

کلسیم فسفات‌های دوفازی هیدروکسی آپاتیت / اکتاکلسیم فسفات برای کاربردهای مهندسی بافت سخت

زهرا محمدی^۱، عبدالرضا شیخ مهدی مسگر^{۲*}، فریبا رسولی^۳ و محمد نوری^۴

- ۱- آزمایشگاه بیوسرامیک و ایمپلنت، دانشکده علوم و فنون نوین، دانشگاه تهران، تهران، ایران
- ۲- آزمایشگاه زیست‌مواد، آزمایشگاه بیوسرامیک و ایمپلنت، دانشکده علوم و فنون نوین، دانشگاه تهران، تهران، ایران
- ۳- آزمایشگاه بیوسرامیک و ایمپلنت، دانشکده علوم و فنون نوین، دانشگاه تهران، تهران، ایران
- ۴- آزمایشگاه زیست‌مواد، دانشکده علوم و فنون نوین، دانشگاه تهران، تهران، ایران

دریافت: آذر ۱۳۹۳، بازنگری: اسفند ۱۳۹۳، پذیرش: فروردین ۱۳۹۴

چکیده: کلسیم فسفات‌های دوفازی هیدروکسی آپاتیت / اکتاکلسیم فسفات (HA/OCP) با ریخت مخلوط ویسکر / اسفرولیت با روش رسوب‌نشانی- آب‌کافت در محیط اسیدی شامل یون‌های کلسیم و فسفات به کمک عامل بالابرنده pH، کربونیل دی-آمید، سنتز و شناسایی شد. فرایند سنتز در شرایط بازروانی در دمای ۹۰ °C به مدت ۸۰ و ۱۰۰ ساعت انجام شد. ساختار بلوری نمونه تهیه شده با پراش پرتو ایکس (XRD)، طیف‌سنجی فرسرخ تبدیل فوریه (FT-IR) و ریخت‌شناسی آن به کمک میکروسکوپ الکترونی روبشی بررسی شد. نتیجه‌ها نشان داد در نسبت مولی Ca/P محلول برابر با ۱٫۶۷، حضور کربونیل دی‌آمید ابتدا باعث تشکیل اسفرولیت‌ها و سپس ویسکرها شده به طوری که با افزایش غلظت کربونیل دی‌آمید، اندازه اسفرولیت‌ها کاهش و طول ویسکرها افزایش می‌یابد. اثر غلظت کربونیل دی‌آمید بر طول و عرض ویسکرها از اثر غلظت کلسیم و نسبت مولی Ca/P مؤثرتر است. افزایش زمان واکنش و عرض ویسکرها، تغییر در ریخت اسفرولیت‌ها از حالت گل مانند به کروی شکل را به همراه دارد. در این مطالعه داربست‌های کامپوزیتی پایه کیتوسانی با نسبت‌های متفاوت کیتوسان به کلسیم فسفات تهیه شد. نتیجه‌ها نشان داد با استفاده از فاز کلسیم فسفاتی تهیه شده در این مطالعه امکان تهیه داربست‌های کامپوزیتی دارای ریزساختاری یکتواخت با درصد تخلخل ۶۵ تا ۸۰٪ با گستره اندازه تخلخل ۵۰ تا ۴۰۰ μm (متوسط ۲۰۰ μm)، مناسب برای کاربردهای مهندسی بافت سخت وجود دارد، به طوری که با افزایش جزء کلسیم فسفاتی کامپوزیت‌ها، از درصد تخلخل تا اندازه‌ای کاسته شده و چگالی افزایش می‌یابد.

واژه‌های کلیدی: ۲، ۴، ۶-تری آریل پیریدین‌ها، سیلیکا فسفوسولفونیک اسید، سنتز سه جزئی تک ظرف، شرایط بدون حلال

مقدمه

متفاوت به دلیل برخورداری از ویژگی زیست‌فعالی و / یا زیست تخریب‌پذیری به منظور ترمیم ضایعات استخوانی در کاربردهای ارتوپدی و دندان‌پزشکی استفاده می‌شوند [۱ و ۲]. در بین کلسیم فسفات‌های متفاوت، اکتاکلسیم فسفات، (OCP،

امروزه کلسیم فسفات‌هایی همچون هیدروکسی آپاتیت (HA، $Ca_{10}(PO_4)_6(OH)_2$)، بتا- تری کلسیم فسفات (β -TCP، $Ca_3(PO_4)_2$) و مخلوط دو فازی آن‌ها به شکل‌های

موجب رهایش فاکتورهای پیش‌التهابی گشته و به نوعی فرایند ترمیم را تحریک می‌کنند [۱۴ تا ۱۶]. این اثر به عنوان یک سیگنال برای استخوان‌سازی مطرح است آن‌چنان که حضور میکروذرات کلسیم فسفاتی در موضعی غیر از بافت سخت (همچون بافت نرم زیرپوستی) سبب تشکیل استخوان شده است. هدف این پژوهش سنتز کلسیم فسفات‌های متشکل از HA و OCP به صورت مخلوط ویسکر/اسفرولیت با روش رسوب نشانی- آب‌کافت است تا از این طریق بتوان شرایط دستیابی به ریخت‌های مخلوط از این دو فاز را پیدا کرد به طوری که از یک سو امکان استفاده از آن برای تهیه کامپوزیت‌ها با ویسکر فراهم شود و از سوی دیگر از تحریک فرایند التهاب با حضور میکرو ذرات به شکل اسفرولیت بهره‌مند شد. بدین منظور داربست‌های پایه زیست‌پلیمری کیتوسان همراه با مقادیرهای متفاوت کلسیم فسفات دوفازی سنتز شده تهیه شد و از نقطه نظر ریز ساختاری برای کاربردهای مهندسی بافت سخت مورد بررسی قرار گرفت.

بخش تجربی

مواد و روش‌ها

سنتز

به منظور سنتز نمونه‌ها (جدول ۱) مواد آزمایشگاهی با خلوص بالا، فراورده شرکت مرک به کار برده شد. برای تأمین کلسیم از $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ و فسفات از $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ و کربونیل دی‌آمید استفاده شد. مقادیرهای لازم این سه جزء بر اساس جدول ۱ برای تهیه ۱۰۰ میلی‌لیتر محلول استفاده شد. تنظیم pH محلول نهایی با نیتریک اسید صورت گرفت. pH محلول حاوی کلسیم نیترات، آمونیم دی‌هیدروژن فسفات و کربونیل دی‌آمید به کمک نیتریک اسید به ۳ رسانده شد. واکنش در یک ظرف یک لیتری و شرایط بازروانی در دمای 90°C برای مدتی معین انجام شد. پس از تکمیل واکنش، رسوب تشکیل شده به کمک فیلتراسیون خارج شد و در دمای 80°C به مدت یک روز خشک شد.

