

ساخت، مشخصه‌یابی و بررسی خواص مکانیکی و زیستی داربست هیبریدی نانوکامپوزیتی استخوانی از جنس آپاتیت / ژلاتین - کیتوسان به روش زیست تقلیدی

مجید راز^۱، فتح‌الله مضطرزاده، محمد علی شکرگزار^۲، مازیار عاشوری^{۱*} و محمدرضا تحریری^۱

۱. دانشکده مهندسی پزشکی، دانشگاه صنعتی امیرکبیر، تهران، ایران

۲. بانک سلولی، انستیتو پاستور ایران، تهران، ایران

(دریافت مقاله: ۱۳۹۰/۱۲/۰۳ - دریافت نسخه نهایی: ۱۳۹۱/۰۴/۳۱)

چکیده -

در این پژوهش، داربست‌های نانوکامپوزیتی از جنس آپاتیت / ژلاتین - کیتوسان را با روش زیست تقلیدی (Biomimetic) تهیه و با استفاده از روش‌های رایج (FTIR، SEM، XRD) مشخصه‌یابی و خواص مکانیکی و زیستی آن‌ها را بررسی کردیم. نتایج نشان داد که داربست‌های تهیه‌شده دارای خواص مکانیکی و زیستی مناسبی برای استفاده در مهندسی بافت استخوان می‌باشد.

واژگان کلیدی:

Preparation, characterization and evaluation of mechanical and biological characteristics of hybrid apatite/ gelatin- chitosan nanocomposite bone scaffold via biomimetic method

M. Raz¹, F. Moztarzadeh¹, M.A. Shokrgozar², M. Ashuri¹ and M. Tahriri¹

1. Biomaterials Group, Faculty of Biomedical Engineering, Amirkabir University of Technology, Tehran, Iran

2. National Cell Bank of Iran, Pasteur Institute of Iran, Tehran, Iran

Abstract: In this project, we prepared biomimetic nanocomposite scaffolds from gelatin and chitosan and hydroxyapatite and subsequently the scaffolds were evaluated by common used bulk technique. For this purpose, the nanocomposite hydrogel/apatite

*: مسئول مکاتبات، پست الکترونیکی: abbasashuri@aut.ac.ir

bone tissue engineering scaffolds were fabricated using applied biomimetic method accompanied with freeze drying technique. The apatite was precipitated using double diffusion mechanism within gelatin hydrogel in similar pH and temperature to the human body. Chitosan initial percentage (20, 30 and 40%) was set as variables. Nanocomposites were soaked in glutaraldehyde solution in order to enhance mechanical properties and make them insoluble in water. Diffusion of calcium and phosphate from lateral hydrogel into the middle hydrogel caused formation of parallel white layer-formed precipitate. Analysis of precipitates formed within middle hydrogel for the samples, showed that detected materials are composed of carbonated hydroxyapatite and dicalcium phosphate dihydrate (DCPD, brushite). Also, mechanical behavior obtained for the scaffolds were comparable with spongy bone. With increasing chitosan in the composite scaffold, the water up-take was increased from 379 to 661%. Phase composition, microstructure and structural groups in the composite samples were also characterized by X-Ray Diffraction (XRD), scanning electron microscopy (SEM) and Fourier transform infra-red (FTIR) analyses. Eventually, the obtained results showed that the composite contains 20% chitosan had appropriate properties for fabricating bone scaffold.

Keywords: Nanocomposite, Biomimetic, Scaffold, Bone, Gelatin- chitosan, Apatite

۱- مقدمه

مهندسی بافت^۱ حوزه‌ی چندگانه‌ای از دانش است که قصد دارد اصول مهندسی و علوم زیستی را در جهت گسترش جایگزین‌های بیولوژیکی با هدف بازسازی، ترمیم و حفظ یا ارتقای قابلیت بافت به کار گیرد. بر خلاف کاربری زیست‌مواد^۲ کلاسیک، مهندسی بافت بر پایه‌ی شناخت از چگونگی شکل‌گیری و بازسازی بنا شده نه اینکه صرفاً هدف، کاشت یک قطعه‌ی جایگزین بافتی باشد. از دیدگاه بیولوژیکی برای رشد بافتی مانند استخوان نیاز به سلول، ماتریس خارج سلولی، ارتباط میان سلولی، اندرکنش ماتریس‌ها و سلول‌ها و فاکتورهای رشد است. هر بافتی از یک ماتریس و دسته‌ای از سلول‌ها تشکیل شده است. ماتریس مذکور یک داربست سه-بعدی برای سلول‌هاست که قابلیت امکان رشد سلول‌ها را در محیطی مناسب فراهم می‌کند. همچنین، ماتریس به‌عنوان منبعی از آب، مواد غذایی، فاکتورهای رشد^۳ برای سلول‌ها عمل می‌کند. بنابراین به منظور بازسازی و حفظ بافت، جایگزینی موقتی برای تکثیر سلولی و ایجاد ماتریس بین سلولی تا شکل‌گیری بافت جدید نیاز است. علاوه بر این، داربست^۴ باید محیطی مناسب برای رگ‌زایی بافت جدید ایجاد کند. بنابراین، یک داربست سه‌بعدی با خصوصیات مناسب، یک ضرورت جدی در مهندسی بافت شناخته می‌شود [۱].

داربست‌ها به طور کلی باید ویژگی‌های خاصی از قبیل زیست‌سازگاری^۵، خواص شیمیایی و فیزیکی مناسب، نرخ

تخریب‌پذیری مطلوب، تخلخل^۶ بالا و خواص مکانیکی متناسب با بافت هدف را دارا باشند. داربست‌های مورد استفاده در مهندسی بافت استخوان، علاوه بر زیست‌سازگاری، باید درصد تخلخل بالا به همراه حفرات به هم مرتبط^۷ و در عین حال، استحکام مطلوب داشته و تحریک‌کننده و هادی رشد بافت استخوان^۸ باشند [۲].

در بین انواع مواد مختلف، سرامیک‌ها به علت تردی و پلیمرها به دلیل عدم استحکام کافی، ایجاد سمیت سلولی و رهایش محصولات نامطلوب ناشی از تخریب‌شان، عملکرد کاملاً ایدئالی از خود به عنوان داربست بافت استخوانی به نمایش نگذاشته‌اند. لذا کامپوزیت‌ها که اکثراً پلیمری/سرامیکی بودند، با توجه به خصوصیات ویژه‌شان نظیر استحکام مناسب و قابل تنظیم و کارایی مطمئن‌تر، به عنوان نسل بعدی این جایگزین‌ها مطرح شدند. داربست‌های کامپوزیتی ساخته شده برای جایگزینی بافت استخوانی، اکثراً شامل یک فاز معدنی مانند هیدروکسی آپاتیت (HA) یا تری کلسیم فسفات (TCP) به همراه یک پلیمر سنتزی مانند PLA، PGA یا PLGA و یا طبیعی مانند کلاژن، آلجینات، کیتوسان و ژلاتین هستند [۳-۶]. با پیشرفت نانو تکنولوژی، امروزه کامپوزیت‌ها جای خود را به نانو کامپوزیت‌ها دادند. نانو کامپوزیت‌ها علاوه بر حفظ ویژگی‌های کامپوزیت‌های متداول، به علت دارا بودن سطح آزاد بیشتر، درگیری مکانیکی بیشتری با زمینه داشته و در صورت شکل‌گیری پیوندهای شیمیایی، تعداد آن‌ها و بنابراین استحکام افزوده شده ناشی از آن‌ها بالاتر خواهد بود.

از لحاظ بیولوژیکی نیز آزمایشات انجام شده روی نانوکامپوزیت‌ها، خصوصیات برتری را نشان داده‌اند [۷-۱۰]. از آنجا که استخوان طبیعی بدن مخلوطی از رشته‌های کلاژنی به همراه نانوکریستال‌های هیدروکسی آپاتیت است، بنابراین سیستم ژلاتین/هیدروکسی آپاتیت می‌تواند به عنوان یکی از نزدیک‌ترین نمونه‌های کامپوزیتی مصنوعی به استخوان طبیعی در مهندسی بافت سخت مورد استفاده قرار گیرد. به علت آنکه تحقیقات نشان‌دهنده‌ی پتانسیل آنتی ژنی کمی در مورد کلاژن است، و نیز یکسان نبودن خواص کلاژن‌های تجاری که باعث عدم پیش‌بینی درست خواص مواد سنتز شده می‌شود، در سال‌های اخیر محققان گرایش به استفاده از ژلاتین به جای کلاژن پیدا کرده‌اند [۲].

کیتوسان نیز به دلیل وجود گروه‌های آمینی و همچنین طبیعی بودن، از ویژگی‌های منحصر به فردی از جمله قابلیت سازگاری بیولوژیکی، قابلیت تجزیه‌ی بیولوژیکی، فعالیت ضد میکروبی^۹، ترمیم زخم و تسریع بهبود آن تا ۷۵٪، اثرات ضدتومور، غیرسمی بودن و سازگاری با ژن برخوردار است. آمین‌های کیتوسان در محیط اسیدی تبدیل به آمین نوع چهارم می‌شوند و در واقع کیتوسان به یک پلی‌کاتیون تبدیل می‌شود [۱۱].

رویکرد زیست‌تقلیدی یعنی اینکه اجزای تشکیل دهنده مجموعه زیست‌تقلیدی مشابه بافت‌های بدن بوده و همچنین از مکانیزم مشابه آنچه در بدن اتفاق می‌افتد برای شکل‌گیری بافت مدنظر استفاده شود [۱۲]. اغلب تحقیقات زیست‌تقلیدی در حوزه‌ی بافت استخوان مربوط به معدنی شدن^{۱۰} سازه‌های پلیمری یا هیدروژلی در شرایط مشابه بدن است [۱۳]. تحقیق در این حوزه شامل دو هدف اصلی است که عبارت‌اند از مطالعه‌ی چگونگی تشکیل استخوان در بدن با استفاده از شبیه‌سازی شرایط مشابه بدن در محیط آزمایشگاه و همچنین تلاش برای ساخت جایگزین استخوانی که حداکثر شباهت را با بافت استخوان طبیعی داشته باشد. عموماً در این فرایندها تلاش شده است تا یک سازه‌ی پلیمری هیدروژلی

(هیدروژل‌های طبیعی نظیر کلاژن، ژلاتین، آلجینات، کیتوسان یا پلیمرهای مصنوعی نظیر پلی وینیل الکل، پلی هیدروکسی اتیل متاکریلات، پلی لاکتیک اسید و ...) به نحوی در معرض یون‌های مورد نیاز (یون‌های کلسیم، فسفر و ...) قرار گرفته، درون محیطی با شرایط مشابه بدن، نحوه‌ی شکل‌گیری کریستال‌های کلسیم فسفات^{۱۱} (نظیر هیدروکسی آپاتیت و ...) مطالعه شوند [۱۴].

