



طراحی و ساخت داربست‌های هیبریدی متخلخل زیست تخریب پذیر بر پایه کیتوسان - ژلاتین - تری فسفات کلسیم برای مهندسی بافت

Design and Fabrication of Biodegradable Porous Chitosan/Gelatin/ Tricalcium Phosphate Hybrid Scaffolds for Tissue Engineering

یوسف محمدی^۱، حمید میرزاده^{۲،*}، فتح الله مضطرزاده^۲، مسعود سلیمانی^۳، اسماعیل جباری^۴

۱ - تهران، پژوهشگاه پلیمر و پتروشیمی ایران، گروه پلیمرهای زیست سازگار، صندوق پستی ۱۴۹۶۵/۱۱۵

۲ - تهران، دانشگاه صنعتی امیرکبیر، دانشکده مهندسی پزشکی، گروه بیومتریال، صندوق پستی ۱۵۸۱۷۵/۴۴۱۳

۳ - تهران، دانشگاه تربیت مدرس، دانشکده علوم پزشکی، گروه هماتولوژی، صندوق پستی ۱۴۱۵۵/۴۸۳۸

۴ - کارولینای جنوبی، کلمبیا، دانشگاه کارولینای جنوبی، دانشکده مهندسی شیمی، ۲۹۲۰۸

دریافت: ۸۵/۹/۱۹، پذیرش: ۸۵/۱۲/۲۸

چکیده

در این کار پژوهشی، فن مهندسی بافت به منظور بازسازی بافت‌های استخوانی و غضروفی مورد استفاده قرار گرفت. در این راستا، با به کارگیری روش ژل شدن انجمادی، داربست‌های متخلخل و زیست تخریب پذیر متنوعی با ریزساختار و خواص فیزیکی - مکانیکی مناسب از تلفیق پلیمرهای طبیعی و زیست سرامیک‌های زیست فعال تهیه گردید. با به کارگیری فنون متنوع شناسایی، خواص فیزیکی، شیمیایی و زیست شناختی داربست‌ها به همراه ویژگی‌های مربوط به ریزساختار و شکل شناسی آنها بررسی و مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت. نتایج به دست آمده بیانگر امکان کنترل مناسب ریزساختار داربست‌های هیبریدی، به ویژه میزان و اندازه تخلخل آنها، با تغییر شرایط عملیاتی و فرایندی است. همچنین، زیست سازگاری و رشد سلول‌های کندروسیت روی داربست‌های تهیه شده از راه روش‌های میکروسکوپی نوری و الکترونی انجام پذیرفت. نتایج به دست آمده موید پتانسیل بسیار زیاد این دسته از داربست‌ها در حمایت از رشد سلول‌ها در فضای درون آنهاست.

واژه‌های کلیدی

مهندسی بافت، داربست متخلخل،
ژل شدن انجمادی، کیتوسان،
تری فسفات کلسیم

مقدمه

بسیاری از بیماری‌ها انتظار می‌رود، مهندسی بافت به عنوان یکی از بهترین و بی نظیرترین گزینه‌های درمانی در مداوای بسیاری از نقص‌ها و بیماری‌ها مطرح باشد، به ویژه آنهایی که هنوز از یک شیوه درمانی قطعی برخوردار نیستند. در حال حاضر، از فنون مهندسی بافت

امروزه، مبحث مهندسی بافت از جایگاه بسیار مهمی در زمینه علوم و فناوری برخوردار است، به طوری که مطالعات و تحقیقات بسیاری را در سرتاسر دنیا، به ویژه در اکثر محافل علمی و پژوهشی، به خود معطوف کرده است. با در نظر گرفتن پتانسیل‌های زیاد این فناوری در درمان

Key Words

tissue engineering, porous scaffold,
freeze-gelation, chitosan,
tricalcium phosphate

سلول‌ها، بازسازی زمینه فراسلولی و حداقل ممانعت به نفوذ عوامل رشد را سبب گردد. ضمن آن که ساختار حفره‌ها باید به گونه‌ای باشد که توزیع سلول‌ها را در سرتاسر داربست موجب شود و شکل‌گیری بافت همگن تسهیل گردد. در این ارتباط محققان بر این باورند که یک داربست ایده‌آل در مهندسی بافت باید از اندازه تخلخل‌های مناسب (بیش از $50 \mu\text{m}$ برای سلول‌های پوست و عصب، بیش از $100 \mu\text{m}$ برای سلول‌های غضروف و بیش از $200 \mu\text{m}$ برای سلول‌های استخوان) برخوردار باشد تا امکان تغذیه برای سلول‌های واقع در نواحی درونی داربست نیز به راحتی میسر شود و سلول‌ها مجبور به مهاجرت به نواحی سطحی داربست نشوند.

- مواد به کار رفته در ساخت داربست باید از نقطه نظر خواص شیمیایی، فیزیکی، مکانیکی و زیست‌شناختی مشابه بافت زنده مورد نظر انتخاب شوند و فرایند تولید ساختارهای سه بعدی از آن به راحتی امکان پذیر و فرایند تکرارپذیر باشد. به همین منظور، داربست‌های متخلخل سه بعدی مختلفی از زیست مواد پلیمری تخریب پذیر طبیعی و مصنوعی و همچنین زیست‌سرامیک‌ها برای کشت سلول‌های تمایز یافته یا سلول‌های بنیادی در مهندسی بافت استفاده شده است. نتایج به دست آمده توسط گروه‌های تحقیقاتی مختلف حاکی از آن است که مواد اشاره شده و سایر مواد مصرفی در مهندسی بافت به تنهایی قادر به تامین تمام شرایط اشاره شده برای داربست‌های ایده‌آل نیستند و به همین دلیل اکثر محققان به دنبال مواد مرکب از تلفیق پلیمرهای زیست سازگار و سرامیک‌های زیست فعال اند [۲۱-۱۸].

در این کار پژوهشی، سعی شده است تا برای نخستین بار در کشور از فن مهندسی بافت برای بازسازی صدمات و نارسایی‌های بافت استخوان و غضروف استفاده گردد. برای این منظور، داربست‌های هیبریدی از کامپوزیت کیتوسان - ژلاتین - تری فسفات کلسیم با ریزساختار و خواص فیزیکی - مکانیکی مناسب تهیه شده و برهم کنش این داربست‌ها با سلول‌های کندروسیت مورد ارزیابی قرار گرفته است.

تجربی

مواد

کیتوسان با وزن مولکولی $400,000 \text{ g/mol}$ و درجه دی استیل دار شدن ۸۵ درصد از شرکت Fluka تهیه گردید. ژلاتین به کار رفته در این تحقیق نیز متعلق به شرکت Fluka و تهیه شده از پوست خوک است. در شکل ۱ فرمول شیمیایی کیتوسان و ژلاتین برای مقایسه با یکدیگر آورده شده

برای ترمیم و بازسازی بافت‌ها و اندام‌هایی نظیر پوست، استخوان، غضروف، کبد، مثانه، لیگامان، اعصاب، دریچه‌های قلب و غیره استفاده می‌گردد، به طوری که در تمام زمینه‌های یاد شده موفقیت‌های جالب توجهی حاصل شده است و هر روز بر دامنه آنها افزوده می‌شود [۱۴-۱]. در یک تعریف کلی، مهندسی بافت فنی در جهت ترغیب و تشویق بافت‌های آسیب دیده برای بازسازی خود به کمک سلول‌ها، زیست مولکول‌ها و ساختارهای نگهدارنده مکانیکی است. به عبارت بهتر، هدف مهندسی بافت بازگرداندن حافظه بافت‌های آسیب دیده به زمان‌های پیشین (به دوران جنینی و مراحل اولیه رشد بافت) برای فراهم آوردن قابلیت مجدد رشد و بازسازی آنهاست.

