Tarbiat Modares University

Journal of
Applied Research in Chemical-Polymer Engineering

journal homepage: www.arcpe.modares.ac.ir

Research Paper

# Optimization of Gelatin/PEG Scaffold with Zn/Mg Doped Bioactive Ceramic Glass Using Response Surface Method (RSM)

Mania Chaychi [1], Gita Bagheri [2,*]

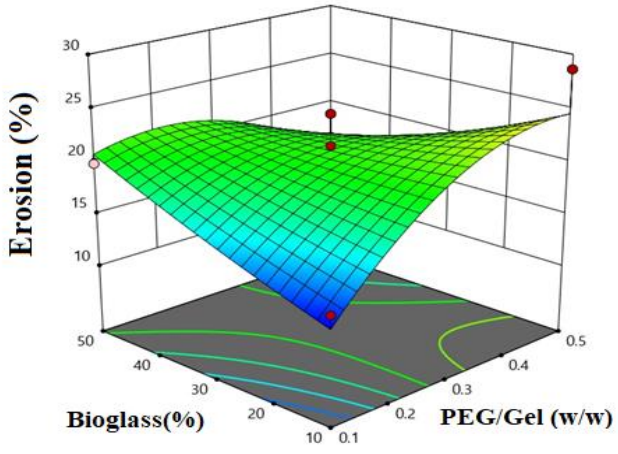
[1] *Department of Medicinal Chemistry, Shahriar Branch, Islamic Azad University, Shahriar, Iran.*
[2] *Department of Chemical Engineering, Shahriar Branch, Islamic Azad University, Shahriar, Iran.*

ARTICLE INFO

Received 2024-10-30
Revised 2024-11-30
Accepted 2024-11-30
Available online 2025-04-12
ISSN: 2588-5316
Online ISSN: 2588-5324

**Keywords:**
Composite scaffold
Gelatin
Polyethylene glycol
Bioactive glass
Response surface

GRAPHICAL ABSTRACT




## ABSTRACT

**Research Subject:** This study aims to improve the biocompatibility, bioactivity, and mechanical properties of gelatin-based composite scaffolds by coating them with polyethylene glycol (PEG) doped with bioactive glasses (BGs) containing zinc and magnesium.

**Research Approach:** A response surface methodology (RSM) was used to model and evaluate the effects of two independent variables: the PEG/Gel weight ratio (X1) and the BG weight percentage (X2). The responses investigated included ultimate strength, Young's modulus, elongation at break, swelling percentage, erosion percentage, and moisture absorption percentage.

**Main Results:** Optimal conditions were determined to obtain scaffolds with suitable mechanical strength, biocompatibility and degradability. Analysis of variance (ANOVA) was used to obtain the best model describing the influence of each independent variable on the responses. The optimal scaffold formulation was selected based on software-defined parameters. The FTIR spectrum was used to analyze the functional groups present on the surface of the samples. The FTIR spectrum of the synthesized BGs showed a broad vibrational band in the range of 900 to 1100 $cm^{-1}$, which is attributed to the asymmetric Si-O-Si stretching band. The FTIR spectrum of the PEG/Gel/BG composite confirmed the presence of BG in the scaffolds and the interaction between the polymer matrix and BG. Increasing the amount of BG relative to the polymer scaffold led to a decrease in pore size and consequently, a decrease in the scaffold's swelling percentage. The effect of varying the BG weight percentage on tensile strength was greater than that of the PEG/Gel weight ratio. The tensile strength increased significantly due to the good interaction between the polymer scaffold and BG, as well as the uniform dispersion of BG within the polymer matrix. SEM images indicated that cells penetrated well into the scaffolds and formed a suitable three-dimensional cellular network. Cytotoxicity, cell attachment and proliferation, and osteogenic differentiation were evaluated using the MTT test and by culturing MG-63 cells on the scaffold. Cell viability showed no significant difference between the tested and control samples.

* Corresponding author: bagheri.gita@iau.ac.ir – ORCID: 0000-0002-0435-7037

Copyright@ 2025, The Authors. This open-access article is published under the terms of the Creative Commons Attribution-NonCommercial 4.0 International License which permits Share (copy and redistribute the material in any medium or format) and Adapt (remix, transform, and build upon the material) under the Attribution-NonCommercial terms.

نشریه پژوهش‌های کاربردی مهندسی شیمی–پلیمر

آدرس صفحه: www.arcpe.modares.ac.ir

مقاله تحقیقاتی

# بهینه‌سازی داربست ژلاتین/ پلی‌اتیلن‌گلیکول با شیشه سرامیک زیست فعال آلاییده شده با Zn/Mg با استفاده از روش سطح پاسخ (RSM)

مانیا چایی چی[۱]، گیتا باقری[۲,*]

[۱] گروه شیمی دارویی، واحد شهریار، دانشگاه آزاد اسلامی، شهریار، ایران.

[۲] گروه مهندسی شیمی، واحد شهریار، دانشگاه آزاد اسلامی، شهریار، ایران.

## چکیده

**موضوع تحقیق:** هدف از این تحقیق بهبود زیست‌سازگاری، فعالیت زیستی و خواص مکانیکی داربست‌های کامپوزیتی ژلاتین پوشش داده‌شده با پلی‌اتیلن‌گلیکول آلاییده‌شده با شیشه‌های زیست‌فعال حاوی روی و منیزیم است.

**روش تحقیق:** در این مطالعه برای مدل‌سازی تجربی و ارزیابی تأثیر متغیرهای مختلف و انتخاب ترکیب‌های بهینه از روش سطح پاسخ با دو متغیر مستقل نسبت وزنی PEG/Gel (X1) و درصد وزنی BG (X2) استفاده شد. پاسخ‌ها شامل استحکام نهایی، مدول یانگ، ازدیاد طول در شکست، درصد تورم، درصد فرسایش و درصد جذب رطوبت بوده است.

**نتایج اصلی:** شرایط بهینه برای به‌دست آوردن داربستی با خواص مکانیکی، زیست سازگاری و تخریب پذیری مناسب تعیین شد. آزمون ANOVA برای به‌دست آوردن بهترین مدل برای توصیف چگونگی تأثیر هر یک از متغیرهای مستقل بر پاسخ‌ها انجام شد و شرایط داربست بهینه بر اساس سطوح تعریف‌شده در نرم‌افزار مشخص شد. برای تحلیل گروه‌های عاملی موجود بر سطح نمونه‌ها از طیف FTIR استفاده شد و طیف FTIR از BGهای سنتزشده نوار ارتعاشی گسترده‌ای را در محدوده ۹۰۰ تا ۱۱۰۰ $cm^{-1}$ نشان داد که به نوار کششی نامتقارن Si-O-Si اختصاص دارد. طیف FTIR کامپوزیت PEG/Gel/BG وجود BG در داربست‌های کامپوزیتی و برهم‌کنش بین ماتریس پلیمری و BG را تأیید کرد. افزایش مقدار BG نسبت به داربست پلیمری منجر به کاهش اندازه منافذ و در نتیجه موجب کاهش درصد تورم داربست شد. تأثیر درصد وزنی متغیر BG بر میزان استحکام کششی در مقایسه با نسبت وزنی PEG/Gel بیشتر بوده و استحکام کششی به‌دلیل برهم‌کنش خوب بین داربست پلیمری و BG و پراکندگی مناسب BG در ماتریس پلیمری به‌طور چشمگیری افزایش یافته است. تصاویر SEM بیانگر آن است که سلول‌ها به خوبی در میان داربست‌ها نفوذ کرده و شبکه سه‌بعدی مناسبی از سلول‌ها ایجاد شده است. سمیت سلولی، اتصال و تکثیر سلولی و تمایز استخوانی نیز توسط آزمون MTT و با کشت سلول‌های MG-63 بر داربست مورد ارزیابی قرار گرفت. زنده‌مانی سلولی تفاوت معنی‌داری بین نمونه مورد آزمایش و شاهد نشان نداد.

**کلیدواژه‌ها**

داربست کامپوزیتی

ژلاتین

پلی‌اتیلن‌گلیکول

شیشه زیست فعال

روش سطح پاسخ

**اطلاعات مقاله**

دریافت: ۱۴۰۳/۰۸/۰۹

بازنگری: ۱۴۰۳/۰۹/۱۰

پذیرش: ۱۴۰۳/۰۹/۱۰

دسترس آنلاین: ۱۴۰۴/۰۱/۲۳

ISSN: 2588-5316

Online ISSN: 2588-5324

* نویسنده مسئول: bagheri.gita@iau.ac.ir – ORCID: 0000-0002-0435-7037

کپی‌رایت © ۲۰۲۵، نویسندگان . این مقاله به صورت دسترسی آزاد منتشر شده و تحت مجوز بین‌المللی Creative Commons Attribution-NonCommercial 4.0 قرار دارد. بر اساس این مجوز، شما می‌توانید این مطلب را در هر قالب و رسانه‌ای کپی، بازنشر و بازآفرینی کنید و یا آن را ویرایش و بازسازی نمایید، به شرط آنکه نام نویسنده را ذکر کرده و از آن برای مقاصد غیرتجاری استفاده کنید.

## ۱ مقدمه

استخوان کامپوزیتی طبیعی است که حدود ۷۰ درصد آن فاز معدنی بر پایه نمک‌های کلسیم و فسفات است. بخش دیگر آن آلی و عمدتاً از کلاژن نوع I به‌همراه پروتئین‌هایی مانند پروتئوگلیکان‌ها و گلیکوپروتئین‌ها تشکیل شده است. موفقیت در ساخت داربست‌های مورد استفاده برای جایگزینی بافت استخوان تنها در صورتی به‌طور کامل حاصل می‌شود که داربست ساخته‌شده از جهات مختلف نظیر خصوصیات شیمیایی، فیزیکی، زیستی و مکانیکی شبیه به بافت استخوان باشد. تفاوت بافت استخوانی با سایر بافت‌ها در فرایند بازسازی دائمی است، زیرا برخی از قسمت‌های استخوان جذب می‌شوند و برخی دیگر در نتیجه پویایی سلول‌های استئوبلاستیک، استئولیتیک و استئوکلاستیک دفع یا بازسازی می‌شوند [۱].

