

سنتر و بررسی خواص مکانیکی و زیست‌فعالی داربست پایه بتا تری کلسیم فسفات - بریدجیت به روش فضا‌ساز برای کاربردهای مهندسی بافت استخوان

فروغ مفید نخعی^۱، محمد رجبی^{۱*} و حمیدرضا بخش‌شیرادی^۲

- ۱- گروه مهندسی مواد، دانشکده مهندسی مواد و صنایع، دانشگاه صنعتی نوشیروانی، بابل، ایران
۲- گروه مهندسی مواد، دانشکده مهندسی مواد، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد نجف آباد، اصفهان، ایران

(دریافت مقاله: ۱۴۰۰/۲/۶ - دریافت نسخه نهایی: ۱۴۰۰/۷/۶)

چکیده - علم مهندسی بافت در کنار علم پزشکی به احیا و ترمیم بافت‌ها و اندام‌های آسیب دیده می‌پردازد. هدف اصلی استفاده از داربست‌ها، بازسازی مجدد بافت‌های بدن است. انتخاب نوع و جنس داربست به دلیل اینکه در نهایت جایگزین بافت آسیب دیده می‌شود بسیار مهم است. توسعه مواد داربست کامپوزیتی سرامیک زیست‌فعال با استحکام مکانیکی بهبود یافته، موضوعی بوده است که مورد توجه مهندسی بافت استخوان قرار گرفته است. در مطالعه حاضر، پس از سنتز پودرهای بتا تری کلسیم فسفات و بریدجیت به ترتیب با روش‌های واکنش حالت جامد و سل ژل، داربست کامپوزیتی بیوسرامیکی بتا تری کلسیم فسفات / بریدجیت (۲۵، ۳۵ و ۴۵ درصد وزنی بریدجیت) با شبکه منافذ بهم پیوسته و مناسب برای بازسازی استخوان با استفاده از روش فضا‌ساز ساخته شد. این مقاله به بررسی تأثیر افزودن مقادیر بالای بریدجیت بر خصوصیات مکانیکی و بیولوژیکی داربست بتا تری کلسیم فسفات می‌پردازد. ترکیب‌های فازی، ساختار متخلخل، ویژگی‌های مکانیکی و ویژگی‌های زیست‌فعالی این داربست‌ها به ترتیب با استفاده از پراش پرتوی ایکس، میکروسکوپ الکترونی روبشی، آزمون‌های مکانیکی و زیست‌فعالی بررسی شد. ارزیابی ریزساختاری داربست‌های کامپوزیتی، منافذ بهم پیوسته با محدوده قطر ۶۰۰-۲۰۰ میکرومتر و میانگین اندازه منافذ ۴۲۱/۱۳ میکرومتر؛ با تخلخل حدود ۷۵-۷۹ درصد را نشان می‌دهد. نتایج نشان داد که استحکام فشاری داربست‌های β -TCP/25Bre (۲/۷ مگاپاسکال) در مقایسه با داربست‌های β -TCP/45Bre (۲/۰ مگاپاسکال) به دلیل توزیع یکنواخت‌تر بریدجیت و عدم آگلومره شدن این فاز در مرزخانه‌ها بالاتر است. همچنین طبق نتایج زیست‌فعالی، غوطه‌وری در محلول شبیه‌سازی شده بدن منجر به شکل‌گیری لایه آپاتیت استخوانی به صورت پیوسته روی سطح داربست‌ها شده است.

واژه‌های کلیدی: مهندسی بافت، بتا تری کلسیم فسفات، بریدجیت، داربست متخلخل، روش فضا‌ساز.

۱- مقدمه

استخوانی است [۱]؛ اما، جایگزین‌های فعلی بافت‌ها دارای مشکلات مختلفی از جمله محدودیت دهنده و رد پیوند هستند که نمی‌توانند نیازهای بیماران را برآورده سازند [۲]. از این رو

بازسازی یکپارچگی ساختاری بافت استخوانی آسیب دیده یک مشکل ضروری برای افراد مبتلا به تروما یا بیماری‌های

* : مسئول مکاتبات، پست الکترونیکی: m.rajabi@nit.ac.ir

بنابراین، ترکیب دو یا چند ماده بیولوژیکی متفاوت برای ایجاد یک «اثر هم‌افزایی» در خصوصیات کلی حاصل شده و بهبود خصوصیات مکانیکی و بیولوژیکی و سیتوتیک تخریب یک داربست و در اصطلاح استفاده از مواد کامپوزیت بسیار معمول است [۸]. از آنجا که بافت استخوان به‌شکل طبیعی شامل نانوکامپوزیت سرامیکی است، استفاده از کامپوزیت‌های سرامیکی برای تولید داربست استخوانی با ویژگی‌های مناسب ضروری است. برای رسیدن به این هدف، طیف گسترده‌ای از مواد طبیعی و مصنوعی به‌عنوان داربست و یا کامپوزیت استخوانی استفاده شده است. در این مطالعه به‌دلیل خواص مطلوب، از نانوکامپوزیت بتا تری‌کلسیم فسفات-بریدیدجیت برای طراحی داربست‌های استخوانی استفاده شد. تری‌کلسیم فسفات یکی از مهم‌ترین مواد زیستی مبتنی بر فسفات‌ها است که به‌عنوان ماده سرامیکی شناخته شده است که ساختار معدنی استخوان را به‌طور قابل توجهی شبیه‌سازی می‌کند. بتا تری‌کلسیم فسفات [β -TCP], $Ca_3(PO_4)_2$ ، بیوسرامیک کلسیم فسفاتی، به‌دلیل ویژگی‌های منحصر به فرد آن از جمله زیست‌سازگاری، هدایت استخوانی، ترکیب شیمیایی مشابه با استخوان طبیعی و جذب در شرایط درون تنی متناسب با رشد استخوان جدید، یکی از بهترین کاندیدها برای توسعه داربست‌های استخوانی مهندسی بافت است [۹]. بیوسرامیک بتا تری‌کلسیم فسفات سریع‌تر از هیدروکسی آپاتیت در محل نقص جذب می‌شود و روند بهبودی را ارتقا می‌بخشد، اما استحکام آن برای کاربردهای تحمل بار قابل قبول نیست. یک تکنیک شناخته شده برای بهبود مشخصات مکانیکی داربست‌های تری‌کلسیم فسفات، ساخت داربست‌های کامپوزیتی با زمینه تری‌کلسیم فسفات است [۱۰]. بریدیدجیت یک بیوسرامیک کلسیم سیلیکاتی منیزیم‌دار ($Ca_7MgSi_4O_{16}$) است، که به‌دلیل زیست‌فعالی و خواص مکانیکی خوب و همچنین تکثیر سلولی عالی به‌دلیل محصولات یونی حاوی سیلیسیم و کلسیم حاصل از انحلال بسیار مورد توجه قرار گرفته است [۱۱].

در حال حاضر پژوهش‌های قابل توجهی در زمینه فناوری

مهندسی بافت به یکی از جذاب‌ترین و قابل جایگزین‌ترین روش‌ها برای بازسازی موفقیت‌آمیز استخوان آسیب دیده تبدیل شده است. اجزای تشکیل‌دهنده مهندسی بافت را می‌توان به سه گروه تقسیم کرد: الف) داربست؛ ب) عوامل رشد و ج) سلول‌های بافت مورد نظر [۳]. برای مهندسی بافت استخوان، داربست‌های سه‌بعدی زیست‌فعال، زیست‌سازگار با ویژگی‌های مکانیکی مناسب، اندازه منافذ کنترل شده (۲۰۰-۱۰۰ میکرومتر)، تخلخل بالا (۸۰ درصد) و به‌هم پیوسته از نیازهای اساسی است [۴]. داربست‌ها به‌عنوان الگوهای برای تعامل سلولی، جایگاه خود را در مهندسی بافت پیدا کرده‌اند و پشتیبانی فیزیکی از بافت توسعه یافته را فراهم می‌کنند. همچنین، داربست‌ها می‌توانند به‌عنوان عوامل حمل و نقل عمل کنند تا از فاکتورهای رشد ضروری برای کنترل و تقویت رشد بافت استفاده کنند [۴]. داربست با ساختار متخلخل سه‌بعدی خود، فضای رشد و تکثیر را شبیه‌سازی می‌کند اما از طرفی باید بتواند پایداری و عملکرد نسبی بافت را تا زمان تشکیل بافت جدید نیز حفظ کند. بنابراین، یکی از مهم‌ترین موارد در مورد داربست داشتن تخلخل مناسب و پایداری مکانیکی همزمان و تخریب متناسب با زمان تشکیل بافت جدید است [۵]. در بازسازی بافت استخوان، انتخاب مناسب مواد زیستی مورد استفاده در داربست گام مهمی در طراحی و ساخت داربست‌هایی با خواص مطلوب (مانند زیست‌فعالی و زیست‌تخریب پذیری) است. اگرچه انواع مختلفی از مواد از جمله فلزات، پلیمرها و سرامیک‌ها از نظر پتانسیل جایگزینی استخوان ارزیابی شده‌اند، اما عملکرد آنها هنوز با عملکرد طبیعی استخوان فاصله دارد [۶]. بافت استخوان دارای ساختار کامپوزیتی است که شامل قسمت‌های آلی (به‌طور معمول کلاژن نوع I) و اجزای غیرآلی (بلورهای آپاتیت) است [۷]. بدین ترتیب شبیه‌سازی محیط پیچیده بافت استخوان و ایجاد مشخصات مورد نیاز بافت مورد نظر برای یک ماده زیستی بسیار دشوار است. همه مواد بیولوژیکی، هر کدامشان دارای ویژگی‌های قابل توجه و محدودیت‌های منحصربه‌فردی هستند.

و کربنات کلسیم (CaCO_3) در دمای 1050°C درجه سانتی گراد کلسینه شد. سپس پودر به دست آمده به مدت ۴۸ ساعت در آسیای گلوله‌ای سیاره‌ای (Retsch PM400) آسیا شد.

پودر بریدجیت به روش سل ژل تهیه شد [۱۵]. هگزا هیدرات نیترات منیزیم ($(\text{Mg}(\text{NO}_3)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O})$)، تترا هیدرات نیترات کلسیم ($(\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O})$) و تترا اتیل ارتوسیلیکات ($(\text{C}_2\text{H}_5\text{O})_4\text{Si}$, TEOS) به عنوان مواد اولیه استفاده شد. پودرهای به دست آمده در دمای 1150°C درجه سانتی گراد کلسینه شدند. آسیاکاری پودرها در یک آسیای گلوله‌ای سیاره‌ای (Retsch PM400) انجام شد.

سپس، داربست بتا تری کلسیم فسفات- بریدجیت با درصد‌های مختلف بریدجیت با تکنیک فضا‌ساز ساخته شد. بدین ترتیب که ابتدا پودر بتا تری کلسیم فسفات و بریدجیت با نسبت‌های ۷۵-۲۵ (β -TCP/25 bre)، ۶۵-۳۵ (β -TCP/35 bre) و ۵۵-۴۵ (β -TCP/45 bre) مخلوط شدند؛ سپس مخلوط پودر سرامیک با کلرید سدیم (به عنوان فضا‌ساز) با اندازه ذرات $420-300$ میکرومتر و با نسبت وزنی ۸۵:۱۵ مخلوط شد. در نهایت، پودر در فشار 100 مگاپاسکال در یک قالب استوانه‌ای شکل با قطر 10 میلی‌متر و ضخامت 15 میلی‌متر فشرده شد و سپس در دمای 1200°C درجه سانتی گراد به مدت سه ساعت و با نرخ گرمایش دو درجه سانتی گراد بر دقیقه تحت عملیات تف‌جوشی قرار گرفت. در ادامه، ذرات کلرید سدیم از طریق غوطه‌وری نمونه‌ها در آب مقطر به مدت ۲۴ ساعت حذف شد.

