

بهینه‌سازی پارامترهای فرایند ساخت داربست کامپوزیت شیشه زیست‌فعال آنتی‌باکتریال/پلی‌کاپرولاکتون به روش چاپ سه‌بعدی

زهرا گل‌نیا^۱، مهدی کلانتر^{۱*}، محمد رفیعی‌نیا^۲ و علی پورسمر^۲

۱- گروه مهندسی مواد، دانشکده مهندسی معدن و متالورژی، دانشگاه یزد، یزد، ایران

۲- گروه بیومواد، نانوتکنولوژی و مهندسی بافت، دانشکده فناوری‌های نوین علوم پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران

(تاریخ دریافت: ۱۴۰۱/۹/۲۰؛ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۲/۲/۲۴)

چکیده: در این مطالعه، داربست سه‌بعدی کامپوزیتی شیشه زیست‌فعال حاوی دو درصد مولی نقره/ پلی‌کاپرولاکتون به کمک پرینتر سه بعدی با مزایای تکرارپذیری و انعطاف‌پذیری بالا در شکل و اندازه ساخته شد. پارامترهای تأثیرگذار (پارامترهای چاپگر و نسبت فاز شیشه، فاز پلیمر و حلال در جوهر پرینتر) برای چاپ داربست نانو کامپوزیتی با روش تاگوجی تعیین شدند. مشخصه‌یابی داربست‌های چاپ شده با کیفیت بهینه به کمک تفرق اشعه ایکس، میکروسکوپ الکترونی جارویی، طیف‌سنجی مادون قرمز، تست زیست‌فعالی، طیف‌سنجی نشر اتمی، تست سمیت و تکنیر سلولی انجام گرفت. نتایج مربوط به سنتز شیشه زیستی حاوی نقره به روش سل-ژل و عملیات حرارتی شده در دمای ۵۵۰ درجه سانتی‌گراد، نانو ذراتی با قطر متوسط کمتر از ۱۵ نانومتر و توزیع همگن نقره در آن را می‌دهد. شرایط بهینه برای چاپ داربست با کیفیت قابل قبول (درصد، اندازه و نحوه توزیع حفره‌ها، ساختار منظم لایه‌ها بر روی یکدیگر و تکرارپذیری)، نسبت فاز پلیمر به پودر شیشه معادل یک به دو، غلظت ۵۰ درصد پلیمر در حلال، ریتراکشن ۱/۵ و درایو جیبر ۱۲۰۰ است. داربست ساخته شده در شرایط بهینه خواص ضد باکتریایی قابل توجه، خاصیت زیست‌فعالی خوب، قابلیت زنده ماندن سلولی قابل قبولی و فعالیت آکالین فسفاتاز بالایی از خود را نشان دادند. بدین ترتیب داربست‌های نانو کامپوزیتی چاپ سه‌بعدی با حفره‌های ماکرو (تا ۵۰۰ میکرون) و میکرو سایز و درصد تخلخل تا ۶۴ درصد در ساختار می‌توانند کاندیدای امیدوارکننده‌ای برای مهندسی بافت استخوان باشند.

واژه‌های کلیدی: شیشه زیست‌فعال، داربست استخوانی، چاپ سه‌بعدی، آنتی‌باکتریال، سل ژل، پلی‌کاپرولاکتون.

Optimization of the Process Parameters of Antibacterial Bioactive Glass/Polycaprolactone Composite Scaffold Printed by 3D Method

* مسئول مکاتبات، پست الکترونیکی: mkalantar@yazd.ac.ir

Z. Golnia¹, M. Kalantar^{1*}, M. Rafienia² and A. Poursamar²¹ Department of Mining and Metallurgical Engineering, Yazd University, Yazd, Iran² Faculty of New Technologies of Medical Sciences, Isfahan University, Isfahan, Iran

ABSTRACT

In this study, a 3D bioactive glass composite scaffold containing 2 mol% silver/polycaprolactone (PCL) was synthesized by a 3D printer with the advantages of reproducibility and high flexibility in shape and size. The effective parameters (printer parameters, ratio of glass-phase, polymer phase, and solvent in printer ink) were determined for printing of nanocomposite scaffold by Taguchi method. Characterization of printed scaffolds was performed using X-ray diffraction, scanning electron microscope, infrared spectroscopy, bioactivity test, atomic emission spectroscopy, toxicity test, and cell proliferation. The results related to the synthesis of silver-containing bioglass by sol-gel method and heat treated at 550°C offered nanoparticles with an average diameter of less than 15 nm and a homogeneous distribution of silver in the matrix. Ratio of polymer phase to glass powder equivalent to 0.5, concentration of polymer in solvent of 50%, retraction of 1.5, and drive gear of 1200 are obtained as the optimum conditions for scaffold printing with acceptable quality (percentage, size and distribution of holes, regular structure of layers, and repeatability). The fabricated scaffold in optimal conditions revealed significant antibacterial properties, good bioactivity, acceptable cell viability, and high ALP activity. 3D printed BG/PCL nanocomposite scaffolds with macro (up to 500 μm) and micro size of holes and porosity percentage up to 64% in the structure can be a promising candidate for bone tissue engineering.

Keywords: Bioactive glass, Bone scaffold, 3D print, Antibacterial, Sol-gel, Polycaprolacton.

۱- مقدمه

از آنجایی که آسیب‌ها و اختلالات استخوانی در دنیا به صورت مداوم رو به افزایش است به خصوص در جوامعی که افزایش سن همراه با افزایش وزن و کاهش فعالیت‌های بدنی همراه است (۱)، یکی از شایع‌ترین بیماری‌های موجود در دنیا بیماری‌های مفصلی و استخوانی می‌باشد که تحقیقات گسترده‌ای توسط دانشمندان مختلف دنیا در مورد این بیماری‌ها انجام شده و به شدت در حال رشد می‌باشد. بنابراین توسعه استفاده از جایگزین‌ها و مواد پیونددهنده استخوانی ضروری به نظر می‌رسد. مشکلات ایجاد شده ناشی از برخی پیوندها نظیر اتوگرفت^۱، آلوگرفت^۲، زنوگرفت^۳ و مواد مصنوعی که در درمان‌های مرسوم وجود دارد منجر به استفاده از راه‌حل‌های دیگر جهت درمان بافت آسیب دیده شد. با توجه به مشکلات مذکور و همچنین استفاده از جراحی‌های مکرر و نسبتاً ناموفق در این زمینه، ایده‌ها به سمت تولید و جایگزین موادی با ترکیباتی شد که به بافت سالم آسیب نرساند. امروزه مواد زیستی سنتز شده تا حد زیادی جایگزین پیوندهای استخوانی در درمان آسیب‌های استخوانی شده‌اند (۲). این مواد عمدتاً به

شکل داربست با خواص مکانیکی و زیستی مناسب ساخته شده و زمینه رشد بافت‌های بدن را فراهم می‌آورند که تحت عنوان مهندسی بافت شناخته می‌شود. داربست‌ها بر اساس کاربرد عمدتاً به صورت ساختارهایی با تخلخل‌های کنترل شده و با روش‌های مختلف تهیه می‌شوند. تخلخل‌های موجود در داربست‌ها نقش مهمی در تشکیل استخوان جدید و عروق زایی و قرارگیری ژن‌ها، داروها، فاکتورهای رشد و سلول‌های بنیادی را دارد (۲ و ۳).

شیشه زیست‌فعال یکی از مواد زیستی جایگزین امیدوارکننده برای رفع عیوب استخوانی به دلیل دارا بودن خواصی مانند زیست‌فعالی، توانایی برقراری پیوند شیمیایی و فیزیکی با استخوان و بافت نرم همچنین برخورداری از خاصیت القاء^۴ و هدایت استخوانی^۵ است. با قرارگیری شیشه زیست‌فعال در محلول شبیه‌سازی شده بدن^۶ با انحلال کلسیم در محلول و رهایش یون‌های کلسیم و نیز وجود شبکه سیلیکاتی هسته اولیه تشکیل می‌شود (۶-۴). پلی‌کاپرولاکتون^۷ پلیمری است که به دلیل برخی خواص منحصر به فرد مانند خصوصیات مکانیکی فوق‌العاده (انعطاف پذیری مکانیکی)، زیست سازگاری خوب،

زیست فعال با یک پلیمر زیست تخریب پذیر مانند پلی لاکتیک اسید یا PCL باعث کاهش pH موضعی و در نتیجه تشکیل یک محصول اسیدی می‌شود. در مقابل، با تجزیه شیشه زیست فعال و تبدیل آن به هیدروکسی آپاتیت، به دلیل آزاد شدن یون‌های فلیایی pH افزایش می‌یابد. در نتیجه، تهیه یک کامپوزیت از شیشه زیست فعال با یک پلیمر زیست تخریب پذیر (یعنی PCL یا PLA) می‌تواند توانایی مقاومت در برابر pH را برای داربست‌ها فراهم کند که این امر می‌تواند میزان تخریب پلیمر را تنظیم کند (۲۰). یکی دیگر از محدودیت‌های کاربردی شیشه زیست فعال، ساخت داربست‌هایی با ساختار متخلخل کنترل شده با تکنیک‌های مرسوم است (۱۸). یک داربست سه بعدی مناسب با ساختار متخلخل به‌خوبی طراحی شده، برهم‌کنش خوبی بین بافت میزبان و ماده زیستی را ایجاد می‌کند (۸ و ۲۱). روش‌های جدیدی که برای این منظور استفاده می‌شوند و از گروه ساخت افزودنی است عبارتند از چاپ سه بعدی^۱، مدل‌سازی رسوبی ذوبی^{۱۱} و رابوکست^{۱۲} بر اساس مدل سه بعدی طراحی شده توسط رایانه انجام می‌شود (۱۸). روش چاپ سه بعدی به دلیل استفاده بهینه از مواد اولیه، افزایش انعطاف‌پذیری در طراحی و تولید دقیق تر اجزاء و قطعات، به‌عنوان یک روش مهم جهت تولید داربست‌های استخوانی در نظر گرفته شده است (۲۲). در این روش یک سوسپانسیون خمیر مانند (جوهر چاپگر سه بعدی^{۱۳}) در یک نازل استوانه‌ای تزریق می‌شود و با اکستروژن جوهر روی یک صفحه به‌صورت لایه به لایه ساختارهای سه بعدی را تشکیل می‌دهد (۲۳). برخی از پارامترهای تعیین شده از جمله ویسکوزیته جوهر و پارامترهای چاپگر بر محصول نهایی تأثیر می‌گذارند. لازم است برای به‌دست آوردن ساختار مورد نظر در هنگام رسوب‌گذاری پارامترهای فرایند به‌طور دقیق تعیین شوند (۲۴). استفاده از شیشه زیست فعال به‌عنوان جوهرهای چاپگر سه بعدی در بسیاری از مطالعات برای اهداف مهندسی بافت استخوان مورد مطالعه قرار گرفته است. اقتصادی و همکاران (۱۵) داربست شیشه زیست فعال ۴۵۵۵ را با تعیین خواص رئولوژی جوهر و

زیست تخریب‌پذیری و غیرسمی بودن محصول حاصل از تخریب آن و محلول در حلال‌های آلی مختلف، عمدتاً برای کاربردهای زیست‌پزشکی استفاده می‌شود. در داربست‌های کامپوزیتی سرامیک- پلیمری میزان برهم‌کنش داربست با بدن انسان را می‌توان با تنظیم کسر حجمی اجزای تشکیل‌دهنده کامپوزیت کنترل کرد (۸ و ۷). یکی از معضلات ترمیم نقص‌های استخوانی عفونت‌های باکتریایی در حین عمل‌های جراحی و ایمپلنت‌گذاری با استفاده از مواد زیستی است (۶). در حالت ایده‌آل، ایمپلنت باید توانایی بازسازی بافت استخوانی و مقابله با عفونت باکتریایی را با خاصیت ضد باکتری به‌صورت کنترل شده و مداوم داشته باشد. با توجه به پژوهش‌های انجام شده به‌کارگیری نقره می‌تواند از رشد و نمو باکتری‌ها و قارچ‌ها و دیگر عوامل بیماری‌زا جلوگیری نماید (۹). آزادسازی کنترل شده یون‌های نقره (Ag^+) به‌عنوان یک عامل کشنده برای گونه‌های مختلف باکتری (به‌عنوان مثال اش‌ریشیا کلی^۸) بدون ایجاد هیچ‌گونه اثر سمی بر استئوبلاست^۹‌های انسانی عمل می‌کند (۸-۱۳). اثر ضدباکتریایی نقره روی چند میکرواورگانیزم مورد بررسی قرار گرفته که نتایج حاصل از آن‌ها حاکی از اثر بی‌نظیر نقره بر باکتری‌های منتخب در محیط کشت بوده به‌طوری‌که نقره مانع رشد باکتری‌های مورد مطالعه شده است (۱۴).

علیرغم خواص بیولوژیکی خوب شیشه زیست فعال، عیب اصلی شیشه زیست فعال شکنندگی آن است که کاربرد آن را برای رفع نقایص استخوانی مختلف محدود می‌کند (۱۵). ساخت کامپوزیت یک رویکرد برای بهبود خواص مکانیکی شیشه زیست فعال است (۷ و ۱۸-۱۶). کیم و همکاران کامپوزیت شیشه زیست فعال/پلی‌کاپرولاکتون را با ترکیب $CaO-SiO_2-P_2O_5-B_2O_3$ جهت بهبود خواص مکانیکی شیشه زیست-فعال خالص ساختند. آن‌ها نشان دادند که خواص مکانیکی کامپوزیت به‌طور قابل توجهی در مقایسه با داربست‌های شیشه‌ای خالص زیست فعال با میزان تخلخل یکسان بهبود یافته است (۱۹). همچنین گزارش شده است که ترکیب شیشه‌های

ارتوپدی استفاده کرد. از ویژگی‌های آن عبارت است از: سرعت بالای واکنش سطحی که منجر به اتصال مستقیم به استخوان از طریق پیوند شیمیایی می‌شود، سهولت طراحی ترکیب با خواص ویژه متناسب با کاربردهای کلینیکی خاص و کنترل بسیار خوب خواص شیمیایی و سرعت پیوند آن‌ها با بافت. مهم‌ترین مزیت این داربست شیشه زیست‌فعال واکنش سریع آن است که منجر به پیوند با بافت می‌شود [۲۱]. روش ساخت و تولید این نوع داربست، چاپ سه بعدی می‌باشد که مزیت این فرایند استفاده بهینه از ماده، افزایش انعطاف‌پذیری در طراحی و تولید دقیق‌تر اجزاء و قطعات می‌باشد که توانایی این روش سنتز را در کاشت مستقیم و یکپارچه مواد با کاربردهای مختلفی همچون سازه‌ای و بیولوژیکی بالا برده است [۲۳]. لذا بنابر آنچه گفته شد، برای اولین بار یک شیشه زیست‌فعال با ترکیب چهار جزئی دارای خواص آنتی‌باکتریال به روش چاپ پرینت سه بعدی تولید خواهد شد که بر اساس مطالعات انجام گرفته و مرور پژوهش‌های پیشین، تا به حال هیچ گزارشی یا پژوهشی در مورد آن نوشته نشده است.

