

Preparation of Nanocomposite Gelatin/Apatite Scaffold through a Biomimetic Method

M. Azami¹, F. Moztarzadeh², M. Rabiee^{3*}

¹ PhD, Tissue Engineering and Cell Therapy Group, School of Advanced Medical science, Tehran University of Medical Science, Tehran, Iran, mazami@aut.ac.ir

² Professor, School of Biomedical Engineering, Amir Kabir University of Technology, Tehran, Iran, moztarzadeh@aut.ac.ir

³ Associate Professor, School of Biomedical Engineering, Amir Kabir University of Technology, Tehran, Iran

Abstract

During past decade, using biomimetic approaches has received much attention by scientists in the field of tissue substitutes preparation. These approaches have been employed for synthesis of bone tissue engineering scaffolds in the case of either materials or synthesis methods. In this study, an apatite phase has been synthesized within gelatin hydrogel in biomimetic condition. The obtained composite hydrogel has changed to a porous scaffold with the application of freeze drying technique in order to be used in bone tissue engineering. To characterize the chemical composition and crystal structure of the synthesized precipitate within hydrogel, FTIR, XRD and TEM analysis were used. Surface morphology and porous structure of the scaffold were studied with SEM. SEM analysis was also used to investigate the quality of cultured osteoblast cells activity. Results approved formation of an apatite phase within gelatin hydrogel in biomimetic condition with crystallite size ranging between 7-10 nm. Porosity percentage of the obtained nanocomposite scaffold was about 82% with pores sizes in the range of 100-350µm. Young's elastic modulus of the scaffold was comparable with that of the spongy bone. The osteoblast cells cultured on the scaffold showed adhesion, immigration and extracellular matrix excretion on the scaffold internal surfaces. Thus, obtained results indicated the potential ability of the prepared biomimetic bone tissue engineering scaffold to be used in bone tissue repair process.

Keywords: Biomimetic, Apatite, Gelatin, Scaffold, Bone tissue engineering.

* Corresponding author

Address: Mohammad Rabiee, School of Biomedical Engineering, Amirkabir University of Technology, Hafiz St, P.O.Box: 15875-4413, Tehran, Iran

Tel: +98 21 64542381

Fax: +98 21 66468186

E-mail: mrabiee@aut.ac.ir

ساخت داربست نانو کامپوزیتی ژلاتین/آپاتیت از طریق یک روش زیست تقلیدی

محمود اعظمی^۱، فتح اله مضطرزاده^۲، محمد ربیعی^{۳*}

^۱ دکترا، گروه بیومواد، دانشکده مهندسی پزشکی، دانشگاه صنعتی امیر کبیر، تهران mazami@aut.ac.ir

^۲ استاد، گروه بیومواد، دانشکده مهندسی پزشکی، دانشگاه صنعتی امیر کبیر، تهران moztarzadeh@aut.ac.ir

^۳ دانشیار، گروه بیومواد، دانشکده مهندسی پزشکی، دانشگاه صنعتی امیر کبیر، تهران

چکیده

طی دهه گذشته، استفاده از رویکرد زیست تقلیدی در ساخت جایگزین‌های بافتی مورد توجه محققان قرار گرفته است. در ساخت بیشتر داربست‌های مهندسی بافت استخوان نیز از نظر نوع مواد مصرفی و همچنین روش سنتز، تلاش شده تا از این قاعده پیروی شود. در این مقاله سنتز نوعی فاز آپاتیتی در میان زمینه هیدروژل ژلاتین در شرایط زیست تقلیدی ارائه شده است. کامپوزیت حاصل طی فرایند خشک‌سازی انجمادی به صورت داربستی متخلخل برای بافت استخوان در آمد. به منظور مشخصه‌یابی محصول از نظر ترکیب شیمیایی و ساختار بلورین از آزمون‌های طیف‌سنجی فروسرخ، پراش پرتو ایکس و میکروسکوپ الکترونی عبوری استفاده شد. ریخت‌شناخت سطحی و همچنین نحوه اتصال و رشد سلول‌های استخوانی روی سطح داربست، با استفاده از میکروسکوپ الکترونی روبشی بررسی شد. نتایج به دست آمده نشان دادند که در شرایط زیست تقلیدی اعمال شده فاز آپاتیتی نانوبلورین با کریستالیت‌های به اندازه ۷-۱۰ nm در میان هیدروژل ژلاتین سنتز شده‌اند. داربست به دست آمده دارای ۸۲٪ تخلخل با ابعاد حفرات ۱۰۰-۳۵۰ μm و ضریب ارتجاعی در محدوده استخوان اسفنجی بوده و کشت سلول‌های استخوانی روی داربست، حاکی از اتصال، مهاجرت و ترشح ماده زمینه خارج سلولی به وسیله آنها بوده است. بنابراین نتایج به دست آمده قابلیت بالقوه استفاده از داربست ساخته شده برای ترمیم بافت استخوان را تأیید می‌کند.

کلید واژگان: زیست تقلیدی، آپاتیت، ژلاتین، داربست، مهندسی بافت استخوان.

* عهده‌دار مکاتبات

نشانی: تهران، خیابان حافظ، دانشگاه صنعتی امیر کبیر، دانشکده مهندسی پزشکی، گروه بیومواد، صندوق پستی ۴۴۱۳-۱۵۸۷۵

تلفن: ۰۶۴۵۴۲۳۸۱، ۰۹۱۲۴۲۷۶۸۵۸، دورنگار: ۰۶۴۵۴۲۳۸۱، پیام نگار: mrabiee@aut.ac.ir

۱- مقدمه

از آن جا که استخوان یک نانوکامپوزیت طبیعی متشکل از حدود ۶۹٪ فاز معدنی هیدروکسی کربنات آپاتیت و ۲۰٪ کلاژن و بقیه آب و عناصر دیگر است، بسیاری از محققان از ترکیب کلاژن به عنوان زمینه و نانوهیدروکسی آپاتیت به عنوان فاز ثانویه برای ساخت داربست‌های استخوانی استفاده کرده‌اند [۱، ۲، ۵، ۸، ۹]. ژلاتین که کلاژن تغییرشکل یافته است نیز به عنوان جایگزین کلاژن به کار گرفته شده است [۳، ۶، ۱۰]. وجود گزارش‌هایی مبنی بر تحریک سیستم ایمنی به وسیله کلاژن در کنار زیست‌سازگاری خوب ژلاتین، سادگی کار با آن، ارزانی، عدم نیاز به حلال‌های آلی از دلایل این جایگزینی است.

