

key words

Bacterial cellulose
Nanocomposite scaffolds
Polypyrrole
Zinc nanoparticles
Biocompatibility

Fabrication of nanocomposite scaffold based on bacterial cellulose/zinc oxide nanoparticles/polypyrrole with antibacterial and cytotoxicity assessment

Sharif Heydari¹, Azadeh Asefnejad^{1*}, Nahid Hassanzadeh Nemati¹, Vahabodin Goodarzi², Ali Vaziri³

1 Department of Biomedical Engineering, Science and Research Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran.

2 Applied Biotechnology Research Center, Baqiyatallah University of Medical Science, P.O.Box 546-19945, Tehran, Iran.

3 Petroleum and Chemical Engineering Department, Science and Research Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran.

Abstract

Research subject: The rise of bacterial infections has become a serious problem in human societies. As a result, the development of nanocomposite materials based on biocompatible and non-hazardous materials, besides having antimicrobial and biocompatibility or non-cytotoxicity, associated with unique structural properties, possesses a great importance.

Research approach: In this study, bacterial cellulose (BC)/polypyrrole (PPy) and zinc nanoparticles (ZnO), which simultaneously have antimicrobial properties and cell proliferation, were introduced as a new generation of nanocomposite scaffolds produced by freeze-drying. To begin with, ZnO with different weight percentages of 1%, 3% and 5% was added to BC and then PPy in the amount of 2 mmol was embedded in the structure by in situ polymerization.

Main results: FESEM images proved that the nanofibrous and porous structure of BC was also preserved in the presence of PPy and ZnO. However, after adding PPy and ZnO, they formed a dense structure and microstructure of grape clusters. By adding 2 mmol PPy into BC and upon in situ synthesizing, the tensile strength and Young modulus of BC were significantly reduced to 71 MPa and 2.5 GPa, respectively. On the other hand, with the addition of ZnO nanoparticles, the mechanical properties significantly increased (both of Young modulus and tensile strength compared to BC/PPy samples) due to the compaction of the nanocomposite aerogel's structure and the formation of the interface of ZnO nanoparticles with both polymers of BC and PPy. The observation of the inhibition zone in the culture medium containing two gram-positive and negative bacteria, well proved the antibacterial ability of ternary nanocomposite scaffolds. The results of MT9 related to L929 on aerogels showed that by adding 3% of ZnO nanoparticles, adhesion and cell proliferation increased significantly during different days of 1 day, 5 days and 7 days of culture.

*To whom correspondence should be addressed:
azadeh_asefnejad@yahoo.com

تولید داربست نانوکامپوزیتی بر پایه سلولز باکتریایی/نانوذرات اکسیدروی/

پلی‌پیرول با بررسی قابلیت ضد میکروبی و سمیت سلولی

شریف حیدری^۱، آزاده آصف نژاد^۱، ناهید حسن زاده نعمتی^۱، وهاب الدین گودرزی^۲،

سیدعلی وزیری یزدی^۳

۱ گروه مهندسی پزشکی، واحد علوم و تحقیقات، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران

۲ مرکز تحقیق بیوتکنولوژی کاربردی، دانشگاه علوم پزشکی بقیه الله، تهران، ایران

۳ گروه مهندسی نفت و شیمی، واحد علوم و تحقیقات، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران

چکیده

موضوع تحقیق: افزایش عفونت‌های باکتریایی به مشکلی جدی در جوامع بشری تبدیل شده است. براین اساس توسعه مواد نانوکامپوزیتی مبتنی بر مواد زیست‌سازگار و بی‌خطر برای محیط زیست که علاوه بر قابلیت ضد میکروبی و زیست‌سازگاری یا عدم سمیت سلولی، خواص ساختاری منحصر به فردی نیز داشته باشد از اهمیت بالایی برخوردار است.

روش تحقیق: در این پژوهش، سلولز باکتریایی (BC)/پلی‌پیرول (PPy) و نانوذرات اکسیدروی (ZnO) که همزمان دارای خواص ضد میکروبی و قابلیت تکثیر سلولی باشند، به عنوان نسل جدیدی از ایروزل نانوکامپوزیتی که به روش خشک کردن انجمادی تولید شدند، معرفی شد. بر این اساس ابتدا ZnO با درصدهای وزنی مختلف ۱٪، ۳٪ و ۵٪ به BC اضافه شد و سپس PPy در مقدار ۲ mmol به روش پلیمری شدن درجا در ساختار مذکور تعبیه شد. **نتایج اصلی:** تصاویر FESEM اثبات کرد که ساختار نانولیفی و متخلخل BC، در حضور PPy و ZnO نیز حفظ شده است. هرچند بعد از افزودن PPy و ZnO ساختار متراکم شده و ریزساختار خوشه انگوری تشکیل دادند. با افزودن ۲ mmol BC و سنتز PPy، استحکام کششی و مدول یانگ BC به طور قابل توجهی کاهش یافته و به ترتیب به مقادیر ۷۱ MPa و ۲/۵ GPa رسید. از سوی مقابل، با افزودن نانوذرات ZnO خواص مکانیکی افزایش قابل توجهی یافته (افزایش مدول یانگ و استحکام کششی در مقایسه با نمونه‌های BC/PPy) که این موضوع به دلیل فشرده شدن ساختار ایروزل نانوکامپوزیتی حاصل و همچنین تشکیل فصل مشترک نانوذرات ZnO با دو پلیمر BC و PPy است. مشاهده هاله و ناحیه ممانعت در محیط کشت حاوی دو باکتری گرم مثبت و منفی، به خوبی قابلیت ضد باکتریایی داربست‌های نانوکامپوزیتی سه جزئی را اثبات کرد. نتایج MTT مربوط به L929 بر روی داربست‌ها نشان داد که با افزودن ۳٪ از نانوذرات ZnO، چسبندگی و تکثیر سلولی در طی روزهای مختلف ۱ روز، ۵ روز و ۷ روز از کشت افزایش قابل توجهی یافت.

کلمات کلیدی

سلولز باکتریایی

داربست نانوکامپوزیتی

پلی‌پیرول

نانوذرات روی

زیست‌سازگاری

*مسئول مکاتبات:

azadeh_asefnejad@yahoo.com

۱ مقدمه

عفونت‌های باکتریایی به مشکلی جدی در جوامع بشری تبدیل شده است. از سوی دیگر سالانه تعداد زیادی از مردم در سرتاسر جهان در اثر عفونت‌های ناشی از سوختگی جان خود را از دست می‌دهند. بنابراین توسعه مواد ضد میکروبی زیست‌سازگار بدیع ضروری به نظر می‌رسد [۱]. داربست برپایه سلولز باکتریایی ((Bacterial Cellulose (BC)، به دلیل زیست‌سازگاری، مساحت سطح زیاد، خواص مکانیکی و انعطاف‌پذیری بالا گزینه‌ای مناسب برای این امر است. هرچند BC فاقد خاصیت ضد میکروبی است اما به دلیل ساختار منحصر به فرد خود بستری مناسب برای رشد و تعبیه نانوذرات و ایجاد خاصیت ضد میکروبی در آن خواهد بود. بر این اساس، BC پس از تولید، به عنوان بستر برای سنتز نانوذرات اکسیدروی ((Zinc Oxide (Nanoparticles) (ZnO) و پلی‌پیرول ((Poly (PPy) Polypyrrole) با روش ساده آغشته‌سازی مورد استفاده قرار می‌گیرد تا سامانه‌ای جدید تولید شود که علاوه بر قابلیت ضد میکروبی به عنوان داربست برای تکثیر سلولی نیز استفاده شود. اکسیدروی بسیار به‌طور گسترده و وسیع در سامانه‌های ترمیم زخم استفاده می‌شود. نانوذرات روی مثل نانوذرات فلزی دیگر از مساحت سطحی بالایی برخوردارند و رفتار ضد باکتریایی بالایی از خود نشان می‌دهند سازوکار نانوذرات روی به عنوان ماده ضد باکتریایی به این صورت است که غشای سلول در مقابل و مواجهه با نانوذرات روی، توازن الکتریکی خود را از دست می‌دهد و دیواره سلول آسیب می‌بیند در نتیجه DNA و RNA به همراه مایع سیتوپلاسم از سلول خارج می‌شوند و مرگ سلولی رخ می‌دهد. اخیراً استفاده از ZnO در BC به عنوان ماده نورکاتالیزگر [۲]، ضد باکتری و زخم‌بند [۳، ۴] مورد استفاده قرار گرفت. از سوی دیگر پلیمرهای رسانا مانند پلی‌پیرول و مشتقات آن‌ها برای ساخت مواد پیشرفته‌ای از قبیل سلول‌های خورشیدی رنگ-حساس [۵]، ابزارهای ذخیره انرژی [۶] حسگرها، و موادی برای اصلاح آب و جذب CO_2 ، به دلیل سنتز نسبتاً آسان و انعطاف‌پذیری در شکل‌دهی استفاده می‌شوند. مخصوصاً ساختارهای نانویی متخلخل از PPy (مانند داربست‌های نانولیفی) می‌تواند محیطی مشابه با ماتریس خارج سلولی را فراهم کرده و توسط تحریک الکتریکی پاسخ سلولی را القا کند [۷]. هرچند بهره‌برداری از پلیمرهای هادی به دلیل پایداری کم آن‌ها، یکپارچگی مکانیکی ضعیف و دشواری در ساخت و شکل‌دهی آن‌ها، محدود شده است. چندین روش برای تسهیل ساخت آن‌ها بررسی شده است که شامل استفاده از زیست‌ماکرومولکول‌هایی (Biomacromolecules) به عنوان بستر و قالب برای پلیمری شدن درجا و رویکردهای آمیزه‌سازی هستند [۸]. مثال‌هایی از این

