

ساخت نانوبیوماده‌ی مرکب سه جزئی هیدروکسی آپاتایت، آلومینا و تیتانیا به روش تف جوشی و بررسی زیست‌فعالی و سمیت سلولی آن برای کاربردهای ارتوپدی*

محبوبه محمودی^(۱) پیمان محمودی هاشمی^(۲) رعنا ایمانی^(۳)

چکیده

در این مطالعه، دو نانوبیوماده‌ی مرکب پایه سرامیکی از جنس هیدروکسی آپاتایت (HA) Al_2O_3 و TiO_2 با خواص زیست‌سازگاری و مکانیکی قابل توجه و قابلیت تشکیل آپاتایت بر روی سطح، با روش فشردن سرد و تف‌جوشی ساخته شد. استحکام فشاری نمونه‌های تولیدی ارزیابی شد. نتایج حاصل از آزمون تعیین استحکام، افزایش استحکام فشاری نمونه‌ی A (حاوی ۵۰ درصد وزنی ذرات تیتانیا، ۳۰ درصد وزنی هیدروکسی آپاتایت و ۲۰ درصد وزنی آلومینا) را نسبت به نمونه‌ی B (حاوی ۵۰ درصد وزنی ذرات هیدروکسی آپاتایت، ۳۰ درصد وزنی ذرات تیتانیا و ۲۰ درصد وزنی آلومینا) نشان دادند. افزون بر این، از نتایج آزمون تعیین تخلخل نتیجه شد که نمونه‌ی A دارای تخلخل کم‌تری نسبت به نمونه‌ی B می‌باشد. برای بررسی زیست‌فعالی، نمونه‌ها به مدت زمان ۷ روز در محلول شبیه‌سازی شده‌ی بدن (SBF) غوطه‌ور شدند. نتایج حاصل از این آزمون نشان دادند که نمونه‌ی B توانایی بیش‌تری را برای تشکیل ترکیبات نوع کلسیم فسفات بر روی سطح نسبت به نمونه‌ی A دارد. همچنین، آزمون‌های آزمایشگاهی برون تنی و تعیین سمیت سلولی (MTT)، چسبیدن و پهن‌شدگی سلول‌های MG-67 (استئوبلاست) را بر روی سطح نمونه‌ها نشان دادند. از نتایج این آزمون‌ها، افزایش رشد و تکثیر سلول‌ها بر روی نمونه‌ی B نسبت به نمونه‌ی A نتیجه شد. در نهایت، آزمون پراش پرتوی ایکس (XRD)، بررسی‌های میکروسکوپ الکترونی روبشی (SEM)، آزمون تعیین عنصری (ENERGY DISPERSIVE X-RAY ANALYSIS (EDX) و آزمون طیف‌سنجی مادون قرمز تبدیل فوری (FTIR) به‌ترتیب برای شناسایی فازها، مطالعه‌ی ریزساختار، تعیین درصد عناصر و شناسایی پیوندهای تشکیل شده در نمونه‌ها انجام شدند. افزون بر این، برای جلوگیری از ایجاد ریزترک و تشکیل فازهای ثانویه، عملیات تف‌جوشی نمونه‌ها در دمای $1000^\circ C$ انجام شد. نتایج آزمایش‌ها نشان دادند که هر دو نانوبیوماده‌ی مرکب، با توجه به خواص متفاوتی که دارند، می‌توانند برای کاربرد به‌عنوان ماده‌ی کاشتنی در دندان‌پزشکی و ارتوپدی استفاده شوند.

واژه‌های کلیدی نانوبیوماده‌ی مرکب، تف‌جوشی، هیدروکسی آپاتایت، تیتانیا، آلومینا، زیست‌فعالی، سمیت سلولی.

Fabrication of TiO_2 - Al_2O_3 -HA Nanobiocomposite by Sintering and Evaluation of in Vitro Bioactivity and Cell Toxicity for Orthopedic Applications

M. Mahmoodi P. M. Hashemi R. Imani

Abstract

For the purposes of this study, Hydroxyapatite (HA)- Al_2O_3 - TiO_2 nanobiocomposites with significant mechanical properties, biocompatibility and capability to form surface apatite were fabricated by cold pressing and sintering. Samples were examined for their compressive strengths. The results of compression experiments showed that sample A (50 wt.% TiO_2 -30 wt.% HA- 20 wt.% Al_2O_3) was superior compared with sample B (30 wt.% TiO_2 -50 wt.% HA- 20 wt.% Al_2O_3). In addition, the examination of porosity in samples' surfaces showed that sample A has less porosity than sample B. In vitro bioactivity of the nanobiocomposites in a simulated body fluid (Simulated Body Fluid (SBF)) was also investigated. After immersing the samples in the SBF solution for 7 days, sample B exhibited greater ability to form calcium phosphate compounds on the surface. In vitro studies showed that MG-67 osteoblast-like cells were attached and spread on the samples' surfaces. The results showed that cells proliferated in greater numbers on the B sample compared to the A sample. Finally, X-Ray diffraction (XRD) and scanning electron microscopic examinations, energy-dispersive X-ray Analysis (EDX), and Fourier transform infrared spectroscopy (FTIR) were performed in order to identify different phases, to study the microstructures, to determine concentration of different elements, and to identify the bonds formed in samples, respectively. To prevent the formation of microcracks and secondary phases, sintering operation was conducted at $1000^\circ C$. Based on the results obtained and considering desirable properties of samples, both nanobiocomposites can be used in dental implants and orthopedic applications.

Key Word Nanobiocomposite, Sintering, Hydroxyapatite, Alumina, Titania, Bioactivity, Cell toxicity.

* نسخه‌ی نخست مقاله در تاریخ ۹۲/۷/۱ و نسخه‌ی پایانی آن در تاریخ ۹۳/۵/۶ به دفتر نشریه رسیده است.

- (۱) نویسنده‌ی مسئول، استادیار گروه مهندسی پزشکی، واحد یزد، دانشگاه آزاد اسلامی.
- (۲) دانشجوی دکتری، گروه مهندسی پزشکی، پردیس علوم و تحقیقات یزد، دانشگاه آزاد اسلامی.
- (۳) دانشجوی دکتری، دانشگاه صنعتی امیرکبیر، دانشکده مهندسی پزشکی.

مقدمه

توسعه‌ی بیومواد جدید برای کاربردهای درمانی، یکی از دغدغه‌های اصلی محققان می‌باشد. ارتوپدی، یکی از دسته‌های علمی است که به‌منظور التیام و جای‌گزینی اجزای از بین رفته، معمولاً به چنین موادی نیاز دارد [1,2]. امروزه، مواد مصنوعی مختلف از جمله مواد مرکب، به‌عنوان جای‌گزین استخوان برای غلبه بر مشکلات مربوط به ترمیم عیب‌های استخوان، به‌کار می‌روند [3-5]. استخوان یک ماده‌ی مرکب طبیعی است که بخش معدنی آن را هیدروکسی آپاتیت کربناتی تشکیل می‌دهد و با الیاف کلاژن تقویت شده است [6-8]. در بسیاری از شکستگی‌ها و عیب‌های استخوانی، به مواد جای‌گزین یا پرکننده برای ترمیم بافت استخوان نیاز است. بنابراین، نمی‌توان ماده‌ای را یافت که به‌تنهایی خواص شیمیایی و مکانیکی استخوان را داشته باشد. مواد مرکب بیوپزشکی، اغلب به‌منظور فراهم کردن زیست‌سازگاری و رفتار مکانیکی مناسب طراحی می‌شوند [9,10].

هیدروکسی آپاتیت (HA)، سرامیکی است که برای کاشتنی‌های ارتوپدی و دندان‌ی استفاده می‌شود. این ماده، یک سرامیک زیست‌سازگار است که از نظر ترکیب شیمیایی بسیار شبیه به بخش معدنی استخوان و دندان است. این ماده می‌تواند پیوند مناسبی با بافت استخوانی برقرار کند. البته، کاربرد هیدروکسی آپاتیت به‌دلیل چقرمگی و استحکام خمشی پایین، در محل‌های تحت بار مکانیکی محدود است [11-13]. به‌همین دلیل، از آن به‌عنوان پرکننده در نقص‌های کوچک استخوانی و پوشش بر روی ایمپلنت‌های فلزی مانند تیتانیوم، استفاده می‌شود [14,15]. در تحقیقات اخیر، بهبود فرایند استخوان‌سازی و تثبیت کاشتنی‌ها به‌روش‌های گوناگون از جمله پلاسما اسپری و لیزر گزارش شده است [16-18].

