

طراحی و ساخت غشاهای کامپوزیتی زیست تخریب پذیر بر پایه ای کایتوسان-فیروئین-پلی وینیل الکل به روش ریخته گری حلal برای مهندسی بافت استخوان

فرزانه جباری^۱, دکتر بهزاد هوشمند^{۲*}, دکتر سعید حصارکی^۳

- ۱- دانشجوی دکترای تخصصی مهندسی برشکی (بیومتریال), پژوهشکده فناوری نانو و مواد پیشرفته, پژوهشگاه مواد و انرژی, البرز, ایران
- ۲- استاد گروه آموزشی پریودنٹیکس, دانشکده دندانپزشکی, دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی, درمانی شهید بهشتی, تهران, ایران
- ۳- دانشیار پژوهشکده فناوری نانو و مواد پیشرفته, پژوهشگاه مواد و انرژی, البرز, ایران

وصول مقاله: ۱۳۹۷/۶/۱۱ | اصلاح نهایی: ۱۳۹۷/۷/۲۸ | پذیرش مقاله: ۱۳۹۷/۹/۱

Designing and fabrication of biodegradable composite membranes based on chitosan fibroin-polyvinyl alcohol by solvent casting method for bone tissue engineering

Farzaneh jabari¹, Behzad houshmand^{2*}, Saeed hesaraki³

¹Ph.D Candidate in Biomedical Engineering(biomaterial), Research Department of Nano-Technology and Advanced Materials, Materials and Energy Research Center (MERC), Alborz, Iran

² Professor, Department of Periodontology School of Dentistry, Shahid Beheshti University of Medical Sciences, Tehran, Iran.

³Associate Professor of Research, Research Department of Nano-Technology and Advanced Materials, Materials and Energy Research Center (MERC), Alborz, Iran.

Received: 2 September 2018; Accepted: 22 November 2018

Abstract

Background & Aim: Designing and fabrication of biodegradable and bioactive membranes are the important issues in guided bone regeneration while these membranes should maintain their structural integrity during repair, have the required mechanical, physical and biological properties and selective permeability. One of the approaches to achieve this purpose is the fabrication of composite membranes based on biopolymers.

Materials and Methods: In this experimental research, the fabrication and characterization of composite membranes composed of chitosan-silk fibroin and polyvinyl alcohol have been performed. Chitosan solution and fibroin- polyvinyl alcohol solution were mixed in different ratio and membranes were fabricated by solvent casting method. Mechanical properties such as tensile strength and ultimate strain percentage and physical properties including water absorption and degradation rate of membranes were investigated.

Results: The FTIR spectrum of the extracted fibroin showed peaks at 1650 cm⁻¹, 1530 cm⁻¹, and 1244 cm⁻¹. The XRD and SEM images showed that the synthesized fibrin has the structure of beta plates. The results of physical and mechanical properties of membranes showed that the presence of fibroin in the composition increases the mechanical strength. Increasing the amount of chitosan in the composition increased the water absorption and degradation rate of membranes.

Conclusion: Fibroin is a suitable polymer for increasing mechanical strength, controlling the degradation rate, improving the water absorption ability and is so biocompatible. Solvent casting method with controlling the viscosity of solution and solvent evaporation rate is appropriate method for fabrication the membranes.

Keywords: biodegradable membrane, Fibroin, bone regeneration

*Corresponding Author: houshmandperio@rocketmail.com

J Res Dent Sci. 2019; 15 (4) :201-210.

خلاصه:

سابقه و هدف: یکی از مسائل مهم در بازسازی هدایت شده ای استخوان، طراحی و ساخت غشاها زیست تخریب پذیر و زیست فعالی است که ضمن حفظ یکپارچگی ساختاری خود در طول زمان ترمیم، دارای خواص مکانیکی، فیزیکی و بیولوژیکی مورد نیاز و البته نفوذ پذیری انتخابی باشند. یکی از رویکردهای دستیابی به این هدف ساخت غشاها کامپوزیتی بر پایه ای زیست پلیمرهاست.

مواد و روش ها: در این پژوهش تجربی، ساخت و مشخصه یابی غشاها کامپوزیتی مت Shank از کایتوسان-فیبروئین و پلی وینیل الكل انجام گرفت. محلول کایتوسان و محلول فیبروئین-پلی وینیل الكل با نسبت های مختلفی با هم مخلوط شده و غشاها، به روش ریخته گری حلal تهیه شدند. خواص مکانیکی مانند استحکام کششی و درصد کشش نهایی و خواص فیزیکی شامل جذب آب و سرعت تخریب شدن غشاها مورد بررسی قرار گرفتند.

یافته ها: نمودار طیف FTIR فیبروئین استخراج شده و پیک هایی را در 1650 cm^{-1} , 1530 cm^{-1} و 1244 cm^{-1} نشان داد. نمودار XRD و تصاویر SEM نشان دادند که فیبروئین سنتز شده دارای ساختار صفحات بتا می باشد. نتایج بررسی خواص فیزیکی و مکانیکی غشاها نشان داد که حضور فیبروئین در ترکیب، موجب افزایش استحکام مکانیکی می شود. افزایش میزان کایتوسان در ترکیب موجب افزایش جذب آب و سرعت تخریب غشاها گردید.

نتیجه گیری: به نظر می رسد که فیبروئین یک پلیمر مناسب جهت افزایش استحکام مکانیکی، کنترل نرخ تخریب و بهبود قابلیت جذب آب غشاها مورد استفاده در بازسازی هدایت شده ای استخوان بوده و با زیست سازگار می باشد. روش ریخته گری حلal به شرط کنترل ویسکوزیته ای محلول و سرعت خروج حلal از ترکیب، یک روش مناسب برای ساخت غشاها می باشد.

