

Fabrication of Hybrid Nanofibrous Scaffolds from Poly(lactic Acid)-Graphene and Gelatin for Application in Bone Tissue Engineering

Marziyeh Ranjbar-Mohammadi^{*1}, Hanieh Shaki², and Saeid Kargozar³

1. Department of Textile Engineering, Faculty of Engineering, University of Bonab, Postal Code 5551761167, Bonab, Iran
2. Department of Chemical Engineering, Faculty of Engineering, Golestan University, Postal Code 49138-15759, Aliabad Katoul, Iran
3. Tissue Engineering Research Group (TERG), Department of Anatomy and Cell Biology, School of Medicine, Mashhad University of Medical Sciences, Postal Code 9177948564, Mashhad, Iran

Received: 31 July 2018, accepted: 19 January 2019

ABSTRACT

Hypothesis: Among nanostructures, nanofibers and nanoparticles have a tremendous efficiency in tissue engineering and controlled release of drugs due to their high specific surface area and excellent biocompatibility.

Methods: The production of nanofibrous scaffolds from poly(lactic acid) (PLA), gelatin (Gel) and graphene (G) has been conducted in order to investigate their application in bone tissue engineering. The use of a combination of natural and synthetic polymers resulted in simultaneous use of the appropriate mechanical stability of PLA and the unique biological properties of Gel. The loading of graphene in the Gel/PLA structure caused the formation of nanofibrous substrate with great resemblance to bone tissue. For the production of scaffolds from two mentioned polymers, the dual electrospinning method was applied. Gelatin solution was injected from a syringe and PLA or PLA-G solutions from another syringe.

Findings: The morphological properties of the produced scaffolds showed that the addition of graphene to PLA solution reduced the diameter of the fabricated fibers, significantly. The addition of Gel to PLA and graphene to Gel/PLA decreased the contact angle of the samples. Gel/PLA-G hybrid nanofibers revealed good biocompatibility in the presence of human osteosarcoma cells, and no trace of cellular toxicity was observed. The cells grown on the scaffolds exhibited a spindle-like and broad morphology and almost uniformly covered the entire substrate structure. The fabricated nanofibers due to smooth and nanofibrous morphology, good cellular behavior and higher hydrophilicity can be a good candidate for use in bone tissue.

Keywords:

gelatin,
poly(lactic acid),
graphene,
hybrid nanofibers,
bone tissue

(*To whom correspondence should be addressed.

E-mail: m.ranjbar@bonabu.ac.ir

Please cite this article using:

Ranjbar-Mohammadi M., Shaki H., and Kargozar S., Fabrication of Hybrid Nanofibrous Scaffolds from Poly(lactic Acid)-Graphene and Gelatin for Application in Bone Tissue Engineering, *Iran. J. Polym. Sci. Technol. (Persian)*, **31**, 565-576, 2019.

ساخت داربست‌های هیبریدی نانولیفی از پلی‌لاکتیک اسید- گرافن و ژلاتین برای کاربرد در مهندسی بافت استخوان

مرضیه رنجبر محمدی^{۱*}، هانیه شکی^۲، سعید کارگذار^۳

- ۱- بناب، دانشگاه بناب، دانشکده فنی و مهندسی، گروه مهندسی نساجی، کد پستی ۵۵۵۱۷۶۱۱۶۷
- ۲- علی‌آباد کتول، دانشگاه گلستان، دانشکده فنی و مهندسی، گروه مهندسی شیمی، کد پستی ۴۹۱۳۸-۱۵۷۵۹
- ۳- مشهد، دانشگاه علوم پزشکی مشهد، دانشکده پزشکی، گروه علوم تشریح و بیولوژی سلولی، بخش تحقیقات مهندسی بافت، کد پستی ۹۱۷۷۹۴۸۵۶۴

دریافت: ۱۳۹۷/۵/۹، پذیرش: ۱۳۹۷/۱۰/۲۹

چکیده

فرضیه: در بین نانوساختارها، نانوالیاف و نانوذرات به دلیل داشتن سطح ویژه زیاد و زیست‌سازگاری عالی کارایی چشمگیری در مهندسی بافت و رهایش کنترل‌شده دارو دارند. **روش‌ها:** در این پژوهش، تولید داربست‌های نانولیفی از پلی‌لاکتیک اسید (PLA)، ژلاتین (Gel) و گرافن (G) به منظور ارزیابی کاربرد آن‌ها در مهندسی بافت استخوان بررسی شده است. به‌کارگیری ترکیب پلیمر طبیعی ژلاتین به همراه پلیمر سنتزی PLA به استفاده هم‌زمان از خواص پایداری مکانیکی مناسب PLA و خواص زیستی منحصر به‌فرد Gel منجر شد. بارگذاری گرافن در ساختار Gel/PLA موجب تشکیل بستر نانولیفی با شباهت زیاد به بافت استخوان شد. برای تولید داربست‌ها از دو پلیمر نامبرده، روش الکتروریسی هیبریدی به‌کار گرفته شد. محلول پلیمری Gel از یک سرنگ محلول پلیمری PLA همراه با نانوذره گرافن از سرنگ دیگر تزریق شدند.

یافته‌ها: مطالعه خواص شکل‌شناختی داربست‌های تولیدشده نشان داد، افزودن گرافن به محلول PLA در ترکیب ژلاتین-پلی‌لاکتیک اسید (Gel/PLA)، قطر الیاف تولیدشده را به‌طور معنی‌داری کاهش داده است. و افزودن ژلاتین به ترکیب PLA و افزودن گرافن به ترکیب Gel/PLA زاویه تماس نمونه‌ها را کاهش داد. نانوالیاف هیبریدی Gel/PLA-G تهیه‌شده در مجاورت سلول‌های استخوان زیست‌سازگاری خوبی نشان دادند و هیچ سمیت سلولی مشاهده نشد. سلول‌های رشدیافته روی داربست‌ها شکل‌شناسی پهن و دوکی‌شکل نشان داد و تقریباً به‌طور یکنواخت کل ساختار بستر را پوشاندند. نانوالیاف نهایی تولیدشده با توجه به داشتن شکل‌شناسی صاف و نانولیفی، رفتار سلولی خوب و آب‌دوستی بیشتر می‌توانند انتخاب مناسبی برای استفاده در بافت استخوان باشند.

واژه‌های کلیدی

ژلاتین،
پلی‌لاکتیک اسید،
گرافن،
نانوالیاف هیبریدی،
بافت استخوان

مقدمه

در سال‌های اخیر با تهیه و ساخت داربست‌ها، جایگزین مناسبی برای ترمیم یا بهبود عملکرد بافت‌های آسیب‌دیده به کمک مهندسی بافت فراهم شده است. داربست‌های ساخته‌شده از نانولیف پلیمری به روش الکتروریسی به دلیل ایجاد ساختار سه‌بعدی متخلخل در ابعاد نانو جالب توجه هستند و می‌توانند ساختار شیمیایی و فیزیکی ماتریس برون‌سلولی (ECM) بدن انسان را شبیه‌سازی کنند [۱،۲]. از سوی دیگر، رساندن هدفمند و کنترل‌شده دارو به بافت‌های آسیب‌دیده و سرطانی نیز به‌عنوان چالشی بزرگ پیش روی پژوهشگران و دانشمندان قرار دارد. امروزه نانوفناوری با ورود خود به عرصه‌های مختلف علمی تحولی شگرف و عظیم را به وجود آورده است. زیست‌پزشکی از زمینه‌هایی است که با استفاده از مواد با ابعاد نانو، رشد چشمگیری داشته است. بدین دلیل، شاخه‌های مختلف حوزه زیست‌پزشکی همچون مهندسی بافت و سامانه‌های ره‌ایش دارو در سال‌های اخیر محصولات بسیار متنوع و کاربردی را با کارایی زیاد تولید کرده‌اند. از این میان، نانولیف توجه بسیاری را در نانوفناوری و مهندسی زیست‌پزشکی برای محدوده گسترده‌ای از کاربردها در زمینه‌های مختلف از جمله کاتالیزورها، حسگرها، پزشکی، داروسازی، انتقال دارو، مهندسی بافت، ذخیره انرژی و سلول‌های سوختی به خود جلب کرده‌اند. از میان روش‌های متعدد تولید نانولیف، الکتروریسی ساده‌ترین، متنوع‌ترین، در دسترس‌ترین و کارآمدترین روش است. با این روش می‌توان داربست‌های نانولیفی تولید کرد که قابلیت شبیه‌سازی ساختار ماتریس برون‌سلولی طبیعی بدن انسان را دارند. روش الکتروریسی ساده، هم‌محور و استفاده از روش الکتروریسی دوگانه رایج‌ترین روش‌های تولید نانولیف هستند [۳-۵]. روش الکتروریسی هیبریدی با استفاده از دو نازل جداگانه که اخیراً کاربردهای زیادی از آن، به‌واسطه قابلیت این روش در ایجاد داربست‌هایی با ویژگی‌های مناسب، گزارش شده است، برای تولید الیافی متشکل از پلیمرهای مختلف به‌کار گرفته می‌شود. در این روش، اجزای پلیمری مختلف ویژگی‌های متعلق به خود را دارند و با روش کنترل‌شده و مناسب در تعیین خواص نهایی داربست سهیم می‌شوند [۶]. تاکنون انواع مختلفی از پلیمرها برای تولید نانولیف استفاده شده و کاربرد آن‌ها در ترمیم بافت استخوان بررسی شده است. زمانی که بافت استخوان آسیب می‌بیند، قابلیت انجام وظایف اساسی مانند راه‌رفتن را محدود می‌کند. مهندسی بافت استخوان به‌عنوان بستری نویدبخش، در سال‌های اخیر راهکارهای جدیدی را برای بازسازی و بهبود بافت‌های سخت آسیب‌دیده یا از دست‌رفته ارائه داده است [۷]. اساس مهندسی بافت بر تقلید از