در روش‌های زیست‌تقلیدی مرسوم، اساس شبیه‌سازی بر فراهم آوردن یون‌های لازم برای رسوب نشانی فازهای آپاتیتی، عمدتاً بر روی سطح یک غشا یا سازه‌ی ضخیم‌تر پلیمری یا هیدروژلی بود، اما باید توجه داشت که در بدن انسان نحوه‌ی نقل و انتقال یون‌های سازنده‌ی فاز معدنی استخوان به محلی که بناست استخوان تشکیل شود، متفاوت از شرایطی است که در روش‌های قبلی بیان شد. یکی از تفاوت‌های عمده، در سرعت انتقال یون‌ها به این محل‌هاست. انتقال یون‌ها زمانی که یک غشای پلیمری در یک محلول یونی قرار می‌گیرد از طریق فرایند همرفت صورت می‌پذیرد و نسبتاً سریع است در حالی که داخل بدن، رسیدن یون‌ها به محل موردنظر با سرعت بسیار آهسته‌تر و با نفوذ از دیواره‌ی عروق و ماتریس خارج سلولی صورت می‌پذیرد. بنابراین، در راستای شبیه‌سازی نحوه‌ی تشکیل فاز معدنی استخوان، اعمال شرایطی که در آن یون‌های کلسیم و فسفات تحت فرایند نفوذ به یکدیگر رسیده و واکنش می‌دهند، اخیراً مورد توجه قرار گرفته‌اند. نحوه‌ی کار در آن‌ها به این صورت است که شرایطی فراهم می‌شود تا یون کلسیم و بنیان فسفات از دو جهت مقابل به درون یک سازه‌ی پلیمری (هیدروژلی) وارد شده و در آن‌جا با یکدیگر واکنش داده و باعث تشکیل نوعی فاز کلسیم فسفات^{۱۱} شوند [۱۵-۱۷]. شرایط زیست‌تقلیدی در این پروژه از چند دیدگاه شبیه بدن انتخاب شده بود که عبارت‌اند از:

الف- تشکیل فاز مینرالی در شرایط مشابه بدن از نظر دما و pH

ب- استفاده از هیدروژلی از جنس ژلاتین/ کیتوسان به عنوان نوعی سازه‌ی اولیه شبیه‌ساز غضروف پیش‌استخوانی؛

ج- استفاده از نفوذ دوسویه و شبیه‌سازی نفوذ یون‌ها از دیواره‌ی عروق و ماتریس خارج سلولی به سمت محل شکل‌گیری استخوان.

از دیدگاه مهندسی فاز رسوبی در این نانوکامپوزیت به عنوان فاز تقویت‌کننده‌ی ذره‌ای عمل کرده و روشن است که هر چه ابعاد ذرات ریزتر و اتصال آن‌ها به زمینه (هیدروژل) بیشتر باشد، خصوصیات مکانیکی بهتری را ارائه خواهد کرد. با توجه به اینکه در تحقیقات قبلی مطلوبیت خصوصیات مکانیکی داربست ژلاتین/هیدروکسی آپاتیت به روش اختلاط فیزیکی با یکدیگر در داخل حلال اثبات شده است، بنابراین داربست ساخته شده به این روش قطعاً خصوصیات مکانیکی بهتری خواهد داشت. هدف از این تحقیق، ساخت داربستی نانوکامپوزیتی با زمینه ژلاتین/کیتوسان و فاز ثانویه آپاتیتی به روش نفوذ دوگانه^{۱۱} و در شرایط زیست‌تقلیدی است.

۲- مواد و روش آزمایش

برای ساخت داربست‌های نانوکامپوزیتی در شرایط زیست‌تقلیدی نوعی سیستم نفوذ دوسویه‌ی یون‌های کلسیم و فسفات طراحی شد. این سیستم به گونه‌ای طراحی شد که هیدروژل ژلاتین

(Merck Co.; Product No. 104070)/کیتوسان (Sigma-Aldrich Co.; Product No. 448877, 75-85% deacetylated) در وسط و طرفین آن، دو محلول به عنوان منبع یون‌های کلسیم و فسفات قرار گرفتند. با گذشت زمان، این یون‌ها در اثر گرادیان غلظتی داخل هیدروژل نفوذ کرده و در آن رسوب می‌کنند که این روند، یادآور شکل‌گیری استخوان در غضروف ابتدایی در بدن است.

برای ساخت نمونه‌های زیست‌تقلیدی، در ابتدا محلول‌های ۵٪ وزنی ژلاتین/کیتوسان آماده شد. حجم محلول با توجه به اندازه‌ی قالب تعیین می‌شود. محلول ژلاتینی با

اضافه کردن تدریجی پودر ژلاتین به آب مقطر روی همزن با دمای حدود ۵۰-۶۰ درجه سانتیگراد انجام شد، ولی برای آماده‌سازی محلول حاوی کیتوسان بایستی محلول ۱٪ اسید استیک آماده و سپس کیتوسان را همانند ژلاتین به تدریج روی همزن، به آن اضافه کرد تا پودر کیتوسان به طور کامل حل شود. پس از اینکه محلول ژلاتین و کیتوسان به طور جداگانه آماده شد، آن‌ها را در یک بشر مخلوط کرده تا همزده شود و یک محلول یکنواخت ژلاتین/کیتوسان به دست آید. سپس محلول ژلاتین/کیتوسان درون قسمت میانی قالب ریخته شده و مجموعه برای شکل گرفتن هیدروژل به مدت یک روز در یخچال قرار می‌گیرد. پس از سفت شدن هیدروژل دیواره‌های موقت حذف شدند. در مرحله‌ی بعد، محلول ۰/۱ مولار CaCl_2 و ۰/۰۴ مولار Na_2HPO_4 تهیه شد و به کمک نمک Tris و هیدروکلریک اسید، pH آن‌ها روی ۷/۴ تنظیم شد. ابتدا محلول CaCl_2 در یک طرف قالب ریخته شد و پس از آن محلول Na_2HPO_4 نیز در طرف دیگر ظرف قالب ریخته شد و مجموعه دوباره به یخچال برگردانده شد و به مدت هفت روز در یخچال ماند. پس از گذشت این مدت، محلول‌ها در داخل ژل رسوب کرده و کامپوزیت تشکیل دادند. هیدروژل ژلاتین/کیتوسان از قالب خارج شده و قسمت کامپوزیت شده‌ی آن برش داده شد. نمونه‌ها به اندازه‌های حدود $20 \times 20 \times 2$ میلیمتر برش داده شده و سپس برای فرایند خشک‌کشی انجام‌دادی و ایجاد ساختار متخلخل ابتدا به مدت ۲۴ ساعت در فریزر و سپس ۲۴ ساعت در فریزدرایر قرار گرفتند. برای مطالعات بعدی، سطح نمونه‌ها با تیغ جراحی برش داده شد تا تخلخل‌های روی سطح مشخص شوند. در مرحله‌ی بعد، نمونه‌های آماده شده برای ایجاد پیوندهای عرضی بین زنجیره‌های ژلاتین و افزایش استحکام مکانیکی در محلول ۱٪ گلو تار آلدهید به مدت ۲۴ ساعت غوطه‌ور شده و بعد از شستشو با الکل و آب، با دستگاه فریز درایر خشک شدند. در نهایت، نمونه‌ها با محلول ۱٪ NaOH خنثی شده و مجدداً توسط فریز درایر خشک شدند. نمونه‌های خشک شده سپس

با سنباده پرداخته شده و به صورت نمونه‌های استاندارد برای آزمون استحکام مکانیکی درآمدند. سه نوع نمونه با نسبت‌های ژلاتین/کیتوسان ۲۰/۸۰، ۳۰/۷۰ و ۴۰/۶۰ آماده شد و آزمون خواص مکانیکی روی آن‌ها انجام شد. برای مشخصه‌یابی نمونه‌های تهیه شده قسمتی از آن‌ها را به صورت پودر درآورده که به دلیل خواص مکانیکی خاص کامپوزیت تهیه شده، تنها روش دستیابی به پودر، ساییدن آن بود که این کار با یک سوهان نرم انجام شد. قسمتی از نمونه‌های آماده شده پس از مرحله‌ی خشک‌کشی انجمادی، در محلول SBF (که مطابق با دستورالعمل پیشنهادی Tadashi Kokubo [۱۸] تهیه شد) در دمای ۳۷ درجه‌ی سانتیگراد و در بازه‌های زمانی ۱، ۳، ۷ و ۱۴ روز نگهداری شد. سپس نمونه‌ها از محلول SBF بیرون آورده شد و توسط دستگاه فریزدرایر خشک شد. نمونه‌های خشک شده برای مشخصه‌یابی دوباره به صورت پودر درآمدند.

