

## ارزیابی خواص ساختاری و رفتار سلولی داربست الکترورسی شده آلیازی پلی(هیدروکسی بوتیرات) / کیتوسان به منظور کاربرد در مهندسی بافت غضروف

داود صادقی<sup>۱</sup>، دکتر سعید کرباسی<sup>۲</sup>، دکتر شاهین بنگدار<sup>۳</sup>، دکتر شهناز رضوی<sup>۴</sup>

### مقاله پژوهشی

### چکیده

**مقدمه:** دستیابی به داربستی با خواص مطلوب، یکی از چالش‌های پیش روی مهندسی بافت می‌باشد. پلی‌هیدروکسی بوتیرات (PHB) یا پلیمرها، به تازگی مورد توجه محققین قرار گرفته است. البته، خواصی نظیر آبدوستی کم و تردی آن باعث می‌شود تا به صورت خالص برای ساخت داربست مهندسی بافت غضروف مناسب نباشد. از جمله راه‌کارهای حل این مشکل، آلیاژسازی آن با سایر پلیمرهاست. هدف از انجام این پژوهش، تهیه داربست‌های الکترورسی شده آلیازی پلی‌هیدروکسی بوتیرات/کیتوسان و بررسی خواص ساختاری و رفتار سلولی آن‌ها بود.

**روش‌ها:** ابتدا محلول‌های پلیمری PHB با استفاده از حلال تری‌فلورواستیک اسید (TFA یا Trifluoroacetic acid) تهیه و الکترورسی شد. پس از بهینه‌سازی پارامترها، جهت بهبود خاصیت آبدوستی و استحکام مکانیکی، کیتوسان با درصدهای مختلف به محلول پلیمری اضافه و الکترورسی شد. به منظور ارزیابی داربست‌ها، از تصویربرداری میکروسکوپ الکترونی (SEM یا Scanning electron microscope)، آزمون استحکام کششی، آنالیز طیف‌سنجی با پرتو مادون قرمز به روش تبدیل فوریه (FTIR یا Fourier transform infrared)، تعیین زاویه‌ی تماس، و تخلخل‌سنجی استفاده شد. سپس با توجه به نتایج، داربست‌های حاوی ۱۵ و ۲۰ درصد کیتوسان به عنوان داربست‌های بهینه انتخاب شد و تحت آزمون‌های سلولی با استفاده از سلول‌های کندروسیت خرگوش قرار گرفت.

**یافته‌ها:** تصاویر میکروسکوپ الکترونی نشان داد که بهترین داربست، از نظر یک‌نواختی قطر الیاف، با استفاده از محلول PHB با غلظت ۹ درصد وزنی و با ولتاژ ۲۱ کیلوولت و در فاصله‌ی ۱۵ سانتی‌متری بین سر سوزن و صفحه‌ی جمع‌کننده به دست می‌آید؛ داربست‌های حاوی ۱۰، ۱۵ و ۲۰ درصد کیتوسان الیاف یک‌نواخت‌تری نسبت به داربست ۵ درصد داشتند. با توجه به نتایج سایر آزمون‌ها مشخص شد که نمونه‌های حاوی ۱۵ و ۲۰ درصد کیتوسان، از خواصی بهینه برخوردارند. تصاویر میکروسکوپ الکترونی نشان‌دهنده‌ی چسبندگی مناسب سلول‌های کندروسیت بر روی این داربست‌ها بود.

**نتیجه‌گیری:** با افزودن کیتوسان به PHB می‌توان خواص مکانیکی و بیولوژیک و آبدوستی داربست‌های PHB را بهبود بخشید.

**واژگان کلیدی:** مهندسی بافت غضروف، پلی‌هیدروکسی بوتیرات، کیتوسان، الکترورسی

**ارجاع:** صادقی داود، کرباسی سعید، بنگدار شاهین، رضوی شهناز. ارزیابی خواص ساختاری و رفتار سلولی داربست الکترورسی شده

آلیازی پلی(هیدروکسی بوتیرات)/کیتوسان به منظور کاربرد در مهندسی بافت غضروف. مجله دانشکده پزشکی اصفهان ۱۳۹۴؛ ۳۳

(۳۴۹): ۱۴۵۸-۱۴۴۱

۱- کارشناس ارشد، گروه بیومواد، نانوتکنولوژی و مهندسی بافت، دانشکده‌ی فناوری‌های نوین پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران

۲- دانشیار، گروه بیومواد، نانوتکنولوژی و مهندسی بافت، دانشکده‌ی فناوری‌های نوین پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران

۳- استادیار، بانک سلولی ایران، انستیتو پاستور ایران، تهران، ایران

۴- استاد، گروه علوم تشریحی، دانشکده‌ی پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران

## مقدمه

آسیب دیدن و یا از دست رفتن بافت‌های بدن، از جمله بافت غضروف، در اثر عواملی همچون بیماری‌ها و صدمات، یکی از مشکلات مهم سلامت بشری می‌باشد. بافت غضروف به دلیل نداشتن رگ خونی و عصب، دارای خاصیت خود ترمیمی اندکی است و در مواردی که به هر دلیل، آسیبی به آن وارد آید، ضایعه‌ای ماندگار و یا طولانی مدت به جای می‌گذارد که بسته به مورد، باعث ایجاد ناتوانی و یا ساختار و شکل نامتناسب در عضو می‌گردد. در حال حاضر، انواع مختلفی از پیوند غضروف، شامل استفاده از غضروف خود فرد (Autograft)، استفاده از غضروف فرد دیگر (Allograft) و استفاده از بافت غضروفی حیوانات (Xenograft)، جهت درمان آسیب‌های وسیع غضروفی استفاده می‌شود. البته هر کدام از این روش‌ها، در کنار مزایایی که دارند، معایبی نیز دارند که کاربرد آن‌ها را با محدودیت روبه‌رو می‌کند.

مهندسی بافت، رویکردی نوین است که در سال‌های اخیر، به منظور برطرف نمودن این محدودیت‌ها و بازسازی بافت‌های آسیب دیده، مورد توجه قرار گرفته است. طبق تعاریف رایج، مهندسی بافت علمی چند دانشی است که اصول مهندسی و علوم طبیعی را به منظور ساخت و توسعه‌ی جایگزین‌های بیولوژیکی به کار می‌برد تا بافت‌های بدن را ترمیم یا بازسازی کند و یا عملکرد آن‌ها را بازگرداند و یا بهبود بخشد (۱-۳).

مهندسی بافت، شامل رشد دادن سلول‌های خاص درون یک زمینه‌ی برون سلولی (Extracellular matrix) به منظور پدید آوردن

ساختاری مشابه با بافت یا ارگان طبیعی می‌باشد. در این روش، به طور معمول، داربستی سه بعدی به منظور شبیه‌سازی زمینه‌ی برون سلولی طبیعی برای چسبندگی اولیه‌ی سلول‌ها (Initial cell attachment) به سطح، و نیز تکثیر سلولی (Proliferation) استفاده می‌شود (۴).

در مهندسی بافت، سلول‌ها بر روی داربستی سه بعدی کشت می‌شوند که در نهایت، این داربست به طور کامل تخریب می‌شود و بافت جدید جایگزین آن می‌شود. بنا بر این، خطر وجود یک جسم خارجی در محل کاشت و التهابات شدید ناشی از آن از بین می‌رود (۴).

تا کنون بسیاری از پلیمرها و سرامیک‌های زیست‌تخریب‌پذیر به عنوان داربست‌های زیست‌سازگار در مهندسی بافت استفاده شده‌اند (۵-۶).

در بین پلیمرهای زیست‌تخریب‌پذیر، پلی‌هیدروکسی‌آلکانوات‌ها به دلیل زیست‌تخریب‌پذیری و سازگاری بهتر، همراه با خواص فیزیکی و مکانیکی مناسب، بیشتر مورد توجه قرار گرفته است. این گروه پلی‌استری، توسط میکروارگانسیم‌ها به روش‌های متفاوت سنتز و تولید می‌شود (۷-۸). پلی‌هیدروکسی‌بوتیرات (PHB) یا Polyhydroxybutyrate، از جمله پلیمرهای جدید این خانواده می‌باشد که بیشتر مورد توجه مهندسان بافت قرار گرفته است (۹). از جمله مزایای این پلیمر، می‌توان به زیست‌سازگاری به نسبت خوب و استحکام مکانیکی بالا در مقایسه با سایر پلیمرها اشاره نمود، اما در کنار مزایایی که این پلیمر دارد، معایبی نظیر آبدوستی کم و نرخ تخریب پایین آن، باعث محدود شدن کاربرد آن در مهندسی بافت می‌شود (۱۰-۱۱).

مکانیکی و رفتار سلول‌های کندروسیت بر روی آن‌ها مورد ارزیابی قرار گرفت.

### روش‌ها

پودر پلی(۳-هیدروکسی بوتیرات) ( $M_w = 300000$ , CAS number = 3-00-26063) با منشأ طبیعی و کیتوسان با وزن مولکولی متوسط و درجه‌ی دی‌استیلاسیون ۷۵-۸۵ درصد از شرکت Sigma Aldrich ایالات متحده‌ی آمریکا خریداری شد. تری‌فلورواستیک اسید با درصد خلوص بیش از ۹۹ درصد و دانسیته‌ی ۱/۴۹ گرم بر میلی‌لیتر از شرکت Carlo Erba خریداری شد. محیط‌های کشت DMEM (Dulbecco's modified eagle medium) و Ham's F12 از شرکت GIBCO اسکاتلند خریداری شدند.

همچنین، سرم جنین گاوی (FBS) یا (Fetal bovine serum) از شرکت Seromed آلمان تهیه شد. پودر MTT (3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide) تریپسین، ال-گلوتامین و گلوکارآلدهید نیز از شرکت Sigma Aldrich ایالات متحده‌ی آمریکا خریداری شدند. به منظور طراحی آزمایش‌ها، از نرم‌افزار MiniTab ۱۶ استفاده شد. همچنین، به منظور آنالیز تصاویر، از نرم‌افزار Image J 1.44p استفاده گردید.

