

## بررسی خواص مکانیکی داربست متخلخل نانو کامپوزیتی پلی کاپرولاکتون حاوی هیدروکسی آپاتیت مستخرج از پوسته تخم مرغ به روش مایکروویو

ویدا راستگوی حقی و نجمه نجم‌الدین\*

گروه تخصصی بیومواد، دانشکده علوم و فناوری پزشکی، واحد علوم و تحقیقات، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران

تاریخ ثبت اولیه: ۱۴۰۰/۰۹/۲۵، تاریخ دریافت نسخه اصلاح شده: ۱۴۰۰/۱۲/۰۳، تاریخ پذیرش قطعی: ۱۴۰۰/۱۲/۲۲

### چکیده

در این پژوهش داربست نانو کامپوزیتی متخلخل پلی کاپرولاکتون (PCL) و نانوهیدروکسی آپاتیت (HA) مستخرج از پوسته تخم مرغ به روش ریخته‌گری حلال/فروشویی ذره با استفاده از نمک سدیم کلرید و پلی اتیلن گلیکول به عنوان ذرات پروژن تهیه گردید. ذرات پروژن با مقدار کلی ۷۰٪ با نسبت ۲۰٪ پلی اتیلن گلیکول و ۵۰٪ نمک بکار گرفته شد. جهت استخراج HA از پوسته تخم مرغ از روش مایکروویو و آلتراسونیک استفاده گردید. نتایج پراش پرتو X (XRD) و میکروسکوپ الکترونی روبشی (SEM) نشان داد که سنتز HA از پوسته تخم مرغ به روش مایکروویو درجه خلوص بالاتری دارد. اندازه بلورک HA سنتز شده از پوسته تخم مرغ تقریباً ۲۱ nm محاسبه گردید. نتایج SEM نشان داد که داربست تهیه شده از ۱۰٪ HA سنتزی دارای تخلخل‌های با اندازه حفره میکرو و ماکرو، بهم مرتبط و با توزیع یکنواخت است. طیف FTIR حضور PCL و HA را در داربست‌ها تایید می‌کند. نتایج آزمون استحکام فشاری نشان داد که مدول یانگ داربست کامپوزیتی PCL/HA حاوی ۱۰wt% HA سنتزی ۱/۰۴ MPa می‌باشد که بیشتر از مدول یانگ نمونه ساخته شده از HA تجاری (۰/۶۳ MPa) است. در مجموع نتایج این پژوهش نشان داد که پوسته تخم مرغ، منبع طبیعی خوبی جهت سنتز هیدروکسی آپاتیت می‌باشد که می‌توان از آن در ساخت داربست‌های کاربردی در مهندسی بافت بهره برد.

**واژه‌های کلیدی:** داربست، نانو کامپوزیت، پلی کاپرولاکتون، هیدروکسی آپاتیت، پوسته تخم مرغ.

### ۱- مقدمه

بافت‌های مختلف نظیر پوست، استخوان، رگ‌های خونی و کندویت عصبی می‌باشد، در سال‌های اخیر بسیار مورد توجه قرار گرفته است [۱-۴]. داربست‌های پلیمری سه بعدی برای

مهندسی بافت که هدف از آن توسعه یک جایگزین بیولوژیکی با قابلیت بازگرداندن، حفظ و بهبود عملکرد

\* **عهده‌دار مکاتبات:** نجمه نجم‌الدین

نشانی: تهران، گروه تخصصی بیومواد، دانشکده علوم و فناوری پزشکی، واحد علوم و تحقیقات، دانشگاه آزاد اسلامی

تلفن: ۰۲۱-۴۴۸۶۵۱۷۹، دورنگار: ۰۲۱-۴۴۸۶۵۱۷۹، پست الکترونیکی: najmoddin@srbiau.ac.ir

معماری حفرات مطلوب می‌باشد. در بین خانواده پلیمرهای آلیفاتیک، PCL پلیمر زیست‌سازگار و زیست‌تخریب‌پذیر به شمار می‌رود. این پلیمر به دلیل نقطه ذوب پایین قابلیت فرآیندپذیری عالی دارد و در حلال‌های آلی انحلال‌پذیری خوبی دارد [۱۶].

افزودن ترکیبات معدنی مانند هیدروکسی آپاتیت ( $HA, Ca_{10}(PO_4)_6(OH)_2$ ) به عنوان یک سرامیک زیست‌فعال به داربست‌های پلیمری می‌تواند زیست‌سازگاری و استحکام آن‌ها را بهبود بخشد [۱۷، ۱۸]. تته و همکارانش، داربست‌های کامپوزیتی پلی‌یورتان/هیدروکسی آپاتیت را به روش الکتروسی تهیه کرده و نقش نوع حلال و اندازه ذرات HA را بر خواص کامپوزیت بررسی کردند [۱۹]. در سال‌های اخیر گزارشات متعددی در خصوص تهیه داربست‌های متخلخل PCL/HA جهت کاربرد در مهندسی بافت استخوان به چاپ رسیده است [۲۰، ۲۱]. چاو و همکاران از فرآیند اصلاح سطح داربست‌های متخلخل PCL/HA توسط محلول بازی جهت بهبود فرآیند استخوان‌سازی بهره بردند [۲۰]. در تحقیق دیگری توسط همین گروه جهت تقویت خواص مکانیکی داربست PCL/HA تهیه شده به روش پرینت سه بعدی از ساختاری موسوم به کاگوم استفاده گردید [۱۲]. ستاری و همکاران گزارش کردند که داربست‌های PCL، HA و ژلاتین چسبندگی، تکثیر و تمایز سلول‌های بنیادین را به میزان چشمگیری افزایش می‌دهد [۲۱]. با این حال در اکثر موارد از HA تجاری یا سنتز شده به روش شیمیایی جهت تهیه داربست استفاده شده است. HAهای تجاری در دسترس به دلیل خلوص بالا بسیار گران هستند. در سال‌های اخیر استفاده از منابع طبیعی مانند پوسته تخم مرغ یا استخوان گاو در سنتز نانوساختارها مورد توجه قرار گرفته است [۲۲-۲۴]. پوسته تخم مرغ منبع خوب کربنات کلسیم (۹۵٪) است که می‌تواند جهت سنتز HA مورد استفاده قرار گیرد [۲۳، ۲۴]. روش مایکروویو یک روش ساده و موثر برای تهیه مواد غیرآلی نانوساختار با توزیع اندازه ذره و شکل باریک با سرعت بالا می‌باشد [۲۳].

