

## داربست کامپوزیتی پلی کاپرولاکتون/نانوگرافن به منظور تمایز عصبی سلول‌های بنیادی پالپ

### دندان

زهرا خبره کاشانی<sup>۱</sup>، M.Sc.، مهدی ابراهیمیان حسین آبادی<sup>۱\*</sup>، Ph.D.، الهه مسائلی<sup>۲\*</sup>، Ph.D.، محمدحسین نصراصفهبانی<sup>۲</sup> Ph.D.

- ۱- دانشگاه اصفهان، دانشکده فنی و مهندسی، گروه مهندسی پزشکی  
 ۲- پژوهشگاه رویان، پژوهشکده زیست فناوری جهاد دانشگاهی، مرکز تحقیقات علوم سلولی، گروه زیست فناوری سلولی، اصفهان، ایران

\* پست الکترونیک نویسنده مسئول: m.ebrahimian@eng.ui.ac.ir و elah.masaeli@royaninstitute.org

تاریخ پذیرش: ۱۳۹۷/۹/۳

تاریخ دریافت: ۱۳۹۷/۶/۱۱

### چکیده

**هدف:** در این پژوهش طراحی و ساخت داربست‌های نانوکامپوزیتی تقویت شده با گرافن به منظور القای تمایز عصبی در سلول‌های بنیادی پالپ دندان مورد توجه قرار گرفت.

**مواد و روش‌ها:** ابتدا داربست‌های کامپوزیتی پلی کاپرولاکتون/نانوگرافن با درصدهای وزنی ۱، ۳ و ۵ درصد گرافن توسط روش ریخته‌گری حلال ساخته شدند. در ادامه میزان آبدوستی و هدایت الکتریکی نانوکامپوزیت‌ها اندازه‌گیری شد. با استفاده از نتایج آزمون‌های فیزیکی ذکر شده، داربست مناسب با درصد بهینه نانوگرافن انتخاب شد و مورفولوژی، فعالیت متابولیکی و پتانسیل تمایز عصبی سلول‌های بنیادی پالپ دندان روی آن به ترتیب توسط میکروسکوپ الکترونی روبشی (SEM)، آزمون MTS و رنگ‌آمیزی ایمونوفلورسنت مورد بررسی قرار گرفت.

**نتایج:** نتایج آزمون هدایت سنجی نشان داد که با افزودن گرافن به پلی کاپرولاکتون، هدایت الکتریکی کامپوزیت به میزان قابل توجهی افزایش می‌یابد. همچنین افزودن ۵ درصد وزنی نانوگرافن به پلیمر منجر به کاهش زاویه تماس از  $99/89 \pm 2/86$  به  $64/03 \pm 3/36$  درجه می‌شود. در نهایت تصاویر میکروسکوپ SEM و رنگ‌آمیزی ایمونوفلورسنت با نشانگر MAP2 نشان دادند که سلول‌ها روی سطح داربست بهینه به سلول‌های شبه عصبی تمایز یافته‌اند.

**نتیجه‌گیری:** نتایج این پژوهش نشان داد که داربست نانوکامپوزیتی پلی کاپرولاکتون/ ۵ درصد گرافن از پتانسیل مناسبی جهت القای تمایز عصبی و کاربرد در مهندسی بافت عصب برخوردار است.

**واژگان کلیدی:** مهندسی بافت، گرافن، سلول‌های بنیادی پالپ دندان، تمایز عصبی، پلی کاپرولاکتون

## مقدمه

امروزه با استفاده از راه‌کارهای مهندسی بافت و پیشرفت‌های علمی در این زمینه، داربست‌های طبیعی و مصنوعی گوناگونی طراحی شده‌اند که از آن‌ها می‌توان به‌عنوان جایگزین پیوندهای عصبی استفاده کرد. موفقیت مهندسی بافت عصبی به‌صورت اساسی به ایجاد تعادل و نظم بین رفتار سلولی و ایجاد بافت درون یک داربست مصنوعی یا طبیعی بستگی دارد. خواص فیزیکی-شیمیایی و زیستی این داربست می‌بایست مشابه ماده زمینه خارج سلولی (ECM) بدن باشد تا بتواند از اتصال، رشد و تمایز سلول‌ها در بدن حمایت کند. خواصی مانند زیست‌سازگاری، زیست‌تخریب‌پذیری، رسانایی و استحکام کششی مناسب از جمله خواص مورد نیاز برای یک داربست عصبی ایده آل می‌باشند (۱، ۲).

گرافن (Graphene) یک لایه تک اتمی از کربن‌هایی است که به‌صورت حلقوی با هم پیوند کووالانسی برقرار کرده‌اند. گرافن دارای ویژگی‌های منحصر بفردی از جمله هدایت الکتریکی و حرارتی بسیار بالا می‌باشد. دیگر خواص ویژه گرافن مانند قابلیت کشسانی بالا و تمایل به جذب پروتئین‌های سبک، می‌تواند تمایز عصبی سلول‌های بنیادی و رشد و تکثیر سلول‌های عصبی را بهبود بخشد (۳-۵). پس از کشف گرافن در سال ۲۰۰۴ محققین به بررسی خواص و کاربردهای گرافن پرداختند که از جمله کاربردهای زیستی مورد توجه آن می‌توان به استفاده در ساخت داربست‌های مهندسی بافت، تصویربرداری مولکولی و سیستم‌های رهایش ژن و دارو اشاره کرد. همچنین گزارش شده که گرافن در آزمون‌های برون‌تنی فاقد سمیت سلولی بوده و به‌علت هدایت الکتریکی بالا گزینه مناسبی برای مهندسی بافت عصب، می‌باشد (۶).

در طراحی داربست‌های مهندسی بافت عصب به‌دلیل خواص مکانیکی نزدیک پلیمرها به بافت عصب، استفاده از

مواد پلیمری بسیار مرسوم است. تاکنون پلیمرهای زیست سازگار مصنوعی متعددی مانند پلی لاکتیک اسید (PLA)، پلی لاکتیک گلیکولیک اسید (PLGA) و پلی کاپرولاکتون (PCL) به‌منظور طراحی و ساخت داربست‌های عصبی به‌کار رفته‌اند. اما جهت بهبود خواص فیزیکی، شیمیایی و زیستی این داربست‌های پلیمری، نیاز به جزء دوم در زمینه داربست نیز ضروری است (۷). سایر و همکارانش در گزارش خود بر این عقیده‌اند که مواد کامپوزیتی پلیمری تقویت شده با پرکننده‌های کربنی در مقیاس نانو، خواص مکانیکی و هدایتی بسیار بهتری نسبت به پلیمرهای خالص دارند. در این تحقیق، آنها از نانو کامپوزیت پلی کاپرولاکتون-گرافن به‌عنوان یک داربست مهندسی بافت استفاده کردند. نتایج به‌دست آمده نشان داد که پس از ترکیب با گرافن، پلیمر خواص زیستی و فرایندپذیری خود را حفظ می‌کند، اما خواص مکانیکی و هدایتی آن به‌دلیل وجود گرافن افزایش می‌یابد. همچنین چسبندگی و رشد سلول‌های PC12 کشت شده روی این نانو کامپوزیت نیز در مقایسه با پلیمر خالص افزایش داشته است (۸). در مطالعه‌ی صورت گرفته توسط روسا و همکارانش نیز نشان داده شده است که سلول‌های بنیادی پالپ دندان (Sayyar) روی بستر کامپوزیتی پلی-کاپرولاکتون/گرافن اکسید از خود تمایز استئوبلاستی (Osteoblastic) و اودونتوبلاستی (Odontoblastic) نشان داده‌اند (۹).

