

ساخت و مشخصه‌یابی خواص داربست کامپوزیتی ژلاتین – فلوئور هیدروکسی آپاتیت به منظور کاربرد در مهندسی بافت استخوان و بررسی نحوه اتصال سلولی

محمد سلطانی^۱، مردعلی یوسف‌پور^{۲*}، زهرا طاهریان^۳

^۱ دانشجوی کارشناسی ارشد مهندسی مواد، دانشکده مهندسی مواد و متالورژی، دانشگاه سمنان، سمنان، ایران

^۲ دانشیار گروه مهندسی مواد، دانشکده مهندسی مواد و متالورژی، دانشگاه سمنان، سمنان، ایران

^۳ دکتری مهندسی مواد، دانشکده مهندسی مواد و متالورژی، دانشگاه سمنان، سمنان، ایران

تاریخ ارائه مقاله: ۹۷/۸/۵ – تاریخ پذیرش: ۹۸/۲/۴

Synthesis and Characterization Properties of Gelatin-Fluorhydroxyapatite Composite Scaffold for Application in Bone Tissue Engineering and Investigation of Cellular Attachment

Mohammad Soltani¹, Mardali Yousefpor^{2*}, Zahra Taherian³

¹ Master Student in Materials Engineering, Faculty of Materials & Metallurgical Engineering, Semnan University, Semnan, Iran

² Associate Professor of Materials Engineering, Faculty of Materials & Metallurgical Engineering, Semnan University, Semnan, Iran

³ Ph.D of Materials Engineering, Faculty of Materials & Metallurgical Engineering, Semnan University, Semnan, Iran

Received: 27 October 2018; Accepted: 24 April 2019

Introduction: Bone injuries are among the challenges of medical science that each year has high costs for treatment in the world. Fluorhydroxyapatite plays an important role in promoting the integration of bones and dental implants, increasing bone density and calcium levels, and accelerating the recovery of bone fractures.

Materials and Methods: In this study, fluorhydroxyapatite powder and composite scaffolds with different weight percentages (40, 50, and 60) of fluorhydroxyapatite were fabricated through co-precipitation and freeze drying mechanisms, respectively. In order to investigate the microscopic properties of composite scaffolds, scanning electron microscopy was used. Also, X-ray diffraction (XRD) and Fourier transform infrared (FTIR) spectroscopy tests were used to evaluate the purity of the manufactured specimens. In addition, in order to evaluate the biological properties of composite scaffolds, MTT and alkaline phosphatase (ALP) tests were used, and finally, the strength of scaffolds and the rate of water absorption were studied. Data analysis was performed using one-way analysis of variance.

Results: Microscopic investigations indicated a porous microstructure with pore diameters within the range of 100-350 μm , which is acceptable for osteoblastic cells to grow and proliferate. Also, the results of FTIR and XRD confirmed the absence of impurities in the samples. In addition, the non-toxicity of the produced specimens and the proper functioning of the bone cells were confirmed through MTT assay (after 3 and 7 days) and ALP activity (after 3, 7, and 14 days), respectively. Accordingly, the scaffold with 60 wt% of fluorhydroxyapatite showed more biocompatibility and ALP activity than the other two scaffolds. Also, the average of Young's modulus and yield strength for the samples were 40 and 7 MPa, which are acceptable for use in bone tissue engineering.

Conclusion: The results showed that the application of fluorhydroxyapatite with gelatin not only improves biological properties but also improves the mechanical properties of the scaffold. Additionally, the obtained results emphasized the potential use of prepared scaffolds to repair bone tissue.

Key words: Gelatin, Fluorhydroxyapatite, Composite, Bone scaffold.

*Corresponding Author: myousefpor@semnan.ac.ir

J Mash Dent Sch 2019; 43(2): 131-47.

چکیده

مقدمه: آسیب‌های استخوانی یکی از چالش‌های علم پزشکی محسوب می‌شوند که هر ساله هزینه زیادی را در دنیا برای درمان به خود اختصاص داده‌اند. فلوئور هیدروکسی آپاتیت در ارتقاء یکپارچه‌سازی استخوان و ایمپلنت‌های دندانی، افزایش تراکم استخوان و میزان کلسیم و تسریع بهبودی شکستگی‌های استخوانی نقش موثری را ایفا می‌کنند.

* مولف مسؤول، نشانی: سمنان، دانشکده مهندسی مواد و متالورژی، تلفن: ۰۹۱۲۷۲۲۴۳۱۳

E-mail: myousefpor@semnan.ac.ir

مواد و روش‌ها: در این تحقیق پودر فلوئورهیدروکسی آپاتیت و داربست‌های کامپوزیتی با درصد‌های وزنی متفاوت (۴۰، ۵۰ و ۶۰) از فلوئورهیدروکسی آپاتیت به ترتیب با استفاده از مکانیزم‌های هم رسوبی و خشک‌سازی انجمادی ساخته شدند. برای بررسی خواص میکروسکوپی داربست‌های کامپوزیتی از میکروسکوپ الکترونی روبشی استفاده شد. همچنین آزمون‌های XRD و FTIR برای ارزیابی خلوص نمونه‌های ساخته شده به کار گرفته شدند. علاوه بر این، به منظور ارزیابی خواص بیولوژیکی داربست‌های کامپوزیتی آزمون‌های MTT و ALP مورد استفاده قرار گرفتند و در نهایت استحکام داربست‌ها و میزان جذب آب در آن‌ها مورد مطالعه قرار گرفت. تجزیه تحلیل داده‌ها با استفاده از ANOVA یک طرفه انجام گرفت.

یافته‌ها: تحقیقات میکروسکوپی نشان دهنده یک میکروساختار متخلخل با قطر منافذ در محدوده ۱۰۰-۳۵۰ میکرومتر می‌باشند که برای رشد و تکثیر سلول‌های استئوبلاست قابل قبول است. علاوه بر این، نتایج حاصل از XRD و FTIR عدم وجود ناخالصی در نمونه‌ها را تایید کردند. همچنین عدم سمیت نمونه‌ها و فعالیت مناسب سلول‌های استخوانی با استفاده از آزمون سنجش سمیت‌زایی (بعد از ۳ و ۷ روز) و آلکالین فسفاتاز (بعد از ۳، ۷ و ۱۴ روز) تایید شد، بطوریکه داربست با ۶۰ درصد وزنی فلوئورهیدروکسی آپاتیت زیست سازگاری و فعالیت آلکالین فسفاتازی بیشتری را در مقایسه با دو داربست دیگر نشان داد. علاوه بر این، مدول یانگ و استحکام شکست به طور میانگین برای نمونه‌ها ۴۰ و ۷ مگا پاسکال بدست آمد که برای کاربرد در مهندسی بافت استخوان مناسب است.

نتیجه‌گیری: نتایج نشان دادند که بکارگیری فلوئور هیدروکسی آپاتیت در کنار ژلاتین نه تنها خواص بیولوژیکی بلکه خواص مکانیکی داربست را نیز بهبود می‌بخشد. علاوه بر این، نتایج بدست آمده قابلیت بالقوه استفاده از داربست‌های ساخته شده برای ترمیم بافت استخوان را تاکید می‌کنند.

کلمات کلیدی: ژلاتین، فلوئورهیدروکسی آپاتیت، کامپوزیت، داربست استخوانی.

مجله دانشکده دندانپزشکی مشهد / سال ۱۳۹۸ دوره ۴۳ / شماره ۲: ۴۷-۱۳۱.

مقدمه

بیومتریال‌های نوینی برای این منظور به جامعه پزشکی معرفی گردید. به طور کلی مهندسی بافت را می‌توان تحت عنوان کاربرد اصول علمی جهت طراحی، ساخت، اصلاح، رشد و ابقاء بافت‌های زنده بدن تعریف نمود که به موجب آن خواص یک بیومتریال به گونه‌ای دستخوش تغییرات قرار می‌گیرد که قادر به تشکیل بافت یا رهایش توده‌ای از سلول‌ها به داخل بدن میزبان باشد و نهایتاً منجر به تشکیل بافت جدید گردد.^(۶-۷) بنابراین می‌توان گفت که روش مهندسی بافت استخوان بر اساس بکارگیری بیومتریال‌های تخریب پذیر استوار است و علیرغم تنوعی که دارد، غالباً از یک قاعده کلی تبعیت می‌کند که مراحل آن ساخت یک داربست یا حامل تخریب پذیر، بارگذاری سلول‌ها، داروها، پروتئین‌های رشد و بطور عموم عوامل برانگیزنده رشد استخوان و در نهایت کاشت موثر مجموعه در موضع مورد نظر را شامل می‌شود.^(۷)

داربست متخلخل در درون بدن شروع به تخریب شدن می‌نماید و همزمان با آن، سلول‌های کشت شده در داخل

مهندسی بافت، علمی میان رشته‌ای است که با بکارگیری قوانین مهندسی و علوم بیولوژی، رویکردی نوین جهت ترمیم بافت‌های طبیعی بدن، ارائه می‌دهد.^(۱و۲) در مهندسی بافت، وجود داربست زیست تقلیدی مناسب، برای بقای سلول‌ها ضروری است. داربست‌ها باید ریزمحیط طبیعی اطراف سلول‌ها را محیا کنند و از چسبندگی سلولی، لنگراندازی، تکثیر و مهاجرت سلول‌ها حمایت به عمل آورند. مدول الاستیک فلزات بالاتر از ۱۰۰GPa می‌باشد که به مراتب بالاتر از میزان سفتی استخوان متراکم خواهد بود. نتیجه این سفتی بالا، بروز پدیده حفاظت تنشی روی استخوان در حال رشد است که منجر به نازکی بافت جدید استخوانی خواهد شد و احتمال شکست مجدد آن را افزایش خواهد داد.^(۳) مشکلاتی از این قبیل، توجه بسیاری از پژوهشگران را به سوی مواد جدیدتری معطوف نمود. بدین ترتیب باب جدید موسوم به مهندسی بافت استخوان باز شد و