۲-۲- مشخصه‌یابی داربست‌ها

ریزساختار پودر سنتز شده بتا تری کلسیم فسفات و همچنین پودر کامپوزیتی بتاتری کلسیم فسفات- بریدجیت با استفاده از میکروسکوپ الکترونی عبوری^۱ (TEM, Hitachi HT7700, Japan) مطالعه شد. ریخت‌شناسی و ساختار داربست‌های کامپوزیتی با میکروسکوپ الکترونی روبشی^۲ (SEM, JEOL JSM-6380LA, Japan) بررسی شد.

نانو و یا استفاده از نانومواد انجام گرفته است. ویژگی بارز این مواد افزایش نسبت سطح به حجم با کاهش اندازه آنها همزمان با تغییر و یا افزایش اثرات فیزیکی و شیمیایی ماده است. فناوری نانو می‌تواند طراحی و ساخت داربست‌های زیست‌سازگار را در مقیاس نانو به منظور هدایت رفتار سلول‌ها و تولید بافت‌های قابل کاشت امکان‌پذیر سازد [۱۲]. تاکنون روش‌های زیادی برای ساخت بیوسرامیک‌های متخلخل ارزیابی شده است. انتخاب روش مناسب برای تولید داربست یکی از موارد کلیدی در موفقیت مهندسی بافت است. فرایندهای خشک کردن انجمادی، ریخته‌گری دوغابی، ریخته‌گری ژل، روش حذف اسفنج پلیمری و تکنیک فضا‌ساز از جمله روش‌های متداول در زمینه ساخت داربست‌های متخلخل به حساب می‌آیند. با توجه به قابلیت عالی کنترل بر اندازه، شکل و به هم پیوستگی منافذ و همچنین استحکام مکانیکی، تکنیک فضا‌ساز به عنوان یک روش امیدوار کننده برای ساخت داربست شناخته شده است [۱۳].

با توجه به بررسی مطالعات انجام شده در این زمینه تاکنون گزارشی مبنی بر ساخت و مشخصه‌یابی داربست نانو کامپوزیتی بتا تری کلسیم فسفات- بریدجیت با مقادیر بالای بریدجیت و به روش پرس پودر با فضا‌ساز با هدف بهبود استحکام مکانیکی و افزایش فعالیت زیستی یافت نشد. در این تحقیق پس از سنتز پودرهای بتاتری کلسیم فسفات و بریدجیت، داربست متخلخل بتاتری کلسیم فسفات- بریدجیت با درصد‌های متفاوت بریدجیت با روش فضا‌ساز ساخته شد و خواص مکانیکی و بیولوژیکی این داربست‌ها ارزیابی شد.

۲- مواد و روش تحقیق

۲-۱- ساخت داربست

تمام مواد شیمیایی با خلوص بالا از شرکت مرک آلمان خریداری شدند. پودر بتا تری کلسیم فسفات به روش واکنش حالت جامد سنتز شد [۱۴]. به طور خلاصه، مخلوط پودری با نسبت مولی دو به یک از فسفات هیدروژن کلسیم (CaHPO_4)

حالت غوطه‌ور در آب و W_w وزن داربست اشباع از آب پس از خارج کردن آن از آب است. میزان تخلخل واقعی یا تخلخل کل که مجموع تخلخل‌های باز و بسته است و ارتباط بهتری با خواص داربست‌های سرامیکی دارد از رابطه (۳) به‌دست می‌آید:

$$\rho = \frac{W_d}{\rho(W_d - W_s)} \times 100 \quad (3)$$

ρ چگالی واقعی یا وزن مخصوص سرامیک است. با وجود اینکه روش ارشمیدس روش دقیقی نیست، این روش به‌عنوان یک روش معمول برای اندازه‌گیری چگالی و میزان تخلخل نمونه‌های متخلخل شناخته شده است [۱۷].

۲-۳- خصوصیات مکانیکی

برای بررسی خواص مکانیکی داربست‌های تولیدی از آزمون فشار استفاده شد. برای این منظور داربست‌های استوانه‌ای شکل به قطر ۱۰ میلی‌متر و ارتفاع ۱۵ میلی‌متر به‌روش پرس‌پودر با فضا‌ساز تولید شد و آزمون فشار با استفاده از دستگاه (Hounsfield H50KS universal testing) با سرعت اعمال فشار پنج میلی‌متر بر دقیقه روی نمونه‌ها اعمال شد. بیشترین میزان تنش به‌عنوان تنش نهایی و تنش نقطه انتقال ناحیه الاستیک به پلاستیک به‌عنوان نقطه تسلیم در نظر گرفته می‌شود. نتایج بر اساس میانگین به‌دست آمده از سه آزمون گزارش می‌شود.

۲-۴- بررسی زیست‌فعالی

یک ماده زیست‌فعال باید توانایی اتصال به بافت‌های بدن را داشته باشد. درباره یک جایگزین استخوانی توانایی تشکیل لایه کلسیم فسفات در سطح ساختار می‌تواند معیار مناسبی از زیست‌فعالی زیست مواد باشد. به‌منظور بررسی زیست‌فعالی داربست تولید شده از محلول شبیه‌سازی شده بدن^۴ (SBF) استفاده شد. برای تهیه محلول شبیه‌سازی شده بدن با غلظت یونی مشابه غلظت پلاسما خون انسان از روش بوهرنر استفاده شد [۱۸]. ابتدا pH محلول توسط دستگاه pH متر مدل Aqbus 2000 اندازه‌گیری شد. برای کالیبره کردن دستگاه قبل از اندازه‌گیری از محلول بافر با pH ۴ و ۱۲ استفاده شد.

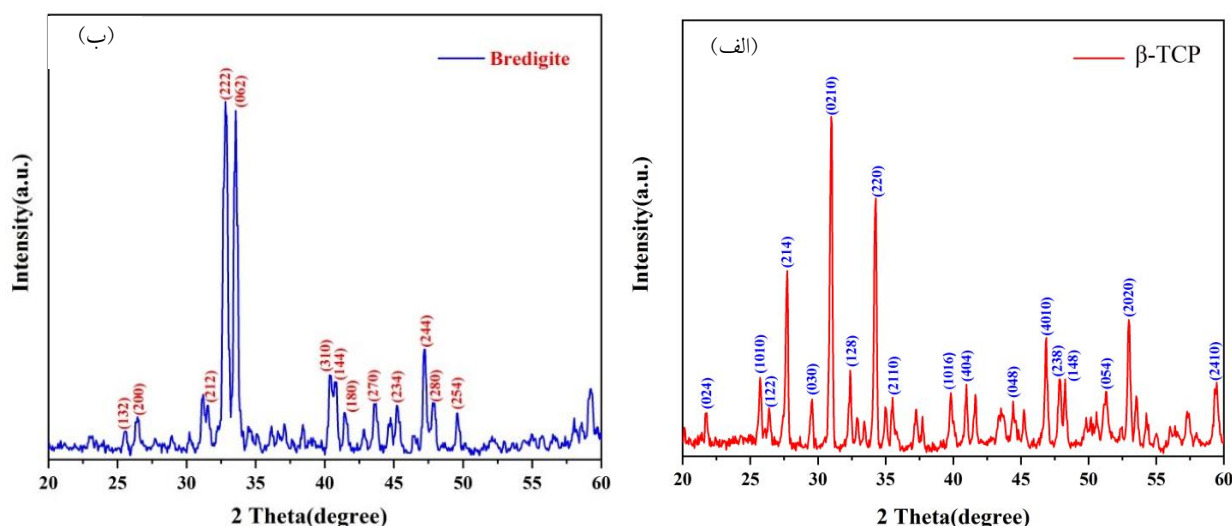
برای شناسایی ترکیب فازی پودرهای سنتز شده و داربست‌های متخلخل کامپوزیتی از تحلیل پراش پرتوی ایکس^۳ (XRD) استفاده شد. الگوهای پراش پرتوی ایکس به‌وسیله دستگاه پراش سنج مدل، با طول موج $\text{CuK}\alpha=1.54$ درجه آنگستروم و محدوده روبش بین ۲۰ تا ۸۰ درجه بررسی شد. پس از حصول الگوهای پراش پرتوی ایکس، فازهای کریستالی از طریق مقایسه پیک‌های پراش و شدت آنها با اطلاعات موجود در استاندارد انجمن استاندارد و تفرق پودری (JCPDS; Joint Committee on) مشخص و تعیین شد. در این پژوهش به‌منظور بررسی و تحلیل الگوهای پراش پرتوی ایکس از نرم‌افزار XPert HighScore استفاده شده است. به‌منظور تعیین اندازه بلورک از روش ویلیامسون- هال استفاده شد [۱۶]:

$$\beta \cos \theta = \frac{0.89\lambda}{d} + 2\varepsilon \sin \theta \quad (1)$$

ε در رابطه (۱) میزان کرنش پسماند را نشان می‌دهد. d اندازه بلورک‌ها برحسب نانومتر، λ طول موج مورد استفاده، β عرض قله در نصف ارتفاع برحسب رادیان و θ زاویه قله برحسب درجه است. در این روش نمودار $\beta \cos \theta$ برحسب $\sin \theta$ برای تمامی پیک‌ها یا هر تعدادی از پیک‌های انتخاب شده رسم شده و بهترین خط گذرا از آن به‌دست می‌آید. در نهایت شیب این خط نشان‌دهنده مقدار عددی 2ε و عرض از مبدأ آن $0.89 \lambda / d$ است. چنین خطی به نمودار ویلیامسون- هال موسوم است. در این مطالعه، محاسبه اندازه بلورک نانوپودرها با استفاده از این روش انجام گرفت [۱۶].

برای محاسبه درصد تخلخل داربست‌ها از روش جابه‌جایی مایع (قانون ارشمیدس) استفاده شد. تخلخل‌های موجود در داربست‌های تولید شده به دو صورت باز و بسته است. میزان تخلخل باز یا تخلخل ظاهری، تعیین کننده میزان نفوذپذیری داربست‌ها و یا سهولت عبور مایعات و گازها از داربست است و با استفاده از رابطه (۲) محاسبه می‌شود.

$$W_d \text{ وزن داربست در حالت خشک, } W_s \text{ وزن داربست در} \quad (2) \quad \text{تخلخل ظاهری یا تخلخل باز} = \left[\frac{(W_w - W_d)}{(W_w - W_s)} \right] \times 100$$



شکل ۱- الگوی پراش پرتوی ایکس پودر: (الف) بتا تری کلسیم فسفات و (ب) پودر بریدیجیت [۱۹]

محلول شبیه سازی شده بدن از آنالیز عنصری با تفکیک انرژی پرتوی ایکس^۵ (EDS, JEOL Inc., Tokyo, Japan) که روی دستگاه میکروسکوپ الکترونی روبشی نصب است، استفاده شد.

