

Investigation of Human Mesenchymal Stem Cells Adhesion and Diffusion into Poly (lactic-co-glycolic acid)/Hydroxyapatite Porous Scaffold Coated with a Biodegradable Triblock Copolymer

M. Haghbin Nazarpak ^{1*}, F. Pourasgari ², M.N. Sarbolouki ³

¹ PhD, New Technologies Research Center (NTRC), Amirkabir University of Technology, Tehran, Iran

² PhD, Stem Cells Technology Research Center, Tehran, Iran, pourasgari@ibb.ut.ac.ir

³ PhD, Biomaterials Research Center (BRC), University of Tehran, Iran, sarbol@ibb.ut.ac.ir

Abstract

The scaffolds for bone tissue engineering should consider the functional requirements: porosity, biocompatibility, and biodegradability. In this study, porous Poly (lactic-co-glycolic acid)/Hydroxyapatite composites were prepared with different weight ratios. Porous samples were fabricated by freeze-extraction method, coated with triblock copolymer and sterilized by UV. Then, human mesenchymal stem cells were cultured on scaffolds. Microstructural studies with SEM suggest the formation of about 50 micrometer size porous structure and interconnected porosity so that cells adhesion within the structure is well in depth in coated samples. DAPI fluorescence microscopy showed cells adhesion to the coated scaffolds and cells diffusion into the pores. Also, direct assay of cell proliferation performed with MTT test showed that, cells grew on the scaffold similar to or more than control samples result. Therefore, these findings suggest that the triblock-coated Poly (lactic-co-glycolic acid)/ Hydroxyapatite porous composite scaffolds could provide cells adhesion and proliferation and are appropriate matrices for bone tissue engineering.

Keywords: Scaffold, Bone tissue engineering, Freeze-extraction, Mesenchymal stem cells, Cell adhesion, Porosity, PLGA, Composite.

* Corresponding author

Address: Masoume Haghbin Nazarpak, New Technologies Research Center (NTRC), Research Administration of Amirkabir University of Technology, Wali Asr' Crossroad, after Balawar Alley, Tehran, Iran

Tel: +98 21 66402044

Fax: +98 21 66419728

E-mail: mhaghbin@aut.ac.ir

بررسی چسبندگی و نفوذ سلول‌های مزانشیم به داربست متخلخل از کامپوزیت هیدروکسی آپاتیت / PLGA با روکش پلیمر سه‌قطعه‌ای

معصومه حق‌بین نظریاک^{۱*}، فرزانه پورعسگری^۲، محمدنبی سربلوکی^۳

^۱ دکترای بیومواد، عضو هیئت علمی پژوهشکده فناوری‌های نو، دانشگاه صنعتی امیرکبیر، تهران
^۲ دکترای بیوشیمی، عضو هیئت علمی شرکت فن‌آوری بن‌یاخته، تهران pourasgari@ibb.ut.ac.ir
^۳ دکترای پلیمر، عضو هیئت علمی مرکز پژوهشی زیست‌مواد، دانشگاه تهران sarbol@ibb.ut.ac.ir

چکیده

داربست‌های مورد استفاده در مهندسی بافت باید علاوه بر عملکرد مناسب، متخلخل، زیست‌سازگار و زیست‌تخریب‌پذیر باشند. در این تحقیق، داربست‌های متخلخل کامپوزیتی PLGA/HA به روش تعویض حلال ساخته شده و با پلیمر سه‌قطعه‌ای روکش‌دهی و با نور UV استریل شدند. مشاهدات حاصل از میکروسکوپ الکترونی روبشی حاکی از تشکیل ریزساختار متخلخل با اندازه حفرات حدود ۵۰۱μm و حفرات به هم پیوسته است. سلول‌های بنیادی مزانشیم انسانی بر روی داربست‌ها بذرافشانی شدند و سلول‌ها در داخل این ساختار به‌طور مطلوب چسبیدند. رنگ‌آمیزی فلورسانس با DAPI نشان‌دهنده چسبندگی سلول‌های مزانشیم به نمونه‌های دارای روکش و نفوذ سلول‌ها به داخل حفرات بود. همچنین، به منظور بررسی میزان تکثیر سلول‌ها روی داربست‌ها، آزمایش MTT روی آنها انجام شد و نشان داد که تعداد سلول‌های کشت شده روی داربست‌ها در مقایسه با نمونه‌های کنترل تفاوت معناداری ندارد. از نتایج به دست آمده استنباط می‌شود که داربست‌های روکش‌دار شده با پلیمر سه‌قطعه‌ای، بستر مناسبی برای سلول‌های مزانشیم و روش به‌کار رفته روشی کارآمد در ساخت داربست مهندسی بافت استخوان است.

کلید واژگان: داربست، مهندسی بافت استخوان، تعویض حلال، سلول بنیادی مزانشیمی، چسبندگی سلولی، تخلخل، PLGA، کامپوزیت.

