



## مطالعه اسپکتروسکوپی و مورفولوژیکی داربست های نانوکامپوزیتی بر پایه ژلاتین و نانوشیشه ی زیستی

افسانه امیری\*<sup>۱</sup>، سعید ملک نیا<sup>۲</sup>، فروغ حافظی<sup>۱</sup>، فاطمه حسین نژاد<sup>۱</sup>

<sup>۱</sup> دانشگاه آزاد اسلامی، واحد تهران مرکزی، دانشکده علوم پایه، گروه شیمی

<sup>۲</sup> دانشگاه علوم پزشکی بقیه الله (عج)، مرکز تحقیقاتی آسیب های شیمیایی

تاریخ ثبت اولیه: ۱۳۹۰/۴/۱۶، تاریخ دریافت نسخه اصلاح شده: ۱۳۹۰/۶/۱۷، تاریخ پذیرش قطعی: ۱۳۹۰/۶/۲۱

### چکیده

در این تحقیق داربست های نانوکامپوزیتی، از مخلوط محلول آبی ژلاتین با پودر نانوساختاری شیشه زیست فعال سنتز شده به روش سل - ژل تهیه شدند. مخلوط فوق سپس به صورت لایه ای ریخته گری شده و در مرحله بعد با فرایند خشک سازی انجمادی، محتوای آب آن توسط تصعید خارج گردید. محصول بدست آمده در این مرحله لایه های کامپوزیتی متخلخلی بود که برای رسیدن به ضخامت بالاتر برش خورده و سپس با استفاده از محلول ژلاتین بر روی یکدیگر چسبانده شدند. در مرحله بعد لایه های اتصال یافته در محلول گلو تار آلدهید شبکه ای شدند. این کار بمنظور افزایش استحکام مکانیکی انجام پذیرفت. غلظت ژلاتین در محلول اولیه ۱۰٪، درصد شیشه زیست فعال (۱۰، ۲۰، ۳۰٪) و غلظت محلول گلو تار آلدهید ۱٪ استفاده شده جهت ایجاد اتصالات بین زنجیره ای، متغیرهای اعمال شده در این تحقیق بودند. ساخت داربست ها به روش ریخته گری لایه ای و فرایند خشک سازی انجمادی باعث ایجاد ساختاری با تخلخل بالا و حفرات با اندازه های نسبتا یکسان و مرتبط با یکدیگر گردید. رفتار مکانیکی داربست ها در تست فشاری بسیار شبیه به استخوان طبیعی بود و مقادیر اندازه گیری شده بعنوان ضریب ارتجاعی در بازه استخوان اسفنجی قرار داشت. افزایش غلظت درصد شیشه زیست فعال باعث کاهش میزان تخلخل و اندازه حفرات و نیز افزایش میزان ضریب ارتجاعی داربست ها می شد. آزمون زیست فعالی نیز شکل گیری فازهای کلسیم فسفاتی را از روزهای ابتدایی اثبات نمود و نسبت Ca/P در آن به استخوان طبیعی بسیار نزدیک شد. همچنین سائز آپاتیت های تشکیل شده بعد از قرارگیری در محلول SBF (simulated body fluid) به سائز آپاتیت های استخوان طبیعی تا حدودی نزدیک بود. تست سمیت سلولی انجام شده نیز حاکی از عدم سمیت و زیست سازگاری داربست یاد شده بود.

واژه های کلیدی: نانوکامپوزیت، شیشه زیست فعال، ژلاتین، داربست، اسپکتروسکوپی، مورفولوژیکی.

\* عهده دار مکاتبات: افسانه امیری

نشانی: دانشگاه آزاد اسلامی واحد تهران مرکزی، دانشکده علوم پایه، گروه شیمی

تلفن: ۰۹۱۹۲۱۵۵۰۹۴، پست الکترونیکی: E-mail: afsaamiri@gmail.com

## ۱. مقدمه

داربست‌ها در مهندسی بافت از اجزای اصلی مورد استفاده جهت ترمیم و بازسازی بافت‌های آسیب دیده هستند. این داربست‌ها باید دارای خصوصیات شیمیایی، مورفولوژیکی، بیولوژیکی و مکانیکی ویژه‌ای باشند تا عملکرد مطلوب داشته باشند. در راستای نزدیک شدن به ساختار طبیعی استخوان و بهره‌گیری از خصوصیات نانوتکنولوژی، امروزه محققین به ساخت داربست‌های نانوکامپوزیتی روی آورده‌اند. یکی از معضلات بزرگی که علم پزشکی از دیرباز با آن درگیر بوده است، ارائه درمانی قطعی برای بازسازی بافت‌های از کار افتاده و یا معیوب است. متداول‌ترین شیوه در درمان این نوع بافت‌ها، روش سنتی پیوند است که خود مشکلات عدیده‌ای را به دنبال دارد. از جمله این مشکلات می‌توان به کمبود عضو اهدائی، هزینه بالا و اثرات جانبی حاصل از پیوند بافت بیگانه که مهمترین آنها همان پس زنی بافت توسط بدن پذیرنده است اشاره کرد. این محدودیت‌ها دانشمندان را بر آن داشت تا راه حلی مناسب برای این معضل بیابند. مهندسی بافت با عمر کوتاه خود روشی نوید بخش در تولید گزینه‌های بیولوژیکی برای کاشتنی‌ها و پروتزها ارائه کرده و وعده بزرگ تهیه اندام‌های کاملاً عملیاتی برای رفع مشکل کمبود عضو اهدائی را می‌دهد. اهداف مهندسی بافت فراهم سازی اندام‌های کارآمد یا جایگزین‌های قسمتی از بافت برای بیمارانی با ضعف یا از کار افتادگی اندام و یا بیماری‌های حاد است که این امر با استفاده از روش‌های درمانی متنوع اندام مصنوعی-زیستی تحقق می‌یابد. بنا به تعریف، مهندسی بافت رشته‌ای است که از ترکیب علم بیولوژی مواد و علم مهندسی جهت بیان ارتباطات ساختاری بافت‌های فیزیولوژیکی و طبیعی پستانداران در راستای توسعه روش‌های نوین ترمیم بافت و جایگزین سازی بافت، توسعه یافته است. مهندسی بافت شامل مباحثی نظیر ترکیبات نوین سلول‌ها، بیومواد غیرسلولی، داروها، فرآورده‌های ژنی یا ژن‌هایی می‌باشد که قابل طراحی، تشخیص و ساخت بوده و امکان رهایش آنها به طور همزمان یا ترتیبی به عنوان عامل‌های درمانی میسر باشد. اگرچه داروها یا بیومواد غیر سلولی به مواد بسیاری اطلاق می‌گردد اما درمان‌های مهندسی بافت در واقع منحصر به فرد هستند. تاکنون مواد و ترکیبات مختلفی به عنوان جایگزین استخوان مورد استفاده قرار گرفته‌اند و هنوز روند بهره

گیری از ترکیبات جدید با هدف ساخت جایگزین‌های برتر و حذف معایب مواد قبلی ادامه دارد. آخرین تحقیقات انجام شده در این زمینه معطوف به استفاده از نانوکامپوزیت‌ها است. به طور کلی نانوکامپوزیت‌ها به دلیل داشتن خواصی نظیر سطح آزاد بیشتر و در این بین با توجه به خصوصیات مطلوبی که در مورد ژلاتین و شیشه زیست فعال و کامپوزیت متشکل از این دو ترکیب ذکر شد و با توجه به این نکته که استخوان دارای ساختار نانوکامپوزیتی حاوی ۶۰٪ آباتیت، ۹٪ آب و ۲۰٪ کلاژن است و این که آباتیت در آن به صورت بلورک‌های بسیار ریز با ابعادی در حدود ۶۰-۵ نانومتر وجود دارند، به ساخت داربست نانوکامپوزیتی از این دو جزء روی آوردیم. باید دقت داشت که نحوه قرار گرفتن این ترکیبات در کنار هم در استخوان طبیعی بسیار حائز اهمیت است. به عبارتی در بافت استخوان عاملی که باعث استحکام آن می‌شود تا حدود زیادی به طرز قرار گرفتن یا به عبارتی تشکیل بلور نانوذرات مینرالی هیدروکسی آباتیت در داخل زمینه کلاژنی و ساختار سلسله‌ای hierarchical آن است. آباتیت‌ها سوزنی شکل به طول ۴۰-۲۰ نانومتر و ضخامت ۳-۱/۵ نانومتر در ماتریس رشته‌ای شکلی از کلاژن قرار گرفته‌اند که مجموعه‌ی آن‌ها در کنار رشته‌های کامپوزیتی دیگر لایه‌هایی را به ضخامت ۷-۳ میکرومتر تشکیل می‌دهند که آن‌ها نیز بصورت ماریچ در راستای یک محور مشخص استوانه‌ای می‌سازد که به آن استئون هاورسین گفته می‌شود. هر کدام از این استئون‌ها که قطری مابین ۱۵۰ تا ۲۵۰ میکرومتر دارند، از ۴ تا ۲۰ لایه استوانه‌ای هم مرکز تشکیل می‌شود. از کنارهم قرار گرفتن این استئون‌ها و کانال‌های مخصوصی که به کانالیکولی (Canaliculi) معروف هستند قسمت داخلی استخوان شکل می‌گیرد [۱]. از دیدگاه کامپوزیتی هر چه اندازه ذرات شیشه زیست فعال که در این داربست به عنوان تقویت کننده از آن استفاده می‌شود ریزتر باشد محصول بدست آمده دارای استحکام و چقرمگی بالاتری خواهد بود. زیرا اولاً کاهش اندازه ذرات باعث افزایش نسبت سطح به حجم شده و درگیری مکانیکی ذرات پودر را با زمینه به صورت فزاینده‌ای افزایش می‌دهد به علاوه این که در داربست‌های ساخته شده از ژلاتین و شیشه زیست فعال پیوندهای شیمیایی مابین ذرات پودر (یون کلسیم) و ژلاتین (یون کربوکسیل) ایجاد می‌گردد [۲]. بنابراین در صورت کاهش اندازه‌ی ذرات که

