

ساخت و مشخصه یابی داربست شبکه ای مهندسی بافت بر پایه پلی کاپرولاکتون دی ال / پلی اتیلن گلایکول دی آکریلات / هیدروکسی آپاتیت

زهرا شاه نظری^۱، نرجس کوپایی^{۲*}

(تاریخ دریافت: ۱۳۹۸/۰۳/۰۲، ش.ص: ۴۶-۳۳، تاریخ پذیرش: ۱۳۹۸/۰۶/۱۱)

چکیده

هدف از این تحقیق، ساخت داربست مهندسی بافت استخوان از طریق برقراری اتصال عرضی رادیکالی بین زنجیره‌های پلی اتیلن گلایکول در حضور پلی کاپرولاکتون و ذرات هیدروکسی آپاتیت و خروج ذرات کلرید سدیم به عنوان تخلخل زا است. نمونه‌های ساخته شده با استفاده از روش‌های میکروسکوپ الکترونی روبشی (SEM)، طیف نگاری مادون قرمز (FTIR) و پراش پرتو ایکس (XRD) مورد ارزیابی قرار گرفت. همچنین درصد تخلخل و اندازه آن‌ها، در صد تورم، درصد کسر ژل و خصوصیات مکانیکی ارزیابی گردید. در آزمون FTIR مشخص شد که اتصالات عرضی در بین زنجیره‌های پلی اتیلن گلایکول برقرار شده است. داربست‌های تهیه شده ساختاری متخلخل با اندازه تخلخل بین ۱۰۰ تا ۱۳۰ میکرومتر و درصد تخلخل در حدود ۷۰ را نشان دادند. نتایج نشان داد که با افزایش نسبت پلی اتیلن گلایکول (PEG) به پلی کاپرولاکتون (PCL) در ساختار، در صد تورم به میزان ۱۱ درصد افزایش یافت و مدول فشاری نیز کاهش یافت. با افزودن ذرات هیدروکسی آپاتیت (HA) به این شبکه پلیمری در صد تورم به میزان ۴ درصد کاهش یافت و مدول فشاری از ۰/۹۶ به ۱/۱۲۲ مگاپاسکال افزایش یافت. همچنین مشاهده شد که همه شبکه‌های هیدروژلی دارای درصد کسر ژل مشابه به طور میانگین ۹۴ درصد هستند. نتایج نشان داد، داربست شبکه‌ای پلی کاپرولاکتون دی ال / پلی اتیلن گلایکول دی آکریلات / هیدروکسی آپاتیت پتانسیل استفاده در مهندسی بافت را دارند.

واژه‌های کلیدی: داربست متخلخل، مهندسی بافت استخوان، پلی اتیلن گلایکول، پلی کاپرولاکتون، هیدروکسی آپاتیت.

۱- کارشناسی ارشد، مرکز تحقیقات مواد پیشرفته، دانشکده مهندسی مواد، واحد نجف آباد، دانشگاه آزاد اسلامی، نجف آباد، ایران

۲- استادیار، مرکز تحقیقات مواد پیشرفته، دانشکده مهندسی مواد، واحد نجف آباد، دانشگاه آزاد اسلامی، نجف آباد، ایران

* نویسنده مسئول مکاتبات: narges_koupaie@Pmt.iaun.ac.ir

پیشگفتار

از گذشته تاکنون، هدف اصلی در مهندسی بافت استخوان، طراحی و ایجاد ساختاری مشابه ساختار طبیعی یک بافت استخوان در بدن موجود زنده، به طور منظم ترمیم آسیب‌ها و ضایعات بافت استخوان بوده است [۱]. در مهندسی بافت، داربست سلولی، سلول‌ها و مولکول‌های فعال زیستی در شرایط آزمایشگاهی ابزارهای اصلی می‌باشند. گستره وسیعی از مواد پلیمری مصنوعی و طبیعی به عنوان داربست برای ترمیم و ایجاد بافت استفاده می‌شود [۲]. پلی‌کاپرولاکتون (PCL) به دلیل دارا بودن ویژگی‌هایی نظیر زیست تخریب پذیری، زیست سازگاری و خواص مکانیکی مناسب در این زمینه از اهمیت زیادی برخوردار است؛ ولی به علت آب‌گریز بودن در چسبندگی سلولی محدودیت دارد و به علت درجه بلورینگی بالا و آب‌گریزی ذاتی سرعت تخریب آن از طریق هیدرولیز بسیار آهسته می‌باشد. این بدین معناست که برای استفاده وسیع-تر از PCL در کاربردهای پزشکی نیاز به تغییراتی در آن است [۳].

مطلوب با بافت استخوان اشاره کرد [۶،۷]. بنابراین پلی-کاپرولاکتون به دلیل خواص مکانیکی مناسب، زیست سازگاری بالا و غیر سمی بودن گزینه خوبی برای استفاده در زمینه مهندسی بافت استخوان می‌باشد؛ ولی به دلیل سرعت تخریب پایین، آبگریزی ذاتی و چسبندگی سلولی ضعیف بهتر است آن را با دیگر مواد پلیمری و سرامیکی به صورت کامپوزیت استفاده کنیم تا معایب آن را بتوانیم کنترل کنیم [۶، ۱۰-۸]. PEG و HA گزینه‌های مناسبی برای تغییر خصوصیات فیزیکی و مکانیکی PCL جهت کاربرد به عنوان داربست در مهندسی بافت استخوان است. در این پروژه با هدف بهبود خصوصیات فیزیکی و مکانیکی پلی‌کاپرولاکتون، داربست هیدروژلی زیست تخریب پذیر از طریق واکنش اتصال عرضی بین زنجیره‌های پلی‌اتیلن گلایکول دی‌آکريلات در حضور پلی‌کاپرولاکتون و ذرات هیدروکسی آپاتیت به عنوان یک روش جدید مطرح شده است [۶].

