

ساخت و مشخصه‌یابی فوم گرافینی و استفاده از آن برای تحریک الکتریکی سلول‌های بنیادی عصبی انسان

فرهاد جهان تیغ^۱ M.Sc.*، حسن نعناکار^۲ Dr.، سید محمدباقر قریشی^۱ Dr.

۱- دانشگاه پدافند هوایی خاتم‌الانبیاء(ص)، دانشکده علوم پایه، گروه فیزیک

۲- دانشگاه کاشان، دانشکده فیزیک

* پست الکترونیک نویسنده مسئول: f.jahantigh@yahoo.com

تاریخ پذیرش: ۱۳۹۵/۱۰/۷

تاریخ دریافت: ۱۳۹۵/۴/۱۳

چکیده

هدف: در این پژوهش از بستر زیست‌سازگار فوم گرافینی سه‌بعدی جهت کشت سلول‌های بنیادی عصبی انسان استفاده شده است.

مواد و روش‌ها: فوم گرافینی برای اولین بار توسط ته نشینی صفحه‌های اکسید گرافینی بر روی زیر لایه‌ای از جنس پلی‌اتیلن ترفتالات (PET) تحت اشعه‌ی فرابنفش و دمای ۸۰ درجه سانتی‌گراد ساخته شده است و روش ساخت صفحه‌های اکسید گرافینی روش بهبود یافته هامرز است.

نتایج: با استفاده از میکروسکوپ الکترونی روبشی ضخامت فوم‌های ساخته شده در حدود ۱۰ تا ۵۰ میکرومتر اندازه‌گیری شد که در هر میکرومتر از آن‌ها حدود ۱۰ لایه‌ی اکسید گرافینی وجود دارد. همچنین میکروسکوپ نیروی اتمی وجود گرافین تک لایه با ضخامت ۱/۴ نانومتر را در محلول اکسید گرافین نشان می‌دهد. طیف سنجی فوتو الکترون پرتوی ایکس احیای جزئی فوم اکسید گرافینی را طی مراحل ساخت تایید می‌کند. طیف سنجی رامان نیز وجود صفحه‌های اکسید گرافینی چند لایه را در ساختار فوم نشان می‌دهد. با استفاده از آزمون کششی، مدول یانگ این فوم‌ها در بهترین حالت حدود ۱/۷ GPa به دست آمد. علاوه بر این، مقاومت سطحی الکتریکی فوم‌ها با استفاده از روش پروب چهار نقطه‌ای در حدود 17-24 Ω /sq اندازه‌گیری شد.

نتیجه‌گیری: با توجه به روش پروب چهار نقطه‌ای مشخص شد این مقاومت الکتریکی برای فراهم کردن جریان الکتریکی در حدود ۲۰ mA تحت ولتاژهایی پایین‌تر از ۰/۵ V به‌منظور تحریک الکتریکی سلول‌های بنیادی عصبی و تمایز آن‌ها به‌سمت نورون‌ها (به نسبت سلول‌های گلیال) مناسب است. تست زاویه‌ی تماس نیز نشان داد که سطح مقطع فوم اکسید گرافینی پیچانده شده خاصیت فرا آبدوستی دارد که به القای تکثیر و تمایز موثر سلول‌های بنیادی عصبی در سرتاسر تخلخل و سطوح داربست کمک می‌کند. تصاویر فلورسانس نیز نشان دادند تحریک الکتریکی سلول‌های بنیادی عصبی منجر به رشد کواکسیال-شکل تارهای عصبی در جهتی مشخص و القای تمایز آن‌ها به‌سمت نورون‌ها شده است. این نتایج فوم گرافینی را به‌عنوان داربستی رسانا و منعطف برای بازتولید سیستم‌های عصبی و مهندسی بافت پیشنهاد می‌دهد.

واژگان کلیدی: تحریک الکتریکی، داربست‌های سه‌بعدی، سلول‌های بنیادی عصبی، فوم گرافینی

مقدمه

گرافین به‌عنوان نانو ماده‌ای دوبعدی با ساختار گرافیتی دارای ویژگی‌های منحصر به فردی از جمله خواص الکتریکی و مکانیکی مثال‌زدنی (۱ و ۲)، سطح مؤثر بسیار بالا (۳)، سادگی در عامل دار شدن (۴) و همچنین تولید کم‌هزینه آن (۵) است. بنابراین، در بخش‌های فراوانی همچون استخراج DNA/RNA (۶ و ۷)، انتقال دارو (۸ و ۹)، هدف‌گیری سلول‌های سرطانی (۱۰) و رشد سلول‌های بنیادی (۱۱) مورد استفاده قرار گرفته است. در سال‌های اخیر، لایه‌های گرافینی به‌طور موفقیت‌آمیز به‌عنوان داربست‌های دوبعدی در مهندسی بافت مبتنی بر سلول‌های بنیادی مورد استفاده قرار گرفته‌اند. به خاطر خواص الکتریکی ویژه‌ی گرافین که می‌تواند به‌طور مؤثری در تحریک الکتریکی نورون‌ها شرکت کند، توجه محققان به آن در حوزه ترمیم سیستم‌های عصبی جذب شده است. چراکه ترمیم بافت‌های عصبی و نورون‌ها به‌خودی‌خود صورت نمی‌گیرد و ساخت بافت مصنوعی عصبی برای ترمیم نقاط و بافت‌های عصبی آسیب‌دیده برای بازیابی عملکرد سیستم عصبی انسان لازم است. از این‌رو، تلاش‌های بسیاری برای ساخت چنین بافت‌هایی با استفاده از مواد مختلف صورت گرفته است. از بین موادی که تاکنون استفاده شده است، گرافین می‌تواند سطح زیست سازگاری برای رشد و تمایز سلول‌های عصبی تأمین کند. جذب و چسبندگی مؤثر سلول‌ها بر بستر گرافینی منجر به انتقال بارهای الکتریکی مورد نیاز تحریک و تمایز عصبی می‌شود (۱۲). برای مثال پارک و همکارانش (۱۳) از گرافین دوبعدی به‌عنوان بستری رسانا در تمایز سلول‌های بنیادی عصبی انسان به سمت نورون‌ها (به‌جای سلول‌های گلیال) با کمک تحریک الکتریکی استفاده کردند. همچنین تزریق الکترون‌ها از ورقه‌های اکسید گرافینی تحریک شده توسط پرتوی لیزر پالسی نیز منجر به تمایز سلول‌های بنیادی عصبی انسان به سمت نورون‌ها شده است (۱۴). هدف تمامی تحقیقات صورت گرفته در این حوزه، دستیابی به بافتی عصبی است که در آن تعداد نورون‌ها در مقایسه به

تعداد سلول‌های گلیال بیشتر باشد تا خصلت پیام‌رسانی بافت حفظ شود. این افزایش نسبی تعداد نورون‌ها نیز به‌طور معمول توسط تحریک الکتریکی سلول‌های بنیادین در طی فرآیند تمایز سلولی صورت می‌پذیرد. در این پژوهش از فوم گرافینی برای ساخت چنین بافت‌های عصبی استفاده شده است. در سال‌های اخیر، فوم‌های گرافینی به‌طور گسترده‌ای توسعه یافته‌اند و به‌عنوان داربست‌های سه‌بعدی در تمایز سلول‌ها به سمت رده‌های سلولی دلخواه مورد استفاده قرار گرفته‌اند (۱۵-۱۷). اگرچه روش شیمیایی و معروف هامرز (Hummers) یکی از ساده‌ترین و کم‌هزینه‌ترین روش‌های ساخت اکسید گرافین و اکسید گرافین احیاء شده است، اما تمام فوم‌های گرافینی‌ای که تاکنون در رشد و تمایزات سلولی مورد استفاده قرار گرفته‌اند از روش رسوب نشانی بخار شیمیایی (Chemical vapor deposition) ساخته شده‌اند. البته قابل ذکر است که دیکینو همکاران (۱۸) فوم‌های گرافینی‌ای بنام صفحات گرافینی با استفاده از روش هامرز ساخته‌اند، اما تاکنون گزارشی مبنی بر استفاده از چنین فوم‌ها و صفحاتی به‌عنوان داربستی سه‌بعدی در رشد و تمایزات سلولی منتشر نشده است.