کلید واژه ها: غشاء های زیست تخریب پذیر، فیبروئین، بازسازی استخوان**مقدمه:**

می شوند که هر یک موارد استفاده مشخصی دارند. غشاها تخریب پذیر، قابلیت جذب بدون ایجاد واکنش جسم خارجی را دارا بوده اما هنوز در مورد زمان بازجذب و مدت زمان تشکیل بافت چالش هایی وجود دارد. غشاها قابل جذب به دو دسته پلیمرهای طبیعی و سنتزی تقسیم می شوند. پلیمرهای طبیعی به دلیل زیست فعالی ذاتی و توانایی ارایه محل های فعال جهت اتصال به سلول، نسبت به پلیمرهای سنتزی برتری داشته اما وجود برخی مشکلات مانند پاسخ ایمنی قوی، فرایند خالص سازی پیچیده و امکان انتقال بیماری کاربرد آن ها را محدود می کند. کایتوسان یکی از مرسوم ترین پلیمرهای طبیعی برای ساخت غشاها زیست تخریب پذیر بوده و در محیط درون تنی سازگاری مناسبی با سلول ها دارد که همین امر منجر به تسهیل در فرایند بازسازی هدایت شده ای استخوان می گردد.^(۳) غشاها بر پایه کایتوسان دارای خواص مکانیکی نامطلوب از جمله استحکام کششی بسیار پایین، سرعت تخریب شدن بالا

همواره بافت استخوان به دلیل قرارگیری در معرض انواع تنش ها و نیروهای مکانیکی، با آسیب دیدگی های زیادی مواجه بوده است.^(۱) پس از آسیب بافت استخوان، فرایند ترمیم و بازسازی طبیعی آن یک امر مهم تلقی می گردد. از این رو بسیاری از مطالعات و پژوهش های معاصر بر روی فرایند ترمیم سریع استخوان مرکز شده است. بازسازی هدایت شده بافت استخوان (Guided Bone Regeneration) از مهمترین روش های بازسازی مرسوم به شمار می آید. به طور کلی بازسازی هدایت شده ای استخوان نوعی تکنیک جراحی بوده که با استفاده از یک غشا پلیمری متخلخل از مهاجرت سلول های بافت نرم و اپیتلیال به محل ضایعه جلوگیری کرده و با ایجاد یک فضای مناسب، سرعت ترمیم بافت آسیب دیده را بهبود می بخشد.^(۲) غشاها مورد استفاده در تکنیک GBR به دو دسته ای غشاها قابل جذب زیستی و غشاها غیرقابل جذب تقسیم

ریخته گری محلول درون قالب، با محبوس شدن هوا در محلول عیوبی به نام عیب ته سنجاقی در غشای خشک شده ظاهر می گردد که باعث افت استحکام مکانیکی شده و عملکرد بیولوژیکی غشا مبنی بر نفوذ پذیری انتخابی را نیز مختل می کنند.^{۸,۹} در این مطالعه با تنظیم ویسکوزیتهٔ محلول ریخته شده، کنترل شرایط ریخته گری و کنترل سرعت خروج حلال از ترکیب این عیوب در ساختار ظاهر نشدند.

مواد و روش‌ها:

تحقیق به روش تجربی انجام گرفت. پیله‌های کرم ابریشم از پرورش دهنده‌گان محلی استان گیلان شهرستان رشت تهیه شد تمامی این پیله‌ها بدون کپک زدگی و بدون لک روی سطح خارجی پیله بودند. کایتوسان با وزن مولکولی متوسط و درجهٔ دی استیله شدن ۷۵-۸۵٪ و لیتیم برماید از شرکت آلدريچ تهیه شدند. برای صمع زدایی و استخراج فیبروئین نمک کربنات سدیم (Na_2CO_3) با خلوص بالای ۹۹/۹ درصد از شرکت Merck (آلمان) تهیه شد. تیوب دیالیز با قابلیت عبور وزن مولکولی KDa ۱۴-۱۲ از شرکت بتاژن (ایران) تهیه شد. آب دو بار تقطیر فوق خالص توسط دستگاه LAN (SHAN مدل LSRO-701A) تهیه و مورد استفاده قرار گرفت. این تحقیق در چندین مرحله و به روش تجربی - آزمایشگاهی و با هدف ساخت غشاهای کامپوزیتی دارای خواص فیزیکی و مکانیکی مطلوبتر، مورد استفاده در بازسازی هدایت شدهٔ استخوان انجام شد. ابتدا پودر فیبروئین از پیله‌های کرم بومبیکس موری استخراج شده و سپس برای تایید ساختار فیبروئین استخراج شده، مشخصهٔ یابی فیزیکی-شیمیائی انجام گرفت. در نهایت غشاهای کامپوزیتی به روش ریخته گری ساخته شدند.

ابتدا پیله‌های کرم بومبیکس موری از تولیدکنندگان محلی در استان گیلان خریداری شد و در روز هفتم برداشت و شفیره داخل پیله با بخار آب داغ از بین رفتند. برای صمع زدایی الیاف، در حدود ۵ عدد پیله را باز کرده و محتویات آن را دور ریختیم سپس پیله‌ها با قیچی به ابعاد کوچکتر تبدیل و در ۷۵۰ میلی لیتر سدیم کربنات ۲/۰ مولار برای مدت ۲