با توجه به اینکه در مطالعات انجام گرفته توسط نویسندگان، تاکنون گزارشی مبنی بر کاربرد داربست‌های نانو کامپوزیتی PCL/Graphene به‌منظور بررسی تمایز عصبی سلول‌های بنیادی پالپ دندان (DPSCs) مشاهده نشده است، رسیدن به هدف مذکور در این پژوهش مد نظر قرار گرفت. ابتدا داربست‌های PCL/Graphene با درصد مختلف وزنی گرافن تولید شده و از نظر فیزیکی و

**بررسی خواص فیزیکی- شیمیایی داربست‌ها**

الگوی پراش اشعه ایکس غشاها توسط دستگاه XRD مدل XMD-300، UNISANTIS ساخت کشور سوئیس تعیین شد. ولتاژ دستگاه ۴۵KV و شدت جریان ۰/۸ میلی‌آمپر انتخاب شدند. جهت تشخیص ساختار شیمیایی غشاها از طیف‌سنجی FTIR استفاده شد. بدین منظور طیف FTIR در محدوده طول‌موج ۴۰۰-۴۰۰۰cm<sup>-1</sup> از کلیه نمونه‌ها توسط دستگاه طیف‌سنج شرکت Thermo-Science مدل IS10 ساخت کشور آمریکا تهیه شد. به‌منظور بررسی ترشوندگی داربست‌ها از دستگاه اندازه‌گیری زاویه تماس ساخت پژوهشگاه مواد و انرژی کشور ایران، با قطره آب با حجم ۴ میکرولیتر استفاده شد که مجهز به دوربین مدل DFK23U618 ساخت کشور آلمان با قابلیت عکسبرداری از قطره و نرم‌افزار سنجش زاویه تماس قطره بود. آزمون زاویه تماس قطره آب برای هر یک از نمونه‌ها در سه نقطه مختلف انجام گرفت. برای بررسی هدایت الکتریکی از روش چهار نقطه‌ای و دستگاه Keithly ساخت کشور آمریکا استفاده شد. در این روش مقاومت سطحی داربست‌ها سنجیده می‌شود.

**آماده سازی داربست‌ها پیش از کشت سلول:** پیش از کشت سلول‌ها، ابتدا داربست‌ها به اندازه‌ی سطح ظروف کشت سلول ۲۴ خانه بریده شدند به مدت ۲ ساعت زیر هود در الکل ۷۰ درصد فیلترشده قرار گرفتند. سپس به مدت ۸ دقیقه در محلول بافر فسفات (PBS) دارای ۱ درصد آنتی‌بیوتیک (پنی‌سیلین، استرپتومایسین) قرار گرفته و با یک پنس استریل به چاهک‌های ۲۴ خانه انتقال داده شدند. پس از ۲ مرتبه شستشوی مجدد با محلول PBS، داربست‌ها به مدت یک شبانه روز با محیط کشت معمول مزانشیمی (HighGlucose DMEM) حاوی ۱ درصد آنتی‌بیوتیک و ۱۰ درصد سرم جنین گاوی (FBS) در انکوباتور قرار گرفتند. کلیه مواد مورد نیاز برای

شیمیایی مشخصه یابی شدند. سپس سلول‌های DPSCs روی آن‌ها کشت داده شدند و میزان تمایز عصبی القا شده توسط داربست روی این سلول‌ها بررسی شد. استفاده از سلول‌های DPSC به این دلیل مورد بررسی قرار گرفت که علاوه بر دسترسی آسان‌تر نسبت به سایر سلول‌های بنیادی، قابلیت تمایز به رده‌های سلولی مختلفی چون غضروفی، چربی، عصبی، استخوانی و ماهیچه‌ای را داشته و همچنین ایمنی‌زایی و رد پیوند کمتری از خود نشان داده است (۱۰). در نهایت نتایج به‌دست آمده در این پژوهش نشان دهنده پتانسیل بالای نانوذرات گرافن جهت القای تمایز عصبی در سلول‌های بنیادی به‌ویژه در روش‌های مهندسی بافت عصب بودند.

**مواد و روش‌ها**

**ساخت غشای نانوکامپوزیت PCL/Graphene** ابتدا پودر نانوگرافن (نوترینو، ایران) در حلال دی‌متیل فرم آمید (DMF) (Merck، آلمان) با غلظت ۰/۵ درصد (w/v) پراکنده شده و به مدت ۱۲ ساعت در حمامอัลتراسونیک قرار گرفت تا سوسپانسیون پایدار حاصل شد. به‌منظور ساخت غشای کامپوزیتی PCL/Nano Graphene، پلیمر PCL با وزن مولکولی ۸۰۰۰۰ (Sigma، آلمان) با غلظت (w/v) ۱۰ درصد در حلال DMF حل شد. سپس سوسپانسیون‌های نانو گرافن با درصد وزنی ۱ تا ۵ درصد در محلول PCL به مدت ۳ ساعت هم زده شدند تا کاملاً حل شوند. در نهایت محلول‌های آمیزه‌ای درون دیش‌های تفلونی با قطر ۸ سانتی‌متر قالب‌گیری شدند و در دمای محیط کمی خشک شدند. برای خروج مقادیر بیشتری از حلال، نمونه‌ها به مدت یک شبانه روز درون آون خلا در دمای پ ۷۰ درجه سانتی‌گراد خشک شدند. به‌عنوان گروه کنترل داربست PCL خالص به روش مشابه تولید شد.

