

## نانوکامپوزیت متخلخل هیدروکسی آپاتیت/تیتانیا برای کاربردهای بافت سخت

مهناز عنایتی جزی<sup>۱\*</sup>، مهران صولتی هاشجین<sup>۲</sup>، علی نعمتی<sup>۳</sup> و زهرا طاهریان<sup>۱</sup>

۱- گرایش سرامیک، دانشکده‌ی مهندسی مواد، دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم و تحقیقات، تهران، ایران.

۲- آزمایشگاه نانوبیومتریال، دانشکده‌ی مهندسی پزشکی، دانشگاه صنعتی امیرکبیر، تهران، ایران.

۳- دانشکده‌ی مهندسی و علم مواد، دانشگاه صنعتی شریف، تهران، ایران.

دریافت: تیر ۱۳۸۹، بازنگری: آذر ۱۳۸۹، پذیرش: فروردین ۱۳۹۰

**چکیده:** در این پژوهش، فنی جدید برگرفته شده از روش‌های حذف اسفنج پلیمری و قالب‌گیری ژل، به منظور ساخت داربست‌های ماکروتخلخلی هیدروکسی آپاتیت/تیتانیا معرفی خواهد شد. با استفاده از این فن، امکان کنترل بیشتری به روی آرایش تخلخلی داربست‌ها به وجود می‌آید و ساخت داربست‌های با ویژگی‌های مکانیکی بهبود یافته‌تر امکان پذیر می‌شود. ترکیب‌های فازی، ساختار تخلخلی، ویژگی‌های مکانیکی و ویژگی‌های زیست فعالی این داربست‌ها به ترتیب با استفاده از پراش پرتو X، میکروسکوپ الکترونی روبشی، آزمون‌های مکانیکی و آزمون‌های زیست فعالی بررسی شدند.

بررسی پراش پرتو X نمونه‌ها، فازهای هیدروکسی آپاتیت، تری کلسیم فسفات ( $\alpha$  و  $\beta$ )، روتایل (تیتانیا) و کلسیم تیتانات را به عنوان، فازهای اصلی داربست‌های متخلخل هیدروکسی آپاتیت/تیتانیا مشخص کرد. تصویرهای میکروسکوپ الکترونی روبشی به دست آمده از داربست‌های متخلخل هیدروکسی آپاتیت/تیتانیا، تخلخل‌های باز، یکنواخت، به هم پیوسته و راه به در با اندازه تخلخلی ۲۰۰ تا ۴۰۰ میکرومتر را نشان می‌دهد. بررسی ویژگی مکانیکی داربست‌های هیدروکسی آپاتیت/تیتانیا، کاهش استحکام فشاری داربست‌ها را در پی افزایش درصد تیتانیا در سامانه تأیید می‌کند. نتیجه‌های آزمون‌های زیست فعالی، ویژگی زیستی مطلوب داربست‌های هیدروکسی-آپاتیت/تیتانیا را به اثر تیتانیا در تهییج فرایند جوانه زنی هیدروکسی آپاتیت به روی سطح نمونه‌ها پس از غوطه‌وری آن‌ها در محلول شبیه سازی شده‌ی بدن نسبت می‌دهد.

**واژه‌های کلیدی:** داربست‌های متخلخل؛ هیدروکسی آپاتیت؛ تیتانیا؛ ویژگی مکانیکی؛ ویژگی زیست فعالی.

## مقدمه

ناتوانی بدن انسان در بازسازی حجم وسیعی از آسیب دیدگی‌ها که در نتیجه‌ی بیماری‌هایی چون پوکی استخوان، سرطان مغز استخوان و بیشتر از همه در تصادف‌ها در بافت سخت به وجود می‌آید، لزوم استفاد از کاشتنی‌های متخلخل را به منظور ترمیم بافت‌های آسیب دیده دو چندان خواهد ساخت [۲،۱]. موادی که در ساخت این دست از داربست‌ها مورد استفاده قرار می‌گیرند ضمن زیست‌فعالی، بایستی از ویژگی مکانیکی مناسبی نیز برخوردار باشند تا بتوانند از بافت استخوانی جدیدی که در داخل تخلخل‌های ساختاریشان رشد می‌یابد حفاظت کنند و از بافت اصلی جدا نشوند [۵،۴،۳،۱].

شباهت‌های زیاد ساختاری و شیمیایی موجود میان هیدروکسی آپاتیت و سرامیک‌های کلسیم فسفاتی مربوط به آن با فاز معدنی استخوان، آپاتیت را به یکی از اصلی‌ترین گزینه‌ها برای ترمیم بافت سخت، میدل کرده است [۶،۳]. فراوری این بیوسرامیک در ساختاری متخلخل علاوه بر امکان هدایت رشد سلول‌های استخوانی در فضای میان تخلخل‌ها و یکپارچه سازی آن با دیگر بخش‌های استخوانی، به شکل‌گیری مسیری مناسب برای شریان یافتن سیال بدن (در جهت تأمین مواد مغذی برای سلول‌های استخوانی در حال رشد) نیز کمک خواهد کرد [۷،۴]. حضور این حفره‌ها در ساختار کاشتنی‌های آپاتیتی به موازات افزایش ویژگی زیستی، ضعف‌های ذاتی در ویژگی مکانیکی این بیوسرامیک (نظیر چقرمگی و استحکام پیوندی پایین) را نیز افزایش خواهد بخشید. در نتیجه‌ی این نقصان کارکرد داربست‌های متخلخل آپاتیتی با وجود زیست‌سازگاری بالا، در بدن و به ویژه در مناطق تحت بار با مشکلات زیادی همچون؛ خوردگی شدید، ناپایداری و نابه‌سامانی کاشتنی همراه است [۸،۳].

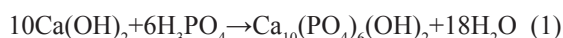
در طول دو دهه‌ی گذشته مطالعه‌های گسترده‌ای به منظور غلبه بر ضعف‌های مکانیکی هیدروکسی آپاتیت در جهت کاربرد وسیع تر آن در ترمیم بافت‌های سخت آسیب دیده (به ویژه در مناطق تحت بار) صورت پذیرفته است. افزودن تقویت‌کننده‌های متفاوت به ساختار سرامیک‌های کلسیم فسفاتی و بهبود روش‌های ساخت و پردازش، از جمله مهم‌ترین راهکارهایی است که برای افزایش ویژگی مکانیکی سرامیک‌های آپاتیتی و حفظ زیست‌سازگاری

آن‌ها، اندیشیده شده است [۸،۳].

ذرات فلزی [۹]، ویسکرها سرامیکی [۱۰]، شیشه‌های زیست سازگار [۱۲،۱۱] و همچنین فازهای سرامیکی خنثی همچون آلومینا [۱۳]، زیرکونیا [۱۴] و تیتانیا [۳-۶] از جمله فازهایی هستند که به منظور بهبود ویژگی مکانیکی هیدروکسی آپاتیت به ساختار آن افزوده شده‌اند. در میان انبوه کامپوزیت‌های بر پایه‌ی آپاتیتی، کامپوزیت‌های هیدروکسی آپاتیت/تیتانیا به دلیل داشتن ویژگی زیستی و مکانیکی مطلوب تیتانیا از جایگاه ویژه‌ای در مهندسی پزشکی برخوردار اند. افزودن نانوذرات تیتانیا به ساختار هیدروکسی آپاتیت، ضمن بهبود ویژگی مکانیکی سرامیک‌های آپاتیتی به دلیل ویژگی مکانیکی برتر تیتانیا در قیاس با هیدروکسی آپاتیت، قدرت چسبندگی کاشتنی به بافت سخت را نیز افزایش بخشیده و بدین ترتیب به تهبیح رشد سلولی نیز کمک خواهد کرد [۱۶،۱۵،۵].