امروزه، تولید مواد مرکب با هیدروکسی آپاتیت در ابعاد نانومتری، امکان طراحی مواد نوین با ساختاری شبیه به استخوان را فراهم آورده است. چنین مواد نوینی، یکنواختی شیمیایی بالایی در پوشش‌ها ایجاد

می‌کند و تولید مواد مرکب چگال در دمای تف‌جوشی پایین را میسر می‌سازد، ولی ساخت مواد مرکب هیدروکسی آپاتیت در دماهای بالا، عمل‌کرد آن‌ها را محدود می‌کند، زیرا در اثر وقوع واکنش‌های سطحی بین هیدروکسی آپاتیت و ماده‌ی تقویت‌کننده در ماده‌ی مرکب در فرایند ساخت آن در دماهای بالا، فازهای جدیدی تشکیل می‌شوند که بر خواص آن تأثیر می‌گذارد. افزون بر این، فازهای کلسیم فسفات مانند تری کلسیم فسفات (TCP) و تترا کلسیم فسفات (TTCP) که فازهایی ترد با استحکام کم می‌باشند، در نتیجه‌ی تجزیه‌ی هیدروکسی آپاتیت به‌وجود می‌آیند که سبب تضعیف خواص مکانیکی آن می‌شود [19,20]. مواد مرکب زیست‌فعال با تشکیل لایه‌ی هیدروکسی آپاتیت بر روی سطح خود، می‌توانند به استخوان زنده متصل شوند. بنابراین، در گزارش‌های اخیر، مواد مرکب بر پایه‌ی هیدروکسی آپاتیت با تقویت‌کننده‌هایی مانند TiO_2 ، Al_2O_3 و ZrO_2 برای بهبود خواص مکانیکی هیدروکسی آپاتیت، علاقه‌ی محققین را به خود جلب کرده است [21-24]. بیوسرامیک Al_2O_3 (آلومینا)، مقاومت به سایش و چقرمگی شکست را افزایش می‌دهد، در حالی‌که زیست‌سازگاری به‌دلیل ماهیت خنثی بودن آن، حفظ می‌شود. افزون بر این، این ماده قادر است تا مقاومت حرارتی مواد مرکب را به‌طور چشم‌گیری افزایش دهد [21].

TiO_2 (تیتانیا) تقویت‌کننده‌ی متداول دیگری در مواد مرکب است. حضور این بیوسرامیک در حالی‌که زیست‌سازگار، ضدباکتریال و فوتوکاتالیست است، موجب افزایش مقاومت به خوردگی مواد کاشتنی نیز می‌شود [25]. افزون بر این، اضافه شدن TiO_2 به‌عنوان تقویت‌کننده در مواد مرکب هیدروکسی آپاتیت بر ساختار آن‌ها تأثیر می‌گذارد و خواص بهبود می‌یابند [26]. اخیراً گزارش‌هایی مبنی بر ساخت مواد مرکب $\text{Ag-TiO}_2/\text{HA}/\text{Al}_2\text{O}_3$ به عنوان غشاء [27] و $\text{Al}_2\text{O}_3/\text{TiO}_2$ [28]، HA/TiO_2 [29] و $\text{HA}/\text{Al}_2\text{O}_3$ [30] برای کاربردهای پزشکی ارائه شده‌اند، اما گزارش‌ها و مقاله‌های مرتبط با ساخت مواد مرکب سه‌فازی HA-

زیست‌فعالی و زیست‌سازگاری دو نانوبیوماده‌ی مرکب سه‌فازی HA-TiO₂-Al₂O₃ با درصد‌های وزنی متفاوت هیدروکسی‌آپاتایت و TiO₂ در دمای پایین تفجوشی برای کاربرد در کاشتنی‌های دندانپزشکی و آرتوپدی می‌باشد.

مواد و روش‌های آزمایش

ساخت نانوبیوماده‌ی مرکب

برای ساخت نانو بیوماده‌ی مرکب، یک قالب استوانه‌ای از جنس فولاد به قطر ۲ cm به‌منظور فشردن سرد مواد اولیه به‌کار رفت. سپس، پودرهای رتیل TiO₂، α-Al₂O₃ و هیدروکسی‌آپاتایت به‌ترتیب با اندازه‌های ۲۰ nm، ۸۰ nm و ۲ μm به‌عنوان مواد اولیه‌ی تشکیل دهنده‌ی بیوماده‌ی مرکب و چسب سیلیکات سدیم برای افزایش چسبندگی ذرات، از شرکت مرک خریداری شد. دو نمونه با درصد‌های وزنی متفاوت مطابق با جدول (۱)، ساخته شد. در نمونه‌ی B، ذرات هیدروکسی‌آپاتایت با ۵۰ درصد وزنی به‌عنوان فاز زمینه و ذرات تیتانیا و آلومینا به‌عنوان فاز تقویت‌کننده، به‌ترتیب با ۳۰ و ۲۰ درصد وزنی ترکیب شدند. نمونه‌ی A با ۵۰ درصد وزنی ذرات تیتانیا به‌عنوان فاز زمینه و به‌ترتیب با ۳۰ و ۲۰ درصد وزنی ذرات هیدروکسی‌آپاتایت و آلومینا به‌عنوان فاز تقویت‌کننده، مخلوط شد.

جدول ۱ درصد وزنی مواد تشکیل دهنده‌ی نانوبیوماده‌ی مرکب

نمونه	Al ₂ O ₃ (%)	TiO ₂ (%)	HA (%)
A	۲۰	۵۰	۳۰
B	۲۰	۳۰	۵۰

برای ساخت نانوبیوماده‌ی مرکب، ابتدا پودرها با درصد‌های وزنی متفاوت (جدول ۱) با سیلیکات سدیم مخلوط شدند و برای رسیدن به یکنواختی بیش‌تر، به‌مدت ۱۰ دقیقه به‌هم زده شدند. سپس، ۴ گرم از پودر مخلوط شده درون قالب استوانه‌ای ریخته شد و مخلوط توسط پرس سرد تک‌محوری با فشار

TiO₂-Al₂O₃ برای کاربردهای پزشکی محدودند. Al₂O₃ یکی از بهترین تقویت‌کننده‌ها در مواد مرکب بیوسرامیکی HA می‌باشد، ولی به‌دلیل ایجاد فازهای جدید در فصل مشترک آن‌ها در دماهای بالاتر از ۱۲۰۰ °C تا ۱۴۰۰ °C، کاربرد آن محدود شده است. در برخی از موارد، شکل‌گیری فازهای جدید هنگام ساخت مواد مرکب سبب افت خواص مکانیکی و حتی خواص بیولوژیکی ماده‌ی مرکب می‌شود. بنابراین، باید توجه داشت که ساخت ماده‌ی مرکب در دماهای بالای تفجوشی باعث ایجاد تغییرات فازی زیادی در آن می‌شود [30].

هیدروکسی‌آپاتایت به‌طور گسترده به‌عنوان بیوماده در کاربردهای پزشکی استفاده می‌شود. این ماده به‌تنهایی می‌تواند بیواکتیویته و تمایل به جذب مواد زیستی نظیر پروتئین را افزایش دهد، اما از نقطه نظر خواص مکانیکی (چقرمگی شکست) و استحکام چسبندگی هنگام پوشش‌دهی بر روی زیر لایه‌ی تیتانیومی، ضعیف است. در تحقیقات انجام شده گزارش شده است که حضور TiO₂ در کنار هیدروکسی‌آپاتایت در ماده‌ی مرکب پوشش داده شده بر روی زیر لایه‌ی تیتانیومی، نه تنها سبب افزایش استحکام چسبندگی به زیر لایه می‌شود، بلکه مقاومت به خوردگی تیتانیم را نیز افزایش می‌دهد [23]. افزون بر این، بدون این‌که توانایی تشکیل آپاتایت به‌خطر بیافتد، سختی سطح را نیز افزایش می‌دهد. حضور Al₂O₃ در سطح ماده‌ی مرکب، در فرایند کلسینه شدن تأثیری نخواهد داشت. از سوی دیگر، چقرمگی شکست و استحکام هیدروکسی‌آپاتایت با افزوده شدن ۲۰ درصد Al₂O₃ به آن، تا دو برابر افزایش می‌یابد [30]. TiO₂ به‌عنوان تقویت‌کننده به‌کار رفته در ماده‌ی مرکب، قابلیت جذب آب و تشکیل گروه‌های Ti-OH بر روی سطح را دارد و این در نهایت، منجر به تشکیل هسته‌های آپاتایت و بلورین در محلول شبیه سازی شده بدن Simulated Body Fluid (SBF) می‌شود. بنابراین، این تقویت‌کننده در چسبندگی استخوان به قطعه‌ی کاشتنی نقش مؤثری را بازی می‌کند [26]. هدف از انجام این تحقیق، ساخت، مقایسه‌ی خواص،

الگوی پراش پرتوی ایکس از نمونه‌ها

آزمون تعیین الگوی پراش پرتوی ایکس (XRD) (Philips, X'PertPro) با هدف شناسایی فازهای تشکیل شده در نمونه‌های ماده‌ی مرکب و بررسی میزان بلورینگی آن‌ها انجام گرفت. فازهای موجود در نمونه‌ها به کمک نرم افزار (Panalytical Software X'Pert High score Plus) [32] و پوشه‌ی PDF-2 مشخص شدند.