و قابلیت جذب آب بالایی باشند و این در حالی است که در تکنیک بازسازی هدایت شدهٔ استخوان، غشاهای باید دارای خواص مکانیکی و فیزیکی بینه‌ای برای رسیدن به نتیجه ای مطلوب باشند. کامپوزیت کردن کایتوسان با زیست پلیمرهایی مانند فیبروئین، موجب بهبود خواص مکانیکی و فیزیکی غشاهای می‌گردد. فیبروئین یک پروتئین رشته‌ای و نامحلول در آب بوده که از دو رشته‌ی سبک و سنگین پروتئینی با نسبت‌های مساوی تشکیل شده است. رشته‌ی سنگین از ماکرومولکول‌های آب گریز و رشته‌ی سبک از آمینواسیدهای قطبی تشکیل شده است. خواص ابریشم ترکیبی از استحکام مکانیکی بالا و سبکی زیاد می‌باشد. امروزه ساختارهای مختلفی برای فیبروئین تعیین گردیده که در محل‌های بلورین به شکل پیچ آلفا و صفحات بتا بوده و در محل‌های آمورف به شکل گلبول‌های تصادفی نامنظم دیده می‌شود.^{۱۰} در بسیاری از مطالعات غشاهای کامپوزیتی بر پایهٔ کایتوسان / فیبروئین برای بازسازی بافت استخوان مورد استفاده قرار گرفته است و همگی نتایج قابل قبولی ارائه نموده اند.^{۱۱,۱۲} روش‌ها و تکنیک‌های بسیاری برای ساخت غشاهای تخریب پذیر ذکر شده است که هر یک مزايا و چالش‌های خاص خود را دارا هستند. با در نظر گرفتن پارامترهایی چون تکرار پذیر بودن فرایند ساخت، توجیه پذیری اقتصادی و نیز دارا بودن اپتیمم خواص مکانیکی، فیزیکی و بیولوژیکی روش ریخته گری حلال یکی از مناسب ترین روش‌های ساخت غشاهای مورد استفاده در بازسازی هدایت شدهٔ استخوان می‌باشد. در مطالعهٔ حاضر غشاهای کامپوزیتی بر پایهٔ کایتوسان/فیبروئین پلی وینیل الكل به روش ریخته گری ساخته شده و خواص مکانیکی و فیزیکی غشاها اندازه گیری شد. در روش ریخته گری، دستیابی به ضخامت مطلوب، اپتیمم خواص مکانیکی و فیزیکی وابسته به ترکیب شیمیایی محلول، ویسکوزیتهٔ محلول ریخته شده و نیز سرعت خروج حلال از ترکیب می‌باشد که ما با ایجاد شرایط بینه‌ای ریخته گری به خواص مورد نظر دست یافتیم. لازم به ذکر است که بعد از

مشخصه یابی فیزیکی و شیمیائی غشاهای کامپوزیتی به روش ریخته گری ساخته شدند. برای ریخته گری لازم بود تا محلول هایی با غلظت و ویسکوزیته مشخص تهیه شود لذا برای تهیه محلول ۰.۲٪ وزنی کایتوسان، ۲ گرم کایتوسان در ۱۰۰ میلی لیتر محلول آبی فرمیک اسید حل شده و محلول برای مدت ۴ ساعت روی استیرر با سرعت ملایم هم زده شد تا یک ترکیب همگن و یکنواخت ایجاد شود سپس محلول ۱/۵ درصد وزنی فیبروئین با انحلال پودر فیبروئین در فرمیک اسید خالص تهیه شد. پلی وینیل الکل در آب مقطر با دمای ۱۰۰°C به نسبت ۱۰ درصد وزنی-وزنی حل شد و برای مدت ۲ ساعت در آون ۹۰°C تا رسیدن به محلول یکنواخت قرار داده شد. در این مدت محلول توسط شیکرهم زده شد و بعد تا دمای اتاق سرد گردید. برای تهیه محلول ریخته گری، ۲ گرم از محلول ۱۰ درصد پلی وینیل الکل به محلول فیبروئین اضافه شده و محلول حاصل به مدت ۳ ساعت روی استیرر با سرعت ۳۰۰ rpm هم زده شد. محلول های کایتوسان و فیبروئین-پلی وینیل الکل در نسبتهاي $۱/۵ \times ۳\text{ cm}^2$ مخلوط شده و درون قالب با ابعاد $20 \text{ EO } 80, 80 \text{ EO } 20$ ضخامت 0.5 cm ریخته گری شدند سپس در آون با دمای ۴۵°C برای مدت ۳ ساعت قرار گرفته و در نهایت زیر هود با جریان هوای سریع خشک شدند.

اندازه گیری نرخ تخریب غشاها

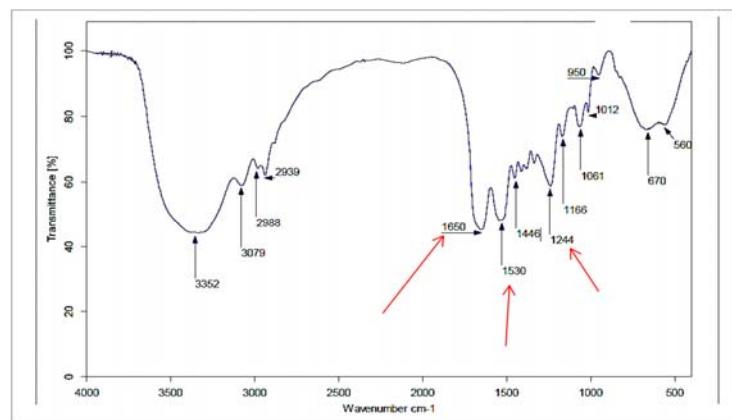
برای ارزیابی نرخ تخریب غشاها، تمامی نمونه ها در ۳۵°C میلی لیتر PBS (Phosphate buffered saline) ور شده سپس در انکوباتور با دمای ۳۷°C قرار گرفتند. میزان تغییرات وزن همه ای نمونه ها هر ۱۰ روز یکبار و به مدت ۶۰ روز اندازه گیری شد. نرخ تخریب غشاها از رابطه W_1 زیر محاسبه شد^(۱۰).