در سال‌های اخیر، کامپوزیت‌هایی با ریختارها و ترکیبات مختلف برای کمک به درمان آسیب‌های بافتی با هدف بهبود زیبایی و عملکردی اندام‌های آسیب‌دیده طراحی شده‌اند [۴-۲]. به‌طور کلی، این مواد باید زیست‌سازگار و زیست‌تخریب‌پذیر باشند، استحکام مکانیکی قابل مقایسه با بافت میزبان داشته باشند و اجازه فعالیت سلولی در محل کاشت را بدهند [۵]. در این میان پلیمرهای طبیعی زیست‌تخریب‌پذیر به‌دلیل وجود ویژگی‌های قابل‌توجهی مانند زیست‌سازگاری، زیست‌تخریب‌پذیری، غیرسمی بودن و همچنین فراوانی، توجه زیادی را به خود جلب کرده‌اند. در میان پلیمرهای طبیعی، ژلاتین Gelatin (GEL) به‌طور گسترده در صنایع غذایی و دارویی و همچنین مواد مهندسی بافت استفاده می‌شود. ژلاتین توانایی تشکیل هیدروژل در حضور کاتیون‌های دوظرفیتی خاص (مانند $Ca^{2+}$ ، $Sr^{2+}$و $Ba^{2+}$ در ترکیب کم) را دارد. از سوی دیگر، ژلاتین برای به‌دست آوردن پایداری لازم در محیط‌های فیزیولوژیکی نیاز به اتصال عرضی زنجیره‌های خود دارد [۸-۶]. به‌عنوان مثال، پایداری گرمایی ژلاتین بدون اتصال عرضی می‌تواند ساختار را از جامد به ژل تغییر دهد که می‌تواند منجر به اثرات نامطلوب هنگام کاشت در داخل بدن شود. پوشش ژلاتین با پلی‌اتیلن گلیکول Polyethylene Glycol (PEG) می‌تواند تا حدودی محدودیت‌های ژلاتین را برطرف کند. PEG پلیمری مصنوعی است که دارای ساختاری خطی و حلالیت در آب و گروه‌های هیدروکسیل در انتهای زنجیره‌های پلیمری خود است. به‌دلیل سمیت کم، سازگاری با طیف گسترده‌ای از مواد شیمیایی، حلالیت بالا در آب و پذیرش مطلوب توسط بدن انسان، به‌طور گسترده در کاربردهای زیست‌پزشکی استفاده می‌شود. این پلیمر آب‌دوست قابلیت افزایش خواص را در صورت ترکیب با ژلاتین دارد.

برای افزایش خاصیت القایی و رسانایی استخوان در غشاهای قابل جذب، استفاده از شیشه‌های زیست‌فعال Bioglass (BG) به‌عنوان جزء معدنی روشی بسیار مؤثر برای ساخت داربست‌های ترمیم استخوان به‌شمار می‌رود. این مواد موجب اصلاح شکل‌پذیری و استحکام کامپوزیت‌های پلیمری و واکنش‌پذیری بیشتر با بافت میزبان هنگام کاشت کامپوزیت می‌شود [۹]. BG در سال‌های اخیر به‌دلیل مجموعه‌ای از ویژگی‌های چشمگیر از جمله زیست‌فعالی، زیست‌سازگاری، زیست‌تخریب‌پذیری و قابلیت پیوند استخوان برای ارتقای ادغام استخوانی و رسانایی استخوان، بسیار مورد توجه قرار گرفته است. علاوه بر این، BG دارای سمیت زیستی پایینی است که قابلیت آن را برای کاربردهای بازسازی استخوان برجسته‌تر کرده است. در بازسازی استخوان، حضور BG باعث ایجاد پیوندی قوی با بافت‌های سخت و نرم و همچنین بیان ژن در سلول‌های استئوبلاست و افزایش رگ‌زایی می‌شود و به‌دلیل وجود یون‌های فعال زیستی موجب کاهش پاسخ التهابی و تحریک ترشح پروتئین‌ها و فاکتورهای رشد می‌شود. اگرچه BG به‌عنوان گسترش‌دهنده پیوند استخوان استفاده می‌شود، برخی جراحان معتقدند که فقدان اثر ضدباکتریایی هنوز نقطه ضعف آن‌هاست. بنابراین برای رفع این مشکل می‌توان کامپوزیت‌های مصنوعی بر اساس عناصری با ماهیت ضدباکتری ساخت؛ به‌طوری‌که خطر عفونت اولیه را به حداقل برساند. برای این منظور می‌توان از یون‌های روی که دارای خواص ضدمیکروبی و ضدالتهابی و همچنین اثر تحریکی ببرای تشکیل استخوان است، استفاده کرد [۱۰]. روی کوفاکتوری مناسب برای بسیاری از آنزیم‌هاست که موجب تحریک سنتز پروتئین می‌شود که در همانندسازی DNA ضروری است و نقش مهمی در رشد، توسعه و تمایز سلول‌های استخوانی دارد [۱۴-۱۱]. همچنین تحقیقات نشان داده است که بافت استخوانی حاوی حدود ۰/۰۱۲۶- ۰/۰۲۱۷ درصد وزنی عنصر روی است و کمبود روی ممکن است باعث پوکی استخوان در افراد مسن شود [۱۵]. عنصر دیگری که می‌توان برای اصلاح ویژگی داربست از آن استفاده کرد، عنصر منیزیم با خواص ضدباکتریایی است که باعث تکثیر و تمایز سلول‌های بنیادی می‌شود. علاوه بر آن، منیزیم نقش حیاتی در کنترل آپوپتوز سلولی دارد و خواص مکانیکی استخوان تازه تشکیل‌شده را نیز بهبود می‌بخشد [۱۸-۱۶]. علاوه بر آن، BG متشکل از منیزیم، شبکه سیلیس را مختل کرده و در نتیجه رفتار انحلال را بهبود بخشیده و تأثیر قابل‌توجهی بر تمایز استئوبلاست دارد [۱۹].

هدف در این مطالعه ارزیابی تأثیر BG حاوی منیزیم و روی بر هیدروژل ژلاتین پوشش‌داده‌شده با PEG است. ویژگی کلیدی این تحقیق آن است که از عناصر کمیاب ضروری یعنی روی و منیزیم با اثر ثابت‌شده ضدباکتریایی و بهبوددهندگی خواص مکانیکی، استفاده شده‌است. با استفاده از نرم‌افزار Design expert® تأثیر درصد غلظت پلیمرها و شیشه زیست‌فعال بر خواص مکانیکی، فیزیکی و زیستی این داربست کامپوزیتی برای بازسازی بافت استخوانی بررسی شده و در نهایت نمونه بهینه توسط نرم‌افزار مشخص شده است.

## ۲ بخش نظری

### ۲-۱ تهیه شیشه زیست فعال روی- منیزیم

تهیه شیشه زیست‌فعال روی- منیزیم به‌روش سل- ژل انجام شد. در ابتدا، برای رقیق‌سازی محلول اسیدی، محلول ۲ مولار اسید نیتریک: آب مقطر با نسبت حجمی ۱:۶ تهیه و به‌مدت ۱۵ دقیقه هم زده شد. سپس تترااتیل ارتوسیلیکات(Tetraethyl Orthosilicate (TEOS به‌عنوان پیش‌ساز سیلیس به محلول اضافه شد و به‌مدت ۱ ساعت به‌منظور آب‌کافت اسیدی با استفاده

از هم‌زن مغناطیسی هم زده شد. سپس تری‌اتیل فسفات Triethyl phosphate (TEP) به‌عنوان پیش‌ساز فسفات به محلول فوق اضافه شد. نسبت مولی ۱:۱۲ برای محلول TEOS:TEP با آب مقطر انتخاب شد. در مرحله بعد، تتراهیدرات نیترات کلسیم، هگزاهیدرات نیترات منیزیم و تتراهیدرات نیترات روی به محلول به‌دست‌آمده اضافه شد و در دمای ۵۰ درجه سانتی‌گراد هم زده شد تا نمک‌های نیترات حل و محلولی همگن حاصل شود. برای تکمیل فرایند ساخت، نمونه‌های آماده‌شده به‌مدت ۱۰ روز در دمای اتاق مهر و موم شدند تا فرایند ژل‌شدن کامل شود. نمونه‌های به‌دست‌آمده به‌مدت یک روز در دمای ۸۰ و ۱۱۰ درجه سانتی‌گراد خشک شدند. در نهایت، نمونه‌ها آسیاب‌شده و به‌مدت ۴ ساعت در دمای ۸۰۰ درجه سانتی‌گراد برای حذف نیترات حرارت‌دهی شدند. ماده حاصل با استفاده از آسیاب سیاره‌ای، آسیاب و کاملاً پودر شد [۲۰].

### ۲-۲ ساخت داربست کامپوزیتیGel/PEG/ BG

محلول ژلاتین با غلظت ۱۰ درصد وزنی با حل کردن پودر ژلاتین در آب مقطر تهیه شد. سپس پلی‌اتیلن گلیکول با نسبت‌های وزنی مختلف PEG/Gel به محلول ژلاتین اضافه شد. در نهایت BGهای سنتز شده از مرحله قبل نیز با درصدهای وزنی مختلف به محلول اضافه شد (مقادیر وزنی موردنیاز مطابق با جدول ۳ گزارش شده است). کامپوزیت‌های به‌دست‌آمده را در ظرف ریخته، به‌مدت ۲۴ ساعت در یخچال قرار داده شد تا ژل‌های کامپوزیتی تشکیل شود. در نهایت ژل‌های آماده‌شده به‌مدت ۲۴ ساعت در منجمدکننده خشک شدند تا داربست‌های کامپوزیتی متخلخل به‌دست آید.

