



# ساخت داربست‌های متخلخل از پلی (D، L- لاکتیک اسید) به روش جدایی فاز مایع - مایع

علی طالبی، محمد تقی خراسانی\*، حمید میرزاده

تهران، پژوهشگاه پلیمر و پتروشیمی ایران، صندوق پستی ۱۱۵-۱۴۹۶۵

دریافت: ۸۷/۵/۱، پذیرش: ۸۷/۱۰/۲۴

## چکیده

در این مطالعه، برای به دست آوردن داربست‌های متخلخل از پلی (D، L- لاکتیک اسید) به روش جدایی فاز مایع - مایع از سامانه سه جزئی (پلیمر - ۴،۱ - دیوکسان - آب)، در غلظت‌های مختلف پلیمر (۲/۵ و ۵ درصد حجمی) و نسبت‌های متفاوت حلال و ضدحلال (۱۷-۸۲ و ۱۵-۸۵، ۱۳-۸۷) استفاده شد. نمودار نقاط کداری محلول‌های مزبور به روش کداری سنجی به دست آمد. برای به دست آوردن شکل‌شناسی متخلخل مرتبط به هم پس از انجام شدن جدایی فاز، محلول به سرعت منجمد شد و در دستگاه خشک‌کن انجامی قرار گرفت تا تمام حلال آن تصعید شود. داربست‌های به دست آمده به وسیله میکروسکوپ الکترونی بررسی شدند، میانگین متفاوتی برای قطر حفره‌های داربست‌ها از ۱۰ تا ۳۷ μm به دست آمد. اندازه‌گیری درصد تخلخل داربست‌ها به روش حجمی انجام و داربست‌هایی با تخلخل ۸۵/۵ درصد حاصل شد. نتایج نشان می‌دهد، تغییر در غلظت‌های اجزای سامانه سه جزئی بر شکل‌شناسی، اندازه حفره‌ها و درصد تخلخل داربست‌ها اثر بسیاری دارد.

## واژه‌های کلیدی

جدایی فاز مایع - مایع،

پلی (D، L- لاکتیک اسید)،

نمودار فازی،

نقطه ابری شدن، زیست‌سازگاری

\* مسئول مکاتبات، پیام‌نگار:

[m.khorasani@ippi.ac.ir](mailto:m.khorasani@ippi.ac.ir)

## Fabrication of Porous Scaffolds from Poly(D,L-lactic acid) by Liquid-Liquid Phase Separation

Talebi A., M.T. Khorasani\* and H. Mirzadeh

Iran Polymer and Petrochemical Institute, P.O. Box: 14965-115

Received 22 July 2008, accepted 13 January 2009

## Abstract

In this study, porous scaffolds from poly(D,L-lactic acid) have been prepared via liquid-liquid phase separation method in ternary system of polymer-1,4-dioxane-water. Polymer dissolved in dioxane in 1.5, 2.5 and 5 % wt/v and the solvent/non-solvent ratios were 13/87, 15/85 and 17/83. Cloud point curves prepared by visual turbidometry. In order to obtain porous scaffolds with inter-connected pores structure, each system cooled below its cloud point temperature to achieve phase separation then promptly frozen. Furthermore, sublimation in freeze-dryer took place. Scanning electron microscopy have been used to study the morphologies of the scaffold and average pore sizes from 10 to 37 μm were obtained with variation in systems concentrations. Porosity density and of the scaffolds were measured by volumetric method and 85.5% was achieved. The results show that variation in concentration of ternary system has great effect on morphology, pore size and porosity density of the scaffolds.

## Key Words

liquid-liquid phase separation, poly(D, L-lactic acid), phase diagram, cloud point, biodegradable

(\* To whom correspondence should be addressed.

E-mail: [m.khorasani@ippi.ac.ir](mailto:m.khorasani@ippi.ac.ir)

## مقدمه

هدف مهندسی بافت، فعال سازی و بازیابی قابلیت‌های از دست رفته در بخش‌های از کار افتاده بدن است که در صورت امکان ترمیم بافت آسیب دیده با کاشت بافت جدید همراه است [۱]. دانش مهندسی بافت ترکیبی از اصول علم زیست‌شناسی، علم مواد و پزشکی و روشی برای دستیابی به ساختار زیستی مناسب برای جای‌گزینی عضو طبیعی آسیب دیده یا از دست رفته است [۲]. در مهندسی بافت ترجیحاً از مواد زیست تخریب پذیر و زیست سازگار استفاده می‌شود. زیرا با رشد بافت جدید، سلول‌های نو جای‌گزين مولکول‌های داربست شده و به مرور داربست از بین می‌رود. بنابراین، آثار جانبی ماندن جسم خارجی در بدن و واکنش‌های واپس‌زنی متعاقب آن از بین می‌رود [۲]. در میان مواد مورد استفاده در ساخت داربست‌ها، پلی ( $\alpha$ - هیدروکسی اسید)ها از قبیل پلی لاکتیک اسید، پلی گلیکولیک اسید و کوپلیمرهای آنها بخش عمده مواد استفاده شده از پلیمرهای زیست تخریب پذیر را شامل می‌شوند و سال‌هاست که به عنوان مواد زیست تخریب پذیر مصنوعی در برخی کاربردهای کلینیکی استفاده می‌شوند. به طور مثال این پلیمرها در ساخت نخ‌های بخیه و تهیه داربست‌های سه بعدی برای کاشت سلولی به کار می‌روند [۳، ۴].