قالب‌ها می‌توان به سلولز، آلژینات و آدامس ژله‌ای یا حتی پلی‌یورتان را نام برد [۹، ۱۰-۱۸]. از میان پلیمرهای طبیعی و زیست‌سازگار، BC به دلیل خواص بی‌همتابی چون ساختار سه‌بعدی، متخلخل و نانولیفی، مساحت سطح بالا، زیست‌سازگاری و زیست‌تخریب‌پذیری [۱۰-۲۱] به عنوان گزینه‌ای مناسب در بحث داربست و قالب برای در برگرفتن نانوذرات و پلیمرهای مختلف توجهات زیادی را به خود معطوف کرده و در نتیجه گزینه‌ای مناسب برای بحث‌های میکروبی، چسبندگی و رشد سلولی است. اخیراً ساخت نانوکامپوزیت سه‌جزئی BC/PPy/ZnO به عنوان فیلم بسته‌بندی مورد استفاده قرار گرفت [۲۲، ۱۱-۲۹]. هر چند خواص ضد میکروبی و زیست‌سازگاری آن با تغییر درصد وزنی ZnO تاکنون گزارش نشده است. دستاورد اصلی مورد انتظار این تحقیق ساخت و ارائه نسل جدیدی از داربست‌های نانوکامپوزیتی برپایه نانوالیاف سلولز باکتریایی به عنوان ماده‌ای ضد میکروبی با قابلیت زیست‌سازگاری مناسب برای چسبندگی و تکثیر سلولی است.

۲ مواد و روش تحقیق

۲-۱ مواد

برای تولید داربست کامپوزیتی بر پایه سلولز باکتریایی ابتدا نیاز به تولید سلولز باکتریایی (میکروبی) که نوعی سلولز است داریم که از کشت گلوکوناستوباکترزایلینوس در محیط مایع تهیه می‌شود. سلولز باکتریایی به صورت هیدروژل و با ابعاد مشخص (10×10 cm) و با درصد وزنی جامد ۴٪ از شرکت نانونوین پلیمر-ایران تهیه شد. ماده شیمیایی مونومر پیرول، با فرمول شیمیایی C_4H_3N که به عنوان مونومر برای سنتز پلی‌پیرول استفاده می‌شود، به صورت مایع از شرکت مرک (Merck) آلمان تهیه شد. آهن (III) کلرید، با فرمول شیمیایی $FeCl_3$ که اکسیدکننده‌ای برای شروع پلیمری‌شدن پیرول به حساب می‌آید، به صورت پودر از شرکت مرک آلمان تهیه شد. هیدروکلریک اسید، با فرمول شیمیایی HCl به عنوان محلولی با مولاریته مشخص برای سنتز پلی‌پیرول به صورت مایع از شرکت مرک آلمان تهیه شد. آگار درشت‌دانه با فرمول شیمیایی $n(C_{12}H_{18}O_4)$ به عنوان پلیمر پلی‌ساکارید برای تهیه کشت جامد از شرکت مرک آلمان تهیه شد. سدیم هیدروکسید با فرمول شیمیایی NaOH برای شستشوی سلولز به صورت محلول از شرکت مرک آلمان تهیه شد. و در نهایت نانواکسید روی با فرمول $n-ZnO$ برای تعبیه در سلولز باکتریایی با متوسط قطر 50 ± 5 نانومتر از شرکت مرک آلمان خریداری شد.

۲-۲ روش‌ها

ابتدا نانوذرات ZnO با درصدهای وزنی مختلف، ۱٪، ۳٪

و ۵٪ در آب مقطر به مدت نیم ساعت همزده می‌شود تا مخلوطی همگن به‌دست آید. پس از این مرحله هیدروژل BC با ابعاد مشخص بریده ($4 \times 4 \times 0.2$ cm) در تعلیقی‌های به‌دست آمده از نانو ZnO خیسانده می‌شود و سپس به مدت ۲۴ h در داخل گرمخانه لرزان (Shaking Incubator) که دما و سرعت آن به‌ترتیب روی 50°C و ۱۵۰ rpm تنظیم شده، قرار داده می‌شود. بعد از اتمام فرایند هیدروژل‌های نانوکامپوزیتی سلولزباکتریایی/نانواکسید روی به مدت ۱ ساعت در محلول آبی پیرول با غلظت ۲ mmol/L در ۵۰ mL قرار داده می‌شود تا به طور کامل مونومر پیرول در آن نفوذ کند. پس از این مرحله هیدروژل در محلول اکسیدکننده (۵۰ mL) $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ که در حمام آب-یخ قرار دارد، اضافه و به مدت ۱ ساعت به آن زمان داده می‌شود تا فرایند پلیمری‌شدن انجام شود. پس از این مرحله، رنگ هیدروژل‌های کامپوزیتی از سفید به سیاه تغییر می‌کند که این امر نشان‌دهنده پلیمری‌شدن موفقیت‌آمیز پلی پیرول و تعبیه آن در ساختار سلولزباکتریایی/نانواکسید روی است. در مرحله بعدی، محصولات تولیدی چندین مرتبه با آب مقطر شسته می‌شود تا ناخالصی‌ها و مونومرهای واکنش ندادۀ از آن زدوده شوند. شایان گفتن است که نسبت مولی اکسیدکننده به پیرول ۲/۵ است. در مرحله آخر نیز هیدروژل‌های نانوکامپوزیتی سنتز شده با روش خشک کردن انجمادی در دمای 54°C خشک شدند. شایان ذکر است که نمونه‌های ساخته شده بر اساس زیر کدگذاری شدند: BC، BC/PPy، ۲ mmol BPY ، BC/ZnO با درصدهای وزنی مختلف ۱٪، ۳٪ و ۵٪ ساخته شده در غلظت ۲ mmol از PPy به‌ترتیب BZ1P2، BZ3P2 و BZ5P2 نام‌گذاری شدند.

۲-۳ دستگاه‌ها و تجهیزات

از دستگاه خشک‌کن انجمادی دانشگاه آزاد تهران مرکز ساخت ایران برای خشک کردن نمونه‌ها به روش انجمادی استفاده شد. به منظور بررسی ریزساختار ابروژل‌های تولید شده، پس از پوشش‌دهی با طلا، از آزمون FESEM با دستگاه SEM FEI Nano-۴۵۰ ژاپن استفاده شد. همچنین به منظور اثبات حضور نانوذرات روی در ساختار ابروژل نانوکامپوزیتی، از آزمون EDAX همراه با Mapping از دستگاه DMA مدل 242C شرکت Netzsch آلمان استفاده شد. برای بررسی ساختار شیمیایی، گروه‌های عاملی و پیوندهای بین BC (سلولز باکتریایی) با PPy (پلی‌پیرول) و ZnO (اکسیدروی)، از روش FTIR در محدوده $4000-500\text{ cm}^{-1}$ و در دمای اتاق از دستگاه مدل Frontier شرکت PerkinElmer آمریکا استفاده شد. نمونه‌های جامد با پتاسیم‌پرمید مخلوط شده، تحت بار ۵ تن به شکل قرص درآمد. سپس نمونه‌های آماده‌شده در دستگاه قرار گرفت و