به‌منظور دستیابی به خواص ویژه نقره در شیشه در این پژوهش، ابتدا شیشه زیست‌فعال $\text{SiO}_2\text{-CaO-P}_2\text{O}_5\text{-Ag}_2\text{O}$ به روش سل-ژل سنتز و سپس داربست نانوکامپوزیت شیشه زیست‌فعال حاوی نقره/پلی‌کاپرولاکتون به روش رابوکست تهیه شد. در ادامه از روش تاگوچی^{۱۶} برای انتخاب بهترین ترکیبات جوهر قابل چاپ شیشه زیست‌فعال حاوی نقره/پلی‌کاپرولاکتون در کنار انتخاب پارامترهای رابوکست استفاده شد. روش تاگوچی راه‌های مشخص و سیستماتیک را برای بهینه کردن پارامترها و طراحی بهتر آزمایش‌ها ارائه می‌دهد (۲۶).

۲- مواد و روش‌ها

۲-۱- مواد اولیه

به‌منظور سنتز پودر شیشه زیست‌فعال با ترکیب $60\% \text{SiO}_2$, $4\% \text{P}_2\text{O}_5$, $34\% \text{CaO}$ and $2\% \text{Ag}_2\text{O}$ به روش سل-ژل (۲۷) از تترا اتیل اورتوسیلیکات^{۱۷} (TEOS - 99%)، کلسیم نترات چهار

تعیین ترکیب مناسب شیشه با ساختار متخلخل را به روش چاپ سه بعدی از نوع رابوکست ساختند. در این پژوهش از کربوکسی متیل سلولز^{۱۴} برای تهیه سوسپانسیون از شیشه و در نتیجه جوهر چاپ استفاده می‌شود. بعد از چاپ کردن، داربست در دمای $500-700$ درجه سانتی‌گراد برای حذف کربوکسی متیل سلولز و به‌دست آوردن داربست استحکام یافته آن را زیتتر نمودند. به‌دلیل میزان سرامیک بالای جوهر و مخلوط شدن بسیار دشوار با محلول کربوکسی متیل سلولز و آب، آگلومره شدن سرامیک و در نتیجه مسدود شدن نازل و در نهایت توقف فرایند چاپ رخ می‌دهد. همچنین برای پیشگیری از ایجاد ترک در داربست، فرایند چاپ در محیط پارافین مایع انجام شده به همین دلیل، داربست حالت خمیری خود را حفظ کرده، لایه‌ها روی هم افتاده^{۱۵} و در نتیجه ساختار اصلی و طراحی شده داربست شکل نمی‌گیرد. در نتیجه، مزیت آن استحکام مکانیکی بالا به‌دلیل زیتتر شدن شیشه است. در سال ۲۰۱۸، لیو و همکاران (۲۵)، ابتدا با استفاده از روش سل-ژل، عناصر (Cu, Fe, Mn, Co) را در شیشه زیست‌فعال سرامیکی دوپ کردند. سپس با استفاده از پرینت سه بعدی، داربست شیشه زیست‌فعال دوپ شده را تولید کردند. پس از آن، توانایی‌های ضد توموری نورگرمایی این داربست‌ها را در شرایط درون و برون تنی مقایسه نموده و فعالیت‌های استخوانی داربست‌های دوپ شده مورد بررسی قرار گرفت. در این بررسی تولید داربست‌های کاربردی محتوی عناصر زیست‌فعال با تکنیک چاپگر سه بعدی همراه روش سل-ژل با موفقیت انجام شد. داربست‌ها پرینت و در دمای اتاق به‌مدت یک شب خشک شدند و در نهایت در دمای 1300 درجه سانتی‌گراد به‌مدت سه ساعت با نرخ دو درجه سانتی‌گراد در دقیقه کلسینه شدند. نتایج نشان می‌دهد داربست‌های دوپ شده با عناصر فوق عملکرد بهتری نسبت به شیشه زیست‌فعال ساده دارند؛ دارای توانایی‌های ضد توموری نورگرمایی، ایمنی و زیست سازگاری بیشتری هستند (۲۵). شیشه زیست‌فعال حاوی نقره یک ماده چند منظوره می‌باشد که به‌دلیل خواص آنتی‌باکتریال آن، می‌توان در کاربردهای دندانپزشکی و

مواد تشکیل‌دهنده داربست، در فرایندی مشابه با چاپ سه بعدی تعداد زیادی پارامتر مستقل وجود دارد که انتخاب هر یک از آن‌ها می‌تواند به‌طور قابل توجهی بر خواص محصول نهایی مؤثر باشد. در بین پارامترهای چاپگر در فرایند چاپ سه بعدی درایو جیبر^{۲۵} (نیروی که از طریق چاپگر به سرنگ حاوی جوهر جهت خروج جوهر از سرنگ اعمال می‌شود که معیاری برای میزان اکستروژن می‌باشد) و

ریترکشن^{۲۶} (نیروی منفی اعمال شده بعد از چاپ هر لایه به جهت جلوگیری از خروج جوهر از سرنگ در حین حرکت نازل به نقطه مبدأ لایه بعدی) مؤثرتر از بقیه هستند. بر این

اساس، به‌منظور تعیین مقدار بهینه هر یک از این عوامل در دستیابی به داربستی ایده‌آل و به‌منظور به حداقل رساندن تعداد آزمون‌ها، طراحی آزمون مورد نیاز است. طراحی آزمایش،

روشی برای به‌دست آوردن اطلاعات نظام‌مند از یک پدیده است. از لحاظ ریاضی، طراحی آزمایش مجموعه‌ای از

آزمایش‌ها است که شاید به نتایج مورد نظر منتهی شود. در بسیاری از موارد به‌خصوص در مواردی که در آن‌ها بهینه‌سازی

نیاز است، روش طراحی آزمایش تاگوچی یکی از بهترین و کامل‌ترین روش‌های طراحی آزمون است. در این روش در ابتدا

الگوی انجام آزمایشات با انتخاب ماتریس اورتوگونال مناسب (این کار بر اساس پارامترهای مؤثر در آزمایش و تعداد سطوح

هر یک از پارامترها انتخاب می‌شود) تعیین شده و سپس طراحی آزمایشات به‌وسیله نرم‌افزار انجام گرفت. در ادامه

آزمایشات انجام شده و در نهایت نتایج، مورد تحلیل و اعتبار بخشی قرار گرفتند. هدف از طراحی آزمون در این تحقیق،

بهینه‌سازی ترکیب جوهر و پارامترهای چاپگر سه بعدی می‌باشد. در این بررسی با توجه به تحقیقات انجام شده (۱۵) و

(۲۸)، چهار پارامتر مستقل که شامل دو پارامتر مربوط به مواد اولیه و دو پارامتر مربوط به دستگاه چاپگر می‌باشد به‌عنوان

مؤثرترین پارامترها انتخاب شد: نسبت وزنی پلی‌کاپرولاکتون/ شیشه زیست‌فعال، غلظت پلی‌کاپرولاکتون حل شده در

کلروفرم، درایو جیبر و ریترکشن. جدول (۱) لیست پارامترهای

آبه^{۱۸} $(Ca(NO_3)_2 \cdot 4H_2O)$ ، نیترات نقره^{۱۹} $(AgNO_3)$ و تری‌اتیل فسفات^{۲۰} $C_6H_{15}O_4P$ استفاده شد که همگی ساخت شرکت مرک آلمان بودند. جهت تهیه جوهر برای چاپ داربست از پلی‌کاپرولاکتون (Sigma-Aldrich, Mn=80000, PCL) به‌عنوان فاز پلیمری داربست و از کلروفرم^{۲۱} (Chl, Merck) به‌عنوان حلال آن استفاده شد که بودند. سرم گاوی (FBS)، پنی سیلین^{۲۲} (۱۰۰۰۰ واحد در میلی‌لیتر)، استرپتومایسین^{۲۳} (۱۰۰۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر) از سیگما آلدردیج^{۲۴} خریداری شد.

۲-۲- سنتز شیشه زیست‌فعال

برای آماده‌سازی محلول شیشه زیست‌فعال بر اساس فرآیند سل-ژل، پس از محاسبات استوکیومتری ابتدا مقادیر مورد نیاز از اسید نیتریک دو نرمال تهیه و به مقدار مورد نظر از آب مقطر اضافه شد. در ادامه تترایاتیل اورتوسیلیکات به محلول فوق اضافه و در دمای اتاق و به مدت یک ساعت، هیدرولیز شد. پس از آن محلول تری‌اتیل فسفات به آرامی به ترکیب فوق اضافه گردید. پس از یک ساعت کلسیم نیترات تتراهیدرات، و نیترات نقره به ترتیب به محلول هیدرولیز شده، اضافه شدند و سپس محلول به مدت هفت روز در دمای محیط- بدون حرکت جهت پیرسازی (ژل شدن) قرار داده شد. به‌منظور به‌دست آوردن نمونه پودری، ابتدا ژل در دمای ۷۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۷۲ ساعت خشک شد و سپس به مدت دو ساعت در دمای ۵۵۰ و ۷۵۰ درجه سانتی‌گراد با استفاده از یک کوره الکتریکی تحت عملیات حرارتی کلیمینه شدن قرار گرفت تا دمای بهینه کلیمینه شدن مشخص گردد.

۲-۳- تعیین پارامترهای بهینه جهت ساخت جوهر کامپوزیتی حاوی شیشه زیست‌فعال و پلی‌کاپرولاکتون با استفاده از مدل تاگوچی

بر اساس پژوهش‌های انجام شده، انتخاب نسبت شیشه زیست‌فعال و پلی‌کاپرولاکتون مهم‌ترین مسئله در خواص و در طراحی ساختار کامپوزیتی داربست نهایی است. علاوه بر نسبت ترکیبی

جدول ۱- تعداد سطوح، پارامترهای کنترل و مقدارشان در مقاله

شماره پارامتر	پارامتر کنترل	سطح					
		۱	۲	۳	۴	۵	۶
۱	نسبت پلی‌کاپرولاکتون به شیشه زیست‌فعال	۱/۱	۱/۲	۱/۳	۱/۴	۱/۵	۱/۶
۲	غلظت پلی‌کاپرولاکتون حل شده در حلال	%۴۰	%۵۰	%۶۰	-	-	-
۳	درایو جیبر	۴۰۰	۸۰۰	۱۲۰۰	-	-	-
۴	ریتراکشن (mm-zero to disable)	۰/۵	۱	۱/۵	-	-	-

دستگاه چاپگر سه بعدی، ساخت شرکت آبتین ایران انجام شد. داربست‌های کامپوزیتی شیشه زیست‌فعال و پلی‌کاپرولاکتون به‌دست آمده، به‌مدت یک شب در دمای ۴۰ درجه سانتی‌گراد خشک می‌شوند. در نهایت، داربست شیشه زیست‌فعال با درصدهای وزنی معین به‌دست خواهد آمد.

ورودی و سطح هر یک از آن‌ها را نشان می‌دهد. با توجه به تعداد پارامترها و سطوح آن، نرم‌افزار، آرایه L18 را انتخاب کرد که شامل ۱۸ آزمایش است. جدول (۲) آزمایش‌های طراحی شده به‌وسیله نرم‌افزار را نشان می‌دهد.

۲-۴- ساخت داربست به روش چاپ سه بعدی

در ابتدا با توجه به نسبت‌های مشخص شده در جدول (۲) به میزان مورد نیاز حلال آماده می‌شود. پس از آن درصد بهینه‌ای از پلی‌کاپرولاکتون را به حلال اضافه کرده و برای یک ساعت در دمای ۴۰ درجه قرار داده می‌شود. بعد از حل شدن کامل پلی‌کاپرولاکتون در حلال، درصد تعیین شده توسط طراحی آزمون تاگوچی از نانوذرات شیشه زیست‌فعال آنتی‌باکتریال را به محلول پلیمری اضافه کرده و به‌طور کامل مخلوط می‌شوند. از آنجایی که پراکندگی ذرات سرامیکی در پلیمر روی فرایند چاپ بسیار اثرگذار است سوسپانسیون نهایی باید کاملاً یکنواخت شود. جوهرهای آماده شده به سرنگ دستگاه پرینت سه بعدی با اندازه نازل‌های متفاوت منتقل می‌شوند. موقعیت نازل مطابق با مدل سه‌بعدی که قبلاً در نرم‌افزار کنترل (آبتین II، ایران) طراحی شده بود حرکت کرد. جوهر از نازل خارج و روی صفحه به‌صورت لایه لایه روی هم قرار گرفته و منجر به چاپ داربست می‌شود. فرایند چاپ در دما و رطوبت اتاق انجام شد. به‌منظور کنترل مورفولوژی داربست و ساختار شبکه حفره‌ها، میزان فشار پمپ سرنگ، سرعت دستگاه توزیع‌کننده پلات و اندازه نازل بهینه انتخاب شدند و عملیات چاپ با

۲-۵- مطالعه فازی و ریزساختاری پودر سنتز شده شیشه زیست‌فعال حاوی نقره

آنالیز حرارتی DTA/TGA شیشه به‌دست آمده به‌منظور تعیین دمای پایدارسازی آن، در کوره الکتریکی انجام خواهد شد. در این مرحله به‌دنبال حذف نیترات‌های باقی‌مانده از مواد اولیه و پایدارسازی شیشه خواهیم بود. بنابراین باید دمایی را انتخاب کنیم که در آن نیترات‌ها حذف شده باشد و در ضمن فاز کریستالی تشکیل نشده باشد و همچنان ماده مورد نظر، شیشه (آمورف) باقی‌مانده باشد. به‌منظور مطالعه و بررسی پیوندهای موجود، آزمون طیف‌سنجی مادون قرمز مدل Tensor27 بروکر آلمان در محدوده عدد موجی ۲۰۰ تا 16000 cm^{-1} و وضوح 2 cm^{-1} برای مطالعه و بررسی پیوندهای پلیمر و شیشه زیست-فعال حاوی نقره انجام شد.

پودر تولیدی در این مرحله توسط آزمون پراش پرتو ایکس (XRD- Philips X'Pert System) مشخصه‌یابی شدند. الگوهای پراش با استفاده از لامپ $\text{CuK}\alpha$ با طول موج $\lambda=0.1541\text{ nm}$ ، در محدوده زاویه $2\theta=90-10$ و با اندازه گام 0.05° به‌دست آمد. فازهای موجود در الگوی پراش از طریق مقایسه زاویه و

جدول ۲- طراحی آزمایش توسط تاگوچی با توجه به پارامترها و سطوح انتخابی

شماره آزمایش	نسبت پلی‌کاپرولاکتون به شیشه	غلظت پلی‌کاپرولاکتون حل شده	درایو جیبر	ریتراکشن (mm-zero to disable)
	زیست فعال	در حلال		
۱	۱/۱	۴۰	۴۰۰	۰/۵
۲	۱/۱	۵۰	۸۰۰	۱
۳	۱/۱	۶۰	۱۲۰۰	۱/۵
۴	۱/۲	۴۰	۴۰۰	۱
۵	۱/۲	۵۰	۸۰۰	۱/۵
۶	۱/۲	۶۰	۱۲۰۰	۰/۵
۷	۱/۳	۴۰	۸۰۰	۰/۵
۸	۱/۳	۵۰	۱۲۰۰	۱
۹	۱/۳	۶۰	۴۰۰	۱/۵
۱۰	۱/۴	۴۰	۱۲۰۰	۱/۵
۱۱	۱/۴	۵۰	۴۰۰	۰/۵
۱۲	۱/۴	۶۰	۸۰۰	۱
۱۳	۱/۵	۴۰	۸۰۰	۱/۵
۱۴	۱/۵	۵۰	۱۲۰۰	۰/۵
۱۵	۱/۵	۶۰	۴۰۰	۱
۱۶	۱/۶	۴۰	۱۲۰۰	۱
۱۷	۱/۶	۵۰	۴۰۰	۱/۵
۱۸	۱/۶	۶۰	۸۰۰	۰/۵

درصد وزنی یا اتمی آن را مشخص کرد. از آنجایی که در فرایند تولید امکان تغییر ترکیب شیمیایی وجود دارد، ترکیب پودر سنتز شده توسط آنالیز فلورسانس پرتو ایکس مورد بررسی قرار گرفته و با ترکیب محاسبه شده مقایسه گردید.

