

Original article

Synthesis and Characterization of Polycaprolactone Scaffolds Containing Carbon Quantum Dots Nanoparticles for Tissue Engineering Applications

Faranak Hasanpour¹, Saber Zahri^{1*}, Arash Abdolmaleki², Asadollah Asadi¹

1. Department of Biology, Faculty of Science, University of Mohaghegh Ardabili, Ardabil, Iran

2. Department of Biophysics, Faculty of Advanced Technologies, University of Mohaghegh Ardabili, Namin, Iran.

* *Corresponding author.* Tel +984531505190, Fax: +984531505187, E-mail: zahri@uma.ac.ir

Article info

Article history:

Received: Oct 26, 2024

Accepted: Jan 6, 2025

Keywords:

Antioxidant

Biocompatibility

Synthetic Scaffold

Tissue Engineering

ABSTRACT

Background: Tissue engineering, by designing biological scaffolds and imitating the extracellular environment, helps the growth and proliferation of cells and plays a key role in replacing and repairing damaged tissues. In recent years, the addition of nanoparticles, such as carbon quantum dots, to biological scaffolds has received attention. In this research, the synthesis of polycaprolactone scaffolds containing carbon quantum dots and the investigation of biocompatibility effects and their protection have been discussed.

Methods: Carbon quantum dots were synthesized using the pyrolysis method, and polymer scaffolds containing carbon quantum dots were prepared by the electrospinning method. The physical and chemical properties of the scaffold were evaluated by scanning electron microscopy and FTIR spectroscopy. The scaffolds' biocompatibility and antioxidant properties were measured by the MTT method.

Results: Examination of the morphology and chemical showed the appropriate porosity of the scaffold containing carbon quantum dots. The MTT assay significantly enhanced stem cell viability on scaffolds incorporating carbon quantum dots. Furthermore, these scaffolds exhibited a significant protective effect against oxidative stress.

Conclusion: This study showed that the polycaprolactone scaffold containing carbon quantum dots, with high biocompatibility and suitable antioxidant properties, provides an effective substrate for tissue engineering and cell protection under oxidative stress conditions.

How to cite this article: Hasanpour F, Zahri S, Abdolmaleki A, Asadi A. Synthesis and Characterization of Polycaprolactone Scaffolds Containing Carbon Quantum Dots Nanoparticles for Tissue Engineering Application. J Ardabil Univ Med Sci. 2024;24(3):333-348.

Extended Abstract

Background: Tissue engineering relies heavily on scaffolds that mimic the extracellular matrix. Designing a scaffold with appropriate mechanical properties is a fundamental criterion in tissue engineering applications because cell adhesion, proliferation, and differentiation depend highly on the scaffold's mechanical properties. A scaffold designed for perfect cell-scaffold interaction should have characteristics such as (1) high porosity with an interconnected pore structure, (2) a large surface area, (3) suitable mechanical strength, (4) high biocompatibility, and (5) biodegradability. Electrospinning is a versatile technique to fabricate nanofibrous scaffolds that mimic the extracellular matrix and increase the available surface area to support cellular attachment. Although synthetic polymers such as polycaprolactone are biocompatible and biodegradable, they cannot fully support cell adhesion because they are usually hydrophobic and lack the necessary cell recognition sites. Adding nanoparticles to the structure of synthetic polymers increases cell adhesion and viability and has the least toxicity. Among various nanoparticles, CQDs have unique properties such as excellent biocompatibility, tunable optical properties, and antioxidant activity. They are considered one of the most efficient nanoparticles to add to scaffolds. CQDs can provide additional functional groups. Increase the available surface and potentially release bioactive molecules; as a result, they are favorable nanoparticles for cell growth and tissue regeneration.

Methods: Carbon quantum dots were synthesized using the pyrolysis method in a 900W microwave. After synthesis, the resulting solution was centrifuged and filtered to obtain a pure CQD solution. Nanoparticles obtained with polycaprolactone dissolved in ultrasound. The resulting solution was then subjected to electrospinning, which involves applying high voltage to the polymer solution to produce nanofibers. Scaffold morphology, pore size distribution, and functional group

analysis were characterized using scanning electron microscopy (SEM) with ImageJ analysis and Fourier transform infrared spectroscopy (FTIR), respectively. Cell viability and biocompatibility of the scaffolds were assessed using the Dimethyl sulfoxide (DMSO), 3-(4, 5-dimethylthiazol-2-yl) - 2, 5-diphenyl tetrazolium bromide (MTT) assay at specific time intervals after cell seeding. Oxidative stress factors such as high-concentration glucose, hydrogen peroxide, and X-rays were used to measure CQD-containing scaffolds' protective and antioxidant ability compared to polycaprolactone scaffolds and cell control samples without scaffolds. Cell viability under oxidative stress conditions was evaluated using MTT analysis.

Results: The chemical composition and morphology of the scaffolds were investigated in the following way. The shape and structure of the pores of the electrospun scaffolds were investigated using a scanning electron microscope (SEM). A distinct nanofibrous structure with associated pores was visible in SEM images, which is essential for nutrient exchange and cell penetration. Using ImageJ software, the pore size distribution was analyzed and found suitable for cell development and proliferation. The chemical composition of the scaffolds was characterized using Fourier transform infrared (FTIR) spectroscopy. Functional groups of carbon quantum dots (CQD) and polycaprolactone (PCL) were shown by distinct peaks in the FTIR spectrum. The successful incorporation of CQDs into the PCL matrix was demonstrated by confirming the presence of carboxyl (COOH) groups. These functional groups are essential for the antioxidant quality of the scaffold.

The biocompatibility of scaffolds was evaluated using the 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) method. This colorimetric method measures cell viability by quantifying the metabolic activity of cells. Cells cultured on PCL scaffolds containing CQDs showed higher viability than those cultured on pure PCL scaffolds or without scaffolds. This increase

in cell proliferation and survival can be attributed to the improvement of surface properties, increase in cell adhesion, and better attachment of cells on the scaffold due to the presence of quantum dot carbon nanoparticles. Cells cultured on different scaffolds were exposed to oxidative stress caused by various substances, such as high concentrations of glucose, hydrogen peroxide, and X-ray radiation, to evaluate the antioxidant quality of the scaffolds. Once again, the MTT assay assessed cell viability under these oxidative conditions. Compared with the control group, the results showed that scaffolds containing CQDs significantly protect cells against oxidative stress. The antioxidant properties of CQDs, which effectively scavenge reactive oxygen species (ROS) produced during oxidative stress, are responsible for this protective effect.

Conclusion: Carbon quantum dots (CQDs) have emerged as promising nanomaterials for various biomedical applications, including tissue engineering. CQDs can be added to synthetic scaffolds to improve their functional characteristics and biocompatibility.

In this study, we successfully synthesized CQDs and incorporated them into polycaprolactone (PCL) scaffolds using the

electrospinning technique. The obtained scaffolds show a nanofibrous structure with interconnected pores, which provides an ideal environment for cell growth and proliferation. Cells were cultured on CQDs containing PCL and pure PCL scaffolds to evaluate the scaffolds' biocompatibility. The results showed that CQDs significantly increased cell viability and proliferation. This improvement can be attributed to the synergistic effect of the nanofibrous structure and CQD bioactivity. In addition, CQDs protect cells against oxidative stress caused by various environmental factors due to their antioxidant properties. The antioxidant effect is caused by the presence of functional groups, such as carboxyl groups, on the CQD surface.

The results of this study show how PCL scaffolds combined with CQDs can be used in tissue engineering applications. These scaffolds, which combine the advantages of nanofibrous scaffolds with the unique properties of CQDs, provide a promising basis for tissue regeneration and repair. Further research is needed to determine the exact processes for enhancing these scaffolds' biocompatibility and antioxidant quality for specific tissue engineering applications.

سنتز و ارزیابی داربست‌های پلی‌کاپرولاکتون حاوی نانوذرات نقاط کوانتومی کربن برای کاربردهای مهندسی بافت

فرانک حسن پور^۱، صابر زهری^{۱*}، آرش عبدالملکی^۲، اسداله اسدی^۱

۱. گروه زیست شناسی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه محقق اردبیل، اردبیل، ایران

۲. گروه بیوفیزیک، دانشکده فناوری های نوین، دانشگاه محقق اردبیلی، نمین، ایران.

* نویسنده مسئول. تلفن: ۰۴۵۳۱۵۰۵۱۹۰ فاکس: ۰۴۵۳۱۵۰۵۱۸۷ پست الکترونیک: Zahri@uma.ac.ir

چکیده

زمینه و هدف: مهندسی بافت، با طراحی داربست‌های زیستی و با تقلید از محیط خارج سلولی، به رشد و تکثیر سلول‌ها کمک کرده و نقش کلیدی در جایگزینی و ترمیم بافت‌های آسیب‌دیده دارد. در سال‌های اخیر، افزودن نانوذرات همانند نقاط کوانتومی کربن به داربست‌های زیستی مورد توجه قرار گرفته است. در این پژوهش به سنتز داربست پلی‌کاپرولاکتون حاوی نقاط کوانتومی کربن و بررسی اثرات زیست‌سازگاری و محافظتی آن در شرایط تنش اکسیداتیو پرداخته شده است.