به طور کلی، الگوی کلاسیک ارائه شده برای مهندسی بافت در محیط‌های آزمایشگاهی (*in vitro*) شامل جداسازی سلول‌های تمایز یافته یا سلول‌های بنیادی از بافت فرد دهنده و کشت آنها در داخل داربست‌های سه بعدی است. به منظور انجام عملیات یاد شده لازم است شرایط محیطی خاصی اعمال گردد، به گونه‌ای که از رشد بافت و شکل‌گیری زمینه فراسلولی حمایت کامل صورت پذیرد. با انتخاب ترکیبی مناسب از داربست‌های مهندسی، محیط‌های کشت و سلول‌های مناسب می‌توان استراتژی‌های موفق را برای تولید پیوندهای سنتزی طراحی و اجرا کرد که هم از قابلیت نگهداری مکانیکی اولیه و هم از قابلیت اتصال، تمایز، رشد و تکثیر سلول‌های زنده به همراه ویژگی‌های رگ‌زایی (*angiogenesis*) برخوردار باشند [۱۵]. لازم به ذکر است، تهیه داربست متخلخل زیست تخریب پذیر یکی از دشوارترین بخش‌های مهندسی بافت به شمار می‌آید و به عنوان یک هنر در فناوری مهندسی بافت مطرح است. چرا که این داربست ضمن آن که باید از خواص فیزیکی و مکانیکی مناسب برخوردار باشد، لازم است شکل‌شناسی و ریزساختار خاص و منحصر به فردی نیز داشته باشد. به طور کلی، یک داربست متخلخل ایده‌آل برای کاربردهای مهندسی بافت باید معیارهای طراحی زیر را دارا باشد [۱۷، ۱۶]:

- به گونه‌ای باشد که چسبیدن سلول‌های زنده به سطح آن به راحتی میسر و انجام اعمال مربوط به تمایز سلولی و رشد و تکثیر سلول‌ها در سرتاسر ساختار آن امکان پذیر باشد.

- زیست‌سازگار باشد، به این معنی که نه تنها پلیمر به کار رفته در ساخت داربست، بلکه محصولات حاصل از تخریب آن نیز سمی نباشد و منجر به ایجاد آماس و التهاب در محیط زنده (*in vitro*) نگردد.

- زیست تخریب پذیر باشد و در زمان مناسب بر اثر تخریب و فرسایش حذف شود.

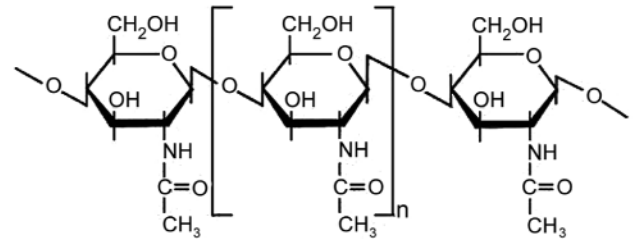
- به اندازه کافی متخلخل باشد تا فضای کافی را برای چسبیدن

ژلاتین و تری فسفات کلسیم هر یک برابر ۲۵ درصد بود [۲۶-۲۳]. در تهیه محلول‌های اشاره شده، ابتدا مقادیر مشخصی از پودر کیتوسان در استیک اسید ۰/۵ مولار حل گردید. در ادامه وزن‌های معینی از ژلاتین در دمای 50°C ، با استفاده از یک هم‌زن مغناطیسی به محلول کیتوسان اضافه گردید. سپس، مقادیر مشخصی از پودر تری فسفات کلسیم در آب دوبار تقطیر با استفاده از یک همگن‌ساز با سرعت چرخشی 24000 rpm به حالت تعلیق پایدار درآمد و همراه با عملیات هم‌زدن به کمک هم‌زن مغناطیسی به محلول کیتوسان و ژلاتین اضافه گردید. در ادامه عامل شبکه‌ای‌کننده یعنی محلول آبی ۰/۲۵ درصد گلو تار آلدهید به میزان ۱ درصد مجموع وزن کیتوسان و ژلاتین به کار رفته، به شکل قطره قطره به محلول‌ها اضافه گردید. محلول‌های حاصل در داخل پتری دیش‌های شیشه‌ای ریخته‌گری شده و ظروف حاوی مخلوط‌های یاد شده در دمای 20°C به مدت ۱۲ ساعت قرار داده شدند تا محلول‌ها منجمد شوند. در اثر کاهش دما، محلول‌ها دچار جدایش فازی از نوع جامد - مایع (مکانیسم تجزیه اسپینودال) شده و شکل‌شناسی مورد انتظار شکل گرفت. در ادامه محلول‌هایی با غلظت‌های ۱ و ۲ مولار از NaOH در آب مقطر تهیه و مقادیر مناسبی اتانول به آنها اضافه گردید، به طوری که کسر حجمی اتانول در همه آنها برابر ۰/۷ بود. محلول‌های تهیه شده به مدت یک روز در دمای 20°C قرار داده شدند تا در این دما به تعادل گرمایی برسند.

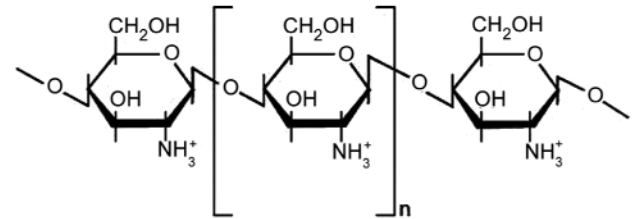
یادآور می‌شود، وجود اتانول برای جلوگیری از انجماد محلول‌های آبی هیدروکسید سدیم است. با قرار دادن محلول‌های منجمد کیتوسان - ژلاتین - تری فسفات کلسیم در درون محلول ۱ مولار هیدروکسید سدیم - اتانول، فرایند ژل شدن محلول‌ها در درون پتری دیش‌ها به وقوع پیوست. این عملیات به مدت ۴۸ h در دمای 20°C انجام گرفت. در پایان این مدت، پتری دیش‌های حاوی محلول‌های ژل شده به منظور تکمیل فرایند ژل شدن به درون محلول ۲ مولار هیدروکسید سدیم - اتانول انتقال داده شد و به مدت ۴۸ h دیگر در درون این محلول و در همان دما نگه‌داری شدند. پس از گذشت مدت زمان یاد شده، محلول‌های ژل شده به راحتی از درون پتری دیش‌ها خارج و در درون آب مقطر به مدت ۲۴ h ساعت نگه‌داری شدند. با انتقال این ژل‌ها به درون دیسکاتور و خشک کردن آنها در دمای محیط، داربست‌های مورد نظر تهیه و در ادامه عملیات شناسایی مختلف روی آنها انجام شد.

شناسایی داربست‌های هیبریدی

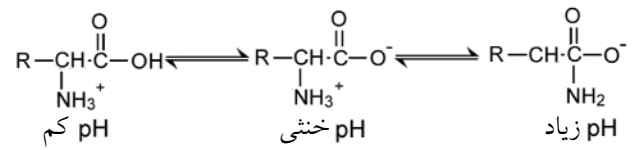
شکل‌شناسی و ریزساختار داربست‌های متخلخل تهیه شده با به کارگیری میکروسکوپ الکترونی مورد ارزیابی قرار گرفت. برای این



(الف)



(ب)



(ج)

شکل ۱- فرمول شیمیایی پلیمرهای به کار رفته در ساخت داربست‌های هیبریدی متخلخل زیست تخریب پذیر: (الف) کیتین، (ب) کیتوسان و (ج) ژلاتین.

است. همچنین، پودر تری فسفات کلسیم با اندازه ذرات کمتر از 40 mm از شرکت Biovision GmbH خریداری گردید. سایر مواد و حلال‌های به کار رفته از نوع آزمایشگاهی انتخاب شدند.

روش‌ها

ساخت داربست‌های هیبریدی

در تهیه داربست‌های مورد نظر در این کار تحقیقاتی از روش ژل شدن انجمادی (freeze-gelation) استفاده شد [۲۲]. برای این منظور محلول‌هایی از کامپوزیت کیتوسان، ژلاتین و تری فسفات کلسیم با غلظت‌های ۲، ۳، ۴ و ۵ درصد وزنی تهیه گردید، به طوری که در تمام محلول‌های تهیه شده کسر وزنی کیتوسان برابر ۵۰ درصد و کسر وزنی

کامل سطوح داربست با فک‌های دستگاه اطمینان حاصل گردد. مدول فشاری نمونه‌ها بر اساس شیب ناحیه کشسانی در منحنی تنش - کرنش معین شد. ضمن آن که براساس گزارش‌های ارائه شده در مقالات، استحکام فشاری داربست‌های متخلخل بر اساس تنش تسلیم معین گردید. لازم به ذکر است که در تعیین خواص مکانیکی هر داربست هیبریدی متخلخل از چهار نمونه یکسان استفاده شده است و نتایج گزارش شده در حقیقت متوسط داده‌های به دست آمده برای چهار نمونه است. علاوه بر این، برای تهیه طیف FTIR از داربست‌های متخلخل هیبریدی، ابتدا داربست به مدت 10 min در داخل نیتروژن مایع قرار گرفت و در ادامه به پودر بسیار نرمی تبدیل و قرص KBr از آن تهیه شد. برای طیف‌سنجی FTIR از کیتوسان و ژلاتین، فیلم‌های شفاف تهیه شد.