فرایند ساخت و ترمیم استخوان در آزمایشگاه است. سه عنصر اصلی در مهندسی بافت استخوان، سلول، عامل رشد یا تمایز استخوانی و ماتریس با قابلیت استخوان‌سازی و هدایت استخوانی است. در پژوهش‌های اخیر، کاربرد داربست‌های ساخته‌شده از نانولیف پلیمری در مهندسی بافت استخوان بررسی شده است. در اکثر مطالعات انجام‌شده، نانولیف به دلیل استحکام و مقاومت زیاد در برابر تغییر شکل و شبیه‌سازی بافت استخوان اثر موفقیت‌آمیزی بر بهبود بافت استخوان نشان داده‌اند [۸].

در پژوهشی نانولیف پلی‌کاپرولاکتون (PCL)، پلی‌اتیلن گلیکول (PEG) دارای نانوذرات شیشه زیست‌فعال (BG) و داروی سیمواستاتین تولید شد تا سامانه ره‌ایش دارو را ایجاد کند. نانولیف PEG/PCL به‌طور موفقیت‌آمیز با روش الکتروریسی از مخلوط پلیمرها دارای مقادیر مختلف BG (۰٪ تا ۲۰٪) و PEG در مخلوط حلال‌های کلروفرم-متانول ۲۵ تولید شدند. سیمواستاتین پیش از الکتروریسی با مقادیر مختلف نسبت به وزن پلیمر، به محلول پلیمری اضافه شد. تصاویر SEM و آزمون XRD تشکیل لایه هیدروکسی آپاتیت روی سطح وب نانولیف دارای نانوذرات را پس از غوطه‌وری در محلول شبیه‌سازی‌شده بدن (SBF) به مدت سه روز نشان داد. تصاویر SEM مشخص کرد، با ادامه قرار دادن نمونه‌ها در بافر نمک فسفات (SBF) به مدت ۱۴، ۲۱ و ۲۸ روز، سطح نانولیف با لایه هیدروکسی آپاتیت پوشش یافته است. پژوهش‌ها نشان داد، این نانولیف کامپوزیتی جدید می‌تواند سیمواستاتین را با رفتار کنترل‌شده آزاد کند. همچنین، قابلیت تشکیل لایه آپاتیت را روی سطح خود در محلول زیستی داشته و بنابراین قابلیت خوبی در کاربردهای بازسازی استخوان دارند [۹].

Yu و همکاران [۱۰] داربست کامپوزیتی آلژینات (AL)، کیتوسان (CS) و هیدروکسی آپاتیت (HAp) را با روش الکتروریسی برای ترمیم بافت استخوان تهیه کردند. استخوان، کامپوزیتی زیست‌سازگار شامل ۳۰٪ کلاژن و ۷۰٪ هیدروکسی آپاتیت است. در این پژوهش، دو جزء پلیمری کیتوسان و آلژینات الکتروریسی شده ساختار پورته مغزی را تشکیل دادند. الیف حاصل دارای بار مثبت، سطح ویژه زیاد و ساختار شبکه‌ای سه‌بعدی بودند.

در مطالعه دیگری Zhou و همکاران [۱۱] چسبندگی و رشد تارسازهای (fibroblasts) موش را روی مخلوطی از نانولیف با اتصالات عرضی میان دو پلیمر کربوکسی اتیل کیتوسان (CECS) و پلی‌وینیل الکل (PVA) بررسی کردند. آن‌ها مخلوط CECS/PVA را با درصد وزنی ۵۰:۵۰ الکتروریسی کرده و با استفاده از نتایج حاصل از SEM رفتار چسبندگی و مقدار انتشار با تمایل سلول‌ها را برای

با استفاده از پلیمر سنتزی پلی‌لاکتیک اسید، پلیمر طبیعی ژلاتین به همراه نانوذرات گرافن و ارزیابی قابلیت کاربرد داربست‌های تهیه‌شده برای استفاده در بافت استخوان بررسی شده است. این داربست‌ها با روش الکتروریسی دوناظلی ساخته شدند که در ساختار داربست نهایی هر دو جزء پلیمری به شکل الیاف جداگانه بوده و ساختار منسجم و درهم‌تنیده‌ای را به وجود آورده‌اند. ژلاتین با وجود داشتن خواص زیستی مطلوب، در محیط بدن پایداری مکانیکی خوبی ندارد. بنابراین، از ترکیب آن به همراه پلی‌لاکتیک اسید استفاده شده است. از سوی دیگر با افزودن گرافن به‌عنوان نانوذره‌ای با خواص مکانیکی، الکتریکی، گرمایی و زیستی چشمگیر، داربست‌های نانولیفی الکتروریسی شده مناسب برای کاربردهای مهندسی بافت استخوان تولید و با انجام آزمون‌های مختلف خواص آن‌ها مطالعه شده است.

تجربی

مواد

ژلاتین نوع B با کد ۱۰۴۰۷۰ از شرکت Merck آلمان خریداری شد. پودر گرافن با ضخامت ۲ nm، قطر ۱-۲ μm، مقادیر اکسیژن ۸٪ و نیتروژن ۲٪ از شرکت XG sciences آمریکا تهیه شد. این گرافن به دلیل وجود زنجیری از گروه‌های اپوکسی در سطح آن، دارای ساختار چروک‌خورده و آکاردئون‌مانند است. از پلی‌لاکتیک اسید نوع D3251 محصول شرکت NatureWorks آمریکا با M_n و M_w به ترتیب برابر ۲۹۰۰۰ و ۵۲۰۰۰ g/mol استفاده شد. حلال‌های کلروفرم با خلوص ۹۸٪ و دی‌متیل‌فرامید (DMF) با خلوص ۹۹٪ هر دو محصول Merck آلمان بودند.

دستگاه‌ها و روش‌ها

ابتدا محلول‌های ۱۵٪ w/v از ژلاتین در حلال استیک اسید ۹۰٪ پس از قرارگرفتن به مدت معین روی همزن مغناطیسی تهیه شدند. پلی‌لاکتیک اسید با غلظت ۱۴٪ در حلال کلروفرم تهیه شد. محلول‌ها پس از تهیه با غلظت مناسب تحت همزدن به مدت ۱۲ h، درون سرنگ‌ها قرار داده شدند و ترکیب ژلاتین-پلی‌لاکتیک اسید ۵۰:۵۰ (Gel/PLA) الکتروریسی شد تا نانولیف‌های هیبریدی تهیه شوند. برای تهیه نانولیف مزبور پلی‌لاکتیک اسید در یک سرنگ و ژلاتین از سرنگی دیگر تحت ریسندگی قرار گرفت. برای تهیه الیاف دارای گرافن (Gel/PLA-G)، حدود ۱/۵٪ وزنی گرافن (بر اساس وزن خشک پلی‌لاکتیک اسید استفاده‌شده برای تهیه داربست هیبریدی مدنظر) درون کلروفرم

چسبندگی به سطح نانولیف حاصل، همچنین تکثیر و رشد را در طول نانولیف بررسی کردند. آن‌ها نشان دادند، نانولیف تهیه‌شده از مخلوط CECS/PVA با روش الکتروریسی، بستر مناسبی برای رشد سلول‌های تارساز هستند.