معدنی مینای دندان که از آپاتیت تشکیل شده است، ۰/۰۴ تا ۰/۰۷ درصد وزنی آن فلوراید بوده و تقریباً ۹۵ تا ۹۷ درصد جرم خشک مینای دندان را شامل می‌شود. یون فلئور در بزاق دهان و پلاسمای خون وجود داشته و برای رشد طبیعی دندان و استخوان‌ها ضروری می‌باشد. یون فلوراید قابلیت درمانی در ترمیم پوکی استخوان دارد چرا که با اعمال آن، جرم استخوان افزایش می‌یابد. همچنین این یون موجب تحریک فعالیت سلول‌های استخوانی در محیط برون‌تن و درون‌تن می‌شود. فلئوریدروکسی آپاتیت پایداری حرارتی و شیمیایی بهتری نسبت به هیدروکسی آپاتیت دارد که این پدیده با توجه به ساختار کریستالی هیدروکسی آپاتیت قابل توجیه است. فلئوریدروکسی آپاتیت به هنگام استفاده در جایگزین‌های استخوانی، زیست سازگاری و هدایت استخوانی خوبی را از خود به نمایش می‌گذارد.^(۱۶) نقطه قوت فسفات‌های کلسیم به خاصیت زیست سازگاری آنها برمی‌گردد که معلول تشکیل لایه غنی از کلسیم -فسفر در سطح این مواد می‌باشد.^(۱۷) وجود چنین لایه‌ای به اتصال شیمیایی میان استخوان و ایمپلنت کمک می‌کند.

تحقیقات نشان داده‌اند که با بکارگیری سرامیک‌ها در کنار مواد پلیمری، علاوه بر امکان حصول خواص مکانیکی بهتر، درجه زیست سازگاری و قابلیت استخوان سازی ایمپلنت نیز به میزان چشمگیری افزایش خواهد یافت. علاوه بر این مشکل محصولات جانبی اسیدی پلیمرها نیز برطرف خواهد شد.^(۱۸ و ۱۹) بنابراین روشن است که با بکارگیری کامپوزیت‌هایی از پلیمرهای طبیعی و سرامیک‌های فسفات کلسیمی در ساخت جایگزین‌های تخریب‌پذیر.^(۲۰-۲۲) می‌توان ماده‌ای نزدیک‌تر به خواص استخوان طبیعی فراهم نمود.

سازه به رشد و تکثیر خود ادامه می‌دهند تا اینکه نهایتاً بافت استخوانی جدید جایگزین آن می‌شود. به چنین مجموعه‌هایی مجموعه سلولی اطلاق می‌گردد. البته علاوه بر این مجموعه‌ها، از مجموعه‌های غیر سلولی نیز در مهندسی بافت استخوان استفاده شده است ولی بکارگیری مجموعه‌های سلولی عملاً نتایج مناسب‌تری را به بار می‌آورد.^(۸) در مجموعه‌های غیر سلولی خاصیت استخوان سازی توسط خود ماده ایمپلنت القاء می‌گردد لذا بیومتریال بکار رفته یا باید از قابلیت تحریک استخوان‌سازی بالایی برخوردار باشد و یا اینکه حاوی مواد برانگیزنده استخوان سازی همچون فاکتورهای رشد و پروتئین‌های زمینه خارج سلولی باشد تا موجب تشکیل استخوان در موضع گردد.^(۹)

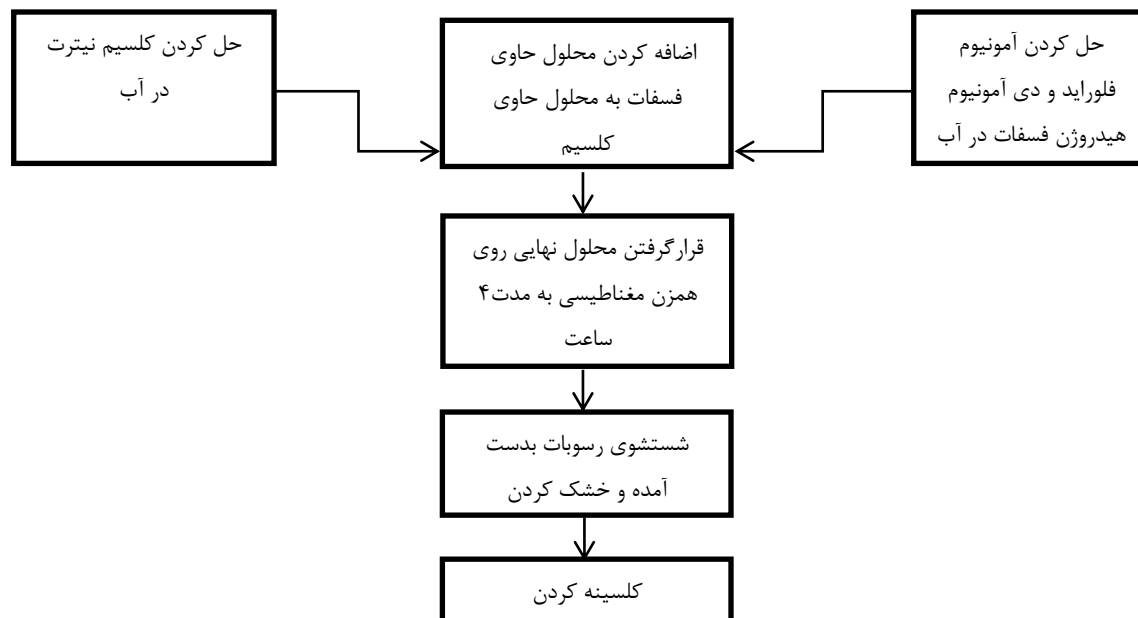
به طور کلی سه گروه پلیمرها، سرامیک‌ها و کامپوزیت‌ها نامزدهای ماده داربستی هستند. پلیمرهای طبیعی که در این زمینه بکار می‌روند، عبارتند از کلاژن یا شکل تغییر یافته آن (ژلاتین)، زمینه استخوان مینرال زدایی شده و مشتقات کیتین.^(۱۰ و ۱۱) در میان پلیمرهای مصنوعی نیز پلی لاکتیک اسید، پلی گلابکولیک اسید و کوپلیمرهای آنها از بیشترین کاربرد در مهندسی بافت استخوان برخوردارند.^(۱۵-۱۱ و ۱۷ و ۱۵)

مواد سرامیکی دسته دیگری از بیومتریال‌های بکار رفته در مهندسی بافت استخوان می‌باشند. در میان سرامیک‌هایی که در این زمینه مورد مطالعه و بررسی قرار گرفته‌اند، سرامیک‌های کلسیم فسفاتی وسیع‌ترین تحقیقات را به خود اختصاص داده‌اند که معروف‌ترین آنها عبارتند از هیدروکسی آپاتیت، تری کلسیم فسفات، تترا کلسیم فسفات و کلسیم فسفات آمورف.^(۱۶ و ۱۷) با این حال فلئوریدروکسی آپاتیت می‌تواند جایگزین مناسبی برای هیدروکسی آپاتیت باشد و نواقص آن را جبران کند. فاز

مواد و روش‌ها

برای سنتز نانوپودر فلوئورهیدروکسی آپاتیت از روش هم‌رسوبی استفاده شد. در این روش از پودرهای کلسیم نترات، دی آمونیوم هیدروژن فسفات و آمونیوم فلوراید، به عنوان مواد اولیه استفاده شد. در ابتدا پودرهای دی آمونیوم هیدروژن فسفات و آمونیوم فلوراید با نسبت مولی ۳ به ۱ در مقادیر مشخص آب مقطر حل شدند، سپس میزان pH محلول فسفاتی با استفاده از آمونیاک به ۱۱ رسید. در ادامه محلول فسفاتی به صورت قطره قطره به محلول کلسیم نترات (نسبت کلسیم به فسفر ۱/۶۷ مول) اضافه گردید. محلول حاصل پس از ۴ ساعت قرارگیری بر روی همزن مغناطیسی، از صافی عبور داده شد و رسوبات حاصل از آن با آب مقطر شست و شو داده شدند و بعد از خشک شدن، به مدت ۴۵ دقیقه و در دمای ۷۰۰ درجه سانتی‌گراد کلسینه شدند. سپس محلولی از

ژلاتین در آب مقطر دیونیزه شده با غلظت ۱۰ درصد تهیه شد. پس از انحلال کامل ژلاتین، پودر فلوئورهیدروکسی آپاتیت به محلول اضافه گردید و محلول نهایی در دمای ۶۰ درجه سانتی‌گراد و به مدت ۱ ساعت به خوبی هم زده شد تا ذرات فلوئورهیدروکسی آپاتیت به طور کاملاً یکنواخت در محلول ژلاتین پراکنده شوند. با تغییر مقادیر فلوئورهیدروکسی آپاتیت افزوده شده، نسبت‌های وزنی مختلف ۴۰، ۵۰ و ۶۰ درصد فلوئورهیدروکسی آپاتیت به ترتیب برای نمونه‌های S_1 ، S_2 و S_3 طبق جدول ۱ بدست آمد. علاوه بر این، فلوجارت تهیه نانوپودر فلوئورهیدروکسی آپاتیت که به روش هم رسوبی به منظور اختلاط با ژلاتین تهیه شد، در تصویر ۱ قابل مشاهده می‌باشد.



