دانشگاه صنعتی امیرکبیر
(پلی‌تکنیک تهران)
دانشکده مهندسی پزشکی

پایان‌نامه دکترا ـ گرایش بیومواد

تهیه و ساخت جایگزین پوستی با استفاده از اصلاح الاستومر سیلیکون با کمک اکریلیک اسید ـ کلاژن و کیتوسان

نگارش
حمید کشوری

اساتید راهنما:
جناب آقای دکتر حمید میرزاده
سرکار خانم دکتر پروین منصوری

اسفندماه ۱۳۸۶

PDF created with pdfFactory Pro trial version www.pdffactory.com

بسمه تعالی

شماره:

تاریخ:

معاونت پژوهشی

فرم پروژه تحصیلات تکمیلی ۷

فرم اطلاعات پایان‌نامه
کارشناسی ارشد و دکترا

۱-مشخصات دانشجو

نام و نام خانوادگی : حمید کشوری دانشجوی آزاد ■ بورسیه ☐ معادل ☐

شماره دانشجویی : 79233938 دانشکده : مهندسی پزشکی رشته تحصیلی : بیومتریال

نام و نام خانوادگی استاد راهنما : آقای دکتر حمید میرزاده - سرکار خانم دکتر پروین منصوری

عنوان به فارسی : تهیه و ساخت جایگزین پوستی با استفاده از اصلاح الاستومر سیلیکون با کمک اکریلیک اسید – کلاژن و کیتوسان

عنوان به انگلیسی :

Preparation and Fabrication of Skin Replacement Using Laser – Treated Silicon Rubber Surface Modified with Acrylic acid , Collagen and Chitosan

نوع پروژه: کاربردی ■ بنیادی ☐ توسعه ای ☐ نظری ☐

تاریخ شروع : بهمن ۷۹ **تاریخ خاتمه : اسفند ۸۶** **تعداد واحد : ۲۴**

سازمان تأمین کننده اعتبار : دانشگاه صنعتی امیرکبیر

واژه های کلید به فارسی : کلمات کلیدی:

سیلیکون ـ اکریلیک‌اسید ـ پیوند لیزری ـ کلاژن ـ کیتوسان ـ تثبیت بیوپلیمر ـ سلولهای فیبروبلاست L929 ـ جایگزین پوست.

واژه های کلیدی به انگلیسی :

Keywoards: silicone - arylic acid - laser grafted – collagen – chitosan – biopolymer immobilization – L929 fibroblast cell – skin replacement.

PDF created with pdfFactory Pro trial version www.pdffactory.com

تقدیم به خانواده عزیزم؛

که در طول این مدت صبر و ایثار را به من اتمام رساندند.

مادر و روح پدربزرگوارم؛

که همه را مدیون دعای خیر آنهایم.

و اساتید بزرگوارم؛

که قدر قلم را به من آموختند.

PDF created with pdfFactory Pro trial version www.pdffactory.com

با قدرشناسی و قدردانی از:

اساتید راهنما جناب آقای دکتر حمید میرزاده و سرکار خانم دکتر پروین منصوری به خاطر راهنمایی‌ها و زحمات بی‌دریغ آنها در انجام پروژه.

با گرامیداشت یاد و خاطرهٔ

مرحومه

خانم دکتر فریبا اورنگ

استاد مشاور اینجانب که خود را مدیون راهنمایی‌های ایشان نیز می‌دانم.

PDF created with pdfFactory Pro trial version www.pdffactory.com

با تشکر فراوان از:

اعضای محترم هیئت ژوری به خاطر زحمات مطالعه و حسن‌نظر در تصویب رساله؛

۱- جناب آقای دکتر کتباب به عنوان نماینده تحصیلات تکمیلی و داور داخلی
۲- جناب آقای دکتر واشقانی به عنوان داور خارجی
۳- سرکار خانم دکتر کردستانی به عنوان داور داخلی
۴- جناب آقای دکتر خراسانی به عنوان داور خارجی که در مراحل مختلف پروژه از راهنمایی‌هایشان بهره جسته‌ام.

