

Morphological and Physiochemical Characteristics of biodegradable PLGA-Gelatin Scaffolds by Unidirectional Freezing Technique

F. Ghorbani¹, A. Zamanian^{2*}, H. Nojehdehyan³

¹M. Sc Student, Department of Biomedical Engineering, Tehran Science and Research Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran

²Associate Professor, Department of Nanotechnology and Advanced Materials, Materials and Energy Research Center, Karaj, Iran

³Assistant Professor, Department of Dental Materials, Dental School, Shahid Beheshti University of Medical Science, Tehran, Iran

Receipt in the online submission system 14 June 2015, received in revised form 26 August 2015, accepted 30 August 2015

Abstract

In this study, we fabricated 3-dimensional PLGA-gelatin scaffolds with aligned-oriented pores by freeze casting technique which is similar to Extra Cellular Matrix (ECM), and evaluated its effect on both physical and mechanical features. Dissolving synthetic (PLGA) and natural (Gelatin) polymers in common solvent was one of the strengths of this investigation. Scanning electron microscopy (SEM) micrographs indicated that scaffolds contained 95% interconnected pores with diameter about 50-400 μm in horizontal direction and 50-200 μm in vertical direction. Moreover, the results of mercury intrusion porosimetry represented diameter of pores in range of 100–300 μm . According to fourier transform infrared (FTIR) spectrum there was no inappropriate interactions during processing. Additionally, mechanical analysis (3.2 MPa) of PLGA-gelatin constructs illustrated that polymeric scaffolds can withstand mechanical loads in freezing direction. Based on the water absorption (950%) and biodegradation results, samples can support cellular interactions and prevent their integrity during tissue regeneration. In brief, freeze casted PLGA-gelatin scaffolds can provide unidirectional matrix with desired physical and mechanical characters to regenerate lesions.

Key words: *Lactic-co-Glycolic acid, gelatin, freeze casting, polymeric scaffolds, acetic acid*

Corresponding author

Address: Department of Nanotechnology and Advanced Materials, Materials and Energy Research Center, P.O.Box: 14155-4777, Karaj, Iran

Tel: +98-26-36280034

Fax: +98-26-36201818

E-mail: a-zamanian@merc.ac.ir

بررسی مورفولوژی و خواص فیزیکی شیمیایی داربست‌های زیست تخریب پذیر کوپلیمر لاکتیک گلیکولیک اسید ژلاتین به روش انجماد جهت‌دار

فرناز قربانی^۱، علی زمانیان*^۲، هانیه نوجه دهیان^۳

^۱دانشجوی کارشناسی ارشد مهندسی پزشکی، دانشکده مهندسی پزشکی، واحد علوم و تحقیقات، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران

^۲دانشیار، گروه بیومواد، پژوهشکده فناوری نانو و مواد پیشرفته، پژوهشگاه مواد و انرژی، کرج

^۳استادیار، گروه مواد دندان، دانشکده دندان پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، تهران

تاریخ ثبت در سامانه: ۱۳۹۴/۴/۷، نسخه اصلاح شده: ۱۳۹۴/۴/۲۰، پذیرش قطعی: ۱۳۹۴/۵/۴

چکیده

داربست‌های سه‌بعدی که شباهت ریزساختاری بسیاری به ماتریکس خارج سلولی (ECM) داشته و از جنس کوپلیمر لاکتیک گلیکولیک اسید (PLGA)/ژلاتین هستند به روش ریخته‌گری انجمادی تهیه شدند. با این روش، امکان انجماد جهت‌دار محلول پلیمری مهیا شده و اثرهای مطلوب آن بر خواص فیزیکی/مکانیکی داربست‌ها مورد ارزیابی قرار گرفت. برای انحلال دو پلیمر PLGA و ژلاتین از استتیک اسید به عنوان حلال مشترک استفاده شد. تصاویر به دست آمده از میکروسکوپ الکترونی روبشی (SEM) نشان‌گر دست‌یابی به داربست‌هایی با تخلخل‌های باز، درصد تخلخل بیش از ۹۵ درصد و با توزیع ابعادی حدود ۴۰۰-۵۰ میکرومتر در مقطع عمود بر جهت انجماد و ۳۰۰-۵۰ میکرومتر در مقطع موازی با جهت انجماد هستند. نتایج تخلخل‌سنجی جیوه‌ای، توزیع تخلخل ۱۰۰-۲۰۰ میکرومتر را نشان داد. نتایج طیف‌سنجی فروسرخ (FTIR) حاکی از عدم تغییر ساختاری مواد پس از ساخت داربست‌ها است. آزمون استحکام فشاری (۳/۲ MPa) نشان داد که داربست‌های ساخته شده از استحکام مناسبی برخوردار هستند. نتایج آزمون جذب آب (۹۵٪) و زیست تخریب پذیری داربست‌ها، گویای حفظ پایداری ساختار و تبادل‌های سلولی در طی دوره‌ی تخریب است. نتایج نشان می‌دهد که داربست‌های مذکور ویژگی‌های اولیه و خواص مطلوبی برای استفاده در مهندسی بافت دارند و گزینه‌ی مناسبی برای حمایت از چسبندگی سلولی و حفظ پایداری ساختاری در بازه‌ی زمانی مورد نظر هستند.

کلیدواژه‌ها: کوپلیمر لاکتیک گلیکولیک اسید، ژلاتین، ریخته‌گری انجمادی، داربست پلیمری، استتیک اسید

* نویسنده مسئول

نشانی: گروه بیومواد، پژوهشکده فناوری نانو و مواد پیشرفته، پژوهشگاه مواد و انرژی، کرج، ایران، صندوق پستی: ۱۴۱۵۵-۴۷۷۷

تلفن: +۹۸(۲۶) ۳۶۲۸۰۰۳۴

دورنگار: +۹۸(۲۶)۳۶۲۰۱۸۸۸

پست الکترونیکی: a-zamaniaan@merc.ac.ir

۱- مقدمه

از آن جا که ترمیم جراحات‌های ایجاد شده در بافت‌های مختلف بدن با استفاده از منابع اتوگرفت معضلاتی هم‌چون پس‌زدن سیستم ایمنی و انتقال بیماری‌ها را به همراه دارد، لذا دانشمندان همواره در صدد یافتن روشی جدید برای ترمیم این قبیل آسیب‌ها هستند [۴-۱]. با به کارگیری مهندسی بافت و داربست‌های زیست تخریب پذیر، زمینه برای پیش‌برد این اهداف فراهم شده است [۵، ۶].

هدف اساسی مهندسی بافت، طراحی و ایجاد ساختاری مشابه ساختار طبیعی بافت موجود زنده به منظور ترمیم آسیب‌ها و ضایعات بافتی است [۷].

داربست‌های مورد استفاده در مهندسی بافت ساختارهایی متخلخل دارند که به علت شباهت بسیار به ماتریکس خارج سلولی از چسبندگی، مهاجرت، تکثیر و تمایز سلولی حمایت می‌کنند [۸].

