



مقاله کامل پژوهشی

ساخت داربست های آپاتیتی نانوساختار به روش ریخته گری انجمادی برای مهندسی بافت استخوان

شکوفه برهان^{۱*}، جواد اسماعیلزاده^۲

^۱ استادیار، گروه مهندسی مواد، شیمی و پلیمر، دانشگاه بین المللی امام خمینی (ره) - مرکز آموزش عالی فنی و مهندسی بوئین زهرا، بوئین زهرا، قزوین، ایران
^۲ استادیار، دانشکده مهندسی مواد و شیمی، مجتمع آموزش عالی فنی و مهندسی اسفراین، اسفراین، خراسان شمالی، ایران

تاریخچه مقاله:

ثبت اولیه: ۱۳۹۹/۰۷/۱۹

دریافت نسخه اصلاح شده: ۱۳۹۹/۰۹/۰۴

پذیرش قطعی: ۱۴۰۰/۰۶/۱۴

کلیدواژه ها:

کلسیم فسفات،

ریخته گری انجمادی،

ماکروتخلخل،

نانوساختار

چکیده حضور ماکروتخلخل ها در داربست ها، علاوه بر افزایش سرعت جذب، باعث فراهم آمدن ساختاری برای رشد سلول های استخوانی و ایجاد استخوان جدید با ساختار کامل و یکنواخت می شود. در این پژوهش، پودر سیمان کلسیم فسفات، با مخلوطی از تتراکلسیم فسفات و دی کلسیم فسفات دوآبه، تهیه شد. برای به دست آوردن سوسپانسیون پایدار، پودر سیمان، با نسبت پودر به مایع ۰/۵ گرم بر میلی لیتر، با آب یون زدایی شده، مخلوط شد و ۳ درصد وزنی دولایپیکس جامد و ۴ درصد وزنی پلی وینیل الکل (PVA) جامد به سوسپانسیون اضافه شد. داربست ها، به روش ریخته گری انجمادی تهیه شدند. متوسط اندازه ذرات پودر سیمان، ۵/۴۵ میکرومتر تخمین زده شد. بررسی میکروسکوپ الکترونی رومیزی (SEM) نشان داد که ساختار، حاوی تخلخل هایی در محدوده ۱۰۰ تا ۳۰۰ میکرومتر است و بعد از قرارگیری داربست ها در محلول شبیه به مایعات بدن، آپاتیت نانوساختار، روی دیواره تخلخل ها تشکیل شد. استحکام فشاری نمونه ها بین ۱/۲ تا ۲/۲ مگاپاسکال اندازه گیری شد. تکثیر سلولی نشان داد با گذشت زمان، تعداد سلول های شمارش شده روی سطح نمونه ها، تقریباً سه برابر شده است.



<https://doi.org/10.30501/jamt.2021.251760.1130>

URL: https://www.jamt.ir/article_126413.html

Original Research Article

Journal of Advanced Materials and Technologies (JAMT): Vol. 10, No. 2, (Summer 2021), 21-31

Fabrication of Nanostructured Apatite Scaffolds by Freeze-Casting Method for Bone Tissue Engineering

Shokoufeh Borhan^{1*}, Javad Esmaeilzadeh²

¹ Assistant Professor, Department of Materials, Chemical and Polymer Engineering, Imam Khomeini International University-Buin Zahra Higher Education Center of Engineering and Technology, Buin Zahra, Qazvin, Iran

² Assistant Professor, Department of Material and Chemical Engineering, Esfarayen University of Technology, Esfarayen, North Khorasan, Iran

Paper History:

Received: 2020-10-10

Revised in revised form: 2020-11-24

Accepted: 2021-09-05

Abstract

The presence of macropores in the scaffolds, in addition to increasing the rate of adsorption, provides a structure for the growth of osteoblasts and promote the formation of new bone with a complete and uniform structure. In this study, calcium phosphate powder was prepared by mixing tetra calcium phosphate and dicalcium phosphate dihydrated. To achieve stable suspension cement powder was mixed with deionized

*عهده دار مکاتبات

نشانی: ایران، قزوین، بوئین زهرا، دانشگاه بین المللی امام خمینی (ره) - مرکز آموزش عالی فنی و مهندسی بوئین زهرا، گروه مهندسی مواد، شیمی و پلیمر، تلفن:

پیام نگار: shkfborhan@bzte.ac.ir

- دورنگار: ۰۹۱۲۷۸۴۷۱۲۶

Please cite this article as: Borhan, Sh., Esmaeilzadeh, J., "Fabrication of nanostructured apatite scaffolds by freeze-casting method for bone tissue engineering", *Journal of Advanced Materials and Technologies (JAMT)*, Vol. 10, No. 2, (2021), 21-31. (<https://doi.org/10.30501/jamt.2021.251760.1130>).



Keywords:Calcium Phosphate,
Freeze Casting,
Macro Porous,
Nanostructure

water at powder to liquid ratio of 0.5 g/mL and 3 wt % of dispersant factor, dolapix, and 4 wt % of polyvinyl alcohol were added to suspension. Scaffolds were prepared by freeze-casting method. The average particle size of cement powder was estimated to be 5.45 μm . SEM micrographs indicate that created pores in the structure are in the range of 100-300 μm . Nanostructure apatite is formed on the wall of pores after soaking in SBF. Compressive strength of samples was measured between 1.2 to 2.2 MPa. Cell numbers on the surface of the samples are tripled over time.


<https://doi.org/10.30501/jamt.2021.251760.1130>
[URL: https://www.jamt.ir/article_126413.html](https://www.jamt.ir/article_126413.html)
۱- مقدمه

هیدروکسی آپاتیت^۱ (HA) به دسته‌ای از زی‌سرامیک‌ها^۲ برپایه کلسیم فسفات گفته می‌شود که به علت تشابه شیمیایی و ساختاری به فاز معدنی استخوان طبیعی، به عنوان پیوند استخوان به کار می‌رود [۱ و ۲]. از آنجایی که HA، پیوند شیمیایی قوی‌ای با بافت استخوان میزبان برقرار می‌کند، به منزله ماده پیوند استخوانی خوب شناخته شده است. HA، نه تنها زیست فعال است، بلکه زیست سازگار و غیرسمی و دارای قابلیت هدایت رشد استخوان^۳ نیز هست و ساختار بلورشناسی آن، مشابه قسمت کانی استخوان با میزان کربنات مناسب است. درواقع، زیست سازگاری از مهم ترین خواص هیدروکسی آپاتیت، به معنای فقدان آثار سمی در عملکرد زیستی است که به توپوگرافی سطحی و بیوشیمی ماده بستگی دارد. زیست فعالی نیز، به معنای توانایی برقراری پیوند شیمیایی مستقیم با سلول‌های بدن است. به عبارتی، این ماده توانایی آن را دارد که وقتی در محیط بدن قرار می‌گیرد، بازسازی بافت استخوان از دست رفته را تسهیل و ترغیب کند [۳ و ۴].

اخیراً هیدروکسی آپاتیت در مقیاس نانو (۱۰ تا ۱۰۰ نانومتر)، نسبت به نمونه متناظر در مقیاس میکرون، کاربرد بیشتری پیدا کرده است، که به علت خواص عملکردی برتر آن، به ویژه واکنش پذیری سطحی و ساختار بسیار ریز، دارای ویژگی بسیار مهم برهم کنش پیوند با بافت است. در چند سال گذشته، تلاش‌های پژوهشی ویژه‌ای برای تهیه HA و کامپوزیت‌هایش در مقیاس نانو برای دستیابی به ساختارهای بسیار ریز با خواص فیزیکی، مکانیکی، شیمیایی و زیستی بهتری نسبت به میکرو HA و مشابه با فاز معدنی استخوان انجام شده است. ثابت شده است که HA، در مقیاس نانو، در مقایسه با نوع میکرونی آن، موجب چسبندگی سلول‌های

استخوانی^۴ (استئوبلاست‌ها)، تمایز و تکثیر آن‌ها، رسوب دهی کانی‌های حاوی کلسیم و تشکیل بافت استخوان تازه در زمانی کوتاه می‌شود [۵].