مواد و روش‌ها

سنتز هیدروژل بدون تخلخل PCLdiol / PEGDA

ساخت هیدروژل PCL/PEGDA از طریق واکنش اتصال عرضی رادیکالی بین زنجیره‌های پلی‌اتیلن گلایکول (PEGDA) در حضور پلی‌کاپرولاکتون انجام شد. در جدول ۱ مواد مورد استفاده و مشخصات آن‌ها در ساخت داربست‌ها مشخص شده است. غلظت‌های کل ۱۵، ۲۵ و ۳۵ درصد برای پلیمر در نظر گرفته شد. بدین منظور پلی‌کاپرولاکتون و پلی‌اتیلن گلایکول دی‌آکريلات با درصد‌های وزنی مختلف در دی‌اکسان حل شدند. سپس مقدار ۰/۵ وزنی/حجمی آغازگر حرارتی AIBN به محلول اضافه شد. به تعدادی از نمونه‌ها، ۵ درصد وزنی/حجمی هیدروکسی آپاتیت (HA) افزوده شد. هموزن کردن مخلوط توسط دستگاه هموزنایزر اولتراسونیک به مدت ۱۰ دقیقه انجام شد. پس از عملیات هموزن کردن، مخلوط حاصله در داخل لوله آزمایش در دار ریخته شد و به مدت ۱۲ ساعت در دمای ۷۰ درجه سانتیگراد در آن حرارتی قرار داده شد.

پلی‌اتیلن گلایکول (PEG) پلیمری زیست سازگار و زیست تخریب پذیر است. خواص بیولوژیکی مناسبی دارد؛ اما خواص مکانیکی آن ضعیف است و در نتیجه استحکام کمی دارد. خاصیت آبدوستی دارد که باعث تورم و جذب آب می‌شود که این خاصیت موجب می‌شود تا جذب پروتئین آن ضعیف شود و چسبندگی سلولی آن نیز محدود می‌شود و هرچه مقدار PEG در ساختار افزایش یابد، استحکام کاهش می‌یابد و برای بهبود خواص بیوموادهای دیگر مانند پلی‌کاپرولاکتون از این پلیمر استفاده می‌شود [۴،۵].

هیدروکسی آپاتیت (HA) از مهم‌ترین بیوسرامیک‌های مورد استفاده در پزشکی و دندان پزشکی است که به دلیل بیو اکتیویته بودن و خواص مکانیکی بالا و شباهت ساختاری زیاد به بافت سخت استخوان، در سال‌های اخیر مورد توجه واقع شده است. به دلیل تشابه ترکیب شیمیایی هیدروکسی آپاتیت با استخوان علاوه بر جنبه‌های زیست فعالی و تأثیرات درمانی هیدروکسی آپاتیت می‌توان به عدم تحلیل رفتن، قابلیت تحریک رشد استخوان (به خصوص داخل تخلخل میان ذرات، حفرات موجود در ماده کاشتنی یا داربست)، ایجاد پیوند مستقیم با استخوان و چسبندگی

جدول ۱- مشخصات مواد اولیه در تهیه داربست‌ها

ردیف	نام ماده	نام اختصاری ماده	جرم مولکولی g/mol	شرکت تولید کننده
۱	Polycaprolactone diol	PCL	۲۰۰۰	Sigma Aldrich
۲	Polyethylene glycol	PEG	۷۰۰	Sigma Aldrich
۳	Azobisisobutyronitrile	AIBN	-	Sigma Aldrich
۴	Hydroxyapatite	HA	۱۰۰۴	Merck
۵	Sodium Chloride	NaCl	۵۸/۴۴	Merck
۶	Dioxane		۸۸/۱۱	Appli chem

با حرارت دادن، آغازگر حرارتی (AIBN) تجزیه می‌شود و رادیکال‌های آزاد تولید می‌کند و این رادیکال‌ها می‌توانند پلیمریزاسیون رادیکال آزاد را آغاز کنند و مابین زنجیره‌های پلی‌اتیلن‌گلیکول اتصال عرضی برقرار نمایند. نمونه‌های هیدروژلی از لوله آزمایش خارج شد و به دیسک‌هایی با ضخامت ۱ میلی‌متر تقسیم شد. سپس با آب مقطر شسته شدند و در نهایت به مدت ۲ روز خشک شدند. سپس مشاهده شد که هیدروژل‌های سنتز شده در غلظت‌های ۱۵ و ۲۵ درصد از کیفیت خوبی برخوردار نیستند و در کل

قابلیت انجام تست برای ارزیابی خواص را نیز ندارند و نمونه سنتز شده با غلظت کل ۳۵ درصد دارای کیفیت بهتری بود. بنابراین، هیدروژل با غلظت ۳۵ درصد به عنوان نمونه بهینه برای ادامه کار انتخاب شد. سپس این نمونه بهینه با نسبت‌های مختلف سنتز شد. جدول ۲ درصد و ترکیبات مورد استفاده و نسبت اجزای پلیمری پلی‌کاپرولاکتون و پلی‌اتیلن‌گلیکول در ساخت هیدروژل بدون تخلخل PCL/PEG را نشان می‌دهد.

جدول ۲- درصد وزنی ترکیبات مورد استفاده در ساخت هیدروژل‌ها

غلظت کل پلیمر (wt/vol%)	HA (wt/vol%)	نسبت وزنی PCL/PEG	کد گذاری نمونه‌ها
35	0	50:50	1PCLPEG
35	0	25:75	3PEGPCL
35	0	65:35	2PCLPEG
35	5	50:50	1PCLPEGHA
35	5	25:75	3PEGPCLHA
35	5	65:35	2PCLPEGHA

سنتر هیدروژل متخلخل PCLdiol/PEG

کردیم تا به وزن ثابت برسند و از رابطه زیر کسر ژل محاسبه شد [۱۱].

$$G\% = (W_d / W_i) * 100$$

که در این رابطه W_i وزن اولیه هیدروژل و W_d وزن هیدروژل خشک شده بعد از خروج اجزای قابل انحلال در حلال است. آزمون کسر ژل برای هر نمونه ۳ بار انجام شد و میانگین مقادیر حاصل گزارش شد.

آزمون تعیین نسبت تورم

به منظور تعیین نسبت تورم، نمونه‌های تهیه شده درون آب مقطر در محیط انکوباتور با دمای ۳۷ درجه سانتی گراد غوطه ور شدند. پس از رسیدن به تورم تعادلی، آب اضافی از سطح نمونه‌ها از طریق قرار گرفتن بر روی کاغذ صافی خارج شد. درصد نسبت تورم با استفاده از رابطه زیر محاسبه گردید [۱۱، ۱۲].

$$S\% = [(W_s - W_d) / W_d] * 100$$

که در آن W_s وزن هیدروژل‌های متورم و W_d وزن هیدروژل‌های خشک شده بعد از خروج اجزای قابل انحلال در حلال است. آزمون میزان تورم برای هر نمونه ۳ بار انجام شد و از نتایج نمونه‌ها مقدار میانگین گزارش شده است.

