ساخت و مشخصه‌یابی نانو کامپوزیت پلی‌کاپرولاکتان/ هیدروکسید دوگانه لایه‌ای به‌منظور کاربرد در مهندسی بافت سخت

منیر برادران[۱و۲]، سیده سارا شفیعی[۲*]، فتح الله مضطرزاده[۲] و سیده زهرا مرتضوی[۳]

۱- پژوهشکده زیست فناوری پزشکی، پژوهشگاه ملی مهندسی ژنتیک و زیست فناوری، تهران

۲- گروه بیومواد، دانشکده مهندسی پزشکی، دانشگاه صنعتی امیرکبیر، تهران

۳- دانشکده علوم، دانشگاه بین‌المللی امام خمینی (ره)، قزوین

(دریافت مقاله: ۱۳۹۴/۰۷/۲۷- دریافت نسخه نهایی: ۱۳۹۴/۱۲/۲۶)

چکیده – در سال‌های اخیر استفاده از نانومواد در داربست‌های مهندسی بافت استخوان به‌دلیل تقلید از ساختار بافت طبیعی استخوان که دارای یک ساختار نانوکامپوزیتی درهم آمیخته با یک ماتریس سه بعدی است، مورد توجه قرار گرفته است. در این میان، پلی‌کاپرولاکتان به‌عنوان یک زیست پلیمر، درساخت داربست‌های مهندسی بافت استخوان مورد استفاده قرار گرفته است. هدف از این پژوهش، ساخت داربست نانوکامپوزیتی پلی‌کاپرولاکتان/ هیدروکسید دوگانه لایه‌ای با خواص مکانیکی، زیست فعالی و زیستی مناسب برای کاربرد در مهندسی بافت استخوان اسفنجی است. برای ساخت داربست‌ها از ترکیب دو روش فروشویی ذره‌ای و خشکایش انجمادی و هم‌چنین برای مطالعات سلولی از سلول MG63 (استئوسارکومای استخوان) استفاده شد. تحلیل طیف سنج طول موج انتشاری از نمونه‌ها، توزیع یکنواخت فاز سرامیکی در بستر پلی کاپرولاکتان را تأیید کرد. نتایج بررسی مکانیکی داربست‌ها حاکی از افزایش مدول یانگ بعد از اضافه شدن فاز سرامیکی بود. بررسی‌های میکروسکوپی نشان داد که داربست‌ها از تجمع ریزکره‌ها پس از اضافه شدن فاز سرامیکی حاصل شدند و اندازه تخلخل‌ها بین ۱۰۰ تا ۶۰۰ میکرومتر گزارش شد. هم‌چنین با افزودن فاز سرامیکی آب‌دوستی پلی کاپرولاکتان افزایش یافت، اما تشکیل هیدروکسی آپاتیت در محیط شبیه‌سازی شده بدن، به‌علت وجود یون منیزیم به‌تأخیر افتاد. ارزیابی‌های سلولی، اتصال سلول‌ها و تکثیرشان روی داربست‌ها را تأیید کردند. نتایج نشان می‌دهد که داربست‌های ساخته شده قابلیت کاربرد در مهندسی بافت استخوان اسفنجی را دارند.

واژگان کلیدی: هیدروکسیددوگانه‌لایه‌ای، کامپوزیت، خشکایش انجمادی، مهندسی بافت، داربست

* مسئول مکاتبات پست الکترونیکی: sarashafiei@aut.ac.ir

[DOR: 20.1001.1.2251600.1395.35.3.2.6]
[DOI: 10.18869/acadpub.jame.35.3.13]

Preparation and Characterization of Polycaprolactone / Layered Double Hydroxide Nanocomposite for Hard Tissue Engineering Applications

M. Baradaran[1,2], S.S. Shafiei[2*], F. Moztarzadeh[2] and S.Z. Mortazavi[1]

1- Stem cell and Regenerative Medicine Department, Institute of Medical biotechnology, National Institute of Genetic Engineering and Biotechnology, Tehran, Iran
2- Biomaterial Group, Biomedical Engineering Faculty, Amirkabir University of Technology, Tehran, Iran
3- Physics Group, Faculty of Science, Imam Khomeini International University, Qazvin, Iran

Abstract: ***In recent years the use of nanomaterials in bone tissue engineering scaffold has been considered due to its imitating the structure of natural bone tissue which contains a nanocomposite structure mixed with a three-dimensional matrix. In the meantime, Polycaprol actone has been used as a bio-polymer in bone tissue engineering applications as a scaffold. The aim of this study is to develop porous scaffolds made of polycaprol actone/layered double hydroxide biocomposite, with appropriate mechanical, bioactive and biological properties, for bone tissue engineering application. The nanocomposite scaffolds were fabricated by the particulate leaching method and freeze-drying method. In this study, MG63 cells (osteosarcoma) was investigated for cellular study. Energy dispersive X-ray analysis confirmed uniform distribution of ceramic phase in polycaprol actone matrix. The results of mechanical tests showed the increase in young's modulus after addition of ceramic phase. The microscopic investigations demonstrated that the pores generated after addition of ceramic phase and the average size of pores was as large as 100-600µm. Also by the addition of LDH, the hydrophilicity of PCL increased but the rate of hydroxyapatite formation was delayed due to presence of magnesium ions. The cell culture experiments confirmed the attachment and proliferation of cells on the scaffolds. The results showed that the fabricated scaffolds have the potential to be used in cancellous bone tissue engineering.***

Keywords: ***Layered double hydroxide, Composite, Freeze-drying, Tissue engineering, Scaffold***

۱- مقدمه

مهندسی بافت به عنوان یک پاسخ به مشکل‌های مرتبط با جایگزین کردن بافت‌هایی که در اثر بیماری یا تروما از دست رفته‌اند، توسعه یافته است. در حال حاضر برای جایگزینی بافت باید به چالش‌های از قبیل پس‌زده شدن، التهاب مزمن و کمبود اهدا کننده اعضا غلبه نمود [۱]. در حال حاضر هزاران نفر از بیماران هرسال در فهرست انتظار پیوند عضو، جان خود را از دست می‌دهند [۲].

امروزه بافت‌های آسیب دیده را می‌توان به طریق زینوگرافت[۱]، آلوگرافت[۲] و اتوگرافت[۳] جایگزین کرد. زینوگرافت پیوندی است که، بافت آن از گونه‌های دیگر تامین می‌شود. از مزایای زینوگرافت می‌توان در دسترس بودن آن در اندازهها و اشکال مختلف را نام برد، ولی از خطرهای غیرقابل اغماض آن، می‌توان به واکنش‌های ایمنی و عفونت‌های که در اثر پیوند بافت اتفاق می‌افتد، اشاره کرد. آلوگرافت بافتی است که از فردی دیگر (معمولاً پس از مرگ آن) گرفته می‌شود. این بافت باید به طور کامل به منظور اجتناب از واکنش‌های ایمنی و انتقال عفونت به‌طور کامل میکروب زدایی شود. از محدودیت‌های این نوع پیوند، می‌توان به کمبود اهدا کننده و خطرات ناشی از عفونت اشاره نمود. اتوگرافت بافتی است که از خود شخص بیمار برای پیوند گرفته شده باشد. اتوگرافت در حال حاضر یک راه‌حل طلایی به شمار می‌آید، چون مشکل‌های مربوط به سیستم ایمنی و پس زده شدن را ندارد. از مشکل‌های این روش، عوارض و درد مزمن در محل بافت اهدا شونده را می‌توان نام برد. ایده اصلی مهندسی بافت از مهندسی اتوگرافت گرفته شد و گسترش پیدا کرد. سلول‌های اتوگرافتی در شرایط برون تنی یا به وسیله یک داربست هدایت می‌شوند تا یک بافت را بسازند یا اینکه یک داربست بدون سلول در بدن بیمار کاشته می‌شود و این داربست سلولهای شخص بیمار را به سمتی هدایت می‌کند که این بافت آسیب دیده را بازسازی نمایند. در هر دو مورد ذکر شده داربست باید در زمان بازسازی شروع به تخریب نماید. به‌طوری که وقتی بافت به‌طور کامل

[DOR: 20.1001.1.2251600.1395.35.3.2.6]
[DOI: 10.18869/acadpub.jame.35.3.13]

تشکیل شد، دیگر اثری از داربست نماند و بافت تشکیل شده عملکرد بافت‌های از دست رفته را داشته باشد [۴ و ۱۳].

یکی از مسائل پیش روی، جراحی ارتوپدی و بازسازی عیوب اسکلتی است. گرچه این عیوب با نمونه‌های آلوگرافتی استخوان قابل ترمیم است، اما پتانسیل بالای استخوان برای شکسته شدن، باعث شکست استخوانی می‌شود. همان‌طور که گفته شد مهندسی بافت علم طراحی و تولید بافت‌های جدید برای ترمیم اندام‌های آسیب دیده و جایگزین کردن قسمت‌های ازدست رفته به‌علت عوامل مختلف است. در بین بافت‌های بدن، استخوان پتانسیل بالایی برای بازسازی مجدد دارد و از این‌رو یک نمونه مناسب برای مهندسی بافت به‌شمار می‌رود [۵]. مهندسی بافت استخوان به دنبال بازگرداندن و حفظ عملکرد بافت استخوان انسان با استفاده ازترکیبی ازاصول زیست شناسی سلولی، علم مواد و اصول مهندسی است [۶].