کشت سلول‌های کندروسیت روی داربست‌های هیبریدی

در این تحقیق، سلول‌های کندروسیت مورد استفاده از غضروف هیالین گوسفند جدا شده و ابتدا در محیط کشت DMEM حاوی 20% سرم، 10 g/mL فاکتور رشد TGF- β و فاکتور رشد bFGF کشت شدند. پس از رشد و تکثیر سلول‌های جداسازی شده، این سلول‌ها با استفاده از تریپسین از کف فلاسک جمع‌آوری شده و سپس به درون داربست‌های هیبریدی استریل شده منتقل شدند. لازم به ذکر است که عملیات استریل کردن داربست‌ها با به کارگیری اتانول 70% و سپس قرار دادن آنها به مدت 24 h در محیط کشت فاقد سرم انجام شد. پس از انتقال سلول‌ها روی داربست‌های متخلخل، محیط کشت هر 2 روز یک بار تعویض شد. پس از گذشت یک هفته از کشت سلول‌ها روی داربست‌ها، آنها را به وسیله گلو تار آلدئید 2/5 درصد روی سطوح داربست‌ها تثبیت کرده و سپس با به کارگیری میکروسکوپ نوری و الکترونی مورد ارزیابی قرار گرفتند.

نتایج و بحث

ارزیابی ریزساختار داربست‌های هیبریدی

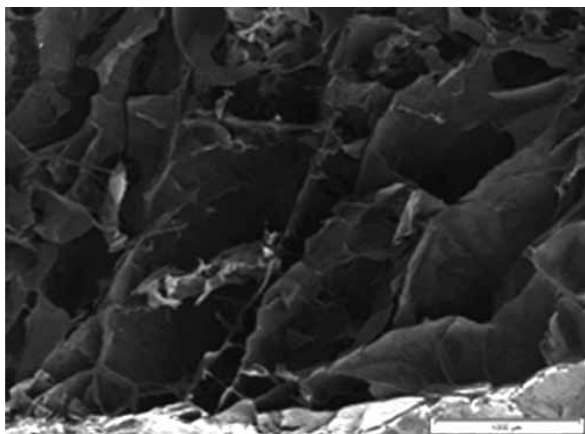
در شکل 2 تصاویر میکروسکوپ الکترونی مربوط به سطح مقطع داربست‌های هیبریدی تهیه شده در این تحقیق آورده شده است. نتایج به دست آمده حاکی از آن است که این داربست‌ها به شدت متخلخل بوده و تخلخل‌های موجود در آنها تا اندازه زیادی با یکدیگر مرتبط‌اند. همچنین، با افزایش غلظت محلول‌های اولیه نه تنها مقدار تخلخل

منظور، نمونه‌های مورد نظر به مدت 10 min در داخل نیتروژن مایع قرار داده شد و پس از انجماد کامل، با به کارگیری تیغ‌های جراحی بسیار ظریف به اندازه‌های کوچکتری بریده شدند. پس از پوشش دهی نمونه‌ها با طلا، تصاویر میکروسکوپ الکترونی از سطوح و مقاطع عرضی آنها تهیه گردید. به منظور تعیین اندازه متوسط قطر تخلخل‌ها در تصاویر تهیه شده، اندازه تقریبی 20 تخلخل به طور تصادفی مشخص گردید و میانگین آنها به عنوان قطر متوسط تخلخل‌ها گزارش شد. همچنین، در تعیین مقدار تخلخل داربست‌های تهیه شده در این تحقیق از روش جابه‌جایی مایع بر اساس روش کار گزارش شده در مراجع استفاده شد [27]. در این روش اصولاً از آب به عنوان مایع جابه‌جا شونده استفاده می‌گردد. اما، در این تحقیق به علت نقش ضدحلالی و نیز به منظور به حداقل رساندن میزان تورم و یا انقباض داربست‌ها، از اتانول به عنوان مایع جابه‌جا شونده استفاده شد.

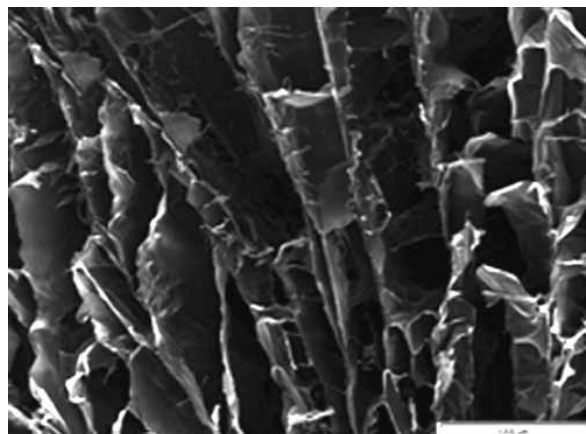
به طور کلی، در این روش برای اندازه‌گیری مقدار تخلخل، ابتدا داربست به مدت 2 h در داخل یک استوانه مدرج حاوی اتانول با حجم V_1 به حالت غوطه‌ور نگاه داشته می‌شود. در ادامه حجم کل، یعنی حجم داربست و حجم اتانول به عنوان V_2 گزارش می‌گردد. بدیهی است که اختلاف این دو حجم، یعنی $(V_2 - V_1)$ ، برابر با حجم داربست متخلخل خواهد بود. با خارج ساختن داربست از درون استوانه مدرج، حجم اتانول باقی‌مانده در استوانه مدرج، یعنی V_3 ، گزارش می‌گردد. حجم اتانول باقی‌مانده در درون داربست، یعنی $V_1 - V_3$ ، برابر با حجم حفره‌های درون داربست است. بنابراین، درصد تخلخل داربست متخلخل، یعنی ε ، از معادله زیر محاسبه می‌گردد [28]:

$$\varepsilon = \frac{V_1 - V_3}{V_2 - V_1} \times 100 \quad (1)$$

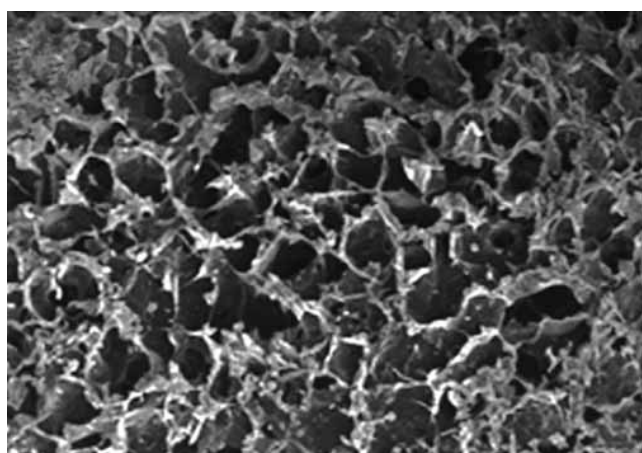
برای اندازه‌گیری خواص مکانیکی داربست‌های متخلخل هیبریدی تهیه شده در این کار تحقیقاتی از آزمون اندازه‌گیری خواص فشاری استفاده گردید. برای این منظور، از نمونه‌های استوانه‌ای شکل با قطر 12 mm و ارتفاع 10 mm استفاده گردید. لازم به ذکر است که اندازه‌گیری خواص فشاری داربست‌ها با استفاده از دستگاه کشش، مدل SMT-20 ساخت شرکت Santam، موجود در آزمایشگاه سنتر IV گروه علوم پژوهشگاه پلیمر و پتروشیمی ایران انجام پذیرفت. خواص فشاری داربست‌ها در سرعت کشش ثابت 1 mm/min و در دمای معمولی انجام شد. اشاره می‌شود که با توجه به عدم یکنواختی سطوح داربست‌ها، پس از قرار دادن نمونه‌ها بین دو فک دستگاه و پیش از شروع آزمون، بار فشاری بسیار اندکی بر نمونه‌ها وارد گردید تا از تماس



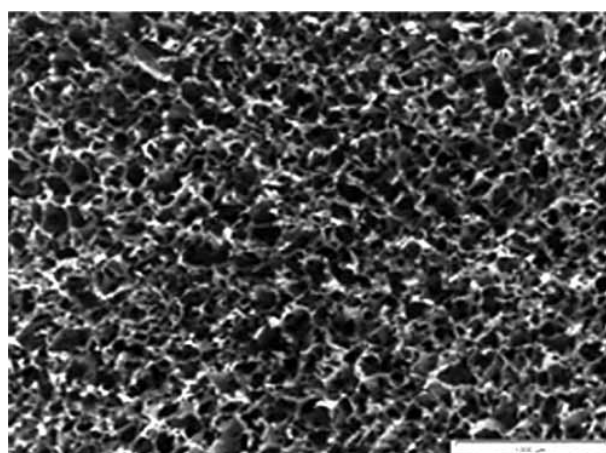
(ب)



(الف)



(د)



(ج)

شکل ۲- تصاویر میکروسکوپ الکترونی از سطح مقطع داربست‌های هیبریدی تهیه شده بر پایه محلول کیتوسان - ژلاتین - تری فسفات کلسیم با درصد‌های وزنی مختلف: (الف) ۲ [۲۹]، (ب) ۳، (ج) ۴ و (د) ۵ [۲۹].