۳- نتایج و بحث

۳-۱- مشخصه یابی پودرها و داربست‌ها

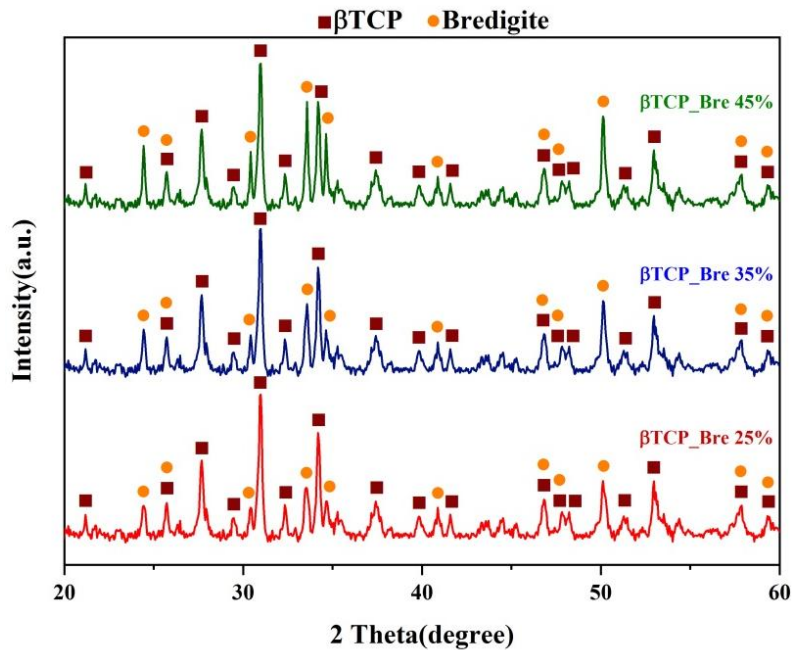
نتایج پراش پرتوی ایکس پودرهای بتا تری کلسیم فسفات و بریدیجیت در شکل (۱) نشان داده شده است. الگوی پراش پرتوی ایکس پودرهای بتا تری کلسیم فسفات و بریدیجیت، تمام پیک‌های مشخصه بتا تری کلسیم فسفات و بریدیجیت را بدون حضور ناخالصی در محصولات نهایی نشان می‌دهد. نتایج به دست آمده از آنالیز پودرهای بتا تری کلسیم فسفات و بریدیجیت با نتایج ارائه شده توسط کمیته استانداردسازی پودر مطابقت دارد. طبق رابطه ویلبامسون- هال [۱۶]، اندازه کریستالیت بتا تری کلسیم فسفات و بریدیجیت به ترتیب در محدوده ۹۲ و ۷۲ نانومتر است [۱۹].

الگوهای پراش پرتوی ایکس ترکیبات کامپوزیتی β -TCP/25 Bre، β -TCP/35 Bre و β -TCP/45 Bre در شکل (۲) نشان داده شده است. مطابق الگوی پراش پرتوی ایکس،

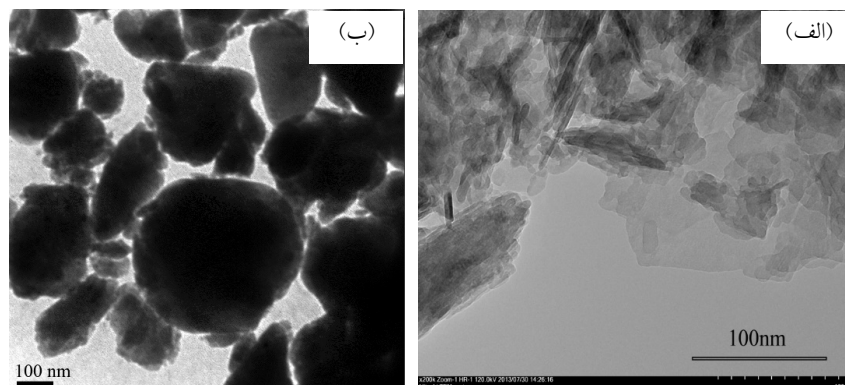
داربست تف‌جوشی شده β -TCP/20 Bre تهیه شده در داخل فالكون‌های ۱۵ سی سی از جنس پلی اتیلن قرار داده شدند. سپس ۱۵ میلی لیتر محلول شبیه سازی شده بدن پس از رسیدن به دمای حدود ۳۷ درجه سانتی گراد به داخل فالكون‌ها اضافه شد و درب فالكون‌ها با درپوش‌های پلاستیکی بسته شد. به منظور تشکیل رسوب یکنواخت آپاتیت بر سطح داربست‌ها، نمونه‌ها به صورت عمودی در مایع شبیه سازی شده بدن غوطه‌ور شدند. نمونه‌ها پس از ۲۸ روز غوطه‌وری با استفاده از یک پنس از داخل محلول شبیه سازی شده بدن خارج شده و پس از شستشو با آب مقطر به مدت یک روز در دمای ۱۰۰ درجه سانتی گراد خشک شدند. قرارگیری داربست متخلخل در درون محلول شبیه سازی شده بدن زمینه ساز انجام واکنش‌های شیمیایی بین محلول شبیه سازی شده و نمونه متخلخل خواهد شد. برای شناسایی بهتر چگونگی انجام واکنش‌های صورت پذیرفته بین نمونه و محلول شبیه سازی شده بدن و بررسی نحوه پیشرفت این واکنش‌ها، داربست کامپوزیتی که در محلول شبیه سازی شده بدن غوطه‌ور شد مورد ارزیابی قرار گرفت.

۲-۵- بررسی ترکیب شیمیایی با آنالیز عنصری با تفکیک انرژی پرتوی ایکس

به منظور بررسی ترکیب شیمیایی داربست پس از غوطه‌وری در



شکل ۲- الگوی پراش پرتوی ایکس ترکیبات کامپوزیتی β -TCP/25 bre، β -TCP/35 bre و β -TCP/45 bre

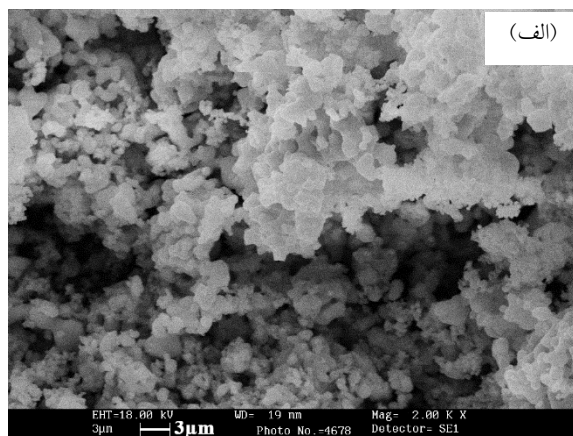
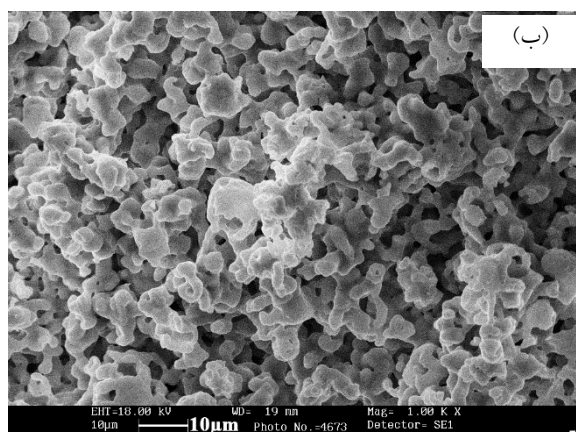


شکل ۳- تصویر میکروسکوپی الکترونی عبوری: (الف) پودر سنتز شده β -TCP و (ب) پودر کامپوزیتی β -TCP/25%wt bre

نانوپودرهای سنتز شده، تا حدی نانوپودرها آگلومره شده و به هم چسبیده‌اند. طبق مطالعه‌ای، مشاهده شد که بیوسرامیک‌های نانو ساختار ویژگی‌های مکانیکی بالاتری نسبت به انواع میکرو دانه دارند [۲۰]. همچنین طبق مطالعات انجام شده، نانو ساختارها به دلیل نسبت سطح به حجم بسیار بالا دارای واکنش‌پذیری بالایی هستند که تأثیر بسزایی در پاسخ‌های بیولوژیکی دارد، به طوری که مواد با ساختار نانو در مقایسه با مواد با ساختار ماکرو خواص آنتی‌باکتریال بالاتر، زیست‌فعالی بهتر و قابلیت چسبندگی سلولی بالاتری دارند [۲۱].

تمامی کامپوزیت‌ها شامل فاز اصلی β -TCP و ترکیب بریدجیت هستند. شدت پیک پراش فاز بریدجیت با افزایش مقدار نانوپودر بریدجیت افزایش می‌یابد.

شکل (۳) تصاویر میکروسکوپی الکترونی عبوری از پودر β -TCP و پودر کامپوزیتی β -TCP/25%wt bre را نشان می‌دهد. تصاویر میکروسکوپی الکترونی عبوری، اشاره به مورفولوژی آگلومره با شکل کره‌ای دارد که هر آگلومره شامل چندین کریستالیت با اندازه ذره در محدوده ۷۰-۱۰۰ نانومتر است. مطابق شکل مشاهده می‌کنیم که به دلیل واکنش‌پذیری بالای

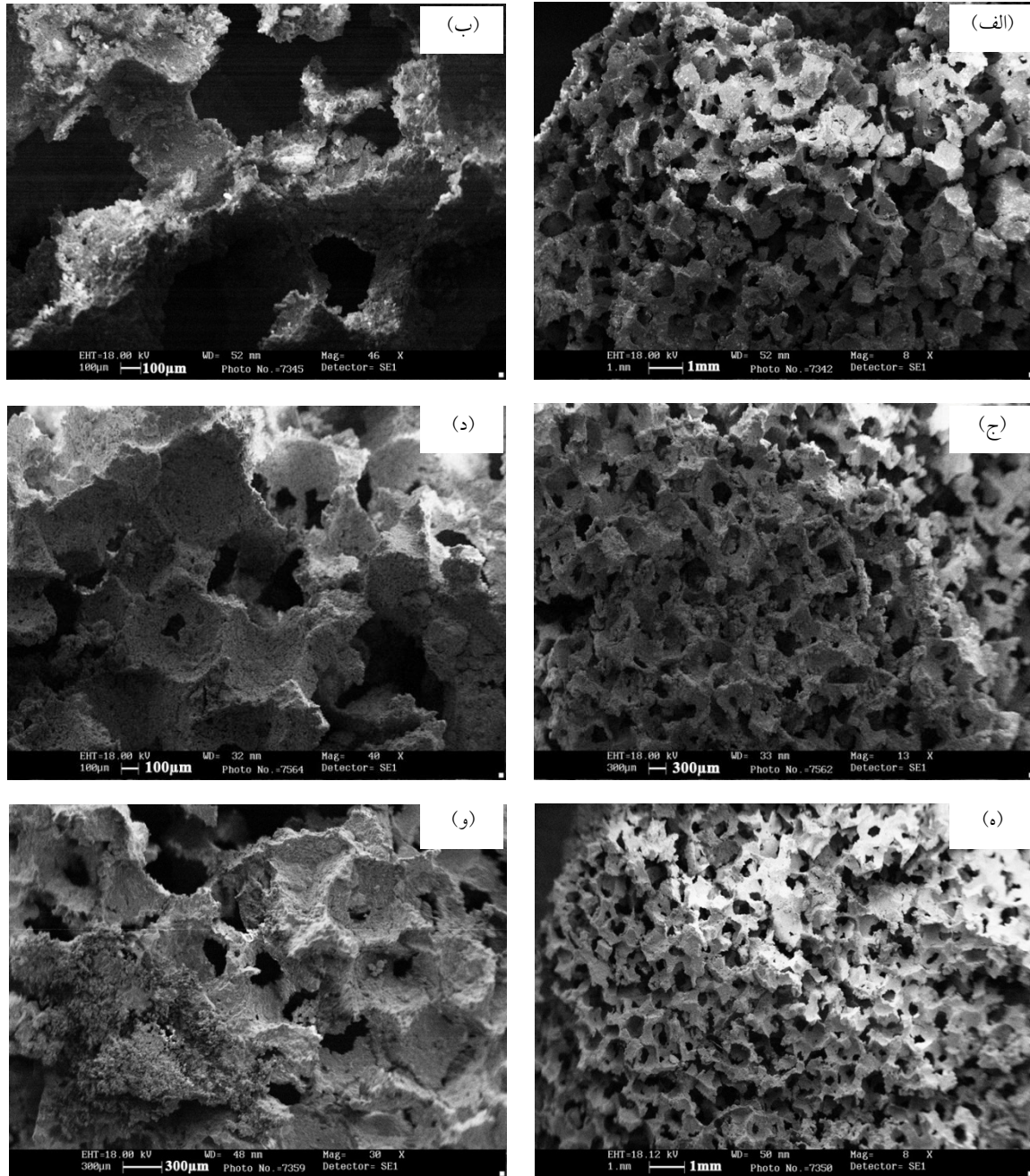


شکل ۴- تصویر میکروسکوپی الکترونی روبشی: (الف) پودر β -TCP و (ب) پودر بریدیجیت

ارشمیدس) به ترتیب ۷۹/۴۲، ۷۷/۷۵ و ۷۵/۳۶ محاسبه شد. اختلاف معنادار در بین نتایج تخلخل، نشان‌دهنده تأثیر درصد بریدیجیت بر درصد تخلخل داربست است. چگالی داربست‌ها با افزایش مقدار بریدیجیت افزایش می‌یابد که تأییدی بر نقش بریدیجیت در کاهش میکروحفرات در دیواره داربست‌ها و بهبود تراکم آنها دارد.