مورفولوژی سطح نمونه‌ها توسط دستگاه Philips XL30 بررسی شد. وجود رسوب کلسیم فسفاتی روی سطوح نمونه توسط آزمون EDS مورد مطالعه قرار گرفت. همچنین با نرم‌افزار Image Tools[®] اندازه‌ی میانگین ذرات رسوبی تشکیل شده بر سطح نمونه‌ها نیز برآورد شد. نمونه‌ها طبق آزمون مکانیکی فشاری توسط دستگاه Zwick/Roell استفاده شد. به این طریق استحکام تسلیم فشاری، ضریب ارتجاعی و حداکثر کرنش قابل تحمل توسط نمونه‌ها اندازه‌گیری شدند. برای تعیین ترکیب شیمیایی از روش طیف‌سنجی فروسرخ با دستگاه FTIR مدل NEXUS FTIR 670 ساخت آمریکا در محدوده‌ی عدد موج $4000-400\text{ cm}^{-1}$ در حالت جذبی استفاده شد. برای مطالعه‌ی ساختار کریستالی از الگوهای پراش پرتو ایکس نمونه‌ها که توسط دستگاه INEL Equinox3000 تحت ولتاژ ۴۰ Kv و جریان ۳۰ mA گرفته شد، استفاده شد. در آزمایش‌ها، از اشعه ایکس Cu-k α با طول موج ۱/۵۴۰۵۶۰ آنگسترم استفاده شده است. محدوده‌ی روبش بین ۰ تا ۱۱۸ درجه انتخاب شد.

فازهای موجود با مقایسه‌ی زاویه تفرق پیک‌های XRD و میزان شدت مربوطه، مطابق با اطلاعات ثبت شده برای ترکیبات مختلف در پایگاه داده‌ی ICCD مورد بررسی قرار گرفته و نوع فازهای موجود در این نمونه‌ها شناسایی شدند. به منظور بررسی سمیت نمونه‌ها و تأثیر آن‌ها بر روند رشد و تکثیر سلولی، فرایند عصاره‌گیری براساس استاندارد ایزو ۵-۹۹۹۳ انجام شد که طی آن به هر نمونه به وزن ۰/۱ گرم، مقدار یک میلی‌لیتر محیط کشت افزوده شد. سپس در فواصل زمانی مشخص از محیط خارج و به سلول‌ها افزوده شد. مقدار مشخصی محیط کشت RPMI نیز به عنوان نمونه‌ی شاهد (کنترل) در نظر گرفته شد.

برای انجام کشت سلولی از سلول‌های استئوسارکومای انسانی (G292) که از بانک سلولی انستیتو پاستور گرفته شده بود، استفاده شد. پس از دفیز کردن سلول‌ها، آن‌ها را به فلاسک حاوی محیط کشت RPMI-10% FBS منتقل کرده و سپس فلاسک در انکوباتور در دمای ۳۷ درجه‌ی سانتیگراد، قرار داده شد. پس از آن سلول‌ها در محیط کشت حاوی عصاره‌ی داربست‌ها، به مدت ۳ روز کشت داده شد. در نهایت مورفولوژی سلول‌ها با استفاده از میکروسکوپ نوری معکوس بررسی شد.

آزمون بررسی سمیت (MTT assay) به منظور مطالعه‌ی سمیت داربست‌های ساخته شده انجام شد. برای انجام این آزمون، ابتدا برای جلوگیری از ایجاد شوک در سلول‌ها و همچنین اطمینان از چسبندگی آن‌ها به ظرف کشت، سلول‌ها ۲۴ ساعت قبل از اضافه کردن عصاره‌ها در ظروف کشت ۹۶ خانه‌ای انکوبه می‌شوند. مقدار سلول‌های هر خانه برابر با 10^4 و حجم هر خانه $100\text{ }\mu\text{l}$ است. سپس عصاره‌ی گرفته شده از داربست‌ها به خانه‌های پلیت افزوده شده و مجدداً به مدت ۲۴ ساعت انکوبه می‌شود. در مرحله بعد محیط کشت هر یک از خانه‌ها برداشته شده و محلول MTT آماده شده (5 mg/ml) در محلول PBS به میزان $100\text{ }\mu\text{l}$ به هر خانه اضافه می‌شود. پس از ۴ ساعت محلول MTT از روی سلول‌ها خارج شده و

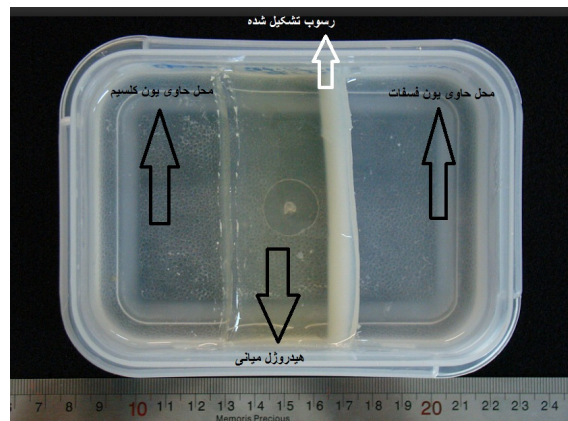
یون‌ها، رسوب سفیدرنگی درون هیدروژل شکل می‌گیرد، اما همان طور که در شکل (۱) نیز مشاهده می‌شود، این رسوب در وسط هیدروژل و در فاصله‌ی مساوی از دو منبع یونی قرار ندارد، بلکه در نزدیکی منبع یون $(\text{HPO}_4)^{2-}$ تشکیل شده است که با توجه به یکسان بودن غلظت و ترکیب هیدروژل زمینه در تمام نقاط، می‌توان این مطلب را به تفاوت ضریب نفوذ یون‌ها در هیدروژل نسبت داد. ضریب نفوذ اتم‌ها، یون‌ها و مولکول‌ها در یک محیط مشخص با استفاده از فرمول استاک-اینشتین، رابطه (۱)، قابل محاسبه است [۱۹]:

$$D = K_B T / 6\pi\eta r \quad (1)$$

که در آن T ، K_B ، r و η به ترتیب برابر با دما بر حسب کلوین، ثابت بولتزمن، شعاع مؤثر اتم یا یون مربوطه و ویسکوزیته برشی محیط هستند. با فرض ثابت ماندن دما در طول فرایند، شعاع یون در حال نفوذ و ویسکوزیته برشی (که مربوط به خصوصیات زمینه است)، تعیین‌کننده‌ی میزان ضریب نفوذ خواهند بود. با توجه به اینکه شعاع یونی Ca^{2+} نسبت به $(\text{HPO}_4)^{2-}$ کوچکتر است و با در نظر گرفتن معادله فوق، ضریب نفوذ یون کلسیم در زمینه بیشتر خواهد بود. بنابراین در زمان مساوی برای هر دو یون Ca^{2+} و $(\text{HPO}_4)^{2-}$ ، مسافت پیموده شده توسط یون کلسیم در زمینه‌ی هیدروژلی بیشتر است. در نتیجه، رسوب سفیدرنگ در فاصله کمتری نسبت به منبع یون $(\text{HPO}_4)^{2-}$ تشکیل می‌شود.

۳-۲- بررسی خواص مکانیکی تحت آزمون فشاری

سه نوع نمونه برای بررسی خواص مکانیکی داربست‌ها آماده شد و نمودار نیرو بر حسب جابه‌جایی هر نمونه به‌دست آمد و با استفاده از آن، مقادیر تنش و کرنش در هر لحظه محاسبه و نمودار تنش بر حسب کرنش برای هر سه نمونه ترسیم شد، شکل‌های (۲-الف) تا (۲-ج)، نیز نمودار تنش - کرنش هر سه نمونه را نشان می‌دهند. نمودار شامل سه قسمت الاستیک، پلاستیک و فشردگی است. منظور از قسمت فشردگی قسمتی است که در آن افزایش مجدد تنش پس از



شکل ۱- تصویر رسوب تشکیل شده در هیدروژل به روش نفوذ دوسویه.

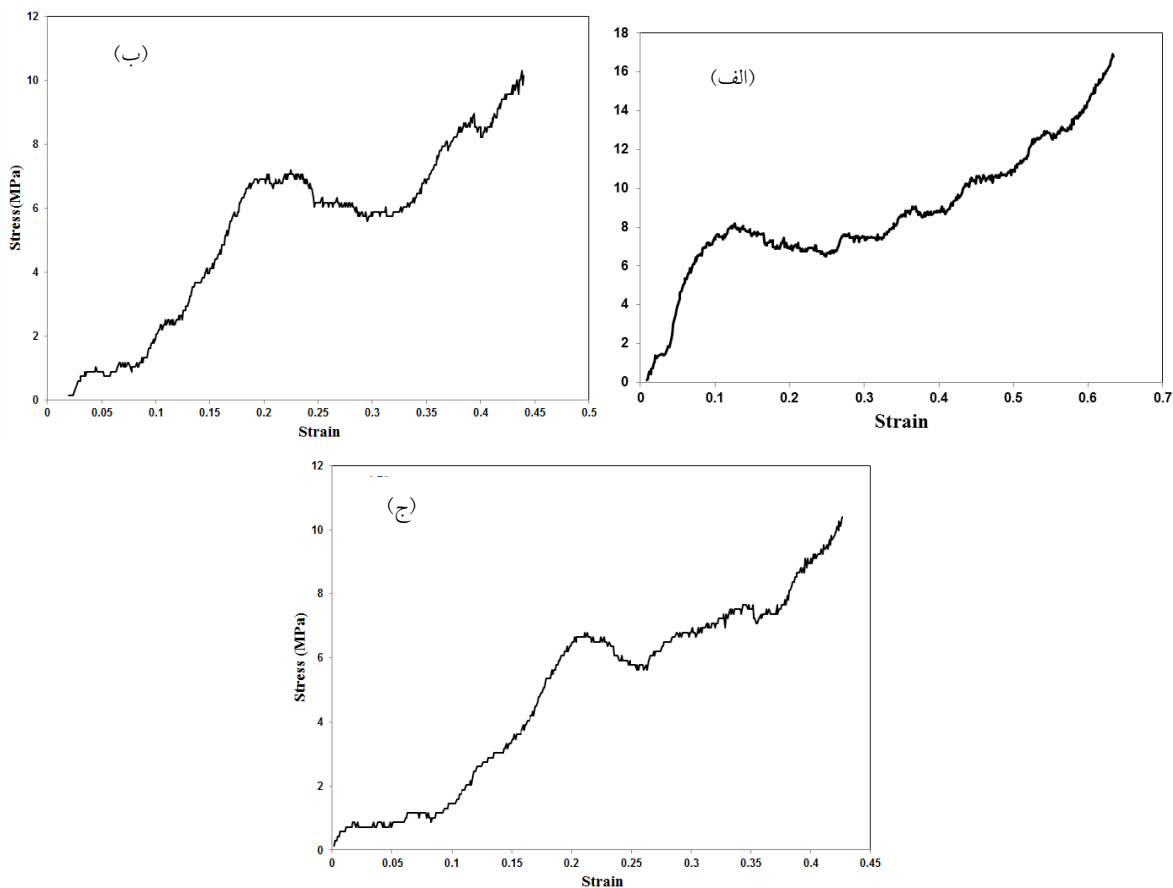
ایزوپروپانول به مقدار $100 \mu\text{l}$ اضافه می‌شود تا بلورهای بنفش رنگ ایجاد شده حل شود و در نهایت غلظت ماده‌ی حل شده در ایزوپروپانول در طول موج 545 nm محاسبه می‌شود.

