

ارزیابی ساختاری و مکانیکی داربست گرادایانی پلی کاپرولاکتون

به منظور کاربرد در مهندسی بافت استخوان

ماهدخت اکبری طائمه، بابک اکبری* و ژامک نورمحمدی

دانشکده علوم و فنون نوین، دانشگاه تهران

(دریافت مقاله: ۱۳۹۶/۰۳/۲۸ - دریافت نسخه نهایی: ۱۳۹۷/۰۳/۲۹)

چکیده- در داربست‌های گرادایانی درصد، اندازه تخلخل و یا ترکیب شیمیایی مواد موجود در داربست به صورت گرادایانی در آن تغییر می‌کنند. اخیراً از روش‌های مختلفی جهت ایجاد گرادایان در داربست استفاده شده است. اما این روش‌ها محدودیت‌هایی از جمله گران بودن فرایند ساخت، در دسترس نبودن تجهیزات، پیچیدگی کنترل شرایط ایجاد گرادایان، پیچیدگی کنترل شکل، اندازه، درصد و راه درهم بودن تخلخل‌ها را دارا هستند. هدف از انجام این تحقیق ابداع روشی جدید، کارآمد، ساده و با صرف کمترین هزینه به منظور ایجاد گرادایان در تخلخل داربست بوده است. دو داربست همگن (نوع ۱ و نوع ۲) و دو داربست گرادایانی (نوع ۱ و نوع ۲) ساخته و با هم مقایسه شدند. گرادایان در راستای شعاع داربست، با ادغام دو روش لایه‌به‌لایه و روش شستشوی ذرات تخلخل‌ساز ایجاد شد. از پلیمر پلی کاپرولاکتون به عنوان ماده اصلی و از میکروذرات پارافین در دو بازه اندازه ذرات ۲۵۰ تا ۴۲۰ میکرومتر و ۴۲۰ تا ۶۰۰ میکرومتر به عنوان تخلخل‌ساز استفاده شد. درصد تخلخل داربست همگن نوع یک، همگن نوع دو، گرادایان نوع یک و گرادایان نوع دو، به ترتیب $1/25 \pm 0/5$ ، $0/77 \pm 0/3$ ، $0/61 \pm 0/3$ و $0/74 \pm 0/4$ درصد به دست آمد؛ گفتنی است که درصد تخلخل مورد نیاز برای رشد و زنده‌مانی سلول بالای ۷۰ درصد است. که درصد تخلخل داربست‌های گرادایانی جهت استفاده در مهندسی بافت استخوان مناسب است. همچنین میانگین اندازه تخلخل برای دو نوع داربست همگن یک و دو به ترتیب $11/23 \pm 278/48$ و $14/62 \pm 417/79$ میکرومتر به دست آمد که این اعداد نیز برای مهندسی بافت استخوان مطلوب هستند. استحکام فشاری در ۸۰ درصد کرنش و مدول فشاری داربست‌ها با ترتیب ذکر شده در بالا $0/16 \pm 0/11$ و $0/25 \pm 0/11$ مگاپاسکال، $0/26 \pm 0/20$ و $0/34 \pm 0/19$ مگاپاسکال، $0/34 \pm 0/43$ و $0/33 \pm 0/43$ مگاپاسکال و $0/12 \pm 0/28$ و $0/51 \pm 0/17$ مگاپاسکال اندازه‌گیری شد. پایین بودن ارقام استحکام نشان می‌دهد که استفاده از پلی کاپرولاکتون به تنهایی مناسب نبوده است. همچنین مقایسه این نتایج نشان می‌دهد که گرادایانی کردن تخلخل‌ها تأثیر چندانی بر خواص مکانیکی داربست‌ها نداشته است. گرادایان 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 گرادایانی مناسب بوده است.

واژه‌های کلیدی: پلی کاپرولاکتون، داربست گرادایانی، اندازه تخلخل، روش لایه‌به‌لایه، شستشوی ذرات تخلخل‌ساز.

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 مکاتبات، پست الکترونیکی: 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 layer-by-layer assembly and porogen leaching techniques. Paraffin micro particles were used as porogen in two size ranges: 250 to 420 μm and 420 to 600 μm . The average pore size of Homog 1 and Homog 2 was $278.48 \pm 11.23 \mu\text{m}$ and 417.79 ± 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 $0.16 \pm 0.16 \text{ MPa}$ and $0.25 \pm 0.11 \text{ MPa}$, $0.26 \pm 0.20 \text{ MPa}$ and $0.53 \pm 0.34 \text{ MPa}$, $0.19 \pm 0.34 \text{ MPa}$ and $0.33 \pm 0.43 \text{ MPa}$, $0.12 \pm 0.28 \text{ MPa}$ and $0.16 \pm 0.51 \text{ MPa}$, respectively. The results showed that pore size gradient had a negligible effect on the mechanical properties of the scaffolds and using polycaprolactone (PCL) as the only material of scaffold was not appropriate. The structure of gradient 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 گرادینانی در فضای سه بعدی آن تغییر می کنند [۵]. داربست های گرادینانی استوانه ای 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 متراکم تر است را تداعی می کنند. بدین ترتیب با ایجاد گرادیان در تخلخل داربست ها، می توان تفاوت های موضعی و ساختاری موجود در ماتریس خارج سلولی بافت هایی چون غضروف مفصل و استخوان بدن انسان را بهتر شبیه سازی کرد؛ در واقع با شبیه سازی تفاوت های موجود در مورفولوژی، می توان خواص ساختاری و مکانیکی بافت استخوان و توانایی بازسازی آن را کنترل کرد. این نوع از داربست ها، از یک سو اجازه رگزایی 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 قرارگیری سلول ها در فضای سه بعدی داربست را کنترل، بازده کشت سلولی را افزایش [۷] و یا از این نوع داربست ها به عنوان ابزاری برای مطالعه تأثیر اندازه تخلخل بر عملکرد بیولوژیک داربست استفاده کرد [۸].

