

مقاله پژوهشی

تهیه و مشخصه‌یابی کامپوزیت تزریق پذیر ژلاتین/آلژینات/کندروئیتین سولفات/ β -TCP/n-CDHA برای کاربردهای ترمیم استخوان

علیرضا چمن‌سرا، علی اصغر بهنام‌قادر* و علی زمانیان

گروه بیومواد، پژوهشکده فناوری نانو و مواد پیشرفته، پژوهشگاه مواد و انرژی، البرز، ایران

تاریخ ثبت اولیه: ۱۴۰۱/۰۴/۱۶، تاریخ دریافت نسخه اصلاح شده: ۱۴۰۱/۰۷/۱۴، تاریخ پذیرش قطعی: ۱۴۰۱/۰۸/۱۲

چکیده

در این مطالعه، خمیرهای کامپوزیتی با مواد معدنی β -TCP و n-CDHA و اجزای پلیمری ژلاتین، آلژینات و کندروئیتین سولفات آماده‌سازی و مشخصه‌یابی شدند. آزمون‌های تزریق‌پذیری، مقاومت به آبشویی و جریان‌یابی در دو حالت چرخشی و نوسانی بر روی نمونه‌ها انجام شد. نتایج آزمون جریان‌یابی نشان داد که نمونه‌ها دارای ویژگی‌های سیالات غیرنیوتنی، رقیق‌گردانی برش و تیکسوتروپی هستند. طیف FTIR، نشان از تشکیل پیوندهای الکترواستاتیک میان COO^- و یون‌های Ca در ترکیب خمیر داشت. زیست‌فعالی با تشکیل یک لایه نانوساختار هیدروکسی‌آپاتیتی بر روی نمونه پس از قرارگیری آن در محیط SBF به مدت ۱۴ روز با تصاویر FESEM و آزمون‌های FTIR و XRD بررسی و تأیید شد. پاسخ سلول‌های MG-63 در MTT، عدم سمیت و افزایش تکثیر سلولی را پس از ۷ روز در حضور نمونه کامپوزیتی نشان داد (چگالی نوری ۱/۷۹). همچنین سطح فعالیت آنزیم ALP نیز در همین مدت در حضور نمونه افزایش یافت ($1/25 \mu\text{g}/\text{min}/\text{mg protein}$). چسبندگی سلول‌های MG-63 بر سطح کامپوزیت نیز با تصاویر SEM بررسی و تأیید گردید. بر طبق نتایج بدست آمده، کندروئیتین سولفات، باعث بهبود درصد وزنی حمل فاز معدنی (۱ تا ۳٪)، تزریق‌پذیری (۱ تا ۷٪)، عملکرد مقاومت به آبشویی (۱ تا ۶٪ پس از یک ماه) و پاسخ سلولی به نمونه‌ها شده است. با در نظر گرفتن این ویژگی‌ها، بیومواد کامپوزیتی تهیه شده در این تحقیق، می‌تواند به عنوان یک ماده زیست‌فعال تزریق‌پذیر برای کاربردهای ترمیم استخوان در ناحیه نزدیک به بافت غضروفی و مهندسی بافت استخوان استفاده شود.

واژه‌های کلیدی: بتاتری کلسیم فسفات، هیدروکسی‌آپاتیت کم کلسیم، ژلاتین، آلژینات و کندروئیتین سولفات.

۱- مقدمه

اتوگرفت و آلوگرفت، باعث شده که در دهه اخیر استفاده از جایگزین‌های مصنوعی استخوان در شکل‌های متفاوت با نرخ زیادی افزایش پیدا کند [۱،۲]. بیومواد تزریق‌پذیر استخوانی با ترکیب‌های گوناگون، با حداقل عملکرد تهاجمی، کاربری

برای درمان برخی از آسیب‌ها و عارضه‌های استخوانی، نیاز به پیونددهی استخوان است. محدودیت‌ها و معایب روش‌های

* عهده‌دار مکاتبات: علی اصغر بهنام‌قادر

نشانی: پژوهشکده فناوری نانو و مواد پیشرفته، پژوهشگاه مواد و انرژی، البرز، ایران

تلفن: ۰۲۶-۳۶۲۸۰۴۰، دورنگار: ۰۲۶-۳۶۲۰۱۸۸۸، پست الکترونیکی: behnamghader@yahoo.com

به این ترتیب به واسطه ماهیت نانومتری پودرهای CDHA، بر افزایش انسجام و پایداری خمیر کامپوزیتی در سطح گسترده، تأثیر گذار باشند [۱۴].

ویژگی‌هایی زیست‌فعالی، زیست‌تخریب‌پذیری و رسانش استخوانی، باعث شده تا از بتا تری کلسیم فسفات (β -TCP) به عنوان فاز معدنی بیومواد کامپوزیتی تزریق‌پذیر استفاده شود [۱۵]. استفاده از گرانول‌های بزرگ‌تر از $500 \mu\text{m}$ و با تخلخل کم، ضامن دستیابی به بازجذب مطلوب β -TCP در شرایط زیستی است [۱۶]. البته در این مورد چالش پر کردن تمام ناحیه آسیب‌دیده، همچنان وجود دارد. راه دیگر استفاده از یک زمینه مناسب برای حمل فاز معدنی β -TCP است.

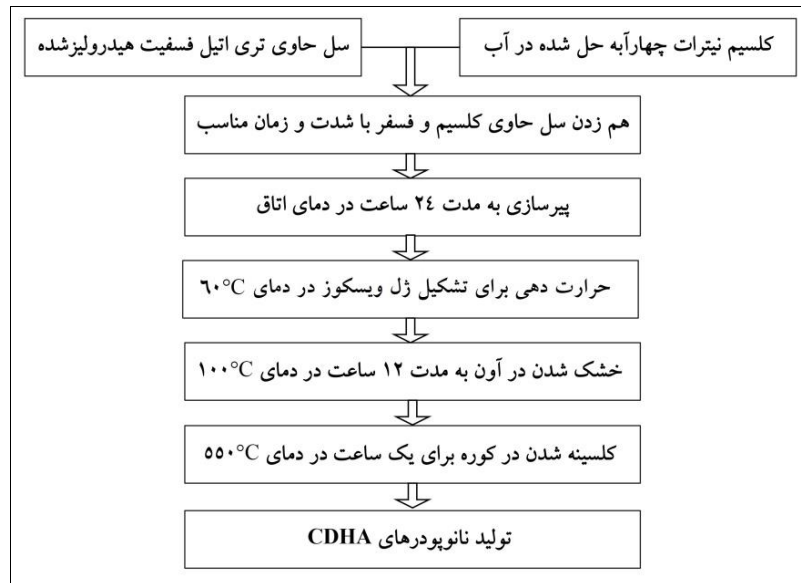
در این روش از سرعت تخریب و بازجذب β -TCP کاسته می‌شود و آزادسازی به هنگام یون‌های کلسیم و فسفات در محل مورد نظر باعث تشکیل بافت استخوان جدید می‌شود [۱۷، ۱۸]. لازم بذکر است که علاوه بر انتخاب اجزای مطلوب برای ساخت یک کامپوزیت تزریق‌پذیر، بررسی خواص پایه‌ای نظیر تزریق‌پذیری، آبشویی، کارپذیری و جریان‌یابی نیز ضروری می‌باشند [۷، ۱۹]. قرارگیری اجزای یادشده، با توجه به ویژگی‌های مطلوب زیستی و شیمیایی آن‌ها، در ترکیب کامپوزیت مورد بحث و بهینه‌سازی ترکیب و مشخصه‌یابی فیزیکی، شیمیایی و زیستی آن از جمله نوآوری‌های این تحقیق به شمار می‌رود. کمبود اطلاعات در زمینه‌های اثرگذاری بهینه پلیمرهای موجود در این کامپوزیت با کنترل پیوندهای هیدروژنی کربوکسیل-آمین، پیوندهای ضعیف آمین-آمین و پیوندهای قدرتمند ولی محدود الکترواستاتیک، اثرگذاری بر پخش گسترده و یکنواخت پیوندهای الکترواستاتیک به دلیل ماهیت نانومتری CDHA و بطور کلی بررسی مشخصه‌های گوناگون کامپوزیت ژلاتین/آلژینات/کندرویتین سولفات/ β -TCP/ α -CDHA، با توجه به ویژگی‌های مطلوب اجزای آن، از جمله دلایل انجام این مطالعه بود.

آسان و پر کردن تمام ناحیه موردنظر، به ترمیم و بازسازی بافت استخوانی آسیب‌دیده کمک می‌کنند [۳، ۴].

ژلاتین از جمله پلیمرها با خواص زیستی ممتاز است که برای حمل فاز معدنی در ترکیب کامپوزیت‌های تزریق‌پذیر بکار می‌رود [۵، ۶]. این امر به دلیل شباهت ساختاری آن با کلاژن، بخش اصلی فاز آلی استخوان، می‌باشد. استفاده تنها از ژلاتین، محدودیت‌هایی نظیر انحلال زود هنگام در محیط‌های زیستی و عدم پایداری مطلوب را برای بیومواد کامپوزیتی به همراه داشته است. برای حل این مشکل، از پلیمرهای کربوهیدراتی مانند آلژینات در کنار ژلاتین استفاده می‌شود [۷، ۸]. آلژینات برهمکنش مطلوبی با ژلاتین دارد و به لطف حضور گروه‌های عاملی کربوکسیل در ساختارش، با اغلب کاتیون‌های دو یا چند ظرفیتی از بخش معدنی کامپوزیت، پیوندهای الکترواستاتیک برقرار می‌کند و پایداری خمیر نهایی را ارتقاء می‌بخشد [۹].