مواد و روش‌ها

در این پژوهش در ابتدا فوم اکسید گرافینی برای اولین بار توسط ته‌نشینی لایه‌های اکسید گرافینی بر روی زیر لایه‌ای از جنس پلی‌اتیلن ترفتالات (Polyethylene terephthalate) تحت اشعه‌ی فرابنفش و دمای ۸۰ درجه سانتی‌گراد ساخته شده است. سپس از سمت یکی از لبه‌های آن پیچانده شده تا به‌عنوان بستری سه‌بعدی و استوانه‌ای شکل که قابلیت تکثیر و تمایز نورون‌ها در جهت محور اصلی استوانه را دارد، عمل کند. ساخت چنین فومی برای اولین بار توسط ته‌نشینی لایه‌های اکسید گرافینی، بدون فیلتر کردن محلول آن صورت گرفته است. طیف‌سنجی فوتوالکترون پرتوی ایکس X-ray (photoelectron spectroscopy) به‌منظور مطالعه حالت

شیمیایی کربن‌های موجود در فوم که تحت تأثیر اشعه‌ی UV(Ultraviolet) قرار داشتند، مورد استفاده قرار گرفته است. میکروسکوپ الکترونی روبشی (Scanning electron microscope) و طیف‌سنجی رامان نیز برای تأیید حضور لایه‌های گرافینی تک‌لایه و چندلایه در ساختار فوم به کار گرفته شده‌اند. مقاومت سطحی الکتریکی فوم گرافینی برای سنجش توانایی فوم در تحریک الکتریکی سلول‌های عصبی تحت ولتاژهای پایین محاسبه شده است. همچنین آب‌دوستی سطوح و سطح مقطع فوم ۳ بعدی نیز مورد بررسی قرار گرفته است. در نهایت فوم گرافینی به عنوان بستری سه‌بعدی در رشد جهت‌دار تارهای عصبی توسط تمایز سلول‌های بنیادی عصبی به سمت نوروها به کمک تحریک الکتریکی مورد استفاده قرار گرفته است.

فعالیت‌های تجربی

ساخت فوم گرافینی سه‌بعدی: در ابتدا برای ساخت فوم سه‌بعدی محلول اکسید گرافین با استفاده از روش بهبودیافته‌ی هامرز به دست آمد. جزئیات این روش پیش‌تر در گزارش‌هایی آمده است (۱۹). سپس محلول اکسید گرافین با غلظت حدود ۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر بر روی زیرلایه با جنس پلی‌اتیلن ترفتالات تحت دمای ۸۰ درجه سانتی‌گراد و اشعه لامپ (Philips, 10W) UV طی مدت ۲۴ ساعت قرار گرفت. در نهایت فوم گرافینی از روی هم انباشته شدن لایه‌های اکسید گرافینی بر روی هم تشکیل شد. ضخامت این فوم به دست آمده از حدود ۱۵ تا ۵۰ میکرومتر بود. هرچه ضخامت فوم گرافینی بیشتر بود، رنگ آن از قهوه‌ای تیره به سمت سیاهی میل می‌کرد. طبق گزارش پارک و همکاران (۱۳) فوم ساخته شده به مدت ۲ ساعت در محلول لامینین با غلظت ۱۰ میکرومتر بر میلی‌لیتر در محیط کشت انکوباتور شد تا چسبندگی سلول‌ها بر روی آن بیشتر شود. سپس ۳ مرتبه با محلول PBS (Phosphate-buffered saline) شسته شد. در مرحله‌ی بعد فوم سه‌بعدی از پیچانده شدن فوم گرافینی حول یکی از لبه‌های آن به دست آمد. این روش منجر به شکل‌گیری داربست استوانه‌ای شکلی با قطر

خارجی در حدود ۳۰ لایه گرافینی شد. **مشخصه‌یابی:** برای مطالعه‌ی مورفولوژی سطح مقطع فوم سه‌بعدی از SEM(TESCAN) در انرژی keV ۲۵ استفاده شده است. از XPS با منبع اشعه ایکس Al-K α در انرژی ۱۴۸۶/۶ eV و در خلا حدود 10^{-7} Pa برای بررسی وضعیت اتم‌های کربن موجود در ساختار فوم گرافینی کمک گرفته شده است. برای کالیبره کردن طیف گرفته شده، انرژی پیوندی قله‌ی اصلی در ۲۸۵/۰ eV ثابت فرض شده و همه‌ی مقادیر انرژی پیوندی با خط ثابت انرژی C(1s) در ۲۸۵/۰ eV سنجیده شده است. قله‌های طیف XPS با استفاده از نرم‌افزار SDP و با در نظر گرفتن مؤلفه‌های گاوسی پس از حذف پیش‌زمینه به حالات شیمیایی آن‌ها تفکیک شده‌اند. ساختار کربنی فوم نیز با استفاده از طیف‌سنجی رامان (HR-800 Jobin-Yvon) با منبع Nd-YAG با طول‌موج تحریکی ۵۳۲ نانومتر مورد بررسی قرار گرفته است. خاصیت آب‌دوستی سطوح و سطح مقطع فوم نیز با کمک تست زاویه تماس در دمای اتاق مورد مطالعه قرار گرفته است. در نهایت رسانندگی الکتریکی فوم نیز با محاسبه مقاومت سطحی لایه‌های گرافینی با استفاده از فن پروب چهار نقطه‌ای اندازه‌گیری شده است.

کشت سلول: سلول‌های بنیادی عصبی انسان (تهیه شده از گیبکو) در محیط مناسبی که متشکل از ۲ درصد سرم آلبومین گاوی (BSA)، ۱ درصد پنی‌سیلین/استرپتومایسین، ۲ میلی‌متر گلوتامین، ۱۰ نانوگرم بر میلی‌لیتر عامل رشد اپیدرمال و ۱۰ نانوگرم بر میلی‌لیتر عامل رشد فیبروبلاست عمومی (bFGF) است، تحت اتمسفر CO₂ و دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد کشت داده شدند. در طی فرآیند کشت، محیط کشت هر سه روز یکبار از نو تازه شده است. سلول‌های بنیادی عصبی با چگالی تقریبی 6×10^4 سلول در هر سانتی‌متر مربع طبق دفترچه راهنمای گیبکو با شماره کاتالوگ N7800-100,200 در بین لایه‌های فوم پیچیده نشده کاشته شدند

و سپس فوم دوباره پیچیده شد. فرآیند تکثیر سلول‌ها به مدت ۷۲ ساعت ادامه پیدا کرد.

تمایز و تحریک الکتریکی سلول‌های بنیادی: بلافاصله پس از فرآیند تکثیر، تمایز عصبی سلول‌های بنیادی با برداشتن عامل‌های رشد از محیط کشت شروع شد (۲۰). مدت‌زمان تمایز در حدود ۲ هفته در نظر گرفته شد. برای تحریک الکتریکی در ابتدا محیط کشت با محیطی خارجی شامل ۱۴۰ میلی‌مول NaCl، ۵ میلی‌مول KCl، ۲ میلی‌مول $CaCl_2$ ، ۱/۵ میلی‌مول $MgCl_2$ ، ۱۵ میلی‌مول اسید اسکوربیک، ۱۰ میلی‌مول گلوکز و ۱۰ میلی‌مول HRPES و pH حدود ۶/۵ جایگزین شد. سپس یک سری پالس‌های ولتاژ کاتدی ۱۰۰ میلی‌ثانیه‌ای در بازه‌های زمانی ۱۰ ثانیه‌ای به دو انتهای فوم پیچیده شده که به‌طور الکتریکی باسیم‌های طلا و چسب نقره به ژنراتور متصل شده بود، اعمال شد. مشخص شد که آستانه‌ی تحریک الکتریکی این سلول‌های عصبی در حدود ۲۰ میلی‌آمپر است.