جدول ۱- نتایج مربوط به مقدار تخلخل و متوسط اندازه تخلخل‌های داربست‌های هیبریدی بر حسب غلظت‌های مختلف کیتوسان - ژلاتین - تری فسفات کلسیم.

اندازه متوسط تخلخل‌ها (μm)	درصد تخلخل	درصد وزنی محلول	نوع محلول
۲۱۲/۷	۸۱/۷۴	۲	کیتوسان - تری فسفات کلسیم
۱۷۳/۰	۸۰/۶۴	۳	
۱۱۴/۹	۷۸/۲۷	۴	
-	-	۵	
۵۰۶/۷	۸۹/۵۲	۲	
۴۳۶/۹	۸۶/۷۴	۳	کیتوسان - ژلاتین - تری فسفات کلسیم
۲۶۴/۳	۸۳/۴۰	۴	
۱۸۷/۹	۷۸/۵۹	۵	

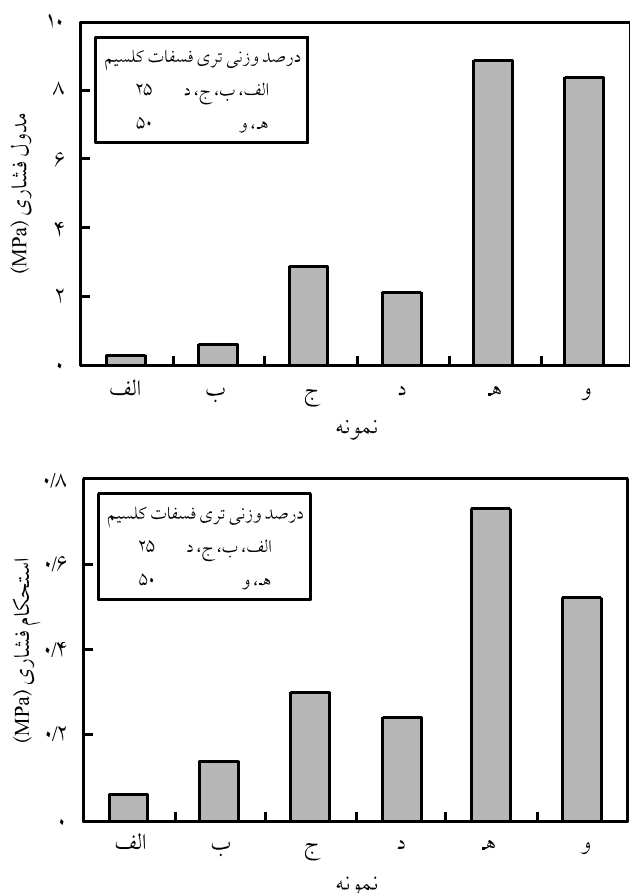
داربست‌ها، بلکه اندازه آنها نیز کاهش می‌یابد. در این راستا در جدول ۱ نتایج مربوط به مقدار تخلخل و متوسط اندازه تخلخل‌های داربست‌ها آورده شده است.

یادآور می‌شود که در تعیین مقدار تخلخل از روش جابه جایی مایع و در تعیین اندازه تخلخل‌ها از تصاویر میکروسکوپ الکترونی استفاده شده است.

در شکل ۳ نتایج مربوط به طیف سنجی FTIR از مواد اولیه و داربست‌های متخلخل تهیه شده آمده است. در شکل ۳- الف پیک‌های جذب مشاهده شده در ۱۶۵۴ و 1597 cm^{-1} به ترتیب مربوط به گروه‌های C=O و NH_2 - روی زنجیرهای کیتوسان است. همچنین، در شکل ۳- ب پیک‌های جذب در ۱۵۴۱ و 1647 cm^{-1} به ترتیب مربوط به پیوندهای آمینی و کربونیل در نمونه ژلاتین است، حال آن‌که پیک‌های جذب در 1034 و 603 cm^{-1} در شکل ۳- ج مربوط به گروه‌های فسفات در پودر

رفته در طراحی و ساخت داربست‌های هیبریدی، مدول کشسان فشاری و استحکام فشاری داربست‌ها افزایش می‌یابد. نکته جالب توجه در این میان کاهش چشمگیر خواص مکانیکی داربست‌ها در حضور ژلاتین است، به طوری که مدول و استحکام فشاری داربست‌های سه جزئی تهیه شده از محلول‌های ۳ درصد وزنی حاوی ۲۵ درصد وزنی زیست‌سرامیک زیست‌فعال به ترتیب ۱۷/۴۴ و ۲۸۷۶ درصد کمتر از داربست‌های دوجزئی تهیه شده از محلول‌هایی با غلظت مشابه ولی فاقد ژلاتین است.

در این پژوهش، انتخاب مواد برای ساخت داربست‌های سه بعدی متخلخل به شکلی کاملاً هدفمند انجام پذیرفته است، به طوری که استفاده از ویژگی‌های منحصر به فرد کیتوسان و ژلاتین به عنوان زیست‌پلیمر و تری فسفات کلسیم به عنوان یک زیست‌سرامیک مد نظر بوده است.

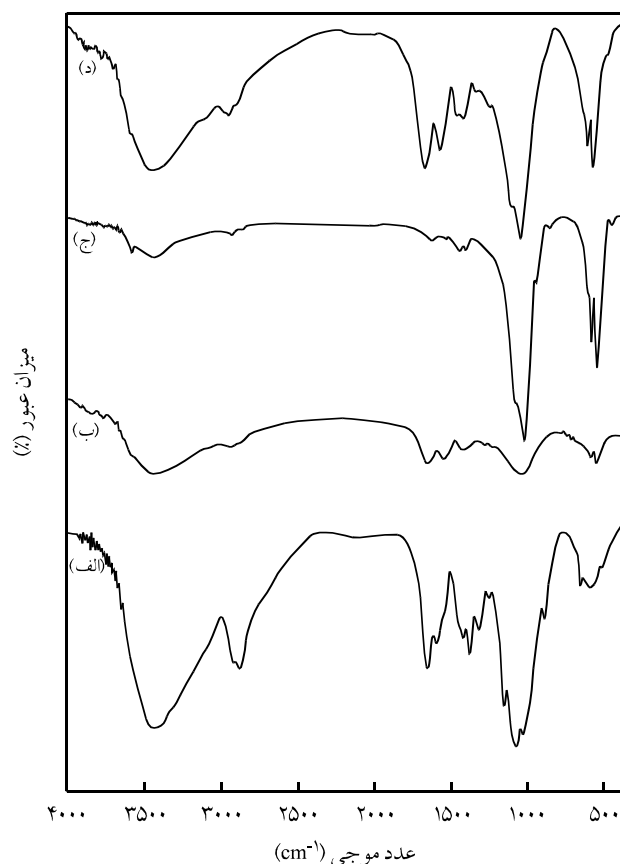


شکل ۴- خواص مکانیکی داربست‌های هیبریدی تهیه شده در غلظت‌های مختلف: (الف) ۱، (ب) ۲، (د) و (و) ۳ درصد وزنی از محلول کیتوسان - ژلاتین - تری فسفات کلسیم و (ج) و (ه) ۳ درصد وزنی از محلول کیتوسان - تری فسفات کلسیم.

تری فسفات کلسیم است. نتایج طیف سنجی FTIR مربوط به داربست‌های هیبریدی متخلخل تشکیل یافته از کیتوسان - ژلاتین - تری فسفات کلسیم در شکل ۳ - آورده شده است. بر اساس این شکل، پیک‌های جذب مشاهده شده در ۱۶۵۸ و 1566 cm^{-1} مربوط به شکل‌گیری گروه‌های ایمینی (C=N) در اثر واکنش بین گروه‌های آمینی موجود روی زنجیرهای کیتوسان و ژلاتین با گروه‌های آلدهیدی عامل شبکه‌ای کننده، یعنی گلو تار آلدهید، است.