مهندسی بافت ضروری بوده و به عنوان یک پایه برای اتصال سلول‌ها و به دنبال آن تشکیل بافت عمل می‌کنند [۵، ۶]. بطور ایده‌آل، یک داربست باید حاوی حفرات باز، بهم پیوسته و با اندازه‌های متنوع باشد که به صورت یکنواخت در سرتاسر داربست توزیع شده باشند تا بتواند چسبندگی و تکثیر سلولی و همچنین انتقال مواد زائد را پشتیبانی کند و در عین حال خواص مکانیکی مطلوب جهت پشتیبانی فیزیکی بافت جدید را دارا باشد [۷، ۸].

روش‌های مختلفی نظیر الکتروسی [۹-۱۱]، پرینت سه بعدی [۱۲]، روش‌شویی ذره [۱۳] و فوم‌گازی [۱۴] جهت تولید داربست‌های متخلخل توسعه داده شده‌اند. از میان این روش‌ها، روش ریخته‌گری حلال/فروشویی ذره یکی از ساده‌ترین و کارآمدترین روش‌هاست که می‌توان بدینوسیله ساختارهای متخلخل با حفرات بهم پیوسته را در مقیاس بالا با صرفه اقتصادی تولید نمود [۶، ۱۵]. تکنیک ریخته‌گری حلال/فروشویی ذره از چهار مرحله تشکیل شده است: ۱- توزیع همگن ذرات پروژن در یک محلول پلیمری، ۲- ریختن محلول بدست آمده در قالب، ۳- حذف حلال از محلول بوسیله تبخیر و ۴- غوطه‌وری پلیمر/پروژن در آب یا حلال مناسب جهت حذف ذرات پروژن [۱۳]. استفاده از دو نوع پروژن ذره‌ای (مانند سدیم کلرید) و پلیمری (مانند پلی اتیلن گلیکول) بطور همزمان در ساخت داربست منجر به کنترل بهتر اتصال حفرات به یکدیگر با اندازه‌های متنوع می‌گردد. لیو و همکاران از دو پروژن جهت ساخت داربست‌های پلی‌کاپرولاکتون (PCL)/هیدروکسی آپاتیت (HA) به منظور استفاده در مهندسی بافت غضروف استفاده کردند [۶]. جینگ و همکاران نیز از دو پروژن جهت ساخت داربست‌های متخلخل PCL حاوی نانوفیبرهای کیتوسان بهره بردند [۳].

پلیمرهای مصنوعی تخریب‌پذیر مانند پلی استرها به عنوان مواد قابل اعتماد در مهندسی بافت مورد استفاده قرار می‌گیرند. از جمله ویژگی‌های قابل توجه این دسته مواد، امکان ساخت آن‌ها در شکل‌های مختلف با مورفولوژی و

واکنش دادند. جهت تهیه پودر HA مخلوط مواد بدست آمده تحت سه عملیات مختلف قرار گرفت: ۱- آلتراسونیک به مدت ۴۵ min با توان ۴۰۰ W (UHA)، ۲- تابش مایکروویو به مدت ۲۵ min با توان ۸۰۰ W (MHA)، ۳- آلتراسونیک به مدت ۴۵ min با توان ۴۰۰ W و سپس تحت تابش مایکروویو به مدت ۲۵ min با توان ۸۰۰ W (UMHA) و یک نمونه بدون عملیات آلتراسونیک و تابش مایکروویو در نظر گرفته شد (ZHA). سپس محصول بدست آمده در هر مرحله با آب مقطر روی کاغذ صافی مورد شستشو قرار گرفت تا یون‌های ناخواسته حذف شوند و در نهایت نمونه‌ها در آون در دمای  $100^{\circ}\text{C}$  در طول شبانه روز خشک گردید. به منظور بهبود بلورینگی، نمونه‌ها در کوره با دمای  $900^{\circ}\text{C}$  به مدت ۲ h حرارت داده شدند. لازم بذکر است که به منظور یکسان‌سازی شرایط جهت مقایسه بهتر ویژگی‌ها، HA تجاری (CHA) نیز تحت عملیات حرارتی در کوره قرار گرفت.

### ۲-۳- ساخت داربست کامپوزیتی PCL/HA

به منظور تهیه داربست کامپوزیتی PCL/HA به روش ریخته‌گری حلال/فروشویی ذره، ابتدا محلول PCL با ۲۰wt% و ۲۵wt% در حلال دی کلرومتان تهیه گردید. سپس سدیم کلراید و PEG به عنوان پروژن با نسبت کلی ۷۰ درصد وزنی (۲۰ wt% PEG و ۵۰ wt% NaCl) به محلول اضافه گردید [۶]. سپس MHA و HA تجاری (CHA) به میزان ۵ wt% و ۱۰wt% به مخلوط اضافه گردید و به مدت ۱۵ min روی همزن مغناطیسی قرار داده شد. مشخصات هر نمونه در جدول ۱ آورده شده است.

به منظور توزیع بهتر ذرات HA، مخلوط بدست آمده به مدت ۵ min اولتراسونیک گردید و پس از آن در قالب سیلیکونی ریخته‌گری شد. به منظور تبخیر حلال، نمونه‌ها به مدت ۴۸ h در آون خلا قرار گرفت تا داربست کاملاً خشک شود. برای خارج کردن ذرات پروژن و ایجاد تخلخل در داربست، نمونه‌ها به مدت ۷۲ h در آب دیونیزه غوطه‌ور گردید. لازم

در این پژوهش، در ابتدا HA از منبع طبیعی پوسته تخم مرغ به روش‌های مختلف سنتز گردید و ساختار فازی و مورفولوژی پودرهای بدست آمده با تکنیک‌های آنالیزی XRD و SEM مورد مطالعه قرار گرفت. سپس داربست‌های متخلخل کامپوزیتی PCL/HA به روش ریخته‌گری حلال/فروشویی ذره با پروژن‌های NaCl و PEG تهیه شدند. جهت تهیه داربست‌ها برای نخستین بار از HA سنتز شده از پوسته تخم مرغ استفاده گردید و ویژگی‌های ساختاری-مکانیکی آن با داربست PCL/HA تهیه شده از HA تجاری مقایسه گردید.

## ۲- فعالیت‌های تجربی

### ۲-۱- مواد مصرفی

پلی کاپرولاکتون (PCL) با وزن مولکولی ۸۰ kDa و پلی اتیلن گلیکول (PEG) با وزن مولکولی ۱۰ kDa از شرکت Sigma-Aldrich آلمان، سدیم کلراید با قطر  $300-500\ \mu\text{m}$ ، هیدروکسی آپاتیت ( $\text{HA}$ ,  $\text{Ca}_5(\text{PO}_4)_3(\text{OH})$ ) تجاری با جرم مولی  $502/31\ \text{g/mol}$  حلال دی کلرومتان (DCM) با چگالی  $1/33\ \text{g/cm}^3$ ، دی آمونیوم هیدروژن فسفات  $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ ) از شرکت Merck آلمان خریداری گردید.

