

### ارزیابی ساختاری و مکانیکی داربست گرادیانی پلی کاپرولاکتون بهمنظور کاربرد در مهندسی بافت استخوان

ماهدخت اکبری طائمه، بابک اکبری<sup>\*</sup> و ژامک نورمحمدی دانشکده علوم و فنون نوین، دانشگاه تهران

(دريافت مقاله: ۱۳۹۶/۰۳/۲۸ – دريافت نسخه نهايي: ۱۳۹۷/۰۳/۱۹)

**چکیدہ**- در داربست های گرادیانی درصد، اندازہ تخلخل و یا ترکیب شیمیایی مواد موجود در داربست بهصورت گرادیانی در آن تغییر میکنند. اخیراً از روش های مختلفی جهت ایجاد گرادیان در داربست استفاده شده است. اما این روش ها محدودیت هایی از جمله گران بودن فرایند ساخت، در دسترس نبودن تجهیزات، پیچیدگی کنترل شرایط ایجاد گرادیان، پیچیدگی کنترل شکل، اندازه، درصد و راه درهم بودن تخلخلها را دارا هستند. هدف از انجام این تحقیق ابداع روشی جدید، کارامد، ساده و با صرف کمترین هزینه بهمنظور ایجاد گرادیان در تخلخل داربست بوده است. دو داربست همگن (نوع ۱ و نوع ۲) و دو داربست گرادیانی (نوع ۱ و نوع ۲) ساخته و با هم مقایسه شدند. گرادیان در راسـتای شـعاع داربسـت، بـا ادغام دو روش لایهبهلایه و روش شستشوی ذرات تخلخلساز ایجاد شد. از پلیمر پلیکایرولاکتون بهعنوان ماده اصلی و از میکروذرات پارافین در دو بازه اندازه ذرات ۲۵۰ تا ۴۲۰ میکرومتر و ۴۲۰ تا ۶۰۰ میکرومتر بهعنوان تخلخلساز استفاده شد. درصد تخلخل داربست همگن نوع یک، همگن نوع دو، گرادیان نوع یک و گرادیان نوع دو، بهترتیب ۱/۲۵ ± ۱/۷۷، ۲/۵ ± ۳/۵، ۵/۰ ± ۷۴ و ۴ ± ۷۹/۸ درصد بهدست آمد؛ گفتنی است. که درصد تخلخل مورد نیاز برای رشد و زندهمانی سلول بالای ۷۰ درصد است. که درصد تخلخل داربست.های گرادیانی جهت استفاده در مهندسی بافت استخوان مناسب است. همچنین میانگین اندازه تخلخل برای دو نوع داربست همگن یک و دو بهترتیب ۲۱۸/۲۳ ± ۲۷۸/۴۸ و ۴۱۷/۷۹ ± ۴۱۷/۷۹ میکرومتر بهدست آمد که این اعداد نیز برای مهندسی بافت استخوان مطلوب هستند. استحکام فشاری در ۸۰ درصد کرنش و مدول فشاری داربست ها با ترتیب ذکر شده در بالا ۱۶/۰ ± ۱۶/۰ و ۱۱/۰ ± ۲۵/۰ مگایاسکال، ۲۶/۰ ± ۲۰/۰ و ۲۴/۰ ± ۵/۰ مگایاسکال، ۱۹/۰ ± ۳۴/۰ و ۴۳/۰ ± ۳۳/۰ مگاپاسکال و ۱۲/۰ ± ۲۸/۰ و ۵۱/۰ ± ۱۷/۰ مگاپاسکال اندازهگیری شد. پایین بودن ارقام استحکام نشان میدهد که استفاده از پلی کایرولاکتون بهتنهایی مناسب نبوده است. همچنین مقایسه این نتایج نشان میدهد که گرادیانی کردن تخلخل ها تـأثیر چنـدانی بـر خواص مکانیکی داربستها نداشته است. گرادیان در تخلخل، پیوستگی کامل بین دو لایه داربست و عدم وجود فصل مشترک بین آنها در تصاویر گرفته شده توسط میکروسکوپ الکترونی روبشی نشان داد که روش استفاده شده در ساخت داربست گرادیانی مناسب بوده است.

واژههای کلیدی: پلی کاپرولاکتون، داربست گرادیانی، اندازه تخلخل، روش لایهبهلایه، شستشوی ذرات تخلخل ساز.

## Structural and Mechanical Evaluation of Polycaprolactone Scaffold with the Gradient Porous Microstructure for Bone Tissue Engineering

**M. Akbari Taemeh, B. Akbari\* and J. Nourmohammadi** Faculty of New Science and Technology, University of Tehran, Tehran, Iran.

Abstract: In gradient scaffolds, changes in porosity, pore size or chemical composition occur gradually. Recently, different

\* : مسئول مكاتبات، يست الكترونيكي: babakbari@ut.ac.ir

methods have been applied to create gradient in the scaffolds, but they have some disadvantages such as high cost and control. The main purpose of this research was to fabricate porous gradient scaffolds by a novel, functional, simple, and low-cost method. Two homogenous scaffolds (Homog 1 and Homog 2) and two gradient scaffolds (Grad 1 and Grad 2) were fabricated and compared. Polycaprolactone scaffolds with the pore size gradient along the radial direction were fabricated by combining layerby-layer assembly and porogen leaching techniques. Paraffin micro particles were used as porogen in two size ranges: 250 to 420  $\mu$ m and 420 to 600  $\mu$ m. The average pore size of Homog 1 and Homog 2 was 278.48  $\pm$  11.23  $\mu$ m and 417.79  $\pm$  14.62, which were suitable for bone tissue engineering. The porosity of the samples was: Homog 1: 77.5  $\pm$  1.25 %, Homog 2: 61.3  $\pm$  3.5 %, Grad 1: 74  $\pm$  0.5 % and Grad 2: 79.8  $\pm$  4 %. It should be stated that the required porosity for cell survival and growth was above 70 %. Compressive strength at 80% strain and compressive modulus for Homog 1, Homog 2, Grad 1 and Grad 2 were 0.16  $\pm$  0.16 MPa and 0.25  $\pm$  0.11 MPa, 0.26  $\pm$  0.20 MPa and 0.53  $\pm$  0.34 MPa, 0.19  $\pm$  0.34 MPa and 0.33  $\pm$  0.43 MPa, 0.12  $\pm$  0.28 MPa and 0.16  $\pm$  0.51 MPa, respectively. The results showed that pore size gradient had a negligible effect on the mechanical properties of the scaffolds showed the radial pore size gradient with a good adhesion between layers without any detectable interface; the result of the compression test also confirmed it.

Keywords: Polycaprolactone (PCL), Gradient scaffold, Pore size, Layer-by-layer assembly, Porogen leaching.

