

## بررسی اثر افزودن نانورس بر خصوصیات داربست نانوکامپوزیتی پلی کاپرولاکتون حاوی سلول‌های بنیادی مزانشیمی مشتق از بافت چربی به منظور کاربرد در مهندسی بافت نرم

سیده سارا شفیعی\*، مهناز شوندی و یگانه نیکاکhtar

پژوهشکده زیست فناوری پزشکی، پژوهشگاه ملی مهندسی ژنتیک و زیست فناوری، تهران، ایران

(دریافت مقاله: ۱۳۹۷/۱۲/۵ - دریافت نسخه نهایی: ۱۳۹۹/۱۰/۲۱)

**چکیده** - داربست‌های مهندسی بافت، چارچوب‌های زیستی هستند که از رشد، تکثیر و تمایز سلول‌ها در بدن حمایت می‌کنند. در این میان، داربست‌های نانولیفی به شکل مناسبی از لحاظ مکانیکی و زیستی از زمینه خارج سلولی تقلید می‌کنند. این داربست‌ها نقش مؤثری در بازسازی و ترمیم بافت ایفا می‌کند. یکی از روش‌های تهیه داربست‌های نانولیفی با خواص دستکاری شده، افزودن نانوذرات به زمینه پلیمری (نانوکامپوزیت) است. در این پژوهش، الیاف یک‌دست از جنس پلی کاپرولاکتون تقویت شده با نانورس هیدروکسید دوگانه لایه‌ای با درصدهای ۱/۰ درصد تا ۱۰ درصد وزنی توسط روش الکتروریسی تهیه شد. افزودن فاز نانورس به فاز پلیمری باعث کاهش قطر الیاف و بهبود خواص مکانیکی شد. به علاوه، حضور نانوذرات رسی در بستر پلی کاپرولاکتون به شکل قابل توجهی موجب افزایش چسبندگی سلول‌ها و تمایز سلول‌های چربی شد. نتایج نشان می‌دهد می‌توان از داربست‌های الکتروریسی شده پلی کاپرولاکتون تقویت شده با نانوذرات رسی در کاربردهای مهندسی بافت نرم استفاده کرد.

واژه‌های کلیدی: مهندسی بافت، مهندسی بافت نرم، داربست‌های الکتروریسی، پلی کاپرولاکتون، نانورس، الکتروریسی، هیدروکسید دوگانه لایه‌ای.

## Effect of Nanoclay Addition on the Properties of Polycaprolactone Nanocomposite Scaffolds Containing Adipose Derived Mesenchymal Stem Cells used in Soft Tissue Engineering

S. S. Shafiei\*, M. Shavandi and Y. Nickakhtar

National Institute of Genetic Engineering and Biotechnology, Tehran, Iran.

**Abstract:** Tissue-engineering scaffolds provide biological and mechanical frameworks for cell adhesion, growth, and differentiation. Nanofibrous scaffolds mimic the native extracellular matrix (ECM) and play a significant role in formation and remodeling of tissues and/or organs. One way to mimic the desired properties of fibrous ECM is adding nanoparticles into the polymer matrix. In the current study, the uniform fibers of poly ( $\epsilon$ -caprolactone) (PCL) enriched with different layered double hydroxide (LDH) contents (ranging from 0.1 wt.% to 10 wt.%) were successfully fabricated by electrospinning method. The LDH

\*: مسئول مکاتبات، پست الکترونیکی: shafiei@nigeb.ac.ir

*nano particles were randomly dispersed in the fibers, as confirmed by Energy Dispersive X-ray analysis (EDX). Scaffolds were analyzed from morphological, physical and mechanical view. Biological assessments of scaffolds in terms of cellular attachment and adipogenic differentiation of mouse adipose derived stem cells (mADSCs) were performed. The results showed that inclusion of LDH nanoparticles reduced the average fiber diameter and enhanced the tensile strength and elongation at break values of the PCL scaffold. The LDH-enriched electrospun PCL scaffolds had remarkable effects on cell adhesion. Moreover, a significant increase in adipogenic differentiation of mADSCs was observed. The PCL/LDH nanofibrous scaffolds showed great potential in application for soft tissue engineering.*

**Keywords:** Tissue engineering, Soft tissue engineering, Scaffold, Electrospinning, Polycaprolactone, Layered double hydroxide.

## ۱- مقدمه

بسیاری از بافت‌های بدن انسان توانایی بازسازی خودشان را ندارند. بنابراین آسیب دیدن این بافت‌ها جبران‌ناپذیر است [۱]. علاوه بر این، توانایی محدود در بهبود بافت‌هایی مانند اعصاب، تاندون، غضروف، بافت چربی در صورتی که آسیب بینند منجر به ناتوانایی‌های گوناگون می‌شود. حتی با جراحی‌های گوناگون هم ممکن است بافت کارکرد خود را به دست نیاورد. بر خلاف موفقیت‌های فراوانی که در مطالعات بالینی به دست آمده است، جراحی‌های انجام شده به دلیل پاسخ‌های ایمنی بدن فرد و محدودیت‌های فراوان در یافتن اهدا کننده مناسب، بسیاری از بیماران به امید بازیابی توانایی‌هایشان برای مدت‌زمان طولانی در لیست انتظار پیوند عضو باقی می‌مانند [۲]. داربست‌های<sup>۱</sup> مهندسی بافت به عنوان یک چارچوب فیزیکی شیمیایی مطلوب برای رشد و بازسازی بافت‌های زیستی شناخته شده‌اند. نقش اصلی آنها حمایت مکانیکی از ساخت و گسترش سلول‌ها به منظور بازیابی، حفاظت، و یا تغییر کاربرد یک بافت یا اندام است. طراحی و ساخت داربست یکی از مهم‌ترین عوامل مهندسی بافت است که روی شرایط محیطی جمعیت سلولی تأثیر می‌گذارد [۳]. یک داربست ایده‌آل باید ریزمحیط مغذی برای حمایت از اتصال، مهاجرت، گسترش، تکثیر و تمایز را فراهم کند. طی دو دهه اخیر روش‌های مختلفی برای ساخت داربست، شامل روش خود تجمعی<sup>۲</sup>، اتصال رشته‌ای<sup>۳</sup>، روشی ذره‌ای و قالب‌گیری حلال<sup>۴</sup>، گاز کف<sup>۵</sup>، امولسیون یخ خشک<sup>۶</sup>، روش حرارتی ناشی از جداسازی فاز<sup>۷</sup>، قالب‌گیری مذاب<sup>۸</sup> و الکترووریسی<sup>۹</sup> است. الکترووریسی یک تکنیک چندکاربردی است که اجازه می‌دهد الیاف با قطرهای مختلف مناسب برای ساخت

داربست‌های سه‌بعدی و متخلخل که ساختاری مشابه با ساختار متخلخل ماتریس خارج سلولی (ECM)<sup>۱۰</sup> دارند، ساخته شود. به علاوه یکی از مهم‌ترین کاربردهای داربست‌های الکترووریسی شده جهت‌دهی و کنترل تمایز سلول‌های بنیادی مزانشیمی انسان در مهندسی بافت‌های نرم و سخت است [۴-۸]. اجزای اصلی داربست، مواد زیستی هستند که باید زیست‌سازگاری، تخلخل مناسب، خصوصیات مکانیکی مطلوب و الگوی تخریب مناسب داشته باشند [۹]. پلی‌استرها به طور گسترده‌ای به دلیل زیست‌سازگاری، زیست تخریب‌پذیری و رفتارهای مکانیکی مناسب‌شان در مهندسی بافت کاربرد دارند. در بین آنها پلی‌کاپرولاکتون (PCL)<sup>۱۱</sup> که تأییدیه سازمان غذا داروی آمریکا را دارد بسیار شناخته شده است و به عنوان یک پلیمر زیست تخریب‌پذیر برای بافت‌های نرم و سخت به شمار می‌رود. به دلیل ثابت شیشه‌ای شدن پایین (۶۰- درجه سانتی‌گراد)، انعطاف در پردازش و طراحی، پلیمری مطلوب برای طراحی و ساخت داربست در مهندسی بافت است [۱۰-۱۳]. از طرفی به دلیل آب‌دوستی پایین و تأخیر در تخریب، همچنین ویژگی‌های مکانیکی ضعیف داربست‌های متخلخل و عدم محدودیت فعالیت‌های زیستی در مهندسی بافت سخت، تأثیر آن در القای پاسخ سلولی ضعیف است [۱۴-۱۷]. سرعت تخریب پلی‌کاپرولاکتون می‌تواند به کمک پرکننده‌های نانو مثل هیدروکسی‌آپاتیت<sup>۱۲</sup>، اکسید نانوذررات<sup>۱۳</sup>، سیلیکا<sup>۱۴</sup> و نانورس<sup>۱۵</sup>‌های سنتزی یا طبیعی درون داربست پلیمری، اصلاح شود. این پرکننده‌ها می‌توانند به طور مستقیم روی آب‌دوست شدن و کریستالیزه شدن ماتریس پلیمر تأثیر بگذارد. استفاده از نانوذرات هیدروکسی‌آپاتیت در الیاف داربست پلی‌کاپرولاکتون/

