

تولید داربست هیدروکسی آپاتیت-اسید هیالورونیک به روش تبخیر حلال

آرش یزدانی^{۱*}، ارمغان نوربخش^۱

(تاریخ دریافت: ۱۳۹۸/۰۳/۰۹، ش.ص: ۱۴۰-۱۳۳، تاریخ پذیرش: ۱۳۹۸/۰۳/۲۵)

چکیده

هدف از این مطالعه بررسی تأثیر هم‌زمان پلیمرهای اسید هیالورونیک (HA)، پلی وینیل الکل (PVA)، ژلاتین (Gel) در داربست مینرال استخوانی نانو هیدروکسی آپاتیت (nHAp) است. در این پژوهش، برای اولین بار با روش تبخیر حلال ساده، داربست استخوانی nHAp و پلیمرهای زیست تخریب پذیر HA، PVA و Gel ایجاد شد. نمونه‌های کامپوزیتی دوجزئی PVA - nHAp، کامپوزیت‌های سه‌جزئی nHAp - PVA - Gel و nHAp - PVA - HA و همچنین کامپوزیت چهار جزئی HA - Gel با nHAp - PVA - با استفاده از فرایند تبخیر حلال ساده تهیه شد. بررسی‌های فازی و شیمیایی داربست به وسیله آزمون‌های FTIR و XRD انجام شد. توزیع و اندازه تخلخل‌ها، چگونگی ارتباط آن‌ها با یکدیگر و همچنین ناهم‌واری‌های سطح تخلخل‌ها با استفاده از میکروسکوپ الکترونی روبشی (SEM) مطالعه گردید. همچنین آزمون استحکام فشاری ضربه‌ای بر روی قرص‌های تهیه شده از این کامپوزیت انجام شد. آزمون FTIR تشکیل ترکیب شیمیایی جدیدی را نشان نداد. بالاترین استحکام فشاری ضربه‌ای مربوط به نمونه‌ی چهار جزئی بود. بررسی آنالیز SEM بر اساس اندازه‌ی تخلخل‌ها برای نمونه‌ی چهار جزئی، تشکیل داربست را بیان نمود، آنالیز XRD آمورف بودن نمونه‌ها را نشان داد و با توجه به شباهت نمودار XRD نمونه چهار جزئی با نمودار مربوط به استخوان طبیعی، همچنین اندازه تخلخل‌ها و ذات روش تولید که معمولاً منجر به تخلخل‌های متصل به هم می‌شود، پیش‌بینی می‌شود که بتوان از این کامپوزیت به‌عنوان پرکننده استخوان استفاده کرد.

واژه‌های کلیدی: داربست، هیالورونیک اسید، پلی وینیل الکل، هیدروکسی آپاتیت، تبخیر حلال.

^۱ - دانشگاه صنعتی شاهرود، دانشکده مهندسی شیمی و مواد
* - نویسنده مسئول مقاله: ayazdani@shahroodut.ac.ir

پیشگفتار

همه چسبندگی بهتر مواد کامپوزیتی در حالت جامد است [8].

با توجه به سابقه تهیه و بررسی کامپوزیت هیدروکسی آپاتیت - ژلاتین - پلی و نیل الکل و شباهت آن به استخوان طبیعی در سال ۲۰۱۲، [9] و کامپوزیت زیست فعال هیدروکسی آپاتیت - کلاژن - اسید هیالورونیک که د آن هیالورونیک نرخ استخوان سازی را افزایش می دهد [8] و تهیه کامپوزیت متشکل از هیدروکسی آپاتیت - سولفات کلسیم - هیالورونیک اسید به عنوان جایگزین ایده‌الی برای تعمیر نقص استخوان وئول در خرگوش [10]، همچنین با توجه به اثر تخلخل‌زایی ژلاتین در داربست‌های استخوانی [11]، مواد اولیه و نسبت‌های آن‌ها در این مطالعه برگزیده شد