ساخت داربست‌های آلیاژی الکتروریسی شده: ابتدا جهت بهینه‌سازی عوامل تأثیرگذار بر خواص داربست‌ها نظیر غلظت، ولتاژ و فاصله، محلول‌های PHB با غلظت‌های مختلف الکتروریسی شد. به این منظور، محلول‌های PHB ساخته شده، بر روی پمپ

تا کنون روش‌های مختلفی برای برطرف نمودن این محدودیت‌ها استفاده شده است؛ که از جمله‌ی آن‌ها، می‌توان به کامپوزیت‌سازی با سرامیک‌های زیست‌فعال، آلیاژسازی با سایر پلیمرها و یا پوشش‌دهی آن‌ها بر روی ساختارهای سرامیکی اشاره نمود. تا کنون، پلیمرهای زیست‌تخریب‌پذیر مختلفی جهت آلیاژسازی با پلی‌هیدروکسی بوتیرات به منظور برطرف نمودن معایب آن استفاده شده‌اند، اما به طور شاخص، هر کدام باعث برطرف نمودن یکی از معایب PHB شده‌اند. کیتوسان، پلیمری طبیعی و آب‌دوست است که دارای نرخ تخریب به نسبت بالایی است. به نظر می‌رسد آلیاژسازی PHB با کیتوسان راهکاری مناسب جهت برطرف نمودن معایب PHB و بهره‌مندی از خواص مطلوب PHB و کیتوسان می‌باشد.

علاوه بر ترکیب‌بندی شیمیایی داربست مورد استفاده در مهندسی بافت، ساختار آن نیز نقش مهمی در نیل به اهداف مورد نظر ایفا می‌کند. از این رو، داربست‌های الکتروریسی شده به جهت تشابهی که با بافت غضروف دارند، بیشتر مورد توجه قرار گرفته‌اند.

از این رو، در پژوهش حاضر، داربست‌های الکتروریسی شده‌ی آلیاژی پلی‌هیدروکسی بوتیرات/کیتوسان جهت کاربرد در مهندسی بافت غضروف، مورد بررسی قرار گرفته‌اند. هدف از پژوهش حاضر، بهبود خواص آب‌دوستی و زیست‌تخریب‌پذیری PHB از طریق آلیاژ کردن آن با کیتوسان بود. بدین منظور، از حلال تری‌فلورواستیک اسید (TFA یا Trifluoroacetic acid) به عنوان حلال مشترک PHB و کیتوسان استفاده شد و محلول‌های پلیمری الکتروریسی شد. پس از ساخت داربست‌ها، مورفولوژی، آب‌دوستی، استحکام

همچنین، ولتاژ مناسب نیز ۹ و ۱۳ کیلوولت تشخیص داده شد. مقدار فاصله در محدوده‌ی ۵-۱۵ سانتی‌متر و دبی خروجی در محدوده‌ی ۵ میلی‌لیتر بر ساعت در نظر گرفته شد. لازم به ذکر است که در این قسمت، جهت ساخت نمونه‌ها از طراحی آزمایش توسط الگوریتم Taguchi استفاده شد (جدول ۱).

از روی تصاویر میکروسکوپ الکترونی (SEM) یا (Scanning electron microscope) نمونه‌ها، مشخص گردید که نمونه‌ی شماره‌ی ۵ یکنواخت‌ترین الیاف را در مقایسه با نمونه‌های دیگر دارد. بنا بر این، به عنوان نمونه‌ی بهینه انتخاب شد. در مرحله‌ی بعد، به منظور بهینه‌سازی بیشتر نمونه‌ی انتخاب شده، محلول ۹ درصد وزنی از PHB، با فواصل و ولتاژهای مختلف (جدول ۲) الکترورسی شد. تصاویر SEM نشان دادند که نمونه‌ی الکترورسی شده با ولتاژ ۲۱ کیلوولت در فاصله‌ی ۱۵ سانتی‌متری، از الیافی یکنواخت‌تر نسبت به بقیه‌ی نمونه‌ها برخوردار است. بنا بر این، همین شرایط به عنوان بهینه‌ترین شرایط برای تولید نمونه انتخاب گردید و درصدهای مختلف کیتوسان (۵، ۱۰، ۱۵ و ۲۰ درصد) نیز به همین نمونه اضافه گردید و الکترورسی شد (جدول ۳).

تزریق افقی قرار گرفت و سپس به سر سرنگ، سوزن (با قطر گیج ۲۱) وصل و در نهایت قطب مثبت منبع تغذیه، بدان متصل گردید و در روبه‌روی سرنگ نیز ورقه‌ای از فویل آلومینیوم بر روی جمع‌کننده قرار گرفت و قطب منفی منبع تغذیه به آن متصل شد. از آن جایی که جهت تولید یک لایه‌ی بهینه از الیاف یکنواخت می‌بایست پارامترهای متعددی را مورد بررسی قرار داد، قبل از انجام آزمایش‌های اصلی جهت ثابت نگه داشتن بعضی از پارامترها به بررسی آن‌ها پرداخته شد. اثر پارامترها از جمله غلظت، ولتاژ مصرفی، فاصله‌ی نوک سوزن تا جمع‌کننده، در یک سری آزمایش‌های جداگانه بر روی مورفولوژی و قطر الیاف حاصل مورد بررسی قرار گرفت.

جهت دسترسی به محدوده‌ی مجاز غلظت، قبل از شروع آزمایش از غلظت پایین پلی‌هیدروکسی بوتیرات (۴ درصد وزنی) استفاده شد. در غلظت‌های ۴، ۵، و ۶ درصد وزنی به دلیل پایین بودن ویسکوزیته‌ی محلول ریسیده نمی‌شد. همچنین، امکان حل کردن غلظت‌های بالاتر از ۱۰ درصد وزنی نیز وجود نداشت. بنا بر این، محدوده‌ی ۷-۱۰ درصد وزنی به عنوان محدوده‌ی مناسب در نظر گرفته شد.

جدول ۱. آزمایش‌های طراحی شده با الگوریتم Taguchi و با استفاده از نرم‌افزار MiniTab

شماره نمونه	غلظت محلول PHB (wt.%)	ولتاژ (KV)	فاصله (cm)
۱	۷	۹	۷
۲	۷	۱۳	۱۴
۳	۸	۹	۷
۴	۸	۱۳	۱۴
۵	۹	۱۳	۷
۶	۹	۹	۱۴
۷	۱۰	۱۳	۷
۸	۱۰	۹	۱۴

PHB: Polyhydroxybutyrate

جدول ۲. لیست آزمایش‌های انجام شده بر روی غلظت ۹ درصد وزنی از محلول PHB (Polyhydroxybutyrate) خالص

شماره‌ی نمونه	غلظت PHB (wt.%)	ولتاژ (KV)	فاصله (cm)
۵-۱	۹	۹	۱۱
۵-۲	۹	۱۳	۷
۵-۳	۹	۱۳	۱۵
۵-۴	۹	۱۷	۱۱
۵-۵	۹	۱۷	۱۵
۵-۶	۹	۲۱	۷
۵-۷	۹	۲۱	۱۱
۵-۸	۹	۲۱	۱۵

PHB: Polyhydroxybutyrate

جدول ۳. نمونه‌های حاوی درصدهای مختلف کیتوسان

شماره‌ی نمونه	غلظت PHB (wt.%)	درصد کیتوسان	ولتاژ (KV)	فاصله (cm)
a	۹	۵	۲۱	۱۵
b	۹	۱۰	۲۱	۱۵
c	۹	۱۵	۲۱	۱۵
d	۹	۲۰	۲۱	۱۵

PHB: Polyhydroxybutyrate

اندازه‌گیری دانسیته و تخلخل سنجی نمونه‌ها: جهت اندازه‌گیری دانسیته‌ی داربست‌های الکتروریسی‌شده و تعیین درصد تخلخل آن‌ها، از هر داربست نمونه‌ای با ابعاد ۱ × ۲ سانتی‌متر مربع تهیه شد و با استفاده از ترازو، وزن آن‌ها اندازه‌گیری شد. همچنین، ضخامت نمونه‌ها توسط دستگاه ضخامت‌سنج تعیین شد. سپس با استفاده از فرمول‌های ۱ و ۲، دانسیته و درصد تخلخل نمونه‌ها محاسبه گردید. لازم به ذکر است که برای هر نمونه، سه بار تکرار در نظر گرفته شد و مقادیر اندازه‌گیری شده به صورت میانگین گزارش شد.

(فرمول ۱)

$$\text{دانسیته‌ی داربست} = \frac{\text{جرم داربست}}{\text{ضخامت داربست} \times \text{مساحت داربست}}$$

میکروسکوپ الکترونی روبشی: در این پژوهش، جهت بررسی قطر الیاف و مورفولوژی داربست‌های الکتروریسی‌شده، از هر نمونه ابعاد ۱ × ۱ سانتی‌متر مربع آماده گردید و با طلا پوشش‌دهی شد و با استفاده از دستگاه میکروسکوپ الکترونی TESCAN مدل VegaII تصاویر مربوط تهیه شدند. اندازه‌گیری زاویه‌ی تماس با قطره‌ی آب: این آزمون، جهت تعیین میزان آب‌دوستی نمونه‌ها انجام شد. این آزمون، به صورت دستی انجام شد؛ به این صورت که یک قطره آب دی‌وئیزه روی سطح نمونه قرار داده شد و پس از ۲ ثانیه از قطره عکس گرفته شد. سپس این عکس به وسیله‌ی نرم‌افزار Image J 1.44p آنالیز و زاویه‌ی تماس تماس قطره محاسبه گردید.

(فرمول ۲)

$$\text{درصد تخلخل داربست} = \left( 1 - \frac{\text{دانسیته داربست}}{\text{دانسیته توده‌ای ماده}} \right) \times 100$$

در پتری دیش، مورد آنالیز قرار گرفت. این آنالیز، با استفاده از دستگاه طیف‌سنج مادون قرمز (Thermo nikolet) در دمای اتاق و نیز در دامنه  $4000-400 \text{ cm}^{-1}$  صورت گرفت.