[وزن W_0 خشک نمونه ها قبل از غوطه وری و وزن W_1 خشک نمونه ها بعد از غوطه وری]

$$\frac{\text{W}_0 - \text{W}_1}{\text{W}_0} \times 100 = \text{درصد تخریب}$$

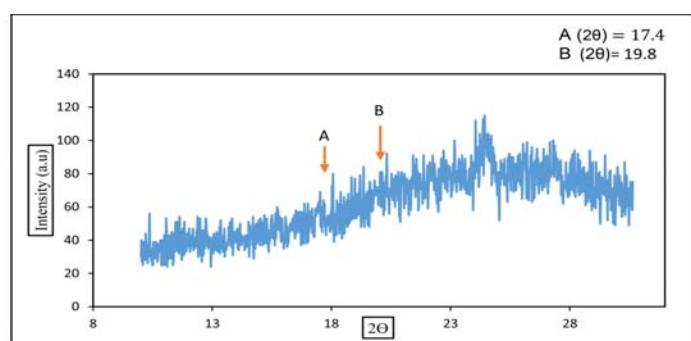
ساعت جوشانده شدند. الیاف بدست امده را سه مرتبه و هر بار برای مدت ۱۵ دقیقه با آب مقطر سرد و گرم آب کشی نموده و برای مدت ۲ شباهه روز در زیر هود خشک کردیم. برای تهیه پودر فیبروئین، الیاف صفحه زدایی شده به نسبت ۱۰ درصد وزنی درون محلول $۹/۳$ مولار لیتیم برماید به مدت ۴ ساعت در ۶۰°C درجه سانتیگراد به طور کامل حل شد. محلول حاصل از این مرحله زرد رنگ و کاملاً ویسکوز می باشد. محلول غلیظ نمک و فیبروئین برای مدت سه شباهه روز درون غشای دیالیز با ضرب خروج $۱۲-۱۴ \text{ KDa}$ ۶۰°C شده و تمامی این مجموعه داخل یک لیتر آب فوق خالص غوطه ور گردید. آب ظرفی که کیسه دیالیز در آن غوطه ور شد در روز اول هر ۴ ساعت یکبار، در روز دوم دوبار و در روز سوم یک بار تعویض شد بعد از این مدت، محتوی کیسه دیالیز درون یک فالون ۵۰ میلی لیتر تخلیه شده و در دمای ۹۰۰ rpm ۶۰°C برای مدت ۲۰ دقیقه با سرعت سانتریفیوژ شده و نهایتاً برای رسیدن به ساختار پودری شکل، محلول سانتریفیوژ شده برای مدت ۷۲ ساعت در دمای ۶۰°C فریز درای شد. فیبروئین استخراج شده با این روش پودر سفید رنگ بوده و برای نگهداری طولانی مدت باید درون فریزر با دمای -۱۸°C قرار گیرد. در ادامه به منظور تایید حضور پیوندهای آمینی برای پودر فیبروئین، آزمون طیف سنجی تبدیل فوریه مادون قرمز طبق استاندارد $4000-500 \text{ cm}^{-1}$ ASTM E1252-07 توسط دستگاه FTIR مدل Vector 33 Bruker انجام شد. برای انجام این آنالیز قرص های نازکی از پودرهای فیبروئین و KBr تهیه شده و در دستگاه قرار گرفت همچنانی برای بررسی میزان بلورینگی پودر فیبروئین آزمون پراش پرتو ایکس در بازه $80^{\circ}-70^{\circ}\text{2}\Theta$ توسط دستگاه Philips pw 3710 XRD مدل ۳۷۱۰ ساخت کشور هلند، انجام شد. ساختار پودر سنتز شده توسط میکروسکوپ Cambridge S360 (SEM) مدل ۱۹۹۰ مورد بررسی قرار گرفت. در مرحله ای نهایی و بعد از

درهم، کاملاً تایید می‌کند. با مقایسه این نمودار با نتایج گزارش شده توسط محققان دیگر این اطمینان حاصل شد که پودر استخراج شده، فیبروئین است.^(۱۲) (شکل ۱)



شکل ۱- طیف Fourier transform infrared (spectroscopy) FTIR پودر فیبروئین استخراج شده در این مطالعه

در الگوی پراش پرتو ایکس پودر فیبروئین استخراج شده در این مطالعه، دو پیک شاخص در $2\Theta = 17.4^\circ$ و $2\Theta = 19.8^\circ$ دیده می‌شود که نشانگر ساختار صفحات بتا می‌باشد.^(۱۳) ساختار صفحات بتا دارای خواص مکانیکی مطلوب تری نسبت به رشته‌های آلفا بوده و در شرایط معمولی در آب حل نخواهد شد



شکل ۲: الگوی پراش پرتو ایکس پودر فیبروئین استخراج شده. دو زاویه مشخص شده در شکل، نشانگر ساختار صفحات بتا می‌باشند

اندازه گیری درصد جذب آب غشاها

جهت بررسی میزان تورم و جذب عاغشاها از آزمون جذب آب استفاده شد. بدین منظور ابتدا همه ی نمونه‌ها وزن شدنده (وزن خشک) پس از ۲۴ ساعت غوطه وری در محلول نمک با فر فسفاتی، دوباره وزن آن (وزن تر) اندازه گیری شد و میزان جذب با استفاده از رابطه زیر تعیین شد.^(۱۰) این آزمون برای هر نمونه ۳ بار تکرار شد تا مقدار میانگین و انحراف معیار به دست آید

$$\text{درصد جذب آب} = \left(\frac{\text{Wet mass} - \text{Dry mass}}{\text{Dry mass}} \right) \times 100$$