تاکنون روش‌های زیادی برای ساخت و پردازش بیوسرامیک‌های متخلخل مانند هیدروکسی آپاتیت/تیتانیا به وسیله‌ی پژوهشگران مورد ارزیابی قرار گرفته است. فرایندهای ریخته‌گری دوغابی [۱۷، ۱۸]، استفاده از حباب زها [۱۸]، سل-ژل [۱۷]، ریخته‌گری ژل [۱۹، ۱۸، ۷] و روش حذف اسفنج پلیمری [۱۸، ۷] از جمله روش‌های متداول در زمینه‌ی ساخت داربست‌های متخلخل به حساب می‌آیند. در هریک از این داربست‌ها، بسته به نوع روش پردازش، شاهد بروز ویژگی‌های متمایزی خواهیم بود؛ برای مثال استحکام مکانیکی بالای داربست‌های تولیدی به روش ریخته‌گری ژل، این دست از داربست‌ها را از دیگر داربست‌ها جدا می‌سازد، با این وجود کارکرد داربست‌های به دست آمده از این روش در تشکیل بافت جدید و یکپارچه سازی آن با بافت قدیمی، در نتیجه‌ی بهم پیوستگی ضعیف تخلخل‌ها و توزیعی غیر یکنواخت از اندازه آن‌ها در داربست، با مشکلات زیادی همراه است [۱۹، ۷]. روش اسفنج پلیمری به عنوان یکی دیگر از روش‌های ساخت داربست‌های متخلخل، به دلیل الگوبرداری از ساختار تخلخلی پلیمر در نهایت به ساختاری از تخلخل‌های باز، با بهم پیوستگی‌های قوی می‌انجامد. با وجود قابلیت‌های این روش، در کنترل به روی اندازه‌ی تخلخل‌ها و تشکیل تخلخل‌های به هم پیوسته با هندسه‌ی مطلوب، ضعف ویژگی مکانیکی داربست‌های

تهیه درجا نانوکامپوزیت هیدروکسی آپاتیت/تیتانیا به منظور کاهش میزان واکنش پذیری تیتانیم ترا کلرید با رطوبت هوا و دست یابی به نانو ذرات تیتانیا در گستره‌ی دمای پایین، محلول ۱ مولار از تیتانیم اکسی کلرید به عنوان محصول واکنش تیتانیم ترا کلرید با قطعه‌های یخ فراوری شد [۲۰]. این محلول همزمان با محلول ۰٫۲۴ مولار از اورتو فسفریک اسید به صورت قطره قطره به سوسپانسیون ۰٫۴ مولار از کلسیم هیدروکسید افزوده شد. با ورود محلول اورتو فسفریک اسید و تیتانیم اکسی کلرید به محلول کلسیم هیدروکسید به ترتیب نانو ذرات هیدروکسی آپاتیت و تیتانیا بر اساس روابط ۱ و ۲ در سامانه شکل می‌گیرند.



قابلیت انحلال ذرات هیدروکسی آپاتیت در محیط‌های اسیدی، امکان جداسازی این ذرات را در چنین محیط‌هایی با مشکل مواجه می‌سازد. برای جدایش کامل ذرات هیدروکسی آپاتیت از حلال بایستی pH سامانه را در گستره‌ی بازی (۱۱) تثبیت کرد [۲۱]. بدین منظور محلول ۲ مولار از سود به صورت قطره قطره به این سامانه افزوده شد. سوسپانسیون مخلوط برای ۱۸ ساعت پیرسازی شد و در ادامه به منظور جدایش ذرات جامد از مایع، سوسپانسیون سانتریفوژ شد. رسوب به دست آمده به مدت ۱۲ ساعت در دمای ۹۰ °C در آون خشک شد. پودر به دست آمده به صورت کلوخه بود، به منظور دست یابی به پودری ریزدانه، کلوخه‌ها در یک هاون آسیاب شدند.

در آزمایش دیگری، همزمان با افزودن قطره قطره محلول ۱ مولار از تیتانیم اکسی کلرید و محلول ۰٫۲۴ مولار از اورتو فسفریک اسید به سوسپانسیون ۰٫۴ مولار از کلسیم هیدروکسید، دمای سوسپانسیون مخلوط نیز تا ۷۰ °C افزایش یافت. در این مرحله از آزمایش pH با شیب تندتری کاهش می‌یابد و به منظور تنظیم pH در گستره‌ی بازی به مقدار بیشتری از محلول سود نیاز است. پس از تنظیم pH در گستره‌ی بازی، سوسپانسیون مخلوط برای ۱ ساعت در دمای ۷۰ °C همزده شد و در ادامه کلیه‌ی

تولیدی به روش اسفنج-پلیمری، این روش را نیز برای تولید داربست‌ها به ویژه داربست‌های مورد استفاده در منطقه‌های تحت بار ناکارآمد می‌سازد [۱۸،۷].

وجود مزیت‌ها و عیب‌های هر یک از این روش‌ها از یک سو و لزوم هم‌خوانی ویژگی‌های مکانیکی و بیولوژیکی کاشتنی با بافت سخت از سوی دیگر، گزینه‌ی جدیدی را در زمینه‌ی ساخت داربست‌های متخلخل مطرح ساخته است و آن ترکیب روش‌های ساخت داربست‌های متخلخل با یکدیگر به منظور دست یابی به داربستی با ویژگی‌های بهینه است [۷].

در این پژوهش با ادغام دو روش ریخته‌گری ژل و روش حذف اسفنج پلیمری، روشی جدید با نام ژل-اسفنج برای ساخت داربست‌های متخلخل هیدروکسی آپاتیت/تیتانیا معرفی خواهد شد. برای ساخت این دست از داربست‌ها نخست پودر نانوکامپوزیتی هیدروکسی-آپاتیت/تیتانیا با استفاده از روش رسوب گذاری درجا در دو دمای اتاق و ۷۰ °C تهیه شد و در ادامه داربست‌های آن به روش ژل-اسفنج آماده شد. ترکیب‌های فازی، ویژگی ریز ساختاری، مکانیکی و زیست‌فعالی این دست از داربست‌ها به ترتیب با استفاده از الگوهای پراش پرتو X، میکروسکوپ الکترونی روبشی، آزمون‌های مکانیکی و زیست‌فعالی مورد ارزیابی قرار گرفت.

## بخش تجربی

ماد

به منظور تهیه نانوکامپوزیت هیدروکسی آپاتیت/تیتانیا، پودر کلسیم هیدروکسید، اورتو فسفریک اسید، تیتانیم ترا کلرید به ترتیب به عنوان پیش ماده‌های سازنده‌ی هیدروکسی آپاتیت و تیتانیا مورد استفاده قرار گرفته‌اند. سود نیز برای تنظیم pH سامانه به کار برده شد.

برای ساخت داربست‌های متخلخل هیدروکسی آپاتیت/تیتانیا، نانو پودر کامپوزیتی هیدروکسی آپاتیت/تیتانیا به همراه آکريل آمید به عنوان مونومر، متیلن بیس آکريل آمید به عنوان اتصال دهنده‌ی عرضی، سدیم تری پلی فسفات به عنوان پخش کننده، آمونیم پرسولفات به عنوان آغازگر و TEMED به عنوان کاتالیست برای ساخت دوغاب سرامیکی مورد استفاده قرار گرفتند. کلیه‌ی واکنشگرها از شرکت مرک تهیه شده‌اند.

مراحل پیرسازی، سانتریفوژ، خشک سازی و آسیاب شبیه آن چه در مرحله‌ی قبل انجام شد، تکرار شد.

