

فرآیندهای نوین در مهندسی مواد

ma.iaumajlesi.ac.ir

بررسی مقایسه‌ای تأثیر عناصر اصلاح‌کننده استرانسیوم و منیزیم بر روی خواص فیزیکی و شیمیایی داربست‌های زیست‌تقلیدی ژلاتین-کلسیم فسفات در مهندسی بافت استخوان

امیرحسین مغنیان^{۱*}، مجید راز^۲، فتح‌الله مظهرزاده^۳

۱- استادیار، دانشکده مواد و متالورژی، دانشگاه بین‌المللی امام خمینی (ره)، قزوین، ایران.

۲- استادیار، گروه مهندسی، واحد شهریار، دانشگاه آزاد اسلامی، شهریار، ایران.

۳- استاد، دانشکده مهندسی پزشکی، دانشگاه صنعتی امیرکبیر، تهران، ایران.

moghanian@eng.ikiu.ac.ir *

اطلاعات مقاله	چکیده
دریافت: ۱۴۰۰/۰۱/۲۰	در این تحقیق داربست‌های زیست‌تقلیدی به منظور مطالعه روند تشکیل رسوب‌های کلسیم فسفاتی با استفاده از مکانیزم نفوذ دوسویه داخل هیدروژل ژلاتین و شرایط دما و pH مشابه بدن طراحی شد و تأثیر یون‌های فلزی منیزیم و استرانسیوم بر روی خواص آن‌ها مورد بررسی قرار گرفت. ۵ نوع نمونه با اعمال تغییر در نسبت یون‌های منیزیم و استرانسیوم انتخاب شد و تغییرات فازی در حضور یون‌های موجود در محلول شبیه‌سازی شده بدن (SBF) بررسی شد. نفوذ یون‌های کلسیم و فسفات به داخل هیدروژل سبب تشکیل رسوب سفید رنگ لایه‌ای داخل آن شد و نمونه‌ها توسط روش خشک‌سازی انجام‌ی به صورت داربست‌های متخلخل درآمدند. ریزساختار داربست‌های موردنظر توسط میکروسکوپ الکترونی روبشی (SEM) مورد بررسی قرار گرفت که سطحی متخلخل را نشان داد. آنالیز رسوب‌های تشکیل شده در نمونه‌های مورد مطالعه نشانگر حضور هیدروکسی‌آپاتیت و برایشیت بود. نتایج طیف‌سنجی تبدیل فوریه فروسرخ (FTIR) حاکی از وجود پیوندهای فسفات و هیدروکسیل ساختاری در ساختار داربست‌ها بود. حضور یون‌های فلزی در ساختار سبب جایجایی پیک‌های آزمون پراش پرتو ایکس (XRD) و تغییر پارامترهای شبکه‌ای شد. نتایج کشت سلول‌های استخوانی نیز بیانگر زیست‌سازگاری بالای نمونه‌های حاوی منیزیم و استرانسیوم با سلول استئوبلاست G292 بود و همچنین فعالیت فسفات‌قلیایی (ALP) نشان داد که مقدار بهینه ۱۰ درصد مولی منیزیم و استرانسیوم (M10 و S10) به طور قابل‌ملاحظه‌ای ($p < 0.01$) منجر به رشد، تکثیر و تمایز سلول‌های استخوانی در داربست‌ها و در ساختار کلسیم فسفاتی سبب بهبود خواص زیستی نمونه‌ها می‌شود. در نهایت نتایج حاصله از آزمون‌های مختلف بر قابلیت بالای داربست ساخته شده به عنوان جایگزین بافت استخوان دلالت دارد.
کلید واژگان:	
داربست	
زیست‌تقلیدی	
استرانسیوم	
منیزیم	
سلول استئوبلاست G292	

Comparative Study of the Effects of Strontium and Magnesium Ions on Physical and Chemical Properties of Calcium Phosphate-Gelatin Biomimetic Scaffolds in Bone Tissue Engineering

Amirhossein Moghanian^{1*}, Majid Raz², Fathollah Moztarzadeh³

1-Department of Materials Engineering, Imam Khomeini International University, Qazvin, 34149-16818, Iran (moghanian@eng.ikiu.ac.ir).

2- Department of Engineering, Shahryar branch, Islamic azad university, Shahryar, Iran (majid.raz@gmail.com).

3- Biomaterial Group, Faculty of Biomedical Engineering (Center of Excellence), Amirkabir University of Technology, Tehran, Iran (moztarzadeh@aut.ac.ir).

* moghanian@eng.ikiu.ac.ir

Article Information

Original Research Paper

Dor:

20.1001.1.24233226.1401.16.1.2.9

Keywords:

Scaffold

Biomimetic

Bone

Strontium

Magnesium

G292 Osteoblast Cell

Abstract

In this study, biomimetic scaffolds were designed to study the formation of calcium phosphate deposits by using a double diffusion method into gelatin hydrogel in temperature and pH similar to body conditions. Moreover, the effect of magnesium (Mg) and strontium (Sr) ions on properties was investigated. Five different types of specimens with different Sr and Mg ions percentage were synthesized and then porous scaffolds were prepared by freeze-drying method. The scaffolds microstructures were examined by scanning electron microscopy (SEM), which showed a smooth and needle-shaped surface of specimens. Fourier transform infrared spectroscopy (FTIR) results indicated the presence of phosphate and hydroxyl bonds in the structure of the scaffolds, due to the formation of calcium phosphate phases such as HA. The presence of metal ions in the structure caused the displacement of the peaks in X-ray diffraction (XRD) analysis and lattice parameters. Additionally, osteoblast cell culture results also demonstrated M10 and S10 specimens had proper biocompatibility. Additionally, alkaline phosphate (ALP) activity revealed the optimal amount of 10 mol. % Mg and Sr (M10 and S10), which led to the significantly (**p < 0.01, ***p < 0.001) growth, proliferation, and differentiation of 292G osteoblasts cells in scaffolds. Moreover, the presence of calcium phosphate improved the biological properties of the specimens. Finally, the results of various analyses confirmed the high capability of the synthesized scaffold as a promising substitute for bone tissue.

برای ارجاع به این مقاله از عبارت ذیل استفاده نمایید:

Please cite this article using:

Amirhossein Moghanian, Majid Raz, Fathollah Moztarzadeh, Comparative Study of the Effects of Strontium and Magnesium Ions on Physical and Chemical Properties of Calcium Phosphate-Gelatin Biomimetic Scaffolds in Bone Tissue Engineering, New Process in Material Engineering, 2022, 16(1), 10-26.

۱- مقدمه

استخوان بافتی پر عروق^۱ و پویا^۲ بوده و دارای قابلیت منحصر به فرد در زمینه ترمیم^۳ و بهبود می‌باشد. همچنین این بافت دارای توانایی بازسازی^۴ بر اساس مقدار و جهت تنش‌های وارده بر خود، بدون بر جای گذاشتن بافت اسکاره^۵ است [۱]. اختصاص سطح و حجم قابل توجهی از بدن به این ماده کامپوزیتی، با وجود داشتن فوایدی مانند تشکیل اسکلت‌بندی بدن و حفاظت از بافت‌های نرم داخلی، امکان وارد شدن صدمات به این بافت را نیز افزایش داده و آن را آسیب‌پذیر نموده است. امروزه به دلیل گسترش بیماری‌های مختلف بالینی^۶ مربوط به استخوان، مانند انواع عفونت‌های استخوانی^۷، تومورها، سرطان‌ها و فقدان بخش‌هایی از استخوان به دلیل ضربات وارده و تصادفات، نیاز به ترمیم و احیای بافت استخوان، بیش از پیش احساس می‌شود. مهندسی بافت^۸ علم طراحی و تولید بافت‌های جدید برای ترمیم اندام‌های آسیب‌دیده^۹ و جایگزین کردن^{۱۰} قسمت‌های از دست رفته به علت عوامل مختلف است. هدف مهندسی بافت به حالت طبیعی برگرداندن عملکرد^{۱۱} از طریق انتقال عوامل زنده‌ای است که با بیمار تلفیق می‌شوند. این هدف می‌تواند منجر به تولید بافت جدید شود [۲]. در این راستا، داربست‌های^{۱۲} مواد زیستی^{۱۳} از مهم‌ترین ارکان مهندسی بافت بوده و با توجه به تقاضای روزافزون مواد زیستی سنتزی در زمینه‌های پیوند^{۱۴} و بازتولید بافت، مطالعات بسیاری بر روی ساخت و ارتقای داربست‌های استخوانی تمرکز نموده‌اند [۳-۶].

داربست‌های مورد استفاده در بافت استخوان علاوه بر زیست‌سازگاری^{۱۵}، بایستی درصد تخلخل^{۱۶} بالا با حفرات^{۱۷} به هم مرتبط و در عین حال استحکام^{۱۸} مطلوب و تحریک‌کننده و هادی رشد بافت استخوان داشته باشند [۷]. از آن جایی که استخوان یک نانوکامپوزیت طبیعی متشکل از حدود ۶۹ درصد فاز معدنی^{۱۹} هیدروکسی‌آپاتایت^{۲۰} و ۲۰ درصد کلاژن و مابقی آب و عناصر دیگر است، بسیاری از محققان از ترکیب کلاژن^{۲۱} به عنوان زمینه و نانو هیدروکسی‌آپاتایت به عنوان فاز ثانویه جهت ساخت

داربست‌های استخوانی استفاده نموده‌اند [۸-۹]. ملاحظه‌ای ساختار طبیعی استخوان چه از نظر ترکیب شیمیایی و چه از نظر نحوه شکل‌گیری و قرارگیری اجزاء در کنار یکدیگر و لزوم نزدیک‌تر شدن به این ساختار به منظور حصول نتایج ایده‌آل در مبحث ساخت داربست‌های استخوانی، موجبات بروز رویکرد زیست‌تقلیدی^{۲۲} که به کنترل دما (۳۷ درجه سانتی‌گراد) و pH مشابه بدن یعنی ۷٫۴ محدود می‌شود را فراهم کرده است. در واقع تمایل محققان به استفاده از پلیمرهای طبیعی مخصوصاً کلاژن، ژلاتین و کیتوسان^{۲۳} و ترکیبات معدنی مشابه در استخوان طبیعی نظیر هیدروکسی‌آپاتایت در راستای همین رویکرد زیست‌تقلیدی است [۸]. در این روش نیز فاز رسوبی تشکیل شده در داخل ژل بر روی زنجیره‌های پلیمری جوانه‌زنی و رشد کرده و ترکیب^{۲۴} بسیار ایده‌آلی با زمینه خواهد داشت. بنابراین بسیار شبیه به استخوان طبیعی خواهد بود. از دیدگاه مهندسی، فاز رسوبی در این نانو کامپوزیت به عنوان فاز تقویت‌کننده‌ی ذره‌ای عمل کرده و روشن است که هرچه ابعاد ذرات ریزتر و اتصال آن‌ها به زمینه (ژل) بیشتر باشد، خصوصیات مکانیکی بهتری را ارائه خواهد کرد. با توجه به اینکه در تحقیقات قبلی مطلوبیت خصوصیات مکانیکی داربست ژلاتین / هیدروکسی‌آپاتایت به روش اختلاط فیزیکی با یکدیگر در داخل حلال اثبات شده است [۱۰]، بنابراین داربست ساخته شده به این روش احتمالاً خصوصیات مکانیکی بهتری خواهد داشت. جایگزین نمودن یون‌های دیگری که بتوانند باعث بهبود پاسخ زیستی^{۲۵} شوند سهم زیادی از مطالعات را به خود اختصاص می‌دهند. بر این اساس، هیدروکسی‌آپاتایت جایگزین شده با یون‌های دیگر به عنوان یک ابزار برای کنترل خواص مواد زیستی و یا به منظور انتقال یون‌های مفید به کار برده می‌شود [۱۱].