PDF created with pdfFactory Pro trial version www.pdffactory.com

دانشکده مهندسی پزشکی

با سپاس فراوان از:

رؤسای محترم دانشکده مهندسی پزشکی: **آقایان دکتر توحیدخواه، دکتر تفصلی و دکتر نجاریان** که هر کدام به سهم خود زحمات و تلاشهای فداکارانه‌ای در پیشروی اهداف دانشکده داشته‌اند.

مدیران محترم تحصیلات تکمیلی: **آقایان دکتر مرادی، دکتر توحیدخواه و دکتر صولتی** که هر کدام در مراحل مختلف انجام پروژه راهنمایی و همکاری بی‌شائبه‌ای با اینجانب داشته‌اند.

آقایان دکتر دلیری و دکتر رفیعی‌نیا که در انجام آزمایشات *In Vitro* همکاری وصف‌ناپذیری داشته‌اند.

آقای دکتر کارخانه که در کلیه مراحل رساله از همفکری و همکاری ایشان استفاده کردم.

و کلیه کارشناسان و کارکنان محترم دانشکده.

PDF created with pdfFactory Pro trial version www.pdffactory.com

سازمان انرژی اتمی ـ بخش لیزر پلیمر

تقدیر و تشکر بی‌شائبه از

۱- جناب آقای مهندس زارع که در کلیه مراحل کوپلیمریزاسیون پیوندی پلیمرها، همکاری و راهنماییهای ارزنده‌ای به اینجانب ارائه نمودند.
۲- جناب آقای محمدی که یار و یاور در اجرای مراحل اولیه رساله بوده‌اند.
۳- جناب آقای پیرهادی
۴- سرکار خانم مهندس غراب
۵- جناب آقای مهندس عبائیانی
۶- جناب آقای موشح
۷- جناب آقای عمویی

PDF created with pdfFactory Pro trial version www.pdffactory.com

پژوهشگاه پلیمر و پتروشیمی ایران

تشکر بی‌پایان از:

۱- جناب آقای دکتر خراسانی که راهنمائیهای ارزنده و بی‌شائبه‌ای را در مراحل اولیه پروژه به اینجانب ارائه نمودند.
۲- جناب آقای دکتر برزین
۳- سرکار خانم دکتر رحیمی
۴- سرکار خانم مهندس میوه‌چی
۵- سرکار خانم مهندس طباطبایی
۶- جناب آقای مهندس سادات‌نیا
۷- سرکار خانم ایرانی
۸- سرکار خانم بارژنگ
۹- سرکار خانم مهندس عسکری
۱۰- سرکار خانم زمانی
۱۱- سرکار خانم جلالی
۱۲-جناب آقای انتظامی
۱۳- جناب آقای حسینی

PDF created with pdfFactory Pro trial version www.pdffactory.com

بیمارستان قلب تهران

با سپاس فراوان از:

۱- جناب آقای دکتر ربانی که انجام آزمایشات *In Vivo* مدیون همکاریها و هدایت علمی ایشان بود.

۲- جناب آقای دکتر امانپور

۳- آقایان صالحی و اسدی که در انجام جراحیها کمک شایان نمودند.

PDF created with pdfFactory Pro trial version www.pdffactory.com

مرکز بهداشت و درمان دانشگاه

با تقدیر بی‌شائبه از:

۱- سرکار خانم آل‌بویه
۲- سرکار خانم مهندس شریفی
۳- سرکار خانم مهندس دلبری
۴- جناب آقای گودرزی
که همگی نهایت همکاری و همگامی با اینجانب را در مراحل مختلف رساله داشته‌اند.