۱ – مقدمه

تخلخل و یا ترکیب شیمیایی مواد موجود در داربست به صورت گرادیانی در فضای سهبعدی آن تغییر میکنند [۵]. داربستهای گرادیانی استوانهای شکل، که در سطح خارجی میکرومتخلخل و در نواحی داخلی آن ماکرومتخلخل هستند؛ ساختاری مشابه با استخوان طبیعی بدن که از درون اسفنجی و سطح آن متراکمتـر است را تداعی میکنند. بدین ترتیب با ایجاد گرادیان در تخلخل داربستها، مي توان تفاوت هاي موضعي و ساختاري موجود در ماتریس خارج سلولی بافت هایی چون غضروف مفصل و استخوان بدن انسان را بهتر شبیهسازی کرد؛ در واقع با شبیهسازی تفاوتهای موجود در مورفولوژی، میتوان خواص ساختاری و مکانیکی بافت استخوان و توانایی بازسازی آن را کنترل کرد. این نوع از داربستها، از یکسو اجازه رگزایمی و تشکیل مستقیم استخوان و از سوی دیگر شکل گیری استخوان از بافت نرم شبه استخوان را فراهم می آورند [۶]. به علاوه می توان قرار گیری سلول ها در فضای سه بعدی داربست را کنترل، بازده کشت سلولی را افزایش [۷] و یا از این نوع داربستها بهعنوان ابزاری برای مطالعه تأثیر اندازه تخلخل بر عملکرد بیولوژیک داربست استفاده کرد [۸].

روش چرخشی<sup>۲</sup>، تفتجوشی لیزر انتخابی<sup>۳</sup>، الکتروریسی<sup>۴</sup>، استفاده از ذرات تخلخلساز<sup>۵</sup> و نشاندن لایهبهلایه<sup>۶</sup>، سانتریفیوژ و نمونهسازی سریع<sup>۷</sup> توسط دستگاه رسام سهبعدی<sup>۸</sup> از روشهایی هستند که در سالهای اخیر برای ایجاد گرادیان در تخلخل داربست استفاده شدهاند [۱۳–۷]. در سال ۲۰۱۰ میلادی گروهی

مهندسی بافت با عنوان دانش طراحی و ساخت بافت جدید برای بازیابی عملکرد ارگانهای معیوب یا بافتهای از دست رفته، از اوایل دهه ۹۰ میلادی پدیدار شد [۱]. برای ساخت یک بافت بەشيوە مهندسى، طراحى ساختارى متخلخل، بەعنوان بسترى براى مهاجرت، چسبندگی، تکثیر و تمایز سلولی ضروری است. مواد پلیمری، بهطور وسیع در ساخت چنین داربستهایی بهکارگرفته شدهاند، چون بیوشیمی سلولهای کشت شده را در بافت در حال رشد، تأمين و پشـتيبانی مـیکننـد [۲]. پلـیکاپرولـاکتون پليمـری زيست تخريب پذير با سرعت تخريب پايين است. نقطه ذوب ايس یلیمر حدود ۶۰ درجه سانتی گراد، نیمه بلوری و آبگریز است. زيست سازگاري، فراينديديري ساده، عدم سميت محصولات حاصل از تخریب و خواص مکانیکی به نسبت مطلوب این پلیمـر را برای استفاده در مهندسی بافت استخوان مناسب کرده است [۳]. با وجود اهمیت زیادی که زیستسازگاری داربست در مهندسی بافت دارد؛ اما از تأثیر مورفولوژی آن در تسهیل عملکردهایی چون مهاجرت و تكثير سلولي، جـذب موادغـذايي، دفـع مـواد زائـد و رگزایی نمیتوان چشمپوشی کرد؛ در واقع یکی از جنبههای مهم در طراحی ساختار و مورفولوژی داربست، ساختار و اندازه تخلخلها است. لذا، درنظر گرفتن فاکتورهایی چون اندازه و درصد تخلخل، شکل هندسی و راه درهم بودن تخلخلها در طراحی داربست اهمیت زیادی دارد [۴]. در داربستهای گرادیانی، بـر خلاف داربستهای همگن، پارامترهایی چون اندازه، درصد

با هدف افزایش بازدهی کشت سلولی و کنترل جایگیری سلولها در فضای سه بعدی داربست، اقدام به ایجاد تخلخل گرادیانی با روش چاپ سه بعدی کردند. از محدودیتهای این روش گران بودن، عدم دسترسی و محدودیت در ساخت تعـداد زیاد داربست با ابعاد بالا، بهعلت سرعت کم فرایند است [۷]. در سال ۲۰۰۷ میلادی با روش سانتریفیوژ محلول حاوی پلیکاپرولاکتون و بهدنبال آن فرایند خشک کردن انجمادی، گرادیان در تخلخل داربست ایجاد شد. اما کنتـرل شـرایط فراینـد سانتریفیوژ برای ساخت داربست گرادیانی با بازه اندازه تخلخل مشخص و مطلوب دشوار است [٨]. با انتخاب نمک بـ معنـوان تخلخلساز و ادغام دو روش شستشوى ذرات تخلخلساز و نشاندن لایهبهلایه میتوان در داربست، تخلخل گرادیانی ایجاد کرد. از محمدودیتهای ایمن روش توزیم غیریکنواخمت تخلخلساز در محلول پلیمری، احتمال کلوخه شدن ذرات نمک و محدودیت در راه درهم کردن تخلخلها است [۱۲]. با توجه به اهمیـت زیـاد گرادیـانی کـردن داربسـتها و بـا توجـه بـه محدودیتهای روشهای مختلف، بـهکـارگیری روشـی نـوین، ساده، بدون نیاز به تجهیزات پیشرفته و کمهزینه امـری ضـروری است. از ایـنرو ایـده ایجـاد گرادیـان شـعاعی در داربسـتهـا بهصورت لایهایه و با استفاده از سرنگ (بهعنوان قالب) و ذرات پارافین بهعنوان تخلخلساز برای نخستین بار اجرا شده و نتایج نشان داد که این روش میتواند پیچیدگی و هزینه ایجاد تخلخل گرادیانی را تا حد مطلوبی کاهش دهد. از نوآوریهای این تحقیق می توان به نوع قالب مورد استفاده و ایجاد گرادیان شعاعی با استفاده از روش لایهبهلایه اشاره کرد. در هـیچ یـک از مطالعـات پیشین از سرنگ بهعنوان قالب سازنده داربست استفاده نشده است. همچنین تا پیش از این تحقیق، با روش لایهبهلایه گرادیان شعاعی در داربست ایجاد نشده است.

۲– **مواد و روش تحقیق** ۲–۱– مواد مورد نیاز جهت ساخت داربست پلیکاپرولاکتون با وزن مولکولی ۸۰۰۰۰ دالتون و پارافین جامد

از شرکت سیگما<sup>۹</sup> و استیک اسید، پلیوینیل الکل، انهگزان و اتانول از شرکت مرک<sup>۱۰</sup> تهیه شدند.