از دیدگاه زیستی، کندروئیتین سولفات به تشکیل بافت استخوانی با فرآیند استخوانی شدن داخل غضروفی سرعت می‌دهد [۱۰]. به این ترتیب، حضور این پلی‌ساکارید در بیومواد کامپوزیتی، به روند بهبود آسیب‌های استخوانی در ناحیه‌های نزدیک به بافت غضروفی کمک می‌کند [۱۱]. همچنین از دیدگاه شیمیایی، گروه‌های عاملی موجود در کندروئیتین سولفات، زمینه‌ای مناسب برای برهمکنش مطلوب کووالانسی یا یونی با دیگر مولکول‌های موجود در بیومواد کامپوزیتی مهیا می‌کند که این امر موجب افزایش پایداری و قوام خمیر تزریق‌پذیر می‌شود [۱۲، ۱۳].

استفاده از نانو پودرهای هیدروکسی‌آپاتیت کم کلسیم (CDHA) در ترکیب کامپوزیت، علاوه بر داشتن ویژگی‌های مطلوب بیولوژیکی، بر انسجام خمیر تأثیر گذار است. یون‌های کلسیم رها شده از نانو پودرهای CDHA، می‌توانند با گروه‌های عاملی موجود در پلیمرهای کامپوزیت، نظیر گروه‌های عاملی کربوکسیل تشکیل پیوند کووالانسی دهند و



شکل ۱: روند نمای سنتز نانوپودرهای CDHA به روش سل-ژل.

۲-۲- سنتز پودر β -TCP

برای سنتز پودر β -TCP مطابق روش آلونسو (Alonso) و همکارانش [۲۱]، تری کلسیم فسفات (Merck, No. 2143) و کلسیم هیدروژن فسفات دوآبه (Sigma-Ald, No. 307653) با مقادیر مشخص در آب برای ۴ h آسیاب و مخلوط شدند. دوغاب بدست آمده در دمای 120°C خشک شد. سرانجام، مخلوط خشک شده در دمای 1100°C برای ۶ h حرارت دهی شد. پودر نهایی پس از آسیاب و گذراندن از الک با مش ۴۰۰، بدست آمد.

۲-۳- آماده‌سازی خمیرهای کامپوزیتی

فاز پلیمری از محلول‌های آبی ژلانی (Merck, 104070)، سدیم آلزینات (Sigma-Aldrich, No. 180947) و سدیم ۴-کندروئیتین سولفات (Carbosynth, YC15288) تهیه شد. سپس مقادیر مشخصی از β -TCP و نانوپودرهای CDHA به ترتیب و به آهستگی به بخش پلیمری افزوده شدند.

در این پژوهش، ابتدا خمیرهای کامپوزیتی با ترکیب مواد معدنی β -TCP و نانوپودرهای CDHA و بیوپلیمرهای ژلاتین، آلزینات و کندروئیتین سولفات تهیه شدند. سپس ویژگی‌های پایه‌ای آن‌ها نظیر تزریق‌پذیری، مقاومت به آبشویی و جریان‌یابی ارزیابی شده و سنجش‌های زیستی برون‌تن و زیست‌فعالی بر روی نمونه کامپوزیتی منتخب انجام گردید. در ادامه، تأثیر حضور کندروئیتین سولفات بر خواص گوناگون خمیر بررسی گردید.

۲- فعالیت‌های تجربی

۲-۱- سنتز نانوپودرهای CDHA

مواد اولیه جهت سنتز نانوپودرهای CDHA به روش سل-ژل شامل Ca نیترات چهارآبه (Sigma-Aldrich, No. C1396) و تری اتیل فسفیت (Sigma-Aldrich, No. T61204) بودند. در این روش نسبت Ca/P، $1/55$ در نظر گرفته شد [۲۰]. روندنمای این سنتز در شکل ۱ نشان داده شده است.

فاکتور شکل، طول موج پرتوی X و زاویه پراش براگ به ترتیب با K ، λ و θ نشان داده شده است. ساختار مولکولی و پیوندهای شیمیایی توسط FTIR (Thermo-Avatar) بررسی شد. از آزمون‌های DLS (Malvern-Zen 3600) و PSA (Malvern Mastersizer) جهت مشخص کردن توزیع اندازه ذرات بکار گرفته شد. زاویه پراکنش و نرخ شمارش در آزمون DLS، به ترتیب 90° و ۲۱۹ kCPS بود. ترکیب عنصری نمونه‌ها توسط ICP-OES (Agilent-ICP 7900) و EDS (TESCAN-MIRA III, SAMX detector) ارزیابی شد. برای بررسی ریزساختار و مورفولوژی از SEM (TESCAN-MIRA III) استفاده شد. در آزمون تزریق‌پذیری، سرنگ حاوی ۳ ml از خمیر کامپوزیتی در یک محفظه ثابت شد و با سرعت ۱۵ mm/min با دستگاه تست یونیورسال (SANTAM STM-20) تزریق گردید. درصد تزریق‌پذیری کامپوزیت‌ها (% Inj.) با معادله ۳ محاسبه شد [۷].

$$\text{Inj. \%} = \frac{\text{جرم نمونه تزریق شده}}{\text{جرم نمونه قبل تزریق}} \times 100 \quad (۳)$$

برای سنجش عملکرد مقاومت به آشنوبی، نمونه‌های قرصی شکل با ارتفاع ۳ mm و قطر ۷ mm در محلول بافر Tris (pH=۷/۴) معلق شدند و در آنکوباتور لرزاننده با دمای 37°C و سرعت ۳۰ rpm برای زمان‌های گوناگون قرار داده شدند. درصد اتلاف وزن (% W.L.) به عنوان معیار آشنوبی کامپوزیت با معادله ۴ بدست آمد [۲۳].

$$\text{W. L. \%} = \frac{\text{جرم نمونه از دست رفته}}{\text{جرم ابتدایی}} \times 100 \quad (۴)$$

ویژگی‌های جریان‌یابی نمونه‌ها در دو حالت چرخشی و نوسانی با دستگاه رئومتر (Anton Paar-Physica MCR 301) دارای صفحات موازی در دمای اتاق بررسی شد. متغیرهای تنش برشی و ویسکوزیته در حالت چرخشی با کنترل نرخ برش بدست آمدند.

در آخر، نمونه‌های کامپوزیتی به منظور مشخصه‌یابی در قالب یا سرنگ ریخته شدند. طراحی آزمایش این مطالعه و ترکیب کامپوزیت‌ها در جدول ۱ آورده شده است. نسبت پودر CDHA به فاز مایع در تمام ترکیب‌ها ثابت و برابر ۰/۱ g/ml در نظر گرفته شد. با توجه به جدول ۱، در نمونه کامپوزیتی با کد $G_xA_yP_m$ ، درصد وزنی ژلاتین، درصد وزنی آلزینات و نسبت پودر β -TCP به مایع، به ترتیب معادل x ، y و $0.1 \times m$ است و حرف C نیز معرف حضور کندروئیتین سولفات در ترکیب می‌باشد.

جدول ۱: درصد وزنی پلیمرها و نسبت وزن β -TCP به حجم فاز آلی در کامپوزیت‌ها.

| کد نمونه | درصد وزنی ژلاتین | درصد وزنی آلزینات | درصد وزنی کندروئیتین سولفات | β -TCP (P/L: g/ml) |
|------------|------------------|-------------------|-----------------------------|--------------------------|
| G2A10P155 | ۲ | ۱ | ۰ | ۱/۵۵ |
| G2A10CP160 | ۲ | ۱ | ۰/۱ | ۱/۶۰ |
| G2A15P180 | ۲ | ۱/۵ | ۰ | ۱/۸۰ |
| G2A15CP195 | ۲ | ۱/۵ | ۰/۱ | ۱/۹۵ |
| G4A10P185 | ۴ | ۱ | ۰ | ۱/۸۵ |
| G4A10CP190 | ۴ | ۱ | ۰/۱ | ۱/۹۰ |
| G4A15P190 | ۴ | ۱/۵ | ۰ | ۱/۹۰ |
| G4A15CP190 | ۴ | ۱/۵ | ۰/۱ | ۱/۹۰ |

۲-۴- مشخصه‌یابی مواد معدنی و خمیرهای کامپوزیتی

ترکیب فازی نمونه‌ها توسط XRD (Philips PW1730) با تابش $\text{Cu-K}\alpha$ در ۴۰ kV و ۳۰ mA انجام شد. درجه بلورینگی (X_c) و اندازه بلورک‌ها ($t_{(hkl)}$)، به ترتیب با معادله‌های ۱ و ۲ محاسبه شدند [۲۲].