PDF created with pdfFactory Pro trial version www.pdffactory.com

در نهایت تشکر و سپاس از سرکار خانم دکتر عسکرزاده

که در تفسیر پاتولوژی آزمایشات *In Vivo* همکاریهای بی‌شائبه‌ای نمودند.

PDF created with pdfFactory Pro trial version www.pdffactory.com

فهرست مطالب

عنوان **صفحه**

چکیده ---------- ۱

فصل اول: مقدمه ---------- ۱

۱-۱- پوست ---------- ۳

۱-۱-۱- ساختمان و بافت‌شناسی پوست ---------- ۳

۱-۱-۲- فیزیولوژی عملکردهای پوست ---------- ۱۰

۱-۱-۳- ترمیم و التیام پوست ---------- ۱۷

۱-۲- جایگزین‌های پوستی ---------- ۲٤

۱-۲-۱- نکات مهم مورد توجه در یک جایگزین پوستی ---------- ۲٤

۱-۲-۲- جایگزین‌های پوست بدون سلول ---------- ۲٦

۱-۲-۳- جایگزینهای پوستی همراه با سلول ---------- ۲۸

۱-۲-۴- مهندسی بافت پوست ---------- ۳۲

۱-۳- مفاهیم و مبانی کار ---------- ٤۲

۱-۳-۱- بررسی مواد ---------- ٤۲

۱-۳-۲- بررسی فرآیندها ---------- ۵۳

هدف و نوآوری پژوهش ---------- ٦٦

نوآوری پروژه ---------- ٦۷

فصل دوم: مواد و روش‌ها (تجربی) ---------- ٦۸

۲-۱- معرفی مواد و وسایل ---------- ٦۹

۲-۲- پیوند پلی‌اکریلیک اسید بر سیلیکون و آنالیز سطح ---------- ۷۰

۲-۲-۱- آماده‌سازی سیلیکون ---------- ۷۱

۲-۲-۲- پرتودهی ---------- ۷۱

۲-۲-۳- تهیه محلول اسیداکریلیک ---------- ۷۲

۲-۲-۴- تخلیه گاز اکسیژن از محلول اسیداکریلیک و سیلیکون ---------- ۷۲

۲-۲-۵- پیوندزنی اسیداکریلیک بر سیلیکون ---------- ۷۲

۲-۲-۶- آنالیز سطح ---------- ۷٤

۲-۳- تثبیت کلاژن و کیتوسان و آنالیز سطح ---------- ۷٤

PDF created with pdfFactory Pro trial version www.pdffactory.com

۲-۳-۱- تهیه محلول کلاژن و کیتوسان با درصدهای مختلف ---------- ۷۵
۲-۳-۲- فعال کردن پلی‌اکریلیک اسید پیوند شده بر سیلیکون ---------- ۷۵
۲-۳-۳- مرحلهٔ تثبیت ---------- ۷۶
۲-۳-۴- آنالیز سطح ---------- ۷۶
۲-۴- ضدعفونی کردن ---------- ۷۶
۲-۵- آزمون *In Vitro* (کشت سلولی و رنگ‌آمیزی) ---------- ۷۶
۲-۶- آزمون *In Vivo* (کاشت نمونه و بررسی‌های آسیب‌شناسی) ---------- ۷۷
۲-۶-۱- ارزیابی بالینی نمونه‌های مختلف تهیه شده در التیام زخم‌های تمام صفحات----- ۷۷
۲-۶-۲- مطالعات هیستوپاتولوژی ---------- ۷۹
فصل سوم: نتایج و بحث ---------- **۸۱**
۳-۱- اثر تعداد پالس لیزر بر کاهش وزن سیلیکون ---------- ۸۲
۳-۲- بررسی میزان پیوند پل‌اکریلیک اسید بر سیلیکون ---------- ۸۳
۳-۲-۱- اثر تعداد پالس ---------- ۸۳
۳-۲-۲- اثر دانسیتهٔ پالس ---------- ۸۵
۳-۲-۳- اثر فرکانس پالس لیزر ---------- ۸۷
۳-۲-۴- اثر فاصله زمانی بین تابش پرتو لیزر و انجام پیوند ---------- ۸۹
۳-۲-۵- اثر مدت زمان اکسیژن‌زدایی ---------- ۹۱
۳-۲-۶- اثر غلظت منومر ---------- ۹۳
۳-۲-۷- اثر دمای پیوند ---------- ۹۶
۳-۲-۸- اثر مدت زمان انجام پیوند---------- ۹۸
۳-۳- تثبیت کلاژن ـ کیتوسان ---------- ۱۰۰
۳-۳-۱- انتخاب نمونه بهینه (از نظر پهن‌شدگی و تکثیر بیشتر فیبروبلاستهایL929) --- ۱۰۰
۳-۳-۲- تثبیت کلاژن و کیتوسان با درصدهای مختلف ---------- ۱۰۲
۳-۳-۳- آبدوستی ---------- ۱۰۳
۳-۳-۴- طیف‌سنجی ---------- ۱۰۳
۳-۳-۵- تصاویر SEM ---------- ۱۰۴
۳-۴- کشت فیبروبلاست (آزمونهای *In Vitro*) ---------- ۱۰۷
۳-۴-۱- بررسی پهن‌شوندگی سلولی ---------- ۱۰۷
۳-۴-۲- بررسی چسبندگی ---------- ۱۰۸