پلی لاکتیک کولاکتیک اسید، نیروی کششی و چسبندگی سلولی و تکثیر سلولی را افزایش داد. به علاوه انتشارات نانوذرات هیدروکسی آپاتیت درون ماتریس پلی کاپرولاکتون فعالیت زیستی و زیست تخریب پذیری را افزایش داد [۱۸]. نانورس‌ها متعلق به گروه بزرگی از مواد معدنی هستند که به طور گسترده در ساخت نانوکامپوزیت‌های پلیمر-رس با ویژگی‌های مناسب برای کاربردهای خاص استفاده می‌شوند. آنها همچنین به عنوان سیلیکات مصنوعی با مورفولوژی صفحه دو وجهی با بار سطحی بالا که منجر به میان‌کنش بین رس و پلیمر می‌شود، شناخته می‌شوند. ترکیب نانورس‌ها با زمینه پلیمری می‌تواند روی خصوصیات فیزیکی شیمیایی نانوکامپوزیت تأثیر بگذارد و پاسخ‌های سلولی خاصی را به منظور کاربردهای مهندسی بافت تحریک کند [۱۹-۲۲]. در مطالعه‌ای دیگر داربست پلی کاپرولاکتون تقویت شده با مونت مرلینت<sup>۱۶</sup> با روش الکتروروسی ساخته شده است. مشاهدات نشان داد که حضور نانورس‌ها موجب توزیع الیاف نازک‌تر می‌شود و نیروی مکانیکی بدون کاهش تورق ارتقا می‌یابد [۱۹]. بین نانورس‌ها، نانورس‌های آنیونی که نانوذرات هیدروکسید دوگانه لایه‌ای<sup>۱۷</sup> (LDH) نیز نامیده می‌شوند، لایه‌های آنها دارای بار مثبت است و به خاطر ویژگی‌های منحصر به فرد مختلف‌شان مثل حالیت وابسته به pH، پایداری دمایی، قابلیت تعویض یونی و زیست‌سازگاری مطلوب توجه بیشتری را به خود جلب کرده‌اند. گزارش‌های متعددی مبنی بر کاربردهای زیست‌پزشکی این هیدروکسیدهای دوگانه لایه‌ای شامل دارورسانی، ژن‌رسانی، درمان مولکولی و مهندسی بافت گزارش شده است [۲۳-۲۷]. ساخت کامپوزیت‌های پلی کاپرولاکتون حاوی هیدروکسید دوگانه لایه‌ای که توسط مولکول‌های ضدالتهاب (دیکلوفناک سدیم) دست‌ورزی شده بودند، نشان داده است که افزودن هیدروکسید دوگانه لایه‌ای به ماتریکس پلی کاپرولاکتون موجب یکنواخت‌سازی قطر الیاف و افزایش تبلور پلی کاپرولاکتون می‌شود. همچنین غشای لیفی پلی کاپرولاکتون می‌تواند به عنوان یک داربست ضدالتهاب در مهندسی بافت استفاده شود [۲۸].

اگرچه تحقیقات بیشتر روی ساخت نانوکامپوزیت‌های پلی-کاپرولاکتون تقویت شده با هیدروکسیدهای دوگانه لایه‌ای به منظور کاربردهای رسانش دارویی متمرکز شده است، اما استفاده از نسبت‌های مختلف این هیدروکسیدهای دوگانه لایه‌ای در کامپوزیت‌های پلیمری می‌تواند برای اصلاح ویژگی‌های فیزیکی شیمیایی و زیستی مانند تحریک یک پاسخ سلولی خاص و پیام‌رسانی سلولی در مهندسی بافت، استفاده شود [۲۹ و ۳۰]. در این مطالعه به کمک فرایند الکتروروسی نانوکامپوزیت پلی کاپرولاکتون-هیدروکسید دوگانه لایه‌ای یا غلظت‌های متفاوتی از هیدروکسید دوگانه لایه‌ای ساخته شد (از ۱-۱۰ درصد وزنی). هدف از این کار ارزیابی تأثیر افزایش هیدروکسید دوگانه لایه‌ای بر ویژگی‌های مکانیکی، فیزیکی، شیمیایی داربست نانوکامپوزیت است. همچنین زیست‌سازگاری و تمایز آدیپوژنیک<sup>۱۸</sup> سلول‌های بنیادی مستخرج از بافت چربی موش روی این داربست بررسی شد.

## ۲- مواد و روش تحقیق

### ۲-۱- سنتز هیدروکسید دوگانه لایه‌ای (Mg/Al-(LDH)

از میان روش‌های گوناگون و متنوعی که برای تهیه هیدروکسید دوگانه لایه‌ای وجود دارد در این پژوهش از روش هم‌رسوبی استفاده شد. این روش شامل جوانه‌زنی و رشد لایه‌های هیدروکسید پس از اختلاط محلول آبی، حاوی نمک‌های دو یون فلزی و همچنین آنیون به یک باز است. برای تهیه هیدروکسید دوگانه لایه‌ای در ابتدا محلول‌هایی از کلرید آلومینیوم و کلرید منیزیم با غلظت و نسبت مشخصی از Mg/Al تهیه شدند (وزن آنها طوری انتخاب شد که نسبت منیزیم به آلومینیوم دو به یک باشد). سپس این محلول‌ها در واکنش‌گاه<sup>۱۹</sup> (راکتور) به یکدیگر افزوده و به مدت ۳۰ دقیقه توسط گاز نیتروژن وارد شده از یکی از دهانه‌های واکنش‌گاه، دی‌اکسید کربن‌زدایی شدند. در طول مدت زمان سنتز، pH محلول توسط pH متر که از دهانه واکنش‌گاه در سوسپانسیون قرار دارد، پایش شد. سپس pH محلول توسط هیدروکسید

## ۲-۳-۲- ارزیابی داربست

۲-۳-۱- پراش پرتو ایکس<sup>۲۴</sup> (XRD)

شناخت فازهای موجود در پودر سنتز شده به وسیله تکنیک پراش پرتو ایکس صورت گرفت. الگوهای پراش پرتو ایکس با استفاده از دستگاه پراش سنج مدل D5000 ساخت شرکت SIEMENS با پرتو CuK $\alpha$  به طول موج ۱/۵۴۰۵۱ و ولتاژ شتاب دهنده ۳۵ کیلوولت در محدود ۷۰-۵ با طول گام ۰/۰۲ تهیه شد.

۲-۳-۲- طیف سنجی مادون قرمز با تبدیل فوریه<sup>۲۵</sup> (FTIR)

برای بررسی طیف مادون قرمز نمونه‌ها از دستگاه BRUKER مدل TENSOR 27، در محدوده ۴۰۰۰-۵۰۰ بر سانتی‌متر استفاده شد. در این آزمون از پتاسیم برمید به عنوان رقیق کننده استفاده شد.

۲-۳-۲- میکروسکوپ الکترونی روبشی<sup>۲۶</sup> (SEM)

در این پژوهش برای بررسی اندازه ذرات پودرها و مورفولوژی آنها از دستگاه میکروسکوپ الکترونی روبشی مدل VEGA ساخت شرکت TSCAN جمهوری چک استفاده شد. ابتدا نمونه‌ها توسط دستگاه پوشاننده با ورقه نازکی از طلا پوشانده می‌شوند تا رسانا شوند.

۲-۳-۲- آزمون طیف سنجی پراش انرژی پرتو ایکس<sup>۲۷</sup>

## EDX روی داربست‌ها

آزمون طیف سنجی پراش انرژی پرتو ایکس روشی برای تعیین عناصر تشکیل دهنده مواد است. علاوه بر بررسی اندازه ذرات و مورفولوژی برای تعیین عناصر از دستگاه میکروسکوپ الکترونی روبشی مدل VEGA ساخت شرکت TSCAN جمهوری چک استفاده شد. به منظور افزایش هدایت الکتریکی سطح نمونه‌ها و وضوح بیشتر تصاویر، پیش از عکسبرداری لایه نازکی از طلا روی نمونه‌ها پاشیده شد. برای تعیین حضور عناصر Mg و Al در ساختار از آزمون پراش انرژی پرتو ایکس استفاده شد.

سدیم ۰/۱ مولار که به صورت قطره قطره به محلول اضافه شد، کنترل شد و نمونه در مدت زمان مشخصی در دمای محیط تحت عملیات پیرسازی<sup>۲۰</sup> قرار گرفت. پس از طی مدت زمان پیرسازی مشخص، رسوب به دست آمده درون راکتور هیدروترمال<sup>۲۱</sup> به حجم ۵۵ میلی‌لیتر ریخته و درون آن حرارتی با دمای ۱۲۰ درجه سانتی‌گراد و مدت زمان ۲۴ ساعت قرار گرفت. بعد از طی زمان معین، هیدروترمال راکتور از درون آن بیرون آورده شد و پس از سرد شدن، نمونه از راکتور خارج شد. برای خارج کردن آب از نمونه، بار دیگر عمل سانتریفیوژ انجام شد. در مرحله بعد نمونه پس از سه بار شستشو توسط سانتریفیوژ جداسازی شد. در انتها نمونه‌ها در خشک‌کن انجامی به منظور به دست آوردن پودر قرار گرفت.

## ۲-۲- سنتز داربست

برای ساخت داربست‌ها از پلی‌کاپرولاکتون به عنوان فاز پلیمری و از هیدروکسید دوگانه لایه‌ای به عنوان فاز سرامیکی و از دی‌کلرومتان<sup>۲۲</sup> (DCM) و دی‌متیل فرم‌آمید<sup>۲۳</sup> (DMF) به عنوان حلال استفاده شد. در این تحقیق، نسبت LDH/PCL به دی‌کلرومتان/دی‌متیل فرم‌آمید در همه نمونه‌ها ۱۲ درصد ثابت در نظر گرفته شد. قبل از آماده‌سازی محلول الکتروریسی، هیدروکسید دوگانه لایه‌ای با درصدهای وزنی ۰/۱، ۱ و ۱۰ درصد نسبت به جرم پلی‌کاپرولاکتون، به مدت ۹۰ دقیقه درون دی‌متیل فرم‌آمید تحت امواج مافوق صوت یکنواخت شد. پلی‌کاپرولاکتون (۱۲ درصد وزنی - حجمی) در دی‌کلرومتان حل شد. مخلوط به محلول همزن مغناطیسی برای یکنواخت شدن قرار گرفت. لازم به ذکر است که نسبت دی‌کلرومتان به دی‌متیل فرم‌آمید، ۴:۱ حجمی/حجمی در نظر گرفته شد. چهار میلی‌لیتر از محلول نهایی PCL-LDH درون سرنگ با قطر سوزن ۲۱ G کشیده شد. ولتاژ اعمال شده در این الکتروریسی ۱۷ کیلوولت و نرخ تغذیه ۱۲ میلی‌لیتر بر ساعت در نظر گرفته شد. فاصله سوزن از کالکتور ۲۳ سانتی‌متر و در دمای محیط الکتروریسی انجام گرفت.