شیشه‌سرامیک‌ها برای به دست آوردن نتیجه‌ی مطلوب‌تر در شیشه‌های بیواکتیو در تشکیل بافت جدید استخوان بستگی به ترکیب شیمیایی و خواص بافتی (اندازه‌ی تخلخل و حجم) دارد. ترکیبات خاصی از شیشه‌های بیواکتیو شامل  $\text{SiO}_2\text{-CaO-P}_2\text{O}_5$  بدون ایجاد شدن لایه‌ی فیروزی، هم با بافت سخت و هم با بافت نرم پیوند می‌دهند. تحقیقات انجام شده روی کاشت in-vivo نشان می‌دهند که این ترکیبات هیچ سمیت موضعی در بدن ایجاد نمی‌کنند و همچنین واکنش جسم خارجی در آن‌ها مشاهده نشده است [۱۳]. امروزه تحقیقات در زمینه‌ی واکنش‌های سل-ژل، به دلیل مزایای واضح این روش برای تولید شیشه، شیشه-سرامیک و پودرهای سرامیکی، توجه زیادی را به خود جلب کرده است. این مزایا عبارتند از: اختلاط مولکولی همگن، دمای پایین فرآیند، قابلیت تولید ذرات با اندازه‌ی نانو، انعطاف‌پذیری شگرف در تهیه‌ی پودرهای نانوبلورین، اجسام جامد بی‌شکل یکپارچه و فیلم‌های نازک است [۱۴].

## ۲. مواد و روش‌ها

ژلاتین، در این پروژه از ژلاتین نوع میکروبیولوژی و محصول شرکت Merck با کد محصول ۱۰۴۰۷۰ استفاده شده است. محلول گلو تار آلدهید ۲۵ درصد، محصول شرکت Merck با کد محصول ۸۲۰۶۰۳ به عنوان عامل ایجاد کننده اتصالات بین زنجیره‌ای در ژلاتین. شیشه زیست فعال، جهت ساخت داربست‌های نانو کامپوزیتی در این پروژه شیشه‌ی زیست فعال با ساختار نانو سنتز شد. مواد لازم برای سنتز نانو پودر شیشه‌ی زیست فعال به روش سل ژل شامل موارد زیر است:

الف- تترا اتیل اور تو سیلیکات (TEOS) از شرکت Merck با کد محصول ۸۰۰۶۵۸ معروف به تترا اتو کسی سیلان با فرمول شیمیایی  $\text{Si}(\text{OC}_2\text{H}_5)_4$  جهت تامین  $\text{SiO}_2$  در ترکیب شیشه.

ب- تری اتیل فسفات (TEP) از شرکت Merck با کد محصول ۸۲۱۱۴۱ با فرمول شیمیایی  $\text{C}_6\text{H}_{15}\text{O}_4\text{P}$  برای تامین  $\text{P}_2\text{O}_5$  در ترکیب شیشه.

ج- نترات کلسیم تتراهیدرات  $(\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O})$  از شرکت Merck با کد محصول ۱۰۲۱۲۳ برای تهیه‌ی  $\text{CaO}$ .

با افزایش سطح آزاد همراه است تعداد این پیوندها بیشتر شده، این امر به نوبه خود می‌تواند باعث افزایش بیشتر استحکام داربست نانو کامپوزیتی شود. بر طبق یکی از تحقیقات انجام شده در این زمینه که در آن پاسخ سلولی و میزان رشد سلول‌های استئوبلاست بر روی داربست‌های کامپوزیتی بررسی شده است نشان داده شده است که چسبندگی و تکثیر سلولی این سلول‌ها بر روی داربست‌های نانو کامپوزیتی به مراتب بیشتر از انواع متداول بوده است [۳]. بنابراین از نظر تحریک سلولی بسیار مناسب‌تر است [۲، ۴]. آنچه از مرور تحقیقات کاربردی در زمینه داربست‌های استخوانی نتیجه‌گیری می‌گردد این است که روند پیشرفت تحقیقات به سمت جایگزین‌های کامپوزیتی با اجزای مشابه استخوان طبیعی و روش‌های ساخت زیست تقلیدی (Biomimetic) سوق یافته است [۵-۶]. به دلیل نارسایی‌های پلیمرها و سرامیک‌ها به صورت تک‌جزیی در ترمیم و بازسازی عیوب استخوانی، توجه زیادی به توسعه‌ی کامپوزیت‌های دوجزیی پلیمر-سرامیک معطوف گردیده است تا با ترکیب این دو دسته از مواد، تلفیقی از خواص هدایت استخوانی، قابلیت پیوند با استخوان، پایداری مکانیکی سرامیک‌ها به همراه انعطاف‌پذیری و خواص مکانیکی دینامیکی پلیمرها به دست آید [۷-۸]. از میان بیوسرامیک‌ها، شیشه‌های بیواکتیو توانایی اتصال به بافت‌های زنده بدن را از طریق تشکیل یک لایه در فصل مشترک شان با بافت‌های زنده دارند. از شیشه‌های بیواکتیو به طور موفقیت‌آمیزی به عنوان پرکننده‌های استخوانی در ارتوپدی و جراحی دندان استفاده شده است [۹-۱۰]. برای اولین بار پروفیسور Hench نشان داد که برخی از شیشه‌ها در سیستم  $\text{Na}_2\text{O-CaO-SiO}_2\text{-P}_2\text{O}_5$  می‌توانند با استخوان طبیعی، پیوند تشکیل دهند [۸]. شیشه‌ها و شیشه‌سرامیک‌هایی بر پایه‌ی سیستم  $\text{SiO}_2\text{-CaO-P}_2\text{O}_5$  جزء گروه حائز اهمیت از مواد محسوب می‌شوند که دارای کاربردهای گسترده‌ای در پزشکی به عنوان ایمپلنت‌های استخوان هستند. این مواد می‌توانند در یک آرگانسیم زنده، از طریق تشکیل لایه‌ی آپاتیت بر سطح ایمپلنت، با استخوان پیوند دهند. جایگزینی استخوان و ایمپلنت‌های استخوانی در سال‌های اخیر از طرف پژوهشگران دارای اهمیت زیادی بوده‌اند چرا که نیاز به آن‌ها بسیار مشاهده شده است [۱۱-۱۲]. از زمان کشف بیوشیشه (45S5) توسط Hench، چندین ترکیب دیگر از شیشه‌ها و

۰/۶۴ مول (۱۳/۳۳ گرم) تترااتوکسی سیلان (TEOS) را در ۳۰ میلی لیتر اسید نیتریک ۰/۱ مولار وارد کرده و اجازه داده می شود که روی همزن به مدت ۳۰ دقیقه، عملیات هیدرولیز TEOS توسط اسید نیتریک انجام گیرد. عوامل زیر هر کدام بعد از ۴۵ دقیقه به محیط اضافه می گردند. تری اتیل فسفات (TEP) در مقادیر مشخص شده، سپس کلسیم نترات تتراهیدرات و بعد از ۴۵ دقیقه، نترات منیزیم هگزا هیدرات و در نهایت اجازه می دهیم تا سیستم برای یک ساعت هم زده شود. در طی یک ساعت عملیات هیدرولیز کامل می گردد. سل تهیه شده در یک ظرف تفلونی ایزوله شده برای ۱۰ روز نگهداری میشود تا عملیات پلی کندانسیون (Polycondensation) و تشکیل ژل آغاز شده و ژل تشکیل گردد. ژل بدست آمده برای مدت ۳ روز در خشک کن دمای ۷۰ درجه سانتیگراد حرارت دهی می شود. سپس نمونه ها در دمای ۱۲۰ درجه به مدت ۴۸ ساعت حرارت دهی شدند. محصول به دست آمده در هاون آلومینایی ساییده شده و از صافی با اندازه ۹۰ میکرون (مش ۱۷۰) گذر داده شد. سپس در کوره الکتریکی تا دمای ۷۰۰ درجه با گرادیان حرارتی ۵ درجه بر دقیقه حرارت دهی شده و برای مدت ۲۴ ساعت در این دما نگهداری شد تا ترکیب شیشه ها تثبیت گشته و سترشوند. در پایان جهت انجام عملیات سایش و حصول به اندازه دانه مناسب، محصول به دست آمده در آسیاب ماهواره ای به مدت ۳۰ دقیقه قرار داده شد. در پایان حدود ۲۵ گرم شیشه زیست فعال جهت ساخت داربست نانو کامپوزیتی به دست آمد.