تصویربرداری فلورسانس از سلول‌ها: به‌منظور تصویربرداری از سلول‌ها با استفاده از نشان‌گرهای پروتئینی، سلول‌های رشد یافته بر روی لایه‌های فوم اکسید گرافینی پیچانده شده به مدت ۲۰ دقیقه توسط محلول PBS حاوی ۴ درصد حجمی پارافورمالدهید تثبیت شدند. در مرحله‌ی بعدی نمونه‌ها سه مرتبه با PBS شستشو گردیدند و به مدت ۶۰ دقیقه در محلول PBS حاوی ۲ درصد BSA، ۱/۰ درصد تریتون ایکس-۱۰۰ و آنتی-نستین (با رقیق‌شدگی ~۱:۵۰۰) انکوبیت شدند. بعد از این مرحله نیز، سلول‌ها به مدت ۶۰ دقیقه با گوت آنتی-ربیت (Tetramethylrhodamine)TRITC (با رقیق‌شدگی ~۱:۵۰۰) انکوبیت شدند. سپس دوباره ۳ مرتبه با محلول PBS شستشو شدند. پس از طی شدن این مراحل، بتا تیوبولین کلاس III مخصوص نورون (TUJ1)، به‌عنوان نشان‌گر سلول نورون که در شکل‌ها با فلش شماره ۱ مشخص شده و با رقیق‌شدگی ~۱:۵۰۰،

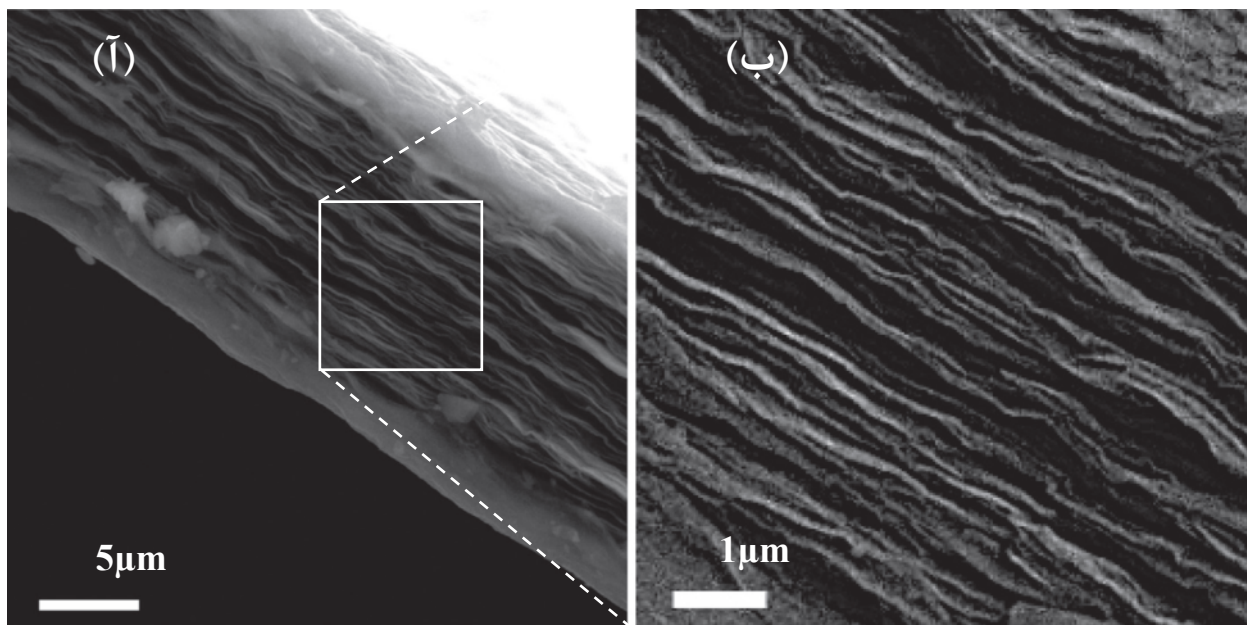
پروتئین اسیدی فیبریلاری گلیال (GFAP) (Glial fibrillar acidic protein)، به‌عنوان نشان‌گر سلول گلایلیکه در شکل‌ها با فلش شماره ۲ مشخص شده و با رقیق‌شدگی ~۱:۵۰۰) و DAPI (4',6-diamidino-phenylindole-) (به‌عنوان نشان‌گر هسته‌های سلول که در شکل‌ها با فلش شماره ۳ مشخص شده و با رقیق‌شدگی ~۱:۱۰۰) به محلول PBS اضافه شدند و به مدت ۳۰ دقیقه با سلول‌های تمایز یافته انکوبیت شدند. سلول‌های رنگ‌آمیزی شده در سطح مقطع فوم (توسط بریدن فوم پیچانده شده) و در سطوح داخلی آن (توسط به‌آرامی باز کردن فوم پیچانده شده) توسط PBS شستشو شدند و با استفاده از میکروسکوپ فلورسانسی هم‌کانون (Zeiss LSM ۵۱۰) تحت نظر قرار گرفتند. تعداد متوسط سلول‌ها در واحد سطح نیز توسط شمارش سلول‌های رنگ‌آمیزی شده در مساحتی در حدود ۴ میلی‌متر مکعب به دست آمد. تمامی آرایه‌های زیستی حداقل ۳ مرتبه انجام گرفتند. اختلاف معنی‌دار برای p مقدار کمتر از ۰/۰۵ در نظر گرفته شد.

نتایج

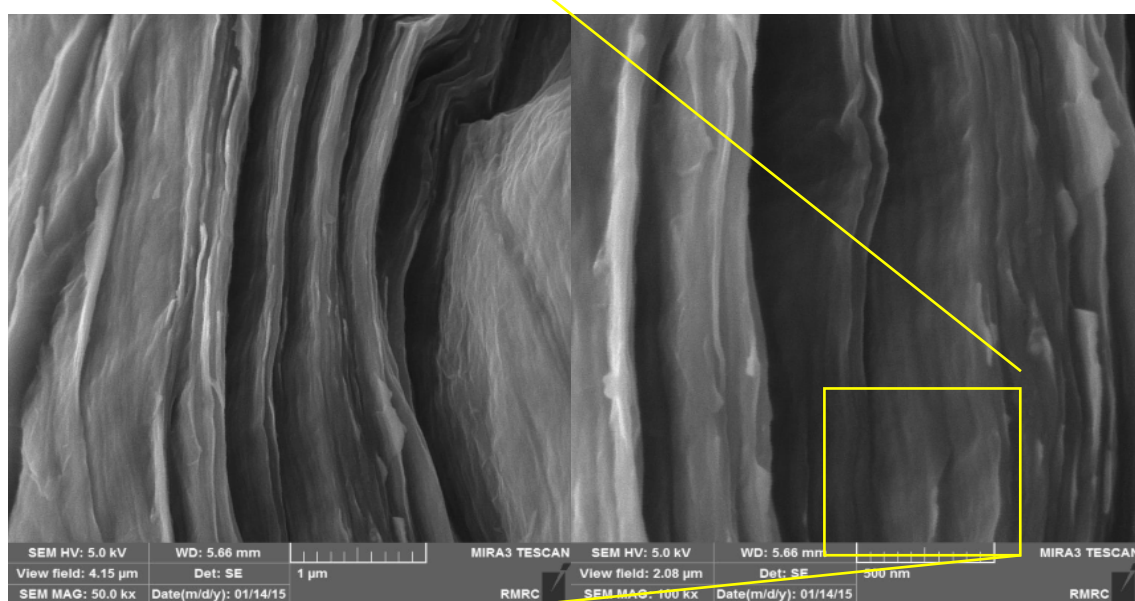
شکل ۱-آ تصویر SEM و شکل ۲ تصویر FESEM از سطح مقطع فوم گرافینی بریده‌شده است و لایه‌لایه بودن آن را نشان می‌دهد. این لایه‌ها بین دو لایه با ضخامت حدود ۱ میکرومتر پکیده شده‌اند. شکل ۱-ب نیز تصویر SEM با بزرگنمایی بیشتر را نشان می‌دهد. از روی شکل فضاهای خالی کمتر از میکرون نیز بین لایه‌های تشکیل‌دهنده فوم با چگالی حدوداً ۱۰ لایه در هر میکرومتر و ضخامت کمتر از ۸۰ نانومتر، کاملاً واضح است. برای تعیین حالات شیمیایی اتم‌های کربن موجود در فوم گرافینی و فوم گرافینی عامل دار شده با لامینین از XPS استفاده شده است. شکل ۳-آ-۱ طیف XPS تفکیک‌پذیری بالای C(1s) را نشان می‌دهد. برای کالیبره کردن طیف گرفته‌شده، انرژی پیوندی اصلی (که به پیوندهای C-C، C-H، و C=C نسبت داده شده‌اند) در

گروه‌های عاملی حاوی اکسیژن $C=O$ ، $C-O-C$ ، $O=C-O$ و $O=C-O$ نسبت داده شده است. نتایج طیف XPS فوم گرافینی عامل‌دار شده با لامینین نیز در شکل ۲-۳ آمده است.