پودر نانوکامپوزیت هیدروکسی آپاتیت/تیتانیا به دست آمده در فاز اول آزمایش، به همراه مونومرهای acrylamide، methylenebisacrylamide، پخش کننده STPP و آب یون زدایی شده، به منظور فرآوری دوغاب سرامیکی با استفاده از جار میل برای ۶ ساعت با یکدیگر مخلوط شدند. جدول ۱ مقدار هریک از ترکیب های شیمیایی را در ۱۰۰ میلی لیتر آب یون زدایی شده نشان می‌دهد. دوغاب آماده شده در این مرحله، برای ۱ ساعت تحت شرایط خلا قرار گرفت، تا کلیه‌ی حباب‌های هوا که در مرحله‌ی مخلوط سازی واکنش دهنده وارد دوغاب شدند، از آن خارج شوند. در ادامه کاتالیست ammonium persulphate و آغازگر TEME به منظور انجام فرایندهای پلیمر شدن به دوغاب افزوده شدند. فوم‌های پلی یورتان که از قبل به شکل و اندازه‌ی مورد نظر در آمده بودند، در درون دوغاب تحت شرایط خلا غوطه ور شدند. اعمال شرایط خلا در این مرحله، به نفوذ ذرات کامپوزیت هیدروکسی آپاتیت/تیتانیا در درون تخلخل‌های فوم اسفنجی می‌انجامد. فوم‌ها پس از خروج از دوغاب به منظور تکمیل فرایندهای پلیمر شدن در محیط نیتروژنی قرار گرفتند. این فوم‌ها برای ۲۴ ساعت در اتمسفر محیط خشک شدند و در ادامه به منظور حذف فازهای آلی با سرعت گرمایشی  $3^{\circ}\text{C}/\text{min}$  تا دمای  $600^{\circ}\text{C}$  گرما دیدند و سپس به منظور افزایش استحکام بدنه از دمای  $600^{\circ}\text{C}$  تا  $1350^{\circ}\text{C}$  با سرعت  $9^{\circ}\text{C}/\text{min}$  کلوخه شدند.

### پراش پرتو X (XRD)

برای شناسایی فازهای نهایی داربست‌های متخلخل هیدروکسی آپاتیت/تیتانیا از آنالیز پراش پرتو X استفاده شد. به منظور دست یابی به پودر بدنه‌های متخلخل، مقداری از این بدنه‌ها در یک هاون آگاتی ساییده شد و پودر به دست آمده از آن به عنوان نمونه‌ی XRD مورد بررسی قرار گرفت. الگوهای پراش پرتو X به وسیله‌ی دستگاه پراش سنج D4 ENDEAVOR و با استفاده از پرتو  $\text{Cu-K}\alpha$  با طول موج  $0.15406$  نانومتر در  $40$  کیلووات و  $30$  میلی آمپر گستره‌ی زوایا  $2\theta = (10-90)^{\circ}$  با اندازه گام‌های برابر  $0.02$  بررسی شد. الگوهای خام به دست آمده، به وسیله‌ی نرم افزارهای (Sig-©) (ma-C GmbH 1991-99) و (OriginLab Pro v 7.5) با استفاده از تقریب Savitzky-cotay و انتخاب 7 polynomial degree به صورت مسطح در آمده اند و سپس به وسیله‌ی نرم افزار Sma4win پردازش و با یکدیگر مقایسه شدند.

### طیف سنجی انتقال فوریه زیرقرمز (FTIR)

طیف سنجی انتقال فوریه زیرقرمز (FTIR) در گستره‌ی موج  $4000-3700$   $\text{cm}^{-1}$  (در حالت عبوری) به منظور تکمیل و تأیید نتیجه‌ها به دست آمده از XRD با استفاده از دستگاه Thermo Nicolet Nexus انجام شد.

### مشاهدات میکروسکوپ الکترونی روبشی (SEM)

عامل‌هایی همچون، شکل و اندازه‌ی تخلخل‌های ایجاد شده

جدول ۱ فرمولاسیون دوغاب در ۱۰۰ میلی لیتر آب یون زدایی شده

ترکیب ها	مقدار افزوده شده به ۱۰۰ میلی لیتر آب یون زدایی شده
پودر نانوکامپوزیت هیدروکسی آپاتیت/تیتانیا	۵۰ گرم
پخش کننده STPP	۵ گرم
آکریل آمید	۴ گرم
متیلن بیسا آکریل آمید	۰.۵ گرم
آمونیم پرسولفات	۰.۱ گرم
TEMED	۰.۱ گرم

بازه‌های زمانی متفاوت ۷ و ۱۴ روز از داخل محلول SBF خارج شده و مورد ارزیابی قرار می‌گیرند. قرارگیری داربست‌های متخلخل در درون محلول SBF زمینه ساز انجام واکنش‌های شیمیایی بین محلول شبیه سازی شده و نمونه‌های متخلخل خواهد بود. برای شناخت بهتر از چگونگی انجام واکنش‌های صورت پذیرفته مابین نمونه و محلول SBF و بررسی نحوه‌ی پیشرفت این واکنش‌ها، داربست‌های کامپوزیتی (که در محلول SBF برای بازه‌های زمانی متفاوت غوطه‌ور گشته‌اند) مورد ارزیابی قرار می‌گیرند. برای این منظور از میکروسکوپ الکترونی روبشی (SEM) استفاده می‌شود. تصویرها به دست آمده از این میکروسکوپ می‌تواند اطلاعات بسیار جامعی درباره‌ی چگونگی انجام واکنش‌های مابین نمونه و محلول SBF و حتی نحوه‌ی پیشرفت این واکنش‌ها در اختیار ما گذارد. نتیجه‌های به دست آمده از این روش در نهایت می‌تواند ما را در تفسیر تأثیر تیتانیا و روش فرآوری بر زیست سازگاری نمونه‌های متخلخل هیدروکسی آپاتیت/تیتانیا یاری رساند.

### نتیجه‌ها و بحث

خروج حجم وسیعی از مواد آلی از یک بدنه‌ی سرامیکی چنانچه در سرعت گرمادهی نامناسب رخ دهد، تنش زیادی را به بدنه اعمال می‌کند که نتیجه‌ی آن کاهش محسوس ویژگی‌های مکانیکی خواهد بود. بر این اساس، تعیین دمای حذف فوم پلیمری و مدت زمان لازم برای خروج آن از بدنه سرامیکی در فرایندهای چون حذف اسفنج پلیمری از اهمیت بسیار ویژه‌ای برخوردار است. شکل ۱ منحنی تغییرات وزن فوم پلی یورتان را نسبت به دما نشان می‌دهد. همانطور که از تصویر پیداست؛ فوم در دمای °C ۵۵۰ به صورت کامل می‌سوزد. با توجه به نمودار، سرعت گرمادهی مناسب به منظور حذف ماده آلی در داربست‌های هیدروکسی آپاتیت/تیتانیا پیش از شروع فرایند کلوخه‌پختن تا دمای °C ۶۰۰، °C/min ۳ تنظیم شد و به منظور حذف کامل ماده‌ی آلی، داربست‌ها برای یک ساعت در این دما نگهداری شدند.