## ۲-۲. ساخت داربست های نانو کامپوزیتی

### ۲-۲-۱. تهیه مخلوط های آبی از ژلاتین - شیشه زیست فعال

در این تحقیق از آب مقطر یون زدایی شده جهت تهیه محلول استفاده شد. به این منظور، ژلاتین با نسبت ۱۰٪، پس از توزین دقیق به تدریج به محلول آبی با درجه حرارت حدود ۴۰°C در حال همزدن با همزن مغناطیسی اضافه شد. پس از نفوذ آب به داخل شبکه و تورم کامل ژلاتین در محلول، متناسب با درصد های مدنظر مقادیر مختلفی از پودر شیشه زیست فعال سنتز شده به محلول اضافه شدند و جهت حصول یک محلول همگن به مدت ۴۵ دقیقه به همان روال قبلی همزده شدند. جدول ۱ مقادیر ترکیبات شیشه

د- نترات منیزیم هگزا هیدرات ( $Mg(NO_3)_2 \cdot 6H_2O$ ) از شرکت Merck با کد محصول ۱۰۵۸۵۳ برای تهیه ی  $MgO$  در ترکیب شیشه.

ه- اسید نیتریک ۰/۱ مولار از شرکت Merck با کد محصول ۱۰۰۶۳۰ به عنوان محیط سل.

### محلول SBF (simulated body fluid)

الف- سدیم کلراید ( $NaCl$ ) از شرکت Merck با کد محصول ۱۰۶۴۰۴۰۵۰۰

ب- سدیم هیدروژن کربنات ( $NaHCO_3$ ) از شرکت Merck با کد محصول ۱۰۱۵۶۲۰۰۰۱

ج- پتاسیم کلراید ( $KCl$ ) از شرکت Merck با کد محصول ۱۰۴۹۳۶۰۲۵۰

د- دی پتاسیم هیدروژن فسفات تری هیدراته ( $K_2HPO_4 \cdot 3H_2O$ ) از شرکت Merck با کد محصول ۱۰۵۰۹۹۱۰۰۰

ه- منیزیم کلراید هگزا هیدرات ( $MgCl_2 \cdot 6H_2O$ ) از شرکت Merck با کد محصول ۱۰۶۷۱۷

و- اسید کلریدریک ( $HCl$ ) از شرکت Merck با کد محصول ۱۰۹۰۵۸۱۰۰۰

ز- کلسیم کلراید ( $CaCl_2$ ) از شرکت Merck با کد محصول ۱۰۲۳۷۸

ح- تریس یا هیدروکسی متیل آمینو متان ( $(CH_2OH)_3CNH_3$ ) از شرکت SIGMA - ALDRICH با کد محصول ۲۰۷۸۰۲-۴۴-۶

برای تهیه محلول SBF مورد استفاده مواد از هر یک از مواد  $NaCl$ ،  $CaCl_2$ ،  $MgCl_2 \cdot 6H_2O$ ،  $K_2HPO_4 \cdot 3H_2O$ ،  $KCl$ ،  $NaHCO_3$ ،  $(CH_2OH)_3CNH_3$  به ترتیب مقادیر ۸/۶۰، ۰/۳۵۳، ۰/۲۴، ۰/۷۴، ۰/۳۰۱، ۰/۲۸، ۰/۰۵ با آب مقطر در حالی که روی همزن مغناطیسی قرار دارد اضافه می گردند. پس از هم خوردن محلول، pH متر در آن قرار می گیرد، به صورت قطره قطره به محلول اضافه می گردد و پس از دادن زمان کافی به محلول پس از افزودن اسید برای رسیدن به pH یکسان تا رسیدن محلول به pH= ۷/۲۵ ادامه می یابد. [۱۵].

### ۲-۱. سنتز شیشه زیست فعال

فازهای تشکیل دهنده ی شیشه زیست فعال مشتق شده از روش سل- ژل در این پژوهش عبارتند از:  $MgO$  و  $P_2O_5$ ،  $CaO$ ،  $SiO_2$ .

جدول ۱- مقادیر ترکیبات ژلاتین و شیشه زیست فعال استفاده شده جهت ساخت داربست های نانو کامپوزیتی.

میزان آب (گرم)	ژلاتین		شیشه زیست فعال		
	گرم	غلظت (%)	گرم	درصد	
۲۸	۲/۸	۱۰	۰	۰	۱
۲۸	۲/۸	۱۰	۰/۳۱۲	۱۰	۲
۲۸	۲/۸	۱۰	۰/۷۰	۲۰	۳
۲۸	۲/۸	۱۰	۱/۲	۳۰	۴
۲۸	۲/۸	۱۰	۲/۱۴	۴۰	۵

### ۳-۲. بررسی خواص مواد سنتزی مورد استفاده

#### ۱-۳-۲. خواص نانو پودر سنتز شده

خواص نانو پودر شیشه زیست فعال سنتز شده در این پروژه با انجام تست های زیر بررسی گردید:

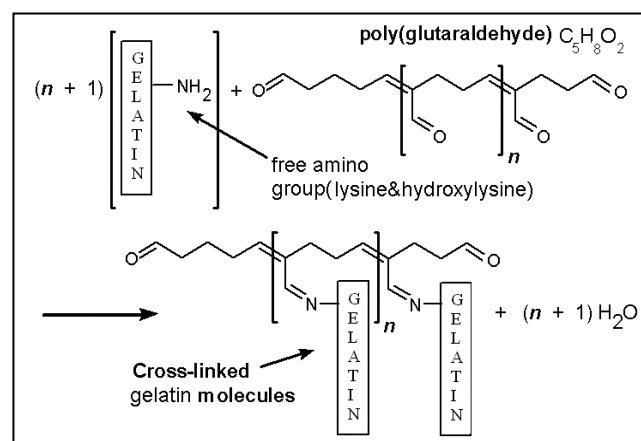
#### ۱-۳-۲-۱. طیف سنجی مادون قرمز فوریه (FTIR)

آزمون FTIR در شناسایی گروه های عاملی و قطعات سازنده سرامیک بر نمونه شیشه ی زیست فعال انجام شد. به این منظور مواد مورد آزمایش با پتاسیم برمید (KBr) مخلوط و سپس تحت فشار، قرص تهیه شد و سپس طیف بینی با قدرت تفکیک  $4\text{ cm}^{-1}$  و  $32\text{ cm}^{-1}$  رویش در محدوده ی عدد موجی دستگاه (ناحیه میانی طیف IR یعنی  $4000 - 400\text{ cm}^{-1}$ ) انجام شد.

#### ۲-۳-۲-۱. آنالیز تفرق اشعه ایکس (XRD)

جهت بررسی ساختار کریستالی، نمونه پودر حاصل شده، مورد آنالیز تفرق اشعه ایکس با استفاده از یک دستگاه XRD ساخت شرکت فیلیپس با طول موج  $\text{CuK}\alpha=1.54\text{ \AA}$  قرار گرفت. زمان اقامت در هر گام یک ثانیه، اندازه گام  $0.02$  درجه و محدوده رویش بین  $20$  تا  $70$  درجه انتخاب گردید.

زیست فعال را برای هر نمونه نشان می دهد. پس از انجام مراحل ریخته گری و خشک سازی انجمادی به منظور افزایش استحکام داربست کامپوزیتی به دست آمده، نمونه ها در محلول گلو تار آلدهید ( $\text{C}_5\text{H}_8\text{O}_2$ ) قرار داده شدند. گلو تار آلدهید با ایجاد اتصالات بین زنجیره ای در ساختار پلیمری ژلاتین باعث افزایش استحکام و کاهش انحلال پذیری آن در آب می شود. اعمال غلظت مناسب برای این منظور حائز اهمیت است زیرا در غلظت های کمتر احتمالاً استحکام کافی ایجاد نمی شود، به علاوه اینکه با افزایش غلظت تردی بیش از حد ژلاتین از یک طرف و باقیمانده احتمالی گلو تار آلدهید در ترکیب، ایجاد سمیت خواهد نمود زیرا این ماده سمی بوده و برای رشد سلول ها مضر است و لذا باقی ماندن مقداری از آن از رشد سلولی ممانعت می کند. بنابراین در این پروژه با توجه به آزمایشات انجام شده در پروژه نانو کامپوزیت ژلاتین هیدروکسی آپاتیت، غلظت گلو تار آلدهید  $1\%$  در نظر گرفته شد تا این که نمونه ها به مدت  $24$  ساعت در آن قرار بگیرند [۷]. شکل ۱ واکنش گلو تار آلدهید را با ژلاتین به صورت شماتیک نمایش می دهد. پس از ایجاد اتصالات بین زنجیره ای توسط محلول گلو تار آلدهید نمونه ها جهت خشک شدن به دستگاه خشک کن انجمادی منتقل شدند. محصول نهایی یعنی داربست نانو کامپوزیتی پس از خشک شدن کامل آماده گردید. سپس نمونه ها از دستگاه خارج شده و برای انجام تست های مختلف آماده شدند [۱۶].



شکل ۱- نحوه ایجاد اتصالات بین زنجیره ای در شبکه ژلاتین توسط گلو تار آلدهید بصورت شماتیک.

## ۲-۳-۲. ارزیابی خواص داربست تهیه شده

## ۲-۳-۲-۱. اندازه و شکل حفره‌ها

به منظور بررسی مورفولوژی حفره‌ها و تخلخل‌های ایجاد شده از میکروسکوپ الکترونی روبشی (LMU) VEGA استفاده شد. لایه‌های نازک از مقاطع بالایی داربست‌های سه بعدی ساخته شده، تهیه شده و با دستگاه فوق تصویربرداری شدند.