$285/0 \text{ eV}$ ثابت فرض شده و همگی مقادیر انرژی پیوندی با خط ثابت انرژی $C(1s)$ در $285/0 \text{ eV}$ سنجیده شده است. با توجه به شکل ۳-۱-آ-قله‌های موجود در $286/6$ $287/3 \text{ eV}$ ، $288/3 \text{ eV}$ و $289/4 \text{ eV}$ به ترتیب به



شکل ۱: تصاویر SEM از سطح مقطع فوم گرافینی ساخته شده با بزرگنمایی‌های مختلف



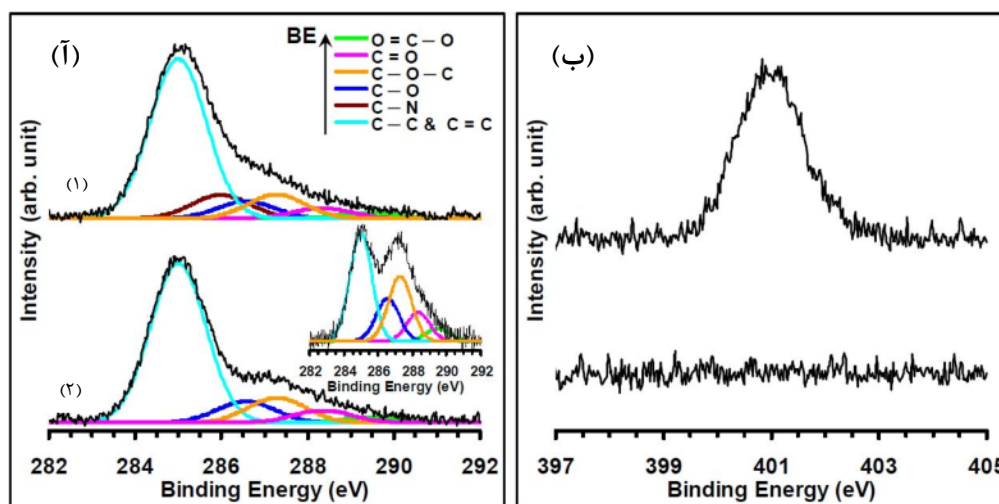
شکل ۲: تصاویر FESEM از سطح مقطع فوم گرافینی ساخته شده با بزرگنمایی‌های مختلف

فوم گرافینی اشاره دارد. علاوه بر این، شکل ۳-ب نیز حضور پیک مربوط به $N(1s)$ در طیف XPS با

همان‌طور که مشاهده می‌شود قله‌ی موجود در $286/0 \text{ eV}$ به شکل‌گیری پیوند کربن با نیتروژن ($C-N$) بر روی سطح

به‌عنوان پارامتری برای ارزیابی متوسط اندازه حوزه‌های sp^2 در ساختار گرافیتی که حاوی پیوندهای sp^2 و sp^3 است، برای فوم اکسید گرافینی در حدود $1/3$ و برای فوم عامل‌دار شده با لامینین در حدود $1/1$ به دست آمد. این کاهش در نسبت شدت پیک G/D نشان‌دهنده تشکیل پیوندهای کربن با نیتروژن موجود در لامینین نسبت داد. در طیف‌سنجی رامان پیک D مواد حاوی گرافین نیز به‌شدت به تعداد لایه‌ها و صفحه‌های گرافینی موجود در ساختار حساس است (۲۱). برای مثال نسبت شدت پیک D/G برای گرافین تک‌لایه، دولایه، سه‌لایه و چندلایه‌به ترتیب در حدود 0.16 ، 0.18 ، 0.3 و 0.7 است. با توجه به شکل ۴ این نسبت برای فوم ساخته‌شده در حدود 0.4 به دست آمد که نشان‌گر وجود گرافین سه‌لایه-ای و بالاتر در ساختار فوم است. برای تعیین میزان آب‌دوستی فوم ساخته‌شده از تست زاویه تماس کمک گرفته‌شده است. شکل ۵ نتایج به‌دست‌آمده برای سطح مقطع و سطح‌رویی فوم اکسید گرافینی پیچانده شده است.

تفکیک‌پذیری بالای فوم گرافینی عامل‌دار شده با لامینینرا نشان می‌دهد که بر موفقیت در عامل‌دار شدن فوم توسط لامینین اشاره دارد. با توجه به طیف گرفته‌شده نسبت اکسیژن به کربن (O/C) در لایه‌های فوم گرافینی و لایه‌های فوم گرافینی عامل‌دار شده با لامینین در حدود 0.25 به دست آمد. برای مقایسه بهتر، طیف XPS صفحه‌های اکسید گرافینی از قبل آماده‌شده (بدون اعمال حرارتی و بدون اینکه تحت اشعه‌ی فرابنفش قرار گرفته باشد) نیز در درون شکل ۳-آ آمده است. نسبت O/C در این صفحه‌های گرافینی در حدود 0.49 است. از آنجایی که نسبت متداول O/C در اکسید گرافین احیاشده با هیدرازین در حدود 0.2 است، این نتایج نشان‌دهنده‌ی احیای جزئی فوم اکسید گرافینی در طول مدت فرآیند ساخت و سپس عامل‌دار شدن لایه‌های فوم اکسید گرافینی است. برای بررسی بیشتر ساختار کربنی فوم گرافینی طبق شکل ۴ از طیف‌سنجی رامان استفاده‌شده است. پیک‌های شناخته‌شده طیف‌سنجی رامان برای مواد کربنی، یعنی پیک G و پیک D به ترتیب در 1580 cm^{-1} و 1350 cm^{-1} دیده می‌شوند. نسبت شدت پیک G/D که



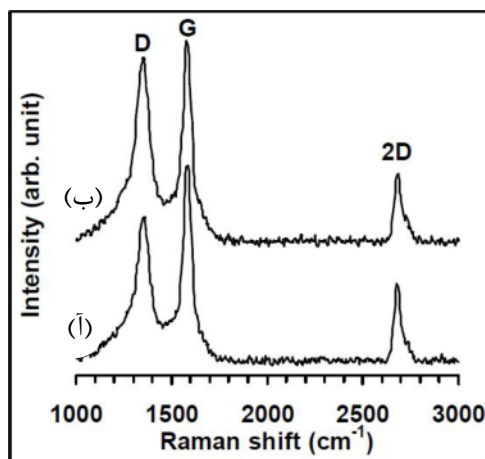
شکل ۳: (آ) طیف XPS با تفکیک‌پذیری بالا مربوط به $C(1s)$ از فوم اکسید گرافینی (۱) بدون عامل‌دار و (۲) با عامل‌دار شدن توسط لامینین؛ (ب) طیف XPS با تفکیک‌پذیری بالا مربوط به $N(1s)$ از فوم اکسید گرافینی قبل و بعد از عامل‌دار شدن توسط لامینین

افزایش میزان جذب آب، عامل‌های رشد و سلول‌ها بسیار مؤثر باشد که در ادامه به آن پرداخته‌شده است. شکل ۵

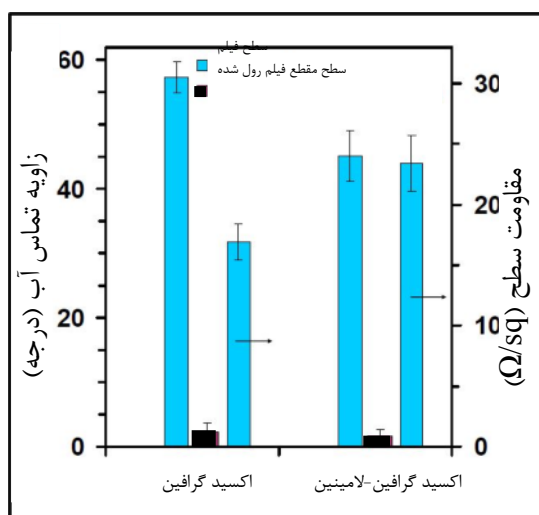
افزایش ناهمواری‌های یک سطح می‌تواند خاصیت آب‌دوستی را تغییر دهد (۲۲) آب دوستی می‌تواند در

سطحی الکتریکی فومی که با لامینین عامل دار شده بود فقط ۳۸ درصد افزایش یافت هبود. برای تأیید صحت مقاومت به دست آمده می‌توان آن را بر اساس میزان مقاومت به دست آمده برای صفحه‌های اکسید گرافینی از پیش گزارش شده تخمین زد.