روش کار: نقاط کوانتومی کربن با استفاده از روش پیرو لیز سنتز شده و داربست‌های پلیمری حاوی نقاط کوانتومی کربن به روش الکترورسی تهیه شدند. ویژگی‌های فیزیکی و شیمیایی داربست با میکروسکوپ الکترونی روبشی و طیف‌سنجی FTIR ارزیابی شد. زیست‌سازگاری داربست‌ها و خواص آنتی‌اکسیدانی آن‌ها با روش MTT سنجیده شد.

یافته‌ها: بررسی مورفولوژی و ساختار شیمیایی داربست، تداخل مناسب داربست حاوی نقاط کوانتومی کربن را نشان داد. آزمون MTT به صورت قابل توجهی قابلیت زنده ماندن سلول‌های بنیادی را بر روی داربست‌های حاوی نقاط کوانتومی کربنی نشان داد. علاوه بر این، این داربست‌ها اثر محافظتی قابل توجهی در برابر استرس اکسیداتیو از خود نشان دادند.

نتیجه‌گیری: این مطالعه نشان داد که داربست پلی‌کاپرولاکتون حاوی نقاط کوانتومی کربن، با ویژگی‌های زیست‌سازگاری بالا و خواص آنتی‌اکسیدانی مناسب، بستر مؤثری برای مهندسی بافت و محافظت سلولی در شرایط تنش اکسیداتیو فراهم می‌آورد.

واژه‌های کلیدی: آنتی‌اکسیدان، زیست‌سازگاری، داربست سنتزی، مهندسی بافت

پذیرش: ۱۴۰۳/۱۰/۱۷

دریافت: ۱۴۰۳/۸/۵

مقدمه

ماتریکس خارج سلولی عمل می‌کند. داربست‌ها قابلیت انتقال و حذف مواد مغذی و مواد زائد تولیدی را از داخل به خارج و یا بالعکس را دارد [۲]. از ویژگی‌های منحصر به فرد داربست‌ها می‌توان تداخل بالا با منافذی در ابعاد مختلف که به صورت یکنواخت در طول داربست پراکنده شده‌اند و محیط مناسبی برای

مهندسی بافت علم طراحی داربست برای جایگزینی، تحویل دارو و بهبود عملکرد بافت‌های آسیب‌دیده است [۱]. داربست نقش حیاتی در تبدیل سلول‌ها به بافت ایفا می‌کند و به عنوان الگوی برای تنظیم عملکرد سلولی (چسبندگی، رشد، تکثیر، تمایز) و رسوب

اتصال بهتر سلول‌ها ایجاد می‌کند اشاره کرد. از دیگر خصوصیات قابل توجه داربست‌ها می‌توان استحکام مکانیکی مناسب، زیست سازگاری بالا، توانایی رهایش انواع داروها و مواد همراه را نام برد [۳-۵]. خواص فیزیکی و شیمیایی، استحکام مکانیکی و زیست سازگاری داربست به معماری سه‌بعدی و ترکیب شیمیایی آن بستگی دارد [۶-۸].

در سنتز داربست‌هایی با میزان تخلخل مناسب روش‌های مختلفی نظیر الکتروریسی [۹، ۱۰]، پرینتر سه بعدی [۱۱]، فروشویی ذره‌ای [۱۲] و فوم‌گازی [۱۳] مورد استفاده قرار می‌گیرد. در این بین الکتروریسی یکی از انعطاف‌پذیرترین و ساده‌ترین تکنیک‌هایی است که امکان تولید الیاف با قطرهای مختلف از ده‌ها نانومتر تا چند میکرومتر را دارد [۱۴، ۱۵].

افزودن مواد مختلف طبیعی و مصنوعی به صورت متداول در جهت تغییرات مثبت و کارایی بهتر داربست‌های زیستی مورد استفاده قرار می‌گیرد. بر همین اساس نقاط کربن در داربست‌های مختلف طبیعی و مصنوعی مبتنی بر پلیمر ادغام می‌شوند تا کاربردهای مهندسی بافت را افزایش دهند [۱۶]. نقاط کوانتومی کربن (CQD)، یک کلاس جدید از نقاط کوانتومی هستند که به دلیل خواص نوری جذابشان توجه روزافزونی را به خود جلب کرده است. برخلاف نقاط کوانتومی نیمه‌هادی و عوامل فلورسنت آلی سنتی، نقاط کوانتومی کربن‌ها مزایای قابل‌توجهی مانند سمیت سلولی کم، پایداری شیمیایی، زیست سازگاری عالی و فوتولومینسانس پایدار (PL)، وزن سبک، ساخت آسان، انعطاف‌پذیری مکانیکی مناسب، پایداری بالا، رسانایی الکتریکی و همگنی ذرات را از خود نشان می‌دهند. در نتیجه طیف وسیعی از کاربردها را می‌توان با این ترکیبات طراحی کرد [۱۷-۲۰]. نقاط کوانتومی نانو کریستال‌های نیمه‌رسانا با اندازه‌های تقریباً ۲-۱۰ نانومتر هستند [۲۱]. از روش‌های سنتز نقاط کوانتومی کربن‌ها می‌توان به کربن‌سازی حرارتی [۲۲]، ماکروویو [۲۳]، لیزر [۲۴]، هیدروترمال

[۲۵]، حل گرمایی [۲۶]، روش‌های الکتروشیمیایی [۲۷] و شیمیایی [۲۸] اشاره کرد. مطالعه حاضر در نظر دارد اثر محافظتی و آنتی‌اکسیدانی داربست پلی‌کاپرولاکتون، غنی‌شده با نقاط کوانتومی کربن (CQD) را در حضور میزان بالای گلوکز، H_2O_2 و اشعه X را بر روی داربست حاوی سلول‌های بنیادی بافت چربی (AD-MSC) مورد بررسی قرار دهد.

روش کار

ملاحظات اخلاقی

این مطالعه آزمایشگاهی در آزمایشگاه تحقیقاتی سلولی و مولکولی دانشگاه محقق اردبیلی از دی‌ماه سال ۱۴۰۲ تا فروردین ۱۴۰۳ در قالب قسمتی از رساله دکتری انجام شد. این مطالعه دارای کد اخلاقی به شماره (IR.UMA.REC.1402.017) است.

سنتز نانوذره نقاط کوانتومی کربن

جهت سنتز کربن کوانتوم دات ۱/۱ گرم اسیدسیتریک (شرکت مرک، آلمان) و ۳۵۰ میکرولیتر دی‌متیل‌آمین (شرکت مرک، آلمان) در ۱۰ میلی‌لیتر آب مقطر به مدت ۲۰ دقیقه حل شد. با استفاده از روش پیرو لیز محلول حاصل به مدت ۵ دقیقه در ماکروویو با قدرت ۹۰۰ وات قرار داده شد تا ماده قهوه‌ای تیره‌ای به دست آید. حجم ماده سنتزی مجدداً به ۱۰ میلی‌لیتر رسانده شد تا نانو ذرات سنتز شده به‌طور یکنواخت در آن پراکنده شوند. در مرحله بعد جهت جداسازی ناخالصی‌ها محلول از کاغذ صافی عبور داده شد و در سانتریفیوژ ۱۲۰۰۰ rpm به مدت ۱۵ دقیقه قرار گرفت. در مرحله آخر محیط رویی از فیلتر سر سرنگی با اندازه ۰/۲ نانومتر عبور داده شد و در یخچال با دمای ۴ درجه سانتی‌گراد نگهداری شد [۲۹].

تهیه نانو داربست

برای ساخت این داربست دو قسمتی از پلی‌کاپرولاکتون (شرکت مرک، آلمان) و نقاط کوانتومی کربن سنتز شده استفاده شد. پلی‌کاپرولاکتون ۱۲ wt٪ در اسید

تبدیل فوریه فروسرخ ساخت کشور امریکا مورد سنجش قرار گرفت.

آماده‌سازی و استریل نمودن داربست

جهت آماده‌سازی داربست‌ها به قطعات ($10 \times 10 \text{ mm}^2$) تقسیم شدند و در چاهک‌های پلیت ۹۶ خانه قرار داده شد و با PBS حاوی آنتی‌بیوتیک پنی‌سیلین/استرپتوماسین به سرعت شسته، سپس در دو نوبت ۲۰ دقیقه‌ای تحت تابش اشعه UV استریل شد و تعداد 5×10^3 سلول بر روی داربست‌ها کشت داده شد.