روش‌های متعددی نظیر الکتروریسی [۹-۱۱]، خشکاندن انجمادی [۱۲]، ریخته‌گری انجمادی [۱۳-۱۷]، ریخته‌گری حلال [۱۸]، جدایش فازی [۱۹] و روش‌های دیگر برای ساخت داربست‌ها ارائه شده است [۲۰].

به علاوه، برای دستیابی به ساختار ایده‌آل، در برخی مطالعات با تلفیق دو روش افزودن تخلخل‌زا [۱۸، ۲۱] و یا کنترل شرایط انجمادی نظیر دمای انجماد، نرخ انجماد و جنس قالب مورد استفاده [۱۲]، تلاش‌های فراوانی انجام شده است، اما در این میان، روش ریخته‌گری انجمادی به علت سادگی دستیابی به درصد تخلخل بالا و کنترل شده و از همه مهم‌تر جهت‌داری آن، توجه زیادی را به خود جلب نموده است. شایان ذکر است که جهت‌دار بودن تخلخل‌ها در این روش، اثرات قابل توجهی بر خواص فیزیکی و مکانیکی داربست‌ها دارد [۱۳، ۱۴].

ریخته‌گری انجمادی، فرآیندی است که محلول تحت تأثیر انجماد جهت‌دار صورت می‌گیرد و نرخ و دمای انجماد در این سیستم با سنسورهای دمایی متصل به سیستم سرد یا گرم کننده، کنترل می‌گردد. سپس، نمونه منجمد در دستگاه خشک‌کن انجمادی قرار می‌گیرد تا حلال یخ‌زده تصعید شود.

در روش ریخته‌گری انجمادی ذرات معلق با جبهه‌ی انجماد پس‌زده می‌شوند و بین کریستال‌های حلال در حال رشد به دام می‌افتند. این پدیده، همانند به دام افتادن ذرات نمک و میکروارگانیزم‌های موجود در آب دریا در هنگام یخ‌زدن آن است. تنوع موادی که تاکنون به این روش تهیه شده‌اند حاکی از آن است که اصول این تکنیک به موارد مورد استفاده بستگی چندانی نداشته و بیشتر وابسته به خواص فیزیکی آن‌ها است. به طور کلی می‌توان گفت این فرآیند به ۳ مرحله آماده سازی محلول، انجماد کنترل شده محلول و تصعید حلال تقسیم می‌شود [۲۳-۱۳].

مواد طبیعی و مصنوعی متنوعی هم‌چون کوپلیمر لاکتیک گلایکولیک‌اسید، پلی‌یورتان، پلی‌کاپرولاکتون، پلی‌هیدروکسی بوتیرات، کلاژن، ژلاتین و کیتوسان در ساخت داربست‌های پلیمری به کار می‌روند [۳۱-۶]. هر یک از این مواد، با توجه به خواص و ویژگی‌هایی که از خود بروز می‌دهند برای ترمیم بافتی از بدن ایده‌آل هستند. اگرچه در پلیمرهای سنتزی نرخ تخریب، درصد تخلخل و خواص مکانیکی قابل کنترل است، اما رفتار سلولی روی پلیمرهای طبیعی مناسب‌تر است. بنابراین، با طراحی کامپوزیتی از این دو پلیمر می‌توان به هدف مورد نظر که ترمیم بافت‌های آسیب دیده بدن است دست یافت [۲۰، ۳۲].

در بین پلیمرهای زیست تخریب پذیر، پلی‌استر آلیفاتیک و ترموپلاستیک نظیر کوپلیمر لاکتیک گلیکولیک‌اسید به علت خواص مکانیکی بالا، زیست سازگاری و زیست تخریب-پذیری در رهایش دارو و ساخت داربست‌های مهندسی بافت کاربرد گسترده دارد. این پلیمر به علت مدول فشاری بالا قادر به تأمین خواص مکانیکی در بافت هدف و حفظ پایداری داربست در بازه‌ی زمانی ترمیم بافت است. سازوکار تخریب این خانواده براساس آبکافت تصادفی در باندهای استری زنجیره‌های پلیمر است که در تماس با مایعات بدن بوده و از نوع فرسایش توده‌ای و یک‌نواخت است [۳۲]. به طوری که شکست هیدرولیتیک زنجیره‌ها رخ داده و لاکتیک‌اسید و گلیکولیک‌اسید از داخل توده‌ی پلیمری به داخل آب نفوذ می‌کنند. در اثر نفوذ آب و از دست دادن استحکام مکانیکی

۲- مواد و روش‌ها

۱-۲- مواد

کوپلیمر لاکتیک گلیکولیک اسید (PLGA)، جرم ملکولی: ۷۵۰۰۰-۴۰۰۰۰ gr/mol (p2191) از شرکت سیگما (آمریکا)، ژلاتین (جرم ملکولی: ۵۰-۴۰ KDa)، استیک اسید (جرم ملکولی: ۶۰/۰۵ gr/mol)، گلو تار آلدهید (۲۵٪، دانسیته: ۱/۰۶) از شرکت مرک (آلمان) خریداری شد. کلیه مواد بدون خلص سازی مجدد مورد استفاده قرار گرفتند. از آب دیونیزه برای محلول‌های آبی استفاده شد.

۲-۲- ساخت داربست‌ها

برای ساخت داربست‌ها به روش ریخته‌گری انجمادی، ابتدا محلول PLGA/ژلاتین با نسبت وزنی ۸۰:۲۰ با استفاده از حلال استیک اسید ساخته شد [۹، ۲۹]. محلول مورد نظر به مدت ۱۲ ساعت در دمای ۵۰ درجه سانتی‌گراد با هم‌زن مغناطیسی هم‌زده شد. در نهایت، ۱٪ گلو تار آلدهید به محلول افزوده شد تا محلول پلیمری هم‌گن با ساختار شبکه‌ای حاصل شود. سپس، محلول در قالب استوانه‌ای از جنس نفلون با قطر داخلی ۲ سانتی‌متر و ارتفاع ۵ سانتی‌متر ریخته شد. قالب استوانه‌ای روی یک صفحه دایره شکل مسی به قطر ۴ سانتی‌متر قرار گرفت. دما از طریق یک سنسور دمایی^۲ که در قسمت زیر قالب به میله‌ی مسی متصل است اندازه‌گیری شد. تمامی قسمت‌ها به یک دستگاه کنترل کننده‌ی دما^۳ متصل بودند. محلول به ارتفاع ۴ سانتی‌متر داخل قالب ریخته شد و انجماد با نرخ ۱°C/min انجام گرفت. پس از انجماد کامل محلول پلیمری، کلیه‌ی نمونه‌ها به مدت ۴۸ ساعت در دستگاه خشک‌کن انجمادی (ساخت شرکت تجهیزات مهندسی پیش‌تاز ایران) با دمای ۵۸°C- و فشار ۰/۵ تور^۴ قرار گرفتند تا کریستال‌های یخ در داخل نمونه‌ها تصعید شوند و ساختاری متخلخل پدید آید. پس از آن برای جلوگیری از تغییر شکل، نمونه‌ها در دسیکاتور گذاشته شدند [۱۳، ۱۴].

