ساخت و ارزیابی داربست نانوکامپوزیتی الکتروریسی شده پلی‌کاپرولاکتون/نانولوله کربنی آمین‌دار شده حاوی سلول‌های بنیادی مزانشیمی جهت کاربرد در مهندسی بافت سخت

محمد هادی توحیدلو[۱] ، سیده سارا شفیعی[۲]* ، فائزه شیرعلی پور[۳]

[۱]پژوهشگاه ملی مهندسی ژنتیک و زیست فناوری، گروه زیست فناوری پزشکی، تهران، ایران.

تاریخ ثبت اولیه: ۱۳۹۷/۱۲/۱٤، **تاریخ دریافت نسخهٔ اصلاح‌شده:** ۱۳۹۸/۰۳/۲۲، **تاریخ پذیرش قطعی:** ۱۳۹۸/۰٤/۱۸

چکیده مهندسی بافت استخوان با هدف ترمیم ضایعات و آسیب‌های استخوانی در تلاش است تا با بهبود داربست‌های سنتزی بتواند شرایط مشابه ماتریس سلولی را برای رشد و تکثیر بهتر سلول‌های بدن فراهم کند. از این‌رو طراحی یک داربست مناسب با خواص زیستی و مکانیکی بهینه می‌تواند نقش مهمی را در این زمینه ایفا کند. در این تحقیق درصدهای وزنی مختلف نانولوله‌های کربن تک‌دیواره عامل‌دار شده با گروه آمین (SWCNTs-amine) با درصدهای وزنی ۰، ۰.۱، ۰.۲ و ۰.۵ به پلی‌کاپرولاکتان (PCL) به منظور افزایش خواص زیستی و مکانیکی داربست اضافه و نانوالیاف‌های کامپوزیتی PCL-SWCNTs با روش الکتروریسی تهیه شد. چسبندگی، تکثیر، تمایز و زنده‌مانی سلول‌های بنیادی مزانشیمال مشتق شده از مغز استخوان موش (BMSCs) بر روی داربست‌ها توسط میکروسکوپ الکترونی عبوری (SEM)، آزمون‌های MTT، live-dead و آلکالین فسفاتاز بررسی شد. مورفولوژی، خواص مکانیکی و زیست‌فعالی داربست‌ها نیز با استفاده از میکروسکوپ الکترونی عبوری، آزمون استحکام کششی و آزمون زیست‌فعالی در محیط شبیه‌سازی‌شده بدن (SBF) مورد ارزیابی قرار گرفت. نتایج نشان داد که نانوکامپوزیت حاوی ۰٫۲ درصد نانولوله کربنی دارای بیشترین میزان استحکام کششی در حدود ۱۰ مگاپاسکال است که در مقایسه با نمونه الکتروریسی شده PCL خالص، افزایش قابل‌توجهی داشته است. هم‌چنین هیچ کدام از نمونه‌ها پس از گذشت یک، سه و پنج روز سمیتی از خود نشان ندادند. به‌علاوه، بررسی‌های صورت گرفته با SEM نشان داد که استفاده از نانولوله‌های کربن تک‌دیواره، چسبندگی و نفوذ سلول‌های BMSC بر روی الیاف داربست را افزایش داده است. این افزایش در نمونه نانوکامپوزیتی حاوی ۰٫۵ درصد وزنی نانولوله کربنی مشهودتر بود. هم‌چنین نتایج آزمون آلکالین فسفاتاز بهبود تکثیر و تمایز سلول‌ها را بر روی داربست‌های حاوی نانوذره نسبت به PCL خالص نشان داد. از نتایج حاصل می‌توان دریافت که نانوالیاف‌های الکتروریسی شده با درصدهای وزنی بهینه می‌توانند کاندیدهای مناسبی جهت کاربرد در مهندسی بافت استخوان باشند.

کلمات کلیدی: پلی‌کاپرولاکتون، نانولوله کربن تک‌دیواره، الکتروریسی، نانوکامپوزیت، مهندسی بافت استخوان.

Preparation and Evaluation of Polycaprolactone / Amine Functionalized Carbon Nanotube Electrospun Nanocomposite Scaffold Containing Mesenchymal Stem Cells for Use in Hard Tissue Engineering

Mohammad hadi tohidloo [*1] and seyedeh sara shafiei [2] and faeze shiralipour[3]

[1]Department of medical biotechnology, National institute of Genetic Engineering and Biotechnogy, Tehran, Iran.

Abstract Bone tissue engineering with the aim of repairing bone defects and bone injuries has been trying to design an appropriate scaffold with optimal mechanical and biological properties that can play an important role in this regard. In this study, different amounts of amine-functionalized single-walled carbon nanotubes (SWCNTs-amine) with the 0, 0.1, 0.2 and 0.5 weight percentages (%wt) were added to polycaprolactone, to enhance biological and mechanical properties of scaffolds, then PCL-SWCNTs composite nanofibers were prepared by electrospinning method. The attachment, proliferation, differentiation and growth of rat bone marrow derived mesenchymal stem cells (BMSCs) on the scaffolds were analyzed by scanning electron microscopy (SEM), MTT, live-dead and alkaline phosphatase activity assays. The morphology and mechanical properties of the scaffolds, using the SEM and tensile strength test, were characterized and the bioactivity of the scaffolds in simulated body fluid (SBF) was assessed. The results indicated that PCL-SWCNTs 0.2 wt. % had the highest tensile strength (about 10 MPa) and showed a significant increase as compared with the pure PCL. Moreover, no toxicity was reported after 1, 3 and 5 days after cell seeding on scaffolds. In addition, surveys carried out by SEM showed that the use of single-walled carbon nanotubes, had promoted cell attachment on the scaffold fibers. This increase was more considerable in PCL-SWCNTs 0.5 wt. %. Furthermore, alkaline phosphatase activity demonstrated enhanced proliferation and differentiation of cells on scaffolds containing nanoparticles in comparison with the pure PCL. It is concluded that electrospun SWCNTs/PCL nanofibers with the optimum concentration can be a good candidate for bone tissue engineering applications.

Keywords: Polycaprolactone, single-walled carbon nanotubes, electrospinning, nanocomposite, Bone Tissue Engineering.

*عهده دار مکاتبات

نشانی: تهران، گروه سلول های بنیادی و پزشکی بازساختی، پژوهشگاه ملی مهندسی ژنتیک و زیست فناوری **تلفن:** ۰۹۱۲۱٤٦۳٦۹۰، **پیام نگار:** shafiei@nigeb.ac.ir

۱- مقدمه

اکثر آسیب‌های استخوانی از تومورها، بیماری‌ها، عفونت‌ها، تروما، اختلالات بیوشیمیایی و یا ناهنجاری‌های اسکلتی دوران جنینی ناشی می‌شود. هر ساله هزاران نفر از این آسیب‌های استخوانی رنج می‌برند و با پیشرفت جمعیت و افزایش میانگین سن جامعه و تغییر الگوهای زندگی پیش‌بینی می‌شود. این آمار افزایش یافته و به دنبال آن تقاضا برای جایگزین‌های استخوانی و درمان نیز بیشتر شود [۱و ۲].