کشت سلول

سلول‌های بنیادی بافت چربی (AD-MSC) از انستیتو پاستور ایران تهیه گردید. سلول‌ها در محیط DMEM (محصول شرکت گیبکو، انگلستان) حاوی ۲۰٪ سرم جنین گاوی (محصول شرکت گیبکو، انگلستان) و آنتی‌بیوتیک ۱٪ (محصول شرکت گیبکو، انگلستان) در انکوباتوری با دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد و ۵٪ CO_2 کشت داده شد. محیط رویی سلول‌ها خارج و برای حذف هرگونه آلودگی با PBS شسته شده و با Trypsin-EDTA از کف فلاسک جدا شدند.

تثبیت سلول بر روی داربست

تعداد 5×10^3 سلول بر روی داربست‌ها کشت داده شد و برای ۴۸ ساعت انکوبه شد. به‌منظور تثبیت سلول‌ها بر روی سطح داربست برای مطالعه اتصال سلولی پس از شستشو با PBS، گلو تار آلدئید (۳٪) (سیگما آلد ریچ، امریکا) اضافه شد و به مدت ۲-۴ ساعت نگهداری شد. در مرحله بعد، فرآیند آبیگری با استفاده از اتانول ۵۰ تا ۱۰۰ درصد وزنی انجام شد و در نهایت داربست‌ها برای ارزیابی FE-SEM آماده شدند [۳۲].

زیست سازگاری نانو داربست

جهت بررسی میزان زنده‌مانی سلول‌ها از تست MTT (methyl-thiazol-tetrazolium) استفاده شد. رنگ زرد MTT به‌وسیله آنزیم ردوکتاز موجود در میتوکندری سلول‌های زنده به رنگ بنفش فورمازون احیا می‌شود؛ بنابراین شدت رنگ بنفش را می‌توان با

استیک (سیگما آلد ریچ، امریکا) به مدت ۵ ساعت بر روی همزن مغناطیسی حل شد. سپس نقاط کوانتومی کربن محلول در آب با غلظت ۶ wt٪ در سه مرحله و تحت فراصوت به پلی‌کاپرولاکتون اضافه شد تا محلولی شفاف و با غلظت مناسب جهت قرار گرفتن در دستگاه الکتروریسی به دست آید [۳۰]. نانو الیاف در بازه زمانی ۵ ساعت جمع‌آوری شدند که سرعت جمع‌آوری نمونه‌ها ۱ میلی‌لیتر در ساعت و با چرخش 250 rpm انجام شد. فاصله سوزن تزریق تا داربست ۱۵ سانتیمتر و در ولتاژ ۱۸ kV این فرآیند انجام شد، سپس داربست‌ها در یک آون خلأ در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲۴ ساعت خشک شدند [۳۱].

بررسی مورفولوژی و فراساختار نانو داربست

به‌منظور بررسی خواص سطحی و اندازه‌گیری قطر نانو داربست از میکروسکوپ الکترونی روبشی FE-SEM ساخت کشور چک استفاده شد. ابتدا نمونه‌های داربست تهیه‌شده در ابعاد $30 \times 30 \text{ mm}^2$ با طلا پوشش‌دهی شده و تصویربرداری انجام شد.

بررسی اندازه نانو ذرات

اندازه نانو ذرات سنتز شده توسط دستگاه DLS اندازه‌گیری شد. اساس کار این دستگاه پراکندگی نور در همه جهات با الگوی شدت وابسته به اندازه ذرات است. در این تجزیه و تحلیل، ۳ میلی‌لیتر محلول آبی حاوی CQD در دستگاه پراکندگی نور دینامیک ساخت کشور ژاپن قرار داده شد و اندازه نانو ذرات در طیف نانومتر اندازه‌گیری شد.

قطر و اندازه منافذ داربست

تعداد و قطر منافذ داربست و قطر رشته‌های تنیده شده توسط Image J مورد ارزیابی قرار گرفت.

بررسی ویژگی‌های شیمیایی نانو داربست‌ها

جهت تشخیص ساختار شیمیایی و گروه‌های عاملی داربست تهیه‌شده با نقاط کوانتومی کربن، از طیف‌سنجی تبدیل فوریه فروسرخ استفاده شد. بدین منظور داربستی در ابعاد 20×20 میلی‌متر در محدوده طول موج $400-4000 \text{ cm}^{-1}$ در دستگاه طیف‌سنجی

۱۰۰ (به مدت ۲۴ ساعت) و اشعه X با دوز 50KV/100mA (در مدت‌زمان ۳۰ دقیقه) قرار گرفتند. در این آزمایش ابتدا داربست‌ها و سلول‌ها همان طور که قبلاً ذکر شد آماده‌شده و ۲۴ ساعت بعد مورد تنش قرار گرفتند، سپس زنده‌مانی سلول‌ها با روش MTT مورد بررسی قرار گرفت [۳۵].

آنالیز آماری

تمام آزمایش‌ها در سه تکرار انجام شد. آنالیز آماری به کمک نرم‌افزار SPSS-29 انجام شد و داده‌ها به صورت میانگین $\pm$ انحراف استاندارد بیان شدند. از آنالیز واریانس یک طرفه و آزمون تعقیبی توکی استفاده‌شده است. نمودارها با استفاده از نرم‌افزار اکسل ورژن ۲۰۱۳ رسم شد. مقدار $p < 0.05$ از نظر آماری معنی‌دار در نظر گرفته شد.

یافته‌ها

بررسی مورفولوژی سلول AD-MSC

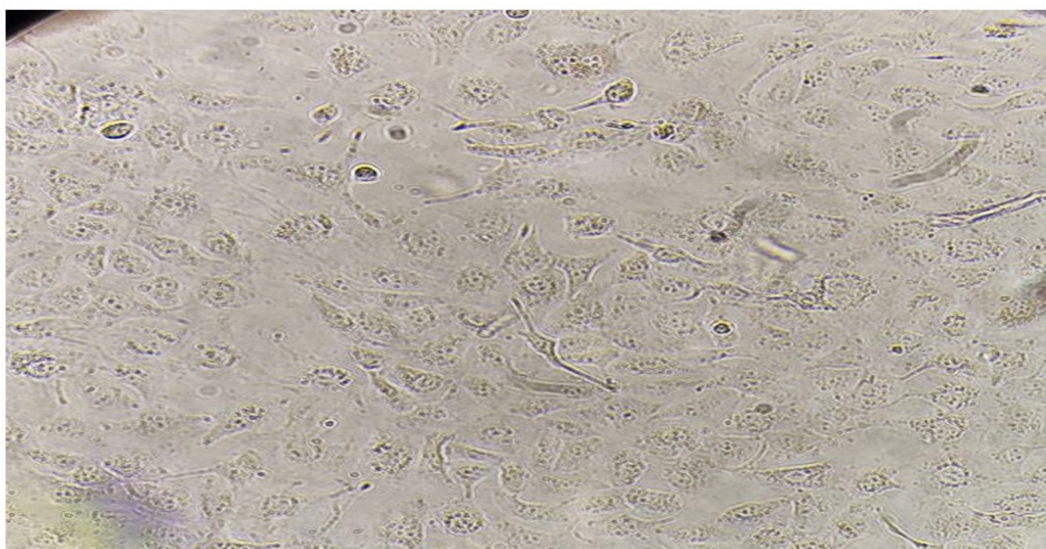
سلول‌های کشت‌شده در محیط DMEM توسط میکروسکوپ فاز معکوس مورد بررسی قرار گرفت که در آن رشد کافی و مورفولوژی دوکی‌شکل قابل مشاهده است (شکل ۱).

تعداد سلول‌های زنده هم‌راستا دانست [۳۳]. داربست‌ها در ابعاد $10 \times 10 \text{ mm}^2$ پانچ شده و پس از استریل کردن داربست‌ها تعداد 5×10^3 سلول در پلیت ۹۶ خانه کشت و به مدت ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت انکوبه شد. پس از آن محیط رویی خارج و سلول‌ها با PBS شستشو شده و به هر چاهک میزان ۴۰ میکرولیتر محلول (۰/۵ mg/mL) MTT و ۱۶۰ میکرو لیتر محیط DMEM اضافه‌شده و به مدت ۶ ساعت انکوبه شد. سپس محیط رویی خارج و ۲۰۰ میکرو لیتر DMSO اضافه شد و به مدت ۲۰ دقیقه انکوبه و جذب نمونه‌ها در ۵۷۰ نانومتر به وسیله دستگاه الیزاریدر ساخت کشور امریکا خوانده شد. شدت جذب ارتباط مستقیم با میزان زنده‌مانی سلول‌ها دارد [۳۴].

تنش‌های اکسیداتیو

برای این منظور سه گروه سلول شاهد (فاقد داربست)، داربست‌های پلی‌کاپرولاکتون و داربست‌های پلی‌کاپرولاکتون به همراه نانو ذرات نقاط کوانتومی کربن تعریف شدند.