به طور عملی نشان داده شده که اندازه بهینه حفره‌ها برای رشد سلول‌های فیبروبلاست  $45 \mu\text{m}$ ، برای بازسازی پوست پستانداران بین  $125-25 \mu\text{m}$  و برای بازسازی بافت استخوان، بین  $30-350 \mu\text{m}$  است. بنابراین، کنترل دقیق اندازه حفره‌ها و مقدار تخلخل، عامل اصلی در ساخت داربست‌ها به منظور بازسازی بافت است [۵].

از میان روش‌های مختلفی که تا کنون برای ساخت داربست‌های متخلخل به کار گرفته شده است، روش جدایی فاز گرما القایی (thermally induced phase separation, TIPS) به دلیل سهولت کاربری و ایجاد شکل‌شناسی‌های مختلف اهمیت خاصی دارد. اساس این روش جدا شدن محلول پلیمری به دو فاز غنی از پلیمر و غنی از حلال در اثر کاهش دمای محیط، انجماد محلول و سپس تصعید حلال منجمد شده است. پس از تکمیل مرحله تصعید حلال، داربست متخلخل که حاصل از فاز غنی از پلیمر است، به دست می‌آید. بسته به این که دمای سرد کردن از دمای تبلور حلال بیشتر یا کمتر باشد، دو نوع جدایی فاز اتفاق می‌افتد. اگر دمای تبلور حلال بیشتر از دمای سرد کردن باشد، جدایی فاز جامد-مایع و اگر دمای تبلور حلال کمتر از دمای سرد کردن باشد، جدایی فاز مایع-مایع اتفاق می‌افتد [۶-۱۱].

در روش جدایی فاز مایع - مایع بسته به غلظت پلیمر در محلول شکل‌شناسی‌های مختلفی به دست می‌آید. اگر حین سرد کردن محلول از

ناحیه نیمه پایدار (metastable) در غلظت کم پلیمر عبور کند، شکل‌شناسی حاصل به شکل گویچه‌های ریزپلیمری با اتصالات ضعیف در بین آنها خواهد بود. اگر از ناحیه نیمه پایدار دوم عبور کند، ساختار به شکل متخلخل با سلول‌های بسته حاصل می‌شود و اگر محلول همگن وارد ناحیه ناپایدار در زیر منحنی اسپینودال شود، ساختار به دست آمده دارای شکل‌شناسی متخلخل و حفره‌ها مرتبط به هم می‌شود. فقط در حالت سوم شکل‌شناسی مناسب برای رشد و مهاجرت سلول‌ها درون داربست و رسیدن مواد غذایی به آنها فراهم می‌شود [۱۲].

به دلیل سهولت روش جدایی فاز گرما القایی (TIPS) و نیز امکان به دست آوردن شکل‌شناسی‌های مختلف با تغییرات اندک در متغیرهای فرایند مانند دما، زمان، غلظت و نحوه گرمادهی به محلول، ساخت داربست‌های متخلخل برای مصارف مهندسی بافت بسیار مورد توجه قرار گرفته است.

Shugen و همکاران با استفاده از روش جدایی فاز مایع - مایع و سامانه سه جزئی PDLLA - دیوکسان - آب داربست‌هایی متخلخل با قطر حفره  $1-10 \mu\text{m}$  به دست آوردند [۱۱]. در مطالعه دیگری با استفاده از پلی (L- لاکتیک اسید) و کوپلیمرهای آن با D- لاکتیک اسید و گلیکولیک اسید، این طور استنباط شد که استفاده از پلیمرهای بی شکل و سرد کردن با سرعت کم منجر به ایجاد داربست‌هایی با ساختار سلولی باز و استفاده از پلیمرهای نیمه بلوری و سرد کردن با سرعت زیاد منجر به ایجاد داربست‌هایی با ساختار سلولی بسته می‌شود [۱۳]. برای ساخت داربست متخلخل از پلی (L- لاکتیک اسید) از سامانه سه جزئی پلیمر-دیوکسان- آب استفاده شد. در این آزمایش نشان داده شده است که تغییرات اندک در مقدار ضدحلال (آب) می‌تواند آثار زیادی روی مرز رسوب دهی پلیمر و پدیده ژل شدن در محلول ایفا کند. در غلظت‌های زیاد پلیمر (بیش از  $4/5$  درصد وزنی) به علت برتری اثر ژل شدن، رسوب دهی پلیمر مشاهده نمی‌شود [۶]. در این پژوهش، داربست‌هایی با قطر حفره  $50-150 \mu\text{m}$  به دست آمده است.

به منظور ایجاد ساختارهایی با حفره‌های بزرگ‌تر و پراکندگی قطر حفره کمتر فرایند جدایی فاز با استفاده از مقادیری از Pluronic F127 به عنوان ماده فعال سطحی انجام شد [۱۴] و با استفاده از روش جدایی فاز چند مرحله‌ای داربست‌هایی از پلی (L- لاکتیک اسید) با حفره‌هایی تا قطر  $300 \mu\text{m}$  تهیه شده است [۱۵]. افزودن مقدار کمی نمک باعث افزایش نقطه کدری، انتقال دمای جدایی فاز اسپینودال و quenching depth به دماهای بیشتر می‌شود و نیز ژل شدن بر اثر تبلور PLLA به درصدهای بیشتر انتقال می‌یابد. بنابراین، داربست‌های PLLA با قطر حفره  $300-50 \mu\text{m}$  از سامانه سه جزئی پلیمر-دیوکسان- آب به دست

آمده است [۱۶].

