

تهیه داربست‌های الیافی نانوکامپوزیتی پلی‌هیدروکسی‌بوتیرات / شیشه زیست‌فعال به روش الکترورسی برای کاربردهای مهندسی بافت استخوان

راضیه آبرون^۱، سعید کرباسی^{۲*}، مهدی مهدیخانی نهرخلجی^۳، داریوش سمنانی^۴

^۱گروه بیومواد، دانشکده مواد، دانشگاه سمنان، سمنان، ایران

^۲گروه بیومواد، نانوتکنولوژی و مهندسی بافت، دانشکده فناوری‌های نوین پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران

^۳گروه مهندسی پزشکی، دانشکده مهندسی، دانشگاه اصفهان، اصفهان، ایران

^۴گروه مهندسی نساجی، دانشکده مهندسی نساجی، دانشگاه صنعتی اصفهان، اصفهان، ایران

تاریخ ثبت اولیه: ۱۳۹۳/۱/۲۰، تاریخ دریافت نسخه اصلاح شده: ۱۳۹۳/۷/۲۶، تاریخ پذیرش قطعی: ۱۳۹۳/۷/۳۰

چکیده: به تازگی داربست‌های کامپوزیتی که به روش الکترورسی تهیه می‌شوند خواص مطلوبی را جهت استفاده در مهندسی بافت از خود نشان داده‌اند. در این پژوهش ابتدا نانوذرات شیشه زیست‌فعال به روش سل-ژل تهیه شد سپس داربست‌های نانوکامپوزیتی PHB/nBG با ۷/۵، ۱۰ و ۱۵ درصد وزنی از نانوذرات شیشه زیست‌فعال به روش الکترورسی ساخته شدند. نانوذرات تهیه شده و داربست‌های ساخته شده توسط میکروسکوپ الکترونی روبشی (SEM)، طیف سنج پراش اشعه ایکس (XRD)، فلورسانس اشعه ایکس (XRF)، طیف سنجی تبدیل فوری مادون قرمز (FTIR) مشخصه‌یابی شدند. نتایج نشان داد شیشه زیست‌فعال تهیه شده دارای ساختاری آمورف بوده و اندازه ذرات آن‌ها کمتر از ۷۰ نانومتر می‌باشد. تصاویر SEM نشان داد که داربست‌های نانوکامپوزیتی دارای توزیع یکنواختی از تخلخل‌های به هم پیوسته با قطر الیاف ۳۲۶/۱ نانومتر تا ۱/۲۷۶ میکرومتر می‌باشند. همچنین تمایل به آگلومره شدن ذرات در کامپوزیت‌های با نانو ذرات بیش از ۷/۵ درصد وزنی مشاهده شد. نتایج حاصل از FTIR نیز نشان دهنده برهمکنش مناسب بین فاز شیشه و پلیمر در فصل مشترک آن‌ها می‌باشد. از نتایج بدست آمده چنین استنباط می‌شود که داربست‌های نانوکامپوزیتی PHB/nBG تهیه شده به روش الکترورسی می‌تواند گزینه مناسبی برای کاربرد در مهندسی بافت استخوان باشند.

کلمات کلیدی: مهندسی بافت، الکترورسی، سل-ژل، نانوذرات شیشه زیست‌فعال، پلی‌هیدروکسی‌بوتیرات

Preparation of Nanocomposite Fibrous Scaffolds of Poly-3-hydroxybutyrate/Bioactive Glass by Electrospinning Method for Bone Tissue Engineering

R. Iron¹, S. Karbasi², M. Mehdikhani³, D. Semnani⁴

¹Department of Material, University of Semnan, Semnan, Iran

² Department of Biomaterials, nanotechnology and tissue engineering, Advanced Medical Technology Department, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, Iran

³ Department of Biomedical engineering, Faculty of engineering, University of Isfahan, Isfahan, Iran

⁴Department of Textile Engineering, Isfahan University of Technology, Isfahan, Iran

Abstract: Recently, composite scaffolds prepared by electrospinning have shown desirable properties for tissue engineering applications. In this study, first the nBGs were prepared via the sol-gel technique, then, the electrospun PHB/nBG nanocomposite scaffolds (with 7.5, 10 and 15 wt% of nBGs) were fabricated. The nanoparticles and scaffolds were characterized by Scanning Electron Microscopy (SEM), X-ray diffraction spectrometer (XRD), X-ray fluorescence spectroscopy (XRF), Fourier transform infrared spectroscopy (FTIR). Results showed that nanoparticles with an amorphous structure mainly had a particle size of less than 70 nm. All the nano-fibrous scaffolds had a uniform distribution of interconnected porosities with fiber diameters ranging from 326.1 nm to 1.276 micrometer. Composite scaffolds having nanoparticle concentrations higher than 7.5 wt%, tend to agglomerate. In addition, the FTIR results showed a favorable interaction between the polymer and nBGs. Therefore, the proposed PHB/nBG scaffolds prepared in this study can be considered as good candidates for bone tissue engineering applications.

Keywords: Tissue engineering, Electrospinning, Sol-gel, Bioactive glass nanoparticles, polyhydroxybutyrate.

۱- مقدمه

امروزه استفاده از روش‌های جراحی مانند اتوگرافت‌ها، آلوگرافت‌ها و استفاده از انواع ایمپلنت‌ها برای درمان عیوب استخوانی ناشی از شکستگی‌ها، تومورها و ... با محدودیت‌های زیادی مواجه می‌باشد [۱] به همین دلیل دانش مهندسی بافت در راستای ترمیم و احیای بافت آسیب دیده مورد توجه واقع شده است. یکی از اجزای اصلی مهندسی بافت، داربست‌ها می‌باشند. در مهندسی بافت استخوان نیز داربستی با ساختار سه‌بعدی با خواص و ساختار مشابه بافت طبیعی برای انجام کشت سلولی و کاشت در محل مورد نظر ساخته می‌شود. با توجه به ویژگی‌های داربست‌ها از قبیل زیست سازگاری، زیست تخریب پذیری، زیست‌فعالیت، داشتن خواص مکانیکی مطلوب، داشتن ساختار متخلخل به هم پیوسته و ... تا کنون مواد و روش‌های متنوعی برای ساخت داربست‌ها مورد استفاده قرار گرفته‌است [۲، ۳]. یکی از انواع پلیمرهایی که مورد توجه قرار گرفته، دسته‌ای از پلی‌استرهای طبیعی با نام پلی‌هیدروکسی‌آلکانوات (PHA) می‌باشد که یا به تنهایی و یا در ترکیب با مواد دیگر در کاربردهای بیوپزشکی مانند نخ‌های بخیه، فنرها، چسب‌ها، پین‌های اورتوپدیک، داربست‌ها و ... مورد استفاده قرار می‌گیرد [۴، ۵].

