

مقایسه کارکرد میکروسکوپ الکترونی روبشی (SEM) و میکروسکوپ نیروی اتمی (AFM) در بررسی توپوگرافی نانوالیاف مورد استفاده به عنوان بستر کشت سلول

علیرضا نادری سهی¹، حسین نادری منش^{2*}، مسعود سلیمانی³

1- دانشجوی دکترای تخصصی نانویوتکنولوژی، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران

2- استاد گروه‌های بیوفیزیک و نانویوتکنولوژی، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران

3- دانشیار گروه هماتولوژی، دانشکده علوم پزشکی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران

* تهران، صندوق پستی 14115-175

naderman@modares.ac.ir

(دریافت مقاله: 94/3/26 پذیرش مقاله: 94/6/17)

چکیده- با توجه به یافته‌های جدید، نقش نانوتوپوگرافی ریزمحیط سلول بر عملکرد و سرنوشت آن، بیش از پیش اهمیت یافته است. از این رو، تهیه نانو ساختارهای زیست سازگار به عنوان بستر کشت سلول و در مرحله بعد، تعیین دقیق ویژگی‌های فیزیکی و هندسی آن‌ها مورد توجه پژوهشگران قرار گرفته است. در این راستا هر چند میکروسکوپ نیروی اتمی، در تعیین خصوصیات نانوالگو¹های مورد استفاده برای کشت سلول، کاربردی گسترده یافته، اما توانایی‌های آن برای مطالعه ساختار نانوالیاف الکترورسی² شده بطور جدی مطالعه نشده است. در تحقیق حاضر، نانوالیاف زیست سازگار کیتوزان که با فناوری الکترورسی تولید و بهینه شده بودند، با میکروسکوپ‌های الکترونی روبشی (SEM) و میکروسکوپ نیروی اتمی (AFM) مورد بررسی قرار گرفته، داده‌های حاصل از هر یک ارزیابی شدند. نتایج حاصل بیانگر این واقعیت بود که استفاده از هر کدام از این دو میکروسکوپ، مزایا و معایبی خواهد داشت. به عنوان اولین نکته، در حالی که فرایندهای آماده‌سازی و روبش نمونه در SEM می‌تواند سبب تخریب ساختار طبیعی الیاف شود، AFM به هیچ‌گونه تیمار نمونه نیازی ندارد. در حالی که مهمترین کاربردهای SEM در بررسی ساختارهای نانوفیبری شامل بررسی سریع شکل، جهت‌گیری، قطر و یکنواختی الیاف است، تصویربرداری سه بعدی با AFM، تعیین درجه زبری سطح، درجه زبری در طول لیف و تعیین ضخامت بافت تولید شده را ممکن می‌سازد. علاوه بر این، با رعایت پاره‌ای ملاحظات تکنیکی، AFM می‌تواند در تخمین قطر میانگین نانوالیاف، به خوبی SEM عمل نماید.

کلید واژگان: نانوالیاف، میکروسکوپ، نیروی اتمی، نانوتوپوگرافی، کیتوزان.

1. Nanopattern
2. Electrospun nanofibers

1- مقدمه

نانوالیاف¹ از جمله نانوساختارهایی محبوب در سراسر جهان می‌باشند که امروزه کاربردی گسترده و متنوع یافته‌اند. استفاده وسیع از نانوالیاف در علوم پزشکی و بیولوژی بخصوص در طب ترمیمی و مهندسی بافت و همچنین بکارگیری روزافزون آن‌ها در ساخت صافی‌ها به منظور حذف آلاینده‌های صنعتی، شواهدی بر این ادعا هستند [1-3]. فارغ از این که کدام روش آزمایشگاهی برای تهیه نانوالیاف مورد استفاده قرار می‌گیرد، مطالعه مورفولوژیکی معمولاً اولین گام برای ارزیابی الیاف حاصله است. در این بین میکروسکوپ الکترونی روبشی (SEM) سال‌هاست که به‌عنوان ابزاری مناسب برای این امر در نظر گرفته می‌شود [4]. هرچند تصاویر بدست آمده از SEM می‌تواند گویای حقایق بسیاری در مورد ساختار نانوالیاف (از جمله شکل، جهت‌گیری، قطر، میزان همگن بودن، وجود یا عدم وجود Bead) باشد اما در واقعیت، دوبعدی بودن این تصاویر، دقت و صحت برخی از این یافته‌ها را با تردید مواجه می‌سازد.

از سوی دیگر فرایند آماده‌سازی نمونه برای بررسی با SEM، که شامل پوشانیدن لایه‌ای از فلزاتی مانند نقره، طلا و یا غیره بر روی نمونه می‌باشد، می‌تواند در مواردی سبب تخریب و تغییر ساختار واقعی آن شود. افزون بر این، عکس‌برداری از نمونه‌ها در شرایط خلاء در این نوع میکروسکوپ نیز ممکن است در برخی موارد منجر به تغییراتی در ساختار نمونه شود [5]. این در حالی است که صرفاً در معدود گزارش‌هایی از میکروسکوپ‌های پروبی روبشی بخصوص میکروسکوپ نیروی اتمی (AFM) برای بررسی مورفولوژیکی نانوالیاف استفاده شده است [6-8]. از جمله مزیت‌های استفاده از AFM در تعیین ویژگی‌های نانوساختارهای جامد، عدم نیاز به فرایندهای آماده‌سازی نمونه و همچنین عدم نیاز به خلاء در زمان

تصویربرداری است. از سوی دیگر میکروسکوپ نیروی اتمی که بررسی سه بعدی نانوساختارها را ممکن ساخته، می‌تواند مکمل مناسبی برای میکروسکوپ الکترونی باشد. در مطالعه حاضر، کیتوزان به‌عنوان یک پلیمر قندی طبیعی نسبتاً ارزان قیمت که سازگاری زیستی آن به اثبات رسیده است، برای تهیه نانوالیاف انتخاب گردید [9,10]. امروزه نانوالیاف کیتوزان در بسیاری از موارد از جمله ایجاد بستر² برای کشت سلول و مهندسی بافت، تثبیت آنزیم‌ها، ایجاد غشای ضد میکروب، تولید ریز سامانه‌های دارورسانی و فیلترهای حذف‌کننده فلزات سنگین، مورد توجه پژوهشگران می‌باشند [11-15]. لازم به ذکر است الکترورسی³ محلول‌های کیتوزان به دلیل برهم‌کنشهای قوی بین مولکولی و لذا گرانیروی (ویسکوزیته) و کشش سطحی بالای آن با چالش‌هایی روبرو گشته و سال‌ها یکی از موضوعات مورد اختلاف در مقالات انتشار یافته بوده است.

امروزه دو روش رایج برای تولید نانوالیاف از کیتوزان وجود دارد که شامل الکترورسی محلول کیتوزان در حلالی شامل غلظت‌های بالا از تری فلئورو استیک اسید (TFA) و دی کلرو متان (DCM) و دیگری، الکترورسی مخلوطی از کیتوزان و پلی اتیلن اکسید (PEO) و یا پلی وینیل الکل (PVA) در حلال استیک اسید است [12,16]. گفتنی است در حال حاضر نیز در مقالات مختلف، این دو روش کلی با تنوع گسترده‌ای از شیوه‌ها و تغییرات در پارامترها انجام می‌گیرد. در این راستا سعی گردید تا با آزمودن شیوه‌های نوین و با تغییرات مقتضی در پارامترهای مؤثر، شرایطی بهینه برای تولید تکرارپذیر نانو الیافی یکنواخت (هموزن) و بدون bead از مخلوط کیتوزان و پلی اتیلن اکسید مشخص شود. در ادامه، نانوفیبرهای حاصله با استفاده از میکروسکوپ‌های SEM

2. Scaffold
3. Electrospinning

1. Nanofibers

نیازی به فیلتر نمودن آن با کیف زینترگلاس نمی‌باشد. سپس، محلول‌های 2 و 3 درصد کیتوزان به ترتیب با نسبت‌های 31 و 9/1 پلی اتیلن اکسید/کیتوزان با محلول PEO مخلوط شده و به مدت 12 ساعت در دمای آزمایشگاه تحت عملکرد همزن مغناطیسی قرار گرفتند. در ادامه این مقاله، محلول‌های حاصل به ترتیب، محلول شماره یک (با نسبت 2/1 کیتوزان به PEO در محلول نهایی و غلظت کلی 2/25% پلیمر) و محلول شماره دو (با نسبت 9/1 کیتوزان به PEO در محلول نهایی و غلظت کلی 3% پلیمر) نامیده می‌شوند. این محلول‌ها برای جلوگیری از فرایند پیری محلول³، بلافاصله برای الکترورسی فرستاده شدند.

2-3- الکترورسی

در هر یک از موارد، مخلوط پلیمری در سرنگ 10 میلی‌لیتری یکبار مصرف ریخته شده و تحت ولتاژ 15 تا 20 کیلو ولت الکترورسی گردید. در این فرایند، سرعت جریان⁴ پلیمر بین 0/3 تا 0/5 میلی‌لیتر در ساعت و فاصله نازل و جمع کننده در حدود 15 سانتی‌متر تنظیم شده بود. طبق روال معمول الکترورسی، جمع کننده با ورقه آلومینیوم پوشانده شد. هر دو مخلوط پلیمری با شرایطی تقریباً یکسان، در دمای 25 ± 1 درجه و رطوبت 20 تا 25% به مدت 5 ساعت الکترورسی گشته، سپس نانوالیاف حاصله بر روی ورقه آلومینیومی در دمای اتاق و در مجاورت هوا خشک شدند و تا زمان بررسی‌های بیشتر در محیط بدون رطوبت مورد نگره‌داری قرار گرفتند.

2-4- بررسی مورفولوژی الیاف با استفاده از

میکروسکوپ الکترونی روبشی (SEM)

برای بررسی‌های ساختاری با میکروسکوپ الکترونی، الیاف حاصل بدون جداسازی از بستر آلومینیومی با لایه

و AFM ارزیابی شده و نتایج حاصل از این دو، مورد مقایسه قرار گرفت.

