

ساخت و مشخصه‌یابی نانوکامپوزیت پلی‌کاپرولاکتون- زئولیت Y برای مهندسی بافت استخوان

ندا ذاکری^۱، حمیدرضا رضایی^{۱*}، جعفر جوادپور^۱ و مهشید خرازیها^۲

۱- دانشکده مهندسی مواد و متالورژی دانشگاه علم و صنعت ایران

۲- دانشکده مهندسی مواد، دانشگاه صنعتی اصفهان، ایران

(دریافت مقاله: ۱۳۹۹/۵/۲۸ - دریافت نسخه نهایی: ۱۳۹۹/۱۲/۹)

چکیده - در سال‌های اخیر استفاده از داربست‌های نانوکامپوزیتی پلیمر-سرامیک در مهندسی بافت استخوان به دلیل شباهت این ساختارها به بافت طبیعی استخوان، مورد توجه قرار گرفته است. در این میان، پلی‌کاپرولاکتون در ساخت داربست‌های استخوانی مورد توجه است. کامپوزیت کردن پلی‌کاپرولاکتون با فازهای سرامیکی مانند زئولیت که توانایی بهبود تشکیل استخوان را دارند می‌تواند منجر به بهبود کارایی این پلیمر در داربست‌های استخوانی شود. هدف از این پژوهش، ساخت داربست نانوکامپوزیتی پلی‌کاپرولاکتون - زئولیت با خواص مکانیکی، زیست تخریب‌پذیری و زیست فعالی مناسب برای کاربرد در مهندسی بافت استخوان اسفنجی است. برای ساخت این داربست از دو روش ریخته‌گری حلال - شستشو ذرات و خشک کردن انجمادی در کنار هم استفاده شد. بررسی‌های میکروسکوپی نشان داد که اندازه تخلخل‌های داربست‌های حاصل بین ۲۰۰ تا ۴۰۰ میکرومتر است. نقشه توزیع عنصری، توزیع یکنواخت فاز نانوزئولیت را در زمینه پلی‌کاپرولاکتون تأیید کرد. همچنین با توجه به نتایج طیف‌سنجی مادون قرمز با تبدیل فوریه نوع اتصال نانوذرات زئولیت به زمینه پلی‌کاپرولاکتون اتصال فیزیکی تعیین شد. نتایج بررسی خواص مکانیکی داربست‌ها نشان‌دهنده افزایش مدول ینگ و استحکام فشاری (به ترتیب از ۰/۴ تا ۰/۳ و ۳ تا ۷ مگاپاسکال) بعد از اضافه شدن فاز نانوزئولیت به داربست‌ها بود. با افزودن نانوزئولیت آبدوستی پلی‌کاپرولاکتون افزایش یافت و کاهش وزن بیشتری مشاهده شد (برای داربست حاوی ۲۰ درصد زئولیت ۱/۶ $\pm$ ۵۳/۵۲ درصد). همچنین تشکیل هیدروکسی آپاتیت در محیط شبیه‌سازی شده بدن سرعت گرفت. نتایج نشان می‌دهد که داربست‌های ساخته شده قابلیت کاربرد در مهندسی بافت استخوان اسفنجی را دارند.

واژه‌های کلیدی: زئولیت، پلی‌کاپرولاکتون نانوکامپوزیت، داربست، مهندسی بافت.

Fabrication and Characterization of Polycaprolactone – Zeolite Y Nanocomposite for Bone Tissue Engineering

N. Zakeri¹, H. R. Rezaie^{1*}, J. Javadpour¹ and M. Kharaziha²

1. Department of Materials and Metallurgical Engineering, Iran University of Science and Technology, Narmak, Tehran 16846-13114, Iran.

2. Department of Materials Engineering, Isfahan University of Technology, Isfahan 84156-83111, Iran.

* : مسئول مکاتبات، پست الکترونیکی: hrezaie@iust.ac.ir

Abstract: In recent years, nanoceramics have been used in scaffolds to emulate the nanocomposite with a three-dimensional structure of natural bone tissue. In this regard, polycaprolactone biopolymer is widely used as a scaffold in bone tissue engineering. The goal of this research is to produce porous scaffolds of polycaprolactone - zeolite biocomposite with suitable mechanical, bioactive and biological properties for bone tissue engineering applications. The nanocomposite scaffolds were synthesized by solvent casting/particulate leaching and freeze-drying approaches. Microscopic investigations showed generation of pores with an average size of 200-400µm after addition of ceramic phase. Energy dispersive X-ray analysis confirmed uniform distribution of ceramic phase in polycaprolactone matrix. FTIR results determined the binding type of zeolite nanoparticles to the polycaprolactone matrix as physical bonding. The results of mechanical tests showed the increase in young's modulus after addition of ceramic phase (from 0.04 to 0.3 and 3 to 7 MPa, respectively). The hydrophilicity of polycaprolactone increased after adding nanozeolite and more weight loss was observed for scaffold containing 20% zeolite (53.52 ± 1.6%) with an increase in the rate of hydroxyapatite formation. The results showed that the prepared scaffolds have potential for cancellous bone tissue engineering application.

Keywords: Zeolite, Nanocomposite, Tissue engineering, Scaffold.

۱- مقدمه

مهندسی بافت عبارت است از، استفاده از اصول و روش‌های مهندسی برای درمان بافت یا عضو آسیب دیده به گونه‌ای که ساختار آناتومیک و فعالیت بیولوژیک بافت دوباره احیا شود. هدف نهایی مهندسی بافت جایگزینی و بازسازی بافت و عضو از دست رفته به کمک مجموعه‌ای از ابزارهای مهندسی بافت یعنی داربست‌ها، سلول‌ها و مولکول‌های زیستی است [۱]. طبق استاندارد ASTM^۱- F2150، داربست تکیه‌گاه، وسیله ره‌ایش یا زمینه‌ای مناسب برای مهاجرت، ایجاد پیوند و حرکت سلول‌ها یا مولکول‌های زیست‌فعال به منظور جایگزینی، ترمیم و یا بازسازی بافت آسیب دیده، است [۲]. امروزه استفاده از سلول‌های رشد یافته روی داربست‌ها بسیار مورد توجه قرار گرفته است. در این روش داربست‌ها نقش اساسی بر عهده دارند، که رشد سلول‌ها، ماتریکس برون‌سلولی و مولکول‌های بیولوژیکی را هدایت و تشکیل بافت جدید را آسان‌تر می‌کنند [۳ و ۴]. داربست‌های مورد استفاده در مهندسی بافت استخوان باید خصوصاتی از قبیل زیست‌سازگاری، ساختاری با تخلخل‌های باز و به هم پیوسته، قابلیت چسبندگی و تکثیر سلولی، خاصیت القای استخوانی^۲، خواص مکانیکی مشابه با بافت استخوان، زیست تخریب‌پذیری و قابلیت استریل شدن [۵] را داشته باشند.

روش ریخته‌گری حلال یکی از راحت‌ترین روش‌ها برای تهیه داربست‌های با درصد تخلخل بالا و مشخص

است. مشکل این روش این است که امکان دارد حلال آلی به‌طور کامل تبخیر نشود این عیب را می‌توان به کمک خشک کردن کامل داربست با استفاده از فرایند خشک کردن انجمادی از بین برد [۶]. نینگ و همکاران [۷] در سال ۲۰۰۸ میلادی، داربست متخلخل پلی‌کاپرولاکتون را به کمک ترکیب دو روش ریخته‌گری حلال و خشک کردن انجمادی ساختند و از ذرات یخ به عنوان پروژن استفاده کردند. نتیجه داربستی با ساختار متخلخل سه‌بعدی با تخلخل‌های باز و به هم پیوسته (با ابعاد ۳۰۰ میکرومتر و حدود ۷۰-۸۰ درصد) و بدون حضور حلال و ذرات پروژن بود [۷].

پلی‌کاپرولاکتون $(C_6H_{10}O_2)_n$ یک پلی‌استر نیمه بلورین زیست تخریب‌پذیر و زیست‌سازگار است که دمای گذار شیشه‌ای آن حدوداً ۶۰ درجه سانتی‌گراد و دمای ذوب آن در محدوده ۵۷-۶۴ درجه سانتی‌گراد است. از جمله مزایای برتر این پلیمر در مقایسه با سایر پلیمرهای زیستی، سیتیک تخریب قابل تغییر، خواص مکانیکی مناسب و راحتی در شکل‌دهی است که سبب ایجاد ساختاری با تخلخل‌هایی با ابعاد مناسب می‌شود. پلی‌کاپرولاکتون یکی از پلیمرهای مورد توجه در مهندسی بافت استخوان است [۸]. مزیت استفاده از داربست‌های ساخته شده با پلی‌کاپرولاکتون پایداری زیستی و کیفیت مکانیکی مطلوب آنها است که حضور طولانی‌مدت داربست در شرایط بیولوژیکی بدن را تضمین می‌کند. پلی‌کاپرولاکتون توسط میکروارگانیسم‌ها به آرامی در محیط

تخریب می‌شود [۹]. ژو و همکاران [۱۰] در سال ۲۰۱۱ میلادی داربست کامپوزیت لایه‌ای از جنس پلی‌کاپرولاکتون و ژلاتین را ساختند که در این داربست لایه‌ای، پلی‌کاپرولاکتون تأمین‌کننده خواص مکانیکی و دوام و پایداری بود و ژلاتین سطح عالی و تخلخل مناسب به‌منظور بهبود چسبندگی سلولی را فراهم کرد [۱۰]. اهداف استفاده از پلی‌کاپرولاکتون در پژوهش حاضر دستیابی به سرعت تخریب‌پذیری و خواص مکانیکی مناسب است. مواد سرامیکی استفاده شده در مهندسی بافت خواصی مانند زیست تخریب‌پذیری، اندازه تخلخل‌های مناسب برای رشد سلول، پایداری مکانیکی، قابلیت هدایت استخوان و قابلیت حمل فاکتورهای رشد^۳ را بهبود خواهند داد [۱۱].