رشد بافت استخوانی، در داخل کاشتنی^۵ HA متخلخل، باعث تثبیت کاشتنی در محل کاشت می‌شود. پس از این که بافت به طور کامل در کاشتنی رشد کرد، کاشتنی، شامل ۱۷ درصد استخوان، ۴۳ درصد بافت نرم و ۴۰ درصد HA باقی مانده خواهد بود. اگرچه این نوع کاشتنی با سرعت بسیار اندک (حدود ۱ درصد در سال) جذب می‌شود، باید آن را نوعی زیست ماده^۶ غیر قابل جذب دانست [۶]. اگر تخلخل‌هایی با اندازه کمتر از حدود ۵۰ میکرومتر در کاشتنی وجود داشته باشد، بافت نمی‌تواند به داخل آن رشد کند. تخلخل‌هایی با اندازه بین ۱ تا ۵۰ میکرومتر، محل مناسبی برای حضور و رشد باکتری در کاشتنی خواهند بود. از آنجا که اندازه درشت خوارها^۷، به مراتب، بزرگتر از ۵۰ میکرومتر است، این سلول‌ها، توانایی دفع و پاک کردن کاشتنی از باکتری‌های تجمع یافته در حفرات کمتر از ۵۰ میکرومتر را ندارند. اما اگر اندازه تخلخل‌ها بیشتر از ۵۰ میکرومتر باشد، بافت می‌تواند داخل کاشتنی رشد کند و درشت خوارها نیز توان حضور در آن را خواهند داشت. بنابراین، امکان عفونت در کاشتنی‌های متخلخل با اندازه بیشتر از ۵۰ میکرومتر، کمتر است [۷]. حضور ماکروتخلخل‌هایی با اندازه مناسب (۵۰ تا ۲۵۰ میکرومتر)، به منظور تداوم رشد استخوان در درون کاشتنی، اهمیت فراوانی دارد [۸]. اندازه تخلخل‌ها، از مهم ترین پارامترها در بحث رشد استخوان داخل کاشتنی است. رشد استخوان، زمانی امکان پذیر است که اندازه تخلخل‌ها در حد چند صد میکرومتر باشد. چنانچه اندازه تخلخل‌ها بین ۵۰ تا ۱۰۰ میکرومتر باشد، رشد بافت نسبتاً متبلور، با ساختار

⁴ Osteoblasts⁵ Implant⁶ Biomaterial⁷ Macrophase¹ Hydroxyapatite² Bioceramics³ Osteoconductivity

روش ریخته‌گری انجمادی است [۱۵-۱۱]. با این روش، امکان تولید فوم‌هایی شدیداً متخلخل، با تخلخل‌هایی بیش از ۹۰ درصد و توانایی کنترل اندازه حفرات در محدوده ۲۰ تا ۲۰۰ میکرومتر میسر خواهد شد [۱۶]. این فرایند، شامل مراحل متعددی است که اولین مرحله آن، انحلال سرامیک در حلالی مناسب است تا محلول همگن و یکنواختی به دست آید. محلول امولسیون به دست آمده، درون قالب ریخته و توسط نیتروژن مایع، تبرید می‌شود. در نهایت، نمونه‌های آماده شده، به درون خشک‌کن انجمادی، انتقال می‌یابند تا حلال باقی مانده، از داربست خارج شود. پس از تصعید حلال، داربستی متخلخل از مواد سرامیکی، به جای می‌ماند. ریخت‌شناسی^۲ تخلخل‌های ایجاد شده، به عوامل متعددی، مانند غلظت سوسپانسیون اولیه و سرعت سرمایش، بستگی دارد. به منظور کنترل ساختار نهایی داربست، می‌توان از عوامل پراکنده‌ساز استفاده کرد. پایداری دوغاب، باید به دقت کنترل شود تا از هرگونه جدایش در مرحله انجماد که باعث شیب چگالی و تخلخل می‌شود، جلوگیری شود. این موضوع، به خصوص درباره دوغاب‌های رقیق، مهم است. حضور چسب، برای استحکام بخشی به قطعه خام، بعد از مرحله تصعید نیز، بسیار مهم است [۱۷ و ۱۸].

تاکنون، در کارهای پژوهشی مختلف، تشکیل آپاتیت نانوساختار، روی سیمان‌های کلسیم فسفاتی، بررسی شده است [۲۲-۱۹]، اما ساخت داربست‌هایی از نانوبلورهای هیدروکسی آپاتیت که دارای ماکروتخلخل‌های منظم در ابعاد مناسب برای رشد سلول باشند، تا به حال بررسی نشده است. هدف از انجام این پژوهش، ساخت داربست آپاتیتی نانوساختار ماکرومتخلخل، به روش ریخته‌گری انجمادی، از پودر سیمان کلسیم فسفات و بررسی خواص ساختاری، مکانیکی و زیستی آن‌هاست. در این داربست، تبدیل واکنشگرها به آپاتیت نانوساختار، در محیط شبیه به مایعات بدن، در روزهای مختلف، ارزیابی می‌شد.

۲- روش تحقیق

۲-۱- سنتز پودر سیمان کلسیم فسفات

استخوانی که کامل نیست، اتفاق می‌افتد. حال آن‌که اگر اندازه تخلخل‌ها کمتر از ۵۰ میکرومتر باشد، فقط بافت نرم در تخلخل‌ها نفوذ می‌کند [۹].

اخیراً تلاش‌هایی برای ایجاد ماکروتخلخل در کلسیم فسفات‌های مختلف، مانند هیدروکسی آپاتیت، بتاتری کلسیم فسفات^۱ و سیمان‌های کلسیم فسفاتی، انجام شده است. برای نمونه، سیمان‌های فسفات کلسیم آپاتیتی، به منظور افزایش سرعت جذب، از طریق فراهم آوردن کانال‌هایی برای گذر سلول‌های استخوانی و نیز بستری برای رشد استخوان داخل کاشتنی، ماکروتخلخل‌هایی را در سیمان به وجود می‌آورند. به عبارت دیگر، میکروتخلخل‌ها در ریزساختار سیمان، به فرایند جذب سیمان کمک می‌کند، حال آن‌که ماکروتخلخل‌ها، علاوه بر افزایش نرخ حلالیت سیمان در سازوکار جذب، باعث فراهم آمدن ساختاری برای رشد و حرکت سلول‌های استخوانی در کاشتنی و ایجاد استخوان جدید با ساختار کامل و یکنواخت می‌شوند [۹].

البته، ایجاد ماکروتخلخل در سیمان، باعث افت استحکام مکانیکی می‌شود، به طوری که اگر استحکام کششی سیمان بدون تخلخل، ۱۰ مگاپاسکال باشد، با ایجاد ۳۸ درصد تخلخل در سیمان، استحکام آن به ۱/۵ مگاپاسکال می‌رسد [۱۰]. اگرچه استحکام داربست‌های سیمان‌های کلسیم فسفاتی ماکرومتخلخل، بسیار اندک است، مشخص شده است که این محدودیت، نمی‌تواند از به کارگیری این دسته از داربست‌ها در بازسازی استخوان جلوگیری کند؛ چراکه اگر این داربست‌ها بتوانند ساختار یک لایه از بافت را تا تشکیل عروق جدید و رشد استخوان تحمل کنند، استحکام بلندمدت آن‌ها اهمیت کمتری می‌یابد و ویژگی قابلیت جذبشان، مهم‌تر خواهد بود. پژوهشگران به این نتیجه رسیده‌اند که ایجاد ماکروتخلخل در سیمان فسفات کلسیم، می‌تواند باعث افزایش سرعت جذب سیمان و جایگزینی استخوان جدید در کاشتنی شود. تاکنون روش‌های متعددی با هدف تولید داربست‌های متخلخل برای کاربردهای مختلف مهندسی بافت استخوان بررسی شده‌اند که هر کدام، مزایا و محدودیت‌های خاص خود را دارند. از روش‌های رایج در تولید داربست‌های متخلخل، استفاده از

