

ارزیابی خواص فیزیکی داربست کامپوزیت نانو کریستال هیدروکسی آپاتیت / پلی هیدروکسی بوتیرات برای کاربرد در مهندسی بافت استخوان

محمد رضا فروغی^{۱*}، سعید کرباسی^۲، رضا ابراهیمی کهریزسنگی^۳ و عباس سعادت^۴

۱- مربی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد نجف آباد، گروه مهندسی مواد، اصفهان، ایران

۲- استادیار، گروه فیزیک و مهندسی پزشکی دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران

۳- دانشیار، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد نجف آباد، گروه مهندسی مواد، اصفهان، ایران

۴- مربی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد مجلسی، گروه مهندسی مواد، اصفهان، ایران

*foroughi@iaun.ac.ir

(تاریخ دریافت: ۱۳۹۰/۰۲/۰۳، تاریخ پذیرش: ۱۳۹۰/۰۵/۳۰)

چکیده

هیدروکسی آپاتیت به خاطر توانایی که در بازسازی استخوان دارد در مهندسی بافت استخوان نقش مهمی را ایفا می کند. در این تحقیق ابتدا پودر نانو کریستال هیدروکسی آپاتیت (HAp) به روش تجزیه گرمایی از استخوان ران گاو در دمای 900°C تهیه و سپس داربست متخلخل سرامیکی هیدروکسی آپاتیت با درصدهای وزنی ۴۰، ۵۰ و ۶۰ به روش تکرارپذیری اسفنج پلی یورتان ساخته شد. سپس داربست‌ها توسط محلول پلی هیدروکسی بوتیرات (P3HB) در زمان‌های ۳۰ ثانیه و ۱ دقیقه پوشش دهی شدند. برای مطالعات فازی، ریخت‌شناسی و تعیین گروه‌های عاملی به ترتیب از دستگاه‌های مشخصه‌یابی XRD، SEM، TEM و FT-IR استفاده شد؛ در نتیجه با توجه به وجود هیدروکسی آپاتیت طبیعی با اندازه ذرات ۵۸nm داربستی با درصد وزنی ۵۰ و درصد تخلخل حدود ۹۰٪ و اندازه بین ۱۰۰ تا ۴۰۰µm بدست آمد که می‌تواند در مهندسی بافت استخوان کاربرد داشته باشد.

واژه‌های کلیدی:

داربست؛ هیدروکسی آپاتیت؛ نانو کریستال؛ مهندسی بافت؛ پلی هیدروکسی بوتیرات؛ کامپوزیت.

۱- مقدمه

پتانسیل بالایی برای تولید مجدد دارد و از این رو یک نمونه مناسب برای مهندسی بافت به شمار می‌رود. در شکستگی‌ها و عیوب بزرگ، روند درمان که توسط بدن انجام می‌شود، کارساز نبوده و پیوند استخوان لازم می‌شود [۲]. دانشمندان از سال‌ها قبل

مهندسی بافت^۱ علم طراحی و تولید بافت‌های جدید برای ترمیم اندام‌های آسیب دیده و جایگزینی قسمت‌های از دست رفته به علت عوامل مختلف می‌باشد [۱]. در بین بافت‌های بدن، استخوان

روش پوشش دهی پلیمر تقویت کننده بر روی این داربست‌ها می‌باشد. زیگنگ میا^۷ و همکارانش پوشش پلیمر پلی لاکتیک کوگلایکولیک اسید^۸ (PLGA) بر روی داربست سرامیکی هیدروکسی آپاتیت-تری کلسیم فسفات اعمال کردند که داربست سرامیکی پوشش داده شده ریخت‌شناسی و استحکام مناسبی را بدست آورد [۱۶]. تان^۹ و همکارانش پوشش پلیمر PLGA-Bioglass را بر روی داربست سرامیکی هیدروکسی آپاتیت پوشش دادند که داربستی با خواص زیست‌فعال مناسبی را بدست آوردند [۱۷].

یکی از تمهیدات صورت گرفته در این پژوهش ایجاد تخلخل در هیدروکسی آپاتیت سنتز شده می‌باشد. رشد بافت در داخل تخلخلها، فصل مشترکی با سطح تماس زیاد، بین کاشتنی سرامیکی و بافت میزبان فراهم می‌سازد [۱۸]. میزان تخلخلها، توزیع اندازه تخلخلها، ریخت‌شناسی، جهت‌گیری و میزان به هم پیوستگی تخلخلها به شدت بر روی نفوذ استخوان در هیدروکسی آپاتیت متخلخل تأثیر می‌گذارد. لذا در این تحقیق ابتدا پودر نانو کریستال هیدروکسی آپاتیت از استخوان ران گاو^{۱۰} به روش تجزیه گرمایی تهیه و سپس از روش تکرار پلیمر یا غوطه‌وری اسفنج در دوغاب سرامیکی، داربست متخلخل ساخته شد و برای بهبود خواص مکانیکی به وسیله غوطه‌وری در پلیمر پلی هیدروکسی بوتیرات^{۱۱} (P3HB) پوشش دهی شد. در نتیجه داربستی با ریخت‌شناسی کاملاً متخلخل و به هم پیوسته بدست آمد.

۲- مواد و روش‌ها

پس از تهیه استخوان ران گاو، ابتدا آن را به مدت ۲ ساعت در آب جوشانده تا گوشت و چربی‌های متصل به آن جدا شود. سپس استخوان‌ها را به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۶۰°C قرار داده تا رطوبت آن خشک شود. برای جلوگیری از ایجاد دوده در مواد هنگام گرم کردن، استخوان‌ها با اَرّه به تکه‌های کوچکی (حدود ۱۰×۱۰×۱۰ mm) برش داده شدند و سپس در هوا به مدت ۳ ساعت با مشعل تا دمای حدود ۴۰۰°C سوزانده شدند تا ترکیبات آلی آن تجزیه شود. ماده حاصل از این فرآیند،