ملاحظه ساختار طبیعی استخوان چه از نظر ترکیب شیمیایی و چه از نظر نحوه شکل‌گیری و قرارگیری اجزاء در کنار یکدیگر و لزوم نزدیک‌تر شدن به این ساختار به منظور حصول نتایج ایدئال در مبحث ساخت داربست‌های استخوانی موجبات بروز رویکرد زیست‌تقلیدی^۱ را فراهم کرده است. در واقع تمایل محققان به استفاده از پلیمرهای طبیعی مخصوصاً کلاژن، ژلاتین و ترکیبات معدنی مشابه موجود در استخوان طبیعی (نظیر هیدروکسی آپاتیت) نیز در راستای همین رویکرد زیست‌تقلیدی است. ولی باید توجه داشت که علاوه بر نزدیک شدن به ترکیب شیمیایی مشابه استخوان، نحوه شکل‌گیری و طرز قرارگیری اجزاء نیز از اهمیت بسیار بالایی برخوردار است. بنابراین واقعیت، بسیاری از محققان سعی کرده‌اند تا به جای افزودن یک فاز آپاتیته آماده به زمینه یک پلیمر طبیعی، آن فاز را در داخل یا بر روی سطح آن پلیمر به صورت زیست‌تقلیدی ایجاد کنند. فرایندهای زیست‌تقلیدی به کنترل دما (۳۷°C) و pH مشابه بدن یعنی ۷/۴ نیازمندند [۱۱]. البته برخی دیگر با اعمال شرایط دیگر نظیر نفوذ در ژل [۱۲] نفوذ دوسویه در ژل^۸ [۱۳-۱۵] و حرکت‌دهی یونها در ژل با کمک میدان الکتریکی [۱۶] تلاش کرده‌اند تا بدین طریق شرایط بهتری در تقلید از محیط بیولوژیکی بدن ایجاد کنند. در بین روش‌های فوق، نفوذ یون‌های کلسیم از یک طرف و یون‌های فسفات از طرف دیگر به درون یک ژل موجود در

داربست‌ها از ابزارهای مهم و ضروری در مهندسی بافت محسوب می‌شوند. عموماً لازم است داربست‌ها ویژگی‌های خاصی از قبیل زیست‌سازگاری، خواص شیمیایی و فیزیکی مناسب، نرخ تخریب‌پذیری مطلوب، تخلخل بالا و خواص مکانیکی متناسب با بافت هدف را دارا باشند. داربست‌های مورد استفاده در بافت استخوان علاوه بر زیست‌سازگاری باید درصد تخلخل بالا با حفرات به هم مرتبط و در عین حال استحکام مطلوب داشته و تحریک‌کننده و هادی رشد بافت استخوان باشند.

در بین انواع مواد مختلف، سرامیک‌ها به علت تردی و پلیمرها گاهی به دلیل عدم استحکام کافی، ایجاد سمیت سلولی و رهایش محصولات نامطلوب ناشی از تخریبشان، عملکرد کاملاً ایدئالی از خود به عنوان داربست بافت استخوان به نمایش نگذاشته‌اند. بنابراین 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 استخوان اکثراً شامل یک فاز معدنی مانند هیدروکسی آپاتیت^۱ (HA) یا تری کلسیم فسفات^۲ (TCP) به همراه یک پلیمر سنتزی مانند پلی‌لاکتیک اسید^۳ (PLA)، پلی‌گلیکولیک اسید^۴ (PGA)، کوپلیمر لاکتیک/گلیکولیک اسید^۵ (PLGA) و یا طبیعی مانند کلاژن، آلجینات^۶ و ژلاتین هستند [۱-۱۰]. امروزه کامپوزیت‌ها با پیشرفت نانوفناوری، جای خود را به نانوکامپوزیت‌ها داده‌اند. نانوکامپوزیت‌ها علاوه بر حفظ ویژگی‌های کامپوزیت‌های متداول، به علت دارا بودن سطح آزاد بیشتر، درگیری مکانیکی بیشتری با زمینه دارند و در صورت شکل‌گیری پیوندهای شیمیایی تعداد آنها و بنابراین استحکام افزوده شده ناشی از آنها بالاتر خواهد بود. از دیدگاه بیولوژی نیز آزمایش‌های انجام شده درباره نانوکامپوزیت‌ها خصوصیات برتری را در این مواد نشان داده‌اند [۱، ۴، ۶-۱۰].

^۱ Hydroxyapatite
^۵ Poly(lactic/glycolic)

^۲ Tri-calcium phosphate
^۶ Alginate

^۳ Poly (lactic acid)
^۷ Biomimetic

^۴ Poly(glycolic acid)
^۸ Double Diffusion

شد و پس از حل شدن کامل ژلاتین، به مقدار کافی از اسید هیدروکلریک به محلول ژلاتینی نهایی اضافه شد تا pH محلول برابر مقدار ۷/۴ تنظیم شد. ۲ محلول دیگر حاوی نمک‌های کلرید کلسیم و دی سدیم هیدروژن فسفات نیز به ترتیب با غلظت‌های ۱ و ۰/۶ مولار تهیه شدند. این pH محلول‌ها نیز مشابه محلول ژلاتینی با استفاده از افزودن بافر روی ۷/۴ تنظیم شدند. پس از تهیه محلول‌های فوق، ابتدا محلول ژلاتینی در قالب مستطیلی شکلی که قبلاً پیش‌بینی شده بود، ریخته شد. دقیقاً قبل از ریختن محلول ژلاتین در قالب، به ازای هر ۱۰۰cc از محلول، ۱cc گلوآلدهید^{۱۴} (GA) با غلظت وزنی ۲۵٪ در آب در حین هم خوردن و در دمای ۴۰°C به آن اضافه شد. هدف از انجام این کار افزایش استحکام محصول به‌واسطه ایجاد پیوندهای عرضی در ساختار زنجیره‌ای ژلاتین و جلوگیری از انحلال مجدد است. علت بالا بودن دمای محلول ژلاتین در هنگام افزودن محلول GA، ترغیب بیشتر واکنش اتصالات عرضی است. به منظور ایجاد اتصالات عرضی فیزیکی، محلول ریخته‌گری شده به داخل یخچال با دمای ۴°C انتقال یافت و به مدت ۲ ساعت نگهداری گردید. پس از شکل‌گیری ژل، نمونه از یخچال خارج شده و محلول‌های کلسیم و فسفات به نحوی که در شکل ۱ به‌صورت طرح‌واره نمایش داده شده است، به طرفین ژل تهیه شده افزوده شدند. با گذشت زمان و نفوذ یون‌ها به داخل ژل، رسوب سفید رنگی در میانه آن تشکیل شد و رفته رفته ضخامت آن بیشتر گردید. با گذشت زمان، پس از رسیدن به ضخامت مطلوب نمونه نانوکامپوزیتی استخراج شد و طی فرایند خشک‌سازی انجمادی^{۱۵} با حذف حلال موجود در ساختار هیدروژل، به‌صورت یک محصول متخلخل نانوکامپوزیتی درآمد. به منظور حذف بقایای احتمالی گلوآلدهید، نمونه‌ها قبل از انتقال به دستگاه به مدت ۲۴ ساعت در آب مقطر دی یونیزه نگهداری و سپس شستشو داده شدند. شایان ذکر است که رسوب‌گذاری فاز آپاتیتی در داخل هیدروژل و در واقع در بین زنجیره‌های پلیمری آن صورت گرفته و باعث افزایش حجم هیدروژل اولیه نشده بود.