## ۲-۳-۲-۲. طیف سنجی مادون قرمز فوریه (FTIR)

به منظور بررسی پیوندهای موجود در ترکیبات افزوده شده به داربست کامپوزیتی و نیز بررسی تاثیر میزان غلظت محلول گلو تار آلدهید از این روش با دستگاه FTIR در محدوده عدد موج  $4000 - 400 \text{ cm}^{-1}$  در حالت عبوری استفاده شد.

## ۲-۴. آزمایش زیست فعالیت و تشکیل و شناسایی لایه‌ی Ca-P

## بر روی سطح نمونه‌ها

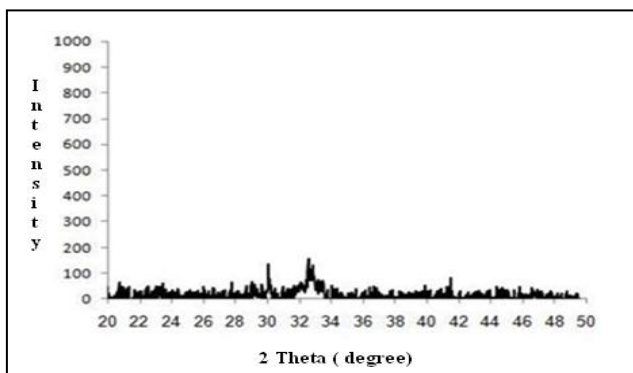
نمونه‌های کامپوزیتی ژلاتین- شیشه زیست فعال به صورت دیسک‌های با قطر ۶ mm و ارتفاع ۲ mm آماده گردید و سپس در مجاورت با محلول SBF به مدت ۱، ۳، ۷، ۱۴ و ۲۱ روز در انکوباتور با دمای  $37^\circ \text{C}$  مشابه با دمای بدن قرار گرفتند که محلول SBF، پلاسمای بدن انسان را شبیه سازی می‌کند. پس از سپری شدن مدت زمان مشخص، نمونه‌ها از SBF خارج گردیده و پس از قرار گرفتن در فریزر و منجمد شدن، نمونه‌ها در فریزر درایر قرار گرفتند تا کاملا خشک شوند. جهت بررسی تشکیل لایه‌ی کلسیم- فسفر بر روی نمونه‌ها از تست میکروسکوپ الکترونی روبشی (EDAX: Energy Dispersive X-Ray Analysis) استفاده شده است. جهت انجام تست SEM از دستگاه VEGA (LMU) ساخت شرکت TE SCAN و تست EDAX از دستگاه INCA Penta FET ساخت شرکت INCA Analrser استفاده گردید. لازم به ذکر است که کامپوزیت‌های پلیمری/سرامیکی حاوی ۴۰٪-۲۰٪ فاز سرامیکی رفتار زیست فعالی مناسب تری از خود بروز می‌دهند، تنها از نمونه حاوی ۳۰ درصد وزنی شیشه جهت بررسی تخلخل و زیست فعالی مورد آزمایش قرار گرفته است.

## ۳. نتایج و بحث

## ۳-۱-۱. نتایج مربوط به پودر شیشه زیست فعال سنتز شده

## ۳-۱-۱-۱. تست پراش اشعه X (XRD)

پودر شیشه زیست فعال سنتز شده در دمای  $700^\circ \text{C}$  توسط XRD مورد بررسی قرار گرفت. با توجه به نمودار XRD در شکل ۲ می‌توان گفت بیوشیشه آمورف است و هیچ پیک خاصی مشاهده نمی‌شود. در نتیجه شیشه‌ی سنتز شده در دمای  $700^\circ \text{C}$  کریستالی نشده است و پودر به دست آمده یک شیشه محسوب می‌شود و نمونه شیشه-سرامیک به حساب نمی‌آید.



شکل ۲- الگوی XRD شیشه زیست فعال سنتز شده در دمای  $700^\circ \text{C}$ .

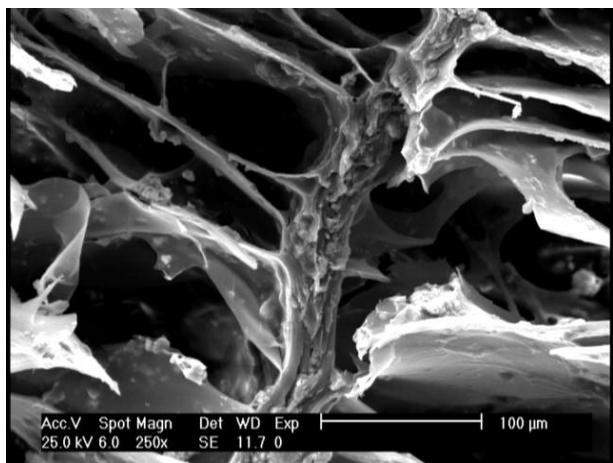
## ۳-۱-۲. طیف سنجی مادون قرمز (FTIR)

جهت تعیین و اطمینان از درستی ترکیب شیمیایی پودر سنتز شده آزمایش فوق انجام شد. شکل ۳ میزان عبور پرتو را بر حسب اعداد موجی نمایش می‌دهد. به طور کلی نتیجه‌ی بدست آمده این موضوع را تایید می‌کند که پودر سنتز شده دارای ترکیب شیمیایی استوکیومتری شیشه زیست فعال است. جدول ۲ مشخصات پیوندهای موجود و اعداد موجی را نشان می‌دهد.

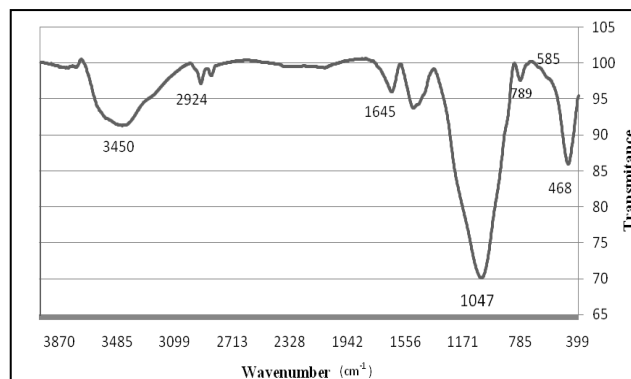
جدول ۲ - پیوندها و اعداد موجی مرتبط به آنها در آزمون طیف سنجی

مادون قرمز پودر سنتزی.

نوع پیوند	محدوده عدد موجی
Si—O—Si	۸۴۶۰، ۱۰۴۷
Si—O	۷۸۹، ۱۶۴۵
$\text{PO}_4^{3-}$	۵۸۵
OH structural	۳۴۵۰



(ب)

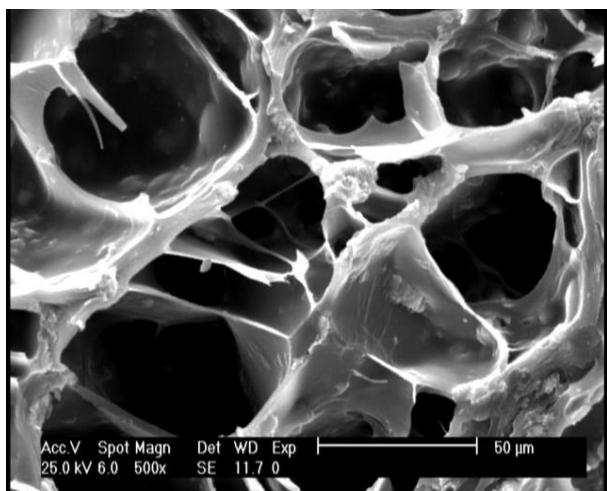


شکل ۳- نتیجه آزمون FTIR مربوط به پودر شیشه زیست فعال سنتز شده.

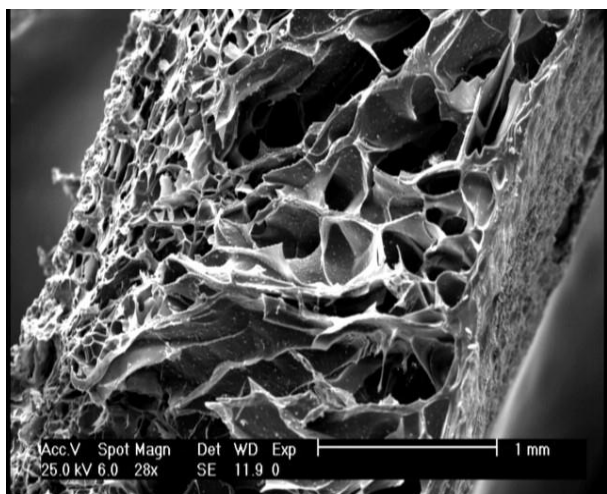
### ۲-۳. نتایج مربوط به داربست کامپوزیتی