سامانه به حالت ناپایدار درآید. روش تشخیص نقطه کداری محلول‌ها، در این مطالعه چشمی بود [۱۱]. برای اطمینان از نتایج، این آزمون دو مرتبه انجام شد و در هر نوبت دو نمونه از هر محلول به روش کداری سنجی بررسی شدند.

برای ساخت داربست متخلخل از محلول‌های مزبور، ابتدا مقدار ۱ mL از آنها را در لوله آزمایش ریخته و لوله‌ها از حالت پایدار در دمای  $50^{\circ}\text{C}$  به سرعت تا  $5^{\circ}\text{C}$  کمتر از دمای نقطه کداری (به دست آمده برای هر یک از سامانه‌های سه جزئی در غلظت‌های مختلف در آزمون کداری سنجی) سرد شدند تا جدایی فاز مایع - مایع حاصل شود. دمای  $5^{\circ}\text{C}$  به منظور حصول اطمینان از قرار گرفتن محلول‌ها در ناحیه اسپینودال و عدم سرد شدن تا زیر دمای انجماد حلال (جدایی فاز جامد - مایع است) انتخاب شد. سامانه‌ها در این دما به مدت ۵ min ثابت نگه داشته شدند، تا جدایی فاز پیش رفت کرده و اندازه نواحی غنی از حلال افزایش یابد. سپس، این لوله‌ها در دمای  $20^{\circ}\text{C}$  قرار گرفتند تا این که شکل‌شناسی به دست آمده به کمک جدایی فاز، به وسیله انجماد سریع محلول تثبیت شود. پس از گذشت ۲ h در همین دما، لوله‌ها به مدت ۲۵ h درون دستگاه خشک‌کن انجمادی قرار گرفتند، تا حلال و ضدحلال در حالت انجماد از پلیمر جدا شوند و ساختارهای متخلخل پلی (لاکتیک اسید) باقی‌بماند. برای حصول اطمینان از تبخیر کامل حلال، داربست‌ها به مدت ۲۴ h در دمای محیط قرار گرفتند تا کاملاً خشک شوند.

برای محاسبه تخلخل داربست‌ها از روش منراد استفاده شد. در این روش، ابتدا قطعات مکعبی شکل از داربست با ابعاد مشخص به دقت بریده و حجم قطعات محاسبه شد [۱۷]. چگالی ظاهری داربست ( $\rho$ ) با به دست آوردن وزن قطعات بریده شده به سهولت قابل تعیین است. کسر حجمی جامد داربست‌ها به کمک معادله (۱) به دست می‌آید:

$$V_s = \frac{\rho}{\rho_b} \quad (1)$$

در این معادله  $\rho_b$  چگالی پلی (لاکتیک اسید) در حالت توده است. درصد تخلخل داربست (کسر حجمی حفره‌های موجود درون داربست‌ها) با استفاده از معادله (۲) به دست می‌آید:

$$\varepsilon = 1 - V_s \quad (2)$$

میانگین درصدهای تخلخل برای دو قطعه بریده شده از هر داربست به ابعاد  $1 \times 2 \times 2 \text{ mm}^3$  محاسبه شد.

برای مشاهده ساختار داربست‌های تهیه شده و هم‌چنین سلول‌های رشد داده شده روی آنها از میکروسکوپ الکترونی استفاده شد. میانگین قطر حفره‌های موجود در ساختار داربست‌ها از روش بررسی تصاویر

در این پژوهش، برای به دست آوردن داربست متخلخل از پلیمر بی‌شکل پلی (L, D-لاکتیک اسید) با وزن مولکولی کم از مخلوط حلال - ضدحلال ۴:۱ دیوکسان و آب استفاده شد. از آن جا که وزن مولکولی پلیمر استفاده شده در این آزمایش به حالت چندتوزیعی بود، به جای منحنی اسپینودال که فقط برای پلیمرهایی با توزیع وزنی بسیار باریک به کار می‌رود، از منحنی نقطه کداری استفاده شد.

## تجربی

### مواد و دستگاه‌ها

در این مطالعه، از پلی (L, D-لاکتیک اسید) خریداری شده از شرکت Boehringer با نام RESOMER R 203 S، ۴:۱ دیوکسان از شرکت Merck به عنوان حلال و آب دو بار تقطیر شده به عنوان ضدحلال استفاده شد. برای مشاهده ساختار داربست پلیمری تهیه شده میکروسکوپ الکترونی Vega Tescan به کار گرفته شد. وزن مولکولی به وسیله دستگاه کروماتوگرافی ژل تراوایی مدل GPS Agilent 1100، مطابق استاندارد ASTM D6579-06 در حلال تتراهیدروفوران (THF) خالص معین شد. وزن مولکولی این پلیمر برابر  $M_n = 13600 \text{ g/mol}$  به دست آمد.

