

ساخت و ارزیابی خواص مکانیکی و زیست فعالی داربست نانو ساختار

هاردیستونیت با استفاده از فضا ساز

سرور صادقزاده*، رحمت الله عمادی و شیدا لباف

دانشکده مهندسی مواد، دانشگاه صنعتی اصفهان

(دریافت مقاله: ۱۳۹۵/۰۵/۲۹ - دریافت نسخه نهایی: ۱۳۹۶/۰۵/۰۵)

چکیده- در سه دهه اخیر سرامیک‌های پایه کلسیم-سیلیکاتی به عنوان انتخاب مناسبی به دلیل زیست فعالی، زیست سازگاری و توانایی تشکیل استخوان مناسب جهت کاربرد در مهندسی بافت مورد توجه واقع شده‌اند. در حال حاضر هاردیستونیت به عنوان یکی از مواد سرامیکی زیست سازگار و زیست فعال برای کاربردهای پزشکی مورد استفاده قرار می‌گیرد. در این تحقیق، برای اولین بار پودر و داربست سه بعدی هاردیستونیت با تخلخل‌های باز به ترتیب با روش سنتز آلیاژسازی مکانیکی و استفاده از فضا ساز ساخته شدند. نانو هاردیستونیت خالص با استفاده از ۱۰ ساعت آسیاکاری و سه ساعت عملیات حرارتی ثانویه در دمای ۸۰۰ درجه سانتی‌گراد حاصل شد. اندازه بلورک‌های پودر و داربست هاردیستونیت به ترتیب 28 ± 2 و 79 ± 1 نانومتر اندازه‌گیری شد. نتایج نشان می‌دهد که داربست‌های نانو ساختار هاردیستونیت به ترتیب با استحکام و مدول فشاری 0.35 ± 0.02 و 10.49 ± 0.21 مگاپاسکال، 81 ± 1 درصد تخلخل و اندازه تخلخل در بازه ۲۰۰-۵۰۰ میکرومتر پس از سه ساعت عملیات حرارتی در دمای ۱۲۵۰ درجه سانتی‌گراد، با موفقیت سنتز شد. در حین عملیات حرارتی نمک سدیم کلرید (۸۰ درصد وزنی، ۳۰۰-۴۲۰ میکرومتر)، به تدریج بخار شده و در داربست ایجاد تخلخل می‌کند. به منظور ارزیابی توانایی تشکیل آپاتیت روی داربست‌ها، از آزمون مایع شبیه‌ساز بدن (SBF) استفاده شد. با توجه به نتایج، تشکیل لایه آپاتیت روی سطح داربست می‌تواند به عنوان معیاری از زیست فعالی در نظر گرفته شود.

واژه‌های کلیدی: هاردیستونیت، داربست، مهندسی بافت استخوان، فضا ساز سدیم کلرید.

Fabrication and Evaluation of the Mechanical and Bioactivity Properties of a Nano Structure-hardystonite Scaffold by the Space Holder Method

S. Sadeghzade, R. Emadi and Sh. Labbaf

Department of Materials Engineering, Isfahan University of Technology, Isfahan, Iran.

Abstract: In the recent three decades, Ca-Si-based ceramics have received great attention as an appropriate candidate for tissue engineering applications due to their remarkable bioactivity, biocompatibility, and good bone formation ability. Hardystonite is currently recognized as a bioactive and biocompatible bio-ceramic material for a range of medical applications. In the present study, for the first time, hardystonite powder and 3D hardystonite scaffold with interconnected porosity were produced using mechanical alloying synthesis and the space holder method, respectively. It was found that pure nano-crystalline hardystonite powder formation occurred following 10 h of milling and subsequent sintering at 800 °C for 3 h. The measured crystallite size of particles and the hardystonite scaffold was found to be 28 ± 2 and 79 ± 1 nm, respectively. The results also showed that nanostructured hardystonite scaffolds with the compressive strength and modulus of 0.35 ± 0.02 and 10.49 ± 0.21

*: مسئول مکاتبات، پست الکترونیکی: s.sadeghzade@ma.iut.ac.ir

MPa, the porosity of $81 \pm 1\%$, and pores size range of $200-500 \mu\text{m}$ were successfully synthesized after sintering at 1250°C for 3 h. During the sintering process, NaCl (80wt%, $300-420 \mu\text{m}$), as the spacer agent, gradually evaporated from the system, producing porosity in the scaffold. Simulated body fluid (SBF) was used to evaluate the apatite formation ability of the scaffolds. The results showed that the formation of an apatite layer on the scaffold surface could be considered as a bioactivity criterion.

Keywords: Hardystonite, Scaffold, Bone tissue engineering, NaCl spacer.

۱- مقدمه

همچنان که متوسط عمر بشر افزایش پیدا می‌کند و بیماری‌های مربوط به فاسد شدن استخوان معمول‌تر می‌شود، نیاز به جایگزین‌های مصنوعی به جای پیوند از انسان دیگر و یا پیوند از خود فرد اهمیت بیشتری پیدا می‌کند. در واقع استفاده از روشی جهت بازسازی بافت به جای تعویض قسمت آسیب دیده یک راه حل مفید به نظر می‌رسد [۱].

مهندسی بافت روشی طبیعی است که اصول اولیه علوم زیستی و مهندسی را به کار می‌برد، که منجر به تولید جایگزین مناسب با توانایی ذخیره‌سازی، محافظت و یا پیشبرد یک منطقه بافتی شود. به نحوی که این منطقه بافتی از بین رفته و باعث تولید مجدد و یا درمان منطقه آسیب دیده، به طور خود به خودی، شود. یکی از چالش‌های اساسی در مهندسی بافت، ساخت داربست‌های سه بعدی با تخلخل بالا و استحکام مکانیکی مناسب است [۲].

بیوسرامیک‌های متخلخل کاربردهای گوناگونی در زمینه مهندسی بافت دارند. از جمله این کاربردها می‌توان به استفاده از آنها در بافت سخت و نرم، به عنوان مواد پرکننده نواقص استخوانی، جهت کاربرد در زمینه رهایش دارو و همچنین ترمیم بافت‌های نرم مانند کاشتنی چشمی، پوست مصنوعی، ترمیم دیواره‌های رگ‌های خونی و کانال‌های عصبی اشاره کرد. نسبت سطح به حجم بالای این مواد منجر به هم‌پندی مناسب با استخوان و دیگر بافت‌های بدن می‌شود. تخلخل بالا و باز این مواد منجر به رشد بافت و ورود سلول‌ها و مواد مغذی به این مواد شده و با توجه به زیست‌اضمحلالی عالی این مواد، در طی سرعتی مناسب با رشد بافت، داربست به تدریج تخریب شده و بعد از مدتی بافت جای آن را پر کرده و به این ترتیب منجر به ترمیم قسمت آسیب دیده از بدن می‌شود. بنابراین ایجاد

داربست‌هایی با تخلخل بالا و باز به یکدیگر در عین داشتن خواص مکانیکی و زیستی مناسب، جایگزین مناسبی برای استفاده در مهندسی بافت خواهد بود [۳].

روش‌های مختلفی جهت ساخت داربست‌های نانوساختار در مهندسی بافت وجود دارد. از جمله این روش‌ها می‌توان به استفاده از مواد فضا‌ساز اشاره کرد. در این روش موادی از قبیل نشاسته، آرد، نمک، پلیمرهای مصنوعی، کربن و... به عنوان مواد فضا‌ساز مورد استفاده قرار می‌گیرند. از مخلوط این مواد، انجام پرس و قرار دادن این مواد در کوره می‌توان به داربست‌هایی تا حدود ۸۰ درصد تخلخل به همراه خواص مکانیکی مناسب دست یافت. در این روش تخلخل‌هایی با اندازه مناسب ایجاد می‌شود [۴].