ژئولیت‌ها بلورهای آلومینا سیلیکات هیدراته از عناصر گروه I, II جدول تناوبی بالاخص سدیم، پتاسیم، منیزیم، کلسیم، استرانسیم و باریم هستند. در ساختمان ژئولیت‌ها آلومینیوم و سیلیسیم و اکسیژن در یک ساختار منظم از سلول‌های چهار وجهی $[\text{SiO}_4]^-$ و $[\text{AlO}_4]^-$ قرار گرفته‌اند و عناصر گروه I, II جدول تناوبی کمبود بار آلومینیوم را جبران می‌کنند [۱۲]. مطالعات اخیر نشان داده است که ژئولیت‌ها اثرات مفید قابل توجهی روی ساختار و تشکیل استخوان دارند. ژئولیت A برای تحریک استخوان‌سازی در افراد مبتلا به پوکی استخوان، مفید بوده است. همچنین ژئولیت A باعث افزایش تکثیر، تمایز و تبدیل فاکتور رشد (TGF β) در سلول‌های معمولی و سلول‌های بالغ استئوبلاست^۴، شده است [۱۳ و ۱۴]. همچنین از ژئولیت در پوشش‌دهی ایمپلنت برای کاهش سمیت استفاده شده است [۱۵]. از ژئولیت نوع ZSM-5 که در آن یون Ca بارگذاری شده است برای ترمیم استخوان استفاده شده است. زیست‌فعالی ژئولیت توسط محلول شبیه‌سازی شده بدن^۵ در بازه‌های زمانی متفاوت بررسی شده است. نتایج نشان داده است که آپاتیت شبه استخوانی در ژئولیت به‌مدت هفت روز پس از غوطه‌وری تشکیل شده است. بنابراین ژئولیت یک ماده بالقوه برای بازسازی بافت استخوانی است [۱۶]. ژئولیت‌ها حاوی سیلیسیم هستند، آزاد شدن سیلیسیم تکثیر سلول‌ها را بهبود بخشیده و

نقشی کلیدی در ایجاد هسته اولیه مواد معدنی زیستی و رشد آن دارند. وجود معیایی از جمله تردی، استحکام شکست پایین و قابلیت شکل‌دهی پایین کاربرد ژئولیت‌ها را به‌صورت یک ماده منفرد محدود کرده است [۱۳ و ۱۴]. بنابراین برای رسیدن به ماده‌ای با خواص مطلوب، ساخت داربست‌های کامپوزیتی پلیمر-سرامیک مورد توجه قرار گرفته است. از مزایای ترکیب پلیمر با مواد غیرآلی، بهبود خواص مکانیکی و ایجاد سطح مناسب برای چسبندگی و گسترش و تکثیر سلولی است.

از پژوهش‌های پیشین مشخص شده است که سطح پلی‌کاپرولاکتون به‌صورت ذاتی آب‌گریز است که این ویژگی مانع تر شدن سطح و واکنش با مایعات بیولوژیکی، که برای چسبندگی و تکثیر سلولی ضروری هستند، می‌شود. این مشکل در داربست‌های خالص پلی‌کاپرولاکتون مشاهده می‌شود و می‌توان این مشکلات را با کامپوزیت کردن زمینه پلی‌کاپرولاکتون با مواد سرامیکی و شیشه‌های زیستی حل کرد [۱۷]. همچنین استفاده از ژئولیت در کنار پلیمرهای مختلف سبب بهبود خواص مکانیکی و زیستی داربست شده است، به‌عنوان مثال، داربست ژلاتین-ژئولیت با روش خشک کردن انجمادی^۶ توسط نینان و همکاران [۱۸] ساخته شده است. نتایج نشان می‌دهد که این داربست‌ها می‌توانند برای کاربرد در مهندسی بافت مورد بررسی قرار گیرند [۱۸]. همچنین نینان و همکاران [۱۶] در سال ۲۰۱۴ میلادی داربستی از ژلاتین-ژئولیت فوجاسیت فعال شده با مس^۷ (CAF) با روش خشک کردن انجمادی برای بهبود و التیام زخم با ضخامت جزئی ساختند. داده‌های به‌دست آمده نشان داد که این داربست کاندید مناسبی برای کاربرد در درمان زخم است [۱۶]. آکمدو [۱۹] در سال ۲۰۱۷ میلادی داربست‌های کیتوسان-ژئولیت A را با روش خشک کردن انجمادی سنتز کردند. نتایج نشان داد که کامپوزیت حاوی ۵/۰ درصد ژئولیت دارای پیوستگی و بقای سلولی مناسب برای سلول hMSC^۸ (سلول‌های بنیادی مزانشیمی مغز استخوان انسان) است [۱۹]. همچنین ژو و همکاران در سال ۲۰۱۷ میلادی داربست‌های ژئولیت نوع

نمونه‌ها روی همزن مغناطیس قرار داده شدند و پس از گذشت دو ساعت، محلول‌ها در قالب حاوی داربست نمکی ریخته شدند. پس از گذشت ۴۸ ساعت و تبخیر حلال آلی، داربست‌های پلیمری و کامپوزیتی به‌همراه نمک از قالب خارج و به مدت چهار روز در آب غوطه‌ور شدند. هر روز آب نمونه‌ها تعویض شد. حاصل این مراحل، داربست متخلخلی از پلی‌کاپرولاکتون و نانوذرات زنولیت بود. به‌منظور حذف کامل حلال پلیمر، نمونه‌ها به مدت ۴۸ ساعت تحت فرایند خشک کردن انجمادی قرار گرفتند.

۲-۲- بررسی مورفولوژی داربست پلی‌کاپرولاکتون - زنولیت

برای بررسی اندازه تخلخل‌های داربست‌ها از تصاویر میکروسکوپی الکترونی روبشی^{۱۰} (SEM, Philips, XL30) استفاده شد. به این منظور، داربست‌ها به مدت ۱۲۰ ثانیه و تحت جریان ۱۰ میلی‌آمپر با طلا پوشش داده شدند و سپس تحت ولتاژ ۱۵-۱۰ کیلوولت از نمونه‌ها عکس گرفته شد. برای اندازه‌گیری قطر حفرات از بیش از ۵ عکس از نقاط مختلف نمونه گرفته شد و اندازه حفرات با استفاده از نرم‌افزار Image J اندازه‌گیری و متوسط آنها به‌همراه انحراف معیار گزارش شد. همچنین به‌منظور مطالعه مورفولوژی داربست‌های پلی‌کاپرولاکتون - زنولیت از تصاویر میکروسکوپی الکترونی روبشی کمک گرفته شد. برای بررسی حضور و نحوه توزیع نانوذرات زنولیت در داربست از طیف‌سنجی پراش انرژی پرتو ایکس^{۱۱} (EDX) و نقشه توزیع فراوانی عناصر (MAP) استفاده شد.

۲-۳- تعیین ترکیب فازی داربست پلی‌کاپرولاکتون - زنولیت

به‌منظور تأیید حضور زنولیت نانومتری در نمونه‌های کامپوزیتی، آزمون الگوی پراش پرتو ایکس^{۱۲} (XRD)، توسط دستگاه پراش پرتو ایکس تتا-دوتا مدل Philips X'Pert - MPD System با پرتو $K\alpha$ فلز هدف مس با طول موج $1.5406 \text{ \AA}$ آنگستروم، ولتاژ ۴۰ کیلوولت، آمپر ۴۰ میلی‌آمپر، صورت گرفت. به‌منظور فازیابی از نرم‌افزار E'Xpert HighScore pluseV2.2 و استانداردهای

ZSM-5 - کیتوسان را از طریق خشک کردن انجمادی سنتز کردند و داروی SC97^۹ را در آن بارگذاری کردند. داربست ZSM-5 / کیتوسان با توجه به ساختار سلسله مراتبی متخلخل زنولیت ZSM-5 و پیوند هیدروژنی بین کیتوسان و SC97، خواص بارگذاری و رهایش داروی مناسبی داشت [۲۰]. با توجه به تحقیقات انجام شده نیاز به داربستی با خواص مکانیکی، زیست تخریب‌پذیری و زیست‌فعالی مناسب غیرقابل انکار است. طبق مطالعات دیگر پژوهشگران اضافه کردن ذرات سرامیکی به داربست‌های پلی‌کاپرولاکتون به بهبود خواص فیزیکی، مکانیکی و بیولوژیکی داربست‌های پلیمری کمک می‌کند و همچنین اضافه کردن زنولیت به داربست‌های پلیمری مختلف باعث بهبود خواص زیستی داربست‌های پلیمری شده است. بنابراین پیش‌بینی می‌شود که اضافه کردن زنولیت به داربست پلی‌کاپرولاکتون باعث بهبود خواص مکانیکی، زیست تخریب‌پذیری و زیست‌فعالی داربست برای استفاده مهندسی بافت استخوان شود.

۲- مواد و روش‌ها

۲-۱- ساخت داربست پلی‌کاپرولاکتون - زنولیت

به‌منظور ساخت داربست پلی‌کاپرولاکتون خالص و پلی‌کاپرولاکتون - زنولیت، ابتدا قالب‌های تفلونی با حجم مشخصی از نمک سدیم کلراید (حدود ۸۰ درصد حجمی قالب) به‌عنوان پروژن پر شدند (ذرات نمک پیش از این به کمک هفت درصد وزنی نمک، آب دوبار تقطیر مرطوب شده بودند). سپس قالب‌ها در خشک کن قرار داده شدند تا رطوبت موجود در ذرات نمک حذف شود. حاصل این مرحله، قالبی حاوی داربست متخلخل نمکی بود. در مرحله بعد، پلی‌کاپرولاکتون به‌طور کامل در کلروفرم (با غلظت ۰/۱ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر) به‌کمک همزن مغناطیس حل شد. به‌منظور ساخت داربست نانوکامپوزیتی درصدهای وزنی مشخص از نانوزنولیت (۵، ۱۰، ۲۰ و ۳۰) به این محلول افزوده شد و نمونه‌ها به مدت ۳۰ دقیقه در حمام اولتراسونیک قرار داده، و

ژئولیت و الگوهای مشاهده شده برای پلی‌کاپرولاکتون استفاده شد.

۲-۴- طیف‌سنجی مادون قرمز با تبدیل فوریه (FTIR)

همچنین به منظور شناسایی و بررسی بنیان‌های موجود در سطح داربست‌های خالص و داربست‌های کامپوزیتی از تکنیک طیف‌سنجی مادون قرمز با تبدیل فوریه (FTIR)، در محدوده ۴۰۰۰-۴۰۰ بر سانتی‌متر و با نرخ روبش دو بر سانتی‌متر، استفاده شد.

۲-۵- اندازه‌گیری درصد تخلخل داربست پلی‌کاپرولاکتون -

ژئولیت

به منظور اندازه‌گیری درصد تخلخل، پنج نمونه از هر ترکیب از داربست تهیه و درصد تخلخل آنها به روش ارشمیدس و به کمک فرمول (۱) محاسبه شده است:

$$V_{sl} = \frac{[W_1 - (W_2 - W_s)]}{\rho} \quad (1)$$

در اینجا V_{sl} حجم داربست، W_1 وزن بطری پر شده با اتانول، W_2 وزن بطری با اتانول و با داربست غوطه‌ور شده، W_s وزن داربست و V_{s2} حجم اولیه داربست است. اندازه‌گیری وزن‌ها با ترازوی پنج رقم اعشار انجام شد.

۲-۶- تعیین زاویه تماس با آب داربست پلی‌کاپرولاکتون -

ژئولیت

به منظور ارزیابی اثرات ژئولیت نانومتری بر میزان آبدوستی داربست‌های پلی‌کاپرولاکتون - ژئولیت، زاویه تماس با آب با استفاده از دستگاه اندازه‌گیری زاویه تماس طبق استاندارد ASTM D5964 تعیین شد. به این منظور، سه نمونه از هر ترکیب انتخاب و با استفاده از این دستگاه، قطره آب روی داربست‌ها انداخته و بعد از پنج ثانیه، از آن تصویر گرفته شد. زاویه تماس با آب با استفاده از نرم‌افزار Image J تعیین شد.

