

Mesenchymal Cell Growth on PVA/MWCNT Electrospun Scaffold under Dynamic Conditions

Narges Pishehvar¹, Mehrdad Kokabi^{1*}, and Shahram Pourbeiranvand²

1. Department of Polymer Engineering, Faculty of Chemical Engineering, Tarbiat Modares University, Tehran, 14115-114, Iran

2. Department of Anatomical Science, Faculty of Medical Science, Tarbiat Modares University, Tehran, 14115-331, Iran

Received: 26 July 2025, accepted: 28 April 2026

ABSTRACT

Hypothesis: The main components in tissue engineering are scaffolds, cells, and growth factors. Also, the use of a bioreactor can provide a greater similarity to tissue conditions by mimicking physiology. The hypothesis of this research is to confirm the synergistic effect of dynamic conditions on the adhesion, growth, and proliferation of mesenchymal cells cultured on a conductive electrospun scaffold. **Methods:** Nanocomposite scaffolds based on poly(vinyl alcohol) and multiwalled carbon nanotubes at concentrations up to 0.3% (by wt) were prepared. SEM images were used to examine the fiber arrangement of the scaffolds, while mechanical and porosimetry tests were employed to assess their characteristics. A special bioreactor was designed and constructed to simulate dynamic conditions such as heartbeat. The acridine orange test was used to examine cell growth.

Findings: SEM images revealed the fiber arrangement of nanocomposite scaffolds composed of nanofibers with diameters ranging from 60 to 90 nm, exhibiting a porosity of more than 80%. By applying heat treatment, water absorption decreased to less than 10%, and the contact angle ranged from 31 to 57 degrees, both indicating the structural stability of the samples in aqueous environments. The results of the mechanical properties test of the scaffolds showed an increase in the modulus of the scaffolds up to 2 times and a decrease in the elongation-at-break compared to the pure scaffold. The results of the cell viability test, cell morphology by SEM, and acridine orange cell staining after 48 h, confirmed the non-toxicity of the scaffolds. By comparing on pure scaffolds and nanocomposite scaffolds, the positive effect of conductivity on cell growth and proliferation is evident. Additionally, comparing the impact of dynamic conditions with static conditions reveals that nanocomposite scaffolds under dynamic conditions provided better cell proliferation and adhesion. The scaffold containing 0.2% (by wt) MWCNT exhibited the best biological performance.

Keywords:

nanocomposite scaffold,
mesenchymal stem cells,
poly(vinyl alcohol),
carbon nanotubes,
dynamic conditions

(*)To whom correspondence should be addressed.

E-mail: mehrir@modares.ac.ir

Please cite this article using:

Pishehvar N., Kokabi M., and Pourbeiranvand Sh., Mesenchymal Cell Growth on PVA/MWCNT Electrospun Scaffold under Dynamic Conditions, *Iran. J. Polym. Sci. Technol. (Persian)*, **38**, 283-299, 2025.

رشد یاخته مزانشیمی روی داربست الکتروریسی شده پلی (وینیل الکل)/نانولوله های کربنی چنددیواره در شرایط پویا

نرگس پیشه‌ور^۱، مهرداد کوکبی^{۱*}، شهرام پوریرانوند^۲

۱- تهران، دانشگاه تربیت مدرس، دانشکده مهندسی شیمی، گروه مهندسی پلیمر، صندوق پستی ۱۱۴-۱۴۱۱۵

۲- تهران، دانشگاه تربیت مدرس، دانشکده علوم پزشکی، گروه علوم تشریح، صندوق پستی ۳۳۱-۱۴۱۱۵

دریافت: ۱۴۰۴/۵/۴، پذیرش: ۱۴۰۵/۲/۸

چکیده

فرضیه: اجزای اصلی در مهندسی بافت، داربست، یاخته‌ها و عوامل رشد هستند، همچنین، استفاده از واکنشگاه زیستی می‌تواند با تقلید فیزیولوژیکی، شباهت بیشتری با شرایط بافت، فراهم کند. فرضیه این پژوهش، اثبات اثر افزایشی شرایط پویا بر چسبندگی، رشد و تکثیر یاخته‌های مزانشیمی کشت شده روی داربست رسانای الکتروریسی شده است.

روش‌ها: داربست‌های نانوکامپوزیتی بر پایه پلی (وینیل الکل) و نانولوله‌های کربنی تا ۰/۳٪ وزنی با روش الکتروریسی تهیه شدند. از تصاویر SEM، برای بررسی آرایش الیاف داربست‌ها و نیز از آزمون خواص مکانیکی و تخلخل‌سنجی برای بررسی خواص استفاده شد. برای شبیه‌سازی شرایط پویا نظیر ضربان قلب، واکنشگاه زیستی خاصی طراحی و ساخته شد. برای بررسی رشد یاخته‌ای از آزمون آکریدین نارنجی استفاده شد.

یافته‌ها: تصاویر SEM و آزمون تخلخل‌سنجی، داربست‌های متشکل از نانوالیاف با قطر ۶۰ nm تا ۹۰ nm و تخلخل بیش از ۸۰٪ را نشان داد. با اعمال عملیات گرمایی مقدار جذب آب به کمتر از ۱۰٪ کاهش یافت. همچنین، زاویه تماس سطح در بازه ۳۱° تا ۵۷°، قرار گرفت که هردو بیانگر پایداری ساختاری نمونه‌ها در محیط‌های آبی هستند. نتایج آزمون خواص مکانیکی داربست‌ها، نشان‌دهنده افزایش مدول داربست‌ها تا دو برابر و کاهش ازدیاد طول در نقطه شکست نسبت به داربست خالص بود. نتایج آزمون زنده‌مانی یاخته‌ای، شکل‌شناسی یاخته‌ای با SEM و رنگ‌آمیزی آکریدین نارنجی پس از مدت ۴۸ h، عدم سمیت داربست‌ها را نشان داد. با مقایسه داربست خالص و داربست‌های نانوکامپوزیتی، اثر مثبت رسانایی روی رشد و تکثیر یاخته‌ها قابل مشاهده است. همچنین مقایسه اثر شرایط پویا و ایستا، نشان داد، داربست‌های نانوکامپوزیتی در شرایط پویا، چسبندگی و تکثیر یاخته‌ای بهتری از شرایط ایستا ارائه داده‌اند. میان تمام داربست‌ها، داربست دارای ۰/۳٪ وزنی نانولوله‌های کربنی چنددیواره (MWCNT)، بهترین کارایی زیستی را نشان داد.

واژه‌های کلیدی

داربست نانوکامپوزیتی،

یاخته‌های بنیادی مزانشیمی،

پلی (وینیل الکل)،

نانولوله‌های کربنی،

شرایط پویا

* مسئول مکاتبات، پیام‌نگار:

mehrir@modares.ac.ir

مقدمه

بیماری‌های قلبی عروقی با رتبه اول علل مرگ‌ومیر در جهان، بزرگ‌ترین تهدید سلامت بشر به‌شمار می‌روند [۱]. به‌دلیل عدم قابلیت خودترمیمی قلب در برخی از بیماری‌های قلبی، بازتولید عضله قلب با استفاده از مهندسی بافت و داربست‌های پلیمری زیست تخریب‌پذیر از راهکارهای درمانی کارآمد به‌شمار می‌آید [۲،۳]. در مهندسی بافت، داربست‌ها نقش حامل‌های یاخته‌ای را دارند و به‌عنوان ماتریس برون‌یاخته‌ای (extracellular matrix)، با تقلید از نشانه‌های زیستی، شیمیایی و مکانیکی بافت بومی، محیط مناسبی را برای تشکیل بافت فراهم می‌آورند. استفاده از داربست‌های مهندسی بافت می‌تواند کمبود اندام‌هایی مانند کلیه و قلب را برطرف کند [۴،۵]. ساختار نانولیفی سه‌بعدی، افزون بر شباهت ظاهری با بافت طبیعی، شرایط لازم برای چسبندگی یاخته‌ها و انتقال مواد مغذی و اکسیژن را فراهم می‌کند.

فرایند الکترورسی به‌عنوان روشی ساده، کارآمد، با بهره‌وری زیاد، مقرون به‌صرفه، با قابلیت تکرارپذیری و امکان تولید الیاف با ساختاری یکنواخت و قطرهایی در بازه چند نانومتر تا یک میکرومتر و خواص مکانیکی مطلوب، برای کاربردهای مهندسی بافت، مورد توجه است [۶]. در فرایند الکترورسی، غلظت محلول پلیمر و ولتاژ، نقش تعیین‌کننده‌ای در شکل‌شناسی نهایی نانوالیاف دارند [۷،۸]. پلیمرهای استفاده‌شده در این زمینه به دو دسته پلیمرهای طبیعی و سنتزی تقسیم می‌شوند. اما به‌دلیل خواص مکانیکی مناسب، تخریب و زیست‌سازگاری پلیمرهای سنتزی، استفاده از پلیمرهای سنتزی به‌عنوان مواد تشکیل‌دهنده داربست توسعه یافته است [۹،۱۰]. پلی (وینیل الکل) یکی از پلیمرهای سنتزی با ویژگی‌های زیست‌سازگاری عالی، زیست تخریب‌پذیری، پایداری شیمیایی-گرما، قابلیت آمیختگی با سایر پلیمرهای زیستی، خاصیت آب‌دوستی بسیار زیاد، عدم سمیت و عدم سرطان‌زایی، گزینه مناسبی برای کاربردهای مهندسی بافت به‌شمار می‌آید. با وجود این، آب‌دوست بودن بیش از حد پلی (وینیل الکل)، مقدار چسبندگی یاخته‌ای به داربست را کم می‌کند و یکپارچگی ساختاری نانوالیاف را از بین می‌برد. بنابراین، برای بهبود پایداری داربست پلی (وینیل الکل) در محیط‌های آبی و نیز چسبندگی یاخته‌ای، ایجاد اتصالات عرضی ضروری است [۷،۸،۱۱]. پیوند عرضی با اتصال زنجیرهای پلیمری به یکدیگر سبب ایجاد شبکه سه‌بعدی و در نتیجه بهبود پایداری الیاف و خواص فیزیکی می‌شود که این فرایند می‌تواند از راه واکنش شیمیایی یا فیزیکی انجام شود. اتصال عرضی شیمیایی با عامل ایجاد پیوند عرضی شیمیایی مانند گلو تارآلدهید، بیس-اپوکسید، دی‌ایزوسیانات و

متاکریلات انجام می‌شود. اتصال عرضی فیزیکی با عملیات گرمایی، یخ‌گشایی و عملیات متانول انجام می‌شود. عملیات گرمایی، در بیش از دمای گذار شیشه‌ای پلی (وینیل الکل) و پیش از دمای °C ۲۰۰، که دمای تخریب پلی (وینیل الکل) است، به پایداری ساختار منجر می‌شود، زیرا در عملیات گرمایی گروه‌های هیدروکسیل پلی (وینیل الکل)، پیوندهای هیدروژنی تشکیل می‌دهند که به ایجاد بلور منجر می‌شوند [۱۲-۱۴].

