DOI: 10.22041/ijbme.2004.13516

Fabrication of a Porous Composite Scaffold for Bone Tissue Engineering Based on Gelatin and Hydroxyapatite, Part I: Cell Culture Results

K. Asgarzadeh Tabrizi, F. Orang*

Department of Biomedical Engineering, AmirKabir University of Technology

Received 8 May 2004; received in revised form 14 August 2004; accepted 25 October 2004

Abstract

Gelatin is a protein which is derived from the organic constituent of bone (collagen). Combination of this protein with the inorganic constituent of bone (hydroxyapatite) may provide closer properties to the natural bone. In this study, a biodegradable composite scaffold based on gelatin and hydroxyapatite was prepared as a substitute for bone tissue. To increase the biocompatibility of this composite, its fabrication was carried out without using any organic solvent. Porosities obtained were spontaneously achieved without any porogen. The pore morphology indicated a high interconnectivity with diameters ranging from 50 to 200 micrometers, which seems appropriate for bone tissue engineering applications. In order to study the biocompatibility of the scaffolds, mouse fibroblastic cells were used. After 24-hour cell culture period in vitro, suitable cell attachment was observed showing high biocompatibility for all the samples. Further examinations demonstrated that the best biocompatibility is obtained for the composite of 50 wt% hydroxyapatite and 50 wt% gelatin.

Keywords: Bone tissue engineering; Gelatin; Hydroxyapatite; Cell attachment; Porosity

***Corresponding author**
Address: *Department of Biomedical Engineering, AmirKabir University of Technology, Hafez St., Tehran, I.R.Iran*
Tel: *+98 21 64542364*
Fax: *+98 21 6495655*
E-mail: *orang@aut.ac.ir*

DOI: 10.22041/ijbme.2004.13516

ساخت داربست کامپوزيتي متخلخل براي مهندسي بافت استخوان بر پايه ژلاتين و هيدروکسي آپاتيت، قسمت اول: نتايج کشت سلولي

کريم عسگرزاده تبريزي، فريبا اورنگ*

دانشگاه صنعتي اميرکبير، دانشکده مهندسي پزشکي

تاريخ ثبت اوليه: ۱۳۸۳/۲/۱۹، تاريخ دريافت نسخه اصلاح شده: ۱۳۸۳/۵/۲٤، تاريخ پذيرش نهايی: ۱۳۸۳/۸/٤

چکيده

ژلاتين، پروتئين مشتق شده از جزء آلي استخوان (کلاژن) است که تلفيق آن با جزء معدني استخوان (هيدروکسي آپاتيت) مي‌تواند خواصي بسيار نزديك به خواص استخوان طبيعي فراهم آورد، لذا در اين تحقيق داربست کامپوزيتي ژلاتين و هيدروکسي آپاتيت به عنوان جايگزين تخريب پذير استخواني پيشنهاد گرديده است. ساخت اين داربست‌ها از طريق فرآيند ريخته‌گري حلال (بدون استفاده از هيچگونه حلال آلي به منظور افزايش درجة زيست سازگاري) صورت پذيرفت. تخلخل حاصله بدون کمك عوامل تخلخل ساز بدست آمد و نشانگر حفره‌هاي به هم مرتبط با ابعادي در محدودة ۵۰ تا ۲۰۰ ميکرومتر بود. به منظور بررسي ميزان زيست سازگاري داربست‌ها، از سلولهاي فيبروبلاستي موش استفاده شد که آزمايشات کشت سلولي در طي مدت ۲٤ ساعت نشان دهنده اتّصال سلولي مناسب و زيست سازگاري عالي بود. بررسي‌هاي تکميلي مؤيد آن است که بهترين نتايج اتصال سلولي مربوط به کامپوزيت حاصل از ۵۰% هيدروکسي آپاتيت و ۵۰% ژلاتين است.

واژه‌هاي کليدي: مهندسي بافت استخوان؛ ژلاتين؛ هيدروکسي آپاتيت؛ اتّصال سلولي؛ تخلخل