*عهده‌دار مکاتبات

نشانی: تهران، بالاتر از چهارراه ولیعصر، نبش کوچه بالاور، معاونت پژوهشی دانشگاه امیرکبیر، پژوهشکده فناوری‌های نو
 تلفن: ۶۶۴۰۲۰۴۴، دورنگار: ۶۶۴۰۲۰۴۴، پیام‌نگار: mhaghbinn@aut.ac.ir

۱- مقدمه

مهندسی بافت رویکرد جدیدی در طراحی و دوباره‌سازی بافت‌های آسیب‌دیده است [۱-۶]. استراتژی مهندسی بافت شامل استفاده از سلول، داربست و عوامل زیست‌فعال است؛ به این ترتیب که داربست، قالب مناسب را برای رشد، تکثیر و تمایز سلول‌ها فراهم می‌کند و موجب چسبندگی و مهاجرت سلول‌ها می‌شود [۷-۹]. یک داربست ایدئال، باید زیست‌سازگار و زیست‌تخریب‌پذیر باشد؛ فعل و انفعال سلول و بافت را افزایش دهد و خواص فیزیکی و مکانیکی مناسبی داشته باشد [۴، ۱۰]. برای ساخت یک داربست سه‌بعدی در مهندسی بافت، ویژگی‌های مختلفی باید در نظر گرفته شوند [۱۱-۱۳]. اول اینکه داربست باید متخلخل باشد تا موجب تکثیر و تفکیک سلولی شده، تشکیل بافت استخوانی را افزایش دهد [۴، ۱۴، ۱۵]. همچنین، داربست باید به منظور ایجاد چسبندگی و رشد سلول‌ها و تشکیل بافت سه‌بعدی، متخلخل باشد [۱۶-۱۸]. تخلخل بالا (بیش از ۹۰٪) برای ساخت همه داربست‌های مهندسی بافت ضروریست [۱۶، ۱۹، ۲۰]. این امر موجب افزایش سطح ویژه و چسبندگی سلولی و رشد بافت می‌شود [۲۱]. همچنین اندازه حفرات باید به اندازه کافی بزرگ باشد تا تعداد زیادی از سلول‌ها به راحتی در ساختار به هم پیوسته حفرات در کنار هم قرار گیرند و توزیع اکسیژن، مواد غذایی و سلول‌ها و مبادله مواد زائد درون ساختار یکنواخت باشد [۶، ۱۵، ۲۲-۲۴]. به علاوه، داربست مهندسی بافت استخوان باید دارای خواص مکانیکی مشابه استخوان باشد [۱۵] و پس از تخریب تدریجی، امکان رشد استخوان را در نقص بافتی فراهم ساخته و در نهایت با بافت استخوان طبیعی جایگزین شود [۲۲].

اثبات شده است که هیدروکسی‌آپاتیت ساختار معدنی استخوان را شبیه‌سازی می‌کند و خواص مکانیکی و هدایت رشد استخوان مطلوبی نیز دارد [۲۵]. ترکیبات هیدروکسی‌آپاتیت نظیر هر ماده‌سرامیکی دیگری، فاقد الاستیسیته و تردی بالاست که موجب نگرانی‌هایی درباره عملکرد مکانیکی آن پس از ایمپلنت شدن^۱ می‌شود [۲۶]. استفاده از کامپوزیت پلیمر/بیوسرامیک می‌تواند راه حل این مشکل

باشد. به علاوه، افزودن پلیمرهای زیست‌تخریب‌پذیر به سرامیک‌های کلسیم‌فسفاتی هادی رشد استخوان، به افزایش زیست‌فعالی و کنترل آهنگ تخریب منجر شده [۲۷] و موجب دستکاری بهتر و کنترل ریزساختار در شکل‌دهی می‌شود [۲۸]. پلیمرهای زیست‌تخریب‌پذیر مصنوعی مانند پلی‌ال لاکتید اسید^۲ (PLLA)، پلی‌گلیکولیک اسید^۳ (PGA) و پلی‌دی، ال لاکتیک اسید-کو-گلیکولیک اسید^۴ (PLGA) به طور گسترده به عنوان داربست برای کشت سلول و مهندسی بافت به کار برده می‌شوند [۶، ۲۹]. کامپوزیت‌ها اغلب توازن خوبی بین استحکام و چقرمگی مواد مختلف فراهم می‌سازند که از استحکام و چقرمگی هر یک از اجزاء تشکیل‌دهنده خود مناسب‌تر است. در واقع، ماده زمینه استخوان طبیعی نیز ترکیبی از کلاژن و هیدروکسی‌آپاتیت است که خواص منحصر به فرد آن ناشی از برهم‌کنش اجزای آلی و معدنی در مقیاس نانو است [۱۸، ۲۵، ۳۰-۳۱]. روش‌های متعددی برای به دست آوردن داربست متخلخل وجود دارد [۳۲] که از آن جمله روش ریختگی حلال است که در آن پس از قالب‌گیری محلول، حلال خارج می‌شود که ممکن است با خشک کردن انجمادی همراه شود تا ساختار متخلخل‌تری به دست آید [۳۳]. به این ترتیب که فضای اشغال شده به وسیله حلال در داربست پس از خروج مایع یا حلال منجمد، موجب ایجاد حفرات می‌شود. بنابراین مرحله خروج حلال، برای حفظ تخلخل داربست اهمیت دارد. به همین دلیل برخی از محققان از روش خشک کردن انجمادی برای خروج حلال استفاده کرده‌اند، اما این روش زمان‌بر است و هزینه بالایی دارد. از سوی دیگر، برای افزایش بازدهی فرایند ساخت، از روش تعویض حلال استفاده می‌شود که در آن نمونه پس از انجماد، در یک حمام غیرحلال غوطه‌ور می‌شود تا حلال قبل از خشک شدن نمونه از آن خارج شود [۲۰].