### ۲-۳ طراحی آزمایش

در این مطالعه، برای مدل‌های عددی و فرایندهای تحلیلی و ارزیابی تأثیر متغیرهای مختلف و انتخاب ترکیب‌های بهینه متغیرها از روش سطح پاسخ Response Surface Methodology (RSM) استفاده شد. در این مطالعه ۲ متغیر مستقل نسبت وزنی PEG/Gel (X1) و درصد وزنی BG (X2) با دو سطح از هر عامل (مقدار بالا و پایین) انتخاب شدند. طراحی آزمایش برای بررسی تأثیر متغیرهای مستقل مختلف مانند X1 و X2 به‌کار گرفته شد.

$$Y = a_0 + a_1X_1 + a_2X_2 + a_{11}{X_1}^2 + a_{22}{X_2}^2 + a_{12}X_1X_2 \qquad (۱)$$

که در آن Y پارامتر وابسته است و $a_1$، $a_2$، $a_{11}$، $a_{22}$ و $a_{12}$ ضرایب رگرسیون محاسبه‌شده از پارامتر تجربی مشاهده‌شده Y هستند. سطوح و ماتریس طراحی در جدول ۱ نشان داده شده است. در مجموع ۱۳ اجرای آزمایشی تولید شد و متغیرهای مستقل انتخاب شدند. فرمول‌ها در سه نسخه تهیه و سپس برای بررسی خصوصیات هر یک از نمونه‌ها، پاسخ‌ها محاسبه و اندازه‌گیری شد.

**جدول ۱** سطوح متغیرها

**Table 1** Levels of variables

| Levels of variables | Input variables |
|---|---|
| 0.1-0.5 | X1: PEG/Gelatin (w/w) |
| 10-50% | X2=BG (weight %) |

نرم‌افزار Design expert® برای غربالگری عوامل استفاده شد. زمانی که مقدار p- به‌دست آمده کوچکتر از ۰/۰۵ بود، نتایج از نظر آماری معنی‌دار در نظر گرفته شد. اعتبار آماری چندجمله‌ای ها بر اساس ارائه تحلیل واریانس (ANOVA) در نرم‌افزار Design expert® به روش Box-Behnken انجام شد [۲۱]. پس از آن، امکان‌سنجی و جستجوی شبکه برای تعیین محل ترکیب فرمول‌بندی بهینه انجام شد. نمودارهای سه‌بعدی هریک از پاسخ‌ها بر حسب متغیرها و پس از توسعه معادلات چندجمله‌ای برای پاسخ‌های توسط نرم‌افزار رسم شد و در نهایت هر یک از پاسخ‌ها با متغیرهای مستقل X1 و X2 بهترین فرمول‌بندی با هر دو نمودار بهینه‌ساز پاسخ بهینه شد، عناوین پاسخ‌ها در جدول ۲ و طراحی آزمایش بر اساس متغیرهای ورودی در جدول ۳ آورده شده است.

### ۲-۴ آزمون خواص مکانیکی

در مطالعه حاضر، برای آزمون کشش، از دستگاه آزمون دینامیکی Zwick/Roell HCT 400/25 آلمان با نرخ جابجایی ۳ میلی‌متر بر دقیقه استفاده شد. هر نمونه در محلول ۱٪ گلوتارآلدهید قرار داده شد و وقتی رنگ نمونه‌ها به نارنجی کم‌رنگ تغییر یافت، از محلول خارج و خشک شدند. پس از خشک‌شدن نمونه‌ها، استحکام نهایی، ازدیاد طول در شکست و مدول یانگ ماده محاسبه گردید. استحکام کششی (MPa) بر اساس حداکثر تنش با استفاده از معادله ۲ محاسبه شد [۲۲].

$$\boldsymbol{\sigma = \frac{F}{A}} \qquad (۲)$$

که در آن F نیروی شکست (N) در حداکثر بار، A سطح مقطع اولیه ($m^2$) نمونه داربست بود. ازدیاد طول در شکست (٪) توسط معادله ۳ محاسبه شد.

$$\boldsymbol{Elongation\ at\ break = \frac{\frac{F}{A}}{\frac{\Delta L}{L_0}}} \qquad (۳)$$

که در آن $\Delta L$ تغییر در مقدار طول جسم و $L_0$ مقدار طول اولیه است. مدول یانگ یا مدول کشسان (MPa) از شیب اولیه منحنی‌های تنش-کرنش در قسمت خطی آن محاسبه شد (معادله ۴). مدول یانگ به نسبت تنش به کرنش مواد جامد خطی در پایین‌تر از استحکام تسلیم گفته می‌شود که در این حالت قانون هوک صادق بوده و ضریب کشسان ثابت است.

$$E = \frac{\sigma}{\varepsilon} \qquad (۴)$$

**جدول ۲** سطوح پاسخ‌ها
**Table 2** Levels of responses

| **Responses** | **Young's Modulus** | **Tensile Strength** | **Swelling** | **Moisture Uptake** | **Elongation at break** |
|---|---|---|---|---|---|
| Unit | **(MPa)** | **(MPa)** | (%) | (%) | (%) |

**جدول ۳** طراحی آزمایش
**Table 3** Experimental design

| **RUN** | **X1: PEG/Gelatin (w/w)** | **X2=Bioglass (weight %)** | **Young Modulus (MPa)** | **Tensile Strength (MPa)** | **Swelling (%)** | **Moisture Uptake (%)** | **Elongation at Break (%)** |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| **1** | 0.1 | 10 | 20.94 | 1.411 | 15.45 | 4.1 | 13.45 |
| **2** | 0.3 | 30 | 20.71 | 1.087 | 39.21 | 2.7 | 18.95 |
| **3** | 0.3 | 1.71573 | 33.45 | 1.201 | 32.05 | 4.00 | 19.26 |
| **4** | 0.3 | 30 | 22.72 | 1.819 | 37.25 | 4.5 | 24.56 |
| **5** | 0.3 | 30 | 28.17 | 2.784 | 35.45 | 3.9 | 19.86 |
| **6** | 0.3 | 30 | 30.85 | 2.044 | 32.43 | 1.5 | 21.56 |
| **7** | 0.582843 | 30 | 33.56 | 2.238 | 40.02 | 2.3 | 12.65 |
| **8** | 0.3 | 58.2843 | 24.24 | 2.259 | 28.97 | 3.7 | 21.05 |
| **9** | 0.5 | 50 | 46.67 | 3.235 | 44.32 | 4.4 | 16.35 |
| **10** | 0.3 | 30 | 32.78 | 1.215 | 33.46 | 3.5 | 20.56 |
| **11** | 0.1 | 50 | 40.69 | 3.463 | 23.74 | 3.2 | 19.86 |
| **12** | 0.5 | 10 | 42.49 | 3.295 | 41.25 | 3.2 | 28.65 |
| **13** | 0.0171573 | 30 | 38.93 | 3.469 | 27.56 | 3.02 | 12.45 |

### ۲-۵ آزمون تورم، فرسایش و جذب رطوبت

به‌منظور ارزیابی درصد تورم، فرسایش داربست‌های ساخته‌شده، محلول بافر فسفات با pH 7.4 (مایع شبیه‌سازی‌شده بدن) تهیه شد. میزان تورم و فرسایش، بر حسب درصد (٪)، با وزن شروع داربست ($W_0$) اندازه‌گیری شد و به‌مدت ۳۰ دقیقه در بافر فسفات با pH 7.4 غوطه‌ور شد. پس از آن، داربست دوباره وزن شد ($W_s$) و در دمای ۲ ± ۶۰ درجه سانتی‌گراد خشک شد، سپس داربست خشک دوباره وزن شد ($W_d$). درصد تورم و درصد فرسایش به‌ترتیب با معادله‌های ۵ و ۶ محاسبه شدند.

$$Swelling\% = \frac{(W_S - W_0)}{W_0} * 100 \quad (۵)$$

$$Erosion\% = \frac{(W_0 - W_d)}{W_0} * 100 \quad (۶)$$

درصد رطوبت با افزایش وزن داربست متناسب است که پس از جذب رطوبت در شرایط مختلف اندازه‌گیری می‌شود. داربست به مدت ۲ هفته در خشک‌کن سیلیکاژل قرار داده شد و سپس وزن آن ($W_0$) اندازه‌گیری شد و با وزن داربست که در رطوبت تنظیم شده با کلریدسدیم اشباع (۷۵ درصد RH) به‌مدت ۸ هفته قرار داشت مقایسه شد. درصد جذب رطوبت (Y6) با (معادله ۷) محاسبه شد.

$$Moisture\ Absorption\ \% = \frac{(W_u - W_0)}{W_0} * 100 \quad (۷)$$

### ۲-۶ بهینه‌سازی داربست‌های کامپوزیتی Gel/PEG/BG توسط طراحی آزمایش

بر اساس تحلیل عددی توسط نرم‌افزار، بهترین نتایج با استفاده از روش حل Box-Behnken برای بهینه سازی به‌دست آمد. برای هر یک از پاسخ‌ها بازه بهینه تعریف و بر اساس آن توسط نرم‌افزار، داربست بهینه تعیین شد.