که به عنوان پیش‌ساز بلورهای آپاتیت زیستی در استخوان، تاج و مینای دندان در نظر گرفته می‌شود [۳ و ۴] توجه زیادی را در سال‌های اخیر به خود معطوف ساخته است. زیست‌ماده تشکیل شده از OCP می‌تواند باعث تحریک سلول‌های استخوان‌ساز انسان شود [۵].

یکی از چالش‌های زیست‌سرامیک‌های کلسیم فسفاتی ویژگی مکانیکی ضعیف آن‌هاست. استفاده از فازهای ثانویه به شکل‌های متفاوت به ویژه ویسکر (الیاف کوتاه) از جمله راه‌کارهای بهبود ویژگی مکانیکی آن‌ها به شمار می‌رود [۶ و ۷]. افزون بر این، با توسعه رویکرد مهندسی بافت نیاز به داربست‌های مناسب به عنوان بستر سلول‌ها با توجه فزاینده‌ای روبه‌رو گشته است. از این رو، امکان تقویت مکانیکی داربست‌های کامپوزیتی به کمک فازهای ثانویه زیست‌سازگار و به ویژه قابل‌جذب با ریخت‌های متفاوت مورد توجه پژوهشگران قرار گرفته است [۸].

ویسکرهای کلسیم فسفاتی به عنوان فاز تقویت‌کننده در کامپوزیت‌های پزشکی با روش‌های متفاوتی همچون رسوب‌نشانی- آب‌کافت [۹]، آب‌گرمایی [۱۰ و ۱۱] و نمک مذاب [۱۲] سنتز شده است. در بین روش‌های گوناگون سنتز، روش آب‌گرمایی به دلیل سرعت بالای دستیابی به ویسکر توجه بیشتری را به خود جلب کرده است. در همه پژوهش‌هایی که طی سال‌های اخیر در این حوزه صورت گرفته است هدف، دستیابی به هیدروکسی‌آپاتیت ویسکر شکل با طول بلند و نسبت طول به عرض بالا بوده است. شایان توجه است با این‌که ویسکرهای اکسیدی یا غیراکسیدی از لحاظ زیست‌سازگاری با بدن انسان نتایج مطلوبی نشان نداده‌اند اما ویسکرهای کلسیم فسفاتی هیچ‌گونه تأثیر نامطلوبی بر رفتار سلول‌های استخوانی نداشته‌اند [۱۳].

از سوی دیگر، به‌تازگی نتیجه‌های پژوهش‌ها در مورد اثر میکروذرات کلسیم فسفاتی (HA، TCP- β و مخلوط دوفازی این دو) بر سلول‌های استخوانی نشان داده است ذرات با قطر زیر ۲۰ میکرومتر با تأثیری دوگانه همراه هستند به طوری که بر سلول‌های استخوان‌ساز و ماکروفاژها تأثیر مثبتی نداشته‌اند اما

تهیه داربست‌های کیتوسان-کلسیم فسفات

داربست متخلخل خواهد بود. با خارج ساختن داربست از درون استوانه مدرج، حجم اتانول باقی‌مانده در استوانه مدرج، یعنی V_3 ، اندازه‌گیری شد. حجم اتانول باقی‌مانده درون داربست، یعنی $V_1 - V_3$ ، برابر با حجم حفره‌های درون داربست است. بنابراین درصد تخلخل داربست متخلخل یعنی P ، از رابطه زیر محاسبه می‌شود.

$$P = [(V_1 - V_3) / (V_2 - V_1)] \times 100 \quad (1)$$

برای هر یک از داربست‌ها آزمون اندازه‌گیری درصد تخلخل سه بار تکرار شد.

جدول ۱ شرایط سنتز نمونه‌ها

نمونه	غلظت کلسیم (مول)	غلظت کربنیل دی‌آمید (مول)	نسبت مولی کلسیم به فسفر	زمان واکنش (ساعت)
A1	۰٫۱	۰	۱٫۶۷	۸۰
A2	۰٫۱	۰٫۰۱	۱٫۶۷	۸۰
A3	۰٫۱	۰٫۰۲	۱٫۶۷	۸۰
A4	۰٫۰۴	۰٫۱	۲	۸۰
A5	۰٫۰۴	۰٫۲	۲	۸۰
A6	۰٫۱	۰٫۵	۱٫۶۷	۸۰
A7	۰٫۱	۰٫۵	۱٫۶۷	۱۰۰

نتیجه‌ها و بحث

نتیجه‌ها

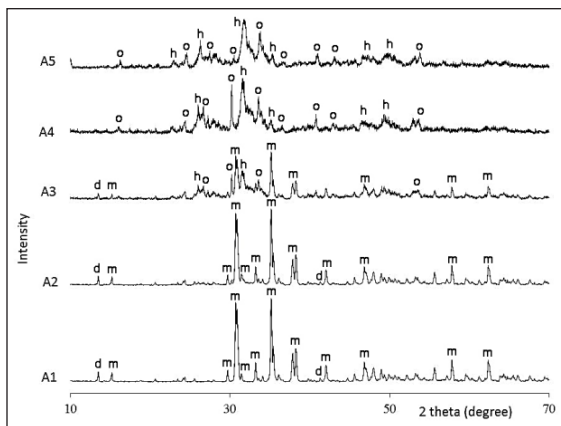
در شکل ۱ الگوی پراش پرتو ایکس نمونه‌های سنتز شده A1 تا A5 نشان داده شده است. مشاهده می‌شود در نمونه فاقد کربونیل دی‌آمید، فازهای دی‌کلسیم فسفات بی‌آب (مونیتیت، CaHPO_4) و آبدار (براشیت، $\text{CaHPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) تشکیل شده است. در شرایط اسیدی و بدون حضور کربونیل دی‌آمید، فاز براشیت فاز پایدار خواهد بود. در اثر دمای بالای سنتز و همچنین خشک کردن فرآورده احتمال تبدیل براشیت به مونیتیت وجود خواهد داشت. در نتیجه، هر دو فاز در الگوی XRD نمونه A1 مشاهده می‌شود. با افزودن مقادیر اندکی کربونیل دی‌آمید تغییری در فازهای ایجاد شده به چشم نمی‌خورد (نمونه A2 شکل ۱). افزودن مقادیر

برای تهیه داربست‌ها از ترکیب A5 استفاده شد (جدول ۱). کامپوزیت‌هایی با نسبت وزنی کلسیم فسفات (A5) به کیتوسان ۱ به ۱، ۱ به ۳ و ۱ به ۵ با استفاده از روش خشکاندن انجمادی تهیه شد. بدین منظور ابتدا محلول‌های یکنواختی از ۲٪ وزنی کیتوسان با وزن مولکولی متوسط از طریق انحلال کیتوسان در محلول ۲٪ وزنی استیک اسید آماده شد. سپس نسبت‌های اشاره شده از ویسکرها کلسیم فسفاتی به محلول‌های کیتوسانی افزوده و به مدت ۱ ساعت به‌طور کامل با همزن به هم زده شد تا مخلوط هموژنی به دست آید و ویسکرها به خوبی در داخل محلول کیتوسانی پخش شوند. این مخلوط در پلیت ۲۴ خانه‌ای ریخته و بلافاصله به فریزر 20°C منتقل شد و پس از ۱۲ ساعت در دستگاه خشکاندن انجمادی به مدت ۴۸ ساعت قرار داده شد.