بین آنها که به نام نفوذ دوسویه شناخته می‌شود، شباهت بیشتری به تشکیل استخوان در داخل بدن دارد. زیرا وجود ژل میانی شبیه‌ساز سازه غضروفی اولیه در بدن بوده و هم‌چنان که حرکت یون‌ها به محل تشکیل استخوان با عبور از دیواره عروق و ماتریس خارج سلولی و ورود به سازه غضروفی اولیه با سازوکار نفوذ صورت می‌گیرد، در این روش نیز حرکت یون‌ها با سازوکار نفوذ کنترل می‌شود. بنابراین از این دیدگاه نیز شرایط زیست‌تقلیدی خود را حفظ می‌کند. با ملاحظه ساختار استخوان طبیعی در می‌یابیم که در ساختار آن ذرات بسیار ریز فاز آپاتیتی با ابعاد ۳×۲۵nm در فواصل منظمی به طول ۳۰۰nm روی رشته‌های کلاژنی قرار دارند [۴]. در این روش نیز فاز رسوبی تشکیل شده در داخل ژل بر روی زنجیره‌های پلیمری جوانه‌زنی و رشد کرده و امتزاج بسیار ایدئالی با زمینه خواهد داشت. بنابراین بسیار شبیه به استخوان طبیعی خواهد بود. از دیدگاه مهندسی فاز رسوبی در این نانوکامپوزیت به عنوان فاز تقویت کننده ذره‌ای عمل کرده و روشن است که هرچه ابعاد ذرات ریزتر و اتصال آنها به زمینه (در اینجا ژل) 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 [۱۰، ۱۷] اثبات شده است، بنابراین داربست ساخته شده به این روش قطعاً خصوصیات مکانیکی بهتری خواهد داشت. هدف از مطالعه حاضر ساخت داربستی نانوکامپوزیتی با زمینه ژلاتین^۹ (GEL) و فاز ثانویه آپاتیتی^{۱۰} (AP) به روش نفوذ دوسویه در شرایط زیست‌تقلیدی است.

۲- روش

۲-۱- ساخت داربست نانوکامپوزیتی

برای ساخت نانوکامپوزیت متخلخل GEL/AP، ابتدا محلولی از ژلاتین میکروبیولوژی (مرک^{۱۱} شماره ۱۰۴۰۷۰) در آب مقطر دی‌یونیزه شده با غلظت ۱۰٪ تهیه شد. قبل از افزودن ژلاتین به حلال مقدار مشخصی از نمک هیدروکسی متیل آمینومتان(تریس)^{۱۲} برای تهیه محلول بافری^{۱۳} به حلال اضافه

⁹ Gel
¹³ Buffer

¹⁰ Apatite
¹⁴ Glutaraldehyde

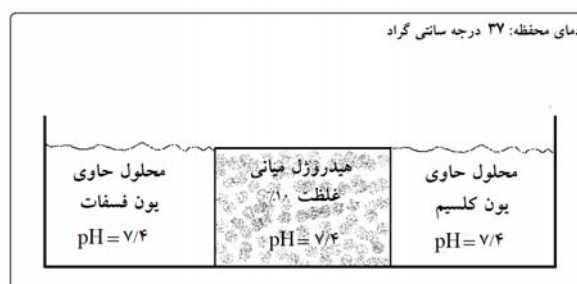
¹¹ Merck
¹⁵ Freeze Drying

¹² Hydroxy methyl amino methane(Tris)

شده از میکروسکوپ الکترونی روبشی^{۲۳} (SEM) (فیلپس XL30) استفاده شد.

به منظور ارزیابی خواص مکانیکی داربست‌های نانوکامپوزیتی سنتز شده از آزمون مکانیکی فشاری مطابق با استاندارد (ASTM F 451-86) به وسیله دستگاه روئل-آمستل^{۲۴} استفاده شد. به این طریق استحکام تسلیم فشاری، ضریب ارتجاعی و حداکثر کرنش قابل تحمل به وسیله نمونه‌ها اندازه‌گیری شدند. ۵ نمونه بدین منظور آزموده شده و مقادیر میانگین برای متغیرهای مذکور محاسبه شدند.

سازگاری زیستی-سلولی داربست‌ها و نحوه رشد و تکثیر آنها روی سطح و در درون تخلخل‌های داربست ساخته شده با استفاده از کشت سلول‌های SaOS_2 (رده سلولی شبه استئوبلاستی انسانی، تهیه شده از بانک سلولی ملی ایران-انستیتو پاستور) انجام گرفت. ابتدا سلول‌های تهیه شده به منظور تکثیر بیشتر در محیط کشت DMEM^{۲۵} به همراه ۱۰٪ سرم جنین گاوی و ۱٪ استروپتومایسین/پنی‌سیلین^{۲۶} (۱۰۰ U/mL) به مدت کافی نگهداری شدند. پس از رسیدن به تعداد مناسب با استفاده از آنزیم تریپسین از ظرف کشت جدا شده و بر روی نمونه‌های داربست ریخته شدند. برای این کار پس از افزودن آنزیم تریپسین، محیط کشت حاوی سلول‌های جدا شده ساتریفیوژ شده و مجدداً محیط کشت جدید به آنها افزوده شده و سلول‌ها مجدداً به حالت معلق درآمدند. سلول‌ها پس از تعویض محیط کشت بر روی سطح داربست ریخته شدند. چگالی سلول‌های ریخته شده بر روی داربست برابر 3×10^5 در هر 200 cc از محلول کشت بوده و قبل از افزودن سلول‌ها، نمونه داربست با محلول کشت مشابه خیسانده شد. مجموعه سلول‌ها/داربست به مدت ۴ روز در شرایط رطوبت بالا، دمای 37°C و حاوی ۵٪ دی اکسید کربن در داخل انکوباتور نگهداری شدند. سپس خارج شده و پس از طی فرایند تثبیت برای مشاهده نحوه رشد و تکثیر سلول‌ها آماده شدند. به منظور تثبیت، داربست‌های حاوی سلول ابتدا به مدت ۱ ساعت در محلول ۲/۵٪ گلو تارآلدئید غوطه‌ور شدند. پس از شستشو و حذف



شکل ۱- طرح‌واره سیستم نفوذ دوسویه کلسیم و فسفات برای سنتز داربست نانوکامپوزیتی در شرایط زیست تقلیدی

۲-۲- مشخصه‌یابی

با توجه به اینکه درصد فاز رسوبی تشکیل شونده در داخل ژلاتین به این روش از قبل مشخص نیست، برای به دست آوردن این درصد و همچنین درصد تخلخل ایجاد شده پس از خشک‌سازی انجام‌دای از تغییرات چگالی ایجاد شده در ۳ حالت هیدروژل بدون حضور رسوب، هیدروژل حاوی رسوب و داربست خشک نهایی استفاده شد.