روش چرخشی^۱، تفت جوشی لیزر انتخابی^۲، الکتروریسی^۳، استفاده از ذرات تخلخل ساز^۴ و نشانندن لایه به لایه^۵، ساترئیفیوژ و نمونه سازی سریع^۶ توسط دستگاه رسام سه بعدی^۷ از روش هایی هستند که در سال های اخیر برای ایجاد گرادیان در تخلخل داربست استفاده شده اند [۱۳-۷]. در سال ۲۰۱۰ میلادی گروهی

مهندسی بافت با عنوان دانش طراحی و ساخت بافت جدید برای بازیابی عملکرد ارگان های معیوب یا بافت های از دست رفته، از اوایل دهه ۹۰ میلادی پدیدار شد [۱]. برای ساخت یک بافت به شیوه مهندسی، طراحی ساختاری متخلخل، به عنوان بستری برای مهاجرت، چسبندگی، تکثیر و تمایز سلولی ضروری است. مواد پلیمری، به طور وسیع در ساخت چنین داربست هایی به کار گرفته شده اند، چون بیوشیمی سلول های کشت شده را در بافت در حال رشد، تأمین و پشتیبانی می کنند [۲]. پلی کاپرولاکتون^۱ پلیمری زیست تخریب پذیر با سرعت تخریب پایین است. نقطه ذوب این پلیمر حدود ۶۰ درجه سانتی گراد، نیمه بلوری و آبگریز است. زیست سازگاری، فرایندپذیری ساده، عدم سمیت محصولات حاصل از تخریب و خواص مکانیکی به نسبت مطلوب این پلیمر را برای استفاده در مهندسی بافت استخوان مناسب کرده است [۳]. با وجود اهمیت زیادی که زیست سازگاری داربست در مهندسی بافت دارد؛ اما از تأثیر مورفولوژی آن در تسهیل عملکردهایی چون مهاجرت و تکثیر سلولی، جذب مواد غذایی، دفع مواد زائد و رگزایی نمی توان چشم پوشی کرد؛ در واقع یکی از جنبه های مهم در طراحی ساختار و مورفولوژی داربست، ساختار و اندازه تخلخل ها است. لذا، در نظر گرفتن فاکتورهایی چون اندازه و درصد تخلخل، شکل هندسی و راه در هم بودن تخلخل ها در طراحی داربست اهمیت زیادی دارد [۴]. در داربست های گرادینانی، بر خلاف داربست های همگن، پارامترهایی چون اندازه، درصد

از شرکت سیگما^۹ و استیک اسید، پلی‌وینیل الکل، ان‌هگزان و اتانول از شرکت مرک^{۱۰} تهیه شدند.

۲-۲- فرایند ساخت داربست

(۱) تهیه محلول ۱۰ درصد وزنی پلی‌کاپرولاکتون-استیک اسید با استفاده از همزن حرارتی در دمایی در حدود ۴۰ درجه سانتی‌گراد انحلال صورت گرفت.

(۲) ساخت میکروذرات پارافین

(الف) محلول ۰/۱ درصد وزنی به حجمی پلی‌وینیل الکل-آب دیونیزه روی همزن حرارتی با اعمال دما تهیه شد.

(ب) محلول ۱/۵ درصد وزنی به حجمی پلی‌وینیل الکل-آب دیونیزه با اعمال دما تهیه شد.

(ج) ۱۰ گرم پارافین ذوب شده در ظرف حاوی ۱۲/۵ میلی‌لیتر محلول ۱/۵ درصد وزنی به حجمی پلی‌وینیل الکل-آب دیونیزه که دمایی حدود ۶۵ درجه سانتی‌گراد داشت، ریخته و به مدت ۱۰ دقیقه روی همزن حرارتی هم‌زده شد.

(د) پس از گذشت این زمان، محتویات ظرف به داخل ظرف حاوی ۵۰۰ میلی‌لیتر محلول ۰/۱ درصد وزنی به حجمی پلی‌وینیل الکل-آب دیونیزه با دمای ۱۷ درجه سانتی‌گراد که با سرعت بالایی روی همزن حرارتی هم‌زده می‌شد، ریخته شد. (ه) با غربال‌گری این ذرات توسط الک با مش‌بندی‌های ۳۰، ۴۰ و ۶۰ میکروذرات در دو بازه اندازه ذرات ۲۵۰ تا ۴۲۰ و ۴۲۰ تا ۶۰۰ میکرومتر تقسیم‌بندی شدند.

(۳) در این مرحله میکروذرات پارافین در بازه اندازه ذرات مورد نظر و به اندازه ۱۰ برابر جرم پلیمر به داخل سرنگ پنج میلی‌لیتر از جنس پلی‌وینیل‌کلراید^{۱۱} که سر آن بریده شده بود؛ ریخته شد.