۲-۷- بررسی خواص مکانیکی داربست پلی‌کاپرولاکتون -

ژئولیت

به منظور ارزیابی رفتار مکانیکی داربست‌ها، از آزمون فشار تک‌محوره با نرخ اعمال بار ۵/۰ میلی‌متر بر ثانیه استفاده شد. بدین منظور برای هر نمونه، آزمایش پنج بار تکرار شد. بعد از ترسیم نمودار تنش فشاری- کرنش، استحکام فشاری و ضریب کشسانی با استفاده از نمودارها تعیین شد، میانگین پنج نمونه به همراه انحراف معیار گزارش شد. در این تحقیق، ضریب کشسانی از منطقه خطی نمودار تنش - کرنش (۱۰-۵ درصد کرنش) به دست آمد و استحکام فشاری بر اساس تنشی که در آن ۷۰ درصد تغییر ابعاد در نمونه رخ می‌دهد، تعریف شد.

۲-۸- بررسی زیست تخریب‌پذیری داربست پلی‌کاپرولاکتون

- ژئولیت

آزمون تخریب‌پذیری و بررسی کاهش وزن مطابق با استاندارد ASTM-F1635 انجام شد. سه نمونه از هر ترکیب داربست با اندازه‌های یکسان بریده و وزن آنها با استفاده از یک ترازوی دیجیتال تا پنج رقم اعشار تعیین شد (M_i). نمونه‌ها در لوله‌های شیشه‌ای جداگانه قرار داده و محلول بافر فسفات به میزان ۱۰۰ برابر وزن نمونه به آن اضافه شد و نمونه‌ها در دمای ۳۷ درجه سلسیوس برای مدت یک ماه غوطه‌ور شدند. در بازه زمانی یک هفته‌ای، نمونه‌ها از داخل محلول خارج شده، وزن آنها بعد از خشک شدن کامل در دسیکاتور اندازه‌گیری کرده (M_d) و از این مقادیر برای تعیین میزان تخریب هر یک از داربست‌ها و همچنین میزان جذب آب آنها استفاده شد. بر این اساس میزان کاهش وزن داربست عبارتند از (ASTM D570):

$$\text{کاهش وزن} = \frac{M_i - M_d}{M_i} \times 100 \quad (2)$$

همچنین میزان جذب بافر فسفات نمونه‌های فوق با استفاده از وزن داربست‌ها در شرایط تر (M_w) اندازه‌گیری شد. به این ترتیب میزان جذب بافر فسفات، از طریق رابطه زیر تعیین شد (ASTM D471):

$$PBS(\%) = \frac{M_w - M_i}{M_i} \times 100 \quad (3)$$

همچنین به منظور حفظ شرایط یکنواخت محلول در طول یک ماه هر چهار روز بازیابی شد.

۲-۹- بررسی زیست‌فعالی داربست پلی‌کاپرولاکتون - ژئولیت

به منظور ارزیابی زیست‌فعالی، داربست‌ها به ابعاد 10×10 میلی‌متر مربع بریده شده و در 10 میلی‌لیتر محلول شبیه‌سازی شده بدن، در حمام بن‌ماری با دمای ثابت 37°C درجه سلسیوس غوطه‌ور شدند. محلول شبیه‌سازی شده بدن مطابق با دستورالعمل کوکوبو تهیه شد.

در طول زمان یک ماه غوطه‌وری در محلول فوق، pH محلول اندازه‌گیری شده و در روزهای مشخصی، نمونه‌ها از محلول خارج شد و آزمون‌هایی برای ارزیابی رفتار زیست‌فعالی انجام شد. بعد از 21 روز غوطه‌وری نمونه‌ها از محلول خارج و غلظت یون‌های کلسیم و فسفر موجود در محلول با آزمون پلاسمای همراه شده با استقرا (ICP) ارزیابی شد (ISO10993-18). بعد از یک ماه غوطه‌وری در محلول شبیه‌سازی شده بدن، به منظور بررسی و مشاهده مورفولوژی آپاتیت تشکیل شده در سطح نمونه‌ها از میکروسکوپ الکترونی روبشی و آزمایش توزیع انرژی پرتو ایکس (EDX) استفاده شد.

۳- نتایج و بحث

۳-۱- مشاهدات ریزساختاری و خواص فیزیکی داربست

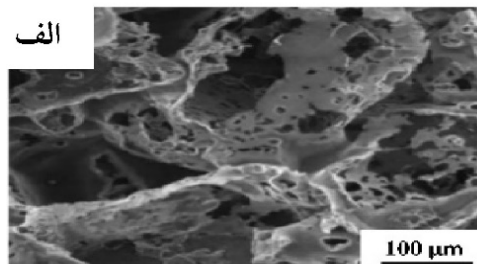
پلی‌کاپرولاکتون - ژئولیت

تصاویر میکروسکوپی الکترونی روبشی و طیف‌سنجی پراش انرژی پرتو ایکس (EDX) داربست پلی‌کاپرولاکتون با درصد‌های مختلف ژئولیت در شکل (۱) ارائه شده است. در طیف‌سنجی پراش انرژی پرتو ایکس (EDX) داربست‌های پلی‌کاپرولاکتون خالص حضور عناصر کربن و اکسیژن مشاهده می‌شود در صورتی که در داربست‌های حاوی ژئولیت عناصر سازنده ژئولیت مانند آلومینوم، سیلیسیم و سدیم نیز مشاهده

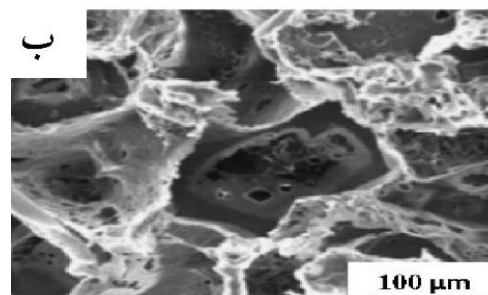
می‌شود، که به معنی حضور نانوذرات ژئولیت در داربست است. با توجه به تصاویر مربوط به داربست‌ها و استفاده از نرم‌افزار Image J، تخلخل بالا و به هم پیوسته با ابعادی در محدوده 200 تا 400 میکرومتر برآورد شد (شکل ۲)، ابعاد تخلخل‌های سطحی به دست آمده برای داربست‌ها در محدوده استاندارد برای داربست‌های استخوانی است، همچنین میکروتخلخل‌های فراوانی (در ابعاد 1 تا 10 میکرومتر) در دیواره‌های داربست مشاهده می‌شود، که تمام معیارهای حفرات در یک داربست ایده‌آل را فراهم می‌کند. این میکروتخلخل‌ها می‌تواند به دلیل خرد شدن یا ورقه‌ورقه شدن پوروژن‌ها یا قرار نگرفتن یک دانه در جایگاهی که اکثریت پوروژن‌ها قرار گرفته‌اند، باشد. تحقیقات نشان داده است که برای مهاجرت و تکثیر سلول‌های استئوبلاست، وجود این حفرات باز و به هم پیوسته ضروری است. همچنین مشاهده می‌شود که افزودن نانوذرات ژئولیت به داربست باعث کاهش ابعاد حفرات داربست شده است، به عبارت دیگر با افزایش درصد ژئولیت ابعاد حفرات داربست کاهش یافته است، اما در درصد‌های بالای نانوذرات ژئولیت این کاهش نسبت به مرحله ابتدایی کمتر بوده است. همچنین افزایش درصد ژئولیت باعث ضخیم‌تر شدن دیواره‌ها و ناهموارتر شدن ساختار شده است. نمونه‌هایی با مقادیر بالاتر ژئولیت (حداکثر 30 درصد وزنی) هنوز ساختار متخلخل را در داربست حفظ کرده‌اند، اما به هم پیوستن منافذ فرعی در آنها رخ داده است.

همچنین درصد تخلخل داربست‌های پلی‌کاپرولاکتون - ژئولیت حاوی درصد‌های مختلف ژئولیت مطابق با روش ارشمیدس محاسبه و در جدول (۱) گزارش شده است. نتایج نشان می‌دهد که به طور کلی درصد تخلخل داربست‌های تهیه شده به این روش بیش از 75 درصد است که یکی از ویژگی‌های مناسب این دسته از داربست‌ها برای مهندسی بافت است. افزایش درصد ژئولیت تا 30 درصد باعث کاهش درصد تخلخل در داربست شده است، که این نتیجه در راستای مشاهدات ریزساختار در تصاویر میکروسکوپی الکترونی که پیش‌تر به آن اشاره شد، است.

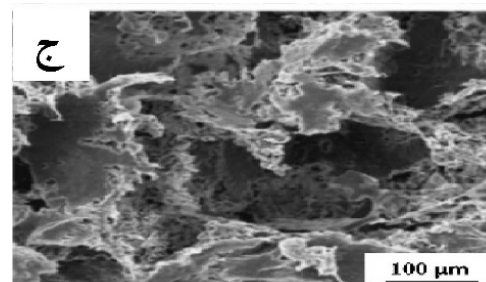
عنصر	درصد وزنی (درصد)	درصد اتمی (درصد)
کربن	۸/۵۹	۴۱/۱۶
اکسیژن	۶/۳۵	۲۲/۸۴
سدیم	۱/۴۲	۳/۵۵
آلومینیوم	۰/۲۶	۰/۵۵
سیلیسیوم	۴/۲۹	۸/۷۹



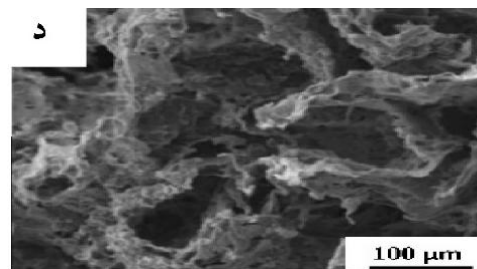
عنصر	درصد وزنی (درصد)	درصد اتمی (درصد)
کربن	۴۱/۶۱	۵۳/۰۵
اکسیژن	۳۵/۸۲	۳۴/۲۸
سدیم	۲/۸۶	۱/۹۰
آلومینیوم	۱/۱۳	۰/۶۴
سیلیسیوم	۱۸/۵۸	۱۰/۱۳



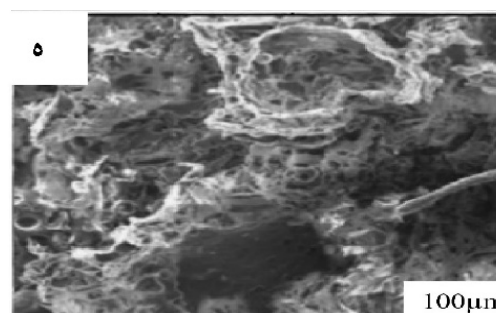
عنصر	درصد وزنی (درصد)	درصد اتمی (درصد)
کربن	۸/۵۹	۴۱/۱۶
اکسیژن	۶/۳۵	۲۲/۸۴
سدیم	۱/۴۲	۳/۵۵
آلومینیوم	۰/۲۶	۰/۵۵
سیلیسیوم	۴/۲۹	۸/۷۹



عنصر	درصد اتمی (درصد)	درصد وزنی (درصد)
کربن	۴۰/۷۳	۵۲/۱۹
اکسیژن	۳۵/۴۲	۳۴/۰۸
سدیم	۵/۳۳	۳/۵۷
آلومینیوم	۰/۶۶	۰/۳۸
سیلیسیوم	۱۷/۸۶	۹/۷۹