### ۲-۷ بررسی خصوصیات فیزیکی شیمیایی

#### ۲-۷-۱ طیف‌سنجی فروسرخ تبدیل فوریه Fourier Transform Infrared Spectroscopy (FTIR)داربست کامپوزیتی Gel/PEG/BG

در این تحقیق، برای انجام تحلیل نمونه‌ها، طیف FTIR شیشه زیست‌فعال و داربست‌های کامپوزیتی Gel/PEG/BG با دستگاه طیف‌سنجی FTIR مدل USA FTIR NEXUS 670 تعیین شد. طیف FTIR از عدد موجی $cm^{-1}$ ۴۰۰۰-۴۰۰ ثبت شد و در حالت جذب گرفته شد.

#### ۲-۷-۲ پراش پرتوی ایکس (XRD) BG

در این مطالعه، ساختار نمونه‌ها با استفاده از دستگاه پراش پرتوی ایکس، XRD، مدل INEL Equinox3000 که در ولتاژ ۴۰ کیلوولت و جریان ۳۰ میلی‌آمپر کار می‌کند، بررسی و انجام شد. داربست‌های کامپوزیتی در محدوده زاویه 2θ برابر با ۰ تا ۱۰۰ درجه تحلیل شدند.

#### ۲-۷-۳ آزمون میکروسکوپ الکترونی پویشی (SEM) داربست کامپوزیتی Gel/PEG/BG

برای بررسی اندازه و ریختار داربست از میکروسکوپ الکترونی پویشی ( LEO 1430 VP، ساخت کشور آلمان) استفاده شد. در این دستگاه یک دسته پرتو الکترونی به نمونه تابیده می‌شود. منبع الکترونی از نوع انتشار ترمودینامیکی رشته تنگستنی است. معمولاً الکترون‌ها بین ۱ تا ۳۰ keV شتاب می‌یابند. سپس با دو یا سه عدسی متمرکز، پرتوی الکترونی را تا حدی کوچک می‌کنند تا موقع برخورد با نمونه، قطر آن حدوداً بین ۱ تا ۲ نانومتر شود.

#### ۲-۷-۴ تحلیل زاویه تماس داربست کامپوزیتی Gel/PEG/BG

خاصیت ترشوندگی تمایل سیال به پخش شدن روی سطح جامد یا چسبیدن به آن در حضور دیگر سیالات امتزاج‌ناپذیر با آن است. تمایل سیال به پخش‌شدن روی سطح جامد، خصوصیت ترشوندگی سیال را نسبت به سطح جامد مشخص می‌کند. معمولاً این تمایل به پخش‌شدن با اندازه‌گیری زاویه سطح تماس جامد- مایع بیان می‌شود که زاویه تماس نامیده می‌شود.

#### ۲-۷-۵ ارزیابی رفتار زیستی داربست کامپوزیتی Gel/PEG/BG

آزمون (3-(4,5dimethylthiazol-2-yl)-2,5 -diphenyltetrazolium bromide) (MTT) سند رنگ‌سنجی برای اندازه‌گیری میزان فعالیت آنزیم سوکسینات دهیدروژناز میتوکندری‌ایی است که به‌عنوان معیاری برای سنجش زنده بودن سلول‌ها استفاده می شود. MTT نمک زرد رنگ ترازولیوم محلول در آب است که توسط سوکینات دهیدروژناز میتوکندری‌های سلول‌های زنده و فعال احیا و به ترکیب رنگی فورمازان نامحلول تبدیل می‌شود که این رنگ در حلال آلی حل شده، شدت رنگ در طول موج ۵۷۰ نانومتر متناسب با میزان سلول‌های زنده است. در این تحقیق، مطالعه سمیت سلولی نمونه‌ها با روش MTT برای رده‌های سلولی MG-63 انجام شد. ابتدا سلول‌ها با تراکم ۱×۱۰۴ سلول در هر چاهک کاشته شدند و به‌مدت ۳ و ۷ روز نمونه‌ها انکوبه شدند. سپس از انکوباتور خارج شدند و محیط حاوی ۱۰ درصد محلول MTT به آن اضافه شد. سپس نمونه ها در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد به‌مدت ۴ ساعت انکوبه شدند. در ادامه محیط حذف شد و بلورهای‌های فورمازان تولیدشده توسط فعالیت آنزیم میتوکندری با ۱۰۰ میکرولیتر بافر انحلال‌سازی (Triton-X 100, 0.1 HCl و ایزوپروپانول) حل شدند. میزان جذب این محلول به‌وسیله اسپکتروفتومتری در طول موج ۵۷۰ نانومتر با صفحه‌خوان اندازه‌گیری شد.

## ۳ نتایج و بحث

### ۳-۱ ارزیابی خواص مکانیکی

#### ۳-۱-۱ استحکام کششی

بهینه‌سازی، معادله ۸ را برای استحکام کششی پیشنهاد می‌کند. مدل F-value 8.86 نشان می‌دهد که مدل در p-value <0.05 معنی‌دار بوده است.

بنابراین از این مدل برای حرکت در فضای طراحی استفاده شد. نمودارهای سطح پاسخ (شکل 1a) اثرات متغیرهای مستقل مختلف را بر استحکام کششی ($Y_1$) نشان می‌دهد. همان‌طور که نشان داده شده، استحکام کششی با افزایش نسبت PEG/GEL ابتدا کاهش و سپس افزایش یافته است. همچنین با افزایش درصد وزنی BG مقدار استحکام کششی افزایش یافته است (p-value = 0.016). بیشینه مقدار تنش ۳/۴۶۹ MPa است و با توجه به نمودار حاصل می‌توان مشاهده نمود که تأثیر متغیر درصد وزنی BG نسبت به متغیر دیگر بر میزان استحکام کششی ایجادشده بیشتر و استحکام کششی به‌دلیل برهم‌کنش خوب بین داربست پلیمری و BG و پراکندگی مناسب BG در ماتریس پلیمری به‌طور چشمگیری افزایش یافته است.

مدل پیش‌بینی شده برای استحکام کششی در معادله ۸ آورده شده است:

$$Y_1 = 59.03 + 0.66X_1 + 15.197X_2 + 6.78X_1X_2 + 7.68X_1^2 - 16.07X_2^2 \quad (۸)$$

$Y_1$ پاسخ پیش‌بینی‌شده برای استحکام کششی و $X_1$ و $X_2$ به‌ترتیب مقدار کدگذاری‌شده برای نسبت وزنی PEG/Gel و درصد وزنی BG هستند. رگرسیون داده‌ها نشان داد که ضرایب خطی عوامل مستقل تأثیر معنی‌داری بر پاسخ‌ها داشتند. ضرایب منفی نشان‌دهنده اثر نامطلوب و ضرایب مثبت نشان‌دهنده اثر مطلوب بر روی پاسخ است.

### ۳-۱-۲ مدول یانگ

با افزایش نسبت وزن PEG/Gel و درصد وزنی BG مقدار مدول یانگ افزایش یافته است. بیشینه مقدار مدول یانگ ۴۶/۶۷ مگاپاسکال است که مربوط به داربستی است که نسبت PEG/GEL در بیشترین مقدار خود و همچنین درصد BG نیز در بیشینه مقدار خود یعنی ۵۰٪ است. در شکل 1b، تأثیر متقابل این دو عامل بر مقدار مدول یانگ به‌صورت هم‌افزایی بوده‌است. مدل پیش‌بینی‌شده برای مدول یانگ در معادله ۹ آورده شده است:

$$Y_2 = 5.49 + 0.2043X_1 + 1.16X_2 + 0.295X_1X_2 - 0.1421X_1^2 - 0.7X_2^2 \quad (۹)$$

$Y_2$ پاسخ پیش‌بینی‌شده برای مدول یانگ و $X_1$ و $X_2$ به‌ترتیب مقدار کدگذاری‌شده برای نسبت وزنی PEG/Gel و درصد وزنی BG هستند. رگرسیون داده‌ها نشان داد که ضریب خطی $X_2$ تأثیر بیشتری بر پاسخ داشته است. ضرایب منفی نشان‌دهنده اثر نامطلوب و ضرایب مثبت نشان‌دهنده اثر مطلوب بر روی پاسخ است.

### ۳-۱-۳ ازدیاد طول در شکست

با توجه به شکل ۲ می‌توان مشاهده می‌شود که با افزایش نسبت وزن PEG/GEL ازدیاد طول در شکست داربست افزایش یافته است. با افزایش درصد وزنی BG، داربست‌ها به‌دلیل برهم‌کنش بین گروه‌های BG و گروه‌های هیدروکسیل PEG، انعطاف‌پذیری خود را از دست داده، در نتیجه حرکت آزاد زنجیره‌های PEG محدود شده و درصد ازدیاد طول در شکست کاهش یافته است. مدل پیش‌بینی‌شده برای بیان ازدیاد طول در شکست در معادله ۱۰ آورده شده است:

$$Y_3 = 3.16 + 0.2789X_1 - 0.0065X_2 - 0.342X_1X_2 - 0.6439X_1^2 - 0.5579X_2^2 \quad (۱۰)$$

$Y_3$ پاسخ پیش‌بینی‌شده برای ازدیاد طول در شکست و $X_1$ و $X_2$ به‌ترتیب مقدار کدگذاری‌شده برای نسبت وزنی PEG/Gel و درصد وزنی BG هستند. رگرسیون داده‌ها نشان داد که ضریب خطی $X_2$ منفی و ضریب $X_1$ تأثیر مثبت بر روی پاسخ داشته است.

### ۳-۲ درصد تورم

در شکل 3a ملاحظه می‌شود که با افزایش نسبت وزن PEG/Gel و همچنین درصد وزنی BG مقدار تورم داربست افزایش می‌یابد. بیشینه درصد تورم ۴۴/۳۲ ٪ و مربوط به داربستی است که نسبت PEG/Gel در بیشترین مقدار خود است. با توجه به اینکه PEG و ژلاتین هر دو آب‌دوست هستند، با افزایش نسبت، میزان جذب آب و تورم داربست افزایش یافته است.

