



سنتز و بررسی خواص مکانیکی و زیستفعالی داربست پایه بتا تری کلسیم فسفات – بریدیجیت بهروش فضاساز برای کاربردهای مهندسی بافت استخوان

فروغ مفید نخعی'، محمد رجبی'* و حمیدرضا بخششیراد'

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: ۲/۶ ۱۴۰۰– دریافت نسخه نهایی: ۷/۶ ۱۴۰۰)

چکیده- علم مهندسی بافت در کنار علم پزشکی به احیا و ترمیم بافتها و اندامهای آسیب دیده می سردازد. هدف اصلی استفاده از داربستها، بازسازی مجدد بافتهای بدن است. انتخاب نوع و جنس داربست به دلیل اینکه درنهایت جایگزین بافت آسیب دیده می شود بسیار مهم است. توسعه مواد داربست کامپوزیتی سرامیک زیست فعال 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 بریدیجیت به ترتیب با روشهای واکنش حالت جامد و سل ژل، داربست کامپوزیتی بیوسرامیکی بتا تری کلسیم فسفات/ بریدیجیت (۲۵، ۳۵ و ۲۵ درصد وزنی بریدیجیت) با شبکه منافذ بههم پیوسته و مناسب برای بازسازی استخوان با استفاده از روش فضاساز ساخته شد. این مقاله به بررسی تأثیر افزودن مقادیر ویژگیهای مکانیکی و ویژگیهای زیست فعالی این داربست بتا تری کلسیم فسفات/ بریدیجیت (۲۵، ۳۵ و ۲۵ درصد وزنی بریدیجیت) با ویژگیهای مکانیکی و ویژگیهای زیست فعالی این داربست بتا تری کلسیم فسفات می پردازد. ترکیب های فیازی، ساختار متخلال میکرومتر و میانگین اندازه منافذ ۲۰/۱۳ میکروست و این داربست ه به استفاده از پراش پرتوی ایکس، میکروسکوپ الکترونی روبشی، میکرومتر و میانگین اندازه منافذ ۲۰۱/۱۳ میکرومتر؛ با تخلخل حدود ۲۹–۷۵ درصد را نشان می می میکروسکوپ الکترونی روبشی، میکرومتر و میانگین اندازه منافذ ۲۱/۱۳ میکرومتر؛ با تخلخل حدود ۲۹–۷۵ درصد را نشان می دهد. نتایج نشان داد که استحکام فشاری میکرومتر و میانگین اندازه منافذ ۲۰/۱۱/۱۳ میکرومتر؛ با تخلخل حدود ۲۹–۷۵ درصد را نشان می دهد. نتایج نشان داد که استحکام فشاری میکرومتر و میانگین اندازه منافذ ۲۱/۱۱/۱۳ میکرومتر؛ با تخلخل حدود ۲۹–۷۵ درصد را نشان می دهد. نتایج نشان داد که استحکام فشاری میکرومتر و میانگین اندازه منافذ ۲۱/۱۱/۱۳ میکرومتر؛ با تخلخل حدود ۲۹–۷۵ در در ان است می در مانه داد که استحکام ف داربست های عرفی مقالی اندازه منافذ ۲۱/۱۱/۱۰ میکرومتر؛ با خلخل حدود ۲۹–۲۵ در در بیت می و در مگایسکال) به دلیل توزیع یکنواخت تسر برد منجر به شکل گیری لایه آپاتی این فاز در مزدانه با بالاتر است. همچنین طبق نتایج زیست فعالی، غوطهوری در محلول شبیه سازی شده

واژههای کلیدی: مهندسی بافت، بتا تریکلسیم فسفات، بریدیجیت، داربست متخلخل، روش فضاساز.

۱ – مقدمه

بازسازی یکپارچگی ساختاری بافت استخوانی آسیب دیدہ یک مشکل ضروری برای افراد مبـتلا بـه ترومـا یـا بیمـاریهـای

استخوانی است [۱]؛ اما، جایگزین های فعلی بافت ها دارای مشکلات مختلفی از جمله محدودیت دهنده و رد پیوند هستند که نمی توانند نیازهای بیماران را بر آورده سازند [۲]. از این رو