در شکستگی‌ها و آسیب‌های بزرگ روند طبیعی ترمیم استخوان کارساز نمی‌باشد و باید درمان کلینیکی انجام گیرد. گزینه بالینی فعلی برای ترمیم و درمان بیماری‌ها و نقایص استخوانی پیوند استخوان است اما محدودیت‌های آنها باعث ظهور جایگزین دیگری به نام جایگزین‌های پیوند استخوان شد. این نوع از پیوند استخوان بر پایه مفهوم اصلی مهندسی بافت استخوان می‌باشد که متشکل از سه رکن اصلی سلول‌های اجدادی استخوان، فاکتورهای رشد[1] و داربست[2] می‌باشد. برای بازسازی موفق استخوان، سه فاکتور کلیدی شامل: ۱) سلول‌های استئوژنیک ۲) داربست استئوکنداکتیو و ۳) فاکتورهای رشد استئوایناداکتیو مورد نیاز است [۳]

داربست‌ها مهم‌ترین بخش مورد استفاده در مهندسی بافت هستند از این‌رو طراحی و انتخاب داربست مناسب از اهمیت بسیار بالایی برخوردار است. اصلی‌ترین هدف استفاده از داربست در مهندسی بافت فراهم کردن یک محیط سه‌بعدی مشابه ماتریس خارج سلولی (ECM) [3] بافت استخوان برای سلولها و بافت است تا بتوانند روی آن به خوبی رشد کنند [٤-۵]. در میان پلی‌استرها، پلی‌کاپرولاکتون (PCL)[4] یک پلیمر شناخته شده است که توسط سازمان غذا و داروی آمریکا (FDA)[5] نیز به عنوان یک پلی‌استر زیست‌تخریب‌پذیر[6] و زیست‌سازگار[7] تایید شده است. ساختار سه‌بعدی غشای نانوالیافی PCL تقلیدی از ماتریس خارج سلولی طبیعی می‌باشد. از این‌رو می‌تواند چسبندگی، رشد، تکثیر و تمایز سلولی را بهبود بخشد. با خصوصیات مکانیکی فوق‌العاده، زیست‌سازگاری خوب، آنتی ژنیسیته پایین، فرآیندپذیری ساده و آسان، زیست‌تخریب‌پذیری و غیرسمی بودن محصول حاصل از تخریب آن، این ماده را به یک پلیمر مناسب جهت ساخت داربست تبدیل کرده است. در مقابل، به دلیل آب‌دوستی ضعیف و تاخیر در زمان تخریب این ماده، اثر آن بر القای پاسخ‌های سلولی ضعیف است. هم‌چنین خواص مکانیکی ضعیف PCL در داربست‌های متخلخل و زیست‌فعالی ضعیف آن، کاربردهای این پلیمر را در مهندسی بافت سخت محدود می‌کند [۵و٦]. سرعت تخریب PCL را می‌توان با ترکیب این پلیمر با مواد طبیعی و سینتیک دیگر مانند نانوپرکننده‌هایی مثل هیدروکسی آپاتیت، سیلیکا و غیره، اصلاح کرد.

مش‌های کربنی مورد استفاده در مهندسی بافت عمدتا از الیاف کربن و نانولوله‌های کربنی شامل نانولوله‌های کربن تک‌دیواره[8] (SWCNTs) و نانولوله‌های کربن چنددیواره[9] (MWCNTs) تهیه می‌شود. نانولوله‌های کربن با خواص مکانیکی فوق‌العاده می‌توانند یک کاندید مناسب برای استفاده در داربست‌های مهندسی بافت استخوان باشند [۷].

اگرچه نانولوله‌های کربنی زیست‌تخریب‌پذیر نیستند و عملکرد طولانی‌مدت آنها در محیط بدن هنوز مورد مطالعه قرار نگرفته است، بسیاری از تحقیقات نشان داده‌اند که این نانولوله‌های کربنی عامل‌دار[10] شده با گروه‌های کربوکسیل، هیدروکسیل، آمین، آمید و غیره، قابلیت انحلال در آب را دارند و در نهایت می‌توانند از گردش خون سیستماتیک از طریق مسیر دفع کلیوی خارج شوند. این بدان معنی است که نانولوله‌های کربنی عامل‌دار شده جهت کاربردهای زیست پزشکی[11] مانند ساخت داربست، کاملا ایمن و بی‌خطر هستند [۸]. گزارش‌ها نشان می‌دهد که خواص مکانیکی برخی از مواد زیست‌تخریب‌پذیر با ترکیب نانولوله‌های کربنی بهبود پیدا می‌کند. علاوه بر این تحقیقات دیگر حاکی از بهبود رفتار سلولی و رشد و تکثیر آنها با استفاده از مواد ساخته شده از نانولوله‌های کربنی می‌باشد. هم‌چنین افزودن نانولوله‌های کربنی به پلیمر پلی‌کاپرولاکتون می‌تواند خواص هدایتی، حرارتی و مکانیکی این پلیمر را

[1] Growth factor
[2] Scaffold
[3] ExtraCellular Matrix
[4] Polycaprolactone
[5] Food and Drug Administration
[6] Biodegradable
[7] Biocompatible
[8] Single-walled carbon nanotubes
[9] Multi-walled carbon nanotubes
[10] Functionalized-CNTs
[11] Biomedical

افزایش دهد [۹]. از میان نانوالیاف الکتروریسی‌شده زیست‌سازگار، نانوالیاف پلی‌کاپرولاکتون می‌تواند خصوصیاتی را که مورد علاقه برای کاربردهای پزشکی است، فراهم کند. با ترکیب خصوصیات عالی ذاتی پلی‌کاپرولاکتون با خصوصیات یک ساختار نانوالیافی و هم‌چنین خصوصیات منحصر به‌فرد نانوذره نانولوله‌های کربنی، یک ماده امیدبخش برای کاربردهای پزشکی فراهم می‌شود. به عبارت دیگر برای بازسازی بافت‌های سخت بدن می‌تواند به‌کار گرفته شود.

در این پژوهش، هدف افزودن نانولوله‌های کربنی تک‌دیواره عامل‌دار شده با آمین به ماتریس پلی‌کاپرولاکتون و بررسی خواص فیزیکی، شیمیایی، مکانیکی و بیولوژیکی داربست‌های نانوکامپوزیتی است. هدف از استفاده از نوع آمینی این نانولوله-ها، همان‌طور که ذکر شد، افزایش خواص زیست‌سازگاری و قابلیت حذف موثرتر از بدن می‌باشد. تاکنون مقاله‌ای مبنی بر استفاده از نانولوله‌های آمین‌دار در نانوکامپوزیت پلی-کاپرولاکتون به منظور استفاده در مهندسی بافت گزارش نشده است.

۲- روش تحقیق

۲-۱مواد اولیه و تجهیزات مورد استفاده در ساخت داربست

به منظور ساخت داربست‌های نانوکامپوزیتی الکتروریسی شده، از PCL با وزن مولکولی ۷۰۰۰۰ (Sigma-Aldrich, Germany) به عنوان فاز پلیمری و از نانولوله کربن تک‌دیواره عامل‌دار شده با گروه آمین(Nanointegris,Canada) به عنوان فاز سرامیکی و هم‌چنین از دی‌کلرومتان و دی‌متیل فرمامید (Merck) به عنوان حلال استفاده شد. در میان روش‌های مختلف برای ساخت داربست در این مطالعه از روش پرکاربرد الکتروریسی استفاده شد.

۲-۲ روش ساخت

در این مطالعه چهار داربست نانوکامپوزیتی الکتروریسی شده با درصدهای وزنی مختلف SWCNTs(۰، ۰/۱، ۰/۲ و ۰/۵) ساخته شد. نسبت PCL/SWCNTs به دی‌کلرومتان/ دی متیل فرمامید یا به اختصارDCM/DMF در همه نمونه‌ها ۱۰ درصد ثابت در نظر گرفته شد. پیش از شروع کار تمامی مواد جامد با ترازو وزن شدند. به منظور پراکنده شدن بهتر و توزیع یکنواخت‌تر نانوذره در حلال از سونیکیتور استفاده شد.

ابتدا مقادیر مورد نظر PCL با DCM مخلوط و در دمای اتاق بر روی هم‌زن مغناطیسی به مدت ۳۰ دقیقه قرار داده شدند و در نهایت ماده ویسکوز و بی‌رنگی حاصل شد. سپس سوسپانسیون پایدار SWCNTs/DMF به‌دست آمده به محلول همگن PCL/DCM اضافه شد. دوباره این ترکیب به مدت ۱۰ دقیقه بر روی هم‌زن مغناطیسی جهت یکنواخت شدن قرار گرفت.