برای تعیین ترکیب شیمیایی از روش طیف‌سنجی فرسرخ با دستگاه FT-IR^{۱۶} (مدل بروکر IFS۴۸ ساخت آلمان) در محدوده عدد موجی $4000-500 \text{ cm}^{-1}$ در حالت عبوری استفاده گردید. مطالعه ساختار بلوری با استفاده از الگوهای پراش پرتو ایکس با دستگاه XRD^{۱۸}، زیمنس^{۱۹}، تحت ولتاژ ۳۰ Kv، جریان ۲۵ mA و اشعه ایکس $\text{Cu K}\alpha$ با طول موج 1.540 \AA انجام شد. با استفاده از فرمول تقریبی دبی-شیرر^{۲۰} (رابطه ۱) استفاده شد.

$$t = \frac{0.9\lambda}{\beta_{1/2} \cos \theta} \quad (1)$$

که در آن، t قطر بلورک‌ها، λ طول موج و $\beta_{1/2}$ عرض قله با شدت بیشتر در ارتفاع نصف آن است.

برای مطالعه ریزساختار بلوری فاز رسوبی تشکیل شده در داخل ژلاتین از میکروسکوپ الکترونی عبوری^{۲۱} (TEM) ساخت شرکت فیلپس^{۲۲} در حالت پودری استفاده شد. برای انجام ۳ تحلیل یاد شده، نانوکامپوزیت سنتز شده طی فرایند سنباده‌زنی به صورت پودر درآمد. به منظور بررسی ریخت‌شناخت سطحی و اندازه‌گیری قطر تخلخل‌های ایجاد

¹⁶ Fourier Transform Infra Red Spectroscopy

²⁰ Debye-Scherrer

²³ Scanning Electron Microscope

²⁶ Penicillin-Streptomycin

¹⁷ Bruker

²¹ Transmission Electron Microscopy

²⁴ Roel-Amstel

¹⁸ X-ray Diffraction

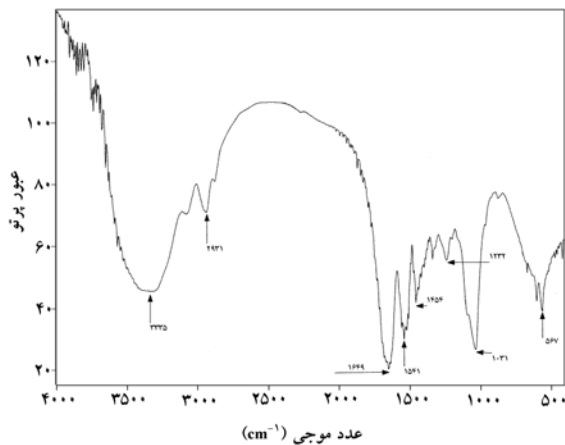
²⁵ Dulbecco's Modified Eagle Medium

¹⁹ Siemens

²² Philips

۲-۳- آزمون FTIR

در شکل ۲ نتیجه به دست آمده از این آزمون و در جدول ۱ اعداد موجی به دست آمده و نوع باند شیمیایی مربوط به آنها در مورد این نمونه نمایش داده شده است. دسته‌ای از اعداد موجی ($1650, 1540, 1450 \text{ cm}^{-1}$) که شاخص‌ترین آنها مربوط به آمید نوع اول و دوم است، ناشی از حضور ژلاتین بوده و اعداد موجی ($1040, 560 \text{ cm}^{-1}$) مربوط به باندهای ارتوفسفات نیز حاکی از شکل‌گیری رسوب آپاتیتی در میان ژلاتین است. ظهور قله در عدد موجی ۱۳۴۵ چنان‌که در منابع دیگر هم بیان شده است [۸، ۹]؛ به علت شکل‌گیری پیوند مابین گروه‌های کربوکسیل از ژلاتین و یون کلسیم از فاز رسوبیست.



شکل ۲- نتیجه آزمون FTIR مربوط به داربست نانوکامپوزیتی ژلاتین/آپاتیت

جدول ۱- اعداد موجی و نوع پیوندهای مربوط به نمونه نانوکامپوزیتی در آزمون FTIR

ترکیب	نوع پیوند	عدد موجی (cm^{-1})
HA	PO_4 bend	۵۶۰، ۱۰۴۰
HA	structural OH	۶۲۲
HA	CO_3	۸۶۸
Amide III (GEL)	N-H	۱۲۳۸
GEL-HA	Ca-COO	۱۳۴۵
GEL	COO	۱۴۵۳
Amide II (GEL)	N-H bend	۱۵۵۰-۱۶۴۰
Amide I (GEL)	C=O Stretch	۱۶۰۰-۱۶۷۰
Amide B	C-H	۲۹۳۱
Amide B	C-H Stretch	۳۰۵۰
رطوبت همراه نمونه	O-H Stretch	۳۱۰۰-۳۶۰۰

گلو تارآلد هید، نمونه‌ها برای تکمیل فرایند تثبیت به مدت ۱۵ دقیقه در محلول ۱٪ ازمیوم تتراکساید^{۲۷} غوطه‌ور شدند. نهایتاً به منظور خشک‌سازی، نمونه‌ها در محلول‌های استون با غلظت‌های افزایش یابنده ۵۰٪، ۷۰٪، ۹۰٪ و ۱۰۰٪ هر کدام به مدت ۱۰ دقیقه غوطه‌ور شدند. مرحله آخر آماده‌سازی نیز اعمال فرایند خشک‌سازی انجمادی بود. تصویربرداری از داربست‌های حاوی سلول‌ها با SEM انجام شد.