پلی‌لاکتیک اسید، پلی‌استر آلیفاتیک مشتق‌شده از ذرت و چغندر قند است و ترکیبات پسماند آن سمی نیستند. از این پلیمر به دلیل زیست‌سازگاری زیاد و زیست‌تخریب‌پذیری در کاربردهای پزشکی به‌وفور استفاده می‌شود. پلی‌لاکتیک اسید به دلیل چقرمگی کم و شکننده‌بودن معمولاً در ترکیب با سایر پلیمرها استفاده می‌شود [۱۲]. ژلاتین زیست‌پلیمر جامدی است که از آبکافت کلاژن بافت پیوندی یا استخوان حیوانات تهیه می‌شود. از جمله خواص ژلاتین می‌توان به زیست‌سازگاری زیاد آن، زیست‌تخریب‌پذیری، ایجادنشدن اشکال روی پادگن‌ها، جذب کامل در شرایط برون‌تنی (in vivo)، هزینه تولید کم نسبت به پلیمرهای سنتزی، قابلیت تسریع در چسبندگی، مهاجرت سلولی و تشکیل کمپلکس پلی‌الکترولیت اشاره کرد [۱۳]. نانولیف تهیه‌شده از ژلاتین همانند الیاف کلاژنی ویژگی‌هایی نظیر خواص زیستی، قیمت مناسب و افزایش دادن عملکرد سامانه ایمنی را دارند. از مشکلات اصلی ژلاتین این است که در دمای بیش از ۳۷°C به سل کلونیدی محلول و در دمای معمولی به ژل تبدیل می‌شود. بدین دلیل، ژلاتین را با پلیمر سنتزی شیکه‌ای می‌کنند تا شکل و ساختار لیف حفظ شود. به دلیل تشابه ژلاتین با کلاژن، الکتروریسی ژلاتین با سایر پلیمرها مانند پلیمرهای سنتزی توجه زیادی را در زمینه مهندسی بافت جلب کرده است [۱۴، ۱۵].

گرافن از نانوذراتی است که در سال‌های اخیر به دلیل داشتن ویژگی‌های شایان توجه از جمله رسانندگی گرمایی زیاد، قابلیت حمل شارژ زیاد، سطح ویژه زیاد، خواص ضدباکتری، خواص نوری و مکانیکی عالی به مقدار زیادی در ساختار نانولیف استفاده شده است [۱۶]. گرافن امکان اتصال و تکثیر سلول‌های تارساز، استخوان‌ساز (osteoblast) و سلول‌های بنیادی مزانشیمی را فراهم کرده است. همچنین نشان داده شد، گرافن می‌تواند تمایز سلول‌های بنیادی را ارتقا دهد [۱۷]. ساختار مسطح گرافن قابلیت بسیاری در گنجاندن دسته گسترده‌ای از مواد از جمله فلزات، داروها، سلول‌ها و زیست‌مولکول‌ها را دارد [۱۸]. در مقالات اخیر از پلیمر طبیعی ژلاتین به‌طور موفقیت‌آمیز به‌عنوان پلیمری برای عامل‌دارکردن گرافن در بارگذاری داروی دکسورویسین استفاده شده است. این ترکیب بازده بارگذاری داروی بیشتری را به دلیل سطح ویژه و برهم‌کنش‌های π بیشتر نشان داد [۱۹].

در این مقاله برای اولین بار، تولید داربست‌های هیبریدی نانولیفی

در معادله (۱) رسانندگی الکتریکی ($\mu\text{S}/\text{cm}$) نانوالیاف اندازه‌گیری شد. اندازه‌گیری ضخامت نانوالیاف با ضخامت‌سنج Shirley ساخت انگلستان انجام شد:

$$(1) \quad \text{رسانندگی الکتریکی} = \frac{10^4 \times (\mu\text{m}) \times \text{ضخامت}}{(\text{cm}^2) \times \text{مساحت سطحی} \times (\Omega) \times \text{امپدانس}}$$

اندازه‌گیری گرانروی محلول‌های پلیمری

گرانروی محلول با گرافن و بدون آن با گرانروی‌سنج Brookfield مدل DV-II+pro ساخت آمریکا اندازه‌گیری شد. محلول با دمای معین داخل ظرف استوانه‌ای شکل ریخته شد و اسپیندل (سامانه چرخشی دستگاه) داخل محلول شروع به چرخش کرد. سرعت چرخش اسپیندل داخل محلول ۴۵ rpm بود. گشتاور تولیدی بازدارنده با گرانروی محلول متناسب است که از ضرب عدد روی صفحه نمایش در ثابت مربوط به اسپیندل به دست می‌آید [۱۹].

آزمون MTT

برای بررسی چسبندگی، تکثیر و انتشار مناسب سلول‌ها روی داربست‌ها، سلول‌های انسانی استئوسارکوما (Human osteosarcoma) (G-292, cell line از بانک ملی سلول مؤسسه پاستور روی داربست‌های Gel/PLA-G و Gel/PLA-G کشت داده شدند. در این آزمون، تعداد سلول‌های زنده با روش رنگ‌سنجی در محلول MTT تهیه شده از پودر ۳-(۴،۵-دی‌متیل-۲-تiazولیل)-۵،۲-دی‌فنیل-۲H-تترازولیم برمید شمارش شدند. داربست‌ها پیش از کشت سلولی و پس از سترون‌سازی در محیط رشد RPMI-1640 به همراه پنی‌سیلین، ۱۰۰ IU/mL استرپتوسین و ۱۰٪ سرم جنین گاوی (FBS) نگهداری شدند. پس از آن در هر خانه از پلیت ۱ mL تعلیق سلولی شامل ۱۰۰۰۰۰ سلول ریخته شد. یک خانه از آن که فقط شامل محیط کشت و سلول و بدون داربست بود، به‌عنوان نمونه کنترل در نظر گرفته شد. پلیت‌ها به مدت ۱، ۲ و ۳ روز در انکوباتور دارای ۵٪ کربن دی‌اکسید، رطوبت ۹۵٪ و دمای ۳۷°C قرار داده شدند. برای انجام آزمون‌های کشت سلولی، از انکوباتور CO₂ مدل NB-203L ساخت شرکت N-BioTek, INC استفاده شد. پس از سپری شدن زمان لازم، سلول‌های رشد یافته روی داربست‌ها با ۵ mg/mL محلول MTT (Sigma-Aldrich) درون انکوباتور به مدت ۴ h نگهداری شدند. پس از آن ۲۵۰ μL از DMSO به هر چاهک اضافه شد که طی آن رنگ زرد حاصل از پودر MTT به ارغوانی تبدیل شد. هر چه شدت رنگ بیشتر باشد، نشانگر مقدار سلول‌های زنده بیشتر روی داربست مربوط است. پس از ۱۵ min تکان دادن، محلول رنگی حاصل به پلیت‌های ۹۶ تایی ELISA

با دستگاه فراصوت‌دهی به مدت ۱ h پراکنده شد. در نهایت، گرافن پراکنده شده به مخلوط پلیمری PLA اضافه شد و محلول پلیمری دارای گرافن به مدت ۱ h دیگر روی همزن قرار گرفت تا برهم‌کنش‌های مناسب بین پلیمر-نانوذره اتفاق بیفتد. سپس، الکتروریسی محلول پلیمری ژلاتین از یک سو و محلول PLA-G از سوی دیگر در دستگاه الکتروریسی برای تولید لیاف هیبریدی مناسب انجام شد. اجزای اصلی این دستگاه شامل منبع ولتاژ قوی ۴۰-۰ kV، صفحه جمع‌کننده دوار با قابلیت چرخش بین ۲۵۰ rpm تا ۳۰۰۰ rpm، دو عدد پمپ سرنگ رقمی با قابلیت تزریق از دو طرف مقابل که هر پمپ قابلیت تزریق سه محلول پلیمری را داشت، سرنگ ۱۰ mL پلاستیکی و نازل (سر سرنگ با اندازه ۱۹ gauge) است. این دستگاه در شرکت نانوساختار آسیا ساخته شده است.

آزمون میکروسکوپی الکترونی پوشی

شکل‌شناسی و قطر نانوالیاف الکتروریسی شده با میکروسکوپ الکترونی پوشی (SEM) Seron Technology مدل AIS2300C ساخت کره ارزیابی شد. از آنجا که دستگاه SEM شعاع‌های الکترونی را به سطح نمونه می‌تاباند، سطح نمونه باید دارای رسانندگی الکتریکی باشد، به همین سبب سطح نانوالیاف با لایه نازکی از طلا پوشش یافت. نرم‌افزار Microstructure Measurement برای اندازه‌گیری قطر نانوالیاف الکتروریسی شده به کار گرفته شد.

