

فرآیندهای نوین در مهندسی مواد

ma.iaumajlesi.ac.ir

استفاده از روش رویه پاسخ در ساخت داربست بهینه کامپوزیتی هیدروکسی آپاتیت/ دیوپساید

نسرین رفیعی^۱، سعید کرباسی^{۲*}، امیرعباس نوربخش^۳، کامران امینی^۴

۱- دانشجوی دکتری مهندسی متالورژی و مواد، گروه مهندسی مواد، واحد شهرضا، دانشگاه آزاد اسلامی، شهرضا، ایران.

۲- استاد، گروه بیومتریال و مهندسی بافت، دانشکده فناوری‌های نوین پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران.

۳- دانشیار، گروه مهندسی مواد، واحد شهرضا، دانشگاه آزاد اسلامی، شهرضا، ایران.

۴- دانشیار، مرکز تحقیقات مواد پیشرفته، واحد مجلسی، دانشگاه آزاد اسلامی، اصفهان، ایران.

* karbasi@med.mui.ac.ir

چکیده	اطلاعات مقاله
روش رویه پاسخ، مجموعه‌ای از تکنیک‌های آماری برای طراحی آزمایشات، مدل‌سازی و بررسی اثر فاکتورها بر نتایج و در نهایت بهینه‌سازی فرآیند است. در این تحقیق جهت انتخاب داربست بهینه کامپوزیتی هیدروکسی آپاتیت و دیوپساید، از روش طراحی آزمایش مرکب مرکزی استفاده شده است. این روش با در نظر گرفتن محدوده مشخص برای سه فاکتور مؤثر (درصد هیدروکسی آپاتیت، درصد روانساز و دمای عملیات حرارتی) و تعیین پاسخ مناسب که میزان تخلخل داربست‌ها است، ۲۰ حالت پیشنهادی برای ساخت داربست کامپوزیتی را ارائه داده که پس از ساخت و تعیین درصد تخلخل، حالت بهینه برای ساخت داربست کامپوزیتی، ۷۷/۵۷ درصد وزنی هیدروکسی آپاتیت، ۲۲/۴۳ درصد وزنی دیوپساید (۰/۶۴ درصد وزنی روانساز (سدیم تری پلی فسفات) و دمای عملیات حرارتی ۱۲۰۰ درجه سانتی‌گراد انتخاب گردید. برای تأیید قدرت پیش‌بینی مدل به‌دست‌آمده آزمایش‌هایی تحت شرایط بهینه معرفی شده توسط روش طراحی مرکب مرکزی انجام گرفت و نتایج تخلخل سنجی به روش ارشمیدس نشان داد که ۰/۰۹۴ درصد اختلاف بین پاسخ (تخلخل) به‌دست‌آمده و پیش‌بینی شده توسط مدل وجود دارد. همچنین نتایج FTIR، XRD و SEM تأییدکننده این است که نمونه داربست ساخته شده با روش رویه پاسخ یک نمونه ایده‌آل جهت استفاده در مهندسی بافت استخوان است. به‌طور کلی با توجه به نتایج این تحقیق، روش رویه پاسخ می‌تواند، ابزاری سودمند برای بهینه‌سازی داربست‌های کامپوزیتی در مهندسی بافت باشد.	دریافت: ۱۳۹۹/۰۱/۱۲ پذیرش: ۱۳۹۹/۰۴/۱۹ کلید واژگان: روش رویه پاسخ داربست هیدروکسی آپاتیت دیوپساید مهندسی بافت طراحی آزمایش مرکب مرکزی

On the use of Response Surface Methodology for Optimization of Scaffold Composite of the Hydroxyapatite and Diopside

Nasrin Rafiee¹, Saeid Karbasi^{2*}, Amir Abbas Norbakhsh¹, Kamran Amini³

1- Department of Materials Science and Engineering, Shahreza Branch, Islamic Azad University, Shahreza, Iran

2- Department of Biomaterials and Tissue Engineering, School of Advanced Technology in Medicine, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, Iran

3- Center for Advanced Engineering Research, Majlesi Branch, Islamic Azad University, Isfahan, Iran

* karbasi@med.mui.ac.ir

Article Information

Original Research Paper

Doi:

10.30495/apme.2021.1889820.1973

Keywords:

Central Composite Design

Tissue Engineering

Diopside

Hydroxyapatite

Scaffold

Response Surface Methodology

Abstract

The response surface methodology is a statistical approach to design the experiments, modeling and analysis of the effective factors as well as to help optimizing the process. In this study, we use the central composite design technique to select the optimum scaffold composite of the Hydroxyapatite and Diopside. This method suggested twenty different scaffold specimens by optimizing the suitable percentage of porosity via determining the percentage weight concentrations of the three effective parameters. After making the scaffold and determining their porosity, the optimum case for composite scaffolds was 77.57 wt% nHA (22.43wt% Di), 0.64wt% lubricant (STPP) and heat treatment temperature 1200. Also, the results of SEM, FTIR, and XRD confirm that the scaffold specimen made with the response method is an ideal specimen for use in bone tissue engineering. In general, according to the results of this research, the response surface methodology can be a useful tool for optimizing composite scaffolds in tissue engineering.

برای ارجاع به این مقاله از عبارت ذیل استفاده نمایید:

Please cite this article using:

Nasrin Rafiee, Saeid Karbasi, Amir Abbas Norbakhsh, Kamran Amini, On the use of Response Surface Methodology for Optimization of Scaffold Composite of the Hydroxyapatite and Diopside, New Process in Material Engineering, 2021, 15(2), 39-48.