تصویر ۱: نمودار تهیه نانو پودر فلوئورهیدروکسی آپاتیت به روش هم‌رسوبی



تصویر ۲: تصویر داربست ژلاتین-فلوئورهیدروکسی آپاتیت
ستز شده به روش خشکایش انجمادی

جدول ۱: ترکیب شیمیایی نمونه‌ها

نمونه	درصد وزنی FHA	درصد وزنی ژلاتین
S ₁	۴۰	۶۰
S ₂	۵۰	۵۰
S ₃	۶۰	۴۰

به منظور تعیین ساختار کریستالی و ترکیب شیمیایی فلوئورهیدروکسی آپاتیت، ژلاتین و داربست‌های کامپوزیتی از روش پراش پرتو ایکس (XRD, BRUKER, D8-Advance model, Germany) استفاده شد. الگوهای پراش با پرتو CuK α و با سرعت روبش ۰/۰۰۵۸ درجه بر ثانیه در محدوده زاویه‌ای (۹۰-۱۰) تهیه شدند و شناسایی الگوها با استفاده از کارت‌های مرجع تشخیص فاز (JCPDS) انجام گرفت.

برای اطمینان از ایجاد پیوند بین گروه‌های عاملی ژلاتین و فلوئورهیدروکسی آپاتیت، مقادیر مشخص از هر نمونه آماده‌سازی شد و توسط طیف‌سنج مادون قرمز (FTIR, SHIMADZU, 8400S model, Japan) با KRS-5prism با زاویه ۴۵ درجه استفاده شد. طیف IR در محدوده طول موج ۱-۵۰۰cm تا ۴۰۰۰ پدیدار شد.

به منظور بررسی ریزساختار پودر فلوئورهیدروکسی آپاتیت ستز شده از میکروسکوپ الکترونی روبشی (SEM, Philips, XL30 model, Poland) استفاده شد. علاوه بر این از داربست‌ها و سلول‌های اتصال یافته به داربست‌ها در بزرگنمایی‌های مختلف توسط دستگاه SEM عکس گرفته شد.

سلول استخوان ساز رده MG-63 (بانک سلولی انستیتو پاستور، ایران) با استفاده از محیط کشت (DMEM, Gibco, Scotland) و افزودن ۱۰ درصد سرم جنین گوساله

سپس در دمای منفی ۵۷ درجه سانتی‌گراد و به مدت ۲۴ ساعت، نمونه‌ها تحت عملیات خشکایش انجمادی قرار گرفتند. پس از انجماد بچ ریخته شده، لایه بدست آمده به ابعاد مطلوب بریده شد و در درجه حرارت اتاق به مدت ۲۴ ساعت رها شد تا کاملاً خشک گردد. سپس هریک از قطعات حاصله به مدت دوساعت در محلول گلو تارآلدئید قرار داده شدند تا در این فاصله اتصالات عرضی لازم در شبکه ژلاتینی رخ دهد و آن را تبدیل به ژلاتین نامحلول نماید تا در اثر تماس با رطوبت دچار تغییر ساختار و خواص نشود. پس از شبکه‌ای شدن ژلاتین، نمونه‌ها جهت شست و شو و حذف بقایای گلو تارآلدئید، به مدت ۲۴ ساعت در آب مقطر شست و شو داده شدند. سپس نمونه‌ها به مدت ۸ ساعت در درجه حرارت اتاق رها شدند تا رطوبت اولیه آن‌ها گرفته شود و خشک گردند و سپس در دمای ۴۰ درجه سانتی‌گراد رطوبت نهایی نمونه‌ها گرفته شد. تصویر ۲ تصویری از داربست ژلاتین / فلوئورهیدروکسی آپاتیت می‌باشد که به روش خشکایش انجمادی تهیه شده است.

مقدار غلظت ماده حل شده در DMSO، با استفاده از دستگاه الیزا ریدر (Stat Fax-2100; GMI, Inc., Miami, FL, USA) در طول موج ۵۴۵ نانومتر محاسبه شد و در نهایت میزان زنده‌مانی سلولی از رابطه زیر بدست آمد. چاهک دارای سلول‌های بیشتر چگالی نوری (OD) بالاتری نسبت به چاهک با سلول کمتر نشان می‌دهد. بنابراین می‌توان از رابطه زیر مقدار سلول را مشخص کرد و با نمونه شاهد مقایسه نمود.

$$\text{رابطه (۱): } \frac{\text{ODs}}{\text{ODc}} = \text{درصد زنده‌مانی}$$

در رابطه (۱)، ODs برابر میانگین چگالی نوری هر نمونه در زمان مورد نظر و ODc برابر میانگین چگالی نوری گروه کنترل می‌باشد.

سنجش فعالیت آلكالین فسفاتازی داربست‌های ساخته شده در روزهای سوم، هفتم و چهاردم بعد از کشت سلولی، بر روی داربست‌ها ارزیابی شد. نمونه‌ها با استفاده از سونیکیت کردن در ۰/۵ میلی‌لیتر بافر لیزکننده یکنواخت شدند و مخلوط حاصل به مدت ۱۰ دقیقه با دور ۱۲۰۰۰ rpm در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد سانتریفیوژ گردید. مواد حاصل از تخریب سلولی با ۰/۵ میلی‌لیتر محلول بافر آلكالین مخلوط شدند. بعد از انکوبه کردن در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۵ دقیقه، ۱ میلی‌لیتر سور ۰/۵ نرمال، جهت توقف برهمکنش به مخلوط فوق، اضافه و جذب در ۴۰۵ نانومتر با استفاده از اسپکتروفتومتر اندازه‌گیری شد. فعالیت آلكالین فسفاتازی بر حسب نسبت اعداد نانومول PNP تبدیل شده در دقیقه به میلی‌گرم پروتئین کل محاسبه شد. و نهایتاً مقدار پروتئین کل با استفاده از الیزا کیت (پارس آزمون، ایران) اندازه‌گیری گردید.

(FCS, Seromed, Germany) به همراه آنتی بیوتیک به میزان 100 IU/ml پنی سیلین و 100 µg/ml استرپتومایسین (Sigma, USA) تکثیر گردید تا سلول برای دو نوع ارزیابی چسبندگی و رشد و تکثیر سلولی آماده گردد.

برای بررسی‌های زیست‌سازگاری و میزان بقاء سلول‌ها از آزمون عصاره‌گیری غیرمستقیم (MTT, Sigma, Saint Louis, USA) استفاده شد. همچنین شرایط محیط کشت تا حد امکان مشابه بدن، دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد و pH خنثی در بازه‌های زمانی ۳ و ۷ روز انجام شد. علاوه بر این، در این روش ابتدا عصاره‌گیری از نمونه‌های داربست انجام می‌گیرد. بنابراین عصاره نمونه‌های مختلف در زمان‌های مورد نظر تهیه شد. بدین صورت که به ازای هر ۵ میلی‌گرم داربست، ۱ سی‌سی محیط کشت افزوده شد و نمونه‌ها در انکوباتور تحت رطوبت ۹۵ درصد و گاز CO_2 ۵ درصد نگهداری شدند. سپس در فواصل زمانی ۳ و ۷ روز محیط خارج و به سلول‌ها اضافه گردید و مقدار مشخصی محیط کشت نیز به عنوان شاهد در نظر گرفته شد. شرایط محیط عصاره‌گیری تا حد امکان مشابه با شرایط محیط بدن است به همین منظور ابتدا 1×10^4 سلول درون پلیت کشت سلولی ۹۶ چاهکی ریخته شدند و به مدت ۲۴ ساعت در انکوباتور ۳۷ درجه سانتی‌گراد قرار گرفتند تا سلول‌ها به کف پلیت بچسبند. عصاره گرفته شده از هر نمونه به چاهک کشت افزوده و سلول‌ها به مدت ۲۴ ساعت دیگر در مجاورت این عصاره‌ها قرار گرفتند. پس از آن محیط کشت خارج شد و ۱۰۰ میکرولیتر RPMI بدون رنگ به همراه ۱۰ میکرولیتر محلول MTT با غلظت ۱۲ میلی‌مولار به هر چاهک وارد شد. پس از گذشت ۴ ساعت محلول روی سلول‌ها خارج گشت و DMSO (D2650, Sigma, Saint Louis, USA) به آن‌ها اضافه گردید تا بلورهای بنفش رنگ ایجاد شده حل شوند. سپس