^{* :} مسئول مكاتبات، پست الكترونيكي: 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 سینتیک تخریب یک داربست و در اصطلاح استفاده از مواد کامپوزیت بسیار معمـول است [٨]. از أنجا كه بافت استخوان به شكل طبيعي شامل نانو کامیوزیت سرامیکی است، استفاده از کامیوزیت، ای سرامیکی برای تولید داربست استخوانی با ویژگی های مناسب ضروری است. برای رسیدن به این هدف، طیف گسترده ای از مواد طبیعی و مصنوعی بهعنوان داربست و یا کامپوزیت استخوانی استفاده شده است. در ایـن مطالعـه بـهدلیـل خـواص مطلوب، از نانوكامپوزیت بتا ترىكلسيم فسفات- بريديجيت برای طراحی داربستهای استخوانی استفاده شد. تری کلسیم فسفات یکی از مهم ترین مواد زیستی مبتنی بر فسفات ها است که به عنوان ماده سرامیکی شناخته شده است که ساختار معدنی استخوان را بهطور قابل توجهی شبیهسازی میکند. بتا ترىكلسيم فسفات [(β-TCP)، (β-TCP]، بيوسراميك كلسيم فسفاتی، بهدلیل ویژگی های منحصر به فرد آن از جمله زيستسازگاري، هدايت استخواني، تركيب شيميايي مشابه با استخوان طبيعي و جذب در شرايط درون تني متناسب بــا رشــد استخوان جديد، يكي از بهترين كانديداها براي توسعه داربستهای استخوانی مهندسی بافت است [۹]. بیوسرامیک بتا ترىكلسيم فسفات سريعتر از هيدروكسي آپاتيت در محل نقص جذب می شود و روند بهبودی را ارتقا می بخشد، اما استحکام آن برای کاربردهای تحمل بار قابل قبول نیست. یک تکنیک شناخته شده برای بهبود مشخصات مکانیکی داربست های ترىكلسيم فسفات، ساخت داربست، اي كاميوزيتي با زمينه ترىكلسيم فسفات است [١٠]. بريـديجيت يـك بيوسـراميك کلسیم سیلیکاتی منیزیمدار (Ca7MgSi4O16) است، کے بےدلیل زيستفعالي و خواص مكانيكي خوب و همچنين تكثير سلولي عالى بەدلىل محصولات يونى حاوى سىلىسىم و كلسىم حاصل از انحلال بسیار مورد توجه قرار گرفته است [۱۱].

در حال حاضر پژوهشهای قابل توجهی در زمینه فناوری

مهندسی بافت به یکی از جـذابترین و قابـل جـایگزینترین روش ها برای بازسازی موفقیت آمیز استخوان آسیب دیده تبدیل شده است. اجزای تشکیل دهنده مهندسی بافت را می توان به سه گروه تقسیم کرد: الف) داربست؛ ب) عوامل رشد و ج) سلولهای بافت مورد نظر [۳]. برای مهندسی بافت استخوان، داربستهای سەبعدی زیستفعال، زیستسازگار با ویژگی های مكانيكي مناسب، اندازه منافذ كنترل شده (٢٠٠-١٠٠ میکرومتر)، تخلخل بالا (۸۰ درصد) و به هم پیوسته از نیازهای اساسی است [۴]. داربست، ا به عنوان الگوهایی برای تعامل سلولی، جایگاه خود را در مهندسی بافت پیدا کردهاند و پشـتیبانی فیزیکـی از بافـت توسـعه یافتـه را فـراهم مـیکننـد. همچنین، داربست،ها می توانند به عنوان عوامل حمل ونقل عمل کنند تا از فاکتورهای رشد ضروری برای کنترل و تقویت رشد بافت استفاده کنند [۴]. داربست با ساختار متخلخل سه بعدی 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 مهم ترین 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، انتخـاب مناسـب مـواد زیسـتی مـورد استفاده در داربست گام مهمی در طراحی و ساخت داربست، ایی با خواص مطلوب (مانند زیستفعالی و زیست تخریب پذیری) است. اگرچـه انـواع مختلفـی از مـواد از جمله فلزات، پليمرها و سراميکها از نظر پتانسيل جـايگزيني استخوان ارزيابي شده اند، اما عملكرد أنها هنوز با عملكرد طبيعي استخوان فاصله دارد [۶]. بافت استخوان داراي ساختار كامپوزيتي است كه شامل قسمت هاي آلي (به طور معمول كلاژن نوع I) و اجزای غیر آلی (بلورهای آپاتیت) است [۷]. بدین ترتيب شبيهسازي محيط پيچيده بافت استخوان و ايجاد مشخصات مورد نیاز بافت مورد نظر برای تنها یک ماده زیستی بسیار دشوار است. همه مواد بیولوژیکی، هر کدامشان دارای ویژگی های قابل توجه و محدودیتهای منحصر به فردی هستند.

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 می تواند طراحی و ساخت داربست های زیستسازگار را در مقیاس نانو بهمنظور هدایت رفتار سلول ها و توليد بافتهاي قابل كاشت امكان ذير سازد [١٢]. تاكنون روش های 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، ریخته گری دوغابی، ریختـه گـری ژل، روش حــذف اسـفنج پليمــري و تكنيـك فضاسـاز از جملــه روشهای متداول در زمینه ساخت داربست های متخلخل به حساب مي آيند. با توجه به قابليت عالى كنترل بر اندازه، شكل و بههم پیوستگی منافذ و همچنین استحکام مکانیکی، تکنیک فضاساز بهعنوان 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 مشخصه یابی داربست نانو کامپوزیتی بتا تریکلسیم فسفات- بریدیجیت با مقادیر بالای بریدیجیت و بهروش 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 بریدیجیت، داربست متخلخل بتاتری کلسیم فسفات و بریدیجیت، داربست متفاوت بیریدیجیت 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 بهروش واکنش
 حالت جامد سنتز شد [۱۴]. به طور خلاصه، مخلوط پودری با
 نسبت مولی دو به یک از فسفات هیدروژن کلسیم (CaHPO4)

و کربنات کلسیم (CaCO₃) در دمای ۱۰۵۰ درجـه سانتی گـراد کلسینه شد. سپس پودر بهدسـت آمـده بـهمـدت ۴۸ سـاعت در آسیای گلولهای سیارهای (Retsch PM400) آسیا شد.