مواد و روش‌ها

تهیه داربست کامپوزیتی

برای تهیه کامپوزیت‌ها از فاز سرامیکی nHAp و پلیمرهای زیست تخریب پذیر PVA, HA, Gel به روش تبخیر حلال استفاده شد. نانو ذرات هیدروکسی آپاتیت با فرمول $\text{Ca}_5(\text{PO}_4)_3(\text{OH})$ از شرکت Merck آلمان، پلی و نیل الکل با فرمول $\text{C}_2\text{H}_4\text{O}$ با وزن مولکولی ۷۲۰۰۰ دالتون از شرکت Merck آلمان، ژلاتین با فرمول $(\text{C}_35\text{H}_{55}\text{N}_{12}\text{O}_{12})_n$ از شرکت کره‌ای Samchan و اسید هیالورونیک با فرمول $(\text{C}_{14}\text{H}_{21}\text{NaNO}_{11})_n$ از شرکت سیگما تهیه گردید.

محلول اولیه نمونه‌های کامپوزیتی دوجزئی PVA - nHAp، کامپوزیت‌های سه‌جزئی PVA - Gel - nHAp و PVA - HA - nHAp و همچنین کامپوزیت چهار جزئی PVA - HA - Gel - nHAp به ترتیب با کدهای S_1 ، S_0 ، S_2 و S_3 بر اساس نسبت‌های مولی که در جدول ۱ بیان شده، در دمای 100°C و با همزن مغناطیسی تهیه شد و سپس روی صفحه‌ای از جنس فولاد زنگ‌نزن در آن در دمای 100°C به مدت ۱۲ ساعت خشک گردید.

از آنجایی که داربست متخلخل در بدن شروع به تخریب شدن می کند و همزمان با آن، سلول‌های وارد شده به داخل داربست شروع به رشد و تکثیر می کنند تا در نهایت بافت جدید و مجموعه سلولی^۲ جایگزین شود [1]، داربست و یا کامپوزیت جایگزین استخوان، بایستی یا ذاتاً استخوان ساز باشد و یا حاوی ماده فعال کننده استخوان سازی همچون فاکتورهای رشد و پروتئین‌های زمینه خارج سلولی (ECM) باشد تا موجب تشکیل استخوان در محل شود [2]. همچنین ساختار استخوان، کامپوزیتی از نانو ذرات هیدروکسی آپاتیت (nHAp) است، بنابراین محققین تمرکز بالایی بر ساخت بیوکامپوزیت و داربست جهت جایگزینی یا بهبود استخوان بر پایه سرامیک استخوان ساز nHAp داشته‌اند [3]. نانوهیدروکسی آپاتیت، به دلیل زیست فعال بودن قابلیت اتصال به بافت زنده بدون ایجاد لایه کلاژنی دارد.

در بسیاری از کاربردهای مهندسی بافت، ماده کاشتنی باید پس از تشکیل کامل بافت استخوانی جدید به طور کامل خارج شود. در عین حال، برای عدم نیاز به یک جراحی ثانویه، استفاده از پلیمرهای زیست تخریب پذیر از قبیل پلی و نیل الکل (PVA) و هیالورونیک اسید (HA) و ژلاتین (Gel) نسبت به سایر انواع پلیمرها متداول تر است. این پلیمرها به تدریج تجزیه شده و جذب مایعات بدن می شوند [4].

پلیمر زیست تخریب پذیر و محلول در آب PVA که از پلی و نیل استات آبکافت می شود و خواص مکانیکی مطلوبی دارد، با وارد کردن ذرات معدنی نانوهیدروکسی آپاتیت به داخل بستر پلیمری موجب هدایت و رشد استخوان می شود [5,6].