طیف‌سنجی مادون قرمز تبدیل فوریه

برای شناسایی گروه‌های عاملی و پیوندهای تشکیل شده در ماده‌ی مرکب ساخته شده، از طیف مادون قرمز تبدیل فوریه (FTIR) در محدوده‌ی cm^{-1} ۴۰۰۰-۴۰۰ (FT-IR Spectrometers) ساخت شرکت Bruker) استفاده شد. ابتدا نمونه‌های A و B با پودر KBr (با نسبت $1/100$ / نمونه) آسیا شدند و پس از آن با استفاده از دستگاه فشار، نمونه‌هایی به شکل قرص نازک تهیه و در دستگاه FTIR برای بررسی پیوندهای ایجاد شده قرار داده شدند.

غوطه‌وری نمونه‌ها در محلول SBF

به منظور ارزیابی رفتار زیست‌فعالی نانوبیوماده‌ی مرکب در محیط آزمایشگاه، محلول SBF با استفاده از دستورالعمل ارائه شده توسط کوکوبو (KOKUBO)، آماده‌سازی شد [33]. در جدول (۲)، ترکیب‌های SBF که شبیه به پلاسمای خون انسان است، مشاهده می‌شود. نمونه‌ها پس از تف‌جوشی، در ۶۰ میلی‌لیتر مایع شبیه‌سازی شده‌ی بدن غوطه‌ور شدند و به مدت ۷ روز در آنکوباتور در دمای مشابه با دمای بدن (37°C)، با ۹۸ درصد رطوبت و حضور ۵ درصد گاز CO_2 قرار گرفتند. افزون بر این، هر روز محلول SBF بر روی نمونه‌ها با محلول تازه جای‌گزین می‌شد. در نهایت و پس از پایان آزمایش، مرفولوژی سطحی نمونه‌ها با استفاده از میکروسکپ الکترونی روبشی (SEM) بررسی شد.

معادل 150 kg/cm^2 ($14/7 \text{ MPa}$) فشرده شد. در مرحله‌ی بعد، نمونه‌های به دست آمده به مدت ۲ ساعت در کوره‌ای با دمای 150°C خشک شدند. برای افزایش استحکام ماده‌ی مرکب، نمونه‌ها در دمای 1000°C به مدت ۴۰ دقیقه تف‌جوشی و سپس، تا دمای اتاق سرد شدند.

بررسی ریزساختار نمونه‌ها

ریزساختار نمونه‌ها توسط میکروسکپ الکترونی روشی (SEM) نوع (SEM, VEGA II, Tescan, USA) بررسی شد. تصویرهای سطح مقطع افقی نمونه‌ها قبل و بعد از قرارگیری در محلول SBF (مایع شبیه‌سازی شده‌ی بدن)، در بزرگنمایی‌های مختلف به دست آمد. افزون بر این، درصد عناصر موجود در نمونه‌ها با انجام آزمون ENERGY DISPERSIVE X-RAY ANALYSIS (EDX) و نحوه‌ی توزیع عناصر در آن‌ها، با انجام آزمون نقشه پرتو ایکس (X-RAY MAP) ارزیابی شد.

اندازه‌گیری تخلخل ظاهری و چگالی نمونه‌ها

چگالی حجمی و تخلخل ظاهری نمونه‌های تف‌جوشی شده، توسط روش آرشمیدس اندازه‌گیری شد. برای انجام آزمایش، نمونه‌ها در آب غوطه‌ور شدند و چگالی آن‌ها با استفاده از پیکنومتر محاسبه شد [31].

استحکام فشاری

به منظور انجام آزمون فشار، نمونه‌ها به شکل استوانه‌هایی به ارتفاع ۱۵ و قطر ۲۰ میلی‌متر تهیه شدند و پس از تف‌جوشی در دمای 1000°C ، در دستگاه کشش-فشار یونیورسال (STM Series) قرار داده شدند. نمونه‌های استوانه‌ای به صورت تک‌محوری با سرعت جابجایی فک برابر با $0/5$ میلی‌متر بر دقیقه فشرده شدند. برای هر آزمون فشار، ۵ نمونه تحت آزمایش قرار گرفتند و مقدار میانگین به دست آمده، به عنوان استحکام فشاری گزارش شد.

جدول ۲ غلظت یون‌های محلول SBF و پلاسمای خون انسان (mmol/L)

نمونه	Na ⁺	K ⁺	Ca ²⁺	Mg ²⁺	HCO ₃ ⁻	Cl ⁻	HPO ₄ ²⁻	SO ₄ ²⁻
SBF	۱۴۲/۰	۰/۵	۲/۵	۱/۵	۴/۲	۱۴۷/۸	۱/۰	۰/۵
پلاسمای خون	۱۴۲/۰	۰/۵	۲/۵	۱/۵	۲۷/۰	۱۰۳/۰	۱/۰	۰/۵

ظرف دیگری برای انجام فرایند تثبیت سلول‌ها منتقل شدند. برای تثبیت سلول‌ها، از محلول گلو تار آلدهید ۲/۵ درصد استفاده شد. ابتدا نمونه‌ها با بافر فسفات استریل دو مرتبه شسته شدند. سپس، هر نمونه درون ۲ میلی لیتر محلول گلو تار آلدهید به مدت ۱/۵ ساعت قرار داده شد. نمونه پس از خروج از درون گلو تار آلدهید، دوباره با بافر فسفات شسته شد و در ادامه، فرایند آب‌گیری از نمونه‌ها انجام شد. آب‌گیری از نمونه‌ها، با استفاده از محلول الکل اتانول با غلظت‌های به ترتیب ۶۰، ۷۰، ۸۰، ۹۰ و ۱۰۰ درصد انجام شد. نمونه‌ها به ترتیب در ۲ میلی لیتر از محلول‌های الکل به مدت ۶۰، ۷۰، ۸۰، ۹۰ و ۱۰۰ دقیقه قرار گرفتند و در نهایت، در الکل ۱۰۰ درصد به مدت ۱۰ دقیقه قرار گرفتند. پس از انجام آب‌گیری، رطوبت سطحی نمونه‌ها در هوای محیط گرفته شد و نمونه‌ها در دمای ۴ °C تا زمان انجام آزمون، نگهداری شدند [34].

آزمون تعیین میزان رشد و سمیت سلولی (MTT)

میزان تکثیر و زنده‌مانی سلول‌های استئوبلاست رده سلولی (MG67) روی سطح نمونه‌ها توسط آزمون MTT ارزیابی شد. به همین منظور، ۲۰ میکرو لیتر محلول MTT با غلظت ۵ میلی گرم در میلی لیتر به چاهک‌های حاوی نمونه و کنترل اضافه شد. پس از گذشت ۴ ساعت قرارگیری در آنکوباتور، محیط کشت تخلیه شد و ۲۰۰ میکرو لیتر دی‌متیل سولفوکسید (Dimethyl Sulfoxide, DMSO) جای‌گزین شد. ۱۰ دقیقه زمان برای حل شدن بلورهای رنگ تشکیل شده کافی بود. پس از گذشت ۱۰ دقیقه، ۲۰۰ میکرو لیتر محلول از هر چاهک برداشته شد و درون

آزمون کشت سلول در محیط آزمایشگاه

برای انجام آزمون تعیین سمیت سلولی و تعیین تکثیر سلولی، از رده‌ی سلولی MG67 تهیه شده از انستیتو پاستور ایران استفاده شد. با توجه به ابعاد نمونه‌های آزمون، از صفحه‌ی کشت سلول ۲۴ خانه استفاده شد. محیط کشت سلول مورد استفاده، DULBECO'S MODIFIED EAGLE MEDIUM FBS (DMEM) به همراه ۱۰ درصد سرم جنین گاوی بود [34]. ابتدا ۱ میلی لیتر از محیط کشت حاوی سرم، درون چاهک‌های مورد نظر ریخته شد و پس از آن، نمونه‌های A و B که در اتوکلاو استریل شده بودند، درون این چاهک‌ها قرار داده شدند. پس از کسب اطمینان از غوطه‌وری کامل نمونه‌ها درون محیط کشت و قرارگیری صحیح آن‌ها به نحوی که بیش‌ترین فضای ممکن از کف چاهک را پوشانند، تعداد ۳۰۰۰۰ سلول به همراه ۱ میلی لیتر از محیط کشت حاوی سرم به چاهک‌ها اضافه شد. در این آزمون، یک چاهک بدون نمونه و حاوی همین تعداد سلول به عنوان کنترل منفی، در نظر گرفته شد. نمونه‌ها به همراه سلول‌ها به مدت ۳ روز درون آنکوباتور با ۵ درصد CO₂ و ۹۸ درصد رطوبت قرار داده شدند و محیط کشت آن‌ها یک روز در میان عوض می‌شد.