2- مراحل کار

2-1- مواد و ابزار آزمایشگاهی

پودر کیتوزان با وزن مولکولی کم (LMW) و پلی اتیلن اکسید (PEO) با میانگین وزن مولکولی 900 کیلوالتون هر دو از شرکت سیگما-آلدریج¹ خریداری شد. استیک اسید از شرکت دکتر مجلی و کیف زینترگلاس از شرکت هندی گوپتا² تهیه گردید. دستگاه الکترورسی مورد استفاده در این پژوهش ساخت شرکت نانو ساختار آسیا و مستقر در شرکت فناوری‌های بن یاخته بوده است. میکروسکوپ الکترونی روبشی (SEM) مورد استفاده، مدل KYKY-EM3200 و ساخت کشور چین و میکروسکوپ نیروی اتمی (AFM)، از محصولات شرکت آراپژوهش می‌باشند.

2-2- تهیه محلول‌های همگن از پلیمرها

برای تهیه محلول‌های 2 و 3 درصد وزنی- حجمی کیتوزان، مطابق با راه‌کارهای قبلی [17] و با تغییرات مقتضی، مقادیر توزین شده از پودر آن در حلال آبی استیک اسید 50% وارد شده، در مدت 48 تا 72 ساعت در دمای آزمایشگاه به کمک هم‌زن مغناطیسی به صورت مایعی نسبتاً شفاف در آمد. در مرحله بعد برای حذف معبود ذرات نامحلول میکرومتری باقی مانده در آن ابتدا محلول‌ها به مدت 20 دقیقه در دمای 4°C و با دور rpm 4800 سانتریفیوژ گشته و سپس مایع شفاف رویی از کیف زینترگلاس با تخلخل P1 و تحت شرایط خلا، عبور داده شد. بطور موازی، محلول 3% پلی اتیلن اکسید نیز در حلال مذکور و با شرایطی مشابه به دست آمد. معمولاً به دلیل حلالیت بالای PEO و عدم تولید ذرات نامحلول،

3. Aging
4. Flow rate

1. Sigma-Aldrich
2. Gupta

کلی نمونه‌ها و زبری میانگین سطح هر لیف تعیین گردید.

7-2- تحلیل آماری نتایج حاصل

داده‌های حاصل از اندازه‌گیری قطر نانوالیاف به وسیله نرم‌افزار EasyFit5.6 پردازش شده و نمودارهای ستونی (هیستوگرام) و منحنی توزیع نرمال در هر مورد ترسیم گردید. تحلیل و ترسیم داده‌های درجه زبری سطح هر لیف به وسیله نرم‌افزار GraphPad prism5 انجام گرفت.

3- نتایج

3-1- تهیه محلول‌های همگن پلیمری

کیتوزان پلیمری طبیعی است که به دلیل پیوندهای هیدروژنی وسیع بین رشته‌ای، حلالیت ناچیزی در آب و ترکیبات آلی داشته و حتی استفاده از حلال‌هایی با ثابت دی الکتریک بالا نظیر DMSO نمی‌تواند به انحلال‌پذیری آن کمکی نماید. متداول‌ترین روش برای حل نمودن کیتوزان، کاهش pH محیط و لذا پروتونه کردن گروه‌های آمین در آن است [18]. حلال‌های آبی اسیدی مختلفی برای انحلال کیتوزان پیشنهاد شده است که در این بین استفاده از محلول آبی استیک اسید به دلیل اسیدیته قابل کنترل، سمیت اندک و فراریت مناسب - که در طی فرایند الکتروریسی یک امتیاز محسوب می‌شود - رواج بیشتری دارد. متأسفانه حتی در حلال‌های مناسب اسیدی و حتی بعد از بهم خوردن مغناطیسی چندروزه، ذرات نامحلولی به صورت شناور در محلول حاصل باقی می‌مانند. عدم حذف این ذرات در محلولی که مورد الکتروریسی قرار می‌گیرد، علاوه بر آنکه می‌تواند با مسدود سازی فضای درون سوزن نازل، جریان (جت) تولید شده را متوقف نماید، ممکن است در بافت ساختاری الیاف نیز سبب بروز ناهنجاری‌هایی ناهمگون شود. این امر بخصوص در زمانی که قطر داخلی سوزن نازل کوچک می‌باشد، مشکل‌زا خواهد بود. شایان توجه است که کاهش قطر

نازکی از طلا به مدت 20 دقیقه پوشانده شد و با دستگاه SEM، تحت ولتاژ 26 kV، مورد عکس‌برداری قرار گرفت. از نرم‌افزار موجود بر روی دستگاه برای تعیین قطر نانوالیاف استفاده گردید و نمودار توزیع قطر نانوالیاف ترسیم شد. ضمناً الیاف از نظر وجود یا عدم وجود Bead، قطرات پاشیده شده و سایر نقص‌های ساختاری مورد ارزیابی قرار گرفتند.

5-2- عکس‌برداری از سطح نمونه با استفاده از

میکروسکوپ نیروی اتمی (AFM)

در هر مورد، الیاف تولید شده، بدون جداسازی از بستر آلومینیومی، مورد آنالیز با دستگاه AFM قرار گرفتند. برای این منظور، مربعی به ابعاد تقریبی یک سانتی متر، از ورقه آلومینیومی مذکور انتخاب و با دقت و بدون آسیب دیدن الیاف راسب گشته بر روی آن، بریده شد. بعد از چسباندن مربع آلومینیومی بر روی قرص مخصوص دستگاه، روبش سطح نمونه‌ها با روبشگر¹ سیلیکونی با ثابت فنر 5 N/m-1 و شعاع انحنای 5-10 nm در وضعیت نیمه تماسی²، تحت ولتاژ 2-1 ولت و در ابعاد مختلف انجام گرفت. در هر مورد، سه نوع تصویر TOPO، Phase و Amplitude با پیکسل 512×512 و با سرعت 1/5-1 lines/s در شرایط یکسان دما و رطوبت محیطی بدست آمده و برای بررسی‌های نرم‌افزاری ذخیره گردید.

6-2- بررسی توپوگرافی سطوح با آنالیز نرم‌افزاری

تصاویر حاصل از AFM

آنالیز تصاویر بدست آمده از AFM به کمک نرم‌افزار Imager نصب شده بر روی دستگاه و پس از حذف نوفه‌های جزئی به کمک آن انجام گرفت. در این راستا، اندازه‌گیری قطر الیاف به روش‌های مختلف صورت گرفته، ضخامت بافت شبکه ای تولید شده، درجه زبری³

1. Probe
2. Tapping
3. Roughness

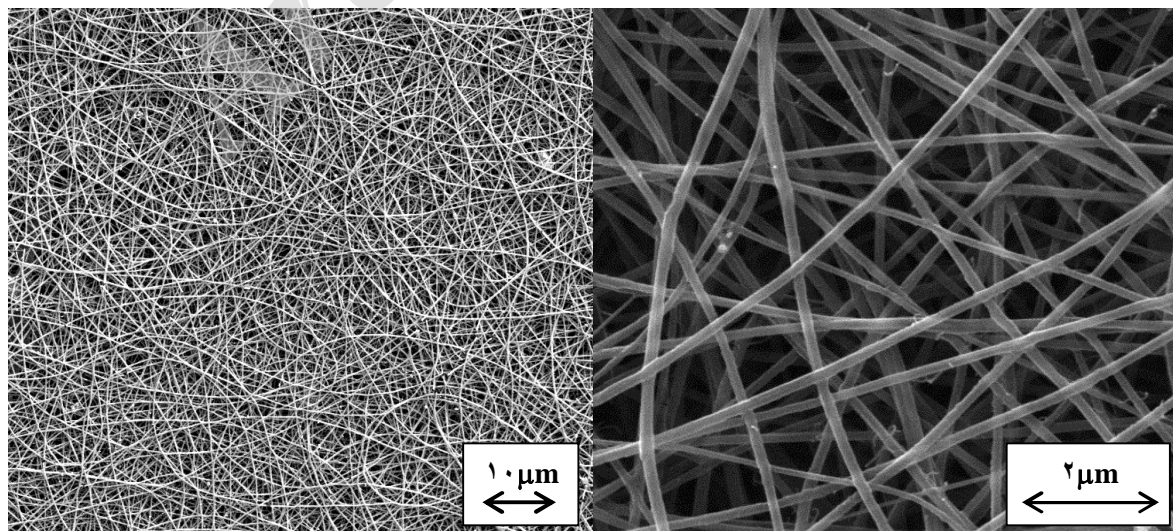
با وزن مولکولی متوسط و نسبت بالایی از پلی اتیلن اکسید (PEO) می‌تواند به تولید نانوالیافی با قطر مناسب منجر شود، اما عدم تکرارپذیری مناسب و تولید Bead در برخی نواحی از بافت تولید شده، رضایت بخش نمی‌باشد. بر طبق مطالعات گذشته افزایش درصد وزنی کیتوزان در محلول می‌تواند به نفع کاهش تولید Bead باشد، اما در زمانی که در چنین محلول‌هایی از کیتوزان با وزن مولکولی بالا یا متوسط استفاده می‌شود، عملاً به دلیل گرانروی بالای محلول‌های مربوطه و عدم تولید جریان (جت)، الکتروریسی آن‌ها امکان‌پذیر نخواهد بود [19]. در مطالعه حاضر، در نهایت با استفاده از کیتوزان با وزن مولکولی کم، شرایطی بهینه برای تولید نانوالیاف کیتوزان مشخص گردید. تصاویر به دست آمده از SEM نشانگر ساختارهایی همگن و بدون Bead می‌باشد (شکل‌های 1 و 2). میانگین قطر نانوالیاف که با بررسی قطر 60 لیف مجزا در هر مورد و با احتساب یک SD انحراف از آن، به دست آمده، در مورد محلول شماره یک با نسبت 3/1 کیتوزان به PEO برابر 213 ± 33 نانومتر (5/15% = CV%) (شکل 3) و در مورد محلول شماره دو با نسبت 9/1 کیتوزان به PEO برابر با 111 ± 29 نانومتر (13/26% = CV%) می‌باشد (شکل 4).

داخلی سوزن نازل سبب کاهش تولید Bead می‌شود [19]. برای رفع این مشکل، علاوه بر ساتریفیوژ که تا حدی می‌تواند در حذف ذرات نامحلول مفید باشد، از فیلترهای زیتروگلاس در شرایط خلاء نیز استفاده شد. بهره‌گیری از این سیستم فیلتراسیون که معمولاً حلقه مفقوده‌ای در پروتکل‌های مرتبط با الکتروریسی است، سبب ایجاد محلولی شفاف و همگن و فاقد هرگونه ذرات نامحلول میکرومتری گردید. از آنجا که مخلوط دو پلیمر کیتوزان و پلی اتیلن اکسید پس از مدتی دو فاز مجزا تشکیل می‌دهند که الکتروریسی آن‌ها را ناموفق می‌سازد، معمولاً فرایند الکتروریسی باید در زمانی کمتر از 24 ساعت بعد از اختلاط این دو انجام گیرد. برای پایدارسازی محلول‌هایی که بیش از این مدت در نوبت الکتروریسی قرار می‌گیرند، افزودن نمک NaCl به مخلوط پلیمری توصیه می‌شود [20].