از مواد رسانای الکتریکی مختلف از جمله نانوذرات، نانومیله‌ها، نانوسیم‌ها، نانولوله‌های کربنی و پلیمرها در کاربردهای مهندسی بافت استفاده می‌شود [۱۵]. نانولوله‌های کربنی چنددیواره به‌عنوان نانومواد زیستی رسانا، به‌دلیل تقویت ساختاری و رسانایی الکتریکی، قابلیت بهتری برای افزایش خواص مکانیکی و چسبندگی گروه‌های مختلف شیمیایی و زیستی در رسانایی رفتار یاخته‌ای، رشد و اتصال یاخته‌ای دارد و در نتیجه زنده‌مانی یاخته‌ها را بهبود می‌بخشد [۱۶،۱۷]. ترکیب پلی (وینیل الکل)، با ضعف ذاتی در رسانایی الکتریکی و خواص مکانیکی، با نانولوله‌های کربنی رسانا، امکان طراحی داربستی با خواص فیزیکی، مکانیکی و زیستی تنظیم‌پذیر را فراهم می‌سازد که برای مهندسی بافت قلب مطلوب است.

یاخته‌های بنیادی مزانشیمی به‌دلیل قابلیت تمایز زیاد و تجدیدپذیری می‌توانند به انواع یاخته‌های بالغ با کارایی‌های متفاوت متمایز شوند [۱۸]. از کشت ایستا به‌عنوان زیرساختی فعال در رشد یاخته‌ای برای سنتز بافت‌ها و اندام‌ها استفاده می‌شود، اما نقطه ضعف آن عدم شبیه‌سازی علائم مکانیکی و زیست‌شیمیایی درون‌تنی است، که باعث کاهش تکثیر، تمایز و توزیع نایک‌نواخت یاخته‌ها می‌شود. بنابراین برای دستیابی به بیشترین قابلیت عملکردی یاخته‌ای، زیرساخت‌های کشت باید دارای ویژگی‌هایی از جمله تلفیق سازوکارهای شیمیایی، الکتریکی و مکانیکی (تولیدکننده تنش) در محیط کشت کاملاً مجزا و عاری از آلودگی باشند. واکنشگاه‌های زیستی، سامانه‌های پویا و قدرتمندی هستند که ریزمحیط درون بافت را شبیه‌سازی می‌کنند و تحریک‌های مکانیکی مختلف و علائم زیست‌شیمیایی را به یاخته‌های بنیادی اعمال می‌کنند تا به‌طور مؤثر اندام‌ها یا بافت‌های قابل پیوند، تولید شوند [۱۹]. مطالعات متعددی اثر شرایط پویا را بر رشد و تمایز یاخته‌ای گزارش کرده‌اند.

Herrmann و همکاران [۲۰] واکنشگاه زیستی چندحالتی را برای تولید جریان تپنده و ضربان الکتریکی طراحی کردند. داربست‌های پلی‌یورتان با یاخته‌های بنیادی مزانشیمی مشتق از بافت بندناف کشت داده شدند و به مدت ۷۲ h در سامانه، تحت تحریک قرار

شد. همچنین، شرایط بهینه برای فرایند الکتروریسی داربست‌های مزبور تعیین و نتایج با استفاده از روش‌های مختلف تحلیل شد.

تجربی

مواد

مواد استفاده شده در این پژوهش عبارت‌اند از: پلی (وینیل الکل) (PVA) با درجه پلیمرشدن ۱۷۰۰ و چگالی $1/84 \text{ g/cm}^3$ تهیه شده از شرکت ژاپنی NIPONGHOSEI، نمک سدیم دودسیل سولفات (SDS) تهیه شده از شرکت Merck آلمان، نانولوله های کربنی چنددیواره (MWCNT) با متوسط اندازه قطر لوله ها ۲۰ nm ساخت Arkema فرانسه، محیط کشت، سرم جنین گاوی (FBS) و پنی سیلین استرپتومایسین هر سه تهیه شده از شرکت GIPCO آمریکا و یاخته بنیادی مزانشیمی (MSCs)، برگرفته از بافت چربی شکم موش BALB/C.

دستگاه‌ها و روش‌ها

ساخت واکنشگاه زیستی

هدف از طراحی واکنشگاه زیستی، شبیه سازی ضربان قلب روی داربست‌های پلیمری در مجاورت یاخته‌هاست. بدین منظور لازم است، حرکتی نوسانی ایجاد شود تا رفتار طبیعی ضربان قلب تقلید شود. در این واکنشگاه زیستی، موتور الکتریکی، نوسان ساز را به چرخش درمی آورد و هم زمان موجب حرکت سیال می شود، طراحی نوسان ساز به گونه ای است که حین چرخش با حداقل فاصله از سطح داربست، ضربان قلب را شبیه سازی می کند. دستگاه به طور یکپارچه درون گرم خانه (incubator) قرار می گیرد تا شرایط محیط کشت تأمین شود. به منظور جلوگیری از واکنش شیمیایی با محیط کشت و امکان مشاهده داربست‌ها، از پلکسی گلاس (ورق آکرلیک) که خاصیت خنثی دارد، به عنوان ماده سازنده دستگاه استفاده شد. قطعات برش خورده و آماده شده در هر مرحله با چسب های نامحلول در آب به یکدیگر متصل شدند. تنها بخش حساس از حیث نشتی سیال، کف محفظه اصلی است، این قسمت از محفظه، پس از اتصال، برای اطمینان از آب بندی، تحت آزمون نشتی قرار گرفت (شکل ۱). برای ایجاد حرکت چرخشی نوسان ساز، به مولد حرکت و گشتاور مناسب نیاز است که به کمک موتور تأمین شد. بدین منظور با توجه به تعداد دوپره ای بودن نوسان ساز، دور موتور بین ۵۰ rpm تا ۶۰ rpm تنظیم شد تا ضربان ۱۰۰ تا ۱۲۰ ضربه در دقیقه را شبیه سازی کند. در این سامانه از موتور گیربگس مدل TG-85E-SG-120 از نوع DC،

گرفتند. سازه های یاخته بنیادی، پس از اعمال تحریک، زنده مانده یاخته ها را نشان دادند.

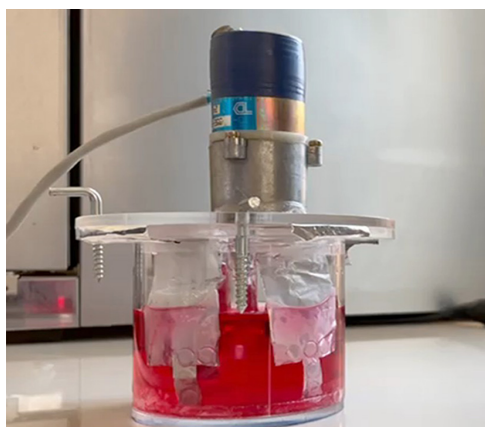
Putame و همکاران [۲۱] واکنشگاه زیستی نوع کششی را برای اعمال کشش مکانیکی تنظیم پذیر در داربست‌ها برای شرایط کشت پویا به منظور مهندسی بافت‌های مختلف پیشنهاد کردند. در این مطالعه، داربست‌های یاخته زدایی شده پوست انسان، با یاخته های پیش ساز قلبی انسان، کشت داده شدند و به مدت ۷ روز در شرایط ایستا و پویا (کشش چرخه ای سینوسی) قرار گرفتند، نتایج آزمایش های یاخته ای نشان داد، یاخته هایی که در معرض کشش چرخه ای قرار گرفته بودند، به سمت لایه های داخلی داربست مهاجرت کرده، کلنی های سه بعدی تشکیل داده و تمایز یافتند.

Manthou و همکاران [۲۲] دستگاه کشت یاخته ای سه بعدی را برای شرایط ایستا و پویا، طراحی کردند. برای ساخت داربست و دستگاه، از فناوری چاپ سه بعدی استفاده شد. یاخته های مشتق از بافت چربی انسان در داربست های پلی (ε-کاپرولاکتون) چاپ شده سه بعدی کشت داده شدند، آن‌ها پس از ۶ روز کشت در شرایط پویا مشاهده کردند، جمعیت یاخته ای بیش از ۲۱ برابر افزایش یافته است.

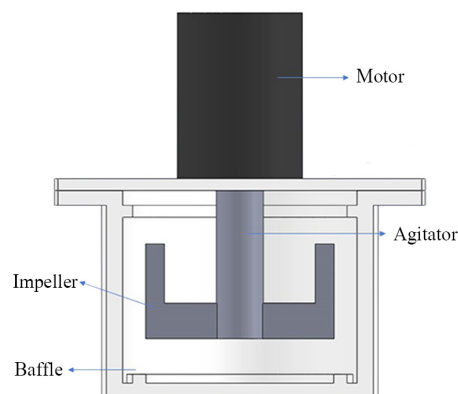
Massai و همکاران [۲۳] واکنشگاه زیستی برای کشش چرخه ای تنظیم پذیر را به منظور بافت های قلبی مهندسی شده در شرایط آزمایشگاهی طراحی کردند. برای ارزیابی کارایی واکنشگاه و بررسی اثر کشش چرخه ای، مدل های حلقوی سه بعدی بافت قلبی، بر پایه یاخته های قلبی موش صحرایی در هیدروژل فیبرین تهیه شد. داربست ها به مدت پنج روز در شرایط ایستا کشت داده شدند و سپس به مدت چهار روز در شرایط کشش چرخه ای تک جهتی در واکنشگاه زیستی قرار گرفتند. نتایج نشان داد، در بافت قلبی کشت داده شده به صورت پویا، تراکم یاخته ای افزایش یافت و یاخته ها کشیدگی موازی با جهت کشش را تجربه کردند.

شمس و همکاران [۲۴] داربست ترکیبی با نانوالیاف پلیمرهای پلی کاپرولاکتون و ژلاتین را با روش الکتروریسی تهیه کرده و به منظور شبیه سازی شرایط طبیعی یاخته های قلبی در محیط آزمایشگاهی، واکنشگاه زیستی طراحی کردند که قادر بود، بار مکانیکی با بسامد ۱ Hz و کشش ۱۰٪ را در جهت موازی با نانوالیاف اعمال کند، تا بتواند ضربان طبیعی قلب را شبیه سازی کند.

در این پژوهش اثر شرایط پویا شبیه ضربان قلب بر رشد و تکثیر یاخته های مزانشیمی روی داربست های الکتروریسی شده مبتنی بر پلی (وینیل الکل) دارای نانولوله های کربنی چنددیواره، در مقایسه با شرایط ایستا، بررسی شده است. برای شبیه سازی ضربان قلب روی داربست در محیط کشت، واکنشگاه زیستی خاصی طراحی و ساخته



(a)



(b)

شکل ۱- واکنشگاه زیستی: (a) تصویر واقعی و (b) طرح‌واره کارتونی.

Fig.1. Biological reactor: (a) real image, and (b) cartoon sketch.

طراحی آزمایش با روش تاگوچی به منظور بهینه‌سازی شرایط الکتروریسی پلی (وینیل الکل)

به منظور بهینه‌سازی شرایط الکتروریسی و دستیابی به الیاف پلی (وینیل الکل) با قطر کمتر از ۱۰۰ nm طراحی آزمایش با روش تاگوچی انجام شد. نکته بسیار مهم پیش از شروع طراحی آزمایش، به دست آوردن عوامل مؤثر و سطوح تغییر مناسب است که با انجام آزمایش‌های افراط-تفریطی قابل حصول است [۲۵]. پس از تعیین سطوح مناسب بالا و پایین برای هر عامل، طراحی آزمایش مطابق جدول ۱ با نرم‌افزار Minitab انجام شد.

بررسی شکل‌شناسی الیاف

برای ارزیابی توزیع قطر نانوالیاف، تصویربرداری با میکروسکوپ الکترونی پوششی Seron Technology, AIS2100SEM ساخت کره جنوبی انجام شد. پیش از تصویربرداری، به منظور حذف رطوبت باقی‌مانده الیاف، داربست‌ها به مدت ۲۴ h در دمای ۴۰ °C درون آون قرار داده شدند، سپس، نمونه‌ها با لایه نازکی از طلا پوشش یافتند. در نهایت، برای تعیین قطر الیاف از روی تصاویر اخذشده، از برنامه

جدول ۱- متغیرها و سطوح انتخاب‌شده.