تعیین اندازه تخلخل‌ها و بررسی مورفولوژی داربست‌ها با استفاده از میکروسکوپ الکترونی روبشی (SEM)

برای بررسی مورفولوژی سطح و مقطع عرضی داربست‌ها و اندازه تخلخل‌ها از دستگاه میکروسکوپ الکترونی روبشی SEM مدل IEO 435VP استفاده شد. به منظور مطالعه توزیع پراکندگی ذرات هیدروکسی آپاتیت در سطح نمونه 2PCLPEG/HA، نقشه عنصری توسط دستگاه SEM مجهز به آنالیز توزیع انرژی پرتو ایکس (EDS) از آن تهیه شد.

به منظور اندازه‌گیری قطر تخلخل‌ها قطر ۲۰ حفره از هر داربست در تصاویر SEM با استفاده از نرم افزار Microstructure Measurement اندازه‌گیری شد و میانگین مقادیر مشخص شده به عنوان قطر تخلخل برای هر داربست گزارش شد [۱۱].

به منظور ساخت داربست متخلخل تمام مراحل ساخت نمونه بدون تخلخل تکرار شد. با این تفاوت که به محلول پلیمرهای مذکور ۱۵۰ درصد وزنی /حجمی کلرید سدیم به عنوان تخلخل‌زا اضافه شد. اندازه ذرات کلرید سدیم بین ۱۰۵ تا ۲۵۰ میکرون می‌باشد. عملیات هموژن‌سازی توسط دستگاه هموژنایزر اولتراسونیک به مدت ۱۰ دقیقه انجام شد. سپس مخلوط حاصله در لوله آزمایش ریخته شد و به مدت ۱۲ ساعت در دمای ۷۰ درجه سانتی‌گراد در آون حرارتی قرار داده شد. نمونه‌ها از لوله آزمایش خارج شد و به دیسک‌هایی به ضخامت ۱ میلی‌متر تقسیم شدند. نمونه‌ها قبل از غوطه‌ور شدن در آب و خروج ذرات کلرید سدیم، به قسمت‌های کوچک‌تر تقسیم شدند. سپس به منظور خروج ذرات تخلخل‌زا نمونه‌ها به مدت ۴ روز در آب مقطر غوطه‌ور شدند. در نهایت نمونه‌ها را از آب خارج کرده و به مدت ۴۸ ساعت در آون خلا در دمای ۴۰ درجه سانتی‌گراد اجازه داده شد کاملاً خشک شوند.

روش‌های ارزیابی خواص نمونه‌ها

طیف نگاری مادون قرمز و الگوی پراش پرتو ایکس

به منظور مشاهده ایجاد پیوند عرضی و بررسی ساختار شیمیایی نمونه‌های شبکه‌ای شده از آنالیز بازتابش کلی (ATR-FTIR) استفاده شد. طیف نگاری توسط دستگاه FTIR مدل ۶۳۰۰ ساخت کشور ژاپن شرکت Jasco انجام گرفت.

ارزیابی ساختار فازی نمونه 2PCLPEG/HA به روش پراش پرتو ایکس توسط دستگاه PHILIPS PW3040 بررسی شد. تیوب به کار رفته پرتو K_{α} مس با طول موج ۱/۵۴۰۶ آنگستروم ($Cu K_{\alpha}, \lambda=1.5406 \text{ \AA}$) را تامین می‌کرد و نرخ روبش معادل ۰/۰۲ درجه بر ثانیه است. زاویه تابش (θ) از ۱۰ تا ۶۰ درجه انتخاب گردید.

آزمون کسر ژل

برای انجام آزمون کسر ژل و خروج اجزای قابل انحلال از نمونه‌ها از آب مقطر استفاده شد. ابتدا ۳ فیلم هیدروژلی از هر کد را به مدت ۴۸ ساعت در آب مقطر غوطه‌ور کردیم. سپس آن‌ها را از آب خارج کرده و در آون خلا خشک

اندازه گیری درصد تخلخل داربست‌ها

برای به دست آوردن درصد تخلخل از قانون ارشمیدس استفاده کردیم. در این آزمون داربست‌ها را در اتانول غوطه‌ور کردیم و در دسی کاتور خلاء قرار دادیم تا حباب‌های هوا از آن‌ها خارج شوند و از محاسبه نسبت حجم تخلخل‌ها به حجم کل نمونه‌ها درصد تخلخل‌ها بدست آمد. درصد تخلخل داربست از رابطه زیر محاسبه شد [۱۳].

$$\text{Porosity}(\%) = \frac{(w_2 - w_3 - w_s)/p_e}{(w_1 - w_3)/p_e} * 100$$

که در آن w_1 وزن ظرف شیشه‌ای پر شده با اتانول، w_2 وزن ظرف شیشه‌ای شامل اتانول و داربست اشباع، w_3 وزن ظرف شیشه‌ای که داربست اشباع از اتانول از آن خارج شده است، w_s وزن داربست، P_e دانسیته اتانول، $(W_1 - W_3)/P_e$ حجم کل داربست به همراه تخلخل‌ها و $(W_2 - W_3 - W_s)/P_e$ حجم تخلخل‌های موجود در داربست می‌باشد.

بررسی خواص مکانیکی داربست‌ها

رفتار مکانیکی داربست‌ها توسط آزمون استحکام فشاری توسط دستگاه STM150 ساخت کشور ایران مطابق استاندارد ASTM D695-2a ارزیابی شد. به منظور انجام آزمون فشاری نمونه‌های استوانه‌ای با قطر ۶ میلی متر و ارتفاع ۱۲ میلی متر تهیه شد. قبل از انجام آزمون نمونه‌های استوانه‌ای شکل به مدت ۴۸ ساعت در دمای ۳۷ درجه در آب مقطر غوطه‌ور شدند. مدول فشاری داربست‌ها از محاسبه شیب ناحیه خطی منحنی تنش-کرنش در محدوده کرنش ۰/۱ تا ۱ درصد به دست آمد. این آزمون برای هر نمونه ۳ بار انجام شد و میانگین و انحراف معیار مدول آن‌ها گزارش شد.