تغییرات قابل توجهی در ساختار ایجاد می‌شود. در نتیجه، مونومرهایی که به راحتی در معرض سوخت‌وساز بدن قرار گرفته‌اند به صورت دی‌اکسید کربن و آب دفع می‌شوند.

فعالیت‌های آنزیمی، فشردگی زنجیرها، ترکیب شیمیایی و نسبت مونومرها در واکنش‌های شیمیایی بسپارش کوپلیمرها به شدت بر خاصیت تخریب پذیریشان اثر گذار است [۱۱، ۲۸، ۳۳].

کوپلیمر لاکتیک گلیکولیک اسید به علت ماهیت آب‌گریز خود حامی ایده‌آلی برای تکثیر سلول‌ها نیست. از این روی، به کارگیری پلیمری طبیعی و آب‌دوست، جبران کننده‌ی این نقص است [۹، ۱۰، ۲۶، ۲۹، ۳۱].

کلاژن از پروتئین‌های اصلی بدن و از اجزای اصلی ماتریکس خارج سلولی است. اما از آن جا که خلص سازی این ماده هزینه‌های زیادی را در بر دارد، احتمال ایجاد عفونت با این ماده بالاست و نرخ تخریب بالایی دارد. در بسیاری از مطالعات، از پلیمر ژلاتین که حاصل از دناتور شدن کلاژن است استفاده می‌کنند [۱۲]. هرچند این پلیمر طبیعی افت خواص مکانیکی دارد، اما به علت ماهیت آب‌دوستی و به دنبال آن اثرهای مطلوب بر رفتار سلولی، طرف‌داران بسیاری را به خود جلب کرده است [۲۹-۳].

هدف این مطالعه، ساخت داربست پلیمری PLGA/ژلاتین به روش ریخته‌گری انجمادی است. نتایج مطالعات مینگ^۱ و هم‌کارانش در ساخت داربست‌های نانوفیبری PLGA/ژلاتین به روش الکتروریسی حاکی از آن است که مناسب‌ترین نسبت وزنی PLGA: ژلاتین، ۸۰:۲۰ است. این نسبت سبب دست‌یابی به ساختاری با ویژگی‌های فیزیکی و مکانیکی مطلوب جهت ترمیم ضایعات بافتی خواهد شد [۹، ۲۹]. از آن جا که اولین رکن این روش در اختیار داشتن محلولی هم‌گن است، بنابراین یافتن حلالی که قادر به انحلال هم‌زمان پلیمر سنتزی و طبیعی با حلال‌های آلی و آبی باشد از اهمیت بالایی برخوردار است. در این کار، استیک اسید به عنوان حلالی ایده‌آل برای دست‌یابی به این هدف شناسایی شد.

² Thermocouple

³ Proportional-integral-derivative

⁴ Torr

¹ Meng

۳-۲-۳- خصوصیات داربست‌های PLGA/ژلاتین

۳-۲-۱- بررسی ریزساختاری

توپوگرافی و مورفولوژی داربست‌های پلیمری PLGA/ژلاتین با استفاده از میکروسکوپ الکترونی روبشی (SEM)، Stereoscan S 360-Leica Cambridge، ساخت انگلستان مورد بررسی قرار گرفت. به دلیل نارسا بودن نمونه‌ها از پوشش نازک طلا روی نمونه‌ها استفاده شد. سپس، تصاویری با بزرگ‌نمایی‌های مختلف از تمامی نمونه‌ها تهیه شدند.

۳-۲-۲- تخلخل سنجی

برای اندازه‌گیری سایز تخلخل‌ها از دو روش اندازه‌گیری از تصاویر SEM و تخلخل سنجی جیوه‌ای استفاده شد. بدین منظور، ۵ تصویر از مکان‌های متفاوت نمونه تهیه شدند و برای هرکدام ۵۰ اندازه‌گیری انجام گرفت. در نتیجه میانگین و انحراف از معیار صحیحی از سایز تخلخل‌ها به دست آمد. برای اندازه‌گیری سایز تخلخل‌ها از نرم‌افزار اندازه‌گیری کمی تصویر (Klonk Image Measurement Light)، نسخه ۱۱،۲،۰،۰ استفاده شد.

در روش دوم به منظور بررسی اندازه و توزیع تخلخل‌ها در سطح و حجم ماده از روش تخلخل سنجی جیوه‌ای کم-فشار (Pascal 140، ساخت آمریکا) استفاده شد. در این روش دیلاتومتر (محل قرارگیری نمونه) از جیوه پر شد و اندازه‌ی حفرات با توجه به فشار مورد نیاز برای وارد کردن جیوه در داخل تخلخل‌ها اندازه‌گیری گردید. تخلخل سنجی جیوه‌ای تحت خلأ انجام می‌گیرد و زاویه تماس جیوه با داربست به طور متوسط ۱۴۰ درجه سانتی‌گراد است.

درصد تخلخل کل (P) داربست‌های PLGA/ژلاتین با مقایسه‌ی چگالی داربست (نرخ وزن به حجم کل داربست، $\rho_{scaffold}$) و چگالی پودر اولیه (وابسته به درصد PLGA و ژلاتین، ρ_{solid}) و با معادله‌ی (۱) محاسبه شد [۳۴]. برای هرکدام حداقل ۵ نمونه محاسبه شد تا میانگین و انحراف معیار صحیحی از درصد تخلخل نمونه‌ها به دست آید.

$$P=1-(\rho_{Scaffold} / \rho_{Solid}) * 100 \quad (1)$$

۳-۳-۲- طیف‌سنجی فروسرخ

به منظور مطالعه پیوندهای موجود در نمونه‌ها، طیف فروسرخ (FTIR، Nicolet Is10، ساخت آمریکا) داربست‌های PLGA/ژلاتین در محدوده عدد موج $4000-400 \text{ cm}^{-1}$ در حالت عبوری مورد بررسی قرار گرفت. بدین منظور، داربست‌های حاصل از روش ریخته‌گری انجمادی پودر شدند و از پتاسیم برماید به عنوان رقیق کننده استفاده شد. نمونه‌ها با نسبت ۱:۱۰۰ رقیق شدند و از آن‌ها طیف فروسرخ گرفته شد.

۳-۳-۲- استحکام فشاری

رفتار مکانیکی داربست‌های PLGA/ژلاتین با استفاده از آزمون استحکام فشاری و با دستگاه سنجش استحکام (Santam، STM20، ساخت ایران) بررسی شد. نمونه‌ها استوانه‌ای شکل با قطر ۲۰ و ارتفاع ۴۰ میلی‌متر بودند، سرعت اعمال بار دستگاه ۰/۵ میلی‌متر بر دقیقه و عمود بر جهت انجماد تنظیم گردید. جهت محاسبه مقدار میانگین و انحراف معیار استحکام فشاری ۵ نمونه استفاده شد.