تعیین زاویه تماس

خواص آب‌دوستی-آب‌گریزی داربست‌های نانولیفی تولید شده با آزمون تعیین زاویه تماس به کمک دوربین Sony Color Video Camera مدل SSC-DC318P ساخت ژاپن بررسی شد. برای انجام این آزمون، با سرنگ ۱ mL قطره آب مقطر روی سطح داربست نانولیفی ریخته و پس از گذشت ۳ s عکس گرفته شد. زاویه تماس با استفاده از نرم‌افزار Image J گزارش شد.

اندازه‌گیری رسانندگی الکتریکی داربست‌های نانولیفی

دستگاه پتانسیوستات-گالوانوستات Autolab مدل PGStat 302N ساخت شرکت Metrohm Autolab برای اندازه‌گیری رسانندگی الکتریکی داربست‌ها به کار گرفته شد. این دستگاه محدوده بسامد ۰/۰۰۱ Hz تا ۱ × ۱۰^۶ Hz را تأمین می‌کند و متشکل از دو الکتروود است. برای انجام آزمون، نانوالیاف با ابعاد ۰/۹ × ۰/۹ × ۰/۹ cm^۲ در فاصله بین دو الکتروود عمود بر هم قرار گرفتند. با استفاده از این دستگاه مقاومت نانوالیاف بر اساس اهم اندازه‌گیری شد و سپس با قراردادن مقاومت

گرافن و زنجیره‌های PLA و افزایش درهم‌گیری بین زنجیرها منجر می‌شود. نتیجه این برهم‌کنش‌ها افزایش گرانیروی محلول در ترکیب نانولیف‌دارای گرافن است [۲۱، ۲۰].

بررسی رسانندگی الکتریکی داربست‌های نانولیفی

با استفاده از دستگاه Autolab، امپدانس نانولیف‌اندازه‌گیری شد. نتایج اندازه‌گیری امپدانس نانولیف‌الکتروروسی شده کاهش شایان توجه مقدار آن را با افزایش بارگذاری گرافن نشان می‌دهد. از آنجا که امپدانس عکس رسانندگی الکتریکی عمل می‌کند، می‌توان دریافت، رسانندگی الکتریکی داربست‌های نانولیفی به مقدار شایان توجهی افزایش یافته است. در **جدول ۲** داده‌های جمع‌آوری شده اندازه‌گیری رسانندگی الکتریکی داربست‌های نانولیفی آمده است. همان‌طور که از این جدول مشهود است، بارگذاری نانوذرات گرافن درون ساختار نانولیف‌الکتروروسی شده با افزایش چشمگیر رسانندگی الکتریکی داربست‌های نانولیفی همراه است. نتایج نشان می‌دهد، رسانندگی الکتریکی نانولیف‌Gel/PLA شامل ۱/۵/wt گرافن در پلی‌لاکتیک اسید حدود یازده برابر نسبت به نانولیف فاقد گرافن افزایش داشته است. این افزایش رسانندگی الکتریکی، نانولیف را به گزینه بسیار مناسبی در زمینه مهندسی بافت استخوان تبدیل می‌کند. تاریخچه کشف خواص الکتریکی بافت استخوانی به سال ۱۹۵۰ میلادی برمی‌گردد. این موضوع بیانگر این است که بافت استخوانی با داشتن میدان الکتریکی داخلی به فشارهای وارد شده از بیرون پاسخ می‌دهد و باعث تغییراتی در نحوه تکثیر سلول‌های استخوان‌ساز می‌شود. همان‌طور که پیش‌تر گزارش شد، القای الکتریکی خارجی نیز می‌تواند به تقویت رشد، تکثیر و تمایز سلول‌های استخوان‌ساز و سلول‌های بنیادی منجر شود که در نهایت باعث بهبود سرعت روند ترمیم آسیب‌های استخوانی می‌شود [۲۲].

جدول ۲- نتایج اندازه‌گیری رسانندگی الکتریکی داربست‌های هیبریدی نانولیفی Gel/PLA و Gel/PLA-G بارگذاری شده با ۱/۵٪ وزنی گرافن. Table 2. Results for measuring electrical conductivity of hybrid nanofibrous scaffolds Gel/PLA and Gel/PLA-G loaded with 1.5%wt graphene.

Sample	Thickness (μm)	Impedance (Ω)	Electrical conductivity (μS/cm)
Gel/PLA	60	2000	3.7
Gel/PLA-G	100	330	41.1

منتقل شد. بدین ترتیب که هر نمونه به چند چاهک با حجم ۱۰۰ μL منتقل شده و سپس جذب محلول حاصل با طیف‌نورسنج Synergy HT ساخت BioTek آمریکا در طول موج‌های ۵۷۰ nm خوانده شد.

کشت سلول‌ها روی داربست برای مطالعه شکل‌شناسی سلولی

تعداد ۱۰۰۰۰۰ سلول روی نمونه‌ها کشت داده شد. این داربست‌ها پیش از کشت سلولی در محیط رشد DMEM به همراه پنی‌سیلین ۱۰۰ IU/mL استرپتومسین و ۱٪ سرم جنینی گاوی (FBS) نگهداری شدند. نمونه‌ها پس از سترون‌سازی در محیط UV، درون ظروف کشت سلولی از جنس پلی‌استیرن قرار گرفتند و ۸ h در محیط کشت معرفی شده در آزمون MTT بدون سلول قرار داده شدند. پس از آن در هر خانه از پلیت ۱ mL از تعلیق سلولی شامل ۱۰۰۰۰۰ سلول ریخته شد. پس از آن ظروف کشت به مدت ۵ روز در انکوباتور CO₂، ۵٪ کربن دی‌اکسید، رطوبت ۹۵٪ و دمای ۳۷°C قرار داده شدند. به دفعات مکرر محیط کشت سلولی با محیط تازه تعویض شد. پس از آن محلول تعلیق از درون تمام خانه‌های ظرف کشت خارج و نمونه‌ها با PBS 1X شسته شدند. سلول‌ها با گلو تار آلدئید به مدت ۳ h تثبیت شدند. سپس نمونه‌ها در الکل ۵۰، ۷۵، ۹۰ و ۱۰۰٪ به مدت ۱۵ min آبگیری شده و پس از آن با هگزامیل‌دی‌سیلازان (hexamethyldisilazane) عمل‌آوری و خشک شدند. نمونه‌های کاملاً خشک‌شده برای بررسی شکل‌شناسی سلول‌ها در آزمون SEM قرار گرفتند.

نتایج و بحث

بررسی گرانیروی محلول‌های پلیمری

نتایج اندازه‌گیری گرانیروی محلول ژلاتین، پلی‌لاکتیک اسید و پلی‌لاکتیک اسید-گرافن در **جدول ۱** آمده است. افزایش گرانیروی در نمونه دارای گرافن احتمالاً به دلیل انبوهش نانوصفحه‌های گرافن در اثر برهم‌کنش‌های π-π می‌تواند باشد. در واقع با بارگذاری گرافن از حجم آزاد در فصل مشترک زنجیره‌های پلیمری PLA و نانوصفحه‌های گرافن کاسته می‌شود. از سوی دیگر، وجود اتم‌های نیتروژن و اکسیژن درون ساختار گرافن به ایجاد پیوند هیدروژنی بین

جدول ۱- گرانیروی محلول‌های Gel، PLA و PLA-G.

Table 1. Viscosity of Gel, PLA and PLA-G solutions.

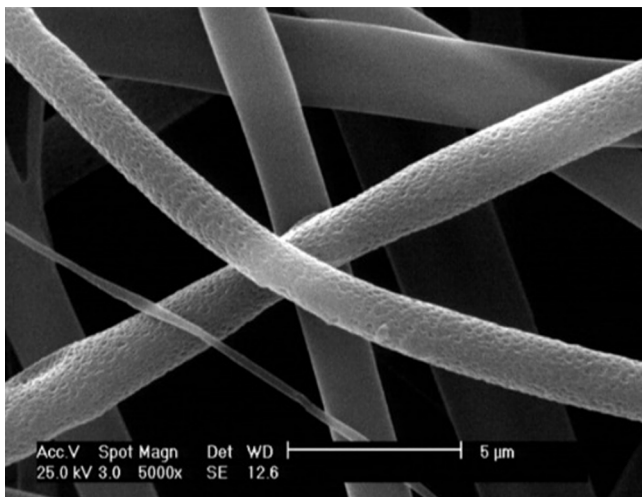
Solution	Gelatin	PLA	PLA-G
Viscosity (cP)	399.3	440.92	501.39

قابلیت رسانندگی الکتریکی بر سلول‌های استخوان‌ساز تأیید شد.