یکی از اجزای شناخته شده این گروه از پلیمرها، پلی‌هیدروکسی‌بوتیرات (PHB) است. این پلیمر دارای خواص قابل توجهی مانند زیست تخریب پذیری، زیست سازگاری با رده‌های مختلف سلولی از جمله استئوبلاست‌ها، اپیتلیوم‌ها، کوندروسایت‌ها می‌باشد [۵، ۶]. در ضمن این پلیمر به دلیل پیژوالکتریک بودن باعث تحریک رشد سلول‌های استخوانی و در نتیجه احیای بافت می‌شود [۷]. محققان هنگام استفاده از PHB برای ساخت داربست‌های مهندسی بافت برای جبران نقطه ضعف‌های این پلیمر از جمله نامطلوب بودن خواص مکانیکی و عدم زیست‌فعالیت، آن را در کنار مواد دیگری به صورت کامپوزیت استفاده می‌کنند. در واقع علت مهم گسترش بیو کامپوزیت‌ها امکان تغییر نوع و توزیع فاز تقویت کننده در زمینه می‌باشد که نتیجه آن داشتن کامپوزیت‌هایی با رنج گسترده‌ای از خواص مکانیکی و بیولوژیکی است [۶]. بنابراین ترکیب این پلیمر با فازهای سرامیکی مانند انواع کلسیم

فسفات‌ها، شیشه‌های زیست‌فعال، ولاستونیت و ... با توجه به مقاومت به خوردگی و مقاومت فشاری بالای آن‌ها منجر به حاصل شدن کامپوزیتی با زیست‌فعالیت مناسب و خواص مکانیکی مطلوب می‌شود [۴، ۶]. اگر این مواد در سایز نانو باشند به دلیل افزایش مساحت سطح ویژه باعث ارتقا خواص شده و در ضمن کامپوزیت از لحاظ ساختاری از بافت استخوان طبیعی پیروی می‌کند. استفاده از نانوذرات شیشه زیست‌فعال با توجه به خواص زیست‌فعالیت آن‌ها، هدایت استخوان سازی بالای آن‌ها و همچنین داشتن خاصیت آنتی‌باکتریال می‌تواند گزینه مناسبی برای ترکیب شدن با PHB باشد [۸، ۹].

یکی دیگر از دغدغه‌های ساخت داربست‌ها در مهندسی بافت شباهت داربست از نظر مرفولوژی و ساختار به ماتریس خارج سلولی (ECM) جهت چسبندگی، رشد و تکثیر بهتر سلول‌هاست [۱۰]، به همین دلیل استفاده از روش الکترورسی برای رسیدن به داربست‌هایی که دارای الیافی با قطر میکرو و یا نانو هستند مورد توجه قرار گرفته است. در این فرآیند از یک میدان الکتریکی با ولتاژ بالا استفاده می‌شود به طوری که محلول پلیمری با عبور از میدان و تبخیر شدن حلال در این مسیر، به صورت الیاف بر روی جمع کننده قرار می‌گیرد. در همین راستا کوراکت و همکارانش از روش الکترورسی برای ساخت داربست‌های PHB/PHBV استفاده کردند و بررسی‌های سلولی بر روی آن‌ها انجام دادند. نتایج نشان داد که این داربست‌ها هیچ گونه پاسخ منفی نسبت به استئوبلاست‌های انسانی (SaOS-2) و فایبروبلاست‌های موش (L929) ندارند به طوری که سلول‌ها پس از ۱۶ ساعت به خوبی بر روی داربست‌ها چسبیدند. همچنین این داربست‌ها فعالیت آلكالین فسفات بالایی را از خود نشان دادند [۱۱].

النا و همکارانش نیز کامپوزیتی از PHBV، nHA و SF (ابریشم) را به روش الکترورسی تهیه کردند و خواص مکانیکی و فیزیکی، مرفولوژی و ساختار، زیست‌فعالیت و زیست تخریب پذیری آن‌ها را مورد بررسی قرار دادند. تصاویر SEM، فبرهایی به هم پیوسته و هموار را نشان داد که قطر فبرها بین ۱۰ تا ۱۵ میکرومتر بود. نتایج آنالیز FTIR نیز حضور HA و SF را بر روی الیاف ثابت کرد. آزمون‌های

بافت استخوان استفاده شد و به دلیل مزیت‌های ذرات شیشه زیست‌فعال نسبت به HA از جمله زیست‌فعال بودن بیشتر و دارا بودن خاصیت آنتی باکتریال آن‌ها [۸] از این ذرات استفاده شد. بنابراین در این پژوهش در جهت بازسازی عیوب استخوانی، داربست‌های الیافی نانوکامپوزیتی PHB/Bioglass با ۰، ۷/۵، ۱۰، ۱۵ درصد وزنی از نانوذرات شیشه‌زیست‌فعال به روش الکترورسی تهیه و سپس آنالیزهای FTIR، SEM، XRD جهت مشخصه‌یابی نمونه‌ها انجام شد.

۲- روش تحقیق

۲-۱- مواد

پودر پلی‌هیدروکسی‌بوتیرات (LOT Number: STBB9669V, CAS Number: 29435-48-1, Mw = 300,000 g mol⁻¹) از شرکت سیگما-آلدردیج ایالت متحده آمریکا و کلروفورم (CF) و دی‌متیل فرامید (DMF) از مرک آلمان خریداری شد.

نانوذرات شیشه زیست‌فعال با استفاده از روش سل-ژل در پژوهشگاه مواد دانشگاه امیر کبیر سنتز شد.

۲-۲- سنتز نانوذرات شیشه زیست‌فعال

شیشه زیست‌فعال مورد مطالعه به سیستم SiO₂-CaO-P₂O₅ با ترکیب ۵۶S تعلق دارد. جهت تهیه شیشه به روش سل-ژل ابتدا ۱۵ میلی لیتر از آب، ۵۰ میلی لیتر اتانول و ۱۸ میلی لیتر تری‌اتیل‌اورتوسیلیکات به همراه ۲/۵ میلی لیتر اسید هیدروکلریک ۲ نرمال به هم اضافه و به مدت ۳۰ دقیقه در دمای محیط با دور ثابت هم‌زده شد. در مرحله بعد ۲ میلی لیتر تری‌اتیل فسفات به سل اسیدسیلیکا افزوده شد. پس از ۲۰ دقیقه، ۱۳ گرم کلسیم نترات چهارآبه به عنوان پیش‌ساز کلسیم به ظرف اضافه گردید. محلول مذکور یک ساعت دیگر روی همزن مغناطیسی، قرار گرفت.