در دهه‌های اخیر استفاده از کلسیم سیلیکات‌های سرامیکی در زمینه بیومواد و ساخت داربست‌های سرامیکی، بسیار مورد توجه قرار گرفته است. این مواد دارای خواص بیولوژیکی عالی مانند زیست‌فعالیت، توانایی جذب عوامل بیولوژیکی، زیست‌سازگاری عالی و واکنش‌های سلولی مناسب هستند. همچنین این سرامیک‌ها دارای خواص مکانیکی بالاتری نسبت به انواع فسفات‌های کلسیم هستند [۵].

سرامیک هاردیستونیت^۱ با فرمول شیمیایی $(\text{Ca}_7\text{ZnSi}_2\text{O}_7)$ عضوی از خانواده کلسیم سیلیکاتی- روی است که در زمینه پزشکی به دلیل زیست‌سازگاری مناسب و خواص مکانیکی برتر در مقایسه با هیدروکسی آپاتیت، بسیار مورد توجه قرار گرفته است. این سرامیک دارای ساختار تراگونال است. دمای ذوب و چگالی این سرامیک به ترتیب 1425°C درجه سانتی‌گراد و $3/4$ گرم بر سانتی‌متر مکعب گزارش شده است. طبق تحقیقات صورت گرفته حضور (۵۰ درصد غلظت) یون روی در ماده، می‌تواند بهترین پایداری شیمیایی را در سرامیک‌های کلسیم

سیلیکاتی ایجاد کند [۶ و ۷]. حضور عناصری مانند سیلیسیم، کلسیم و روی در این سرامیک منجر به تکثیر سلول‌های استئوبلاست، افزایش متابولیسم، افزایش استخوان‌سازی و همچنین آنتی‌باکتریایی شده است [۶ و ۸]. وو و همکاران [۹] سرامیک هاردیستونیت را به روش سل-ژل تهیه کرده و با انجام آزمایشات برون‌تنی و همچنین انجام کشت سلول، زیست‌سازگاری و عدم سمیت این سرامیک را گزارش کردند. زیرکات و همکاران [۱۰] در طی انجام آزمایشات درون‌تنی و قرار دادن سرامیک هاردیستونیت به عنوان ایمپلنت در استخوان موش، یک افزایش رشد استخوان را در مقایسه با بتا تری کلسیم فسفات مشاهده کردند. وانگ و همکاران [۱۱] نشان دادند که داربست هاردیستونیت تخریب‌پذیری کمتری نسبت به سرامیک‌های کلسیم سیلیکاتی دارد. همچنین قابلیت ایجاد و چسبندگی سلول استئوبلاست روی سرامیک هاردیستونیت بیش از سایر سرامیک‌های کلسیم سیلیکاتی است. قیصری و همکاران [۱۲] نشان دادند که افزودن هاردیستونیت تا ۱۰ درصد وزنی به سرامیک هیدروکسی آپاتیت، منجر به افزایش استحکام فشاری و چگالی ماده حجیم شده خواهد شد. همچنین نشان داده شد که افزایش درصد هاردیستونیت منجر به افزایش توانایی تشکیل لایه آپاتیت روی سطح ماده حجیم می‌شود. تاکنون از روش اسفنج پلیمری جهت ساخت داربست هاردیستونیت استفاده شده که منجر به ایجاد خواص مکانیکی مطلوبی نشده است.

در پژوهش حاضر با توجه به خواص مطلوب داربست‌های بیوسرامیکی نانوساختار نظیر نسبت سطح به حجم بالا، سطح تماس بالا، بهبود چسبندگی، تکثیر و تمایز سلولی، افزایش قابلیت تشکیل آپاتیت و اتصال با بافت بدن موجود زنده سعی بر تولید داربست هاردیستونیت با ساختار نانو شد. علاوه بر این، نانوساختار بودن داربست هاردیستونیت منجر به کاهش دما و زمان تفجوشی در فرایند تولید داربست در مقایسه با ساختارهای میکرونی می‌شود [۱۳]. در این راستا نانوپودر هاردیستونیت برای بار اول به روش آلیاژسازی مکانیکی ساخته و داربست‌های متخلخل به روش استفاده از ذرات فضا‌ساز تهیه

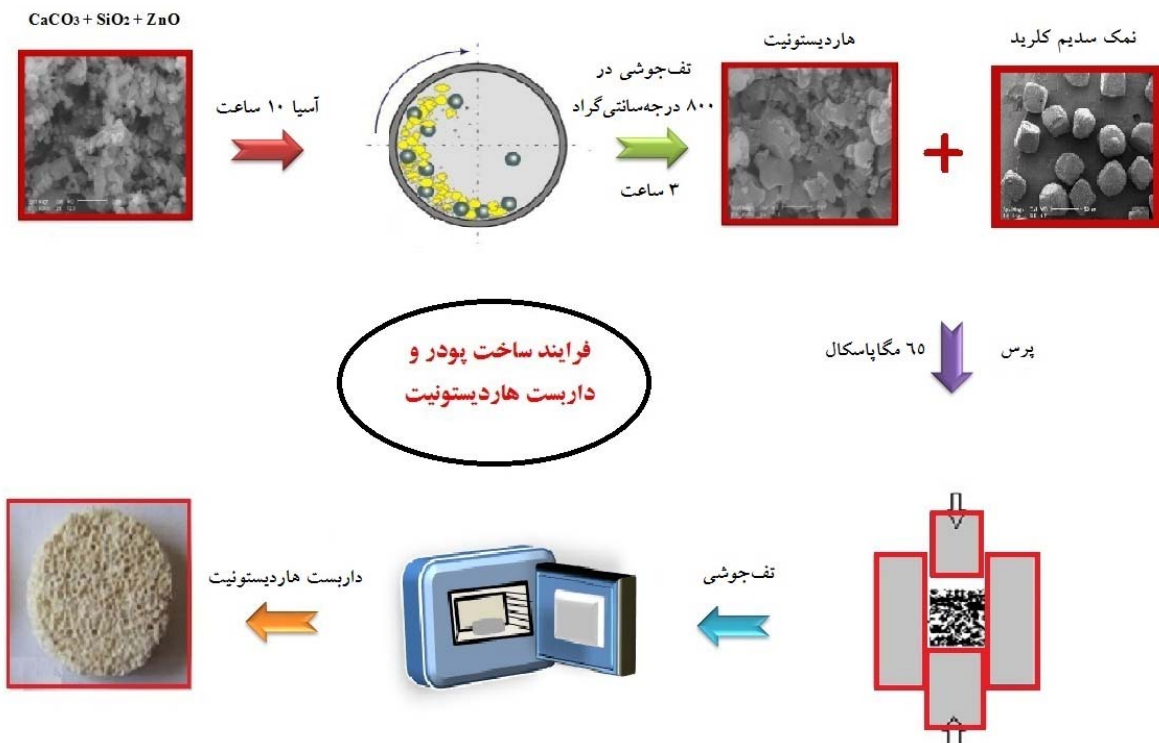
شد. خواصی از قبیل بررسی ریزساختار، اندازه، شکل و میزان تخلخل، خواص مکانیکی و زیست‌فعالی این داربست به‌منظور بررسی پتانسیل این داربست جهت کاربرد در مهندسی بافت، مورد ارزیابی قرار گرفت.

