ارزیابی زیست فعالی داربست کامپوزیتی نانوبیوگلاس پوشش داده شده با پلی هیدروکسی بوتیرات جهت مهندسی بافت استخوان

محبوبه منتظری[۱]، سعید کرباسی[*۲]، احمد منشی[۳]، رضا ابراهیمی کهریزسنگی[۱]

[۱] کارشناسی ارشد مواد، باشگاه پژوهشگران جوان، دانشگاه آزاد اسلامی واحد نجف آباد

[۲] عضو هیئت علمی گروه بیومواد، نانوتکنولوژی و مهندسی بافت، دانشکده فناوری های نوین پزشکی ، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان

[۳] عضو هیئت علمی گروه مواد، دانشکده مهندسی مواد، دانشگاه صنعتی اصفهان

تاریخ ثبت اولیه: ۹۲/۷/۸، **تاریخ دریافت نسخهٔ اصلاح‌شده:** ۹۲/۹/۲۴، **تاریخ پذیرش قطعی:** ۹۲/۹/۲۴

چکیده توسعه داربست های کامپوزیتی به علت ترکیب شدن خواص مفید دو یا چند ماده در راستای رسیدن به نیازهای مکانیکی و فیزیولوژیکی بافت میزبان روز افزون می باشد. در این تحقیق ابتدا پودر نانوبیوگلاس (nBioglass) با اندازه دانه بین ۶۵-۵۵ نانومتر تهیه و سپس داربست متخلخل سرامیکی بیوگلاس با درصدهای وزنی ۳۰ و ۴۰ ، ۵۰ به روش تکرار پذیری غوطه وری اسفنج پلی یورتان تهیه شد. جهت بهبود استحکام مکانیکی، داربست‌ها توسط ۶٪درصدوزنی-پلیمر پلی هیدروکسی بوتیرات(P3HB) در مدت زمان ۳۰ ثانیه و ۱ دقیقه پوشش دهی شدند. جهت مطالعات فازی و عنصری، ریخت شناسی، اندازه ذرات و تعیین گروه عاملی به ترتیب از دستگاه های مشخصه یابی XRD ، XRF ، SEM ، FE-SEM و FT-IR استفاده شد. سپس جهت ارزیابی زیست فعالی داربست بهینه با ۳۰ درصد وزنی بیوگلاس و ۶ درصد وزنی P3HB انتخاب گردید.جهت زیست فعالی از محلول شبیه سازی بدن(SBF) استفاده شد که داربست ها به مدت ۴ هفته در این محلول در درجه حرارت ۳۷ درجه سانتی گراد در انکوباتور نگهداری شد. آزمون های XRD , SEM وAAS نشان دهنده تشکیل هیدروکسی آپاتیت بر روی سطح داربست زیست فعال می باشد. در نتیجه، مناسب ترین داربست، داربستی با ۳۰ درصد وزنی بیوگلاس و۶ درصد وزنی P3HB ودرصد تخلخل بین ٪ ۸۷– ۷۵ می باشد که می تواند در مهندسی بافت استخوان کاربرد داشته باشد.

کلمات کلیدی: شیشه زیست‌فعال 45S5، داربست کامپوزیتی، P3HB، مهندسی بافت استخوان.

Evaluation of bioactivity poly-3-hydroxybutyrate coated Nano-Bioglass 45S5 composite scaffolds for bone tissue engineering

M. Montazeri[1], S. Karbasi[*2], A. Monshi [3] and R. Ebrahimi-kahrizsangi [1]

[1]Department of Material engineering, University of Najafabad, City Esfahan, Country Iran
[2] Department of Biomaterials, nanotechnology and tissue engineering, Advanced Medical Technology Department, Isfahan University of Medical Sciences, City Esfahan, Country Iran
[3] Department of Material engineering, Isfahan University of technology, City Esfahan, Country Iran

Abstract Development of composite scaffolds due to combing useful properties of two or more materials in order to meet mechanically and physiologically host tissue is increasing. Firstly, nano-Bio glass (nBG) powder was made with grain size between 55-65nm and then porous nBG of 30, 40 and 50%wt was produced by polyurethane sponge replication method. In order to increase the scaffoldsmechanical properties, they coated with 6%wt poly-Hydroxybutyrate (P3HB) for 30sec and 1min. XRD,XRF, SEM, FE-SEM and FT-IR were used in order to study the phase and elemental structure , morphology , grain size and functional groups , respectively. The scaffold including 30%wt nBG and 6%wt was used for evaluation of bioactivity. Biocompatibility of the scaffold was also tested in SBF solution for 4 weeks at 37 ºC. XRD ,SEM and AAS results showed formation of HA on the surface of scaffold which prove the its biocompatibility, the result is showing that, the best scaffold is 30%wt nBG /6%wt P3HB with 75-87% porosity, which is a good candidate for bone tissue engineering.

Keywords: Bioglass 45S5; composite scaffolds; P3HB ;Bone tissue engineering.

[*] **عهده‌دار مکاتبات**

نشانی: اصفهان، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، دانشکده فناوری های نوین پزشکی، گروه بیومواد، نانوتکنولوژی و مهندسی بافت

تلفن: ۰۳۱۱۷۹۲۲۴۵۹، **دورنگار:** ۰۳۱۱۷۹۲۲۴۳۲، **پیام‌نگار:** karbasi@med.mui.ac.ir

