

بِسْمِ اللَّهِ الرَّحْمَنِ الرَّحِيمِ



دانشکده مهندسی شیمی و مواد

پایان نامه کارشناسی ارشد مهندسی مواد مرکب

ساخت داربست کامپوزیتی پلی کاپرولاکتون / نانوهیدروکسی آپاتیت / اکسید نقره به روش
خشک کردن انجمادی

نگارنده: غزاله سلمانیان

استاد راهنما:

دکتر آرش یزدانی

استاد مشاور:

دکتر اسماعیل سلیمی

بهمن ۹۷

شماره: ۹۷/۲۵
تاریخ: ۹۷/۱۲/۱۱

باسمه تعالی



مدیریت تحصیلات تکمیلی

فرم شماره (۳) صورتجلسه نهایی دفاع از پایان نامه دوره کارشناسی ارشد

با نام و یاد خداوند متعال، ارزیابی جلسه دفاع از پایان نامه کارشناسی ارشد خانم غزاله سلمانیان با شماره دانشجویی ۹۵۰۸۰۶۴ رشته مهندسی مواد گرایش کامپوزیت تحت عنوان ساخت داریست کامپوزیتی پلی کاپرولاکتون/ نانوهیدروکسی آپاتیت/ اکسید نقره به روش خشک کردن انجمادی که در تاریخ ۱۳۹۷/۱۱/۹ با حضور هیأت محترم داوران در دانشگاه صنعتی شاهرود برگزار گردید به شرح ذیل اعلام می گردد:

قبول (با درجه: خوب) ☒ مردود ☐ نوع تحقیق: نظری ☐ عملی ☒			
عضو هیأت داوران	نام و نام خانوادگی	مرتبه علمی	امضاء
۱- استاد راهنمای اول	دکتر آرش یزدانی	استادیار	
۲- استاد راهنمای دوم	-	-	-
۳- استاد مشاور	دکتر اسماعیل سلیمی	استادیار	نایب
۴- نماینده تحصیلات تکمیلی	دکتر ماشالله رضا کاظمی	استادیار	
۵- استاد ممتحن اول	دکتر مجید محمدی	استادیار	
۶- استاد ممتحن دوم	دکتر محمد جعفر مولایی	استادیار	



نام و نام خانوادگی رئیس دانشکده:

تاریخ و امضاء و مهر دانشکده:

۹۷/۱۲/۱۱

توضیح: در صورتی که کسی مردود شود حداکثر یکبار دیگر (در مدت مجاز تحصیل) می تواند از پایان نامه خود دفاع نماید (دفاع مجدد نباید زودتر از ۴ ماه برگزار شود).

تقدیم بہ:

پدر و مادر عزیزم

کہ بادعای خیرشان و کماک بی مستشان، ہمارہ پشوانہ می تمام دوران زندگی ام بودہ اند.

تشکر و قدردانی

تشکر و سپاس بی پایان مخصوص خدایی است که بشر را آفریده و به او قدرت اندیشیدن داده و توانایی های بالقوه را در وجود انسان قرار داده و او را امر به تلاش و کوشش نموده و راهنمایی را برای هدایت بشر فرستاده است.

پس از ارادت خاضعانه به درگاه خداوند بی همتا لازم است از پدر و مادر عزیزم به خاطر زحمات بی دریغشان تشکر کنم.

از استاد راهنمای محترم جناب آقای دکتر آرش یزدانی و استاد مشاور جناب آقای دکتر اسماعیل سلیمی به خاطر راهنمایی های ایشان در این تحقیق تشکر و قدردانی می کنم.

تعهد نامه

اینجانب غزاله سلمانیان دانشجوی دوره کارشناسی ارشد رشته مهندسی مواد مرکب دانشکده مهندسی شیمی و مواد دانشگاه صنعتی شاهرود نویسنده پایان نامه « ساخت داربست کامپوزیتی پلی کاپرولاکتون/نانوهیدروکسی آپاتیت/اکسید نقره به روش خشک کردن انجمادی» تحت راهنمایی جناب آقای دکتر آرش یزدانی متعهد می شوم:

- تحقیقات در این پایان نامه توسط اینجانب انجام شده است و از صحت و اصالت برخوردار است .
- در استفاده از نتایج پژوهشهای محققان دیگر به مرجع مورد استفاده استناد شده است .
- مطالب مندرج در پایان نامه تاکنون توسط خود یا فرد دیگری برای دریافت هیچ نوع مدرک یا امتیازی در هیچ جا ارائه نشده است .
- کلیه حقوق معنوی این اثر متعلق به دانشگاه صنعتی شاهرود می باشد و مقالات مستخرج با نام « دانشگاه صنعتی شاهرود » و یا « **Shahrood University of Technology** » به چاپ خواهد رسید .
- حقوق معنوی تمام افرادی که در به دست آمدن نتایج اصلی پایان نامه تأثیرگذار بوده اند در مقالات مستخرج از پایان نامه رعایت می گردد.
- در کلیه مراحل انجام این پایان نامه ، در مواردی که از موجود زنده (یا بافتهای آنها) استفاده شده است ضوابط و اصول اخلاقی رعایت شده است .
- در کلیه مراحل انجام این پایان نامه، در مواردی که به حوزه اطلاعات شخصی افراد دسترسی یافته یا استفاده شده است اصل رازداری ، ضوابط و اصول اخلاق انسانی رعایت شده است .

تاریخ

امضای دانشجو

مالکیت نتایج و حق نشر

- کلیه حقوق معنوی این اثر و محصولات آن (مقالات مستخرج ، کتاب ، برنامه های رایانه ای ، نرم افزار ها و تجهیزات ساخته شده است) متعلق به دانشگاه صنعتی شاهرود می باشد . این مطلب باید به نحو مقتضی در تولیدات علمی مربوطه ذکر شود .
- استفاده از اطلاعات و نتایج موجود در پایان نامه بدون ذکر مرجع مجاز نمی باشد.

چکیده

با توجه به ساختار نانوکامپوزیتی زمینه‌ی استخوان، تولید داربست‌های کامپوزیتی پلیمر-سرامیکی به عنوان جایگزین پیوند استخوان، توجه بسیاری به خود جلب کرده است. اخیراً در مهندسی بافت استخوان، استفاده از پلی‌کاپرولاکتون به دلیل زیست‌سازگاری و زیست تخریب‌پذیری مناسب و نانوذرات هیدروکسی‌آپاتیت، که جزء اصلی استخوان طبیعی است، بسیار مورد توجه قرار گرفته است. همچنین خواص آنتی‌باکتریال نقره نیز شناخته شده است. در این پژوهش داربست کامپوزیتی پلی‌کاپرولاکتون/نانوهیدروکسی‌آپاتیت/اکسید نقره با درصدهای مختلف مواد اولیه به روش خشک کردن انجمادی تهیه شد و سپس مورد ارزیابی قرار گرفت. مورفولوژی داربست‌ها توسط میکروسکوپ الکترونی روبشی (SEM)، بررسی فازهای موجود در داربست‌ها با آنالیز پراش پرتو ایکس (XRD)، بررسی پیوندهای شیمیایی و گروه‌های عاملی با طیف‌سنجی تبدیل فوریه مادون قرمز (FTIR) و آزمون مکانیکی برای بررسی استحکام فشاری انجام گرفت. همچنین زیست‌فعالی داربست‌ها با غوطه‌وری نمونه‌ها در محلول شبیه‌ساز بدن به مدت ۱۴ روز در شرایط آزمایشگاهی از لحاظ تشکیل لایه‌های آپاتیتی روی سطح نمونه‌ها مورد بررسی قرار گرفت. به منظور شناسایی عناصر موجود در داربست‌های تولید شده به روش خشک کردن انجمادی نیز از آشکارساز EDX استفاده شد. نتایج حاکی از آن بود که داربست‌های تولید شده به روش خشک کردن انجمادی دارای تخلخل‌های به هم پیوسته با اندازه تخلخل‌های میانگین حدود $114-135 \mu m$ بودند که جهت اتصال و رشد سلول‌های استخوانی مناسب هستند. همچنین می‌توان گفت ذرات نانو هیدروکسی‌آپاتیت و اکسید نقره در ساختار پلیمر پراکنده شده‌اند، ضمن آنکه افزایش مقادیر این دو ماده منجر به افزایش استحکام فشاری داربست‌ها و کاهش درصد تخلخل از ۸۱٪ برای پلی‌کاپرولاکتون خالص به ۷۳٪ برای داربست حاوی ۲۰٪ هیدروکسی‌آپاتیت و ۶٪ اکسید نقره، شده است. تشکیل لایه‌ی آپاتیت روی سطح نمونه‌ها نیز گواه بر زیست‌فعالی داربست است که با افزایش درصد وزنی نانو هیدروکسی‌آپاتیت در ارتباط مستقیم است. براین اساس می‌توان گفت ساخت داربست کامپوزیتی پلی‌کاپرولاکتون/نانو هیدروکسی‌آپاتیت/اکسید نقره به منظور کاربرد در مهندسی بافت استخوان و ترمیم عیوب استخوانی مناسب است.

کلید واژه‌ها: مهندسی بافت استخوان، خشک کردن انجمادی، هیدروکسی‌آپاتیت، زیست فعال

فهرست مطالب

فصل اول.....	۱
مقدمه.....	۱
۱-۱- تاریخچه ی مهندسی بافت.....	۲
۲-۱- اهمیت داربست‌های استخوانی.....	۴
۳-۱- پیشرفت جایگزین‌های پیوند استخوان.....	۶
فصل دوم.....	۱۱
تئوری و مروری بر پژوهش‌های پیشین.....	۱۱
۱-۲- داربست‌های مهندسی بافت.....	۱۲
۲-۲- فیزیولوژی استخوان و ترمیم آن.....	۱۳
۳-۲- مواد زیست فعال.....	۱۷
۴-۲- مواد قابل استفاده در ساخت داربست‌ها.....	۲۰
۱-۴-۲- پلیمرهای طبیعی.....	۲۰
۲-۱-۴-۲- کلاژن (ژلاتین).....	۲۱
۲-۱-۴-۲- آلبومین.....	۲۲
۳-۱-۴-۲- فیبرین.....	۲۲
۴-۱-۴-۲- پلی‌ساکاریدها.....	۲۲
۵-۱-۴-۲- هیالورونیک اسید.....	۲۳
۶-۱-۴-۲- کیتوسان.....	۲۳
۷-۱-۴-۲- آلژینات.....	۲۴
۸-۱-۴-۲- ابریشم.....	۲۴
۲-۴-۲- پلیمرهای مصنوعی.....	۲۴
۱-۲-۴-۲- پلی‌استرهای آلیفاتیک اشباع (PLA، PGA و PCL).....	۲۵

۲۶	 پلی گلیکولیک اسید
۲۶	 پلی لاکتیک اسید
۲۷	 پلی کاپرولاکتون
۲۸	 کلسیم فسفات ها و سایر سرامیک ها
۲۹	 تری کلسیم فسفات
۳۰	 هیدروکسی آپاتیت
۳۱	 بیوگلاس
۳۲	 فلزات
۳۳	 کامپوزیت ها
۳۳	 پلیمر / سرامیک ها
۳۴	 سرامیک / فلزات
۳۴	 پلیمر / فلزات
۳۵	 یون های فلزی و خواص درمانی آن ها در مهندسی بافت
۳۸	 روش های ساخت داربست
۳۸	 روش خود تجمعی
۳۹	 روش اتصال رشته ای
۴۰	 روش گاز کف
۴۱	 روش سل - ژل
۴۱	 روش حرارتی ناشی از جداسازی فاز
۴۲	 روش الکتروریسی
۴۳	 روش خشک کردن انجمادی
۴۴	 روش های ساخت سریع
۴۴	 روش استریولیتوگرافی

۴۵	۲-۸-۵-۲- روش مدل سازی جوش خوردگی رسوبی.....
۴۵	۲-۸-۵-۳- روش تف جوشی با لیزر انتخابی.....
۴۶	۲-۸-۴- روش پرینت سه بعدی.....
۴۷	۲-۶- مزایا و معایب روش های ساخت داربست ها.....
۴۷	۲-۷- مروری بر پژوهش های پیشین.....
۶۱	فصل سوم.....
۶۱	مواد و روش ها.....
۶۲	۳-۱- مقدمه.....
۶۲	۳-۱- مواد اولیه برای ساخت داربست.....
۶۲	۳-۱-۱ پلی کاپرولاکتون.....
۶۳	۳-۱-۲ نانو هیدروکسی آپاتیت.....
۶۴	۳-۱-۳ اکسید نقره.....
۶۵	۳-۱-۴ اسید استیک.....
۶۵	۳-۲- روش تولید داربست پلی کاپرولاکتون / نانو هیدروکسی آپاتیت / اکسید نقره.....
۶۷	۳-۳- محلول سازی.....
۶۸	۳-۴- خشک کردن انجمادی.....
۶۹	۳-۵- ارزیابی و مشخصه یابی داربست ها.....
۷۰	۳-۵-۱- میکروسکوپ الکترونی روبشی (SEM).....
۷۰	۳-۵-۲- آزمون استحکام فشاری.....
۷۰	۳-۵-۳- آزمون طیف سنجی تبدیل فوریه مادون قرمز (FTIR).....
۷۰	۳-۵-۴- آزمون پراش پرتو ایکس (XRD).....
۷۱	۳-۵-۵- آزمون زیست فعالی.....
۷۱	۳-۵-۶- تخلخل سنجی.....

فصل چهارم.....	۷۳
نتایج و بحث.....	۷۳
۴-۱- مقدمه.....	۷۴
۴-۲- نتایج آزمون‌ها.....	۷۴
۴-۱-۱- آزمون طیف‌سنجی تبدیل فوریه مادون قرمز (FTIR).....	۷۴
۴-۱-۲- آزمون پراش پرتو ایکس (XRD).....	۷۹
۴-۲-۳- تخلخل سنجی.....	۸۳
۴-۱-۴- نتایج آزمون میکروسکوپ الکترونی روبشی (SEM).....	۸۵
۴-۱-۵- آزمون زیست‌فعالی.....	۹۳
۴-۱-۶- آزمون استحکام فشاری.....	۱۰۴
فصل پنجم.....	۱۰۹
نتیجه‌گیری و پیشنهادها.....	۱۰۹
۵-۱- نتیجه‌گیری.....	۱۱۰
۵-۲- پیشنهادات.....	۱۱۲
منابع.....	۱۱۳

فهرست اشکال

- شکل ۱-۲- استخوان اسفنجی و استخوان متراکم..... ۱۴
- شکل ۲-۲- مراحل ترمیم استخوان شکسته..... ۱۶
- شکل ۳-۲- شماتیک مهندسی بافت استخوان..... ۱۹
- شکل ۴-۲- تصویر داربست سرامیکی ایمپلنت شده در استخوان ران خرگوش..... ۲۰
- شکل ۵-۲- ساختار پلی استرهای آلیفاتیک..... ۲۵
- شکل ۶-۲- روتور برای تجمع نانوالیاف در روش خود تجمعی..... ۳۹
- شکل ۷-۲- روند ساخت داربست به روش گازکف..... ۴۰
- شکل ۸-۲- تصویر شماتیک روش الکتروریسی..... ۴۳
- شکل ۹-۲- شکل شماتیک از سیستم استریولیتوگرافی..... ۴۴
- شکل ۱۰-۲- شکل شماتیک از روش مدل سازی جوش خوردگی رسوبی..... ۴۵
- شکل ۱۱-۲- شکل شماتیک از روش تف جوشی با لیزر انتخابی..... ۴۶
- شکل ۱۲-۲- شکل شماتیک از فرآیند پرینت سه بعدی..... ۴۶
- شکل ۱-۳- دانه های پلی کاپرولاکتون..... ۶۳
- شکل ۲-۳- پودر نانو هیدروکسی آپاتیت..... ۶۴
- شکل ۳-۳- پودر اکسید نقره..... ۶۴
- شکل ۴-۳- دستگاه خشک کن انجمادی..... ۶۹
- شکل ۵-۳- داربست های تهیه شده به روش خشک کردن انجمادی..... ۶۹
- شکل ۱-۴- تصاویر میکروسکوپ الکترونی روبشی مربوط به نمونه WA..... ۸۶
- شکل ۲-۴- تصاویر میکروسکوپ الکترونی روبشی مربوط به نمونه WD..... ۸۷
- شکل ۳-۴- تصاویر میکروسکوپ الکترونی روبشی مربوط به نمونه WE..... ۸۸
- شکل ۴-۴- تصاویر میکروسکوپ الکترونی روبشی مربوط به نمونه XD..... ۸۹
- شکل ۵-۴- تصاویر میکروسکوپ الکترونی روبشی مربوط به نمونه XE..... ۹۰

- شکل ۴-۶- تصاویر میکروسکوپ الکترونی روبشی مربوط به نمونه YD ۹۱
- شکل ۴-۷- تصاویر میکروسکوپ الکترونی روبشی مربوط به نمونه YE ۹۲
- شکل ۴-۸- تصاویر میکروسکوپ الکترونی روبشی ۹۵
- شکل ۴-۹- تصاویر میکروسکوپ الکترونی روبشی ۹۷
- شکل ۴-۱۰- تصاویر میکروسکوپ الکترونی روبشی ۹۸
- شکل ۴-۱۱- تصاویر میکروسکوپ الکترونی روبشی ۹۹
- شکل ۴-۱۲- تصاویر میکروسکوپ الکترونی روبشی ۱۰۰
- شکل ۴-۱۳- تصاویر میکروسکوپ الکترونی روبشی ۱۰۱
- شکل ۴-۱۴- تصاویر میکروسکوپ الکترونی روبشی ۱۰۲

فهرست نمودارها و جداول

جدول ۱-۲- خواص مکانیکی استخوان اسفنجی و استخوان متراکم.....	۱۵
جدول ۲-۲- خلاصه‌ای از عملکرد و تأثیر زیستی یون‌های فلزی در مهندسی بافت.....	۳۷
جدول ۱-۳- خواص فیزیکی پلی‌کاپرولاکتون.....	۶۲
جدول ۲-۳- خواص فیزیکی هیدروکسی‌آپاتیت.....	۶۳
جدول ۳-۳- خواص فیزیکی اکسید نقره.....	۶۴
جدول ۴-۳- خواص فیزیکی اسید استیک.....	۶۵
جدول ۵-۳- جدول طراحی آزمون.....	۶۶
جدول ۱-۴- پیوندهای موجود در نمونه‌ی WA.....	۷۵
نمودار ۱-۴- طیف‌سنجی تبدیل فوریه مادون‌قرمز نمونه‌ی WA.....	۷۶
نمودار ۲-۴- طیف‌سنجی تبدیل فوریه مادون‌قرمز نمونه‌ی WE.....	۷۷
نمودار ۳-۴- طیف‌سنجی تبدیل فوریه مادون‌قرمز نمونه‌ی YE.....	۷۸
نمودار ۴-۴- پراش پرتو ایکس نمونه‌ی WA.....	۷۹
نمودار ۵-۴- پراش پرتو ایکس نمونه‌ی WD.....	۸۰
نمودار ۶-۴- پراش پرتو ایکس نمونه‌ی WE.....	۸۱
نمودار ۷-۴- پراش پرتو ایکس نمونه‌ی XD.....	۸۱
نمودار ۸-۴- پراش پرتو ایکس نمونه‌ی XE.....	۸۲
نمودار ۹-۴- پراش پرتو ایکس نمونه‌ی YD.....	۸۳
نمودار ۱۰-۴- پراش پرتو ایکس نمونه‌ی YE.....	۸۳
جدول ۲-۴- درصد تخلخل داربست‌ها به روش ارشمیدس.....	۸۴
جدول ۳-۴- غلظت یون‌های موجود در محلول شبیه‌سازی شده بدن.....	۹۴
جدول ۴-۴- نتایج آنالیز عنصری داربست XD.....	۱۰۳
نمودار ۱۱-۴- نمودار آنالیز عنصری داربست XD.....	۱۰۴

جدول ۴-۵- استحکام فشاری داریست‌ها..... ۱۰۵

نمودار ۴-۱۲- نمودار تنش- کرنش داریست‌ها..... ۱۰۶

فصل اول

مقدمه

۱-۱- تاریخچه‌ی مهندسی بافت

شاید در چند دهه‌ی گذشته اهدای اعضای بدن از شخصی به شخص دیگر غیر قابل تصور و دور از ذهن بود ولی عملی شدن این نظریه، نخستین پیشرفتی بود که در زمینه‌ی علم پزشکی و درمان نارسایی‌ها اعضای بدن به «مهندسی بافت» انجامید. پس از سال‌ها مطالعه و آزمایش‌های فراوان، سرانجام در سال ۱۹۵۴ دکتر جوزف موری در بیمارستان بوستون در طی یک عمل جراحی، کلیه‌ای از بدن یک برادر به برادر دوقلوی او پیوند زد. این عمل جراحی که دکتر موری را موفق به کسب جایزه‌ی نوبل کرد، منجر به پدید آمدن مجموعه‌ای از روش‌های درمانی جدید شد که در نهایت مهندسی بافت را پدید آورد. با مطالعه‌ی روش‌های کنترل پاسخ سیستم ایمنی بدن، بهبود روش‌های جراحی و بیهوشی در دهه‌ی هفتاد میلادی، جراحی‌های پیوند عضو به اوج خود رسید [۱].

گسترش عمل‌های جراحی پیوند عضو، مشکلات جدیدی را نیز به همراه داشت که بزرگ‌ترین آن‌ها کمبود اعضای قابل پیوند بود. روش‌هایی به‌عنوان روش جایگزین برای حل این مشکل پیشنهاد شد؛ مانند استفاده از اعضای بدن حیوانات، استفاده از کاشتنی‌های مصنوعی و همچنین بهبود روش‌های جراحی به منظور استفاده‌ی بهینه از اعضای اهدا شده و ... ولی باوجود تمام این اقدامات، نیاز افراد به پیوند عضو خیلی بیشتر از تعداد اعضای موجود برای اهدا بود. در سال ۱۹۸۵ برای اولین بار مقاله‌ای علمی توسط پزشکی به نام پل راسل^۱ منتشر شد که در آن فرآیند انتقال سلول‌های آیسلت^۲ جدا شده از یک شخص به شخص دیگر را مطرح کرد، که در این فرآیند عضو مذکور از بدن شخص خارج نمی‌شد. این روش نیز مشکلاتی به همراه داشت از جمله آن‌که سلول‌ها به دلیل نداشتن یک ساختار اولیه و یا یک بستر، نمی‌توانستند روند رشد خود را شروع کنند و در نتیجه سلول‌ها معلق بودند. همچنین محدودیت دیگر؛ حجم بافتی بود که می‌توانست

^۱ Paul Russell

^۲ Islet

به‌طور موفقیت‌آمیز در بدن کاشته شود؛ به این معنی که سلول‌ها نمی‌توانند در فاصله‌ی بیش از چند میکرون از شبکه‌های مویرگی زنده بمانند زیرا امکان مبادله‌ی مواد غذایی و همچنین ضایعات حاصل از سوخت‌وساز سلولی، وجود نداشت. از این رو برای حل چنین مشکلاتی، نخستین آزمایشگاه مهندسی بافت، در بیمارستان کودکان بوستون توسط رابرت لانگر^۱ و با همراهی جوزف وِکنتی^۲، تأسیس شد [۱].

لانگر و وِکنتی در سال ۱۹۹۳ مهندسی بافت را به این صورت تعریف نمودند: «مهندسی بافت نقطه‌ی اشتراک اصول کاربردی مهندسی و علوم زیستی است که با هدف ایجاد جایگزین‌های بیولوژیکی که امکان بازیابی، حفظ و بهبود عملکرد بافت یا عضو آسیب‌دیده را داشته باشند مورد استفاده قرار می‌گیرند». مهندسی بافت یک علم چند وجهی است که بیولوژی سلولی، مهندسی و علم مواد و فنون جراحی را در کنار هم قرار داده است تا با استفاده از سلول‌های زنده و داربستی که می‌تواند طبیعی، مصنوعی و یا ترکیبی از این‌ها باشد بافت جدید را به وجود بیاورد. با وجود این که بیش از سه دهه از تعریف مهندسی بافت نمی‌گذرد، این حوزه هنوز در حال رشد و گسترش است. در چنین مرحله‌ای، مهندسی بافت نیز مانند هر عنوان علمی دیگر، بخش بزرگی از پیشرفت‌های حاصل را مدیون تعریف اصول و در راستای تکمیل مدل‌ها و توصیف اصول رشد سلولی بوده است. سه استراتژی برای رشد بافت جدید مطرح است:

۱- قرار دادن سلول‌های منفرد و جایگزین که به‌منظور عملکرد صحیح بافت لازم هستند، به‌صورت تنها؛ مانند تزریق محلولی حاوی سلول‌های بنیادی به عضله‌ی قلب ضعیف و یا منتقل کردن چند سلول آیسلت لوزالمعده از شخصی به شخص دیگر

۲- انتقال ترکیب القاء‌کننده‌ی رشد بافت‌های خاص. مانند انواع فاکتورهای رشد و مولکول‌های سیگنال

دهنده

¹ Robert Langer

² Joseph Vacanti

۳- قرار دادن سلول‌ها در داخل یا روی داربستی ساخته شده از پلیمرهای مصنوعی یا ترکیبات طبیعی مانند کلاژن [۱]

۱-۲- اهمیت داربست‌های استخوانی

آسیب‌های استخوانی عموماً تأثیر بسزایی در کیفیت زندگی بیمار دارند و در نتیجه درمان‌های مربوط به استخوان و هزینه‌ی آن‌ها روزبه‌روز در حال افزایش است. علاوه بر این، به دلیل امید به زندگی بالا و جمعیت رو به پیری جهان، بیماری‌های اسکلتی-عضلانی مثل شکستگی‌ها، کمردرد، کژپشتی^۱، پوکی استخوان، عفونت استخوان و تومور، نقص مادرزادی و آسیب‌های دهان و فک و صورت، به سرعت در حال افزایش است [۲]. پیوند استخوان به منظور تقویت یا تحریک کردن تشکیل بافت استخوانی جدید در مواردی از جمله ترمیم شکستگی‌های استخوانی یا بین دو استخوان در مفصل آسیب‌دیده، جایگزینی و بازسازی استخوان آسیب‌دیده در اثر آسیب‌های مختلف ذکر شده و یا بهبود واکنش استخوان‌سازی در اطراف ایمپلنت‌های کاشته شده طی جراحی‌های مختلف مانند جایگزینی مفصل‌های مصنوعی یا صفحات شکسته‌بندی، استفاده می‌شود. ساختار دینامیک استخوان خاصیت بازسازی مجدد قابل توجهی دارد. با این حال، نواقص پیچیده‌تر و بزرگ‌تری که در استخوان ایجاد می‌شود روند بهبودی کندتری دارد که این امر باعث شده تا ابزار و درمان‌های اضافی برای بازسازی استخوان نیاز شود. هر سال در سراسر جهان بیش از ۲/۲ میلیون پیوند استخوان انجام می‌شود. سه شیوه‌ی اصلی پیوند استخوان شامل پیوند آتوگرفت^۲ (پیوند از خود شخص بیمار)، پیوند آلوگرفت^۳ (پیوند از شخص اهدا کننده) و جایگزین‌های دیگر مانند پیوند از حیوانات^۴، است.

^۱ Scoliosis

^۲ Autograft

^۳ Allograft

^۴ Xenograft

ظرفیت بازسازی استخوان این پیوندها از طریق توانایی استخوان سازی، رسانش استخوانی و القای استخوانی سنجیده می شود [۳].

توانایی استخوان سازی یک پیوند استخوانی، توسط سلول هایی که در تشکیل استخوان نقش دارند همانند سلول های بنیادی مزانشیمی^۱، استئوبلاست ها^۲ و استئوسیت ها^۳ مشخص می شود. رسانش استخوانی مربوط به داربست یا زمینه ای است که سلول های استخوانی را برای رشد روی سطح آن تحریک می کند. ظرفیت القای استخوانی می تواند مهم ترین ویژگی در بهبودی استخوان باشد زیرا سلول های مزانشیمی را تحریک می کند تا به پری استئوبلاست^۴ تمایز پیدا کنند و روند تشکیل استخوان شروع شود. از بین انواع مختلف پیوند استخوان، پیوند آتوگرفت رایج تر است، که در این پیوند بافت استخوان از یک ناحیه بدن به ناحیه دیگر از بدن همان شخص (شخص نیازمند به پیوند) پیوند داده می شود. معمولاً برای پیوند از استخوان ستیغ خاصه^۵ استفاده می شود، ولی می توان از استخوان دیستال ران^۶ و پروگزیمال درشت نی^۷ نیز استفاده کرد. این روش به عنوان استاندارد پیوند استخوان انتخاب شده است زیرا علاوه بر داشتن سلول های استخوان ساز، زمینه خارج سلولی معدنی شده را نیز دارا است که می تواند منجر به رشد و تکثیر سلول ها شود. با این حال، استفاده از این روش به دلیل مشکلاتی از جمله درد، عفونت ها، جای زخم، از دست رفتن خون و عوارض جانبی در ناحیه ای که بافت از آن برداشته شده، محدود شده است [۳].

جایگزین دیگر، پیوند آلوگرفت است که در آن بافت استخوان از جسد یا اهدا کننده زنده دریافت می شود. مزیت پیوند آلوگرفت نسبت به آتوگرفت این است که منجر به درد مضاعف برای بیمار نمی شود و محدودیتی

¹ Mesenchymal stem cells (MSCs)

² osteoblasts

³ osteocytes

⁴ preosteoblasts

⁵ Iliac crest

⁶ Distal femur

⁷ Proximal tibia

از نظر تأمین بافت و اهدا کننده وجود ندارد. با این حال ظرفیت استخوان سازی آتوگرفت بیشتر است و همچنین ریسک عفونت و رد پیوند توسط سیستم ایمنی بدن در آلوگرفت وجود دارد. اگرچه هردو روش پیوند استخوان به طور گسترده استفاده می شوند، اما محدودیت های آن ها، جستجو برای جایگزین دیگر پیوند بافت استخوان را مطرح کرده است. این نوع پیوند استخوان بر پایه ی مفهوم مهندسی بافت استخوان است که بر بهبود استخوان سازی، رسانش استخوانی و القای استخوان سازی، از طریق ترکیب سلول های پیشرو استخوانی و فاکتورهای رشد برای تحریک سلول ها به داخل داربست ساخته شده از مواد طبیعی یا سنتزی و یا ترکیب این ها، متمرکز شده است و از ساختار میکرو محیطی استخوان تقلید می کند [۳].

۱-۳- پیشرفت جایگزین های پیوند استخوان

پیشرفت کاشتنی های استخوانی به این دلیل است که دانسته ها و اطلاعات بشر راجع به میکرو محیط بافت ها افزایش یافته است که در نتیجه ی آن خواص و ملزومات بیومواد می شوند را مورد تغییر قرار داده است. این پیشرفت ها را می توان به صورت سه نسل تعریف کرد. نسل اول جایگزین های پیوند استخوان، به بیومادهای نیاز دارد که خواص فیزیکی آن با خواص فیزیکی بافت تحت جایگزینی، همخوانی داشته باشد که شامل فلزاتی مثل فولاد زنگ نزن، تیتانیوم و آلیاژها، مواد سرامیکی مثل آلومینا و زیرکونیا و پلیمرهایی مانند سیلیکون رابر، پلی پروپیلن و پلی متیل متاکریلات هستند. اتفاق رایجی که برای همه ی این بیومواد رخ می دهد تشکیل بافت فیبروز^۱ در فصل مشترک بافت- بیوماده است که در نهایت بسته شدن پیوند را به دنبال دارد و منجر به شل شدگی غیر عفونی^۲ می شود. این پدیده یک پاسخ ایمنی غیر اختصاصی توسط بدن به ماده است که نتوانسته فاگوسیتوز^۳ شود و پاسخ التهابی باقی می ماند تا زمانی که جسم خارجی توسط بافت

^۱ Fibrous tissue

^۲ Aseptic loosening

^۳ Phagocytosis

همبند فیبروتیک کپسوله شود و جسم خارجی را از پاسخ ایمنی بدن در امان نگه داشته و از بافت‌های اطراف مجزا می‌کند [۳، ۴].

برای جلوگیری از این پاسخ ایمنی غیراختصاصی، نسل دوم جایگزین‌های پیوند استخوان دارای فصل مشترک زیست‌فعال گسترش پیدا کردند که یک پاسخ بیولوژیکی خاص (به عنوان مثال رسانش استخوان^۱) ایجاد می‌کند که از تشکیل لایه‌ی فیبروز ذکر شده جلوگیری کرده و استخوان‌سازی را بهبود می‌بخشد. استراتژی کلی، اصلاح بیومواد نسل اول از طریق پوشش‌دهی آن‌ها با مواد زیست‌فعال یا زیست‌تخریب‌پذیر است. زیست‌فعال‌سازی از طریق عملیات شیمیایی سطحی انجام می‌گیرد که می‌تواند یا از طریق معدنی‌سازی در طول فرآیند هسته گذاری همگن و کریستاله‌شدن هیدروکسی‌آپاتیت و یا از طریق پوشش‌دهی سطح بیوماده با سرامیک‌های زیست‌فعال مثل هیدروکسی‌آپاتیت، بتا-تری‌کلسیم فسفات (β -TCP) و یا شیشه زیست‌فعال انجام شود [۳].

یک نوع دیگر از جایگزین‌های پیوند استخوان نسل دوم این است که بیوماده‌ی زیست‌تخریب‌پذیر تولید شود با هدف اینکه نرخ خوردگی بیوماده با نرخ بهبودی بافت استخوانی آسیب دیده هماهنگی داشته باشد. این بیومواد بر اساس این که از انواع پلیمرهای طبیعی هستند یا مصنوعی تقسیم می‌شوند و در هنگامی که در شرایط فیزیولوژیک قرار می‌گیرند به صورت کنترل شده تجزیه شیمیایی شده و محصولات خنثی تولید می‌کنند که بدن می‌تواند به راحتی آن‌ها را جذب کند. پلیمرهای مصنوعی از جمله پلی‌لاکتیک، پلی‌کاپرولاکتون، پلی‌گلیکولید و پلیمرهای طبیعی مانند کیتوسان، هیالورونیک اسید هستند. خواص مکانیکی و رسانش استخوان این پلیمرها را می‌توان از طریق کامپوزیت سازی آن‌ها با سرامیک‌های زیست‌فعال بهبود بخشید [۳].

¹ Osteoconduction

در نسل سوم جایگزین‌های پیوند استخوان سعی شده که با استفاده از بیوموادى که واکنش‌های سلولى خاص را از طریق زیست‌فعال کردن و زیست‌تخریب‌پذیر کردن ابزار نسل دوم تحریک می‌کنند، به استانداردهای پیوند آتوگرفت نزدیک شد. این نوع پیوند استخوان بر پایه‌ی مفهوم مهندسی بافت است، به‌طوری‌که تمرکز اصلی بر ساخت ابزاری است که با استفاده از سلول‌های پیش‌ساز استخوان و فاکتورهای رشد، سلول‌ها را به داخل داربست، ساخته شده از زیست مواد طبیعی و مصنوعی یا ترکیبی از آن‌ها، هدایت کند و جهت دسترسی به مواد غذایی و کامل شدن روند درمان، سیستم عروقی به‌طور مؤثر در آن تشکیل شود و در نتیجه منجر به بهبود اصلاح و بازسازی استخوان شود. این روند بازسازی استخوان، رسانش استخوان نام دارد که در آن سلول‌های بنیادی مزانشیمی تازه روی کار می‌آیند و برای تمایز به سلول‌های پری‌استئوبلاست هدایت می‌شوند و به میکرومحیط وابسته هستند. این روند مشابه روندی است که هنگام تشکیل استخوان جدید یا بلافاصله پس از آسیب‌های اسکلتی یا ایمپلنت، به‌ویژه در هفته اول پس از آسیب دیدن، رخ می‌دهد. در مقابل، بازسازی استخوان یک واکنش التهابی به دنبال دارد که به دلیل تشکیل بافت فیبروز است و به توانایی القای استخوانی میکرومحیط وابسته نیست. سلول‌های پیش‌ساز استخوان^۱، فاکتورهای رشد و عروق‌زایی همه جزء اجزا طبیعی میکرومحیط بافت استخوان هستند و داربست تنها عضوی از این مجموعه است که احتیاج به ساخت دارد. این امر مستلزم آن است که پارامترهایی برای طراحی تعریف شود تا از طریق آن‌ها بتوان به عملکرد سلولی مناسب که مربوط به رشد استخوان است یعنی چسبندگی، تکثیر و تمایز سلول، دست‌یافت. این پارامترهای طراحی باید منجر به ایجاد خواص خاصی در داربست شود که شامل زیست‌سازگاری، تخلخل، ساختاری با مقیاس میکرو و نانو، نرخ خوردگی، استحکام مکانیکی و تحویل فاکتور رشد^۲ هستند که همه‌ی این موارد مشخص‌کننده‌ی استفاده از زیست ماده یا بهبود و توسعه آن است [۳].

¹ Osteoprogenitor cells

² Growth factor delivery

با توجه به مشکلات پیوندهای رایج استخوانی از جمله کمبود اهدا کننده، جای زخم ناخواسته در بدن اهدا کننده و مشکلات مربوط به سیستم ایمنی که اشاره شد، می توان گفت استفاده از داربست های مهندسی بافت استخوان جایگزین مناسبی برای بهبود آسیب های استخوانی است. انتخاب مواد اولیه ی مناسب و کنترل شرایط ساخت داربست و همچنین ویژگی های ساختاری ویژه از جمله تخلخل های به هم پیوسته، مواردی هستند که در ساخت داربست اهمیت فراوان دارند. هدف از انجام این تحقیق، ساخت یک داربست نانوکامپوزیتی با خصوصیات زیست سازگاری و زیست تخریب پذیری مطلوب است، به طوری که بتواند به خوبی تشکیل بافت استخوانی جدید را، پس از قرار گیری در بدن، القا کند. لذا با استفاده از روش خشک کردن انجمادی به دلیل ایجاد تخلخل های مناسب و به هم پیوسته و مواد اولیه ی زیست سازگار پلی کاپرولاکتون، نانوهیدروکسی آپاتیت و اکسید نقره با خواص ویژه برای جایگزینی استخوان، داربست نانوکامپوزیتی تهیه شد که در ادامه به تفصیل بررسی می شود.