نمونه‌ها در دستگاه، در شرایط خلا با آشکارسازی الکترون‌های ثانویه (Electron (SE) Secondary)، تصاویر میکروسکوپی الکترونی روبشی با بزرگنمایی مورد نظر تهیه شدند. پوشش‌دهی طلا (قبل از رویت زیر میکروسکوپ) نیز به مدت ۱۰ دقیقه به وسیله دستگاه لایه‌گذاری انجام شد. جهت بررسی ریخت شناسی سلول‌ها ابتدا باید سلول‌ها روی سطح تثبیت شوند. بدین منظور از محلول تثبیت کننده شامل ۱۰ درصد فرمالدئید ۳۷ درصد، آب دیونیزه، دی‌سدیم هیدروژن فسفات (Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>) و سدیم‌دی هیدروژن فسفات (NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>) به مدت ۳۰ دقیقه استفاده شد. از پس از تثبیت عملیات آب‌گیری با استفاده از غلظت‌های سریالی اتانول (۶۰، ۷۰، ۸۰، ۹۰، ۹۸ و ۱۰۰ درصد) انجام شد و نمونه‌ها در دمای محیط خشک شدند.

#### تمایز عصبی سلول‌های DPSC

۵ یا ۶ روز پس از کشت سلول در محیط کشت مزانشیمی زمانی که سلول‌ها به تراکم مورد نظر رسیدند، محیط کشت مزانشیمی با محیط تمایز عصبی (NB + 1% Pen/Strep + 1% NEAA + 1% L-Glu + 1% ITS حاوی bFGF (100 ng/ml) (رویاب بیوتک، ایران) تعویض یافت. پس از گذشت ۶ روز فاکتورهای رشد shh (100ng/ml) (رویاب بیوتک، ایران) و FGF8b (10ng/ml) (Sigma، آلمان) نیز به مدت ۶ روز به محیط تمایزی اضافه شدند. طی دوره تمایز نیمی از محیط کشت سلول‌ها هر سه روز یکبار تعویض شد. پس از گذشت دوره ۱۲ روزه تمایز سلول‌ها با پارافرمالدئید ۴ درصد جهت رنگ‌آمیزی ایمونوفلورسنت تثبیت شدند.

#### رنگ‌آمیزی ایمونوفلورسنت

در رنگ‌آمیزی ایمونوفلورسنت از نشانگر هسته ای DAPI (Sigma، آلمان) که به DNA هسته سلول‌ها متصل

کشت سلول شامل محیط کشت، سرم و آنتی بیوتیک‌ها از شرکت Gibco، کشور انگلستان خریداری شدند.

#### کشت سلول‌های DPSCs

به منظور کشت سلول‌های DPSC جهت آزمون‌های سلولی از محیط کشت معمول مزانشیمی استفاده شد. پس از استریل کردن داربست‌ها میزان ۵۰۰۰۰ سلول روی سطح هر داربست در ظروف ۲۴ خانه کشت شد.

#### بررسی فعالیت متابولیسی سلول‌ها روی داربست‌ها (MTS assay)

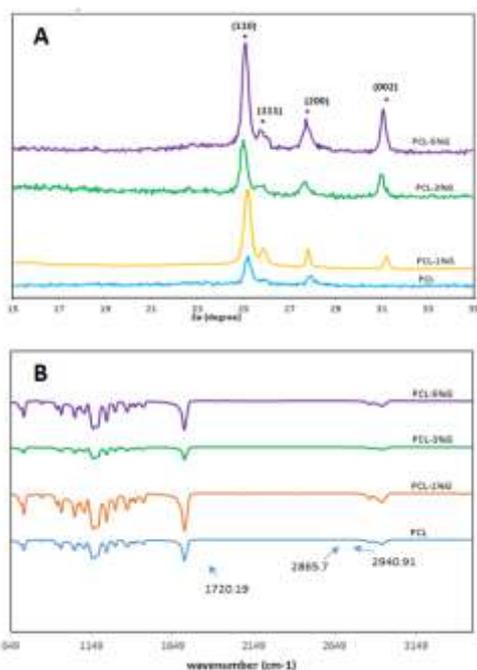
به منظور بررسی فعالیت متابولیسی و میزان تکثیر سلول‌ها روی داربست‌های مختلف از کیت MTS ساخت شرکت Promega (امریکا) استفاده شد. به این صورت که محلول MTS در حضور فنازین متوسولفات (PMS)، فورموزانی تولید می‌کند که در محلول فسفات بافر در محدوده ۴۹۰ تا ۵۰۰ نانومتر، توسط دستگاه اسپکتوفوتومتری جذب نوری آن خوانده می‌شود. به این منظور آزمون MTS در روزهای ۱، ۴ و ۷ پس از کشت سلول انجام گرفت. روش انجام بدین صورت است که پس از یک مرحله شستشو با PBS منفی سلول‌ها به همراه محلول MTS حاوی محیط کشت کامل به نسبت ۱:۶، به مدت ۳ تا ۴ ساعت در انکوباتور دور از نور قرار گرفتند. در نهایت جذب نوری محلول MTS روی سلول‌ها توسط دستگاه الیزا در طول موج ۴۹۰ نانومتر خوانده شد.

#### میکروسکوپ الکترونی روبشی (SEM)

به منظور بررسی ریخت شناسی و رفتاری سلول‌ها از میکروسکوپ الکترونی روبشی مستقر در مرکز پژوهش متالورژی رازی (SEM, VEGA, TESCAN, Czech Republic) استفاده شد. به طور خلاصه پس از قراردادن

### بررسی طیف FTIR غشاهای کامپوزیتی

در این پژوهش از طیف سنجی FTIR برای تشخیص برهم کنش‌های احتمالی بین ذرات نانو گرافن و پلیمر استفاده شده است. به‌طور کلی طیف جذبی پلی کاپرولاکتون دارای سه پیک شاخص در اعداد موج  $1720$ ،  $2865$ ،  $2940$   $\text{cm}^{-1}$  می‌باشد، که به ترتیب نشان دهنده وجود ارتعاش کششی پیوندهای  $\text{CH}_2$ - و ارتعاش پیوندهای  $\text{C}=\text{O}$  می‌باشد. در مقایسه با پلی کاپرولاکتون خالص این سه پیک در طیف‌های مربوط به نمونه‌های پلی کاپرولاکتون/گرافن نیز دیده می‌شود ( **Error!** Reference source not found). بنابراین هیچ تفاوتی بین طیف غشای پلیمر خالص و غشاهای مرکب حاوی نانوگرافن دیده نمی‌شود، بدین معنی که پلیمر PCL با گرافن برهمکنش فیزیکی داشته است.



شکل ۱: (A) الگوهای پراش اشعه ایکس، (B) طیف های جذبی FTIR غشاهای مرکب قالب گیری شده

### بررسی میزان آبدوستی غشاهای کامپوزیتی

پس از ساخت داربست‌ها (شکل ۲- A) میزان آبدوستی

می‌شود، به‌عنوان نشانگر هسته‌ای سلول‌ها و از آنتی‌بادی اولیه MAP2<sup>(3)</sup> Microtubule-associated protein2 (Chemicon، امریکا) به‌عنوان (نشانگر اختصاصی تمایز عصبی استفاده شد. به این منظور پس از تثبیت سلول‌ها به مدت ۱ شبانه روز با آنتی بادی اولیه با غلظت  $1:300$  در دمای  $4$  درجه سانتی‌گراد قرار گرفتند و سپس به مدت یک ساعت با آنتی بادی ثانویه ( Goat anti mouse IgG-FITC, 1:600, Millipore) در دمای  $37$  درجه سانتی‌گراد در انکوباتور قرار گرفتند. در نهایت رنگ آمیزی هسته به مدت  $10$  دقیقه در دمای محیط انجام گرفت.