۲-۲- فرایند ساخت داربست تهیه محلول ۱۰ درصد وزنی پلی کایرولاکتون – استیک اسید با استفاده از همزن حرارتی در دمایی در حدود ۴۰ درجه سانتی گراد انحلال صورت گرفت. ۲) ساخت میکروذرات پارافین الف) محلول ١/٥ درصد وزني به حجمي پليوينيل الكـل- أب ديونيزه روى همزن حرارتي با اعمال دما تهيه شد. ب) محلول ١/۵ درصد وزني به حجمي پليوينيل الكل- آب دیونیزه با اعمال دما تهیه شد. ج) ۱۰ گرم پارافین ذوب شده در ظرف حاوی ۱۲/۵ میلی لیتـر محلول ١/٥ درصد وزنبي بـ حجمـي پلـيوينيـل الكـل- أب ديونيزه كه دمايي حدود ۶۵ درجه سانتي گراد داشت، ريخته و بهمدت ۱۰ دقیقه روی همزن حرارتی همزده شد. د) پس از گذشت این زمان، محتویات ظرف به داخل ظرف حاوی ۵۰۰ میلیلیتر محلول ۱/۰ درصد وزنبی بـه حجمی پلیوینیل الکل – آب دیونیزہ با دمای ۱۷ درجہ سانتی گراد کے با سرعت بالایی روی همزن حرارتی همزده میشد، ریخته شد. هـ) با غربالگرى اين ذرات توسط الك بـا مشبنـدىهـاى ٣٠، ۴۰ و ۶۰ میکروذرات در دو بازه اندازه ذرات ۲۵۰ تـا ۴۲۰ و ۴۲۰ تا ۶۰۰ میکرومتر تقسیمبندی شدند. ۳) در این مرحله میکروذرات پارافین در بازه اندازه ذرات مورد

۱) در این مرحله میکرودرات پارافین در باره انداره درات مورد نظر و به اندازه ۱۰ برابـر جـرم پلیمـر بـه داخـل سـرنگ پـنج میلیلیتر از جنس پلیوینیلکلراید<sup>۱۱</sup> که سر آن بریده شـده بـود؛ ریخته شد.

۴) محلول پلیمری روی ذرات تخلخلساز ریخته و میکروذرات پارفین در محلول پلیمری به صورت یکنواخت پراکنده شدند.
۵) پس از قرارگیری و انجماد نمونه در فریزر ۲۰ - درجه سانتی گراد، به مدت ۷۲ ساعت در دستگاه خشککن انجمادی قرار گرفت.

مواد پیشرفته در مهندسی، سال ۳۷، شمارهٔ ۳، پاییز ۱۳۹۷

۶) در مرحله بعد شستشوی ذرات پارافین توسط حلال انهگزان صورت گرفت. به این صورت که نمونه بهمدت ۴۸ ساعت در انهگزان غوطهور مانده و هر هشت ساعت انهگزان تعویض شد. پس از گذشت ۴۸ ساعت بهمنظور خروج کامل انهگزان، نمونه با اتانول شسته شده و پس از انجماد نمونه در نیتروژن مایع، مجدداً بهمدت ۲۴ ساعت در دستگاه خشککن انجمادی قرار گرفت.

### ۲-۳- فرایند ساخت داربست گرادیانی

در این تحقیق داربستهای گرادیانی بهصورت دو لایه ساخته شدند. از دو سرنگ با حجم سه و پنج میلیلیتر بهعنوان قالب استفاده شـد. بهطوري كه لايه اول در قالب با قطر كمتر (به همان صورتي كه در پیش ذکر شد) و با بازه اندازه ذرات پارافین مشخص (بهعنوان مثال ۲۵۰ تا ۴۲۰ میکرومتر) ساخته شده و بدون آنکه ذرات پارافین در آن شسته شوند، در مرکز قالب بزرگتر قرار گرفت. در ایـن مرحلـه بهمنظور ساخت لایه دوم، میکروذرات پارافین با بازه اندازه ذرات ۴۲۰ تا ۶۰۰ میکرومتر و به اندازه حجم محلول پلیمری دور لایـه اول (در قالب بزرگ) ریخته شده و پس از اضافه کردن محلـول بـهطور یکنواخت در آن پراکنده شدند. پس از انجماد نمونه در فریزر ۲۰-درجه سانتی گراد، بهمنظ ور رخ دادن فرایند تصعید و خرارج شدن کامل حلال نمونه بهمدت ۷۲ ساعت در دستگاه خشککن انجمادی قرار گرفت. در مرحله بعد شستشوی ذرات پارافین توسط حلال ان هگزان صورت گرفت. به این صورت که نمونه بهمدت ۴۸ ساعت در انهگزان غوطهور مانده و هر هشت ساعت انهگزان تعویض شد. پس از گذشت ۴۸ ساعت نمونه با اتانول شسته شده و بهمنظ ور خشک شدن کامل و بدون تغییر ساختار پـس از انجمـاد در نیتـروژن مایع، مجدداً بهمدت ۲۴ ساعت در دستگاه خشککن انجمادی قرار گرفت. داربستهای همگن و گرادیانی ساخته شده در شکل (۱) ديده مي شوند.

۲-۴- مطالعات میکروسکوپ الکترونی روبشی<sup>۱۲</sup> هدف از به کارگیری این میکروسکوپ، مشاهده و بررسی

ساختار داربست، تخلخلها، میزان راه درهم بودن آنها، مشاهده گرادیان در تخلخل داربستها و پیوستگی بین لایههای داربست گرادیانی و همچنین بررسی میزان چسبندگی سلولها بوده است. نمونهها بعد از آمادهسازی، توسط طلا تحت خلا پوشش دهی شدند و در بزرگنماییهای مختلف توسط میکروسکوپ الکترونی روبشی (ای آی اس ۲۱۰۰)<sup>۱۳</sup> ساخت کارخانه سرون تکنولوژی<sup>۱۴</sup> مورد بررسی قرار گرفتند. با بررسی تصاویر میکروسکوپ الکترونی و به علت کوچکتر بودن اندازه تخلخلها نسبت به اندازه ذرات تخلخل ساز استفاده شده، با اندازه گیری سطح مقطع نمونه قبل و بعد از شستشوی میکروذرات پارافین میزان انقباض آنها اندازه گیری شد.

که در آن A<sub>t</sub> مساحت سطح مقطع نمونه پس از شستشو و خشک شدن و .A مساحت سطح مقطع نمونه قبل از شستشوی میکروذرات پارافین است.

