

بررسی مورفولوژی و تخریب داربست نانوکامپوزیتی پلی(هیدروکسی بوتیرات) / نانوهیدروکسی آپاتیت (PHB/nHA) مورد استفاده در مهندسی بافت

محسن رادمهر^۱، دکتر سعید کرباسی^۲، دکتر مرتضی صادقی^۳، دکتر سعید نوری خراسانی^۴، عباس سعادت^۵

چکیده

مقدمه: امروزه نانوکامپوزیت پلیمرهای زیست تخریب پذیر / سرامیک های زیست فعال با دارا بودن خواص مکانیکی و زیست سازگاری عالی، از اهمیت ویژه ای در مهندسی بافت استخوان برخوردار هستند. اندازه ی ذرات سرامیک در ابعاد نانو، خواص زیست سازگاری و زیست تخریب پذیری این مواد را افزایش داده است. در میان این نانوکامپوزیت ها، می توان به داربست های نانوکامپوزیتی پلی (هیدروکسی بوتیرات) / نانوهیدروکسی آپاتیت (PHB/nHA) یا nano-hydroxyapatite / Poly (3-hydroxybutyrate) که به روش قالب گیری محلولی / شستن ذرات تهیه شده اند و دارای درصد تخلخل مناسب هستند؛ اشاره نمود.

روش ها: داربست های نانوکامپوزیتی پلی (هیدروکسی بوتیرات) / نانوهیدروکسی آپاتیت (PHB/nHA) به روش قالب گیری محلولی / شستن ذرات تهیه شده اند. مقدار nHA در داربست ها از ۰ تا ۱۰ درصد وزنی نسبت به پلیمر متغیر است. محاسبه ی درصد تخلخل داربست ها به روش نفوذ آب بدون یون صورت گرفته است. ریخت تخلخل ها، پراکنندگی آن ها، اندازه ی ذرات nHA و پراکنندگی آن ها در بستر پلیمری، توسط آزمون های SEM (Scanning electron microscope) و EDX (Energy dispersive X-ray) مشخص شده اند. تخریب نمونه های داربستی در محیط خارج بدن در Phosphate buffered saline (PBS) و دمای $38 \pm 2^\circ\text{C}$ به مدت ۱۰۲ روز انجام شده است. به منظور مطالعه ی تخریب داربست ها، کاهش وزن نمونه ها با گذشت زمان اندازه گیری شده و آزمون های FTIR (Fourier transform infrared) و SEM قبل و پس از تخریب روی نمونه ها انجام گرفته است.

یافته ها: درصد تخلخل داربست ها با افزایش درصد nHA کاهش نمی یابد. تخلخل ها با یکدیگر ارتباط مناسبی دارند و ابعاد آن ها از ۲۰۰ تا ۲۵۰ میکرون متغیر است. اندازه ی ذرات nHA در بستر پلیمری زیر ۱۰۰ نانومتر می باشد. مطالعه ی تخریب نمونه های داربستی در محیط خارج بدن در PBS و دمای $38 \pm 2^\circ\text{C}$ به مدت ۱۰۲ روز انجام شده است. با بررسی تخریب داربست ها مشخص گردید که تخریب آن ها به صورت توده ای بوده است و بیشترین میزان تخریب مربوط به داربست تهیه شده با ۷/۵ درصد وزنی nHA می باشد.

نتیجه گیری: با توجه به نتایج این پژوهش، می توان از داربست های نانوکامپوزیتی سه بعدی PHB/nHA که دارای تخلخل هایی باز و درصد تخلخل زیاد هستند، در مهندسی بافت استخوان برای کشت و رشد سلول روی آن استفاده نمود.

واژگان کلیدی: داربست، نانوکامپوزیت، پلی (هیدروکسی بوتیرات)، نانوهیدروکسی آپاتیت، مهندسی بافت

مقدمه

بیمارستان ها و کلینیک های جهان با آن مواجهند (۱-۲). استفاده از پلیمرهای زیست تخریب پذیر، به عنوان یک گروه بزرگ مواد زیستی، کاهش تعداد عمل های جراحی و همچنین کاهش زمان بهبود عضو

امروزه ترمیم صدمات وارد شده به استخوان ناشی از تصادفات و سوانح رانندگی، نقص مادرزادی و بیماری و سرطان ها یکی از بزرگ ترین مشکلاتی است که

^۱ دانشجوی کارشناسی ارشد، گروه مهندسی شیمی، دانشکده ی مهندسی شیمی، دانشگاه صنعتی اصفهان، اصفهان، ایران

^۲ استادیار، گروه فیزیک پزشکی و مهندسی پزشکی، دانشکده ی پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران

^۳ استادیار، گروه مهندسی شیمی، دانشکده ی مهندسی شیمی، دانشگاه صنعتی اصفهان، اصفهان، ایران

^۴ دانشیار، گروه مهندسی شیمی، دانشکده ی مهندسی شیمی، دانشگاه صنعتی اصفهان، اصفهان، ایران

^۵ دانشجوی دکتری، دانشکده ی مهندسی پزشکی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد علوم و تحقیقات، تهران، ایران

عکس برداری میکروسکوپ الکترونی روبشی (SEM یا Scanning electron microscope) و پخش انرژی اشعه‌ی (Energy dispersive X-ray) یا (EDX) بررسی می‌شود. در نهایت با بررسی کاهش وزن، تغییرات pH، آزمون‌های تبدیل فوریه‌ی زیر قرمز (FTIR یا Fourier transform infrared) و SEM، تأثیر درصد ذرات nHA بر روند تخریب این داربست‌ها در محلول بافر فسفات و دمای $38 \pm 2^\circ\text{C}$ مورد مطالعه قرار می‌گیرد.