۳-۳-۲- جذب آب

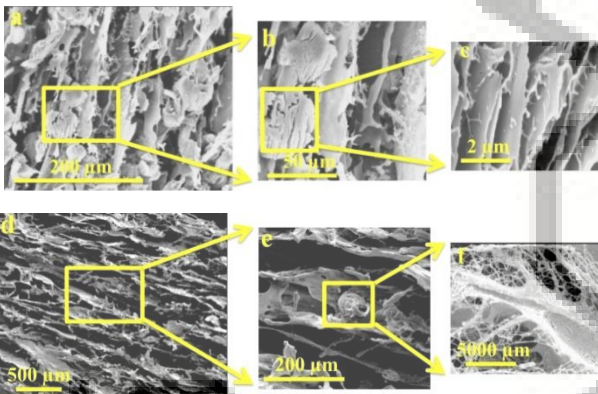
جهت بررسی میزان تورم و جذب داربست‌ها از آزمون جذب آب استفاده شد. بدین منظور، ابتدا نمونه‌ها وزن شدند (وزن خشک)، پس از ۱، ۳، ۷ و ۲۴ ساعت غوطه‌وری در محلول نمک بافر فسفات‌ی (PBS)، دوباره وزن آن‌ها (وزن تر) اندازه‌گیری شد و از معادله‌ی (۲) میزان جذب به دست آمد [۳۵]. این آزمون برای ۵ نمونه تکرار گردید تا مقدار میانگین و انحراف معیار به دست آید.

$$[\% \text{ جذب PBS}] = [(W - W_0) / W_0] * 100 \quad (2)$$

۳-۳-۲- زیست تخریب پذیری

جهت بررسی میزان پایداری داربست‌های PLGA/ژلاتین و اندازه‌گیری سرعت تخریب در محیط برون‌تن از آزمون زیست تخریب پذیری هیدرولیتیکی و آنزیمی استفاده شد. به منظور شبیه‌سازی بیشتر محیط بدن، تخریب آنزیمی مورد ارزیابی قرار گرفت. بنابراین، ابتدا داربست‌ها وزن شدند (وزن

به علاوه، بررسی کلوخه‌های ایجاد شده در ساختار داربست‌ها (شکل ۱- b و ۱- c) نشان‌گر جهت‌دار بودن تخلخل‌ها در این نواحی است. در نتیجه، انتظار می‌رود کلوخه‌ها مکان ایده‌آلی را برای لنگراندازی سلولی فراهم کنند. همچنین ساختار درهم نفوذی تخلخل‌ها قادر به ایجاد شرایطی ایده‌آل در مهاجرت و لنگراندازی سلول‌ها در عمق داربست‌ها است.



شکل (۱) - تصویر SEM داربست‌های PLGA/ژلاتین ساخته شده به روش ریخته‌گری انجمادی (تصاویر a-c نشان‌گر مقطع موازی با جهت انجماد و تصاویر d-f نشان‌گر مقطع عمود بر جهت انجماد داربست‌ها است)

شکل (۲) نشان‌گر میانگین سایز تخلخل‌ها با استفاده از نرم‌افزار اندازه‌گیری کمی تصویر است. همان‌طور که مشاهده می‌شود داربست‌ها حدود ۹۵٪ تخلخل با ابعاد ۱۰۰-۳۰۰ میکرومتر دارند که پراکندگی ابعاد تخلخل‌ها در مقطع عمودی و عرضی داربست‌ها به علت ساختار جهت‌دار ریخته‌گری انجمادی اندکی متفاوت است. براساس نتایج حاصل از تصاویر SEM ابعاد تخلخل‌ها در مقطع عرضی (عمود بر جهت انجماد) در بازه‌ی ۵۰ تا ۴۰۰ میکرومتر و در مقطع طولی (موازی بر جهت انجماد) در بازه‌ی ۵۰ تا ۳۰۰ میکرومتر است (شکل ۲- a و ۲- b).

از آن جایی که معمولاً از تخلخل سنجی جیوه‌ای برای بررسی اندازه و توزیع تخلخل‌ها استفاده می‌شود، در این مطالعه نیز به منظور بررسی نتایج با روش اندازه‌گیری از تصاویر، از روش تخلخل سنجی جیوه‌ای استفاده شد.

خشک) و به مدت یک ماه در نمک بافر فسفات‌ی و نمک بافر فسفات‌ی حاوی ۴ mg/ml آنزیم تریپسین قرار گرفتند [۲۷]. در طی بازه‌ی یک ماهه‌ی آزمون زیست تخریب پذیری هر هفته داربست‌ها در خشک‌کن انجمادی خشک شدند و وزن خشک آن‌ها اندازه‌گیری شد. لازم به یادآوری است که محیط تخریب داربست‌ها هر هفته تعویض گردید و در پایان هفته چهارم، درصد جرم باقیمانده داربست‌ها از معادله‌ی (۳) به دست آمد [۲۴]. این آزمون برای ۵ نمونه تکرار شد تا میانگین و انحراف معیار به دست آید.

$$(3) \quad I = \frac{W - W_0}{W_0} * 100 \quad \text{کاهش جرم} [\%] [21]$$

۳- یافته‌ها و بحث

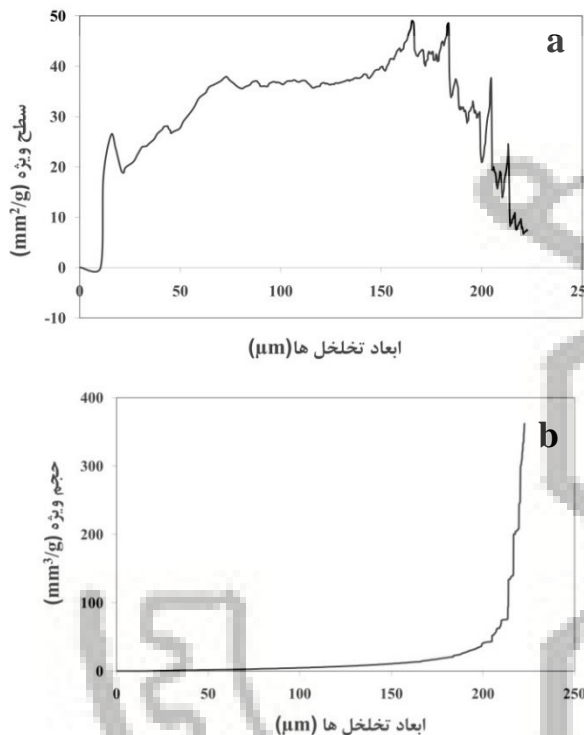
۳-۱- بررسی مورفولوژی

عوامل متعددی نظیر انتقال حرارت، نرخ انجماد و دمای نهایی بر ساختار تخلخل‌ها [۱۲] و به دنبال آن خواص سطحی، تخلخل و ترکیب شیمیایی بر رفتار سلول‌ها اثرگذار هستند. از این روی، بررسی مورفولوژی داربست‌ها از نکات حائز اهمیت است.