استرانسیوم با کلسیم از نظر شعاع اتمی و قرارگیری در یک گروه جدول تناوبی شبیه به همدیگر می‌باشند به همین دلیل می‌تواند در ساختار هیدروکسی‌آپاتایت جایگزین کلسیم شود. این یون در مقادیر کم در درمان پوکی استخوان^{۲۶} مؤثر است به طوری که مطالعات نشان داده است که حضور

یون استرانسیوم سبب کاهش تجزیه و افزایش تشکیل بافت استخوانی می‌گردد [۱۲].

همچنین مطالعات بالینی بر روی استخوان تعدادی زن که دچار پوکی استخوانی شده بودند نشان داد که حضور این یون سبب افزایش توده استخوانی، مقاومت و استحکام استخوان خواهد شد و در حال حاضر به عنوان درمان پوکی استخوان بعد از یائسگی تجویز می‌شود [۱۳]. استرانسیوم نیز همانند روی تأثیری دوسویه بر روی افزایش استخوان سازی^{۲۷} داشته و علاوه بر تحریک^{۲۸} تمایز^{۲۹} استئوبلاست‌ها^{۳۰} و افزایش استخوان‌سازی از تمایز استئوکلاست‌ها^{۳۱} جلوگیری کرده و جذب^{۳۲} و تحلیل^{۳۳} استخوانی را کاهش می‌دهد. تصور می‌شود که استرانسیوم با اینتگرین‌های^{۳۴} سلول‌های استئوبلاست که مسئول چسبندگی و مهاجرت این سلول‌ها هستند، بر هم کنش دارد و به طور مستقیم تکثیر^{۳۵} سلول‌های استئوبلاست را با یک تأثیر قابل مقایسه با فاکتور رشد شبه انسولین^{۳۶} تحریک می‌کند [۱۲]. عنصر استرانسیوم در سال‌های اخیر در زمینه ترمیم پوکی استخوان توجه بسیاری را به خود جلب کرده است که این عنصر می‌تواند بر واکنش‌ها و فعالیت‌های استخوانی تأثیر بگذارد به نحوی که باعث افزایش شکل‌گیری استخوان و هم‌زمان کاهش خوردگی^{۳۷} دوباره و از بین رفتن استخوان می‌شود. تحقیقات اخیر نشان داده است که وجود عنصر استرانسیوم می‌تواند تراکم استخوان جدید را بین سه تا چهار برابر بیشتر از استخوان قدیمی برساند [۱۳]. استرانسیوم می‌تواند در داخل ساختار آپاتایت قرار گیرد که جایگزینی کامل به صورت $Sr_{10}(PO_4)_6(OH)_2(SrHA)$ خواهد بود.

جایگزینی استرانسیوم با شعاع یونی بزرگ‌تر (۱/۲۰ آنگستروم) با کلسیم منجر به انبساط شبکه و تغییر پارامترهای a و c سلول خواهند شد (a برابر با ۹/۷۶۶۰ و c برابر با ۷/۲۷۶۰ آنگستروم طبق شماره کارت ۱۳۴۸-۳۳) و در نتیجه تغییر حجم سلول واحد رخ خواهد داد. اغلب مطالعات بر روی هیدروکسی‌آپاتایت آرایش‌یافته با استرانسیوم بر روی نمونه‌های تهیه شده در محلول‌های آبی با روش هم رسوبی بوده است [۱۴]. به منظور تهیه نمونه‌هایی با

بلورینگی^{۳۸} بالا، دیگر روش‌های آماده‌سازی نیز مورد مطالعه قرار گرفته‌اند که از بین این روش‌ها می‌توان به هیدروترمال^{۳۹} [۱۵] الکترولیز^{۴۰} [۱۶] و روش حالت جامد [۱۷] اشاره نمود. مطالعات آینا و همکاران^{۴۱} نشان داد که جایگزینی استرانسیوم با کلسیم معمولاً بر حلالیت هیدروکسی‌آپاتایت تأثیر گذاشته و باعث افزایش آن خواهد شد؛ بنابراین بر رهایش یونی و در نهایت پاسخ زیستی این دو عنصر تأثیر خواهد گذاشت [۱۸].

از عناصر دیگر می‌توان به منیزیم اشاره کرد که یکی از مهم‌ترین کاتیون‌های مرتبط با آپاتایت زیستی می‌باشد. به طور کلی در مراحل اولیه معدنی شدن یک بافت، میزان منیزیم بسیار زیاد می‌باشد درحالی‌که با افزایش معدنی شدن، میزان منیزیم کم‌تر می‌شود. این عنصر نقش کلیدی در سوخت و ساز^{۴۲} استخوان ایفا می‌کند به نحوی که می‌تواند بر فعالیت استئوکلاست‌ها، فعالیت رشد استخوانی، ضعف و شکنندگی استخوانی و یا از دست دادن استخوان مؤثر باشد [۱۹]. تعدادی از مطالعات بر روی افزایش میزان جایگزین نمودن یون منیزیم با کلسیم در هیدروکسی‌آپاتایت متمرکز شده است. اندازه‌های یونی مختلف منیزیم و کلسیم و جایگزینی آن‌ها باعث کاهش پارامترهای شبکه خواهد شد. داده‌های پرتوایکس و مادون قرمز بر جایگزینی منیزیم و یا جذب آن که منجر به کاهش بلورینگی می‌شود، تأثیر دارد. کاهش بلورینگی که ممکن است همراه با هیدراسیون سطح افزایش یافته باشد، منجر به افزایش حلالیت و کاهش پایداری حرارتی خواهد شد [۲۰-۱۹]. ریزساختار^{۴۳} هیدروکسی‌آپاتایت وابسته به روش آماده‌سازی آن است. اگرچه بلورهای سنتز شده در حضور منیزیم نشان از کاهش ابعاد نسبت به هیدروکسی‌آپاتایت خالص دارد. تصاویر میکروسکوپ الکترونی روبشی^{۴۴} با قدرت تفکیک بالا نشان داد که یک فاز بی شکل^{۴۵} بلوری در مرزخانه‌ها وجود دارد که با افزایش مقدار منیزیم، افزایش یافته است. تأثیر مشابهی بر روی اندازه ذرات در نمونه‌های تهیه شده با نسبت‌های وزنی متفاوت از کلسیم و منیزیم مشاهده شده است [۲۱]. در تحقیقی از منیزیم به عنوان یک افزودنی در

عنوان منبع یون منیزیم، که همگی محصول شرکت مرک آلمان هستند، برای تهیه نمونه مورد نظر استفاده می‌شوند. عناصر موجود در کلسیم فسفات در جدول ۱ نشان داده شده است.

جدول (۱): عناصر موجود در کلسیم فسفات

نام اختصاری	درصد مولی	نام
M5	5	Mg
S5	5	Sr
M10	10	Mg
S10	10	Sr

جهت ساخت نمونه‌های زیست‌تقلیدی، نوعی سیستم نفوذ دوسویه برای یون‌های کلسیم، فسفات، استرانسیوم و منیزیم طراحی شده است. سیستم به گونه‌ای طراحی شده که هیدروژل ژلاتین در وسط قرار دارد و طرفین آن محلول‌های حاوی یون‌های بنیان فسفات، کلسیم، استرانسیوم و منیزیم قرار می‌گیرند. برای ساخت نمونه‌های زیست‌تقلیدی در ابتدا محلول‌های ۱۰٪ وزنی ژلاتین آماده شد. محلول ژلاتینی با اضافه کردن تدریجی پودر ژلاتین به آب مقطر روی همزن با دمای حدود ۶۰-۵۰ درجه سانتی‌گراد انجام شد. سپس محلول ژلاتینی درون قسمت میانی قالب ریخته شده و مجموعه برای شکل گرفتن هیدروژل به مدت یک روز در یخچال قرار گرفت. در مرحله بعد محلول‌های دی کلرید کلسیم، سدیم هیدروژن فسفات و نیترات استرانسیوم و نیترات منیزیم در طرفین دیواره ژلاتینی ریخته شد و کل سیستم به مدت ۷ روز در یخچال قرار گرفتند. با گذشت زمان این یون‌ها در اثر گرادیان غلظتی در هیدروژل نفوذ کرده که منجر به رسوب فاز کلسیم فسفات در آن و تشکیل کامپوزیت شد.