### آنالیز آماری

به‌منظور بررسی آماری نتایج، ابتدا داده‌ها با استفاده از شاخص میانگین و همچنین انحراف معیار توصیف گردیدند. سپس برای مقایسه داده‌های بیش از دو گروه از آزمون آماری One-Way ANOVA (آنالیز واریانس یکطرفه) در سطح معنی‌داری  $95$  درصد استفاده شد. آنالیز آماری با استفاده از نرم افزار SPSS انجام گرفت.

### نتایج

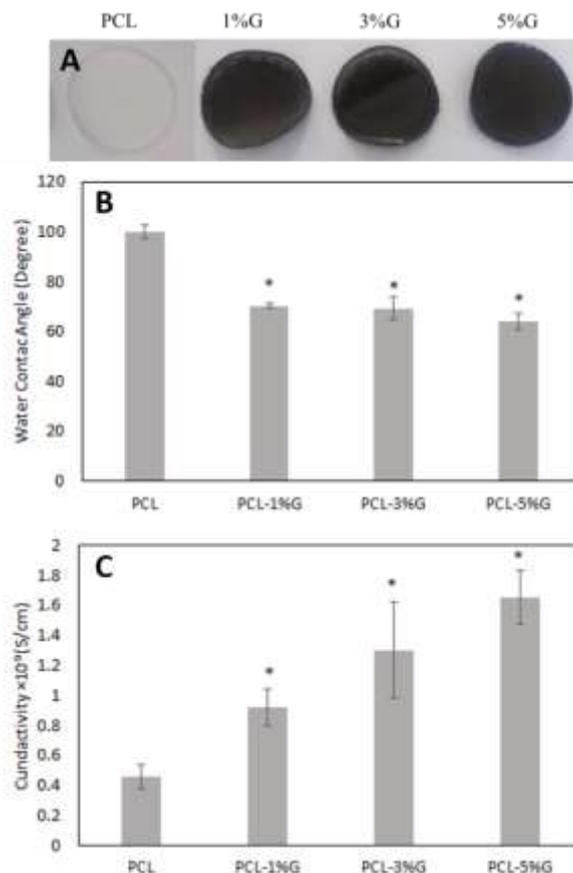
#### بررسی الگوی پراش اشعه ایکس غشاهای نانو کامپوزیتی

ساختار بلورین غشاهای کامپوزیتی توسط الگوی پراش اشعه ایکس مورد مطالعه قرار گرفت که نتایج آن در شکل ۱- A نشان داده شده است. به‌طور کلی مشاهده می‌شود که پیک شاخص صفحه‌های گرافن  $31/84$  آنگستروم قرار دارد که با افزایش درصد گرافن در غشاها شدت آن افزایش یافته است، همچنین الحاق گرافن تغییری در ساختار بلوری پلیمر ایجاد نکرده است. از طرفی تشابه بین الگوی پراش غشاهای مرکب با درصد‌های متفاوت نانوگرافن، نشان‌دهنده این است که غشاها ساختار بلوری مشابه دارند.

### بررسی هدایت الکتریکی غشاهای کامپوزیتی

شکل ۲-C نتایج اندازه گیری هدایت الکتریکی داربست‌های مختلف را نشان می‌دهد، به‌طور کلی با افزایش درصد گرافن در پلیمر هدایت الکتریکی غشاها نیز افزایش یافته است. مقدار هدایت الکتریکی داربست‌ها بر اساس رابطه  $\sigma = G.L / A$  اندازه‌گیری شد (۱۱). در این رابطه  $\sigma$  معرف رسانایی بر حسب  $S.cm^{-1}$ ،  $L$  معرف فاصله بین دو الکترود بر حسب  $cm$ ،  $A$  معرف مساحت مقطع عرضی غشا بر حسب  $cm^2$  و  $G$  معرف مقدار معکوس مقاومت الکتریکی غشا بر حسب زیمنس ( $S$ ) است. در این مرحله با توجه به نتایج مشخصه یابی داربست‌ها، غشاء PCL-5%G برای مطالعات سلولی بعدی انتخاب شد.

سطح آن‌ها با استفاده از دستگاه اندازه‌گیری زاویه تماس بررسی شد. نتایج نشان داده شده در شکل ۲-B نشان دادند که زاویه‌ی تماس آب با سطح این داربست‌ها به‌ترتیب در پلی‌کاپرولاکتون، پلی‌کاپرولاکتون-۱ درصد گرافن، پلی‌کاپرولاکتون ۳ درصد گرافن و پلی‌کاپرولاکتون ۵ درصد گرافن برابر با  $99/89 \pm 2/86$ ،  $70/28 \pm 1/20$ ،  $64/03 \pm 3/36$  و  $69/23 \pm 4/62$  درجه می‌باشد. به این معنی که به‌طور کلی با افزایش میزان نانوگرافن در داربست‌ها، میزان ترشوندگی نیز افزایش یافته است.



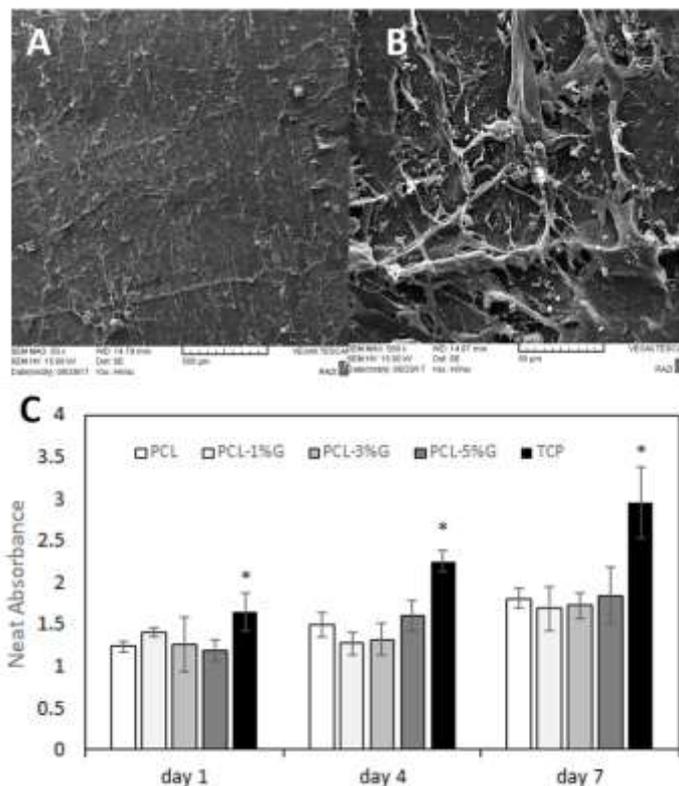
شکل ۲: (A) تصاویر غشاهای مرکب قالب گیری شده، (B) نتایج آزمون اندازه‌گیری زاویه تماس قطره، (C) نتایج آزمون اندازه‌گیری هدایت الکتریکی. علامت \* نشان دهنده اختلاف معنی‌دار نتایج در مقایسه با گروه کنترل (PCL) می‌باشد ( $p \leq 0.05$ ).