۲- مواد و روش‌ها

۲-۱- ساخت پودر و داربست نانوهاردیستونیت

به‌منظور تهیه نانوپودر هاردیستونیت از روش آلیاژسازی مکانیکی استفاده شد. شکل (۱) طرحواره‌ای از روند ساخت این سرامیک را به روش آلیاژسازی مکانیکی نشان می‌دهد. در این روش مواد اولیه کلسیم کربنات، اکسید روی و اکسید سیلیسیم با نسبت استوکیومتری ۲:۱:۲ با یکدیگر مخلوط و به مدت ۱۰ ساعت در آسیای سیاره‌ای با انرژی بالا، آسیا شد. جدول (۱) اطلاعات کامل مواد اولیه را نشان می‌دهد. محفظه آسیا و گلوله‌ها از جنس زیرکونیا انتخاب شد. نسبت گلوله به پودر ۱:۱۰ انتخاب شد. سپس پودر حاصله در دمای ۸۰۰ درجه سانتی‌گراد به مدت سه ساعت تحت عملیات حرارتی قرار گرفت.

در راستای ساخت داربست نانوساختار هاردیستونیت با استفاده از ذرات فضا‌ساز، نسبت مشخصی از پودر ساخته شده با ۸۰ درصد وزنی نمک سدیم کلرید (NaCl, Samchoun) با خلوص ۹۸ درصد، مخلوط شد. دلیل این انتخاب منحصراً مربوط به استحکام بالای این فضا‌ساز در مقابل اعمال فشار پرس، عدم سمی بودن این ماده و عدم واکنش شیمیایی این ماده با زمینه بوده است [۱۴ و ۱۵]. نمایی از روند ساخت داربست هاردیستونیت به روش استفاده از ذرات فضا‌ساز در شکل (۱) آورده شده است. همان‌طور که در شکل (۱) نیز مشاهده می‌شود اندازه دانه‌های نمک در محدوده ۳۰۰-۴۲۰ میکرومتر انتخاب شد. مخلوط پودر و فضا‌ساز به وسیله دستگاه آمالگاماتور همگن‌سازی شد. به‌منظور فشرده‌سازی مخلوط همگن شده به همراه روغن مایع خوراکی (به میزان یک درصد وزنی پودر همگن‌سازی شده) از یک قالب استوانه‌ای شکل به قطر ۱۰ میلی‌متر تحت فشار ۶۵ مگاپاسکال استفاده شد.



شکل ۱- طرحواره ساخت پودر و داربست هاردیستونیت با استفاده از آلیاژسازی مکانیکی و استفاده از مواد فضا ساز

جدول ۱- اطلاعات مواد اولیه جهت ساخت نانو پودر هاردیستونیت

ماده	فرمول شیمیایی	شرکت سازنده
کلسیم کربنات	CaCO ₃	Merck
اکسید روی	ZnO	Merck
اکسید سیلیسیم	SiO ₂	Sigma Aldrich

اندازه گیری شد [۱۶]:

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

که در این رابطه λ طول موج پرتو ایکس (نانومتر)، d اندازه دانه (نانومتر)، A عدد ثابت که اصولاً یک در نظر گرفته می شود، β پهنای پیک در نیمه ارتفاع (برحسب رادیان) و θ زاویه براگ است.

به منظور اندازه گیری میزان تخلخل داربست ها، از روش ارشمیدس [۱۷] استفاده شد. رابطه ارشمیدس جهت محاسبه تخلخل کل در رابطه (۲) آورده شده است:

$$\text{تخلخل کل} = 1 - \frac{w_d}{\rho(w_w - w_d)} \times 100 \quad (2)$$

به منظور خروج کامل نمک، قطعه در دماهای مختلف ۱۰۵۰-۱۲۵۰ درجه سانتی گراد تحت عملیات تفجوشی قرار گرفت.

۲-۲- ارزیابی پودر و داربست نانو ساختار هاردیستونیت

به منظور ارزیابی فازی از آزمون پراش پرتو ایکس^۲ (X' pert Philips) استفاده شد. در این فرایند از لامپ Cu K α با ولتاژ ۴۰ کیلوولت و جریان ۳۰ میلی آمپر با سرعت روبش و زمان ایستایی به ترتیب ۰/۵ و ۱ ثانیه استفاده شد. اندازه بلورک های پودر و داربست نانو ساختار هاردیستونیت با استفاده از روش ویلیامسون- هال رابطه (۱) و الگوی پراش پرتو ایکس

همان‌طور که در این رابطه دیده می‌شود w_d وزن نمونه در حالت خشک، w_w وزن نمونه در حالت تر و ρ دانسیته تئوری هاردیستونیت که برابر با $3/4$ گرم بر سانتی‌متر مکعب است. جهت ارزیابی مورفولوژی نانوپودر تولید شده و ساختار تخلخل (شکل، اندازه، مرتبط بودن) از میکروسکوپ الکترونی روبشی^۳ (SEM, Philips XL30) با اعمال 30° کیلوولت ولتاژ، و میکروسکوپ الکترونی عبوری^۴ (TEM, Philips EM208S) با اعمال 100° کیلوولت ولتاژ استفاده شد. آزمون استحکام فشاری روی نمونه‌هایی به قطر 10° و ارتفاع 20° میلی‌متر با سرعت $0/5^\circ$ میلی‌متر بر دقیقه با استفاده از دستگاه (HOUNSFIELD: H50KS) انجام شد. برای هر تست در شرایط دمایی مختلف، سه نمونه در نظر گرفته شد.

آزمون غوطه‌وری در مایع شبیه‌سازی شده در بدن^۵ (SBF) به منظور بررسی زیست‌فعالی داربست ساخته شده، انجام شد. به منظور بررسی خواص زیست‌فعالی داربست‌های ساخته شده و تشخیص حضور لایه آپاتیت از روش‌های طیف‌سنجی مادون قرمز^۶ (FTIR)، میکروسکوپ الکترونی روبشی (SEM) و آنالیز عنصری با تفکیک انرژی پرتو ایکس^۷ (EDS) استفاده شد. تغییرات pH در مایع شبیه‌سازی شده بدن به وسیله دستگاه سنجش pH هر سه روز یکبار انجام گرفت. برای اندازه‌گیری pH سه نمونه در فاکتورهای جداگانه برای هر زمان غوطه‌وری قرار داده شد.

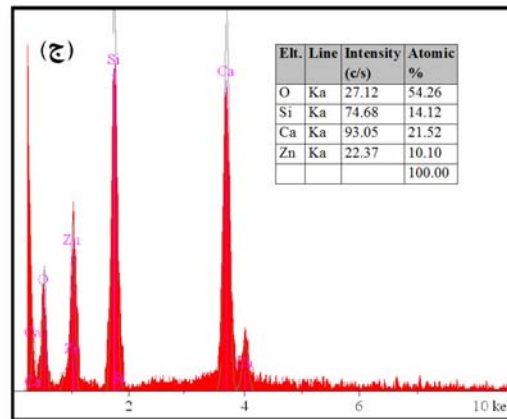
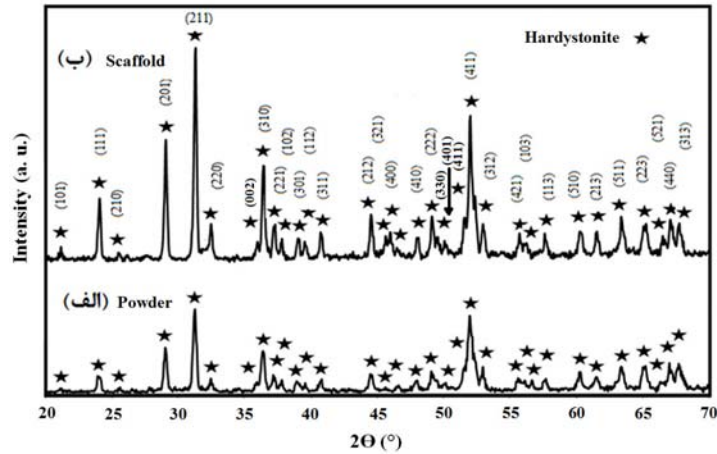
۲- نتایج و بحث