۱– مقدمه

علی‌رغم پیشرفت فناوری‌های دارویی و پزشکی، تعداد نقص‌ها و بیماری‌های مربوط به بافت استخوانی به دلیل کاهش عمر متوسط افراد، افزایش روز افزون جمعیت، آلودگی‌های زیست محیطی و تنش‌های ناشی اززندگی ماشینی، کاهش چندانی نداشته است. همچنین صدمات ناشی از سوانح، این نقص‌ها و بیماری‌ها را افزایش می‌دهد. مرور تاریخی نیز بر این مطلب صحه می‌گذارد که تنها در دهه ۱۹۹۰ رشد جمعیت در آمریکا به مرز ۳۲/۷ میلیون نفر رسیده بود و این رشد از تمام دهه‌های قرن ۲۰ بیشتر می‌باشد. با توجه به پدیده پیرشدگی جمعیت[1]، پیشگیری و درمان به ویژه در زمینه ارتوپدی[2] از اهمیت خاصی برخوردار شده است [۱]. مهندسی بافت استخوان، یکی از پیشرفت‌های پزشکی است که راهکارهای مناسبی جهت بهبود و رفع نواقص و بیماری‌های ایجاد شده ارائه می‌دهد. امروزه این روش نوین درمان توانسته است مشکلات موجود در زمینه پیوند اعضاء از جمله قبول نکردن عضو هدیه شده را به راحتی حل کند. بنابراین موادی که حساسیت و سمّیتی برای بافت زنده ایجاد نکنند، از اهمیت ویژه‌ای در این زمینه برخوردار هستند. پلیمرهای زیست‌سازگارو زیست‌تخریب‌پذیر از این دسته مواد هستند که کاربرد آن‌ها در این زمینه روز به روز در حال افزایش است [۲].

ماده زیست فعال، ماده ای است که از یک پاسخ بیولوژیکی خاص در سطح مشترک مواد نتیجه می‌شود که باعث تشکیل پیوند بین بافت و ماده می شود. امروزه انواع مختلفی ازمواد زیست فعال مورد تحقیق و بررسی قرار می‌گیرند که عبارتند از: شیشه‌های زیست فعال، شیشه سرامیک‌های زیست فعال مانند سرویتال[3]، هیدروکسی آپاتیت متراکم و متخلخل، کامپوزیت های زیست فعال. تمامی این موارد با بافت مجاور در فصل مشترک پیوند تشکیل می‌دهند. البته زمان پیوند خوردن، استحکام، مکانیزم و ضخامت منطقه واکنشی برای مواد مختلف متفاوت خواهد بود [۳]. در میان همه مواد زیست فعال، بهترین رفتار زیست فعالی[4] متعلق به شیشه‌های زیست فعال است که در بر گیرنده‌ی گروهی از ترکیبات شیشه‌اند که در زمان کوتاهی با بافت پیوند برقرار می‌کنند [۴]. این شیشه‌های زیست فعال همچنین از تشکیل بافت ریشه دار در فصل مشترک کاشتنی و استخوان جلوگیری کرده و تشکیل یک پیوند شیمیایی قوی را بین کاشتنی و بافت استخوانی ترغیب می کنند [۵–۶] .

از آنجا که داربست های سرامیکی استحکام و چقرمگی شکست پایینی دارند و نمی‌توان آنها را به تنهایی در باز سازی بافت استخوان به کار برد، لذا بهتر است برای افزایش خواص مکانیکی داربست‌های سرامیکی از پلیمرها به عنوان فاز تقویت کننده استفاده کرد [۷].

پلیمرهای زیست تخریب پذیر یک گروه بزرگ از مواد زیستی هستند. به طور عمده پلیمرهای زیست تخریب پذیر به دو دسته پلیمرهای طبیعی و سنتزی تقسیم می‌شوند. که پلیمرهای طبیعی شامل پلی(ساکاریدها) مانند نشاسته، آلژینات، کیتوسان و ... یا پروتئین هایی مثل پروتئین های گیاهی، کلاژن، ژل های فیبرین و ... می‌شوند. دسته دوم پلیمرهای زیست تخریب پذیر سنتز شده می‌باشند. برای مثال می توان به پلی(اورتواستر)ها، پلی(انیدرید)ها و ... ، یا پلیمرهای سنتز شده از میکروارگانیسم ها مانند پلی(هیدروکسی آلکانوات)ها اشاره کرد. پلیمرهای طبیعی دارای محدودیت‌های ضدایمنی، حساسیت دمایی، فرآوری مشکل و امکان انتقال بیماری می باشند. اما پلیمرهای سنتزی به دلیل اینکه تحت شرایط کنترل شده ساخته می‌شوند در نتیجه خواص فیزیکی و مکانیکی قابل پیش بینی و تکرارشدنی (مثل استحکام کششی، مدول الاستیک و نرخ تخریب) از خود نشان می‌دهند. و همچنین احتمال خطرات احتمالی مثل سمیت، واکنش های ضدایمنی و ایجاد عفونت درپلیمرهای سنتزی خالص با ساختار ساده کمتر می‌باشد.

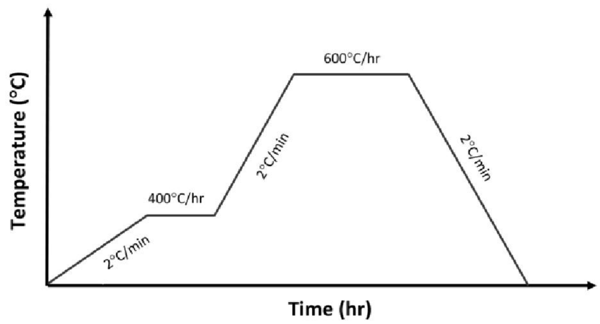
1- Population Aging
2- Orthopedics
3 -Ceravital
5 Bioactive

از جمله معروفترین و ساده ترین پلیمرهای تخریب پذیر، خانواده پلی هیدروکسی آلکانوات[1] می‌باشد که می توان به پلی هیدروکسی بوتیرات[2] اشاره کرد. این پلیمر برای اولین بار توسط لموئیجن در سال ۱۹۲۶ ساخته شد. ویژگی‌های منحصر به فرد P3HB همچون بلورینگی، زیست سازگاری و خواص فیزیکی و مکانیکی عالی ، این پلیمر را نسبت به دیگر پلیمرها در این دسته مورد توجه قرار داده است [۸].