روش‌ها

مواد اولیه

برای تهیه‌ی داربست به روش قالب‌گیری محلولی و شست‌وشوی نمک، نمک طعام (NaCl) در اندازه‌ی مشخص مورد نیاز است. نمک طعامی در ابعاد $250-200$ با خلوص ۹۹/۹ درصد از شرکت Merck تهیه گردید. Phosphate buffered saline (PHB) با وزن مولکولی متوسط گرانروی $105 \times 3 \text{ g/mol}$ از شرکت Sigma Aldrich خریداری شد. کلروفورم با فرمول شیمیایی CHCl_3 و درجه‌ی خلوص ۹۹/۵ برای تهیه‌ی محلول پلیمری از شرکت اسپانیایی Scharlau خریداری شد. ذرات nHA به روش سل-ژل و با اندازه‌ی ذراتی در محدوده‌ی $100-50 \text{ nm}$ تهیه شد. اتانول با درجه‌ی خلوص ۹۹/۹ درصد از شرکت Merck تهیه گردید. PBS از شرکت هندی Himedia خریداری شد که با حل کردن $10/79$ گرم این ماده درون ۱ لیتر آب مقطر در دمای 25°C ، محلولی با $\text{pH} = 7/2 \pm 0/2$ به دست آمد.

ساخت داربست

$0/4$ گرم PHB در 10 ml کلروفورم و دمای

صدمه دیده را به همراه دارد. ساخت داربست‌های سه بعدی از این مواد جهت کاشت و رشد سلول روی آن، از روش‌های نوین در مهندسی بافت می‌باشد. این داربست‌ها بایستی زیست‌سازگار و زیست‌تخریب‌پذیر باشند و در عین داشتن درصد تخلخل مناسب، خواص مکانیکی مطلوبی داشته باشند (۳). برای به دست آوردن خواص بیولوژیکی مناسب می‌توان این پلیمرها را با ذرات و مواد سرامیکی زیست‌فعال مخلوط کرد. پژوهش‌های اخیر در این زمینه روی ساخت مواد مرکب از این پلیمرها تمرکز داشته است. شیشه زیستی (BG یا Bioglass) و هیدروکسی‌آپاتیت (HA یا Hydroxyapatite) از جمله سرامیک‌های زیست‌فعال هستند که به صورت‌های مختلف در زمینه‌ی پلیمری استفاده می‌شوند. این افزودنی‌ها منجر به بهبود خواص مکانیکی و زیست‌سازگاری می‌شوند و سرعت تخریب را تغییر می‌دهند. استفاده از سرامیک‌های زیست‌فعال در زمینه‌ی پلیمر از ۱۹۸۰ شروع شد (۳-۶). با ظهور فن‌آوری نانو در دو دهه‌ی اخیر، استفاده از ذرات و افزودنی‌ها با اندازه‌ی نانو در عرصه‌ی مهندسی پزشکی نیز معمول گردید. پژوهش‌های اخیر نشان داده است که برای بهبود خواص در یک کاربرد یکسان، مقدار افزودنی مورد نیاز در ابعاد نانو بسیار کمتر از این مواد در ابعاد بزرگ‌تر است (۱۳-۷).

ساخت داربست نانوکامپوزیتی PHB/nHA (Poly (3-hydroxybutyrate)/nano-hydroxyapatite) به روش قالب‌گیری محلولی و شست‌وشوی نمک با درصد تخلخل زیاد و درصدهای مختلف nHA هدف این پژوهش است. ریخت، ساختار و پراکندگی تخلخل‌ها و ذرات nHA در ماتریس پلیمری با

نسبت به پلیمر از ۰ تا ۱۰ درصد به صورت ۰، ۲/۵، ۵، ۷/۵ و ۱۰ درصد تغییر می‌کند. بدین ترتیب، داربست‌های نانوکامپوزیتی متفاوت تهیه می‌گردد. نام نمونه‌ها و مقدار پلیمر، نمک و nHA برای تهیه‌ی داربست‌های مختلف در جدول ۱ آورده شده است.

آنالیز و شناسایی نمونه‌های داربستی

آزمون میکروسکوپ الکترونی روبشی (SEM)

برای بررسی ریخت تخلخل‌ها و اندازه‌ی ذرات موجود در کامپوزیت از دستگاه میکروسکوپ الکترونی روبشی (SEM) با نشان تجاری Philips XL30-Holland استفاده شد.

آزمون پخش انرژی اشعه‌ی X (EDX)

جهت بررسی چگونگی پراکندگی ذرات نانو در زمینه‌ی پلیمری از دستگاه EDX با نشان تجاری WDX-3PC-USA استفاده گردید.

اندازه‌گیری درصد تخلخل

از نواحی مختلف داربست‌ها (کنار و وسط)، نمونه‌های مربعی جدا و پس از محاسبه‌ی حجم (V)، جرم نمونه‌ها، m_0 ، اندازه‌گیری شد. نمونه‌ها یک ساعت در اتانول خیس داده شده و سپس با آب بدون یون شست‌و شو گردیدند و ۱۲ ساعت درون آب بدون یون غوطه‌ور شدند. جرم نمونه‌های خیس شده (m) پس از