Table 1. Selected variables and levels.

Variables	Level 1	Level 2	Level 3
PVA concentration (wt%)	5.5	6.5	7.5
Voltage (kV)	15	17	19

۲۴ ولت، شرکت TSUKASA ژاپن و برای راه‌اندازی موتور از منبع تغذیه DC (ADAK) ساخت تایوان استفاده شد.

تعیین گرانروی محلول پلی (وینیل الکل)

به منظور تعیین حدود غلظت مناسب محلول پلی (وینیل الکل) برای فرایند الکتروریسی، گرانروی محلول‌ها با گرانروی‌سنج نوع Brookfield ساخت تایوان اندازه‌گیری شد. محلول‌های پلیمری در غلظت‌های ۵، ۶، ۸، ۱۰، ۱۴ g/L آماده شدند و مورد آزمون قرار گرفتند.

تهیه محلول مناسب الکتروریسی پلی (وینیل الکل)

برای تهیه محلول PVA با غلظت مدنظر، پلی (وینیل الکل) در آب مقطر در دمای ۹۰-۸۰ °C به مدت ۱ h با همزن مغناطیسی با دور ثابت حل شد تا محلولی همگن و شفاف حاصل شود.

تهیه محلول مناسب الکتروریسی نانوکامپوزیت‌های PVA-MWCNT

برای تهیه محلول پلیمری دارای نانولوله‌های کربنی، ابتدا نمک سدیم دودسیل سولفونات به مقدار ۱٪ وزنی حلال، به آب مقطر افزوده و به مدت ۱ h در دمای محیط روی همزن قرار داده شد. پس از انحلال نمک، نانولوله‌های کربنی با درصدهای مدنظر (۰/۱، ۰/۲ و ۰/۳٪ وزنی) به محلول اضافه شد و به مدت ۱۵ min در دستگاه فراصوت مدل UP-48000 ساخت آلمان قرار گرفت. در این مرحله برای جلوگیری از افزایش دمای محلول هنگام استفاده از فراصوت، ظرف دارای محلول درون حمام یخ قرار داده شد. در نهایت، پودر PVA به آن افزوده شد و به مدت ۲ h در دمای ۸۰ °C هم‌زده شد تا محلول همگنی حاصل شود.

AxionVision متعلق به شرکت Zeiss آلمان استفاده شد [۲۶].

عملیات گرمایی

با هدف ایجاد اتصالات عرضی و بهبود پایداری ساختاری داربست‌ها، نمونه‌های تهیه شده تحت عملیات گرمایی در دمای 190°C به مدت ۱ h درون آن قرار گرفتند. تغییر رنگ الیاف از سفید به زرد، دلالت بر وقوع اتصالات عرضی دارد. این تغییر رنگ به دلیل تغییر در ساختار الکترونی و تشکیل پیوندهای جدید در ساختار پلیمر است که باعث تغییر در ویژگی‌های جذب نور می‌شود [۲۳، ۲۷].

عدم حلالیت داربست در آب و محیط کشت

پس از اعمال عملیات گرمایی، به منظور ارزیابی پایداری داربست‌ها در محیط آبی، نمونه‌ها تحت آزمون جذب آب قرار گرفتند. این آزمون به مدت ۲۴ h در دمای محیط انجام شد. برای اطمینان بیشتر، پس از عملیات گرمایی و انجام آزمون جذب آب، شکل‌شناسی یکی از داربست‌ها با SEM دوباره بررسی شد [۲۳].

بررسی درصد تخلخل داربست‌ها

درصد تخلخل نمونه‌ها با روش وزن‌سنجی طبق معادله (۱) محاسبه شد:

$$p = (1 - \frac{\rho_a}{\rho_s}) \times 100 \quad (1)$$

در این معادله p ، درصد تخلخل؛ ρ_a ، چگالی ظاهری نمونه‌ها و ρ_s ، چگالی اسکلتی نمونه‌ها در حالت توده است. بدین منظور، جرم و حجم ظاهری نمونه‌های خشک اندازه‌گیری و چگالی ظاهری محاسبه شد و برای محاسبه چگالی اسکلتی در حالت توده با فرض پراکندگی یکنواخت نانولوله‌های کربنی در ساختار نانوکامپوزیت‌ها، از قانون مخلوط‌ها استفاده شد [۲۸]. ρ_s برای پلی (وینیل الکل) $1/84 \text{ g/cm}^3$ و برای نانولوله‌های کربنی $1/2 \text{ g/cm}^3$ است. در نهایت، درصد تخلخل براساس معادله (۱) محاسبه و گزارش شد.

آزمون اندازه‌گیری جذب آب

برای تعیین مقدار جذب آب و درجه تورم طبق استاندارد اندازه‌گیری ASTM D570، نمونه‌هایی با ابعاد $20 \times 20 \text{ mm}$ برای آزمون جذب آب بریده و وزن شدند. سپس در ۲۰ mL محلول بافر نمکی فسفات (PBS) با $\text{pH} = 7.4$ در دمای 37°C قرار داده شدند. نمونه‌ها پس از ۲۴ h از محلول خارج و سریع با کاغذ صافی خشک و وزن شدند. مقدار جذب آب به داربست‌ها از تفاوت وزن آن‌ها پیش و پس از غوطه‌وری

در فسفات بافر نمکی محاسبه می‌شود. سپس، مقدار جذب و تورم الیاف از معادله (۲) محاسبه شد [۲۹]. در این معادله، W_d و W_f به ترتیب وزن داربست نانولیفی پس از غوطه‌وری و وزن اولیه داربست نانولیفی است:

$$(2) \quad \text{جذب آب} = (W_d - W_f) / W_f$$

اندازه‌گیری زاویه تماس

به منظور ارزیابی آب‌دوستی داربست‌ها، زاویه تماس سطحی داربست‌ها، به کمک سامانه اندازه‌گیری زاویه تماس با استفاده از دوربین دیجیتال ساخت شرکت Dinolite تایوان، اندازه‌گیری شد. یک قطره آب یون‌زدوده با حجم $10 \mu\text{L}$ روی سطح داربست نانوالیاف به مساحت یک سانتی‌متر مربع قرار داده شد. برای اطمینان هر آزمون حداقل پنج بار تکرار شده و مقدار متوسط گزارش شد [۲۸].

تعیین خواص مکانیکی داربست‌ها

آزمون کشش

به منظور تعیین خواص مکانیکی داربست‌های الکتروریسی شده PVA و نانوکامپوزیت‌های آن از دستگاه اندازه‌گیری خواص کششی INSTRON TMSM ساخت انگلستان مطابق با استاندارد اندازه‌گیری خواص مکانیکی توده الیاف (ASTM D882) استفاده شد. آزمون در دمای 27°C انجام شد. نمونه‌های آزمون به صورت مستطیلی با ابعاد $5 \text{ mm} \times 5 \text{ mm} \times 30 \text{ mm}$ تهیه شدند. سرعت کشش 5 mm/min و فاصله دو فک دستگاه ۲ cm بود. در هر حالت سه نمونه مورد آزمایش قرار گرفت. با استفاده از منحنی‌های تنش برحسب کرنش نمونه‌ها، خواص کششی آن‌ها از قبیل مدول یانگ، استحکام کششی و ازدیاد طول در نقطه پارگی به دست آمد [۲۳].

جداسازی و کشت یافته

جداسازی یافته‌ای

در این پژوهش برای استخراج یافته‌های مزانشیمی از بافت چربی شکمی موش ماده BALB/C استفاده شد. رسوب یافته‌ای حاصل در محیط کشت Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) دارای سرم جنینی گاوی و ۱٪ آنتی‌بیوتیک پنی‌سیلین و استرپتومایسین معلق و پس از عبور از غشاهای $100 \mu\text{m}$ میکرو به فلاسک منتقل شده، درون گرم‌خانه (incubator) 37°C با ۵٪ CO_2 و ۹۵٪ رطوبت قرار گرفت. هر روز به منظور حذف یافته‌های خونی، محیط کشت یافته‌ها با محیط تازه تعویض شد.

جدول ۲ - تغییر گرانروی بر حسب غلظت برای محلول پلی (وینیل الکل).

Table 2. The variation of viscosity versus concentration for poly(vinyl alcohol) solution.

PVA solution concentration (wt%)	Viscosity (mPa.s)
5	70
6	90
8	210
10	410
14	1690

میکروسکوپ فلئورسانس Axiophote ساخت آلمان استفاده شد. داربست‌های کشت‌شده، دو بار با PBS شست‌وشو داده شدند و سپس به مدت ۵ min در محلول آکریدین نارنجی قرار گرفتند. پس از رنگ‌آمیزی، نمونه‌ها دو بار با PBS شسته شدند تا رنگ اضافی حذف شود. در نهایت، تصاویر فلئورسانس با میکروسکوپ فلئورسانس تهیه و برای بررسی کیفی زنده‌مانی یافته‌ها استفاده شدند [۲۱].

نتایج و بحث

تنظیم گرانروی محلول ریسندگی (پلی وینیل الکل)

تغییرات گرانروی محلول پلی (وینیل الکل) در غلظت‌های مختلف PVA در جدول ۲ آمده است. داده‌ها، متوسط اطلاعات به دست آمده از سه مرتبه تکرار برای هر محلول است. مشاهده می‌شود، از غلظت ۱۰٪ وزنی و بیش از آن، گرانروی، به صورت تصاعدی افزایش یافته است. از آنجا که گرانروی زیاد می‌تواند به افزایش قطر الیاف در فرایند الکترورسی منجر شود، از این رو برای دستیابی به نانوالیاف با قطر کمتر از ۱۰۰ nm، غلظت محلول پلیمری در محدوده ۵٪ تا ۸٪ وزنی در نظر گرفته شد.

شکل‌شناسی

(الف) نانوالیاف پلی (وینیل الکل)

در این پژوهش، براساس تجربه‌های پیشین گروه پژوهشی، از میان عوامل مؤثر بر فرایند الکترورسی نانوالیاف پلی (وینیل الکل)، تنها دو عامل مهم و اثرگذار غلظت و ولتاژ، انتخاب شد و سایر عوامل از جمله فاصله هوایی با اندازه ۱۶ cm و سرعت تغذیه حدود ۰/۲ mL/h در تمام آزمایش‌ها ثابت در نظر گرفته شد. طراحی آزمایش با روش تاگوچی در جدول ۳ آمده است. با توجه به نتایج شرایط

کاشت یافته روی داربست‌های پلیمری

برای کاشت یافته در شرایط ایستا و پویا، ابتدا داربست‌ها با ابعاد ۶×۳ cm برش داده شدند و سپس با استفاده از سوراخ‌کن (punch)، روی آن‌ها ۹ دایره با قطر ۶ mm ایجاد شد، تا برای کشت یافته‌ای استفاده شود. پس از سوراخ‌کردن، نمونه‌ها به منظور ضد عفونی شدن، طی چند مرحله تحت پرتو UV قرار گرفتند. پس از آماده‌سازی یافته‌ها، آن‌ها روی داربست‌ها کشت شدند و به مدت ۳۰ min درون گرم‌خانه قرار گرفتند تا چسبندگی یافته به داربست صورت گیرد. پس از کاشت یافته، برای آزمون‌های حالت ایستا، چهار عدد از نمونه‌های دایره‌ای شکل برش داده شده در داخل ظرف شیشه‌ای و سایر نمونه‌ها درون واکنشگاه زیستی قرار داده شدند و واکنشگاه زیستی به مدت ۴۸ h در داخل گرم‌خانه قرار داده شد.