*عهده‌دار مکاتبات

نشانی: تهران، خيابان حافظ، دانشگاه صنعتي اميرکبير، دانشکده مهندسي پزشکي

تلفن: ۶۴۵۴۲۳۶۴-۰۲۱، دورنگار: ۶۴۹۵۶۵۵-۰۲۱، پيام نگار: orang@aut.ac.ir

۱- مقدمه

در طول چند دهة اخير، تلاش‌هاي زيادي براي يافتن جايگزين‌هاي مناسب استخوان از سوي پژوهشگران صورت پذيرفته است. تلاش‌هاي اوليه بيشتر معطوف به استفاده از جايگزين‌هاي فلزي بود اما خوردگي اين نوع از كاشتني‌ها در بدن بيماران علاوه بر افت خواص مكانيكي و شل شدن تدريجي آنها، منجر به آزاد شدن يون‌هاي شديداً سمي فلزي و متعاقباً واكنشهاي التهابي و تحريك كنندة اين محصولات با نسوج اطراف مي‌گردد [۱]. مشكل ديگر فلزات، ضريب كشساني بسيار بالاي آنها است [۲]. ضريب كشساني فلزات بالاتر از ۱۰۰GPa است كه به مراتب بالاتر از ميزان سفتي استخوان متراكم است (۲۰-۶GPa). نتيجة اين سفتي بالا، بروز پديدة حفاظت تنشي روي استخوان در حال رشد است كه منجر به نازكي بافت جديد استخواني خواهد شد و احتمال شكست مجدد آن را افزايش خواهد داد [۳].

مشكلاتي از اين دست، توجه بسياري از پژوهشگران را به سوي مواد جديدتري معطوف نموده است؛ موادي كه مشكلات كاشتني‌هاي پيشين را دربرنداشته باشند و در عين حال امكان تشكيل بافت استخواني را در موضع عيب با سرعت و كيفيت بالاتري فراهم آورند. بدين ترتيب باب جديدي موسوم به "مهندسي بافت استخوان" باز شد و مواد زيست سازگار (بيومتريال) نويني براي اين منظور به جامعة پزشكي معرفي گرديد. به طور كلّي، مهندسي بافت را مي‌توان تحت عنوان كاربرد اصول علمي براي طراحي، ساخت، اصلاح، رشد و ابقاي بافت‌هاي زندة بدن تعريف نمود كه به موجب آن خواص يك بيومتريال به گونه‌اي دستخوش تغييرات قرار مي‌گيرد كه قادر به تشكيل بافت و يا رهايش توده‌اي از سلول‌ها به داخل بدن ميزبان باشد و نهايتاً منجر به تشكيل بافت جديد گردد [٤-٦]. بنابراين مي‌توان گفت روش مهندسي بافت استخوان بر اساس به كارگيري بيومتريال‌هاي تخريب پذير استوار است و عليرغم تنوعي كه دارد غالباً از اسلوبي كلّي تبعيت مي‌كند كه مراحل آن عبارتند از: ۱) ساخت داربست يا حامل تخريب پذير ۲) بارگذاري سلول‌ها، داروها، پروتئين‌هاي رشد و به طور كلّي عوامل برانگيزندة رشد استخوان و در نهايت ۳) كاشت مؤثّر مجموعه در موضع مورد نظر [۷]

داربست متخلخل در درون بدن شروع به تخريب شدن مي‌نمايد و همزمان با آن، سلول‌هاي كشت شده در داخل سازه به رشد و تكثير خود ادامه مي‌دهند تا اينكه بالاخره بافت استخواني جديد جايگزين آن مي‌شود. به چنين مجموعه‌هايي مجموعة سلولي[1] اطلاق مي‌گردد. البتّه علاوه بر اين مجموعه‌ها، از مجموعه‌هاي غيرسلولي[2] نيز در مهندسي بافت استخوان استفاده شده است ولي به كارگيري مجموعه‌هاي سلولي عملاً نتايج مناسب‌تري را به بار مي‌آورد [۸]. در مجموعه‌هاي غيرسلولي خاصيت استخوان‌سازي توسط خود مادة كاشتني القاء مي‌گردد؛ لذا بيومتريال به كار رفته يا بايد از قابليت تحريك استخوان سازي[3] بالايي برخوردار باشد و يا اينكه حاوي مواد برانگيزندة استخوان‌سازي همچون فاكتورهاي رشد و پروتئين‌هاي زمينة خارج سلولي[4] باشد تا موجب تشكيل استخوان در آن موضع گردد [۹].

به طور كلّي، سه گروه از مواد: پليمرها (طبيعي يا مصنوعي)، سراميك‌ها و كامپوزيت‌ها، نامزدهاي مادة داربستي هستند. پليمرهاي طبيعي كه در اين زمينه به كار مي‌روند شامل كلاژن (يا شكل تغيير يافتة آن يعني ژلاتين)، زمينة استخواني مينرال زدايي شده[5] و مشتقّات كيتين [۱۰،۵] هستند. در ميان پليمرهاي مصنوعي نيز گروه پلي α- هيدروكسي اسيدها؛ يعني پلي لاكتيك اسيد (PLA)، پلي گليكوليك اسيد (PGA) و كوپليمرهاي مختلف آنها (PLGA) از بيشترين كاربرد در مهندسي بافت استخوان برخوردارند [۷،۵، ۱۱-۱۵].