مدل پیش‌بینی‌شده برای درصد تورم در معادله ۱۱ آورده شده است:

$$Y4 = 21.58 + 6.31X_1 + 1.65X_2 - 6.035X_1X_2 \quad (۱۱)$$

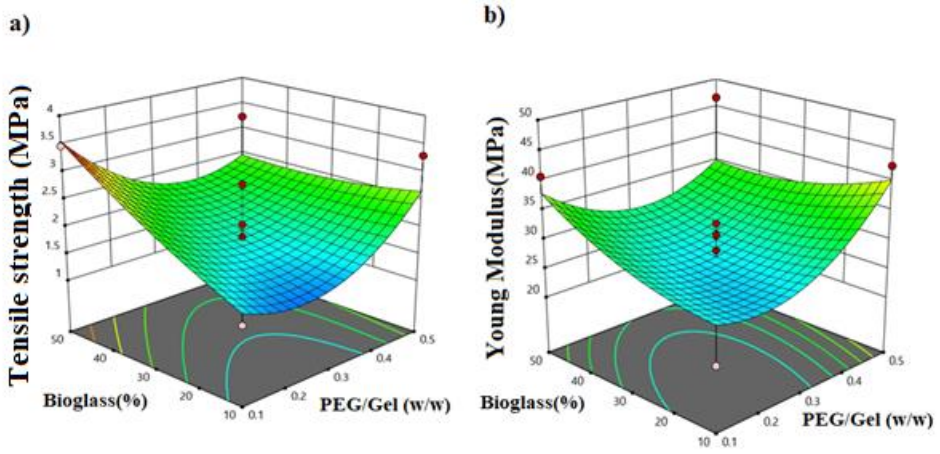
$Y_4$ پاسخ پیش‌بینی‌شده برای درصد تورم و $X_1$ و $X_2$ به‌ترتیب مقدار کدگذاری‌شده برای نسبت وزنی PEG/Gel و درصد وزنی BG هستند. رگرسیون داده‌ها نشان داد که ضریب خطی $X_1$ تأثیر بیشتری بر پاسخ داشته است. ضرایب منفی نشان‌دهنده اثر نامطلوب و ضرایب مثبت نشان‌دهنده اثر مطلوب بر روی پاسخ است.

### ۳-۲-۱ ارزیابی درصد جذب رطوبت

در شکل 3b مشاهده می‌شود که با افزایش درصد BG، درصد جذب رطوبت کاهش می‌یابد و بیشینه آن در کمینه درصد BG یعنی در ۱۰٪ است. این مسئله را می‌توان به افزایش درصد بلورینگی داربست ارتباط داد. با افزایش نسبت وزنی PEG/Gel ابتدا درصد جذب رطوبت افزایش و سپس کاهش می‌یابد و مقدار بیشینه درصد جذب رطوبت در مقدار متوسط PEG/Gel است. در محدوده مقادیر تعیین‌شده برای هر دو عامل، اثر دو عامل بر درصد رطوبت حالت متقابل داشته و اثر همدیگر را خنثی می‌کنند.

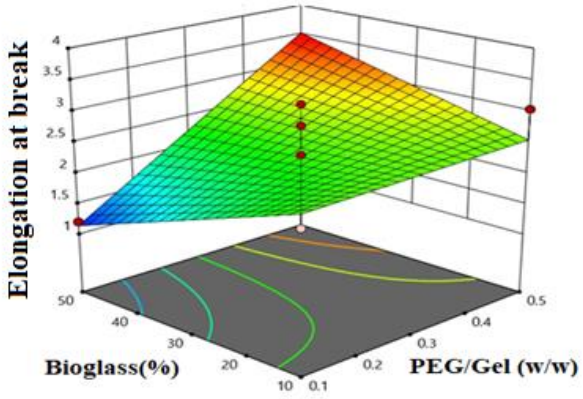
$$Y_5 = 3.98 + 0.1862X_1 - 0.485X_2 + 0.725X_1X_2 - 0.815X_1^2 - 0.04X_2^2 \quad (۱۲)$$

Y5 پاسخ پیش‌بینی‌شده برای درصد جذب رطوبت و $X_1$ و $X_2$ به‌ترتیب مقدار کدگذاری‌شده برای نسبت وزنی PEG/Gel و درصد وزنی BG هستند. رگرسیون داده‌ها نشان داد که ضریب خطی $X_2$ منفی و ضریب $X_1$ تأثیر مثبت بر روی پاسخ داشته است.



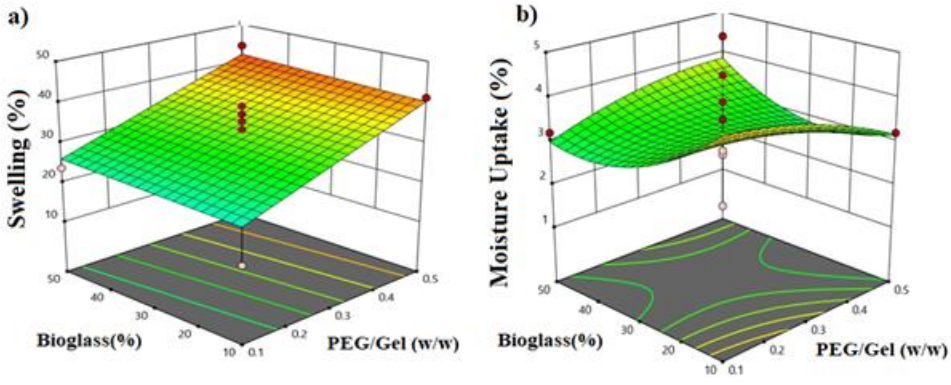

**شکل ۱** نمودار سطح پاسخ الف) استحکام کششی ب) مدول یانگ بر حسب PEG/Gel و درصد وزنیBG

**Figure 1** Response surface graph of: a) Tensile Strength, b) Young's Modulus versus PEG/Gel weight ratio and BG weight percent, respectively




**شکل ۲** نمودار سطح پاسخ ازدیاد طول شکست بر حسب PEG/GEL و درصد وزنی BG

**Figure 2** Response surface plot of elongation at break versus PEG/GEL weight ratio and BG weight percent




**شکل ۳** نمودار سطح پاسخ الف) درصد تورم ب) درصد جذب رطوبت بر حسب نسبت وزن PEG/Gel و درصد وزنیBG

**Figure 3** Response surface graph of: a) Swelling percentage b) Moisture Uptake (%) versus PEG/Gel weight ratio and BG weight percent

### ۳-۲-۲ ارزیابی درصد فرسایش

با توجه به شکل (۴) می‌توان مشاهده کرد که با افزایش نسبت وزنی PEG/Gel و همچنین درصد وزنی BG درصد فرسایش افزایش می‌یابد، اما میزان تأثیرگذاری نسبت وزنی PEG/Gel بر درصد فرسایش بیشتر از مقدار درصد وزنی BG است.

$$Y_6 = 33.22 + 2.44X_1 + 1.08X_2 - 1.43X_1X_2 - 4.76X_1^2 - 6.94X_2^2 \quad (۱۳)$$

$Y_6$ پاسخ پیش‌بینی‌شده برای درصد فرسایش و $X_1$ و $X_2$ به‌ترتیب مقدار کدگذاری‌شده برای نسبت وزنی PEG/Gel و درصد وزنی BG هستند. رگرسیون داده‌ها نشان داد که ضریب خطی $X_1$ تأثیر بیشتری بر پاسخ داشته است. ضرایب منفی نشان‌دهنده اثر نامطلوب و ضرایب مثبت نشان‌دهنده اثر مطلوب بر روی پاسخ است.

### ۳-۳ بهینه‌سازی داربست‌های کامپوزیتی Gel/PEG/BG

در جدول ۴ بهترین مدل‌های پیش‌بینی‌شده و سطح بهینه برای هر یک از پاسخ‌ها به همراه مقادیر P و F آورده شده است و با توجه به آنکه خطای پیش‌بینی تخمین‌زده‌شده کمتر از ۱۰ درصد بوده، اعتبار و پیش‌بینی مدل توسعه یافته تأیید شد. در جدول ۵ شرایط داربست بهینه بر اساس سطح بهینه تعریف‌شده، آورده شده است.

### ۳-۴ ارزیابی طیف فروسرخ BG با استفاده از آزمون FTIR

با توجه به آزمون FTIR در شکل 5a، ارتعاش کششی پیوند نامتقارن Si-O-Si در ناحیه ۱۰۹۷ $cm^{-1}$ و قله ایجادشده در ناحیه ۷۹۵ $cm^{-1}$ به ارتعاش کششی متقارن Si-O-Si نسبت داده می‌شود. همچنین، قله ارتعاشی در عدد موجی ۴۸۳ $cm^{-1}$ به‌دلیل حالت ارتعاشی خمش Si-O-Si است که نشان می‌دهد نمونه پودر شیشه زیست‌فعال از شبکه Si-O-Si تشکیل شده است. طیف FTIR شامل قله در حدود ۹۵۶ $cm^{-1}$ است که به ارتعاش کششی پیوندهای Si-OH نسبت داده می‌شود. قله کوچکی در ۲۳۷۰ $cm^{-1}$ به جذب $CO_2$ توسط اتمسفر مربوط است. قله پهن در ناحیه ۳۴۴۴ $cm^{-1}$ به گروه هیدروکسیل ساختار شیشه زیست فعال اختصاص دارد [۲۳].