$2 \pm 50^\circ\text{C}$ تحت سیستم بازیافت حلال کامل حل می‌شود. سپس ذرات nHA با مقدار معین به محلول پلیمری اضافه می‌شود، ابتدا با همزن مغناطیسی ذرات پراکنده شده، سپس با دستگاه فوق صوت حمامی، این ترکیب مخلوط می‌شود تا ذرات با ابعاد ریز به یکدیگر نچسبند. سپس ۳/۶ گرم نمک طعام به مخلوط اضافه می‌شود و با همزن مغناطیسی هم زده می‌شود. پس از اختلاط کامل اجزاء، مخلوط تهیه شده فوری درون ظرف شیشه‌ای آزمایشگاهی خالی می‌گردد. برای به دست آوردن لایه‌ی نازکی از داربست و اطمینان از خروج کامل حلال از داربست، ظرف ابتدا در محیط آزمایشگاه به مدت ۴۸ ساعت و سپس در آون خلأ با فشار ۲۰۰ mbar به مدت ۲۴ ساعت قرار داده می‌شود. پس از خشک شدن کامل نمونه‌ها، عملیات خروج ذرات نمک از طریق شست‌وشوی نمونه‌ها با آب بدون یون آغاز می‌شود. پس از شست‌وشو، ذرات نمک در آب بدون یون حل می‌شوند و تخلخل‌هایی با ابعاد ذرات تشکیل می‌شود. به منظور خشک شدن نهایی، نمونه‌ها ابتدا به مدت ۲۴ ساعت در هوای محیط و سپس به مدت ۴۸ ساعت درون آون خلأ با فشار ۲۰۰ mbar در دمای $45 \pm 5^\circ\text{C}$ قرار داده می‌شوند. در نمونه‌های مختلف درصد وزنی نانو ذره

جدول ۱. مقدار پلیمر، نمک و nHA و درصد تخلخل داربست‌های مختلف

نام نمونه	(g)PHB	(g)NaCl	(wt/%)NaCl	(g)nHA	(wt/%)nHA	(%)Porosity
P4 ^a	۰/۴	۳/۶	۹۰	۰	۰	۸۳/۸۱
P4-H2/5 ^b	۰/۴	۳/۶	۹۰	۰/۰۱۱	۲/۵	۸۳/۷۶
P4-H5	۰/۴	۳/۶	۹۰	۰/۰۲۱	۵	۸۳/۵۱
P4-H7/5	۰/۴	۳/۶	۹۰	۰/۰۳۲	۷/۵	۸۳/۳۷
P4-H10	۰/۴	۳/۶	۹۰	۰/۰۴۴	۱۰	۸۳/۰۲

a غلظت محلول پلیمری

b درصد وزنی nHA

nHA: Nano-hydroxyapatite

PHB: Phosphate buffered saline

استفاده شد. نشان تجاری دستگاه FTIR مورد استفاده
Jasco FTIR 680 plus-Japan بود.

خروج از آب بدون یون اندازه‌گیری و درصد تخلخل
داربست با معادله‌ی (۱) محاسبه شد (۱۴):

$$P = \frac{m - m_0}{V} * 100 \quad (1)$$

یافته‌ها

مطالعه‌ی مورفولوژی داربست نانوکامپوزیتی

تصاویر حاصل از آزمون SEM جهت بررسی اندازه‌ی
تخلخل‌ها و نحوه‌ی پراکندگی آن‌ها در شکل ۱ ارایه
شده است. کشت و رشد سلول روی داربست با
تخلخل زیاد و مرتبط با یکدیگر مناسب است. در این
صورت، سلول‌ها راحت‌تر می‌توانند از سطح داربست
به قسمت‌های داخل داربست نفوذ کنند، به رشد خود
ادامه دهند و مواد غذایی و زاید خود را از طریق این
ارتباطات رد و بدل نمایند (۳-۵). با توجه به تصاویر
SEM، ابعاد تخلخل‌ها در محدوده‌ی ۲۵۰-۲۰۰ μm
می‌باشد که پراکندگی تخلخل‌ها در هر دو سطح رویی
و مقطع داربست یکنواخت می‌باشد.

تخریب داربست‌های نانوکامپوزیتی

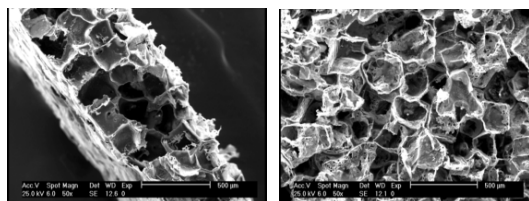
پس از اندازه‌گیری جرم نمونه‌های داربستی $1 \text{ cm}^2 \times$
۱، نمونه‌ها درون ظروف شیشه‌ای آزمایشگاهی قرار
داده شدند. ۱۰ ml محلول PBS روی آن‌ها ریخته شد
و درون آن با دمای $38 \pm 2^\circ \text{C}$ قرار گرفتند.
محلول PBS هر ۶ روز یکبار تعویض می‌گردید.
برای بررسی تخریب، نمونه‌ها نیز هر ۶ روز یکبار از
PBS خارج و پس از سه بار شست‌وشو با آب بدون
یون در آن خلأ و دمای $45 \pm 5^\circ \text{C}$ در مدت زمان
۲۴ ساعت خشک می‌شد و جرم آن‌ها اندازه‌گیری
می‌گردید. برای محاسبه‌ی درصد جرم باقی‌مانده از
معادله‌ی (۲) استفاده شد:

$$R = \frac{m}{m_0} * 100 \quad (2)$$

که در آن R ، m و m_0 به ترتیب درصد جرم باقی‌مانده،
جرم نمونه پس از گذشت زمان مشخص و جرم ابتدایی
می‌باشد. برای هر نمونه ۴ تکرار در نظر گرفته شد و
میانگین مقادیر گزارش گردید. در ضمن، برای بررسی
تخریب، تغییرات pH محلول PBS پس از تعویض
اندازه‌گیری شد. بدین ترتیب، تخریب نمونه‌ها برای
مدت ۱۰۲ روز مورد مطالعه و بررسی قرار گرفت.