(۴) محلول پلیمری روی ذرات تخلخل‌ساز ریخته و میکروذرات پارافین در محلول پلیمری به صورت یکنواخت پراکنده شدند.

(۵) پس از قرارگیری و انجماد نمونه در فریزر ۲۰- درجه سانتی‌گراد، به مدت ۷۲ ساعت در دستگاه خشک‌کن انجمادی قرار گرفت.

با هدف افزایش بازدهی کشت سلولی و کنترل جای‌گیری سلول‌ها در فضای سه بعدی داربست، اقدام به ایجاد تخلخل‌گرادیانی با روش چاپ سه بعدی کردند. از محدودیت‌های این روش گران بودن، عدم دسترسی و محدودیت در ساخت تعداد زیاد داربست با ابعاد بالا، به علت سرعت کم فرایند است [۷]. در سال ۲۰۰۷ میلادی با روش سانتریفیوژ محلول حاوی پلی‌کاپرولاکتون و به دنبال آن فرایند خشک کردن انجمادی، گرادیان در تخلخل داربست ایجاد شد. اما کنترل شرایط فرایند سانتریفیوژ برای ساخت داربست گرادییانی با بازه اندازه تخلخل مشخص و مطلوب دشوار است [۸]. با انتخاب نمک به عنوان تخلخل‌ساز و ادغام دو روش شستشوی ذرات تخلخل‌ساز و نشان دادن لایه‌به‌لایه می‌توان در داربست، تخلخل‌گرادیانی ایجاد کرد. از محدودیت‌های این روش توزیع غیریکنواخت تخلخل‌ساز در محلول پلیمری، احتمال کلوخه شدن ذرات نمک و محدودیت در راه درهم کردن تخلخل‌ها است [۱۲]. با توجه به اهمیت زیاد گرادییانی کردن داربست‌ها و با توجه به محدودیت‌های روش‌های مختلف، به‌کارگیری روشی نوین، ساده، بدون نیاز به تجهیزات پیشرفته و کم‌هزینه امری ضروری است. از این‌رو ایده ایجاد گرادیان شعاعی در داربست‌ها به صورت لایه‌به‌لایه و با استفاده از سرنگ (به عنوان قالب) و ذرات پارافین به عنوان تخلخل‌ساز برای نخستین بار اجرا شده و نتایج نشان داد که این روش می‌تواند پیچیدگی و هزینه ایجاد تخلخل‌گرادیانی را تا حد مطلوبی کاهش دهد. از نوآوری‌های این تحقیق می‌توان به نوع قالب مورد استفاده و ایجاد گرادیان شعاعی با استفاده از روش لایه‌به‌لایه اشاره کرد. در هیچ یک از مطالعات پیشین از سرنگ به عنوان 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

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

۲-۳- فرایند ساخت داربست گرادایانی

در این تحقیق داربست‌های گرادایانی به صورت دو لایه ساخته شدند. از دو سرنگ با حجم سه و پنج میلی‌لیتر به عنوان قالب استفاده شد. به طوری که لایه اول در قالب با قطر کمتر (به همان صورتی که در پیش ذکر شد) و با بازه اندازه ذرات پارافین مشخص (به عنوان مثال ۲۵۰ تا ۴۲۰ میکرومتر) ساخته شده و بدون آنکه ذرات پارافین در آن شسته شوند، در مرکز قالب بزرگ‌تر قرار گرفت. در این مرحله به منظور ساخت لایه دوم، میکروذرات پارافین با بازه اندازه ذرات ۴۲۰ تا ۶۰۰ میکرومتر و به اندازه حجم محلول پلیمری دور لایه اول (در قالب بزرگ) ریخته شده و پس از اضافه کردن محلول به‌طور یکنواخت در آن پراکنده شدند. پس از انجماد نمونه در فریزر ۲۰- درجه سانتی‌گراد، به منظور رخ دادن فرایند تصعید و خارج شدن کامل حلال نمونه به مدت ۷۲ ساعت در دستگاه خشک‌کن انجمادی قرار گرفت. در مرحله بعد شستشوی ذرات پارافین توسط حلال ان‌هگزان صورت گرفت. به این صورت که نمونه به مدت ۴۸ ساعت در ان‌هگزان غوطه‌ور مانده و هر هشت ساعت ان‌هگزان تعویض شد. پس از گذشت ۴۸ ساعت نمونه با اتانول شسته شده و به منظور خشک شدن کامل و بدون تغییر ساختار پس از انجماد در نیتروژن مایع، مجدداً به مدت ۲۴ ساعت در دستگاه خشک‌کن انجمادی قرار گرفت. داربست‌های همگن و گرادایانی ساخته شده در شکل (۱) دیده می‌شوند.

