



نشریه علمی پژوهشی

علوم و فناوری کامپوزیت

http://jstc.iust.ac.ir



## ساخت، مشخصه‌یابی و ارزیابی زیستی داربست کامپوزیتی سدیم آلژینات-فلوئوریدروکسی آپاتیت به منظور کاربرد در مهندسی بافت استخوان

محمد سلطانی<sup>1</sup>، مردعلی یوسف‌پور<sup>2\*</sup>، زهرا طاهریان<sup>3</sup>

1- دانشجوی کارشناسی ارشد، مهندسی مواد، دانشگاه سمنان، سمنان

2- دانشیار، مهندسی مواد، دانشگاه سمنان، سمنان

3- دکترا، مهندسی مواد، دانشگاه سمنان، سمنان

\* سمنان، صندوق پستی 35131-19111، myousefpor@semnan.ac.ir

## چکیده

هیدروکسی آپاتیت به دلیل زیست سازگاری و داشتن ترکیب شیمیایی مشابه ماتریس معدنی استخوان، به عنوان ماده جایگزین استخوان مورد توجه قرار گرفته است. علی‌رغم برخورداری هیدروکسی آپاتیت از خواص زیستی مناسب، این ماده از خواص مکانیکی ضعیفی برخوردار است. فلوئوریدروکسی آپاتیت به علت دارا بودن پایداری حرارتی بالاتر نسبت به هیدروکسی آپاتیت، خواص مکانیکی بهتری دارد و ترکیب آن با آلژینات به صورت داربست کامپوزیتی، ضمن بهبود خواص بیولوژیکی می‌تواند آن را به جایگزینی مناسب برای هیدروکسی آپاتیت تبدیل کند. در این پژوهش فلوئوریدروکسی آپاتیت با استفاده از روش هم رسوبی تهیه شد و سپس کامپوزیت‌های آلژینات-فلوئوریدروکسی آپاتیت با 40، 50 و 60 درصد وزنی فلوئوریدروکسی آپاتیت به روش خشک‌کایش انجمادی ساخته شدند. به منظور مشخصه‌یابی داربست‌های ساخته شده آزمون‌های میزان سمیت سلولی با روش غیر مستقیم (MTT)، آلکالین فسفاتاز (ALP)، طیف‌سنجی فوریه فروسرخ (FTIR)، پراش پرتو ایکس (XRD)، طیف نگاری فلوئورسانس اشعه ایکس (XRF)، آنالیز حرارتی (DSC-TG) و آزمون‌های فشاری استفاده شدند. ریخت شناسی سطحی و همچنین نحوه اتصال و رشد سلول‌های استخوانی روی سطح داربست، با استفاده از میکروسکوپ الکترونی روبشی (SEM) بررسی شد. تجزیه تحلیل داده‌ها با استفاده از آنوا یک طرفه انجام گرفت. نتایج نشان داد که داربست کامپوزیتی سدیم آلژینات-60٪ فلوئوریدروکسی آپاتیت در مقایسه با دو داربست دیگر از نظر خواص بیولوژیکی و مکانیکی دارای شرایط مناسب و بهینه می‌باشد.

## اطلاعات مقاله

دریافت: 97/9/12

پذیرش: 97/12/23

## کلیدواژگان:

کامپوزیت

هیدروکسی آپاتیت

فلوئوریدروکسی آپاتیت

آلژینات

## Preparation, characterization and biological investigation of Sodium Alginate/Flourohydroxyapatite composite scaffold for bone tissue engineering application

