



بررسی نانوالیاف کامپوزیتی لایه به لایه همراه با بتاتری کلسیم فسفات

مجید سهرابی^۱ | مرجان عباسی^۲

چکیده

مهندسی بافت، امید فراوانی را برای بازسازی ضایعات استخوانی فراهم آورده است. داربست، ماتریس موقتی برای رشد استخوان است که محیطی اختصاصی برای تکامل بافت فراهم می‌کند و باعث تسهیل چسبندگی، رشد و تمایز سلولی می‌شود. در این پژوهش با استفاده از روش الکتروریسی لایه به لایه و پلیمرهای زیست تخریب پذیر، داربست‌های کامپوزیتی نانولیفی شامل: پلی کاپرولاکتون، فوق جاذب‌هایی؛ مثل، پلی وینیل الکل و پلی وینیل پیرولیدون به همراه نانوذره بتاتری کلسیم فسفات که شباهت به بلورهای هیدروکسی آپاتیت طبیعی در استخوان دارد تولید شد. در الکتروریسی از دو نازل که یکی شامل پلی کاپرولاکتون و پلی وینیل پیرولیدون و دیگری شامل پلی کاپرولاکتون، پلی وینیل الکل و بتاتری کلسیم فسفات است به طور متناوب و لایه به لایه بعد از تعیین پارامترهای موثر الکتروریسی استفاده شد. بعد از تهیه داربست، از آزمون‌های میکروسکوپ الکترونی روبشی (SEM)، تورم، تخلخل و رفتار زیست تخریب پذیری در محلول PBS، به منظور بررسی ویژگی‌ها و خواص داربست‌ها استفاده شد که نتایج آزمون‌ها زیست فعالی و خواص مناسب داربست لایه به لایه را تایید می‌کند.

مقدمه

این پلیمر را برای محدوده گسترده‌ای از داربست‌ها فراهم می‌کند. تعداد زیادی از مواد کامپوزیتی بر پایه PCL در طی سالیان گذشته با استفاده از پرکننده‌هایی مانند بیوسرامیک‌ها، نانوساختارهای کربنی و نانوذرات خاک رس به منظور کاربردهای پزشکی به کار رفته‌اند. در این پژوهش بررسی تولید نانوالیاف پلی کاپرولاکتون (PCL)، با استفاده از پلیمرهای فوق جاذب نظیر PVA و PVP به روش الکتروریسی لایه به لایه انجام می‌شود و پس از تولید داربست جهت شناسایی و بررسی خواص مکانیکی و بیولوژیکی تست‌های مربوطه بر روی آن انجام خواهد شد. از پلیمرهای آب دوست جهت کاهش خاصیت آبگریزی و همچنین کاهش زمان زیست تخریب پذیری پلی کاپرولاکتون و از نانو ذره بتاتری کلسیم فسفات (β -TCP) جهت بهبود خواص زیستی و شبیه‌سازی بخش معدنی استخوان (نانو هیدروکسی آپاتیت طبیعی) استفاده می‌شود.

درمان نقایص استخوانی ناشی از تروما، عفونت، تومورها یا بیماری‌های مادرزادی یک چالش بزرگ است. مهندسی بافت استخوان با هدف ترمیم، جایگزینی و یا بازسازی این نقایص استخوانی به وسیله داربست تخریب پذیر که به عنوان یک قالب موقت به منظور فراهم کردن محیط اختصاصی مناسب که اجازه رشد، تکثیر و تمایز سلول‌ها به ماتریس خارج سلولی خود را می‌دهد و به محض تجدید تولید ماتریس خارج سلولی طبیعی تخریب می‌شود پدید آمده است استخوان طبیعی یک کامپوزیت حاصل از یک ماتریکس آلی (کلاژن، پروتئین‌های غیر کلاژنی و لیپیدها) و یک فاز بلوری معدنی شامل نانوهیدروکسی آپاتیت (HA) می‌باشد که به شکل سلسله مرتبه‌ای تنظیم شده‌اند. در بین روش‌های موجود برای تولید داربست، روش الکتروریسی به عنوان یک روش ساده، مقرون به صرفه و متنوع در فناوری برای تهیه الیاف بی‌بافت با قطر در محدوده میکرون تا نانومتر مطرح می‌شود. با استفاده از الکتروریسی، امکان ایجاد داربست‌هایی با تقلید از معماری اختصاصی ماتریس خارج سلولی استخوان با وجود مزایایی؛ مانند، تخلخل بالا، نسبت طول به قطر زیاد و سطح مخصوص بالا وجود دارد. سطح مخصوص بالا در داربست‌های الکتروریسی شده سطح بیشتری را برای اتصال سلولی مناسب آماده می‌کند و تخلخل بالا و اتصال داخلی زیاد حفرات، فضای کافی را برای تشکیل عروق خونی جدید که برای تغذیه استخوان جدید نیاز است را فراهم می‌کند و توانایی تعویض مواد مغذی و ضایعات متابولیسمی بین داربست و محیط را دارا می‌باشد. پلی کاپرولاکتون (PCL) پلیمری نیمه‌بلوری با نقطه ذوب پایین $64-59^{\circ}\text{C}$ می‌باشد و دارای حالیت خوب و ترکیب پذیری عالی می‌باشد؛ علاوه بر آن، هنگامی که تنش اعمال می‌شود به شکل خطی با زمان در برابر جریان برشی مقاومت می‌کند و وقتی تنش برداشته می‌شود خیلی سریع به حالت اولیه خود برمی‌گردد. این ویژگی‌های پلیمر پلی کاپرولاکتون به کار بردن