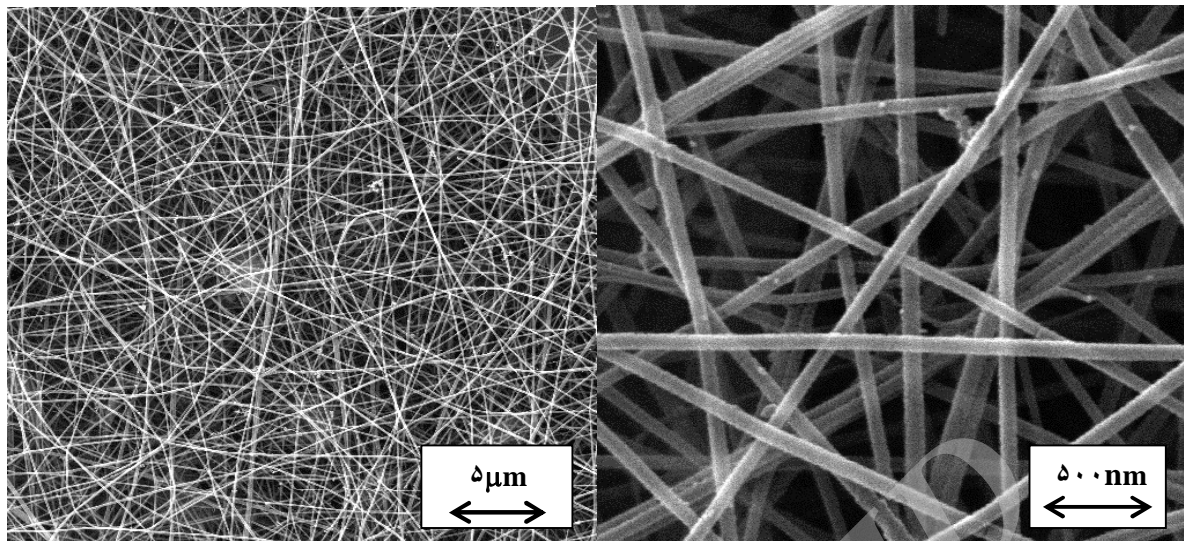
2-3- بررسی ساختار نانوالیاف الکتروریسی شده با

استفاده از تصاویر SEM

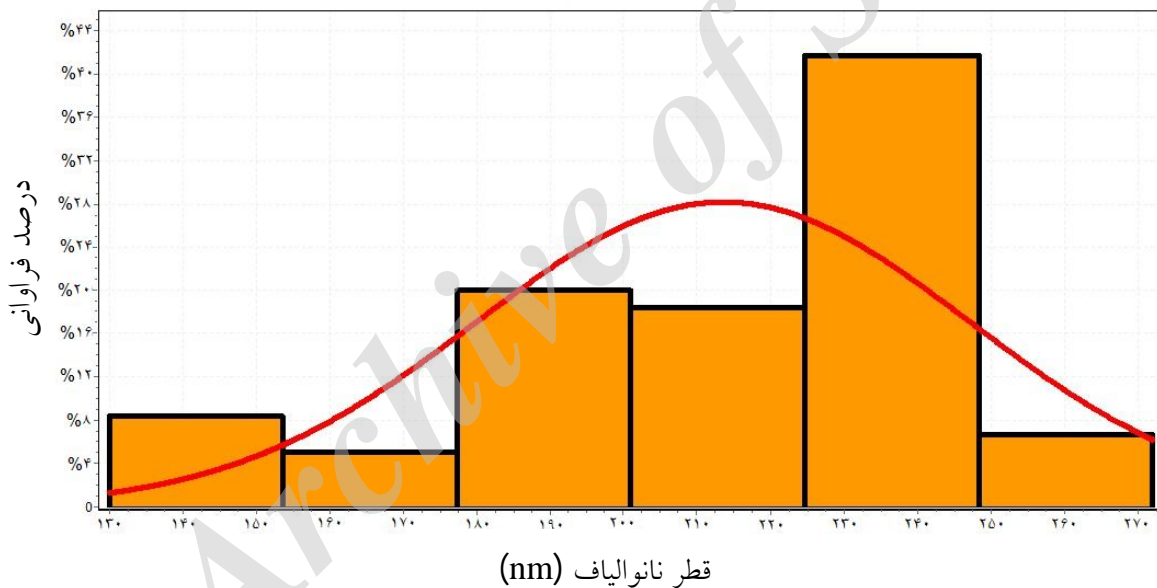
برای تولید نانوالیاف همگن و بدون ناهنجاری، روش‌های مختلفی آزموده شد (اطلاعات مربوط به این آزمایش‌های مقدماتی نشان داده نشده است). هرچند اختلاط کیتوزان



شکل 1 تصاویر SEM از نانوالیاف کیتوزان حاصل از محلول شماره یک (محلول پلیمری 2/25% با نسبت 2/1 کیتوزان به پلی اتیلن اکسید)



شکل 2 تصاویر SEM از نانوالیاف کیتوزان حاصل از محلول شماره دو (محلول پلیمری 3% با نسبت 9/1 کیتوزان به پلی اتیلن اکسید)



شکل 3 نمودار هیستوگرام و منحنی توزیع نرمال قطر نانوالیاف محلول شماره یک بر اساس تصاویر به دست آمده از SEM. بر این اساس قطر میانگین فیبرها با احتساب پراکندگی معادل یک واحد انحراف معیار برابر 213 ± 33 نانومتر می باشد.

حاکی از عدم وجود Bead در محدوده رویش شده بود (شکل 5).

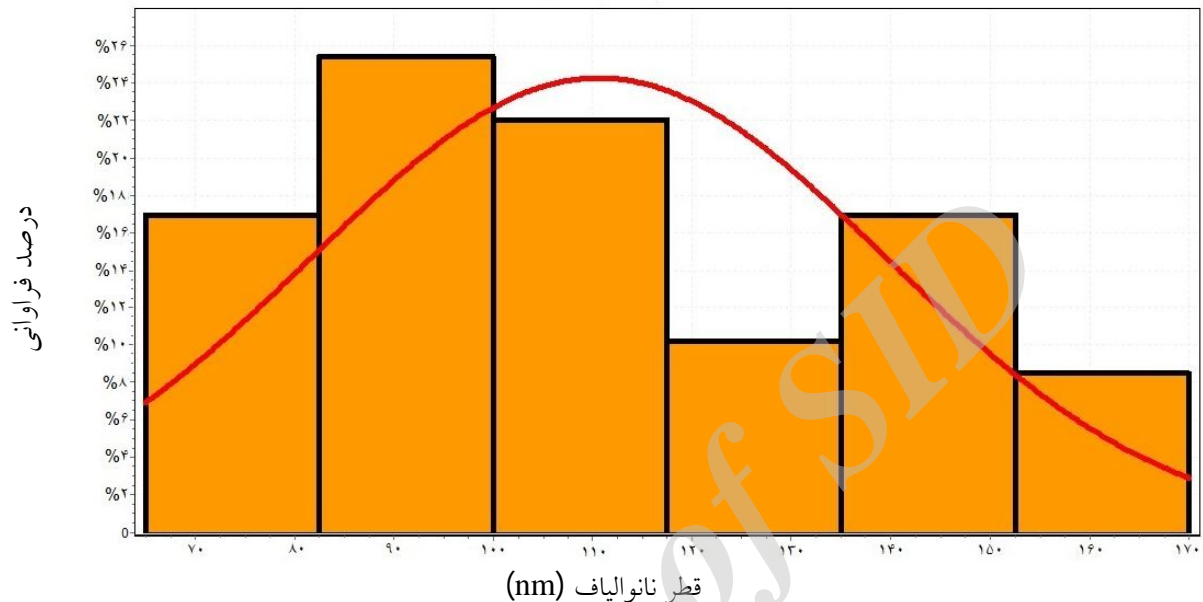
لازم به ذکر است که تصاویر TOPO از تغییرات طولی پیزوالکتریک در راستای محور z (در حالت نیروی ثابت) حکایت دارد در حالی که تصاویر Amplitude از طریق تغییرات در نیروی حس شده توسط روبشگر (قبل از

3-3- بررسی ساختار نانوالیاف الکترونی شده با استفاده از میکروسکوپ نیروی اتمی

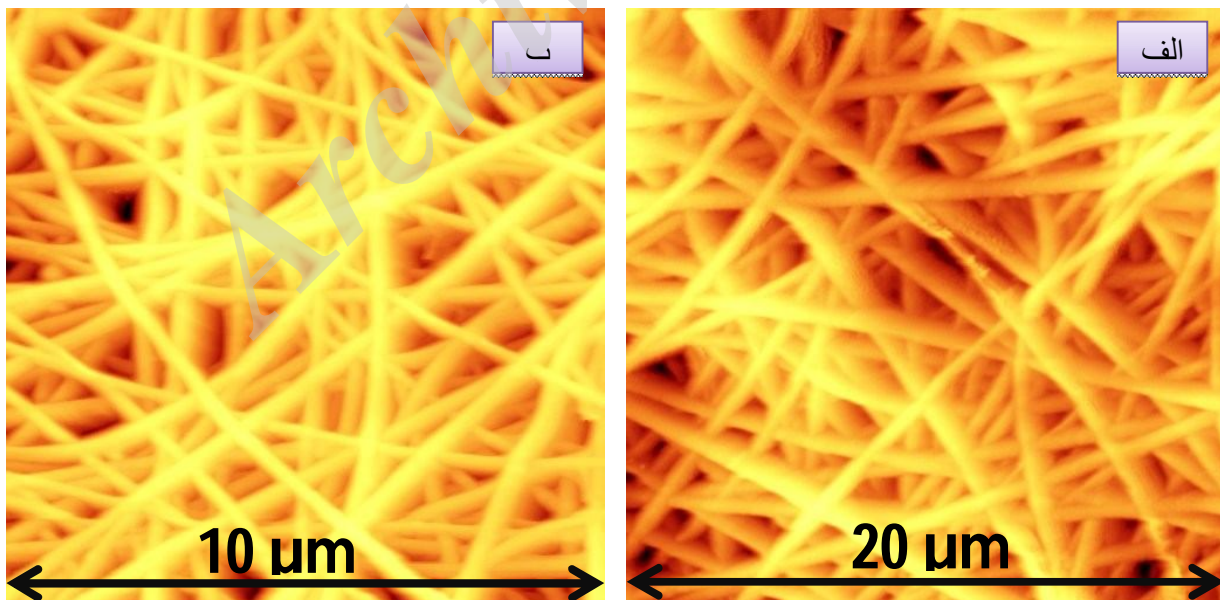
تصاویر بدست آمده از رویش سطوح نانوالیاف به وسیله میکروسکوپ AFM به دقت با نرم افزار آنالیز آن بررسی گردید. تصاویر TOPO که مهمترین بخش از تصاویر بدست آمده در وضعیت غیرتماسی و نیمه تماسی هستند،

xy، اختلاف فاحشی با نتایج حاصل از SEM داشت، بطوری که میانگین قطر الیاف حاصل از محلول شماره یک برابر 554 ± 129 نانومتر محاسبه گردید (شکل 6).