قادر به کشت سلول‌ها در خارج از بدن بودند، ولی فناوری رشد شبکه‌های پیچیده و سه‌بعدی سلولی برای جایگزینی بافت آسیب دیده اخیراً توسعه یافته‌است. برای ساخت یک بافت به شیوه‌های مهندسی، نیاز به طراحی یک داربست با ساختار فیزیکی مناسب با امکان چسبندگی سلول‌ها به آن، مهاجرت سلولی، تکثیر سلولی و تمایز سلولی و در نهایت رشد و جایگزینی بافت جدید است. داربست‌های مورد استفاده در مهندسی بافت استخوان باید دارای تخلخل بالا و خواص زیست‌فعالی و زیست‌تخریب‌پذیری مناسب و در عین حال خواص مکانیکی خوبی باشند که این داربست‌ها بصورت زمینه پلیمری و سرامیکی می‌باشند که هر کدام دارای مزایا و معایبی هستند که با توجه به اهمیت زیست‌فعالی در مهندسی بافت استخوان، بهتر است که از داربست‌های زمینه سرامیکی استفاده شود [۳]. استفاده از هیدروکسی آپاتیت^۲ به عنوان یک ماده زیست‌فعال سرامیک‌های فسفات کلسیم و بخاطر شباهت نزدیک ترکیب شیمیایی آن به جزء معدنی و اصلی تشکیل دهنده استخوان طبیعی و دندان، در سال‌های اخیر در ساخت کاشتنی‌های مورد استفاده در ارتوپدی یا دندانپزشکی کاربرد فراوان پیدا کرده است [۴]. یکی از روش‌های ساخت داربست^۳ با تخلخل‌های بالا، روش تکرار پلیمر^۴ می‌باشد که می‌توان از اسفنج پلی‌یورتان^۵ استفاده کرد [۵-۷]. تخلخل باز در داربست‌های متخلخل می‌تواند عامل مهمی در رشد بافت باشد. بر اساس مطالعات قبلی [۸-۱۵]، معیارهای مناسب برای یک داربست، تخلخل‌های باز، مقاومت فشاری خوب و امکان مهاجرت سلول‌ها می‌باشد. داربست‌هایی که از روش تکرار پلیمر یا غوطه‌وری اسفنج در دوغاب^۶ سرامیکی ساخته می‌شوند از تخلخل و یکنواختی مناسبی برخوردار هستند ولی به دلیل وجود تخلخل‌های زیاد از استحکام فشاری پایینی برخوردار هستند و در صورت قرار گرفتن در محل استخوان آسیب دیده، احتمال این وجود دارد که قبل از تشکیل پیوند بین بافت و استخوان، داربست تخریب شود [۲]، لذا دانشمندان تصمیم به تقویت این داربست‌ها گرفتند. یکی از روش‌هایی که برای تقویت این نوع داربست‌ها مورد استفاده قرار می‌گیرد،

اندازه و شکل واقعی خود حامل دوغاب شود. این مرحله یکی از مراحل مؤثر در خواص نمونه‌ها است. در این مرحله باید حدود ۲۵-۷۵٪ دوغاب توسط اعمال نیروی مکانیکی، از اسفنج حذف شود. خاصیت ارتجاعی بالای اسفنج در این مرحله باعث می‌شود اسفنج به شکل و ابعاد اولیه خود باز گردد. برای جلوگیری از پاره شدن تخلخل‌های اسفنج، نمونه‌ها به مدت ۲۴ ساعت درون محیط خلاء خشک شدند؛ سپس نمونه‌ها در کوره عملیات حرارتی (FinrTech, Muffle Furnace) قرار گرفتند و در چهار مرحله که شامل، (۱) قرار دادن نمونه‌ها داخل کوره در دمای 600°C با نرخ سرعت گرم شدن $3^{\circ}\text{C}/\text{min}$ به مدت ۱ ساعت جهت سوختن کامل اسفنج پلیمری، (۲) افزایش دما از 600°C به 1200°C با نرخ سرعت گرم شدن $5^{\circ}\text{C}/\text{min}$ ، (۳) نگهداری در دمای 1200°C به مدت ۴ ساعت جهت تف‌جوشی شدن داربست سرامیکی و (۴) سرد کردن در کوره تا دمای اتاق با نرخ سرعت سرد شدن $5^{\circ}\text{C}/\text{min}$ می‌باشد، داربست هیدروکسی آپاتیت تشکیل شد. پس از خارج کردن نمونه‌ها از کوره، نمونه‌ها وزن شدند و سپس درون دسیکاتور قرار گرفتند. برای پوشش دهی داربست، مقدار $0/6$ گرم پودر P3HB را در ۱۰ میلی لیتر حلال کلروفرم (CHCl_3) به مدت ۶ ساعت در حمام روغن و دمای 60°C حل کرده و محلول پلیمری برای پوشش دهی داربست سرامیکی بدست آمد. برای تهیه این محلول بخاطر فرار بودن کلروفرم باید از دستگاه مبرد استفاده شود. سپس داربست هیدروکسی آپاتیت را در زمان‌های ۳۰ ثانیه و ۱ دقیقه در محلول پلیمری غوطه‌ور کرده و برای یکنواخت شدن پوشش در همه نقاط داربست و خروج محلول پلیمری اضافی، نمونه‌ها درون سانتریفیوژ با سرعت ۵۰۰ دور در دقیقه به مدت ۳۰ ثانیه قرار گرفتند و نهایتاً نمونه‌ها به مدت ۲۴ ساعت در آون خلاء قرار داده شدند تا خشک شوند.

۲-۱- مشخصه‌یابی نمونه‌ها

برای بررسی تغییرات ساختاری و مطالعه فازها از روش پراش پرتو ایکس (XRD, Philips X'Pert) استفاده شد. برای آنالیز از تابش پرتو $\text{CuK}\alpha$ استفاده شد. نرخ روبش معادل ۱ درجه بر

خاکستر سیاه رنگ استخوان می‌باشد که برای تولید هیدروکسی آپاتیت مورد استفاده قرار می‌گیرد. پس از این فرآیند برای تولید، پودر هیدروکسی آپاتیت در دمای 900°C به مدت ۲ ساعت تحت عملیات حرارتی قرار گرفت [۱۹]. ماده حاصل از این مرحله، پودر سفید رنگ نانوکریستال هیدروکسی آپاتیت می‌باشد که برای ساخت داربست سرامیکی مورد استفاده قرار گرفت.