### روش‌ها

برای ساخت داربست متخلخل به روش جدایی فاز مایع - مایع از سامانه سه جزئی پلی (L, D-لاکتیک اسید) - دیوکسان - آب در غلظت‌های مختلف استفاده شد. انتخاب دیوکسان به عنوان حلال پلی (لاکتیک اسید) به دلیل دمای جوش کم ( $107^{\circ}\text{C}$ ) و دمای انجماد نسبتاً زیاد ( $178^{\circ}\text{C}$ ) آن است که باعث می‌شود، تصعید در خشک‌کن انجمادی سریع‌تر انجام شود. سه غلظت ۱/۵، ۲/۵ و ۵ درصد وزنی پلیمر، در سه نسبت حجمی ۱۳/۸۷، ۱۵/۸۵ و ۱۷/۸۳ (حلال - ضدحلال) برای تهیه محلول‌های پلیمری آماده شد. برای به دست آوردن محلول‌های مزبور ابتدا پلیمر در غلظت‌های مختلف در دیوکسان حل شد، سپس آب دو بار تقطیر شده با نسبت گفته شده به محلول پلیمر و حلال افزوده شد.

برای به دست آوردن دمای نقطه کداری محلول‌های مورد نظر، ابتدا آنها را در دمای  $50^{\circ}\text{C}$  به مدت ۳۰ min برای رسیدن به حالت همگن نگه داشته، سپس به تدریج محلول‌ها به مقدار  $1^{\circ}\text{C}$  در ۳۰ min خنک شدند، تا در نقطه جدایی فاز مایع - مایع محلول از حالت شفاف خارج شده و

دمای محلول بحرانی بالایی است، (upper critical solution UCST) نشان نمی‌دهد. این موضوع، بدین معنی است که غلظت‌های پلیمر در سمت چپ غلظت بحرانی ( $^*C$ ) و در ناحیه غلظت کم پلیمر قرار گرفته‌اند [۱۳]. هم‌چنین، در نمودار نقطه کدري مشاهده می‌شود، با تغییرات اندکی در نسبت دیوکسان - آب، دمای نقطه کدري سامانه به شدت تحت تأثیر قرار گرفته و با افزایش نسبت حجمی ضدحلال، نقطه کدري محلول‌ها به دماهای بیشتر انتقال می‌یابد [۶].

چنانچه در شکل ۲ معلوم است، تمام محلول‌های مورد آزمایش، در دمایی مشخص کدر شدند و جدایی فاز مایع - مایع در آنها مشاهده شد، به جز سامانه PDLLA ۷۵ درصد در نسبت حجمی حلال به ضدحلال ۸۷/۱۳، که با کاهش دما در محلول همگن کدر نشد. ولی، در دمای  $1^{\circ}C$  پلیمر از محلول شفاف جدا شد و رسوب کرد. این موضوع نشان می‌دهد، جدایی فاز جامد - مایع به دلیل انجماد مخلوط حلال - ضدحلال و رسوب کردن پلیمر اتفاق افتاده است. این نتایج با نتایج به دست آمده از مطالعه Schugens و همکاران [۱۱] مطابقت خوبی دارد. در آن مطالعه نیز اشاره شده است، نمونه‌هایی وجود دارند که هنگام تعیین نقطه کدري کدر نشدند. اما، تبلور حلال و جدایی فاز جامد - مایع در آنها اتفاق افتاده است. در نسبت ثابت حلال - ضدحلال نیز دمای نقطه کدري با غلظت پلیمر افزایش می‌یابد که این مشاهده با نمودار فازی از نوع UCST تطابق دارد.

### اثر غلظت پلیمر بر شکل شناسی داربست‌ها

مقادیر درصد تخلخل (%) (معادله‌های ۱ و ۲) و میانگین اندازه قطر حفره داربست‌های ساخته شده از سامانه‌های پیش گفته در جدول ۱ آورده شده است.

عکس‌های میکروسکوپ الکترونی این داربست‌ها در شکل ۲ نشان داده شده است. در ساختار داربست‌های تهیه شده، شکل شناسی نهایی آنها به وسیله موقعیت ترمودینامیکی محلول و کنترل سینتیک فرایند TIPS معین می‌شود. نیروی محرک ترمودینامیکی برای جدایی فاز در یک غلظت خاص پلیمر و مخلوط دیوکسان - آب به وسیله دمای سردکردن معین می‌شود. رشد و گسترش شکل شناسی در طول جدایی فاز تحت این نیروی محرک ترمودینامیکی را می‌توان به وسیله زمان نگاه داشتن محلول در آن دما کنترل کرد [۶].

همان‌طور که در جدول ۱ مشاهده می‌شود، با افزایش غلظت پلیمر در محلول‌ها درصد تخلخل کاهش می‌یابد. به طور مثال برای نسبت حلال ۱۳/۸۷ در غلظت ۷۵ درصد پلیمر، تخلخل داربست ۸۵/۵ درصد است که با افزایش غلظت پلیمر به ۲/۵ و ۵ درصد، تخلخل به ۸۳/۲ و ۷۶/۳ درصد می‌رسد. مطابق با درصد تخلخل داربست‌ها، چگالی داربست نیز با

حاصل از میکروسکوپ الکترونی به وسیله نرم‌افزار Manual Microstructure Distance Measurement محاسبه شد. برای هر داربست میانگین قطر ۱۵ حفره گزارش شد.