جداسازی سلول‌های کندروسیت از غضروف مفصلی خرگوش: جهت جداسازی سلول‌های کندروسیت، ابتدا نمونه‌ای از غضروف مفصلی خرگوش جداسازی گردید. سپس به قطعات کوچک تبدیل شد و پس از چندین بار شستشو، با محیط کشت حاوی پنی سیلین-استرپتومایسین، به مدت ۲۴ ساعت تحت تأثیر آنزیم کلاژناز نوع II (۰/۱ میلی گرم بر میلی لیتر، شرکت Invitrogen) قرار گرفت. سپس سوسپانسیون سلولی به دست آمده، سانتریفیوژ شد و سلول‌های جداسازی شده به فلاسک انتقال یافتند.

بررسی چسبندگی سلول‌ها بر روی داربست‌ها: جهت بررسی چسبندگی و مورفولوژی سلول‌ها، سوسپانسیون سلولی بر روی سطح نمونه‌ها ریخته شد و به مدت چهار ساعت به سلول‌ها اجازه چسبیدن به سطح نمونه‌ها داده شد. سپس جهت تثبیت سلول‌های چسبیده بر روی نمونه‌ها، محلول گلو تار آلدهید ۴ درصد بر روی آن‌ها ریخته شد و به مدت ۳۰ دقیقه درون یخچال نگهداری شد. سپس سطح نمونه‌ها با (Phosphate buffered saline) PBS شستشو و سریع تخلیه شد و در آخر نیز، جهت از بین بردن نمک‌های باقی مانده از PBS، سطح نمونه‌ها با آب شستشو داده شد و سپس نمونه‌ها با درجات صعودی اتانول آب‌گیری شدند. بعد از آن، سطح نمونه‌ها خشک شدند و به منظور تهیه تصاویر میکروسکوپ الکترونی، با طلا پوشش‌دهی شدند.

بررسی خواص مکانیکی: برای انجام این آزمون بر روی نمونه‌های پیش گفته، از دستگاه Instron با لود سل ۵۰ N استفاده شد. به منظور آماده‌سازی نمونه‌ها جهت قرار دادن در فک دستگاه، ابتدا داربست‌های فیبری با ابعاد  $3 \times 0/5$  سانتی متر مربع تهیه و بر روی قالب مخصوص چسبانده شد. لازم به ذکر است که سرعت کرنش ۱۰ میلی متر در دقیقه در نظر گرفته شد و همچنین، ضخامت نمونه‌ها پس از اندازه‌گیری برای دستگاه تعریف شد و طول و عرض نمونه‌ها به ترتیب ۲ و ۰/۵ سانتی متر تعیین شد. با احتساب این مقادیر، دستگاه اقدام به کشش نمونه‌ها تا نقطه‌ی شکست نمود و نمودار تنش-کرنش آن‌ها رسم و استحکام هر کدام از نمونه‌ها مشخص شد.

طیف‌سنجی با پرتو مادون قرمز به روش تبدیل فوریه (FTIR یا Fourier transform infrared spectroscopy): این روش ابزاری قوی برای کسب اطلاعاتی نظیر بلورینگی و وجود برهم‌کنش‌های خاص در مورد سیستم‌های آلیاژی است. جهت بررسی برهم‌کنش‌های احتمالی بین پلی هیدروکسی بوتیرات و کیتوسان در نمونه‌های آلیاژی، سه نمونه برای این آنالیز تهیه و آماده‌سازی شد. نمونه‌ی اول داربست الکترورسی شده از جنس پلی هیدروکسی بوتیرات خالص بود. نمونه‌ی دوم، داربست آلیاژی حاوی ۲۰ درصد کیتوسان بود. نمونه‌ی سوم کیتوسان بود که به دلیل عدم قابلیت ریسندگی این پلیمر، ابتدا در تری فلورواستیک اسید حل شد و پس از خشک کردن

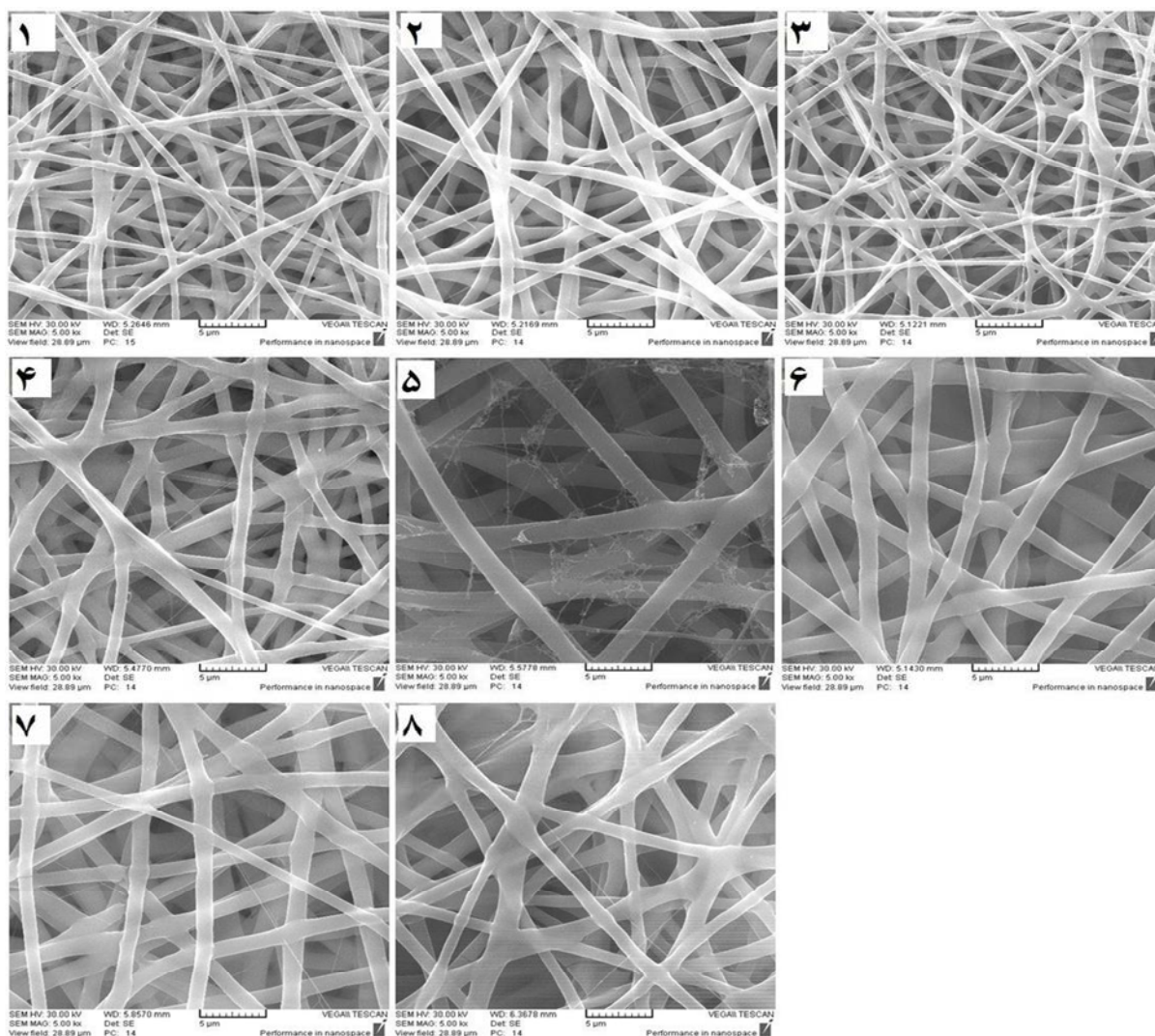
## یافته‌ها

## بررسی تصاویر میکروسکوپ الکترونی (SEM)

## داربست‌های فیبری

قطر الیاف نمونه‌ها آمده است. همان‌طور که در تصاویر مشاهده می‌شود، با افزایش غلظت محلول پلیمری، الیاف ضخیم‌تری تشکیل شد؛ که این به دلیل افزایش ویسکوزیته‌ی محلول می‌باشد. همچنین، در هر غلظت خاص، با افزایش ولتاژ، میزان یکنواختی الیاف کمتر شد و الیاف با قطر بیشتر به دست آمد.

چنانچه گفته شد، ابتدا محلول‌های PHB با غلظت‌های ۵-۱۰ درصد وزنی با فاصله‌ها و ولتاژهای مختلف الکتروریسی شد. تصاویر این نمونه‌ها در شکل ۱ آمده است. در شکل ۲، اندازه‌ی