$$X_c = 1 - \frac{V_{112/300}}{I_{300}} \quad (۱)$$

$$t_{(hkl)} = \frac{K\lambda}{BCos(hkl)} \quad (۲)$$

در معادله ۱، $V_{112/300}$ و I_{300} به ترتیب نشان‌گر شدت پیک (۳۰۰) و دره میان (۳۰۰) و (۱۱۲) می‌باشد. در معادله ۲،

۳- نتایج و بحث

۳-۱- مشخصه‌یابی مواد معدنی

در شکل ۱-الف، پیک‌های با شدت بیشتر با صفحات اتمی (۲۰۱۰)، (۲۲۰)، (۲۱۴)، (۱۰۱۰) و (۲۰۲۰) مؤید فاز β -TCP منطبق بر کارت مرجع تشخیص فاز (JCPDS) با شماره ۰۹-۰۱۶۹ می‌باشند [۲۸]. همچنین در شکل ۱-ب، پیک‌های با شدت بیشتر به ترتیب با صفحات اتمی (۲۱۱)، (۱۱۲)، (۳۰۰)، (۲۱۳) و (۰۰۲)، حضور فاز هیدروکسی‌آپاتیت (HA) منطبق بر کارت JCPDS با شماره ۰۹-۰۴۳۲ تأیید می‌کند [۲۹]. با توجه به الگوی XRD، درصد بلورینگی و متوسط اندازه بلورک‌ها برای CDHA به ترتیب و بطور تقریبی برابر ۳۵٪ و ۱۷ nm می‌باشد. تصاویر SEM نشان می‌دهند که عمده مورفولوژی ذرات β -TCP و CDHA به شکل کروی بوده و توزیع اندازه آن‌ها بطور تقریبی یکنواخت و همگن می‌باشند (شکل ۱-پ تا ج). توزیع اندازه ذره‌ها در تصاویر SEM برای CDHA تأییدکننده اندازه بلورک‌های بدست آمده از آزمون XRD است و هر دو بر ماهیت نانومتری CDHA صحت می‌گذارند. همچنین در برخی نقاط آگلومراسیون وجود دارد که به دلیل دمای کلسینه شدن است و در تحقیقات دیگر نیز مشاهده شده است [۲۹]. با توجه به نتایج آزمون‌های PSA و DLS (شکل ۱-چ و ح)، میانگین اندازه ذرات β -TCP و نانوذرات CDHA به ترتیب و بطور تقریبی ۱۰ μm و ۹۲ nm می‌باشند.

۳-۲- مشخصه‌یابی خمیر کامپوزیتی

در شکل ۳-الف، منحنی‌های نیرو-جابجایی به همراه شکل ظاهری نمونه‌های تزریق شده، نشان داده شده است. با توجه به مشاهدات، تمام نمونه‌ها پیوسته و یکنواخت تزریق شدند و بیومواد معدنی به خوبی توسط زمینه پلیمری حمل شد. این مطلب می‌تواند به دلیل جرم مولکولی بالای پلیمرهای موجود در نمونه‌ها باشد [۱۹،۳۰].

نرخ برش از 0.1 s^{-1} تا 1000 s^{-1} در مدت ۱۸۰ s افزایش پیدا کرده و سپس در همان مدت زمان به صورت برعکس کاهش یافت. در حالت نوسانی، ابتدا اندازه‌ها در کرنش‌های متغیر با فرکانس ثابت برای رسیدن به کرنش ناحیه ویسکوالاستیک خطی بدست آمدند. سپس آزمون در یک کرنش مطلوب (۰/۱٪) با فرکانس متغیر انجام شد.

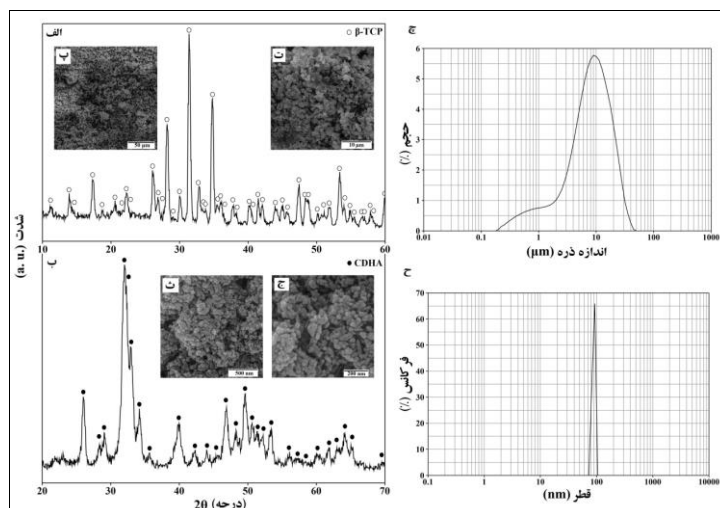
برای تحلیل رفتار جریان‌یابی کامپوزیت‌ها از مدل قانون تنش و مساحت حلقه هیستریزس تشکیل شده در نمودار تنش برشی استفاده شد. در مدل قانون توانی، نمودار تنش برشی بر حسب نرخ برش در مرحله رفت توسط معادله استوالد-دویل (Ostwald-de Waele) بیان شد [۲۴].

$$\tau = K \left(\frac{d\gamma}{dt} \right)^n = K \dot{\gamma}^n \quad (5)$$

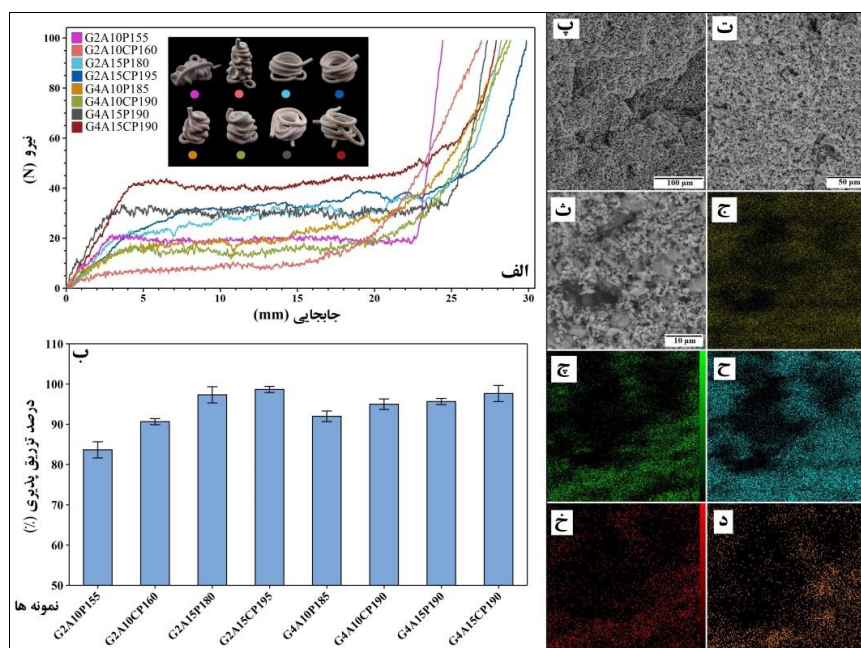
که در این معادله، متغیرهای τ ، $\dot{\gamma}$ ، K و n به ترتیب نشان دهنده تنش برشی، نرخ برش، ضریب قوام و شاخص قانون توانی می‌باشند.

برای بررسی زیست‌فعالی برون‌تنی، نمونه‌ها در ظرف محتوی SBF ساخته شده به روش کوکوبو [۲۵] معلق شدند. ظرف مورد نظر در داخل انکوباتور لرزاننده با دمای 37°C و سرعت ۳۰ rpm به مدت ۱۴ روز قرار داده شد. سپس تشکیل آپاتیت بر روی سطح نمونه‌ها به عنوان معیار زیست‌فعالی برون‌تن بررسی و ارزیابی شد.

سنجش MTT جهت بررسی تکثیر و سمیت سلولی با پروتکل نوری و همکارانش [۲۶]، با سلول‌های استئوساکروما MG-63 در مدت زمان ۱، ۳ و ۷ روز انجام شد. چسبندگی و تکثیر سلول‌ها پس از ۷۲ ساعت، با تصاویر SEM و DAPI بررسی شد. همچنین فعالیت آنزیم آلکالین فسفاتاز (ALP) مطابق روش نظافتی و همکارانش [۲۷] در مدت زمان ۱ و ۷ روز در محیط کشت سلول‌های MG-63 بررسی شد.



شکل ۲: الف و ب) الگوی XRD، پ-ج) تصاویر SEM و چ و ح) توزیع اندازه ذرات β -TCP (بالا) و نانوذرات CDHA (پایین).



شکل ۳: الف) منحنی‌های نیرو-جابجایی و ب) درصد تزریق پذیری کامپوزیت‌ها به همراه شکل ظاهری نمونه‌های تزریق شد، پ-ت) تصاویر SEM نمونه G2A15CP195 و نقشه توزیع عنصرهای (ج) کلسیم، (چ) اکسیژن، (ح) فسفر، (خ) کربن و (د) گوگرد در این نمونه کامپوزیتی.

بررسی دیده نمی‌شود. این توزیع یکنواخت اجزای معدنی و آلی در نمونه‌ها و برهمکنش مطلوب نانوذرات CDHA پخش شده در ترکیب با پلیمرهای طبیعی موجود در کامپوزیت، از دیگر دلایل انسجام بهتر و عدم تقطیع نمونه‌ها حین آزمون تزریق می‌باشند.