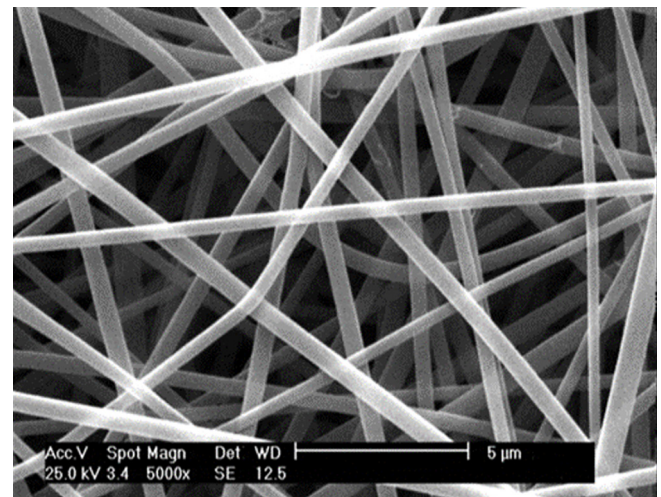
بررسی شکل‌شناسی نانوالیاف تولیدشده

خواص شکل‌شناختی داربست‌های هیبریدی تولیدشده نیز بررسی شد. نتایج شکل‌شناسی نمونه‌های Gel، PLA، Gel/PLA و Gel/PLA-G در شکل ۱ نشان داده شده است. ابعاد الیاف گزارش شده برای نمونه PLA متخلخل، حدود $46 \pm 1/53 \mu\text{m}$ (شکل ۱ (a)) و قطر نانوالیاف برای نمونه ژلاتینی الکترورسی‌شده در محدوده $27 \pm 47 \text{ nm}$ بود (شکل ۱ (b)). در شکل ۱ (c) ساختار هیبریدی متشکل از ژلاتین و پلی‌لاکتیک اسید دیده می‌شود. همان‌طور که در تصویر مشخص است، الیاف پلی‌لاکتیک اسید با قطر بیشتر و در محدوده میکرومتر

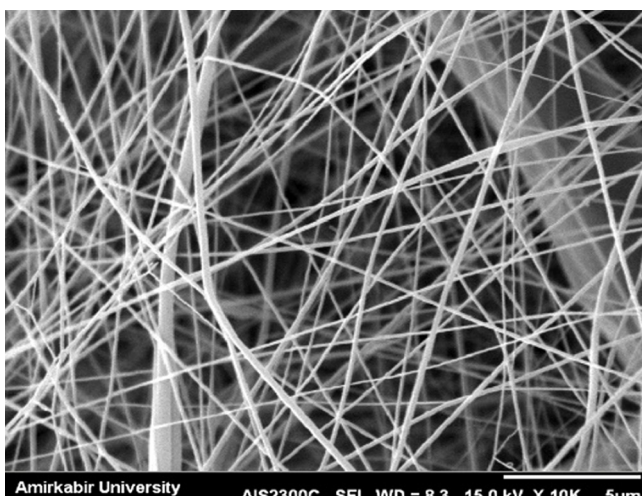
Shao و همکاران [۲۳] گزارش کردند، استفاده از نانوالیاف رسانای الکتریکی از پلی‌لاکتیک اسید به همراه نانولوله‌های کربن چنددیواره (PLA/MWCNTs) موجب بهبود عملکرد سلول‌های استخوانی می‌شود. در مطالعه دیگری، Guex و همکاران [۲۴] داربست‌هایی از جنس پلی‌۴،۳-اتیلن دی‌اکسی تیوفن و پلی‌استیرن سولفونات (PEDOT:PSS) تهیه کردند تا قابلیت بهبود تکثیر سلول‌های استخوانی را داشته باشد. نمونه‌های سنتزی دارای رسانندگی الکتریکی $140 \mu\text{S/cm}$ بودند که این مقدار پس از گذشت ۲۸ روز در محیط کشت به مقدار ۶/۱ کاهش یافت. نتایج آزمون‌های سلولی آن‌ها حاکی از اثرهای مثبت این داربست‌های رسانای الکتریکی بر بهبود عملکردهای سلول‌های استخوان بود. در مطالعه حاضر نیز اثر مثبت سازه‌های با



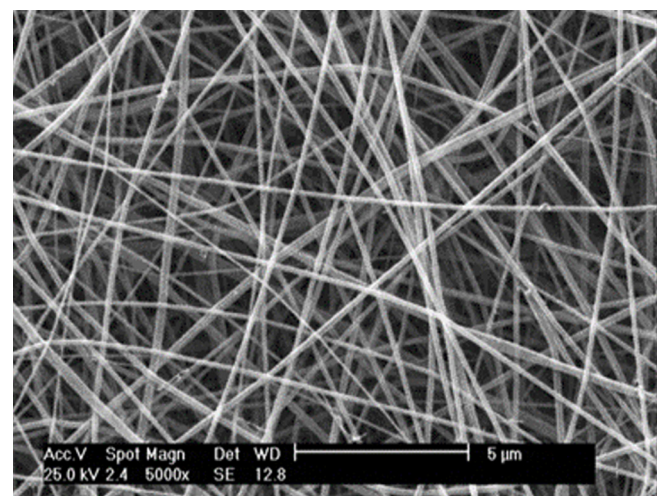
(a)



(b)



(c)



(d)

شکل ۱- شکل‌شناسی نانوالیاف: (a) PLA، (b) Gel، (c) Gel/PLA و (d) Gel/PLA-G.

Fig. 1. The morphology of nanofibers: (a) PLA, (b) Gel, (c) Gel/PLA, and (d) Gel/PLA-G.

نانوالیاف نهایی دارای گرافن می‌شود [۲۵].

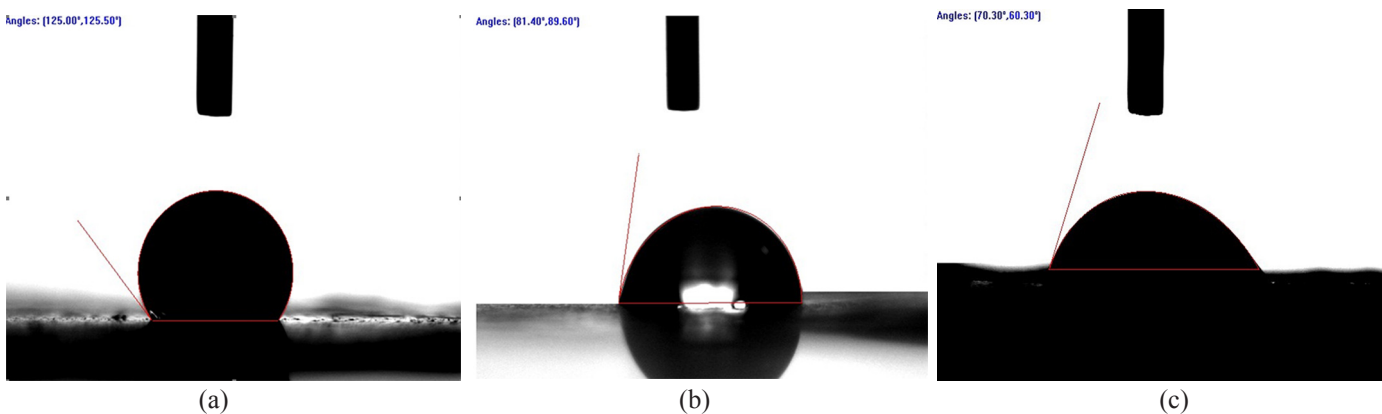
بررسی زاویه تماس داربست‌های نانولیفی برای ارزیابی مقدار آب‌دوستی

تمایل نانوالیاف به جذب یا دفع آب، به مقدار زیادی روی کاربرد آن‌ها در مهندسی بافت اثرگذار است. به‌طور کلی، نانوالیاف آب‌دوست چسبندگی و تکثیر سلولی را در مقایسه با نانوالیاف آب‌گریز افزایش می‌دهند که فاقد مکان‌های سطحی کافی برای برهم‌کنش با سلول‌ها هستند. خاصیت آب‌دوستی به منظور بهبود توزیع یکنواخت سلول‌های تغذیه‌شده اولیه در طول داربست و تغذیه مناسب اکسیژن و سایر مواد مغذی به داربست از اهمیت زیادی برخوردار است. اندازه‌گیری زاویه تماس قطره آب با داربست می‌تواند به‌عنوان معیاری برای بررسی مقدار آب‌دوستی یا آب‌گریزی داربست به‌کار رود. هر چه زاویه تماس کمتر باشد، سطح آب‌دوست‌تر بوده و زاویه تماس بزرگ‌تر بیانگر مقاومت سطح در برابر آب است. نتایج حاصل از اندازه‌گیری زاویه تماس در شکل ۲ نشان داده شده است.