مشاهده این پیک‌ها بیانگر شکل‌گیری ساختار شبکه‌ای بین کیتوسان و ژلاتین به همراه پراکنش ذرات تری فسفات کلسیم در داخل این شبکه است.

در شکل ۴ خواص مکانیکی شامل مدول و استحکام فشاری داربست‌های هیبریدی متخلخل کیتوسان - ژلاتین - تری فسفات کلسیم آورده شده است. با دقت در این تصاویر مشاهده می‌گردد که با افزایش غلظت محلول اولیه و نیز کسر وزنی زیست‌سرامیک زیست‌فعال به کار



شکل ۳- طیف سنجی FTIR از مواد اولیه و داربست‌های هیبریدی: (الف) کیتوسان، (ب) ژلاتین، (ج) تری فسفات کلسیم و (د) داربست بر پایه کیتوسان - ژلاتین - تری فسفات کلسیم.

برخوردار باشند و در اثر حذف حلال دچار انقباض نگردند. بنابراین، ایده اصلی در به کارگیری روش ژل شدن انجمادی تغییر کیفیت حلال و تنظیم خواص آن برای ژل شدن فاز غنی از پلیمر است. از آنجا که محلول کیتوسان در استیک اسید، در محیط‌های بازی به شکل ژل تبدیل می‌گردد، از این رو با غوطه‌ورسازی محلول کیتوسان منجمد شده در درون محلول آبی هیدروکسید سدیم با pH مشخص می‌توان فاز منجمد غنی از پلیمر را به ژل تبدیل کرد.

پس از فرایند ژل شدن فاز غنی از کیتوسان، امکان انحلال پلیمر در دمای معمولی منتفی بوده و ژل حاصل از استحکام کافی برای جلوگیری از انقباض تخلخل‌ها طی فرایند خشک کردن برخوردار می‌شود. در نهایت، با خشک کردن نمونه در شرایط معمولی داربست‌های پلیمری سه بعدی با تخلخل‌های مناسب تهیه می‌گردد.

نکته حائز اهمیت در این روش آن است که فرایند ژل شدن فاز غنی از کیتوسان باید در دماهایی پائین‌تر از دمای انجماد محلول پلیمری انجام پذیرد تا از انحلال مجدد فاز غنی از کیتوسان جلوگیری گردد. از این رو، همان‌گونه که عنوان شد با اختلاط محلول آبی هیدروکسید سدیم با مقادیر مناسبی از اتانول می‌توان از آن به عنوان حمام مناسبی برای تبدیل محلول کیتوسان منجمد به حالت ژل استفاده کرد. در چنین حمامی، محلول آبی NaOH نقش محیط بازی با قدرت ژل‌کنندگی و محلول آبی اتانول نقش کاهش دهنده دمای حمام را دارد [۲۲].

همان‌گونه که اشاره شد، داربست‌های تهیه شده با این روش دارای مقدار زیادی تخلخل‌های مرتبط هستند. دست‌یابی به چنین مقداری از تخلخل‌ها در مبحث مهندسی بافت امری ضروری است، چرا که این مقدار تخلخل بذرافشانی زیاد و یکنواخت سلول‌ها را در سرتاسر فضای داربست امکان‌پذیر می‌سازد.

از سوی دیگر، ارتباط داشتن تخلخل‌ها با یکدیگر در مباحث مربوط به برهم‌کنش سلول‌ها با یکدیگر و با داربست پلیمری بسیار حائز اهمیت است و به عنوان یکی از عوامل حیاتی و مهم در بحث انتقال سیگنال‌های مختلف از محیط به سلول و از یک سلول به سلول‌های دیگر مطرح است. در واقع، این امر یکی از پیش‌شرط‌های مهم در زمینه مهندسی بافت است. ویژگی بسیار مهم دیگر داربست‌های تهیه شده در این تحقیق، که قبلاً نیز بدان اشاره شد، مربوط به اندازه تخلخل‌های ایجاد شده است.

همان‌گونه که در جدول ۱ نیز مشخص است، اندازه تخلخل‌های به دست آمده در درون داربست‌های هیبریدی موردنظر به طور متوسط بالاتر از $200 \mu\text{m}$ است. این موضوع در مبحث مهندسی بافت غضروف و استخوان بسیار حائز اهمیت بوده است و دست‌یابی به این مقدار از

در حقیقت با تهیه یک ساختار کامپوزیتی از این ترکیبات می‌توان ویژگی‌های خاصی را در داربست نهایی انتظار داشت. کیتوسان با وجود زیست‌سازگاری و زیست‌تخریب‌پذیری عالی و همچنین مشابهت ساختاری و شیمیایی به مواد سازنده زمینه‌های فراسلولی بافت‌های طبیعی، از خواص مکانیکی بسیار ضعیفی برخوردار است، که این امر استفاده از آن را به عنوان یک داربست در مبحث مهندسی بافت با مشکل مواجه می‌کند.

این در حالی است که با به کارگیری زیست‌سرامیک زیست‌فعال و قابل جذب تری فسفات کلسیم تا حدودی زیادی می‌توان بر این مشکل غلبه کرد. حضور ذرات زیست‌سرامیکی ضمن افزایش زیست‌سازگاری داربست‌های متخلخل، سبب ایجاد یک لایه آپاتیتی در سطح تخلخل شده و اتصالات محکم و مقاومی بین بافت طبیعی و داربست‌های کیتوسانی مورد نظر می‌شود.

با توجه به این که زمینه فراسلولی بافت‌های استخوانی حاوی مقادیر زیادی از فسفات کلسیم شکل بلورهای هیدروکسی آپاتیت است، بنابراین به کارگیری این زیست‌سرامیک ضمن تقویت خواص مکانیکی داربست‌های ساخته شده از کیتوسان - ژلاتین، زمینه فراسلولی بافت‌های طبیعی استخوان را نیز هر چه بهتر شبیه‌سازی می‌کند. از این رو، براساس نتایج به دست آمده با پراکنش ذرات زیست‌سرامیک در درون داربست‌های متخلخل بر پایه کیتوسان - ژلاتین افزون بر بهبود خاصیت بافت‌سازگاری داربست‌ها، خواص مکانیکی آنها نیز به طرز چشمگیری تقویت می‌شود. باید یادآور شد، تمام مواد به کار رفته در این تحقیق و مواد حاصل از تخریب آنها زیست‌سازگاراند [۲۴، ۲۵].

تصاویر میکروسکوپ الکترونی تهیه شده از داربست‌های هیبریدی متخلخل بیانگر آن است که با کنترل شرایط عملیاتی، فرایند ژل شدن انجمادی از کارایی کافی برای تهیه ساختارهای متخلخل در مبحث مهندسی بافت برخوردار می‌شود.

به طور کلی، مبنای روش ژل شدن انجمادی در تهیه داربست‌های پلیمری متخلخل سه بعدی بر پایه جدایش فازی محلول‌های پلیمری است. در این روش پس از تهیه محلول پلیمری با غلظت مشخص، در طول فرایند انجماد ساختار متخلخل مورد انتظار در اثر پدیده جدایش فازی القا شده به وسیله کاهش دما ایجاد می‌گردد. پس از حذف حلال از سیستم دو فازی ایجاد شده، فضاهای اشغال شده به وسیله بلورهای جامد حلال به شکل حفره ظاهر می‌شوند.

نکته کلیدی در فرایند حذف حلال برای تهیه ساختار متخلخل آن است، زنجیرهای پلیمری، که اطراف بلورهای جامد حلال را در بر گرفته‌اند، از استحکام کافی برای حفظ ساختار ناحیه غلیظ از پلیمر

اندازه تخلخل‌ها با به کارگیری روش ژل شدن انجمادی از ویژگی‌های منحصر به فرد کار اخیر است. به طور کلی، یکی از شرایط موفقیت یک داربست متخلخل سه بعدی پلیمری در مباحث مربوط به مهندسی بافت دارا بودن ویژگی‌های مناسب در پدیده انتقال جرم برای گازها، مواد غذایی، پروتئین‌ها، سلول‌های زنده و محصولات ضایعاتی حاصل از سوخت و ساز سلول‌ها به داخل یا خارج از داربست است. با توجه به ویژگی‌های داربست‌های متخلخل، شاید مهمترین ساز و کار انتقال جرم برای اکثر آنها در شرایط کشت استاتیک، پدیده نفوذ باشد.