پودر بریدیجیت بهروش سل ژل تهیه شد [۱۵]. هگزا هیدرات نیترات منیزیم (Mg(NO₃)₂.6H₂O)، تترا هیدرات نیترات کلسیم (Ca(NO₃)₂. 4H₂O) و تترا اتیل ارتوسیلیکات (Ca(NO₃)₂. 4H₂O)) بهعنوان مواد اولیه استفاده شد. پودرهای به دست آمده در دمای ۱۱۵۰ درجه سانتی گراد کلسینه شدند. Retsch) نجام شد.

سپس، داربست بتا تری کلسیم فسفات - بریدیجیت با درصدهای مختلف بریدیجیت با تکنیک فضاساز ساخته شد. بدین ترتیب که ابتدا پودر بتا تری کلسیم فسفات و بریدیجیت با نسبتهای ۲۵–۵۵ (β-TCP/25 bre)، ۵۵–۵۶ (۲CP/35-و TCP/35)، ۵۵–۵۵ (۶۵–۵۵ (۶۵–۵۵)، ۵۵–۵۹ (۲۵– افترا) و ۴۵–۵۵ (۲۵–۵۵ (۲۰–۵۰)، مخلوط شدند؛ سپس مخلوط پودر سرامیک با کلرید سدیم (بهعنوان فضاساز) با اندازه ذرات ۰۴۲۰ - ۲۰۰ میکرومتر و با نسبت وزنی ۵۱:۵۸ مخلوط شد. درنهایت، پودر در فشار ۱۰۰ مگاپاسکال در یک قالب استوانهای شکل با قطر ۱۰ میلی متر و ضخامت ۱۵ میلی متر فشرده شد و سپس در دمای ۱۲۰۰ درجه سانتی گراد به مدت سه ساعت و با نرخ گرمایش دو درجه سانتی گراد به مدت مد عملیات تفجوشی قرار گرفت. در ادامه، ذرات کلرید سدیم از طریق غوطهوری نمونه ها در آب مقطر به مدت ۲۴ ساعت حذف شد.

۲-۲- مشخصهیابی داربستها

ریزساختار پودر سنتز شده بتا تریکلسیم فسفات و همچنین پودر کامپوزیتی بتاتری کلسیم فسفات- بریدیجیت با استفاده از میکروسکوپ الکترونی عبوری^۱ (, TEM, Hitachi HT7700, مطالعه شد. ریختشناسی و ساختار داربستهای کامپوزیتی با میکروسکوپ الکترونی روبشی^۲ SEM, JEOL (وبسی 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 1.54=αCuKα 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 Joint (JCPDS; Joint) مشایسه پرتوی ایکس از (no e تعلیل الگوهای پراش پرتوی ایکس از 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]:

$$\beta \cos \theta = \frac{0.89\lambda}{4} + 2\varepsilon \sin \theta \tag{1}$$

3 در رابطه (۱) میزان کرنش پسماند را نشان می دهـد. d انـدازه بلورکها برحسب نانومتر، λ طول موج مورد استفاده، β عـرض قله در نصف ارتفاع برحسب رادیـان و θ زاویـه قلـه برحسب درجه است. در این روش نمودار β cosθ برحسب θ sin بـرای تمامی پیکها یا هر تعدادی از پیکهای انتخاب شده رسم شده و بهترین خط گذرا از آن به دست می آید. درنهایـت شیب ایـن خط نشان دهنده مقدار عددی ع2 و عرض از مبدأ آن h/λ 9.00 است. چنین خطی به نمودار ویلیامسون – هال موسوم است. در این مطالعه، محاسبه اندازه بلورک نانوپو درها بـا اسـتفاده از ایـن روش انجام گرفت [۹۲].

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

اخلخل ظاهری یا تخلخل باز =
$$\left[\frac{(W_w - W_d)}{(W_w - W_s)}\right] \times 100$$
 (۲)

Wd وزن داربست در حالت خشک، Ws وزن داربست در

حالت غوطه ور در آب و Ww وزن داربست اشباع از آب پس از خارج کردن آن از آب است. میزان تخلخل واقعی یا تخلخل کل که مجموع تخلخل های باز و بسته است و ارتباط بهتری با خواص داربستهای سرامیکی دارد از رابطه (۳) بهدست میآید: (۳) $001 \times \frac{W_d}{\rho(W_d - W_s)} - 1 = تخلخل واقعی یا تخلخل کل$ م چگالی واقعی یا وزن مخصوص سرامیک است. با وجوداینکه روش ارشمیدس روش دقیقی نیست، این روش به عنوانیک روش معمول برای اندازه گیری چگالی و میزان تخلخلنمونههای متخلخل شناخته شده است [۱۷].