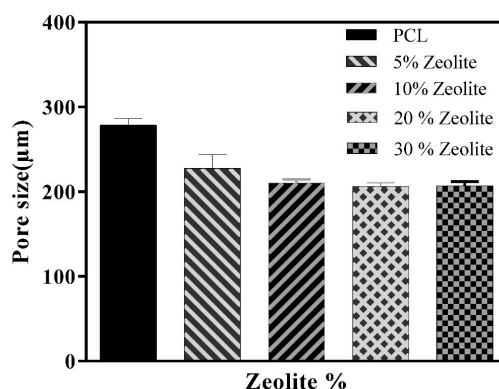
عنصر	درصد اتمی (درصد)	درصد وزنی (درصد)
کربن	۴۰/۷۳	۵۲/۱۹
اکسیژن	۳۵/۴۲	۳۴/۰۸
سدیم	۵/۳۳	۳/۵۷
آلومینیوم	۰/۶۶	۰/۳۸
سیلیسیوم	۱۷/۸۶	۹/۷۹



شکل ۱- تصاویر میکروسکوپی الکترونی روبشی سطح مقطع داربست و نتایج طیف‌سنجی پراش انرژی پرتو ایکس داربست:
الف) پلی‌کاپرولاکتون خالص، ب) نمونه پنج درصد ژئولیت، ج) ۱۰ درصد ژئولیت، د) ۲۰ درصد ژئولیت و ه) ۳۰ درصد ژئولیت

جدول ۱- درصد تخلخل داربست‌های پلی‌کاپرولاکتون ژئولیت

درصد وزنی ژئولیت	۰	۵	۱۰	۲۰	۳۰
درصد تخلخل	$89/9 \pm 0/9$	$82/0 \pm 0/2$	$80/1 \pm 0/6$	$75/6 \pm 0/4$	$74/2 \pm 0/2$



شکل ۲- اندازه حفرات داربست‌ها با غلظت‌های متفاوت ژئولیت

درصد‌های مختلف نانوذرات ژئولیت انجام شد و الگوی پراش پرتو ایکس آنها در شکل (۵-الف) ارائه شده است. طبق نتایج حاصل حضور ژئولیت تا ۱۰ درصد وزنی تغییری در الگوی پراش پرتو ایکس داربست ایجاد نکرده است، درحالی که در الگوی پراش پرتو ایکس داربست حاوی ۲۰ درصد وزنی حضور نانوذرات کریستالی در زمینه پلی‌کاپرولاکتون قابل مشاهده است. با مقایسه الگوی پراش پرتو ایکس موجود با کارت‌های استاندارد ژئولیت اثبات می‌شود که پیک اول ژئولیت در زاویه $6/2^\circ$ درجه، ظاهر شده است. با توجه به تأیید حضور نانوذرات ژئولیت در نقشه توزیع فراوانی عناصر و طیف‌سنجی پراش انرژی پرتو ایکس، عدم حضور بقیه پیک‌ها می‌تواند به علت غلظت کم نانوذرات در زمینه و حضور پیک‌های نویز در خط پایه زمینه آمورف پلیمر که شدت آنها بیشتر از شدت پیک‌های اصلی ژئولیت است، باشد. با مقایسه بین گروه‌های کامپوزیتی، شدت پیک مشخصه ژئولیت در $2\theta = 6/31^\circ$ درجه با افزایش درصد وزنی ژئولیت افزایش یافته است که می‌توان به صورت کیفی حضور نانوذرات ژئولیت و افزایش مقدار آن را با افزایش شدت پیک تخمین زد.

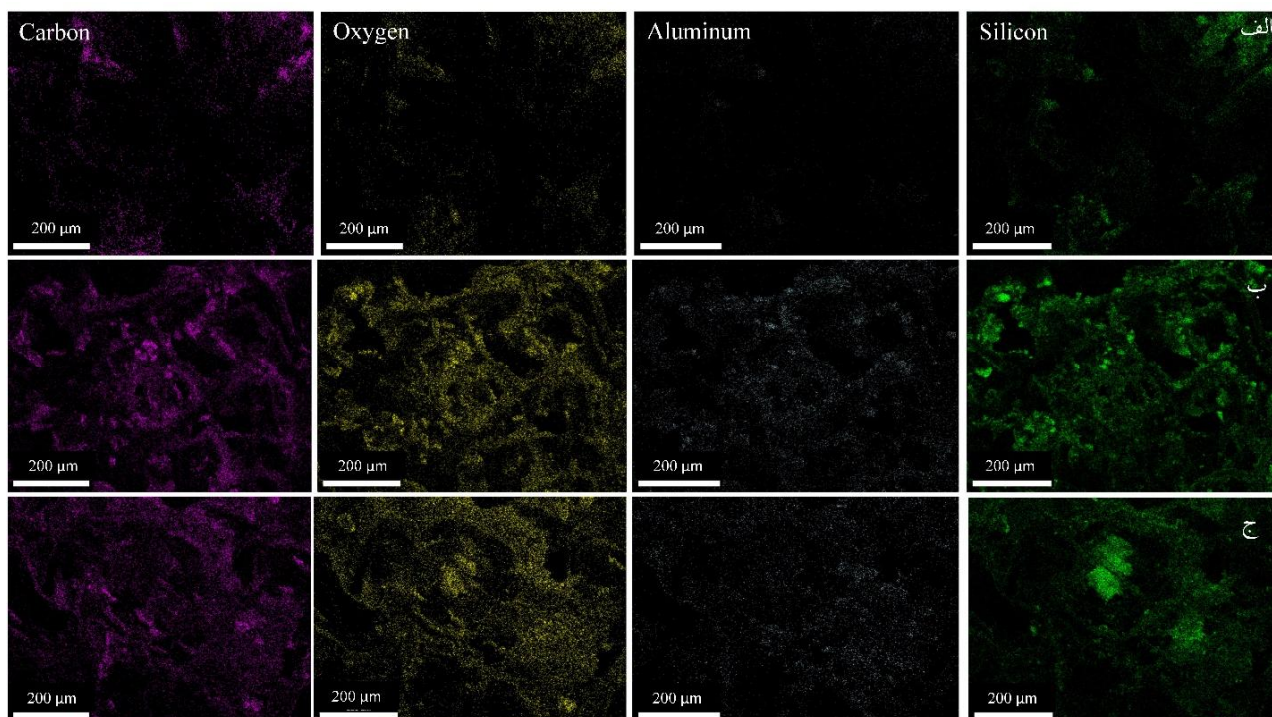
دیبا و همکاران [۲۱] در داربست پلی‌کاپرولاکتون - فورستريت (درصد فورستريت از صفر تا ۵۰ درصد تغییر کرده است) درصد تخلخل و داربست‌ها را در محدوده ۹۰/۹۴ تا ۹۲/۶۵ گزارش کرده‌اند [۲۱].

نقشه توزیع فراوانی عناصر (MAP) داربست پلی‌کاپرولاکتون با مقادیر متفاوت ژئولیت در شکل (۳) ارائه شده است. حضور عناصر سازنده ژئولیت (شامل Al, Si و Na) در تصاویر مشخص شده است که بیانگر حضور نانوذرات ژئولیت در داربست است. با توجه به تصاویر، نانوذرات ژئولیت به صورت یکنواخت در داربست توزیع شده است. حضور نانوذرات ژئولیت با افزایش درصد ژئولیت تا ۲۰ درصد وزنی در داربست واضح‌تر و یکنواخت‌تر است.

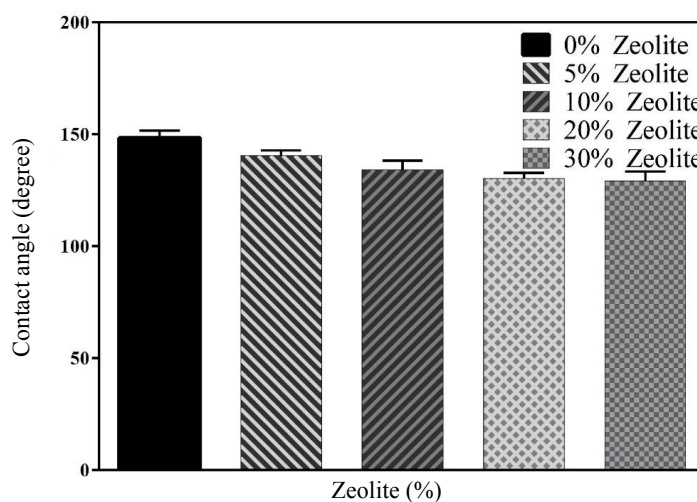
مطابق شکل (۴) زاویه تماس داربست‌های پلی‌کاپرولاکتون ژئولیت اندازه‌گیری شد و مشخص شد که افزایش درصد ژئولیت باعث کاهش زاویه تماس و افزایش آبدوستی داربست‌ها شده است.

۲-۳- بررسی‌های فازی داربست پلی‌کاپرولاکتون - ژئولیت

آزمون پراش پرتو ایکس نانوکامپوزیت‌های حاوی



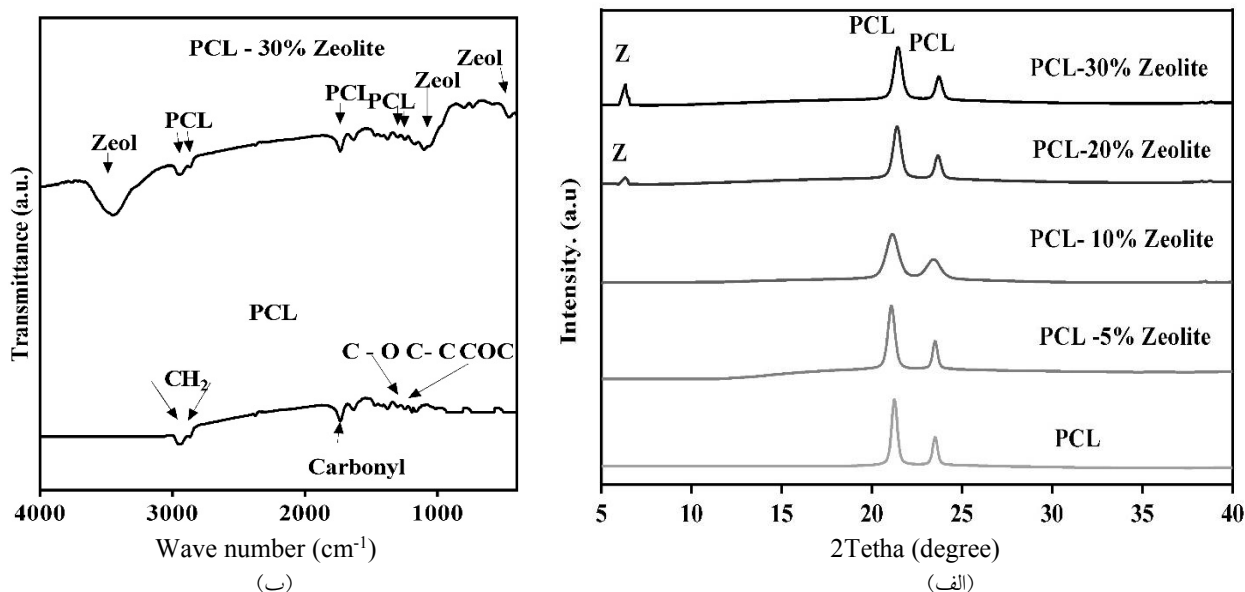
شکل ۳- نقشه توزیع فراوانی عناصر داربست پلی‌کاپرولاکتون زئولیت با مقادیر متفاوت زئولیت: (الف) پنج درصد زئولیت، (ب) ۱۰ درصد زئولیت و (د) ۲۰ درصد زئولیت (رنگی در نسخه الکترونیکی)



شکل ۴- تعیین زاویه تماس با آب داربست‌های پلی‌کاپرولاکتون با درصدهای مختلف زئولیت

۳-۳- بررسی طیف‌سنجی مادون قرمز با تبدیل فوریه (FTIR) در شکل (۵- ب) طیف مادون قرمز با تبدیل فوریه داربست پلی‌کاپرولاکتون خالص و داربست حاوی ۳۰ درصد زئولیت نشان داده شده است. در الگوی مادون قرمز

در تحقیقات مشابه اکمدو و همکاران [۲۲] نیز پیک‌های زئولیت را در داربست پلی‌لاکتیک کوگلیکولیک اسید- زئولیت شناسایی نکردند، درحالی که طیف‌سنجی پراش انرژی پرتو ایکس، حضور آن را تأیید کرده بود [۲۲].