در استخوان‌سازی داخل غضروفی^{۵۰}، در ابتدا قالب یا طرحی از غضروف شفاف برای استخوان آینده ساخته شده و سپس در این قالب غضروفی، استخوان‌سازی به صورت معدنی شدن فاز کلسیم فسفات انجام می‌شود. در این تحقیق نیز هیدروژل میانی ژلاتین نقش غضروف ابتدایی را برای انجام استخوان‌سازی ایفا کرده و یون‌های کلسیم، فسفات، استرانسیوم و منیزیم نیز فاز کلسیم فسفات استخوان را به

ترکیب سیمان استخوانی کلسیم فسفات به منظور کنترل تخریب‌پذیری^{۴۶}، خواص مکانیکی و پاسخ سلولی استفاده شده است. در عمل افزودن منیزیم به یک سیمان کلسیم فسفات بی‌شکل باعث شد تا بر واکنش هیدراسیون تأثیر گذاشته و منجر به ایجاد یک زمینه سیمانی چگال و دارای خواص مکانیکی فشاری بالا شود [۲۲]. همچنین حضور منیزیم بر بلورینگی، ریزساختار و اندازه بلورهای پوشش‌های هیدرکسی‌آپاتایت رسوب داده شده تأثیرگذار می‌باشد. علاوه بر این، حضور منیزیم در مواد بر پایه آپاتایت دارای نقش مفیدی در تکثیر سلول‌ها می‌باشد [۲۳]. بررسی نحوه شکل‌گیری فاز کلسیم فسفات، بررسی میزان جانمایی یون‌های منیزیم و استرانسیوم اضافه شده در ساختار رسوب تشکیل‌شونده، شکل‌گیری فاز کلسیم فسفات درون ساختار هیدروژل به شیوه‌ی زیست‌تقلیدی و در نهایت بررسی مقادیر بهینه ۵ و ۱۰ درصد مولی منیزیم (M5) و استرانسیوم (S5 و S10) در ساختار فاز کلسیم فسفات ایجاد شده با گذشت زمان و بررسی تکثیر و رشد سلول‌های استخوانی، فعالیت فسفات‌قلیایی^{۴۷} و میزان سمیت سلولی^{۴۸} با توجه به تحلیل (P-Value) قابل ملاحظه آماری کمتر از ۰/۰۵ ($p^* < 0.05$) در طول فرآیند نفوذ و خواص زیستی داربست کامپوزیتی از اهداف پژوهش می‌باشد.

۲- مواد و روش‌ها

۲-۱- مواد و سنتز نمونه

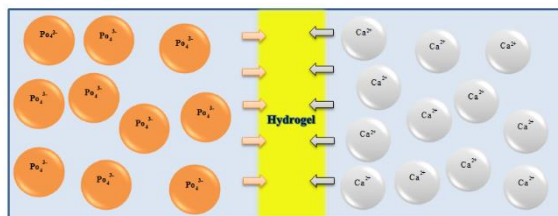
مواد ژلاتین نوع میکروپ شناسی^{۴۹}، محلول گلو تار آلدهید ۲۵ درصد وزنی به عنوان عامل ایجادکننده اتصالات عرضی در ژلاتین، دی سدیم هیدروژن فسفات (Na- $HPO_4 \cdot 12H_2O$) به عنوان منبع یون فسفات، کلسیم کلراید ($CaCl_2$) به عنوان منبع یون کلسیم، نمک تریس (tris (hydroxymethyl) aminomethane) به عنوان عامل بافری کننده در محلول‌ها، محلول اسید هیدروکلریک (HCl) ۳۷ درصد وزنی به عنوان مکمل عامل بافری کننده در محلول‌ها، نیترات استرانسیوم ($Sr(NO_3)_2$) به عنوان منبع یون استرانسیوم، نیترات منیزیم ۶ آب ($Mg(NO_3)_2 \cdot 6H_2O$) به

جدول (۲): مقایسه غلظت‌های اسمی یون‌های موجود در محلول

شبه‌سازی شده بدن با پلاسما خون انسان

Concentration (mmol/dm ³)		Ion
Human blood plasma	Simulated body fluid (SBF)	
۱۴۲,۰	۱۴۲,۰	Na ⁺
۵,۰	۵,۰	K ⁺
۱,۵	۱,۵	Mg ²⁺
۲,۵	۲,۵	Ca ²⁺
۱۰۳,۰	۱۴۷,۸	Cl ⁻
۲۷,۰	۴,۲	HCO ₃ ⁻
۱,۰	۱,۰	HPO ₄ ²⁻
۰,۵	۰,۵	SO ₄ ²⁻

شبه نفوذ به وجود می‌آورند. اشکال ۱ و ۲ به ترتیب نفوذ یون‌های کلسیم و استرانسیوم درون هیدروژل در اثر گرادیان غلظتی را نشان می‌دهد.



شکل (۱): نفوذ کلسیم درون هیدروژل در اثر گرادیان غلظتی

۲-۲- مشخصه‌یابی نمونه‌ها

۲-۲-۱- آزمون‌های پراش پرتو ایکس^{۵۲}

طیف‌سنجی تبدیل فوریه فروسرخ^{۵۳} و بررسی

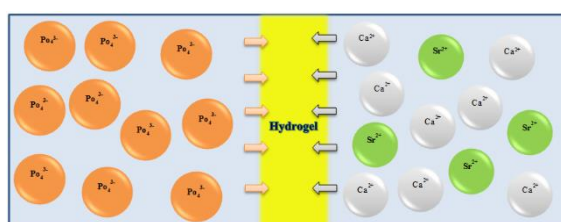
تصاویر میکروسکوپ الکترونی روبشی

جهت مطالعه ساختار بلوری نمونه‌ها و نیز بررسی تغییرات ساختاری حاصل از ورود یون‌های منیزیم و استرانسیوم با درصد‌های مختلف به داخل ساختار فاز کلسیم فسفاتی، الگوها توسط نرم‌افزار Crystal Impact با کارت‌های XRD مربوط به ترکیبات کلسیم فسفاتی موجود در پایگاه داده‌ای ICDD^{۵۴} مقایسه شدند و مورد بررسی و مطالعه قرار گرفته و نوع فازهای موجود در این نمونه‌ها شناسایی شدند. در ادامه به منظور تعیین گروه‌های شیمیایی و میزان تشکیل شدن پیوندهای یون‌های منیزیم و استرانسیوم و فاز کلسیم فسفاتی با زمینه ژلاتینی با افزایش زمان ماندگاری در محلول شبه‌سازی شده بدن، از روش طیف‌سنجی فروسرخ با دستگاه FTIR مدل NEXUS FTIR 670 ساخت آمریکا در محدوده عدد موج ۴۰۰-۴۰۰۰ cm⁻¹ در حالت جذبی استفاده شد. در نهایت با استفاده از میکروسکوپ الکترونی روبشی ریزساختار سطح ساختار کامپوزیت سنتز شده به روش زیست تقلیدی مورد بررسی قرار گرفت.

۳-۲- ارزیابی زیستی

۳-۲-۱- کشت سلول‌های استئوبلاست G292

کشت سلول‌های استئوبلاست به منظور بررسی سمیت نمونه‌ها و تأثیر آن‌ها بر رشد و تکثیر سلول‌ها انجام شد به



شکل (۲): نفوذ یون استرانسیوم درون هیدروژل در اثر گرادیان غلظتی

پس از ساخت نمونه‌های زیست تقلیدی کامپوزیتی، نمونه‌ها برای فرآیند سرمایش انجمادی و ایجاد ساختار متخلخل ابتدا به مدت ۲۴ ساعت در فریزر و سپس ۲۴ ساعت در فریز درایر قرار گرفتند. برای مطالعات بعدی سطح نمونه‌ها با تیغ جراحی برش داده شده تا تخلخل‌های آن‌ها روی سطح مشخص شوند.

نمونه‌های کامپوزیتی درون ظروف درسته‌ای حاوی محلول شبه‌سازی شده بدن^{۵۱} قرار داده شدند و سپس ظروف مذکور برای زمان‌های ۳ روز، یک هفته و دو هفته در انکوباتوری با دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد قرار گرفتند. سپس نمونه‌ها از محلول شبه‌سازی شده بدن خارج شده و به وسیله دستگاه فریز درایر خشک شدند. روی نمونه‌ها آزمون تست استحکام مکانیکی انجام شد و در نهایت نمونه‌های استاندارد جهت مشخصه‌یابی دوباره به صورت پودر درآمدند.

در جدول ۲ مقایسه غلظت‌های اسمی یون‌های موجود در محلول شبه‌سازی شده بدن با پلاسما خون انسان نشان داده شده است [۲۴].

نهایت غلظت ماده حل شده در ایزوپروپانول در طول موج ۵۴۵ نانومتر محاسبه شد [۲۶].

۳-۳-۲- بررسی فعالیت فسفات قلیایی

فسفات قلیایی آنزیمی است که مقدار آن بیانگر فعالیت سلول‌های استئوبلاست است. در این پژوهش میزان فعالیت فسفات قلیایی ترشح شده از سلول‌های استئوبلاست قرار گرفته در مجاورت داربست‌ها پس از ۳ روز با استفاده از دستگاه Autoanalyzer مدل Hitachi 902 ساخت کشور آلمان ارزیابی شد.

۴-۲- تحلیل آماری

تمامی داده‌های عددی برای حداقل سه دوره تکرار آزمون‌ها گزارش شد. همچنین به منظور تجزیه و تحلیل آماری داده‌ها از نرم‌افزار GraphPad Prism نسخه ۸ استفاده و در نهایت مقدار احتمال (P-Value) کمتر از ۰/۰۵ ($p < 0.05$) به عنوان تفاوت قابل ملاحظه آماری در نظر گرفته شد.

۳- نتایج و بحث

۱-۳-۳- بررسی نتایج آزمون پراش پرتو ایکس

برای انجام این آزمون، پودر برش داده شده قسمت کامپوزیتی داربست‌ها قبل و پس از قرارگیری در محلول شبیه‌سازی شده بدن مورد آنالیز قرار گرفتند. با توجه به الگوهای پراش پرتو ایکس به دست آمده، ترکیبات و فازهای موجود در هر نمونه شناسایی شدند. شکل ۳ الگو پراش پرتو ایکس نمونه‌های M5 و S5 و M10 و S10 در مقایسه با نمونه کنترل قبل از غوطه‌وری^{۵۸} در محلول شبیه سازی شده بدن را نشان می‌دهد.

