

بررسی خواص فیزیگو شیمیایی داربست کامپوزیتی کیتوسان-ژلاتین-هیدروکسی آپاتیت تهیه شده به روش خشکاندن انجمادی

نازنین معروف*، فاطمه کریم آفالو*، دکتر الهه وحید دستجردی**، حمید نظریان***، دکتر هانیه نوجه‌دهیان****

چکیده

سابقه و هدف: با توجه به ساختار کامپوزیتی استخوان طبیعی، با طراحی مواد کامپوزیتی پلیمر-سرامیک می‌توان داربستی ایده آل برای مهندسی بافت استخوان به منظور افزایش خواص مکانیکی، بیولوژیکی و فیزیکی به دست آورد. هدف از این مطالعه بررسی تأثیر مقادیر مختلف پلیمری ژلاتین در داربست کامپوزیتی، کیتوسان-ژلاتین-هیدروکسی آپاتیت و همچنین تأثیر تغییر فاز سرامیکی هیدروکسی آپاتیت به بتا تری کلسیم فسفات در خواص این داربست است.

مواد و روشها: در این مطالعه داربست کامپوزیتی پلیمر-سرامیکی، کیتوسان-ژلاتین-هیدروکسی آپاتیت و کیتوسان-ژلاتین-بتا تری کلسیم فسفات به منظور استفاده در کاربردهای مهندسی بافت استخوان به روش خشکاندن انجمادی تهیه گردید. هم چنین تأثیر اضافه نمودن غلظت های مختلف ژلاتین بر روی خواص این داربست های کامپوزیتی مطالعه شد. به منظور بررسی اثرات متفاوت HA و TCP - β درون داربست کامپوزیتی هر کدام از این مواد به طور جداگانه و هم چنین در ترکیب با یکدیگر، به عنوان یک کلسیم فسفات دو فازی، به محلول های پلیمری اضافه گردید.

خواص داربست های تهیه شده با استفاده از آزمون هایی مانند میکروسکوپ الکترونی روشی (SEM) به منظور ارزیابی مورفولوژی، بررسی میزان تورم در PBS برای تخمین درصد جذب آب نمونه ها، تخلخل سنجی و طیف سنجی مادون قرمز (FT IR) به منظور مطالعه ساختار شیمیایی نمونه ها، مورد ارزیابی قرار گرفته شده است.

یافته‌ها: تصاویر بدست آمده از SEM بیانگر این است که داربست های تهیه شده با این روش متخلخل و با تخلخل های به هم مرتبط می باشند. هم چنین مطالعات نشان داده است که افزایش ژلاتین تا میزان ۱۰٪ منجر به افزایش تخلخل ها و اندازه تخلخل هائی گردد اما با بیشتر شدن میزان ژلاتین تا ۲۰٪ این مقادیر کاهش یافته است. در حالیکه نرخ تورم به طور مداوم افزایش یافته است. هم چنین در داربست های با فاز پلیمری ثابت، با تغییر فاز سرامیکی از HA به TCP متوسط اندازه تخلخل، میزان تخلخل و میزان جذب آب داربست ها افزایش یافته است.

نتیجه‌گیری: نتایج این پژوهش نشان داد که تهیه داربست های کامپوزیتی پلیمر-سرامیک کیتوسان-ژلاتین-هیدروکسی آپاتیت به روش خشکاندن انجمادی به دلیل شباهت داشتن به ساختار استخوان و همچنین دارا بودن تخلخل های مناسب، می‌تواند در کاربردهای مهندسی بافت استخوان به کار گرفته شود.

کلید واژگان: مهندسی بافت، داربست کامپوزیتی، هیدروکسی آپاتیت، کیتوسان، ژلاتین.

تاریخ دریافت مقاله: ۱۳۹۰/۱۲/۹ تاریخ اصلاح نهایی: _____ تاریخ تأیید مقاله: ۱۳۹۰/۱۲/۱۱

مجله دانشکده دندانپزشکی دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، دوره ۲۹، ویژه‌نامه، زمستان ۱۳۹۰، ۳۹۳-۳۸۵

مقدمه

استخوانی و یک ماتریس با قابلیت استخوان سازی و هدایت استخوانی می باشد. بافت میزالی مانند استخوان و دندان با ساختار کامپوزیتی طبیعی دارای خواص مناسب

اساس مهندسی بافت بر تقلید از فرایند ساخت و ترمیم استخوان در آزمایشگاه می باشد. سه عنصر اصلی در مهندسی بافت استخوان، سلول، فاکتور رشد یا تمایز

* دانشجوی مهندسی پزشکی، دانشکده مهندسی پزشکی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد علوم و تحقیقات تهران.

** دانشیار گروه ارتودنسی، دانشکده دندانپزشکی، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی

*** دانشجوی پزشکی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی.

**** نویسنده مسئول: استادیار گروه مواد دندانی، دانشکده دندانپزشکی، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی.