PLA پلیمر آب‌گریزی با زاویه تماس حدود $125 \pm 2^\circ$ است که به دلیل کمبود گروه‌های عاملی آب‌دوست، کاربرد آن به مقدار زیادی در داربست‌های مهندسی بافت محدود شده است. از سوی دیگر، ژلاتین پلیمر آب‌دوستی است.

اضافه کردن ژلاتین به PLA به دلیل وجود گروه‌های عاملی آمین و کربوکسیلیک اسید در ساختار آن به مقدار زیادی آب‌دوستی داربست‌های نانولیفی PLA-ژلاتین را افزایش می‌دهد. این تفاوت در مقدار آب‌دوستی پلی‌لاکتیک اسید و داربست هیبریدی Ge/PLA، معنادار است. نتایج نشان می‌دهد، اضافه کردن گرافن به ساختار نانوالیاف PLA-ژلاتین از یک سو به دلیل وجود گروه‌های آب‌دوست شامل نیتروژن و اکسیژن و امکان ایجاد پیوند هیدروژنی و از سوی

مشابه شکل ۱ (a) موجودند، اما الیاف ژلاتین قطری در محدوده‌ای نزدیک به الیاف تشکیل‌شده در شکل ۱ (b) وجود دارند. می‌توان نتیجه گرفت، توزیع قطر در این نمونه به دلیل اختلاف زیاد قطر دو بخش پلیمری با ساختار متفاوت، دوقله‌ای است. بنابراین، در این نمونه می‌توان برای ساختار به‌هم‌پیوسته و درهم‌تنیده دوجزئی حاصل، قطر مربوط به الیاف ژلاتین و پلی‌لاکتیک اسید را به ترتیب در حدود 379 ± 39 nm و $1/45 \pm 31$ μ m گزارش کرد. قطر مشاهده‌شده برای الیاف دارای گرافن Gel/PLA-G در شکل ۱ (d)، حدود 202 ± 18 nm بود. در نمونه دارای گرافن ترکیبی، به دلیل بارگذاری نانوذرات گرافن در محلول PLA، قطر این الیاف کاهش یافته است، به‌طوری که در تصویر کلی SEM از ساختار دوجزئی تشکیل‌شده از دو پلیمر متفاوت، همه نانوالیاف همگن و با قطر تقریباً یکسان تشکیل شده‌اند. در الکتروریسی، گرانیروی محلول و رسانندگی الکتریکی دو عامل اساسی در تعیین قطر نانوالیاف هستند. بررسی مطالعات پیشین بیانگر این مطلب است که با کاهش گرانیروی محلول و افزایش رسانندگی الکتریکی آن، از قطر نانوالیاف کاسته می‌شود. بر اساس نتایج به‌دست آمده در این پژوهش، رسانندگی الکتریکی محلول با افزایش مقدار گرافن افزایش می‌یابد. رسانندگی زیاد محلول دلیل اصلی کاهش قطر نانوالیاف نانوکامپوزیتی است، بدین دلیل که رسانندگی الکتریکی بیشتر محلول به ایجاد نیروی دافعه الکتروستاتیک قوی‌تر بارهای الکتریکی منفی بسیار زیاد تجمع‌یافته درون جت محلول طی فرایند الکتروریسی منجر می‌شود. افزون بر این، بر اساس نتایج حاصل از بررسی اثر گرافن بر گرانیروی محلول، با افزایش مقدار بارگذاری گرافن گرانیروی به مقدار کمی افزایش می‌یابد که احتمالاً در رقابت بین گرانیروی و رسانندگی الکتریکی، مورد اخیر نقش غالب را ایفا می‌کند. این تغییرات موجب کاهش قطر



شکل ۲- مقادیر زاویه تماس داربست‌های نانولیفی الکتروریسی‌شده: (a) PLA، (b) Gel/PLA و (c) Gel/PLA-G.

Fig. 2. Contact angle measurements for electrospun nanofibrous scaffolds: (a) PLA, (b) Gel/PLA, and (c) Gel/PLA-G.

استفاده شد. شکل‌شناسی سلول‌های استئوسارکوما روی نمونه‌های لیفی Gel/PLA-G و Gel/PLA پس از ۵ روز در شکل ۳ نشان داده شده است. در این تصاویر شکل‌شناسی و برهم‌کنش بین سلول‌ها و داربست نانولیفی به‌خوبی نشان داده شده است. در این شکل، تعداد سلول‌های زیادی روی داربست Gel/PLA-G و Gel/PLA در جهت‌های مختلف آرایش‌یافتگی الیاف، اتصال مناسبی برقرار کردند و سلول‌ها شکل‌شناسی گسترده و معمولی دارند. همچنین، سلول‌ها با حفظ شکل‌شناسی طبیعی خود، لایه به‌هم‌پیوسته سلولی را روی داربست نانولیفی نشان دادند.

بررسی مقدار سمیت و زیست‌سازگاری نمونه‌های تهیه‌شده (آزمون MTT)

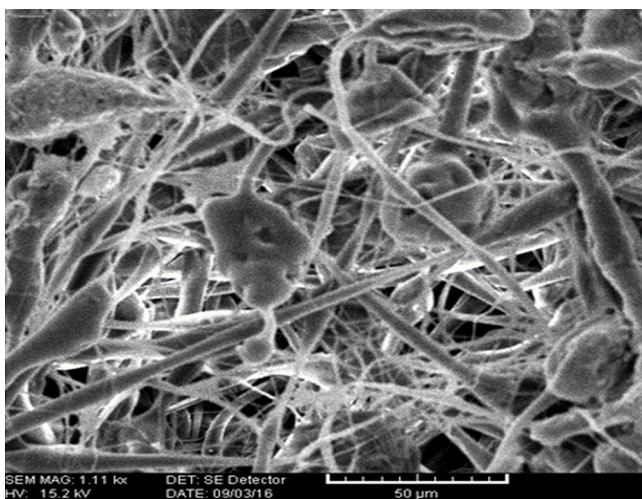
نانوذرات بر پایه گرافن می‌توانند برهم‌کنش‌های خوبی با زیست‌مولکول‌ها، سلول‌ها و بافت‌ها بر اساس تعداد لایه‌ها، ابعاد، عامل‌دار کردن شیمیایی و افزایش آب‌دوستی ایجاد کنند. سطح ویژه زیاد گرافن می‌تواند به بهبود برهم‌کنش‌های سلولی کمک کند. همچنین، گرافن خواص خوبی همانند کشسانی زیاد، استحکام، انعطاف‌پذیری و نیز قابلیت ایجاد گروه‌های عاملی مختلف را روی سطوح دارد. به همین دلیل می‌تواند به‌عنوان ماده تقویت‌کننده در داربست‌های مهندسی بافت به‌کار رود. در پژوهش حاضر، ارزیابی قابلیت زنده‌مانی سلول‌های استخوان روی سطح داربست‌های لیفی و زیست‌سازگاری آن‌ها برای بررسی اثر وجود گرافن با استفاده از آزمون MTT انجام شد. آزمون MTT، روش رنگ‌سنجی است که بر اساس تشکیل بلورهای آبی‌رنگ نامحلول به دلیل کاهش و

دیگر به دلیل افزایش قطبیت سطح به ازدیاد آب‌دوستی آن‌ها منجر شده است. همان‌طور که مشاهده می‌شود، با افزودن گرافن به پلی‌لاکتیک اسید زاویه تماس کاهش می‌یابد و به حدود $70 \pm 3^\circ$ می‌رسد. مقدار کاهش زاویه تماس و افزایش مقدار آب‌دوستی نسبت به نمونه پلی‌لاکتیک اسید و نمونه Gel/PLA معنادار است. به‌عبارت دیگر، نانوالیاف نانوکامپوزیت ماهیت آب‌دوستی پیدا می‌کنند که در مقایسه با نانوالیاف PLA-ژلاتین فاقد گرافن با زاویه تماس حدود $80 \pm 5^\circ$ مقدار کمتری به‌شمار می‌آید. این مسئله تأیید می‌کند، نانوالیاف دارای گرافن هنوز قابلیت آب‌دوستی زیادی دارند. از این‌رو، داربست‌های نانولیفی الکترورسی‌شده به دلیل افزایش آب‌دوستی قابلیت‌های زیادی برای کاربردهای زیست‌پزشکی دارند.