### بررسی ریخت شناسی و رفتار متابولیکی سلول‌ها روی غشاهای کامپوزیتی

به منظور بررسی تاثیر خصوصیات فیزیکی و شیمیایی داربست‌ها روی رفتار چسبندگی سلول‌ها از تصویربرداری SEM استفاده شد (شکل‌های A-3 و B-3). همان‌طور که در تصاویر مشخص است یک هفته پس از کشت، سلول‌ها روی سطح داربست ایده‌ال PCL-5%G چسبندگی، پهن‌شدگی و رشد مطلوبی از خود نشان داده‌اند و استحاله‌های سلولی آن‌ها نیز به خوبی مشخص است.

به منظور بررسی زنده‌مانی، فعالیت متابولیکی و تکثیر

سلول‌ها روی داربست‌های مرکب نیز از آزمون MTS استفاده شد (شکل 3-C). با توجه به نتایج جذب در روزهای مختلف اگرچه فعالیت متابولیکی سلول‌ها روی سطح ظرف کشت سلول معولی افزایش معنی‌داری نسبت به داربست‌ها دارد، اما روند افزایشی و غیرسمی بودن داربست‌ها نیز حائز اهمیت است. این روند افزایشی نشان دهنده این است که داربست‌های پلی‌کاپرولاکتون/گرافن می‌توانند بستر مناسبی جهت چسبندگی، بقا، رشد و مهاجرت سلولی باشند.

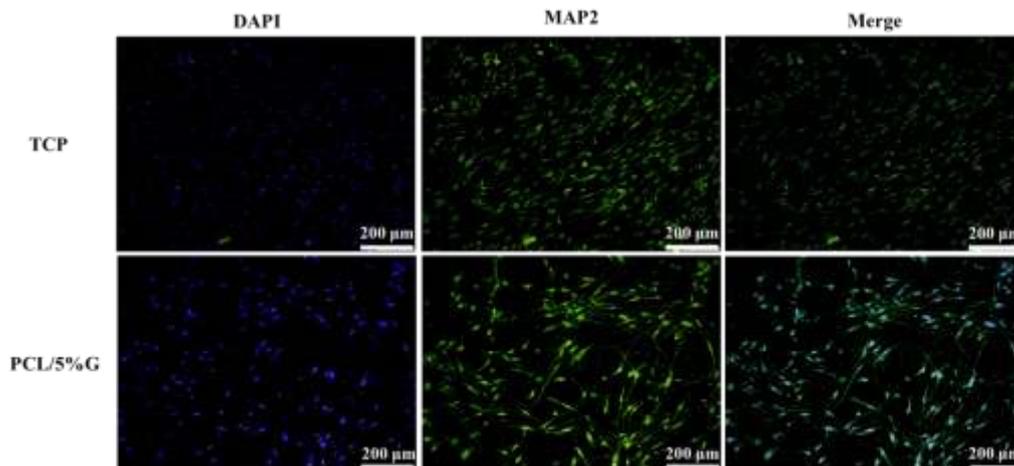


شکل 3: (A و B) تصاویر میکروسکوپ الکترونی روبشی از سلول‌های DPSC کشت شده روی سطح غشا PCL-5%G در دو بزرگ‌نمایی (B و A). (C) نتایج آزمون بررسی فعالیت متابولیکی سلول‌ها (MTS assay). علامت \* نشان دهنده اختلاف معنی‌دار نتایج در 500 و 50 میکرومتر، مقایسه با گروه کنترل (PCL) می‌باشد ( $p \leq 0.05$ ).

### بررسی تمایز عصبی سلول‌ها روی غشاهای کامپوزیتی

طبق تصاویر به‌دست آمده از رنگ آمیزی ایمنوفلورسانس سلول‌های کشت شده روی سطح داربست PCL-5%G، مشاهده می‌شود که سلول‌ها علاوه بر اینکه نسبت به

مارکر عصبی MAP2 مثبت بودند، مورفولوژی شبه نورونی نیز از خود نشان دادند (شکل ۴). از طرفی روی سطح غشاهای مرکب سلول‌ها در یک جهت رشد یافته اند که می‌تواند به دلیل وجود لایه‌های نانوگرافن باشد.



شکل ۴: تصاویر رنگ آمیزی فلورسنت سلول‌های بنیادی پالپ دندان کشت داده شده روی سطح داربست PCL-5%G پس از ۱۲ روز.

### بحث

آسیب‌های سیستم عصبی به‌خصوص آسیب‌های طناب نخاعی و اعصاب محیطی یکی از مهمترین مسائل در زمینه پژوهش‌های درمانی است که از دیرباز توجهات بسیاری را به‌خود جلب کرده‌اند. با توجه به این مساله که بافت عصبی قابلیت خود ترمیمی بسیار کمی دارد، اغلب درمان‌های متداول به جایگزینی بافت با استفاده از پیوند معطوف شده است. معایب درمان‌های وابسته به پیوند مانند آسیب به ارگان‌های دیگر، رد پیوند و انتقال بیماری‌ها استفاده از این روش‌ها را محدود کرده و توجه زیادی را به راه‌کارهای مهندسی بافت معطوف کرده‌است (۱۲). تا کنون تحقیقات بسیاری روی بیومتریال‌های مختلف و روش‌های سلولی برای درمان آسیب‌های عصبی صورت گرفته است.

در این میان مطالعات متعددی به استفاده از لایه‌های کربنی گرافن جهت القاء تمایز عصبی به‌علت هدایت الکتریکی بالا، پایداری شیمیایی مناسب و زیست سازگاری بالای آن‌ها بسیار پرداخته اند (۱۳-۱۵). همچنین ذکر شده است که دیگر خواص گرافن مانند الاستیسیته بالا و قابلیت جذب پروتئین‌های سبک، نیز می‌تواند تمایز سلول‌های بنیادی و رشد و تکثیر سلول‌های عصبی را بهبود بخشد (۱۶، ۱۷).