بررسی سمیت داربست‌های پلیمری

ارزیابی سمیت یافته‌ای داربست‌ها با آزمون MTT (نمک تترازولیم)، به مدت ۴۸ h پس از کاشت یافته‌ها انجام شد. بدین منظور داربست‌های پلیمری از محیط کشت خارج و در محلول MTT قرار داده شدند. پس از ۲ h گرم‌خانه‌گذاری در دمای ۳۷ °C، محلول MTT دارای یافته‌های زنده و بلورهای فورمازان تشکیل شده به دست آمد. در ادامه، محلول رویی خارج شده و بلورهای فورمازان رسوب کرده در محلول ایزوپروپانول دارای کلریدریک اسید ۰/۱ نرمال حل شدند. مقدار جذب نوری محلول با دستگاه در طول موج ۵۷۰ nm اندازه‌گیری شد. از آنجا که افزایش تعداد یافته‌های زنده به افزایش مقدار فورمازان تشکیل شده منجر می‌شود، مقدار جذب نوری افزایش می‌یابد که بیانگر زیست‌پذیری بیشتر یافته‌ها و عدم سمیت داربست‌هاست [۱۶، ۲۸].

بررسی شکل‌شناسی یافته

پس از ۴۸ h، داربست‌های یافته‌ای با محلول PBS شست‌وشو داده شدند. به منظور تثبیت یافته‌ها برای تصویربرداری، داربست‌های یافته‌ای با محلول گلو تار آلدهید ۲/۵٪ به مدت ۳۰ min تثبیت شدند. در ادامه، فرایند آب‌گیری نمونه‌ها با محلول‌های اتانول درجه‌بندی شده (در غلظت‌های ۵۰، ۶۰، ۷۰، ۸۰، ۹۵ و ۱۰۰٪) به مدت ۳۰ min انجام شد. در نهایت، نمونه‌های تثبیت‌شده با نانولایه طلا (Bal Tec, Swiss) پوشش یافتند و از آن‌ها تصاویر SEM در ولتاژ ۲۰ kV به منظور بررسی شکل‌شناسی، چسبندگی و گسترش یافته‌ای گرفته شد [۲۶].

میکروسکوپی فلئورسانس

برای تعیین زنده‌مانی یافته‌ها، از روش تصویربرداری به کمک

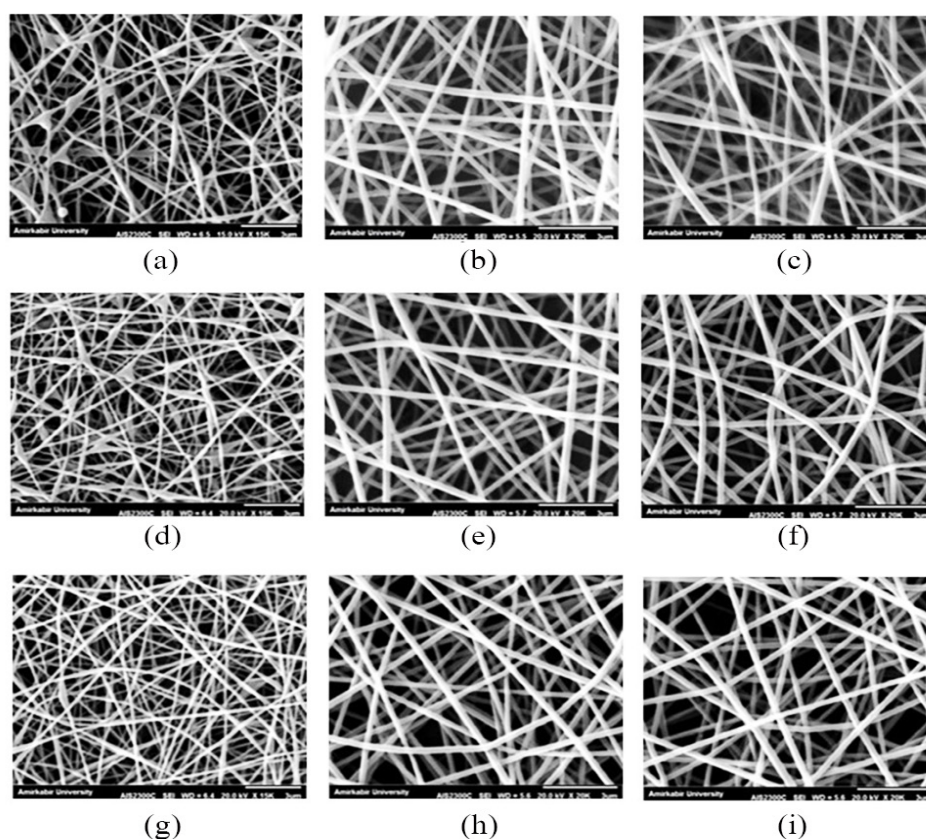
جدول ۳- نتایج حاصل از طراحی آزمایش با روش تاگوچی.

Table 3. The results of the experimental design using Taguchi's method.

Test number	PVA concentration (wt%)	Voltage (kV)	Nanofiber diameter (nm)	
			First collection	Second collection
1	1	1	123	125
2	2	1	178	175
3	3	1	228	230
4	1	2	110	107
5	2	2	162	165
6	3	2	203	207
7	1	3	85	88
8	2	3	135	131
9	3	3	182	181

نانوالیاف با کمترین قطر (۸۵ nm) منجر شد. این رفتار را می توان به کاهش گران روی محلول و افزایش نیروی کششی الکتریکی نسبت داد که موجب کشیده شدن بیشتر جت پلیمری و در نتیجه کاهش قطر

آزمایش شماره ۷ (شکل ۲ (c)) با قطر ۸۵ nm به عنوان شرایط بهینه انتخاب شد. همان طور که انتظار می رفت، الکتروریسی محلول پلیمری با کمترین غلظت، ۵/۵٪ وزنی پلیمر و بیشترین ولتاژ، ۱۹ kV، به تولید



شکل ۲- ریزنگاره های SEM نانوالیاف PVA مبتنی بر طراحی آزمایش تاگوچی (مقیاس ۳ μm و بزرگ نمایی ۲۰ هزار)، تصاویر (a) تا (i) به ترتیب مربوط به شرایط ۱ تا ۹ هستند.

Fig. 2. SEM of PVA nanofibers based on Taguchi's experimental design (scale- 3 μm and magnification 20k), micrographs (a) to (i) are related to conditions of 1 to 9, respectively.

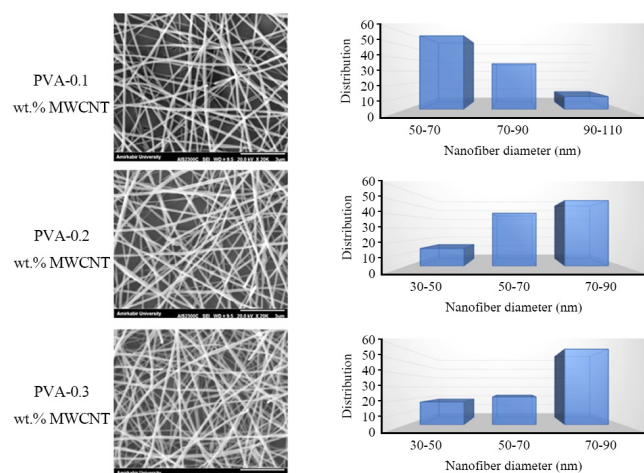
مربوط مشخص شده است:

$$Z = F(X, Y) = 49.17X - 10.58Y + 15.56 \quad (3)$$

معادله (۳) بیانگر رابطه بین غلظت پلیمر، ولتاژ اعمال شده و میانگین قطر الیاف به عنوان تابعی از این دو متغیر است، X ، نمایانگر متغیر غلظت پلیمر؛ Y ، متغیر ولتاژ و Z ، میانگین قطر الیاف به عنوان تابعی از این دو متغیر در معادله (۳) تعریف شده‌اند. ضریب مثبت و بزرگ‌تر غلظت (۴۹/۱۷) نشان‌دهنده اثر غالب و مستقیم غلظت پلیمر بر افزایش قطر نانوالیاف است، در حالی که ضریب منفی ولتاژ (۱۰/۵۸-) بیانگر اثر معکوس ولتاژ بر قطر الیاف است، به طوری که افزایش ولتاژ به کاهش قطر منجر می‌شود. مقایسه قدر مطلق ضرایب نشان می‌دهد، غلظت محلول نقش تعیین‌کننده‌تری نسبت به ولتاژ در کنترل قطر نانوالیاف دارد. این نتیجه با شیب تندتر نمودار (S/N) برای غلظت در شکل ۳ و نیز گزارش‌های پیشین در ادبیات الکتروپرسی همخوانی دارد [۲۵].

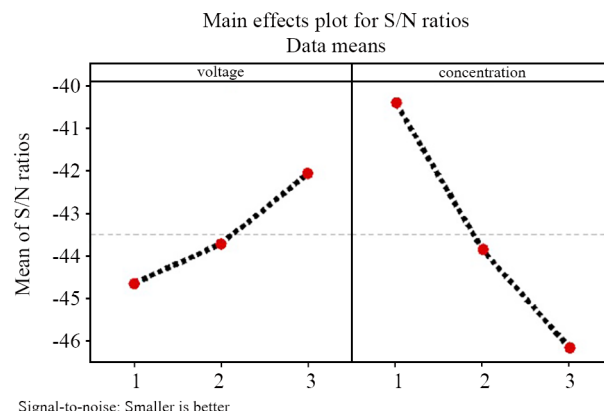
(ب) نانوالیاف نانوکامپوزیتی PVA-MWCNT

بررسی شکل‌شناسی و توزیع قطر نانوالیاف نمونه‌های نانوکامپوزیتی PVA-MWCNT با استفاده از تصاویر SEM در شکل ۴ و داده‌های آماری ارائه‌شده در جدول ۴ انجام شد. همان‌طور که در شکل ۴ مشاهده می‌شود، تمام نمونه‌ها دارای ساختاری کاملاً لیفی، یکنواخت و



شکل ۴- ریزنگاره‌های میکروسکوپ الکترونی (مقیاس ۳ μm و بزرگ‌نمایی ۲۰۰۰۰ برابر) و نمودار توزیع فراوانی قطر نانوالیاف.

Fig. 4. Electron microscope micrographs (3-micron scale and 20k magnification) and nanofiber diameter frequency distribution diagram.



شکل ۳- نمودار نسبت S/N دو متغیر (غلظت پلیمر و ولتاژ اعمال‌شده).

Fig.3. S/N ratio graphs of two variables (polymer concentration, and applied voltage).

الیاف می‌شود [۷۸]. تصاویر حاصل از شکل‌شناسی الیاف در شکل ۲ نشان داده شده است. در هر تصویر SEM، قطر ۳۰ نانولیف به صورت تصادفی با نرم‌افزار Axio Vision اندازه‌گیری و میانگین قطر برای هریک از شرایط محاسبه شده است. بر این اساس، شرایط تولید نانوالیاف با قطر کمتر از ۱۰۰ nm به عنوان شرایط بهینه برای تولید سایر نمونه‌های نانوکامپوزیتی پلی (وینیل الکل) در نظر گرفته شد.