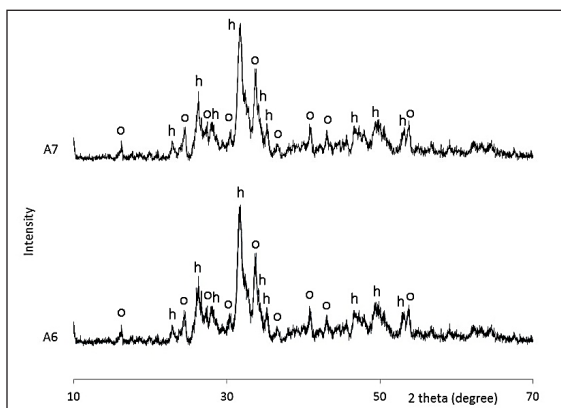
شناسایی

ارزیابی فازهای بلوری نمونه‌ها پس از سنتز به‌وسیله پراش پرتو ایکس (X'PertHighscore, PANalytical, Philips) در شرایط 35 mA و 40 kV با سرعت روش $0.02^\circ/\text{s}$ انجام شد. شناسایی فازهای بلوری با نرم‌افزار دستگاه صورت پذیرفت. طیف جذبی پودرهای سنتز شده به وسیله طیف‌سنجی فروسرخ تبدیل فوریه (VERTEX 70, FTIR; Bruker) در گستره عدد موج 400 تا 4000 cm^{-1} با دقت 4 cm^{-1} انجام شد. مقدار مشخصی از نمونه با پودر KBr مخلوط شد و به صورت قرص مورد آزمایش قرار گرفت. ریخت شناسی پودرهای سنتز شده و کامپوزیت‌های تهیه شده با میکروسکوپ الکترونی روبشی (SEM) نوع Serom مدل AIS 2100 صورت پذیرفت.

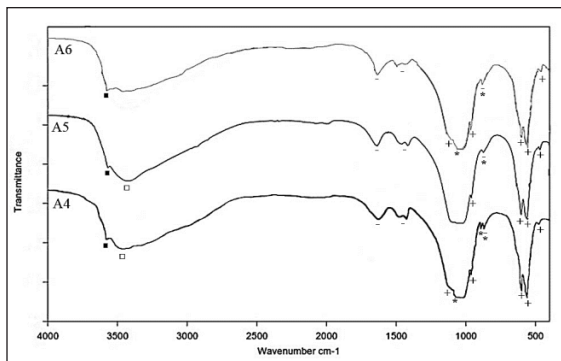
درصد تخلخل و چگالی داربست‌ها به روش جابه‌جایی مایع اندازه‌گیری شد. از اتانول به عنوان مایع استفاده شد. ابتدا داربست به مدت ۲۴ ساعت در داخل یک استوانه مدرج حاوی اتانول با حجم V_1 به حالت غوطه‌ور نگاه داشته شد. در ادامه حجم کل، یعنی داربست و حجم اتانول به عنوان V_2 در نظر گرفته شد. بدیهی است که تفاوت این دو حجم، یعنی $(V_2 - V_1)$ ، برابر حجم



شکل ۱ الگوهای پراش پرتو ایکس نمونه‌ها، A1 تا A5
d، براشیت $(CaHPO_4 \cdot 2H_2O)$; m، موتنیت $(CaHPO_4)$; O، اکتاکلسیم فسفات $(Ca_8(HPO_4)_2(PO_4)_4 \cdot 5H_2O)$ ؛ h، هیدروکسی آپاتیت $(Ca_{10}(PO_4)_6(OH)_2)$ و اکتاکلسیم فسفات



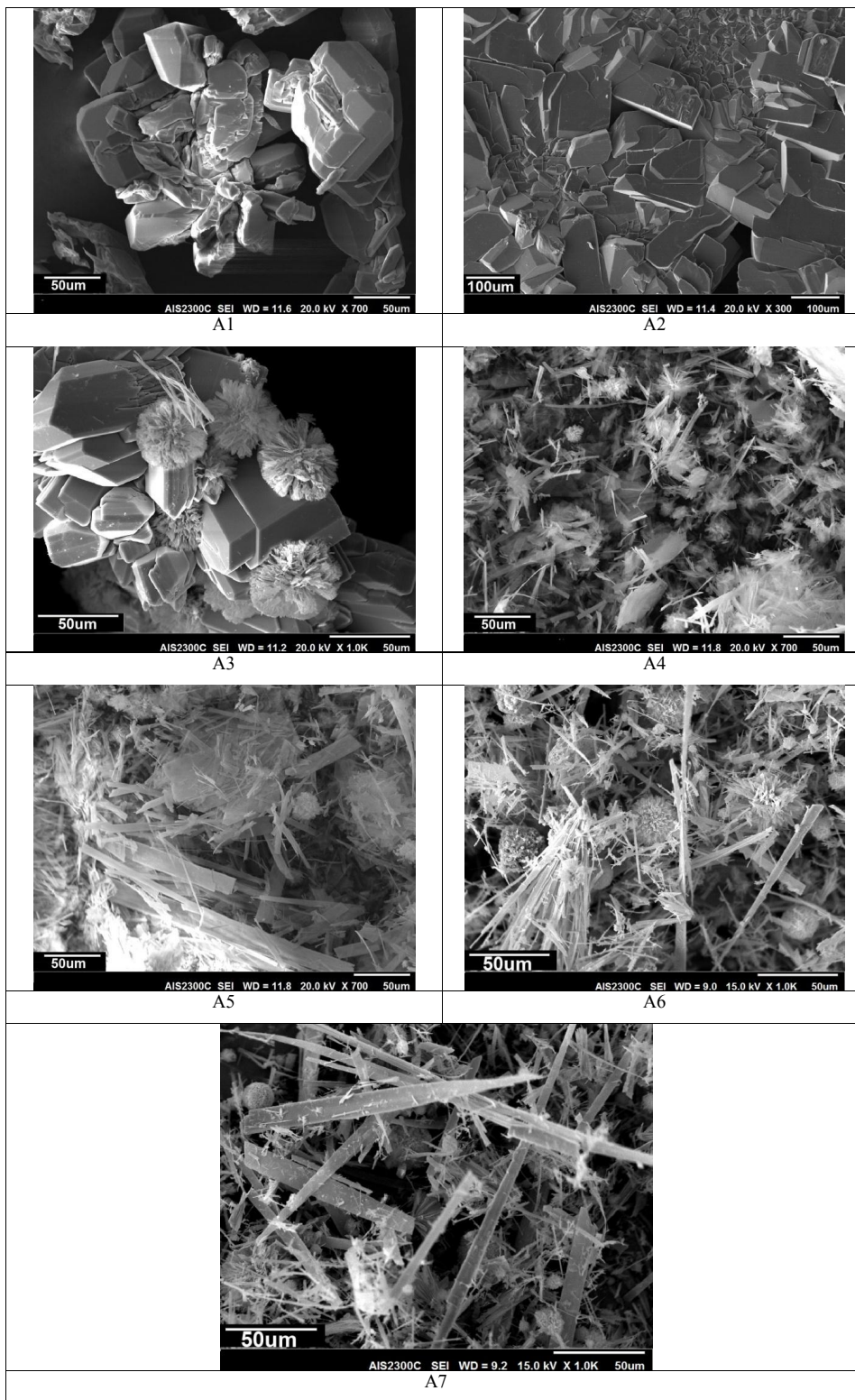
شکل ۲ الگوهای پراش پرتو ایکس نمونه‌های A6 و A7
O، اکتاکلسیم فسفات $(Ca_8(HPO_4)_2(PO_4)_4 \cdot 5H_2O)$ ؛ h، هیدروکسی آپاتیت $(Ca_{10}(PO_4)_6(OH)_2)$ و اکتاکلسیم فسفات