² Morphology

¹ Beta-Tricalcium Phosphate

برای تهیه هر داربست، مقدار ۵ میلی‌لیتر از سوسپانسیون تهیه‌شده، درون قالب استوانه‌ای پلی‌اتیلنی با قطر ۲۰ میلی‌متر ریخته شد. این قالب، در تماس مستقیم با صفحه مسی که قسمت سردکننده دستگاه است و دمای آن با نیتروژن مایع کنترل می‌شود، قرار دارد. سرعت معمول سرمایش بین ۰/۵ تا ۵ درجه سلسیوس بر دقیقه است [۲۳] که برای این سوسپانسیون، سرعت سرمایشی معادل ۲ درجه سلسیوس بر دقیقه انتخاب شد. بعد از انجماد کامل، نمونه‌های ریخته‌گری‌شده، از قالب جدا شدند و داخل خشک‌کن انجمادی^۷ (beta 1-2LD plus marin Christ Gmbtt- Germany)، با فشار ۲/۱ پاسکال و دمای ۵۵- درجه سلسیوس، به مدت ۷۲ ساعت، قرار داده شدند. آب موجود در نمونه‌ها، تصعید شد و بدنه سرامیکی خام به دست آمد.

داربست‌های تهیه‌شده، به مدت ۲ روز در حمام آب با دمای ۳۷ درجه سلسیوس و رطوبت ۱۰۰ درصد، قرار داده شدند. سپس، به منظور تشکیل آپاتیت نانوساختار، به مدت ۱، ۳، ۷ و ۱۴ روز، درون محلول شبیه‌سازی‌شده بدن^۸ (SBF) غوطه‌ور شده و در اینکوباتور^۹ (EHRET KBK 4200) ۳۷ درجه سلسیوس نگهداری شدند. ساخت محلول شبیه مایعات بدن، طبق روش کوکوبو^{۱۰}، انجام شد [۲۴]. SBF هر نمونه، هر ۲۴ ساعت، تعویض شد.

۲-۳- توزیع اندازه ذرات پودر کلسیم فسفات سنتز شده

توزیع اندازه ذرات پودر سیمان آپاتیتی که شامل اجزاء اصلی تتراکلسیم فسفات و دی‌کلسیم فسفات دواژه بودند، با استفاده از روش تحلیل اندازه ذرات با لیزر^{۱۱} (LPSA) و از طریق دستگاه FRITSCH PARTICL SIZE ANALYSER ۲۲، تعیین شد. با توجه به این‌که این مواد در آب دارای حلالیت جزئی هستند، استون، به منزله محیط واسطه، برای اندازه‌گیری اندازه ذرات، انتخاب شد.

۲-۴- بررسی مشخصات داربست‌های تهیه‌شده

پودر سیمان کلسیم فسفات، به روش واکنش حالت جامد تهیه شد [۱۵]. برای سنتز تتراکلسیم فسفات^۱ (TTCP)، مخلوطی از یک مول کربنات کلسیم (Merck 2069) و یک مول دی‌کلسیم فسفات^۲ بدون آب (مونیتیت)^۳ (Merck 2144)، به مدت ۱ ساعت، در آسیاب سیاره‌ای (SV015IG5-1)، با سرعت ۱۸۰ دور در دقیقه، همگن شد. مخلوط حاصل، به مدت ۶ ساعت، درون کوره الکتریکی (AZAR FURNACES Co.)، PA 8, F2L-1500، المنت (SiC) با دمای ۱۵۰۰ درجه سلسیوس نگهداری شد. سپس، محصول در دمای محیط، سردایش شد. کلوخه‌های به دست آمده، با هاون عقیق، خرد و از الک مش ۱۰۰، عبور داده شد. در ادامه، تتراکلسیم فسفات حاصل و دی‌کلسیم فسفات دواژه (براشیت)^۴ (Merck 2146)، به نسبت مولی ۱:۱ و به مدت ۱ ساعت در آسیاب ماهواره‌ای با سرعت ۲۰۰ دور در دقیقه مخلوط شدند تا پودر سیمان همگن و نسبتاً ریزی به دست آید. محصول، برای ذخیره‌سازی و جلوگیری از نفوذ رطوبت، در محفظه‌ای سربسته، نگهداری شد.

۲-۲- تهیه داربست‌های آپاتیتی ماکروتخلخل نانوساختار

سوسپانسیون استفاده‌شده در روش ریخته‌گری انجمادی باید طی فرایند یخ‌زدن، پایداری کافی داشته باشد و ذرات جامد در آن ته‌نشین نشوند تا داربستی یکنواخت، به دست آید. بدین منظور، پودر سیمان، با نسبت پودر به مایع ۰/۵ گرم بر میلی‌لیتر، با آب یون‌زدایی‌شده، مخلوط شد و به میزان ۳ درصد وزنی ماده جامد عامل پراکنده‌ساز دولاپیکس^۵ P62، اضافه شد. سوسپانسیون حاصل، روی همزن، به مدت ۲۰ دقیقه، هم‌زده شد تا یکنواختی لازم به دست آید. به منظور استحکام بخشی اولیه داربست‌ها، ۴ درصد وزنی ماده جامد پلی وینیل الکل^۶ (PVA)، به سوسپانسیون در حال هم‌زدن اضافه شد. با استفاده از محلول NaOH یک مولار، pH سوسپانسیون، در مقدار ۱۰، ثابت شد. سپس، با استفاده از دسیکاتور خلاء، سوسپانسیون حاصل، حباب‌زدایی شد.

¹ Tetracalcium Phosphate

² Dicalcium Phosphate

³ Montith

⁴ Brashit

⁵ Dolapix

⁶ Polyvinyl Alcohol

⁷ Freeze Dryer

⁸ Simulated Body Fluid

⁹ Incubator

¹⁰ Kokubo

¹¹ Laser Particle Size Analysis

۲-۴-۱- ترکیب فازی

شبیه به مایعات بدن، با استفاده از دستگاه تعیین خواص مکانیکی (Crop, canton Instron 5565) و با سرعت حرکت فک ۱ میلی‌متر در دقیقه، اندازه‌گیری شد. چهار نمونه، از هر ترکیب سیمان، آزمایش شد.

۲-۴-۵- ریخت‌شناسی سلولی

پس از تثبیت سلول‌های زنده روی سطح نمونه‌ها، ریخت‌شناسی آن‌ها و نیز چگونگی چسبندگی آن‌ها به سطح، پس از ۲ و ۷ روز قرارگیری در محیط کشت، با میکروسکوپ الکترونی روبشی (Stero Scan S360 Cambridge) بررسی شد. برای آماده‌سازی نمونه‌ها، لایه بسیار نازکی از طلا، به‌عنوان پوشش هادی و به روش کندوپاش، روی سطح نمونه‌ها نشانده شد و سپس، سطح نمونه، توسط الکترون‌های ثانویه، مطالعه شد.