#### ۱-۲-۳. اندازه و شکل حفره‌ها

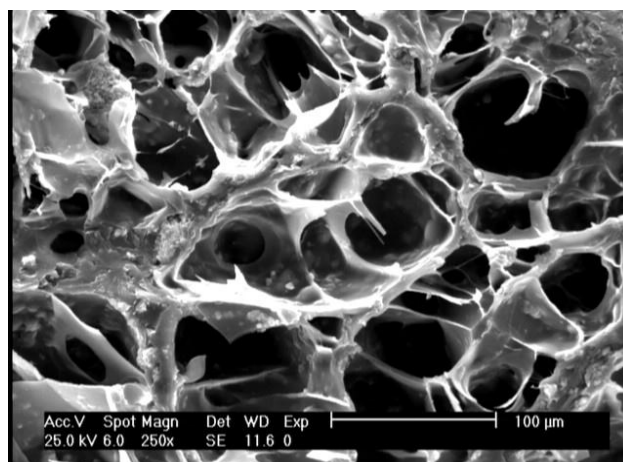
روش ساخت لایه‌ای داربست‌های نانو کامپوزیتی در کنار اعمال متغیرهایی از قبیل درصد شیشه‌ی زیست فعال در کامپوزیت باعث ایجاد ساختاری متخلخل با اندازه حفرات مختلف می‌شود. شکل کلی حفره‌ها از یک ساختار عمومی تبعیت می‌کند که البته با افزایش درصد شیشه زیست فعال دچار تحول شده و از این قاعده منحرف می‌شود. از آن جایی که مکانیزم ایجاد حفره در این داربست‌ها فرآیند خشک‌سازی انجمادی بوده است و این نمونه‌ها به صورت لایه‌ای و از هر دو سطح گسترده‌شان تحت این فرآیند قرار گرفتند، بنابراین ساختار کلی حفره‌ها از مقطع جانبی به صورت استوانه‌های قرار گرفته در کنار هم و از مقطع فوقانی به صورت سوراخ‌های نسبتاً منظم در کنار یکدیگر دیده می‌شوند. در شکل ۴ نمایش تخلخل‌ها، اندازه حفرات و ضخامت دیواره‌های تصاویر میکروسکوپ الکترونی روبشی مربوط به سطح مقطع داربست نانو کامپوزیتی با ۳۰٪ وزنی شیشه زیست فعال مشاهده می‌شود.



(ج)



(د)



(الف)

شکل ۴ - تصاویر میکروسکوپ الکترونی روبشی مربوط به سطح مقطع داربست نانو کامپوزیتی با ۳۰٪ وزنی شیشه زیست فعال: نمایش تخلخل‌ها، اندازه حفرات و ضخامت دیواره‌ها، الف) و ب) (۱۰۰× ج) (۲۰۰× د) (۱۰۰۰×).

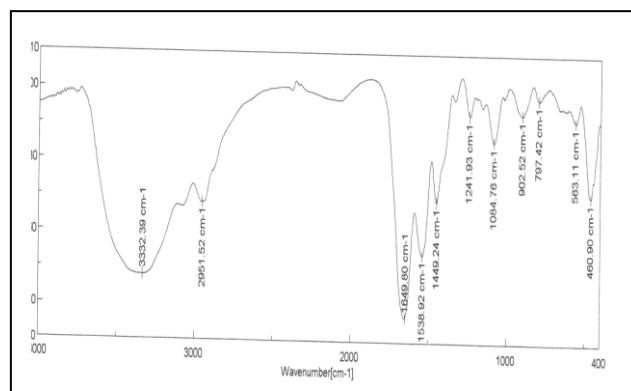
۳-۲-۲. طیف سنجی مادون قرمز (FTIR)

به منظور مطالعه پیوندهای شیمیایی موجود در داربست این آزمایش بر روی آن ها انجام پذیرفت و با توجه به آن که در همه نمونه ها ترکیب کامپوزیت یکسان و تنها درصد شیشه زیست فعال در آنها تغییر کرده است تنها نمونه با ۳۰ درصد شیشه زیست فعال از بین ۳ نمونه جهت تست انتخاب گردید و پیوندهای موجود در آن مورد بررسی قرار گرفت که در شکل ۵ آورده شده است. لازم به ذکر است که نمونه یاد شده به مدت ۲۴ ساعت در محلول گلوکارآلدئید ۱٪ جهت ایجاد اتصالات بین زنجیره‌های پلیمری قرار گرفته است و بعد از شستشو با آب دو بار تقطیر به منظور خشک شدن در فریز درایر قرار گرفت. همچنین در جدول ۳ اعداد موجی و نوع پیوندهای مرتبط به آنها را که مربوط به پیک‌های موجود در تصاویر FTIR است را با استفاده از منابع نشان می‌دهد.

توجه به تراکم مقادیر شیشه زیست فعال توزیع شده در شبکه‌ی پلیمری است.

جدول ۳- اعداد موجی و پیوندهای مرتبط با آن ها برای داربست های نانو کامپوزیتی از جنس ژلاتین-شیشه زیست فعال در آزمون طیف سنجی مادون قرمز [۱۷].

محدوده عدد موجی (cm <sup>-1</sup> )	نوع پیوند	ترکیب
۵۶۳	PO <sub>4</sub> bend	شیشه زیست فعال
۳۳۳۲	O-H ساختاری	شیشه زیست فعال
۱۰۸۴	Si—O—Si	شیشه زیست فعال
۷۹۷	Si-O	شیشه زیست فعال
۱۲۴۱	N-H	ژلاتین ( Amide III )
۱۳۵۳	Ca-COO	یون کلسیم از شیشه زیست فعال و کربوکسیل از ژلاتین
۱۴۴۹	COO	ژلاتین
۱۵۳۸	N-H bend	ژلاتین ( Amide II )
۱۶۴۹	C=O Stretch	ژلاتین ( Amide I )
۲۳۴۸	P-H	فسفر - هیدروژن
۲۹۵۱	C-H	Amide B
۳۳۳۲	O-H Stretch	ژلاتین (اسیدهای کربوکسیلیک)

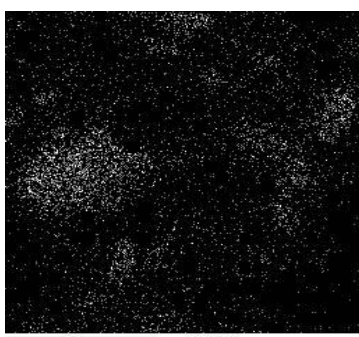


شکل ۵ - FTIR مربوط به نمونه با ۳۰٪ شیشه زیست فعال غوطه ور شده در محلول ۱٪ گلوکارآلدئید.

۳-۳. بررسی توزیع ذرات شیشه زیست فعال در زمینه

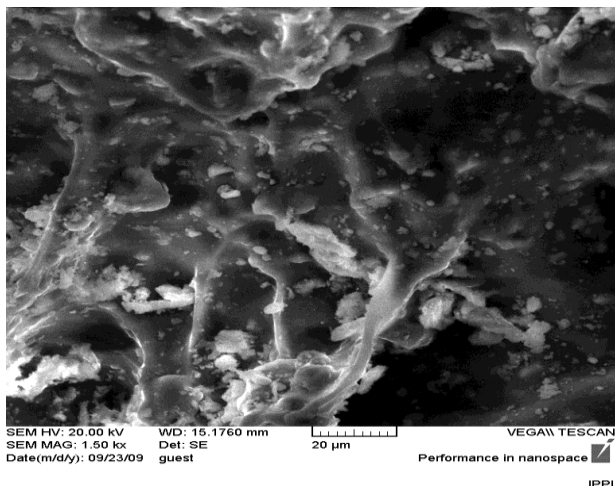
پلیمری کامپوزیت

توزیع عناصر سیلیسیم و کلسیم در کامپوزیت ژلاتین- شیشه زیست فعال به عنوان شاخصی، نمایانگر حضور شیشه زیست فعال در ساختار کامپوزیت می باشد. شکل ۶ سطحی از کامپوزیت حاوی ۳۰٪ شیشه زیست فعال را نشان می‌دهد که با توجه به تصاویر تراکم عناصر سیلیسیم و کلسیم در محل، وجود ذرات شیشه زیست فعال قابل مشاهده می‌باشد. شکل ۷ نیز مقادیر عناصر را در مقطع مشخص شده نشان می‌دهد. ذراتی که در زمینه دیده می شود با

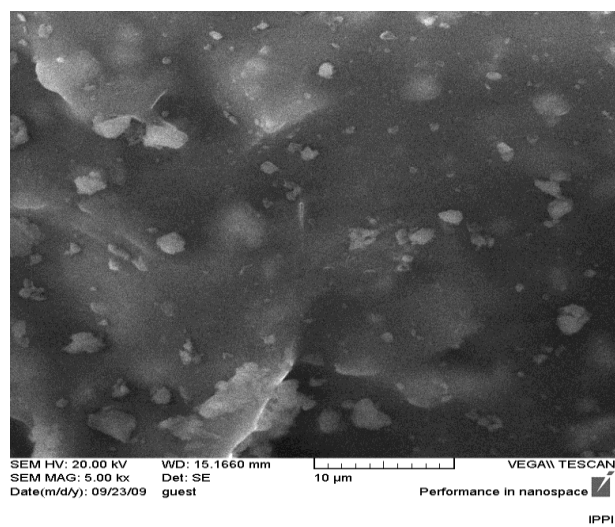


شکل ۶- توزیع عناصر Si و Ca در نمونه‌ی کامپوزیتی با ۳۰٪ شیشه زیست فعال با بزرگ نمایی ۲۵۰۰×.