**۲-۳-۵- خواص مکانیکی داربست‌ها**

برای بررسی خواص مکانیکی داربست‌های الکترورسی شده از آزمون کشش استفاده شد که به این منظور از دستگاهی با مدل SMT-20 ساخت شرکت Santam کشور ایران استفاده شد. داربست‌های الکترورسی شده به صورت مستطیلی به ابعاد  $10 \times 20$  میلی‌متر مربع بریده شدند و در داخل فک‌های بالا و پایین دستگاه قرار گرفت، درحالی که فاصله بین دو فک ۲۰ میلی‌متر در نظر گرفته شد. سرعت حرکت فک‌ها پنج میلی‌متر بر دقیقه تنظیم شد. برای هر یک از داربست‌ها این آزمون سه بار تکرار شد. ضخامت فیبرهای داربست بین ۱۰۰ تا ۲۰۰ میکرومتر اندازه‌گیری شد.

**۲-۴-۱- ارزیابی‌های زیستی****۲-۴-۱- بررسی مورفولوژی سلول**

برای بررسی مورفولوژی سلولی از دستگاه میکروسکوپ الکترونی روبشی مدل XL30 ساخت شرکت PHILIPS استفاده شد. برای هر نمونه ۳۰۰۰ سلول بنیادی آدیپوژنیک مستخرج از بافت چربی در محیط کشت DMEM کشت داده و روی داربست‌های الکترورسی شده کشت شدند. بعد از گذشت زمان لازم داربست‌ها سه بار با محلول نمک فسفات با خاصیت بافری<sup>۲۸</sup> (PBS) شسته و به مدت سه روز سلول‌ها با گلو تار آلدئید ۲/۵ درصد با مشخصات Merck 8.14393.1000 تثبیت شدند. بعد از سه روز نمونه‌ها از گلو تار آلدئید خارج و با محلول نمک فسفات با خاصیت بافری سه بار شسته شد. سپس داربست‌ها را داخل پتری دیش قرار داده و به ترتیب با الکل ۳۰، ۴۰، ۵۰، ۷۰، ۸۰، ۹۰، ۹۶ و ۱۰۰ درصد برای دو بار و هر بار به مدت ۱۰ دقیقه دهیدراته شد و به مدت یک شبانه‌روز زیر هود قرار داده شدند تا داربست‌ها به طور کامل خشک شوند.

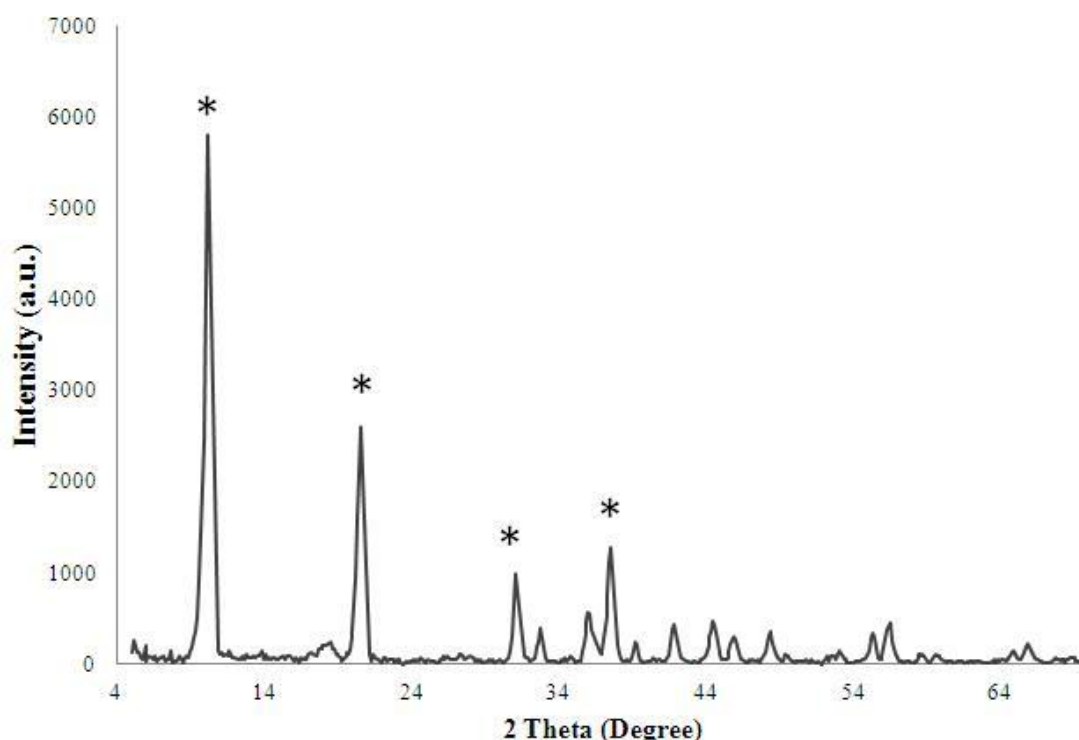
**۲-۴-۲- تمایز سلول‌های بنیادی آدیپوژنیک مستخرج از****بافت چربی<sup>۲۹</sup> (ADSC) به سلول‌های چربی**

به منظور بررسی تأثیر داربست‌ها روی تمایز سلول‌های بنیادی

آدیپوژنیک مستخرج از بافت چربی در پاساژ سوم استفاده شد که بدین منظور ۳۰۰۰ سلول روی هر یک از داربست‌ها کشت شد و از محیط کشت تمایزی چربی (Pen/strep 1% ,DMEM High Glucose % 10 FBS )  $10 \text{ nM } \beta\text{-glycero phosphate}$ ،  $0.1 \mu\text{M Dexamethasone}$  و  $0.05 \text{ mM Ascorbate}$  که از دانشگاه تربیت مدرس تهران خریداری شده بود، استفاده شد. محیط کشت هر پلیت سه روز یکبار تعویض و بعد از ۱۴ روز توسط رنگ اوایل‌رد (Oil red) رنگ‌آمیزی شد. پروتکل رنگ‌آمیزی به شرح زیر است که ۰/۳۵ گرم از رنگ اوایل‌رد در ۱۰۰ میلی‌لیتر ایزوپروپانول حل کرده و یک روز در دمای اتاق نگهداری می‌شود. در ادامه، محلول حاصل را فیلتر کرده و ۶۰ میلی‌لیتر از محلول فیلتر شده را برداشته و ۳۰ میلی‌لیتر آب به آن اضافه و یک شبانه‌روز در دمای چهار درجه سانتی‌گراد نگهداری شد. در نهایت محلول حاصل دو بار فیلتر شده و روی داربست‌ها ریخته شد و داربست‌های دارای سلول‌های چربی توسط محلول نمک فسفات با خاصیت بافری شستشو شده و برای یک ساعت در پارافرمالدهید چهار درصد فیکس می‌شوند. سپس با محلول نمک فسفات با خاصیت بافری و آب دوبار تقطیر شستشو و بعد توسط رنگ اوایل‌رد ۰/۱ درصد برای دو ساعت رنگ‌آمیزی و در نهایت توسط میکروسکوپ نوری بررسی شد.

**۳- نتایج و بحث****۳-۱- آزمون پراش پرتو ایکس**

همان‌طور که در شکل (۱) الگوی پراش پرتو ایکس مشخص است، الگوی پراش پرتو ایکس نمونه از الگوهای شبه هیدروتالیستی تبعیت می‌کند و دارای پیک‌های مشخصه هیدروکسید دوگانه لایه‌ای است. الگوها شامل یک طیف با تعداد پیک‌های کم، پیک‌های تیز و متقارن در زوایای کم و پیک‌های به نسبت پهن و نامتقارن در زوایای بالا هستند، که این خصوصیات ویژگی‌های اصلی الگوی پراش پرتو ایکس کانی‌های رسی با ساختار لایه‌ای هستند.



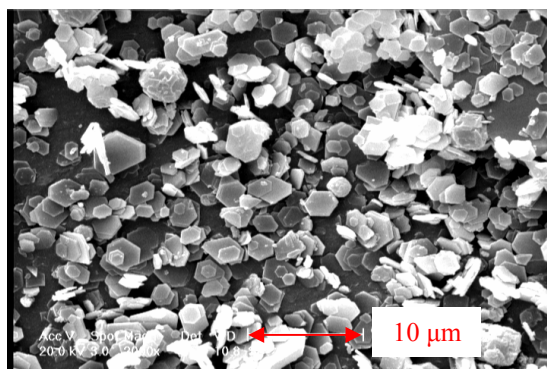
شکل ۱- الگوی پراش پرتو ایکس نمونه Mg/Al LDH

هیدروکسید دوگانه لایه‌ای در زوایای کم، پیک‌های (۰۰۳)، (۰۰۶) و (۰۰۹) را دارد. الگوی پراش پرتو ایکس ماده سنتز شده مطابق با الگوی استاندارد مواد شبه هیدروتالسیت است.