۲-۴- مطالعات میکروسکوپ الکترونی روبشی^{۱۲}

هدف از به‌کارگیری این میکروسکوپ، مشاهده و بررسی

ساختار داربست، تخلخل‌ها، میزان راه درهم بودن آنها، مشاهده گرادایان در تخلخل داربست‌ها و پیوستگی بین لایه‌های داربست گرادایانی و همچنین بررسی میزان چسبندگی سلول‌ها بوده است. نمونه‌ها بعد از آماده‌سازی، توسط طلا تحت خلا پوشش‌دهی شدند و در بزرگنمایی‌های مختلف توسط میکروسکوپ الکترونی روبشی (ای‌اس ۲۱۰۰) ساخت کارخانه سرون تکنولوژی^{۱۴} مورد بررسی قرار گرفتند. با بررسی تصاویر میکروسکوپ الکترونی و به‌علت کوچک‌تر بودن اندازه تخلخل‌ها نسبت به اندازه ذرات تخلخل‌ساز استفاده شده، با اندازه‌گیری سطح مقطع نمونه قبل و بعد از شستشوی میکروذرات پارافین میزان انقباض آنها اندازه‌گیری شد.

که در آن A_f مساحت سطح مقطع نمونه پس از شستشو و خشک شدن و A_o 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^{۱۵} اندازه‌گیری شد و میانگین اندازه حفرات محاسبه شد. به منظور اندازه‌گیری درصد تخلخل در داربست‌ها از روش جابه‌جایی مایع^{۱۶} استفاده شد [۱۴]. در این تحقیق از ان‌هگزان به عنوان ماده‌ای جهت نفوذ به داخل تخلخل‌ها استفاده شد. در حجم مشخصی از ان‌هگزان (V_1) داربست انداخته شد؛ حجم ان‌هگزان وقتی داربست درون آن بود، اندازه گرفته شد (V_2). داربست از ان‌هگزان خارج و مجدداً حجم نهایی ان‌هگزان (V_3) اندازه‌گیری شد [۱۵].

$$V_A = V_2 - V_1 \quad (۱) \quad \text{حجم داربست}$$

$$V_B = V_1 - (V_2 + V_A) \quad (۲) \quad \text{حجم هگزان داخل تخلخل‌ها}$$



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

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 می‌شود، شکل میکروذرات در بازه ۴۲۰ تا ۶۰۰ 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 می‌یابد؛ بنابراین با توجه به آنچه بالاتر ذکر شد، در سرعت‌های پایین‌تر ذرات بزرگ‌تر و غیرکروی‌تر تشکیل می‌شوند. قابل ذکر است که با تغییر سرعت هم خوردن و غلظت محلول پلی‌وینیل‌الکل می‌توان 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 ۴۲۰ میکرومتر بیشتر از تعداد ذرات در بازه اندازه ۴۲۰ 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 ۴۲۰ میکرومتر و ۴۲۰ تا ۶۰۰ میکرومتر نشان می‌دهند. در این تحقیق از دو بازه اندازه ذرات ۲۵۰ تا ۴۲۰ و ۴۲۰ تا ۶۰۰ میکرومتر در ساخت داربست‌های گرادایانی استفاده شد. با توجه به اینکه

$$(۳) \text{ درصد تخلخل} = \frac{V_B}{V_A + V_B} \times 100$$

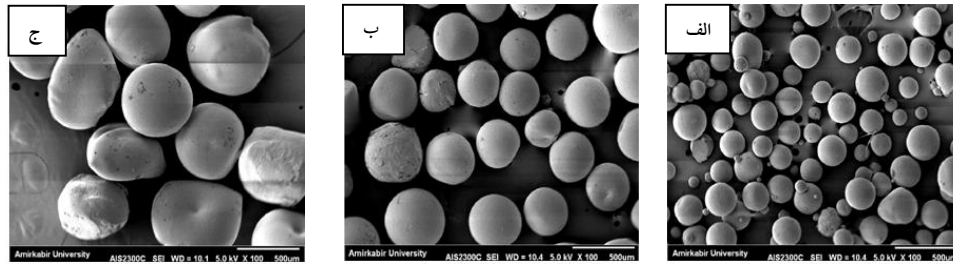
۲-۶- بررسی خواص مکانیکی

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 $^{\text{۱۷}}\text{Z}050$ و بر اساس استاندارد ای اس تی ام $^{\text{۱۸}}\text{D}5۷۵$ با بارگذاری ۲۵ کیلو نیوتن 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 اندازه‌گیری شد.

۳- نتایج و بحث

۳-۱- بررسی میکروسکوپی میکروذرات پارافین

در سال‌های اخیر از روش لایه‌به‌لایه و شستشوی ذرات تخلخل‌ساز جهت ایجاد گرادایان 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



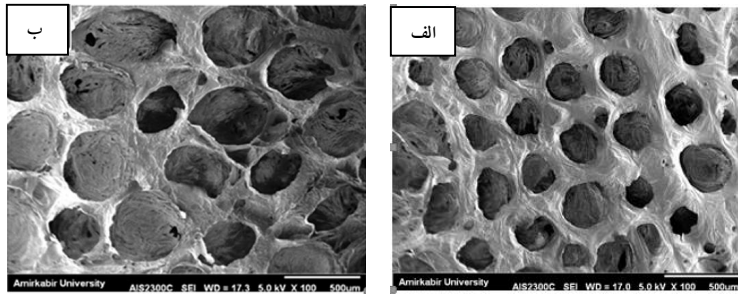
شکل ۲- تصاویر میکروسکوپی الکترونی روبشی از میکروذرات پارافین در بازه اندازه: الف) ۱۵۰ تا ۲۵۰ میکرومتر، ب) ۲۵۰ تا ۴۲۰ میکرومتر و ج) ۴۲۰ تا ۶۰۰ میکرومتر