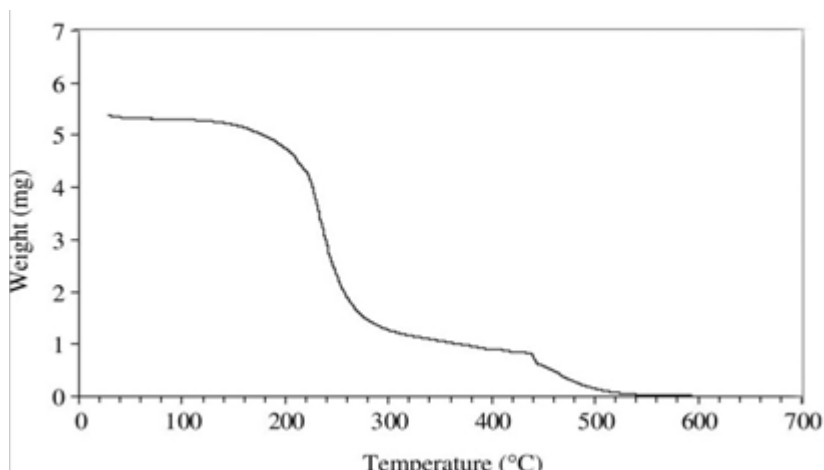
در داربست‌ها، اندازه‌ی پنجره‌های بین تخلخل‌ها، تعداد متوسط پنجره‌ها در هر حفره، برآورد کیفی راه به در بودن تخلخل‌ها در داربست‌های به دست آمده، ارزیابی دیواره‌های بین حفرات و توپر بودن آن‌ها و بسیاری از اطلاعات دیگر پیرامون ساختار داربست‌های متخلخل را می‌توان با استفاده از تصویرهای به دست آمده از میکروسکوپ الکترونی روبشی (SEM) مورد مطالعه و بررسی قرار داد. به منظور دست یابی به تصویرهایی با وضوح بالا، این نمونه‌ها در ابتدا با لایه‌ی بسیار نازک از طلا پوشش داده شده و در ادامه تصویرهای آن‌ها با استفاده از دستگاه Philips مدل XL30 با آشکارساز SE گرفته خواهد شد.

### اندازه‌گیری استحکام مکانیکی

به منظور تعیین تأثیر تیتانیا و بررسی عملکرد فرایند ساخت، در بهبود ویژگی‌های مکانیکی داربست‌های بیوسرامیکی هیدروکسی-آپاتیت/تیتانیا، از این داربست‌ها آزمون‌های فشاری گرفته خواهد شد. انتظار می‌رود، این داربست‌ها نسبت به نوع آپاتیتی خالص رفتار مکانیکی بهتری را از خود به نمایش بگذارند. دستگاه آزمون مکانیکی به کار رفته در این پروژه مدل HCR. 25-400 Zwick/Roell و سرعت بارگذاری آن برابر ۰/۵ mm/sec خواهد بود.

### بررسی زیست‌فعالی نمونه‌ها در محلول شبیه سازی شده‌ی بدن (SBF)

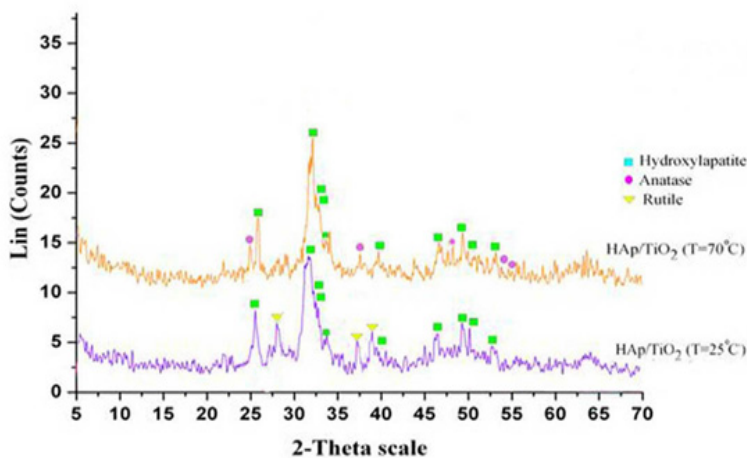
به منظور بررسی عملکرد داربست‌های هیدروکسی آپاتیت/تیتانیا در محیط‌های فیزیولوژیک و هم چنین ارزیابی تأثیر نانوذرات تیتانیا بر زیست-سازگاری داربست‌های کامپوزیتی هیدروکسی آپاتیت/تیتانیا، آزمون‌های زیست‌فعالی به روی این داربست‌ها انجام خواهد شد. بدین منظور محلول شبیه سازی شده‌ی بدن مطابق با آنچه در منابع گزارش شده ساخته شد [۲۲، ۲۳]. سپس نمونه‌هایی از داربست‌های هیدروکسی آپاتیت/تیتانیا در مایع SBF در آنکوباتور (دمای °C ۳۷) قرار می‌گیرند. این نمونه‌ها پس از طی



شکل ۱ منحنی کاهش وزن فوم پلی یورتان نسبت به تغییرات دما

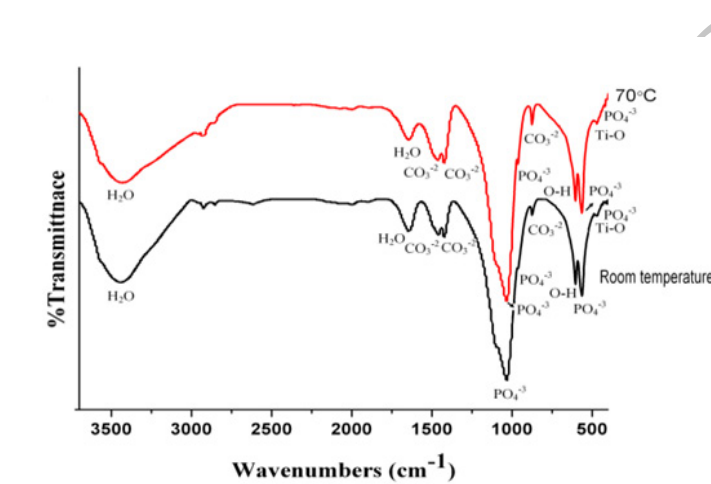
تیتانیا (روتیل) در چنین گستره‌ی دمایی، پیامدی از سرعت‌های بسیار پایین واکنش رسوب گذاری درجا در گستره‌ی دمای اتاق است [۲۰]. هم خوانی پیک‌های منحنی دوم با پیک‌های استاندارد هیدروکسی آپاتیت و فاز بلوری آناتاز با شماره کارت استاندارد (JCPDS. No. 21-1272)، تشکیل این دو فاز بلوری در نمونه‌ی نانوکامپوزیتی تهیه شده در دمای ۷۰ °C تأیید می‌کند.

شکل ۲ الگوی پراش پرتو X، نانوکامپوزیت‌های هیدروکسی آپاتیت/تیتانیا را که در دو دمای اتاق و ۷۰ °C تهیه شده را نمایش می‌دهد. پیک‌های منحنی اول با پیک‌های استاندارد هیدروکسی آپاتیت با شماره کارت (JCPDS. No. 09-0432) و فاز بلوری روتیل با شماره کارت استاندارد (JCPDS. No. 34-0180) از تیتانیا همخوانی دارد. به نظر می‌رسد؛ تشکیل فاز دمایی بالای

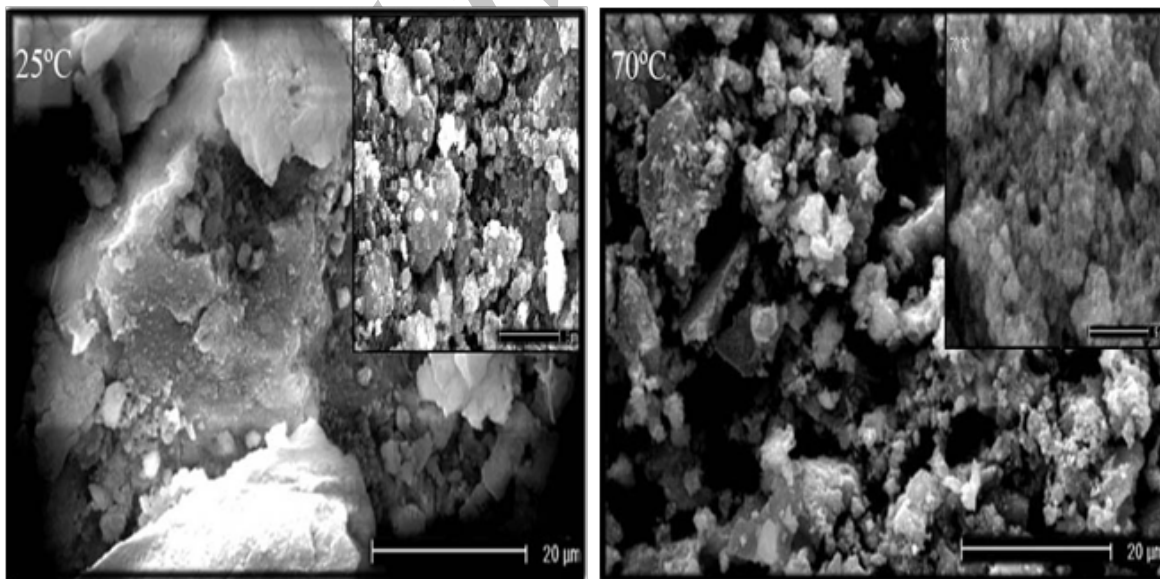


شکل ۲ الگوی پراش پرتو X پودرهای نانوکامپوزیتی هیدروکسی آپاتیت/تیتانیا در دمای اتاق و ۷۰ °C