شکل (۲- الف) الگوی پراش پرتو ایکس نانوپودر تک‌فاز هاردیستونیت، پس از 10° ساعت آلیاژسازی مکانیکی و عملیات حرارتی در دمای 800° درجه سانتی‌گراد را نشان می‌دهد. عدم حضور ترکیبات روی به‌عنوان ناخالصی مانند ویلمیت^۸ در این دما را می‌توان ناشی از تأثیر آلیاژسازی مکانیکی بر همگن‌سازی کامل مواد اولیه و فعال کردن سطح آنها دانست. همچنین در این روش به دلیل جوش خوردگی و شکست مداوم و با توجه به اینکه مواد استفاده شده ماهیت سرامیکی دارند منجر به ریز شدن ذرات

و رسیدن به مواد نانوساختار سرامیکی می‌شود [۱۶]. اندازه بلورک‌های پودر هاردیستونیت با استفاده از روش ویلیامسون- هال 3 ± 21 نانومتر محاسبه شد. در شکل (۲- ب) الگوی پراش پرتو ایکس داربست خالص هاردیستونیت تولید شده به روش استفاده از فضا‌ساز نمک نشان داده شده است. همان‌طور که مشاهده می‌شود هیچ‌گونه فاز ناخالصی ناشی از واکنش پودر هاردیستونیت و سدیم کلرید مشاهده نشده است. ضمن اینکه پیکی ناشی از حضور سدیم کلرید در ساختار، ظاهر نشده است که این نشان‌دهنده خروج کامل مواد فضا‌ساز است.

با افزایش دمای عملیات حرارتی به منظور تف‌جوشی کامل داربست و خروج مواد فضا‌ساز و ایجاد داربست متخلخل، افزایش در شدت پیک‌های هاردیستونیت دیده می‌شود. همچنین با استفاده از روش ویلیامسون- هال، اندازه بلورک‌های داربست هاردیستونیت 1 ± 79 نانومتر محاسبه شد. با توجه به نتایج آنالیز عنصری (شکل ۲- ج) حضور عناصر O, Si, Zn, Ca بدون ناخالصی و عدم حضور فضا‌ساز را اثبات می‌کند و در تطابق کامل با نتایج مشاهده شده از آزمون پراش پرتو ایکس است.

یکی از عناصر کلیدی در تعیین داربستی مناسب جهت استفاده در بدن موجود زنده، خواص مکانیکی داربست از جمله مدول و استحکام آن است. در واقع با در نظر گرفتن خواص مکانیکی یک داربست می‌توان موفقیت و یا شکست آن ماده کاشتنی را پیش‌بینی کرد [۱۸ و ۱۹]. بسیاری از بافت‌های بدن انسان تحت تنش‌ها و کرنش‌های مکانیکی هستند، بنابراین بسیار اهمیت دارد که خواص مکانیکی داربست، نزدیک به آن بافتی باشد که قرار است جایگزین آن شود. خواص مکانیکی یک داربست ساخته شده با روش استفاده از فضا‌ساز تحت تأثیر عوامل مختلفی از قبیل دمای تف‌جوشی، فشار پرس، اندازه و شکل ذرات فضا‌ساز و درصد استفاده از فضا‌ساز است [۲۰]. قومی و همکاران داربست دی‌پوساید^۹ را تحت فشار پرس‌های مختلف ($50^\circ-150^\circ$ مگاپاسکال)، مقدار فضا‌ساز مختلف ($60^\circ-80^\circ$ درصد) و فضا‌سازهای مختلف (سدیم کلرید و آمونیوم بی‌کربنات) ساختند. با توجه به نتایج بهترین شرایط مکانیکی و



شکل ۲- الگوی پراش پرتو ایکس: (الف) نانوپودر هاردیستونیت تک فاز بعد از ۱۰ ساعت آسیا و عملیات حرارتی در ۸۰۰ درجه سانتی‌گراد، (ب) داربست هاردیستونیت تک فاز عملیات حرارتی شده در دمای ۱۲۵۰ درجه سانتی‌گراد. (ج) آنالیز عنصری با تفکیک انرژی پرتو ایکس داربست هاردیستونیت خالص پس از عملیات حرارتی در دمای ۱۲۵۰ درجه سانتی‌گراد

توجه به نتایج این تحقیق نیز استفاده از فضا ساز سدیم کلرید به میزان ۸۵ درصد تحت فشار پرس ۶۵ مگاپاسکال بهترین شرایط را برای خواص فیزیکی و مکانیکی داربست به وجود آورد. جدول (۲) خواص مکانیکی و خواص فیزیکی داربست در دماهای مختلف تفجوشی را نشان می‌دهد. با استفاده از روش ارشمیدس، میزان تخلخل کل برای نمونه‌ها در دماهای مختلف در بازه ۶۴-۸۱ درصد اندازه‌گیری شد. همان‌طور که در جدول (۲) نشان داده شده است میزان استحکام فشاری و مدول فشاری برای داربست‌های هاردیستونیت خالص در بازه دمایی ۱۰۵۰-۱۲۵۰ درجه سانتی‌گراد، به ترتیب در بازه ۰/۰۴-۰/۳۵ و

فیزیکی برای نمونه شامل ۸۰ درصد وزنی نمک سدیم کلرید تحت ۱۰۰ مگاپاسکال فشار پرس حاصل شد. استفاده از ذرات فضا ساز کلرید سدیم منجر به ایجاد تخلخل‌های باز با مورفولوژی کروی شد (تخلخل ظاهری ~ ۸۰ درصد). این در حالی است که تخلخل ظاهری آمونیوم بی‌کربنات در حدود ۴۲ درصد با مورفولوژی بی‌شکل بوده است. همچنین مشاهده شد که کاهش میزان فشار پرس منجر به افزایش تخلخل ظاهری و کاهش استحکام فشاری شده است [۲۱]. در تحقیقی دیگر داربست کامپوزیتی فورستریت-دیوپساید توسط صادق‌زاده و همکاران [۲۲] در درصد‌های مختلف دیوپساید ساخته شد. با

جدول ۲- بررسی خواص مکانیکی (استحکام فشار و مدول فشاری) و خواص فیزیکی (تخلخل کل و اندازه تخلخل)

در دماهای مختلف تفجوشی مختلف

فشار پرس نمونه (مگاپاسگال)	تخلخل کل (درصد)	مدول فشاری (مگاپاسگال)	استحکام فشاری (مگاپاسگال)	دماهای مختلف تفجوشی (درجه سانتی گراد)
۶۵	۶۴ ± ۲/۱	۱/۸۴ ± ۰/۱	۰/۰۴ ± ۰/۰۳	۱۰۵۰
۶۵	۶۹ ± ۳	۳/۴ ± ۰/۳	۰/۱۹ ± ۰/۰۲	۱۱۵۰
۶۵	۸۱ ± ۱	۱۰/۴۹ ± ۱	۰/۳۵ ± ۰/۰۲	۱۲۵۰

جدول ۳- مقایسه خواص مکانیکی و فیزیکی استخوان فشرده، اسفنجی و داربست هیدروکسی آپاتیت با داربست هاردیستونیت

مرجع	تخلخل کل (درصد)	استحکام فشاری (مگاپاسگال)	ماده
[۲۵-۲۳]	۱۳-۵	۱۸۰-۱۳۰	استخوان فشرده
[۲۵-۲۳]	۹۰-۳۰	۴-۰/۲	استخوان اسفنجی
[۲۵-۲۳]	۸۶-۶۹	۰/۲۹-۰/۰۳	هیدروکسی آپاتیت (HA)
در این تحقیق	۸۱ ± ۱	۰/۳۵ ± ۰/۰۲	هاردیستونیت