### ۳-۵ ارزیابی طیف فروسرخ داربست‌های کامپوزیتی Gel/PEG/BG

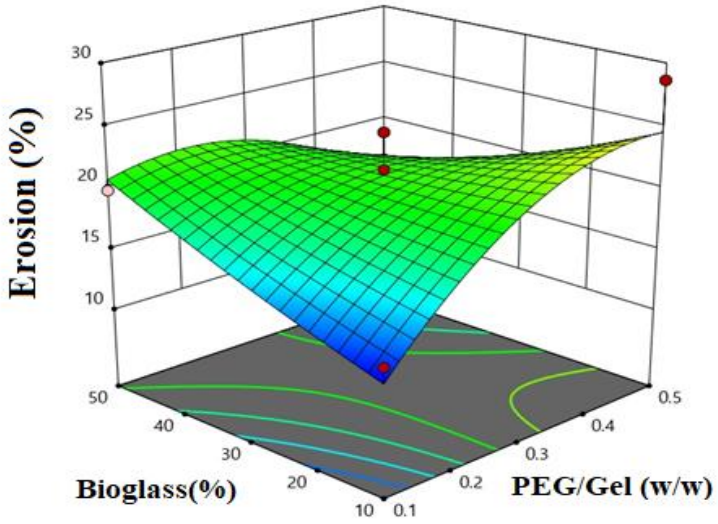
تحلیل طیف FTIR سه نمونه با کدهای (S1) PEG/Gel:10, BG:50%، (S2) PEG/Gel:30, BG:30%، (S3) PEG/Gel:50, BG:10% انجام شد (شکل 5b). همان‌طور که مشاهده می‌شود، قله پهن در ناحیه ۳۴۴۴ $cm^{-1}$ تا ۳۴۲۱ به گروه هیدروکسیل ساختار BG مرتبط است. در این حالت، قله در ناحیه ۲۵۷۳ و ۲۸۷۴ $cm^{-1}$ نشان‌دهنده گروه‌های متیل در ساختار تهیه-شده است. ارتعاش کششی پیوند نامتقارن Si-O-Si در ناحیه ۱۰۸۸، ۱۰۹۸ و ۱۱۹۰ $cm^{-1}$ است. همچنین، قله ارتعاشی در عدد موجی ۶۱۱ و ۶۱۴ $cm^{-1}$ مربوط به ارتعاش خمش Si-O-Si است. قله در ناحیه ۱۵۵۷، ۱۶۶۰ و ۱۶۵۴ $cm^{-1}$ نشان‌دهنده پیوند C=O-O ژلاتین و قله در نزدیکی ۱۶۵۷ $cm^{-1}$ مربوط به آمید نوع I و قله در نزدیکی ۱۳۶۵ و ۱۲۴۰ $cm^{-1}$ به‌ترتیب مربوط به پیوند آمید نوعII ($NH_2$) و نوع III است. پیوند OH در ژلاتین خالص در محدوده ۳۴۲۰ $cm^{-1}$ بوده که با تشکیل پیوندهای هیدروژنی در داربست از شدت آن‌ها کاسته شده و در منطقه‌ای از عدد موجی ۳۴۲۱ تا ۳۳۴۴ $cm^{-1}$ گسترده شده است [۲۴].

### ۳-۶ ارزیابی پراش پرتوی ایکس (XRD) پودر شیشه زیست‌فعال

نتایج XRD برای پودر شیشه زیست فعال، حالت آمورف را نشان داد که نشان‌دهنده اختلال داخلی و ماهیت شیشه‌ای است (شکل ۶). هیچ الگوی پراش مشخصی که بیانگر ساختار بلوری نمونه شیشه‌ای باشد، مشاهده نشد.

### ۳-۷ ارزیابی ریختار داربست‌های کامپوزیتی Gel/PEG/BG با استفاده از میکروسکوپ الکترونی پویشی (SEM)

برای بررسی یکنواختی و خصوصیات فیزیکی و ریختار، از میکروسکوپ الکترونی استفاده شد. تصاویر سه نمونه با کدهای PEG/Gel:10, BG:50% (S1)، PEG/Gel:30, BG:30% (S2) و PEG/Gel:50, BG:10% (S3) در شکل 7a آورده شده است. برای برهم‌کنش سلول-ماتریس، از انواع مختلفی از سلول‌ها مانند IMR-32، $C_2C_{12}$ و Cos-7 استفاده شد و اندازه این سلول‌ها تقریباً کمتر از اندازه منافذ داربست است. تصاویر SEM بیانگر آن است که سلول‌های رشدیافته روی داربست به خوبی در میان داربست‌ها نفوذ کرده و شبکه سه‌بعدی مناسبی از سلول‌ها ایجاد شده است. شبکه سلولی ایجادشده بیانگر حفظ ریختار سلول طی فرایند کاشت است و نقاط سفید موجود در تصاویر میکروسکوپی مربوط به سلول است که به داربست به خوبی چسبیده‌اند. توزیع یکنواخت پلیمر در داربست‌ها با کمترین کلوخگی مشاهده شد. بنابراین بدون هیچ محدودیتی مهاجرت، چسبندگی و تکثیر سلول‌ها روی این ماتریس‌ها صورت می‌گیرد. عکس‌های دیجیتالی نیز در شکل 7b آورده شده است. افزایش غلظت پلیمر حین سنتز داربست همچنین باعث افزایش سفتی و شکنندگی آن بسته به پلیمر مورد استفاده می‌شود. مشاهده شد که داربست‌هایی که غلظت ژلاتین بیشتری دارند، ماهیت اسفنجی و کشسانی بیشتری از خود نشان می‌دهند. با افزایش غلظت ژلاتین، مقدار آب متصل به پلیمر نیز افزایش می‌یابد که باعث افزایش انعطاف‌پذیری و کشسانی داربست‌ها می‌شود. رفتار موضعی سلول‌ها و بافت نیز تحت تأثیر خواص مکانیکی است که به موفقیت کاشتینه‌های زیست مواد و مهندسی بافت کمک می‌کند.




**شکل ۴** نمودار سطح پاسخ درصد فرسایش بر حسب نسبت وزنی PEG/Gel و درصد وزنی BG

**Figure 4** Response surface graph of erosion percentage versus PEG/Gel weight ratio and BG weight percent

**جدول ۴** ویژگی‌های مدل‌های متناسب با پاسخ‌ها

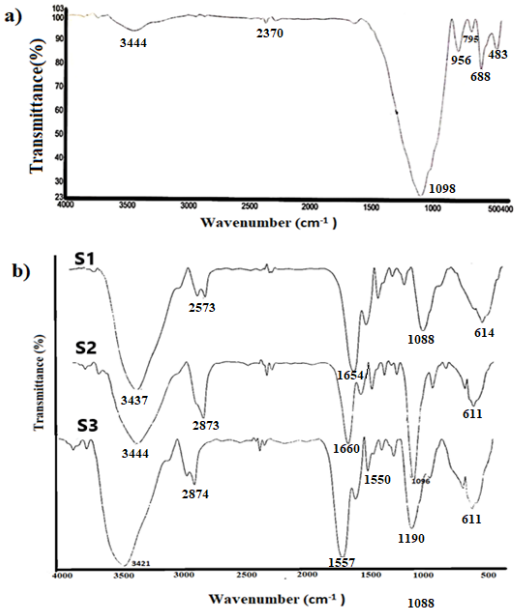
**Table 4** Characteristics of response-fit models

| Responses | Optimal level | Predicted model | P and F Values |
|---|---|---|---|
| **Y1 = Young modulus (MPa)** | Maximize | Quadratic | 0.017 - 5.56 |
| **Y2 = Tensile strength (MPa)** | Maximize | Quadratic | 0.0149 - 5.83 |
| **Y3 = Swelling (%)** | Maximize | 2FI | 0.0015 - 12.56 |
| **Y4 = Moisture Uptake (%)** | Maximize | Quadratic | 0.0124 - 5.89 |
| **Y5 = Erosion (%)** | Minimize | Quadratic | 0.0248 - 4.365 |
| **Y6 = Elongation of Break (%)** | Maximize | Quadratic | 0.00254 - 6.88 |

**جدول ۵** شرایط داربست کامپوزیتی بهینه

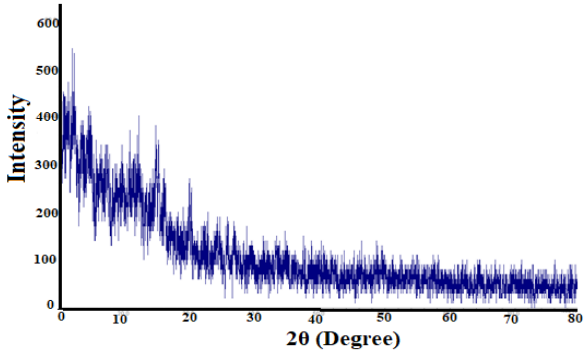
**Table 5** Optimum composite scaffold conditions

| $X_1$ PEG/Gel (w/w) | $X_2$ BG (Weight %) | $Y_1$ Young's Modulus (MPa) | Y2 Tensile Strength (MPa) | Y3 (٪) Swelling | Y4 Moisture Uptake (٪) | Y5 Erosion (%) | Y6 Elongation (٪) at Break |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| 0.555 | 30 | 59.03 | 5.488 | 21.577 | 3.98 | 33.224 | 3.1574 |