لازم به ذکر است، این مکانیسم انتقال جرم به تنهایی برای بازسازی و ایجاد بافت‌های سه بعدی جدید کافی نیست و وجود مکانیسم نفوذ مناسب به عنوان حداقل شرط لازم برای موفقیت در دستیابی به بافت‌های بازسازی شده است.

به طور کلی در یک داربست متخلخل پلیمری، سرعت و عمق نفوذ یک مولکول خاص به ویژگی‌های مولکول نفوذ کننده و ماده سازنده داربست از یک سو و برهم کنش این دو جزء از سوی دیگر بستگی دارد. همچنین، مقدار تخلخل‌ها و اندازه آنها به شدت بر سرعت و مقدار نفوذپذیری داربست نسبت به اجزای یادشده اثر دارد.

نکته مهم آن است که در موجودات زنده محیط‌های اکثر سلول‌ها در فاصله‌ای کمتر از $100 \mu\text{m}$ نسبت به عروق خونی قرار دارند و بنابراین مکانیسم نفوذ مواد غذایی و محصولات حاصل از سوخت و ساز سلول‌ها در چنین فاصله‌ای برای زنده ماندن بافت و سلول‌های سازنده آنها کافی است [۱۵]. این در حالی است که در زنده ماندن سلول‌هایی که در فواصل بیشتری نسبت به عروق خونی قرار دارند، ساز و کارهای دیگری چون رگ‌زایی هم زمان یا انتقال جرم با مکانیسم هم رفت مورد نیاز است. از این رو، با توجه به عدم حضور رگ‌های خونی، به ویژه در مراحل اولیه کاشت در درون داربست‌های پلیمری متخلخل، بازسازی بافت و نقل و انتقال مواد غذایی به نواحی درونی داربست نیاز به طراحی مناسب آن به ویژه طراحی صحیح اندازه تخلخل‌ها دارد و داربست‌های تهیه شده در این تحقیق از چنین ویژگی‌هایی برخورداراند.

مطابق با جدول ۱، نتایج به دست آمده موید آن است که با افزایش غلظت پلیمرهای به کار رفته در محلول‌های اولیه، داربست‌های تهیه شده دارای تخلخل‌های کوچک‌تر و بسته‌تری خواهند بود. این داربست‌ها به واسطه ریزساختار همگون و دیواره ضخیم‌تر تخلخل‌ها، مدول و استحکام فشاری بیشتری دارند. کاهش اندازه تخلخل‌ها در داربست‌های تهیه شده از محلول‌های غلیظ‌تر به گرانروی زیاد این محلول‌ها نسبت داده می‌شود، چرا که افزایش گرانروی مانع از رشد بلورهای یخ طی فرایند انجماد می‌شود و بنابراین امکان ایجاد

تخلخل‌های بزرگ منتفی می‌گردد.

داربست‌های چندجزئی تهیه شده در این کار پژوهشی، به واسطه مشابهت شیمیایی مواد به کار رفته در ساختار آنها و همچنین شباهت ریزساختار و معماری آن به زمینه بافت‌های طبیعی از قابلیت و پتانسیل بسیار زیادی در بازسازی بافت‌های غضروف و استخوان، به ویژه استخوان‌های اسفنجی، با به کارگیری فن مهندسی بافت برخوردار است. زیست‌سازگار بودن مواد و ترکیبات شیمیایی به کار رفته در ساخت این داربست‌ها به همراه سهولت و تکرارپذیری فرایند به کار رفته در تهیه آنها از مهم‌ترین ویژگی‌های کار اخیر است. مقدار تخلخل بیش از ۸۰ درصد و ارتباط بسیار زیاد این تخلخل‌ها با یکدیگر با در نظر گرفتن اندازه زیاد آنها (بیش از $200 \mu\text{m}$) شرایط ایده‌آلی را برای کشت سلول‌های کندروسیت و استئوبلاست در درون این داربست‌های کامپوزیتی در سه بعد فراهم می‌آورد.

به طور کلی، اندازه تخلخل‌های داربست‌های تهیه شده از کیتوسان - تری فسفات کلسیم با وجود ژلاتین به مراتب بزرگتر از اندازه تخلخل‌های به دست آمده از محلول‌های فاقد ژلاتین است [۲۴]. علت این امر به طور عمده به واسطه مقدار زیاد جذب آب زنجیرهای ژلاتین است که در آن در یک محلول سه‌تایی با غلظت مشخص، میزان انبساط محلول از محلول دوتایی مشابه با همان غلظت بیشتر می‌شود.

به عبارت دیگر، به واسطه آب دوستی و تورم زیاد زنجیرهای ژلاتین، از نقطه نظر ترمودینامیکی، حجم هیدرودینامیکی اشغال شده به وسیله زنجیرهای ژلاتین در محیط‌های آبی به شدت بیشتر است، بنابراین محلول‌های به کار رفته، در مقایسه با محلول‌های دوتایی کیتوسان - تری فسفات کلسیم حجم بیشتری دارند. از آنجا که طی فرایند انجماد سریع محلول‌ها، شکل فضایی زنجیرهای پلیمری تا حدود زیادی حفظ می‌گردد، از این رو اندازه تخلخل‌های ایجاد شده در داربست‌های تهیه شده با وجود ژلاتین به مراتب بزرگتر می‌شود. به این ترتیب، با در نظر گرفتن این واقعیت که ژلاتین یکی از اجزای اصلی زمینه فراسلولی معدنی استخوان است، بدیهی است که وجود زنجیرهای ژلاتین در ساختار داربست‌های یاد شده ضمن بهبود زیست‌سازگاری و بافت‌سازگاری داربست‌ها، منجر به بهبود ریزساختار آنها نیز می‌گردد.

از سوی دیگر، همان‌گونه که در بخش قبل نیز بدان اشاره شد، خواص مکانیکی داربست‌های هیبریدی با وجود ژلاتین به طور چشمگیری کاهش می‌یابد که شاید دلایل اصلی این کاهش مقدار تخلخل و اندازه متوسط تخلخل‌های بزرگتر این دسته از داربست‌هاست [۲۳]. بنابراین از نقطه نظر خواص مکانیکی، به کارگیری داربست‌های هیبریدی متخلخل زیست تخریب پذیر بر پایه کیتوسان - ژلاتین - تری فسفات

مهاجرت و لانه‌گزینی سلول‌های کندروسیت در درون تخلخل‌ها و نواحی درونی داربست و همچنین رشد و تکثیر آنها در این نواحی به خوبی قابل پی‌گیری است، به طوری که در شکل ۶- ب نحوه اتصال یک سلول کندروسیت به دیواره یکی از تخلخل‌های درون داربست به وضوح نشان داده شده است.

در شکل ۷ نیز تصاویر میکروسکوپ نوری تهیه شده از داربست‌های حاوی سلول‌های کندروسیت پس از گذشت ۲۱ روز از عملیات کشت استاتیک به منظور ارزیابی‌های بافت شناختی نشان داده شده است. در حقیقت شکل ۷- الف نشان دهنده یکی از تجمع‌های ایجاد شده به وسیله سلول‌های کندروسیت اولیه است که این تجمع در شکل ۷- ب با بزرگ‌نمایی بیشتری نشان داده شده است. شکل‌گیری چنین تجمع‌هایی از ویژگی‌های ذاتی سلول‌های کندروسیت است و به طور کلی نحوه رشد و تکثیر سلول‌های کندروسیت از راه ایجاد تجمع‌های اشاره شده است، بنابراین مشاهده چنین تجمع‌هایی در درون داربست‌های هیبریدی تهیه شده در این تحقیق بیانگر پتانسیل بسیار زیاد این دسته از داربست‌ها در مبحث مهندسی بافت است.

آزمون‌های در موجود زنده

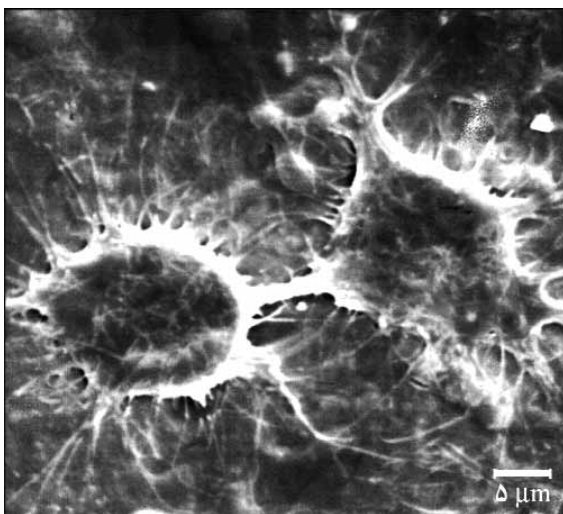
به منظور بررسی عملکرد داربست‌های تهیه شده در محیط‌های زنده، نمونه‌های مناسبی برای کاشت در مدل‌های حیوانی انتخاب و پس از استریل کردن به وسیله اکسید اتیلن، با انجام عمل جراحی در اتاق عمل

کلسیم در مهندسی بافت استخوان با وجود ریزساختار مناسب آنها، نیازمند نگهداری مکانیکی بیشتری است.

