

ساخت کانال هدایت عصبی بر پایه گرافن سه بعدی/پلیمر برای کاربرد در مهندسی بافت عصب

ندا بهرمندی طلوع^{۱*}، حمیدرضا سلیمی جزی^۱، مهشید خرازیها^۱، نیکلا لیسی^۲، جولیانا فاگیو^۳ و السیو تامبورانو^۴

۱- دانشکده مهندسی مواد، دانشگاه صنعتی اصفهان، اصفهان، ایران

۲- ENEA، آژانس ملی انرژی ایتالیا، رم، ایتالیا

۳- دپارتمان مهندسی اطلاعات، فراساختارها و انرژی‌های نو، رگیو کالابریا، ایتالیا

۴- دانشکده مهندسی برق و انرژی، دانشگاه ساپینزا، رم، ایتالیا

(دریافت مقاله: ۱۳۹۸/۵/۱۵ - دریافت نسخه نهایی: ۱۳۹۹/۲/۳)

چکیده- در سال‌های اخیر گرافن بهدلیل خواص منحصر به‌فردی چون هدایت الکتریکی بسیار بالا، استحکام مکانیکی بالا، ساختار متخلخل برای تبادل مواد مغذی و مواد زائد، زیست‌سازگاری، امکان بارگذاری دارو، متغیرهای رشد و ... در مهندسی بافت‌های مختلف از جمله در ساخت کانال هدایت عصبی مورد توجه قرار گرفته است. در این پژوهش، ساخت کانال هدایت عصبی بر پایه گرافن سه بعدی به‌روش رسوب شیمیایی بخار با گرمایش القایی (ICVD) دنبال شد. گرافن در دمای ۱۰۸۰ درجه سانتی‌گراد روی فوم نیکلی سنتز و نمونه‌ها با استفاده از آنالیز رaman و میکروسکوپ الکترونی روبشی مشخصه‌یابی شدند. آنالیز رaman نمونه‌ها نشان داد که گرافن سنتز شده به‌صورت گرافن چندلایه توربواستراتیک با عیب‌های بسیار کم است. به‌منظور حذف نیکل از سایکلودود کان به‌عنوان لایه محافظ استفاده شد. بعد از حذف نیکل، گرافن سه بعدی به‌دست آمده با استفاده از روش قطره‌ای و غوطه‌وری در محلول پلیمری پلی‌کاپرولاکتون پوشش داده و کانال هدایت عصبی به‌صورت کامپوزیتی از گرافن سه بعدی در هسته و پوشش پلیمری پلی‌کاپرولاکتون ساخته شد. مقایسه خواص الکترومکانیکی کانال هدایت کامپوزیتی با کانال پلیمری پلی‌کاپرولاکتون نشان داد که ابتدا حضور گرافن سه بعدی باعث افزایش هدایت الکتریکی کانال هدایت کامپوزیتی شده و انتظار می‌رود که این امر بهبود فرایند ترمیم عصب و رشد آکسون‌ها را به‌دبی داشته باشد. سپس استحکام مکانیکی و انعطاف‌پذیری آن در مقایسه با کانال هدایت پلی‌کاپرولاکتون افزایش یافته است.

واژه‌های کلیدی: رسوب شیمیایی بخار (CVD)، گرافن سه بعدی، کانال هدایت عصبی، پلی‌کاپرولاکتون، پوشش دهنده قطره‌ای، پوشش دهنده غوطه‌وری.

Fabrication of Nerve Guide Conduit Based on 3D Graphene/ Polymer for Nerve Tissue Engineering

N. Bahremandi Tolou^{1*}, H. R. Salimi Jazi¹, M. Kharaziha¹, N. Lisi², G. Faggio³ and A. Tamburano⁴

*: مسئول مکاتبات، پست الکترونیکی: bahremandi.n@gmail.com

- 1- Department of Materials Engineering, Isfahan University of Technology, Isfahan, Iran.
- 2- ENEA Casaccia, Italian National Agency for New Technologies, Energy and Sustainable Economic Development, Rome, Italy.
- 3- Università Mediterranea of Reggio Calabria, Department of Information Engineering, Infrastructure and Sustainable Energy (DIIES), Reggio Calabria, Italy.
- 4- Sapienza University of Rome, Department of Astronautical, Electrical and Energy Engineering, Rome, Italy.

Abstract: In recent years, graphene has been considered in various tissue engineering applications such as nerve guide conduits because of its unique properties such as high electrical and mechanical properties, porous structure for exchange of nutritious and waste materials, biocompatible, capability of drug and growth factor delivery. In the current study, nerve guide conduits based on a 3D graphene were synthesized by induction heating chemical vapor deposition (ICVD). Graphene was synthesized on Ni foam template at 1080 °C. Fabricated samples were characterized by Raman analysis and Scanning Electron Microscopy. Raman analysis showed that the synthesized graphene is in the form of a turbostratic multilayered graphene with little defects. Cyclododecane (CD) as a temporary protective layer was used to remove nickel. After removing nickel, the free-standing 3D-graphene structure was coated with a polymer (PCL) by drop and dip coating methods to obtain the composite conduit. A comparison of the electromechanical results of the 3D-graphene/PCL conduit and PCL conduit indicated that firstly, grapheme increased the electrical conductivity of the composite conduit which will help promote nerve regeneration and axon growth. Secondly, tensile strength and flexibility of the 3D-graphene/PCL conduit was improved compared to the PCL conduit.

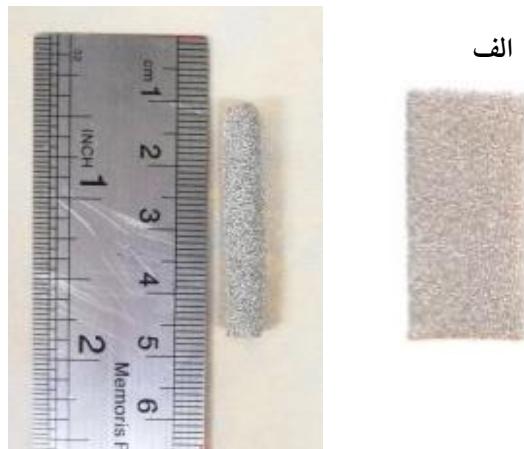
Keywords: Chemical vapor deposition (CVD), 3D-Graphene, Nerve guide conduit, PCL, Drop coating, Dip coating.

هدايت الکتریکی، انعطاف‌پذیری، زیست‌سازگاری و زیست‌تخریب‌پذیری و همچنین فعالیت نئورولوژیکی خوبی دارد [۸]. کوین و همکاران از روش پوشش‌دهی لایه با لایه^۳ برای ساخت کanal هدايت گرافن سه‌بعدی از محلول‌های حاوی پولک‌های گرافن و پلی‌کاپرولاتون (PCL)^۴ و نیز محلول پلی‌گلیکولیک اسید/پلی‌دوبامین (PGA/PDA)^۵ استفاده کردند. آنها گزارش کردند که داریست گرافن سه‌بعدی هادی می‌تواند به میزان قابل توجهی رشد عصب‌ها را در شرایط درون‌تنی^۶ و برون‌تنی^۷ تحت تأثیر قرار دهد [۷].