آزمون انتقال فوریه‌ی زیر قرمز (FTIR)

جهت بررسی و مطالعه‌ی گروه‌های عاملی موجود در
داربست‌های ساخته شده از پلیمر خالص و
داربست‌های نانوکامپوزیتی، برهم کنش میان اعضای
نانوکامپوزیت و مشخص شدن گروه‌های عاملی حاصل
از تخریب، آزمون انتقال فوریه‌ی زیر قرمز (FTIR)



(ب)

(الف)

شکل ۱. تصویر Scanning electron microscope (SEM) از
از (الف) روی نمونه، (ب) سطح مقطع داربست PHB/nHA
(Poly (3-hydroxybutyrate)/ nano-hydroxyapatite)
جهت بررسی مورفولوژی تخلخل‌ها

مطابق شکل ۲ حفره‌هایی که روی دیواره‌ی داخلی
تخلخل‌ها در هر دو سطح رویین و سطح مقطع
داربست‌های تهیه شده مشاهده می‌شود، نشان دهنده‌ی
ارتباط زیاد و قابل توجه تخلخل‌ها
(Interconnectivity) در کل داربست می‌باشد.

تمامی ذرات نشان داده شده در شکل ۳، روی دیواره‌های داخلی تخلخل‌ها قرار گرفته‌اند. با افزایش درصد nHA، تعداد ذرات با اندازه‌ی نانو درون داربست بیشتر می‌شود؛ از طرفی انباشتگی و کلوخگی ذرات نیز افزایش می‌یابد. به‌طور کلی به دلیل وجود سطح ویژه‌ی زیاد ذرات nHA، جلوگیری کامل از انباشته شدن ذرات نانو امری ناممکن است. با استفاده از دستگاه مخلوط‌کن فوق‌صوت تا حد امکان سعی گردید که از این انباشتگی ذرات کاسته شود. تعداد ذرات nHA با ابعاد ۵۰-۹۰ nm بیشتر از ذرات بهم‌پیوسته و انباشته شده با اندازه‌ی بیشتر از ۱۰۰ nm بود.

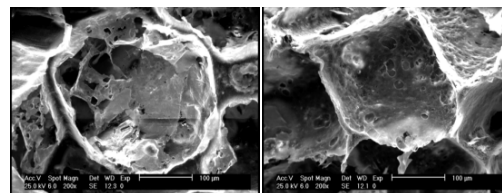
مطالعه‌ی پراکنندگی ذرات nHA در داربست

نانوکامپوزیتی

توزیع یکنواخت ذرات درون داربست منجر به همگن شدن خواص داربست نانوکامپوزیتی در تمام مکان‌ها می‌شود. با توجه به تصاویر EDX که برای بررسی چگونگی توزیع ذرات nHA از سطح مقطع داربست گرفته شده است، می‌توان گفت توزیع ذرات به صورت یکنواخت انجام گرفته است و با افزایش درصد nHA، امکان تجمع ذرات بیشتر می‌شود. در داربست شامل ۷/۵ درصد nHA، توزیع ذرات یکنواخت‌تر و تجمع آن‌ها اندک می‌باشد. بنابراین، فارغ از در نظر گرفتن خواص مکانیکی، داربست تهیه شده با ۷/۵ درصد وزنی nHA می‌تواند به عنوان بهترین نمونه برای کشت و رشد سلول‌های بافت استخوان انتخاب شود (شکل ۴).

درصد تخلخل داربست نانوکامپوزیتی

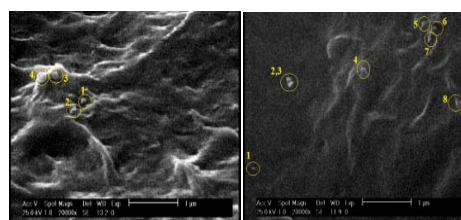
با توجه به جدول ۱ با به کارگیری ۹۰wt% نمک، درصد تخلخل قابل قبولی به منظور استفاده‌ی این داربست‌ها در مهندسی بافت استخوان به دست آمده است.



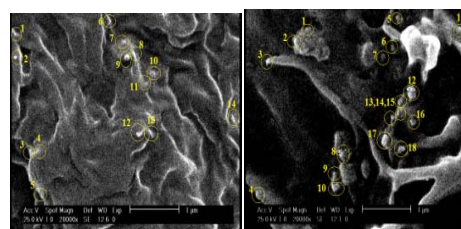
(الف) (ب)

شکل ۲. تصویر Scanning electron microscope (SEM) از یک تخلخل و حفره‌های روی دیواره‌ی آن

(الف) روی نمونه، (ب) سطح مقطع داربست PHB/nHA (Poly (3-hydroxybutyrate)/ nano-hydroxyapatite)



(الف) (ب)

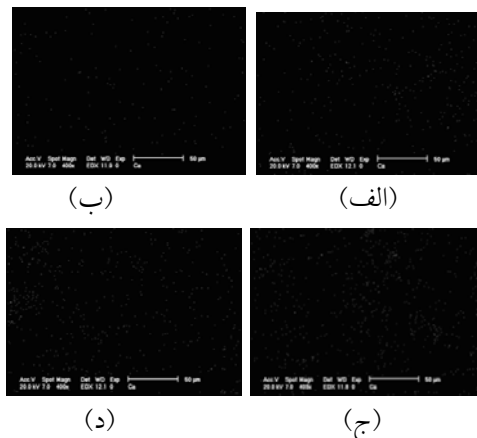


(ج) (د)

شکل ۳. تصویر Scanning electron microscope (SEM) ذرات HA روی دیواره‌ی تخلخل‌های داربست PHB/nHA (Poly (3-hydroxybutyrate)/ nano-hydroxyapatite) حاوی ذرات nHA. (الف) ۲/۵ wt٪، (ب) ۵ wt٪، (ج) ۱۰ wt٪، (د) ۱۷/۵ wt٪

خواص داربست نانوکامپوزیتی بستگی به اندازه‌ی ذرات موجود در آن دارد. به‌گونه‌ای که داربست‌های کامپوزیتی شامل مقدار کمی از ذرات با ابعاد کوچک‌تر در مقایسه با داربست کامپوزیتی با همان ذرات در ابعاد بزرگ‌تر، کارایی و خواص بهتری دارند. با توجه به اهمیت این موضوع با آزمون SEM اندازه‌ی ذرات nHA در بستر داربست پلیمری مشخص گردید.