هیالورونیک اسید عملکردهای زیادی در سرتاسر بدن، به خصوص در بافت‌های پیوندی دارد. برخی از نقش‌های شناخته شده هیالورونیک اسید عبارت‌اند از: نگهداری رطوبت، افزایش ویسکوزیته و کاهش روانی مایع خارج سلول، تنظیم بازسازی بافت‌ها، تنظیم حرکات و تکثیر سلول‌ها، تنظیم پاسخ‌های ایمنی و التهابی [7] و مهم تر از

¹-Cellular system

جدول ۱- نسبت مولی نمونه‌ها

نمونه‌ها	PVA	Gel	HA	nHAp
S ₀	۲	۰	۰	۶
S ₁	۲	۰	۳	۶
S ₂	۲	۳	۰	۶
S ₃	۲	۲	۱	۶

آزمون SEM

به منظور تعیین اندازه تخلخل‌ها از آنالیز میکروسکوپ الکترونی روبشی با مدل Hitachi S-4160 با بزرگنمایی‌هایی تا ۳۰۰۰۰ برابر استفاده شد.

آزمون XRD

در جهت شناسایی نوع فازهای تشکیل‌دهنده در هر نمونه آزمایش پراش پرتو X با کاتد مس K α ساخت شرکت Bruker، و 2θ در محدوده 10° تا 80° در دمای اتاق انجام شد.

آزمون میکرو فشار

هر یک از نمونه‌ها بعد از تبدیل به قرص با قطر ۴mm و ارتفاع ۶mm توسط دستگاه STM150 ساخت ایران، مطابق با استاندارد STM - D695- 2a مورد آزمون میکرو فشار قرار گرفت.

آزمون FTIR

در راستای بررسی ساختار ترکیبات و پیوندهای شیمیایی کامپوزیت از نمونه‌ها آزمون FTIR گرفته شد. تغییرات ساختاری نمونه‌ها با استفاده از آنالیزگر مدل Rayleigh /WQF-510A ساخت کشور چین، در محدوده طیف $4000-400\text{ cm}^{-1}$ مورد بررسی قرار گرفته شد.

نتایج و بحث

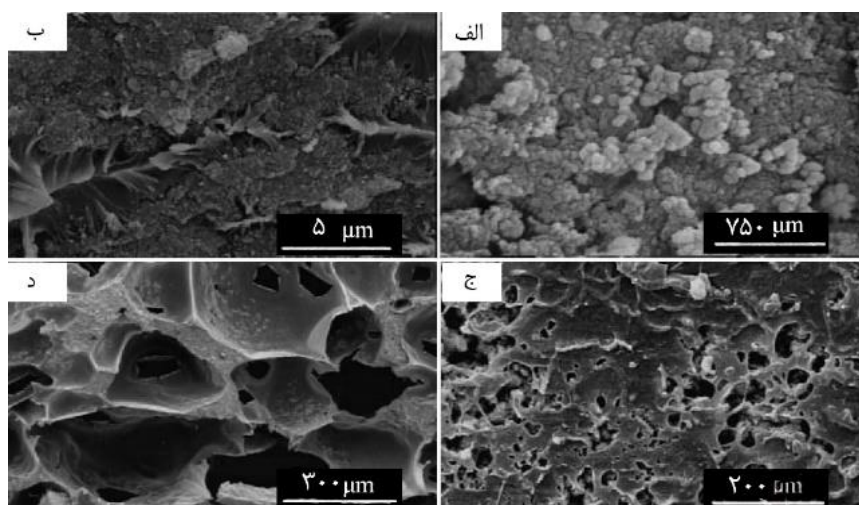
نتایج آزمون SEM

در راستای تعیین اندازه تخلخل‌های نمونه‌های کامپوزیتی دوجزئی (S₀) nHAp - PVA کامپوزیت‌های