۱- مقدمه

از میان روش‌های طراحی آزمایش، روش طراحی مرکب مرکزی^۱، یک روش ایده‌آل برای بهینه‌سازی یک محصول یا فرآیند است که اثرات متقابل بین متغیرها را بررسی و به نمایش می‌گذارد. در روش‌های طراحی آزمایش سنتی، فقط یک عامل به‌عنوان متغیر در نظر گرفته می‌شود و دیگر عوامل در یک سطح ثابت قرار داده می‌شوند که این روش، یک متغیر در یک‌زمان نامیده می‌شود و اثرات متقابل بین متغیرها قابل‌نمایش نیست. همچنین در روش سنتی، برای انجام پژوهش، تعداد زیادی آزمایش موردنیاز است که منجر به افزایش زمان و هزینه و همچنین افزایش مصرف مواد مورد آزمایش می‌شود. برای غلبه بر این مشکل، روش رویه پاسخ^۲ (RSM) که یک مجموعه از تکنیک‌های آماری و ریاضیات کاربردی برای ساخت مدل‌های تجربی است مطرح می‌شود. هدف در این گونه طرح‌ها، بهینه‌سازی پاسخ (متغیر خروجی) است که متأثر از چندین متغیر مستقل (متغیرهای ورودی) است. کاربرد RSM برای بهینه‌سازی طرح، در کاهش هزینه روش‌های تحلیل گران‌قیمت و بی‌نظمی‌های عددی مرتبط با آن‌ها است که تاکنون استفاده از آن در مهندسی بافت مورد توجه نبوده است. مهندسی بافت به‌طور عام به معنی توسعه و تغییر در زمینه رشد آزمایشگاهی مولکول‌ها و سلول‌ها در بافت و یا عضو، برای جایگزینی یا ترمیم قسمت آسیب‌دیده بدن است. بر اساس تعریف برای ساخت یک بافت به شیوه‌های مهندسی، نیاز به طراحی یک داربست با ساختار فیزیکی مناسب است. سازه‌های مهندسی بافت در بدن بیمار به‌منظور جایگزینی بافت آسیب‌دیده یا از بین رفته کاشته می‌شوند. با گذر زمان، داربست‌ها تخریب شده و با بافت میزبان جایگزین می‌گردند. در تحقیقات مهندسی بافت استخوان، داربست‌های پایه سرامیکی نقش مؤثری داشته و مهم‌ترین مشخصه آن‌ها در انتخاب، درصد تخلخل است. ازجمله مواد مطرح در مهندسی بافت استخوان، هیدروکسی آپاتیت بوده است [۱]؛ که به دلیل اتصال کاملاً نزدیک با سلول‌های بافت زنده دارای خواص

زیست‌سازگاری قابل‌توجهی است. قابل‌ذکر است که هیدروکسی آپاتیتی که با استفاده از منبع طبیعی تهیه شده باشد، سازگاری بیشتری با بافت‌های زنده بدن دارد و پس از کاشت در بدن، به‌راحتی بافت استخوانی جدیدی بر روی آن رشد کرده و اتصال محکمی میان این نوع کاشتنی با بدن برقرار می‌شود. لذا برای کاربرد در انواع زیست‌مواد مناسب‌تر است [۲]. هیدروکسی آپاتیت طبیعی بیشترین سازگاری را با بافت‌های زنده بدن دارد و اگرچه به دلیل توانایی در بازسازی بافت استخوان بسیار مورد توجه است، خواص مکانیکی ضعیف (تردی بالا) استفاده از آن را به‌ویژه در قسمت‌هایی از بدن که تحت ضربه و فشار بیشتر هستند، محدود می‌کند. لذا جهت بهبود خواص مکانیکی این بیوسرامیک با حفظ خواص زیستی، کامپوزیت کردن آن با سایر بیوسرامیک‌ها ازجمله دیوپساید مطرح می‌گردد [۳]. دیوپساید خالص دارای ۳۴/۵۵ درصد وزنی منیزیم، ۱۱ درصد وزنی سیلیسیم و ۵۴/۵۵ درصد وزنی کلسیم است. سیلیسیم باعث تحریک رشد استخوان می‌شود. منیزیم نیز از مهم‌ترین عناصر در بدن انسان است که به‌طور غیرمستقیم بر سوخت‌وساز معدنی بدن اثر می‌گذارد. تحقیقات بسیاری در رابطه با دیوپساید و عناصری که نقش کلیدی در استخوان‌سازی و تشکیل لایه آپاتیتی بر روی مواد بیومتریال سرامیکی دارد، انجام شده است [۴]. همچنین ارزیابی‌های انجام شده در مورد خواص زیستی و مکانیکی داربست دیوپساید نشان‌دهنده مناسب بودن خواص زیستی و مکانیکی داربست این بیوسرامیک است [۵]. در سال ۲۰۱۸ تحقیقات گسترده در رابطه با ساخت داربست‌های هیدروکسی آپاتیت در بهبود افزایش استخوان‌سازی در محیط برون‌تنی و درون‌تنی انجام شد و نتایج مطلوبی جهت کاربردهای کلینیکی گزارش شده است [۶]. با توجه به بالاتر بودن تافنس شکست دیوپساید ($K_{IC}=3.5 \text{ MPa.m}^{1/2}$) نسبت به هیدروکسی آپاتیت ($K_{IC}=0.6-1.0 \text{ MPa.m}^{1/2}$)، این سرامیک زیست‌سازگار می‌تواند گزینه مناسبی در کنار هیدروکسی آپاتیت برای کاربردهای ارتوپدی و به‌خصوص کاشتنی‌های تحت بار

رطوبت آن خشک شود. پس از آن در هوا به مدت ۳ ساعت با مشعل تا دمای حدود ۴۰۰ درجه سانتی‌گراد سوزانده شد تا ترکیبات آلی آن تجزیه شود. ماده حاصل از این فرآیند، خاکستر سیاه‌رنگ استخوان است. سپس در دمای ۹۰۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲ ساعت تحت عملیات حرارتی قرار گرفت. ماده حاصل از این مرحله، پودر سفیدرنگ هیدروکسی آپاتیت است.