### ۳-۲- بررسی میکروسکوپی الکترونی روبشی

به‌منظور بررسی ساختار و مورفولوژی پودر سنتز شده از تصاویر میکروسکوپی الکترونی روبشی استفاده شد. با توجه به تصویر پودر سنتز شده، مورفولوژی مربوط به ساختار هیدروکسید دوگانه لایه‌ای دیده می‌شود (شکل ۲). برخی از خصوصیات هیدروکسید دوگانه لایه‌ای عبارتند از: (۱) داشتن ساختار لایه‌ای دوبعدی که یک بعد آن در محدوده نانومتر قرار می‌گیرد. ضخامت یک لایه تتراهدرال-اکتاهدرال حدود ۰/۰۷ نانومتر و برای یک لایه تتراهدرال-اکتاهدرال حدود یک نانومتر است. از این رو رس‌ها را می‌توان مواد ذاتاً نانو نامید. (۲) ناهمسانی در لایه‌ها یا ذرات و (۳) داشتن چند سطح شامل سطح پایه‌ای خارجی، سطح لبه و سطوح داخلی.

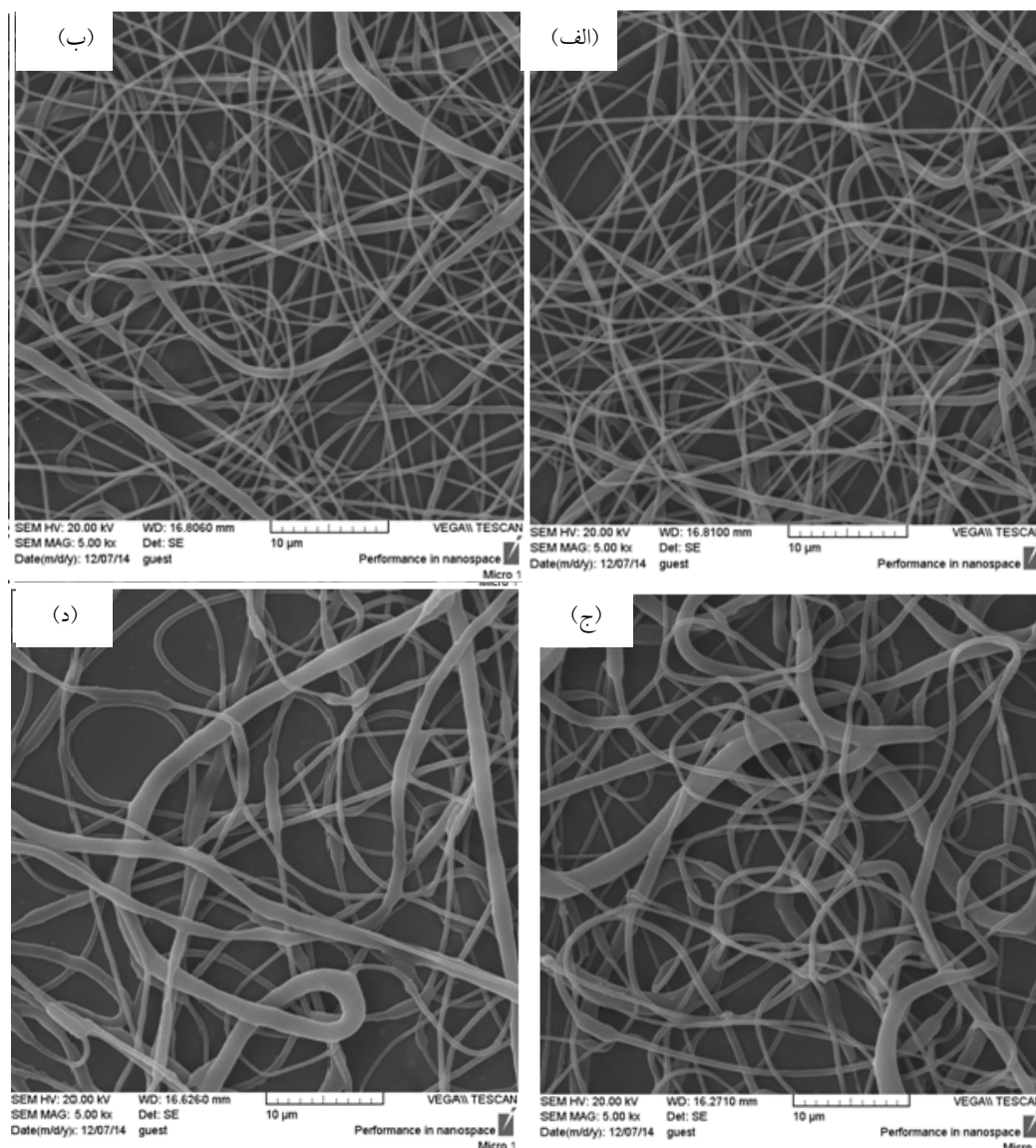
در محدوده  $2\theta$ ، در ناحیه بین زوایای ۱۱ و ۱۴/۵ درجه و همچنین ۲۴/۵ و ۲۹/۵ درجه مربوط به محل قرارگیری پیک‌های (۰۰۳) و (۰۰۶) است. صفحات  $\text{OH}^-$  در لایه شبه بروسیت دارای دو نوع پلی‌تیپ هستند، رمبوهدرال و هگزاگونال. به‌طور کلی سه بخش مختلف در الگوی پراش پرتو ایکس قابل مشاهده است: مجموعه پیک‌های تیز در زوایای کم که مربوط به صفحات اتمی (۰۰۱) هستند. این پیک‌ها در واقع نشان‌دهنده فاصله بین لایه‌ای و ضخامت لایه شبه‌بروسیتی هستند. پیک مربوط به صفحه اتمی  $110^\circ$  در زوایای بالا که معادل نصف پارامتر شبکه  $a$  است. پارامتر شبکه  $a$  در واقع فاصله بین دوکاتیون مجاور را نشان می‌دهد. سومین بخش الگوی پراش پرتو ایکس مجموعه پیک‌های مربوط به صفحات اتمی  $L01$  است که اغلب برای تعیین الگوی قرارگیری لایه‌ها روی یکدیگر استفاده می‌شود. بر مبنای این حقیقت که پراش پرتو ایکس برای هر ماده بلوری منحصر به فرد است، می‌توان با توجه به الگوی پراش پرتو ایکس ماده آن را شناسایی کرد. الگوی پراش پرتو ایکس یک



شکل ۲- تصویر میکروسکوپی الکترونی روبشی پودر هیدروکسید دوگانه لایه‌ای

الکتریکی بیشتر باشد کشیدگی جت و جدا شدن آن نیز سریع‌تر خواهد بود که منجر به تولید الیافی با قطر کم می‌شود. از سوی دیگر افزایش نرخ جریان حاصل از افزایش نیروی کشش منجر به افزایش ضخامت داربست‌ها می‌شود. با توجه به توضیحات بالا، فاکتورهای گفته شده همزمان روی قطر الیاف و توزیع مؤثرند. افزودن هیدروکسید دوگانه لایه‌ای می‌تواند سبب بهبود هدایت الکتریکی و ضریب دی‌الکتریک محلول پلی‌کاپرولاکتون شود درحالی که نرخ جریان به اندازه کافی بالا نگه‌داشته شود. بنابراین، افزودن مقادیر کم هیدروکسید دوگانه لایه‌ای منجر به تولید الیاف نازک‌تر می‌شود، زیرا پارامترهای هدایت الکتریکی و ضریب دی‌الکتریک توانسته‌اند بر پارامترهای کشش سطحی و گرانیوی غلبه کنند، و افزودن بیشتر هیدروکسید دوگانه لایه‌ای منجر به افزایش گرانیوی و درگیر شدن مولکول‌های حلال در محلول پلیمری می‌شود. همین عامل سبب کاهش کشش سطحی محلول پلیمری و در نهایت قطر الیاف و توزیع وسیع‌تر آن می‌شود. نتایج نشان می‌دهد که داربست پلی‌کاپرولاکتون دارای الیاف یکنواخت‌تری نسبت به داربست‌های کامپوزیتی است. علاوه بر این سطح داربست پلیمری خالص صاف‌تر است درحالی که با افزودن فاز سرامیکی سطح داربست زبرتر شده است. همان‌طور که در تصاویر مشاهده می‌شود، با وجود افزودن فاز سرامیکی تغییری در الیاف (بید یا گره الیاف) مشاهده نمی‌شود که علت آن توزیع یکنواخت فاز سرامیکی و درگیر شدن منومرهای پلیمری در فاز سرامیکی است.