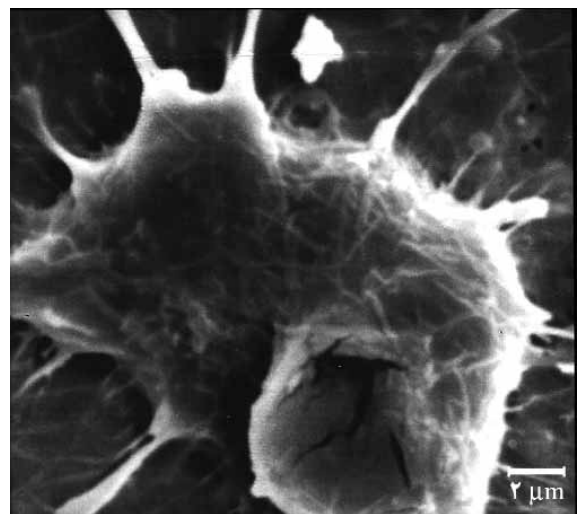
ارزیابی‌ها و آزمون‌های زیست شناختی آزمون‌های در آزمایشگاه

بررسی زیست‌سازگاری داربست‌های تهیه شده در آزمایشگاه (*in vitro*) پژوهشگاه پلیمر و پتروشیمی ایران با به کارگیری سلول‌های فیروبلاست L۹۲۹ انجام پذیرفت. ارزیابی برهم کنش این سلول‌ها با داربست‌های تهیه شده نشان داد که نه تنها شکل‌شناسی سلول‌های به کار رفته در مجاورت نمونه‌های مورد نظر دستخوش تغییر قرار نگرفت، بلکه این سلول‌ها از رشد و تکثیر مناسبی نیز برخوردار بودند. در ادامه، چگونگی برهم کنش سلول‌های کندروسیت با داربست‌های هیبریدی تهیه شده مورد ارزیابی قرار گرفت.

در شکل ۵ تصاویر میکروسکوپ الکترونی تهیه شده از برهم کنش سلول‌های کندروسیت با داربست‌های مورد نظر نشان داده شده است. با دقت در شکل‌های ۵- الف و ب می‌توان نتیجه گرفت که سلول‌های کندروسیت از اتصال بسیار خوبی به سطح داربست‌ها برخوردارند، چرا که پاهای کاذب سلول‌ها، که باعث اتصال آنها به زمینه می‌شود، به وضوح قابل مشاهده است. ضمن آن که شکل‌شناسی سلول‌های کندروسیت نیز پس از گذشت ۷ روز از عملیات کشت استاتیک دستخوش تغییر قرار نگرفته است. علاوه بر این در شکل ۶- الف

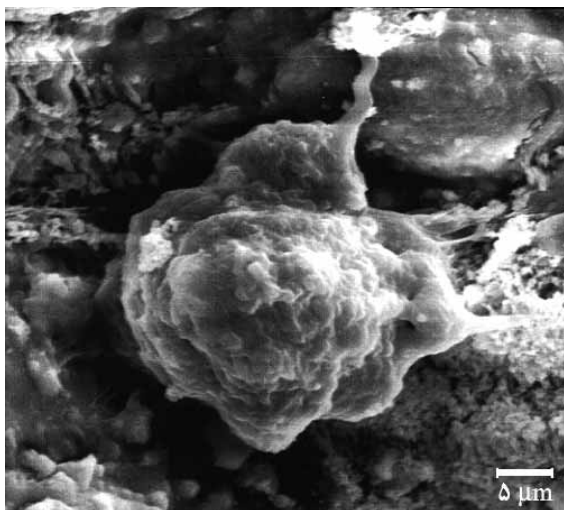


(ب)

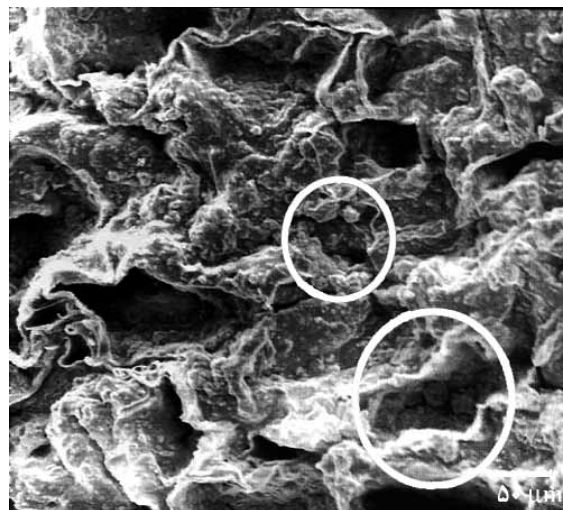


(الف)

شکل ۵- تصاویر میکروسکوپ الکترونی تهیه شده از برهم کنش سلول‌های کندروسیت با داربست‌های هیبریدی بر پایه کیتوسان - ژلاتین - تری فسفات کلسیم تهیه شده از محلول‌های ۳ درصد وزنی: (الف) برهم کنش یک سلول کندروسیت با سطح داربست و (ب) برهم کنش سلول‌های کندروسیت با یکدیگر روی سطح داربست.



(ب)



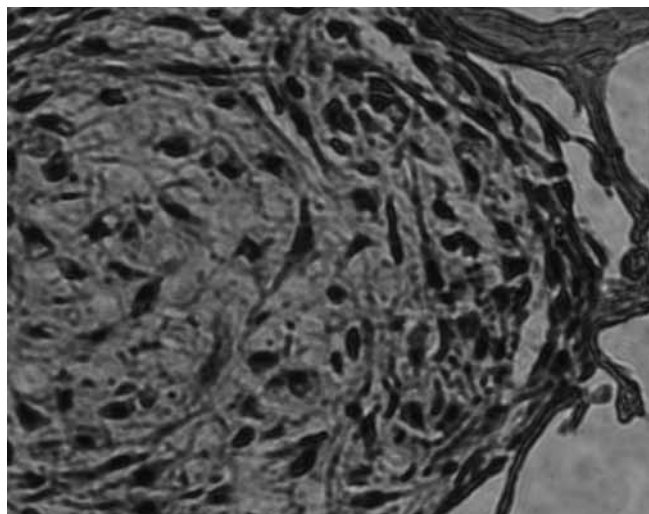
(الف)

شکل ۶- تصاویر میکروسکوپ الکترونی تهیه شده از برهم کنش سلول‌های کندروسیت با داربست‌های هیبریدی بر پایه کیتوسان - ژلاتین - تری فسفات کلسیم تهیه شده از محلول‌های ۳ درصد وزنی: (الف) مهاجرت و لانه گزینی سلول‌های کندروسیت در درون تخلخل‌ها و نواحی درونی داربست و رشد و تکثیر آنها در این نواحی و (ب) نحوه اتصال یک سلول کندروسیت به دیواره یکی از تخلخل‌های درون داربست.

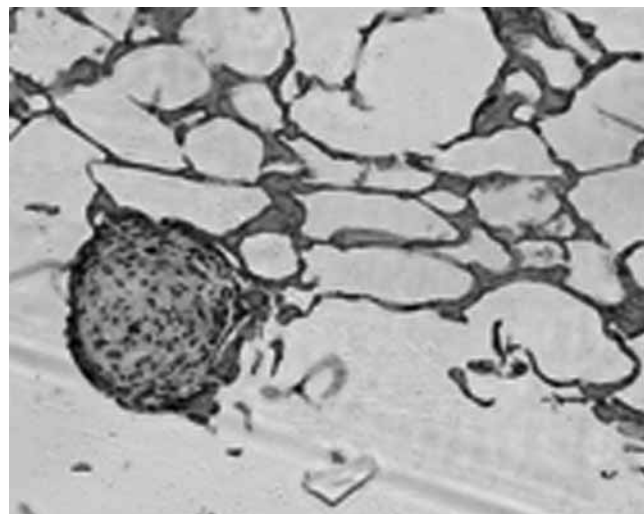
موفقیت عمل پیوند پس از گذشت ۳ ماه از زمان کاشت است، چرا که هیچ علامتی از واکنش‌های ناخواسته یا پس زنی پیوند به وسیله سیستم ایمنی مدل مورد استفاده مشاهده نشده است. نتایج مربوط به این دسته از آزمون‌ها پس از گذشت ۶ ماه از زمان کاشت، با خارج ساختن داربست و بررسی‌های بافت شناختی مناسب گزارش خواهد شد.