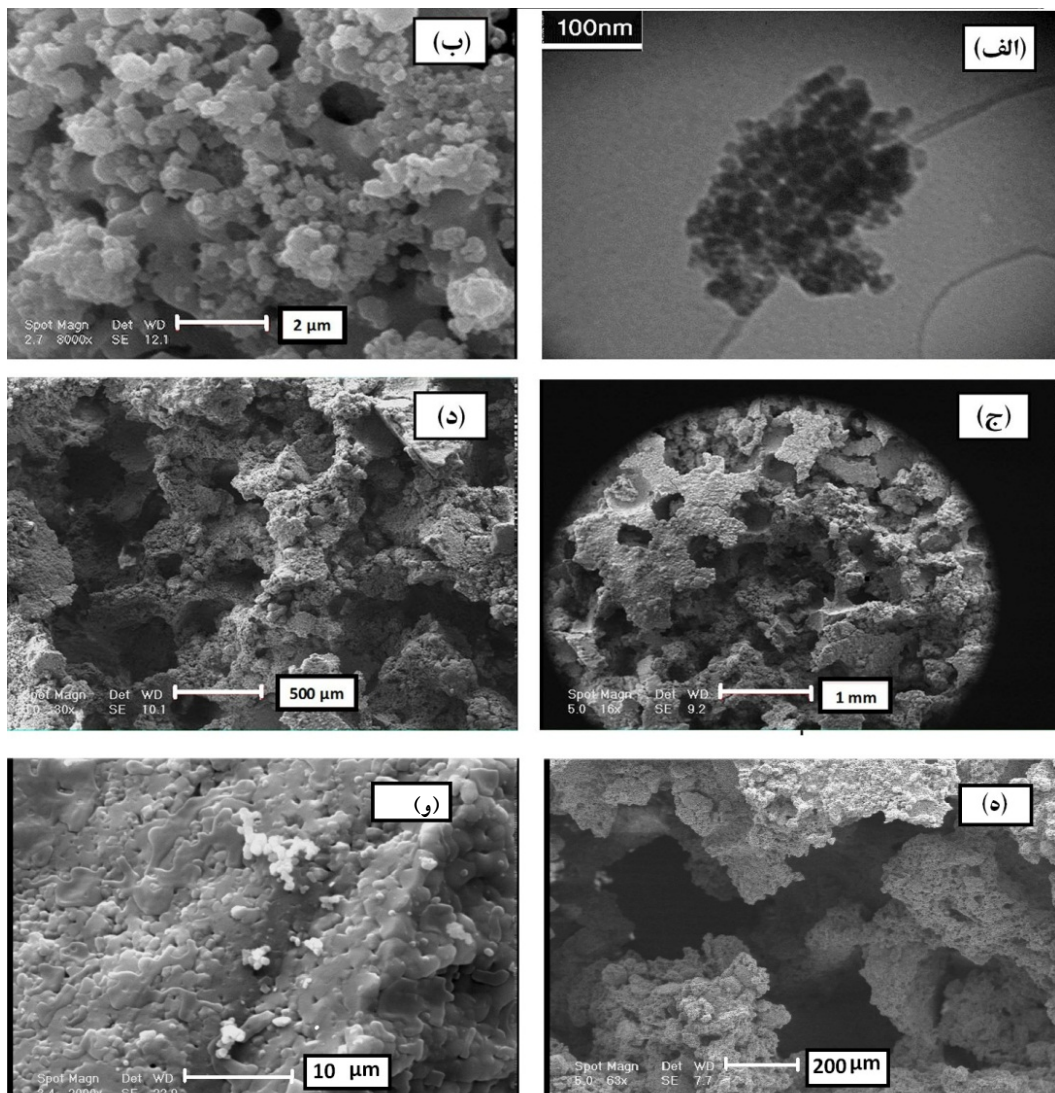
در انتقال مواد مغذی جهت رشد سلول‌ها و بافت جدید اهمیت بالایی دارد. انتقال مواد مغذی و اکسیژن کافی در محیط طبیعی و عروق خونی بسیار اهمیت دارد [۲۰ و ۲۱].

یک داربست ایده‌آل باید دارای تخلخل‌های باز و بی‌دررو باشد. در تحقیقات پیشین میزان تخلخل مناسب برای یک داربست بین ۳۰-۹۰ درصد بیان شده است. همچنین اندازه تخلخل‌ها نیز از اهمیت ویژه‌ای برخوردار است. ابعاد تخلخل‌ها در بازه ۱۰-۵۰۰ میکرومتر جهت کشت سلول، رشد بافت نرم، سخت، عروق خونی و رگ‌سازی در نظر گرفته می‌شود. حضور تخلخل‌هایی با اندازه کوچک (کمتر از ۵۰ میکرومتر) جهت چسبندگی سریع سلول و پروتئین، مهاجرت و رشد سریع سلول، بسیار ضروری است. همچنین، حضور این تخلخل‌ها جهت تشویق شرایط هیپوکسی^۶ و تشویق به غضروف‌سازی قبل از رشد استخوان می‌شود. در صورتی که تخلخل‌ها با سایز بزرگ منجر به ایجاد استخوان می‌شوند. تخلخل‌هایی با اندازه بزرگ‌تر از ۳۰۰ میکرومتر جهت تسریع تشکیل استخوان جدید، رشد استخوان و همچنین رشد مویرگ‌ها باید در ساختار یک داربست وجود داشته باشد. البته

۱/۸۴-۱۰/۴۹ مگاپاسکال ارزیابی شد. با توجه به نتایج دیده می‌شود که دمای تفجوشی تأثیر به‌سزایی در افزایش خواص مکانیکی داربست‌ها داشته است.

نکته‌ای قابل توجه در استفاده از داربست‌ها مربوط به تنش استحفاظی است. این پدیده منجر به ایجاد آثار مخربی بر بافت مجاور می‌شود [۲۲]. بنابراین ایجاد داربستی با خواص مکانیکی نزدیک به استخوان (اسفنجی و یا فشرده) بسیار پراهمیت است. در جدول (۳) خواص مکانیکی استخوان فشرده، استخوان اسفنجی و هیدروکسی آپاتیت با داربست هاردیستونیت ساخته شده در این تحقیق مقایسه شده است. همان‌طور که دیده می‌شود استحکام فشاری داربست هاردیستونیت (۰/۳۵ ± ۰/۰۲ مگاپاسکال) از هیدروکسی آپاتیت (۰/۲۹-۰/۰۳ مگاپاسکال) بیشتر بوده و مقادیر به‌دست آمده در محدوده حد استحکام پایینی برای استخوان اسفنجی است [۲۳-۲۵].

فرایند کلونی شدن سلول‌ها بر داربست تنها به خواص سطحی و مکانیکی آن بستگی ندارد، بلکه ساختار سه بعدی داربست نیز در این راستا از اهمیت بالایی برخوردار است. میزان تخلخل، اندازه، هندسه، جهت‌گیری و باز بودن تخلخل‌ها



شکل ۳- تصاویر: الف) میکروسکوپی الکترونی عبوری، ب) میکروسکوپی الکترونی روبشی پودر هاردستونیت بعد از ۱۰ ساعت آسیاکاری و عملیات حرارتی در دمای ۸۰۰ درجه سانتی گراد، ج- و) تصاویر میکروسکوپی الکترونی روبشی داربست هاردستونیت عملیات حرارتی شده در ۱۲۵۰ درجه سانتی گراد در بزرگنمایی‌های مختلف

شکل هندسی غیریکنواخت در یک داربست تطابق بهتری با مورفولوژی محل آسیب‌دیده در بدن بیمار خواهد داشت. نوع ماده سازنده داربست و روش ساخت آن جهت تجاری‌سازی از اهمیت ویژه‌ای برخوردار است. در واقع هزینه ساخت داربست بسیار اهمیت داشته و باید مقرون به صرفه باشد تا قابلیت تجاری‌سازی داشته باشد [۲۳]. شکل (۳) تصاویر میکروسکوپی الکترونی عبوری و روبشی حاصل از نانوپودر هاردستونیت

باید به این مهم نیز توجه شود که درصد بالایی از تخلخل با اندازه بزرگ منجر به کاهش خواص مکانیکی داربست می‌شود. بنابراین ایجاد یک تعادل بین خواص ذکر شده می‌تواند منجر به ایجاد داربستی مناسب برای استفاده در مهندسی بافت شود [۲۶ و ۲۷].