داربست در مهندسی بافت استخوان از اهمیت حیاتی برخوردار است. به‌عنوان یک بستر موقت برای چسبندگی سلول عمل می‌کند و اجازه می‌دهد سلول‌ها به آن بچسبند تا تکثیر و تمایز سلول‌ها صورت بگیرد. بنابراین این داربست برای بازسازی استخوان باید معیارهای خاص داشته باشد که این معیارها به‌شرح زیراست: ۱) داربست باید یک ساختار متخلخل بهم پیوسته و حداقل اندازه تخلخل‌ها باید حدود ۱۰۰ میکرومتر باشد. به‌منظور استخوان‌سازی و تشکیل مویرگ‌ها، اندازه تخلخل‌های بزرگتر از ۳۰۰ میکرومتر نیز توصیه می‌شود. ۲) ساختارهای با درصد تخلخل بالا به استخوان‌سازی کمک می‌کنند. ۳) خواص مکانیکی داربست باید شبیه استخوان باشد. ۴) داربست باید از زیست‌سازگاری بالا برخوردار باشد. ۵) سرعت تخریب داربست باید با سرعت ترمیم استخوان مطابقت داشته باشد. ۶) موادی که برای ساخت داربست انتخاب می‌شوند باید قابلیت ساخت داشته باشند، به‌طور مثال این مواد با اشکال نامنظم که مطابق با نقص استخوان بیمار است، قابل ساخته شدن باشند. ۷) تهیه و ساخت مواد و داربست باید قابلیت تجاری شدن را داشته باشند [۶ و ۷].

استخوان، ترکیبی از پلیمر طبیعی و آپاتیت زیستی است، بنابراین از دیدگاه بیولوژیکی بسیار منطقی به نظر می‌رسد که از ترکیب پلیمر با بیوسرامیک‌ها برای ساخت داربست مهندسی بافت استخوان استفاده شود و از نقطه نظر علم مواد یک نوع ماده به تنهایی معمولاً خواص مکانیکی یا شیمیایی لازم را فراهم نمی‌کند، چون خواص دو یا چند ماده می‌تواند در ماده کامپوزیتی جمع شود، در نتیجه برای رسیدن به خواص مطلوب از مواد کامپوزیتی استفاده می‌شود. پلیمرها و سرامیک‌ها که توانایی تخریب در شرایط درون تنی[۴] را دارند گزینه‌های مناسبی برای داربست‌های کامپوزیتی هستند، زیرا به‌تدریج تخریب می‌شوند و جای آن‌ها را بافتی جدید می‌گیرد. حجم زیادی از مواد حاصل از تخریب پلیمرها، اسیدی است که می‌تواند باعث واکنش التهابی شود [۸ و ۹]. خواص مکانیکی بیوسرامیک‌ها و شیشه‌های زیستی بسیار بهتر از پلیمرها است و نقشی حیاتی در پایداری مکانیکی سازه قبل از تشکیل استخوان جدید توسط سلول بازی می‌کنند. هدف از شکل‌گیری موادکامپوزیتی استفاده از مزایای هر دو نوع ماده و به حداقل رساندن معایب آن‌ها است. یکی از چالش‌های بزرگ برای بهینه‌سازی عملکرد بیولوژیکی و مکانیکی کامپوزیت‌های پلیمر/سرامیک رسیدن به یک اتصال فیزیکی و شیمیایی خوب بین پلیمر و فاز معدنی است [۱۰].

استخوان را می‌توان به عنوان یک نانو کامپوزیت با ساختار پیچیده و با اجزاء در مقیاس نانو و ماکرو در نظر گرفت [۱۱]. در سال‌های اخیر استفاده از نانومواد در داربست‌های مهندسی بافت استخوان مورد استقبال قرار گرفته است و این امر به دلیل تقلید از ساختار بافت طبیعی استخوان به عنوان یک ساختار نانوکامپوزیتی درهم آمیخته با ماتریس سه بعدی است. قرار دادن نانو ذرات در ماتریس پلیمرهای زیستی با هدف دوگانه بهبود خواص مکانیکی و گنجاندن ویژگی‌های نانو توپوگرافی که شبیه نانو ساختار بافت طبیعی است انجام می‌شود. نقش داربست‌ها از تنها به عنوان یک حمایت‌کننده مکانیکی، به سطوح هوشمندی که توانایی ارائه پاسخ‌های

[DOR: 20.1001.1.2251600.1395.35.3.2.6]
[DOI: 10.18869/acadpub.jame.35.3.13]

شیمیایی و فیزیکی برای هدایت سلول‌ها و تمایز سلولی را دارند،تغییر یافته است [۶]. در بسیاری از پژوهش‌های نشان داده شده است که استفاده ازنانوذرات نتایج مثبت بر روی ترمیم استخوان داشته است. نانو ذرات در مقایسه با میکرو ذرات باعث افزایش چسبندگی استئوبلاست‌ها می‌شوند [۱۲ و ۱۳].

پلی‌کاپرولاکتان[۵] (PCL) یکی از پلیمرهای است که درساخت داربست‌ها مهندسی بافت استخوان توجه زیادی به آن شده است. پلی‌کاپرولاکتان یک پلی استر آلفاتیک، زیست تخریب‌پذیر، زیست سازگار، آب گریز، دارای محدوده وزن مولکولی گسترده و دارای خواص رئولوژیکی مناسب است. و هم‌چنین از مزایای آن قابلیت حل شدن در بسیاری از حلال‌های آلی رایج و نقطه ذوب پایین آن، ۶۰ درجه‌سانتی‌گراد،است که به دلیل همین امر در دماهای پایین قابلیت فرایندپذیری دارد و بسته به وزن مولکولی پلی‌کاپرولاکتان فرایند تخریب آن بین ۲ تا ۳ سال به طول می‌انجامد. به‌منظور ساخت این نوع داربست‌ها ازتکنولوژی‌های ساخت مختلف که برای پلیمرها متداول است، استفاده می‌شود [۱۱، ۱۵-۱۴]. مزیت استفاده از داربست‌های ساخته شده با پلی‌کاپرولاکتان پایداری زیستی و کیفیت مکانیکی مطلوب آن‌ها است که حضور طولانی مدت داربست در شرایط بیولوژیکی بدن را تضمین می‌نماید [۱۶].

در بسیاری از پژوهش‌های انجام شده، از کامپوزیت پلی‌کاپرولاکتان/هیدروکسی‌آپاتیت [۱۹-۱۷]، پلی‌کاپرولاکتان /شیشه‌های زیست فعال [۲۳-۲۰] و پلی‌کاپرولاکتان /تری کلسیم فسفات‌ها [۲۳ و ۲۴] در مهندسی بافت استخوان استفاده شده است، ولی مطالعات بسیار کمی بر روی داربست‌های نانو کامپوزیتی پلیمر/ هیدروکسید دوگانه لایه‌ای[۶] (LDH) انجام شده است. این کامپوزیت‌ها دارای خواص حرارتی و مکانیکی بسیار عالی‌اند و به‌عنوان دسته جدیدی از مواد با کاربردهای نوین به‌شمار می‌آیند [۲۵].

هیدروکسید دوگانه لایه‌ای متعلق به خانواده رس‌های آنیونی است و ساختار لایه‌ای دوبعدی دارد که یک بعد آن در محدوده نانومتری قرار می‌گیرد [۲۶] هیدروتالسیت[۷]، مشابه طبیعی هیدروکسید دوگانه لایه‌ای است که یک ماده‌رسی است، در نتیجه به این مواد، ترکیبات شبه هیدروتالسیت نیزگفته می‌شود [۲۷].

هیدروکسیدهای دوگانه لایه‌ای خواص فیزیکی و شیمیایی مشابه کانی‌های رسی دارند از جمله این خواص می‌توان به ساختار لایه‌ای، ترکیب شیمیایی مختلف به دلیل جانشینی‌های همریختی[۸] کاتیون‌های فلزی، خواص تبادل یون، خواص تورمی در آب و... اشاره کرد.

این مواد امروزه به وفور به عنوان کاتالیست، جاذب و تبادل‌کننده یون مورد استفاده قرار می‌گیرند. علاوه بر آن، هیدروکسیدهای دو گانه لایه‌ای در ساخت نانوکامپوزیت‌های آلی نیز کاربرد وسیعی دارند. به علاوه امروزه این مواد به‌عنوان حامل داروها و عوامل بیولوژیک مورد استفاده قرار می‌گیرند [۲۸ و ۲۹].

روش‌های گوناگون و متنوعی برای تهیه هیدروکسید دوگانه لایه‌ای وجود دارد یکی ازاین روش‌ها، روش هم‌رسوبی است. این روش شامل جوانه‌زنی و رشد لایه‌های هیدروکسید پس از اختلاط محلول آبی حاوی نمک‌های دو یون فلزی و هم‌چنین آنیون بر روی یک پایه است.

دراین پژوهش هدف مورد نظر، ساخت و بررسی داربست‌های نانو کامپوزیتی بر پایه پلی‌کاپرولاکتان / هیدروکسید دوگانه لایه‌ای به‌منظور استفاده در مهندسی بافت استخوان است. در این داربست‌ها، پلی‌کاپرولاکتان به‌عنوان فاز زمینه و نانو ذرات هیدروکسید دوگانه لایه‌ای به عنوان فازدوم مورد استفاده قرارگرفتند. برای ساخت این داربست‌ها از ترکیب دو روش فروشویی ذره‌ای و خشکایش انجمادی استفاده می‌شود. در این پژوهش کلرید سدیم به‌عنوان فاز ایجاد کننده تخلخل یا پروژن در نظر گرفته شده است. بعد از ساخت داربست‌ها خواص آن‌ها ازجمله خواص مکانیکی مورد بررسی قرار گرفته است.

۲- مواد و روش‌ها

۲-۱- سنتز هیدروکسیددوگانه لایه‌ای

در این مطالعه از روش هم‌رسوبی برای سنتز هیدروکسید دوگانه

[DOR: 20.1001.1.2251600.1395.35.3.2.6]
[DOI: 10.18869/acadpub.jame.35.3.13]

لایه‌ای استفاده شده است.

برای سنتز هیدروکسید دوگانه لایه‌ای از نمک‌های کلریدمنیزیم[9] و کلرید آلومینیوم[10] در بستر آبی به‌عنوان مواد اولیه استفاده شد. تنظیم pH توسط هیدروکسید سدیم[11] صورت گرفت.