مواد سراميكي دستة ديگري از بيومتريال‌هاي به كار رفته در مهندسي بافت استخوان هستند. در ميان سراميك‌هايي كه در اين زمينه مورد مطالعه و بررسي قرار گرفته اند، سراميك‌هاي كلسيم فسفاتي وسيع‌ترين تحقيقات را به خود اختصاص داده‌اند كه معروفترين آنها عبارتند از: هيدروكسي آپاتيت (HA)، تري كلسيم فسفات (TCP)، تترا

[1] Cellular system
[2] Acellular system
[3] Osteoinductivity
[4] Extra Cellular Matrix
[5] Demineralized Bone Matrix

کلسیم فسفات (TTCP) و کلسیم فسفات آمورف (ACP) [۶،۵].

این گروه از مواد که جزء اصلي بافت سخت را در استخوان‌ها و دندان‌ها تشکیل مي‌دهند به هنگام استفاده در جایگزین‌هاي استخواني، زیست سازگاري و هدایت استخواني[6] خوبي را از خود به نمایش مي‌گذارند [۱۶]. نقطة قوت فسفات‌هاي کلسیم به خاصیت زیست سازگاري آنها برمي‌گردد که معلول تشکیل لایة غني از کلسیم - فسفر در سطح این مواد است [۱۷]. وجود چنین لایه‌اي به اتّصال شیمیایي میان استخوان و کاشتني کمك مي کند.

تحقیقات نشان داده است با به کارگیري سرامیك‌ها، به ویژه سرامیك‌هاي فسفات کلسیمي همچون HA، در کنار مواد پلیمري، علاوه بر امکان حصول خواص مکانیکي بهتر، درجة زیست سازگاري و قابلیت استخوان سازي کاشتني نیز به میزان چشمگیري افزایش خواهد یافت. بعلاوه، مشکل محصولات جانبي اسیدي پلیمرها نیز برطرف خواهد شد [۱۹،۱۸،۱۶].

در اصل خود استخوان طبیعي نیز ماده‌اي کامپوزیتي متشکّل از بلورهاي HA و فیبریل‌هاي کلاژن است که سلول‌هاي استخواني در این ماتریس کامپوزیتي پراکنده هستند [۲۰]، بنابراین روشن است با به کارگیري کامپوزیت‌هایي از پلیمرهاي طبیعي (مثل کلاژن یا ژلاتین) و سرامیك‌هاي فسفات کلسیمي (به ویژه HA) در ساخت جایگزین‌هاي تخریب پذیر [۲۱]، مي‌توان ماده‌اي نزدیك‌تر به خواص استخوان طبیعي فراهم نمود.

۲- بخش تجربي

۲-۱- مراحل ساخت داربست‌ها

پودر ژلاتین (از نوع میکروبیولوژیکي مخصوص کشت سلولي محصول شرکت Merck® آلمان) در آب مقطر بخوبي حل شد تا محلولي با غلظت ۱۲/۳۳% w/v ایجاد شود. پس از انحلال کامل ژلاتین، پودر HA (محصول شرکت Merck® آلمان با وزن مولکولي ۵۰۲/۳۲ g/mol) عبور کرده از الك با مش ۲۳۰ (ذرات کوچك تر از ۶۳ μm طبق استاندارد ASTM) به محلول اضافه گردید و بخوبي همزده شد تا ذرات HA به طور کاملاً یکنواخت در محلول ژلاتین پراکنده شوند. با تغییر مقادیر HA افزوده شده، نسبتهاي وزني مختلف ۱۰، ۲۰، ۳۰، ۴۰ و ۵۰ درصد HA به ترتیب براي نمونه‌هاي S_1 ، S_2 ، S_3 ، S_4 و S_5 طبق جدول ۱ بدست آمد. به منظور داشتن مقایسه‌اي میان کامپوزیت‌هاي مختلف و ژلاتین خالص، نمونة S_0 به صورت خالص و بدون افزودن HA تهیه گردید.

جدول ۱- ترکیب شیمیایي نمونه‌ها

نمونه	درصد وزني HA	درصد وزني ژلاتین
S_0	۰	۱۰۰
S_1	۱۰	۹۰
S_2	۲۰	۸۰
S_3	۳۰	۷۰
S_4	۴۰	۶۰
S_5	۵۰	۵۰

تمامي نمونه‌هاي مذکور تحت فرآیند یکساني عمل آوري شدند. محلول ژلاتیني خالص و محلولهاي ژلاتین + HA، همگي به مدت یك ساعت در درون حمام ۶۰°C حرارت داده شدند و در طول این مدت توسط همزن مغناطیسي[7] به طور پیوسته همزده شدند تا ترکیب کاملاً یکنواختي بدست آید. پس از ریختن هر مخلوط در ظروف پتري دیش[8] جداگانه، اجازه داده شد تا با درجه حرارت اتاق به تعادل برسند و خنك شوند. با انجماد مخلوط‌هاي تهیه شده، لایة منجمد بدست آمده به ابعاد مطلوب بریده شده و در درجه حرارت اتاق به مدت ۲۴ ساعت رها شدند تا کاملاً خشك گردند. آنگاه هر یك از قطعات حاصله به مدت ۲ ساعت در محلول گلوتارآلدئید (محلول ۲۵ درصد وزني محصول شرکت Merck® رقیق شده تا ۸% w/v) قرار داده شد تا در این فاصله زمانی، اتّصالات عرضي لازم در شبکة ژلاتیني رخ دهد و آن را تبدیل به ژلاتین نامحلول نماید. پس از شبکه‌اي