سل بدست آمده جهت پیرسازی درون آون با دمای ۶۰ درجه سانتی‌گراد و مدت زمان ۵۲ ساعت قرار گرفت. پس از پیرسازی مجدداً پودر سفید رنگ حاصل به مدت ۴۸ ساعت در آون با دمای ۱۳۰ درجه سانتی‌گراد گذاشته شد. در مرحله آخر پودر خشک شده جهت فرآیند کلسیناسیون به مدت ۱ ساعت در کوره الکتریکی با دمای ۶۰۰ درجه سانتی‌گراد قرار گرفت

مکانیکی بیانگر این امر بود که نمونه‌های حاوی ۲٪ وزنی از هر تقویت کننده مدول یانگ را افزایش می‌دهند. تشکیل لایه HA بعد از ۲۸ روز بر روی کامپوزیت‌ها، نشان دهنده زیست‌فعال بودن آن‌ها بود در واقع تشکیل کریستال‌های HA بر روی سطح فیبرها باعث چسبندگی و تکثیر سلول‌های استئوبلاست در محیط‌های درون تنی می‌شود [۱۲]. حاجی‌علی و همکارانش کامپوزیتی از PHB را به همراه درصدهای متفاوتی از نانوذرات شیشه زیست‌فعال به روش شستشوی نمک (با ۷۰، ۸۰ و ۹۰ درصد وزنی نمک) تهیه کردند. نتایج آنالیزهای FTIR و DTA بیانگر برهمکنش خوب نانوذرات با پلیمر در فصل مشترک بود. تصاویر SEM داربست‌ها نشان داد که داربست‌ها دارای ساختار متخلخل درون‌مرتبط می‌باشند و سایز تخلخل‌ها بین ۲۵۰ تا ۳۰۰ میکرومتر است که برای چسبندگی، تکثیر و مهاجرت سلول‌ها مناسب می‌باشند. نتایج تست‌های مکانیکی نشان داد که با کاهش تخلخل‌ها (کاهش میزان نمک) و همچنین افزایش نانوذرات شیشه، مدول الاستیک و استحکام کششی نمونه‌ها به طور محسوسی افزایش می‌یابد. نتایج آزمون زیست‌فعالی داربست‌ها بیانگر تشکیل HA بر روی نمونه‌ها و در نتیجه زیست‌فعالی آن‌ها بود. نتایج تخریب داربست‌ها در محلول PBS نیز نشان داد که افزایش میزان تخلخل‌ها و همچنین افزایش نانوذرات باعث افزایش نرخ تخریب و درصد کاهش وزن نمونه‌ها می‌شود [۱۶].

تهرانی و همکارانش داربست‌های فیبری نانوکامپوزیتی PHB/nHA را به روش الکترورسی تهیه و مشخصه‌یابی کردند. تصاویر SEM نشان داد که داربست‌ها دارای ساختار الیافی با قطر نانو می‌باشند و ذرات HA به صورت همگن بر روی آن‌ها توزیع شده است. طیف IR هم نشان‌دهنده تغییر قابل توجه در شدت پیک‌ها، توزیع و جابجایی آن‌ها نسبت به طیف اجزا سازنده بود و به این معناست که باندهای هیدروژنی بین گروه کربونیل پلیمر و گروه فسفات نانوذرات به خوبی شکل گرفته‌اند. نتایج تست کشش حاکی از آن بود که با افزایش نانوذرات تا ۵٪ وزنی مدول افزایش یافته و پس از آن کاهش مدول مشاهده می‌شود [۶]. با توجه به مطالعات ذکر شده (خصوصاً دو مطالعه [۱۶و۱۷])، در این تحقیق از روش الکترورسی در راستای رسیدن به داربستی با ساختار مشابه با

[۹،۸]. سپس پودر حاصل مشخصه‌یابی شد.

۲-۳- ساخت داربست پلیمری نانوالیافی

با توجه به مطالعات قبلی که بر روی غلظت محلول، ولتاژ اعمالی و نسبت حلال‌ها برای ساخت داربست‌ها به روش الکترورسی صورت گرفت [۱۳]، ۶ داربست پلیمری با غلظت ولتاژهای متفاوت ساخته شد (جدول ۱). روش کار به این صورت بود که پس از توزین مقدار مورد نیاز از پلیمر حلال‌های CF و DMF به پلیمر اضافه شدند سپس محلول در دمای ۶۰ درجه سانتی‌گراد به مدت زمان ۳۰ دقیقه روی همزن مغناطیسی قرار گرفت. در مرحله آخر محلول پلیمری شفاف حاصل الکترورسی شد. برای تمامی نمونه‌ها فاصله نازل تا جمع‌کننده (۲۰ سانتی‌متر) و نرخ تغذیه (۱۰ میلی‌لیتر بر ساعت) ثابت در نظر گرفته شد. از حلال‌های CF و DMF به ترتیب با نسبت ۹ به ۱ استفاده گردید. سپس نمونه‌های تهیه شده مشخصه‌یابی و از بین آن‌ها داربستی که دارای شرایط بهینه از لحاظ مرفولوژی شامل حجم و سایز مناسب تخلخل‌ها و درون‌مرتبطی مناسب آن‌ها و همچنین داشتن الیافی با قطر بهینه بود، برای ساخت داربست نانو کامپوزیتی پلیمر/شیشه زیست‌فعال انتخاب شد.

جدول ۱. مشخصات داربست‌های سنتز شده.

نام نمونه	غلظت محلول (%)	ولتاژ اعمالی (kv)
S ₁	۶	۹
S ₂	۶	۶/۱
S ₃	۵	۱۲
S ₄	۵	۸/۵
S ₅	۴	۸
S ₆	۴	۶

۲-۴- ساخت داربست نانوکامپوزیتی PHB/nBG

برای تهیه این داربست‌ها ابتدا به همان روش قبل محلول پلیمری تهیه گردید. سپس نانوذرات شیشه زیست‌فعال با سه درصد وزنی مختلف ۷/۵، ۱۰ و ۱۵ به محلول پلیمری

اضافه و مجدداً روی همزن به مدت ۳۰ دقیقه قرار گرفت. سپس برای توزیع یکنواخت و بهتر ذرات در محلول و جلوگیری از آگلومره شدن ذرات، محلول برای ۲۰ تا ۳۰ دقیقه توسط هم‌زن‌نایزر هم خورد و بلافاصله الکترورسی شد. به منظور الکترورسی محلول از جمع‌کننده ثابت استفاده گردید و فاصله بین نازل و جمع‌کننده ۲۰ سانتی‌متر در نظر گرفته شد.