در این پژوهش میزان آلکالین فسفاتاز ترشح شده از سلول‌های استئوبلاست قرار گرفته در مجاورت داربست‌ها پس از ۳ روز، با استفاده از دستگاه Autoanalyzer مدل Hitachi 902 ساخت کشور آلمان و کیت پارس آزمون ساخت ایران، ارزیابی شد. برای اندازه‌گیری، ابتدا 10^4 سلول را بر روی هر کدام از داربست‌ها ریخته و $100 \mu\text{l}$ محیط کشت را به هر کدام اضافه کرده و پس از ۳ ساعت نیز ۱ میلی‌لیتر محیط کشت اضافه کرده تا سلول‌ها بتوانند به داربست چسبیده و تکثیر شوند. پس از ۲۴ ساعت، ۱ میلی‌لیتر از محیط کشت به نمونه‌ها افزوده و بعد از ۳ روز محیط کشت روی نمونه‌ها جمع‌آوری شده و توسط دستگاه فوق، میزان آلکالین فسفاتاز موجود در نمونه‌ها اندازه‌گیری شد.

۳- نتایج و بحث

۳-۱- بررسی مکان تشکیل رسوب در هیدروژل

پس از ریختن یون‌ها در اطراف هیدروژل، به سبب نفوذ



شکل ۲- نمودار تنش - کرنش سه نوع داربست (الف) ۲۰/۸۰، (ب) ۷۰/۳۰ و (ج) ۴۰/۶۰.

بتوان گفت که علت این تفاوت، تشکیل بلورهای براشیت و آپاتیت در ابعاد نانو در داربست است، زیرا کاهش اندازه‌ی ذرات تا ابعاد نانو باعث افزایش سطح آزاد و در نتیجه افزایش ناحیه‌ی تماس فاز تقویت‌کننده با فاز زمینه شده و استحکام اتصال مکانیکی آن‌ها را چند برابر می‌سازد. افزون بر این، چنان که بعداً در آزمون طیف فرسرخ نیز بیان خواهد شد، وجود نوعی پیوند شیمیایی بین HA/ براشیت و ژلاتین (ماتریس و فاز تقویت‌کننده) موجب تقویت خواص مکانیکی کامپوزیت شده است که در داربست‌های ساخته شده مشابه وجود این نوع پیوند گزارش نشده است [۴].

در تحقیقات مشابه، تفاوت در مکانیزم جوانه‌زنی لایه

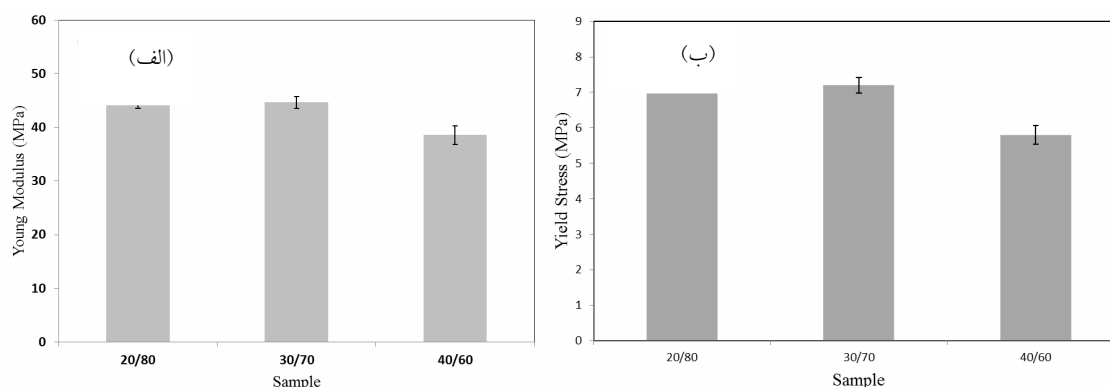
له‌شدگی نمونه رخ می‌دهد. در واقع این قسمت به علت وقوع شکست در ساختار متخلخل داربست به وجود آمده است که با افزایش تنش، حفره‌های داربست به تدریج پر شده و کرنش افزایش یافته است و این افزایش تا زمانی ادامه پیدا می‌کند که تمامی حفره‌ها پر شده و داربست به یک سازه‌ی توپر تبدیل - شود و پس از آن تنش به طور ناگهانی افزایش می‌یابد [۲۰].

مدول یانگ و استحکام تسلیم داربست ساخته شده، استخوان و یک نوع داربست کامپوزیتی دیگر ساخته شده با درصد و شرایط تقریباً مشابه برای مقایسه در جدول (۱) آمده است.

مدول یانگ و استحکام تسلیم به طور میانگین برای نمونه‌ها ۴۰ و ۷ مگاپاسکال به دست آمد. این مقادیر چند برابر مقادیر گزارش شده در داربست‌های مشابه است [۹]. شاید

جدول ۱- مدول یانگ داربست ساخته شده در این پژوهش در مقایسه با استخوان اسفنجی، استخوان فشرده و یک داربست دیگر [۹].

نمونه	مدول یانگ (MPa)	استحکام تسلیم (MPa)
داربست زیست تقلیدی ساخته شده در این پژوهش	40 ± 3	7 ± 0.5
داربست نانوکامپوزیتی ژلاتین-HA [۹]	40.1 ± 0.39	0.65
استخوان فشرده [۲۱]	$2-30 \times 10^3$	$180-130$
استخوان اسفنجی [۲۱]	$50-500$	$12-4$

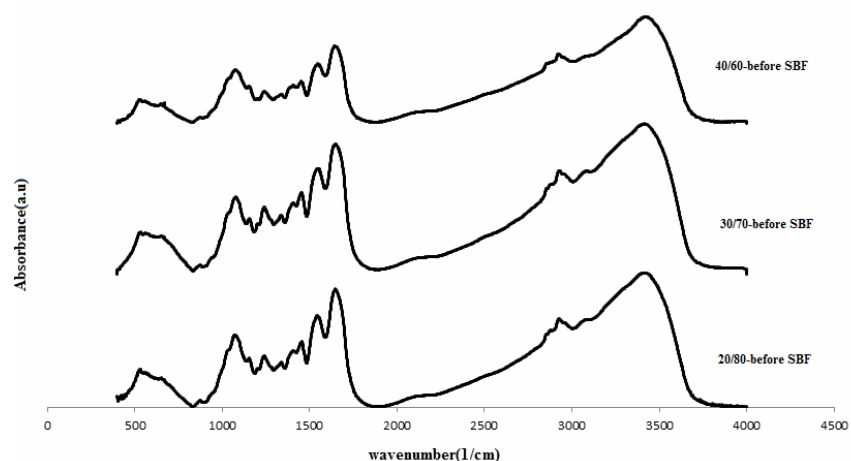


شکل ۳- نمودار (الف) مدول یانگ و (ب) استحکام تسلیم بر حسب نوع نمونه.

ذرات هیدروکسی آپاتیت بیشتر بروی سطح کامپوزیت‌های تهیه شده به صورت درجا و به روش زیست تقلیدی، مکان‌های جوانه زنی بیشتری برای جوانه زنی هیدروکسی آپاتیت بر روی سطح این کامپوزیت وجود داشته و وجود این مناطق باعث کاهش انرژی سطحی و در نهایت جوانه زنی لایه آپاتیت روی سطح کامپوزیت‌های تهیه شده به صورت درجا، به طور ناهمگن انجام می‌شود. دانسته بالا، نیمه‌کروی بودن و داشتن سختی بالاتر پوشش‌های ایجاد شده روی سطح کامپوزیت‌های تهیه شده به صورت درجا نیز به دلیل انجام شدن جوانه زنی ناهمگن روی سطح این مواد گزارش شده است [۴]. در مقایسه با استخوان‌های طبیعی، خصوصیات داربست در محدوده‌ی استخوان‌های اسفنجی قرار می‌گیرد [۲۱].

در شکل (۳) نیز مدول یانگ و استحکام تسلیم سه نوع نمونه تهیه شده به منظور مقایسه با یکدیگر آمده است. با

هیدروکسی آپاتیت روی سطح هر یک از این دو نوع کامپوزیت به عنوان علت تفاوت‌های خواص مکانیکی مطرح شده است. ایجاد لایه هیدروکسی آپاتیت روی سطح می‌تواند به دو صورت همگن (هموژن) و یا ناهمگن (هتروژن) صورت پذیرد. جوانه زنی توسط هر یک از این دو مکانیزم توسط انرژی سطح مشترک و ترکیب شیمیایی محلول تعیین می‌شود، در حالی که ترکیب شیمیایی محلول برای هر دو کامپوزیت یکسان باشد، عامل دوم یعنی انرژی سطح مشترک در تعیین نوع مکانیزم جوانه زنی مؤثر خواهد بود که خود، توسط ترکیب شیمیایی و مشخصات سطحی ماده تعیین می‌شود. از سوی دیگر سطوحی که روی آن‌ها جوانه زنی به صورت ناهمگن انجام می‌گیرد، دارای انرژی سطح مشترک کمتری نسبت به سطوحی هستند که جوانه زنی روی آن‌ها به صورت همگن انجام می‌شود. بر این اساس به دلیل حضور



شکل ۴- طیف فروسرخ سه نوع نمونه قبل از قرارگیری در SBF.