### ۲-۵- بررسی تخلخلها

اندازه و درصد تخلخل، پارامترهای بسیار مهمی در تعیین خواص مکانیکی و زیستسازگاری داربستها هستند. برای محاسبه اندازه تخلخلهای داربست، از تصاویر گرفته شده توسط میکروسکوپ الکترونی روبشی استفاده شد. بدین منظور، برای هر نمونه سه عکس میکروسکوپ الکترونی روبشی گرفته شد. اندازه حفرات با استفاده از نرمافزار ایمیج جی<sup>۱۵</sup> اندازهگیری شد و میانگین اندازه حفرات محاسبه شد. به منظور اندازهگیری درصد تخلخل در داربستها از روش جابه جایی اندازهگیری درصد تخلخل در داربستها از انهگزان به عنوان مایع<sup>۹۲</sup> استفاده شد [۱۴]. در این تحقیق از انهگزان به عنوان ماده ای جهت نفوذ به داخل تخلخل ها استفاده شد. در حجم ماده ای جهت نفوذ به داخل تخلخل ها استفاده شد. در حجم انهگزان وقتی داربست درون آن بود، اندازه گرفته شد (۲۷). داربست از انهگزان خارج و مجدداً حجم نهایی انهگزان داربست از انهگزان خارج و مجدداً حجم نهایی انهگزان

- $V_{\rm A} = V_{\rm Y} V_{\rm Y}$  (۱) حجم داریست
- $V_{\rm B} = V_{\rm r} (V_{\rm r} + V_{\rm A})$  (۲) حجم هگزان داخل تخلخل ها



شکل ۱- الف) چند نمونه داربست همگن، ب) لایه داخلی داربست گرادیانی و ج) داربست گرادیانی

 $\frac{V_B}{V_A + V_B} \times \cdots$ 

(۳) درصد تخلخل

۲-۶- بررسی خواص مکانیکی

از آنجایی که استحکام مکانیکی داربستها برای قرارگیری در استخوان از اهمیت فراوانی برخوردار است، آزمون مکانیکی تمام نمونهها تحت آزمون فشاری انجام شد. برای این آزمون نمونههایی به شکل استوانهای با قطر تقریبی ۱/۱ سانتیمتر و ارتفاع یک سانتیمتر آماده شدند. آزمون فشار بهصورت تک محوری با استفاده از دستگاه زوئیک روئل ۵۰۰×۷۰ و بر اساس استاندارد ای اس تی ام ۵۷۵۸ با بارگذاری ۲۵ کیلونیوتن انجام شد. نمونهها بین دو فک دستگاه قرار داده شدند و نیرو با سرعت یک میلیمتر بر دقیقه و تا اندازه کرنش ۸۰ درصد اعمال شد. مدول الاستیک داربستها از ناحیه خطی و الاستیک منحنی های تنش – کرنش و استحکام فشاری داربستها در ۸۰ درصد کرنش اندازه گیری شد.

# ۳- نتایج و بحث ۳-۱- بررسی میکروسکویی میکروذرات پارافین

در سالهای اخیر از روش لایهبهلایه و شستشوی ذرات تخلخلساز جهت ایجاد گرادیان در تخلخل استفاده شده است و تخلخلسازهای استفاده شده در این تحقیقها ذرات نمک و ذرات یخ در اندازههای مختلف بوده است [۱۲ و ۱۳]. از دلایل استفاده از میکروذرات پارافین بهعنوان تخلخلساز، امکان دستیابی به تخلخلهای کروی و امکان کنترل بههم پیوستگی

تخلخلها در داربست بوده است. در صورت استفاده از نمک بهعنوان تخلخلساز، شکل تخلخلها محدود به شکل کریستالی ذرات نمک بوده و امکان راه در هم کردن تخلخلها وجود ندارد [۱۶]. از دیگر محدودیتهای استفاده از ذرات نمک، توزیع غیریکنواخت ذرات نمک در محلول پلیمری و احتمال کلوخه شدن آنهاست [۱۲].

همانطور که در تصاویر میکروسکوپی دیده می شود، شکل میکروذرات در بازه ۴۲۰ تا ۵۰۰ میکرومتر از حالت کروی خارج و تقریباً بیضی است. با توجه به جریان و حرکت گردابی محلول روی همزن حرارتی، هرچه از محور فرضی حرکت سیال دورتر شویم سرعت جریان کاهش می یابد؛ بنابراین با توجه به آنچه بالاتر ذکر شد، در سرعتهای پایین تر ذرات بزرگتر و غیر کروی تر تشکیل می شوند. قابل ذکر است که با تغییر سرعت هم خوردن و غلظت محلول پلی وینیل الکل می توان شکل و توزیع اندازه ذرات پارافین را کنترل کرد.

در تحقیق صورت گرفته با توجه به شرایط انجام فرایند، ذرات تشکیل شده بهطور عمده در بازه اندازه ۱۵۰ تا ۶۰۰ میکرومتر بوده و تعداد ذرات تشکیل شده در بازه ۱۵۰ تا ۲۵۰ و ۲۵۰ تا ۲۵۰ میکرومتر بیشتر از تعداد ذرات در بازه اندازه ۲۲۰ تا ۶۰۰ میکرومتر بود. تصاویر میکروسکوپی گرفته شده از میکروذرات تهیه شده در شکل (۲) میکروکرههای پارافین را در سه بازه اندازه ذره ۱۵۰ تا ۲۵۰ میکرومتر، ۲۵۰ تا ۲۰۰ میکرومتر و ۲۲۰ تا ۶۰۰ میکرومتر نشان میدهند. در این تحقیق از دو بازه اندازه ذرات ۲۵۰ تا ۲۰۰ و ۲۲۰ تا ۶۰۰ میکرومتر در ساخت داربستهای گرادیانی استفاده شد. با توجه به اینکه

DOI: 10.29252/jame.37.3.75



شکل ۲– تصاویر میکروسکوپی الکترونی روبشی از میکروذرات پارافین در بازه اندازه: الف) ۱۵۰ تا ۲۵۰ میکرومتر، ب) ۲۵۰ تا میکرومتر و ج) ۴۲۰ تا ۶۰۰ میکرومتر

امکان انقباض جزئی داربستها و درنتیجه تخلخلها پس از شستشوی پروژن وجود داشت؛ علت بهکارگیری این بازه اندازه ذرات، دستیابی به اندازه تخلخلهای مناسب برای استفاده در مهندسی بافت استخوان بوده است [۱۷ و ۱۸]. طبق مطالعات انجام شده حداقل اندازه تخلخل مورد نیاز برای مهندسی بافت استخوان ۱۰۰ میکرومتر و حداقل اندازه بهینه برای استخوانسازی بهتر ۳۰۰ میکرومتر است [۶].

۳–۲– بررسی میکروسکوپی ساختار داربست در جدول (۱) انواع داربستهای همگن و گرادیانی ساخته شده در این تحقیق آورده شده است.میانگین اندازه تخلخلها در داربست همگن نوع یک با بازه اندازه ذرات پارافین ۲۵۰ تا ۲۰۰ میکرومتر، ۱۱/۲ ± ۵/۸۷۲ میکرومتر و در داربست همگن نوع دو با بازه اندازه ذرات پارافین ۲۲۰ تا ۵۰۰ میکرومتر، ۱۴/۶ ± ۲۱۷/۸ میکرومتر اندازه گیری شده است. اندازه تخلخلهای ایجاد شده میتواند برای استفاده در مهندسی بافت استخوان مناسب باشد. با توجه به تحقیقات انجام شده، حداقل اندازه تخلخل مورد نیاز برای رشد استخوان ۱۰۰ تا ۱۳۵ میکرومتر و مقدار بهینه ۱۰۰ تا ۴۰۰ میکرومتر است [۷۱ و ۱۸].