۲-۴-۶- تکثیر سلولی

برای بررسی ویژگی‌های زیستی داربست‌ها، سلول‌های استخوانی، از فک نوزاد موش، استخراج شد و در محیط کشت Dulbecco modified Eagle medium, Gibco-) DMEM (BRL, Life Technologies, Grand Island, NY حاوی ۱۵ درصد سرم جنین گاوی و ۱۰۰ واحد بر میلی‌لیتر پنی‌سیلین، در اینکوباتور با اتمسفر ۹۵ درصد هوا و ۵ درصد دی‌اکسید کربن، به‌مدت یک هفته، کشت داده شد. برای بررسی تکثیر سلولی، از روش MTT استفاده شد. به این ترتیب که نمونه‌ها، با استفاده از ۷۰ درصد اتانول، استریل‌سازی شده و سلول‌های استخوانی، روی سطح آن‌ها، با غلظت 10^4 سلول در سطح، کشت داده شدند. مجموعه نمونه - سلول، ابتدا، درون ظرف کشت ۲۴ خانه‌ای قرار داده شد و سپس، به‌مدت ۳ ساعت، درون اینکوباتور قرار داده شد تا سلول‌ها به نمونه‌ها بچسبند و ۳۰ میلی‌لیتر دیگر محیط کشت به هر خانه، اضافه شد. آن‌گاه، مجموعه نمونه - سلول، در اینکوباتوری با دمای ۳۷ سلسیوس و رطوبت ۱۰۰ درصد و اتمسفر ۹۵ درصد هوا-۵ درصد دی‌اکسید کربن، در فاصله‌های زمانی ۲ و ۷ روز، قرار داده شد. در این مدت، محیط کشت، هر سه روز یک‌بار، تعویض شد. محلول MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl-)، توسط سلول‌های زنده، جذب

به‌منظور شناسایی نوع فازهای تشکیل‌شده روی داربست‌های تهیه‌شده، قبل از غوطه‌وری در SBF و بعد از غوطه‌وری به‌مدت ۱، ۳، ۷ و ۱۴ روز، آزمایش پراش پرتو ایکس^۱ (XRD) انجام گرفت. الگوی پراش، با استفاده از پراش‌سنج پرتو X مدل Philips PW 3710 با آند Cu و فیلتر Ni و با طول موج ۱/۵۴ انگستروم تابش $Cu-K\alpha$ ، در ولتاژ KV ۴۰ و جریان ۳۰ mA به‌دست آمد. الگوی XRD نمونه‌ها در محدوده زاویه 2θ ، ۲۰ تا ۵۰ درجه ثبت شد.

۲-۴-۲- گروه‌های ساختاری

به‌منظور مطالعه پیوندها و گروه‌های شیمیایی موجود در داربست‌های تهیه‌شده، قبل از غوطه‌وری و ۱۴ روز بعد از غوطه‌وری، ۱۰ میلی‌گرم از پودر مورد نظر، با ۸۰۰ میلی‌گرم KBr مخلوط و به شکل قرص شفاف KBr، پرس شد. طیف فروسرخ با استفاده از طیف‌سنج مادون قرمز BRUKER VECTOR 33، در محدوده $4000-400\text{ cm}^{-1}$ با توان تفکیک^۲ 2 cm^{-1} ، اندازه‌گیری شد.

۲-۴-۳- ریزساختار

ریخت‌شناسی سطح نمونه‌های سیمانی، توسط میکروسکوپ الکترونی روبشی^۳ (Stereoscan S360-) (Cambridge 1990) با ولتاژ شتاب‌دهنده ۲۰ کیلوولت، بررسی شد. در ابتدا، به‌دلیل هدایت الکتریکی ضعیف نمونه‌ها، لایه بسیار نازکی از طلا، به روش کندوپاش، روی نمونه‌ها نشانده شد و سپس، مشاهدات ریزساختاری، در بزرگ‌نمایی‌های مختلف، انجام گرفت. اندازه‌گیری تخلخل‌ها روی تصاویر SEM، توسط نرم‌افزار ImageJ، انجام شد [۲۵-۲۷].

۲-۴-۴- استحکام فشاری

نمونه‌های استوانه‌ای شکل با قطر ۱۵ میلی‌متر و ارتفاع ۲۰ میلی‌متر، تهیه شدند. استحکام فشاری نمونه‌ها، قبل از غوطه‌وری و بعد از ۱، ۳، ۷ و ۱۴ روز غوطه‌وری در محلول

^۱ X-Ray Diffraction

^۲ Resolution

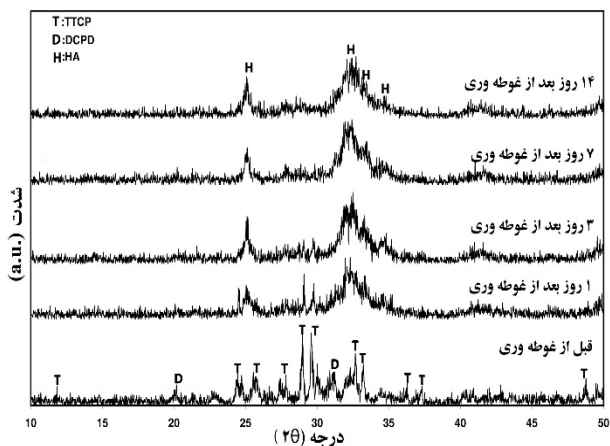
^۳ Scanning Electron Microscopy

این‌که حضور ذرات بزرگ و آگلومره، برای ساختار نهایی، محدودکننده است [۱۶]. پودر سیمان تهیه‌شده، دارای اندازه ذرات زیر میکرون بود و منحنی توزیع اندازه ذرات، مشخص کرد که ذرات آگلومره شده در پودر وجود ندارند. این امر، موجب رسیدن به پایداری مناسب در سوسپانسیون شد.

۳-۲- ترکیب فازی، گروه‌های ساختاری و ریزساختار داربست‌های آپاتیتی ماکرومتخلخل

۳-۲-۱- ترکیب فازی

شکل ۲، الگوهای XRD به‌دست‌آمده از داربست‌های تهیه‌شده از پودر سیمان را نشان می‌دهد. در نمونه قبل از غوطه‌وری، تمام پیک‌های مشاهده شده، مربوط به تتراکلسیم فسفات (JCPDS 25-1137) و دی‌کلسیم فسفات دی‌هیدرات (JCPDS 09-0077) است. با توجه به این الگو، هیچ‌گونه فاز ناخالص قابل تشخیصی، با این روش، در پودر سیمان وجود ندارد. بعد از ۱ روز غوطه‌وری در SBF، از مقدار فاز تتراکلسیم فسفات و دی‌کلسیم فسفات بدون آب، کاسته شده است و فاز آپاتیت تشکیل شده است. با افزایش زمان غوطه‌وری، فازهای TTCP و DCPA کاملاً حذف شده‌اند و بر شدت پیک آپاتیت (JCPDS 09-0432)، اضافه شده است. بعد از ۱۴ روز غوطه‌وری، آپاتیت تنها فاز موجود در سیمان است. پیک پهن موجود در الگوهای XRD، نشان‌دهنده بلورینگی کم فاز آپاتیت تشکیل شده و همچنین نانومتری بودن اندازه بلورهای این فاز است.



شکل ۲. الگوی پراش پرتو X داربست تهیه‌شده، قبل از غوطه‌وری و

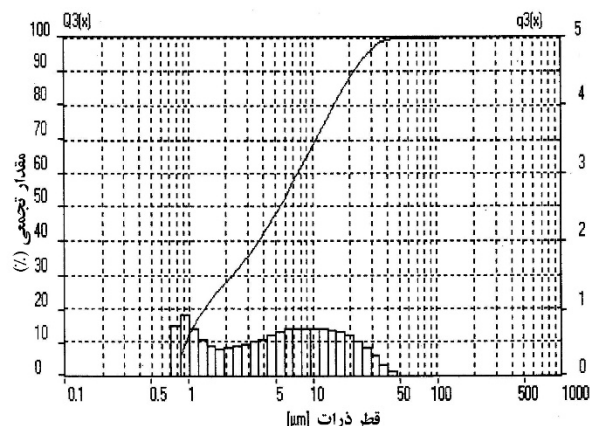
بعد از ۱، ۳، ۷ و ۱۴ روز غوطه‌وری در SBF

شده و باعث رسوب فورمازون توسط سلول‌ها می‌شود. بلورهای فورمازون، در محلول دی‌متیل سولفوکساید، حل شد و دانسیته نوری محلول، توسط طیف‌سنج نوری^۱ (Bio-TEK Elx 800, Highland park, USA)، در طول موج ۵۷۰ نانومتر، اندازه‌گیری شد و سپس، با استفاده از منحنی واسنجی^۲، با تعداد سلول‌های مشخص، تعداد سلول‌ها روی سطح نمونه، تعیین شد.