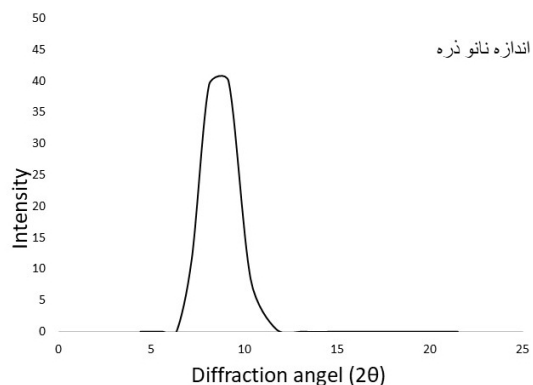
همه گروه‌ها در سه تکرار برای سنجش تأثیرات حفاظتی و آنتی‌اکسیدانی تحت تنش با گلوکز در غلظت‌های ۸۰ و ۱۰۰ (به مدت ۲۴ ساعت)، پراکسید هیدروژن (H_2O_2) در غلظت‌های ۵۰ μl و



شکل ۱. سلول‌های AD-MSC کشت داده شده در محیط کشت DMEM بزرگنمایی ۴۰۰×

بررسی اندازه نانو ذرات

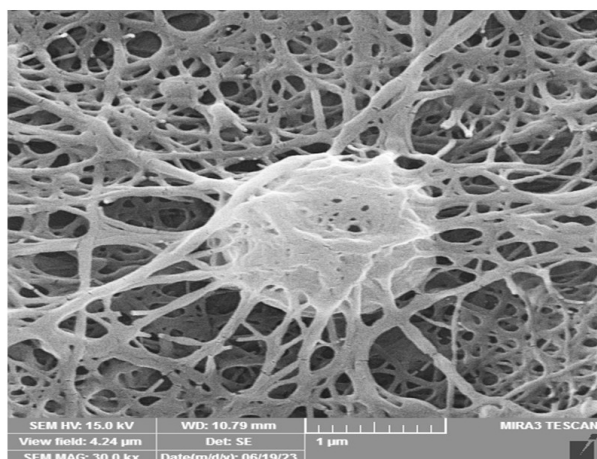
نتیجه اندازه گیری اندازه هیدرودینامیکی نانو ذرات سنتز شده با استفاده از دستگاه DLS در شکل ۲ نشان داده شده است. اندازه ذرات ۸/۱ نانومتر است. وجود تک پیک پراکندگی منفرد را نشان می دهد.



شکل ۲. اندازه نانوذره CQD با استفاده از دستگاه DLS

بررسی مورفولوژی و فراساختار نانو داربست

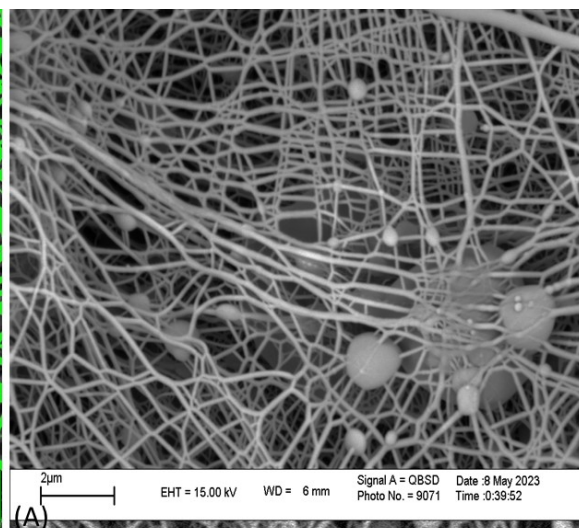
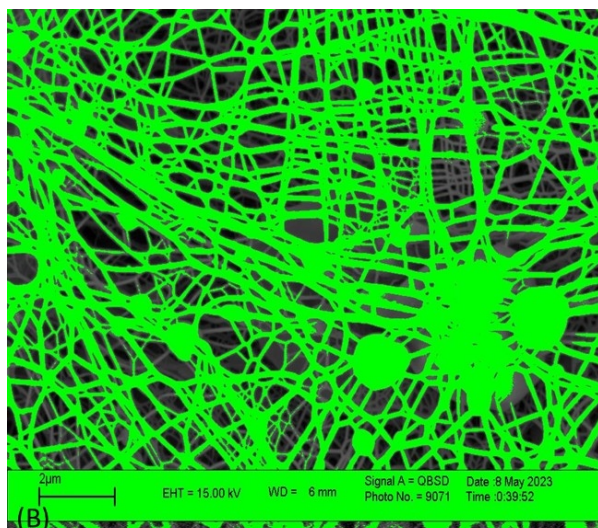
ساختار، تخلخل و تغییرات داربست های تهیه شده به وسیله میکروسکوپ SEM مورد بررسی قرار گرفت. نتایج حاصل نشان داد که داربست در سطح نانو سنتز شده است و سطح داربست حاوی منافذ و قطر مناسب جهت اتصال و رشد سلول ها است (شکل ۳).



شکل ۳. تصاویر میکروسکوپ FE-SEM داربست PCL/CQD به همراه سلول

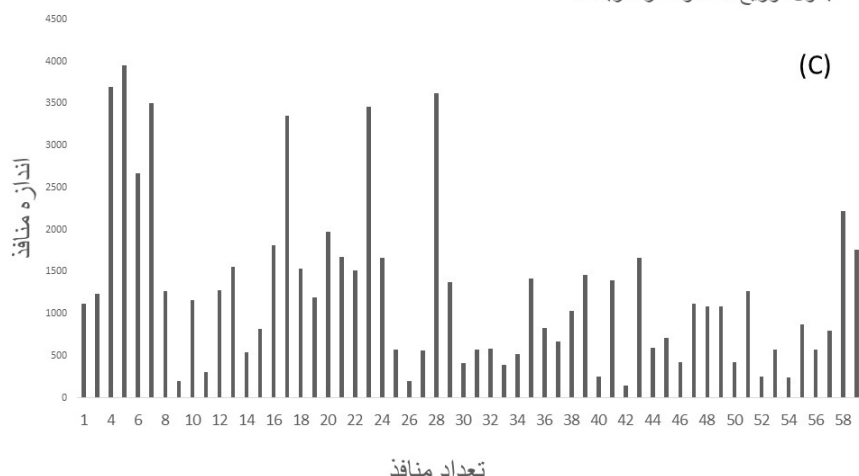
بررسی اندازه منافذ داربست ها

میزان تخلخل و زاویه بندی داربست با نرم افزار Image J مورد بررسی قرار گرفت که اندازه بزرگ ترین منفذ ۳۹۰۰ نانومتر مربع و اندازه کوچک ترین منفذ ۱۴۸ نانومتر مربع بود که نشان دهنده تخلخل مناسب داربست برای رشد وزنده مانی سلول ها است (شکل ۴) (نمودار ۱).



شکل ۴. تصویر FE-SEM از موقعیت منافذ داربست (A) چگونگی توزیع منافذ داربست PCL/CQD، (B) تصویر گرافیکی از موقعیت منافذ

جدول توزیع منافذ و قطر داربست



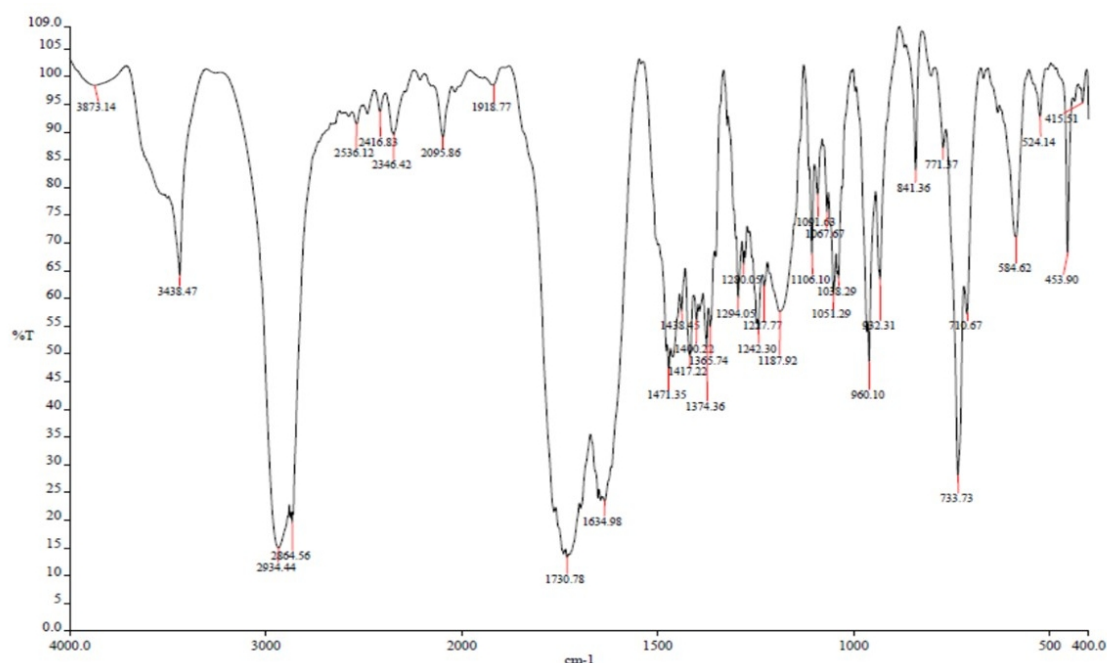
نمودار ۱. گراف توزیع منافذ داربست PCL / CQD

تربیت نشان‌دهنده پیوندهای N-H و C-N هستند و همچنین پیک ۱۴۰۰ نشان‌دهنده حلقه آروماتیک است. پیک مشخصه ۳۸۷۳ نشان‌دهنده OH کششی است. در محدوده ۲۹۰۰ تا ۳۵۰۰ پیک‌های مربوط به پیوند کششی C-H و O-H مربوط به کربوکسیلیک‌اسید دیده می‌شود (شکل ۵).