از طرف دیگر مهندسی بافت بر پایه سلول، فرصت مناسب و سودمندی برای کاربردهای بالینی ارائه می‌کند [۳۴]. به علاوه یافتن منبع سلولی مناسب یکی از ملاحظات اصلی در مهندسی بافت است [۳۵]. سلول‌های بنیادی سلول‌هایی هستند که توانایی خودترمیمی و تمایز به انواع

^۱ Implanting^۲ Poly-L-Lactide Acid^۳ Polyglycolic Acid^۴ Poly (lactic-co-glycolic acid)

قطره قطره محلول اسیدی است. برای تهیه رسوب ژله‌ای، محلول ۰/۳mol/L اسید فسفریک قطره قطره به سوسپانسیون هیدروکسیدکلسیم افزوده شد. pH مخلوط با افزودن مقادیر مناسب NH₄OH طی فرایند رسوب کنترل شد. رسوب حاصل یک شب ساکن مانده و مایع رویی دور ریخته شد. سپس رسوب با استفاده از سانتریفوژ با دور ۱۵۰۰۰rpm فیلتر شده و در دمای ۸۰°C خشک شده و در دمای ۱۰۰°C به مدت ۲ ساعت سینتر^۸ شد. الگوهای پراش پرتو ایکس تأییدکننده تشکیل فاز آپاتیت بود.

۲-۳- کشت سلولی

داربست‌ها قبل از بذرافشانی، با اشعه UV استریل شدند و سپس برای بررسی استریلیتی و همچنین به منظور سازگار شدن با محیط کشت به مدت یک روز در محیط کشت DMEM^۹ قرار گرفتند. سلول مزانشیم انسانی به عنوان منبع سلولی مورد استفاده قرار گرفت و روی داربست‌ها بذرافشانی شد. به طوری که روی هر داربست با قطر ۱cm^۲، ۱۰۰۰۰ سلول در محیط DMEM دارای ۱۰٪ FBS^{۱۰} کشت داده شد.

۲-۴- رنگ آمیزی فلورسانت DAPI

داربست‌ها، سه روز پس از بذرافشانی، مورد آزمایش DAPI^{۱۱} قرار گرفتند. به این منظور، محیط کشت هر چاهک بشقاب ۲۴ خانه‌ای دارای داربست برداشته شد و پس از دو بار شستشو با PBS^{۱۲}، به مدت ۳۰s به آنها محلول DAPI اضافه شد. سپس باز هم دو بار با PBS شستشو انجام شد و با میکروسکوپ فلورسانس با لنز DAPI مشاهده شدند.

۲-۵- آزمایش MTT

سلول‌های کشت داده شده بر روی داربست‌ها پس از ۱، ۳، ۵ و ۷ روز مورد آزمایش MTT^{۱۳} قرار گرفتند. به این منظور، محیط کشت هر چاهک بشقاب ۲۴ خانه‌ای دارای داربست برداشته شد و به آن محیط DMEM دارای ۱۰٪ محلول MTT، ۵ mg/ml اضافه شد و به مدت ۴ ساعت در انکوباتور ۳۷°C و ۵٪ دی اکسید کربن قرار داده شد. سوپ سلولی به

سلول‌ها نظیر استخوان و غضروف را دارند [۳۶] و به همین دلیل در تحقیقات گسترده‌ای به کار رفته‌اند.

هدف از این تحقیق، کشت سلول‌های مزانشیم انسانی روی داربست کامپوزیتی PLGA/HA تولید شده و بررسی چسبندگی و نفوذ سلول‌ها به آن برای ترمیم و دوباره‌سازی بافت استخوانی است.