تصاویر میکروسکوپ الکترونی روبشی داربست‌های PLGA/ژلاتین ساخته شده به روش ریخته‌گری انجمادی در شکل (۱) نشان داده شده است. تصاویر a-c ساختار مقطع عمودی و d-f ساختار مقطع عرضی داربست‌ها را نسبت به جهت انجماد، نشان می‌دهند. همان‌طور که در تصاویر SEM مشاهده می‌شود، تخلخل‌های ایجاد شده در داربست‌های پلیمری به دلیل جهت‌گیری کریستال‌های یخ، طی پروسه انجماد کاملاً جهت‌دار بوده و در مقایسه با داربست‌های ساخته شده با سایر روش‌ها، تخلخل‌هایی با نظم بیش‌تر ایجاد شدند [۱۵-۲۳].

از ویژگی‌های مثبت داربست‌های ساخته شده با این روش، می‌توان به این نکته اشاره نمود که اگرچه تخلخل‌های داربست‌ها باز هستند، ولی اثری از تخلخل‌های مازاد در دیواره‌ها مشاهده نشده است (شکل ۱- c).

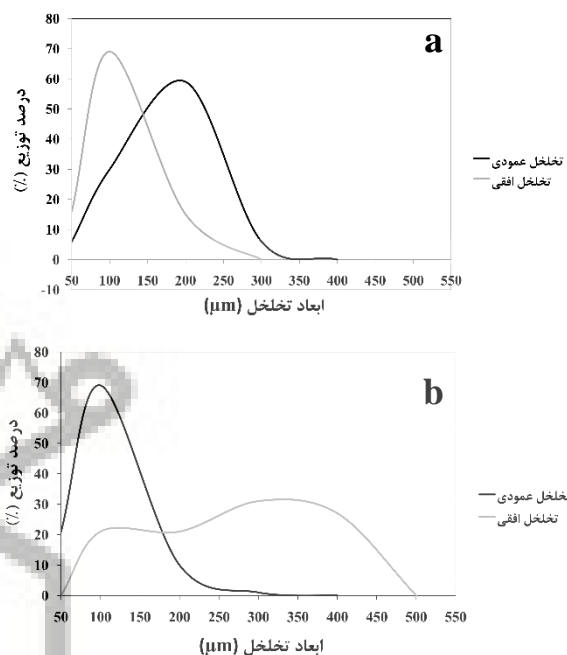
از ساختار مناسبی جهت حمایت از پروسه‌های سلولی و ترمیم ضایعات ایجاد شده در بافت آسیب دیده برخوردار هستند.



شکل (۳) - ابعاد تخلخل‌ها بر حسب سطح ویژه (a) و حجم ویژه (b) با استفاده از روش تخلخل سنجی جیوه‌ای

۲-۳- طیف‌سنجی فرسرخ

شکل (۴) طیف‌سنجی فرسرخ داربست‌های PLGA/ژلاتین تهیه شده به روش ریخته‌گری انجمادی را نشان می‌دهد. جذب مشخصه PLGA در 1761 cm^{-1} مشاهده می‌شود که مربوط به ارتعاش کششی C-O است. در 1188 cm^{-1} نیز پیوند کششی C-O-C گروه اتری PLGA نمایان است. به علاوه در 1089 cm^{-1} و 1451 cm^{-1} به ترتیب پیوندهای C-O و C-H گروه متیل PLGA است. پیوندهای مربوط به ژلاتین در 1650 cm^{-1} و 1538 cm^{-1} دیده می‌شود که گروه‌های آمید I و II است [۹، ۲۹]. علاوه بر آن، پیوند جذبی در 3400 cm^{-1} نمایان است که به ارتعاش کششی N-H و OH-O و نیز پیوند هیدروژنی بین ملکول‌ها مربوط می‌باشد. در این طیف وجود پیوندهای شیمیایی مربوط به ژلاتین و PLGA در



شکل (۴) - ابعاد تخلخل‌های عمودی و افقی در دو مقطع عرضی (a) طولی (b) داربست‌های PLGA/ژلاتین با استفاده از نرم‌افزار کمی تصویر

نتایج این آزمون نشان می‌دهد که ماکروتخلخل‌های موجود در داربست‌های PLGA/ژلاتین ابعاد ۲۰۰-۱۰۰ میکرومتر، میانگین سطح ویژه $30\text{ mm}^2/\text{g}$ و میانگین حجم ویژه $55\text{ mm}^3/\text{g}$ را دارند.

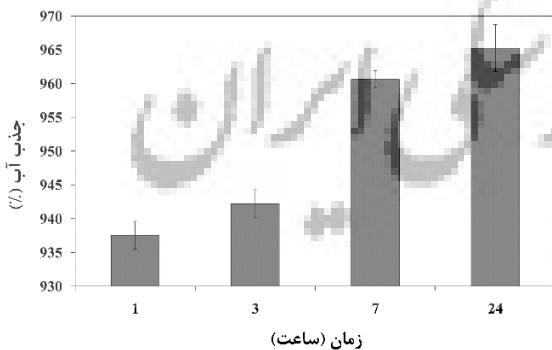
شکل (۳-a و ۳-b) نتایج به دست آمده از تخلخل سنجی جیوه‌ای را نشان می‌دهد. از مقایسه نتایج اندازه‌گیری توزیع اندازه تخلخل‌ها از دو روش یاد شده، مشاهده می‌شود که در این گونه داربست‌ها استفاده از روش اندازه‌گیری مستقیم از تصاویر SEM درک بهتری از ساختار و توزیع تخلخل‌ها به دست می‌دهد. به همین دلیل، در اکثر تحقیقات انجام شده با ریخته‌گری انجمادی، اندازه‌گیری تخلخل‌ها با این روش صورت گرفته است [۱۳، ۱۴]. جهت‌دار بودن تخلخل‌ها در روش ریخته‌گری انجمادی و نیز بالاتر بودن میانگین ابعاد تخلخل‌ها در مقایسه با مطالعات شویچت^۱ [۳۶] اثرات مطلوبی را بر حفظ پایداری و خواص فیزیکی و شیمیایی داربست‌ها گذاشته است. لذا با در نظر گرفتن میانگین ابعاد تخلخل‌ها و ساختار درهم نفوذی آن‌ها، می‌توان ادعا نمود که

^۱ Shoichet

آورد. با توجه به نتایجی که لی^۱ و هم‌کارانش به آن دست یافتند، افزودن ژلاتین به PLGA با افت خواص مکانیکی همراه است و تردی داربست‌ها را افزایش و سفتی را کاهش می‌دهد. علت این پدیده، کاهش لزجت محلول و کاهش یکنواخت بودن داربست‌ها در اثر افزودن ژلاتین است [۲۴]. اما از آن جا که ژلاتین اثرات چشم‌گیری در زیست‌سازگاری و رفتار سلولی ایجاد می‌کند، می‌توان کاهش جزئی خواص مکانیکی را نادیده گرفت. البته افزایش استحکام داربست‌ها به علت وجود تخلخل‌های جهت‌دار حاصل از روش ریخته‌گری انجمادی در مقایسه با سایر روش‌ها را نباید نادیده گرفت [۲۵]. به هر حال، عدم وجود تخلخل‌های مازاد در دیواره‌ها (شکل ۱- C) در افزایش استحکام این داربست بسیار مؤثر واقع می‌شود. نکته حائز اهمیت در رابطه با استحکام داربست‌ها این است که افزایش استحکام آن‌ها، دلیل موجهی بر عدم تخریب داربست‌ها نیست [۲۱].