منظور بررسی سمیت نمونه‌ها و تأثیر آن‌ها بر رشد و تکثیر سلول‌ها، فرآیند عصاره‌گیری بر اساس استاندارد ایزو ۵-۱۰۹۹۳ انجام شد که طی آن به هر نمونه به وزن ۰٫۱ گرم، مقدار یک میلی‌لیتر محیط کشت افزوده گردید. سپس در فواصل زمانی مشخص محیط خارج و به سلول‌ها افزوده شد. مقدار مشخصی محیط کشت (RPMI) نیز به عنوان شاهد (کنترل) در نظر گرفته شد. برای انجام کشت سلولی نیز از سلول‌های استئوسارکوما‌ی انسانی استفاده شده است. پس از دفریز کردن سلول‌ها، آن‌ها را به فلاسک حاوی محیط کشت FBS (10%) RPMI منتقل کرده و سپس فلاسک در انکوباتور در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد، قرار می‌گیرند. پس از آن سلول‌ها در محیط کشت حاوی عصاره داربست‌ها، به مدت ۳ روز کشت داده شده و در نهایت مورفولوژی سلول‌ها با استفاده از میکروسکوپ نوری معکوس بررسی شدند [۲۵]. میکروسکوپ نوری معکوس میکروسکوپی است که منبع نوری و کوندانسور آن در قسمت فوقانی آن، بالای صفحه قرارگیری نمونه و عدسی شیئی آن پایین محل قرارگیری نمونه قرار دارد. در المنتور عمودی نور از منبع که معمولاً یک لامپ هالوژن ۱۲ ولت و ۱۰۰ یا ۵۰ وات است، حرکت می‌کند. در این پژوهش از میکروسکوپ معکوس ساخت کمپانی المپوس (Olympus) استفاده شد.

۲-۳-۲- آزمون سمیت سلولی

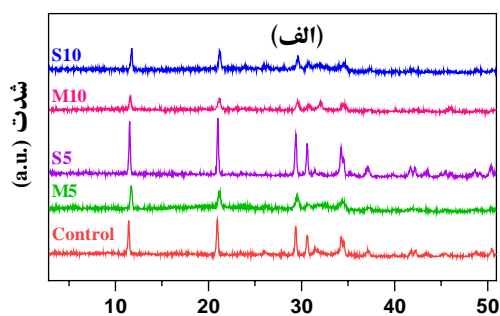
این آزمون به منظور بررسی سمیت داربست‌های ساخته شده انجام می‌شود. بررسی سمیت سلولی توسط آزمایش MTT^{۵۵} انجام گرفت. در پلیت‌های ۹۶ خانه سلول‌ها کاشته شد و به مدت ۲۴ ساعت در انکوباتور قرار گرفت. پس از طی مدت زمان‌های لازم ۱ محیط سلول‌ها خارج و محیط جدید به همراه ۱۰۰ μL محلول PBS^{۵۶} با غلظت ۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر به هر چاهک افزوده و به مدت ۲۴ ساعت در انکوباتور قرار داده شد. پس از ۴ ساعت محلول MTT از روی سلول‌ها خارج شده و ایزوپروپانول^{۵۷} به مقدار ۱۰۰ μl اضافه شد تا بلورهای بنفش رنگ ایجاد شده حل شود و در

همچنین در صورت جایگزین شدن اتم کوچک‌تر در ساختار ماده بایستی سینوس زاویه افزایش یابد. جدول ۳ میزان جابجایی پیک‌های اصلی را در اثر افزوده شدن یون استرانسیم نشان می‌دهد.

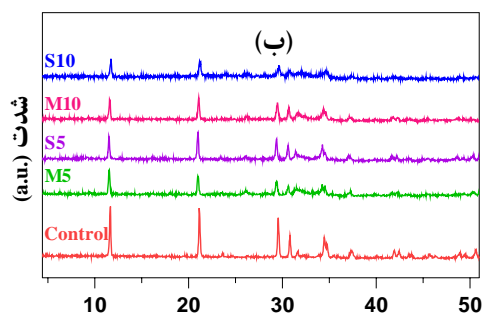
جدول (۳): میزان جابجایی پیک‌های اصلی در نمونه‌های سنتز شده

نمونه	صفحه کریستالی			
	(۰۲۰)	(۰۴۱)	(۰۲۱)	(-۲۲۰)
(Sr) ۰٪	۱۱,۵۷	۲۱,۱۰	۲۹,۵۰	۳۴,۴۳
(Sr) ۵٪	۱۱,۵۵	۲۱,۰۵	۲۹,۴۵	۳۴,۳۳
(Sr) ۱۰٪	۱۱,۴۷	۲۱,۰۳	۲۹,۴۲	۳۴,۲۹

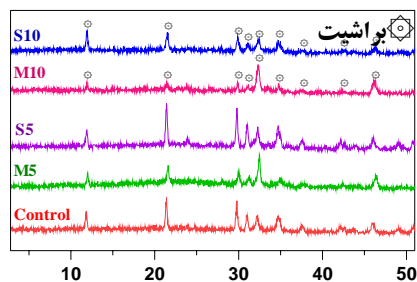
نمونه‌هایی M5 و M10 کمترین شدت پیک‌های براشیت را در مقایسه با نمونه‌های S5 و S10 داشته‌اند که می‌تواند نشان از اثر بیشتر منیزیم نسبت به استرانسیوم در کاهش بلورینگی براشیت باشد. در سایر مطالعات انجام شده بر روی منیزیم نیز اثر کاهش بلورینگی آن دیده شده است [۲۷ - ۲۸]. شکل ۴ الف تا ت نشان می‌دهد الگو پراش پرتوایکس نمونه‌های M5 و S5 و M10 و S10 پس از ۷، ۳، ۰ و ۱۴ روز غوطه‌وری در محلول شبیه‌سازی شده بدن به چه صورت است.



دو تا (درجه)



دو تا (درجه)



دو تا (درجه)

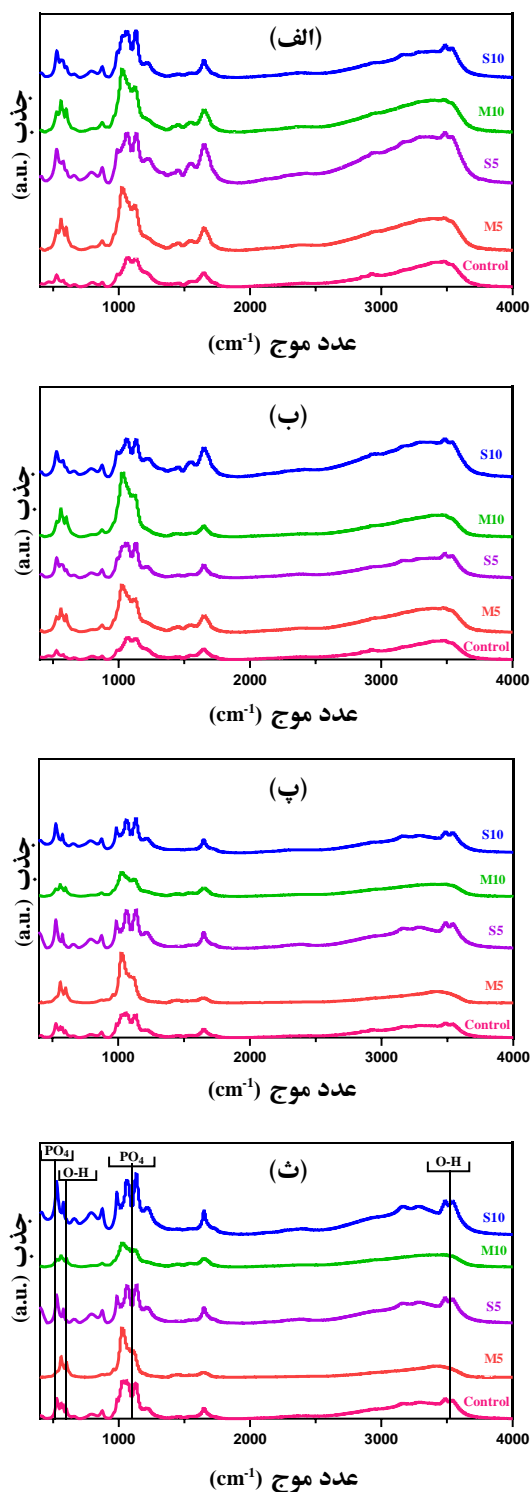
شکل (۳): الگو پراش پرتوایکس نمونه‌های M5 و S5 و M10 و S10 در مقایسه با نمونه کنترل قبل از غوطه‌وری در محلول شبیه‌سازی شده بدن

همان‌گونه که بر روی نمودارها قابل مشاهده است با افزودن یون‌های منیزیم و استرانسیوم به ساختار کلسیم فسفات، پیک‌های مربوطه جابجایی اندکی پیدا کرده‌اند که این جابجایی برای نمونه حاوی استرانسیوم به سمت زاویه‌های پراش (دو تا) کوچک‌تر و برای نمونه‌های حاوی منیزیم به سمت زاویه‌های پراش بزرگ‌تر بوده است. علت این امر می‌تواند تغییر فاصله بین صفحات اتمی، تغییر پارامتر شبکه‌ای و به هم خوردن تقارن شبکه‌ای باشد که در اثر ورود یون‌های فلزی (با شعاع یونی متفاوت نسبت به کلسیم) در ساختار کلسیم فسفاتی ایجاد شده است. بر اساس قانون براگ با تغییر فاصله بین صفحات کریستالی زاویه‌ای که پیک در آن دیده می‌شود، تغییر می‌کند. چرا که بر اساس قانون براگ:

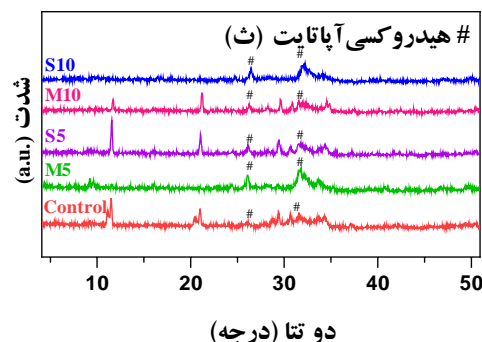
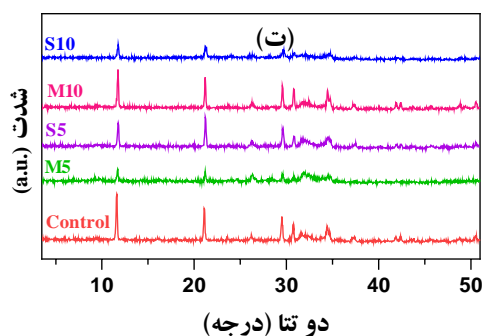
$$n\lambda = 2d \sin \theta$$

حال در صورتی که اتمی بزرگ‌تر از اتم‌های خود ماده، جایگزین آن‌ها در ساختار ماده شود، شبکه اتمی منبسط شده و فاصله بین صفحات اتمی (d) زیاد می‌گردد؛ بنابراین با ثابت ماندن طول موج اشعه تابیده به ماده، باید سینوس زاویه پراش کاهش یابد تا نسبت فوق برقرار باشد. همچنین در صورت جایگزین شدن اتم کوچک‌تر در ساختار ماده بایستی سینوس زاویه افزایش یابد. در صورتی که اتمی بزرگ‌تر از اتم‌های خود ماده، جایگزین آن‌ها در ساختار ماده شود، شبکه اتمی منبسط شده و فاصله بین صفحات اتمی (d) زیاد می‌گردد؛ بنابراین با ثابت ماندن طول موج اشعه تابیده به ماده، باید سینوس زاویه پراش کاهش یابد.