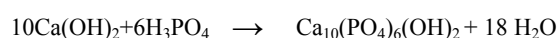
۲- روش

۲-۱- ساخت داربست کامپوزیتی

پلیمر PLGA (با نسبت ۸۵:۱۵) و پودر هیدروکسی‌آپاتیت تهیه شده در آزمایشگاه مورد استفاده قرار گرفت. درصد‌های مختلف کامپوزیت PLGA/HA با حل کردن نسبت‌های مختلف مخلوط PLGA / هیدروکسی‌آپاتیت در DMSO و هم زدن مخلوط به مدت ۲ ساعت به دست آمده و قالب‌گیری شد. سپس نمونه‌ها در فریزر ۴°C- منجمد شده و پس از خروج از فریزر به منظور تعویض حلال، به مدت ۲۴ ساعت در محلول اتانول ۳۰٪ (غیرحلال) غوطه‌ور شدند. در مرحله بعد، نمونه‌ها از اتانول خارج شده و در هوا خشک شدند. پلیمر سه‌قطعه‌ای (تشکیل شده از پلی اتیلن گلیکول - پلی (فوماریک - سبسیک اسید)^۵- پلی اتیلن گلیکول) [۳۷، ۳۸] نیز در اتانول حل شد و نمونه‌ها با غوطه‌وری در این محلول روکش‌دهی شده و در هوا خشک شدند. نمونه‌ها قبل از انجام کشت سلولی به وسیله نور فرابنفش^۶ (UV) استریل شدند.

۲-۲- ساخت پودر هیدروکسی‌آپاتیت

روش‌های مختلفی برای ساخت بلورهای هیدروکسی‌آپاتیت وجود دارند؛ از جمله روش شیمی تر، سل-ژل^۷ و رسوب‌دهی الکتریکی. در این تحقیق از روش رسوب‌دهی شیمی تر استفاده شد که در آن سوسپانسیون نانوبلورهای هیدروکسی‌آپاتیت با واکنش زیر به دست می‌آید:



فرایند تهیه هیدروکسی‌آپاتیت، شامل هم زدن سوسپانسیون ۰/۵mol/L هیدروکسید کلسیم قبل و طی افزودن

^۵ Fumaric acid/ Sebacic acid

^۶ UltraViolet

^۷ Sol-gel

^۸ Sinter

^۹ Dulbecco's modified Eagle's medium

^{۱۰} Fetal bovine serum

^{۱۱} 4',6-diamidino-2-phenylindole

^{۱۲} Phosphate buffered saline

^{۱۳} 3-(4, 5-dimethyl thiazolyl-2)-2, 5-diphenyl tetrazolium bromide

مناسب بوده و موجب مرگ سلولی یا کنده شدن آن از داربست نشده است. بنابراین نتیجه‌گیری می‌شود خلل و فرج‌های داربست برای کاشت سلول به اندازه کافی بزرگ هستند و سطحی به اندازه کافی وسیع برای چسبندگی سلول و نفوذ مواد غذایی و متابولیت‌ها فراهم می‌کنند که آن را برای کاربرد به عنوان داربست مهندسی بافت مناسب می‌سازد.

جدول ۱- نتایج بررسی‌های میکروسکوپ فلورسانس پس از

رنگ‌آمیزی با DAPI

| کد نمونه | نمونه | اسیدی بودن | مقدار سلول‌ها در DAPI |
|----------|------------------------------|------------|-----------------------|
| ۱۱ | و ۳۰٪ PLGA ۳٪ HA | معمولی | متوسط، سطحی و عمقی |
| ۱۴ | و ۳۰٪ PLGA ۱۰٪ HA | تا حدودی | متوسط، سطحی و عمقی |
| ۱۶ | و ۳۰٪ PLGA ۱۵٪ HA | زیاد | زیاد، سطحی و عمقی |
| ۱۲ | و ۲۰٪ PLGA ۲٪ HA | معمولی | متوسط، سطحی و عمقی |
| ۱۳ | و ۲۰٪ PLGA ۱۰٪ HA | کمی اسیدی | زیاد، سطحی و عمقی |
| ۱۵ | و ۲۰٪ PLGA ۱۵٪ HA | کمی اسیدی | زیاد، سطحی و عمقی |
| ۲۱ | و ۲۰٪ PLGA با روکش ۲٪ HA | کمی اسیدی | سطحی کم ولی عمقی زیاد |
| ۲۳ | و ۲۰٪ PLGA با روکش ۱۰٪ HA | کمی اسیدی | زیاد، سطحی و عمقی |
| ۲۵ | و ۲۰٪ PLGA با روکش ۱۵٪ HA | معمولی | زیاد، سطحی و عمقی |
| ۲۲ | و ۳۰٪ PLGA با روکش ۳٪ HA | زیاد | زیاد، سطحی و عمقی |
| ۲۴ | و ۳۰٪ PLGA با روکش ۱۰٪ HA | تا حدودی | کم، بیشتر عمقی |
| ۲۶ | و ۳۰٪ PLGA با روکش ۱۵٪ HA | معمولی | سطحی کم ولی عمقی زیاد |

آرامی، بدون هم زدن محتویات چاهک‌ها و به طور کامل خارج شد. سپس به هر چاهک به مقدار $100 \mu\text{l}$ از DMSO^{14} اضافه شد و دو تا سه بار پیتاژ^{۱۵} گردید و جذب در طول موج 570 nm به وسیله دستگاه الیزا ریدر^{۱۶} خوانده شد.