بررسی دقیق‌تر نتایج حاصل از تحلیل آماری نرم‌افزار Minitab نشان داد، کاهش غلظت محلول پلیمری و افزایش ولتاژ اعمالی، اثر مثبتی بر کاهش قطر نانوالیاف دارند. در ادامه، به منظور تعیین مقدار اثرگذاری هر یک از متغیرها، تحلیل براساس طراحی آزمایش با روش تاگوچی انجام شد. در طراحی آزمایش با روش تاگوچی، نمودار نسبت سیگنال به نویز (signal-to-noise ratio, S/N) از اهمیت زیادی برخوردار است، این نمودار براساس نوع معیار بهینه‌سازی انتخاب می‌شود و با توجه به اینکه در پژوهش حاضر کمینه‌سازی قطر نانوالیاف مدنظر بوده است، از معیار کمتر استفاده شده است. در این نمودارها بیشترین مقدار نسبت S/N، بیانگر شرایط بهینه فرایند خواهد بود. در شکل ۳ محور افقی شامل سطوح ۱، ۲ و ۳ است که هر یک نشان‌دهنده سطوح منتخب برای متغیرهای غلظت پلیمر و ولتاژ اعمال‌شده هستند. نتایج نشان می‌دهد، با انتخاب غلظت در سطح (۵/۵٪ وزنی) و ولتاژ در سطح ۳ (۱۹ kV)، شرایط بهینه برای دستیابی به کمترین قطر نانوالیاف حاصل می‌شود. نکته قابل توجه دیگر در این نمودار، امکان ارزیابی مقدار اثر نسبی هر یک از متغیرها بر پاسخ خروجی است. با توجه به شیب زیاد غلظت نسبت به ولتاژ، می‌توان دریافت، تغییرات غلظت اثر بیشتری نسبت به تغییرات ولتاژ در تعیین قطر نانوالیاف دارد که این اثرها در معادله (۳) با مقادیر ضرایب

جدول ۵- درصد تخلخل داربست های نانوکامپوزیتی.

Table 5. Porosity percentage of nanocomposite scaffolds.

Nanofiber-nanocomposite scaffolds	Calculated density of scaffold (g/cm ³)	Porosity (%)
PVA	0.72	5.54± 85.8
PVA-0.1%MWCNT	0.73	3.12 ± 80.8
PVA-0.2%MWCNT	0.75	5.49 ± 86.3
PVA-0.3%MWCNT	0.77	4.73± 87.8

نانولوله های کربنی چنددیواره دارای بیشترین تخلخل هستند، زیرا افزایش درصد نانولوله ها موجب افزایش گرانروی محلول و در نتیجه افزایش میانگین قطر نانوالیاف می شود. افزایش قطر الیاف سبب افزایش فاصله بین الیاف و حجم کل داربست می شود. از آنجا که جرم نمونه ها تقریباً ثابت است، افزایش حجم موجب کاهش چگالی ظاهری داربست و در نهایت افزایش درصد تخلخل می شود.

(ب) مقدار جذب آب

اطمینان از عدم حل پذیری نانوالیاف در محیط آبی و بررسی غیرمستقیم مقدار شبکه ای شدن، با آزمون جذب آب و نیز تصاویر SEM بررسی شد. تصاویر SEM ارائه شده در شکل ۵، وضعیت نانوالیاف پلی (وینیل الکل) را پیش (شکل ۵ (a)) و پس از قرارگیری در محیط آبی (شکل ۵ (b)) نشان می دهند. مقایسه این تصاویر بیانگر آن است که داربست های نانولیفی پس از قرارگیری در محیط آبی، ساختار لیفی خود را به طور کامل حفظ کرده و تنها دچار کمی تورم شده اند که نشان دهنده عدم حل پذیری و پایداری ساختاری داربست ها پس از عملیات گرمایی است، همچنین نتایج حاصل از آزمون جذب آب در جدول ۶، نشان دهنده جذب ناچیز آب به وسیله نانوالیاف است و همان طور که این جدول نشان می دهد، با افزایش کمیت نانوذرات، مقدار جذب آب به وسیله داربست های نانوکامپوزیتی در مقایسه با پلیمر خالص تقریباً به نصف کاهش یافته است، که دلیل این موضوع وجود نانولوله های کربنی و عملیات گرمایی است. زیرا وجود نانولوله های کربنی موجب افزایش برهم کنش ها در ماتریس پلیمری و محدود شدن تحرک زنجیرهای PVA می شود که نفوذ مولکول های آب به داخل ساختار را کاهش می دهد. همچنین ماهیت نسبتاً آب گریز نانولوله های کربنی، باعث کاهش آب دوستی مؤثر داربست شده است. افزون بر آن، عملیات گرمایی اعمال شده، به افزایش تراکم شبکه ای در داربست ها منجر می شود و با کاهش گروه های آزاد هیدروسیلی،

جدول ۴- نتایج آماری مربوط به محاسبه قطر نانوالیاف PVA-MWCNT.

Table 4. Statistical results related to the calculation of the diameter of PVA-MWCNT nanofibers.

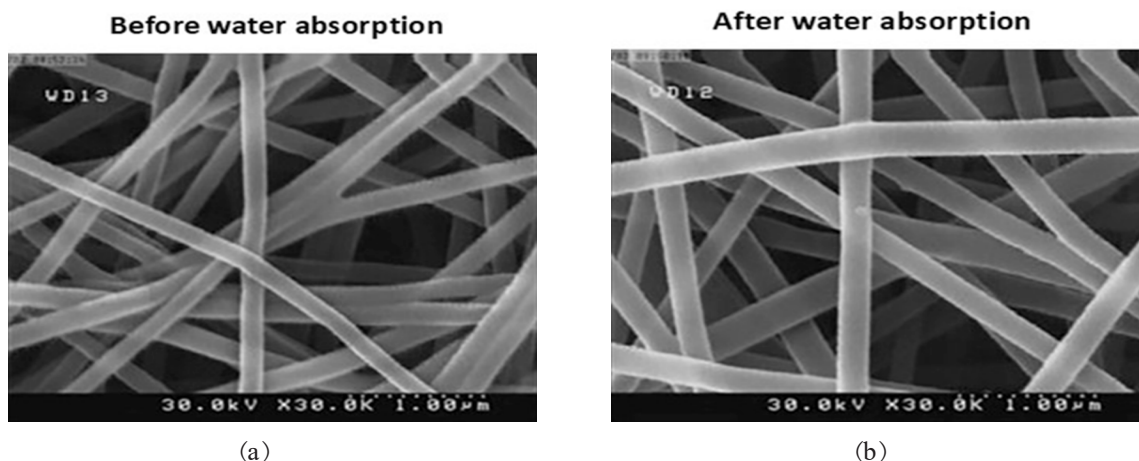
Samples	Average	Standard deviation
PVA-0.1%MWCNT	61	12.24
PVA-0.2%MWCNT	69	17.63
PVA-0.3%MWCNT	75	20.11

بدون دانه هستند و شبکه ای سه بعدی با تخلخل زیاد و منافذ به هم پیوسته ایجاد کرده اند. براساس داده های آماری ارائه شده در جدول ۴، میانگین قطر در محدوده ۶۰-۷۵ nm قرار دارد و قطر نانوالیاف در تمام نمونه ها کمتر از ۱۰۰ nm است. در نمونه دارای ۱/۱٪ وزنی نانولوله های کربنی، الیاف با قطر ۵۰-۷۰ nm بیشترین فراوانی را دارند، که نشان دهنده تولید الیافی نسبتاً نازک تر و با پراکندگی محدودتر است. در حالی که با افزایش بارگذاری نانوذرات، توزیع قطر نانوالیاف به ۹۰ nm افزایش یافته است. مشاهده می شود، افزایش درصد MWCNT در فرمول بندی های مختلف موجب افزایش قطر نانوالیاف به دلیل افزایش زیاد گرانروی محلول در حذف درصد زیاد MWCNT می شود. با وجود این، حفظ قطر الیاف در محدوده نانومتری و جلوگیری از تشکیل ناپیوستگی های شکل شناسی نشان می دهد، شرایط الکترونیسی به درستی تنظیم شده است و ریزساختار مشاهده شده در داربست های PVA-MWCNT نه تنها از نظر شکل شناسی مطلوب است، بلکه از دیدگاه زیست کاربردی نیز بستر مناسبی برای تقلید ماتریس برون یاخته ای و استفاده در مهندسی بافت قلبی فراهم می کند [۶،۷].

خواص داربست ها

(الف) درصد تخلخل

همان طور که در جدول ۵ مشاهده می شود، مقدار درصد تخلخل تمام داربست ها بسیار زیاد (بیش از ۸۰٪) است که در کاربردهای مهندسی بافت در محدوده مناسبی قرار دارد. تخلخل زیاد نقش کلیدی در تسهیل نفوذ مواد مغذی، تبادل اکسیژن و حذف مواد زائد متابولیکی ایفا می کند و شرایط لازم برای چسبندگی، رشد و تکثیر یاخته ها را فراهم می سازد. در این پژوهش، درصد تخلخل نمونه ها با روش وزن سنجی و براساس معادله (۱) محاسبه شده است [۲۸]، که با افزایش مقدار بارگذاری نانوذرات، مقدار تخلخل افزایش می یابد. مشاهده می شود، داربست های نانوکامپوزیتی دارای ۰/۳٪ وزنی

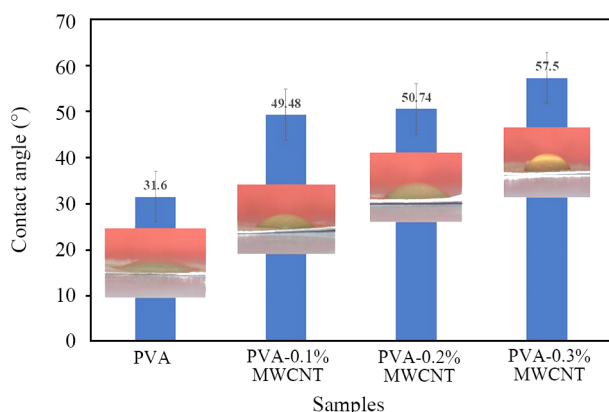


شکل ۵- ریزنگاره های SEM نانوالیاف پلی (وینیل الکل) (مقیاس $1\text{ }\mu\text{m}$ و بزرگنمایی ۳۰۰۰۰ برابر).

Fig. 5. SEM micrographs of poly(vinyl alcohol) nanofibers (1-micron scale and 30k magnification).

پس از انجام عملیات گرمایی روی الیاف پلی (وینیل الکل)، به دلیل کاهش گروه های هیدروکسیل و افزایش پیوندهای بین زنجیری، مقاومت الیاف به حل شدن در آب افزایش می یابد. همان طور که شکل ۶ نشان می دهد، با افزایش کمیت نانوذرات، زاویه تماس افزایش و آب دوستی نمونه ها کاهش یافته است. این رفتار را می توان به ماهیت نسبتاً آب گریز نانولوله های کربنی و نیز کاهش دسترسی گروه های هیدروکسیل پلی (وینیل الکل) در سطح داربست نسبت داد. با توجه به محدوده مطلوب و بهینه زاویه تماس برای چسبندگی و تکثیر یاخته های بر داربست ها، داربست های نانولیفی نانوکامپوزیتی نسبت به داربست نانولیفی پلی (وینیل الکل) گزینه مناسب تری برای چسبندگی و تکثیر یاخته های هستند.

از منظر مهندسی بافت، این هم زمانی تخلخل زیاد، جذب آب کنترل شده و آب دوستی مناسب، مزیتی قابل توجه به شمار می آید.



شکل ۶- زاویه تماس داربست های نانولیفی.

Fig. 6. Contact angle of nanofibrous scaffolds.