فصل دوم

تئوری و مروری بر پژوهش‌های پیشین

در این فصل، به تعریف داربست‌های استخوانی به‌عنوان جایگزین پیوند استخوان پرداخته می‌شود و در ادامه بیوموادى که برای ساخت این داربست‌ها می‌توان استفاده کرد و روش‌های ساخت داربست‌ها اشاره خواهد شد. همچنین به‌طور مختصر پژوهش‌های پیشین که در این زمینه صورت گرفته است و نتایج حاصل از این پژوهش‌ها، بررسی خواهد شد.

۲-۱- داربست‌های مهندسی بافت

تمرکز مهندسی بافت استخوان بر ساختن داربست سه‌بعدی است که از زمینه خارج سلولی تقلید کرده و در حین تشکیل استخوان جدید، از ساختار حمایت کند [۳]. به‌طور کلی داربست، ساختاری مصنوعی است که به تقلید از بافت زنده و حمایت از آن ساخته می‌شود و به‌عنوان بستری برای قرار گرفتن سلول‌ها و رشد آن‌ها است [۵]. تقسیم‌بندی کلی برای داربست‌ها به سه صورت است:

۱- از لحاظ قابلیت تزریق سلول‌ها به آن می‌تواند قابل تزریق یا غیر قابل تزریق باشد؛ این ویژگی به دو صورت بیان می‌شود: الف) قابلیت تزریق سلول‌ها به آن وجود دارد، به طوری که در این حالت سلول‌ها پس از ورود به فضای داخل داربست روی سطح داربست جایگزین شده و احتمالاً پوششی از سلول‌ها روی سطح داربست ایجاد می‌شود که در این حالت دیگر نیازی به پوشش دادن سلول‌ها با استفاده از مواد شیمیایی مثل تیتانیوم نیست. ب) قابلیت تزریق داربست به همراه سلول‌های موجود در آن، بدون نیاز به عمل جراحی، به محل مورد نیاز در بدن، وجود دارد، به طوری که کاشت داربست در همان محل صورت می‌گیرد. این حالت بیشتر برای داربست‌های خونی مطرح است [۵].

۲- از لحاظ ساختاری می‌تواند ساده یا پیچیده باشد. در داربست‌های با ساختمان ساده تنها یک نوع پلیمر وجود دارد، ولی در داربست‌های پیچیده از چندین پلیمر استفاده می‌شود. حالتی از این داربست می‌تواند به‌صورت مخلوطی از چند پلیمر محلول باشد که به فرم مورد نظر قالب‌گیری شده‌اند. در حالت دیگر دو یا

تعداد بیشتری پلیمرهای زیستی به فرم فیبر تهیه شده و سپس این الیاف را به صورت بافته شده در کنار یکدیگر قرار می دهند. همچنین داربست پیچیده می تواند تنها یک پلیمر باشد ولی با انواع مختلف نمک ها، مواد آلی و معدنی روی سطح آن تقویت شود به طوری که دیگر ساده نباشد و پیچیدگی بافت و یک زمینه ی طبیعی را به خود بگیرد [۵].

۳- از لحاظ منشأ می تواند با منشأ زیستی و طبیعی و یا سنتزی باشد؛ در پلیمرهای طبیعی چسبندگی سلول ها بیشتر است و در داربست های سنتزی می توان راحت تر ویژگی های مکانیکی و شدت تخریب پذیری را کنترل کرد. ویژگی های مکانیکی داربست اهمیت بالایی دارد زیرا کشت روی داربست منجر به افزایش تکثیر سلول ها به ویژه سلول های بنیادی می شود [۵].

همان طور که اشاره شد، داربست بر اساس زمینه ی خارج سلولی^۱ بافت هدف و الزامات هر بافت، ساخته می شود و لذا کاربرد وسیعی دارد. داربست های مورد استفاده در جایگزینی دیواره ی آئورت، داربست های غضروفی، ماهیچه، پوست و استخوان، از جمله بافت هایی هستند که با انتخاب بیومواد متناسب با ویژگی های هر کدام از آن ها و همچنین انتخاب روش متناسب با ساختار هر بافت، می توان داربست آن ها را تهیه کرد [۶].

۲-۲- فیزیولوژی استخوان و ترمیم آن

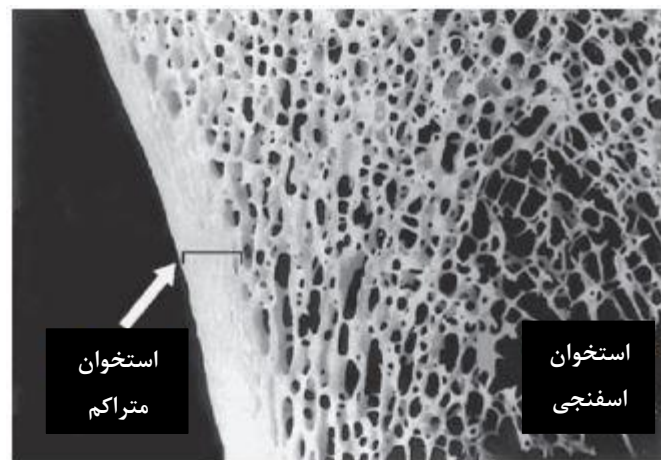
استخوان را می توان به عنوان یک نانوکامپوزیت متشکل از نانوکریستال های غیر آلی هیدروکسی آپاتیت، اجزای آلی (عمدتاً کلاژن) و آب که زمینه ی استخوان را تشکیل داده اند، معرفی کرد. علاوه بر اجزای زمینه، سه نوع سلول اصلی شامل سلول های استئوبلاست یا استخوان ساز، سلول های استئوسیت یا استخوان یاخته و سلول های استئوکلاست یا استخوان کاه^۲ نیز در ساختار استخوان حضور دارند. مواد غیر آلی ۵۰ درصد از

^۱ ECM

^۲ Osteoclasts

وزن خشک زمینه‌ی استخوان را تشکیل می‌دهند. فراوان‌ترین جزء، کلسیم هیدروکسی‌آپاتیت است، اما یون‌های بی‌کربنات، سیتрат، منیزیم، پتاسیم و سدیم نیز یافت می‌شوند. مقادیر قابل‌توجهی از کلسیم فسفات آمورف (غیر کریستالی) نیز موجود است. یون‌های سطحی کریستال‌های هیدروکسی‌آپاتیت هیدراته هستند. لایه‌ی آب اطراف کریستال تبادل یون‌ها را بین مواد معدنی و مایعات بدن تسهیل می‌کند. مواد آلی که در زمینه‌ی کلسیفیه جا گرفته‌اند نیز شامل کلاژن نوع ۱، تجمعات پروتئوگلیکان و گلیکوپروتئین‌های چند اتصال‌ی اختصاصی استخوان مانند استئونکتین هستند [۷].

مطابق با شکل ۱-۲، مشاهده ماکروسکوپی استخوان در مقطع عرضی، دو ناحیه را نشان می‌دهد: یک ناحیه‌ی متراکم نزدیک به سطح که مربوط به استخوان متراکم یا قشری^۱ بوده و ۸۰ درصد کل حجم استخوان را تشکیل می‌دهد و ناحیه‌ای عمیق‌تر با حفرات متعدد مرتبط به هم استخوان اسفنجی^۲ نام دارد و حدود ۲۰ درصد از حجم کل استخوان را شامل می‌شود [۷]. هم‌چنین در جدول ۱-۲ خواص مکانیکی استخوان اسفنجی و متراکم مشاهده می‌شود.



شکل ۱-۲- استخوان اسفنجی و استخوان متراکم [۷].

^۱ Compact or cortical bone

^۲ Trabecular or Cancellous or spongy bone

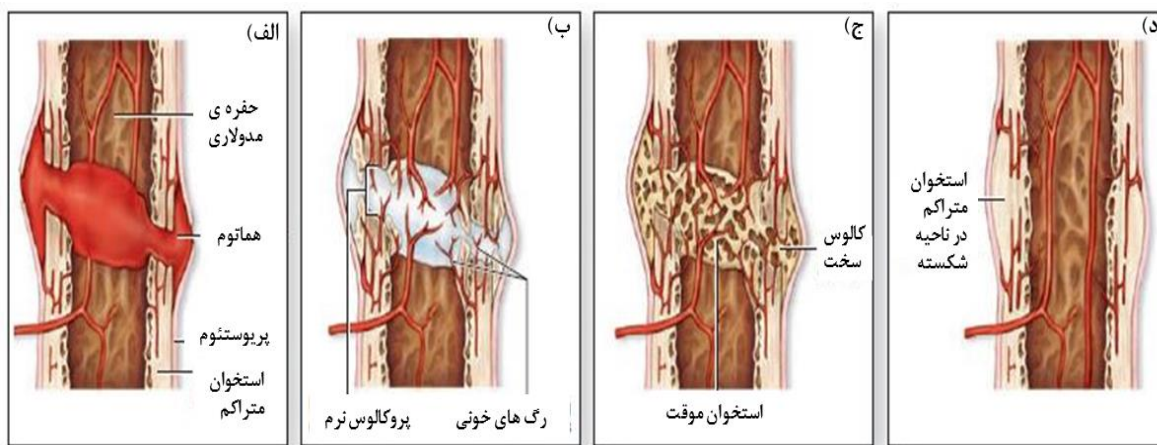
جدول ۱-۲- خواص مکانیکی استخوان اسفنجی و استخوان متراکم [۸]

مدول یانگ (GPa)	استحکام فشاری (MPa)	استحکام کششی (MPa)
استخوان اسفنجی	۰/۰۲-۰/۵	۴-۱۲
استخوان متراکم	۳-۳۰	۶۰-۱۶۰

استخوان سازی و رشد استخوان شامل باز جذب نسبی بافت استخوانی که از قبل تشکیل شده و ایجاد هم زمان استخوان جدید (با سرعتی بیش از سرعت حذف استخوان) است. مجموع فعالیت های استئوبلاست ها و استئوکلاست ها در یک استخوان در حال رشد، فرآیند قالب گیری مجدد^۱ استخوان را به وجود می آورند. قالب گیری مجدد، باعث حفظ شکل کلی هر استخوان در کنار افزایش حجم آن می شود [۷].

ترمیم یک استخوان شکسته شده در طی چندین مرحله صورت می گیرد و البته از مکانیسم های مؤثر در قالب گیری مجدد استخوان استفاده می شود. مطابق شکل ۲-۲ در مرحله اول، از عروق خونی پاره شده در محل شکستگی خون خارج می شود که باعث تشکیل لخته و هماتوم بزرگی در محل شکستگی می گردد. در مرحله بعد، لخته به تدریج توسط ماکروفاژها برداشته شده و با توده ای نرم، شبیه غضروف لیفی به نام بافت پیش کالوس که غنی از کلاژن و فیبروبلاست است جایگزین می شود. پریوستئوم اگر پاره شده باشد، به صورت پیوسته دوباره بر روی این بافت ایجاد می شود. سپس، این پروکالوس نرم مورد تهاجم عروق خونی در حال رشد و استئوبلاست ها قرار می گیرد. در طی چند هفته ی بعدی، غضروف لیفی به تدریج توسط تراکولاهای استخوان نامنظم جایگزین شده و در سرتاسر منطقه اصلی شکستگی، یک کالوس سخت ایجاد می شود. در مرحله آخر، استخوان نامنظم به صورت استخوان متراکم و اسفنجی و در امتداد مناطق مجاور آسیب ندیده قالب گیری شده و عروق کاملاً عملکردی، مجدداً به وجود می آیند [۷].

^۱ Remodeling



شکل ۲-۲- مراحل ترمیم استخوان شکسته. الف) پاره شدن عروق خونی در محل شکستگی، ب) تشکیل بافت پیش کالوس، ج) تشکیل کالوس سخت و د) تشکیل استخوان جدید [۷].

هندسه‌ی داربست از طریق اندازه تخلخل‌ها و به هم پیوستگی آن‌ها ارزیابی می‌شود که به طور مستقیم بر خاصیت متخلخل بودن داربست تأثیر می‌گذارند. به نظر می‌رسد که ساختار متخلخل و تخلخل کلی داربست می‌تواند رشد استخوان را تعدیل کند زیرا دیده شده که سلول‌های استخوان‌ساز به تخلخل‌های با ابعاد خاص واکنش نشان می‌دهند. برای مثال رشد استخوان در کانی‌هایی با محدوده ابعاد تخلخل ۵۰-۱۵۰ میلی‌متر رشته‌ای-رگی^۱، ۱۵۰-۵۰۰ میلی‌متر استئوئید^۲ و ۱۵۰-۵۰۰ میلی‌متر معدنی^۳ است. به همین دلیل است که هسته گذاری و مهاجرت سلولی در داربست‌های دارای تخلخل زیاد راحت‌تر است درحالی‌که داربست‌های کم تخلخل رشد درونی بافت دارند. در طراحی بسیاری از داربست‌ها تخلخل بالا، بیش از ۹۰٪ انتخاب می‌شود به این دلیل که تخلخل زیاد امکان انتشار مناسب مواد غذایی در طول کاشت بافت را فراهم کرده و یک سطح^۴ مؤثر برای فعل و انفعالات بین سلول و زیست ماده ایجاد می‌کند. از آنجایی‌که استحکام مکانیکی توسط داربست تأمین می‌شود و تخلخل موجب کاهش آن می‌شود، این کمیت باید همیشه با استحکام

¹ Fibrovascular

² Osteoid

³ mineralize

⁴ Surface area

مکانیکی خاص مورد نیاز در بافت مورد جایگزینی، هماهنگ باشد. یکی دیگر از جنبه‌های مهم در ساختار متخلخل، به هم پیوستگی تخلخل‌هاست زیرا به هم پیوستگی تخلخل‌ها باعث بهبود نرخ انتشار به سمت مرکز داربست و از مرکز داربست به بیرون و تسهیل رگ‌زایی می‌شود بنابراین تأمین اکسیژن و مواد غذایی و خروج مواد زائد بهتر انجام می‌گیرد. تخلخل‌ها امکان مهاجرت سلولی، توزیع عروق و انتشار مواد غذایی و اکسیژن و در نتیجه رسانش استخوان را فراهم می‌کند. در مقابل زیست مواد نانو ساختار به طور مؤثری عملکرد سلولی را افزایش می‌دهند و منجر به بهبود القای استخوان‌سازی می‌شود زیرا سلول‌های استخوان‌ساز با مواد معدنی و پروتئین‌های نانو ساختار فعل و انفعال بهتری انجام می‌دهند [۳].

نرخ خوردگی داربست باید به گونه‌ای تنظیم شود که تا زمانی که بافت استخوان جدید رشد کند و استحکام مکانیکی لازم را برای جایگزین شدن با داربست پیدا کند، از ساختار حمایت کند. اگر این شرایط به خوبی مهیا نباشد ممکن است داربست قبل از بهبودی کامل استخوان و تشکیل بافت جدید، تحت اعمال بار مکانیکی شکسته شده و از بین برود [۳].

۲-۳- مواد زیست فعال

به عنوان یک مفهوم کلی، مواد زیست فعال موادی هستند که به منظور القای یک فعالیت زیستی خاص طراحی شده‌اند؛ به این معنی که این مواد پس از قرارگیری در بدن، تحت واکنش‌های سطحی خاص قرار گرفته که منجر به ایجاد یک لایه مشابه با هیدروکسی‌آپاتیت می‌شوند که این لایه مسئول اتصال با بافت سخت و نرم اطراف است. بنابراین توانایی یک ماده در تشکیل لایه‌ی سطحی مشابه با مواد سخت بدن از قبیل هیدروکسی‌آپاتیت در هنگام قرارگیری در مایع شبیه‌ساز بدن (SBF)^۱، یکی از نشانه‌های زیست‌فعالی آن ماده است [۹]. از آنجایی که در مهندسی بافت سیگنالینگ سلولی و عملکردهای مشابه آن نقش مهمی

¹ Simulated Body Fluid

دارند، مهندسان بافت در حال ساخت داربست‌های چندمنظوره‌ی زیست‌فعال هستند. داربست‌های مصنوعی ایده‌آل باید قادر به ارائه‌ی یک محیط بیومیمتیک^۱ فیزیکی-شیمیایی باشند و بتوانند هم‌زمان با رشد بافت میزبان، تجزیه زیستی شوند و به‌طور فعال پاسخ‌های فیزیولوژیکی مطلوب و نامطلوب را پاسخ دهند. برای رفع این نیازهای زیستی خاص، یک داربست مصنوعی استخوان باید:

- ۱- حمایت مکانیکی موقت در بافت آسیب‌دیده ایجاد کند؛
- ۲- به‌عنوان یک بستر برای رسوب استئوئیدها عمل کند؛
- ۳- ساختار متخلخلی داشته باشد تا رگ‌زایی و رشد استخوان به راحتی انجام گیرد؛
- ۴- مهاجرت سلول‌های استخوانی به داخل داربست را تسهیل کند؛
- ۵- حمایت و ترویج تمایز سلول‌های استخوان‌ساز در داربست‌های غیر استخوانی مصنوعی^۲؛
- ۶- بهبود فعالیت سلولی در فصل مشترک داربست و بافت میزبان^۳؛
- ۷- به‌صورت کنترل شده تخریب شود تا انتقال بار به استخوان تشکیل‌شده را تسهیل کند؛
- ۸- محصولات حاصل از تجزیه آن غیر سمی باشند؛
- ۹- واکنش التهابی مزمن را فعال نکند؛
- ۱۰- امکان استریل کردن داشته باشد، بدون اینکه زیست‌فعالی آن از بین برود؛ و
- ۱۱- قادر به تحویل مولکول‌های زیست‌فعال و داروها به صورت کنترل شده باشد تا روند بهبودی را سرعت ببخشد [۱۰].

استراتژی‌های چندگانه‌ی مهندسی بافت استخوان مانند پیوند سلول، داربست‌های غیر سلولی، ژن‌درمانی، درمان به‌وسیله‌ی سلول‌های بنیادی و تحویل فاکتورهای رشد، به منظور پاسخ به نیازهای چالش برانگیز

¹ Biomimetic

² Osteoinduction

³ Osseointegration

ذکر شده، مورد استفاده قرار می‌گیرند. در عمل، بسیاری از روش‌های مهندسی بافت، ترکیبی از این استراتژی‌ها را اجرا می‌کنند. با این حال، دو استراتژی اولیه‌ی مهندسی بافت به‌عنوان امیدوارکننده‌ترین رویکرد، مطرح شده است.

۱- مطابق شکل ۲-۳، قبل از عمل ایمپلنت، سلول‌های بنیادی مزانشیمی (MSCs) جداسازی شده

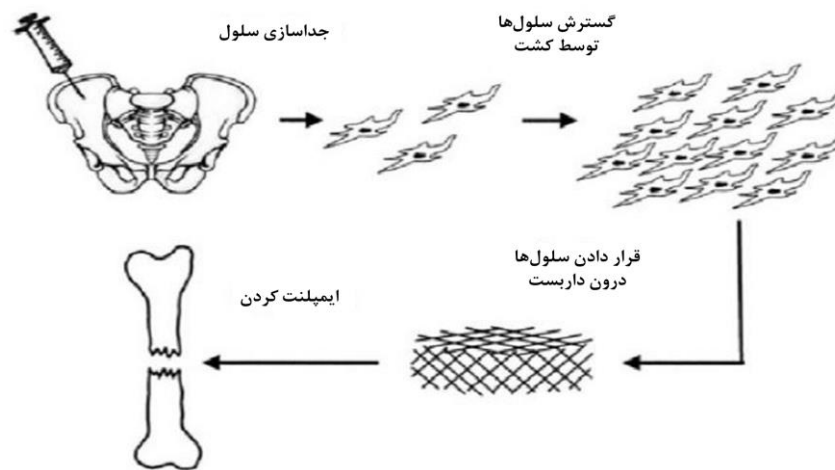
(معمولاً از بیمار)، سپس به‌صورت برون‌تن گسترش داده می‌شوند و روی یک داربست مصنوعی

کاشته می‌شوند، اجازه داده می‌شود تا زمینه خارج سلولی در شرایط کشت کنترل‌شده روی داربست

به وجود آید و درنهایت در قسمت آسیب دیده یا حفره‌ی استخوانی بیمار، ایمپلنت می‌شود.

۲- ایمپلنت کردن داربست غیر سلولی بلافاصله بعد از ایجاد آسیب یا از بین رفتن استخوان [۱۰].

نمونه‌ای از کاربرد داربست استخوان در استخوان ران خرگوش در شکل ۲-۴ مشاهده می‌شود.



شکل ۲-۳- شماتیک مهندسی بافت استخوان، که قبل از ایمپلنت شدن داربست، به‌صورت ex vivo سلول‌ها روی آن کشت داده شده‌اند [۱۰].



شکل ۲-۴- تصویر داربست سرامیکی ایمپلنت شده در استخوان ران خرگوش [۳].

۲-۴- مواد قابل استفاده در ساخت داربست‌ها

در طول قرن گذشته، زیست مواد متعددی به‌عنوان کاشتنی در عمل‌های جراحی مورد استفاده قرار گرفتند. مواد پلیمری، به دلیل خواص خوبی که دارند؛ ازجمله تخریب پذیری، زیست سازگاری و سهولت کار با آن‌ها، به‌طور گسترده در مهندسی بافت استفاده می‌شوند. مواد مورد استفاده در مهندسی بافت باید خصوصیات القای استخوانی و رسانش استخوانی را دارا باشند [۸]. به‌طور کلی می‌توان پلیمرها را به دودسته‌ی پلیمرهای طبیعی و پلیمرهای مصنوعی تقسیم کرد:

۲-۴-۱- پلیمرهای طبیعی

پلیمرهای طبیعی خواص مورد توجهی برای ساخت داربست سه‌بعدی، مانند زیست‌سازگاری و زیست‌تخریب‌پذیری، از خود نشان داده‌اند. مهم‌تر از همه این‌که با تغییر غلظت پلیمر، شرایط پلیمریزاسیون یا با استفاده از گروه‌های عاملی مختلف، می‌توان تخلخل‌ها و استحکام مکانیکی را کنترل کرد. زیست‌فعالی نیز می‌تواند با اضافه کردن مواد شیمیایی، پروتئین‌ها، پپتیدها و سلول‌ها کنترل شود. پلیمرهای طبیعی به‌عنوان یک الگوی ذاتی برای چسبندگی و رشد سلول‌ها عمل می‌کنند. ساختار پلیمرهای طبیعی بسیار سازمان یافته است و شامل مواد خارج سلولی به نام لیگاند هستند که می‌توانند به گیرنده‌های سلولی متصل شوند [۳، ۸].

اگرچه این پلیمرها به عنوان مواد زیست سازگار شناخته می‌شوند، ولی معایبی نیز دارند از جمله؛ کمبود مقادیر بالک، گستردگی ظاهری و دشوار بودن انجام فرآیند روی آن‌ها به منظور کاربردهای بالینی. نرخ خوردگی پلیمرهای طبیعی در بیماران مختلف، متفاوت است و علت آن این است که تخریب پلیمرهای طبیعی به آنزیم‌ها وابسته است که آنزیم‌ها نیز در افراد مختلف، متفاوت‌اند. کلاژن/ ژلاتین، کیتوسان، ابریشم، مواد پایه آلژیناتی، هیالورونیک‌اسید فیبرین، آگارز و پپتیدها، پلیمرهای طبیعی هستند که به دلیل زیست‌سازگاری عالی، در مهندسی بافت استخوان و غضروف مورد استفاده قرار می‌گیرند. در اینجا به طور مختصر به بررسی این پلیمرها و خواص آن‌ها برای ساخت داربست سه‌بعدی پرداخته می‌شود [۳، ۸].

۲-۴-۱-۱- کلاژن (ژلاتین)

کلاژن (یا ژلاتین) به طور گسترده برای بازسازی بافت‌ها، مخصوصاً بافت‌های نرم، مورد استفاده قرار می‌گیرد. این پلیمر ذاتاً زیست‌سازگار و زیست تخریب‌پذیر است. کلاژن از چسبندگی سلولی حمایت می‌کند و برای تنظیم عملکرد و چسبندگی سلولی، تشخیص سلولی^۱ را فراهم می‌کند. کلاژن تحت تجزیه‌ی آنزیمی قرار می‌گیرد که در بدن توسط آنزیم‌هایی مانند؛ کلاژناز و متالوپروتئیناز، اتفاق می‌افتد تا آمینواسیدهای مشابه تولید کنند. به دلیل تجزیه‌ی آنزیمی آن‌ها، خواص منحصر به فرد فیزیکی- شیمیایی، مکانیکی و بیولوژیکی کلاژن برای کاربردهای مختلف مورد مطالعه قرار گرفتند. با این حال کلاژن خواص مکانیکی ضعیفی دارد. کلاژن (یا ژلاتین)، به عنوان جز اصلی استخوان، گزینه مناسبی جهت ساخت داربست‌های سه‌بعدی استخوان است. کامپوزیت کلاژن و هیدروکسی‌آپاتیت و تری‌کلسیم فسفات، به عنوان جایگزین پیوند استخوان مصنوعی و زیست تخریب‌پذیر، مورد استفاده قرار گرفته است. این ماده به طور گسترده به صورت داربست برای مهندسی بافت اسکلتی- عضلانی و بافت عصبی، مورد بررسی قرار گرفته است. کلاژن خالص از لحاظ ظاهری

¹ Cellular recognition

گسترده است. معایب کلاژن، متغیر بودن خواص فیزیکی شیمیایی و نرخ تخریب آن و همچنین خطر ایجاد عفونت و دشوار بودن انجام فرآیند روی آن و خواص مکانیکی ضعیف، است [۳، ۸].

۲-۴-۱-۲- آلبومین

آلبومین، پروتئینی است که در پلاسمای خون یافت می‌شود و بیش از ۵۰٪ از حجم کلی پلاسما را تشکیل داده است. آلبومین یک پروتئین محلول در آب است. بدن انسان قادر است آلبومین را تجزیه کند. با توجه به سازگاری خونی عالی آلبومین، می‌توان از این ماده برای کاربردهای دارورسانی استفاده کرد [۸].

۲-۴-۱-۳- فیبرین

فیبرین یک بیوپلیمر مشابه کلاژن است که در فرآیند لخته شدن خون در بدن، نقش دارد. فیبرین، از فیبرینوژن و ترومبین گرفته شده است که پروتئین ۳۶۲KDA است و از سه جفت زنجیره‌ی پپتیدی تشکیل شده است. این ماده همواره به عنوان حامل سلول‌ها و در کنار سایر مواد داربست، مورد استفاده قرار می‌گیرد. فیبرین کاملاً تخریب پذیر و قابل تزریق است، اما استحکام مکانیکی پایینی دارد و برای مهندسی بافت غضروف و مفصل مناسب نیست [۸].

۲-۴-۱-۴- پلی‌ساکاریدها

پلی‌ساکاریدها، ماکرو مولکول‌هایی هستند که از تعداد زیادی واحد مونوساکارید ساخته شده‌اند که توسط پیوندهای گلیکوزیدی به هم متصل شده‌اند. پلی‌ساکاریدها دارای ویژگی منحصر به فرد سیگنال‌های سلولی برای سیستم ایمنی هستند. زیست‌تخریب‌پذیری و توانایی تولید ساختارهای مناسب باعث شده است که این مواد به عنوان یکی از مهم‌ترین و پرکاربردترین بیومواد، مورد مطالعه قرار بگیرند [۸].

۲-۴-۱-۵- هیالورونیک اسید

هیالورونیک اسید از خانواده ی گلیکوزآمینوگلیکان است که پلی ساکارید خطی متشکل از واحدهای متناوب N- استیل - D- گلوکزآمین و گلوکورونیک اسید است و تقریباً در بدن همه ی بی مهره ها یافت می شود، آب دوست است و واکنش سیستم ایمنی بدن را به دنبال ندارد. از آنجایی که هیالورونیک اسید قادر به ترمیم بافت از طریق گسترش مهاجرت و تمایز سلول های مزانشیمی و اپیتلیال است و باعث افزایش تشکیل کلاژن می شود، این ماده را می توان در ترمیم آسیب هایی با شکل نامنظم مورد استفاده قرارداد و عملیات ایمپلنت کردن آن با تهاجم خیلی کمی انجام می گیرد. هیالورونیک اسید نیز به عنوان یک بیوماده دارای توانایی جهت ساخت داربست استخوان مورد بررسی قرار گرفته است. این ماده به همان شکل طبیعی مورد استفاده قرار می گیرد. با این وجود خواص مکانیکی پایین و کاربرد محدودی دارد. این پلیمر طبیعی برای ترکیب شدن با سایر مواد، فاکتورها و داروها استفاده می شود تا توانایی رسانش استخوان در داربست را بهبود دهد [۳، ۸].

۲-۴-۱-۶- کیتوسان

کیتوسان از کیتین گرفته شده است. کیتوسان یک پلیمر طبیعی زیست تخریب پذیر است. این ماده یک پلی ساکارید خطی کاتیونی است. کیتوسان در شرایط بدن، زیست سازگاری بالایی دارد و دارای خواص آنتی باکتریال، ترمیم زخم و چسبندگی زیستی است. مطالعاتی نیز برای بررسی امکان استفاده از مواد قابل تزریق بر پایه ی کیتوسان و مشتقات آن، به عنوان ماده ی سازنده ی داربست، انجام شده است که در مهندسی بافت غضروف، پوست و استخوان مورد استفاده قرار گیرد. تخلخل های داربست کیتوسانی قابل کنترل هستند و بر خواص مکانیکی تأثیر می گذارند [۳، ۸].

۲-۴-۱-۷- آلژینات

آلژینیک اسید، یک پلی ساکارید با منشأ غیرانسانی است. آلژینات یک کوپلیمر دوتایی و بدون شاخه‌ی (۱)- (۴) گلیکوزیدیکال و D-b- منورونیک اسید و مونومرهای L-a- گلورونیک اسید است. عملکرد بالای آلژینیک اسید باعث شده که این ماده به عنوان یک پلیمر زیست سازگار شناخته شود و جهت ساخت داربست‌های سه بعدی مهندسی بافت مناسب است. این پلیمر محلول در آب است و در دمای اتاق در حضور کاتیون‌های دو ظرفیتی به صورت ژل سه بعدی درمی آیند. همچنین به عنوان حامل انتقال سلول‌های کاشته شده و رشد بافت جدید و همچنین به عنوان پوشش زخم مورد استفاده قرار می گیرد. از معایب این ماده‌ی پلیمری می توان به تخریب پذیری آهسته و یکپارچگی مکانیکی نامناسب اشاره کرد که باعث شده است آلژینات برای کاشتنی‌های بلندمدت و دائمی، گزینه‌ی مناسبی نباشد [۳، ۸].

۲-۴-۱-۸- ابریشم

فیبروئین ابریشم^۱ یک پلیمر طبیعی است که به طور گسترده در مهندسی بافت مورد استفاده قرار گرفته است. این ماده خواص مکانیکی چشم گیری دارد و دارای پایداری محیطی، زیست سازگاری، زیست تخریب پذیری پروتئولیتیک کنترل شده و انعطاف پذیری سطحی است [۳].

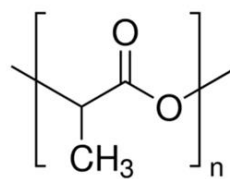
۲-۴-۲- پلیمرهای مصنوعی

سال‌های گذشته، دانشمندان و محققان با خاصیت رسانش استخوانی پلیمرهای مصنوعی قابل جذب آشنا شدند که این خاصیت، بستگی به مکان و ساختار آن‌ها داشت. پلیمرهای مصنوعی زیست تخریب پذیر نسبت به پلیمرهای طبیعی، مزایای بیشتری دارند و می توان این پلیمرها را با خواص مختلفی سنتز کرد به طوری که برای سیستم ایمنی بدن نگرانی ایجاد نکنند [۸].

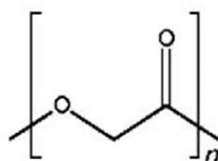
¹ Silk fibroin

۲-۴-۱- پلی استرهای آلیفاتیک اشباع (PLA, PGA, PCL)

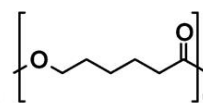
مواد پلیمری آلیفاتیک اشباع، گروهی از قدیمی ترین و پرکاربردترین مواد مورد استفاده در حوزه ی مهندسی بافت استخوان هستند. در این گروه، موادی از جمله پلی لاکتیک اسید (PLA) و پلی گلیکولیک اسید (PGA)، پلی لاکتیک- گلیکولید (PLGA) و کوپلیمرها، وجود دارند. PLA به شکل های L-PLA, D-PLA (PDLA) و مخلوطی از (PLLA) D,L-PLA (PDLLA), PGA, PLGA وجود دارد که به در ساخت داربست های استخوان، بسیار پر کاربرد هستند. این پلی استرها وزن مولکولی بالایی دارند و اغلب از روش پلیمریزاسیون تراکمی تهیه می شوند. پلیمرهای آلیفاتیک مشهور، یعنی (poly (L-lactide), PLA و PCL، به روش پلیمریزاسیون "حلقه باز" با استفاده از مونومرهای مربوطه، سنتز می شوند و می توان از کاتالیست هایی مانند آنتیموان، روی یا سرب نیز استفاده کرد [۸]. ترکیبات حاصل از تجزیه این پلیمرها در بدن وجود دارند و توسط روند متابولیسم بدن حذف می شوند [۳]. ساختار شیمیایی پایه ی این پلی استرهای آلیفاتیک، مشابه است و تنها تفاوت در گروه های جانبی است که در شکل ۲-۵ نشان داده شده است. همچنین تغییر این گروه های جانبی باعث تغییر وزن مولکولی و بلورینگی می شود و مستقیماً بر نرخ تخریب پلیمر تأثیر می گذارد [۸]. در نتیجه تنظیم نرخ مولی این پلیمرها می تواند خواص مکانیکی و نرخ خوردگی داربست را تحت تأثیر قرار دهد. داربست های سه بعدی با این مواد می توانند با استفاده از روش های مختلف، تولید شوند [۳].



پلی لاکتیک اسید



پلی گلیکولیک اسید



پلی کاپرولاکتون

شکل ۲-۵- ساختار پلی استرهای آلیفاتیک [۸].

۲-۴-۲-۲- پلی گلیکولیک اسید

یک ماده‌ی ترموپلاستیک است که دارای درصد بلورینگی بالا (۴۵-۵۵٪)، نقطه ذوب بالا و دمای انتقال شیشه‌ای بالا است. به دلیل درجه بلورینگی بالا، این ماده در بسیاری از حلال‌های آلی، به جز حلال‌های حاوی فلئوئور مانند هگزا فلورو ایزو پروپانول، قابل حل نیست. PGA یک ماده‌ی اسیدی است و نسبت به PLA آب دوست‌تر است. برای انجام عملیات روی PGA، می‌توان از روش‌های متداول مانند استروژن، تزریق و قالب‌گیری فشاری، استفاده کرد. PGA را می‌توان هم به صورت فوم و هم داربست‌های متخلخل، شکل داد. خواص و تخریب پذیری این ماده بستگی به روش مورد استفاده دارند؛ همچنین از آنجایی که این پلیمر نسبت به تخریب پذیری بسیار حساس است، باید شرایط انجام عملیات روی آن به طور دقیق کنترل شود. روش لیچینگ ریخته‌گری حلال و قالب‌گیری فشاری برای ساخت داربست متخلخل PGA مورد استفاده قرار گرفته‌اند. به دلیل بالا بودن استحکام و مدول این ماده‌ی پلیمری، از فیبرهای پلی گلیکولیک اسید به عنوان بخیه استفاده می‌شود. محصولات حاصل از تخریب این پلیمر نیز، همان‌طور که قبلاً اشاره شد، توسط بدن قابل جذب هستند و به همین دلیل در مهندسی بافت استخوان و کاربردهای پزشکی مورد استفاده قرار می‌گیرد [۸].

۲-۴-۲-۳- پلی لاکتیک اسید

این ماده دارای استحکام کششی، کرنش و مدول بالا است و این خصوصیات باعث شده است تا پلی لاکتیک اسید در کاربردهایی که نیاز به تحمل بار دارند؛ مانند بخیه‌ها و تثبیت استخوان در ارتوپدی، مورد استفاده قرار گیرد. پلی لاکتیک اسید ساختار خطی دارد و دارای یک گروه جانبی متیل است که ساختار آن را نسبت به پلی گلیکولیک اسید، آمورف‌تر و آب‌گریزتر می‌کند و همچنین در نتیجه‌ی آن، حلالیت این پلیمر در حلال‌های آلی نیز تقویت می‌شود. پلی لاکتیک اسید در حلال‌های آلی مختلفی از جمله کلروفرم، متیلن کلراید، متانول، اتانول، بنزن، استون، DMF و غیره قابل حل است. جهت انجام عملیات روی این ماده،

روش‌های مختلفی قابل استفاده هستند که شامل روش قالب‌گیری تزریقی، اکستروژن صفحه‌ای، قالب‌گیری دمشی و شکل‌دهی حرارتی، هستند. به‌منظور ساخت داربست‌های سه‌بعدی پلی‌لاکتیک‌اسید و مشتقات آن، روش‌های ریخته‌گری محلول، ریخته‌گری ژل، ریخته‌گری حلال و لیچینگ ذره‌ای، گاز کف با فشار بالا و الکترواسپینینگ، می‌توانند روش‌های مناسبی باشند [۸].