از آن‌ها طیف تهیه شد. برای تعیین خواص فیزیکی و مکانیکی نمونه‌های ابروژل‌های نانوکامپوزیتی ساخته شده از دستگاه اندازه‌گیری خواص کششی با نام Universal testing machine، مدل D638 شرکت Gotech تایوان مطابق با استاندارد اندازه‌گیری خواص مکانیکی فیلم‌ها و صفحات پلیمری استفاده شده است. آزمون در شرایط دما و رطوبت محیط آزمایشگاه انجام شده است. نمونه‌های آزمون به صورت مستطیلی با ابعاد $1 \text{ mm} \times 0.1 \text{ mm} \times 40 \text{ mm}$ آماده شدند. سرعت کشش ۵ mm/min بوده است. فاصله دو فک دستگاه ۲ سانتی‌متر بود. در هر حالت ۳ تا ۵ نمونه مورد آزمایش قرار گرفت. با استفاده از منحنی‌های تنش بر حسب کرنش نمونه‌ها، خواص کششی آن‌ها از قبیل مدول یانگ، استحکام کششی و ازدیاد طول در نقطه پارگی به دست آمد. برای تنظیم دمای مشخص محیط کشت از دستگاه آنکوباتور مدل Class I، IPX0 شرکت Behdad ایران با دقت 0.1°C استفاده شد. مشاهده باکتری‌ها با میکروسکوپ نوری مدل 016259، 45VA Type B شرکت Ziess آلمان انجام شد. از مولتی‌متر مدل CP-500L شرکت ISTEK کره جنوبی با دقت ۰/۱ برای اندازه‌گیری pH محیط کشت استفاده شد. توزین نمونه‌ها با ترازوی مدل Type ABS، 120-4 شرکت Kern آلمان انجام پذیرفت. فعالیت ضدباکتریایی داربست نانوکامپوزیتی BC/PPy/ZnO در برابر باکتری E. coli به‌عنوان مدل باکتری گرم منفی، S. aureus به‌عنوان مدل باکتری گرم مثبت توسط روش نفوذ دیسک بررسی شد. بر این اساس، ضخامت هاله مشاهده شده به‌عنوان ناحیه عدم رشد باکتری مربوط می‌شود. برای این منظور، ابتدا داربست‌های تولید شده در ابعاد 50×50 میلی‌متر بریده شده و سپس توسط الکل ۷۰ درصد سترون شدند. در مرحله بعدی، حدود ۵۰۰۰ سلول به روی هر ابروژل انتقال یافت و محیط کشت نیز به آن‌ها افزوده شد. تعویض محیط هر ۲ روز یکبار انجام شد. تکثیر و چسبندگی سلول‌های مورد مطالعه در ابروژل‌ها با استفاده از آزمون MTT مورد ارزیابی قرار گرفت. این آزمون ساده، روشی متداول برای اندازه‌گیری فعالیت سلول‌های زنده از طریق فعالیت هیدروژن-زدایی میتوکندری (Mitochondria) است. در این آزمون نمک تترازیوم (Tetrazolium) محلول MTT که زرد رنگ است، به وسیله الکترون‌هایی که در طی فرایند اکسایش و احیا در میتوکندری سلول زنده آزاد شده است، به بلور ارغوانی رنگ فورمازان تبدیل می‌شود. بدین منظور ابتدا ابروژل از محیط کشت خارج شده، سپس در محلول MTT قرار داده می‌شود. پس از ۴ ساعت ماندگاری در آنکوباتور در دمای 37°C ، محلول MTT حاوی سلول‌های زنده و بلورهای فورمازان حاصل می‌شود. سپس محلول خارج شده و بلور ته‌نشین

تمامی نمونه‌ها زیر ۱۰٪ بوده و به نظر می‌رسد که با افزودن نانوذرات روی و PPy درصد آبرفتگی به طور چشمگیری کاهش یافته و به حدود ۳/۸٪ برای نمونه نانوکامپوزیتی BZ5P2 می‌رسد. این موضوع می‌تواند به تقویت و افزایش استحکام ساختاری هیدروژل BC در حضور هم‌زمان ZnO و PPy مربوط است. از سوی دیگر این نمونه، بیشترین چگالی (0.032 g/cm^3) و کمترین درصد تخلخل (۸۷٪) را در مقایسه با نمونه‌های دیگر دارد. داربست BC خالص نیز به ترتیب تخلخل ۹۶٪ و چگالی 0.0181 g/cm^3 دارد. افزایش چگالی و کاهش تخلخل نمونه‌های ابروژل نانوکامپوزیتی را می‌توان به تراکم‌تر شدن ساختار BC بعد از تعبیه کردن ZnO و PPy ارتباط داد. بنابراین می‌توان نتیجه گرفت داربست‌های ساخته شده به‌عنوان ابروژل می‌توانند در نظر گرفته شوند.

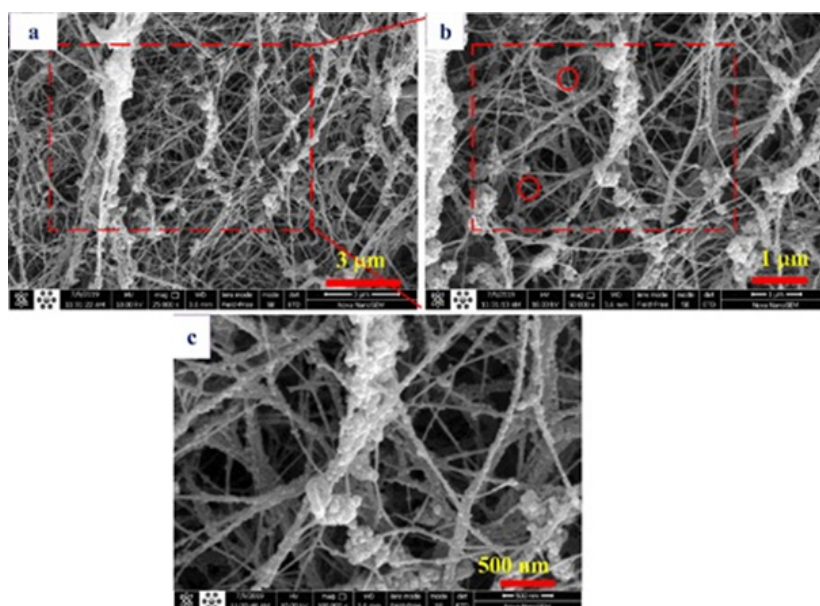
شده، در محلول ایزوپروپانول حاوی اسیدکلریدریک ۰/۱ نرمال حل می‌شود. میزان جذب نوری محلول با استفاده از دستگاه طیف‌نگار نوری در طول موج ۵۷۰ نانومتر تعیین شد. افزایش در تعداد سلول‌ها منجر به افزایش فورمازان تشکیل شده می‌شود و میزان جذب نوری افزایش می‌یابد.

۳ نتایج و بحث

نتایج مربوط به خواص فیزیکی و ساختاری داربست‌های نانوکامپوزیتی برپایه BC از جمله چگالی، تخلخل و درصد آبرفتگی در جدول ۱ خلاصه شده است. همان‌طور که مشاهده می‌شود برای تمامی نمونه‌ها چگالی و درصد تخلخل محاسبه شده در محدوده تعریف علمی ابروژل (تخلخل بالای ۸۰٪ و چگالی فوق‌العاده کم در محدوده 0.004 تا 0.5 g/cm^3) قرار دارد. همچنین آبرفتگی

جدول ۱ دماها در نواحی مختلف اکستروژن در شرایط کاری مختلف ($^{\circ}\text{C}$)
Table 1 Temperature of extruder zones at different working conditions ($^{\circ}\text{C}$)

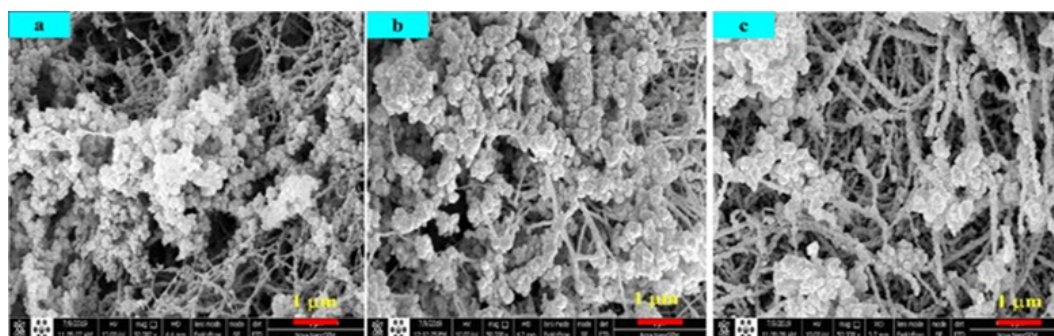
Sample	Shrinkage (%) ± 2	Porosity (%) ± 5	Density (g/cm^3) ± 0.008
BC	8.3	96	0.0181
BP2	7.6	94	0.0195
BZ1P2	5.2	91	0.025
BZ3P2	4.4	89	0.028
BZ5P2	3.8	87	0.032



شکل ۱ تصاویر FESEM از نمونه ابروژل BP2 در سه بزرگ‌نمایی مختلف (الف) ۲۵۰۰۰، (ب) ۵۰۰۰۰ و (ج) ۱۰۰۰۰۰ برابر.
Figure 1 FESEM images of BP2 aerogels at different magnifications (a) 25000, (b) 50000, (c) 100000.