بررسی ساختار شیمیایی نانو داربست‌ها توسط

طیف‌سنجی تبدیل فوریه فروسرخ (FTIR)

در این نمودار پیک‌های مشخصه هر جزء داربست نمایش داده شده است. پیک‌های ۲۸۶۴ و ۲۹۳۴ به ترتیب مربوط به کشش متقارن و نامتقارن CH_2 در پلی‌کاپرولاکتون هستند. پیک ۱۷۳۰ نشان‌دهنده پیوند C=O است که در هر دو جزء پلی‌کاپرولاکتون و نقاط کوانتومی کربن وجود دارد. پیک‌های ۱۶۳۴ و ۱۲۱۷ به

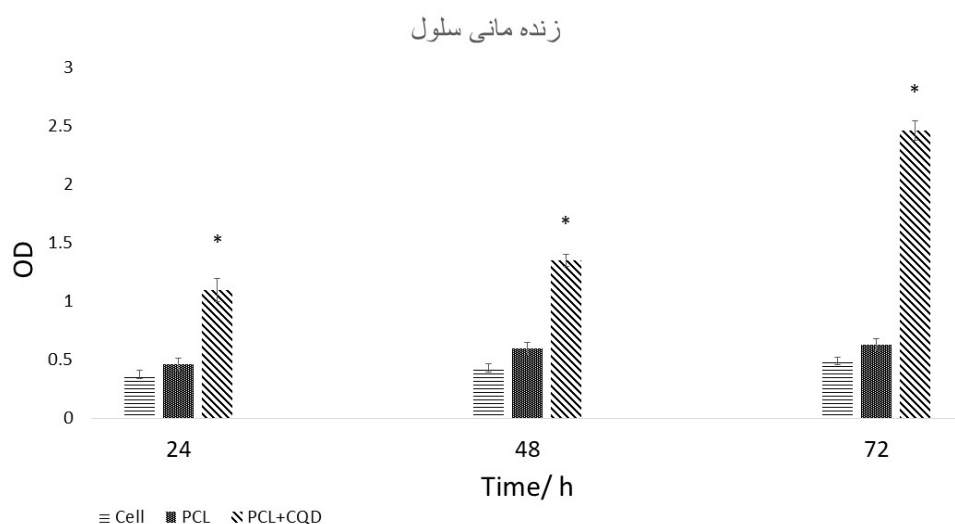


شکل ۵. گراف FTIR حاصل از نانوداربست PCL / CQD

زیست سازگاری نانو داربست

نتایج حاصل از رشد و تکثیر سلول‌های AD-MSC بر روی نانو داربست در بازه‌های زمانی ۴۸، ۷۲ و ۷۲ ساعت پس از کشت سلول‌ها نشان داد که زنده‌مانی سلول‌ها بر روی داربست پلی‌کاپرولاکتون حاوی نانو ذرات نقاط کوانتومی کربن در مقایسه با گروه کنترل به صورت معنی‌داری افزایش یافته است (نمودار ۲). داربست‌های دارای نانوذره در هر سه دوره زمانی مورد آزمایش افزایش جذب را نسبت به نمونه‌های شاهد (فاقد داربست) و داربست‌های پلی‌کاپرولاکتون نشان می‌دهند. بیشترین و کمترین شدت جذب

خوانده شده پس از ۷۲ ساعت به ترتیب $2/46 \pm 0/01$ برای داربست‌های حاوی نقاط کوانتومی کربن و $0/489 \pm 0/01$ برای نمونه شاهد (بدون داربست) است. نتایج نشان می‌دهد که داربست حاوی نقاط کوانتومی کربن بستر بسیار خوبی برای تکثیر سلول‌ها ایجاد کرده است و افزایش زنده‌مانی تا دو برابر گروه کنترل در ۷۲ ساعت دیده می‌شود که نشان‌دهنده عدم سمیت و ایمن بودن داربست برای سلول‌ها است ($p < 0/05$).



نمودار ۲. نمودار حاصل از تست MTT، میزان زنده‌مانی سلول‌ها بر روی داربست PCL / CQD و داربست PCL پس از ۴۸، ۷۲ ساعت از کشت سلولی (۳ بار تکرار). داده‌ها به صورت میانگین $\pm$ انحراف استاندارد نمایش داده شده است. مقدار ($p < 0.05$) در مقایسه با گروه کنترل معنی‌دار در نظر گرفته شد.

بررسی اثر آنتی‌اکسیدانی و محافظتی داربست حاوی

نقاط کوانتومی کربن

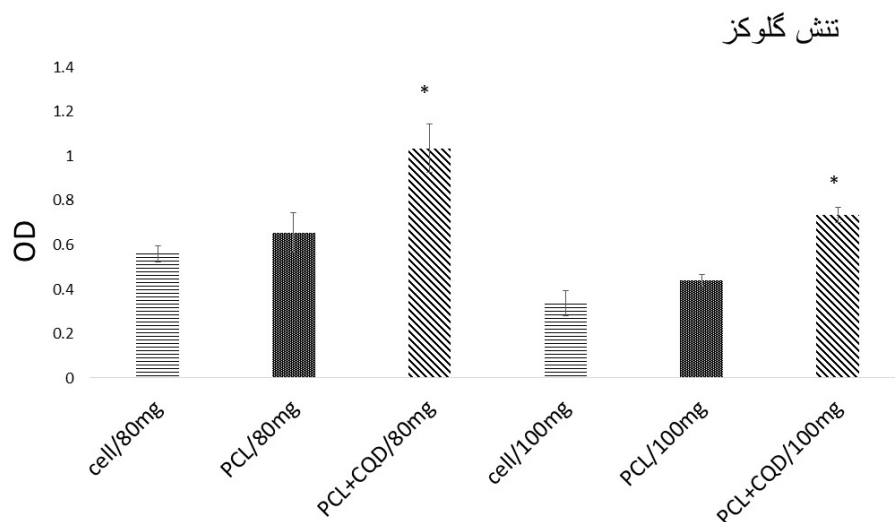
نتایج زنده‌مانی سلول‌های تحت تنش آنتی‌اکسیدانی به روش MTT انجام شد و در نمودارهای ۳، ۴ و ۵ به تصویر درآمده است. داربست حاوی نقاط کوانتومی کربن در غلظت ۸۰ mg در غلظت جذب $1/03 \pm 0/01$ را از خود نشان داد که بیشترین میزان جذب در این غلظت بود (نمودار ۳) و تفاوت معناداری ($p < 0/05$) را نسبت به نمونه شاهد نشان داد. غلظت ۱۰۰ mg/ml گلوکز میزان شدت جذب $0/735 \pm 0/01$ را نشان داد که

نسبت به نمونه شاهد معنادار بوده و افزایش محافظت را نشان می‌دهد. مقایسه نتایج دو غلظت به کاررفته حاکی از آن است که داربست‌های حاوی نانو ذرات در غلظت کمتر محافظت بیشتری را از خود نشان می‌دهند.