استفاده نمود. تری کلسیم فسفات نیز همچون هیدروکسی آپاتیت یکی از سرامیک های زیستی، دارای زیست سازگاری بسیار خوب با بافت سخت و همچنین زیست فعالی زیاد و قابلیت القاء استخوان است و می تواند در اشکال متخلخل به عنوان جایگزین یا داربست استخوانی استفاده شود (۶). تکنیک های متفاوتی برای ساخت داربست های متخلخل سه بعدی زیست تخریب پذیر توسعه یافته است، که داربست هایی با درصد تخلخل های مختلف، ساختار مختلف تخلخل، جهت گیری تخلخل ها، اندازه تخلخل ها، ارتباط بین تخلخل ها را نتیجه می دهند. ویژگی هایی که این روش ها را از هم متمایز می کند عبارتند از: استفاده یا عدم استفاده از حلال، گرما، فشار یا افزودنی های تخلخل زا (۱۰). در این پژوهش روش خشکاندن انجمادی مورد استفاده قرار گرفت که ابتدا پلیمر مورد نظر در یک حلال مناسب حل می شود و سپس در مرحله اول محلول پلیمری در یک دمای پایین فریز شده تا جایی که همه مواد به شکل کریستال های یخ در آیند. در مرحله دوم حلال به کمک ایجاد یک فشار، کمتر از فشار بخار تعادل حلال و با استفاده از خلأ بالا تصعید می گردد. تصعید کریستال های یخ سبب ایجاد یک اسفنج بسیار متخلخل می شود (۳).

در این پژوهش تأثیر اضافه نمودن غلظت های مختلفی از ژلاتین بر روی خواص داربست های کامپوزیتی مطالعه شد. همچنین به منظور بررسی اثرات متفاوت HA و TCP - β درون داربست کامپوزیتی هر کدام از این مواد به طور جداگانه و همچنین در ترکیب با یکدیگر، به عنوان یک کلسیم فسفات دو فازی به محلول های پلیمری اضافه گردید.

مواد و روشها:

مواد مصرفی در انجام آزمایش ها شامل مواد زیر می باشند: اسید استیک (۹۶٪ - شرکت Merck آلمان)، گلو تار آلدئید (محلول ۲۵/۱۰ آبی - شرکت Merck آلمان)، اتانول (۹۶٪)، کیتوسان (Cs) (درجه دی استیلاسیون ۹۵٪ - شرکت Merck آلمان، ژلاتین (Gel) (شرکت Merck آلمان)، هیدروکسی آپاتیت (HA) (شرکت Merck آلمان)، بتا تری کلسیم فسفات (TCP- β)، کلرید سدیم NaCl (شرکت Merck آلمان)، برمید سدیم NaBr (شرکت Merck آلمان)، کلرید پتاسیم KCl (شرکت Merck آلمان)، پتاسیم دی هیدروژن فسفات KH_2PO_4 (شرکت Merck آلمان)، سدیم

مکانیکی، شیمیایی و بیولوژیکی است. به منظور بازسازی بافت سخت، داربست سه بعدی کامپوزیتی با شبکه به هم پیوسته و متخلخل و اندازه تخلخل بالا اجازه می دهد تا عملکرد سلول برای ترمیم مناسب گردد. بنابراین عیوب استخوانی به وسیله بافت استخوانی طبیعی، بدون حضور یک ایمپلنت دائمی، با تمامی خواصش بازسازی می شود (۱۰۲). داربست ایده آل باید شبیه ماتریس خارج سلولی بافت طبیعی باشد که سبب احیاء بافت شود. در بافت استخوان ماتریس خارج سلولی شامل یک فاز آلی ساخته شده از کلاژن نوع ۱ و ۲ به عنوان پروتئین و گلوکز آمینو گلیکان ها به عنوان پلی ساکارید و نیز یک فاز معدنی هیدروکسی آپاتیت می باشد.

بدین منظور در این پروژه از پلیمرهای طبیعی کیتوسان و ژلاتین برای جایگزینی فاز آلی و از سرامیک های هیدروکسی آپاتیت و بتاتری کلسیم فسفات به عنوان فاز معدنی استفاده شد. این مواد زیست تخریب پذیر و زیست جذب پذیر دارای خواص منحصر به فردی در مهندسی بافت می باشند.

کیتوسان به دلیل ویژگی های زیست سازگاری و فعالیت ضدباکتریایی آن، انتخاب مناسبی برای کاربردهای متنوع مهندسی بافت می باشد. می توان خواص مکانیکی و یا بیولوژیکی و زیست فعالی کیتوسان را از طریق ترکیب آن با مواد فعال بیولوژیکی دیگر، همچون هیدروکسی آپاتیت و ژلاتین بهبود بخشید (۳). ژلاتین به علت ویژگی هایی از قبیل افزایش چسبندگی، مهاجرت، تکثیر و تمایز سلولی، زیست سازگاری بالا و زیست تخریب پذیری به عنوان ماده ای زیستی برای ساخت داربست مهندسی بافت استفاده می شود. ژلاتین در ترکیب با کیتوسان فعالیت بیولوژیکی را بهبود می بخشد (۴ و ۵). با این حال عدم زیست فعالی کیتوسان و هم چنین خواص مکانیکی پایین ژلاتین کاربرد آنها را در مهندسی بافت استخوان محدود می کند. هیدروکسی آپاتیت بسیار شبیه به ساختار مینرال استخوان است و سرامیک های هیدروکسی آپاتیت می توانند پیوند مستقیم با استخوان برقرار کنند. از ویژگی های هیدروکسی آپاتیت می توان به زیست سازگاری، زیست فعالی، قابلیت هدایت استخوانی، غیرسمی و غیرالتهابی و ایمونولوژی بودن آن اشاره کرد (۹). با توجه به این ویژگی ها می توان برای بدست آوردن داربست مطلوب مهندسی بافت استخوان از کامپوزیت کردن هیدروکسی آپاتیت با کیتوسان و ژلاتین

میزان تخلخل داربست‌ها با قرارگیری نمونه‌ها در اتانول ۹۶٪ به مدت ۴۵ دقیقه درون دسیکاتور خلأ با استفاده از فرمول زیر بدست آمد.

هیدروژن فسفات ($\text{Na}_2\text{HPO}_4(12\text{H}_2\text{O})$) شرکت Merck (آلمان).