در قسمت‌هایی نیز ریزساختار خوشه انگوری تشکیل شده است. این موضوع می‌تواند به قرار گرفتن و نشستن ذرات PPy در حین سنتز، روی نانوذرات ZnO باشد که خود این نانوذرات نیز روی نانوالیاف نشسته‌اند. در نتیجه این فعل و انفعال، ساختار متراکم و خوشه انگوری تشکیل می‌شود. از سوی دیگر، در بخش‌هایی از نانوالیاف BC که ممکن است نانوذرات ZnO حضور نداشته باشند، بعد از سنتز PPy، نانوالیاف از ذرات PPy پوشیده شود. این موضوع شبکه به پیوسته‌ای از نانوذرات ZnO و PPy

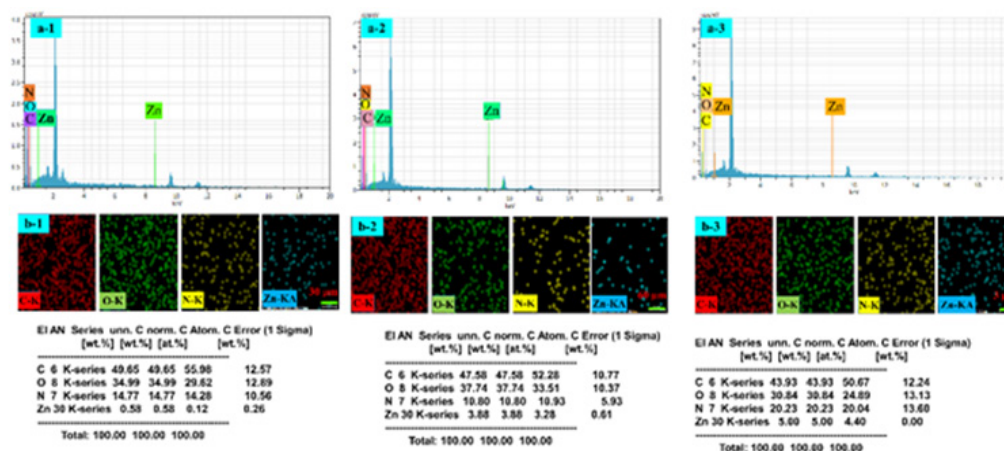
به‌منظور بررسی بیشتر تأثیر حضور نانوذره روی و پلی‌پیرول روی ریزساختار و مورفولوژی از آزمون FESEM استفاده شد. تصاویر FESEM نمونه‌های BC/PPy در شکل ۱ آورده شده است. وقتی پیرول با غلظت mmol ۲ به BC اضافه می‌شود، بعد از سنتز PPy در ساختار BC، ذراتی کروی شکل در ساختار BC پدید می‌آید که به‌طور همگون سطح نانو الیاف BC را می‌پوشانند. با دقت بیشتر به نظر می‌رسد در برخی نواحی ناپیوستگی در اتصال ذرات PPy به همدیگر وجود دارد.



شکل ۲ تصاویر FESEM از نمونه‌های داربست نانوکامپوزیتی (الف) BZ1P2، (ب) BZ3P2 و (ج) BZ5P2.
Figure 2 FESEM images of nanocomposite tissues (a) BZ1P2, (b) BZ3P2, (c) BZ5P2.

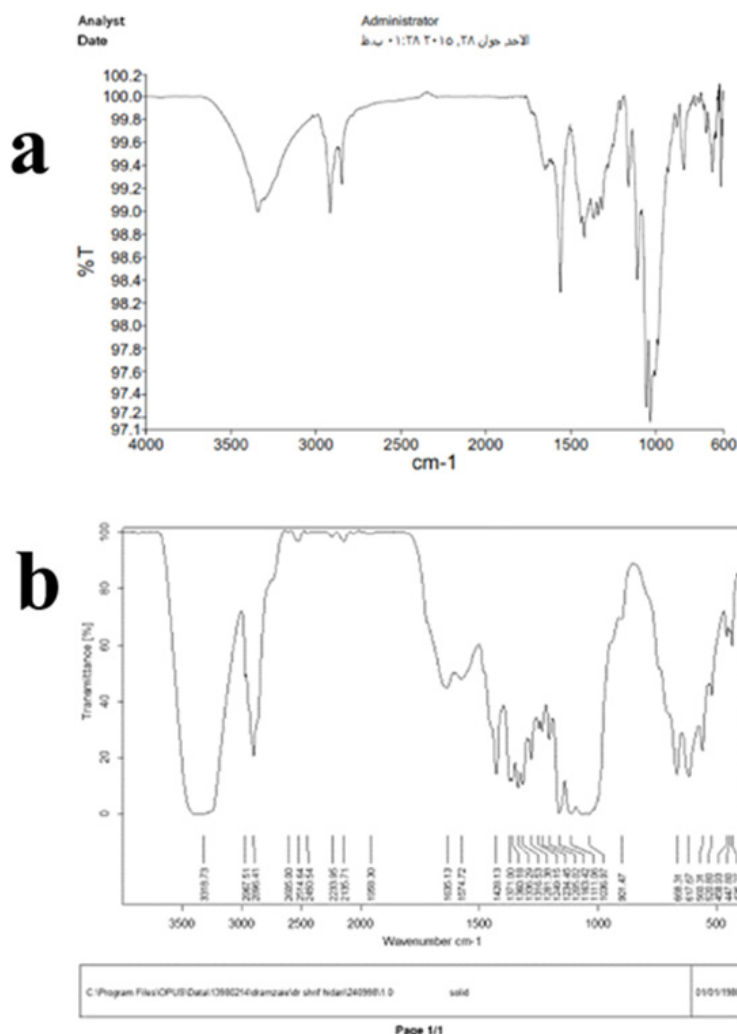
را در ساختار زمینه نانوالیافی BC فراهم می‌آورد که نقش تعیین‌کننده‌ای در خواص مکانیکی و زیستی آن دارد. از سوی دیگر از تصاویر FESEM نمونه‌های داربست نانوکامپوزیتی نیز چنین برمی‌آید که ساختار سه‌بعدی نانوالیافی و متخلخل BC، در حضور همزمان نانوذرات ZnO و PPy حفظ شده است که این امر در پایداری مکانیکی و همچنین کشت سلولی و خواص بیولوژیکی اهمیت به‌سزایی دارد. حضور همزمان نانوذرات ZnO و PPy در ساختار BC، توسط آزمون EDAX که در شکل ۳ (الف) نشان داده شده، اثبات شده است. همان‌گونه که دیده می‌شود، برای تمامی نمونه‌ها قله واضحی برای

این ناپیوستگی‌ها با دوایری قرمز رنگ در شکل متمایز شده است (شکل ۲ (الف)). از سوی دیگر اندازه‌گیری ذرات PPy نشان می‌دهد که متوسط قطر آن‌ها ۲۰ nm است. شکل ۲، تصاویر مربوط به نمونه‌های داربست‌های نانوکامپوزیتی با درصد‌های وزنی مختلف نانوذرات اکسید روی را نشان می‌دهد. تصاویر FESEM مربوط به نمونه‌های داربست‌های نانوکامپوزیتی به‌خوبی نشان می‌دهد که نانوذرات ZnO به سطح نانوالیاف BC متصل شده‌اند و عمیقاً در ساختار زمینه BC نفوذ کرده‌اند. در مقایسه با داربست‌های BC/PPy، ساختار داربست‌های نانوکامپوزیتی متراکم‌تر شده،



شکل ۳ (الف) طیف‌های EDAX و (ب) تصاویر Mapping نمونه‌های داربست نانوکامپوزیتی BZP2mmol حاوی درصد‌های وزنی متفاوت (۱) ۱٪، (۲) ۳٪، (۳) ۵٪.

Figure 3 (a) EDAX spectra and (b) Mapping images of nanocomposite scaffold of BZ5P2 at different contents of ZnO at (1) 1%, (2) 3% and (3) 5%



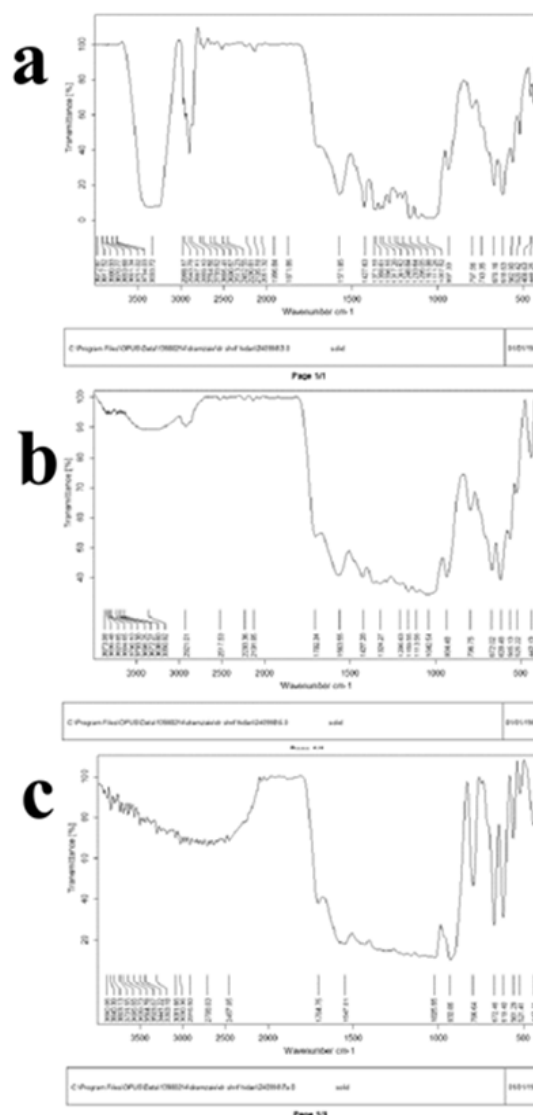
شکل ۴ طیف‌های FTIR به‌دست آمده از (الف) BC و (ب) BP2.
Figure 4 FTIR spectra of (a) BC and (b) BP2