۳- نتایج

۳-۱- محاسبه درصد فاز آپاتیتی و درصد تخلخل

داربست

بدین منظور لازم بود که چگالی هیدروژل در سه حالت محاسبه شود. برای این کار ابتدا جرم (با استفاده از ترازوی دیجیتالی) و سپس حجم (با استفاده از غوطه‌وری در محلول اتانول و اندازه‌گیری تغییر حجم ناشی از آن) هر نمونه اندازه‌گیری و چگالی محاسبه شد. مقادیر به دست آمده به ترتیب برای هیدروژل بدون رسوب، حاوی رسوب و نهایتاً نانوکامپوزیت خشک شده ۱/۰۱، ۱/۰۵ و ۰/۲۵ به دست آمد. با استناد به قانون مخلوط‌ها (رابطه‌های ۲ و ۳):

$$\rho = V_1\rho_1 + V_2\rho_2 + V_3\rho_3 + \dots + V_n\rho_n \quad (2)$$

$$\frac{1}{\rho} = \frac{\omega_1}{\rho_1} + \frac{\omega_2}{\rho_2} + \frac{\omega_3}{\rho_3} + \dots + \frac{\omega_n}{\rho_n} \quad (3)$$

که در این روابط ρ چگالی به دست آمده از نمونه، ρ_1 تا ρ_n چگالی اجزاء، ω_1 و ω_n درصد‌های وزنی و V_1 تا V_n درصد‌های حجمی هر جزء است، درصد فاز رسوبی با استفاده از رابطه (۲) و درصد تخلخل از رابطه (۳) محاسبه شدند. منظور از اجزاء در اینجا فاز آب، ژلاتین و فاز رسوبی و در هنگام محاسبه تخلخل، فاز آبی حذف و تخلخل با چگالی صفر جایگزین می‌شود. چگالی ژلاتین، فاز رسوبی و آب به ترتیب برابر $1/15 \text{ gr/cm}^3$ ، $3/15$ و ۱ منظور شدند. از محاسبات فوق درصد وزنی فاز رسوبی و درصد تخلخل به ترتیب ۳۰٪ و ۸۲٪ به دست آمدند.

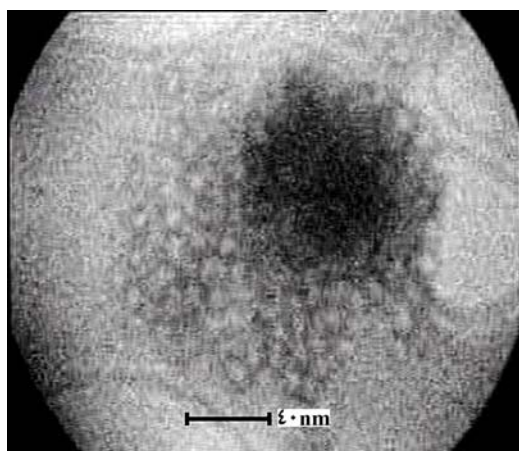
²⁷ Osmium Tetroxide

۳-۴- نتایج مشاهده با TEM

برای مشاهده نمونه‌ها با این روش مشابه روش XRD از پودر کامپوزیتی استفاده شد. همان‌طور که در شکل ۴ نمایش داده شده است، تصاویر به دست آمده از این مشاهده، شامل دانه‌های بلورین است که به صورت مناطق روشن دیده می‌شوند و با توده‌ای تیره رنگ که همان ژلاتین است، احاطه شده‌اند. در نتیجه این مشاهدات شکل‌گیری فاز آپاتیتی بر روی رشته‌های ژلاتینی و اتصال آنها به یکدیگر را تأیید نمودند. شکل دانه‌های بلورین تقریباً کروی و ابعاد آنها در محدوده ۷-۱۰ nm بوده است.

۳-۵- نتایج مشاهده با SEM

تصاویر به دست آمده از سطح نانوکامپوزیت، نشان دهنده وجود تخلخل بالا با حفره‌های منظم مشابه ساختار لانه زنبوری و تقریباً هم اندازه در کنار یکدیگر و مرتبط با هم هستند. قطر تخلخل‌ها در بازه $100\text{--}350\ \mu\text{m}$ قرار می‌گیرند. تصویر سطح نانوکامپوزیت در شکل ۵ نمایش داده شده است. تصاویر SEM مؤید وجود مسیرهای ارتباطی ما بین حفره‌های ایجاد شده بوده و در مجموع با توجه به بازه اندازه تخلخل‌ها و ارتباط حفره‌ها به یکدیگر می‌توان گفت محصول به دست آمده از این نظر، تا حد زیادی خصوصیات یک داربست مطلوب مورد استفاده در مهندسی بافت استخوان را دارد.

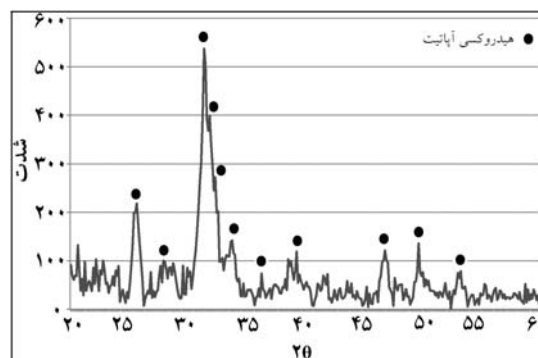


شکل ۴- تصویر TEM به دست آمده از فاز آپاتیتی در میان زمینه هیدروژل ژلاتین

اساساً ویژگی تقویت‌کنندگی فاز ذره‌ای در داخل فاز زمینه زمانی رخ می‌دهد که این دو فاز اتصال مستحکمی با یکدیگر داشته باشند، در غیر این صورت نه تنها تقویت کننده نخواهد بود بلکه به عنوان عاملی برای ایجاد ترک و در نتیجه کاهش استحکام مکانیکی عمل خواهد کرد. بنابراین تشکیل پیوندی بین ذرات آپاتیتی با زمینه ژلاتینی چنان‌که در اینجا مشاهده شد، سبب بهبود خصوصیات مکانیکی داربست کامپوزیتی نهایی می‌شود.

۳-۳- آزمون XRD

برای انجام این آزمون، ابتدا یک نمونه از داربست تهیه شده با استفاده از یک سنباده، ساییده و به شکل پودری کامپوزیتی از ژلاتین و فاز رسوبی درآمد. چنان‌که در شکل ۳ قابل مشاهده است، الگوی پراش به دست آمده از این نمونه نشان دهنده تشکیل نوعی فاز بلورینست ولی از آنجایی که فاز آپاتیتی مورد سنجش در داخل هیدروژل سنتز شده و در نتیجه آمیخته با ژلاتین است، شدت قله‌های به دست آمده پایین هستند. بررسی قله‌های ثبت شده در مقایسه با کارت‌های XRD مربوط به ترکیبات کلسیم فسفاتی موجود در پایگاه داده‌ای ICDD^{۲۸} و با استفاده از نرم‌افزار شناسایی فازها که قله‌های به دست آمده را با اطلاعات ثبت شده برای ترکیبات مختلف مقایسه کرده و تحلیل می‌کند، اثبات کرد که فاز رسوبی تشکیل شده از نوع آپاتیتی مخصوصاً هیدروکسی آپاتیت است. به علاوه، اندازه تقریبی بلورک‌ها با استفاده از رابطه (۱) محاسبه شد که برابر ۱۲ nm به دست آمد.