تجربیات

مواد

پلی کاپرولاکتون با وزن مولکولی ۷۰ تا ۹۰ کیلو دالتون از شرکت Sigma-Aldrich، پلی وینیل پیرولیدون (PVP) با وزن مولکولی ۴۰ کیلو دالتون و پلی وینیل الکل (PVA) با وزن مولکولی ۷۲ کیلو دالتون از شرکت Merk و نانو ذره بتاتری کلسیم فسفات (β -TCP) با اندازه ذرات ۱۵۰ نانومتر از شرکت نیک سرام رازی خریداری شد. استیک اسید، دی کلرو متان و سایر مواد شیمیایی نیز از شرکت Merk خریداری شدند.

دستگاه‌ها و روش‌ها

تهیه محلول‌ها

محلول ۱۵٪ w/v پلی کاپرولاکتون و پلی وینیل الکل با نسبت وزنی PCL/PVA (۶۰/۴۰) از حل کردن پلیمرها در حلال مشترک اسیداستیک تهیه و پس از تهیه محلول، به مقدار ۵٪ وزنی نانو ذره بتاتری کلسیم

۱- دانشجوی دکتری نساجی، دانشگاه گیلان

۲- استادیار گروه نساجی، دانشگاه گیلان



ضخامت آنها اندازه‌گیری شد تا حجم نانو الیاف محاسبه شود. درصد تخلخل با استفاده از روش وزنی از طریق رابطه (۲) اندازه‌گیری شد که در این رابطه ρ_m چگالی مواد پلیمری تشکیل‌دهنده نانو الیاف و ρ_{ap} چگالی ظاهری نانو الیاف می‌باشد.

$$\text{Swelling Ratio}(\%) = \frac{W_s - W_d}{W_d} \times 100 \quad (2)$$

بررسی رفتار زیست تخریب پذیری نانو الیاف تولید شده

به منظور بررسی رفتار تخریبی نانوالیاف تولید شده، ابتدا نمونه‌ها با ابعاد $1\text{cm} \times 1\text{cm}$ وزن شدند (W_i). سپس در 30 ml از محلول PBS در دمای 37°C و به مدت زمان‌های مختلف ۳، ۷، ۱۴ و ۲۸ روز (غوطه‌ور شدند. بعد از خروج نمونه‌ها از محلول PBS، با آب مقطر شستشو داده شدند و در دمای 37°C به مدت ۴۸ ساعت خشک شدند تا وزن آنها ثابت شود (W_f). قابل ذکر است، این آزمون برای هر نمونه سه بار تکرار و مقادیر میانگین کاهش وزن برای هر نمونه محاسبه شد. درصد کاهش وزن نانو الیاف تولید شده از رابطه (۵) محاسبه شد:

$$\text{Weight loss}(\%) = \frac{W_i - W_f}{W_f} \times 100 \quad (3)$$

نتایج و بحث

نتایج ریخت‌شناسی نانوالیاف

بررسی ریخت‌شناسی نانو الیاف در شکل (۱) نشان داده شده است. همان‌طور که در این شکل مشاهده می‌شود، نانوالیاف حاصل به شکل شبکه‌ای به هم پیوسته و با ریخت‌شناسی یکنواخت و بدون دانه تسبیحی حاصل شده‌اند. همچنین بررسی قطر نانوالیاف نشان می‌دهد که قطر متوسط نانو الیاف (PCL/PVP (۶۰/۴۰)، $314/7 \pm 96/69$ و قطر متوسط نانو الیاف β -TCP/PVA (۶۰/۴۰)، $461/7 \pm 92/7$ می‌باشد. این افزایش قطر در نانو الیاف به دلیل وجود پلیمر پلی وینیل الکل با وزن مولکولی به مراتب بیشتر نسبت به پلیمر پلی وینیل پیرولیدون و همچنین وجود ذره بتاتری کلسیم فسفات در ترکیب می‌باشد. وجود ذرات سرامیکی مانند بتاتری کلسیم فسفات موجب افزایش ویسکوزیته محلول پلیمری و افزایش مقاومت در برابر ازدیاد طول در هنگام الکتروریسی می‌شود و از این رو قطر نانو الیاف افزایش می‌یابد. قطر متوسط نانو الیاف لایه‌به‌لایه [PCL/PVP (۶۰/۴۰)/ β -TCP]، $541/5 \pm 232$ ، [PCL/PVA (۶۰/۴۰)]، $541/5 \pm 232$ اندازه‌گیری شد که تقریباً معادل میانگین قطر متوسط لایه‌های جداگانه تشکیل‌دهنده نانوالیاف لایه به لایه می‌باشد.

بررسی نتایج رفتار جذب آب و تخلخل نانوالیاف

توانایی جذب آب یک فاکتور مهم در بسترهای مورد کاربرد در مهندسی بافت استخوان است؛ در واقع جذب آب، نشان‌دهنده توانایی نانوالیاف برای جذب ترشحات اضافی و مرطوب نگه‌داشتن بستر زخم می‌باشد؛

فسفات به محلول اضافه شد و نانو ذره در محلول به مدت ۱۰ دقیقه توسط دستگاه التراسونیک همگن شد.

همچنین محلول ۱۵٪ w/v پلی کاپرولاکتون و پلی وینیل پیرولیدون با نسبت وزنی (۶۰/۴۰) PCL/PVA از حل کردن پلیمرها در حلال مشترک دی کلرومتان آماده شد. پس از تهیه دو محلول، هر کدام از محلول‌ها برای الکتروریسی داخل سرنگ مجزا منتقل شدند.

الکتروریسی

دستگاه الکتروریسی شامل منبع ولتاژ قوی ۳۰ - ۰ KV، دو الکتروود مثبت و منفی که الکتروود مثبت به نازل و منفی به صفحه جمع‌کننده متصل می‌شود. صفحه جمع‌کننده ساکن (ورق آلومینیومی با اندازه $15 \times 15\text{ cm}$) پمپ سرنگ رقمی (Terumo Terfusion syringe pump) مدل STC-523 ساخت ژاپن با حداقل سرعت 0.1 ml/h ، سرنگ 5 ml پلاستیکی و نازل (سر سرنگ Spinal با اندازه Gauge ۲۴) است. محلول پلی کاپرولاکتون پلی وینیل الکل بتاتری کلسیم فسفات و محلول پلی کاپرولاکتون پلی وینیل پیرولیدون در دو سرنگ جداگانه قرار گرفتند و به فاصله زمانی ۳۰ دقیقه به شکل متناوب این محلول‌ها بر روی پمپ سرنگ تک‌نازله قرار داده شدند و سرعت خروج 0.2 ml/h روی دستگاه تنظیم شد. فاصله نازل تا جمع‌کننده (ورق آلومینیومی با اندازه $15 \times 15\text{ cm}$) به اندازه 15 cm در نظر گرفته شد. ولتاژ 15 KV به دو سر الکتروود متصل به نازل و جمع‌کننده اعمال شد و به این ترتیب محلول‌ها تحت الکتروریسی لایه به لایه قرار گرفتند و شبکه بی‌بافت نانولیفی روی صفحه جمع‌کننده جمع‌آوری شد.