اما در تحقیقات انجام شده تاکنون، گرافن به صورت یک جزء افزودنی در ساخت کanal مورد توجه قرار گرفته است. نکته گفتنی این است که زمانی که پولک‌های گرافن به طور رندوم درون زمینه توزیع می‌شوند، هدايت الکتریکی کامپوزیت حاصل، به شدت به نفوذ الکترون بین ورقه‌های گرافن جداگانه بستگی دارد. اگر تعداد این پولک‌های گرافنی کم باشد، کامپوزیت هدايت الکتریکی کمی دارند. در مقابل به دلیل اینکه الکترون می‌تواند به سرعت از طریق شبکه بهم متصل فرم گرافنی با کیفیت بالا حرکت کند، هدايت الکتریکی و سرعت انتقال الکترون در گرافن سه‌بعدی بالا است [۹-۱۱]. از میان روش‌های سنتز ساختارهای سه‌بعدی گرافنی، روش رسوب

۱- مقدمه

یکی از روش‌های ترمیم اعصاب آسیب‌دیده استفاده از کanal هدايت عصبی است و همچنان تلاش برای بهینه‌سازی کanal‌های عصبی موجود با استفاده از اصلاحات ساختاری کanal، بهبود ماده و استفاده از افزودنی‌هایی مثل سلول‌های شوآن و فاکتورهای رشد ادامه دارد. یکی از مواد جدید که قابلیت بالایی برای استفاده در ساخت کanal هدايت عصبی دارد، گرافن است. گرافن به دلیل خواص منحصر به‌فردی چون هدايت الکتریکی بسیار بالا، استحکام مکانیکی بالا، ساختار متخلخل برای تبادل مواد مغذی و مواد زائد، زیست‌سازگاری، امکان بارگذاری دارو، فاکتورهای رشد، سلول‌های بنیادی و... در سال‌های اخیر در مهندسی بافت‌های مختلف مورد توجه قرار گرفته است [۱-۳]. از این‌رو استفاده از گرافن و مشتقاش در مهندسی بافت عصب دنبال شد [۴-۶]. همچنین ساخت کanal هدايت عصبی حاوی گرافن مورد توجه قرار گرفت [۷ و ۸]. جکوز و همکاران، پولک‌های گرافنی^۱ را به کوپلیمر پلی‌لactیکو گلایکولیک اسید (PLGA)^۲ اضافه کرده و یک زیست-جوهر برای پرینت سه‌بعدی کanal هدايت عصبی تهیه کردند. آنها گزارش کردند که کامپوزیت حاوی ۶۰ درصد حجمی از پولک‌های گرافن بهترین عملکرد را داشته و بالاترین



شکل ۱- فوم نیکل: (الف) به صورت مسطح و (ب) به صورت رول شده برای ساخت کانال هدایت عصبی

موقت استفاده شد. علت انتخاب این ماده حذف راحت CD با گرمایش در دمای پایین و همچنین عدم حضور باقی مانده این ماده در سطح نمونه است [۱۵]. بعد از حذف نیکل و به دست آمدن گرافن سه بعدی خودایستا، نمونه با استفاده از روش پوشش دهی قطره ای و غوطه وری در محلول پلیمری پلی کاپرولاتون پوشش دهی شد و کانال هدایت عصبی به صورت کامپوزیت گرافن سه بعدی / پلیمر به دست آمد.

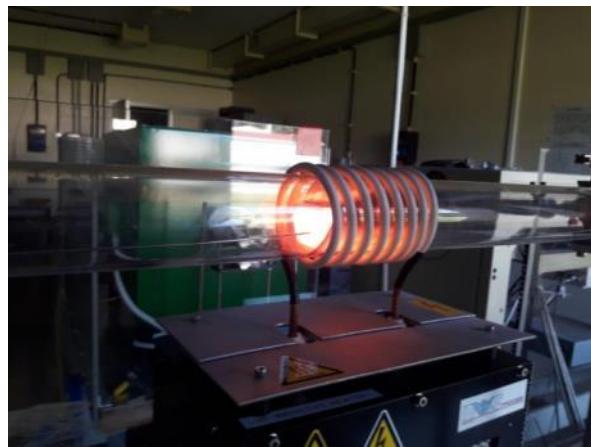
۲- مواد و روش تحقیق

۱-۱- مواد اولیه و تجهیزات مورد استفاده

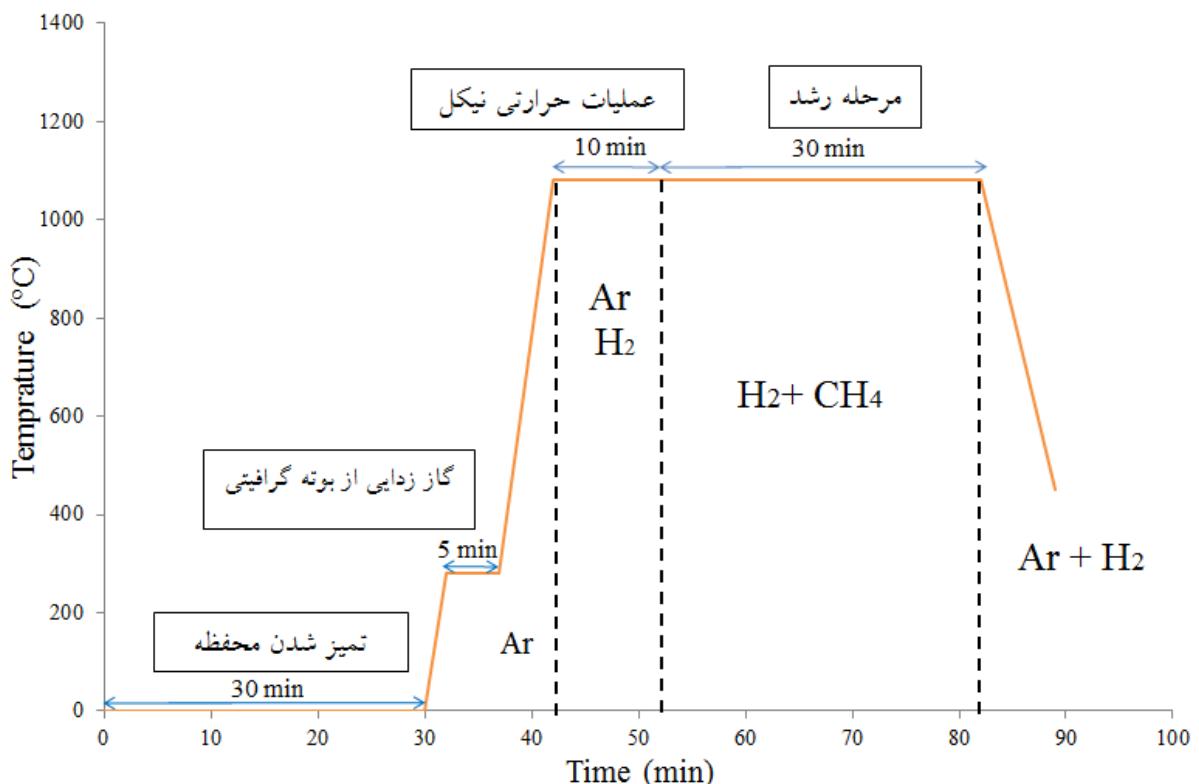
در این پژوهش، از فوم نیکل به عنوان الگو برای سنتز گرافن سه بعدی استفاده شد. فوم نیکل با ضخامت $1/5$ میلی متر و چگالی سطحی 320 گرم بر متر مربع ($>99/8$ PPI)،^{۱۳۰} شرکت Henzen، چین) به تکه هایی مستطیل شکل بریده (شکل ۱-الف) و سپس به صورت یک لوله توخالی آمده شد (شکل ۱-ب). برای سنتز گرافن از دستگاه رسوب شیمیایی بخار با سیستم گرمایشی القایی (ICVD) استفاده شد که تصویر آن در شکل (۲) نشان داده شده است. نمونه ها درون بشري از اتانول قرار گرفته و به مدت 15 دقیقه اولتراسونیک شده و درنهایت بعد از خشک شدن درون بوته گرافیتی برای ورود در دستگاه ICVD قرار داده شدند.