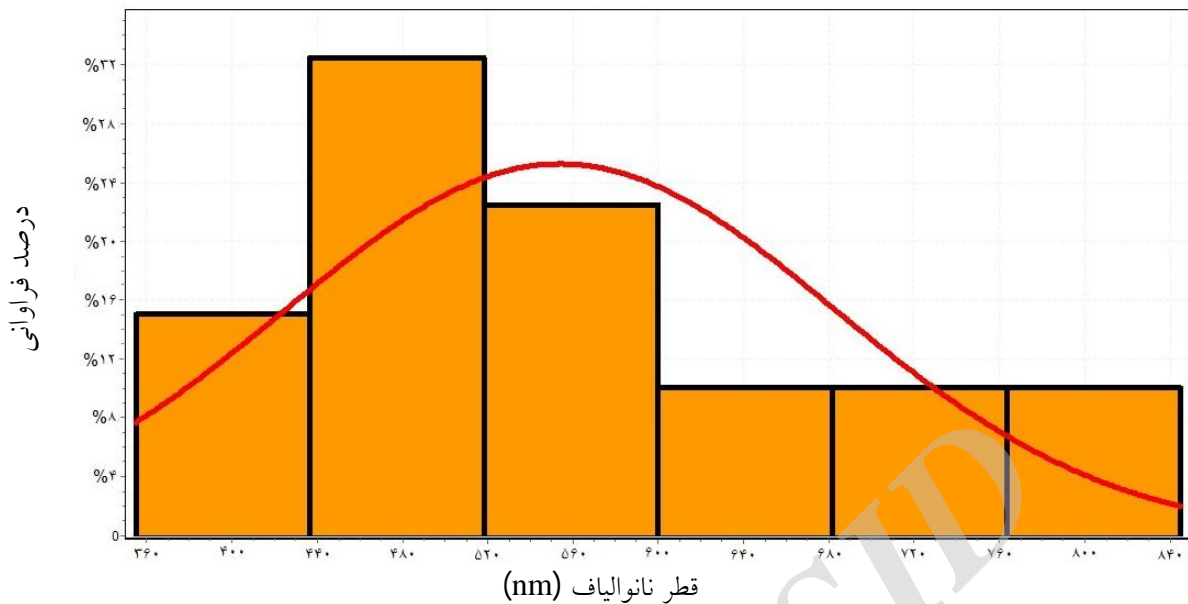
اصلاح ارتفاع روبشگر توسط پیزوالکتریک) بدست می‌آیند. نتایج بررسی قطر نانوالیاف بدست آمده با استفاده از تصاویر TOPO و آنالیز نیم رخ عرضی الیاف در صفحه



شکل 4 نمودار هیستوگرام و منحنی توزیع نرمال قطر نانوالیاف محلول شماره دو بر اساس تصاویر به دست آمده از SEM. بر این اساس قطر میانگین فیبرها با احتساب پراکندگی معادل یک واحد انحراف معیار برابر 111 ± 29 نانومتر می باشد.



شکل 5 تصاویر TOPO حاصل از روبش نمونه به وسیله AFM. الف - نانوالیاف کیتوزان حاصل از الکتروریسی محلول شماره یک (محلول پلیمری 2/25 % با نسبت 2/1 کیتوزان به پلی اتیلن اکسید) ب - نانوالیاف کیتوزان حاصل از الکتروریسی محلول شماره دو (محلول پلیمری 3 % با نسبت 9/1 کیتوزان به پلی اتیلن اکسید)



شکل 6 نمودار هیستوگرام و منحنی توزیع نرمال قطر نانوالیاف محلول شماره یک بر اساس آنالیز تصاویر به دست آمده از AFM در صفحه XY. بر این اساس قطر میانگین فیبرها با احتساب پراکندگی معادل یک واحد انحراف معیار برابر 554 ± 129 نانومتر می باشد.

بدین ترتیب، فاصله بین دو فیبر متقاطع در راستای محور z نشانگر قطر فیبر بالایی خواهد بود (شکل 11).

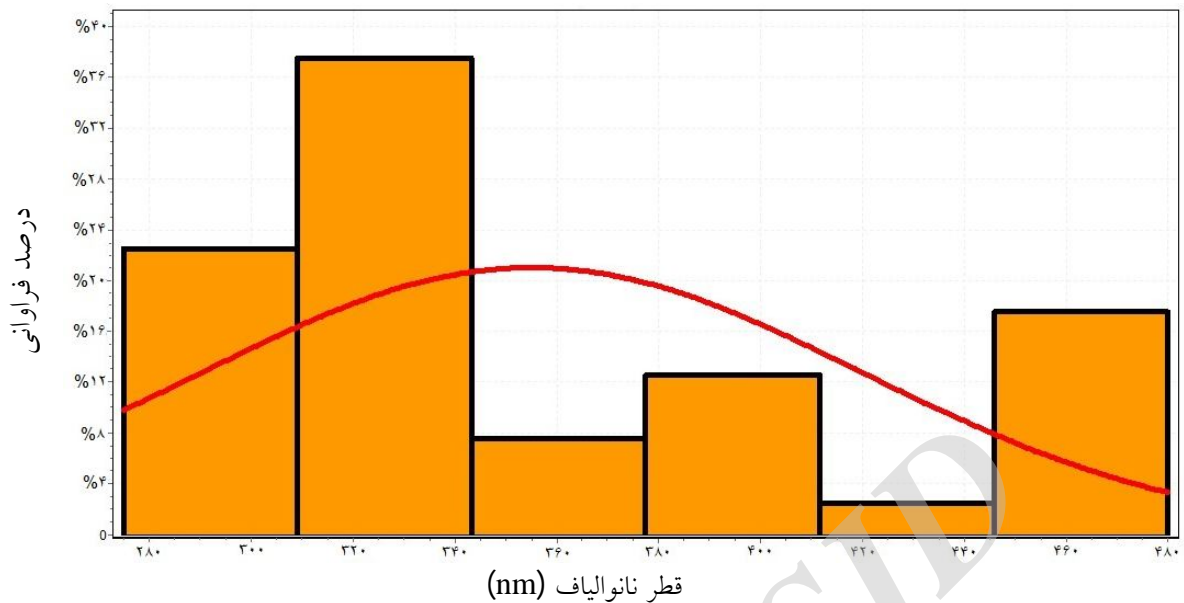
ابزار هیستوگرام، در تخمین تراکم الیاف در یک سطح مشخص و همچنین ضخامت کلی بافت تولید شده بویژه در زمانی که به دلیل ضخامت اندک، بکارگیری سایر روش‌ها با چالش روبرو است، نیز می‌تواند مفید واقع شود. بر اساس این ابزار، بیشینه ضخامت بافت حاصل از محلول شماره یک در محدوده روبش شده برابر 950 نانومتر است. این عدد برای بافت حاصل از محلول شماره دو برابر 790 نانومتر می‌باشد.

در مرحله بعد، پس از فرایند شیب‌گیری¹، درجه زبری² نانوالیاف حاصل به‌عنوان یکی از معیارهای مهم در تعیین توپوگرافی بسترهای کشت سلول مورد ارزیابی قرار گرفت که نتایج آن در جدول 1 خلاصه شده است. نتایج حاکی از این واقعیت است که با کاهش قطر نانوالیاف، درجه زبری بافت حاصله نیز کاهش می‌یابد.

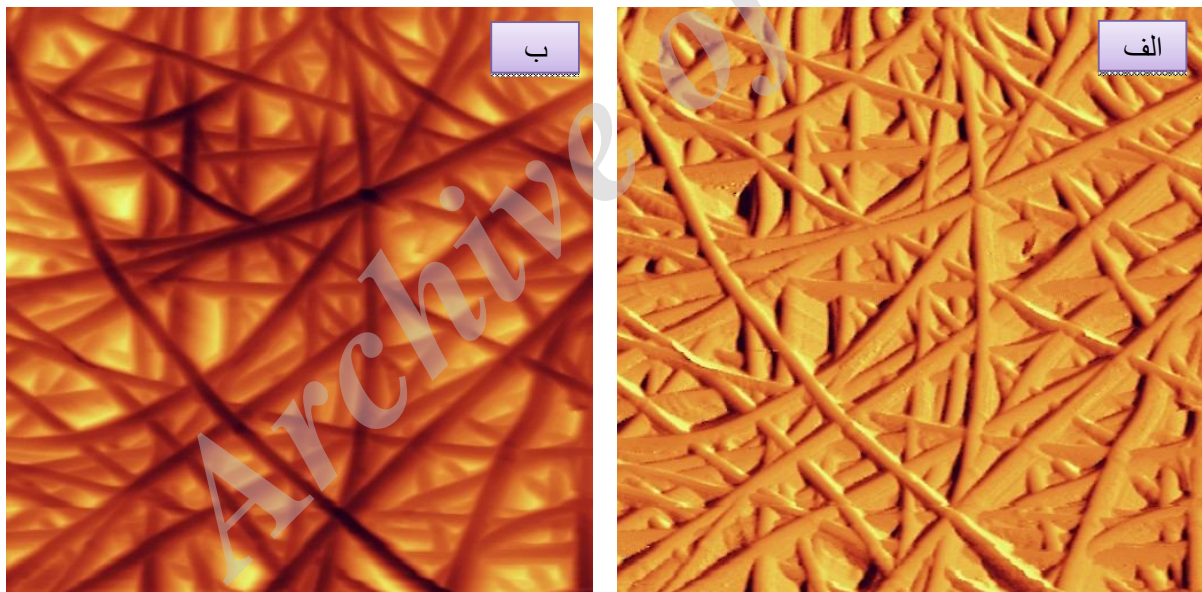
این عدد در مورد الیاف حاصل از محلول شماره دو، برابر 355 ± 65 نانومتر به دست آمد (شکل 7). استفاده از تصاویر Amplitude و یا تصاویر با رنگ معکوس (Reverse) که گاهی مرز بین الیاف را با وضوح بالاتری نشان می‌دهند، نیز کمابیش نتایج مشابهی داشته، اطلاعات به دست آمده را به نتایج حاصل از تصاویر SEM نزدیک نمی‌نمود (شکل 8).