۲-۴-۲- پلی‌کاپرولاکتون

پلی‌کاپرولاکتون که در گروه پلی‌استرهای آلیفاتیک قرار دارد، در کاربردهای مهندسی بافت به‌طور گسترده مورد استفاده و بررسی قرار گرفته است. این ماده یک پلیمر نیمه بلورین با فرمول $(C_6H_{10}O_2)_n$ است که دمای انتقال شیشه‌ای آن حدود ۶۰- درجه سانتی‌گراد و دمای ذوب پایین (حدود $57^{\circ}C$ تا $64^{\circ}C$) دارد. بلورینگی پلی‌کاپرولاکتون با کاهش وزن مولکولی آن، افزایش می‌یابد. پلی‌کاپرولاکتون از پلیمریزاسیون حلقه باز مونومر حلقه‌ای ϵ -caprolactone، در حضور کاتالیزور اکتوات قلع، سنتز می‌شود. این پلیمر در حلال‌های مختلف از جمله تتراهیدروفوران، کلروفرم، متیلن کلراید، کربن تتراکلراید، بنزن، تولوئن، سیکلو هگزانون دی‌هیدروپیران و ۲-نیتروپروپان به خوبی حل می‌شود و در حلال‌های استون، ۲-بوتانول، اتیل استات، استونتریل و دی‌متیل فومارات به‌صورت جزئی حل می‌شود. این پلیمر به‌راحتی در دماهای پایین فرآوری می‌شود ولی به علت ماهیت نیمه بلورین و آب‌گریزی شدید، تخریب آن بسیار کند است. آرایش ماکرو مولکول‌ها در سطح بدنه‌های ساخته‌شده از پلی‌کاپرولاکتون از نفوذ مایعات به حجم ماده جلوگیری می‌کند. مشکل اساسی پلی‌کاپرولاکتون ترشوندگی ضعیف، تخریب آرام در محیط بدن و تکثیر سلولی ضعیف بر سطح آن است که استفاده از این پلیمر را در ساخت داربست‌های مهندسی بافت محدود می‌کند. به همین دلیل معمولاً پلی‌کاپرولاکتون را می‌توان با سایر پلیمرها به‌صورت کامپوزیت استفاده کرد تا هم باعث کنترل و افزایش سرعت تخریب و هم بهبود خواص چسبندگی سلولی آن شود [۸، ۱۱].

بنابراین به دلیل مزایای زیاد این مواد، پلیمرهای پلی استری آلیفاتیک به طور گسترده در مهندسی بافت مورد استفاده قرار می گیرند. داشتن پتانسیل رسانش استخوانی، زمان کم تخریب پذیری، خواص مکانیکی خوب و عدم انتشار محصولات مضر، از مهم ترین مزایای این پلیمرها است [۸].

از دیگر پلیمرهای مصنوعی که در مهندسی بافت می توانند مورد استفاده قرار گیرند می توان به پلی پروپیلن فومارات (PPF)، پلی هیدروکسی آلکانوات ها، پلی آنیدریدها، پلی اورتواسترها و پلی فسفازن ها اشاره کرد.

۲-۴-۳- کلسیم فسفات ها و سایر سرامیک ها

کلسیم فسفات ها به عنوان ماده ای برای ترمیم عیوب استخوانی در مقالات علمی زیادی ذکر شدند و به صورت های تری کلسیم فسفات TCP، گرانوله های سرامیکی هیدروکسی آپاتیت و سیمان های کلسیم فسفاتی خود سخت شونده^۱ (CPC) وجود دارند [۳]. درصد زیادی از وزن کلی استخوان را، فاز معدنی تشکیل داده است که در این فاز معدنی، هیدروکسی آپاتیت طبیعی بخش عمده است و به همراه مواد جایگزین دیگر شامل کربنات، سیترات و یا یون های دیگر، فاز معدنی را تشکیل داده اند. با پیشرفت هیدروکسی آپاتیت آپاتیت های مصنوعی و سایر کلسیم فسفات ها مانند تری کلسیم فسفات (TCP)، تحقیقات روی این مواد به عنوان جایگزین پیوند استخوان، افزایش یافت. اخیراً این مواد در دندان پزشکی و در شرایط بالینی مانند جراحی های ارتوپدی، پلاستیک و ترمیمی مورد آزمایش قرار گرفته اند [۱۲].

یکی از جنبه های مهم در طراحی داربست های کلسیم فسفات، هندسه ی ساختار متخلخل آن ها است که باعث تقویت استخوان سازی و تسهیل نقل و انتقالات به درون شبکه می شود [۳].

^۱ Self-hardening calcium phosphate

۲-۴-۳-۱- تری کلسیم فسفات (TCP)

یکی از مواد سرامیکی کلسیم فسفاتی که به طور گسترده مورد آزمایش قرار گرفته است، تری کلسیم فسفات است. TCP با فرمول $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ شناخته می شود که نسبت کلسیم به فسفر در آن ۱/۵ است. TCP یک ماده ی به شدت زیست سازگار است و دارای دو شکل کریستالوگرافی متفاوت α -TCP و β -TCP یافت می شود. برای بررسی سمیت این ماده، آزمون سمیت در قسمت پهن استخوان فمور سگ انجام شد و هیچ افزایشی در کلسیم سرم، هیچ واکنش التهابی مشاهده نشد و فقط یک واکنش بافتی بی خطر اتفاق افتاد [۱۲].

TCP به دلیل ساختار کریستالی که دارد، نرخ زیست تخریب پذیری خیلی بالاتری نسبت به هیدروکسی آپاتیت دارد. این در حالی است که هنوز مکانیسم دقیق زیست تخریب پذیری نامعلوم است و بسیاری از محققان بر این باورند که با قرار دادن تری کلسیم فسفات در یک محیط اسیدی، این سرامیک به صورت درجا حل می شود. همان طور که ماده ی کاشته شده در حال جذب است، استخوان جدید در ناحیه ی درگیر با ایمپلنت تری کلسیم فسفات، در حال تشکیل است. از آنجایی که TCP هیچ فعالیت القای استخوان سازی ندارد، لذا این زیست فعالی به عنوان رسانش استخوان شناخته می شود، بنابراین داربستی برای رشد شبکه ی رگ ها و ایجاد استخوان جدید، فراهم می سازد. با وجود اینکه که بخش زیادی از ایمپلنت TCP در ماه اول جذب می شوند، مقداری از ماده مدت طولانی تری در ناحیه ی آسیب دیده باقی می ماند و شاید حتی سال ها در بدن انسان باقی بماند و به نظر می رسد که مواد باقی مانده در ساختار استخوان جدید قرار می گیرند و با آن ترکیب می شوند [۱۲].

زیست سازگاری و زیست جذب پذیری TCP، کاربرد این ماده را در مواردی از جمله پرکردن فواصل خالی ایجاد شده در پیوند آتوگرفت و یا به عنوان مکمل رشد استخوان، افزایش داده است. اگرچه این ماده در

نقاط بدون مغز استخوان، مانند جمجمه، کاربرد ندارد، اما نتایج استفاده از TCP در آرتروز مفاصل ساکروایلیاک یا جوش دادن مهره‌ها، بسیار مطلوب بوده است [۱۲].

۲-۴-۳-۲- هیدروکسی آپاتیت

این ماده‌ی طبیعی، جزء معدنی استخوان است و با ترکیب $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ شناخته می‌شود [۱۳]. شکل مصنوعی و سنتزی هیدروکسی آپاتیت نیز اگرچه کاملاً با شکل طبیعی آن یکسان نیست، اما نشان داده شده که از لحاظ شیمیایی و بلورشناسی مشابه هستند و از این رو توجه زیادی را جهت استفاده به عنوان جایگزین پیوند استخوان به خود جذب کرده‌اند. زیست‌سازگاری هیدروکسی آپاتیت نه تنها به خاطر ترکیب آن است، بلکه نتایج حاصل از ایمپلنت این ماده به صورت درون تن^۱، هیچ سمیت موضعی و سیستمیک، التهاب و پاسخ ایمنی را نشان ندادند و لذا زیست‌سازگاری هیدروکسی آپاتیت تأیید شد. بسیاری از محققان، اعمال تماس مستقیم هیدروکسی آپاتیت و استخوان را مورد بررسی قرار دادند. این تماس باید مستقیم و بدون مداخله‌ی لایه‌ی فیبروز باشد. جالب توجه است که ذراتی که در اثر ایمپلنت دچار شکستگی شده‌اند، با تشکیل استخوان جدید در نواحی ترک خورده و قرار گرفتن استخوان در هر دو طرف آن، زیست‌سازگاری هیدروکسی آپاتیت را به خوبی اثبات می‌کنند. در آزمون‌های مکانیکی نیز، شکست معمولاً در ناحیه‌ی استخوان و یا هیدروکسی آپاتیت رخ می‌دهد و در فصل مشترک استخوان- هیدروکسی آپاتیت، شکست ایجاد نمی‌شود [۱۲].

از مزایای اصلی استفاده از هیدروکسی آپاتیت به عنوان جایگزین پیوند استخوان، ایجاد پیوند قوی بین هیدروکسی آپاتیت و استخوان است. در حال حاضر اعتقاد بر این است که در ساعات اولیه پس از ایمپلنت، یک فاز التهابی^۲ به وجود می‌آید. در این زمان، سلول‌های مختلف؛ از جمله ماکروفاژها، به محل جراحی هجوم

¹ In vivo

² Inflammatory phase

برده و عمل فاگوسیتوز (بیگانه‌خواری) سلول‌های مرده‌ی باقی مانده را شروع می‌کنند و سپس به سطح ذرات هیدروکسی‌آپاتیت حمله می‌کنند. در نتیجه‌ی این عوامل، سطح ناهموار هیدروکسی‌آپاتیت یک لایه آپاتیت شیمیایی به وجود می‌آورد که در ظاهر نمی‌توان آن را از آپاتیت بیولوژیکی تشخیص داد [۱۲].

ویژگی دیگر هیدروکسی‌آپاتیت این است که ظاهراً قابلیت جذب پایینی دارد. در موارد بالینی خاص، به‌ویژه در دندان‌پزشکی، این ویژگی یک مزیت محسوب می‌شود. با این حال، در شرایط بالینی ایمپلنتی مطلوب است که در نهایت جذب شده و فضایی را برای تشکیل استخوان جدید ایجاد کند. برخی از محققان بر این باورند که هیدروکسی‌آپاتیت اساساً خنثی است اما برخی دیگر معتقدند که این ماده حداقل سرعت تخریب آهسته‌ای دارد. هیدروکسی‌آپاتیت با اینکه خاصیت القای استخوانی ندارد اما هنگامی که در محل آسیب‌دیده‌ی استخوان قرار می‌گیرد، خاصیت رسانش استخوانی نشان می‌دهد. تشکیل استخوان جدید از لبه‌های محل آسیب دیده شروع شده و در طول هیدروکسی‌آپاتیت هدایت می‌شود و پلی از جنس استخوان و هیدروکسی‌آپاتیت تشکیل می‌شود. در نهایت این استخوان نابالغ، تغییر شکل داده و به شکل نهایی درمی‌آید [۱۲]. این سرامیک به دلیل خواصی از جمله رسانش استخوان، زیست‌فعالی و زیست‌سازگاری خوبی که از خود نشان داده است، توجه زیادی را به خود جلب کرده و یکی از پرکاربردترین مواد در مهندسی بافت استخوان است اما علی‌رغم خواص بیولوژیکی مناسبی که دارد، هیدروکسی‌آپاتیت بسیار ترد است و برای رفع این مشکل باید با پلیمرها ترکیب شده و داربست کامپوزیتی پلیمر/سرامیک تشکیل شود [۱۳].

۲-۴-۳- بیوگلاس

در سال ۱۹۶۹ میلادی، ترکیبات خاصی از شیشه که دارای زیست‌سازگاری عالی و قابلیت پیوند با استخوان را داشتند، توسط هنج و همکارانش کشف شد [۱۴]. شیشه‌ی زیست‌فعال 45s5 با نام تجاری بیوگلاس، شایع‌ترین ترکیبی است که در کاربردهای پزشکی مورد مطالعه قرار گرفته است. این شیشه‌ها که شیشه‌های زیست‌فعال سیلیکاتی هستند؛ یک شبکه‌ی سه‌بعدی متشکل از SiO_2 هستند. علت زیست‌فعالی این ماده،

میزان کم SiO_2 آن، Na_2O و CaO زیاد و نسبت بالای $\text{CaO/P}_2\text{O}_5$ است. شیشه‌های زیست فعال از مواد معدنی که به‌طور طبیعی در بدن وجود دارند مانند SiO_2 ، Ca ، Na_2O ، H و P تشکیل شده‌اند و جالب است که نسبت‌های مولکولی اکسیدهای کلسیم و فسفر در این شیشه‌ها، مشابه با ترکیب استخوان طبیعی است. مطالعات بر روی این ماده و زیست‌فعالی آن نشان داد که با ایجاد لایه‌ی جایگزین مشابه کربنات هیدروکسی‌آپاتیت روی شیشه‌ی 45s5، پیوند این ماده با استخوان برقرار می‌شود [۹]. بیوگلاس مزایای زیادی از جمله قابلیت کنترل نرخ تخریب پذیری، خاصیت رسانش استخوان عالی، زیست‌فعالی و ظرفیت تحویل سلول‌ها را دارد و در مقابل محدودیت‌هایی در خواص مکانیکی نشان داده است که می‌توان به استحکام، چقرمگی و قابلیت اطمینان پایین آن اشاره کرد [۳].

۲-۴-۴- فلزات

از آنجایی که فلزات، موادی با استحکام مکانیکی و چقرمگی شکست بالا هستند، اغلب به عنوان بیومواد فلزی در زمینه‌ی دندان‌پزشکی و ارتوپدی برای جایگزینی و حمایت از استخوان آسیب دیده و کمک به بهبود آن، مورد استفاده قرار می‌گیرند. فلزات رایج که به‌عنوان ایمپلنت‌های استاندارد جراحی استفاده می‌شوند شامل فولاد زنگ نزن ۳۱۶L (ASTM F138)، آلیاژهای بر پایه‌ی کبالت (معمولاً ASTM F75 و ASTM F799) و آلیاژهای تیتانیوم به‌صورت Ti-6Al-4V (ASTM F67 و ASTM F136)، هستند. با این حال، این بیومواد فلزی مضراتی دارند که عبارت‌اند از: احتمال آزاد شدن یون‌های فلزی سمی و یا ذرات ناشی از فرایند خوردگی یا سایش که می‌تواند باعث التهاب و واکنش‌های آلرژیک شود و در نهایت بر زیست‌سازگاری و از بین رفتن بافت تأثیر می‌گذارد. هم‌چنین به دلیل مدول الاستیکشان که با استخوان طبیعی هم‌خوانی ندارد، نمی‌توانند به‌خوبی فرآیند استخوان سازی را تقویت کنند. علی‌رغم این‌ها، گزارش شده است که فلزات پایه تیتانیومی به دلیل خاصیت الاستیکی، خواص مکانیکی، اثر حافظه‌دار بودن، ساختار متخلخل و زیست فعالشان می‌توانند به‌عنوان جایگزین استخوان استفاده شوند. هم‌چنین داربست‌های سه‌بعدی میکرو متخلخل

تیتانیومی و نیکل تیتانیومی ساخته شده به روش متالورژی پودر، سطح آبدوستی فراهم کردند که رسوب هیدروکسی آپاتیت را تسهیل کرده و باعث تحریک چسبندگی و تکثیر سلول‌ها می‌شوند [۳].

۲-۴-۵- کامپوزیت‌ها

به منظور ایجاد ویژگی‌های مختلف در یک ماده، از جمله واکنش‌پذیری سطحی، زیست‌فعالی، استحکام مکانیکی و قابلیت تحویل دارو و فاکتورهای رشد، ساخت داربست‌های کامپوزیتی گسترش یافته است. خواص نهایی کامپوزیت‌ها طبق اثر هم‌افزایی^۱، با بهره‌گیری از خواص مواد مختلف به دست می‌آید. معمولاً داربست‌های کامپوزیتی با استفاده از انواع زمینه و فاز پراکنده در آن تولید می‌شوند که عبارت‌اند از پلیمر/سرامیک‌ها، سرامیک/فلزات و پلیمر/فلزات [۳].

۲-۴-۵-۱- پلیمر/سرامیک‌ها

در پنج سال اخیر داربست‌های پایه پلیمر/سرامیکی توسط محققان زیادی مورد مطالعه و بررسی قرار گرفته‌اند. ترکیب کلسیم فسفات/پلی‌استرها برای تولید داربست توسط کاپلان^۲ و همکاران [۱۵] مورد بررسی قرار گرفت. مطالعات برون‌تن انجام گرفته، زنده ماندن سلول‌ها، تکثیر و تمایز استئوژنیک را نشان دادند، اگرچه توزیع غیریکنواخت سلول‌ها به دلیل رسوب مواد معدنی نیز مشاهده شد. لی^۳ و همکاران [۱۶] از دو پلیمر زیست سازگار و زیست تخریب‌پذیر پلی‌لاکتیک گلیکولیک اسید و پلی‌کاپرولاکتون پوشش داده شده با یک لایه کلسیم فسفات و ژلاتین، استفاده کردند. سلول‌های MC3T3 به مناطقی از داربست، که حاوی مقادیر بالای کلسیم فسفات بوده است، چسبیدند که نشان می‌دهد معدنی‌سازی بر چسبندگی و

¹ Synergistic effect

² David L. Kaplan

³ Xiaoran Li

تکثیر سلول‌ها بر داربست و خواص فیزیکی آن‌ها تأثیرگذار است. در رابطه با خواص مکانیکی، کرنش موضعی در امتداد محور طولی داربست متغیر است و مدول یانگ با افزایش سطح کلسیم فسفات، افزایش یافت [۳].

۲-۴-۵-۲- سرامیک / فلزات

در سال‌های اخیر مطالعات گسترده‌ای روی داربست‌های سرامیک/فلزی انجام شده است و نشان داده شده که این داربست‌ها خواص مطلوبی از جمله خواص مکانیکی و زیست‌فعالی (چسبندگی سلولی، تکثیر و تمایز) دارا هستند [۳]. یانگ^۱ و همکاران [۱۷] داربستی زیست‌فعال و زیست‌تخریب‌پذیر ترکیب شده از منیزیم با پوشش بتا تری کلسیم فسفات طراحی کردند. آزمون مکانیکی نشان داد که کاهش استحکام مربوط به افزایش تخلخل‌ها بوده است. نتایج آزمون برون‌تن نیز چسبندگی سلولی و زیست‌فعالی خوبی را نشان داد.

۲-۴-۵-۳- پلیمر / فلزات

خواص فیزیکی و شیمیایی نقش مهمی در اتصال استخوان با سطح ایمپلنت دارد و امکان جذب پروتئین بین ایمپلنت زیستی و محیط بیولوژیکی را فراهم می‌کند. بنابراین برای ایجاد پیوند بین ایمپلنت و بافت زنده میزبان، استراتژی‌های مختلفی ارائه شده است. اخیراً استفاده از ایمپلنت‌های فلزی با پوشش پلیمر، با اهداف ذکر شده، توسط پژوهشگران زیادی مطرح شده است. تیتانیوم، اکسید تیتانیوم، و آلیاژ تیتانیوم (Ti6Al4V) ترکیب شده با پوشش‌های پلی‌استر، به‌طور گسترده برای ساخت داربست‌ها مورد مطالعه قرار گرفته‌اند [۳].

¹ Ke Yang

۲-۴-۶- یون‌های فلزی و خواص درمانی آن‌ها در مهندسی بافت

در حدود ۵٪ از بیمارانی که تحت عمل جراحی و کاشت ایمپلنت قرار می‌گیرند دچار عفونت می‌شوند و این مشکل با جراحی مجدد و خروج ایمپلنت برطرف می‌شود. چسبندگی میکروآرگانایسم‌ها روی سطح ایمپلنت، مرحله اولیه ایجاد عفونت است و منجر به ایجاد بیوفیلم می‌شود که در آن میکروآرگانایسم‌ها نسبت به عوامل آنتی‌میکروبی مقاوم هستند. برای حل این مشکل، پیشنهاد شده که از عوامل آنتی‌میکروبی مانند آنتی‌بیوتیک‌ها، فلورین و یون‌های فلزی که می‌توانند برخی عوامل زیستی را از بین ببرند، استفاده شود. مشکل اصلی آنتی‌بیوتیک‌ها این است که میکروآرگانایسم‌ها نسبت به آن مقاوم می‌شوند و آنتی‌بیوتیک‌های جذب شده توسط مایعات بدن به سرعت از بین می‌روند و در نتیجه در دراز مدت نمی‌توانند از ایجاد عفونت پس از جراحی‌ها جلوگیری کنند. یون‌های فلزی Ag^+ ، Cu^{2+} و Zn^{2+} به‌طور گسترده به‌عنوان عوامل آنتی‌میکروبی در پزشکی استفاده می‌شوند. [۱۸، ۱۹].

داربست‌های ساخته شده از مواد زیست تخریب‌پذیر پلیمری، سرامیکی و یا کامپوزیتی، جز محبوب‌ترین مواد جهت استفاده در مهندسی بافت هستند و تحقیقات در زمینه‌ی داربست‌های مهندسی بارگذاری شده با داروها و عوامل درمانی گسترش یافته که باعث عملکرد دوگانه برای ماتریس می‌شود؛ یعنی داربست‌های ساخته شده هم برای رشد بافت جدید و هم به‌عنوان حامل داروها برای دارورسانی کنترل‌شده به‌صورت درجا، عمل می‌کنند. به منظور ساخت چنین داربست‌هایی، متغیرهای متعددی باید مورد نظر قرار بگیرند. از لحاظ مهندسی بافت، انتخاب روشی مناسب برای ساخت داربست که بتواند خواص ساختاری و مکانیکی مناسبی ارائه دهد، اهمیت دارد. از لحاظ دارویی، روش ساخت داربست باید با پایداری دارو و رهایش آن سازگاری داشته باشد؛ شرایطی از جمله دمای بالا، استفاده از برخی حلال‌های آلی، فشار و رادیکال‌های آزاد می‌توانند منجر به تجزیه‌ی داروها شود و لذا انتخاب روش‌های ساخت داربست را محدود می‌کنند. چندین روش مناسب جهت ساخت داربست‌ها وجود دارد که در میان آن‌ها روش‌هایی است که با ترکیب داروهای

آلی ناسازگار هستند. بنابراین استفاده از یون‌های فلزی به عنوان عواملی با خواص درمانی در این نوع داربست‌ها مورد توجه قرار گرفته است. محدوده‌ی گسترده‌ای از یون‌های فلزی با کاربرد درمانی، که اکثر آن‌ها کوفاکتورهای آنزیمی هستند، می‌توانند در این زمینه استفاده شوند که شامل کبالت، مس، گالیوم، آهن، منگنز، نقره، استرانسیوم، وانادیوم و روی هستند [۲۰].

استفاده از یون‌های فلزی با کاربرد درمانی برخلاف مولکول‌های آلی، ریسک تجزیه و ناپایداری را ندارد. علاوه بر این، روش استفاده از یون‌های فلزی به عنوان عواملی با خواص درمانی بسیار مقرون به صرفه بوده و تحت شرایط رایج عملیات ساخت داربست‌های زیستی، که ممکن است با حلال‌های آلی، دماهای بالا، فشار و یا رادیکال‌های آزاد همراه باشند، پایدار خواهد بود. با این حال باید پتانسیل ایجاد سمیت یون‌های فلزی در هنگام رها شدن در محل نیز مورد توجه قرار گیرد [۲۰].

فعل و انفعالات با یون‌های فلزی، نقش مهمی در بسیاری از بیماری‌ها و اختلالات متابولیکی دارد؛ از جمله سرطان، اختلالات سیستم عصبی مرکزی، بیماری‌های عفونی، اختلال فعالیت دستگاه گوارش و اختلالات غدد درون‌ریز؛ که مطالعات در زمینه‌ی تأثیر این یون‌های فلزی بسیار گسترده است. بنابراین با کنترل میزان یون‌های فلزی و محل قرارگیری آن در بدن می‌توان کارایی آن را کنترل کرد. استفاده از یون‌های فلزی در زمینه‌ی مهندسی بافت به این دلیل مورد توجه و مطالعه قرار گرفته است که می‌توان با بهره‌گیری از آن‌ها و همچنین با استفاده از طیف گسترده‌ای از روش‌های تولید، داربست‌های زیستی با خاصیت درمانی تهیه کرد. علاوه بر این، نسبت به روش‌های مهندسی ژنتیک و پروتئین‌های نو ترکیب، مقرون به صرفه‌تر، دارای پایداری بالاتر و ایمنی بالاتری هستند. روش‌های ساخت داربست از جمله روش‌های ساخت سریع، الکتروروسی، جدایش فازی و خشک کردن انجمادی، روش‌هایی هستند که می‌توان در آن‌ها از یون‌های فلزی درمانی استفاده کرد [۲۰].

در رابطه با مهندسی بافت استخوان، استفاده از برخی یون‌های فلزی (برای مثال مس، استرانسیوم و روی) مورد توجه قرار گرفته است زیرا بسیاری از آن‌ها کوفاکتورهای فرآیندهای متابولیکی، از جمله استخوان، بافت‌های مفصلی و عملکرد سیستم ایمنی هستند. همچنین، همان‌طور که در بالا اشاره شد، بارگذاری این فلزات در داربست‌ها، فاقد ریسک تجزیه‌ی دارویی و یا ناپایداری حاصل از روش تولید است. علاوه بر این چسبندگی باکتری‌ها به بیومواد، که منجر به عفونت اطراف بیوماده می‌شود و اختلاط با بافت مشکلاتی هستند که به‌ویژه در موارد درون‌تن، می‌توانند کارایی داربست را کاهش دهند [۲۰].

در جدول ۲-۲ به‌طور خلاصه به بررسی عملکرد و تأثیر زیستی برخی یون‌های فلزی با کاربرد امید بخش در مهندسی بافت خواهیم پرداخت.

جدول ۲-۲- خلاصه‌ای از عملکرد و تأثیر زیستی یون‌های فلزی در مهندسی بافت [۲۰]

یون فلزی	عملکرد و تأثیر زیستی
مس	- تحریک تکثیر سلول‌های اندوتلیال انسان - ترکیب مس- تیولات ضد التهاب گزارش شده است. - مدول تکثیر و تمایز سلول‌های بنیادی مزانشیمی به سمت استخوان‌سازی - تسهیل آزادسازی فاکتورهای رشد و سیتوکین‌ها - خواص آنتی‌باکتریال
استرانسیوم	- از طریق مبادله با Ca^{2+} در شبکه‌ی کریستالی هیدروکسی‌آپاتیت، درون اسکلت ذخیره می‌شوند، ترجیحاً در استخوان تراکولار - دوزهای پایین Sr^{2+} باعث تحریک رشد استخوان می‌شوند. دوزهای بالا به دلیل کاهش جذب کلسیم و تغییر خواص معدنی، بر روی معدنی سازی استخوان اثرات زیان‌بار دارند. - افزایش تشکیل استخوان و کاهش جذب استخوان که منجر به افزایش حجم استخوان و بهبود خواص مکانیکی در حیوانات و انسان می‌شود.

-
- روی تحریک استخوان سازی از طریق بهبود تمایز سلول های استئوبلاست
 - تسهیل رشد اعصاب
 - در متابولیسم استخوان، وابسته به هورمون رشد یا فاکتور رشد مشابه انسولین است.

- نقشه عامل آنتی باکتریال (Ag^{2+})
- اتصال به DNA میکروبی (جلوگیری از تکثیر) و یا گروه های سولفیدریل آنزیم های باکتریایی (مهار تنفس سلول ها و نقل و انتقالات محدود مواد مهم در غشا و درون سلول ها).

۲-۵- روش های ساخت داربست

روش های ساخت داربست به دو گروه کلی تقسیم می شوند. روش های مرسوم^۱ و روش های ساخت سریع^۲. در ادامه به روش های مرسوم برای ساخت داربست، که هر یک از این روش ها دارای مزایا و معایبی هستند، اشاره خواهد شد:

۲-۵-۱- روش خود تجمعی^۳

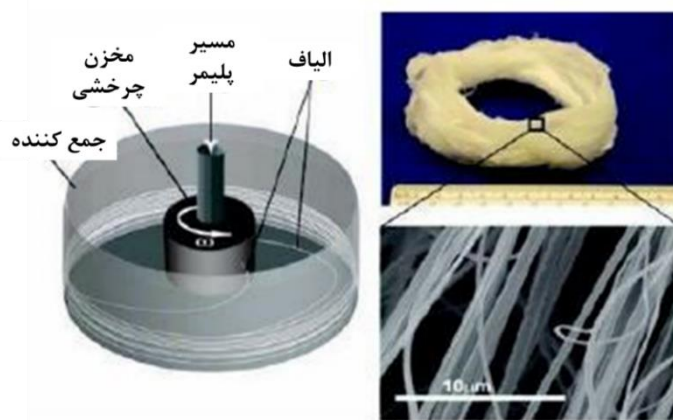
این روش برای ساخت داربست های زیستی به کار می رود. در این روش از ذراتی استفاده می شود که از لحاظ ویژگی های فیزیکی مانند اندازه و هم چنین ویژگی های شیمیایی مشابه هم هستند. نانوذرات کاندیدی مناسبی برای این روش هستند. با حرکت از جز به کل در روش مهندسی معکوس، این ذرات در کنار هم قرار می گیرد و با تجمع این ذرات، ساختارهای متخلخل به وجود می آیند. مطابق شکل ۲-۶، برای ساخت

^۱ Conventional Scaffold Fabrication Techniques

^۲ Rapid Prototyping

^۳ Self-Assembly method

داربست از نانوفیبرها به این روش، می‌توان از یک ماشین چرخنده (روتور) نیز استفاده کرد به این صورت که با حرکت دورانی و سریع محفظه‌ی روتور، الیاف روی هم فشرده و جمع می‌شوند. تهیه داربست به این روش آسان و کم‌هزینه است و درکل بسیار پرکاربرد است [۵].



شکل ۲-۶- روتور برای تجمع نانوالیاف در روش خود تجمعی [۵].

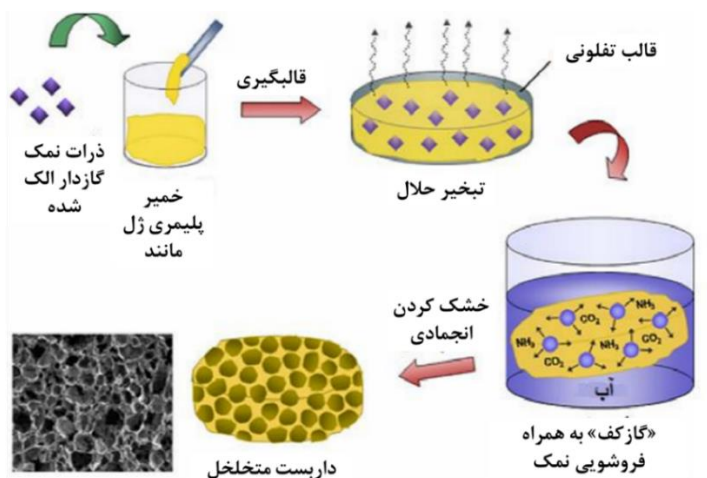
۲-۵-۲- روش اتصال رشته‌ای^۱

در این روش، داربست از طریق اتصال الیاف به یکدیگر به دست می‌آید و در نقاط تقاطع الیاف، حفرات به وجود می‌آیند. این روش ساخت نوعی از تکنولوژی نساجی است که مواد اولیه‌ی آن از جنس پلیمرهای تخریب‌پذیر شبکه‌ای و غیر بافته شده است. پلیمرهای PGA و PLA تاکنون در این روش استفاده شده‌اند. داربست‌های ساخته شده به این روش، پایداری کمی دارند و پس از کاشته شدن سلول‌ها روی داربست، تغییر شکل آن مشاهده می‌شود. بنابراین برای بهبود خواص مکانیکی داربست‌های ساخته شده به این روش، اقداماتی انجام می‌شود [۵].

^۱ Fiber bonding

۲-۵-۳- روش گازکف^۱

در این روش برای ایجاد حفرات در داربست، از گاز دی‌اکسیدکربن با فشار بالا استفاده می‌شود. به این صورت که ابتدا پلیمر را روی صفحات مشبکی قرار می‌دهند و به مدت چند روز آن را در معرض گاز دی‌اکسیدکربن با فشار بالا قرار می‌دهند. طی این مدت پلیمر توسط گاز دی‌اکسیدکربن اشباع می‌شود. در مرحله‌ی بعد، فشار روی داربست را کم می‌کنند و به سطح فشار اتمسفر می‌رسانند و در نتیجه‌ی آن حلالیت گاز در پلیمر کاهش یافته و گاز از پلیمر خارج می‌شود و به جای آن حفرات در داربست شکل می‌گیرند. از مزایای این روش این است که نیازی به حلال نیست و فرآیند گرمادهی وجود ندارد، لذا برای موادی که به حرارت حساس هستند روش مناسبی است. برای کارآمدتر شدن این روش، می‌توان از ذرات نمک نیز استفاده کرد، مثلاً به خمیر یا ژل پلیمر، ذرات نمک بی‌کربنات آمونیوم اضافه می‌کنند و پس از غوطه‌ور شدن پلیمر حاصل در آب، این نمک به آمونیاک و گاز دی‌اکسیدکربن تبدیل می‌شود. به این ترتیب گاز دی‌اکسیدکربن خارج شده و آمونیاک نیز شسته می‌شود و پلیمر متخلخل به دست می‌آید [۵]. مراحل این فرآیند در شکل ۲-۷ مشاهده می‌شود.



شکل ۲-۷- روند ساخت داربست به روش گازکف [۵].

¹ Gas foaming

۲-۵-۴- روش سل- ژل

روش سل- ژل بر پایه‌ی پلیمریزاسیون غیرآلی آلکوکسیدهای فلزی است. سل با اضافه شدن ماده‌ی فعال سطحی^۱ به دست می‌آید و در ادامه متراکم سازی و ژل شدن اتفاق می‌افتد. این فرآیند برای تولید مواد سرامیکی یا شیشه‌ای به صورت پودر بسیار ریز یا کروی شکل، پوشش‌های فیلم نازک، فیبرهای سرامیکی، غشاهای غیرآلی با تخلخل‌های میکرو، سرامیک‌ها و شیشه‌های مونولیتیک و مواد ژلی با دانسیته کم و تخلخل زیاد، مناسب است. داربست‌های ساخته شده با روش سل- ژل استحکام مکانیکی پایینی دارند و باید از روش‌های اصلاح‌شده‌ی روش سل- ژل استفاده شود [۲].

۲-۵-۵- روش حرارتی ناشی از جداسازی فاز^۲

اساس این روش، جداسازی دو فاز است. حلال مورد استفاده در این فرآیند باید نقطه ذوب پایینی داشته باشد تا بتواند به سرعت تصعید شود. برای مثال پلیمر PLA در حلال دی‌اگزان حل می‌شود و سپس برای اینکه دو فاز داشته باشیم به آن مقداری آب اضافه می‌شود. در این مرحله دو فاز به وجود آمده که یکی دارای مقدار زیادی پلیمر و در فاز دیگر مقدار کمی پلیمر وجود دارد. در مرحله بعد دمای محلول را به زیر دمای ذوب حلال می‌رسانند تا دوفاز باحالت جامد تشکیل شود. بعد از چند روز با خشک کردن در خلأ، حلال تصعید شده و داربست متخلخل حاصل می‌شود. در این روش تخلخل بالای ۹۰ درصد است و منافذ به دست آمده از ۱ تا ۱۰ میکرومتر خواهند بود. برای افزایش مورفولوژی اسفنجی شکل می‌توان به محلول پلیمری سورفکتانت یا مولکول‌های فعال از لحاظ بیولوژیکی مانند آلکالین فسفاتاز اضافه کرد [۵].

¹ surfactant

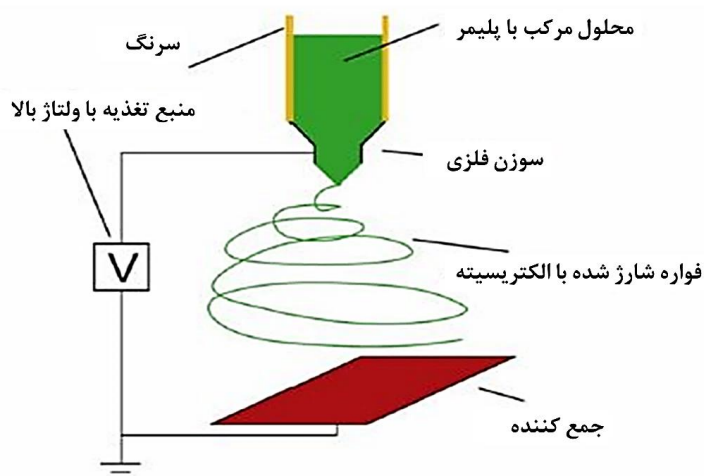
² Thermally Induced Phase Separation(TIPS)

۲-۵-۶- روش الکترورسی^۱

این روش پرکاربردترین روش ساخت داربست است که بسیار ساده بوده و در سطح آزمایشگاه نیز می‌توان انجام داد. در این روش از یک سرنگ، یک صفحه‌ی جمع‌کننده به همراه ولتاژ ۲۰-۱۰ KV استفاده می‌شود. در ابتدا پلیمر به صورت محلول یا مذاب درآمده و داخل سرنگ ریخته می‌شود. در این روش هیچ محدودیتی برای نوع پلیمر مورد استفاده وجود ندارد و می‌توان از انواع مختلف پلیمرها استفاده کرد [۵].

مطابق شکل ۲-۸، با استفاده از نیروی گرانش، فشار مکانیکی سرنگ و میدان الکتریکی با ولتاژ بالا، محلول پلیمری از سرنگ خارج می‌شود. سطح هر پلیمر به صورت طبیعی باردار است و در نتیجه میدان الکتریکی اعمالی در هر لحظه در سطح پلیمر جاذبه و دافعه ایجاد می‌کند و همچنین این نیروی الکتریکی برکشش سطحی قطره‌ی محلول پلیمری غلبه کرده و پلیمر به صورت فواره‌ی نازکی از نوک سرنگ خارج می‌شود. حلال نیز به طور هم‌زمان تبخیر شده و پلیمر به صورت فیبر پیوسته‌ای از نازل خارج می‌شود و روی صفحه جمع‌کننده به صورت رفت و برگشتی تنیده می‌شود و در نهایت داربستی متخلخل به دست می‌آید. با تغییر شدت جریان خروج محلول از سرنگ، فاصله صفحه جمع‌کننده تا سرنگ و مقدار ولتاژ (تا ۳۰ KV) می‌توان اندازه حفرات را تغییر داد [۵].