قبل از شروع فرایند سنتز، آب مورد استفاده دوبار تقطیر و جوشانده شد تا کلیه ترکیبات مزاحم از قبیل کربنات حذف شد. برای تهیه هیدروکسید دو گانه لایه‌ای در ابتدا محلول‌هایی از کلرید آلومینیوم و کلرید منیزیم طوری تهیه شد که نسبت منیزیم به آلومینیوم در محلول تهیه شده ۲ به ۱ باشد. سپس این محلول‌ها در واکنشگاه[12] به یک‌دیگر افزوده و به مدت ۳۰ دقیقه توسط دی‌اکسیدکربن زدایی شدند. در طول مدت زمان سنتز، pH محلول توسط هیدروکسید سدیم ۰/۲ مولار کنترل و به حدود ۱۰ رسانده شد. سپس نمونه در مدت زمان ۲۴ ساعت در دمای محیط تحت عملیات پیرسازی[13] قرار گرفت. سوسپانسیون به‌دست آمده چندین بار توسط آب دوبار تقطیر شده شستشو و رسوب‌گیری توسط سانتریفوژ[14] انجام شد. این کار تا جایی ادامه پیدا کرد که pH سوسپانسیون به عدد ۷ رسید. در انتها رسوب در خشک کن انجمادی تحت فشار ۶۲۷ پاسکال یا ۰/۶ میلی‌بار و دمای پایین‌تر از ۴۰- درجه سانتی‌گراد به‌مدت ۲۴ ساعت به‌منظور به‌دست آوردن پودر قرار گرفت.

۲-۲- روش ساخت داربست

همان‌طور که در قبل اشاره شد، در این مطالعه از ترکیب دو روش خشکایش انجمادی و فروشویی ذره‌ای برای ساخت داربست استفاده شده است. روش خشک کن انجمادی روشی برای خروج حلال یا رطوبت از ماده به‌وسیله خلا است که به ساختار ماده آسیبی وارد نمی‌شود. در روش فروشویی ذره‌ای با استفاده از مواد تخلخل‌زا، داربست پس از تشکیل به‌منظور خروج مواد تخلخل زا، درحلال قرار می‌گیرد و داربست با تخلخل‌های کنترل شده ساخته می‌شود.

برای ساخت داربست‌ها از پلی‌کاپرولاکتان به عنوان فاز پلیمری، از هیدروکسید دو گانه لایه‌ای به‌عنوان فاز سرامیکی، از دی‌کلرومتان[15] (DCM) ودی‌متیل فرم‌آمید[16] (DMF) به‌عنوان حلال و هم‌چنین از کلرید سدیم به عنوان ماده تخلخل‌زا استفاده شده است.

در این بررسی، چهار داربست با درصدهای وزنی مختلف که در جدول ۱ آمده است، ساخته شده‌اند. نسبت LDH/PCL به DCM/DMF در همه نمونه‌ها ۱۵ درصد ثابت در نظر گرفته شده است.

در ابتدا تمامی مواد جامد با ترازو وزن شد و کلرید سدیم طوری غربالگری شد که اندازه ذرات نمک کوچک‌تر از ۶۰۰ میکرومتر باشد. در ادامه پلی‌کاپرولاکتان در دی‌کلرومتان بر طبق نسبت‌های وزنی که در جدول ۱ آمده است، حل شد. به‌منظور حل شدن کامل پلی‌کاپرولاکتان در دی‌کلرومتان از هم‌زن مغناطیسی به مدت ۳۰ دقیقه استفاده شد. دمای تهیه محلول، همان دمای محیط در نظر گرفته شد سپس دی‌متیل فرم‌آمید به هیدروکسید دو گانه لایه‌ای با نسبت‌های وزنی موجود در جدول ۱ اضافه شد و با استفاده از سونیکتور در مدت ۳۰ دقیقه پراکنده سازی[17] انجام گرفت. مخلوط حاصل به محلول PCL/DCM اضافه شد. این ترکیب به مدت ۱۰ دقیقه بر روی هم‌زن مغناطیسی برای یکنواخت شدن قرار داده شد. در ادامه کلرید سدیمی که از قبل طبق جدول ۱ وزن شده بود به این مخلوط اضافه شد و دوباره به مدت ۱۰ دقیقه به وسیله هم‌زن مغناطیسی هم‌زده شد. مخلوط به‌دست آمده در داخل قالب‌های مورد نظر ریخته‌گری شد و تحت انجماد به مدت ۳ روز در فریزر با دمای ۸۰- درجه قرار گرفت. بعد از ۳ روز برای خروج حلال، نمونه‌ها به دستگاه خشک‌کن انجمادی منتقل و به مدت ۲۴ ساعت در این دستگاه قرارداده شدند. در ادامه به منظور خروج کامل نمک از داخل ساختار، نمونه‌ها به مدت ۷۲ ساعت در دمای محیط با آب دیونیزه شده مورد شست‌شو قرار داده شدند. لازم به‌ذکر است آب هر سه ساعت یکبار در طی این ۷۲ ساعت تعویض شد. سپس به منظور خشک کردن داربست‌ها، مجدداً از دستگاه خشک‌کن انجمادی به مدت ۲۴ ساعت استفاده شد.

[DOR: 20.1001.1.2251600.1395.35.3.2.6]
[DOI: 10.18869/acadpub.jame.35.3.13]

جدول ۱- ترکیبات و درصد تخلخل داربست‌ها

	درصد وزنی پلی کاپرولاکتان (٪)	درصد وزنی هیدروکسید دوگانه لایه‌ای (٪)	نسبت کلرید سدیم به مواد ماتریس	نسبت کلرومتان به متیل فرم آمید	درصد تخلخل (٪)
داربست ۰	۱۰۰	۰	۰۱:۰۸	۰۲:۰۳	۷۶/۷۷±۱/۴
داربست ۱	۹۹/۹۰	۰/۱	۰۱:۰۸	۰۲:۰۳	۷۶/۲±۲/۴۴
داربست ۲	۹۹	۱	۰۱:۰۸	۰۲:۰۳	۷۶/۴±۴/۶۸
داربست ۳	۹۰	۱۰	۰۱:۰۸	۰۲:۰۳	۷۵/۱۱±۵/۳

۲-۳- بررسی اندازه وساختار پودر سرامیکی و اندازه و شکل تخلخل‌های داربست‌ها

برای بررسی اندازه ذرات پودرها و مورفولوژی آن‌ها از دستگاه میکروسکوپ الکترونی روبشی[۱۸] مدل VEGA ساخت شرکت TSCAN جمهوری چک استفاده شد. برای مشاهده مورفولوژی مقطع عرضی، داربست‌ها به مدت ۲ دقیقه در نیتروژن مایع فریز و سپس به‌وسیله کاتر بریده شدند. به منظور افزایش هدایت الکتریکی سطح نمونه‌ها و وضوح بیش‌تر تصاویر، پیش از عکس‌برداری لایه نازکی از طلا به روش کندوپاش روی نمونه‌ها پاشیده شد. برای تعیین حضور عناصر منیزیم و آلومینیم در ساختار از دستگاه طیف سنج تفرق انرژی اشعه ایکس[۱۹] (EDX)مدل INCA ساخت شرکت آکسفورد انگلستان استفاده شد. اندازه تخلخل‌ها و ریزکره‌ها از روی تصاویر به‌دست آمده از میکروسکوپ الکترونی روبشی توسط نرم‌افزار Image-Pro اندازه‌گیری شد.

۲-۴-اندازه‌گیری میزان خلل و فرج داربست‌ها

به منظور اندازه‌گیری میزان تخلخل داربست‌ها از روش جابجایی الکل[۲۰] استفاده شد[۳۲-۳۰]. در این مطالعه از اتانول با خلوص ۱۰۰٪ به دلیل تر شوندگی بالا استفاده شده است. ابتدا از هر داربست نمونه‌های با ابعاد ۱×۱ سانتی‌مترمربع برش زده و حجم و وزن نمونه‌ها اندازه‌گیری شد و سپس به این نمونه‌ها برای اندازه‌گیری میزان تخلخل اتانول اضافه شد. بعد از ۲۴ ساعت غوطه‌وری نمونه‌ها در داخل اتانول وزن نمونه‌ها دوباره اندازه‌گیری و با استفاده از رابطه ۱ درصد تخلخل‌ها محاسبه شد:

$$P = \frac{(W - W_0)V}{\rho} \times 100 \qquad (۱)$$

که در این فرمول W وزن نمونه‌ها بعد از قرار گرفتن در اتانول، W_0 و V به‌ترتیب وزن و حجم اولیه نمونه‌ها و ρ چگالی اتانول (۰/۷۸۹g/ml) است.

۲-۵-اندازه‌گیری میزان تر شوندگی سطح داربست‌ها

میزان ترشوندگی سطح از طریق اندازه‌گیری زاویه تماس قطره آب با آن سطح به‌دست می‌آید. برای بررسی تر شوندگی سطح از دستگاه مدل FEJ-200 استفاده شد. میزان ۱ میکرولیتر قطره آب بر سطح ریخته و بعد از۳۰ ثانیه و به تعادل رسیدن سیال، زاویه تماس بین قطره سیال و سطح اندازه‌گیری شد (این آزمون سه بار تکرار شد). اندازه زاویه نشان‌دهنده مستقیم میزان ترشوندگی سطح کامپوزیت است.

۲-۶- مطالعه رفتار مکانیکی داربست‌های نانوکامپوزیتی

رفتار مکانیکی داربست‌های نانوکامپوزیتی با استفاده ازآزمون استحکام فشاری بررسی شد. استحکام فشاری داربست‌ها طبق استانداردASTMF2150-07 توسط دستگاه Zwick/Roell مدل Z100 ساخت آلمان اندازه‌گیری شد. اندازه مدول الاستیک داربست، از شیب خط ناحیه الاستیک منحنی‌های به‌دست آمده تعیین شدند (این آزمون سه بار تکرار شد).