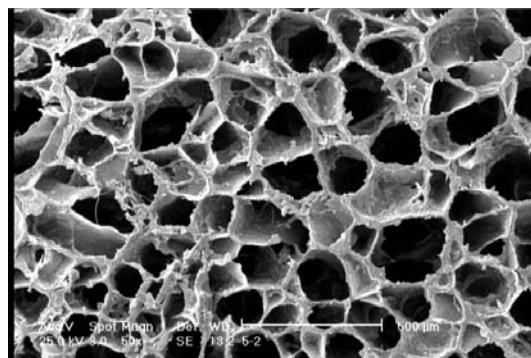


شکل ۳- الگوی XRD از داربست نانوکامپوزیتی ژلاتین/آپاتیت سنتز شده در این مقاله

این نمودار دارای سه قسمت متمایز شامل ناحیه الاستیک، پلاستیک و فشردگی است. فشردگی شدن نمونه بعد از کرنش ۱۰٪ به افزایش مجدد تنش در قسمت انتهایی نمودار منجر شده است. ضریب ارتجاعی و استحکام تسلیم داربست ساخته شده در این تحقیق چند برابر داربست ساخته شده توسط کیم^{۲۸} و همکاران [۳] است. به نظر می‌رسد علت این تفاوت قابل توجه در این است که داربست مذکور به صورت نانوکامپوزیتی نبوده و چون در ساخت آن از ذرات آپاتیتی با ابعاد میکرون استفاده شده است، کامپوزیت ساخته شده در نهایت از خصوصیات مکانیکی پائین‌تری برخوردار بوده است. کاهش اندازه ذرات تا ابعاد نانومتر باعث افزایش چشمگیر سطح آزاد ذرات و ناحیه در تماس این ذرات با فاز زمینه (ژلاتین) شده و گیرش مکانیکی آنها را چند برابر می‌سازد. از این رو خواص مکانیکی نیز بهبود می‌یابد. به علاوه، وجود نوعی پیوند شیمیایی (چنان‌که در بخش ۲-۳ بیان شد) در مورد این کامپوزیت دلیل دیگری بر ارتقای خواص مکانیکی این داربست در مقایسه با داربست ارائه شده در مرجع [۳] است زیرا در کامپوزیت‌های متداول ژلاتین/آپاتیت وجود این پیوند گزارش نشده است. ولی در مقایسه با استخوان‌های طبیعی، می‌توان گفت که خصوصیات مکانیکی داربست زیست‌تقلیدی ساخته شده در این پژوهش تقریباً در محدوده استخوان اسفنجی قرار می‌گیرد.

۳-۷- کشت سلول‌های استخوانی

تصاویر تهیه شده از سلول‌های شبه استنوبلاستی کشت داده شده بر روی داربست نانوکامپوزیتی در شکل ۶ نشان داده شده‌اند. این تصاویر دلالت بر این واقعیت دارند که سلول‌های کشت یافته به خوبی به درون حفره‌های داربست نفوذ کرده و بر روی سطح دیواره تخلخل‌ها رشد نمودند. چسبندگی سلول‌ها به سطح زیرین، مهاجرت و ترشح ماده زمینه خارج سلولی، هم بر روی سطح سلول‌ها و هم روی سطوح داخلی داربست مشاهده شد (شکل ۷). اندازه مناسب حفرات داربست امکان نفوذ سلول‌های استخوانی به درون آنها را فراهم کرده است. ترشح ماده زمینه خارج سلولی باعث



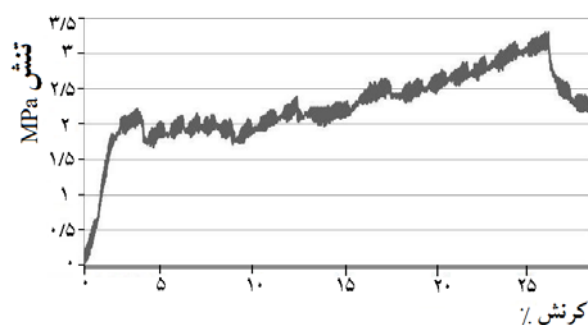
شکل ۵- ریخت‌شناخت سطحی و تخلخل‌های داربست نانوکامپوزیتی ژلاتین/آپاتیت

۳-۶- خواص مکانیکی تحت آزمون فشاری

جدول ۲ خصوصیات مکانیکی داربست نانوکامپوزیتی سنتز شده در کنار همین خصوصیات برای یک داربست متداول ساخته شده با ترکیب و شرایط تقریباً مشابه و استخوان‌های اسفنجی و متراکم را برای مقایسه نشان می‌دهد. شکل ۶ نمودار تنش-کرنش داربست را در این آزمون نشان داده است.

جدول ۲- خواص مکانیکی داربست نانوکامپوزیتی زیست‌تقلیدی ساخته شده در این تحقیق در مقایسه با یک داربست مشابه، استخوان اسفنجی و متراکم به دست آمده از آزمون فشاری

نمونه	ضریب ارتجاعی (MPa)	تنش تسلیم (MPa)	تخلخل (%)
داربست ژلاتین/آپاتیت	۸۵±۵	۲±۰/۲	۸۲
داربست ژلاتین/هیدروکسی آپاتیت [۳]	۴/۰۱±۰/۳۹	۰/۶۵	۸۴/۶±۲/۵
استخوان متراکم [۴]	۳-۳۰×۱۰ ^۳	۱۳۰-۱۸۰	۵-۳۰
استخوان اسفنجی [۴]	۲۰-۵۰۰	۴-۱۲	۳۰-۹۰