مقدار برهم کنش PVA با آب را محدود می کند. مطالعات پیشین نیز نشان داد، شبکه ای شدن فیزیکی یا گرمایی PVA باعث کاهش جذب آب و افزایش پایداری داربست در محیط های آبی می شود [۱۳، ۱۴].

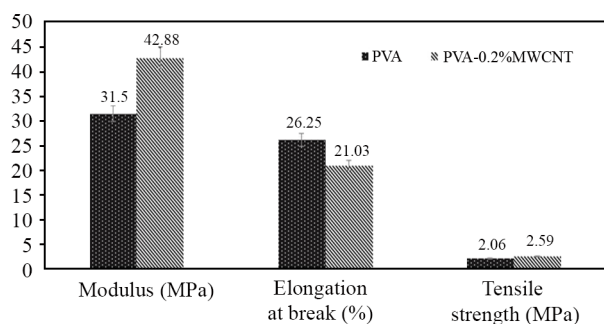
(ج) آب دوستی داربست ها

برای تعیین آب دوستی، از آزمون زاویه تماس آب استفاده شد. آب دوستی سطح یکی از عوامل کلیدی در طراحی داربست های مهندسی بافت به شمار می رود، زیرا نقش تعیین کننده ای در جذب پروتئین های سرمی، چسبندگی یاخته ای و در نهایت تکثیر و تمایز یاخته ها ایفا می کند. مطالعات پیشین نشان داده، یاخته های مزانشیمی و یاخته های چسبنده به طور کلی تمایل بیشتری به سطوحی با زاویه تماس بین 40° تا 70° دارند، زیرا این محدوده، تعادل مناسبی میان آب دوستی و آب گریزی فراهم می کند و امکان جذب پروتئین های چسبنده را افزایش می دهد [۳۰].

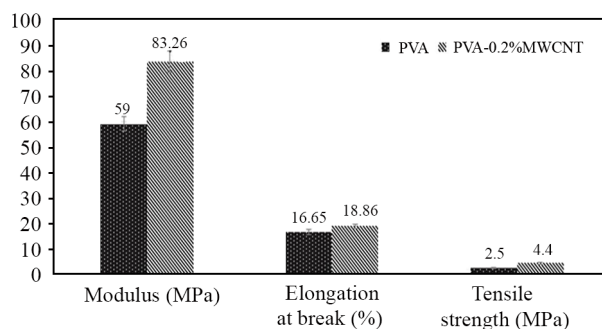
جدول ۶- مقدار جذب آب داربست های نانولیفی.

Table 6. Water absorption of nanofibrous scaffolds.

Nanofiber-nanocomposite scaffolds	Water absorption (%)
PVA	7.00
PVA-0.1%MWCNT	5.21
PVA-0.2%MWCNT	4.89
PVA-0.3%MWCNT	3.45



(a)



(b)

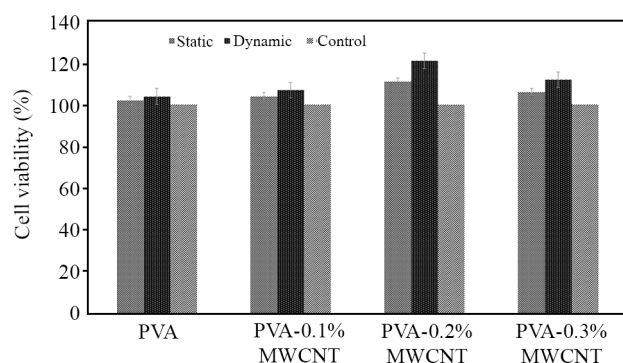
شکل ۷- خواص مکانیکی داربست ها: (a) پیش از انجام عملیات گرمایی و (b) پس از انجام عملیات گرمایی.

Fig. 7. Mechanical properties of scaffolds: (a) before heat treatment and (b) after heat treatment.

پایداری کمتر منجر می شود. این تغییرات ساختاری، ضمن افزایش مقاومت داربست ها در برابر حل شدن و تورم در محیط آبی، موجب بهبود قابل توجه خواص مکانیکی آن ها نیز شده است، این ویژگی برای کاربردهای مهندسی بافت بسیار مهم است، زیرا داربست باید ضمن حفظ استحکام مکانیکی، در محیط های زیستی آبی عملکردی پایدار داشته باشد. در مجموع، نتایج آزمون های مکانیکی نشان می دهد، ترکیب هم زمان نانولوله های کربنی و عملیات گرمایی، راهکار مؤثری برای تنظیم و بهبود خواص مکانیکی داربست های نانولیفی پلی (وینیل الکل) فراهم می کند.

بررسی رشد و تکثیر یاخته ای

نتایج آزمون MTT برای داربست های PVA و نانوکامپوزیت های دارای نانولوله های کربنی چنددیواره، با درصدهای وزنی مختلف در شکل ۸ نشان داده شده است. چسبندگی و تکثیر یاخته ای به



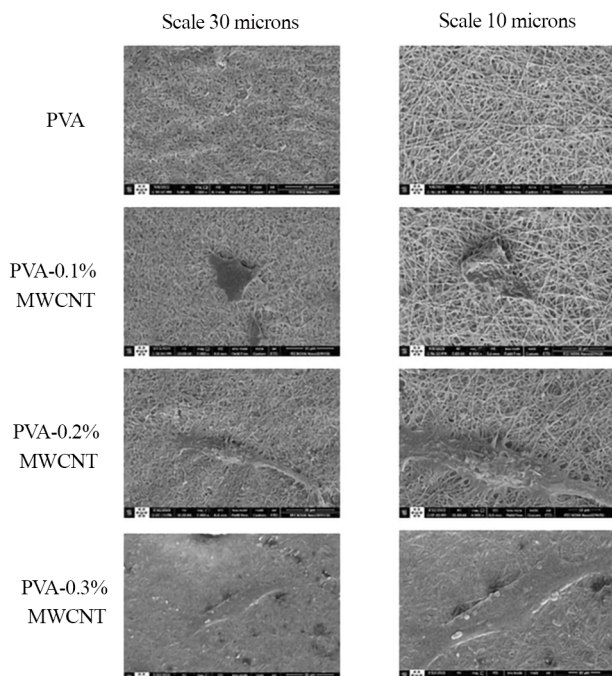
شکل ۸- نتایج آزمون MTT برای داربست های PVA و نانوکامپوزیت های آن.

Fig. 8. MTT test results for PVA scaffolds and their nanocomposites.

زیرا ضمن فراهم کردن مسیرهای مناسب برای تبادل مواد مغذی و اکسیژن، از تورم بیش از حد و کاهش پایداری مکانیکی داربست در محیط های آبی جلوگیری می کند. بنابراین، داربست های نانوکامپوزیتی PVA-MWCNT نسبت به داربست پلی (وینیل الکل) خالص، رفتار متوازن تر و مطلوب تری برای کاربردهای زیست پزشکی نشان می دهند.

(د) خواص مکانیکی

مدول یانگ، استحکام و ازدیاد طول تا نقطه پارگی داربست های PVA خالص و داربست نانوکامپوزیتی دارای ۰/۲٪ وزنی نانولوله های کربنی پیش و پس از عملیات گرمایی، در شکل ۷ نشان داده شده است. در مقایسه مدول داربست ها، مشاهده می شود، افزودن نانوذره به داربست، نسبت به نمونه خالص، مدول داربست را افزایش داده است، این رفتار به مدول کشسانی بسیار زیاد و استحکام مکانیکی قابل توجه نانولوله های کربنی نسبت داده می شود که نقش عامل تقویت کننده را در ماتریس پلیمری ایفا می کنند. انتقال تنش مؤثر از ماتریس پلی (وینیل الکل) به نانولوله ها، به ویژه در صورت توزیع مناسب آن ها در ساختار نانولیفی، سبب افزایش سفتی داربست و در نتیجه افزایش مدول یانگ می شود. هم زمان، کاهش ازدیاد طول تا نقطه پارگی در نمونه های نانوکامپوزیتی مشاهده می شود که ناشی از محدود شدن تحرک زنجیرهای پلیمری در مجاورت فاز تقویت کننده است. بررسی اثر عملیات گرمایی، مطابق شکل ۷ (b)، نشان می دهد که پس از اعمال این فرایند، مدول یانگ داربست ها به طور محسوسی افزایش یافته و ازدیاد طول تا نقطه پارگی کاهش یافته است. عملیات گرمایی باعث افزایش برهم کنش های بین زنجیری، افزایش بلورینگی و ایجاد اتصالات فیزیکی و کاهش تحرک زنجیرهای پلیمری در پلی (وینیل الکل) می شود که در نهایت به تشکیل ساختار شبکه ای



شکل ۹- شکل شناسی یاخته‌ها روی داربست‌های PVA-MWCNT در شرایط ایستا.

Fig. 9. Morphology of cells on PVA-MWCNT scaffolds under static conditions.

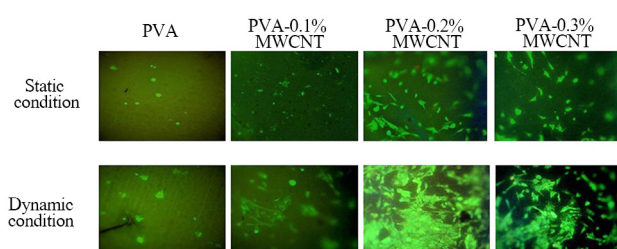
می‌شود، در تمام نمونه‌ها به جز نمونه خالص، یاخته‌ها به خوبی به سطح داربست چسبیده و گسترش یافته‌اند، در حالی که در داربست نانولیفی PVA خالص، چسبندگی یاخته‌ای به صورت محدود و ضعیف مشاهده می‌شود. این تفاوت رفتاری را می‌توان به تغییر ویژگی‌های سطحی و رسانایی داربست‌ها در اثر افزودن MWCNT نسبت داد. این مشاهدات کیفی با نتایج کمی آزمون MTT همخوانی کامل دارد؛ به طوری که نمونه‌های نانوکامپوزیتی، جذب فورمازان بیشتری نسبت به نمونه خالص PVA نشان داده که بیانگر عدم سمیت و فعالیت بیشتر یاخته‌ها هستند. در میان نمونه‌ها، داربست دارای ۰/۲٪ وزنی MWCNT بیشترین مقدار چسبندگی و گسترش یاخته‌ای را نشان می‌دهد. در تصاویر SEM این نمونه، یاخته‌ها به صورت یکنواخت‌تر بر سطح داربست توزیع شده و با ایجاد اتصالات یاخته‌ای-یاخته‌ای و یاخته‌ای-داربست، شکل‌شناسی کشیده و پهن‌شده‌ای از خود نشان می‌دهند که نشانه‌ای از چسبندگی پایدار و شرایط مناسب برای تکثیر یاخته‌ای است. این موضوع نشان می‌دهد، در این غلظت، نانولوله‌های کربنی بدون ایجاد اثرهای سمی، نقش مؤثری در بهبود رفتار زیستی داربست ایفا می‌کنند. این رفتار، با بیشینه‌بودن مقدار رشد یاخته‌ای در آزمون MTT برای این ترکیب درصد نیز مطابقت

زمان کشت، ویژگی‌های توپوگرافی و گروه‌های عاملی سطح بستگی دارد. جذب فورمازان در این آزمون به عنوان معیاری برای زنده‌مانی و تکثیر یاخته‌ای استفاده می‌شود، زیرا تنها یاخته‌های زنده دارای آنزیم‌های میتوکندریایی قادر به تبدیل MTT به فورمازان هستند. در نتیجه، هرچه مقدار جذب فورمازان بیشتر باشد، نشان‌دهنده زنده‌مانی و تکثیر یاخته‌ای بهتر و سمیت کمتر نمونه است [۱۴]. همان‌طور که در شکل ۸ مشاهده می‌شود، مقدار جذب فورمازان در تمام داربست‌ها نسبت به نمونه کنترل بیشتر است که نشان‌دهنده عدم سمیت و زیست‌سازگاری داربست‌های استفاده شده است. افزون بر آن مشاهده می‌شود، بارگذاری MWCNT در بستر داربست‌ها، نه تنها اثر منفی (سمیت) بر داربست‌ها نداشته، بلکه موجب بهبود در مقدار رشد و تکثیر یاخته‌ای داربست‌ها نسبت به نمونه خالص PVA شده است. این یافته با مطالعات مشابه در زمینه داربست‌های پلیمری تقویت‌شده با نانوذرات مطابقت دارد، که نشان داده‌اند، افزودن نانوذرات سازگار می‌تواند رفتار زیستی و برهم‌کنش با یاخته‌ها را بهبود دهد [۳۱].