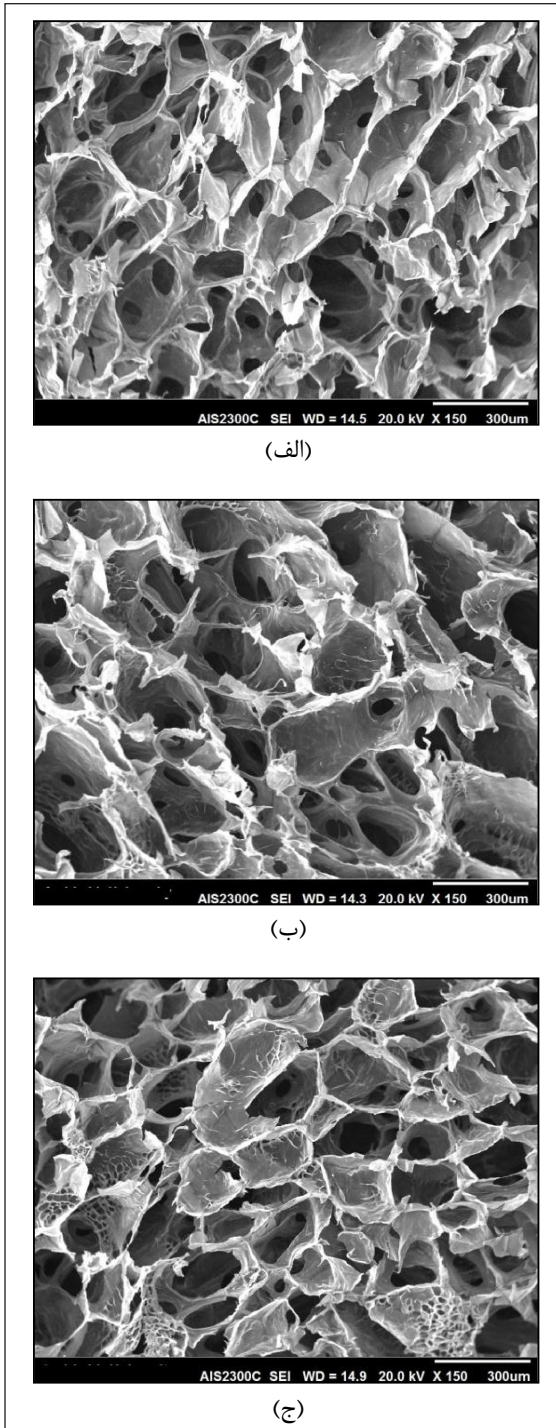
شکل ۳ طیف جذبی FT-IR سه نمونه A4، A5 و A6
+، فسفات (PO_4^{3-}) ؛ -، کربنات (CO_3) ؛ *، هیدروژن فسفات (HPO_4^{2-}) ؛ □، آب جذب شده؛ ■، OH

بیشتر کربونیل دی‌آمید به محلول سنتز باعث ایجاد فازهای اکتاکلسیم فسفات (OCP) و هیدروکسی‌آپاتیت (HA) در رسوب و کاهش فازهای دی‌کلسیم فسفات (موتنیت و براشیت) خواهد شد (نمونه A3). لازم به ذکر است که سه نمونه A1، A2 و A3 فقط از لحاظ مقدار کربونیل دی‌آمید در محلول سنتز با یکدیگر متفاوت هستند. در دو نمونه A4 و A5 در مقایسه با سه نمونه قبل، مقدار کربونیل دی‌آمید افزایش قابل توجهی داشته و غلظت مولی کلسیم کاهش یافته است. در شکل ۱ مشاهده می‌شود در دو نمونه A4 و A5 اثری از فازهای موتنیت و/یا براشیت به چشم نمی‌خورد به طوری که فقط فازهای OCP و HA قابل مشاهده هستند. شرایط سنتز نمونه A6 همانند سه نمونه A1، A2 و A3 بوده و فقط مقدار کربونیل دی‌آمید به مقدار قابل توجهی افزایش یافته است. در این نمونه تنها دو فاز OCP و HA شناسایی شد (شکل ۲). همان طور که در شکل ۲ مشاهده می‌شود با افزایش زمان واکنش در نمونه A7 تغییری در فازهای ایجاد شده دیده نشد به طوری که همانند نمونه A6 دو فاز OCP و HA در الگوی XRD دیده می‌شود.