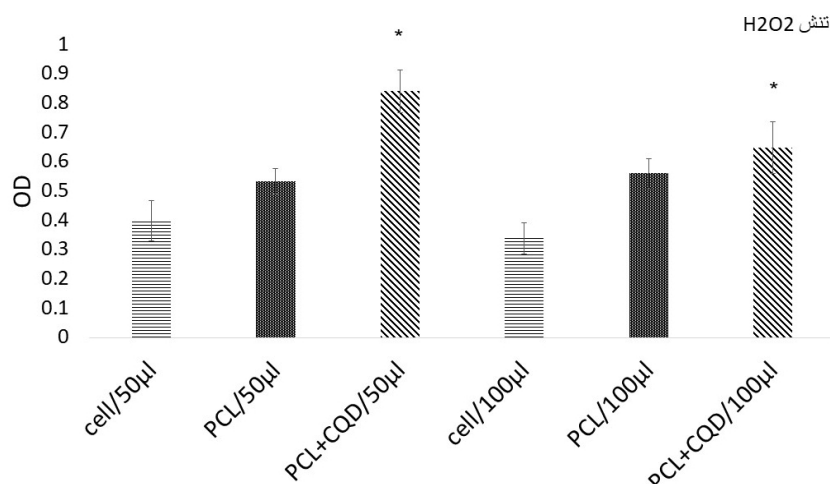
نمونه‌های شاهد در سنجش آنتی‌اکسیدانی پراکسید هیدروژن در غلظت ۱۰۰ μ l جذب $0/338 \pm 0/01$ را نشان داد که در مقایسه با نمونه‌های داربست پلی‌کاپرولاکتون با جذب $0/532 \pm 0/01$ و داربست پلی‌کاپرولاکتون حاوی نقاط کوانتومی کربن با

مقایسه با دو نمونه دیگر بیشترین میزان جذب 0.65 ± 0.01 را از خود نشان دادند (نمودار ۵). در هر سه تست نتایج بیانگر این است که داربست پلی‌کاپرولاکتون حاوی نقاط کوانتومی کربن در برابر انواع تنش‌ها اعم از گلوکز، پر اکسید هیدروژن و اشعه X اثر آنتی‌اکسیدانی و محافظتی خوب و معناداری را بر روی سلول‌ها در مقایسه با سلول‌های شاهد (بدون داربست) و داربست پلی‌کاپرولاکتون از خود نشان می‌دهد ($p < 0.05$).

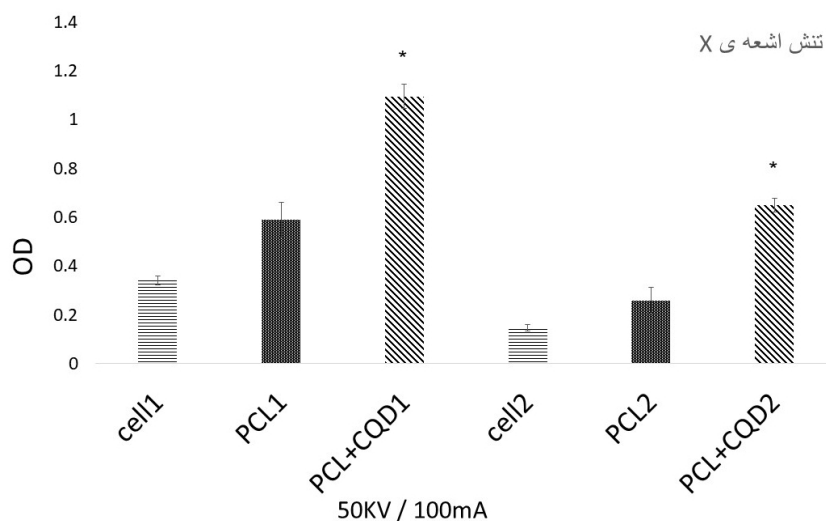
جذب 0.647 ± 0.01 کمترین میزان جذب است (نمودار ۴). داربست‌های پلی‌کاپرولاکتون حاوی نقاط کوانتومی کربن در هر دو غلظت پراکسید هیدروژن سنجش شده (50 و $100 \mu\text{M}$) حفاظت معناداری را از خود نشان دادند ($p < 0.05$). قبل از تنش با اشعه X بیشترین میزان جذب (در مقایسه با نمونه شاهد و داربست پلی‌کاپرولاکتون) در داربست‌های پلی‌کاپرولاکتون حاوی نقاط کوانتومی کربن (1.09 ± 0.01) دیده شد. پس از تنش نمونه داربست‌های پلی‌کاپرولاکتون/نقاط کوانتومی کربن در



نمودار ۳. نمودار حاصل از تست MTT میزان زنده‌مانی سلول‌ها بر روی داربست PCL / CQD و داربست PCL و گروه شاهد که تحت تنش اکسیداتیو گلوکز (غلظت ۸۰ و ۱۰۰ میلی گرم بر میلی لیتر) قرار گرفت. مقدار ($p < 0.05$) در مقایسه با گروه کنترل معنی دار در نظر گرفته شد.



نمودار ۴. نمودار حاصل از تست MTT میزان زنده‌مانی سلولی‌ها بر روی داربست PCL / CQD و داربست PCL و گروه شاهد (سلول خالص) که تحت تنش اکسیداتیو H2O2 (غلظت ۵۰ و ۱۰۰ میکرو لیتر) قرار گرفت. مقدار ($p < 0.05$) در مقایسه با گروه کنترل معنی دار در نظر گرفته شد.



نمودار ۵. نمودار حاصل از تست MTT میزان زنده‌مانی سلولی‌ها بر روی داربست PCL / CQD و داربست PCL و گروه شاهد قبل و پس از پرتو دهی با اشعه X به مدت ۳۰ دقیقه (با توانایی 50 KV/100mA) قرار گرفت. مقدار ($p < 0.05$) در مقایسه با گروه کنترل معنی دار در نظر گرفته شد. (نمونه‌ها قبل و پس از پرتو دهی به ترتیب به صورت (Cell 1/ PCL1 / PCL/CQD 1) و (Cell 2/ PCL2 / PCL/CQD 2) نمایش داده شده است.)

بحث

در این مطالعه، ویژگی‌های داربست سنتز شده از پلی‌کاپرولاکتون و نقاط کوانتومی کربن مورد بررسی قرار گرفت و سنجش‌های آنتی‌اکسیدانی و زیست سازگاری سلولی بر روی این داربست‌ها انجام شد. اندازه نانو ذرات در محدوده زیر ۱۰ قرار دارد، این اندازه نشان‌دهنده تشکیل صحیح نانوذره سنتز شده است [۳۱،۳۶]. بر اساس نتایج حاصل از FE-SEM و همچنین Image J می‌توان بیان کرد که اتصال چسبندگی سلول‌ها بر روی داربست حاوی نقاط کوانتومی کربن توزیع یکنواخت داشته و به دلیل تخلخل مناسب دیده شده در داربست سلول‌ها کاملاً به منافذ داربست متصل شده و بر روی آن گسترش یافته‌اند که این موضوع تصدیق ریسیده شدن کامل داربست است. از سوی دیگر داده‌های MTT نشان‌دهنده افزایش زنده‌مانی سلول‌ها و عدم سمیت داربست پلی‌کاپرولاکتون حاوی نقاط کوانتومی کربن نسبت به داربست پلی‌کاپرولاکتون خالص و نمونه شاهد است. هماهنگی داده‌های به دست آمده از MTT و FE-SEM توانایی داربست‌های پلی‌کاپرولاکتون حاوی نقاط کوانتومی کربن را برای اتصال، نگهداری،

توسعه و تکثیر سلولی تأیید می‌کند [۳۷،۳۸]. پلی‌کاپرولاکتون پلیمری آب‌گریز است و انحلال کمی در آب دارد به همین جهت افزودن نانوذره نقاط کوانتومی کربن که محلول در آب هستند باعث افزایش حلالیت آن‌ها می‌شود. می‌توان اتصال بهتر سلول‌ها به داربست حاوی نقاط کوانتومی کربن را با ایجاد پیوندهای هیدروژنی و در نتیجه افزایش میزان زنده‌مانی سلول‌ها بر روی داربست مرتبط دانست. نانو ذرات می‌توانند زبری سطح نانو داربست‌ها را افزایش دهند و لنگر انداختن سلول‌ها را بهبود بخشند [۱۰، ۳۱، ۳۹، ۴۰]. بر اساس داده‌های FTIR بر روی سطح نقاط کوانتومی کربن‌ها گروه‌های کربوکسیل وجود دارد، این گروه‌ها توانایی به دام انداختن رادیکال‌های آزاد موجود در تنش‌های اکسیداتیو محیطی را از خود نشان می‌دهد که وجود این نانوذره در برابر عدم وجود آن در داربست ساختار حفاظت سلولی بهتری را از خود نشان می‌دهد [۴۱، ۴۲]. نتایج حاصل از MTT سلول‌ها بر روی داربست قبل و بعد از تنش اکسیداتیو نشان از توانایی بالای داربست پلی‌کاپرولاکتون حاوی نقاط کوانتومی کربن در زنده‌مانی سلول‌های تحت تنش اکسیداتیو دارد که هم‌راستایی این موضوع با گروه‌های

عاملی (COOH) بر روی سطح نقاط کوانتومی کربن قابل توجه است [۹،۴۳]. افزایش غلظت گلوکز و پر اکسید هیدروژن باعث کاهش زنده‌مانی سلول‌ها شده است اما می‌توان اثر محافظتی داربست پلی‌کاپرولاکتون حاوی نقاط کوانتومی کربن را نسبت به داربست پلی‌کاپرولاکتون خالص و نمونه شاهد مشاهده کرد که افزایش زنده‌مانی بین گروه کنترل و داربست دارای نقاط کوانتومی کربن معنادار است. از سوی دیگر داده‌های MTT حاصل از اشعه X نشان می‌دهد کمترین میزان جذب که به معنای کمترین میزان زنده‌مانی است در گروه شاهد مشاهده می‌شود و بیشترین میزان جذب مربوط به گروه داربست دارای نقاط کوانتومی کربن است که معنادار بوده و اثر محافظتی داربست را تأیید می‌کند [۴۴،۴۵]. فرایندهایی که در مهندسی بافت صورت می‌گیرد به سه قسمت اصلی، فناوری سلول، فناوری ساخت داربست و فناوری کاشت و ترکیب در محیط برون تنی دسته‌بندی می‌شوند. در این بین انتخاب روش و مواد سنتزی داربست از اصلی‌ترین نکات جهت رسیدن به اهداف اصلی مهندسی بافت است. روش الکتروریسی به دلیل ایجاد منافذ اتصال مناسب، تراوایی بالا و سطح وسیع در دسترس می‌تواند افزایش تماس سلول با داربست و در نتیجه بهبود تبادل مواد مغذی و متابولیسم را در پی داشته باشد [۴۰،۴۱].