با توجه به نقشه توزیع عنصرهای کلسیم و فسفر (نشان‌گر β -TCP و CDHA)، عنصر اکسیژن (نشان‌گر فازهای معدنی و آلی) و عنصر کربن (نشان‌گر پلیمرها) در خمیر کامپوزیتی (شکل ۳-ج تا د)، پخش شدگی فاز معدنی کلسیم‌دار و فاز پلیمری مطلوب بوده و تجمع موضعی شدید در ناحیه مورد

با توجه به شکل ۴، اتلاف وزن کامپوزیت‌ها در ساعت‌های ابتدایی کمتر از ۷٪ بود. تماس کامپوزیت‌های تزریق‌پذیر با جریان خون و مایع‌های فیزیولوژیکی بدن در زمان‌های نخست کارگذاری، ممکن است به گسستگی و در نهایت شکست پیوند استخوان بینجامد. از این رو، مقاومت به آبشویی نمونه‌ها در ساعت‌های نخست، حائز اهمیت است.

با توجه به اینکه، پلیمرهای طبیعی دارای محدوده‌ای از وزن‌های مولکولی متفاوت هستند، بخش‌هایی از پلیمرهای موجود در ترکیب که دارای وزن مولکولی کمتر هستند، نسبت به باقی بخش‌های دیگر زودتر حل می‌شوند. بنابراین مواد معدنی موجود در فاز آلی به دلیل شکست اتصالات، با یک لایه نازک پلیمری در اطراف‌شان در فاز آلی رها می‌شوند. البته با وقوع این اتفاق، همچنان اتصالات قطبی در ساختار پلیمر و پیوندهای الکترواستاتیک قدرتمند میان پلیمر و فاز معدنی وجود دارند و این به دلیل بیشتر بودن انرژی پیوند قطبی نسبت به پیوند هیدروژنی است [۷].

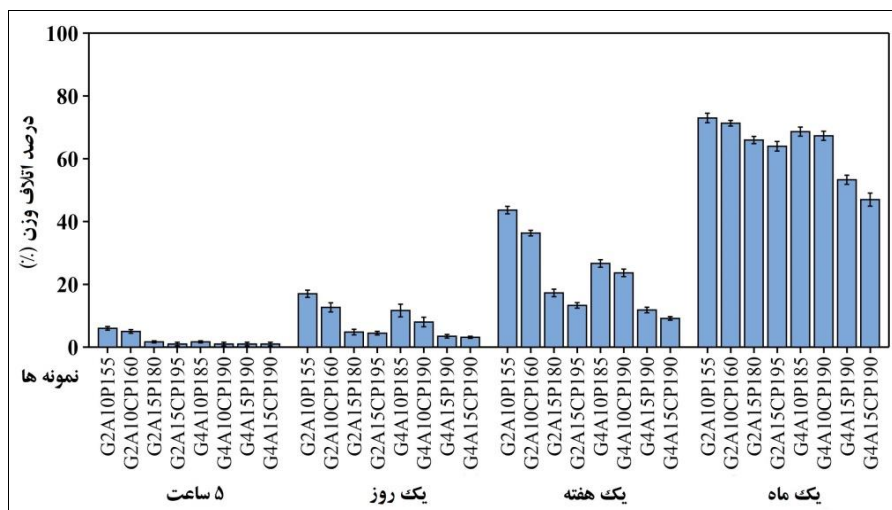
با توجه به شکل ۴، میزان آبشویی نمونه‌ها با گذشت زمان سرعت بیشتری می‌گیرد و در پایان یک ماه در محدوده ۴۷٪ تا ۷۵٪ قرار گرفته است. درصد وزنی کم پلیمرها به ویژه آلزینات در دو نمونه G2A10P155 و G2A10CP160 باعث شده که پیوندهای آلی-معدنی در آن‌ها در مقایسه با سایر نمونه‌ها کمتر و ضعیف‌تر باشند در نتیجه آبشویی این دو نمونه نسبت به سایرین بیشتر شده است.

همچنین، کمترین درصد اتلاف وزن مربوط به نمونه‌هایی بود که بیشینه مقدار آلزینات در ترکیب آن‌ها قرار داشت. کلسیم موجود در ترکیب که بطور عمده به دلیل حضور نانوذرات CDHA در ترکیب است، عامل کی‌لیت‌ساز برای گروه‌های کربوکسیل آلزینات و گروه‌های کربوکسیل و سولفات کندروئیتین سولفات است [۱۳، ۳۱]. به همین دلیل اثر کندروئیتین سولفات و آلزینات بر پایداری نمونه‌ها مشهود است.

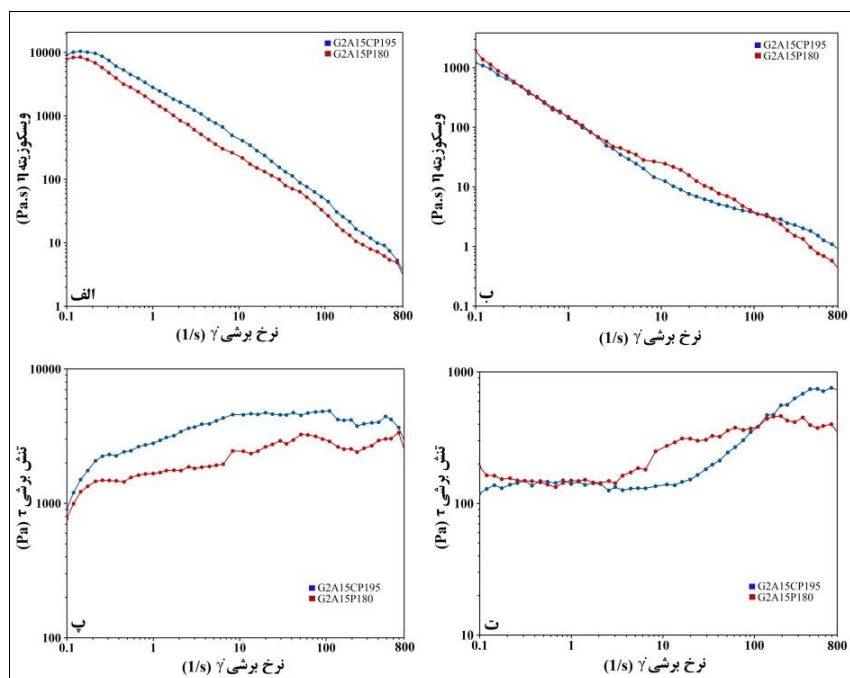
با توجه به شکل ۵، با افزایش نرخ برش در مرحله رفت، مقدار ویسکوزیته و تنش برشی در نمونه‌ها به ترتیب کاهش و

افزایش یافته است. شیب کم نمودار ویسکوزیته و شیب زیاد نمودار تنش برشی در نرخ‌های برش اولیه، بیشتر از سایر مناطق در نمودار رفت است که به دلیل مقاومت داخلی نمونه‌ها در مقابل افزایش نرخ برش ناشی از درهم پیچیده بودن زنجیره‌های پلیمرها می‌باشد [۱۹]. با افزایش نرخ برش، زنجیره‌های پلیمری از یکدیگر باز شده و در راستای جریان قرار گرفته‌اند. کاهش یافتن مقاومت نمونه‌ها در نرخ‌های برش پایانی، ناشی از باز شدن زنجیره‌های پلیمری و شکسته شدن پیوندها در ساختار کامپوزیت می‌باشد [۳۲]. در نمودارهای برگشت با کاهش نرخ برش، ویسکوزیته افزایش و تنش برشی کاهش یافته که این مطلب به دلیل تشکیل دوباره بخشی از پیوندها و بسته شدن زنجیره‌های پلیمری و در نتیجه افزایش مقاومت داخلی کامپوزیت‌ها می‌باشد [۳۳].

نرخ کاهش ویسکوزیته و افزایش تنش برشی برای کامپوزیت‌ها، نسبت به تغییرات نرخ برش، مقدار ثابتی نیست. بنابراین ویژگی رئولوژیکی نمونه‌ها مطابق با رفتار سیالات غیرنیوتنی است [۳۰]. از آنجا که با افزایش نرخ برش، ویسکوزیته کاهش پیدا کرده است، کامپوزیت‌ها دارای رفتار رقیق‌گردانی برش هستند [۳۴]. همچنین، تشکیل شدن حلقه هیستریزس طی مرحله‌های رفت و برگشت، نشانگر رفتار تیکسوتروپی نمونه‌ها است. رفتار تیکسوتروپی بر خلاف رفتار رقیق‌گردانی برش، وابسته به متغیر زمان است [۱۹]. در جدول ۲، مقدارهای K و n حاصل از برازش منحنی‌های ویسکوزیته بر معادله ۵ به همراه سطح تیکسوتروپی (AT) بدست آمده از نمودار تنش برشی نشان داده شده است. مقدار n معیاری جهت سنجش طبیعت رفتار رئولوژیکی ماده است. هر چه n به عدد یک نزدیک‌تر باشد، رفتار ماده نیوتنی‌تر و هر چه به عدد صفر نزدیک‌تر باشد، رفتار ماده متمایل به رقیق‌گردانی برش است [۳۵]. مقدار n در نمونه‌ها کمتر از یک است، بنابراین طبیعت آن‌ها غیرنیوتنی می‌باشد و دارای رفتار رقیق‌گردانی برش هستند. همچنین، هر چه میزان سطح تیکسوتروپی بیشتر باشد، نمونه دارای پیوندهای داخلی قوی‌تری است [۳۶].