۲-۵- طیف سنج پراش اشعه ایکس (XRD)

یکی از الزامات لازم برای نانوذرات شیشه زیست‌فعال، آمورف بودن آن‌هاست به همین دلیل اولین آزمون انجام شده پس از سنتز ذرات، XRD بود. ترکیب فازی و کریستالینیتی نانوذرات حاصل با طیف‌سنج پراش اشعه ایکس (XRD) دارای مشخصات D8-ADVANCE Bruker و با طول موج 0/15406 nm با زاویه‌ی ۲۰ در گستره ۲۰ تا ۸۰ درجه در دانشکده مواد دانشگاه سمنان بررسی شد.

۲-۶- فلئورسانس اشعه ایکس (XRF)

برای تأیید ترکیب شیشه زیست‌فعال آزمون طیف سنج فلئورسانس اشعه ایکس (XRF) با مشخصات Bruker, S4 PIONEER انجام شد.

۲-۷- طیف سنجی تبدیل فوریه مادون قرمز (FTIR)

جهت بررسی گروه‌های عاملی، ساختار پلیمر پلی هیدروکسی‌بوتیرات خالص، نانوذرات شیشه زیست‌فعال و نانوکامپوزیت از آنالیز FTIR (دستگاه مدل ۴۰۰-۴۰۰۰ cm⁻¹) IASCO استفاده شد. برای انجام آزمون FTIR نمونه‌ها باید به صورت پودری یا شفاف باشند تا طیف IR را از خود عبور دهند و یا به صورت یک فیلم با سطح نسبتاً صاف تا بتوانند طیف IR را منعکس کنند که در این حالت تست به صورت ATR-FTIR انجام می‌شود. در این طرح از پودر پلیمر و نانوذرات شیشه زیست‌فعال تست FTIR و از داربست نانوکامپوزیتی حاوی ۱۰ درصد وزنی نانوذرات شیشه، تست ATR-FTIR گرفته شد و در نهایت نتایج این سه طیف با هم مقایسه گردید.

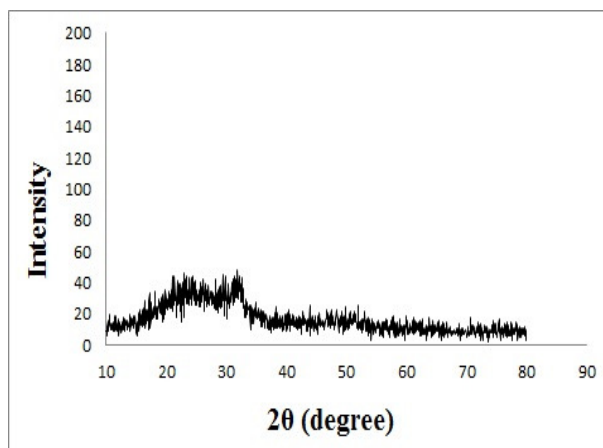
۸-۲- میکروسکوپ الکترونی روبشی (SEM)

بررسی مرفولوژی داربست‌های پلیمری از نظر اندازه تخلخل‌ها، نحوه توزیع تخلخل‌ها، درون‌مرتبطی آن‌ها و مشخص شدن قطر الیاف توسط میکروسکوپ الکترونی روبشی (SEM، با دستگاه KYKY-EM ۳۲۰۰) انجام شد. همچنین جهت بررسی توزیع ذرات شیشه بر روی الیاف و تاثیر آن‌ها بر روی مرفولوژی الیاف این آزمون بر روی داربست‌های نانوکامپوزیتی نیز انجام گردید. بررسی مرفولوژی و اندازه ذرات پودر شیشه زیست‌فعال نیز توسط میکروسکوپ الکترونی عبوری گسیل میدانی (FESEM) صورت گرفت.

۳- نتایج و بحث

۱-۳-۱- نتایج XRD

شکل (۱) نمودار XRD ذرات شیشه زیست‌فعال را نشان می‌دهد. همان‌طور که مشاهده می‌شود نانوذرات شیشه زیست‌فعال تهیه شده، دارای ساختاری آمورف می‌باشند بنابراین استدلال می‌شود که روش سل-ژل می‌تواند روش مناسبی برای تولید نانوذرات شیشه زیست‌فعال باشد زیرا همان‌طور که قبلاً اشاره شد برای تهیه داربست‌های استخوانی، نانوذرات شیشه دارای ساختاری آمورف نیاز می‌باشد. از سوی دیگر فعالیت ضدباکتریایی شیشه زیست‌فعال، تحت تاثیر ترکیب شیمیایی و شرایط تجزیه آن در محیط اطرافش است [۸] بنابراین آمورف بودن شیشه فاکتوری مثبت در جهت افزایش تجزیه آن می‌باشد.



شکل ۱. منحنی XRD نانوذرات شیشه زیست‌فعال.

۲-۳- نتایج XRF

نتایج XRF، شیشه زیست‌فعال تشکیل شیشه با ترکیب $56/22 \text{ mol\% SiO}_2 - 31/34 \text{ mol\% CaO} - 7/03 \text{ mol\% P}_2\text{O}_5$ را تأیید می‌کند (جدول ۲). با توجه به اینکه در مطالعات قبلی برای شیشه‌های زیست‌فعال با ترکیبات همچون ۵۸S و ۶۳S خاصیت آنتی باکتریال اثبات شده است، می‌توان پیش بینی کرد که شیشه تهیه شده در این تحقیق با ترکیب ۵۶S نیز به دلیل داشتن مقدار کلسیم بالاتر و در نتیجه ایجاد محیط بازی بیشتر، دارای خاصیت آنتی باکتریال می‌باشد و یک نقطه قوت برای این شیشه محسوب می‌شود [۸].

جدول ۲. ترکیب نهایی شیشه زیست‌فعال حاصل از آزمون XRF.