با توجه به تحقیق‌های انجام شده چن و همکارانش (۲۰۰۶) [۹] داربستی از جنس شیشه زیست فعال پوشش داده شده با پلیمرپلی وی-ال لاکتیک اسید (PDLLA) راساختند.پس از بررسی های آزمون زیست سازگاری در محلول SBF مشاهده شد که پس از یک هفته لایه ای از آپاتیت بر روی سطح داربست تشکیل شده است. تا کنون داربستی با نانوذرات شیشه زیست فعال با پوشش پلی هیدروکسی بوتیرات به منظور بهبود خواص مکانیکی و چقرمگی شکست داربست گزارش نشده است که بیانگر نوآوری تحقیق حاضر می باشد.در تحقیق حاضر ابتدا پودر نانو بیوگلاس در مقادیر زیاد توسط روش ذوبی ساخته شد و سپس از روش غوطه وری اسفنج در دوغاب سرامیکی ، داربست متخلخل ساخته شد و جهت بهبود خواص مکانیکی به وسیله غوطه وری در پلیمر P3HB پوشش دهی شد. پلیمر P3HB به دلیل پایداری بالا، بهبود خواص مکانیکی و میزان تخلخل مناسب برای داربست ساخته شده از اهمیت زیادی برخوردار است که این داربست می تواند جهت مهندسی بافت استخوان بکار برده شود [۱۰].

۲- مواد و روش تحقیق

مواد اولیه جهت ساخت و آماده سازی نانو بیوگلاس شامل ۴۶/۱۳g SiO_2 ، ۴۸/۰۳g $CaCO_3$ ، ۴۱/۶۴g Na_2CO_3 و g ۳/۵۹H_3PO_4) با یکدیگر ترکیب شدندوسپس درون بوته آلومینا دردمای^{o}C ۱۴۰۰سینترشد.و تحت آسیاب به نانو ذرات بیوگلاس 45S5 تبدیل گردید. یکی از مراحل ساخت داربست متخلخل، تهیه دوغاب پایدارسرامیکی با کمک افزودنی‌های مناسب می باشد. در این تحقیق از پودر بیوگلاس با اندازه دانه بین ۶۵-۵۵ نانومتر جهت ماده زمینه داربست استفاده شد. پودر بیوگلاس با درصد وزنی ۳۰ و ۴۰ و۵۰ در آب دو بار تقطیر به آرامی حل شد تا از کلوخه‌ای شدن جلوگیری شود. پس از همگن شدن محلول، جهت افزایش درصد وزنی جامد، از مقدار ۲٪ وزنی متفرق ساز آمونیوم پلی متاکریلات(APMA) (DARVAN® C-N, R.T. Vanderbilt Company, Inc., USA, MW=10000 to 16000). استفاده شد. سپس دوغاب با سرعت مناسب (۳۰۰rpm) به مدت ۹۰ دقیقه همزده شد تا محلولی به صورت همگن به دست آید [۱۱]. مقدار ۱/۵٪ وزنی از پودر کربوکسی متیل سلولز (CMC) (CMC, Hangzhou Hongbo Chemical Co. Ltd, China) به عنوان پیوند دهنده و افزایش گرانروی دوغاب به آرامی به محلول اضافه شد. سپس محلول تا همگن شدن کامل در ۶۰^{o}C و با سرعت ۱۰۰۰rpm همزده شد. اسفنج تجاری پلی یورتان (۸۰cpi) MEAY Co., Ltd. China پس از برش به ابعاد مناسب ($1\times1\times1cm^3$) به آرامی درون دوغاب فرو برده می‌شود.برای جلوگیری از پر شدن تخلخل‌های اسفنج، نمونه‌ها به مدت ۲۴ ساعت درون آون خلاء در دمای ۸۰^{o}C خشک شدند. سپس نمونه‌ها تحت سیکل عملیات حرارتی در کوره عملیات حرارتی قرار گرفتند و در پنج مرحله مطابق با شکل (۱) سینترشدند.



شکل ۱. منحنی سیکل عملیات حرارتی داربست سرامیکی و دمای تثبیت بیوگلاس [۱۲]

مقدار۰/۶ گرم پودر P3HB را در ۱۰ میلی‌لیتر حلال کلروفرم ($CHCl_3$) (شرکت اسپانیایی اسکارلائو) به مدت۶ ساعت در حمام روغن و دمای ۶۰°C حل کرده و محلول پلیمری جهت پوشش‌دهی داربست سرامیکی بدست آمد. برای تهیه این محلول بخاطر فرار بودن کلروفرم باید از دستگاه

[1] -Poly hydroxyalkanoate(PHA)
[2] -Poly 3hydroxybotirate(P3HB)

مبرد استفاده شود. سپس داربست‌های هیدروکسی‌آپاتیت را به مدت ۳۰ ثانیه و ۱ دقیقه در محلول‌های پلیمری غوطه‌ور کرده و برای یکنواخت شدن پوشش در همه نقاط داربست و خروج محلول پلیمری اضافی، نمونه‌ها درون فویل آلومینیوم گذاشته و سپس درون سانتریفیوژ با سرعت ۵۰۰ دور در دقیقه به مدت ۳۰ ثانیه قرار گرفتند و نهایتاً نمونه‌ها به مدت ۲۴ ساعت در آون خلاء قرار داده شدند تا خشک شوند.

۲-۱-مشخصه یابی نمونه ها

در این تحقیق جهت بررسی آنالیز فازی و عنصری پودر شیشه زیست فعال 45S5 از آزمون های (XRD, Philips X'Pert) XRD و XRF استفاده شد و همچنین FT-IR (FTIR:6300, JASCO,Japan) جهت تعیین گروه های عاملی به کار برده شد. از آنالیز FE-SEM (Hitachi S-4160) جهت نشان دادن نانو بودن ذرات بیوگلاس استفاده شد. میکروسکوپ الکترونی روبشی (SEM ,Philips XL-30,Netherlands) نیز به منظور مطالعه و بررسی مشخصات ظاهری و ریخت شناسی داربست سرامیکی و کامپوزیتی مورد استفاده قرار گر فت.آزمون XRD و FT-IR نیز جهت تشکیل کامپوزیت انجام گرفت.