شکل ۴: درصد اتلاف وزن کامپوزیت‌ها در محیط بافر Tris (۵ ساعت، یک روز، یک هفته و یک ماه).

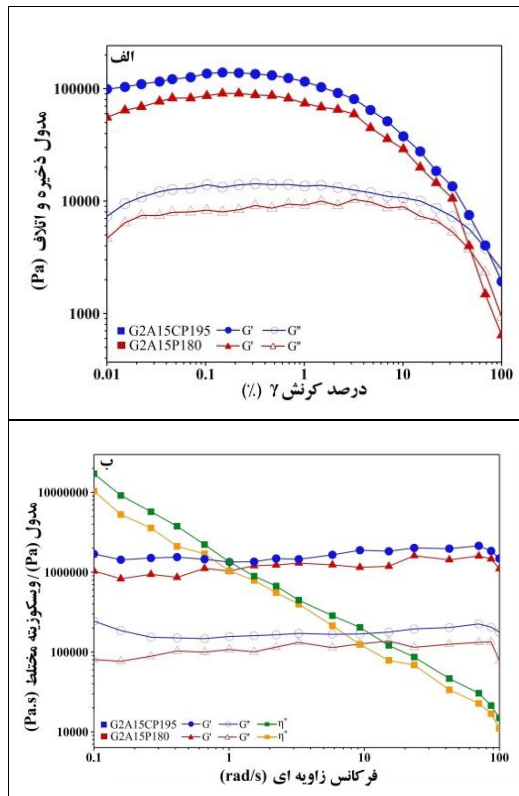


شکل ۵: نمودار ویسکوزیته بر حسب نرخ برش: (الف) رفت و (ب) برگشت، نمودار تنش برشی بر حسب نرخ برش: (پ) رفت و (ت) برگشت.

جدول ۲: شاخص قانون توانی (n)، ضریب قوام (K)، ضریب همبستگی (R²) و سطح تیکسوتروپی (A_T) کامپوزیت‌ها.

| کد نمونه | n | K (Pa.s ⁿ) | R ² | A _T (Pa/s) × 10 ⁴ |
|------------|-----|------------------------|----------------|---|
| G2A10P180 | ۰/۸ | ۳۴۲ | ۰/۹۸ | ۷۱ |
| G2A10CP195 | ۰/۸ | ۴۸۶ | ۰/۹۸ | ۸۹ |

تغییرات ناگهانی در مدول‌ها نشده است. بنابراین که نشان‌گر اجزای کامپوزیت به صورت همگن در ساختار آن توزیع شده است [۱۹]. با افزایش فرکانس زاویه‌ای، ویسکوزیته مختلط که تابعی از مدول ذخیره و اتلاف است، کاهش پیدا کرده است که نشان‌گر رفتار رقیق‌گردانی برش در کامپوزیت‌ها است [۷].

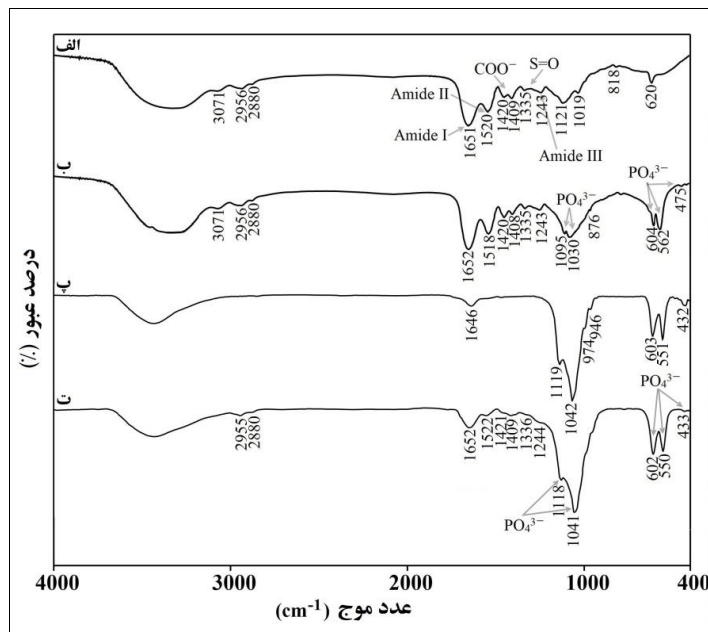


شکل ۶: (الف) نمودار مدول ذخیره و اتلاف بر حسب درصد کرنش و (ب) نمودار مدول ذخیره و اتلاف به همراه ویسکوزیته مختلط بر حسب فرکانس زاویه‌ای برای نمونه‌های کامپوزیتی.

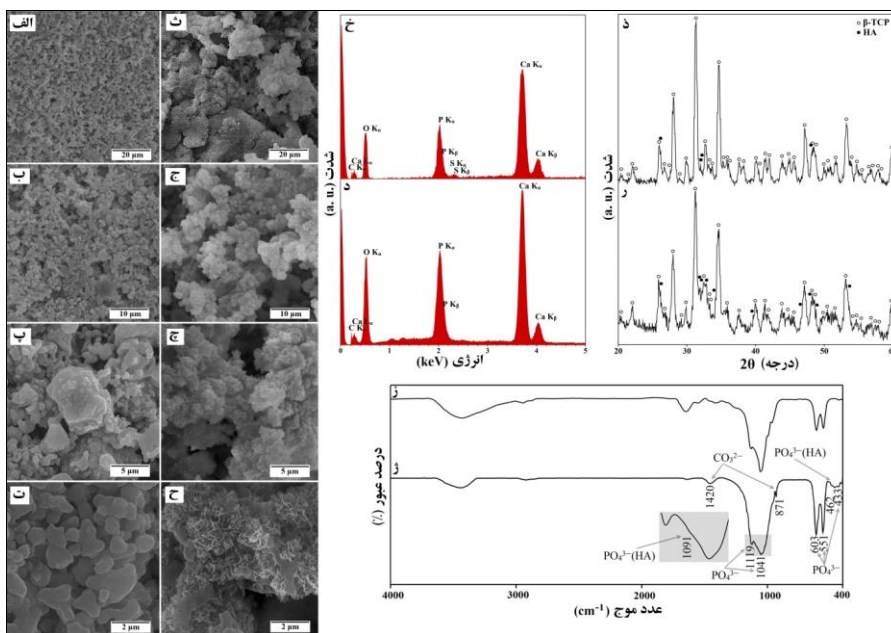
طیف FTIR کامپوزیت G2A15CP195 به تفکیک بخش آلی و معدنی در شکل ۷ نشان داده شده است. با توجه به طیف کامپوزیت در شکل ۷-ت، پیک جذب ضعیف 433 cm^{-1} برای حالت ν_2 ، پیک‌های 550 و 602 cm^{-1} برای حالت ν_4 ، پیک‌های 972 و 944 cm^{-1} برای حالت ν_1 و پیک‌های 1118 و 1041 cm^{-1} برای حالت ν_3 همگی مربوط به گروه‌های فسفات β -TCP می‌باشند [۳۷].

با توجه به جدول ۲، حضور کندروئیتین سولفات، موجب افزایش ضریب قوام و سطح تیکسوتروپی شده است. مدول ذخیره (G') و اتلاف (G'') در شکل ۶-الف، به ترتیب نشانگر رفتار الاستیک و رفتار ویسکوز نمونه‌ها می‌باشند. با توجه به شکل ۶-الف، با افزایش درصد کرنش در کامپوزیت‌ها، G' و G'' با نرخ‌های متفاوت ابتدا افزایش و سپس کاهش یافته‌اند و نرخ کاهش G' از مدول G'' بیشتر بوده است. در درصد‌های کرنش کمتر، G' بیشتر از G'' می‌باشد و رفتار الاستیک، رفتار غالب کامپوزیت‌ها است. این ناحیه، بازه‌ای از نمودار است که نرخ تغییرات مدول‌ها نسبت به تغییرات درصد کرنش، کمتر از باقی مناطق است و به ناحیه خطی ویسکوالاستیک مشهور است [۷]. پس از این ناحیه، در درصد‌های کرنش بیشتر از نقطه تسلیم، فاصله میان G' و G'' کاهش پیدا کرده است. کاهش فاصله دو مدول، نشان‌گر شکسته شدن پیوندها و اتصالات ساختاری در کامپوزیت‌ها و غالب شدن جریان سیال در آن‌ها است. با افزایش شکاف و شکست اتصالات ساختاری در نهایت رفتار ویسکوز در نمونه‌ها غالب شده است. هر چه نقطه جریان (نقطه برخورد نمودار G' و G'') در درصد کرنش کمتری رخ دهد، نشان‌دهنده تمایل بیشتر نمونه به رفتار ویسکوز است. نمودار شکل ۶-الف نشان می‌دهد که حضور کندروئیتین سولفات، موجب افزایش درصد کرنش نقطه جریان شده است. در کرنش‌های بیشتر از نقطه جریان، رفتار ویسکوز بر رفتار الاستیک نمونه‌ها غالب شده است. همچنین، در هیچ یک از کامپوزیت‌ها ناحیه بین نقطه تسلیم و نقطه جریان به اندازه‌ای کوچک نیست که شکست ترد رخ بدهد.