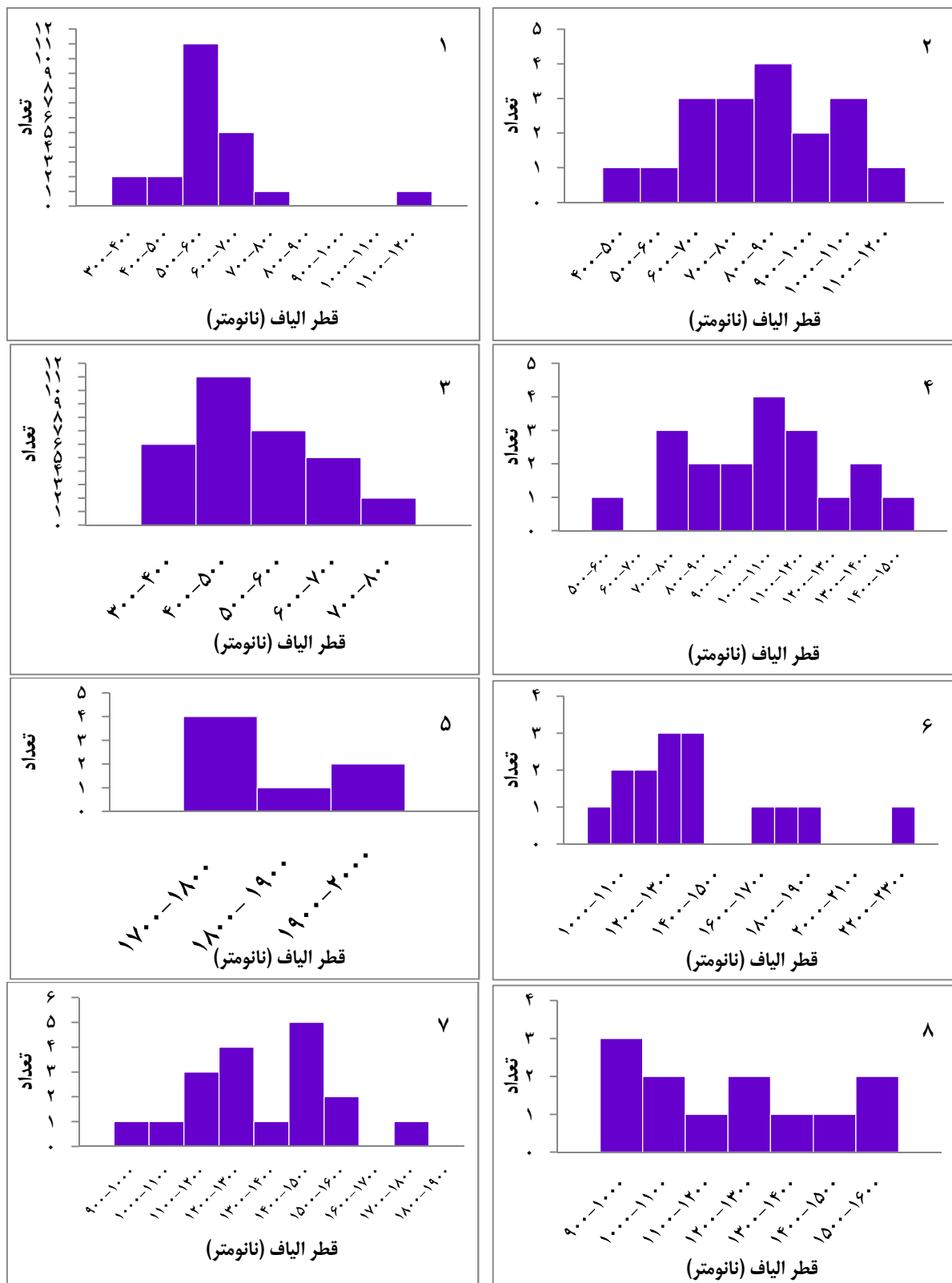


شکل ۱. تصاویر میکروسکوپ الکترونی مربوط به نمونه‌های (Polyhydroxybutyrate) PHB خالص طراحی شده با الگوریتم Taguchi:

(۱)  $D = 7, V = 9$  و  $PHB = 7$  (۲)  $D = 14, V = 13$  و  $PHB = 7$  (۳)  $D = 7, V = 9$  و  $PHB = 8$  (۴)  $D = 14, V = 13$  و  $PHB = 8$

(۵)  $D = 7, V = 13$  و  $PHB = 9$  (۶)  $D = 7, V = 13$  و  $PHB = 9$  (۷)  $D = 14, V = 9$  و  $PHB = 10$  (۸)  $D = 14, V = 9$

$PHB = 10$

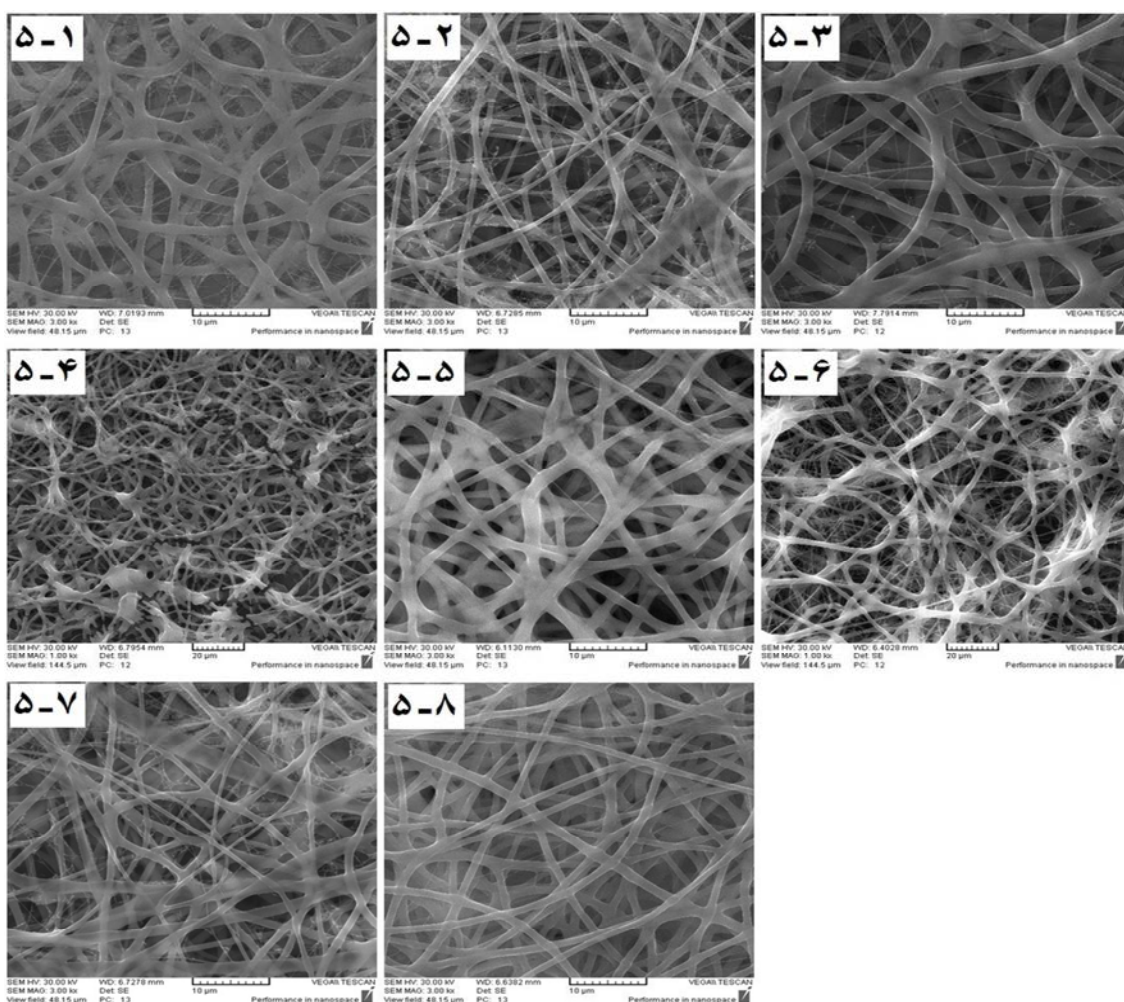


شكل ٢. نمودارهاى مربوط به قطر الياف نمونه‌هاى الكترويسى شده PHB (Polyhydroxybutyrate) خالص: (١)  $D = 7, V = 9$  و (٢)  $D = 14, V = 13$  (٣)  $D = 7, V = 9$  و  $D = 14, V = 13$  (٤)  $D = 14, V = 13$  و  $D = 14, V = 13$  (٥)  $D = 7, V = 13$  و  $D = 14, V = 13$  (٦)  $D = 14, V = 9$  و  $D = 14, V = 9$  (٧)  $D = 7, V = 13$  و  $D = 14, V = 9$  (٨)  $D = 14, V = 9$  و  $D = 14, V = 9$



تصاویر نمونه‌های ۱-۵ تا ۸-۵ نیز در شکل ۳ آمده است. همان‌طور که مشاهده می‌شود، در نمونه‌های ۴-۵ و ۶-۵، علاوه بر الیاف، تعداد زیادی بید هم تشکیل شده است. شاید این پدیده به علت مناسب نبودن فاصله‌ها و ولتاژهای به کار گرفته شده برای الکتروریسی این نمونه‌ها باشد. همچنین، در سایر نمونه‌ها، به جز نمونه‌ی ۸-۵، الیافی غیر همگن به دست آمده است که نشان دهنده‌ی مناسب نبودن پارامترهای الکتروریسی برای غلظت‌های مختلف می‌باشد.

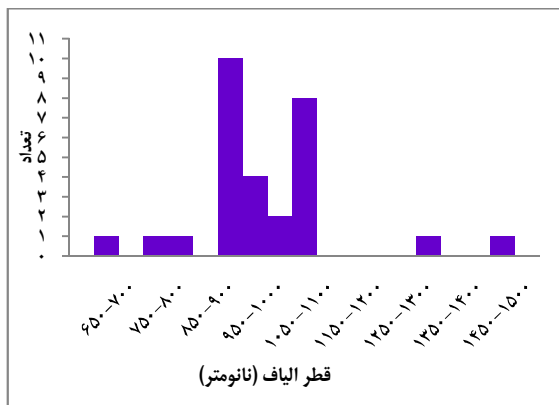
از طرفی، با افزایش فاصله‌ی سر سوزن سرنگ با صفحه‌ی جمع‌کننده نیز قطر الیاف و یکنواختی آن‌ها کاهش یافت. همچنین، با توجه به تصاویر SEM، مشخص شد که در هیچ کدام از نمونه‌ها بید تشکیل نشده است. اما به طور کلی، الیاف به دست آمده در تمامی نمونه‌ها، به جز نمونه‌ی شماره‌ی ۵، از نظر توزیع اندازه، غیر یکنواخت بودند. یکنواخت‌ترین الیاف به دست آمده، مربوط به نمونه‌ی شماره‌ی ۵ بود که الیاف با قطری در حدود ۱/۸۱۱ میکرومتر داشت.