۲-۳- خصوصیات مکانیکی

برای بررسی خواص مکانیکی داربست های تولیدی از آزمون فشار استفاده شد. برای این منظور داربست های استوانه ای شکل به قطر ۱۰ میلی متر و ارتفاع ۱۵ میلی متر به روش پرس پودر با فضاساز تولید شد و آزمون فشار با استفاده از دستگاه (Hounsfield H50KS universal testing) با سرعت اعمال فشار پنج میلی متر بر دقیقه روی نمونه ها اعمال شد. بیشترین میزان تنش به عنوان تنش نهایی و تنش نقطه انتقال ناحیه الاستیک به پلاستیک به عنوان نقطه تسلیم درنظر گرفته می شود. نتایج بر اساس میانگین به دست آمده از سه آزمون گزارش می شود.

۲-۴- بررسی زیستفعالی

یک ماده زیست فعال باید توانایی اتصال به بافتهای بدن را داشته باشد. درباره یک جایگزین استخوانی توانایی تشکیل لایه کلسیم فسفات در سطح ساختار می تواند معیار مناسبی از زیست فعالی زیست مواد باشد. به منظور بررسی زیست فعالی داربست تولید شده از محلول شبیه سازی شده بدن با غلظت استفاده شد. برای تهیه محلول شبیه سازی شده بدن با غلظت یونی مشابه غلظت پلاسمای خون انسان از روش بوهنر استفاده شد [۱۸]. ابتدا ph محلول توسط دستگاه ph متر مدل از اندازه گیری از محلول بافر با pH و ۲۱ استفاده شد.



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– نتايج و بحث

۳-۱- مشخصه یابی پودرها و داربست ها

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 بهدست آمده از آنالیز پودرهای بتا تری کلسیم فسفات و بریدیجت با نتایج ارائه شده توسط کمیته استانداردسازی پودر مطابقت دارد. طبق رابطه ویلیامسون – هال [۱۶]، اندازه کریستالیت بتا تری کلسیم فسفات و بردیجیت به ترتیب در محدوده ۹۲ و ۲۷ نانومتر است [۱۹].

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

داربست تـفجوشـی شـده B-TCP/20 Bre تهیـه شـده در داخـل فالکون،های ۱۵ سیسی از جنس پلیاتیلن قرار داده شدند. سیس ۱۵ میلیلیتر محلول شبیهسازی شده بدن پس از رسیدن به دمای حدود ۳۷ درجه سانتی گراد به داخل فالکونها اضافه شد و درب فالکونها با دريـوش،هـاي پلاسـتيكي بسـته شـد. بـمنظـور تشـكيل رسـوب یکنواخت آپاتیت بر سطح داربستها، نمونهها بهصورت عمـودی در مایع شبیهسازی شده بدن غوطهور شدند. نمونهها پس از ۲۸ روز غوطهوری با استفاده از یک پنس از داخل محلول شـبیهسـازی شـده بدن خارج شده و پس از شستشو با آب مقطر بـهمـدت یـک روز در دمای ۱۰۰ درجه سانتی گراد خشک شدند. قرارگیری داربست متخلخل در درون محلول شبیهسازی شده بدن زمینهساز انجام واکنش های شیمیایی بین محلول شبیهسازی شده و نمونهٔ متخلخل خواهد شد. برای شناسایی بهتر چگونگی انجام واکنش های صورت پذیرفته بین نمونه و محلول شبیهسازی شده بدن و بررسی نحوهٔ پیشرفت این واکنش ها، داربست کامپوزیتی که در محلول شبیهسازی 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 غوطه وری در



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



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

تمامی کامپوزیتها شامل فاز اصلی β-TCP و ترکیب بریـدیجیت هستند. شدت پیک پراش فاز بریدیجیت با افزایش مقدار نانوپودر بریدیجیت 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 کروی دارد که هر آگلومره شامل چندین کریستالیت با اندازه ذره در محدوده ۱۰۰–۷۰ نانومتر است. مطابق شکل مشاهده میکنیم که بهدلیل واکنش پذیری بالای

نانوپودرهای سنتز شده، تا حدی نانوپودرها آگلومره شده و بههم چسبیدهاند. طبق مطالعهای، مشاهده شد که بیوسرامیکهای نانوساختار ویژگیهای مکانیکی بالاتری نسبت به انواع میکرودانه دارند [۲۰]. همچنین طبق مطالعات انجام شده، نانوساختارها بهدلیل نسبت سطح به حجم بسیار بالا دارای شده، نانوساختارها بهدلیل نسبت سطح به حجم بسیار بالا دارای واکنش پذیری بالایی هستند که تأثیر بسزایی در پاسخهای بیولوژیکی دارد، بهطوری که مواد با ساختار نانو در مقایسه با مواد با ساختار ماکرو خواص آنتی باکتریال بالاتر، زیست فعالی بهتر و قابلیت چسبندگی سلولی بالاتری دارند [۲۱].