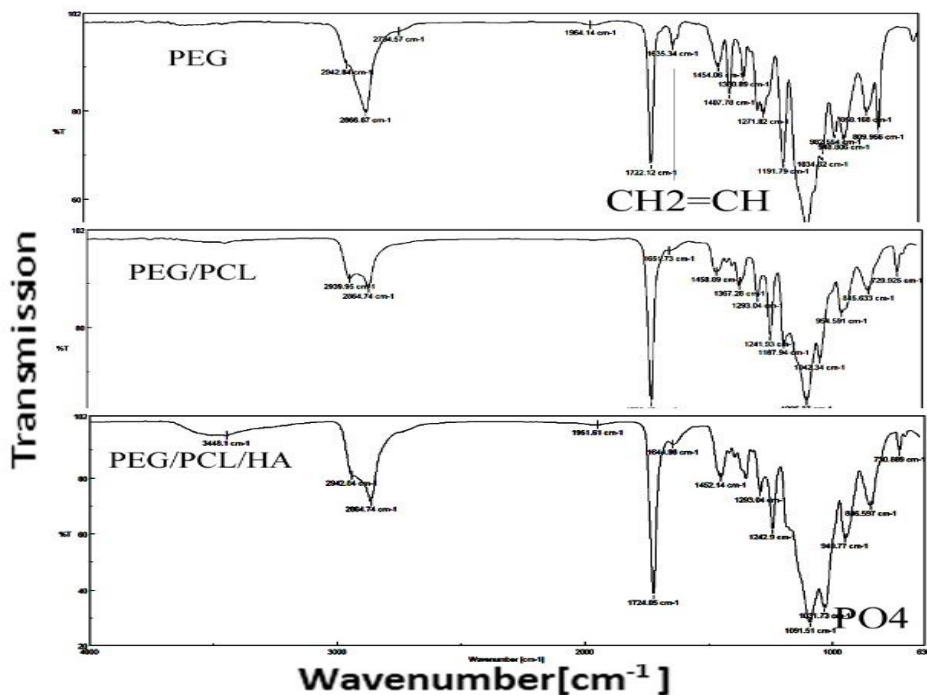
نتایج و بحث

آنالیز ATR-FTIR و آنالیز فازی هیدروژل PCL/PEG

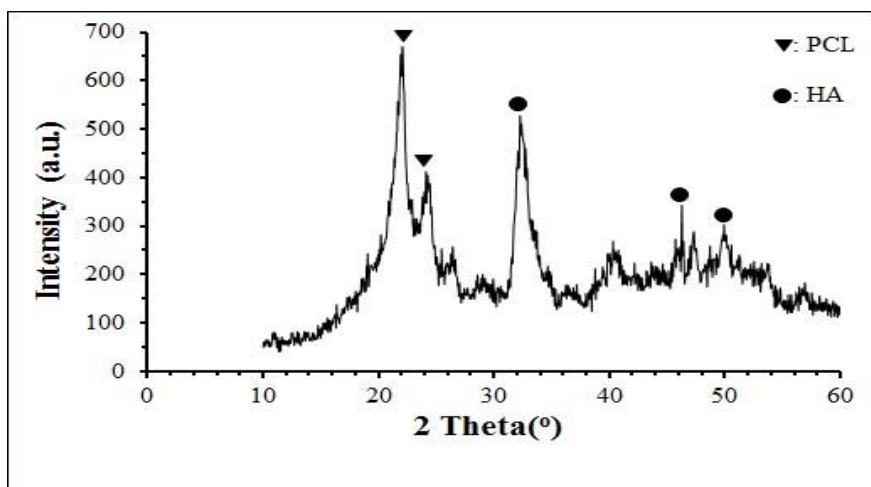
شبکه هیدروژلی PCL/PEG از طریق برقراری اتصال عرضی بین زنجیره‌های PEG و قرار گرفتن رشته‌های PCL در بین زنجیره‌ها در حضور ذرات هیدروکسی آپاتیت ساخته شده است [۱۱].

همان‌گونه که در شکل ۱ مشاهده می‌شود، دو پیک جذبیه گروه وینیل (CH₂=CH) در عدد موجی ۱۶۳۵ cm⁻¹ و ۸۱۰ cm⁻¹ در طیف PEGDA مشاهده می‌شود. پیک جذبیه کربونیل (C=O) در عدد موجی ۱۷۲۵ cm⁻¹ و پیک جذبیه گروه متیلن (-CH₂) در عدد موجی ۲۷۰۰ cm⁻¹ مشاهده می‌شوند. با توجه به شکل ۱ در این شبکه‌ها پیک جذبیه مربوط به گروه وینیل در هیدروژل‌های PCL/PEG و PCL/PEG/HA حذف شده است که دلیل این امر را می‌توان به شکسته شدن پیوند دو گانه کربن-کربن توسط آغازگر حرارتی (AIBN) و برقراری اتصال عرضی بین زنجیره‌های پلی اتیلن گلیکول و تشکیل شبکه هیدروژلی نیمه در هم نفوذ نسبت داد [۱۱]. در طیف PCL/PEG/HA علاوه بر پیک‌های موجود در طیف PCL/PEG، پیک مربوط به گروه فسفات (PO₄)₃ هیدروکسی آپاتیت نیز در عدد موجی ۱۰۲۹ cm⁻¹ قابل مشاهده است [۱۱].

نتیجه آزمون پراش پرتو ایکس بر روی نمونه 2PCLPEG/HA در شکل ۲ نشان داده شده است. در این الگو حضور پیک‌های پلی کاپرولاکتون و هیدروکسی آپاتیت قابل مشاهده است. پیک‌های موجود در الگوی پراش پرتو ایکس، نشان دهنده حفظ بلورینگی پلی کاپرولاکتون و هیدروکسی آپاتیت در حین تولید داربست نیمه در هم نفوذ 2PCLPEG/HA می‌باشد. پیک‌های مشخص در زوایای ۲۱/۸° و ۲۴/۱° مربوط به پلی کاپرولاکتون موجود در داربست 2PCLPEG/HA است.



شکل ۱- نمودار ATR-FTIR هیدروژل های سنتز شده



شکل ۲- الگوی پراش پرتو ایکس داربست 2PCLPEG/HA

نتایج آزمون کسر ژل و تورم نمونه‌ها

نتایج نسبت کسر ژل و تورم در حضور و عدم حضور ذرات هیدروکسی آپاتیت در جدول ۳ ارائه شد. همان‌گونه که مشاهده می‌شود، همه شبکه‌های هیدروژلی دارای درصد کسر ژل تقریباً مشابه و بالای ۹۲ درصد هستند و تفاوت معناداری در مقادیر گزارش شده در شبکه‌های هیدروژلی وجود ندارد.

همچنین، پیک‌های مشخص در زوایای $32/4^\circ$ ، $46/1^\circ$ و $49/3^\circ$ حضور ذرات هیدروکسی آپاتیت را در داربست نیمه در هم نفوذ 2PCLPEG/HA نشان می‌دهد. نتایج حاصل از آزمون XRD با نتایج حاصل از آزمون XRD ساپرامانیان و همکارانش بر روی داربست PCL/HA مطابقت دارد [۱۴].