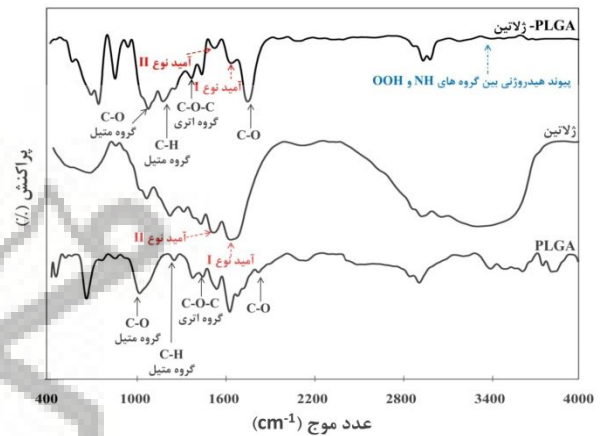
۴-۳- جذب آب

نتایج آزمون جذب آب داربست‌های PLGA/ژلاتین (شکل ۶) نشان‌گر آن است که داربست‌ها در بازه‌ی زمانی یک ساعت تا یک روز، جذب آبی بیش از ۹۰۰ درصد دارند. جذب آب نسبتاً بالای داربست‌ها باعث شده که پس از کارگذاری داربست‌ها در موضع مورد نظر و لنگراندازی سلولی، تبادلات سلولی نظیر جذب مواد غذایی و دفع مواد زائد بهتر انجام پذیرد.



شکل ۶- جذب آب داربست‌های PLGA/ژلاتین ساخته شده به روش ریخته‌گری انجمادی

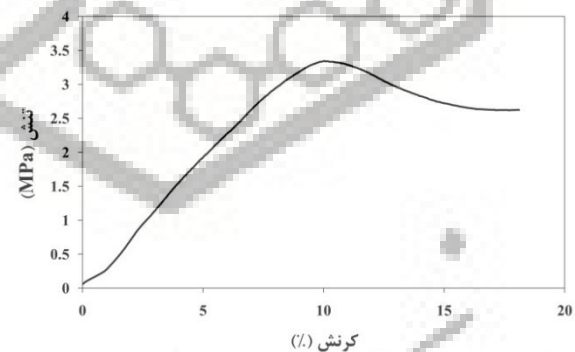
ساختار داربست‌ها مشخص بوده و عدم تخریب مواد در برهم‌کنش با یک‌دیگر را نشان می‌دهد.



شکل ۴- طیف سنجی فروسرخ داربست‌های PLGA/ژلاتین ساخته شده به روش ریخته‌گری انجمادی

۳-۳- استحکام فشاری

شکل ۵) نتایج آزمون استحکام فشاری داربست‌های پلیمری را نشان می‌دهد.



شکل ۵- استحکام فشاری داربست‌های PLGA/ژلاتین ساخته شده به روش ریخته‌گری انجمادی جهت انجماد

استحکام فشاری داربست‌های PLGA/ژلاتین نشان‌گر استحکامی در حدود ۳/۲ مگاپاسکال در جهت انجماد است. استحکام نسبتاً بالای داربست‌های یاد شده تحمل اعمال بارهای مکانیکی پس از کارگذاری در موضع آسیب دیده را امکان پذیر می‌سازد. از آن جا که پلیمر سنتزی PLGA در تأمین خواص مکانیکی نقش به‌سزایی دارد، می‌توان آن را به عنوان یک عامل مهم در ایجاد استحکام داربست‌ها به شمار

^۱ Li

تطابق این کاهش جرم با تخریب در محیط آنزیمی مقایسه پذیرتر است. تخریب داربست‌های PLGA/ژلاتین شرایط را برای ترمیم بافت و جانشینی داربست تخریب شده با بافت درحال ترمیم فراهم می‌کند. به علاوه، محصولات تخریب کاملاً زیستی ایجاد شده در اثر تخریب داربست به راحتی از بدن دفع شده و اثرات سوئی برجای نمی‌گذارند [۳۲].

تخلخل‌های جهت‌دار داربست‌ها نرخ آب‌دوستی و جذب آب را بهبود می‌بخشند، بنابراین افزایش سرعت تخریب در مقایسه با ساختاری با تخلخل‌های اتفاقی نتیجه‌ای دور از انتظار نیست. نتایج تحقیقات دای^۱ نیز گویای چنین نکته‌ای است [۲۵]. انتظار می‌رود که افزودن ژلاتین به علت کاهش پایداری محلول پلیمری و عدم یکنواخت بودن داربست نهایی در بالا بردن نرخ تخریب بسیار مؤثر باشد و حتاً باعث کاهش جرم در ساعات اولیه پس‌از تورم کامل داربست‌ها شود [۹، ۲۹]. اما با توجه به درصد پایین ژلاتین استفاده شده در این داربست (۲۰٪) علی‌رغم بهره‌جستن از مزایای ژلاتین (آب-دوستی و جذب آب بالا) پایداری مناسبی از داربست‌ها مشاهده شد.