این گروه‌ها به هنگام ترکیب این مواد با یکدیگر، در شکل ۵ ارایه شده است. در طیف جذب مربوط به نانوذرات HA، پیک‌های مربوط به فاز آپاتیت به وضوح نشان داده شده که پیک‌های در محدوده 1025 cm^{-1} و $629-570\text{ cm}^{-1}$ ناشی از پیوندهای یون PO_4^{3-} می‌باشد. گروه OH^- هیدروکسی آپاتیت یک پیک پهن در محدوده $3400-3550\text{ cm}^{-1}$ را نتیجه می‌دهد. در طیف PHB، پیک‌های 1055 cm^{-1} و 1128 و 1176 cm^{-1} ناشی از پیوند C-O موجود در PHB است. در عدد موجی 1724 cm^{-1} یک پیک بسیار تیز و واضح مشاهده می‌شود که ناشی از ارتعاش کششی گروه‌های کربونیل می‌باشد. گروه‌های انتهایی هیدروکسیل PHB پیک پهنی در محدوده $3400-3550\text{ cm}^{-1}$ نتیجه می‌دهند. طیف FTIR این کامپوزیت در مقایسه با ذرات nHA و PHB به ترتیب در دو محدوده جذب $650-550\text{ cm}^{-1}$ در شکل ۵ (ب) و $1740-1717\text{ cm}^{-1}$ در شکل ۵ (ج) با بزرگ‌نمایی بیشتر نشان داده شده است. چنانچه مشهود است پیک جذب گروه کربونیل PHB خالص در فرکانس 1724 cm^{-1} به صورتی واضح‌تر نسبت به پیک نانوکامپوزیت آشکار می‌شود. این پیک در نانوکامپوزیت PHB/nHA به عدد موجی پایین‌تر 1721 cm^{-1} انتقال یافته است. انتقال پیک جذب کربونیل به فرکانس‌های پایین‌تر، احتمال وقوع پیوندهای هیدروژنی بین گروه‌های کربونیل موجود در PHB و گروه‌های مستعد در ذرات nHA را نشان می‌دهد. این پدیده می‌تواند مقیاسی برای تأیید توزیع ذرات nHA در بستر پلیمر به صورت یکنواخت و کارا باشد. مقایسه‌ی پیک‌های مربوط به PO_4^{3-} در هر دو حالت ارتعاش کششی و چرخشی، نشان‌گر کاهش شدت این پیک‌ها در



شکل ۴. تصویر EDX (Energy dispersive X-ray) نانوذرات HA سطح مقطع داربست PHB/nHA حاوی ذرات nHA. (الف) ۲/۵ wt.، (ب) ۵ wt.، (ج) ۱۰ wt.، (د) ۷/۵ wt.

همچنین با افزایش مقدار nHA درصد تخلخل به مقدار ناچیزی کاهش می‌یابد. می‌توان از این مقدار ناچیز صرف‌نظر کرد؛ به عبارتی افزایش nHA تأثیر معنی‌داری روی درصد تخلخل نداشته است.

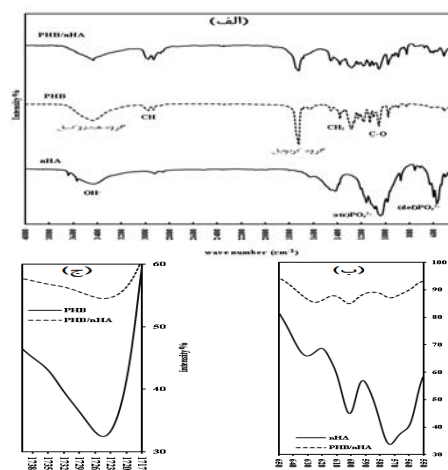
در تحقیقات اخیر، با افزایش مقدار ذره‌ی میکرونی HA در بستر پلیمری، افت خواص مکانیکی به دلیل تجمع ذرات مشاهده شده است. درصد تخلخل و زیست‌سازگاری نیز، به دلیل بسته شدن تخلخل‌ها کاهش یافت. در حالی که در این پژوهش، با افزایش مقدار nHA تا ۱۰ درصد وزنی به دلیل اندازه‌ی نانوذرات، تخلخل‌ها بسته نشده‌اند و درصد تخلخل کاهش نمی‌یابد (۱۷-۱۵).

آزمون FTIR و بررسی گروه‌های عاملی داربست

نتایج حاصل از آزمون FTIR بر روی پلیمر خالص PHB، نانوذرات HA و نانوکامپوزیتی PHB/nHA، به منظور بررسی حضور گروه‌های عاملی موجود در پلیمر و نانوذرات nHA و همچنین چگونگی اثربخشی

نانوکامپوزیت نسبت به nHA خالص است.

موجب افزایش مقاومت و استحکام نمونه می‌شود و از طرفی با ویژگی زیست‌فعالی خود سرعت تخریب داربست را افزایش می‌دهد. گروه‌های هیدروکسیل و PO_4^{3-} موجود در nHA می‌توانند با گروه‌های کربونیل PHB پیوند هیدروژنی برقرار کنند و موجب افزایش مقاومت در برابر تخریب شوند؛ از طرفی خود این گروه‌های هیدروکسیل می‌توانند به عنوان یک سرعت دهنده‌ی تخریب عمل کنند و در محیط آبی عاملی برای شروع هیدرولیز شوند. اثر کاتالیزوری گروه‌های هیدروکسیل موجود در نمونه‌های حاوی nHA با افزایش مقدار nHA تا ۷/۵ درصد وزنی، مکانیسم غالب در تخریب داربست می‌باشد. اما با افزایش میزان nHA بیشتر از ۷/۵ درصد به علت استحکام مکانیکی بیشتر nHA به‌عنوان یک ماده‌ی سرامیکی و همچنین افزایش احتمال وقوع پیوندهای هیدروژنی، مقاومت نمونه در برابر تخریب افزایش و میزان تخریب کاهش می‌یابد.