یکی از مهم‌ترین مراحل ساخت داربست مختلخل، تهیه دوغاب پایدار با کمک افزودنی‌های مناسب می‌باشد. طبق تحقیقاتی که در مورد ساخت دوغاب مناسب صورت پذیرفت، افزودنی‌های متنوعی با اهداف مختلف و با توجه به خواص زیستی آنها بررسی شد. در این تحقیق، از پودر طبیعی هیدروکسی آپاتیت تهیه شده از روش تجزیه حرارتی با اندازه دانه حدود ۸۵ نانومتر برای ماده زمینه داربست استفاده شد. پودر هیدروکسی آپاتیت با درصد‌های وزنی ۴۰، ۵۰ و ۶۰ درون آب مقطر دوبار تقطیر به آرامی حل شد تا از کلوخه‌ای شدن جلوگیری شود. پس از همگن شدن محلول، به دلیل نیاز به استحکام مکانیکی مناسب، باید میزان جامدی که بر روی اسفنج پلیمری می‌نشیند، زیاد باشد. بنابراین برای افزایش درصد وزنی جامد از مقدار ۱٪ وزنی متفرق‌ساز^{۱۲} آمونیوم پلی متاکریلات (APMA) استفاده شد. سپس دوغاب با سرعت مناسب (۳۰۰ دور در دقیقه) به مدت ۳۰ دقیقه همزده شد تا محلولی بصورت همگن بدست آید. مقدار ۱٪ وزنی از پودر کربوسی‌متیل سلولز (CMC) به عنوان پیونددهنده^{۱۳} و افزایش روانروی دوغاب به آرامی به محلول اضافه می‌کنیم. سپس محلول تا همگن شدن کامل در 60°C همزده شد.

پس از تهیه دوغاب نوبت به ساخت داربست می‌رسد که اسفنج تجاری پلی‌پورتان (80 cpi) پس از برش به ابعاد مناسب ($1 \times 1 \times 1\text{ cm}^3$)، به آرامی درون دوغاب فرو برده می‌شود. فوم اسفنجی بوسیله خاصیت موئینگی به دوغاب آغشته می‌گردد و سپس در درون دوغاب فشرده می‌شود تا هوای محبوس در آن خارج شده و اسفنج توسط دوغاب پر شود. فشرده شدن و باز شدن مجدد اسفنج در دوغاب موجب می‌گردد که قطعه در

مدت ۱۰ دقیقه سونیکیت شد و بر روی گیرندهای با پایه Formvar با مش ۲۰۰ قرار گرفت. در نهایت نمونه خشک و وارد دستگاه قرار داده شد. میکروسکوپ الکترونی روبشی (SEM, Philips XL-30, Netherlands) نیز به منظور مطالعه و بررسی مشخصات ظاهری داربست مورد استفاده قرار گرفت.

۳- نتایج و بحث

۳-۱- مشخصه‌یابی پراش اشعه ایکس

شکل ۱، طیف‌های XRD پودر هیدروکسی آپاتیت تف‌جوشی شده در دمای 900°C و داربست متخلخل هیدروکسی آپاتیت و استاندارد JCPDS:9-432 را نشان می‌دهد. همانطور که در شکل مشاهده می‌شود، طبق استاندارد، همه قله‌ها مربوط به هیدروکسی آپاتیت خالص می‌باشد. پس می‌توان نتیجه گرفت که داربست ساخته شده بدون هرگونه ناخالصی می‌باشد. با توجه به شکل، پیک‌های اصلی پراش اشعه ایکس پودر و داربست هیدروکسی آپاتیت در محدوده 30° تا 35° درجه قرار گرفته است که مطابقت کامل با استاندارد دارد. علت کشیده شدن پیک‌ها در داربست، بخاطر افزایش دمای تف‌جوشی به 1200°C می‌باشد؛ ولی در پودر هیدروکسی آپاتیت بخاطر کمتر بودن دمای تف‌جوشی، دانه‌ها فرصت رشد نداشته و لذا پیک‌های مربوط به پودر هیدروکسی آپاتیت دارای پهن‌شدگی بیشتری نسبت به داربست متخلخل هیدروکسی آپاتیت می‌باشد.

۳-۲- مشخصه‌یابی طیف‌سنج مادون قرمز

به منظور بررسی حضور گروه‌های عاملی موجود در پلیمر و نانو کریستال‌های هیدروکسی آپاتیت و همچنین چگونگی اثربخشی این گروه‌ها به‌هنگام ترکیب این مواد با یکدیگر، آزمون FT-IR بر روی پلیمر خالص P3HB، نانو کریستال‌های هیدروکسی آپاتیت و نانو کریستال‌های HAp/P3HB انجام‌پذیر است. نتایج حاصل از این آزمون در شکل ۲ ارائه شده است.

دقیقه، ولتاژ اعمالی برابر 30 کیلو ولت و جریان معادل 30 میلی‌آمپر بود و زاویه پراش (2 θ) از 10° تا 90° درجه انتخاب گردید. پس از حصول الگوی پراش پرتو ایکس، برای مطالعه گروه‌های عاملی از طیف‌سنج مادون قرمز (FT-IR:6300,JASCO,Japan) برای شناسایی وجود ترکیبات آلی و همچنین درجه دی‌هیدروکسیلاسیون هیدروکسی آپاتیت در طی عملیات حرارتی استفاده شد. تجزیه وزن‌سنجی گرمایی^{۱۴} (TGA) برای اندازه‌گیری ثبات حرارتی و ترکیب مواد مورد استفاده قرار گرفت. این اندازه‌گیری، کاهش درصد وزن ماده نسبت به تغییرات دمایی را نشان می‌دهد. در این تحقیق، از دستگاه تجزیه وزن‌سنجی گرمایی (TG/DTA, TGA 401, Sanatara.co) برای کاهش درصد وزن اسفنج پلی‌یورتان نسبت به دما استفاده شد. برای محاسبه تخلخل و دانسیته داربست‌ها از روش جابجایی مایع^{۱۵} (قانون ارشمیدس) استفاده شد. اندازه‌گیری دانسیته اطلاعاتی در مورد اندازه و توزیع منافذ، نفوذپذیری و حضور عیوب ساختاری در ساختارهای سرامیکی تف‌جوشی شده ارائه می‌دهد [۲۰]. در این روش به دلیل خاصیت آبگریز بودن پلیمر، بجای آب، از اتانول ۹۶٪ استفاده شد که به راحتی درون تخلخل‌های ریز نفوذ نماید.