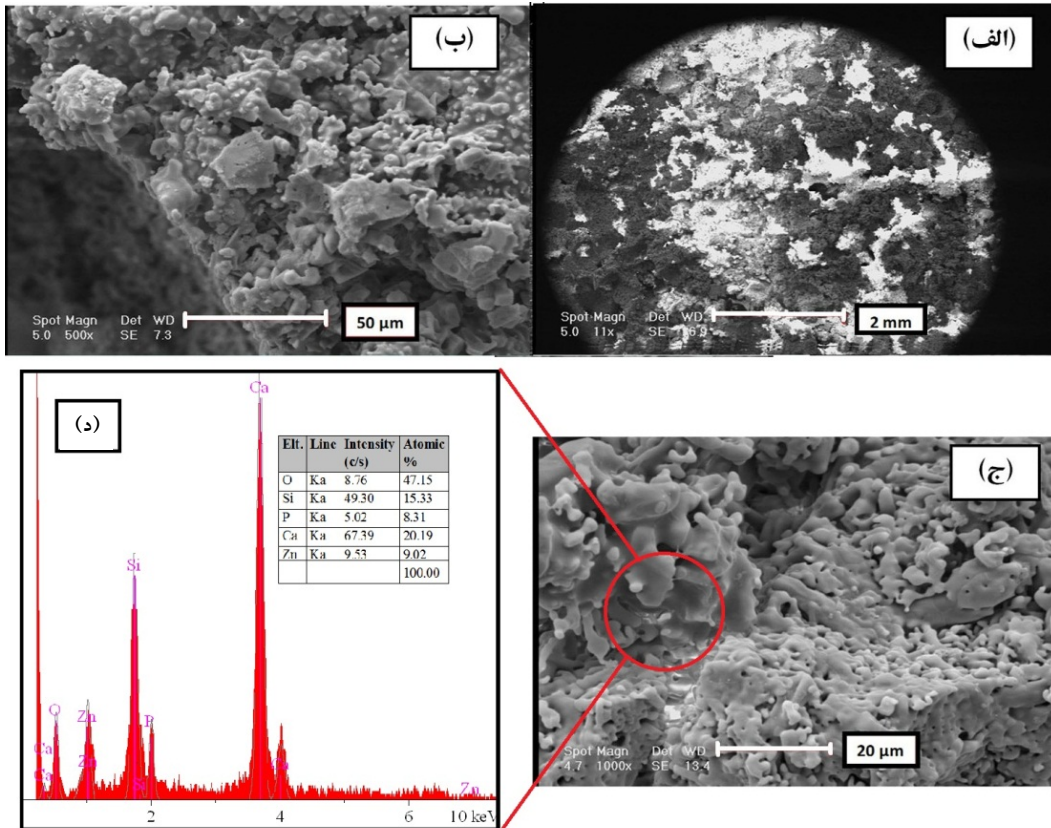
در برخی از مراجع نیز ذکر شده است که داربست ساخته شده باید دارای شکل هندسی غیریکنواخت باشد. در واقع

داربست هاردیستونیت شامل ۸۰ درصد وزنی سدیم کلرید و میزان تخلخل کل ۸۱ درصد را در بزرگنمایی‌های مختلف نشان می‌دهد. در تصاویر (۳-الف و ۳-ب) اندازه متوسط بلورک‌ها و ذرات آگلومره شده به ترتیب 28 ± 3 و 191 ± 3 نانومتر اندازه‌گیری شد. در تصاویر (۳-ج و ۳-ه) مورفولوژی تخلخل‌ها و اندازه آنها، در داربست هاردیستونیت نشان داده شده است. از این تصاویر تخلخل‌های باز و پیوسته با یکدیگر با اندازه ۲۰۰ تا ۵۰۰ میکرومتر قابل مشاهده هستند. چنین ساختاری در داربست‌های زیستی حائز اهمیت است. در واقع به دلیل وجود تخلخل‌های باز با اندازه میکرومتری، اجازه رشد بافت و رگ‌های خونی، همچنین عبور مواد مغذی و پروتئینی و سلول‌ها را به داخل بافت داده و در نهایت منجر به جایگزینی بافت جدید به جای داربست می‌شود. بنابراین داربست فوق قابلیت استفاده در مهندسی بافت را خواهد داشت. همچنین در بزرگنمایی هزار برابر دانه‌های تفجوشی شده سطح داربست مشاهده می‌شود (شکل ۳-و). در این شکل برخی نقاط سفید رنگ دیده شده است که احتمال تجمع بار روی سطح (با توجه به اینکه نمونه سرامیکی بوده و احتمال تجمع بار روی سطح در بزرگنمایی‌های بالای تصویرگیری وجود دارد) و یا احتمال وجود آلودگی بر سطح نمونه است. وو و همکاران [۹] داربست هاردیستونیت خالص با ۸۶/۹۴ درصد تخلخل، اندازه تخلخل را ۹۱۹/۶ میکرومتر و استحکام فشاری ۰/۰۶ مگاپاسکال را به روش اسفنج پلیمری تهیه کردند. با توجه به مقادیر ذکر شده برای حد پایینی استحکام فشاری استخوان اسفنجی (۰/۲ تا ۴ مگاپاسکال با حدود ۷۰-۹۰ درصد تخلخل) مقادیر میانگین استحکام فشاری، میزان و اندازه تخلخل‌های داربست تهیه شده در این مطالعه بسیار نزدیک به استخوان اسفنجی است. مقایسه نتایج به دست آمده در این تحقیق با سایر گزارشات نشان‌دهنده آن است که روش استفاده از مواد فضا‌ساز قادر به ایجاد داربست‌هایی با استحکام بالا و نزدیک‌تر به خواص استخوان اسفنجی در بدن موجود زنده است.

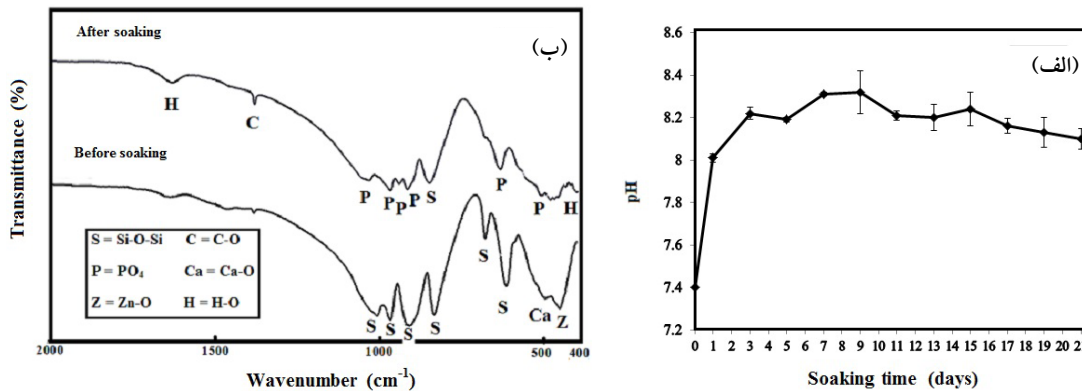
به منظور بررسی توانایی زیست‌فعالی داربست‌های ساخته