برای تهیه نمونه‌ها به روش خشکاندن انجمادی ابتدا کیتوسان ۲٪ (w/v) در محلول استیونیک ۱٪ حل گردید. ژلاتین با سه درصد مختلف (۰،۲۰،۴۰٪) به محلول کیتوسان اضافه شد و به مدت ۱۰۰ ساعت در دمای ۳۷ درجه بر روی همزن مغناطیسی قرار داده شد. محلول پلیمری اضافه گردید و به مدت ۴۸ ساعت به منظور پراکنده شدن ذرات HA بر روی همزن مغناطیسی قرار داده شد. از گلوکارآلدئید ۰،۲۵٪ به عنوان عامل شبکه‌ای کننده استفاده گردید. محلول‌های شبکه‌ای شده درون ظروف استوانه‌ای شکل ریخته و در فریزر با دمای ۲۰- قرار داده شد، نمونه‌ها که کاملاً به صورت جامد درآمدند، درون دستگاه خشکاندن انجمادی در دمای ۵۷- با خلأ ۰،۰۰۳ میلی بار به مدت ۴۸ ساعت قرار گرفت. سپس نمونه‌ها به مدت ۲ ساعت در محلول ۲٪ کلرید سدیم و ۵٪ برمید سدیم قرار گرفتند تا اثر عامل شبکه‌ای کننده از آنها حذف شود. پس از آن به مدت ۱ ساعت نمونه‌ها به منظور شستشو درون آب مقطر قرار داده شدند. نمونه‌ها دوباره درون دستگاه خشکاندن انجمادی جهت خشک شدن قرار داده شد. بعد از تهیه داربست‌ها، جهت بررسی ویژگی‌های داربست‌ها روش‌های زیر به کار گرفته شد:

همچنین اندازه تخلخل داربست‌ها از روی تصاویر SEM با مقیاس بزرگ نمایی مشخص با استفاده از نرم افزار Image Analyzer اندازه گیری گردید.
۴- آزمایش FTIR:

به منظور بررسی ساختار ترکیبات کامپوزیت FTIR نمونه‌ها گرفته شد تا ساختار و پیوندهای شیمیایی و پیک‌های حاصل مورد بررسی قرار گیرند. تغییرات ساختاری نمونه‌ها با استفاده از آنالیزگر مدل Thermo Nicolet, NEXUS 870 و در محدوده طیف 400-4000 cm^{-1} مورد بررسی قرار گرفت.

یافته‌ها:

۱- بررسی مورفولوژی نمونه‌ها با استفاده از SEM:

تصاویر SEM به خوبی وجود ارتباط داخلی (به هم پیوستگی) بین خلل و فرج را که نقش مهمی در تغذیه رسانی سلول و دفع پسماندهای حاصل از سلول بازی می‌کند، در هر نوع کامپوزیت نشان می‌دهد. همچنین انتخاب یا آماده سازی ماده مناسب برای کاربردهای مورد نیاز با توجه به نتایج SEM می‌تواند انجام گیرد. با توجه به تصاویر SEM به دست آمده، ملاحظه شد که نمون‌ها دارای ساختاری متخلخل هستند و اکثر آنها دارای تخلخل‌هایی از نوع تخلخل‌های باز می‌باشند (شکل ۱). هم چنین با توجه به تصاویر SEM مشاهده شد که با افزودن ژلاتین در داربست‌ها میزان تخلخل افزایش یافته است.

با توجه به تصاویر به دست آمده از SEM نمونه‌های Ch-Gel-βTCP و Gel-HA مشاهده شد که حفرات موجود در داربست‌های دارای βTCP نسبت به داربست‌ها حاوی HA دارای ساختاری کروی شکل تر هستند و ارتباط بین سطح مقطع عمومی تخلخل‌ها و به هم پیوستگی آنها بوضوح قابل مشاهده است.

۱- بررسی خاصیت جذب آب:

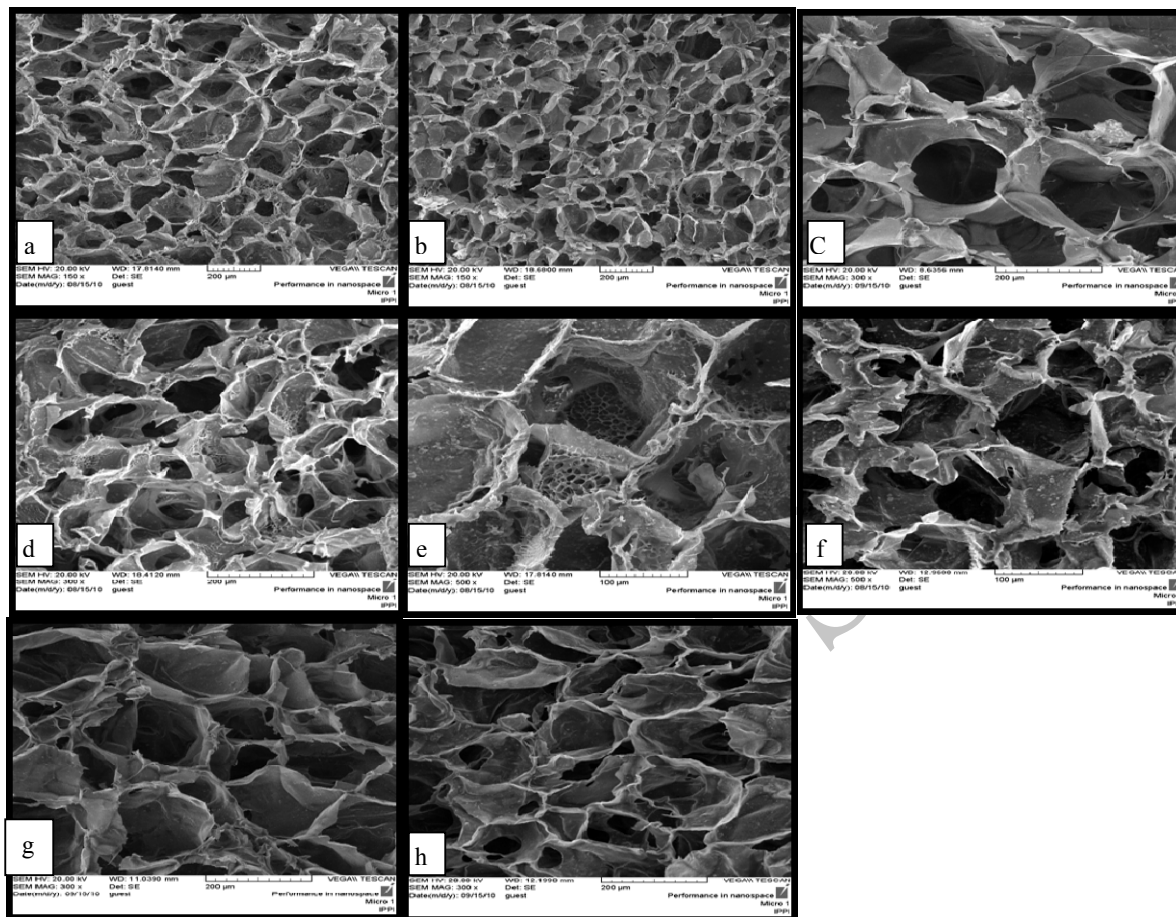
وزن نمونه‌ها در حالت خشک اندازه گیری شد (W_0) و نمونه‌ها در محلول (PBS) با PH ۷،۴ به مدت ۲۴ ساعت قرار گرفتند و وزن تر نمونه‌ها اندازه گیری گردید (W_w). تعیین درصد جذب آب نمونه‌ها با استفاده از فرمول زیر به دست آمد.

جذب آب

۲- آزمایش میکروسکوپ الکترونی روبشی:

هدف از انجام این آزمایش بررسی مورفولوژی ساختاری نمونه‌ها و مطالعه ریز ساختار آنها بود. از سطح مقطع افقی و سطح مقطع عمودی نمونه‌ها در بزرگ نمایی‌های مختلف عکس گرفته شد.

۳- بررسی ساختار تخلخل‌ها:



شکل ۱- تصاویر میکروسکوپ الکترونی روبشی از نمونه ها

a)(Gel/Ch/HA):Ch:Gel ۹۰:۱۰ (150x); b)(Ch/HA)(150x); c)(Ch/Gel/ β TCP): Ch/Gel:80/20 (300x);
 d)(Ch/Gel/HA):Ch/Gel:80/20(300x); e)(Ch/Gel/HA):Ch/Gel:90/10(500x);f): (Ch/Gel/ β TCP): Ch/Gel:80/20
 (300x)(300x); g)Ch/Gel/ β TCP):Ch/Gel:80/20;h) (Ch/Gel/ β TCP/HA):Ch/Gel:80/20 (300x)

۲- نتایج آزمایش سنجش تخلخل

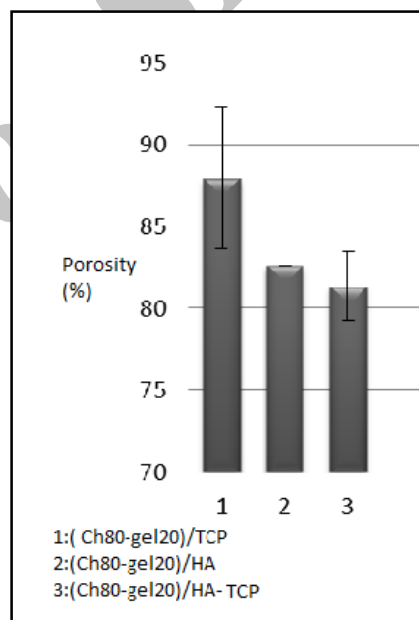
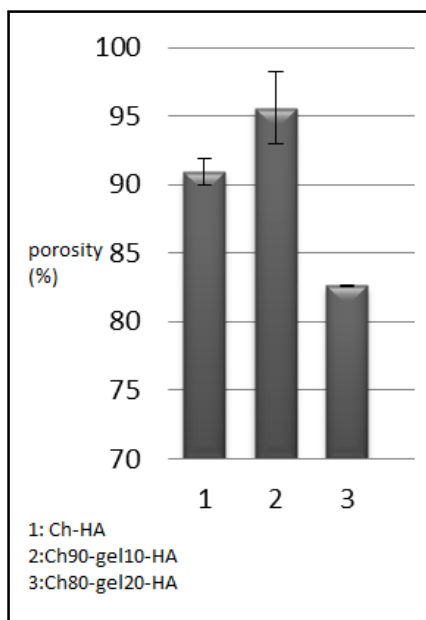
ماده در بخش سرامیکی کامپوزیت مورد بررسی قرار گرفت. پس از انجام محاسبات، مشاهده شد که در غلظت ثابت پلیمری و سرامیکی با افزایش نسبت ژلاتین به کیتوسان میزان تخلخل‌های نمونه افزایش یافت. با توجه به آنچه در شکل ۲ مشاهده می شود، با افزودن ژلاتین تا میزان ۱۰٪ میزان تخلخل افزایش یافته است. اما با افزودن میزان بیشتر ژلاتین تا ۲۰٪ کاهش میزان تخلخل مشاهده می‌شود. حضور فاز سرامیک در داربست‌های کامپوزیتی پلیمر-سرامیک میزان تخلخل‌ها را کاهش می دهد. با توجه به درصدها در شکل ۲ مشاهده گردیده است که HA نسبت به β TCP