آپاتیت کلسینه شده در دمای ۷۰۰ درجه سانتی‌گراد به وسیله آزمون XRD مورد بررسی قرار گرفت. با توجه به تصویر ۳ اغلب قله‌های اصلی مربوط به فاز آپاتیت از جمله قله‌های (۲۱۱)، (۰۰۲) و (۳۰۰) به وضوح دیده می‌شوند. به دلیل تشابه زیاد ساختار بلوری و ابعاد واحد شبکه، همه قله‌های فلئورآپاتیت و هیدروکسی‌آپاتیت به طور دقیق قابل تمایز از یکدیگر نیستند. نتایج نشان داد که به جز فاز آپاتیت سایر فازهای ناخواسته در ترکیب پودر تولیدی حضور ندارند. مشخص است که برخی پیک‌ها با ورود یون فلئور به ساختار آپاتیتی، به سمت زوایای بالاتر شیفت پیدا می‌کنند. شیفت پیک‌های مشخصه آپاتیت در اثر حضور یون فلئور در ساختار آپاتیت ناشی از کاهش پارامتر شبکه a در اثر جایگزینی نسبی یون فلئور به جای گروه‌های هیدروکسیل، که دارای شعاع یونی بزرگتری نسبت به یون فلئور هستند، می‌باشد. علاوه بر این همانطور که در تصویر ۳ قابل مشاهده است، الگوی پراش بدست آمده از داربست‌های کامپوزیتی نشان دهنده تشکیل نوعی فاز بلوری است ولی از آنجا که فاز آپاتیتی آمیخته با ژلاتین است شدت قله‌های بدست آمده نسبت به قله‌های فلئور هیدروکسی آپاتیت پایین هستند. بررسی قله‌های ثبت شده در مقایسه با کارت‌های XRD مربوط به ترکیبات کلسیم فسفات‌ی موجود در پایگاه داده‌ای ICDD و استفاده از نرم‌افزار شناسایی فازها که قله‌های بدست آمده را با اطلاعات ثبت شده برای ترکیبات مختلف مقایسه کرده و تحلیل می‌کند، اثبات کرد که فازهای تشکیل شده در داربست از نوع آپاتیتی، مخصوصاً فلئور هیدروکسی آپاتیت است. یک پیک وسیع تپه مانند در الگوی پراش ژلاتین در ناحیه $2\theta = 20^\circ$ نیز قابل مشاهده است که نشان دهنده ساختار کریستالی مارپیچ سه تایی در ژلاتین است و شبیه کلاژن نیز می‌باشد. (۲۴ و ۲۳)

به منظور انجام آزمون مکانیکی دستگاه انجام آنالیز مکانیکی (Zwick/Roell, Z050 model, Germany) مورد استفاده قرار گرفت. به همین منظور داربست‌های کامپوزیتی با سنباده پرداخته شده و به صورت نمونه‌های استاندارد برای آزمون استحکام مکانیکی در آمدند. سه نمونه با درصد‌های وزنی متفاوت از فلئور هیدروکسی آپاتیت (۴۰، ۵۰ و ۶۰) آماده شدند و نمودار تنش- کرنش، استحکام تسلیم، فشاری و مدول یانگ، به ترتیب رسم و اندازه‌گیری شدند.

برای محاسبه‌ی نسبت تورم، داربست‌های تهیه شده به مدت ۲۴ ساعت در آب قرار گرفتند و وزن‌گیری شدند. میزان جذب آب با توجه به فرمول زیر محاسبه گردید:

$$\text{رابطه (۲): } \frac{W_t - W_o}{W_o} = \text{میزان جذب آب}$$

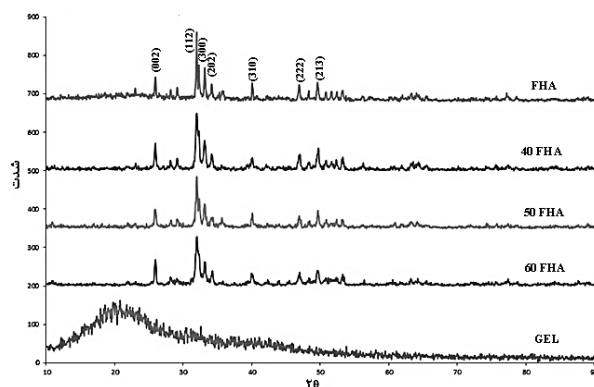
با توجه به فرمول (۲)، W_t وزن داربست متورم شده در زمان‌های مشخص و W_o وزن خشک اولیه داربست می‌باشد.

به منظور تحلیل نتایج حاصل از ارزیابی‌های زیستی، تجزیه و تحلیل آنالیز واریانس یک طرفه با استفاده از نرم افزار آماری SPSS انجام گرفت و نتایج بدست آمده بصورت نمودارهای ستونی در مایکروسافت اکسل ۲۰۱۰ رسم شدند. همچنین سطح معنی داری در آزمون‌ها $P \leq 0/05$ در نظر گرفته شد.

یافته‌ها

تصویر ۳ الگوی پراش پرتو ایکس نانوپودر فلئور هیدروکسی آپاتیت، ژلاتین و داربست‌های کامپوزیتی ژلاتین/ فلئور هیدروکسی آپاتیت را نشان می‌دهد. تغییرات فازی نانو پودر فلئور هیدروکسی

مرتبط با ارتعاشات V_1 و V_2 به ترتیب در 961 cm^{-1} و 454 cm^{-1} ظاهر شده‌اند. پیک مشاهده شده در موقعیت 745 cm^{-1} مشخصه زنجیر هیدروکسیلی است که در ساختار آپاتیت، غنی از فلوئور شده و تاییدی است بر جایگزین شدن کامل گروه‌های هیدروکسیل در ساختار آپاتیت با یون فلوئور که در نتایج سایر پژوهش‌ها نیز حضور این پیک گزارش شده است. ارتعاش V_3 از ارتعاشات مربوط به گروه‌های فسفاتی، که شدیدترین ارتعاش موجود در میان ارتعاشات معرف فسفات در ترکیب آپاتیت است، نیز در محدوده طول موج $1100-1000 \text{ cm}^{-1}$ به صورت یک پیک گسترده با شدت بالا مشاهده شد. با توجه به طیف سنجی مادون قرمز داربست‌های کامپوزیتی دسته‌ای از اعداد موجی (1450 ، 1540 ، 1650) که شاخص‌ترین آنها مربوط به آمید نوع اول و دوم است، ناشی از حضور ژلاتین بوده و اعداد موجی (1040 ، 560 cm^{-1}) مربوط به باندهای ارتوفسفات نیز حاکی از شکل‌گیری رسوب آپاتیته در میان ژلاتین است. ظهور قله در عدد موجی 1345 چنانکه در منابع دیگر هم بیان شده است، به علت شکل‌گیری پیوند مابین گروه‌های کربوکسیل از ژلاتین و یون کلسیم از آپاتیت می‌باشد. همانطور که در طیف سنجی مادون قرمز ژلاتین مشاهده می‌شود، باند موجود در ناحیه 3457 cm^{-1} مربوط به حضور آب و آمید A می‌باشد. پیک‌های موجود در 1657 ، 1544 و 1236 cm^{-1} به ترتیب مربوط به آمید I، آمید II و آمید III می‌باشند. علاوه بر این پیک‌های موجود در محدوده 1350 تا 1480 cm^{-1} مربوط به باند ارتعاشی گروه متیل می‌باشند. (۲۷-۲۵)

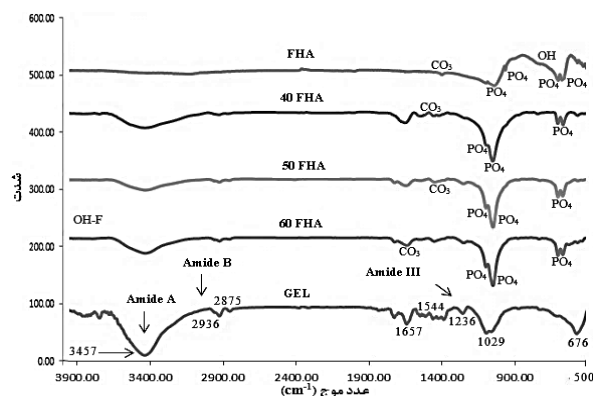


تصویر ۳: الگوی پراش پرتو ایکس نانوپودر فلوئورهیدروکسی آپاتیت، داربست‌های کامپوزیتی و ژلاتین

در تصویر ۴ نتایج آزمون FTIR برای نانوپودر فلوئورهیدروکسی آپاتیت، ژلاتین و داربست‌های کامپوزیتی با درصد‌های مختلفی از فلوئورهیدروکسی آپاتیت (۴۰ درصد فلوئورهیدروکسی آپاتیت، ۵۰ درصد فلوئورهیدروکسی آپاتیت و ۶۰ درصد فلوئورهیدروکسی آپاتیت) نمایش داده شده است. با توجه به طیف بدست آمده از پودر فلوئورهیدروکسی آپاتیت، پیک اضافی که بیان‌کننده جایگزینی گروه‌های عاملی ناخواسته در ترکیب آپاتیت یا حضور ناخالصی‌ها باشد، وجود ندارد. در فلوئورهیدروکسی آپاتیت سنتز شده ساختار آپاتیت با طول موج‌های $610-560 \text{ cm}^{-1}$ و $950-1100 \text{ cm}^{-1}$ مشاهده می‌شود. همچنین یک پیک کوچک در طول موج 960 cm^{-1} که مربوط به باند فسفاتی ساختار آپاتیت است در ساختار فلوئورهیدروکسی آپاتیت دیده می‌شود. در واقع آنچه ساختار هیدروکسی آپاتیت را از فلوئورهیدروکسی آپاتیت متمایز می‌کند، باندهای مرتبط با گروه‌های هیدروکسیل شبکه‌ای در طول موج‌های 633 cm^{-1} و 3570 cm^{-1} می‌باشد. چهار پیک مرتبط با ارتعاشات V_1 ، V_2 ، V_3 و V_4 از گروه‌های فسفاتی در ترکیب آپاتیت به روشنی قابل تشخیص هستند. پیک‌های