جدول ۳- کسر ژل و نسبت تورم شبکه های هیدروژلی PCL/PEG در حضور و عدم حضور ذرات هیدروکسی آپاتیت

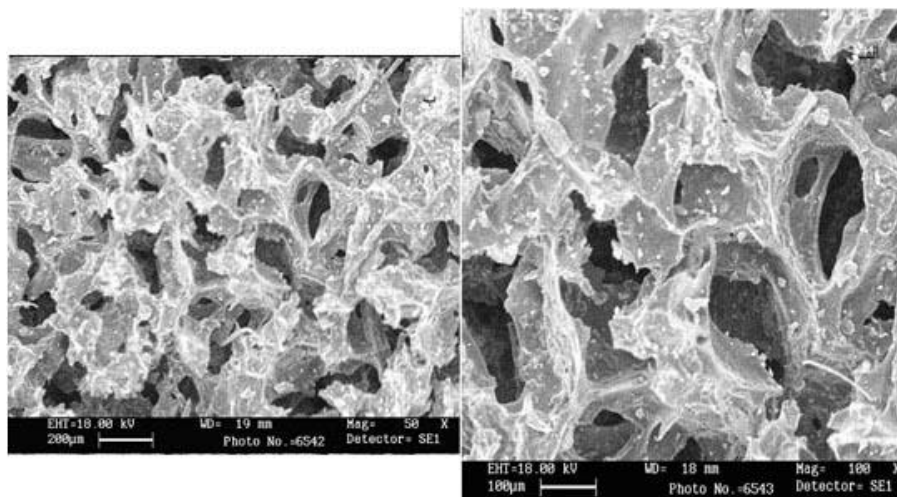
نسبت تورم (%) n=3	کسر ژل (%) n=3	کدگذاری نمونه‌ها
113/12 ± 0/85	93/61 ± 0/46	1PCLPEG
124/11 ± 0/79	94/32 ± 0/76	3PEGPCL
119/47 ± 0/52	92/25 ± 0/32	2PCLPEG
102/2 ± 0/96	94/22 ± 0/56	1PCLPEG/HA
115/13 ± 0/66	94/82 ± 0/34	3PEGPCL/HA
116/17 ± 0/82	92/78 ± 0/63	2PCLPEG/HA

استفاده در مهندسی بافت باید دارای ساختاری متخلخل با درصد بالا باشند. همچنین باید تخلخل‌های موجود در ساختار با یکدیگر ارتباط داشته باشند تا امکان انتقال مواد غذایی و دفع مواد زائد از سطوح داخلی داربست وجود داشته باشد و در این صورت امکان زنده ماندن و رشد سلول در این نواحی فراهم می‌شود [۱۶]. در این تحقیق ساختار متخلخل توسط خروج ذرات کلرید سدیم حاصل شد. در شکل ۳ تصاویر میکروسکوپی الکترونی (SEM) از مقطع عرضی داربست و در شکل ۴ تصاویر میکروسکوپی الکترونی (SEM) از سطح داربست بعد از خروج ذرات کلرید سدیم مشاهده می‌گردد و مقایسه این تصاویر نشان دهنده خروج ذرات تخلخل‌زا از ساختار می‌باشد. براساس تصاویر میکروسکوپی (SEM) ساختار تمام داربست‌ها دارای تخلخل یکنواخت می‌باشد و همچنین خروج ذرات تخلخل‌زا از داربست را مشاهده می‌کنیم که با غوطه‌ور سازی داربست‌های ساخته شده در آب مقطر پس از ۴ روز بوجود آمده‌اند. همچنین نقاط تخلخل با یکدیگر مرتبط هستند که این موضوع بسیار مهم است؛ زیرا این ارتباط برای امکان انتقال مواد غذایی و اکسیژن برای رشد سلول می‌باشد. تخلخل‌های به هم اتصال یافته نقش مهمی در رشد سلول و تشکیل بافت را دارند و شرایط مناسب برای مهندسی بافت فراهم می‌شود [۱۷].

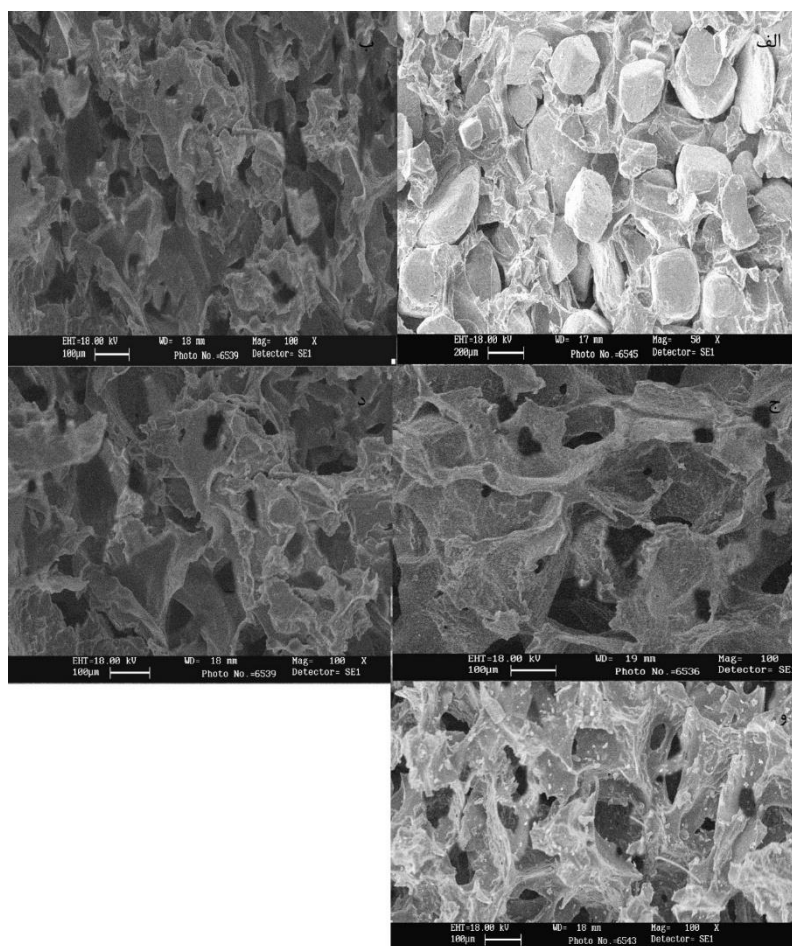
بر اساس جدول ۳ با وارد شدن ذرات هیدروکسی آپاتیت به ساختار، نسبت کسر ژل شبکه‌های پلیمری کاهش نیافته و نشان دهنده آن است که حضور ذرات هیدروکسی آپاتیت در ساختار، مانع برقراری اتصال عرضی بین زنجیره‌های پلیمری نبوده است [۱۵]. میزان تورم و توانایی جذب آب داربست‌ها از موارد مهم در کاربرد آن‌ها در مهندسی بافت می‌باشد؛ زیرا این فاکتور، باعث جذب مایع فیزیولوژی و انتقال مواد غذایی به سلول توسط داربست می‌شود. با در نظر گرفتن جدول ۳ درصد تورم شبکه‌های هیدروژلی با افزایش مقدار PEG در شبکه افزایش یافته و نشان دهنده آن است که آبدوستی ساختار نیز افزایش یافته است [۱۵]؛ ولی با توجه به جدول ۳ نسبت تورم تمام شبکه‌های هیدروژلی با ورود ذرات هیدروکسی آپاتیت به داخل شبکه کاهش یافته است. در واقع ذرات هیدروکسی آپاتیت مابین شبکه پلیمری قرار می‌گیرند و باعث بوجود آمدن شبکه هیدروژلی متراکم شده‌اند و این‌گونه به نظر می‌رسد که فضای خالی بین زنجیره‌های پلیمری برای قرار گرفتن مولکول‌های آب کاهش یافته است. بنابراین چنین شبکه‌هایی توانایی متورم شدن به اندازه شبکه‌های هیدروژلی فاقد ذرات هیدروکسی آپاتیت را ندارند [۱۵].