۲-۶- مطالعه فازی و ریزساختاری داربست چاپ شده

مطالعات ریزساختاری داربست کامپوزیتی شیشه زیست فعال حاوی نقره-پلی کاپرولاکتون چاپ شده توسط میکروسکوپ الکترونی روبشی (SEM)، کوانتا ۲۰۰، FEI اروپا، هلند) انجام شد. داربست مذکور توسط آزمون پرتو ایکس (Philips X'Pert System) مشخصه‌یابی شد. پراش پرتو ایکس با استفاده از لامپ CuK α با طول موج $\lambda = 0.15418 \text{ nm}$ در محدوده

شدت پیک‌های پراش با استفاده از نرم‌افزار X'Pert و بر اساس اطلاعات موجود در کارت‌های استاندارد مشخص و تعیین گردید. از آنجا که اندازه و مورفولوژی ذرات پودر روی خواص جوهر و قابلیت چاپ آن تأثیر دارد، بررسی ریزساختار و مورفولوژی سطحی پودر سنتز شده با استفاده از میکروسکوپ الکترونی روبشی انجام شد. جهت آماده‌سازی نمونه، نمونه مورد بررسی ابتدا بر روی پایه نگه دارنده نمونه قرار گرفت. سپس جهت ایجاد رسانایی، پوشش بسیار نازک طلا توسط سیستم رسوب فیزیکی بخار روی نمونه اعمال شد. طیف‌سنجی پراش انرژی پرتو ایکس جهت تشخیص درصد عناصر در داربست چاپ شده استفاده شد. این آنالیز با استفاده از انرژی اشعه ایکس منحصر به فرد ساطع شده از نمونه، نوع عنصر و

حمام آب خارج شده و نمونه‌ها با آب مقطر شسته و سپس جهت خشک شدن در آن قرار داده شدند.

۲-۸-۱- ارزیابی زیست‌فعالی به کمک میکروسکوپ الکترونی روبشی

سطح نمونه غوطه‌ور شده در محلول شبیه‌سازی شده بدن به‌منظور بررسی میزان و مورفولوژی آپاتیت‌های بیولوژیک، که در اثر رخداد پدیده‌های فوق‌اشباع و رسوب در فصل مشترک محلول شبیه‌سازی شده بدنو نمونه غوطه‌ور شده، بر سطح نمونه تشکیل می‌شوند، پس از زمان‌های غوطه‌وری متفاوت با میکروسکوپ الکترونی روبشی مورد ارزیابی قرار گرفت.

۲-۸-۲- ارزیابی زیست‌فعالی به کمک آزمون طیف‌سنجی نشر اتمی

برای ارزیابی رفتار زیست‌فعالی داربست‌ها، مقدار غلظت عناصر موجود در محلول شبیه‌سازی شده بدن مانند کلسیم و نقره که در اثر فعل و انفعال داربست با محلول شبیه‌سازی شده بدن در این محلول وجود دارند توسط دستگاه ICP, PQ9000، آلمان، در سه دوره زمانی، روزهای ۷، ۱۴ و ۲۱ روز اندازه‌گیری شد. این روش از جمله روش‌های آنالیز عنصری می‌باشد که برای شناسایی عناصر موجود در نمونه و تعیین غلظت آن‌ها استفاده می‌شود.

۲-۹- بررسی سمیت سلولی

آزمون سمیت سلولی در شرایط آزمایشگاهی بر اساس دستورالعمل‌های سازمان بین‌المللی استاندارد (ISO 10,993-5) انجام شد. رده سلولی MG-63، (ATCC CRL-1427)، استئوسارکوم^{۲۹} انسانی برای ارزیابی اثر سمی داربست ساخته شده استفاده شد. سلول‌ها (۵۰۰۰ سلول در میلی‌لیتر) در پلیت کشت سلول در انکوباتور با دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد، شرایط محیطی ۵ درصد دی‌اکسید کربن، ۹۵٪ رطوبت نسبی، متشکل از محیط کشت دالبکو اصلاح شده^{۳۰} همراه با ۱۰ درصد (v/v)

زاویه ۹۰-۱۰=۲۰ و با اندازه گام ۰/۰۳ برای ارزیابی ترکیب و فازهای موجود در داربست تهیه شده استفاده شد. فازهای موجود در الگوی پراش پرتو ایکس از طریق مقایسه زاویه و شدت پیک‌های پراش با استفاده از نرم‌افزار X^۲Pert-MPD و بر اساس اطلاعات موجود در کارت‌های استاندارد مشخص و تعیین گردید. FTIR (مدل Tensor27، بروکر، آلمان) همراه در محدوده ۲۰۰cm⁻¹ تا ۶۰۰۰ و وضوح ۲cm⁻¹ برای مطالعه و بررسی پیوندهای پلیمر و شیشه زیست‌فعال حاوی نقره انجام شد.

۲-۷- ارزیابی استحکام فشاری

برای ارزیابی خواص مکانیکی داربست‌های چاپ شده، آزمون استحکام فشاری برای هر یک از نمونه‌ها با دستگاه آزمون فشار (SANTAM ایران) انجام شد. داربست‌ها دارای شکل استوانه‌ای به قطر ۵/۵ ± ۵ میلی‌متر و ارتفاع ۵/۵ ± ۵ میلی‌متر در نظر گرفته شد. استحکام فشاری نمونه‌ها ۲۴ ساعت بعد از ساخت تا حد شکستن آن اندازه‌گیری می‌شود. سرعت فک دستگاه جهت اعمال فشار ۵/۵ mm/s در نظر گرفته شد.

۲-۸-۸- ارزیابی رفتار زیست‌فعالی داربست چاپ شده

برای ارزیابی خاصیت زیست‌فعالی در شرایط آزمایشگاهی^{۲۷} از محلول شبیه‌سازی شده بدن انسان استفاده شد. این محلول به‌طور گسترده توسط محققین به‌منظور شبیه‌سازی شرایط محیط بدن موجود زنده^{۲۸} استفاده شده است (۲۹). به‌منظور ساخت محلول شبیه‌سازی شده بدن انسان از روش ارائه شده توسط کوکوبو و تاکاداما (۳۰) استفاده شد. به‌منظور انجام آزمون آزمایشگاهی ارزیابی زیست‌فعالی نمونه تولید شده در محلول شبیه‌سازی شده از ظروف پلاستیکی استفاده شد. در هر ظرف ابتدا نمونه اضافه و سپس ۵۰ میلی‌لیتر محلول شبیه‌سازی شده بدن به آن افزوده شد. پس از مسدود کردن درب ظروف با درپوش پلاستیکی، ظروف در حمام آب گرم با دمای ثابت ۳۷ درجه سانتی‌گراد قرار گرفتند. زمان غوطه‌وری ۷، ۱۴، ۲۱ و ۲۸ روز انتخاب شد. پس از پایان زمان ذکر شده، ظروف مربوطه از

پلیت‌های استریل توزیع شدند. سپس این پلیت‌های کشت داده شده به مدت ۲۴ ساعت در انکوباتور در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد قرار گرفتند. اندازه‌گیری ابعاد هاله عدم رشد با استفاده نرم‌افزار image J انجام شد.

۳- نتایج و بحث

۳-۱- مطالعه فازی و ریزساختاری پودر سنتز شده شیشه

زیست‌فعال حاوی نقره

با توجه به منحنی‌های آنالیز حرارتی از ژل شیشه زیست‌فعال حاوی نقره سنتز شده، دو مرحله کاهش وزن وجود دارد (شکل ۱). مرحله اول از دمای ۲۰۰ تا ۵۰۰ درجه سانتی‌گراد است که با دو پیک گرمای در محدوده دمایی یکسان همراه است. این پیک‌ها را می‌توان به حذف ترکیبات آلی مانند گروه‌های آلکوکسی^{۳۵} اختصاص داد (۱۲ و ۱۳). پیک مشخص و شدیدی در دمای ۵۰۰ تا ۶۰۰ درجه سانتی‌گراد وجود دارد که کاهش وزن مربوط به تجزیه و حذف ترکیبات گروه‌های نیترات می‌باشد (۱۳). دمای انتقال شیشه (T_g)، ۷۶۸ درجه سانتی‌گراد می‌باشد. دو پیک گرمای آخر در دماهای ۸۰۰ و ۹۰۰ درجه سانتی‌گراد مربوط به تبلور فاز شیشه‌ای که به ترتیب تبلور β -CaSiO₃ و ولستونیت و کریستوبالیت است (۳۱). بر اساس نتایج آنالیز حرارتی به دست آمده، دمای ۵۵۰ و ۷۵۰ درجه سانتی‌گراد، به‌عنوان دمای کلسیناسیون ژل سنتز شده تعیین شد تا دمای مطمئن و قطعی کلسیناسیون شیشه مشخص گردد. شکل (۲) منحنی طیف‌سنجی مادون قرمز با تبدیل فوریه برای پودر شیشه زیست‌فعال حاوی دو درصد مولی نقره را نشان می‌دهد. پیک مشخص در حدود 470 cm^{-1} می‌تواند مربوط به پیوند خمشی Si-O-Si باشد (۳۲ و ۳۳). پیوند در ناحیه ۵۰۰ تا ۶۰۰ بیانگر ترکیب PO_4^{3-} می‌باشد (۱۲ و ۳۲). پیوند در ناحیه ۸۰۰ تا ۱۳۰۰ مربوط به موده‌های نوسانی کششی PO_4 هستند که مشاهده شده است. پیوند در طیف 1080 cm^{-1} به ارتعاش کششی پیوندهای Si-O اختصاص داده شده است (۳۳). وجود پیوند در محدوده $1375-1565 \text{ cm}^{-1}$ مربوط به

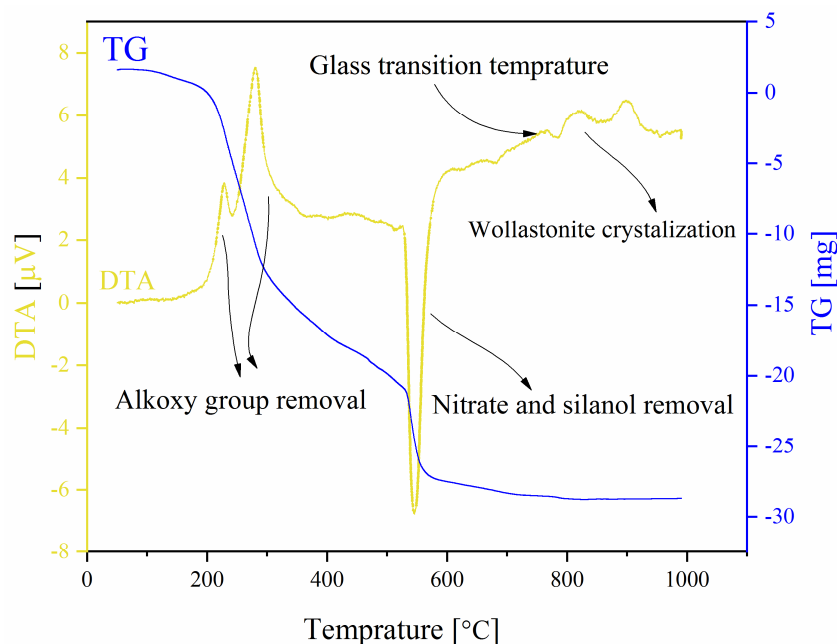
سرم جنین گاوی^{۳۱}، ۵ درصد گلوتامین، ۵ درصد پروت سدیم، پنسیلین (۱۰۰ U/ml) و استرپتوماسیون^{۳۲} ($100 \mu\text{g ml}^{-1}$) روی داربست‌ها کشت داده شد. در روزهای ۱، ۳ و ۷ محیط کشت با محلول MTT جایگزین شد و طبق دستورالعمل میزان جذب محلول به روش اسپکتروفتومتری در طول موج ۵۷۰ نانومتر اندازه‌گیری شد.

۲-۱- فعالیت آلكالین فسفاتاز^{۳۳}

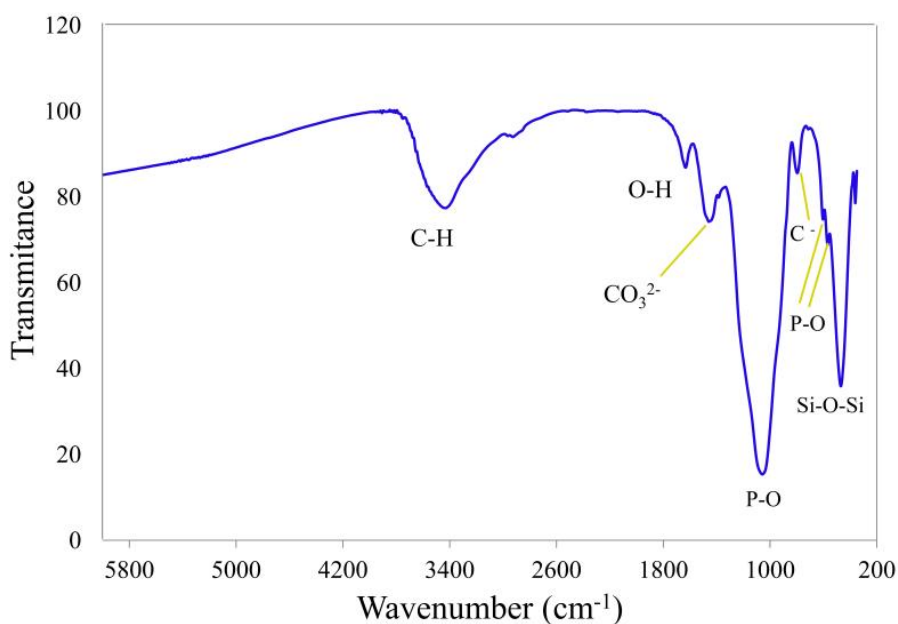
بررسی اثر داربست‌های ساخته شده بر رفتار سلولی با کشت سلول‌های MG-63 با تراکم 2×10^4 سلول بر سانتی‌متر مربع در یک محیط کشت استاندارد انجام شد. سپس در محیط (DMEM، ۱۰ درصد سرم جنینی گاوی، ۵۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر اسید اسکوربیک، ۸ تا ۱۰ مولار دگزامتازون و ۱۰ میلی‌مولار بی-گلیسرول فسفات) قرار داده شد. در زمان‌های ۷ و ۱۴ روز فعالیت آلكالین فسفاتازی بررسی انجام شد. ابتدا محیط رویی سلول‌های استئوبلاست تخلیه و ۲ بار با PBS شستشو داده شد. سپس سلول‌ها را تریپسینه و داخل فالكون قرار داده و به مدت ۱۰ دقیقه با سرعت ۱۴۰۰ دور در دقیقه سانتریفوژ شد. پس از آن مایع رویی را تخلیه و با اضافه کردن PBS دوباره سانتریفوژ شد. در ادامه ۲۰۰ میکرولیتر تریتون با غلظت ۲۰ درصد را روی سلول‌ها اضافه کرده تا لیز سلولی انجام گردد، سپس ۲۰ میکرولیتر از این ترکیب را به پلیت منتقل و با استفاده از کیت آلكالین فسفاتاز، فعالیت این آنزیم را با استفاده از دستگاه الیزاریدر اندازه‌گیری شد.