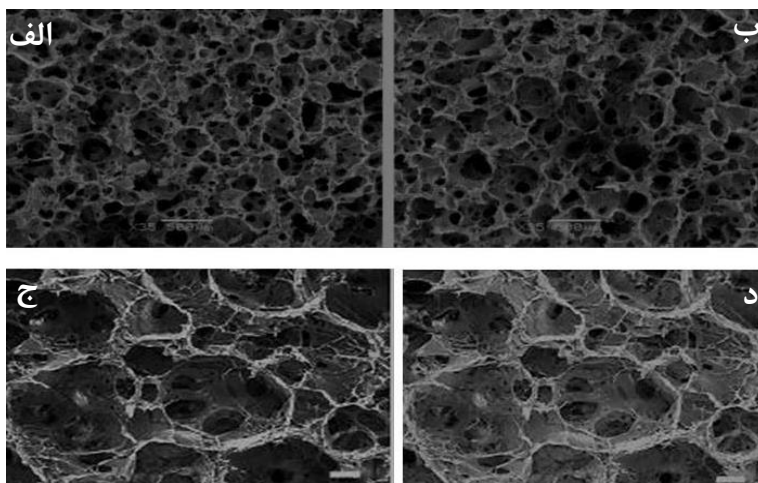
۸۱/۵۸±۳۱/۳ میکرومتر است. همان‌طور که در تصویر مشاهده می‌گردد با افزایش درصد فلوئورهیدروکسی آپاتیت در ساختار داربست، میانگین اندازه قطر تخلخل کاهش یافته است. علاوه بر این می‌توان دریافت که علت کاهش درصد تخلخل با افزایش میزان فلوئورهیدروکسی آپاتیت به ماهیت و چگونگی ایجاد تخلخل‌ها و تمایل ذاتی ژلاتین به اسفنجی شدن خودبه‌خودی در اثر انحلال در آب بر می‌گردد. میانگین اندازه قطر تخلخل در داربست ۵۰ درصد وزنی FHA و ۴۰ درصد وزنی FHA به ترتیب برابر $۹۴/۹۹ \pm ۳۴/۴۸$ و $۱۸۰/۷۵ \pm ۵۸/۵۴$ میکرومتر است، هم‌چنین پراکندگی اندازه تخلخل‌ها روی نمودار تصویر ۷ نشان می‌دهد که با افزایش میزان فلوئورهیدروکسی آپاتیت در ساختار داربست‌ها، توزیع تخلخل‌ها به سمت تخلخل‌های ریزتر نیز می‌رود. تصاویر SEM موید وجود مسیرهای ارتباطی مابین حفره‌های ایجاد شده می‌باشند و در مجموع با توجه به بازه اندازه تخلخل‌ها و ارتباط حفره‌ها به یکدیگر می‌توان گفت داربست‌های کامپوزیتی بدست آمده از این نظر، تا حد زیادی خصوصیات یک داربست مطلوب مورد استفاده در مهندسی بافت استخوان را دارند.

علاوه بر این مورفولوژی سلول‌ها پس از قرارگیری داربست‌ها به مدت ۷ روز در محیط کشت در تصویر ۸ نشان داده شده است. همان‌طور که در تمامی نمونه‌ها دیده می‌شود سلول‌ها بوسیله پایک‌های کاذب به درون تخلخل‌ها نفوذ کرده و به سطح داربست چسبیده‌اند و تشکیل لایه‌ای سلولی را داده‌اند.

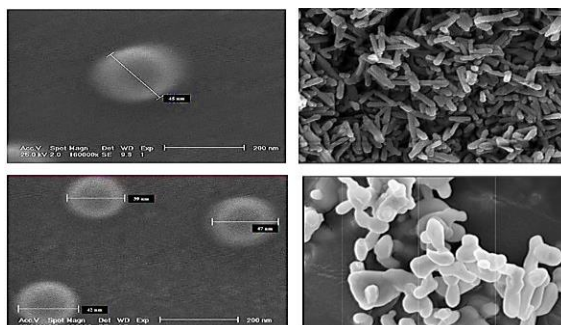


تصویر ۴: طیف‌های مادون قرمز نانوذرات نانوپودر فلوئورهیدروکسی آپاتیت، ژلاتین و داربست‌های کامپوزیتی

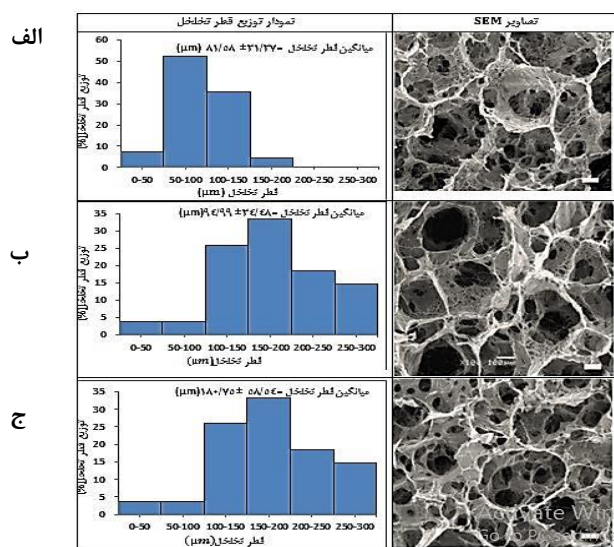
تحقیقات در زمینه مهندسی بافت نشان داده است که محدوده تخلخل بهینه برای مهندسی بافت استخوان برابر با ۱۰۰-۳۰۰ میکرومتر است. تحقیقات انجام شده و داده‌های حاصل از اندازه حفرات و پراکندگی آن‌ها بیانگر این موضوع است که داربست‌ها برای کاربردهای مهندسی بافت استخوان مناسب می‌باشند. تصاویر بدست آمده از سطح کامپوزیت‌ها، نشان دهنده وجود تخلخل بالا با حفره‌های منظم، مشابه ساختار لانه زنبوری و تقریباً هم اندازه در کنار یکدیگر و مرتبط باهم هستند. قطر تخلخل‌ها در بازه ۱۰۰ تا ۳۵۰ میکرومتر قرار می‌گیرد. تصویر ۶ تصاویر SEM از پودر فلوئورهیدروکسی آپاتیت را نشان می‌دهد. در این تصویر مشاهده می‌شود که ذرات تشکیل شده‌اند و گروهی شکل هستند و در بعضی نقاط حالت توده‌ای پیدا کرده‌اند. نتایج بدست آمده از تصاویر SEM در تصویر ۵ و ۷ و آنالیز داده‌ها با استفاده از نرم‌افزار Image J نشان می‌دهد که در داربست با بیشترین درصد فلوئورهیدروکسی آپاتیت میانگین قطر تخلخل برابر با



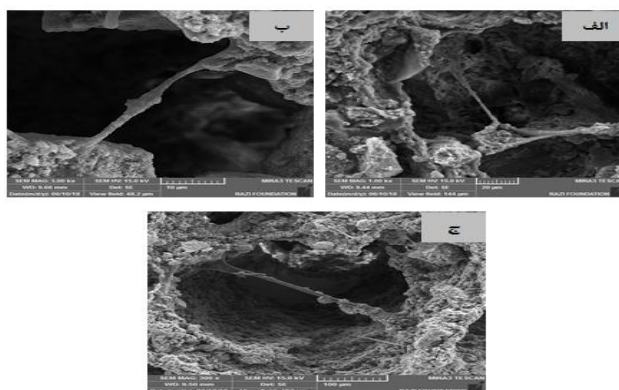
تصویر ۵ : تصاویر میکروسکوپ الکترونی روبشی داربست‌های کامپوزیتی. الف و ب به ترتیب مربوط به تصاویر مقاطع افقی و عمودی داربست‌ها می‌باشند. ج و د نیز مربوط به مقاطع مشخصی از داربست‌های کامپوزیتی می‌باشند



تصویر ۶ : تصاویر میکروسکوپ الکترونی روبشی از نانو پودر فلوئورهیدروکسی آپاتیت کلسینه شده در دمای ۷۰۰ درجه سانتی‌گراد



تصویر ۷ : نمودار توزیع قطر تخلخل و تصاویر SEM از داربست‌ها. الف) ۴۰ درصد وزنی فلوئورهیدروکسی آپاتیت، ب) ۵۰ درصد وزنی فلوئورهیدروکسی آپاتیت و ج) ۶۰ درصد وزنی فلوئورهیدروکسی آپاتیت

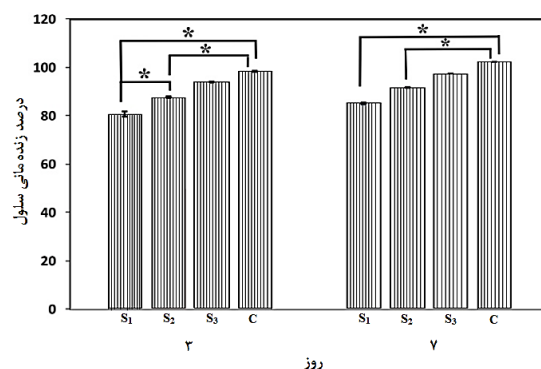


تصویر ۸: تصاویر SEM چسبندگی سلول‌ها بر داربست‌های: الف) ۶۰ درصد وزنی FHA، ب) ۵۰ درصد وزنی FHA و ج) ۴۰ درصد وزنی FHA