PDF created with pdfFactory Pro trial version www.pdffactory.com

۳-۴-۳- بررسی تکثیر سلولی ---------- ۱۱۰
۳-۵- کاشتن نمونه‌ها (آزمونهای *In Vivo*)---------- ۱۱۲
۳-۵-۱- نتایج بررسی ماکروسکوپی ---------- ۱۱۲
۳-۵-۲- بررسیهای هیستو پاتولوژیکی ---------- ۱۱٤
۳-۵-۳- نتایج نهایی از عملکرد نمونه‌های مختلف کاشته شده (آزمون *In Vivo*) ----- ۱۲۲
فصل چهارم: نتیجه‌گیری ---------- ۱۲٤
۴-۱- نتیجه‌گیری ---------- ۱۲۵
۴-۲- پیشنهادها ---------- ۱۲۷
منابع و مراجع ---------- ۱۲۹

PDF created with pdfFactory Pro trial version www.pdffactory.com

چکیده

هدف از این پژوهش تهیه یک جایگزین پوستی برای درمان زخمهای تمام ضخامت بود تا بتوان ازآن به وسیلهٔ بذرافشانی سلولهای کراتینوسیت و فیبروبلاست به عنوان پوست مصنوعی استفاده کرد. سیلیکون به عنوان ماده اولیه انتخاب گردید و با استفاده از لیزر پالسی CO_2، پلی‌اکریلیک‌اسید بر روی آن پیوند گردید. قبل و بعد از پیوند، به ترتیب کاهش وزن نمونه‌ها ناشی از تابش لیزر و افزایش وزن آنها ناشی از پلی اکریلیک‌اسید پیوندی، به ترتیب مشخص گردیدند. علاوه بر این سطح نمونه‌ها با اندازه‌گیری زاویه تماس قطره آب و برداشت آب توسط سطح ، طیف سنجی Attenuated Total Reflectance-Fourier Transform Infared (ATR-FTIR) و (SEM) Scanning Electron Microscopy بررسی شد. در این مرحله، اثرات هشت عامل نیز به شرح ذیل مورد بررسی قرار گرفت:

۱- تعداد پالس لیزر

۲- چگالی پالس لیزر

۳- فرکانس پالس لیزر

۴- فاصله زمانی میان تابش و پیوند

۵- غلظت منومر: اکریلیک‌اسید

۶- مدت زمان دمش (مدت زمان اکسیژن‌زدایی)

۷- دمای پیوند

۸- مدت زمان پیوند

و پارامترهای بهترین نمونه‌ها به شرح ذیل انتخاب گردید.