از پلیمرهای معمول مورد استفاده در سنتز داربست‌ها پلی‌کاپرولاکتون را می‌توان نام برد که پلیمری خطی و آب‌گریز است، تخریب پذیری بسیار کند و قابلیت ترکیب شدن با مواد گوناگون از جمله ویژگی‌های جالب آن است [۴۲]. امروزه افزودن نانو ذرات کربنی با خواص مکانیکی، الکتریکی و نوری منحصربه‌فرد به پلیمرهایی مانند پلی‌کاپرولاکتون، کینوزان، پلی‌کاپرولاکتون فومارات و غیره در مطالعات مهندسی بافت و پزشکی بازساختی بسیار مورد توجه قرار گرفته است [۴۳]. گزارش‌های متعدد حاکی از آن است که استفاده از داربست‌های حاوی نقاط کوانتومی کربن

باعث انسجام داربست و کاهش قطر الیاف، بهبود خواص مکانیکی، ایجاد سیگنال‌های الکتریکی می‌شود [۶،۴۱،۴۶]. در گزارش‌ها آمده است که غلظت مورد استفاده از نقاط کوانتومی کربن در سنتز داربست و میزان کارایی آن بسیار با اهمیت است به همین دلیل غلظت ۰/۵ از نقاط کوانتومی کربن برای سنتز داربست مورد استفاده قرار گرفت [۳۱]. از سوی دیگر گزارش‌ها حاکی از آن است که این نقاط کربنی‌ها نه تنها سمیت سایر نانو ذرات را نداشته بلکه فعالیت‌های آنتی‌اکسیدانی، ضد التهابی و تکثیری از خود نشان می‌دهد. جانوس و همکاران در مطالعه‌ای انواع مختلفی از نقاط کوانتومی کربن را سنتز کرده و سمیت سلولی، فعالیت آنتی‌اکسیدانی و عملکرد فلورسانس آن‌ها را بررسی کردند و نشان دادند که استفاده از این نانو ذرات حذف ۹۰٪ رادیکال‌های آزاد را به همراه داشته است [۴۷]. داس و همکاران در گزارش دیگری بیان کردند که نقاط کوانتومی کربن با سطح اصلاح‌شده توانایی بالایی از حذف رادیکال‌های سوپر اکسید و هیدروکسیل را در شرایط درون تنی از خود نشان دادند [۴۸]. نقاط کوانتومی کربن به دلیل خواص منحصربه‌فرد خود از جمله اثر آنتی‌اکسیدانی و زیست سازگاری بالا، می‌تواند به عنوان یکی از اجزای اصلی داربست‌های مهندسی بافت در نظر گرفته شود. با توجه به این موضوع که مشخص شده است که شرایط سخت در محل آسیب‌دیدگی، مانند استرس اکسیداتیو شدید و التهاب، منجر به مرگ سلولی گسترده سلول‌های بنیادی می‌شود و اثربخشی درمان با سلول‌های بنیادی را تا حد زیادی کاهش می‌دهد می‌توان از ادغام این نقاط در داربست‌ها، در جهت بهبود فرآیند ترمیم زخم، بافت و افزایش موفقیت پیوندهای بافت مهندسی‌شده استفاده کرد.

نتیجه‌گیری

به‌طور کلی، نتایج پژوهش نشان داد که سنتز داربست‌های پلی‌کاپرولاکتون حاوی نانو ذرات نقاط

تشکر و قدردانی

نویسندگان مراتب تقدیر و تشکر خود را از دانشگاه محقق اردبیلی به دلیل حمایت مالی و فراهم آوردن تجهیزات اعلام می‌دارند.

تعارض منافع

مقاله فاقد هر گونه تعارض منافع است.

کوانتومی کربن بهبود زیست سازگاری و خواص آنتی‌اکسیدانی این داربست‌ها را در پی داشت که می‌تواند نمونه ایده آلی در کاربردهای مهندسی بافت باشد. نانو داربست‌ها می‌توانند به عنوان بستر مناسبی در ترمیم بافت‌های آسیب‌دیده و کاهش اثرات آنتی‌اکسیدانی ناشی از شرایط بهبود زخم مورد استفاده قرار گیرند. پیشنهاد می‌شود ویژگی‌های نقاط کوانتومی کربن سنتز شده بر روی دیگر رده‌های سلولی و در شرایط درون تنی بر ترمیم زخم مورد بررسی بیشتر قرار گیرد.

References

- 1- Tanner KE. Bioactive composites for bone tissue engineering. Proc Inst Mech Eng H. 2010; 224(12):1359-1372.
- 2- Ort C, Dayekh K, Xing M, Mequanint K. Emerging strategies for stem cell lineage commitment in tissue engineering and regenerative medicine. ACS Biomater Sci Eng. 2018; 4(11):3644-57.
- 3- Babbar A, Jain V, Gupta D, Singh S, Prakash C, Pruncu C. Biomaterials and Fabrication Methods of Scaffolds for Tissue Engineering Applications. In: Singh S, Prakash C, Singh R. (eds) 3D Printing in Biomedical Engineering. Materials Horizons: From Nature to Nanomaterials. Singapore, Springer. 2020;3:167-86.
- 4- Raja IS, Fathima NN. Gelatin-Cerium Oxide nanocomposite for enhanced excisional wound healing. ACS Appl Bio Mater. 2018; 1(2):487-95.
- 5- Nidhin M, Vedhanayagam M, Sangeetha S, Kiran M, Nazeer S, Jayasree R, et al. Fluorescent nanonetworks: a novel bioalley for collagen scaffolds and tissue engineering. Sci Rep. 2014; 4(8):59-68.
- 6- Vedhanayagam M, Nidhin M, Duraipandy N, Naresh N, Jaganathan G, Ranganathan M, et al. Role of nanoparticle size in self-assemble processes of collagen for tissue engineering application. Int J Biol Macromol. 2017;99: 655-64.
- 7- Kang MS, Lee SH, Park WJ, Lee JE, Kim B, Han DW. Advanced techniques for skeletal muscle tissue engineering and regeneration. Bioengineering (Basel). 2020;7(3):99-114.
- 8- Vedhanayagam M, Unni Nair B, Sreeram KJ. Collagen-ZnO scaffolds for wound healing applications: role of dendrimer functionalization and nanoparticle morphology. ACS Appl Bio Mater. 2018;1(6):42-1958.
- 9- Najafi R, Asadi A, Zahri S, Abdolmaleki A. Comparison of biocompatibility and morphology of PC12 cell line on a Polycaprolactane/Silymarin scaffold and a Polycaprolactane/Tragacanth scaffold. Gene Cell Tissue. 2023;10(4):31-35.
- 10- Gautam S, Sharma C, Purohit SD, Singh H, Dinda A, Potdar P, et al. Gelatin-Polycaprolactone-nanohydroxyapatite electrospun nanocomposite scaffold for bone tissue engineering. Mater Sci Eng C Mater Biol Appl. 2021;119:111588-111600.
- 11- Cho Y, Quan M, Kang N, Jeong H, Hong M, Kim Y, et al. Strategy for enhancing mechanical properties and bone regeneration of 3D polycaprolactone kagome scaffold: Nano hydroxyapatite composite and its exposure. Eur Poly J. 2020; 134(5):109814-109825.
- 12- Taherkhani S, Moztarzadeh F. Fabrication of a poly (ϵ -Caprolactone)/starch nanocomposite scaffold with a solvent-casting/salt-leaching technique for bone tissue engineering applications. J Appl Polym Sci. 2016;133(23):1-7.