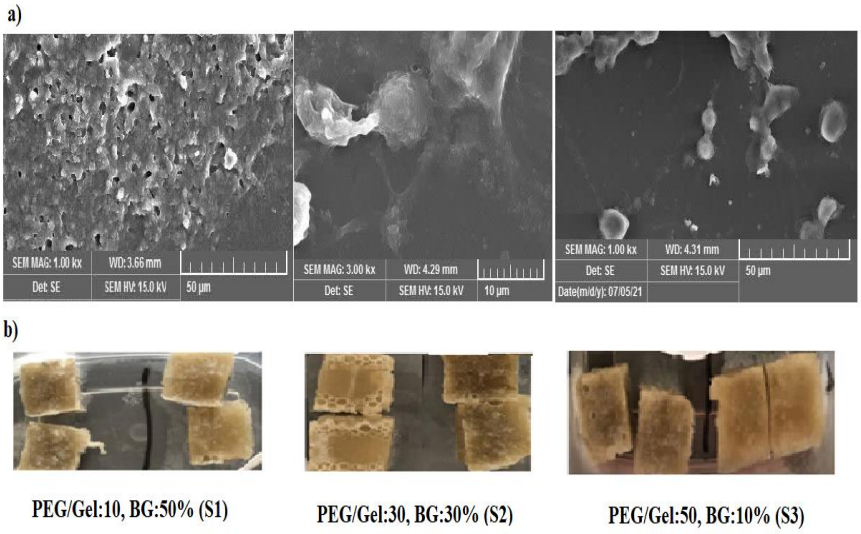

**شکل ۵** طیف FTIR مربوط به الف) BG و ب) داربست‌های PEG/Gel:10, BG:50% (S1)، PEG/Gel:30, BG:30% (S2) و PEG/Gel:50, BG:10% (S3)

**Figure 5** FTIR spectrum of a) BG and b) scaffolds PEG/Gel:10, BG:50% (S1), PEG/Gel:30, BG:30% (S2), and PEG/Gel:50, BG:10% (S3)




**شکل ۶** الگوی XRD پودر شیشه زیست‌فعال

**Figure** 6 XRD pattern of bioactive glass powder




**شکل ۷** الف) تصاویر SEM و ب) تصاویر دیجیتالی برای سه داربست S1, S2, S3

**Figure 7** a) SEM micrographs and b) digital images for S1, S2, and S3 scaffolds

### ۳-۸ ارزیابی خواص مکانیکی داربست‌های کامپوزیتی Gel/PEG/BG

نتایج حاصل از آزمون استحکام کششی برای سه نمونه با کدهای PEG/Gel:10, BG:50% (S1)، PEG/Gel:30 BG:30% (S2) و PEG/Gel:50, BG:10% (S3) در شکل ۸ آورده شده است.

مدول یانگ یا شیب نمودار، از قسمت خطی نمودار تنش- کرنش حاصل می‌شود. قسمت خطی نمودار تنش- کرنش نشان‌دهنده ناحیه کشسان و قسمت غیرخطی ناحیه پلاستیک است. بیشینه استحکام کششی نقطه‌ای است که نمونه بیشترین تنش را متحمل می‌شود و پارگی برای نمونه اتفاق می‌افتد. ویژگی تقویت‌کنندگی فاز پراکنده در فاز زمینه زمانی رخ می‌دهد که این دو فاز اتصال مستحکمی با یکدیگر داشته باشند؛ در غیر این صورت، نه‌تنها تقویت‌کننده نخواهد بود، بلکه به‌عنوان عاملی برای ایجاد ترک و در نتیجه کاهش استحکام مکانیکی عمل خواهد کرد. بنابراین تشکیل پیوندی بین شیشه‌های زیست‌فعال با زمینه ژلاتینی سبب بهبود خواص مکانیکی داربست کامپوزیتی شده است.

### ۳-۹ ارزیابی زاویه تماس داربست‌های کامپوزیتی Gel/PEG/BG

از اهداف اصلی ساخت داربست، رشد و چسبندگی سلول‌ها برای ترمیم یا جایگزینی بافت آسیب‌دیده است. به همین دلیل، بررسی میزان آب‌دوستی و آب‌گریزی داربست‌ها برای پیش‌بینی وضعیت سلول‌ها هنگام قرار گرفتن در محیط کشت الزامی است. بدین منظور، با اندازه‌گیری زاویه تماس قطره آب با سطح داربست می‌توان به آب‌دوست یا آب‌گریز بودن آن پی برد. اگر زاویه تماس بین قطره آب و سطح داربست بین ۱ تا ۵۱ درجه باشد، سطح داربست آب‌دوست است. هرچه زاویه به صفر نزدیکتر باشد، سطح آب‌دوست‌تر است و این یعنی میزان ترشوندگی داربست در تماس با آب بیشتر است. در مقابل، اگر زاویه تماس قطره آب با سطح داربست بین ۵۱ تا 180 درجه باشد، داربست آب‌گریز است. هرچه این زاویه به 180 درجه نزدیک‌تر باشد، داربست آب‌گریزتر است. تحلیل زاویه تماس سه نمونه PEG/Gel:10, BG:50% (S1)، PEG/Gel:30, BG:30% (S2) و PEG/Gel:50, BG:10% (S3) انجام شد (شکل ۹).

عکس‌برداری حین جذب آب در ساختار از هر سه نمونه با فواصل زمانی مختلف انجام شد. این تحلیل برای هر نمونه ۳ مرتبه تکرار شده است. با توجه به نتایج، هر چه نمونه در مدت زمان کوتاه‌تر، قطره آب را جذب کند، نمونه سنتزی آب‌دوست‌تر خواهد بود. بنابراین نمونه S2 در مدت زمان کوتاه‌تری نسبت به نمونه S1 قطره آب را جذب می‌کند. با مقایسه داده‌های حاصل از تکرار آزمون نمونه S2 مشاهده شد که هر سه تکرار با سه مقدار مختلف زاویه تماس به‌دست آمده است. این احتمال وجود دارد که سطح نمونه ۲ دارای گروه‌های عاملی آب‌دوست و آب‌گریز باشد. داده‌های حاصل از تکرار آزمون زاویه تماس نمونه S3 نشان می‌دهد که نمونه دارای سطح یکسان بوده و جذب سطحی به نسبت یکسان صورت گرفته است. با مقایسه هر سه نمونه مشخص شد میزان آب‌دوستی نمونه S1 نسبت به نمونه S3 کمتر است که این مسئله را با توجه به آب‌دوست بودن PEG می‌توان توجیه کرد. نمونه S2 نسبت به نمونه‌های S1 و S3 خصلت آب‌دوستی بیشتری دارد.

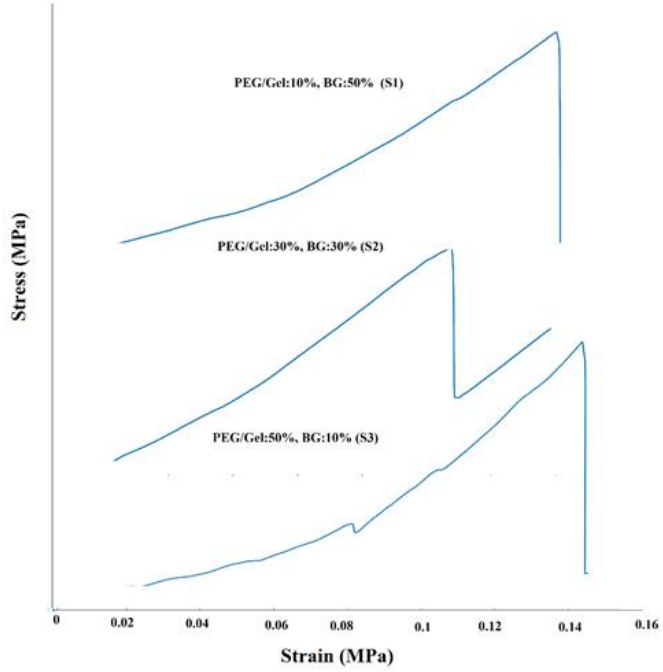
### ۳-۱۰ ارزیابی رفتار زیستی نمونه‌ها

در این تحقیق، بر اساس نتایج، میزان زنده‌مانی سلول‌ها پس از ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت در گروه‌های شاهد و داربست بدون شیشه زیست‌فعال و داربست با شیشه زیست‌فعال (جدول۶) نشان داد که به‌دلیل حضور یون‌هایی مانند منیزیم و روی در شیشه‌های زیست‌فعال، سمیت سلولی افزایش می‌یابد. پس از ۲۴ ساعت، بقای سلولی در همه گروه‌ها تقریباً در هر سه نمونه یکسان بود. پس از ۷۲ ساعت، درصد زنده مانی سلولی در سلول‌ها تقریباً یکسان اما کمتر از ۴۸ و ۲۴ ساعت بود. به عبارتی، نتایج زنده‌مانی سلولی آزمون MTT تفاوت معنی‌داری را بین نمونه آزمایش و شاهد نشان نداد. بنابراین می‌توان این داربست کامپوزیتی را داربستی زیست‌پزشکی دانست.

## ۴ نتیجه‌گیری

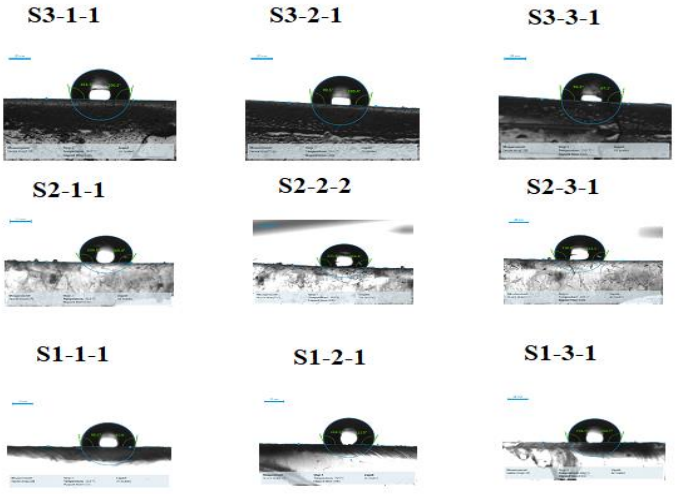
بهینه‌سازی سامان‌مند برای ساخت داربست‌های ژلاتین پِگ‌دارشده با دو متغیر مستقل نسبت وزنی PEG/Gel و درصد وزنی BGتوسط Box-Behnken (RSM) انجام شد. پاسخ‌ها شامل استحکام نهایی، مدول یانگ، ازدیاد طول در شکست، درصد تورم، درصد فرسایش و درصد جذب رطوبت بود. شرایط بهینه برای به‌دست‌آوردن داربستی با خواص مکانیکی، زیست‌تخریب‌پذیری و زیست‌سازگاری مناسب تعیین شد و آزمون ANOVAبرای به‌دست‌آوردن بهترین مدل برای توصیف چگونگی تأثیر هر یک از متغیرهای مستقل بر پاسخ‌ها بررسی شد و شرایط داربست بهینه بر اساس سطوح تعریف‌شده در نرم‌افزار مشخص شد.