[DOR: 20.1001.1.2251600.1395.35.3.2.6]
[DOI: 10.18869/acadpub.jame.35.3.13]

۲-۷- آماده‌سازی نمونه‌ها برای بررسی تشکیل بلورهای هیدروکسی‌آپاتیت

رفتار داربست‌ها در محیط‌های بیولوژیک نشان‌دهنده رفتار آن‌ها در محیط حیوانی است. اولین نشانه زیست فعال بودن داربست‌ها پیوند آن‌ها به استخوان و تشکیل لایه آپاتیتی شبه استخوانی بر روی سطح آن‌ها ست. این پدیده می‌تواند در محیط آزمایشگاهی با استفاده از محلول مایع مصنوعی بدن (SBF)[۲۱] که محیطی عاری از پروتئین و مشابه پلاسمای خون انسانی است، مورد مطالعه قرار بگیرد. توسط این محلول تشکیل آپاتیت بر سطح مواد زیست فعال در محیط آزمایشگاه مورد بررسی قرار می‌گیرد. در این مطالعه، ابتدا محلول SBF با غلظت ۱/۵ برابر مایع بدن آماده شده وسپس از هر داربست یک نمونه ۱×۱ سانتی متر مربع برش زده و به هر نمونه ۲ میلی‌لیتر SBF اضافه شد. نمونه‌ها در داخل انکوباتور با دمای ۳۷ درجه‌سانتی‌گراد قرار گرفته و هر دو روز یک بار SBF نمونه‌ها تعویض شد. این کار تا بیست و یک روز ادامه پیدا کرد و بعد از روز بیست و یکم، نمونه‌ها در در داخل فریزر ۸۰- درجه سانتی‌گراد به مدت یک روز قرار گرفت و سپس به‌منظور خشک شدن در داخل دستگاه خشک‌کن انجمادی قرار داده شد. برای بررسی تشکیل لایه هیدروکسی‌آپاتیت بر روی نمونه‌ها از میکروسکوپ الکترونی روبشی و دستگاه EDX استفاده شده است.

۲-۸- کشت سلول بر روی داربست و بررسی مورفولوژی سلولی

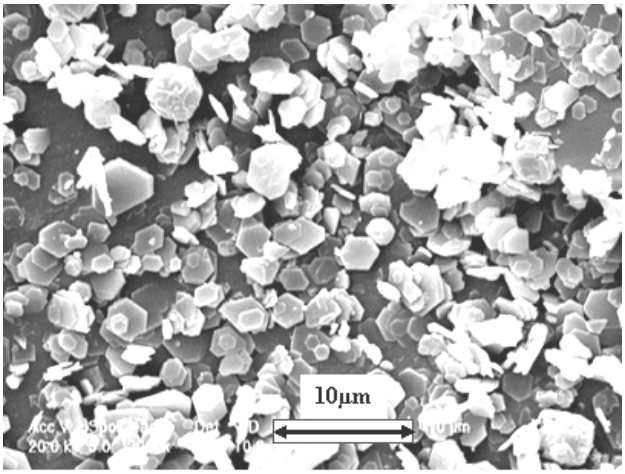
رده سلولی MG63 که رده سلولی استئوسارکومای انسانی است از انستیتو پاستور ایران بخش بانک سلولی خریداری شد و پس از کشت و پاساژ به منظور ارزیابی‌های سلولی مورد استفاده قرار گرفت. قبل از کاشت سلول‌ها، داربست‌ها با اتانول ۷۰ درصد به مدت ۴ ساعت میکروب‌زدایی شدند. سپس برای خارج کردن اتانول از نمونه‌ها ۶ مرتبه و هر ۳۰ دقیقه یک بار نمونه‌ها با محلول بافر فسفات سالین[۲۲](PBS) شستشو داده شد. سپس به مدت ۲۴ ساعت نمونه‌ها همراه با محلول PBS در دستگاه انکوباتور قرار داده شدند. پس از انجام مراحل میکروب‌زدایی، داربست‌ها به‌مدت یک ساعت در محیط کشت سلولی (DMEM) قرار داده شدند و سپس محیط روی داربست‌ها خارج و به تعداد $۳×۱۰^۴$ سلول روی هر بستر قرار داده شد. برای جلوگیری از تجمع سلولی در یک قسمت، سوسپانسیون سلولی در نقاط مختلفی از سطح قرار گرفت. به‌منظور اتصال سلول، داربست به‌مدت ۳۰ دقیقه در انکوباتور دی‌اکسیدکربن با دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد قرار گرفت و در هر چاهک ۵ میلی‌لیتر DMEM ریخته شد. سلول‌ها به مدت ۴۸ ساعت روی بسترهای اشاره شده در انکوباتور دی‌اکسیدکربن کشت داده شدند. بعد از گذشت دو روز ابتدا نمونه‌ها را سه بار با محلول PBS شسته و سپس برای ثابت کردن سلول‌ها بر روی داربست‌ها محلول گلوتارآلدهید ۱٪ تهیه شده، نمونه‌ها برای یک ساعت در آن قرار داده شد. سپس محلول گلوتارآلدهید ۳٪ تهیه و نمونه‌ها سه روز در داخل آن نگه‌داری شدند. [۳۲ و ۳۳]. سپس نمونه‌ها از محلول خارج و با آب دیونیزه شده شسته شده‌اند. به‌منظور آب‌زدایی سلول‌ها از محلول‌های الکل و آب با نسبت‌های حجمی مختلف الکل به آب استفاده شده است. این نسبت‌ها به‌ترتیب ۳۰٪، ۵۰٪، ۷۰٪، ۸۰٪، ۹۰ ٪ و ۱۰۰٪ بودند. نمونه‌ها به مدت ۲۰ دقیقه در محلول ۳۰٪ و سپس ۲۰ در محلول ۵۰٪ و به‌همین ترتیب در محلول‌های ۷۰٪، ۸۰٪، ۹۰٪ و ۱۰۰٪ قرار گرفتند و در ادامه برای تبخیر الکل از داخل ساختار نمونه‌ها، آن‌هادر زیر هود قرار داده شدند. سپس برای بررسی چسبندگی سلولی بر روی نمونه‌ها از میکروسکوپ الکترونی روبشی فیلیپس مدل XL30 استفاده شد.

۳- یافته‌ها و بحث

۳-۱- سنتز هیدروکسید دوگانه لایه‌ای

به‌منظور مشخصه‌یابی پودر سنتز شده از میکروسکوپ الکترونی روبشی استفاده شده است. همان‌گونه که درشکل ۱ مشاهده می‌شود، ساختار مرسوم LDH با مشخصاتی مانند

[DOR: 20.1001.1.2251600.1395.35.3.2.6]
[DOI: 10.18869/acadpub.jame.35.3.13]



شکل ۱- تصویر میکروسکوپی الکترونی روبشی پودر (LDH) سنتز شده

ساختار لایه‌ای دوبعدی (که یک بعد آن در محدوده نانومتر است) شکل شش وجهی، ناهمسانی در لایه‌ها یا ذرات قابل مشاهده است [۲۶ و ۲۷].