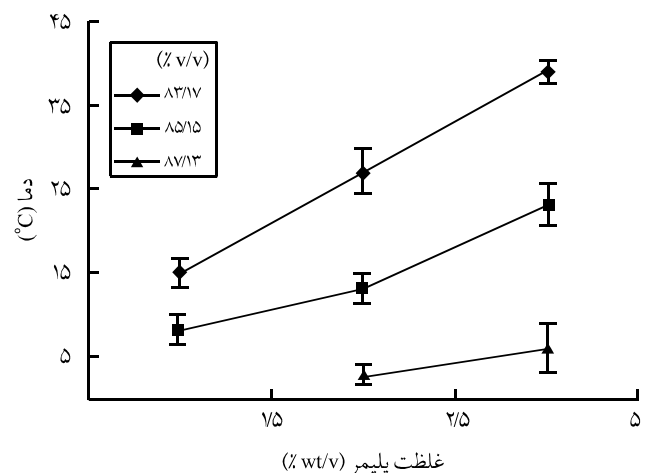
## نتایج و بحث

### تعیین دمای نقطه کدري

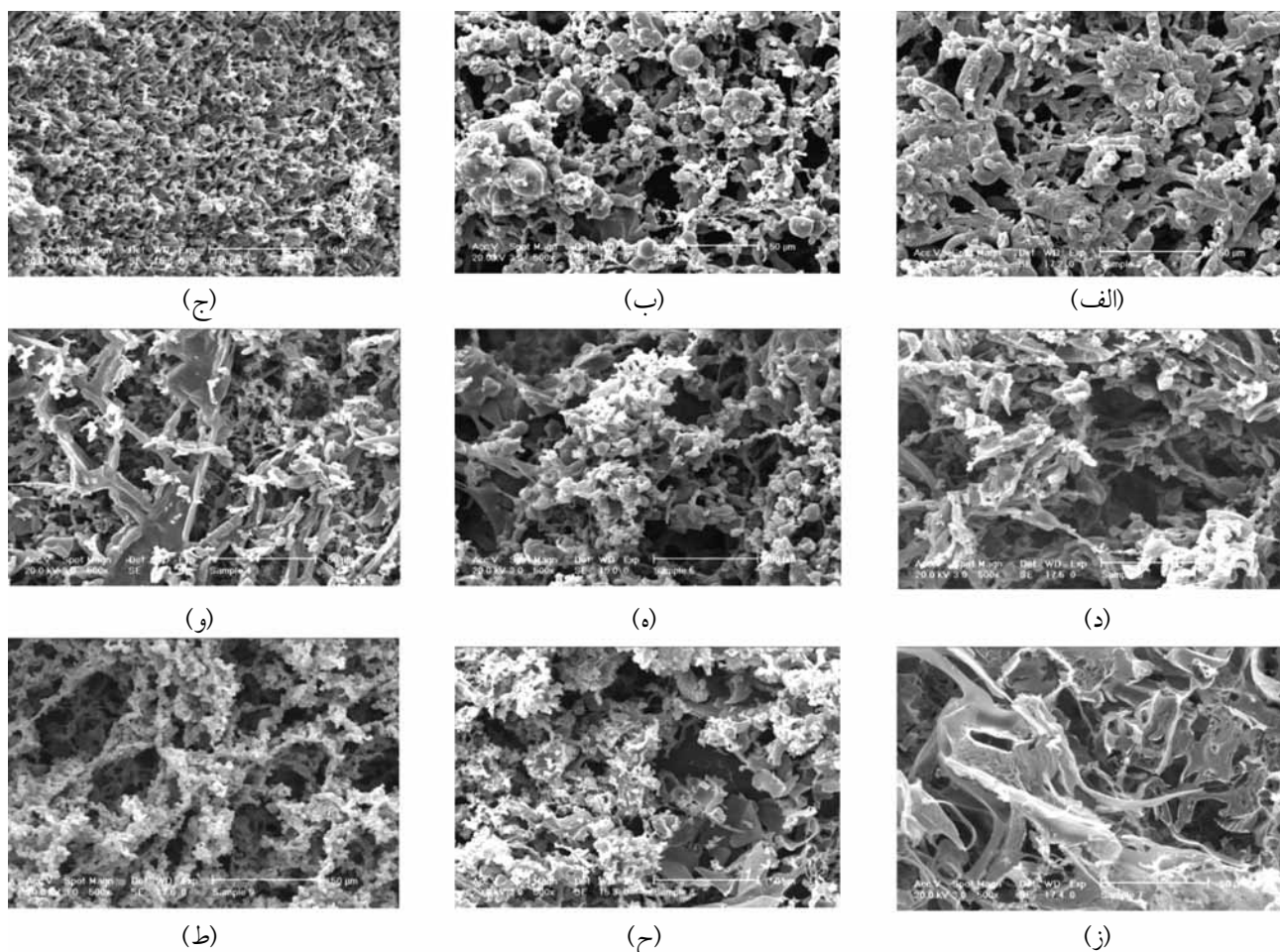
برای تعیین دمای نقطه کدري، محلول‌ها از دماهای بالای منحنی هم‌زیست (bionodal) (شکل ۱)، در حالت پایدار و همگن به منظور جدایی محلول به مناطق غنی از پلیمر و غنی از حلال، به تدریج و به مقدار  $1^{\circ}C$  در مدت ۳۰ min سرد شدند. شکل ۱ نشان دهنده تغییرات دمای نقطه کدري سامانه سه جزئی PDLLA-دیوکسان-آب برحسب تغییرات غلظت‌های هر سه جزء تشکیل دهنده محلول‌هاست.