با توجه به شکل ۸، مقدار جذب با افزایش بارگذاری نانوذرات تا ۰/۲٪ وزنی بر پایه پلیمر در دو حالت ایستا و پویا، به افزایش جذب فورمازان و در نتیجه افزایش مقدار رشد و تکثیر یاخته‌ای داربست‌ها منجر شده است. این پدیده ممکن است، به دلیل بهبود خواص سطحی و افزایش رسانایی برای چسبندگی یاخته‌ای باشد که نقش مهمی در برهم‌کنش یاخته-داربست دارد. در داربست‌های دارای ۰/۳٪ وزنی نانولوله کربنی مقدار جذب فورمازان در دو حالت ایستا و پویا نسبت به ۰/۲٪ وزنی کاهش یافته است. شاید بتوان این گونه برداشت کرد که ۰/۳٪ وزنی نانولوله کربنی و بیشتر از آن، سمیت داربست را افزایش داده، موجب جذب پروتئین سرم و مرگ یاخته‌ای شده است که از لحاظ زیست‌سازگاری، نامطلوب تلقی می‌شود. با مقایسه دو حالت ایستا و پویا مشاهده می‌شود، در شرایط پویا مقدار جذب فورمازان در تمام نمونه‌ها، بیشتر از شرایط ایستا بوده است. افزایش جذب فورمازان در حالت پویا نشان‌دهنده بهبود زنده‌مانی و تکثیر یاخته‌ای در این شرایط است. این بهبود می‌تواند ناشی از ارتقای انتقال مواد غذایی، اکسیژن‌رسانی مؤثرتر به عمق داربست و حذف یاخته‌های مرده از سطح باشد، که فضای بیشتری برای رشد یاخته‌های زنده فراهم می‌کند. نتایج حاضر با مطالعات پیشین مبنی بر مزیت‌های سامانه‌های پویا نسبت به ایستا در کشت یاخته‌ها هم‌راستا است.

تعیین چسبندگی یاخته روی داربست در شرایط ایستا

شکل ۹ تصاویر SEM یاخته‌های کشت‌شده روی داربست در شرایط ایستا را پس از ۴۸ h از کشت یاخته‌ای نشان می‌دهد. مشاهده



شکل ۱۱- تصاویر رنگ آمیزی یاخته‌ای آکریدین نارنجی، پس از مدت ۴۸ h.

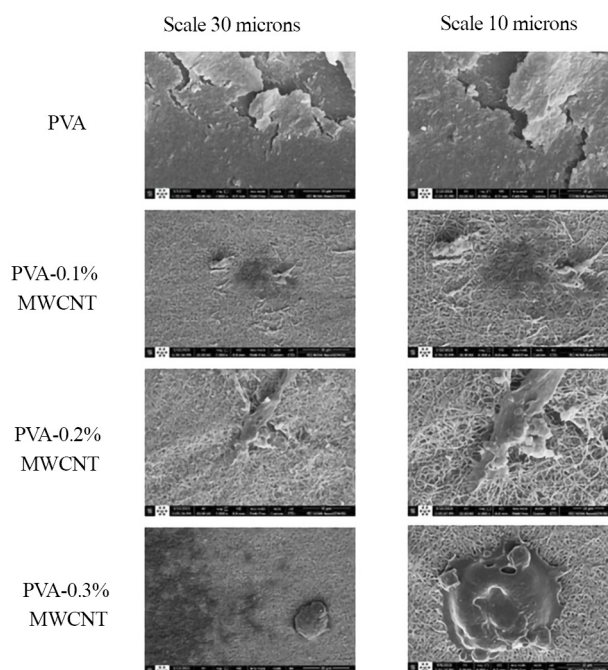
Fig. 11. Acridine orange cell staining images, after 48 h.

گسترش یاخته‌ای قابل مشاهده است. بهبود چسبندگی یاخته‌ای در شرایط پویا را می‌توان به اثر جریان مداوم محیط کشت در شرایط پویا نسبت داد که موجب بهبود انتقال مواد غذایی، اکسیژن‌رسانی مؤثرتر و حذف متابولیت‌های سمی از سطح داربست می‌شود که فضای بیشتری برای چسبندگی و تکثیر یاخته‌های زنده فراهم می‌کند. این پدیده در مطالعات پیشین نیز به‌عنوان یکی از عوامل کلیدی بهبود رفتار یاخته‌ای در داربست‌ها گزارش شده است [۲۳]. همچنین، نتایج کیفی تصاویر SEM در شرایط پویا، تطابق خوبی با داده‌های کمی آزمون MTT دارد؛ به‌طوری‌که بیشترین مقدار جذب فورمازان و بیشترین مقدار زیست‌مانی یاخته‌ای در نمونه دارای ۰/۲٪ وزنی نانولوله کربنی مشاهده شده است. این همخوانی، نشان‌دهنده آن است که شرایط پویا زنده‌مانی و تکثیر یاخته‌ای را نسبت به شرایط ایستا افزایش می‌دهد.

مقایسه چسبندگی یاخته‌ها در شرایط ایستا و پویا

چسبندگی، رشد و تکثیر یاخته‌ای از عوامل کلیدی در ارزیابی کارایی داربست‌ها هستند. در مطالعه حاضر، با حذف سایر متغیرهای زیستی و تنها تمرکز بر شرایط کشت ایستا و پویا، مشاهده شد که شرایط پویا روی چسبندگی و رشد اثری مثبت داشته و به رشد و چسبندگی یاخته‌ای بیشتری نسبت به شرایط ایستا منجر شده است. این رفتار به‌طور عمده به بهبود انتقال مواد غذایی و اکسیژن به درون ساختار متخلخل داربست‌ها و نیز تسهیل دفع مواد زائد متابولیکی در شرایط پویا نسبت داده می‌شود که موجب ایجاد محیط مطلوب‌تری برای یاخته‌ها می‌شود.

در تکمیل و تأیید ارزیابی‌های برون‌تنی، رنگ‌آمیزی آکریدین نارنجی نیز انجام شد. تصاویر شکل ۱۱ رنگ‌آمیزی یاخته‌ای پس از مدت زمان ۴۸ از شروع کشت برای داربست PVA و داربست‌های نانوکامپوزیتی را نشان می‌دهد. مطابق انتظار، تمام نمونه‌ها در



شکل ۱۰- شکل شناسی یاخته‌ها روی داربست‌های PVA-MWCNT در شرایط پویا.

Fig. 10. Morphology of cells on PVA-MWCNT scaffolds under dynamic conditions.

دارد. در مجموع، تحلیل کیفی تصاویر SEM در شرایط ایستا تأیید می‌کند که افزودن مقدار بهینه‌ای از نانولوله‌های کربنی چنددیواره، بدون ایجاد سمیت یاخته‌ای، موجب بهبود چسبندگی، گسترش و در نتیجه تکثیر یاخته‌ای روی داربست‌های نانولیفی PVA می‌شود. این نتایج، همراه با داده‌های کمی آزمون MTT، نشان‌دهنده نقش مؤثر ترکیب ۰/۲٪ وزنی MWCNT در بهینه‌سازی عملکرد زیستی داربست‌ها برای کاربردهای مهندسی بافت است. در مقابل، در نمونه دارای ۰/۳٪ وزنی MWCNT، اگرچه چسبندگی یاخته‌ای همچنان مشاهده می‌شود، اما یکنواختی و کیفیت گسترش یاخته‌ای کاهش یافته است. این کاهش می‌تواند به سمیت نسبت داده شود.

تعیین چسبندگی یاخته روی داربست در شرایط پویا

شکل ۱۰ تصاویر SEM یاخته‌های کشت‌شده روی داربست‌ها در شرایط پویا پس از ۴۸ h از کشت را نشان می‌دهد. همان‌طور که در شکل ۱۰ مشاهده می‌شود، در این شرایط، چسبندگی و گسترش یاخته‌ای در تمام نمونه‌ها، نسبت به شرایط ایستا بهبود یافته است که بیانگر اثر مثبت محیط پویا بر برهم‌کنش یاخته-داربست است. در حالت ۰/۲٪ وزنی از نانولوله‌های کربنی، بیشترین مقدار چسبندگی و

عملیات گرمایی روی داربست‌های تولیدشده باعث شبکه‌ای شدن مؤثر پلی (وینیل الکل)، افزایش پایداری ساختاری در محیط کشت و کاهش مقدار جذب آب به کمتر از ۱۰٪ شد که نشان‌دهنده مقاومت مناسب داربست‌ها در محیط‌های آبی است.

با بارگذاری درصدهای متفاوت نانولوله‌های کربنی، زاویه تماس آب داربست‌ها از حدود ۳۱٪ به ۵۷٪ افزایش یافته و آب‌دوستی داربست‌ها در محدوده مطلوب، برای چسبندگی و تکثیر یاخته‌ای تنظیم شده است و بدین ترتیب افزایش بارگذاری نانوذرات، موجب بهبود چسبندگی، رشد و تکثیر یاخته‌ها روی داربست شده است. نتایج آزمون MTT پس از ۴۸ h نشان داده که تمام داربست‌ها بدون سمیت برای یاخته‌های مزانشیمی بوده و شرایط پویا نسبت به شرایط ایستا به دلیل بهبود انتقال مواد غذایی و نیز اکسیژن‌رسانی موجب افزایش چسبندگی، رشد و تکثیر یاخته‌ای شده است. از میان همه داربست‌ها، ابتدا داربست دارای ۰/۲٪ وزنی MWCNT و سپس داربست دارای ۰/۱٪ وزنی MWCNT در دو شرایط ایستا و پویا، نسبت به سایر داربست‌ها، بهترین عملکرد زیستی را از نظر چسبندگی و تکثیر یاخته‌ای نشان دادند. بر این اساس، می‌توان نتیجه گرفت، کنترل هم‌زمان ترکیب داربست، ریزساختار نانولیفی و شرایط کشت پویا، راهبرد مؤثری برای بهینه‌سازی داربست‌های پلیمری در کاربردهای مهندسی بافت و بازسازی بافت‌های دینامیک نظیر بافت قلبی به‌شمار می‌آید.

قدردانی

از دانشگاه تربیت مدرس به دلیل تأمین شرایط مناسب برای انجام این پژوهش قدردانی می‌شود.