۲-۲- سنتز پودر دیوسپاید

جهت سنتز پودر دیوسپاید ($\text{CaMgSi}_2\text{O}_6$)، روش فعال‌سازی مکانیکی انتخاب شد [۱۱-۱۲]. مواد مورد نیاز عبارتند از تالک، کلسیت و سیلیکا که جهت تهیه ۱۰ گرم پودر دیوسپاید، درصد وزنی این عناصر به ترتیب ۴/۴۷، ۳/۶۷ و ۱/۵ است. مواد اولیه پس از توزین، مطابق با نسبت‌های استوکیومتری واکنش، به درون محفظه دستگاه بالمیل (آسیاب سیاره‌ای) ریخته شدند. سرعت چرخش ۶۰۰ rpm، گلوله‌هایی از جنس آلومینا، فضای آزاد کاپ یک سوم و نسبت گلوله به پودر ۱۰:۱ به‌عنوان پارامترهای دستگاه در نظر گرفته شد. این ترکیب به مدت ۱۰ ساعت فعال‌سازی مکانیکی شد و پس از آن به مدت ۳ ساعت در دمای ۱۲۰۰ درجه سانتی‌گراد حرارت داده شد.

۲-۳- ساخت داربست هیدروکسی آپاتیت طبیعی و دیوسپاید

برای ساخت داربست، ابتدا دوغاب که ترکیبی از هیدروکسی آپاتیت طبیعی، دیوسپاید و سدیم تری پلی فسفات (STPP) که روانساز است، استفاده شد و مقدار ۱ درصد وزنی از پودر کربوکسی متیل سلولز (CMC) به‌عنوان پیونددهنده اضافه گردید. دوغاب با سرعت ۳۰۰ دور در دقیقه به مدت ۳۰ دقیقه و دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد، همزده شد تا محلولی به‌صورت همگن به دست آید. در مرحله بعد، اسفنج پلی یورتان برش داده شده به ابعاد ۱*۱*۱ سانتی‌متر مکعب به آرامی درون دوغاب فرو برده شد. سپس نمونه‌ها به مدت ۲۴ ساعت درون

و انواع داربست‌ها باشد [۷-۸]. از طرف دیگر، تهیه داربست با زمینه‌های مختلف نیازمند به‌کارگیری روش‌های ساخت متفاوتی است که هر یک شیوه و کاربرد منحصر به فرد خود را دارد. از جمله روش‌های ساخت داربست، قالب‌گیری حلال، جداسازی فاز، الکترورسی، پرینت سه‌بعدی و روش تکرار اسفنج پلیمری است. ساخت داربست با هر کدام از روش‌های فوق منوط به این است که با توجه به تحقیقات و مطالعات قبلی انجام شده به تعداد دفعات، نمونه‌های داربست ساخته شود و بعد از بررسی‌ها و مقایسه نتایج آزمایشات، حالت بهینه و ایده-آل انتخاب گردد. لذا استفاده از نرم‌افزارهای آماری از جمله روش رویه پاسخ، به محقق کمک می‌کند که در انجام تحقیقات با صرف زمان و هزینه کمتر به نتایج بهینه مطلوب‌تری دسترسی پیدا کند. در این تحقیق ساخت داربست کامپوزیتی پایه سرامیکی (هیدروکسی آپاتیت و دیوسپاید)، به روش تکرار پلیمر^۳ و با استفاده از نرم‌افزار آماری Central Composite Design انجام شد. پس از ساخت داربست و تعیین در صد تخلخل که همان پاسخ مسئله است، نرم‌افزار آماری با توجه به معناداری داده‌ها یک مدل ریاضی معرفی کرده و نمونه بهینه انتخاب و برهم‌کنش داده‌های مؤثر بررسی گردید. تحقیقات گسترده در رابطه با ساخت داربست‌ها به‌خصوص داربست بر پایه هیدروکسی آپاتیت و داربست دیوسپاید انجام شده است [۹]. ولی ترکیب کامپوزیتی این دو، در ساخت داربست و استفاده از روش رویه پاسخ در تعیین ترکیب بهینه این دو بیوسرامیک تاکنون مطرح نشده است.

۲- مواد و روش‌ها

۲-۱- سنتز هیدروکسی آپاتیت طبیعی

جهت سنتز هیدروکسی آپاتیت طبیعی $(\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2)$ ، طبق مطالعاتی که در گذشته انجام شده [۱۰]، ابتدا استخوان ران گوساله به مدت ۲ ساعت در آب جوشانده شد تا گوشت و چربی‌های متصل به آن جدا شود. سپس استخوان‌ها به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۶۰ درجه سانتی‌گراد قرار داده شد تا

نهایت، حجم نهایی داربست از رابطه (۱) و مقدار تخلخل باز داربست (E) از رابطه (۲) به دست می‌آیند [۱۴].