بررسی‌های ریخت‌شناسی

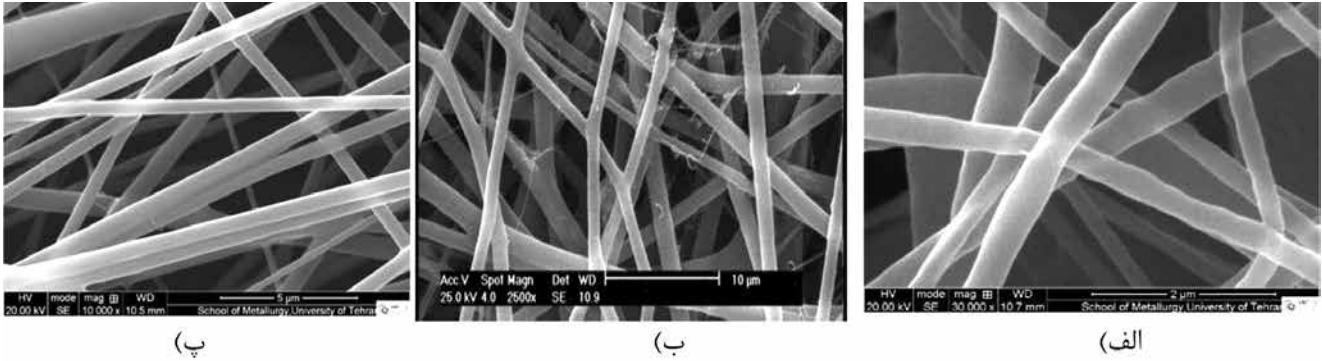
در این آزمون از میکروسکوپ الکترونی روبشی (SEM) مدل XL 30 ساخت شرکت Philips هلند برای شناسایی و مشاهده ساختار نانولیفی نمونه‌های تهیه شده و همچنین چگونگی ریخت‌شناسی و قرار گرفتن سلول‌ها روی شبکه‌های نانولیفی مورد بررسی قرار گرفت.

بررسی خواص آبدوستی و تخلخل نانو الیاف

در این آزمون ابتدا نمونه‌های برش داده شده وزن شده و به مدت ۲۴ ساعت در آب دیونیزه شده قرار داده شدند و پس از خشک شدن با کاغذ صافی وزن خیس آن اندازه‌گیری و آبدوستی شبکه‌های نانولیفی با استفاده از رابطه ۱ محاسبه شد:

$$\text{porosity} = \left(1 - \frac{\rho_{ap}}{\rho_m}\right) \times 100\% \quad (1)$$

که در این رابطه W_d وزن خشک نمونه و W_s وزن خیس نمونه می‌باشد. این آزمون برای هر نمونه ۳ بار انجام و میانگین آن گزارش شده است. در این آزمون اندازه‌گیری تخلخل نانوالیاف به روش وزنی انجام شد. در این روش، شبکه‌های نانولیفی برش داده شده ابتدا وزن شده و بعد



شکل ۱- تصاویر SEM نانوالیاف های الکترورسی شده

نتایج زیست تخریب پذیری

یکی از ویژگی‌های مهم برای نانوالیاف در برخی کاربردها، میزان تخریب پذیری آنهاست. در این پژوهش که نتایج زیست تخریب پذیری آن در شکل (۲) نشان داده شده است مشاهده می‌شود با افزودن هیدروژل پلی‌وینیل پیرولیدون میزان زیست تخریب پذیری در نانوالیاف تولید شده نسبت به نانوالیاف شامل پلی‌کاپرولاکتون خالص افزایش پیدا می‌کند اما این افزایش غیرقابل کنترل می‌باشد و بعد از ۲۸ روز نانوالیاف به‌طور کلی تخریب می‌شود و این به دلیل خواص زیست تخریب پذیری بعد، β -TCP / PCL/PVA (۶۰/۴۰) و ژله پلی وینیل پیرولیدون می‌باشد. اما با افزودن هیدروژل پلی‌وینیل الکل در نانوالیاف از ۲۸ روز میزان تخریب پذیری به حدود ۴۰٪ می‌رسد و روند تخریب زیستی منسجم‌تری اتفاق می‌افتد؛ همچنین مشاهده نیز بعد از گذشت β -TCP / PCL/PVA (۶۰/۴۰)، PCL/PVA (۶۰/۴۰) می‌شود میزان تخریب پذیری در نمونه لایه‌به‌لایه ۲۸ روز ۴۶٪ می‌باشد.