۶-۲- آزمایش‌های میکروسکوپ الکترونی روبشی (SEM)^{۱۷}

داربست‌ها سه روز پس از بذرافشانی، به منظور مشاهده با SEM ثابت شدند به این صورت که پس از شستشو با PBS به مدت ۲ ساعت در محلول گلو تارالدئید^{۱۸} ۲/۵٪ تثبیت شدند؛ مجدداً ۲ بار شستشو با PBS انجام شد و سپس در سری صعودی اتانول به ترتیب ۵۰٪، ۶۰٪، ۷۰٪، ۸۰٪، ۹۰٪ و ۱۰۰٪ هر کدام به مدت ۱۰ تا ۱۵ دقیقه قرار گرفتند تا دهیدراته شوند. در انتها، داربست‌های ثابت شده خشک و با طلا پوشش داده شدند و با SEM مشاهده شدند.

۳- نتایج

۱-۳- بررسی وجود سلول‌ها بر روی داربست با

رنگ‌آمیزی فلورسانس DAPI

هسته سلول‌ها پس از آزمایش DAPI با میکروسکوپ فلورسانس مشاهده شدند. در مشاهدات میکروسکوپی هسته سلول‌ها هم در سطوح و هم در داخل حفرات داربست‌ها قابل مشاهده بودند. این مشاهده بیانگر اندازه مناسب و به هم پیوسته بودن حفرات است که موجب نفوذ سلول‌ها به لایه زیرین داربست‌ها می‌شود و عبور مواد غذایی به سلول‌ها را نیز تسهیل می‌نماید. نتایج رنگ‌آمیزی DAPI به طور خلاصه در جدول ۱ ارائه شده است.

۲-۳- بررسی میزان زنده ماندن سلول‌ها با آزمایش

MTT

آزمایش MTT تفاوت معناداری را در زنده ماندن سلول‌ها در زمان‌های ۱، ۳، ۵ و ۷ روز بین نمونه کنترل و سایر نمونه‌ها نشان نداد. این نتیجه مؤید این نکته است که داربست تولید شده برای رشد و چسبندگی سلول‌ها در زمان یاد شده

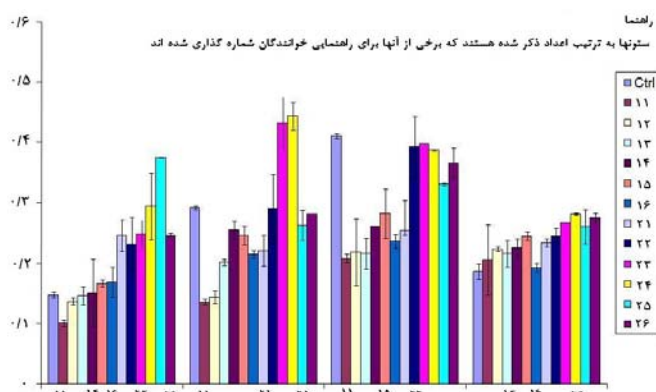
¹⁴ Dimethyl sulfoxide
¹⁸ Glutaraldehyde

¹⁵ Pipetage

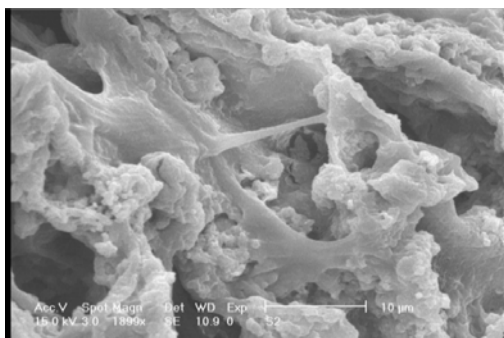
¹⁶ ELISA Reader

¹⁷ Scanning Electron Microscope

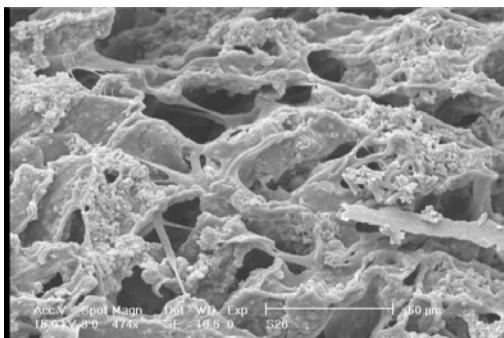
خوبی در آن قرار گرفته‌اند. همان‌طور که از شکل ۱ می‌توان دریافت، سلول‌ها با ایجاد پایک‌ها سعی در چسبیدن و قرار گرفتن در حفرات دارند (شکل ۲). همچنین شکل ۳ بیانگر نفوذ سلول‌ها به لایه‌های زیرین و درون حفرات است. از طرف دیگر بررسی‌های رنگ‌آمیزی DAPI نیز نفوذ سلول‌های مزانشیم به داخل تخلخل‌ها را نشان داد و این امر نشان‌دهنده اندازه مناسب تخلخل‌های ایجاد شده و در نتیجه کارایی روش به کار برده شده برای ایجاد تخلخل است.