بررسی مورفولوژی داربست‌ها

وجود تخلخل در داربست‌ها برای مهاجرت و تکثیر سلول استخوانی بسیار حائز اهمیت است. داربست‌های مورد



شکل ۳- تصاویر SEM از مقطع شکست عرضی داربست با کد 3PEGPCL/HA با بزرگنمایی (الف) ۱۰۰، (ب) ۵۰



شکل ۴- تصاویر SEM از داربست های سنتز شده با درصد های وزنی مختلف PCLdiol و PEGDA در بزرگنمایی ۱۰۰ الف- 2PCLPEG/HA بدون خروج ذرات تخلخل زا، ب- 3PEGPCL ج- 2PCLPEG/HA د- 1PCLPEG/HA، و- 3PEGPCL/HA بعد از خروج تخلخل زا

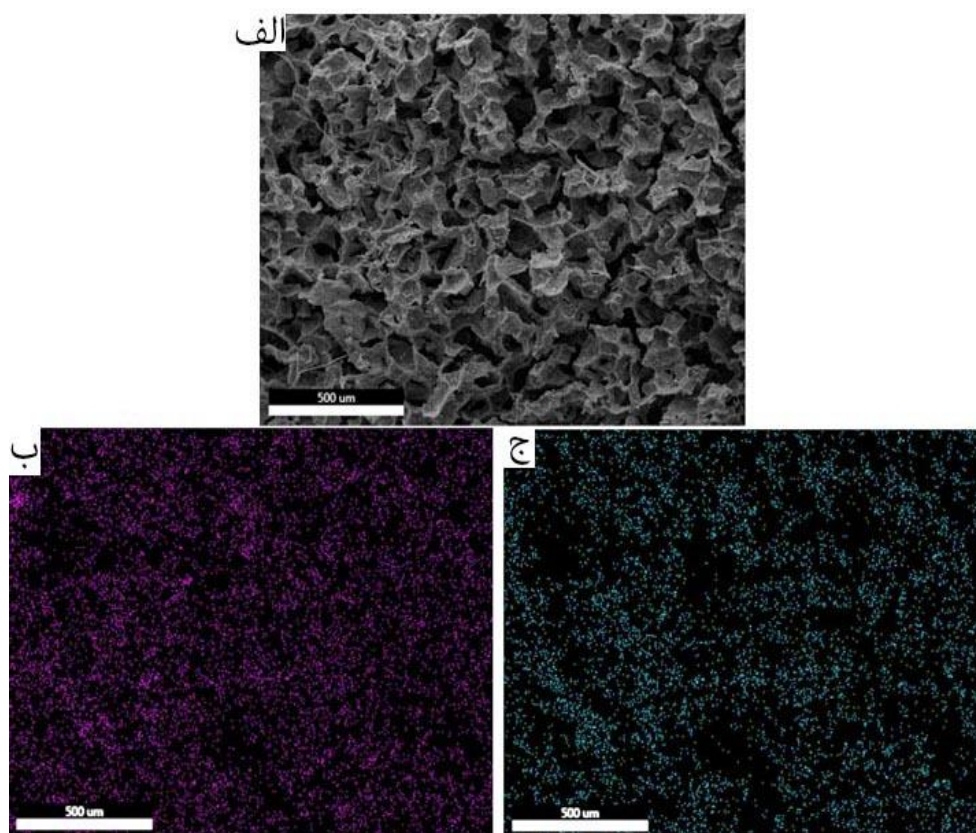
مشاهده می‌شود، میانگین اندازه تخلخل‌های موجود در داربست‌ها در محدوده ۱۰۰ تا ۱۳۰ میکرو متر قرار دارد.

تخلخل کوچک مهاجرت سلول‌ها و انتقال مواد غذایی و خروج مواد زائد در ساختار را دچار مشکل می‌کند و تخلخل بزرگ تماس سطحی داربست را با سلول کم می‌کند و در نتیجه مقدار چسبندگی کاهش می‌یابد. براساس تحقیقات انجام شده حداقل اندازه تخلخل برای رشد استخوان ۷۵-۱۰۰ میکرومتر می‌باشد. اندازه تخلخل در محدوده ۱۰۰ تا ۳۵۰ میکرومتر برای بازسازی استخوان مناسب می‌باشد [۱۸]. پژوهشگران معتقدند که ساختار متخلخل با درصد تخلخل بالا و تخلخل‌های بهم پیوسته رشد بافت را تسریع می‌کند. طبق بررسی مقادیر بدست آمده نسبت وزنی PCL و PEG اثر قابل توجهی بر روی میزان تخلخل‌ها نداشته است. همچنین همه داربست‌ها تخلخل در حدود ۷۰ درصد دارند که جهت چسبندگی و رشد سلول مفید است.