جدول ۲- اعداد موجی مشاهده شده و نوع باند شیمیایی مربوط به نمونه‌ها قبل از قرارگیری در SBF [۲۲].

محدوده عدد موجی (cm^{-1})			نوع پیوند	نوع ترکیب
نمونه ۴۰/۶۰	نمونه ۳۰/۷۰	نمونه ۲۰/۸۰		
۳۴۲۷	۳۴۱۲	۳۴۱۰	O-H Stretch	رطوبت همراه نمونه
۲۹۲۴	۲۹۲۸	۲۹۲۷	C-H	زمینه (آمید B)
۱۶۴۲	۱۶۶۴	۱۶۴۷	C=O Stretch	زمینه (آمید نوع I)
۱۵۴۷	۱۵۴۷	۱۵۴۱	N-H bend	زمینه (آمید نوع II)
۱۴۵۲	۱۴۵۳	۱۴۵۵	CO ₃	کربنات (آپاتیت)
۱۳۳۷	۱۳۳۷	۱۳۳۷	Ca-COO	زمینه - فاز رسوبی
۱۲۴۰	۱۲۴۰	۱۲۴۰	N-H	زمینه (آمید نوع III)
۱۰۷۶	۱۰۷۸	۱۰۷۵	C-N	زمینه
۸۶۲	۸۶۰	۸۷۲	CO ₃	کربنات (آپاتیت)
۶۱۷	۶۱۹	۶۰۰	Liberational OH	هیدروکسی آپاتیت
۵۲۴	۵۳۱	۵۳۰	v ₂ PO ₄ bend	کلسیم فسفات

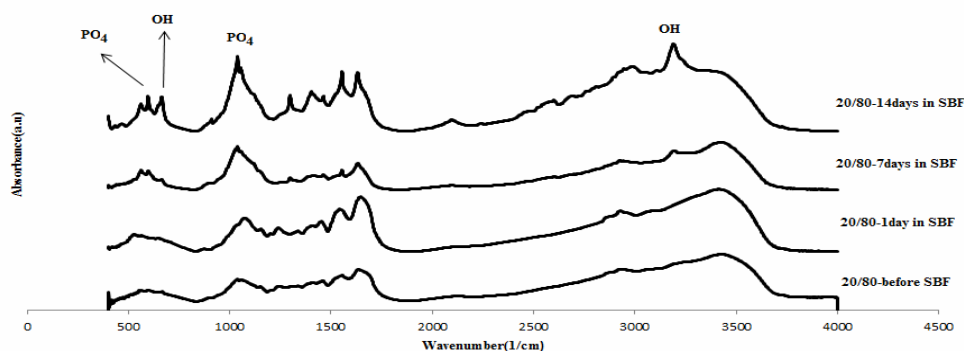
۳-۳- بررسی نتایج آزمون طیف‌سنجی فروسرخ

FTIR) داربست‌ها قبل و بعد از قرارگیری در SBF

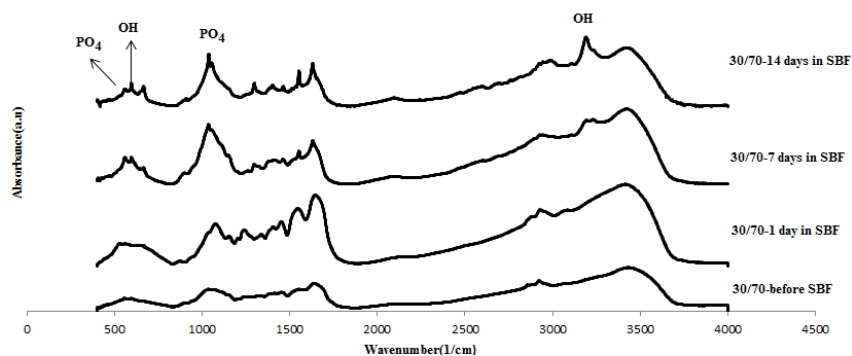
شکل (۴) نمودارهای طیف فروسرخ نمونه‌های ۲۰/۸۰،

۳۰/۷۰ و ۴۰/۶۰ را قبل از قرارگیری در SBF نشان می‌دهد.

مقایسه‌ی این داده‌ها می‌توان دریافت که با افزایش میزان کیتوسان در نمونه‌ها خواص مکانیکی کاهش یافته است. این مشاهده با نتایج به‌دست آمده توسط آقای تین-هان و همکارانش مشابهت دارد [۱۰].



شکل ۵- طیف فروسرخ نمونه ۲۰/۸۰ پس از قرارگیری در SBF به مدت ۱، ۷ و ۱۴ روز.



شکل ۶- طیف فروسرخ نمونه ۳۰/۷۰ پس از قرارگیری در SBF به مدت ۱، ۷ و ۱۴ روز.

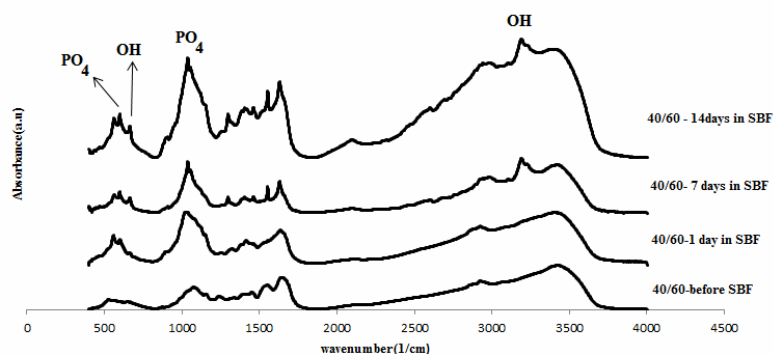
1337cm^{-1} به علت وجود پیوند میان گروه‌های کربوکسیل از ژلاتین و یون کلسیم از فاز رسوبی است. حضور این پیوند اتصال فاز رسوبی به زمینه را تأیید می‌کند [۴].

با مقایسه‌ی پیک‌های شکل (۳) می‌توان مشاهده کرد که در تمامی نمونه‌ها قبل از قرارگیری در SBF، پیک‌های مشابهی دیده می‌شود که می‌تواند به سبب حضور پیوندهای مشابه در ساختار نمونه‌ها باشد و این مطلب نشانگر آن است که تغییر نسبت ژلاتین به کیتوسان تأثیر چندانی در نوع پیوندهای تشکیل شده نداشته است.

شکل‌های (۵) تا (۷) نتایج این آزمون را برای هر سه دسته نمونه پس از اینکه به مدت زمان‌های ۱، ۷ و ۱۴ روز در SBF قرار گرفتند، نشان می‌دهد. در طیف فروسرخ نمونه‌ها

در جدول (۲) نیز تمامی پیک‌های موجود در طیف فروسرخ به دست آمده از نمونه‌ها به همراه نوع ترکیب و پیوند مربوطه آورده شده است.

علی‌رغم تعداد زیاد پیک‌های مشاهده شده، می‌توان آن‌ها را به سه دسته تقسیم کرد. این دسته‌بندی شامل اعداد موجی مختص ژلاتین و کیتوسان (فاز زمینه)، فاز رسوبی و دسته سوم اعداد موجی مربوط به ارتباط بین این دو فاز یا در واقع پیوند شیمیایی موجود بین فاز زمینه و فاز تقویت کننده است. برای مثال پیک‌های مربوط به اعداد موجی (۲۹۲۷، 1640cm^{-1} و 1540cm^{-1}) مربوط به پیوندهای زمینه‌ی ژلاتین/کیتوسان است و پیک‌های مربوط به 600cm^{-1} و 530cm^{-1} به سبب پیوندهای مربوط به رسوب تشکیل شده و ظهور پیک در عدد موجی



شکل ۷- طیف فروسرخ نمونه ۴۰/۶۰ پس از قرارگیری در SBF به مدت ۱، ۷ و ۱۴ روز.

حدود 1460 cm^{-1} به خاطر وجود باند کربنات (CO_3^{2-}) است که نشان‌دهنده جایگزینی نوع A (جایگزینی CO_3^{2-} به جای OH^-) در ساختار آپاتیت است و یا می‌تواند به دلیل جذب کربنات از محیط باشد که در هر صورت می‌تواند دلیلی بر تشکیل آپاتیت کربناتی در داربست پس از قرارگیری در SBF باشد [۱۲].

۳-۴ بررسی الگوی پراش پرتو ایکس (XRD) داربست‌ها قبل و بعد از قرارگیری در SBF

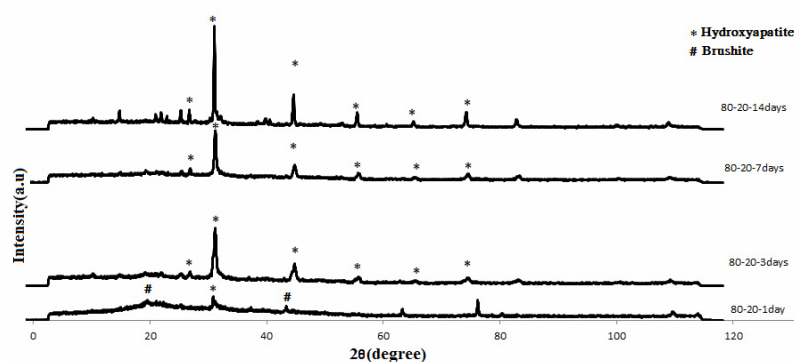
برای انجام این آزمون، پودرهای سه نوع نمونه مورد نظر قبل و پس از قرارگیری در SBF مورد تحلیل قرار گرفتند. شکل‌های (۸) تا (۱۰) الگوهای پراش به دست آمده از این نمونه‌ها را نشان می‌دهند. الگوهای پراش به دست آمده از این نمونه‌ها با استفاده از نرم‌افزار Crystal Impact با کارت‌های XRD مربوط به ترکیبات کلسیم فسفات‌ی موجود در پایگاه داده‌ای ICDD (International Center for Diffraction Data) مقایسه شد و ترکیبات و فازهای موجود در هر نمونه شناسایی شدند. به نظر می‌رسد حضور پیک‌های با شدت کم و نويز قابل توجه در این نمونه‌ها، مربوط به مخلوط بودن نمونه‌های رسوبی با زمینه ژلاتین/ کیتوسان است. با توجه به تحلیل انجام شده پیک‌های مربوط به ترکیب براشیت ($\text{CaHPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) قبل از قرارگیری نمونه‌ها در SBF کاملاً آشکارتر از پیک‌های

پس از قرارگیری در SBF، پیک‌های موجود در (1630 cm^{-1} و 1552) مربوط به پیوند آمیدی و پیک 1404 cm^{-1} مربوط به پیوند CH است. پیک‌های (1037 و 560 cm^{-1}) مربوط به پیوند PO_4 و پیک‌های (3190 و 600 cm^{-1}) ناشی از تشکیل پیوند هیدروکسیل ساختاری است.