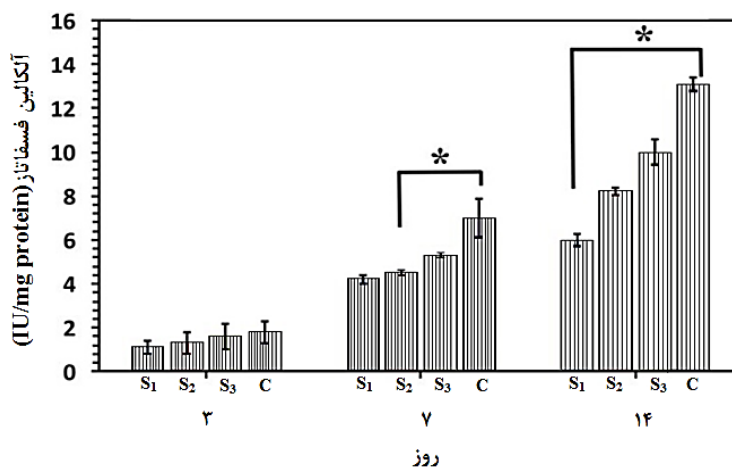
این آنزیم در تخریب پیروفسفات معدنی مشارکت می‌کند تا یک غلظت موضعی کافی از فسفات یا پیروفسفات معدنی، به منظور فرآیند معدنی شدن، فراهم نماید. در میان آزمون‌های بیولوژیکی مختلف برای تخمین میزان فعالیت استئوبلاست‌ها درون داربست‌ها، ترشح آلکالین فسفاتاز، آزمونی مهم است. فعالیت آلکالین فسفاتازی سلول‌های استئوبلاست کشت شده بر روی داربست‌های کامپوزیتی ساخته شده از ژلاتین و فلوئور هیدروکسی آپاتیت، با سه نسبت مختلف فلوئور هیدروکسی آپاتیت، در روزهای سوم، هفتم و چهاردهم کشت سلولی در نمودار ۲ قابل مشاهده است.

بر اساس نمودار، فعالیت آلکالین فسفاتازی بین روز سوم، هفتم و چهاردهم از تفاوت معنی داری برخوردار است. تفاوت چشمگیر در فعالیت آلکالین فسفاتاز در داربست‌ها، می‌تواند به این علت باشد که در داربست با غلظت‌های بالاتر فلوئور هیدروکسی آپاتیت چسبندگی و تکثیر سلول‌ها بر روی داربست‌ها افزایش می‌یابد.

نمودار ۱ میزان بقای سلولی برای نمونه‌های مختلف را با آزمون اندازه‌گیری میزان سمیت سلولی با روش غیرمستقیم در مقایسه با نمونه کنترل (C) و در زمان‌های مختلف نشان می‌دهد. همان‌طور که مشاهده می‌شود، زنده ماندن همه داربست‌ها بالای ۹۰ درصد می‌باشد و با افزایش درصد فلوئور هیدروکسی آپاتیت در ساختار داربست، میزان زنده ماندن افزایش یافته است. این نتایج نشان‌دهنده زیست‌سازگاری داربست‌های ساخته شده می‌باشد و می‌توان گفت که این داربست‌ها هیچ اثر سمیتی روی سلول‌های MG-63 ندارند. تصاویر SEM و نتایج عصاره‌گیری نشان می‌دهند که داربست‌های کامپوزیتی ساخته شده با درصدهای مختلف آپاتیت زیست‌سازگارند و مناسب برای کاربردهای مهندسی بافت استخوان می‌باشند. لازم به ذکر است که مقدار P -value برای مقادیر بدست آمده کمتر از ۰/۰۵ بود که نشان دهنده معنی دار بودن داده‌های بدست آمده است. آلکالین فسفاتاز، یک اکتوآنزیم است که به وسیله سلول‌های استئوبلاست تولید می‌شود. برخی معتقدند که



نمودار ۱: نتایج آزمون MTT برای داربست‌های کامپوزیتی ژلاتین-فلوئورهیدروکسی آپاتیت با نسبت‌های مختلف از فلوئورهیدروکسی آپاتیت بعد از سه و هفت روز ($P \leq 0.05$)



نمودار ۲: فعالیت آلکالین فسفاتاز سلول‌های استئوبلاست کشت شده بر روی داربست‌های کامپوزیتی ژلاتین - فلوئورهیدروکسی آپاتیت با نسبت‌های مختلف فلوئورهیدروکسی آپاتیت در روزهای سوم، هفتم و چهارم بعد از کشت سلولی ($P \leq 0.05$)

با یکدیگر تا حدودی رابطه خطی دارند و با توجه به این ناحیه مدول یانگ برای نمونه‌ها محاسبه گردید. همانطور که در تصویر ۱۱ قابل مشاهده است ناحیه پلاستیک برای هر سه نمونه در محدوده نقطه تسلیم تا ایجاد فشردگی و شکست در نمونه‌ها واقع شده است. منظور از قسمت فشردگی قسمتی است که در آن افزایش مجدد تنش پس از له شدگی نمونه رخ می‌دهد. در واقع این قسمت به علت وقوع شکست در ساختار متخلخل داربست بوجود آمده است که با افزایش تنش حفره‌های داربست به تدریج

سه نوع نمونه برای بررسی خواص مکانیکی داربست‌ها آماده شد و نمودار نیرو بر حسب جابه‌جایی هر نمونه بدست آمد و با استفاده از آن، مقادیر تنش و کرنش در هر لحظه محاسبه و نمودار تنش بر حسب کرنش برای هر سه نمونه ترسیم شد. تصاویر ۱۱-الف تا ۱۱-ج، نیز نمودار تنش-کرنش هر سه نمونه را نشان می‌دهند. نمودار شامل سه قسمت الاستیک، پلاستیک و فشردگی است. با توجه به تصویر ۱۱ قسمت الاستیک برای هر سه نمونه، ناحیه قبل از نقطه تسلیم می‌باشد که تنش و کرنش

نتایج حاصل از طیف سنجی فروسرخ، وجود نوعی پیوند شیمیایی بین فلئوریدروکسی آپاتیت و ژلاتین که موجب تقویت خواص مکانیکی کامپوزیت شده است قابل تایید است که این مکانیزم در داربست‌های مشابه گزارش نشده است.^(۳۰) نهایتاً با مقایسه این داده‌ها می‌توان دریافت که با افزایش میزان فلئوریدروکسی آپاتیت در ساختار داربست‌ها خواص مکانیکی نیز مانند خواص بیولوژیکی بهبود یافته است.

با تعیین وزن داربست‌ها قبل و پس از قرارگیری در داخل آب مقطر به مدت ۲۴ ساعت میزان جذب آب داربست‌ها اندازه‌گیری شد. که به صورت خلاصه و به منظور سهولت مقایسه در جدول ۳ نشان داده شده است. با مقایسه اعداد جدول می‌توان مشاهده کرد که با افزایش درصد وزنی فلئوریدروکسی آپاتیت در ساختار داربست کامپوزیتی، میزان جذب آب داربست افزایش می‌یابد.

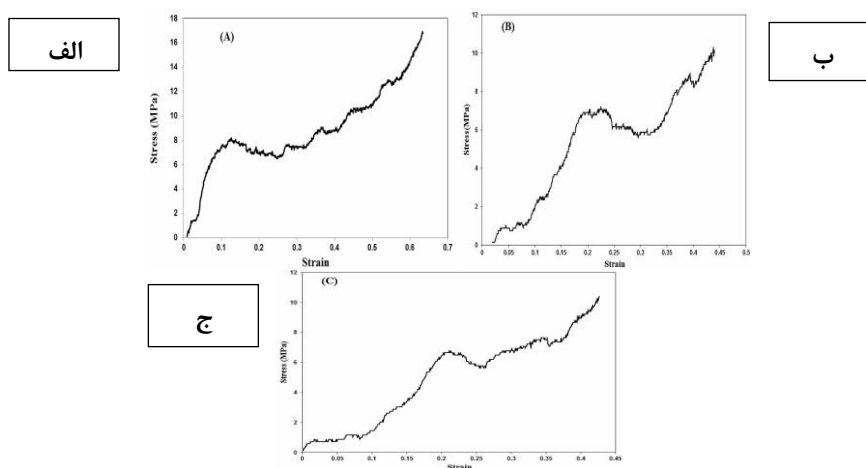
پر شده و کرنش افزایش یافته است و این افزایش تا زمانی ادامه پیدا می‌کند که تمامی حفره‌ها پر شده و داربست به یک سازه توپر تبدیل شود و پس از آن تنش به طور ناگهانی افزایش می‌یابد.^(۲۸)

همچنین مدول یانگ داربست‌های کامپوزیتی در ناحیه الاستیک با استفاده از معادله ۳ محاسبه شد.

$$E = \frac{\sigma}{\varepsilon} \quad \text{رابطه (۳)}$$

در معادله فوق E مدول یانگ، σ تنش و ε کرنش اعمالی به هر کدام از داربست‌های کامپوزیتی می‌باشد.