۳- نتایج و بحث

۳-۱- اندازه ذرات پودر سیمان کلسیم فسفات سنتز شده

متوسط اندازه ذرات پودر سیمان، متشکل از دی‌کلسیم فسفات دی‌هیدرات^۳ (DCPD) و تتراکلسیم فسفات (TTCP)، ۵/۴۵ میکرومتر تخمین زده شد. همان طوری که در منحنی توزیع اندازه ذرات پودر، در شکل ۱ مشاهده می‌شود، ۹۰ درصد ذرات، اندازه‌ای کمتر از ۲۱ میکرومتر داشتند. به‌منظور جلوگیری از ته‌نشینی فاز جامد حین فرایند ریخته‌گری، پایداری سوسپانسیون باید به‌دقت کنترل شود؛ زیرا عدم پایداری سوسپانسیون، موجب گرادیان دانسیته و تخلخل در نمونه می‌شود. وجود چسب برای استحکام بخشی به نمونه، بعد از تصعید، لازم است.



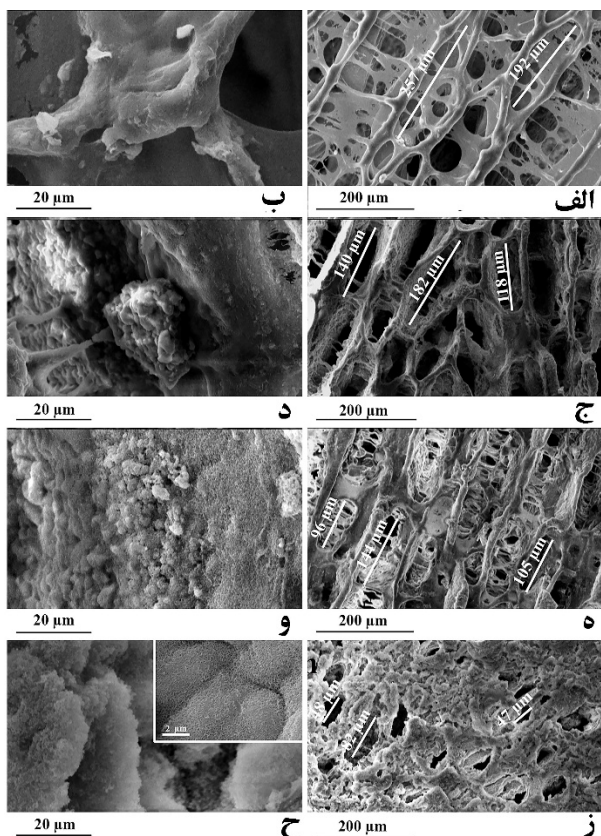
شکل ۱. منحنی توزیع اندازه ذرات پودر سیمان سنتز شده

برای ایجاد ساختار هموزن و پایدار، پودری با اندازه ذرات متوسط، در محدوده زیر میکرون، مناسب است. ضمن

^۱ Spectrophotometer

^۲ Calibration

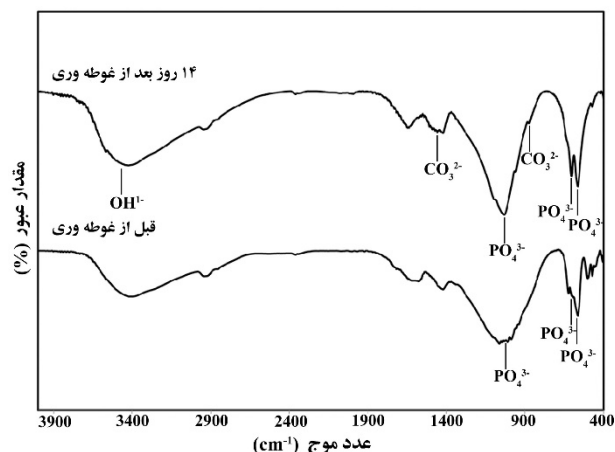
^۳ Dicalcium Phosphate Dihydrate



شکل ۴. تصاویر SEM در بسته‌های نانو ساختار ماکرومتمخلخل: الف و ب) قبل از غوطه‌وری؛ ج و د) بعد از ۱ روز؛ ه و و) بعد از ۳ روز و ز و ح) بعد از ۱۴ روز غوطه‌وری در بزرگ‌نمایی‌های مختلف

قرارگیری نمونه‌ها در SBF و تشکیل آپاتیت روی سطح آن‌ها، باعث کاهش اندازه تخلخل‌ها شده است، به‌طوری که اندازه تخلخل در نمونه قبل از غوطه‌وری و بعد از ۱۴ روز غوطه‌وری، از حدود ۱۹۲ میکرومتر به ۴۸ میکرومتر رسیده است. در بزرگ‌نمایی بالاتر، ریخت‌شناسی سطح دیواره تخلخل‌های نمونه‌های مختلف در مقایسه با یکدیگر، نشان داده شده است. هیچ رسوب آپاتیتی، روی سطح داربست، قبل از غوطه‌وری در SBF، وجود ندارد. درحالی‌که تشکیل رسوب جزئی در شکل‌های ۴-د، ۴-و و ۴-ح دیده می‌شود که ریخت‌شناسی توپی شکل، گواه تشکیل رسوب آپاتیتی است [۲۹]. سرانجام، پس از ۷ روز غوطه‌وری، این رسوب آپاتیتی کامل می‌شود، به‌طوری که در بزرگ‌نمایی ۱۰۰۰۰ برابر (گوشه بالایی تصویر ۴-ح)، نانوبلورهای سوزنی‌شکل آپاتیت، قابل رؤیت هستند.

در همه نمونه‌ها، بعد از غوطه‌وری، ریزساختار توپی‌شکلی، شامل نانوبلورهای که تنگاتنگ در هم پیچیده



شکل ۳. الگوی FTIR داربست تهیه شده، قبل از غوطه‌وری و ۱۴ روز بعد از غوطه‌وری در SBF

۳-۲-۲- گروه‌های ساختاری

شکل ۳، طیف FTIR نمونه‌ها را قبل و بعد از ۱۴ روز غوطه‌وری، نشان می‌دهد. جذب ایجادشده در عدد موج‌های ۵۶۵، ۵۶۵ و 1070 cm^{-1} ، مربوط به گروه فسفات است که در هر دو نمونه دیده می‌شود. پیک ایجادشده در عدد موج 1448 cm^{-1} ، به کربنات کلسیم نسبت داده می‌شود که در داربست ساخته‌شده، با شدت زیاد، بعد از ۴۸ ساعت قرارگیری در حمام آبی، دیده می‌شود و ناشی از کربنات دوپ‌شده در شبکه هیدروکسی آپاتیت است. شانه ایجادشده در عدد موج 870 cm^{-1} ، مربوط به کربنات جانشین‌شده در آپاتیت است که مؤید نکته فوق است و کربناتی‌بودن آپاتیت را تأیید می‌کند. ایجاد هیدروکسی آپاتیت، بر اثر غوطه‌ورکردن نمونه‌ها در SBF، با حضور پیک مربوط به OH موجود در شبکه هیدروکسی آپاتیت، در حوالی 3500 cm^{-1} نیز تأیید می‌شود [۲۸].