در ادامه مقدار دو میلی‌لیتر از هر کدام از محلول‌های آماده الکتروریسی در داخل سرنگ الکتروریسی (سر سوزن شماره ۲۱) ریخته و در جایگاه مخصوص پمپ تزریق در دستگاه الکتروریسی قرار داده شد. فاصله سر سوزن از صفحه جمع‌کننده دوار ۲۱ سانتی‌متر و نرخ تزریق یک میلی‌لیتر بر ساعت انتخاب شد. در نهایت اختلاف پتانسیل ۱۷ کیلووات با استفاده از دستگاه مولد جریان الکتریکی بین سر سوزن و صفحه جمع‌کننده برقرار گردید و نانوالیاف الکتروریسی شد.

داربست‌های الکتروریسی شده به مدت یک شبانه-روز در زیر هود قرار داده شدند تا حلال آن‌ها به‌طور کامل تبخیر شود.

۲-۳ مشخصه‌یابی داربست

۲-۳-۱بررسی مورفولوژی داربست

جهت بررسی ساختار نانوالیاف و نیز ارزیابی شکل و مورفولوژی سلول‌های کشت شده بر روی داربست‌های نانولیفی تهیه شده، از دستگاه میکروسکوپ الکترونی روبشی (SEM) استفاده شد. در این پژوهش از دستگاه میکروسکوپ الکترونی روبشی مدل ALS2100 ساخت شرکت SERON کره جنوبی استفاده شد.

هم‌چنین جهت اندازه‌گیری قطر الیاف و اندازه منافذ داربست الکتروریسی شده از نرم‌افزار Image-J استفاده شد. با استفاده از این نرم‌افزار تعداد ۵۰ مرتبه اندازه‌گیری از نقاط مختلف عکس‌های تهیه شده از داربست‌ها به وسیله SEM، انجام شد و متوسط قطر الیاف توسط نرم‌افزار محاسبه گردید.

۲-۳-۲مطالعه رفتار مکانیکی داربست

رفتار مکانیکی داربست‌ها با استفاده از آزمون استحکام کششی[1] بررسی شد. استحکام کششی داربست‌ها توسط دستگاه SMT-20 ساخت شرکت سنتام کشور ایران اندازه‌گیری شد. بدین منظور داربست‌های الکتروریسی شده با ضخامت ۱۵۰-۲۵۰ میکرومتر (ضخامت توسط میکرومتر اندازه‌گیری شد) به صورت مستطیلی با ابعاد ٤×۱ سانتی‌متر بریده شدند و در فک‌های بالا و پایین دستگاه قرار گرفتند. سرعت حرکت فک‌ها ۱۰ میلی‌متر در هر دقیقه (10 mm/min) تنظیم شد. برای هر یک از درصدهای مختلف داربست‌ها، این آزمون به‌طور جداگانه سه بار تکرار شد. نتایج حاصل توسط نرم‌افزار Excel رسم شدند.

۲-۳-۳ بررسی زیست‌فعالی[2] داربست‌ها

یک ماده زیست‌فعال باید توانایی اتصال به بافت‌های بدن را داشته باشد. در مورد یک جایگزین استخوانی توانایی تشکیل لایه هیدروکسی آپاتیت[3] در سطح ساختار می‌تواند معیار مناسبی از زیست‌فعالی زیست‌مواد باشد.

بدین منظور زیست‌فعالی داربست‌های تهیه شده با استفاده از غوطه‌وری در محلول شبیه‌سازی شده بدن (SBF) به مدت هفت روز ارزیابی شد (تهیه محلول شبیه سازی شده طبق روش گزارش شده Kokubo تهیه شد [۱۰]).

۲-٤ مطالعات سلولی برون‌تنی (In-vitro)

۲-٤-۱جداسازی و کشت سلول‌های مزانشیم مغز استخوان رت

در این مطالعه تجربی موش‌های صحرایی نرنژاد ویستار با سن تقریبی چهار هفته، به کمک روش در رفتگی مهره گردنی کشته شدند و استخوان‌های ران و ساق پای آن‌ها جدا و سپس بافت‌های پیوندی اطراف استخوان‌ها به‌طور کامل پاک گردید. استخوان‌ها در داخل یک فالکن ۵۰ میلی‌لیتری حاوی PBS سرد و ۵٪ پنی‌سیلین/ استرپتومایسین بر روی یخ به زیر هود لامینار منتقل شدند. دو سر استخوان‌های ران و ساق پا با قیچی استریل قطع و سپس مغز استخوان با تزریق محیط کشت کامل (DMEM حاوی ۱۰٪ سرم جنینی گاو و ۱٪ پنی‌سیلین/ استرپتومایسین) به وسیله یک سرنگ توسط روش فلاشینگ خارج و به داخل لوله فالکن هدایت شد. لوله فالکن به مدت پنج دقیقه در دور 1200 rpm[4] و دمای اتاق سانتریفیوژ شد. سپس محیط رویی حذف و رسوب سلولی در محیط کشت معلق گردید و یک‌بار دیگر شست‌وشو انجام شد. در مرحله بعد رسوب سلولی در یک میلی‌لیتر محیط کامل معلق گردید و پس از شمارش به یک فلاسک کشت سلول منتقل و در انکوباتور کشت سلولی در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد و غلظت پنج درصد CO_2 نگه‌داری شد.

۲-٤-۲کاشت سلول بر روی داربست‌ها

پس از آماده‌سازی داربست‌ها در ابعاد ۱ × ۱ سانتی‌متر مربع و استریل کردن، در داخل چاهک‌های پلیت ۲٤ خانه قرار داده شدند و تعداد 10^4 سلول در هر سانتی‌متر مربع بر روی آن کاشت شد.

۲-٤-۳ بررسی مورفولوژی و چسبندگی سلول‌ها بر روی داربست‌ها

برای بررسی مورفولوژی سلول‌های متصل به داربست از میکروسکوپ الکترونی روبشی استفاده شد. بدین منظور پس از کشت سلول‌ها بر روی داربست‌های مورد نظر در بازه‌های زمانی سه ساعت و ۷۲ ساعت، داربست‌ها را دو مرتبه با PBS شسته و در نهایت با گلوتارالدهید ۲٫۵٪ (Merck) به مدت چهار روز تثبیت شدند. پس از گذشت چهار روز، گلوتارالدهید از نمونه‌ها خارج و با ۲ میلی لیتر PBS شسته شدند. سپس داربست‌ها را داخل پتری دیش قرار داده و به ترتیب با الکل ۳۰٪، ٤۰٪، ۵۰٪، ٦۰٪، ۷۰٪، ۸۰٪، ۹۰٪ و ۱۰۰٪ برای دو بار و هر بار به مدت ۱۰ دقیقه دی‌هیدراته شدند و یک شبانه‌روز زیر هود قرار داده شدند تا به‌طور کامل خشک شوند.

۲-۵بررسی فعالیت متابولیکی

۲-۵-۱ آزمون MTT

به منظور بررسی میزان سمیت داربست‌های ساخته شده، اثر آن‌ها بر میزان زنده بودن سلول‌ها در کشت سلولی، توسط آزمون سنجش نمک تترازولیوم (MTT) بررسی شد. معرف MTT که یک نمک تترازولیوم زرد رنگ است که جذب میتوکندری سلول‌های فعال متابولیک شده و در اثر

[1] Tensile
[2] Bio activity
[3] Hydroxyapatite
[4] Round Per Minute

فعالیت آنزیم سوکسینات دهیدروژناز، تولید بلورهای فورمازان بنفش رنگ می‌کند که در حلال مناسب حل و میزان رنگ تولید شده با اسپکتروفتومتری اندازه‌گیری می‌شود. هر چه سلول‌های زنده فعال‌تر و تعداد آنها بیشتر باشد، میزان رنگ ایجاد شده بیشتر است. بنابراین بر اساس خوانش میزان جذب نوری سلول‌ها می‌توان با رسم منحنی استاندارد خطی، رابطه متناسبی از تعداد سلول ها و رنگ تولید شده را به‌دست آورد.

