



قوه قضائیه

سازمان ثبت اسناد و املاک کشور

گواهی نامه ثبت اختراع



۰۰۲۹۱۵ الف/۸۹

مشخصات مالک: پژوهشگاه پلیمر و پتروشیمی ایران ، ، نشانی: تهران، کیلومتر ۱۵ اتوبان تهران-کرج، بلوار پژوهش، پژوهشگاه پلیمر و پتروشیمی ایران، کد پستی: ۱۴۹۷۷۱۳۱۱۵، تابعیت جمهوری اسلامی ایران

مشخصات مخترع: اسماعیل قاسمی ، شماره ملی: ۴۵۷۹۲۵۵۰۸۹، نشانی: تهران، کیلومتر ۱۵ اتوبان تهران-کرج، بلوار پژوهش، پژوهشگاه پلیمر و پتروشیمی ایران، کد پستی: ۱۴۹۷۷۱۳۱۱۵، تابعیت جمهوری اسلامی ایران
پیمان عزتی ، شماره ملی: ۳۷۶۲۰۰۶۱۸۰، نشانی: تهران، کیلومتر ۱۵ اتوبان تهران-کرج، بلوار پژوهش، پژوهشگاه پلیمر و پتروشیمی ایران، کد پستی: ۱۴۹۷۷۱۳۱۱۵، تابعیت جمهوری اسلامی ایران
محمد کرابی ، شماره ملی: ۰۷۹۳۳۷۰۲۵۶، نشانی: تهران، کیلومتر ۱۵ اتوبان تهران-کرج، بلوار پژوهش، پژوهشگاه پلیمر و پتروشیمی ایران، کد پستی: ۱۴۹۷۷۱۳۱۱۵، تابعیت جمهوری اسلامی ایران

عنوان اختراع: ساخت داربست زیستی پلیمری متخلخل PLLA/PCL با توزیع دوقله ای اندازه تخلخل ها

طبقه بندی بین المللی: C22;C08C;C08F;B01D;B29K

حق تقدم:

شماره و تاریخ اظهارنامه اصلی:

مل ثبت:

شماره و تاریخ ثبت اختراع: ۱۳۹۳/۰۸/۲۱ - ۸۴۲۳۶

شماره و تاریخ ثبت اظهارنامه: ۱۳۹۲/۱۱/۲۶ - ۱۳۹۲۵۰۱۴۰۰۳۰۹۱۰۰۵

مدت حمایت: ۲۰ سال از تاریخ ۱۳۹۲/۱۱/۲۶ تا ۱۴۱۲/۱۱/۲۶

امضاء:

تایخ: ۱۳۹۲/۱۱/۲۵

مهر داد الیاسی

اداره کل مالکیت صنعتی
رئیس اداره ثبت اختراعات

مدت حمایت اختراع 20 سال از تاریخ تسلیم اظهارنامه می باشد منوط به اینکه اقساط سالیانه اختراع در مواعد مقرر توسط متقاضی پرداخت شود

* منافع گواهی نامه: توصیف ادعا ، خلاصه توصیف و نشر

* * در صورت تعدد مخترعین، مالکین و یا تغییرات مراتب، شرح مندرج در گواهی نامه می باشد.

ن (۳۰) (۱۹-۳)

۵۵۰۰
ریال



پژوهشگاه پلیمر و پتروشیمی ایران

پژوهشگاه پلیمر و پتروشیمی ایران

ساخت داربست زیستی پلیمری متخلخل PLLA/PCL با توزیع دوقله ای اندازه تخلخل ها

توصیف و ادعای اختراع

پیمان عزتی ، اسماعیل قاسمی ، محمد کرابی
آذرماه ۱۳۹۲

۱- عنوان اختراع

ساخت داربست زیستی پلیمری متخلخل PLLA/PCL با توزیع دوقله ای اندازه تخلخل ها

۲- زمینه فنی اختراع

از آنجایی که امروزه پلیمرها کاربرد وسیعی در علوم و صنایع مختلف دارند لذا می توان با ترکیب و آلیاژسازی آنها با یکدیگر بر وسعت نقش و کاربرد آنها در ساخت مواد جدید افزود. تولید آلیاژ پلیمری متخلخل PLLA/PCL بر پایه آلیاژ چهارتایی PLLA/PCL/PEO/NaCl با روش آلیاژسازی مذاب و ایجاد تخلخل بوسیله آب به جهت سهولت در تولید و عدم استفاده از مواد سمی و همچنین زیست سازگاری پلیمرهای بکار رفته بستر مناسبی برای ساخت داربست های زیستی و استفاده در مهندسی بافت ایجاد می کند.

۳- مشکل فنی و بیان اهداف اختراع

ساخت ماده متخلخل با استفاده از پلیمرهای زیست سازگار و زیست تخریب پذیر جهت استفاده در مهندسی بافت و بالاخص داربست های زیستی از جمله مواردی است که بالغ بر دو دهه است که مورد کنکاش قرار گرفته است لذا دانش و تکنولوژی این کار همواره دستخوش تغییر و تکمیل بوده است. عمده مشکلات در تولید مواد متخلخل مناسب داربست های زیستی آن است که باید دارای درصد تخلخل بالا، ساختاری سه بعدی و عاری از مواد سمی و روش های آسان جهت تکرار پذیری در تولید باشد. تا به امروز در تولید این مواد متخلخل تمامی این محدودیت ها اعمال نگردیده است از این روی جای کار ، تحقیق و تکمیل دارد.

از آنجاکه روش های تولید مختلف معایب و مزایای خاص خود را دارند در ادامه روش های مختلف تولید داربست های زیستی آورده می شود :

۳-۱- روش ذوب ریسی الکتریکی^۱

در این روش یعنی ذوب ریسی الکتریکی محلول پلیمر شارژ شده و متعاقب آن از طریق یک لوله باریک مانند راهگاه مویینه تزریق می گردد. ماده خروجی تزریق توسط یک قرقره با ۱۰ تا ۳۰ kV جمع می گردد

با تبخیر ، حلال خروجی تزریق بر روی قرقره به صورت الیاف درخواهد آمد. در این روش الیاف از نانومتر تا میکرون قابل تهیه می باشد. متغیرهایی نظیر قدرت میدان الکتریکی، فاصله مابین تزریق و قرقره و غلظت پلیمر و حلال موجب حصول الیاف متفاوت می شود.

۱ - Electro spinning

بزرگترین مزیت این روش انعطاف بسیار بالای آن در تولید اندازه‌های مختلف از الیاف می‌باشد اما نقص این روش در جایی نمایان می‌شود که الیاف تولید شده در معرض پاره شدن قرار بگیرد همچنین باقی ماندن حلال در درون پلیمر منجر به آلوده کردن و سمی کردن محیط داربست می‌گردد.