¹ Electrospinning



شکل ۲-۸- تصویر شماتیک روش الکتروریسی [۵].

۲-۵-۷- روش خشک کردن انجمادی^۱

در این روش، یک پلیمر مصنوعی را در حلال مناسب حل می کنند. سپس محلول پلیمری حاصل را تا دمای پایین تر از نقطه ی انجماد آن منجمد کرده که در نتیجه ی آن حلال منجمد می شود و در مراحل بعدی، با استفاده از دستگاه خشک کن انجمادی و تحت خلأ، حلال تصعید شده و از بین می رود و یک داربست خشک با حفرات به هم متصل بیشمار، به دست می آید. یکی از مزیت های این روش این است که از دماهای بالا، که باعث کاهش فعالیت فاکتورهای بیولوژیکی مورد استفاده در ساخت داربست می شوند، استفاده نمی شود. علاوه بر این اندازه حفرات را می توان با تنظیم دمای انجماد، کنترل کرد. از معایب این روش می توان به مدت زمان طولانی تولید، انرژی مصرفی زیاد، استفاده از حلال های سمی و ساخت حفرات نامنظم با اندازه ی کوچک (معمولاً بین ۱۵ تا ۳۵ میکرومتر) اشاره کرد. برای اصلاح مشکل کوچک بودن حفرات، روش هایی از جمله تغییر دمای انجماد (۱۰- تا ۷۰- درجه سانتی گراد) و یک مرحله اضافی تابکاری^۲ برای افزایش نرخ رشد کریستال های یخ، آزمایش شدند [۲].

^۱ Freeze drying/Lyophilization

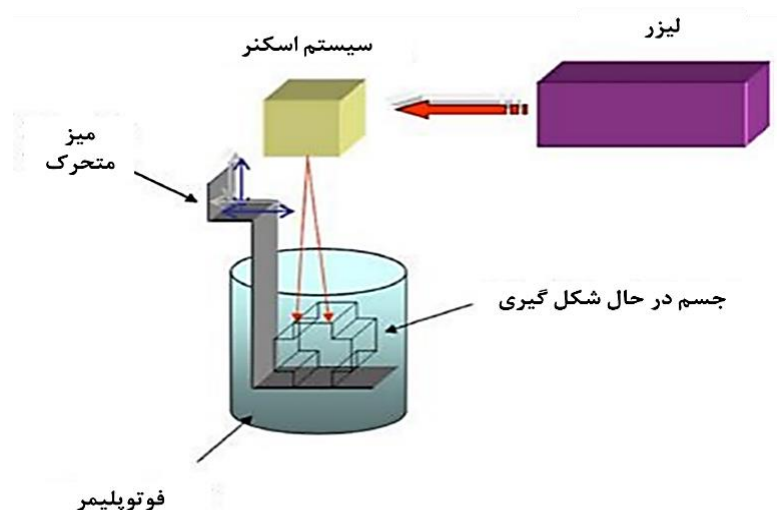
^۲ Annealing

۲-۵-۸- روش‌های ساخت سریع

به عنوان جایگزین روش‌های مرسوم ساخت داربست، اخیراً گروهی از روش‌ها با عنوان روش‌های ساخت سریع معرفی شدند. این روش‌های ساخت پیشرفته بر پایه‌ی یک فرآیند افزایشی هستند که در آن می‌توان ساختارهایی با شکل پیچیده را از طریق برنامه‌ی کامپیوتری و به صورت لایه-لایه، ساخت [۲۱]. برخی از این روش‌ها عبارت‌اند از:

۲-۵-۸-۱- روش استریولیتوگرافی

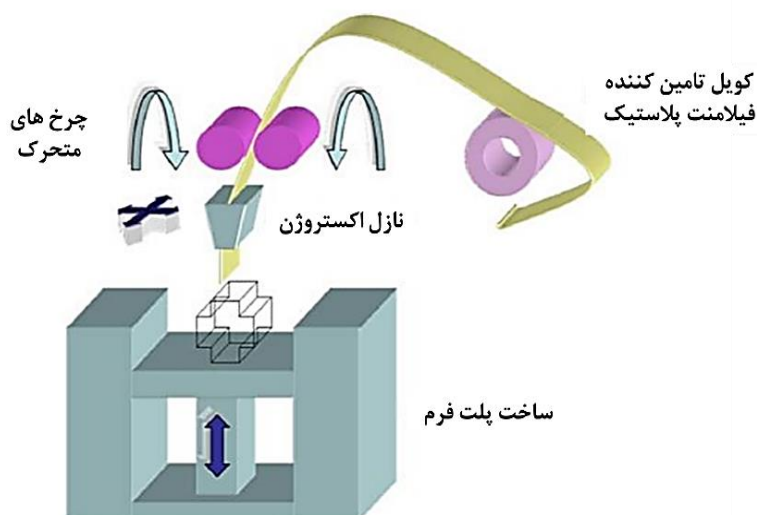
در این روش، مطابق شکل ۲-۹ با استفاده از یک لیزر فرابنفش (UV) سطح مقطع مدل مورد نظر به صورت جامد درآمده و سایر قسمت‌ها به صورت مایع باقی می‌مانند. سپس میز متحرک به مقدار مشخص به سمت پایین حرکت می‌کند تا سطح جامد توسط لایه‌ای دیگر از رزین مایع پر شود و عملیات دوباره تکرار می‌شود [۲۱].



شکل ۲-۹- شماتیک از سیستم استریولیتوگرافی [۲۱].

۲-۵-۸-۲- روش مدل سازی جوش خوردگی رسوبی^۱

با توجه به شکل ۲-۱۰، در روش FDM با استفاده از یک نازل متحرک، فیبر پلیمری اکسترود می شود و مدل فیزیکی به صورت لایه به لایه ساخته می شود [۲۱].



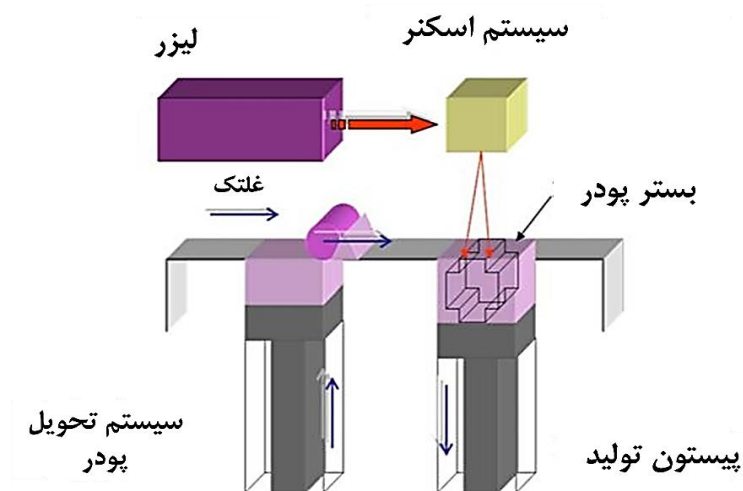
شکل ۲-۱۰- شکل شماتیک از روش مدل سازی جوش خوردگی رسوبی [۲۱].

۲-۵-۸-۳- روش تف جوشی با لیزر انتخابی^۲

همان طور که در شکل ۲-۱۱ مشاهده می شود، در روش تف جوشی با لیزر انتخابی، لیزر از طریق اسکن سطح مقطع های مشخص بستر پودر، که به صورت سه بعدی تعریف شده اند، پودر را گداخته می کند. بعد از اینکه هر سطح مقطع اسکن شد، بستر پودر به ضخامت یک لایه پایین می رود و لایه جدیدی از ماده روی آن قرار می گیرد و این فرآیند تا کامل شدن شکل ادامه می یابد [۲۱].

¹ Fused Deposition Modeling

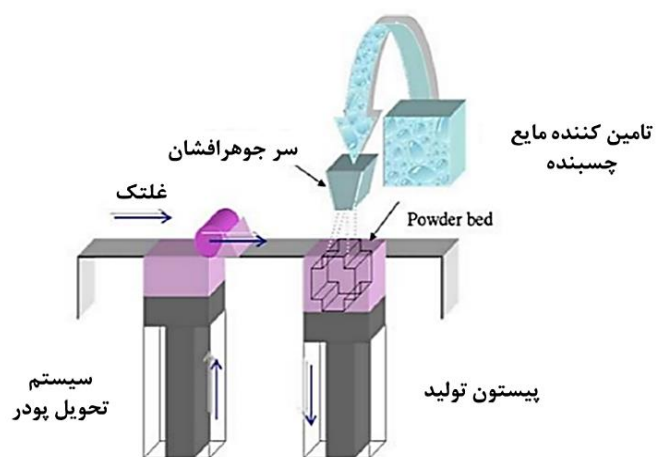
² Selective Laser Sintering



شکل ۲-۱۱- شکل شماتیک از روش تفجوشی با لیزر انتخابی [۲۱].

۲-۵-۸-۴- روش پرینت سه بعدی

در این روش، با توجه به شکل ۲-۱۲ جریانی از قطرات چسبنده از قسمت جوهرافشان چاپگر خارج شده و به صورت انتخابی لایه‌ی نازکی از ذرات پودری را به هم می‌چسباند تا شکل جامد موردنظر به دست آید [۲۱].



شکل ۲-۱۲- شکل شماتیک از فرآیند پرینت سه بعدی [۲۱].

۲-۶- مزایا و معایب روش‌های ساخت داربست‌ها

روش‌های مختلف ساخت داربست‌های سه‌بعدی در بخش قبلی توضیح داده شد. به‌طور کلی در روش‌های ساخت مرسوم، برخلاف روش‌های ساخت سریع، امکان کنترل دقیق روی ساختار داخلی داربست و یا ایجاد ساختارهای پیچیده با استفاده از نرم‌افزارهای مدل‌سازی مانند CAD وجود ندارد. همچنین در روش‌های مرسوم احتیاج به مهارت ساخت خوب است تا بتوان ثبات و استحکام خوبی در ساختار داربست ایجاد کرد. محدودیت دیگر این روش‌ها استفاده از حلال‌های سمی در آن‌ها است و در صورتی که به‌طور کامل از ساختار حذف نشوند می‌توانند باعث مرگ سلولی شوند. همچنین داربست‌های ساخته شده با روش‌های مرسوم مدول فشاری حداکثر 0.4 MPa ایجاد می‌کنند در حالی که این مقدار در بافت‌های سخت $10-1500 \text{ MPa}$ و در اکثر بافت‌های نرم $0.4-350 \text{ MPa}$ است. بنابراین گسترش روش‌های ساخت سریع امکان ساخت داربست‌هایی را می‌دهد که خواص مکانیکی بهبود یافته و محدوده‌ی مدول گسترده از بافت نرم تا بافت سخت را دارا هستند. روش‌های ساخت سریع دارای تکرارپذیری در طراحی و کنترل ساختار داربست هستند. اگرچه روش‌های ساخت سریع مزایایی دارند، در مقابل محدودیت‌ها و چالش‌هایی نیز در این روش‌ها وجود دارد؛ برای مثال تعداد بیومواد که از روش‌های ساخت سریع می‌توان مورد استفاده قرار داد در مقایسه با روش‌های مرسوم خیلی محدود است [۲۲].

۲-۷- مروری بر پژوهش‌های پیشین

از دهه ۶۰ میلادی پلیمرهای قابل جذب و تخریب پذیر برای انتقال دارو و هورمون به کار می‌رفت. پس از آن در دهه ۷۰ به عنوان کاشت برای کنترل رهاسازی هورمون، به ویژه هورمون‌های پیشگیری از بارداری به کاربرده شدند [۵]. در سال ۱۹۷۰ میلادی برای اولین بار داربست برای رشد غضروف از پلیمرهای زیست سازگار و زیست‌تخریب‌پذیر ابداع شد. از اواسط دهه ۱۹۹۰ میلادی تا اواخر آن، تحقیقات در زمینه‌ی مهندسی بافت در اغلب کشورهای توسعه یافته شروع به رشد کرد و سرمایه‌گذاری در این زمینه نیز گسترش

یافت [۲۳, ۴]. در سال ۱۹۹۲ میلادی ناتون^۱ و همکاران روی پروتز مفصل ران تحقیقی انجام دادند، بدین ترتیب که آن را با پوششی از سلول‌های غضروف، که به صورت سه بعدی کشت داده شده بود، در بدن فرد بیمار جایگزین کردند [۲۴].

کیم^۲ و همکاران [۲۵] در سال ۲۰۰۴ میلادی داربست متخلخل استخوانی از جنس هیدروکسی‌آپاتیت با پوشش هیبریدی پلی‌کاپرولاکتون و پودر هیدروکسی‌آپاتیت، به منظور کاربرد در بازسازی بافت و سیستم رهایش کنترل‌شده، طراحی کردند. داروی آنتی‌بیوتیک «تتراسایکلین هیدروکلراید» درون لایه‌ی پوشش هیبریدی، به روش غوطه‌وری و ریخته‌گری حلال، کپسوله شد. چرخه‌ی پوشش‌دهی و میزان بارگذاری دارو، به منظور کنترل نرخ رهایش دارو، متغیر بود. چارچوب داربست هیدروکسی‌آپاتیت، به روش فوم پلیمری ساخته شد و یک ساختار بسیار متخلخل با میزان تخلخل حدود ۸۷٪ و اندازه تخلخل حدود $180\text{ }\mu\text{m}$ ، ارائه داد. لایه‌ی هیبریدی، شامل ورق پلی‌کاپرولاکتون و پودر ریزساختار هیدروکسی‌آپاتیت، به‌طور یکنواخت روی سطح داربست پوشش داده شد. لایه‌ی پوششی فقط فازها و ساختارهای هیدروکسی‌آپاتیت و پلی‌کاپرولاکتون را نشان داد و با توجه به مشاهدات حاصل از آزمون XRD و FTIR، هیچ‌گونه برهم‌کنش شیمیایی میان اجزای پوشش دهنده رخ نداده بود. داربست پوشش داده شده‌ی هیدروکسی‌آپاتیت در شرایطی که تحت بار قرار گرفت، توزیع تنش مؤثری نشان داد که از طریق منحنی تنش- کرنش فشاری مشخص شد. خواص مکانیکی داربست‌ها در اثر پوشش دهی افزایش چشم‌گیری داشتند؛ استحکام فشاری و مدول الاستیک داربست‌های پوشش داده شده حدود ۳ الی ۴ برابر و جذب انرژی آن‌ها حدود ۸ برابر بیشتر از داربست‌های بدون پوشش بود. حلالیت داربست‌های ساخته شده در محلول فسفات بافر سالین^۳ (PBS) با تنظیم زمان انکوباسیون، افزایش یافت. دارو در طول چند ساعت اولیه (۲ ساعت) با شدت زیاد

¹ Gail K. Naughton

² Hae-Won Kim

³ Phosphate buffersaline

رها شد، اما نرخ رهایش آن به مرور کاهش پیدا کرد. نرخ رهایش از طریق سیکل پوشش دهی و مقدار بارگذاری اولیه، به خوبی کنترل شد و نشان داد که طراحی داربست‌های پوششی به منظور سیستم‌های رهایش دارو بسیار مؤثر است.

ساراسام^۱ و همکاران [۲۶] در سال ۲۰۰۵ کامپوزیت پلی‌کاپرولاکتون/کیتوسان تولید کردند و خواص بیومکانیکی ایجادشده بعد از اختلاط این دو ماده را بررسی نمودند. کشت سلولی آزمایشگاهی روی داربست انجام شد و نتیجه گرفتند که بهترین خواص مکانیکی در شرایط مرطوب را مخلوط ۵۰:۵۰ این دو ماده ایجاد کرده است.

آصف‌نژاد و همکاران [۲۷] در سال ۱۳۸۹ هـ.ش داربست کامپوزیتی پلی‌یورتان/هیدروکسی‌آپاتیت به روش خشک کردن انجمادی تهیه کردند و خصوصیات مورفولوژیکی و مکانیکی آن را، با افزایش مقدار هیدروکسی‌آپاتیت (۵٪، ۱۰٪ و ۲۰٪)، مورد بررسی قراردادند. نتایج حاصل از بررسی‌ها نشانگر آن بود که داربست ساخته شده به روش خشک کردن انجمادی دارای تخلخل‌های به هم مرتبط بوده که محیط مناسبی را برای رشد سلول‌ها فراهم کرده است. با افزایش مقدار هیدروکسی‌آپاتیت در نمونه‌ها، درصد تخلخل‌ها کاهش یافته و دیواره‌ها ضخیم‌تر شدند و در نتیجه‌ی آن اندازه حفرات کم شدند. اندازه‌ی تخلخل‌ها در محدوده‌ی ۵۰-۲۰۰ μm بود. مدول و استحکام داربست‌ها و هم‌چنین میزان جذب آب داربست‌ها با افزایش مقدار هیدروکسی‌آپاتیت، افزایش یافت. به طوری که بیشترین استحکام فشاری مربوط به نمونه‌ی حاوی ۲۰٪ هیدروکسی‌آپاتیت برابر با ۰/۸۵ MPa بود.

^۱ Aparna Sarasam

بونتاریکا^۱ و همکاران [۲۸] در سال ۲۰۱۰ داربست کامپوزیتی پلی کاپرولاکتون/ هیدروکسی آپاتیت به روش ریخته‌گری ترکیبی حلال^۲ و لیچینگ ذره‌ای^۳ تولید کردند. میانگین اندازه حفرات پس از بررسی حدود $480-500 \mu m$ گزارش شده است. تخلخل، جذب آب و مدول فشاری داربست اندازه‌گیری شدند. واکنش داربست نسبت به کشت سلول‌های ابتدایی استخوان هم در شرایط برون‌تن (in vitro) و هم در شرایط درون‌تن (in vivo) ارزیابی شد. کشت سلولی روی داربست پلی کاپرولاکتون/ هیدروکسی آپاتیت در مقایسه با کشت سلولی روی داربست پلی کاپرولاکتون تمایز سلول‌های استئوژنیک را به خوبی نشان داد که در نتیجه این داربست جهت کاربرد در مهندسی بافت استخوان مناسب است.

روحانی و همکاران [۲۹] در سال ۲۰۱۰ داربست کامپوزیتی تهیه کردند که در آن سطح کلسیم فسفات دوفازی توسط لایه‌ای از نانو کامپوزیت متشکل از نانو ذرات هیدروکسی آپاتیت و پلی کاپرولاکتون، پوشش داده شده بود و سپس تأثیر اندازه و شکل ذرات هیدروکسی آپاتیت، که در لایه‌ی پوششی استفاده شد، بر روی خواص مکانیکی و زیستی داربست کلسیم فسفات دوفازی مورد بررسی قرار گرفت. مطالعه‌ی توموگرافی میکرو-کامپیوتری نشان داد که داربست‌های تهیه شده دارای ساختاری با تخلخل بالا (حدود ۹۱٪) با اندازه حفرات بزرگ ($400-700 \mu m$) و به هم پیوسته هستند. داربست‌های پوشش داده شده با کامپوزیت نانو ذرات هیدروکسی آپاتیت (سوزنی شکل)، بالاترین استحکام فشاری (0.07 ± 0.1 MPa) را در مقایسه با هیدروکسی آپاتیت/ بتا تری کلسیم فسفات خالص (0.05 ± 0.1 MPa) و داربست‌های پوشش داده شده با کامپوزیت هیدروکسی آپاتیت (0.07 ± 0.29 MPa) داشت. همچنین این داربست‌های سوزنی شکل الاستیسیته بهتر و منحنی تنش-کرنش مشابهی با استخوان نشان دادند. ذرات سوزنی شکل هیدروکسی آپاتیت/ پلی کاپرولاکتون، تمایز سلول‌های مشتق شده از استخوان انسان را، به همراه تغییرات

¹ Boontharika Chuenjitkuntaworn

² Combined solvent casting

³ Particulate leaching

قابل توجهی در بیان ژن استخوان ساز (Runx2، کلاژن نوع ۱، استئوکلسین و سیالوپروتئین استخوان) و فعالیت آلکالین فسفاتاز را در مقایسه با گروه‌های دیگر، تحریک کردند. این خواص برای بهبود استخوان سازی در محل‌های تحت بار بسیار ضروری هستند و داربست کامپوزیتی تولید شده خواص فیزیکی، مکانیکی و زیستی عالی ارائه کرد که برای استفاده به عنوان بازسازی بافت استخوان مناسب است.

تریپاتی^۱ و همکاران [۳۰] در سال ۲۰۱۱ داربست کامپوزیتی از مواد کیتوسان، نانو ذرات هیدروکسی آپاتیت و نانو ذرات مس- روی به روش خشک کردن انجمادی به منظور استفاده در مهندسی بافت استخوان تهیه کردند. اضافه کردن نانو ذرات مس و روی به داربست کیتوسان/ هیدروکسی آپاتیت باعث افزایش تورم و جذب آب داربست‌ها، کاهش تجزیه پذیری داربست، افزایش جذب پروتئین و افزایش فعالیت آنتی باکتریال داربست‌ها شد. با انجام آزمون‌های SEM، EDX، XRD و FTIR داربست‌های ساخته شده مورد بررسی قرار گرفتند و نشان داده شد که ساختار داربست‌ها دارای تخلخل‌های در حدود $115\text{ }\mu\text{m}$ بود که برای رشد و تکثیر سلول‌ها مناسب است. همچنین نانو ذرات مس و روی در زمینه کیتوسان/ هیدروکسی آپاتیت به خوبی توزیع شده بودند.

ساروانان^۲ و همکاران [۳۱] در سال ۲۰۱۱ داربست کامپوزیتی کیتوسان/ نانو-هیدروکسی آپاتیت/ نانو-نقره تهیه و مشخصه‌یابی کردند و فعالیت آنتی میکروبی آن را مورد ارزیابی قرار دادند. در این پژوهش داربست مورد نظر از روش خشک کردن انجمادی ساخته شد و به دنبال آن یون‌های نقره با مقادیر کنترل شده طی پدیده کاهش توسط گروه‌های عاملی کیتوسان نشان داده شدند. داربست ساخته شده به وسیله آزمون‌های SEM، XRD، FTIR و همچنین تورم سنجی و ارزیابی تخریب پذیری مورد بررسی و مشخصه‌یابی قرار گرفت. بررسی مورفولوژی داربست‌ها ساختار متخلخل با اندازه تخلخل‌های حدود $50-100\text{ }\mu\text{m}$ را نشان داد.

¹ Anjali Tripathi

² Sekaran Saravanan

همچنین بررسی داربست‌ها با باکتری‌های گرم مثبت و منفی نشان دهنده‌ی فعالیت آنتی باکتریال داربست‌ها بود و از سوی دیگر هیچ سمیتی در تماس با سلول‌های استئوپروژنی‌تور موش و سلول‌های استئوسارکوما انسان نشان ندادند که در نتیجه این نتایج نشان داد که داربست ساخته شده دارای پتانسیل کنترل عفونت‌های باکتریایی در جراحی‌های ایمپلنت استخوان است.

صادقی و همکاران [۳۲] در سال ۱۳۹۱ هـ.ش داربست کامپوزیتی با مواد کیتوسان، ژلاتین و هیدروکسی‌آپاتیت به روش خشک کردن انجمادی تهیه کردند و تأثیر میزان ژلاتین بر خواص بیولوژیکی داربست را از طریق کشت سلول‌های استئوبلاست و آزمون سنجش فعالیت آلكالین فسفاتازی بررسی کردند. به همین منظور درصدهای مختلف ژلاتین (۰، ۱۰ و ۲۰ درصد) به کیتوسان و هیدروکسی‌آپاتیت اضافه شد و نتایج نشان داد فعالیت سلول‌های استئوبلاست روی تمام داربست‌ها زیاد بوده ولی داربست‌های شامل ژلاتین مناسب‌تر هستند.

حسن^۱ و همکاران [۳۳] در سال ۲۰۱۲ بر روی داربست پلی‌کاپرولاکتون/هیدروکسی‌آپاتیت مطالعه‌ای انجام دادند. در این پژوهش، پودر هیدروکسی‌آپاتیت به روش خشک کردن انجمادی تهیه شده است؛ به این صورت که ابتدا محلول کلسیم نترات ۴- هیدرات و استون با محلول آبی آمونیوم فسفات و آمونیوم کربنات در pH کنترل‌شده‌ی ۱۱ مخلوط شد. نانو امولسیون ساخته شده به مدت یک روز در فریزر منجمد شد و پس از آن به مدت ۳ روز در دستگاه خشک‌کن انجمادی قرار گرفت و در نهایت پودر هیدروکسی‌آپاتیت با درجه آگلومره‌ی پایین، تهیه شد. نانو ذرات تهیه شده به وسیله‌ی SEM مورد بررسی قرار گرفتند. نتایج حاصل از EDX، طیف عناصر موجود در هیدروکسی‌آپاتیت و نسبت Ca/P را نشان داد که نزدیک به مقادیر آن‌ها در استخوان طبیعی بود. داربست‌های پلی‌کاپرولاکتون و هیدروکسی‌آپاتیت/پلی‌کاپرولاکتون، به روش حرارتی ناشی از جدایش فازی (TIPS) تهیه شد. داربست‌ها توسط SEM بررسی شدند و مشاهده شد که هر دو نوع

¹ Mohd I. Hassan

داربست دارای ساختار متخلخل هستند. اندازه حفرات در داربست پلی کاپرولاکتون/ هیدروکسی آپاتیت، نسبت به داربست پلی کاپرولاکتون، اندکی کاهش یافته بود و این داربست برای کاربردهای مهندسی بافت استخوان مناسب شناخته شد.

در سال ۲۰۱۲ مارس‌یچ^۱ و همکاران [۳۴] روی داربست نانو کامپوزیتی با خاصیت آنتی باکتریال، که به دلیل حضور نانو ذرات نقره بود، با هدف استفاده به عنوان جایگزین پیوند استخوان، مطالعه‌ای انجام دادند. داربست کامپوزیتی آلژینات/ هیدروکسی آپاتیت به روش ژل شدن داخلی به همراه عملیات خشک کردن انجمادی، به منظور دستیابی به ساختار متخلخل، تهیه شد. نانو ذرات در حضور کیتوسان اصلاح شده با لاکتوز تهیه شدند و این محلول کلونیدی از طریق برهم کنش‌های الکترواستاتیک، روی داربست‌ها جذب شد. جذب و آزادسازی نقره از داربست کامپوزیتی به وسیله‌ی ICP-AES و اسپکترو فلوریمتری، اندازه‌گیری شد. آنالیز توموگرافی میکروسکوپی داربست‌ها حاکی از آن بود که ساختار داربست‌ها؛ ساختاری با تخلخل‌های همگن با اندازه تخلخل $341/5 \mu m$ و درصد تخلخل حدود ۸۰٪ است. آزمون بیولوژیکی برون تن نشان داد که نقره، تاثیری در توانایی داربست برای ترویج تکثیر استئوبلاست‌ها ندارد و به‌طور هم‌زمان می‌تواند تأثیر ضد باکتری زیادی بر هر دو باکتری‌های گرم مثبت و گرم منفی داشته باشد. به‌طور کلی می‌توان نتیجه گرفت که این داربست‌های زیست‌سازگار و آنتی میکروبی، خصوصیات ایده‌آلی برای کاربردهای مهندسی بافت ارائه دادند.

سلطانان^۲ و همکاران [۳۵] در سال ۲۰۱۳ با ساخت داربست پلی کاپرولاکتون و داربست کامپوزیتی پلی کاپرولاکتون/ هیدروکسی آپاتیت به روش خشک کردن انجمادی، مقایسه‌ای بر روی این دو داربست انجام دادند. نتایج نشان داد که افزون هیدروکسی آپاتیت به میزان ۱۰ درصد وزنی - حجمی علی‌رغم اینکه خاصیت رسانش استخوان برای داربست ایجاد می‌کند و خواص مکانیکی فشاری داربست را افزایش می‌دهد، باعث

¹ Eleonora Marsich

² Naznin Sultana

کاهش میزان تخلخل‌ها و اندازه آن‌ها در مقایسه با داربست پلی‌کاپرولاکتون می‌شود. هم‌چنین در این پژوهش دمای انجماد داربست‌ها 18°C - در نظر گرفته شده که به نسبت توزیع اندازه تخلخل بهتری ایجاد کرده است.

قربانی و همکاران [۳۶] در سال ۲۰۱۴ داربست نانو کامپوزیتی به روش الکتروریسی از جنس پلی‌کاپرولاکتون/ کیتوسان/ نانو هیدروکسی‌آپاتیت دوپ شده با روی، تهیه کردند و مورد بررسی قرار دادند. کیتوسان و پلی‌کاپرولاکتون به‌طور گسترده به عنوان بیومواد با خواص مطلوب برای کاربردهای مهندسی بافت، استفاده می‌شوند. در این پژوهش این دو ماده با نانو ذرات هیدروکسی‌آپاتیت دوپ شده با روی مخلوط شده و با استفاده از حلال فرمیک‌اسید/ استیک‌اسید، به‌صورت داربست‌های نانوفیبری الکتروریسی شدند. هدف از این پژوهش این بود که نشان داده شود حضور مقادیر کم یون‌های Zn^{2+} به‌صورت دوپ شده در نانو ذرات هیدروکسی‌آپاتیت، می‌تواند باعث تقویت زیست‌سازگاری مخلوط پلی‌کاپرولاکتون/ کیتوسان شود. با توجه به مشاهدات SEM، ابعاد میانگین فیبرها از حدود ۱۳۶ nm در مخلوط پلی‌کاپرولاکتون/ کیتوسان به حدود ۲۱۰ nm در نانو کامپوزیت پلی‌کاپرولاکتون/ کیتوسان/ نانو هیدروکسی‌آپاتیت دوپ شده با روی، ارزیابی شد. داربست‌های پلی‌کاپرولاکتون/ کیتوسان/ نانو هیدروکسی‌آپاتیت روی، مدول الاستیک (حدود ۳ برابر) و استحکام کششی (حدود ۱/۵ برابر) بیشتری نسبت به داربست پلی‌کاپرولاکتون/ کیتوسان داشتند. بررسی زیست‌سازگاری برون‌تن این داربست‌ها، با استفاده از سلول‌های بنیادی مشتق شده از بافت چرب انسان (hAD-MSCs) انجام شد و نتایج حاصل نشان داد که حضور تنها ۵ درصد وزنی از نانو ذرات هیدروکسی‌آپاتیت دوپ شده با روی در داربست نانو کامپوزیتی، در مقایسه با PCL/ Ch و PCL/ Ch/ nHA می‌تواند باعث بهبود چسبندگی سلول‌های بنیادی hAD-MSCs شود.

مظفری و همکاران [۳۷] در سال ۱۳۹۴ هـ.ش با بررسی تأثیر اندازه ذرات و درصد هیدروکسی‌آپاتیت در داربست کامپوزیتی پلی‌کاپرولاکتون/ هیدروکسی‌آپاتیت ساخته شده به روش لیچینگ ذره‌ای بر روی خواص

مکانیکی و زیست تخریب پذیری، نشان دادند که داربست شامل ذرات نانومتری هیدروکسی آپاتیت دارای استحکام فشاری بالاتری نسبت به اندازه‌ی میکرومتری آن است ولی با افزایش مقدار تقویت کننده‌ی سرامیکی (هیدروکسی آپاتیت) بیش از ۱۰ درصد وزنی، استحکام فشاری داربست‌ها کاهش یافته و میزان تخریب آن‌ها افزایش می‌یابد. همچنین نرخ تخریب پذیری داربست حاوی ذرات نانو هیدروکسی آپاتیت نسبت به ذرات میکرو بهتر بوده است.

برادران و همکاران [۳۸] در سال ۱۳۹۴ هـ ش داربست نانو کامپوزیتی با مواد پلی کاپرولاکتون/ هیدروکسید دوگانه‌ی لایه‌ای با ترکیب دو روش فروشویی ذره‌ای و خشک کردن انجمادی تهیه کردند. هدف از این پژوهش، ساخت داربستی با مواد ذکر شده با خواص مکانیکی، زیست‌فعالی و زیستی مناسب برای کاربرد در مهندسی بافت استخوان اسفنجی بوده است. بررسی‌های انجام شده روی داربست نشان دادند که فاز سرامیکی به طور یکنواخت در نمونه‌ها پراکنده شده است و همچنین با افزایش فاز سرامیکی، مدول ینگ و آب دوستی پلی کاپرولاکتون افزایش پیدا کرده است. به علاوه اندازه تخلخل‌ها در نمونه‌های ساخته شده بین $100\text{ }\mu\text{m}$ تا $600\text{ }\mu\text{m}$ اندازه‌گیری شد. ارزیابی‌های سلولی، اتصال سلول‌ها و رشد و تکثیرشان روی داربست‌ها را تأیید کردند که نشان می‌دهد این داربست‌ها قابلیت استفاده در مهندسی بافت استخوان اسفنجی را دارند.

چُنْگ^۱ و همکاران [۳۹] در سال ۲۰۱۵ پژوهشی بر روی داربست‌های سه بعدی با تخلخل بالا انجام دادند. هدف از این پژوهش، ساخت داربست سه بعدی بسیار متخلخل از مخلوط پلی کاپرولاکتون و کیتوسان، با رفتار آب دوستی بهبود یافته، به منظور کاربردهای مهندسی بافت استخوان بود. روش خشک کردن انجمادی، به عنوان روشی مؤثر، برای این پژوهش مورد استفاده قرار گرفت تا به کمک آن داربست‌های سه بعدی متخلخل و اسفنجی شکل با ۱۰ درصد وزنی- حجمی پلی کاپرولاکتون خالص و ۱۲ درصد وزنی- حجمی

¹ Lor H. Chong

مخلوط پلی کاپرولاکتون/ کیتوسان، تولید شود. برای مشخصه یابی داربست‌ها از آزمون‌های مختلف از جمله SEM، ATR-FTIR برای بررسی مورفولوژی داربست‌ها مورد استفاده قرار گرفت و همچنین پیوندهای شیمیایی داربست‌ها در حین آزمون‌های زاویه تماس آب و جذب آب، به منظور بررسی آب دوستی داربست‌ها، انجام شد. مشاهدات SEM حاکی از آن بود که داربست‌های پلی کاپرولاکتون خالص و مخلوط پلی کاپرولاکتون/ کیتوسان، ساختار بسیار متخلخلی با میانگین اندازه حفرات $73/6 \mu\text{m}$ و $74/9 \mu\text{m}$ دارا هستند که این محدوده اندازه برای رشد استخوان مطلوب است. نتایج ATR-FTIR نیز بیانگر آن بود که کیتوسان به خوبی در داربست پلی کاپرولاکتونی مخلوط شده است. داربست ترکیبی پلی کاپرولاکتون/ کیتوسان ساخته شده در این پژوهش، ساختاری با تخلخل‌های همگن ارائه داد و همچنین خواص آب دوستی را بهبود داد. این داربست پتانسیل استفاده در کاربردهای مهندسی بافت استخوان را دارا است.

میرحاج و همکاران [۴۰] در سال ۱۳۹۵ هـ ش داربست‌های کامپوزیتی با مواد کراتین/ پلی کاپرولاکتون/ هیدروکسی آپاتیت، با درصدهای حجمی مختلف، به روش الکتروریسی ساختند و رفتار مکانیکی و مورفولوژی سطحی نمونه‌ها را بررسی کردند. بررسی و مقایسه‌ی استحکام کششی و سطح ویژه‌ی داربست کراتین/ پلی کاپرولاکتون و داربست کراتین/ پلی کاپرولاکتون/ هیدروکسی آپاتیت نشان داد که افزودن هیدروکسی آپاتیت موجب کاهش قطر نانو الیاف الکتروریسی، افزایش استحکام کششی و همچنین افزایش سطح ویژه و تخلخل‌های نمونه شده و در نهایت منجر به تسریع چسبندگی سلولی می‌شود. همچنین داربست دارای هیدروکسی آپاتیت رفتار آب دوستی بهتری در مقایسه با داربست بدون هیدروکسی آپاتیت از خود نشان داده که این خاصیت باعث بهبود پهن شوندگی و رشد سلول‌ها روی داربست شده است و در مجموع این داربست می‌تواند گزینه‌ی مناسبی برای کاربرد در مهندسی بافت استخوان باشد.

صفوی و همکاران [۴۱] در سال ۱۳۹۵ هـ ش یک داربست سه بعدی نانو لیفی پلی کاپرولاکتون/ هیدروکسی آپاتیت/ ژلاتین با استفاده از الکتروریسی هیبریدی ساختند. مطالعات برای ساخت این داربست

نشان داد که برای الکتروریسی پلی کاپرولاکتون و ژلاتین حلال مناسب و غلظت محلول ساخته شده اهمیت زیادی دارند که برای این دو ماده به ترتیب حلال‌های متانول و کلروفرم با نسبت ۷۵:۲۵ و با غلظت ۹/۵٪ وزنی- حجمی و ژلاتین با حلال‌های استیک اسید و آب مقطر با نسبت ۱:۱ و غلظت ۳٪ وزنی- حجمی مناسب است.

اوفر^۱ و همکاران [۴۲] در سال ۲۰۱۶ با توجه به این نکته که اعمال محرک‌های الکتریکی در ناحیه‌ی آسیب دیده‌ی استخوان می‌تواند بازسازی مجدد آن را تسریع کند، به منظور ایجاد رسانایی الکتریکی در داربست استخوانی، با افزودن پلی‌پیرول به پلی کاپرولاکتون و هیدروکسی‌آپاتیت، داربست کامپوزیتی به روش خشک کردن انجمادی تهیه کردند. بررسی نتایج آزمون SEM نشان داد که محدوده اندازه حفرات داربست پلی کاپرولاکتون/ هیدروکسی‌آپاتیت/ پلی‌پیرول حدود ۲۵۰-۵۰ μm است و همچنین با اضافه شدن هیدروکسی‌آپاتیت و پلی‌پیرول، دانسیته داربست افزایش و تخلخل‌ها کاهش پیدا کرده‌اند. هدایت الکتریکی داربست‌ها با استفاده از یک مولتی‌متر دیجیتالی ارزیابی شد. ترشوندگی و تخلخل داربست‌ها با افزودن پلی‌پیرول به داربست، نسبت به داربست پلی کاپرولاکتون، افزایش یافت و در نهایت داربست PCL/ HA/PPY برای استفاده در مهندسی بافت استخوان کاندید مناسبی شناخته شد.