۲-۵-۲ آزمون LiveDead

جهت ارزیابی چسبندگی و زنده‌مانی از کیت آزمون LiveDead، حاوی Calcein-AM و Ethidium homodimer (Thermofisher-L3224) استفاده شد. بدین منظور سلول‌ها در چاهک‌های پلیت ٢٤ خانه کاشت شدند (سلول‌ها در کفت چاهک‌ها کاشت شدند و تحت تیمار با عصاره داربست‌ها به مدت سه روز قرار گرفتند). در روز آزمون، محیط کشت خارج و شست‌وشو با PBS انجام شد. سپس مطابق با دستورالعمل شرکت تولیدکننده مخلوط رنگ‌ها تهیه گردید و به هر کدام از خانه‌های مورد نظر ۱۰۰ میکرولیتر اضافه شد. به منظور جلوگیری از تابش نور به روی پلیت فویل کشیده و به مدت ۳۰ دقیقه در دمای اتاق انکوبه شد. سپس در زیر میکروسکوپ فلوروسنت با فیلترهای مخصوص سلول‌های زنده (ex/em ~495 nm/~515 nm) و مرده (ex/em ~495 nm/~635nm) مشاهده شدند و با دوربین دیجیتال عکس تهیه شد. سلول‌های با هسته قرمز به عنوان سلول‌های در حال مرگ و سلول‌های با رنگ سبز به عنوان سلول‌های زنده در نظر گرفته شدند.

۳-۵-۲ القای تمایز استخوانی

سلول‌های پاساژ ٤ جهت کاشت بر روی داربست‌ها استفاده شدند. قبل از کاشت سلولی، داربست‌ها به روش گفته شده با الکل ۷۰٪ استریل شدند. پس از کاشت سلولی به میزان 10^4 سلول در هر چاهک و بعد از گذشت یک روز، محیط کشت سلول‌ها با محیط القاکننده تمایز به استخوان جایگزین شد. این محیط شامل محیط DMEM حاوی ۱۰ درصد FBS، ۱۰۰ نانو-مول بر لیتر دگزامتازون، ۰٫۰۵ میلی‌مول بر لیتر آسکوربیک اسید و ۱۰ میلی‌مول بر لیتر بتاگلیسرول فسفات بود. کشت سلول به مدت ۷هفت و ١٤ روز در شرایط دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد و پنج درصد CO_2 انکوبه شد. محیط کشت تمایزی هر دو روز یک‌بار تعویض گردید و در پایان هر دوره وقوع تمایز سلول بررسی شد.

٤-۵-۲سنجش فعالیت آلکالین فسفاتاز

فعالیت آنزیم آلکالین فسفاتاز با تجزیه پیروفسفات‌ها در محیط in vitro قابل اندازه‌گیری است. در روزهای ۷ و ١٤ تمایزی، میزان فعالیت آنزیم آلکالین فسفاتاز سلول‌ها بر روی داربست‌ها با استفاده از کیت (abcam, ab83369) سنجیده شد. این کیت حاوی بافر سنجش آلکالین فسفاتاز[1]، pNPP[2]، آنزیم آلکالین فسفاتاز و Stop Solution است.

۳- نتایج و بحث

۱-۳ آنالیز داربست

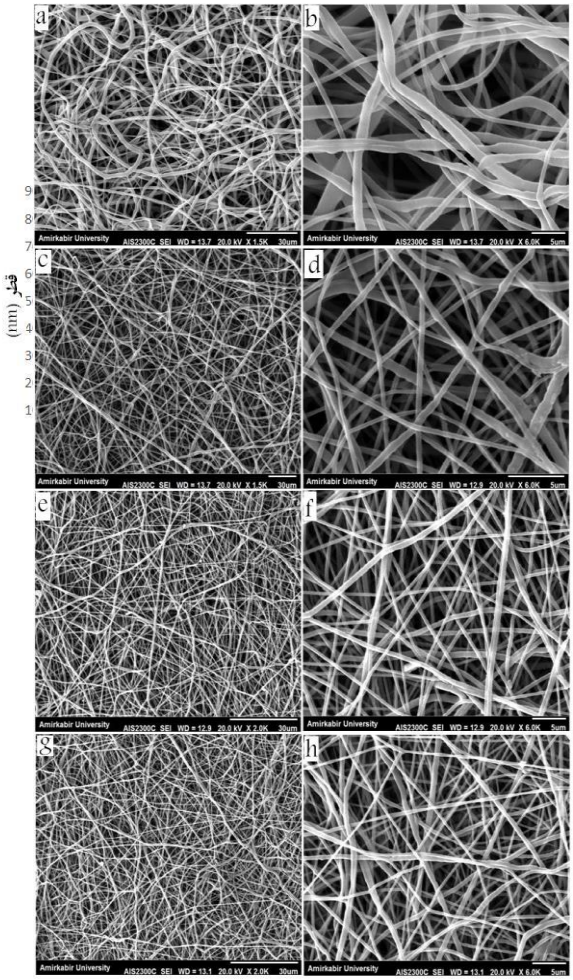
۱-۱-۳ آنالیز SEM

به منظور ارزیابی مورفولوژی الیاف و بررسی اندازه قطر الیاف از میکروسکوپ الکترونی روبشی استفاده شد. تمامی الیاف ساخته شده تقریبا فاقد گره بوده و با جهت‌گیری-های متفاوت ریسیده شده‌اند (شکل ۱) . با استفاده از برنامه پردازش تصویر Image J، قطر الیاف اندازه‌گیری شد (شکل ۲). متوسط قطر الیاف برای داربست PCL خالص ۷٦۹ نانومتر بود، در حالی‌که با افزودن ۰٫۱٪ SWCNTs، متوسط قطر الیاف به ٤۲۷٫۷ نانومتر کاهش یافت. افزودن غلظت بیشتر SWCNTs منجر به ادامه روند کاهشی ضخامت الیاف گردید تا جایی‌که متوسط قطر الیاف در نمونه ۰٫۵٪SWCNTs به ۲٦۷ نانومتر رسید.

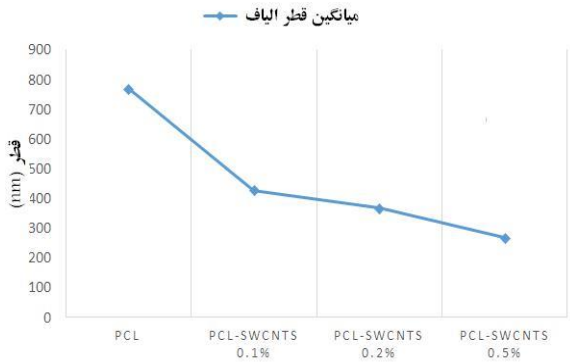
۲-۱-۳ آزمون استحکام کششی

ویژگی مکانیکی یک داربست نقش مهمی را در رفتار سلولی از جمله چسبندگی، اتصال و تکثیر ایفا می‌کند. علاوه بر این، داربست برای کاربرد خاص باید مشخصه طبیعی بافت هدف یا ارگان را تقلید کند، در حالی‌که حمایت مکانیکی طی بازسازی بافت را حفظ می‌کند. شکل ۳ منحنی کشش تنش-کرنش داربست‌های نانوالیاف الکتروریسی شده را نشان می دهد. داده‌های به‌دست آمده از منحنی تنش- کرنش در جدول ۱ گزارش شده است.

[1] ALP assay buffer
[2] p-nitrophenyl phosphate (pNPP)



شکل ۱ . تصاویر SEM داربستهای تهیه شده (a, b) PCL، (c, d) PCL/SWCNTs ۰.۱٪، (e, f) PCL/SWCNTs ۰.۲٪، (g, h) PCL/SWCNTs ۰.۵٪

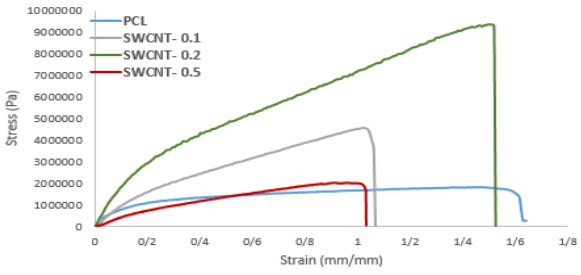


شکل ۲ . نمودار متوسط قطر الیاف در داربستها.