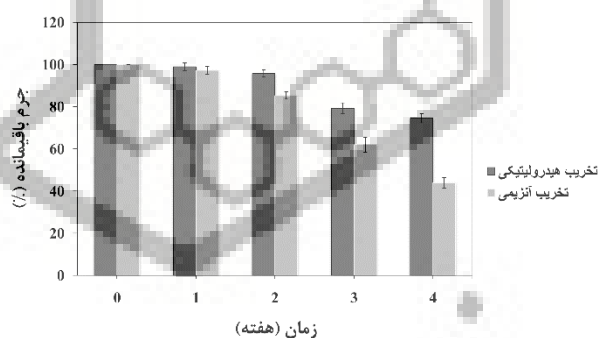
۴- نتیجه‌گیری

داربست‌های PLGA/ژلاتین با نسبت وزنی ۸۰ : ۲۰ به روش ریخته‌گری انجمادی ساخته شدند. روش ریخته‌گری انجمادی نیازمند انحلال هم‌زمان پلیمرها است، لذا با استفاده از حلال استیک‌اسید دست‌یابی به محلولی یک‌نواخت از این دو پلیمر میسر شد. تصاویر SEM داربست‌ها نشان‌گر ۹۵ درصد تخلخل جهت‌دار با توزیع ابعاد ۱۰۰-۳۰۰ میکرومتر است و به علت ایجاد شبکه‌های درهم نفوذی و ساختار شبیه ECM انتظار می‌رود که داربست‌های مناسبی برای چسبندگی و مهاجرت سلولی باشند. هم‌چنین نتایج تخلخل سنتجی با دو روش تصاویر SEM و جیوه‌ای نشان داد که اندازه‌گیری مستقیم می‌تواند روش مناسب‌تری برای داربست‌های حاصل از روش ریخته‌گری انجمادی باشد. طیف‌سنجی فروسرخ داربست‌های PLGA/ژلاتین گویای عدم تخریب و تغییر

از آن جا که ژلاتین پلیمری طبیعی و درشت ملکولی آب‌دوست است، بدون شک افزودن آن به PLGA نقش بسیار مؤثری در افزایش آب‌دوستی ساختار و میزان جذب آب داربست‌ها در مقایسه با تحقیقاتی که منگ و هم‌کارانش بر داربست‌های نانوفیبری PLGA انجام داده‌اند، نشان می‌دهد. بنابراین، قادر به بهبود پایداری زیستی و تکثیر سلولی خواهد بود [۹، ۲۹]. در واقع وجود گروه‌های کربوکسیلیک و آمین در ساختار ژلاتین در افزایش نرخ آب‌دوستی نقش اساسی ایفا می‌کند. به علاوه، تخلخل‌های جهت‌دار ایجاد شده در روش ریخته‌گری انجمادی در مقایسه با سایر روش‌ها در بهبود جذب آب مؤثر هستند [۸، ۲۵، ۳۶].

۳-۵- زیست تخریب پذیری

نتایج تخریب هیدرولیتیکی و آنزیمی داربست‌های PLGA/ژلاتین در بازه‌ی زمانی یک ماه در شکل (۷) نشان داده شده است.



شکل (۷)- زیست تخریب پذیری داربست‌های PLGA/ژلاتین ساخته شده به روش ریخته‌گری انجمادی

انتخاب آنزیم تریپسین برای این آزمون جهت شبیه‌سازی هرچه بیش‌تر محیط درون بدن صورت گرفت. همان‌طور که در شکل (۷) مشاهده می‌شود کاهش جرم چشم‌گیری طی بازه‌ی یک ماهه رخ داده است. هم‌چنین نرخ کاهش در محیط آنزیمی در مقایسه با PBS بیش‌تر بوده است [۲۷]. لذا انتظار داریم که پس‌از کارگذاری داربست‌ها در موضع آسیب دیده به علت فعالیت‌های آنزیمی محیط درون‌تن نرخ تخریب بیش‌تری در مقایسه با محیط PBS مشاهده شود. بدون شک

¹ Dai

- [6] B. Liu, S. X. Cai, K. W. Ma, Z. L. Xu, X. Z. Dai, L. Yang, et al. "Fabrication of a PLGA-collagen peripheral nerve scaffold and investigation of its sustained release property in vitro" *Journal of Materials Science. Materials in Medicine* 19, pp 1127–32, 2008.
- [7] L. Song, D. Baksh, R. S. Tuan, "Mesenchymal stem cell-based cartilage tissue engineering: cells, scaffold and biology" *Cytotherapy* 6, pp 596–601, 2004.
- [8] J. L. Drury, D. J. Mooney, "Hydrogels for tissue engineering: scaffold design variables and applications" *Biomaterials* 24, pp 4337–4351, 2003.
- [9] Z. X. Meng, Y. S. Wang, C. Ma, W. Zheng, L. Li, Y. F. Zheng, "Electrospinning of PLGA/gelatin randomly-oriented and aligned nanofibers as potential scaffold in tissue engineering" *Materials Science and Engineering: C* 30, pp 1204–1210, 2010.
- [10] X. Y. Zhao, J. Zhao, Y. P. Zhang, W. Yuan, "Electrospinning of PLGA/Gt blend system" *Chemical Journal of Chinese Universities* 30, pp 391–395, 2009.
- [11] G. Wang, X. Hu, W. Lin, C. Dong, H. Wu, "Electrospun PLGA-silk fibroin-collagen nanofibrous scaffolds for nerve tissue engineering" *In Vitro Cellular & Developmental Biology Animal* 47, pp 234–40, 2011.
- [12] H. Ghaleh, F. Abbasi, M. Alizadeh, A. B. Khoshfetrat, "Mimicking the quasi-random assembly of protein fibers in the dermis by freeze-drying method" *Materials Science & Engineering C Materials for Biological Applications* 49, pp 807–15, 2015.
- [13] N. Arabi, A. Zamanian, "Effect of cooling rate and gelatin concentration on the microstructural and mechanical properties of ice template gelatin scaffolds" *Biotechnology and Applied Biochemistry* 60, pp 573–9, 2013.
- [14] A. Zamanian, S. Farhangdoust, M. Yasaei, M. Khorami, "The Effect of Particle Size on the Mechanical and Microstructural Properties of Freeze-Casted Macroporous Hydroxyapatite Scaffolds" *International Journal of Applied Ceramic Technology* 10, pp 1–10, 2013.
- [15] Y. Zhou, S. Fu, Y. Pu, S. Pan, A. J. Ragauskas, "Preparation of aligned porous chitin nanowhisker foams by directional freeze-casting technique" *Carbohydrate Polymers* 112, pp 277–83, 2014.
- [16] Y. Tang, Q. Miao, S. Qiu, K. Zhao, L. Hu, "Novel freeze-casting fabrication of aligned lamellar porous alumina with a centrosymmetric structure" *Journal of the European Ceramic Society* 34, pp 4077–4082, 2014.
- [17] Y. Tang, K. Zhao, L. Hu, Z. Wu, "Two-step freeze casting fabrication of hydroxyapatite porous scaffolds with bionic bone graded structure" *Ceramics International* 39, pp 9703–9707, 2013.

ساختار مواد اولیه پس از ساخت داربست‌ها است. پلیمر PLGA یکی از مواد مورد استفاده در این بررسی است که در تأمین خواص مکانیکی داربست‌ها و افزایش استحکام فشاری و بهبود سفتی ساختار نقش مؤثری ایفا می‌کند. به طوری که استحکام فشاری به دست آمده (۳٫۲ MPa) می‌تواند قابل توجه باشد. پلیمر طبیعی ژلاتین نیز سبب افزایش آب‌دوستی، جذب آب و سرعت تخریب می‌شود. همچنین وجود ساختار جهت‌دار داربست‌های PLGA/ژلاتین یکی از دلایل افزایش خواص فیزیکی/مکانیکی در مقایسه با سایر روش‌ها است. مجموع این ویژگی‌ها ساختاری را ایجاد می‌کند که ضمن ترمیم بافت آسیب دیده، پایداری خود را در طول مدت زمان کارایی حفظ می‌نماید.