طیف جذبی FT-IR برخی از نمونه‌های سنتز شده در شکل ۳ نشان داده شده است. وجود شیوه‌های ارتعاشی اصلی گروه‌های فسفات در 570 ، 610 ، 960 و 1110 cm^{-1} و نوار جذبی OH در 3572 cm^{-1} می‌تواند نشان‌دهنده تشکیل فاز آپاتیت باشد [۱۷]. از سوی دیگر وجود نوار جذبی یون‌های هیدروژن فسفات (HPO_4^{2-}) در 870 و 910 cm^{-1} تشکیل OCP و/یا هیدروکسی‌آپاتیت با کمبود کلسیم (CDHA) را اثبات می‌کند [۱۷ و ۱۸]. نوار جذبی پهن در گستره عدد موج 3300 تا 3500 cm^{-1} به وجود آب جذب شده نسبت داده می‌شود. نوار جذب در 1470 ، 1410 ، 870 و 1650 cm^{-1} به گروه کربنات تعلق دارد [۱۷]. بر این اساس CO_2 در خلال سنتز به OCP و/یا CDHA جذب شده است. کربن دی‌اکسید می‌تواند در نتیجه آب کافت کربونیل دی‌آمید تولید شده باشد [۹]. مقایسه سه طیف جذب A4، A5 و A6 در شکل ۳ نشان می‌دهد که به دلیل حضور نوار جذب در 910 cm^{-1} در نمونه A4 مقدار فاز OCP در این نمونه بیش از دو نمونه دیگر است.



شکل ۴ تصویرهای SEM نمونه‌های سنتز شده



شکل ۵ تصویرهای SEM از داربست‌های کامپوزیتی تهیه شده با نسبت ویسکر کلسیم فسفات به کیتوسان، (الف) ۵:۱ (ب) ۳:۱ (ج) ۱:۱

در شکل ۴ تصاویر میکروسکوپی نمونه‌های سنتز شده مشاهده می‌شود. در سه نمونه A1، A2 و A3 غلظت کربونیل دی‌آمید استفاده شده در سنتز به ترتیب افزایش یافته است. همان طور که دیده می‌شود در دو نمونه A1 و A2 هیچ‌گونه اثری از تشکیل ایاف وجود ندارد در حالی که در نمونه A3 با افزایش کربونیل دی‌آمید، اسفرولیت‌های گل‌مانند به قطر متوسط $50 \mu\text{m}$ متشکل از ایاف کوتاه با طول حدود $10 \mu\text{m}$ تشکیل شده است. بر اساس نتیجه‌های XRD در نمونه A3 فازهای OCP و HA شروع به تشکیل شدن کرده‌اند. ریخت اسفرولیتی را می‌توان به فازهای OCP و HA نسبت داد. شرایط نمونه A6 مشابه نمونه A3 بوده جز این که مقدار کربونیل دی‌آمید استفاده شده در سنتز به مقدار قابل توجهی افزایش یافته است که منجر به افزایش قابل توجه pH خواهد شد. در شکل ۴ مشاهده می‌شود که نمونه A6 از اسفرولیت‌های گل‌مانند با قطر کمتر از $40 \mu\text{m}$ و ویسکرهای بلند با طول متوسط $80 \mu\text{m}$ تشکیل یافته است. در حقیقت، با افزایش مقدار کربونیل دی‌آمید امکان تشکیل ویسکرهای بلند به همراه اسفرولیت‌ها فراهم شده است. با افزایش زمان واکنش، تعداد و اندازه اسفرولیت‌ها کاهش یافته و عرض ویسکرها با افزایش چند برابری روبه‌رو شده است. به نظر می‌رسد اسفرولیت‌ها از حالت گل‌مانند به صورت کروی تغییر یافته است. در دو نمونه A4 و A5 در مقایسه با سایر نمونه‌ها در محلول سنتز، غلظت کلسیم کاهش و نسبت مولی کلسیم به فسفر افزایش یافته است (جدول ۱). همان‌طور که در شکل ۴ دیده می‌شود در دو نمونه A4 و A5 با نسبت مولی Ca/P و غلظت کلسیم مشابه، با افزایش غلظت کربونیل دی‌آمید، اسفرولیت‌های با قطر حدود $25 \mu\text{m}$ از لحاظ اندازه و تعداد با کاهش روبه‌رو شده و طول ویسکرها افزایش یافته است هر چند که عرض ویسکرها نیز با افزایش روبه‌رو بوده است. در شکل ۵ ریزساختار داربست‌های کامپوزیتی تهیه شده در مقادیرهای متفاوت کلسیم فسفات ویسکر/اسفرولیت قابل مشاهده است. مشاهده می‌شود جزء ایافی کلسیم فسفات در دیواره داربست کیتوسان قرار گرفته است. ایاف به طور همگن در داخل داربست کیتوسانی پخش شده‌اند به طوری که با افزودن

بحث

روش‌های متفاوتی برای تولید ویسکرها ی کلسیم فسفات‌ی توسعه یافته است. در بین این روش‌ها روش آب‌گرمایی بیشترین تعداد پژوهش‌ها را به خود اختصاص داده است [۱۰، ۱۱، ۱۹ و ۲۰]. این روش و همچنین روش رسوب نشانی - آب‌کافت مبتنی بر ایجاد رسوب از محلول فوق‌اشباع است. از نقطه نظر ترمودینامیکی برای تشکیل رسوب یک کانی از محلول باید آن محلول نسبت به تشکیل فاز کانی فوق‌اشباع باشد. افزون بر این شرط لازم، باید شرایط سینتیکی به عنوان شرط کافی فرایند رسوب‌نشانی محقق باشد. تشکیل رسوب با ریخت الیافی شکل از محلول در فرایندهای آب‌گرمایی یا رسوب نشانی - آب‌کافت مبتنی بر اصول فوق و وابسته به درجه فوق‌اشباع است. در این روش‌ها از یک عامل بالابرنده pH همچون آمیدها (کربنیل دی‌آمید، استامید، پروپیونامید [۲۱] یا فورمامید [۲۲]) استفاده می‌شود. ریخت فاز کانی تشکیل شده به مقدار و نوع این عوامل وابسته است [۹ و ۲۲]. به عنوان مثال، کربنیل دی‌آمید به سرعت در دمای °C ۸۰ آب‌کافت شده و pH را به سرعت به دلیل واکنش زیر و ایجاد آمونیاک به بالای ۹/۴ افزایش می‌دهد:



در خصوص استامید یا فورمامید مشخص شده است که به دلیل سرعت آب‌کافت پایین این آمیدها فقط می‌توان از آن‌ها در شرایط آب‌گرمایی در دمای °C ۱۶۰ استفاده کرد [۲۳]. این درحالی‌ست که استفاده از کربنیل دی‌آمید باعث افزایش سریع درجه فوق‌اشباع شده و در نتیجه تعداد جوانه‌های بیشتری تشکیل می‌شود از این رو، ویسکرها ی تشکیل شده از طول و نسبت طول به قطر کمتری نسبت به ویسکرها ی تشکیل شده از استامید و فورمامید برخوردار خواهند بود [۹]. در نتیجه، کربنیل دی‌آمید برای روش آب‌گرمایی مناسب نیست. به همین دلیل در این پژوهش از کربنیل دی‌آمید استفاده شده است. در این پژوهش، مشاهده شد که با افزایش مقدار کربنیل دی‌آمید فازهای متفاوتی همچون براشیت، مونتیت، اکتا کلسیم فسفات و هیدروکسی آپاتیت تشکیل شدند. سازوکار تشکیل را می‌توان به صورت زیر خلاصه کرد.