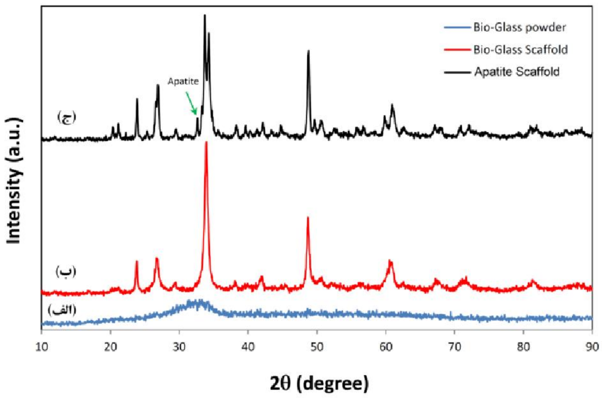
۲-۲-ارزیابی زیست فعالی

برای بررسی زیست فعالی، از محلول شبیه سازی شده بدن (SBF) استفاده شد.پس از آماده‌سازی محلول، نمونه‌ها درون محلول SBF قرار می‌گیرند. حجم محلول SBF به نسبت مساحت سطوح تقسیم بر۱۰ روی نمونه‌ها ریخته می‌شود [۱۳]. باید توجه شود که در تمام مراحل تا هفته چهارم باید pH محلول در بازه ۷/۴۵–۷/۴۲ نگهداری شود. داربست‌ها در این محلول در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد به مدت ۴ هفته درون انکوباتور قرار گرفته و در هر مرحله از خارج کردن نمونه از محلول باید با آب دیونیزه شسته و سپس جهت خشک شدن در آون خلاء قرار داده شوند. نمونه‌ها پس از ۴ هفته مورد بررسی آنالیز XRD لایه نازک، EDXA و SEM قرار می‌گیرند. دستگاه اسپکترومتری جذب اتمی (مدل A-Analyst 300، Perkiin Elmer Co.) برای محاسبه غلظت یون کلسیم در محلول SBF بکار برده شد. در حین انجام آزمون SEM، آزمون تجزیه پراش پرتو ایکس (EDXA) نیز روی نمونه‌های آزمون زیست فعالی جهت تشخیص در تشکیل هیدروکسی‌آپاتیت انجام شد.

۳-نتایج و بحث

۳-۱-مشخصه یابی پراش پرتو ایکس(XRD)

با توجه به شکل (۲-الف)، ملاحظه می‌شود که محصول بدست آمده بیوگلاس می‌باشد و هیچگونه فاز پایدار اضافی مشاهده نمی‌شود. سپس با محلول سازی و ساخت داربست در اثر حرارت در دمای ۶۰۰°C پیک‌های XRD به صورت مقایسه‌ای با حالت آمورف آن در همان شکل (۲-ب) نشان داده شده است واندازه بلورها در دمای ۶۰۰°C، ۲۷–۲۴ نانومتر بوسیله رابطه اصلاح شده شرر (منشی و همکاران) بدست آمد [۱۴] . شکل (۲-ج) مربوط به داربست سرامیکی متخلخل می‌باشد که در زاویه ۳۲/۵۷۵ درجه در دمای ۱۰۰۰°C یک پیک نسبتاً بلند ظاهر شده است که مربوط به آپاتیت می‌باشد که در این تحقیق می‌تواند به عنوان یک نا خالصی در کنار بیوگلاس عمل نماید. پس بنابراین بهترین دما جهت ساخت داربست دمای ۶۰۰°C می‌باشد.



شکل ۲. الگوی پراش اشعه ایکس الف) پودر شیشه زیست‌فعال، ب)داربست بیوگلاس دردمای۶۰۰ °C و ج) داربست بیوگلاس در دمای ۱۰۰۰°C

۳-۲- مشخصه‌یابی میکروسکوپ الکترونی روبشی نشر میدانی(FE-SEM)

جهت بررسی ریز ساختار، شکل و اندازه ذرات پودر تولید شده از میکروسکوپ FE-SEM استفاده گردید که این

نتیجه در شکل (۳) نشان داده شده است. با توجه به شکل ملاحظه می‌شود که ذرات عمدتاً مورفولوژی شبه کروی داشته و اندازه ذرات در نمونه سنتز شده به روش ذوبی ۶۵-۵۵ نانومتر می‌باشد. روش اصلاح شده شرر توسط دکتر منشی ارائه شد[۱۴] که روشی دقیق تر برای محاسبه اندازه دانه ها می باشد. بر طبق محاسبات با استفاده از رسم نمودار $Ln\beta$ در مقابل $Ln(1/\cos\theta)$ به روش کمترین مربعات خطا و استفاده از عرض از مبدا این نمودارها (بر اساس معادله شرر) اندازه دانه دقیق تری را گزارش کرد.

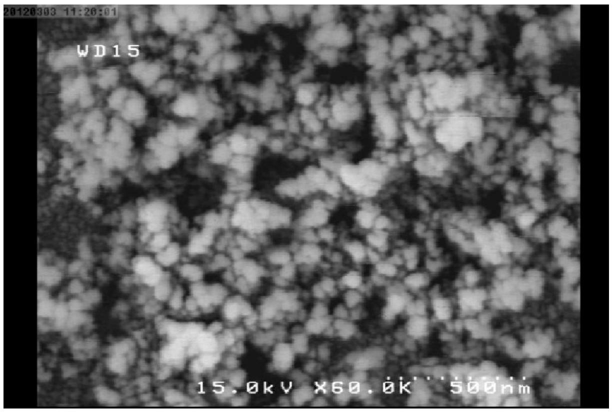
(معادله ۱)

$$L=\frac{k\lambda}{\beta\cos\theta}\Rightarrow\beta=\frac{k\lambda}{L\cos\theta}\Rightarrow\beta=\frac{k\lambda}{L}.\frac{1}{\cos\theta}$$

$$Ln\beta=Ln\frac{k\lambda}{L}+Ln\frac{1}{\cos\theta}$$

$$y=ax\pm b$$

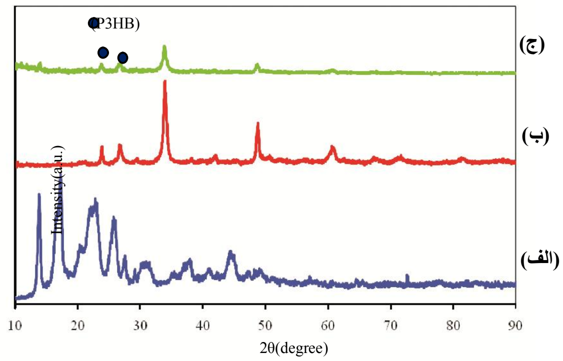
ابتدا با استفاده از فرمول شرر اندازه دانه با استفاده از تک تک θ ها و β مخصوص هرکدام از θها به دست آمد. بر اساس داده‌ها هر کدام از نمودارها بر اساس روش کمترین مربعات خطا رسم شد. پس از رسم نمودار و با قرار دادن آن در معادله (۱)، اندازه دانه‌ها به دست آمدند.