- 13- Song P, Zhou C, Fan H, Zhang B, Pei X, Fan Y, et al. Novel 3D porous biocomposite scaffolds fabricated by fused deposition modeling and gas foaming combined technology. *Compos B Eng*. 2018; 152:151-9.
- 14- Nawalakhe R, Hudson S, Seyam A, Waly A, Abou-Zeid N, Ibrahim H. Development of electrospun iminochitosan for improved wound healing application. *J Eng Fiber Fabr*. 2012; 7(2):47-55.
- 15- Han X, Xing Z, Si S, Yao Y, Zhang Q. Electrospun grape seed Polyphenols/Gelatin composite fibers contained Silver nanoparticles as biomaterials. *Fibers Polym*. 2014; 15:2572-80.
- 16- Shafiei S, Omidi M, Nasehi F, Golzar H, Mohammadrezaei, D, Rezai Rad, et al. Egg shell-derived Calcium phosphate/Carbon dot nanofibrous scaffolds for bone tissue engineering: Fabrication and characterization. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl*. 2019;100:564-575.
- 17- Baker S, Baker G. Luminescent Carbon nanodots: emergent nanolights. *Angew Chem Int Ed Engl*. 2010;49(38):6726-44.
- 18- Ray S, Saha A, Jana N, Sarkar R. Fluorescent Carbon nanoparticles: synthesis, characterization, and bioimaging application. *J Phys Chem A*. 2009; 113(43):18546-51.
- 19- Li H, Liu R, Liu Y, Huang H, Yu H, Ming H, et al. Carbon quantum dots/Cu₂O composites with protruding nanostructures and their highly efficient (near) infrared photocatalytic behavior. *J Mater Chem*. 2012;22(34):17470-5.
- 20- Yan L, Li Y, Yang Y, Liu X, Chen Y, Xu B. P3HT/Dodecylamine functioned Carbon microspheres composite films for polymer solar cells. *Int J Mol Sci*. 2015; 23(6):549-56.
- 21- Ning Z, Gong X, Comin R, Walters G, Fan F, Voznyy O, et al. Quantum-dot-in-perovskite solids. *Nature*. 2015;523(7560):324-328.
- 22- Zhou J, Sheng Z, Han H, Zou M, Li C. Facile synthesis of fluorescent Carbon dots using watermelon peel as a Carbon source. *Mater Lett*. 2012; 66(1):222-4.
- 23- Doroodmand MM, Askari M. Synthesis of a novel Nitrogen-doped carbon dot by microwave-assisted carbonization method and its applications as selective probes for optical pH (acidity) sensing in aqueous/nonaqueous media, determination of Nitrate/Nitrite, and optical recognition of NOX gas. *Anal Chim Acta*. 2017;968:74-84.
- 24- Tarasenko N, Stupak A, Tarasenko N, Chakrabarti S, Mariotti D. Structure and optical properties of Carbon nanoparticles generated by laser treatment of Graphite in liquids. *Chemphyschem*. 2017;18(9):1074-1083.
- 25- Li X, Zhang S, Kulinich SA, Liu Y, Zeng H. Engineering surface states of carbon dots to achieve controllable luminescence for solid-luminescent composites and sensitive Be²⁺ detection. *Sci Rep*. 2014;4(1):4976.
- 26- Liu W, Diao H, Chang H, Wang H, Li T, Wei W. Green synthesis of carbon dots from rose-heart radish and application for Fe³⁺ detection and cell imaging. *Sens Actuators B Chem*. 2017;241:190-8.
- 27- Deng J, Lu Q, Mi N, Li H, Liu M, Xu M, et al. Electrochemical synthesis of Carbon nanodots directly from Alcohols. *Chemistry*. 2014;20(17):4993-9.
- 28- Wang F, Xie Z, Zhang H, Liu CY, Zhang YG. Highly luminescent organosilane-functionalized carbon dots. *Adv Funct Mater*. 2011;21(6):1027-31.
- 29- Dager A, Uchida T, Maekawa T, Tachibana M. synthesis and characterization of mono-disperse Carbon quantum dots from fennel seeds: photoluminescence analysis using machine learning. *sci rep*. 2019;9(1):14004.
- 30- Martins AM, Eng G, Caridade SG, Mano JF, Reis RL, Vunjak-Novakovic G. Electrically conductive Chitosan/Carbon scaffolds for cardiac tissue engineering. *Biomacromolecules*. 2014;15(2):635-43.
- 31- Rastegar S, Mehdikhani M, Bigham A, Poorazizi E, Rafienia M. Poly Glycerol Sebacate/Polycaprolactone/Carbon quantum dots fibrous scaffold as a multifunctional platform for cardiac tissue engineering. *Mater Chem Phys*. 2021;266:124-135.
- 32- Abbaszadeh S, Asadi A, Zahri S, Abdolmaleki A, Mahmoudi F. Does phenytoin have neuroprotective role and affect biocompatibility of decellularized sciatic nerve scaffold. *Gene, Cell and Tissue*. 2020;8(1):1-7.

- 33- Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods*. 1983;65(1-2):55-63.
- 34- Hasanpour F, Hamidi K, Zahri S, Latifi Navid S. Study of cell viability and JNK/SAPK level following abiotic stresses (heat & radiation) in Breast Cancer cells. *J Educ Health Promot*. 2017;17(2):154-63.
- 35- Najafi R, Asadi A, Zahri S, Abdolmaleki A. Polycaprolactan/tragacanth nanoscaffold enriched with sililymarin as a protector of neural progenitor cells under oxidative stress conditions. *Cell Tissue J*. 2023;14(1):66-79. [Full text in Persian]
- 36- Nallayagari AR, Sgreccia E, Pizzoferrato R, Cabibbo M, Kaciulis S, Bolli E, et al. Tuneable properties of carbon quantum dots by different synthetic methods. *J Nanostructure Chem*. 2021;30:1-6.
- 37- Sun Y, Liu X, George MN, Park S, Gaihre B, Terzic A, et al. Enhanced nerve cell proliferation and differentiation on electrically conductive scaffolds embedded with graphene and carbon nanotubes. *J Biomed Mater Res A*. 2021;109(2):193-206.
- 38- Saljoughi H, Khakbaz F, Mahani M. Synthesis of folic acid conjugated photoluminescent carbon quantum dots with ultrahigh quantum yield for targeted cancer cell fluorescence imaging. *Photodiagnosis Photodyn Ther*. 2020;30:687-701.
- 39- Ghorghi M, Gharavi AM, Rafienia M. Evaluation of mg63 cells behavior with electrospun nanocomposite scaffolds of polycaprolactone and carbon quantum dot containing captopril for bone tissue engineering. *J Knowl Health Basic Med Sci*. 2020;15(1):10-8.
- 40- Yan C, Ren Y, Sun X, Jin L, Liu X, Chen H, et al. Photoluminescent functionalized carbon quantum dots loaded electroactive Silk fibroin/PLA nanofibrous bioactive scaffolds for cardiac tissue engineering. *J Photochem Photobiol B*. 2020;202:111680-34.
- 41- Ghorghi M, Rafienia M, Nasirian V, Bitaraf FS, Gharravi AM, Zarrabi A. Electrospun captopril-loaded PCL-carbon quantum dots nanocomposite scaffold: Fabrication, characterization, and in vitro studies. *Polym Adv Technol*. 2020;31(12):3302-15.
- 42- Nandiyanto AB, Oktiani R, Ragadhita R. How to read and interpret FTIR spectroscopy of organic material. *Indones J Sci Technol*. 2019;4(1):97-118.
- 43- Rosenkrans ZT, Sun T, Jiang D, Chen W, Barnhart T, Zhang Z, et al. Selenium-doped Carbon quantum dots act as broad-spectrum antioxidants for acute kidney injury management. *adv sci (weinh)*. 2020;7(12):2000420-2000433.
- 44- Sharma N, Das GS, Yun K. Green synthesis of multipurpose carbon quantum dots from red cabbage and estimation of their antioxidant potential and bio-labeling activity. *Appl Microbiol Biotechnol*. 2020;104(16):7187-200.
- 45- Son MH, Park SW, Jung YK. Antioxidant and anti-aging carbon quantum dots using tannic acid. *Nanotechnology*. 2021;32(41):10-20.
- 46- Abolghasemzade S, Pourmadadi M, Rashedi H, Yazdian F, Kianbakht S, Navaei-Nigjeh M. PVA based nanofiber containing CQDs modified with silica NPs and silk fibroin accelerates wound healing in a rat model. *J Mater Chem B*. 2021;9(3):658-676.
- 47- Janus Ł, Radwan-Pragłowska J, Piątkowski M, Bogdał D. Smart, tunable cqds with antioxidant properties for biomedical applications-ecofriendly synthesis and characterization. *Molecules*. 2020;25(3):736.
- 48- Das B, Pal P, Dadhich P, Dutta J, Dhara S. In vivo cell tracking, reactive Oxygen species scavenging, and antioxidative gene down regulation by long-term exposure of biomass-derived Carbon dots. *Acs Biomater Sci Eng*. 2019;5(1):346-356.