الگوهای انتقال فوریه زیرقرمز نانوکامپوزیت‌های HAp/TiO<sub>2</sub> که در دو دمای اتاق و 70 °C تهیه شده‌اند، در شکل ۳ نمایش داده شده است. مدهای ارتعاشی در  $cm^{-1}$  [۴۷۰، ۵۶۳، ۹۶۲، ۱۰۴۰] و نوارهای جذبی در  $cm^{-1}$  ۶۰۳ و گستره‌ی  $cm^{-1}$  (۳۰۰۰-۳۷۰۰) در هر دو نمونه به ترتیب نمایشگر گروه‌های فسفاتی و هیدروکسیلی از ساختار هیدروکسی آپاتیت است [۲۵، ۴۲، ۸۶]. نوار ارتعاشی در گستره‌ی جذبی  $cm^{-1}$  (۴۰۰-۸۰۰) متعلق به گروه‌های Ti-O، تشکیل نانو ذرات تیتانیا را در این دو نمونه‌ی نانوکامپوزیتی تأیید می‌کند [۲۶-۲۸]. تصویرهای میکروسکوپ الکترونی روبشی دو نمونه‌ی نانوکامپوزیتی HAp/TiO<sub>2</sub> در شکل ۴ نشان داده شده است. همان طور که در تصویرها نیز مشهود است؛ ریخت شناسی هر دو نمونه کلوخه‌های سخت و به هم فشرده از ذرات ریز است.

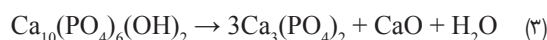


شکل ۳ الگوی انتقال فوریه زیرقرمز پودرهای نانوکامپوزیتی در دمای اتاق و 70 °C



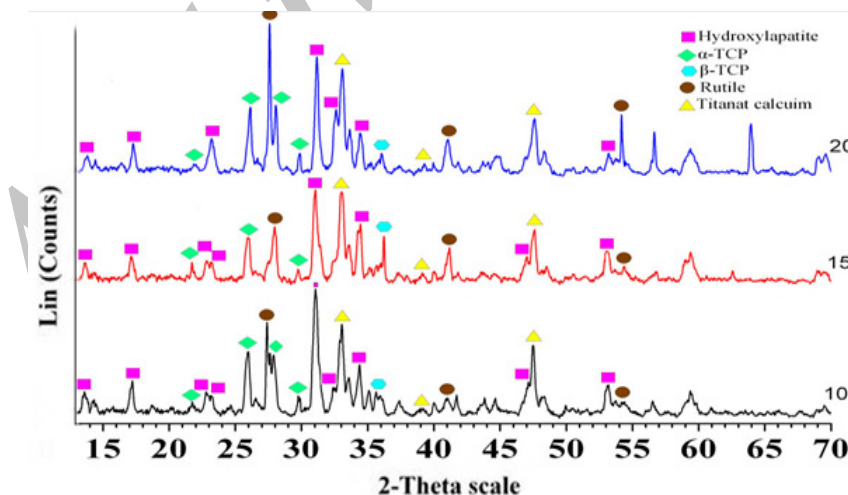
شکل ۴ تصویرهای میکروسکوپ الکترونی روبشی پودرهای نانوکامپوزیتی HAp/TiO<sub>2</sub> در بزرگ‌نمایی‌های متفاوت

هیدروکسی آپاتیت، بایستی فازهای کلسیم فسفات و کلسیم اکسید در سامانه پدیدار شوند، با استناد به الگوی پراش پرتو X به دست آمده، علی رغم حضور پیک‌های کلسیم فسفات، هیچ شاهدهی مبنی بر حضور پیک‌های اکسید کلسیم در هیچ یک از نمونه‌ها وجود ندارد. عدم حضور پیک‌های کلسیم اکسید و حضور هم زمان پیک‌های کلسیم تیتانات در این سامانه، انجام واکنش مابین کلسیم اکسید به دست آمده از تجزیه‌ی هیدروکسی آپاتیت و تیتانیا (در فاز بلوری روتیل) را مطابق با رابطه‌ی (۴) تأیید می‌نماید.



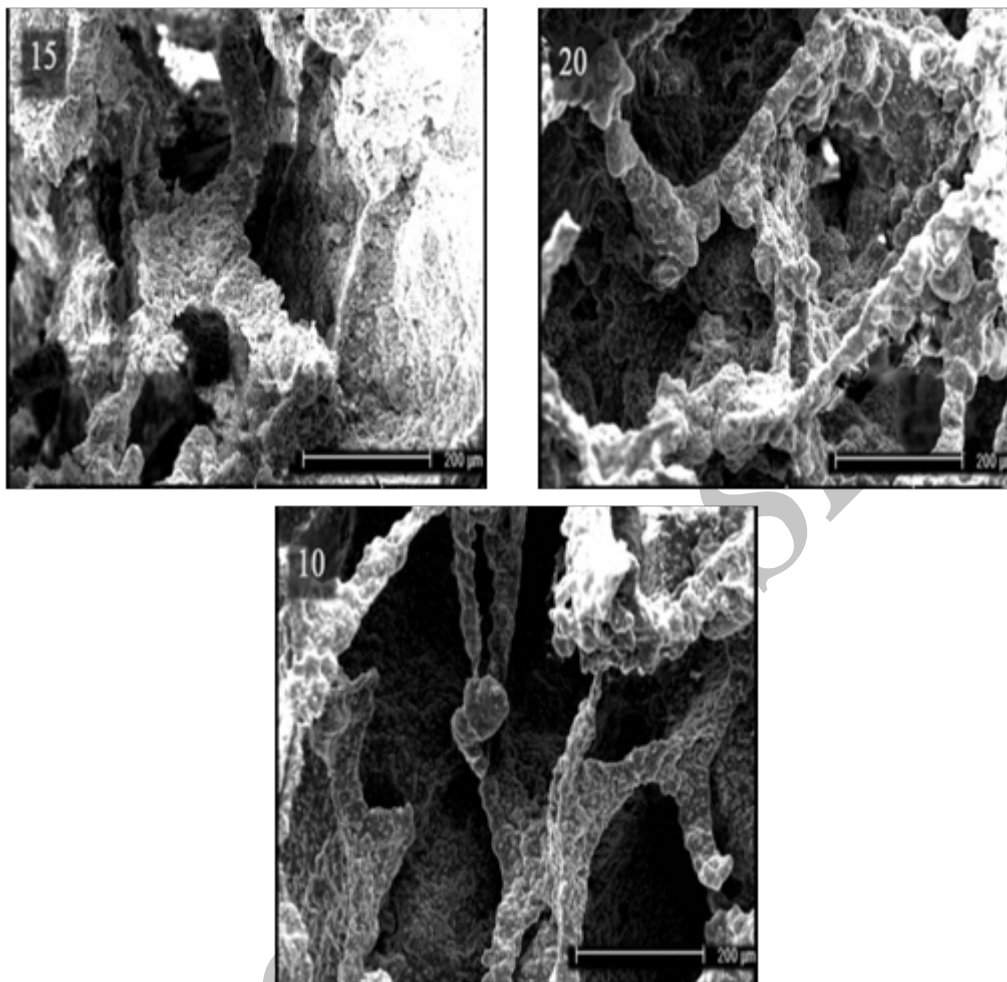
شکل ۶ تصویرهای میکروسکوپ الکترونی روبشی از داربست‌های متخلخل هیدروکسی آپاتیت/تیتانیا را با درصدهای متفاوت از تیتانیا نمایش می‌دهد.

