolated stromal cells as an injectable for cartilage regeneration", *Acta Biomaterialia*, Vol. 36, (2016), 55-62. <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2016.03.008>
88. Shekaran, A., Lam, A., Sim, E., Jialing, L., Jian, L., Wen, J. T., Chan, J. K., Choolani, M., Reuveny, S., Birch, W., Oh, S., "Biodegradable ECM-coated PCL microcarriers support scalable human early MSC expansion and in vivo bone formation", *Cytotherapy*, Vol. 18, No. 10, (2016), 1332-1344. <https://doi.org/10.1016/j.jcyt.2016.06.016>
89. Goudarzi, R., Reid, A., McDougall, J. J., "Evaluation of the novel avocado/soybean unsaponifiable Arthrocent to alter joint pain and inflammation in a rat model of osteoarthritis". *PLoS One*, Vol. 13, No. 2, (2018), e0191906. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0191906>
90. Hashemibeni, B., Ansar, M. M., Kabiri, A., Goharian, M., Nasiri, P., Aliakbari, M., Ghorbani, M., "The effects of TGF-β3 on the proliferation and function of encapsulated costal cartilage chondrocytes in alginate scaffold", *Journal of Applied Biotechnology Reports*, Vol. 6, No. 2, (2019), 55-59. <https://doi.org/10.29252/JABR.06.02.03>
91. Cassie, A. B., Baxter, S., "Wettability of porous surfaces", *Transactions of the Faraday Society*, Vol. 40, (1944), 546-551. <https://doi.org/10.1039/TF9444000546>
92. Szymański, T., Mieloch, A. A., Richter, M., Trzeciak, T., Florek, E., Rybka, J. D., Giersig, M., "Utilization of carbon nanotubes in manufacturing of 3D cartilage and bone scaffolds", *Materials*, Vol. 13, No. 18, (2020), 4039. <https://doi.org/10.3390/ma13184039>
93. Rajagopal, K., Dutt, V., Manickam, A. S., Madhuri, V., "Chondrocyte source for cartilage regeneration in an immature animal: Is iliac apophysis a good alternative?". *Indian Journal of Orthopaedics*, Vol. 46, No. 4, (2012), 402-406. <https://dx.doi.org/10.4103%2F0019-5413.98828>
- 105, No. 12, (2017), 3432-3444. <https://doi.org/10.1002/jbm.a.36196>
73. Kumar, A., Lee, Y., Kim, D., Rao, K. M., Kim, J., Park, S., Haider, A., Han, S. S., "Effect of crosslinking functionality on microstructure, mechanical properties, and in vitro cytocompatibility of cellulose nanocrystals reinforced poly (vinyl alcohol)/sodium alginate hybrid scaffolds", *International Journal of Biological Macromolecules*, Vol. 95, (2017), 962-973. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2016.10.085>
74. Zarei, M., Karbasi, S., "Evaluation of the effects of multiwalled carbon nanotubes on electrospun poly (3-hydroxybutyrate) scaffold for tissue engineering applications", *Journal of Porous Materials*, Vol. 25, No. 1, (2018), 259-272. <https://doi.org/10.1007/s10934-017-0439-5>
75. Silverstein, R. M., Bassler, G. C., "Spectrometric identification of organic compounds", *Journal of Chemical Education*, Vol. 39, No. 11, (1962), 546. <https://doi.org/10.1021/ed039p546>
76. Wu, J., Kong, T., Yeung, K. W., Shum, H. C., Cheung, K. M., Wang, L., To, M. K. T., "Fabrication and characterization of monodisperse PLGA-alginate core-shell microspheres with monodisperse size and homogeneous shells for controlled drug release", *Acta Biomaterialia*, Vol. 9, No. 7, (2013), 7410-7419. <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2013.03.022>
77. Karkeh-Abadi, F., Saber-Samandari, S., Saber-Samandari, S., "The impact of functionalized CNT in the network of sodium alginate-based nanocomposite beads on the removal of Co (II) ions from aqueous solutions", *Journal of Hazardous Materials*, Vol. 312, (2016), 224-233. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2016.03.074>
78. Lawrie, G., Keen, I., Drew, B., Chandler-Temple, A., Rintoul, L., Fredericks, P., Grøndahl, L., "Interactions between alginate and chitosan biopolymers characterized using FTIR and XPS", *Biomacromolecules*, Vol. 8, No. 8, (2007), 2533-2541. <https://doi.org/10.1021/bm070014y>
79. Kim, M. S., Kim, G., "Three-dimensional electrospun polycaprolactone (PCL)/alginate hybrid composite scaffolds", *Carbohydrate Polymers*, Vol. 114, (2014), 213-221. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2014.08.008>
80. Gillies, E. R., Frechet, J. M., "Dendrimers and dendritic polymers in drug delivery", *Drug Discovery Today*, Vol. 10, No. 1, (2005), 35-43. [https://doi.org/10.1016/S1359-6446\(04\)03276-3](https://doi.org/10.1016/S1359-6446(04)03276-3)
81. Gaharwar, A. K., Peppas, N. A., Khademhosseini, A., "Nanocomposite hydrogels for biomedical applications", *Biotechnology and Bioengineering*, Vol. 111, No. 3, (2014), 441-453. <https://doi.org/10.1002/bit.25160>
82. Bibi, A., Rehman, S. U., Yaseen, A., "Alginate-nanoparticles composites: Kinds, reactions and applications", *Materials Research Express*, Vol. 6, No. 9, (2019), 092001. <https://doi.org/10.1088/2503-1591/ab2016>
83. Seda Kehr, N., Riehemann, K., "Controlled cell growth and cell migration in periodic mesoporous organosilica/alginate