شکل ۶-ب، نمودار G' و G'' به همراه ویسکوزیته مختلط (η^*) بر حسب تغییرات فرکانس زاویه‌ای را نشان می‌دهد. با توجه به نمودار، برای هر دو نمونه در فرکانس‌های زاویه‌ای متفاوت، مدول ذخیره بیشتر از مدول اتلاف می‌باشد. این نتایج نشان می‌دهد که نمونه‌ها جامد ویسکوالاستیک هستند و تأیید‌کننده نتایج قبلی است. تغییرات فرکانس زاویه‌ای، موجب



شکل ۷: طیف FTIR فاز پلیمری کامپوزیت، (الف) فاز پلیمری کامپوزیت، (ب) فاز پلیمری کامپوزیت به همراه نانوذرات CDHA، (پ) β -TCP و (ت) کامپوزیت G2A15CP195.



شکل ۸: تصاویر SEM (الف-ث) قبل از قرارگیری در SBF و (ت-ح) پس از قرارگیری در SBF و الگوهای XRD و FTIR (خ، ز) قبل از قرارگیری در SBF و (د، ر، ژ) پس از قرارگیری در SBF به مدت ۱۴ روز.

طیف نمونه کامپوزیتی، نشان‌گر تشکیل پیوندهای الکترواستاتیک میان COO^- و یون‌های کلسیم می‌باشد [۷]. از دیگر پیک‌های جذبی ناشی از حضور آلزینات می‌توان به ارتعاش C-C در حالت ν ($1200-1000 \text{ cm}^{-1}$)، ارتعاش C-O در حالت ν ($1200-1000 \text{ cm}^{-1}$ و $1000-600 \text{ cm}^{-1}$) اشاره کرد [۴۴]. این پیک‌ها در طیف FTIR کامپوزیت توسط پیک‌های گروه‌های فسفات β -TCP پوشانده شده است. پیک‌های جذبی ارتعاش متقارن و نامتقارن آمید و ارتعاش پیوند N-H آمید II، هر دو از ترکیب کندروئیتین سولفات به ترتیب در $1600-2000$ و $1600-1500 \text{ cm}^{-1}$ قرار دارند [۴۰]. کربوکسیلات‌ها و گروه‌های آزاد کربوکسیلیک‌اسید در کندروئیتین سولفات، پیک‌های جذبی در $2000-1600 \text{ cm}^{-1}$ و $1500-1400 \text{ cm}^{-1}$ را ناشی می‌شوند. همچنین ارتعاش پیوند S=O از این ترکیب نیز در محدوده $1350-1200 \text{ cm}^{-1}$ قرار دارند [۴۵].

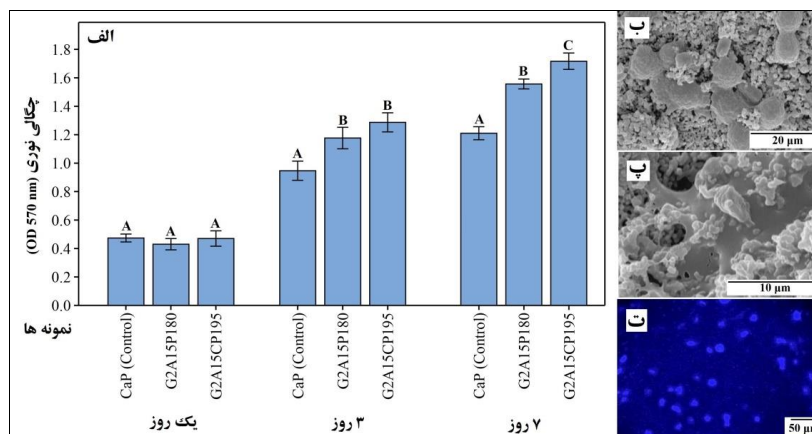
با توجه به شکل ۷، اگرچه پیک‌های اجزای کامپوزیت به دلیل بیشتر بودن درصد وزنی β -TCP، آن‌گونه که در طیف‌های الف و ب مشخص هستند در طیف خمیر کامپوزیتی مشاهده نمی‌شوند، ولی آثارشان به شکل پیک‌های ضعیف‌تر در ناحیه اثرانگشتی از طیف خمیر کامپوزیتی (کمتر از 1500 cm^{-1}) قابل مشاهده است.

به منظور بررسی زیست‌فعالی، مورفولوژی و الگوهای EDS، XRD و FTIR نمونه G2A15CP195 با بعد از قرارگیری آن در محیط SBF (۱۴ روز)، مقایسه شد (شکل ۸). با توجه به تصاویر SEM، لایه‌ای از نانوساختارهای متراکم هیدروکسی‌آپاتیت با تخلخل‌های ریز بر روی سطح کامپوزیت تشکیل شده است. این تخلخل‌های ریز، قابلیت زیست‌بازجذب‌پذیری کامپوزیت را ارتقا می‌دهند [۳۲]. همچنین، طیف EDS، بیشتر شدن نسبت عنصری کلسیم به فسفر پس از قرارگیری در SBF در مقایسه با قبل از قرارگیری در آن را نشان می‌دهد که تأییدکننده تشکیل هیدروکسی‌آپاتیت روی سطح نمونه است.

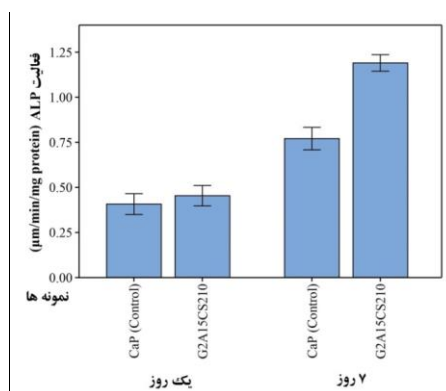
پیک‌های جذبی CDHA برای حالت ν_2 در 475 cm^{-1} ، ارتعاش کششی متقارن برای حالت ν_4 در $500-700 \text{ cm}^{-1}$ و ارتعاش کششی نامتقارن برای حالت ν_3 در $1000-1100 \text{ cm}^{-1}$ همگی مربوط به گروه‌های فسفات، ارتعاش کششی گروه‌های هیدروکسیل در محدوده $3000-4000 \text{ cm}^{-1}$ و ارتعاش ν_2 گروه کربنات در 876 cm^{-1} در طیف شکل ۷-ب قابل مشاهده است [۳۸]. این پیک‌ها در طیف شکل ۷-ت با پیک‌های مشخصه β -TCP پوشانده شده است.

پیک پهن جذبی در محدوده $3000-4000 \text{ cm}^{-1}$ در تمام طیف‌ها، به ارتعاش کششی گروه‌های هیدروکسیل در حالت ν مربوط است. ارتعاش خمشی پیوند N-H از آمید A ژلاتین و ارتعاش کششی N-H کندروئیتین سولفات نیز در همین ناحیه قرار دارند [۳۹،۴۰]. پیک مربوط به ارتعاش حالت ν پیوند C-H و همچنین آمید B از ژلاتین در محدوده $2800-3000 \text{ cm}^{-1}$ در طیف‌های (الف)، (ب) و (ت) در شکل ۷ قرار دارند [۴۱]. پیک‌های جذبی ارتعاش خمشی پیوند N-H در 3071 cm^{-1} و $1500-1700 \text{ cm}^{-1}$ و ارتعاش کششی C-N در بازه $1200-1400 \text{ cm}^{-1}$ در طیف‌های (الف) و (ب) از شکل ۷، مربوط به آمیدهای ژلاتین هستند [۴۲]. پیک جذبی مرتبط با آمید III و پیوند C-O در محدوده $1000-1300 \text{ cm}^{-1}$ طیف شکل ۷-الف قرار دارند. همچنین ارتعاش کششی قدرتمند C=O از آمید I موجود در ترکیب ژلاتین در 1651 cm^{-1} از طیف (الف) و 1652 cm^{-1} از طیف (ب) و (ت) قرار دارد که با پیک جذبی گروه هیدروکسیل همپوشانی داشته است [۴۳].

پیک‌های جذبی آلزینات در طیف FTIR فاز پلیمری کامپوزیت قابل مشاهده هستند. ارتعاش‌های پیوند C-H در حالت‌های ν و δ ، به ترتیب در بازه‌های $2500-3000 \text{ cm}^{-1}$ و $600-1000 \text{ cm}^{-1}$ قرار دارند [۴۴]. پیک‌های ایجاد شده در محدوده $1400-1450 \text{ cm}^{-1}$ با ارتعاش کششی نامتقارن O=C=O و ارتعاش متقارن COO^- مرتبط هستند. پیک‌های جذبی دیگر مربوط به کربوکسیلات‌ها در بازه $1400-1200 \text{ cm}^{-1}$ قرار دارند. ضعیف‌تر شدن پیک‌های جذبی یاد شده در



شکل ۹: (الف) سنجش MTT جهت بررسی سمیت و تکثیر سلول‌های استنوبلاست در نمونه‌های کامپوزیتی و نمونه کنترل. (ب و پ) تصاویر SEM و (ت) تصویر DAPI از نمونه G2A15CP195 که ۷۲ ساعت در محیط کشت سلول‌های MG-63 قرار گرفته است. گروه‌بندی آماری با استفاده از روش توکی (Tukey) و ۹۵٪ اطمینان انجام شد.