شکل ۳. تصویر میکروسکوپ FESEM پودر شیشه زیست فعال

۳-۳- آزمون XRD داربست نانوبیوگلاس با و بدون پوشش پلیمر P3HB

جهت بررسی تشکیل داربست کامپوزیتی nBioglass/P3HB، الگوی پراش اشعه ایکس از داربست سرامیکی ۳۰٪ بیوگلاس (به دلیل اینکه مقدار درصد وزنی بیوگلاس تاثیری بر روی پیک‌های XRD نمی‌گذارد) بدون و با پوشش پلیمری در شکل (۴) نشان داده شده است. همانطور که در شکل (۴-الف) مشاهده می شود XRD مربوط به پلیمر P3HB می باشد. شکل(۴-ب) نشان دهنده داربست شیشه زیست فعال می‌باشد و شکل (۴-ج) نیز کامپوزیت nBioglass/P3HB را نشان می دهد که با توجه به استاندارد JCPDS:033-1161، داربست پس از پوشش‌دهی، در زاویه‌های ۱۴ و ۱۷/۱۳ درجه پیک‌هایی آشکار شده که با توجه به استاندارد، مربوط به P3HB می باشند که می توان اثبات کرد ساختار کامپوزیت حاصل، یک داربست کامپوزیتی nBioglass/P3HB می باشد.

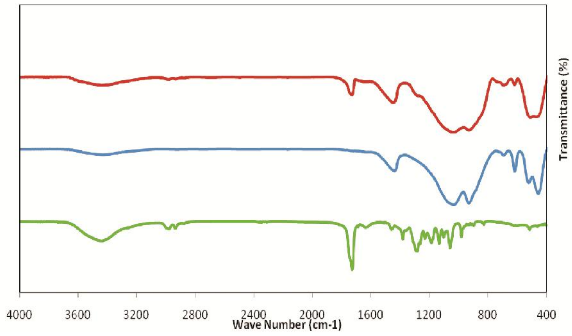


شکل ۴. پراش اشعه ایکس، الف) P3HB، ب) داربست 30%nBG و ج) داربست کامپوزیتی nBioglass/P3HB

۴-۳- آزمون FT-IR داربست nBioglass با و بدون پوشش پلیمر P3HB

شکل (۵ -الف) طیف مادون قرمز تبدیل فوریه مربوط بهP3HB را نشان می دهد.طیف مادون قرمز مربوط به داربست شیشه زیست فعال در شکل (۵-ب)، پیک‌های مربوط به حضور فاز مهم $Na_2Ca\ _2Si_2O_6$ را به وضوح نشان می‌دهد. همچنین باند $۹۳۰\ cm^{-1}$ موجود درشیشه زیست فعال در شکل (۵-ج) نیز دیده می‌شود که تشکیل کامپوزیت را به اثبات می‌رساند. همانطور که ملاحظه می‌شود در شکل (۵-ج) مربوط به کامپوزیت درعدد موج $۱۷۱۷\ cm^{-1}$ یک پیک کوتاه از گروه کربونیل تشکیل شده است که مربوط به گروه کربونیل طیف P3HB می باشد. نمودار P3HB درعدد موجی $۲۹۸۰cm^{-1}$یک پیک که ناشی از ارتعاش کششی پیوندC-H

است مشاهده می شود که همین پیک درعدد موج $2981 cm^{-1}$ در نمودار (۵ –ج) قابل مشاهده است.

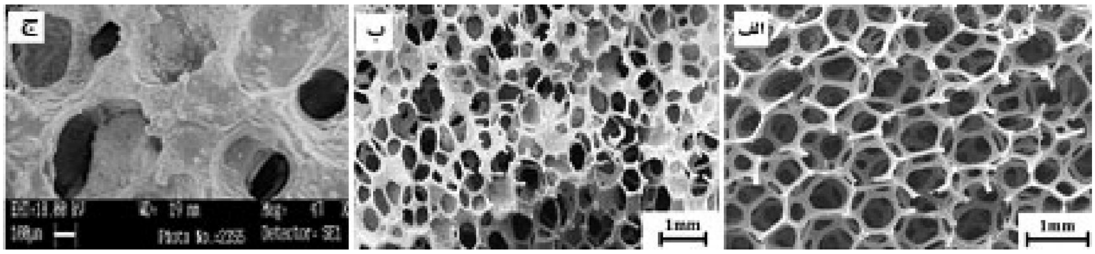


شکل۵. طیف جذب FT-IR، الف)پلیمرP3HB، ب)داربست شیشه زیست فعال و ج) داربست nBioglass/P3HB

۳–۵– ریخت شناسی ساختار متخلخل داربست nBioglass با و بدون پوشش پلیمر P3HB

شکل (۶–الف) تصاویر میکروسکوپ الکترونی روبشی اسفنج پلی‌یورتان باتخلخل‌های باز در محدوده ۳۰۰ تا۷۰۰ میکرومتر را قبل از غوطه‌وری دردوغاب سرامیکی نشان می-دهد و شکل (۶–ب) داربست متخلخل سرامیکی که محدوده قطر تخلخل ها بین ۲۰۰ تا ۶۰۰ میکرومتر است را نشان می-دهد و تصویر نشان دهنده مرتبط بودن حفرات می باشد که جهت مهاجرت سلولی، رسیدن مواد غذایی و خروج مواد زائد بسیار با اهمیت می باشد [۱۵] .