$$V = (V2 - V1) + (V1 - V3) = V2 - V3 \quad (1)$$

$$E = V1 - V3 / V2 - V3 \quad (2)$$

۲-۵- طراحی آزمایش

برای به دست آوردن شرایط بهینه جهت دستیابی به بیشترین تخلخل داربست، سه فاکتور کمی و محدوده، شامل روانساز (۳/۸-۰/۰ درصد)، دمای عملیات حرارتی (۱۳۰۰-۱۱۰۰ درجه سانتی‌گراد) و هیدروکسی آپاتیت (۹۰-۷۰ درصد)، مورد توجه قرار گرفتند. بهینه‌سازی به‌طور هم‌زمان و طراحی آن توسط نرم‌افزار Design Expert (ورژن ۷) انجام شد. سپس شرایط بهینه برای هر کدام از پارامترها و معادله کلی واکنش به دست آمد. جدول (۱) فاکتورهای اصلی و علائم اختصاری آنها را نشان می‌دهند. بر این اساس ۲۰ آزمایش طراحی گردید و همه آنها در یک دسته بر اساس CCD انجام شد. نتایج به‌دست‌آمده از آزمایش‌های انجام شده در جدول (۱) نشان داده شده است. در این طراحی برهم‌کنش‌های اصلی و اثرات مضاعف عوامل مورد ارزیابی قرار گرفت.

جدول (۱): طراحی و نتایج تخلخل پس از ساخت داربست‌های پیشنهادی

نرم‌افزار Design Expert

Run	Factor1 A:STPP	Factor2 B:Temperature	Factor3 C:nHA	Response: Porosity%
1	0.55	1200	80	86
2	0.30	1100	90	78
3	0.55	1368.18	80	69
4	0.13	1200	80	72
5	0.30	1100	70	75
6	0.80	1300	90	77
7	0.55	1200	80	85
8	0.55	1200	96.82	74
9	0.55	1200	63.18	77
10	0.30	1300	70	68
11	0.80	1100	70	80
12	0.55	1200	80	85
13	0.55	1200	80	82
14	0.55	1200	80	85
15	0.80	1300	70	75
16	0.80	1100	90	80
17	0.30	1300	90	68.3
18	0.55	1200	80	85
19	0.55	1031.82	80	77
20	0.97	1200	80	88

محیط خلأ خشک شده و پس از آن تحت عملیات حرارتی قرار گرفت. دمای عملیات حرارتی نقطه بهینه با توجه به پیشنهاد نرم‌افزار آماری ۱۲۰۰ درجه سانتی‌گراد تعیین گردید.

۲-۴- مشخصه یابی نمونه‌ها

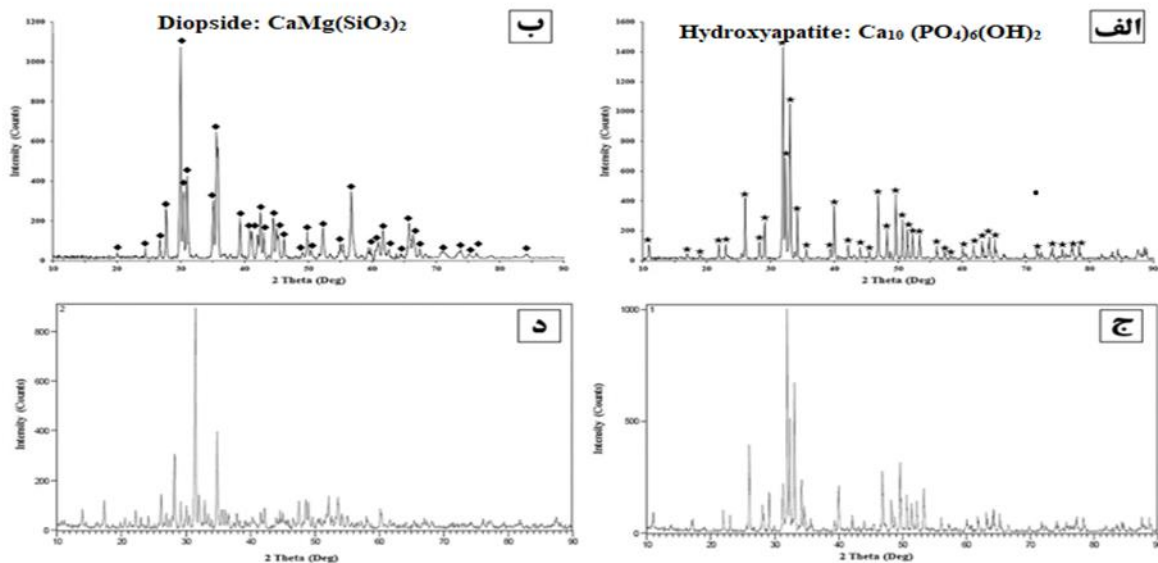
برای بررسی تغییرات ساختاری و مطالعه فازها از روش پراش پرتو ایکس (XRD, Philips X Pert) استفاده شد. برای آنالیز از تابش پرتو CuKα استفاده شد. زاویه پراش (2θ) از ۱۰ تا ۹۰ درجه انتخاب گردید. پراش پرتو ایکس برای دی‌پوساید، هیدروکسی آپاتیت طبیعی و داربست کامپوزیتی بهینه هیدروکسی آپاتیت و دی‌پوساید انجام شد. به‌منظور بررسی حضور گروه‌های عاملی موجود در نانو کریستال‌های هیدروکسی آپاتیت و دی‌پوساید و همچنین چگونگی اثربخشی این گروه‌ها به هنگام ترکیب این مواد با یکدیگر در داربست کامپوزیتی هیدروکسی آپاتیت و دی‌پوساید، آزمون FT-IR انجام شد. این آزمون با دستگاه ساخت شرکت PerkinElmer Spectrum 65 در محدوده 4000 تا 300 cm^{-1} انجام شد. تخلخل و مورفولوژی داربست‌های بهینه با دستگاه میکروسکوپ الکترونی نشر میدانی مدل MIRA3 ساخت شرکت TESCAN انجام گرفت. اندازه‌گیری تخلخل، اطلاعاتی در مورد اندازه و توزیع منافذ، نفوذپذیری و حضور عیوب ساختاری در ساختارهای سرامیکی تف جوشی شده ارائه می‌دهد [۱۳]. برای محاسبه درصد تخلخل داربست‌ها از روش جابجایی مایع (قانون ارشمیدس) به شرح ذیل استفاده شد. بدین منظور اتانول ۹۶٪ درون استوانه مدرج ریخته و حجم (V1) آن اندازه‌گیری می‌شود. اتانول به‌راحتی درون تخلخل‌های ریز نفوذ می‌کند. سپس، نمونه را درون اتانول به مدت ۵ دقیقه قرار داده تا کاملاً از اتانول اشباع شود که با V2 نشان داده می‌شود. تفاوت حجم (V1-V2)، حجم داربست است. داربست آغشته به اتانول از درون استوانه مدرج خارج شده و مقدار حجم باقیمانده با V3 نشان داده می‌شود. مقدار V1-V3، حجم اتانول جذب شده توسط داربست است. در