در ادامه کار، بررسی قطر نانوالیاف با استفاده از نیمرخ عرضی و عمق سنجی در راستای محور z، نتایجی نزدیکتر به یافته‌های SEM حاصل نمود. بطوری که بر اساس این نوع سنجش، میانگین قطر نانوالیاف حاصل از محلول‌های شماره یک و دو، به ترتیب برابر 238 ± 61 نانومتر ($CV = 25/63\%$) و 137 ± 51 ($CV = 37/22\%$) به دست آمد (شکل‌های 9 و 10). لازم به ذکر است که برای تخمین صحیح تر قطر نانوالیاف با این روش، لازم دانسته شد فیبرهایی که تقریباً در تماس با یکدیگر و بر روی هم قرار گرفته‌اند، با استفاده از ابزار هیستوگرام موجود در نرم‌افزار Imager مشخص شوند.

1. Leveling
2. Roughness



شکل 7 نمودار هیستوگرام و منحنی توزیع نرمال قطر نانوالیاف محلول شماره دو بر اساس آنالیز تصاویر به دست آمده از AFM در صفحه XY. بر این اساس قطر میانگین فیبرها با احتساب پراکندگی معادل یک واحد انحراف معیار برابر 355 ± 65 نانومتر می باشد.



شکل 8 تصاویر AFM از نانو الیاف حاصل از محلول شماره دو برای تعیین بهتر مرز بین الیاف. الف- تصویر Amplitude ب- تصویر TOPO (inverse) معکوس

محصول شماره یک و دو را نشان نمی دهد (شکل 12).

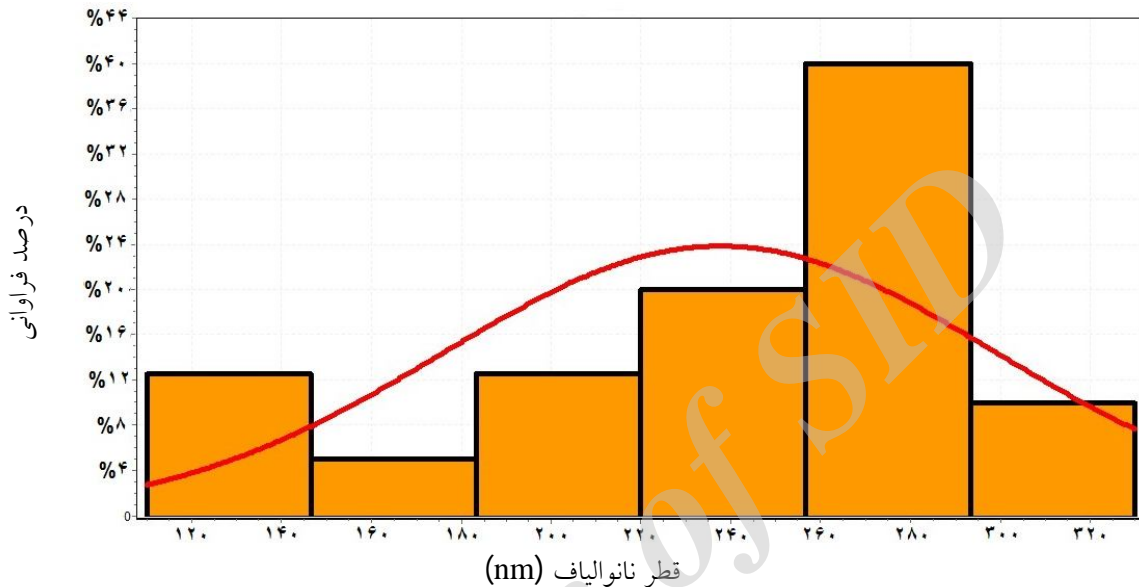
4- بحث

هرچند تکنیک الکترورسی و تولید الیاف در ابعاد میکرو و نانو توسط آن، روشی ساده و دارای سابقه ای طولانی

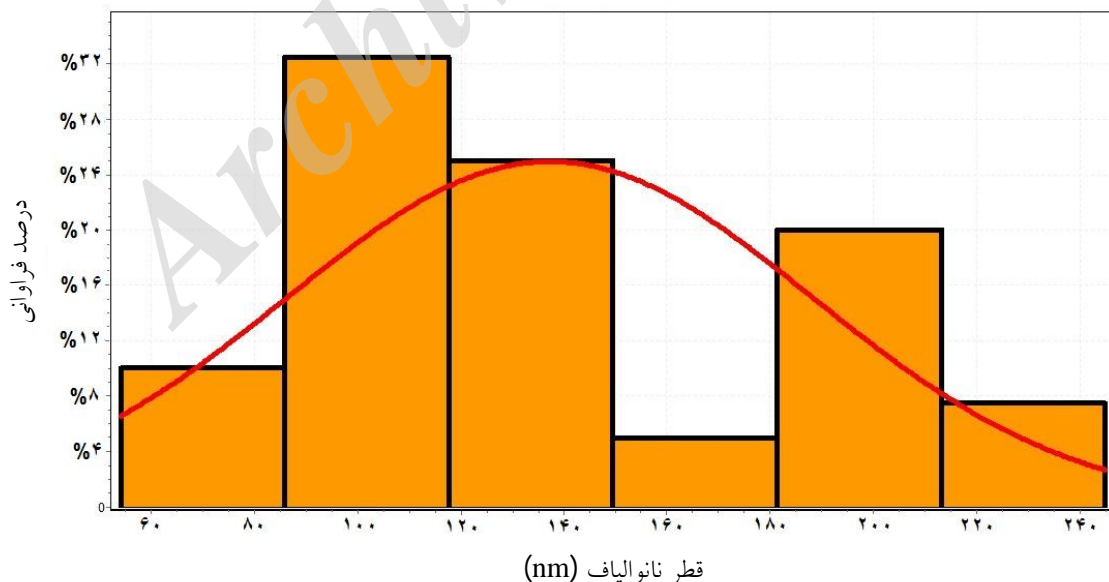
در ادامه به عنوان یک پارامتر مهم در تعیین ویژگی های بستر کشت سلول، درجه زبری (با مؤلفه های Ra و Rq) در راستای یک لیف واحد و در طولی برابر با 3 میکرومتر، برای حداقل 30 لیف مجزا به دست آمد. تحلیل آماری این نتایج، اختلاف معناداری بین درجات زبری دو

نانوالیاف دانست، قطعاً کنترل آسان ویژگی‌های نانوالیاف از طریق متغیرهای تکنیک الکتروریسی نیز بر اهمیت‌ترین دلیل برای تولید نانوالیاف از این طریق است [21].

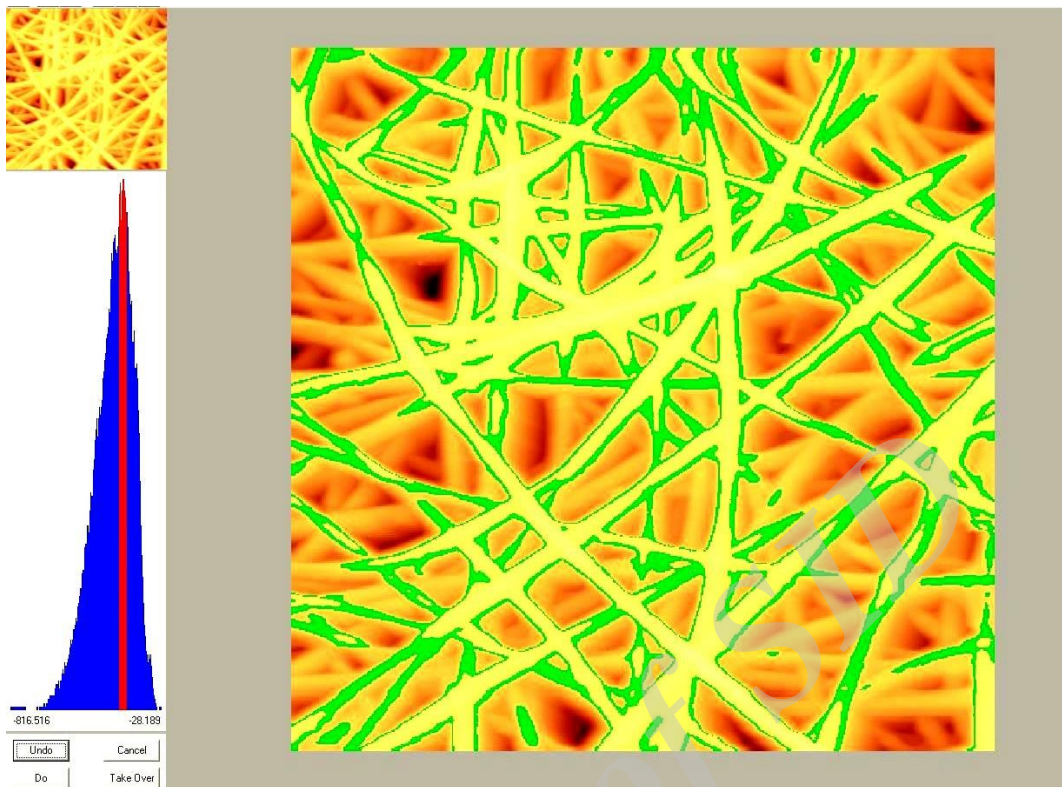
است، استفاده از آن در سال‌های اخیر به‌منظور ساخت بسترهای کشت سلول، گسترشی فوق‌العاده یافته است. اگر تقلید از توپوگرافی ماتریکس خارج سلولی (ECM) را بتوان مهمترین دلیل اقبال پژوهشگران به استفاده از



شکل 9 نمودار هیستوگرام و منحنی توزیع نرمال قطر نانوالیاف محلول شماره یک بر اساس آنالیز تصاویر به دست آمده از AFM در راستای محور Z. بر این اساس قطر میانگین فیبرها با احتساب پراکندگی معادل یک واحد انحراف معیار برابر 237 ± 61 نانومتر می باشد.