شکل ۵- الف) الگوی پراش پرتو ایکس داربست پلی‌کاپرولاکتون حاوی درصد‌های متفاوت از ژئولیت و
ب) الگوی مادون قرمز با تبدیل فوریه داربست پلی‌کاپرولاکتون خالص و پلی‌کاپرولاکتون حاوی ۳۰ درصد نانوزئولیت

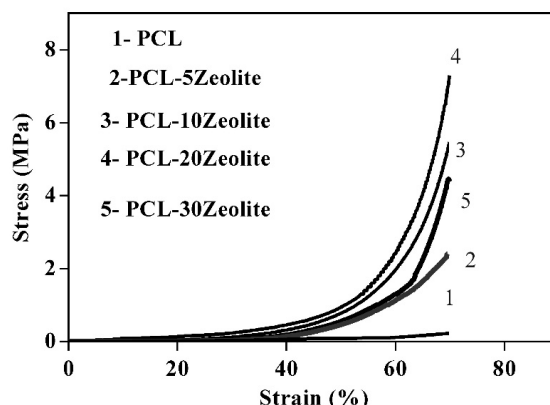
استفاده از آزمون فشار تک‌محوره به صورت تابعی از درصد وزنی نانوزئولیت ارزیابی شد. شکل (۶) نمودار تنش فشاری- کرنش را برای داربست‌های پلی‌کاپرولاکتون خالص و کامپوزیت‌های آن نشان می‌دهد. کلیه داربست‌ها رفتار مکانیکی شبیه به الاستومرها از خود نشان داده‌اند. همه آنها یک ناحیه تغییر فرم الاستیک، انتقال از ناحیه الاستیک به پلاستیک و ناحیه پلاستیک دارند تا کل تغییر فرم انتخاب شده انجام شود. استحکام فشاری و مدول الاستیک داربست‌ها در جدول (۲) گزارش شده است. با توجه به نتایج، استحکام فشاری و مدول الاستیک داربست‌ها با افزایش درصد ژئولیت تا ۲۰ درصد و کاهش درصد تخلخل‌ها بهبود یافته‌اند ولی افزایش درصد ژئولیت تا ۳۰ درصد موجب کاهش استحکام و مدول الاستیک شده است که ممکن است به علت آگلومره شدن نانوذرات در داربست باشد. دیبا و همکاران [۲۱] در داربست پلی‌کاپرولاکتون - فورستريت (درصد فورستريت از صفر تا ۵۰ درصد تغییر کرده است) استحکام فشاری و مدول الاستیک داربست را به ترتیب از ۰/۴ تا ۰/۳ و ۳ تا ۷ مگاپاسکال گزارش کرده‌اند.

داربست خالص و داربست حاوی نانوزئولیت پیک‌های مشخصه پلی‌کاپرولاکتون در طول موج‌های ۲۹۴۹ و ۲۸۶۵ بر سانتی‌متر کشش CH_2 ، ۱۷۲۷ بر سانتی‌متر کشش کربوکسیل (C-O-C)، ۱۲۹۳ بر سانتی‌متر C-O و C-C کشش در فاز بلوری و ۱۲۴۰ بر سانتی‌متر (کشش نامتقارن COC) مشاهده می‌شوند. علاوه بر این در طیف داربست کامپوزیتی، پیک‌های مربوط به ژئولیت در طول موج‌های ۳۳۶۵ و ۳۴۸۹ بر سانتی‌متر (مربوط به مولکول SiO_4 و Al-OH)، ۱۰۱۹-۱۰۱۰ بر سانتی‌متر (Si-O) و ۱۶۰۰ بر سانتی‌متر (ارتعاش خمشی ملکول‌های آب در ژئولیت) قابل مشاهده هستند. حضور پیک‌های مربوط به پلی‌کاپرولاکتون و ژئولیت بدون هیچ تغییری در شدت و موقعیت ثابت و عدم وجود پیکی مبنی بر ایجاد اتصال شیمیایی بین زمینه و تقویت کننده، بدین معنی است که پلیمر پلی‌کاپرولاکتون با نانوذرات ژئولیت برهم‌کنش فیزیکی داشته است.

۳-۴- بررسی خواص مکانیکی داربست پلی‌کاپرولاکتون -

ژئولیت

خواص مکانیکی داربست‌های پلی‌کاپرولاکتون - ژئولیت با



شکل ۶- نمودار تنش- کرنش داربست پلی‌کاپرولاکتون با درصد‌های متفاوت ژئولیت

جدول ۲- استحکام فشاری و مدول الاستیک داربست‌های پلی‌کاپرولاکتون

درصد وزنی ژئولیت	۰	۵	۱۰	۲۰	۳۰
استحکام فشاری (مگاپاسکال)	0.25 ± 0.07	2.4 ± 0.09	5.47 ± 0.1	7.5 ± 0.2	4.2 ± 0.2
مدول الاستیک (مگاپاسکال)	2 ± 0.1	2.5 ± 0.2	10.2 ± 0.8	15.0 ± 0.4	9.2 ± 0.2

باتوجه به اینکه استحکام فشاری استخوان اسفنجی بین چهار تا ۱۲ مگاپاسکال و محدوده مدول الاستیک برای این نوع استخوان بین ۰/۱ تا ۰/۵ گیگاپاسکال گزارش شده است، نتایج حاصل از پژوهش حاضر به این مقادیر نزدیک‌تر و در نتیجه مناسب‌تر است [۲۳]. ضریب کشسانی، استحکام کششی و کرنش شکست سه خاصیت مهم داربست‌های مورد استفاده برای مهندسی بافت استخوان است. داربست‌های کامپوزیتی گوناگونی در این زمینه استفاده شده‌اند که در اغلب آنها خواص مکانیکی مهم‌ترین محدودیت برای کاربرد آنها است. به‌عنوان نمونه لی و همکاران نشان دادند که حضور نانوذرات سیلیکا در زمینه پلی‌کاپرولاکتون، استحکام کششی و ضریب کشسانی را به ترتیب از ۱/۶۳ و ۰/۱۸ مگاپاسکال به حدود ۸/۴۵ و ۰/۵۳ افزایش می‌دهد درحالی که کرنش شکست به‌طور قابل ملاحظه‌ای کاهش پیدا می‌کند (از ۱۰۸ درصد به کمتر از ۲۸ درصد) [۲۴]. فوجیه‌ها و همکاران [۲۵] نشان دادند که اضافه کردن کربنات کلسیم به الیاف پلی‌کاپرولاکتون سبب کاهش استحکام کششی از ۸/۴ به ۸/۳ مگاپاسکال و کاهش کرنش شکست از ۸۰ به ۷۰ درصد

می‌شود [۲۵]. در بررسی دیگری، بیانکو و همکاران نشان دادند که درصد بهینه برای حضور نانوذرات هیدروکسی آپاتیت در زمینه پلی‌کاپرولاکتون تنها دو درصد است درحالی که این مقدار خواص زیستی مناسبی به سیستم نمی‌دهد. نتایج زیستی مناسب در نمونه حاوی شش درصد وزنی هیدروکسی آپاتیت گزارش شده است. همچنین ضریب کشسانی، استحکام و کرنش شکست به ترتیب در حدود ۲/۴ مگاپاسکال، ۱۲ مگاپاسکال و ۱۳۰ درصد گزارش شده است [۲۶]. بر اساس تحقیقات انجام شده، بهترین نوع داربست ساختارهایی هستند که توانایی تقلید از بافت طبیعی و ویژگی‌های آنها را دارند. خواص مکانیکی مشابه و نزدیک‌تر به بافت طبیعی سبب می‌شود سلول‌ها برهم‌کنش بهتری از خود نشان داده که در نهایت منجر به تسریع تشکیل بافت جدید می‌شود. در واقع یک داربست بایستی استحکام مکانیکی و ساختاری مناسبی داشته باشد و شرایط مشابه با بافت طبیعی را در مراحل اولیه ترمیمی فراهم آورد. پلیمرهای خالص به دلیل خواص مکانیکی ضعیف به تنهایی نمی‌توانند گزینه مناسبی در این زمینه باشند و استفاده از ترکیبات کامپوزیتی می‌تواند تا حدودی مشکلات را

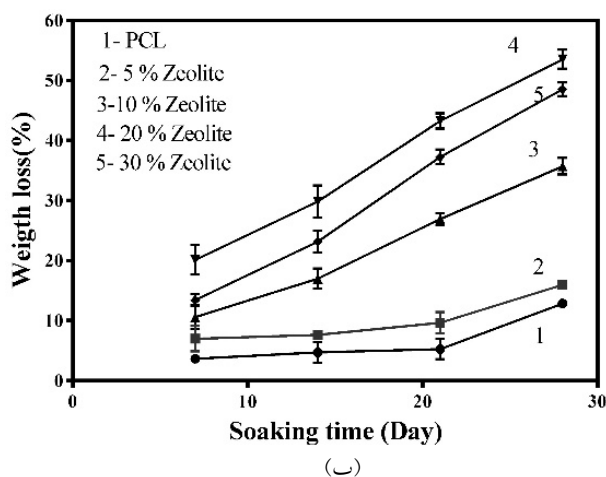
آزمون اتفاق افتاده و مقدار آن به‌عنوان نمونه برای داربست پلی‌کاپرولاکتون ۲۰ درصد ژئولیت در حدود $25/0 \pm 225/85$ درصد است. کاهش جذب آب داربست حاوی ۳۰ درصد نانوزئولیت می‌تواند به‌دلیل به‌هم پیوستن حفرات داربست باشد. تغییرات روند جذب آب توسط روند تغییرات وزن داربست و تغییرات pH محلول در زمان‌های مختلف غوطه‌وری، قابل تأیید است. نتایج تغییرات درصد وزنی داربست‌ها در محلول بافر فسفات شکل (۷-ب) نشان می‌دهد که با افزایش نانوزئولیت تا ۲۰ درصد وزنی، درصد کاهش وزن داربست افزایش می‌یابد و در کاهش وزن در حضور ۳۰ درصد نانوزئولیت نسبت به داربست حاوی ۲۰ درصد ژئولیت کمتر است که ممکن است به‌دلیل به‌هم پیوستن حفرات در این داربست و در نتیجه جذب آب کمتر باشد. به‌گونه‌ای که بعد از ۲۸ روز غوطه‌وری در محلول بافر فسفات کاهش وزن برای پلی‌کاپرولاکتون خالص و نمونه‌های حاوی ۵، ۱۰، ۲۰ و ۳۰ درصد ژئولیت به‌ترتیب $0/6 \pm 15/94$ ، $1/4 \pm 35/68$ ، $1/6 \pm 53/52$ و $1/2 \pm 48/52$ درصد به‌دست آمد. داربست حاوی ۲۰ درصد ژئولیت بیشترین آبدوستی و کاهش وزن را نشان داده است.