فرشته و همکاران [۴۳] در سال ۲۰۱۶ داربستی هم‌راستا از پلی کاپرولاکتون/ زین، به‌عنوان سیستم دارورسانی، با استفاده از روش بهبودیافته‌ی خشک کردن انجمادی یک‌طرفه تهیه کردند. این داربست‌ها با درصد تخلخل بالا (حدود ۸۹٪) و تخلخل‌های تیوب شکل، با تنظیم غلظت محلول‌های پلی کاپرولاکتون/ زین به دست آمد. به‌منظور بررسی داربست‌ها، ویژگی‌هایی از جمله میکروساختار، میزان تخلخل و استحکام فشاری آن‌ها بررسی شد. آب دوستی و تخریب پذیری کامپوزیت‌ها در محیط PBS بررسی شدند. نتایج نشان دادند که حضور زین نرخ تخریب پذیری داربست را در مدت آزمایش (۲۸ روز) افزایش می‌دهد و

¹ Sharon K. J. Uferea

در نتیجه می‌توان با انطباق غلظت زین، رفتار تخریب پذیری پلی‌کاپرولاکتون را در شرایط آزمایشگاهی، کنترل کرد. بررسی آزادسازی پروتئین و تخریب پذیری داربست در شرایط آزمایشگاهی نشان داد که با افزایش غلظت زین در داربست، روند کاهش وزن داربست افزایش پیدا کرده است. قابلیت دارورسانی داربست با استفاده از تتراسایکلین هیدروکلراید بررسی شد و نشان داده شد که حضور زین در داربست برای دارورسانی تأثیر مثبتی داشته است.

هوور^۱ و همکاران [۴۴] در سال ۲۰۱۷ مطالعه‌ای روی داربست قابل جذب تری‌کلسیم فسفات به همراه ذرات نقره، به منظور کاربرد در پیوند استخوان (در این پژوهش بازسازی استخوان‌های فک و صورت) انجام دادند. از آنجایی که در همه‌ی عمل‌های جراحی ریسک عفونت وجود دارد، آزاد شدن یون‌های نقره از داربست می‌تواند نقش مهم و مؤثری در کاهش ریسک عفونت‌ها داشته باشد و همچنین قادر است آنتی‌بیوتیک‌ها را در مقابل باکتری‌های مقاوم تقویت کند. در این پژوهش داربست تری‌کلسیم فسفات همراه با ذرات نقره به روش مایع براساس پروژن تهیه شد. اکسید نقره با سه درصد متفاوت ۰/۵، ۱ و ۲ درصد وزنی درون داربست قرار گرفت. داربست‌ها، برای بررسی آزادسازی یون نقره، طی یک دوره ۶۰ روزه درون محلول بافر استات با $\text{pH} = 5$ قرار گرفتند. داربست‌های متراکم به‌عنوان کنترل بین $32 \mu\text{mol}$ و $54 \mu\text{mol}$ یون آزاد کردند درحالی که این مقدار برای نمونه‌های متخلخل بین $80 \mu\text{mol}$ و $90 \mu\text{mol}$ گزارش شده است. تخلخل‌ها میزان حل‌شدن داربست‌ها را با فاکتور ۲ افزایش داده است. در ادامه‌ی ارزیابی نمونه‌ها، سلول‌های استئوبلاست انسان روی داربست کشت داده شد تا میزان سمیت و تکثیر سلول‌ها اندازه‌گیری شود و از آنجا که میزان رشد و تکثیر سلول‌ها دو برابر شده بود نتیجه گرفتند که تخلخل‌ها باعث افزایش رسانش استخوان شده است و همچنین نمونه‌ها (حتی نمونه شامل ۲ درصد وزنی اکسید نقره) هیچ سمیتی ایجاد نکردند.

¹ Sean Hoover

نتایج این پژوهش نشان داد که ذرات نقره می‌توانند در یک دوره طولانی مدت از داربست آزاد شوند و هیچ تأثیر منفی بر زیست‌سازگاری داربست‌ها نداشته باشند.

شیم^۱ و همکاران [۴۵] در سال ۲۰۱۷ داربست‌های پلی‌کاپرولاکتون با روش پرینت سه‌بعدی را تهیه کردند و روی سطح این داربست‌ها، نانو ذرات کلسیم فسفات دوفازی (BCP NPs) را تثبیت کردند.^۲ داربست‌های ساخته شده هم در شرایط استخوان سازی برون تن و هم به صورت درون تن در استخوان درشتنی (تیبیا) موش صحرایی، مورد بررسی قرار گرفتند. مطالعات برون تن و درون تن نشان دادند که داربست BCP-IM-PCL، در مقایسه با داربست‌های پلی‌کاپرولاکتون اصلاح نشده و مخلوط کلسیم فسفات دوفازی و پلی‌کاپرولاکتون، به‌طور مؤثری باعث بهبود علائم استخوان‌سازی شده است و به‌طور قابل ملاحظه‌ای تشکیل استخوان جدید را افزایش داده و بافت‌های استخوانی را در ناحیه‌ی آسیب دیده‌ی تیبیا، معدنی سازی کرده است. نتایج این پژوهش نشان داد که این داربست الگوی امیدبخشی برای مهندسی بافت استخوان است.

در این پژوهش، داربست کامپوزیتی پلیمر-سرامیکی با مواد اولیه‌ی پلی‌کاپرولاکتون و نانو هیدروکسی‌آپاتیت و اکسید نقره به روش خشک کردن انجمادی تهیه شده است. همان‌طور که اشاره شد، استفاده از داربست‌های مهندسی بافت به دلیل مزایایی که نسبت به روش‌های رایج پیوند دارند، بسیار مورد توجه قرار گرفته‌اند. شناسایی خواص اولیه‌ی داربست تهیه شده، از جمله مورفولوژی سطحی و تخلخل‌ها، شناسایی فازها و پیوندها و زیست‌فعالی داربست، امری ضروری است. در فصل سوم و چهارم مراحل تولید و مشخصه‌یابی داربست بیان شده است.

¹ Kyu S. Shim

² BCP Immobilized PCL scaffolds

فصل سوم

مواد و روش‌ها

۳-۱- مقدمه

همان‌طور که در فصل‌های گذشته اشاره شد؛ داربست‌های کامپوزیتی به دلیل این که از چند ماده‌ی مختلف تشکیل شده‌اند، خواص گسترده و مناسب‌تری از لحاظ زیست سازگاری، زیست فعالی و خواص مکانیکی نسبت به داربست‌های پلیمری از خود نشان می‌دهند. از سوی دیگر تنوع مواد مورد استفاده در داربست‌های کامپوزیتی زیاد است و از این رو تحقیقات در این زمینه توسط پژوهشگران سراسر جهان، مورد توجه قرار گرفته است. لذا با توجه به مطالعات پیشین مربوط به داربست‌های کامپوزیتی مورد استفاده در مهندسی بافت استخوان، در این پژوهش داربست کامپوزیتی ساخته شد که در ادامه بررسی شده است.

۳-۱- مواد اولیه برای ساخت داربست

به منظور تهیه‌ی داربست کامپوزیتی در این پژوهش، از مواد زیست‌سازگار با قابلیت تولید داربست استفاده شد. به‌عنوان فاز زمینه‌ی داربست، از پلیمر و برای بهبود خواص زمینه‌ی پلیمری و به عنوان فاز تقویت‌کننده، از پودر سرامیکی بهره گرفته شد. همچنین برای ایجاد خاصیت آنتی‌باکتریال در داربست، از پودر اکسید نقره استفاده شد که در ادامه به تفصیل آمده است.

۳-۱-۱ پلی‌کاپرولاکتون

پلی‌کاپرولاکتون با وزن مولکولی میانگین $Mn: 80000$ از شرکت سیگما-آلد ریچ تهیه شد. این ماده به‌صورت دانه‌های سفید رنگ است، که در شکل ۳-۱ مشاهده می‌شود و زمینه‌ی پلیمری داربست کامپوزیتی را ایجاد می‌کند. خواص فیزیکی این بیوپلیمر در جدول ۳-۱ آورده شده است.

جدول ۳-۱- خواص فیزیکی پلی‌کاپرولاکتون

کد	دمای انتقال شیشه‌ای (°C)	دمای ذوب (°C)	دانسیته (g/cm ³)	
سیگما-آلد ریچ				
۴۴۰۷۴۴	-۶۰	۶۰	۱/۱۴۵	خواص فیزیکی



شکل ۳-۱- دانه‌های پلی‌کاپرولاکتون.

۳-۱-۲- نانو هیدروکسی آپاتیت

این ماده‌ی سرامیکی قسمت معدنی استخوان را تشکیل می‌دهد و فرمول شیمیایی آن $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ بوده که در آن نسبت Ca/P برابر با ۱/۶۷ است.

با توجه به این که بیش از ۷۰٪ وزن استخوان از هیدروکسی آپاتیت تشکیل شده است، از این ماده به عنوان فاز معدنی و تقویت کننده‌ی داربست استفاده می‌شود. پودر سفیدرنگ نانو هیدروکسی آپاتیت، که در شکل ۳-۲ مشاهده می‌شود، از شرکت مرک تهیه شد. خواص فیزیکی هیدروکسی آپاتیت در جدول ۳-۲ آورده شده است.

جدول ۳-۲- خواص فیزیکی هیدروکسی آپاتیت

کد مرک	دمای ذوب (°C)	دانسیته (g/cm ^۳)	جرم مولکولی g/mol	خواص فیزیکی
۱۰۲۱۹۶	۱۶۷۰	۳/۱۸	۱۰۰۴/۶	



شکل ۳-۲- پودر نانو هیدروکسی آپاتیت.

۳-۱-۳- اکسید نقره

پودر خاکستری رنگ اکسید نقره، مطابق شکل ۳-۳، با فرمول Ag_2O ، به عنوان عامل آنتی باکتریال در داربست، مورد استفاده قرار گرفت. خواص فیزیکی اکسید نقره در جدول ۳-۳ آورده شده است.

جدول ۳-۳- خواص فیزیکی اکسید نقره

جرم مولکولی g/mol	دانسیته (g/cm ^۳)	دمای ذوب (°C)	کد سیگما-آلدریچ
۲۳۱/۷۳۵	۷/۱۴	۲۸۰	۱۱۹۲۰۸

خواص فیزیکی



شکل ۳-۳- پودر اکسید نقره.

۳-۱-۴- اسید استیک

اسید استیک یک حلال آلی از گروه کربوکسیلیک اسیدها با نام آیوپاک اتانویک اسید است که اسید سرکه است. فرمول مولکولی این اسید CH_3COOH است. خواص فیزیکی استیک اسید در جدول ۳-۴ آورده شده است.

جدول ۳-۴- خواص فیزیکی اسید استیک

جرم مولی g/mol	دمای جوش (°C)	دمای انجماد (°C)	خواص فیزیکی
۶۰/۰۵	۱۱۸/۱	۱۶/۶	

در برخی پژوهش‌ها گزارش شده است که استیک اسید می‌تواند به عنوان پراکنده‌ساز استفاده شود. هافیان^۱ و همکاران [۴۶] در پژوهشی نشان دادند که استیک اسید برای سیمان آلومینیومی نقش پراکنده‌سازی داشته است.

۳-۲- روش تولید داربست پلی‌کاپرولاکتون / نانو هیدروکسی آپاتیت / اکسید نقره

به منظور ساخت نمونه‌های کامپوزیتی از مواد ذکر شده به روش خشک کردن انجمادی، لازم است ابتدا محلول‌هایی تهیه شده و در قالب مناسب ریخته و منجمد شود و با قرارگیری در دستگاه خشک‌کن انجمادی، حلال موجود در نمونه‌ها تصعید شود و نمونه‌های خشک و متخلخل به دست آید. لذا محلول‌سازی اولین مرحله‌ی ساخت داربست است و به این منظور باید درصدهای مورد نیاز از هر ماده به صورت دقیق محاسبه شده و مورد استفاده قرار گیرد.

^۱ Y. El Hafiane

همان‌طور که در مطالعه‌ی پژوهش‌های پیشین اشاره شد، پلی‌کاپرولاکتون به‌عنوان فاز زمینه انتخاب شده است و لذا بیش‌ترین درصد وزنی را در بین مواد خواهد داشت. از طرفی هیدروکسی‌آپاتیت فاز تقویت‌کننده و سرامیکی است و درصدهای بالای آن در کامپوزیت منجر به تردی و شکنندگی و در واقع کاهش خواص مکانیکی شده و هم‌چنین اندازه حفرات موجود در داربست را کاهش می‌دهد. بنابراین مطالعات انجام‌شده نشان دادند که درصد وزنی مناسب هیدروکسی‌آپاتیت که بتواند بهترین خواص را ارائه دهد بین ۱۵ تا ۲۰ درصد است. از سوی دیگر مطالعات نشان دادند که درصدهای بالای اکسید نقره (بیش از ۶ درصد وزنی) سمیت ایجاد می‌کند و بهترین مقدار بارگذاری نقره، که هم خاصیت آنتی‌باکتریال ارائه دهد و هم سمیت ایجاد نکند، بین ۲ تا ۴ درصد وزنی است. از استیک اسید ۹۹/۹٪ نیز، با توجه به قابلیت حل‌شدن هر سه ماده‌ی مورد نظر، به عنوان حلال استفاده شد. در جدول ۳-۵ درصد وزنی مواد مورد استفاده در ساخت داربست مشاهده می‌شود.

جدول ۳-۵- جدول طراحی آزمون

نمونه	پلی‌کاپرولاکتون		نانوهیدروکسی‌آپاتیت		اکسید نقره		اسید استیک
	%wt	(g)	%wt	(g)	%wt	(g)	(g)
WA	۱۰۰	۲/۴۰۵	۰	۰	۰	۰	۲۴/۰۴۵
WD	۸۵	۲/۲۶۱	۱۵	۰/۳۹۹	۰	۰	۲۲/۶۰۸
WE	۸۰	۲/۲۰۶	۲۰	۰/۵۵۱	۰	۰	۲۲/۰۵۹
XD	۸۲	۲/۲۴۴	۱۵	۰/۴۱۰	۳	۰/۰۸۲	۲۲/۴۳۶
XE	۷۷	۲/۱۸۶	۲۰	۰/۵۶۸	۳	۰/۰۸۵	۲۱/۸۶۴
YD	۷۹	۲/۲۲۵	۱۵	۰/۴۲۳	۶	۰/۱۶۹	۲۲/۲۵۳
YE	۷۴	۲/۱۶۶	۲۰	۰/۵۸۵	۶	۰/۱۷۶	۲۱/۶۵۶

بر اساس جدول فوق، ۷ دسته‌ی ۶ تایی نمونه با تغییر مقدار نسبی هیدروکسی‌آپاتیت و اکسید نقره تهیه شد.

۳-۳- محلول سازی

به منظور ساخت محلول، در ابتدا مقادیر پلی کاپرولاکتون و اسید استیک، مطابق جدول ۳-۵، با ترازو اندازه گیری شد و درون بشر ریخته شده و سپس روی همزن مغناطیسی با دمای حدود 50°C ، به مدت ۳ ساعت قرار گرفت تا ذرات پلیمر به خوبی حل شوند و محلول ژلی و بی رنگی به دست آید. پس از آن مقادیر هیدروکسی آپاتیت با ترازو اندازه گیری شد و به محلول پلیمری اضافه شد و به مدت ۲ ساعت روی همزن مغناطیسی قرار گرفت تا ذرات هیدروکسی آپاتیت درون محلول پلیمری به خوبی پراکنده شوند و هیچ ذره ای دیده نشود. در مرحله آخر مقادیر پودر اکسید نقره با ترازو اندازه گیری شد و به محلول اضافه شد و مدت ۳ ساعت دیگر با همزن مغناطیسی هم زده شد تا ذرات نقره نیز در محلول پراکنده شود و محلول همگن و یکنواختی از پلی کاپرولاکتون، هیدروکسی آپاتیت و اکسید نقره به دست آید.

محلول های ساخته شده سپس درون «پتری دیش» و «ویال» ریخته شد به طوری که هر محلول ۳ پتری دیش و ۳ ویال را پر کرد و از هر دسته، ۶ نمونه به دست آمد و درب آن ها با یک لایه آلومینیوم پوشانده شد و سوراخ های ریزی در آن تعبیه شد تا محتویات ظرف ها پس از قرار گیری در دستگاه خشک کن انجمادی و کاهش فشار و اعمال خلأ، از ظروف خارج نشود و همچنین حلال بتواند از نمونه ها خارج شود.

در پژوهشی مشابه، تریپاتھی^۱ و همکاران [۳۰]، داربست کامپوزیتی کیتوسان/ نانو هیدروکسی آپاتیت/ نانوذرات مس-روی را به روش خشک کردن انجمادی تهیه کردند. در این پژوهش نیز از استیک اسید به عنوان حلال استفاده شد و مواد اولیه پس با حلال هم زده شدند تا مخلوط همگن به دست آید.

در پژوهشی دیگر کیم^۲ و همکاران [۴۷]، داربست ژلاتین/ هیدروکسی آپاتیت با استفاده از روش خشک کردن انجمادی و با حلال آب مقطر، تهیه کردند. مراحل محلول سازی در این پژوهش به این صورت بود که ابتدا

¹ Anjali Tripathi

² Hae-Won Kim

ژلاتین درون حلال ریخته شده و به مدت ۱ ساعت و در دمای 40°C ، هم زده شده است. سپس پودر هیدروکسی آپاتیت به محلول قبلی اضافه شده و به مدت ۶ ساعت دیگر مخلوط شده است. در نهایت محلول آماده شده درون قالب ریخته شده و پس از انجماد به مدت ۲۴ ساعت، درون دستگاه خشک کن انجمادی قرار گرفته است.

۳-۴- خشک کردن انجمادی

همان طور که پیش تر اشاره شد، در روش خشک کردن انجمادی، نمونه ها باید کاملاً منجمد باشند؛ در غیر این صورت در اثر اعمال خلأ توسط دستگاه، محلول از ظروف خارج شده و داریست های به دست آمده مطلوب نخواهند بود و ساختار مورد نظر را نخواهند داشت. لذا ظروف حاوی محلول تهیه شده، به مدت ۲۴ ساعت درون فریزر با دمای -18°C درجه ی سانتی گراد قرار گرفت تا به طور کامل منجمد شود. در مرحله بعد، با حصول اطمینان از انجماد کامل نمونه ها، قالب ها درون سینی دستگاه خشک کن انجمادی (OPERON FDB-5503)، که در شکل ۳-۴ مشاهده می شود، قرار گرفت و در محفظه ی دستگاه و پیچ های هوا به طور کامل بسته شدند تا از ورود و خروج هوا جلوگیری شود. پس از تنظیم دستگاه، پمپ خلأ روشن شده و دما به تدریج کاهش پیدا کرد و به دمای -55°C درجه ی سانتی گراد رسید. نمونه ها پس از ۲۴ ساعت از دستگاه خارج شدند و از خشک بودن آن ها اطمینان حاصل شد. در نهایت داریست های کامپوزیتی متخلخل، برای بررسی و ارزیابی های بعدی، آماده شدند که در شکل ۳-۵ مشاهده می شود.



شکل ۳-۴- دستگاه خشک کن انجمادی OPERON مدل FDB-5503.



شکل ۳-۵- داربست‌های تهیه شده به روش خشک کردن انجمادی.

۳-۵- ارزیابی و مشخصه یابی داربست‌ها

داربست‌های مهندسی بافت، به دلیل نقش مهمی که در بازسازی بافت دارند باید از جهات مختلفی مورد بررسی و ارزیابی قرار بگیرند. از پارامترهای مختلفی که در داربست‌ها باید مورد بررسی قرار بگیرد می‌توان به مورفولوژی و اندازه‌ی تخلخل‌ها، ساختار و پیوندهای شیمیایی، استحکام و درصد تخلخل و زیست‌سازگاری داربست‌ها اشاره کرد که در ادامه به این آزمون‌ها و شرایط مورد نیاز برای انجام آن‌ها پرداخته شده است.

۳-۵-۱- میکروسکوپ الکترونی روبشی (SEM)

به منظور بررسی مورفولوژی داربست‌های تهیه شده و بررسی تخلخل‌ها، از لحاظ پراکندگی و به هم پیوستگی آن‌ها و همچنین اندازه تخلخل‌ها، از میکروسکوپ الکترونی روبشی (SEM- ZEISS آلمان) واقع در دانشگاه صنعتی اصفهان استفاده شد. برای این منظور ابتدا داربست‌های ساخته شده با ابعاد 1×1 cm با طلا پوشش‌دهی شد و سپس در شرایط یکسان درون دستگاه SEM قرار گرفتند و تصاویری با بزرگ‌نمایی‌های مختلف از سطح نمونه‌ها تهیه شد.

۳-۵-۲- آزمون استحکام فشاری

ابتدا داربست‌ها به منظور انجام آزمون آماده‌سازی شدند، به این صورت که ابعاد آن‌ها به ابعاد مساوی (طول ۱۱ میلی‌متر) اندازه‌گیری شد. سپس استحکام فشاری داربست‌ها توسط دستگاه یونیورسال (Hounsfield Test Equipment Model HS-KS) واقع در دانشگاه صنعتی اصفهان، با واحد بار 500 N و سرعت 2 mm/min اندازه‌گیری شد.

۳-۵-۳- آزمون طیف‌سنجی تبدیل فوریه مادون قرمز (FTIR)

به منظور بررسی و شناسایی پیوندهای شیمیایی و گروه‌های عاملی موجود در داربست‌های تهیه شده، آزمون FTIR توسط دستگاه (Bruker- Tensor 27) واقع در دانشگاه صنعتی اصفهان، در محدوده 400 cm^{-1} تا 4000 cm^{-1} انجام گرفت و پیک‌های حاصل مورد ارزیابی قرار گرفتند.

۳-۵-۴- آزمون پراش پرتو ایکس (XRD)

هدف از انجام آزمون پراش پرتو ایکس (XRD) این بود که فازهای موجود در داربست‌های تهیه شده شناسایی شوند. این آزمون توسط دستگاه پراش پرتو ایکس مدل ASEWARE AW-DX300.

step time: 1 sec, step size: 0.5 degree, current: 30 mA, 40 voltage KV, Tube: Cu 1/54186A

واقع در شهرک علمی تحقیقاتی اصفهان، در محدوده زاویه $90^{\circ} > \theta > 10^{\circ}$ انجام شد.

۳-۵-۵- آزمون زیست‌فعالی

به‌منظور بررسی زیست‌فعالی داربست‌ها ابتدا آن‌ها را به مدت ۱۴ روز درون محلول شبیه‌ساز بدن^۱ قرار داده و سپس مورفولوژی داربست‌ها و توده‌های آپاتیت تشکیل‌شده توسط میکروسکوپ الکترونی روبشی بررسی شد. برای این کار با استفاده از چسب نواری رسانای آلومینیوم و با روش PVD در دستگاه COXEM ساخت کشور کره جنوبی، سطح داربست‌ها با طلا پوشش داده شد. سپس مورفولوژی داربست‌ها با استفاده از میکروسکوپ الکترونی روبشی FEI ESEM QUANTA 200 ساخت کشور آمریکا واقع در شرکت آزمایشگاهی رستاک، بررسی شدند. آنالیز عنصری فازهای مختلف مشاهده شده در تصاویر از آشکارساز EDAX EDS Silicon Drift 2017 استفاده شد.

۳-۵-۶- تخلخل‌سنجی

درصد تخلخل‌های موجود در داربست‌ها به روش ارشمیدس اندازه‌گیری شد. برای این کار ترازوی ارشمیدس Precisa واقع در دانشگاه صنعتی شاهرود، مورد استفاده قرار گرفت. به دلیل آبگریز بودن پلیمر، از اتانول ۹۶٪ بجای آب استفاده شد و وزن نمونه‌ها در سه حالت خشک، غوطه‌ور و اشباع اندازه‌گیری گردید و با استفاده از رابطه (۱)، درصد تخلخل‌های موجود در داربست‌ها به‌دست آمد.

$$\text{درصد تخلخل} = \frac{\text{وزن خشک} - \text{وزن اشباع}}{\text{وزن غوطه‌ور} - \text{وزن اشباع}} \times 100 \quad \text{رابطه (۱) [۴۸]:}$$

^۱ SBF

فصل چهارم

نتایج و بحث

۴-۱- مقدمه

همان‌طور که در فصل‌های گذشته اشاره شد، داربست مهندسی بافت استخوان باید ویژگی‌های مختلفی از جمله ساختار متخلخل، مقاومت مکانیکی مناسب، زیست‌فعالی و غیره داشته باشد. به همین دلیل داربست‌های تهیه شده باید توسط آزمون‌های مختلف مورد بررسی و مشخصه‌یابی قرار بگیرند که برای کاربرد در مهندسی بافت استخوان مناسب باشند. در این فصل، نتایج حاصل از آزمون‌های مختلف انجام شده روی داربست‌های کامپوزیتی تهیه شده به روش خشک‌کردن انجمادی، گزارش شده است.

۴-۲- نتایج آزمون‌ها

تحلیل و بررسی نتایج آزمون‌های طیف‌سنجی تبدیل فوریه مادون قرمز، پراش پرتو ایکس، میکروسکوپ الکترونی روبشی و آزمون مکانیکی در ادامه به تفصیل گزارش شده است.

۴-۱-۱- آزمون طیف‌سنجی تبدیل فوریه مادون قرمز (FTIR)

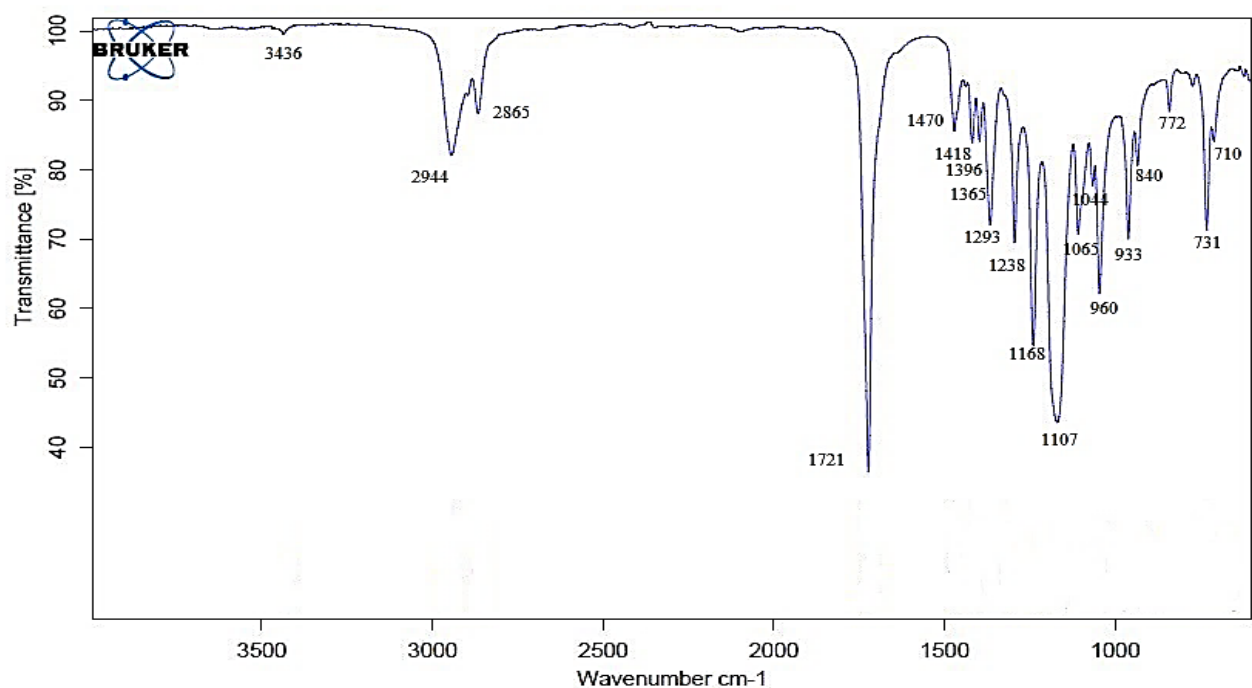
در نمودار ۴-۱ الگوی طیف‌سنجی تبدیل فوریه مادون قرمز مربوط به داربست پلیمری بدون حضور هیدروکسی‌آپاتیت و اکسید نقره مشاهده می‌شود. پیک‌های ارتعاشی ظاهر شده در طول موج‌های مختلف و پیوندهای مربوط به آن‌ها در جدول ۴-۱ آورده شده است.

با توجه به جدول ۴-۱، پیک‌های مشخصه‌ی پلی‌کاپرولاکتون عبارت‌اند از: پیوند کربونیل ($C=O$ کششی) در محدوده‌ی 1721 cm^{-1} ظاهر شده است که نشان‌دهنده‌ی استر آلیفاتیک است. در محدوده‌ی $2850 - 3000\text{ cm}^{-1}$ پیوند CH_2 و 1365 cm^{-1} و 1470 cm^{-1} پیوند $C-H$ مشاهده شد که مربوط به گروه $(CH_2)_4$ است. پیک 1293 cm^{-1} نشان‌دهنده‌ی پیوندهای $C-O$ و $C-C$ کششی است. 1107 cm^{-1} و 1396 cm^{-1} مربوط به پیوند $C-O$ هستند و 1044 cm^{-1} و 1065 cm^{-1} و 1418 cm^{-1} نشانگر پیوند

C-C هستند. پیک مربوط به پیوند کششی متقارن C-O-C در 960 cm^{-1} و پیوند کششی نامتقارن C-O-CH₂ در 1238 cm^{-1} و پیوند کششی O-C-O در 1168 cm^{-1} ظاهر شده اند. پیک 731 cm^{-1} گروه CH₂ را نشان می‌دهد. علاوه بر این سهم کوچکی از پیوند O-H که ناشی از تغییر شکل و یا آب جذب شده است، دیده می‌شود. بنابراین تمامی پیک‌های مربوط به پلی‌کاپرولاکتون در طیف FTIR به دست آمده از داربست WA وجود داشت [۴۹].

جدول ۴-۱- پیوندهای موجود در نمونه‌ی WA

نوع پیوند	فرکانس ارتعاش (cm^{-1})
CH ₂	۷۳۱
C-O-C کششی متقارن	۹۶۰
C-C کششی	۱۰۴۴
C-C کششی	۱۰۶۵
C-O کششی	۱۱۰۷
O-C-O کششی	۱۱۶۸
C-O-C کششی نامتقارن	۱۲۳۸
C-O و C-C کششی	۱۲۹۳
C-H	۱۳۶۵
C-O	۱۳۹۶
C-C	۱۴۱۸
C-H	۱۴۷۰
C=O کششی	۱۷۲۱
CH ₂	۲۸۶۵
CH ₂	۲۹۴۴
O-H	۳۴۳۶

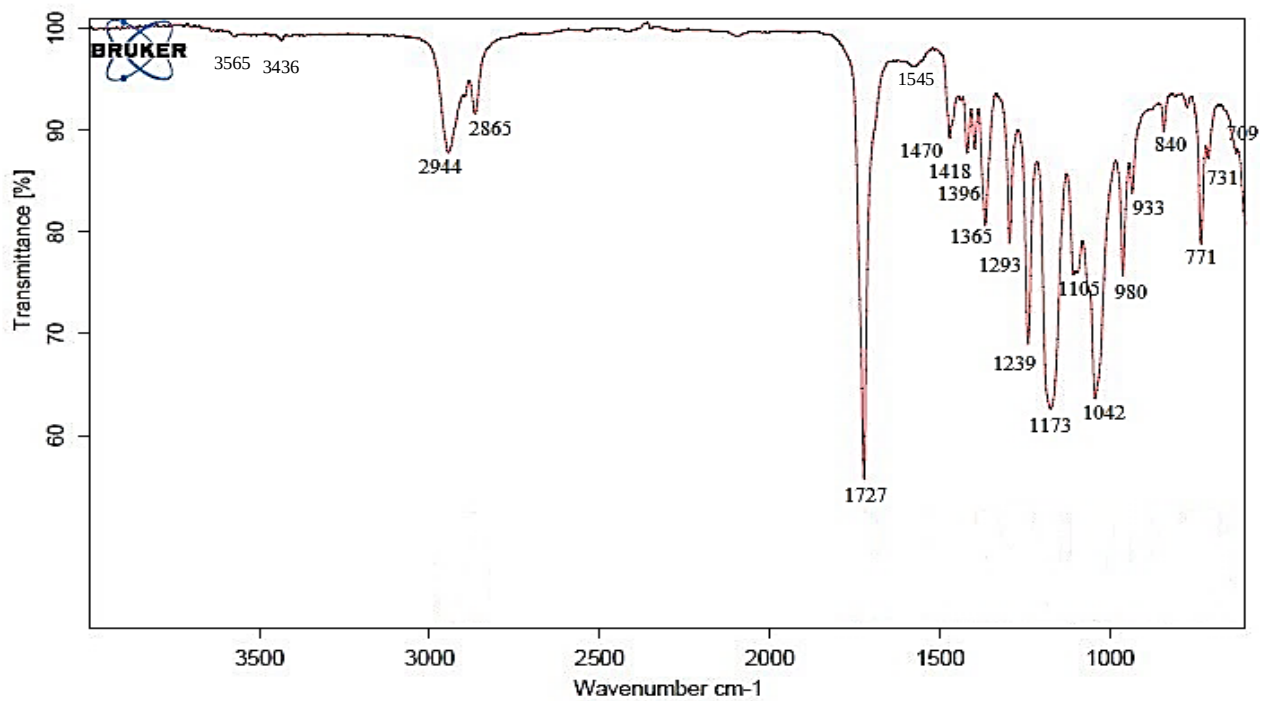


نمودار ۴-۱- طیف‌سنجی تبدیل فوریه مادون قرمز نمونه‌ی WA.

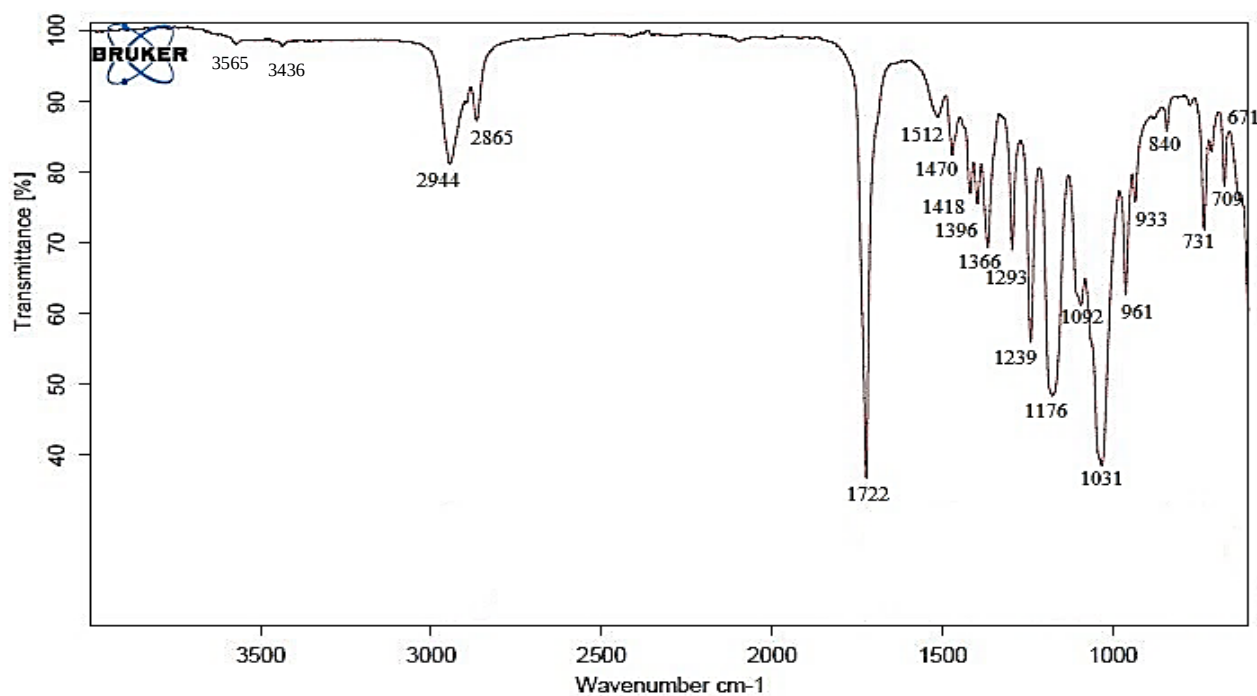
در نمودارهای ۴-۲ و ۴-۳ طیف‌های مربوط به داربست‌های پلی‌کاپرولاکتون/ هیدروکسی‌آپاتیت و پلی‌کاپرولاکتون/ هیدروکسی‌آپاتیت/ اکسید نقره مشاهده می‌شود که تفاوت چندانی با هم ندارند. در هر دو نمودار در محدوده‌ی پیک 3565 cm^{-1} پیوند ضعیفی دیده می‌شود که مربوط به OH ساختاری در هیدروکسی‌آپاتیت است. همچنین پیک‌های مشخصه‌ی یون فسفات در محدوده‌ی 1500 cm^{-1} - 600 cm^{-1} ظاهر می‌شود. مشاهده می‌شود که در پیک‌های 980 cm^{-1} ، 961 cm^{-1} ، 1031 cm^{-1} ، 1042 cm^{-1} و 1092 cm^{-1} شدت افزایش پیدا کرده است و نسبت به نمودار قبل شیفت پیدا کرده‌اند و این پیک‌ها مربوط به PO_4^{2-} در هیدروکسی‌آپاتیت هستند. پیک مشاهده شده در حدود فرکانس 671 cm^{-1} نیز می‌تواند مربوط به مد ارتعاشی خمشی O-P-O باشد [۴۹، ۵۰].