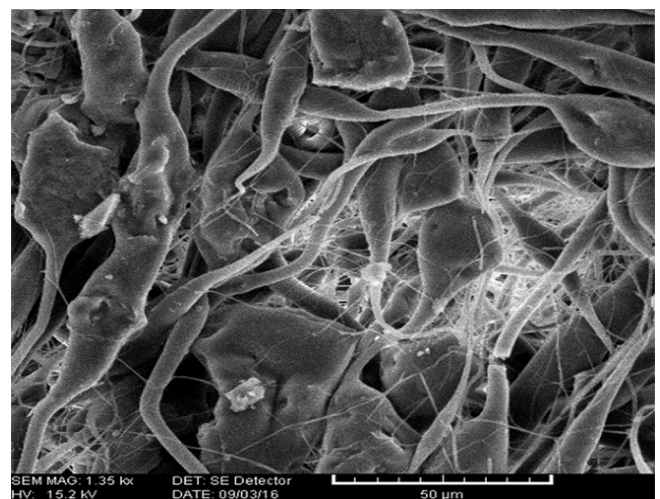
بررسی کشت سلولی روی داربست‌های نانولیفی

بررسی روند رشد سلول‌ها روی داربست‌های زیستی تقلیدکننده ماتریس برون‌سلولی (ECM) از اهمیت چشمگیری برخوردار است. چون داربست‌های تهیه‌شده باید رفتار سلولی مناسبی داشته باشند. ابتدا سلول‌ها به شکل کروی بوده و با پهن شدن شکل‌شناسی سلول‌ها روند رشد آن‌ها کامل می‌شود. هر چه تعداد سلول‌های پهن‌شده از تعداد سلول‌های کروی بیشتر باشد، نشانگر مناسب‌تر بودن داربست برای کاربردهای زیستی و نیز مناسب بودن زیست‌مواد تشکیل‌دهنده آن است.

در این مطالعه، برای ارزیابی نحوه اتصال و چسبندگی سلول روی داربست‌های لیفی از سلول‌های استئوسارکوما (G-292) انسانی



(a)



(b)

شکل ۳- شکل‌شناسی سلول‌های استخوان روی داربست‌های: (a) Gel/PLA و (b) Gel/PLA-G.

Fig. 3. The morphology of bone cells on scaffolds: (a) Gel/PLA and (b) Gel/PLA-G.

ندارند و زیست‌سازگاری آن‌ها برای استفاده در کاربردهای مهندسی بافت مناسب است. همچنین، نتایج این پژوهش با نتایج سایر پژوهش‌ها مطابقت دارد [۲۶، ۲۷]. رشد سلولی بیشتر و معنادار دیده شده برای نانولیفای دارای گرافن را می‌توان به خواص زیستی عالی گرافن درون ساختارهای نانولیفی نسبت داد که احتمالاً به افزایش آب‌دوستی و جذب پروتئین بیشتر به وسیله الیاف منجر شده است، زیرا آب‌دوستی می‌تواند عامل مهم و اصلی در چسبندگی، اتصال و تکثیر سلول‌ها به شمار آید [۲۸، ۲۹].

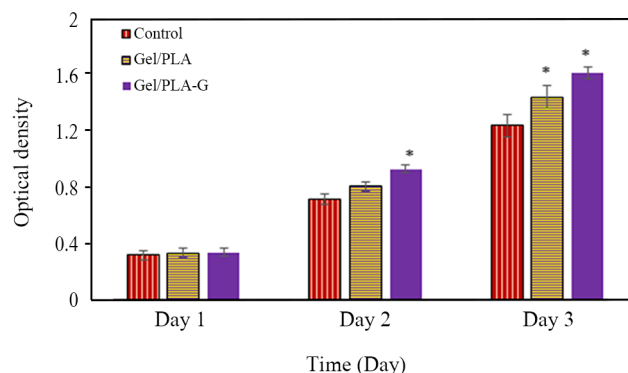
در مطالعات پیشین انجام شده، گرافن امکان اتصال و تکثیر سلول‌های استخوان‌ساز و سلول‌های بنیادی مزانشیمی را فراهم کرده است. همچنین نشان داده شد، گرافن می‌تواند تمایز سلول‌های بنیادی استخوانی را به دلیل داشتن خواص مکانیکی چشمگیر ارتقا دهد. Luo و همکاران [۲۷] نانولیفای PLGA/GO الکترورسی شده را با ویژگی بهبودیافته تکثیر سلول‌های استخوانی تولید کردند. بررسی نتایج سمیت سلولی پس از ۱، ۲ و ۳ روز نشان داد، سرعت رشد سلول به مقدار شایان توجهی با وجود گرافن در مقایسه با نانولیفای فاقد گرافن افزایش یافته است. این رشد بهبودیافته سلول‌ها به قابلیت جذب پروتئین روی سطح داربست بارگذاری شده با گرافن نسبت داده شد.

نتیجه گیری

در این پژوهش، داربست‌های نانولیفی با روش الکترورسی هیبریدی از دو پلیمر پلی‌لاکتیک اسید و ژلاتین به همراه نانوذرات گرافن بارگذاری شده در پلی‌لاکتیک اسید تهیه شدند. اندازه‌گیری گرانروی محلول‌های PLA، PLA-G و ژلاتین نشان داد، وجود گرافن درون محلول به افزایش گرانروی محلول پلیمری منجر شده است. همچنین وجود گرافن در داربست‌های Gel/PLA-G باعث افزایش رسانندگی الکتریکی آن‌ها در مقایسه با نمونه Gel/PLA شده است. بنابراین، رقابت بین این دو پارامتر در نهایت نقش تعیین‌کننده‌ای روی شکل‌شناسی نانولیفای حاصل دارد. بررسی خواص آب‌دوستی داربست‌های تولید شده نشان داد، داربست نهایی تولید شده Gel/PLA-G خاصیت آب‌دوستی دارد و این ویژگی باعث افزایش سلول‌های استخوان رشد کرده روی این داربست و شکل‌شناسی مناسب آن‌ها شده است. در نهایت مشخص شد، داربست‌های هیبریدی دارای گرافن زیست‌سازگارند و در روزهای ۱، ۲ و ۳، با انجام مطالعات تکثیر سلولی، هیچ سمیتی برای آن‌ها گزارش نشد.

شکسته شدن بلورهای زردرنگ تترازولیوم به وسیله آنزیم سوکسینات دهیدروژناز به کار گرفته می‌شود. مقدار و شدت رنگ تولید شده در این آزمون با تعداد سلول‌هایی رابطه مستقیم دارد که از نظر متابولیک فعال هستند. شکل ۴ نمودار میله‌ای نتایج آزمون MTT این سلول‌ها را پس از ۱، ۲ و ۳ روز روی داربست‌های لیفی ژلاتین-پلی‌لاکتیک اسید و ژلاتین-پلی‌لاکتیک اسید-گرافن و نمونه کنترل نشان می‌دهد. گفتنی است، در نمونه کنترل کشت سلول‌ها روی ظرف کشت فاقد داربست (کنترل) انجام شد.

بررسی نتایج نشان می‌دهد، در تمام روزهای بررسی، نمونه‌های سنتزی اثر منفی بر رشد و تکثیر سلول‌ها نداشته‌اند. همان‌طور که در نمودار مشخص است، در روز اول (۲۴ h پس از نهفتگی) مقدار رشد و تکثیر سلول‌ها در تمام گروه‌ها به یکدیگر نزدیک است و تفاوت معناداری بین نمونه‌های لیفی با نمونه کنترل دیده نمی‌شود. با وجود این، با افزایش مدت زمان نهفتگی (روزهای ۱، ۲ و ۳) رشد و تکثیر سلول‌ها افزایش یافته است. همچنین، اثر مواد سنتزی روی سلول‌ها در مقایسه با روز اول نهفتگی با وضوح بیشتری قابل دیدن است، به طوری که در روز سوم تعداد سلول‌های زنده روی داربست‌های لیفی به حداکثر مقدار رسیده است. با در نظر گرفتن مقادیر نشان داده شده در شکل، تعداد سلول‌های زنده بیشتری در داربست‌های لیفی نسبت به نمونه کنترل دیده می‌شود. بنابراین بر اساس نتایج می‌توان گفت، داربست‌های لیفی گرافن هیچ سمیتی



شکل ۴- آزمون MTT نمونه‌های مختلف شامل نمونه کنترل، Gel/PLA، Gel/PLA-G پس از ۱، ۲ و ۳ روز (گروه‌هایی که با علامت * نشانه‌گذاری شدند، نسبت به گروه کنترل افزایش معناداری در میانگین درصد تکثیر سلولی با مقدار P-value کمتر از ۰/۰۵ نشان می‌دهند).
Fig. 4. MTT test of different samples including control sample, Gel/PLA and Gel/PLA-G, after passing 1, 2 and 3 days (* Shows cell proliferation of samples are significant compared with control ($P \leq 0.05$)).