ترکیب	غلظت (%w/w)
SiO ₂	۵۶/۲۲
CaO	۳۱/۳۴
P ₂ O ₅	۷/۰۳

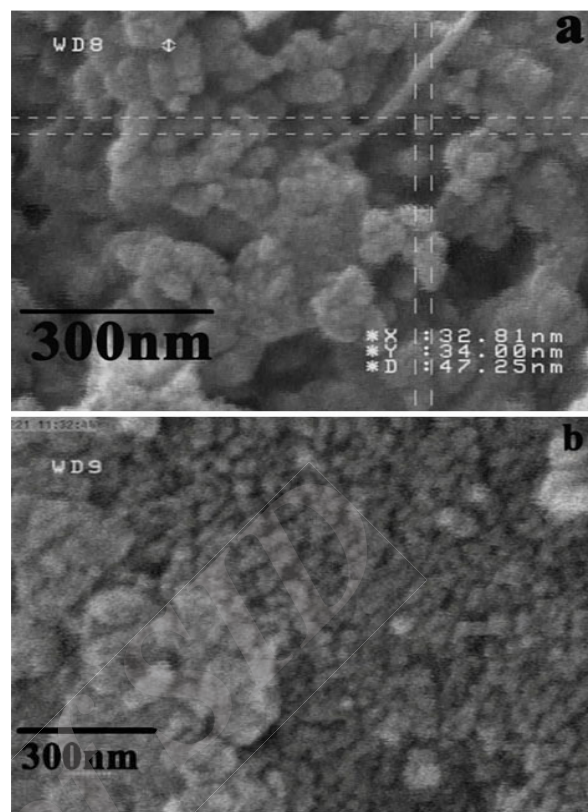
۳-۳- نتایج SEM

۱-۳-۳- نتایج FESEM ذرات شیشه زیست‌فعال

شکل (۲) تصاویر FESEM شیشه زیست‌فعال را در دو بزرگنمایی مختلف نشان می‌دهد. یکی از اهداف ما برای انتخاب روش سل-ژل جهت سنتز شیشه، بدست آوردن ذراتی با سایز نانو بود. با توجه به شکل اندازه ذرات در گستره‌ی ۳۰ تا ۷۰ نانومتر به دست آمده است. از نظر مرفولوژی ذرات تقریباً کروی بوده و مشابه هم هستند. از طرفی انباشتگی ذرات نیز در تصویر قابل مشاهده است. هنگامی که ذرات با اندازه‌های متفاوت در کنار یکدیگر قرار می‌گیرند باعث بوجود آمدن فضاهای متخلخل می‌شوند که باعث تخریب‌پذیری سریع‌تر می‌شوند. در اینجا نیز این پدیده مشاهده می‌شود.

دامنه بهینه از ولتاژ، افزایش ولتاژ باعث کشیده شدن بیشتر زنجیره‌های پلیمری و در نتیجه الیافی نازک‌تر با منافذ بزرگتر و درون‌مرتبطی بهتر حاصل می‌شود. همچنین نتایجی که از طریق برنامه نویسی مطلب برای محاسبه میزان حجم تخلخل‌ها بدست آمد [۱۴] نشان می‌دهد حجم تخلخل‌ها در تمامی داربست‌ها بالای ۸۰٪ می‌باشد و بیشترین حجم تخلخل متعلق به لایه اول است و با پیشروی به سمت لایه دوم و سوم از میزان آن‌ها کاسته می‌شود (جدول ۳). نتیجه دیگری که از محاسبه میزان تخلخل‌ها می‌توان گرفت این است که اثر تغییر ولتاژ بر روی داربست‌هایی با غلظت‌های یکسان قابل صرف‌نظر است.

با توجه به نتایج تصاویر SEM و نتایج مربوط به جدول (۳)، داربست پلیمری S₁ به دلیل داشتن الیافی با قطر نانو، حجم بالای تخلخل (۸۴٪) و درون‌مرتبطی خوب تخلخل‌ها، برای تهیه داربست نانوکامپوزیتی انتخاب گردید. در واقع نانوذرات شیشه زیست‌فعال با درصدهای وزنی ۷/۵، ۱۰ و ۱۵ به محلول ۶ درصد وزنی پلی‌هیدروکسی‌بوتیرات اضافه شدند.



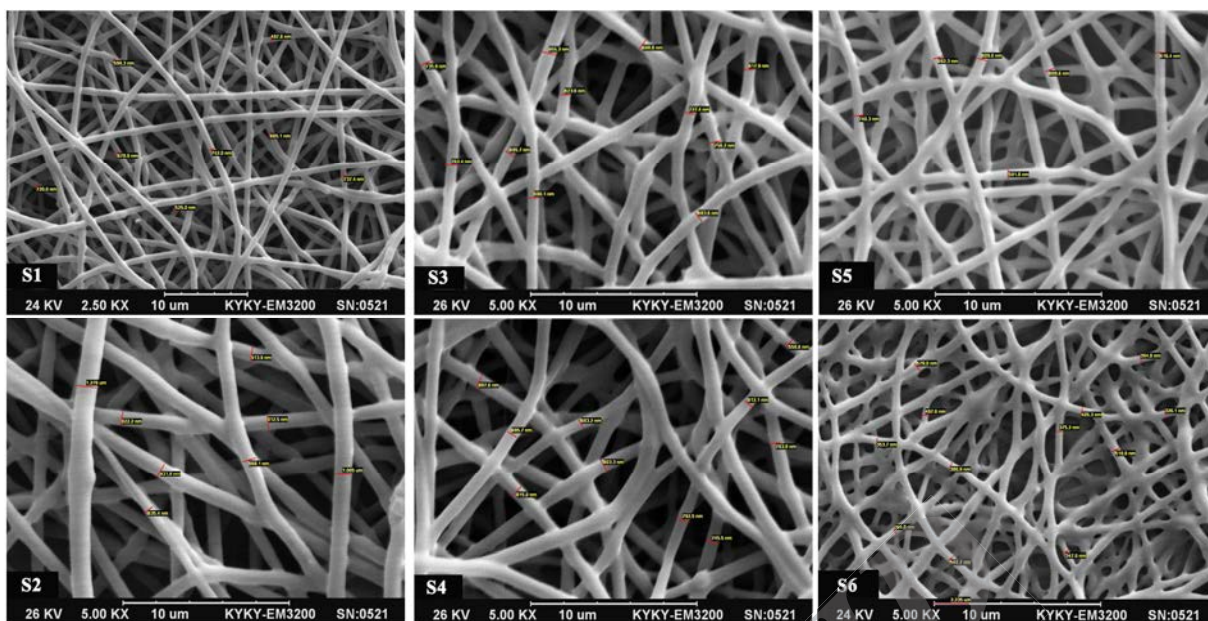
شکل ۲- تصاویر FESEM نانوذرات شیشه زیست‌فعال.