شکل 10 نمودار هیستوگرام و منحنی توزیع نرمال قطر نانوالیاف محلول شماره دو بر اساس آنالیز تصاویر به دست آمده از AFM در راستای محور Z. بر این اساس قطر میانگین فیبرها با احتساب پراکندگی معادل یک واحد انحراف معیار برابر 137 ± 51 نانومتر می باشد.

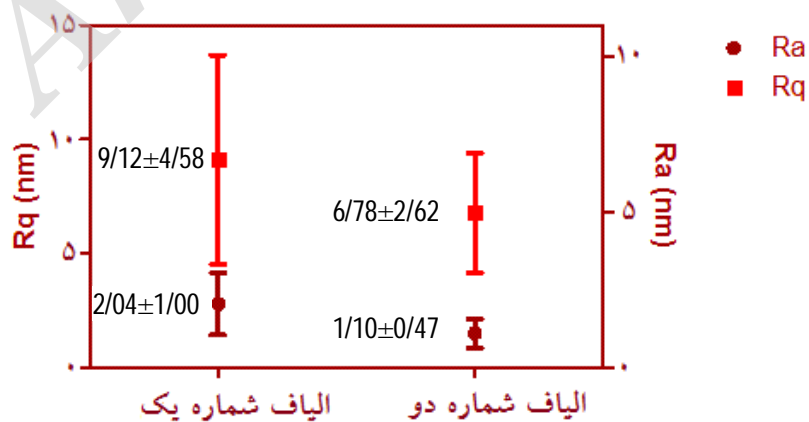


شکل 11 بکارگیری ابزار هیستوگرام برای تشخیص نانوالیافی که از بستر ارتفاع تقریباً یکسانی دارند.

جدول 1 درجه زبری نانوالیاف حاصل از الکتروریسی. محاسبه درجه زبری پس از روبش نمونه با میکروسکوپ AFM و در محدوده دو مربع به اضلاع 5 و 15 میکرومتری به دست آمده است.

محدوده روبش نمونه

15 μ m		5 μ m		نمونه مورد سنجش
Ra	Rq	Ra	Rq	
27/05nm	147/18nm	17/56nm	131/29nm	نانوالیاف حاصل از محلول شماره یک (2/25%)
20/55nm	106/52nm	11/44nm	99/52nm	نانوالیاف حاصل از محلول شماره دو (3%)



شکل 12 درجه زبری در طول الیاف بر حسب نانومتر. برای هر نمونه، درجه زبری در بازه های 3 میکرومتری برای 30 لیف مجزا اندازه گیری شده است.

را مشخص سازد. از سوی دیگر، میکروسکوپ نیروی اتمی (AFM) که آماده‌سازی و تصویربرداری از نمونه در آن، هرگز دشواری‌ها و معایب میکروسکوپ‌های الکترونی را ندارد، هرچند کاربردی گسترده در تعیین ساختار نانوالگوها و همچنین پتیدهای خودآرا یافته، توانایی‌های آن در مطالعه نانوالیاف آن گونه که باید، شناخته نشده است [27,24]. در مطالعه حاضر، سعی گردید تا با بررسی داده‌های تصویری دو میکروسکوپ SEM و AFM از نانوالیاف کیتوزان-پلی اتیلن اکسید که به روش الکتروروسی و در شرایطی بهینه تولید شده‌اند، مقایسه‌ای بین این دو روش میکروسکوپی صورت پذیرد. طبق مطالعه حاضر، استفاده از میکروسکوپ AFM به‌منظور تعیین قطر نانوالیاف در صفحه xy ناموفق بوده، ابعادی بزرگتر از واقعیت را نشان می‌دهد. این خطای محاسباتی بیش از هرچیز به دلیل تأثیر شکل و سایز پروب بوده و در تعیین ابعاد سایر نانوساختارها به کمک AFM از جمله نانوذرات فلزی نیز به چشم می‌خورد. با این حال، اندازه‌گیری ابعاد نانوساختارها در راستای محور z همان‌گونه که در مورد نانوذرات به نتایجی صحیح می‌انجامد، در مورد نانوالیاف نیز، تخمین مناسب‌تری از قطر آن‌ها ارائه می‌دهد [6]. نکته‌ای که باید بر آن تأکید شود، لزوم استفاده از این طریقه اندازه‌گیری در مناطق کم تراکم‌تر است. هرچند در مورد نانوذرات معمولاً تراکم نمونه به حدی نیست که سبب ممانعت از حرکت عمقی روبشگر در راستای محور z شود، در مورد نانوالیافی که به طریقه الکتروروسی و در زمانی چند ساعته بر روی پوشش آلومینیومی راسب شده‌اند، ساختارهایی متراکم‌تر مشاهده می‌شود. از سوی دیگر، در زمانی که لایه‌هایی از نانوالیاف بر روی هم قرار گرفته‌اند، تعیین قطر در راستای z با اندازه‌گیری فاصله میان رویه یک لیف و بستر، نمی‌تواند روش مناسبی محسوب شود. ابزار ترسیم‌کننده هیستوگرام قادر است اجزایی با ارتفاع (عمق) تقریباً

بطور ویژه، رویکرد نوین دانشمندان علوم سلول‌های بنیادی به تغییر سرنوشت این سلول‌ها از طریق دست‌ورزی ساختار هندسی و فیزیکی ریزمحیط اطراف آن‌ها که می‌تواند جایگزین مناسبی برای فاکتورهای شیمیایی القاکننده باشد، سبب ارتقا یافتن بیش از پیش جایگاه الکتروروسی در علوم سلولی و مهندسی بافت شده است [23,22]. امروزه مولفه‌های فیزیکی بسترهای رشد سلول مانند توپوگرافی هندسی، درجه زبری، کشسانی¹ و غیره حتی بیش از ترکیب شیمیایی اجزای تشکیل‌دهنده آن، مورد توجه می‌باشند [21]. در این راستا به ترتیب، استفاده از نانوالگوها، پلیمرهای الکتروروسی شده و پتیدهای خودآرا² با خواص فیزیکی مشخص و قابل‌سنجش در دستور کار محققان قرار گرفته‌اند [25,24,21]. تغییر در ابعاد و دیگر خواص این نانوساختارها می‌تواند آبخارهای پیام‌رسانی مختلفی را در سلول‌ها به راه اندازد و سرنوشت متفاوتی را برای آن‌ها رقم بزند [25].

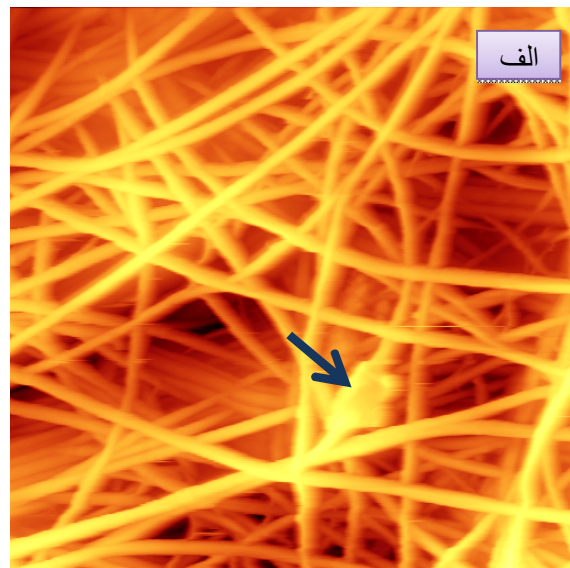
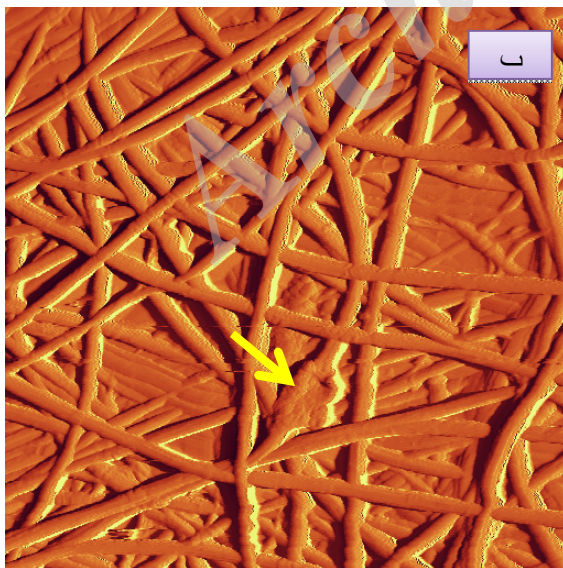
هرچند بکارگیری میکرو و نانوالگوها به دلیل امکان تولید آن‌ها در ابعاد و اشکال کاملاً مشخص و یکسان در این گونه مطالعات رواج بیشتری دارد، اما هزینه نسبتاً بالای تهیه و ضمناً عدم تشابه‌شان با ساختارهای واقعی در ماتریکس خارج سلولی، بهره‌گیری از الیاف الکتروروسی شده را در این امر، معقولانه‌تر می‌نماید. اغلب مهم‌ترین ابزار برای بررسی ساختار نانوالیاف، میکروسکوپ الکترونی روبشی (SEM) در نظر گرفته می‌شود. با وجود انتقاداتی که بخاطر فرایند آماده‌سازی نمونه و عکس‌برداری تهاجمی از طریق جریان الکترونی [26] و شرایط خلاء در زمان عکس‌برداری بر این نوع میکروسکوپ وارد است، SEM این توانایی را دارد که با بزرگ‌نمایی‌های مختلف، ویژگی‌های ساختاری مهمی از جمله قطر، تراکم، جهت‌گیری و میزان یکنواختی نانوالیاف

1. Elasticity
2. Self-assembled peptides

برابر 2/25% بوده است (محلول شماره یک) الیافی همگن تر از لحاظ قطر تولید شده‌اند. این امر می‌تواند به دلیل اندرکنش‌های هیدروژنی موفق تر بین زنجیره‌های PEO و کیتوزان در غلظت‌های بالاتر PEO باشد که منجر به فاصله گرفتن زنجیره‌های کیتوزان از یکدیگر و توزیع یکنواخت آن بین زنجیره‌های PEO می‌گردد. کاهش ویسکوزیته محلول در زمانی که از غلظت‌های بالاتر PEO استفاده می‌شود، معلول همین پدیده است. به هر حال قطر میانگین نانوالیاف در زمانی که غلظت کیتوزان و به طور کلی پلیمر در محلول افزایش می‌یابد، رو به کاهش می‌گذارد. کاهش قطر نانوالیاف به دنبال افزایش غلظت پلیمر کیتوزان در محلول، در مقالات دیگر نیز مورد تأکید قرار گرفته است [17]. گفتنی است طبق برخی گزارش‌ها، تهیه نانوالیاف با تعداد Bead کم در زمانی که غلظت پلی اتیلن اکسید استفاده شده تنها یک نهم غلظت کیتوزان است، امکان‌پذیر نمی‌باشد [17]. نسبت 9/1 کیتوزان به PEO، کمترین میزانی از PEO را دارد که می‌تواند الکتروریسی رشته‌های کیتوزان را ممکن سازد [10].