شیمیایی بخار^۸ (CVD) به دلیل قابلیت تولید انبوه، هزینه پایین تولید و تولید گرافن با کیفیت بالا مورد توجه زیادی قرار گرفته است [۴، ۱۲ و ۱۳]. با توجه به موارد گفته شده و نظر به اینکه فوم گرافنی ساخته شده به روش CVD تاکنون برای ساخت کانال هدایت عصبی مورد استفاده قرار نگرفته است، در این پژوهش ساخت کانال هدایت عصبی بر پایه گرافن سه بعدی با روش CVD مانظر قرار گرفت. اما چالش استفاده از فوم گرافن حاصل از CVD، قابلیت کار با دست و قابلیت جابه جایی کم آن است. بدین منظور، استفاده از یک پوشش پلیمری زیست تخریب پذیر پیشنهاد شد. از میان پلیمرهای استفاده شده در ساخت کانال هدایت عصبی، پلیمر PCL به دلیل زیست تخریب پذیری، زیست سازگاری، راحتی در استفاده و هزینه پایین انتخاب شد. همچنین انجمن غذا و دارو آمریکا^۹ (FDA) استفاده از این ماده را برای ترمیم بافت های سخت و نرم تأیید کرده است [۱۴].

در این پژوهش، ساخت کانال هدایت عصبی بر پایه گرافن سه بعدی دنبال شد. گرافن سه بعدی با روش رسوب شیمیایی بخار با گرمایش القایی^{۱۰} (ICVD) روی فوم نیکلی سنتز شد. در مرحله حذف نیکل به منظور حفظ ساختار سه بعدی گرافن سنتز شده، بایستی از یک ماده محافظ استفاده شود. در اکثر تحقیقات از پلی متیل متاکریلات^{۱۱} (PMMA) استفاده می شود [۱۱]. اما در این پژوهش از سایکلودودکان^{۱۲} (CD) به عنوان این لایه محافظ



شکل ۲- تصویر دستگاه ICVD



شکل ۳- منحنی دما- زمان برای سنتز گرافن با ICVD

دما- زمان در شکل (۳) دنبال شد. جدول (۱) پارامترهای بهینه رشد گرافن را نشان می دهد.

۲-۳- استخراج گرافن سه بعدی
مهم ترین و پرچالش ترین مرحله ساخت کانال هدایت عصبی بر پایه گرافن سه بعدی / پلیمر، مرحله استخراج گرافن و حذف

۲- سنتز گرافن سه بعدی

ابتدا نمونه ها درون بوته گرافیتی گذاشته شد و سپس بوته درون لوله کوارتزی قرار گرفت. پمپ روتاری و سپس پمپ توربو مولکولار برای تمیز کردن محفظه از آلودگی ها به مدت ۲۰ دقیقه روشن می شوند. درنهایت پمپ توربو خاموش شده و فقط روتاری کار می کند. بعد از آن فرایند رشد گرافن طبق منحنی

جدول ۱- پارامترهای سنتز گرافن با ICVD

کد نمونه	دبی کربن (متان)	دبی هیدروژن	فسار	دما رشد	(درجه سانتی گراد)	(مترمکعب بر دقیقه)	(میلی بار)	(دقیقه)	زمان رشد
CH-1080	۷	۱۰۸۰	۶	۱۴	۳۰				

۴-۲- ساخت کامپوزیت گرافن سه بعدی / پلیمر

به منظور ساخت کامپوزیت فوم گرافن / پلیمر از دو روش پوشش دهی قطره ای و غوطه وری برای ساخت کامپوزیت استفاده شد. ابتدا فوم گرافن خودایستای به دست آمده از مرحله قبل با استفاده از محلول پلی کاپرولاکتون یک درصد وزنی به صورت قطره ای پوشش دهی شد. این روش برای فوم گرافن دمای پایین که تعداد لایه های گرافن کمی داشت، قابل استفاده نبود زیرا فوم از محل فرود قطره پاره می شد. اما برای دماهای بالاتر امکان پوشش دهی قطره ای بود. از آنجا که بعد از یکبار پوشش دهی قطره ای نمونه استحکام کافی نداشت، فرایند کلی به این صورت پیش رفت که ابتدا یک مرحله پوشش دهی قطره ای داشته باشیم و سپس پوشش دهی مرحله دوم با روش قطره ای یا با غوطه وری در محلول دوم (پنج درصد وزنی پلی کاپرولاکتون) دنبال شود. نمونه یک ساعت بعد از خشک شدن در هوا، درون خشک کن در دمای ۴۵ درجه سانتی گراد قرار گرفت تا به طور کامل خشک شود.

همچنین به منظور مقایسه خواص کامپوزیت ساخته شده با خود پلی کاپرولاکتون، با استفاده از فوم نیکلی داربستی از پلی کاپرولاکتون (بدون گرافن) ساخته شد. فوم نیکلی بعد از شستشو و اولتراسونیک در اتانول، درون محلول پنج درصد وزنی پلی کاپرولاکتون غوطه ور شد و پس از خشک شدن و تبخیر حلال، مراحل استخراج و حذف نیکل با قرار دادن نمونه در محلول های FeCl_3 و HCl انجام شد. جدول (۲) کد نمونه های ساخته شده را نشان می دهد.

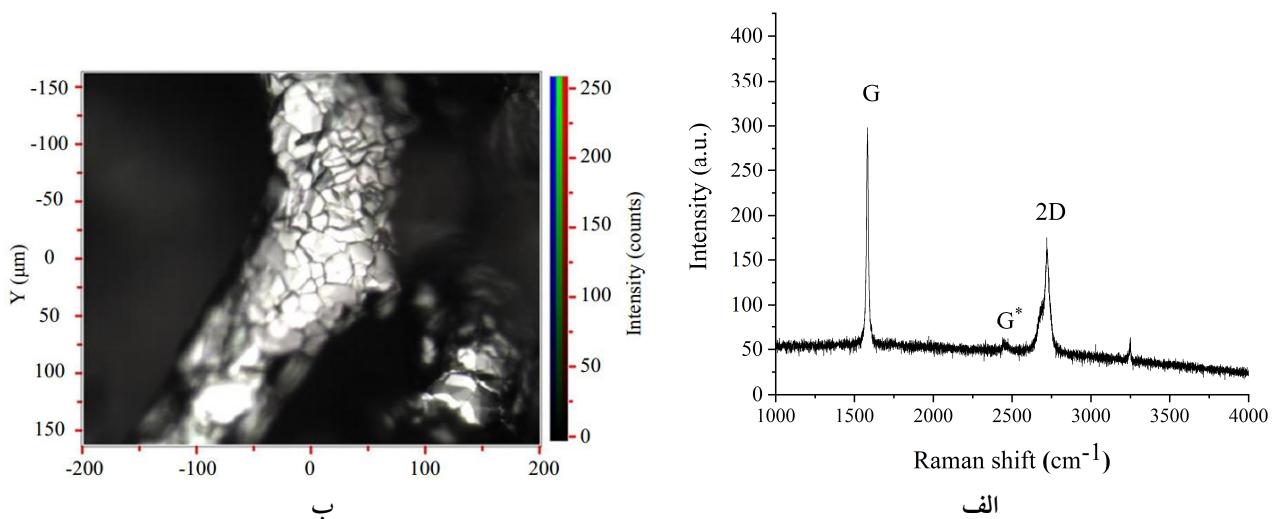
۵-۲- مشخصه یابی گرافن سه بعدی و کامپوزیت گرافن سه بعدی / پلی کاپرولاکتون