۳-۲- روش امولسیون خشک منجمد^۱

در این روش سیستم پلیمر - حلال هموژن شده و آب بصورت یک امولسیون در می‌آیند. یک سیستم امولسیونی متشکل از دو فاز می‌باشد، فاز پیوسته و فاز توزیع شده که در این روش فاز پیوسته غنی از پلیمر می‌باشد که آب در آن توزیع شده است. امولسیون تهیه شده به سرعت سرد شده تا جایی که هر دو فاز منجر گردد که نتیجه آن تشکیل پلیمر جامد دارای منافذ می‌باشد. سپس فاز حلال و آب منجر به روش خشک منجمد از محیط امولسیون تخلیه می‌گردد.

این روش بیشتر در تهیه داربست‌های ضخیم با منافذ و حفره‌های بزرگ کاربرد دارد. از معضلات این روش می‌توان باقیمانده حلال در محیط و همچنین منافذ به هم پیوسته سهم کمی در ساختار داربست تولید شده، نام برد .

۳-۳- روش فشار بالا^۲

فرایند فشار بالا تحت عنوان تکنولوژی سیالات فوق بحرانی^۳ هم شناخته شده است. در این روش از مقدار زیادی گاز که معمولاً از N_2 یا CO_2 فوق بحرانی استفاده می‌شود، در پلیمر در فشار بالا تحت دمای خاصی حل می‌شود و زمانی که پلیمر اشباع شد با کاهش یا افزایش دما این ناپایداری اترمودینامیکی به سیستم تحمیل می‌شود تا جدایی فازی اتفاق بیافتد و نیرو محرکه برای رشد سلول‌ها فراهم شود. با توجه به توان این نیرو محرکه، هسته‌گذاری انجام می‌شود.

تعداد هسته‌ها به صورت نمایی با مقدار گاز حل شده در پلیمر افزایش می‌یابد . براین اساس روش‌هایی برای تولید داربست‌ها با اندازه حفره‌ها و منافذ در مقیاس میکرو وارد مبحث تولید داربست‌های زیستی شد.

از مزایای این روش این است که جهت تولید داربست از حلال استفاده نمی‌شود اما بهم مرتبط نبودن قسمت زیادی از حفره‌ها و منافذ از معایب این روش می‌باشد که مانع رگ‌زایی در سطح وسیعی از داربست می‌شود.

۱ - Emulsion freeze drying

۲ - High pressure processing

۳ - Supercritical fluid

۳-۴- روش فوم سازی گازی / استخراج ذره^۱

در این روش نمک گازدار^۲ بعنوان عامل فومزا مورد استفاده قرار می گیرد. مخلوط دوتایی پلی لاکتیک اسید ژل شده حاوی ذرات بی کربنات آمونیوم در قالب ریخته شده و سپس در داخل آب گرم گذاشته می شود. تغییر و تحول، آمونیا و گاز دی اکسید کربن که از ذرات بی کربنات سدیم توزیع شده در توده پلیمر متصاعد می شود منجر به تشکیل ساختار متخلخل با بیشترین میزان بهم پیوستگی می شود.

۳-۵- روش ریخته گری حلال / استخراج ذره^۳

این روش یکی از سنتی ترین روش های تولید داربست های زیست متخلخل می باشد. اساس کار این روش مبتنی به تهیه مخلوط پلیمر، نمک و یک حلال آلی می باشد که پس از تبخیر حلال و حل کردن نمک در پلیمر تخلخل هایی ایجاد شود. در این روش اندازه دانه های نمک، غلظت پلیمر و نحوه چگونگی استخراج، تصعید و یا تبخیر حلال آلی در شکل گیری داربست حفره دار نهایی نقش موثری دارد. در واقع حل کردن ذرات نمک فرایند تکمیل کننده بر ریخته گری محلول پلیمر می باشد تا با عبور نمک حل شده در مسیر ایجاد حفره نماید..

بهمین دلیل اگر این فرایند بدون حضور نمک انجام گیرد تحت عنوان فرایند جدایی فازی^۴ هم معرفی شده است.

از مزایای این روش تولید داربست با اندازه حفرات دلخواه و بهم مرتبط می باشد اما باقیماندن حلال در پلیمر می تواند عامل سویی در استفاده از آنها بعنوان داربست زیستی می باشد .

۳-۶- روش جدایی فازی گرما القایی^۵

روش جدایی فازی بر مبنای جدایش ترمودینامیکی محلول حلال و پلیمر به دو فاز غنی از پلیمر و بدون پلیمر با قرار دادن محلول در یک ضدحلال می باشد.

با اضافه شدن دما به روش جدایی فازی، عامل دما بعنوان یک حلال نهایی عمل می کند که موجب جدایی فازها از همدیگر می گردد. در حقیقت تفاوتی که با روش ریخته گری محلول دارد این است که دمای محلول پلیمر - حلال، در روش گرمای القایی بسیار بالا می رود و ناگهان محلول پلیمر سرد می شود اما در ریخته گری محلول در دمای محیط آماده شده و ناگهان سرد می گردد و در ادامه عملیات استخراج حلال انجام می گردد.

۱ - Gas foaming/particulate leaching (GF/PL)

۲ - Effervescent slat

۳ - Solvent casting/particle leaching (SL/PL)

۴ - Phase separation

۵ - Thermally induced phase separation (TIPS)

۳-۷- روش الیاف پیچی^۱

در این روش ابتدا الیاف پلیمر تولید شده بعد بر روی همدیگر قرار می گیرند و سپس محل تقاطع الیاف با همدیگر به وسیله پلیمر دومی به همدیگر متصل می گردد .

۳-۸- روش نمونه سازی سریع^۲

در این روش که اخیراً مورد توجه قرار گرفته است مبتنی بر شکل دهی مستقیم بصورت جامد می باشد. در این روش که از طریق برنامه های کامپیوتری طرح ریزی می شود داربست مورد نظر لایه به لایه و مطابق نقشه از پیش تعیین شده در سه بعد تهیه می گردد .

۳-۹- روش آلیاژ سازی مذاب/استخراج ذره^۳

با تجمیع روش های بالا و شناسایی نقاط ضعف و قوت این روش ها روش آلیاژ سازی مذاب بر پایه مطالعاتی قوی در زمینه مورفولوژی آلیاژهای پلیمری انجام می شود. با استفاده از روش استخراج ذره که معمولاً ذرات نمک طعام می باشد روش آلیاژسازی مذاب کامل می گردد. در این روش با استفاده از آلیاژسازی بصورت اختلاط پلیمرها در حالت مذاب ابتدا یک آلیاژ دوتایی یا سه تایی ساخته شده سپس با استخراج فازها یا فاز موردنظر با استفاده از حلال فاز باقیمانده بصورت متخلخل باقی می ماند.