تصاویر میکروسکوپ الکترونی روبشی در شکل (۶–ج) نیز داربست بیوگلاس با پوشش پلیمر را نشان می دهد. بر اساس تصاویر SEM و نتایج حاصل از آزمون های FT-IR و XRD کامپوزیت بودن داربست به اثبات می رسد.



شکل ۶. الف) تصویر SEM اسفنج پلی‌یورتان، ب) سطح مقطع داربست بیوگلاس بدون پوشش پلیمری، ج) سطح مقطع داربست بیوگلاس با پوشش P3HB

۳–۶– آزمون XRD لایه نازک جهت مطالعه رفتار زیست فعالی داربست های کامپوزیتی

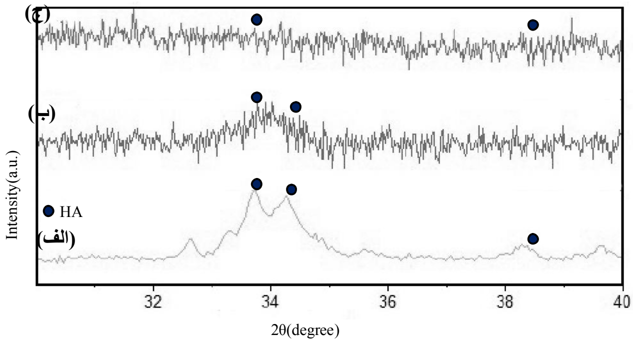
برای مطالعه تشکیل هیدروکسی‌آپاتیت بر روی سطح داربست‌ها، از دستگاه طیف‌سنج اشعه ایکس لایه نازک (*XRD*; Philips *PW 1390*) بانرخ روبش معادل ۱ درجه بر دقیقه، ولتاژ اعمالی برابر ۱۵ کیلوولت و جریان معادل ۳۰ میلی‌آمپر و آنالیز تابش پرتو *CuKα* و زاویه پراش (2θ) از ۳۰ تا ۴۰ درجه بدلیل تراکم بیشتر پیک‌های اصلی هیدروکسی‌آپاتیت در این منطقه، انتخاب گردید. شکل (۷) مربوط به پیک‌های داربست با و بدون پوشش پلیمری بعد از غوطه‌وری در SBF می‌باشد که در شکل (۷–الف) به منظور اثبات اینکه پیک‌های شکل (۷– ب، ج) مربوط به هیدروکسی‌آپاتیت تشکیل شده بر روی داربست می‌باشد، لذا پیک مربوط به هیدروکسی آپاتیت در این شکل آورده شده است. شکل (۷–ب) وجود پیک‌های هیدروکسی‌آپاتیت بر روی سطح داربست بدون پوشش است که به دلیل زمینه بیوگلاس داربست، شدت پیک‌ها زیادتر هستند ولی شکل (۷–ج) که مربوط به داربست پوشش‌دهی شده بوسیله P3HB با زمان ۱ دقیقه غوطه‌وری می‌باشد، از شدت این پیک‌ها کاسته می‌شود که دلیل آن، وجود پوشش پلیمری و حداقل تشکیل هیدروکسی‌آپاتیت می‌باشد. پیک‌های هیدروکسی‌آپاتیت در زاویه بین ۳۰ تا ۴۰ درجه که بازه اصلی تشکیل پیک‌های هیدروکسی‌آپاتیت می‌باشد، به صورت کشیده و شارپ تشکیل شده‌اند که خود وجود تشکیل هیدروکسی‌آپاتیت در سطح داربست می‌باشد.

۳–۷– آزمون SEM و EDXA

a) داربست هیدروکسی‌آپاتیت بدون پوشش

شکل (۸) تشکیل هیدروکسی‌آپاتیت بر روی داربست سرامیکی بدون پوشش در۷ و ۲۸روزرانشان می‌دهد. شکل (۸–

الف) مربوط به تشکیل هیدروکسی‌آپاتیت با بزرگنمایی ۲۰۰۰ برابر مربوط به روز ۲۸ام است که کمترین آپاتیت روی سطح داربست تشکیل شده است و شکل (۸–ب) مربوط به تشکیل هیدروکسی‌آپاتیت با بزرگنمایی ۲۰۰۰ برابر مربوط به روز ۷ام است که بیشترین میزان آپاتیت روی سطح داربست تشکیل شده است.



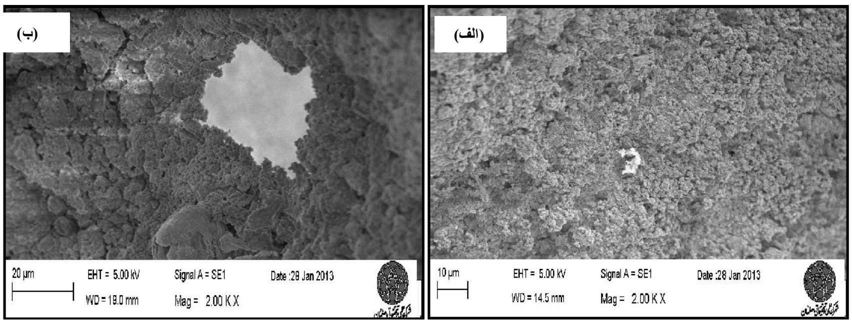
شکل۷. آنالیز XRD لایه نازک، الف) مربوط به هیدروکسی آپاتیت طبیعی[۱۰۴] ، ب) داربست nBioglass درونSBF، ج) داربست با پوشش P3HB با زمان ۱دقیقه غوطه‌وری

شکل (۹) نتایج EDXA گرفته شده از آپاتیت‌های تشکیل شده بر روی سطح داربست در هفته اول (۹–ب) وهفته چهارم (۹–الف) را نشان می‌دهد.مشاهده شده که تشکیل هیدروکسی آپاتیت از محلول SBF، مستلزم تشکیل یک فاز ابتدایی آمورف است که همان تری‌کلسیم فسفات‌دهیدراته و آمورف است که می‌توانند یون‌های $Po4^{2-}$ یا Ca^{2+} را جذب کند. همچنین دیده شده که دی‌کلسیم فسفات‌دی‌هیدراته اولین رسوبی است که تشکیل و سپس به هیدروکسی آپاتیت فقیر از کلسیم هیدرولیز می‌شود [۱۶].