از آنالیز رaman به منظور بررسی ساختاری گرافن سه بعدی سنتز

نیکل بود به طوری که ساختار گرافن سه بعدی حفظ شود. در این مرحله نمونه که شامل زیرلایه نیکلی و پوشش گرافنی هست درون محلول اج نیکل (محلول کلرید آهن (FeCl_3) یا اسید کلریدریک (HCl) و یا ترکیبی از این دو محلول) فرو برد می شود. برای حفظ ساختار گرافن نیاز به استفاده از یک لایه واسطه است که لایه محافظ نامیده می شود. در مقالات از پلیمرهای مختلف و به خصوص از پلی متیل متاکریلات (PMMA) استفاده می کنند [۱۱]. در این پژوهش از سایکلودودکان ($\text{C}_{12}\text{H}_{24}$) استفاده شد. سایکلودودکان (CD) یک هیدروکربن چرخه ای ^{۱۳} است غیرسمی و آلی دوستدار محیط در دمای اتاق جامد بوده، چگالی پایین (حدود ۸۲ گرم بر سانتی متر مکعب در دمای ۸۰ درجه سانتی گراد) داشته و فشار بخار بالا (حدود ۳۳/۱ کیلو پاسکال در دمای ۱۰۰ درجه سانتی گراد) دارد. این ماده در دمای ۶۰/۷ درجه سانتی گراد ذوب می شود در حالی که نقطه جوش آن ۲۴۷ درجه است. به دلیل این خصوصیات، سایکلودودکان وقتی در معرض هوا قرار می گیرد به طور کامل تبخیر می شود [۱۵]. در این پژوهش، نمونه ها پس از سنتز درون محلول سایکلودودکان در دی کلرو متان، فرو برد شد و سپس در هات پلیت قرار گرفت تا حلال آن تبخیر شود. درنهایت درون محلول FeCl_3 (۱۰ درصد وزنی) غوطه ور شدند. بعد از حذف نیکل، نمونه ها از محلول بیرون آورده، با آب مقطر شسته شد و سپس درون محلول HCl (۱۰ درصد وزنی) به مدت یک ساعت قرار داده می شوند تا آهن احتمالی روی سطح نمونه ها حذف شود. سپس نمونه ها از محلول HCl خارج شده و بعد از شستن با آب مقطر درون خشک کن در دمای ۴۰ درجه به مدت یک شبانه روز قرار می گیرند. در این مرحله فوم گرافن خودایستا ^{۱۴} به دست می آید.

جدول ۲- کد نمونه‌های کانال هدایت عصبی

کد نمونه	روش ساخت	ترکیب محلول
Drop-1080	پوشش دهی قطره‌ای فوم گرافن خودایستا- دو بار پوشش دهی	دو درصد وزنی
Drop & dip-1080	پوشش دهی قطره‌ای / غوطه‌وری فوم گرافن خودایستا	قطره‌ای: دو درصد وزنی غوطه‌وری: پنج درصد وزنی
PCL scaffold	پوشش دهی غوطه‌وری	پنج درصد وزنی پلی‌کاپرولاتون در دی‌کلرومتان



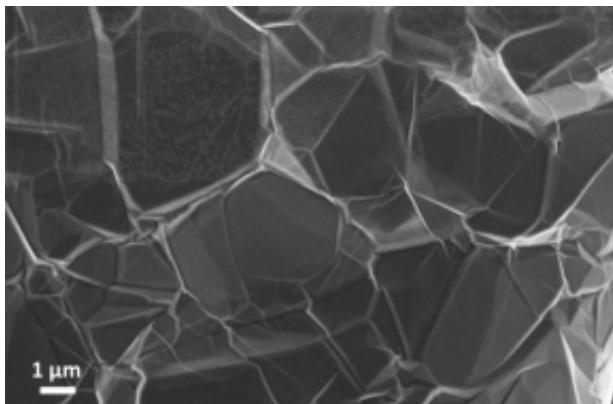
شکل ۴- (الف) آنالیز رامان و (ب) تصویر میکروسکوپی نوری از گرافن سنتز شده روی فوم نیکل در دمای ۱۰۸۰ درجه سانتی‌گراد

نمونه‌های کانال هدایت (به صورت تیوبی‌شکل) از دستگاه Instron 3366 استفاده و برای نگهداشتن نمونه‌ها دو فک تفلونی طراحی شد. نمونه‌هایی با طول 2 ± 35 میلی‌متر و قطر خارجی $3/5$ میلی‌متر تهیه شد و با استفاده از دو پیچ فلزی بین دو فک تفلونی قرار گرفت. سرعت حرکت فک دستگاه یک میلی‌متر بر دقیقه بود. مقاومت الکتریکی نمونه‌ها همزمان با اعمال نیرو اندازه‌گیری شد و نتایج به صورت منحنی تنش-کرنش و همچنین مقاومت-کرنش بدست آمد.

۳- نتایج و بحث

گرافن سه بعدی سنتز شده با آنالیز رامان و میکروسکوپ الکترونی رویشی^{۱۶} مورد ارزیابی قرار گرفتند. شکل (۴) تصاویر میکروسکوپی و نیز طیف رامان نمونه CH-1080 را نشان

شده استفاده شد. همچنین این آنالیز می‌تواند به صورت کمی تعداد لایه‌ها و نقص‌های ساختاری آنها را نشان دهد. در این پژوهش از دستگاه رامان HORIBA Scientific LabRAM HR Olympus BX41 بود، استفاده شد. که مجهز به میکروسکوپ BX41 بود، استفاده شد. طول موج لیزر استفاده شده ۵۳۲ نانومتر است. لیزر روی سطح نمونه روی نقطه‌ای به طول یک میکرومتر با بزرگنمایی ۱۰۰ متمرکز شد. برای مطالعه ساختار، بررسی مورفولوژی و تعیین اندازه تخلخل‌های نمونه‌های فوم گرافن خودایستا و نمونه‌های کامپوزیتی از میکروسکوپ الکترونی رویشی گسیل میدانی^{۱۵} ساخت شرکت Ziess Gemini-LEO 1530، (Equipped to Inlense) استفاده شد. به منظور اندازه‌گیری تخلخل‌ها از نرم‌افزار J Image استفاده شد. به منظور ارزیابی رفتار مکانیکی و همچنین الکتریکی به منظور ارزیابی رفتار مکانیکی و همچنین الکتریکی



ب

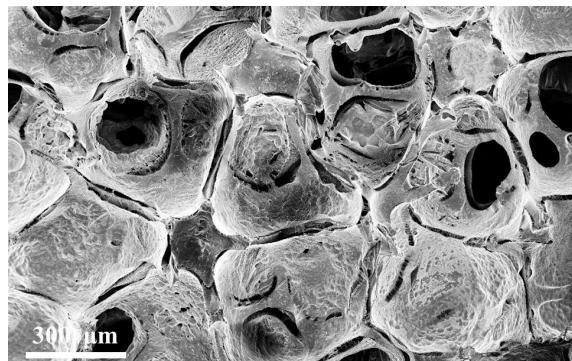


الف

شکل ۵- تصاویر میکروسکوپی الکترونی رو بشی نشر میدانی از گرافن سنتز شده روی فوم نیکل در دمای 1080°C در بزرگنمایی‌های مختلف

یک شیفت (حدود 20° بر سانتی‌متر) به سمت مقادیر بالاتر دارد. طیف رامان نمونه CH-1080 شامل باندهای G و $\text{I}_{2\text{D}}$ هستند و هیچ نشانی از باند D وجود ندارد. شدت باند D به طور مستقیم به عیوب‌های نمونه نسبت داده می‌شود [۱۸ و ۲۲]. این نشان می‌دهد که گرافن تشکیل شده از عیوب‌های کمی برخوردار بوده و درجه بلورینگی بالایی دارد. همچنین نسبت $\text{I}_{2\text{D}}/\text{I}_{\text{G}}$ و پهنا در نیمه ماکزیمم ارتفاع (FWHM) برای نمونه CH-1080 به ترتیب، $0/49$ و 72 است. بنابراین شدت قلهای D بیشتر از قله G و همچنین FWHM بزرگ‌تری نسبت به گرافن تکلایه (حدود 30° بر سانتی‌متر) دارد. بنابراین می‌توان نتیجه گرفت که یک ساختار گرافیتی با گرافن چندلایه بدون هیچ نظم انباشتگی بین لایه‌های مجاور وجود دارد و به طور کلی می‌توان گفت نمونه‌ها حاوی ذرات گرافن چندلایه توربواستراتیک هستند [۲۱]. همان‌طور که از منحنی‌های رامان مشاهده می‌شود، قله D وجود نداشته و این نشان می‌دهد که عیوب‌های ساختاری در این دما بسیار کم و کربستالیته گرافن سنتز شده بالا است [۲۳]. تصاویر میکروسکوپی الکترونی رو بشی گسیل میدانی گرافن رشد داده شده روی فوم نیکلی (تصویرگیری بدون حذف زیرلایه نیکلی انجام شد) در شکل (۵) نشان داده شده است. مکانیزم تشکیل گرافن روی زیرلایه نیکلی، مکانیزم رسوب و جدایش سطحی طی سرد شدن است. نیکل از جمله فلزاتی