جدول ۳. میزان حجم تخلخل در داربست‌های پلیمری (%).

نام نمونه	تخلخل لایه اول	تخلخل لایه دوم	تخلخل لایه سوم
S ₁	۸۴/۰۹	۵۱/۶۵	۲۰/۲۶
S ₂	۸۲/۲۷	۵۳/۵۰	۲۱/۷۷
S ₃	۸۱/۹۲	۵۱/۱۷	۲۱/۸۱
S ₄	۸۲/۶۲	۵۲/۲۵	۲۳/۷۰
S ₅	۸۳/۹۴	۴۸/۰۸	۲۰/۸۳
S ₆	۸۳/۷۷	۵۰/۶۶	۱۹/۸۲

۳-۲-۳- تصاویر SEM داربست‌های پلیمری

برای بدست آوردن شرایط بهینه برای ساخت داربست‌های نانوکامپوزیتی، ۶ داربست پلیمری با غلظت‌های متفاوت از پلیمر و اعمال ولتاژ متفاوت تهیه شد. شکل (۳) تصاویر SEM بدست آمده از این داربست‌ها را نشان می‌دهد. نتایج حاکی از آن است که با افزایش غلظت محلول پلیمری، قطر الیاف افزایش می‌یابد و درون‌مرتبطی تخلخل‌ها تا حدودی کاهش می‌یابد. از طرف دیگر ولتاژ اعمالی از پارامترهای مؤثر در فرآیند الکتروریسی است اما در اولویت دوم قرار دارد و اثر آن به اندازه غلظت محلول نیست. می‌توان گفت در یک



شکل ۳. تصاویر SEM از داربست‌های فیبری PHB بدون گره که با قطر الیاف بین $1/276 \mu\text{m}$ و $326/1 \text{nm}$. نمونه‌های انتخاب شده دارای غلظت پلیمری و ولتاژ اعمالی به ترتیب (S1) 6 kv ، $6\% \text{ wt}$ (S2) 9 kv ، $6\% \text{ wt}$ (S3) 12 kv ، $5\% \text{ wt}$ (S4) $8/5 \text{ kv}$ ، $4\% \text{ wt}$ (S5) 8 kv ، $4\% \text{ wt}$ (S6) 6 kv می باشند.

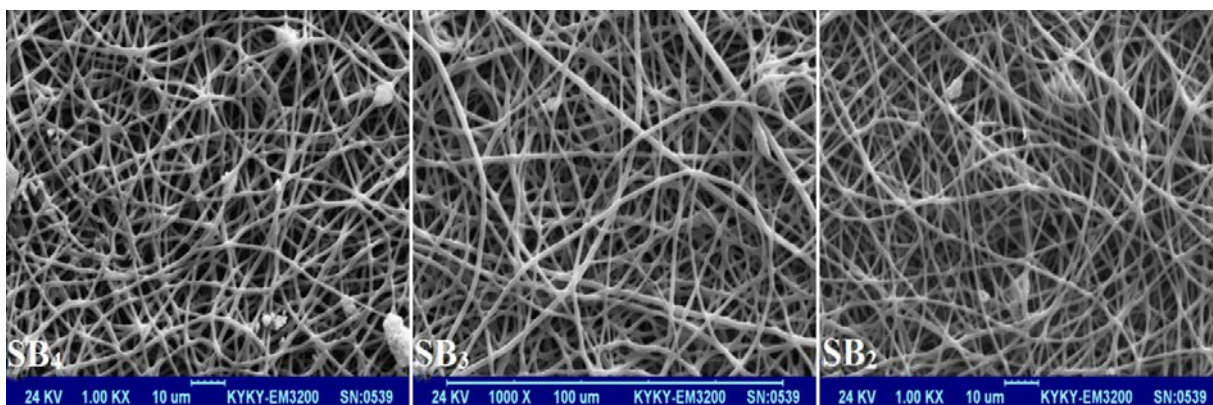
پیوند ضعیفی که با پلیمر برقرار می‌کنند هنگام اعمال تنش شکسته و نقاط تمرکز تنش را تشکیل می‌دهند در نتیجه باعث افت خواص مکانیکی می‌شوند. میزان حجم تخلخل‌های داربست‌های نانوکامپوزیتی نیز از طریق برنامه نویسی مطلب محاسبه شد. همان‌طور که در جدول (۴) مشاهده می‌شود با افزایش ذرات شیشه حجم تخلخل‌ها در لایه اول کاهش می‌یابد اما تغییرات آن بسیار ناچیز و قابل صرف‌نظر است. نکته قابل توجه این است که تمامی داربست‌ها دارای حجم تخلخل بالا (۹۴٪) بوده و با حرکت از لایه اول به لایه سوم میزان تخلخل‌ها کاهش می‌یابد. تاثیر بسیار اندک مقدار نانو ذرات شیشه بر روی حجم تخلخل‌ها می‌تواند نقطه قوتی برای این داربست‌ها محسوب شود.

جدول ۴. میزان حجم تخلخل‌ها در داربست‌های نانوکامپوزیتی بر حسب درصد.

نام نمونه	تخلخل لایه اول	تخلخل لایه دوم	تخلخل لایه سوم
SB _۱	۹۴،۹۴	۸۴،۱۴	۷۳،۱۳
SB _۲	۹۴،۵۰	۸۴،۴۴	۷۴،۶۳
SB _۳	۹۴،۳۶	۸۴،۲۸	۷۴،۴۵