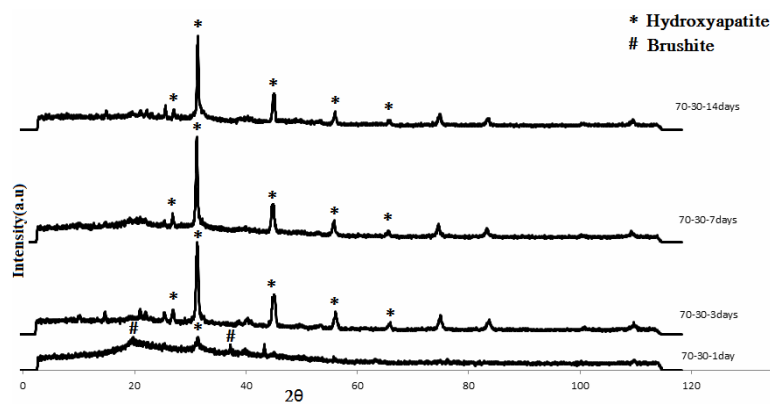
با توجه به نمودارهای فوق مشاهده می‌شود که در تمامی نمونه‌ها، پیک‌های مربوط به تشکیل کلسیم فسفات در ساختار (1630 ، 1037 ، 600 و 3190 cm^{-1}) پس از قرارگیری نمونه‌ها در SBF و همچنین با افزایش زمان قرارگیری در آن بسیار آشکارتر شده‌اند که می‌تواند دلیلی بر افزایش میزان کلسیم فسفات تشکیل شده در ساختار باشد که نشان می‌دهد هر سه نوع داربست ساخته شده پس از قرارگیری در محیط مشابه بدن زیست فعالی خوبی از خود نشان داده‌اند.

در مورد نوع فازهای کلسیم فسفات‌ی تشکیل شده نیز می‌توان گفت که اگرچه حضور پیک مربوط به هیدروکسیل ساختاری (3190 و 600 cm^{-1}) می‌تواند اثبات کند که حداقل بخشی از ترکیب از نوع هیدروکسی آپاتیت است، اما به طور کلی تفاوت موجود در این فازها در این آزمون قابل تمایز نیست و برای حصول به این هدف از آزمون‌های دیگری مانند پراش اشعه ایکس که در ادامه به آن اشاره خواهد شد مدد گرفته شد.

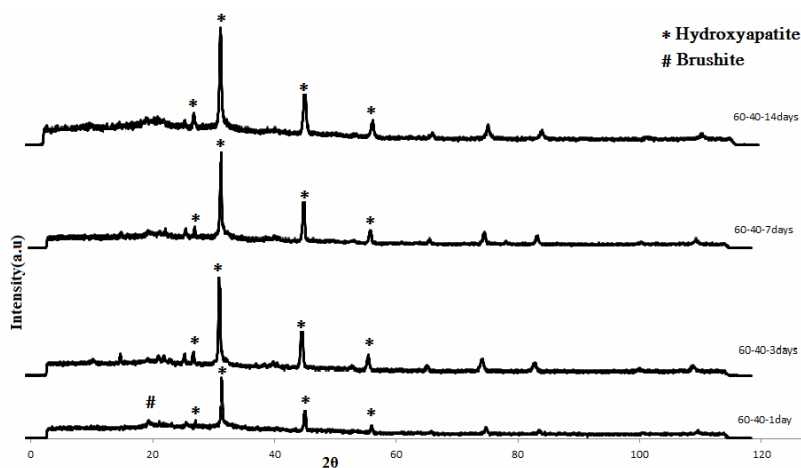
از سوی دیگر وجود پیوندی در عدد موج‌های بالاتر و در



شکل ۸- الگوهای پراش به دست آمده از نمونه ی ۲۰/۸۰ پس از نگهداری در محلول SBF در زمان های مختلف.



شکل ۹- الگوی های پراش به دست آمده از نمونه ی ۳۰/۷۰ پس از نگهداری در محلول SBF در زمان های مختلف.



شکل ۱۰- الگوی های پراش به دست آمده از نمونه ی ۴۰/۶۰ پس از نگهداری در محلول SBF در زمان های مختلف.

هیدروکسی آپاتیت بود در حالی که پس از قرارگیری نمونه‌ها در SBF فاز اصلی شناسایی شده هیدروکسی آپاتیت است یعنی اینکه نمونه‌ی رسوبی نگهداری شده در یخچال یا همان رسوب اولیه‌ی تشکیل شده دارای سهم قابل توجهی از ترکیب برایشیت به همراه هیدروکسی آپاتیت بوده است ولی پس از نگهداری در محلول SBF و دمای ۳۷ درجه سانتیگراد (در شرایط مشابه بدن) فاز برایشیت عمده‌تاً تبدیل به هیدروکسی آپاتیت شده است. این اتفاق در واقع به نوعی تقلید فرایندی است که ثابت شده طی مینرالی شدن بافت استخوان طبیعی در بدن رخ می‌دهد [۲۳]. به طوری که ابتدا نوعی فاز واسطه از نوع برایشیت تشکیل شده و سپس طی یک تبدیل فیزیکی - شیمیایی تبدیل به فاز هیدروکسی آپاتیت می‌شود. قابل ذکر است که فاز زمینه (ژلاتین و کیتوسان) به علت آمورف بودن ساختارشان و شدت بسیار کم پیک‌هایشان نسبت به پیک‌های فاز رسوبی قابل تشخیص نیستند.

با توجه به پیک‌های مشاهده شده در الگوهای XRD نمونه‌ها، پس از قرارگیری در SBF می‌توان دو نتیجه را استنباط کرد:

۱- با افزایش زمان ماندگاری در SBF، شدت پیک‌های مربوط به هیدروکسی آپاتیت افزایش می‌یابد که این پدیده می‌تواند ناشی از افزایش میزان هیدروکسی آپاتیت رسوب کرده در روی سطح نمونه باشد و این افزایش میزان هیدروکسی آپاتیت، نشانه‌ی زیست‌فعالی خوب داربست‌های ساخته شده است.

۲- با افزایش زمان ماندگاری در SBF، علاوه بر افزایش شدت پیک‌ها، پیک‌های مربوط به هیدروکسی آپاتیت باریکتر شده‌اند که این امر نیز می‌تواند به سبب افزایش کریستالیزاسیون هیدروکسی آپاتیت باشد. به عبارت دیگر با افزایش زمان ماندگاری در SBF، آپاتیت رسوب کرده روی سطح شروع به کریستالیزاسیون نسبی کرده است.

۳-۵- بررسی تصاویر میکروسکوپ الکترونی روبشی

با توجه به تصاویر SEM می‌توان اندازه‌ی تخلخل‌ها را

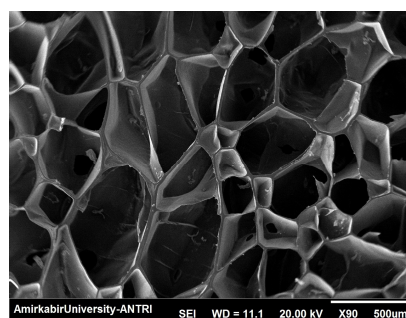
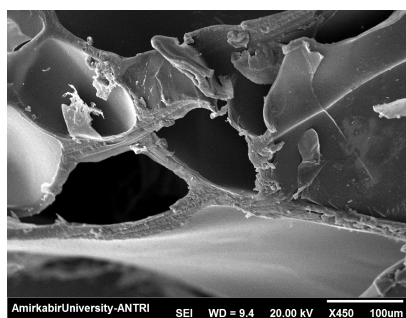
تخمین زد. در شکل (۱۱) حفره‌ها، ساختار لانه زنبوری داشته و به هم پیوسته‌اند. همچنین اندازه‌ی بهینه حفرات برای رشد سلول‌های استخوانی، حدود ۲۰۰-۵۰۰ میکرون است که داربست تهیه شده، این نیاز را تأمین می‌کند [۱۰].

در تصاویر SEM نمونه‌هایی که در تماس با محلول SBF قرار نگرفته‌اند، ذرات رسوبی روی سطح و درون تخلخل‌های داربست پراکنده بودند. شکل این ذرات کروی و اندازه‌ی میانگین آن‌ها در حدود ۱۲۵ nm برآورد شد که در شکل (۱۲) مشخص است.