(ب)

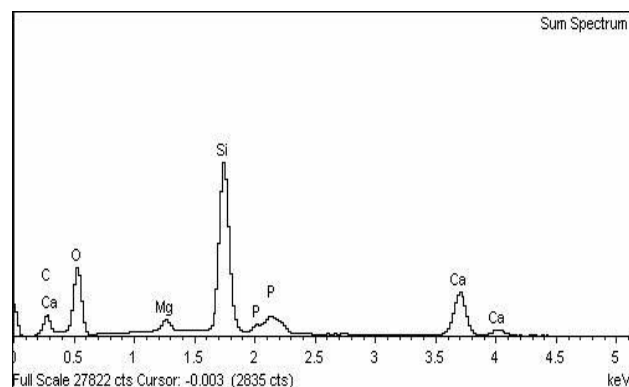


(ج)

شکل ۸- نمایش توزیع پودر شیشه زیست فعال در کامپوزیت با ۳۰ درصد وزنی شیشه زیست فعال با استفاده از میکروسکوپ الکترونی روبشی در بزرگ نمایی‌های (الف)  $\times 200$  (ب)  $\times 1500$  (ج)  $\times 5000$ .

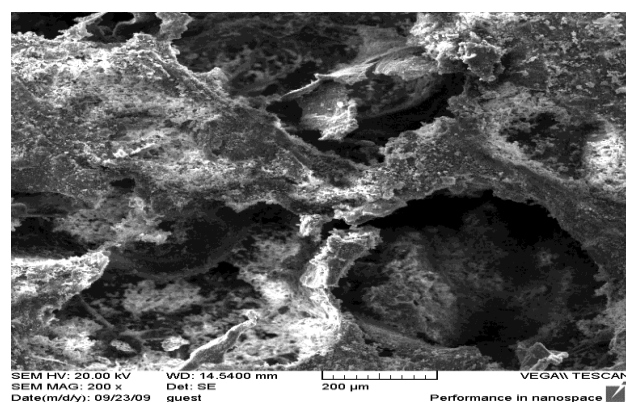
### ۳-۱. بررسی زیست فعالی و تشکیل لایه‌ی Ca-P بر روی سطوح حاوی شیشه زیست فعال در محلول SBF.

برای بررسی تشکیل لایه‌ی هیدروکسی آپاتیت بر روی سطح نمونه‌های کامپوزیتی از نمونه حاوی شیشه زیست فعال پس از قرار گرفتن ۱، ۳، ۷، ۱۴ و ۲۱ روز در محلول SBF تست میکروسکوپ الکترونی روبشی و تست آنالیز و توزیع عناصر کلسیم، فسفر و قبل، تست میکروسکوپ الکترونی روبشی و EDAX تنها بر روی کامپوزیت حاوی ۳۰٪ شیشه جهت بررسی رفتار زیست فعالی انجام شد. بررسیها پس از روزهای متوالی نشان دهنده افزایش میزان



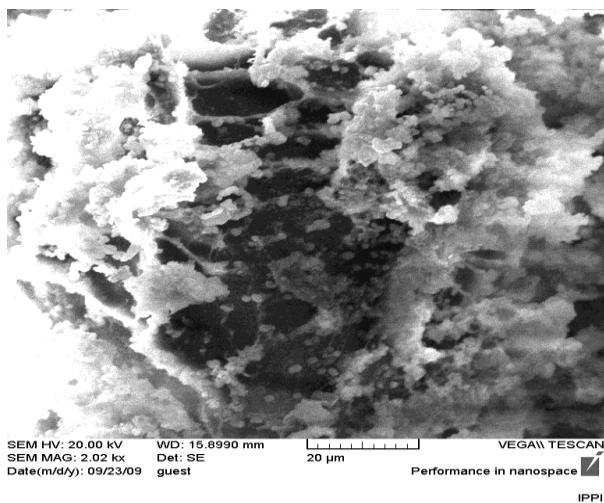
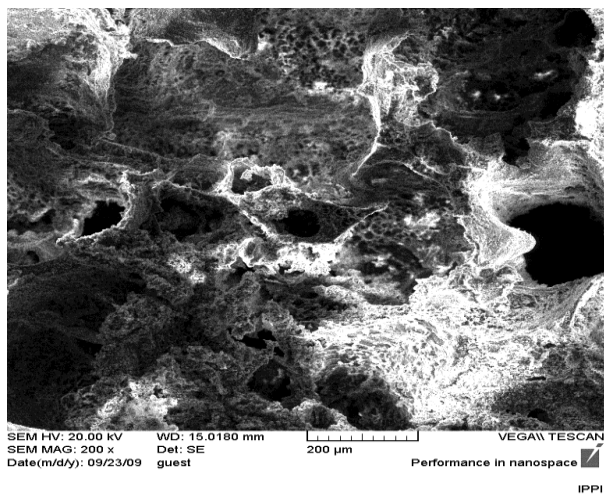
شکل ۷- مقادیر عناصر موجود در سطح نمونه کامپوزیتی حاوی ۳۰٪ شیشه زیست فعال (آزمون EDAX).

پراکندگی عناصر فسفر و کلسیم در سطح کامپوزیت حاوی ۳۰٪ وزنی شیشه زیست فعال در زمینه‌ی ژلاتین نشان از توزیع مناسب ذرات سرامیکی در ساختار دارد. پارامترهای متعددی در چگونگی توزیع پودر سرامیکی در فاز پلیمری اثرگذار هستند که از جمله می‌توان شکل و اندازه ذرات تقویت کننده، ساختار فاز زمینه و روش ساخت کامپوزیت را برشمرد. توزیع مناسب و همگن پودر سرامیکی در کامپوزیت‌های پایه پلیمری و یکنواختی توزیع در بهبود خواص مکانیکی موثر است. اگرچه با کاهش اندازه ذرات و افزایش نسبت ظاهری در ذرات سرامیکی، تمایل به کلوخه شدن در آن‌ها به شدت افزایش می‌یابد و تشکیل بخش‌های کلوخه شده در ساختار کامپوزیتی افت خواص مکانیکی کامپوزیت را به دنبال خواهد داشت. توزیع ذرات شیشه زیست فعال در زمینه کامپوزیت پلیمری در شکل ۸ آورده شده است. توزیع پودر شیشه زیست فعال در زمینه ژلاتین با تمهیدات به کار رفته در هنگام اختلاط دو فاز، توزیع نسبتاً مناسبی را دارا می‌باشند و به طور کلی اختلاط مناسب ذرات سرامیکی با زمینه پلیمری توزیع مناسبی از پودر شیشه زیست فعال در زمینه کامپوزیت را موجب شده است.

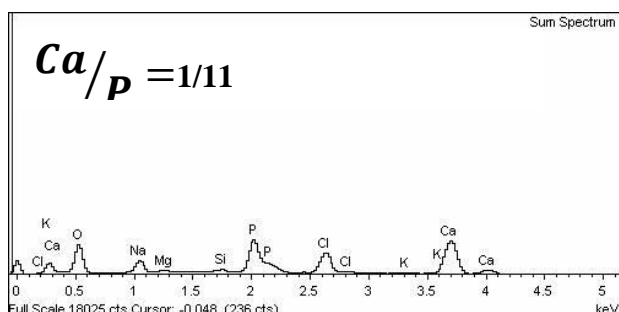


(د)

که به سائز آپاتیت های استخوان طبیعی که در حدود ۴۰-۲۰ نانومتر است تا حدودی نزدیک است [۲۰].

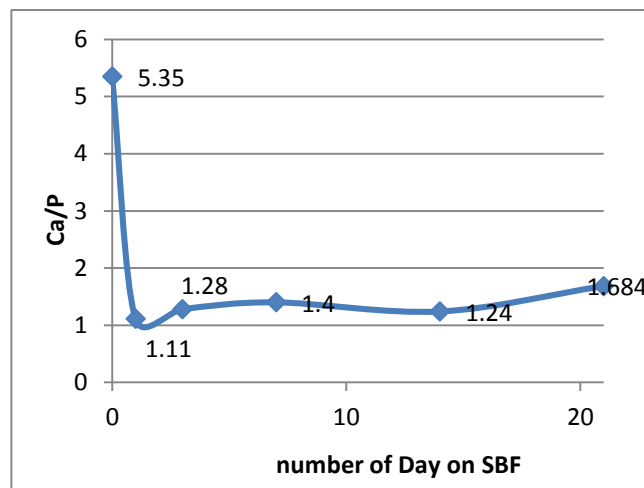


شکل ۱۰- تصاویر SEM از کامپوزیت با ۳۰٪ شیشه زیست فعال پس از سپری شدن ۱ روز در SBF، که نشان دهنده جوانه زنی کلسیم فسفات روی سطح داربست از روزهای آغازین است. (بزرگ نمایی تصویر بالاتر ۲۰۰×، تصویر پایین تر ۲۰۰۰×).



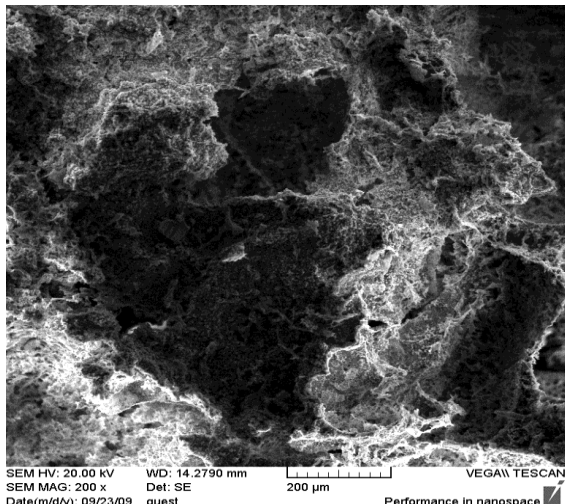
شکل ۱۱- توزیع عناصر Ca و P در کامپوزیت با ۳۰٪ شیشه زیست فعال پس از سپری شدن ۱ روز در SBF (EDAX).