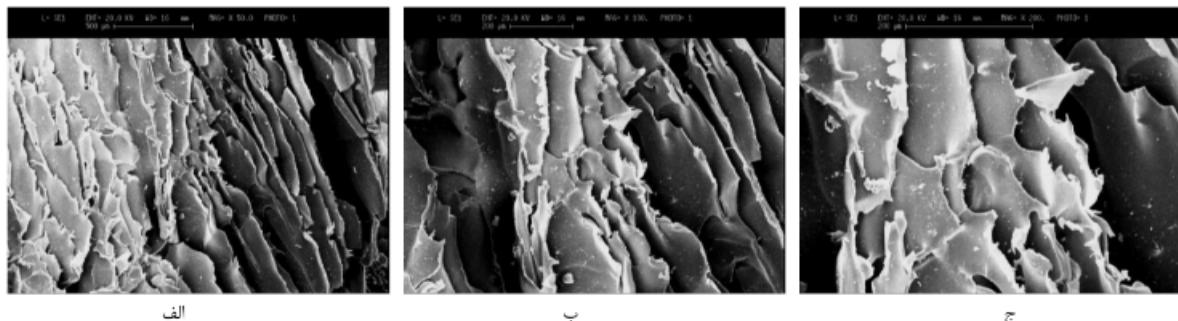
اندازه گیری خواص مکانیکی غشاها برای اندازه گیری خواص مکانیکی نمونه‌ها، غشاها تهیه شده به شکل مستطیل در ابعاد $30 \times 15 \text{ mm}^2$ مورد بررسی قرار گرفتند. ضخامت نمونه‌ها در سه بخش مختلف غشاها با ضخامت سنج اندازه گیری شد سپس آزمون کشش در شرایطی که فاصله‌ی فک‌ها از هم ۱۵ میلی لیتر بود با سرعت ۵ mm/min در دمای محیط انجام شد. برای انجام آزمون از سلول بارگذاری N ۵۰ استفاده شد. مقدار تنش وارد شده به نمونه از تقسیم نیروی وارد حین کشش به سطح آزمون اولیه نمونه به دست آمد.^(۱۱)

آنالیز آماری داده‌ها

یافته‌ها با آزمون‌های آماری یک طرفه تجزیه و تحلیل شدند و سطح معنی داری کمتر از ۵٪ درصد معنی دار محسوب می‌گردد. ($P < 0.05$)

یافته‌ها

پروتئین‌ها پیک‌های شاخصی را در فاصله 1630 cm^{-1} تا 1650 cm^{-1} برای آمید I و در فاصله I 1520 cm^{-1} تا 1540 cm^{-1} برای آمید II و در فاصله II 1230 cm^{-1} تا 1270 cm^{-1} برای آمید III در طیف IR خود نشان می‌دهند. در نمودار FTIR پودر فیبروئین استخراج شده حضور بارز باندهای آمید I در 1650 cm^{-1} و آمید II در 1530 cm^{-1} و آمید III در 1520 cm^{-1} وجود پروتئین را در ساختار مارپیچی و پیچ‌های



شکل ۳: تصاویر SEM پودر فیبروئین استخراج شده با نمک لیتیم برماید. شکل (الف) در بزرگنمایی (۵۰)، (ب) در بزرگنمایی (۱۰۰) و (ج) در بزرگنمایی (۲۰۰) می‌باشد.

خاطر داشت که این غشاها باید ۴ الی ۶ هفته پایستاری ساختاری خود را در ناحیه‌ی مورد استفاده حفظ کرده و بعد از این مدت، فرایند تخریب شدن آغاز گردد به طوری که در مدت زمان ۳ ماه، تخریب انجام شده و محصولات تخریب طی فرایندهای متابولیک در بدن دفع شوند. نتایج آزمون تخریب شدن در طی مدت زمان ۶۰ روز، در جدول زیر ارائه شده است. همان‌طور که مشاهده می‌شود با افزایش درصد وزنی کایتوسان، سرعت تخریب به شدت افزایش یافته و این در حالی است که افزایش میزان کایتوسان نه تنها روی سرعت تخریب تاثیر مستقیم داشته بلکه خواص مکانیکی و فیزیکی را نیز تحت تاثیر قرار می‌دهد و باعث افت استحکام مکانیکی غشاها می‌گردد. با افزایش درصد وزنی فیبروئین در ترکیب، سرعت تخریب کاهش چشمگیری داشته و خواص مکانیکی ارتقا می‌یابد. مهمترین دلیل استفاده از پودر فیبروئین در کنار کایتوسان، بهبود خواص فیزیکی و مکانیکی غشاها می‌باشد. (شکل ۴)

بررسی میزان جذب رطوبت برای تمامی نمونه‌ها در شرایط یکسان انجام شد. نتایج نشان داد که وجود فیبروئین و پلی

بنابراین در کاربردهای داخل بدن برای بهبود سرعت تخریب، بهتر است با سایر پلیمرهای تخریب پذیر نظیر کایتوسان و کلژن ترکیب شود تا ضمن دست یابی به خواص مکانیکی مورد نظر، خواص بیولوژیکی مطلوب نیز تأمین گردد. (شکل ۲ و ۳)

تصاویر SEM مربوط به پودر فیبروئین استخراج شده نشان دهنده ساختار صفحات بتا بودند. فیبروئین استخراج شده در این مطالعه با نمک لیتیم برماید، کاملاً نامحلول در آب بوده و فقط در فرمیک اسید ۹۸ درصد حل شد. در بسیاری از منابع علمی و مطالعات تجربی، بیان شده که فیبروئین نامحلول در آب دارای ساختار صفحات بتا می‌باشد. با توجه به عدم انحلال پودر سنتز شده در آب و اسیدهایی چون استیک اسید، هیدروکلریک اسید، فسفریک اسید و نیتریک اسید و نیز مقایسه تصاویر SEM و الگوی پراش پرتو ایکس این مطالعه با سایر مطالعات انجام یافته، وجود ساختار صفحات بتا تایید گردید.^(۱۵, ۱۴)

در رابطه با فرایند تخریب شدن غشاها مورد استفاده در بازسازی هدایت شده‌ی بافت استخوان، باید این نکته را در