همانطور که مشاهده میشود، مدول یانگ، کرنش و استحکام کششی نهایی محاسبه شده است. اثر افزودن SWCNTs بر ویژگیهای مکانیکی از طریق آزمون کشش تک-محوری ارزیابی شد. داربست PCL الکتروریسی شده دارای مدول یانگ ۱٫۰٦۲ مگاپاسکال، کرنش ۱٫٦ و استحکام کششی ۱٫۷ مگاپاسکال بود. افزودن ۰٫۱٪ SWCNTs منجر به افزایش مدول یانگ به ٤٫۲٤٥ مگاپاسکال و کاهش کرنش به ۱٫۰٦ و استحکام کششی ٤٫۵ مگاپاسکال شد. در ادامه افزایش در مقدار ۰٫۲٪ SWCNTs، افزایش در مدول یانگ تا ٦٫۲ مگاپاسکال و ثابت ماندن تقریبی کرنش نسبت به نمونه PCL خالص (۱٫۵) و همچنین افزایش در استحکام کششی تقریبا تا ۹٫۳ مگاپاسکال را ناشی میشود. به واسطه افزایش در مقدار SWCNTs تا ۰٫۵٪ مدول یانگ، کرنش و استحکام کششی به-طور قابل ملاحظهای کاهش مییابد. افزودن مقادیر بیشتر SWCNTs ممکن است به عنوان یک افزایشدهنده تنش عمل کند و در نتیجه منجر به عملکرد مکانیکی پایینتر شود. این یافتهها نشان میدهد که افزودن مقدار ناچیز (بهینه) SWCNTs منجر به افزایش کشش‌پذیری الیاف الکتروریسی میشود که عمدتا به دلیل در یک راستا قرار گرفتن الیاف طی تغییرشکل مکانیکی است. شایان ذکر است که فرآیند الکتروریسی ممکن است بر نیروهای الکترواستاتیک و در نتیجه تعامل PCL با SWCNTs اثر گذارد. این نتایج نشان میدهد که یک غلظت بهینه برای غلظت SWCNTs وجود دارد که اثرات مطلوب از نظر استحکام کششی و کرنش فراهم میکند.

جدول ۱. خصوصیات مکانیکی داربستها.

	استحکام کششی نهایی (MPa)	کرنش(٪) (%)	مدول یانگ (MPa)
PCL	۱٫۷±۰٫۱۲	۱٫٦±۰٫۰٤	۱٫٦۲۰±۰٫۰٦
PCL + SWCNTs ٪۰٫۱	٤٫۵±۰٫۲۹	۱٫٦۰±۰٫۰۸	٤٫۲٤۵±۰٫۵٤
PCL + SWCNTs ٪۰٫۲	۹٫۳±۰٫۲۹	۱٫۵±۰٫۰۵	٦٫۲±۰٫۰۱۵
PCL + SWCNTs ٪۰٫۵	۲±۰٫٤۵	۱٫۳۰±۰٫۰۲۵	۱٫۹٤۱±۰٫۷۱

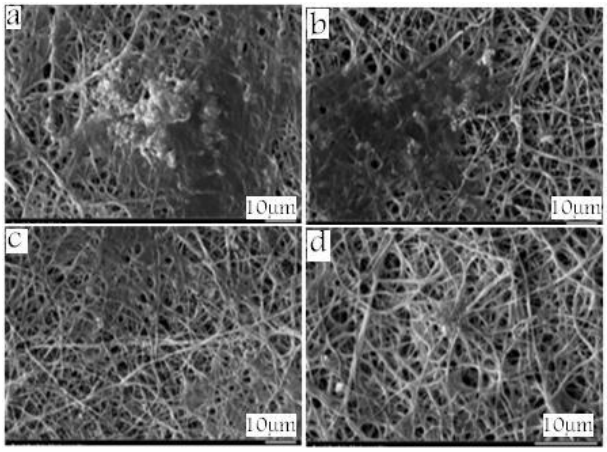


شکل ۳. منحنی تنش- کرنش داربستها.

۳-۲ ارزیابی زیست‌فعالی

اولین نشانه زیست‌فعال بودن داربست‌ها پیوند آن‌ها به استخوان و تشکیل لایه آپاتیتی شبه‌استخوانی بر روی سطح آن-ها می‌باشد. این پدیده می‌تواند در محیط آزمایشگاهی با استفاده از محلول SBF که مشابه پلاسمای خون انسانی می‌باشد، مورد مطالعه قرار گیرد. تصاویر میکروسکوپ الکترونی روبشی مربوط به تشکیل لایه هیدروکسی آپاتیت بر روی نمونه‌ها در شکل ٤ نشان داده شده است. همان‌طور که در شکل مشخص است در تمامی نمونه‌ها تشکیل لایه هیدروکسی آپاتیت مشاهده می‌شود. عواملی چون زبری سطح الیاف به فرایند معدنی شدن کمک می‌کند. در داربست PCL خالص تشکیل لایه هیدروکسی آپاتیت به این دلیل است که هنگامی‌که PCL تحت شرایط فیزیولوژیکی قرار می‌گیرد، پیوند استری در سطح آن هیدرولیز شده و گروه‌های (COOH-) و (-OH) ایجاد شده که به دلیل وجود بار منفی این گروه‌ها، یون-های کلسیم و فسفات موجود در SBF را جذب می‌کنند و منجر به فرایند معدنی شدن می‌شود.

خواص مطلوب به‌دست آمده در نانوکامپوزیت به علت کمتر بودن قطر الیاف و وجود نانوذرات SWCNTs باعث جذب یون‌های کلسیم و فسفات بیشتر می‌گردد که در نهایت می‌تواند منجر به افزایش تشکیل لایه آپاتیتی شود. شکل ٤ تشکیل لایه هیدروکسی آپاتیت را بر روی تمامی داربست‌ها پس از هفت روز غوطه‌وری در محلول SBF نشان می‌دهد.



شکل .Error! No text of specified style in document

تصاویر SEM داربست‌ها پس از غوطه‌وری در محلول SBF به مدت هفت روز

(a) PCL، (b) PCL/SWCNTs-0.1%، (c) PCL/SWCNTs-0.2%، (d) PCL/SWCNTs-0.5%

۳-۳ ارزیابی زیستی

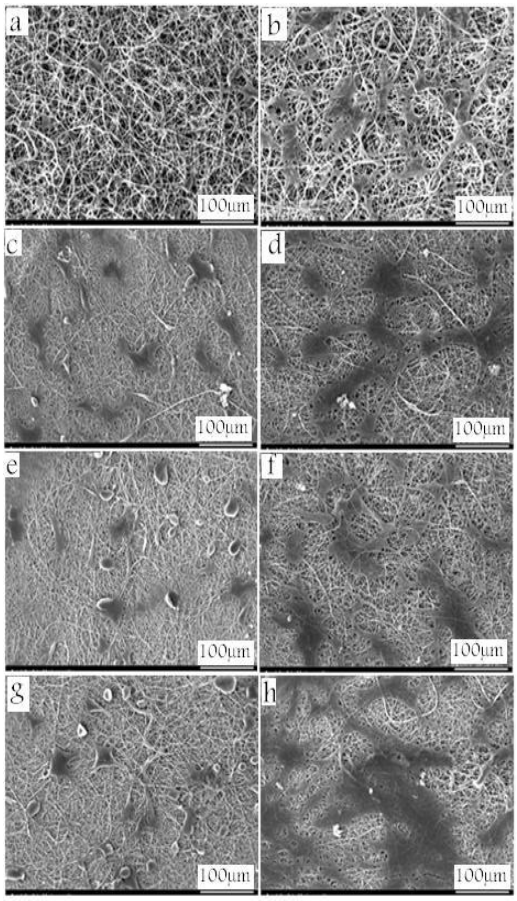
۳-۳-۱ بررسی مورفولوژی و چسبندگی سلولهای BMSCs