۳- نتایج و بحث

۳-۱- نتایج پراش اشعه ایکس (XRD)

به فاز دیوپساید هستند. شکل (۱-ج)، طیف XRD مربوط به داربست هیدروکسی آپاتیت را نشان می‌دهد. پیک‌های اصلی پراش در محدوده ۳۰ تا ۳۵ درجه قرار گرفته که مطابقت کامل با استاندارد JCPDS:9-432 دارد. شکل (۱-د)، مربوط به داربست کامپوزیتی هیدروکسی آپاتیت/ دیوپساید بوده که پیک‌ها نشان‌دهنده حضور فازهای هیدروکسی آپاتیت و دیوپساید بوده است.

شکل (۱-الف)، طیف XRD پودر هیدروکسی آپاتیت طبیعی زینتر شده در دمای ۹۰۰ درجه سانتی‌گراد را نشان می‌دهد. طبق استاندارد، همه قله‌ها مربوط به هیدروکسی آپاتیت است. شکل (۱-ب) طیف XRD پودر دیوپساید سنتز شده به روش فعال‌سازی مکانیکی را نشان می‌دهد که تمامی پیک‌ها مربوط



۳-۳- آنالیز واریانس (ANOVA)

برای پیدا کردن مهم‌ترین برهم‌کنش‌ها، آنالیز واریانس (ANOVA) با استفاده از نرم‌افزار Design Expert (ورژن ۷) انجام شد. همان‌طور که قبلاً نیز عنوان گردید، تخلخل داربست در هر آزمایش به‌عنوان پاسخ در نظر گرفته شده است. مدل تجربی نهایی برای تخلخل داربست کامپوزیتی هیدروکسی آپاتیت/ دیوپساید برحسب علائم اختصاری عوامل مؤثر به‌وسیله رابطه (۳) بیان گردید.

$$Porosity = 84.68 + 3.63A - 2.79B + 0.019C + 1.09AB - 1.75A^2 - 4.23B^2 - 3.34C^2 \quad (3)$$

برای ارزیابی مدل از پارامترهای مجذور ضریب همبستگی (R^2)، مجذور ضریب همبستگی تصحیح شده (R^2_{adj}) و مجذور ضریب همبستگی پیش‌بینی شده (R^2_{pred}) استفاده شده است که هرکدام از آن‌ها توسط مدل به‌دست آمده است. پارامترهای آماری محاسبه شده در جدول (۲) آورده شده است.

جدول (۲): ارزیابی آماری مدل با R^2

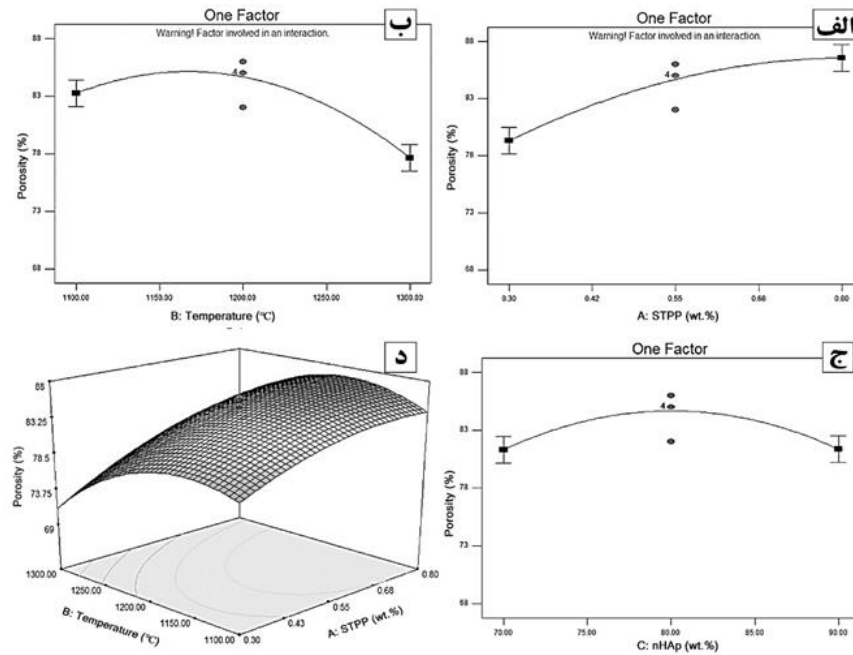
R^2	Adjusted R^2	Predicted R^2	Adequate precision
0.9520	0.9241	0.8133	16.670