نداشته است، همچنین راه در هم کردن تخلخل‌ها به سختی قابل کنترل بوده است [۱۲-۷]. این در حالی است که با استفاده از ذرات پارافین و دما دادن به آنها تا حدود ۳۰ تا ۳۲ درجه سانتی‌گراد و در نتیجه چسبندگی جزئی ذرات کروی تخلخل‌ساز به هم، امکان راه درهم تخلخل‌ها وجود دارد [۱۶]. در تحقیقی که در سال ۲۰۱۳ میلادی انجام شده است به منظور داشتن تخلخل‌های کروی از میکروذرات یخ به عنوان 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 اندازه‌گیری میزان انقباض پس از خشک شدن نمونه‌ها در دستگاه خشک‌کن انجمادی نشان داد که سطح مقطع و ارتفاع آنها تا حدی (حدود ۱۰ درصد) کاهش یافته است. انقباض داربست باعث کاهش جزئی اندازه تخلخل‌ها نسبت به اندازه ذرات پارافین استفاده شده به عنوان تخلخل‌ساز می‌شود [۲۰]. به طور کلی نیروی محرکه انقباض مواد پلیمری، حرکت زنجیره‌های پلیمری در نواحی آمورف است و احتمال انقباض در مواد نرم بالاتر است [۲۱]. تصاویر میکروسکوپی گرفته شده از سطح مقطع داربست‌ها، تخلخل‌های کروی شکل ایجاد شده توسط میکروذرات کروی پارافین و همچنین راه درهم بودن آنها را نشان می‌دهد. از جمله پارامترهای مهم در طراحی داربست، شکل تخلخل‌ها، مورفولوژی دیواره تخلخل‌ها و راه درهم بودن آنهاست؛ این موارد از پارامترهای مؤثر بر کشت، 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

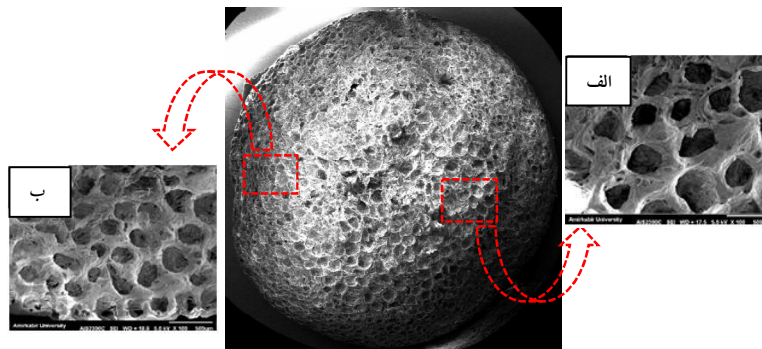
امکان انقباض جزئی داربست‌ها و در نتیجه تخلخل‌ها پس از سستشوی پروژن وجود داشت؛ علت به‌کارگیری این بازه اندازه ذرات، دستیابی به اندازه تخلخل‌های مناسب برای استفاده در مهندسی بافت استخوان بوده است [۱۷ و ۱۸]. طبق مطالعات انجام شده حداقل اندازه تخلخل مورد نیاز برای مهندسی بافت استخوان ۱۰۰ میکرومتر و حداقل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

۳-۲- بررسی میکروسکوپی ساختار داربست

در جدول (۱) انواع داربست‌های همگن و گرادپانی ساخته شده در این تحقیق آورده شده است. میانگین اندازه تخلخل‌ها در داربست همگن نوع یک با بازه اندازه ذرات پارافین ۲۵۰ تا ۴۲۰ میکرومتر، $11/2 \pm 278/5$ میکرومتر و در داربست همگن نوع دو با بازه اندازه ذرات پارافین ۴۲۰ تا ۶۰۰ میکرومتر، $14/6 \pm 417/8$ میکرومتر اندازه‌گیری 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 [۱۷ 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 تخلخل‌زا است [۱۹]. در اکثر مطالعات انجام شده روی داربست‌های گرادپانی امکان دستیابی به تخلخل‌های کروی وجود



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



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

میکروذرات پارافین به‌عنوان تخلخل‌ساز و ساخت داربست به صورت لایه‌لایه و با استفاده از دستگاه خشک‌کن انجمادی، روشی کارآمد و ساده جهت دستیابی به ساختار مطلوب در داربست‌های گرادایانی است.

۳-۳- بررسی درصد تخلخل

همان‌طور که در نمودار شکل (۵) مشخص است، نمونه همگن نوع دو با $3/5 \pm 61/3$ درصد تخلخل، کمترین درصد تخلخل را در بین چهار نمونه ساخته شده دارد. درصد تخلخل داربست همگن نوع یک، $1/25 \pm 77/5$ درصد، گرادایانی نوع یک، $0/5 \pm 74$ درصد و داربست گرادایانی نوع دو، $4 \pm 79/8$ درصد اندازه‌گیری شده است. بنابر تحقیقات انجام شده درصد تخلخل بالای 70 درصد برای زنده‌مانی و رشد سلول‌ها مورد نیاز است [۲۵]. طبق مطالعات انجام شده درصد تخلخل داربست‌ها با سرعت تخریب نسبتاً بالا نباید از 90 درصد بالاتر باشد [۶]. در داربست همگن نوع یک با بازه اندازه ذرات تخلخل‌ساز

داربست همگن نوع یک تعدادی حفره کوچک دیده می‌شود؛ این حفره‌ها می‌توانند به علت عدم نفوذ کامل و توزیع غیریکنواخت محلول پلیمری بین ذرات تخلخل‌ساز ایجاد شده باشند [۱۶].