۳-۳-۳- تصاویر SEM از داربست نانوکامپوزیتی PHB/nBG

برای اثبات حضور ذرات شیشه زیست‌فعال بر روی الیاف داربست پلیمری و همچنین بررسی اثر این ذرات با درصدهای وزنی متفاوت بر روی مورفولوژی الیاف، از داربست‌های نانوکامپوزیتی SB_۲، SB_۳، SB_۴ که به ترتیب دارای ۷/۵، ۱۰ و ۱۵ درصد وزنی از ذرات شیشه‌های زیست‌فعال بودند به‌طور جداگانه تصاویر SEM گرفته شد (شکل ۴). همان‌طور که در شکل مشاهده می‌شود حضور ذرات بر روی الیاف کاملاً مشخص است. در واقع در این شکل‌ها ساختار نانوکامپوزیتی الیافی PHB/nBG دیده می‌شود که نانوذرات شیشه بر روی الیاف پلیمری قرار گرفته‌اند. حضور ذرات شیشه زیست‌فعال بر روی این الیاف باعث زیست‌فعال شدن این داربست‌ها می‌شود و نتیجه آن شکل گرفتن پیوند مناسب بین بافت میزبان و داربست است اما با افزایش بیش از حد مقدار وزنی ذرات شیشه زیست‌فعال پدیده آگلومره شدن رخ می‌دهد که تصویر نمونه SB_۴ در شکل (۴) این پدیده را به‌طور واضح نشان می‌دهد. برای نمونه SB_۳ نیز آگلومره شدن رخ می‌دهد اما میزان آن کم است. ایجاد نقاط توده‌ای شکل به شدت بر روی خواص مکانیکی داربست تاثیر گذار است و به دلیل ایجاد

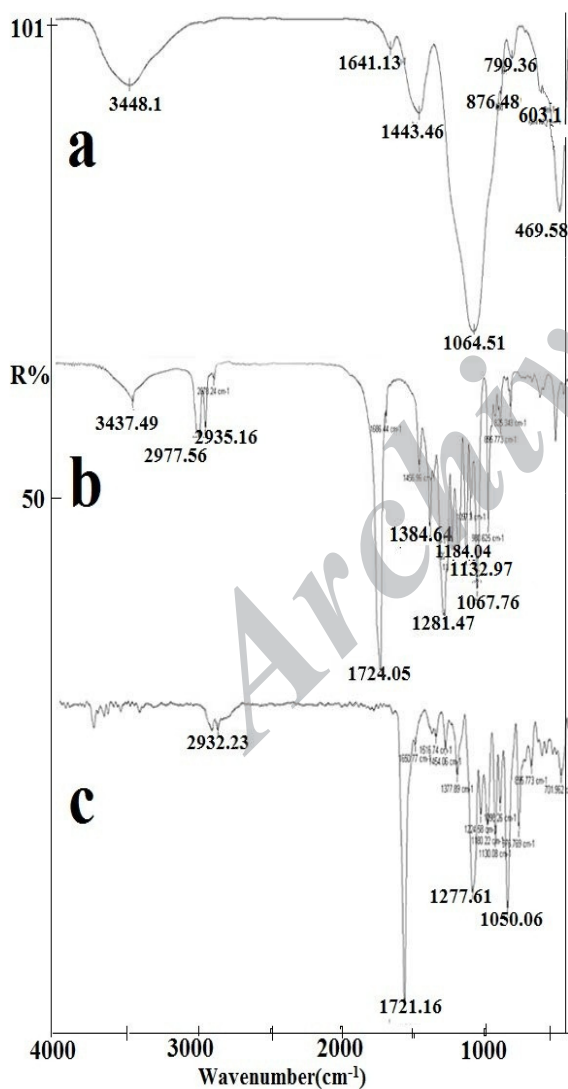


شکل ۴- تصاویر SEM نانو کامپوزیت های PHB/Bioglass

۴-۳- نتایج FTIR

نشان دهنده برقراری پیوند بین گروه کربونیل پلیمر و Ca-O شیشه زیست فعال است [۱۶].

شکل (۵) نمودار (a) نتایج طیف IR شیشه زیست فعال را نشان می دهد. به طور کلی ۴ پیک اصلی در آن دیده می شود. پیک ۱۰۴۰ تا ۱۱۰۰ مربوط به ارتعاشات کششی پیوند غیر متقارن Si-O-Si و پیک ۷۹۳ تا ۸۱۴ متعلق به ارتعاشات کششی پیوند متقارن Si-O-Si می باشد. جذب در محدوده ۹۵۰ مربوط به پیوند Ca-O-Si بوده [۱۵] و پیوند O-H و آب جذب شده در محدوده ۳۴۳۰ مشاهده می شود. پیک ۲۳۶۲ مربوط به CO₂ اتمسفر می باشد [۱۶] و پیوند Ca-O نیز در محدوده ۶۴۰ تا ۶۷۰ مشاهده می شود.



شکل ۵. نتایج طیف FTIR (a) پودر شیشه زیست فعال (b) پلیمر PHB/nBG کامپوزیت (c) PHB

شکل (۵) نمودار (b) مربوط به نتایج طیف IR پلیمر پلی هیدروکسی بوتیرات است. در این نمودار کلیه پیک های بین ۸۰۰ تا ۱۰۰۰ بر سانتی متر مربوط به پیوندهای C-C می باشد. جذب در ۱۱۳۳ مربوط به ارتعاشات کششی نامتقارن C-O-C و در ۱۱۸۴ مربوط به ارتعاشات کششی متقارن این پیوند بوده و همچنین پیک ۱۳۸۴ مربوط به گروه متیل CH₃ می باشد. در ۱۷۲۴ بر سانتی متر، پیوند گروه کربونیل ظاهر می شود [۱۸]. پیک مربوط به گروه های انتهایی هیدروکسیل را می توان در محدوده ۳۶۸۰-۳۱۰۰ بر سانتی متر مشاهده کرد.

نتایج طیف IR از داربست نانوکامپوزیتی در شکل (۵) (c) نشان داده شده است. با توجه به شکل می توان نشانه هایی از برهمکنش بین پلیمر و شیشه مشاهده کرد. به عنوان نمونه پیک مربوط به کربونیل کوچکتر شده به طوری که به عدد موجی ۱۷۲۱ انتقال یافته است که این نشان دهنده برقراری پیوندهای هیدروژنی بین گروه کربونیل پلیمر با گروه های هیدروکسیل و فسفات شیشه زیست فعال می باشد. با توجه به نتایج مطالعات قبلی می توان گفت جابجایی بعضی از پیک ها

۴- نتیجه گیری

در این پژوهش داربست‌های الیافی نانوکامپوزیتی PHB/Bioglass ساخته شده به روش الکتروریسی مورد ارزیابی قرار گرفتند. صرف‌نظر از میزان نانوذرات شیشه زیست‌فعال تقریباً تمامی داربست‌ها دارای ساختار متخلخل از نوع درون‌مرتبط با حجم تخلخل بالای ۹۴ درصد می‌باشند. همچنین ذرات شیشه بر روی نانو الیاف توزیع شدند و فقط زمانی که میزان آن‌ها به ۱۰ درصد وزنی و بالاتر از آن افزایش یابد پدیده آگلومره شدن مشاهده می‌شود. نتایج FTIR نیز بیانگر برهمکنش خوب ذرات شیشه با الیاف پلیمری در فصل مشترک می‌باشد که نتیجه آن ایجاد خواص مکانیکی مطلوب برای داربست‌ها می‌باشد. بدیهی است با افزایش نانوذرات شیشه به دلیل رخ دادن پدیده آگلومره شدن با افت خواص روبرو می‌شویم. نهایتاً می‌توان گفت داربست الیافی نانوکامپوزیتی PHB/Bioglass با ۷/۵ درصد نانوذرات شیشه به دلیل داشتن شرایط بهینه می‌تواند پیشنهاد خوبی برای تحقیق و بررسی بیشتر به منظور استفاده در مهندسی بافت استخوان باشد.