مقدارهای بیشتر ویسکر به کامپوزیت، حضور ویسکرها بارزتر شده است هر چند که یکنواختی پخش‌شدگی آن‌ها تحت تأثیر قرار نگرفته است به طوری که در نمونه با نسبت ۱ به ۱ با وجود مقدارهای بالای فاز کلسیم فسفات، همچنان ساختار متخلخل مورد نیاز برای داربست‌های مهندسی بافت سخت حفظ شده است. در شکل ۵ مشاهده می‌شود اندازه تخلخل‌ها در گستره ۵۰ تا ۴۰۰ μm قرار دارد. بر اساس نتیجه‌های آرایه شده در جدول ۲، اندازه متوسط تخلخل داربست‌ها در مقدارهای متفاوت کلسیم فسفات حدود ۲۰۰ میکرومتر بوده و از نظر متوسط اندازه تخلخل تفاوت معناداری میان داربست‌های متفاوت نشان ندادند هر چند که با افزایش فاز کلسیم فسفات، افزایش چگالی و کاهش درصد تخلخل مشاهده شد. همچنین در تصویرهای SEM ارتباط داشتن تخلخل‌ها با یکدیگر که از موارد با اهمیت در داربست‌ها به منظور خون‌رسانی مناسب است به خوبی قابل مشاهده است.

جدول ۲- درصد تخلخل و چگالی داربست‌های کامپوزیت کیتوسان / کلسیم فسفات الیافی در مقایسه با استخوان اسفنجی

نمونه	متوسط درصد تخلخل (%)	چگالی (g/m ³)	متوسط اندازه تخلخل (μm)
استخوان اسفنجی	۳۰-۹۰	۰٫۱۴-۱٫۲۰	-
داربست کیتوسانی	۸۲٫۸	۰٫۲۶	-
کامپوزیت کیتوسان/ویسکر کلسیم فسفات با نسبت ۱ به ۱	۶۸٫۵	۰٫۳۶	۱۹۴
کامپوزیت کیتوسان/ویسکر کلسیم فسفات با نسبت ۳ به ۱	۷۲٫۶	۰٫۳۱	۲۰۱
کامپوزیت کیتوسان/ویسکر کلسیم فسفات با نسبت ۵ به ۱	۷۵٫۰	۰٫۲۸	۲۰۸

در این جا کربونیل دی‌آمید) وابسته است به طوری A4 به دلیل مقدار کمتر کربونیل دی‌آمید استفاده شده در سنتز دارای طول کوچکتري نسبت به ویسکرهای نمونه A6 است. این موضوع در خصوص اسفرولیت‌ها نیز صادق است.

در پژوهش حاضر تأثیر غلظت کربونیل دی‌آمید و نسبت Ca/P و هم‌چنین زمان واکنش بررسی مشاهده شد که با افزایش کربونیل دی‌آمید به دلیل کاهش pH، ذرات می‌توانند به شکل اسفرولیت یا گل‌های الیافی کوچک تشکیل شوند. با افزایش بیشتر کربونیل دی‌آمید ذرات کوچکتر با سطح ویژه بالا تولید می‌شوند که منجر به گل‌های فیبری کوچک خواهد شد (در شکل ۴ تصاویر مربوط به A3 و A6 را مقایسه کنید). در غلظت کمتر واکنشگرها، درجه فوق‌اشباع کمتر شده و در نتیجه الیاف کوتاه‌تری به دست خواهد آمد. در صورتی که نیروی محرکه برای رشد کم باشد می‌تواند منجر به عریض شدن الیاف و تشکیل ریخت صفحه‌ای شود (در شکل ۴ تصویرهای مربوط به نمونه‌های A4 و A5 را مشاهده شود). افزایش زمان واکنش درجه آب‌کافت کربونیل دی‌آمید را افزایش داده و درجه فوق‌اشباع به دلیل افزایش pH، افزایش می‌یابد. این موضوع در شکل ۴ تصویر مربوط به نمونه A7 با کاهش تعداد اسفرولیت‌ها و حتی تغییر شکل آن‌ها (کروی‌تر شدن آنها) قابل مشاهده است. افزایش زمان واکنش منجر به عریض شدن الیاف شد.

در تمام مطالعات انجام شده تاکنون فقط اهمیت ویسکرها برای تقویت مکانیکی مدنظر بوده است و ایجاد ذرات باریخت‌های متفاوت (به غیر از ویسکر) به عنوان نتیجه مطلوبی تلقی نشده است. در سال‌های اخیر نشان داده شده است که میکروذرات کلسیم فسفاتی می‌توانند تأثیر قابل توجهی بر فرایند استخوان‌سازی داشته باشند [۱۴ تا ۱۶]. این اثر در مورد ذرات کوچکتر از $20 \mu\text{m}$ چشم‌گیرتر از ذرات در گستره $40 \mu\text{m}$ تا $80 \mu\text{m}$ و $80 \mu\text{m}$ تا $200 \mu\text{m}$ بوده است [۱۴]. اعتقاد بر این است که ذرات کوچک‌تر از $5 \mu\text{m}$ مشابه ذراتی هستند که در اثر حضور سرامیک‌های متخلخل در بافت استخوان آزاد می‌شوند و ویژگی القای استخوان (osteoinductivity) را به عهده دارند [۱۴]. از سوی دیگر مشخص شده است که گرانول‌های

در اثر تجزیه کربونیل دی‌آمید، pH محلول افزایش یافته و در یک pH ویژه DCPD تشکیل خواهد شد. مقدار فوق‌اشباع فازهای متفاوت به ترتیب زیر است:



بنابر این، با تشکیل DCPD این فاز خود به HA آب‌کافت می‌شود [۹]. آب‌کافت DCPD با افزایش سریع pH همراه بوده و انحلال DCPD و HA را به دنبال دارد. هنگامی که pH به بالاتر از ۳٫۸ افزایش یابد رسوب الیافی شکل OCP تشکیل می‌شود. این فاز نیم‌پایدار بوده و در اثر آب‌کافت به HA تبدیل خواهد شد. به دلیل قرابت ساختاری HA و OCP، آپاتیت تشکیل شده می‌تواند به صورت هیدروکسی‌آپاتیت با کمبود کلسیم $(\text{CDHA}, \text{Ca}_{10-x}(\text{HPO}_4)_x(\text{PO}_4)_{6-x}(\text{OH})_{2-x})$ باشد [۱۸]. با افزایش pH، جاهای خالی کلسیم در ساختار بلوری می‌تواند کلسیم بیشتری از محلول جذب کند. به دلیل تشکیل CO_2 در اثر تجزیه کربونیل دی‌آمید احتمال وارد شدن CO_3^{2-} به داخل ساختار وجود دارد که این موضوع در نتیجه‌های FT-IR ما مشاهده شد. کربنات می‌تواند در موقعیت هیدروکسیل یا فسفات در هر دو فاز OCP یا CDHA جایگزین شود [۹ و ۲۲].

اکثر پژوهش‌های انجام شده در خصوص تأثیر عامل‌های فرایند بر ریخت فازهای ایجاد شده متمرکز بر فرایند آب‌گرمایی و استفاده از استامید بوده است [۱۱ و ۲۲ تا ۲۴]. نشان داده شده است که ریخت کلسیم فسفات‌های تشکیل شده به نسبت مولی Ca/P، pH محلول و غلظت اولیه کلسیم وابسته است [۲۳]. در همه این پژوهش‌ها هدف دست‌یابی به ریخت الیافی و تشکیل ویسکر بوده است. در مقدار ثابت استامید در فرایند آب‌گرمایی در دمای 180°C نشان داده شده است که با کاهش غلظت کلسیم محلول و نسبت مولی Ca/P محلول، عرض و طول ویسکر افزایش می‌یابد [۲۳]. ویسکرهای یکنواخت در pH پایین و Ca/P بالا یا pH بالا و Ca/P پایین به دست آمده است. در مطالعه حاضر انتظار می‌رفت که با کاهش غلظت کلسیم و افزایش نسبت Ca/P افزایش قابل توجهی در طول یا عرض ویسکرها مشاهده شود اما مشاهده شد که این موضوع به مقدار عامل بالا برنده pH

ویسکر/ اسفرولیت را می‌توان به عنوان اجزای زیست‌سرامیکی واکنش‌پذیری در نظر گرفت که از زیست‌تخریب‌پذیری متوسط برخوردار هستند [۲۶].

نتیجه‌گیری

در این پژوهش با تغییر عامل‌های سنتز کلسیم فسفات‌ها به روش رسوب نشانی- آب‌کافت (نسبت Ca/P محلول و غلظت کلسیم محلول) به کمک کربونیل دی‌آمید در مقادیرهای متفاوت، شرایط تشکیل مخلوطی از ویسکر/ اسفرولیت کلسیم فسفات دوفازی مطالعه شد. نتیجه‌ها نشان دادند که به کمک فرایند رسوب‌نشانی- آب‌کافت می‌توان افزودن بر هیدروکسی‌آپاتیت، به اکتاکلسیم فسفات به عنوان یکی از فازهای زیست‌سازگار دست یافت. در نسبت مولی Ca/P یکسان با شروع تشکیل اسفرولیت‌ها با افزایش مقدار کربونیل دی‌آمید، اندازه اسفرولیت‌ها کاهش و ویسکرهای تشکیل شده با ازدیاد طول روبه‌رو می‌شوند. اثر غلظت کربونیل دی‌آمید بر طول و عرض ویسکرها از اثر غلظت کلسیم و نسبت مولی Ca/P بر اندازه ویسکرها مؤثرتر است. در مقادیر بالای کربونیل دی‌آمید، افزایش زمان واکنش باعث افزایش عرض ویسکرها و تغییر در ریخت اسفرولیت‌ها از حالت گل‌مانند به شکل کروی می‌شود. داربست‌های کامپوزیتی پایه کیتوسانی با مقادیرهای متفاوت کلسیم فسفات با ریزساختار همگن به کمک فرایند خشکاندن انجمادی تهیه شد. داربست‌های تهیه شده از ریزساختار همگن و مناسب برای استفاده در کاربردهای مهندسی بافت استخوان (درصد تخلخل بالا و اندازه تخلخل بالاتر از $100 \mu\text{m}$ برخوردار بودند.

OCP در مقایسه با الیاف OCP از ویژگی "هدایت‌کنندگی استخوان" (Osteoconductivity) بیشتری برخوردار هستند [۴ و ۵]. بر این اساس حضور ریخت‌های اسفرولیتی در کنار ویسکرها می‌تواند افزودن بر حفظ اثر تقویت‌کنندگی، تحریک فرایند ترمیم و استخوان‌سازی را به دنبال داشته باشد. در این پژوهش تلاش شد کلسیم فسفات‌های دوفازی OCP/HA به صورت مخلوطی از ویسکر/ اسفرولیت با تغییر عامل‌های سنتز به روش رسوب نشانی- آب‌کافت به دست آید.

در سال‌های اخیر نشان داده شده است که در داربست‌های کامپوزیتی ژلاتین کلسیم فسفات ویسکر/اسفرولیت، تهیه داربست‌هایی با ریزساختار همگن و توزیع یکنواخت فاز کلسیم فسفات در مقادیر بالا (در نسبت زیست‌پلیمر به کلسیم فسفات برابر ۱ به ۱) امکان‌پذیر نبوده است [۲۵]. این درحالی است که نتیجه‌های این مطالعه نشان داد در خصوص داربست‌های پایه کیتوسانی امکان تهیه داربست‌هایی با مقادیر بالای فاز کلسیم فسفات وجود دارد. متوسط درصد تخلخل داربست‌های کیتوسان/کلسیم فسفات تهیه شده در این مطالعه به مقادیرهای استخوان اسفنجی و هم‌چنین داربست‌های پایه ژلاتین حاوی ویسکر نزدیک است. در مهندسی بافت سخت، داربست‌ها باید دارای تخلخل‌هایی با اندازه بزرگتر از $100 \mu\text{m}$ باشند تا امکان اتصال، رشد و تکثیر سلول‌های استئوبلاست وجود داشته باشد. داربست‌های تهیه شده در این مطالعه از ریزساختار مناسب برای کاربرد در مهندسی بافت استخوان برخوردار هستند. شایان توجه است کلسیم فسفات‌های دوفازی HA/OCP به صورت مخلوط