دقت مناسب بر اساس سیگنال به نویز محاسبه شده که برای این پارامتر نسبت بزرگ‌تر از چهار مناسب است. جدول (۲) نشان‌دهنده این امر است که سیگنال‌ها به‌اندازه کافی قوی بوده و هم‌چنین اختلاف R^2 و R^2_{adj} نیز کم است که مناسب و مورد تأیید است. برای بررسی پارامترهای تأثیرگذار و با معنی بودن مدل از مقدار پارامتر p استفاده گردید. اگر مقدار p-value کمتر از ۰/۰۰۵ باشد، فاکتورها به‌صورت با اثر و در صورتی که بالاتر از ۰/۱ باشد به‌صورت بی‌معنی یا بی‌اثر تعریف می‌شوند. میزان عدم انطباق LOF فاکتوری است که برای مناسب بودن مدل مورد استفاده قرار گرفته است. این فاکتور نشان‌دهنده این است که داده‌ها تا چه میزان توانسته‌اند بر روی مدل پیشنهادی انطباق پیدا کنند و یا اینکه میزان عدم انطباق به چه میزان است. در نتیجه LOF به‌دست آمده برای مدل‌های پیشنهادی نباید معنی‌دار یا اثرگذار باشد.

در جدول (۳) آنالیز واریانس داده‌های آماری آورده شده است. همان‌طور که در این جدول مشاهده می‌شود، مدل مؤثر است و به این معنا است که فاکتورهای مورد مطالعه در مدل اثرگذار هستند. از آنجایی که فقدان برازش (LOF) به‌صورت بی‌اثر است در نتیجه مدل را می‌توان با داده‌های واقعی برازش کرد.

جدول (۳): آنالیز واریانس داده‌های آماری مدل

Source	Sum of Squares	df	Square Mean	F-value	p-value, Prob>F	
Model	695.10	7	99.30	34.04	< 0.0001	significant
A-STPP	180.20	1	180.20	61.77	< 0.0001	
B-Temperature	106.60	1	106.60	36.54	< 0.0001	
C-nHAp	4.747E-003	1	4.747E-003	1.627E-003	0.9685	
AB	9.46		9.46	3.24	0.0969	
A ²	44.29	1	44.29	15.18	0.0021	
B ²	257.60	1	257.60	88.30	< 0.0001	
C ²	161.15	1	161.15	55.24	< 0.0001	
Residual	35.01	12	2.92			
Lack of Fit	25.68	7	3.67	1.96	0.2373	
Pure Error	9.33	5	1.87			insignificant
Cor Total	730.11	19	99.30			
Model	695.10	7				

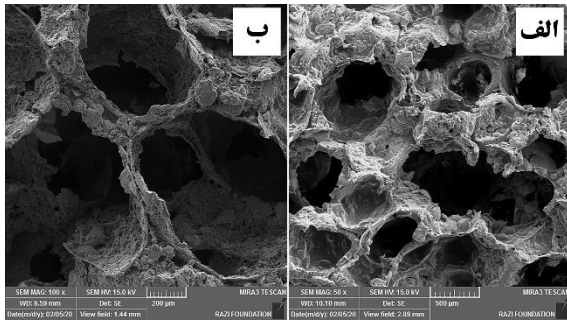


شکل (۳): نمودارهای RSM حاصل از آنالیز آماری با بررسی تأثیر (الف) روانساز، (ب) عملیات حرارتی، (ج) درصد هیدروکسی آپاتیت و (د) سطح پاسخ برهم کنش دو فاکتور روانساز و دما بر تخلخل

۱-۳-۳- نمودارهای رویه پاسخ و فاکتورهای مؤثر

نمودار رویه پاسخ سه بعدی به منظور مطالعه اثرات سه عامل انتخاب شده و تمام برهم کنش‌های مؤثر آن‌ها در CCD رسم شده است. بر اساس نتایج ANOVA، هر سه فاکتور مورد بررسی یعنی درصد روانساز، درصد هیدروکسی آپاتیت و دمای عملیات حرارتی و برهم‌کنش عملیات حرارتی و درصد روانساز، عواملی مؤثر در میزان تخلخل داربست است. شکل (۳-الف) تأثیر روانساز STPP بر روی تخلخل را نشان می‌دهد با افزایش درصد روانساز میزان تخلخل افزایش یافته که به خوبی این روند در شکل قابل مشاهده است. طبق شکل (۳-ب) که تأثیر دما بر روی تخلخل را نشان می‌دهد با افزایش دما تا ۱۲۰۰ درجه سانتی‌گراد افزایش تخلخل مشاهده می‌شود و بعد از دمای ۱۲۰۰ درجه، کاهش میزان درصد تخلخل مشاهده می‌شود. در شکل (۳-ج) تأثیر درصد هیدروکسی آپاتیت طبیعی با میزان تخلخل نشان داده شده که در محدوده ۷۸ تا ۸۳ درصد هیدروکسی آپاتیت طبیعی میزان تخلخل ۸۳ تا ۸۵ درصد است و خارج از این محدوده میزان تخلخل کمتر از ۸۰

درصد نشان داده شده است. شکل (۳-د) بیانگر برهم‌کنش عملیات حرارتی و درصد روانساز است. همان‌طور که از شکل (۳-د) مشخص است، در این نمودار دو عامل در حال تغییر و عامل دیگر در سطح میانی ثابت نگه‌داشته شده است. میزان تخلخل داربست با افزایش میزان روانساز به شکل محسوسی افزایش یافته است. بیشترین میزان تخلخل داربست در شرایطی حاصل می‌شود که میزان روانساز و دمای عملیات حرارتی تقریباً در میانه مقدار محدوده مورد مطالعه باشد. برهم‌کنش دمای عملیات حرارتی و درصد روانساز مصرفی در نمودار سه بعدی شکل (۳-د)، میزان ۰/۶۴ درصد روانساز (STPP) و دمای ۱۲۰۰ درجه سانتی‌گراد را با در نظر گرفتن تخلخل ایده‌آل برای ساخت داربست که بالای ۸۳ درصد می‌باشد را به وضوح نشان می‌دهد. در تحقیقات گذشته نیز تأثیر فاکتورهای مختلف از جمله دما و روانساز بر تخلخل داربست‌های پایه سرامیکی مورد بررسی قرار گرفته که نشان می‌دهد افزایش درصد روانساز، میزان تخلخل را افزایش داده و