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

تصاوير ميكروسكوبي الكتروني روبشي اطلاعاتي درباره توزيع اندازه تخلخل، مورفولوژی، اندازه و ارتباط بین تخلخلها ارائـه مـیکنـد. از اینرو بهمنظور شناسایی ساختار تخلخـلهـا، سطح داربسـتهـای ساخته شده با استفاده از میکروسکوپ الکترونی روبشی بررسی شـد. تصاوير ميكروسكوپ الكتروني رويشي پودر بتا ترىكلسيم فسفات، بریدیجیت در شکل (۴) نشان داده شده است. همان طور که در شکل دیده می شود، پودرهای β-TCP و بریدیجیت دارای مورفولوژی كروى بـا ذرات أگلـومره هسـتند. تصـاوير ميكروسـكوپ الكترونـي روبشی و هیستوگرام اندازه ماکرو حفره های داربست های β-TCP حاوي مقادير مختلف بريديجيت نيز بـ ترتيب در شـكل هـاي (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 تـ۰۶ میکرومتر تعیین شد. هیستوگرام اندازه ماکروحفرههای داربستهای كامپوزيتي شامل ٢٥، ٣٥ و ٢٥ درصد وزني پودر بريـديجيت (شـكل ۶)، نشاندهنده داربستهای متخلخل شامل میانگین اندازه منافذ بــهترتيـب ۲۹۶/۵±۲۶/۵، ۴۴۸/۱±۲۶/۵ و ۳۹۶/۵±۳۷/۵ ميکرومتـر است. ميانگين تخلخل نمونهها نيز ۲۲±۴۲۱/۱۳ ميكرومتر تعيين شـد. طبق نتایج، میانگین تخلخل داربست ها با روش ارشمیدس در محدوده ۷۹-۷۵ درصد محاسبه شد. درصد تخلخل داربست. ای β-TCP/35Bre ،TCP/25Bre و β-TCP/25Bre با این روش (روش

ارشمیدس) بهترتیب 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 میکرو حفرات در دیواره داربستها و بهبود تراکم آنها دارد.

درصد تخلخل، اولين پارامتر مهم در تعيين 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 سلول ها چسبیده می شود. همان طور که گفته شد میانگین اندازه منافذ تخمین زده شده از تصاویر میکروسکوپی الکترونی روبشی، در محدوده ۵۰۰-۵۰۰ میکرومتر متغیر است که برای چسبندگی، تکثیر و تمایز سلولی و ایجاد مسیرهایی برای مایعات بيولوژيكي مناسب است. طبق مطالعـات پيشـين يـك داربسـت ایدهآل برای کاربرد در مهندسی بافت استخوان باید دارای ساختاري متخلخل با تخلخلهاي بههم پيوسته براي تبادل اكسيژن و مواد غذایی برای زنده ماندن، رشـد و مهـاجرت سـلولی باشـد.



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) 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 شکل گیری استخوان جدید، رشد استخوان و رگزایی در داربست مهندسی بافت استخوان ضروری است.

داربستهایی که فاقد تخلخل باشند، سلولها نمی توانند به عمق آن نفوذ و رشد پیدا کنند. درنتیجه 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 ماکروحفرات داربستهای β-TCP/35 Bre β-TCP/25 Bre و β-TCP/45 Bre و β-TCP/45

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 [11].

افزایش فاز بریدیجیت منجر به اندکی کاهش سایز منافذ می شود. همان طور که مشاهده می شود، با افزایش مقدار بریدیجیت، اندازه منافذ کاهش می یابد که احتمالاً به افزایش قابلیت تفجوشی داربست نسبت داده می شود. دمای تفجوشی نمونه ها نزدیک به نقطه ذوب بریدیجیت انتخاب شد. به همین دلیل، نانوپودر بریدیجیت ممکن است به عنوان یک کمک تفجوشی برای افزایش خواص مکانیکی داربست عمل کند [۲۰]. به طور مشابه، ایلباقی و همکاران [۲۲] داربست

کامپوزیتی با پایه هیدروکسی آپاتیت حاوی ۵، ۱۰ و ۱۵ درصد وزنی نانوپودر بریدیجیت را سنتز کردند. نتایج آنها نشان داد که افزایش نانوپودر بریدیجیت منجر به کهش اندازه منافذ و افزایش چگالی داربستها میشود. صادق زاده و همکاران [۳۳] نیز داربستهای کامپوزیتی فورستریت - دایوپساید را با مقادیر مختلف دایوپساید سنتز کردند. تخلخل نمونههای اندازه گیری شده توسط روش ارشمیدس بین ۶۹ و ۷۹ درصد متفاوت بود. در واقع، با افزایش مقدار دایوپساید، اندازه منافذ کاهش می یابد، فلاکس در فرایند تف جوشیینگ عمل میکند، درجه حرارت تف جوشی را کاهش میدهد تا پیوند قویتری بین دانههای