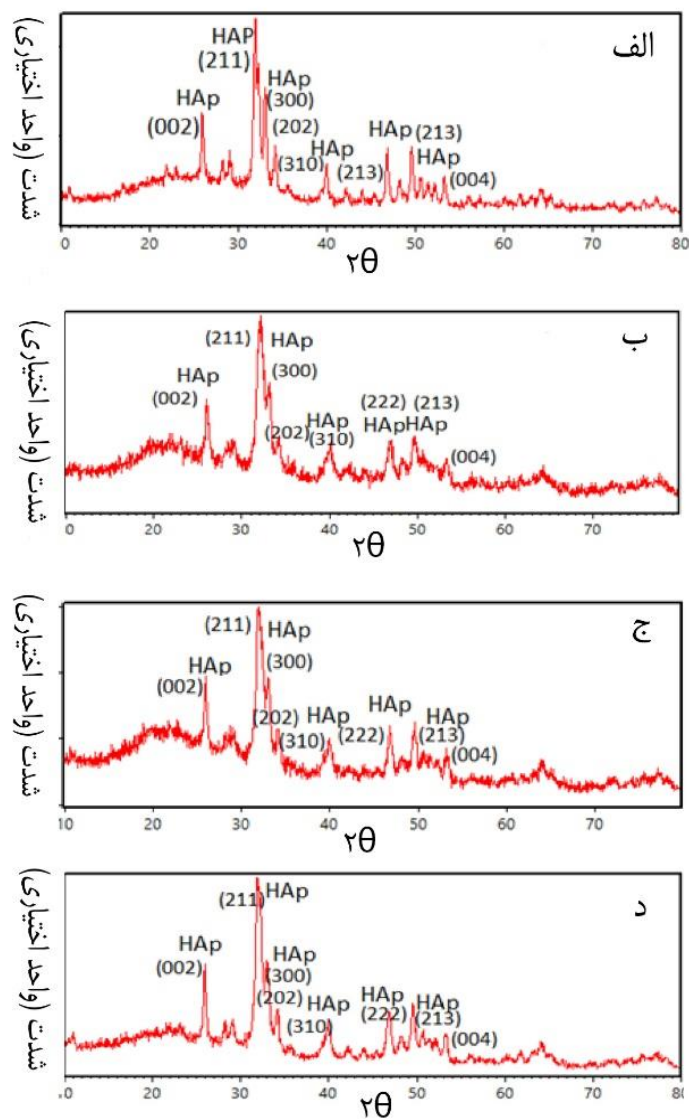
سه‌جزئی (S₁) nHAp - PVA - Gel، (S₂) nHAp - PVA - HA و کامپوزیت چهار جزئی (S₃) nHAp - PVA - HA - Gel از آنالیز میکروسکوپ الکترونی روبشی با مدل Hitachi S-4160 با بزرگنمایی‌هایی تا ۳۰۰۰۰ برابر استفاده شد (شکل ۱). مطالعه نتایج SEM حکایت از وجود ساختاری متخلخل در نمونه‌ی S₃ (برخلاف نمونه‌های دیگر) دارد که جهت کاربردهای مهندسی بافت استخوان مناسب است. حفرات غالباً دارای یک مورفولوژی بیضوی شکل هستند و در بسیاری از نقاط، ساختاری به هم مرتبط دارند. این ویژگی برای رشد و نفوذ بافت استخوانی به درون داربست بسیار حائز اهمیت است.

نتایج آزمون XRD

در جهت شناسایی نوع فازهای تشکیل‌دهنده، نمونه دوجزئی S₀، نمونه‌های سه‌جزئی S₁ و S₂ و همچنین نمونه چهار جزئی S₃، آزمایش پراش پرتو X با کاتد مس، K α ، با 2θ در محدوده 10° تا 80° در دمای اتاق انجام شد (شکل ۲). همان‌طور که از نتایج XRD مشخص است که PVA ساختار کریستالی ندارد. شکل پیک XRD ژلاتین هم مانند PVA ساختار غیرکریستالی دارد. پیک پراش X-ray به‌خوبی با استاندارد JCPDS (۰۴۳۲-۰۹) منطبق است. سه پیک شارپ در محدوده 2θ بین 30° تا 35° دیده می‌شود که مربوط به فاز HAp است. پراش X-ray کامپوزیت HAp-PVA-Gel-HA بسیار شبیه به پیک‌های HAp خالص است؛ اما پیک‌های این کامپوزیت پهن‌تر از پیک‌های خالص است، که دلایلش استفاده از پلیمرها است.