به حالت خمشی CH_2 و طیف 1637 cm^{-1} نیز متعلق به گروه کربونیل آمیدی است که از پروتئین‌ها و سلول‌های باکتری باقی‌مانده در محیط ناشی می‌شود که ممکن است هنگام شستشو با NaOH به‌طور کامل خارج نشده باشند [۱۲]. طیف جذب به‌دست آمده در محدوده 1000 cm^{-1} تا 1500 cm^{-1} نواحی ارتعاشی کششی C-O را نشان می‌دهد. نوار 1163 cm^{-1} به اتصال گلیکوسیدی C1-O-C4 و همچنین نوار 1111 cm^{-1} ، 1061 cm^{-1} و 1035 cm^{-1} به ترتیب به ارتعاشات O3-C3، O2 و O6-C6 نسبت داده می‌شود. طیف FTIR نمونه BP2 در شکل ۴ (ب) مشاهده می‌شود. نوار مشاهده شده در 1707 cm^{-1} به پیوند C=O گروه کربوکسیلیک اسید BC مربوط می‌شود که بعد از اضافه شدن PPy، به طول موج‌های بالاتر جابه‌جا شده است. این موضوع تأکیدی بر برهم‌کنش بین نانوالیاف BC و ذرات PPy است. نوازی قوی در 1546 cm^{-1} مشخصه ارتعاش کششی حلقه آروماتیک PPy است. شدت جذب در 1306 cm^{-1} ، 1017 cm^{-1} و 888 cm^{-1} به ترتیب به کشش

اتم N و Zn در طیف‌های EDAX وجود دارد که به ترتیب نشان‌دهنده حضور هم‌زمان ZnO و PPy در ساختار BC است. از سوی دیگر با دقت در تصاویر Mapping (شکل ۳ (ب)) نمونه‌ها می‌توان دریافت که نحوه پراکنش Zn و N در ساختار BC، به‌صورت همگن بوده و در سرتاسر زمینه یکنواخت توزیع یافته‌اند.

به‌منظور بررسی و مطالعه بیشتر ریزساختار داربست‌های نانوکامپوزیتی، اثر PPy روی ساختار BC و سازوکار برهم‌کنش میان نانوذرات ZnO و PPy با همدیگر و BC از آزمون FTIR استفاده شد که در شکل‌های ۴ و ۵ مشاهده می‌شود.

شکل ۴ (الف) طیف FTIR مربوط به BC خالص را نشان می‌دهد. به‌طور کلی BC، قله مشخصه در 3300 cm^{-1} از خود نشان می‌دهد که به ارتعاش کششی O-H مربوط است. همچنین قله‌ای در 2900 cm^{-1} مشاهده می‌شود که به ارتعاش کششی آلیفاتیک C-H مربوط است. قله تیز و واضح در 1057 cm^{-1} ناشی از ارتعاش کششی C-O-C است. علاوه بر این، طیف 1428 cm^{-1} مربوط

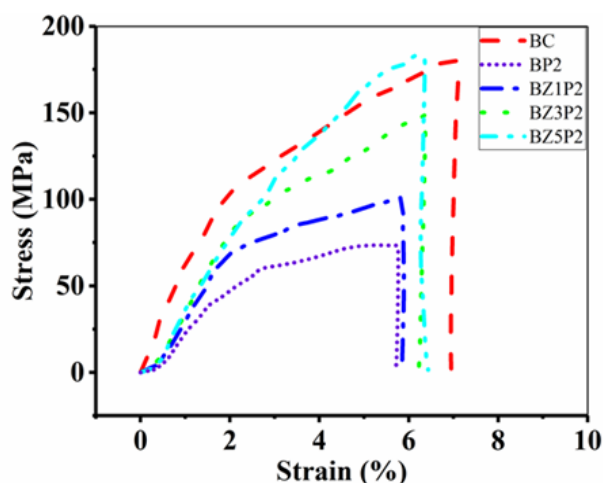


شکل ۵ طیف‌های FTIR نمونه‌های داربست نانوکامپوزیتی BZP2 حاوی نانوروی (الف) ۱٪، (ب) ۳٪ و (ج) ۵٪
Figure 5 FTIR spectra of BZP2 nanocomposite scaffold at different ZnO content of (a) 1%, (b) 3%, and (c) 5%

(کرنش تا نقطه شکست) در جدول ۲ خلاصه شده است. ابروژل خالص BC ازدیاد طولی تا کرنش ۷٪ از خود نشان می‌دهد. استحکام کششی و مدول یانگ برای ابروژل BC خالص، به ترتیب ۱۸۱ MPa و ۶/۱ GPa به دست آمد. این مقادیر مشابه با مقادیری است که در مراجع برای سلولز گزارش شده است [۱۴]. این خواص مکانیکی فوق‌العاده را می‌توان به برهم‌کنش قوی میان نانوالیاف BC از طریق برهم‌کنش هیدروژنی و گرہ خوردگی نانوالیاف ساختار BC نسبت داد. از سوی دیگر، با افزودن ۲ mmol به BC و سنتز PPy، استحکام کششی و مدول یانگ به‌طور قابل توجهی کاهش یافته و به ترتیب به مقادیر ۷۱ MPa و ۲/۵ GPa می‌رسد. به‌طور کلی افزودن PPy خواص مکانیکی مربوطه را تقریباً ۵۰٪ کاهش می‌دهد. دلیل این امر کاهش تعداد برهم‌کنش‌های گروه‌های OH ای است که بین نانوالیاف وجود دارد که با افزودن PPy به ساختار BC و حضور گروه‌های عاملی -NH، برهم‌کنش‌های OH

C-N، ارتعاش کششی C-H و ارتعاش N-H در حلقه PPy ارتباط دارد [۱۳]. در نواحی 800 cm^{-1} تا 1300 cm^{-1} قله جذب متناظر با خمش C-H و اتصالات اتری C-O برای BC نیز با اندکی جابه‌جایی قابل مشاهده است. نتایج آزمون FTIR برای ابروژل‌های نانوکامپوزیتی BC/PPy حاوی درصدهای وزنی مختلف ۱٪، ۳٪ و ۵٪ در شکل ۵ ارائه شده است. همان‌طور که مشاهده می‌شود تمامی مشخصه‌هایی که در طیف‌های مربوط به BC و BC/PPy وجود دارد در طیف‌های FTIR ابروژل‌های نانوکامپوزیتی BC/PPy/ZnO نیز وجود دارد. تنها تفاوت، حضور قله‌های اضافی در 480 cm^{-1} و 1642 cm^{-1} به وجود می‌آید که مربوط به حضور نانوذرات ZnO است که با افزایش مقدار نانوذرات، شدت این قله‌ها افزایش می‌یابد [۴].

منحنی‌های تنش-کرنش نمونه‌های داربست در شکل ۶ مشاهده می‌شود. همچنین مقادیر استحکام کششی نهایی، مدول الاستیک و ازدیاد طول تا نقطه پارگی



شکل ۶ منحنی‌های تنش-کرنش برای داربست‌های ساخته شده.
Figure 6 Stress-strain curves of fabricated scaffolds.

فصل مشترک می‌تواند نقش قابل توجهی در انتقال تنش از نانوذره به زمینه را داشته باشد. خاصیت ضد میکروبی داربست‌های نانوکامپوزیتی تولید شده در برابر دو نوع باکتری شامل باکتری گرم منفی *E. coli*، باکتری گرم مثبت *S. aureus* که به‌طور عمده در عفونی شدن زخم‌ها نقش دارند مورد ارزیابی قرار گرفت. تصاویر مربوط به آن در شکل ۷ نشان داده شده است.

همان‌طور که پیشتر نیز بیان شد، داربست BC فاقد خاصیت ضد میکروبی است. از سوی مقابل، همان‌طور که برای نمونه BP2 نیز مشاهده می‌شود، نمونه مذکور در برابر باکتری گرم مثبت و منفی قابلیت ضدباکتری دارند.