در برخی از پژوهش‌ها گزارش شده است که یون‌های CO_3^{2-} می‌تواند وارد ساختار هیدروکسی‌آپاتیت شود. تصور می‌شود که این یون‌ها از طریق CO_2 موجود در هوا و یا واکنش‌دهنده‌هایی که برای ساخت

هیدروکسی آپاتیت استفاده شده‌اند، نشأت گرفته است. این یون‌های CO_3^{2-} به راحتی می‌توانند جایگزین OH^- و یا PO_4^{2-} در شبکه می‌شوند، به طوری که پیک‌های محدوده‌ی $1545\text{--}1500\text{ cm}^{-1}$ مربوط به جایگزین شدن کربنات با OH^- است که در نمونه‌های ساخته شده قابل مشاهده است و لذا می‌توان گفت که نمونه‌ها شامل یون کربنات هستند [۴۹].



نمودار ۴-۲- طیف‌سنجی تبدیل فوریه مادون قرمز نمونه‌ی WE.



نمودار ۳-۴- طیف‌سنجی تبدیل فوریه مادون قرمز نمونه‌ی YE.

مشابه یون‌های کربنات، یون‌های HPO_4^{2-} نیز می‌توانند وارد ساختار هیدروکسی‌آپاتیت شوند و منجر به ایجاد هیدروکسی‌آپاتیتی با کمبود یون کلسیم (Ca^{2+}) شوند. این پیوندها در حدود پیک‌های 862 cm^{-1} ، 1222 cm^{-1} و 1118 cm^{-1} دیده شده‌اند که در ساختار داربست‌ها مشاهده نمی‌شود [۴۹].

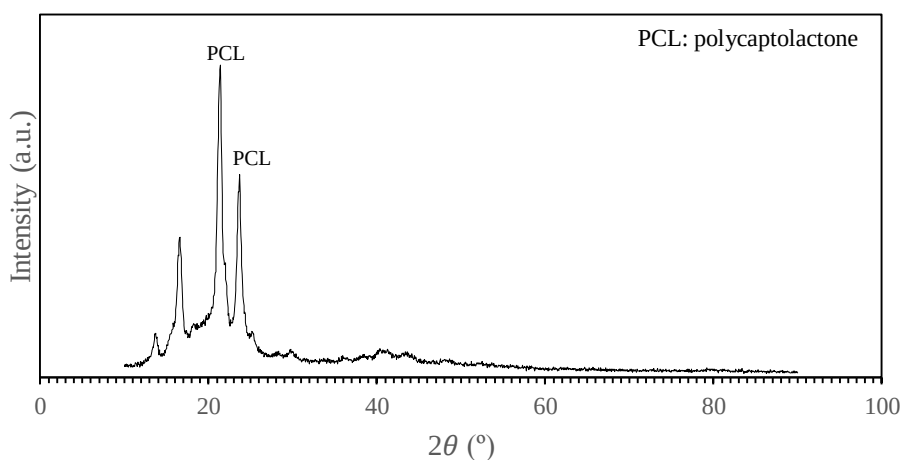
به دلیل تداخل پیک‌های پلی‌کاپرولاکتون و هیدروکسی‌آپاتیت در ناحیه‌ی 960 cm^{-1} – 1100 cm^{-1} ، این ناحیه برای مطالعه‌ی برهم‌کنش این دو ماده مناسب نیست. از سوی دیگر پیوند کربونیل موجود در پلی‌کاپرولاکتون، محتمل‌ترین پیوندی است که می‌تواند با OH موجود در هیدروکسی‌آپاتیت پیوند برقرار کند [۴۹]. علاوه بر این، این ناحیه با پیوندهای دیگر تداخل و هم‌پوشانی ندارد و برای بررسی برقراری پیوند هیدروژنی بین پلی‌کاپرولاکتون و هیدروکسی‌آپاتیت مناسب است. با مقایسه‌ی پیوند کربونیل در طیف FTIR مربوط به پلی‌کاپرولاکتون و پیوند کربونیل موجود در طیف FTIR پلی‌کاپرولاکتون/هیدروکسی‌آپاتیت، خواهیم دید که تغییری در پیک کربونیل ایجاد نشده و در نتیجه پیوند هیدروژنی بین دو ماده برقرار نشده است. هم‌چنین

از آنجایی که ساختار پلی‌کاپرولاکتون «جاذب رطوبت»^۱ است، اندکی شیفت پیدا کردن پیک کربونیل می‌تواند ناشی از برقراری پیوند بین کربونیل و آب جذب‌شده است. بنابراین می‌توان نتیجه گرفت که پیک‌های شاخص پلی‌کاپرولاکتون و هیدروکسی‌آپاتیت در ساختار داربست‌ها وجود دارند [۴۹، ۵۰].

۴-۱-۲- آزمون پراش پرتو ایکس (XRD)

هدف از انجام این آزمون، آنالیز فازی و بررسی فازهای موجود در ساختار داربست‌های تهیه شده بود. در نمودارهایی که در ادامه نشان داده شده است، نتایج حاصل از آزمون XRD داربست‌های WE، WD، WA، XD، XE و YD نشان داده شده است. از پیک‌های زوایای پایین‌تر از 20° به دلیل وجود نویز در دستگاه، صرف‌نظر شده است.

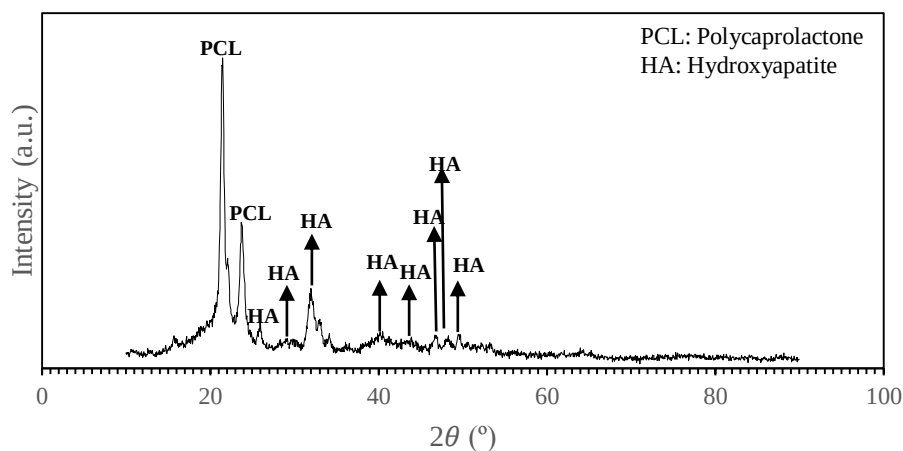
همان‌طور که در نمودار ۴-۴ مشخص است، داربست پلی‌کاپرولاکتون با دو پیک شاخص در زوایای 2θ $21/3^\circ$ و $23/7^\circ$ ظاهر شده است و این پیک‌ها در تمام نمودارها مشاهده می‌شود.



نمودار ۴-۴- پراش پرتو ایکس نمونه ی WA.

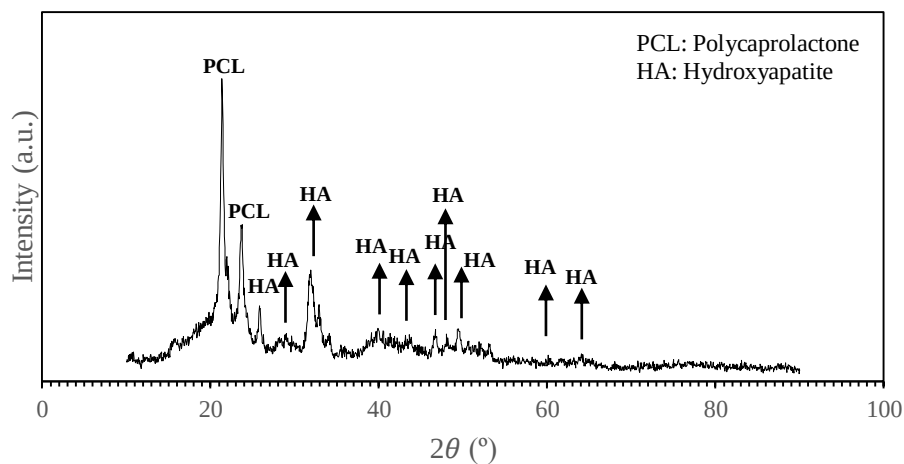
¹ Hygroscopic

در نمودار ۴-۵ که مربوط به داربست حاوی ۱۵٪ نانوهیدروکسی آپاتیت در ساختار پلیمری است، علاوه بر پیک‌های پلی کاپرولاکتون، پیک‌های اصلی مربوط به هیدروکسی آپاتیت، مطابق با استاندارد JCPDS NO.86-1199 در زوایای 26° ، $29/3^{\circ}$ ، $32/2^{\circ}$ ، $46/6^{\circ}$ و $49/4^{\circ}$ ظاهر شده‌اند [۱۳]. همچنین با افزودن هیدروکسی آپاتیت، شدت پیک‌های مربوط به پلی کاپرولاکتون کاهش پیدا کرده است. علاوه بر این با توجه به این که پیک جدیدی ظاهر نشده است، می‌توان گفت که ترکیب جدیدی به وجود نیامده است.



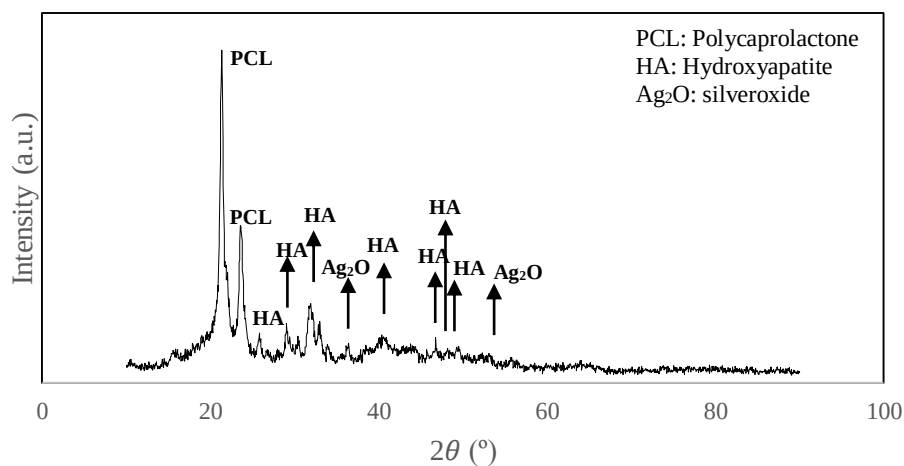
نمودار ۴-۵- پراش پرتو ایکس نمونه‌ی WD.

در نمودار ۴-۶ پیک‌های داربست WE حاوی ۲۰٪ نانوهیدروکسی آپاتیت مشاهده می‌شود. همان‌طور که از نمودار مشخص است، پیک جدیدی ایجاد نشده است و تنها تفاوت جزئی در شدت پیک‌ها مشاهده می‌شود. لازم به ذکر است که کاهش شدت پیک‌های پلی کاپرولاکتون و کاهش پهنای آن‌ها به دلیل حضور هیدروکسی آپاتیت بوده و با افزایش مقدار تقویت‌کننده‌ی هیدروکسی آپاتیت، شدت پیک‌های پلی کاپرولاکتون کاهش و شدت پیک‌های هیدروکسی آپاتیت افزایش یافته است.



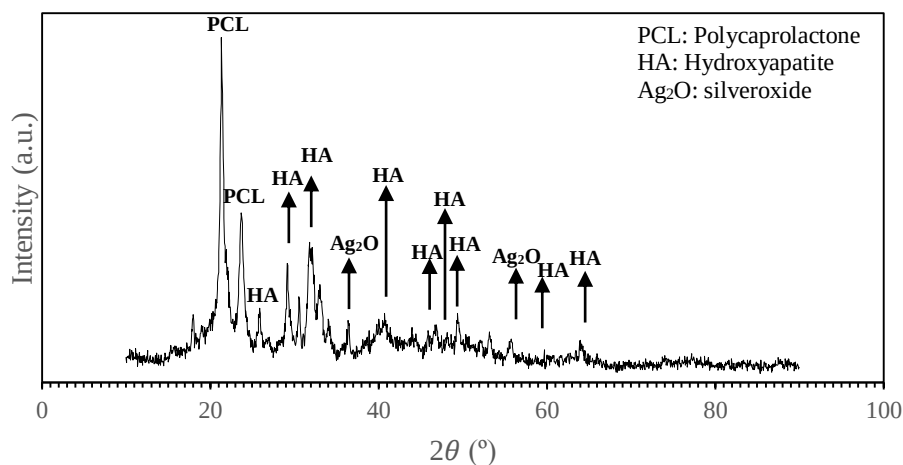
نمودار ۴-۶- پراش پرتو ایکس نمونه ی WE.

نمودار ۴-۷ پراش پرتو ایکس داربست XD را نشان می‌دهد که علاوه بر ۱۵٪ وزنی نانوهیدروکسی‌آپاتیت، حاوی ۳٪ وزنی اکسید نقره نیز می‌باشد. در این نمودار علاوه بر پیک‌های مربوط به پلی‌کاپرولاکتون و هیدروکسی‌آپاتیت، پیک‌های اصلی مربوط به اکسید نقره در زاویه‌های 2θ برابر با $36/4^{\circ}$ و $55/5^{\circ}$ قرار گرفته است.



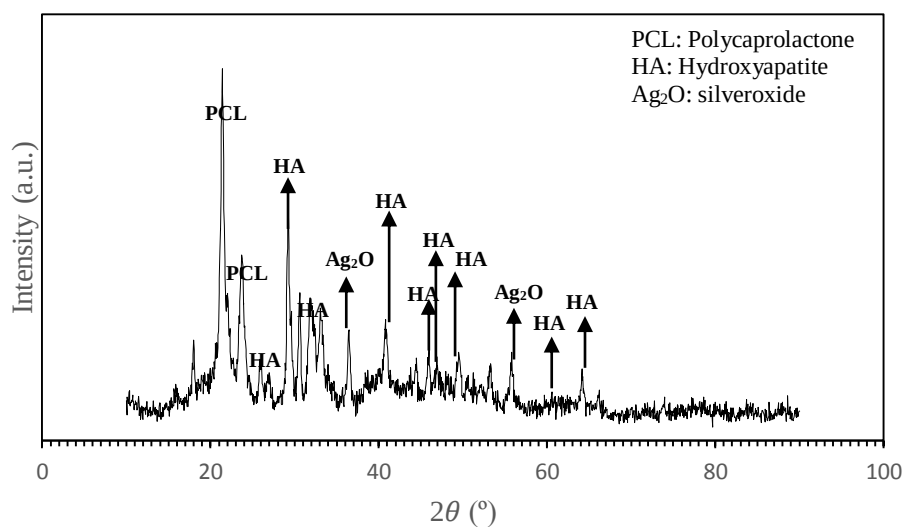
نمودار ۴-۷- پراش پرتو ایکس نمونه ی XD.

در نمودار ۴-۸- مشاهده می‌شود که افزایش درصد هیدروکسی‌آپاتیت باعث کاهش شدت پیک‌های پلی‌کاپرولاکتون شده است. همچنین پیک‌های مربوط به اکسید نقره و هیدروکسی‌آپاتیت نیز مشاهده می‌شود که نشان‌دهنده‌ی حضور این ذرات در ساختار است.

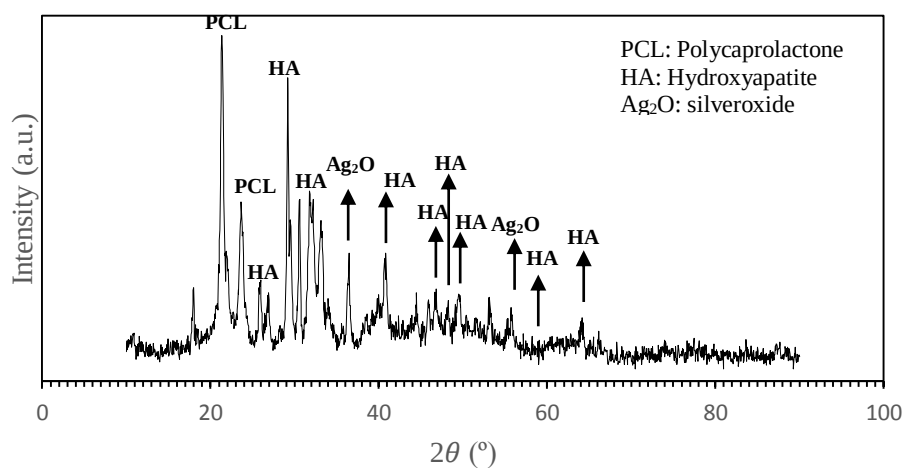


نمودار ۴-۸- پراش پرتو ایکس نمونه‌ی XE.

در نمودارهای ۴-۹ و ۴-۱۰ که مربوط به نمونه‌های YD و YE است، مشاهده می‌شود که افزایش درصد وزنی اکسید نقره باعث افزایش شدت پیک مربوط به آن شده است. همچنین هیچ برهم‌کنشی بین مواد رخ نداده است.



نمودار ۴-۹- پراش پرتو ایکس نمونه‌ی YD.



نمودار ۴-۱۰- پراش پرتو ایکس نمونه‌ی YE.

۴-۲-۳- تخلخل سنجی

از آنجایی که وجود درصد بالای تخلخل در داربست برای رشد و تکثیر و تمایز سلول‌ها لازم و ضروری است، لذا اندازه‌گیری درصد تخلخل داربست اهمیت دارد. روش ارشمیدس با استفاده از ترازوی مخصوص

ارشمیدس انجام می‌گیرد و به دلیل این که پلی‌کاپرولاکتون خاصیت آبگریز دارد، بجای آب از اتانول ۹۶٪ استفاده شد. همچنین از آن جایی که داربست‌های تولید شده در ویال، سبک بودند و روی سطح الکل می‌ماندند، لذا از نمونه‌های تولید شده در ظروف پتری‌دیش استفاده شد. ابتدا وزن همه‌ی داربست‌ها در حالت خشک اندازه‌گیری شد و سپس نمونه‌ها داخل سبد ترازو که درون اتانول قرار گرفته بود، قرار گرفت تا وزن حالت غوطه‌ور به‌دست آید. در آخر سطح داربست‌های غوطه‌ور شده خشک شد و مجدداً وزن آن‌ها اندازه‌گیری شد تا وزن حالت اشباع به‌دست آید. با استفاده از فرمول ارائه شده در فصل گذشته و با توجه به داده‌های حاصل از اندازه‌گیری وزن داربست‌ها در سه حالت خشک، غوطه‌ور و اشباع، درصد تخلخل مربوط به هر کدام از داربست‌ها محاسبه شد.

استخوان اسفنجی دارای ۷۵ تا ۸۵ درصد تخلخل می‌باشد درحالی که استخوان متراکم دارای ۵ تا ۱۰ درصد تخلخل است [۵۱]. درصد تخلخل‌های به‌دست‌آمده از آزمون تخلخل‌سنجی داربست‌ها در جدول ۴-۲ مشاهده می‌شود و نتایج حاکی از آن بود که داربست‌ها شامل حدود ۷۳ تا ۸۱ درصد تخلخل می‌باشند که این مقدار برای مهندسی بافت استخوان قابل قبول می‌باشد.

جدول ۴-۲- درصد تخلخل داربست‌ها به روش ارشمیدس

نمونه	درصد تخلخل
WA	۸۱/۰۷
WD	۷۷/۰۱
WE	۷۴/۵
XD	۷۸/۱۴
XE	۷۵/۲۲
YD	۷۷/۲۲
YE	۷۳/۵۳

با توجه به جدول ۴-۲ می‌توان نتیجه گرفت که افزایش درصد نانو هیدروکسی آپاتیت از ۱۵٪ به ۲۰٪ وزنی باعث کاهش درصد تخلخل داربست‌ها شده است. همچنین افزودن اکسید نقره به ساختار داربست‌ها نیز تا حدودی بر کاهش میزان تخلخل داربست‌ها تأثیرگذار بوده است.

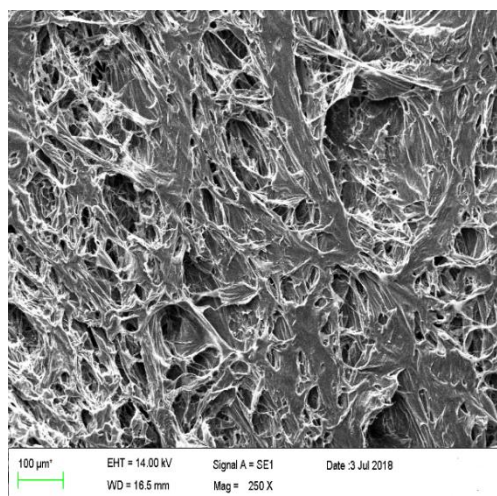
۴-۱-۴- نتایج آزمون میکروسکوپ الکترونی روبشی (SEM)

هدف از انجام این آزمون، بررسی مورفولوژی و سطح داربست‌های تهیه شده بود که توسط میکروسکوپ الکترونی روبشی در بزرگنمایی‌های مختلف انجام گرفت. از آنجایی که داربست‌ها نارسا بودند لذا در ابتدا سطح همه‌ی داربست‌ها توسط دستگاه پوشش دهی با طلا پوشش داده شد و سپس درون دستگاه میکروسکوپ الکترونی روبشی قرار گرفتند و تصاویری از سطح داربست‌ها به دست آمد که در ادامه مشاهده می‌شود.

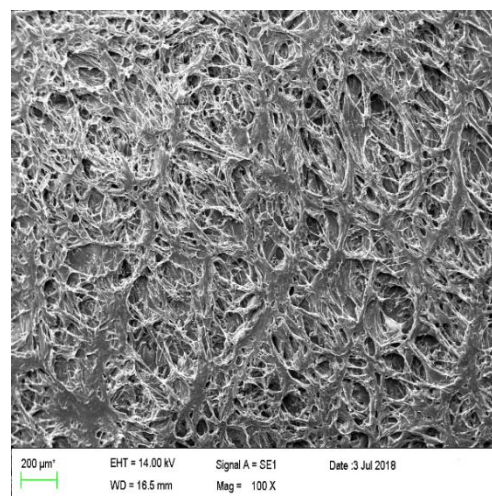
با مشاهده‌ی تصاویر میکروسکوپ الکترونی روبشی به دست آمده، ساختار متخلخل داربست‌های تهیه شده دیده می‌شود. می‌توان گفت زمانی که دمای محلول پلیمری کمتر از دمای انجماد حلال است، کریستالی شدن حلال اتفاق می‌افتد و با تصعید کریستال‌های حلال، داربست متخلخل شکل گرفته است که نزدیک به هندسه‌ی کریستال‌های حلال است. با اضافه شدن هیدروکسی آپاتیت و اکسید نقره و توزیع تصادفی آن‌ها، به علت ممانعت و نامنظم کردن رشد کریستال‌ها، کریستالیت‌های حلال تغییر می‌کند. سپس با خروج حلال، فاز غنی از پلی‌کاپرولاکتون / هیدروکسی آپاتیت / اکسید نقره به دست می‌آید که دارای ساختاری به هم پیوسته است و در مکان‌هایی که کریستال‌های حلال وجود داشته، تخلخل به وجود آمده است. بنابراین به دلیل رشد نامنظم کریستال‌های حلال، شکل حفرات نیز نامنظم و غیر یکنواخت است.

برای محاسبه‌ی اندازه تخلخل‌های داربست‌ها از روی تصاویر میکروسکوپ الکترونی روبشی به دست آمده، از نرم‌افزار ImageJ استفاده شد و در نهایت میانگین گرفته شد تا اندازه حفرات میانگین به دست آید.

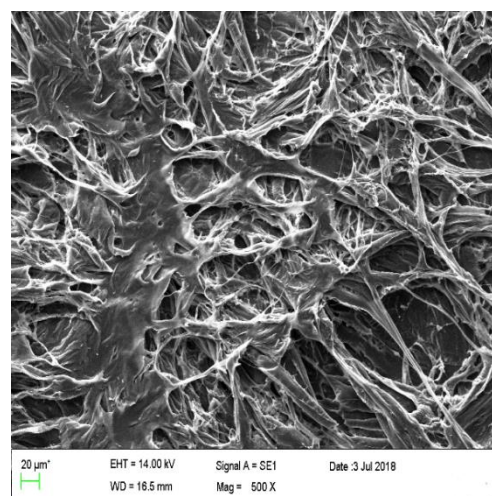
در شکل ۴-۱ تصاویر میکروسکوپ الکترونی روبشی مربوط به داربست WA مشاهده می‌شود که در قسمت (الف)، سطح داربست دارای تخلخل‌های زیاد با توزیع تقریباً یکنواخت است. در قسمت (ب) شکل یکسان حفرات دیده می‌شود که تقریباً به صورت بیضوی هستند و در قسمت (ج) ضخامت زیاد دیواره‌های حفرات جهت ایجاد استحکام مناسب، دیده می‌شود. هم‌چنین میانگین اندازه حفرات $116 \mu\text{m}$ محاسبه شد.



(ب)



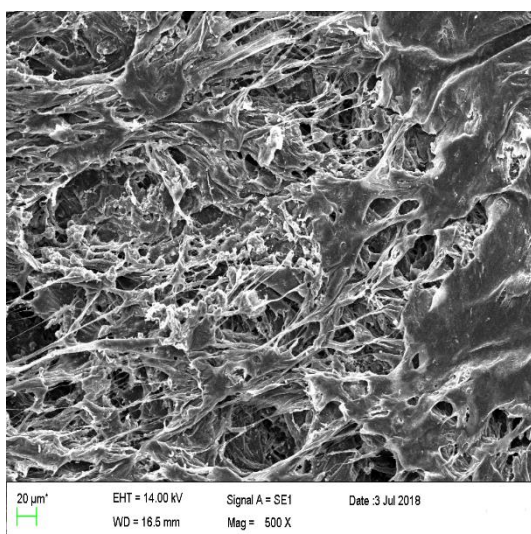
(الف)



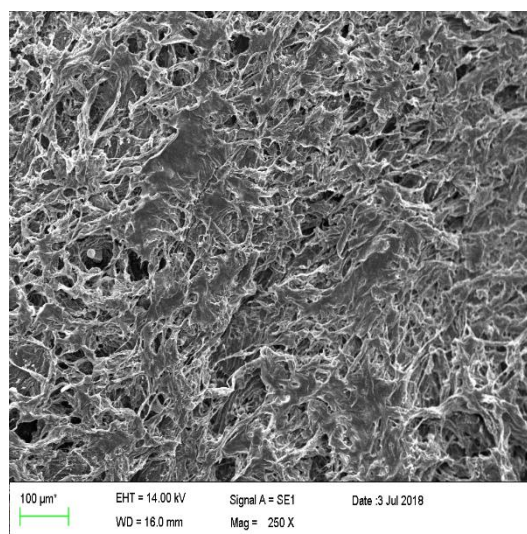
(ج)

شکل ۴-۱- تصاویر میکروسکوپ الکترونی روبشی مربوط به نمونه WA. (الف) بزرگنمایی ۱۰۰ برابر، (ب) بزرگنمایی ۲۵۰ برابر و (ج) بزرگنمایی ۵۰۰ برابر.

در شکل ۴-۲ تصاویر میکروسکوپ الکترونی روبشی داربست WD مشاهده می‌شود. میانگین اندازه حفرات این داربست $123 \mu\text{m}$ محاسبه شد که برای رشد سلولی مناسب است. در قسمت (الف)، مشابه تصاویر مربوط به داربست قبل، سطح دارای تخلخل‌های قابل مشاهده است و همچنین شکل حفرات تقریباً یکسان هستند. در قسمت (ب) دیواره‌های پلیمری با ضخامت‌های مختلف و تخلخل‌های غیریکنواخت مشاهده می‌شود.



(ب)



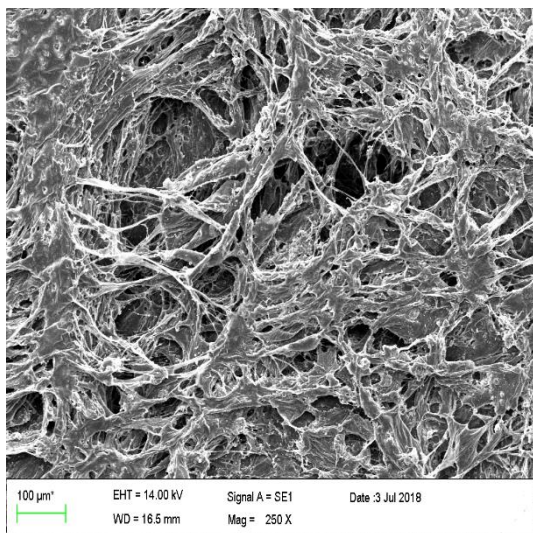
(الف)

شکل ۴-۲- تصاویر میکروسکوپ الکترونی روبشی مربوط به نمونه WD. (الف) بزرگنمایی ۲۵۰ برابر و (ب) بزرگنمایی ۵۰۰ برابر.

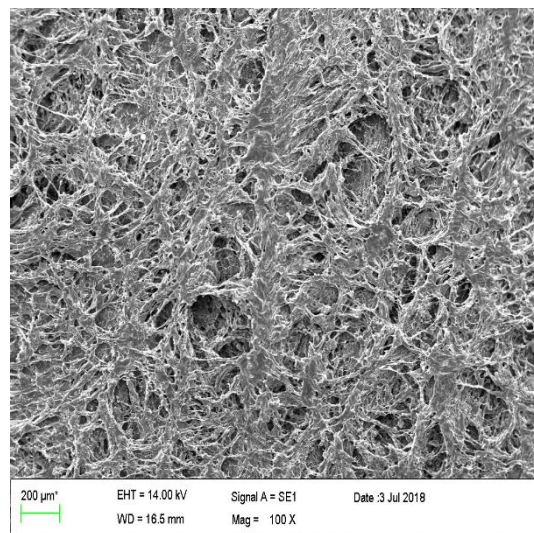
در شکل ۴-۳ تصاویر میکروسکوپ الکترونی روبشی داربست WE مشاهده می‌شود که با توجه به قسمت (الف) ساختار متخلخل داربست تهیه شده مشخص است. در قسمت (ب) و (ج) علاوه بر شکل یکسان حفرات، به هم پیوستگی^۱ و اتصال حفرات به یکدیگر کاملاً مشهود است که از الزامات ساخت داربست‌های

^۱ Interconnect

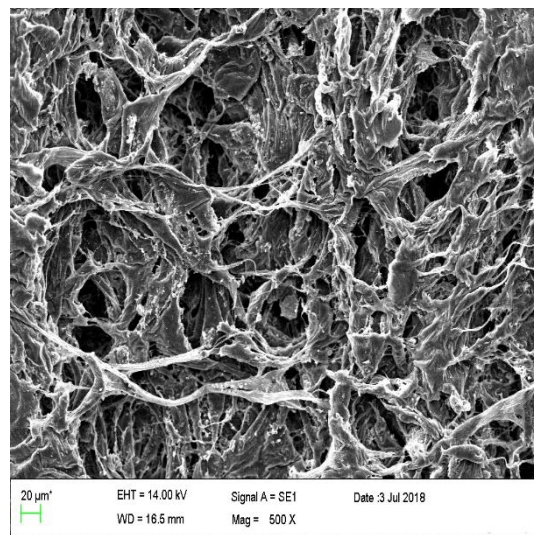
مهندسی بافت است و میانگین اندازه حفرات $117 \mu\text{m}$ است. علاوه بر این غیر یکنواخت بودن ساختار و زبری سطح به منظور چسبندگی و تکثیر سلول‌ها روی داربست، مناسب است.



(ب)



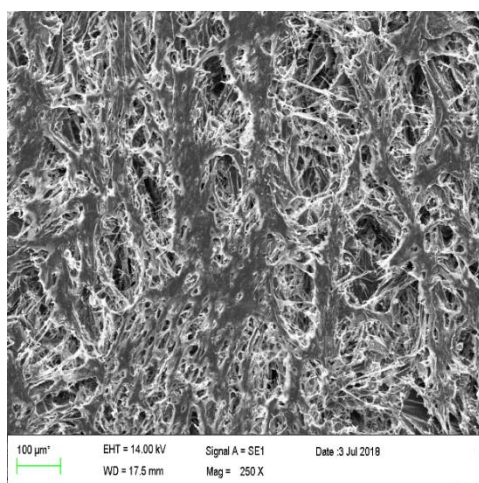
(الف)



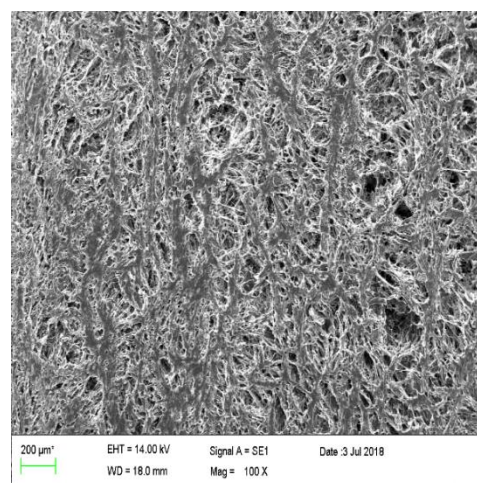
(ج)

شکل ۴-۳- تصاویر میکروسکوپ الکترونی روبشی مربوط به نمونه WE. الف) بزرگنمایی ۱۰۰ برابر، ب) بزرگنمایی ۲۵۰ برابر و ج) بزرگنمایی ۵۰۰ برابر.

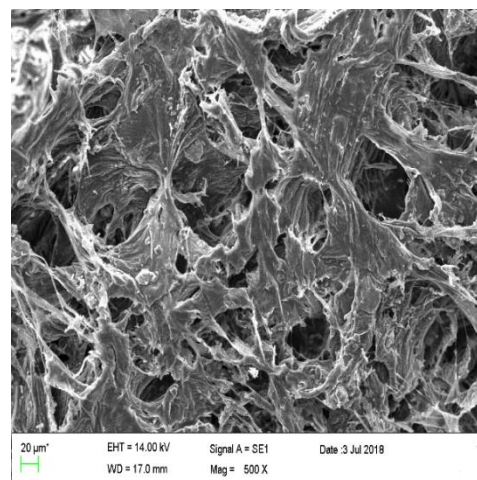
در شکل ۴-۴ قسمت (الف) و (ب) سطح متخلخل داربست XD با توزیع و شکل تقریباً یکسان حفرات دیده می‌شود. در قسمت (ج) به هم پیوستگی حفرات و راه به در بودن آن‌ها قابل تشخیص است و همچنین پراکندگی ذرات هیدروکسی‌آپاتیت در دیواره‌های پلیمری مشاهده می‌شود. علاوه بر این در برخی نواحی تجمع ذرات هیدروکسی‌آپاتیت دیده می‌شود. زبری و غیر یکنواخت بودن ساختار داربست نیز برای چسبندگی سلولی مناسب است. میانگین اندازه‌ی حفرات $128\text{ }\mu\text{m}$ محاسبه شد.



(ب)

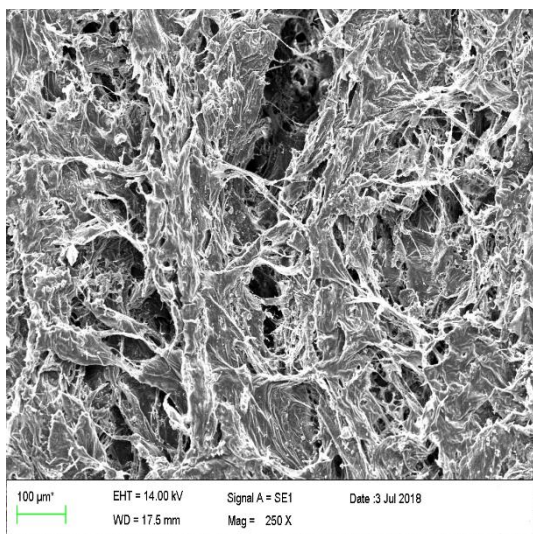


(الف)

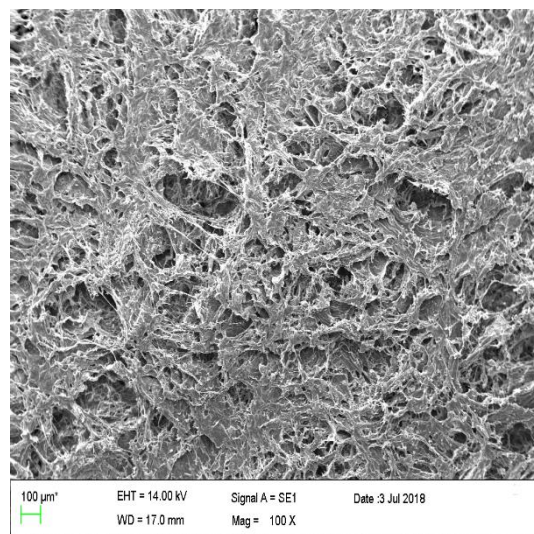


(ج)

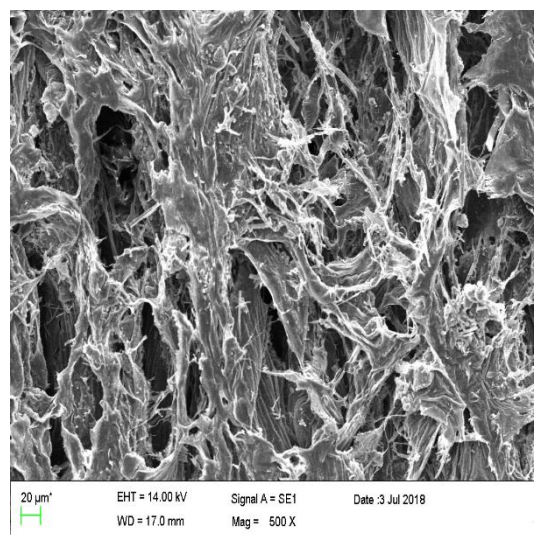
شکل ۴-۴ - تصاویر میکروسکوپ الکترونی روبشی مربوط به نمونه XD. الف) بزرگنمایی ۱۰۰ برابر، ب) بزرگنمایی ۲۵۰ برابر و ج) بزرگنمایی ۵۰۰ برابر.