دانسیته داربست (ρ) از رابطه (۱) محاسبه می‌شود [۲۱]:

$$\rho = W/V_2 - V_3 \quad (1)$$

و مقدار تخلخل باز داربست (ε) از رابطه (۲) بدست می‌آید:

$$\varepsilon = V_1 - V_3 / V_2 - V_3 \quad (2)$$

W = وزن داربست سرامیکی

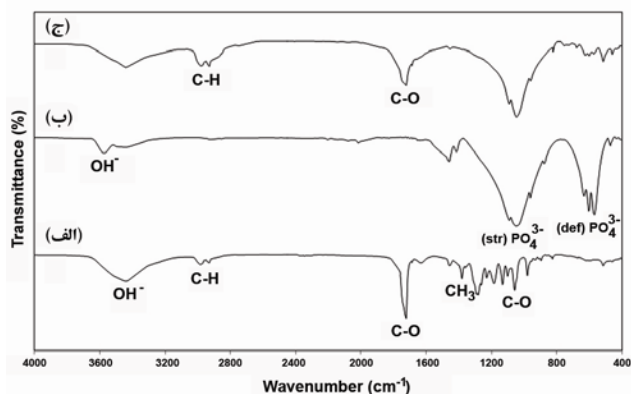
V_1 = حجم اتانول درون استوانه مدرج

V_2 = حجم اتانول پس از قرار گرفتن نمونه درون استوانه مدرج

V_3 = حجم اتانول باقیمانده پس از خارج کردن نمونه از درون استوانه مدرج

برای مشخصه‌یابی پودر هیدروکسی آپاتیت، نمونه با میکروسکوپ الکترونی عبوری (TEM, Philips CM10) تصویربرداری شد، به این ترتیب که نمونه درون اتانول مرک 100% گذاشته شد، سپس در پراب مستقیم دستگاه SMC به

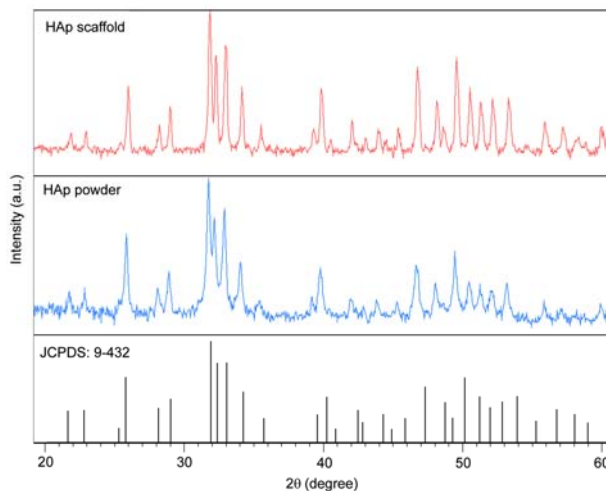
پیوند C-O است. گروه‌های CH_3 پیک تیزی را در 1374 cm^{-1} به وجود می‌آورند که ناشی از ارتعاش کششی این پیوند است. در عدد موجی 1720 cm^{-1} یک پیک بسیار تیز و واضح مشاهده می‌شود که ناشی از ارتعاش کششی گروه‌های کربونیل می‌باشد. همانطور که ملاحظه می‌شود در شکل ۲-ج در عدد موج 1717 cm^{-1} یک پیک کوتاه از گروه کربونیل تشکیل شده است که مربوط گروه کربونیل طیف P3HB می‌باشد.



شکل (۲): طیف جذب FT-IR، (الف) پلیمر P3HB، (ب) داربست هیدروکسی آپاتیت و (ج) داربست HAp/P3HB

P3HB دارای گروه‌های انتهایی هیدروکسیل می‌باشد که می‌توان پیک پهن مربوط به این گروه را در محدوده $3680-3100 \text{ cm}^{-1}$ مشاهده نمود.

به منظور بررسی دقیق‌تر برهم‌کنش ذرات HAp و P3HB، طیف FT-IR این کامپوزیت در مقایسه با ذرات HAp در دو محدوده جذب $650-550 \text{ cm}^{-1}$ و طیف FT-IR کامپوزیت با پلیمر خالص در محدوده جذب $1740-1717 \text{ cm}^{-1}$ در شکل ۳ با وضوح بیشتر نشان داده شده است. چنانچه مشهود است پیک جذب گروه کربونیل P3HB خالص در فرکانس 1724 cm^{-1} به صورت تیزتر و واضح‌تر نسبت به پیک مربوط در نانو کامپوزیت آشکار می‌گردد. در ضمن این پیک در نانو کامپوزیت HAp/P3HB به عدد موجی پایین‌تر 1721 cm^{-1} انتقال یافته است. انتقال پیک جذب کربونیل به فرکانس‌های پایین‌تر احتمال وقوع پیوندهای هیدروژنی بین گروه‌های کربونیل موجود در P3HB و گروه‌های مستعد در ذرات HAp



شکل (۱): پراش اشعه ایکس پودر هیدروکسی آپاتیت تف‌جوشی شده در دمای 900°C ، داربست متخلخل هیدروکسی آپاتیت مطابق با استاندارد JCPDS-9-432

طیف جذب مربوط به نانو کریستال‌های هیدروکسی آپاتیت در شکل ۲، پیک‌های مربوط به فاز آپاتیت را به وضوح نشان می‌دهد. پیک‌های مشاهده شده در محدوده $616-560 \text{ cm}^{-1}$ مربوط به ارتعاش از نوع چرخشی پیوندهای یون PO_4^{3-} و جذب در 1020 cm^{-1} ناشی از ارتعاش از نوع کششی پیوندهای یون PO_4^{3-} می‌باشد. گروه OH^- هیدروکسی آپاتیت یک پیک پهن در طیف 3577 cm^{-1} را نشان می‌دهد و همانطور که همانطور که مشخص است سنتز هیدروکسی آپاتیت معمولاً در محیط آبی صورت می‌گیرد و به دلیل وجود فازهای آمورف در ساختار پودر هیدروکسی آپاتیت، امکان وارد شدن آب به ساختار هیدروکسی آپاتیت وجود دارد. به علاوه منشاء آب جذب شده می‌تواند از محیط اطراف و یا دستگاه طیف سنج FTIR نیز باشد. لذا همواره در طیف‌های FTIR پیک‌های مربوط به آب جذب شده نیز مشاهده می‌شوند. در شکل ۲ پیک پهن ظاهر شده در ناحیه تقریبی 1126 cm^{-1} مربوط به حرکات خمشی گروه هیدروکسیل آب جذب شده است [۲۲]. در نمودار P3HB، پیک‌های 1051 cm^{-1} و 1126 cm^{-1} و 1172 cm^{-1} ناشی از پیوند C-O موجود در P3HB است که پیک‌های 1126 cm^{-1} و 1172 cm^{-1} به ترتیب مربوط به ارتعاش کششی نامتقارن و متقارن