در این مطالعه، از ژلاتین، پلیمر طبیعی غیرسمی و زیست‌تخریب‌پذیر به‌عنوان ماتریس و از پلی‌اتیلن گلیکول به‌عنوان پوشش برای اصلاح خواص آب‌دوستی کامپوزیت‌ها استفاده شد. ترکیب شیشه‌های زیستی حاوی روی و منیزیم خواص مکانیکی و زیست فعالی داربست‌های کامپوزیتی را بهبود بخشید. ذرات BG، ساخته شده با فن سل-ژل، به‌طور یکنواخت در ماتریس کامپوزیتی و تقریباً بدون کلوخگی توزیع شدند. طیف ATR-FTIR از BGهای سنتزشده نوار ارتعاشی گسترده‌ای را در محدوده ۹۰۰ تا $cm^{-1}$ ۱۱۰۰ نشان داد که به نوار کششی نامتقارن Si-O-Si اختصاص دارد. طیف FTIRکامپوزیتی PEG/Gel/BG وجود BG در داربست‌های کامپوزیتی و برهم‌کنش بین ماتریس پلیمری و BG را تأیید کرد. افزایش مقدار BG نسبت به داربست پلیمری منجر به کاهش اندازه منافذ و درنتیجه موجب کاهش درصد تورم داربست شد. تصاویر SEM ساختار متخلخل منظم و به‌هم‌پیوسته خوبی را نشان دادند. داربست‌های کامپوزیتی PEG/Gel/BG پاسخ سلولی MG-63 خوبی (زنده‌پذیری، اتصال و تکثیر) و تمایز استئوبلاست‌ها را نشان دادند. بنابراین می‌توان نتیجه گرفت که کامپوزیت‌های PEG/Gel/BG می‌توانند گزینه‌های مناسبی برای مهندسی بافت استخوان باشند




**شکل ۸** نمودار تنش- کرنش سه داربست S1, S2, S3

**Figure 8** Stress-strain diagram of S1, S2, and S3 scaffolds




**شکل ۹** تصاویر زاویه تماس سه نمونه داربستS1, S2, S3

**Figure 9** Contact angle images of S1, S2, and S3 scaffolds

**جدول ۶** نتایج آزمون MTT برای نمونه کنترل و داربست بدون BG و داربست با BG

**Table 6** MTT test results for control sample and scaffolds without BG and with BG

| **24 Hours** | | | **48 Hours** | | | **72 Hours** | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| Control | Without BG | With BG | Control | Without BG | With BG | **Control** | **Without BG** | **With BG** |
| 0.248 | 0.265 | 0.239 | 0.523 | 0.531 | 0.509 | 0.793 | 0.788 | 0.791 |
| 0.312 | 0.301 | 0.324 | 0.548 | 0.592 | 0.552 | 0.812 | 0.818 | 0.819 |
| 0.282 | 0.298 | 0.299 | 0.583 | 0.558 | 0.591 | 0.803 | 0.812 | 0.814 |

## مراجع


1. Farag M.M., Liu H.H. and Makhlouf A.H., New Nano-Bioactive Glass/Magnesium Phosphate Composites by Sol-Gel Route for Bone Defect Treatment, *Silicon*, 13, 857-865, 2021.
2. Ghomi F., Asefnejad A., Daliri M., Godarzi V. and Hemati M., Fabrication and characterization of chitosan/gelatin scaffold with bioactive glass reinforcement using PRP to regenerate bone tissue, *Nanomedicine Research Journal*, *7*, 205-213,2022.
3. Raz M., Moztarzadeh F. andKordestani S. S., Sol-gel based fabrication and properties of Mg-Zn doped bioactive glass/gelatin composite scaffold for bone tissue engineering, *Silicon*, *10*, 667-674, 2018.
4. Sharifi S., Ebrahimian-Hosseinabadi M., Dini G. and Toghyani S., Magnesium-zinc-graphene oxide nanocomposite scaffolds for bone tissue engineering, *Arabian Journal of Chemistry*, *16*, 104715,2023.
5. Zhu G., Zhang T., Chen M., Yao K., Huang X., Zhang B. and Zhao Z., Bone physiological microenvironment and healing mechanism: Basis for future bone-tissue engineering scaffolds, *Bioactive Materials*, *6*, 4110-4140,2021.
6. Safari B., Davaran S. and Aghanejad A., Osteogenic potential of the growth factors and bioactive molecules in bone regeneration, *International Journal of Biological Macromolecules*, *175*, 544-557,2021.
7. Levy M. N., Koeppen B. M. and Stanton B. A., Principi di fisiologia di Berne & Levy, *Penerbit Buku Kompas*,2007.
8. Sonatkar J. and Kandasubramanian B., Bioactive glass with biocompatible polymers for bone applications, *European Polymer Journal*, *160*, 110801, 2021.
9. Sergi R., Bellucci D. and Cannillo V., A review of bioactive glass/natural polymer composites: State of the art, *Materials*, *13*, 5560, 2020.
10. Newman H., Shih Y. V. and Varghese S., Resolution of inflammation in bone regeneration: From understandings to therapeutic applications, *Biomaterials, 277*, 121114, 2021.
11. Safari B., Davaran S. and Aghanejad A., Osteogenic potential of the growth factors and bioactive molecules in bone regeneration, *International Journal of Biological Macromolecules*, *175*, 544-557, 2021.
12. Liang W., Wu X., Dong Y., Shao R., Chen X., Zhou P. and Xu F., In-vivo behavior of bioactive glass-based composites in animal models for bone regeneration, *Biomaterials Science*, *9*, 1924-1944, 2021.
13. Gupta N. and Santhiya D., In-situ mineralization of bioactive glass in gelatin matrix, *Materials Letters*, *188*, 127-129, 2017.
14. Jain S., Gujjala R., Azeem P. A., Ojha S. and Samudrala R. K., A review on mechanical and in-vitro studies of polymer reinforced bioactive glass-scaffolds and their fabrication techniques, *Ceramics International*, *48*, 5908-5921, 2022.
15. Sharifi E., Sadati S. A., Yousefiasl S., Sartorius R., Zafari M., Rezakhani L. and Makvandi P., Cell loaded hydrogel containing Ag-doped bioactive glass–ceramic nanoparticles as skin substitute: Antibacterial properties, immune response, and scarless cutaneous wound regeneration, *Bioengineering & Translational Medicine*, *7*, e10386, 2022.
16. Yao L., Gao H., Lin Z., Dai Q., Zhu S., Li S. and Cao X., A shape memory and antibacterial cryogel with rapid hemostasis for noncompressible hemorrhage and wound healing, *Chemical Engineering Journal*, *428*, 131005, 2022.
17. Afghah F., Iyison N. B., Nadernezhad A., Midi A., Sen O., Saner Okan B. and Koc B., 3D fiber reinforced hydrogel scaffolds by melt electrowriting and gel casting as a hybrid design for wound healing, *Advanced Healthcare Materials*, *11*, 2102068, 2022.
18. Begines B., Arevalo C., Romero C., Hadzhieva Z., Boccaccini A. R. and Torres Y., Fabrication and characterization of bioactive gelatin–alginate–bioactive glass composite coatings on porous titanium substrates, *ACS Applied Materials & Interfaces*, *14*, 15008-15020, 2022.
19. Karadjian M., Essers C., Tsitlakidis S., Reible B., Moghaddam A., Boccaccini A. R. and Westhauser F., Biological properties of calcium phosphate bioactive glass composite bone substitutes: Current experimental evidence, *International Journal of Molecular Sciences*, *20*, 305, 2019.
20. Rahmani M., Moghanian A. and Yazdi M. S., The effect of Ag substitution on physicochemical and biological properties of sol-gel derived 60% $SiO_2$–31% CaO–4% $P_2O_5$–5% $Li_2O$ (mol%) quaternary bioactive glass, *Ceramics International*, *47*, 15985-15994, 2021.
21. Montazerian M., Zanotto E. D. and Mauro J. C. Model-driven design of bioactive glasses: from molecular dynamics through machine learning, *International Materials Reviews*, *65*, 297-321, 2020.
22. Goudarzi G., Dadashian F., Vatanara A. and Sepehrizadeh Z., Optimization of keratin sponge preparation conditions for hemostatic application using response surface methodology (RSM), *Journal of Polymers and the Environment*, *32*,1135-49, 2024.
23. Mehrabi T., Mesgar A. S. and Mohammadi Z., Bioactive glasses: a promising therapeutic ion release strategy for enhancing wound healing, *ACS Biomaterials Science & Engineering*, *6*, 5399-5430, 2020.
24. Elkhouly H., Mamdouh W. and El-Korashy D. I., Electrospun nano-fibrous bilayer scaffold prepared from polycaprolactone/gelatin and bioactive glass for bone tissue engineering, *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, *32*, 111, 2021.