در شکل ۱ مشاهده می‌شود، با افزایش غلظت پلیمر در محلول، دمای نقطه کدر شدن نیز افزایش پیدا می‌کند [۱۸]. محلول‌های PDLLA بی‌شکل در مخلوط‌های حلال - ضدحلال حین فرایند سردکردن محلول پس از عبور از دمای نقطه کدري به سرعت کدر می‌شوند. این موضوع بیان‌گر آن است که کدري به وسیله فرایند جدایی مایع - مایع به سامانه القا شده است. دمای محلول‌ها پس از این که به دماهای بیش از نقطه کدري رسانده شوند، دوباره همگن می‌شوند. پس از گذشت زمان‌های طولانی از تعادل در حالت دوفازی، فازهای جدا شده کدر، کاملاً به دو فاز مایع شفاف تفکیک می‌شوند [۱۷].

نمودارهای کدري به دست آمده، غلظت بحرانی پلیمر را که بیان‌گر



شکل ۱- دمای نقطه کدري برای غلظت‌های مختلف سامانه PDLLA-دیوکسان - آب.



شکل ۲- عکس‌های SEM سامانه‌های پلی (L, D, لاکتیک اسید) - ۴,۱ دیوکسان- آب در نسبت‌های مختلف با بزرگ‌نمایی  $500\times$ : (الف) ۱۳-۸۷-۵، (ب) ۱۵-۸۵-۵، (ج) ۱۷-۸۳-۵، (د) ۱۷-۸۳-۲/۵، (ه) ۱۵-۸۵-۲/۵، (و) ۱۷-۸۳-۲/۵، (ز) ۱۳-۸۷-۱/۵، (ح) ۱۵-۸۵-۱/۵ و (ط) ۱۷-۸۳-۱/۵.

افزایش غلظت پلیمر زیاد می‌شود [۱۱]. هم‌چنین از عکس‌های شکل ۲ و جدول ۱ مشخص است که با افزایش غلظت پلیمر از ۱/۵ به ۲/۵ و سپس ۵ درصد (wt/v) اندازه حفره‌های تشکیل شده در داربست‌ها کاهش می‌یابد که در جدول ۱ برای سامانه‌های تهیه شده از نسبت حلال ۱۷/۸۳ میانگین قطر حفره‌ها به ترتیب با افزایش غلظت پلیمر ۲۲، ۱۴ و ۳۷ mm به دست آمده است.

اثر غلظت پلیمر بر شکل‌شناسی را می‌توان این‌طور بررسی کرد که افزایش غلظت پلیمر باعث کاهش کسر حجمی محمل (حلال) - ضدحلال می‌شود که در نتیجه منجر به کاهش درصد تخلخل می‌شود. از طرف دیگر، با افزایش غلظت پلیمر در سامانه محلول، گرانیوی سامانه به شدت تحت تأثیر قرار گرفته و افزایش می‌یابد. افزایش گرانیوی باعث آهسته شدن سینتیک فرایند جدایی فاز و کند شدن رشد مناطق غنی از حلال و غنی از پلیمر می‌شود.

در نتیجه دو عامل افزایش گرانیوی سامانه و کاهش کسر حجمی

جدول ۱- درصد تخلخل و قطر حفره داربست‌های به دست آمده از سامانه PDLLA-دیوکسان-آب.

میانگین قطر حفره ( $\mu\text{m}$ )	درصد تخلخل (% $\epsilon$ )	۴,۱-دیوکسان-آب (% v/v)	غلظت PDLLA (% wt/v)
$30 \pm 1$	$85/5 \pm 0/1$	۱۳-۸۷	۱/۵
$35 \pm 1$	$82/0 \pm 0/1$	۱۵-۸۵	
$37 \pm 1$	$81/3 \pm 0/1$	۱۷-۸۳	
$8 \pm 1$	$83/2 \pm 0/1$	۱۳-۸۷	۲/۵
$10 \pm 1$	$80/7 \pm 0/1$	۱۵-۸۵	
$22 \pm 1$	$80/0 \pm 0/1$	۱۷/۸۳	
$5 \pm 1$	$76/3 \pm 0/1$	۱۳-۸۷	۵
$10 \pm 1$	$74/7 \pm 0/1$	۱۵-۸۵	
$14 \pm 1$	$77/7 \pm 0/1$	۱۷-۸۳	