شکل ۱۰: سنجش سطح فعالیت آنزیم ALP برای نمونه کامپوزیتی G2A15CP195 و نمونه کنترل در محیط کشت سلول‌های MG-63 (گروه‌بندی آماری با استفاده از روش توکی و ۹۵٪ اطمینان).

گروه‌های فسفات هیدروکسی آپاتیت را مشاهده کرد. البته برخی پیک‌های دیگر نظیر پیک‌های گروه‌های فسفات HA در حالت v_3 و v_4 با پیک‌های جذبی گروه‌های فسفات β -TCP در 1119 cm^{-1} و 1041 cm^{-1} ، 603 cm^{-1} ، 551 cm^{-1} همپوشانی داشته است. دو پیک کوچک ظاهر شده در 871 cm^{-1} و 1420 cm^{-1} نیز مربوط به گروه کربنات جایگزین شده در ساختار آپاتیتی ایجاد شده بر روی سطح نمونه می‌باشد که از نوع جایگزینی B است [۳۲، ۳۷].

سمیت و تکثیر سلولی در نمونه‌های G2A15P180 و G2A15CP195 در مقایسه با نمونه کنترل بوسیله سنجش MTT بررسی شد. با توجه به شکل ۹-الف، تعداد سلول‌های MG-63 در هر سه نمونه با گذشت زمان (یک روز، ۳ روز و

با توجه به XRD نمونه پس از قرارگیری در SBF، اگرچه برخی از پیک‌های HA توسط پیک‌های مشخصه β -TCP (کارت JCPDS به شماره ۰۹-۰۱۶۹-۲۸) پوشانده شده است ولی پدیدار شدن پیک‌های مربوط به صفحه‌های (۲۱۱)، (۱۱۲) و (۳۰۰) در محدوده 31° تا 33° ، (۰۰۲) در حوالی 25° و (۲۱۳) در نزدیکی 50° با توجه به اطلاعات کارت JCPDS به شماره ۰۹-۰۴۳۲-۰۹ نشان از تشکیل بلورهای آپاتیتی بر روی سطح کامپوزیت پس از قرارگیری در SBF دارد [۳۸].

با مقایسه طیف FTIR نمونه پس از قرارگیری در SBF با قبل از قرارگیری در آن، می‌توان ظهور پیک‌های جذبی در 462 cm^{-1} و 1091 cm^{-1} برای حالت‌های v_2 و v_3 مربوط به

فعالیت آنزیم ALP در روزهای اول و هفتم برای نمونه کامپوزیتی و نمونه کنترل، رشد معنی‌داری داشته است. اگرچه مقدار سطح فعالیت آنزیم ALP میان نمونه کامپوزیتی و نمونه کنترل در روز اول معنی‌دار نیست، ولی در روز هفتم معنی‌دار شده است. سطح فعالیت ALP با رشد بیشتر سلول‌های استئوبلاست در ارتباط است [۵۰]. در این بین می‌توان به نقش مهم پلیمرهای ژلاتین و کندروئیتین سولفات در افزایش سطح فعالیت ALP اشاره کرد. توالی‌های آرژنین-گلیسین-آسپارتیک در مولکول‌های ژلاتین توانایی برقراری اتصال با اینتگرین (یک گیرنده غشای سلولی) دارند [۲۷]. همچنین کندروئیتین سولفات به عنوان یک جزء مهم در مایع خارج سلولی، بر بی‌حرکتی مولکولی فاکتورهای رشد و دیگر سیتوکین‌ها بر روی سطح بیومواد تأثیرگذار است و برهمکنش مطلوبی با سلول‌های استخوانی نظیر استئوبلاست‌ها و استئوکلاست‌ها، اینتگرین‌ها و دیگر گیرنده‌های ویژه سلولی دارد. بنابراین ژلاتین و کندروئیتین سولفات می‌توانند بطور مستقیم یا غیرمستقیم بر چسبندگی، مهاجرت، رشد، تکثیر و تمایز سلولی اثرگذار باشند. همچنین رهایش کلسیم زیست‌فعال و استئوژنیک از نانوذرات CDHA و β -TCP حاضر در ترکیب، از دیگر دلایل افزایش سطح فعالیت ALP در نمونه کامپوزیتی است.

۴- نتیجه‌گیری

در این پژوهش، خمیرهای کامپوزیتی تزریق‌پذیر با اجزای بیوپلیمری ژلاتین، آلژینات و کندروئیتین سولفات و مواد معدنی n-CDHA و β -TCP، آماده‌سازی شدند. حضور کندروئیتین سولفات در ترکیب خمیر، موجب افزایش حمل‌پذیری فاز معدنی، تزریق‌پذیری، ضریب قوام، سطح تیکسوتروپی و تکثیر سلول‌های MG-63 شد و میزان اتلاف وزن نمونه در محیط بافر Tris در زمان‌های گوناگون را کاهش داد. تشکیل شدن لایه نانو ساختار هیدروکسی‌آپاتیتی بر روی کامپوزیت پس از قرارگیری آن در محیط SBF، طبیعت زیست‌سازگار خمیر کامپوزیتی را ثابت کرد.

۷ روز) به صورت معنی‌داری بیشتر شده است. در روز اول تفاوت معنی‌داری میان چگالی نوری سلول‌ها در نمونه‌های کامپوزیتی و کنترل دیده نمی‌شود ولی در روزهای سوم و هفتم این تفاوت معنی‌دار شده است. این مطلب می‌تواند به دلیل حضور مواد پلیمری زیست‌سازگار (ژلاتین و آلژینات) و CDHA در ترکیب هر دو نمونه باشد که بطور کلی زیست‌سازگاری را افزایش داده است. این درصد بالای سلول‌های تکثیرشده در نمونه‌های کامپوزیتی، شرایط مطلوبی را برای یک پیوند استخوان موفق ایجاد می‌نماید [۲۷]. با توجه به نتایج، تفاوت معنی‌داری میان تکثیر سلولی در نمونه‌های کامپوزیتی و نمونه کنترل در روزهای سوم و هفتم وجود دارد. با توجه به نتایج بدست آمده، استفاده از کندروئیتین سولفات با درصد وزنی انتخاب شده در این تحقیق، مقدار تکثیر سلولی و به تبع آن زیست‌سازگاری را بهبود بخشیده است. این پلیمر نقش مهمی در افزایش فعالیت متابولیک سلول‌های استئوبلاست دارد [۴۶-۴۸] و با تأثیر در افزایش بیوسنتز mRNA و DNA، متابولیسم سلولی را ارتقا می‌بخشد [۱۳]. تصاویر SEM و DAPI از نمونه G2A15CP195 پس از ۷۲ ساعت قرارگیری در محیط کشت سلول‌های MG-63 در شکل ۹ نشان داده شده است. با توجه به تصاویر SEM، سلول‌ها با موفقیت به سطح نمونه کامپوزیتی چسبیده و متصل شده‌اند و این مطلب شاهدهی بر مطلوب بودن سطح نمونه برای چسبندگی، رشد و تکثیر سلول‌های استئوبلاست است. به علاوه تصویر DAPI نیز رشد و تکثیر سلول‌های MG-63 را در تماس با نمونه کامپوزیتی نشان می‌دهد (سلول‌های زنده و مرده). آبدوستی زیاد، زیست‌سازگاری اجزای پلیمری و معدنی موجود در ترکیب کامپوزیت و برهمکنش مطلوب میان کندروئیتین سولفات و فیبرونکتین عوامل تأثیرگذار در چسبندگی سلول‌ها بر نمونه G2A15CP195 هستند [۱۳، ۲۷، ۴۸].