شکل ۱- تصویر میکروسکوپ الکترونی روبشی نمونه‌ها، الف) نمونه S_0 ، ب) نمونه S_1 ، ج) نمونه S_2 و د) نمونه S_3



شکل ۲- نتایج آزمون XRD نمونه‌ها، الف) نمونه S_0 ، ب) نمونه S_1 ، ج) نمونه S_2 و د) نمونه S_3

نتایج آزمون میکروفشار

اما پیک‌های (cm^{-1}) ۱۷۳۹-۱۰۹۷-۱۹۹۸ حاصل از پیوند بین PVA و HAp است. بر اساس شکل ۳-ب، نمونه S_1 دارای پیک‌هایی از جمله (cm^{-1}) ۵۶۵ که نشانگر حضور HAp است و پیک‌های (cm^{-1}) ۱۳۸۵-۱۲۵۲ مربوط به PVA و پیک‌های (cm^{-1}) ۱۴۱۵-۱۶۲۶ مربوط به HA و پیک‌های (cm^{-1}) ۳۴۳۳-۱۰۳۴-۶۰۴ بین HAp و HA مشترک است. بر اساس شکل ۳-ج، نمونه S_2 که پیک‌های (cm^{-1}) ۱۴۵۲-۱۰۳۴-۶۲۷-۶۰۴-۵۶۵ نمایانگر حضور HAp است و پیک (cm^{-1}) ۱۲۵۹ مربوط به PVA است و اما پیک (cm^{-1}) ۱۰۹۷ به پیوند ایجاد شده بین HAp-PVA است پیک‌های (cm^{-1}) ۱۶۴۹-۱۵۵۶ مربوط به پیوند بین HAp-Gel است، آخرین پیک (cm^{-1}) ۳۴۲۷ ناشی از حضور Gel در کامپوزیت است. بر اساس شکل ۳-د، نمونه S_3 دارای پیک‌های (cm^{-1}) ۱۴۵۲-۱۰۳۴-۶۰۴-۵۶۵ مربوط به nHAp می‌شود و اما پیک (cm^{-1}) ۱۰۹۷ ناشی از پیوند ایجاد شده بین HAp-PVA است، پیک (cm^{-1}) ۱۴۱۵ مربوط به HA است و اما پیک (cm^{-1}) ۱۵۴۹ مربوط به پیوند ایجاد شده بین nHAp-Gel می‌باشد، پیک (cm^{-1}) ۱۶۵۸ مربوط به ترکیب Gel است، پیک (cm^{-1}) ۲۹۳۵ مربوط به پیوند بین Gel-PVA است و در نهایت پیک (cm^{-1}) ۳۴۱۳ مربوط به پیوند Gel-HA می‌باشد.