در پلیمرهای نیمه بلورین مانند پلی‌کاپرولاکتون، بعد از غوطه‌وری پلیمر در محلول‌های آبی، ابتدا آب به ناحیه آمورف پلیمر نفوذ کرده که منجر به گسیختگی تصادفی زنجیره‌های پلیمری در اثر هیدرولیز باندهای استری می‌شود. این حالت کاهش چشمگیری در وزن پلیمر ایجاد نمی‌کند. با افزایش زمان غوطه‌وری، فرایند هیدرولیز به سمت ناحیه بلوری منعطف می‌شود، درحالی که ناحیه آمورف در معرض هیدرولیز، به زنجیره‌های کوچک‌تری که قابل خروج از ساختار هستند، تبدیل می‌شود. در این مرحله، کاهش وزن به طور جزئی مشاهده می‌شود. با افزایش زمان غوطه‌وری همان‌طور که در شکل مشاهده شد، میزان آبدوستی پلی‌کاپرولاکتون افزایش پیدا کرده که منجر به افزایش سرعت تخریب می‌شود. علت می‌تواند تشکیل گروه‌های هیدروکسیل ناشی از هیدرولیز باندهای استری باشد [۹ و ۲۸].

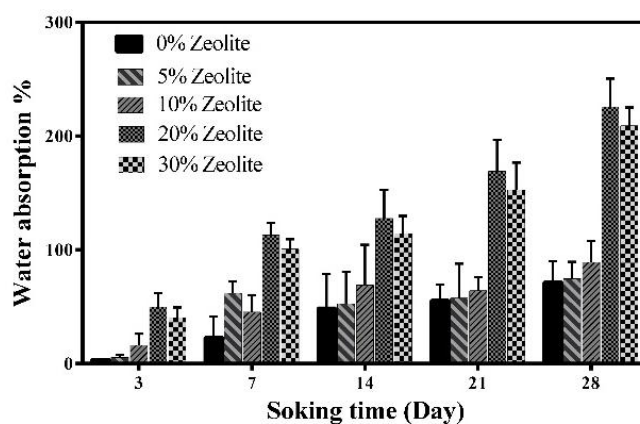
برطرف سازد. در سیستم‌های پلیمری، خواص و ویژگی‌های مکانیکی پلیمرها تابع حرکت اجزای زنجیره پلیمری است. درحالی که در نمونه‌های کامپوزیتی، برهم‌کنش اجزای زنجیره پلیمری با نانوذرات توزیع شده در زمینه می‌تواند منجر به بهبود خواص مکانیکی شود. نتایج نشان می‌دهد که بهبود خواص مکانیکی در حضور نانوذرات سرامیکی ناشی از مکانیزم جذب انرژی^{۱۴} است که با وارد کردن نانوذرات در زمینه پلیمری، ایجاد می‌شود [۲۷]. در واقع زنجیره‌های ملکولی خطی پلیمر می‌تواند به سطح ذرات چسبیده و سبب تثبیت بیشتر داربست شود. بنابراین با افزایش درصد وزنی نانوزئولیت، به‌دلیل افزایش تماس بین زنجیره‌های ملکولی و نانوذرات، استحکام تسلیم و ضریب کشسانی داربست‌ها افزایش پیدا می‌کند. بر این اساس، داربست کامپوزیتی با ۲۰ درصد ژئولیت با توجه به خواص مکانیکی بهتر در مقایسه با سایر داربست‌های مورد مطالعه به‌عنوان داربست بهینه از لحاظ خواص مکانیکی انتخاب شد. همچنین در مقایسه با داربست‌های مورد بررسی در پژوهش‌های دیگر، نتایج خواص مکانیکی مناسب‌تر بوده است.

۳-۵- ارزیابی زیست‌فعالی و تخریب زیستی داربست پلی‌کاپرولاکتون - ژئولیت

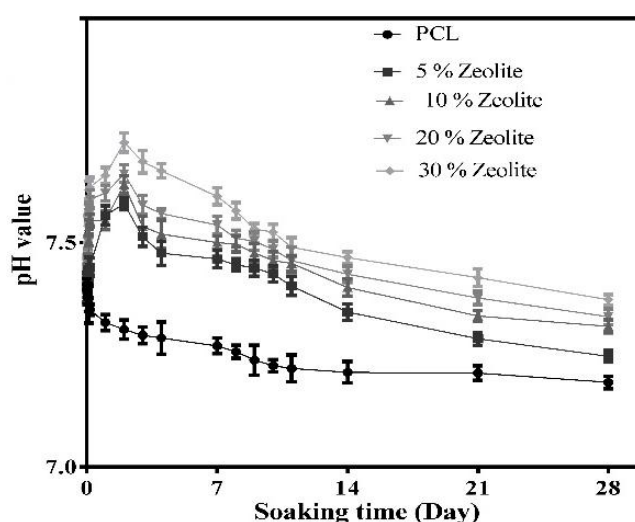
با توجه به شکل (۷) نتایج نشان می‌دهد که میزان آبدوستی و قابلیت تخریب‌پذیری داربست‌های پلی‌کاپرولاکتون و کامپوزیت‌های آن تابع درصد وزنی ژئولیت نانومتری موجود در ساختار داربست است. با افزایش ژئولیت تا ۲۰ درصد وزنی درصد جذب محلول بافر فسفات داربست‌های کامپوزیتی به‌طور قابل توجهی افزایش می‌یابد (شکل ۷-الف). میزان جذب آب داربست پلی‌کاپرولاکتون خالص به‌طور تدریجی افزایش پیدا می‌کند تا روز ۲۱ از غوطه‌وری در محلول بافر فسفات به حدود $6/1 \pm 92/34$ درصد برسد و در ادامه به آرامی کاهش پیدا می‌کند. درحالی که در داربست‌های کامپوزیتی، میزان جذب بیشینه محلول بافر فسفات در روز هفتم



(ب)



(الف)



(ج)

شکل ۷- نتایج آزمون تخریب‌پذیری داربست پلی‌کاپرولاکتون خالص و کامپوزیت پلی‌کاپرولاکتون - ژئولیت: (الف) میزان جذب آب، (ب) کاهش وزن، (ج) تغییرات pH محلول بافر فسفات به صورت تابعی از زمان غوطه‌وری

در فصل مشترک دو جزء ترکیب سبب افزایش نفوذ آب و نرخ تخریب پلیمر می‌شود. همچنین جذب آب بالاتر سبب افزایش تخریب پلی‌کاپرولاکتون در کامپوزیت حاصل می‌شود. همچنین تغییرات pH محلول بافر فسفات در زمان‌های مختلف غوطه‌وری داربست‌ها نشان می‌دهد که در نمونه‌های کامپوزیتی، PH محیط از مقدار اولیه ۷/۴ بعد از هفت روز غوطه‌وری داربست افزایش پیدا کرده و به ۷/۴، ۷/۵، ۷/۶ و ۷/۷ واحد به ترتیب برای کامپوزیت‌های ۵، ۱۰، ۲۰ و ۳۰ درصد وزنی می‌رسد. در ادامه این مقادیر کاهش پیدا کرده و به حدود ۷/۳، ۷/۳، ۷/۴ و ۷/۴ می‌رسد

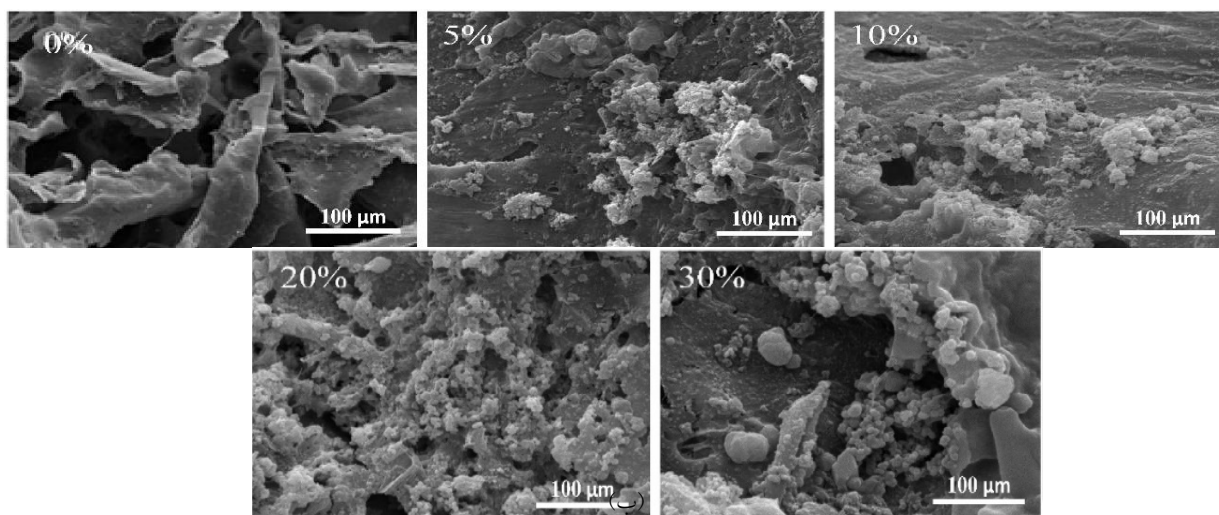
همچنین در نمونه کامپوزیتی، در محیط‌های بافر آبی، با جدا شدن یون سدیم تخریب ذرات ژئولیت آغاز می‌شود. سرعت این تبادل با کاهش pH افزایش می‌یابد. تبادل پروتون منجر به از بین رفتن بلورینگی ژئولیت می‌شود. مرحله دوم جدا شدن آلومیناسیلیکات‌های قابل حل از ذرات ژئولیت آمورف است که این آلومیناسیلیکات‌ها واکنش‌های ثانویه‌ای را بر اساس شرایط متحمل می‌شوند و محصولات غیرقابل انحلالی ایجاد می‌کنند که توسط بدن دفع می‌شوند. به دلیل عدم برهم‌کنش بین نانوذرات ژئولیت در زمینه پلیمری، حضور گروه‌های سیالونی

است، این گونه ساختارها مطلوب‌تر هستند.