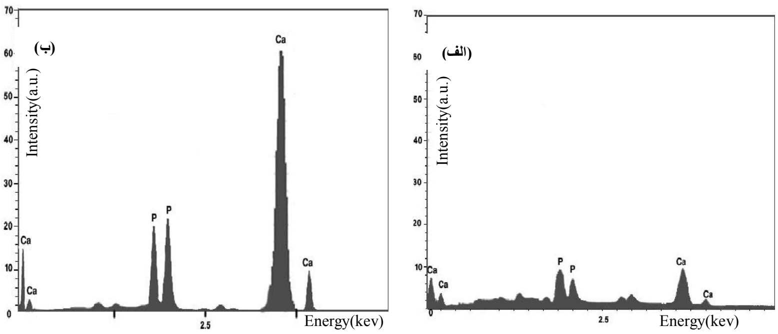
b)داربست هیدروکسی‌آپاتیت با پوششP3HB

شکل (۱۰) تشکیل هیدروکسی‌آپاتیت بر روی داربست سرامیکی با پوشش P3HB در ۷ روز و ۲۸ روز را نشان می‌دهد. شکل (۱۰–الف) مربوط به تشکیل هیدروکسی‌آپاتیت با بزرگنمایی ۵۰۰۰ برابر مربوط به روز ۲۸ام است که بیشترین آپاتیت روی سطح داربست تشکیل شده است و شکل (۱۰–ب) مربوط به تشکیل هیدروکسی‌آپاتیت با بزرگنمایی ۵۰۰۰ برابر مربوط به روز ۷ام است که کمترین میزان آپاتیت روی سطح داربست تشکیل شده است.

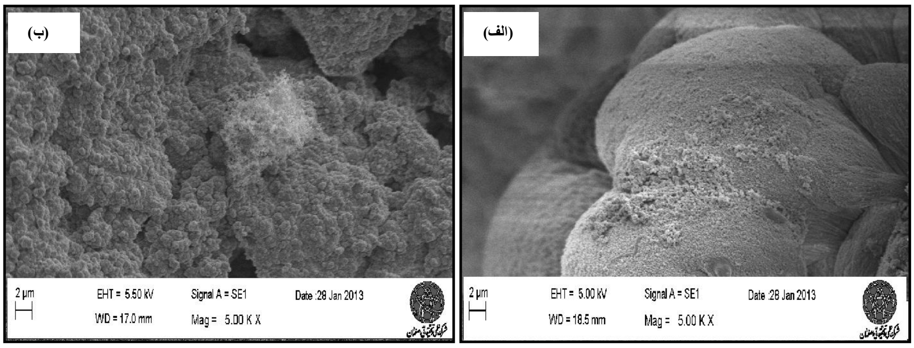
شکل (۱۱) نتایج EDXA گرفته شده از آپاتیت‌های تشکیل شده بر روی سطح داربست سرامیکی با پوشش P3HB در زمان ۱ دقیقه غوطه‌وری را در هفته اول (۱۱–ب) هفته چهارم (۱۱–الف) را نشان می‌دهد.



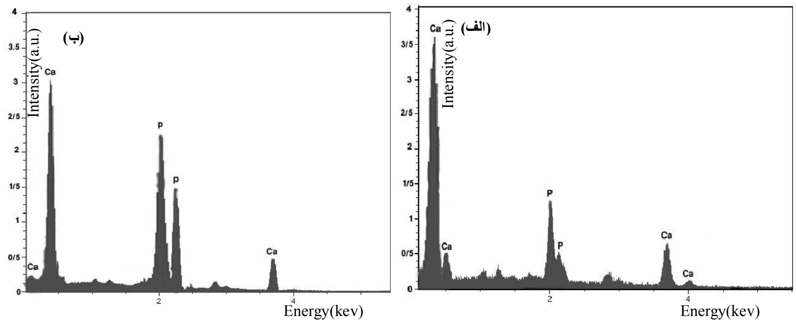
شکل ۸ تصویر SEM ذرات هیدروکسی‌آپاتیت تشکیل شده بر روی سطح داربست زیست‌فعال بدون پوشش درون SBF، الف) به مدت۲۸ روز ب)۷روز



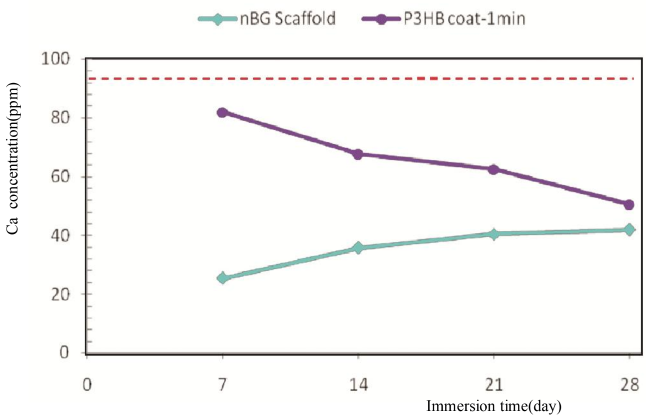
شکل ۹.آزمون EDXA هیدروکسی‌آپاتیت شکل گرفته بر روی داربست nBioglass بدون پوشش در الف) هفته چهارم و ب) هفته اول



شکل ۱۰. تصویر SEM ذرات هیدروکسی‌آپاتیت تشکیل شده بر روی سطح داربست زیست‌فعال با پوشش P3HB با زمان غوطه‌وری ۱دقیقه درون SBF، الف)به مدت۲۸روز وب) ۷ روز



شکل ۱۱. آزمون EDXA هیدروکسی‌آپاتیت شکل گرفته بر روی داربست با پوششP3HB با زمان غوطه‌وری ۱دقیقه درالف) هفته چهارم وب) هفته اول