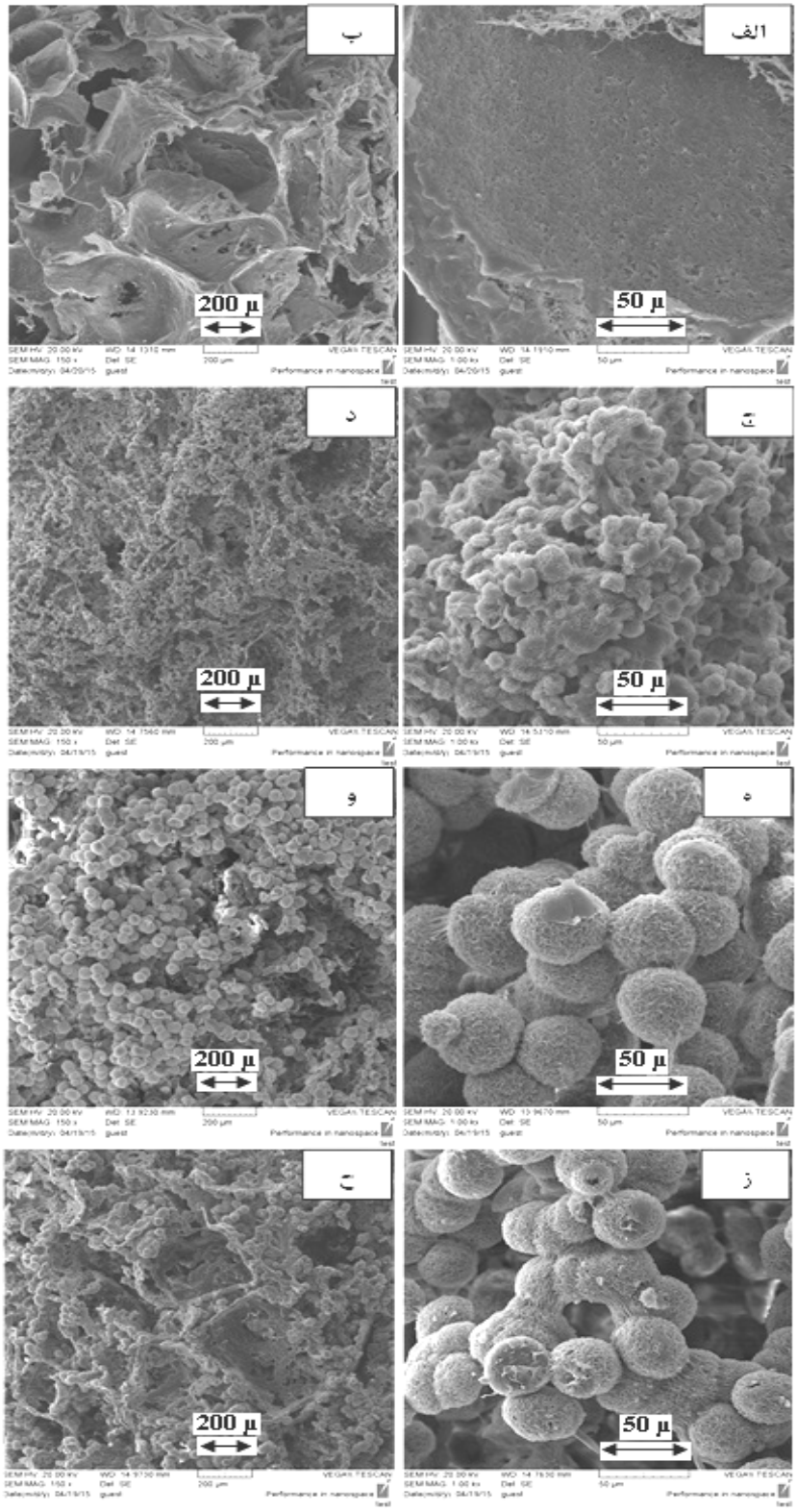
۳-۲- بررسی ریزساختار و تخلخل داربست‌ها

تصاویر میکروسکوپ الکترونی روبشی از داربست‌ها در شکل ۲ قابل مشاهده است. همان‌طور که در تصاویر دیده می‌شود، تمامی داربست‌ها دارای دودسته تخلخل‌اند، تخلخل‌های ریز در حد چند میکرومتر که حاصل خروج حلال و تخلخل‌های بزرگ که حاصل شسته شدن کلرید سدیم از داخل ساختار است. همان‌طور که در تصاویر مشخص است اندازه تخلخل‌ها از چند تا ۶۰۰ میکرومتر متغیر است. همان‌طورکه در بخش‌های قبلی مطرح شد، اندازه تخلخل‌ها در مهندسی بافت استخوان باید حداقل ۱۰۰ میکرومتر و به‌منظور استخوان‌سازی و تشکیل مویرگ‌ها، اندازه تخلخل‌ها بزرگ‌تر ۳۰۰ میکرومتر باشد. برای بافت استخوان اسفنجی حداقل اندازه تخلخل‌ها ۱۰۰ میکرومتر و تخلخل‌های بزرگ‌تر بین ۲۰۰ تا ۶۰۰ میکرومتر گزارش شده است. همان‌طور که تصاویر نشان می‌دهد تمامی تخلخل‌ها به هم‌پیوسته‌اند و مسیر بن‌بست دیده نمی‌شود. مطابق تصاویر میکروسکوپ الکترونی روبشی گرفته شده نشان می‌دهد با اضافه شدن فاز سرامیکی (هیدروکسید دوگانه لایه‌ای) داربست‌ها به ریزکره تغییر شکل می‌دهند. در مطالعات قبلی انجام شده پس از استفاده از حلال تتراهیدروفوران [۲۳](THF) و بالا بردن دمای حل شدن PCL در THF به دمای بالای ۳۷ درجه سانتی‌گراد و یا افزایش غلظت محلول به بالاتر از ۱۵درصد داربست‌های متشکل از ریزکره[۲۴] حاصل شده است [۳۲، ۳۴ و ۳۵]. در حالی‌که در این پژوهش حلال‌های استفاده شده دی‌کلرومتان و دی‌متیل فرم‌آمید است که در دمای محیط PCL در حلال‌ها حل شده ، غلظت محلول نیز ۱۰درصد گرفته شده است. هم‌چنین درصد هیدروکسید دوگانه لایه‌ای بر روی اندازه ریزکره‌ها تاثیرگذار بوده است. در نمونه ۰/۱ درصد محدوده اندازه ریز کره‌ها به طور متوسط بین ۱۳-۲۷ میکرومتر، در نمونه ۱درصد محدوده اندازه بین ۳۵-۵۸ میکرومتر و در نمونه ۱درصد این اندازه به طور متوسط بین ۴۰-۵۸ میکرومتر است. با افزایش درصد هیدروکسید دوگانه لایه¬ای، از ۰/۱ به ۱ اندازه ریزکره‌ها افزایش می‌یابد، ولی در نمونه ۱۰ درصد نسبت به نمونه ۱ درصد اندازه ریزکره‌ها تقریباً تغییر پیدا نکرده است.درصد تخلخل‌های داربست‌ها در جدول ۱ گزارش شده است.

۳-۳- تحلیل طیف سنجی تفرق انرژی اشعه ایکس (EDX)

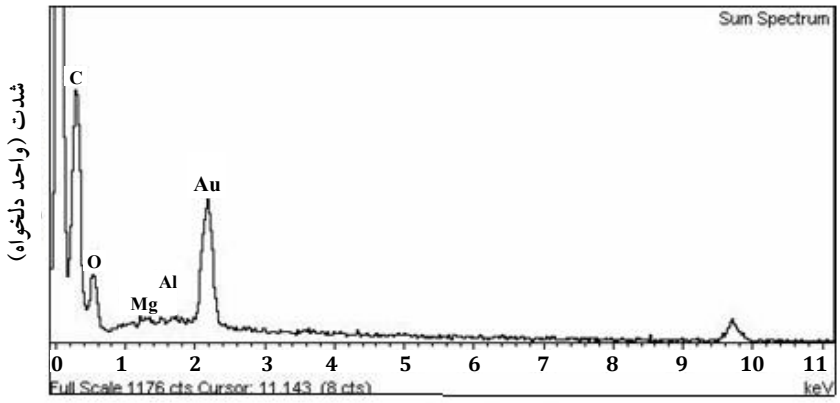
برای تعیین ترکیب عنصری محدوده‌های فازی و شناسایی فازهای سرامیکی داربست LDH/PCL-10 از تحلیل عنصری EDX استفاده شده است. شکل ۳ نشان دهنده وجود عناصر

[DOR: 20.1001.1.2251600.1395.35.3.2.6]
[DOI: 10.18869/acadpub.jame.35.3.13]



شکل ۲- تصاویر میکروسکوپی الکترونی روبشی از مورفولوژی مقطع عرضی الف) داربست۰ با بزرگ‌نمایی 1k× ب) داربست۰ با بزرگ‌نمایی ۱۵۰× ج) داربست۱ با بزرگ‌نمایی 1k× د) داربست۱ تصویر با بزرگ‌نمایی ۱۵۰× ه) داربست ۲ با بزرگ‌نمایی 1k× و) داربست۲ با بزرگ‌نمایی ۱۵۰× ز) داربست۳ با بزرگ‌نمایی 1k× ح) داربست۳ با بزرگ‌نمایی ۱۵۰×

[DOR: 20.1001.1.2251600.1395.35.3.2.6]
[DOI: 10.18869/acadpub.jame.35.3.13]



شکل ۳- نمودار تحلیل EDX داربست ۳

منیزیم و آلومینیوم به‌عنوان جزء تشکیل‌دهنده ساختار و عنصر اکسیژن به میزان کم است. شایان ذکر است که وجود عنصر طلا در نمودارهای تحلیل عنصری EDX مربوط به پوشش طلای اعمال شده برای انجام تحلیل است. شکل ۴ نشان‌دهنده پراکندگی یکنواخت فاز سرامیکی در داخل فاز زمینه (فاز پلیمری) است که عناصر منیزیم و آلومینیوم در شکل به عنوان عناصر تشکیل دهنده نانو رس مشخص شده است.

۳-۴- تحلیل ترشوندگی

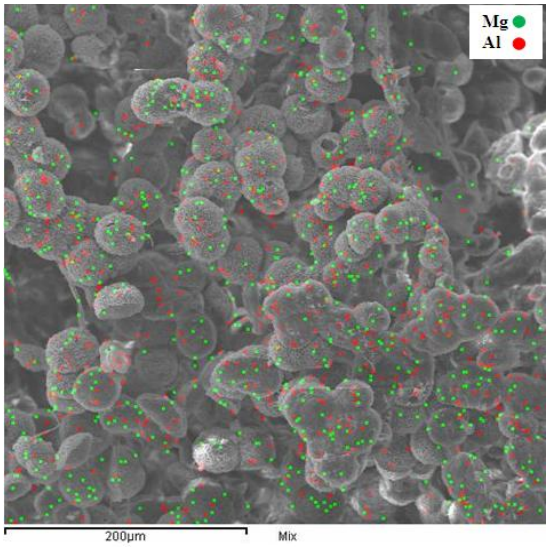
همان‌طور که در شکل ۵ نشان داده شده است با افزایش فاز سرامیکی در داربست میزان زاویه تماس کاهش می‌یابد، در نتیجه میزان آب‌دوستی سطح افزایش می‌یابد. فاز سرامیک اضافه شده ماده‌ای به شدت آب‌دوست است که پس از کامپوزیت شدن با پلی کاپرولاکتان برروی خواص نهایی کامپوزیت تأثیر می‌گذارد و آب‌دوستی کامپوزیت نهایی را افزایش می‌دهد. میزان این تغییرات در محدوده بسیار کم است زیرا درصد فاز سرامیک افزوده شده کم است و در نمونه داربست ۳ بیشترین میزان کاهش زاویه مشاهده می‌شود (۱۳۸ درجه). افزایش آب‌دوستی از این جهت حائز اهمیت است که بر روی زیست سازگاری و چسبندگی سلول‌ها به داربست تأثیر گذار است و موجب افزایش چسبندگی، جذب پروتئین و ترشح زمینه خارج سلولی می‌شود.

۳-۵- مطالعه رفتار مکانیکی داربست‌ها

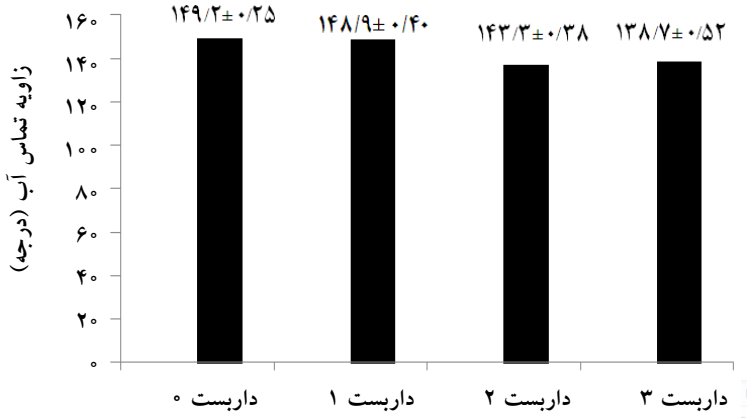
در شکل ۶ نمودار تنش-کرنش چهار داربست ساخته شده نشان داده شده است. با استفاده از این نمودار، مدول فشاری که میزان شیب نمودار در ناحیه الاستیک (قسمت خطی منحنی) است، محاسبه شده‌است.