که این سرعت تخریب شدن، برای بازسازی هدایت شده‌ی بافت استخوان مطلوب نیست. افزودن فیبروئین به کایتوسان موجب ایجاد تعادل منطقی بین خواص مکانیکی و فیزیکی می‌گردد. در این مطالعه فیبروئین در فرمیک اسید خالص حل شد و فرمیک اسید به شدت فرار می‌باشد لذا کنترل غلظت محلول فیبروئین برای آماده سازی نمونه‌ها و کنترل سرعت خروج حلال محلول نهایی بسیار دشوار بود ولی مخلوط نمودن پلی وینیل الکل با فیبروئین موجب کاهش سرعت خروج فرمیک اسید از محلول شده و با افزایش ویسکوزیته محلول، موجب افزایش استحکام مکانیکی و تسهیل فرایند ریخته گری شد. یکی از مهمترین عیوب قطعات ساخته شده در روش ریخته گری، محبوس شدن حباب‌های هوا در محلول و ایجاد عیوب ته سنجاقی می‌باشد که بعد از خشک شدن نمونه این عیوب در کل قطعه به وضوح دیده می‌شود. عیوب ته سنجاقی علاوه بر کاهش استحکام مکانیکی غشاها، موجب اختلال در عملکرد نفوذ پذیری آن‌ها نیز می‌گردد که در این جا ما با افزایش ویسکوزیته (با مخلوط کردن پلی وینیل الکل در ترکیب) مانع ایجاد این عیوب شدیم. یکی از مهمترین نکات در این روش نحوه‌ی آماده سازی محلول نهایی جهت ریخته گری می‌باشد. بهتر است بعد از مخلوط نمودن محلول‌های کایتوسان و فیبروئین-پلی وینیل الکل، محلول نهایی را برای مدت ۳ ساعت در یخچال با دمای ۰°C قرار دهید در این صورت تمام حباب‌های موجود در محلول کاملاً از بین رفته و یک ترکیب همگن و شفاف خواهد داشت. (جدول ۲)

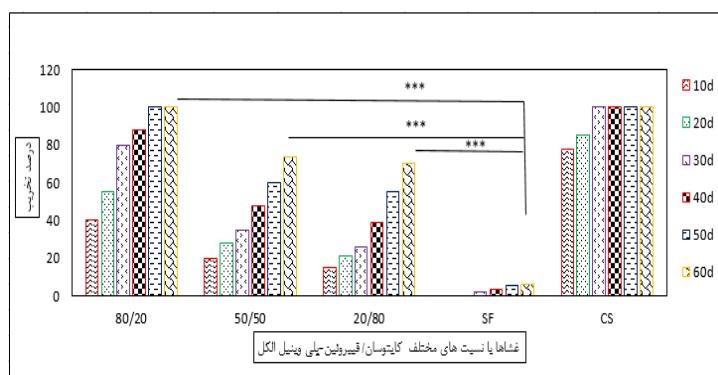
جدول ۲- نتایج بررسی خواص مکانیکی و اندازه‌گیری ضخامت غشاها

Tensile stress(MPa)	Ultimate strain(%)	ضخامت	نمونه‌ها
		نمونه‌ها (میلی‌متر)	نمونه‌ها
۱/۵ ± ۰/۱۲	۴/۵ ± ۰/۲	۰/۳	۸۰/۲۰
۱/۳ ± ۰/۳	۳ ± ۰/۲۵	۰/۳	۵۰/۵۰
۱/۱ ± ۰/۲۱	۱/۱ ± ۰/۲	۰/۳	۲۰/۸۰
۴/۷ ± ۰/۱۲	۳/۸ ± ۰/۲	۰/۲۸	فیبروئین خالص

وینیل الکل در ساختار، قابلیت جذب رطوبت را به شدت کاهش داده و نیز موجب افزایش استحکام غشاها گردید. نتایج این بررسی در جدول زیر گردآوری شده است. (جدول ۱)

جدول ۱- میزان جذب آب غشاها کامپوزیتی

نمونه‌ها	درصد جذب آب
۸۰/۲۰	۱۷۰ ± ۱/۸
۵۰/۵۰	۱۳۸ ± ۱/۴
۲۰/۸۰	۹۰ ± ۰/۵
کایتوسان خالص	۲۴۰ ± ۱/۱
فیبروئین خالص	۵۱ ± ۱/۵



شکل ۴: نمودار سرعت تخریب غشاها کامپوزیتی طی مدت زمان ۶۰ روز. *** نشان دهنده‌ی میزان تفاوت بین گروه‌ها در < p < 0.001 است.

نتایج اندازه‌گیری خواص مکانیکی نشان داد که، با افزایش میزان فیبروئین و پلی وینیل الکل در ترکیب غشاها، استحکام مکانیکی افزایش می‌یابد. کایتوسان خالص انعطاف پذیری بیشتری نسبت به فیبروئین خالص داشته و مخلوط نمودن نسبت‌های معینی از هر یک، اپتیمم خواص مکانیکی و فیزیکی را ایجاد می‌نماید. غشای حاوی فقط کایتوسان در مقایسه با غشای حاوی فقط فیبروئین انعطاف پذیرتر و الاستیک بوده ولی سرعت تخریب شدن بسیار بالایی داشت