مُرفولوژی سلول‌ها

مُرفولوژی سلول‌ها پس از مدت ۳ روز کشت، با استفاده از میکروسکپ الکترونی روبشی بررسی شد. به همین منظور، پس از طی زمان ۷۲ ساعت از تماس نمونه‌ها و سلول‌ها، محیط کشت تخلیه شد و نمونه‌ها تحت شرایط استریل از درون ظرف کشت خارج و به

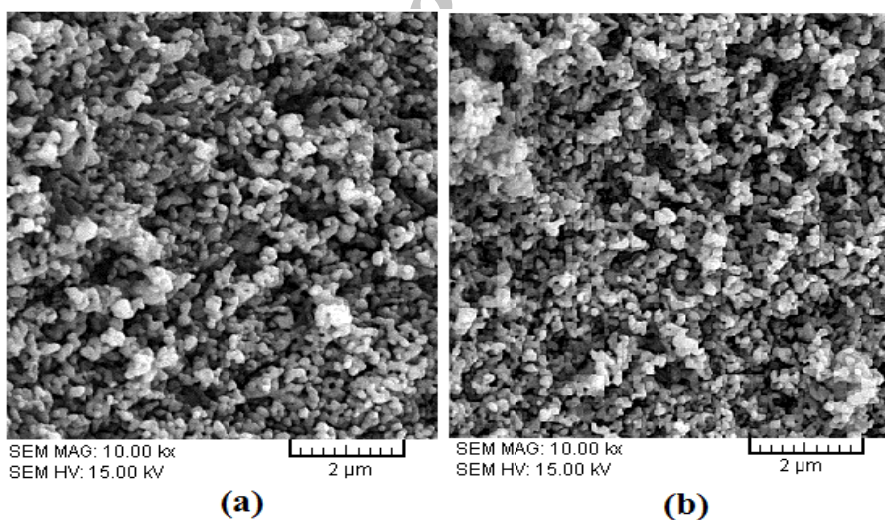
نمونه کاملاً تف‌جوشی شده است. بنابراین، ذرات به‌خوبی با یکدیگر اتصال برقرار کرده‌اند و نمونه‌ها از تراکم و تخلخل مناسبی برخوردارند. البته، اندازه‌ی ذرات پس از تف‌جوشی متغیر است. اندازه‌ی میانگین تخلخل در سطح نمونه‌های A و B برابر با ۱۰۰ تا ۳۰۰ نانومتر است. تفاوت موجود در ضریب انبساط حرارتی مواد تشکیل‌دهنده‌ی ماده‌ی مرکب حین حرارت‌دهی و سرد کردن، می‌تواند منجر به تشکیل ریزترک در آن‌ها شود [36]. در این مطالعه، برای جلوگیری از تشکیل ریزترک، نمونه‌ها در دمای 1000°C به مدت ۴۰ دقیقه تف‌جوشی شدند. همان‌طور که در شکل (۱) مشاهده می‌شود، هیچ‌گونه ترکی در سطح نمونه‌ها وجود ندارد. در جدول (۳)، درصد وزنی عناصر شیمیایی موجود در سطح نانوبیومواد مرکب مشاهده می‌شود.

صفحه‌ی با ۹۶ چاهک قرار گرفت. جذب نوری چاهک‌ها، با استفاده از دستگاه الیزاریدر (BioTek, Elx808, USA) با طول موج ۵۷۰ نانومتر خوانده شد [35]. آزمون‌های آماری در این مقاله، به‌کمک نرم‌افزار اکسل با روش تجزیه و تحلیل آماری One-Way ANOVA انجام شد.

نتایج و بحث

بررسی مُرفولوژی و خواص مکانیکی نمونه‌ها

مواد مرکب پیشرفته با چگالی کم، استحکام مکانیکی بالا و زیست‌سازگاری عالی، به‌عنوان کاشتنی‌های مناسب در کاربردهای ارتوپدی و دندان‌پزشکی به‌کار برده می‌شوند. با مشاهده‌ی تصویرهای SEM، ریزساختار و مُرفولوژی سطح نمونه‌های نانوبیوماده‌ی مرکب A و B بررسی شدند. تصویرهای شکل (۱)، نشان می‌دهند که سطح هر دو

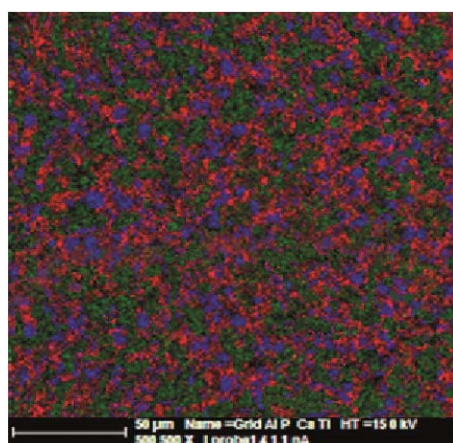


شکل ۱ تصویرهای SEM از نمونه‌ی A (a) و نمونه‌ی B (b) قبل از غوطه‌وری در محلول SBF

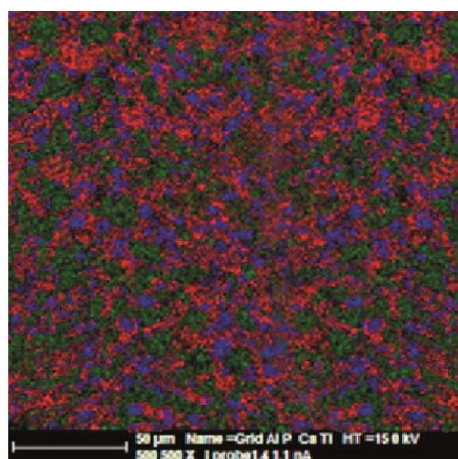
جدول ۳ درصد وزنی عناصر شیمیایی در سطح نمونه‌ها قبل از غوطه‌وری در محلول SBF

نمونه	Ca (wt.%)	Ti (wt.%)	O ₂ (wt.%)	P (wt.%)	Al (wt.%)
A	۷/۷۶	۲۶/۵۳	۵۳/۷۷	۴/۴۵	۷/۴۹
B	۱۳/۴۳	۱۸/۹۱	۵۳/۳۸	۷/۱	۷/۱۸

نانو که باعث پرشدن حفره‌ها و فضاهاى خالی بین ذرات می‌شود، دارای با مدول یانگ 64MPa نسبت به نمونه B با مدول یانگ 39MPa دارای استحکام بالاتری می‌باشد. از طرف دیگر، کاهش استحکام و مدول یانگ نمونه‌ی B نسبت به نمونه‌ی A را می‌توان به تشکیل بیش‌تر فاز بتا- تری‌کلسیم فسفات نسبت داد.



(a)



(b)

شکل ۲ تصویرهای نقشه پرتو ایکس (X-RAY MAP) از نمونه‌ی

(a) A و نمونه‌ی B (b)

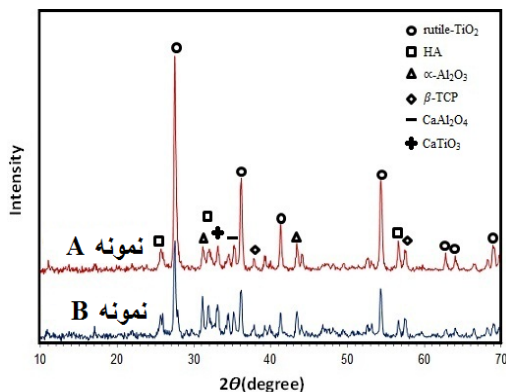
جدول ۴ درصد تخلخل و چگالی نمونه‌ها

نمونه	تخلخل ظاهری (%)	چگالی (gr/cm^3)
A	۳۱/۳۰	۲/۰۱۶
B	۴۱/۹۹	۱/۹۹۴

از طرفی، تصویرهای نقشه پرتو ایکس (X-RAY MAP) نشان می‌دهند که عناصر تشکیل دهنده نانویوماده‌ی مرکب (Al و Ti, P, Ca) در تمام ساختار به صورت یکنواخت پراکنده شده‌اند و یکنواختی خواص در نواحی مختلف نمونه برقرار شده است (شکل ۲). درصد تخلخل و چگالی نمونه‌ها، در جدول (۴) مشاهده می‌شود. نمونه‌ی B دارای توزیع اندازه‌ی ذرات بهتر، سطح یکنواخت‌تر و درصد تخلخل بیش‌تری (۴۱/۹۹ درصد) نسبت به نمونه‌ی A (با تخلخل ۳۱/۳۰ درصد) می‌باشد. در نتیجه، در نمونه‌ی B با افزایش درصد تخلخل، فضای خالی برای رشد و تغذیه‌ی سلول‌های استخوانی فراهم می‌باشد و با افزایش میزان هیدروکسی آپاتایت در آن، خاصیت بیواکتیویته و استئوکنداکتیویته این ماده‌ی کاشتنی افزایش می‌یابد [37]. افزون بر این، نمونه‌های A و B به ترتیب دارای چگالی ۲/۰۱۶ و ۱/۹۹۴ گرم بر سانتی متر مکعب می‌باشند. بنابراین، چگالی هر دو نمونه بسیار نزدیک به چگالی استخوان ($1/85\text{ gr/cm}^3$) می‌باشد. البته، چگالی نمونه‌ی A به دلیل به‌کار بردن TiO_2 در آن در مقایسه با نمونه‌ی B اندکی افزایش یافته است. استفاده از ذرات هیدروکسی آپاتایت به‌عنوان فاز زمینه و افزودن ذرات تیتانیا و آلومینا به‌عنوان فاز تقویت‌کننده به ترتیب به میزان تا ۳۰ و ۲۰ درصد وزنی در نمونه‌ی B، باعث بهبود زیست‌فعالی ماده‌ی کاشتنی در مناطقی که نیاز به بهبود فرایند استخوان‌سازی و تثبیت ماده‌ی کاشتنی و افزایش چسبندگی بیوماده‌ی مرکب به استخوان می‌باشد، می‌شود.