۲-۱۱- آزمون ضدباکتریایی

فعالیت ضدباکتریایی داربست‌های سه بعدی با استفاده از باکتری‌های استافیلوکوکوس^{۳۴} (باکتری‌های گرم مثبت) و اشیریشیا کلی (باکتری‌های گرم منفی) انجام شد. سوسپانسیون میکروارگانیزم ۹/۰ درصد NaCl در آب مقطر قبل از اضافه کردن به محیط کشت آگار آماده گردید. سپس مقدار مشخص محیط کشت آگار تهیه شده همراه با سوسپانسیون باکتری درون



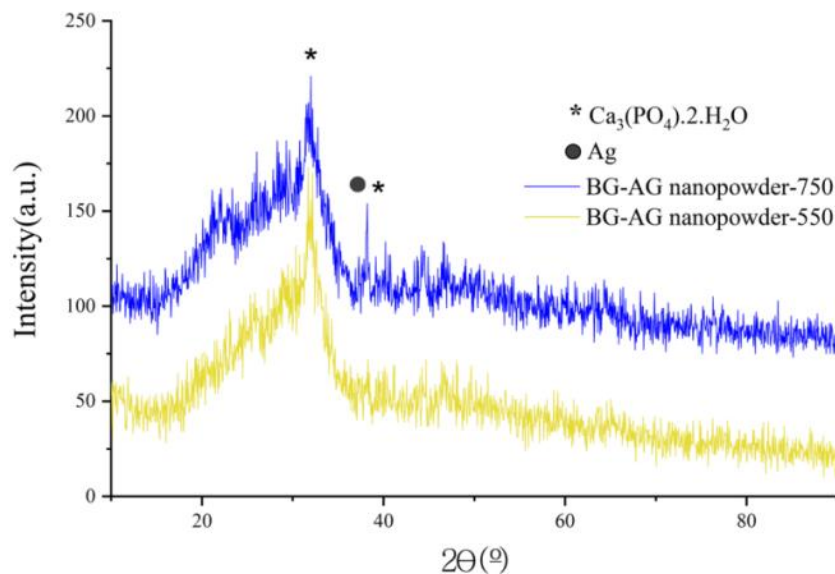
شکل ۱- منحنی‌های DTA/TGA از ژل شیشه زیست‌فعال حاوی نقره سنتز شده.



شکل ۲- منحنی طیف‌سنجی مادون قرمز با تبدیل فوریه برای پودر شیشه زیست‌فعال حاوی دو درصد مولی نقره.

تهیه شده به روش سل-ژل حاوی دو درصد مولی نقره که در دماهای 55°C و 75°C تحت عملیات حرارتی قرار گرفته است در شکل (۳) آورده شده است. مطابق شکل هر دو پراش نشان دهنده فاز آمورف شیشه زیست‌فعال و پیک کلسیم

تشکیل گروه کربنات (CO_3^{2-}) است که نتیجه واکنش BAG و CO_2 اتمسفر است (۱۲). پیوند شناسایی شده در حدود cm^{-1} ۱۶۴۸ به پیوند خمشی O-H در آب جذب شده ارتباط دارد (۳۲). الگوی پراش پرتو ایکس از نمونه پودر شیشه زیست‌فعال



شکل ۳- الگوی پراش پرتو ایکس شیشه زیست‌فعال حاوی نقره.

حاوی نقره دارای ذرات با سطح ناهمگن و شکل نامنظم با لبه‌های تیز است (شکل ۴- الف و ب) (۱۲). اندازه ذرات نانو پودر با نرم‌افزار تحلیل تصاویر^{۳۶} اندازه‌گیری شد و نتایج نشان داد که میانگین اندازه ذرات $13/4 \pm 2$ نانومتر است. الگوی طیف‌سنجی پراش انرژی پرتو ایکس (شکل ۴- ج، د و ه) نیز حضور عناصر از جمله نقره را در شیشه زیست‌فعال تأیید می‌کند و یک توزیع همگن از فسفر، کلسیم، سیلیسیم و نقره در نقشه پراش پرتو ایکس مشاهده می‌شود. این نتیجه نشان می‌دهد که با وجود مناطق مشاهده شده با مورفولوژی متفاوت، جداسازی فازی وجود ندارد (۳۵ و ۳۶). نتایج آنالیز اشعه ایکس فلورسنتی نانو پودر شیشه زیست‌فعال حاوی نقره (جدول ۳) در مقایسه با ترکیبات محاسبه شده و اندازه‌گیری شده نزدیک بودن نتایج این دو آنالیز را نشان می‌دهد که خلوص بالای نمونه شیشه زیست‌فعال حاوی نقره را نشان می‌دهد (۳۲).

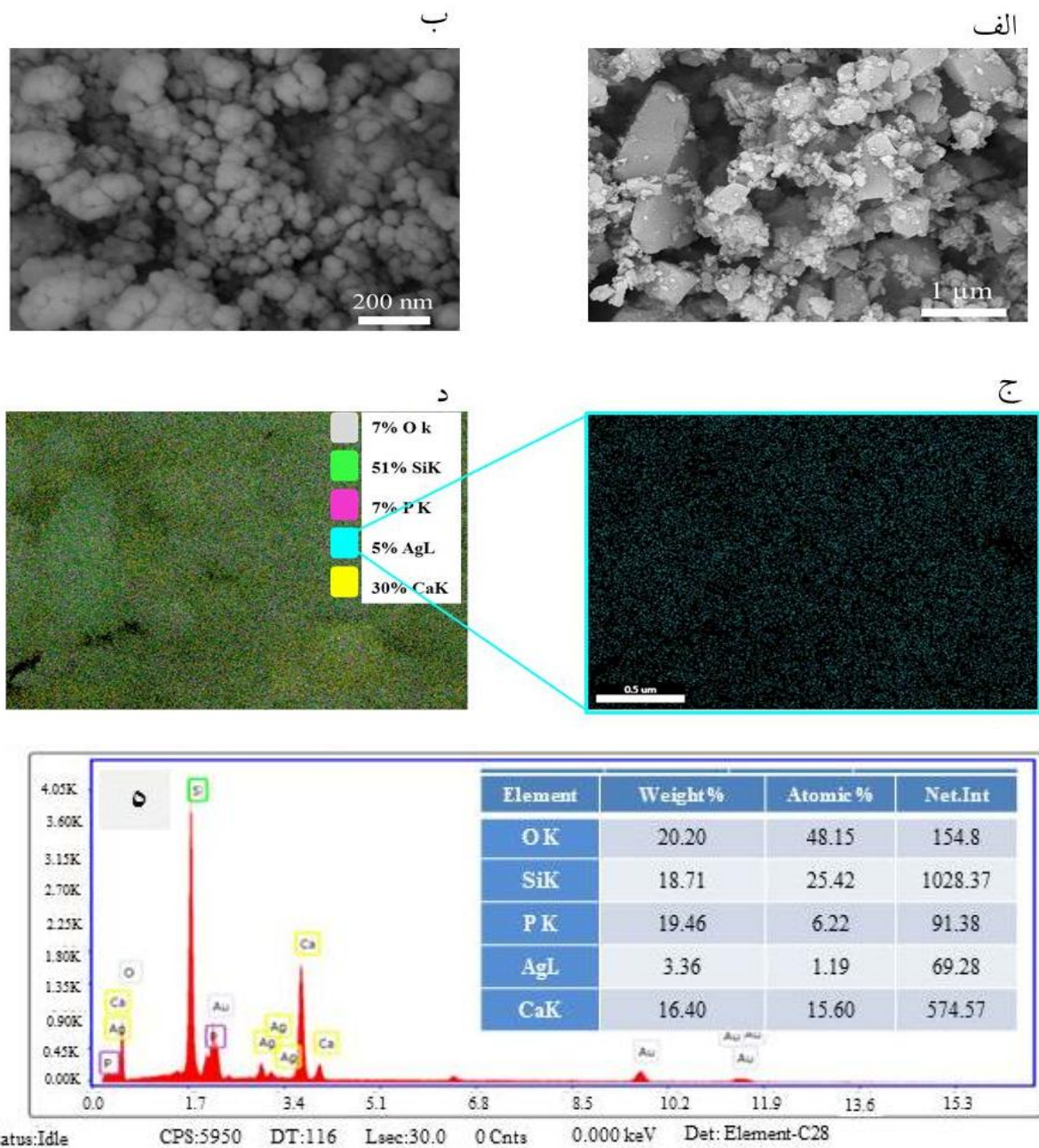
۳-۲- داربست ساخته شده به روش چاپ سه بعدی

آزمایش شماره ۱ در طراحی آزمایش تاگوچی

این آزمایش با دو نازل به قطرهای ۰/۶ و ۰/۷ میلی‌متر انجام شد که در شکل (۵- الف و ب)، تصاویر ساختارهای چاپ

فسفات هیدروکسید در $2\theta = 32$ است که به دلیل همراهی یون‌های کلسیم (Ca)، هیدروژن (H) و فسفر (P) در شبکه می‌باشد. ابتدا دمای ۷۵° درجه سانتی‌گراد برای عملیات حرارتی انتخاب شد اما همان‌طور که در شکل (۳) مشاهده می‌شود، نمونه در مقایسه با عملیات حرارتی انجام شده در دمای ۵۵° درجه سانتی‌گراد بیشتر متبلور شده است. پراش پرتو ایکس در دمای ۷۵° درجه سانتی‌گراد شیشه زیست‌فعال آمورف را با دو فاز کریستالی ($\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (JCPDS No. 18-0303) و Ag (JCPDS No. 87-0718) نشان می‌دهد درحالی‌که پراش پرتو ایکس در دمای ۵۵° درجه سانتی‌گراد تنها یک پیک مربوط به فاز $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ وجود دارد (۱۲ و ۳۴). این نتیجه نشان می‌دهد که کریستالی شدن در دمای ۷۵° درجه سانتی‌گراد بیشتر از دمای ۵۵° درجه سانتی‌گراد است. بنابراین دمای ۵۵° درجه سانتی‌گراد به‌عنوان دمای کلسیناسیون پودر نانو شیشه زیست‌فعال حاوی نقره انتخاب شد.

تصاویر میکروسکوپی الکترونی روبشی، طیف‌سنجی انرژی پراش پرتو ایکس و نقشه پرتو ایکس عناصر مربوط به نانو پودر شیشه زیست‌فعال حاوی نقره در شکل (۴) نشان داده شده است. می‌توان مشاهده کرد که نانو پودر شیشه زیست‌فعال



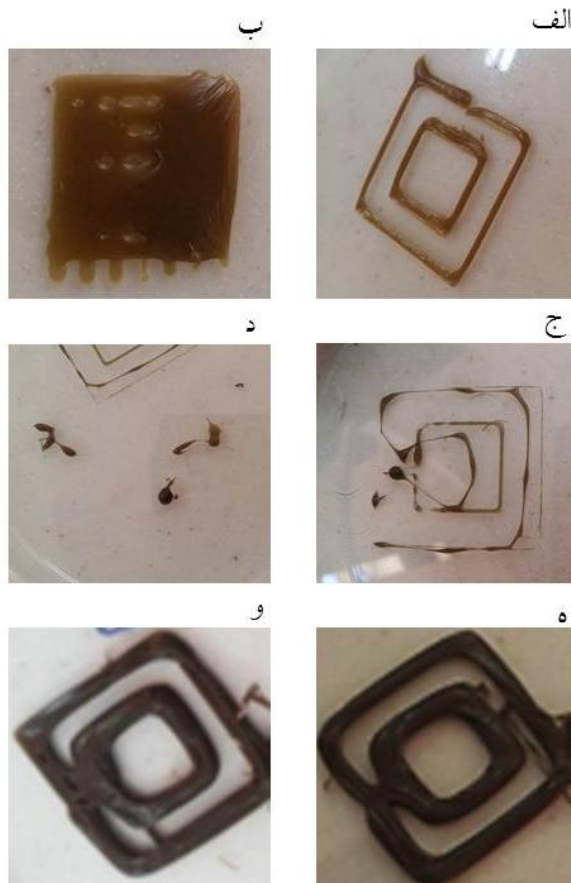
شکل ۴- الف) تصویر میکروسکوپ الکترونی شیشه زیست فعال حاوی نقره، ب) در بزرگنمایی بالا، ج) نقشه پرتو ایکس عناصر موجود در شیشه زیست فعال حاوی نقره، د) نقشه پرتو ایکس نقره در پودر، ه) طیف‌سنجی انرژی پراش پرتو ایکس.

بزرگ و تک لایه شد. همان‌طور که در شکل مشاهده می‌شود خطوط و لایه‌های در هم ادغام شده باعث شد حفره‌های داربست به صورت کامل بسته شود. در نتیجه مشخص شد که این ترکیب از جوهر، برای چاپ ساختار سه بعدی داربست به دلیل گرانی بالای آن مناسب نمی‌باشد.

شده مشاهده می‌شود. در این آزمایش لایه نشانی جوهر روی سطح انجام شد اما به دلیل عدم گرانی کافی جوهر، لایه‌ها شره کرده و در هم ادغام می‌شوند و رشته‌هایی^{۳۷} که برای ساخت داربست از نازل خارج شده بود با هم مخلوط و تبدیل به داربست تک لایه با پهنای زیاد مثل یک رشته با قطر بسیار

جدول ۳- ترکیبات شیشه زیست‌فعال حاوی نقره به‌دست آمده از آزمون اشعه ایکس فلورسنتی و مقادیر محاسبه شده استوکیومتری

ترکیب	محاسبه شده	
	درصد وزنی	آزمون
SiO ₂	۵۵/۰۸	۵۳/۳۰
CaO	۲۹/۱۲	۳۰/۷۲
P ₂ O ₅	۸/۶۸	۸/۷۸
Ag ₂ O	۷/۰۸	۶/۹۹
MgO	۰	۰/۱۰
Fe ₂ O ₃	۰	۰/۰۹
ZnO	۰	۰/۰۲



شکل ۵- تصاویر داربست‌های چاپ شده در آزمایش شماره ۱ تاگوچی (الف) داربست با حفره‌های بسته، (ب) شره کردن فیلامنت‌ها، (ج و د) تصاویر داربست‌های چاپ شده در آزمایش شماره ۲ تاگوچی، (ج- قرار نگرفتن لایه‌ها روی هم - عدم خروج ماده از سرنگ به‌صورت فیلامنت، ه و و) تصاویر داربست‌های چاپ شده در آزمایش شماره ۳ تاگوچی.

علاوه بر تناسب ویسکوزیته جوهر با پارامترهای چاپگر، باید تناسب معناداری بین اندازه نازل و نیروی اکسترودر نیز باشد.