### ۲-۲- سنتز هیدروکسی آپاتیت از پوسته تخم مرغ

جهت استخراج پوسته تخم مرغ از روش ارائه شده در مقاله ۲۳ به همراه پاره‌ای اصلاحات استفاده گردید. ابتدا پوسته‌های تخم مرغ با آب مقطر به خوبی شستشو داده شده و در دمای محیط خشک گردید. سپس پوسته‌های تخم مرغ در کوره با دمای  $900^{\circ}\text{C}$  به مدت ۲ h حرارت داده شدند. به موجب آن مواد آلی پوسته تخم مرغ تجزیه شده و کلسیم کربنات به اکسید کلسیم تبدیل می‌شود. اکسید کلسیم بدست آمده در هاون عقیق آسیاب گردید و در مجاورت هوا به پودر هیدروکسید کلسیم تبدیل گردید. پودر هیدروکسید کلسیم توزین گردید و با آب مقطر مخلوط گردید تا سوسپانسیون  $0/3\ \text{M}$  حاصل گردد. سپس با محلول  $0/5\ \text{M}$  دی آمونیوم هیدروژن فسفات با نسبت استوکیومتری کلسیم به فسفر  $1/67$

موج  $4000-400 \text{ cm}^{-1}$  استفاده گردید.

به منظور بررسی مورفولوژی پودرهای سنتز شده و همچنین اندازه و مورفولوژی حفره‌ها و تخلخل‌های موجود در داربست، از دستگاه میکروسکوپ الکترونی روبشی گسیل میدانی (FESEM TESCANMIRA3) استفاده گردید. به منظور افزایش هدایت الکتریکی سطح و وضوح بیشتر تصاویر، پیش از تصویربرداری لایه نازکی از طلا روی سطح نمونه‌ها پوشش داده شد. میانگین قطر تخلخل داربست‌ها با استفاده از نرم‌افزار ImageJ، از روی تصاویر FESEM محاسبه گردید.

رفتار مکانیکی داربست‌های کامپوزیتی با استفاده از آزمون استحکام فشاری مدل (SANTAM STM-20) بررسی شد. نمونه‌ها با سرعت  $1 \text{ mm/min}$  بارگذاری شدند. بیشترین میزان تنش به عنوان تنش فشاری نهایی و اندازه مدول الاستیک داربست از شیب خط ناحیه الاستیک منحنی‌های تنش- کرنش بدست آمده تعیین شدند.

### ۳- نتایج و بحث

#### ۳-۱- سنتز پودر HA از پوسته تخم مرغ

طیف XRD پودرهای HA سنتز شده از پوسته تخم مرغ در شرایط مختلف در شکل ۱ نشان داده شده است. در بین نمونه‌های سنتز شده، پودر MHA که تنها تحت تابش مایکروویو قرار گرفته بود، مطابقت بیشتری با کارت استاندارد هیدروکسی آپاتیت (JCPDS 9-432) دارد. علاوه بر این شدت پیک‌ها در این نمونه نسبت به سایر نمونه‌ها قوی‌تر بوده و هیچ پیک ناخالصی در این نمونه مشاهده نمی‌شود. در حالیکه در سایر نمونه‌ها پیک‌های مربوط به فاز  $\beta$ -TCP (JCPDS 9-196) مشاهده می‌شود. محاسبه اندازه بلورک‌ها با استفاده از رابطه شرر نشان می‌دهد که اندازه بلورک در نمونه MHA برابر  $21 \text{ nm}$  است که مطابق استاندارد ISO80004-1 نمونه مذکور در دسته مواد نانوساختار قرار دارد. پهن شدگی پیک‌ها در نمونه MHA نشان دهنده طبیعت نانوبلورک پودر سنتز شده است.

بذکر است آب دیونیزه هر  $6 \text{ h}$  تعویض گردید. برای اطمینان از خروج ذرات پروژن، وزن نمونه‌ها قبل و بعد از عملیات فروشویی ذرات با ترازوی دیجیتال مورد ارزیابی قرار گرفت. در نهایت نمونه‌ها به مدت  $24 \text{ h}$  در دمای محیط خشک گردید.

جدول ۱: مشخصات داربست‌های کامپوزیتی PCL/HA.

داربست	PCL (wt %)	HA (wt %)	PEG (wt %)	NaCl (wt %)
25P 5CHA	۲۵	۵	۲۰	۵۰
25P 5MHA	۲۵	۵	۲۰	۵۰
20P 10CHA	۲۰	۱۰	۲۰	۵۰
20P 10MHA	۲۰	۱۰	۲۰	۵۰

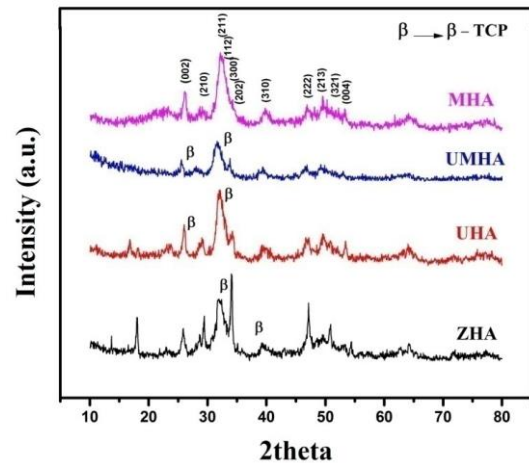
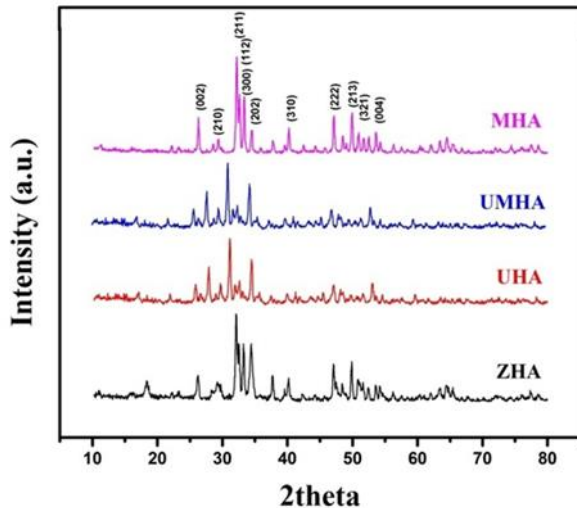
#### ۲-۴- مشخصه‌یابی داربست‌های تهیه شده