[6]Osteoconductivity [7]Magnetic stirrer [8]Petri dish

شدن ژلاتين، نمونه‌ها براي شستشو و حذف بقاياي گلوتارآلدئيد، به مدت ٢٤ ساعت در آب مقطر قرار داده شدند. در طول اين مدت، هر ٦ ساعت يك بار آب مقطر تعويض گرديد. سپس نمونه‌ها به مدت ٨ ساعت در درجه حرارت اتاق رها شدند تا رطوبت اولية آنها گرفته شود و پس از آن به منظور خشك كردن نهايي، به آون انتقال يافتند تا در دماي ٥٠°C به مدت ٢٤ ساعت ديگر حرارت ديده، كاملاً خشك گردند.

٢-٢- شناسايي داربست‌ها

٢-٢-١- ميكروسكوپ الكتروني روبشي (SEM)

نمونه‌هايي به ضخامت حدود ٢mm براي مطالعه و بررسي مناسب‌تر سطوح مقاطع در شناسايي به روش SEM مورد استفاده قرار گرفتند. نمونه‌ها ابتدا تحت خلاء با لاية طلا (با ضخامت ٥٠nm) پوشش داده شدند و سپس توسط ميكروسكوپ الكتروني روبشي، SEM، (Stereo-scan 360) مجهز به دستگاه جانبي EDXA مورد مطالعه قرار گرفتند.

٢-٣- زيست سازگاري داربست‌ها

براي بررسي درجة زيست سازگاري داربست‌ها، سلول‌هاي فيبروبلاستي L929 موش مورد استفاده قرار گرفتند. اين سلول‌ها پيش از كشت سلولي در محيط رشد RPMI-1640 به همراه ١٠٠ IU/ml پني سيلين، ١٠٠ µg/ml استرپتوميسين و ١٠% سرم جنيني گوساله (FCS) نگهداري شدند. سوسپانسيون سلولي در هنگام كشت ٤×١٠^{٥}cell/ml بود. نمونه‌هاي مخصوص كشت سلولي در ابتدا توسط الكل اتانول ٧٠% به مدت ٢ ساعت ضدعفوني گرديدند و سپس دو مرتبه هر بار به مدت ٢ ساعت با آب مقطر استريل شستشو داده شدند. پس از استريليزاسيون و قرار دادن نمونه‌ها در درون خانه‌هاي ظرف كشت سلولي[9] از جنس پلي استايرين، در هر خانه ١ml از سوسپانسيون سلولي كه قبلاً تهيه شده بود، ريخته شد. تعداد ٨ خانه به عنوان شاهد منفي (بدون نمونه) نگه داشته شدند. آنگاه پليت آماده شده به مدت ٢٤ ساعت در انكوباتور با شرايط ٥% CO_2 ، دماي ٣٧°C و رطوبت ٩٠% قرار داده شد.

پس از ٢٤ ساعت، محلول سوسپانسيوني از درون تك تك خانه ها بيرون كشيده شد و نمونه‌ها به ترتيب در الكل‌هاي ٥٠%، ٧٠%، ٨٠% و ٩٦% هر كدام به مدت ١٠ دقيقه نگه داشته شدند تا سلولها تثبيت شوند. سپس نمونه‌ها در زير ميكروسكوپ نوري مورد مطالعه قرار گرفتند.