تغییرات غلظت یون‌های موجود در محلول شبیه‌سازی شده بدن (شکل ۸-ج) هم کاهش شدید درصد یون‌های کلسیم و فسفر موجود در محلول شبیه‌سازی شده بدن را یک ماه بعد از غوطه‌وری در این محلول به‌خوبی تأیید می‌کنند که نشان‌دهنده رسوب فاز آپاتیتی در سطح است. تغییرات pH محلول شبیه‌سازی شده بدن در زمان‌های مختلف غوطه‌وری (شکل ۸-د) نشان می‌دهد که pH محلول شبیه‌سازی شده بدن در تماس با پلی‌کاپرولاکتون خالص، بعد از چهار هفته غوطه‌وری آن از ۷/۴ به ۷/۱۹ می‌رسد. در صورتی که pH در نمونه‌های کامپوزیتی، در هفت روز اول افزایش یافته (به‌عنوان مثال تا ۸/۳ واحد در نمونه ۲۰ درصد ژئولیت) و در ادامه کاهش می‌یابد. افزایش pH ناشی از کاهش پروتون‌های موجود در محلول در نتیجه تبادل یونی یون‌های سدیم و به‌دنبال آن یون سیلیسیم در نانوذرات ژئولیت است. بر این اساس، اصلاح خاصیت زیست‌فعالی با استفاده از نانوذرات ژئولیت ناشی از حل شدن جزئی آن و آزاد شدن یون‌های سیلیسیم و سدیم است. با این حال جدا شدن نانوذرات ژئولیت از سطح سبب افزایش زبری داربست شده که مکان‌های جوانه‌زنی برای رشد فاز آپاتیت را تشکیل می‌دهد. افزایش فعالیت زیست‌محیطی کامپوزیت‌ها را می‌توان به حضور گروه سیلانول در زمینه داربست کامپوزیتی نسبت داد، که می‌تواند به تشکیل لایه آپاتیت کمک کند. مکانیسم کلی شامل تبادل یون‌های سدیم از سطح کامپوزیت با پروتون‌های موجود در مایع شبیه‌سازی شده بدن باعث تشکیل گروه‌های سیلانول روی سطح، می‌شود. گفته شده است که گروه سیلانول به‌طور مستقیم با یون‌های کلسیم ترکیب نمی‌شود. در ابتدا، گروه سیلانول از قسمت‌هایی با بار منفی جدا می‌شوند که برای تولید کلسیم سیلیکات آمورف با یون‌های کلسیم مایع بدن شبیه‌سازی شده ترکیب می‌شوند. سپس سیلیکات کلسیم به‌طور مداوم یون‌های مثبت را جذب می‌کند تا زمانی که پیوند با یون‌های فسفات موجود در مایع بدن شبیه‌سازی شده بدن آغاز شود و لایه نهایی فسفات کلسیم آمورف روی سطح تولید شود که در نهایت به آپاتیت کریستالی تبدیل می‌شود.

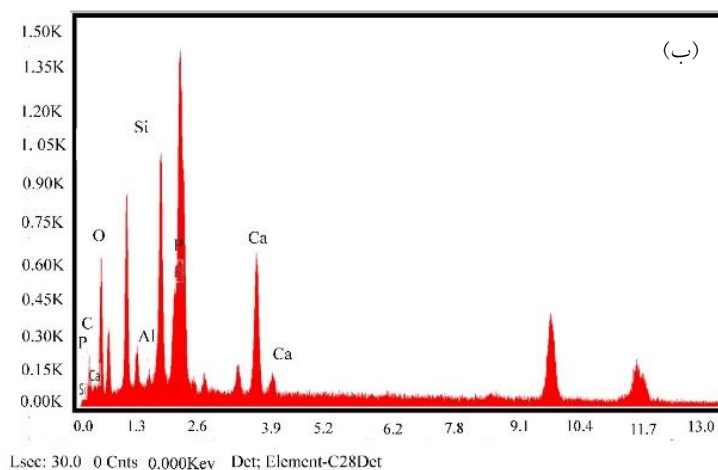
درحالی که در نمونه پلی‌کاپرولاکتون خالص، pH به‌آرامی کاهش پیدا کرده تا به حدود ۷/۲ واحد برسد. کاهش pH ناشی از افزایش گروه‌های کربوکسیل و هیدروکسیل در ساختار پلیمر و افزایش آبدوستی آن است که نرخ تخریب را در زمان‌های طولانی افزایش داده و سبب ایجاد زنجیره‌های کوچک پلیمری با انتهای اسیدی می‌شود. این زنجیره‌ها از یک‌سو منجر به پدیده اتوکاتالیزتی می‌شوند و سرعت تخریب را با پاره کردن زنجیره‌های طولانی و ایجاد زنجیره‌های کوتاه افزایش می‌دهند و از سوی دیگر باقی ماندن محصولات تخریب در داخل پلیمر منجر به کاهش pH محیط اطراف می‌شوند. همان‌گونه که مشاهده شد، بیشترین آهنگ تغییر pH در نمونه ۲۰ درصد وزنی ژئولیت بود. در این نمونه‌ها به دلیل جذب آب بیشتر تبادل یون سدیم و هیدروژن موجود در نمونه و محلول، در روزهای ابتدایی، pH نسبت به دیگر نمونه‌ها بیشتر افزایش پیدا می‌کند. در ادامه محصولات اسیدی ناشی از تخریب پلی‌کاپرولاکتون که در نمونه‌های کامپوزیتی به دلیل جذب آب بیشتر افزایش پیدا می‌کند، تا حدودی کم می‌شود.

از جمله ویژگی‌های مهم داربست‌های مهندسی بافت استخوان، قابلیت هدایت بافت استخوانی است. این ویژگی در شرایط آزمایشگاهی از طریق قابلیت تشکیل آپاتیت استخوانی تحت غوطه‌وری داربست‌ها در محلول شبیه‌سازی شده بدن ارزیابی می‌شود. همان‌گونه که در شکل (۸-الف) مشاهده می‌شود، فاز آپاتیتی در سطح داربست پلی‌کاپرولاکتون خالص مشاهده نشده. این نتیجه پیش از این برای بسیاری از پلیمرها در محلول شبیه‌سازی شده بدن تأیید شده بود [۲۹]. این درحالی است که رسوباتی در سطح داربست‌های کامپوزیتی مشاهده می‌شود که با توجه به تجزیه عنصری انجام شده در سطح نمونه کامپوزیتی حاوی ۲۰ درصد وزنی ژئولیت (شکل ۸-ب)، این رسوبات حاوی کلسیم و فسفر بوده که نسبت بین آنها ۱/۴۳ است که به نسبت بین کلسیم و فسفر در هیدروکسی آپاتیت نزدیک است. این نسبت نشان می‌دهد که هیدروکسی آپاتیت ناتمام^{۱۵} تشکیل شده است. از آنجایی که نسبت کلسیم به فسفر در استخوان طبیعی از هیدروکسی آپاتیت پایین‌تر

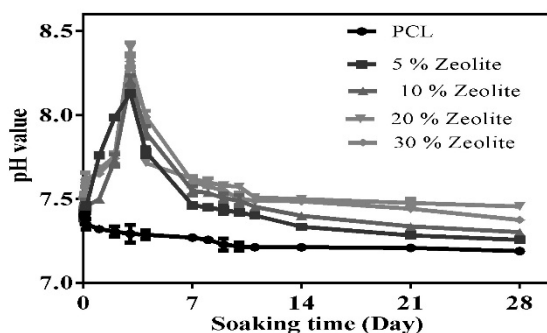


(الف)

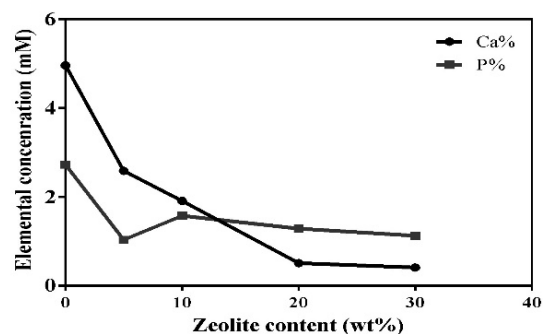
عنصر	درصد وزنی (درصد)	درصد اتمی (درصد)
کربن	۳/۳۰	۱۴/۶
اکسیژن	۳۸/۹۸	۴۸/۵۴
آلومینیوم	۰/۴۲	۳۴/۰
سیلیسیم	۱۶/۵۳	۱۶/۱۳
فسفر	۱۷/۰۴	۷۴/۱۳
کلسیم	۲۴/۳۴	۱۳/۱۲



(ب)



(د)



(ج)

شکل ۸- ارزیابی زیست‌فعالی داربست پلی‌کاپرولاکتون و کامپوزیت پلی‌کاپرولاکتون - ژئولیت بعد از چهار هفته غوطه‌وری در محلول شبیه‌سازی شده بدن: (الف) مورفولوژی داربست‌هایی با درصدهای مختلف ژئولیت (صفر تا ۳۰ درصد)، (ب) آنالیز عنصری پرتو ایکس از رسوبات تشکیل شده در داربست پلی‌کاپرولاکتون ژئولیت ۲۰ درصد وزنی ژئولیت، (ج) تغییرات غلظت یون‌های کلسیم و فسفر و (د) روند تغییرات pH محلول شبیه‌سازی شده بدن

داخل فاز زمینه (پلی‌کاپرولاکتون) پخش شده است. تحلیل زاویه تماس آب نشان می‌دهد که با اضافه کردن فاز ژئولیت میزان آبدوستی سطح افزایش می‌یابد. با توجه به نتایج به‌دست آمده از آزمون مکانیکی انجام شده روی نمونه‌ها می‌توان گفت اضافه کردن فاز ژئولیت در داربست‌های پلیمری تا ۲۰ درصد وزنی سبب افزایش استحکام فشاری و مدول ینگ می‌شود. تصاویر میکروسکوپی الکترونی روبشی از داربست‌ها بعد از گذشت ۲۱ روز در مایع شبیه‌سازی شده بدن نشان می‌دهد که هیدروکسی آپاتیت در نمونه‌ها تشکیل شده است و بیشترین درصد تشکیل هیدروکسی آپاتیت مربوط به داربست با ۲۰ درصد ژئولیت است. این تصاویر نشان می‌دهد با افزودن فاز ژئولیت (که شامل سدیم و سیلیسیم است) به فاز زمینه، تشکیل هیدروکسی آپاتیت سرعت می‌یابد. نتایج این پژوهش بیانگر مناسب بودن داربست‌های کامپوزیتی به‌منظور بهره‌گیری از آن در پژوهش‌های مهندسی بافت استخوان است.

تشکر و سپاسگزاری

نویسندگان مقاله بر خود لازم می‌دانند که از دانشگاه‌های علم و صنعت و صنعتی اصفهان برای در اختیار قرار دادن تجهیزات مورد نیاز برای انجام این پژوهش، تقدیر و تشکر کند.