پژوهشگاه پلیمر و پتروشیمی ایران در درون استخوان لگن گوسفند کاشته شدند.

باید اشاره کرد که انجام این عمل به طور عمدی برای بررسی زیست سازگاری داربست‌های اشاره شده و نیز تعیین میزان رشد بافت استخوان به درون داربست‌ها انجام پذیرفت. ارزیابی‌های اولیه حاکی از



(ب)



(الف)

شکل ۷- تصاویر میکروسکوپ نوری از تجمع ایجاد شده به وسیله سلول‌های کندروسیت اولیه روی داربست‌ها پس از گذشت ۲۱ روز از عملیات کشت استاتیک با بزرگ‌نمایی: (الف) ۱۰۰ برابر و (ب) ۲۵۰ برابر.

نتیجه گیری

روی داربست‌های تهیه شده نشانگر زیست سازگاری زیاد نمونه‌های ساخته شده است. تصاویر تهیه شده از مهاجرت سلول‌های زنده به نواحی درونی داربست در کنار لانه‌گزینی و رشد و تکثیر سلول‌ها در درون تخلخل‌ها بیانگر طراحی موفق و معماری مناسب داربست‌های متخلخل هیبریدی تهیه شده است. در حقیقت، اندازه زیاد تخلخل‌ها به همراه مقدار زیاد تخلخل داربست‌ها امکان نفوذ محیط کشت را به نواحی درونی آن فراهم کرده و منجر به مهاجرت سلول‌های زنده به درون داربست می‌شود.

قدردانی

بدین وسیله از مسئولان محترم پژوهشگاه پلیمر و پتروشیمی ایران، به ویژه گروه پلیمرهای زیست سازگار، به دلیل حمایت‌های مالی از این پژوهش، تشکر و قدردانی می‌شود.

مراجع

- Gomes M.E. and Reis R.L., Tissue Engineering: Key Elements and Some Trends, *Macromol. Biosci.*, **4**, 737-742, 2004.
- Mikos A.G., Thorsen A.J., Czerwonka L.A., Bao Y. and Langer R., Preparation and Characterization of Poly(L-lactic acid) Foams, *Polymer*, **35**, 1068-1077, 1994.
- Gunatillake P.A. and Adhikari R., Biodegradable Synthetic Polymers for Tissue Engineering, *Eur. Cells Mater.*, **5**, 1-16, 2003.
- Lewandrowski K.U., Wise D.L., Trantolo D.J., Gresser J.D., Yaszemski M.J. and Altobelli D.E., *Tissue Engineering and Biodegradable Equivalents: Scientific and Clinical Applications*, Marcel Dekker, New York, Chap. 1, 2002.
- Frenkel S.R. and DI Cesare P.E., Scaffolds for Articular Cartilage Repair, *Annals Biomed. Eng.*, **32**, 26-34, 2004.
- Shin H., Jo S. and Mikos A.G., Biomimetic Materials for Tissue Engineering, *Biomaterials*, **24**, 4353-4364, 2003.
- Georgiou G., Mathieu L., Pioletti D.P., Bourban P.E., Knowles J.C. and Nazhat S.N., Polylactic Acid-Phosphate Glass Composite Foams as Scaffolds for Bone Tissue Engineering, *J. Biomed. Mater. Res., Part B: Appl. Biomater.*, **80**, 322-331, 2007.
- Ciapetti G., Ambrosio L., Marletta G., Baldini N. and Giunti A., Human Bone Marrow Stromal Cells: *In Vitro* Expansion and Differentiation for Bone Engineering, *Biomaterials*, **27**, 6150-6160, 2006.
- Goldberg V.M. and Caplan A.I., *Orthopedic Tissue Engineering*, Marcel Dekker, New York, Chap. 1, 2004.
- Hollinger J.O., Einhorn T.A., Doll B.A. and Sfeir C., *Bone Tissue Engineering*, CRC, New York, Chap. 6, 2005.
- Mirzadeh H., Mohagheghi M.A., Ahmadi H., Mirkhani H. and Amanpour S., Cartilage Tissue Engineering for Ear as in Rabbit Model with Perforated Polyurethane: *In Vitro* Assay, *Iran. Polym. J.*, **9**, 73-80, 2000.
- Yuan J., Cui L., Zhang W.J., Liu W. and Cao Y., Repair of Canine Mandibular Bone Defects with Bone Marrow Stromal Cells and Porous β -Tricalcium Phosphate, *Biomaterials*, **28**, 1005-1013, 2007.
- Hutmacher D.W., Scaffolds in Tissue Engineering Bone and Cartilage, *Biomaterials*, **21**, 2529-2543, 2000.
- Mirzadeh H., Mohammadi Y., Moztarzadeh F. and Jabbari E., Biodegradable Hybrid Scaffolds with Interconnected Networks for Bone Tissue Engineering, *Inter. J. Artif. Organs, Special Issue*, **28**, 889, 2005.
- Atala A. and Lanza R.P., *Methods of Tissue Engineering*, Academic, New York, Chap. 1, 2002.
- Ma P.X. and Elisseeff J., *Scaffolding in Tissue Engineering*, CRC, London, Chap. 2, 2006.
- Drury J.L. and Mooney D.J., Hydrogels for Tissue Engineering: Scaffold Design Variables and Applications, *Biomaterials*, **24**, 4337-4351, 2003.

18. Elices M., *Structural Biological Materials: Design and Structure-Property Relationship*, Pergamon, Netherlands, Chap. 1, 2000.
19. Chen G., Ushida T. and Tateishi T., Scaffolds Design for Tissue Engineering, *Macromol. Biosci.*, **2**, 67-77, 2002.
20. Dillow A.K. and Lowman A.M., *Biomimetic Mater. Design*, Marcel Dekker, New York, Chap. 2, 2002.
21. Sharma B. and Elisseeff J.H., Engineering Structurally Organized Cartilage and Bone Tissues, *Annals Biomed. Eng.*, **32**, 148-159, 2004.
22. Ho M.H., Kuo P.Y., Hsieh H.J., Hsien T.Y., Hou L.T., Lai J.Y. and Wang D.M., Preparation of Porous Scaffolds by Using Freeze-Extraction and Freeze-Gelation Methods, *Biomaterials*, **25**, 129-138, 2004.
23. Zhao F., Yin Y., Lu W.W., Leong J.C., Zhang W., Zhang J., Zhang M. and Yao K., Preparation and Histological Evaluation of Biomimetic Three-Dimensional Hydroxyapatite/Chitosan/Gelatin Network Composite Scaffolds, *Biomaterials*, **23**, 3227-3234, 2002.
24. Shen F., Cui Y., Yang L.F., Yao K.D., Dong X.H., Jia W.Y. and Shi H.D., A Study on the Fabrication of Porous Chitosan/Gelatin Network Scaffold for Tissue Engineering, *Polym. Int.*, **49**, 1596-1599, 2000.
25. Mao J.S., Zhao L.G., Yin Y.J. and Yao K.D., Structure and Properties of Bilayer Chitosan-Gelatin Scaffold, *Biomaterials*, **24**, 1067-1074, 2003.
26. Zhang Y. and Zhang M., Three-Dimensional Macroporous Calcium Phosphate Bioceramics with Nested Chitosan Sponges for Load-Bearing Bone Implants, *J. Biomed. Mater. Res.*, **61**, 1-8, 2002.
27. Maniopoulos C., Sodek J. and Melcher A.H., Bone Formation *In Vitro* by Stromal Cells Obtained from Bone Marrow of Young Adult Rat, *Cell Tissue Res.*, **254**, 317-330, 1988.
28. Zhang R. and Ma P.X., Porous Poly(L-lactic acid)/Apatite Composites Created by Biomimetic Process, *J. Biomed. Mater. Res.*, **45**, 285-293, 1999.
29. Mohammadi Y., Mirzadeh H., Moztarzadeh F., Soleimani M. and Jabbari E., Osteogenic Differentiation of Mesenchymal Stem Cells on Novel Three-dimensional Poly(L-lactic acid)/Chitosan/Gelatin/ β -Tricalcium Phosphate Hybrid Scaffolds, *Iran. Polym. J.*, **16**, 57-69, 2007.