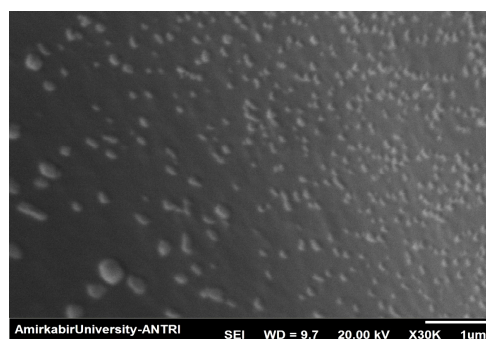
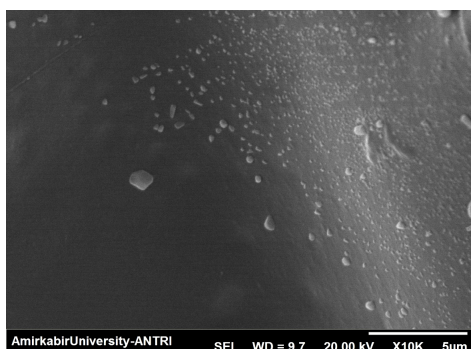
در تصاویر SEM مربوط به نمونه‌هایی که به مدت ۷ روز در محلول SBF قرار گرفتند شکل (۱۳)، بلورهای ذرات رسوبی به صورت توده‌هایی مشخص هستند. این ذرات سطحی صاف و شکلی شبیه کره یا چند کره‌ی درهم فرورفته دارند. از مقایسه‌ی تصاویر نمونه‌ها، قبل و پس از قرارگیری در SBF می‌توان دریافت که میزان رسوب‌های تشکیل شده به صورت قابل توجهی افزایش پیدا کرده است. علت افزایش چشمگیر میزان رسوبات را می‌توان در زیست‌فعالی بالای این داربست‌ها و همچنین قابلیت تشکیل هیدروکسی آپاتیت روی سطح آن‌ها دانست. همچنین نمودار EDS حضور عناصر کلسیم و فسفر را در سطح نمونه‌ها نشان داد که حاکی از تشکیل لایه‌ی کلسیم فسفاتی در سطح نمونه‌هاست.

۳-۶- تعیین میزان جذب آب^{۱۲}

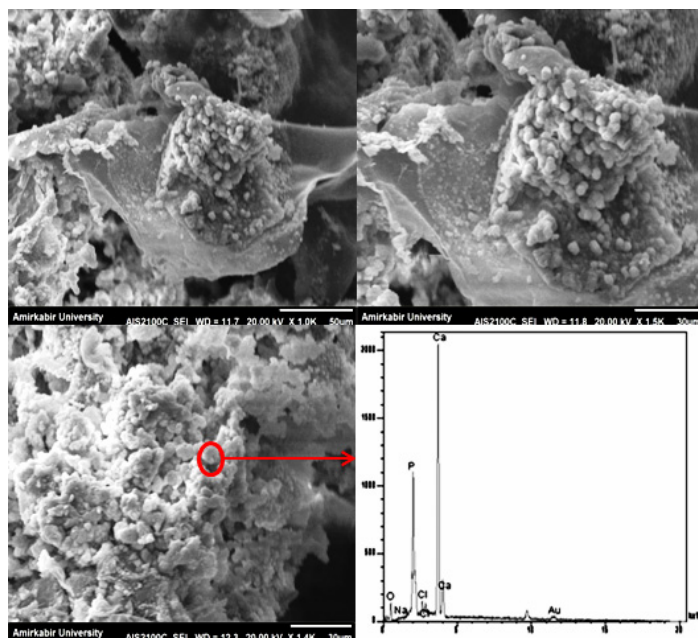
با تعیین وزن داربست‌ها قبل و پس از قرارگیری در داخل آب مقطر به مدت ۲۴ ساعت میزان جذب آب داربست‌ها اندازه‌گیری شد که به صورت خلاصه و به منظور سهولت مقایسه در جدول (۳) نشان داده شده است. با مقایسه اعداد جدول می‌توان مشاهده کرد که با افزایش نسبت کیتوسان به ژلاتین میزان جذب آب داربست افزایش می‌یابد. علت این افزایش جذب آب را می‌توان در تفاوت ساختار کیتوسان و ژلاتین دانست؛ زیرا کیتوسان دارای گروه‌های آب‌دوست در زنجیره‌های پلی‌ساکاریدی است (گروه‌های هیدروکسیل و آمینو) [۲۴].



شکل ۱۱- ساختار متخلخل داربست تولید شده در تصاویر SEM در بزرگنمایی های مختلف.



شکل ۱۲- تصویر ذرات رسوبی در داربست های ساخته شده قبل از قرارگیری در محلول SBF در بزرگنمایی های مختلف.



شکل ۱۳- تصاویر SEM ذرات رسوبی به دست آمده از نمونه هایی که در محلول SBF قرار گرفته اند (۷ روز) در بزرگنمایی های مختلف.

جدول ۳- میزان جذب آب سه نوع داربست ساخته شده در مقایسه با یکدیگر.

درصد جذب آب (%)	نوع نمونه
۳۷۹	۲۰/۸۰
۴۸۱	۳۰/۷۰
۶۶۱	۴۰/۶۰

۷-۳ بررسی نتایج کشت سلول‌های استئوبلاست

همان‌طور که در شکل (۱۴) دیده می‌شود، مورفولوژی سلول‌ها در تمامی نمونه‌ها به صورت دوکی شکل است که با مورفولوژی سلولی قبل از کشت تفاوتی ندارد. این مورفولوژی بیانگر زیست‌سازگاری تمام نمونه‌ها با سلول استئوبلاست است [۷].

۸-۳ بررسی سمیت سلولی (MTT)

همان‌گونه که در شکل (۱۵) مشاهده می‌شود، حضور داربست‌های کامپوزیتی سبب افزایش رشد و تکثیر سلول‌های استئوبلاست نسبت به نمونه‌ی کنترل شده است. در واقع مواد حاصل از تخریب نمونه‌ها، نه تنها اثر سمیت برای سلول‌ها نداشته‌اند، بلکه سبب بهبود عملکرد سلول‌ها، رشد و تکثیر بیشتر آن‌ها شده‌اند. حضور فاز کلسیم فسفاتی در ساختار داربست‌ها نیز به علت تشابه بسیار زیاد ساختار آن با استخوان طبیعی بدن و آزادسازی مواد و یون‌های مشابه بدن، سبب رشد و تکثیر سلول‌های استخوانی می‌شود [۷]. لازم به ذکر است که مقدار p-value برای مقادیر به دست آمده کمتر از ۰/۰۵ بود که نشان‌دهنده‌ی معنی‌دار بودن داده‌های به دست آمده است.

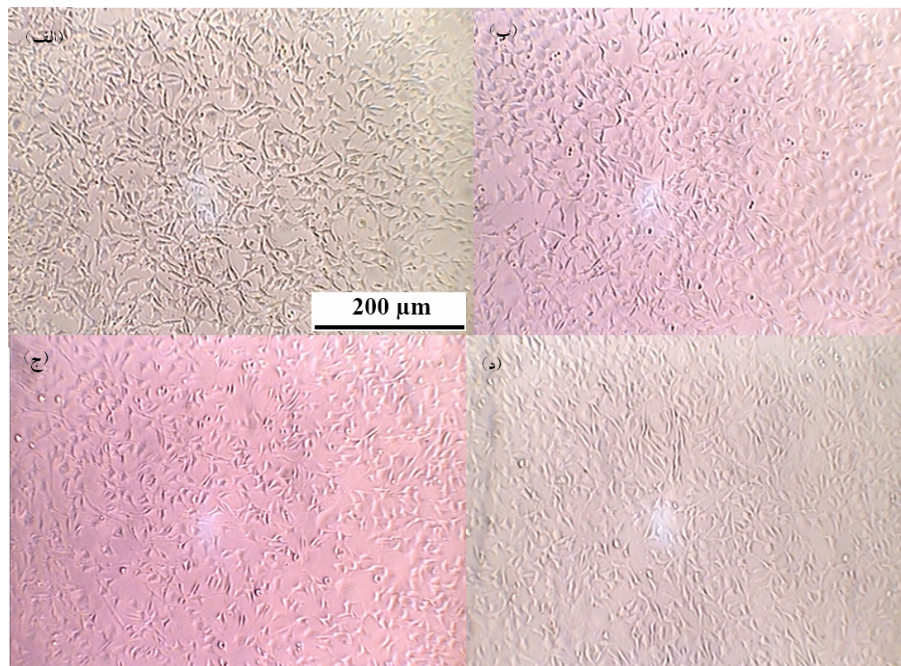
۹-۳ ارزیابی آلكالین فسفاتاز

در این آزمون میزان آلكالین فسفاتاز ترشح شده از سلول‌های استئوبلاست قرار گرفته در مجاورت داربست‌ها پس از ۳ روز ارزیابی شد. این آزمون برای هر نمونه ۳ مرتبه

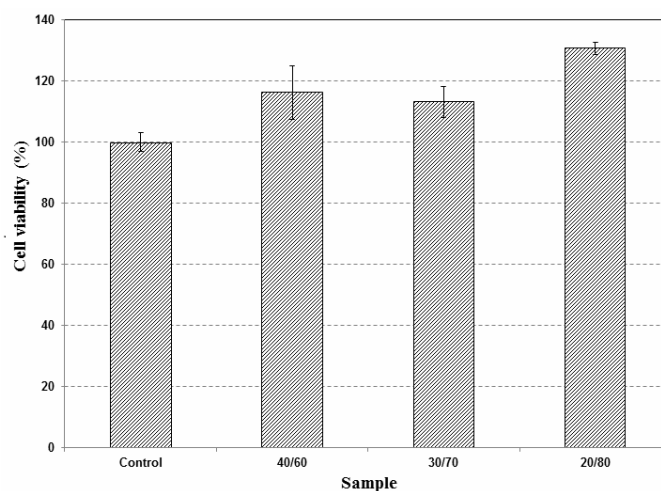
تکرار شد. شکل (۱۶) نیز نتایج به دست آمده از این آزمون را برای داربست‌ها نشان می‌دهد. مقدار p-value با توجه به روش One-way ANOVA توسط نرم‌افزار Minitab برای مقادیر به دست آمده کمتر از ۰/۰۵ بود که نشان‌دهنده‌ی معنادار بودن داده‌های به دست آمده است. نتایج حاصله بیانگر فعالیت سلول‌های استخوانی و هدایت استخوانی نمونه‌ها با اختلاف، نسبت به نمونه‌ی کنترل هستند که ظرفیت بالای ماده برای استفاده در مهندسی بافت استخوان را تأیید می‌کند [۷].