واضح است حذف پلیمر در توده پلیمر دیگر، زمانی منجر به ایجاد داربست متخلخل می گردد که مورفولوژی ابتدایی آلیاژ تولید شده از نوع به هم پیوسته^۴ باشد تا هم امکان نفوذ حلال به تمام نقاط داربست فراهم شود و هم اینکه پس از استخراج ساختار متخلخل و با حفره های بهم مرتبط، ساخته شود.

مهمترین مشکل موجود در اکثر این روش ها استفاده از حلال های آلی برای استخراج یک فاز جهت ایجاد تخلخل می باشد که موجب می شود جسم متخلخل ساخته شده آلوده به حلال شده و حتی با حذف حلال، مقادیر هرچند اندک از آن موجب اخلاط در رفتار زیستی محصول نهایی شود. معضل دیگر مقرون به صرفه نبودن و یا خاص بودن تجهیزات تولید داربست متخلخل می باشد.

۱ - Fiber bonding

۲ - Rapid prototyping

۳ - Melt blending/particulate leaching (MB/PL)

۴ - Co-continuous

در روش آلیاژ سازی مذاب قالبی، تمام اجزاء آلیاژ مطابق با ترکیب درصد مورد نظر داخل قالب ریخته شده و تحت فشار با دما و زمان شکل دهی می گردند. از معضلات این روش پایین بودن درصد تخلخل ها و تکرارناپذیری آن روش می باشد. اما در اختراع حاضر از روش آلیاژ سازی مذاب با استفاده از مخلوط کن داخلی جهت آمیزه سازی استفاده شده است که تفاوت آن در سهولت روش ساخت و تکرار پذیری آن می باشد. البته این روش هم به تنهایی درصد تخلخل های نسبتاً پایینی ایجاد می کند که گستره استفاده از آن را در ساخت داربست های زیستی کوچک تر می کند. برای جبران این نقیصه ذرات نمک طعام (NaCl) به سیستم آلیاژ سه تایی PLLA/PCL/PEO در حالت مذاب اضافه شده که پس از اختلاط اجزا و سرد شدن آنی سیستم بوسیله حل شدن در آب از سیستم استخراج می گردد.

با کنترل مورفولوژی در حالت مذاب با استفاده از متغیرهای ترکیب درصد پلیمرها، دما، زمان و شدت برش وارده می توان مورفولوژی های مختلفی در حالت بهم پیوسته تولید کرد که حاصل آن ساختار متخلخل با حذف یکی از فازها بوسیله حلال می باشد. این روش مکمل روش های یاد شده از نظر عدم سمیت در محیط آلیاژ، کنترل شکل و اندازه و میزان تخلخل های ایجاد شده در داربست و همچنین آسانی روش تولید از مزایای این روش می باشد که در این اختراع در پلیمر PLLA/PCL/PEO برای نخستین بار ارائه شده است.

در این اختراع، استفاده از روش اختلاط مذاب با استفاده از دستگاه مخلوط کن داخلی، استفاده از ذرات نمک طعام جهت افزایش مقدار تخلخل، بکار بردن پلیمر پلی اتیلن اکساید (PEO) محلول در آب، همگی از نکات قابل توجه می باشد که منجر به ساخت آلیاژ متخلخل بر پایه آلیاژ دو پلیمر پلی ال - لاکتیک اسید (PLLA) و پلی کاپرولاکتام (PCL) می شود. این آلیاژ متخلخل تولید شده دارای درصد تخلخل های بالا بوده، توزیع اندازه آنها دوقله ای می باشد، عاری از هرگونه حلال آلی سمی است و در نهایت به دلیل حضور همزمان دو پلیمر PLLA و PCL با خواص مختلف دارای خواص مکانیکی مناسبی جهت استفاده در مهندسی بافت می باشد.

۴- شرح وضعیت دانش فنی پیشین

آغاز کار مهندسی بافت در سال ۱۹۳۳ بود، هنگامی که دانشمندی به نام بیسزلیک، سلول های توموری موش را در یک غشاء پلیمری قرار داده و سپس آن را در شکم خوک کاشت و هیچ گونه پاسخ ایمنی را مشاهده نکرد. انفجار در تحقیقات و استفاده واقعی از مهندسی بافت، با نگارش مقاله ای توسط لانگر و وکنتی که در شماره ماه May سال ۱۹۹۳ مجله علوم منتشر شد، آغاز شد. این مقاله کوشش های اولیه در این زمینه را توصیف کرد و مفهوم و پتانسیل مهندسی بافت را توضیح داد.

در سال های اخیر محدوده وسیعی از پلیمرهای زیستی با خصوصیات متعدد و روش های مختلف فرایندی جهت شکل دهی و کاربرد آنها در مهندسی بافت و ساخت داربست های زیستی استفاده شده است. قطعه مورد استفاده در

ساخت داربست های زیستی علاوه بر خواص زیست سازگاری و زیست تخریب پذیری باید دارای ساختاری متخلخل، سه بعدی و همچنین خواص مکانیکی مناسبی باشد.

در موارد مشابه برای ساخت داربست های زیستی مشاهده شده است علاوه بر زیست سازگاری و زیست تخریب پذیری، آسانی روش ساخت و سه بعدی بودن ماده ساخته شده در دستور کار قرار گرفته است. در سال ۱۹۸۳ در مقاله به شماره US Patent ۴۴۱۱۰۲۷ چون بتازگی در مهندسی بافت بحث ساخت داربست های زیستی مطرح شده بود لذا جذابیتی در روش های ساخت داربست زیستی در نظر گرفته نشده است و بیشتر عملکرد داربست ساخته شده مورد بحث قرار گرفته است. در این مقاله روش ساخت داربست الیاف پیچی حلالی بوده است. در سال ۲۰۰۶ در US Patent ۶۹۹۳۴۰۶ B۱ ابتکار جدیدی انجام گرفته است ساخت داربست توسط ربات و ادامه همان روش الیاف پیچی حلالی و ریخته گری^۱ می باشد. در سال ۲۰۱۱ در مقاله B۲ US Patent ۷۹۲۳۴۸۶ ابتکار نویسنده در انتخاب مواد پلی یورتانی جدید و پخت آنها در ساخت داربست است. در B۱ US Patent ۸۵۴۱۰۱۵ در سال ۲۰۱۳ مبنای ساخت داربست بروش حلالی است اما با استفاده از سه پلیمر که از نظر اسلوب کار با اختراع حاضر تقریباً هم خوانی دارد اما روش اصلی جهت حذف پلیمر استفاده از حلال و شکل دهی بصورت ریخته گری می باشد. بطور کلی با رصد کردن اختراعات موجود مبنای ساخت داربست زیستی از زیست سازگاری شروع شده و به شیوه تولید و تنوع بخشی در انتخاب پلیمرهای سازنده داربست منتهی می گردد. اما در این میان مبحث تولید داربست بروش آلیاژسازی مذاب در داخل مخلوط کن داخلی مشاهده نگردید.