٣- بررسي و تحليل نتايج

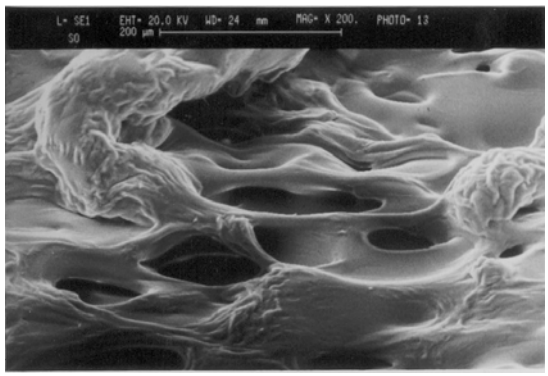
٣-١- مقايسة عكسهاي SEM

مطالعة عكس‌هاي SEM گرفته شده از نمونه‌ها حكايت از وجود ساختاري متخلخل با حفره‌هاي در محدودة ٥٠ تا ٢٠٠ ميكرومتر دارد كه جهت كاربردهاي مهندسي بافت استخوان، محدوده اي مناسب خواهد بود [٢]. حفره‌ها غالباً داراي يك ساختار بيضوي شكل هستند و در بسياري از نقاط نيز، ساختاري به هم مرتبط[10] از خود نشان مي دهند. اين ويژگي براي رشد و نفوذ بافت استخواني به درون داربست بسيار حائز اهميت است. در شكل‌هاي ١، ٢ و٣ به ترتيب تصاوير SEM مربوط به مقطع نمونه‌هاي S_0، S_2 و S_5 نشان داده شده است. اگرچه ساختار به هم مرتبط تخلخل‌ها در اكثر نمونه‌ها قابل رؤيت است، ولي مي‌توان گفت با افزايش درصد HA، علاوه بر كاهش تعداد حفره‌ها در واحد سطح، ارتباط بينابيني آنها نيز كاهش مي‌يابد. بعلاوه در نمونه‌هاي با HA كمتر، ساختار بيضوي شكل تخلخل‌ها نسبت به نمونه‌هاي داراي HA بالاتر، بيشتر حفظ شده است.

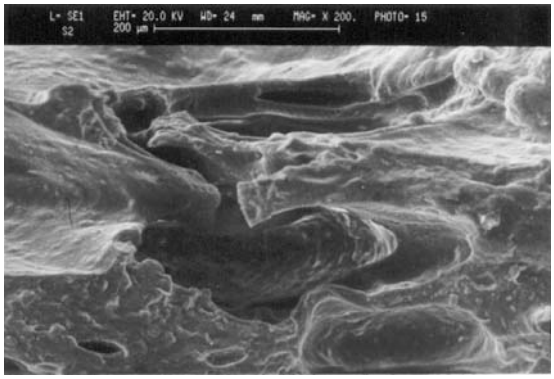
نكتة جالب توجه در مورد كلية اين نمونه‌ها اين است كه تخلخل ايجاد شده در ساختار آن‌ها به صورت كاملاً خودبخودي و بدون افزودن هيچ نوع عامل تخلخل سازي صورت پذيرفته است. در واقع انحلال طبيعي ژلاتين در آب خود باعث ايجاد اين تخلخل گشته است.

[9] Plate

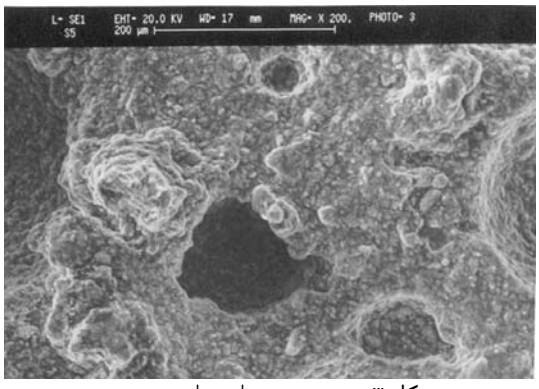
[10] Interconnectivity



شکل ۱- تصویر SEM از مقطع نمونهٔ S_0



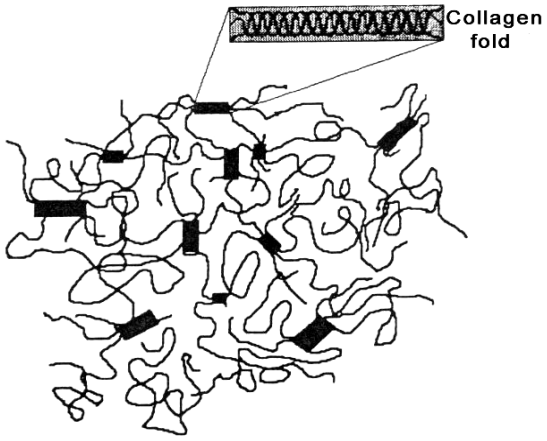
شکل ۲- تصویر SEM از مقطع نمونهٔ S_2



شکل ۳- تصویر SEM از مقطع نمونهٔ S_5

علّت این امر را باید در ماهیت ژل شدن این پلیمر جستجو کرد: درجه حرارت فرآیند (۶۰°C) عملاً بالاتر از دماي ژل شدن ژلاتین (۴۰°C-۳۵) قرار دارد؛ بنابراین ژلاتین در این دما، در حالت سل[11] می‌باشد و زنجیره‌هاي طویل آن با آرایش نامنظّم و کلافي شکل در آب پراکنده اند. در خلال سرد شدن پلیمر و با رسیدن به نقطهٔ ژل شدن، محلول پلیمري به صورت ژل در می‌آید یعني زنجیره هاي ژلاتین به طریق فیزیکي، اتّصال عرضي می‌یابند و شبکه اي را بوجود می‌آورند که مولکول هاي آب را در خود به دام می‌اندازند [۲۲].