شکل (۴): تصویر SEM داربست بهینه هیدروکسی آپاتیت /دیوپساید با

بزرگنمایی (الف) ۵۰ X و (ب) ۱۰۰ X

۳-۵- تخلخل

همان طور که در جدول (۵) مشاهده می شود تخلخل محاسبه شده در شرایط بهینه اختلاف کمی با تخلخل پیشنهادی توسط نرم افزار در شرایط بهینه دارند.

جدول (۵): مقایسه تخلخل پیشنهاد شده با تخلخل تجربی

نمونه بهینه پیشنهادی	مقدار nHA (%)	مقدار Di (%)	مقدار STPP (%)	دما (°C)	تخلخل پیش بینی شده (%)	تخلخل محاسبه شده (%)
۱	۷۷/۵۷	۲۲/۴۳	۰/۶۴	۱۲۰۰	۸۴/۴۰	۸۳/۷۸

۴- نتیجه گیری

در این تحقیق به منظور پیدا کردن عوامل مؤثر بر روی تخلخل داربست کامپوزیتی هیدروکسی آپاتیت /دیوپساید از طراحی آزمایش و روش Central Composite Design (CCD) استفاده شد. نتایج به دست آمده نشان داد که درصد روانساز، درصد هیدروکسی آپاتیت و دمای عملیات حرارتی و برهم کنش دو عامل (دما و روانساز)، بر روی تخلخل داربست مؤثر بوده اند. برای تأیید قدرت پیش بینی مدل به دست آمده آزمایش هایی تحت شرایط بهینه معرفی شده توسط روش CCD انجام گرفت و نتایج حاصل نشان داد که:

۱- اختلاف بسیار اندکی (۰/۰۹۴ درصد) بین پاسخ یعنی تخلخل به دست آمده و تخلخل پیش بینی شده توسط مدل وجود دارد.

۲- با افزایش درصد روانساز، تخلخل افزایش می یابد و نقطه بهینه ۰/۶۴ درصد است.

افزایش دمای عملیات حرارتی، ابتدا تخلخل را افزایش و سپس کاهش می دهد [۱۷-۱۵].

۳-۳-۲- ارزیابی مدل

با توجه به در نظر گرفتن سه فاکتور مؤثر بر تخلخل داربست، یعنی درصد روانساز، دمای عملیات حرارتی و درصد هیدروکسی آپاتیت، شرایط بهینه بر اساس مدل پیشنهادی با کمک نرم افزار Experimental Design به دست آمد و مقادیر پیش بینی شده توسط مدل با مقادیر به دست آمده در آزمایش مقایسه گردید. همان طور که در جدول (۴) نشان داده شده است، میزان تخلخل به دست آمده برای داربست در شرایط بهینه ۸۴/۴۸ با درصد خطای ۰/۰۹۴ بوده است که بسیار نزدیک به مقدار پیش بینی شده (۸۴/۴۰) توسط مدل است. درصد خطا از رابطه (۴) محاسبه گردید.

جدول (۴): ارزیابی صحت مدل

STPP	Temperature	nHAp	Rejection rate (%)		
			Actual	Predicted	Error (%)
0.64	1200	77.57	84.48	84.40	0.094

$$(۴) \quad \text{مقدار پیش بینی شده} - \text{مقدار واقعی} = \frac{\text{مقدار واقعی}}{\text{مقدار واقعی}} \times 100 = \text{درصد خطا} (\%)$$

۳-۴- آنالیز SEM

شکل (۴) تصاویر میکروسکوپ الکترونی روبشی (FE-SEM) داربست بهینه پیشنهادی نرم افزار آماری Design expert را نشان می دهد. داربست بهینه با ۷۷/۵۷ درصد هیدروکسی آپاتیت (۲۲/۴۳ درصد دیوپساید)، ۰/۶۴ درصد روانساز STPP (سدیم تری پلی فسفات) و دمای عملیات حرارتی ۱۲۰۰ معرفی شده و تخلخل تخمین زده شده ۸۴/۴۰ است که علاوه بر نزدیک بودن تخلخل محاسبه شده با تخمین زده شده (۰/۰۹۴ درصد خطا) تخلخل در تصاویر تأیید کننده مناسب بودن داربست بهینه پیشنهادی است.

forsterite bioceramics", International Journal of Modern Physics B, vol. 22, no. 18,19, pp. 3082-3091, 2008.

[6] X. Ren, Q. Tuo, K. Tian, G. Huang, J. Li, T. Xu, X. Lv, J. Wu, Z. Chen & J. Weng, "Enhancement of osteogenesis using a novel porous hydroxyapatite scaffold in vivo and vitro", Ceramics International, vol. 44, no. 17, pp. 21656-21665, 2018.

[7] س. راهوی، ا. منشی، ر.ا. عمادی و م. فتحی، "بررسی و مشخصه یابی هیدروکسی آپاتیت نانوکریستال مشتق از استخوان انسان"، اولین همایش ملی نانومواد و نانو تکنولوژی، شاهرود، سیولیکا، دانشگاه آزاد اسلامی واحد شاهرود، ۱۳۹۰.