میزان تخلخل و اندازه تخلخل پارامترهای بسیار مهمی در تعیین خواص مکانیکی و زیست سازگاری داربست ها می باشند. برای تعیین میزان تخلخل ها از نمونه هایی با نسبت های مختلف کیتوسان و ژلاتین در حضور هیدروکسی آپاتیت و بتا تری کلسیم فسفات (با نسبت ثابت) استفاده شد. هم چنین تأثیر حضور ژلاتین با نسبت های مختلف به عنوان ماده پلیمری در کامپوزیت و نیز تفاوت بین حضور β TCP و HA در ماتریس پلیمری و نیز ترکیب این دو

داربست Ch-Gel-HA- β TCP کاهش میزان اندازه تخلخلها را نشان می‌دهد. به نظر می‌رسد که حضور فاز سرامیکی HA نقش مؤثر تری را بر روی کاهش اندازه تخلخل ایفا می‌کند.

همچنین مشاهده می‌شود که با افزایش میزان ژلاتین، اندازه تخلخلها بطور پیوسته افزایش می‌یابد. بطوریکه در نمونه فاقد ژلاتین میانگین اندازه تخلخل ۱۲۲/۲۸ میکرومتر و در نمونه حاوی ۱۰٪ ژلاتین ۲۰۶/۰۸ میکرومتر و در نمونه حاوی ۲۰٪ ژلاتین ۹۷/۳۸ میکرومتر می‌باشد. بنابراین بیشترین اندازه تخلخل در داربست حاوی Ch-Gel-HA با نسبت ۱۰٪ ژلاتین و کمترین اندازه تخلخل مربوط به داربست حاوی Ch-Gel-H با نسبت ۲۰٪ ژلاتین می‌باشد.

میزان تخلخل را بیشتر کاهش می‌دهد و حضور این دو سرامیک به طور همزمان و تشکیل کلسیم فسفات دو فازی منجر به کاهش بیشتری در میزان تخلخل می‌شود. به منظور بررسی تأثیر تغییر درصد ژلاتین و هم چنین تغییر نوع ماده سرامیکی بر اندازه تخلخلها با استفاده از تصاویر SEM، اندازه تخلخلها در داربست های تهیه شده با درصد های مختلف کیتوسان و ژلاتین و همچنین در داربست های با فاز سرامیکی متفاوت اندازه گیری گردید. نتایج میانگین اندازه تخلخلها به صورت کمی در داربست های حاوی فاز سرامیکی β -TCP ۱۵۸/۲۶ میکرومتر، HA ۹۷/۳۸ میکرومتر و به نسبت مساوی از هر دو ۹۶.۵۹ میکرومتر نشان داده شده است. در حقیقت با تغییر نوع فاز سرامیکی HA به β TCP اندازه تخلخلها افزایش یافته است، ولی در

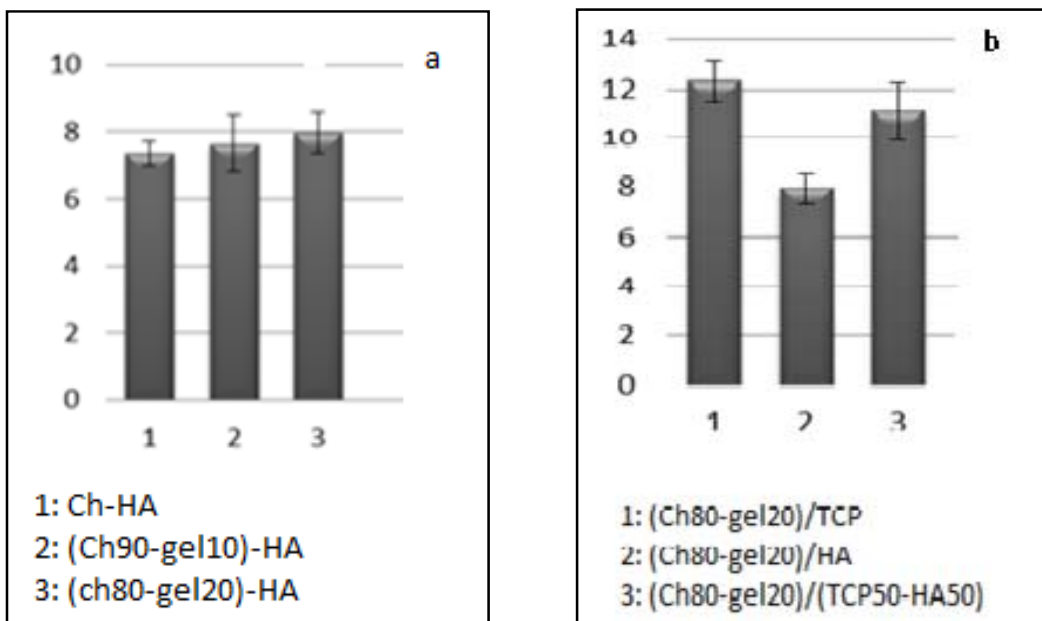


a: تأثیر نسبت های ژلاتین بر میزان تخلخل نمونه ها b: تأثیر تغییر فاز سرامیکی بر میزان تخلخل نمونه ها

حضور و افزایش میزان ژلاتین در داربست کامپوزیتی میزاجذب آب نمونه ها را افزایش داده است. همانطور که در شکل ۳b مشاهده می‌شود، در حضور β TCP نسبت به حضور HA در داربست کامپوزیتی میزان جذب آب نمونه ها به طور چشمگیری افزایش یافته است.