شکل ۵. مقایسه‌ی طیف Fourier transform infrared

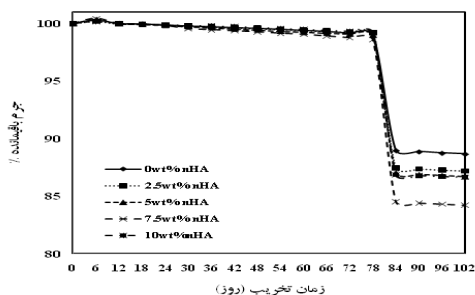
(الف) PHB/nHA, PHB, nHA (FTIR)

(ب) بزرگ‌نمایی طیف PHB/nHA و nHA (ج) بزرگ‌نمایی

طیف PHB/nHA و PHB

تخریب داربست‌های نانوکامپوزیتی PHB/nHA

بررسی کاهش وزن نمونه‌ها در محلول PBS به عنوان معیار تخریب نشان داد که کل نمونه‌ها با روند کندی تا روز ۷۸ام وزن خود را از دست می‌دهند. سپس افت ناگهانی در وزن نمونه‌ها مشاهده شد و روند کند تخریب ادامه داشت (شکل ۶). با افزایش مقدار nHA، تخریب افزایش می‌یابد و نمونه‌های حاوی ۷/۵ درصد وزنی nHA بیشترین مقدار تخریب را نشان دادند. نتایج حاصل از تخریب نشان می‌دهد که تا ۷/۵ درصد وزنی nHA در داربست، تخریب افزایش یافته است و در این مقدار دارای یک بیشینه می‌شود و با افزایش nHA بیشتر از ۷/۵ درصد وزنی، آهنگ تغییرات کاهش خواهد بود. اضافه کردن nHA به عنوان یک سرامیک زیست‌فعال به این داربست‌های نانوکامپوزیتی دو نقش را ایفا می‌کند. ابتدا به عنوان یک سرامیک

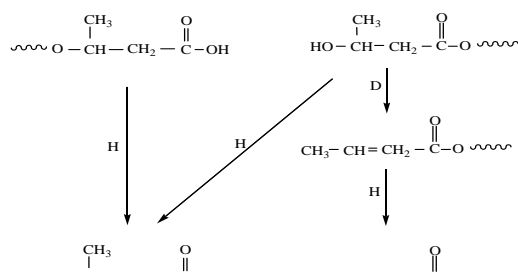


شکل ۶. روند تخریب داربست نانوکامپوزیتی در ۱۰۲ روز

قبل و پس از قرار گرفتن داربست درون محلول PBS، تخریب داربست با آزمون FTIR بر روی نمونه‌ها بررسی شد. در شکل ۷ شدت پیک‌های مربوط به گروه‌های کربونیل (C = O) و گروه‌های C - O در PHB پس از تخریب نسبت به قبل از تخریب، کاهش و به عددهای موجی پایین‌تر انتقال می‌یابند. این شواهد نشان دهنده‌ی تولید گروه‌های

تخریب این پیک، به دلیل تلاقی با پیک گروه کربونیل به وضوح دیده نمی‌شود، اما به دلیل اثر رزونانسی، پیک جذب مربوط به گروه کربونیل را به فرکانس‌های پایین‌تر انتقال می‌دهد.

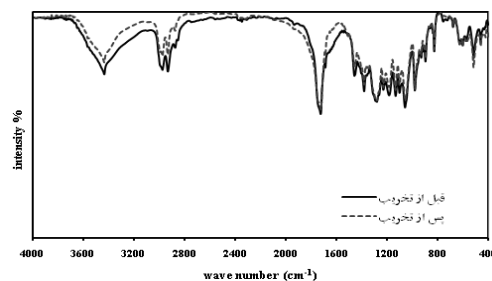
مکانیسم پیشنهادی این چنین است که با اولین شکست پیوند استری گروه‌های انتهایی آزاد COO^- و CHOH تولید می‌شوند و توسط گروه OH^- مورد حمله قرار می‌گیرند. محصولات آب‌دوست تولیدی از هیدرولیز وارد فاز محلول می‌شوند و مقدار کمی از گروه‌های OO^- ، OH یا $\text{C}=\text{C}$ روی سطح داربست باقی می‌مانند (۱۸). کاهش شدت پیک جذب برای گروه کربونیل و انتقال آن به فرکانس‌های پایین‌تر در طیف FTIR پس از تخریب، تأکیدی بر این امر است. مکانیسم پیشنهادی برای هیدرولیز PHB در PBS، در شکل ۹ نشان داده شده است.