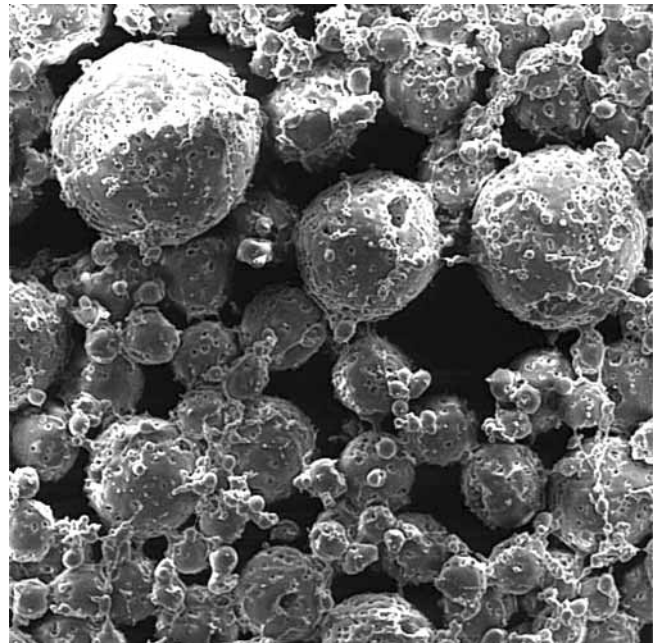
شدن و رسوب کردن پلیمر در محلول، در سمت چپ منحنی هم زیست اتفاق می افتد. همان طور که در نمودار نقطه کداری (شکل ۱) نیز قابل تشخیص است، برای این سامانه دمای نقطه کداری که مشخصه جدایی مایع - مایع است، به دست نمی آید و پیش از جدایی مایع - مایع، در این سامانه به دلیل تبلور حلال، ژل شدن و رسوب کردن پلیمر جدایی فاز جامد - مایع رخ می دهد.

نمای نزدیک تر از ساختار به دست آمده از سامانه ۷۵-۸۳-۱۷ (شکل ۳) نشان می دهد که داربست تهیه شده از این سامانه دارای شکل شناسی دانه مانند با اتصالات ضعیف بین دانه هاست که این شکل شناسی را می توان با جدایی فاز در ناحیه هم زیست اول که در غلظت های اندک پلیمر اتفاق می افتد، مرتبط دانست. در این ناحیه در محلول پلیمری، پلیمر فاز پراکنده و حلال فاز پیوسته را تشکیل می دهد و جدایی فاز از روش هسته گذاری و رشد پیروی می کند. با توجه به این که شکل شناسی های به دست آمده از سایر داربست ها ساختار متخلخل و حفره های مرتبط به هم دارد، می توان نتیجه گرفت که جدایی فاز در زیر منحنی اسپینودال و با روش تجزیه اسپینودالی انجام شده است.

مطالعات Park [۱۴] و Lee [۱۶] تأیید کننده این نتایج است، شکل شناسی داربست های حاصل از روش جدایی فاز مایع - مایع و بدون اثر Pluronic F127 [۱۴] و نمک طعام [۱۶] نشان می دهد که اندازه حفره های داربست ها با غلظت پلیمر رابطه عکس دارد و نیز افزایش مقدار آب در سامانه سه جزئی پلیمر - دیوکسان - آب باعث افزایش میانگین قطر حفره ها می شود.

### نتیجه گیری

روش جدایی فاز بر اثر دما با توجه به سادگی روش و عدم نیاز به ابزار و تجهیزات پیچیده، یکی از روش های مناسب برای ساخت داربست پلیمری متخلخل به منظور کاربردهای مهندسی بافت است. عوامل مختلفی در ساخت داربست به روش جدایی فاز اثر دارند که مهم ترین آنها نوع پلیمر و حلال به کار رفته، غلظت محلول پلیمری، دمای جدایی فاز، وزن مولکولی پلیمر، غلظت و نوع ضدحلال است. کنترل دقیق متغیرهای مؤثر بر فرایند جدایی فاز برای رسیدن به شکل شناسی و اندازه حفره های مناسب ضروری است. استفاده از آب به عنوان ضدحلال در سامانه پلی (L, D-لاکتیک اسید) - دیوکسان، سبب بروز جدایی فاز به روش مایع - مایع در سامانه می شود. با افزایش مقدار آب نسبت به دیوکسان نقطه کداری در دماهای بیشتری حاصل می شود. این



شکل ۳ - شکل شناسی گلوله‌ی مربوط به سامانه پلی (D, L-لاکتیک اسید) - ۴،۱ - دیوکسان - آب با نسبت ۷۵-۸۳-۱۷ در بزرگ نمایی  $2000\times$ .

مخلوط حلال - ضدحلال، با افزایش غلظت پلیمر سبب کاهش درصد تخلخل و اندازه حفره ها می شود [۶].

### اثر نسبت حلال - ضدحلال بر شکل شناسی داربست ها

اثر ترکیب حلال ها بر شکل شناسی داربست ها با تغییر نسبت حلال به ضدحلال در سه نسبت ۱۷-۸۳، ۱۵-۸۵ و ۱۳-۸۷ بررسی شده است. در سه غلظت پلیمر مشاهده می شود، با افزایش مقدار آب در ترکیب حلال اندازه حفره ها بزرگ تر می شوند. این موضوع می تواند بر اساس این واقعیت باشد که با افزایش کسر حجمی ضد حلال، برهم کنش ضعیف تری بین پلیمر و حلال القا می شود و باعث تسریع رشد مناطق غنی از حلال با محدوده های وسیع تری از قطره محمل می شود. افزون بر این، افزایش تدریجی آب به سامانه پلی (لاکتیک اسید) - دیوکسان - آب باعث افزایش دمای نقطه کداری (جدول ۱) و کاهش گرانیروی ظاهری می شود. پس بنابراین، اندازه حفره بزرگ تر در سامانه هایی که مقدار ضدحلال بیشتری دارند، به دلیل ترکیب شدن دو اثر تضعیف برهم کنش پلیمر - حلال و کاهش گرانیروی محلول در سامانه های ضدحلالی است [۱۳].