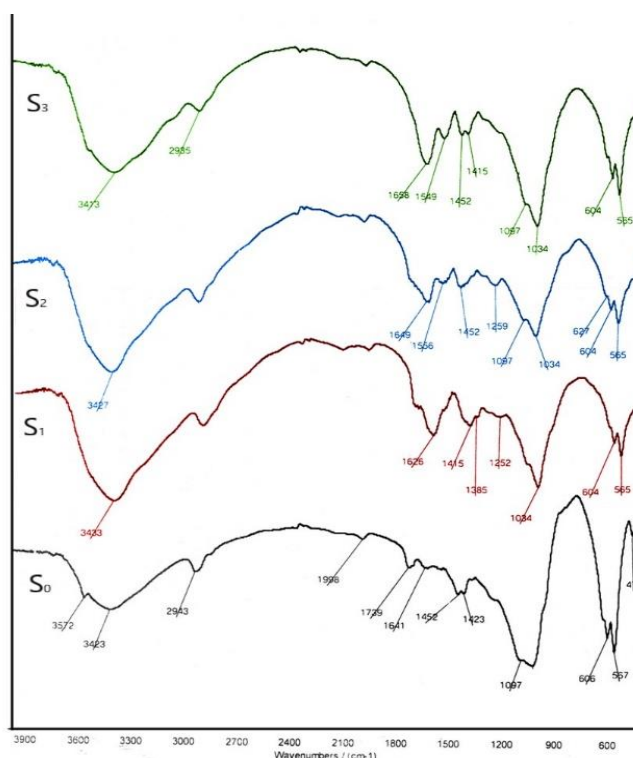
نمونه دوجزئی S_0 ، نمونه‌های سه‌جزئی S_1 و S_2 و همچنین نمونه چهار جزئی S_3 بعد از تبدیل به قرص با قطر ۴mm و ارتفاع ۶mm، با نیروهای ۲۰، ۳۰، ۶۰ و ۶۲/۵ klb مورد آزمون میکروفشار قرار گرفت. جدول ۲، نتایج آزمون میکروفشار را نشان می‌دهد. نمونه S_0 از استحکام کافی برای قرارگرفتن در زیر بار برخوردار نبوده و به محض قرار گرفتن در دستگاه دچار ترک شده و شکسته شد، اما از بین سه نمونه‌های دیگر بهترین نتیجه را نمونه S_3 کسب کرد که بیشترین سختی را نشان داد و بعد از آن نمونه S_2 نتایجی نزدیک به S_3 حاصل شد.

نتایج آزمون FTIR

در جهت بررسی پیوندهای شیمیایی از نمونه دوجزئی S_0 ، نمونه‌های سه‌جزئی S_1 و S_2 و همچنین نمونه چهار جزئی S_3 در محدوده طیف $4000-400 \text{ cm}^{-1}$ طیف‌نگاری مادون قرمز FTIR انجام شد. بر اساس شکل ۳-الف، نمونه S_0 دارای پیک‌های (cm^{-1}) ۱۶۴۱-۶۰۶-۵۶۷-۴۷۲ و ۳۵۷۲-۱۴۵۲-۳۴۲۳ نشانگر حضور nHAp است و پیک‌های (cm^{-1}) ۱۴۲۳-۲۹۴۳ معرف حضور PVA است؛

جدول ۲- استحکام فشاری نمونه‌ها (MPa)

	۶۲٫۵ klb	۶۰ klb	۳۰ klb	۲۰ Klb	$\bar{\sigma}$ MPa
	-	-	-	-	S_0
	۴۹/۹۴	۴۲/۹۴	۵۵/۴۳	۴۹/۹۶	S_1
	.	۲۶/۵۴	۲۶/۵۴	۴۱/۳۸	S_2
	.	۳۶/۶۹	۵۸/۵۵	۴۹/۱۹	S_3



شکل ۳- نتایج آزمون FTIR نمونه‌های S0، S1، S2 و S3

دما در حالت سل قرار گرفته و زنجیره‌های طولانی آن با شکل‌گیری نامنظم و کلافی شکل در آب پراکنده شدند. در حین سرد شدن پلیمر و با رسیدن به نقطه ژل شدن، محلول به ژل تبدیل شده، یعنی زنجیره‌های ژلاتین به طریق فیزیکی دارای اتصال عرضی شدند و شبکه‌ای را به وجود آوردند که مولکول‌های آب را در خود به دام انداخته است. این پدیده می‌تواند ناشی از ایجاد فرآیند توده‌های چین کلاژنی باشد که گره‌های فیزیکی باعث قفل شدن درونی مولکول‌ها و ژل شدن پلیمر می‌شود. پس از قفل شدن زنجیرها و به دام افتادن مولکول‌های حلال (آب) در شبکه ژل، توده ژلاتین شروع به خشک شدن نموده و طی آن مولکول‌های محبوس آب به آرامی تبخیر شدند و تخلخل ایجاد شد؛ اما نمی‌توان از تأثیر HA در ایجاد چنین تخلخل‌هایی چشم‌پوشی کرد، با بررسی نمونه S2، مشخص شد که ژلاتین به تنهایی نتوانست باعث ایجاد چنین تخلخل‌هایی شود.