ارزش این اختراع از آن جهت است که با استفاده از بحث بررسی توسعه مورفولوژی پلیمرها کمک شایانی به ساخت مواد جدید با خواص جدید می شود. امروزه بحث و بررسی پیش بینی مورفولوژی آلیاژهای پلیمری جهت کنترل خواص مکانیکی و حصول شرایط از پیش تعیین شده حائز اهمیت می باشد. در این میان بررسی مورفولوژی آلیاژهای سه تایی و چهارتایی به جهت پیچیده تر شدن شرایط کنترل مورفولوژی کمتر مورد بحث و بررسی قرار گرفته است. بررسی مورفولوژی آلیاژهای سه تایی و چهارتایی نیاز به انتخاب صحیح مواد با توجه به چسبندگی بین سطحی زوج پلیمرها دارد. مبنای این اختراع شیوه جدید ساخت داربست زیستی و کنترل خواص مکانیکی بر اساس دانش بررسی مورفولوژی آلیاژهای پلیمری می باشد نه بررسی خواص زیستی آن تا مهندسين بافت بهترین گزینه را برای انتخاب روش و خواص مورد نظر آماده داشته باشند.

۵- ارائه راه حل برای مشکل فنی موجود همراه با شرح دقیق و کافی و یکپارچه اختراع

جهت برطرف نمودن و پوشش معایب روش های ذکر شده ، در روش آلیاژسازی مذاب پلیمرهای PLLA، PCL و PEO و اختلاط با پودر نمک NaCl نمونه ها ابتدا در مخلوط کن داخلی بصورت مذاب مخلوط می گردند.

ترکیب درصد نمونه ها در جدول ۱-۵ مورد ذکر شده است.

برای محاسبه درصد تخلخل های داربست از روش Menrad استفاده شد. در این روش ابتدا قطعاتی استوانه ای شکل از داربست بروش قالبگیری فشاری تولید و حجم این قطعات محاسبه گردید. چگالی ظاهری (ρ^*) با بدست آوردن وزن قطعات تولید شده به سهولت قابل تعیین است. پس از استخراج توسط آب و اندازه گیری مجدد چگالی که موسوم به چگالی اسکلتی می باشد (ρ_s) درصد تخلخل داربست ها با استفاده از رابطه ۱-۵ بدست می آید.

$$V_f = (1 - \frac{\rho^*}{\rho_s}) \times 100 \quad 1-5$$

جدول ۱-۵- فرمولاسیون نمونه های آلیاژ PLLA/PCL/PEO/NaCl

نام نمونه	PLLA	PEO	PCL	NaCl
	wt%	wt%	wt%	wt%
NaCEL ۱۰۱	۱۰	۵۰	۴۰	۴۰
NaCEL ۱۰۲	۱۰	۵۰	۴۰	۵۰
NaCEL ۱۰۳	۱۰	۵۰	۴۰	۶۰
NaCEL ۱۰۴	۱۰	۵۰	۴۰	۷۰
NaCEL ۱۰۵	۱۰	۵۰	۴۰	۸۰

برای محاسبه میزان بهم پیوستگی فاز PEO استخراج شده از رابطه ۲-۵ استفاده می گردد.

$$\%PEO \text{ Continuity} = \left(\frac{\text{weight PEO}_{\text{initial}} - \text{weight PEO}_{\text{final}}}{\text{weight PEO}_{\text{initial}}} \right) \times 100 \quad 2-5$$

جهت محاسبه قطر تخلخل بوسیله نرم افزا Image J با معلوم بودن A قطر تخلخل از روی رابطه ۳-۵ به دست می آید.

$$d = (4A / \pi)^{1/2} \quad 3-5$$

از هر نمونه چند تصویر SEM مورد بررسی قرار گرفته و در هر تصویر نیز حداقل ۲۰۰ تخلخل در نظر گرفته شده است. در نهایت قطر متوسط عددی تخلخل ها در مورفولوژی موجود بدست آمده که تصویر میکروسکوپ الکترونی (SEM) نمونه ها در شکل ۶-۱ آورده شده است، اندازه قطر متوسط تخلخل نمونه ها مطابق با رابطه ۵-۴ محاسبه می گردد:

$$D_n = \sum N_i D_i / \sum N_i \quad 4-5$$

که در آن N_i تعداد قطرات دارای قطر D_i می باشد.

نتایج اندازه گیری تخلخل نمونه ها و بهم پیوستگی شان با استفاده از روش اندازه گیری چگالی در جدول ۵-۲ آورده شده است.

جدول ۵-۲- تخلخل نمونه ها و بهم پیوستگی فاز PEO

نام نمونه	NaCEL ۱۰۱	NaCEL ۱۰۲	NaCEL ۱۰۳	NaCEL ۱۰۴	NaCEL ۱۰۵
$V_f (\%)$	۶۵/۳۹	۷۳/۸۵	۷۶/۸۴	۷۸/۸۱	۸۴/۵۳
PEO Continuity (%)	۹۱/۵۳	۹۱/۶۴	۹۱/۶۸	۹۲/۱۳	۹۲/۴۸

به منظور انجام آنالیز کمی از اندازه تخلخل ها در هر نمونه، از نرم افزار آنالیز تصاویر Image J استفاده شد. این نرم افزار مساحت هر حفره A، را به صورت جداگانه اندازه می گیرد.

پس از تولید نمونه آلیاژها در داخل مخلوط کن داخلی و سردکردن آنی آنها در نیتروژن مایع از ترکیبات ساخته شده استوانه هایی بروش قالبگیری فشاری تهیه می گردد. بدین منظور از یک دستگاه پرس ۲۵ تنی با قابلیت اعمال فشار ۱۵۰ bar و قابلیت کنترل دما در محدوده ۱۰۰°C الی ۳۰۰°C استفاده شد. این دستگاه مجهز به سامانه گردش آب برای سرمایش می باشد. جهت استخراج در آب و همچنین ساخت نمونه جهت انجام آزمون خواص مکانیکی فشاری، نمونه آلیاژهای مخلوط شده مطابق با فرمولاسیون جدول ۵-۱ استوانه هایی به قطر ۱۰ mm و ضخامت ۸ mm بروش قالبگیری فشاری ساخته شد. جهت ساخت این نمونه ها از قالب جنس فولاد معمولی استفاده شد که تصویر آن در شکل ۵-۱ دیده می شود.