شکل ۶- نمودار تنش-کرنش نمونه داربست سنتز شده تحت آزمون مکانیکی فشاری

۴- بحث و نتیجه‌گیری

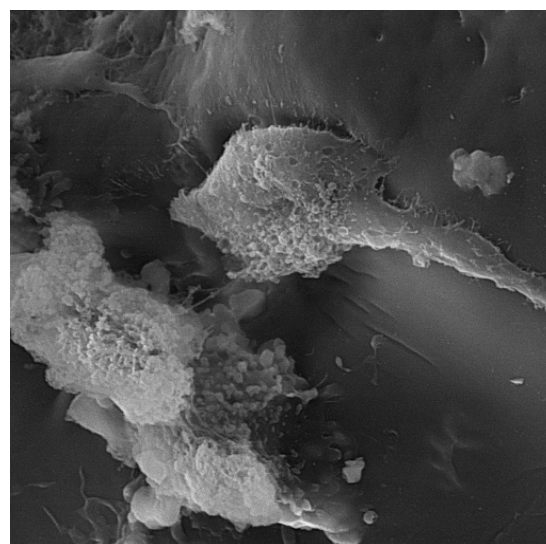
موفقیت در ساخت داربست‌های مورد استفاده برای جایگزینی بافت استخوان تنها در صورتی به‌طور کامل حاصل می‌شود که داربست ساخته شده از جهات مختلف نظیر خصوصیات شیمیایی، فیزیکی، بیولوژیکی و مکانیکی شبیه به بافت استخوان باشد. با توجه به پیچیدگی بافت استخوان و خصوصیات منحصر به فرد آن، گردآوری تمام این خواص در کنار یکدیگر در یک مجموعه خارج از بدن تنها در صورتی امکان‌پذیر است که شباهت قابل توجهی بین آن محیط خارجی با محیط بیولوژیکی بدن وجود داشته باشد. طبق آنچه که در قسمت مقدمه بیان شد، امرزه تحقیقات زیادی در این راستا با عنوان کلی زیست‌تقلیدی در حال انجام است. به نظر می‌رسد میزان موفقیت هر سیستم زیست‌تقلیدی به میزان نزدیکی مجموعه طراحی شده به مجموعه مشابه خود در محیط بیولوژیکی بستگی دارد. شرایط زیست‌تقلیدی به‌کار گرفته شده در این پژوهش از چند دیدگاه شبیه به شرایط بدن انتخاب شد. که عبارت‌اند از:

۱- تشکیل فاز معدنی در شرایط مشابه بدن از نظر دما و pH. با توجه به اثرگذاری دما و شرایط pH در فرایند رسوب‌گذاری فازهای کلسیم فسفاتی، دما و pH به ترتیب مقادیر ۳۷°C و ۷/۴ انتخاب شدند.

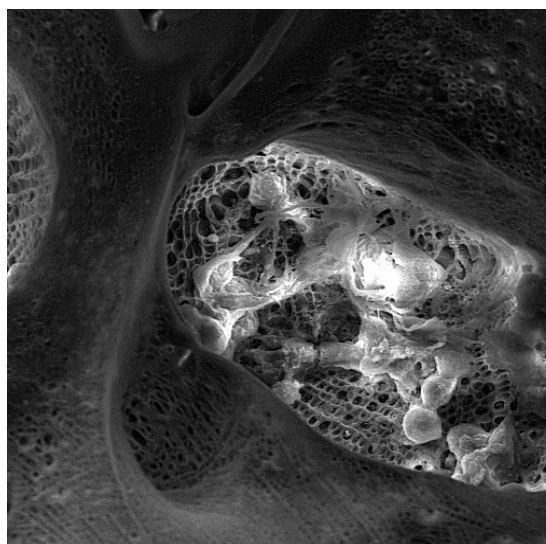
۲- استفاده از هیدروژلی از جنس ژلاتین که از نظر فیزیکی به عنوان نوعی سازه اولیه شبیه‌ساز ماده زمینه خارج سلولی و از نظر شیمیایی به علت شباهت به کلاژن، به عنوان جایگزین غضروف پیش‌استخوانی متشکل از کلاژن در بدن، عمل می‌کند. دلیل استفاده از ژلاتین به‌عنوان سازه زمینه، شباهت ساختاری این پلیمر به جزء آلی استخوان است که غالباً از کلاژن تشکیل شده است.

۳- استفاده از فرایند نفوذ دوسویه در مطالعات اخیر نیز مورد توجه قرار گرفته است. از ویژگی‌های بسیار مهم بافت استخوان که سبب به‌وجود آمدن خصوصیات ویژه‌ای برای این بافت شده نحوه چینش یا قرارگیری اجزای تشکیل‌دهنده در کنار یکدیگر به‌ویژه نحوه قرارگیری فاز معدنی بر روی زنجیره‌های کلاژنی در لابه‌لای استخوان است. ایجاد

ایجاد سطحی ناصاف روی سطح سلول‌ها شده است. شکل الف-۶ سلول‌های نفوذ کرده به درون یک حفره و شکل ب-۶ اتصال و تمایل به مهاجرت سلولی روی سطوح داخلی حفرات داربست را به خوبی نشان می‌دهد. این مشاهدات نشان می‌دهند که داربست نانوکامپوزیتی ساخته شده قابلیت ترغیب و هدایت رشد سلول‌های استخوانی را داراست.



الف



ب

شکل ۷- تصاویر مربوط به کشت سلول‌های استخوانی روی داربست نانوکامپوزیتی ژلاتین/آپاتیت: الف) نفوذ سلول‌ها به درون حفرات؛ ب) چسبندگی و تمایل به مهاجرت سلولی

با یکدیگر را داراست و اندازه تخلخلها تقریباً در بازه مطلوب برای رشد سلولهای استخوانیست. خصوصیات مکانیکی به دست آمده از آزمون فشاری در مقایسه با داربست مشابه بررسی شده در یک مطالعه دیگر [۳] بسیار برتر بوده و به استخوان اسفنجی شبیه تر است. نفوذ سلولهای استخوانی به درون حفرات و اتصال آنها به دیواره حفرات و ترشح ماده زمینه خارج سلولی بیانگر سازگاری بالای داربست ساخته شده است. در مجموع نتایج به دست آمده از تحلیل‌های مختلف، بر قابلیت محصول نهایی برای استفاده به عنوان داربست در ترمیم استخوان دلالت می‌کند.

مراجع

- [1] Zhang S.M., Cui F.Z., Liao S.S., Zhu Y., Han L., Synthesis and biocompatibility of porous nano-hydroxyapatite/collagen/alginate composite, *J Mater Sci Mater Med*, 2003; 14: 641-645.
- [2] Liao S.S., Cui F.Z., Zhu Y., Osteoblasts adherence and migration through three-dimensional porous mineralized collagen based composite: nHAC/PLA, *J Bioact Compat Polym*, 2004; 19: 117-130.
- [3] Kim H.W., Knowles J.C., Kim H.E., Hydroxyapatite and gelatin composite foams processed via novel freeze-drying and crosslinking for use as temporary hard tissue scaffolds, *J Biomed Mater Res Part A*, 2005; 72: 136-145.
- [4] Murugan R., Ramakrishna S., Development of nanocomposites for bone grafting, *Compos Sci Technol*, 2005; 65: 2385-2406.
- [5] Itoh S., Kikuchi M., Koyama Y., Matumoto H.N., Takakuda K., Shinomiya K., Tanaka J., Development of a novel biomaterial, hydroxyapatite/collagen (HAp/Col) composite for medical use, *Bio-Medical Materials and Engineering*, 2005; 15:29-41.
- [6] Kim H.W., Kim H.E., Salih V., Stimulation of osteoblast responses to biomimetic nanocomposites of gelatin-hydroxyapatite for tissue engineering scaffolds, *Biomaterials*, 2005; 26: 5221-5230.
- [7] Yamaguchi I., Tokuchi K., Fukuzaki H., Koyama Y., Takakuda K., Monma H., Tanaka T., Preparation and microstructure analysis of chitosan/hydroxyapatite nanocomposites, *J Biomed Mater Res Part A*, 2001; 55: 20-27.
- [8] Kikuchi M., Matsumoto H.N., Yamada T., Koyama Y., Takakuda K., Tanaka J., Glutaraldehyde cross-linked hydroxyapatite/collagen self-organized nanocomposites, *Biomaterials*, 2004; 25: 63-69.
- [9] Chang M.C., Tanaka J., FT-IR study for hydroxyapatite/collagen nanocomposite cross-linked by glutaraldehyde, *Biomaterials*, 2002; 23: 4811-4818.
- [10] Azami M., Moztafzadeh F., Tahriri M., Preparation, characterization and mechanical properties of controlled porous Gelatin/Hydroxyapatite nanocomposite through layer solvent casting combined with freeze-drying and lamination techniques, *Journal of Porous Materials*, 2010; 17: 1380-2224.