بدین ترتیب در این پژوهش طراحی و کاربرد غشاهای کامپوزیتی پلی کاپرولاکتون/گرافن مورد بررسی قرار گرفته‌اند. جز پلیمری به‌کار رفته به‌منظور افزایش خواص مکانیکی داربست به‌ویژه جهت کاربرد در مطالعات درون تنی بعدی انتخاب شده است. برهم‌کنش بین ذرات نانوگرافن و پلی کاپرولاکتون به‌صورت فیزیکی بوده است که این مطلب با توجه به نتایج الگوی پراش اشعه ایکس و طیف‌های FTIR به‌دست آمده قابل اثبات می‌باشد (شکل

۱). بدیهی است که چنانچه برهم کنش شیمیایی در سطح مشترک پلیمر و نانوگرافن رخ می داد تغییرات پیک‌های جذبی FTIR و تغییرات میزان بلورینگی می‌بایست مشاهده شود. برهم‌کنش‌های شیمیایی عموماً در اثر افزودن اکسید گرافن به پلیمرها گزارش شده است و در مورد گرافن به‌علت عدم وجود گروه فعال شیمیایی چنین مواردی مشاهده نمی‌شود. به‌عنوان مثال وان و همکاران (۱۸) گزارش کرده اند که افزودن گرافن اکسید به پلی کاپرولاکتون منجر به ایجاد پیوند هیدروژنی بین دو ماده می‌شود و ساختار شیمیایی ترکیب حاصله را دچار تغییر می‌کند.

یکی از موارد مهم موثر در چسبندگی سلولی آبدوستی سطح موردنظر می‌باشد به‌صورتی که هر چقدر سطح داربست آبدوست‌تر باشد زاویه تماس قطره آب کوچکتر و چسبندگی سلول‌ها بهتر خواهد شد (۹). شاپان ذکر است که البته آبدوستی یک بستر کشت سلول باید میزان بهینه‌ای داشته باشد و آبدوستی بیش از حد هم منجر به جداسدن سلول‌ها از سطح می‌شود. گزارش شده است که میزان بهینه زاویه تماس قطره آب برای چسبندگی موثر سلول‌ها به یک سطح حدود ۴۰ تا ۷۰ درجه سانتی‌گراد می‌باشد (۱۹). در این پژوهش با افزودن نانوگرافن به پلیمر آبدوستی آن به‌صورت معنی‌داری در مقایسه با پلیمر خالص افزایش یافته است و هرچقدر درصد نانوگرافن اضافه شده افزایش یافته است، کاهش زاویه تماس قطره آب نیز بیشتر شده است (شکل ۲- B). با توجه به مقداری زاویه تماس قطره به‌دست آمده نمونه حاوی ۵ درصد گرافن به‌نظر می‌رسد در محدوده بهینه آبدوستی برای چسبیدن سلول‌ها قرار دارد. علت افزایش آبدوستی پلی کاپرولاکتون پس از افزودن گرافن را می‌توان به افزایش زبری سطح و رسانایی الکتریکی آن نسبت داد (۲۰).

عامل موثر دیگر در طراحی داربست‌های مهندسی بافت

عصب، رسانایی داربست می‌باشد. گرافن با توجه به هدایت الکتریکی بالایی که دارد هدایت سیگنال‌های الکتریکی موثر در تمایز را تسهیل می‌کند و منجر به القای تمایز عصبی می‌شود (۱۴). در این پژوهش هم با افزایش مقدار ماده رسانای گرافن، رسانایی داربست‌ها افزایش داشته به‌طوری‌که با افزودن گرافن به پلیمر خالص هدایت الکتریکی آن حدود ۱۰۴ برابر شده است (شکل ۲-C) به‌طوری‌که سیار و همکاران (۸) نیز در مطالعات خود روی کامپوزیت پلی-کاپرولاکتون/گرافن به هدایت الکتریکی مشابه دست یافتند. بنابراین از لحاظ هدایت الکتریکی نیز غشاهای ساخته شده با ۵ درصد گرافن می‌توانند پیشنهاد مناسبی برای کاربردهای مهندسی بافت عصب باشند. بنابراین از میان نمونه‌های مرکب ساخته شده، غشای مرکب حاوی ۵ درصد گرافن برای مطالعات سلولی انتخاب شد.

همان‌طور که در شکل‌های ۳-A و ۳-B مشخص است سلول‌ها روی سطح داربست چسبندگی، پهن‌شدگی و رشد مطلوبی را از خود نشان داده‌اند و استحاله‌های سلولی به‌خوبی مشخص است. با توجه به نتایج MTS assay نیز (شکل ۳-C)، مشاهده می‌شود که اگر چه فعالیت متابولیکی سلول‌ها روی سطح ظروف کشت سلول معمولی نسبت به داربست‌ها طی یک هفته کشت سلول بیشتر بوده است اما روند افزایشی فعالیت متابولیکی سلول‌ها طی زمان در سایر گروه‌ها نیز دیده می‌شود. این روند افزایشی نشان دهنده این است که غشاهای پلی‌کاپرولاکتون/گرافن می‌توانند بستر مناسبی جهت چسبندگی، بقا، رشد و مهاجرت سلول‌ها باشند و اثر سمیتی روی سلول‌های DPSC ندارند. به‌طور کلی گزارش‌های ضد و نقیضی در زمینه سمیت سلولی ترکیبات گرافن وجود دارد که وابسته به روش ساخت گرافن و ماهیت سلول‌های به‌کار رفته هستند. اما در اکثر مقالات گزارش شده است که ترکیبات گرافنی روی رفتار سلولی (چسبندگی، تکثیر و تمایز) به‌صورت مثبت تاثیر گذار

هستند که عمدتاً به علت ساختار اتمی این ترکیبات است. به عنوان نمونه حلقه‌های آروماتیک موجود در ساختار گرافن می‌تواند تجمع پروتئین‌های ماده زمینه خارج سلولی مانند لامینین و فیبرونکتین را توسط پیوندهای غیرکووالانسی افزایش دهد (۲۱). همچنین این حلقه‌ها می‌توانند به عنوان یک نقطه اتصال برای گیرنده‌های سطح سلولی عمل کنند (۲۲).

مقالات متعددی پتانسیل بالای ترکیبات گرافنی جهت القای تمایز عصبی را گزارش کرده اند (۱۴، ۱۵، ۲۲-۲۵). به طور کلی نانوگرافن از سه طریق تمایز عصبی سلول‌های بنیادی را بهبود می‌بخشد:

به طور کلی ویژگی‌های سطحی منحصر به فرد گرافن می‌تواند در تمایز مستقیم سلول‌های بنیادی به رده‌های مختلف موثر باشد (۱۴).

ساختار سه بعدی داربست‌های مرکب ریز محیطی فراهم می‌آورد که می‌تواند شرایط درون تنی بدن موجود زنده را شبیه سازی کند (۱۴، ۲۶).