شده، از محلول شبیه‌سازی بدن مطابق با دستور بوهنر و لیماتره [۲۸] استفاده شد. شکل (۴-الف و ۴-ج) تصاویر میکروسکوپی الکترونی روبشی داربست هاردیستونیت بعد از ۲۱ روز غوطه‌وری در محلول شبیه‌سازی بدن را نشان می‌دهد. همان‌طور که قابل مشاهده است آپاتیت شبه استخوانی بر سطح داربست ایجاد شده، به طوری که به صورت یک لایه کاملاً چسبیده تمام سطح و داخل تخلخل‌ها را پوشانده است. همان‌طور که از تصاویر با بزرگنمایی بالاتر قابل مشاهده است، کلونی‌های آپاتیت با اندازه‌ای بالغ بر ۵۰۰ نانومتر و دارای مورفولوژی کرمی شکل هستند. همچنین به منظور شناسایی ترکیب لایه ایجاد شده بر سطح داربست آنالیز عنصری (شکل ۴-د) انجام گرفته است. همان‌طور که مشاهده می‌شود حضور پیک‌های فسفر و افزایش شدت پیک‌های کلسیم اثبات‌کننده حضور آپاتیت روی سطح داربست است.

شکل (۵-الف) تغییرات pH در مایع شبیه‌سازی بدن در طی ۲۱ روز را نشان می‌دهد. همان‌طور که مشخص است بیشترین تغییرات pH در روزهای اول اتفاق افتاده است به طوری که بعد از ۳ روز مقدار pH از ۷/۴ به ۸/۲۲ رسیده است. این تغییرات pH ناشی از شکسته شدن پیوندهای Si-O-Si و آزاد شدن یون‌های کلسیم و روی از ساختار داربست بعد از غوطه‌وری آن در محلول SBF است. این جابه‌جایی یونی (رهاش یون روی و کلسیم از داربست به داخل محلول و جذب H^+ و شکسته شدن پیوندها منجر به تشکیل گروه سیلانول روی سطح شده و منجر به ایجاد بار منفی روی سطح می‌شود. در نتیجه یون‌های کلسیم با بار مثبت جذب سطح شده و منجر به کاهش pH در محلول می‌شود (بعد از حدود ۸ روز غوطه‌وری) و بعد از آن به دلیل ایجاد دوباره بار مثبت روی سطح، گروه‌های فسفاتی با بار منفی به سمت سطح داربست رفته و گروه‌های کلسیم-فسفاتی ایجاد شده و در نهایت منجر به ایجاد آپاتیت کریستالی روی سطح می‌شود [۲۹]. این نتایج در تطابق با نتایج حاصل از آنالیز عنصری است. شکل (۵-ب) طیف مادون قرمز با تبدیل فوریه داربست هاردیستونیت قبل و



شکل ۴- الف-ج) تصاویر میکروسکوپی الکترونی روشنی داربست هاردستونیت بعد از ۲۱ روز غوطه‌وری در مایع شبیه‌سازی بدن در بزرگنمایی‌های مختلف و د) آنالیز عنصری با تفکیک پرتو ایکس داربست خالص هاردستونیت پس از ۲۱ روز غوطه‌وری در مایع شبیه ساز بدن



شکل ۵- الف) تغییرات pH اندازه گرفته شده حاصل از غوطه‌وری داربست هاردستونیت در مایع شبیه‌سازی بدن در زمان‌های مختلف، ب) الگوی مادون قرمز با تبدیل فوریه مربوط به داربست هاردستونیت قبل و بعد از غوطه‌وری در مایع شبیه‌سازی بدن به مدت ۲۱ روز

۴- نتیجه گیری

در این تحقیق پودر تک فاز هاردیستونیت به روش آلیاژسازی مکانیکی و سپس داربست هاردیستونیت تک فاز نانوساختار با استفاده از روش استفاده از فضا ساز سدیم کلرید با اندازه تخلخل ۲۰۰ تا ۵۰۰ میکرومتر با موفقیت ساخته شد. متوسط اندازه کریستالیت ها در پودر و داربست هاردیستونیت به ترتیب 28 ± 3 و 79 ± 1 نانومتر اندازه گیری شد. مقادیر استحکام و مدول فشاری نمونه در دمای تف جوشی 1250 درجه سانتی گراد به ترتیب $0.2/0$ و $0.35/0$ و $0.21/0 \pm 0.49/10$ مگاپاسکال اندازه گیری شد. میزان تخلخل کل 81 ± 1 درصد اندازه گیری شد. با توجه به نتایج حاصل از آزمون زیست فعالی و غوطه وری داربست هاردیستونیت در مایع شبیه سازی بدن به مدت ۲۱ روز، حضور آپاتیت تأیید شد. با توجه به نتایج طیف سنجی مادون قرمز، آزمون ارزیابی عنصری با تفکیک پرتو ایکس و تصاویر میکروسکوپی الکترونی روبشی آپاتیت به صورت یک لایه چسبیده تمامی سطح داربست و همچنین داخل تخلخل ها را پوشانده است. داربست حاصل به دلیل داشتن ساختار تخلخل (تخلخل با اندازه مناسب و تخلخل های باز) نزدیک به استخوان طبیعی، می تواند انتخاب مناسبی برای استفاده در مهندسی بافت باشد.

بعد از غوطه وری در محلول شبیه سازی شده بدن به مدت ۲۱ روز را نشان می دهد. قبل از غوطه وری پیک های جذب مخصوص داربست هاردیستونیت خالص را نشان می دهد. پیک های مشاهده شده در ۴۹۹، ۴۵۵ بر سانتی متر به ترتیب مربوط به گروه های Zn-O و Ca-O است. همچنین پیک های مشاهده شده در ۶۱۷، ۶۸۱، ۸۳۵، ۹۱۱، ۹۷۰ و ۱۰۱۰ بر سانتی متر مربوط به گروه های SiO_4 است.

الگوی مربوط به بعد از غوطه وری در مایع شبیه سازی بدن پیک های ناشی از به وجود آمدن فاز آپاتیت روی داربست را نشان می دهد. همان طور که در تصویر نشان داده شده است پیک های مشاهده شده در ۱۶۲۱ و ۴۷۴ بر سانتی متر متعلق به گروه هیدروکسیل (H-O) در ساختار آپاتیت است. پیک های مشخصه گروه فسفات ۶۳۶، ۹۱۸، ۹۴۴، ۹۷۱ و ۱۰۳۶ بر سانتی متر در شکل نیز تشخیص داده شده است. همچنین پیک مربوط به 1420 بر سانتی متر متعلق به گروه کربنات در ساختار آپاتیت است [۳۰-۳۲]. اطلاعات حاصل از طیف مادون قرمز با تغییرات pH در محلول مطابقت داشته و حضور آپاتیت بر سطح داربست تعیین می شود. همچنین خوشه های آپاتیت در تصاویر میکروسکوپی الکترونی روبشی کاملاً مشخص هستند.

واژه نامه

1. Hardystonite
2. X-ray diffraction (XRD)
3. scanning electron microscope (SEM)
4. transmission electron microscopic (TEM)
5. simulated body fluid (SBF)
6. fourier transform infrared spectroscopy (FTIR)
7. energy-dispersive spectroscopy (EDS)
8. Willemite
9. Diopside

مراجع

1. Burg, K. J. L., Porter, S., and Kellam, J. F., "Biomaterial Developments for Bone Tissue Engineering", *Biomaterials*, Vol. 21, pp. 2347-2359, 2000.
2. Shirtliff, V. J., and Hench, L. L., "Bioactive Materials for Tissue Engineering Regeneration and Repair", *Journal of Materials Science*, Vol. 38, pp. 4697-4707, 2003.
3. Roohani-Esfahani, S. I., Dunstan, C. R., Davies, B., Pearce, S., Williams, R., and Zreiqat, H., "Repairing a Critical-sized Bone Defect with Highly Porous Modified and Unmodified Baghdadite Scaffolds", *Acta Biomaterialia*, Vol. 8, pp. 4162-4172, 2012.
4. Ghomi, H., Emadi, R., and Haghjooye Javanmard, S., "Preparation of Nanostructure Bioactive Diopside Scaffolds for Bone Tissue Engineering by Two Near Net Shape Manufacturing Techniques", *Materials Letters*, Vol. 167, pp. 157-160, 2016.