درصد تخلخل، اولین پارامتر مهم در تعیین خواص مکانیکی و زیست‌سازگاری داربست‌ها است. نفوذ رگ‌ها به داربست و تغذیه سلول‌ها، انتقال گازها و کنترل فاکتورهای بقای تکثیر و تمایز سلول، همگی به درصد تخلخل و ارتباط حفرات با یکدیگر بستگی دارد. بنابراین انتخاب داربست مناسب منوط به درصد تخلخل بالای داربست برای تکثیر سلول و همبندی با بافت استخوان است. هرچه درصد تخلخل افزایش یابد منجر به افزایش نسبت سطح به حجم داربست شده و در واقع سطح بیشتری به سلول‌ها چسبیده می‌شود. همان‌طور که گفته شد میانگین اندازه منافذ تخمین زده شده از تصاویر میکروسکوپی الکترونی روبشی، در محدوده ۲۰۰-۶۰۰ میکرومتر متغیر است که برای چسبندگی، تکثیر و تمایز سلولی و ایجاد مسیرهایی برای مایعات بیولوژیکی مناسب است. طبق مطالعات پیشین یک داربست ایده‌آل برای کاربرد در مهندسی بافت استخوان باید دارای ساختاری متخلخل با تخلخل‌های به هم پیوسته برای تبادل اکسیژن و مواد غذایی برای زنده ماندن، رشد و مهاجرت سلولی باشد.

تصاویر میکروسکوپی الکترونی روبشی اطلاعاتی درباره توزیع اندازه تخلخل، مورفولوژی، اندازه و ارتباط بین تخلخل‌ها ارائه می‌کند. از این رو به منظور شناسایی ساختار تخلخل‌ها، سطح داربست‌های ساخته شده با استفاده از میکروسکوپ الکترونی روبشی بررسی شد. تصاویر میکروسکوپ الکترونی روبشی پودر بتا تری کلسیم فسفات، بریدیجیت در شکل (۴) نشان داده شده است. همان‌طور که در شکل دیده می‌شود، پودرهای β -TCP و بریدیجیت دارای مورفولوژی کروی با ذرات آگلومره هستند. تصاویر میکروسکوپ الکترونی روبشی و هیستوگرام اندازه ماکروحفره‌های داربست‌های β -TCP حاوی مقادیر مختلف بریدیجیت نیز به ترتیب در شکل‌های (۵) و (۶) نشان داده شده است. مطابق شکل نمایان است که تمامی داربست‌های سنتز شده دارای ساختاری متخلخل هستند. درصد تخلخل نمونه‌ها با نرم‌افزار Image J به‌طور متوسط ۷۶-۷۴ درصد تعیین شد. رنج تخلخل‌ها برای هر سه نمونه در محدوده ۲۰۰ تا ۶۰۰ میکرومتر تعیین شد. هیستوگرام اندازه ماکروحفره‌های داربست‌های کامپوزیتی شامل ۲۵، ۳۵ و ۴۵ درصد وزنی پودر بریدیجیت (شکل ۶)، نشان‌دهنده داربست‌های متخلخل شامل میانگین اندازه منافذ به ترتیب $448/8 \pm 17/76$ ، $418/1 \pm 26/5$ و $396/5 \pm 37/2$ میکرومتر است. میانگین تخلخل نمونه‌ها نیز $421/13 \pm 22$ میکرومتر تعیین شد. طبق نتایج، میانگین تخلخل داربست‌ها با روش ارشمیدس در محدوده ۷۵-۷۹ درصد محاسبه شد. درصد تخلخل داربست‌های β -TCP/25Bre، β -TCP/35Bre و β -TCP/45Bre با این روش (روش

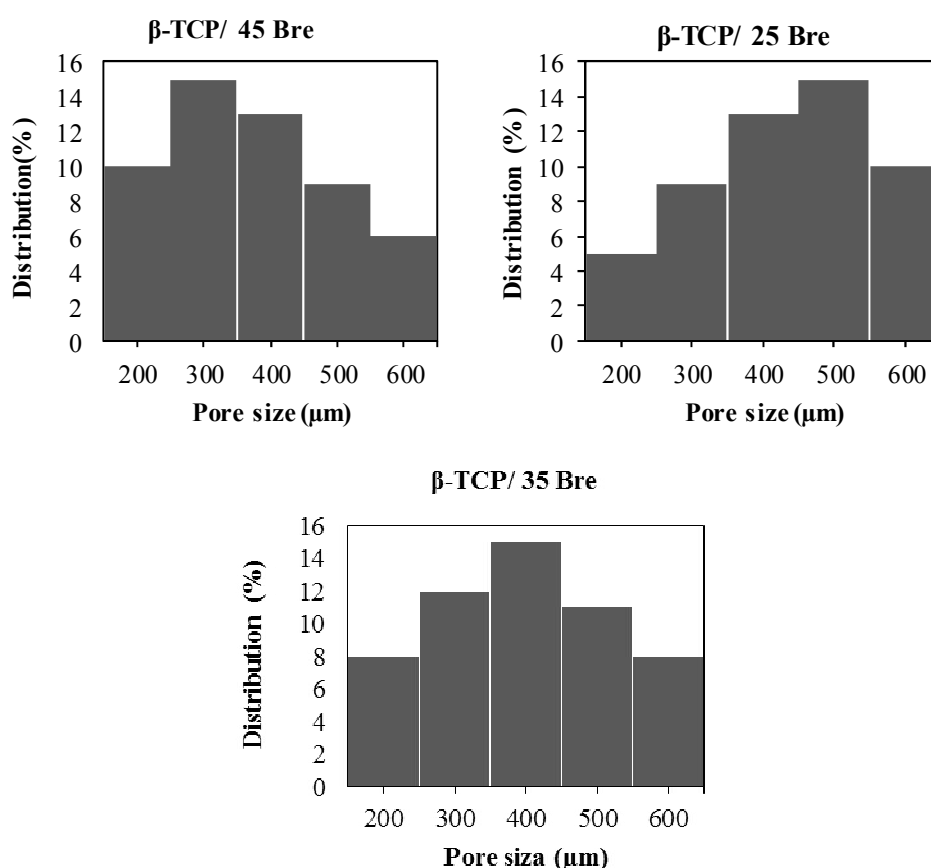


شکل ۵- تصاویر میکروسکوپی الکترونی روبشی داربست‌های:

الف و ب) β -TCP/25 bre، ج و د) β -TCP/35 bre و ه و و) β -TCP/45 bre در بزرگنمایی‌های مختلف

خیلی کوچک باشند، نفوذ سلول‌ها به حفرات مسدود شده و موجب مرگ سلولی می‌شود و همچنین رگ‌زایی و تولید ماتریکس مختل می‌شود. تخلخل‌هایی با ابعاد بزرگ‌تر از ۳۰۰ میکرون برای تسریع فرایند شکل‌گیری استخوان جدید، رشد استخوان و رگ‌زایی در داربست مهندسی بافت استخوان ضروری است.

داربست‌هایی که فاقد تخلخل باشند، سلول‌ها نمی‌توانند به عمق آن نفوذ و رشد پیدا کنند. در نتیجه زمانی که در داخل بدن ایمپلنت شوند با پدیده رد پیوند مواجه می‌شوند. بنابراین دارا بودن تخلخل مناسب در طراحی یک داربست مهندسی بافت استخوان از مهم‌ترین فاکتورهای طراحی است. اگر حفرات داربست

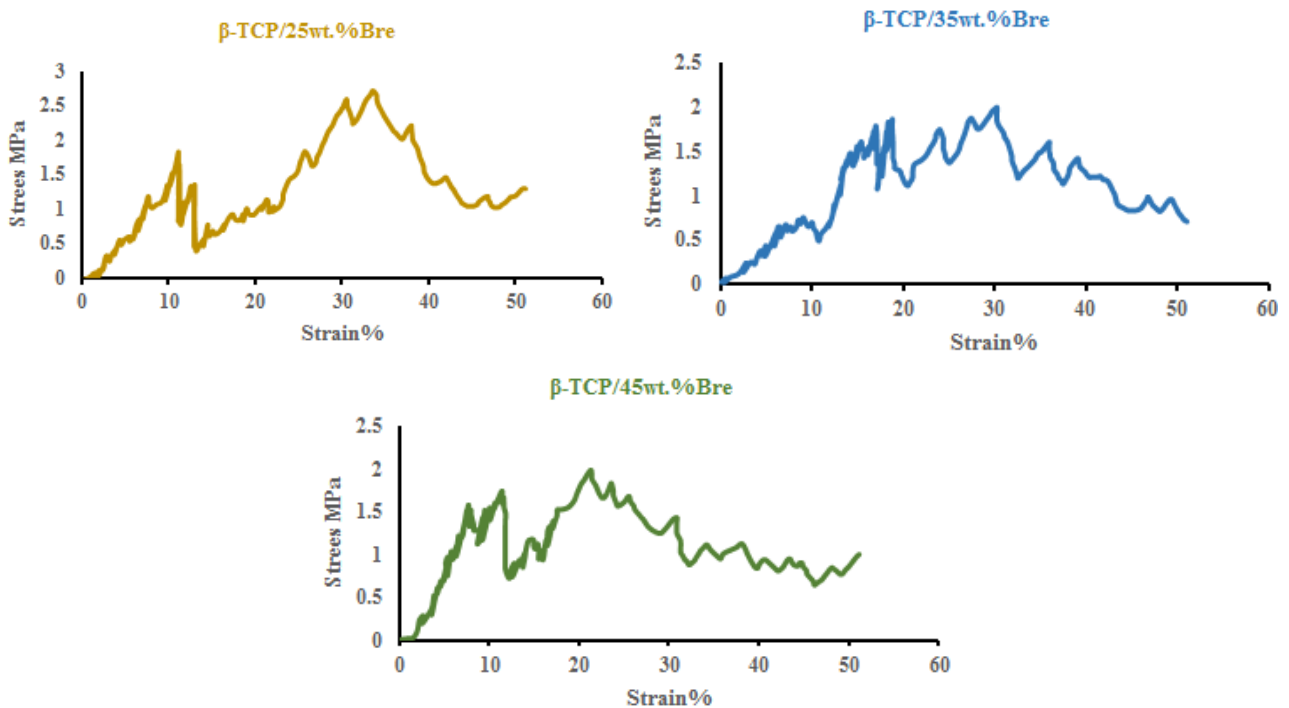


شکل ۶- هیستوگرام توزیع اندازه ماکرو حفرات داربست‌های β-TCP/25 Bre، β-TCP/35 Bre و β-TCP/45 Bre

کامپوزیتی با پایه هیدروکسی‌آپاتیت حاوی ۵، ۱۰ و ۱۵ درصد وزنی نانوپودر بریدیجیت را سنتز کردند. نتایج آنها نشان داد که افزایش نانوپودر بریدیجیت منجر به کاهش اندازه منافذ و افزایش چگالی داربست‌ها می‌شود. صادق زاده و همکاران [۲۳] نیز داربست‌های کامپوزیتی فورستریت- دایوپساید را با مقادیر مختلف دایوپساید سنتز کردند. تخلخل نمونه‌های اندازه‌گیری شده توسط روش ارشمیدس بین ۶۹ و ۷۹ درصد متفاوت بود. در واقع، با افزایش مقدار دایوپساید، اندازه منافذ کاهش می‌یابد، در حالی که استحکام فشاری افزایش می‌یابد. دایوپساید به‌عنوان فلاکس در فرایند تف‌جوشینگ عمل می‌کند، درجه حرارت تف‌جوشی را کاهش می‌دهد تا پیوند قوی‌تری بین دانه‌های فورستریت ایجاد کند [۲۲].