این استوانه ها با قرار گرفتن در آب مقطر به مدت ۷ شبانه روز که در خلال این مدت هر ۲۴ ساعت آب آن عوض می گردد عملیات استخراج فازهای PEO و ذرات NaCl انجام می شود.

در شکل ۶-۱ نمودار توزیع اندازه ذرات تخلخل های بوجود آمده در جسم متخلخل آورده شده است. تخلخل های بزرگ در مقیاس ماکرو ناشی از حذف دانه ها و ذرات نمک می باشند و حفره های ریزتر در اندازه میکرو از حذف فاز PEO از بستر آلیاژ PLLA/PCL/PEO بوجود می آیند.



شکل ۵-۱- قالب استوانه ای

جهت تهیه نمونه آلیاژ PLLA/PCL/PEO مطابق با فرمولاسیون ارائه شده در جدول ۵-۱ از دستگاه مخلوط کن داخلی در محدوده دمایی $180-200^{\circ}\text{C}$ و روتور از نوع Banbury با محدوده دور $50-60\text{rpm}$ و زمان اختلاط 10min استفاده شد این نمونه ها با پسوند NaCEL به علاوه یک عدد از ۱۰۱ الی ۱۰۵ نام گذاری شده اند. ابتدا PLLA و PCL بصورت فیزیکی و خارج از اتاقک اختلاط مخلوط کن داخلی با همدیگر مخلوط شدند سپس به داخل مخلوط کن در دما و دور تنظیم شده ریخته شد. پس از اطمینان از ذوب این دو پلیمر و یکنواختی اختلاط از روی نمودار گشتاور زمان دستگاه، پلیمر سوم یعنی PEO به محفظه اختلاط اضافه گردید. این مرحله در تمام نمونه آلیاژها در دقیقه سوم به بعد انجام شد. پس از اضافه شدن پلیمر سوم، مجدداً گشاور روتورها زیاد شد تا به یکنواختی اختلاط رسید. پس از اضافه شدن PEO به مذاب یکنواخت PLLA/PCL در دقیقه سوم و پس از یکنواختی اختلاط مذاب PLLA/PCL/PEO ذرات نمک NaCl در دقیقه پنجم به بعد اضافه شد. پس از یکنواختی و طی شدن زمان کامل اختلاط معین شده نمونه آلیاژها به یکباره در داخل نیتروژن مایع ریخته شد تا مورفولوژی آن در همان حالت منجمد گردد.

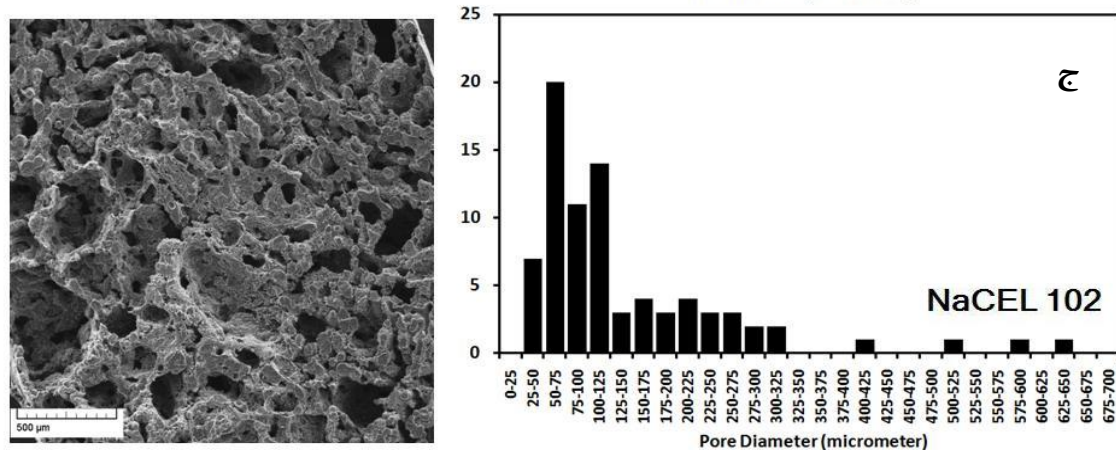
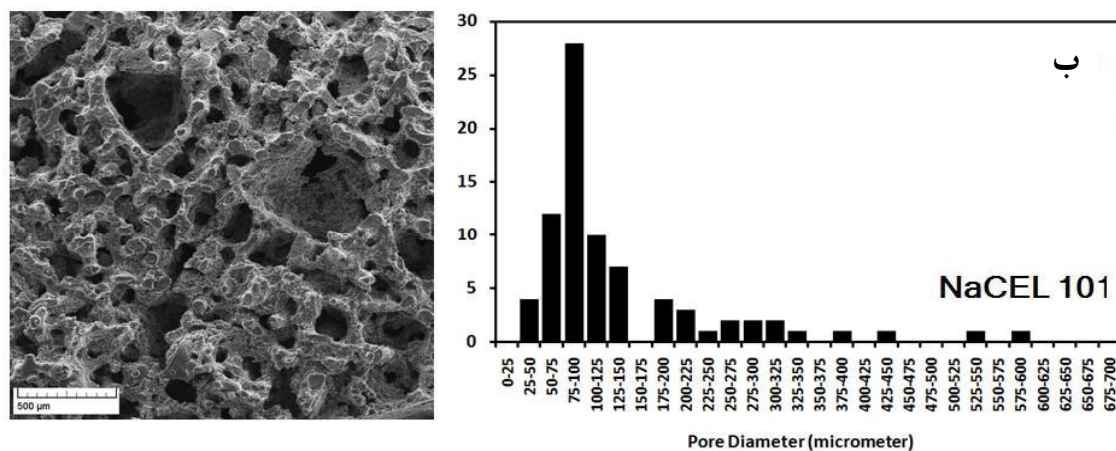
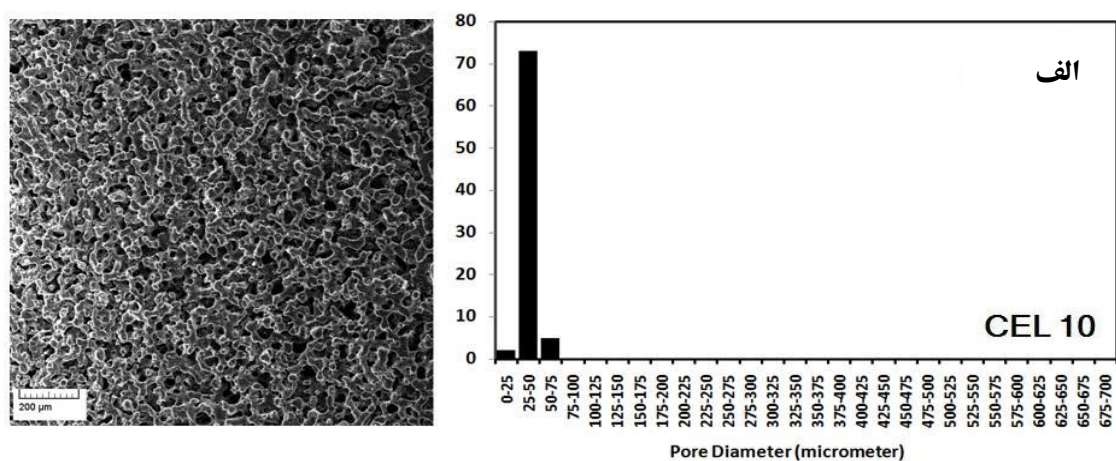
در ادامه جهت عملیات استخراج و اندازه گیری میزان تخلخل و در نهایت انجام آزمون خواص مکانیکی استوانه های کوچکی از آلیاژهای تولید شده مطابق با اندازه مورد نظر برش قالب گیری فشاری در دمای 190°C به مدت ۳ دقیقه تهیه می شدند. بدین منظور آلیاژ ریز شده در داخل نیتروژن مایع داخل محفظه قالب گرم شده ریخته می شود تا حرارت دیده و آرام آرام نرم و مایع گردد. پس از هوا گیری مذاب داخل محفظه بوسیله پیستون مذاب