داربست ساخته شده از سامانه ۷۵-۸۷-۱۳ ساختار شبکه ای همانند سایر سامانه ها را نشان نمی دهد (شکل ۲). این تفاوت در ساختار را می توان به وقوع جدایی فاز جامد - مایع مربوط دانست که بر اثر ژل

داربست افزایش می‌یابد. اما، اندازه حفره‌ها و درصد تخلخل کاهش می‌یابد. با افزایش مقدار ضدحلال در سامانه سه جزئی اندازه حفره‌ها بزرگ‌تر می‌شود. داربست تهیه شده از سامانه شامل ۷۵٪ درصد پلیمر، ۸۳ درصد حلال و ۱۳ درصد آب، دارای شکل شناسی گلوله‌ای با اتصالات ضعیف بین گلوله‌هاست که این شکل شناسی مربوط به جدایی فاز در ناحیه هم‌زیست اول است.

## مراجع

1. Minuth W.W., Streth R., and Schumacher K., *Tissue Engineering Essentials for Daily Laboratory Work*, Wiley-VCH, Germany, Chap. 1, 2005.
2. Novakivic G. and Freshney R.I., *Culture of Cells for Tissue Engineering*, Wiley-LISS, USA, Chap. 6, 2006.
3. Wu X.Sh., *Encyclopedic Handbook of Biomaterials and Bioengineering Part A: Materails*, CRC, 2, 1995.
4. Cohn D., Thermal Characterization of Poly lactides, *Polymer*, **29**, 2229-2234, 1988.
5. Whang K. and Healy K.E., *Processing of Polymer Scaffolds: Freeze-Drying, Methods of Tissue Engineering*, Atala A. and Lanza R.P. (Eds.), Academic, 697-704, 2002.
6. Hua F.J., Kim G.E., Lee J.D., Son. Y.K., and Lee D.S., Macroporous PLLA Scaffold 1. Preparation of a Macro-porous Scaffold by Liquid-Liquid Phase Separation of a PLLA-Dioxane-Water system, *J. Biomed. Mater. Res.*, **63**, 161- 167, 2002.
7. Shirong L., Carrubba L.V., Piccarolo S., Sannino D., and Brucato V., Preparation and Properties of Poly(L-lactic acid) Scaffolds by Thermally Induced Phase Separation from a Ternary Polymer-Solvent System, *Polym. Int.*, **53**, 2079-2085, 2004.
8. Lee J.S., Lee H.K., Kim J.Y., Hyon S.H., and Kim S.C., Thermally Induced Phase Separation in PLA/ Dialkyl Phthalate Systems, *J. Appl. Polym. Sci.*, **88**, 2224-2232, 2003.
9. Li S., Carruba V.L., Piccarolo S., Samnino D., and Brueato V., Preparation and Prosperities of Poly(L-lactic acid) Scaffolds by Thermally Induced Phase Separation from Ternary Polymer Solvent System, *Polym. Int.*, **53**, 2072-2085, 2004.
10. Hua F.J., Park T.G., and Lee D.S., A Facile Preparation of Highly Interconnected Macroporous Poly(D,L-lactic acid-co- glycolic acid) (PLGA) Scaffolds by Liquid-Liquid Phase Separation of a PLGA-Dioxane-Water Ternary System, *Polymer*, **44**, 1911-1920, 2003.
11. Schugens Ch., Maquet V., Grandfils Ch., Jerome R., and Teyssie Ph., Poly lactide Macro-porous Biodegradable Implants for Cell Transplantation. II. Preparation of Poly lactide Foams by Liquid-Liquid Phase Separation, *J. Biomed. Mater. Res.*, **30**, 449-461, 1996.
12. Akki R., Desai P., and Abhiraman A.S., A Framework for Morphology Evolution vis-a-vis Phase Transition in Polymer Solution, *J. Appl. Polym. Sci.*, **73**, 1343-1355, 1999.
13. Nam Y.S. and Park T.G., Porous Biodegradable Polymeric Scaffolds by Thermally Induced Phase Separation, *J. Biomed. Mater. Res., Part A*, **47**, 8-17, 1999.
14. Nam Y.S. and Park T.G., Biodegradable Polymeric Microcellular Foams by Modified Thermally Induced Phase Separation Method, *Biomaterials*, **20**, 1783-1790, 1999.
15. Gong Y., Ma Z., Gao Ch., Wang W., and Shen J., Specially Elaborated Thermally Induced Phase Separation to Fabricate Poly(L-lactic acid) Scaffolds with Ultra Large Pores and Good Interconnectivity, *J. Appl. Polym. Sci.*, **110**, 3336-3342, 2006.
16. Hua F.Y., Nam D.J., and Lee D.S., Preparation of a Macroporous Poly(L-lactide) Scaffold by Liquid- Liquid Phase Separation of a PLLA/ 1,4 Dioxane/ Water Ternary System in the Presence of NaCl, *Macromol. Rapid. Commun.*, **22**, 1053-1057, 2001.
17. Park J.B. and Lakes R.S., *Biomaterails, An Introduction*, Plen, New York, Chap. 1, 1992.
18. Yang F., Murgan R., Ramakrishan S., Wang X., Ma X., and Wang S., Fabrication of Nano-structured Poroud PLLA Scaffold Intended for Nerve Tissue Engineering, *Biomaterials*, **25**, 1891-1900, 2004.