جهت تعیین نوع فاز و ارزیابی بلورینگی پودرهای سنتز شده HA، از روش پراش پرتو ایکس (XRD, PW1730) استفاده گردید. الگوی پراش پرتو ایکس هر نمونه با استفاده از پرتو  $\text{CuK}\alpha$  با طول موج  $\lambda = 1.54 \text{ \AA}$  در محدوده  $2\theta$  از  $10^\circ$  تا  $80^\circ$  درجه با طول گام  $0.05^\circ$  درجه و زمان بر گام  $1 \text{ s}$  بدست آمد. پس از حصول الگوهای پراش پرتو ایکس هر نمونه، هر یک از فازها و اجزا سازنده از راه مقایسه زاویه و شدت پیک‌های پراش با داده‌های موجود در کارت‌های استاندارد (JCDPS) مشخص و تعیین گردید. جهت محاسبه اندازه متوسط بلورک‌ها از فرمول زیر استفاده گردید [۲۵]:

$$t = \frac{K\lambda}{\beta \cos\theta}$$

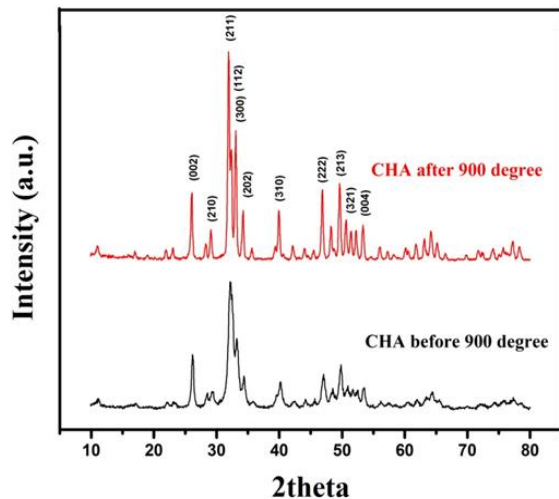
طبق این فرمول،  $t$  اندازه متوسط بلورک (nm) است،  $K$  ضریب شکل ( $K=0.9$ )،  $\lambda$  طول موج پرتو ایکس ( $\lambda=1.54056 \text{ \AA}$ )،  $B$  پهنای پیک ماکزیمم در نصف ارتفاع آن (رادیان) و  $\theta$  زاویه پراش براگ ( $^\circ$ ) می‌باشد.

به منظور بررسی پیوندهای شیمیایی و گروه‌های عاملی داربست‌های کامپوزیتی از روش طیف‌سنجی فروسرخ با تبدیل فوریه (FTIRVARIAN 670-IR) در محدوده طول



شکل ۱: الگوی پراش پرتو ایکس پودرهای HA سنتز شده از پوسته تخم مرغ در شرایط مختلف.

شکل ۲: الگوی پراش ایکس پودرهای HA سنتز شده از پوسته تخم مرغ در شرایط مختلف پس از عملیات حرارتی در دمای ۹۰۰ °C.



شکل ۳: الگوی پراش پرتو ایکس پودرهای HA تجاری (CHA) قبل و پس از عملیات حرارتی در دمای ۹۰۰ °C.

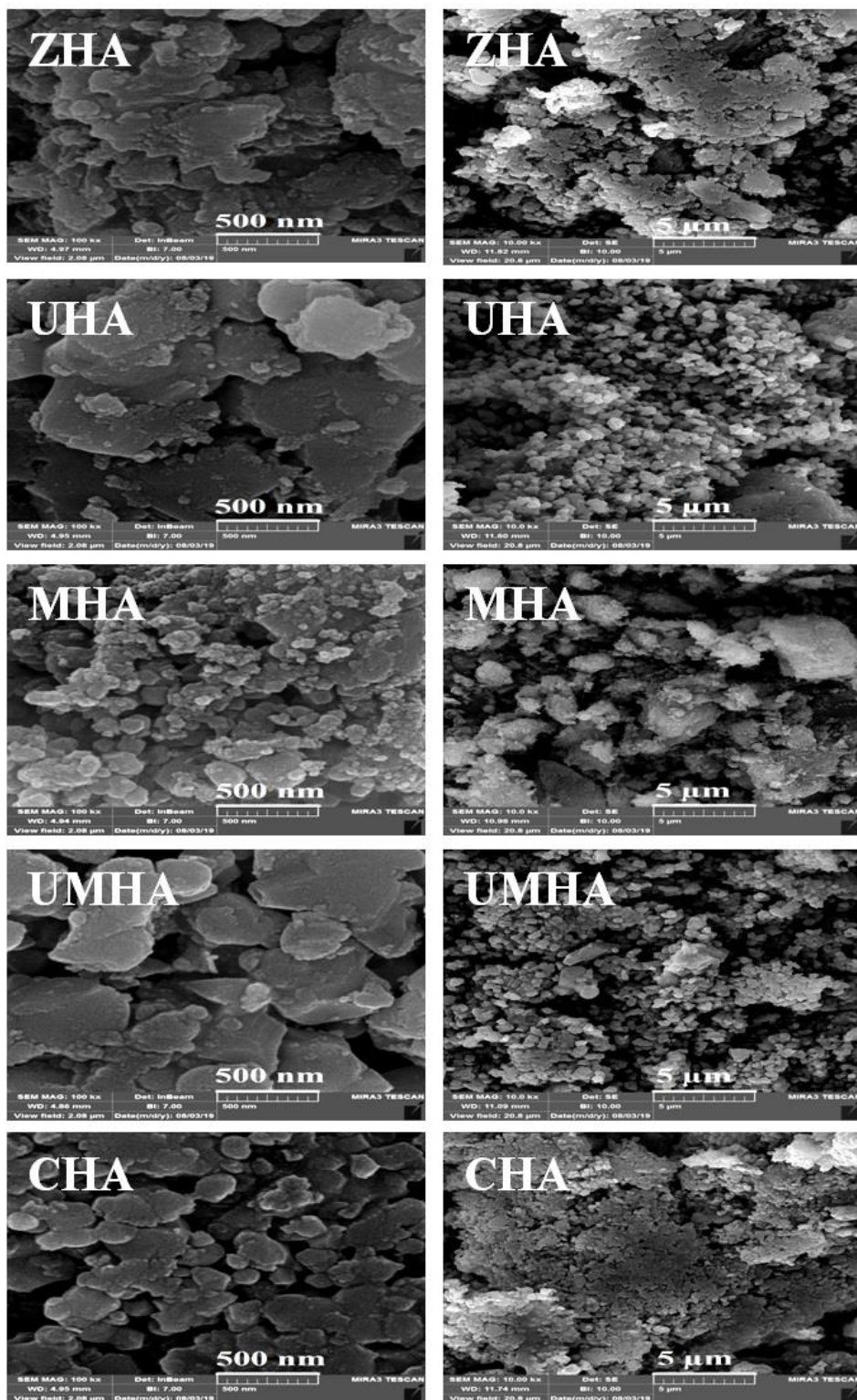
به منظور بهبود بلورینگی در نمونه‌ها، عملیات حرارتی در دمای ۹۰۰ °C به مدت ۲ h انجام گردید. با توجه به شکل ۲، ارزیابی پیک‌ها نشان می‌دهد که پیک‌های ظاهر شده در نمونه MHA به نمونه استاندارد هیدروکسی آپاتیت شباهت بیشتری دارد. از طرفی شدت پیک‌ها و درجه بلورینگی در این نمونه نسبت به نمونه عملیات حرارتی نشده افزایش یافته است.