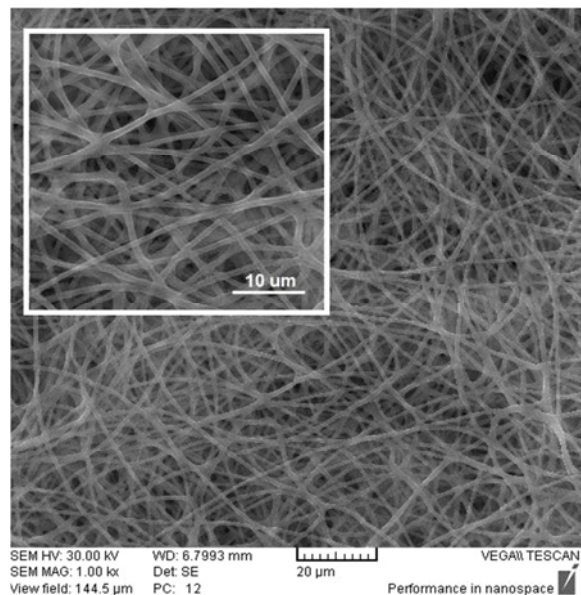
شکل ۳. تصاویر میکروسکوپ الکترونی مربوط به نمونه‌های (Polyhydroxybutyrate) PHB خالص (۹ درصد وزنی) با فاصله‌ها و ولتاژهای مختلف: (۵-۱)  $D = 11, V = 9$  (۵-۲)  $D = 7, V = 13$  (۵-۳)  $D = 7, V = 13$  (۵-۴)  $D = 15, V = 17$  (۵-۵)  $D = 11, V = 17$  (۵-۶)  $D = 15, V = 17$  (۵-۷)  $D = 7, V = 21$  (۵-۸)  $D = 11, V = 21$  (۵-۷)  $D = 7, V = 21$  (۵-۸)  $D = 11, V = 21$

آب‌گریز است. به طور کلی، چنانچه زاویه‌ی تماس برای سطحی بیش از ۷۰ درجه باشد، آن را آب‌گریز و چنانچه زاویه‌ی تماس کمتر از ۷۰ درجه باشد، آن را آب‌دوست می‌گویند. پس از اختلاط این دو پلیمر، انتظار می‌رود آب‌دوستی داربست حاصل بیشتر از PHB خالص باشد. در جدول ۴، زاویه‌ی تماس نمونه‌های مختلف آمده است. همان‌طور که مشاهده می‌شود، با افزایش میزان کیتوسان در نمونه‌ها بین ۲۰-۰ درصد، زاویه‌ی تماس نمونه‌ها از ۷۶ درجه که مربوط به داربست PHB خالص است، به ۵۳ درجه می‌رسد که مربوط به نمونه‌ی حاوی ۲۰ درصد کیتوسان است. بنا بر این، همان‌طور که انتظار می‌رفت، با افزودن کیتوسان، آب‌دوستی نمونه‌ها افزایش یافت.

یکنواخت‌ترین الیاف مربوط به نمونه‌ی ۵-۸ می‌باشد که تصویری دیگر از این نمونه در شکل ۴ دیده می‌شود. بنا بر این، نمونه‌ی ۵-۸ به عنوان نمونه‌ی بهینه انتخاب شد و درصدهای مختلف کیتوسان (۲۰-۵ درصد) به آن اضافه گردید. نمودار قطر الیاف نمونه‌ی ۵-۸ در شکل ۵ آمده است که بیانگر یکنواخت بودن الیاف می‌باشد. تصاویر مربوط به نمونه‌های a تا d نیز در شکل ۶ نشان آمده است. همچنان که مشاهده می‌شود، در تمامی نمونه‌ها الیاف به طور تقریبی یکنواخت، تشکیل شده‌اند و بید وجود ندارد. همان‌طور که در شکل ۶ مشاهده می‌شود، نمونه‌های حاوی ۱۰، ۱۵ و ۲۰ درصد کیتوسان، الیاف یکنواخت‌تری نسبت به نمونه‌ی حاوی ۵ درصد کیتوسان دارند.



شکل ۵. نمودار توزیع اندازه‌ی قطر الیاف نمونه‌ی ۵-۸



شکل ۴. تصویر میکروسکوپ الکترونی مربوط به نمونه‌ی ۵-۸ با

دو بزرگ‌نمایی مختلف

### دانسیته و درصد تخلخل داربست‌ها

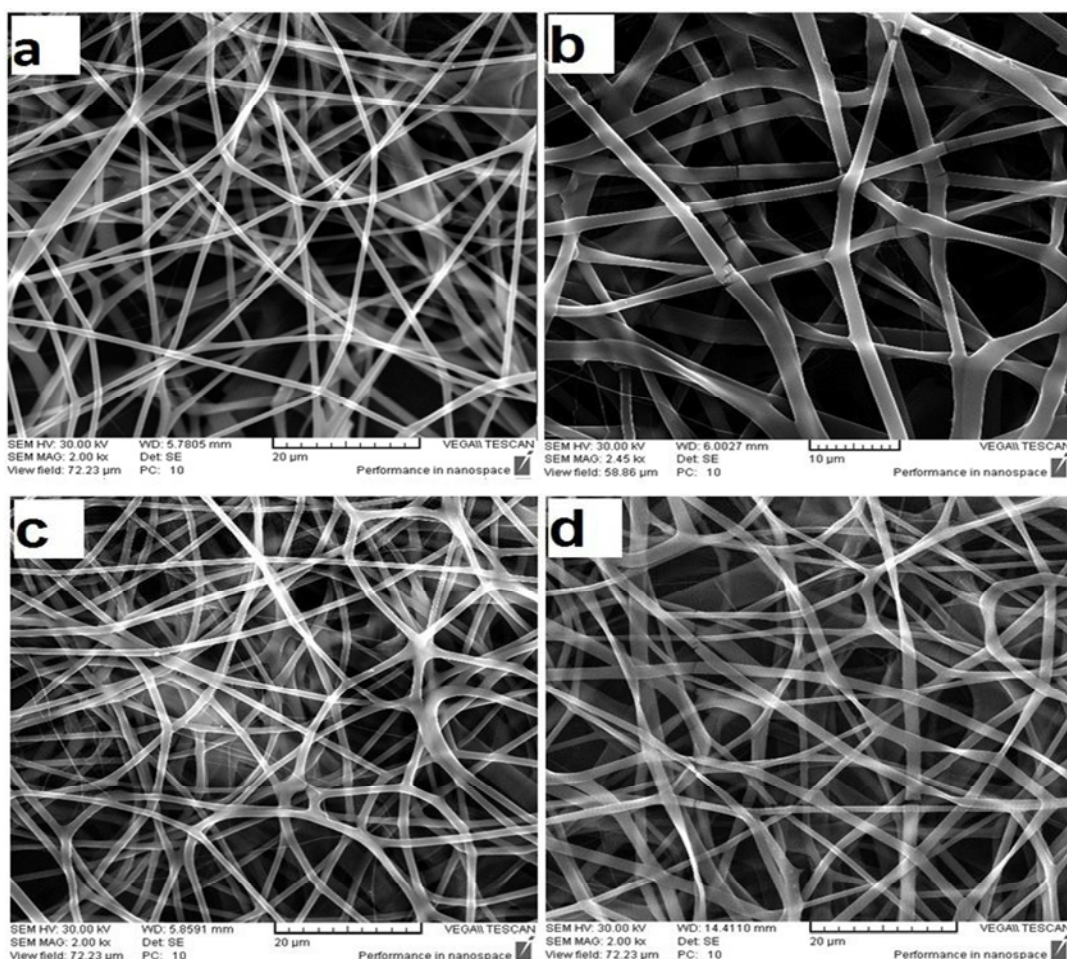
جهت اندازه‌گیری دانسیته و درصد تخلخل داربست‌ها، ابتدا از هر داربست نمونه‌ای با ابعاد ۲ × ۱ سانتی‌متر مربع تهیه شد و با استفاده از ترازو، وزن آن‌ها اندازه‌گیری شد. همچنین، ضخامت نمونه‌ها توسط دستگاه ضخامت‌سنج

### نتایج آزمون زاویه‌ی تماس با قطره‌ی آب

کیتوسان، پلیمری آب‌دوست و PHB پلیمری

میلی لیتر در نظر گرفته شد (۱۳-۱۲). با استفاده از فرمول‌های ۱ و ۲، دانسیته و درصد تخلخل داربست‌ها محاسبه گردید.

تعیین شد که در جدول ۵ نتایج آن گزارش شده است. همچنین، دانسیته‌ی توده‌ای برای پلیمرهای PHB و کیتوسان، به ترتیب ۱/۲۴ و ۰/۳۰ گرم بر



شکل ۶. تصاویر مربوط به نمونه‌های PHB (Polyhydroxybutyrate) (۹ wt%) حاوی (a) ۵٪ کیتوسان، (b) ۱۰٪ کیتوسان، (c) ۱۵٪ کیتوسان و (d) ۲۰٪ کیتوسان

جدول ۴. زوایای تماس قطره‌ی آب با نمونه‌های بهینه‌سازی شده.

نمونه	زاویه‌ی تماس راست (درجه)	زاویه‌ی تماس چپ (درجه)
PHB	۷۶/۰۶	۷۶/۰۲
a	۶۴/۸۷	۶۵/۰۰
b	۶۳/۹۱	۶۳/۹۸
c	۶۰/۰۱	۵۹/۹۸
d	۵۳/۲۲	۵۳/۰۳

PHB: Polyhydroxybutyrate

جدول ۵. نتایج مربوط به اندازه‌گیری دانسیته و درصد تخلخل داربست‌های الکترورسی شده.

نمونه	وزن نمونه (گرم)	ضخامت (میلی‌متر)	مساحت (میلی‌تر مربع)	درصد تخلخل (%)	دانسیته‌ی داربست (گرم بر میلی‌لیتر)	دانسیته‌ی توده‌ای (گرم بر میلی‌لیتر)
PHB	۲/۴۹۷	۰/۵۴	۲۰	۸۱/۳۵	۰/۲۳۱	۱/۲۴۰
a	۱/۹۰۰	۰/۵۱	۲۰	۸۳/۶۳	۰/۱۹۶	۱/۱۹۸
b	۱/۴۵۵	۰/۵۶	۲۰	۸۸/۷۶	۰/۱۲۹	۱/۱۵۶
c	۱/۳۸۶	۰/۵۲	۲۰	۸۸/۰۳	۰/۱۳۳	۱/۱۱۴
d	۱/۲۸۲	۰/۵۴	۲۰	۸۸/۹۲	۰/۱۱۸	۱/۰۷۲

PHB: Polyhydroxybutyrate

بین مقدار مدول در نمونه‌های دارای کیتوسان مشاهده نشد. در عین حال، چقرمگی و بیشینه‌ی کشش داربست‌ها، با افزایش کیتوسان افزایش یافت؛ به طوری که مقدار آن از ۱۶۳۴/۰۱۹ که مربوط به داربست PHB خالص است، به ۲۴۶۸/۴۳۴ که مربوط به داربست حاوی ۲۰ درصد کیتوسان است، افزایش یافت.