شکل ۱- نتایج بررسی MTT پس از گذشت روزهای مختلف کشت سلولی



شکل ۲- چسبندگی سلول‌ها به سطح داربست نمونه ۳۰٪ PLGA و ۱۵٪ HA دارای روکش پلیمر سه‌قطعه‌ای



شکل ۳- نفوذ سلول‌ها در داخل حفرات نمونه ۳۰٪ PLGA و ۱۵٪ HA دارای روکش پلیمر سه‌قطعه‌ای

۳-۳- بررسی چسبندگی سلول‌ها به داربست با میکروسکوپ الکترونی روبشی

مشاهده ریزساختار با استفاده از SEM نشان داد سلول‌ها هم در سطح و هم در داخل حفره‌های داربست‌ها دیده می‌شوند. همچنین ریخت‌شناخت سلول‌ها نیز نشانگر پهن شدن آنها روی داربست است که تأیید می‌کند سطح تخلخل‌ها هم از نظر اندازه حفرات و هم از نظر نوع مواد به کار رفته برای قرارگیری سلول‌ها مناسب است. این نتیجه که در تأیید نتایج به دست آمده از DAPI و MTT است؛ نشان می‌دهد که نوع داربست و اندازه حفرات حاصل در این روش برای چسبندگی و نفوذ سلولی مناسب بوده است به طوری که سلول‌ها در داخل حفرات هم مشاهده می‌شوند.

۴- نتیجه‌گیری

در این مطالعه، داربست متخلخل کامپوزیتی PLGA/HA روکش‌دهی شده با پلیمر سه‌قطعه‌ای ساخته شد و برخی از خصوصیات زیستی آن مورد بررسی قرار گرفت.

نتایج مشاهده هسته سلول‌ها پس از رنگ‌آمیزی DAPI در سطوح مختلف بیانگر چسبندگی سلول‌ها در سطح داربست و نفوذ سلول‌ها به داخل حفرات بود. علاوه بر این، نتایج رنگ‌آمیزی با DAPI نشان‌دهنده چسبندگی بیشتر سلول‌های مزانشیم به نمونه‌های دارای روکش بود.

آزمایش MTT در روزهای مختلف نشان داد که داربست‌های تولید شده، به علت زنده ماندن سلول‌ها، بستر مناسبی برای رشد و تکثیر سلول‌های مزانشیم هستند. به علاوه در داربست‌های روکش داده شده با پلیمر سه‌قطعه‌ای، چسبندگی سلولی افزایش یافته است که بیانگر مناسب بودن روکش به کار رفته برای چسبندگی سلول‌هاست.

از طرف دیگر نفوذ سلول‌ها به داخل تخلخل‌ها نیازمند اندازه مناسب تخلخل‌هاست که در مورد تولید بافت‌های استخوانی حائز اهمیت است. نتایج بررسی ریزساختار، حاکی از تشکیل ساختار متخلخل با اندازه حفرات حدود ۵۰ μm و به هم پیوستگی حفره‌هاست. تصاویر SEM نمونه‌ها مؤید تشکیل ساختار متخلخل و حفرات به هم پیوسته است که سلول‌ها به