مدول یانگ و استحکام تسلیم به طور میانگین برای نمونه‌ها ۴۰ و ۷ مگاپاسکال بدست آمد. این مقادیر چند برابر مقادیر گزارش شده در داربست‌های مشابه است.^(۲۹) در واقع علت این تفاوت، تشکیل بلورهای آپاتیت در ساختار داربست است. علاوه بر این تشکیل بلورهای آپاتیت باعث افزایش سطح آزاد و در نتیجه افزایش ناحیه تماس فاز تقویت کننده با فاز زمینه شده و استحکام مکانیکی آن‌ها را چند برابر می‌سازد. همچنین با توجه به



تصویر ۱۱: نمودار تنش-کرنش داربست‌های کامپوزیتی (الف- ۶۰ درصد وزنی فلئوریدروکسی آپاتیت، ب- ۵۰ درصد وزنی فلئوریدروکسی آپاتیت و ج- ۴۰ درصد وزنی فلئوریدروکسی آپاتیت)

جدول ۲: مدول یانگ داربست ساخته شده در این پژوهش در مقایسه با استخوان اسفنجی، استخوان فشرده و یک داربست دیگر

نمونه	مدول یانگ (MPa)	استحکام تسلیم (MPa)
داربست کامپوزیتی ژلاتین/FHA	40 ± 3	7 ± 0.5
داربست کامپوزیتی ژلاتین/HA ^(۲۹)	4.01 ± 0.39	۰/۶۵
استخوان فشرده ^(۳۱)	$2-30 \times 10^3$	۱۸۰-۱۳۰
استخوان اسفنجی ^(۳۱)	۵۰-۵۰۰	۱۲-۴

این پژوهش از چند دیدگاه شبیه به شرایط بدن انتخاب شد که عبارتند از:

۱- تشکیل فاز معدنی (فلوئورهیدروکسی آپاتیت) در شرایط مشابه بدن از نظر دما و pH.

۲- استفاده از ژلاتین که از نظر فیزیکی به عنوان نوعی سازه اولیه شبیه ساز ماده زمینه خارج سلولی و از نظر شیمیایی به علت شباهت به کلاژن، به عنوان جایگزین غضروف پیش استخوانی متشکل از کلاژن در بدن، عمل می‌کند. دلیل استفاده از ژلاتین به عنوان سازه زمینه، شباهت ساختاری این پلیمر به جزء آلی استخوان است که غالباً از کلاژن تشکیل شده است.

۳- استفاده از فرآیند خشک‌کشی انجمادی در مطالعات اخیر نیز مورد توجه قرار گرفته است. از ویژگی‌های بسیار مهم بافت استخوان که سبب بوجود آمدن خصوصیات ویژه‌ای برای این بافت شده نحوه چینش یا قرارگیری اجزای تشکیل دهنده در کنار یکدیگر به ویژه نحوه قرارگیری فاز معدنی بر روی زنجیرهای کلاژنی در لا به لای استخوان است. ایجاد این نظم در استخوان مستلزم رخداد فرآیندهای وابسته به نفوذ یون‌ها از دیواره عروق و ماده زمینه خارج سلولی به سمت محل شکل‌گیری استخوان است که لزوماً فرآیند زمان‌بری است.

جدول ۳: میزان جذب آب سه نوع داربست ساخته شده در مقایسه با یکدیگر

نوع نمونه	درصد جذب آب (درصد)
40FHA	۳۸۰
50FHA	۴۹۱
60FHA	۶۷۲

بحث

موفقیت در ساخت داربست‌های مورد استفاده برای جایگزینی بافت استخوان تنها در صورتی به طور کامل حاصل می‌شود که داربست ساخته شده از جهات مختلف نظیر خصوصیات شیمیایی، فیزیکی، بیولوژیکی و مکانیکی شبیه به بافت استخوان باشد. با توجه به پیچیدگی بافت استخوان و خصوصیات منحصر به فرد آن، گردآوری تمام این خواص در کنار یکدیگر در یک مجموعه خارج از بدن تنها در صورتی امکان‌پذیر است که شباهت قابل توجهی بین آن محیط خارجی با محیط بیولوژیکی بدن وجود داشته باشد. طبق آنچه که در قسمت مقدمه بیان شد، امروزه تحقیقات زیادی در این راستا در حال انجام است. به نظر می‌رسد میزان موفقیت هر داربست مهندسی بافت، به میزان نزدیکی مجموعه طراحی شده به مجموعه مشابه خود در محیط بیولوژیکی بستگی دارد. شرایط به کار گرفته شده برای ساخت داربست مهندسی بافت در

کشت یافته به خوبی به درون حفره‌های داربست نفوذ کرده و بر روی سطح دیواره تخلخل‌ها رشد نمودند. چسبندگی سلول‌ها به سطح زیرین، مهاجرت و ترشح ماده زمینه خارج سلولی، هم بر روی سطح سلول‌ها و هم روی سطوح داخلی داربست مشاهده شد. اندازه مناسب حفرات داربست، امکان نفوذ سلول‌های استخوانی به درون آن‌ها را فراهم کرده است. ترشح ماده زمینه خارج سلولی، باعث ایجاد سطحی ناصاف روی سطح سلول‌ها شده است. در تصویر ۸ سلول‌های نفوذ کرده به درون یک حفره و تمایل به مهاجرت سلولی روی سطوح داخلی حفرات داربست را به خوبی نشان می‌دهد. این مشاهدات نشان می‌دهند که داربست کامپوزیتی ساخته شده قابلیت ترغیب و هدایت رشد سلول‌های استخوانی را داراست. در بحث بررسی سمیت سلولی، همانگونه که در تصویر ۹ مشاهده می‌شود، حضور داربست‌های کامپوزیتی سبب افزایش رشد و تکثیر سلول‌های استئوبلاست شده است. در واقع مواد حاصل از تخریب نمونه‌ها، نه تنها اثر سمیت برای سلول‌ها نداشته اند، بلکه سبب بهبود عملکرد سلول‌ها، رشد و تکثیر بیشتر آن‌ها شده‌اند. حضور فاز کلسیم فسفات در ساختار داربست‌ها نیز به علت تشابه بسیار زیاد ساختار آن با استخوان طبیعی بدن و آزادسازی مواد و یون‌های مشابه بدن، سبب رشد و تکثیر سلول‌های استخوانی می‌شود.

در ارزیابی آلكالین فسفاتاز، میزان آلكالین فسفاتاز ترشح شده از سلول‌های استئوبلاست قرار گرفته در مجاورت داربست‌ها پس از فواصل زمانی مشخص ارزیابی شد. نتایج بدست آمده از این آزمون همانطور که در تصویر ۱۰ قابل مشاهده است، بیانگر فعالیت سلول‌های استخوانی و هدایت استخوانی نمونه‌ها می‌باشد که ظرفیت بالای داربست کامپوزیتی ژلاتین فلئورایدروکسی آپاتیت

از روش خشک‌کایش انجمادی بیشتر برای مطالعه چگونگی روند معدنی کردن در بدن و ساخت داربست‌های ژلاتین و هیدروکسی آپاتیت استفاده شده است، بنابراین تا زمان نگارش این مقاله، گزارشی بدین مضمون به چاپ نرسیده است. از این رو می‌توان اظهار نمود که نوآوری پژوهش انجام شده به طور عمده بکارگیری فلئورایدروکسی آپاتیت و روش خشک‌کایش انجمادی برای ساخت داربست کامپوزیتی ژلاتین / فلئورایدروکسی آپاتیت بوده است.

مطالعه عکس‌های SEM گرفته شده از نمونه‌ها حکایت از وجود ساختاری متخلخل با حفره‌های در محدوده مورد قبول برای مهندسی بافت استخوان دارد. حفره‌ها غالباً دارای یک ساختار بیضوی شکل هستند و در بسیاری از نقاط نیز، ساختاری به هم مرتبط از خود نشان می‌دهند. این ویژگی برای رشد و نفوذ بافت استخوانی به درون داربست بسیار حائز اهمیت است. اگرچه ساختار به هم مرتبط تخلخل‌ها در اکثر نمونه‌ها قابل مشاهده است، ولی می‌توان گفت با افزایش درصد FHA، علاوه بر کاهش تعداد حفره‌ها در واحد سطح، ارتباط بینایی آن‌ها نیز کاهش می‌یابد. بعلاوه در نمونه‌های با FHA کمتر، ساختار بیضوی شکل تخلخل‌ها نسبت به نمونه‌های دارای FHA بالاتر، بیشتر حفظ شده است. نکته جالب توجه در مورد کلیه این نمونه‌ها این است که تخلخل ایجاد شده در ساختار آن‌ها به صورت کاملاً خود به خودی و بدون افزودن هیچ نوع عامل تخلخل‌سازی صورت پذیرفته است. در واقع انحلال طبیعی ژلاتین در آب خود باعث ایجاد این تخلخل گشته است.

تصاویر سلول‌های استئوبلاستی کشت داده شده بر روی داربست کامپوزیتی در تصویر ۸ نشان داده شده‌اند. این تصاویر دلالت بر این واقعیت دارند که سلول‌های

برخوردار بودند. نتایج این تحقیق بر اساس آزمایش‌ها در خارج از محیط بدن بوده لیکن می‌تواند نتایج مشابهی را با آزمایش‌های درون بدن نشان دهد.