شکل ۵ الف تا ت نشان‌دهنده‌ی طیف‌سنجی تبدیل فوریه فروسرخ نمونه‌های M5 و S5 و M10 و S10 در مقایسه با نمونه کنترل قبل و پس از قرارگیری در محلول شبیه‌سازی شده بدن در زمان‌های ۰، ۳، ۷ و ۱۴ می‌باشد.



شکل (۵): طیف‌سنجی تبدیل فوریه فروسرخ نمونه‌های M5 و S5 و M10 و S10 مقایسه با نمونه کنترل قبل و پس از قرارگیری در محلول شبیه‌سازی شده بدن در زمان‌های ۰، ۳ و ۷ و ۱۴



شکل (۴): الگو پراش پرتو ایکس نمونه‌های M5 و S5 و M10 و S10 پس از ۰، ۳، ۷ و ۱۴ روز غوطه‌وری در محلول شبیه‌سازی شده بدن

با افزایش زمان ماندگاری در محلول شبیه‌سازی شده بدن، شدت پیک‌های مربوط به هیدروکسی‌آپاتایت افزایش می‌یابد که این پدیده می‌تواند ناشی از افزایش میزان هیدروکسی‌آپاتایت رسوب کرده روی سطح نمونه همان رسوب اولیه‌ی تشکیل شده از ترکیب برآشیت باشد که پس از نگهداری در محلول شبیه‌سازی شده بدن فاز برآشیت تبدیل به فاز هیدروکسی‌آپاتایت می‌شود و این افزایش میزان هیدروکسی‌آپاتایت نشانه زیست‌فعالی^{۵۹} خوب داربست‌های ساخته شده است. همچنین با افزایش زمان ماندگاری در محلول شبیه‌سازی شده بدن علاوه بر افزایش شدت پیک‌ها، پیک‌های مربوط به هیدروکسی‌آپاتایت اندکی باریک‌تر شده‌اند که این امر نیز می‌تواند سبب افزایش بلورینگی هیدروکسی‌آپاتایت شود.

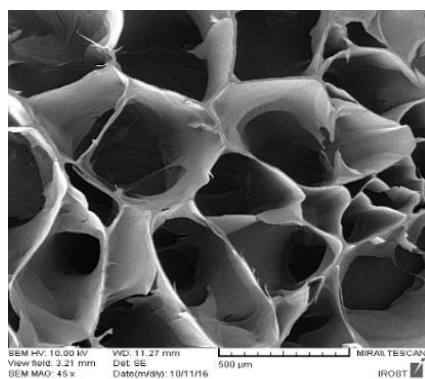
۳-۲- بررسی نتایج آزمون طیف‌سنجی فروسرخ

آزمون موردنظر بر روی تمام نمونه‌های رسوب‌دار برش خورده که به صورت پودر درآمده‌اند، انجام شد.

موجود در این فازها توسط آزمون پراش پرتو ایکس که بیشتر به آن اشاره شد دیده شده است.

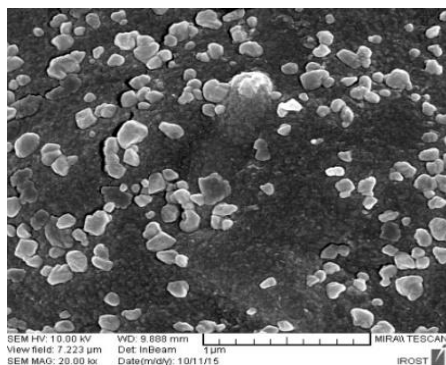
۳-۳- بررسی تصاویر میکروسکوپ الکترونی روبشی

با توجه به تصویر میکروسکوپ الکترونی روبشی در شکل ۶ مشهود است که حفره‌ها ساختار لانه زنبوری داشته و به هم پیوسته می‌باشند که امکان انتقال اکسیژن و مواد غذایی را داشته، که نهایتاً شرایط رشد سلول‌ها را مهیا می‌کند. همچنین اندازه‌ی حفرات برای رشد سلول‌های استخوانی حدود ۲۰۰-۵۰۰ میکرون است که داربست تهیه شده این نیاز را تأمین می‌کند [۳۲-۳۳].



شکل (۶): ساختار متخلخل داربست تولید شده

شکل ۷ تصویر ذرات رسوبی در داربست‌های ساخته شده قبل از قرارگیری در محلول شبیه‌سازی شده بدن را نشان می‌دهد. شکل این ذرات نیز تقریباً کروی و اندازه‌ی آن‌ها در حدود صد نانومتر است که در افزایش چقرمگی کامپوزیت تأثیر بسزایی دارند [۳۴].

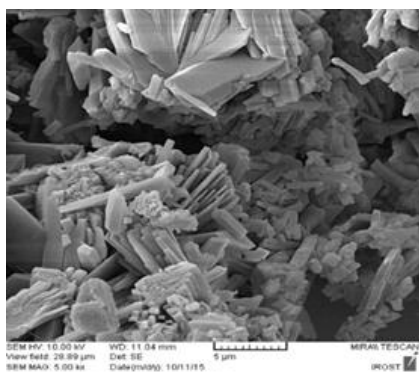


شکل (۷): تصویر ذرات رسوبی در داربست‌های ساخته شده قبل از قرارگیری در محلول شبیه‌سازی شده بدن

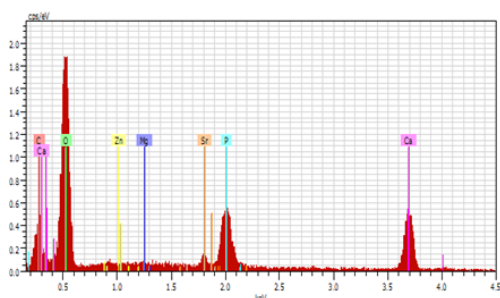
با توجه به باند فسفات در ناحیه $900-1200 \text{ cm}^{-1}$ ، با افزایش میزان یون منیزیم، پیک مربوطه پهن‌تر شده و از شکل سه‌شاخه به صورت دوشاخه درمی‌آید که این مطلب در تحقیقات مشابه نیز دیده شده است و ممکن است به علت تغییر در انرژی پیوندها به سبب حضور یون منیزیم باشد [۲۹].

در مورد نمونه‌های حاوی استرانسیوم باند فسفات به سمت عدد موج کمتر جابجا شده است که با افزایش میزان استرانسیوم این جابجایی بیشتر می‌گردد. این کاهش فرکانس ارتعاش ممکن است به سبب کاهش انرژی پیوند P-O باشد که به علت افزایش فاصله گروه‌های PO_4 در اثر انبساط شبکه‌ای ناشی از جایگزینی یون استرانسیوم ایجاد شده است که در برخی از پژوهش‌ها به آن اشاره شده است [۳۰]. همان‌گونه که در شکل ۵ مشخص شده است شدت پیک‌های مربوط به ساختار کلسیم فسفات (بنیان فسفات و هیدروکسیل) در نمونه حاوی ۱۰ درصد مولی منیزیم نسبت به استرانسیوم کمتر است. علت این اتفاق را می‌توان در تأثیر منیزیم در ایجاد تأخیر در تشکیل کلسیم فسفات‌ها و یا بی‌شکل نمودن ساختار آن‌ها دانست که این تأثیر در تحقیقاتی که توسط سایر محققان در زمینه سنتز کلسیم فسفات‌های حاوی منیزیم انجام شده نیز مشاهده شده است [۳۱-۳۰].

در تمامی نمونه‌ها قبل از قرارگیری در محلول شبیه‌سازی شده بدن، پیک‌های مشابهی دیده می‌شود که می‌تواند به سبب حضور پیوندهای مشابه در ساختار نمونه‌ها باشد و همچنین تغییر میزان استرانسیوم و منیزیم تأثیر چندانی در نوع پیوندهای تشکیل شده نداشته است. با افزایش زمان غوطه‌وری پیک‌های مربوط به تشکیل کلسیم فسفات در ساختار در محدوده عدد موجی $600, 550, 345 \text{ cm}^{-1}$ و بسیار آشکارتر شده‌اند که می‌تواند دلیلی بر افزایش میزان کلسیم فسفات تشکیل شده در ساختار و زیست‌فعالیت باشد. اگرچه حضور پیک مربوط به هیدروکسیل ساختاری در محدوده 345 cm^{-1} و 600 می‌تواند نوع فازهای کلسیم فسفاتی تشکیل شده را اثبات نماید، اما به طور کلی تفاوت



(ب)



(ج)

شکل (۸): تصویر ذرات رسوبی در داربست‌های ساخته شده بعد از الف (۷، ب) ۱۴ روز قرارگیری در محلول شبیه‌سازی شده بدن و ج) نمونه آنالیز EDS از ذرات دیده شده در تصاویر SEM

۴-۳- ارزیابی زیستی

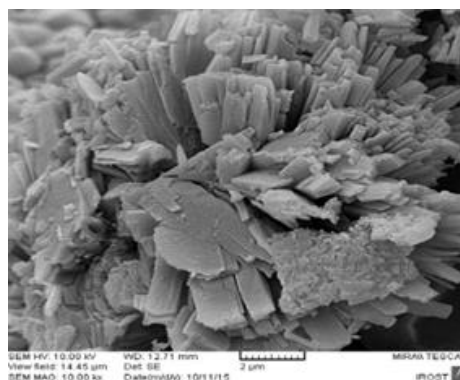
۴-۳-۱- بررسی کشت سلول‌های استئوبلاست

G۲۹۲

در شکل ۹ الف تا ث ریزساختار سلول‌ها در تمامی نمونه‌ها قبل و بعد از کشت که به صورت دوکی شکل هستند، دیده می‌شود. این مطلب بیانگر زیست سازگاری تمام نمونه‌ها با سلول استئوبلاست می‌باشد [۳۶]. چرا که مورفولوژی سلول‌های استئوبلاست سالم در زیر میکروسکوپ به صورت دوکی شکل دیده می‌شود و سلول‌های مرده به صورت گرد شده دیده خواهند شد. چنانچه داربست‌های ساخته شده سمیت ایجاد کرده باشند سبب مرگ سلولی و گرد شدن مورفولوژی سلول‌ها خواهند شد.