گرادیان شعاعی ایجاد شده در تصاویر میکروسکوپی شکل (۴) قابل مشاهده است. همان‌طور که در شکل (۴) مشخص است، در داربست گرادایانی نوع دو تخلخل‌ها در لایه میانی بزرگ‌تر از تخلخل‌های لایه خارجی هستند، این در حالی است که در داربست گرادایانی نوع یک لایه داخلی تخلخل‌هایی کوچک‌تر از لایه خارجی دارد. در این شکل پیوستگی و اتصال کامل بین دو لایه داربست، بدون مشاهده فصل مشترک بین لایه‌ها به‌وضوح نمایان است. لازم به‌ذکر است که وجود فصل مشترک پوسته‌ای شکل بین لایه‌های داربست یکی از محدودیت‌های ایجاد گرادایان به روش نشانندن لایه‌به‌لایه بوده است [۱۲]. در تحقیقی دیگر با به‌کارگیری روش تفت‌جوشی لیزر انتخابی زبری سطح نمونه نهایی استفاده از این روش را جهت ایجاد گرادایان در تخلخل با محدودیت روبه‌رو می‌کند [۱۱]. بنابراین می‌توان نتیجه گرفت که استفاده از

سانتریفیوژ و بالاتر بودن میانگین اندازه تخلخل‌ها در هر لایه در داربست نسبت به داربست‌های گرادایانی این تحقیق باشد. در سال ۲۰۱۱ میلادی با استفاده از روش نمونه‌سازی سریع دو نوع داربست همگن و دو نوع داربست گرادایانی ساخته شد. نتایج به‌دست آمده نشان داد که درصد تخلخل داربست‌های گرادایانی (۵۶ و ۶۰ درصد) تقریباً برابر با میانگین درصد تخلخل به‌دست آمده برای داربست‌های همگن (۳۱ و ۸۰ درصد) بوده است [۷]. همان‌طور که دیده می‌شود درصد تخلخل داربست‌های گرادایانی پایین‌تر از اعداد به‌دست آمده در تحقیق حال حاضر است، علت این تفاوت را می‌توان با تفاوت در نوع گرادایان ایجاد شده و هندسه داربست‌ها توجیه کرد. در تحقیقی با استفاده از روش شستشوی ذرات پروژن و نشان دادن لایه‌به‌لایه، درصد تخلخل‌های به‌دست آمده برای لایه‌های مختلف داربست گرادایانی از پایین به بالا، به‌ترتیب حدود ۶۵، ۷۲، ۷۷، ۸۵ 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 گرادایانی آورده شده است. در جدول (۲) نیز مقادیر اندازه‌گیری 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 گرادایانی نوع دو (D۴۲۰) 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 [۱۶ و ۲۶]. طبق رابطه فانی و نیوگی^{۱۹} با افزایش درصد تخلخل میزان استحکام کاهش می‌یابد [۲۷].

$$E = E_S \left(1 - \frac{p}{p_c}\right)^f \quad (4)$$

در این رابطه E مدول یانگ ماده متخلخل، E_S مدول یانگ ماده جامد، p درصد تخلخل ماده متخلخل و p_c درصد تخلخل ماده

۲۵۰ تا ۴۲۰ میکرومتر، تخلخل $1/25 \pm 77/5$ درصد است؛ در حالی که تخلخل در داربست همگن نوع دو، $3/5 \pm 61/3$ درصد است. علت این تفاوت را می‌توان این‌گونه شرح داد: طبق تحقیق انجام شده در این رابطه، کوچک‌تر بودن اندازه ذرات تخلخل‌ساز می‌تواند باعث توزیع غیریکنواخت‌تر محلول پلیمری در بین میکروذرات شود. در واقع هرچه میکروذرات کوچک‌تر باشند نفوذ محلول پلیمری بین آنها سخت‌تر خواهد بود. این امر می‌تواند باعث ایجاد حفره و حباب و یا باریک شدن دیواره تخلخل‌ها و در نتیجه افزایش درصد تخلخل شود [۱۶].

در داربست‌های گرادایانی 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. با استناد به دلیل گفته شده برای داربست‌های همگن و با توجه به اینکه در این داربست‌ها جرم تخلخل‌ساز و پلیمر در لایه داخلی کمتر از لایه خارجی است؛ می‌توان کمتر بودن درصد تخلخل داربست گرادایانی نوع یک نسبت به داربست گرادایانی نوع دو را توجیه کرد. در داربست گرادایانی نوع یک بازه اندازه ذرات تخلخل‌ساز در لایه داخلی ۲۵۰ تا ۴۲۰ میکرومتر و در لایه خارجی ۴۲۰ تا ۶۰۰ میکرومتر و در داربست گرادایانی نوع دو، بازه اندازه ذرات تخلخل‌ساز در لایه داخلی ۴۲۰ تا ۶۰۰ میکرومتر و لایه خارجی ۲۵۰ تا ۴۲۰ میکرومتر است؛ در نتیجه مقدار ذرات با بازه اندازه پایین‌تر در داربست گرادایانی نوع دو بیشتر از داربست گرادایانی نوع یک بوده و احتمال توزیع غیریکنواخت محلول پلیمری و تشکیل حفره و در نتیجه بیشتر بودن درصد تخلخل در این نوع داربست بیشتر خواهد بود.