آزمایش شماره ۴ در طراحی آزمایش تاگوچی

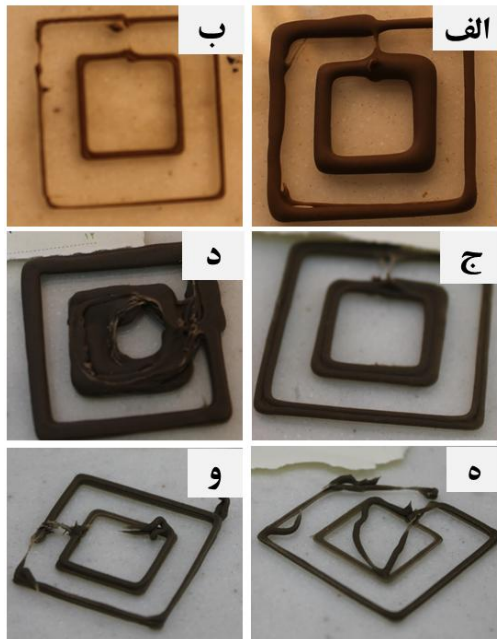
این آزمایش با دو نازل به قطرهای ۰/۵ و ۰/۷ میلی متر انجام شد که تصاویر داربست‌های چاپ شده در شکل (۶- الف و ب)، مشاهده می‌شود. در این آزمایش ابتدا با نازل ۰/۵ میلی متر، فرایند چاپ انجام شد که روند چاپ به‌صورت مناسبی پیش

آزمایش شماره ۲ در طراحی آزمایش تاگوچی

در شکل (۵- ج و د)، تصاویر داربست‌های چاپ شده با نازل ۰/۶ و ۰/۷ مشاهده می‌شود. در این آزمایش به‌حدی ماده به‌سختی از سرنگ خارج می‌شد که سرنگ از جای خودش در چاپگر خارج شد. قدرت موتور دستگاه برای اعمال نیروی کافی به جوهر موجود در سرنگ که قدرت خارج کردن و انحراف سرنگ که به دستگاه متصل بود را داشت کافی نبود و به این معنی است جوهر به‌حدی ویسکوزیته بالایی داشت نیروی بیشتری برای چاپ لازم است و قدرت موتور دستگاه توان اعمال این نیرو را ندارد.

آزمایش شماره ۳ در طراحی آزمایش تاگوچی

در شکل (۵- ه و و)، تصاویر داربست‌های چاپ شده با نازل ۰/۷ مشاهده می‌شود. در این آزمون، به‌دلیل بزرگ بودن اندازه نازل و نیروی اکسترودر بالا جوهر به مقدار بیش از اندازه لازم برای چاپ داربست از سرنگ خارج شده و لایه‌ها روی هم شره کرده، در هم ادغام شده و نمونه چاپ شده دارای خطوط با پهنای خیلی زیاد تشکیل شد. جهت رفع این مشکل، باید درایو جیبی‌تری تغییر کند که ماده کمتری از سرنگ خارج شود و یا اندازه نازل کوچک‌تر انتخاب شود. در هر صورت



شکل ۶- تصاویر داربست‌های چاپ شده در آزمایش شماره ۴ تاگوچی با استفاده از الف) نازل ۰/۷ میلی‌متر، ب) نازل ۰/۵ میلی‌متر، ج و د) تصاویر داربست‌های چاپ شده در آزمایش شماره ۵ تاگوچی، ه و و) تصاویر داربست‌های چاپ شده در آزمایش شماره ۶ تاگوچی.

آزمایش شماره ۷ در طراحی آزمایش تاگوچی

این آزمایش با نازل ۰/۷ میلی‌متر انجام شد. در این آزمایش در لایه‌های اول و دوم که توسط دستگاه تعریف شده و نازل بر اساس مختصات حرکت می‌کند که هیچ ماده‌ای از سرنگ خارج نشد و در لایه سوم با اعمال نیروی اکستروژن کمکی، جوهر به‌سختی از سرنگ خارج شد به حدی ویسکوزیته جوهر بالا است که اتصالی بین سطح و رشته برقرار نشد و فیلامنت اصلاً روی سطح قرار نگرفت و به‌دنبال سرنگ حرکت کرد و حتی با تغییر درایو جیبر و افزایش نیروی اعمالی بیشتر باز هم جوهر قابلیت خروج از نازل را نداشته و این فرایند غیر قابل اجرا شد. از آزمایش شماره ۷ به بعد به‌دلیل افزایش نسبت پودر شیشه زیست‌فعال به پلیمر پلی‌کاپرولاکتون و در نتیجه افزایش ویسکوزیته جوهر، و محدودیت نیروی اعمالی توسط چاپگر قابلیت چاپ به صفر رسید.

رفته و لایه نشانی به‌خوبی انجام گرفت اما بعد از چاپ دو لایه، خروج ماده از سرنگ متوقف شد که ممکن است به‌دلیل عدم یکنواختی کامل جوهر و آگلومره شدن پودر و گیر کردن در نازل باشد که در این صورت باید جوهر تخلیه و دوباره تهیه شود و یا به‌دلیل عدم کفایت نیروی اکستروژن برای کل فرایند چاپ باشد که در این صورت باید درایو جیبر به میزانی تغییر کند که قدرت فشار بر روی اکستروژن افزایش و در نتیجه جوهر بتواند از سرنگ خارج شود. در ادامه با استفاده از نازل بزرگ‌تر ۰/۷ میلی‌متری چاپ به‌خوبی پیش رفت اما فیلامنت‌ها با ضخامت بیشتری تشکیل شد که با تغییر درایو جیبر و کاهش میزان آن، این مشکل برطرف و لایه نشانی و فرایند چاپ به‌خوبی انجام شد.

آزمایش شماره ۵ در طراحی آزمایش تاگوچی

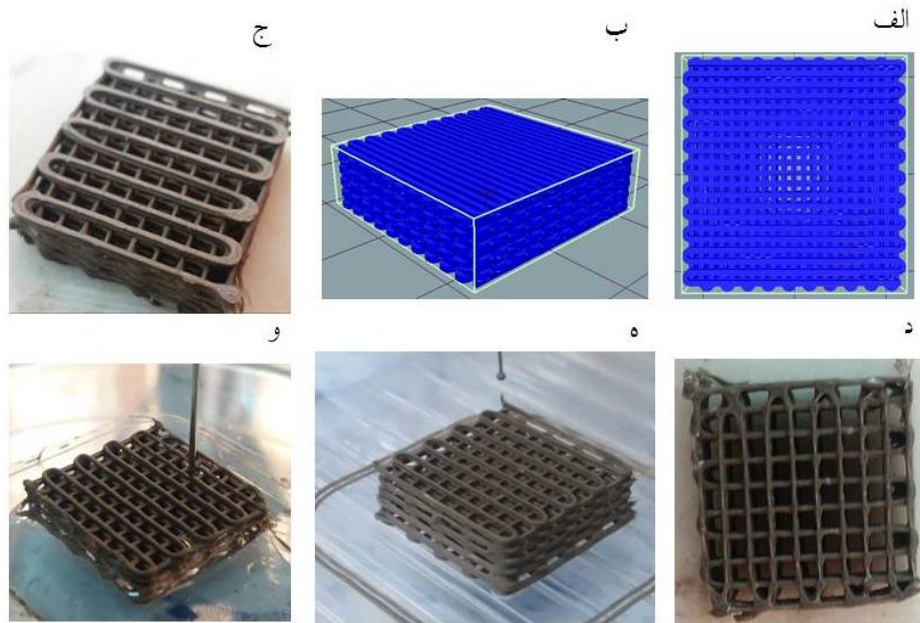
این آزمایش با نازل به قطر ۰/۷ میلی‌متر انجام شد که تصاویر ساختارهای چاپ شده در شکل (۶- ج و د)، مشاهده می‌شود. در این آزمایش لایه نشانی انجام شد اما از آنجایی که اندازه نازل بزرگ بود فیلامنت‌ها شره کرده، در همدیگر ادغام شده و ساختاری با رشته‌های بسیار ضخیمی حاصل شد.

آزمایش شماره ۶ در طراحی آزمایش تاگوچی

این آزمایش با نازل ۰/۷ میلی‌متر چاپ شده که تصاویر ساختارهای چاپ شده در شکل (۶- ه و و)، مشاهده می‌شود. در این آزمایش ویسکوزیته جوهر بالا بوده به همین جهت با درایو جیبر طراحی شده توسط تاگوچی که ۱۲۰۰ بود قابلیت چاپ نداشت اما با تغییر درایو جیبر و اعمال نیروی بیشتر لایه نشانی انجام شد. فرایند چاپ تا لایه چهارم پیش رفت اما به دلیل ویسکوزیته بالای جوهر در هنگام چاپ، خروج ماده به شکل پیوسته انجام نمی‌شد که منجر به عدم یکپارچگی در طرح چاپ شده گردید. برای حل این مشکل می‌توان از غلظت پایین‌تری از پلیمر حل شده در کلروفورم استفاده کرد تا ویسکوزیته کمی کاهش یابد.

جدول ۴- ترکیب جوهر جهت چاپ داربست بهینه ۲۰ لایه‌ای

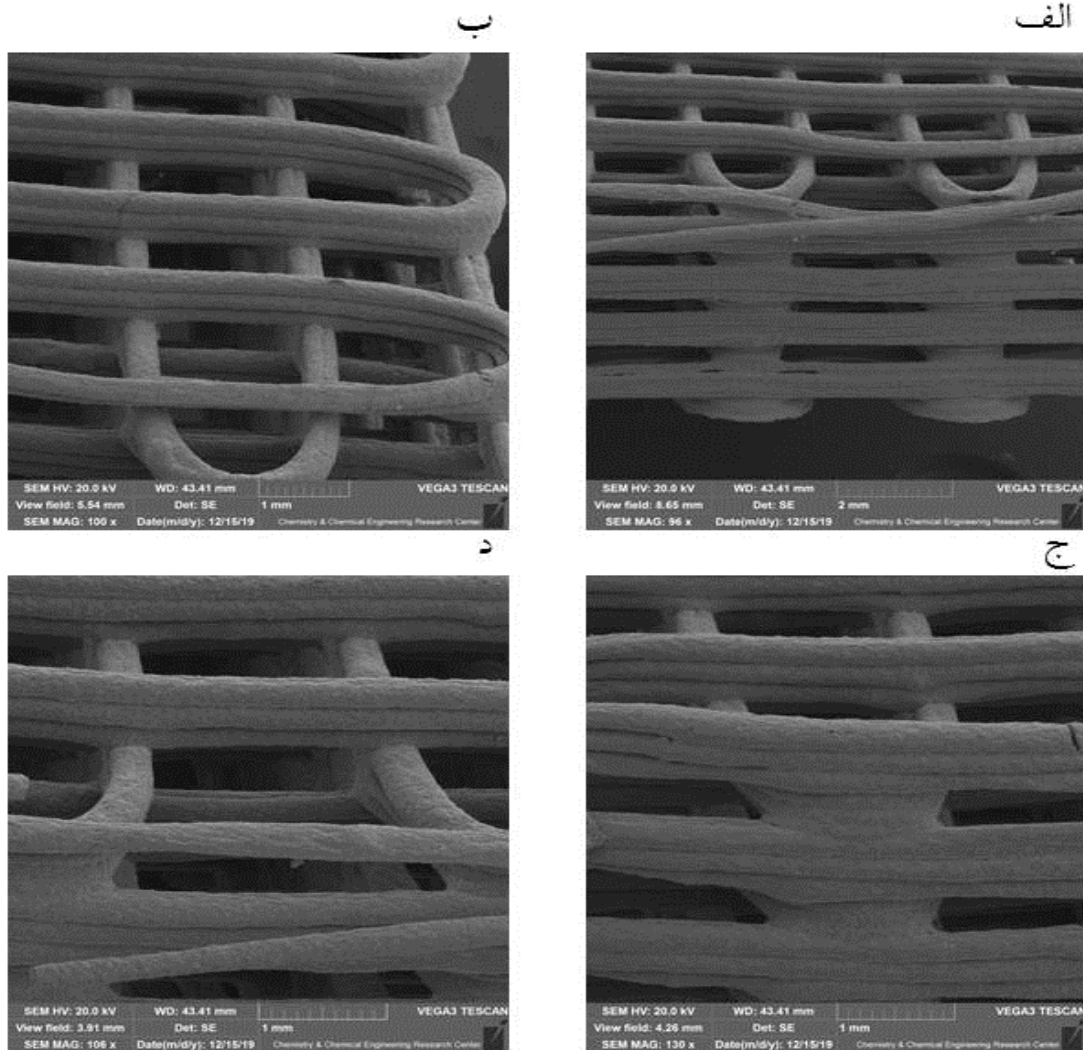
نسبت پلی‌کاپرولاکتون به شیشه زیست‌فعال	غلظت پلی‌کاپرولاکتون حل شده در حلال	درایو جیبیر	ریترکشن
۱/۲	۵۰	۱۲۰۰	۱/۵



شکل ۷- تصاویر داربست چاپ شده الف و ب) طرح طراحی شده توسط نرم‌افزار به صورت مکعب با اندازه ۲×۲ سانتی‌متر مربع، ج) داربست چاپ شده با ۲۰ لایه، د) نمای از بالای داربست، ه) نمایی از اثر ریترکشن پس از اتمام پرینت لایه و) در حین چاپ.

اتفاق می‌افتد اما ویسکوزیته در حدی است که نه تنها جوهر شره نکرده بلکه لایه نشانی به‌خوبی انجام شد. از جهتی به‌دلیل کاهش ویسکوزیته ریترکشن باید افزایش یابد تا بعد از اتمام چاپ یک لایه و حرکت نازل چاپگر جوهر از نازل خارج نشده و روی سطح داربست ریخته نشود و منجر به تخریب سطح و در نتیجه بسته شدن تخلخل‌های داربست نگردد. داربست طراحی شده با استفاده از نازل ۰/۴ میلی‌متر با طرح مکعب با اندازه ۲×۲ سانتی‌متر مربع که توسط نرم‌افزار مربوط به چاپگر طراحی شد و در شکل (۷- الف و ب)، نشان داده شده است، با فواصل بین خطی ۵۰۰ میکرون و ارتفاع لایه ۳۰۰ میکرومتر و به تعداد ۲۰ لایه با ساختار مناسب پرینت شد که شکل (۷- ج)، داربست چاپ شده با ۲۰ لایه، (۷- د)، نمای از بالای داربست، (۷- ه)، نمایی از اثر ریترکشن پس از اتمام پرینت

بر اساس نتایج آزمون‌های فوق و تکرار چاپ آن‌ها در چندین مرحله چاپ به‌صورت مستمر، با طرح‌ها و ابعاد متفاوت، منتج به دستیابی به پارامترهای بهینه و چاپ داربست کامل و مشابه با داربست‌های گزارش شده در پژوهش‌های انجام شده گردید. در ادامه در چندین مرحله، داربست‌های طراحی شده توسط آزمون تاگوچی با نازل ۰/۴ میلی‌متر پرینت شد که در نتیجه با توجه به دستیابی به ترکیب و پارامترهای بهینه به‌دست آمده، با کمی تغییر جزئی در پارامترهای داربست شماره ۶ با نسبت پلی‌کاپرولاکتون به شیشه زیست‌فعال حاوی نقره ۲/۱ و غلظت پلی‌کاپرولاکتون حل شده در کلروفورم ۵۰ درصد، درایو جیبیر ۱۲۰۰ و ریترکشن ۱/۵ (جدول ۴) قابلیت پرینت‌پذیری بهتری از خود نشان داد چرا که با کاهش غلظت پلی‌کاپرولاکتون ویسکوزیته جوهر کمتر شده و خروج جوهر از نازل به‌آسانی



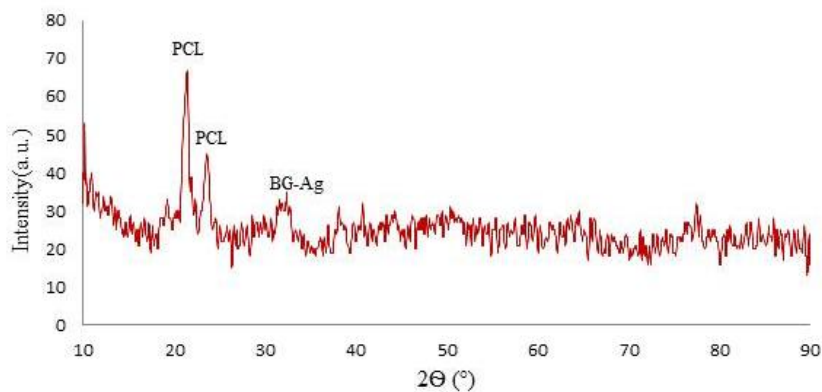
شکل ۸- تصاویر میکروسکوپی الکترونی روبشی از داربست چاپ شده الف و ب) به ترتیب وجه کناری و وجه بالایی داربست با بزرگنمایی $10^{\circ}X$ ، ج و د) به ترتیب وجه کناری و وجه بالایی داربست با بزرگنمایی $13^{\circ}X$.