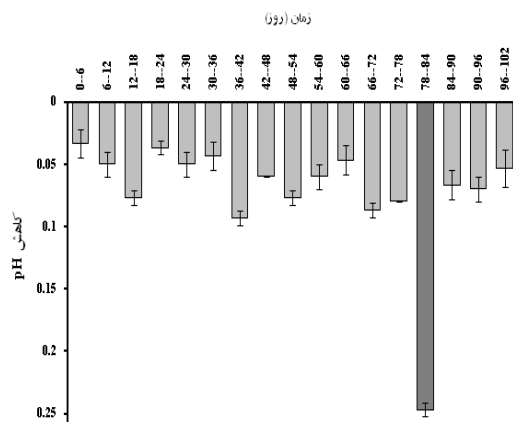
شکل ۹. مکانیسم هیدرولیز Poly (3-hydroxybutyrate) (PHB) و تولید اسیدهای بوتیریک و کتونیک (H): هیدرولیز، D: دی‌هیدراسیون (۱۸)

با توجه به تصاویر SEM قبل و پس از تخریب در شکل ۱۰، نمونه‌ها از کناره‌ها یا از وسط به طور ناگهانی خورده می‌شوند. با اندازه‌گیری کاهش وزن، تغییر pH و تصاویر SEM نمونه‌ها قبل و پس از تخریب، مشخص شد که روند تخریب داربست‌های PHB دو مرحله‌ای است؛ (۱) نفوذ محلول PBS به

اسیدی ناشی از هیدرولیز آرام PHB می‌باشد که کاهش pH محلول PBS (شکل ۸)، تولید اسید ناشی از هیدرولیز را تأیید می‌کند (۱۸). همچنین پس از تخریب، شدت پیک مربوط به فاز آپاتیت حدود 570 cm^{-1} افزایش نشان داده است. این امر ناشی از تشکیل لایه‌های ناچیز آپاتیت روی داربست به دلیل حضور ذرات nHA می‌باشد (۹).



شکل ۷. طیف FTIR (Fourier transform infrared) داربست نانوکامپوزیتی قبل و بعد از تخریب



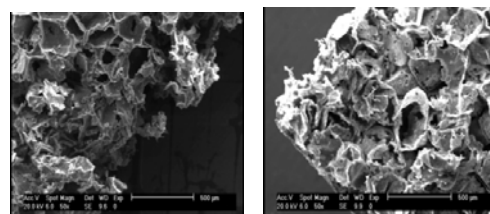
شکل ۸. کاهش pH محلول Phosphate buffered saline (PBS) پس از تعویض

اسیدهای تولیدی از هیدرولیز PHB بوتیریک اسید و کتونیک اسید می‌باشند (شکل ۹). کتونیک اسید پیوندی دوگانه در ساختار خود دارد که این پیوند دوگانه پیک مشخصی در محدوده‌ی عدد موجی cm^{-1} ۱۶۸۰ نشان می‌دهد. در نمودار FTIR پس از

فرکانس‌های پایین‌تر در PHB/nHA مربوط به PO_4^{3-} احتمال پیوند هیدروژنی میان گروه‌های کربونیل PHB و PO_4^{3-} و OH^- هیدروکسی‌آپاتیت را نشان می‌دهد. به طور کلی، فارغ از در نظر گرفتن خواص فیزیکی و مکانیکی و با توجه به نتایج حاصل از تصاویر SEM و EDX، بهترین داربست برای کشت و رشد مناسب‌تر سلول‌های بافت استخوان، نمونه‌ی تهیه شده با ۷/۵ درصد وزنی nHA می‌باشد.

با افزایش درصد nHA تا ۷/۵ درصد وزنی مقدار تخریب داربست پلیمری افزایش یافته است. افزودن nHA بیش از این مقدار، تخریب را کاهش می‌دهد. تخریب این داربست نانوکامپوزیتی توده‌ای می‌باشد. نتایج FTIR قبل و پس از تخریب بیان‌گر تولید گروه‌های اسید، ناشی از هیدرولیز آرام PHB است که کاهش pH محلول PBS حین تخریب و تولید اسیدهای بوتیریک و کرتونیک را تأیید می‌نماید. نتایج به دست آمده از این پژوهش نشان داد که با افزودن nHA تغییری در درصد تخلخل ایجاد نمی‌شود، در عین حال زیست تخریب پذیری بهبود می‌یابد. بنابراین می‌توان از داربست نانوکامپوزیتی PHB/nHA به عنوان یک بستر مناسب برای کشت و رشد سلول در مهندسی بافت استخوان استفاده نمود.

درون داربست و زنجیره‌های پلیمری، (۲) هیدرولیز و تخریب پلیمر. کاهش ناگهانی وزن و pH و خوردگی نمونه‌ها در بازه‌ی زمانی ۷۸-۸۴ روز حاکی از این است که نمونه‌ها از توده‌ی داربست پلیمری تخریب می‌شوند. بنابراین می‌توان تخریب داربست‌های نانوکامپوزیتی PHB/nHA را به صورت توده‌ای در نظر گرفت.



(الف) (ب)

شکل ۱۰. تصویر Scanning electron microscope (SEM)

داربست نانوکامپوزیتی قبل و پس از تخریب

بحث

افزایش درصد وزنی nHA در نمونه‌ها تأثیر معنی‌داری بر درصد تخلخل نشان نداد؛ به عبارتی با افزایش nHA تا ۱۰ درصد وزنی، درصد تخلخل کاهش نیافت. کاهش شدت پیک گروه‌های کربونیل و انتقال آن به عدد موجی پایین‌تر در داربست نانوکامپوزیتی، همچنین کاهش شدت پیک جذب و انتقال به

References

1. Chaput C, Selmani A, Rivard CH. Artificial scaffolding materials for tissue extracellular matrix repair. *Current Opinion in Orthopedics* 1996; 7(6): 62.
2. Gomes ME, Reis RL, Mikos AG. Bone tissue engineering constructs based on starch scaffolds and bone marrow cells cultured in a flow perfusion bioreactor. *Materials Science Forum* 2006; 174: 514-6.
3. Rezwan K, Chen QZ, Blaker JJ, Boccaccini AR. Biodegradable and bioactive porous polymer/inorganic composite scaffolds for bone tissue engineering. *Biomaterials* 2006; 27(18): 3413-31.
4. Liu X, Ma PX. Polymeric scaffolds for bone tissue engineering: on musculoskeletal bioengineering. *Annals of Biomedical Engineering* 2004; 32(3): 477-86.
5. Misra SK, Valappil SP, Roy I, Boccaccini AR. Polyhydroxyalkanoate (PHA)/inorganic phase composites for tissue engineering applications. *Biomacromolecules* 2006; 7(8): 2249-58.
6. Liu Y, Wang M. Developing a composite materials for bone tissue repair. *Current Applied Physics* 2007; 7: 547-54.
7. Yang K WJWCLY. Study on in vitro and in vivo