البته باید به این نکته مهم توجه شود که میزان تخلخل بالا و سایز تخلخل بزرگ می‌تواند منجر به افت شدید استحکام مکانیکی شود و داربست با کوچک‌ترین فشار تخریب شود. بنابراین همیشه باید تعادل بین دو پارامتر تخلخل و استحکام مکانیکی حفظ شود [۲۱].

افزایش فاز بریدیجیت منجر به اندکی کاهش سایز منافذ می‌شود. همان‌طور که مشاهده می‌شود، با افزایش مقدار بریدیجیت، اندازه منافذ کاهش می‌یابد که احتمالاً به افزایش قابلیت تف‌جوشی داربست نسبت داده می‌شود. دمای تف‌جوشی نمونه‌ها نزدیک به نقطه ذوب بریدیجیت انتخاب شد. به همین دلیل، نانوپودر بریدیجیت ممکن است به‌عنوان یک کمک تف‌جوشی برای افزایش خواص مکانیکی داربست عمل کند [۲۰]. به‌طور مشابه، ایلباقی و همکاران [۲۲] داربست



شکل ۷- استحکام فشاری نهایی داربست‌ها به‌عنوان تابعی از مقدار بریدیجیت

۳-۲- نتایج تعیین خواص مکانیکی

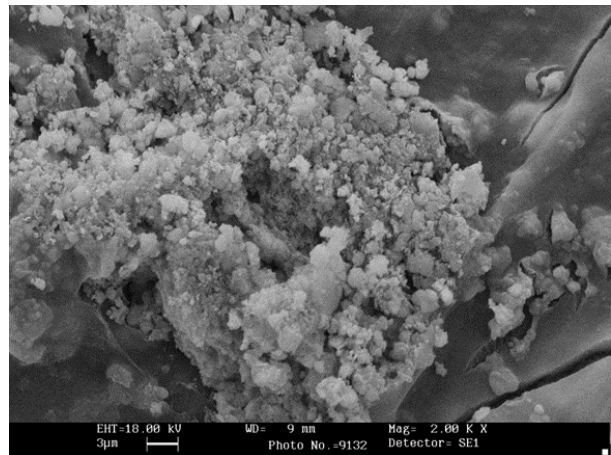
در استخوان طبیعی، ارتباط کریستال‌های نانوذره هیدروکسی آپاتیت با الیاف کلاژنی سبب پایداری و خواص مکانیکی منحصر به فردی می‌شود. به‌همین دلیل یافتن مواد مصنوعی که خواص مکانیکی مشترک با استخوان طبیعی داشته باشد دقت و آگاهی زیادی لازم دارد [۲۴]. استحکام فشاری داربست‌های β -TCP / bre در شکل (۷) نشان داده شده است. مطابق شکل مشاهده می‌شود که در منحنی تنش- کرنش هر سه نمونه، سه ناحیه مختلف قابل مشاهده است که این سه ناحیه مجزا طبق مطالعات پیشین صورت گرفته درباره داربست‌های سرامیکی متخلخل سنتز شده به‌روش فضا‌ساز به این صورت تعریف می‌شود: (۱) ناحیه اول ناحیه کاملاً خطی است که تنش با کرنش تقریباً رابطه مستقیمی دارد و مدول الاستیک از شیب این ناحیه خطی محاسبه می‌شود و این ناحیه تا استحکام فشاری ماکزیمم ادامه می‌یابد. (۲) ناحیه دوم بیانگر از هم گسسته شدن تخلخل‌ها تحت فشار است که در این ناحیه تخلخل‌ها از هم گسیخته و شکسته می‌شوند. (۳) در ناحیه سوم متراکم شدن داربست و

بسته شدن تخلخل‌ها طی افزایش فشار اتفاق می‌افتد [۱۳]. مطابق شکل (۷) استحکام فشاری نهایی برای نمونه‌های β -TCP / 25Bre، β -TCP / 35Bre و β -TCP / 45Bre به ترتیب حدود ۲/۷، ۲/۱ و ۲/۰ مگاپاسکال تعیین شد که کاملاً در محدوده استحکام فشاری استخوان اسفنجی (۰/۲-۴ مگاپاسکال) بوده و دلالت بر توانایی بالای داربست‌های ساخته شده برای استفاده در مهندسی بافت استخوان دارد. طبق مطالعات ایلباقی و همکاران محدوده استحکام فشاری نهایی برای داربست‌های هیدروکسی آپاتیت حاوی مقادیر کم بریدیجیت (۵، ۱۰، ۱۵ درصد وزنی) در محدوده ۱/۷-۱ مگاپاسکال است [۲۲]. همچنین در مطالعه دیگری [۱۹] داربست کامپوزیتی بتا تری کلسیم فسفات- بریدیجیت حاوی مقادیر کم بریدیجیت به‌روش فضا‌ساز سنتز شد و استحکام فشاری نهایی در محدوده ۱/۹-۰/۵ مگاپاسکال به‌دست آمد. در این پژوهش با افزودن مقدار بریدیجیت به داربست بتا تری کلسیم فسفات تا ۲۵ درصد وزنی استحکام فشاری نسبت به مقادیر کم بریدیجیت [۱۹] بهبود می‌یابد.

به درستی اتفاق نیفتاده باشد و دارای توزیع یکنواختی نباشد. بدین صورت که ممکن است در یک قسمت بریدجیت حضور نداشته نباشد اما در قسمت دیگر تجمع دانه‌های بریدجیت را داشته باشیم و آگلومره شدن اتفاق بیفتد. هرچقدر درصد بریدجیت بالاتر می‌رود امکان انجام نشدن درست آسیاکاری و عدم توزیع یکنواخت پودر بیشتر است. در نتیجه، افزودن بیشتر بریدجیت باعث کاهش استحکام فشاری می‌شود که ناشی از آگلومره شدن فاز بریدجیت در مرز دانه‌ها است که به‌عنوان محل شروع ترک عمل کرده و بنابراین استحکام فشاری را کاهش می‌دهد.

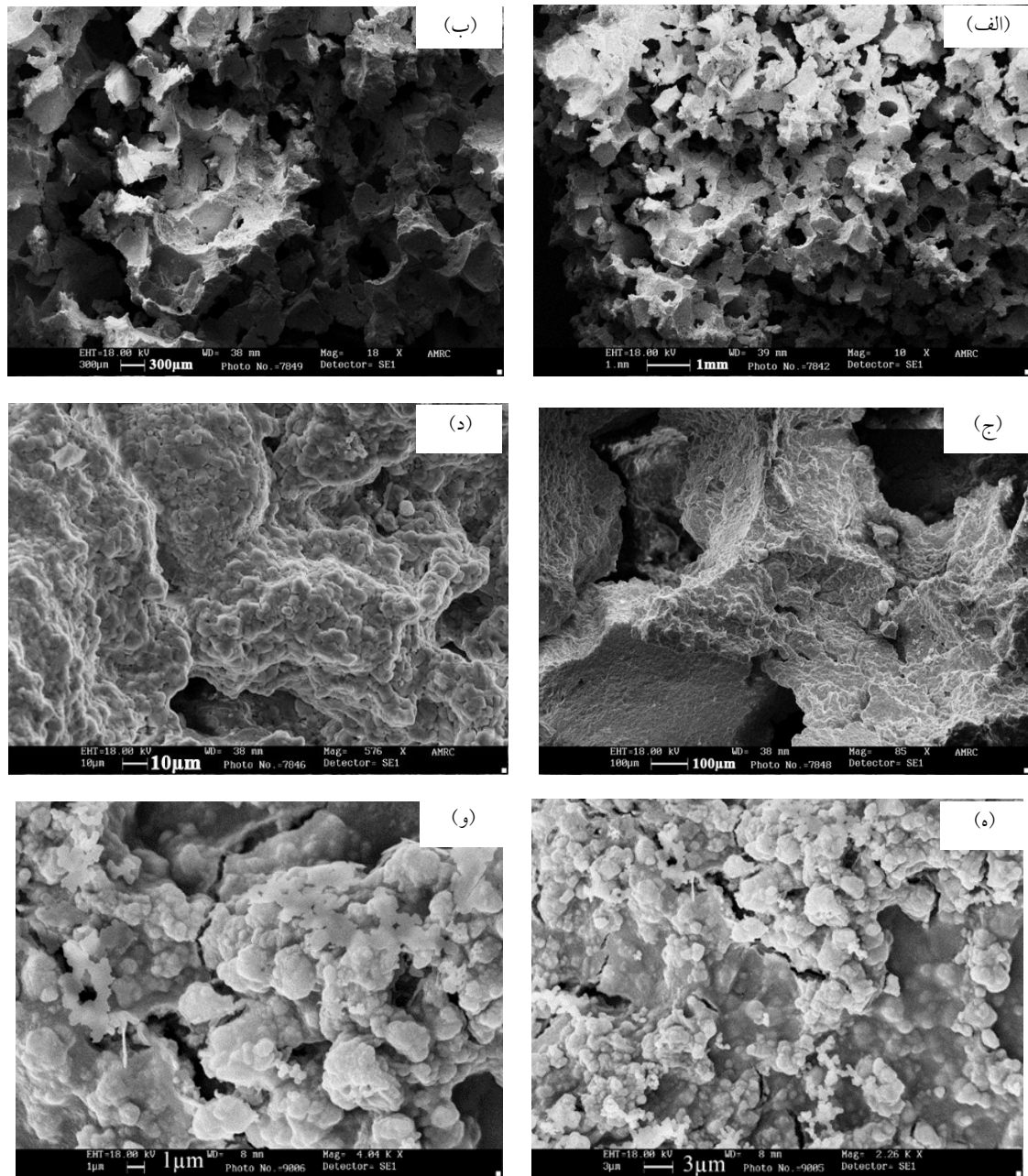
بدیهی است که نمونه‌های متراکم پودر نانوکامپوزیت سنتر شده در دمای بالا در مقایسه با تک‌فازهای بتا تری‌کلسیم فسفات و بریدجیت، بهبود قابل توجهی در خواص مکانیکی نشان می‌دهند که هر کدام به‌نوبه خود به‌عنوان یک کاندید مناسب برای استفاده در مهندسی بافت استخوان هستند [۲۰]. همچنین لازم به ذکر است که مسیر فراوری مورد استفاده برای تهیه داربست‌ها نقش مهمی در خصوصیات ریزساختاری مواد دارد. در نتیجه، داربست‌های آماده شده از همان زمینه، اما با استفاده از روش‌های مختلف، منجر به تخلخل‌های مختلف و در نتیجه رفتار مکانیکی متفاوت می‌شوند. سپلودا و همکاران تولید داربست‌های هیدروکسی آپاتیت را گزارش کردند که دارای تخلخل‌های نسبی متغیر در مرزها و استحکام فشاری در محدوده ۵/۸-۱/۶ مگاپاسکال است. وو و همکاران نیز در سال ۲۰۱۱ آماده‌سازی داربست‌های بایوگلس را که دارای تخلخل ۷۹ درصد و استحکام فشاری ۱/۹ مگاپاسکال هستند گزارش کردند. در هر دو مورد، مقادیر توصیف شده برای استحکام فشاری داربست‌ها با تخلخل مشابه، نزدیک به مقادیر به‌دست آمده در این کار است [۱۴].