همچنین مقاومت سطحی الکتریکی لایه‌های فوم گرافینی را نشان می‌دهد. آنچه اندازه‌گیری شد در حدود $17 \Omega/\text{sq}$ بود که نشان‌دهنده این است که فوم به خوبی می‌تواند جریان‌های تحریک الکتریکی در حدود 20 mA را برای تمایز سلول‌های عصبی تحت ولتاژهای کمتر از ۵ ولت فراهم کند. علاوه بر این مشخص شد که مقاومت



شکل ۴: طیف رامان (آ) فوم اکسید گرافینی و (ب) فوم اکسید گرافینی عامل دار شده با لامینین با استفاده از طول موج تحریکی ۵۳۲ نانومتر



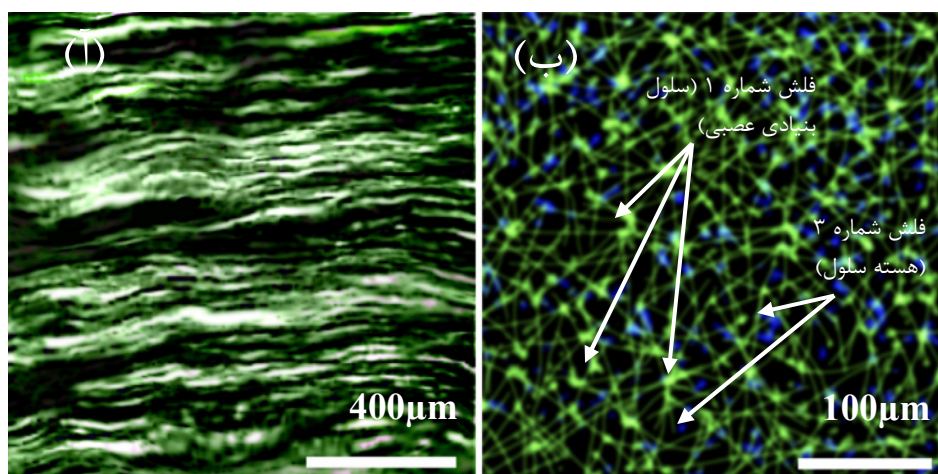
شکل ۵: تست زاویه تماس و مقاومت سطح برای سطح‌رویی و سطح مقطع فوم سه‌بعدی گرافینی

الکتریکی در آن جریان دارد فوم پیچیده شده بود که انباشتی از صفحه‌های ته‌نشین شده اکسید گرافین است. برای فوم استوانه‌ای شکل با شعاع خارجی در حدود ۴۵۰ میکرومتر (مطابق با ۱۵ لایه روی هم انباشته‌شده) و

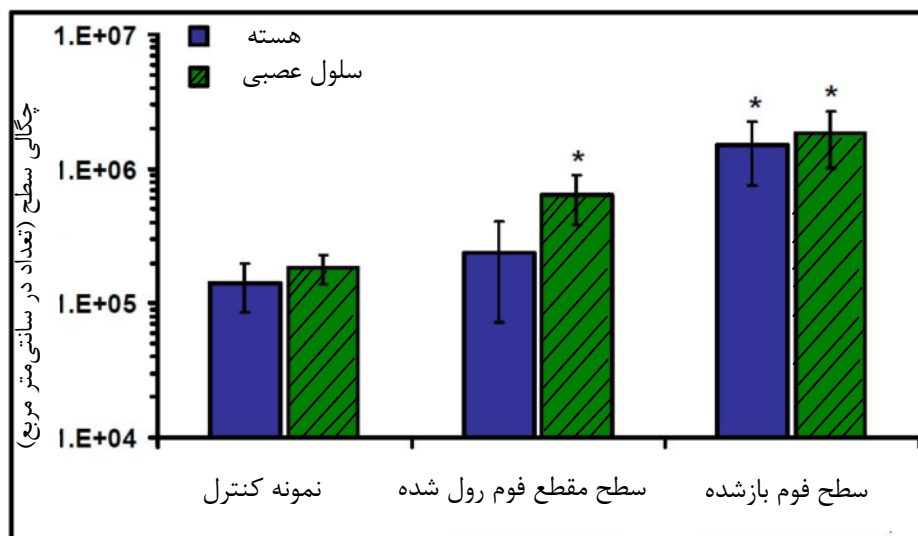
برای مثال در یکی از گزارش‌ها (۲۳) میزان R_s برای اکسید گرافینی که به‌طور جزئی احیاشده بود در حدود $10 \text{ M}\Omega/\text{sq}$ (که برابر مقاومت در حدود 1 cm است) است. در این پژوهش ماده‌ای که جریان

عصبی در سرتاسر تخلخل فوم سه‌بعدی است. به‌منظور تجزیه‌وتحلیل کمی فرآیند تکثیر، شکل ۷ تعداد هسته سلول و سلول‌های عصبی در واحد مساحت تصویر فلورسانس سلول‌های تکثیر یافته بر روی سطح مقطع و لایه‌های داخلی فوم گرافینی و زیرلایه PDMS (به‌عنوان نمونه مرجع) را نشان می‌دهد. استفاده از PDMS این کمک را کرده تا بتوان تشخیص داد رشد سلولی بین سطوح فوم گرافینی به‌طور مشخصی بیشتر از رشد بر روی PDMS است و همچنین رشد سلولی بر روی سطح مقطع فوم استوانه‌ای شکل قابل‌مقایسه با رشد بر روی PDMS است. این رشد قابل‌توجه سلول‌ها در سطوح داخلی و سطح مقطع فوم گرافینی را می‌توان به زیست‌سازگاری سطح و فرا-آبدوستی سطح مقطع فوم نسبت داد. البته این را هم باید توجه کرد که به علت ماهیت ناهموار سطح مقطع فوم، تمرکز میکروسکوپ بر روی سلول‌ها ساده نبود و به همین دلیل همان‌طور که در شکل ۶ نیز با خط خطا مشخص شده، مقدار و شمارش سلول‌ها به‌طور قابل‌توجهی کاهش یافته است.

طول ۱/۵ سانتی‌متری توان میزان مقاومت را در حدود $200\ \Omega$ تخمین زد که به‌خوبی مطابق با محاسبات ما بوده است. برای تجزیه‌وتحلیل خواص زیستی در ابتدا چسبندگی به سطح و تکثیر سلول‌های بنیادی در سرتاسر تخلخل و حفره‌های موجود در فوم گرافینی که خاصیت فرا-آبدوستی در سطح مقطع خود دارد، مورد بررسی قرار گرفته است. در رابطه با همین منظور شکل ۶-آ نشان‌دهنده تصویر فلورسانس از سلول‌های بنیادی عصبی رشد یافته بر روی سطح مقطع فوم استوانه‌ای شکل است. فواصل بین لایه‌های تشکیل‌دهنده فوم به‌خوبی مشخص است که در حدود ۲۰ میکرومتر است. به‌طور واضح می‌توان دید که سلول‌ها به‌طور یکپارچه بر روی سطح مقطع تکثیر یافته‌اند. این موضوع نشان‌دهنده رشد سلول‌ها در سرتاسر تخلخل و سطوح لایه‌های تشکیل‌دهنده فوم است. علاوه بر این شکل ۶-ب نیز تصویر فلورسانس از رشد سلول‌ها در لایه‌های داخلی فوم گرافینی‌باز شده را نشان می‌دهد. این طویل شدن و کشیده شدگی سلول‌ها به همراه جواب مثبت آن‌ها به نشان‌گر نستین نشان‌دهنده تکثیر سه‌بعدی سلول‌ها با مشخصات



شکل ۶: (آ) شکل فلورسانس از سلول‌های بنیادی عصبی رشد یافته بر روی سطح مقطع فوم استوانه‌ای شکل و (ب) لایه‌های داخلی فوم گرافینی باز شده، از نشان‌گر نستین (فلش شماره ۱) برای رنگ‌آمیزی سلول‌های بنیادی عصبی و از نشان‌گر DAPI (فلش شماره ۳) برای رنگ‌آمیزی هسته‌ی سلول استفاده شده است.



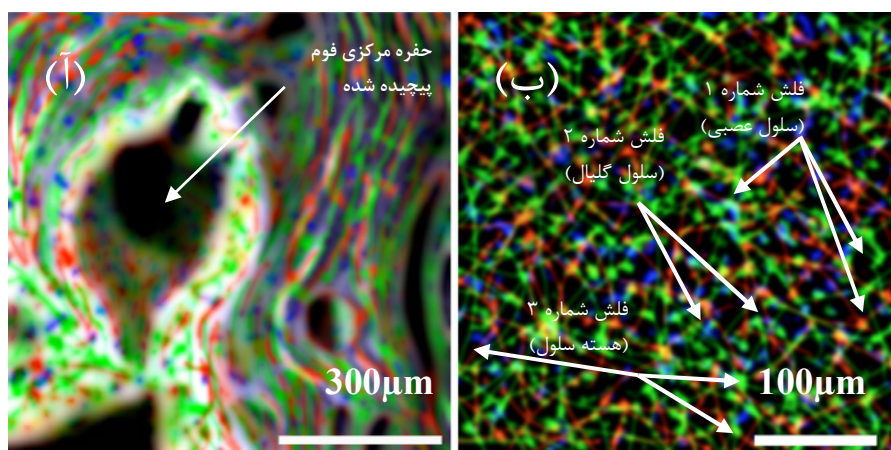
شکل ۷: تعداد هسته‌ها و سلول‌های عصبی رنگ‌آمیزی شده (ستون‌های سمت چپ و ستون‌های سمت راست) و تکثیر یافته بر روی سطح مقطع فوم استوانه‌ای شکل و سطوح داخلی فوم باز شده در مساحت سطح در مقایسه با نمونه مرجع (PDMS). نتایج معنی‌دار با (*) برای p-مقدار کمتر از 0/05 مشخص شده‌اند (n=3).