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

بسته شدن تخلخل ها طي افزايش فشار اتفاق مي افتد [١٣]. مطابق شکل (۷) استحکام فشاری نهایی برای نمونه های β -TCP / 45Bre β -TCP / 35Bre β -TCP / 25Bre به ترتیب حدود ۲/۱، ۲/۱ و ۲/۰ مگاپاسکال تعیین شد که كاملاً در محدوده استحكام فشارى استخوان اسفنجي (۴-۲/۰ مگاپاسکال) بوده و دلالت بر توانایی بالای داربست های 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 بریادیجیت (۵، ۱۰ ۱۵ درصاد وزنای) در محادوده ۱/۷-۱ مگاپاسکال است [۲۲]. همچنین در مطالعه دیگری [۱۹] داربست كامپوزيتي بتا ترىكلسيم فسفات- بريديجيت حاوى مقادیر کم بریدیجیت بهروش فضاساز سنتز شد و استحکام فشاری نهایی در محدوده ۱/۹–۵/۰ مگایاسکال بهدست آمد. در این پژوهش با افزودن مقدار بریدیجیت به داربست بتا ترىكلسيم فسفات تا ٢٥ درصد وزنى استحكام فشارى نسبت به مقادیر کم بریدیجیت [۱۹] بهبود می یابد.

۲-۳- نتایج تعیین خواص مکانیکی در استخوان طبيعي، ارتباط كريسـتالهـاي نـانوذره هيدروكسـي آپاتیت با الیاف کلاژنی سبب پایداری و خواص مکانیکی منحصر به فردی میشود. به همین 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 می شود که در منحنی تنش- کرنش هر سه نمونه، سه ناحيه مختلف قابل مشاهده است كه اين سه ناحيه مجزا طبق مطالعات پیشین صورت گرفته درباره داربست های سرامیکی متخلخل سنتز شده بهروش فضاساز به اين صورت تعريف می شود: ۱) ناحیه اول ناحیه کاملاً خطی است که تنش با کرنش تقريباً رابطه مستقيمي دارد و مدول الاستيک از شيب اين ناحيـه خطي محاسبه مي شود و اين ناحيه تا استحكام فشاري ماكزيمم ادامه می یابد. ۲) ناحیه دوم بیانگر از هم گسسته شدن تخلخل ها تحت فشار است که در این ناحیه تخلخل ها از هم گسیخته و شکسته می شوند. ۳) در ناحیـه سـوم متـراکم شـدن داربسـت و



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

در حقیقت، بریدیجیت به عنوان یک فیلر در کامپوزیت عمل میکند، از اینرو منجر به کاهش دمای تفجوشی و درنتیجه بهبود خواص مکانیکی میشود. از طرفی چون بریـدیجیت یـک بيوسراميك با استحكام بالا است، سبب افزايش استحكام فشاری داربست های بتا تریکلسیم فسفات نیز می شود. علاوه بر این، حضور بریدیجیت در زمینه بتا تریکلسیم فسفات همزمان روند تفجوشي را بهبود بخشيده و رشد دانه را كاهش میدهد [۲۲]. یافته های مشابهی در سایر مطالعات بیان شده مربوط به وجود دایوپساید در زمینه اکسید آلومینیم که دایوپساید منجر به کاهش رشـد دانـه آلومینـا و افـزایش میـزان 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 آگلـومره شـدن بریدیجیت در داربست β-TCP/35Bre در شکل (۸) نشان داده شده است. مكانيزم أكلومره شدن بريديجيت بدين صورت اتفاق میافتد که در ساخت این داربستها درصد بالایی نمک كلريد سديم بهعنوان فضاساز استفاده شد يعنى با نسبت ٨٥ به ۱۵ درصد، نمک کلرید سدیم با یودر کامیوزیتی مخلوط شد، از طرفی سایز دانههای کلرید سدیم نسبت به پودر کامپوزیتی درشتتر بوده، بنابراین این امکان وجود دارد که اختلاط

به درستی اتفاق نیفتاده باشد و دارای توزیع یکنواختی نباشد. بدین صورت که ممکن است در یک قسمت بریدیجیت حضور نداشته نباشد اما در قسمت دیگر تجمع دانههای بریدیجیت را داشته باشیم و آگلومره شدن اتفاق بیفتد. هرچقدر درصد بریدیجت بالاتر میرود امکان انجام نشدن درست آسیاکاری و عدم توزیع یکنواخت پودر بیشتر است. درنتیجه، افزودن بیشتر بریدیجیت باعث کاهش استحکام فشاری میشود که ناشی از آگلومره شدن فاز بریدیجیت 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 سـنتز شده در دمای بالا در مقایسه با تکفازهای بتا تریکلسیم فسفات و بریدیجیت، بهبود قابل توجهی در خواص مکانیکی نشان میدهند که هر کدام بهنوب 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. درنتیجه، داربستهای آماده شده از همان زمینه، اما با استفاده از روش های مختلف، منجر به تخلخ ل های مختلف و درنتیجه رفتار مکانیکی متفاوت می شوند. سیلودا 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].