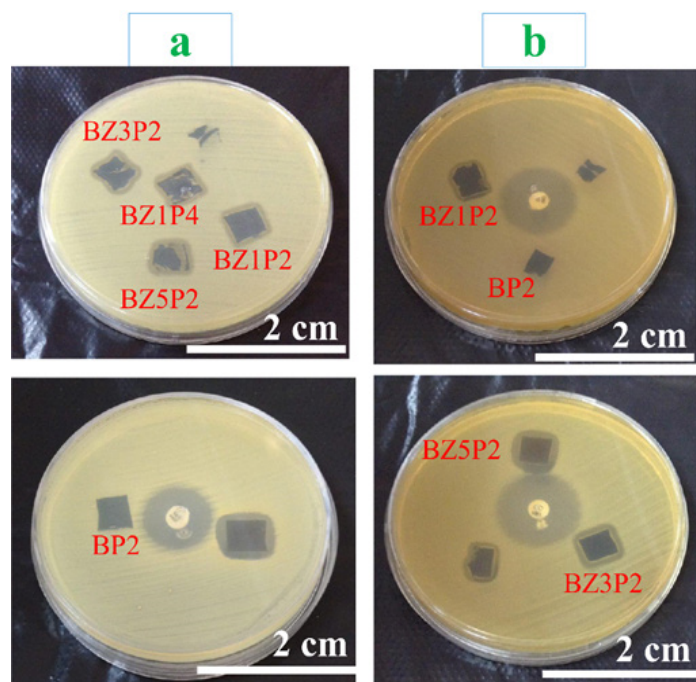
OH از بین رفته و برهم‌کنش‌های OH-NH جایگزین آن می‌شود. دلیل دیگر ممکن است به کاهش اتصالات بین لیفی BC در اثر اضافه شدن نانوذرات PPy مرتبط باشد. به‌طور کلی ذرات PPy به‌دلیل برهم‌کنش‌های بین مولکولی قوی تمایل به کلوخه‌ای شدن دارند. از سوی دیگر ساختار نانولیفی BC به‌صورت لایه‌هایی روی هم قرار می‌گیرند که این امر دلیل خاصیت مکانیکی فوق‌العاده آن‌هاست. با تشکیل ساختار هسته-پوسته سطح نانوالیاف ناصاف شده و تمایل ذرات PPy به کلوخه‌ای شدن و تشکیل پوسته‌ای دور نانوالیاف BC، برهم‌کنش نانوالیاف را تضعیف کرده و خواص مکانیکی را کاهش می‌دهد چرا که پیوندهای بین

جدول ۲ خواص فیزیکی-مکانیکی شامل مدول یانگ، استحکام کششی و ازدیاد طول تا نقطه پارگی برای نمونه‌های ساخته شده.
Table 2 Physical-mechanical properties of fabricated samples including Young modulus, tensile strength, and elongation at break.

Sample	(GPa) Young modulus	(MPa) Tensile strength	(%)Elongation at break
BC	6.1	181	7.1
BP2	2.5	71	5.9
BZ1P2	3.8	98	5.9
BZ3P2	4.2	130	6.3
BZ5P2	4.8	175	6.3

این موضوع ثابت می‌کند که PPy ماده‌ای ضدباکتری نبوده و تغییر مقدار آن در BC نیز خواص ضدباکتری را تغییر نمی‌دهد. هر چند با افزودن نانوذرات روی، خواص ضدباکتری بهبود یافته و با افزایش مقدار آن این خاصیت بهبود می‌یابد. این موضوع به خوبی از هاله تشکیل شده اطراف نمونه‌های نانوکامپوزیتی سه جزئی که در محیط کشت قرار داده شده اند، نمایان است؛ به‌طوری‌که هیچ رشدی از باکتری نزدیک به نمونه‌ها

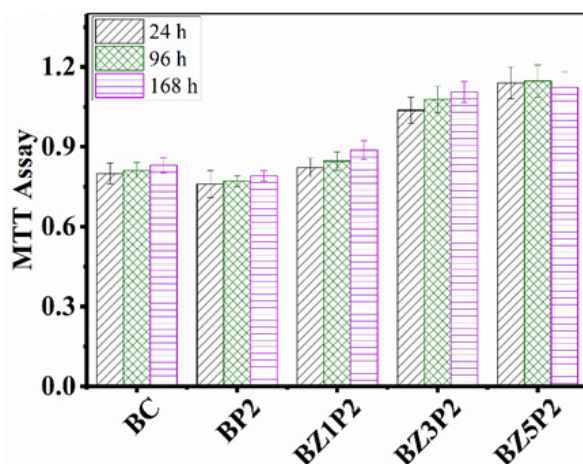
PPy-PPy ضعیف‌تر از پیوند نانوالیاف سلولز-سلولز است (خواص مکانیکی PPy نیز بسیار ضعیف‌تر از BC است). از سوی مقابل، با افزودن نانوذرات ZnO خواص مکانیکی افزایش قابل توجهی یافته (افزایش مدول یانگ و استحکام کششی در مقایسه با نمونه‌های BC/PPy) که این موضوع به‌دلیل فشردن ساختار ابروزل نانوکامپوزیتی حاصل و همچنین تشکیل فصل مشترک نانوذرات ZnO با دو پلیمر BC و PPy است. تشکیل این



شکل ۷ خواص ضدباکتری داربست‌های ساخته شده در برابر (الف) باکتری گرم مثبت *S. aureus* و (ب) گرم منفی *E. coli*.
Figure 7 Antibacterial activity of fabricated scaffolds against (a) gram positive *S. aureus* and (b) gram negative *E. coli*.

به‌عنوان زخم‌بند را داراست. شکل ۸ نتایج آزمون MTT برای داربست‌های نانوکامپوزیتی حاوی درصد‌های وزنی مختلف نانو ZnO را در مدت زمان ۲۴ و ۹۶ و ۱۶۸ ساعت نشان می‌دهد. میزان جذب فورمازان در آزمون MTT معیاری از میزان زنده بودن سلول‌ها بر روی داربست‌ها است.

مشاهده نمی‌شود و ناحیه ممانعت واضحی در اطراف نمونه‌ها قابل رؤیت است. همان‌طور که در مقدمه بدان اشاره شد، توانایی ZnO در از بین بردن باکتری شناخته شده است. تشکیل ناحیه ممانعت به یونیزه شدن Zn و توانایی آن برای رهايش از ابروژل و نفوذ به غشای سلول باکتری مرتبط است [۱۵]. گزارش شده



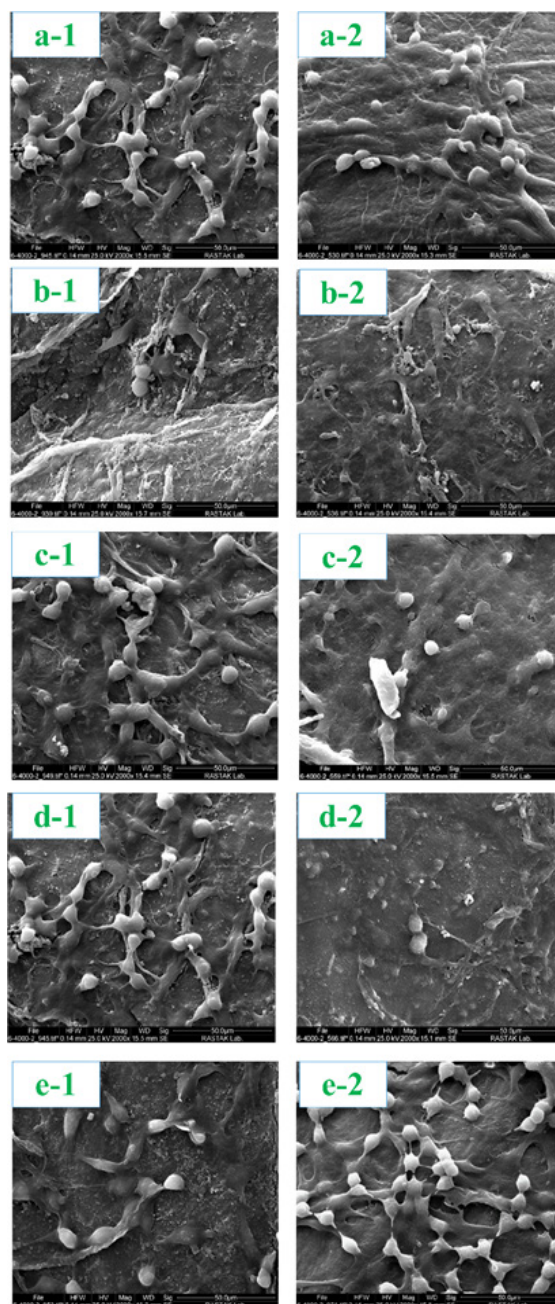
شکل ۸ نتایج آزمون MTT برای داربست BC خالص و داربست‌های نانوکامپوزیتی حاوی PPy و درصد‌های وزنی مختلف ZnO.
Figure 8 MTT results for pure BC scaffold and nanocomposite scaffold containing PPy and different contents of ZnO.