عصبی حول سمتی فرض شده (محور اصلی استوانه) را ایفا کند. اگرچه اندازه بخش قابل‌توجهی از تخلخل سطح مقطع فوم زیر میکرون است، اما نقایص تخلخلی با اندازه‌های بین ۱ تا ۱۰ میکرومتر نیز موجود است که می‌تواند به‌عنوان مکان مناسبی برای رشد هسته سلول عمل کند. قابل‌ذکر است که تخلخل‌ها و فصل مشترک‌های زیر میکرون هم می‌تواند مکان مناسبی برای رشد تارهای طویل نوروها باشد. تصاویر فلورسانسی که اینجا از سطح مقطع فوم گرفته شده است تقریباً بهترین تصاویری است که در شرایط آزمایش گرفته شده است. تصاویر مناسب دیگری نیز برای تجزیه و تحلیل کمی فرآیند تمایز مورد استفاده قرار گرفت. به همین منظور، تعداد سلول‌ها در واحد مساحت سطح به وسیله شمارش هسته سلول رنگ شده با DAPI به دست آمده است (شکل ۹-ا). سپس خصوصیات عصبی سلول‌های تمایز یافته بر اساس نسبت تعداد سلول‌های عصبی (مشخص شده با فلش شماره ۱) و سلول‌های گلیال (مشخص شده با فلش شماره ۲) به تعداد هسته سلول مورد بررسی قرار گرفت (شکل ۹-ب و ۹-ج). علاوه بر این نسبت تعداد سلول‌های عصبی به سلول‌های گلیال نیز محاسبه شد که نتیجه آن در شکل ۹-د آمده

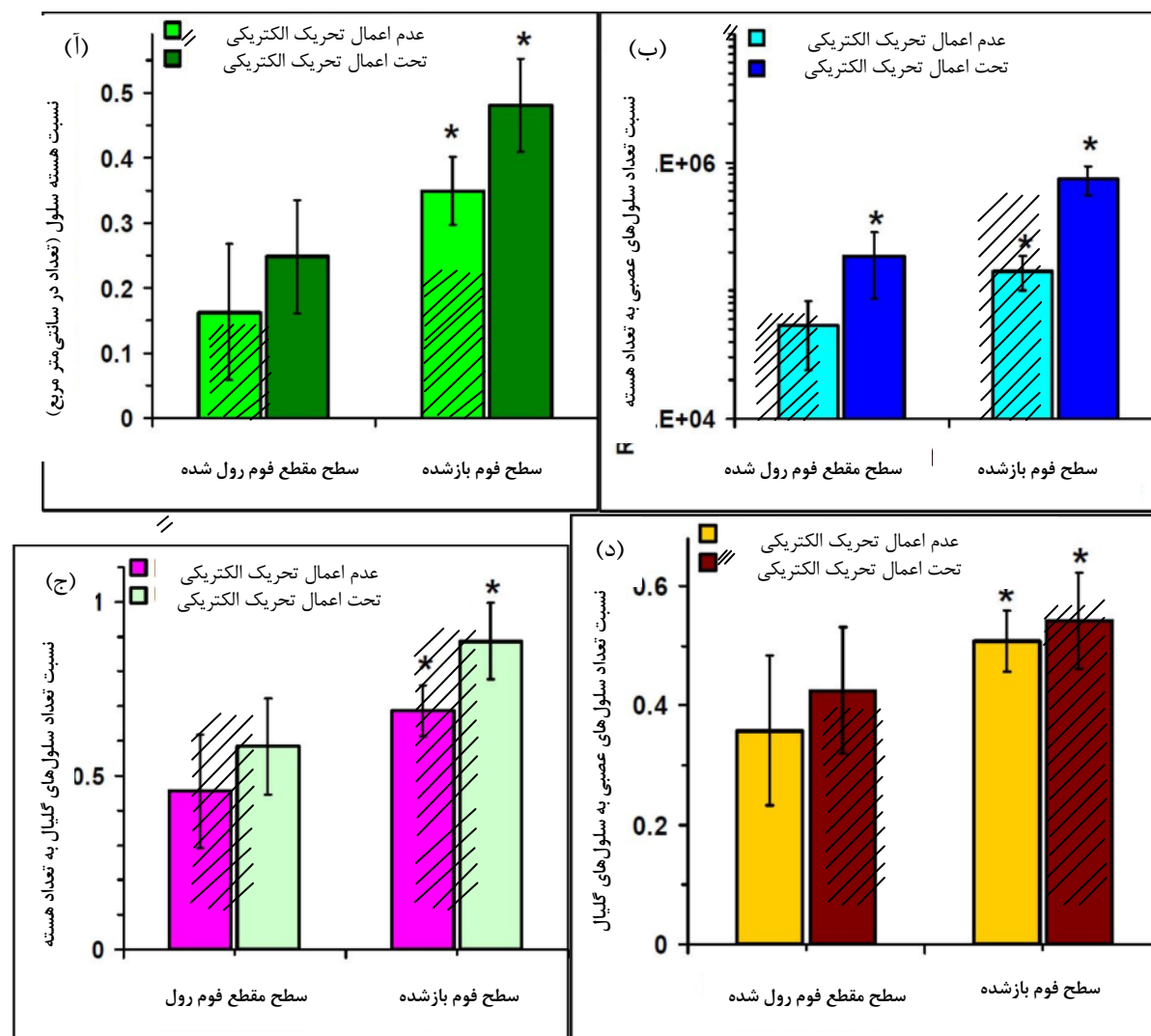
تمایز سلول‌های بنیادی عصبی انسان به سمت نوروها نیز بلافاصله پس از حذف عامل‌های رشد EGF (Epidermal growth factor) و bFGF (Basic fibroblast growth factor) از محیط کشت شروع شد. پس از گذشت ۳ روز، هیچ تغییر خاصی در مورفولوژی سلول‌ها دیده نشد. اما بعد از ۲ هفته، تغییرات قابل‌توجهی در مورفولوژی سلول‌های تمایز یافته مشاهده شد. به طوری که طویل شدند و علائم عصبی نشان دادند. در ضمن سلول‌های بنیادی عصبی به سمت سلول‌های گلیال (پشتیبان بافت‌های عصبی و فعالیت نوروها) نیز تمایز یافتند. در این پژوهش از نشان‌گر GFAP با فلش شماره ۲ برای مشخص کردن سلول‌های گلیال و نشان‌گر TUJ1 با فلش شماره ۱ برای مشخص کردن سلول‌های عصبی (نوروها) استفاده شده است. شکل ۸-ا و ۸-ب نشان‌دهنده تصاویر فلورسانس از سلول‌های گلیال و نوروهای تمایز یافته بر سطح داخلی فوم باز شده و سطح مقطع فوم استوانه‌ای شکل پس از گذشت ۲ هفته از تحریک الکتریکی است. این تصاویر اشاره بر این دارند که فوم سه‌بعدی استوانه‌ای شکل به خوبی توانسته نقش یک داربست سه‌بعدی برای تمایز نوروها و رشد تارهای

و فصل مشترک‌های فوم پیچیده شده نیز افزایش تحت تحریک الکتریکی افزایش یافته است (شکل ۹-ب و ۹-ج). هرچند طبق شکل ۹-د این افزایش برای تعداد نورون‌ها به نسبت تعداد سلول‌های گلیال بیشتر است. این نتایج نشان می‌دهند که فوم گرافینی پیچیده شده که به صورت استوانه‌ای شکل است می‌تواند تحت تحریک الکتریکی به‌عنوان یک داربست سه‌بعدی نویدبخشی در بازسازی قابل کنترل نورون‌ها عمل کند.