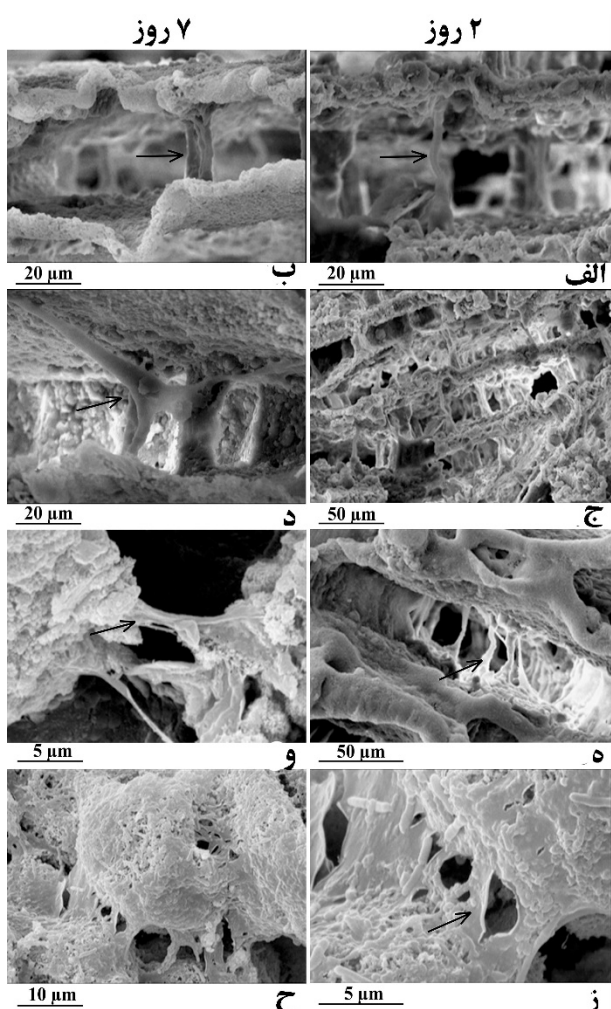
۳-۲-۳- ریز ساختار

شکل ۴، تصاویر SEM داربست‌های متخلخل را قبل و بعد از غوطه‌وری در SBF، در دو بزرگ‌نمایی مختلف، نشان می‌دهد. تخلخل‌هایی که به‌صورت کانال به‌هم مرتبط هستند در تصاویر دیده می‌شوند. روش ریخته‌گری انجمادی، برای ایجاد ساختاری متخلخل با اندازه تخلخل چند صد میکرومتری، استفاده می‌شود. همان‌طور که فلش‌های روی تصاویر نیز نشان می‌دهند، اندازه تخلخل‌های به‌دست‌آمده به این روش توسط برنامه ImageJ، بین ۱۰۰ تا ۳۰۰ میکرومتر تخمین زده شد.

۳-۴- ویژگی‌های زیستی داربست‌های آپاتیتی نانوساختار ماکرومتخلخل

۳-۴-۱- ریخت‌شناسی سلولی

شکل ۵، تصاویر SEM سطح داربست‌های حاوی سلول، بعد از ۲ و ۷ روز از کشت را نشان می‌دهد. در این تصاویر، ریخت‌شناسی سلول‌های استخوانی، روی سطح نمونه دیده می‌شود. این سلول‌ها، به‌صورت دوکی‌شکل که با یک غشای سیتوپلاسمی پهن شده و بین دیواره‌های تخلخل‌ها پل زده‌اند، رؤیت می‌شوند [۲۸]. پژوهش‌ها نشان می‌دهد که این نوع ریخت‌شناسی، به‌سبب برهم‌کنش مناسب داربست و سلول، ایجاد می‌شود [۳۲].



شکل ۵. تصاویر SEM داربست‌های مختلف، بعد از ۲ و ۷ روز کشت سلول: الف و ب) نمونه قبل از غوطه‌وری؛ ج و د) نمونه بعد از ۱ روز غوطه‌وری؛ ه و و) نمونه بعد از ۳ روز غوطه‌وری و ز و ح) نمونه بعد از ۱۴ روز غوطه‌وری

شده‌اند، دیده می‌شود. این ریخت‌شناسی، مربوط به هیدروکسی آپاتیتی است که طی سازوکار حلالیت رسوب، روی سطح سیمان، به‌وجود می‌آید. در مایعات شبیه‌سازی‌شده بدن که ترکیب شیمیایی نمک معدنی مشابه پلاسمای خون انسان را دارد، جوانه‌زنی و رشد هیدروکسی آپاتیت نانومتری مشابه استخوان، در شرایط دما و pH فیزیولوژیک، روی می‌دهد. حضور این لایه آپاتیت کربناتی که توسط فرایندهای تقلید زیستی، روی مواد مختلف ایجاد می‌شود، تکثیر سلولی و نیز معدنی‌شدن را افزایش می‌دهد و اتصال قوی‌تری با استخوان پدید می‌آورد [۳۰ و ۳۱].

۳-۳- ویژگی‌های مکانیکی داربست‌های آپاتیتی نانوساختار ماکرومتخلخل

در جدول ۱، میانگین استحکام فشاری داربست‌های مختلف، بین ۱/۲ تا ۲/۲ مگاپاسکال گزارش شده است. مدت زمان غوطه‌وری در SBF، تأثیر معناداری در استحکام فشاری نداشته است؛ زیرا در تعیین استحکام فشاری این داربست‌ها، عوامل متعددی دخیل هستند. استحکام فشاری، به پارامترهای ساختاری زیادی بستگی دارد، از جمله: الف) جنس ماده، نوع و میزان چسب و پراکنده‌ساز استفاده‌شده؛ ب) ابعاد تخلخل‌ها به‌طوری که هرچه کانال‌ها باریک‌تر باشند، استحکام بیشتر است؛ ج) جهت و ریخت‌شناسی تخلخل‌ها و د) یکپارچگی ساختار و ابعاد بلورهای آپاتیت تشکیل‌شده.

استحکام کم این ساختارها می‌تواند به‌علت وجود عیوب ترک‌مانند در ساختار باشد. عیوب، به‌صورت عمود بر جهت انجماد قرار گرفته‌اند و حضور آن‌ها باعث کاهش استحکام می‌شود [۳۱].

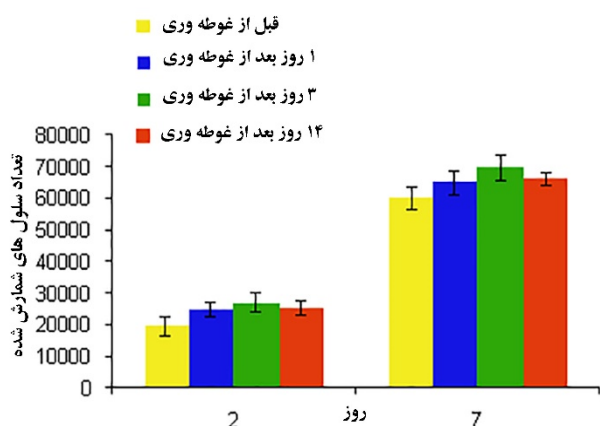
جدول ۱. ویژگی‌های مکانیکی داربست‌های مختلف

نمونه	استحکام فشاری (مگاپاسکال)
قبل از غوطه‌وری	$2/22 \pm 0/2$
بعد از ۱ روز غوطه‌وری	$1/2 \pm 0/2$
بعد از ۳ روز غوطه‌وری	$1/16 \pm 0/1$
بعد از ۷ روز غوطه‌وری	$1/41 \pm 0/05$
بعد از ۱۴ روز غوطه‌وری	$1/33 \pm 0/1$

برای دستیابی به هم‌بندی بلندمدت و مناسب با استخوان کافی نیست و عملکرد بعدی این سلول‌ها نیز اهمیت بسیاری دارد. نتایج پژوهش‌ها، افزایش تکثیر سلول‌های استخوان‌ساز، ستر فسفات‌های قلیایی و تغلیظ مواد حاوی کلسیم روی آلومینا تیتانیا و هیدروکسی آپاتیت نانومتری را در مقایسه با انواع میکروساختار این مواد، نشان می‌دهد [۳۳].

۲-۴-۳- تکثیر سلولی

شکل ۶، نشان‌دهنده تعداد سلول‌های شمارش‌شده روی سطح نمونه‌ها، پس از ۲ و ۷ روز کشت است. همان‌طور که ملاحظه می‌شود در تمام نمونه‌ها، با گذشت زمان، تعداد سلول‌های روی سطح، افزایش می‌یابد، به‌طوری که در پایان روز هفتم، این مقدار، تقریباً سه برابر تعداد سلول‌های کشت‌شده در روز دوم است. این امر، نشان می‌دهد که ترکیب ماده مورد نظر، سمیت ندارد. بین تعداد سلول‌های کشت‌شده قبل و بعد از غوطه‌وری، تفاوت معناداری مشاهده نمی‌شود.