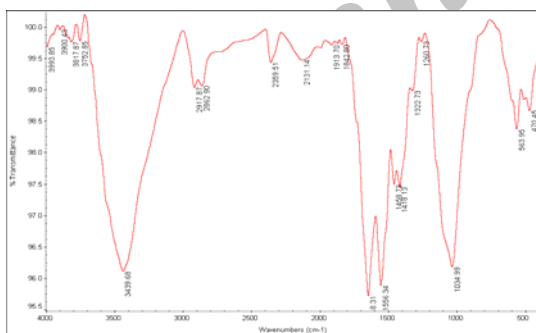
۳- بررسی خواص جذب آب

مطالعات تورم بر روی داربست های کامپوزیتی نشان دهنده قابلیت تورم خیلی بالای آنها بود. با توجه به شکل ۳ a



شکل ۳ - (a) تأثیر نسبت های مختلف ژلاتین بر میزان جذب آب (b): تأثیر ترکیبات فاز سرامیکی بر میزان جذب آب

۲۹۱۸ نشانگر حضور Ch و Gel ، باند (C=O) در حوالی 1653 cm^{-1} نشانگر حضور Gel و باند (PO_4^{3-}) در حوالی 1034 cm^{-1} ، 566 cm^{-1} و 1034 cm^{-1} که نشانگر حضور HA می باشد ، مشاهده می شود. پیک در 2357 cm^{-1} مشاهده می شود که مربوط به ژلاتین در حالت شبکه ای شده است.



شکل ۴- نمودار طیف FTIR نمونه Ch-HA

همانطور که در طیف FTIR نمونه Ch - Gel - β TCP در شکل (۶) مشاهده می شود ، پیک های مشخصه باندها و گروه های عاملی به صورت، باند (OH) نشانگر حضور Ch و باند (- NH) نشانگر حضور Gel در حوالی 3444 cm^{-1} و

۴- بررسی طیف FTIR نمونه های Ch-HA و Ch - Gel - β TCP و Gel - HA

هدف از انجام این آزمایش بررسی ساختار شیمیایی نمونه می باشد . باندها و پیک های مشخصه زیر با توجه به مراجع در نظر گرفته شده است (۱۱ و ۱۲ و ۱۳).

همانطور که در طیف FTIR نمونه Ch- HA در شکل (۴) مشاهده می شود ، پیک های مشخصه باندها و گروه های عاملی به صورت، باند (OH) در حوالی 3439 cm^{-1} که نشانگر حضور Ch و HA ، باند (NH_2) در حوالی 3400 cm^{-1} که نشانگر حضور Ch و Gel ، باند (-CH) در حالت کششی در حوالی 2911 cm^{-1} و 2862 cm^{-1} که نشانگر حضور Ch و Gel ، باند (- NH) در حوالی 1648 cm^{-1} نشانگر حضور Ch و باند (PO_4^{3-}) در حوالی 1034 cm^{-1} ، 563 cm^{-1} و 1034 cm^{-1} که نشانگر حضور HA می باشد، مشاهده شده است.

همانطور که در طیف FTIR نمونه Ch - Gel - HA در شکل (۵) مشاهده می شود ، پیک های مشخصه باندها و گروه های عاملی به صورت، باند (OH) نشانگر حضور HA و باند (- NH) نشانگر حضور Gel در حوالی 3432 cm^{-1} ، باند (NH_2) در حوالی 1569 cm^{-1} نشانگر حضور Ch ، باند (-CH) در حالت کششی در حوالی 2867 cm^{-1} و

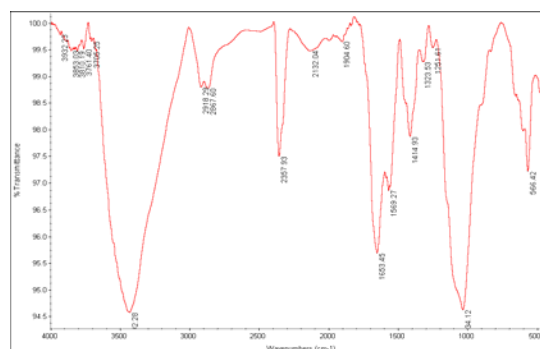
آنجائیکه غیر یکنواختی تخلخل ها تنها در مقاطع عرضی قابل مشاهده است ، احتمال می رود که این موضوع به جهت خروج حلال بستگی داشته باشد.

با توجه به نتایج ،چنانچه میزان ژلاتین تا ۲۰٪ افزایش یابد منجر به کاهش میزان تخلخل می گردد. با توجه به اینکه حالت ژل مانند ژلاتین ویسکوزیته ماده را افزایش می دهد،این احتمال وجود دارد که با ورود ذرات پراکنده هیدروکسی آپاتیت و افزایش ویسکوزیته ماده ، مانع حرکت زنجیره ها گردد و از یکنواختی بهتر محلول جلوگیری کند .در حقیقت، زمانی که غلظت ژلاتین افزایش می یابد و منجر به افزایش ویسکوزیته محلول می گردد ،باعث ایجاد تخلخل های بسته می شود و ممکن است نسبت تخلخل های بسته به تخلخل های باز افزایش یابد و در نتیجه کاهش میزان تخلخل نشان داده می شود .