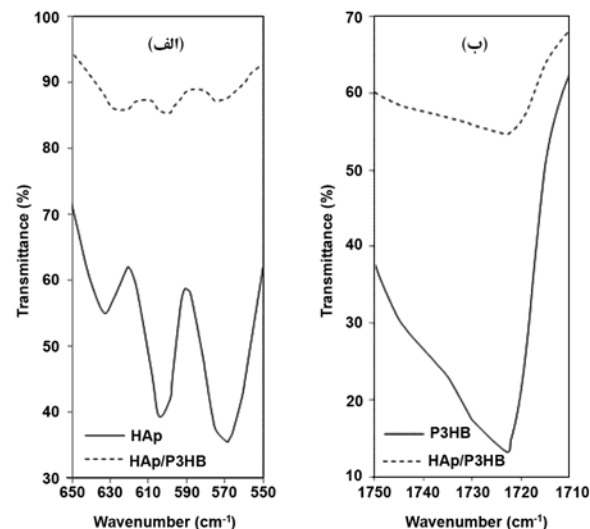
می‌شود که ذرات عمدتاً مورفولوژی شبه کروی داشته و اندازه ذرات حدود ۸۵nm می‌باشد. از آنجاییکه هیدروکسی آپاتیت نانو کریستالی با مورفولوژی کروی در مقایسه با مورفولوژی‌های نامنظم در فرایند استخوان‌سازی از اهمیت بیشتری برخوردار است.

۳-۱- تجزیه وزن‌سنجی گرمایی اسفنج پلی‌یورتان

به منظور اطمینان از محدوده دمایی تجزیه اسفنج پلی‌یورتان، از دستگاه TGA استفاده شد. بطور کلی، تجزیه حرارتی پلیمر نقش حیاتی در سنتز سرامیک‌ها با استفاده از مواد پلیمری ایفا می‌کند [۲۴]. به منظور جلوگیری از ایجاد ترک در ساختار سرامیک، باید زمان کافی برای سوختن اسفنج پلیمری وجود داشته باشد. در این تحقیق، تجزیه حرارتی انجام شده، دمای سوختن کامل اسفنج پلیمری را مشخص می‌نماید. شکل ۵ تغییرات وزن اسفنج پلی‌یورتان را بر اساس درجه حرارت نشان می‌دهد. همانطور که مشاهده می‌شود تجزیه اسفنج پلیمری در دو مرحله صورت می‌گیرد. مرحله اول از حدود ۲۳۰°C شروع شده و تا دمای ۴۲۰°C ادامه می‌یابد.

به دلیل تولید میزان گاز در اثر اکسید شدن پلیمر، کاهش وزن زیادی در این مرحله مشاهده می‌شود. اما میزان کاهش وزن در مرحله دوم تجزیه، محدوده دمایی ۴۲۰-۶۰۰°C، چندان قابل توجه نیست. بخش عمده پلیمر در دمای بین ۲۳۰ تا ۶۰۰°C از سیستم خارج می‌شود، از این رو در نظر گرفتن سرعت گرمایش آهسته در این مرحله برای جلوگیری از تخریب ساختار در اثر خروج گازهای ناشی از تجزیه حرارتی پلیمر امری ضروری است. در دماهای بالاتر از ۶۰۰°C پلیمر اسفنجی کاهش وزن کمی دارد که آن را می‌توان به اکسید شدن مقداری از کربن حاصل از فرآیند تجزیه پلیمر دانست. سوختن و حذف کامل اسفنج پلیمری در دمای ۶۰۰°C اتفاق می‌افتد.

را نشان می‌دهد [۲۳]. این پدیده می‌تواند مقیاسی برای تأیید توزیع ذرات HAp در بستر پلیمر به صورت یکنواخت و کارا باشد. مقایسه پیک‌های مربوط به PO_4^{3-} در هر دو حالت ارتعاش کششی و چرخشی، نشانگر کاهش شدت این پیک‌ها در نانو کامپوزیت نسبت به HAp خالص است.



شکل (۳): مقایسه نمودار FT-IR برای HAp و HAp/P3HB، (ب)

HAp/P3HB و P3HB

همچنین عدد موجی این پیک‌ها برای چرخشی به ترتیب از 574 ، 598 و 628 cm^{-1} در HAp خالص به 566 ، 604 و 633 در نانو کامپوزیت کاهش یافته است (شکل ۳). در مورد پیک‌های کششی PO_4^{3-} عدد موجی از 1025 cm^{-1} در HAp خالص به وضوح در عدد موجی 1019 cm^{-1} نانو کامپوزیت دیده می‌شود که این وضوح پیک به دلیل زمینه سرامیکی داربست است. این شواهد حضور HAp را در کامپوزیت اثبات می‌کند و چنانچه گفته شد تغییر اعداد جذب پیوندها به اعداد موجی پایین‌تر احتمال ایجاد پیوند هیدروژنی میان گروه‌های هیدروکسیل و PO_4^{3-} هیدروکسی آپاتیت و گروه‌های کربونیل P3HB را نشان می‌دهد.

۳-۳- مشخصه‌یابی SEM و TEM هیدروکسی آپاتیت

شکل ۴ تصاویر میکروسکوپ الکترونی عبوری (TEM) و میکروسکوپ الکترونی روبشی (FE-SEM) پودر نانو کریستال هیدروکسی آپاتیت را نشان می‌دهد. با توجه به شکل ملاحظه

سپس برای سوختن کامل اسفنج، به مدت ۱ ساعت در دمای مذکور نگه داشته شد.