عامل سوم که مهم‌ترین عامل نیز می‌باشد، رسانایی الکتریکی گرافن است. از آنجایی که سلول‌های عصبی با تحریک الکتریکی فعال می‌شوند و برای مهاجرت، تکثیر و تمایز به انتقال بار الکتریکی نیاز دارند، ترکیبات رسانا می‌توانند تاثیر زیادی در القای تمایز عصبی در آن‌ها داشته باشند (۲۷).

یکی از مزایای قابل توجه گرافن در مقایسه با پلیمرهای رسانا برای ساخت داربست‌های مهندسی بافت عصب این است که رسانایی گرافن در شرایط محیطی مختلف تقریباً پایدار باقی می‌ماند (۱۴). در این پژوهش از گرافن به عنوان جزء رسانا در ساختار یک پلیمر عایق استفاده شده است تا از قابلیت انتقال بار الکتریکی ترکیب حاصله به منظور القای تمایز عصبی روی سلول‌های DPSC استفاده شود. بدیهی است که استفاده از جز پلیمری نه تنها قابلیت شکل‌گیری و

انعطاف پذیری داربست را افزایش می‌دهد بلکه روی خواص مکانیکی آن نیز تاثیر گذار است. به علاوه گزارش شده است که در مواردی ساختار صفحه‌ای صاف گرافن انتقال بار الکتریکی را محدود کرده است، بنابراین استفاده از ترکیب گرافن با یک زیست پلیمر دیگر می‌تواند این مشکل را رفع کند (۲۸). در این پژوهش تصاویر ایمونوفلورسنت سلول‌های رنگی آمیزی شده با نشانگر عصبی MAP2 نشان دادند که سلول‌های DPSC کشت شده روی داربست PCL-5%G نسبت به این نشانگر مثبت بودند و مورفولوژی شبه نرونی را نیز از خود نشان دادند (شکل ۴). به علاوه در غشاهای نانو کامپوزیتی می‌توان جهت‌گیری سلول‌های عصبی را نیز تا حدی مشاهده کرد. منابع متعددی وجود دارند که در آن‌ها داربست‌های که قادر به القای آرایش یافتگی در سلول‌ها هستند را برای کاربرد در مهندسی بافت عصب مناسب می‌دانند (۷، ۱۲). اگرچه پروتئین MAP2 یکی از نشانگرهای اساسی در بررسی تمایز عصبی می‌باشد، اما بررسی‌های دقیق تر در سطح mRNA و پروتئین برای نشانگرهای اختصاصی دیگر مانند NF (Neurofilament) نیز پیشنهاد می‌شود.

همچنین در مطالعات بعدی استفاده از سلول‌های پیش‌ساز عصبی و پیوند داربست‌ها در مدل موش صحرایی برای مطالعات درون تنی تمایز نیز پیشنهاد می‌شود.

### نتیجه‌گیری

با توجه به اهمیت استفاده از مواد رسانا در ساخت داربست‌های مهندسی بافت عصب، در این مطالعه غشاهای نانو کامپوزیتی پلی-کاپرولاکتون/گرافن مورد بررسی قرار گرفتند. غشاهای نانو کامپوزیتی با زمینه پلی کاپرولاکتون تقویت شده با نانوصفحه‌های گرافن با مقادیر ۰-۵ درصد وزنی گرافن توسط روش ریخته‌گری حلالی ساخته شدند. طیف‌های حاصل از طیف‌سنجی اشعه مادون قرمز و الگوی پراش اشعه ایکس برهمکنش فیزیکی بین پلیمر و ذرات نانوگرافن را نشان دادند. در

differentiation. *Biomaterials*. 2012; 33(2): 418-27.

4. Allen MJ, Tung VC, Kaner RB. Honeycomb carbon: a review of graphene. *Chemical reviews*. 2009; 110(1): 132-45.

5. Chen H, Müller MB, Gilmore KJ, Wallace GG, et al. Mechanically strong, electrically conductive, and biocompatible graphene paper. *Advanced Materials*. 2008; 20(18): 3557-61.

6. Jorge IRD, Bimeng Z, Daniel R, Zhi-dong S, et al. High throughput miniature drug-screening platform using bioprinting technology. *Biofabrication*. 2012; 4(3): 035001.

7. Masaeli E, Wieringa PA, Morshed M, Nasr-Esfahani MH, et al. Peptide functionalized polyhydroxyalkanoate nanofibrous scaffolds enhance Schwann cells activity. *Nanomedicine: nanotechnology, biology and medicine*. 2014; 10(7): 1559-69.

8. Sayyar S, Murray E, Thompson BC, Gambhir S, et al. Covalently linked biocompatible graphene/polycaprolactone composites for tissue engineering. *Carbon*. 2013; 52(29): 304-6.

9. Rosa V, Xie H, Dubey N, Madanagopal TT, et al. Graphene oxide-based substrate: physical and surface characterization, cytocompatibility and differentiation potential of dental pulp stem cells. *Dental Materials*. 2016; 32(8): 1025-19.

10. Zhang J, Lian M, Cao P, Bao G, et al. Effects of nerve growth factor and basic fibroblast growth factor promote human dental pulp stem cells to neural differentiation. *Neurochemical research*. 2017; 42(4): 1015-25.

11. Flores-Cedillo M, Alvarado-Estrada K, Pozos-Guillén A, Murguía-Ibarra J, et al. Multiwallcarbon anotubes/polycaprolactone scaffolds seeded with human dental pulp stem cells for bone tissue regeneration. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*. 2016; 27(2): 35.

12. Masaeli E, Morshed M, Nasr-Esfahani MH, Sadri S, et al. Fabrication, characterization and cellular compatibility

آزمون هدایت سنجی نیز افزایش هدایت الکتریکی به ازای افزایش مقدار وزنی گرافن دیده شد. با انجام مطالعات تکمیلی روی غشاها و مقایسه خواصی همچون زاویه تماس و آزمون سمیت سلولی، با سلول‌های بنیادی پالپ دندان، مشاهده شد که افزودن گرافن به پلی کاپرولاکتون می‌تواند موجب افزایش آبدوستی داربست و پاسخ سلولی مناسب‌تری نسبت به پلیمر خالص شود که این مطلب توسط تصاویر میکروسکوپ الکترونی رویشی از غشاهای حاوی سلول نیز مجدداً تایید شد. همچنین تمایز عصبی و مورفولوژی عصبی سلول‌ها پس از گذشت دوره تمایز توسط رنگ‌آمیزی ایمونوفلورسنت و تصاویر حاصل از میکروسکوپ فلورسانس تایید شد. بنابر مطالعات انجام شده در این پژوهش، غشای نانو کامپوزیتی رسانای پلی-کاپرولاکتون/۵ درصد گرافن (PCL-5%G) برای کاربردهای مهندسی بافت عصب به‌عنوان داربست پیشنهاد می‌شود.