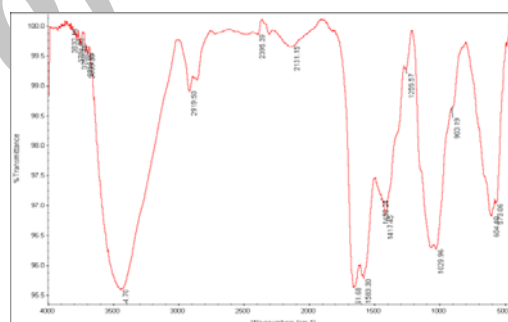
با توجه به بررسی های انجام شده ، مشاهده شده بود که حضور فاز سرامیک در داربست های کامپوزیتی پلیمر - سرامیک میزان تخلخل ها را کاهش می دهد . اگر چه احتمال رسوب β TCP و HA در زمان انحلال وجود دارد اما از آنجائیکه β TCP نسبت به HA انحلال پذیر تر است ، در نمونه هایی با حضور β TCP انحلال به سمت ایجاد مایع همگن تر پیشرفته و مورفولوژی یکنواخت تری قابل مشاهده است . در حالیکه وجود HA به صورت فاز پراکنده میزان همگنی محلول را کاهش داده و مورفولوژی غیر یکنواخت تری را ایجاد می کند.بی نظمی های مشاهده شده در روند تغییر درصد میزان تخلخل ها ممکن است به ناکافی بودن دمای انجام اولیه و یکسان نبودن پارامترهای دستگاه خشکاننده انجامی در تمامی محفظه دستگاه مربوط باشد.از آنجائیکه اندازه تخلخل ها در داربست های مهندسی بافت باید متناسب با سلول های مورد کشت بر روی آنها باشد ،می توان با توجه به شرایط مختلف از جمله روش ساخت ،پارامترهای دستگاه ، نوع و میزان ماده تشکیل دهنده اندازه تخلخل ها را کنترل نمود.

پس از قرار گیری نمونه ها در بافر PBS محلول به درون داربست نفوذ کرده و به بخش های آمورف حمله می کند و زنجیره های بلند شکسته شده ولی توسط بخش های بلورینه داربست ساختار آن حفظ می شود.با توجه به نتایج بدست آمده حضور و افزایش میزان ژلاتین در داربست کامپوزیتی ،میزان جذب آب نمونه ها را افزایش داده است ، که این مسأله به دلیل خاصیت جذب آب بالای ژلاتین به

باند (NH_2) در حوالی 1583 cm^{-1} نشانگر حضور Ch، باند $(-CH)$ در حالت کششی در حوالی 2919 cm^{-1} نشانگر حضور Ch و Gel، باند $(C=O)$ در حوالی 1661 cm^{-1} نشانگر حضور Gel و باند (PO_4^{2-}) در حوالی 1029 cm^{-1} و 903 cm^{-1} ، 573 cm^{-1} ، 438 cm^{-1} و 418 cm^{-1} که نشانگر حضور HA می باشد، مشاهده می گردد (۱۳-۱۱).



شکل ۵- نمودار طیف FTIR نمونه Ch- Gel- HA



شکل ۶- نمودار طیف FTIR نمونه Ch - Gel - β TCP

بحث:

بر هم کنش قطبی یا یونی گروه $COOH$ از ژلاتین به صورت COO^- با Ca^{2+} از HA و همچنین ایجاد باند های هیدروژنی بین NH_2 ژلاتین و OH هیدروکسی آپاتیت منجر به تجمع غیر یکنواخت دانه های HA گردیده و در نتیجه باعث تبخیر غیر یکنواخت حلال می شود و در مناطقی که تبخیر کمتر است تخلخل های کوچکتری مشاهده می شود . بنابراین نظم ساختار به هم خورده و دونوع مورفولوژی متفاوت از تخلخل ها دیده می شود ، که این مطلب در تصاویر بدست آمده از SEM قابل مشاهده است. از

میزان جذب آب با افزایش سه نسبت ژلاتین در یک غلظت ثابت پلیمری و سرامیکی، افزایش یافته است. از آنجائیکه شبکه ای کردن نمونه ها قبل از عملیات خشکاندن انجمادی صورت گرفته، ممکن است باندها و اتصالات ایجاد شده مانع از جذب آب بیشتر گردد.

با توجه به طیف FTIR نمونه های Ch-Gel-HA و بررسی طیف های مواد خالص، پیک های بدست آمده در 3444 cm^{-1} ، 2867 cm^{-1} و 2918 cm^{-1} ، 1653 cm^{-1} ، 1569 cm^{-1} ، 1459 cm^{-1} و 1034 cm^{-1} به ترتیب مربوط به باندهای (OH) و (-NH) و (NH₂)، (-) (CH در حالت کششی، (C=O)، (PO₄³⁻) مشاهده شد، که بیانگر وجود کیتوسان، ژلاتین و هیدروکسی آپاتیت در نمونه بود و پیکی که در 2357 cm^{-1} مشاهده گردید، مربوط به ژلاتین در حالت شبکه ای شده است. با توجه به نتایج مقاطع میکروسکوپ الکترونی (SEM) و نتایج آزمون های تخلخل سنجی و جذب آب، نمونه Ch-Gel-HA با نسبت پلیمری ۱۰:۹۰ خواص مناسب تری را نسبت به سایر نمونه ها از خود نشان داده است.