شکل ۳ الگوی پراش پرتو ایکس پودر HA تجاری (CHA) قبل و پس از عملیات حرارتی در دمای ۹۰۰ °C را نشان می‌دهد. در این نمونه نیز انجام عملیات حرارتی منجر به بهبود بلورینگی شده است.

جهت بررسی مورفولوژی و اندازه پودرهای HA سنتز شده (MHA, UMHA, UHA, ZHA) و نمونه HA تجاری (CHA)، از نمونه‌ها در دو بزرگنمایی کم و زیاد تصاویر FESEM گرفته شد (شکل ۴).

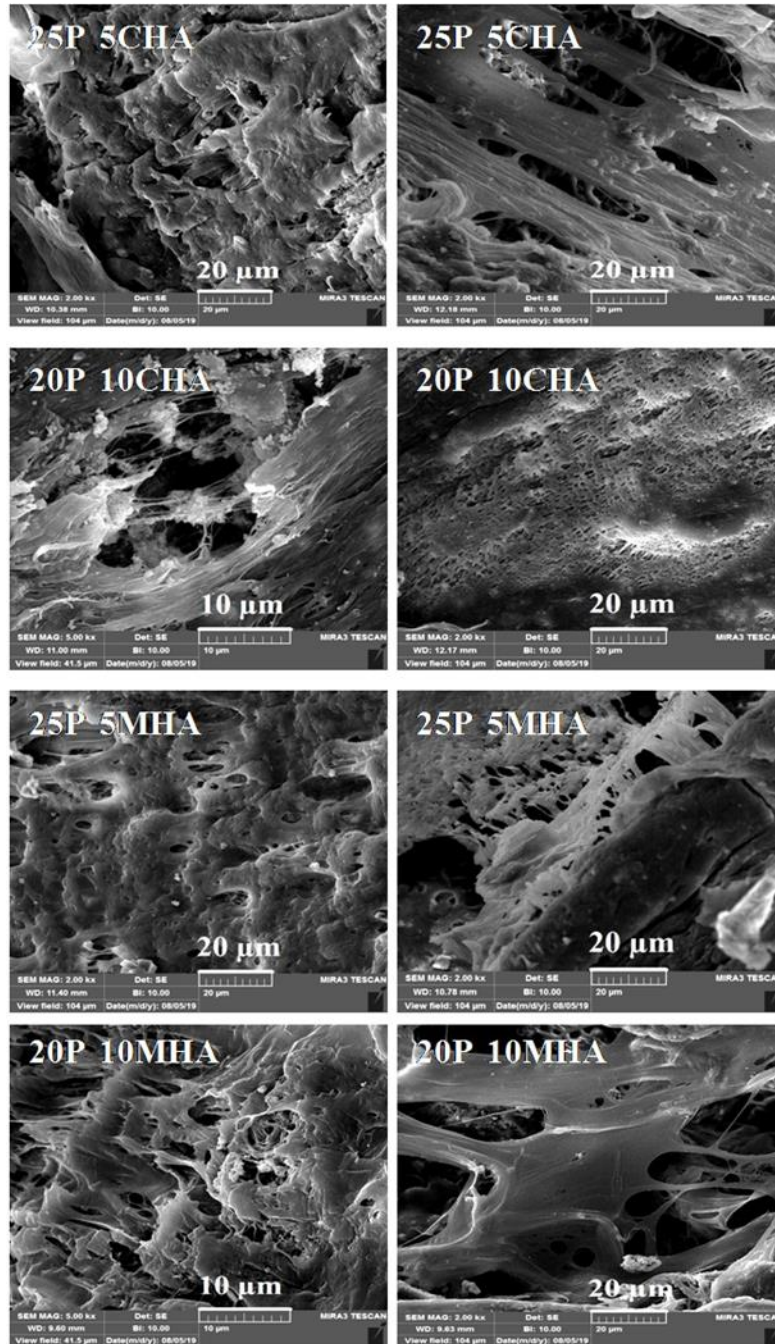
تصاویر FESEM در بزرگنمایی کم نشان می‌دهد که پودرهای سنتز شده از ذرات ریزی تشکیل شده‌اند که آگلومره شده و خوشه‌ها را تشکیل داده‌اند. در حالی که در

بزرگنمایی‌های بالاتر مورفولوژی و اندازه ذرات به وضوح قابل تشخیص است. در نمونه ZHA و نمونه‌هایی که تحت عملیات آلتراسونیک قرار گرفتند، مورفولوژی صفحه‌ای در محدوده میکرومتری قابل مشاهده است و ساختار به صورت غیریکنواخت تر و توده‌ای است.



شکل ۴: تصاویر FESEM از پودرهای سنتز شده با دو بزرگنمایی  $\times 100K$  و  $\times 10K$  برای نمونه‌های ZHA، UHA، MHA، UMHA و CHA.





شکل ۶: تصاویر FESEM داربست‌های کامپوزیتی PCL/HA ساخته شده با ۵ wt% و ۱۰ wt% HA تجاری و HA سنتز شده از پوسته تخم مرغ به روش میکروویو.

استاندارد ISO80004-1 اندازه ذره در محدوده نانومقیاس است.