می‌دهد. منحنی رامان گرافن، دو قله مشخص و مجزا دارد: قله G (1587°C بر سانتی‌متر) و 2D (2700°C بر سانتی‌متر) که موقعیت قله‌ها، عرض و ارتفاع می‌تواند برای ارزیابی و شناسایی مواد مختلف استفاده شود [۱۶، ۳ و ۱۷]. در لایه‌های گرافنی بی‌نظم و همراه عیوب، برخی از باندهای دیگر مثل باند D (1350°C بر سانتی‌متر)، D^* (1620°C بر سانتی‌متر)، G^* (2450°C بر سانتی‌متر) [۲۰] نیز ایجاد می‌شود [۱۸ و ۱۹] و D^* (2950°C بر سانتی‌متر) [۲۱] نیز ایجاد می‌شود [۲۱]. اطلاعات مفیدی می‌تواند از قله‌های طیف رامان گرافن به دست آید [۱۸ و ۲۲]. نسبت شدت قله‌های G به 2D برای گرافن تکلایه حدود دو و برای گرافن چندلایه کمتر از یک است. همچنین پهنا در نیمه ماکزیمم ارتفاع (FWHM)، موقعیت، شدت و شکل قله 2D پارامترهای مهم برای مشخصه‌یابی لایه‌های گرافن و نظم انباشتگی در امتداد محور C در ساختار گرافیتی است [۱۸، ۲۱ و ۲۲]. گزارش شده است وقتی از متان برای سنتز گرافن استفاده می‌شود نسبت $\text{I}_{2\text{D}}/\text{I}_{\text{G}}$ اغلب بین $0/5$ تا یک به ترتیب برای گرافن کم‌لایه تا گرافن چندلایه بسته به موقعیت آنالیز رامان روی نمونه فوم گرافن است. این پدیده به رسوب ترجیحی اتم‌های کربن در مرز دانه‌های زیرلایه نیکل پلی‌کربیتان نسبت داده می‌شود و در این محل‌ها تعداد لایه‌های بیشتری از گرافن تشکیل می‌شود [۱۳]. لازم به ذکر است که موقعیت قله 2D در گرافن توربواستراتیک ^{۱۷}



شکل ۶- تصویر میکروسکوپی الکترونی روبشی از داربست پلی‌کاپرولاتون در بزرگنمایی‌های مختلف

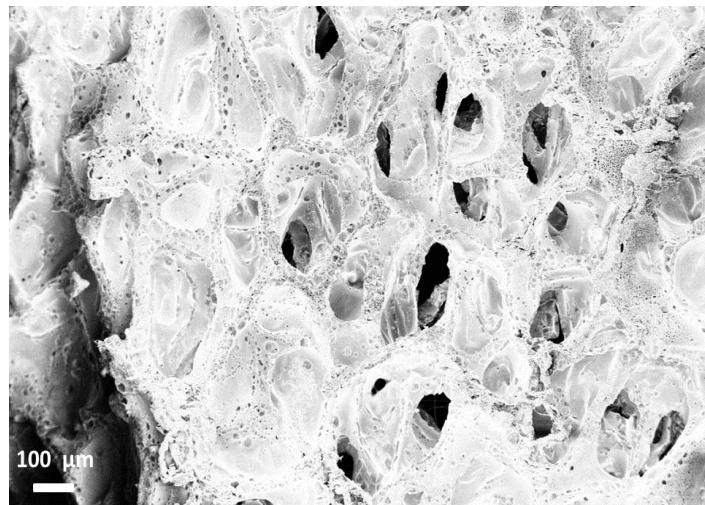
پلیمری هم تخلخل میکرومتری دارد و هم خود شاخه‌های ساختار سه‌بعدی پلیمری به‌دلیل حذف نیکل توخالی هستند. از این‌رو انتظار می‌رود که از نظر ویژگی انتقال مواد مغذی و اکسیژن و ... به‌خوبی عمل کند. شکل (۷) تصویر میکروسکوپی الکترونی روبشی گسیل میدانی از سطح داخلی نمونه-Drop-1080 که دو مرتبه به‌صورت قطره‌ای پوشش داده شده است را نشان می‌دهد. ساختار گرافن سه‌بعدی کاملاً مشخص است و پلیمر داخل برخی حفرات و سطح شاخه‌های گرافن را پوشانده است. تخلخل‌های ناشی از تبخیر حلال از سطح پلیمر نیز قابل مشاهده است.

شکل (۸) تصاویر میکروسکوپی الکترونی روبشی گسیل میدانی نمونه-Drop& dip-1080 را که با روش قطره‌ای و غوطه‌وری ساخته شده است نشان می‌دهد. مشخص است که پلیمر بخش عمده‌ای از نمونه را پوشانده و تنها در محل تخلخل‌ها، گرافن قابل مشاهده است. خواص مکانیکی و الکتریکی کanal هدایت ساخته شده نیز مورد بررسی قرار گرفت. مطالعات زیادی هست که خصوصیات بیومکانیکی عصب‌ها را مورد ارزیابی قرار داده است. اما نتایج اکثر این مطالعات از یکدیگر متفاوت هستند که علت آن بررسی عصب‌های مختلف، روش‌های جراحی و عوامل دارویی متفاوتی است که استفاده می‌شود [۲۵]. در واقع مقادیر خواص مکانیکی بسته به نوع عصب، نوع حیوان و حتی خصوصیات بیولوژیکی حیوان موردنظر مثل سن و جنس، تغییر می‌کند چرا که در هر مورد اجزای ماتریکس برون سلولی (ECM)^{۱۷} یعنی

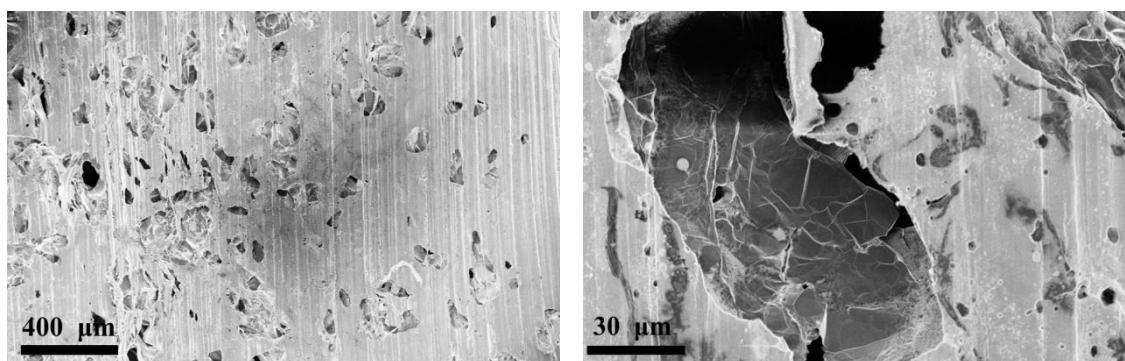
است که قابلیت انحلال کربن در آن بالا است بنابراین در مرحله رشد متان روی زیرلایه نیکلی طبق معادله (۱) تجزیه شده و کربن به درون حجم نیکل نفوذ می‌کند. طی مرحله سرد شدن، کربن حل شده از حجم به سطح نیکل آمده و تشکیل لایه گرافنی را می‌دهد. تحقیقات نشان داده که در نیکل پلی‌کریستال در مکان مرزدانه‌ها و عیب‌ها تعداد لایه گرافن بیشتری تشکیل می‌شود و محدوده‌ای از تعداد لایه‌های گرافنی وجود دارد. در سنتز گرافن روی نیکل پلی‌کریستال، پوشش به‌طور کامل یکنواخت نیست و در برخی مناطق تعداد لایه‌های گرافن بیشتر است. به‌طور عمومی این مناطق مرزدانه‌ها یا محل برخورد دانه‌ها هستند [۱۳]. همچنین چین و چروک‌هایی روی سطح نمونه مشاهده می‌شود (شکل ۵-ب) که گزارش شده است چروکیدگی و ترک‌های ایجاد شده روی سطح به‌دلیل اختلاف ضریب انبساط حرارتی بین زیرلایه نیکلی و گرافن تشکیل شده است [۱۳].