شکل ۸ تصاویر میکروسکوپ الکترونی روبشی مربوط به نمونه‌های حاوی استرانسیوم که به مدت ۷ و ۱۴ روز در محلول شبیه‌سازی شده بدن قرار گرفته را نشان می‌دهد. آنالیز EDS ذرات دیده شده در تصاویر SEM نیز آورده شده است. بلورهای ذرات رسوبی به صورت توده‌هایی مشخص هستند که از نظر زیستی این ذرات سطحی صاف و سوزنی شکل داشته و دارای ساختار گل قاصدکی هستند. همانگونه که در تصاویر میکروسکوپ الکترونی داربست‌ها پس از قرارگیری در محلول شبیه‌سازی شده بدن مشخص است بلورهای شکل گرفته سطح ویژه بالایی دارند، در نتیجه سطح تماس بیشتری برای واکنش با یون‌های موجود در ماتریس خارج سلولی و سلول‌های استخوانی ایجاد می‌کنند [۳۵].

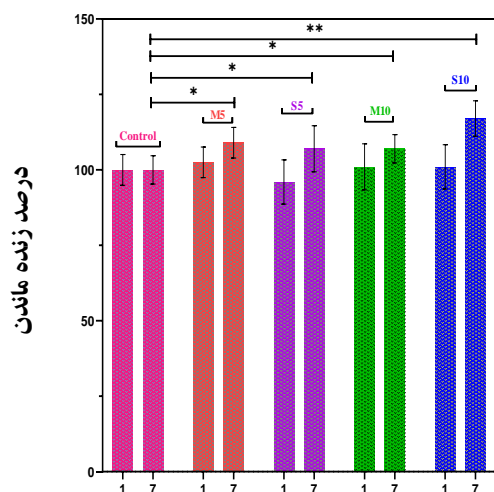
از مقایسه تصاویر نمونه‌ها، قبل و پس از قرارگیری در شبیه‌سازی شده بدن می‌توان دریافت که میزان رسوب‌های تشکیل شده به صورت قابل توجهی افزایش پیدا کرده است و همچنین با افزایش زمان قرارگیری در شبیه‌سازی شده بدن نیز بر میزان رسوبات تشکیل شده اضافه شده است. علت این افزایش در میزان رسوبات را می‌توان در زیست فعالی بالای این داربست‌ها و همچنین قابلیت تشکیل هیدروکسی آپاتیت روی سطح دانست.



(الف)

۲-۴-۳- آزمون سمیت سلولی

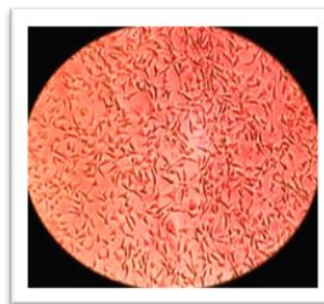
شکل ۱۰ نتایج حاصل از آزمون سمیت سلولی نمودار MTT مربوط به داربست‌های کامپوزیتی ساخته شده نمونه-های M5 و S5 و M10 و S10 در مقایسه با نمونه کنترل را نشان می‌دهد.



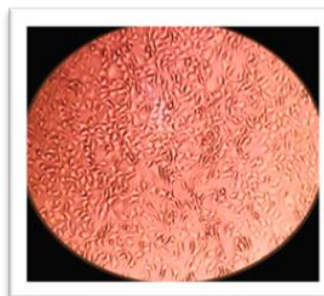
روزهای غوطه‌وری در SBF

شکل (۱۰): نمودار MTT مربوط به داربست‌های کامپوزیتی ساخته شده نمونه‌های M5 و S5 و M10 و S10 در مقایسه با نمونه کنترل

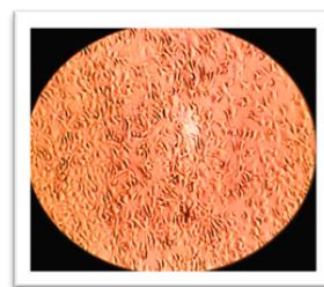
همان‌طور که مشاهده می‌شود نمونه‌ها پس از ۱ روز سمیتی از خود نشان ندادند و در مقایسه با نمونه کنترل تفاوت معناداری وجود نداشت ($p > 0.05$). بالا بودن تعداد و درصد زنده بودن سلول‌ها در نمونه‌های M5 و M10 و همچنین نمونه S10، پس از گذشت ۱ روز از قرارگیری در محیط کشت، در مقایسه با نمونه کنترل مشاهده می‌گردد که با توجه این نکته که اجزا داربست کامپوزیتی، مشابه ساختار استخوان طبیعی انتخاب و سنتز شده بودند، نتایج اولیه کشت قابل توجه است. نتایج حاصل از ۷ روز کشت سلول‌ها نیز نشان می‌دهد که در اکثر نمونه‌های ساخته شده افزایش رشد و تکثیر سلول‌های استئوبلاست مشاهده گردیده است. در واقع مواد حاصل از تخریب و آزاد شده از نمونه‌ها نه تنها اثر سمیتی بر سلول‌ها نداشته است بلکه سبب بهبود عملکرد سلول‌ها، رشد و تکثیر بیشتر آن‌ها شده است. حضور فاز کلسیم فسفاتی در ساختار داربست‌ها نیز به علت تشابه بسیار زیاد ساختار آن با استخوان طبیعی بدن و آزادسازی مواد



(الف)



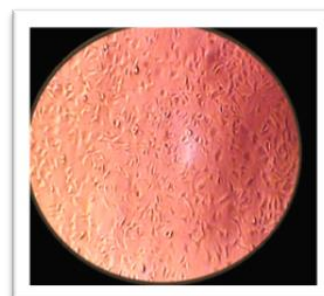
(ب)



(پ)



(ت)



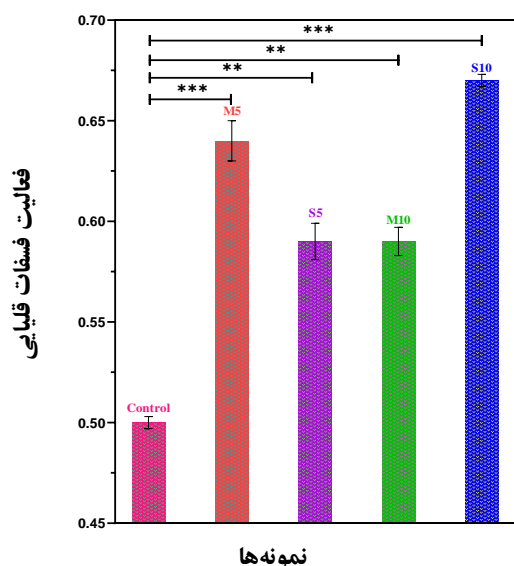
(ث)

شکل (۹): تصاویر (الف) نمونه کنترل، (ب) M5، (پ) S5، (ت) M10 و (ث) S10 کشت سلول استئوبلاست بر روی داربست‌های ساخته شده

میزان ۶٫۸ درصد مولی تأثیری بر آپوپتوز استئوکلاست‌ها ندارد [۴۳].

۳-۴-۳- بررسی فعالیت فسفات قلیایی

فعالیت فسفات قلیایی از طریق اندازه‌گیری میزان جذب نوری به منظور بررسی تکثیر و تمایز سلول‌های استخوانی می‌باشد. در شکل ۱۱ نمودار بررسی فعالیت فسفات قلیایی سلول‌های G292 (رده سلولی استئوسارکومای انسانی) کشت داده شده نمونه‌های M5 و S5 و M10 و S10 به مدت ۳ روز بر روی داربست‌های تهیه شده و مقایسه با نمونه کنترل، در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد نشان داده شده است که تفاوت قابل ملاحظه فعالیت فسفات قلیایی سلول‌های G292 بر روی اکثر داربست‌ها در مقایسه با نمونه کنترل می‌باشند ($p^{**} < 0/01$, $p^{*} < 0/05$).



شکل (۱۱): نمودار میزان فعالیت فسفات قلیایی بعد از ۳ روز در مجاورت داربست‌های حاوی نمونه‌های M5 و S5 و M10 و S10

داربست‌های ساخته شده در مقایسه با نمونه کنترل فعالیت فسفات قلیایی به مراتب بهتری از خود نشان می‌دهند. طبق نتایج حاصل از این آزمون در نمونه‌های S5 و S10 با افزایش محتوای استرانسیوم در ترکیب نمونه‌ها فعالیت فسفات قلیایی افزایش می‌یابد ($p^{**} < 0/01$, $p^{***} < 0/001$). یون استرانسیوم می‌تواند با گیرنده کلسیم در سلول بر هم کنش انجام داده و بنابراین میزان mRNA را افزایش دهد و

یون‌های مشابه با بدن سبب رشد و تکثیر سلول‌های استخوانی می‌گردد [۳۷].