است. این امر به دلیل تمایز گلیالی در غیاب محرک‌های فیزیکی و شیمیایی است (۲۴-۲۶) درحالی‌که در احیای عصبی و مرمت مغز تقاضای بیشتر مربوط به تمایزات نورونی است (۲۷ و ۲۸). همچنین، مشخص شد که تحت تحریک الکتریکی تعداد هسته سلول به‌طور قابل‌توجهی بر روی سطح مقطع و فصل مشترک‌های فوم پیچیده شده افزایش یافته است (شکل ۹-آ). علاوه بر این، نسبت تعداد نورون‌ها و سلول‌های گلیال تمایز یافته بر روی سطح مقطع



شکل ۸: تصاویر فلورسانس از نورون‌ها و سلول‌های گلیال تمایز یافته بر روی سطح مقطع فوم استوانه‌ای شکل و (ب) سطح داخلی فوم باز شده پس از گذشت ۲ هفته تحریک الکتریکی، هسته سلول، نورون‌ها و سلول‌های گلیاله ترتیب با نشان‌گرهای DAPI، TUJ1 و GFAP و به ترتیب با فلش‌های شماره ۱، ۲ و ۳ مشخص شده‌اند



شکل ۹: مقایسه‌ی (آ) تعداد هسته سلول تمایز یافته، (ب) نسبت تعداد نورون‌ها به تعداد هسته سلول، (ج) نسبت تعداد سلول‌های گلیال به تعداد هسته سلول تمایز یافته و (د) نسبت تعداد نورون‌ها به تعداد سلول‌های گلیال تمایز یافته در مساحت سطح موجود در سطح مقطع و فصل مشترک فوم گرافینی در زمان استفاده از تحریک الکتریکی و عدم استفاده از آن

بحث

سلول‌های بنیادی مزانشیمی انسانی بر روی یک تک لایه از گرافن لوله شده (نانو لوله کربنی) بدون هیچ فاکتور عصبی در محیط کشت، سلول‌های بنیادی مزانشیمی پس از هفت روز کشت روی این بستر کربنی مارکرهای عصبی نستین و MAP2 را بیان کردند که نشان دهنده‌ی تمایز عصبی در آن‌ها بود (۳۱) از طرفی اهمیت گروه‌های کربوکسیل در افزایش توان نانولوله‌های کربنی در تمایز عصبی بیان شده است. وقتی سلول‌های بنیادی مزانشیمی انسانی بر روی نانو لوله‌های کربنی کربوکسیل‌دار کشت یافتند، نه تنها میزان بیان پروتئین‌های عصبی نسبت به گروه کنترل (گروه فاقد کربوکسیل) افزایش یافت بلکه

در سال ۲۰۱۳ گزارش شد که کشت سلول‌های بنیادی عصبی موشی روی یک لایه‌ی نازک از گرافن سبب افزایش سیگنال‌های الکتریکی در شبکه‌های عصبی می‌شود که این امر ناشی از خاصیت رسانندگی الکتریکی گرافن، با کشت سلول‌های بنیادی عصبی روی گرافن است (۲۹) وقتی سلول‌های بنیادی موش به مدت ۹ روز در روی بستری از گرافن اکساید کشت داده می‌شوند بیان مارکرهای بنیادی بودن در آن‌ها به شدت کاهش می‌یابد که نشان دهنده‌ی القای تمایز عصبی در این سلول‌ها است (۳۰). در سال ۲۰۱۰ نشان داده شد که با کشت

مدت زمان بیان این مارکرها از ۱ روز به ۱۴ روز افزایش، نشان داد نانو لوله‌های کربنی کربوکسیله شده از یک طرف سبب افزایش بیان فاکتورهای رشد عصبی می‌شود و از طرف دیگر با برقراری پیوند با آن‌ها از طریق گروه‌های کربوکسیل خود، سبب به دام انداختن آن‌ها به منظور ایجاد یک محیط مناسب برای تمایز طولانی مدت عصبی می‌شود (۳۱). توانایی نانو ذرات گرافن اکساید در تمایز عصبی سلول‌های بنیادی جنینی و موش گزارش شده است. با توجه به اطلاعات موجود از اثرات خانواده‌ی مواد گرافن و مشتقات آن در تمایز عصبی و از یک طرف به دلیل اهمیت گروه‌های عاملی کربوکسیل در افزایش میزان تمایل نورون (۳۲) و از طرف دیگر توانایی بالاتر نانو ذرات گرافن اکساید در مقایسه با نانو لوله‌های کربنی در تمایز عصبی (۳۳)، نانو ذرات گرافن اکساید (گرافن دارای گروه‌های عاملی کربوکسیل و هیدروکسیل) به‌عنوان ماده‌ی القاکننده‌ی تمایز عصبی انتخاب شد. سلول‌های بنیادی مزانشیمی مغز استخوان به‌دلیل تهیه و کشت آسان، بالا بودن قدرت تمایز و عمر طولانی، با صرفه بودن از نظر اقتصادی و همچنین دارا بودن قدرت رشد و تکثیر بالا، یک کاندید خوبی برای استفاده در این تحقیق تبدیل شدند و نظر به اینکه بر اساس مطالعات صورت گرفته، اثرات احتمالی نانو گرافن اکساید بر روی روند تمایز سلول‌های بنیادی مزانشیمی موش به سلول‌های عصبی بدون اضافه کردن فاکتورهای تمایزی عصبی هنوز مورد بررسی قرار نگرفته بود ما در این تحقیق نتیجه گرفتیم سلول‌های بنیادی عصبی انسان به‌خوبی بر روی داربست سه بعدی گرافینی ساخته شده تکثیر یافتند و سپس به کمک تحریک الکتریکی، به سمت رده نوروئی و گلیالی تمایز یافتند. مساله قابل اهمیت، تمایز بیشتر به سمت رده نوروئی (به جای رده گلیالی) می‌باشد که این مطلب در شکل ۹ به‌خوبی نشان داده شده است. با توجه به این موضوع که ویژگی رسانندگی الکتریکی داربست‌های گرافینی در تکثیر و تمایز سلول‌های بنیادی عصبی و

تحریک الکتریکی آن‌ها و تشکیل بافت‌های عصبی نقش اساسی دارند، می‌توان در تحقیقات آینده به‌سوی ساخت داربست‌های اکسید گرافینی احیا شده با درصد مولکول‌های اکسیژن کمتر، به‌منظور افزایش میزان رسانندگی الکتریکی رفت. برای مثال می‌توان از احیا کننده‌های سبز و دوستدار محیط زیست برای احیای محلول اکسید گرافین سنتز شده استفاده کرد و سپس اقدام به ساخت داربست گرافینی کرد. این نوع بافت‌های عصبی ساختگی، معمولاً قبل از استفاده عملی در انسان احتیاج به آزمایشات فراوان به‌منظور بررسی عدم ایجاد مشکل در بدن انسان دارند و حتی آن نتایجی که بر روی دیگر موجودات از جمله موش‌های آزمایشگاهی و ... به‌دست می‌آیند، دلیل کافی برای نتیجه‌گیری یکسان بر روی انسان نخواهند بود و به بررسی و تحقیق بیشتری احتیاج است.

نتیجه‌گیری

در این پژوهش فوم گرافینی پیچیده شده به‌عنوان داربست سه‌بعدی رسانای الکتریکی در مقیاس موردنظر ساخته شد و در رشد تارهای عصبی تحت تحریک الکتریکی مورد استفاده قرار گرفت. آنالیز XPS نشان داد که فوم گرافینی به‌طور جزئی تحت اشعه فرابنفش و دمای ۸۰ درجه‌ی سانتی‌گراد احیاشده بود. ضخامت متوسط هر فوم گرافینی در حدود ۱۵ الی ۵۰ میکرومتر به دست آمد و چگالی لایه‌های تشکیل‌دهنده آن نیز به‌طور متوسط حدود ۱۰ لایه در هر میکرومتر است. طیف‌سنجی رامان وجود صفحه‌های گرافینی چندلایه‌ای در ساختار فوم را تأیید کرد. مشخص شد مقاومت سطحی الکتریکی فوم گرافینی نیز حدود $17 \Omega/sq$ به‌طور کامل مناسب برای تولید جریان‌های تحریک الکتریکی (حدود ۲۰ mA) در تمایز سلول‌های عصبی با استفاده از ولتاژهای کمتر از ۵ ولت بود. تست زاویه تماس نیز نشان داد که اگرچه سطح فوم گرافینی عامل دار شده با لامینین آب‌دوست هستند، اما سطح مقطع فوم پیچیده شده خاصیت فرا-آبدوستی

دارد که به تکثیر و تمایز مؤثرتر سلول‌ها در سراسر تخلخل و فصل مشترک‌های فوم منجر می‌شود. در نهایت تحریک الکتریکی سلول‌های بنیادی عصبی انسان بر روی فوم نیز به تکثیر بیشتر سلول‌ها و تسریع تمایز آن‌ها به سمت

نورون‌ها در مقایسه با سلول‌های گلیال منتهی شد. همه این نتایج می‌تواند کاربردهای فوم گرافینی پیچیده شده را به‌عنوان داربست سه‌بعدی در بازسازی مؤثر شبکه‌های عصبی در نانو داروهای آتی مهیا کند.