تصاویر الیاف داربست‌های الکترونیسی شده پلی‌کاپرولاکتون و کامپوزیت PCL+LDH در شکل (۳) نشان داده شده است. تأثیر افزودن فاز سرامیکی به پلیمر روی سطح داربست‌ها و قطر الیاف توسط میکروسکوپی الکترونی روبشی بررسی شد. نتایج نشان داد که میانگین قطر الیاف برای داربست پلی‌کاپرولاکتون فاقد نانوذرات حدود ۰/۲ تا ۰/۹ میکرومتر بود (۱۰۰ لایف = n). درحالی که داربست پلی‌کاپرولاکتونی حاوی ۰/۱ درصد LDH میانگین قطر الیاف الکترونیسی شده را به ۰/۱-۱/۲ کاهش داد. افزودن بیشتر هیدروکسید دوگانه لایه‌ای سبب افزایش ضخامت الیاف و توزیع گسترده‌تر قطر الیاف می‌شود. هدایت الکتریکی محلول یکی از عوامل مهم و اثرگذار روی قطر و توزیع الیاف الکترونیسی شده است. محلول پلیمری به‌وسیله پمپ ریسندگی به نازل منتقل می‌شود و در ادامه محلول پلیمری تحت کشش سطحی خود، در انتهای نازل نگه‌داشته می‌شود. با اعمال ولتاژ با قطبیت مخالف به نازل و جمع‌کننده، میدان الکترومغناطیسی بین نازل و جمع‌کننده شکل می‌گیرد. با افزایش میدان الکتریکی و با غلبه بر نیروهای کشش سطحی محلول پلیمری، سیال از حالت قطره‌های واقع بر نازل، به شکل مخروطی موسوم به جت مخروطی تیلور درمی‌آید. محلول پلیمری تحت تأثیر میدان الکترومغناطیس و جاذبه میان قطب‌های مخالف در نازل و صفحه جمع‌کننده کشیده شده و به شکل رشته‌های بسیار ظریف، روی صفحه جمع‌کننده جمع می‌شود. در فضای بین نازل و صفحه جمع‌کننده، با تبخیر حلال نانوالیاف جامد روی جمع‌کننده تشکیل می‌شوند. از این‌رو هر چه ضریب هدایت



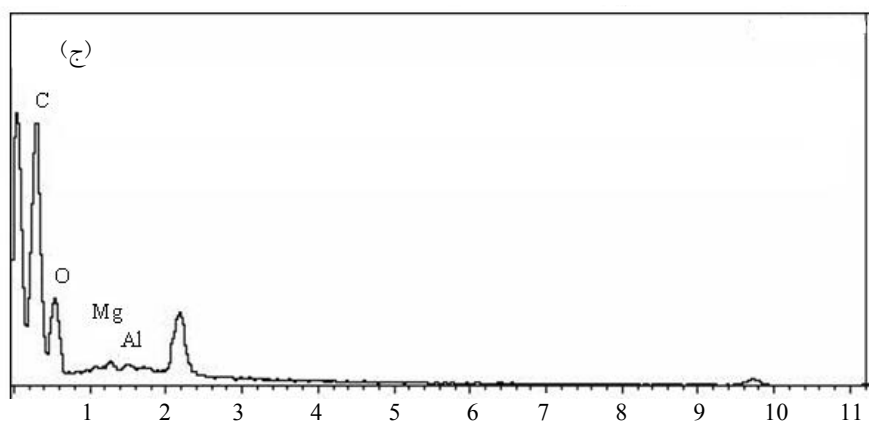
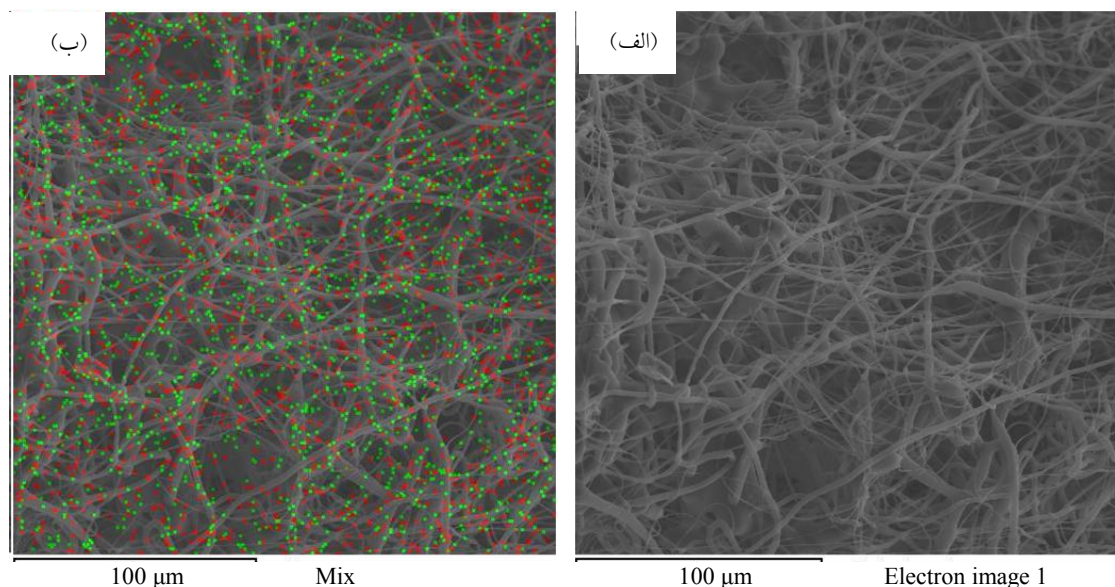
شکل ۳- تصاویر میکروسکوپی الکترونی روبشی داربست‌های الکترونیسی شده به ترتیب مربوط به: الف) پلی‌کاپرولاکتون و حاوی، ب) ۱/۰، ج) ۱ و د) ۱۰ درصد هیدروکسید دوگانه لایه‌ای

### ۳-۳- طیف‌سنجی پراش انرژی پرتو ایکس

برای بررسی عناصر تشکیل دهنده، توزیع یکنواخت هیدروکسید دوگانه لایه‌ای و ماهیت ساختاری داربست‌ها از طیف‌سنجی پراش انرژی پرتو ایکس استفاده شد. توزیع یکنواخت فاز سرامیکی در فاز پلیمری از اهمیت فراوانی برخوردار است، زیرا تجمع فاز سرامیکی در یک منطقه منجر به ایجاد بیدهایی در داربست می‌شود که نه تنها مورفولوژی داربست را تحت تأثیر قرار می‌دهد، بلکه منجر به تخریب سریع منطقه مذکور نیز می‌شود. همان‌طور که در

شکل (۴) مشاهده می‌شود، پیک بزرگ متعلق به کربن و اکسیژن از اجزای اصلی پلی‌کاپرولاکتون است. پراش انرژی پرتو ایکس داربست PCL+10%LD علاوه بر پیک‌های پلی‌کاپرولاکتون، پیک‌های عناصر منیزیم (نقاط سبز رنگ) و آلومینیوم (نقاط قرمز رنگ) به‌عنوان جزء تشکیل‌دهنده هیدروکسید دوگانه لایه‌ای را نیز داراست. گفتنی است که وجود عنصر طلا در نمودارهای طیف‌سنجی پراش انرژی پرتو ایکس مربوط به پوشش طلای اعمال شده برای انجام آنالیز است.





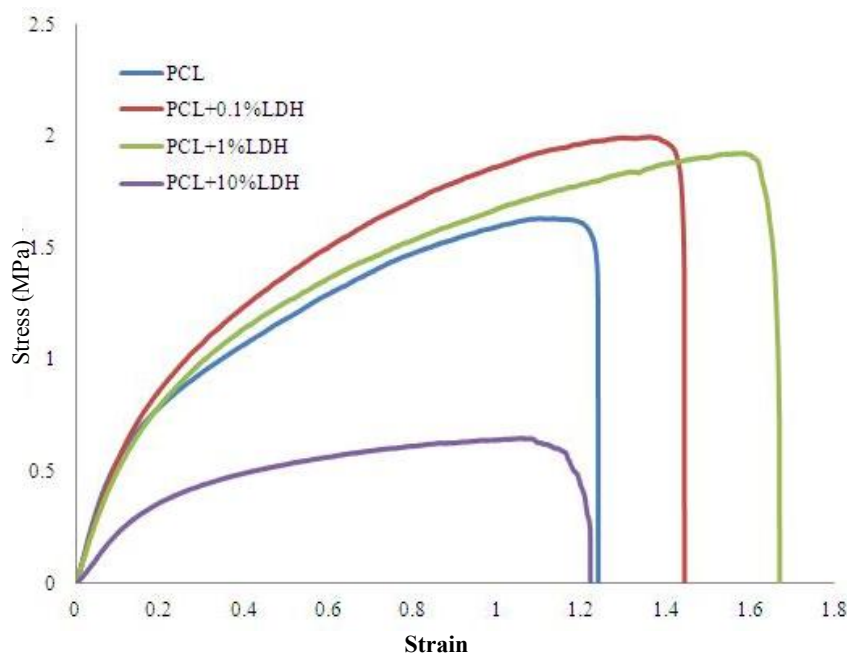
شکل ۴- الف) تصویر میکروسکوپی الکترونی روبشی، ب) آنالیز نقشه عنصری و ج) الگوی پراش انرژی پرتو ایکس (منبزم نقاط سبز رنگ) و آلومینیوم (نقاط قرمز رنگ)) از داربست لیفی پلی کاپرولاکتون + ۱۰ درصد هیدروکسید دوگانه لایه‌ای (رنگی در نسخه الکترونیکی)

ارگان را تقلید کنند درحالی که نقش حمایت مکانیکی را در طول بازسازی بافت حفظ کنند. همان‌طور که دیده می‌شود، مدول یانگ، تنش در نقطه شکست، و استحکام کششی نهایی محاسبه شد. اثر هیدروکسید دوگانه لایه‌ای بر خواص مکانیکی داربست توسط آزمون کششی تک محوره بررسی شد (شکل ۵). داربست پلی کاپرولاکتون الکترورسی شده دارای مدول یانگ ۷/۲۳ مگاپاسکال، کشیدگی ۱۲۶ درصد و استحکام کششی ۱/۶۳ مگاپاسکال بود. افزودن نانورس (۱/۰ درصد) منجر به کاهش در مدول یانگ به ۶/۳ مگاپاسکال و افزایش طول به ۱۴۵ درصد و استحکام کششی به ۱/۹۹۶ مگاپاسکال شد.