به منظور مشاهده مورفولوژی سلول‌های کشت داده شده بر روی داربست‌ها از میکروسکوپ الکترونی روبشی استفاده شد. تصاویر این سلول‌ها پس از سه و ۷۲ ساعت کشت بر روی داربست‌ها در شکل ۵ نمایش داده شده است. همان‌طور که در تصویرهای SEM مشاهده می‌شود در داربست‌های PCL و PCL/SWCNTs گسترش سلول‌ها به خوبی قابل مشاهده است که با الگوی نامنظم بر روی الیاف پهن شدند و ماتریس خارج سلولی (ECM) ترشح کرده‌اند. هم‌چنین، سلول‌ها در طول و عرض داربست گسترده شده که بیانگر شرایط مناسب برای رشد و تکثیر سلول می‌باشد. این گستردگی و نفوذ سلول‌ها در داربست‌های PCL/SWCNTs به‌طور ویژه‌ای قابل ملاحظه هستند در حالی‌که در داربست PCL پدیده مهاجرت سلولی و نفوذ به درون الیاف دیده نمی‌شود. از دلایل دیگر اتصال بهتر سلول‌ها بر روی داربست-های حاوی SWCNTs می‌توان به آب‌دوست بودن سطح این داربست‌ها اشاره کرد، در حالی‌که در داربست حاوی PCL خالص به دلیل آب‌گریز بودن این پلیمر اتصال و نفوذ درون الیاف کمتر مشاهده می‌شود. مطالعات نشان دادند که الیاف حاوی نانولوله‌های کربن نسبت به PCL خالص سطح صاف و یکدستی دارد [۱۱].

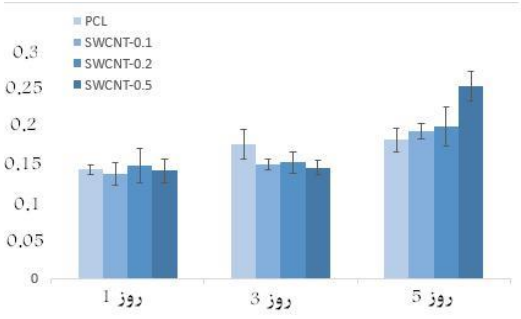
۳-۳-۲ بررسی سمیت

با توجه به کاربرد داربست‌های PCL/SWCNTs در مهندسی بافت، تاثیر این داربست ها بر روی تکثیر سلول-های BMSCs و عدم سمیت آن‌ها با استفاده از آزمون MTT سنجیده شد. سلول‌ها در سه بازه زمانی یک، سه و پنج روز بر روی داربست‌ها کشت داده شدند. نتایج حاصل از این بررسی اثر سمیت قابل توجهی را برای هیچ‌کدام از نمونه‌ها نشان نمی‌دهد و همان‌طور که در شکل ٦ مشاهده می‌شود، تعداد و میزان تکثیر سلولی در همه نمونه‌ها پس از گذشت پنج روز از کشت افزایش یافته است. جالب توجه است که بیشترین میزان زنده‌مانی در مقایسه با سایر نمونه‌ها در نمونه PCL/SWCNTs 0.5% مشاهده شد. نتایج نشان می‌دهد که سلول‌های زنده در الیاف حاوی بالاترین غلظت نانولوله

کربن تک‌دیواره، بالاترین نرخ تکثیر را در طی این دوره کشت سلول داشتند. اثر هم‌افزایی افزودن نانولوله کربن به پلی-کاپرولاکتون می‌تواند در تکثیر و اتصال سلولی نقش داشته باشد. مطالعات قبلی نیز نشان داده است که افزودن نانوذرات اتصال سلول- سلول و تکثیر سلولی را بهبود می‌بخشد.



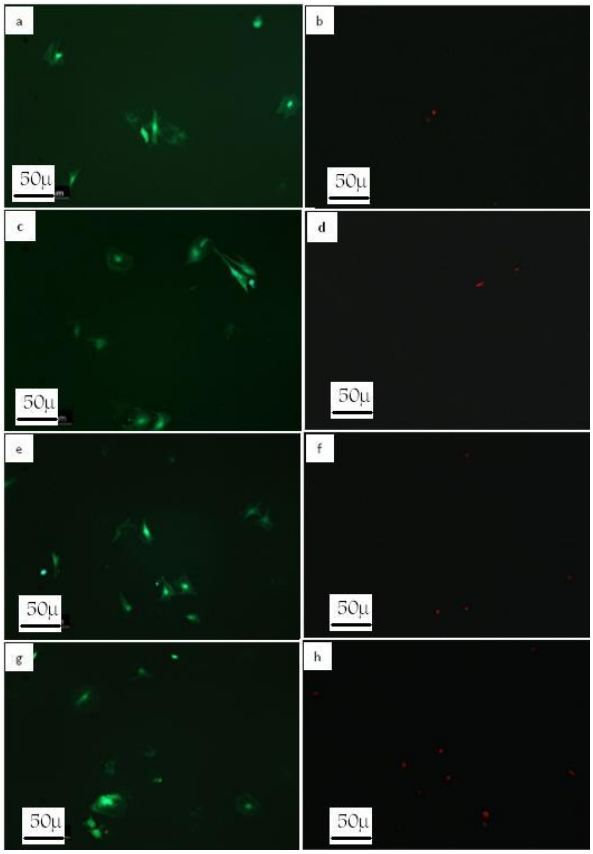
شکل ۵ . تصاویر SEM سلول‌های کشت داده شده بر روی داربست‌ها پس از گذشت سه و ۷۲ ساعت
g,) ،PCL/SWCNTs 0.2% (e, f) ،PCL/SWCNTs 0.1% (c, d) ،PCL (a, b)
PCL/SWCNTs 0.5% (h



شکل ٦. نمودار زیست‌سازگاری داربست‌های الکتروریسی شده.

۳-۳-۳ بررسی زنده‌مانی سلول‌ها بر روی داربست

سلول‌های با سیتوپلاسم قرمز یا نارنجی، سلول‌های در حال مرگ و سلول‌های با هسته و سیتوپلاسم کاملا سبز سلول-های زنده می‌باشند. همان‌طور که در شکل ۷ مشخص است اکثریت سلول‌ها پس از گذشت سه روز به داربست چسبیده و در حال رشد هستند و درصد بسیار کمی از سلول‌ها دچار مرگ سلولی شده‌اند.



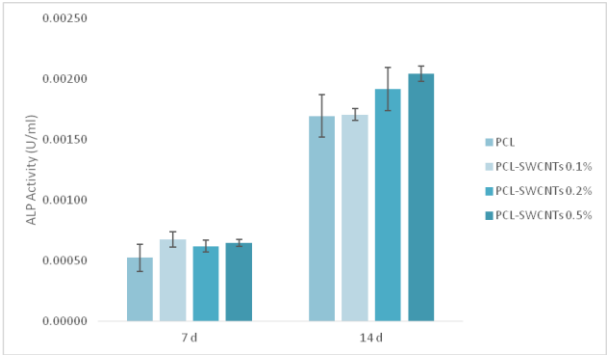
شکل ۷. تصاویر میکروسکوپ فلورسنت، آزمون Live-Dead روز سوم
g,) ،PCL/SWCNTs 0.2% (e, f) ،PCL/SWCNTs 0.1% (c, d) ،PCL (a, b)
(i, j) نمونه کنترل ،PCL/SWCNTs 0.5% (h

٤-۳-۳ سنجش فعالیت آلکالین فسفاتاز

آلکالین فسفاتاز یک اکتوآنزیم[1] است که به وسیله سلول‌های استئوبلاست تولید می‌شود. برخی معتقدند که این آنزیم در تخریب پیروفسفات معدنی مشارکت می‌کند تا یک غلظت موضعی کافی از فسفات یا پیروفسفات معدنی، به منظور فرایند معدنی شدن فراهم نماید. در میان آزمون‌های بیولوژیکی مختلف برای تایید تمایز سلول‌های مزانشیمی به رده استخوانی و هم‌چنین تخمین میزان فعالیت استئوبلاست‌ها