منابع

1. GeimAK, Novoselov KS. The rise of graphene, *Nat. Mater.* 2007; 6(3): 183–191.
2. Lee C, Wei X, KysarJW, HoneJ. Measurement of the elastic properties and intrinsic strength of monolayer graphene, *Science.* 2008; 321: 385–388.
3. LiD, MüllerMB, GiljeS, KanerRB, WallaceGG. Processable aqueous dispersions of graphene nanosheets, *Nat. Nanotechnol.* 2008; 3(2): 101–105.
4. Akhavan O, GhaderiE, EmamyH. Nontoxic concentrations of PEGylated graphene nanoribbons for selective cancer cell imaging and photothermal therapy, *J. Mater. Chem.* 2012; 22 (43): 20626–20633.
5. AkhavanO, BijanzadK, MirsepahA. Synthesis of graphene from natural and industrial carbonaceous wastes, *RSC Adv.* 2014; 4 (39): 20441–20448.
6. AkhavanO, GhaderiE, HashemiE, RahighiR. Ultra-sensitive detection of leukemia by graphene, *Nanoscale.* 2014; 6 (24): 14810–14819.
7. HashemiE, AkhavanO, ShamsaraM, ValimehrS, et al. DNA and RNA extractions from eukaryote and prokaryote cells by graphene nanoplatelets, *RSC Adv.* 2014; 4: 60720–60728.
8. MohantyN, BerryV. Graphene-based single-bacterium resolution biodevice and DNA transistor: interfacing graphene derivatives with nanoscale and microscale biocomponents, *Nano Lett.* 2008; 8 (12): 4469–4476.
9. AkhavanO, GhaderiE, RahighiR, AbdollahM. Spongy graphene electrode in electrochemical detection of leukemia at single-cell levels, *Carbon.* 2014; 79: 654–66.
10. YangK, ZhangS, ZhangG, SunX, et al. Graphene in mice: ultrahigh in vivo tumor uptake and efficient photothermal therapy, *Nano Lett.* 2010; 10(9): 3318–3323.
11. AkhavanO, GhaderiE, AkhavanA. Size-dependent genotoxicity of graphene nanoplatelets in human stem cells, *Biomaterials.* 2012; 33 (32): 8017–8025.
12. KotovNA, WinterJO, ClementsIP, JanE, et al. Campidelli, et al., Nanomaterials for neural interfaces, *Adv. Mater.* 2009; 21 (40): 3970–4004.
13. ParkSY, ParkJ, SimSH, SungMG, et al., Enhanced differentiation of human neural stem cells into neurons on graphene, *Adv. Health Mater.* 2011; 23 (36) 263–267.
14. AkhavanO, GhaderiE. The use of graphene in the self-organized differentiation of human neural stem cells into neurons under pulsed laser stimulation, *J. Mater. Chem. B.* 2014; 2: 5602–5611.
15. ChenZ, RenW, GaoL, LiuB, et al. Cheng, Three-dimensional flexible and conductive interconnected graphene networks grown by chemical vapour deposition, *Nat. Mater.* 2011; 10(6): 424–428.
16. LiN, ZhangQ, GaoS, SongQ, et al., Three-dimensional graphene foam as a biocompatible and conductive scaffold for neural stem cells, *Sci. Rep.* 2013; 3: 1604.
17. CrowderSW, PrasaiD, RathR, BalikovDA, et al. Three-dimensional graphene foams promote osteogenic differentiation of human mesenchymal stem cells, *Nanoscale.* 2013; 5 (10): 4171–4176.
18. DikinDA, StankovichS, ZimneyEJ, PinerR.D, et al. Preparation and characterization of graphene oxide paper, *Nature.* 2007; 448 (7152): 457–460.
19. EsfandiariA, AkhavanO, IrajizadA. Melatonin as a powerful bio-antioxidant for reduction of graphene oxide, *J. Mater. Chem.* 2011; 21(29) 10907–10914.
20. DonatoR, MiljanEA, HinesSJ, AouabdiS, et al. Differential development of neuronal physiological responsiveness in two human neural stem cell lines, *BMC Neurosci.* 2007; 8: 36.
21. MalardLM, PimentaMA, DresselhausG. Raman spectroscopy in graphene, *Phys. Rep.* 2009; 473(5-6): 51–87.
22. WenzelRN. Surface roughness and contact

- angle, J. Phys. Colloid Chem. 1949; 53(9): 1466–1467.
23. Akhavan O, Kalaei M, Alavi ZS, et al. Esfandiari, Increasing the antioxidant activity of green tea polyphenols in the presence of iron for the reduction of graphene oxide, Carbon. 2012; 50 (): 3015-3025.
24. Ellis-Behnke RG, Liang YX, You SW, Tay DK, et al. Nanoneuro knitting: peptide nanofiber scaffold for brain repair and axon regeneration with functional return of vision, Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2006; 103(13). 5054–5059.
25. Orive G, Anitua E, Pedraz JL, Emerich DF. Biomaterials for promoting brain protection, repair and regeneration, Nat. Rev. Neurosci. 2009; 10 (9): 682–692.
26. Silva GA, Czeisler C, Niece KL, Beniash E, et al. Selective differentiation of neural progenitor cells by high-epitope density nanofibers, Science. 2004; 303: 1352–1355.
27. Conti L E. Cattaneo, Neural stem cell systems: physiological players or in vitro entities, Nat. Rev. Neurosci. 2010; 11 (3): 176–187.
28. Gage FH. Mammalian neural stem cells, Science. 2000; 287 (5457): 1433–1438.
29. Mingliang Tang, Qin Song, Ning Li, Ziyun Jiang, Rong Huang, Guosheng Cheng. “Enhancement of electrical signaling in neural networks on graphene films”. Biomaterials 2211, Pages 6122–6111. 1.
30. Chen GY, Pang DW, Hwang SM, Tuan HY, Hu YC. “A graphene-based platform for induced pluripotent stem cells culture and differentiation”. Biomaterials. 2212 Jan; 11(2): 111-22.
31. Chor Yong Tay, Haigang Gu, Wen Shing Leong, Haiyang Yu, Hua Qiong Li, Boon Chen Heng, Hosea Tintang, Say Chye Joachim Loo, Lain Jong Li, Lay Poh Tan. “Cellular behavior of human mesenchymal stem cells cultured on single-walled carbon nanotube film”. C A R B ON 11 (2212) 1295 –1121.
32. Yu-Shuan Chen a, Ging-Ho Hsiue. “Directing neural differentiation of mesenchymal stem cells by carboxylated multiwalled carbon nanotubes”. Biomaterials 11 (2211)
33. Yang D, Li T, Xu M, Gao F, Yang J, Yang Z, Le W. “Graphene oxide promotes the differentiation of mouse embryonic stem cells to dopamine neurons”. Nanomedicine (Lond). 2211.

Fabrication and characterization of graphene foams and using it for electrical stimulation of human neural stem cells

Jahantigh F. M.Sc.^{1,2*}, Nanakar H. M.Sc.¹, Ghorashi SMB. M.Sc.²

1- Department of Fundamental science, Khatamolanbiya University, Tehran, Iran

2- Department of Photonics, Faculty of Physics, University of Kashan, Iran

* Email corresponding author: f.jahantigh@yahoo.com

Received: 3 Jul. 2016

Accepted: 27 Dec. 2016

Abstract

Aim: In this study biocompatible 3D graphene oxide foams have been used for Human neural stem cells (hNSCs) culturing.

Material and Methods: For the first time, graphene oxide foam were fabricated by precipitation of chemically exfoliated graphene oxide sheets in an aqueous suspension onto the PET substrate at ~80 oC under UV irradiation.

Results: By using scanning electron microscopy, the thickness of these foams (with linear density of ~10 GO sheets/ μm) was measured around 10-50 μm . X-Ray photoelectron spectroscopy confirmed that the UV irradiation resulted in partial reduction of the layers during fabrication process. Also Raman spectroscopy demonstrated the presence of multilayer graphene oxide sheets (≥ 3 layers) in the foam structure. The Young's modulus of the foams was obtained about 1.7 GPa. Furthermore, Four probe method found that the electrical sheet resistance of the GOFs was low enough (17-24 Ω/sq).

Conclusion: To produce the electrical stimulation currents (~20 mA) used in differentiation of the neural stem cells into the neurons (rather than glial cells). Contact angle test also showed that rolling the GOFs resulted in formation of cross-section with superhydrophilic characteristic, inducing effective proliferation and differentiation of the hNSCs throughout the pores and interfaces of the scaffold. Moreover, Fluorescence imaging revealed that stimulating the hNSCs resulted in coaxial-like growth of the neural fibers and inducing differentiation of the neural stem cells in to the neurons.

Key words: Graphene foams, Electrical Stimulation, 3D Scaffolds, Neural stem cells