۳-۳- نتیجه ارزیابی میزان زیست‌فعالی داربست β -TCP/25Bre
میزان زیست‌فعالی با تشکیل لایه آپاتیت روی سطح داربست‌های در مجاورت با مایع بیولوژیکی یا محلول شبیه‌سازی شده بدن مشخص می‌شود. شکل (۹) تصاویر



شکل ۸- تصویر میکروسکوپی الکترونی روبشی از آگلومره شدن پودر بریدجیت در داربست β -TCP/35 Bre

در حقیقت، بریدجیت به‌عنوان یک فیلر در کامپوزیت عمل می‌کند، از این‌رو منجر به کاهش دمای تف‌جوشی و در نتیجه بهبود خواص مکانیکی می‌شود. از طرفی چون بریدجیت یک بیوسرامیک با استحکام بالا است، سبب افزایش استحکام فشاری داربست‌های بتا تری‌کلسیم فسفات نیز می‌شود. علاوه بر این، حضور بریدجیت در زمینه بتا تری‌کلسیم فسفات همزمان روند تف‌جوشی را بهبود بخشیده و رشد دانه را کاهش می‌دهد [۲۲]. یافته‌های مشابهی در سایر مطالعات بیان شده مربوط به وجود دایوپساید در زمینه اکسید آلومینیم که دایوپساید منجر به کاهش رشد دانه آلومینا و افزایش میزان فشردگی می‌شود. اما در مقادیر بالاتر، تجمع فاز دایوپساید در امتداد مرزهای دانه منجر به شروع ترک شده و از این‌رو استحکام فشاری داربست‌ها را کاهش می‌دهد [۲۵]. مشابه این نتایج، تصویر میکروسکوپی الکترونی روبشی از آگلومره شدن بریدجیت در داربست β -TCP/35Bre در شکل (۸) نشان داده شده است. مکانیزم آگلومره شدن بریدجیت بدین صورت اتفاق می‌افتد که در ساخت این داربست‌ها درصد بالایی نمک کلرید سدیم به‌عنوان فضا‌ساز استفاده شد یعنی با نسبت ۸۵ به ۱۵ درصد، نمک کلرید سدیم با پودر کامپوزیتی مخلوط شد، از طرفی سایز دانه‌های کلرید سدیم نسبت به پودر کامپوزیتی درشت‌تر بوده، بنابراین این امکان وجود دارد که اختلاط

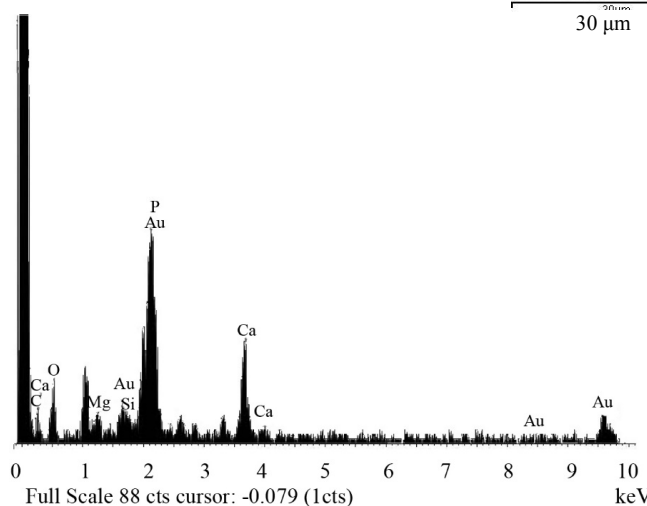
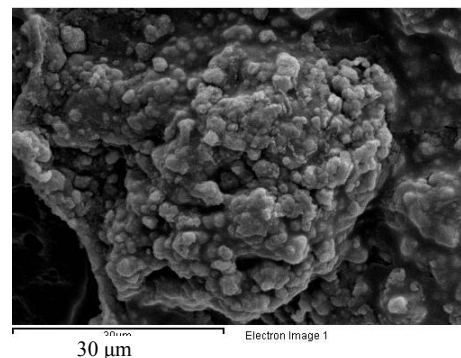


شکل ۹- الف و) تصاویر میکروسکوپ الکترونی روبشی مربوط به داربست β -TCP/25Bre پس از ۲۸ روز غوطه‌وری در محلول شبیه‌سازی شده بدن در بزرگنمایی‌های مختلف

از ۲۸ روز غوطه‌وری داربست در محلول شبیه‌سازی شده بدن، آپاتیت استخوانی سطح منافذ را پوشانده است. مطالعات قبلی در مورد بیوسرامیک‌های حاوی سیلیسیم، زیست‌فعالی بیشتر آنها را نسبت به کلسیم فسفات‌ها نشان می‌دهد [۲۶].

میکروسکوپی الکترونی روبشی مربوط به داربست β -TCP / 25Bre را پس از غوطه‌وری به مدت ۲۸ روز در محلول شبیه‌سازی شده بدن نشان می‌دهد. ارزیابی زیست‌فعالی در تأیید تشکیل لایه آپاتیت روی سطح داربست کامپوزیتی موفقیت‌آمیز بود. طبق تصاویر میکروسکوپی الکترونی روبشی (شکل ۹) پس

Element	App Conc.	Intensity Corr.	Weight%	Weight% Sigma	Atomic%
C K	0.27	0.3556	0.75	0.16	51.66
O K	0.24	0.2940	0.81	0.21	41.70
Mg K	0.04	0.6442	0.05	0.02	1.86
Si K	0.01	0.8274	0.01	0.02	0.43
P K	0.05	1.2172	0.04	0.06	1.17
Ca K	0.14	0.9082	0.15	0.04	3.18
Totals			1.83		



شکل ۱۰- طیف تفکیک انرژی پرتوی ایکس داربست β -TCP/25Bre بعد از ۲۸ روز غوطه‌وری در محلول شبیه‌سازی شده بدن

نقاط با بار منفی مانند آهن‌با یون‌های با بار مثبت موجود در محلول مانند Ca^{2+} را به‌خود جذب می‌کند. در حالت دوم، جوانه‌زنی آپاتیت به ویژگی‌های میکروساختاری و ترکیب شیمیایی سطح ماده مربوط می‌شود که مکان‌های مناسب جوانه‌زنی را در سطح فراهم می‌کند. گفتنی است که حضور دو گروه عاملی اکسید کلسیم (CaO) و دی‌اکسید سیلیسیم (SiO_2) در سطح مواد برای ایجاد جوانه‌زنی آپاتیت لازم است. ابتدا آپاتیت‌ها به‌صورت گرانول‌های مجزا رشد کرده و سپس این گرانول‌ها با افزایش زمان رشد کرده و به هم متصل می‌شوند تا یک لایه متراکم را تشکیل دهند [۲۸]. مطابق مطالعات پیشین مکانیزم آپاتیت‌سازی بریدجیت بدین صورت است که زمانی که بریدجیت در محلول شبیه‌سازی شده بدن قرار می‌گیرد یون‌های Ca^{2+} به داخل محلول رهاش پیدا می‌کنند که منجر به افزایش pH محلول می‌شود و شرایط را برای جوانه‌زنی آپاتیت مساعد می‌کند. از طرفی دیگر رهاش یون‌های سیلیسیوم از

طیف تفکیک انرژی پرتوی ایکس داربست β -TCP/25Bre پس از ۲۸ روز غوطه‌وری در محلول شبیه‌سازی شده بدن در شکل (۱۰) نشان داده شده است. غلظت یون‌های کلسیم و فسفر افزایش می‌یابد که تأییدی بر تشکیل لایه آپاتیت روی سطح است. علاوه بر این، یون‌های منیزیم و سیلیسیم آشکار شده روی داربست مربوط به فاز بریدجیت است. نسبت Ca/P حدود ۲/۷۱ است که نشان‌دهنده تشکیل یک لایه متراکم آپاتیت روی سطح است. در مطالعه‌ای توسط وو و همکاران نشان داده شد که بریدجیت بعد از غوطه‌وری داخل محلول شبیه‌سازی شده بدن به مدت ۱۰ روز قابلیت آپاتیت‌سازی دارد [۲۷]. طبق مطالعات انجام شده [۲۸]، مکانیزم تشکیل لایه آپاتیت روی سرامیک‌های کلسیم سیلیکاتی زمانی که در محلول شبیه‌سازی شده بدن قرار می‌گیرند به دو صورت اتفاق می‌افتد. مکانیزم اول شامل رهاش یون‌های حاصل از تخریب سطح سرامیک است که منجر به تشکیل شارژ با بار منفی در سطح می‌شود که این

نانوساختار، تلاش بر تولید داربست‌های نانوساختار متخلخل سرامیکی متمرکز شد. به این منظور داربست‌های بتا تری کلسیم فسفات با درصدهای مختلفی از بریدجیت (۲۵، ۳۵ و ۴۵ درصد وزنی) تقویت شد و به‌روش فضا‌ساز به‌صورت داربست‌های متخلخل سنتز شد. در این پژوهش تأثیر درصدهای مختلف بریدجیت روی خواص مکانیکی و زیست‌فعالی بررسی شد.

۱- داربست‌ها یک ساختار همگن با منافذ کروی و به‌هم پیوسته داشته، اندازه تخلخل حدود ۷۹-۷۵ درصد و اندازه متوسط منافذ در محدوده ۶۰۰-۲۰۰ میکرومتر متغیر است.

۲- نتایج استحکام فشاری نشان داد که با افزایش درصد بریدجیت تا ۲۵ درصد وزنی مدول فشاری داربست‌ها تا حد قابل توجهی افزایش یافت. اما افزودن بیشتر بریدجیت باعث کاهش استحکام فشاری می‌شود که ناشی از آگلومره شدن فاز بریدجیت در مرز دانه‌ها است که به‌عنوان محل شروع ترک عمل کرده و بنابراین استحکام فشاری را کاهش می‌دهد.

۳- نتایج تست زیست‌فعالی حاکی از آن است که در نمونه β -TCP/25%wt.bredigite هسته‌زایی هیدروکسی آپاتیت مشاهده شد. نتایج همچنین نشان داد که افزودن بریدجیت به بیوسرامیک‌های متخلخل β -TCP ممکن است یک روش مؤثر برای تهیه داربست‌های زیست‌فعال برای کاربردهای مهندسی بافت استخوان باشد.