[1] Ectoenzyme

درون داربست‌ها و ترشح آلکالین فسفاتاز، آزمونی مهم می‌باشد. در این پروژه اندازه‌گیری فعالیت آنزیم آلکالین فسفاتاز با استفاده از سوبسترای پارانیتروفنل فسفات صورت گرفت. این سوبسترا تحت تاثیر آنزیم آلکالین فسفاتاز به پارانیتروفنل که یک ترکیب زرد رنگ است تبدیل می‌شود. این واکنش در حضور یون‌های Mg^{2+} که به عنوان گیرنده فسفات عمل می‌کند، انجام می‌شود. شدت رنگ تولید شده متناسب با فعالیت آنزیم است. برای محاسبه میزان فعالیت آنزیم آلکالین فسفاتاز، با استفاده از نمودار منحنی استاندارد به‌دست آمده از این نمودار، غلظت پارانیتروفنل در جذب‌های مختلف محاسبه و در نهایت به کمک فرمول موجود در پروتکل میزان فعالیت آنزیم آلکالین فسفاتاز برای هر نمونه محاسبه شد. نمودار فعالیت آنزیم آلکالین فسفاتاز در شکل ۸ نمایش داده شده است. همان‌طور که در نمودار مشخص است میزان فعالیت آنزیم در روز ١٤ نسبت به روز هفت، در تمامی نمونه‌ها افزایش داشته و این افزایش در نمونه حاوی SWCNTs 0.5% مشهودتر است [۱۲].



شکل ۸. نمودار فعالیت آنزیم آلکالین فسفاتاز در روزهای هفت و ١٤.

٤- بحث

علم مهندسی بافت به عنوان راه‌کاری نوین و امید بخش بر بهبود جانشین‌های زیستی برای ترمیم، نگه‌داری و بهبود بافت و عملکرد صحیح عضو تمرکز یافته است. فرآیندهایی که در مهندسی بافت انجام می‌شود بر سه جزء فناوری سلول، فناوری ساخت داربست و فناوری کاشت و ترکیب در محیط درون‌تنی استوار است. در بین عوامل مهم و موثر، روش تهیه داربست یکی از موارد تاثیرگذار در موفقیت مهندسی بافت می‌باشد. انتخاب روش مناسب برای تولید داربست یکی از موارد کلیدی است. نانوالیاف الکتروریسی شده به دلیل منافذ اتصالی، تراوایی بالا و ناحیه سطحی وسیع می‌تواند تماس بین سلول‌ها و داربست‌ها را افزایش داده و تبادل مواد مغذی و متابولیسمی را بهبود بخشد. در بازسازی بافت استخوان، انتخاب صحیح زیست‌مواد مورد استفاده، گامی مهم در طراحی و ساخت یک داربست ایده‌آل می‌باشد. پلیمرهای مصنوعی به لحاظ ویژگی‌های مکانیکی و سهولت در ساخت، نسبت به پلیمرهای طبیعی دارای برتری می‌باشند. در این پروژه از PCL به عنوان فاز پلیمری استفاده شد. این پلیمر دارای تایدیه سازمان غذا و داروی آمریکا است و کاربردهای وسیعی در زمینه‌های پزشکی و مهندسی بافت دارد. به منظور تقویت برخی از ویژگی‌های داربست، فاز سرامیکی در غلظت-های متفاوت به PCL افزوده شد. بدین منظور، نانولوله‌های کربنی تک‌دیواره که با گروه آمین عامل‌دار شده بودند (SWCNTs-amine)، در حلال مناسب پراکنده و به فاز پلیمری افزوده شد.

به منظور تهیه نانوالیاف یکنواخت و بدون گره[1] در الکتروریسی، پارامترهای بسیاری نقش دارند که رسیدن به پارامترهای بهینه تنها با انجام فرآیند و بررسی تصاویر SEM امکان‌پذیر است. در این پروژه به منظور الکتروریسی داربست‌ها، پارامترهای فاصله سوزن تا صفحه جمع‌کننده ۲۱ سانتی‌متر، اختلاف پتانسیل اعمال شده ۱۷ کیلوولت، نرخ تزریق پلیمر یک میلی‌لیتر در ساعت در نظر گرفته شد. تصاویر SEM تهیه شده از داربست‌ها (شکل ٤-۱ و ٤-۲) حاکی از الکتروریسی الیاف یکنواخت و بدون گره با قطر متوسط ٢٦٧-٤٢٧ نانومتر می‌باشد که جهت استفاده در مهندسی بافت استخوان مناسب است.

یکی از فاکتورهای مهم تاثیرگذار بر قطر الیاف الکتروریسی شده، رسانایی الکتریکی محلول است. محلول پلیمری به وسیله پمپ ریسندگی به نازل منتقل می‌شود و در ادامه محلول پلیمری تحت کشش سطحی خود، در انتهای نازل نگه داشته می‌شود. با اعمال ولتاژ با قطبیت مخالف به نازل و جمع‌کننده، میدان الکترومغناطیسی بین نازل و جمع‌کننده شکل می‌گیرد. با افزایش میدان الکتریکی و با غلبه بر نیروهای کشش سطحی محلول پلیمری، سیال از حالت قطره کروی، به شکل

[1] bead

مخروطی موسوم به جت مخروطی تیلور در می‌آید. محلول پلیمری تحت تاثیر میدان الکترومغناطیس و جاذبه میان قطب‌های مخالف در نازل و صفحه جمع‌کننده کشیده شده و به شکل رشته‌های بسیار ظریف، روی صفحه جمع‌کننده جمع می‌شود. با تبخیر حلال در فضای بین نازل و صفحه جمع‌کننده، نانوالیاف جامد روی صفحه جمع‌کننده تشکیل می‌شوند. از این‌رو هرچه ضریب هدایت الکتریکی بیشتر باشد کشیدگی جت و جدا شدن آن نیز سریع‌تر خواهد بود که منجر به تولید الیافی با قطر کم می‌شود. در آنالیزی که به کمک نرم‌افزار Image J از تصاویر تهیه شده میکروسکوپ SEM داربست‌ها انجام شد، مشخص شده است که افزایش میزان نانولوله کربنی، منجر به افزایش ضریب هدایت الکتریکی در کامپوزیت گردیده و قطر الیاف کاهش پیدا کرده است.

نکته حائز اهمیت در ساخت داربست‌های مورد استفاده در مهندسی بافت استخوان، داشتن استحکام مکانیکی بالا است. بنابراین، با انجام آزمون مکانیکی در داربست‌های PCL تقویت شده با نانوذرات SWCNTs، بهبود خواص مکانیکی در داربست‌های سنتز شده حاوی SWCNTs 0.2% حاصل شد. در مطالعه مشابهی، PCL به همراه نانوذره MWCNTs تقویت شده که نتایج گزارش شده حاکی از تقویت خواص مکانیکی داربست‌ها با افزایش میزان بهینه نانوذره است [۱۱–۱۳] .

از مشخصه زیست‌فعالی داربست‌ها ارزیابی تشکیل هیدروکسی آپاتیت در سطح آن‌ها است. با توجه به این مشخصه، توانایی داربست‌ها در تشکیل لایه هیدروکسی آپاتیت با غوطه‌وری در محلول SBF بررسی شد. نتایج این بررسی نشان داد که افزودن SWCNTs به داربست‌ها نیز مانند نمونه PCL خالص باعث تشکیل ذرات هیدروکسی آپاتیت می‌شود و خواص زیست‌فعالی پلی‌کاپرولاکتون حفظ می‌شود. از علل افزایش زیست‌فعالی پس از افزودن نانوذرات می‌توان به زیری سطح و افزایش آب‌دوستی و شارژ سطحی اشاره کرد.