شکل کاملاً کروی تخلخلها نشاندهنده حذف کامل میکروذرات کروی پارافین است. از طرفی آزمون سلولی و آزمون مورفولوژی گرفته شده از این داربستها، عدم سمیت سلولی و چسبندگی کامل سلولها بر سطح داربست را نشان داد که دلیل دیگری بر حذف کامل مواد تخلخل زا است [۱۹]. در اکثر مطالعات انجام شده روی داربستهای گرادیانی امکان دستیابی به تخلخل های کروی وجود

نداشته است، همچنین راه در هم کردن تخلخل ها به سختی قابل کنترل بوده است [۱۲–۷]. این در حالی است که با استفاده از ذرات پارافین و دما دادن به آنها تا حـدود ۳۰ تـا ۳۲ درجـه سـانتیگـراد و درنتیجـه چسبندگی جزئی ذرات کروی تخلخلساز بـههـم، امکـان راه درهـم تخلخل ها وجود دارد [۱۶]. در تحقیقی که در سال ۲۰۱۳ میلادی انجام شده است بهمنظور داشتن تخلخل هـای کـروی از میکـروذرات يـخ بهعنوان تخلخلساز استفاده شده است، از محدودیتهای استفاده از ذرات یخ، میتوان به دشواری کنترل شرایط فرایند جهت ایجاد میکروذرات یخ در بازه اندازه ذرات مشخص اشاره کرد [۱۳]. نتایج حاصل از اندازه گیری میزان انقباض پس از خشک شدن نمونهها در دستگاه خشککن انجمادی نشان داد که سطح مقطع و ارتفاع آنها تـا حدى (حدود ١٠ درصد) كاهش يافته است. انقباض داربست باعـث كاهش جزئي اندازه تخلخلها نسبت به اندازه ذرات پارفین استفاده شده بهعنوان تخلخلساز میشود [۲۰]. بهطور کلی نیروی محرکه انقباض مواد پلیمری، حرکت زنجیرههای پلیمری در نواحی آمورف است و احتمال انقباض در مواد نـرم بالـاتر اسـت [۲۱]. تصـاوير میکروسکوپی گرفته شده از سطح مقطع داربستها، تخلخاهای کروی شکل ایجاد شده توسط میکروذرات کروی پارافین و همچنین راه درهم بودن آنها را نشان میدهـد. از جملـه پارامترهـای مهـم در طراحی داربست، شکل تخلخلها، مورفولوژی دیواره تخلخل ها و راه درهم بودن آنهاست؛ این موارد از پارامترهای مؤثر بـر کشـت، مهاجرت و رشد سلول، بیان ژن و تشکیل بافت جدید در سه بعد هستند [۲۲، ۲۳ و ۲۴]. همانطور که در تصاویر میکروسکوپی در شکلهای (۳) و (۴) مشخص است، در ساختار داربستها بهویژه



شکل ۳- ساختار میکروسکوپی داربست همگن: الف) نوع ۱ و ب) نوع ۲



شکل ۴- تصاویر میکروسکوپی الکترونی روبشی از داربست گرادیانی: الف) لایه خارجی داربست و ب) لایه داخلی داربست

داربست همگن نوع یک تعدادی حفره کوچک دیده می شود؛ این حفرهها میتوانند بهعلت عدم نفوذ کامل و توزیع غیریکنواخت محلول پلیمری بین ذرات تخلخل ساز ایجاد شده باشند [۱۶].

گرادیان شعاعی ایجاد شده در تصاویر میکروسکوپی شکل (۴) قابل مشاهده است. همان طور که در شکل (۴) مشخص است، در داربست گرادیانی نوع دو تخلخل ها در لایه میانی بزرگتر از تخلخل های لایه خارجی هستند، این در حالی است که در داربست گرادیانی نوع یک لایه داخلی تخلخل هایی کوچکتر از لایه خارجی دارد. در این شکل پیوستگی و اتصال کامل بین دو لایه داربست، بدون مشاهده فصل مشترک بین لایه ها به وضوح نمایان است. لازم به ذکر است که وجود فصل مشترک پوسته ای شکل بین نشاندن لایه به ایه داخابی زبری سطح نمونه نهایی استفاده از روش تفت جوشی لیزر انتخابی زبری سطح نمونه نهایی استفاده از این روش را جهت ایجاد گرادیان در تخلخل با محدودیت روب درو می کند [1]. بنابراین میتوان نتیجه گرفت که استفاده از

میکروذرات پارافین بهعنـوان تخلخلسـاز و سـاخت داربسـت بـه صورت لایهلایه و با استفاده از دستگاه خشککن انجمادی، روشـی کارامد و ساده جهت دستیابی به ساختار مطلـوب در داربسـتهای گرادیانی است.

### ۳-۳- بررسی درصد تخلخل

همان طور که در نمودار شکل (۵) مشخص است، نمونه همگن نوع دو با ۲۳/۵ ۲/۳ درصد تخلخل، کمترین درصد تخلخل را در بین چهار نمونه ساخته شده دارد. درصد تخلخل داربست همگن نوع یک، ۲/۱۵ ± ۲/۷۵ درصد، گرادیانی نوع یک، ۵/۵ ± ۷۴ درصد و داربست گرادیانی نوع دو، ۴ ± ۸/۹۷ درصد اندازه گیری شده است. بنابر تحقیقات انجام شده درصد تخلخل بالای ۷۰ درصد برای زندهمانی و رشد سلولها مورد نیاز است [۲۵]. طبق مطالعات انجام شده درصد تخلخل داربستها با سرعت تخریب نسبتاً بالا نباید از ۹۰ درصد بالاتر باشد [۶]. در داربست همگن نوع یک با بازه اندازه ذرات تخلخل ساز

مواد پیشرفته در مهندسی، سال ۳۷، شمارهٔ ۳، پاییز ۱۳۹۷

۸١

۲۵۰ تا ۲۰۱۰ میکرومتر، تخلخل ۱/۲۵ ± ۷۷/۵ درصد است؛ در حالی که تخلخل در داربست همگن نوع دو، ۵/۳± ۶۱/۳ درصد است. علت این تفاوت را می دوان این گونه شرح داد: طبق تحقیق انجام شده در این رابطه، کوچک تر بودن اندازه ذرات تخلخل ساز می تواند باعث توزیع غیریکنواخت تر محلول پلیمری در بین میکروذرات شود. در واقع هرچه میکروذرات کوچک تر باشند نفوذ محلول پلیمری بین آنها سخت تر خواهد بود. این امر می تواند باعث ایجاد حفره و حباب و یا باریک شدن دیواره تخلخل ها و درنتیجه افزایش درصد تخلخل شود [17].