نقشه طیف‌سنجی پراش انرژی پرتو ایکس نشان‌دهنده توزیع یکنواخت فاز سرامیکی در فاز زمینه (فاز پلیمری) است، که یکنواختی توزیع فاز سرامیکی را در داربست PCL+10%LDH می‌توان مشاهده کرد که نشان‌دهنده نقش دی‌متیل فرم‌آمید در پراکندگی یکنواخت هیدروکسید دوگانه لایه‌ای است.

### ۴-۳- آزمون مکانیکی

خصوصیات مکانیکی داربست‌ها تأثیرات فراوانی را روی اتصال و تکثیر سلول‌ها دارد. علاوه بر این، داربست‌ها به‌منظور کاربرد خاص باید ویژگی‌های طبیعی بافت هدف و یا



شکل ۵- نمودار تنش- کرنش داربست‌های لیفی حاوی غلظت‌های مختلف هیدروکسید دوگانه لایه‌ای (رنگی در نسخه الکترونیکی)

جدول ۱- خصوصیات مکانیکی داربست‌های لیفی حاوی غلظت‌های مختلف هیدروکسید دوگانه لایه‌ای

نام نمونه	استحکام کششی نهایی (مگاپاسکال)	کرنش (درصد)	مدول یانگ (مگاپاسکال)
PCL	۱/۶۳±۰/۱۲	۱۲۶±۴	۷/۲۳±۰/۰۶
PCL + ۰/۱٪	۱/۹۹۶±۰/۲۹	۱۴۵±۸	۶/۳۰۰±۰/۰۵۴
PCL + ۱٪	۱/۹۲۰±۰/۲۹	۱۴۵±۵	۵/۱۱±۰/۰۱۵
PCL + ۱۰٪	۰/۹±۰/۴۵	۱۰۳±۱۲	۱/۹۴۱±۰/۷۱

پس از آن، افزایش بیشتر در مقدار هیدروکسید دوگانه لایه‌ای به (یک درصد) منجر به کاهش در مدول یانگ به ۵/۱۱ مگاپاسکال و افزایش طول تا ۱۴۵ درصد، درحالی که استحکام کششی تقریباً ثابت باقی مانده ۱/۹۲۰، با افزایش مقدار هیدروکسید دوگانه لایه‌ای تا ۱۰ درصد، مدول یانگ، استحکام کششی به‌طور قابل توجهی کاهش می‌یابد (جدول ۱). علت آن می‌تواند مربوط به به توزیع گسترده‌تر قطر الیاف باشد که از توزیع یکنواخت تنش جلوگیری می‌کند. علاوه بر این، ممکن است هیدروکسید دوگانه لایه‌ای S به‌عنوان افزایش دهنده تنش عمل کند. این یافته‌ها نشان داد که افزایش مقادیر کم هیدروکسید دوگانه لایه‌ای منجر به کاهش‌پذیری بالاتر الیاف

می‌شود که بیشتر به دلیل در یک راستا قرار گرفتن الیاف در طول تغییر شکل مکانیکی هست. باید توجه داشت که فرایند الکتروریسی ممکن است روی نیروهای الکترواستاتیک و در نتیجه تعامل بین پلی‌کاپرولاکتون و هیدروکسید دوگانه لایه‌ای اثرگذار باشد. با این حال، در غلظت‌های زیاد هیدروکسید دوگانه لایه‌ای، اندازه ناهمگن الیاف و تشکیل مرکز تنش کوچک‌تر منجر به یکنواختی کمتر الیاف در منطقه شکسته و تجمع گروهی غیرقابل قبول الیاف مشاهده می‌شود. این نتایج نشان داد که به‌منظور بهره بردن از اثرات مطلوب افزودن نانورس‌ها باید غلظت مناسبی از نانورس که سبب افزایش قدرت کشسانی و ازدیاد طول کشش می‌شود را انتخاب کرد. از

خاص تأثیر چشمگیری دارد. هدف مهندسی بافت، تولید یک داربست ایده‌آل است که بتواند شرایط ریزمحیطی داخل بدن را تقلید کند و پاسخ سلولی مطلوبی را ارائه دهد. واکنش اولیه سلول‌ها به داربست نه تنها روی چسبندگی، تکثیر و تمایز سلول اثرگذار است، بلکه مسیرهای پیام‌رسانی ویژه‌ای را فراهم می‌کند که سبب تمایز سلول‌ها به رده خاصی می‌شود. در این مطالعه، سلول‌های بنیادی آدیپوز مشتق از موش روی داربست لیفی کشت داده شدند و پس از آن در معرض محیط کشت القایی چربی به منظور بررسی اثر داربست لیفی در پتانسیل تمایز آنها قرار گرفتند. تشکیل قطرات چربی مشخصه تمایز چربی است. برای قطرات چربی پس از ۱۴ روز از کشت اولیه در تمام نمونه‌ها مشاهده شود (شکل ۷-الف). از آنجا که الیاف نیز در طول روش رنگ‌آمیزی، رنگ شده‌اند، داده‌ها در روز دوم بررسی و هم‌تراز سازی شدند. این زمان با توجه به تشکیل اولین قطرات چربی در سلول انتخاب شده است. تجمع چربی در سلول‌های کشت شده روی داربست پلی‌کاپرولاکتون + ۱۰ درصد هیدروکسید دوگانه لایه‌ای اختلاف معنی‌داری در مقایسه با پلی‌کاپرولاکتون + ۱ درصد هیدروکسید دوگانه لایه‌ای و پلی‌کاپرولاکتون + ۱ درصد هیدروکسید دوگانه لایه‌ای ندارد، درحالی که با سلول‌های کشت شده در داربست پلی‌کاپرولاکتون اختلاف معنی‌دار وجود دارد. به‌عنوان شاهد، تعداد مساوی از سلول‌ها در ظرف کشت دوبعدی تحت همان شرایط نگهداری شدند. این نتایج نشان داد که افزودن نانورس هیدروکسید دوگانه لایه‌ای به زمینه پلی‌کاپرولاکتون می‌تواند آدیپوزنز در سلول‌های بنیادی مزانشیمی را افزایش دهد. در مجموع، بررسی‌های بیشتری درخصوص تمایز سلول‌های چربی مورد نیاز است.

#### ۴- نتیجه‌گیری

داربست PCL-LDH به‌کمک روش الکتروریسی با درصدهای مختلف هیدروکسید دوگانه لایه‌ای ساخته شد. آنالیزهای میکروسکوپی الکترونی روبشی و طیف‌سنجی پراش انرژی پرتو ایکس توزیع یکنواخت هیدروکسید دوگانه لایه‌ای را در الیاف پلی‌کاپرولاکتون تأیید کرد.

این‌رو با مهندسی مدول الاستیکی می‌توان داربستی با توان کشسانی کمینه و بیشینه ساخت.