در شکل ۵ تصویر SEM از سطح داربست 2PCLPEG به همراه نقشه توزیع نقطه‌ای اشعه ایکس مربوط به عناصر کلسیم (Ca) و فسفر (P) مشاهده می‌گردد. نقشه عنصری داربست 2PCLPEG نشان داد که کلسیم و فسفر به طور گسترده در ساختار حضور دارند و به طور یکنواختی در شبکه پراکنده شده‌اند. بنابراین، از آن جایی که کلسیم و فسفر از اجزای اصلی تشکیل دهنده هیدروکسی آپاتیت است، می‌توان استنباط نمود که ذرات هیدروکسی آپاتیت به طور یکنواخت و هموزن در ساختار پراکنده شده‌اند.

تعیین اندازه تخلخل‌ها و درصد تخلخل‌های موجود در داربست‌ها

برای اندازه‌گیری تخلخل‌های موجود در داربست‌ها قطر تخلخل‌ها اندازه‌گیری شد. مقادیر میانگین اندازه تخلخل‌های موجود در داربست‌ها با درصد‌های مختلف وزنی در جدول ۴ مشاهده می‌شود. همان‌گونه که در جدول



شکل ۵- الف- تصویر SEM از سطح داربست 2PCLPEG/HA به همراه نقشه توزیع نقطه‌ای پرتو ایکس عناصر ب- Ca و

ج- P

جدول ۴- اندازه و درصد تخلخل‌های موجود در داربست PCL/PEG در حضور و عدم حضور ذرات هیدروکسی آپاتیت

تخلخل (%)	اندازه تخلخل ها (μm)	کدگذاری نمونه ها
n=3	n=3	
۶۹/۱۲ ± ۰/۸۶	۰/۱۲۵ ± ۲۳/۰۰۵	1PCLPEG
۷۴/۳۴ ± ۰/۷۲	۱۱۳/۶۴ ± ۰/۲۱	3PEGPCL
۷۲/۶۷ ± ۰/۴۵	۱۲۸/۴۸ ± ۰/۴۱	2PCLPEG
۷۰/۱۷ ± ۰/۸۵	۱۲۶/۳۲ ± ۰/۵۶	1PCLPEG/HA
۷۴/۱۱ ± ۰/۴۹	۱۲۲/۵۵ ± ۰/۱۳	3PEGPCL/HA
۷۲/۵۴ ± ۰/۶۳	۱۲۹/۴۳ ± ۰/۴۸	2PCLPEG/HA

داربست پلیمری داشته است و باعث کاهش مدول فشاری می‌شود [۱۱].

مطابق مقادیر گزارش شده در جدول ۵ با افزودن ذرات هیدروکسی آپاتیت به داربست مدول فشاری افزایش داشته است و از ۰/۳۶ مگاپاسکال در داربست 3PEGPCL به ۰/۴۸ مگاپاسکال در داربست 3PEGPCL/HA رسیده است. همچنین در داربست 2PCLPEG نیز مدول فشاری از ۰/۹۶ مگاپاسکال به ۱/۲۲ مگاپاسکال در داربست 2PCLPEG/HA رسیده است و این مقادیر نشان دهنده آن است که حضور ذرات هیدروکسی آپاتیت در ساختار به عنوان پر کننده فیزیکی عمل می‌کنند و به ساختار پلیمری استحکام می‌بخشند. توزیع فاز معدنی در زمینه پلیمری، باعث افزایش مدول فشاری می‌شود. تحقیقات متعددی بهبود خواص مکانیکی را با افزودن هیدروکسی آپاتیت در ساختار نشان داده است [۱۹].

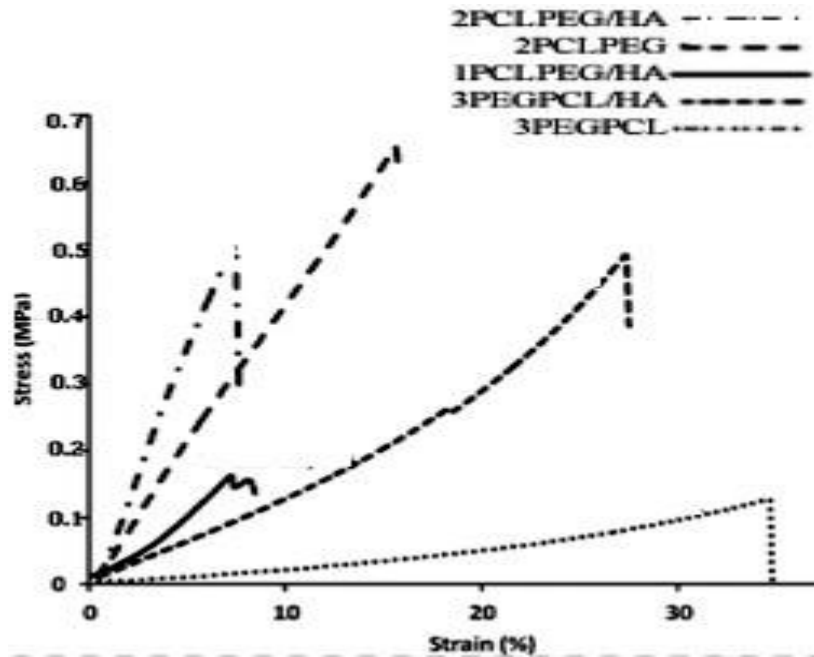
در داربستی مشابه داربست تولید شده با افزودن ذرات HA به شبکه‌های هیدروژلی PEG/PCL مدول فشاری داربست به صورت معناداری افزایش یافت [۱۱].

بررسی خواص مکانیکی داربست‌ها

در شکل ۶ نمودار تنش و کرنش حاصل از آزمون فشاری داربست‌های PCL/PEG با درصد‌های وزنی مختلف در حالت تر مشاهده می‌شود. مدول فشاری داربست‌ها از طریق محاسبه شیب ناحیه خطی منحنی تنش - کرنش حاصل و نتایج در جدول ۵ گزارش شد.

همان‌گونه که در جدول ۵ مشاهده می‌شود، مدول فشاری داربست 3PEGPCL در حدود ۰/۳ مگاپاسکال است و مدول فشاری داربست 2PCLPEG در حدود ۰/۹۶ مگاپاسکال است که علت این امر، حضور مقدار بیش‌تر PEG در داربست 3PEGPCL می‌باشد و کاهش مدول فشاری با افزایش مقدار PEG در ساختار مشاهده شده است.