۴- نتیجه‌گیری

در این تحقیق، نوعی سیستم زیست‌تقلیدی با استفاده از مکانیزم نفوذ دوسویه در داخل هیدروژل ژلاتین/کیتوسان و شرایط دمایی و pH مشابه بدن طراحی و به منظور تشکیل رسوب‌های کلسیم فسفاتی زیست‌تقلیدی مورد استفاده قرار گرفت. محصول به دست آمده از رسوب‌گذاری فازهای کلسیم فسفاتی در داخل ژلاتین/کیتوسان نوعی نانوکامپوزیت با زمینه‌ی پلیمری با ذرات تقویت‌کننده‌ی کلسیم فسفاتی داخل آن است. با توجه به مکانیزم به کار گرفته شده در این تحقیق، فاز تقویت‌کننده کلسیم فسفاتی به صورت درجا، داخل زمینه تشکیل شد و به سبب ایجاد اتصالات شیمیایی با زمینه، امتزاج مناسبی با آن داشت. ذرات رسوب کاملاً در زمینه توزیع شده و ابعادشان کمتر از ۱ میکرون و دارای شکل هندسی تقریباً کروی بودند. استفاده از روش خشک‌کشی انجمادی سبب ایجاد تخلخل‌های منظم و مرتبط با یکدیگر شد و اندازه‌ی تخلخل‌ها در محدوده‌ی مناسب برای رشد سلول‌های استخوانی قرار داشت. خواص مکانیکی داربست‌های ساخته شده در محدوده‌ی استخوان اسفنجی قرار داشت. نتایج FTIR حاکی از حضور باندهای فسفات و هیدروکسیل ساختاری در ساختار داربست‌ها بود که می‌تواند ناشی از تشکیل هیدروکسی آپاتیت باشد. نوع فازهای رسوبی در داربست‌هایی که در محلول SBF قرار نگرفته بودند، بیشتر شامل برایشیت و در داربست‌های که در محلول SBF قرار گرفته بودند، بیشتر



شکل ۱۴- تصاویر کشت سلول استئوبلاست (الف) نمونه‌ی شاهد، (ب) نمونه ۲۰/۸۰، (ج) نمونه ۳۰/۷۰ و (د) نمونه ۴۰/۶۰



شکل ۱۵- نمودار MTT مربوط به سه نوع داربست ساخته شده و نمونه شاهد برای مدت زمان ۳ روز.

بافت استخوان طبیعی در بدن رخ می‌دهد. نتایج کشت سلول‌های استخوانی نیز بیانگر زیست سازگاری بالای تمام نمونه‌ها با سلول استئوبلاست بود. همچنین این نتایج بیانگر فعالیت سلول‌های استخوانی و هدایت استخوانی نمونه‌ها با

شامل هیدروکسی آپاتیت بود. در واقع برآشیت موجود در داربست پس از قرارگیری در شرایط مشابه بدن از نظر دما و pH به هیدروکسی آپاتیت تبدیل شد که این پدیده در واقع به نوعی تقلید فرایندی است که ثابت شده طی مینرالی شدن

خواص مناسبتری نسبت به دو نمونه‌ی دیگر داشته و برای ساخت داربست استخوانی مناسب‌تر است.

اختلاف نسبت به نمونه‌ی کنترل هستند که ظرفیت بالای ماده برای استفاده در مهندسی بافت استخوان را تأیید می‌کنند. با توجه به نتایج آزمون‌های بیولوژیک و آزمون‌های قبلی مانند خواص مکانیکی می‌توان گفت که نمونه‌ی ۲۰/۸۰ در مجموع

واژه‌نامه

- | | | |
|-----------------------|---------------------|---------------------------|
| 1. tissue Engineering | 5. biocompatibility | 9. antimicrobial Scaffold |
| 2. biomaterials | 6. porosity | 10. mineralization |
| 3. growth factor | 7. interconnected | 11. double diffusion |
| 4. scaffold | 8. osteoconductive | 12. water uptake |

مراجع

1. Liebschner, M.A.K. and Wettergreen, M.A., *Topics in Tissue Engineering*, Chapter 6, pp. 1-39, University of Oulu, Finland, 2003.
2. Liao, S.S., Cui, F.Z. and Zhu, Y., "Osteoblasts Adherence and Migration Through Three-Dimensional Porous Mineralized Collagen Based Composite: nHAC/PLA," *Journal of Bioactive & Compatible Polymers*, Vol. 19, pp. 117-130, 2004.
3. Huang, Y., Onyeri, S., Siewe, M., Moshfeghian, A., and Madhally, S.V., "In Vitro Characterization of Chitosan-Gelatin Scaffolds for Tissue Engineering," *Biomaterials*, Vol. 26, pp. 7616-7627, 2005.
4. Murugan, R. and Ramakrishna, S., "Development of Nanocomposites for Bone Grafting," *Composites Science & Technology*, Vol. 65, pp. 2385-2406, 2005.
5. Itoh, S., Kikuchi, M., Koyama, Y., Matumoto, H.N., Takakuda, K., Shinomiya, K. and Tanaka, J., "Development of a Novel Biomaterial, Hydroxyapatite/Collagen (HAp/Col) Composite for Medical Use," *Biomedical Materials & Engineering*, Vol. 15, pp. 29-41, 2005.
6. Depan, D., Surya P.K.C., Girase B., and Misra, R.D.K., "Organic/Inorganic Hybrid Network Structure Nanocomposite Scaffolds Based on Grafted Chitosan for Tissue Engineering," *Acta Biomaterialia*, Vol. 7, pp. 2163-2175, 2011.
7. Kim, H.W., Kim, H.E., and Salih, V., "Stimulation of Osteoblast Responses to Biomimetic Nanocomposites of Gelatin-Hydroxyapatite for Tissue Engineering Scaffolds," *Biomaterials*, Vol. 26, pp. 5221-5230, 2005.
8. Kikuchi, M., Matsumoto, H.N., Yamada, T., Koyama, Y., Takakuda, K. and Tanaka, J., "Glutaraldehyde Cross-Linked Hydroxyapatite/Collagen Self-Organized Nanocomposites," *Biomaterials*, Vol. 25, pp. 63-69, 2004.
9. Kim, H.W., Knowles, J.C., and Kim, H.E., "Hydroxyapatite and Gelatin Composite Foams Processed Via novel Freeze-Drying and Crosslinking for Use as Temporary Hard Tissue Scaffolds," *Journal of Biomedical Materials Research: Part A*, Vol. 72, pp. 136-145, 2005.
10. Thein-Han, W.W., Saikhun, J., Pholpramoo, C., Misra, R.D.K., and Kitiyanant, Y., "Chitosan-Gelatin Scaffolds for Tissue Engineering: Physico-Chemical Properties and Biological Response of Buffalo Embryonic Stem Cells and Transfectant of GFP-Buffalo Embryonic Stem Cell," *Acta Biomaterialia*, Vol. 5, pp. 3453-3466, 2009.
11. Sanat, K.B., Kunchu, K., and Mani, R., "Evaluation of Ionotropic Cross-Linked Chitosan/Gelatin B Microspheres of Tramadol Hydrochloride," *AAPS Pharm Sci Tech*, Vol. 12, pp. 28-34, 2011.
12. Morgan, H., Wilsone, R.M., Elliott, J.C., Dowker, S.E.P., and Anderson, P., "Preparation and Characterization of Monoclinic HA and Its Precipitated Carbonate Apatite Intermediate," *Biomaterials*, Vol. 21, pp. 617-627, 2000.
13. Solati-Hashjin, M., "The Effect of Powder Synthesis Route on Microstructure and Properties of Hydroxyapatite," Ph.D. Thesis, Materials & Energy Research Center, Tehran, 1998.
14. Park, J.B., and Lakes R.S., *Biomaterials: An Introduction*, 3rd ed., pp. 45-90, Springer, New York, 1992.
15. Manjubala, I., Scheler, S., Bössert, J. and Jandt, K.D. "Mineralisation of Chitosan Scaffolds with Nano-Apatite Formation by Double Diffusion Technique," *Acta Biomaterialia*, Vol. 2, pp. 75-84, 2006.
16. Ehrlich, H., Krajewska, B., Hanke, T., Born, R., Heinemann, S., Knieb, C., and Worch, H. "Chitosan Membrane as a Template for Hydroxyapatite Crystal

- Growth in a Model Dual Membrane Diffusion System,” *Journal of Membrane Science*, Vol. 273, pp. 124-128, 2006.
17. Furuichi, K., Oaki, Y., Ichimiya, H., Komotori, J., and Imai, H. “Preparation of Hierarchically Organized Calcium Phosphate–Organic Polymer Composites by Calcification of Hydrogel,” *Science and Technology of Advanced Materials*, Vol. 7, pp. 219-225, 2006.
 18. Kokubo, T., and Takadama, H., “How Useful is SBF in Predicting in Vivo Bone Bioactivity?,” *Biomaterials*, pp. 2907-2915, 2006.
 19. Koryta, J., Dvorak, W., and Kavan, L., *Principles of Electrochemistry*, 2nd ed., pp. 79-144, John Wiley & Sons, New York, 1993,.
 20. Du, C., Cui, F.Z., Zhang, W., Feng, Q.L., Zhu, X.D. and de Groot, K., “Formation of Calcium Phosphate/Collagen Composites Through Mineralization of Collagen Matrix,” *Journal of Biomedical Materials Research*, Vol. 50, pp. 518-527, 2000.
 21. Cowin, S.C., *Bone Mechanics Handbook*, 2nd ed., pp. 70-73, CRC Press LLC, London, 2000.
 22. Azami, M., Mossavifar, M.J., Baheiraei, N., Moztarzadeh, F., and Ai, J. “Preparation of a Biomimetic Nanocomposite Scaffold for Bone Tissue Engineering Via Mineralization of Gelatin Hydrogel and Study of Mineral Transformation in Simulated Body Fluid,” *Journal of Biomedical Materials Research: Part A*, Vol. 100, pp. 1347-1355, 2012.
 23. Ma, P.X. “Scaffolds for Tissue Fabrication,” *Materials Today*, Vol. 7, pp. 30-40, 2004.
 24. Xiao, L., Yu, Z., Yang, C., Zhu, H., and Du, Y., “Swelling Studies of Chitosan.Gelatin Films Cross Linked by Sulfate,” *Wuhan University Journal of Natural Sciences*, Vol. 9, pp. 247-251, 2004.