- [8] Hutmacher D. W., Garcia A. J., Scaffold-based bone engineering by using genetically modified cells, *Gene*, 2005; 347: 1–10.
- [9] Zhu X., Cui W., Li X. and Jin Y., Electrospun fibrous mats with high porosity as potential scaffolds for skin tissue engineering, *Biomacromolecules*, 2008; 9: 1795–1801.
- [10] Ma P. X., Biomimetic materials for tissue engineering, *Adv Drug Deliv Rev*, 2008; 60 (2): 184–198.
- [11] Budyanto L., Ooi C.P. and Goh Y.Q., Fabrication and characterization of porous poly (L-lactide) PLLA scaffolds using liquid-liquid phase separation, *IFMBE Proceedings*, 2008; 21: 322-325.
- [12] Gunatillake P.A. and Adhikari R., Biodegradable synthetic polymers for tissue engineering, *European Cells and Materials*, 2003; 5: 1-16.
- [13] Yang S., Leong K.F., Du Z., Chua C.K., The design of scaffolds for use in tissue engineering. Part I. Traditional Factors, *Tissue Engineering*, 2001; 7 (6): 679-689.
- [14] Jones A. C., Milthorpe B., Averdunka H., Limaye A., Senden T. J., Sakellariou A., Sheppard A. P., Soka R. M., Knackstedt M. A., Brandwood A., Rohner D., Hutmacher D. W., Analysis of 3D bone ingrowth into polymer scaffolds via micro-computed tomography imaging, *Biomaterials*, 2004; 25: 4947–4954.
- [15] Wei G., Ma P. X., Macroporous and nanofibrous polymer scaffolds and polymer/bone-like apatite composite scaffolds generated by sugar spheres, *J Biomed Mater Res*, 2006; 78A: 306–315.
- [16] Ma P. X., Zhang R., Xiao G., Franceschi R., Engineering new bone tissue in vitro on highly porous poly (α -hydroxyl acids)/hydroxyapatite composite scaffolds, *J Biomed Mater Res*, 2001; 54: 284-293.
- [17] Papenburg B.J., Vogelaar L., Bolhuis-Versteeg L.A.M., Lammertink R.G.H., Tamatialis D. S., Wessling M., One-step fabrication of porous micropatterned scaffolds to control cell behavior, *Biomaterials*, 2007; 28: 1998–2009.
- [18] Zhang R., Ma P. X., Porous poly (L-lactic acid)/apatite composites created by biomimetic process, *J Biomed Mater Res*, 1999; 45: 258-293.
- [19] Chua C. K., Leong K. F., Cheah C. M. and Chua S.W., Development of a tissue engineering scaffold Structure library for rapid prototyping. Part 2: Parametric library and assembly program, *Int J Adv Manuf Technol*, 2003; 21:302–312.
- [20] Horch R. A., Shahid N., Mistry A. S., Timmer M. D., Nanoreinforcement of poly (propylene fumarate)-based networks with surface modified alumoxane nanoparticles for bone tissue engineering, *Biomacromolecules*, 2004; 5 (5): 1990–1998.
- [21] Buckley C.T., O’Kelly K.U., Regular scaffold fabrication techniques for investigations in tissue engineering, *Topics in Bio-Mechanical Engineering*, CHAPTER V, 2004:147-166.
- [22] Gong S., Dong J., Xue S.T., Wang J.Y., A novel porous natural polymer scaffold for tissue Engineering, *Proceedings of the IEEE Engineering in Medicine and Biology 27th Annual Conference*, 2005: 4884-4887.
- [23] Ho M.H., Kuo P.Y., Hsieh H.J., Hsien T.Y., Hou L.T., Lai J.Y., Wang D.M., Preparation of porous scaffolds by using freeze-extraction and freeze-gelation methods, *Biomaterials*, 2004; 25: 129-138.
- [24] Partap S., Lyons F., O’Brien F.J., *Biomaterials and tissue engineering*, Chapter 5, Royal College of Surgeons in Ireland. Available at www.tara.tcd.ie/

از سوی دیگر، پلیمر سه‌قطعه‌ای مورد استفاده به دلیل دارا بودن اجزای آب‌دوست و آب‌گریز مانند پل برای اتصال سلول‌ها عمل می‌کند و سبب افزایش زیست‌سازگاری داربست می‌شود. از آنجا که PLGA آب‌گریز است؛ عامل‌دار کردن پلیمر با استفاده از افزودنی‌ها به بهبود خواص آن کمک می‌کند. PEG به دلیل زیست‌سازگاری بالا و حلالیت بالا در محلول‌های آبی و سمیت ناچیز، پلیمر مطلوبی در کاربردهای بیومواد است که به عنوان حامل دارو نیز به‌کار می‌رود. فوماریک اسید نیز پلیمر زیست‌تخریب‌پذیر دیگری است که به عنوان پلیمر حساس به دما یا تزریق‌پذیر مورد توجه قرار گرفته و قابلیت ایجاد اتصال عرضی در *in situ* و تغییر پلیمر را داراست. ترکیب این دو موجب افزایش آب‌دوستی داربست کامپوزیتی می‌شود. جزء سباکویل کلراید^{۱۹} نیز موجب افزایش استحکام و تحریک چسبندگی سلولی می‌شود ضمن اینکه داربست ما حاوی گروه‌های OH آزاد بیشتری خواهد شد.

نتایج این مطالعه نشان می‌دهد داربست‌های ساخته شده هم از نظر اندازه و میزان تخلخل و هم از نظر نوع روکش به کار رفته انتخاب مناسبی برای مهندسی بافت هستند. به هر حال در ادامه این تحقیق بررسی خواص مکانیکی نمونه‌ها و تمایز سلولی به سلول‌های استخوانی نیاز است.