5. Sadeghzade, S., Emadi, R., and Ghomi, H., "Mechanical Alloying Synthesis of Forsterite-diopside Nanocomposite Powder for using in Tissue Engineering", *Ceramics-Silikáty*, Vol. 59, pp. 1-5, 2015.
 6. Hafezi, M., Nezafati, N., Nadernezhad, A., Ghazanfari, S. M. H., and Sepantamehr, M., "Bioinorganics in Bioactive Calcium Silicate Ceramics for Bone Tissue Repair: Bioactivity and Biological Properties", *Ceramic Science and Technology*, Vol. 5, pp. 1-12, 2014.
 7. Sadeghzade, S., Emadi, R., and Tavangarian, F., "Combustion Assisted Synthesis of Hardystonite Nanopowder", *Ceramic International*, Vol. 42, pp. 14656-14660, 2016.
 8. Wu, C., Ramaswamy, Y., and Zreiqat, H., "Porous Diopside (CaMgSi₂O₆) Scaffold: a Promising Bioactive Material for Bone Tissue Engineering", *Acta Biomaterialia*, Vol. 6, pp. 2237-2245, 2010.
 9. Wu, C., Chang, J., and Zhai, W., "A Novel Hardystonite Bioceramic: Preparation and Characteristics", *Ceramic International*, Vol. 31, pp. 27-31, 2005.
 10. Zreiqat, H., Ramaswamy, Y., Wu, C., Paschalidis, A., Lu, Z., Birke, O., McDonald, M., Little, D., and Dunstan, C. R., "The Incorporation of Strontium and Zinc Into a Calcium-Silicon Ceramic for Bone Tissue Engineering", *Biomaterials*, Vol. 31, pp. 3175-3184, 2010.
 11. Wang, G., Lu, Z., Dwarde, D., and Zreiqat, H., "Porous Scaffolds with Tailored Reactivity Modulate In-Vitro Osteoblast Responses", *Materials Science and Engineering C*, Vol. 32, pp. 1818-1826, 2012.
 12. Gheisari, H., Karamian, E., and Abdollahi, M., "A Novel Hydroxyapatite- Hardystonite Nanocomposite Ceramic", *Ceramics International*, Vol. 41, pp. 5967-5975, 2015.
 13. Ghomi, H., Jaberzadeh, M., and Fathi, M., "Novel Fabrication of Forsterite Scaffold with Improved Mechanical Properties", *Alloys and Compounds*, Vol. 509, pp. 63-67, 2011.
 14. Arifvianto, B., and Zhou, J., "Fabrication of Metallic Biomedical Scaffolds with the Space Holder Method: a Review", *Materials*, Vol. 7, pp. 3588-3622, 2014.
 15. Sadeghzade, S., Emadi, R., and Labbaf, S., "Hardystonite-diopside Nanocomposite Scaffolds for Bone Tissue Engineering Applications", *Materials Chemistry and Physics*, Vol. 202, pp. 95-103, 2017.
 16. Tavangarian, F., and Emadi, R., "Mechanochemical Synthesis of Single Phase Nonocrystalline Forsterite Powder", *International Journal of Modern Physics B*, Vol. 24, pp. 343-350, 2010.
 17. Askeland, D. R., *The Science and Engineering of Materials*, PWS Pub. Co., 1989.
 18. Li, H., and Chang, J., "Fabrication and Characterization of Bioactive Wollastonite/PHBV Composite Scaffolds", *Biomaterials*, Vol. 25, pp. 5473-5480, 2004.
 19. Wu, C. T., Ramaswamy, Y., and Zreiqat, H., "Porous Diopside (CaMgSi₂O₆) Scaffold: a Promising Bioactive Material for Bone Tissue Engineering", *Acta Biomaterial*, Vol. 6, pp. 2237-2245, 2010.
 20. Sadeghzade, S., Shamoradi, F., Emadi, R., and Tavangarian, F., "Fabrication and Characterization of Baghdadite Nanostructured Scaffolds by Space Holder method", *Journal of the Mechanical Behavior of Biomedical Materials*, Vol. 68, pp. 1-7, 2017.
 21. Ghomi, H., Emadi, R., and Haghjo Javanmard, S., "Fabrication and Characterization of Nanostructure Diopside Scaffolds using the Space Holder Method: Effect of Different Space Holders and Compaction Pressures", *Materials and Design*, Vol. 91, pp. 193-200, 2016.
 22. Sadeghzade, F., Emadi, R., Tavangarian, F., and Naderi, M., "Fabrication and Evaluation of Silica-based Ceramic Scaffolds for Hard Tissue Engineering Applications", *Materials Science & Engineering C*, Vol. 71, pp. 431-438, 2017.
 23. Johnson, A. J. W., and Herschler, B. A., "A Review of the Mechanical Behavior of CaP and CaP/polymer Composites for Applications in Bone Replacement and Repair", *Acta Biomaterial*, Vol. 7, pp. 16-30, 2011.
 24. Gerhardt, L. C., and Boccaccini, A. R., "Bioactive Glass and Glass-ceramic Scaffolds for Bone Tissue Engineering", *Materials*, Vol. 3, pp. 3867-3910, 2010.
 25. Sadeghzade, S., Emadi, R., and Labbaf, S., "Formation Mechanism of Nano-hardystonite Powder Prepared by Mechanochemical Synthesis", *Advanced Powder Technology*, Vol. 27, pp. 2238-2244, 2016.
 26. Rana, D., Arulkumar, S., Vishwakarma, A., and Ramalingam, M., *Considerations on Designing Scaffold for Tissue Engineering*, pp. 133-148, In: Ramalingam, A. V. S. S., (Eds.), *Stem Cell Biology and Tissue Engineering in Dental Sciences*, Academic Press, Boston, 2015.
 27. Shirliff, V. J., and Hench, L. L., "Bioactive Materials for Tissue Engineering, Regeneration and Repair", *Journal of Materials Science*, Vol. 38, pp. 4697-4707, 2003.
 28. Böhner, M., and Lemaître, J., "Can Bioactivity be Tested in Vitro with SBF Solution?", *Biomaterials*, Vol. 30, pp. 2175-2179, 2009.
۲۹. خرازیها، م.، و فتحی، م. ح.، "ساخت، مشخصه‌یابی و ارزیابی فعالیت زیستی نانو بیوسرامیک فورستریت"، نشریه مواد پیشرفته در مهندسی، سال ۲۹، شماره ۱، ص. ۴۵-۵۵، بهار ۱۳۸۹.
30. 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. 1818-1826, 2012.
31. Soundrapandian, C., Datta, S., Kundu, B., Basu, D., and Sa, B., “Porous Bioactive Glass Scaffolds for Local Drug Delivery in Osteomyelitis: Development and in Vitro Characterization”, *American Association of Pharmaceutical Scientists*, Vol. 11, pp. 1675-1683, 2010.
32. Tavangarian, F., and Emadi, R., “Nanostructure Effects on the Bioactivity of Forsterite Bioceramic”, *Materials Letters*, Vol. 65, pp. 740-743, 2011