شکل (۹) تصویر میکروسکوپی الکترونی روبشی گسیل میدانی داربست پلیمری ساخته شده را نشان می‌دهد. همان‌طور که مشاهده می‌شود ساختار داربست پلیمری همانند ساختار فوم نیکلی است که داخل برخی از حفرات با پلیمر پر و یا نیمه‌پر شده است و برخی از حفرات نیز خالی باقی مانده‌اند. قبلًا کanal هدایت از پلی‌کاپرولاتون با روش‌هایی مثل الکتروریسی، قالب‌گیری تزریقی و ... ساخته شده است [۲۴]. اما با استفاده از فوم نیکلی به عنوان الگو این کار انجام نشده بود. این داربست



شکل ۷- تصویر میکروسکوپی الکترونی روشی گسیل میدانی از نمونه Drop-1080



شکل ۸- تصاویر میکروسکوپی الکترونی روشی گسیل میدانی نمونه Drop& dip -1080

فوم گرافن خودایستا در حالت فشاری و کششی به ترتیب دارای مدلول یانگ حدود $1/2$ مگاپاسکال و 339 کیلوپاسکال و استحکام نهایی در حالت کششی برابر $4/8$ کیلوپاسکال است و فوم در حالت فشاری بهتر عمل می‌کند. همچنین گزارش کرد که استحکام فوم در کشش به دلیل هم راستا شدن شاخه‌های گرافنی است که شاخه‌ها را قادر می‌سازد که از خصوصیات صفحه‌ای گرافن استفاده کند [۲۷]. علاوه بر این رفتار کششی فوم گرافن نشان داد که شکست فوم گرافن در یک صفحه 45 درجه رخ می‌دهد. این دلالت می‌کند که فوم گرافن ساختار پیوسته‌ای دارد که می‌تواند نیروها را از طریق کل فوم انتقال دهد [۷]. اما مشاهده شد که به علت عیب در ساختار فوم گرافن مثل شاخه‌های گرافن ترک خورده و ورقه‌های گرافنی ناپیوسته،

کلارژن و الاستین تغییر کرده و خواص عصب تغییر خواهد کرد [۲۶]. در جدول (۳) مقادیر پارامترهای مکانیکی اندازه‌گیری شده برای عصب‌های حیوانات مختلف در چندین پژوهش، خواص مکانیکی فوم گرافن خودایستا ارائه شده است. همان‌طور که مشاهده می‌شود مقادیر خواص مکانیکی برای دو عصب متفاوت از یک حیوان (خوک) و همچنین یک عصب از دو حیوان مختلف (مثل خوک و موش صحرایی)، متفاوت است. تحقیقات نشان داده است که خواص مکانیکی عصب خوک به عصب انسان نزدیک‌تر است؛ بنابراین مقایسه داده‌ها با عصب خوک منطقی است [۲۶].

خواص مکانیکی فوم گرافن خودایستا نیز در جدول (۳) ارائه شده است. نتایج تحقیقات نایتو و همکاران نشان داد که

جدول ۳- خصوصیات مکانیکی چند عصب در حیوانات مختلف و گرافن سه بعدی

شماره	نوع عصب/ ماده	مدول یانگ (مگاپاسکال)	استحکام کششی نهایی (مگاپاسکال)	کرنش در شکست	نوع حیوان	مقاومت الکتریکی (اهم) مرجع
۱	Peroneal	۷/۷۵ ± ۱/۲۶	۱/۲۳ ± ۰/۱۳	۰/۲۳ ± ۰/۰۸	خوک	[۲۶]
۲	Tibial	۷/۴۳ ± ۱/۶۹	۰/۸۷ ± ۰/۲۹	۰/۱۶ ± ۰/۰۵	خوک	[۲۶]
۳	Fresh sciatic nerves	۰/۵۸	۲/۷	۰/۸۱	موس صحرایی	[۳۰]
۴	Acellular sciatic nerves	۰/۵۷	۱/۴	۰/۴۸	موس صحرایی	[۳۰]
۵	sciatic nerve	۱/۷	۰/۸۴ ± ۰/۱	۰/۶۰ ± ۰/۰۲	خرگوش	[۲۵]
۶	گرافن سه بعدی خودایستا	۰/۳۴	۰/۰۰۴۸	۰/۰۵	-	[۲۷]

Drop & dip-1080 افزایش می‌یابد. بنابراین می‌توان گفت تخلخل مهم‌ترین عامل در تعیین خواص مکانیکی کانال‌های هدایت ساخته شده است به طوری که کاهش درصد تخلخل نمونه‌های کامپوزیتی، باعث افزایش قابل توجهی در خواص مکانیکی (افزایش استحکام کششی نهایی از ۰/۰۶ مگاپاسکال برای کanal پلی‌کاپرولاتون به حدود ۱/۸ مگاپاسکال برای نمونه‌های کامپوزیتی) می‌شود.

مقایسه خواص مکانیکی کانال‌های کامپوزیتی ساخته شده با عصب خوک (که در جدول ۳ گزارش شده است) نشان می‌دهد که کانال‌های هدایت کامپوزیتی برای کاربرد به عنوان کanal هدایت عصبی خواص مکانیکی قابل قبولی دارند. نمونه Drop & dip که با روش قطره‌ای و غوطه‌وری ساخته شده است، قابلیت کار با دست بیشتری دارد. این نمونه به راحتی خم شده و با فیچی بریده می‌شود. بنابراین می‌توان یک کanal هدایت با طول زیاد را بسته به نیاز به کانال‌هایی با طول‌های کوچک‌تر برید.