همچنین نتیجه مطالعات آزمایشگاهی توانایی کامپوزیت‌های ژئولیت را در حمایت و تسریع رشد هیدروکسی آپاتیت تأیید کرده است [۳۰]. داورپناه جزئی و همکاران [۲۲] در سال ۲۰۱۷ میلادی داربست نانوکامپوزیتی پلی‌لاکتیک-کو-گلیکولیک اسید^{۱۶} - ژئولیت (۳، ۷ و ۱۰ درصد وزنی) را به روش الکترورسی ساختند. نتایج نشان داد که داربست، رفتار زیست‌فعالی قابل توجهی داشته و خواص مکانیکی آن در مقایسه با داربست پلی‌لاکتیک کوگلیکولیک اسید بهبود یافته است. داربست با سلول سازگار بوده و از تکثیر سلولی حمایت می‌کند. سلول‌های استخوان‌ساز MG63 به نانوکامپوزیت‌ها پیوستند [۲۲].

۴- نتیجه‌گیری

در این پژوهش، داربست‌های نانوکامپوزیتی پلی‌کاپرولاکتون-ژئولیت به‌منظور کاربرد در مهندسی بافت استخوان اسفنجی ساخته و آزمون‌های مشخصه‌یابی روی آنها انجام شد. تصاویر میکروسکوپی الکترونی روبشی از داربست‌ها اندازه تخلخل و درصد تخلخل‌های مناسب برای استفاده به‌عنوان داربست استخوان اسفنجی را نشان می‌دهد. تحلیل طیف‌سنجی پراش انرژی پرتو ایکس داربست نشان‌دهنده وجود عناصر سیلیسیم، آلومینیوم و سدیم به‌عنوان اجزای تشکیل دهنده ژئولیت موجود در ساختار است. نتایج نقشه توزیع فراوانی داربست‌ها نشان می‌دهد که نانوذرات ژئولیت به‌صورت یکنواخت در

واژه‌نامه

- | | |
|---|---|
| 1. American Society for Testing and Materials | 9. AKT activator drug |
| 2. Osteoinductivity | 10. Scanning Electron Microscope |
| 3. Growth factor | 11. Energy Dispersive X ray |
| 4. Osteoblast | 12. X Ray Diffraction |
| 5. Simulated body fluid | 13. Fourier Transform Infrared Spectrometer |
| 6. Lyophilisatin | 14. Energy Dissipating |
| 7. Copper activated faujasites | 15. Calcium-deficient hydroxyapatite (CDHA) |
| 8. Human mesenchymal stem cell | 16. Poly lactic-co-glycolic acid |

مراجع

- | |
|--|
| 1. Hing, K., "Bone Repaire in the Twenty- First Century: Biology, Chemistry or Engineering", <i>Philosophcal Transaction: Mathematical, Physical and Engineering Science</i> , Vol. 62, pp. 2821-2850. 2004. |
|--|

2. Bronner, F., Farach-C, M. C., and Mikos, A., *Engineering of Functional Skeletal Tissues*, Springer, London, 2007.
3. Ma, P. X., "Scaffolds for Tissue Fabrication", *Materialstoday*, pp. 30-40, 2004.
4. Stamatialis, F. D., Papenburg, J. B., Girones, M., Saiful, S., Bettahalli, N. M. S., Schmitmeier, S., and Wessling, M., "Medical Application of Membranes: Drug Delivery, Artificial Organs and Tissue Engineering", *Journal of Membrane Science*, Vol. 308, pp. 1-34, 2008.
5. Fergal, J., and Brien, O., "Biomaterials & Scaffolds for Tissue Engineering", *Materialstoday*, Vol. 14, No. 3, pp. 88-95, 2011.
6. Lukasz, J., Mateusz, J., and Slawomir, S., "Designing of Macroporous Magnetic Bioscaffold Based on Functionalized Methacrylate Network Covered by Hydroxyapatites and Doped with Nano-MgFe₂O₄ for Potential Cancer Hyperthermia Therapy", *Materials Science & Engineering*, Vol. 78, No. 1, pp. 901-911, 2017.
7. Ning, Ch., Cheng, H., Yin, Zh., Zhu, W., Chen, H., Lei, Sh., Yin, Sh., and Liu, H., "Preparation of Porous Polycaprolactone Scaffolds by using Freeze-Drying Combined Porogen-leaching Methods", *Key Engineering Materials*, Vols. 368-372, pp. 1224-1226, 2008.
8. Sultanova, Z., Kaleli, G., Kabay, G., and Mutlu, M., "Controlled Release of a Hydrophobic Drug Coaxially Electrospun Polycaprolacton", *International Journal of Pharmaceutics*, Vol. 505, No. 1-2, pp. 133-138, 2016.
9. Woodruff, M., and Hutmacher, D., "The Return of a Forgotten Polymer -Polycaprolactone in the 21st Century", *Progress in Polymer Science*, Vol. 35, 10, pp. 1217-1256, 2010.
10. Zhou, Z., Zhou, Y., Chen, Y., Nie, H., Wang, Y., Li, F., and Zheng, Y., "Bilayer Porous Scaffold Based on Poly-(caprolactone) Nanofibrous Membrane and Gelatin Sponge for Favoring Cell Proliferation", *Applied Surface Science*, Vol. 258, pp. 1670 -1676, 2011.
11. Khatamian, M., Yavari, A., Akbarzadeh, A., and Saket Oskoui, M., "A Study on the Synthesis of [Fe, B]-MFI Zeolites using Hydrothermal Method and Investigation of their Properties", *Journal of Molecular Liquids*, Vol. 242, pp. 979-986, 2017.
12. Joseph, F., "Synthesis of Linde -Type X Zeolite and its Application to Improve Soil Nutrients", Master of Scince, Departemant of Physics, Kwame Nkrumah University of Scince and Tecnology, 2011.
13. Auerbach, S., Carrado, K., and Dutta, P., *Hand book of Zeolite Science and Technology*, Marcel Dekker, 2003.
14. Keeting, Ph., Oursler, M., Wiegand, K., Bonde, S., Spelsberg, T., and Riggs, B., "Zeolite A Increases Proliferation, Differentiation, and Transforming Growth Factor β Production in Normal Adult Human Osteoblast-like Cells in Vitro", *Bone and Mineral Reacharch*, Vol. 7, p. 11, 1992.
15. Tavolaro, P., Martino, G., Andò, S., and Tavolaro, S., "Zeolite Scaffold for Culture of Human Breast Cancer Cells. Part II: Effect of and Hybrid Zeolite Membranes on Neoplastic and Metastatic Activity Control", *Materials Science and Engineering*, Vol. 68, pp. 474-481, 2018.
16. Ninan, N., Muthunarayanan, M., Nur Aliza Bt, Y., In-Kyu Park, A. E., and Tin, W., "Antibacterial and Wound Healing Analysis of Gelatin Zeolite Scaffolds", *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, Vol. 115, pp. 244-252, 2014.
17. Diba, M., Fathi, M. H., and Kharaziha, M., "Novel Forsterite/Polycaprolactone Nanocomposite Scaffold for Tissue Engineering Applications", *Materials Letters*, Vol. 65, pp. 1931-1934, 2011.
18. Ninan, N., Grohens, Y., Elain, A., Kalarikkal, N., and Thomas, S., "Synthesis and Characterization of Gelatin/Zeolite Porous Scaffold", *European Polymer Journal*, Vol. 49, pp. 2433-2445, 2013.
19. Akmammedove, R., Huysal, M., Isik, S., and Senel, M., "Preparation and Characterization of Novel Chitosan/Zeolite Scaffolds for Bone Tissue Engineering Applications", *Taylor and Francis*, [https:// DOI: 10.1080/00914037.2017.1309539](https://doi.org/10.1080/00914037.2017.1309539), 2017.
20. Zhu, R., Chen, Y., Ke, Q., Gao, Y., and Guo, Y., "SC79-Loaded ZSM-5/Chitosan Porous Scaffolds With Enhanced Stem Cell Osteogenic Differentiation and Bone Regeneration", *Journal of Materials Chemistry B*, Vol. 285, No. 5, pp. 1670-1676, 2017.
21. Diba, M., Kharaziha, M., Fathi, M. H., Gholipourmalekabadi, M., and Samadikuchaksaraei, A., "Preparation and Characterization of Polycaprolactone/Forsterite Nanocomposite", *Composites Science and Technology*, Vol. 72, pp. 716-723, 2012.
22. Davarpanah Jazi, R., Rafienia, M., Salehi Rozve, H., Karamian, E., and Sattary, M., "Fabrication and Characterization of Electrospun Poly lactic-co-Glycolic acid/Zeolite Nanocomposite Scaffolds using Bone Tissue Engineering", *Journal of Bioactive and Compatible Polymers*, Vol. 33, No. 1, pp. 63-78, 2018.
23. Mallick, S., Tripathi, S., and Srivastava, P., "Advancement in Scaffolds for Bone Tissue Engineering: A Review", *Journal of Pharmacy and Biological Sciences*, Vol. 10, No. 1, pp. 37-54, 2015.
24. Lee, E., Teng, S. H., Jang, T., Wang, P., Yook, S., Kim, H., and Koh, Y., "Nanostructured Poly (e-caprolacton)-Silica Xerogel Fibrous Memberan for Guided Bone Regeneration", *Acta Biomaterialia*, Vol. 6, pp. 3557-3565, 2010.
25. Fujihara, K., Kotaki, M., and Ramakrishna, S., "Guided Bone Regeneration Memberane Made of Polycaprolactone/Calcium carbonate Composite

- Nanofibres”, *Biomaterials*, Vol. 26, pp. 802-805, 2010.
26. Bianco, A., Federico, E., Moscatelli, I., Camaioni, A., Armentano, I., Campagnolo, L., Dottori, M., Kenny, J., Siracusa, G., and Gusmano, G., “Electrospun Poly(caprolactone)/ Ca- deficient Hydroxyapatite Nanohybrids: Microstructure, Mechanical Properties and Cell Response by Murine Embryonic stem Cells”, *Materials Science and Engineering C*, Vol. 29, pp. 2063-2071, 2009.
 27. Gaharwar, A., Rivera, Ch., Wu, Ch., and Schmidt, G., “Transparent, Elastomeric and Tough Hydrogels from Poly(ethylene glycol) and Silicate Nanoparticles”, *Acta Biomaterialia*, Vol. 7, pp. 4139-4148, 2011.
 28. Christopher, X. F. L., “Dynamics of In vitro Polymer Degradation of Polycaprolactone-based Scaffolds: Accelerated Versus Simulated Physiological Conditions”, *Biomedical Materials*, Vol. 3, No. 3, pp. 034108-034108, 2008.
 29. Kharaziha, M., Fathi, M. H., Edris, H., “Development of Novel Aligned Nanofibrous Composite Membranes for Guided Bone Regeneration”, *Journal of the Mechanical Behavior of Biomedical Materials*, Vol. 24, pp. 9-20, 2013.
 30. Iqbal, N., “Nanohydroxyapatite Reinforced Zeolite ZSM Composites: A Comprehensive study on the Structural and in vitro Biological Properties”, *Ceramics International*, Vol. 42, pp. 7175-718, 2016.