β-TCP / 25Bre نتیجه ارزیابی میزان زیست فعالی داربست β-TCP / 25Bre میزان زیست فعالی داربست روی سطح میزان زیست می در مجاورت با مایع بیولوژیکی یا محلول شبیه سازی شده بدن مشخص می شود. شکل (۹) تصاویر



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 بزرگنمایی های مختلف

از ۲۸ روز غوطهوری داربست در محلول شبیه سازی شده بدن، آپاتیت استخوانی سطح منافذ را پوشانده است. مطالعات قبلی در مورد بیو سرامیک های حاوی سیلیسیم، زیست فعالی بیشتر آنها را نسبت به کلسیم فسفات ها نشان می دهد [۲۶]. میکروسکوپی الکترونی روبشی مربوط بـ داربسـت β-TCP / 25Bre را پس از غوطه وری بهمدت ۲۸ روز در محلول شبیهسازی شده بدن نشان میدهد. ارزیابی زیستفعالی در تأیید تشکیل لایه آپاتیت روی سطح داربست کامپوزیتی موفقیت آمیز بـود. طبق تصاویر میکروسکوپی الکترونی روبشی (شکل ۹) پـس App Conc

Element



СК	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
РК	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		

Intensity Corrn.

Weight%





Weight% Sigma

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 آهنربا یونهای با بار مثبت موجود در محلول مانند +Ca² را به خود جذب می کند. در حالت دوم، جوانهزنی آپاتیت به ویژگیهای میکروساختاری و ترکیب شیمیایی سطح ماده مربوط می شود که مکانهای مناسب جوانهزنی را در سطح فراهم می کند. گفتنی است که حضور دو گروه عاملی اکسید کلسیم (CaO) و دی اکسید سیلیسیم (SiO2) در سطح مواد برای ایجاد جوانهزنی آپاتیت لازم است. ابتدا آپاتیتها به صورت گرانولهای مجزا رشد کرده و سپس این گرانولها با افزایش زمان رشد کرده و به هم متصل می شوند تا یک لایه متراکم را تشکیل دهند [۲۸]. مطابق مطالعات پیشین که بریدیجیت در محلول شبیه سازی شده بدن قرار می گیرد یونهای +Ca² به داخل محلول رهایش پیدا می کنند که منجر به مکانیزم آپاتیت سازی بریدیجیت بدین صورت است که زمانی مالولها با افزایش و مان رشد کرده و به مورت است که منجر به که بریدیجیت در محلول می شود و شرایط را برای جوانهزنی آپاتیت طیف تفکیک انرژی پرتوی ایکس داربست β-TCP/25Bre پس از ۲۸ روز غوطهوری در محلول شبیه سازی شده بدن در شکل (۱۰) نشان داده شده است. غلظت یون های کلسیم و فسفر افزایش مییابد که تأییدی بر تشکیل لایه آپاتیت روی سطح است. علاوه بر این، یون های منیزیم و سیلیسیم آشکار شده روی داربست مربوط به فاز بریدیجیت است. نسبت Ca/P حدود ۲/۷۱ است که نشان دهنده تشکیل یک لایه متراکم آپاتیت روی سطح است. در مطالعه ای توسط وو و همکاران نشان داده شد که بریدیجیت بعد از غوطهوری داخل محلول شبیه سازی شده بدن به مدت ۱۰ روز قابلیت آپاتیت سازی دارد [۲۷]. طبق مطالعات انجام شده [۲۸]، مکانیزم تشکیل لایه آپاتیت روی شده بدن قرار می گیرند به دو صورت اتفاق می افتد. مکانیزم اول شامل رهایش یون های حاصل از تخریب سطح سرامیک است که منجر به تشکیل شارژ با بار منفی در سطح می شود که این

نانوساختار، تلاش بر تولید داربست های نانوساختار متخلخل سرامیکی متمرکز شد. به این منظور داربست های بتا تری کلسیم فسفات با درصدهای مختلفی از بریدیجیت (۲۵، ۳۵ و ۴۵ درصد وزنی) تقویت شد و بهروش فضاساز بهصورت داربست های متخلخل سنتز شد. در این پژوهش تأثیر درصدهای مختلف بریدیجیت روی خواص مکانیکی و زیست فعالی 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 بریدیجیت تا ۲۵ درصد وزنی مدول فشاری داربست ها تا حد قابل توجهی افزایش یافت. اما افزودن بیشتر بریدیجیت باعث کاهش استحکام فشاری می شود که ناشی از آگلومره شدن فاز بریدیجیت در مرز دانه ها است که به عنوان 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 بریدیجیت به مشاهده شد. نتایج همچنین نشان داد که افزودن میدروکسی آپاتی بیوسرامیکهای متخلخل G-TCP، ممکن است یک روش مؤثر برای تهیه داربستهای زیستفعال برای کاربردهای مهندسی بافت استخوان باشد.