(ب)



(الف)

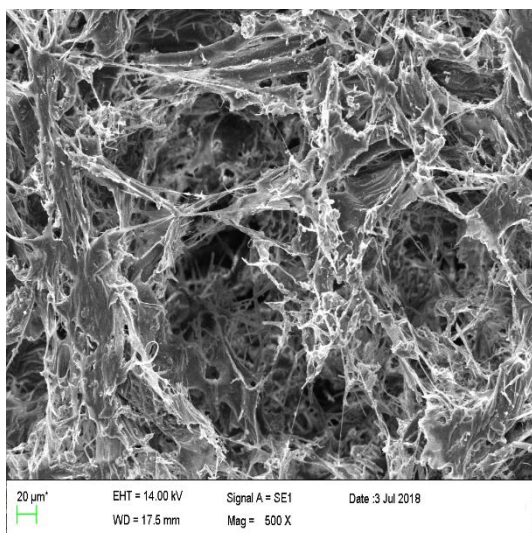


(ج)

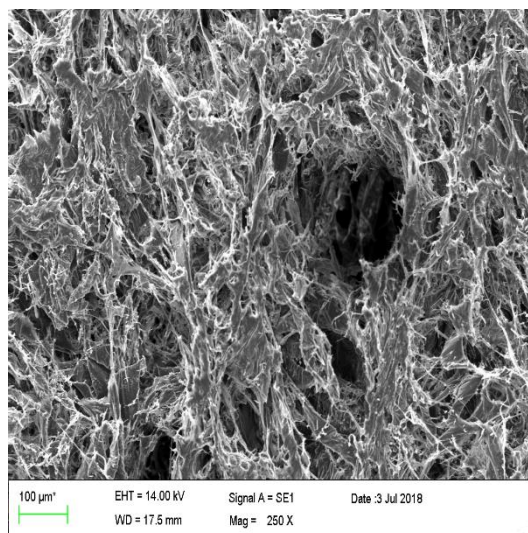
شکل ۴-۵- تصاویر میکروسکوپ الکترونی روبشی مربوط به نمونه XE. الف) بزرگنمایی ۲۵۰ برابر، ب) بزرگنمایی ۵۰۰ برابر.

در شکل ۴-۵ تصاویر میکروسکوپ الکترونی روبشی داربست XE مشاهده می‌شود. میانگین اندازه حفرات این داربست $135 \mu\text{m}$ به دست آمد. در قسمت (الف) سطح متخلخل داربست و توزیع حفرات در سطح داربست مشاهده می‌شود. در قسمت (ب) ذرات هیدروکسی‌آپاتیت در دیواره‌های پلیمر مشاهده می‌شوند.

در قسمت (ج) در برخی نواحی داربست تجمع ذرات هیدروکسی آپاتیت مشاهده می‌شود. هم‌چنین حفره‌ها به هم پیوسته هستند و شکل تقریباً یکسانی دارند.



(ب)



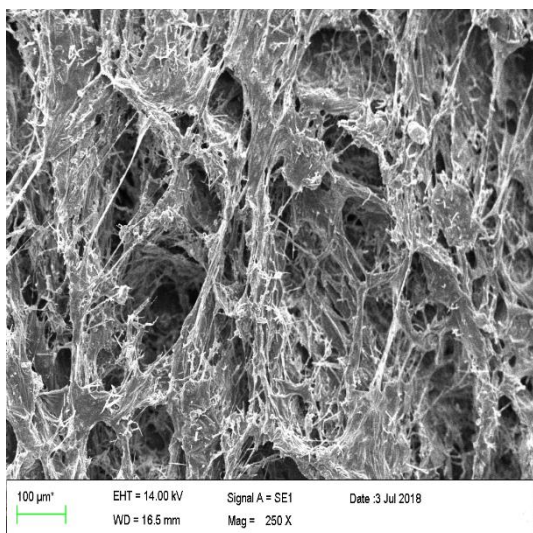
(الف)

شکل ۴-۶- تصاویر میکروسکوپ الکترونی روبشی مربوط به نمونه YD. (الف) بزرگنمایی ۲۵۰ برابر، (ب) بزرگنمایی ۵۰۰ برابر.

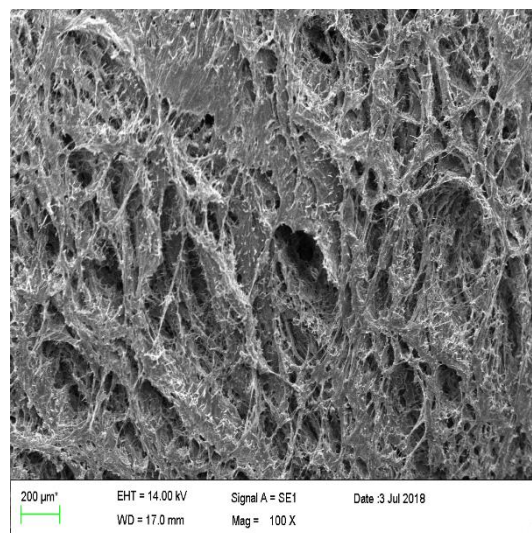
شکل ۴-۶ تصاویر میکروسکوپ الکترونی داربست YD را نشان می‌دهد. میانگین اندازه حفرات این داربست در حدود $120\text{ }\mu\text{m}$ است. با توجه به قسمت (الف) توزیع مناسب حفرات در داربست دیده می‌شود و داربست دارای تخلخل‌های با اندازه‌ی متفاوت است. در قسمت (ب) به هم پیوستگی حفرات و ذرات هیدروکسی آپاتیت در دیواره‌های پلی‌کاپرولاکتون دیده می‌شود. هم‌چنین سطح داربست غیریکنواخت و زیر به نظر می‌رسد و برای رشد سلولی مناسب است.

تصاویر میکروسکوپ الکترونی مربوط به داربست YE در شکل ۴-۷ مشاهده می‌شود. این داربست دارای میانگین اندازه حفرات $114\text{ }\mu\text{m}$ است. در قسمت (الف) و (ب) تخلخل‌های موجود در داربست، به هم پیوستگی، شکل بیضوی و توزیع یکسان آن‌ها مشاهده می‌شود. علاوه بر این پراکندگی ذرات هیدروکسی آپاتیت در دیواره‌های پلیمر مشخص است. هم‌چنین داربست دارای ساختار غیریکنواخت و زیر

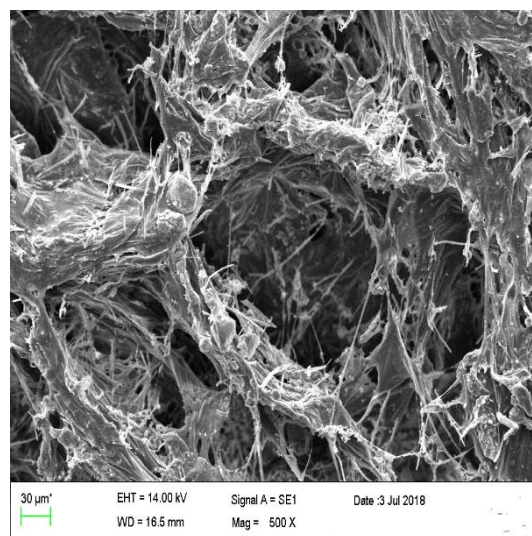
است. در قسمت (ج) به هم پیوستگی حفرات به خوبی دیده می‌شود و در برخی نواحی توده‌های تجمع یافته‌ی هیدروکسی آپاتیت وجود دارد.



(ب)



(الف)



(ج)

شکل ۴-۷- تصاویر میکروسکوپ الکترونی روبشی مربوط به نمونه YE. (الف) بزرگنمایی ۱۰۰ برابر، (ب) بزرگنمایی ۲۵۰ برابر، (ج) بزرگنمایی ۵۰۰ برابر.

احتمال می‌رود که چسبندگی خوبی بین زمینه‌ی پلیمری و ذرات تقویت کننده ایجاد شده است. داربست‌های تهیه شده از لحاظ اندازه حفرات ($114-135 \mu m$) برای رشد و تکثیر سلولی مناسب هستند و

با استاندارد لازم مطابقت دارند. همچنین به هم پیوستگی و شکل تخلخل‌های داربست امکان جریان پیوسته‌ی مواد مغذی برای سلول‌ها را فراهم خواهد کرد و برای مهندسی بافت استخوان مناسب است. با توجه به پژوهش‌هایی که در زمینه‌ی مهندسی بافت استخوان انجام گرفته است، اندازه بهینه تخلخل‌های داربست برای رشد سلول‌های استئوبلاست هنوز بحث برانگیز است چراکه نتایج بسیار متناقض هستند.

در پژوهشی با روش خشک کردن انجمادی که توسط تریپاتهی و همکاران [۳۰] روی کیتوسان، نانو هیدروکسی‌آپاتیت و نانوذرات مس-روی صورت گرفت، اندازه‌ی تخلخل‌های به دست آمده $115\text{ }\mu\text{m}$ گزارش شده است.

به‌طور کلی داربست‌هایی با اندازه تخلخل $20\text{ }\mu\text{m}$ تا $1500\text{ }\mu\text{m}$ در مهندسی بافت مورد استفاده قرار گرفته‌اند [۲۲]. اندازه تخلخل‌های استخوان اسفنجی حدود $300\text{ }\mu\text{m}$ تا $600\text{ }\mu\text{m}$ است در حالی که ابعاد تخلخل‌های استخوان متراکم حدود $10\text{ }\mu\text{m}$ تا $50\text{ }\mu\text{m}$ میکرومتر است. هالبرت و همکاران به این نتیجه رسیدند که حداقل اندازه تخلخل مورد نیاز برای رشد مؤثر سلول‌های استخوانی در یک کاشتنی $100\text{ }\mu\text{m}$ است [۵۱].

۴-۱-۵- آزمون زیست‌فعالی

همان‌طور که قبلاً اشاره شد زیست‌فعالی داربست‌ها از طریق تشکیل لایه‌ی آپاتیت روی سطح آن‌ها پس از قرارگیری در محیط شبیه‌سازی بدن (SBF) بررسی می‌شود. محلول شبیه‌ساز بدن محلولی است که حاوی یون‌های موجود در پلاسمای خون بوده و pH برابر ۷/۴ دارد. غلظت یون‌های موجود در محلول SBF در مقایسه با مقادیر واقعی موجود در پلاسمای خون انسان در جدول ۴-۳ نشان داده شده است. محلول SBF مورد استفاده در این آزمون به صورت آماده تهیه شد.

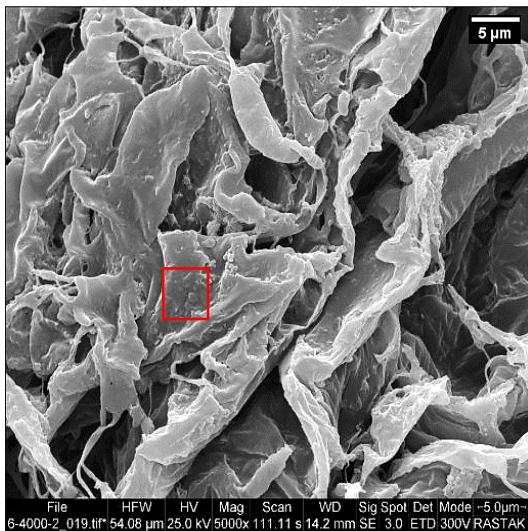
برای انجام این آزمون، داریست‌ها با اندازه‌های یکسان بریده شد و سپس به صورت جداگانه درون ظروف فالكون حاوی ۱۰cc محلول SBF گذاشته و در نهایت درون حمام آب (بن ماری) در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد قرار گرفت. پس از گذشت ۱۴ روز نمونه‌ها از حمام آب خارج شدند و سپس به مدت ۱ ساعت درون آون ۴۰ درجه‌ی سانتی‌گراد قرار گرفتند تا به‌طور کامل خشک شوند و برای تهیه‌ی تصاویر میکروسکوپ الکترونی روبشی آماده شوند. تصاویر به‌دست‌آمده از سطح این داریست‌ها در ادامه مشاهده می‌شود.

جدول ۴-۳- غلظت یون‌های موجود در محلول شبیه‌سازی‌شده بدن در مقایسه با مقدار یون‌های موجود در پلاسمای خون انسان [۵۲]

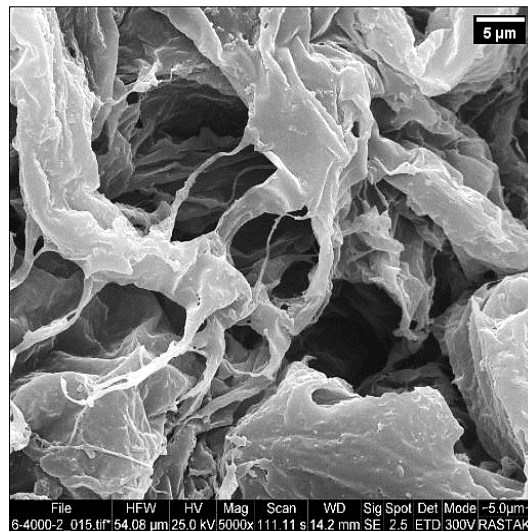
غلظت (mM)		
یون	پلاسمای خون انسان (HBP)	محلول شبیه‌ساز بدن (SBF)
Na^+	۱۴۲/۰	۱۴۲/۰
K^+	۵/۰	۵/۰
Mg^{2+}	۱/۵	۱/۵
Ca^{2+}	۲/۵	۲/۵
Cl^-	۱۰۳/۰	۱۴۷/۸
HCO_3^-	۲۷/۰	۴/۲
HPO_4^{2-}	۱/۰	۱/۰
SO_4^{2-}	۰/۵	۰/۵

شکل ۴-۸ تصاویر میکروسکوپ الکترونی روبشی داریست WA قبل و بعد از غوطه‌وری در محلول شبیه‌ساز بدن را نشان می‌دهد. همان‌طور که در تصویر قسمت (الف) مشاهده می‌شود داریست پلی‌کاپرولاکتون با

ساختار متخلخل و فاقد ذرات تقویت کننده است. قسمت (ب) مربوط به داربست پس از غوطه‌وری در محلول شبیه‌ساز بدن است. عدم حضور ذرات نانوهیدروکسی‌آپاتیت در ترکیب داربست باعث شده است که رشد آپاتیت پس از قرارگیری در محلول شبیه‌ساز بدن بسیار کم باشد اما با این وجود، جوانه‌هایی روی سطح مشاهده می‌شود که ممکن است ناشی از رسوب نمک‌ها و یون‌های موجود در محلول شبیه‌ساز بدن باشد.



(ب)



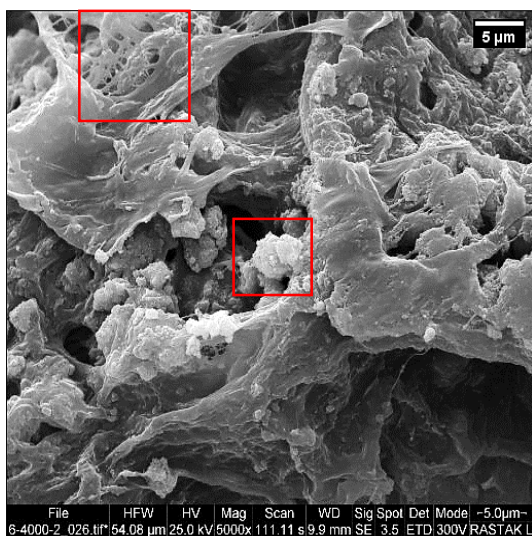
(الف)

شکل ۴-۸- تصاویر میکروسکوپ الکترونی روبشی مربوط به نمونه‌ی WA، (الف) قبل از غوطه‌وری در محلول شبیه‌ساز بدن با بزرگنمایی ۵۰۰۰ برابر، (ب) پس از غوطه‌وری در محلول شبیه‌ساز بدن با بزرگنمایی ۵۰۰۰ برابر، جوانه‌های ریز در دیواره‌های پلیمری ناشی از رسوب نمک‌های موجود در محلول شبیه‌ساز بدن.

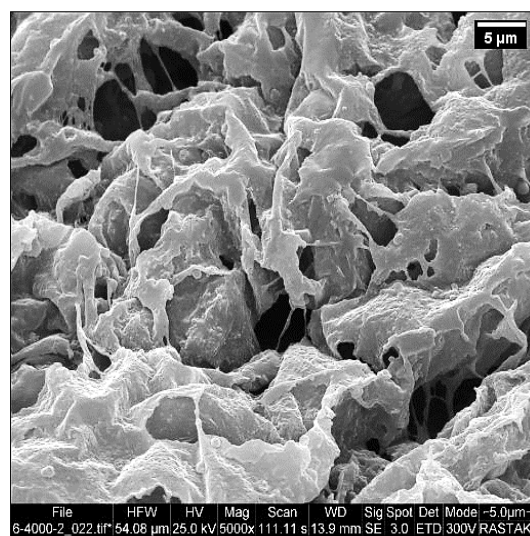
تصاویر میکروسکوپ الکترونی روبشی مربوط به داربست WD در شکل ۴-۹ دیده می‌شود. در تصویر (الف) که مربوط به قبل از غوطه‌وری در محلول شبیه‌ساز بدن است مشاهده می‌شود که در ساختار داربست که حاوی ۱۵٪ وزنی ذرات نانو هیدروکسی‌آپاتیت است، ذرات هیدروکسی‌آپاتیت پراکنده شده‌اند. حال آن‌که در قسمت (ب) ساختار گل‌کلمی آپاتیت‌های تشکیل شده به‌خوبی قابل مشاهده است و ساختار این آپاتیت‌های تشکیل شده با ذرات هیدروکسی‌آپاتیت اولیه کاملاً متفاوت است. جوانه‌های آپاتیت تشکیل شده از ابعاد نانو تا میکرو در ساختار حضور دارند و هم‌چنین پراکندگی و توزیع این جوانه‌های آپاتیتی

نشان‌دهنده‌ی پراکندگی مناسب ذرات نانو هیدروکسی‌آپاتیت در مرحله‌ی ساخت داربست است. در قسمت (ج) توده‌های آپاتیت گل کلم شکل با بزرگنمایی ۱۰۰۰۰ برابر مشاهده می‌شود.

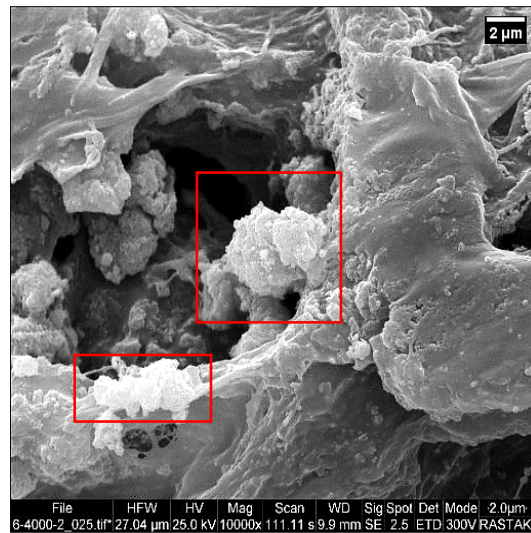
شکل ۴-۱۰ تصاویر میکروسکوپ الکترونی روبشی مربوط به داربست WE مشاهده می‌شود. در قسمت (الف) پراکندگی ذرات نانو هیدروکسی‌آپاتیت مشاهده می‌شود. از آنجایی که درصد وزنی ذرات نانو هیدروکسی‌آپاتیت به ۲۰٪ افزایش پیدا کرده است، در قسمت (ب) و (ج) مشاهده می‌شود که جوانه‌ها و ذرات هیدروکسی‌آپاتیت علاوه بر رشد گل کلمی، رشد صفحه‌ای نیز پیدا کرده‌اند و این رشد صفحه‌ای نشان می‌دهد که داربست از لحاظ رشد هیدروکسی‌آپاتیت و زیست‌فعالی، بسیار فعال است.



(ب)

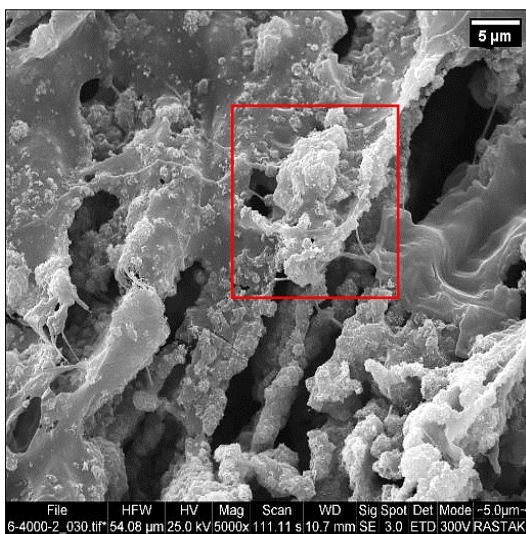


(الف)

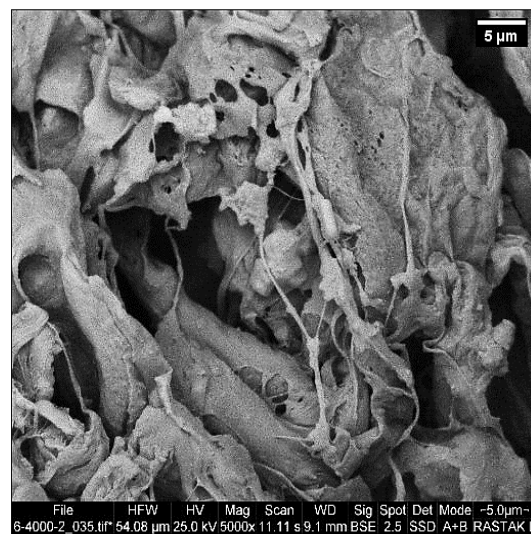


(ج)

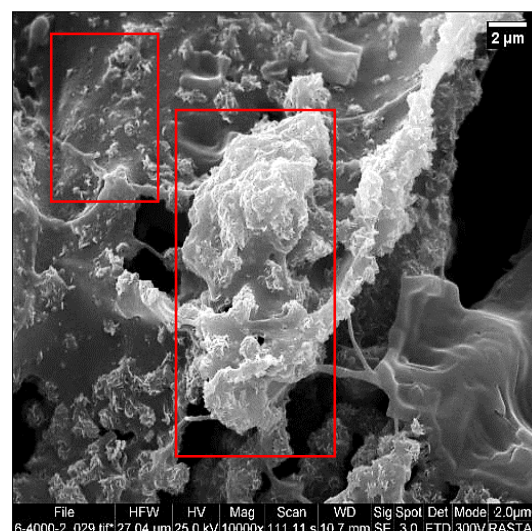
شکل ۴-۹- تصاویر میکروسکوپ الکترونی روبشی مربوط به نمونه‌ی WD. الف) قبل از غوطه‌وری در محلول شبیه‌ساز بدن با بزرگنمایی ۵۰۰۰ برابر، ب) پس از غوطه‌وری در محلول شبیه‌ساز بدن با بزرگنمایی ۵۰۰۰ برابر، توده‌های آپاتیت با ساختار گل‌کلمی و حفرات ثانویه، ج) پس از غوطه‌وری در محلول شبیه‌ساز بدن با بزرگنمایی ۱۰۰۰۰ برابر، برخی از توده‌های آپاتیت مشخص شده است.



(ب)



(الف)



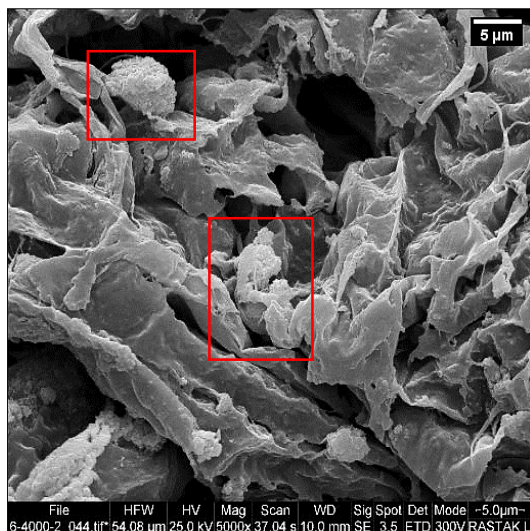
(ج)

شکل ۴-۱۰- تصاویر میکروسکوپ الکترونی روبشی مربوط به نمونه‌ی WE، الف) قبل از غوطه‌وری در محلول شبیه‌ساز بدن با بزرگنمایی ۵۰۰۰ برابر، ب) پس از غوطه‌وری در محلول شبیه‌ساز بدن با بزرگنمایی ۵۰۰۰ برابر، پراکندگی توده‌های سفیدرنگ آپاتیت، ج) پس از غوطه‌وری در محلول شبیه‌ساز بدن با بزرگنمایی ۱۰۰۰۰ برابر، رشد گل‌کلمی و صفحه‌ای توده‌های سفیدرنگ آپاتیت.

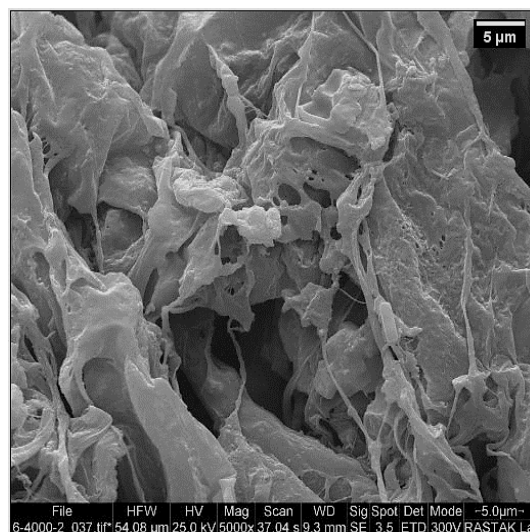
شکل ۴-۱۱ تصاویر میکروسکوپ الکترونی روبشی مربوط به داربست XD مشاهده می‌شود. همان‌طور که در قسمت الف) مشاهده می‌شود سطح داربست هیچ جوانه‌ی آپاتیتی وجود ندارد و تنها دیواره‌های پلیمری مشاهده می‌شود. در قسمت ب) و ج) توده‌های آپاتیتی پس از قرارگیری در محلول شبیه‌ساز بدن در بزرگنمایی‌های ۵۰۰۰ برابر و ۱۰۰۰۰ برابر مشاهده می‌شود. در داربست XD به دلیل وجود درصد کمتر نانو ذرات هیدروکسی‌آپاتیت (۱۵٪ وزنی) جوانه‌های آپاتیت کمتری نسبت به داربست WE تشکیل شده اما توده‌های آپاتیتی کاملاً در سطح داربست دیده می‌شوند و زیست‌فعالیت داربست XD را تأیید می‌کنند.

در شکل ۴-۱۲ تصاویر میکروسکوپ الکترونی روبشی داربست XE مشاهده می‌شود. مشابه داربست‌های قبل، در شکل الف) دیواره‌های پلیمری مشاهده می‌شود که فاقد توده‌های آپاتیت هستند. مطابق شکل قسمت ب) و پ) مشاهده می‌شود که حجم آپاتیت‌های تشکیل شده زیاد است و پراکندگی آن‌ها در سطح

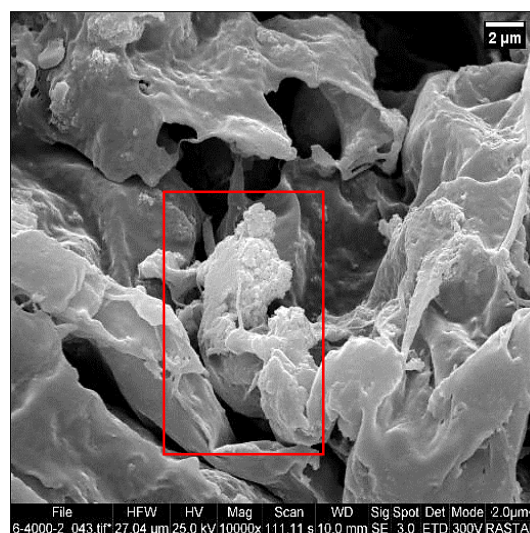
داربست مناسب است و رشد صفحه‌ای نیز پیدا کرده‌اند که علت رشد زیاد آپاتیت‌ها به علت افزایش درصد وزنی هیدروکسی آپاتیت اولیه نسبت به داربست XD است.



(ب)

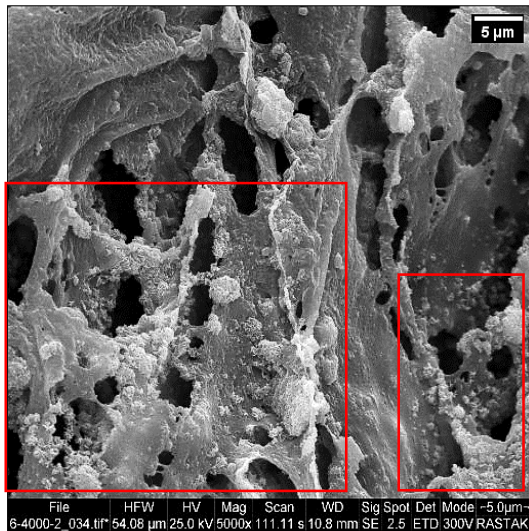


(الف)

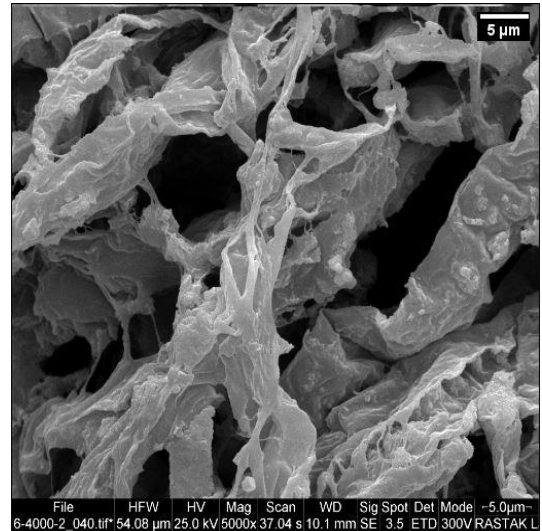


(ج)

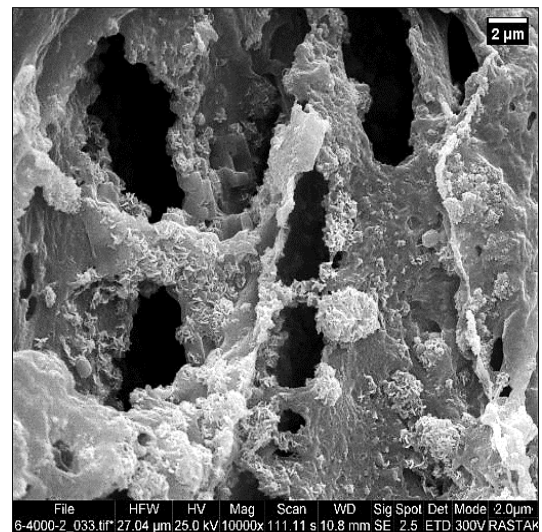
شکل ۴-۱۱- تصاویر میکروسکوپ الکترونی روبشی مربوط به نمونه‌ی XD، (الف) قبل از غوطه‌وری در محلول شبیه‌ساز بدن با بزرگنمایی ۵۰۰۰ برابر، (ب) پس از غوطه‌وری در محلول شبیه‌ساز بدن با بزرگنمایی ۵۰۰۰ برابر، جوانه‌ها و توده‌های آپاتیت مشخص شده‌اند، (ج) پس از غوطه‌وری در محلول شبیه‌ساز بدن با بزرگنمایی ۱۰۰۰۰ برابر.



(ب)



(الف)

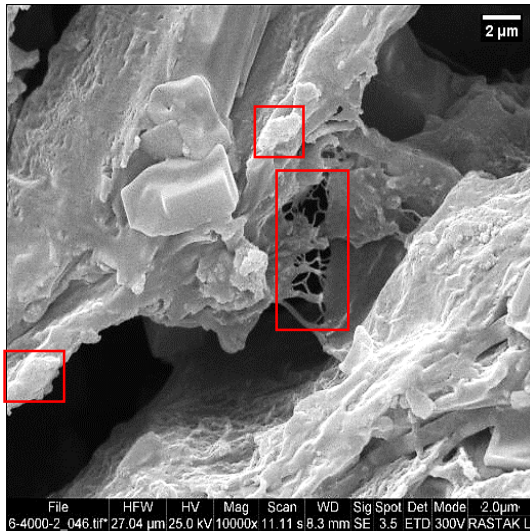


(ج)

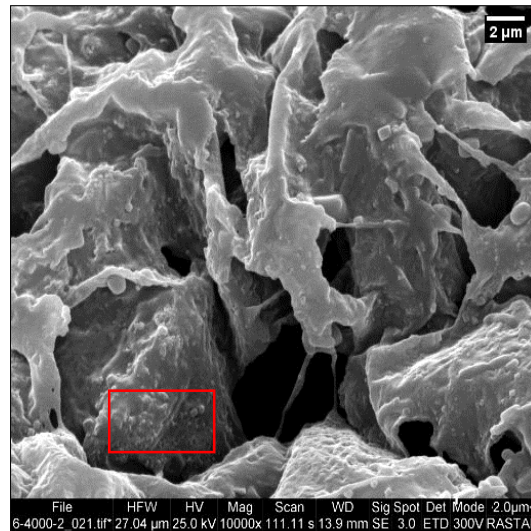
شکل ۴-۱۲- تصاویر میکروسکوپ الکترونی روبشی مربوط به نمونه‌ی XE، (الف) قبل از غوطه‌وری در محلول شبیه‌ساز بدن، (ب) پس از غوطه‌وری در محلول شبیه‌ساز بدن با بزرگنمایی ۵۰۰۰ برابر، توده‌های آپاتیت با پراکندگی بالا در سطح پلیمر مشاهده می‌شود، (ج) پس از غوطه‌وری در محلول شبیه‌ساز بدن با بزرگنمایی ۱۰۰۰۰ برابر و (د) پس از غوطه‌وری در محلول شبیه‌ساز بدن با بزرگنمایی ۲۰۰۰۰ برابر.

تصاویر میکروسکوپ الکترونی روبشی داربست YD در شکل ۴-۱۳ مشاهده می‌شود. در قسمت (الف) دیواره‌های پلیمری فاقد توده‌های آپاتیت مشاهده می‌شود. در قسمت (ب) و (ج) علاوه بر توده‌های

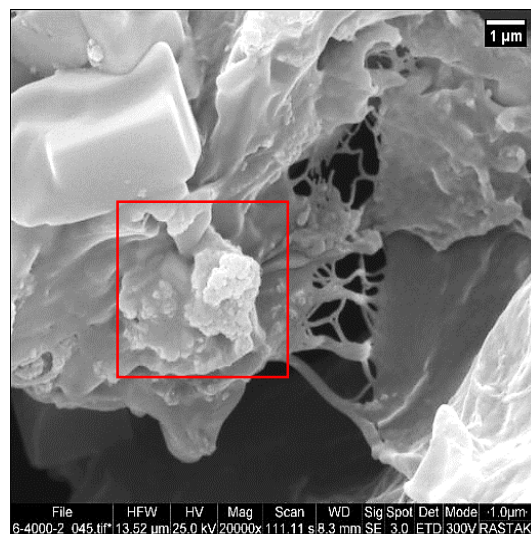
آپاتیت تشکیل شده، حفرات ثانویه‌ای مشاهده می‌شود که احتمالاً پس از قرارگیری در محلول شبیه‌ساز بدن تشکیل شده‌اند.



(ب)



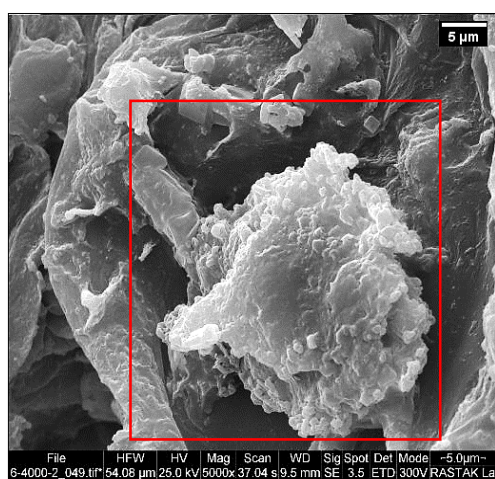
(الف)



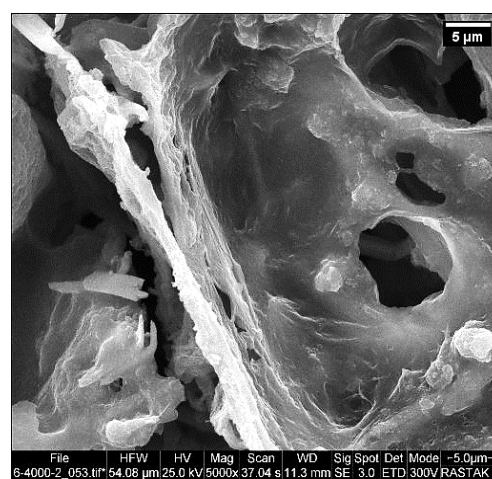
(ج)

شکل ۴-۱۳- تصاویر میکروسکوپ الکترونی روبشی مربوط به نمونه‌ی YD، الف) قبل از غوطه‌وری در محلول شبیه‌ساز بدن با بزرگنمایی ۱۰۰۰۰ برابر، ب) پس از غوطه‌وری در محلول شبیه‌ساز بدن با بزرگنمایی ۱۰۰۰۰ برابر، حفرات ثانویه و برخی جوانه‌های آپاتیتی در شکل مشخص شده است، ج) پس از غوطه‌وری در محلول شبیه‌ساز بدن با بزرگنمایی ۲۰۰۰۰ برابر.