به نظر می‌رسد روش تبخیر حلال از توانایی زیادی برای کنترل عوامل مؤثر بر فرایند برای ایجاد تخلخل‌های متمایز برخوردار نیست. همان‌گونه که در شکل ۱، نمایان است

نتیجه‌گیری

در این پژوهش برای اولین بار با روش تبخیر حلال ساده، داربست استخوانی Gel - PVA - HA - nHAp تهیه شد.

نمونه‌های کامپوزیتی دوجزئی (S₀) PVA - nHAp کامپوزیت‌های سه‌جزئی (S₁) nHAp - PVA - Gel (S₂) و کامپوزیت چهار جزئی (S₃) Gel - PVA - HA - nHAp، پس از تولید با آزمون‌های SEM، XRD، میکروفشار و FTIR مورد بررسی قرار گرفت. نتایج SEM تشکیل داربست را در نمونه S₃ نشان داد و آزمون‌های دیگر، پتانسیل استفاده از این کامپوزیت به عنوان داربست را تایید نمود. تخلخل ایجادشده در ساختار این نمونه کاملاً خودبه‌خودی و بدون افزودن هیچ نوع عامل تخلخل‌سازی صورت گرفت. در واقع انحلال طبیعی ژلاتین در آب خود باعث ایجاد تخلخل شد. دلیل پدیده فوق می‌تواند ماهیت ژل شدن این پلیمر باشد. درجه حرارت فرآیند، بالاتر از دمای ژل شدن ژلاتین بوده، بنابراین ژلاتین در این

آب، باعث ایجاد تخلخل در داربست شده و نیازی به استفاده از عوامل تخلخل‌ساز نبوده است. استفاده هم‌زمان HA و Gel، باعث ایجاد تخلخل‌های مؤثرتر و بزرگ‌تری برای تولید داربست می‌شود.

تلفیق هم‌زمان بیوپلیمرهای HA، PVA و Gel به منظور تولید نانو-بیوکامپوزیت‌هایی مخصوصاً HA می‌تواند در ساختن داربست‌های فعال بیولوژیکی کمک کنند تا رشد استخوانی را حمایت کنند. یکی از مزیت‌های این داربست غیر سمی بودن آن است؛ اما پیشنهاد می‌شود آزمون زیست‌سازگاری گرفته شود.

تخلخل‌های درشت با شکل‌های ناموزونی پراکنده شده‌اند. هرچند این پدیده اثر نامطلوب شدیدی بر قابلیت جایگزینی و تکثیر سلول‌ها ندارد؛ اما عدم وجود آن می‌تواند بر استحکام داربست مؤثر باشد. برهم‌کنش قطبی یا یونی گروه COOH از ژلاتین به صورت COO⁻ با Ca²⁺ موجود در nHAP و همچنین ایجاد باندهای هیدروژنی بین NH₂ ژلاتین و OH هیدروکسی‌آپاتیت و OH هیالورونیک اسید منجر به تجمع غیریکنواخت دانه‌های HAP گردیده و در نتیجه تبخیر غیریکنواخت حلال می‌شود و در مناطقی که تبخیر کم‌تر است، تخلخل‌های کوچک‌تری مشاهده می‌شود. بنابراین، نظم ساختار به‌هم‌خورده و دو نوع مورفولوژی متفاوت از تخلخل‌ها دیده می‌شود.