کلسیم و فسفر در سطح داربست است که نمایانگر تشکیل لایه ی Ca-P بر روی سطح نمونه ها است و نتیجه حاصل از متوسط گیری چهار بار تکرار آزمایش در شکل ۹ نشان داده شده است. همان طور که ملاحظه می شود پس از قرار گرفتن داربست در SBF با گذشت زمان نسبت Ca/P رو به افزایش بوده و به استخوان طبیعی نزدیکتر می شود. همچنین نمایش عناصر سیلیسیم، کلسیم و فسفر توزیع مناسب این ذرات در فاز ژلاتین را نشان می دهد.

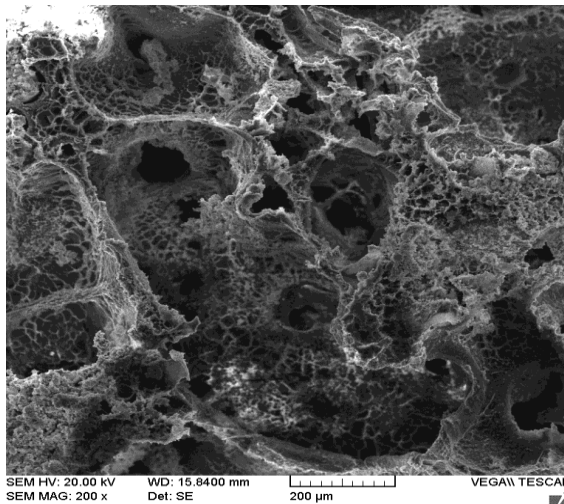


شکل ۹- مقایسه نسبت کلسیم به فسفات بعد از روزهای مختلف قرار گیری در SBF.

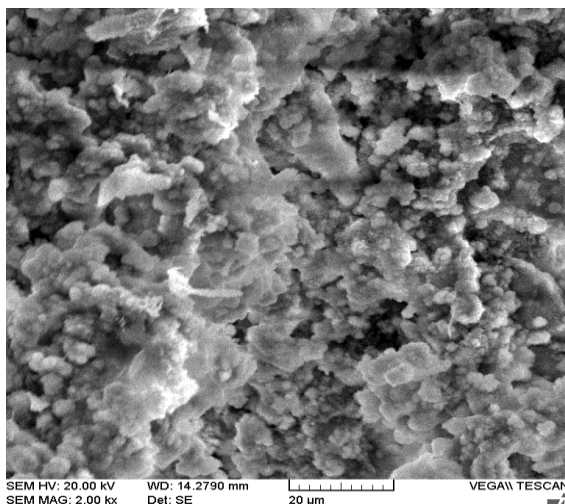
شکل های ۱۰ تا ۱۹ که قرارگیری ۱، ۳، ۷، ۱۴ و ۲۱ روزه را در SBF نشان می دهند نیز حاکی از آن هستند که در همان روزهای ابتدایی بدلیل حضور شیشه زیست فعال در ساختار داربست کامپوزیتی باعث شروع و جوانه زنی هیدروکسی آپاتیت در سطح داربست شده اند. همچنین حضور منیزیم در ترکیب این نوع از شیشه هیچ اثر مخربی بر روی زیست فعالیت داربست نگذاشته است و می توان از این عنصر به عنوان یک ترکیب مفید برای محیط بدن و استخوانها استفاده نماییم [۱۸]. همان طور که در شکل های ۱۸ و ۱۹ مشاهده می شود یک لایه از هیدروکسی آپاتیت روی سطح داربست را به طور کامل پوشانده است و نسبت Ca/P در روز بیست و یکم به مقدار طبیعی آن در استخوان طبیعی که به نسبت ۱ به ۶۷ است، بسیار نزدیک شده و در حدود ۱ به ۶۸/۴ است [۱۹]. همچنین سائز آپاتیت ها که در شکل ۱۸ بعد از ۲۱ روز قرارگیری در محلول SBF مشاهده می شود در حدود ۳۰۰-۱۰۰ نانومتر بوده



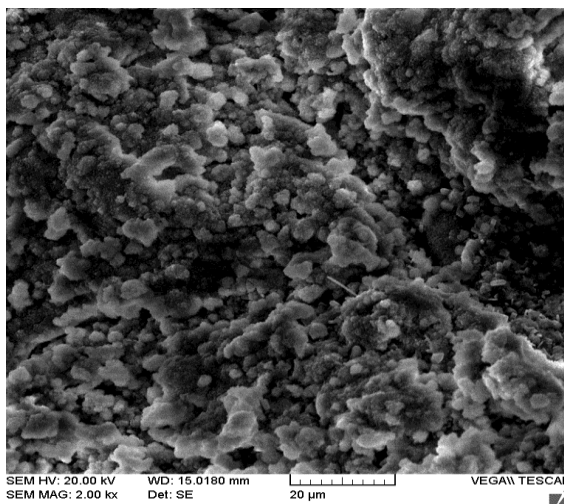
IPPI



IPPI



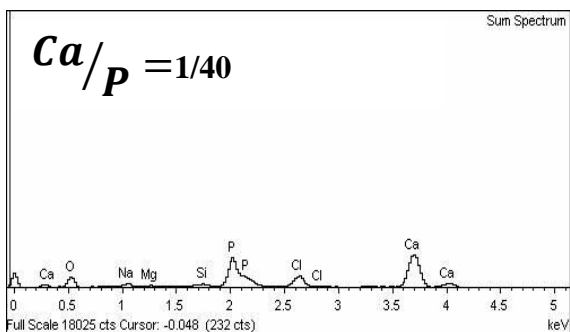
IPPI



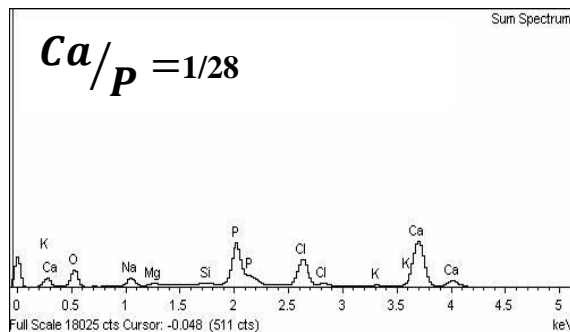
IPPI

شکل ۱۴- تصاویر SEM از کامپوزیت با ۳۰٪ شیشه زیست فعال پس از سپری شدن ۷ روز در SBF، که تشکیل بیشتر کلسیم فسفات روی سطح نسبت به روزهای گذشته مشاهده می شود. (بزرگ نمایی تصویر بالاتر  $\times 200$ ، تصویر پایین تر  $\times 2000$ ).

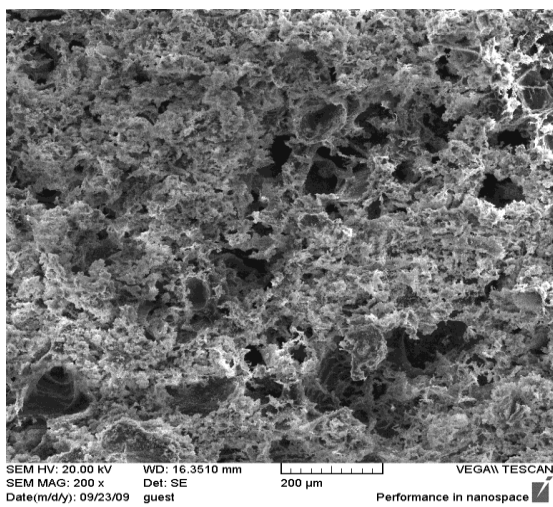
شکل ۱۲- تصاویر SEM از کامپوزیت با ۳۰٪ شیشه زیست فعال پس از سپری شدن ۳ روز در SBF، که نشان دهنده جوانه زنی کلسیم فسفات روی سطح داربست از روزهای آغازین است. (بزرگ نمایی تصویر بالاتر  $\times 200$ ، تصویر پایین تر  $\times 2000$ ).



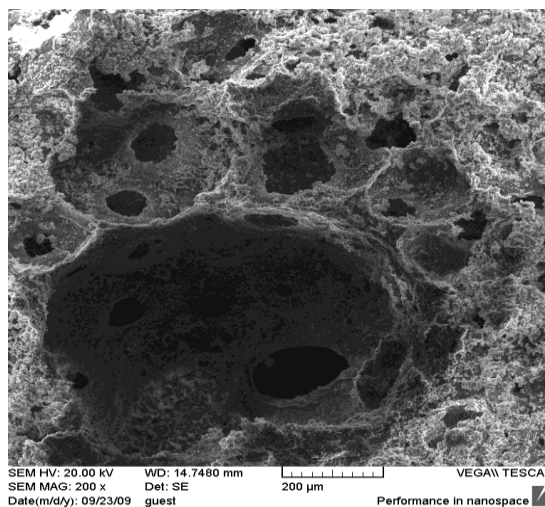
شکل ۱۵- توزیع عناصر P و Ca در کامپوزیت با ۳۰٪ شیشه زیست فعال پس از سپری شدن ۷ روز در SBF (EDAX).