#### ۳-۵- ارزیابی زیستی

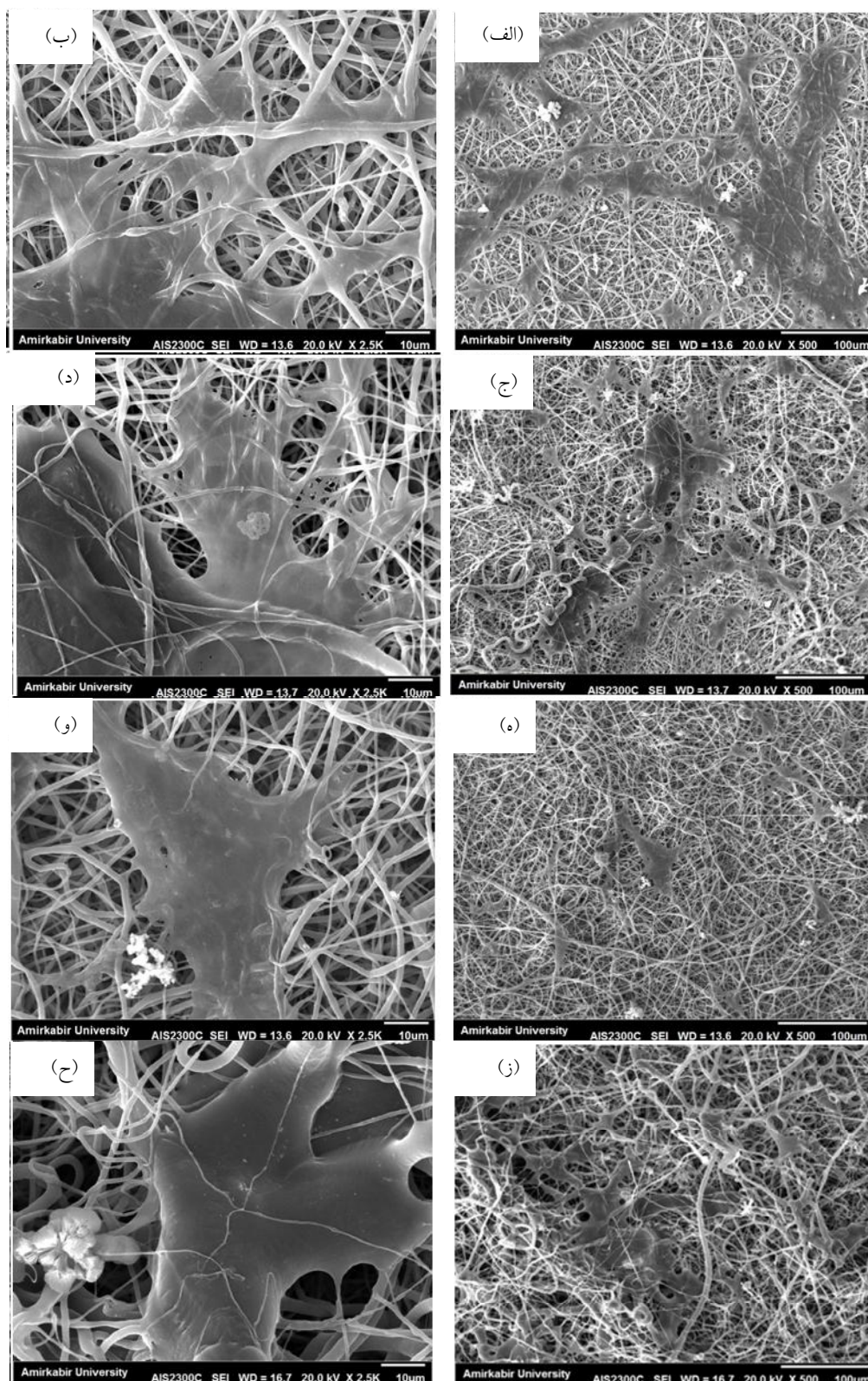
##### ۳-۵-۱- مورفولوژی سلولی

ساختار داربست‌های مهندسی بافت به‌طور مستقیم بر رفتار سلول و ایجاد کلونی سلولی تأثیر می‌گذارند، و گسترش سلول‌ها در داربست را تنظیم می‌کند. به‌منظور مطالعه مورفولوژی سلول‌های بنیادی آدیپوز مشتق از موش (mADSCs) کشت شده بر داربست، میکروسکوپی الکترونی روبشی استفاده شد (شکل ۶). در هر دو داربست نانوکامپوزیتی پلی‌کاپرولاکتون و PCL-LDH، گسترش سلول‌ها به‌خوبی قابل مشاهده است که با الگوی نامنظم روی الیاف پهن شدند و ماتریکس خارج سلولی ترشح کردند. همان‌طور که در میکروگراف‌های میکروسکوپی الکترونی روبشی مشاهده می‌شود سلول‌ها به‌صورت مسطح و ورقه‌ای در طول الیاف گسترده شدند. حالت دوکی شکل سلول‌ها نشان‌دهنده مناسب بودن محیط برای رشد سلولی است. برخی از سلول به منافذ داربست PCL-LDH مهاجرت و در لایه‌های مختلف گسترده شدند، درحالی که این پدیده را نمی‌توان در داربست پلی‌کاپرولاکتون دید. این ممکن است به‌دلیل خلل‌وفرج بزرگ‌تر و حضور عوامل القاکننده باشد که سبب تسهیل اتصال و گسترش سلول‌ها می‌شود.

##### ۳-۵-۲- تمایز سلول‌های سلول‌های بنیادی مزانشیمی به

##### سلول‌های آدیپوسیت<sup>۳۰</sup> (ADC)

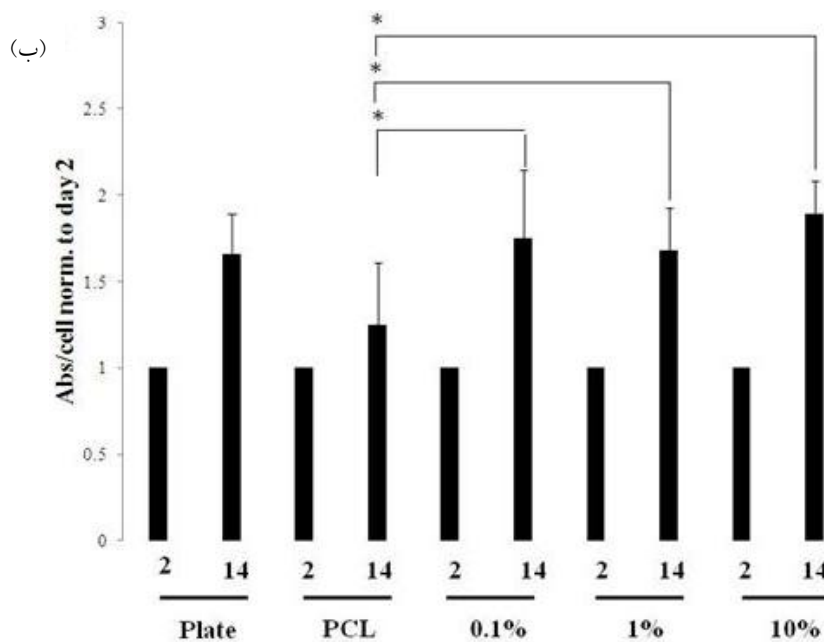
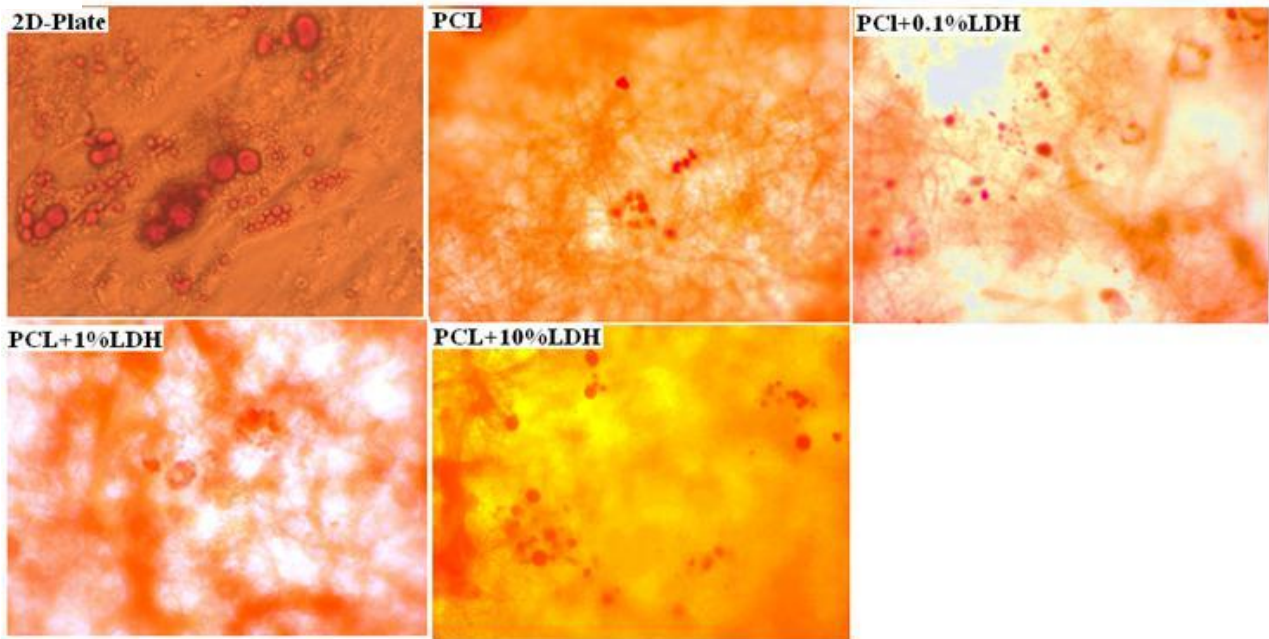
سلول‌های بنیادی مزانشیمی (MSC) را می‌توان از بافت‌های مختلف مانند مغز استخوان، بافت چربی، و پالپ دندان استخراج کرد. سلول‌های بنیادی مزانشیمی توانایی ساخت سلول مشابه خود را دارند، این توانایی، آنها را گزینه خوبی برای کاربردهای بالینی به‌منظور ترمیم بافت و بازسازی قرار می‌دهد. شرایط محیطی روی جهت‌گیری تمایز سلول‌ها به رده



شکل ۶- مورفولوژی سلول بنیادی آدیپوز مشتق از بافت چربی موش پس از کاشت مربوط به:

الف و ب) پلی کاپرولاکتون، ج و د) پلی کاپرولاکتون + ۱٪ درصد هیدروکسید دوگانه لایه‌ای، ه و و) پلی کاپرولاکتون + ۱۰ درصد هیدروکسید دوگانه لایه‌ای و ح و ط) پلی کاپرولاکتون + ۱۰ درصد هیدروکسید دوگانه لایه‌ای

(الف)



شکل ۷- الف) تصاویر میکروسکوپی نوری از تشکیل قطرات چربی و

ب) نمودار کمی میزان تمایز سلول‌های آدیپوز مشتق از بافت چربی به آدیپوسیت در داربست‌های مختلف  $P \leq 0.05$

کرنش شکست شد، درحالی که مدول الاستیک اندکی کاهش یافت. با افزودن هیدروکسید دوگانه لایه‌ای، چسبندگی، تکثیر و تمایز سلول‌های بنیادی آدیپوز مشتق از بافت چربی موش به‌طور قابل توجهی بهبود یافت. به‌طور خلاصه، داربست

متوسط قطر الیاف در پلی‌کاپرولاکتون + ۱٪ درصد هیدروکسید دوگانه لایه‌ای در مقایسه با پلی‌کاپرولاکتون خالص کاهش یافت. نتایج آنالیز مکانیکی نشان داد که اضافه کردن مقدار کم‌هیدروکسید دوگانه لایه‌ای باعث افزایش استحکام کششی و

## تشکر و سپاسگزاری

پژوهش حاضر در قالب طرح پژوهانه در پژوهشگاه ملی مهندسی ژنتیک و زیست فناوری انجام شده است. بدین وسیله از حمایت مالی و فنی پژوهشگاه ملی مهندسی ژنتیک و زیست فناوری، پژوهشکده زیست فناوری پزشکی تقدیر و تشکر می‌شود.