همان‌طور که مشاهده می‌شود میزان جذب تقریباً در تمامی نمونه‌ها با افزایش زمان، روند افزایشی داشته است که نشان‌دهنده این است که کلیه داربست‌ها از قابلیت فراهم کردن امکان تکثیر سلولی برخوردار هستند. در مورد داربست BC خالص می‌توان مشاهده کرد که با افزایش زمان از ۲۴ ساعت تا ۱۶۸ ساعت، تکثیر و چسبندگی سلول‌ها افزایش می‌یابد. به‌طور

است که Zn به دلیل تخریب تراوایی غشای پلاسمای سلول باکتری، آن را از بین می‌برد. از سوی دیگر واضح است که اثر نانوذرات ZnO بر روی باکتری گرم مثبت و منفی متفاوت است که این موضوع نیز به برهم کنش متفاوت نانوذره با دیواره سلولی دو باکتری مربوط است. بر اساس نتایج ارائه شده می‌توان نتیجه گرفت که داربست سه جزئی BC/ZnO/PPy قابلیت استفاده

می‌گیرد، قبل از چسبیدن اولین سلول، لایه‌ای از پروتئین‌ها بر روی سطح نانوالیاف جذب می‌شود. جذب ترجیحی و انتخابی برخی از پروتئین‌های سرم مانند فیبرونکتین و ویترونکتین بر روی سطوحی با آبدوستی متعادل دلیلی برای بهتر بودن چسبندگی، گسترش و تکثیر سلولی بر روی این سطوح است [۱۵-۱۹]. میزان جذب اولیه که نشان‌دهنده چسبندگی اولیه سلول‌های L۹۲۹ بر روی داربست‌ها است در مورد داربست BP۲ مقدار کمتری را در مقایسه با BC خالص از خود نشان داده است. این موضوع به کاهش آبدوستی این نمونه

کلی، گروه‌های هیدروکسیل بر روی سطح نانوالیاف BC تأثیر مثبتی در چسبندگی و رشد سلول دارند. از سوی دیگر، میزان چسبندگی، گسترش و رشد سلول‌ها بر روی سطوحی با میزان آبدوستی متعادل (میزان زاویه تماس آب بین ۴۰ تا ۶۰ درجه، صرف‌نظر از نوع سلول مورد استفاده) نسبت به سطوح خیلی آبدوست یا خیلی آب‌گریز، بیش‌تر است. این امر ارتباط مستقیمی با جذب پروتئین سرم مورد استفاده در ساخت محیط کشت دارد. وقتی داربست (منظور ساختار سه‌بعدی نانولیفی) در تماس با محیط کشت و سلول‌ها قرار



شکل ۹ ریختار سلول‌ها بر روی (a) BC، (b) BP۲، (c) BZ۱P۲، (d) BZ۳P۲ و (e) BZ۵P۲ در (۱) روز اول و (۲) روز هفتم.
Figure 9 Morphology of cells on the (a) BC, (b) BP2, (c) BZ1P2, (d) BZ3P2 and (e) BZ5P2 at (1) first day and (2) 7th day.

و استفاده از آن در مهندسی بافت است.

۴ نتیجه‌گیری

در این پژوهش، تولید موفق داربست نانوکامپوزیتی سلولز باکتریایی (BC) در حضور همزمان پلی پیرول (PPy) و نانوذرات روی (ZnO) که مقادیر نانوذره روی به ترتیب ۱، ۳ و ۵٪ بود گزارش شد. نتایج نشان داد که تخلخل تمامی نمونه‌های ایزوژل بالای ۸۰٪ و چگالی آن‌ها زیر 0.5 g/cm^3 قرار دارد. همچنین آب‌رفتگی تمامی نمونه‌ها زیر ۱۰٪ بوده است. بر اساس تصاویر FESEM نتیجه گرفته شد، با افزودن PPy و ZnO به ساختار BC، ساختار لیفی و متخلخل آن حفظ شد، هر چند ساختار متراکم‌تر به نظر می‌رسید. با افزودن PPy به ساختار BC مدول و استحکام کششی هر دو افت پیدا کرد. اما با افزودن نانوذره ZnO و در حضور همزمان PPy و ZnO مدول و استحکام کششی دوباره افزایش یافت؛ به‌طوری که برای نمونه BZ5P2 به ترتیب به ۴/۸ GPa و ۱۷۵ MPa رسید. نتایج آزمون ضدباکتری نشان داد که حضور PPy در BC تأثیری روی خواص ضدباکتری ندارد. هر چند با افزودن نانوذرات روی خواص ضد باکتری در برابر هر دو باکتری گرم منفی و مثبت مشاهده شد و با افزایش مقدار آن، این خاصیت بهبود یافت. چسبندگی اولیه سلول‌های L929 بر روی داربست‌های نانوکامپوزیتی BP4 مقدار کم‌تری را در مقایسه با داربست BC خالص از خود نشان داد. این موضوع به کاهش آب‌دوستی دو نمونه ارتباط داده شد. در مقابل، با افزودن نانوذرات ZnO چسبندگی و تکثیر سلول‌ها دوباره افزایش یافت. هر چند در مورد داربست نانوکامپوزیتی BZ5P2 میزان تکثیر سلول‌ها در مدت زمان ۹۶ ساعت به بعد، با افزایش مقدار نانوذره از ۳ به ۵٪، کاهش یافت که این امر به افزایش بیش از حد آب‌دوستی در این نمونه‌ها نسبت داده شد. تصاویر FESEM نیز چسبندگی سلول‌ها را روی سطح ایزوژل‌های ساخته شده بعد از ۱ و ۷ روز تأیید و نشان داد چسبندگی مناسب بر روی داربست وجود داشته، ظاهر و ریختار متعادلی دارند. یافته‌های این پژوهش نشان می‌دهد که سامانه‌های داربست‌های نانوکامپوزیتی ساخته‌شده در این پژوهش به‌عنوان نسل جدیدی از سامانه‌های داربست نانوکامپوزیتی، علاوه بر سبکی و وزن کم همراه با خواص مکانیکی و همچنین زیست‌سازگاری بسیار مناسبی داشته و گزینه‌ای مناسب برای استفاده در زخم‌بندها هستند.

مربوط می‌شود. از سوی مقابل با افزودن نانوذرات ZnO دوباره چسبندگی و تکثیر سلول‌ها افزایش می‌یابد که این امر به دلیل افزایش آب‌دوستی نمونه‌های داربست نانوکامپوزیتی در اثر افزودن نانوذرات ZnO است. بر این اساس، در مقایسه با داربست BP2، چسبندگی و تکثیر سلولی در نمونه BZ1P2 ۸/۳٪ افزایش یافته است. در مورد داربست‌های نانوکامپوزیتی BZ5P2 میزان تکثیر سلول‌ها در مدت زمان ۹۶ ساعت به بعد، با افزایش مقدار نانوذره از ۳ به ۵٪، کاهش یافته است که این به دلیل افزایش بیش از حد آب‌دوستی در این نمونه‌ها است. بر این اساس، میزان کاهش چسبندگی و تکثیر سلولی برای BZ5P2 بعد از ۹۶ ساعت، ۱/۷٪ کاهش یافته است. ریختار (Morphology) سلول‌های L929 و برهم‌کنش بین آن‌ها و داربست‌های نانولیفی در ایزوژل ساخته شده برپایه BC خالص و داربست‌های نانوکامپوزیتی آن‌ها، پس از طی ۱ روز و ۷ روز کشت در محیط آزمایشگاه با FESEM بررسی شد. شکل ۹ عکس‌های FESEM کشت سلول را بر روی داربست‌ها نشان می‌دهد.

چسبندگی سلول‌های بافت به داربست نانولیفی عامل موثری در تعیین زیست‌سازگاری نمونه‌های داربست‌های نانولیفی بر پایه BC است. همان‌طور که مشاهده می‌شود در کلیه نمونه‌ها، سلول‌ها، چسبندگی مناسب سلول‌ها بر روی داربست وجود داشته، ظاهر و ریختار متعادلی دارند. هر چند در نمونه خالص BC به نظر می‌رسد که تراکم سلولی بیشتر و چسبندگی واضح‌تری در مقایسه با نمونه BP2 وجود دارد که این امر ناشی از آب‌دوست‌تر بودن سطح BC نسبت به دو نمونه دیگر است. هر چند با وجود آب‌گریزتر شدن سطوح داربست BP2، مشاهده می‌شود که سلول‌ها به خوبی روی داربست چسبیده و رشد و تکثیر داشته‌اند و این نشان‌دهنده آن است که زیست‌سازگاری داربست‌های BC نقش اصلی و پایه‌ای در چسبندگی و رشد و تکثیر سلولی، نسبت به سایر عوامل دارد. در نمونه‌های داربست‌های نانوکامپوزیتی حاوی درصد‌های وزنی مختلف نانوذرات ZnO، عکس‌های FESEM چسبندگی بسیار بالای سلول‌ها به داربست‌های ساخته شده را نشان می‌دهد که به دلیل آب‌دوست بودن تمامی این سطوح و زیست‌سازگاری آن‌ها با سلول‌ها است. در کلیه حالت‌ها سلول‌ها در جهت آرایش الیاف پخش شدگی داشته‌اند و بین سلول‌ها پل‌های کاذب ایجاد شده است و سلول‌ها مقداری زمینه خارج سلولی ترشح کرده‌اند. نتایجی مشابه در تصاویر FESEM به کشت سلول‌ها در روز هفتم نیز مشاهده می‌شود. بر اساس نتایج ارائه شده می‌توان نتیجه گرفت که داربست نانوکامپوزیتی ساخته شده بر پایه BC و در حضور پلیمر PPy و درصد‌های وزنی مختلف نانوذرات ZnO گزینه‌ای بسیار مناسب در طراحی و ساخت داربست