بحث

محدودیت های مشخصی دارند. انتخاب هر یک از این روش ها به عواملی چون ترکیب شیمیائی غشا، خواص مکانیکی و فیزیکی مورد انتظار، مقرن به صرفه بودن اقتصادی و البته تکرار پذیری روش ساخت بستگی دارد. ریخته گری حلال ساده ترین و مرسوم ترین روش برای ساخت این سازه ها می باشد ولی در نظر گرفتن چندین نکته از جمله ویسکوزیته ای محلول، نحوه ای ریختگری محلول درون قالب، کنترل سرعت خروج حلال و نیز فرایند خشک کردن نهایی، ضروری است.^(۱۶، ۱۷) الکترورسی یکی دیگر از روش های بسیار پر طرفدار برای ساخت غشا و ساختارهای فیلم مانند با ضخامت های گوناگون می باشد. الکترورسی فرایندی جهت تولید انواع نانوالیاف و میکروالیاف از محلول های مواد پلیمری می باشد. Shijun Lu^(۱۸) و همکاران در مطالعه خود، غشای نانو فیبری فیبروئین را به روش الکترورسی تهیه کردند. نتایج بررسی آن ها نشان داد غشای الکترورسی شده استحکام کششی بیشتر و سرعت تخریب شدن کمتری در مقایسه با غشای Bio-Gide® دارد. همچنین حجم استخوان بازسازی شده توسط غشای الکترورسی شده بسیار بیشتر از نمونه ای Bio-Gide® بود.^(۱۹) افزایش درصد وزنی کایتوسان در ترکیب، موجب کلوخه شدن الیاف و افت شدید استحکام مکانیکی می گردد. افزودن پلی وینیل الكل علاوه بر تسهیل فرایند رسیدگی، موجب بهبود خواص فیزیکی و مکانیکی غشا و جلوگیری از کلوخه شدن الیاف می گردد.^(۲۰) H. Celebi^(۲۱) و K. Paipitak^(۲۲) و همکاران^(۲۳) Zhipeng Gu^(۲۴) و همکاران^(۲۵) Sareen Sheik^(۲۶) و RP Gonçalves^(۲۷) و همکاران^(۲۸) Zhang^(۲۹) و همکاران^(۳۰) در مطالعات خود هنگام الکترورسی ساختارهای حاوی کایتوسان، از پلی وینیل الكل برای بهبود ویسکوزیته ای محلول، تسهیل فرایند رسیدگی، ممانعت از کلوخه شدن الیاف و نیز دست یافتن به خواص مکانیکی و فیزیکی مطلوب استفاده نمودند. این محققان بیان کرده اند که بر خلاف فیبروئین، کایتوسان به تنها یک قابلیت الکترورسی را ندارد لذا افزودن ترکیباتی مانند پلی وینیل الكل و کربوکسی متیل

به طور معمول در تکنیک بازسازی هدایت شده ای بافت استخوان، انواع مختلفی از غشاها زیست تخریب پذیر به عنوان سدی در جداسازی بافت پوششی از بافت آسیب دیده، استفاده می شوند. در این مطالعه غشاها کامپوزیتی از کایتوسان/فیبروئین/پلی وینیل الكل به روش ریخته گری حلل ساخته شده و سپس برخی خواص فیزیکی و مکانیکی غشاها اندازه گیری شدند. طی سال های اخیر، پلیمر کایتوسان به واسطه ویژگی هایی مانند زیست سازگاری زیاد، خاصیت ضد باکتری و نیز انعطاف پذیری در شرایط مرطوب به عنوان گزینه ای مناسب برای مهندسی بافت استخوان، مورد توجه قرار است. پلیمر کایتوسان به تنها یک، به دلیل سرعت تخریب بالا، استحکام مکانیکی پایین در شرایط مرطوب و میزان زیاد جذب رطوبت برای ساخت غشاها بازسازی کننده ای بافت استخوان مناسب نمی باشد. کامپوزیت کایتوسان باسایر زیست پلیمرها نظیر فیبروئین ابریشم موجب بهبود خواص فیزیکی و مکانیکی غشاها می گردد. Zhipeng Gu^(۲۷) و همکاران در مطالعه ای خود از کامپوزیت alginante dialdehyde^(۲۸) کایتوسان/فیبروئین تثبیت شده با برای ترمیم بافت نرم استفاده کردند. نتایج مطالعه ای آن ها نشان داد که با افزایش درصد وزنی فیبروئین در ترکیب، استحکام کششی غشا افزایش یافته و سرعت تخریب شدن کاهش می یابد.^(۲۹) طبق مطالعه Sheik^(۲۰) و همکاران بر روی ویژگی های مورفولوژیکی و زیست سازگاری غشا کایتوسان/فیبروئین/پلی وینیل الكل، مشخص گردید که این غشا کاملا زیست سازگار بوده و برای دست یافتن به اپتیمم استحکام کششی، سرعت تخریب شدن بهینه و نیز اپتیمم مقدار تخلخل در غشا لازم است تا نسبت های معینی از کایتوسان و فیبروئین در ترکیب به کار روند.^(۳۰) روش های متعددی برای ساخت غشاها مورد استفاده در بازسازی هدایت شده ای استخوان وجود دارد که هر یک مزایا و

می باشد و مهمتر اینکه به لحاظ اقتصادی مفروض به صرفه بوده و تکرار پذیر نیز است اما در مورد ساخت غشاها مورد استفاده در بازسازی بافت استخوان با این روش باید به چند نکته توجه داشت: ویسکوزیته محلول در حدی باشد که علاوه بر تسهیل فرایند ریخته گری بتواند خواص مکانیکی، فیزیکی و ضخامت مورد نظر غشاها را تامین کند. دوم این که سرعت خروج حلال از محلول ریخته گری شده کنترل شود تا میزان تشکیل عیوب ته سنجاقی (حفراتی که هوا داخل آنها محبوس شده است) در قطعه‌ی نهایی به حداقل رسیده و فیلمی با سطح یکنواخت و بدون عیوب ظاهری حاصل گردد.

تقدیر و تشکر: این مقاله مستخرج از پایان نامه‌ی دکترای تخصصی ثبت شده به شماره ۷۸۱۳۹۶۰۵۲ می باشد.

سلولز به کایتوسان، موجب تسهیل فرایند الکترورسی خواهد شد. غشاها مورد استفاده در بازسازی بافت استخوان باید ویژگیهای فیزیکی و مکانیکی مشخص و معینی را دارا باشند لذا لازم است تا در انتخاب ترکیب شیمیائی غشا و روش ساخت نهایی، مطالعات بسیاری صورت گیرد.