#### تشکر و قدردانی

نویسندگان این پژوهش از حمایت‌های دانشگاه اصفهان و پژوهشکده زیست فناوری پژوهشگاه رویان تشکر و قدردانی می‌کنند.

#### منابع

1. Bini T, Gao S, Xu X, Wang S, et al. Peripheral nerve regeneration by microbraided poly (Llactideoglycolide) biodegradable polymer fibers. *Journal of Biomedical Materials Research Part A*. 2004; 68(2): 286-95.

2. Chang CJ, Hsu SH. The effects of low-intensity ultrasound on peripheral nerve regeneration in poly (DL-lactic acid-co-glycolic acid) conduits seeded with Schwann cells. *Ultrasound in medicine & biology*. 2004; 30(8): 1079-84.

3. Chen GY, Pang DP, Hwang SM, Tuan HY, et al. Graphene-based platform for induced pluripotent stem cells culture and of poly (hydroxy alkanoate) composite nanofibrous scaffolds for nerve tissue engineering. *PLoS one*. 2013; 8(2): e57157.

13. Akhavan O. Graphene scaffolds in progressive nanotechnology/stem cell-based

- tissue engineering of the nervous system. *Journal of Materials Chemistry B*. 2016; 4(19): 3169-90.
14. Li N, Zhang Q, Gao S, Song Q, et al. Three-dimensional graphene foam as a biocompatible and conductive scaffold for neural stem cells. *Scientific reports*. 2013; 3: 1604.
15. Shah S, Yin PT, Uehara TM, Chueng STD. Guiding Stem Cell Differentiation into Oligodendrocytes Using Graphene Nanofiber Hybrid Scaffolds. *Advanced materials*. 2014; 26(22): 3673-80.
16. Shin SR, Li Y-C, Jang HL, Khoshakhlagh P, et al. Graphene-based materials for tissue engineering. *Advanced drug delivery reviews*. 2016; 1(74): 255-74.
17. Bressan E, Ferroni L, Gardin C, Sbricoli L, et al. Graphene based scaffolds effects on stem cells commitment. *Journal of translational medicine*. 2014; 12(1): 296.
18. Wan C, Chen B. Reinforcement and interphase of polymer/graphene oxide nanocomposites. *Journal of Materials Chemistry*. 2012; 22(8): 3637-46.
19. Arima Y, Iwata H. Effect of wettability and surface functional groups on protein adsorption and cell adhesion using well-defined mixed self-assembled monolayers . *Biomaterials*. 2007; 28(20): 3074-82.
20. Yoo BM, Shin HJ, Yoon HW, Park HB. Graphene and graphene oxide and their uses in barrier polymers. *Journal of Applied Polymer Science*. 2014; 131(1): 39628–39650.
21. Wang Y, Lee WC, Manga KK, Ang PK, et al. Fluorinated graphene for promoting neuroinduction of stem cells. *Advanced Materials*. 2012; 24(31): 4285-90.
22. Park SY, Park J, Sim SH, Sung MG, et al. Enhanced differentiation of human neural stem cells into neurons on graphene. *Advanced Materials*. 2011; 23(36): H263-H7.
23. Li N, Zhang X, Song Q, Su R, Zhang Q, Kong T, et al. The promotion of neurite sprouting and outgrowth of mouse hippocampal cells in culture by graphene substrates. *Biomaterials*. 2011; 32(35): 9374-82.
24. Tang M, Song Q, Li N, Jiang Z, et al. Enhancement of electrical signaling in neural networks on graphene films. *Biomaterials*. 2013; 34(27): 6402-11.
25. Akhavan O, Ghaderi E, Abouei E, Hatamie S, et al. Accelerated differentiation of neural stem cells into neurons on ginseng-reduced graphene oxide sheets. *Carbon*. 2014; 66: 395-406.
26. Masaeli E, Morshed M, Rasekhian P, Karbasi S, et al. Does the tissue engineering architecture of poly (3- hydroxybutyrate) scaffold affects cell-material interactions? *Journal of Biomedical Materials Research Part A*. 2012; 100(7): 1907-18.
27. Ghasemi Mobarakeh L, Prabhakaran MP, Morshed M, Nasr Esfahani MH, et al. Application of conductive polymers, scaffolds and electrical stimulation for nerve tissue engineering. *Journal of tissue engineering and regenerative medicine*. 2011; 5(4): e17-e35.
28. Wang K, Fishman HA, Dai H, Harris JS. Neural stimulation with a carbon nanotube microelectrode array. *Nano letters*. 2006; 6(9): 2043-8.

## Polycaprolactone/nano-graphene composite scaffolds for neural differentiation of dental pulp stem cells

Khebreh-Kashani Z, M.Sc<sup>1</sup>, Ebrahimian-Hosseiniabadi M, Ph.D.<sup>1\*</sup>, Masaeli E, Ph.D.<sup>2\*</sup>, Nasr-Esfahani MH, Ph.D.<sup>2</sup>

1. Department of Biomedical Engineering, Faculty of Engineering, University of Isfahan, Isfahan, Iran
2. Department of Cellular Biotechnology, Cell Science Research Center, Royan Institute for Biotechnology, ACECR, Isfahan, Iran

\* Email corresponding author: m.ebrahimian@eng.ui.ac.ir , elahe.masaeli@royaninstitute.org

Received: 2 Sep. 2018

Accepted: 24 Nov. 2018

---

### Abstract

**Aim:** In this research, design and fabrication of graphene reinforced nano-composite scaffolds for neural induction in dental pulp stem cells (DPSCs) has been considered.

**Material and methods:** Polycaprolactone / nano-graphene composite scaffolds with 1%, 3% and 5% wt. graphene were firstly fabricated by the solvent casting method. Subsequently, hydrophilicity and electrical conductivity of the nano-composites were measured. According to the results of the mentioned physical experiments, the appropriate scaffold with the optimal ratio of nano-graphene was selected and cellular morphology, metabolic activity and neural differentiation potential of cultured DPSCs on it were evaluated by scanning electron microscopy (SEM), MTS assay and Immunofluorescent staining, respectively.

**Results:** Conductivity results demonstrated that by adding graphene to pure polymer, the electrical conductivity of the composite considerably increased. The addition of 5% wt. nano-graphene to the polymer can also reduce contact angle amount from  $99.89 \pm 2.86^\circ$  to  $64.03 \pm 3.36^\circ$ . Finally, SEM and Immunofluorescence images with MAP2 marker illustrated that the cultured cells on the surface of optimum scaffold differentiated into neuron-like cells with neural morphology.

**Conclusion:** The results of this study showed that conductive polycaprolactone containing 5% graphene nano-composite scaffolds have the appropriate potential for induction of neural differentiation and application in neural tissue engineering.

**Keywords:** Tissue Engineering; Graphene, Dental Pulp Stem Cells; Neural Differentiation; Polycaprolactone