مراجع

- [1] Ye S., Jiang L., Wu J., Su C., Huang C., Liu X. and Shao W., Flexible Amoxicillin-Grafted Bacterial Cellulose Sponges for Wound Dressing: In Vitro and in Vivo Evaluation, *ACS Applied Materials & Interfaces*, 5870–5862 ,10 2018.
- [2] Fu F., Gu J., Xu X., Xiong Q., Zhang Y., Liu X. and Zhou J., Interfacial Assembly of ZnO-Cellulose Nanocomposite Films via a Solution Process: A One-Step Biomimetic Approach and Excellent Photocatalytic Properties, *Cellulose*, 2017 ,162–147 ,24.
- [3] Wang P., Zhao J., Xuan R., Wang Y., Zou C., Zhang Z., Wan Y. and Xu Y., Flexible and Monolithic Zinc Oxide Bionanocomposite Foams by a Bacterial Cellulose Mediated Approach for Antibacterial Applications, *Dalton Transactions*, 2014 ,6768–6762 ,43.
- [4] Khalid A., Khan R., Ul-Islam M., Khan T. and Wahid F., Bacterial Cellulose-Zinc Oxide Nanocomposites as a Novel Dressing System for Burn Wounds, *Carbohydrate Polymers*, 164 2017 ,221–214.
- [5] ElNahrawy A.M., Haroun A.A., Hamadneh I., Al-Dujaili A.H. and Kamel S., Conducting Cellulose/TiO₂ Composites by in Situ Polymerization of Pyrrole, *Carbohydrate Polymers*, 2017 ,190–182 ,168.
- [6] Wu X., Chabot V.L., Kim B.K., Yu A., Berry R.M. and Tam K.C., Cost-Effective and Scalable Chemical Synthesis of Conductive Cellulose Nanocrystals for High-Performance Supercapacitors, *Electrochimica Acta*, –139 ,138 2014 ,147.
- [7] Shi Z., Gao H., Feng J., Ding B., Cao X., Kuga S., Wang Y., Zhang L. and Cai J., In Situ Synthesis of Robust Conductive Cellulose/Polypyrrole Composite Aerogels and Their Potential Application in Nerve Regeneration, *Angewandte Chemie International Edition*, 2014 ,5384–5380 ,(21)53.
- [8] Zhou S., Wang M., Chen X. and Xu F., Facile Template Synthesis of Microfibrillated Cellulose/Polypyrrole/Silver Nanoparticles Hybrid Aerogels with Electrical Conductive and Pressure Responsive Properties, *ACS Sustainable Chemistry & Engineering*, (12)3 2015 ,3354–3346.
- [9] Ning C., Zhou Z., Tan G., Zhu Y. and Mao C., Electroactive Polymers for Tissue Regeneration: Developments and Perspectives, *Progress in Polymer Science*, 162–144 ,81 2018.
- [10] Sannino A., Demitri C. and Madaghiele M., Biodegradable Cellulose-Based Hydrogels: Design and Applications, *Materials*, –353 ,(2)2 2009 ,373.
- [11] Nouri HoseinAbadi F., Shahsavari Sh., Vaziri Yazdi A., Hemmati A., Formulation of Collagen-Cyclodextrin Protein Nanofibers Containing Nano Clay using Electrospinning Process, *Journal of Food Science and Industry*, 2019 ,313–303 ,16.
- [12] Hosseini H., Kokabi M. and Mousavi S.M., Conductive Bacterial Cellulose/Multiwall Carbon Nanotubes Nanocomposite Aerogel as a Potentially Flexible Lightweight Strain Sensor, *Carbohydrate Polymers*, 2018 ,235–228 ,201.
- [13] Lay M., Méndez J.A., Delgado-Aguilar M., Bun K.N. and Vilaseca F., Strong and Electrically Conductive Nanopaper from Cellulose Nanofibers and Polypyrrole, *Carbohydrate Polymers*, 2016 ,369–361 ,152.
- [14] Hosseini H., Kokabi M. and Mousavi S.M., Dynamic Mechanical Properties of Bacterial Cellulose Nanofibres, *Iranian Polymer Journal*, 2018 ,443–433 ,27.
- [15] Wan C. and Li J., Cellulose Aerogels Functionalized With Polypyrrole and Silver Nanoparticles: In-Situ Synthesis, Characterization and Antibacterial Activity, *Carbohydrate Polymers*, 2016 ,367–362 ,146.
- [16] Picheth G.F., Pirich C.L., Sierakowski M.R., Woehl M.A., Sakakibara C.N., de Souza C.F., Martin A.A., da Silva R. and de Freitas R.A., Bacterial Cellulose in Biomedical Applications: A Review, *International Journal of Biological Macromolecules*, 2017 ,106–97 ,104.
- [17] Raisi A., Asefnejad A., Shahali M., Doozandeh Z., Kamyab Moghadas B., Saber-Samandari S., and Khandan A., A Soft Tissue Fabricated using a Freeze-Drying Technique with Carboxymethyl Chitosan and Nanoparticles for Promoting Effects on Wound Healing, *Journal of Nanoanalysis*, 2022 .274–262 ,(4)7.
- [18] Foroutan S., Hashemian M., Khosravi M., Nejad M. G., Asefnejad A., Saber-Samandari S., and Khandan A., A Porous Sodium Alginate-Casio 3 Polymer Reinforced with Graphene Nanosheet: Fabrication and Optimality Analysis, *Fibers and Polymers*, 2021 .549–540 ,(2)22.
- [19] Raisi A., Asefnejad A., Shahali M., Kazerouni

- Z. A. S., Kolooshani A., Saber Samandari S., and Khandan A., Preparation, Characterization, and Antibacterial Studies of N, O Carboxymethyl Chitosan as a Wound Dressing for Bedsore Application. Archives of Trauma Research, 2020, DOI: 10.4103/atr.atr_20_10.
- [20] Jamnezhad S., Asefnejad A., Motififard M., Yazdekhashti H., Kolooshani A., Saber-Samandari S., and Khandan A., Development and Investigation of Novel Alginate-Hyaluronic Acid Bone Fillers using Freeze Drying Technique for Orthopedic Field. Nanomedicine Research Journal, 2020 .315-306 ,(4)5.
- [21] Hosseini S. M., Shahrousvand M., Shojaei S., Khonakdar H. A., Asefnejad A., and Goodarzi V., Preparation of Superabsorbent Eco-Friendly Semi-Interpenetrating Network Based on Cross-Linked Poly Acrylic Acid/Xanthan Gum/GrapheneOxide(PAA/XG/GO):Characterization and Dye Removal Ability. International Journal of Biological Macromolecules, .893-884 ,152 2020.
- [22] Hosseini H., Teymouri M., Saboor S., Khalili A., Goodarzi V., Hajipoor F. P., and Bagheri H., Challenge between Sequence Presences of Conductive Additives on Flexibility, Dielectric and Supercapacitance Behaviors of Nanofibrillated Template of Bacterial Cellulose Aerogels. European Polymer Journal, -335 ,115 2019 .345.
- [23] Foroutan S., Hashemian M., and Khandan A., A Novel Porous Graphene Scaffold Prepared using Freeze-Drying Technique for Orthopedic Approaches: Fabrication and Buckling Simulation using GDQ Method. Iranian Journal of Materials Science and Engineering, ,(4)17 2020 .76-62.
- [24] Nassireslami E., Motififard M., Kamyab Moghadas B., Hami Z., Jasemi A., Lachiyani A., and Khandan A., Potential of Magnetite Nanoparticles with Biopolymers Loaded with Gentamicin Drug for Bone Cancer Treatment. Journal of Nanoanalysis, 2020, DOI: 10.22034/jna.2020.1908273.1229.
- [25] Khandan A., Doozandeh Z., and Saber-Samandari S., Preparation of Novel Arabic Gum-C6H9NO Biopolymer as a Bedsore for Wound Care Application. Acta Medica Iranica, .530-520 2020.
- [26] Mirsasaani S. S., Bahrami M., and Hemati M., Effect of Argon Laser Power Density and Filler Content on Physico-Mechanical Properties of Dental Nanocomposites. Bulletin of Environment, Pharmacology and Life Sciences, 2016 .36-28 ,5.
- [27] Sun C., Yarmohammadi A., Isfahani R. B., Nejad M. G., Toghraie D., Fard E. K., and Khandan A., Self-Healing Polymers using Electrospayed Microcapsules Containing Oil: Molecular Dynamics Simulation and Experimental Studies. Journal of Molecular Liquids, ,325 2021 .115182.
- [28] Ghomi F., Asefnejad, A. Daliri M., Godarzi V., and Hemati M., A Novel Investigation on Characterization of Bioactive Glass Cement and Chitosan-Gelatin Membrane For Jawbone Tissue Engineering. Journal of Nanoanalysis, 2021, DOI: 10.22034/jna.2021.1916281.1241.
- [29] Mirsasaani S. S., Hemati M., Dehkord E. S., Yazdi G. T., and Poshtiri D. A., Nanotechnology and Nanobiomaterials in Dentistry. In: Nanobiomaterials in Clinical Dentistry, Subramani K. and Ahmed W. (Eds.), Elsevier, pp. 2019 ,37-19.