همواره این بحث وجود دارد که استفاده از نانوذرات مانند CNTs می‌تواند برای سلول‌ها سمیت داشته باشد. پن و همکاران در مطالعه‌ای، نانوکامپوزیت پلی‌کاپرولاکتون و نانولوله‌های کربنی چنددیواره را با درصدهای مختلف وزنی ساختند و رشد و سمیت آن‌ها را با استفاده از کشت سلول‌های مزانشیم مغز استخوان رت مورد ارزیابی قرار دادند. هم‌چنین آنها به منظور افزایش حلالیت CNT و کاهش اثر سمیت آن، از CNTهای عامل‌دار شده با گروه کربوکسیل استفاده کردند. نتایج حاصل در مقایسه با PCL خالص سمیتی را نشان نداد و موجب افزایش تکثیر سلول‌ها گردید [۱۳]. در مطالعه حاضر از CNTهای عامل‌دار شده با گروه آمین استفاده شد و نتایج به‌دست آمده از آزمون‌های MTT، Live-Dead و بررسی میکروسکوپی SEM نشان دادند که سلول‌های مزانشیمی مغز استخوان رت کشت داده شده بر روی داربست‌ها، اتصال و رشد خوبی دارند و هیچ‌کدام از داربست‌ها سمیت نداشته و حتی میزان زنده‌مانی سلول‌ها در داربست‌ها به‌خصوص داربست حاوی SWCNTs 0.5%، بیشتر از نمونه کنترل شده است (شکل ۷). علاوه بر این، با توجه به تصاویر SEM، میزان نفوذ سلول‌ها به درون الیاف در داربست‌های حاوی SWCNTs بیشتر از داربست حاوی PCL خالص است که این میزان نفوذ به دلیل تخلخل بیشتر و آب‌دوستی این داربست‌ها می‌باشد که در نتیجه افزودن نانولوله کربنی به فاز پلیمری است.

شکل ۷ و تصاویر رنگ‌آمیزی مربوط به آزمون live-dead را برای کشت سه روزه سلول‌های BMSC نشان می‌دهند. سلول‌های زنده BMSC به رنگ سبز و با مورفولوژی و چسبندگی طبیعی هستند در حالی‌که سلول‌های مرده یا در حال مرگ رنگ قرمز به خود گرفته‌اند. همان‌طور که مشاهده می‌شود تعداد سلول‌های مرده در تمامی نمونه‌ها بسیار کم هستند. این نتایج حاکی از آن است که تمامی داربست‌های حاوی نانوذره CNT تکثیر سلول‌های BMSC را حمایت می‌کنند.

فرآیند معدنی شدن و تمایز استئوژنیک سلول‌های مزانشیمی به کمک آزمون آلکالین فسفاتاز قابل سنجش است. نتایج حاصل از این آزمون افزایش فعالیت آنزیم آلکالین فسفاتاز را در نمونه‌های حاوی نانوذره نسبت به PCL خالص (نمونه کنترل) نشان می‌دهد، هرچند این افزایش در نمونه حاوی SWCNTs 0.5% مشهودتر است. این افزایش می‌تواند به دلیل افزایش زبری و کاهش قطر الیاف در نمونه SWCNTs 0.5% باشد. در مجموع، تاثیر خصوصیات منحصر به‌فرد نانو-لوله‌های کربنی آمینی در بستر پلی‌کاپرولاکتون نتایج بسیار ثمر-بخشی را نشان داد. نانو لوله‌های کربنی به علت بار سطحی، ایجاد زبری سطح، جذب پروتئین بیشتر و افزایش هدایت

الکتریکی می‌توانند کاندید مناسبی در کاربرد های مهندسی بافت باشند. نتایج حاصل از تحقیقات انجام شده توسط دیگر دانشمندان نیز این موضوع را تائید می‌کند [۱۳].

۵- نتیجه‌گیری

در این پژوهش، مقادیر مختلفی از نانولوله‌های کربنی تک‌دیواره عامل‌دار شده با آمین با درصدهای وزنی ۰، ۰٫۱، ۰٫۲ و۰٫۵ درصد به ماتریس پلی‌کاپرولاکتون اضافه و توسط روش الکتروریسی داربست‌های نانوکامپوزیتی تهیه شدند. با توجه به بررسی‌ها و ارزیابی‌های صورت گرفته بر روی خواص فیزیکی، شیمیایی، مکانیکی و بیولوژیکی داربست‌های نانو-کامپوزیتی مشخص شد که افزودن نانوذرات به PCL باعث بهبود خواص مکانیکی و زیستی داربست‌ها و هم‌چنین افزایش تکثیر و تمایز سلول‌های مزانشیم مغز استخوان می‌شود. طبق نتایج به‌دست آمده داربست PCL/SWCNTs با ۰٫۲ درصد بهترین خواص مکانیکی را در مقایسه با دیگر داربست‌ها و نمونه PCL/SWCNTs با ۰٫۵ درصد، بیشترین افزایش را در تکثیر و تمایز سلول‌های BMSC در مقایسه با نمونه‌های دیگر از خود نشان دادند. از این‌رو این داربست‌ها کاندید مناسبی جهت کاربرد در مهندسی بافت استخوان می‌باشند.

مراجع

1. Costa-Pinto, A.R., R.L. Reis, and N.M. Neves, *Scaffolds based bone tissue engineering: the role of chitosan.* Tissue Engineering Part B: Reviews, 2011. 17(5): p. 331-347.
2. Mow, V.C. and R. Huiskes, *Basic orthopaedic biomechanics & mechano-biology*2005: Lippincott Williams & Wilkins.
3. Oryan, A., et al., *Bone regenerative medicine: classic options, novel strategies, and future directions.* Journal of orthopaedic surgery and research, 2014. 9(1): p. 1.
4. Polo-Corrales, L., Latorre-Esteves, M., & Ramirez-Vick, J. E. (2014). Scaffold design for bone regeneration. Journal of nanoscience and nanotechnology, 14(1), 15-56
5. Abedalwafa, M., Wang, F., Wang, L., & Li, C. (2013). Biodegradable poly-epsilon-caprolactone (PCL) for tissue engineering applications: a review. Rev. Adv. Mater. Sci, 34(2), 123-140.
6. Chao-jing, L. I., Abedalwafa, M., Fu-Jun, W., Peng, G. E., Pei-feng, C. H. E. N., & Lu, W. A. N. G. (2013). Effect of Molecular Weight of PCL on the Structure and Mechanical Properties of PCL/PET Composite Vascular Scaffold Prototype. Journal of Donghua University (Eng. Ed.) Vol, 30(5).
7. Hutmacher, D.W., *Scaffolds in tissue engineering bone and cartilage.* Biomaterials, 2000. 21(24): p. 2529-2543.
8. Mattioli-Belmonte, M., et al., *Tuning polycaprolactone–carbon nanotube composites for bone tissue engineering scaffolds.* Materials Science and Engineering: C, 2012. 32(2): p. 152-159.
9. Pan, L., et al., *Multiwall carbon nanotubes/polycaprolactone composites for bone tissue engineering application.* Colloids and Surfaces B: Biointerfaces, 2012. 93: p. 226-234.
10. Kokubo,T., Takadama,H.,(2006). How useful is SBF in predicting in vivo bone bioactivity?,Biomaterials.27(15),2907-2915.
11. Crowder, S. W., Prasai, D., Rath, R., Balikov, D. A., Bae, H., Bolotin, K. I., & Sung, H. J. (2013). Three-dimensional graphene foams promote osteogenic differentiation of human mesenchymal stem cells. Nanoscale, 5(10), 4171-4176.
12. Swat, M. H., Thomas, G. L., Belmonte, J. M., Shirinifard, A., Hmeljak, D., & Glazier, J. A. (2012). Multi-scale modeling of tissues using CompuCell3D. In Methods in cell biology (Vol. 110, pp. 325-366). Academic Press.
13. Golub, E. E., & Boesze-Battaglia, K. (2007). The role of alkaline phosphatase in mineralization. Current Opinion in Orthopaedics, 18(5), 444-448.