شکل ۵ الگوی پراش پرتو X نمونه‌های نانوکامپوزیتی HAp/TiO<sub>2</sub> با ۱۰، ۱۵ و ۲۰ درصد وزنی تیتانیا، را پس از انجام عملیات گرمایی در دمای ۱۳۵۰ °C به تصویر کشیده است. مطابقت پیک‌های الگوهای تمامی نمونه‌ها با کارت‌های استاندارد هیدروکسی آپاتیت (JCPDS.No.09-432)، فاز روتایل از تیتانیا (JCPDS.No.34-0180)، کلسیم تیتانات (0423-JCPDS.No.42) و کلسیم فسفات (JCPDS. No. 09-0169)، بر حضور فازهای هیدروکسی آپاتیت، تیتانیا در فرم بلوری روتیل،  $\alpha$  و  $\beta$  کلسیم فسفات و همچنین کلسیم تیتانات در تمامی پودرهای به دست آمده از داربست‌های متخلخل پس از عملیات پخت دلالت می‌کند. افزایش دما در گستره‌ی دمای ۱۰۰۰-۴۰۰ °C استحاله‌ی فازی (قابل پیش بینی) تیتانیا از فرم بلوری آناتاز به روتیل را در پی دارد. هیدروکسی آپاتیت استکیومتری تا دمای ۱۳۶۰ °C فرم بلوری خود را حفظ خواهد کرد، اما حلالیت جزیی یون تیتانیم در ساختار شبکه‌ی آپاتیت، باعث برهم زدن استکیومتری آن و کاهش دمای پایداری این ترکیب کلسیم فسفاتی خواهد شد. بدین ترتیب مطابق با رابطه‌ی (۳) و به واسطه‌ی تجزیه‌ی



شکل ۵ الگوی پراش پرتو X سه نمونه‌ی نانوکامپوزیتی HAp/TiO<sub>2</sub> پس از عملیات گرمایی در دمای ۱۳۵۰ °C





شکل ۶ تصویرهای میکروسکوپ الکترونی روبشی از داربست‌های متخلخل هیدروکسی آپاتیت/تیتانیا با درصدهای متفاوت تیتانیا

با استناد به داده‌های جدول ۲، داربست‌های متخلخل کامپوزیتی HAp/TiO<sub>2</sub> از استحکام فشاری بالاتری در قیاس با داربست آپاتیتی خالص برخوردارند. افزایش ویژگی مکانیکی داربست‌های کامپوزیتی هیدروکسی آپاتیت/تیتانیا در قیاس با داربست آپاتیتی خالص، به اثر تیتانیا به عنوان یک فاز تقویت کننده در سامانه نسبت داده می‌شود [۵]. با این وجود با افزایش درصد تیتانیا از ۱۰ تا ۲۰ درصد، از مقدار استحکام فشاری داربست‌ها کاسته می‌شود. به نظر می‌رسد؛ افت ویژگی مکانیکی داربست‌های هیدروکسی آپاتیت/تیتانیا با افزایش درصد تیتانیای سامانه، پیامدی از تنش‌های به دست آمده از فعل و انفعالات شیمیایی در حین فرایند پخت است.

در هر سه داربست آرایشی یکنواخت از تخلخل‌های باز، راه به در، بهم پیوسته با اندازه‌ی تخلخلی (۲۰۰-۴۰۰) میکرومتر در سه بعد داربست به چشم می‌خورد. جدول ۲ تغییرات استحکام فشاری داربست‌های متخلخل هیدروکسی آپاتیت/تیتانیا را با درصدهای متفاوت از تیتانیا نشان می‌دهد. به منظور ارزیابی عملکرد این دست از داربست‌ها در محیط‌های بیولوژیک به جای استخوان اسفنجی و مقایسه ویژگی‌های مکانیکی آن‌ها با داربست آپاتیتی خالص، استحکام فشاری استخوان اسفنجی به همراه استحکام فشاری داربستی از هیدروکسی آپاتیت خالص نیز در این جدول قرار گرفته است.

به منظور ارزیابی ویژگی زیستی، داربست‌های متخلخل کامپوزیتی HAp/TiO<sub>2</sub> برای بازه‌ی زمانی ۷ و ۱۴ روز در محلول شبیه سازی شده‌ی بدن در دمای ۳۷ °C غوطه ور شدند. این داربست‌ها پس از خروج از محلول شبیه سازی شده با استفاده از تصویرهای میکروسکوپ الکترونی روبشی مورد مطالعه قرار گرفتند.

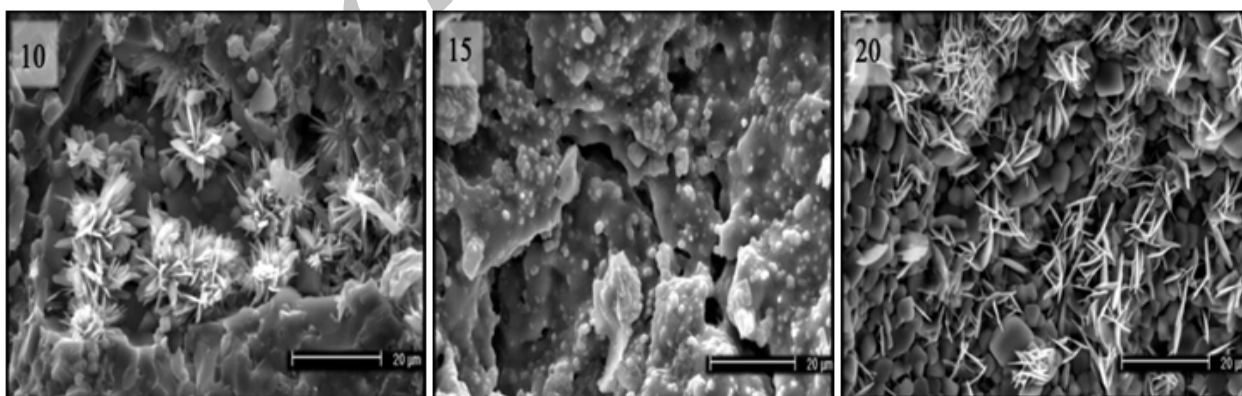
شکل ۷ و ۸ تصویرهای میکروسکوپ الکترونی روبشی این داربست‌ها را پس از خروج از محلول شبیه سازی شده بدن در دو بازه‌ی زمانی ۷ و ۱۴ روز نمایش می‌دهد.