درصد تخلخل برش‌های مختلف از داربست‌های گرادایانی ساخته شده با روش سانتریفیوژ، بین ۸۰ تا ۹۴ درصد به‌دست آمده است؛ قابل ذکر است که با کنترل سرعت سانتریفیوژ امکان تغییر اندازه و درصد تخلخل‌ها وجود دارد [۸]. درصد تخلخل این داربست‌ها در مقایسه با تحقیق حال حاضر بیشتر است علت این امر می‌تواند راه درهم‌تر بودن تخلخل‌ها در روش

جدول ۱- انواع داربست‌های همگن و گرادایانی

نوع داربست	بازه اندازه ذرات تخلخل‌ساز (میکرومتر)
همگن نوع یک	۲۵۰-۴۲۰
همگن نوع دو	۴۲۰-۶۰۰
گرادایانی نوع یک	لایه میانی ۲۵۰-۴۲۰ لایه خارجی ۴۲۰-۶۰۰
گرادایانی نوع دو	لایه میانی ۴۲۰-۶۰۰ لایه خارجی ۲۵۰-۴۲۰

جدول ۲- استحکام و مدول فشاری داربست‌ها

داربست	استحکام فشاری در ۸۰ درصد کرنش (مگاپاسکال)	مدول فشاری (مگاپاسکال)
همگن نوع یک	۰/۱۶±۰/۱۶	۰/۲۵±۰/۱۱
همگن نوع دو	۰/۲۶±۰/۲	۰/۵۳±۰/۳۴
گرادایانی نوع یک	۰/۱۹±۰/۳۴	۰/۳۳±۰/۴۳
گرادایانی نوع دو	۰/۱۲±۰/۲۸	۰/۱۷±۰/۵۱

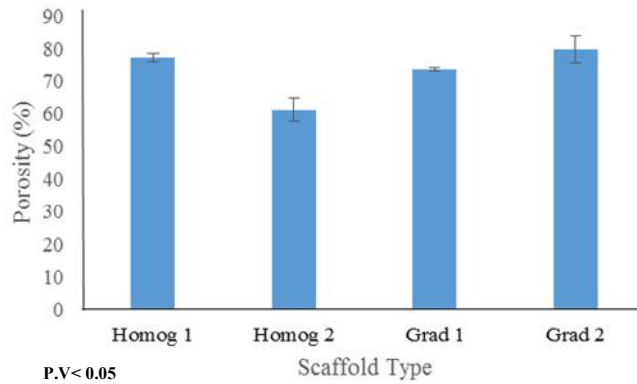
است زمانی که مدول پانگ صفر می‌شود. f نیز پارامتری وابسته به مورفولوژی و هندسه تخلخل‌هاست.

همان‌طور که دیده می‌شود، نمونه همگن شماره دو با کمترین درصد تخلخل بیشترین خواص مکانیکی را از خود نشان داده است و همان‌طور که انتظار می‌رفت، داربست گرادایانی نوع دو با ۸۱ درصد تخلخل پایین‌ترین خواص مکانیکی را دارد. با بررسی و مقایسه نمودار تنش-کرنش همه نمونه‌ها، می‌توان گفت که گرادایانی کردن اندازه تخلخل در داربست‌ها تأثیر چندانی بر خواص مکانیکی داربست نداشته است.

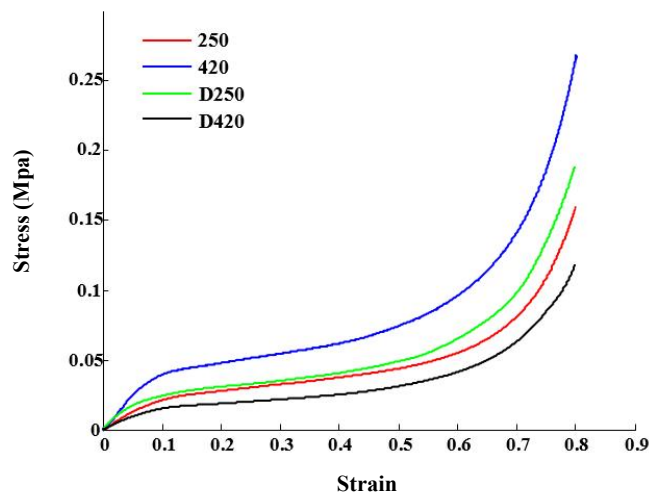
با مقایسه خواص مکانیکی دو نوع داربست گرادایانی دیده می‌شود که داربست گرادایانی نوع یک خواص مکانیکی بهتری از خود نشان داده است. با توجه به درصد تخلخل پایین‌تر این نمونه نسبت به داربست گرادایانی نوع دو همین انتظار می‌رفت. در دو نوع داربست همگن نیز علت تفاوت خصوصیات مکانیکی از جمله استحکام و مدول فشاری، تفاوت درصد تخلخل در این دو نمونه است. داربست همگن نوع یک با

درصد تخلخل بالاتر نسبت به داربست همگن نوع دو، خواص مکانیکی پایین‌تری 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 می‌تواند بر زنده‌مانی و رشد سلول اثر منفی داشته باشد.