آنالیز عنصری EDAX نمونه MHA در شکل ۵ نشان داده شده است. ظهور پیک‌های کلسیم، فسفر و اکسیژن به علت حضور فاز هیدروکسی آپاتیت در ساختار نمونه است. ضمناً

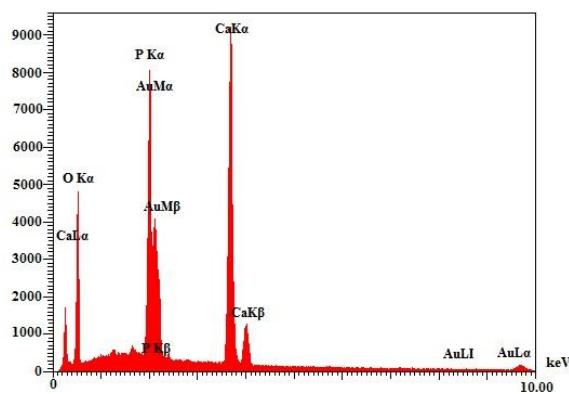
در حالی که در نمونه سنتز شده تحت تابش مایکروویو (MHA) ذرات زینتر شده به خوبی از هم جدا شده‌اند و پودر با ساختار منظم، کروی شکلی و با توزیع یکنواخت‌تری بدست آمده است. اندازه ذرات با استفاده از نرم‌افزار ImageJ در نمونه MHA برابر ۲۳ nm محاسبه شد که با توجه به

شده از CHA دارای تخلخل‌های یکنواخت‌تری هستند که در سرتاسر داربست پراکنده شده‌اند. به نظر می‌رسد که با افزایش درصد HA میزان تخلخل‌ها در داربست‌های 20P10MHA و 20P10CHA نسبت به نمونه‌های 25P5CHA و 25P5MHA افزایش یافته است که می‌تواند ناشی از نقش HA به عنوان یک فاز معدنی در جوانه‌زنی و رشد حفرات و تخلخل‌ها باشد. اندازه تخلخل‌ها در داربست 20P10MHA در محدود ماکرو و میکرو قرار دارد. اندازه حفرات در محدوده ماکرو در توافق با اندازه نمک NaCl می‌باشد که به عنوان پروژن در ساخت داربست مورد استفاده قرار گرفته است. اگرچه نمک تنها منبع ایجاد حفره نبوده و حضور پروژن دوم PEG در کنار تبخیر حلال منجر به ایجاد حفرات بیشتر با اندازه میکرو در نمونه شده است. وجود حفرات با اندازه‌های مختلف در داربست، عملکرد آن را تحت تاثیر قرار می‌دهد. به گونه‌ای که وجود حفرات ماکرو (میکرون  $> 50$ ) در شکل بافت و حفرات میکرومتر (50-1 میکرون) در عملکرد سلول نقش مهمی دارند [۳]. از طرفی حفرات موجود در داربست 20P10MHA به یکدیگر مرتبط بوده به گونه‌ای که حضور تخلخل در دیواره‌ها مشهود است. حضور دو پروژن حین ساخت داربست می‌تواند در دستیابی به یک ساختار متخلخل با حفرات مرتبط و اندازه‌های متنوع موثر باشد.

طیف FTIR داربست‌های کامپوزیتی PCL/HA ساخته شده با ۵ و ۱۰ درصد CHA و MHA در شکل ۷ نشان داده شده است.

با توجه به طیف FTIR نمونه‌ها، پیک‌های مشخصه PCL و HA در تمام نمونه‌ها مشاهده می‌شود. پیک در عدد موجی  $3429\text{ cm}^{-1}$  مربوط به گروه OH و پیک‌های ظاهر شده در  $2922\text{ cm}^{-1}$  و  $2856\text{ cm}^{-1}$  مربوط به ارتعاش کششی نامتقارن و متقارن  $\text{CH}_2$  در ساختار PCL است [۲۶، ۲۷]. پیک مشخصه در  $1641\text{ cm}^{-1}$  مربوط به ارتعاش کششی  $\text{C=O}$  استری PCL است. باندهای  $1171\text{ cm}^{-1}$  و  $1048\text{ cm}^{-1}$  به کشش COC نسبت داده می‌شود. پیک‌های مشخصه گروه  $\text{PO}_4^{3-}$  در عدد

پیک قوی طلای ظاهر شده به علت پوشش نمونه‌ها با طلا پیش از تصویربرداری توسط دستگاه میکروسکوپ الکترونی روبشی است.



شکل ۵: آنالیز عنصری EDAX پودر MHA.

با توجه به نتایج بدست آمده از الگوی پراش پرتو ایکس و تصاویر FESEM، نمونه MHA به عنوان نمونه بهینه جهت ساخت داربست کامپوزیتی PCL/HA انتخاب گردید. به منظور مقایسه داربست کامپوزیتی PCL/HA تهیه شده از CHA نیز مورد ارزیابی قرار گرفت.

### ۳-۲- ساخت داربست کامپوزیتی PCL/HA

طیف درصد تخلخل، اندازه حفرات و نحوه ارتباط آن‌ها به یکدیگر می‌تواند نفوذ سلول‌ها به داخل داربست را تحت تاثیر قرار دهد [۱۹]. وجود حفرات باز بهم پیوسته به سلول‌ها امکان نفوذ به داخل داربست را می‌دهد و همچنین امکان تبادل مواد غذایی برای سلول و دفع مواد زائد فراهم می‌شود [۳]. به منظور بررسی مورفولوژی حفرات داربست‌های کامپوزیتی PCL/HA، از سطح شکست داربست‌ها تصاویر FESEM تهیه گردید (شکل ۶).

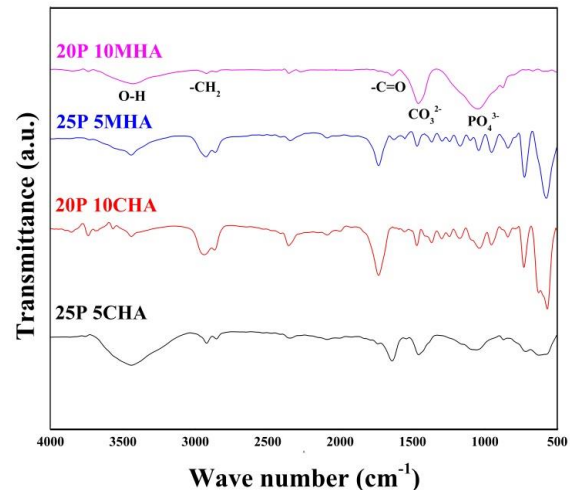
همانطور که در شکل ۶ قابل مشاهده است، تمام داربست‌ها حاوی تخلخل می‌باشند که از خروج پروژن NaCl و PEG و همچنین تبخیر حلال از نمونه‌ها حاصل شده است.