در بین داربستها با درصدهای متف اوت بریدیجیت، داربست β-TCP/25%wt.bredigite به دلیل دارا بودن بالاترین استحکام مکانیکی و زیستفعالی مناسب، به عنوان 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 حمایت های مالی و معنوی دانشگاه صنعتی نوشیروان بابل تشکر و قدردانی می شود.

سطح بریدیجیت منجر به تشکیل گروههای سیلانی روی سطح آن می شود که این لایه دارای بار منفی است. این لایه با بار منفی، یونهای مثبت موجود در محلول مانند Ca²⁺ را به خود جذب میکند؛ سپس این لایه با بار مثبت، یون، ای فسفات با بار منفی را بهخود جذب میکند. درنهایت یک لایه کلسیم فسفاتی (آپاتیت) تمام سطح نمونه را می پوشاند و با افزایش زمان غوطهوری، جوانه آپاتیت تشکیل شده با مصرف یون، ای 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 بـه ایـن کـاهش مـیشـود [۲۷]. مكانيزم جوانهزني آپاتيت در بتا تـرىكلسـيم فسـفات نيـز بـه رهایش یون های +Ca²⁺ و PO₄³⁻ در داخل محلول نسبت داده می شود که افزایش زمان رهایش این یون ها منجر به افزایش درجه اشباع شدن محلول میشود و محیط مناسبی را برای جوانەزنى تركيبات كلسيم فسفاتى ايجاد مىكنىد. لازم بـ ذكـر است هر چه زمان غوطهوری افزایش پیدا کند بهدلیل افزایش نرخ انحلال بتا ترىكلسيم فسفات، جوانەزنى آپاتيت بيشتر صورت می گیرد بهطوری که لایه متراکمی از آپاتیت تمام سطح نمونے را می پوشاند [۲۹]. همچنان که از تصاویر مشخص است آپاتیت روى سطح و ديواره داخلى تخلخل ها، درنتيجه تماس داربست بـا محلول شبیهسازی شده بدن تشکیل شده است. از طرف دیگر تشکیل آپاتیت منجر به تغییر مورفولوژی و سایز تخلخها در داربستهای تولیدی میشود. رشد کریستالهای آپاتیت در داخل تخلخل ها منجر به پر شدن تخلخل های کوچک و کاهش اندازه تخلخل های بزرگ شده و بنابراین می تواند منجر به افزایش استحكام داربستها شود. مورفولوژي آپاتيت تشكيل شده روي سطح داربستها ظاهری تکهای شکل داشته و مشاهدات در بزرگنمایی های بالاتر نشان میدهـد كـه آپاتيـت تشـكيل شـده از ذرات کروی بسیار ریزی تشکیل شده است.

۴- نتیجه گیری
در این پژوهش با توجه به مزایای زیست سرامیکهای

واژەنامە

مراجع

- 1. transmission electron microscopy
- 2. scanning electron microscopy
- 3. X ray diffraction
- 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.
- Tabata, Y., "Recent Progress in Tissue Engineering", Drug Discovery Today, Vol. 6, pp. 483-487, 2001.
- 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.
- 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.
- 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.
- 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.
- 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.
- 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.

- 4. simulated body fluid
- 5. energy dispersive spectroscopy
- 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 Structuresof β-TCP/45S5 Bioglasshybrid Scaffolds Preparedbygelcasting", *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.
- 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.
- 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.
- Bohner, M., and Lemaitre, J., "Can Bioactivity be Tested In Vitro with SBF Solution?", *Biomaterials*, Vol. 30, pp. 2175-2179, 2009.
- 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., Omidi, 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 Silicabased 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 (Ca₇MgSi₄O₁₆) 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 $(\beta$ -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 [\beta-TCP/25Bre], 65-35 [\beta-TCP/35Bre], and 55-45 [B-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 composite, TCP/bredigite 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 µm 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 μ m. 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

 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.

- 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.
- 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.
- Lopes, J. H., Magalha, J. A., Gouveia, R. F., Bertran, C. A., Motisuke, M., Camargo, S., and Triche, E., "Hierarchical Structuresof β-TCP/45S5 Bioglasshybrid Scaffolds Preparedbygelcasting", *Journal of the Mechanical Behavior of Biomedical Materials*, Vol. 62, pp. 10-23, 2016.
- R., 5. Bakhsheshi-Rad, H. Hamzah, E., Abbasizadeh, N., Najafinezhad, A., and "Synthesis Kashefian, М., of Novel Bredigite-Amoxicillin Nanostructured Defect Treatment: Scaffolds for Bone Cytocompatibility and Antibacterial Activity", Journal of Sol-Gel Science and Technology, Vol. 86, pp. 83-93, 2018.
- 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.
- 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.
- Kokubo, T., Kim, H.M., and Kawashita, M., "Novel bioactive materials with different mechanical properties", *Biomaterials*, Vol. 24, pp. 2161-75, 2003.