نتایج حاصل از بررسی خواص مکانیکی داربست‌های گرادایانی ساخته شده به روش سانتریفیوژ نشان داد که در برش‌هایی از داربست که میانگین اندازه تخلخل‌ها بالاتر بوده، خواص مکانیکی پایین‌تر 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 سانتی‌گراد) و در نتیجه اتصال جزئی فیبرهای پلیکاپرولاتون خواص مکانیکی تا حد زیادی افزایش یافته است [۸]. البته به‌علت اینکه در تحقیق حال حاضر خواص مکانیکی داربست‌ها به‌صورت کلی و نه لایه‌به‌لایه اندازه‌گیری شده است و همچنین گرادایان به‌صورت شعاعی



شکل ۵- درصد تخلخل داربست‌ها



شکل ۶- نمودار تنش- کرنش داربست همگن نوع یک (۲۵۰)، همگن نوع دو (۴۲۰)، گرادپانی نوع یک (D۲۵۰) و گرادپانی 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 گرادپان و یا حتی تفاوت در شرایط بررسی خواص مکانیکی داربست، مثل ابعاد آن باشد.

۴- نتیجه‌گیری

سادگی روش استفاده شده جهت ایجاد گرادپان در تخلخل، در مقایسه با روش‌هایی مانند روش چرخشی و روش سانتریفیوژ، در

ایجاد شده است؛ امکان مقایسه خواص مکانیکی با دیگر تحقیق‌ها به‌طور دقیق وجود ندارد. طی تحقیقی که در سال ۲۰۱۱ میلادی روی داربست‌های همگن و گرادپانی ساخته شده طی تحقیقی که در سال ۲۰۱۱ میلادی روی داربست‌های همگن و گرادپانی ساخته شده به‌روش نمونه‌سازی سریع انجام شده است، مدول الاستیک داربست‌های گرادپانی عددی پایین‌ترین و کمترین مقدار مدول الاستیک داربست‌های همگن بوده است. علت این امر تفاوت در خواص مکانیکی و درصد تخلخل داربست‌ها است. به‌طور کلی هرچه درصد تخلخل کل داربست بیشتر باشد، خواص مکانیکی داربست ضعیف‌تر

درصد تخلخل داربست‌های گرادیدانی ساخته شده در این تحقیق جهت استفاده در مهندسی بافت استخوان مناسب بوده است (بالاتر از ۷۰ درصد). درصد تخلخل داربست‌های گرادیدانی در مقایسه با نمونه‌های ساخته شده با روش نمونه‌سازی سریع، با وجود اندازه تخلخل‌های کوچک‌تر بالاتر بوده است؛ علت این امر می‌تواند تفاوت در نوع گرادیدان ایجاد شده و هندسه داربست‌ها باشد. نتایج آزمون فشار نشان داد که گرادیدانی 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 می‌توان نتیجه گرفت که استفاده از پلی‌کاپرولاکتون به‌تهایی در ساخت داربست جهت استفاده در مهندسی بافت استخوان مناسب نیست.

دسترس بودن تجهیزات مورد نیاز و پایین بودن هزینه فرایند ساخت در مقایسه با دیگر روش‌ها به‌ویژه روش نمونه‌سازی سریع و تفجوشی لیزر انتخابی از مزیت‌های ابداع این روش بوده است. تولید و استفاده از میکروذرات پارافین به‌عنوان تخلخل‌ساز امکان دستیابی به تخلخل‌های کروی، امکان راه درهم کردن تخلخل‌ها و عدم نیاز به استفاده از حلال‌های سمی و خطرناک پلی‌کاپرولاکتون مثل کلروفرم را فراهم آورد. در این تحقیق پیوستگی کامل بین دو لایه داربست گرادیدانی، بدون وجود فصل مشترک قابل مشاهده بین آنها، نتیجه شد.

در روش استفاده شده امکان کنترل بازه اندازه تخلخل‌ها در ساختار داربست گرادیدانی با تغییر اندازه ذرات تخلخل‌ساز در هر لایه وجود دارد؛ اما در روش‌هایی مانند روش سانتریفیوژ و روش چرخشی کنترل اندازه تخلخل‌ها به‌راحتی امکان‌پذیر نخواهد بود.

واژه‌نامه

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

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

مراجع

1. Lanza, R., Langer, R., and Vacanti, J., *Principle of Tissue Engineering*, 3rd ed., Academic Press, p. 1344, 2007.
2. 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.
3. 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.
4. 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. Moztaezadeh, F., Rabiei, M., and Nourmohammadi, Zh., *Application of Composites in Biomedical Engineering*, 3rd ed., Amirkabir University Press, 2015.
6. Karageorgiou, V., and Kaplan, D., "Porosity of 3D Biomaterial Scaffolds and Osteogenesis", *Biomaterials*, Vol. 26, pp. 5474-5491, 2005.
7. 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 Biomaterialia*, Vol. 7, pp. 1009-1018, 2011.

8. 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.
9. 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.
10. 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.
11. 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.
12. 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.
13. 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.
15. 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.
16. 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 Biomaterialia*, Vol. 4, pp. 1637-1645, 2008.
19. 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 (α -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.
27. Phani, K. K., and Niyogi, S., "Young's Modulus of Porous Brittle Solids", *Journal of Materials Science*, Vol. 22, pp. 257-263, 1987.