۳-۲- تخلخل و دانسیته داربست هیدروکسی آپاتیت با و

بدون پوشش P3HB

در جدول ۱ میانگین درصد تخلخل ها و دانسیته داربست بدون و با پوشش P3HB آورده شده است که همانطور که مشخص است با اعمال پوشش پلیمری روی داربست از درصد تخلخل ها کاسته شده است. داربست ها پس از پوشش دهی P3HB حدود ۱۲٪ افزایش وزن پیدا کردند. در جدول ۱، نمونه ۱، داربست سرامیکی بدون پوشش پلیمری، نمونه ۲، داربست سرامیکی با پوشش پلیمری و زمان غوطه وری ۳۰ ثانیه، نمونه ۳، داربست سرامیکی با پوشش پلیمری و زمان غوطه وری ۱ دقیقه و ϵ درصد تخلخل و ρ دانسیته می باشد.

جدول (۱): درصد تخلخل و دانسیته داربست ۴۰، ۵۰ و ۶۰٪ وزنی

هیدروکسی آپاتیت بدون و با پوشش پلیمری P3HB

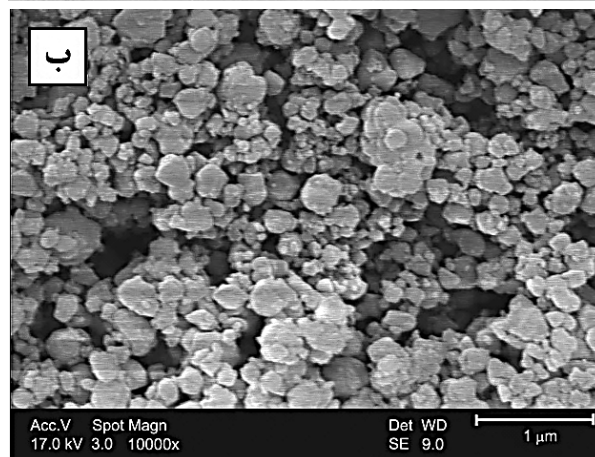
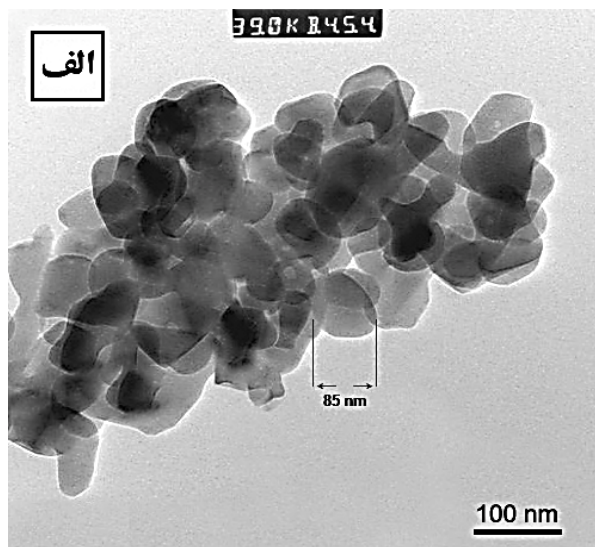
HAp وزنی ۶۰٪		HAp وزنی ۵۰٪		HAp وزنی ۴۰٪		نمونه
ϵ (%)	ρ (gr/cm ³)	ϵ (%)	ρ (gr/cm ³)	ϵ (%)	ρ (gr/cm ³)	
۸۲	۲/۲۴	۸۷	۲	۸۹	۱/۷۲	۱
۷۶	۲/۶۵	۸۰	۲/۳۳	۸۴	۲/۱۰	۲
۶۹	۲/۸۰	۷۷	۲/۴۸	۸۱	۲/۳۱	۳

۳-۳- ریخت شناسی ساختار متخلخل داربست

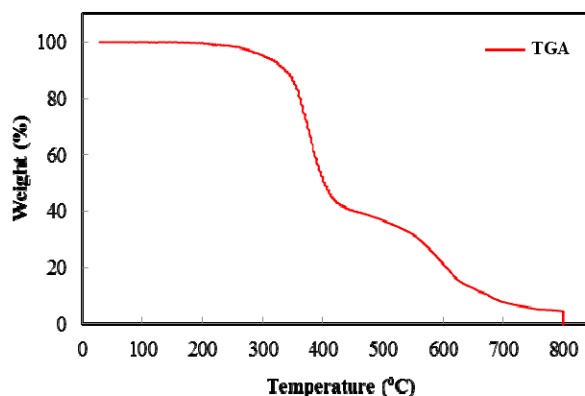
هیدروکسی آپاتیت با و بدون پوشش P3HB

بمنظور بررسی مشخصات ظاهری و ریخت شناسی داربست با و بدون پوشش P3HB، مطالعات ریزساختاری با SEM انجام گرفت (شکل ۶).

داربست سرامیکی هیدروکسی آپاتیت در این تحقیق از روش تکرارپذیری اسفنج پلی یورتان ساخته شد که محصول نهایی آن داربستی با درصد تخلخل بالا می باشد. شکل ۶- الف تصویر میکروسکوپ الکترونی اسفنج پلی یورتان با تخلخل های باز در محدوده ۳۰۰ تا ۷۰۰ μm را قبل از غوطه وری در دوغاب سرامیکی نشان می دهد و شکل ۶- ب داربست متخلخل سرامیکی که محدوده قطر تخلخل ها بین ۱۰۰ تا ۴۰۰ μm است را