در ادامه‌ی این تحقیق، آزمون‌های برون‌تن و درون‌تن در

حال انجام هستند.

۵- مرجع‌ها

- [1] Y. Hagiwara, A. Nakashima, S. Itoh, T. Sakakura, C. Otsuji, E. Yamagishi, H. Shimizu, "Clinical application of PGA-tube for regeneration of intrapelvic nerves during extended surgery for intrapelvic recurrent rectal cancer, Gan to Kagaku Ryoho" *Cancer & Chemotherapy* 29, pp 2202–2204, 2002.
- [2] W. Noordenbos, P. D. Wall, "Implications of the failure of nerve resection and graft to cure chronic pain produced by nerve lesions" *Journal of Neurology, Neurosurgery & Psychiatry* 44, pp 1068–1073, 1981.
- [3] T. Nakamura, Y. Inada, S. Fukuda, M. Yoshitani, A. Nakada, S. Itoi, et al. "Experimental study on the regeneration of peripheral nerve gaps through a polyglycolic acid-collagen (PGA-collagen) tube" *Brain Research* 1027, pp 18–29, 2004.
- [4] K. Mizuseki, T. Sakamoto, K. Watanabe, K. Muguruma, M. Ikeya, A. Nishiyama, et al. "Generation of neural crest-derived peripheral neurons and floor plate cells from mouse and primate embryonic stem cells" *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 100, pp 5828–33, 2003.
- [5] D. Y. Lee, B. H. Choi, J. H. Park, S. J. Zhu, B. Y. Kim, J. Y. Huh, et al. "Nerve regeneration with the use of a poly (l-lactide-co-glycolic acid)-coated collagen tube filled with collagen gel" *Journal of Cranio-Maxillo-Facial Surgery: Official Publication of the European Association for Cranio-Maxillo-Facial Surgery* 34, pp 50–6, 2006.

- [28] V. K. Nandagiri, P. Gentile, V. Chiono, C. Tonda-Turo, A. Matsiko, Z. Ramtoola, et al. "Incorporation of PLGA nanoparticles into porous chitosan-gelatin scaffolds: influence on the physical properties and cell behavior" *Journal of the Mechanical Behavior of Biomedical Materials* 4, pp 1318–27, 2011.
- [29] Z. X. Meng, X. X. Xu, W. Zheng, H. M. Zhou, L. Li, Y. F. Zheng, et al. "Preparation and characterization of electrospun PLGA/gelatin nanofibers as a potential drug delivery system" *Colloids and Surfaces B, Biointerfaces* 84, pp 97–102, 2011.
- [30] C. Ye, P. Hu, M. X. Ma, Y. Xiang, R. G. Liu, X. W. Shang, "PHB/PHBHHx scaffolds and human adipose-derived stem cells for cartilage tissue engineering" *Biomaterials* 30, pp 4401–6, 2009.
- [31] A. L. Luís, J. M. Rodrigues, S. Geuna, S. Amado, Y. Shirosaki, J. M. Lee, et al. "Use of PLGA 90:10 scaffolds enriched with in vitro-differentiated neural cells for repairing rat sciatic nerve defects" *Tissue Engineering Part A* 14, pp 979–93, 2008.
- [32] H. Nojehdehian, F. Moztafzadeh, H. Baharvand, H. Nazarian, M. Tahriri, "Preparation and surface characterization of poly-L-lysine-coated PLGA microsphere scaffolds containing retinoic acid for nerve tissue engineering: in vitro study" *Colloids and Surfaces B, Biointerfaces* 73, pp 23–29, 2009.
- [33] G. R. D. Evans, K. Brandt, S. Katz, P. Chauvin, L. Otto, M. Bogle, et al. "Bioactive poly (L-lactic acid) conduits seeded with Schwann cells for peripheral nerve regeneration" *Biomaterials* 23, pp 841–8, 2002.
- [34] P. A. Webb, "Volume and Density Determinations for Particle Technologists" *Micromeritics Instrument Corp* 2001.
- [35] J. Khazaei, "Water Absorption Characteristics" *Cercetari Agronomice in Moldova XLI*, pp 5–16, 2008.
- [36] S. G. Lévesque, R. M. Lim, M. S. Shoichet, "Macroporous interconnected dextran scaffolds of controlled porosity for tissue-engineering applications" *Biomaterials* 26, pp 7436–46, 2005.
- [18] T. H. Qazi, R. Rai, A. R. Boccaccini, "Tissue engineering of electrically responsive tissues using polyaniline based polymers: A review" *Biomaterials* pp 1–19, 2014.
- [19] P. van de Witte, P. J. Dijkstra, J. W. a. van den Berg, J. Feijen, "Phase separation processes in polymer solutions in relation to membrane formation" *Journal of Membrane Science* 117, pp 1–31, 1996.
- [20] S. C. Subia, B. Kundu, J. Kundu, "Biomaterial scaffold fabrication techniques for potential tissue engineering applications" in: *Tissue Engineering*: pp 141–159, 2010.
- [21] M. Alizadeh, F. Abbasi, A. B. Khoshfetrat, H. Ghaleh, "Microstructure and characteristic properties of gelatin/chitosan scaffold prepared by a combined freeze-drying/leaching method" *Materials Science & Engineering C, Materials for Biological Applications* 33, pp 3958–67, 2013.
- [22] S. Deville, "Freeze Casting of Porous Ceramics: A Review of Current Achievements" *Advanced Engineering Materials* pp 115–169, 2008.
- [23] M. Ho, P. Kuo, H. Hsieh, T. Hsien, L. Hou, "Preparation of porous scaffolds by using freeze-extraction and freeze-gelation methods" *Biomaterials* 25, pp 129–138, 2004.
- [24] X. K. Li, S. X. Cai, B. Liu, Z. L. Xu, X. Z. Dai, K. W. Ma, et al. "Characteristics of PLGA-gelatin complex as potential artificial nerve scaffold" *Colloids and Surfaces B, Biointerfaces* 57, pp 198–203, 2007.
- [25] X. Dai, L. Wang, K. Ma, K. Pan, "Characterization of a Hybridization Scaffold Based on PLGA/Acellular Pigskin for Nerve Regeneration" *Journal of Medical and Biological Engineering* 33, 2012.
- [26] F. Zamani, M. Latifi, M. Amani-Tehran, M. A. Shokrgozar, "Effects of PLGA nanofibrous scaffolds structure on nerve cell directional proliferation and morphology" *Fibers and Polymers* 14, pp 698–702, 2013.
- [27] Q. Cai, G. Shi, J. Bei, S. Wang, "Enzymatic degradation behavior and mechanism of Poly (lactide-co-glycolide) foams by trypsin" *Biomaterial* 24, pp 629–638, 2003.

انجمن مهندسی پزشکی ایران