مراجع

1. Leung V. and Ko F., Biomedical Applications of Nanofibers, *Polym. Adv. Technol.*, **22**, 359-365, 2011.
2. Mashayekhi M., Mirzadeh H., and Bagheri-Khoulenjani S.H., Effects of Crosslinking and Neutralization Agents on the Morphology of Chitosan Electrospun Scaffolds, *Iran. J. Polym. Sci. Technol.*, **29**, 521-531, 2017.
3. Ranjbar-Mohammadi M., Characteristics of Aloe Vera Incorporated Poly(ϵ caprolactone)/Gum Tragacanth Nanofibers as Dressings for Wound Care, *J. Indust. Text.*, **47**, 1464-1477, 2018.
4. Koushki P., Bahrami S.H., and Ranjbar-Mohammadi M., Coaxial Nanofibers from Poly(caprolactone)/Poly (vinyl alcohol)/Thyme and Their Antibacterial Properties, *J. Indust. Text.*, **47**, 834-852, 2018.
5. Zarekhalili Z., Bahrami S.H., Ranjbar-Mohammadi M., and Milan B.P., Fabrication and Characterization of PVA/Gum Tragacanth/PCL Hybrid Nanofibrous Scaffolds for Skin Substitutes, *Int. J. Biolog. Macromol.*, **94**, 679-690, 2017.
6. Torricelli P., Gioffrè M., Fiorani A., Panzavolta S., Gualandi C., and Fini M., Co-electrospun Gelatin-Poly(L-lactic acid) Scaffolds: Modulation of Mechanical Properties and Chondrocyte Response as a Function of Composition, *Mater. Sci. Eng., C*, **36**, 130-138, 2014.
7. Wang T., Zhai Y., Nuzzo M., Yang X., Yang Y., and Zhang X., Layer-by-Layer Nanofiber-enabled Engineering of Biomimetic Periosteum for Bone Repair and Reconstruction, *Biomaterials*, **182**, 279-288, 2018.
8. Howie R.N., Durham E., Oakes B., Grey Z., Smith J., Campbell P., LaRue A., Steed M., Muise-Helmericks R., Cray J., Testing a Novel Nanofibre Scaffold for Utility in Bone Tissue Regeneration, *J. Tissue Eng. Regen. Med.*, **12**, 2055-2066, 2018.
9. Kouhi M., Morshed M., Varshosaz J., and Fathi M.H., Poly(ϵ -caprolactone) Incorporated Bioactive Glass Nanoparticles and Simvastatin Nanocomposite Nanofibers: Preparation, Characterization and In Vitro Drug Release for Bone Regeneration Applications, *Chem. Eng. J.*, **228**, 1057-1065, 2013.
10. Yu C.C., Chang J.J., Lee Y.Y.H., Lin C., Wu M.H., Yang M.C., and Chien C.T., Electrospun Scaffolds Composing of Alginate, Chitosan, Collagen and Hydroxyapatite for Applying in Bone Tissue Engineering, *Mater. Lett.*, **93**, 133-136, 2013.
11. Zhou Y.S., Yang D., Chen X., Xu Q., Lu F., and Nie J., Electrospun Water-Soluble Carboxyethyl Chitosan/Poly(vinyl alcohol) Nanofibr Us Membrane as Potential Wound Dressing for Skin Regeneration, *Biomacromolecules*, **9**, 349-354, 2008.
12. Zhang W., Chen L., and Zhang Y., Surprising Shape-Memory Effect of Polylactide Resulted from Toughening by Polyamide Elastomer, *Polymer*, **50**, 1311-1315, 2009.
13. Zhang Y., Ouyang H., Lim C.T., Ramakrishna S., and Huang Z.M., Electrospinning of Gelatin Fibers and Gelatin/PCL Composite Fibrous Scaffolds, *J. Biomed. Mater. Res., B: Appl. Biomater.*, **72B**, 156-165, 2005.
14. Sell S.A., Wolfe P.S., Garg K., McCool J.M., Rodriguez I.A., and Bowlin G.L., The Use of Natural Polymers in Tissue Engineering: A Focus on Electrospun Extracellular Matrix Analogue, *Polymers*, **2**, 522-553, 2010.
15. Heidari M., Bahrami S.H., and Ranjbar-Mohammadi M., Fabrication, Optimization and Characterization of Electrospun Poly(caprolactone)/Gelatin/Graphene Nanofibrous Mats, *Mater. Sci. Eng., C*, **78**, 218-229, 2017.
16. Goenka S., Sant V., and Sant S., Graphene-Based Nanomaterials for Drug Delivery and Tissue Engineering, *J. Control. Release*, **173**, 75-88, 2014.
17. Dubey N., Bentini R., Islam I., Cao T., Helio Castro Neto A., and Rosa V., Graphene: A Versatile Carbon-Based Material for Bone Tissue Engineering, *Stem Cells Int.*, **2015**, 1-12, 2015.
18. Liu J., Cui L., and Losic D., Graphene and Graphene Oxide as New Nanocarriers for Drug Delivery Applications, *Acta Biomaterialia*, **9**, 9243-9257, 2013.
19. Abbasi A., Nasef M.M., Takeshi M., and Faridi-Majidi R., Electrospinning of Nylon-6,6 Solutions into Nanofibers: Rheology and Morphology Relationships, *Chin. J. Polym. Sci.*, **32**, 793-804, 2014.
20. Bao Q., Zhang H., Yang J.X., Wang S., Tang D.Y., Jose R., Ramakrishna R., Lim C.T., and Loh K.P., Graphene-Polymer Nanofiber Membrane for Ultrafast Photonics, *Adv. Funct. Mater.*, **20**, 782-791, 2010.
21. Ramazani S., Karimi M., Aligned Poly(ϵ -caprolactone)/Graphene Oxide and Reduced Graphene Oxide Nanocomposite Nanofibers: Morphological, Mechanical and Structural

- Properties, *Mater. Sci. Eng. C*, **56**, 325-334, 2015.
22. Shahini A., Yazdimamaghani M., Walker K., Eastman M., Hatami-Marbini H., Smith B., Ricci J., Madihally S., Vashae D., and Tayebi L., 3D Conductive Nanocomposite Scaffold for Bone Tissue Engineering, *Int. J. Nanomed.*, **9**, 167-181, 2014.
23. Shao S., Zhou S., Li L., Li J., Luo C., Wang J., Li X., and Weng J., Osteoblast Function on Electrically Conductive Electrospun PLA/MWCNTs Nanofibers, *Biomaterials*, **32**, 2821-2833, 2011.
24. Guex A.G., Puetzer J.L., Armgarth A., Littmann E., Stavrinidou E., Giannelis E.P., Malliaras G.G., and Stevens M.M., Highly Porous Scaffolds of PEDOT:PSS for Bone Tissue Engineering, *Acta Biomaterialia*, **62**, 91-101, 2017.
25. Ramazani S. and Karimi M., Electrospinning of Poly(ϵ -caprolactone) Solutions Containing Graphene Oxide: Effects of Graphene Oxide Content and Oxidation Level, *Polym. Compos.*, **37**, 131-140, 2014.
26. Yu Y.H., Chan Ch.Ch., Lai Y.Ch., Lin Y.Y., Huang Y.Ch., Chi W.F., Kuo Ch.W., Lin H.M., and Chen P.Ch., Biocompatible Electrospinning Poly(vinyl alcohol) Nanofibres Embedded with Graphene-Based Derivatives with Enhanced Conductivity, Mechanical Strength and Thermal Stability, *RSC Adv.*, **4**, 56373-56384, 2014.
27. Luo Y., Shen H., Fang Y., Cao Y., Huang J., Zhang M., Dai J., Shi X., and Zhang Z., Enhanced Proliferation and Osteogenic Differentiation of Mesenchymal Stem Cells on Graphene Oxide-Incorporated Electrospun Poly(lactic-co-glycolic acid) Nanofibrous Mats, *ACS Appl. Mater. Interfaces*, **7**, 6331-6339, 2015.
28. Sayyar S., Murray E., Thompson B.C., Gambhir S., Officer D.L., and Wallace G.G., Covalently Linked Biocompatible Graphene/Polycaprolactone Composites for Tissue Engineering, *Carbon*, **52**, 296-304, 2013.
29. Ma H., Su W., Tai Z., Sun D., Yan X., Liu B., and Xue Q., Preparation and Cytocompatibility of Poly(lactic acid)/Hydroxyapatite/Graphene Oxide Nanocomposite Fibrous Membrane, *Chin. Sci. Bull.*, **57**, 3051-3058, 2012.