این پدیده نتیجهٔ ایجاد توده‌هاي چین کلاژني[12] است که همچون گره‌هایي فیزیکي باعث قفل شدن دروني مولکول‌ها[13] و در نتیجه ژل شدن پلیمر می‌گردد (شکل ٤) [۲۳]. پس از قفل شدن زنجیره‌ها و به دام افتادن مولکول‌هاي حلال در شبکهٔ ژل، تودهٔ ژلاتین شروع به خشك شدن می‌نماید و طي آن مولکول‌هاي محبوس آب به تدریج تبخیر شده جاي خود را به تخلخل‌هایي می‌دهند که در ساختار باقي می‌مانند. بنابراین، از آنجایی که مکانیزم ایجاد تخلخل بر اساس انحلال ژلاتین استوارست، طبیعي است هر چقدر نسبت وزني ژلاتین در مادهٔ کامپوزیتي داربست بیشتر باشد، تمایل به فوم شدن ماده افزایش می‌یابد.



شکل ٤- تشکیل توده‌هاي چین کلاژني [۲٤]

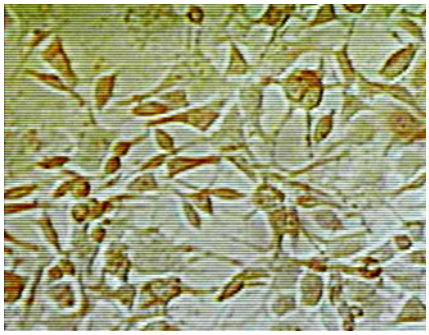
۳-۲- بررسي نتایج کشت سلولي

آزمایش‌هاي کشت سلولي نیز در مورد کلیهٔ نمونه‌ها موفقیت آمیز بود. در طول مدت ۲٤ ساعت کشت سلولي، اتّصال سلولي مناسبي در مقایسه با نمونهٔ کنترل بدست آمد. در شکل ۵، نحوهٔ اتّصال سلولي در نمونه‌هاي کنترل (شاهد منفي) نشان داده شده است. این تصویر حکایت از آن دارد که شرایط آزمایشگاهي براي اتّصال و رشد سلول‌ها کاملاً مناسب بوده است.

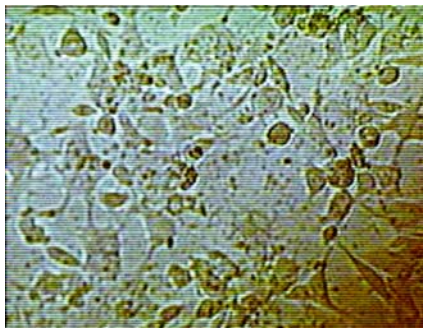
در نمونهٔ S_0، اتّصال سلولي مناسبي بدست آمده است اگرچه تعدادي سلول هاي کروي شکل نیز یافت می‌شوند که نشان

[11] Sol
[12] Collagen fold
[13] Interlocking

از مرگ سلولي دارند. اين سلول‌ها در نمونه‌هاي كنترل نيز وجـود دارند ولي تعدادشان در نمونة S_0 بيشتر است (شكل ٦). بهترين شكل براي اتّصال سلـول‌هاي فيبروبلاستي حالت دوكي شكل و كشيده است.



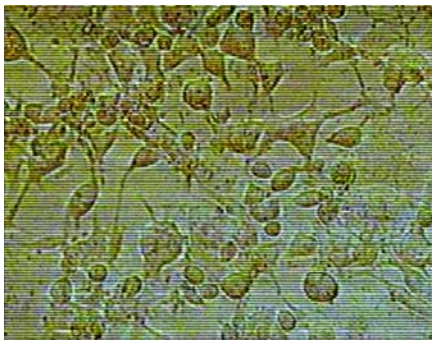
شكل ٥- تصوير ميكروسكوپ نوري از نمونة كنترل پس از كشت سلولي (بزرگنمايي ٢٥٠ ×)



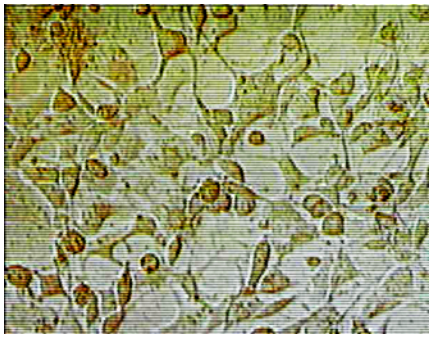
شكل ٦- تصوير ميكروسكوپ نوري از نمونة S_0 پس از كشت سلولي (بزرگنمايي ٢٥٠ ×)