نتایج حاصل از آزمون فشار بر روی نمونه‌های نانویوماده‌ی مرکب A و B، در شکل (۳) نشان داده شده‌اند. استحکام شکست فشاری نمونه‌های A و B به ترتیب برابر با 3 MPa و $2/7\text{ MPa}$ می‌باشد. اندازه‌ی ذرات و نحوه‌ی توزیع مواد تشکیل‌دهنده‌ی مواد مرکب در استحکام آن‌ها مؤثرند. نمونه‌ی A به دلیل دارا بودن درصد وزنی بالاتری از TiO_2 و اندازه‌ی ذرات در حد

فصل مشترک آن‌ها تشکیل شده است. البته، مقدار β -TCP در نمونه‌ی B به دلیل وجود درصد بیش‌تری از هیدروکسی آپاتیت، بیش از نمونه‌ی A می‌باشد.

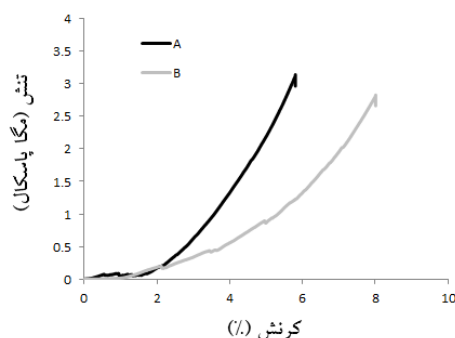


شکل ۴ الگوی پراش پرتوی ایکس نمونه‌های نانوبیوماده‌ی

مرکب نمونه‌ی A (a) و نمونه‌ی B (b)

اگر چه هیدروکسی آپاتیت در محیط بدن ثابت و پایدار است، اما حضور فازهای ثانویه باعث حل شدن آن و در نتیجه، تخریب قطعه‌ی کاشتنی در بدن موجود زنده می‌شود. بنابراین، افزایش دمای تفجوشی و به‌دنبال آن، افزایش بلورینگی، برای عمر بیش‌تر قطعه‌ی کاشتنی ضروری است [36]. از طرفی، دمای بالای تفجوشی 800°C منجر به تجزیه‌ی هیدروکسی آپاتیت به β -TCP و $\alpha\text{-Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ می‌شود. حضور این مواد در ماده‌ی مرکب سبب کاهش زیست‌سازگاری قطعه‌ی کاشتنی می‌شود، افزون بر این، β -TCP با قرارگیری نمونه‌ها در محیط‌های بیولوژیکی نظیر پلاسماي خون، ناپایدار است و به مرور زمان تخریب می‌شود. از این رو، دلیل افت استحکام ماده‌ی مرکب پس از قرارگیری در محلول SBF را می‌توان حضور این فاز دانست [36]. در این تحقیق، فاز β -TCP به مقدار ناچیز در ساختار هر دو نمونه‌ی نانوبیوماده‌ی مرکب در نتیجه‌ی حرارت‌دهی نمونه‌ها در دمای 1000°C ، مشاهده شد، ولی این مقدار نمی‌تواند تأثیر چندانی بر زیست‌سازگاری نمونه‌ها داشته باشد.

نانوآلومینا به‌عنوان بهترین ماده‌ی تقویت‌کننده در بیوسرامیک‌های هیدروکسی آپاتیت به‌شمار می‌رود. این ماده استحکام شکست و سختی ماده‌ی مرکب را



شکل ۳ نمودار تنش - کرنش نمونه‌ها

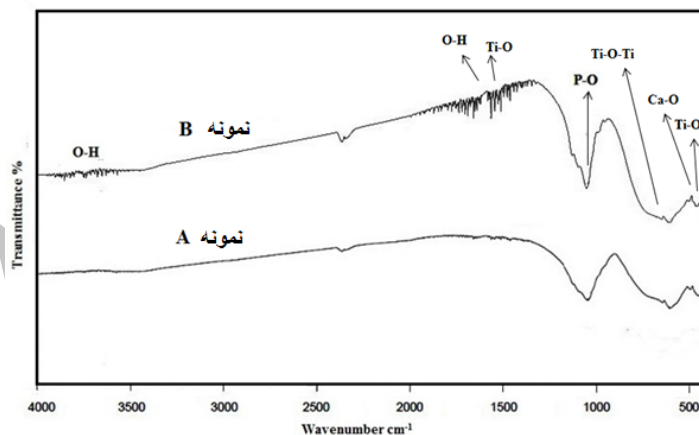
بررسی‌های ریزساختاری

صفحه‌های بلوری و فازهای موجود در نمونه‌ها به‌کمک آزمون پراش پرتوی ایکس (XRD) تعیین شد. با انجام این آزمون، فازهای موجود در نمونه‌های A و B قبل از قرارگیری در محلول SBF مشاهده شد (شکل ۴). قله‌های مربوط به هیدروکسی آپاتیت در نزدیکی‌های زاویه‌های $2\theta = 26^{\circ}$ و $2\theta = 32^{\circ}$ به ترتیب در صفحه‌های (۲۰۱) و (۲۱۱) آشکار می‌شود. افزون بر این، پیک β -TCP در نزدیکی زاویه‌ی $2\theta = 31/5^{\circ}$ و در صفحه‌ی (۲۲۱) دیده می‌شود که بسیار نزدیک به پیک مربوط به هیدروکسی آپاتیت است. پیک مربوط به TiO_2 با دامنه‌ی بزرگ، در اطراف زاویه‌ی $2\theta = 36^{\circ}$ با صفحه‌ی بلوری (۱۱۰) مشاهده می‌شود. دامنه‌ی پیک TiO_2 در نمودار پراش پرتوی ایکس مربوط به نمونه‌ی A بلندتر است. آلومینا، تقویت‌کننده‌ی دیگری در نانوبیوماده‌ی مرکب است که در نزدیکی‌های زاویه‌های $2\theta = 38^{\circ}$ و $2\theta = 58^{\circ}$ دارای صفحه‌های بلوری (۱۱۰) و (۱۱۶) می‌باشد. افزون بر این، فاز آلومینات کلسیم (CaAl_2O_4) در زاویه‌های $2\theta = 35/5^{\circ}$ و $2\theta = 57^{\circ}$ و فاز CaTiO_3 در نزدیکی زاویه‌ی $2\theta = 32/5^{\circ}$ در هر دو نمونه، دارای پیکی با دامنه‌ی کوتاه می‌باشد. فصل مشترک بین هیدروکسی آپاتیت، TiO_2 و Al_2O_3 با تشکیل فازهای جدید CaTiO_3 ، CaAl_2O_4 و β -TCP ایجاد می‌شود [۱۹]. نتایج نشان می‌دهند که پس از ۴۰ دقیقه تفجوشی هر دو نمونه در دمای 1000°C ، تنها مقدار ناچیزی از فازهای β -TCP، CaAl_2O_4 و CaTiO_3 در

طول موج 1042 cm^{-1} در نمونه‌ی B، دارای دامنه‌ی بزرگ‌تری نسبت به نمونه‌ی A می‌باشد و این، وجود درصد بیش‌تری از هیدروکسی آپاتایت را در نمونه‌ی B ثابت می‌کند. افزون بر این، پیک‌های موجود در طول موج‌های 450 cm^{-1} ، 595 cm^{-1} ، 1413 cm^{-1} و 1483 cm^{-1} در نمونه‌های A و B را می‌توان به گروه‌های Ti-O نسبت داد. پیک‌های ظاهر شده در طول موج‌های 410 cm^{-1} ، 678 cm^{-1} ، 500 cm^{-1} و 680 cm^{-1} ، به گروه‌های Ti-O-Ti مربوطند [39]. هم‌چنین، پیک مشاهده شده در طول موج 545 cm^{-1} را می‌توان به Al-O-Al و پیک‌های موجود در طول موج‌های 602 cm^{-1} ، 678 cm^{-1} و 699 cm^{-1} را به Al_2O_3 نسبت داد [40]. پیک مورد نظر در طول موج‌های 463 cm^{-1} و 560 cm^{-1} مربوط به Ca-O و پیک حاضر در طول موج 1439 cm^{-1} مربوط به Ca-OH می‌باشد. پیک‌های ظاهر شده در نزدیکی‌های طول موج‌های 1650 cm^{-1} و 3570 cm^{-1} نیز نشان‌دهنده‌ی حرکت‌های کششی یون‌های هیدروکسیل موجود در شبکه‌ی هیدروکسی آپاتایت می‌باشد [41].