در تمامی نمونه‌ها می‌توان نمودار تنش- کرنش را به سه قسمت تقسیم کرد ۱) ناحیه کشسان که کرنش با تنش تناسب مستقیم دارد و با افزایش تنش، کرنش نیز به صورت خطی افزایش می‌شود، ۲) ناحیه مومسان که تناسب خطی بین کرنش و تنش وجود ندارد و ۳) ناحیه مقاومت در برابر فشردگی که در آن میزان تنش بطور قابل توجهی افزایش می‌یابد. علت افزایش تنش بسته شدن تخلخل‌ها و رفتار ماده به‌عنوان یک قطعه توپر و بدون خلل وفرج است. به‌منظور مقایسه خواص مکانیکی داربست‌ها با یک‌دیگر، نتایج به‌دست آمده در جدول ۲ گزارش شده است. هو و همکارانش در سال ۲۰۰۲ میلادی در طی مطالعه‌ای با ترکیب دو روش خشکایش انجمادی و فروشویی ذره‌ای داربست‌های با درصد تخلخل بالا ساختند. دراین مطالعه از چند پلیمر مختلف از جمله پلی-کاپرولاکتان استفاده شده است و پلیمرها با درصدهای ۵ تا ۱۵ در حلال ۱،۴- دی اکسان[۲۵] حل شده‌اند. مدول فشاری به‌دست آمده برای کامپوزیت، در بهترین حالت ۶۹/۳ کیلو پاسکال گزارش شده است [۳۶].

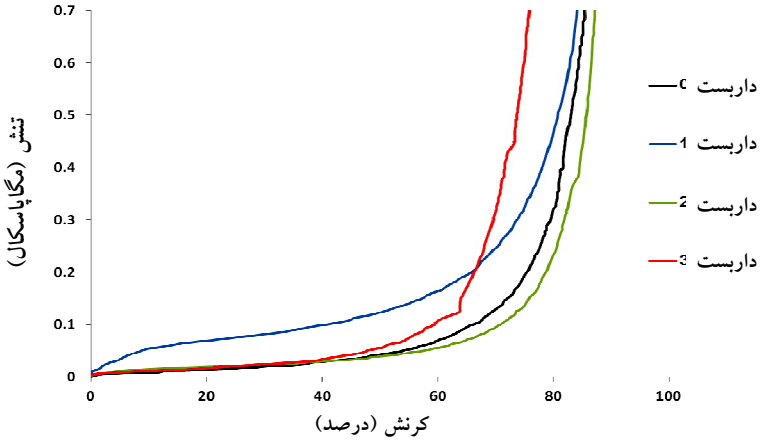
[DOR: 20.1001.1.2251600.1395.35.3.2.6]
[DOI: 10.18869/acadpub.jame.35.3.13]



شکل ۴- (رنگی در نسخه الکترونیکی) تصویر میکروسکوپی الکترونی روبشی به‌همراه تحلیل نقطه‌ای و نقشه عناصر منیزیم و آلومینیوم در داربست ۳



شکل ۵- زاویه تماس با آب در داربست‌های مختلف



شکل ۶- نمودار تنش-کرنش داربست‌ها

[DOR: 20.1001.1.2251600.1395.35.3.2.6]
[DOI: 10.18869/acadpub.jame.35.3.13]

جدول ۲- مدول فشاری داربست‌ها

داربست	۰	۱	۲	۳
مدول فشاری مگاپاسکال	۰/۳۹±۰/۱۰۳	۵/۷±۰/۲۹	۴۵/۰±۷/۱	۷۸۷/۰±۳

گرک و همکارانش در سال ۲۰۰۷ میلادی درطی یک مطالعه‌ای، با استفاده از پلی‌کاپرولاکتان به روش خشکایش انجمادی داربست سه بعدی جدیدی از تجمع میکروبیدهای[۲۶] پلی‌کاپرولاکتان ساخته‌اند. پلی‌کاپرولاکتان را با درصدهای مختلف ۱۰ و ۲۰ درصد در تتراهیدروفوران حل شد. در این مطالعه خواص مکانیکی نسبت به داربست‌های که هو و همکارانش ساخته بودند به طور قابل توجه‌ای افزایش پیدا کرد. بهترین مدول فشاری به دست آمده ۹۷۵±۳۴ کیلو پاسکال گزارش شده است [۳۴].

وانگ و همکارانش در سال ۲۰۱۲ میلادی با استفاده از درصدهای مختلف پلی‌کاپرولاکتان و حلال THF و روش خشکایش انجمادی داربستی از تجمع ریزکره‌ها ساخته‌اند. مدول فشاری به دست آمده تقریباً ۰/۲ مگاپاسکال بود [۳۲]. همان‌طور که جدول ۲ نشان می‌دهد داربست‌های کامپوزیتی ساخته شده در این مطالعه از مدول فشاری بسیار بالای برخوردارند. نتایج نشان می‌دهد داربست ۱ با ۰/۱ درصد فاز سرامیکی بیشترین مدول فشاری (۵/۷ مگاپاسکال) را در مقایسه با داربست پلی کاپرولاکتان خالص (۰/۳۹ مگاپاسکال) و داربست‌های دیگر داراست. همان‌طور که در بخش بررسی ریز ساختار اشاره شد، کمترین اندازه متوسط ریزکره‌ها مربوط به نمونه ۰/۱ درصد است که این کاهش اندازه ذرات منجر به بهبود چشم‌گیر خواص مکانیکی شده است. هم‌چنین، با افزودن فاز سرامیکی مدول فشاری نمونه‌های کامپوزیتی نسبت به نمونه پلی کاپرولاکتان افزایش یافته است.

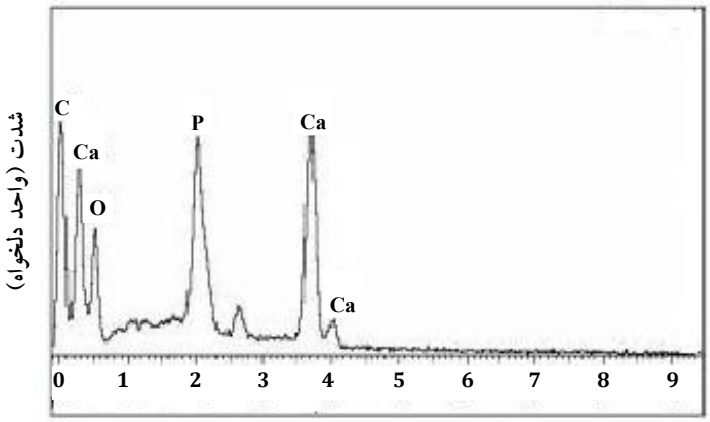
۳-۶- مطالعه رفتار داربست‌ها در مایع شبیه سازی شده بدن

به منظور بررسی زیست فعالی داربست‌ها، مرفولوژی نمونه‌ها بعد از گذشت بیست و یک روز غوطه وری در محیط شبیه‌سازی شده بدن و طیف سنج تفرق انرژی اشعه ایکس توسط میکروسکوپ الکترونی روبشی ارزیابی شد که این دو تحلیل در شکل‌های ۷-۹ نشان داده شده است. تصاویر بیانگر تشکیل هیدروکسی‌آپاتیت در همه نمونه‌هاست (نقاط سبز در تصاویر نشان‌دهنده فسفر و نقاط قرمز نشان دهنده کلسیم است). همان‌طور که در تصویر ۹- الف مشخص است، سطح داربست۰ بعد از گذشت ۲۱ روز توسط یک لایه هیدروکسی آپاتیت پوشیده شده است، ولی در داربست کامپوزیتی ۱ این لایه هیدروکسی آپاتیت کم‌تر تشکیل شده است. منیزیم شکل‌گیری فسفات‌های کلسیم در محیط‌های بیولوژیکی را تحت تاثیر قرار می‌دهد و به عبارتی حضور یون منیزیم جوانه‌زنی آپاتیت را به تأخیر می‌اندازد [۳۷].

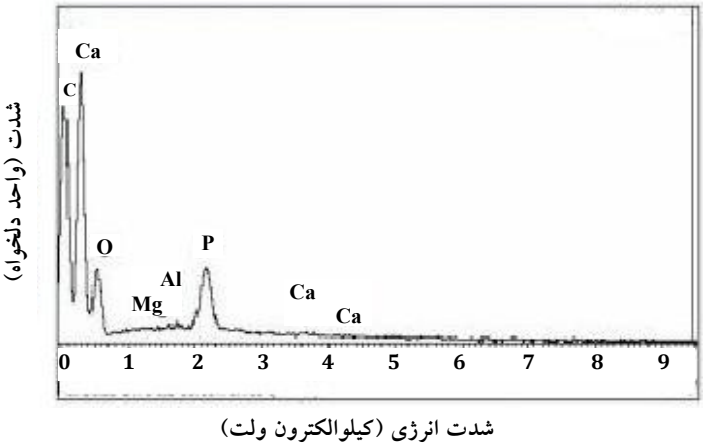
۳-۷- بررسی موفولوژی سلولی

به منظور بررسی مورفولوژی سلول‌های کشت داده شده بر روی داربست‌ها از میکروسکوپ الکترونی روبشی استفاده شد. تصاویر این تحلیل در شکل ۱۰ نشان داده‌شده است. همان‌طور که در تصاویر همه نمونه‌ها مشخص است سلول‌ها برروی داربست چسبیده و ساختار فیلوپدیای[۲۷] سلول‌ها قابل مشاهده است. هم‌چنین، سلول‌ها در طول و عرض داربست گسترده شده است که بیانگر شرایط مناسب برای رشد و تکثیر سلول است. همان‌طور که در شکل قابل مشاهده است، مایع خارج سلولی ترشح شده نشانگر فعالیت مناسب سلول‌ها برروی بستر است. در نمونه‌های حاوی نانورس، سلول‌ها کاملاً پهن شده‌اند و به داخل تخلخل‌ها نفوذ کرده‌اند که در نمونه پلی کاپرولاکتان به علت عدم وجود تخلخل مناسب این پدیده دیده نمی‌شود.