شکل ۶. تعداد سلول‌های شمارش‌شده روی سطح داربست‌ها، پس از روزهای مختلف کشت

۴- نتیجه‌گیری

روش ریخته‌گری انجمادی، روشی مناسب برای تولید داربست‌های ماکرومتخلخل است. از آنجایی که این فرایند برپایه واکنش‌های فیزیکی، نه شیمیایی است، می‌تواند برای کاربردهای زیست‌مواد، از جمله کلسیم فسفات‌ها، توسعه داده شود. در این پژوهش، بلورهای نانومتری فاز آپاتیت، روی سطح نمونه‌های کلسیم فسفاتی، بعد از قرارگیری در محیط فیزیولوژیک، تشکیل شد. کنترل اندازه تخلخل‌ها و ناصافی

به‌نظر می‌رسد چسبندگی سلول، به‌دلیل ریخت‌شناسی خشن سطح و درگیر شدن زائده‌های سلول روی آن‌ها، پدید آمده باشد و حالت کشیده‌شدن سلول روی دیواره‌ها، حاکی از تمایل آن به سطح است که زیست‌سازگاری نمونه‌ها را نشان می‌دهد. این نتایج، حاکی از مناسب بودن نمونه‌ها از لحاظ سطحی و ترکیبی، برای رشد سلول‌هاست. سلول‌های پل‌زده بین دیواره‌های تخلخل‌ها، با فلش، نشان داده شده است.

در داربست‌هایی که آپاتیت نانوساختار روی دیواره‌های آن‌ها تشکیل شده است، ریخت‌شناسی توپی‌شکل و بلورهای سوزنی‌شکل آپاتیت، باعث چسبندگی بهتر سلولی در این نواحی شده است. دیواره‌های تخلخل‌ها، در داربست‌هایی که ۷ روز در محیط کشت قرار داده شده‌اند، تحت تأثیر رسوبات محیط کشت قرار گرفته و تغییر شکل داده‌اند. با گذشت زمان، هیدروکسی آپاتیت، روی غشاهای سلولی، تشکیل شده است. پدیده رسوب بلورهای آپاتیت طی فرایندهای هیدرولیز، در شکل‌گیری سلول‌ها و ریخت‌شناسی آن‌ها دخالت می‌کند. درواقع، طی ۷ روز نگهداری نمونه‌های حاوی سلول در محیط کشت، هم‌زمان با رشد سلولی و تکثیر آن‌ها، رسوب‌دهی بلورهای آپاتیتی نیز رخ داده است و گویی سلول‌ها در زیر لایه‌های آپاتیتی قرار گرفته‌اند (شکل ۵-ح).

ساختار سرمایه‌های متخلخل به‌دست‌آمده از روش ریخته‌گری انجمادی، بسیار شبیه به زیست‌ماده‌ای مانند استخوان است. درنتیجه، از این زیست‌ماده، در مهندسی بافت، بسیار استفاده می‌شود. مشکلات ایجادشده در کاشت‌نی‌ها، معمولاً، به‌دلیل پیوند ضعیف آن‌ها با استخوان است. برای تثبیت کاشت‌نی‌های ارتوپدی و دندان‌ی در محل استخوان و کاهش صدمات ناشی از حرکت کاشت‌نی‌ها و همچنین افزایش بازدهی کاشت‌نی‌ها، هم‌بندی مطلوب با استخوان، مورد نیاز است. نبودن پیوند مناسب بین استخوان و کاشت‌نی، می‌تواند ناشی از خواص سطحی ماده باشد که رشد استخوان را ترویج نمی‌کند. به همین دلیل، طراحی و ساخت زیست‌ماده‌ای که سطح آن، باعث ترویج رشد استخوان شود از اهداف نسل آینده کاشت‌نی‌های ارتوپدی و دندان‌ی است. در مقایسه با زی‌سرامیک‌های سنتی، هیدروکسی آپاتیت نانومتری، چسبندگی سلول‌های استخوان‌ساز را افزایش می‌دهد. البته، چسبندگی سلول‌های استخوان‌ساز به سطح مواد، به‌تهایی،

8. De Groot, K., "Effect of porosity and physicochemical properties on the stability, resorption and strength of calcium phosphate ceramics", *Annals of the New Academy of Sciences*, Vol. 523, No. 1, (1988), 227-233. <https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.1988.tb38515.x>
9. Xu, H. H., Quinn, J. B., Takagi, S., Chow, L. C., Eichmiller, F. C., "Strong and macroporous calcium phosphate cement: Effects of porosity and fiber reinforcement on mechanical properties", *Journal of Biomedical Materials Research*, Vol. 57, No. 3, (2001), 457-466. [https://doi.org/10.1002/1097-4636\(20011205\)57:3<457::AID-JBM1189>3.0.CO;2-X](https://doi.org/10.1002/1097-4636(20011205)57:3<457::AID-JBM1189>3.0.CO;2-X)
10. Takagi, S., Chow, L. C., "Formation of macropores in calcium phosphate cement implant", *Journal of material Science Material Medicine*, Vol. 12, No. 2, (2001), 135-139. <https://doi.org/10.1023/A:1008917910468>
11. Landi, E., Valentini, F., Tampieri, A., "Porous hydroxyapatite/gelatin scaffolds with ice-designed channel-like porosity for biomedical applications", *Acta Biomaterialia*, Vol. 4, No. 6, (2008), 1620-1626. <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2008.05.023>
12. Munch, E., Franco, J., Deville, S., Hunger, P., Saiz, E., Tomsia, A. P., "Porous ceramic scaffolds with complex architectures", *The Journal of The Minerals, Metals & Materials Society*, Vol. 60, No. 6, (2008), 54-58. <https://doi.org/10.1007/s11837-008-0072-5>
13. Waschkies, T., Oberacker, R., Hoffmann, M. J., "Investigation of structure formation during freeze-casting from very slow to very fast solidification velocities", *Acta Materialia*, Vol. 59, No. 13, (2011), 5135-5145. <https://doi.org/10.1016/j.actamat.2011.04.046>
14. Araki, K., Halloran, J. W., "Room-temperature freeze casting for ceramics with nonaqueous sublimable vehicles in the naphthalene-camphor eutectic system", *Journal of American Ceramic Society*, Vol. 87, No. 11, (2004), 2014-2019. <https://doi.org/10.1111/j.1151-2916.2004.tb06353.x>
15. Hesarakhi, S., Zamanian, A., Moztaaradeh, F., "Effect of adding sodium hexametaphosphate liquefier on basic properties of calcium phosphate cements", *Journal of Biomedical Materials Research Part A*, Vol. 88, No. 2, (2009), 314-321. <https://doi.org/10.1002/jbm.a.31836>
16. Deville, S., "Freeze-casting of porous ceramics: A review of current achievements and issues", *Advanced Engineering Materials*, Vol. 10, No. 3, (2008), 155-169. <https://doi.org/10.1002/adem.200700270>
17. Farhangdoust, S., Zamanian, A., Yasaei, M., Khorami, M., "The effect of processing parameters and solid concentration on the mechanical and microstructural properties of freeze-casted macroporous hydroxyapatite scaffolds", *Materials Science and Engineering C*, Vol. 33, No. 1, (2013), 453-460. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2012.09.013>
18. Liu, R., Xu, T., Wang, C., "A review of fabrication strategies and applications of porous ceramics prepared by freeze-casting method", *Ceramics International*, Vol. 42, No. 2, (2016), 2907-2925. <https://doi.org/10.1016/j.ceramint.2015.10.148>
19. Ginebra, M. P., Espanol, M., Montufar, E. B., Perez, R. A., Mestres, G., "New processing approaches in calcium phosphate cements and their applications in regenerative medicine", *Acta Biomaterial*, Vol. 6, No. 8, (2010), 2863-2873. <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2010.01.036>
20. Sariibrahimoglu, K., Wolke, J. G., Leeuwenburgh, S. C., Yubao, L., Jansen, J. A., "Injectable biphasic calcium phosphate cements as a potential bone substitute", *Journal of Biomedical Material Research B Applied Biomaterial*, Vol. 102, No. 3, (2014), 415-422. <https://doi.org/10.1002/jbm.b.33018>
21. Grover, L. M., Wright, A. J., Gbureck, U., "The effect of amorphous pyrophosphate on calcium phosphate cement resorption and bone generation", *Biomaterials*, Vol. 34, No. 28, (2013), 6631-6637. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2013.05.001>
22. Zhang, J., Liu, W., Schnitzler, V., Tancet, F., Boulter, J. M., "Calcium phosphate cements for bone substitution: Chemistry, handling and mechanical properties", *Acta Biomaterial*, Vol. 10, No. 3, (2014), 1035-1049. <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2013.11.001>
23. Deville, S., Saiz, E., Tomsia, A. P., "Freeze casting of hydroxyapatite scaffolds for bone tissue engineering",