۱- تعداد پالس لیزر: ۱

۲ـ چگالی پالس لیزر $۱/۲۵ \ J/Cm^2$

۳- فاصله زمانی بین تابش و پیوند: در حد امکان کوتاه

۴- غلظت منومر، ۳۰%

۵- مدت زمان اکسیژن‌زدایی (دمش): ۲۰ دقیقه

۶- دمای پیوند: ۶۵°C

۷- مدت‌زمان پیوند: ۴ ساعت

سپس کلاژن و کیتوسان با درصدهای مختلف بر روی نمونه‌های انتخابی تثبیت گردیده و خصوصیات نمونه‌ها با روشهای گفته شده در قبل بررسی گردیدند.

PDF created with pdfFactory Pro trial version www.pdffactory.com

بعد از آن سلولهای فیبروبلاست L929 بر روی نمونه‌ها کشت شدند تا چسبندگی، پهن‌شدگی و تکثیر سلولی مشخص گردد. آزمونهای *In Vitro* نشان داد که چسبندگی و تکثیر قابل ملاحظه بر روی نمونه‌های مختلف همراه با تثبیت بیوپلیمرها به‌خصوص نمونهٔ با تثبیت ۲۵% کلاژن و ۷۵% کیتوسان دیده می‌شود، در حالیکه سطح پلی‌اکریلیک اسید پیوندی بر سیلیکون چسبندگی وپهن شدگی و تکثیر کم و سطوح با تثبیت کلاژن بیشترین پهن‌شدگی سلولی را نشان دادند. علاوه بر این، نمونه‌های مختلف بر روی زخمهای تمام ضخامت ۲۴ موش صحرایی پیوند شدند. مشاهدات ماکروسکوپی (عفونت، التهاب و تشکیل اسکار) و میکروسکوپی (بافت جوشگاهی، سلولهای فیبروبلاست، میزان بافت همبندی، رگزایی، سلولهای التهابی و کراتین) ارزیابی گردیدند.

نتایج ، ترمیم پوستی سریع و کامل را به وسیله نمونه‌های با تثبیت بیوپلیمرها بر پلی‌اکریلیک‌اسید پیوندی بر سیلیکون به‌خصوص نمونهٔ حاوی ۲۵% کلاژن و ۷۵% کیتوسان به درجات مختلف نشان داده، در حالیکه سطوح سیلیکونی و پلی‌اکریلیک‌اسید پیوندی بر سیلیکون ترمیم را به تأخیر انداختند.

بر این اساس ما می‌توانیم آسیبهای پوستی تمام ضخامت با خصوصیات مختلف را توسط تثبیت بیوپلیمرها با درصدهای مختلف درمان نمائیم.

Keywoards: silicone - arylic acid - laser grafted – collagen – chitosan – biopolymer immobilization – L929 fibroblast cell – skin replacement.