همچنین، داربست‌های PCL/HA ساخته شده از HA سنتز شده از پوسته تخم مرغ (MHA) نسبت به داربست‌های تهیه



استحکام بالاتر ذاتی بیوسرامیک‌ها، ترکیب آن‌ها با مواد بیوپلیمری منجر به تولید مواد کامپوزیتی با خواص مکانیکی بهبود یافته می‌گردد. از طرف دیگر، حفظ خواص مکانیکی حین تخریب تاثیر قابل ملاحظه‌ای در عملکرد داربست دارد. اگرچه ماتریس پلیمری در نهایت تخریب می‌شود، داربست سه بعدی باید تا زمانی که بافت مهندسی شده یکپارچگی مکانیکی جهت حفظ خود را داشته باشد، حمایت کننده فیزیکی را فراهم کند. همچنین نتایج بدست آمده حاکی از آن است که داربست تهیه شده با استفاده از HA استخراج شده از پوسته تخم مرغ استحکام فشاری و مدول یانگ بالاتری نسبت به نمونه مشابه با HA تجاری دارد. این موضوع می‌تواند به دلیل اندازه ذرات نانومتری HA استخراج شده از پوسته تخم مرغ باشد که توسط تصاویر FESEM هم تایید گردیده است. یکی از مزایای استفاده از عوامل تقویت کننده نانومتری در مقایسه با میکرومتری در کامپوزیت‌های زمینه پلیمری، بهبود الاستیسیته و چقرمگی است که با اندازه‌گیری انرژی جذب شده پیش از شکست تعیین می‌شود. این امر به دلیل نسبت سطح به حجم بالای نانومواد است که باعث افزایش فصل مشترک بین پلیمر و فاز تقویت کننده می‌شود. در نتیجه انتقال بار از طریق زمینه به جزء تقویت کننده به صورت موثرتری انجام می‌شود و همچنین میزان تنش در مکان‌های معیوب کاهش و لذا چقرمگی و انعطاف‌پذیری افزایش می‌یابد [۲۸]. پژوهش صورت گرفته توسط تته و همکاران نیز نشان داد که نانوذرات HA در مقایسه با میکروذرات HA تاثیر بیشتری در بهبود خواص مکانیکی داربست‌های الکترورسی شده پلی یورتان داشته است [۱۹]. در پژوهش دیگری داربست PCL/HA با ۱۰ wt% هیدروکسی آپاتیت تهیه گردید [۲۹]. مقدار استحکام فشاری داربست PCL/HA حاوی ۱۰ wt% MHA در پژوهش حاضر بسیار بالاتر از مقدار گزارش شده برای داربست مذکور است. علت این امر ناشی از اندازه کوچک‌تر HA استفاده شده در این پژوهش در مقایسه با منبع مذکور باشد.

موجی  $1048 \text{ cm}^{-1}$  ظاهر می‌شوند که این گروه در ساختار HA حضور دارد. در نمونه 20P10MHA مشاهده می‌شود که با افزایش درصد HA شدت پیک  $\text{PO}_4^{3-}$  افزایش یافته است. همچنین باند  $1459 \text{ cm}^{-1}$  مربوط به یون  $\text{CO}_3^{2-}$  می‌باشد [۲۳].



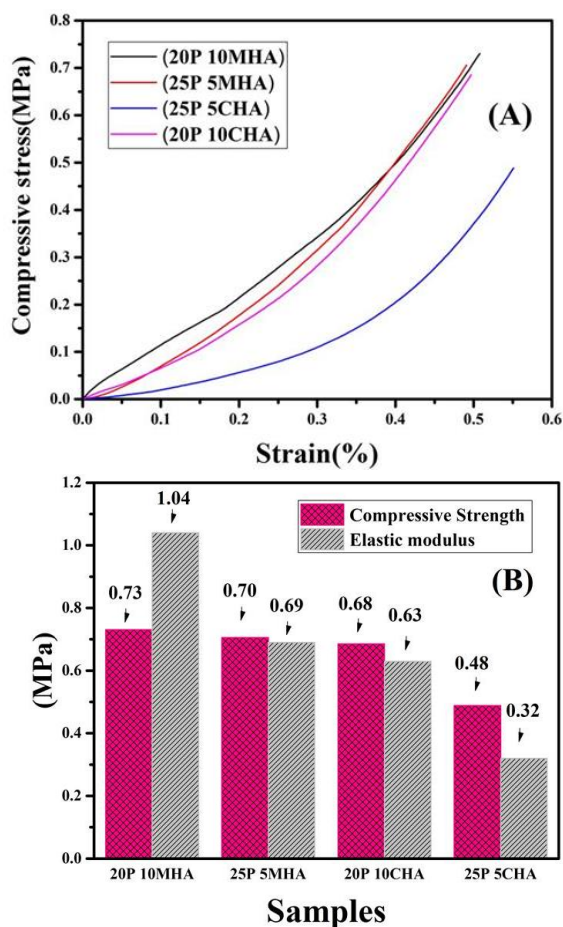
شکل ۷: طیف FTIR داربست‌های کامپوزیتی PCL/HA ساخته شده با ۵wt% و ۱۰ wt% CHA و MHA.

خواص مکانیکی داربست‌های ساخته شده یکی از عوامل تاثیرگذار در موفقیت داربست بعد از ایمپلنت شدن داخل بدن است و بر مدل‌سازی مجدد بافتی تاثیر می‌گذارد. به همین دلیل استحکام فشاری داربست‌ها مورد بررسی و نتایج آن در شکل ۸ نشان داده شده است. استحکام فشاری داربست‌های 20P10MHA، 25P5MHA، 20P10CHA، 25P5CHA و 20P10MHA به ترتیب برابر با  $0/48$ ،  $0/68$ ،  $0/7$  و  $0/73$  MPa می‌باشد. مدول یانگ داربست‌های 25P5CHA، 20P10CHA، 25P5MHA و 20P10MHA به ترتیب برابر با  $0/32$ ،  $0/63$ ،  $0/69$  و  $1/04$  MPa می‌باشد. نتایج نشان می‌دهد که نمونه 20P10MHA دارای استحکام فشاری و مدول یانگ بالاتری در مقایسه با سایر نمونه‌ها است. پلیمرها بطور کلی انعطاف‌پذیر هستند و استحکام مکانیکی و سفتی پایی از خود نشان می‌دهند، در حالی که مواد غیرآلی مانند بیوسرامیک‌ها سفت و ترد هستند. به دلیل سفتی و

میکروسکوپ الکترونی روبشی نشان داد که ذرات هیدروکسی آپاتیت سنتز شده به روش مایکروویو نسبت به سایر روش‌های سنتز، کروی شکل، منظم‌تر و ریزتر بودند. تصاویر میکروسکوپ الکترونی روبشی نشان داد که داربست‌های کامپوزیتی پلی کاپرولاکتون و هیدروکسی آپاتیت، حاوی ۱۰ wt% از هیدروکسی آپاتیت سنتز شده به روش مایکروویو دارای تخلخل‌های منظم‌تر و بهم مرتبط و با اندازه‌های میکرو و ماکرو بودند و از استحکام فشاری و مدول یانگ بالاتری در مقایسه با داربست تهیه شده از هیدروکسی آپاتیت تجاری برخوردار هستند.