در داربستهای گرادیانی نیز نسبت جرم کل تخلخلساز به جرم کل پلیمر استفاده شده در هر دو نوع داربست یکی است. اما درصد تخلخل این دو نوع داربست به هم متفاوت است. ب استناد بهدلیل گفته شده برای داربستهای همگن و با توجه به اینکه در این داربستها جرم تخلخلساز و پلیمر در لایه داخلی كمتر از لایه خارجی است؛ می توان كمتر بودن درصد تخلخل داربست گرادیانی نوع یک نسبت به داربست گرادیانی نـوع دو را توجیه کرد. در داربست گرادیانی نوع یک بازه اندازه ذرات تخلخلساز در لایه داخلی ۲۵۰ تا ۴۲۰ میکرومتر و در لایه خارجی ۴۲۰ تا ۶۰۰ میکرومتر و در داربست گرادیانی نوع دو، بازه اندازه ذرات تخلخل ساز در لایه داخلی ۴۲۰ تا ۶۰۰ میکرومتر و لایه خارجی ۲۵۰ تا ۴۲۰ میکرومتر است؛ درنتیجـه مقدار ذرات با بازه اندازه پایینتر در داربست گرادیانی نـوع دو بیشتر از داربست گرادیانی نـوع یـک بـوده و احتمـال توزیـع غیریکنواخت محلول پلیمری و تشکیل حفره و درنتیجه بیشـتر بودن درصد تخلخل در این نوع داربست بیشتر خواهد بود.

درصد تخلخل برش های مختلف از داربست های گرادیانی ساخته شده با روش سانتریفیوژ، بین ۸۰ تا ۹۴ درصد به دست آمده است؛ قابل ذکر است که با کنترل سرعت سانتریفیوژ امکان تغییر اندازه و درصد تخلخلها وجود دارد [۸]. درصد تخلخل این داربست ها در مقایسه با تحقیق حال حاضر بیشتر است علت این امر می تواند راه درهم تر بودن تخلخل ها در روش

سانتریفیوژ و بالاتر بودن میانگین اندازه تخلخلها در هر لایه در داربست نسبت به داربستهای گرادیانی این تحقیق باشد. در سال ۲۰۱۱ میلادی با استفاده از روش نمونهسازی سریع دو نوع داربست همگن و دو نوع داربست گرادیانی ساخته شد. نتایج بهدست آمده نشان داد که درصد تخلخل داربستهای گرادیانی (۹۵ و ۶۰ درصد) تقریباً برابر با میانگین درصد تخلخل بهدست آمده برای داربستهای همگن (۳۱ و ۸۰ درصد) بوده است گرادیانی پایین تر از اعداد بهدست آمده در تحقیق حال حاضر است، علت این تفاوت را میتوان با تفاوت در نوع گرادیان ایجاد شده و هندسه داربستها توجیه کرد. در تحقیقی با استفاده از روش شستشوی ذرات پروژن و نشاندن لایهبهلایه، درصد تخلخلهای بهدست آمده برای لایههای مختلف داربست گرادیانی از پایین به بالا، بهترتیب حدود ۵۶، ۷۲، ۷۷، ۵۸ و ۹۲ درصد بهدست آمده است [۱۲].

### ۳-۴- بررسی خواص مکانیکی

در نمودار تنش – کرنش مدول فشاری داربستهای ساخته شده از شیب ناحیه خطی نمودار بهدست آمد. در شکل (۶) نمودار تنش – کرنش فشاری برای هر چهار نمونه داربست همگن و گرادیانی آورده شده است. در جدول (۲) نیز مقادیر اندازه گیری شده استحکام فشاری در ۸۰ درصد کرنش و مدول فشاری نمونهها آمده است. با توجه به نمودار و جدول، داربست همگن نوع دو (۴۲۰) بیشترین استحکام و مدول فشاری و داربست گرادیانی نوع دو (۲۰۴۵) کمترین استحکام و مدول فشاری را داراست. بررسی تحقیقات انجام شده نشان داده است که خواص مکانیکی داربست به شکل، اندازه و درصد تخلخل در آن وابسته است [۶۱ و ۲۶]. طبق رابطه فانی و نیوگی<sup>۱۹</sup> با افزایش درصد تخلخل میزان استحکام کاهش می یابد [۲۷].  $F = E_{\rm c}(1 - \frac{p}{2})$ 

در این رابطه d مدون یابک ماده متخلخل،  $p_{c}$  مدون یابک ماده جنجل،  $p_{c}$  ماده جامد،  $p_{c}$  درصد تخلخل ماده

بازه اندازه ذرات تخلخلساز (میکرومتر)	نوع داربست	
YQ0-470	همگن نوع يک	
470-800	همگن نوع دو	
لایه میانی ۴۲۰–۲۵۰		
لایه خارجی ۶۰۰-۴۲۰	كرادياني نوع يك	
لایه میانی ۶۰۰–۴۲۰	المان المالي	
لايه خارجي ۴۲۰-۲۵۰	فرادیانی فوج دو	

جدول ۱- انواع داربست های همگن و گرادیانی

جدول ۲ – استحکام و مدول فشاری داربستها

مدول فشاري (مگاپاسکال)	استحکام فشاری در ۸۰ درصد کرنش (مگاپاسکال)	داربست
•/YQ±•/11	۰/ <i>\۶</i> ±۰/ <i>\۶</i>	همگن نوع يک
۰/۵۳± ۰/۳۴	∘/Y۶±∘/Y	همگن نوع دو
•/44±•/44	•/19±•/٣۴	گرادیانی نوع یک
۰/۱۷± ۰/۵۱	•/\Y±•/YA	گرادیانی نوع دو

است زمانی که مدول یانگ صفر می شود. f نیز پارامتری وابسته به مورفولوژی و هندسه تخلخلهاست.

همانطور که دیده می شود، نمونه همگن شماره دو با کمترین درصد تخلخل بیشترین خواص مکانیکی را از خود نشان داده است و همانطور که انتظار می رفت، داربست گرادیانی نوع دو با ۸۱ درصد تخلخل پایین ترین خواص مکانیکی را دارد. با بررسی و مقایسه نمودار تنش – کرنش همه نمونه ها، می توان گفت که گرادیانی کردن اندازه تخلخل در داربست ها تأثیر چندانی بر خواص مکانیکی داربست نداشته است.