با توجه به نتایج گزارش شده، با افزایش مقدار PEG میزان تورم ساختار بالا رفته است و حضور بیش‌تر مولکول‌های آب در ساختار دلیل دیگری برای کاهش مدول فشاری می‌باشد. از طرفی دکنتر کوپایی و همکارانش گزارش کرده‌اند با افزایش مقدار PEG درجه بلورینگی PCL نیز کاهش یافته و درجه بلورینگی نقش مهمی بروی خواص مکانیکی



شکل ۶- نمودار تنش- کرنش داربست های سنتز شده با درصد های وزنی مختلف در حضور و عدم حضور ذرات هیدروکسی آپاتیت

جدول ۵- مدول یانگ داربست های سنتز شده در حضور و عدم حضور ذرات هیدروکسی آپاتیت

مدول فشاری (MPa)	کد گذاری نمونه ها
$n = 3$ 0.36 ± 0.12	3PEGPCL
0.48 ± 0.34	3PEGPCL/HA
0.96 ± 0.32	2PCLPEG
0.65 ± 0.15	1PCLPEG/HA
0.1 ± 0.22	2PCLPEG/HA
-	1PCLPEG

نتیجه گیری

ذرات کلرید سدیم به عنوان تخلخل زا و ذرات هیدروکسی آپاتیت به عنوان فاز معدنی ساختار ساخته شد و با خروج ذرات کلرید سدیم داربستی با درصد تخلخل حدود ۷۰ درصد ایجاد شد. بررسی آزمون تورمی شبکه های هیدروژلی مشخص نمود که با افزایش پلی اتیلن گلیکول در شبکه های هیدروژلی درصد تورم آنها افزایش یافت که می توان

نتایج به دست آمده از این تحقیق را می توان به صورت کلی این گونه بیان کرد که شبکه هیدروژلی PCL/PEG از طریق برقراری اتصال عرضی پلی گلیکول در ساختار و قرار گرفتن رشته های PCL در مابین اتصالات عرضی و با ورود

عرضی در شبکه به‌وجود نمی‌آورند. نتایج خواص مکانیکی داربست‌ها نشان داد که با افزایش مقدار PEG و کاهش مقدار PCL در داربست‌ها مدول فشاری داربست‌ها کاهش یافت. با افزودن ذرات HA در داربست‌ها مدول فشاری افزایش یافت. با توجه به نتایج حاصله از بین داربست‌های مورد بررسی، داربست 2PCLPEG/HA استحکام بیش‌تر و خواص مکانیکی بهتری نسبت به دیگر داربست‌ها دارد و می‌تواند به عنوان داربست بهینه در نظر گرفته شود و برای استفاده در مهندسی بافت استخوان بیش‌تر بررسی شود.

References:

- 1- W.Hutmacher, "Bone tissue ",National university of Singapore,The best paper biomaterials,PP.45-52,2014.
- 2- S.Varghese,J.H . Elisseff,," Hydrogels for musculoskeletal tissue engineering", Medicine, Springer, Berlin/Heidelberg, Germany pp. 95–144,2006.
- 3- L. Rummler,R. Gupta , " PeripHeral nerve repair: a review. Current Opinion in Orthopaedics", PP.215-9,2004.
- 4- R. Langer , " Biodegradable polymer scaffolds for tissue engineering", Nat Biotechnol, PP.234-239,2003.
- 5- M. Khandaker,A. Orock, S.Tarantini,J. White, O.Yasar," Biomechanical performances of networked polyethylene glycol diacrylate effect of photoinitiator concentration, temperature, and incubation time",Int. J. Biomater,PP.563-570,2016.
- 6- SH. Zhi fu ,X. Wang,G.Guo,"Preparation and characterization of nano HA/PCL/PEG Composite", state key laboratory of Biotherapy West china,PP.13-15,2010.

دلیل آن را آبدوستی این پلیمر دانست. درصد تورم همه هیدروژل‌های سنتز شده با وارد کردن ذرات هیدروکسی آپاتیت به ساختار کاهش یافت. این موضوع نشان می‌دهد که قرار گرفتن ذرات هیدروکسی آپاتیت در ساختار، باعث می‌شود فضا برای قرار گرفتن مولکول‌های آب کم‌تر شود و بنابراین جذب آب کمتری صورت می‌گیرد. نتایج آزمون کسر زل مشخص نمود که درصد کسر زل کلیه هیدروژل‌ها نزدیک به هم می‌باشد و تفاوت چندانی ندارند و این نشان می‌دهد که ذرات هیدروکسی آپاتیت مانعی برای اتصالات

7- R. Rubin , "Biology of bone and how it orchestrates the form and function of the skeleton", PP. 86-95,2001.

8- L. Danie, S. Kohane,R. Langer,"Polymeric Biomaterials in tissue engineering",PP.189-195,2008.

9- N.Garcia, R.Giralt, R.Izquierdo,X.Nogues,"A porous PCL scaffold",university Autonoma Barcelona,PP.310-320,2007.

10- H.Joon Sung,C. Meredith,"The effect of scaffold degradation",University Emory, PP.29-47,2004.

11- N. Koupaei , A. Karkhaneh , M. Daliri Joupari, "Preparation of PCL/PEG/HA as bone tissue scaffolds",Journal of Biomedical Materials,Part A ,Tehran Polytechnic,Iran, PP.103-115,2015.

12- Y. Choi, E.Subramanyam, M.Huh , "Synthesis and characterization of biodegradable elastic hydrogels based on poly(ethylene glycol) and poly(ϵ -caprolactone) blocks",PP. 363–369,2007.

13- H. Wu, Y. Wan, S. Dalai, "Response of rat osteoblasts to polycaprolactone/chitosan blend porous scaffolds",PP. 238–245,2010.

- 14- S.U. Maheshwari, "Fabrication and evaluation of (PVA/HAp/PCL) bilayer composites as potential scaffolds for bone tissue regeneration application", PP. 8469-8477, 2014.
- 15- M. Parvinzadeh Gashti, F. Alimohammadi, "Microscopic methods to study the structure of scaffold in bone tissue", Islamic Azad University South Tehran, Iran, PP.567-573, 2013.
- 16- H. Mo yin, J. Qian, J. Zhang, "poly(lactic acid) scaffolds with pcl", collage of polymer Science and engineering, PP.2866-2875, 2016.
- 17- I. subuki, R.w. sharudin, "Morphology composite of PCL/HA", Malasia, PP.398-412, 2017.
- 18- J. Yasu, D. Watso, "engineering, Fabrication of 3D printed pcl/PEG scaffold for bone tissue", Journal of Bionic, PP.1278-1286, 2018.
- 19- D. Ronca, F. Langella, "PCL-based nanocomposite scaffold with tailored properties", PP.675-680, 2016.