افزایش می‌دهد، ولی در فرایندهای دما بالا (1400°C) - 1200°C) حین مراحل تولید به دلیل افزایش سطح و وسعت منطقه‌ی واکنش، فازهای جدیدی از جمله فاز آلومینات کلسیم ایجاد می‌شود که باعث افت خواص مکانیکی ماده‌ی مرکب می‌شود و کاربرد آن را محدود می‌کند [30]. در این مطالعه، به دلیل تف‌جوشی نمونه‌های نانوبیوماده‌ی مرکب در دمای 1000°C ، فاز آلومینات کلسیم در ریزساختار به مقدار ناچیز مشاهده شد.

به منظور کسب اطمینان از انجام واکنش بین اجزای تشکیل‌دهنده‌ی نانوبیومواد مرکب، آزمون FTIR انجام شد. در شکل (۵)، طیف FTIR مربوط به نمونه‌های A و B در محدوده طول موج $4000 - 500 \text{ cm}^{-1}$ نشان داده شده است. حضور پهن‌ترین پیک در نمونه‌های A و B قبل از غوطه‌وری در محلول SBF، نشان‌دهنده‌ی وجود گروه‌های فسفاتی (پیوند کششی P-O) در طول موج 1042 cm^{-1} می‌باشد. وجود این پیک، حضور هیدروکسی آپاتایت را در نمونه‌های ماده‌ی مرکب را نشان می‌دهد [38]. پیک موجود در



شکل ۵ طیف FTIR مربوط به نمونه‌های نانوبیوماده‌ی مرکب

جدول ۵ درصد وزنی عناصر موجود در سطح نانوبیومواد مرکب پس از غوطه‌وری در محلول SBF

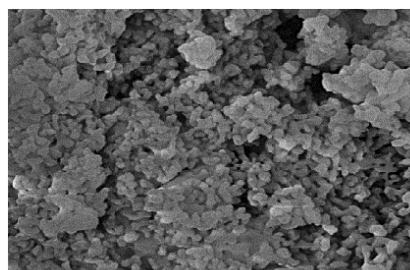
نمونه	Ca (%)	Ti (%)	O ₂ (%)	P (%)	Al (%)
A	۱۸/۲۶	۲۰/۷۵	۴۷/۶۱	۹/۷۴	۳/۶۴
B	۲۵/۶	۸/۳۳	۴۹/۲۶	۱۴/۶۲	۲/۱۹

زیست‌فعالی بیوسرامیک‌ها به دلیل توانایی آن‌ها در تشکیل هیدروکسی آپاتیت در محیط‌های فیزیولوژیک (SBF) می‌باشد [43,44]. در این مطالعه، تشکیل آپاتیت و سایر انواع کلسیم فسفات بر روی نانوبیومواد مرکب سرامیکی ارزیابی شده است و ارتباط بین تشکیل آپاتیت و زیست‌فعالی بیوسرامیک‌ها تعیین شده است. با توجه به نتایج به‌دست آمده از آزمون (EDX) (جدول ۵)، مشاهده می‌شود که میزان کلسیم و فسفر بعد از غوطه‌وری نمونه‌ها در مقایسه با قبل از غوطه‌وری آن‌ها در محلول SBF (جدول ۳)، به‌میزان چشم‌گیری افزایش یافته است و این در حالی است که نسبت کلسیم به فسفر در نمونه‌ها تغییر چندانی نکرده است. غلظت یون کلسیم از یک طرف با تشکیل لایه‌ی آپاتیت در محلول SBF و از سوی دیگر، با میزان رهایش آن از نمونه‌ی ماده‌ی مرکب کنترل می‌شود [45].

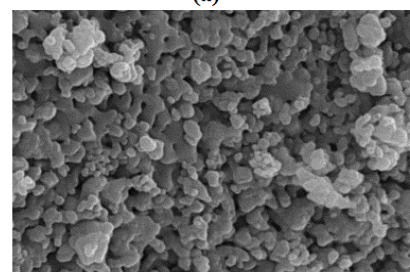
تصویرهای میکروسکپ الکترونی روبشی در شکل (۷)، چسبندگی، رشد، پهن‌شوندگی و مرفولوژی سلول‌های MG-67 بر روی نمونه‌ها را پس از ۳ روز کشت نشان می‌دهند. همان‌گونه که مشاهده می‌شود، سلول‌ها به‌خوبی در سطح هر دو نمونه گسترش یافته‌اند و سلول‌ها از طریق ترشحات ریز سلولی مثل فلوپدیا، به‌یکدیگر و به ماده‌ی زمینه چسبیده‌اند، با این تفاوت که سطح نمونه‌ی B با تعداد سلول‌های بیش‌تری نسبت به نمونه‌ی A و به‌طور کامل با سلول‌های دارای ترشحات فلوپدیای بزرگ چسبیده به سطح پوشیده شده است. افزون بر این، رشد سلولی درون حفره‌های نمونه‌ی B رخ داده است، در حالی که بر روی سطح نمونه‌ی A، رشد سلولی کم‌تر است و سلول‌ها پراکنده‌اند. سلول‌ها بر روی تمام سطح نمونه‌ی A به دلیل بزرگ شدن حفره‌ها، به تلاقی کامل نرسیده‌اند. در این حالت، سلول‌ها بر روی سطح یک خوشه‌ی چند لایه پل ارتباطی تشکیل داده‌اند.

مطالعه زیست‌فعالی و زیست‌سازگاری نمونه‌ها

رفتار زیست‌فعالی و تشکیل فاز کلسیم فسفات بر روی سطح نانوبیو مواد مرکب در محلول SBF توسط میکروسکپ SEM و آزمون ENERGY DISPERSIVE X-RAY ANALYSIS (EDX) ارزیابی شد. در شکل (۶)، تصویرهای SEM مربوط به نمونه‌های A و B پس از غوطه‌وری در محلول SBF نشان داده می‌شود. با بررسی نتایج غوطه‌وری نمونه‌ها در محلول SBF، تشکیل جوانه‌های آپاتیت بر روی هر دو نمونه مشاهده می‌شود، اما تفاوت چشم‌گیری در میزان توانایی تشکیل جوانه‌های آپاتیت در نمونه‌ی B نسبت به نمونه‌ی A وجود دارد. درصد بیش‌تر هیدروکسی آپاتیت در نمونه‌ی B، دلیلی بر پوشانده شدن تمام سطح آن توسط جوانه‌های آپاتیت است، در حالی که این جوانه‌ها در نمونه‌ی A به‌طور پراکنده در نقاط مختلف تشکیل شده‌اند. اخیراً، محققان [42]، گزارش کرده‌اند که افزایش میزان هیدروکسی آپاتیت در ترکیبات مواد مرکب باعث ترغیب تشکیل جوانه‌های آپاتیت بر روی سطح نمونه‌ها درون محلول SBF می‌شود.

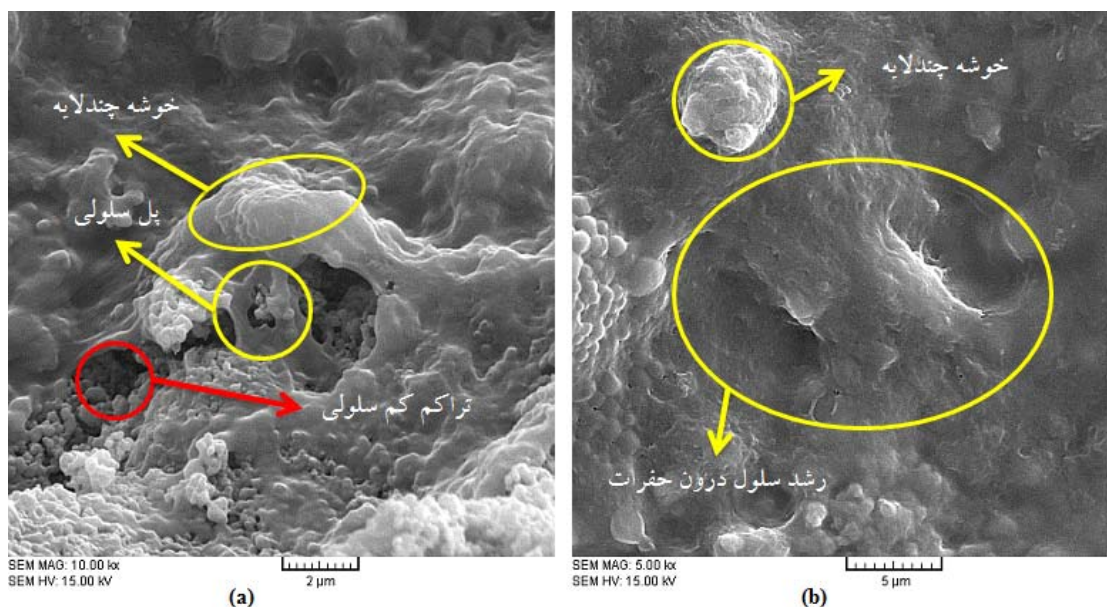


(a)