با مقایسه خواص مکانیکی دو نوع داربست گرادیانی دیـده میشود که داربست گرادیانی نوع یک خواص مکانیکی بهتـری از خود نشان داده است. با توجه به درصد تخلخل پایین تر ایـن نمونه نسبت به داربست گرادیانی نوع دو همین انتظار میرفت. در دو نـوع داربست همگـن نیـز علـت تفـاوت خصوصیات مکانیکی از جمله استحکام و مـدول فشـاری، تفـاوت درصـد تخلخل در این دو نمونه است. داربست همگـن نـوع یـک بـا

درصد تخلخل بالاتر نسبت به داربست همگن نوع دو، خواص مکانیکی پایین تری دارد. از طرفی با وجود بالاتر بودن خواص مکانیکی نمونه همگن نوع دو، درصد تخلخل آن نسبت به سه نمونه دیگر نسبتاً پایین بوده و تا حدودی می تواند بر زندهمانی و رشد سلول اثر منفی داشته باشد.

نتایج حاصل از بررسی خواص مکانیکی داربستهای گرادیانی ساخته شده به روش سانتریفیوژ نشان داد که در برش هایی از داربست که میانگین اندازه تخلخل ها بالاتر بوده، خواص مکانیکی پایین تر بوده است. همچنین با مقایسه داربست عملیات حرارتی شده و داربست ساده دیده شده است که با حرارت دادن داربستها تا نزدیکی نقطه ذوب پلیکاپرولاتون (حدود ۵۹ درجه سانتی گراد) و درنتیجه اتصال جزئی فیبرهای پلیکاپرولاتون خواص مکانیکی تا حد زیادی افزایش یافته است [۸]. البته به علت اینکه در تحقیق حال حاض خواص مکانیکی داربستها به صورت کلی و نه لایه به لایه اندازه گیری شده است و همچنین گرادیان به صورت شعاعی



شکل ۶- نمودار تنش-کرنش داربست همگن نوع یک (۲۵۰)، همگن نوع دو (۴۲۰)، گرادیانی نوع یک (D۲۵۰) و گرادیانی نوع دو (D۴۲۰) (رنگی در نسخه الکترونیکی)

خواهد بود [۷]. مقایسه مدول الاستیک بهدست آمده در تحقیقات پیشین با داربستهای ساخته شده در تحقیق حاضر، خواص مکانیکی ضعیف داربستها را نشان میدهد. علت این امر میتواند تفاوت در مواد سازنده داربست، روش ایجاد گرادیان و یا حتی تفاوت در شرایط بررسی خواص مکانیکی داربست، مثل ابعاد آن باشد.

۴- نتیجهگیری

سادگی روش استفاده شده جهـت ایجـاد گرادیـان در تخلخـل، در مقایسه با روش.هایی مانند روش چرخشی و روش سـانتریفیوژ، در ایجاد شده است؛ امکان مقایسه خواص مکانیکی با دیگر تحقیقها به طور دقیق وجود ندارد. طی تحقیقی که در سال ۲۰۱۱ میلادی روی داربستهای همگن و گرادیانی ساخته شده طی تحقیقی که در سال ۲۰۱۱ میلادی روی داربستهای همگن و گرادیانی ساخته شده به روش نمونه سازی سریع انجام شده است، مدول الاستیک داربستهای گرادیانی عددی مابین بیشترین و کمترین مقدار مدول الاستیک داربستهای همگن بوده است. علت این امر تفاوت در خواص مکانیکی و درصد تخلخل داربستها است. به طور کلی هرچه درصد تخلخل کل داربست ضعیف تر

مواد پیشرفته در مهندسی، سال ۳۷، شمارهٔ ۳، پاییز ۱۳۹۷

٨۴

دسترس بودن تجهیزات مورد نیاز و پایین بودن هزینه فرایند ساخت در مقایسه با دیگر روش ها به ویژه روش نمونه سازی سریع و تفجوشی لیزر انتخابی از مزیت های ابداع این روش بوده است. تولید و استفاده از میکروذرات پارافین به عنوان تخلخل ساز امکان دستیابی به تخلخل های کروی، امکان راه درهم کردن تخلخل ها و عدم نیاز به استفاده از حلال های سمی و خطرناک پلیکاپرولاکتون مثل کلروفرم را فراهم آورد. در این تحقیق پیوستگی کامل بین دو انها، نتیجه شد.

در روش استفاده شده امکان کنترل بازه انـدازه تخلخـل.هـا در ساختار داربست گرادیانی با تغییر اندازه ذرات تخلخلسـاز در هـر لایه وجود دارد؛ اما در روش.هایی ماننـد روش سـانتریفیوژ و روش چرخشی کنترل اندازه تخلخل.ها بهراحتی امکان پذیر نخواهد بود.

#### واژەنامە

مراجع

- 11. Polyvinyl Chloride (PVC)
- 12. Scanning Electron Microscope (SEM)
- 13. AIS2100
- 14. Seron Technology
- 15. ImageJ
- 16. liquid displacement 17. Zwick/Roel Z050
- 17. Zwick/Roel Z 18. ASTM D575
- 19. Phani and Nivogi

درصد تخلخل داربستهای گرادیانی ساخته شده در این تحقیق جهت استفاده در مهندسی بافت استخوان مناسب بوده است (بال اتر از ۲۰ درصد). درصد تخلخل داربستهای گرادیانی در مقایسه با نمونههای ساخته شده با روش نمونه سازی سریع، با وجود اندازه تخلخلهای کوچکتر بالاتر بوده است؛ علت این امر می تواند تفاوت در نوع گرادیان ایجاد شده و هندسه داربستها باشد. نتایج آزمون فشار نشان داد که گرادیانی کردن تخلخلها تأثیر چندانی بر خواص مکانیکی داربستها نداشته است و با توجه به مقدار پایین مدول و استحکام فشاری داربستها نسبت به تحقیقات پیشین می توان نتیجه گرفت که استفاده از پلی کاپرول کتون به تنه ایی در ساخت داربست جهت استفاده در مهندسی بافت استخوان مناسب نیست.

- 1. polycaprolactone
- 2. spinning
- 3. selective laser sintering
- 4. electrospinning
- 5. porogen
- 6. layer by layer assembly
- 7. rapid prothotyping
- 8. 3D plotting
- 9. Sigma Aldrich
- 10. Merck Millipore
- Lanza, R., Langer, R., and Vacanti, J., *Principle of Tissue Engineering*, 3rd ed., Academic Press, p. 1344, 2007.
- Hong, S., and Kim, G. H., "Fabrication of Size-Controlled Three-dimensional Structures Consisting of Electrohydrodynamically Produced Polycaprolactone Micro/Nanofibers", *Applied Physics A*, Vol. 103, pp. 1009-1014, 2011.
- Yilgor, P., Sousa, R. A., Reis, R. L., Hasirci, N., and Hasirci, V., "3D Plotted PCL Scaffolds for Stem Cell Based Bone Tissue Engineering", *Macromolecular Symposia*, Vol. 269, No. 1, pp. 92-99, 2008.
- Flemming, R. G., Murphy, C. J., Abrams, G. A., Goodman, S. L., and Nealey, P. F., "Effects of Synthetic Micro- and Nano-structured Surfaces on

Cell Behavior", *Biomaterials*, Vol. 20, pp. 573-588, 1999.