در بین داربست‌ها با درصدهای متفاوت بریدجیت، داربست β -TCP/25%wt.bredigite به دلیل دارا بودن بالاترین استحکام مکانیکی و زیست‌فعالی مناسب، به‌عنوان داربست بهینه انتخاب شد. امیدواریم که با پیشرفت‌های آینده در مهندسی بافت بتوان از داربست نانوکامپوزیتی کلسیم فسفاتی-کلسیم سیلیکاتی در زمینه ترمیم ضایعات استخوانی استفاده کرد.

تشکر و سپاسگزاری

بدینوسیله از حمایت‌های مالی و معنوی دانشگاه صنعتی نوشیروان بابل تشکر و قدردانی می‌شود.

سطح بریدجیت منجر به تشکیل گروه‌های سیلانی روی سطح آن می‌شود که این لایه دارای بار منفی است. این لایه با بار منفی، یون‌های مثبت موجود در محلول مانند Ca^{2+} را به‌خود جذب می‌کند؛ سپس این لایه با بار مثبت، یون‌های فسفات با بار منفی را به‌خود جذب می‌کند. درنهایت یک لایه کلسیم فسفاتی (آپاتیت) تمام سطح نمونه را می‌پوشاند و با افزایش زمان غوطه‌وری، جوانه آپاتیت تشکیل شده با مصرف یون‌های کلسیم و فسفات موجود در محلول رشد کرده و بزرگ‌تر می‌شود. با گذشت زمان pH محلول کاهش می‌یابد زیرا آپاتیت با اضافه کردن یون OH^- منجر به این کاهش می‌شود [۲۷]. مکانیزم جوانه‌زنی آپاتیت در بتا تری کلسیم فسفات نیز به رهائش یون‌های Ca^{2+} و PO_4^{3-} در داخل محلول نسبت داده می‌شود که افزایش زمان رهائش این یون‌ها منجر به افزایش درجه اشباع شدن محلول می‌شود و محیط مناسبی را برای جوانه‌زنی ترکیبات کلسیم فسفاتی ایجاد می‌کند. لازم به ذکر است هر چه زمان غوطه‌وری افزایش پیدا کند به دلیل افزایش نرخ انحلال بتا تری کلسیم فسفات، جوانه‌زنی آپاتیت بیشتر صورت می‌گیرد به طوری که لایه متراکمی از آپاتیت تمام سطح نمونه را می‌پوشاند [۲۹]. همچنان که از تصاویر مشخص است آپاتیت روی سطح و دیواره داخلی تخلخل‌ها، در نتیجه تماس داربست با محلول شبیه‌سازی شده بدن تشکیل شده است. از طرف دیگر تشکیل آپاتیت منجر به تغییر مورفولوژی و سایز تخلخل‌ها در داربست‌های تولیدی می‌شود. رشد کریستال‌های آپاتیت در داخل تخلخل‌ها منجر به پر شدن تخلخل‌های کوچک و کاهش اندازه تخلخل‌های بزرگ شده و بنابراین می‌تواند منجر به افزایش استحکام داربست‌ها شود. مورفولوژی آپاتیت تشکیل شده روی سطح داربست‌ها ظاهری تکه‌ای شکل داشته و مشاهدات در بزرگنمایی‌های بالاتر نشان می‌دهد که آپاتیت تشکیل شده از ذرات کروی بسیار ریزی تشکیل شده است.

۴- نتیجه‌گیری

در این پژوهش با توجه به مزایای زیست‌سرامیک‌های

واژه‌نامه

1. transmission electron microscopy
2. scanning electron microscopy
3. X ray diffraction
4. simulated body fluid
5. energy dispersive spectroscopy

مراجع

1. Niaza, K. V., Senatov, F. S., Kaloshkin, S. D., Maksimkin, A. V., and Chukov, D. I., "3D-Printed Scaffolds Based on PLA/HA Nanocomposites for Trabecular Bone Reconstruction", *Journal of Physics: Conference Series*, Vol. 741, pp. 28-30, 2016.
2. Tabata, Y., "Recent Progress in Tissue Engineering", *Drug Discovery Today*, Vol. 6, pp. 483-487, 2001.
3. Mikos, A. G., and Temenoff, J. S., "Formation of Highly Porous Biodegradable Scaffolds for Tissue Engineering", *Electronic Journal of Biotechnology*, Vol. 3, pp. 23-24, 2000.
4. Derakhshanfar, S., Mbeleck, R., Xu, K., Zhang X., Zhong, W., and Xing, M., "3D Bioprinting for Biomedical Devices and Tissue Engineering: A Review of Recent Trends and Advances", *Bioactive Materials*, Vol. 3, pp.144-156, 2018.
5. Karageorgiou, V., and Kaplan, D., "Porosity of 3D Biomaterial Scaffolds and Osteogenesis", *Biomaterials*, Vol. 26, pp. 5474-91, 2005.
6. Tanodekaew, S., Channasanon, S., Kaewkong, P., and Uppanan, P., "PLA-HA Scaffolds: Preparation and Bioactivity", *Procedia Engineering*, Vol. 59, pp. 144-149, 2013.
7. Nalla, R. K., Kinney, J. H., and Ritchie, R., "Mechanistic Fracture Criteria for Failure of Human Cortical Bone", *Nature Materials*, Vol. 2, pp. 164-169, 2003.
8. Asa'ad, F., Pagni, G., Pilipchuk, S. P., Gianni, A. B., Giannobile, W. V., and Rasperini, G., "3D-Printed Scaffolds and Biomaterials: Review of Alveolar Bone Augmentation and Periodontal Regeneration Applications", *International Journal of Dentistry*, Vol. 2016, pp. 1-16, 2016.
9. Mirhadi, B., Mehdikhani, B., and Askari, N., "Synthesis of Nano-Sized β -Tricalcium Phosphate via Wet Precipitation", *Processing and Application of Ceramics*, Vol. 5, pp. 193-198, 2011.
10. Salehi, S., and Fathi, M. H., "Fabrication and Characterization of Sol-Gel Derived Hydroxyapatite/Zirconia Composite Nanopowders with Various Yttria Contents", *Ceramics International*, Vol. 36, pp. 1659-1667, 2010.
11. Mirhadi, S. M., Tavangarian, F., and Emadi, R., "Synthesis, Characterization and Formation Mechanism of Single-phase Nanostructure Bredigite Powder", *Materials Science and Engineering C*, Vol. 32, pp.133-139, 2012.
12. Shi, J., Votruba, A. R., Farokhzad, O. C., and Langer, R., "Nanotechnology in Drug Delivery and Tissue Engineering: from Discovery to Applications", *Nano Letters*, Vol. 10, pp. 3223-3230, 2010.
13. Ghomi, H., Emadi, R., and Haghjooye Javanmard, Sh., "Fabrication and Characterization of Nanostructure Diopside Scaffolds Using the Space Holder Method: Effect of Different Space Holders and Compaction Pressures", *Materials & Design*, Vol. 91, pp. 193-200, 2016.
14. Lopes, J. H., Magalha, J. A., Gouveia, R. F., Bertran, C. A., Motisuke, M., Camargo, S., and Triche, E., "Hierarchical Structures of β -TCP/45S5 Bioglasshybrid Scaffolds Prepared by gel casting", *Journal of the mechanical behavior of biomedical materials*, Vol. 62, pp. 10-23, 2016.
15. Bakhsheshi-Rad, H. R., Hamzah, E., Abbasizadeh, N., Najafinezhad, A., and Kashefian, M., "Synthesis of Novel Nanostructured Bredigite-Amoxicillin Scaffolds for Bone Defect Treatment: Cytocompatibility and Antibacterial Activity", *Journal of Sol-Gel Science and Technology*, Vol. 86, pp. 83-93, 2018.
16. Ibsen, C. J. S., and Birkedal, H., "Pyrophosphate-Inhibition of Apatite Formation Studied by In Situ X-Ray Diffraction", *Minerals*, Vol. 8, p. 65, 2018.
17. Saiz, E., Gremillard, L., Menendez, G., Miranda, P., Gryn, K., and Tomsia, A. P., "Preparation of Porous Hydroxyapatite Scaffolds", *Materials Science and Engineering: C*, Vol. 27, pp. 546-550, 2007.
18. Bohner, M., and Lemaitre, J., "Can Bioactivity be Tested In Vitro with SBF Solution?", *Biomaterials*, Vol. 30, pp. 2175-2179, 2009.
19. Nakhaee, F. M., Rajabi, M., and Bakhsheshi-Rad, H. R., "In-Vitro Assessment of β -Tricalcium Phosphate/Bredigite-Ciprofloxacin (CPFX) Scaffolds for Bone Treatment Applications", *Biomedical Materials*, Vol. 16, p. 045038, 2021.
20. Hamvar, M., Bakhsheshi-Rad, H. R., Omid, M., Fauzi Ismail, A., Aziz, M., Berto, F., and Chen, X., "Biocompatibility and Bioactivity of Hardystonite-Based Nanocomposite Scaffold for Tissue Engineering Applications", *Biomedical Physics & Engineering Express*, Vol. 6, p. 035011, 2020.
21. Asghari, F., Samiei, M., Adibkia, Kh., Akbarzadeh, A., and Davaran, S., "Biodegradable and Biocompatible Polymers for Tissue Engineering

- Application: A Review”, *Artificial Cells, Nanomedicine, and Biotechnology*, Vol. 45, pp. 185-192, 2017.
22. Eilbagi, M., Emadi, R., Raeissi, K., Kharaziha, M., and Valiani, A., “Mechanical and Cytotoxicity Evaluation of Nanostructured Hydroxyapatite-Bredigite Scaffolds for Bone Regeneration”, *Materials Science and Engineering C*, Vol. 68, pp. 603-612, 2016.
 23. Sadeghzade, S., Emadi, R., Tavangarian, F., and Naderi, M., “Fabrication and Evaluation of Silica-based Ceramic Scaffolds for Hard Tissue Engineering Applications”, *Journal of Materials Science*, Vol. 71, pp: 431-438, 2017.
 24. Ochsner, A., and Ahmed, W., *Biomechanics of Hard Tissues: Modeling, Testing, and Materials*, John Wiley & Sons, 2011.
 25. Liu, C., Zhang, J., Sun, J., Zhang, X., and Hu, Y., “Addition of Al-Ti-C Master Alloys and Diopside to Improve the Performance of Alumina Matrix Ceramic Materials”, *Ceramics International*, Vol. 33, pp. 1149-1154, 2007.
 26. Kokubo, T., Kim, H. M., and Kawashita, M., “Novel Bioactive Materials with Different Mechanical Properties”, *Biomaterials*, Vol. 24, pp. 2161-2175, 2003.
 27. Wu, Ch., Chang, J., Zhai, W., and Ni, S., “A Novel Bioactive Porous Bredigite ($\text{Ca}_7\text{MgSi}_4\text{O}_{16}$) Scaffold with Biomimetic Apatite Layer for Bone Tissue Engineering”, *Materials Science Materials in Medicine*, Vol. 18, pp. 857-864, 2007.
 28. Wu, Ch., and Chang, J., “Degradation, Bioactivity, and Cytocompatibility of Diopside, Akermanite, and Bredigite Ceramics”, *Biomedical Material Research Part B: Application Biomaterials*, Vol. 83, pp. 153-160, 2007.
 29. Denry, I., and Kuhn, L. T., “Design and Characterization of Calcium Phosphate Ceramic Scaffolds for Bone Tissue Engineering”, *Dental Materials*, Vol. 32, pp.43-53, 2016.