نمونه‌های کامپوزیتی ژلاتین/کلسیم فسفات S5 و S10 نشان می‌دهند که با افزایش درصد استرانسیوم، تکثیر سلول‌ها افزایش یافته و سمیتی مشاهده نشده است. قابل ذکر است که بیشترین میزان تکثیر در بین نمونه‌ها پس از ۷ روز کشت متعلق به نمونه حاوی S10 بوده و افزایش معناداری نسبت به نمونه کنترل وجود داشته است ($p^{**} < 0/01$). در پژوهشی که توسط هرتل و همکاران^{۶۰} انجام شده به اثر استرانسیوم در القای آپوپتوز^{۶۱} سلول‌های استئوکلاست نیز اشاره شده است [۳۸]. در نمونه‌های M5 و M10 پس از گذشت ۷ روز کشت نسبت به نمونه کنترل افزایش در تکثیر سلول‌ها و افزایش زیست‌پذیری و تفاوت قابل ملاحظه‌ای ($p^{*} < 0/05$) مشاهده می‌شود. در واقع به علت اینکه منیزیم یک جزء کلیدی از دستگاه ریبوزومی است که اطلاعات ژنتیکی کدبندی شده توسط mRNA^{۶۲} را به ساختارهای پلی‌پپتیدی^{۶۳} ترجمه می‌کند بنابراین ممکن است که ساخت پروتئین‌های ضروری برای ماتریس خارج سلولی مانند کلاژن نوع I و استئوپونین^{۶۴} در حضور منیزیم افزایش یابد. قابل ذکر است که در پژوهش‌هایی که بر روی کاشتنی‌های منیزیمی^{۶۵} انجام شده بیان کلاژن نوع یک و استئوپونین در اطراف این کاشتنی‌ها دیده شده است [۳۹]. در پژوهشی از لندی و همکاران^{۶۶} گرانول‌های^{۶۷} هیدروکسی‌آپاتایت حاوی ۵٫۷ درصد وزنی منیزیم را درون بدن خرگوش کاشتن و نشان دادند که خاصیت هدایت استخوانی این ترکیب از هیدروکسی‌آپاتایت خالص استوکیومتری بالاتر بوده است [۴۰]. همچنین نشان دادند که خاصیت تحریک استخوانی هیدروکسی‌آپاتایت حاوی منیزیم در مقایسه با هیدروکسی‌آپاتایت خالص بهتر است و رشد سلول‌ها بالاتر بوده است. همچنین چسبندگی سلولی و رشد سلول‌های استخوانی بر روی آپاتایت حاوی منیزیم بررسی شد که در هردو مورد حضور منیزیم در ساختار سبب بهبود نتایج بوده است [۴۱-۴۲]. مطالعه‌ی دیگری نشان داد که حضور منیزیم در ساختار تری‌کلسیم فسفات به

هیدروکسیل ساختاری در ساختار داربست‌ها بود که می‌تواند ناشی از تشکیل هیدروکسی‌آپاتایت باشد. نوع فازهای رسوبی در داربست‌هایی که در محلول شبیه‌سازی شده بدن قرار نگرفته بودند، بیشتر شامل براشیت و در داربست‌های که در محلول شبیه‌سازی شده بدن قرار گرفته بودند، بیشتر شامل هیدروکسی‌آپاتایت بود. در واقع براشیت موجود در داربست پس از قرارگیری در شرایط مشابه بدن از نظر دما و pH به هیدروکسی‌آپاتایت تبدیل شد که این پدیده در واقع به نوعی تقلید فرآیندی است که ثابت شده طی معدنی شدن بافت استخوان طبیعی در بدن رخ می‌دهد. حضور یون‌های استرانسیوم و منیزیم در ساختار کلسیم فسفاتی سبب جابجایی پیک‌های آزمون پراش پرتو ایکس و تغییر پارامترهای شبکه‌ای شدند. نتایج کشت سلول‌های استخوانی نیز بیانگر زیست سازگاری بالای نمونه‌های M10 و S10 با سلول استئوبلاست بود و همچنین فعالیت فسفات قلیایی نشان داد که مقدار بهینه ۱۰ درصد مولی منیزیم و استرانسیوم (M10 و S10) به طور قابل ملاحظه‌ای ($p^{***}<0/001$, $p^{**}<0/01$) منجر به رشد، تکثیر و تمایز سلول‌های استخوانی در داربست‌ها، و در ساختار کلسیم فسفاتی سبب بهبود خواص زیستی نمونه‌ها می‌شود.

۵- منابع

- [1] G. Schett, "4 - Biology, Physiology, and Morphology of Bone A2 - Firestein, Gary S. In: Budd RC, Gabriel SE, McInnes IB, O'Dell JR, editors", Kelley's Textbook of Rheumatology (Ninth Edition), Philadelphia: W.B. Saunders, pp. 61-6, 2013.
- [2] B. D. Boyan, D. J. Cohen & Z. Schwartz, "7.17 Bone Tissue Grafting and Tissue Engineering Concepts☆ A2 - Ducheyne", Paul. Comprehensive Biomaterials II, Oxford: Elsevier, pp. 298-313, 2017.
- [3] F. Jakob, R. Ebert, A. Ignatius, T. Matsushita, Y. Watanabe, J. Groll & et al, "Bone tissue engineering in osteoporosis", Maturitas, vol. 75, pp. 118-24, 2013.
- [4] S. Naahidi, M. Jafari, M. Logan, Y. Wang, Y. Yuan, H. Bae & et al, "Biocompatibility of hydrogel-based scaffolds for tissue engineering

در نتیجه سبب افزایش تکثیر استئوبلاست‌ها گردد. همچنین یون استرانسیوم می‌تواند در سرکوب کردن فعالیت استئوکلاست‌ها نیز نقش داشته باشد. [۴۴]. پژوهش‌های قبلی که توسط هرتل و همکاران انجام شده نیز نشان می‌دهد که بر هم کنش بین یون‌های کلسیم و استرانسیوم می‌تواند سبب افزایش فعالیت فسفات قلیایی و معدنی شدن ماتریس خارج سلولی شود. علاوه بر آن مشخص شده است که حضور هم‌زمان یون کلسیم و استرانسیوم تأثیر بیشتری بر روی آپوپتوز استئوکلاست‌ها دارد [۳۸]. مقایسه نمونه‌های M5 و M10 نشان‌دهنده افزایش فعالیت فسفات قلیایی نمونه‌ها با حضور منیزیم در ساختار نسبت به نمونه کنترل بوده است ($p^{**}<0/001$, $p^{**}<0/01$). همچنین سایر تحقیقات انجام شده نشان می‌دهد که حضور منیزیم به طور قابل ملاحظه‌ای تکثیر و تمایز سلول‌های استخوانی را در داربست افزایش می‌دهد [۴۵].

۴- نتیجه‌گیری

استفاده از نفوذ دوسویه و شبیه‌سازی نفوذ یون‌های منیزیم و استرانسیوم از دیواره‌ی عروق و ماتریس خارج سلولی به سمت محل شکل‌گیری استخوان، استفاده از هیدروژلی از جنس ژلاتین به عنوان نوعی سازه اولیه شبیه‌ساز غضروف پیش استخوانی و تشکیل فاز معدنی در شرایط مشابه بدن از نظر دما و pH از شرایط سیستم زیست تقلیدی در این تحقیق می‌باشد. محصول به دست آمده از رسوب‌گذاری فازهای کلسیم فسفاتی در داخل ژلاتین نوعی کامپوزیت با زمینه پلیمری با ذرات تقویت‌کننده کلسیم فسفات در داخل آن است. ذرات رسوب کاملاً در زمینه توزیع شده و ابعادشان در حدود ۱۰۰ نانومتر بوده و دارای سطحی صاف و سوزنی شکل بودند. استفاده از روش سرما خشک‌سازی سبب ایجاد تخلخل‌های منظم و مرتبط با یکدیگر شد و اندازه تخلخل‌ها در محدوده ۲۰۰-۵۰۰ میکرون برای رشد سلول‌های استخوانی قرار داشت.

خواص مکانیکی داربست‌های ساخته شده در محدوده‌ی استخوان اسفنجی قرار داشت. نتایج طیف‌سنجی تبدیل فوریه فروسرخ حاکی از حضور باندهای فسفات و

- [13] E. Bonnelye, A. Chabadel, F. Saltel & P. Jurdic, "Dual effect of strontium ranelate: Stimulation of osteoblast differentiation and inhibition of osteoclast formation and resorption *in vitro*", *Bone*, vol. 42, pp. 129-38, 2008.
- [14] A. Bigi, E. Boanini, C. Capuccini & M. Gazzano, "Strontium-substituted hydroxyapatite nanocrystals", *Inorganica Chimica Acta*, vol. 360, pp. 1009-16, 2007.
- [15] K. Zhu, K. Yanagisawa, R. Shimanouchi, A. Onda & K. Kajiyoshi, "Preferential occupancy of metal ions in the hydroxyapatite solid solutions synthesized by hydrothermal method", *Journal of the European Ceramic Society*, vol. 26, pp. 509-13, 2006.
- [16] RM. S. Echeverría & M. L. Montero, "Electrolytic one-pot synthesis of Group II nanohydroxyapatites", *Journal of Materials Science*, vol. 48, pp. 5253-60, 2013.
- [17] V. Aina, L. Bergandi, G. Lusvardi, G. Malavasi, F. E. Imrie, I. R. Gibson & et al, "Sr-containing hydroxyapatite: morphologies of HA crystals and bioactivity on osteoblast cells", *Materials Science and Engineering: C*, vol. 33, pp. 1132-42, 2013.
- [18] M. Šupová, "Substituted hydroxyapatites for biomedical applications: A review", *Ceramics International*, vol. 41, pp. 9203-31, 2015.
- [19] S. Lala, M. Ghosh, P. K. Das, D. Das, T. Kar & S. K. Pradhan, "Magnesium substitution in carbonated hydroxyapatite: Structural and microstructural characterization by Rietveld's refinement", *Materials Chemistry and Physics*, vol. 170, pp. 319-29, 2016.
- [20] A. Farzadi, F. Bakhshi, M. Solati-Hashjin, M. Asadi-Eydivand & N. A. A. Osman, "Magnesium incorporated hydroxyapatite: Synthesis and structural properties characterization", *Ceramics International*, vol. 40, pp. 6021-9, 2014.
- [21] L. Bertinetti, C. Drouet, C. Combes, C. Rey, A. Tampieri, S. Coluccia & et al, "Surface Characteristics of Nanocrystalline Apatites: Effect of Mg Surface Enrichment on Morphology, Surface Hydration Species, and Cationic Environments", *Langmuir*, vol. 25, pp. 5647-54, 2009.
- [22] M. Julien, I. Khairoun, R. Z. LeGeros, S. Delplace, P. Pilet, P. Weiss & et al, "Physico-chemical-mechanical and *in vitro* biological applications", *Biotechnology Advances*, vol. 35, pp. 530-44, 2017.
- [5] S. Deepthi, J. Venkatesan, S. K. Kim, J. D. Bumgardner & R. Jayakumar. "An overview of chitin or chitosan/nano ceramic composite scaffolds for bone tissue engineering", *International Journal of Biological Macromolecules*, vol. 93, pp. 1338-53, 2016.
- [6] م. نصر اصفهانی، "تأثیر تابش نور فرابنفش بر زیست‌فعالی پوشش‌های هیبریدی نانو ساختار پلی سیلوکسان-تیتانیوم دی‌اکسید-شیشه زیستی به‌روش سل-ژل"، فصلنامه علمی-پژوهشی فرآیندهای نوین در مهندسی مواد، سال ۹، شماره ۴، صفحه ۱۲۹-۱۳۷، ۱۳۹۴.
- [7] F. J. O'Brien, "Biomaterials & scaffolds for tissue engineering", *Materials Today*, vol. 14, pp. 88-95, 2011.
- [8] S. Kuttappan, D. Mathew & M. B. Nair. "Biomimetic composite scaffolds containing bio ceramics and collagen/gelatin for bone tissue engineering - A mini review", *International Journal of Biological Macromolecules*, vol. 93, pp. 1390-401, 2016.
- [9] C. Liu, "10 - Collagen-hydroxyapatite composite scaffolds for tissue engineering A2 - Mucalo", Michael. *Hydroxyapatite (Hap) for Biomedical Applications: Woodhead Publishing*, pp. 211-34, 2015.
- [10] K. R. Razali, N. F. M. Nasir, E. M. Cheng, N. Mamat, M. Mazalan, Y. Wahab & et al, "The effect of gelatin and hydroxyapatite ratios on the scaffolds' porosity and mechanical properties", 2014 IEEE Conference on Biomedical Engineering and Sciences (IECBES), pp. 256-9, 2014.
- [۱۱] م. خورسند قاینی، "بررسی خصوصیات حرارتی کامپوزیت پلی لاکتیک اسید با ذرات شیشه زیست‌فعال ۴۵ S5 و هیدروکسی آپاتیت (HA) به منظور استفاده در پیچ‌های تداخلی قابل جذب"، فصلنامه علمی-پژوهشی فرآیندهای نوین در مهندسی مواد، سال ۱۱، شماره ۴، صفحه ۵۵-۵۶، ۱۳۹۶.
- [12] M. Schumacher, A. Henss, M. Rohnke & M. Gelinsky, "A novel and easy-to-prepare strontium (II) modified calcium phosphate bone cement with enhanced mechanical properties", *Acta Biomater*, vol. 9, pp. 7536-44, 2013.