در نمونة S_1، جمعيت سـلولـي اتّصال يافته بيش از نمونة S_0 به نظر مي‌رسد. بعلاوه تعدادي از سـلـول‌ها در مـراحـل شبكه‌اي شدن و پـهـن شدن قـابـل رؤيت هستند ولـي تعدادشان اندك است. در اينجا نيز سلول‌هاي كروي شكل زيادي ديده مي‌شوند (شكل ٧). اما در مورد نمونة S_2، اتّصال و رشد سلولي نسبت به نـمـونـة S_1 بـه مراتب بهتر شده است. علاوه بـر افزايش تعداد سلول‌ها در واحـد سطح، ساختار دوكي شكل آنها نيز مشهودتر از سلول‌هاي اتّصال يافته بـه نمونة S_1 است كه اين امر، نشان از زيست سازگاري بالاتر اين نمونه در مقايسه با نمونه‌هاي S_0 و S_1 دارد (شكل ٨).

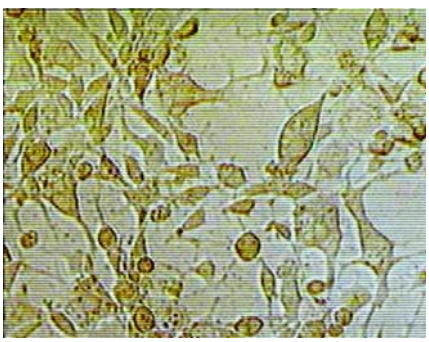
در نمونه هاي S_3 و S_4، از نظر تعداد و جمعيت سلولي تفاوت فاحشي نسبت به نمونة S_2 مشاهده نمي‌شود جز اينكه در اين نمونه‌ها اندكي بر تعداد سلول‌هايي كه به مراحل بالاتر رشد و تكثير سلولي رسيده اند، افزوده شده است يعني تعداد سلول‌هاي پهن و دوكي شكـل افزايش يافته است (شكل‌هاي ٩ و ١٠). در نمونة S_5، سلول‌ها بـه مراتب درشت‌تر شده، اتّصال بهتري را نيز با داربست برقرار نموده اند (شكل ١١).



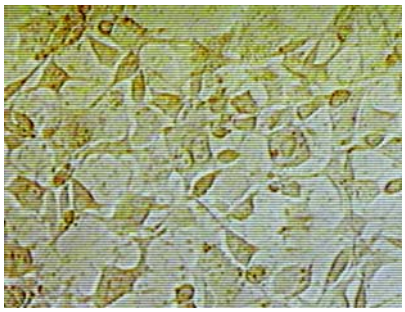
شكل ٧- تصوير ميكروسكوپ نوري از نمونة S_1 پس از كشت سلولي (بزرگنمايي ٢٥٠ ×)



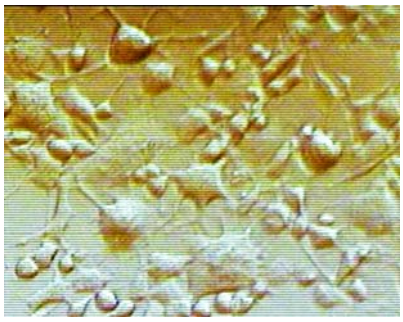
شكل ٨- تصوير ميكروسكوپ نوري از نمونة S_2 پس از كشت سلولي (بزرگنمايي ٢٥٠ ×)



شكل ٩- تصوير ميكروسكوپ نوري از نمونة S_3 پس از كشت سلولي (بزرگنمايي ٢٥٠ ×)



شکل ۱۰- تصویر میکروسکوپ نوري از نمونة S_4 پس از کشت سلولي (بزرگنمايي ۲۵۰ ×)



شکل ۱۱- تصویر میکروسکوپ نوري از نمونة S_5 پس از کشت سلولي (بزرگنمايي ۲۵۰ ×)

٤- نتيجه گيري

۱- روش مورد استفاده در اين تحقيق براي ساخت داربست‌هاي کامپوزيتي ژلاتين و HA روشي بسيار ساده و مقرون به صرفه، چه از نظر اقتصادي و چه از نظر زماني، بوده نياز به استفاده از حلال‌هاي آلي سمي را به طور کامل مرتفع مي‌سازد.

۲- انحلال ژلاتين در آب، خود فرآيندي است که تخلخل‌هاي لازم را به طور خودبخودي در داربست‌ها ايجاد مي‌کند، بنابراين نيازي به استفاده از عوامل تخلخل ساز نيست.

۳- با افزايش درصد HA علاوه بر کاهش ميزان حفره‌ها ارتباط بينابيني آنها نيز کمتر مي‌شود.

۴- اتّصال سلولي بدست آمده در مورد نمونه‌ها حکايت از زيست سازگاري عالي داربست‌هاي ساخته شده براي کاربردهاي مهندسي بافت استخوان دارد که در ميان اين داربست‌ها، بر اساس تحقيق انجام گرفته در اين مقاله، کامپوزيت متشکل از ۵۰% ژلاتين و ۵۰% HA از نظر اتّصال و رشد سلولي مناسب‌تر است.