## مراجع

- [1] نوشین زندی، محمد علی شکرگزار، الناز تمجید و عبدالرضا سیم‌چی، الکترونیسی ژلاتین با غلظت بالا و اتصال عرضی آن از طریق واکنش میلارد برای کاربرد در ساخت داربست‌های مهندسی بافت، مجله نانومواد، شماره ۴۱، ۱۳۹۹، ۳۱-۴۱.
- [2] P. Chocholata, V. Kulda, V. Babuska, *Materials*, **12**, 2019, 568.
- [3] X. Jing, H.Y. Mi, T. Cordie, M. Salick, X.F. Peng, L.S. Turng, *Industrial & Engineering Chemistry Research*, **53**, 2014, 17909.
- [4] P. Ghaderinejad P.N. Najmoddin, Z. Bagher, M. Saeed, S. Karimi, S. Simorgh, M. Pezeshki-Modaress, *Chemical Engineering Journal*, **420**, 2021, 130465
- [5] S. Shkarina, R. Shkarin, V. Weinhardt, E. Melnik, G. Vacun, P.J. Kluger, K. Loza, M. Epple, S.I. Ivlev, T. Baumbach, M.A. Surmeneva, R.A. Surmenev, *Scientific Reports*, **8**, 2018, 8907.
- [6] L. Liu, Y. Wang, S. Guo, Z. Wang, W. Wang, *Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials*, **100**, 2012, 956.
- [7] J.M. Unagolla, A.C. Jayasuriya, *Materials Science & Engineering C*, **102**, 2019, 1.
- [8] S.M. Bittner, B.T. Smith, L. Diaz-Gomez, C.D. Hudgins, A. J. Melchiorri, D.W. Scott, J.P. Fisher, A.G. Mikos, *Acta Biomaterialia*, **90**, 2019, 37.
- [9] Z. Heydari, D. Mohebbi-Kalhari, M.S. Afarani, *Materials Science & Engineering C*, **81**, 2017, 127.
- [10] S. Gautam, C.H. Sharma, D.P.H. Singh, A.K. Dinda, P.D. Potdar, C. Chou, N.C. Mishra, *Materials Science & Engineering C*, **119**, 2021, 111588.
- [11] H. Samadian, H. Khastar, A. Ehterami, M. Salehi, *Scientific Reports*, **11**, 2021, 13877.
- [12] Y.S. Cho, M. Quan, N. Kang, H. Jeong, M.W. Hong, Y.Y. Kim, Y. Chod, *European Polymer Journal*, **134**, 2020, 109814.
- [13] S. Taherkhani, F. Moztaazadeh, *Journal of Applied Polymer Science*, **133**, 2016, 43523.
- [14] P. Song, C. Zhou, H. Fan, B. Zhang, X. Pei, Y. Fan, Q. Jiang, R. Bao, Q. Yang, Z. Dong, X. Zhang, *Composites Part B: Engineering*, **152**, 2018, 151.
- [15] N.B. Erdal, J.G. Yao, M. Hakkarainen, *Biomacromolecules*, **20**, 2019, 738.



شکل ۸: الف) نمودار تنش فشاری/ کرنش داربست‌های کامپوزیتی PCL/HA ساخته شده با ۵ wt% و ۱۰ wt% MHA و CHA (ب) مدول یانگ و استحکام فشاری نمونه‌ها که از روی منحنی تنش-کرنش بدست آمده است.

## ۴- نتیجه گیری

داربست‌های کامپوزیتی متخلخل پلی کاپرولاکتون و هیدروکسی آپاتیت مستخرج از پوسته تخم مرغ به روش فروشویی ذرات/ریخته گری حلال با استفاده از دو پروژن نمک سدیم کلرید و پلی اتیلن گلیکول ساخته شدند. در ابتدا هیدروکسی آپاتیت از پوسته تخم مرغ به روش مایکروویو، آلتراسونیک و ترکیب این دو روش استخراج گردید. با توجه به الگوی پراش پرتو ایکس، هیدروکسی آپاتیت سنتز شده به روش مایکروویو از درجه خلوص بالاتری برخوردار بوده و با عملیات حرارتی در دمای ۹۰۰ °C پیک‌های قوی‌تر و بلورینگی بیشتری از خود نشان می‌دهد. همچنین تصاویر

- [23] D.S.R. Krishna, A. Siddharthan, S.K. Seshadri, *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, **18**, 2007, 1735.
- [24] N.K. Nga, N.T.T. Chau, P.H. Viet, *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, **172**, 2018, 769.
- [25] S. Karimi, Z. Bagher, N. Najmoddin, S. Simorgh, M. Pezeshki-Modaress, *International Journal of Biological Macromolecules*, **167**, 2021, 796.
- [26] H. Janik, M.A. Marzec, *Materials Science and Engineering: C*, **48**, 2015, 586.
- [27] D.L. Pavia, G.M. Lampman, G.S. Kriz, J.R. Vyvyan, *Introduction to Spectroscopy*, Brooks/Cole, Cengage Learning, 4<sup>th</sup> edition, USA, 2009.
- [28] S.K. Misra, F. Ostadossein, R. Babu, J. Kus, D. Tankasala, *Advanced Healthcare Materials*, **6**, 2017, 1700008.
- [29] B. Chuenjitkuntaworn, W. Inrung, D. Damrongsri, K. Mekaapiruk, P. Supaphol, P. Pavasant, *Journal of Biomedical Materials Research Part A*, **94**, 2010, 241.
- [16] A. Oryan, S. Hassanajili, S. Sahvieh, N. Azarpira, *Life Sciences*, **257**, 2020, 118038.
- [17] S.A.S. Nasrollah, N. Najmoddin, M. Mohammadi, A. Fayyaz, B. Nyström, *Journal of Applied Polymer Science*, **138**, 2021, 50017.
- [18] M. Meskinfam, S. Bertoldi, N. Albanese, A. Cerri, M.C. Tanzi, R. Imani, N. Baheiraei, M. Farokhi, S. Farè, *Materials Science and Engineering: C*, **82**, 2018, 130.
- [19] G. Tetteh, A. Khan, R. Delaine-Smith, G. Reilly, I. Rehman, *Journal of the Mechanical Behavior of Biomedical Materials*, **39**, 2014, 95.
- [20] Y.S. Cho, M. Quan, S. Lee, M.W. Hong, Y.Y. Kim, Y. Cho, *Composites Science and Technology*, **184**, 2019, 107844.
- [21] M. Sattary, A. Kefayat, A. Bigham, M. Rafienia, *Materials Technology: Advanced Performance Materials*, **14**, 2020, 1.
- [22] J. Athinarayanan, V.S. Periasamy, A.A. Alshatwi, *Materials Science & Engineering C*, **117**, 2020, 111313.