بنا بر این، طبق پیش‌بینی صورت گرفته، با افزودن کیتوسان به پلی‌هیدروکسی بوتیرات، میزان استحکام کششی و Young's modulus کاهش می‌یابد و از طرف دیگر، بیشینه‌ی کشش و چقرمگی افزایش می‌یابد. بر اساس نتایج به دست آمده از تصاویر میکروسکوپ الکترونی و آزمون‌های تخلخل‌سنجی، زاویه‌ی تماس با آب و استحکام مکانیکی، مشخص شد که نمونه‌های حاوی ۱۵ و ۲۰ درصد کیتوسان، دارای خواص بهینه می‌باشند. بنا بر این، به عنوان نمونه‌های اصلی برای آزمون سلولی انتخاب شدند.

#### بررسی نتایج طیف‌سنجی با پرتو مادون قرمز به روش تبدیل فوریه (FTIR)

روش FTIR ابزاری قوی برای کسب اطلاعاتی نظیر بلورینگی و وجود برهم‌کنش‌های خاص در مورد سیستم‌های آلیاژی است. شکل ۸، طیف FT-IR پلیمرهای PHB، کیتوسان و آلیاژ آن‌ها را نشان می‌دهد.

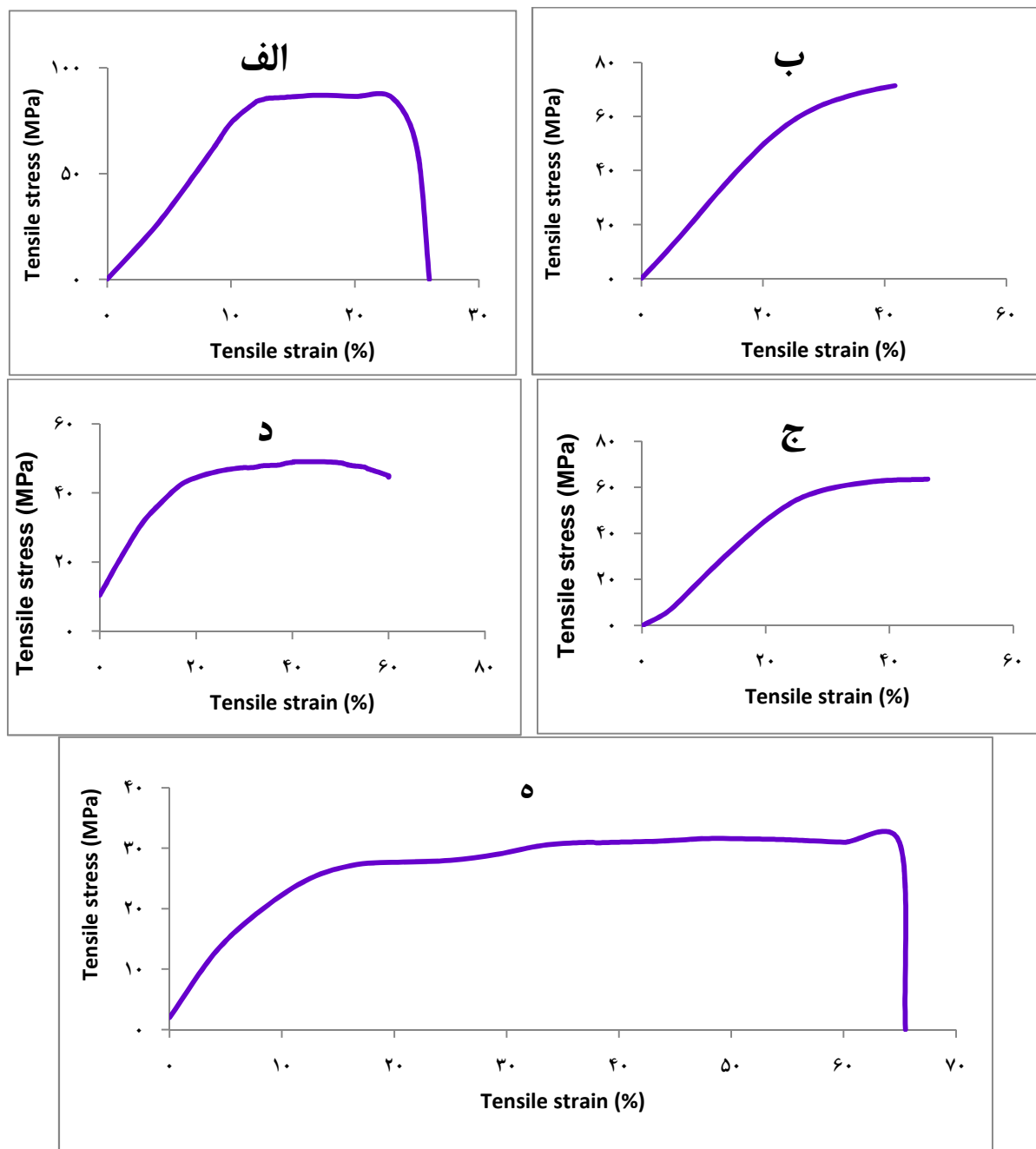
#### نتایج آزمون استحکام کششی داربست‌ها

پلی‌هیدروکسی بوتیرات، پلیمری ترد است که میزان تردی آن وابسته به درجه‌ی بلورینگی آن است. در مقایسه، کیتوسان پلیمری انعطاف‌پذیر است که با افزودن آن به پلی‌هیدروکسی بوتیرات، می‌توان از طریق تنظیم درجه‌ی بلورینگی پلی‌هیدروکسی بوتیرات، میزان تردی و خواص کششی آن را تغییر داد. نمودارهای تنش- کرنش مربوط به نمونه‌های a تا d در شکل ۷ آمده است. با توجه به شکل ۷ و جدول ۶، یک ارتباط خطی میان مقدار کیتوسان در نمونه‌ها با میزان استحکام کششی، Young's modulus، بیشینه‌ی کشش و چقرمگی (مقاومت مواد در برابر شکست در اثر اعمال تنش) داربست‌ها مشاهده می‌شود. استحکام کششی داربست‌های الکترورسی شده، از ۸۷ مگاپاسکال، که مربوط به داربست PHB خالص است، به ۳۱/۶ مگاپاسکال، که مربوط به نمونه‌ی حاوی ۲۰ درصد کیتوسان است، کاهش یافت.

همچنین، Young's modulus نمونه‌ها، با افزودن ۵ درصد کیتوسان، از ۷۴/۴۵ به ۵۱/۳۴ رسید، اما با افزایش بیشتر کیتوسان تا ۲۰ درصد، مقدار مدول افزایش یافت و به ۵۹/۷۴ رسید، اما اختلاف معنی‌داری

طیف PHB، یک پیک مشخصه‌ی برجسته دارد که مرکز آن در حدود  $1731 \text{ cm}^{-1}$  قرار گرفته است و می‌توان آن را به جذب کششی گروه کربونیل ( $\text{C=O}$ ) مربوط دانست. به علاوه، پیک‌های موجود در مربوط به ارتعاش متقارن گروه  $\text{CH}_3$  می‌باشد.

طیف PHB، یک پیک مشخصه‌ی برجسته دارد که مرکز آن در حدود  $1731 \text{ cm}^{-1}$  قرار گرفته است و می‌توان آن را به جذب کششی گروه کربونیل ( $\text{C=O}$ ) مربوط دانست. به علاوه، پیک‌های موجود در مربوط به ارتعاش متقارن گروه  $\text{CH}_3$  می‌باشد.

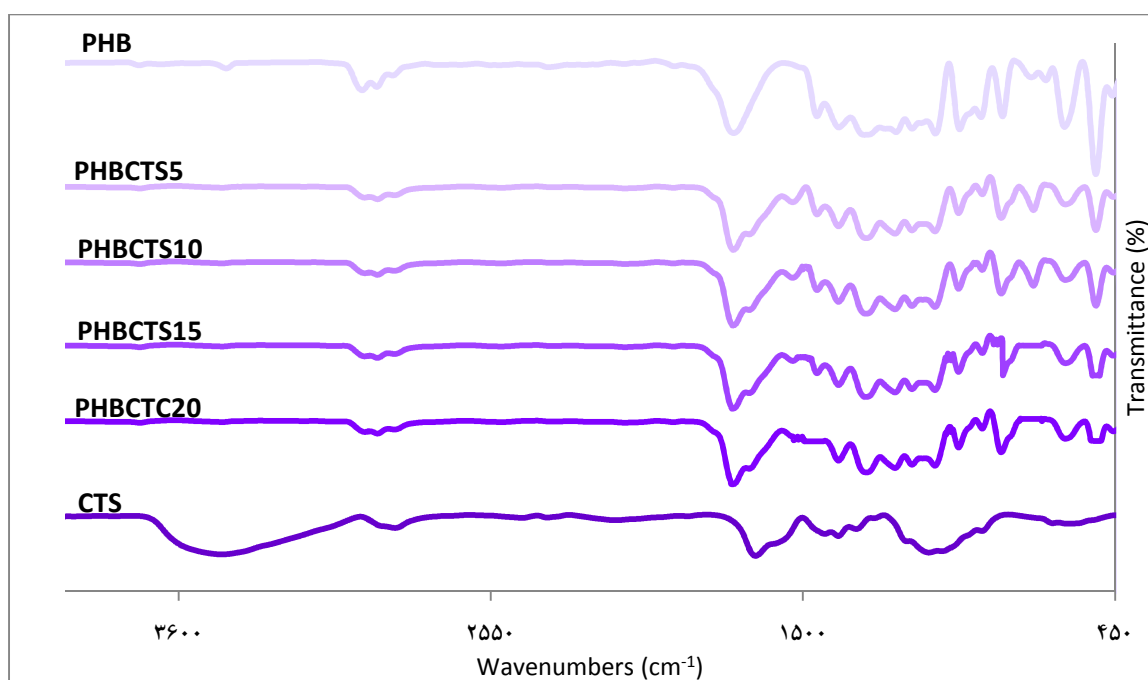


شکل ۷. نمودار تنش- کرنش مربوط به نمونه‌های: الف) PHB (Polyhydroxybutyrate) خالص، ب) PHB/کیتوسان ۵٪، ج) PHB/کیتوسان ۱۰٪، د) PHB/کیتوسان ۱۵٪، ه) PHB/کیتوسان ۲۰٪