درون محفظه قالب تحت فشار قرار می گیرد. پس از فشرده شدن مذاب درون قالب سیستم سرمایش پرس را روشن کرده و حرارت دهی قطع می گردد. با سرد شدن قالب تا دمای 30°C استوانه ها از درون قالب تخلیه می گردند. استوانه تولید شده پس از اندازه گیری ابعاد و وزن آن، درون آب مقطر گذاشته شده و پس از مدت یک هفته با حل شدن فاز PEO و ذرات NaCl در نمونه های NaCEL نمونه متخلخل تهیه می گردید.

اندازه های ابعادی و وزن این نمونه ها مجدداً محاسبه می گردید و از روی آن مشخصات ظاهری جسم متخلخل گزارش می شد. در ادامه استوانه های متخلخل مورد انجام آزمون خواص مکانیکی فشاری می گردید. با تصویر برداری بوسیله میکروسکوپ الکترونی (SEM) و استفاده از نرم افزار بررسی تصاویر تخلخل ها اندازه گیری می شوند.

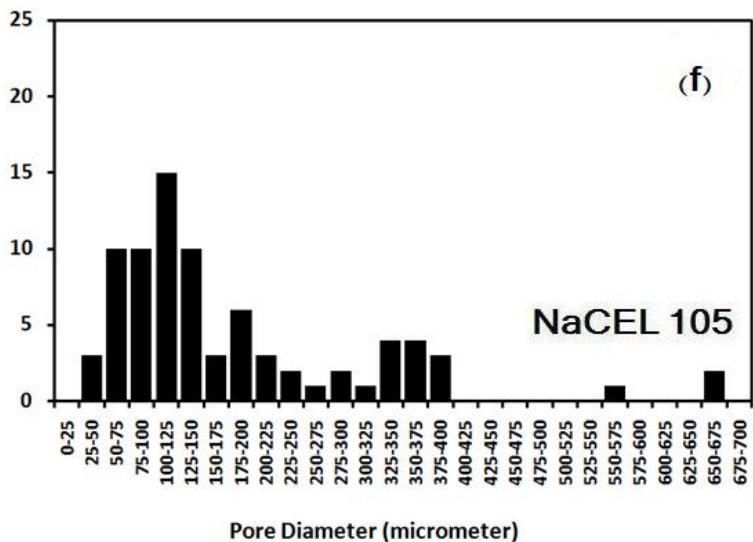
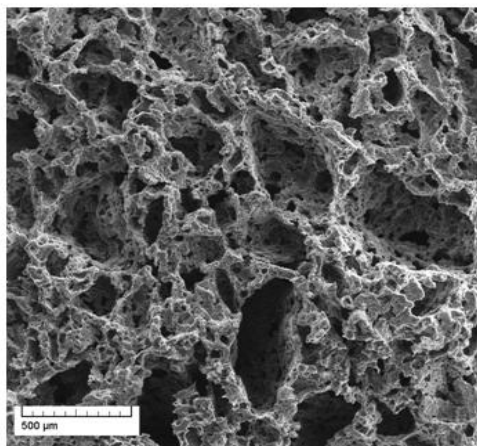
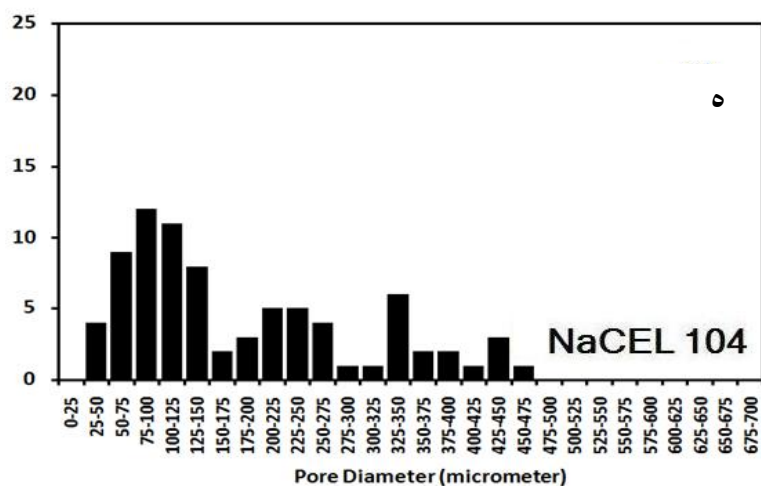
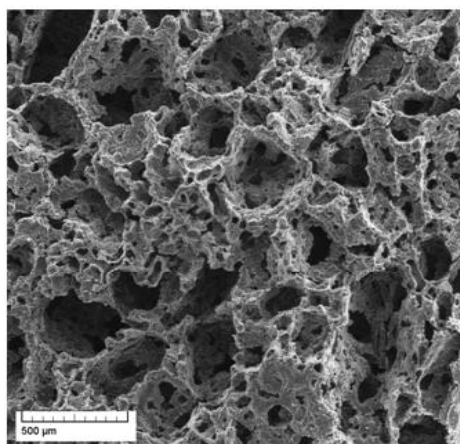
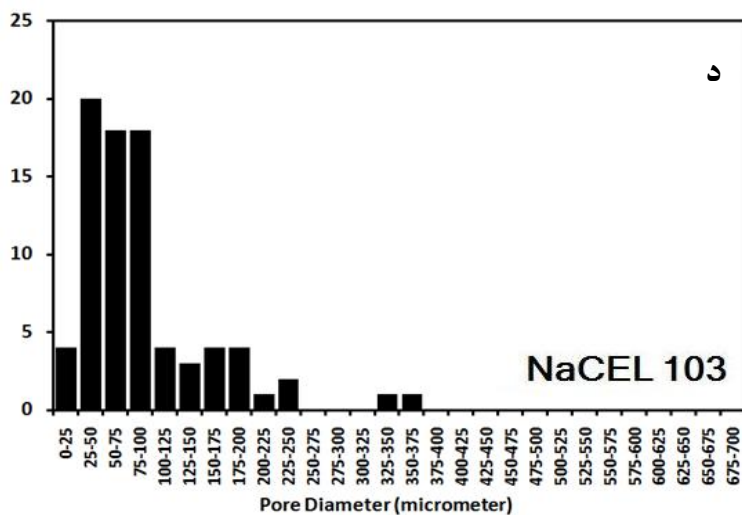
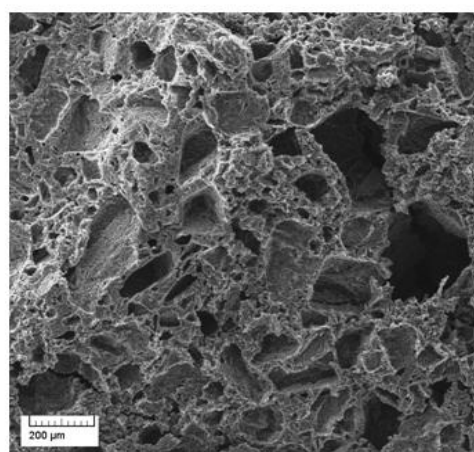
۶- توضیح اشکال، نقشه ها، نمودارها در صورت وجود