مراجع

[1] Park JB, Lakes RS; Biomaterials: An Introduction; Plenum Press, 1992.

[2] Liu DM, Dixit V editors; Porous materials for tissue engineering; Switzerland; Trans Tech Pub; 1997.

[3] Flahiff CM, Blackwell AS, Hollis JM, Feldman DS; Analysis of a biodegradable composite for bone healing. J Biomed Mater Res 1996; 32:419-424.

[4] Bronzino JD; The Biomedical Engineering Handbook; 2nd ed; Vol. 2; USA; CRC Press, 2000.

[5] Burg, KJL, Porter S, Kellam JF; Biomaterial developments for bone tissue engineering; Biomaterials 2000; 21:2347-2359.

[6] Lee YM, Seol YJ, Lim YT, Kim S, Han SB, Rhyu IC, Baek SH, Heo SJ, Choi JY, Klokkevold PR, Chung CP; Tissue-engineered growth of bone by marrow cell transplantation using porous calcium metaphosphate matrices; J Biomed Mater Res 2001; 54(2):216-223.

[7] Hutmacher DW; Scaffolds in tissue engineering bone and cartilage; Biomaterials 2000; 21:2529-2543.

[8] Kon E, Muraglia A, Corsi A, Bianco P, Marcacci M, Martin I, Boyde A, Ruspantini I, Chistolini P, Rocca M, Giardino R, Cancedda R, Quarto R; Autologous bone marrow stromal cells loaded onto porous hydroxyapatite ceramic accelerate bone repair in critical-size defects of sheep long bones; J Biomed Mater Res 2000; 49(3):328-337.

[9] Wise DL, Trantolo DJ, Altobelli DE, Yaszemski MJ, Gresser JD; Human Biomaterials Application; USA Humana Press Inc; 1996.

[10] Wan ACA, Khor E, Hastings GW; Preparation of a chitin–apatite composite by in-situ precipitation onto porous chitin scaffolds; J Biomed Mater Res 1998; 41:541-548

[11] Törmälä P, Vasenius J, Vainionpää S, Laiho J, Pohjonen T, Rokkanen P; Ultra-high strength absorbable self-reinforced polyglycolide (SR-PGA) composite rods for internal fixation of bone fractures: *In vitro* and *in vivo* study; J Biomed Mater Res 1991; 25:1-22.

[12] Matsusue Y, Yamamuro T, Oka M, Shikinami Y, Hyon SH, Ikada Y; *In vitro* and *in vivo* studies on bioabsorbable ultra-high-strength poly(L-lactide) rods; J Biomed Mater Res 1992; 26:1553–1567.

[13] Gogolewski S, Pineda L, Busing CM; Bone regeneration in segmental defects with resorbable polymeric membranes: IV Does the polymer chemical composition affect the healing process?; Biomaterials 2000; 21(24):2513-2520.

[14] Ishaug SL, Crane GM, Miller MJ, Yasko AW, Yaszemski MJ, Mikos AG; Bone formation by three-dimensional stromal osteoblast culture in biodegradable polymer scaffolds; J Biomed Mater Res 1997; 36(1):17-28.

[15] Murphy WL, Kohn DH, Mooney DJ; Growth of continuous bonelike mineral within porous poly (lactide-co-glycolide) scaffolds *in vitro*; J Biomed Mater Res 2000; 50(1):50-58.

[16] Linhart W, Peters F, Lehmann W, Schwarz K, Schilling AF, Amling M, Rueger JM, Epple M; Biologically and chemically optimized composites of carbonated apatite and polyglycolide as bone substitution materials; J Biomed Mater Res 2001; 54(2):162-171.

[17] Guo L, Guo X, Leng Y, Cheng JC, Zhang X; Nanoindentation study of interfaces between calcium phosphate and bone in an animal spinal fusion model; J Biomed Mater Res 2001; 54(4):554-559.
[18] Durucan C, Brown PW; Low temperature formation of calcium-deficient hydroxyapatite - PLA/PLGA composites; J Biomed Mater Res 2000; 51(4):717-725.
[19] Ma PX, 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(2):284-293.
[20] Eroschenko VP; Atlas of Histology with Functional Correlations International ed; 8th ed, Lippincott Williams & Wilkins; 1996.
[21] Yaylaoglu MB, Korkusuz P, Ors U, Korkusuz F, Hasirci V; Development of a calcium phosphate-gelatin composite as a bone substitute and its use in drug release; Biomaterials 1999; 20(8):711-719.
[22] Guenet JM; Thermoreversible Gelation of Polymers and Biopolymers; USA; Academic Press; 1992.
[23] Kroschwitz JI ed; Encyclopedia of Polymer Science and Engineering; USA; John Wiley and Sons Inc, Vol 7, 1987.