جدول ۶. نتایج کمی مربوط به آزمون کشش داربست‌ها

نمونه	بیشینه‌ی کشش (درصد)	چقرمگی	Young's modulus (MPa)	استحکام کششی (MPa)
PHB	۲۶/۰۰	۱۶۳۴/۰۱۹	۷۴/۴۵	۸۷/۰۰
a	۴۱/۶۶	۱۸۷۵/۱۵۲	۵۱/۳۴	۷۱/۳۷
b	۴۶/۰۰	۱۹۸۳/۴۵۲	۵۲/۷۹	۶۳/۶۶
c	۶۰/۰۰	۲۴۶۰/۰۱۲	۵۷/۸۰	۴۹/۰۶
d	۶۵/۵۰	۲۴۶۸/۴۳۴	۵۹/۷۴	۳۱/۶۰

PHB: Polyhydroxybutyrate



شکل ۸. طیف FTIR (Fourier transform infrared spectroscopy) داربست PHB خالص، کیتوسان و داربست‌های آلیاژی (Polyhydroxybutyrate/Chitosan) PHB/CTS حاوی درصدهای مختلف کیتوسان

نیز به عدد موج‌های بالاتر جابه‌جا می‌شوند. حضور این پیک‌ها و ضعیف‌تر شدن آن‌ها در اثر افزایش کیتوسان، نشان دهنده‌ی وجود مرحله‌ی بلوری PHB، اما آمورف‌تر شدن ساختار می‌باشد.

#### بررسی سلول‌ها بر روی داربست‌های فیبری

در این بخش، مورفولوژی سلول‌های کندروسیت و برهم‌کنش سلول‌ها با داربست آلیاژی پلی هیدروکسی-بوتیرات/کیتوسان مورد بررسی قرار گرفت. همان‌طور که در شکل ۹ مشخص است، سلول‌های کندروسیت

کیتوسان در حدود  $3455\text{ cm}^{-1}$  و  $1660\text{ cm}^{-1}$  جذب‌های مشخصه‌ای دارد. پیک  $3455\text{ cm}^{-1}$  مربوط به کشش هیدروکسیل ( $\text{O-H}$ ) و کشش N-H است و  $1660\text{ cm}^{-1}$  مربوط به تغییر شکل (Deformation) N-H است که از گروه آمین ناشی می‌شود. با توجه به طیف مربوط به نمونه‌های حاوی کیتوسان، مشخص می‌شود که پیک کربونیل PHB موجود در  $1731\text{ cm}^{-1}$ ، به سمت عدد موج‌های بالاتر جابه‌جا می‌شود. به علاوه، پیک‌های موجود در  $1293\text{ cm}^{-1}$  و  $973\text{ cm}^{-1}$

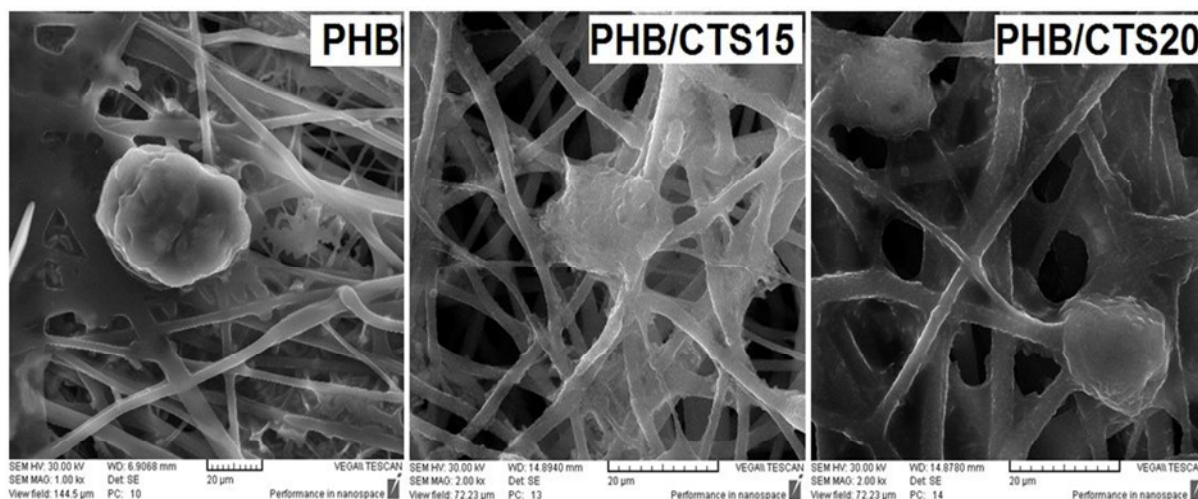
این یافته‌ها با نتایج حاصل از مطالعه‌ی Correia و همکاران مطابقت دارد. آنان در مطالعه‌ی خود با استفاده از حلال ترکیبی دی‌متیل فرمامید/کلروفرم (با نسبت ۷/۳) محلول‌های ۷ و ۱۰ درصد وزنی PHB را تهیه و الکتروریسی کردند. نتایج، نشان داد که غالب الیاف به دست آمده از محلول ۷ درصد وزنی در محدوده‌ی ۴۰۰-۶۰۰ نانومتر هستند. در حالی که غالب الیاف به دست آمده از محلول ۱۰ درصد وزنی، قطری بیشتر از ۱ میکرومتر داشتند (۱۴).

همچنین در مطالعه‌ی Wang و Tong، نیز نتایج مشابهی بدست آمد. آنان داربست‌های الکتروریسی شده‌ی کوپلیمر پلی (هیدروکسی بوتیرات-کو-هیدروکسی والرات) را تهیه کردند و تأثیر پارامترهای مختلف را بر قطر الیاف مورد بررسی قرار دادند. نتایج مطالعات آن‌ها نشان داد که افزایش غلظت و افزایش ولتاژ، هر کدام به طور جداگانه باعث افزایش قطر الیاف می‌شوند. همچنین، نشان دادند که با افزایش فاصله، قطر الیاف حاصل کاهش می‌یابد (۱۵).

با الیاف تمامی نمونه‌ها اتصال خوبی برقرار کردند، اما دو نکته‌ی اساسی در این تصاویر وجود داشت. در داربست فاقد کیتوسان، سلول کندروسیت به داربست چسبیده است، اما پهن نشده و به داخل ماتریس پلیمری داربست نیز نفوذ پیدا نکرده است. اما در داربست‌های حاوی ۱۵ و ۲۰ درصد کیتوسان، سلول‌ها علاوه بر اتصال به الیاف، بر روی آن‌ها پهن شده و به داخل ماتریس پلیمری نیز نفوذ پیدا کرده‌اند.

### بحث

نتایج حاصل از تصاویر میکروسکوپ الکترونی نشان داد با افزایش غلظت محلول پلیمری، الیاف ضخیم‌تری تشکیل می‌شود و در هر غلظت خاص، با افزایش ولتاژ، میزان یکنواختی الیاف کمتر می‌شود و الیاف با قطر بیشتر به دست می‌آید و همچنین، با افزایش فاصله‌ی سر سوزن سرنگ با صفحه‌ی جمع‌کننده، قطر الیاف و یکنواختی آن‌ها کاهش می‌یابد.



شکل ۹. تصاویر میکروسکوپ الکترونی سلول‌های کندروسیت تثبیت شده بر روی داربست‌های بهینه‌ی (Polyhydroxybutyrate) PHB خالص، Chitosan/PHB ۱۵٪، Chitosan/PHB ۲۰٪ پس از گذشت ۴ ساعت

همچنین، به نظر می‌رسد که نمونه‌های حاوی ۱۵ و ۲۰ درصد کیتوسان، دارای الیاف یکنواخت‌تری نسبت به نمونه‌های حاوی ۵ و ۱۰ درصد کیتوسان هستند. این پدیده را می‌توان این طور توجیه کرد که به طور کلی، محلول کیتوسان خالص به دلیل داشتن ویسکوزیته‌ی پایین، قابلیت الکتروریسی مطلوبی ندارد. بنا بر این، وقتی به محلول PHB اضافه می‌شود نیز ویسکوزیته را کاهش می‌دهد و باعث خوب ریسیده نشدن محلول آلیاژی و به دست آمدن الیاف نامناسب می‌شود. از طرف دیگر، کیتوسان به طور طبیعی دارای بار مثبت است.

بنا بر این، زمانی که کیتوسان به PHB اضافه می‌شود، به دلیل داشتن بار مثبت، تمایل محلول پلیمری را برای پرتاب شدن از سر سوزن سرنگ که به قطب مثبت متصل است، به سمت صفحه‌ی جمع کننده که به قطب منفی متصل است، افزایش می‌دهد و از این طریق، باعث بهبود فرایند الکتروریسی می‌شود. از طرفی، چون در ساخت محلول‌ها از حلال TFA استفاده شده است، گروه‌های آمین کیتوسان می‌توانند با TFA ترکیب شوند و نمک تشکیل دهند که این پدیده، به طور مؤثری باعث کمتر شدن برهم‌کنش‌های بین مولکولی در بین مولکول‌های کیتوسان می‌شود و الکتروریسی را تسهیل می‌کند (۱۶).

بنابراین، با افزایش مقدار کیتوسان در محلول آلیاژی، اثر نامطلوب کاهش ویسکوزیته در اثر افزودن کیتوسان جبران می‌شود و الیافی مناسب شکل می‌گیرند. همچنین، طبق پیش‌بینی صورت گرفته، با افزودن کیتوسان به PHB، آب‌دوستی آن افزایش یافت که نشان دهنده‌ی مؤثر بودن راهکار اعمال شده است. نتایج حاصل از آزمون استحکام کششی

داربست‌های آلیاژی، با نتایج حاصل از مطالعه‌ی Daranarong و همکاران که در آن داربست‌های آلیاژی پلی هیدروکسی بوتیرات/پلی (لاکتید-کو-کاپرولاکتون) تهیه شدند، مطابقت دارد. مطالعه‌ی آنان نشان داد که با افزایش میزان پلی (لاکتید-کو-کاپرولاکتون) در آلیاژ، استحکام کششی داربست‌ها کاهش و بیشینه‌ی کشش آن‌ها افزایش می‌یابد (۱۷).