مراجع

- Chandika P., Yeong Heo S., Hee Kim T., Woo Oh G., Hyeong Kim G., Sung Kim M., and Kyo Jung W., Recent Advances in Biological Macromolecule-Based Tissue-Engineered Composite Scaffolds for Cardiac Tissue Regeneration Applications, *Int. J. Biol. Macromol.*, **164**, 2329-2357, 2020.
- Afzali M., Mirhosseini M., Molla Hosein H., and Nikukar H., A Review on Tissue Engineering Scaffolds and Their Function in Regenerative Medicine, *J. Shahid Sadoughi Univ. Med. Sci.*, **26**, 126-140, 2018.
- Vacanti C.A., The History of Tissue Engineering, *J. Cell. Mol. Med.*, **3**, 569-576, 2006.
- Echeverria Molina M.I., Malollari K.G., and Komvopoulos K., Design Challenges in Polymeric Scaffolds for Tissue Engineering, *Front. Bioeng. Biotechnol.*, **9**, 101-130, 2021.
- Peng Zh., Haibing G., Haoyang M., Chengchen R., Jianzhong F., and Lih-sheng T., Fabrication of Scaffolds in Tissue Engineering: A Review, *Front. Mech. Eng.*, **13**, 107-119, 2018.
- Khorshidi S., Solouk A., Mirzadeh H., Mazinani S., Lagaron J.M., Sharifi S., and Ramakrishna S., A Review of Key Challenges of Electrospun Scaffolds for Tissue-Engineering Applications, *J. Tissue Eng. Regen. Med.*, **10**, 715-738, 2016.
- Dattola E., Parrotta E.I., Scalise S., Perozziello G., Limongi T.,

زمان بررسی شده دارای سازگاری زیستی و تکثیر یاخته‌ای مطلوب هستند. همچنین، با افزایش بارگذاری نانوذرات در این نمونه‌ها و اعمال شرایط پویا، تکثیر یاخته‌ای افزایش یافته است. در این میان، داربست نانوکامپوزیتی دارای ۰/۲٪ وزنی نانوذرات در شرایط پویا دارای بیشترین تعداد یاخته زنده و چسبندگی است. این نتیجه با گزارش‌های قبلی مبنی بر اینکه نانوکامپوزیت‌های کربنی می‌توانند موجب بهبود خواص سطح و افزایش برهم‌کنش یاخته و سطح شوند، هم‌راستاست. درصدهای بیشتر MWCNT، ممکن است به سمیت یا اثرهای نامطلوب منجر شود.

نتیجه‌گیری

در این پژوهش، شبیه‌سازی مناسب ماتریس برون‌یاخته‌ای در شرایط پویا نظیر ضربان قلب در محیط آزمایشگاهی انجام شد. تمایز این پژوهش با سایر یافته‌های علمی، در نوع طراحی واکنشگاه زیستی و داربست استفاده شده است، که افزون بر مقرون به‌صرفه بودن، دارای کاربری آسان و تنظیم‌پذیر برای کشت سازه‌های مهندسی شده سه‌بعدی در شرایط آزمایشگاهی در شرایط پویا نظیر ضربان قلب است. شکل‌شناسی داربست‌ها نشان‌دهنده ساختاری کاملاً لیفی با تخلخل بیش از ۸۰٪ با اتصالات داخلی به هم پیوسته است. با تنظیم شرایط الکتروورسی از جمله ولتاژ و غلظت، نانوالیافی با متوسط قطر کمتر از ۱۰۰ nm حاصل شده است. وجود نانولوله‌های کربنی در محلول پلیمری موجب افزایش رسانایی الکتریکی محلول و در نتیجه کاهش متوسط قطر نانوالیاف تا حدود ۸۰-۶۰ nm شد.

- Candeloro P., Coluccio M.L., Maletta C., Bruno L., De Angelis M.T., Santamaria G., Mollace V., Lamanna E., Di Fabrizio E., and Cuda G., Development of 3D PVA Scaffolds for Cardiac Tissue Engineering and Cell Screening Applications, *RSC Adv.*, **9**, 4246-4257, 2019.
8. Teixeira M.A., Amorim M.T.P., and Felgueiras H.P., Poly(vinyl alcohol)-Based Nanofibrous Electrospun Scaffolds for Tissue Engineering Applications, *Polymers*, **12**, 7-40, 2019.
 9. Kai D., Prabhakaran M.P., Liao S., and Ramakrishna S., Stem Cells for Myocardial Tissue Engineering, *Nano Biomedicine*, **2**, 1-22, 2010.
 10. Vu T.D. and Kofidis T., Biomaterials and Cells for Cardiac Tissue Engineering, In *Cardiac Regeneration and Repair*, 1st ed., Woodhead, Singapore, 127-179, 2014.
 11. Liu P., Chen W., Liu C., Tian M., and Liu P., A Novel Poly(vinyl alcohol)/Poly(ethylene glycol) Scaffold for Tissue Engineering with a Unique Bimodal Open-Celled Structure Fabricated Using Supercritical Fluid Foaming, *Sci. Rep.*, **9**, 9534, 2019.
 12. Kumar A., Ryparova P., Hosseinpourpia R., Adamopoulos S., Prosek Z., Zigon J., and Petric M., Hydrophobicity and Resistance Against Microorganisms of Heat and Chemically Crosslinked Poly(vinyl alcohol) Nanofibrous Membranes, *Chem. Eng. J.*, **360**, 788-796, 2019.
 13. Miraftab M., Saifullah A., and Cay A., Physical Stabilization of Electrospun Poly(vinyl alcohol) Nanofibers: Comparative Study on Methanol and Heat-Based Crosslinking, *J. Mater. Sci.*, **50**, 1943-1957, 2014.
 14. Homer A., Lisnenko M., Hauzerova S., Heczkova B., Gardner C., Kostakova K., Topham P., Jencova V., and Theodosiou E., Thermally Stabilized Poly(vinyl alcohol) Nanofibrous Materials Produced by Scalable Electrospinning: Applications in Tissue Engineering, *Polymers*, **16**, 2079-2097, 2024.
 15. Roshanbinfar K., Kolesnik-Gray M., Angeloni M., Schrufer S., Fiedler M., Schubert D.W., Ferrazzi F., Krstic V., and Engel F.B., Collagen Hydrogel Containing Polyethylenimine-Gold Nanoparticles for Drug Release and Enhanced Beating Properties of Engineered Cardiac Tissues, *Adv. Healthc. Mater.*, **12**, 2202408, 2023.
 16. Abedi A., Bakhshandeh B., Babaie A., Mohammadnejad J., Vahdat S., Mombeiny R., Moosavi S., Amini J., and Tayebi L., Concurrent Application of Conductive Biopolymeric Chitosan/Poly(vinyl alcohol)/MWCNTs Nanofibers, Intracellular Signaling Manipulating Molecules and Electrical Stimulation for more Effective Cardiac Tissue Engineering, *Mater. Chem. Phys.*, **258**, 121842-121855, 2021.
 17. Ghai P., Mayerhofer T., and Jha R.K., Exploring the Effectiveness of Incorporating Carbon Nanotubes into Bioengineered Scaffolds to Improve Cardiomyocyte Function, *Expert Rev. Clin. Pharmacol.*, **13**, 1347-1366, 2020.
 18. Mombini S., Mohammadnejad J., Bakhshandeh B., Narmani A., Nourmohammadi J., Vahdat S., and Zirak S., Chitosan-PVA-CNT Nanofibers as Electrically Conductive Scaffolds for Cardiovascular Tissue Engineering, *Int. J. Biol. Macromol.*, **140**, 278-287, 2019.
 19. Lim D., Renteria E.S., Sime D.S., Ju Y.M., Kim J.H., Criswell T., Shupe T.D., Atala A., Marini F.C., Gurcan M.N., Soker S., Hunsberger J., and Yoo J.J., Bioreactor Design and Validation for Manufacturing Strategies in Tissue Engineering, *Bio-Des. Manuf. (BDM)*, **5**, 43-63, 2022.
 20. Herrmann F.E.M., Lehner A., Koenig F., Hollweck T., Fano C., Dauner M., Eissner G., Hagl C., and Akra B., A Feasibility Study of a Multimodal Stimulation Bioreactor for the Conditioning of Stem Cell Seeded Cardiac Patches via Electrical Impulses and Pulsatile Perfusion, *Biomed. Mater. Eng.*, **30**, 37-48, 2019.
 21. Putame G., Gabetti S., Carbonaro D., Meglio F.D., Romano V., Sacco A.M., Belviso I., Serino G., Bignardi C., Morbiducci U., Castaldo C., and Massai D., Compact and Tunable Stretch Bioreactor Advancing Tissue Engineering Implementation, Application to Engineered Cardiac Constructs, *Med. Eng. Phys.*, **84**, 1-9, 2020.
 22. Manthou M.E., Theodoridis K., Aggelidou E., Bakopoulou A., and Domouhtsidou G., An Effective Device and Method for Enhanced Cell Growth in 3D Scaffolds: Investigation of Cell Seeding and Proliferation under Static and Dynamic Conditions, *Mater. Sci. Eng. C*, **114**, 110060-110071, 2020.
 23. Massai D., Pisani G., Isu G., Rodriguez Ruiz A., Cerino G., Galluzzi R., Pisanu A., Tonoli A., Bignardi C., Audenino A.L., Marsano A., and Morbiducci U., Bioreactor Platform for Biomimetic Culture and In-Situ Monitoring of the Mechanical Response of In-Vitro Engineered Models of Cardiac Tissue, *Front. Bioeng. Biotechnol.*, **8**, 733-747, 2020.
 24. Shams Z., Akbari B., Rajabi S., and Aghdami N., Manufacturing a Biomimetic Bioreactor in Cardiac Tissue Engineering, *Scient. Res. J. Shahid Sadoughi Univ. Med. Sci.*, **29**, 3500-3513, 2021.
 25. Mousavi S.M., Yaghmaei S., Jafari A., Vossoughi M., and Ghobadi Z., Optimization of Ferrous Biooxidation Rate in a Packed Bed Bioreactor Using Taguchi Approach, *Chem. Eng.*

- Process.: Process Intensif.*, **46**, 935-946, 2007.
26. Tondnevis F., Keshvari H., and Mohandesi J.A., Fabrication, Characterization, and In-Vitro Evaluation of Electrospun Polyurethane-Gelatin-Carbon Nanotube Scaffolds for Cardiovascular Tissue Engineering Applications, *J. Biomed. Mater. Res. B: Appl. Biomater.*, **108**, 2276-2293, 2020.
 27. Mínguez-García D., Montava I., Bonet-Aracil M., Gisbert-Payá J., and Díaz-García P., PVA Nanofibers as an Insoluble pH Sensor, *Polymers*, **15**, 4480-4488, 2023.
 28. Santos-Rosales V., Gallo M., Jaeger P., Alvarez-Lorenzo C., Gomez-Amoza J.L., and García-Gonzalez C.A., New Insights in the Morphological Characterization and Modelling of Poly(ϵ -caprolactone) Bone Scaffolds Obtained by Supercritical CO₂ Foaming, *J. Supercrit. Fluids*, **166**, 104812-104823, 2020.
 29. Ahmadi P., Nazeri N., Derakhshan M.A., and Ghanbari H., Preparation and Characterization of Polyurethane/Chitosan/CNT Nanofibrous Scaffold for Cardiac Tissue Engineering, *Int. J. Biol. Macromol.*, **180**, 590-598, 2021.
 30. Kurakula M. and Koteswara Rao G.S.N., Moving Polyvinyl Pyrrolidone Electrospun Nanofibers and Bioprinted Scaffolds toward Multidisciplinary Biomedical Applications, *Eur. Polym. J.*, **136**, 109810-109826, 2020.
 31. Kumar Kankala R., Zhu K., Sun X.N., Liu C.G., Wang S.B., and Chen A., Cardiac Tissue Engineering on the Nanoscale, *ACS Biomat. Sci. Eng.*, **3**, 2750-2763, 2018.