تصویرهای میکروسکوپ الکترونی روبشی از داربست‌های هیدروکسی آپاتیت/تیتانیا پس از ۷ روز غوطه وری در محلول شبیه سازی شده‌ی بدن، تشکیل جوانه‌های هیدروکسی آپاتیت را به روی سطح داربست‌های متخلخل تأیید می‌کند. تشکیل جوانه‌های آپاتیت به روی سطح داربست در پایان زمان اول غوطه وری بر زیست فعالی بالای این دست از داربست‌ها دلالت می‌کند. با افزایش زمان غوطه وری تا ۱۴ روز، حجم و تعداد جوانه‌های هیدروکسی آپاتیت در سطح تمامی داربست‌های متخلخل افزایش یافته؛ به گونه‌ای که در پایان زمان دوم غوطه‌وری، پوششی یکنواخت از جوانه‌های آپاتیتی سطح دو داربست متخلخل ۱۵ و ۲۰ درصد تیتانیا را پوشش داده است. همان طور که در تصویرها نیز مشهود است؛ حضور نانو ذرات تیتانیا در ساختار داربست‌های

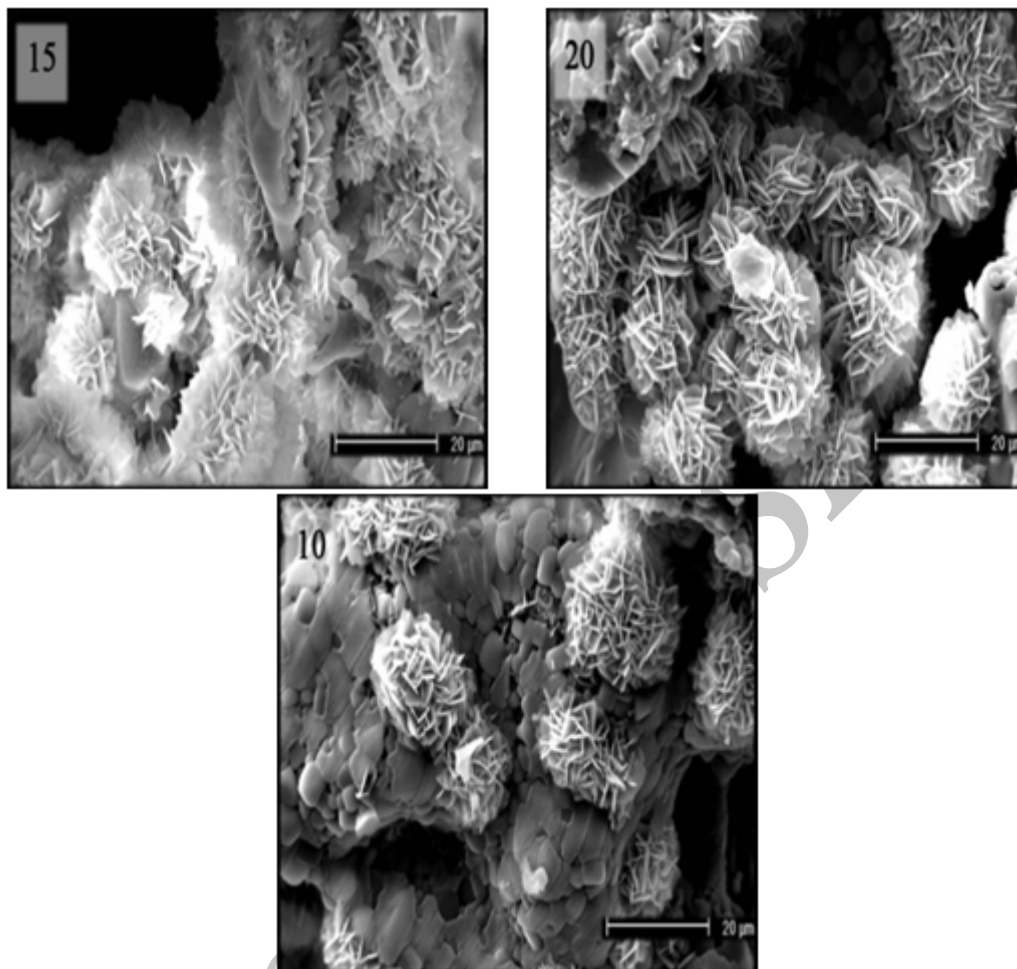
با افزایش درصد تیتانیا در سامانه، سهم بیشتری از هیدروکسی آپاتیت تجزیه خواهد شد و در ادامه نیز فراورده‌های تجزیه‌ی این واکنش مطابق با رابطه‌ی (۴) با واکنش با تیتانیای موجود در سامانه به تیتانات کلسیم تبدیل خواهند شد. این برهم کنش‌های شیمیایی منجر به ذخیره سازی مقادیری تنش در داربست‌های متخلخل خواهد شد و این تنش از ویژگی مکانیکی داربست‌های کامپوزیتی می‌کاهد [۵].

جدول ۲ استحکام فشاری استخوان اسفنجی، داربست‌های متخلخل هیدروکسی آپاتیت خالص و داربست‌های هیدروکسی آپاتیت/تیتانیا با درصدهای ۱۰، ۱۵ و ۲۰ درصد وزنی تیتانیا

نمونه	استحکام فشاری (مگا پاسکال)
استخوان اسفنجی	۱۲-۲
داربست هیدروکسی آپاتیت خالص	۵٫۲
داربست HAp/TiO <sub>2</sub> با ۱۰ درصد تیتانیا	۱۱٫۲
داربست HAp/TiO <sub>2</sub> با ۱۵ درصد تیتانیا	۹٫۳
داربست HAp/TiO <sub>2</sub> با ۲۰ درصد تیتانیا	۸٫۹



شکل ۷ تصویرهای میکروسکوپ الکترونی روبشی داربست‌های کامپوزیتی HAp/TiO<sub>2</sub> با درصدهای متفاوت از تیتانیا پس از ۷ روز غوطه‌وری در محلول شبیه‌سازی شده‌ی بدن



شکل ۸. تصویرهای میکروسکوپ الکترونی روبشی داربست‌های کامپوزیتی HAp/TiO<sub>2</sub> با درصد‌های متفاوت از تیتانیا پس از ۱۴ روز غوطه وری در محلول شبیه سازی شدهی بدن

افزایش درصد تیتانیا در سامانه و تشکیل تیتانات کلسیم بیشتر، گروه‌های بیشتری از Ti-OH در نتیجهی فعل و انفعالات سطح و مایع شبیه سازی شدهی بدن به روی سطح داربست به وجود می‌آیند و بدین ترتیب جوانه زنی هیدروکسی آپاتیت در سامانه تهییج می‌شود.

### نتیجه گیری

نانوکامپوزیت HAp/TiO<sub>2</sub> با استفاده از روش رسوب گذاری درجا در دو دمای اتاق و دمای ۷۰ °C با موفقیت تهیه شد. پراش پرتو X و انتقال فوریه فرو سرخ، تشکیل فازهای بلوری هیدروکسی آپاتیت و روتیل در نانوکامپوزیتی که در دمای اتاق تهیه شده را

هیدروکسی آپاتیت/تیتانیا، به افزایش زیست فعالی این دست از داربست‌ها انجامیده است. افزایش ویژگی زیستی داربست‌های هیدروکسی آپاتیت/تیتانیا به تأثیر گروه‌های Ti-OH در تهییج فرایند جوانه-زنی و رشد بلورهای آپاتیت نسبت داده می‌شود [۵]. رهایش یون‌های Ca<sup>2+</sup> و PO<sub>4</sub><sup>3-</sup> از داربست‌های متخلخل HAp/TiO<sub>2</sub> به اشباع غلظت این یون‌ها در مایع شبیه سازی شده بدن می‌انجامد. با مبادلهی گروه‌های Ca<sup>2+</sup> با گروه‌های H<sub>3</sub>O<sup>+</sup> در مایع شبیه سازی شدهی بدن و در ادامه تشکیل گروه‌های Ti-OH به روی سطح، جوانه زنی هیدروکسی آپاتیت به روی سطح به دلیل افزایش محصول فعال یونی آپاتیت، در سیال تهییج می‌گردد. با

افزایش ویژگی مکانیکی و تهییج فرایند جوانه زنی و رشد بلورهای هیدروکسی آپاتیت در محلول شبیه سازی شده‌ی بدن نسبت داد. با تولید داربست‌های متخلخل هیدروکسی آپاتیت/تیتانیا، ترمیم و بازسازی حجم وسیعی از آسیب دیدگی‌های بافت سخت در بازه‌ی زمانی کوتاه تر و بدون نیاز به عملیات جراحی متعدد امکان پذیر خواهد بود.