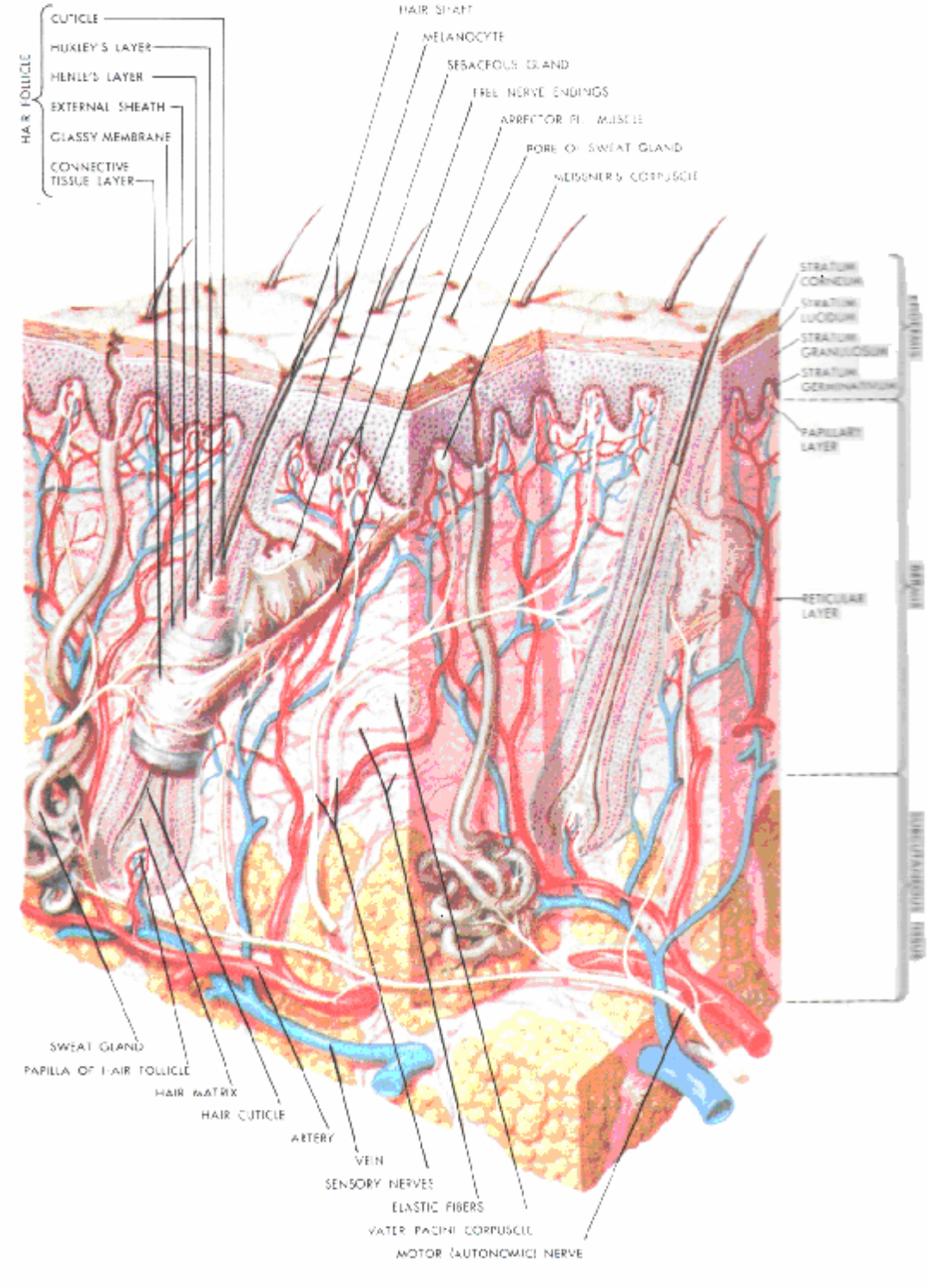
کلمات کلیدی: سیلیکون ـ اکریلیک‌اسید ـ پیوند لیزری ـ کلاژن ـ کیتوسان ـ تثبیت بیوپلیمر ـ سلولهای فیبروبلاست L929 ـ جایگزین پوست.

PDF created with pdfFactory Pro trial version www.pdffactory.com

فصل اول

مقدمه

PDF created with pdfFactory Pro trial version www.pdffactory.com



شکل ۱-۱: پوست طبیعی [۱]