این نظم در استخوان مستلزم رخداد فرایندهای وابسته به نفوذ یون‌ها از دیواره عروق و ماده زمینه خارج سلولی به سمت محل شکل‌گیری استخوان است که لزوماً فرایند زمان‌بر است. بنابراین، امروزه بخشی از تحقیقات با عنوان زیست‌تقلیدی [۱۲، ۱۳، ۱۵، ۱۸، ۱۹] با محوریت پیاده‌سازی نوعی سیستم نفوذی برای سنتز محصولات با کاربردهای مرتبط به بافت استخوان انجام شده است.

به‌رغم اهمیت مبحث نفوذ در فرایندهای زیست‌تقلیدی، بیشتر تحقیقاتی که با عنوان زیست‌تقلیدی از آنها یاد شده است [۶، ۱۴، ۲۰، ۲۱]، محدود به شبیه‌سازی محیط شیمیایی بدن مخصوصاً محیط یونی و استفاده از محلول‌های شبیه‌ساز بدن نظیر ^{29}SBF بوده است. ضمن اینکه عمدتاً هدف مطالعه، خود فرایند معدنی شدن تحت شرایط زیست‌تقلیدی بوده و کمتر برای ساخت داربست استفاده شده است. در مورد استفاده از روش نفوذی هم به‌جز یک مورد در معدنی کردن نوعی داربست کایتوسانی^{۳۰} [۱۳]، از این روش بیشتر برای مطالعه چگونگی روند معدنی کردن در بدن استفاده شده است تا ساخت نوعی داربست برای مهندسی بافت استخوان. بنابراین تا زمان نگارش این مقاله، گزارشی بدین مضمون به چاپ نرسیده است. از این رو می‌توان اظهار نمود که نوآوری پژوهش انجام شده به‌طور عمده به‌کارگیری روش نفوذ دوسویه برای ساخت داربست زیست‌تقلیدی در زمینه ژلاتینی بوده است.

با استفاده از روش نفوذدهی دوگانه در داخل هیدروژل ژلاتین می‌توان فاز آپاتیتی در داخل هیدروژل تشکیل داده و نوعی کامپوزیت ژلاتین/آپاتیت برای کاربرد به‌عنوان داربست در مهندسی بافت استخوان سنتز کرد. با توجه به آنالیزهای انجام شده اثبات شد که امکان تشکیل فاز نانوآپاتیتی در شرایط زیست‌تقلیدی با ساختار نانوکربلورین و ابعاد ۷-۱۰nm در داخل هیدروژل وجود دارد. اندازه بلورهای به‌دست آمده در این روش در مقایسه با فاز آپاتیتی سنتز شده به روش ترسیبی^{۳۱} [۱۰، ۱۷] کاهش جزئی را نشان داد. روش خشک‌سازی انجمادی مورد استفاده در این تحقیق قابلیت ساخت سازه‌هایی با تخلخل بالا با حفره‌های منظم و مرتبط

²⁹ Simulated Body Fluid³⁰ Chitosan³¹ Precipitation

- Hydroxyapatite Formation in Hydrogels, *Biomacromolecules*, 2006; 7: 3008-3011.
- [17] Azami M, Rabiee M., Moztarzadeh F., Glutaraldehyde Crosslinked Gelatin/hydroxyapatite Nanocomposite Scaffold, Engineered via Compound Techniques, *Polymer Composite*, 2010; 31: 1987-2137.
- [18] Gomes S., Boulon M., Oliveira A.L., Leonor I.B., Mano J.F., Reis R.L., Mineralization of Chitosan Membrane Using a Double Diffusion System for Bone Related Applications, *Materials Science Forum*, 2008; 587/588: 77-81.
- [19] Ehrlich H., Hanke T., Born R., Fischer C., Frolov A., Langrock T., Hoffmann R., Schwarzenbolz U., Henle T., Simon P., Geiger D., Bazhenov V.V., Worch H., Mineralization of biomimetically carboxymethylated collagen fibrils in a model dual membrane diffusion system, *Journal of Membrane Science*, 2009; 326: 254-259.
- [20] Bigi A., Boanini E., Panzavolta S., Roveri N., Rubini K., Formation of calcium phosphate/collagen composites through mineralization of collagen matrix, *J.Biomed.Mater.Res*, 2002; 59: 709-809.
- [21] Maeda H., Kasuga T., Nogami M., Hibino Y., Hata K., Ueda M., Ota Y., Biomimetic apatite formation on poly(lactic acid) composites containing calcium carbonates, *J.Mater.Res*, 2002; 17: 727-730.
- [11] Parekh B., Joshi M., Vaidya A., Characterization and inhibitive study of gel-grown hydroxyapatite crystals at physiological temperature, *Journal of Crystal Growth*, 2008; 310: 1749-1753.
- [12] Furuichi K., Oaki Y., Ichimiya H., Komotori J., Imai H., Preparation of hierarchically organized calcium phosphate-organic polymer composites by calcification of hydrogel, *Science and Technology of Advanced Materials*, 2006; 7: 219-225.
- [13] Manjubala I., Scheler S., Bossert J., Klaus D., Mineralisation of chitosan scaffolds with nano-apatite formation by double diffusion technique, *Acta Biomaterialia*, 2006; 2: 75-84.
- [14] Ehrlich H., Krajewskab B., Hanke T., Born R., Heinemann S., Knieb C.h., Worch H., Chitosan membrane as a template for hydroxyapatite crystal growth in a model dual membrane diffusion system", *Journal of Membrane Science*, 2006; 273: 124-128.
- [15] Kniep R., Simon P., Fluorapatite-Gelatine-Nanocomposites: Self-Organized Morphogenesis, Real Structure and Relations to Natural Hard Materials, *Top Curr Chem*, Springer-Verlag Berlin Heidelberg, 2007; 270: 73-125.
- [16] Watanabe J., Akashi M., Novel Biomineralization for Hydrogels: Electrophoresis Approach Accelerates