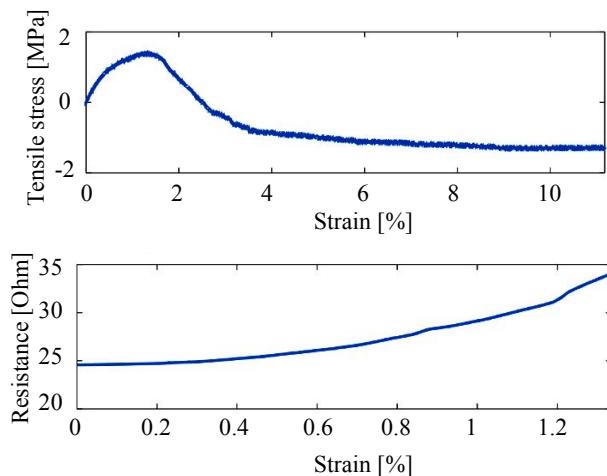
مقادیر مقاومت الکتریکی برای هر کدام از نمونه‌های ساخته شده در این پژوهش نیز در جدول (۴) ارائه شده است. کanal هدایت ساخته شده از پلی‌کاپرولاتون (بدون گرافن سه بعدی)، هیچ‌گونه هدایت الکتریکی ندارد اما کانال‌های هدایت کامپوزیتی ساخته شده هادی هستند. مقاومت الکتریکی کanal هدایت ساخته شده برای نمونه پوشش داده شده با روش

فقط بخش کوچکی از شاخه‌های گرافنی بارها را تحمل می‌کند. ساخت یک ساختار فوم گرافن که عیوب‌های کمتر داشته باشد منجر به تحمل بار بیشتر توسط شاخه‌ها شده و بنابراین خصوصیات مکانیکی گرافن سه بعدی را افزایش می‌دهد [۲۷]. همچنین انتقال بار در امتداد شاخه‌های به هم متصل و سرهای فوم گرافنی، علاوه بر مدول الاستیک صفحه‌ای بالای آن، می‌تواند استحکام کششی نهایی کامپوزیت‌های زمینه پلیمری را افزایش دهد. بنابراین شبکه فوم گرافنی اجازه انحراف ترک را داده و نتیجه افزایش تافنس شکست مواد کامپوزیتی بر پایه فوم گرافن است [۲۸]. با توجه به این تحقیقات انجام شده مشخص است که فوم گرافن خودایستا به تنها یک استحکام کمی دارد چرا که ساختار هندسی فوم گرافنی کرنش محدودی را تحمل می‌کند و خصوصیات مکانیکی آن بایستی با کامپوزیت‌سازی با پلیمر تقویت شود [۲۹].

جدول (۴)، خواص مکانیکی و الکتریکی نمونه‌های ساخته شده در این پژوهش را به همراه درصد تخلخل نمونه‌ها نشان می‌دهد. کanal پلی‌کاپرولاتون ۶۲/۵ درصد تخلخل دارد در حالی که درصد تخلخل نمونه‌های کامپوزیتی Drop-1080 & dip-1080 به ترتیب به ۴۵/۵ و ۱۵ درصد کاهش می‌یابد. همچنین مدول یانگ نمونه‌های ساخته شده از ۰/۶۲ مگاپاسکال برای کanal پلی‌کاپرولاتون به ۲/۷۲ و ۳/۹۰ درصد تخلخل دارد. همچنین مکانیکی مدول یانگ نمونه‌های ساخته شده از Drop-1080 & dip-1080 به ترتیب برای کanal های کامپوزیتی ۱۳۹۹

جدول ۴- خصوصیات مکانیکی و الکتریکی کانال‌های هدایت کامپوزیتی ساخته شده

مقاومت الکتریکی (آhm)	کرنش در شکست	درصد تخلخل	استحکام کششی نهایی (مگاپاسکال)	مدول یانگ (مگاپاسکال)	کد نمونه
Over load	$62/5 \pm 3/8$	۰/۱۱	۰/۰۶	۰/۶۲	PCL scaffold
۳۲	$45/5 \pm 0/5$	۳	۱/۸۵	۲/۷۲	Drop-1080
۲۵	15 ± 5	۲	۱/۸۰	۳/۹۰	Drop & dip-1080



شکل ۹- الف) منحنی تنش-کرنش و ب) منحنی مقاومت الکتریکی - کرنش Drop-Dip-1080

قطع می‌شود و درنهایت استحکام شروع به کاهش و مقاومت شروع به افزایش می‌کند.

۴- نتیجه گیری

در این پژوهش کanal هدایت عصبی بر پایه گرافن سه بعدی سنتز شده با روش رسوب شیمیایی بخار ساخته شد. آنالیز رامان نمونه‌ها نشان داد که گرافن سنتز شده به صورت چندلایه و با عیب بسیار کم است. تصاویر میکروسکوپی الکترونی رویشی حضور مناطق تیره و روشن که به محدوده تعداد لایه‌های گرافن بستگی دارد را نشان داد. استفاده از پلیمر محافظ سایکلودودکان امکان حذف نیکل بدون آسیب رسیدن به ساختار گرافن سه بعدی را فراهم کرد. بررسی خواص کanal‌های هدایت عصبی ساخته شده نشان داد کanal ساخته شده از پلی‌کاپرولاکتون هدایتی ندارد اما کanal‌های ساخته شده از گرافن سه بعدی / پلی‌کاپرولاکتون مقاومت الکتریکی بسیار

قطرهای و نمونه پوشش داده شده با روش قطرهای / غوطه‌وری نزدیک بهم است. بنابراین با مقایسه خواص مکانیکی چند عصب ارائه شده در جدول با کanal هدایت ساخته شده می‌توان گفت کanal هدایت ساخته شده بر پایه گرافن سه بعدی / پلیمر با روش قطرهای و غوطه‌وری، خصوصیات مکانیکی مناسبی برای استفاده در ترمیم عصب قطع شده دارا است. علاوه بر این حضور گرافن سه بعدی در هسته ساختار کanal هدایت عصبی باعث افزایش هدایت الکتریکی شده و انتظار می‌رود بهبود فرایند ترمیم عصب و رشد آکسون‌ها را به دنبال داشته باشد. همچنین شکل (۹) منحنی تنش-کرنش و مقاومت-کرنش را برای نمونه Drop-dip-1080 نشان می‌دهد. با مقایسه روند منحنی‌ها می‌توان گفت در محدوده‌ای که استحکام نمونه شروع به کاهش می‌کند، مقاومت نمونه شروع به افزایش می‌کند. در واقع با اعمال نیروی کششی، شاخه‌های گرافن شروع به جدا شدن از هم دیگر کرده و مسیر اعمال نیرو یا حرکت الکترون نیز

۲/۷۲ مگاپاسکال برای کانال‌های کامپوزیتی می‌شود.

تشکر و قدردانی

از صندوق حمایت از پژوهشگران کشور به دلیل حمایت مالی از این پژوهش سپاسگزاری می‌شود.

پایین (حدود ۳۲ اهم) دارند و این نشان می‌دهد حضور گرافن سه‌بعدی باعث افزایش هدایت الکتریکی کانال شده و انتظار می‌رود که این امر بهبود فرایند ترمیم عصب و رشد آکسون‌ها را به دنبال داشته باشد. بررسی خواص مکانیکی نمونه‌ها نشان داد کاهش تخلخل‌ها با ساخت کامپوزیت، منجر به افزایش استحکام کششی نهایی و مدول یانگ بهتری از حدود ۰/۰۶ و ۰/۶۲ مگاپاسکال برای کانال پلی‌کاپرولاتون تا حدود ۰/۸۰ و

واژه‌نامه

1. graphene flakes
2. polylacticoglycolic acid (PLGA)
3. layer by layer coating
4. polycaprolactone (PCL)
5. polyglycolide acid/Polydopamine (PGA/PDA)
6. in vivo
7. in vitro
8. chemical vapor deposition (CVD)
9. food and drug administration (FDA)
10. induction chemical vapor deposition (ICVD)
11. poly methyl methacrylate (PMMA)
12. Cyclododecane
13. cyclic hydrocarbon
14. free-standing
15. field emission scanning electron microscope (FESEM)
16. scanning electron microscope (SEM)
17. turbostratic