### سپاسگزاری

نویسندگان این مقاله بر خود لازم می‌دانند از دکتر عالیه امینان، به خاطر تلاش در زمینه‌ی تحلیل داده‌ها و دکتر احسان صادقیان، به خاطر انجام آزمون‌های مکانیکی، قدردانی کنند.

### مراجع

- [۱] صولتی هشجین، مهران، تأثیر روش تهیه پودر بر ریزساختار و ویژگی هیدروکسی آپاتیت، رساله دکتری مهندسی مواد (سرامیک)، پژوهشگاه مواد و انرژی، ایران، صفحه‌ی ۵۷-۲۳، ۱۳۷۶.
- [۲] گودرزی، آزاده، کنترل مورفولوژی و اندازه ذرات هیدروکسی آپاتیت، پایان نامه کارشناسی ارشد مهندسی پزشکی (بیومواد)، دانشگاه صنعتی امیرکبیر، ایران، صفحه‌ی ۲۵-۲۱، ۱۳۸۵.
- [3] Oktar .F.N, Materials Letters, 60, 2207-2210, 2006.
- [4] E. Fidancevska, G. Ruseska, J. Bossert, Y.Min. Lin, A. Boccaccini, Materials Chemistry and Physics, 103, 95-100, 2007.
- [5] Que.W, Khor. K.A, Xu. J.L, Yu .L.G, Journal of the European Ceramic Society, 28, 3083-3090, 2008.
- [6] Pushpakanth.S, Srinivasan .B, Sreedhar.B, Sasstry. T.P, Materials Chemistry and Physics, 107, 492-498, 2008.
- [7] Rehman.Ramay.H, Zhang.M, Biomaterials, 24, 3293-3302, 2003.
- [8] Nath.S, Tripathi.R, Basu. B, Materials Science and Engineering C, 29, 97-107, 2009.

تأیید می‌نماید، این در حالی است که بر اساس همین نتیجه‌ها، فازهای هیدروکسی آپاتیت و آاناتاز فازهای اصلی نانوکامپوزیتی است که در دمای  $70^{\circ}\text{C}$  تهیه شده است. نانوکامپوزیت پیوندی هیدروکسی آپاتیت/تیتانیا برای ساخت داربست‌های متخلخل با استفاده از روش ژل-اسفنج به کار گرفته شد. تصویرها میکروسکوپ الکترونی روشی از داربست‌های هیدروکسی آپاتیت/تیتانیا که به روش ژل-اسفنج فرآوری شده‌اند، توزیعی یکنواخت از تخلخل‌های باز، بهم پیوسته و راه به در را با اندازه تخلخلی (۲۰۰-۴۰۰) میکرومتر در سه بعد از داربست نشان می‌دهد. ارزیابی آزمون‌های مکانیکی، برتری استحکام فشاری داربست‌های هیدروکسی آپاتیت/تیتانیا را در قیاس با داربست‌های هیدروکسی-آپاتیت خالص تأیید می‌نماید. با استناد بر همین نتیجه‌ها، با افزایش درصد تیتانیا در نانوکامپوزیت هیدروکسی آپاتیت/تیتانیا از استحکام فشاری این داربست‌ها کاسته می‌شود. مطالعات *In vitro* زیست فعالی بالای داربست‌های هیدروکسی آپاتیت/تیتانیا را به اثر تیتانیا در تهییج فرایند جوانه زنی و رشد بلورهای آپاتیت، نسبت می‌دهد. مقایسه ویژگی مکانیکی و زیست سازگاری داربست‌های هیدروکسی-آپاتیت/تیتانیا که به روش ژل-اسفنج فرآوری شده‌اند با نمونه‌های مشابه که به روش ریخته‌گری ژل و یا روش حذف اسفنج پلیمری ساخته شده‌اند، نشان می‌دهد. این دست از داربست‌ها آرایش تخلخلی مناسبی را جهت رشد سلول‌های بافت سخت مشابه با آنچه در فرایند روش حذف اسفنج پلیمری گزارش شده از خود به نمایش می‌گذارد. حال آنکه ویژگی مکانیکی آن قابل مقایسه با داربست‌های تولیدی به روش ریخته‌گری ژل است. بنابراین می‌توان نتیجه گرفت ادغام دو روش حذف اسفنج پلیمری و ریخته‌گری ژل، فرآوری داربست‌های با ویژگی مکانیکی بالا و با آرایش تخلخلی مناسب را میسر می‌سازد؛ مزیتی که دست یابی به آن با هیچ یک از این دو روش به تنهایی امکان پذیر نیست. این دست از داربست‌های حتی در قیاس با داربست‌های آپاتیتی خالص (که به روش ترکیبی ژل-اسفنج پیش از این توسط Rehman.Ramay و Zhang، فرآوری شده بودند) از ویژگی مکانیکی و زیستی بالاتری برخوردارند. بهبود ویژگی داربست‌های هیدروکسی آپاتیت/تیتانیا در مقایسه با انواع آپاتیتی آن که به روشی مشابه فرآوری شده را می‌توان به اثر تیتانیا در

- [9] Chu. C, Xue. X, Zhu. J, Yin. Z, J. Mater. Sci.: Mater. Med, 15, 665-671, 2004.
- [10] Suchanek. W, Yashima. M, Kakihana. M, Yoshimura. M, Biomaterials , 17, 1715-1727, 1996.
- [11] Georgiou. G, Knowles .J.C, Barralet. J.E, Kong. Y.M, Kim. H.E, J. Mater. Sci.: Mater. Med, 15, 705-711, 2004.
- [12 ] Georgiou. G, Knowles. J.C, Barralet .J.E, J. Mater. Sci, 39, 2205-2213, 2004.
- [13] Huaxia.J, Marquis P.M, Biomaterials, 13, 744-748, 1992.
- [14] Sung.Y, Shin.Y , Jun.R, Jae Nontechnology, 18, 601-607, 2008.
- [15] Ramires. P. A, Romito. A , Cosentino.F, Milella . E, Biomaterials, 22, 1467-1474, 2001.
- [16] Ramires.P.A, Cosentino. F, Milella . E , Torricelli.P, Giavaresi. G, Giardino. R, J. Mater. Sci. Mater. Med, 13, 797-801, 2002.
- [17] Carter.C.B, Norton.M.G, Ceramic materials: Science and Engineering, springer, chapter 23: Shaping and Forming, 104-187, 2007.
- [18] Woyansky.J.S, Scott.C.E, Minnear.W.P, Am Ceram Soc Bull, 71, 1674-81, 1992.
- [19] Sepulveda.P, Am Ceram Soc. Bull, 76, 61-65, 1997.
- [20] Kim. S, Park. S, Jeong. Y, J. Am. Ceram. Soc, 82, 927-32, 1999.
- [21] Ratner. E.D, Hoffman.A.S, Biomaterials science, an introduction to materials in medicine, Academic press, 73-78,1996.
- [22] Kukubo. T, Kushitani. H, Kitsugi. S, Yamamuro. T, A-W. J. Biomed. Mater. Res, 24, 721-726, 1990.
- [23] Ning. C.Q, Zhou. Y, Biomaterials, 23, 2909-2915, 2002.
- [24] Anmin. H, Tong. L, Ming. L, Chengkang. C, Huiqin. L, Dali. M, Applied Catalysis B: Environmental, 63, 41-44, 2006.
- [25] Mobasherpour. I, Soulati.Heshajin. M, Kazemzadeha. A, Zakeri .M, Journal of Alloys and Compounds, 430, 330-333, 2007.
- [26] Busani. T, Devine. R.A, Sci. Technol, 20, 870-879, 2005.
- [27] Nakamoto. K, Infrared and Raman Spectra of Inorganic and Coordination Compounds, John Wiley & Sons, USA, 4th edition, 107-112, 1986.
- [28] Zhang. W.j, He .Y, Qi. Q, Mater. Chem. Phys, 93, 508-515, 2005.