SYNTHESIS AND EVALUATION OF MECHANICAL AND BIOACTIVE PROPERTIES OF β -TCP/ BREDIGITE SCAFFOLD FOR BONE TISSUE ENGINEERING APPLICATIONS

F. Mofid Nakhaee¹, M. Rajabi^{1*} and H. R. Bakhsheshi-rad²

¹ Department of materials Engineering, Faculty of Materials and Industries Engineering, Noshirvani University of Technology, Babol.

² Department of Materials Engineering, Faculty of Materials Engineering, Najafabad Branch, Islamic Azad University, Najafabad, Iran.

(Received: 26 April 2021; Accepted: 28 September 2021)

ABSTRACT

Development of bioactive ceramic composite scaffold materials with enhanced mechanical strength has been a topic of great interest in bone tissue engineering. In the present study, β -tricalcium phosphate scaffolds with various amounts of bredigite and an interconnected pore network suitable for bone regeneration were fabricated by the space holder method. The effect of high concentrations of bredigite on the structure, mechanical properties (compressive strength), and in vitro bioactivity was investigated. According to the results, immersion in simulated body fluid (SBF) led to the apatite formation on the surface of the scaffold, but increasing the bredigite content caused the agglomeration of the bredigite phase at the grain boundaries and deteriorated the mechanical properties.

Keywords: Tissue engineering, β -tricalcium phosphate, Bredigite, Porous scaffold, Space holder method.

1. INTRODUCTION

Bone tissue has a composite structure, hence it is very common to combine two or more different biomaterials to produce a “synergistic effect” in the overall resulting properties and improve the mechanical and biological properties of a scaffold [1]. In this research, the β -tricalcium phosphate (β -TCP)-bredigite (Bre) nanocomposite was employed as a bioactive ceramic to fabricate bone scaffolds. β -TCP bioceramic has great biodegradability, but low mechanical properties that limits its use for load-bearing applications. An approach to resolve this limitation is to fabricate the composite scaffolds with β -TCP as a matrix [2]. Recently, magnesium-containing silicate ceramics such as bredigite, have been introduced as one of the best choices for bone tissue engineering as a result of its excellent bioactivity and better mechanical properties than β -TCP [3]. In this study, after synthesizing β -TCP and bredigite powders, β -TCP/ bredigite porous scaffolds with different percentages of bredigite were made by space holder method and the

mechanical and biological properties of these scaffolds were evaluated.

2. MATERIALS AND METHODS

2.1 Preparation of powders and scaffolds

All chemicals were purchased with an analytical grade from Merck company. β -TCP powder was synthesized by solid-state reaction [4] and bredigite powder was prepared via sol-gel method [5]. The space holder method was used to make β -TCP/bredigite scaffolds. In this technique, NaCl with a particle size range of 300–420 μ m was used as the spacer. β -TCP and bredigite powders were combined in three ratios of 75-25 [β -TCP/25Bre], 65-35 [β -TCP/35Bre], and 55-45 [β -TCP/45Bre], and then mixed with NaCl with a ratio of 85:15 in weight. The powder was pressed at 100 MPa in a cylindrical form with 10 mm in diameter and 15 mm in height. The samples were then sintered at 1200°C for 3 h by a heating rate of 2°C/min. Finally, the samples were immersed in distilled water for 24 h to remove NaCl particles.

*: m.rajabi@nit.ac.ir

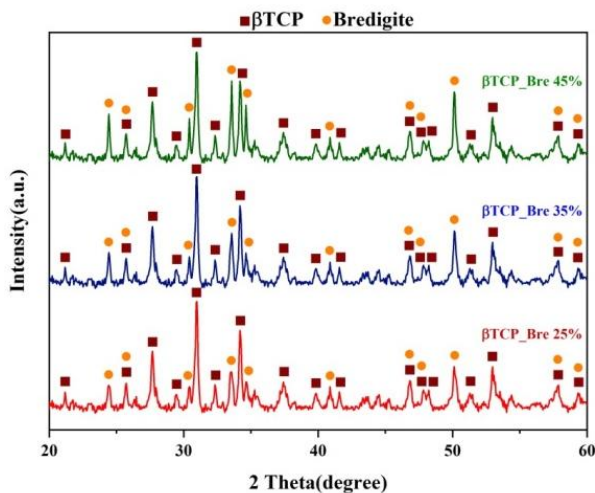


Figure 1. XRD patterns of the scaffolds containing various bredigite contents

Scanning electron microscopy (SEM) was used to investigate the microstructures of the scaffolds. X-ray diffraction (XRD) was applied to determine the phase components. The compressive strength of the sintered scaffolds was determined using a Hounsfield H50KS universal testing machine at room temperature with a crosshead speed of 5 mm min⁻¹.

2.3 Apatite forming ability

To evaluate the bioactivity of the engineering scaffolds, the sintered β -TCP/25Bre scaffold was soaked in simulated body fluid (SBF) solution at 37°C for 28 days.

3. RESULTS AND DISCUSSION

3.1. Characterization of the scaffolds

The XRD patterns of the scaffolds (Figure 1) showed all characteristic peaks of β -TCP and bredigite without the presence of impurities. With increasing the amount of bredigite in the β -TCP/bredigite composite, the intensity of bredigite peaks became sharper. SEM images of β -TCP/xBre scaffolds with different amounts of bredigite are presented in Figure 2. According to the SEM images, porous scaffolds with interconnected pores of a typical size range of 200–600 μ m have been formed. The pores could provide an excellent environment in which bone tissue ingrowth and body fluid exchange can easily take place [6]. According to the images, as the bredigite phase increases, the pore size decreases to some extent.

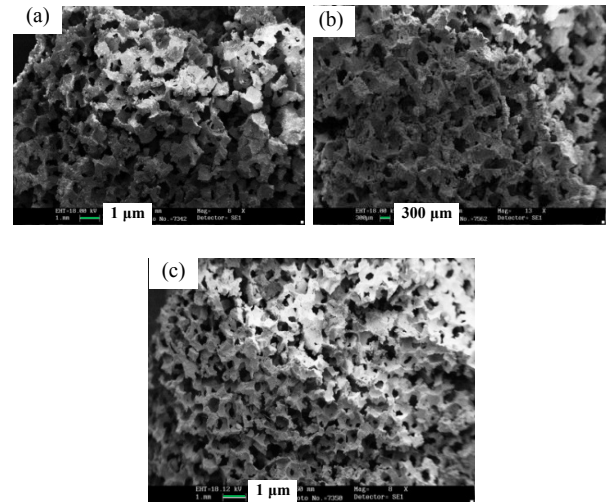


Figure 2. SEM images of: a) β -TCP/25Bre, b) β -TCP/35Bre, and c) β -TCP/45Bre scaffolds

3.2. Mechanical characterization

The compressive strength of the samples increased with increasing the bredigite content up to 25 wt.%. Further increase in bredigite content to 45 wt.% reduced the strength of the scaffolds. The ultimate compressive strength of the β -TCP/25Bre, β -TCP/35Bre, and β -TCP/45Bre were obtained 2.7, 2.1, and 2 MPa, respectively. This data was entirely in the range of the spongy bone compressive strength (0.2 to 4 MPa). Bredigite acts as a filler in the composite and decreases the curing temperature and enhances the mechanical properties [7]. Reduction of compressive strength with a further increase in the amount of bredigite is related to the agglomeration of the bredigite phase within the grain boundaries, which works as a crack initiation site.

3.3. In-vitro bioactivity of β -TCP/25Bre scaffold

SEM micrographs of the β -TCP/25Bre scaffold after 28 days of immersion in SBF solution are shown in Figure 3. The surface of the pores has been covered with bone-like apatite. It has been reported that silica encourages nucleation and growth of the bone-like apatite layer on the surface of the bioactive composites [8].

4. CONCLUSION

β -TCP composite scaffolds containing different bredigite contents (25, 35, 45 wt.%) were fabricated by the space holder method. The scaffolds had a homogeneous microstructure with

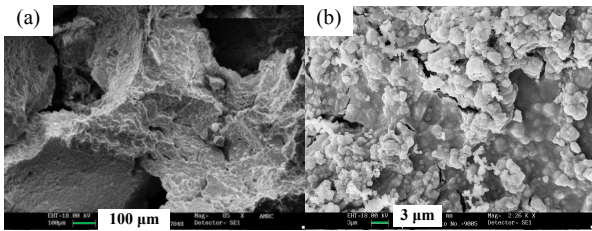


Figure 3. a) SEM images of β -TCP/25Bre scaffold after 28 days immersion in SBF b) higher magnification of (a)

interconnected pores of spherical type. The mean pore size of the scaffolds varied in the range of 200–600 μm . The compressive strength of the β -TCP/25Bre scaffold was approximately twice of the pure β -TCP scaffold and equivalent to the trabecular bone. However, adding more bredigite reduced the compressive strength due to the agglomeration of bredigite phase at the grain boundaries. Result of the bioactivity test indicated that after immersion in SBF, apatite-like layer was covered the surface of the scaffold. According to the results, adding bredigite into β -TCP bioceramics may be an effective method for the preparation of bioactive scaffolds.

ACKNOWLEDGEMENT

This work was partially supported by the Noshirvani University of Technology, Babol, Iran.

CONFLICT OF INTERESTS

The authors declare that there is no conflict of interest for this paper.

REFERENCES

1. Asa'ad, F., Pagni, G., Pilipchuk, S. P., Gianni, A. B., Giannobile, W. V., and Rasperini, G., "3D-Printed Scaffolds and Biomaterials: Review of Alveolar Bone Augmentation and Periodontal Regeneration Applications", *International Journal of Dentistry*, Vol. 2016, Article ID 1239842, pp. 1-16, 2016.
2. Salehi, S., and Fathi, M. H., "Fabrication and Characterization of Sol-Gel Derived Hydroxyapatite/Zirconia Composite Nanopowders with Various Ytria Contents", *Ceramics International*, Vol. 36, pp. 1659-1667, 2010.
3. Mirhadi, S. M., Tavangarian, F., and Emadi, R., "Synthesis, Characterization and Formation Mechanism of Single-Phase Nanostructure Bredigite Powder", *Materials Science and Engineering C*, Vol. 32, pp. 133-139, 2012.
4. Lopes, J. H., Magalha, J. A., Gouveia, R. F., Bertran, C. A., Motisuke, M., Camargo, S., and Triche, E., "Hierarchical Structures of β -TCP/45S5 Bioglasshybrid Scaffolds Prepared by gel casting", *Journal of the Mechanical Behavior of Biomedical Materials*, Vol. 62, pp. 10-23, 2016.
5. Bakhsheshi-Rad, H. R., Hamzah, E., Abbasizadeh, N., Najafinezhad, A., and Kashefian, M., "Synthesis of Novel Nanostructured Bredigite-Amoxicillin Scaffolds for Bone Defect Treatment: Cytocompatibility and Antibacterial Activity", *Journal of Sol-Gel Science and Technology*, Vol. 86, pp. 83-93, 2018.
6. Zhang, Y., Zhai, D., Xu, M., Yao, Q., Zhu, H., Chang, J., and Wu, Ch., "3D-Printed Bioceramic Scaffolds with Antibacterial and Osteogenic Activity", *Biofabrication*, Vol. 9, pp. 25-37, 2017.
7. Eilbagi, M., Emadi, R., Raeissi, K., Kharaziha, M., and Valiani, A., "Mechanical and Cytotoxicity Evaluation of Nanostructured Hydroxyapatite-Bredigite Scaffolds for Bone Regeneration", *Materials Science and Engineering C*, Vol. 68, pp. 603-612, 2016.
8. Kokubo, T., Kim, H.M., and Kawashita, M., "Novel bioactive materials with different mechanical properties", *Biomaterials*, Vol. 24, pp. 2161-75, 2003.