آلکالین فسفاتاز آنزیمی است که با هیدرولیز استرهای فسفاتی و افزایش درجه فسفات، در فرآیند مینرالیزاسیون استخوان‌ساز شرکت می‌کند [۴۹]. با توجه به شکل ۱۰، سطح

- [18] X. Fang, L. Lei, T. Jiang, *Journal of Biomedical Materials Research-Part B Applied Biomaterials*, **106**, 2018, 1739.
- [19] S. Borhan, S. Hesaraki, A.A. Behnamghader, E. Ghasemi, *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, **27**, 2016, 1.
- [20] K. Ishikawa, E. Garskaite, A. Kareiva, *Journal of Sol-Gel Science and Technology*, **94**, 2020, 551.
- [21] L. Morejon-Alonso, R.G. Carrodegua, J.A.D. Garcia-Menocal, J.A.A. Pérez, S.M. Manent, *Materials Research*, **10**, 2007, 15.
- [22] T.S. Sampath Kumar, "Characterization of Biomaterials", Elsevier, Amsterdam, 2013.
- [23] H. Liu, Z. Zhang, C. Gao, Y. Bai, B. Liu, W. Wang, Y. Ma, Sajjilafu, H. Yang, Y. Li, A. Chan, L. Yang, *Materials Science and Engineering C*, **116**, 2020, 110904.
- [24] T. Zheng, P. Tang, L. Shen, H. Bu, G. Li, *Journal of Applied Polymer Science*, **138**, 2021, 50840.
- [25] T. Kokubo, H. Takadama, *Biomaterials*, **27**, 2006, 2907.
- [26] M. Nouri-Felekor, M. Khakbiz, N. Nezafati, J. Mohammadi, M.B. Eslaminejad, N. Fani, *Journal of Alloys and Compounds*, **832**, 2020, 154938.
- [27] N. Nezafati, M. Farokhi, M. Heydari, S. Hesaraki, N.A. Nasab, *Composites Part B: Engineering*, **175**, 2019, 107146.
- [28] K. Madhukumar, H.K. Varma, M. Komath, T.S. Elias, V. Padmanabhan, C.M.K. Nair, *Bulletin of Materials Science*, **30**, 2007, 527.
- [29] R. Jahandideh, A. Behnamghader, M. Rangie, A. Youzbashi, S. Joughehdoust, R. Tolouei, *Key Engineering Materials*, **396**, 2009, 607.
- [30] S. Borhan, S. Hesaraki, N. Nezafati, *Journal of the Australian Ceramic Society*, **52**, 2016, 120.
- [31] X. Wang, L. Chen, H. Xiang, J. Ye, *Journal of Biomedical Materials Research-Part B Applied Biomaterials*, **81**, 2007, 410.
- [32] M. Rasti, S. Hesaraki, N. Nezafati, *Journal of Applied Polymer Science*, **136**, 2019, 47604.
- [33] B. Das, A. Basu, S. Maji, K. Dutta, M. Dewan, A. Adhikary, T.K. Maiti, D. Chattopadhyay, *Carbohydrate Polymers*, **237**, 2020, 116146.
- [34] C. Xue, H. Xie, J. Eichenbaum, Y. Chen, Y. Wang, F.W. van den Dolder, J. Lee, K.J. Lee, S. Zhang, W. Sun, A. Sheikhi, S. Ahadian, N. Ashammakhi, M.R. Dokmeci, H.J. Kim, A. Khademhosseini, *Biotechnology Journal*, **15**, 2020, 1900456.
- [35] C. Liu, H. Shao, F. Chen, *Biomaterials*, **27**, 2006, 5003.
- [36] T. Gao, G.J. Gillispie, J.S. Copus, A.P.R. Kumar, Y.J. Seol, A. Atala, J.J. Yoo, S.J. Lee, *Biofabrication*, **10**, 2018, 34106.
- [37] Y.M. Sahin, Z. Orman, S. Yucel, *Journal of the Australian Ceramic Society*, **56**, 2020, 477.
- [38] M.H. Fathi, A. Hanifi, V. Mortazavi, *Journal of Materials Processing Technology*, **202**, 2008, 536.
- [39] J. Kozłowska, N. Stachowiak, A. Sionkowska, *Polymers*, **10**, 2018, 456.
- [40] A. Galus, J.M. Mallet, D. Lembo, V. Cagno, M. Djabourov, H. Lortat-Jacob, *Carbohydrate Polymers*, **136**, 2016, 113.
- [41] H.M. Elsayed, R.Z. Attia, O.A. Mohamed, N.H. El-Sayed, S.A. Ibrahim, *Leather and Footwear Journal*, **18**, 2018, 259.
- [42] E. Jeevithan, B. Bao, Y. Bu, Y. Zhou, Q. Zhao, W. Wu, *Marine Drugs*, **12**, 2014, 3852.
- [43] Y.L. Chang, C.Y. Hsieh, C.Y. Yeh, F.H. Lin, *Polymers*, **11**, 2019, 1454.
- [44] O.A. Ojiako, P.C. Chikezie, A.C. Ogbuji, *Journal of Traditional and Complementary Medicine*, **6**, 2016, 184.
- [45] L.C. Lopes, A.R. Fajardo, J.F. Piai, A.F. Rubira, E.C. Muniz, *Journal of Applied Polymer Science*, **128**, 2013, 3417.
- [46] T. Koike, T. Izumikawa, J.I. Tamura, H. Kitagawa, *Biochemical and Biophysical Research Communications*, **420**, 2012, 523.
- [47] E. Lopez-Senra, P. Casal-Beiroa, M. Lopez-Alvarez, J. Serra, P. Gonzalez, J. Valcarcel, J.A. Vazquez, E. Burguera, F.J. Blanco, J. Magalhães, *Marine Drugs*, **18**, 2020, 94.
- [48] B.N. Singh, V. Veeresh, S.P. Mallick, Y. Jain, S. Sinha, A. Rastogi, P. Srivastava, *International Journal of Biological Macromolecules*, **133**, 2019, 817.
- [49] S. Borhan, S. Hesaraki, S. Ahmadzadeh-Asl, *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, **21**, 2010, 3171.
- [50] S. Yang, L. Wang, S. Feng, Q. Yang, B. Yu, *Biomedical Materials (Bristol)*, **12**, 2017, 35004.

پاسخ‌های استئوبلاستی برون‌تن نشان از عدم سمیت، افزایش تکثیر سلولی و بیشتر شدن سطح فعالیت آنزیم ALP در حضور خمیر کامپوزیتی داشت. همچنین چسبندگی سلول‌های استئوبلاست به نمونه با تصاویر SEM تایید شد. با توجه به نتایج، خمیر کامپوزیتی زیست‌فعال و تزریق‌پذیر تشکیل شده از ژلاتین، آلژینات، کندروئیتین سولفات، CDHA و β -TCP، مشخصه‌های شیمیایی، عملکرد فیزیکی و رفتار زیستی رضایت‌بخشی را نشان داد و پیش‌بینی می‌شود که پس از کاشت این کامپوزیت در بدن، اجزای آلی به مرور حل شوند و بخش معدنی، نقش خود را در ترمیم و بازسازی استخوان به ویژه در ناحیه نزدیک به بافت غضروفی، ایفا کند. البته پیشنهاد می‌شود که مشخصه‌های این بیومواد با سنجش‌های سلولی بیشتر و آزمون‌های درون‌تن نیز مورد بررسی قرار گیرد.

مراجع

- [1] R. Zhao, R. Yang, P.R. Cooper, Z. Khurshid, A. Shavandi, J. Ratnayake, *Molecules*, **26**, 2021, 3007.
- [2] A.H. Schmidt, *Injury*, **52**, 2021, 18.
- [3] M.G. Ruccia, U. D'Amora, A. Ronca, L. Ambrosio, *Advanced Healthcare Materials*, **9**, 2020, 2000349.
- [4] Y. Luo, L. Fan, C. Liu, H. Wen, S. Wang, P. Guan, D. Chen, C. Ning, G. Tan, *Bioactive Materials*, **7**, 2022, 98.
- [5] S. Lim, D. Jeong, M.R. Ki, S.P. Pack, Y.S. Choi, *Korean Journal of Chemical Engineering*, **38**, 2021, 98.
- [6] Y.K. Eriwati, D.P. Utami, D. Arsista, Sunarso, S. Triaminingsih, *Key Engineering Materials*, **829**, 2020, 69.
- [7] G. Salehi, A. Behnamghader, S. Hesaraki, M. Mozafari, *European Polymer Journal*, **119**, 2019, 523.
- [8] M. Alipour, N. Firouzi, Z. Aghazadeh, M. Samiei, S. Montazersaheb, A.B. Khoshfetrat, M. Aghazadeh, *Biotechnology*, **21**, 2021, 1.
- [9] W. Zhong, L. Sun, T. Yu, C. Zhou, *Ceramics International*, **47**, 2021, 1712.
- [10] H.D. Kim, X. Hong, Y.H. An, M.J. Park, D.G. Kim, A.K. Greene, B.L. Padwa, N.S. Hwang, R.Z. Lin, J.M. Melero-Martin, *Advanced Healthcare Materials*, **10**, 2021, 2100070.
- [11] M. Fenbo, L. Sijing, L.I. Ruiz-Ortega, Z. Yuanjun, X. Lei, W. Kui, T. Bin, *Materials Science and Engineering C*, **116**, 2020, 111217.
- [12] O.A. Shavlovskaya, I.D. Romanov, *Meditinskiy Sovet*, **2020**, 2020, 130.
- [13] H. Shi, X. Ye, J. Zhang, J. Ye, *ACS Biomaterials Science and Engineering*, **5**, 2019, 262.
- [14] A. Bertacci, D. Moro, G. Ulian, G. Valdre, *Journal of Composites Science*, **5**, 2021, 30.
- [15] C.M. Chen, S.M. Chen, S.F. Lin, H.C. Liang, C.C. Wu, *Polymers*, **13**, 2021, 2552.
- [16] N. Eskandari, S.S. Shafiei, *Molecular Biotechnology*, **63**, 2021, 477.
- [17] J. Lorenz, M. Barbeck, C. Kirkpatrick, R. Sader, H. Lerner, S. Ghanaati, *The International Journal of Oral & Maxillofacial Implants*, **33**, 2018, 636.