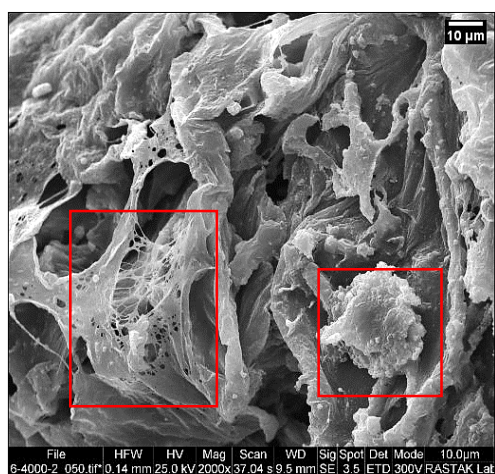
در رابطه با داربست YE، که در شکل ۴-۱۴ تصاویر مربوط به آن مشاهده می‌شود، در قسمت (ب) توده‌های تشکیل‌شده‌ی بسیار بزرگی مشاهده می‌شود که کریستال‌های نانو هیدروکسی‌آپاتیت در مقایسه با قسمت (الف)، رشد زیادی داشته‌اند که به علت درصد وزنی بالاتر هیدروکسی‌آپاتیت اولیه نسبت به داربست YD است. هم‌چنین در قسمت (د) در برخی قسمت‌ها حفرات ثانویه‌ای مشاهده می‌شود که به نظر می‌رسد پس از قرارگیری در محلول شبیه‌ساز بدن در داربست تشکیل شده‌اند.



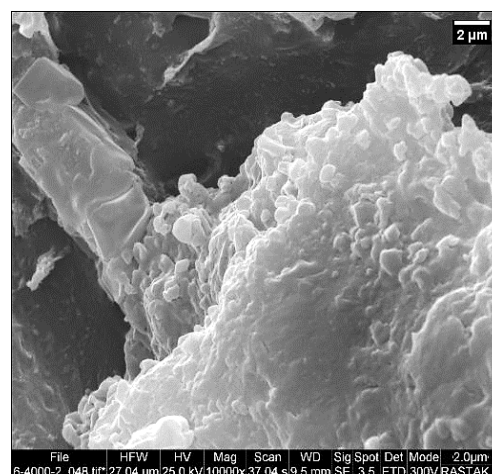
(ب)



(الف)



(د)



(ج)

شکل ۴-۱۴- تصاویر میکروسکوپ الکترونی روبشی مربوط به نمونه‌ی YE، (الف) قبل از غوطه‌وری در محلول شبیه‌ساز بدن با بزرگنمایی ۵۰۰۰ برابر، (ب) پس از غوطه‌وری در محلول شبیه‌ساز بدن با بزرگنمایی ۵۰۰۰ برابر، رشد زیاد آپاتیت‌ها، (ج) پس از غوطه‌وری در محلول شبیه‌ساز بدن با بزرگنمایی ۱۰۰۰۰ برابر و (د) پس از غوطه‌وری در محلول شبیه‌ساز بدن با بزرگنمایی ۲۰۰۰۰ برابر، حفرات ثانویه در سطح پلیمر در شکل مشخص شده‌اند.

به طور کلی می‌توان گفت همه‌ی داربست‌های حاوی نانوذرات هیدروکسی‌آپاتیت تهیه شده به روش خشک‌کردن انجمادی، زیست فعال هستند و در همه‌ی داربست‌ها پس از قرارگیری در محلول شبیه‌ساز بدن لایه‌ی آپاتیت تشکیل شده است. شکل این آپاتیت‌ها با ذرات هیدروکسی‌آپاتیت اولیه متفاوت است و ساختار شاخص آن‌ها به صورت گل کلم و توده‌های سفید رنگ دیده می‌شود. میزان این آپاتیت تشکیل شده در داربست‌های حاوی ۱۵٪ وزنی هیدروکسی‌آپاتیت کمتر از داربست‌های حاوی ۲۰٪ وزنی هیدروکسی‌آپاتیت است. هم‌چنین افزودن اکسید نقره به ساختار داربست‌ها نیز باعث افزایش تشکیل توده‌های آپاتیت شده و در مقادیر بالاتر، منجر به بزرگ‌تر شدن و افزایش حجم آپاتیت‌ها شده است.

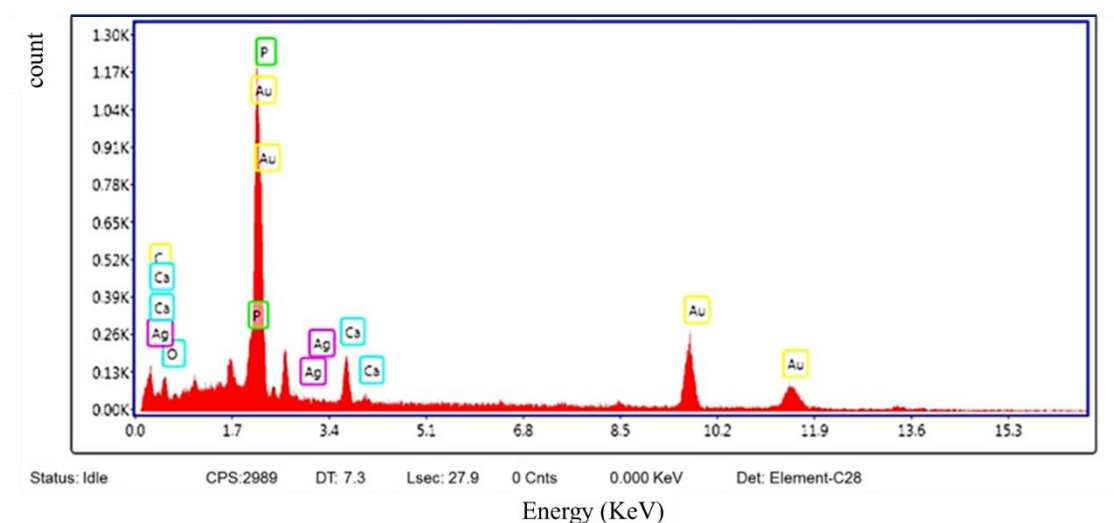
در پژوهشی که توسط نیرمالا و همکاران [۵۳] صورت گرفت، گزارش شده است که افزایش درصد هیدروکسی‌آپاتیت و نقره، تشکیل ماده‌ی آپاتیت مانند بر سطح داربست قرار گرفته در محلول شبیه‌ساز بدن را افزایش می‌دهد.

برای تائید حضور عناصر کلسیم و فسفر که عناصر اصلی سازنده‌ی هیدروکسی‌آپاتیت هستند و اکسید نقره، از آشکارساز EDAX در داربست XD استفاده شد که نتایج حاصل از آن در ادامه مشاهده می‌شود.

جدول ۴-۴- نتایج آنالیز عنصری داربست XD

عنصر	درصد وزنی	درصد اتمی
کربن	۷/۷۷	۳۶/۰۵
اکسیژن	۸/۲۹	۲۸/۸۷
فسفر	۲/۹۷	۵/۳۴
نقره	۱/۳۸	۰/۷۱
کلسیم	۵/۹	۸/۲
طلا	۷۳/۶۸	۲۰/۸۴

با توجه به نتایج ارائه شده در جدول ۴-۴ و نمودار ۴-۱۱، عناصر کربن، اکسیژن، نقره، کلسیم و فسفر در ساختار داربست مشاهده شدند. همچنین نسبت Ca/P به دست آمده حدود ۱/۶ است که با نسبت Ca/P موجود در هیدروکسی آپاتیت متناسب است. علاوه بر این، پیک‌های طلا نیز مشاهده می‌شود که مربوط به پوشش دهی طلا به منظور رساناسازی سطح داربست‌ها است.



نمودار ۴-۱۱- نمودار آنالیز عنصری داربست XD پس از ۱۴ روز غوطه وری در محلول شبیه‌ساز بدن.

۴-۱-۶- آزمون استحکام فشاری

استحکام فشاری داربست‌ها با استفاده از دستگاه یونیورسال با سرعت ۲ mm/min و نیروی ۵۰۰N اندازه‌گیری شد.

در جدول ۴-۵ مقادیر استحکام فشاری داربست‌ها نشان داده شده است. همان طور که در نمودار تنش- کرنش ۴-۱۲ مربوط به داربست‌های WD، WE، XD، XE و YD مشاهده می‌شود، با افزایش درصد وزنی هیدروکسی آپاتیت، میزان استحکام فشاری داربست‌ها افزایش داشته است؛ به طوری که داربست حاوی ۱۵٪ وزنی نانو هیدروکسی آپاتیت استحکام فشاری کمتری نسبت به داربست حاوی ۲۰٪ وزنی

نانوهیدروکسی آپاتیت نشان داده است. همچنین با مقایسه‌ی نمودارها در مقادیر ثابت نقره نیز می‌توان نشان داد که میزان استحکام فشاری داربست‌ها با افزایش درصد وزنی نانو هیدروکسی آپاتیت، افزایش یافته است.

جدول ۴-۵- استحکام فشاری داربست‌ها

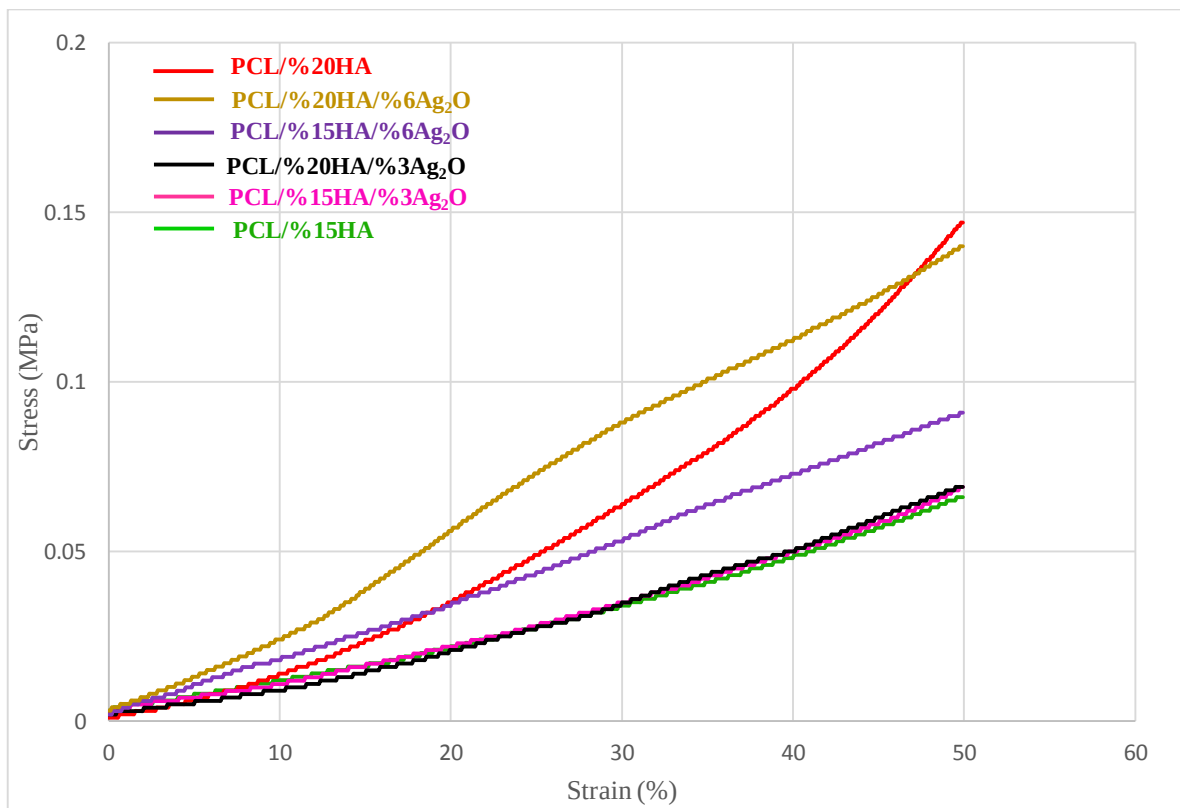
نمونه	استحکام فشاری (MPa)
WD	۰/۰۶۶۵
WE	۰/۱۴۷۳
XD	۰/۰۶۹۱
XE	۰/۰۶۹۳
YD	۰/۰۹۱۰
YE	۰/۱۴۰۲

در رابطه با نمودار مربوط به داربست حاوی ۲۰٪ وزنی نانو هیدروکسی آپاتیت و ۳٪ وزنی اکسید نقره احتمال می‌رود که تجمع ذرات نانو هیدروکسی آپاتیت و آگلومره شدن آن‌ها باعث کاهش خواص مکانیکی داربست شده و همان‌طور که در نمودار مشاهده می‌شود، استحکام فشاری این داربست در مقایسه با داربست حاوی درصد پایین‌تر نانو هیدروکسی آپاتیت، کمتر است.

همچنین با مقایسه‌ی نمودارها می‌توان به این نکته نیز اشاره کرد که افزودن نقره بر خواص مکانیکی داربست‌ها بی‌تأثیر نبوده و منجر به افزایش استحکام فشاری داربست‌ها شده است؛ به طوری که در مقادیر ثابت نانو هیدروکسی آپاتیت، استحکام فشاری داربست حاوی ۳٪ وزنی اکسید نقره کمتر از استحکام فشاری داربست حاوی ۶٪ وزنی اکسید نقره است.

با توجه به مطالعات پیشین می‌توان به این نکته اشاره کرد که روش‌های مرسوم ساخت داربست‌ها، که روش خشک‌کردن انجمادی نیز شامل آن است، می‌توانند حداکثر مدول فشاری ۴ MPa ایجاد کنند که این

مقدار بسیار پایین‌تر از مقدار آن در بافت‌های سخت ($10-1500\text{ MPa}$) و بسیاری از بافت‌های نرم ($0.4-350\text{ MPa}$) است [۲۲]. لذا روش ساخت داربست می‌تواند توجیهی برای پایین بودن میزان استحکام داربست‌های ساخته شده باشد. از سوی دیگر پایین بودن خواص مکانیکی داربست، کاربرد آن را محدود می‌کند و تنها در قسمت‌هایی از استخوان که تحت بار نیستند (مانند جمجمه) و یا تحت بار کم هستند، کاربرد دارد [۵۴].



نمودار ۴-۱۲- نمودار تنش- کرنش داربست‌ها.

آصف‌نژاد و همکاران [۲۷] در پژوهشی نشان دادند که افزایش درصد هیدروکسی‌آپاتیت در ساختار پلیمر پلی‌یورتان، باعث کاهش درصد تخلخل داربست و همچنین افزایش استحکام فشاری آن می‌شود، به طوری که استحکام فشاری نمونه‌ی پلی‌یورتان برابر با 0.29 MPa بوده که با افزودن 20% هیدروکسی‌آپاتیت به

۰/۸۵ MPa رسیده است. نیرمالا و همکاران [۵۳] نیز در پژوهشی نشان دادند که حضور هیدروکسی آپاتیت

و نقره در ساختار پلی کاپرولاکتون باعث بهبود خواص مکانیکی کامپوزیت می شود.

فصل پنجم

نتیجه‌گیری و پیشنهادها

۵-۱- نتیجه‌گیری

در این پژوهش، داربست‌های کامپوزیتی از جنس پلی‌کاپرولاکتون/نانو هیدروکسی‌آپاتیت/اکسید نقره به روش خشک کردن انجمادی تهیه شد و به منظور بررسی چند جانبه‌ی آن‌ها از آزمون‌های پراش پرتو ایکس، میکروسکوپ الکترونی روبشی، طیف‌سنجی تبدیل فوریه مادون قرمز، آزمون فشاری و آزمون زیست‌فعالی استفاده شد. نتایج حاصل از بررسی داربست‌ها در ادامه به‌طور خلاصه اشاره شده است.

۱- نتایج آزمون استحکام فشاری نشان داد که داربست تهیه شده دارای استحکام پایینی است و لذا برای برای استفاده در ترمیم مناطقی از استخوان که محل آسیب بزرگ است و یا مناطقی که تحت بار زیاد است، مناسب نیست و تنها برای آسیب‌های کوچک در استخوان مناسب است. هم‌چنین با افزایش درصد وزنی نانو هیدروکسی‌آپاتیت و اکسید نقره، میزان استحکام فشاری داربست افزایش یافت.

۲- نتایج آزمون پراش پرتو ایکس نشان داد که داربست دارای همه‌ی ترکیبات استفاده شده به عنوان مواد اولیه بوده و برهم‌کنشی بین این ترکیبات رخ نداده است.

۳- نتایج آزمون طیف سنجی تبدیل فوریه مادون قرمز نشان داد که داربست پیوندهای مربوط به پلی‌کاپرولاکتون و هیدروکسی‌آپاتیت را دارا است و هیچ پیوندی بین این دو ماده برقرار نشده است و ذرات هیدروکسی‌آپاتیت فقط در ساختار داربست پراکنده شده است.

۴- نتایج میکروسکوپ الکترونی روبشی قبل از غوطه‌وری داربست در محلول شبیه‌ساز بدن نشان داد که داربست دارای ساختار متخلخل با تخلخل‌های به هم پیوسته و راه به در است و دارای سطح زبر و غیریکنواخت است که برای چسبندگی سلولی مناسب است. هم‌چنین اندازه‌ی میانگین این تخلخل‌ها در حدود $114-135\ \mu\text{m}$ است که این مقدار برای رشد و تکثیر سلولی مناسب است.

۵- نتایج آزمون تخلخل سنجی به روش ارشمیدس نشان داد که داربست‌ها دارای درصد تخلخل بالا در حدود ۸۱٪ - ۷۳٪ است که این مقدار برای مهندسی بافت استخوان مناسب است. هم‌چنین با افزایش درصد هیدروکسی‌آپاتیت از ۱۵٪ وزنی به ۲۰٪ وزنی و اکسید نقره از ۳٪ وزنی به ۶٪ وزنی، درصد تخلخل‌های داربست کاهش یافت. بیشترین میزان تخلخل مربوط به داربست پلی‌کاپرولاکتون فاقد ذرات تقویت‌کننده برابر با ۸۱٪ بود و کمترین میزان تخلخل مربوط به داربست حاوی ۲۰٪ هیدروکسی‌آپاتیت و ۶٪ اکسید نقره است. از آنجایی که آزمون تخلخل سنجی با نمونه‌ی پتری‌دیش انجام شد، لذا نتایج به دست آمده از این آزمون با آزمون میکروسکوپ الکترونی روبشی قابل مقایسه نیست.

۶- نتایج آزمون زیست‌فعالی نشان داد که داربست دارای خاصیت زیست‌فعالی است و حضور ذرات نانوهیدروکسی‌آپاتیت در ساختار داربست، داربست‌ها را از لحاظ تشکیل آپاتیت در محلول شبیه‌ساز بدن فعال کرده است. پس از قرارگیری داربست در محلول شبیه‌ساز بدن به مدت ۱۴ روز، تصاویر میکروسکوپ الکترونی به دست آمده این لایه‌های آپاتیت را به خوبی نشان داد. هم‌چنین افزایش درصد هیدروکسی‌آپاتیت با مقدار و حجم آپاتیت تشکیل شده رابطه‌ی مستقیم دارد به طوری که داربست‌های حاوی ۲۰٪ وزنی نانوهیدروکسی‌آپاتیت، زیست‌فعالی بیشتری نشان دادند.

۷- با توجه به به هم‌پیوستگی و اندازه‌ی تخلخل‌های به دست آمده در داربست می‌توان گفت که روش خشک کردن انجمادی، روشی مناسبی برای ساخت داربست کامپوزیتی بوده است.

۸- نمونه‌ی YE (پلی‌کاپرولاکتون / ۲۰٪ هیدروکسی‌آپاتیت / ۶٪ اکسید نقره) از لحاظ زیست‌فعالی و تشکیل آپاتیت و هم‌چنین از لحاظ استحکام فشاری می‌تواند گزینه‌ی مناسبی برای مهندسی بافت استخوان باشد.

۵-۲- پیشنهادات

با توجه به پیشرفت داربست‌ها و مهندسی‌بافت و محدودیت‌هایی که در انجام پژوهش و همچنین مواد مورد استفاده و آزمون‌ها و ... وجود دارد، پیشنهادات زیر برای بررسی بیشتر داربست‌های تهیه شده، ارائه می‌شود.

۱- داربست باید از لحاظ خاصیت آنتی‌باکتریال مورد ارزیابی قرار گیرد.

۲- سطح ویژه و تخلخل‌های موجود در داربست توسط آزمون‌های مختلف (BET و مرکوری) مورد ارزیابی قرار گیرد.

۳- به‌منظور بهبود خواص مکانیکی می‌توان از روش‌های ساخت سریع استفاده کرد و نتایج به‌دست‌آمده با نتایج حاصل از روش خشک‌کردن انجمادی مقایسه شود.

۴- میزان زیست‌تخریب‌پذیری و رهایش یون‌های نقره با استفاده از آزمون ICP در طی زمان‌های مختلف بررسی شود.

۵- آزمون زیست‌فعالی، زیست‌سازگاری و زیست‌تخریب‌پذیری به‌صورت درون‌تن روی حیوانات انجام شود و نتایج حاصل با نتایج آزمایشگاهی مقایسه شود.

- [۱] B. E. Chaignaud, R. Langer, and J. P. Vacanti, "The history of tissue engineering using synthetic biodegradable polymer scaffolds and cells," in *Synthetic biodegradable polymer scaffolds*: Springer, pp. 1-14, 1997.
- [۲] L. Roseti et al., "Scaffolds for Bone Tissue Engineering: State of the art and new perspectives," *Materials Science and Engineering: C*, 2017.
- [۳] L. Polo-Corrales, M. Latorre-Esteves, and J. E. Ramirez-Vick, "Scaffold design for bone regeneration," *Journal of nanoscience and nanotechnology*, vol. 14, no. 1, pp. 15-56, 2014.
- [۴] C. A. Vacanti, "The history of tissue engineering," *Journal of cellular and molecular medicine*, vol. 10, no. 3, pp. 569-576, 2006.
- [۵] ز. هاشمی و م. سلیمانی، "داربست های مهندسی بافت: تاریخچه، انواع و روش ساخت"، *مجله علوم تشریح ایران*، جلد ۳۵، ص ۱۶۸-۱۴۵، ۱۳۹۰.
- [۶] C. Migliaresi and A. Motta, *Scaffolds for tissue engineering: Biological design, materials, and fabrication*. Pan Stanford, 2014.
- [۷] L. C. Junqueira, J. Carneiro, and R. O. Kelley, *Basic histology: text & atlas*. McGraw-Hill New York, 2003.
- [۸] M. I. Sabir, X. Xu, and L. Li, "A review on biodegradable polymeric materials for bone tissue engineering applications," *Journal of materials science*, vol. 44, no. 21, pp. 5713-5724, 2009.
- [۹] N. Baheiraei, S. Z. Jalise, and S. A. Sanei, "Recent advances in bioglass applications for bone tissue engineering," *Pathobiology Research*, vol. 20, no. 2, pp. 1-22, 2017.
- [۱۰] J. R. Porter, T. T. Ruckh, and K. C. Popat, "Bone tissue engineering: a review in bone biomimetics and drug delivery strategies," *Biotechnology progress*, vol. 25, no. 6, pp. 1539-1560, 2009.
- [۱۱] س. علی اکبری قویمی، م. صولتی هاشجین، م. ابراهیم زاده، م. شکرگزار و ف. فیاض بخش، "ساخت و مشخصه یابی و ارزیابی زیستی کامپوزیت پلی کاپرولاکتون/ نشاسته به منظور کاربردهای مهندسی بافت استخوان"، *مجله علوم پزشکی مدرس: آسیب شناسی زیستی*، دوره ۱۵، شماره ۳، ۱۳۹۱ هـ.ش.
- [۱۲] C. J. Damien and J. R. Parsons, "Bone graft and bone graft substitutes: a review of current technology and applications," *Journal of Applied Biomaterials*, vol. 2, no. 3, pp. 187-208, 1991.
- [۱۳] S. Abd-Khorsand, S. Saber-Samandari, and S. Saber-Samandari, "Development of nanocomposite scaffolds based on TiO₂ doped in grafted chitosan/hydroxyapatite by freeze drying method and evaluation of biocompatibility," *International Journal of Biological Macromolecules*, vol. 10, pp. 51-58, 2017.
- [۱۴] K. Rezwan, Q. Chen, J. Blaker, and A. R. Boccaccini, "Biodegradable and bioactive porous polymer/inorganic composite scaffolds for bone tissue engineering," *Biomaterials*, vol. 27, no. 18, pp. 3413-3431, 2006.
- [۱۵] H. J. Kim et al, "Bone tissue engineering with premineralized silk scaffolds," *Bone*, vol. 42, no. 6, pp. 1226-1234, 2008.
- [۱۶] X. Li, J. Xie, J. Lipner, X. Yuan, S. Thomopoulos, and Y. Xia, "Nanofiber scaffolds with gradations in mineral content for mimicking the tendon-to-bone insertion site," *Nano letters*, vol. 9, no. 7, pp. 2763-2768, 2009.

- [۱۷] Y. Lu, L. Tan, H. Xiang, B. Zhang, K. Yang, and Y. Li, "Fabrication and characterization of Ca–Mg–P containing coating on pure magnesium," *Journal of Materials Science & Technology*, vol. 28, no. 7, pp. 636-641, 2012.
- [۱۸] V. Stanić et al., "Synthesis of antimicrobial monophase silver-doped hydroxyapatite nanopowders for bone tissue engineering," *Applied Surface Science*, vol. 257, no. 9, pp. 4510-4518, 2011.
- [۱۹] J. W. Alexander, "History of the medical use of silver," *Surgical infections*, vol. 10, no. 3, pp. 289-292, 2009.
- [۲۰] V. Mourinho, J. P. Cattalini, and A. R. Boccaccini, "Metallic ions as therapeutic agents in tissue engineering scaffolds: an overview of their biological applications and strategies for new developments," *Journal of the Royal Society Interface*, vol. 9, no. 68, pp. 401-419, 2012.
- [۲۱] S. M. Peltola, F. P. Melchels, D. W. Grijpma, and M. Kellomäki, "A review of rapid prototyping techniques for tissue engineering purposes," *Annals of medicine*, vol. 40, no. 4, pp. 268-280, 2008.
- [۲۲] Q. L. Loh and C. Choong, "Three-dimensional scaffolds for tissue engineering applications: role of porosity and pore size," *Tissue Engineering Part B: Reviews*, vol. 19, no. 6, pp. 485-502, 2013.
- [۲۳] F.-M. Chen and X. Liu, "Advancing biomaterials of human origin for tissue engineering," *Progress in polymer science*, vol. 53, pp. 86-168, 2016.
- [۲۴] G. K. Naughton and B. A. Naughton, "Three-dimensional cell and tissue culture apparatus," ed: Google Patents, 1992.
- [۲۵] H. W. Kim, J. C. Knowles, and H. E. Kim, "Development of hydroxyapatite bone scaffold for controlled drug release via poly (ϵ -caprolactone) and hydroxyapatite hybrid coatings," *Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials*, vol. 70, no. 2, pp. 240-249, 2004.
- [۲۶] A. Sarasam and S. V. Madhally, "Characterization of chitosan–polycaprolactone blends for tissue engineering applications," *Biomaterials*, vol. 26, no. 27, pp. 5500-5508, 2005.
- [۲۷] آ. آصف نژاد، ع. ا. بهنام قادر، م. ت. خراسانی و م. دلیری، "داربست های کامپوزیتی پلی یورتان/ هیدروکسی آپاتیت جهت کاربرد در مهندسی بافت ۱. ساخت و بررسی خصوصیات مورفولوژی و مکانیکی"، ۱۳۸۹ ه.ش.
- [۲۸] B. Chuenjitkuntaworn, W. Inrung, D. Damrongsri, K. Mekaapiruk, P. Supaphol, and P. Pavasant, "Polycaprolactone/hydroxyapatite composite scaffolds: preparation, characterization, and in vitro and in vivo biological responses of human primary bone cells," *Journal of Biomedical Materials Research Part A*, vol. 94, no. 1, pp. 241-251, 2010.
- [۲۹] S.-I. Roohani-Esfahani, S. Nouri-Khorasani, Z. Lu, R. Appleyard, and H. Zreiqat, "The influence hydroxyapatite nanoparticle shape and size on the properties of biphasic calcium phosphate scaffolds coated with hydroxyapatite–PCL composites," *Biomaterials*, vol. 31, no. 21, pp. 5498-5509, 2010.
- [۳۰] A. Tripathi, S. Saravanan, S. Pattnaik, A. Moorthi, N. C. Partridge, and N. Selvamurugan, "Bio-composite scaffolds containing chitosan/nano-hydroxyapatite/nano-copper–zinc for bone tissue engineering," *International journal of biological macromolecules*, vol. 50, no. 1, pp. 294-299, 2012.
- [۳۱] S. Saravanan, S. Nethala, S. Pattnaik, A. Tripathi, A. Moorthi, and N. Selvamurugan, "Preparation, characterization and antimicrobial activity of a bio-composite scaffold containing chitosan/nano-hydroxyapatite/nano-silver for bone tissue engineering," *International Journal of Biological Macromolecules*, vol. 49, no. 2, pp. 188-193, 2011.

- [۳۲] د. صادقی، ح. نظریان، ن. معروف، ف. کریم آقالو، ه. نوجه دهیان، و ا. وحید دستجردی "بررسی میزان فعالیت آلکالین فسفاتاز سلول های استئوبلاست بر روی داربست های سه بعدی کامپوزیتی کیتوسان-ژلاتین/هیدروکسی آپاتیت"، مجله دانشکده دندان پزشکی دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، جلد ۳۰، شماره ۴، ص ۲۰۹-۲۰۳، ۱۳۹۱ هـ.ش.
- [۳۳] M. I. Hassan, M. Mokhtar, N. Sultana, and T. H. Khan, "Production of hydroxyapatite (HA) nanoparticle and HA/PCL tissue engineering scaffolds for bone tissue engineering," in Biomedical Engineering and Sciences (IECBES), 2012 IEEE EMBS Conference on, pp. 239-242, 2012.
- [۳۴] E. Marsich, F. Bellomo, G. Turco, A. Travan, I. Donati, and S. Paoletti, "Nano-composite scaffolds for bone tissue engineering containing silver nanoparticles: preparation, characterization and biological properties," Journal of Materials Science: Materials in Medicine, vol. 24, no. 7, pp. 1799-1807, 2013.
- [۳۵] N. Sultana and T. Hayat Khan, "Polycaprolactone scaffolds and hydroxyapatite/polycaprolactone composite scaffolds for bone tissue engineering," Journal of Bionanoscience, vol. 7, no. 2, pp. 169-173, 2013.
- [۳۶] F. M. Ghorbani, B. Kaffashi, P. Shokrollahi, E. Seyedjafari, and A. Ardeshtyrlajimi, "PCL/chitosan/Zn-doped nHA electrospun nanocomposite scaffold promotes adipose derived stem cells adhesion and proliferation," Carbohydrate polymers, vol. 118, pp. 133-142, 2015.
- [۳۷] م. مظفری، ن. جوهری، و م. فتحی، "داربست کامپوزیتی پلی کاپرولاکتون-هیدروکسی آپاتیت: بررسی تاثیر درصد ذرات هیدروکسی آپاتیت و مقایسه ذرات با سایز نانومتری و میکرومتری و اثر آنها بر خواص مکانیکی و زیست تخریب پذیری داربست"، مواد نوین، جلد ۵، شماره ۴، ص ۱۴۲-۱۳۱، ۱۳۹۴ هـ.ش.
- [۳۸] S. S. S. M. Baradaran, F. Moztarzadeh and S. Z. Mortazavi, "preparation and characterization of Polycaprolactone / Layered Double Hydroxide Nanocomposite for hard tissue engineering applications," 2017.
- [۳۹] L. H. Chong, N. Z. Zarith, and N. Sultana, "Poly (Caprolactone)/chitosan-based scaffold using freeze drying technique for bone tissue engineering application," in Control Conference (ASCC), 2015 10th Asian, pp. 1-4, 2015.
- [۴۰] م. میرحاج، م. محمودی و ع. شیبانی، "ساخت و مشخصه یابی نانوالیاف کامپوزیتی کراتین/ پلی کاپرولاکتون/ هیدروکسی آپاتیت جهت کاربرد به عنوان داربست در مهندسی بافت" ۱۳مین همایش علمی دانشجویی مهندسی مواد و متالورژی ایران- دانشگاه صنعتی امیرکبیر، ۱۳۹۵ هـ.ش.
- [۴۱] ا. ر. صفوی و د. سمنانی، "ساخت داربست سه بعدی نانولیفی پلی کاپرولاکتون/ هیدروکسی آپاتیت/ ژلاتین"، دهمین کنفرانس ملی مهندسی نساجی ایران، ۱۳۹۵.
- [۴۲] S. K. J. Uferea And N. Sultana, "Fabrication and characterization of pcl/Ha/ppy composite scaffold using freeze-Drying technique," Jurnal Teknologi, Vol. 78, No. 12, Pp. 89-94, 2016.
- [۴۳] Z. Fereshteh, M. Fathi, A. Bagri, and A. R. Boccaccini, "Preparation and characterization of aligned porous PCL/zein scaffolds as drug delivery systems via improved unidirectional freeze-drying method," Materials Science and Engineering: C, vol. 68, pp. 613-622, 2016.
- [۴۴] S. Hoover, S. Tarafder, A. Bandyopadhyay, and S. Bose, "Silver doped resorbable tricalcium phosphate scaffolds for bone graft applications," Materials Science and Engineering: C, vol. 79, pp. 763-769, 2017.
- [۴۵] K.-S. Shim et al., "Surface immobilization of biphasic calcium phosphate nanoparticles on 3D printed poly (caprolactone) scaffolds enhances osteogenesis and bone tissue regeneration," Journal of Industrial and Engineering Chemistry, vol. 55, pp. 101-109, 2017.

- [٤٦] Y. El Hafiane, A. Smith, J. Bonnet, and B. Tanouti, "Effect of a carboxylic acid on the rheological behavior of an aluminous cement paste and consequences on the properties of the hardened material," *Journal of the European Ceramic Society*, vol. 25, no. 7, pp. 1143-1147, 2005.
- [٤٧] H .W. Kim, J. C. Knowles, and H. E. Kim, "Hydroxyapatite and gelatin composite foams processed via novel freeze-drying and crosslinking for use as temporary hard tissue scaffolds," *Journal of Biomedical Materials Research Part A: An Official Journal of The Society for Biomaterials, The Japanese Society for Biomaterials, and The Australian Society for Biomaterials and the Korean Society for Biomaterials*, vol. 72, no. 2, pp. 136-145, 2005.
- [٤٨] C. Agrawal, J. McKinney, D. Lancot, and K. Athanasiou, "Effects of fluid flow on the in vitro degradation kinetics of biodegradable scaffolds for tissue engineering," *Biomaterials*, vol. 21, no. 23, pp. 2443-2452, 2000.
- [٤٩] D. Verma, K. Katti, and D. Katti, "Experimental investigation of interfaces in hydroxyapatite/polyacrylic acid/polycaprolactone composites using photoacoustic FTIR spectroscopy," *Journal of Biomedical Materials Research Part A: An Official Journal of The Society for Biomaterials, The Japanese Society for Biomaterials, and The Australian Society for Biomaterials and the Korean Society for Biomaterials*, vol. 77, no. 1, pp. 59-66, 2006.
- [٥٠] M. Mozaffari, N. Johari, and M. Fathi, "poly (ε-caprolactone)/hydroxyapatite scaffold: evaluation of the effect of the amount of hydroxyapatite particles, compare of the effect of nanoscale and microscale particles and the effect of them on mechanical and biodegradable properties of bone tissue engineering scaffold," 2015.
- [٥١] A. Zare-Harofteh, S. Saber-Samandari, and S. Saber-Samandari, "The effective role of akermanite on the apatite-forming ability of gelatin scaffold as a bone graft substitute," *Ceramics International*, vol. 42, no. 15, pp. 17781-17791, 2016.
- [٥٢] F. Yang, J. Wolke, and J. Jansen, "Biomimetic calcium phosphate coating on electrospun poly (ε-caprolactone) scaffolds for bone tissue engineering," *Chemical Engineering Journal*, vol. 137, no. 1, pp. 154-161, 2008.
- [٥٣] R. Nirmala, K. T. Nam, D. K. Park, B. Woo-il, R. Navamathavan, and H. Y. Kim, "Structural, thermal, mechanical and bioactivity evaluation of silver-loaded bovine bone hydroxyapatite grafted poly (ε-caprolactone) nanofibers via electrospinning," *Surface and Coatings Technology*, vol. 205, no. 1, pp. 174-181, 2010.
- [٥٤] S. Bose, S. Vahabzadeh, and A. Bandyopadhyay, "Bone tissue engineering using 3D printing," *Materials today*, vol. 16, no. 12, pp. 496-504, 2013.

Abstract

According to natural bone structure, fabrication of polymer-ceramic nano-composite scaffolds has attracted a great deal of attention as an alternative for bone grafts. Recently, polycaprolactone has extensively been used for its great biocompatibility and biodegradation, as well as hydroxyapatite nano particles as the main mineral component of bone for bone tissue engineering. Also antibacterial properties of silver particles are well known. In this research, polycaprolactone, nano-hydroxyapatite (0%wt, 15%wt, 20%wt) and silver oxide (0%wt, 3%wt, 6%wt) composite scaffolds with different compositions were prepared by freeze drying method and their properties were investigated. Scanning electron microscopy (SEM), X-ray diffraction analysis, Fourier transform infrared spectroscopy (FTIR) and mechanical test were carried out to evaluate the surface morphology, phase content, chemical bonds and functional groups and compressive strength, respectively. In addition, in vitro bioactivity of scaffolds were evaluated by soaking them in SBF for 14 days to observe apatite layer formation. Results demonstrated that freeze dried scaffolds had interconnected pores with suitable mean pore size (114-135 μm) for cell adhesion and proliferation. HA and silver oxide particles were well disperse in polymer matrix, and increasing in weight percent of them, enhanced the compressive strength, as well as decreasing the porosity from 81% for pure PCL to 73% for scaffold contain 20%HA/ 6%Ag₂O. Formation of apatite layer confirmed the bioactivity of the scaffolds and had direct relationship with nano-hydroxyapatite weight percent. Finally PCL/n-HA/Ag₂O composite scaffold is suitable for bone tissue engineering.

Keywords: Bone tissue engineering, Freeze drying, Hydroxyapatite, Bioactive



Shahrood University of
Technology

Faculty of Chemical and Materials Engineering

M.Sc. Thesis in Composite Engineering

Preparation of polycaprolactone/nano hydroxyapatite/silver oxide composite scaffold by freeze drying

By: Ghazaleh Salmanian

Supervisor:

Dr. Arash Yazdani

Advisor:

Dr. Esmaeil Salimi

January 2019