است، رشته‌های ضخیم‌تر در لایه‌های زیرین و رشته‌های باریک‌تر در لایه‌های میانی دیده شد. ساختار داربست و وضعیت قرار گرفتن رشته‌ها روی هم نیز یک ساختار ناهموار را نشان می‌دهد که ممکن است به دلیل چاپ شدن زود هنگام لایه بالایی روی لایه پایین رخ داده باشد. چرا که زمان کافی برای خشک شدن لایه زیرین نبوده است. اما در حالت کلی می‌توان گفت که داربست با کیفیت قابل قبولی چاپ شده و تخلخل‌ها بسته نشده و به اندازه تخلخل‌های طراحی شده هستند که به دلیل تعادل مناسب پودر و پلیمر و تنظیم پارامترها

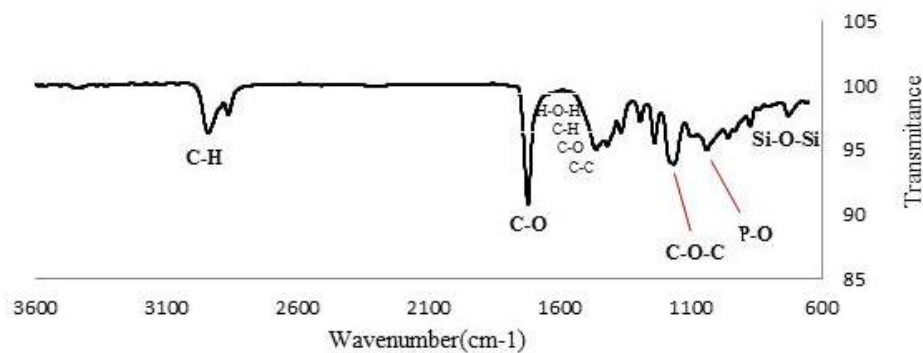
لایه و (۷-و)، در حین چاپ را نشان می‌دهد. در ادامه آزمون‌های مشخصه‌یابی و زیستی برای این داربست انجام شد.

۳-۳- مطالعه فازی و ریزساختاری داربست چاپ شده

با توجه به تصاویر میکروسکوپ الکترونی روبشی از داربست چاپ شده در شکل (۸)، یک شبکه از رشته‌های استوانه‌ای با قطر حدودی 41° میکرومتر و طول 27 میلی‌متر وجود دارد. با توجه به تصاویر میکروسکوپی الکترونی روبشی (شکل ۸، ساختار و ضخامت رشته‌ها که در برخی از قسمت‌ها ضخیم‌تر



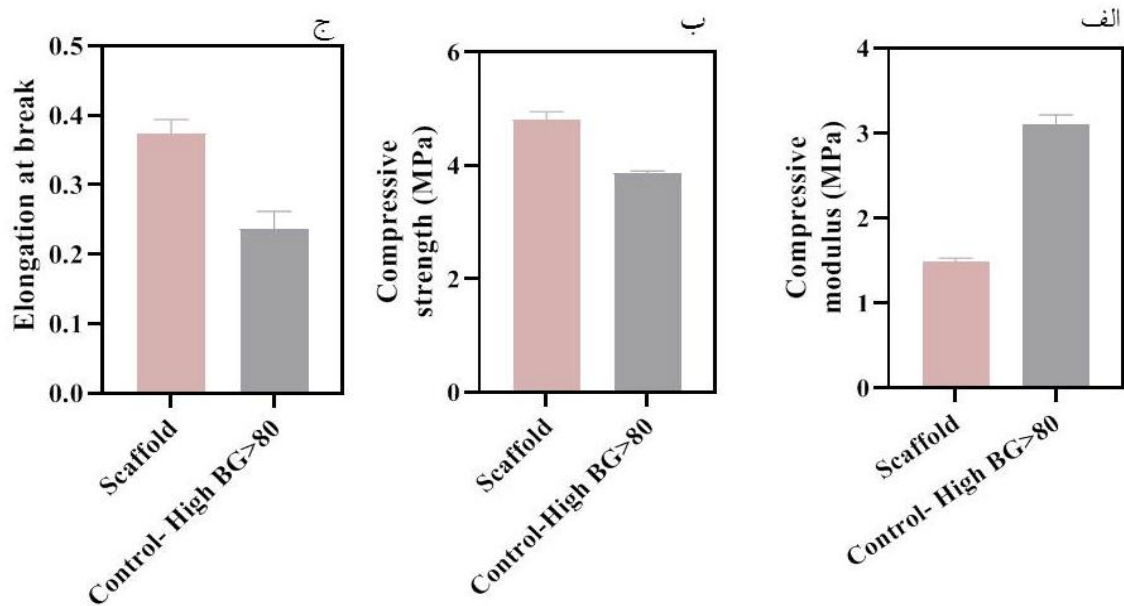
شکل ۹- پراش پرتو ایکس داربست بهینه چاپ شده.



شکل ۱۰- منحنی طیف‌سنجی مادون قرمز با تبدیل فوریه برای داربست بهینه.

بودن شیشه می‌باشد. شکل (۱۰)، منحنی طیف‌سنجی مادون قرمز با تبدیل فوریه برای داربست را نشان می‌دهد. دو پیوند اصلی پلی‌کاپرولاکتون در 1180 cm^{-1} (نوسانی کششی گروه‌های C-O-C) و 1726 cm^{-1} (نوسانی کششی کربوکسیل، C=O وجود دارند. همچنین پیوندهای C=O در 1296 cm^{-1} (کشش C-O و C-C)، 1244 cm^{-1} (کشش نامتقارن C-O-C) و پیوندهای C-H را می‌توان در داربست شناسایی کرد (۴ و ۸). به‌طور کلی، BAG خالص در درجه اول دو باند اولیه P-O و Si-O-Si را نشان می‌دهد، درحالی‌که گروه‌های ساختاری C-O-C و C=O برای نمونه ترکیبی شیشه و پلیمر معرفی می‌شوند (۳۸). این نتایج حضور فاز آمورف شیشه زیست فعال و فاز کریستالی پلی‌کاپرولاکتون با ترکیبات مشخص را در داربست چاپ شده نشان می‌دهد.

به‌صورت بهینه برای فرایند است. وجود و نظم تخلخل‌های کوچک و بزرگ نمونه‌ها می‌توانند طراحی مناسبی را برای رشد بافت‌های نرم و سخت در داربست فراهم کنند (۱۵). آزمون تفرق اشعه ایکس داربست بهینه چاپ شده برای تأیید وجود پلی‌کاپرولاکتون در ترکیب انجام شد. همان‌طور که در شکل (۹) نشان داده شده، دو پیک مشخص در زوایای 20° و $23/6^\circ$ مربوط به پلی‌کاپرولاکتون (۸ و ۱۷) و یک پیک در زاویه 32° به نانو پودر شیشه زیست‌فعال حاوی نقره نسبت داده می‌شود که نشان‌دهنده حضور نقره در ترکیب است و با پیک مربوط به تری‌کلسیم فسفات همپوشانی دارد (۱۳ و ۳۷). در این ترکیب درصد وزنی شیشه زیست‌فعال حاوی نقره دو برابر درصد وزنی پلی‌کاپرولاکتون است با این وجود پیک‌های مربوط به پلیمر شدت بالاتری دارند که نشان‌دهنده آمورف



شکل ۱۱- الف) مدول فشار، ب) استحکام فشاری و ج) ازدیاد طول در نقطه شکست.

۴-۳- ارزیابی استحکام فشاری

نتایج خواص مکانیکی داربست‌ها در شکل (۱۱) نشان داده شده است. مطابق شکل (۱۱-الف) و مقایسه داربست و نمونه کنترل که حاوی مقادیر بالای شیشه است، مدول یانگ با افزایش درصد وزنی شیشه زیست‌فعال در نمونه کنترل افزایش یافت. به عبارت دیگر، اضافه کردن شیشه زیست‌فعال می‌تواند مدول فشاری را تغییر دهد که مطابق با مطالعات انجام شده است (۳۸ و ۳۹). همچنین افزایش مقدار شیشه باعث کاهش استحکام فشاری و میزان ازدیاد طول در نقطه شکست^{۳۸} شد. شیشه در ساختار داربست نقش پرکننده را دارد که خواص مکانیکی ساختار را تغییر می‌دهد. به‌طور کلی مقادیر بالای شیشه نمی‌تواند پیوستگی مناسبی با زمینه پلیمری داشته باشد که به این دلیل است که مقدار پلی‌کاپرولاکتون کمتر از میزانی است که بتواند ذرات شیشه را احاطه کند و در نتیجه ذرات شیشه به‌صورت آگلومره‌های با اندازه‌های بسیار کوچک تشکیل می‌شود که این امر منتج به افزایش مدول و کاهش استحکام می‌شود (۴۰).

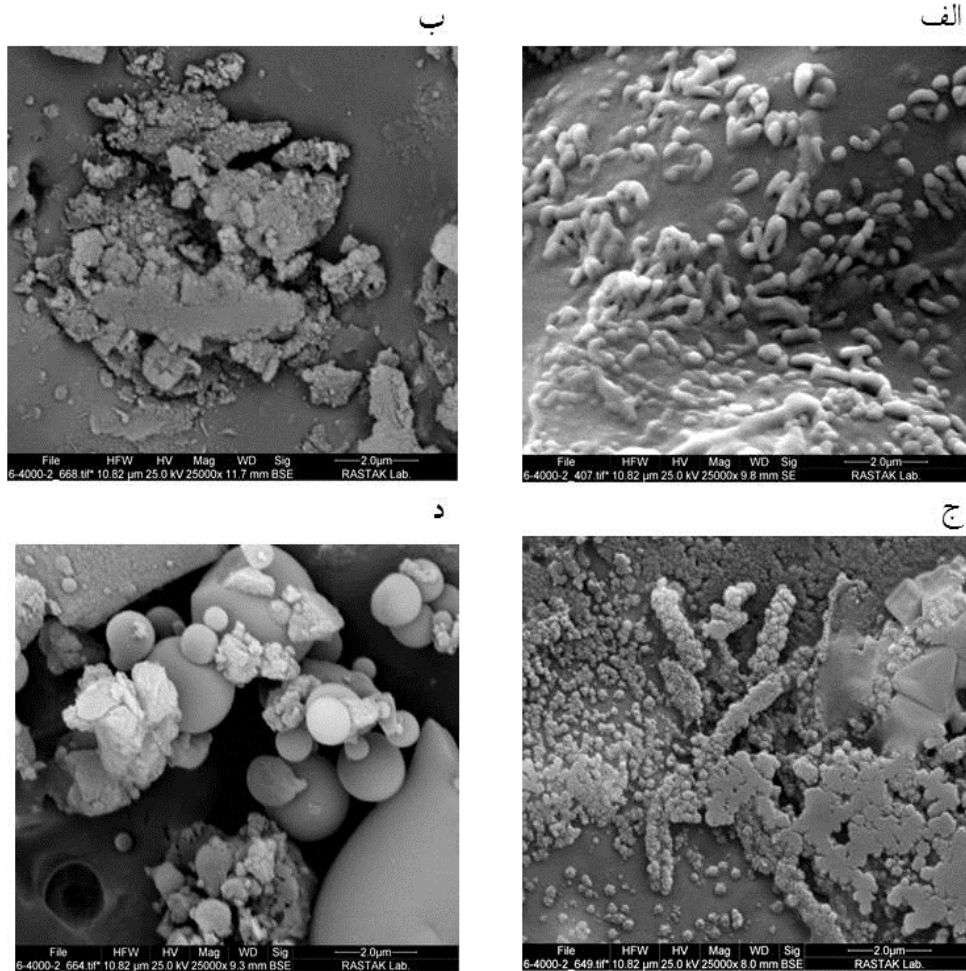
۳-۵- ارزیابی رفتار زیست‌فعالی داربست چاپ شده

به‌عنوان یکی از نشانه‌های زیست‌فعالی، توانایی تشکیل آپاتیت در محلول شبیه‌سازی شده بدن را می‌توان در نظر گرفت (۳۶). تشکیل آپاتیت بر روی سطح نمونه‌ها و پس از دوره‌های ۷، ۱۴، ۲۱ و ۲۸ روز غوطه‌وری نمونه‌ها در محلول شبیه‌سازی شده بدن توسط آزمون میکروسکوپ الکترونی روبشی و آزمون طیف‌سنجی نشر اتمی بررسی و مقایسه شد.

۳-۵-۱- ارزیابی زیست‌فعالی به‌کمک میکروسکوپ

الکترونی روبشی

شکل (۱۲) مجموعه‌ای از تصاویر میکروسکوپ الکترونی روبشی از داربست را به‌عنوان تابعی از زمان غوطه‌وری نشان می‌دهد. در این تصاویر تشکیل لایه سطحی از کریستال‌های آپاتیت شبه استخوانی بر سطح داربست قابل تشخیص است و شکل‌گیری ساختارهای کره‌مانند در اثر تماس نمونه با محلول SBF و تبادل یونی را بر روی سطح داربست نشان می‌دهد، مشابه نتایج تحقیقات انجام شده این رسوبات کروی تشکیل شده مشابه مورفولوژی معمولی هیدروکسی آپاتیت است (۴۱).



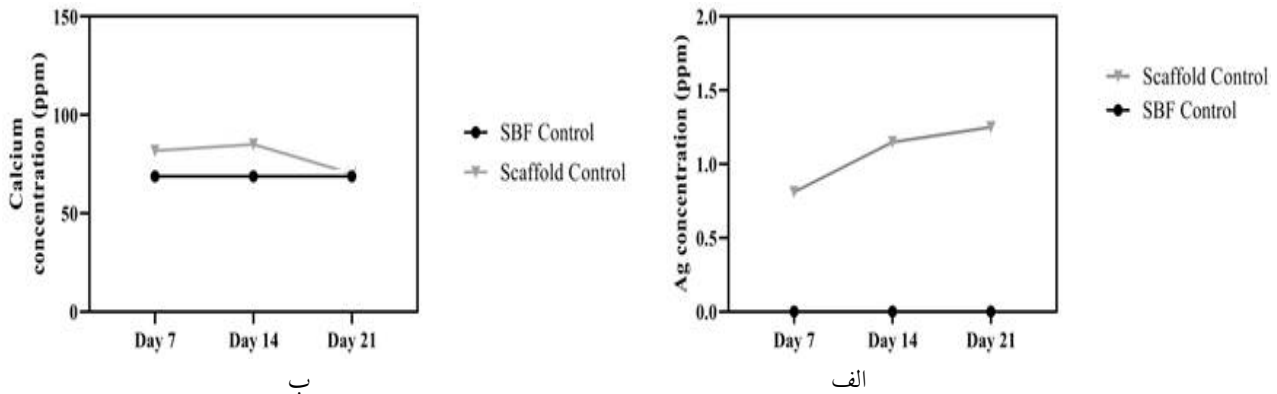
شکل ۱۲- تصاویر میکروسکوپی الکترونی روبشی داربست غوطه‌ور شده در SBF با بزرگنمایی $\times 2500$ (پس از روزهای الف) ۷ (ب) ۱۴ (ج) ۲۱ (د) ۲۸.