مراجع

- [1] Dorozhkin, S.V.; Acta biomaterialia, 8(3), 963-977, 2012.
- [2] Mohammadi, Z.; Mesgar, A.S.; Allahbakhshi, A.; 15th Iranian Inorganic Chemistry Conference, 2013.
- [3] Ito, N.; Kamitakahara, M.; Yoshimura, M.; Ioku, K.; Materials Science and Engineering: C.; 40, 121-126, 2014.
- [4] Suzuki, O.; Acta biomaterialia, 6 (9), 3379-3387, 2010.
- [5] Murakami, Y.; Honda, Y.; Anada, T.; Shimauchi, H.; Suzuki, O.; Acta biomaterialia, 6 (4), 1542-1548, 2010.
- [6] Converse G.L.; Conrad T.L.; Roeder, R.K.;

- Journal of the mechanical behavior of biomedical materials, 2 (6), 627-635, 2009.
- [7] Shen, Y.; Liu, J.; Lin, K.; Zhang, W.; Materials Letters, 70, 76-79, 2012.
- [8] Wu, H.; Pang, D.; Ma, C.; Li Q.; Xiong, C.; Journal of Macromolecular Science, Part B.; 51 (6), 1242-1255, 2012.
- [9] Zhang, H.; Wang, Y.; Yan, Y.; Li, S.; Ceramics International, 29 (4), 413-418, 2003.
- [10] Mostafa, N.Y.; Materials chemistry and physics, 94 (2), 333-341, 2005.
- [11] Zhang, H.; Darvell, B.W.; Acta biomaterialia, 6 (8), 3216-3222, 2010.
- [12] Jalota, S.; Tas, A.C.; Bhaduri S.B.; Journal of materials research, 19 (06), 1876-1881; 2004.
- [13] Jalota S.; Bhaduri S.B.; Tas A.C.; Journal of Biomedical Materials Research Part A, 78(3), 481-490, 2006.
- [14] Fellah, B.H.; Josselin-Chappard, N.; Weiss, D.P.; Layrolle, P.; Journal of Materials Science: Materials in Medicine, 18 (2), 287-294, 2007.
- [15] Fellah, B.H.; Delorme, B.; Sohier, J.; Magne, D.; Hardouin, P.; Layrolle, P.; Journal of Biomedical Materials Research Part A, 93 (4), 1588-1595, 2010.
- [16] Chai, Y.C.; Carlier, A.; Bolander, J.; Roberts, S.J.; Geris, L.; Schrooten, J.; Oosterwyck H.V.; Luyten, F.P.; Acta biomaterialia, 8 (11), 3876-3887, 2012.
- [17] Berzina-Cimdina, L.; Borodajenko, N.; Research of calcium phosphates using Fourier transform infrared spectroscopy, Infrared Spectroscopy Materials Science, Engineering and Technology, Edited by Theophile Theophanides, 123-149, 2012.
- [18] Temizel, N.; Giriskan, G.; Tas, A.C.; Materials Science and Engineering: C., 31 (5), 1136-1143, 2011.
- [19] Lam, W.M.; Pan, H.B.; Li, Z.Y.; Yang, C.; Chan, W.K.; Wong, C.T.; Luk, K.D.K.; Lu, W.W.; Ceramics International, 36 (2), 683-688, 2010.
- [20] Neira, I.S.; Guitián, F.; Taniguchi, T.; Watanabe, T.; Yoshimura, M.; Journal of Materials Science, 43 (7), 2171-2178, 2008.
- [21] Hao, L.; Yang, H.; Zhao, N.; Du, C.; Wang, Y.; Powder Technology, 253, 172-177, 2014.
- [22] Zhang, H.; Darvell, B.W.; Journal of the European Ceramic Society, 30 (10), 2041-2048, 2010.
- [23] Zhang, H.; Darvell, B.W.; Acta biomaterialia, 7 (7), 2960-2968, 2011.
- [24] Zhang, H.; Darvell, B.W.; Acta biomaterialia, 6 (8), 3216-3222, 2010.
- [25] Nouri-Felekori, M.; Mesgar, A.S.; Mohammadi, Z.; Ceramics International, 41 (4), 6013-6019, 2015.
- [۲۶] محمدی، زهرا؛ شیخ مهدی مسگر، عبدالرضا؛ بیوسرامیک‌های واکنش‌ناپذیر، انتشارات دانشگاه تهران؛ تألیف، چاپ دوم، ۴۱، ۱۳۹۳.

Biphasic calcium phosphates of hydroxyapatite/octacalcium phosphate with mixed morphology for hard tissue engineering applications

Z. Mohammadi¹, A.R. Sheikh-Mehdi-Mesgar^{3,*}, F. Rasouli³ and M. Noori⁴

1. Bioceramics and Implants Laboratory, Faculty of New Sciences and Technologies, Tehran University, Tehran, Iran
2. Biomaterials Laboratory, Bioceramics and Implants Laboratory, Faculty of New Sciences and Technologies, Tehran University, Tehran, Iran
3. Bioceramics and Implants Laboratory, Faculty of New Sciences and Technologies, Tehran University, Tehran, Iran
4. Biomaterials Laboratory, Faculty of Modern Science and Technology, Tehran University, Tehran, Iran

Received: November 2014, Revised: March 2015, Accepted: April 2015

Abstract: Biphasic calcium phosphates (BCPs) of hydroxyapatite/Octacalcium phosphate (HA/OCP) with mixed morphology of whisker/spherulite were synthesized and characterized by the precipitation-hydrolysis method in an acidic solution containing calcium and phosphate ions and carbonyl diamide. The synthesized solutions were refluxed at 90 °C for 3 or 4 days. The crystalline structure of products was determined by X-ray diffraction (XRD). Fourier transformed infra-red spectroscopy (FTIR) was used to characterize the absorption spectrum. The morphology of products was evaluated by scanning electron microscopy (SEM). The results showed the presence of carbonyl diamide (CA) in synthesized solutions with a Ca/P molar ratio of 1.67 led spherulites to be formed and then whiskers such that an increase of CA concentration was associated with an increase in whisker length and a decrease in spherulite diameter. The concentration of CA was more effective than calcium concentration and Ca/P molar ratio on the size of whiskers. The increase of reaction time may give rise to change the morphology of whiskers to lath-like one (increasing the whisker width) and spherulites from flower-like forms to microspheres. The appropriate chitosan-based composite scaffolds containing various amounts of calcium phosphate phase with a homogenous microstructure of 65–80 porosity are percent and pore size of 50–400 μm could be produced for hard tissue engineering applications. The porosity of scaffolds was decreased with increasing the calcium phosphate phase.

Keywords: Octacalcium phosphate, Hydroxyapatite, Chitosan, Composite scaffolds, Hard tissue engineering