یکسان در راستای محور z را نشان دهد. لذا می‌توان با انتخاب دو لیف متقاطع با الگوی هیستوگرامی یکسان، تفاوت عمق آن‌ها در راستای محور z را به‌عنوان قطر لیف بالایی در نظر گرفت. به نظر می‌آید که از این روش می‌توان برای تعیین قطر نانوالیافی که فاقد ساختار ربان مانند یا ورقه‌ای هستند، به‌ویژه در زمانی که استفاده از SEM بنا بر هر دلیلی مطلوب نیست، استفاده نمود. لازم به ذکر است که اندازه‌گیری قطر الیاف با SEM نیز می‌تواند با خطا همراه بوده، میانگینی کمتر از واقعیت را گزارش دهد. این امر که Perspective Effect نام دارد، به دلیل دوبعدی بودن تصاویر حاصل از SEM و لذا احتمال اندازه‌گیری قطر الیافی است که در عمق دورتری واقع شده و لذا باریک‌تر دیده می‌شوند [28]. گفتنی است از میکروسکوپ نیروی اتمی برای بررسی وجود یا عدم وجود نقوصی مانند Bead نیز در محدوده روبش شده می‌توان بهره گرفت (شکل 13).

با توجه به محاسبه ضریب پراکندگی (CV) از طریق داده‌های SEM و AFM، در زمانی که مقدار وزنی کیتوزان دو برابر PEO و غلظت کلی پلیمر در محلول



شکل 13 عکس‌های TOPO (الف) و Amplitude (ب) از الیاف دارای Bead (نشان داده شده با پیکان). الیاف حاصل از الکتروریسی محلولی 2% کیتوزان با وزن مولکولی متوسط و نسبت 3/1 کیتوزان به PEO به دست آمده‌اند.

در مطالعه حاضر، بافت تولید شده از محلول شماره دو که دارای نسبت مذکور است، به جز در نواحی بسیار محدودی فاقد هرگونه Bead است.

از پارامترهای تأثیرگذار در تعیین ویژگی‌های بسترهای کشت سلول که در مقدار سلول نشانی و امکان مهاجرت سلول‌ها و غیره نقش ایفا می‌کند، ضخامت بافت (شبکه) تولید شده است. برای اندازه‌گیری این مؤلفه تکنیک‌های مختلفی در مقالات گزارش گردیده که مهمترین و رایج‌ترین آن‌ها استفاده از Micrometer screw [29]، بررسی برش عرضی با میکروسکوپ SEM [30] و استفاده از لیزر (با هزینه‌ای بسیار بالا) [31] می‌باشد. در مطالعه حاضر برای اولین بار از ابزار هیستوگرام در تخمین ضخامت بافت تهیه شده از نانوالیاف استفاده گردید. این امر در حالی بود که به دلیل ضخامت اندک نمونه و ویژگی‌های فیزیکی آن، استفاده از سایر گزینه‌ها عملاً امکان‌پذیر نبوده است. اختلاف عمق بین بالاترین نقطه (دارای بالاترین پیکسل رنگی) و پایین‌ترین نقطه (دارای پایین‌ترین پیکسل رنگی) در تصاویر TOPO که به وسیله ابزار هیستوگرام گزارش می‌گردد، در واقع تخمین مناسبی از بیشینه قطر بافت تولید شده در محدوده مورد روبش است. همچنین متوسط ضخامت بافت نیز با استفاده از همین روش (اختلاف عمق بین الیاف با پیکسل متوسط و پایین‌ترین پیکسل) قابل تخمین است. لازم به ذکر است که این نتیجه‌گیری زمانی معتبر است که بخشی از بستر فاقد الیاف نیز مورد روبش قرار گرفته باشد.

درجه زبری نمونه بخصوص در زمانی که قرار است بافت تهیه شده به‌عنوان یک بستر کشت سلول مورد استفاده قرار گیرد، پارامتری مهم محسوب می‌شود، زیرا که در اتصال سلول‌ها به بستر، میزان تکثیر و تعیین سرنوشت سلول‌ها نقش دارد [32]. معمولاً میکروسکوپ نیروی اتمی (AFM) رایج‌ترین ابزار برای تعیین زبری نمونه محسوب می‌گردد. در زمانی که محدوده وسیع‌تری روبش

شود، پستی و بلندی‌های بیشتری آشکار گشته، درجه زبری محاسبه شده افزایش می‌یابد. گاهی درجه زبری برای دو وسعت متفاوت از نمونه گزارش می‌شود. در این راستا، مقایسه درجه زبری بافت‌های حاصل (اندازه‌گیری پارامترهای Ra و Rq) حاکی از زبری بیشتر در مورد بافت حاصل از محلول شماره یک (با قطر بیشتر نانوالیاف) می‌باشد. ظاهراً، تفاوت قطر چشمگیر نانوالیاف در دو بافت حاصل، بیشتر از میزان پراکندگی قطر الیاف (با توجه به مقدار CV) در تفاوت زبری دو نمونه تأثیر داشته است. شایان ذکر است که در هر مورد تعیین درجه زبری، بعد از فرایند شیب‌گیری انجام شده است که این امر بخصوص در مورد بستری که کاملاً مسطح¹ نمی‌باشند، حائز اهمیت است [32].

بررسی درجه زبری در طول هر لیف علاوه بر این که می‌تواند بیانگر میزان همگنی الیاف تهیه شده باشد، اطلاعات دقیق‌تری نیز از ماهیت بستر ارائه می‌دهد که می‌تواند برای پیش‌بینی و یا تفسیر رفتار سلول‌های قرار داده شده بر روی آن مفید باشد. از آن جا که بسیاری از سلول‌ها از طریق زوائد سلولی مبتنی بر اکتین نظیر لاملپودیا و فیلوپودیا می‌توانند هندسه نانومتری محیط اطراف خود را حس نمایند، تعیین درجه زبری در طول هر لیف می‌تواند بسیار مفید باشد، به‌ویژه آن که بافت تهیه شده از نانوالیاف کاملاً مسطح نبوده و تعیین درجه زبری کلی که بیشتر ناشی از خلل و فرج ناشی از الیاف در هم تنیده شده است، اطلاعات کاملی را در باره هندسه بستر ارائه نمی‌دهد. در همین راستا Y.Fan و همکاران با ایجاد تغییراتی در میکروسکوپ نیروی اتمی، نوعی از آن را با عنوان SPRM² عرضه نمودند که می‌تواند تحلیل‌های مکانیکی بسیاری را از جمله درجه زبری و کشسانی برای هر لیف مجزا اندازه‌گیری نماید [32]. در پژوهش نوآورانه دیگری، از کانتیلور میکروسکوپ نیروی اتمی و

1. Flat

2. Scanning probe recognition microscopy (SPRM)

پرداخته نشد [35,34]. ضمناً گزارش‌هایی وجود دارد که از میکروسکوپ نیروی اتمی حتی به‌عنوان ابزاری برای تهیه نانوالیاف استفاده شده است [36]. مطالعه حاضر، اولین تلاش هدفمند برای مقایسه توانایی‌های دو نوع میکروسکوپ نیروی اتمی (AFM) و الکترونی روبشی (SEM) و همچنین نقاط ضعف آن‌ها در تعیین خصوصیات لیاف تولید شده به وسیله الکترونیسی و با تأکید ویژه بر کاربردهای بسیار سودمند میکروسکوپ نیروی اتمی در این راستا است. جدول 2، امتیازات و معایب این دو نوع میکروسکوپ را در این حیطه باخترار نشان می‌دهد.