- [32] B. Thavornnyutikarn, N. Chantarapanich, K. Sitthiseripratip, G. A. Thouas & Q. Chen, "Bone tissue engineering scaffolding: computer-aided scaffolding techniques", *Progress in Biomaterials*, vol. 3, pp. 61-102, 2014.
- [33] L. Roseti, V. Parisi, M. Petretta, C. Cavallo, G. Desando, I. Bartolotti & et al, "Scaffolds for Bone Tissue Engineering: State of the art and new perspectives", *Materials Science and Engineering: C*, vol. 78, pp. 1246-62, 2017.
- [34] S. A. Hutchens, R. S. Benson, B. R. Evans, H. M. O'Neill & C. J. Rawn, "Biomimetic synthesis of calcium-deficient hydroxyapatite in a natural hydrogel", *Biomaterials*, vol. 27, pp. 4661-70, 2006.
- [35] S. J. Kalita, A. Bhardwaj & H. A. Bhatt, "Nanocrystalline calcium phosphate ceramics in biomedical engineering", *Materials Science and Engineering: C*, vol. 27, 441-9, 2007.
- [36] A. Amelian, K. Wasilewska, D. Megias & K. Winnicka, "Application of standard cell cultures and 3D in vitro tissue models as an effective tool in drug design and development", *Pharmacological Reports*, vol. 69, pp. 861-70, 2017.
- [37] L. Nie, J. Suo, P. Zou & S. Feng, "Preparation and Properties of Biphasic Calcium Phosphate Scaffolds Multiply Coated with HA/PLLA Nanocomposites for Bone Tissue Engineering Applications", *Journal of Nanomaterials*, vol. 11, 2012.
- [38] A. S. Hurtel-Lemaire, R. Mentaverri, A. Caudrillier, F. Cournaire, A. Wattel, S. Kamel & et al, "The calcium-sensing receptor is involved in strontium ranelate-induced osteoclast apoptosis, New insights into the associated signaling pathways", *The Journal of biological chemistry*, vol. 284, pp. 575-84, 2009.
- [39] A. Bondarenko, N. Angrisani, A. Meyer-Lindenberg, J. M. Seitz, H. Waizy & J. Reifenrath, "Magnesium-based bone implants: immunohistochemical analysis of peri-implant osteogenesis by evaluation of osteopontin and osteocalcin expression", *Journal of biomedical materials research Part A*, vol. 102, pp. 1449-57, 2014.
- [40] E. Landi, G. Logroscino, L. Proietti, A. Tampieri, M. Sandri & S. Sprio, "Biomimetic Mg-substituted hydroxyapatite: from synthesis to in vivo behavior", *Journal of materials properties of calcium phosphate cements with doped amorphous calcium phosphates*", *Biomaterials*, vol. 28, pp. 956-65, 2007.
- [23] Z. S. Tao, W. S. Zhou, X. W. He, W. Liu, B. L. Bai, Q. Zhou & et al, "A comparative study of zinc, magnesium, strontium-incorporated hydroxyapatite-coated titanium implants for osseointegration of osteopenic rats", *Materials Science and Engineering: C*, vol. 62, pp. 226-32, 2016.
- [24] T. Kokubo & H. Takadama, "How useful is SBF in predicting in vivo bone bioactivity?", *Biomaterials*, vol. 27, pp. 2907-15, 2006.
- [25] R. I. Freshney, "Culture of Tumor Cells. Culture of Animal Cells: John Wiley & Sons", Inc, pp. 463-79, 2010.
- [26] R. I. Freshney, "Cytotoxicity. Culture of Animal Cells: John Wiley & Sons", Inc., pp. 365-81, 2010.
- [27] L. Stipniece, K. Salma-Ancane, N. Borodajenko, M. Sokolova, D. Jakovlevs & L. Berzina-Cimdina, "Characterization of Mg-substituted hydroxyapatite synthesized by wet chemical method", *Ceramics International*, vol. 40, pp. 3261-7, 2014.
- [28] D. Laurencin, N. Almora-Barrios, N. H. De Leeuw, C. Gervais, C. Bonhomme, F. Mauri & et al, "Magnesium incorporation into hydroxyapatite", *Biomaterials*, vol. 32, pp. 1826-37, 2011.
- [29] J. Kolmas, A. Jaklewicz, A. Zima, M. Bućko, Z. Paszkiewicz, J. Lis & et al, "Incorporation of carbonate and magnesium ions into synthetic hydroxyapatite: The effect on physicochemical properties", *Journal of Molecular Structure*, vol. 987, pp. 40-50, 2011.
- [30] M. Frasnelli, F. Cristofaro, V. M. Sglavo, S. Dire, E. Callone, R. Ceccato & et al, "Synthesis and characterization of Strontium-substituted hydroxyapatite nanoparticles for bone regeneration", *Materials Science and Engineering: C*, vol.71, pp.653-62, 2017.
- [31] S. S. Singh, A. Roy, B. Lee, I. Banerjee & P. N. Kumta, "Synthesis, characterization, and invitro cytocompatibility of amorphous β -tricalcium magnesium phosphate ceramics", *Materials Science and Engineering: C*, vol. 67, pp. 636-45, 2016.

- [23] Chitosan
 [24] Combination
 [25] Biological
 [26] Osteoporosis
 [27] Osteogenesis
 [28] Stimulation
 [29] Differentiation
 [30] Osteoblast
 [31] Osteoclast
 [32] Absorption
 [33] Resolution
 [34] Integrations
 [35] Proliferation
 [36] Insulin-Like Growth Factor (IGF)
 [37] Corrosion
 [38] Crystallization
 [39] Hydrothermal
 [40] Electrolysis
 [41] Aina
 [42] Metabolism
 [43] Morphology
 [44] Scanning Electron Microscope (SEM)
 [45] Amorphous
 [46] Degradation
 [47] Alkaline Phosphate Activity (ALP)
 [48] Cytotoxicity
 [49] Microbiology
 [50] Cartilaginous
 [51] Simulated Body Fluid (SBF)
 [52] X-ray Diffraction (XRD)
 [53] Fourier Transform Infrared Spectroscopy (FTIR)
 [54] International Center For Diffraction Data
 [55] (3-(4,5-Dimethylthiazol-2-YL)-2,5-Diphenyltetrazolium Bromide
 [56] Peripheral Blood Smear
 [57] Isopropanol
 [58] Immersion
 [59] Bioactivity
 [60] Hurtle
 [61] Apoptosis
 [62] Messenger RNA
 [63] Polypeptide
 [64] Osteopontin
 [65] Implant
 [66] Landi
 [67] Granules
- science Materials in medicine, vol. 19, pp. 239-47, 2008.
- [41] Y. Yamasaki, Y. Yoshida, M. Okazaki, A. Shimazu, T. Kubo, Y. Akagawa & et al, "Action of FGMgCO₃Ap-collagen composite in promoting bone formation", Biomaterials, vol. 24, pp. 4913-20, 2003.
- [42] Y. Yamasaki, Y. Yoshida, M. Okazaki, A. Shimazu, T. Uchida, T. Kubo & et al, "Synthesis of functionally graded MgCO₃ apatite accelerating osteoblast adhesion", J Biomed Mater Res, pp. 99-105, 2002.
- [43] X. Li, K. Senda, A. Ito, Y. Sogo & A. Yamazaki, "Effect of Zn and Mg in tricalcium phosphate and in culture medium on apoptosis and actin ring formation of mature osteoclasts", Biomedical materials (Bristol, England), vol. 3, pp. 045002, 2008.
- [44] W. Xue, J. L. Moore, H. L. Hosick, S. Bose, A. Bandyopadhyay, W. W. Lu & et al, "Osteoprecursor cell response to strontium-containing hydroxyapatite ceramics", Journal of Biomedical Materials Research Part A, vol. 79A, pp. 804-14, 2006.
- [45] F. Tamimi, D. Le Nihouannen, D. C. Bassett, S. Ibasco, U. Gbureck, J. Knowles & et al, "Biocompatibility of magnesium phosphate minerals and their stability under physiological conditions", Acta Biomater, vol. 7, pp. 2678-85, 2011.

۶- پی نوشت

- [1] Artery
 [2] Dynamic
 [3] Repair
 [4] Reconstruction
 [5] Scar tissue
 [6] Clinical
 [7] Infection
 [8] Tissue Engineering
 [9] Damaged
 [10] Substitute
 [11] Function
 [12] Scaffold
 [13] Biomaterials
 [14] Bond
 [15] Biocompatibility
 [16] Porosity
 [17] Cavities
 [18] Strength
 [19] Mineral
 [20] Hydroxyapatite (HA)
 [21] Collagen
 [22] Biomimetic