در داربست هایی با فاز پلیمری ثابت، با تغییر فاز سرامیکی از HA به β TCP متوسط اندازه تخلخل و میزان تخلخل و میزان جذب آب افزایش یافته است. با توجه به طیف FTIR نمونه های Ch-Gel- β TCP و بررسی طیف های مواد خالص، پیک های بدست آمده در 3432 cm^{-1} ، 1583 cm^{-1} ، 2919 cm^{-1} ، 1661 cm^{-1} ، 1418 cm^{-1} ، 1378 cm^{-1} ، 1029 cm^{-1} و 903 cm^{-1} به ترتیب مربوط به باندهای (OH) و (-NH) و (NH₂)، (-) (CH در حالت کششی، (C=O)، (PO₄³⁻) مشاهده گردید. که بیانگر وجود کیتوسان، ژلاتین و بتاتری کلسیم فسفات در نمونه بود. با توجه به نتایج مقاطع میکروسکوپ الکترونی (SEM) و نتایج آزمون های تخلخل سنجی و جذب آب، نمونه Ch-Gel- β TCP خواص مناسب تری را نسبت به نمونه Ch-Gel-HA از خود نشان داد.

واسطه گروه های کربوکسیل و آمین و هیدروکسیل زیاد می باشد. هم چنین از آنجایی که نرخ تخریب پذیری β TCP بیشتر از HA می باشد، سبب جذب آب بیشتر آن گردیده است. اما در ساختار کلسیم فسفات دو فازی این مقدار کاهش یافته است و میزان جذب آب در محدوده ای بین میزان جذب آب داربست کامپوزیتی Ch-Gel-HA و β TCP- Ch-Gel قرار گرفته است.

در بررسی طیف های FTIR باید توجه داشت که جابجایی اندک در پیک های مذکور نسبت به مراجع ذکر شده، مربوط به جابجایی باندها بر اثر اختلاط و هم پوشانی پیک ها در یک محدوده به صورت یک پیک واحد می باشد. البته این احتمال وجود دارد که شرایط آزمایش (مانند روش ساخت، مدت زمان و سرعت چرخش مگنت) سبب جابجایی نامحسوس پیک ها گردد. همچنین اثر عامل شبکه ای کننده در پیک ها بیانگر عملکرد مناسب آن بر داربست ها می باشد.

نتیجه گیری:

در پژوهش حاضر داربست های سه بعدی کیتوسان-ژلاتین-هیدروکسی آپاتیت و کیتوسان-ژلاتین-بتاتری کلسیم فسفات به روش خشکاندن انجمادی ساخته شدند و آزمایشاتی به منظور بررسی مورفولوژی داربست ها، اندازه و درصد تخلخل ها، میزان جذب آب و هم چنین مطالعه ساختار شیمیایی و گروه های عاملی و پیک های حاصل آن صورت گرفت که نتایج بدست آمده نشان داد که با استفاده از روش خشکاندن انجمادی، می توان به داربست های متخلخل با درصد تخلخل بالا دست یافت. تصاویر بدست آمده از SEM بیانگر این بود که داربست های تهیه شده با این روش متخلخل و با تخلخل های به هم مرتبط هستند. هم چنین با اضافه شدن ژلاتین تا میزان ۱۰٪ به داربست های Ch-Gel-HA، اندازه تخلخل ها و درصد تخلخل ها افزایش یافته است. در حالیکه با افزایش درصد ژلاتین در فاز پلیمری به میزان ۲۰٪ کاهش درصد تخلخل مشاهده شده است.

References

1. Schieker M, Seitz H, Drosse I, Seitz S, Mutschler W : Biomaterials as Scaffold for Bone Tissue Engineering. Eur.J.Trauma 2006;32:114-124.
2. Mistry AS, Mikos AG: Tissue engineering strategies for bone regeneration. Adv Biochem Eng Biotechnol. 2005;94:1-22.

3. Puppi D, Chiellini F, Piras AM, Chiellini E: Polymeric materials for bone and cartilage repair. *Polymer Science* 2010; 35:403–440
4. Lien S, Li W, Huang T: Genipin -cross linked gelatin scaffolds for articular cartilage tissue engineering with a novel crosslinking method; *Mater. Sci.Eng.C.* 2008;28:36-43
5. Thein-Han WW, Saikhun J, Pholpramoo C, Misra RD, Kitiyanant Y: Chitosan-gelatin scaffolds for tissue engineering: physico-chemical properties and biological response of buffalo embryonic stem cells and transfectant of GFP-buffalo embryonic stem cells. *Acta biomaterialia.*2009;5:3453-3466.
6. Marcho M : Calcium phosphate ceramics as hard Tissue prosthetics. *Clin Ortho* 1981;157:259-278.
7. Boccaccini AR; Mysra SK: *Tissue Engineering using ceramics and polymers.* Cambridge England: CRC Press: 2007; Chap4:72-89.
8. Peter M, Ganesh N, Selvamurugan N, Nair SV, Furuike T, Tamura H, Jayakumar R : Preparation and characterization of chitosan–gelatin/nanohydroxyapatite composite scaffolds for Tissue Engineering applications . *Carbohydrate Polymers* 2010 ;80: 687–694 .
9. Swetha M, Sahithi K, Moorthi A, Srinivasan N, Ramasamy K, Selvamurugan N. Biocomposites containing natural polymers and hydroxyapatite for bone tissue engineering. *Int. J. Biol Macromol* 2010;47: 1–4.
10. Hutmacher DW. Scaffold design and fabrication technologies for Engineering Tissues state of the art and future perspectives. *J Biomater Sci Polym Ed* 2001;12:107–124.
11. Bahrami SB: Poly(Vinyl alcohol)-chitosan based blends: preparation, mechanical and physical properties. *Iranian polymer* 2003;12:139-146.
12. Pal K , Banthia AK, Majumdar DK: Preparation and characterization of polyvinyl alcohol-gelatin hydrogel membranes for biomedical applications . *AAPS PharmSciTech.*2007;8:142-146.
13. Peon E, Fuentes G, Delgado JA, Morejon L, Almirall A, Garcia R: Preparation and characterization of porous blocks of synthetic hydroxyapatite. *LAAR* 2004;34:225-228.