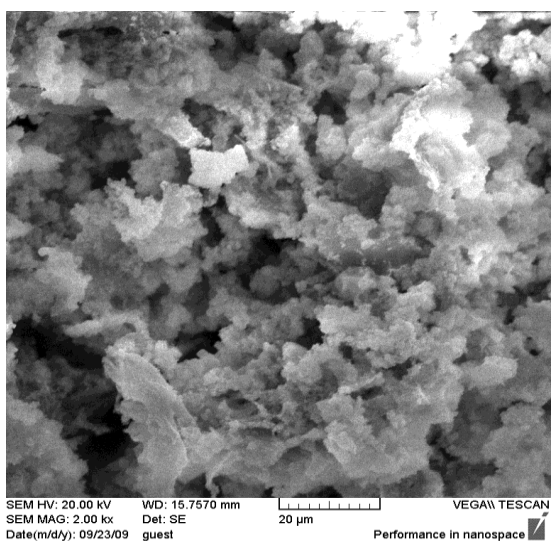
شکل ۱۳- توزیع عناصر P و Ca در کامپوزیت با ۳۰٪ شیشه زیست فعال پس از سپری شدن ۳ روز در SBF (EDAX).



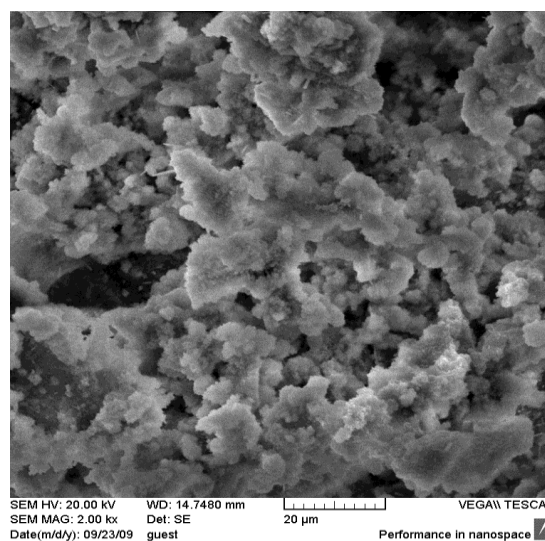
IPPI



IPPI



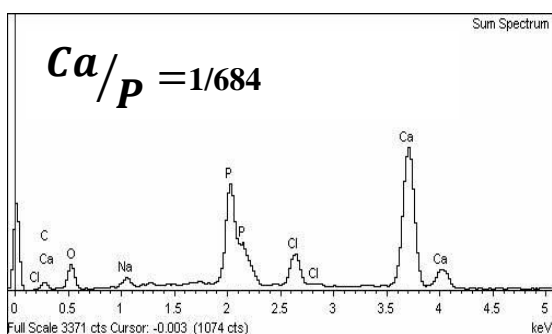
IPPI



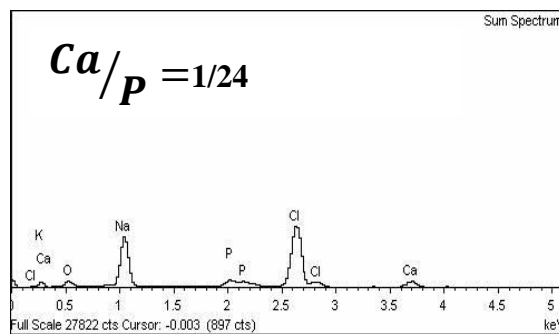
IPPI

شکل ۱۸- تصاویر SEM از کامپوزیت با ۳۰٪ شیشه زیست فعال پس از سپری شدن ۲۱ روز در SBF، که نشان دهنده شکل گیری لایه ای غنی از هیدروکسی آپاتیت روی سطح داربست است. (بزرگ نمایی تصویر بالاتر ۲۰۰×، تصویر پایین تر ۲۰۰۰×).

شکل ۱۶- تصاویر SEM از کامپوزیت با ۳۰٪ شیشه زیست فعال پس از سپری شدن ۱۴ روز در SBF، (با بزرگ نمایی تصویر بالاتر ۲۰۰×، تصویر پایین تر ۲۰۰۰×).



شکل ۱۹- توزیع عناصر P و Ca در کامپوزیت با ۳۰٪ شیشه زیست فعال پس از سپری شدن ۲۱ روز در SBF (EDAX)



شکل ۱۷- توزیع عناصر P و Ca در کامپوزیت با ۳۰٪ شیشه زیست فعال پس از سپری شدن ۱۴ روز در SBF (EDAX).

## ۴. نتیجه گیری

همچنین داربست های نانو کامپوزیتی ژلاتین/شیشه زیست فعال به روش ریخته گری حلال، خشک سازی انجمادی و لایه چینی تهیه شدند. متغیر اصلی در روند ساخت این داربست ها درصد پودر شیشه زیست فعال افزوده شده در کامپوزیت دوجزبی GEL/BG بود که مورد مطالعه قرار گرفت.

در این تحقیق، پودر شیشه زیست فعال به روش سل-ژل سنتز گردید. نتایج بدست آمده از آزمون FTIR و XRD تایید کننده صحت ترکیب شیمیایی و استوکیومتری بودن پودر سنتز شده هستند و نتایج XRD تاییدی بر آمورف بودن شیشه زیست فعال و عدم وجود فازهای کریستالی است. توزیع اندازه ذرات پودر نیز با استفاده از آزمون Static Light Scattering سنجیده شد که نتیجه آن نشان می دهد اول این که توزیع اندازه ذرات بشکل گوسی بوده، دوم این که حدود ۵۰٪ ذرات دارای قطری حدود ۵μm، که ۲۵٪ حدود ۵۵۰nm و ۲۵٪ دیگر نیز حدود ۳۵۰nm هستند. البته به نظر می رسد با اعمال فرآیندهای جداسازی ذرات در محلول مانند اعمال مافوق صوت می توان اندازه قطر ذرات را کاهش داد. زیرا وجود ذرات ریز تر از بازه ی مشاهده شده در تست یاد شده، در حدود حتی کمتر از ۱۰۰nm در تصاویر SEM تایید کننده این واقعیت است که ذرات تمایل به کلوخه شدن دارند. تصاویر SEM نیز نشان می دهند که ذرات به شکل میله ای متمایل به کروی بوده و اندازه آن ها غالباً کمتر از ۴۰۰nm است. شیشه زیست فعال سنتز شده جهت استفاده در کامپوزیت، شامل جزء MgO است که ترکیبی غیرمعمول نسبت به سایر شیشه های زیست فعال جهت کاربرد در بدن است. ولی با توجه به تحقیقات انجام شده توسط سایر محققین بر روی این نوع از شیشه حاکی از آن است که در تمامی مراحل آماده سازی، عملیات حرارتی و تست زیست فعالیت هیچ تاثیر مخربی نداشته است و تنها اثر اصلی آن تعویق در زیست فعالی در حد بسیار کمی بوده است. در عوض با توجه به اثرات مفیدی که این یون می تواند در ترکیب شیشه های زیست فعال از جمله جلوگیری از پوکی استخوان در مکانهای آسیب دیده که استعداد بالایی برای ابتلا به آن را دارند، قابل قبول و قابل تحمل است [۱۸].

## ۵. مراجع

- [1] J.B. Park, *Introduction to biomaterials*. (1992), New York: Plenum Press.
- [2] D.W. Hutmacher, *Biomaterials.*, 21 (2000) 2529.
- [3] T.O. Jones JR, E.E. Coates, M.M. Stevens, J.M. Polak, L.L. Hench, *Biomaterials.*, 28 (2007) 1653.
- [4] V. Maquet, L. Pravata, I. Notingher, R. Jerome, *Biomaterials.*, 25 (2004) 4185.13
- [5] S. Yang, K. F.L., D. Zhaohui, C. K. Chua, *Tissue Engineering.*, 7 (2004) 679.
- [6] S. Yang, *The design of scaffolds for use in tissue engineering. Part I. Traditional factors. Tissue Eng.*, 7(6) (2001) 679.
- [7] W. Linhart, *J Biomed Mater Res.*, 54 (2) (2001) 162.
- [8] A. Balamurugan, G.S.J. Michel, J. Faure, V. Banchet and L. Wortham, *Mater. Let.*, 60 (2006) 3752.
- [9] M. Cerruti, S. N, *Mineralogy & Geochemistry.*, 64 (2006) 283.
- [10] B. Al, *Mineralization of bones and teeth.*, Elements. 3 (2007) 385.
- [11] F.H. Lin, *Biomaterials.*, 15(13) (1994) 1087.
- [12] J.F. Shackelford, *Bioceramics application of ceramic and glass materials in medicine*. California, (1999).
- [13] L.L. Hench, *Ceramics International.*, 22(6) (1996) 493.
- [14] J. Brinker, *Sol-Gel Science: The Physics and Chemistry of Sol-Gel Processing*. Academic Press, San Diego, (1990).
- [15] T. Kokubo, H. Kushitani, S. Sakka, T. Kitsugi and T. Yamamuro, *J. Biomed. Mater. Res.*, 24 (1990) 721.