شکل۱۲. جذب یون کلسیم محلول SBF پس از غوطه وری داربست‌ها با و بدون پوشش P3HB

۳-۸- آزمون جذب اتمی

برای بررسی میزان جذب اتم کلسیم و درصد جـذب آن توسط داربست، از دستگاه جذب اتمـی اسـتفاده شـد. در ایـن آزمون پس از خروج داربست‌ها از محلول SBF، میزان جـذب اتم کلسیم بدست آمد کـه هـر چقـدر درصـد اتـم کلسـیم در محلول بیشتر باشد نشانگر این است که جذب توسط داربست کمتر صورت گرفته و داربست از لحاظ زیست‌فعالی ضعیف‌تر می‌باشد. برای آزمون جذب اتمـی ابتـدا غلظـت یـون کلسـیم موجود در محلول SBF اولیه معادل ۹۳ppm می‌باشد (خطـوط خط چین در شکل ۱۲). سپس غلظت یون کلسیم در روزهـای ۷، ۱۴، ۲۱ و ۲۸ روز ثبت گردید.لذا نـوآوری ایـن تحقیـق در مقایسه با تحقیقات قبلی انجام شده زیست فعـالی بـالای ایـن داربست می باشد.

۴-نتیجه گیری

در این تحقیق داربست سرامیکی نانو بیوگلاس با پوشش پلیمری پلی هیدروکسی بوتیرات با استفاده از روش اسفنج پلی‌یورتان ساخته شد. نتایج FTIR وXRF و XRD نشان می‌دهد که پودر نانوشیشه زیست فعال با اندازه ذرات بین۶۵-۵۵ نانومتربه عنوان ماده زمینه داربست حاصل شد. نتایج XRD نشان داد که با توجه به استاندارد JCPDS:033-1161، داربست پس از پوشش‌دهی، در زاویه‌های ۱۴و۱۷/۱۳ درجه پیک‌هایی آشکار شده که با توجه به استاندارد، مربوط به P3HB می‌باشند که می‌توان اثبات کرد ساختار کامپوزیت

حاصل، یک داربست کامپوزیتی nBioglass/P3HB می‌باشد. اعداد جذب پیوندها در آزمون FTIR ، ایجاد پیوند هیدروژنی میان گروه های هیدروکسیل و پیوند Si-O شیشه زیست فعال و گروه های کربونیل P3HB را نشان می‌دهد و همچنین تشکیل داربست کامپوزیتی را نشان می دهد.و همچنین باتوجه به نتایج آزمونهای SEM،XRD EDXA و AAS این داربست زیست فعالی بالایی از خود نشان می‌دهد.ودر نهایت با توجه به آزمون های انجام شده وزیست فعالی جهت مهندسی بافت بهترین داربست، داربست Bioglass۳۰wt% با ۶wt% P3HB می‌باشد.

مراجع

1. C.Cnhaput, A.Selmani, C.Rivard, "Artificial scaffolding materials for tissue extracellular matrix repair", Current Opinion in Orthopaedics. 7(1) (1996) 62-68.
2. D. M. Tan, J. Li, Y. Xiao, R.Crawford," Mechanical and biological properties of hydroxyapatite/tricalcium phosphate scaffolds coated with poly(lactic-co-glycolic acid)", Acta Biomaterialia. 4 (2008) 638–645.
3. L.L. Hench , "Bioceramics: From Concept to Clinic", Journal of the American Ceramic Society. 74(7) (1991) 1487- 510.
4. J. Sehrooten, JA. Helsen, " Adhesion of bioactive glass coating to Ti6Al4V oral implant Biomaterials". 21(14) (2000) 46-191.
5. DA. Jones, "Principles and prevention of corrosion ", singapore, MacMillan Publishing Company. (1992).

۶. ع. دوست محمدی، "تهیه و مشخصه یابی پودر شیشه زیست فعال وبهینه سازی پوشش آن برای بهبود رفتار خوردگی کاشتنی فلزی بدن"، دانشکده مهندسی مواد، دانشگاه صنعتی اصفهان، ۱۳۸۵.

۷. م،رفیعی نیا، ش، بنکدار، "بیومتریال ها؛اصول وکاربردها"،انتشارات دانشگاه صنعتی امیرکبیر،۱۳۸۶.

8. S.Misra , S.Valappil, I.Roy, A.Boccaccini, "Polyhydroxyalkanoate (PHA)/inorganic phase composites for tissue engineering applications", Biomacromolecules. 7(50) (2006) 2249-2258.
9. Q.Z. Chen, A. R.Boccaccini, "Poly(dl-lactide) coated 45S5 Bioglass®-based scaffolds: Processing and Characterisation", J. Biomed Mater Res. 77A (2006) 445-452.
10. R.K. Nalla, J.H.Kinney, R.O.Ritchie, "Mechanistic Fracture Criteria for the Failure of Human Cortical Bone", Nature Mater. 2 (2003) 164-168.

۱۱. م.منتظری، س.کرباسی، "ارزیابی خواص فیزیکی و مکانیکی داربست سرامیکی متخلخل شیشه زیست‌فعال 45S5 "مجله مواد وفناوری های پیشرفته،زمستان ۱۳۹۱.

12. Z. Qizhi Chen, D. Ian Thompson, R. Aldo Boccaccini, " 45S5 Bioglass-derived glass–ceramic scaffolds for bone tissue engineering", Imperial College London. (2005) 1-12.
13. T. Kokubo, H. Takadama, "How useful is SBF in predicting in vivo bone bioactivity?", Biomaterials. 27 (2006) 2907–2915.
14. A. Monshi, M.R. Foroughi, M.R. Monshi, "Modified Scherrer Equation to Estimate More Accurately Nano-Crystallite Size Using XRD", World Journal of Nano Science and Engineering. 2[3] (2012) 154-160.
15. SH.Oh, K. Park, JM. Kim, JH. Lee, "In vitro and in vivo characteristics of PCL Scaffolds with pore size gradient fabricated by a centrifugation method ", Biomaterials. 28(9) (2007) 1664-1671.
16. Meyer U,Weisman HP."Bone and Cartiage Engineering".Gabriele Schroder, Heidelberg(Eds). Germany. Springer.1 (2006) 6-10.