- bioactivity of nano hydroxyapatite/polymer biocomposite. Chinese Science Bulletin 2007; 52(2): 267-71.
8. Wei G, Ma PX. Structure and properties of nano-hydroxyapatite/polymer composite scaffolds for bone tissue engineering. Biomaterials 2004; 25(19): 4749-57.
 9. Jack KS, Velayudhan S, Luckman P, Trau M, Grondahl L, Cooper-White J. The fabrication and characterization of biodegradable HA/PHBV nanoparticle-polymer composite scaffolds. Acta Biomater 2009; 5(7): 2657-67.
 10. Jie w, Yubao L. Tissue engineering scaffold material of nano-apatite crystals and polyamide composite. European Polymer Journal 2004; 40(3): 509-15.
 11. Zhang P, Hong Z, Yu T, Chen X, Jing X. In vivo mineralization and osteogenesis of nanocomposite scaffold of poly(lactide-co-glycolide) and hydroxyapatite surface-grafted with poly(L-lactide). Biomaterials 2009; 30(1): 58-70.
 12. Nejati E, Mirzadeh H, Zandi M. Synthesis and characterization of nano-hydroxyapatite rods/poly(l-lactide acid) composite scaffolds for bone tissue engineering. Composites Part A: Applied Science and Manufacturing 2008; 39(10): 1589-96.
 13. Xiao Y, Li D, Fan H, Li X, Gu ZH, Zhang X. Preparation of nano-HA/PLA composite by modified-PLA for controlling the growth of HA crystals. Materials Letters 2007; 61(1): 59-62.
 14. Kuo YC, Leou SN. Effects of composition, solvent, and salt particles on the physicochemical properties of polyglycolide/poly(lactide-co-glycolide) scaffolds. Biotechnol Prog 2006; 22(6): 1664-70.
 15. Wang YW, Wu Q, Chen GQ. Attachment, proliferation and differentiation of osteoblasts on random biopolyester poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyhexanoate) scaffolds. Biomaterials 2004; 25(4): 669-75.
 16. Li H, Zhai W, Chang J. In vitro biocompatibility assessment of PHBV/Wollastonite composites. J Mater Sci Mater Med 2008; 19(1): 67-73.
 17. Sultana N, Wang M. Fabrication of HA/PHBV composite scaffolds through the emulsion freezing/freeze-drying process and characterisation of the scaffolds. J Mater Sci Mater Med 2008; 19(7): 2555-61.
 18. Yu J, Plackett D, Chen LXL. Kinetics and mechanism of the monomeric products from abiotic hydrolysis of poly[(R)-3-hydroxybutyrate] under acidic and alkaline conditions. Polymer Degradation and Stability 2005; 89(2): 289-99.

Morphology and Degradation of Poly (3-Hydroxybutyrate)/ Nano-Hydroxyapatite Scaffold Used in Tissue Engineering

Mohsen Radmehr¹, Saeed Karbasi PhD², Morteza Sadeghi PhD³, Saeid Nouri Khorasani PhD⁴, Abbas Saadat MSc⁵

Abstract

Background: Nanocomposites of biodegradable polymers and bioactive ceramics have high biocompatible and mechanical properties and are thus of high importance in bone tissue engineering. Among these nanocomposites, poly (3-hydroxybutyrate)/nano-hydroxyapatite (PHB/nHA) has favorable porosity.

Methods: Nanocomposite scaffolds of PHB/nHA were prepared via solvent-casting and particulate leaching technique. NHA constituted 0-10% of weight of polymers. The porosity of the samples was measured by diffusion method. Scanning electron microscopy (SEM) was used to evaluate the morphology of prepared scaffolds and size of nano-particles in the polymer matrix. Distribution of nHA in scaffold was investigated by energy dispersive X-ray (EDX). Degradation of scaffolds was studied by SEM, Fourier transform infrared (FTIR) spectroscopy, and weighting samples before and after degradation in phosphate-buffered saline (PBS) solution.

Findings: Porosity percentage was not decreased by increasing nHA content. Size of HA particles on wall of scaffold porosity was in nano-scale and distribution of nano particles in polymer matrix was uniform. Type of PHB/nHA scaffold degradation in PBS solution was bulk degradation.

Conclusion: Prepared scaffolds had good interconnectivity. Size and percentage of porosity was acceptable for cell growth, attachment, and seepage in tissue engineering. Therefore, these new PHB/nHA nanocomposite scaffolds may serve as a 3D substrate in tissue engineering.

Keywords: Solvent-casting, Particulate leaching, Poly (3-hydroxybutyrate), Hydroxyapatite, Nanocomposite, Scaffold

¹ MSc Student, Department of Chemical Engineering, School of Chemical Engineering, Isfahan University of Technology, Isfahan, Iran

² Assistant Professor, Department of Medical Physics and Biomedical Engineering, School of Medicine, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, Iran

³ Assistant Professor, Department of Chemical Engineering, School of Chemical Engineering, Isfahan University of Technology, Isfahan, Iran

⁴ Associate Professor, Department of Chemical Engineering, School of Chemical Engineering, Isfahan University of Technology, Isfahan, Iran

⁵ PhD Student, Department of Biomedical Engineering, Science and Research Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran

Corresponding author: Saeed Karbasi PhD, Email: karbasi@med.mui.ac.ir