سطح دیواره‌ها، به چسبندگی سلولی کمک کرد. اگر کنترل مناسبی بر فرایند انجام شود، حتی استحکام فشاری مواد ذاتاً ضعیفی مانند کلسیم فسفات‌ها نیز، نسبتاً، بهبود خواهد یافت. استفاده از ذراتی با اندازه دانه زیر میکرون، پراکنده‌ساز و چسب PVA، باعث ایجاد سوسپانسیونی پایدار از پودر سیمان کلسیم فسفات شد. سطح آپاتیتی دیواره‌های تخلخل‌ها، چسبندگی سلولی را بهبود بخشید. وجود تخلخل‌هایی در مقیاس چند صد میکرومتر و نانوبلورهای سوزنی آپاتیت، تشکیل داربست نانوساختار ماکرومتخلخل آپاتیتی را تأیید کرد. نتایج آزمون‌های بیولوژیکی، حاکی از مناسب بودن نمونه‌ها، از لحاظ سطحی (نقشه‌برداری سطح برای چسبندگی سلول) و ترکیبی (سمی نبودن)، برای رشد سلول‌ها بود.

۵- سپاسگزاری

نگارندگان بر خود لازم می‌دانند از مسئولان آزمایشگاه زیست‌مواد پژوهشگاه مواد و انرژی، به دلیل فراهم آوردن تجهیزات لازم برای انجام این پژوهش، تشکر کنند.

مراجع

1. Jarcho, M., "Calcium phosphates ceramics as hard tissue prosthetics", *Classic Papers in Orthopaedics*, Vol. 157, (1981), 259-278. <https://doi.org/10.1097/00003086-198106000-00037>
2. De Groot, K., Ducheyne, P., "In vivo surface activity of a hydroxyapatite alveolar bone substitute", *Journal of Biomedical Materials Research*, Vol. 15, No. 3, (1981), 441-445. <https://doi.org/10.1002/jbm.820150315>
3. Teixeira, S., Queiroz, A. C., Monteiro, F. J., Ferraz, M. P., Vilar, R., Eugenio, S., "Osteoblast proliferation and morphology analysis on laser modified hydroxyapatite surfaces: Preliminary results", *Key Engineering Materials*, Vol. 309-311, (2006), 105-108. <https://doi.org/10.4028/www.scientific.net/KEM.309-311.105>
4. Santos, E. A., Farina, M., Soares, G. A., "Specific proliferation rates of human osteoblasts on calcium phosphate surfaces with variable concentrations of α -TCP", *Materials Science and Engineering C*, Vol. 27, No. 1, (2007), 61-66. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2006.02.003>
5. Webster, T. J., Siegel, R. W., Bizios, R., "Enhanced functions of osteoblasts on nanophase ceramics", *Biomaterials*, Vol. 21, No. 17, (2000), 1803-1810. [https://doi.org/10.1016/S0142-9612\(00\)00075-2](https://doi.org/10.1016/S0142-9612(00)00075-2)
6. Salyer, K. E., Hall, C. D., "Porous hydroxyapatite as an onlay bone graft substitute for maxillofacial surgery", *Plastic and Reconstructive Surgery*, Vol. 84, No. 2, (1989), 236-244. <https://doi.org/10.1097/00006534-198908000-00008>
7. Merritt, K., Shafer, J. W., Brown, S. A., "Implant site infection rate with porous and dense materials", *Journal of Biomedical Material Research*, Vol. 13, No. 1, (1979), 101-108. <https://doi.org/10.1002/jbm.820130111>

- of Biomedical Material Research Part B: Applied Biomaterial*, Vol. 102, No. 1, (2014), 108-118. <https://doi.org/10.1002/jbm.b.32987>
29. Borhan, S., Hesarak, S., Behnamghader, A. A., Ghasemi, E., "Rheological evaluations and in vitro studies of injectable bioactive glass-polycaprolactone-sodium alginate composites", *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, Vol. 27, No. 9, (2016), 1-15. <https://doi.org/10.1007/s10856-016-5745-y>
 30. Abdollahi, E., Bakhsheshi-Rad, H., "Evaluation of mechanical properties and apatite formation of synthesized fluorapatite-hardystonite nanocomposite scaffolds", *Advanced Ceramic Progress*, Vol. 4, No. 3-4, (2018), 8-15. <https://doi.org/10.30501/acp.2018.92930>
 31. Akbarpour, S., Karbasi, S., "Evaluation of physical and mechanical properties of hydroxyapatite/titanium dioxide composite scaffold for tissue engineering applications", *Journal of Advanced Materials and Technologies (JAMT)*, Vol. 3, No. 3, (1393), 17-26. <https://doi.org/10.30501/jamt.2635.70268>
 32. Nezafati, N., Farokhi, M., Heydari, M., Hesarak, S., Ahmadi Nasab, N., "In vitro bioactivity and cytocompatibility of an injectable calcium phosphate cement/silanated gelatin microsphere composite bone cement", *Composites Part B: Engineering*, Vol. 175, (2019), 107146. <https://doi.org/10.1016/j.compositesb.2019.107146>
 33. Deville, S., "Freeze-casting of porous biomaterials: Structure, properties and opportunities", *Materials*, Vol. 3, No. 3, (2010), 1913-1927. <https://doi.org/10.3390/ma3031913>
 - Biomaterials*, Vol. 27, No. 32, (2006), 5480-5489. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2006.06.028>
 24. Kokubo, T., Kushitani, H., Sakka, S., Kitsugi, T., Yamamuro, T., "Solutions able to reproduce in vivo surface-structure changes in bioactive glass-ceramic A-W", *Journal of Biomedical Materials Research*, Vol. 24, No. 6, (1990), 721-734. <https://doi.org/10.1002/jbm.820240607>
 25. Tondatur, C., Gentile, P., Saracino, S., Chiono, V., Nandagiri, V. K., Muzio, G., Canuto, R. A., Ciardelli, G., "Comparative analysis of gelatin scaffolds crosslinked by genipin and silane coupling agent", *International Journal of Biological Macromolecules*, Vol. 49, No. 4, (2011), 700-706. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2011.07.002>
 26. Nadeem, D., Kiamehr, M., Yang, X., Su, B., "Fabrication and in vitro evaluation of a spongelike bioactive-glass/gelatin composite scaffold for bone tissue engineering", *Materials Science and Engineering: C*, Vol. 33, No. 5, (2013), 2669-2678. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2013.02.021>
 27. Barabadi, Z., Azami, M., Sharifi, E., Karimi, R., Lotfikhshai, N., Roozafzoon, R., Joghataei, M. T., Ai, J., "Fabrication of hydrogel based nanocomposite scaffold containing bioactive glass nanoparticles for myocardial tissue engineering", *Materials Science and Engineering: C*, Vol. 69, (2016), 1137-1146. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2016.08.012>
 28. Hesarak, S., Nazarian, H., Pourbaghi-Masouleh, M., Borhan, S., "Comparative study of mesenchymal stem cells osteogenic differentiation on low-temperature biomineralized nanocrystalline carbonated hydroxyapatite and sintered hydroxyapatite", *Journal*