- 5. Moztarzadeh, F., Rabiei, M., and Nourmohammadi, Zh., *Application of Composites in Biomedical Engineering*, 3rd ed., Amirkabir University Press, 2015.
- Karageorgiou, V., and Kaplan, D., "Porosity of 3D Biomaterial Scaffolds and Osteogenesis", *Biomaterials*, Vol. 26, pp. 5474-5491, 2005.
- Sobral, J. M., Caridade, S. G., Sousa, R. A., Mano, J. F., and Reis, R. L., "Three-dimensional Plotted Scaffolds with Controlled Pore Size Gradients: Effect of Scaffold Geometry on Mechanical Performance and Cell Seeding Efficiency", *Acta Biomaterailia*, Vol. 7, pp. 1009-1018, 2011.

مواد پیشرفته در مهندسی، سال ۳۷، شمارهٔ ۳، پاییز ۱۳۹۷

۸۵

- Oh, S. H., Park, I. K., Kim, J. M., and Lee, J. H., "In Vitro and In Vivo Characteristics of PCL Scaffolds with Pore Size Gradient Fabricated by a Centrifugation Method", *Biomaterials*, Vol. 28, pp. 1664-1671, 2007.
- Harley, B. A., Hastings, A. Z., Yannas, I. V., and Sannino, A., "Fabricating Tubular Scaffolds with a Radial Pore Size Gradient by a Spinning Technique", *Biomaterials*, Vol. 27, pp. 866-874, 2006.
- Woodfield, T. B. F., Blitterswijk, C. V., Wijn, J. D., Sims, T. J., Hollander, A. P., and Riesle, J., "Polymer Scaffolds Fabricated with Pore-size Gradients as a Model for Studying the Zonal Organization within Tissue-Engineered Cartilage Constructs", *Tissue Engineering*, Vol. 11, pp. 1297-1311, 2005.
- Salmoria, G. V., Ahrens, C. H., Klauss, P., Paggi, R. A., Oliveira, R. G., and Lago, A. "Rapid Manufacturing of Polyethylene Parts with Controlled Pore Size Gradients using Selective Laser Sintering", *Materials Research*, Vol. 10, pp. 211-21, 2007.
- Wu, H., Wan, Y., Cao, X., Dalai, S., Wang, S., and Zhang, S., "Fabrication of Chitosan-g-Polycaprolactone Copolymer Scaffolds with Gradient Porous Microstructures", *Materials Letters*, Vol. 62, pp. 2733-2736, 2008.
- Zhang, Q., Lu, H., Kawazoe, N., and Chen, G., "Preparation of Collagen Porous Scaffolds with a Gradient Pore Size Structure using Ice Particulates", *Materials Letters*, Vol. 107, pp. 280-283, 2013.
- 14. Zhang, R., and Ma, P. X., "Poly (α-Hydroxyl Acids)/Hydroxyapatite Porous Composites for Bone-Tissue Engineering. I. Preparation and Morphology", *Journal of Biomedical Materials Research*, Vol. 44, pp. 446-455, 1999.
- Guan, J., Fujimoto, K. L., Sacks, M. S., and Wagner, W. R., "Preparation and Characterization of Highly Porous, Biodegradable Polyurethane Scaffolds for Soft Tissue Applications", *Biomaterials*, Vol. 26, pp. 3961-3971, 2005.
- Ma, P. X., and Choi, J. W., "Biodegradable Polymer Scaffolds with Well-defined Interconnected Spherical Pore Network", *Tissue Engineering*, Vol. 7, pp. 23-33, 2001.
- 17. Murphy, C. M., Haugh, M. G., and O'Brien, F. J., "The Effect of Mean Pore Size on Cell Attachment, Proliferation and Migration in Collagen-Glycosaminoglycan Scaffolds for Bone Tissue Engineering", *Biomaterials*, Vol. 31, pp. 461-466, 2010.
- 18. Martins, A. M., Santos, M. I., Azevedo, H. S.,

Malafaya, P. B., and Reis, R. L., "Natural Origin Scaffolds with In Situ Pore Forming Capability for Bone Tissue Engineering Applications", *Acta Biomaterailia*, Vol. 4, pp. 1637-1645, 2008.

- Akbari Taemeh, M., Akbari, B., and Nourmohammadi, J., "Fabrication of Polycaprolactone Scaffold with Gradient Porous Microstructure for Bone Tissue Engineering", MSc Thesis, University of Tehran, Tehran, Iran, 2016.
- 20. Guarino, V., Causa, F., Netti, P. A., Ciapetti, G., Pagani, S., Martini, D., and Ambrosio, L., "The Role of Hydroxyapatite as Solid Signal on Performance of PCL Porous Scaffolds for Bone Tissue Regeneration", *Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials*, Vol. 86, pp. 548-557, 2008.
- 21. Zong, X., Ran, S., Kim, K. S., Fang, D., Hsiao, B. S., and Chu, B., "Structure and Morphology Changes During In vitro Degradation of Electrospun Poly (Glycolide-co-Lactide) Nanofiber Membrane", *Biomacromolecules*, Vol. 4, pp. 416-423, 2003.
- 22. Ma, P. X., and Zhang, R. "Synthetic Nano-Scale Fibrous Extracellular Matrix", *Journal of Biomedical Materials Research*, Vol. 46, pp. 60-72, 1999.
- 23. Ma, P. X., Zhang, R., Xiao, G., and Franceschi, R., "Engineering New Bone Tissue In vitro on Highly Porous Poly (Alpha-Hydroxyl Acids)/Hydroxyapatite Composite Scaffolds", *Journal of Biomedical Materials Research*, Vol. 54, pp. 284-293, 2001.
- 24. Zhang, R., and Ma, P. X., "Synthetic Nano-fibrillar Extracellular Matrices with Predesigned Macroporous Architectures", *Journal of Biomedical Materials Research*, Vol, 52, pp. 430-438, 2000.
- 25. Koupaei, N., Karkhaneh, A., and Daliri Joupari, M., "Preparation and Characterization of (PCL-crosslinked-PEG)/Hydroxyapatite as Bone Tissue Engineering Scaffolds", *Journal of Biomedical Materials Research Part A*, Vol. 103, pp. 3919-3926, 2015.
- 26. Eshraghi, S., and Das, S., "Mechanical and Microstructural Properties of Polycaprolactone Scaffolds with One-Dimensional, Two-Dimensional, and Three-Dimensional Orthogonally Oriented Porous Architectures Produced by Selective Laser Sintering", Acta Biomaterialia, Vol. 6, pp. 2467-2476, 2010
- Phani, K. K., and Niyogi, S., "Young's Modulus of Porous Brittle Solids", *Journal of Materials Science*, Vol. 22, pp. 257-263, 1987.