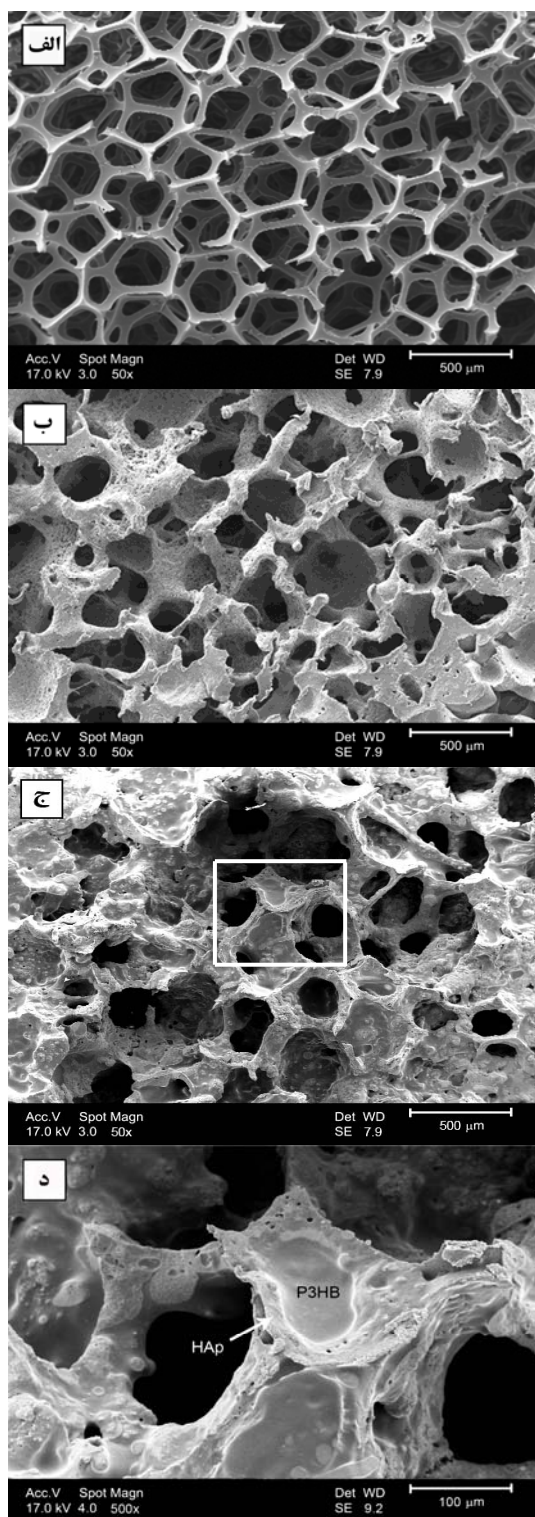


شکل (۴): (الف) تصویر میکروسکوپ الکترونی عبوری و (ب) تصویر میکروسکوپ الکترونی روبشی نانوبلورهای هیدروکسی آپاتیت



شکل (۵): کاهش وزن در اثر تجزیه حرارتی اسفنج پلی یورتان

بنابراین، برای جلوگیری از شوک حرارتی و ایجاد ترک، دما با نرخ گرم شدن ۳°C/min بالا رفت تا به دمای ۶۰۰°C رسید و



شکل (۶): الف) تصویر SEM اسفنج پلی یورتان، ب) سطح مقطع داربست هیدروکسی آپاتیت بدون پوشش، ج) سطح مقطع داربست هیدروکسی آپاتیت با پوشش P3HB و د) داربست با پوشش P3HB در بزرگنمایی ۵۰۰x

نشان می‌دهد که برای یکنواختی تخلخل‌ها و مشخص بودن فصل مشترک بین زمینه و پوشش، داربست قبل از تصویربرداری توسط دستگاه پولیش الماسی، سایش داده شد. این محدوده نزدیک به قطر تخلخل‌های استخوان می‌باشد و همانطور که در شکل ۶-ج دیده می‌شود، محلول پلیمری P3HB پس از غوطه‌وری داربست سرامیکی بصورت پوششی بر روی ذرات هیدروکسی آپاتیت نشسته است که باعث افزایش استحکام داربست می‌شود ولی همانطور که در شکل مشخص است پس از پوشش دهی اندازه تخلخل‌ها کمتر شده است که قطر آنها در حدود ۱۰۰ تا ۲۵۰ μm می‌باشد. شکل ۶-د پوشش همگن و یکدست P3HB را بر روی داربست سرامیکی نشان داده است.

۴- نتیجه گیری

در این تحقیق داربست سرامیکی با ۴۰، ۵۰ و ۶۰ درصد وزنی هیدروکسی آپاتیت با استفاده از اسفنج پلی یورتان با تخلخل نزدیک استخوان طبیعی ساخته شد و سپس بدلیل شکننده بودن داربست، بوسیله محلول پلیمری P3HB در زمان‌های ۳ و ثانیه و ۱ دقیقه پوشش دهی شدند. نتایج این تحقیق:

۱- پودر نانو کریستال هیدروکسی آپاتیت با اندازه دانه‌های حدود ۸۵nm به عنوان ماده زمینه این داربست پس از تف‌جوش شدن در دمای ۹۰۰°C، بدون هیچگونه ناخالصی مورد استفاده قرار گرفت.

۲- با نتایج حاصل از آزمون FT-IR مشخص گردید که کاهش شدت پیک گروه‌های کربونیل و انتقال آن به عدد موجی در داربست نانو کامپوزیتی، همچنین کاهش شدت پیک جذبی و انتقال به فرکانس‌های پایین‌تر در داربست HAp/PHB مربوط به PO_4^{3-} ، احتمال پیوند هیدروژنی میان گروه‌های کربونیل PHB و PO_4^{3-} و OH هیدروکسی آپاتیت وجود دارد.