روش مورد استفاده در این پژوهش، نسبت به روش‌های دیگر ساده‌تر و مقرون به‌صرفه‌تر است. انحلال ژلاتین در

[5] N. J. Kaljahi, B. Ghanbarzadeh, J. Dehghannya, and A. Akbar, "Plasticized Starch Based Bionanocomposites

Containing Cellulose Nanowhiskers and Titanium Dioxide Nanoparticles: Study of Structure and Water Vapor Permeability," *Sci. Technol.*, vol. 27, no. 3, pp. 179–192, 2014.

[6] Y. Pan and D. Xiong, "Study on compressive mechanical properties of nanohydroxyapatite reinforced poly (vinyl alcohol) gel composites as biomaterial," *J. Mater. Sci. Mater. Med.*, vol. 20, no. 6, pp. 1291–1297, 2009.

[7] G. Kogan, L. Šoltés, R. Stern, and P. Gemeiner, "Hyaluronic acid: a natural biopolymer with a broad range of biomedical and industrial applications," *Biotechnol. Lett.*, vol. 29, no. 1, pp. 17–25, 2007.

[8] D. Bakoš, M. Soldan, and I. Hernandez-Fuentes, "Hydroxyapatite–collagen–hyaluronic acid composite," *Biomaterials*, vol. 20, no. 2, pp. 191–195, 1999.

References:

[1] E. Kon et al., "Autologous bone marrow stromal cells loaded onto porous hydroxyapatite ceramic accelerate bone repair in critical-size defects of sheep long bones," *J. Biomed. Mater. Res. An Off. J. Soc. Biomater. Japanese Soc. Biomater.*, vol. 49, no. 3, pp. 328–337, 2000.

[2] حیدری، "ساخت و مقایسه داربست‌های هیدروکسی‌آپاتیت طبیعی و مصنوعی ساخته شده به روش فشار ایزواستاتیک سرد،" *فصلنامه علمی-پژوهشی مواد نوین*, vol. 9, no. 33, pp. 113–124, 2018.

[3] م. مظفری، ن. جوهری and م. ح. فتحی، "داربست کامپوزیتی پلی‌کاپرولاکتون-هیدروکسی‌آپاتیت: بررسی تاثیر درصد ذرات هیدروکسی‌آپاتیت و مقایسه ذرات با سایز نانومتری و میکرومتری و اثر آنها بر خواص مکانیکی و زیست‌تخریب‌پذیری داربست،" *فصلنامه علمی-پژوهشی مواد نوین*, vol. 5, no. 20, pp. 131–142, 2015.

[4] J. C. Doadrio, D. Arcos, M. V Cabanas, and M. Vallet-Regí, "Calcium sulphate-based cements containing cephalixin," *Biomaterials*, vol. 25, no. 13, pp. 2629–2635, 2004.

[9] F. Wang, E. Guo, E. Song, P. Zhao, and J. Liu, "Structure and properties of bone-like-nanohydroxyapatite/gelatin/polyvinyl alcohol composites," *Adv. Biosci. Biotechnol.*, vol. 1, no. 03, p. 185, 2010.

[10] S. Subramaniam, Y.-H. Fang, S. Sivasubramanian, F.-H. Lin, and C. Lin, "Hydroxyapatite-calcium sulfate-hyaluronic acid composite encapsulated

with collagenase as bone substitute for alveolar bone regeneration," *Biomaterials*, vol. 74, pp. 99–108, 2016.

[11] معروف، et al., "بررسی خواص فیزیکیوشیمیایی داربست کامپوزیتی کیتوسان-ژلاتین-هیدروکسی آپاتیت تهیه شده به روش خشکاندن انجمادی," *مجله دانشکده دندانپزشکی دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی*, vol. 29, no. 5, pp. 390–398, 2012.