مراجع

- nanocomposite fibrous scaffolds of P3HB/nHA for bone tissue engineering", 17th Annual Conference on Biomedical Engineering, Isfahan, Iran, 2010.
- Knowles, J. C., Mahmud, F. A., Hastings, G. W., "Piezoelectric characteristics of a polyhydroxybutyrate-based composite", *Clinical Materials*, 1990, 8, 155-158.
- Mortazavi, V., Mehdikhani Nahrkhalaji, M., Fathi, M. H., Mousavi, S. B., Nasr Esfahani, B., "Antibacterial effects of sol-gel-derived bioactive glass nanoparticle on aerobic bacteria", *J Biomed Mater Res A*, 2010, 94, 160-168.
- Fathi, M.H., Doost Mohammadi, A., "Preparation and characterization of sol-gel bioactive glass coating for improvement of biocompatibility of human body implant", *Materials Science and Engineering: A*, 2008, 474, 128-133.
- Guan, D., Chen, Z., Huang, Ch., Lin, Y., "Attachment, proliferation and differentiation of BMSCs on gas-jet/electrospun nHAP/PHB fibrous scaffolds", *Applied Surface Science*, 2008, 255, 324-327.
- Sombatmankhong, K., Sanchavanakit, N., Pavasant, P., Supaphol, P., "Bone Scaffolds from Electrospun Fiber Mats of Poly(3-Hydroxybutyrate), Poly(3-Hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) and their Blend", 2007, 48, 1419-1427.
- Paşcu, I. E., Stokes, J., McGuinness, B. G., "Electrospun Composites of PHBV, Silk Fibroin and Nano-Hydroxyapatite for Bone Tissue Engineering", *Materials Science and Engineering*, 2013, 4905-4916.
- Taherani, A. H., Zadhoush, A., Karbasi, S., Sadeghi, H., Abadi, A., " Scaffold Percolative efficiency: in vitro evaluation of the structural for electrospun mats", *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, 2010, 21, 2989-2998.
- Ghasemi-Mobarakeh, L., Semnani, D., Morshed, M., "A Novel Method for Porosity Measurement of Various Surface Layers of Nanofibers Mat Using Image Analysis for Tissue Engineering Applications", *Journal of Applied Polymer Science*, 2007, 106, 2536-2542.
- Pappas, G. S., Liatsi, P., Kartsonakis, I. A., Danilidis, I., Kordas, G., "Synthesis and characterization of new SiO₂-CaO hollow nanospheres by sol-gel method: Bioactivity of the new system", *Journal of Non-Crystalline Solids*, 2008, 354, 755-760.
۱۶. ه. حاجی علی، "سنتر و ارزیابی خواص مکانیکی، تخریب پذیری و زیست‌فعالی داربست‌های کامپوزیتی پلی هیدروکسی بوتیرات/نانو ذرات شیشه زیست فعال جهت مهندسی بافت استخوان"، دانشکده مهندسی مواد، دانشگاه علم و صنعت ایران، ۱۳۸۹.
- Shajan, X. S., Mahadevan, C., " FT-IR spectroscopic and thermal studies on pure and impurity added calcium tartrate tetrahydrate crystals", *Cryst Res Technol*, 2005, 40, 598-602.
- Xua, J., Guoa, B. H., Yanga, R., Wub, Q., Chenb, G. Q., Zhang, Z. M., "In situ FTIR study on melting and crystallization of Polyhydroxyalkanoates". *Polymer*, 2002, 43, 6893-6899.
۱۹. ز. ناظمی، "بررسی اثر ضدباکتریایی نانوذرات شیشه زیست‌فعال و روی - کلسیم فسفات دوفازی"، دانشکده مهندسی مواد، دانشگاه سمنان، ۱۳۹۲.
۲۰. ا. حیدرخان تهرانی، " ساخت داربست‌های نانوکامپوزیتی پلی هیدروکسی بوتیرات / هیدروکسی آپاتیت به روش الکتروریسی و به منظور استفاده در مهندسی بافت"، دانشکده مهندسی صنایع، دانشگاه صنعتی اصفهان، ۱۳۸۹.
۲۱. ا. نساچی، دانشگاه صنعتی اصفهان، ۱۳۸۹.
- Hajali, H., Karbasi, S., Hosseinalipour, M., Rezaie, H. R., "preparation of a novel biodegradable nanocomposite scaffold based on poly (3-hydroxybutyrate) / bioglass nanoparticles for bone tissue engineering", *Journal of Material science:Materials in Medicine*, 2010, 21, 2125-2132.
- Nemati Hayati, M. Hosseinalipour, H. R. Rezaie, M.A. Shokrgozar, "Characterization of poly(3-hydroxybutyrate)/nano-hydroxyapatite composite scaffolds fabricated without the use of organic solvents for bone tissue engineering applications", *Materials Science and Engineering: C*, 2012, 32, 416-422.
- Saadat, A., Behnamghader, A. A., Karbasi, S., Abedi, D., Soleimani, M., Shafiee, A., "Comparison of Acellular and Cellular Bioactivity of Poly 3-hydroxybutyrate/hydroxyapatite Nanocomposite and Poly 3-hydroxybutyrate Scaffolds", *Biotechnology and Bioprocess Engineering*, 2012.
- Hajiali, H., Hosseinalipour, M., Karbasi, S., Shokrgozar, M. A., " The influence of bioglass nanoparticles on the biodegradation and biocompatibility of poly (3-hydroxybutyrate) scaffolds", 2012.
- Guo-Qiang Chen, Qiong Wu, "The application of polyhydroxyalkanoates as tissue engineering materials", *Biomaterials*, 2005, 26, 6565-6578.
- A. H. Taherani, A. H., Zadhoush, A., Karbasi, S., "Preparing