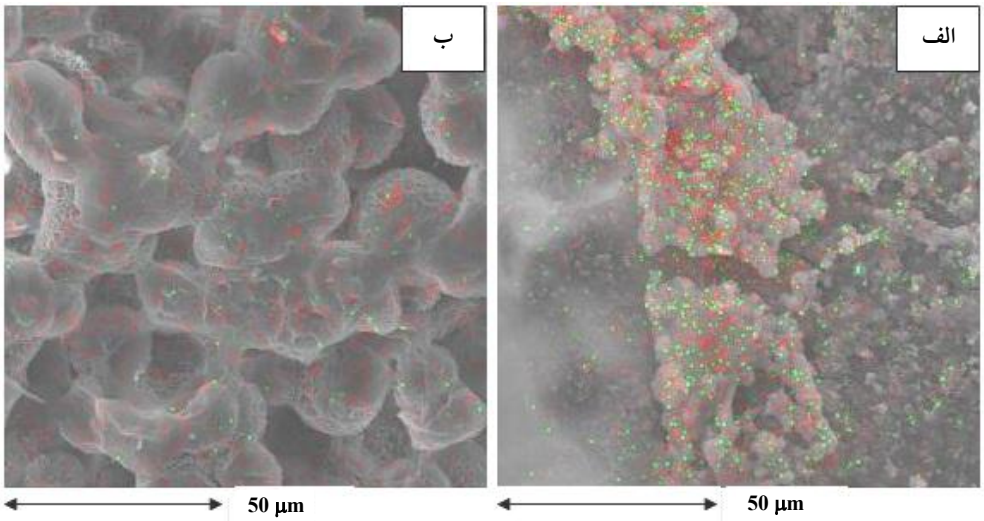
[DOR: 20.1001.1.2251600.1395.35.3.2.6]
[DOI: 10.18869/acadpub.jame.35.3.13]



شکل ۷- نمودار تحلیل EDX بعد از تشکیل هیدروکسی آپاتیت برروی داربست۰

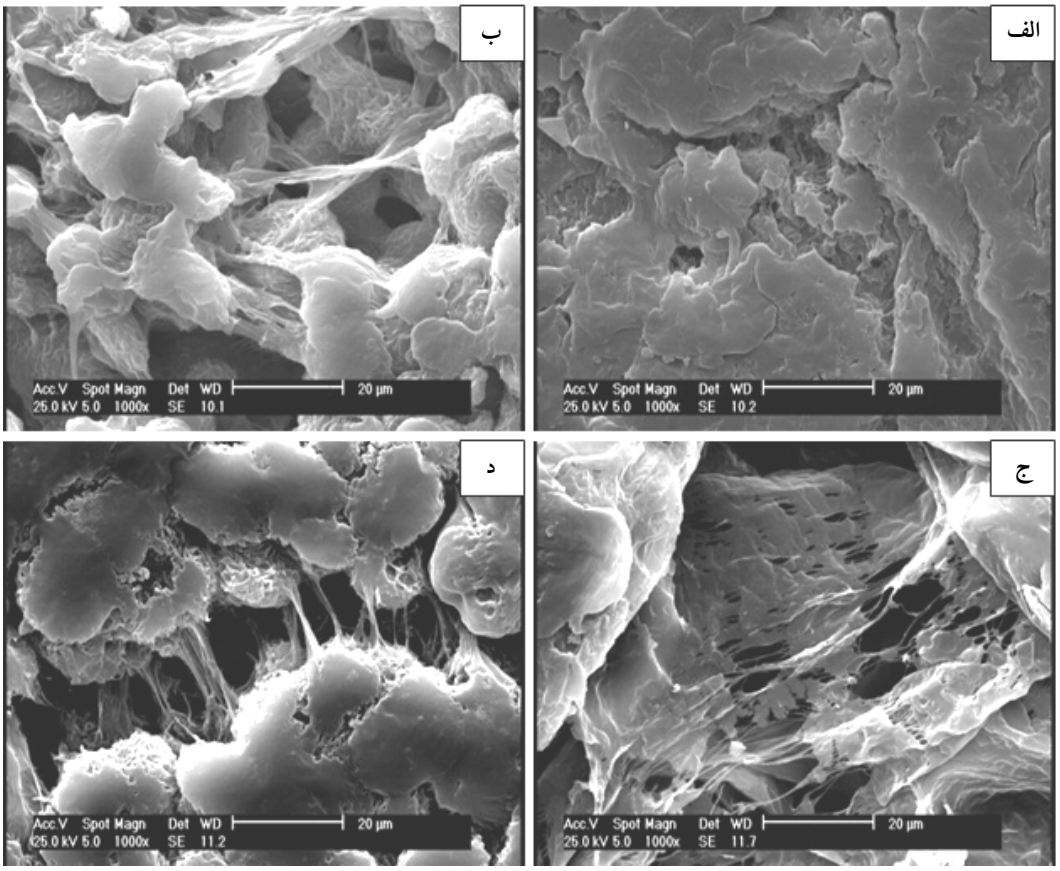


شکل ۸- نمودار تحلیل EDX بعد از تشکیل هیدروکسی آپاتیت برروی داربست ۱



شکل ۹- تصاویر میکروسکوپی الکترونی روبشی به همراه تحلیل نقطه‌ای و نقشه عناصر کلسیم و فسفر، الف) داربست ۰ و ب) داربست ۱

[DOR: 20.1001.1.2251600.1395.35.3.2.6]
[DOI: 10.18869/acadpub.jame.35.3.13]



شکل ۱۰- تصاویر میکروسکوپی الکترونی روبشی از سلول‌های MG63 برروی، الف) داربست ۰ با بزرگ‌نمایی ۱۰۰۰×، ب) داربست ۱ با بزرگ‌نمایی ۱۰۰۰×، ج) داربست ۲ با بزرگ‌نمایی ۱۰۰۰× و د) داربست ۳ با بزرگ‌نمایی ۱۰۰۰×

۴-نتیجه‌گیری

در این پژوهش، داربست‌های نانوکامپوزیتی پلی‌کاپرولاکتان/ هیدروکسید دوگانه لایه‌ای برای کاربرد در مهندسی بافت استخوان اسفنجی ساخته و آزمون‌های مشخصه‌یابی برروی آن‌ها انجام شد. تصاویر میکروسکوپ الکترونی روبشی از داربست‌ها اندازه تخلخل و درصد تخلخل‌های مناسب برای استفاده به‌عنوان داربست استخوان اسفنجی را نشان می‌دهد. هم‌چنین، تصاویر میکروسکوپ الکترونی روبشی از داربست‌ها نشان می‌دهد با اضافه کردن فاز سرامیکی، داربستی متشکل از ریزکره‌ها به‌دست می‌آید که با افزایش فاز سرامیکی محدوده اندازه ریزکره‌ها در نمونه ۱ درصد نسبت به نمونه ۰/۱ درصد افزایش یافته است ولی در نمونه ۱۰ درصد نسبت به نمونه ۱ درصد این محدوده اندازه ریزکره‌ها تقریباً تغییر نکرده است. تحلیل عنصری EDS داربست ۳ نشان‌دهنده وجود عناصر منیزیم و آلومینیوم به‌عنوان جزء تشکیل‌دهنده ساختار است. این تحلیل نشان می‌دهد که فاز سرامیکی به صورت یکنواخت در داخل فاز زمینه (پلیمری) پخش شده‌است. تحلیل زاویه تماس آب نشان می‌دهد که با اضافه کردن فاز سرامیکی میزان آب‌دوستی سطح افزایش می‌یابد. باتوجه به نتایج به دست آمده از آزمون مکانیکی انجام شده برروی نمونه‌ها می‌توان گفت اضافه کردن فازسرامیکی در داربست‌های پلیمری سبب افزایش مدول یانگ می‌شود. بیشترین افزایش خواص مکانیکی در داربست ۱ با ۰/۱ درصد فاز افزودنی گزارش شده است این افزایش ارتباط مستقیم با اندازه ریزکره‌ها دارد. تصاویر میکروسکوپی الکترونی روبشی از داربست‌ها بعد از گذشت ۲۱ روز در

[DOR: 20.1001.1.2251600.1395.35.3.2.6]
[DOI: 10.18869/acadpub.jame.35.3.13]

مـایع شـبیه سـازی شـده بـدن نشـان مـی‌دهـد کـه هیدروکسی‌آپاتیت در نمونه‌ها تشکیل شده است و بیشـترین درصد تشکیل هیدروکسی‌آپاتیت مربوط به داربست۰ اسـت. این تصاویر نشان می‌دهد با افزودن فاز سرامیکی (کـه شـامل منیزیم است) به فاز زمینـه، تشـکیل هیدروکسـی‌آپاتیـت بـه تأخیر می‌افتد. تصـاویر میکروسـکوپ الکترونـی روبشـی از داربست‌ها نشان می‌دهد پس از گذشت دو روز کاشت سلول بر روی نمونه‌ها سلول‌ها به داربست‌ها چسبیدند و فیلوپدیای خود را پهن نمودند. نتایج این پژوهش بیانگر مناسـب بـودن داربست‌های کامپوزیتی به منظور کشت سلول و بهره‌گیری از آن در پژوهش‌های مهندسی بافت استخوان است.

واژه‌نامه

1. xenograft
2. allograft
3. autograft
4. in vivo
5. poly (ε-caprolactone) (PCL)
6. layered doublehydroxide (LDH)
7. hydrotalcite
8. isomorphic substitutions
9. $MgCl_2.6H_2O$
10. $AlCl_3.6H_2O$
11. NaOH
12. coprecipitation
13. ageing time
14. centrifuge
15. dichloromethane (DCM)
16. dimethylformamide (DMF)
17. disperse
18. scanning electron microscope
19. energy dispersive X-ray
20. ethanol displacement method
21. simulated body fluids (SBF)
22. phosphate buffer saline
23. Tetrahydrofuran (THF)
24. microsphere25. 1,4-dioxane
26. microbeads
27. philopedia

مراجع

1. Godbey, WT., Atala, A., "In Vitro Systems for Tissue Engineering", *Annals of the New York Academy of Sciences*, Vol. 961, p.p. 10-26, 2002.
2. Diego, S., *Principles of Tissue Engineering*, 2nd eddition, Academic Press, 2000.
3. Ross, JM., "*Cell-Extracellular Matrix Interactions*", *Oxford: Elsevier Science Ltd*, p.p. 15-27, 1998.
4. Sipe, JD., "Tissue Engineering and Reparative Medicine", *Annals of the New York Academy of Sciences,* Vol. 961, p.p. 1-9. 2002.