مراجع

1. Kayhan, E., "Graphene: Synthesis, Characterization, Properties and Functional Behavior as Catalyst Support and Gas Sensor", Ms.c Thesis, Department of Chemistry, Technical University of Darmstadt, 2013.
2. Sharon, M., Shinohara, H., and Tiwari, A., *Graphene: An Introduction to the Fundamentals and Industrial Applications*, New Jersey: Wiley, ISBN: 978-1-118-84256-0, 2015.
3. Sharma, D., "Chemical Vapor Deposition of Graphene on a Dielectric Substrate and Its Characterization", MSc Thesis, University of Eastern Finland, Department of Physics and Mathematics, 2012.
4. Li, N., Zhang, Q., Gao, S., Song, Q., Huang, R., Wang, L., Liu, L., Dai, J., Tang, M., and Cheng, G., "Three-Dimensional Graphene Foam as a Biocompatible and Conductive Scaffold for Neural Stem Cells", *Scientific Reports*, Vol. 3, pp. 1-6, 2013.
5. Golafshan, N., Kharaziha, M., and Fathi, M., "Tough and Conductive Hybrid Graphene-PVA: Alginate Fibrous Scaffolds for Engineering Neural Construct", *Carbon*, Vol. 111, pp. 752-763, 2017.
6. Hong, S. W., Lee, J., Kang, S. H., Hwang, E. Y., Hwang, Y. S., Lee, M. H., Han, D. W., and Park, J. C., "Enhanced Neural Cell Adhesion and Neurite Outgrowth on Graphene-Based Biomimetic Substrates", *BioMed Research International*, Vol. 2014, pp. 1-8, 2014.
7. Yuan, W., "An 4?bvcntegrated Multi-Layer 3D-Fabrication of PDA/RGD Coated Graphene Loaded PCL Nanoscaffold for Peripheral Nerve Restoration", *Nature Communications*, Vol. 9, No. 323, pp. 1-16, 2018.
8. Jakus, A. E., Secor, E. B., Rutz, A. L., Jordan, S. W., Hersam, M. -C., and Shah, R. -N., "Three Dimensional Printing of High-Content Graphene Scaffolds for Electronic and Biomedical Applications", *American Chemical Society*, Vol. 9, pp. 4636-4648, 2015.
9. Qin, Z., Jung, G. S., Kang, M. J., and Buehler, M., "The Mechanics and Design of a Lightweight Three-Dimensional Graphene Assembly", *Science Advanced*, Vol. 3, e1601536, 2017.
10. Min, Z., Wen-Long, W., and Xue-Dong, B., "Preparing Three-Dimensional Graphene Architectures: Review of Recent Developments", *Chinese Physics B*, Vol. 22, No. 9, pp. 1-6, 2013.
11. Chen, Z., Ren, W., Gao, L., Liu, B., Pei, S., and Cheng, H. M., "Three-Dimensional Flexible and Conductive Interconnected Graphene Networks Grown by Chemical Vapour Deposition", *Nature Materials*, Vol. 10, pp. 424-428, 2011.
12. Lai, Y. C., Yu, S. C., Rafailov, P. M., Vlaikova, E.,

- Valkov, S., Petrov, S., Koprinarova, J., Terziyska, P., Marinova, V., Lin, S. -H., Yu, P., Chi, G. -C., Dimitrov, D., and Gospodinov, M. M., "Chemical Vapour Deposition Growth of Graphene Layers on Metal Substrates", *Journal of Physics: Conference Series*, Vol. 558, p. e 012059, 2014.
13. Trinsoutrot, P., Vergnes, H., and Caussat, B., "Three Dimensional Graphene Synthesis on Nickel Foam by Chemical Vapor Deposition from Ethylene", *Materials Science and Engineering: B*, Vol. 179, pp. 12-16, 2014.
14. Kehoe, S., Zhang, X. F., and Boyd, D., "FDA Approved Guidance Conduits and Wraps for Peripheral Nerve Injury: A Review of Materials and Efficacy", *Injury*, Vol. 43, pp. 553-572, 2012.
15. Capasso, A., De Francesco, M., Leoni, E., Dikonimos, T., Buonocore, F., Lancellotti, L., Bobeico, E., Sarto, M. S., Tamburrano, A., De Bellis, G., and Lisi, N., "Cyclododecane as Support Material for Clean and Facile Transfer of Large-Area few-Layer Graphene", *Applied Physics Letters*, Vol. 105, No. 11, p. 113101, 2014.
16. Tan, A. "Optimization of Chemical Vapor Deposition Grown Graphene", Ph.D. Thesis, Department of Physics, Linfield College, McMinnville, 2014.
17. Pollard, B., "Growing Graphene via Chemical Vapor Deposition", Ph.D. Thesis, Department of Physics, Pomona College, 2011.
18. Malard, L. M., Pimenta, M. A., Dresselhaus, G., and Dresselhaus, M. S., "Raman Spectroscopy in Graphene", *Physics Reports*, Vol. 473, No. 5-6, pp. 51-87, 2009.
19. Ferrari, A. C., "Determination of Bonding in Diamond-Like Carbon by Raman Spectroscopy", *Diamond and Related Materials*, Vol. 11, pp. 1053-1061, 2002.
20. Hawaldar, R., Merino, P., Correia, M. R., Bdikin, I., Gracio, J., Mendez, J., Martin-Gago, J. A., and Singh, M. K., "Large-Area High-Throughput Synthesis of Monolayer Graphene Sheet by Hot Filament Thermal Chemical Vapor Deposition", *Scientific Reports*, Vol. 2, p. 682, 2012.
21. Habibi, A., Khoie, A., FarzadMahboubi, S. M. M., and Urgen, M., "Fast Synthesis of Turbostratic Carbon Thin Coating by Cathodic Plasma Electrolysis", *Thin Solid Films*, Vol. 621, pp. 253-258, 2017.
22. Ferrari, A. C., "Raman Spectroscopy of Graphene and Graphite: Disorder, Electron-Phonon Coupling, Doping and Nonadiabatic Effects", *Solid State Communications*, Vol. 143, No. 1-2, pp. 47-57, 2007.
23. Calizo, I., Ghosh, S., Bao, W., Miao, F., Ning Lau, C., and Balandin, A. A., "Raman Nanometrology of Graphene: Temperature and Substrate Effects", *Solid State Communications*, Vol. 149, No. 27-28, pp. 1132-1135, 2009.
24. Arslantunali, D., Dursun, T., Yucel, D., Hasirci, N., and Hasirci, V., "Peripheral Nerve Conduits: Technology Update", *Medical Devices: Evidence and Research*, Vol. 7, pp. 405-524, 2014.
25. Mekaj, A. Y., Morina, A. A., Lajqi, Sh., Manxhuka-Kerliu, S., Kelmendi, F. -M., and Duci, S. -B., "Biomechanical Properties of the Sciatic Nerve Following Repair: Effects of Topical Application of Hyaluronic Acid or Tacrolimus", *International Journal of Clinical and Experimental Medicine*, Vol. 8, No. 11, pp. 20218-20226, 2015.
26. Zilic, L., Garner, P. E., Yu, T., Roman, S., Haycock, W. J., and Wilshaw, S -P., "An Anatomical Study of Porcine Peripheral Nerve and Its Potential use in Nerve Tissue Engineering", *Journal of Anatomy*, Vol. 227, pp. 302-314, 2015.
27. Nieto, A., Boesl, B., and Agarwal, A., "Multi-Scale Intrinsic Deformation Mechanisms of 3D Graphene Foam", *Carbon*, Vol. 85, pp. 299-308, 2015.
28. Jia, J., Sun, X., Lin, X., Shen, X., Mai, Y. -W., and Kim, J. -K., "Exceptional Electrical Conductivity and Fracture Resistance of 3D Interconnected Graphene Foam/Epoxy Composites", *ACS Nano*, Vol. 8, No. 6, pp. 5774-5783, 2014.
29. Idowu, A., Boesl, B., and Agarwal, A., "3D Graphene Foam-Reinforced Polymer Composites – A Review", *Carbon*, Vol. 135, pp. 52-71, 2018.
30. Borschel, H. G., Kia, F. K., Kuzon, M. W., and Dennis, G. R., "Mechanical Properties of Acellular Peripheral Nerve", *Journal of Surgical Research*, Vol. 114, No. 2, pp. 133-139, 2003.