پلی‌کاپرولاکتون غنی شده با هیدروکسید دوگانه لایه‌ای خواص بهتر و ویژگی‌های مطلوب‌تری را در مقایسه با پلی‌کاپرولاکتون خالص به همراه داشت. این نتایج به وضوح نشان داد که امکان استفاده از داربست PCL-LDH برای کاربرد در مهندسی بافت، به ویژه برای تمایز آدیپوژنیک سلول‌های بنیادی مزانشیمال مناسب است. تحقیقات آینده می‌تواند روی تمایز آدیپوژنیک و کاشت in vivo داربست‌ها متمرکز شود.

## واژه‌نامه

1. scaffold
2. extrusion
3. fiber bonding
4. solvent casting
5. gas foaming
6. freeze-drying
7. phase separation
8. melt molding
9. electrospinning
10. extracellular matrices
11. polycaprolactone
12. hydroxyapatite
13. oxides nanoparticles
14. silica
15. nano clay
16. montmorillonite
17. layered double hydroxide (LDH)
18. Adipogenic
19. co-precipitation
20. aging time
21. hydrothermal reactor
22. Dichloromethane (DCM)
23. Dimethylformamide (DMF)
24. X-ray powder diffraction (XRD)
25. fourier-transform infrared spectroscopy (FTIR)
26. scanning electron microscope (SEM)
27. energy-dispersive X-ray spectroscopy (EDX)
28. Phosphate buffered saline (PBS)
29. adipose tissue-derived stem cell (ADSC)
30. adipocyte cell (ADC)

## مراجع

1. Sabetkish, S., Kajbafzadeh, A. M., and Sabetkish, N., "Whole-Organ Tissue Engineering: Decellularization and Recellularization of Three-Dimensional Matrix Liver Scaffolds", *Journal of Biomedical Material Research Part A*, Vol. 103, No. 4, pp. 1498-1508, 2015.
2. Lanza, R., Langer, R., and Vacanti, J. P., *Principles of Tissue Engineering*: 4th Edition, 2013.
3. Yang, S., Leong, K. F., Du, Z., and Chua, C. K., "The Design of Scaffolds for Use in Tissue Engineering. Part I. Traditional Factors", *Tissue Engineering*, Vol. 7, pp. 679-89, 2001.
4. Huang, Z. M., Zhang, Y. Z., Kotaki, M., and Ramakrishna, S., "A Review on Polymer Nanofibers by Electrospinning and Their Applications in Nanocomposites", *Composites Science and Technology*, Vol. 63, pp. 2223-2253, 2003.
5. Teo, W. E., and Ramakrishna, S., "A Review on Electrospinning Design and Nanofibre Assemblies", *Nanotechnology*, Vol. 17, pp. 89-106, 2006.
6. Jang, J. H., Castano, O., and Kim, H. W., "Electrospun Materials as Potential Platforms for Bone Tissue Engineering", *Advanced Drug Delivery Reviews*, Vol. 61, No. 12, pp. 1065-1083, 2009.
7. Cipitria, A., Skelton, A., Dargaville, T. R., Dalton, P. D., and Huttmacher, D. W., "Design, Fabrication and Characterization of PCL Electrospun Scaffolds - A Review", *Journal of Materials Chemistry*, Vol. 26, pp. 9381-9792, 2011.
8. Chen, L., and Yi, B., "Electrospun Poly (L-lactide)/Poly( $\epsilon$ -caprolactone) Blend Nanofibrous Scaffold: Characterization and Biocompatibility with Human Adipose-Derived Stem Cells", *PLoS One*, Vol. 8, No. 8, pp. 14-16, 2013.
9. Gunn, J., and Zhang, M., "Polyblend Nanofibers for Biomedical Applications: Perspectives and Challenges", *Trends in Biotechnology*. Vol. 28, pp. 189-197, 2010.
10. Huttmacher, D. W., "Scaffolds in Tissue Engineering Bone and Cartilage", *Biomaterials*, Vol. 24, pp. 2529-2543, 2000.
11. Agrawal, C. M., and Ray, R. B., "Biodegradable Polymeric Scaffolds for Musculoskeletal Tissue

- Engineering”, *Journal of Biomedical Material Research Part A*, Vol. 55, pp. 141-150, 2001.
12. Woodruff, M. A., and Hutmacher, D. W., “The Return of a Forgotten Polymer - Polycaprolactone in the 21st Century”, *Progress in Polymer Science*, Vol. 35, pp. 1217-1256, 2010.
  13. Li, D., Wu, T., and He, N., “Three-Dimensional Polycaprolactone Scaffold via Needleless Electrospinning Promotes Cell Proliferation and Infiltration”, *Colloids Surfaces B Biointerfaces*, Vol. 3, pp. 432-443, 2014.
  14. Pitt, C. G., Hendren, R. W., Schindler, A., and Woodward, S. C., “The Enzymatic Surface Erosion of Aliphatic Polyesters”, *Journal of Controlled Release*, Vol. 1, pp. 3-14, 1984.
  15. Zhu, Y., Gao, C., Liu, X., and Shen, J., “Surface Modification of Polycaprolactone Membrane via Aminolysis and Biomacromolecule Immobilization for Promoting Cytocompatibility of Human Endothelial Cells”, *Biomacromolecules*, Vol. 3, pp. 1312-1319, 2002.
  16. Lam, C. X. F., Hutmacher, D. W., Schantz, J. T., Woodruff, M. A., and Teoh, S. H., “Evaluation of Polycaprolactone Scaffold Degradation for 6 Months in Vitro and in Vivo”, *Journal of Biomedical Material Research Part A*, Vol. 3, pp. 906-919, 2009.
  17. Liao, G., Jiang, S., Xu, X., and Ke, Y., “Electrospun Aligned PLLA/PCL/HA Composite Fibrous Membranes and Their in Vitro Degradation Behaviors”, *Materials Letters*, Vol. 12, No. 23, p. 3879, 2012.
  18. Wutticharoenmongkol, P., Sanchavanakit, N., Pavasant, P., and Supaphol, P., “Preparation and Characterization of Novel Bone Scaffolds Based on Electrospun Polycaprolactone Fibers Filled with Nanoparticles”, *Macromolecular Bioscience*, Vol. 5, pp. 70-77, 2006.
  19. Marras, S. I., Kladi, K. P., Tsvintzelis, I., Zuburtikudis, I., and Panayiotou, C., “Biodegradable Polymer Nanocomposites: The Role of Nanoclays on the Thermomechanical Characteristics and the Electrospun Fibrous Structure”, *Acta Biomaterialia*, Vol. 4, pp. 756-765, 2008.
  20. Schmidt, G., and Gaharwar, A. K., “Highly Extensible Bio-Nanocomposite Films with Direction-Dependent Properties”, *Advanced Functional Materials*, Vol. 20, pp. 429-436, 2010.
  21. Nitya, G., Nair, G. T., Mony, U., Chennazhi, K. P., and Nair, S. V., “In Vitro Evaluation of Electrospun PCL/Nanoclay Composite Scaffold for Bone Tissue Engineering”, *Journal of Materials Science*, Vol. 23, No. 7, pp. 1749-1761, 2012.
  22. Ambre, A. H., Katti, D. R., and Katti, K. S., “Nanoclays Mediate Stem Cell Differentiation and Mineralized ECM Formation on Biopolymer Scaffolds”, *Journal of Biomedical Material Research Part A*, Vol. 101, pp. 2644-2660, 2013.
  23. Miyata, S., “Anion-Exchange Properties of Hydrotalcite-Like Compounds”, *Clays Clay Miner*, Vol. 31, No.4, 305-311, 1983.
  24. Choy, J. H., Oh, J., and Park, M., “Layered Double Hydroxide as an Efficient Drug Reservoir for Folate Derivatives”, *Biomaterials*, Vol. 5, pp. 3059-3064, 2004.
  25. Xia, S. J., Ni, Z. M., Xu, Q., Hu, B. X., and Hu, J., “Layered Double Hydroxides as Supports for Intercalation and Sustained Release of Antihypertensive Drugs”, *Journal of Solid State Chemistry*, Vol. 13, pp. 453-458, 2008.
  26. Shafiei, S. S., Solati-Hashjin, M., Rahim-Zadeh, H., and Samadikuchaksaraei, A., “Synthesis and Characterisation of Nanocrystalline Ca-Al Layered Double Hydroxide  $\{[Ca_2 Al(OH)_6]NO_3 \cdot nH_2O\}$ : in Vitro Study”, *Advances in Applied Ceramics*, Vol. 112, No. 1, pp. 59-65, 2013.
  27. Rives, V., del Arco, M., and Martín, C., “Intercalation of Drugs in Layered Double Hydroxides and Their Controlled Release: A Review”, *Applied Clay Science*, Vol. 88, pp. 239-269, 2014.
  28. Tamaro, L., Russo, G., and Vittoria, V., “Encapsulation of Diclofenac Molecules into Poly( $\epsilon$ -Caprolactone) Electrospun Fibers for Delivery Protection”, *Journal of Nanomaterials*, Vol. 35, No. 2, pp. 120-127, 2009.
  29. Zhao, N., Shi, S., Lu, G., and Wei, M., “Polylactide (PLA)/Layered Double Hydroxides Composite Fibers by Electrospinning Method”, *Journal of Physics and Chemistry of Solids*, Vol. 69, No. 5-6, pp. 1564-1568, 2008.
  30. Miao, Y. E., Zhu, H., Chen, D., Wang, R., Tjiu, W. W., and Liu, T., “Electrospun Fibers of Layered Double Hydroxide/biopolymer Nanocomposites as Effective Drug Delivery Systems”, *Materials Chemistry and Physics*, Vol. 134, No. 2-3, pp. 623-630, 2012.