۵. خلیلی مقدم گ، "رشد و تمایز سلول‌هـای مزانشـیمی روی داربست هیدروکسی آپاتیت در مهنـدسی بافـت استخـوان" مجله آفتاب، ص‌ص. ۱-۲، ۱۳۸۶.

Chen, Q., Roether, J. A. and Boccaccini, A. R.,, "*Tissue Engineering Scaffolds from Bioactive Glass and Composite Materials*" Chapter 6, Vol. 4, p.p. 1-27, 2008.

6. Fan, W., Changsheng, L., Brian, O., Jie, W., Yung N., "Fabrication and Properties of Porous Scaffold of Magnesium Phosphate/Polycaprolactone Biocomposite for Bone Tissue Engineering", *Applied Surface Science,* Vol. 258, p.p. 7589– 7595, 2012.
7. Bergsma, E.J., Rozema, F.R., Bos, R., Debruijn, W.C., "Foreign-Body Reactions to Resorbable Poly (L-Lactide) Bone Plates and Screws Used for the Fixation of Unstable Zygomatic Fractures", *Journal of Oral and Maxillofacial Surgery*, Vol. 51(6), p.p. 666-670, 1993.
8. Bergsma, J.E, Debruijn, W.C, Rozema, F.R., Bos, R., Boering, G. L., "Degradation Tissue Response to Poly (L-lactide) Bone Plates and Screws", *Biomaterials*, Vol. 16(1), p.p. 25-3, 1995.
9. Mano, J.F., Reis, R.L, "Osteochondral Effects: Present Situation and Tissue Engineering Approaches", *Journal of Tissue Engineering and Regenerative Medicine*, Vol. 1, p.p. 281-287, 2007.
10. Avinash, H. A., Dinesh, R. K, Kalpana, S. K., "Biomineralized Hydroxyapatite Nanoclay Composite Scaffolds with Polycaprolactone for Stem Cell-Based Bone Tissue Engineering", *Journal of Biomedical Materials Research Part A*, , Vol. 103, p.p. 2077-2101, 2015.
11. Webster, T.J., Ergun, C., Doremus, R.H., Siegel R.W., Bizios, R., "Enhanced Functions of Osteoblasts on Nanophase Ceramics", *Biomaterials*, Vol. 21(17), p.p. 1803-1810, 2000,
12. Shi, Z., Huang, X., Cai, Y., Tang, R., Yang, D., "Size Effect of Hydroxyapatite Nanoparticles on Proliferation and Apoptosis of Osteoblast-Like Cells", *Acta Biomaterialia*, Vol. 5(1), p.p. 338-345, 2009.
13. Woodruff, M.A., Werner Hutmacher, D., "The Return of a Forgotten Polymer—Polycaprolactone in the 21st Century", *Polymer Science*, Vol. 35, p.p. 1217–1256, 2010.
14. Ali Akbari Ghavimi, S., Ebrahimzadeh, M.H., Solati-Hashjin, M., Abu Osman, N.A., "Polycaprolactone/

[DOR: 20.1001.1.2251600.1395.35.3.2.6]

[DOI: 10.18869/acadpub.jame.35.3.13]

Starch Composite: Fabrication, Structure, Properties, and Applications", *Journal of Biomedical Materials Research Part A*, Vol. 103(7), p.p. 2482–2498, 2015.
15. Dai, N., Williamson, M.R., Khammo, N., et al, "Composite Cell Support Membranes Based on Collagen and Polycaprolactone for Tissue Engineering of Skin", *Biomaterials*, Vol. 25, p.p. 4263-4271, 2004.
16. Lebourg, M., Anton, J.S., Ribelles, J.L.G., "Hybrid Structure in PCL-HAp Scaffold Resulting from Biomimetic Apatite Growth", *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, Vol. 21, p.p. 33–44, 2010.
17. Eosoly, S., Brabazon, D., Lohfeld, S., Looney, L., "Selective Laser Sintering of Hydroxyapatite/ Polycaprolactone Scaffolds", *Acta Biomaterialia*, Vol. 6, p.p. 2511–2517, 2010.
18. Heo, S.J., Kim, S.E., Wei, J., Hyun, Y.T., Yun, H.S., Kim, D.H., Shin, J.W., " Fabrication and Characterization of Novel Nano- and Micro-HA/PCL Composite Scaffolds Using a Modified Rapid Prototyping Process", *Journal of Biomedical Materials Research Part A,* Vol. 89A, p.p. 108–116, 2009.
19. Fabbri, P., Cannillo, V., Sola, A., Dorigato, A., Chiellini, F., "Highly Porous Polycaprolactone-45S5Bioglass® Scaffolds for Bone Tissue Engineering", *Composites Science and Technology*, Vol. 70, p.p. 1869–1878, 2010.
20. Cannillo, V., Chiellini, F., Fabbri, P., Sola, A., "Production of Bioglass®45S5-Polycaprolactone Composite Scaffolds via Salt-Leaching", *Composite Structures*, Vol. 92, p.p. 1823–1832, 2010.
21. Li, X., Shi, J.L., Dong, X.P., Zhang, L.X., Zeng, H.Y., "A Mesoporous Bioactive Glass/Polycaprolactone Composite Scaffold and its Bioactivity Behavior", *Journal of Biomedical Materials Research Part A,* Vol. 84A, p.p. 84–91, 2008.
22. Lei, Y., Rai, B., Ho, K.H., Teoh, S.H., "In Vitro Degradation of Novel Bioactive Polycaprolactone-20% Tricalcium Phosphate Composite Scaffolds for Bone Engineering", *Materials Science and Engineering* C, Vol. 27, p.p. 293–298, 2007.
23. Yeo, A., Sju, E., Rai, B., Teohm, S.H., "Customizing the Degradation and Load-Bearing Profile of 3D Polycaprolactone-Tricalcium Phosphate Scaffolds under Enzymatic and Hydrolytic conditions", *Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials*, Vol. 87B, p.p. 562–569, 2008.
24. Chiang, M.F., Wu, T.M., "Synthesis and Characterization of Biodegradable Poly (L-lactide)/ Layered Double Hydroxide Nano-Composites", *Composites Science and Technology*, Vol. 70, p.p. 110–115, 2010.
25. He, J., Wei, M., Li, B. , Kang, Y., Evans, D.G., Duan, X., "Preparation of Layered Double Hydroxides", *Structure and Bonding*, Vol. 119, p.p. 89–119, 2006.
26. Bergaya, F., et al, *Handbook of Clay Science*, Developments in Clay Science, Vol. 2, p. 1021, 2006.
27. Hoyo, C.D., "Layered Double Hydroxide and Human Health", *Applied Clay Science*, Vol. 36, p.p. 103–121, 2006.
28. Kovanda. F., Kolousˇek, D., Cı´lova´, Z. and Hulı´nsky´, V., "Crystallization of Synthetic Hydrotalcite under Hydrothermal Conditions", *Applied Clay Science*, Vol. 28, p.p. 101– 109, 2005.
29. Karageorgiou, V., Kaplan, D., "Porosity of 3D Biomaterial Scaffolds and Osteogenesis.", *Biomaterials,* Vol. 26, p.p. 5474–5491, 2005.
30. Wang , W., Li, D., Wang, M.C, Li, Y.L., Gao, C.A. "Hybrid Scaffold of Poly(Lacide-Co-Glycolide) Sponge Filled with Fibrin Gel for Cartilage Tissue Engineering.", *Chinese Journal of Polymer Science*, Vol. 29, p.p. 233–240, 2011.
31. Wang, M., Ma, L., Li, D., Jiang, P., Gao, C., "Preparation of Polycaprolactone Microspheres-Aggregated Scaffold with Ultra-Big Pores and Fuzzy Sphere Surface by a One-Step Phase Separation Method", *Journal of Biomedical Materials Research Part A*, Vol. 101A, p.p. 3219–3227, 2013.
32. Qiu, Y., Mao, Z., Zhao Y., Zhang J., Guo, Q., Gou, Z., Gao C,. "Polycaprolactone Scaffold Modified with Galactosylated Chitosan for Hepatocyte Culture", *Macromolecular Research,* Vol. 20, p.p. 283–291, 2012.
33. Gerc¸ek, I., Tıgˇ lı, R. S., Gu¨mu¨ s_dereliogˇlu, M., "A Novel Scaffold Based on Formation and Agglomeration of PCL Microbeads by Freeze-Drying", *Journal of Biomedical Materials Research Part A,* Vol. 86A, p.p. 1012-1022, 2008.
34. Ma´s Estelle´s, J. , Vidaurre, A., Meseguer Duenˇas Jose´, M. , Castilla Corta´zar, I., "Physical Characterization of Polycaprolactone Scaffolds", *The Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, Vol. 19, p.p. 189–195, 2008.
35. Hou, Q., Grijpma, D., Feijen, J., " Preparation of Interconnected Highly Porous Polymeric Structures by a Replication and Freeze-Drying Process", *Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials*, Vol. 67B, p.p. 732–740, 2003.
36. Martin, R I., Brown, P. W., "The Effects of Magnesium on Hydroxyapatite Formation In Vitro from CaHPO4 and Ca4(PO4)2O at 37.4°C", *Calcified Tissue International*, Vol. 60, p.p. 538–546, 1997.

[DOR: 20.1001.1.2251600.1395.35.3.2.6]
[DOI: 10.18869/acadpub.jame.35.3.13]