در شکل ۱-۶ اندازه تخلخل ها و توزیع آنها به همراه تصاویر میکروسکوپ الکترونی دیده می شود.



شکل ۶-۱- تصاویر نمودار توزیع اندازه تخلخل های آلیاژهای و تصاویر SEM نمونه های :

(الف) CEL ۱۰ ، (ب) NaCEL ۱۰۱ ، (ج) NaCEL ۱۰۲ ، (د) NaCEL ۱۰۳ ، (ه) NaCEL ۱۰۴ و (و) NaCEL ۱۰۵



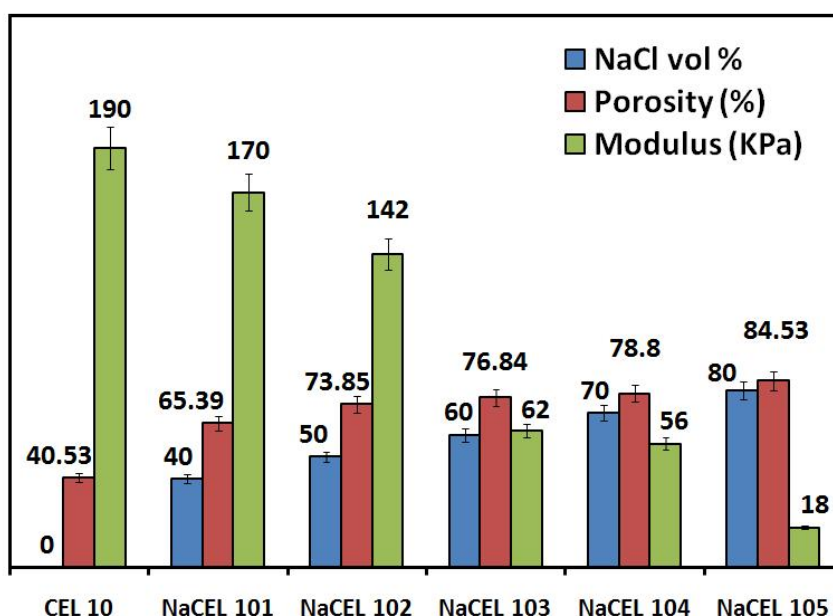
خواص مکانیکی فشاری آلیاژ متخلخل PLLA/PCL به اندازه تخلخل های میکرو و ماکرو و توزیع اندازه آنها ارتباط دارد. همانطور که در بخش پیشین ذکر شد خواص مکانیکی به طرز چشمگیری متأثر از نوع، اندازه و مقدار تخلخل-ها می باشد لذا در این آلیاژ این میزان تغییرات بیشتر به چشم می آید. جدول (۶-۱) مدول فشاری، چگالی ظاهری و چگالی اسکلتی را در ناحیه الاستیک خطی نشان می دهد.

جدول ۶-۱- مدول فشاری، چگالی ظاهری و چگالی اسکلتی آلیاژ متخلخل PLLA/PCL

Sample	Com. Modulus (KPa)	ρ^* (gr/cm ^۳)	ρ_s (gr/cm ^۳)	relative density
NaCEL ۱۰۱	۱۷۰	۰/۴۴	۱/۳۹	۰/۳۴
NaCEL ۱۰۲	۱۴۲	۰/۳۲	۱/۵۳	۰/۲۸
NaCEL ۱۰۳	۶۲	۰/۲۵	۱/۶۱	۰/۲۳
NaCEL ۱۰۴	۵۶	۰/۴۱	۱/۴۸	۰/۲۱
NaCEL ۱۰۵	۱۸	۰/۴۷	۱/۳۷	۰/۱۵

همانطور که از داده های جدول (۶-۱) دیده می شود برای نمونه های NaCEL با افزایش مقدار ذرات نمک NaCL که منجر به افزایش تخلخل می گردد مدول فشاری کاهش پیدا می کند. در این میان کمترین مقدار مدول مربوط به ۰۵^۹ می باشد که دارای بیشترین مقدار تخلخل نیز می باشد. می توان اینگونه توجیه کرد که افزایش میزان تخلخل در مقدار ثابتی از ماده باعث به وجود آمدن تخلخل هایی با دیواره های نازک تر می شود و این دیواره ها هر چقدر نازک تر باشد تحت فشار راحت تر می شکنند. اثر حضور ذرات نمک NaCL، مقدار نمک و اثر مقدار تخلخل بر روی مدول فشاری همگی در شکل (۶-۲) نشان داده شده است.

اگرچه همیشه در نگاه اول ایده آل آن بوده است که خواص مکانیکی دارای مقداری بالا باشد اما در این مورد چون هدف استفاده از این ماده متخلخل در بحث مهندسی بافت و ساخت داربست زیستی است لذا می توان با ایجاد توازن صحیح مابین خواص مکانیکی و مقدار تخلخل به نتایج مورد نظر رسید.