[8] M. Zhang, C. Liu, J. Sun & X. Zhang, "Hydroxyapatite/diopside ceramic composites and their behaviour in simulated body fluid", Ceramics International, vol. 37, no. 6, pp. 2025-2029, 2011.

[9] S. Sadeghzade & R. Emadi, "Improving the mechanical and bioactivity of hydroxyapatite porous scaffold ceramic with diopside/forstrite ceramic coating", Nanomedicine Journal, vol. 6, no. 1, pp. 50-54, 2019.

[۱۰] م. فروغی، ب.ن. تبریزی، س. کرباسی و ر. ابراهیمی کهریزسنگی، "مقایسه ساختاری هیدروکسی آپاتیت نانو کریستال طبیعی و سنتز شده". هفدهمین کنفرانس مهندسی پزشکی ایران، اصفهان، انجمن مهندسی پزشکی ایران، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، ۱۳۸۹.

[11] A. Kazemi, M. Abdellahi, A. Khajeh-Sharafabadi, A. Khandan & N. Ozada, "Study of in vitro bioactivity and mechanical properties of diopside nano-bioceramic synthesized by a facile method using eggshell as raw material", Materials Science and Engineering: C, vol. 71 pp. 604-610, 2017.

[12] T. Nonami, "In vivo and in vitro testing of diopside for biomaterial", Journal of the Society of Materials Engineering for Resources of Japan, vol. 8, no. 2, pp. 12-18, 1996.

[13] R. Hodgkinson & J. Currey, "The effect of variation in structure on the Young's modulus of cancellous bone: a comparison of human and non-human material", Proceedings of the Institution of Mechanical Engineers, Part H: Journal of Engineering in Medicine, vol. 204, no. 2, pp. 115-121, 1990.

۳- افزایش دمای عملیات حرارتی تا دمای ۱۲۰۰ درجه سانتی گراد، ابتدا تخلخل را افزایش و سپس کاهش می دهد.

۴- برهم کنش دمای عملیات حرارتی و درصد روانساز (سدیم تری پلی فسفات) در نمودار سه بعدی، میزان ۰/۶۴ درصد روانساز و دمای ۱۲۰۰ درجه سانتی گراد را با در نظر گرفتن تخلخل، ایده آل برای ساخت داربست که بالای ۸۳ درصد است را تأیید می کند.

۵- حالت بهینه برای ساخت داربست کامپوزیتی، ۷۷/۵۷ درصد هیدروکسی آپاتیت، (۲۲/۴۳ درصد دیوپساید) ۰/۶۴ درصد روانساز STPP (سدیم تری پلی فسفات) و دمای عملیات حرارتی ۱۲۰۰ درجه سانتی گراد است.

۶- آزمون های FTIR و XRD نمونه بهینه نشان داد که فاز دیوپساید با موفقیت با هیدروکسی آپاتیت در داربست زینتر شده است.

۷- تصاویر SEM نمونه بهینه نیز، تأییدکننده تخلخل اندازه گیری شده با تخلخل پیش بینی شده توسط نرم افزار Design Expert است.

۵- منابع

[1] W. Suchanek & M. Yoshimura, "Processing and properties of hydroxyapatite-based biomaterials for use as hard tissue replacement implants", Journal of Materials Research, vol. 13, no. 1, pp. 94-117, 1998.

[2] S, Teixeira, M. Rodriguez, P. Pena, A. De Aza, S. De Aza, M. Ferraz & F. Monteiro, "Physical characterization of hydroxyapatite porous scaffolds for tissue engineering", Materials Science and Engineering: C, vol. 29, no. 5, pp. 1510-1514, 2009.

[۳] ن. رفیعی و ا. کرمان، "بررسی زیست فعالی نانو کامپوزیت آپاتیت طبیعی - دیوپساید متراکم سازی شده به روش زینترینگ دومرحله ای جهت مصارف پزشکی"، فرآیندهای نوین در مهندسی مواد، دوره ۱۰، شماره ۲، ۱۳۹۵.

[4] T. Nonami, "Developmental study of diopside for use as implant material", MRS Online Proceedings Library Archive, vol. 252, 1991.

[5] M. Fathi & M. Kharaziha, "Mechanochemical synthesis and characterization of nanostructure

- [14] H. R. Ramay & M. Zhang, "Preparation of porous hydroxyapatite scaffolds by combination of the gel-casting and polymer sponge methods", *Biomaterials*, vol. 24, no. 19, pp. 3293-3302, 2003.
- [15] E. Saiz, L. Gremillard, G. Menendez, P. Miranda, K. Gryn A. P. Tomsia, "Preparation of porous hydroxyapatite scaffolds", *Materials Science and Engineering: C*, vol. 27, no. 3, pp. 546-550, 2007.
- [16] F. Scalera, F. Gervaso, K. Sanosh, A. Sannino & A. Licciulli, "Influence of the calcination temperature on morphological and mechanical properties of highly porous hydroxyapatite scaffolds", *Ceramics International*, vol. 39, no. 5, pp. 4839-4846, 2013.
- [17] J. Ko, N. K. Mohtaram, F. Ahmed, A. Montgomery, M. Carlson, P. C. Lee, S. M. Willerth & M. B. Jun, "Fabrication of poly (ϵ -caprolactone) microfiber scaffolds with varying topography and mechanical properties for stem cell-based tissue engineering applications", *Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition*, vol. 25, no. 1, pp. 1-17, 2014.

۶- پی نوشت

- [1] Central Composite Design
[2] Response Surface Method
[3] Foam Replication Method
[4] Lack of Fit