تصویربرداری با میکروسکوپ SEM برای اندازه‌گیری خواص مکانیکی لیف‌های واحد، استفاده گردید [33]. مطالعه حاضر، حاکی از عدم تفاوت معنادار در زبری لیاف بین دو نمونه موجود بود. شایان ذکر است برای افزایش جامعه آماری و بررسی تعداد لیاف بیشتر در هر نمونه، استفاده از بافت‌هایی با تراکم کمتر مناسب‌تر می‌باشد، زیرا در بافت‌های چگال‌تر، تقاطع زیاد بین لیاف از دسترسی به سطح قابل توجهی از هرلیف، ممانعت می‌نماید. میکروسکوپ نیروی اتمی علاوه بر موارد ذکر شده، به‌عنوان Nanoindenter قابلیت اندازه‌گیری کشسانی و مدوله یانگ لیاف را نیز دارد که در مطالعه اخیر به آن

جدول 2 مقایسه مزایا و معایب بررسی نانوالیاف با استفاده از میکروسکوپ‌های SEM و AFM

میکروسکوپ الکترونی روبشی (SEM)
مزایا:
- سرعت بالای روبش و عکس‌برداری از نمونه
- تعیین قطر لیاف و بررسی شکل و نحوه جهت‌گیری آنها در زمان نسبتاً کوتاه
- بررسی عیوب شامل وجود Bead، قطرت پاشیده شده و رشته‌های پاره شده در گستره‌ای وسیع از نمونه
- امکان رویت نمونه با بزرگنمایی کم و لذا بررسی اجمالی کل بافت تولید شده
- امکان استفاده از سیستم EDX به منظور رویت هم‌زمان و افتراقی لیاف و نانوذرات فلزی و تعیین ماهیت شیمیایی این نانوذرات
معایب:
- امکان تخریب نمونه در مراحل آماده‌سازی آن پیش از عکس‌برداری
- امکان تخریب و یا تغییر ساختاری نمونه در زمان عکس‌برداری در شرایط خلاء یا تحت تأثیر جریان الکترونی
- احتمال خطا در تعیین ابعاد نانوالیاف به دلیل دوبعدی بودن تصاویر
میکروسکوپ نیروی اتمی (AFM)
مزایا:
- عدم نیاز به ایجاد پوشش فلزی بر روی نمونه برای عکس‌برداری
- عدم نیاز به ایجاد خلاء در زمان عکس‌برداری
- تهیه تصاویر سه‌بعدی از نمونه و امکان بررسی عمیق
- تعیین قطر لیاف در راستای عمق (محور z) با توجه به سه‌بعدی بودن تصاویر حاصله
- تعیین ضخامت بافت لیافی تولید شده
- تعیین درجه زبری (Roughness) نمونه، درجه زبری در راستای هر لیف و سایر خواص مکانیکی (الاستیسیته و مدوله یانگ)
معایب:
- زمان طولانی روبش نمونه
- عدم امکان رویت اولیه نمونه با بزرگنمایی کم و بررسی اجمالی کلیت بافت تولید شده
- فرایند طولانی برای تعیین قطر لیاف
- امکان نقص در تصاویر بدست آمده به دلیل نویزهای مکانیکی محیط عکس‌برداری

5- منابع

- [11] Wang Y-Y, Lü L-X, Feng Z-Q, Xiao Z-D, Huang N-P. Cellular compatibility of RGD-modified chitosan nanofibers with aligned or random orientation. *Biomedical Materials* 2010, **5**:054112.
- [12] Sun K, Li Z. Preparations, properties and applications of chitosan based nanofibers fabricated by electrospinning. *Express Polymer Letters* 2011, **5**:342-361.
- [13] Jacobs V, Patanaik A, Anandjiwala RD. Electrospun chitosan nanofibre membranes for antimicrobial application: Role of electrospinning processing parameters. 2010.
- [14] Esmaili A, Beni AA. A novel fixed-bed reactor design incorporating an electrospun PVA/chitosan nanofiber membrane. *Journal of hazardous materials* 2014, **280**:788-796.
- [15] Min L-L, Yuan Z-H, Zhong L-B, Liu Q, Wu R-X, Zheng Y-M. Preparation of chitosan based electrospun nanofiber membrane and its adsorptive removal of arsenate from aqueous solution. *Chemical Engineering Journal* 2014.
- [16] Monteiro N, Martins M, Martins A, Fonseca NA, Moreira JN, Reis RL, et al. Antibacterial activity of chitosan nanofiber meshes with liposomes immobilized releasing gentamicin. *Acta biomaterialia* 2015, **18**:196-205.
- [17] Pakravan M, Heuzey M-C, Aji A. A fundamental study of chitosan/PEO electrospinning. *Polymer* 2011, **52**:4813-4824.
- [18] Pillai C, Paul W, Sharma CP. Chitin and chitosan polymers: Chemistry, solubility and fiber formation. *Progress in polymer science* 2009, **34**:641-678.
- [19] Homayoni H, Ravandi SAH, Valizadeh M. Electrospinning of chitosan nanofibers: Processing optimization. *Carbohydrate Polymers* 2009, **77**:656-661.
- [20] Klossner RR, Queen HA, Coughlin AJ, Krause WE. Correlation of chitosan's rheological properties and its ability to electrospin. *Biomacromolecules* 2008, **9**:2947-2953.
- [21] Higuchi A, Ling Q-D, Chang Y, Hsu S-T, Umezawa A. Physical cues of biomaterials guide stem cell differentiation fate. *Chemical reviews* 2013, **113**:3297-3328.
- [22] Kim HN, Jiao A, Hwang NS, Kim MS, Kim D-H, Suh K-Y. Nanotopography-guided tissue engineering and regenerative medicine. *Advanced drug delivery reviews* 2013, **65**:536-558.
- [1] Bjorge D, Daels N, De Vrieze S, Dejangs P, Van Camp T, Audenaert W, et al. Performance assessment of electrospun nanofibers for filter applications. *Desalination* 2009, **249**:942-948.
- [2] Liu W, Thomopoulos S, Xia Y. Electrospun nanofibers for regenerative medicine. *Advanced healthcare materials* 2012, **1**:10-25.
- [3] Sell SA, Wolfe PS, Garg K, McCool JM, Rodriguez IA, Bowlin GL. The use of natural polymers in tissue engineering: a focus on electrospun extracellular matrix analogues. *Polymers* 2010, **2**:522-553.
- [4] Jacobs V, Anandjiwala RD, Maaza M. The influence of electrospinning parameters on the structural morphology and diameter of electrospun nanofibers. *Journal of applied polymer science* 2010, **115**:3130-3136.
- [5] Širc J, Hobzová R, Kostina N, Munzarová M, Juklickova M, Lhotka M, et al. Morphological characterization of nanofibers: methods and application in practice. *Journal of Nanomaterials* 2012, **2012**:121.
- [6] Reneker D, Kataphinan W, Theron A, Zussman E, Yarin A. Nanofiber garlands of polycaprolactone by electrospinning. *Polymer* 2002, **43**:6785-6794.
- [7] Chen R, Huang C, Ke Q, He C, Wang H, Mo X. Preparation and characterization of coaxial electrospun thermoplastic polyurethane/collagen compound nanofibers for tissue engineering applications. *Colloids and Surfaces B :Biointerfaces* 2010, **79**:315-325.
- [8] Aljehani AK, Hussaini MA, Hussain MA, Alothmany NS, Aldhaheri RW. Effect of electrospinning parameters on nanofiber diameter made of poly (vinyl alcohol) as determined by Atomic Force Microscopy. In: *Biomedical Engineering (MECBME), 2014 Middle East Conference on: IEEE*; 2014. pp. 379-381.
- [9] Vulcani VAS, Bizarria MTM, d Ávila MA, Mei LHI, Bernal C, Perussi JR. Cytotoxicity tests for nanostructured chitosan/PEO membranes using the agar diffusion method. *Materials Research*. ۲۰۱۲-۲۰۱۲, ۱۵:۲۱۳
- [10] Bhattarai N, Edmondson D, Veisoh O, Matsen FA, Zhang M. Electrospun chitosan-based nanofibers and their cellular compatibility. *Biomaterials* 2005, **26**:6176-6184.

- cultivation of osteoblasts: an in vitro study. *The Scientific World Journal* 2009, **9**:13.۱۳۹۳-۸۲
- [30] Menchaca-Campos C, García-Pérez C, Castañeda I, García-Sánchez MA, Guardián R, Uruchurtu J. Nylon/Graphene Oxide Electrospun Composite Coating. *International Journal of Polymer Science* 2013.
- [31] Liu W, Yeh Y-C, Lipner J, Xie J, Sung H-W, Thomopoulos S, *et al.* Enhancing the stiffness of electrospun nanofiber scaffolds with a controlled surface coating and mineralization. *Langmuir* 2011, **27**:9088-9093.
- [32] Fan Y, Chen Q, Ayres VM, Baczewski AD, Udupa L, Kumar S. Scanning probe recognition microscopy investigation of tissue scaffold properties. *International journal of nanomedicine* 2007, **2**:651.
- [33] Hwang KY, Kim S-D, Kim Y-W, Yu W-R. Mechanical characterization of nanofibers using a nanomanipulator and atomic force microscope cantilever in a scanning electron microscope. *Polymer Testing* 2010, **29**:375-380.
- [34] Clifford CA, Seah M. Modelling of nanomechanical nanoindentation measurements using an AFM or nanoindenter for compliant layers on stiffer substrates. *Nanotechnology* 2006, **17**:5283.
- [35] Finke M, Hughes JA, Parker DM, Jandt KD. Mechanical properties of in situ demineralised human enamel measured by AFM nanoindentation. *Surface science* 2001, **491**:456-467.
- [36] Gururajan G, Sullivan S, Beebe T, Chase D, Rabolt J. Continuous electrospinning of polymer nanofibers of Nylon-6 using an atomic force microscope tip. *Nanoscale* 2011, **3**:3300-3308.
- [23] Alessandri M, Lizzo G, Gualandi C, Mangano C, Giuliani A, Focarete M, *et al.* Influence of biological matrix and artificial electrospun scaffolds on proliferation, differentiation and trophic factor synthesis of rat embryonic stem cells. *Matrix Biology* 2014, **33**:68-76.
- [24] Jeon K, Oh H-J, Lim H, Kim J-H, Lee DH, Lee E-R, *et al.* Self-renewal of embryonic stem cells through culture on nanopattern polydimethylsiloxane substrate. *Biomaterials* 2012, **33**:5206-5220.
- [25] Bae D, Moon S-H, Park BG, Park S-J, Jung T, Kim JS, *et al.* Nanotopographical control for maintaining undifferentiated human embryonic stem cell colonies in feeder free conditions. *Biomaterials* 2014, **35**:916-928.
- [26] TAMULEVIČIUS T, ŠILEIKAITĖ A, TAMULEVIČIUS S, Madsen M, Rubahn H-G. Scanning electron microscopy of semiconducting nanowires at low voltages. *Mater Sci-Medzg* 2009, **15**:86-90.
- [27] Luo Z, Yue Y, Zhang Y, Yuan X, Gong J, Wang L, *et al.* Designer D-form self-assembling peptide nanofiber scaffolds for 3-dimensional cell cultures. *Biomaterials* 2013, **34**:4902-4913.
- [28] Tomba E, Facco P, Roso M, Modesti M, Bezzo F, Barolo M. Artificial vision system for the automatic measurement of interfiber pore characteristics and fiber diameter distribution in nanofiber assemblies. *Industrial & Engineering Chemistry Research* 2010, **49**:2957-2968.
- [29] Paletta J, Erffmeier K, Theisen C, Hussain D, Wendorff JH, Greiner A, *et al.* Influence of poly-(L-lactic acid) nanofiber functionalization on maximum load, Young's modulus, and strain of nanofiber scaffolds before and after