مراجع

- [1] Vindigni V., Cortivo R., Iacobellis L., Abatangelo G. and Zavan B., Hyaluronan benzyl ester as a scaffold for tissue engineering, *Int. J. Mol. Sci.*, 2009; 10: 2972-2985.
- [2] Mistry A.S., Mikos A.G., Tissue engineering Strategies for bone regeneration, *Adv Biochem Engin/ Biotechnol*, 2005; 94: 1–22.
- [3] Tan Q., Steiner R., Hoerstrup S.P., Weder W., Tissue-engineered trachea: History, problems and the future, *European Journal of Cardio-thoracic Surgery*, 2006; 30: 782-786.
- [4] Liu X. and Ma P.X., Polymeric scaffolds for bone tissue engineering, *Annals of Biomedical Engineering*, 2004; 32 (3): 477–486.
- [5] Tabata Y., Recent progress in tissue engineering, *DDT*, 2001; 6 (1): 483-487.
- [6] Mikos A.G., Temenoff J.S., Formation of highly porous biodegradable scaffolds for tissue engineering, *EJB Electronic Journal of Biotechnology*, 2000; 3 (2). <http://www.scielo.cl/pdf/ejb/v3n2/art03.pdf>
- [7] Chen G., Ushida T., Tateishi T., Development of biodegradable porous scaffolds for tissue engineering, *Materials Science and Engineering C*, 2001; 17: 63–69.

¹⁹ Sebacoil chloride

- [32] Heo S.J., Kim S.E., Hyun Y.T., Kim D.H., Kim J. H., Lee Y.J., Kim Y.J., Shin J.W., Hwang Y.M. and Shin J.W., Fabrication of porous scaffolds for bone tissue engineering using a 3-D Robotic system: comparison with conventional scaffolds fabricated by particulate leaching, *MCB*, 2006; 3 (4): 179-180.
- [33] Kazemzadeh Narbat M., Orang F., Solati Hashtjin M. and Goudarzi A., Fabrication of porous hydroxyapatite-gelatin composite scaffolds for bone tissue engineering, *Iranian Biomedical Journal*, 2006; 10 (4): 215-223.
- [34] Duarte A.R.C., Mano J.F., Reis R.L., Preparation of starch-based scaffolds for tissue engineering by supercritical immersion precipitation, *J. of Supercritical Fluids*, 2009; 49: 279-285.
- [35] Metcalfe A.D. and Ferguson M.W.J., Tissue engineering of replacement skin: the crossroads of biomaterials, wound healing, embryonic development, stem cells and regeneration, *J. R. Soc. Interface*, 2007; 4: 413-437.
- [36] Hosseinkhani H. and Hosseinkhani M., Tissue engineered scaffolds for stem cells and regenerative medicine, *Trends in Stem Cell Biology and Technology*, Humana Press, 2009: 367-387.
- [37] Najafi F., Sarbolouki M.N., Synthesis and characterization of block copolymers from aromatic diols, fumaric acid, sebacic acid and PEG, *J Appl Polym Sci*, 2003; 90: 2358-2363.
- [38] Najafi F., Sarbolouki M.N., Biodegradable micelles/polymer sponges from fumaric/sebacic acids and poly (ethylene glycol), *Biomaterials*, 2003; 24: 1175-1182.
- jspui/bitstream/2262/3/5.1_ScaffoldsSurfaces_final.doc
- [25] Zhang R., Ma P. X., Poly (α - hydroxyl acids) /hydroxyapatite porous composites for bone tissue engineering. I. Preparation and morphology, *J Biomed Mater Res*, 1999; 44: 446-445.
- [26] Neumann M., Epple M., Composites of calcium phosphate and polymers as bone substitution materials, *European Journal of Trauma*, 2006; 32: 125-131.
- [27] Marcelle Mathieua L., Muellerb T.L., Bourbana P.E., Pioletti D.P., Ilerb R.M., Mañson J.A.E., Architecture and properties of anisotropic polymer composite scaffolds for bone tissue engineering, *Biomaterials*, 2006; 27: 905-916.
- [28] Kim S., Park M.S., Jeon O., Choi C.Y., Kim B., Poly (lactide-co-glycolide)/ hydroxyapatite composite scaffolds for bone tissue engineering, *Biomaterials*, 2006; 27: 1399-1409.
- [۲۹] کاظم‌زاده مهدی، ساخت داربست‌های مهندسی بافت به روش گاز فومینگ، ۱۳۸۸؛ قابل مشاهده در: <http://www.taksirsazan.com/tabid/250/View/866/id/4130/Default.aspx>
- [30] Thompson J.B., Kindt J H., Drake B., Hansma H.G., Morse D.E., Hansma P.K., Bone indentation recovery time correlates with bond reforming time, *Letters to nature, Nature*, 2001; 414 (13): 773-775.
- [31] Mano J.F., Sousa R.A., Boesel L.F., Neves N.M., Reis R.L., Bioinert, biodegradable and injectable polymeric matrix composites for hard tissue replacement: state of the art and recent developments, *Composites Science and Technology*, 2004; 64: 789-817.