PDF created with pdfFactory Pro trial version www.pdffactory.com

۱-۱- پوست

۱-۱-۱- ساختمان و بافت‌شناسی پوست

پوست با دارا بودن ۱۶% وزن کل بدن سنگین‌ترین عضو منفرد بدن محسوب می‌گردد و در بالغین سطحی معادل ۱/۲ تا ۲/۳ مترمربع با محیط اطراف ایجاد می‌کند. پوست از روپوست (epidermis ـ اپیدرم) که لایه‌ای اپیتیال با منشاء اکتودرمی است و میان‌پوست (dermis ـ درم) که لایه‌ای از بافت همبند با منشاء مزودرمی می‌باشد، تشکیل یافته است. (شکل ۱-۱) بر اساس مقایسه ضخامت اپیدرم می‌توان پوست ضخیم (thic) و نازک (thin) را از هم افتراق داد. بیرون‌زدگی‌های اپیدرم به نام ستیغ‌های اپیدرمی (epidermal ridges) با برآمدگی‌های درم به نام پاپی‌ها (papilla) در هم فرو می‌روند. مشتقات اپیدرم شامل مو، ناخن و غدد چربی و عرق هستند. در زیر درم، زیرپوست (hypodermis ـ هیپودرم) یا بافت زیرجلدی (subcutaneous tissue) قرار دارد که بافت همبندی سست حاوی توده‌ای از سلول‌های چربی می‌باشد. هیپودرم که جزء پوست محسوب نمی‌شود، پوست را به طور نه چندان محکم به بافت‌های مجاور متصل می‌سازد و به فاسیای سطحی تعلق دارد [۱].

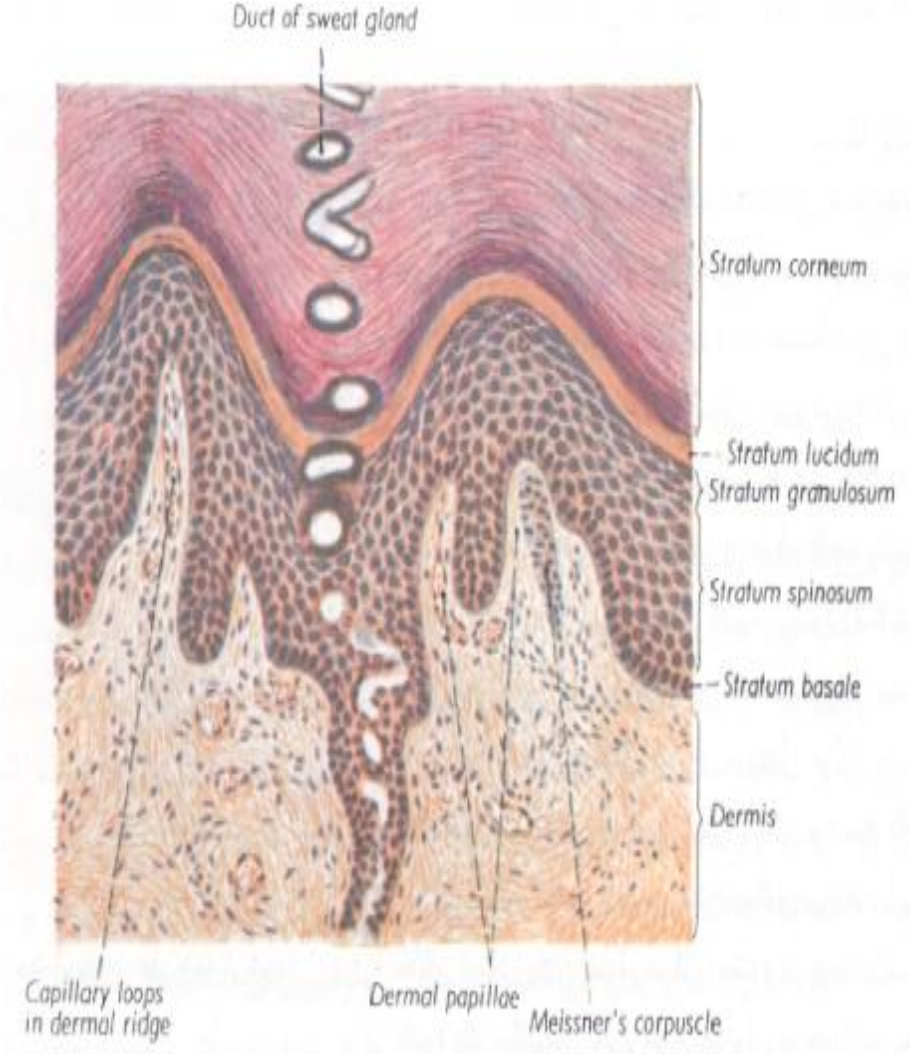
لایه خارجی پوست نسبت به آب نسبتاً نفوذناپذیر است؛ این امر از اتلاف آب بدن در اثر تبخیر جلوگیری نموده، امکان زندگی در خشکی را فراهم می‌سازد. پوست به عنوان یک عضو گیرنده، در ارتباط مداوم با محیط قرار دارد و موجود زنده را از آسیب‌های فشاری و فرسایشی محافظت می‌کند. ملانین (melanin)، رنگدانه‌ای که در سلول‌های اپیدرم تولید و ذخیره می‌شود، اثر حفاظتی بیشتری در مقابل اشعه فرابنفش نور خورشید ایجاد می‌نماید. غدد پوست، عروق خونی و بافت چربی در تنظیم حرارتی، متابولیسم و دفع مواد مختلف از بدن ایفای نقش می‌کنند. ویتامین D_3 تحت اثر نور خورشید از پیش‌سازهای تولید شده در بدن، پدید می‌آید. از آنجا که پوست ارتجاع‌پذیر است، می‌تواند گسترش یابد تا مناطق بزرگی از بدن را در شرایطی مثل خیز (ادم ـ edema) و حاملگی که با تورم بدن همراه است، بپوشاند [۱].