نتیجه گیری

کایتوسان یک زیست پلیمر بسیار مطلوب برای کاربردهای مهندسی بافت استخوان می باشد ولی به دلیل خواص مکانیکی و فیزیکی ضعیف مانند استحکام کششی پایین، سرعت تخریب شدن بالا و درصد بالای جذب رطوبت، به تنها یکی برای ساخت غشاهای بازسازی کننده بافت استخوان مورد استفاده قرار نمی گیرد. کامپوزیت کردن کایتوسان با سایر زیست پلیمرها مانند فیبروئین می تواند موجب بهبود خواص مکانیکی و فیزیکی غشاها گردد. روش‌های مختلفی برای ساخت غشاها وجود دارد که هر یک مزایا و معایب مشخصی دارند. ریخته گری حلال یکی از ساده‌ترین و راحت‌ترین روشها برای ساخت قطعاتی به شکل فیلم نازک

References:

1. Meinel L, Fajardo R, Hofmann S, Langer R, Chen J, Snyder B, et al. Silk implants for the healing of critical size bone defects. *Bone* 2005;37(5):688-98.
2. Gentile P, Chiono V, Tonda-Turo C, Ferreira AM, Ciardelli G. Polymeric membranes for guided bone regeneration. *Biotechnology Journal*. 2011;6(10):1187-97.
3. Sheik S, Sheik S, Nairy R, Nagaraja G, Prabhu A, Rekha P, et al. Study on the morphological and biocompatible properties of chitosan grafted silk fibre reinforced PVA films for tissue engineering applications. *International journal of biological macromolecules* 2018;116:45-53.
4. Sionkowska A, Płanecka A. Preparation and characterization of silk fibroin/chitosan composite sponges for tissue engineering. *Journal of Molecular Liquids* 2013;178:5-14.
5. Bhardwaj N, Kundu SC. Chondrogenic differentiation of rat MSCs on porous scaffolds of silk fibroin/chitosan blends. *Biomaterials* 2012;33(10):2848-57.
6. Song JM, Shin SH, Kim YD, Lee JY, Baek YJ, Yoon SY, et al. Comparative study of chitosan/fibroin-hydroxyapatite and collagen membranes for guided bone regeneration in rat calvarial defects: micro-computed tomography analysis. *International journal of oral science* 2014;6(2):87-93.
7. Kim S-G, Kim M-K, Kweon H, Jo Y-Y, Lee K-G, Lee JK. Comparison of unprocessed silk cocoon and silk cocoon middle layer membranes for guided bone regeneration. *Maxillofacial plastic and reconstructive surgery* 2016;38(1):11.
8. Rajkolhe R, Khan J. Defects, causes and their remedies in casting process: A review. *International Journal of Research in Advent Technology*. 2014;2(3):375-83.
9. Juriani A. Casting defects analysis in foundry and their remedial measures with industrial case studies. *IOSR journal of mechanical and civil engineering* 2015;12(6):43-54.
10. Gu Z, Xie H, Huang C, Li L, Yu X. Preparation of chitosan/silk fibroin blending membrane fixed with alginate dialdehyde for wound dressing. *International journal of biological macromolecules* 2013;58:121-6.
11. Lu S, Wang P, Zhang F, Zhou X, Zuo B, You X, et al. A novel silk fibroin nanofibrous membrane for guided bone regeneration: a study in rat calvarial defects. *American journal of translational research* 2015;7(11):2244.
12. Mobini S, Solati-Hashjin M, Peirovi H, Samadikochaksaraei A. Extraction and characterization of Bombyx Mori silk for medical application. *Iranian Journal of Biomedical Engineering* 2011;5:151-60.
13. Drummy LF, Phillips DM, Stone MO, Farmer B, Naik RR. Thermally induced α -helix to β -sheet transition in regenerated silk fibers and films. *Biomacromolecules* 2005;6(6):3328-33.
14. Qi Y, Wang H, Wei K, Yang Y, Zheng R-Y, Kim I, et al. A review of structure construction of silk fibroin biomaterials from single structures to multi-level structures. *International journal of molecular sciences*. 2017;18(3):237.
15. Drnovšek N, Kocen R, Gantar A, Drobnič-Košorok M, Leonardi A, Križaj I, et al. Size of silk fibroin β -sheet domains affected by Ca $^{2+}$. *Journal of Materials Chemistry B* 2016;4(40):6597-608.
16. Prieto E, Guelcher S. Tailoring properties of polymeric biomedical foams. *Biomedical Foams for Tissue Engineering Applications*: Elsevier; 2014. p. 129-62.
17. Parikh T, Gupta SS, Meena AK, Vitez I, Mahajan N, Serajuddin AT. Application of film-casting technique to Investigate drug-polymer miscibility in solid dispersion and hot-melt extrudate. *Journal of pharmaceutical sciences*. 2015;104(7):2142-52.
18. Choo K, Ching YC, Chuah CH, Julai S, Liou N-S. Preparation and characterization of polyvinyl alcohol-chitosan composite films reinforced with cellulose nanofiber. *Materials* 2016;9(8):644.
19. Linh NTB, Lee B-T. Electrospinning of polyvinyl alcohol/gelatin nanofiber composites and cross-linking for bone tissue engineering application. *Journal of biomaterials applications* 2012;27(3):255-66.
20. Paipitak K, Pornpra T, Mongkontalang P, Techitdheer W, Pecharapa W. Characterization of PVA-chitosan nanofibers prepared by electrospinning. *Procedia Engineering* 2011;8:101-5.
21. Celebi H, Gurbuz M, Koparal S, Dogan A. Development of antibacterial electrospun chitosan/poly (vinyl alcohol) nanofibers containing silver ion-incorporated HAP nanoparticles. *Composite Interfaces* 2013;20(9):799-812.
22. Zhang Y, Huang X, Duan B, Wu L, Li S, Yuan X. Preparation of electrospun chitosan/poly (vinyl alcohol) membranes. *Colloid and Polymer Science* 2007;285(8):855-63.
23. Gonçalves RP, Ferreira WH, Gouvêa RF, Andrade CT. Effect of chitosan on the properties of electrospun fibers from mixed poly (vinyl alcohol)/chitosan solutions. *Materials Research* 2017;20(4):984-93.