شکل ۶-۲ اثر ذرات نمک NaCl و تغییرات مقدار آن از ۰ الی ۸۰ wt.% بر روی مقدار تخلخل و مدول فشاری

۷- بیان واضح و دقیق مزایای اختراع

بررسی رفتار مورفولوژیکی آلیاژهای پلیمری و نحوه کنترل آنها این امکان را به محققان می دهد تا با انتخاب درست و صحیح مواد اولیه و روش های تولید و تکمیل فرایند آنها به مواد جدیدی رسید. در این کار با انتخاب پلیمرهای زیست سازگار و زیست تخریب پذیر PLLA، PCL و PEO و با اضافه نمودن ذرات نمک NaCl به آلیاژ سه تایی PLLA/PCL/PEO حین اختلاط مذاب آلیاژ چهارتایی PLLA/PCL/PEO/NaCl حاصل می شود. با استفاده از فرایند استخراج فازهای PEO و NaCl توسط آب مقطر، محصول حاصله به یک جسم متخلخل تبدیل می گردد که می تواند در زمینه مهندسی بافت و تولید داربست های زیستی کاربرد داشته باشد.

به طور کلی در مهندسی بافت محققین با سه چالش عمده مواد زیستی^۱، رگ زایی^۲ بافت مهندسی شده و سیستمی برای تحویل^۳ فاکتورهای زیستی و داروها به بافت مهندسی شده روبرو هستند و سعی در بهینه سازی آنها

۱ - Biomaterial

۲ - Angiogenesis

۳ - Delivery

دارند. رگ‌زایی برای توسعه اغلب بافت‌ها از جمله آنهایی که دچار اخلاص در خون‌رسانی پاتولوژیک شده‌اند، جزء مهمی از استراتژی‌های مهندسی بافت می‌باشد. بنابراین کنترل مقدار، مکان و مدت زمان تجویز فاکتورهای رگ‌زایی از طریق استراتژی‌های تحویل دارو برای تقلید هرچه بهتر محیط سلول‌های بنیادی ضروری می‌باشد.

محققین حوزه مهندسی بافت با استفاده از نتایج بدست آمده در این کار می‌توانند با ایجاد تغییرات در ترکیب درصد دو جز PLLA و PCL و نحوه فرایند به گستره نسبتاً وسیعی از درصد تخلخل و خواص مکانیکی آلیاژ متخلخل PLLA/PCL دست یابند. این اختراع در قیاس با دیگر روش‌های تولید داربست‌های زیستی دارای این مزیت است که از حلال سمی جهت استخراج مواد استفاده نمی‌شود لذا محیط آلیاژ متخلخل عاری از هرنوع سمیت می‌باشد. اندازه تخلخل‌ها کاملاً کنترل پذیر بوده و در دو اندازه میکرو و ماکرو می‌باشند. این دو اندازه می‌توانند در کنار هم باشند و توزیعی دو قله ای از اندازه تخلخل‌ها بوجود آید که این امر به رگ‌زایی بافت طبیعی بدن و جایگزینی هرچه بهتر مب‌انجامد و در نهایت تکرار پذیری و سادگی فرایند موجب شده است که محصول نهایی ارزان تر تولید گردد.

۸- روش اجرایی برای به کارگیری اختراع

با استفاده از آلیاژ متخلخل PLLA/PCL می‌توان داربست‌های زیستی مختلفی برای کارکردهای مختلف و خواص مختلف در مهندسی بافت تولید نمود که در این اختراع هدف نشان دادن یک روش جدید تولید داربست زیستی می‌باشد.

۹- ذکر صریح کاربرد صنعتی اختراع

هدف ساخت آلیاژ متخلخل PLLA/PCL در دامنه وسیعی از خواص ظاهری و مکانیکی می‌باشد تا محققان حوزه مهندسی بافت با ادامه مسیر استفاده از داده‌های این کار استفاده نمایند.

پلیمرهای PLLA، PCL و PEO در بدن قابل تجزیه و قابل جذب می‌باشند. اداره کل غذا و دارو (FDA) این مواد را تایید کرده و حتی آنها را تهیه هم می‌نماید. این پلیمرها به راحتی به ماتریکس‌های سه بعدی با ساختارهای متنوع تبدیل می‌شود. پلیمرهای نامبرده برای مهندسی بافت بکار می‌روند که بطور کلی شامل پلی‌آلفاهیدروکسی استرها که پلی‌استرهای آلیفاتیک هستند و پلی‌آنیدرید و پلی‌اورتواسترها می‌باشند.

۱- پلی‌لاکتیک اسید (PLA)

محصول‌های زیستی از نوع مونومری گلیکولیک اسید و لاکتیک اسید در بدن انسان به صورت طبیعی در مسیرهای متابولیک تولید و سپس حذف می‌شود. در حالت داربست همین مواد را بصورت پلیمر تهیه می‌

کنند. تفاوت این دو در شدت تخریب پذیری آنهاست به طوری که پلی گلیکولید سریعتر از پلی لاکتید تجزیه می شود.

۲- پلی کاپرولاکتون (PCL)

از این داربست برای تمایز سلول های بنیادی سوماتیک غیر محدود شده به سلول های کبدی استفاده شده است.

۳- آلیاژ PLLA/PCL متخلخل

در مطالعات دیده شده است که در درمان ضایعات مربوط به مثانه و همچنین دریچه های قلب استفاده شده است.

۱۰- خلاصه اختراع

در ساخت داربست زیستی پلیمری متخلخل PLLA/PCL با توزیع دوقله ای اندازه تخلخل ها، هدف روش جدیدی در ساخت داربست زیستی مورد استفاده در مهندسی بافت می باشد. در اکثر روش های ساخت داربست های زیستی عموماً از حلال استفاده می شود. استفاده از حلال در مرحله شکل دهی و ایجاد تخلخل، موجب سمیت داربست می گردد. در این اختراع با سه پلیمر زیست سازگار و ذرات نمک پس از اختلاط مذاب، یک آلیاژ چهارتایی PLLA/PCL/PEO/NaCl بدست می آید. با استفاده از استخراج با آب مقطر به مدت یک هفته دانه های نمک و فاز PEO استخراج می گردد. پس از خشک شدن محصول موجود آلیاژ PLLA/PCL متخلخل است. در این روش، ساخت داربست ساده و تکرار پذیر می باشد. با تغییر در نسبت درصدهای PLLA و PCL می توان خواص مکانیکی در گستره مختلف بدست آورد. با استفاده از مقدار و اندازه ذرات نمک می توان درصد، اندازه و توزیع اندازه تخلخل های اندازه ماکرو و با تغییرات فاز PEO تخلخل های اندازه میکرو را تولید و کنترل کرد. این تنوع در تخلخل ها و تنوع در خواص مکانیکی دست طراحان مهندسی بافت را برای بکارگیری از دانش بدست آمده در ساخت داربست زیستی باز می گذارد.