نتیجه‌گیری

از ترکیب لایه β -TCP / PCL/PVA (۶۰/۴۰)، PCL/PVP (۶۰/۴۰) در این پژوهش، نانوالیاف کامپوزیتی لایه‌به‌لایه با موفقیت الکترورسی شدند. نتایج ریخت‌شناسی β -TCP / PCL/PVA (۶۰/۴۰) و PCL/PVP (۶۰/۴۰) های جداگانه (۴۰ نشان می‌دهد نانوالیاف کامپوزیتی لایه‌به‌لایه حاصل به شکل شبکه‌ای به هم پیوسته و با ریخت‌شناسی یکنواخت و بدون دانه تسیب‌ی حاصل شده است و قطر آن تقریباً میانگین قطر لایه‌های جداگانه تشکیل دهنده نانوالیاف می‌باشد. رفتار جذب آب و تخریب پذیری نمونه‌ها با افزودن هیدروژل‌هایی مانند پلی‌وینیل پیرولیدون و پلی‌وینیل الکل در لایه‌ها، نسبت به خالص تغییر کرده و بهبود می‌یابد و در نانوالیاف کامپوزیتی لایه‌به‌لایه جذب آب نسبت به لایه‌های جداگانه بیشتر PCL هم می‌شود و همچنین تخریب پذیری روند متعادلی پیدا می‌کند. بررسی نتایج تخلخل‌سنجی نیز وضعیت مطلوبی را برای نانوالیاف نشان داده است.

منبع

بازدهمین کنفرانس ملی مهندسی نساجی ایران (دانشگاه گیلان)

به این منظور میزان جذب آب نانوالیاف با غوطه‌ور کردن آنها در محلول PBS اندازه‌گیری شد. تغییرات میزان جذب آب نانوالیاف در جدول (۱) نشان داده شده است. میزان جذب آب نانوالیاف PCL خالص بعد از ۲۴ ساعت غوطه‌وری در محلول PBS، $142 \pm 0.172\%$ / ۴۹۸ اندازه‌گیری شد. به‌منظور ارتقای قابلیت جذب آب نانو الیاف از هیدروژل‌ها استفاده شده است که میزان جذب آب نانو الیاف (۶۰/۴۰) PCL/PVP، $738 \pm 91.162\%$ / ۹۰٪ می‌باشد که مشاهده می‌شود جذب آب نانوالیاف به صورت معناداری افزایش می‌یابد. از طرفی میزان جذب آب نمونه نانوالیاف شامل β -TCP / PCL/PVA (۶۰/۴۰)، محاسبه و مقدار آن $498 \pm 223.14\%$ / ۱۴٪ اندازه‌گیری شد که نسبت به نمونه‌های شامل PVP کمتر می‌باشد که البته میزان جذب آب پلیمر PVA به مراتب بیشتر از PVP می‌باشد که این کاهش احتمالاً به دلیل وجود نانوذره β -TCP در نمونه نانوالیاف می‌باشد؛ همچنین بررسی رفتار جذب آب نانوالیاف لایه‌به‌لایه [PCL/PVA (۶۰/۴۰) / β -TCP، PCL/PVP (۶۰/۴۰)] مورد بررسی قرار گرفت که نتیجه آن میزان جذب $811 \pm 39.14\%$ / ۴۶٪ می‌باشد. که این نتیجه نشان می‌دهد میزان جذب آب در نانو الیاف لایه‌به‌لایه نسبت به نمونه‌های مجزا بیشتر می‌باشد. در این پژوهش همان‌طور که در جدول (۱) نشان داده شده است میزان تخلخل برای PCL خالص ۶۹٪ اندازه‌گیری شد. با اضافه کردن هیدروژل پلی‌وینیل پیرولیدون مشاهده می‌شود میزان تخلخل به ۷۳٪ می‌رسد و در نمونه شامل پلی‌وینیل الکل و نانو ذره بتاتری کلسیم فسفات، میزان تخلخل ۶۹٪ می‌شود و در نمونه لایه به لایه مد نظر میزان تخلخل ۷۰٪ می‌باشد.

جدول (۱) توانایی جذب آب و میزان تخلخل نانوالیاف الکترورسی شده

نوع نانوالیاف	جذب آب (%)	تخلخل (%)
PCL خالص	۴۹۸	۶۹
PCL/PVP (60/40)	۷۳۸	۷۳
PCL/PVA (60/40) / β -TCP	۵۴۲	۶۹
لایه به لایه	۸۱۱	۷۰