در دوره ۷ تا ۱۴ روز افزایش و به دنبال آن از روز ۱۴ تا روز ۲۱ کاهش یافت؛ این تغییر غلظت یون کلسیم به این دلیل است که از یک طرف از سطح داربست رهایش کلسیم و از طرف دیگر توسط تشکیل لایه آپاتیت کنترل می‌شود. کاهش غلظت کلسیم در محلول شبیه‌سازی شده بدن به دلیل افزایش رشد هسته‌های آپاتیت بر روی داربست‌ها است که نشان‌دهنده تشکیل و رسوب فاز آپاتیت بر روی سطح نمونه است. در مقابل یون‌های نقره از روز ۷ تا روز ۲۱ در محلول افزایش یافته و این نتیجه به دلیل حضور یون نقره در داربست و رهایش آن در این بازه زمانی می‌باشد (شکل ۱۳).

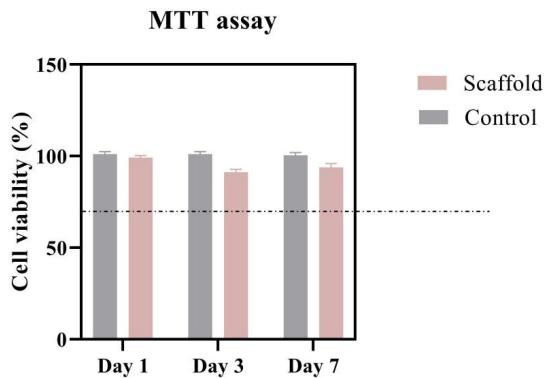
مطابق با تصاویر ارائه شده، با افزایش زمان غوطه‌وری لایه سطحی ضخیم‌تر شده است. پس از گذشت مدت زمان ۲۸ روز سطح داربست به صورت کامل با کریستال‌های آپاتیت پوشیده شده است. این یافته‌ها دلالت بر زیست‌فعالی مناسب داربست کامپوزیتی شیشه زیست‌فعال حاوی نقره و پلی‌کاپرولاکتون دارد که با تشکیل پیوند با بافت سخت استخوان سبب ایجاد پاسخ بیولوژیکی مناسب از طرف بافت می‌گردد (۴۱).

۳-۵-۲- ارزیابی زیست‌فعالی به کمک آزمون طیف‌سنجی نشر اتمی

با توجه به نتایج ICP، میزان یون کلسیم آزاد شده از داربست



شکل ۱۳- نتایج آزمون طیف‌سنجی نشر اتمی داربست غوطه‌ور شده در SBF از روز ۷ تا ۲۱
الف) تغییرات غلظت نقره ب) تغییرات غلظت کلسیم.



شکل ۱۴- وضعیت سلول‌های کشت شده بر روی داربست را پس از ۱، ۳ و ۷ روز بعد از کشت سلولی.

سلول‌ها بر روی تمام داربست به‌خوبی چسبیده و گسترش یافته‌اند و پاهای کاذب آن‌ها نیز به وضوح در تصاویر قابل مشاهده است. تمام داربست زیست‌سازگاری خوب، چسبندگی نرمال و گسترش مناسبی را از خود نشان داده‌اند.

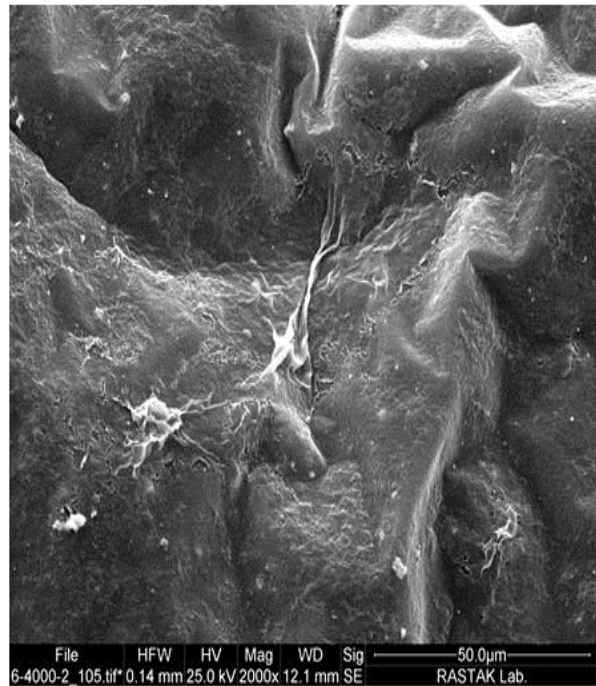
۳-۷- فعالیت آلکالین فسفاتاز

آلکالین فسفاتاز یک آنزیم است که به‌وسیله سلول‌های استئوبلاست تولید می‌شوند. فعالیت ALP یکی از الگوهای فنوتیپیک برای تفکیک و تکثیر سلول‌های استخوانی است و می‌تواند برای ارزیابی شدت فعالیت‌های استئوبلاستی مورد استفاده قرار گیرد. همان‌طور که در شکل (۱۶) نشان داده شده است، در روز ۷ ام، فعالیت آلکالین فسفاتازی بین داربست

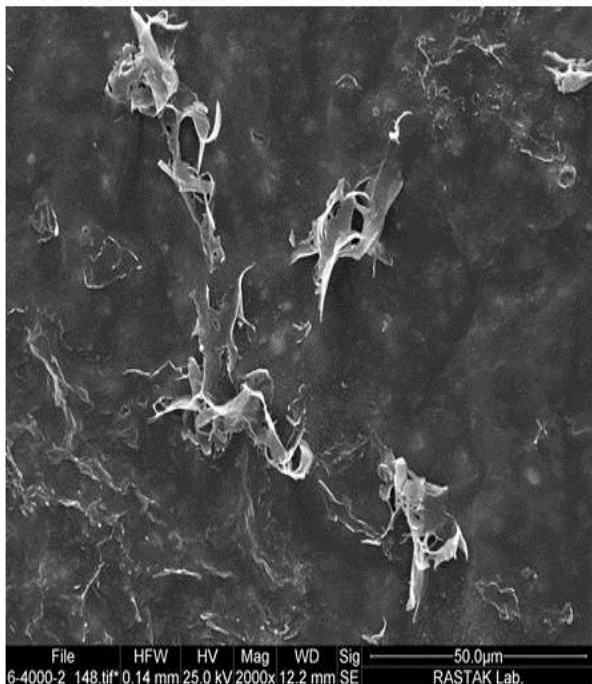
۳-۶- بررسی سمیت سلولی

علی‌رغم خاصیت ضد باکتری یون‌های نقره، که آن را به یک عامل ضد باکتری پرمصرف در کاربردهای بالینی تبدیل می‌کند، زیست‌سازگاری آن هنوز چالش برانگیز است. سلول‌های MG-63 شبیه استئوبلاست انسانی یکی از سلول‌های رایجی هستند که برای بررسی میزان قدرت بیوماده برای داشتن یک تعامل مطلوب بین سلول‌های استخوان و بیوماده مورد استفاده قرار می‌گیرند (۴۲). سلول‌های MG-63 رشد سریع سلولی با شکل (فنوتیپ^{۳۹}) استئوبلاست‌های اولیه را نشان می‌دهند (۴۳). محسن زاده و همکاران در سال ۲۰۱۰ به بررسی اثر سمی ذرات نانو نقره در غلظت‌های ۰/۰۵، ۰/۰۱، ۰/۰۵، ۰/۰۰۱، ۰/۰۰۵، ۰/۰۵، ۰/۱، ۱ و ۵ ppm بر روی سلول‌های خون محیطی در سه زمان ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت با استفاده از تست MTT پرداختند و نشان دادند که غلظت‌های کمتر از ۱۰ ppm سمیتی برای سلول‌ها وجود ندارد (۴۴). شکل (۱۴) وضعیت سلول‌های کشت شده بر روی داربست را پس از ۱، ۳ و ۷ روز بعد از کشت سلولی نشان می‌دهد. طبق استاندارد ISO 10,993-5 آنجایی که قابلیت زنده ماندن سلول‌ها بالاتر از ۷۰ درصد گروه کنترل است، هیچ اثر سمی مشاهده نشد و اثر سمیت سلولی در داربست وجود ندارد (۴۵). تصاویر میکروسکوپ الکترونی روبشی (شکل ۱۵) نشان داد که سلول‌های MG-63 به‌خوبی بر روی داربست چسبیده و گسترش یافته‌اند. ابتدا در روز ۱،

الف



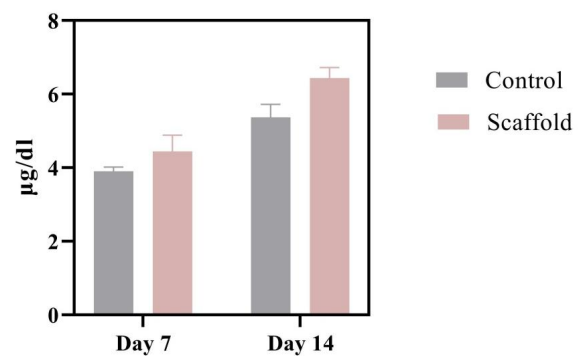
ب



شکل ۱۵- مورفولوژی سلول‌های MG-63 بر روی داربست‌ها بعد از الف) ۱ و ب) ۷ روز از کشت در بزرگنمایی X ۲۰۰۰.

است که با نقش ALP در تفکیک سلول‌های استخوان‌ساز مطابقت دارد. کریمی و همکاران گزارش کرده‌اند که فعالیت ALP در هفته دوم پس از جایگزینی محیط استخوانی بهبود یافته است. استفاده از شیشه‌های زیست فعال در سطح داربست‌ها یک رویکرد مطلوب در سال‌های اخیر بوده است. به‌عنوان مثال، در یک مطالعه، سطح داربست‌های PLLA با پوشش نانوذرات بغدادیت برای کاربرد مهندسی بافت استخوان مورد استفاده قرار گرفت (۲۶). سلول‌های کشت شده روی سطح نمونه‌های حاوی نانوذرات بغدادیت فعالیت قابل توجه ALP و رسوب کلسیم را نشان دادند. علاوه بر این، فاضلی و همکاران (۲۶)، یک کامپوزیت متشکل از PCL و HA را به روش چاپ سه‌بعدی ساخت و نشان داد که سازگاری سلولی و استخوان‌سازی داربست‌های کامپوزیتی در کشت سلولی در مقایسه با داربست‌هایی که صرفاً از هیدروکسی آپاتیت ساخته شده‌اند بالاتر است.

ALP activity



شکل ۱۶- فعالیت آلکالین فسفاتاز سلول‌های MG-63 کشت شده بر روی داربست چاپ شده.

و نمونه کنترل از تفاوت معناداری برخوردار نبود. فعالیت آلکالین فسفاتازی زیادی در نمونه کنترل مشاهده شده که در مقایسه با سایر داربست‌ها، می‌تواند به دلیل اثر هم‌افزایی نانوذرات هیدروکسی آپاتیت باشد. برای این نمونه‌ها، فعالیت ALP سلول‌های MG-63 به‌طور قابل توجهی افزایش یافته

۴- نتیجه‌گیری

به منظور دستیابی به داربست کامپوزیتی شیشه زیست‌فعال حاوی نقره/پلی‌کاپرولاکتون با قابلیت چاپ، ابتدا پودر شیشه زیست‌فعال آنتی‌باکتریال، حاوی نقره به روش سل-ژل سنتز شده که در آن بر اساس نتایج دمای ۵۵۰ درجه سانتی‌گراد دمای بهینه برای کلسینه کردن ژل است به طوری که پودر شیشه با کمترین درصد تبلور، اندازه ذرات کمتر از ۱۵ نانومتر و با توزیع همگن نقره در آن حاصل شد. سپس با استفاده از روش تاگوجی آزمایش‌هایی با متغیرها و مقادیر مختلف‌شان طراحی و بر اساس این آزمون‌ها و تغییر پارامترهای نسبت وزنی پلی‌کاپرولاکتون/شیشه زیست‌فعال، غلظت پلی‌کاپرولاکتون حل شده در کلروفرم، درایو جیبر و ریتراکشن، جوهرهای متعددی برای فرایند چاپ تهیه و در ادامه داربست‌های نانوکامپوزیت ضد باکتری شیشه زیست‌فعال- پلی‌کاپرولاکتون با پارامترهای بهینه ساخته شد. داربست بهینه از نظر اندازه و توزیع حفره‌ها و تکرارپذیری در شرایط نسبت پلی‌کاپرولاکتون به شیشه زیست‌فعال حاوی نقره ۲/۱ و غلظت پلی‌کاپرولاکتون حل شده در کلروفرم ۵۰٪، درایو جیبر ۱۲۰۰ و ریتراکشن ۱/۵ حاصل شد. در پژوهش ما به دلیل استفاده از پلی‌کاپرولاکتون در تهیه جوهر، پلیمر به راحتی دور ذرات شیشه را احاطه کرده و باعث پخش یکنواخت پودر در جوهر و پایین آمدن احتمال آگلومره شدن و مسدود شدن نازل می‌شود. از طرفی چون چاپ داربست در محیط هوای اتاق انجام شد معضل روی هم افتادن لایه‌ها وجود نداشت و در نهایت ساختار با کیفیت تری چاپ شد.

داربست ساخته شده در شرایط بهینه خواص ضد باکتریایی قابل توجه (آزادسازی یون نقره با اصلاح ترکیب شیشه)، خاصیت زیست‌فعالی خوب (شکل‌گیری آپاتیت بر روی سطح داربست و آنالیز غلظت یون‌ها در محلول شبه‌سازی) و قابلیت زنده ماندن سلولی قابل قبولی را نشان داده و فعالیت آکالین فسفاتاز MG-63 کشت شده روی نمونه قابل قبول بود. بدین ترتیب داربست مورد مطالعه ساخته شده به روش پرینت سه بعدی می‌تواند کاندیدای خوبی برای مهندسی بافت استخوان باشد.

ب



الف



د



ج



شکل ۱۷- نواحی عدم رشد شفاف در اطراف داربست‌ها الف و ج) به ترتیب برای داربست و پلیمر خالص با استفاده از باکتری استافیلوکوکوس (ب و ج) و ه) ترتیب برای داربست و پلیمر خالص با استفاده از باکتری اشریشیا کلای.