با مشاهده دقیق پوست مشخص می‌گردد که بخش‌های خاصی از آن به صورت لبه و شیار و با الگویی مشخص استقرار یافته‌اند. این الگو برای نخستین بار در زندگی داخل رحمی‌شکل می‌گیرد به طوری که در هفته ۱۳ حاملگی در نوک انگشتان و سپس سطوح کف دستی و کف پایی پدید می‌آید. این الگوهای حاصل از شیارها و برآمدگی‌ها تحت عنوان خطوط پوستی (اثر انگشت) شناخته می‌شوند. این الگوها برای هر فرد اختصاصی هستند و به شکل منحنی، قوس، حلقه یا ترکیبی از این اشکال تظاهر می‌یابند [۱].

PDF created with pdfFactory Pro trial version www.pdffactory.com

۱-۱-۱-۱- اپیدرم

اپیدرم (epidermis) عمدتاً از یک بافت پوششی سنگفرشی مطبق شاخی تشکیل یافته ولی ۳ نوع سلول دیگر را هم دارا می‌باشد. سلول‌های لانگرهانس (Langerhans cells)، ملانوسیت‌ها (melanocytes) و سلول‌های مرکل (merkel's cells). سلول‌های شاخی‌کننده اپیدرم، کراتینوسیت‌ها (Keratinocytes) نامیده می‌شوند. مرسوم است که بین پوست ضخیم (صاف و بدون مو) که در کف دست و پا یافت می‌شود و پوست نازک (مودار) که در سایر مناطق بدن وجود دارد فرق بگذارند. واژه‌های «ضخیم» و «نازک» به ضخامت لایه اپیدرم اشاره دارند که از ۷۵ تا ۱۵۰ میکرون برای پوست نازک و از ۴۰۰ تا ۶۰۰ میکرون برای پوست ضخیم متفاوت است. کل ضخامت پوست (اپیدرم به علاوه درم) نیز بر حسب محل آن متغیر است. به عنوان مثال، پوست ناحیه پشت ۴mm ضخامت دارد در حالی که ضخامت پوست جمجمه حدود ۱/۵mm است [۱].



شکل ۱-۲: لایه‌های اپیدرم [۱]

PDF created with pdfFactory Pro trial version www.pdffactory.com