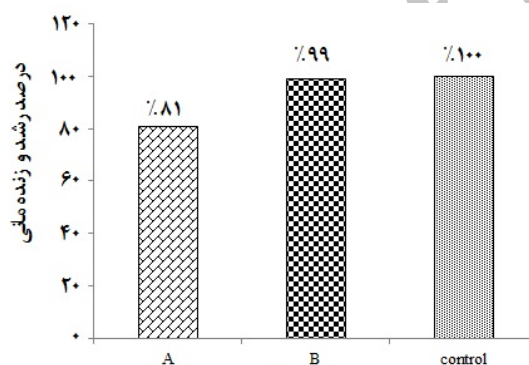


(b)

شکل ۶ تصویرهای SEM از نمونه‌ی A (a) و نمونه‌ی B (b) پس از غوطه‌وری در محلول SBF



شکل ۷ تصویرهای میکروسکوپ الکترونی روبشی نشان‌دهنده‌ی مرفولوژی سلول‌های MG-67 پس از ۳ روز کشت در نمونه‌ی A (a) و در نمونه‌ی B (b)



شکل ۸ نتایج آزمون MTT مربوط به سلول‌های MG-67 پس از ۳ روز کشت بر روی نمونه‌ها

نتیجه‌گیری

در این مطالعه، نانویوماده‌ی مرکب TiO_2 - Al_2O_3 -HA با خواص مطلوب به‌روش فشردن سرد و تف‌جوشی ساخته شد. افزون بر این، تشکیل فازهایی از نوع کلسیم فسفات بر روی سطح نانویوماد مرکب در محلول SBF بررسی شد. بر روی سطح نمونه‌ی B، درصد وزنی بیش‌تری از هیدروکسی آپاتایت و فازهای نوع کلسیم فسفات نسبت به نمونه‌ی A تشکیل شد. ایجاد سطحی بدون ریزترک، کاهش احتمال ایجاد فازهای جدید از جمله CaAl_2O_4 و β -TCP و جلوگیری از ایجاد فاز α - $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ از دیگر نتایج

برای تعیین کمی تکثیر سلول‌های استخوانی در هر دو نمونه‌ی A و B، آزمون MTT انجام شد. در شکل (۸)، درصد زنده‌مانی سلول‌ها در نمونه‌ها پس از ۳ روز کشت نشان داده شده است. در مدت زمان کشت، تکثیر سلول‌های بیش‌تری بر روی نمونه‌ی B در مقایسه با نمونه‌ی A مشاهده شد. درصد رشد و زنده ماندن سلول‌ها بر روی سطح نمونه‌ی B با بیش‌ترین میزان تخلخل، ۹۹ درصد و در روی سطح نمونه‌ی A برابر با ۸۱ محاسبه شد. نتایج به‌دست آمده بیان‌گر زیست‌سازگاری عالی هر دو نمونه با توجه به تکثیر ۱۰۰ درصدی نمونه‌ی کنترل منفی هستند.

مناطقى که نیاز به بهبود فرایند استخوان‌سازی، تثبیت قطعه‌ی کاشتنی، پرکننده استخوان و افزایش چسبندگی بیوماده‌ی مرکب به استخوان می‌باشد، به کار برده شود. این در حالی است که نمونه‌ی A در مناطقی که نیاز به پوشش به منظور افزایش زیست‌سازگاری، چسبندگی و استحکام ماده‌ی کاشتنی می‌باشد، می‌تواند استفاده شود.

قدردانی و تشکر

نویسندگان این مقاله، از مدیریت و کارکنان آزمایشگاه مواد گروه متالورژی و مکانیک در دانشگاه آزاد واحد یزد، به دلیل حمایت از انجام این کار تحقیقاتی و همکاری در انجام آزمایش‌ها، تشکر می‌نمایند.

این مطالعه می‌باشند. افزون بر این، استحکام فشاری نمونه‌ی A بیش از نمونه‌ی B و مدول یانگ آن تقریباً ۱/۵ برابر بزرگ‌تر از نمونه‌ی B بود. نتایج آزمون برون تنی *in vitro* نشان دادند که سلول‌ها بر روی سطح هر دو نمونه پس از ۳ روز به شکلی مطلوب پهن شده‌اند، با این تفاوت که بیش‌ترین رشد سلولی بر روی سطح نمونه‌ی B رخ داده بود. بنابراین، نتایج آزمون تعیین میزان سمیت سلولی، بیان‌گر زیست‌سازگاری عالی نمونه‌های A و B و توانایی بهبود چسبندگی و تکثیر سلولی بودند. به این ترتیب، نشان داده شد که هر دو نانوبیوماده‌ی مرکب با توجه به خواص متفاوتی که دارند، می‌توانند برای کاربردهای متفاوت اُرتوپدی و دندانپزشکی مفید باشند. بنابراین، نمونه‌ی B با داشتن زیست‌فعالی مناسب برای ماده‌ی کاشتنی، می‌تواند در

مراجع

1. Dorozhkin, S.V., "Bioceramics of calcium orthophosphates", *Biomaterials.*, Vol. 31, pp. 1465-1485, (2010).
2. Bellucci, D., Cannillo, V., Sola, A., Chiellini, F., and Gazzarri, M., Migone, C., "Macroporous Bioglass®-derived scaffolds for bone tissue regeneration", *Ceramics International.*, Vol. 37, pp. 1575-1585, (2011).
3. Lee, S.-H., and Shin, H., "Matrices and scaffolds for delivery of bioactive molecules in bone and cartilage tissue engineering", *Advanced Drug Delivery Reviews.*, Vol. 59, pp. 339-359, (2007).
4. Uemura, T., Dong, J., Wang, Y., Kojima, H., Saito, T., Iejima, D., Kikuchi, M., Tanaka, J., and Tateishi, T., "Transplantation of cultured bone cells using combinations of scaffolds and culture techniques", *Biomaterials.*, Vol. 24, pp. 2277-2286, (2003).
5. Yoneda, M., Terai, H., Imai, Y., Okada, T., Nozaki, K., Inoue, H., Miyamoto, S., and Takaoka, K., "Repair of an intercalated long bone defect with a synthetic biodegradable bone-inducing implant", *Biomaterials.*, Vol. 26, pp. 5145-5152, (2005).
6. Olszta, M.J., Cheng, X., Jee, S.S., Kumar, R., Kim, Y.-Y., Kaufman, M.J., Douglas, E.P., and Gower, L.B., "Bone structure and formation: A new perspective", *Materials Science and Engineering: R: Reports.*, Vol. 58, pp. 77-116, (2007).
7. Sun, F., Zhou, H., and Lee, J., "Various preparation methods of highly porous hydroxyapatite/polymer nanoscale biocomposites for bone regeneration", *Acta Biomaterialia.*, Vol. 7, pp. 3813-3828, (2011).
8. Nandakumar, A., Cruz, C., Mentink, A., Tahmasebi Birgani, Z., Moroni, L., van Blitterswijk, C., and