نتیجه‌گیری

تصاویر میکروسکوپی داربست کامپوزیتی ژلاتین - فلوئورهیدروکسی آپاتیت، تخلخل‌های به هم مرتبط را نشان دادند که برای رشد و تکثیر سلول‌های استئوبلاست مناسب می‌باشند. همچنین، نتایج بدست آمده از آزمون‌های بیولوژیکی و مکانیکی نشان دادند که با افزایش غلظت فلوئورهیدروکسی آپاتیت میزان زنده‌مانی، فعالیت آلکالین فسفاتازی سلول‌ها و استحکام داربست‌ها افزایش یافته است. بنابراین داربست‌های کامپوزیتی ساخته شده در این پژوهش، کاندیدای مناسبی برای کاربرد در مهندسی بافت استخوان هستند. همچنین کار تحقیقاتی آینده ما پیرامون بحث‌های بالینی و بیرون بدنی فراورده حاصل از این تحقیق خواهد بود.

تشکر و قدردانی

نویسندگان مقاله بر خود لازم می‌دانند از دانشکده مهندسی مواد و متالورژی دانشگاه سمنان به دلیل حمایت از مقاله حاضر تشکر نمایند.

با درصدهای مختلف از فلوئورهیدروکسی آپاتیت، برای استفاده در مهندسی بافت استخوان را تایید می‌کند.

علاوه بر این، خصوصیات مکانیکی بدست آمده از آزمون فشاری در مقایسه با داربست مشابه بررسی شده در یک مطالعه دیگر^(۲۸) بسیار برتر بوده و به استخوان اسفنجی شبیه‌تر است. در اندازه‌گیری میزان تورم داربست‌ها نیز مشاهده شد که با افزایش درصد فلوئورهیدروکسی آپاتیت در داربست کامپوزیتی ژلاتین/فلوئورهیدروکسی آپاتیت، میزان جذب آب افزایش یافته است. علت این افزایش جذب آب را می‌توان در تفاوت ساختار فلوئورهیدروکسی آپاتیت و ژلاتین دانست زیرا فلوئورهیدروکسی آپاتیت دارای گروه‌های آب دوست است.

با توجه به نتایج آزمون‌های بیولوژیک، آزمون‌های خواص مکانیکی و شناسایی گروه‌های عاملی و نسبت تورم، می‌توان گفت که داربست‌های کامپوزیتی ژلاتین / فلوئورهیدروکسی آپاتیت در مجموع خواص مناسبی داشتند و چسبندگی مناسب و افزایش رشد سلول‌های MG-63 بر روی داربست‌های کامپوزیتی ژلاتین / فلوئورهیدروکسی آپاتیت را باعث شدند و از قابلیت‌های لازم به منظور کاربرد در مهندسی بافت استخوان

منابع

1. Sachlos E, Czernuszka JT. The application of solid freeform fabrication technology to the production of tissue engineering scaffolds. *Eur Cells Mater* 2003; 5(1):29-39.
2. Cima LG, Vacanti JP, Vacanti C, Ingber D, Mooney D, Langer R. Tissue engineering by cell transplantation using degradable polymer substrates. *J Biomech Eng* 1991; 113(2):143-51.
3. Flahiff CM, Blackwell AS, Hollis JM, Feldman DS. Analysis of a biodegradable composite for bone healing. *J Biomed Mater Res* 1996; 32(3):419-24.
4. Takei J. Drug screening, tissue engineering and cancer biology. *J Alternat Animal Test Exp* 2006; 11(3):170-6.
5. Burg K, Porter S, Kellam JF. Biomaterial developments for bone tissue engineering. *Biomaterials* 2000; 21(23):2347-59.
6. Lee YM, Seol YJ, Lim YT, Kim S, Han SB, Rhyu IC, et al. Tissue-engineered growth of bone by marrow cell transplantation using porous calcium metaphosphate matrices. *J Biomed Mat Res* 2001; 54(2):216-23.
7. Hutmacher DW. Scaffolds in tissue engineering bone and cartilage. *Biomaterials* 2000; 21(24):2529-43.

8. Kon E, Muraglia A, Corsi A, Bianco P, Marcacci M, Martin I, et al. Autologous bone marrow stromal cells loaded onto porous hydroxyapatite ceramic accelerate bone repair in critical-size defects of sheep long bones. *J Biomed Mater Res* 2000; 49(3):328-37.
9. Slaughter BV, Khurshid SS, Fisher OZ, Khademhosseini A, Peppas NA. Hydrogels in regenerative medicine. *Adv Mater* 2009; 21(32-33):3307-29.
10. Wan AC, Khor E, Hastings GW. Preparation of a chitin-apatite composite by in situ precipitation onto porous scaffolds. *J Biomed Mater Res* 1998; 41(4):541-8.
11. Törmälä P, Vasenius J, Vainionpää S, Laiho J, Pohjonen T, Rokkanen P. Ultra-high-strength absorbable self-reinforced polyglycolide (SR-PGA) composite rods for internal fixation of bone fractures: in vitro and in vivo study. *J Biomed Mater Res* 1991; 25(1):1-22.
12. Matsusue Y, Yamamuro T, Oka M, Shikinami Y, Hyon SH, Ikada Y. In vitro and in vivo studies on bioabsorbable ultra- high-strength poly (L-lactide) rods. *J Biomed Mater Res* 1992; 26(12):1553-67.
13. Gogolewski S, Pineda L, Büsing CM. Bone regeneration in segmental defects with resorbable polymeric membranes: IV. Does the polymer chemical composition affect the healing process? *Biomaterial* 2000; 21(24):2513-20.
14. Ishaug SL, Crane GM, Miller MJ, Yasko AW, Yaszemski MJ, Mikos AG. Bone formation by three-dimensional stromal osteoblast culture in biodegradable polymer scaffolds. *J Biomed Mater Res* 1997; 36(1):17-28.
15. Murphy WL, Kohn DH, Mooney DJ. Growth of continuous bonelike mineral within porous poly (lactide co-glycolide) scaffolds in vitro. *J Biomed Mater Res* 2000; 50(1):50-8.
16. Linhart W, Peters F, Lehmann W, Schwarz K, Schilling AF, Amling M, et al. Biologically and chemically optimized composites of carbonated apatite and polyglycolide as bone substitution materials. *J Biomed Mater Res* 2001; 54(2):162-71.
17. Soltani M, Yousefpour M, Taherian Z. Porous fluorhydroxyapatite-magnesium-gelatin novel composite scaffold based on freeze-drying mechanism for bone tissue engineering application. *Mater Lett* 2019; 244:195-8.
18. Durucan C, Brown PW. Low temperature formation of calcium- deficient hydroxyapatite-PLA/PLGA composites. *J Biomed Mater Res* 2000; 51(4):717-25.
19. Ma PX, Zhang R, Xiao G, Franceschi R. Engineering new bone tissue in vitro on highly porous poly(alpha-hydroxyl acids)/hydroxyapatite composite scaffolds. *J Biomed Mater Res* 2001; 54(2):284-93.
20. Ramakrishna S, Mayer J, Wintermantel E, Leong KW. Biomedical applications of polymer composite materials. *J Compos Sci Technol* 2001; 61(9):1189-224.
21. Du C, Cui FZ, Zhu XD, de Groot K. Three-dimensional nano-HA/Collagen matrix loading with osteogenic cells in organ culture. *Japanese Soc Biomater Austral Soc Biomater* 1999; 44(4):407-15.
22. Yaylaoglu MB, Korkusuz P, Ors U, Korkusuz F, Hasirci V. Development of a calcium phosphate-gelatin composite as a bone substitute and its Use in drug release. *Biomaterial* 1999; 20(8):711-9.
23. Yakimets I, Wellner N, Smith AC, Wilson RH, Farhat I, Mitchell J. Mechanical properties with respect to water content of gelatin films in glassy state. *Polymer* 2005; 46(26):12577-85.
24. Pena C, de la Caba K, Eceiza A, Ruseckaite R, Mondragon I. Enhancing water repellence and mechanical properties of gelatin films by tannin addition. *Bioresour Technol* 2010; 101(17):6836-42.
25. Suneeta k, Rath P, Sri Hari Kumar A. Chitosan from shrimp shell (Crangon crangon) and fish scales (Labeorohita) extraction and characterization. *J Biotechnol* 2016; 15(24):1258-68.
26. Kumari S, Rath P, Kumar AS. Chitosan from shrimp shell (Crangon crangon) and fish scales (Labeorohita): Extraction and characterization Suneeta. *Afr J Biotechnol* 2016; 15(24):1258-68.
27. Bergo P, Sobral PJ. Effects of plasticizer on physical properties of pigskin gelatin films. *J Food Hydrocolloid* 2007; 21(8):1285-9.
28. Du C, Cui FZ, Zhang W, Feng QL, Zhu XD, de Groot K. Formation of calcium phosphate/collagen composites through mineralization of collagen matrix. *J Biomed Mater Res* 2000; 50(4):518-27.
29. Kim HW, Knowles JC, Kim HE. Hydroxyapatite and gelatin composite foams processed via novel freeze-drying and crosslinking for use as temporary hard tissue scaffolds. *J Biomed Mater Res A* 2005; 72(2):136-45.
30. Murugan R, Ramakrishna S. Development of nanocomposites for bone grafting. *Composites Sci Technol* 2005; 65(15-16):2385-406.
31. Cowin SC. Bone mechanics handbook. 2nd ed. Florida: CRC Press; 2000. P. 70-3.