همچنین، طیف‌های به دست آمده از آنالیز FTIR نشان دهنده‌ی کاهش مرحله‌ی بلوری PHB و افزایش مرحله‌ی آمورف آن در اثر افزودن کیتوسان می‌باشد. این پدیده، از تشکیل باندهای هیدروژنی درون مولکولی بین گروه‌های جانبی آمین در کیتوسان با گروه‌های کربونیل در PHB ناشی می‌شود که در نهایت، باعث کاهش بلورینگی در فیبرهای آلیاژی می‌شود. این نوع برهم‌کنش، به عنوان پل ارتباطی بین پلیمرها عمل می‌کند و امتزاج پذیری دو پلیمر را در آلیاژ تسهیل می‌کند.

Ikejima و همکاران نیز در مورد آلیاژهای PHB/کیتوسان به نتایج مشابهی دست یافتند. با این تفاوت که در آلیاژهایی که آن‌ها تهیه کردند، کیتوسان غالب بود. در مطالعه‌ی آنان نیز طیف‌های FTIR به دست آمده از آلیاژها، نشان داد که با افزایش کیتوسان (بیش از ۷۰ درصد)، پیک بلوری به طور کامل حذف و پیک آمورف ظاهر می‌شود. اما برای درصدهای کیتوسان زیر ۷۰ درصد، پیک گروه کربونیل مشاهده می‌شود و با افزایش مقدار کیتوسان در آلیاژ، پیک آمورف قوی‌تر می‌شود (۱۸).

نفوذ سلول‌های کندروسیت به بستر پلیمری الیاف در داربست‌های حاوی کیتوسان، نشان دهنده‌ی مناسب‌تر بودن آن‌ها برای سلول‌ها در مقایسه با



## تشکر و قدردانی

این مقاله حاصل پایان‌نامه‌ی دوره‌ی کارشناسی ارشد داود صادقی به شماره ۳۹۳۳۴۱ در دانشگاه علوم پزشکی اصفهان است. بدین وسیله از معاونت تحقیقات و فناوری این دانشگاه سپاسگزاری می‌نمایم. همچنین، از رئیس بخش بانک سلولی انستیتو پاستور ایران، جناب آقای دکتر محمد علی شکرگزار که در انجام این پژوهش ما را یاری رساندند، تشکر و قدردانی می‌شود.

داربست‌های فاقد کیتوسان است. همچنین، به نظر می‌رسد که تعداد سلول‌های چسبیده به داربست‌های حاوی کیتوسان در مقایسه با داربست فاقد کیتوسان، بیشتر است که نشان دهنده‌ی تمایل بیشتر سلول‌ها برای چسبیدن به داربست حاوی کیتوسان در مقایسه با داربست PHB خالص می‌باشد. بنا بر این، با افزودن کیتوسان به PHB، آب‌دوستی، خواص مکانیکی و رفتار بیولوژیکی آن بهبود می‌یابد.

## References

- Johnstone B, Alini M, Cucchiari M, Dodge GR, Eglin D, Guilak F, et al. Tissue engineering for articular cartilage repair--the state of the art. *Eur Cell Mater* 2013; 25: 248-67.
- Tuli R, Li WJ, Tuan RS. Current state of cartilage tissue engineering. *Arthritis Res Ther* 2003; 5(5): 235-8.
- Portocarrero G, Collins G, Livingston Arinze H. Challenges in cartilage tissue engineering. *J Tissue Sci Eng* 2013; 4(1): e120.
- Lanza R, Langer R, Vacanti J. Principles of tissue engineering. New York, NY: Academic Press; 2011.
- O'Brien FJ. Biomaterials and scaffolds for tissue engineering. *Materials Today* 2011; 14(3): 88-95.
- Gardin C, Ferroni L, Favero L, Stellini E, Stomaci D, Sivoletta S, et al. Nanostructured biomaterials for tissue engineered bone tissue reconstruction. *Int J Mol Sci* 2012; 13(1): 737-57.
- Chen GQ, Wu Q. The application of polyhydroxyalkanoates as tissue engineering materials. *Biomaterials* 2005; 26(33): 6565-78.
- Williams SF, Martin DP, Horowitz DM, Peoples OP. PHA applications: addressing the price performance issue: I. Tissue engineering. *Int J Biol Macromol* 1999; 25(1-3): 111-21.
- Misra SK, Valappil SP, Roy I, Boccaccini AR. Polyhydroxyalkanoate (PHA)/inorganic phase composites for tissue engineering applications. *Biomacromolecules* 2006; 7(8): 2249-58.
- Doyle C, Tanner ET, Bonfield W. In vitro and in vivo evaluation of polyhydroxybutyrate and of polyhydroxybutyrate reinforced with hydroxyapatite. *Biomaterials* 1991; 12(9): 841-7.
- Luklinska ZB, Schluckwerder H. In vivo response to HA-polyhydroxybutyrate/polyhydroxyvalerate composite. *J Microsc* 2003; 211(Pt 2): 121-9.
- Godoi FC, Pereira NR, Rocha SCS. Analysis of the drying process of a biopolymer (polyhydroxybutyrate) in rotating-pulsed fluidized bed. *Chemical Engineering and Processing: Process Intensification* 2015; 50(7): 623-9.
- Badwan A, Al-Remawi M. Chitosan-silicon dioxide coprecipitate and use as excipient in solid dosage forms [Google Patents: CA 2616470 A1]. 2006.
- Correia DM, Ribeiro C, Ferreira JCC, Botelho G, Ribelles JLG, Lanceros-Mendez S, et al. Influence of electrospinning parameters on poly(hydroxybutyrate) electrospun membranes fiber size and distribution. *Polym Eng Sci* 2014; 54(7): 1608-17.
- Tong HW, Wang M. Electrospinning of Poly(Hydroxybutyrate-co-hydroxyvalerate) Fibrous Scaffolds for Tissue Engineering Applications: Effects of Electrospinning Parameters and Solution Properties. *J Macromol Sci, Part B* 2011; 50(8): 1535-58.
- Sun K, Li ZH. Preparations, properties and applications of chitosan based nanofibers fabricated by electrospinning. *Express Polymer Letters* 2011; 5(4): 342-61.
- Daranarong D, Chan RTH, Wanandy NS, Molloy R, Punyodom W, Foster JR. Electrospun polyhydroxybutyrate and poly(L-lactide-co-ε-caprolactone) Composites as Nanofibrous Scaffolds. *BioMed Research International* 2014; 2014(1): 12.
- Ikejima T, Yagi K, Inoue Y. Thermal properties and crystallization behavior of poly(3-hydroxybutyric acid) in blends with chitin and chitosan. *Macromol Chem Phys* 1999; 200(2): 413-21.

## Evaluation of the Structural Properties and Cellular Behavior of Electrospun Poly(hydroxybutyrate)/Chitosan Blend Scaffolds for Cartilage Tissue Engineering

Davoud Sadeghi MSc<sup>1</sup>, Saeed Karbasi PhD<sup>2</sup>, Shahin Bonakdar PhD<sup>3</sup>, Shahnaz Razavi PhD<sup>4</sup>

### Original Article

#### Abstract

**Background:** Achieving to a scaffold with suitable properties is a current challenge in tissue engineering. Polyhydroxybutyrate (PHB) is a polymer which has attracted attentions due to have favorable properties such as good biocompatibility and relative high mechanical properties; but, its hydrophobicity and brittleness are not suitable for cartilage tissue engineering scaffold fabrication. Blending with other polymers is a strategy to solve this problem. This study aimed to prepare electrospun PHB/chitosan (CTS) blend scaffold and to investigate its structural properties and cellular behavior.

**Methods:** First, polymeric solutions of PHB in trifluoroacetic acid (TFA) were electrospun and after optimization of parameters, various percentages of chitosan with aim to improve its hydrophilicity and mechanical properties were added to polymeric solution and electrospun. To characterize prepared scaffolds, scanning electron microscopy (SEM), tensile strength test, Fourier transform infrared spectroscopy (FT-IR), contact angle measurement, and porosimetry were performed. According to the obtained results, the scaffold containing 15 and 20 percent of chitosan were selected as the optimized scaffolds and were examined for rabbit chondrocyte cell adhesion test.

**Findings:** Scanning electron microscopy images showed that electrospinning of the solution with PHB of 9 percent by weight (wt%) in 21 kilovolt at 15 cm produced the most uniform fibers; the scaffolds containing 10, 15 and 20 percent of CTS have more uniform fibers than the scaffold containing 5 percent. Finally, based on the results of other experiments, the scaffolds containing 15 and 20 percent of chitosan were identified as optimized scaffolds. SEM images showed good chondrocyte cell adhesion on these scaffolds.

**Conclusion:** Addition of chitosan to PHB, can improve its mechanical and biological properties and hydrophilicity.

**Keywords:** Cartilage tissue engineering, Polyhydroxybutyrate, Chitosan, Electrospinning

**Citation:** Sadeghi D, Karbasi S, Bonakdar Sh, Razavi Sh. **Evaluation of the Structural Properties and Cellular Behavior of Electrospun Poly(hydroxybutyrate)/Chitosan Blend Scaffolds for Cartilage Tissue Engineering.** J Isfahan Med Sch 2015; 33(349): 1441-58

1- Department of Biomaterials and Tissue Engineering, School of Advanced Medical Technology, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, Iran

2- Associate Professor, Department of Biomaterials and Tissue Engineering, School of Advanced Medical Technology, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, Iran

3- Assistant Professor, National Cell Bank of Iran, Pasteur Institute of Iran, Tehran, Iran

4- Professor, Department of Anatomical Sciences, School of Medicine, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, Iran

**Corresponding Author:** Davoud Sadeghi MSc, Email: davoud.sadeghi@yahoo.com