- Habibovic, P., "Monolithic and assembled polymer–ceramic composites for bone regeneration", *Acta Biomaterialia*, Vol. 9, pp. 5708-5717, (2013).
9. Chen, Q.Z., Wong, C.T., Lu, W.W., Cheung, K.M.C., Leong, J.C.Y., and Luk, K.D.K., "Strengthening mechanisms of bone bonding to crystalline hydroxyapatite in vivo", *Biomaterials*, Vol. 25, pp. 4243-4254, (2004).
10. Rath, P.C., Besra, L., Singh, B.P., and Bhattacharjee, S., "Titania/hydroxyapatite bi-layer coating on Ti metal by electrophoretic deposition: Characterization and corrosion studies", *Ceramics International*, Vol. 38, pp. 3209-3216, (2012).
11. Swetha, M., Sahithi, K., Moorthi, A., Srinivasan, N., Ramasamy, K., and Selvamurugan, N., "Biocomposites containing natural polymers and hydroxyapatite for bone tissue engineering", *International Journal of Biological Macromolecules*, Vol. 47, pp. 1-4, (2010).
12. Zhou, H., and Lee, J., "Nanoscale hydroxyapatite particles for bone tissue engineering", *Acta Biomaterialia*, Vol. 7, pp. 2769-2781, (2011).
13. Balani, K., Anderson, R., Laha, T., Andara, M., Tercero, J., Crumpler, E., and Agarwal, A., "Plasma-sprayed carbon nanotube reinforced hydroxyapatite coatings and their interaction with human osteoblasts in vitro", *Biomaterials*, Vol. 28, pp. 618-624, (2007).
14. Sadat-Shojai, M., Atai, M., Nodehi, A., and Khanlar, L.N., "Hydroxyapatite nanorods as novel fillers for improving the properties of dental adhesives: Synthesis and application", *Dental Materials*, Vol. 26, pp. 471-482, (2010).
15. Sato, M., Sambito, M.A., Aslani, A., Kalkhoran, N.M., Slamovich, E.B., and Webster, T.J., "Increased osteoblast functions on undoped and yttrium-doped nanocrystalline hydroxyapatite coatings on titanium", *Biomaterials*, Vol. 27, pp. 2358-2369, (2006).
16. Topić, M., Ntsoane, T., and Heimann, R.B., "Microstructural characterisation and stress determination in as-plasma sprayed and incubated bioconductive hydroxyapatite coatings", *Surface and Coatings Technology*, Vol. 201, pp. 3633-3641, (2006).
17. Khosroshahi, M.E., Mahmoodi, M., and Saeedinasab, H., "In vitro and in vivo studies of osteoblast cell response to a titanium-6 aluminium-4 vanadium surface modified by neodymium:yttrium–aluminium–garnet laser and silicon carbide paper", *Lasers Med Sci*, Vol. 24, pp. 925-939, (2009).
18. Khosroshahi, M.E., Tavakoli, J., and Mahmoodi, M., "Analysis of Bioadhesivity of Osteoblast Cells on Titanium Alloy Surface Modified by Nd:YAG Laser", *J Adhes.*, Vol. 83, pp. 151-172, (2007).
19. Aminzare, M., Eskandari, A., Baroonian, M.H., Berenov, Razavi Hesabi, A. Z., Taheri, M., and Sadrnezhad, S.K., "Hydroxyapatite nanocomposites: Synthesis, sintering and mechanical properties", *Ceramics International*, Vol. 39, pp. 2197-2206, (2013).
20. Andronescu, E., "Ceramics in substitutive and reconstructive surgery: Edited: P. Vincenzini, Faenza, Italy Materials Science Monographs Volume 69 Publisher: Elsevier Science Publisher, Sara

- Burgerhartstraat 25, P.O. Box 211, 1000 AE Amsterdam The Netherlands, (ISBN 0-444-89060-2)", *Microelectronics Reliability.*, Vol. 33, pp. 767, (1993).
21. Kalmodia, S., Goenka, S., Laha, T., Lahiri, D., Basu, B., and Balani, K., "Microstructure, mechanical properties, and in vitro biocompatibility of spark plasma sintered hydroxyapatite–aluminum oxide–carbon nanotube composite", *Materials Science and Engineering: C*, Vol. 30, pp. 1162–1169, (2010).
 22. Kratschmer, T., and Aneziris, C.G., "Amorphous zones in flame sprayed alumina–titania–zirconia compounds", *Ceramics International.*, Vol. 37, pp. 181-188, (2011).
 23. Wen, C.E., Xu, W., Hu, W.Y., and Hodgson, P.D., "Hydroxyapatite/titania sol–gel coatings on titanium– zirconium alloy for biomedical applications", *Acta Biomaterialia.*, Vol. 3, pp. 403-410, (2007).
 24. Sopyan, I., Fadli, A., and Mel, M., "Porous alumina–hydroxyapatite composites through protein foaming – consolidation method", *Journal of the Mechanical Behavior of Biomedical Materials.*, Vol. 8, pp. 86-98, (2012).
 25. Cho, J., Schaab, S., Roether, J., and Boccaccini, A., "Nanostructured carbon nanotube/TiO₂ composite coatings using electrophoretic deposition (EPD)", *J Nanopart Res.*, Vol. 10, pp. 99-105, (2008).
 26. Beherei, H.H., Mohamed, K.R., and El-Bassyouni, G.T., "Fabrication and characterization of bioactive glass (45S5)/titania biocomposites", *Ceramics International.*, Vol. 35, pp. 1991-1997, (2009).
 27. Ning, M., Xinfei, F., Xie, Q., and Yaobin, Z., "Ag–TiO₂/HAP/Al₂O₃ bioceramic composite membrane: Fabrication, characterization and bactericidal activity", *Journal of Membrane Science*, Vol. 336, pp. 109–117, (2009).
 28. Habibpanah, A.A., Pourhashem, S., and Sarpoolaky, H., "Preparation and characterization of photocatalytic titania– alumina composite membranes by sol–gel methods", *Journal of the European Ceramic Society.*, Vol. 31, pp. 2867-2875, (2011).
 29. Enayati-Jazi, M., Solati-Hashjin, M., Nemati, A., and Bakhshi, F., "Synthesis and characterization of hydroxyapatite/titania nanocomposites using in situ precipitation technique", *Superlattices and Microstructures.*, Vol. 51, pp. 877-885, (2012).
 30. Viswanath, B., and Ravishankar, N., "Interfacial reactions in hydroxyapatite/alumina nanocomposites", *Scripta Materialia.*, Vol. 55, pp. 863-866, (2006).
 31. Wan, Y., Wu, H., Cao, X., and Dalai, S., "Compressive mechanical properties and biodegradability of porous poly(caprolactone)/chitosan scaffolds", *Polymer Degradation and Stability.*, Vol. 93, pp. 1736-1741, (2008).

32. David, B., Pizúrová, N., Schneeweiss, O., Klementová, M., Šantavá, E., Dumitrache, F., Alexandrescu, R., and Morjan, I., "Magnetic properties of nanometric Fe-based particles obtained by laser-driven pyrolysis", *Journal of Physics and Chemistry of Solids.*, Vol. 68, pp. 1152-1156, (2007).
33. Kokubo, T., Kim, H.M., Miyaji, F., Takadama, H., and Miyazaki, T., "Ceramic-metal and ceramic-polymer composites prepared by a biomimetic process", *Composites Part A: Applied Science and Manufac.*, Vol. 30, pp. 405-409, (1999).
34. Kim, H., Kong, Y., Bae, C., Noh, Y., and Kim, H., "Sol-gel derived fluor-hydroxyapatite biocoatings on zirconia substrate", *Biomaterials.*, Vol. 25, pp. 2919-2926, (2004).
35. Huang, Y., Hsiao, P., and Chai, H., "Hydroxyapatite extracted from fish scale: Effects on MG63 osteoblast-like cells", *Ceramics International.*, Vol. 37, pp. 1825-1831, (2011).
36. Kwok, C.T., Wong, P.K., Cheng, F.T., and Man, H.C., "Characterization and corrosion behavior of hydroxyapatite coatings on Ti6Al4V fabricated by electrophoretic deposition", *Applied Surface Science.*, Vol. 255, pp. 6736-6744, (2009).
37. Harle, J., Kim, H.-W., Mordan, N., Knowles, J.C., and Salih, V., "Initial responses of human osteoblasts to sol-gel modified titanium with hydroxyapatite and titania composition", *Acta Biomaterialia.*, Vol. 2, pp. 547-556, (2006).
38. Salehi, S., and Fathi, M.H., "Fabrication and characterization of sol-gel derived hydroxyapatite/zirconia composite nanopowders with various yttria contents", *Ceram Int.*, Vol. 36, pp. 1659-1667, (2010).
39. Cordeiro, D., Vasconcelos, L., and Costa, V., "Infrared Spectroscopy of Titania Sol-Gel Coatings on 316L Stainless Steel", *Materials Sciences and Applications.*, Vol. 2, pp. 1375-1382, (2011).
40. Kumara, K., Singh, A.K., and Rai, S.B., "Laser excited long lasting luminescence in $\text{CaAl}_2\text{O}_4:\text{Eu}^{3+}/\text{Eu}^{2+}+\text{Nd}^{3+}$ phosphor", *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy.*, Vol. 102, pp. 212-218, (2013).
41. Barinov, S.M., Rau, J.V., Cesaro, S.N., and Durisin, J., "Carbonate Release from Carbonated Hydroxyapatite in the Wide Temperature Range", *Journal of Materials Science Materials in Medicine.*, Vol. 17, pp. 597-604, (2006).
42. Kong, L., Gao, Y., Lu, G., Gong, Y., Zhao, N., and Zhang, X., "A study on the bioactivity of chitosan/nano-hydroxyapatite composite scaffolds for bone tissue engineering", *European Polymer Journal.*, Vol. 42, pp. 3171-3179, (2006).
43. Fujibayashi, S., Neo, M., Kim, H.-M., Kokubo, T., and Nakamura, T., "A comparative study between in vivo bone ingrowth and in vitro apatite formation on $\text{Na}_2\text{O}-\text{CaO}-\text{SiO}_2$ glasses", *Biomaterials.*, Vol. 24, pp. 1349-1356, (2003).
44. Rámila, A., and Vallet-Regí, M., "Static and dynamic in vitro study of a sol-gel glass bioactivity", *Biomaterials.*, Vol. 22, pp. 2301-2306, (2001).

45. Martínez, A., Izquierdo-Barba, I., and Vallet-Regí, M., "Bioactivity of a CaO-SiO₂ Binary Glasses System", Chemistry of Materials., Vol. 12, pp. 3080-3088, (2000).

Archive of SID