- Materials in Medicine, Vol. 19 (2), pp. 855-859, 2008.
- [8] R. Zhang, PX. Ma, "Poly (a-hydroxyl acids)/hydroxyapatite porous composites for bone-tissue engineering – (1) Preparation and morphology", J Biomed Mater Res, Vol. 44(4), pp. 446–455, 1999.
- [9] X. Huang, X. Miao, "Novel porous hydroxyapatite prepared by combining H₂O₂ foaming with PU sponge and modified with PLGA and bioactive glass", J Biomater Appl, Vol. 21(4), pp. 351–374, 2007.
- [10] HW. Kim, JC. Knowles, HE. Kim, "Development of hydroxyapatite bone scaffold for controlled drug release via poly (ε-caprolactone) and hydroxyapatite hybrid coatings", J Biomed Mater Res-B, Vol. 70(2), pp. 240–249, 2004.
- [11] AJW. Johnson, JR. Woodard, AJ. Hilldore, SK. Lan, CJ. Park, Morgan AW, et al. "The mechanical properties and osteoconductivity of hydroxyapatite bone scaffolds with multi-scale porosity", Biomaterials, Vol. 28(1), pp. 45–54, 2007.
- [12] X. Miao, LP. Tan, LS. Tan, X. Huang, "Porous calcium phosphate ceramics modified with PLGA-bioactive glass", Mater Sci Eng C, Vol. 27(2), pp. 274–279, 2007.
- [13] JM. Oliveira, MT. Rodrigues, SS. Silva, PB. Malafaya, ME. Gomes, CA. Viegas, et al. "Novel hydroxyapatite/chitosan bilayered scaffold for osteochondral tissue-engineering applications: scaffold design and its performance when seeded with goat bone marrow stromal cells", Biomaterials, Vol. 27(36), pp. 6123–6137, 2006.
- [14] RC. Thomson, MJ. Yaszemski, JM. Powers, AG. Mikos, "Hydroxyapatite fiber reinforced poly (alpha-hydroxy ester) foams for bone regeneration", Biomaterials, Vol. 19, pp. 1935–1943, 1998.
- [15] AR. Boccaccini, JJ. Blaker, V. Maquet, RM. Day, R. Je'ro'me, "Preparation and characterisation of poly (lactide-co-glycolide) (PLGA) and PLGA/bioglass composite tubular foam scaffolds for tissue engineering applications", Mater Sci Eng C, Vol. 25, pp. 23–31, 2005.
- [16] X. Miao, et al., "Mechanical and biological properties of hydroxyapatite/tricalcium phosphate scaffolds coated with poly (lactic-co-glycolic acid)", Acta Biomaterialia, Vol. 4(3), pp. 638–645, 2008.
- [17] D.M.F. Tan, X. Miao, J. Li, Y. Xiao, R.Crawford, "Characterisation of Calcium Phosphate Cement-Derived Hydroxyapatite Scaffolds with a PLGA-Bioactive Glass Composite Coating", Journal of Biomimetics, Biomaterials and Tissue Engineering, Vol. 1, pp. 99-107, 2008.
- [18] S. Pramanik, AK. Agarwal, KN. Rai, "Development of high strength hydroxyapatite for hard tissue replacement", Trends. Biomater Artif Organs, Vol. 19(1), pp. 46–51, 2005.
- [19] C.Y. Ooi, M. Hamdi, S. Ramesh, "Properties of hydroxyapatite produced by annealing of bovine bone", Ceramics International, Vol. 33, pp. 1171–1177, 2007.
- [20] R. Hodgkinson, JD. Currey, "Effect of variation in structure on Young's modulus of cancellous bone, a comparison of human and non-human material", Proc Inst Mech Eng, Part H: J. Eng. Med., Vol. 204, pp. 115–121, 1986.
- [21] H. Ramay, M. Zhang, "Preparation of porous
- ۳- نتایج حاصل آزمون درصد تخلخل‌ها نشان داد که بهترین درصد وزنی برای تولید داربست، مقدار ۵۰ درصد وزنی هیدروکسی آپاتیت می‌باشد.
- ۴- به‌طور کلی بدون در نظر گرفتن خواص فیزیکی و با توجه به نتایج حاصل از تصاویر SEM، بهترین داربست برای کشت و رشد مناسب‌تر سلول‌های بافت استخوان، نمونه‌ی تهیه شده با ۵۰ درصد وزنی هیدروکسی آپاتیت می‌باشد.
- ۵- ساخت داربست مناسب برای استفاده در مهندسی بافت، مستلزم آزمایشات زیست‌فعالی، زیست‌تخریب‌پذیری، تست‌های مکانیکی و کشت سلولی می‌باشد که برای تحقیقات آتی پیشنهاد می‌شود.
- ۴- سپاسگذاری**
- در اینجا لازم است از جناب آقای پروفیسور حمدی عضو هیئت علمی دانشگاه UM مالزی و جناب آقای دکتر ربیعی عضو هیئت علمی دانشگاه نوشیروانی بابل که مرا در انجام این تحقیق راهنمایی کردند، کمال تشکر را داشته باشم.
- ۵- منابع**
- [1] R. Lanza, R. Langer, J. Vacanti, "Principle of Tissue Engineering", Academic Press, Third Edition, p. 6, 2007.
- [2] O. Jeffrey, A. Thomas. Einhorn, A. Bruce Doll, S.Charles, "Bone Tissue Engineering", CRC Press, pp. 54, 2005.
- [3] Wojciech, Suchanek, Yoshimura, Masahiro, "Processing and properties of hydroxyapatite-based biomaterials for use as hard tissue replacement implants", Journal of Materials Research, Vol. 13, Issue 1, pp. 94-117, 1998.
- [4] L. Hench, "Bioceramics: From Concept to Clinic", Journal of the American Ceramic Society, Vol. 74 (7), pp. 1487-1510, 1991.
- [5] A.C. Queiroz, S. Teixeira, J.D. Santos, F.J. Monteiro, "Production of porous hydroxyapatite with potential for controlled drug delivery", Advanced Materials Forum, Vol. 455–456, pp. 358–360, 2004.
- [6] A.C. Queiroz, S. Teixeira, J.D. Santos, F.J. Monteiro, "Laser surface modification of hydroxyapatite and glass-reinforced hydroxyapatite", Bioceramics, Vol. 24, pp. 4607–4614, 2004.
- [7] S. Teixeira, M.P. Ferraz, F.J. Monteiro, "Biocompatibility of highly macroporous ceramic scaffolds: cell adhesion and morphology studies", Journal of Materials Science-

- hydroxyapatite scaffolds by combination of the gel-casting and polymer sponge methods”, *Biomaterials*, Vol. 24, pp. 3293–3302, 2003.
- [22] S. Koutsopoulos, “Synthesis and characterization of Hydroxyapatite crystals: A review study on the analytical methods”, *J. Biomed. Mater. Res.*, Vol. 62, pp. 600-612, 2002.
- [23] R. Murugan, S. Ramakrishna, K. Panduranga Rao, et al. “Nanoporous hydroxy-carbonate apatite scaffold made of natural bone” *Materials Letters*, Vol. 60 (23), pp. 2844-2847, 2006.
- [24] K. Zin-Kook, O. Jeong-Jung, K. Hisamichi, “Architecture of Porous Hydroxyapatite Scaffolds Using Polymer Foam Process”, *Journal of Biomechanical Science and Engineering*, Vol. 4(3), pp. 377-383, 2009.

واژه‌نامه

- 1- Tissue Engineering
- 2- Hydroxyapatite (HAp)
- 3- Scaffold
- 4- Polymer replication method
- 5- Polyurethane sponge
- 6- Slurry
- 7- Xigeng Miao
- 8- Poly(lactic-co-glycolic acid)
- 9- D.M.F. Tan
- 10- Bovine bone
- 11- Polyhydroxybutyrate (P3HB)
- 12- Dispersant
- 13- Binder
- 14- Thermal Gravity Analysis (TGA)