۳-۸- آزمون آنتی‌باکتریال

اثر ضد باکتری داربست سه بعدی با اندازه‌گیری نواحی عدم رشد شفاف در اطراف داربست‌ها، بررسی شد. ابعاد نواحی عدم رشد در شکل (۱۷) نشان داده شده است. با توجه به نتایج، می‌توان فهمید که ترکیب شیشه زیست‌فعال حاوی نقره با پلی‌کاپرولاکتون در داربست، می‌تواند خاصیت ضد باکتریایی را به داربست اضافه کند. چندین فرضیه مکانیزم اثر ضد باکتری یون نقره بر روی میکرو ارگانیسم‌ها را توجیه می‌کند. یون‌های نقره می‌توانند به سطح سلول متصل شوند و در نتیجه باعث نفوذ در سلول و تغییر ساختار آن‌ها شود و باعث مهار پروتئین‌های موجود در سیتوپلاسم شوند که منجر به تداخل در فرآیندهای تکثیر می‌شود (۴۶). نتایج آنتی‌باکتریال نشان داد که شیشه زیست‌فعال حاوی نقره موجود در داربست نقش کلیدی در خواص ضد باکتریایی داربست ایفا می‌کند. با اندازه‌گیری قطر هاله عدم رشد و مقایسه با نمونه داربست پلیمری خالص (۴۷)، می‌توان به خاصیت ضد باکتری داربست پی برد. ژانگ و همکاران نشان دادند اثر ضد باکتریایی شیشه زیست‌فعال با گذشت زمان و غلظت شیشه در ترکیب، افزایش می‌یابد (۴۸).

تشکر و سپاسگزاری

نویسندگان از دکتر پدرو میراندا^{۴۰} از گروه مهندسی مکانیک دانشگاه اکسترادورا اسپانیا، معاونت پژوهشی دانشگاه یزد و دانشکده فناوری‌های نوین علوم پزشکی - دانشگاه علوم پزشکی اصفهان برای کمک‌های علمی، آزمایشگاهی و حمایت مالی آن‌ها در این مطالعه قدردانی می‌کنند.

تضاد منافع

نویسندگان مقاله اذعان دارند هیچ نوع تضاد منفعی با شخص، شرکت یا سازمانی برای این پژوهش ندارند.

واژه‌نامه

- | | |
|-------------------------------------|--------------------------------------|
| 1. autograft | 21. penicillin |
| 2. allograft | 22. streptomycin |
| 3. xenograft | 23. Sigma-Aldrich |
| 4. osteoinduction | 24. drive geer |
| 5. osteoconduction | 25. retraction |
| 6. simulated body fluid (SBF) | 26. in-vitro |
| 7. polycaprolactone (PCL) | 27. in-vivo |
| 8. escherichia coli | 28. osteosarcoma |
| 9. osteoblast | 29. Dulbecco's modified eagle medium |
| 10. 3D- printing | 30. fetal bovine serum (FBS) |
| 11. fused deposition modeling (FDM) | 31. streptomycin |
| 12. robocasting 13ink | 32. staphylococcus |
| 13. carboxymethyl cellulose (CMC) | 33. alkaline phosphatase |
| 14. collapse | 34. staphylococcus bacteria |
| 15. Taguchi method | 35. alkoxy group |
| 16. tetraethyl orthosilicate (TEOS) | 36. image |
| 17. calcium nitrate tetrahydrate | 37. filament |
| 18. silver nitrate | 38. elongation at break |
| 19. triethyl phosphate | 39. phenotype |
| 20. chloroform | 40. Pedro Miranda |

مراجع

1. Amini AR, Laurencin CT, Nukavarapu SP. Bone Tissue Engineering: Recent Advances and Challenges, *Crit Rev Biomed. Eng* 2012; 40(5): 363–408.
2. Langer R, Vacanti R. Advances in Tissue Engineering, *Journal of Pediatric Surgery* 2016; 51(1): 8–12.
3. O'Brien FJ. Biomaterials & Scaffolds for Tissue Engineering, *Materials Today* 2011; 14(3): 88–95.
4. Koons GL, Diba M, Mikos AG. Materials design for bone-tissue engineering, *Nat Rev Mater* 2020; 5(8): 584–603.
5. Hench LL, Jones JR. Bioactive glasses: frontiers and challenges, *Frontiers in bioengineering and biotechnology* 2015; 3:194.
6. Imran Z. Bioactive Glass: A Material for the Future, *World Journal of Dentistry* 2021; 3(2): 199–201.
7. Soni R, Kumar NV, Chameettachal S, Pati F, Narayan Rath S. Synthesis and Optimization of PCL-Bioactive Glass Composite Scaffold for Bone Tissue Engineering, *Mater Today Proc* 2019; 15(4): 294–299.
8. Bahremandi Tolou N, Salimijazi H, Dikonimos T, Faggio GG, Tamburrano A, Aurora ALN. Fabrication of 3D monolithic graphene foam/polycaprolactone porous nanocomposites for bioapplications, *J Mater Sci* 2021; 56(9): 5581–5594.
9. Ahmed AA, Ali AA, Doaa Mahmoud AR, El-Fiqi AM. Preparation and Characterization of Antibacterial P2O5–CaO–Na2O–Ag2O Glasses, *Journal of Biomedical Materials Research Part A* 2011; 98(1): 132-142.
10. Crabtree J, Burchette R, Siddiqi R, Huen I, Hadnott L, Fishman A. The Efficacy of Silver-Ion Implanted Catheters in Reducing Peritoneal Dialysis-Related Infections, *Peritoneal dialysis international: journal*

- of the International Society for Peritoneal Dialysis 2003; 23(4): 368-74.
11. Miola M, Verné E, Vitale-Brovarone C, Baino F. Antibacterial Bioglass-Derived Scaffolds: Innovative Synthesis Approach and Characterization, *Int J Appl Glass Sci* 2016; 7: 238–247.
 12. Solgi S, Khakbiz M, Shahrezaee M, Zamanian A, Tahriri M, Keshtkari S, Raz M, Khoshroo K, Moghadas S, Rajabnejad A. Synthesis, Characterization and In Vitro Biological Evaluation of Sol-gel Derived Sr-containing Nano Bioactive Glass, *Silicon* 2015; 9(4): 535-542.
 13. Vulpoi A, Baia L, Simon S, Simon V. Silver effect on the structure of SiO₂-CaO-P₂O₅ ternary system, *Materials Science and Engineering* 2021; 32(2): 178–183.
 14. Bellantone M, Williams H.D, Hench LL. Broad-Spectrum Bactericidal Activity of Ag₂O-Doped Bioactive Glass, *Antimicrobial agents and chemotherapy* 2002; 46(6): 1940-1945.
 15. Eqtesadi S, Motealleh A, Pajares A, Guiberteau F, Miranda P. Improving Mechanical Properties of 13–93 Bioactive Glass Robocast Scaffold by Poly (lactic acid) and Poly (ε-caprolactone) Melt Infiltration, *Journal of Non-Crystalline Solids* 2016; 432: 111-119.
 16. Distler T, Fournier N, Grünewald A, Polley C, Seitz H, Detsch R, Boccaccini AR. Polymer-Bioactive Glass Composite Filaments for 3D Scaffold Manufacturing by Fused Deposition Modeling: Fabrication and Characterization, *Front Bioeng Biotechnol* 2020; 8: 552.
 17. Fathi A, Kermani F, Behnamghader A, Banijamali S, Mozafari M, Baino F, Kargoazar S. Three-dimensionally printed polycaprolactone/multicomponent bioactive glass scaffolds for potential application in bone tissue engineering, *Biomedical Glasses* 2020; 6(1): 57–69.
 18. Martínez-Vázquez FJ, Perera FH, Miranda P, Pajares A, Guiberteau F. Improving the compressive strength of bioceramic robocast scaffolds by polymer infiltration, *Acta Biomater* 2010; 6(11): 4361–4368.
 19. Kim YB, Lim JY, Yang G, Seo JH, Ryu HS, Kim GH. 3D-printed PCL/bioglass (BGS-7) composite scaffolds with high toughness and cell-responses for bone tissue regeneration, *Journal of Industrial and Engineering Chemistry* 2019; 79: 163–171.
 20. Rahaman MN, Xiao W, Huang W. Bioactive glass composites for bone and musculoskeletal tissue engineering, in: *Bioactive Glasses*, Elsevier 2018; 285–336.
 21. Zhang Y, Yu W, Ba Z, Cui S, Wei J, Li H. 3D-printed scaffolds of mesoporous bioglass/gliadin/polycaprolactone ternary composite for enhancement of compressive strength, degradability, cell responses and new bone tissue ingrowth, *Int J Nanomedicine*, 2018; 13: 5433–5447.
 22. Boga JC, Miguel S.P, De Melo-Diogo D, Mendonça AG, Louro RO, Correia IJ. In Vitro Characterization of 3D Printed Scaffolds Aimed at Bone Tissue Regeneration, *Colloids Surfaces B Biointerfaces* 2018; 165: 207–218.
 23. Lewis JA, Smay JE, Stuecker J, Cesarano J. Direct ink writing of three-dimensional ceramic structures, *Journal of the American Ceramic Society* 2006; 89(12): 3599–3609.
 24. Michna S, Wu W, Lewis JA. Concentrated hydroxyapatite inks for direct-write assembly of 3-D periodic scaffolds, *Biomaterials* 2005; 26(28): 5632–5639.
 25. Liu Y, Li T, Ma H, Zhai D, Deng C, Wang J, Zhuo S, Chang J, Wu C. 3D-printed scaffolds with bioactive elements-induced photothermal effect for bone tumor therapy. *Acta biomaterialia* 2018; 73: 531-46.
 26. Karimi Z, Seyedjafari E, Mahdavi FS, Hashemi SM, Khojasteh A, Kazemi B, Mohammadi-Yeganeh S. Baghdadite nanoparticle-coated poly l-lactic acid (PLLA) ceramics scaffold improved osteogenic differentiation of adipose tissue-derived mesenchymal stem cells, *J Biomed Mater Res A* 2019; 107(6): 1284–1293.
 27. Jazi FS, Parvin N, Tahriri M, Alizadeh M, Abedini S, Alizadeh M. The Relationship Between the Synthesis and Morphology of SnO₂-Ag₂O Nanocomposite, *Synthesis and Reactivity in Inorganic, Metal-Organic, and Nano-Metal Chemistry*, 2014; 44(5), 759–764.
 28. Eqtesadi S, Motealleh A, Miranda P, Pajares A, Lemos A, Ferreira JM. Robocasting of 45S5 Bioactive Glass Scaffolds for Bone Tissue Engineering, *Journal of the European Ceramic Society* 2014; 34(1): 107-118.
 29. Ohtsuki C, Kokubo T, and Yamamuro T. Mechanism of apatite formation on CaO-SiO₂-P₂O₅ glasses in a simulated body fluid, *Journal of Non-Crystalline Solids* 1992; 143: 84-92.
 30. Kokubo T, Takadama H. How useful is SBF in predicting in vivo bone bioactivity?, *Biomaterials* 2006; 27(15): 2907-2915.
 31. Jones JR, Ehrenfried LM, Hench LL. Optimising bioactive glass scaffolds for bone tissue engineering, *Biomaterials* 2006; 27(7): 964–973.
 32. Prabhu M, Kavitha v, Suriyaprabha R, Manivasakan P, Rajendran V, Kulandaivelu P. Preparation and Characterization of Silver-Doped Nanobioactive Glass Particles and Their &In Vitro& Behaviour for Biomedical Applications, *J Nanosci Nanotechnol* 2013; 13(8): 5327–5339.
 33. Vulpoi A, Gruian C, Vanea E, Baia L, Simon S, Steinhoff HJ, Göller G, Simon V. Bioactivity and protein attachment onto bioactive glasses containing silver nanoparticles, *J Biomed Mater Res A* 2012; 100(5): 1179–1186.
 34. Vulpoi A, Baia L, Simon L, Simon V. Silver Effect on the Structure of SiO₂-CaO-P₂O₅ Ternary System, *Materials Science and Engineering: C* 2012; 32(2):

- 178-183.
35. Vallet-Regí M, Román J, Padilla S, Doadrio JC, Gil FJ. Bioactivity and Mechanical Properties of SiO₂-CaO-P₂O₅ Glass-Ceramics, *Journal of Materials Chemistry* 2005; 15(13): 1353-1359.
36. Muthusamy P, Kandiah K, Rangaraj S, Manivasakan P, Venkatachalam R, Kulandaivelu P. Preparation and Characterization of Silver-Doped Nanobioactive Glass Particles and Their In Vitro Behaviour for Biomedical Applications, *Journal of Nanoscience and Nanotechnology* 2013; 13(8):5327-39.
37. Vallet-Regí M, Román J, Padilla S, Doadrio JC, Gil FJ. Bioactivity and mechanical properties of SiO₂-CaO-P₂O₅ glass-ceramics, *J Mater Chem* 2005; 15(13): 1353-1359.
38. Boccaccini AR, Erol M, Stark WJ, Mohn D, Hong Z, Mano JF. Polymer/bioactive glass nanocomposites for biomedical applications: a review. *Composites science and technology* 2010; 70(13): 1764-76.
39. Dziadek M, Menaszek E, Zagrajczuk B, Pawlik J, Cholewa-Kowalska K. New generation poly (ϵ -caprolactone)/gel-derived bioactive glass composites for bone tissue engineering: Part I. Material properties. *Materials Science and Engineering: C* 2015; 56: 9-21.
40. Rich J, Jaakkola T, Tirri T, Närhi T, Yli-Urpo A, Seppälä J. In vitro evaluation of poly (ϵ -caprolactone-co-DL-lactide)/bioactive glass composites. *Biomaterials* 2002; 23(10): 2143-50.
41. Petretta M, Gambardella A, Boi M, Berni M, Cavallo C, Marchiori G, Maltarello MC, Bellucci D, Fini M, Baldini N, Grigolo B. Composite scaffolds for bone tissue regeneration based on PCL and Mg-containing bioactive glasses. *Biology* 2021; 10(5): 398.
42. Staehlke S, Rebl H, Nebe B. Phenotypic stability of the human MG-63 osteoblastic cell line at different passages, *Cell Biol Int* 2019; 43(1): 22-32.
43. Chang YY, Huang HL, Chen YC, Hsu JT, Shieh TM, Tsai MT. Biological characteristics of the MG-63 human osteosarcoma cells on composite tantalum carbide/amorphous carbon films, *PLoS One* 2014; 9(14): e9559.
44. Mohsenzadeh S, Nazarymoghaddam K. Evaluation of Cytotoxicity of Nanosilver Particles on Monocytes of White Blood Cells (Doctoral dissertation, Dissertation] Dental Faculty of Shahed University of Medical Science).
45. Ben-Arfa BA, Neto AS, Miranda Salvado IM, Pullar RC, Ferreira JM. Robocasting: Prediction of ink printability in solgel bioactive glass. *Journal of the American Ceramic Society* 2019; 102(4):1608-18.
46. Dakal TC, Kumar A, Majumdar RS, Yadav V. Mechanistic basis of antimicrobial actions of silver nanoparticles. *Frontiers in microbiology* 2016; 7:1831.
47. Shoja M, Shameli K, Ahmad MB, Kalantari K. Preparation, characterization and antibacterial properties of polycaprolactone/ZnO microcomposites, *Digest Journal of Nanomaterials and Biostructures* 2015; 10(1): 69-78.
48. Zhang D, Leppäranta O, Munukka E, Ylänen H, Viljanen MK, Eerola E, Hupa M, Hupa L. Antibacterial effects and dissolution behavior of six bioactive glasses. *Journal of Biomedical Materials Research Part A: An Official Journal of the Society for Biomaterials, The Japanese Society for Biomaterials, and The Australian Society for Biomaterials and the Korean Society for Biomaterials* 2010; 93(2): 475-83.