Mohammad Soltani, Mardali Yousefpor\*, Zahra Taherian

Department of Material Engineering, Semnan University, Semnan, Iran

\*P.O.B. 35131-19111, Semnan, Iran, myousefpor@semnan.ac.ir

## Keywords

Composite  
Hydroxyapatite  
Flourohydroxyapatite  
Alginate

## Abstract

Hydroxyapatite has been studied intensively as an alternative to bone due to its biocompatibility and the chemical composition of the bone mineral matrix. Despite the good biological properties of hydroxyapatite, this material has poor mechanical properties. Flourohydroxyapatite due to its higher thermal stability than hydroxyapatite has better mechanical properties and its combination with alginate as a composite scaffold, while improving its biological properties, can be used as a substitute for hydroxyapatite. In this study, flourohydroxyapatite was prepared using a co-precipitation method, and then Alginate- Flourohydroxyapatite composites with 40, 50 and 60 wt% flourohydroxyapatite were synthesized by freeze-drying technique. In order to characterize the scaffolds, MTT, ALP, FTIR, XRD, XRF, TG/DSC and compressive tests were used. Surface morphology, as well as the connection and growth of bone cells on the scaffold surface, were studied using SEM. Data analysis were performed using one-way ANOVA. The results showed that Alginate-60wt% flourohydroxyapatite composite scaffold has suitable and optimal conditions for bio-mechanical and biological properties in comparison with two other scaffolds that prepared in this study.

## 1-مقدمه

[2,1] در مهندسی بافت وجود داربست زیست تقلیدی مناسب، برای بقای سلول‌ها ضروری است. داربست‌ها باید ریز محیط طبیعی اطراف سلول‌ها را محیا

مهندسی بافت علمی میان رشته‌ای است که با بکارگیری قوانین مهندسی و علوم بیولوژی، رویکردی نوین جهت ترمیم بافت‌های طبیعی بدن، ارائه می‌دهد

## Please cite this article using:

Soltani, M. Yousefpor, M. and Taherian, Z., "Preparation, characterization and biological investigation of Sodium Alginate/ Flourohydroxyapatite composite scaffold for bone tissue engineering application", In Persian, Journal of Science and Technology of Composites, Vol. 6, No. 3, pp. 481-490, 2019.

برای ارجاع به این مقاله از عبارت زیر استفاده نمایید:

کنند و از چسبندگی سلولی، لنگراندازی، تکثیر و مهاجرت سلول‌ها حمایت به عمل آورند [4,3].

به منظور بازسازی بافتی خاص، داربستی مخصوص با خواص بیومکانیکی، بیوشیمیایی و بیولوژیکی مناسب نیاز است، که این به علت تفاوت بین انواع مختلف سلولی در بافت‌های گوناگون و ریز محیط طبیعی آن‌ها در بدن است [5-7]. به علاوه داشتن یک ساختار متخلخل همراه با یک شبکه حفرات به هم پیوسته برای مهاجرت سلول‌ها و انتقال مواد غذایی و دفع متابولیکی مورد نیاز است [8,9].

روش‌های متداول ساخت داربست‌های مهندسی بافت شامل ریخته‌گری حلال- انحلال ذره، جدایش فازی، فوم سازی با گاز، خشک‌کشی انجمادی، قالب‌گیری فشاری و غیره می‌باشد [10]. مزیت روش خشک‌کشی انجمادی، کنترل درصد تخلخل و مستقل بودن اندازه و شکل حفرات از درصد تخلخل می‌باشد در حالی که در روش ریخته‌گری حلال نشت ذرات، ارتباط داخلی کم بین حفرات نسبت به دیگر روش‌ها، از محدودیت‌های این روش به حساب می‌آید [10,11].

خواص مکانیکی داربست باید متناسب با خواص مکانیکی بافت مورد نظر در محل لانه‌گزینی باشد. به گونه‌ای که سلول‌ها را در برابر نیروهای فشاری و کششی مخرب محافظت نماید تا سلول‌ها بتوانند تحت شرایط فیزیولوژیکی بدن زنده بمانند و عملکرد مناسبی داشته باشند [12,13]. تولید داربست با خواص مکانیکی کافی یکی از چالش‌های بزرگ در بازسازی انواع بافت‌ها به ویژه استخوان یا غضروف است. داربست کاشته شده باید یکپارچگی مکانیکی کافی برای عملکرد مناسب، از زمان کاشت تا تکمیل فرایند بازسازی را دارا باشد [18,19].

استفاده از هیدروکسی آپاتیت به عنوان یک ماده زیست فعال از خانواده سرامیک‌های فسفات کلسیم و به خاطر شباهت نزدیک ترکیب شیمیایی آن به جزء معدنی و اصلی تشکیل دهنده استخوان طبیعی و دندان، در سال‌های اخیر در ساخت کاشتنی‌های مورد استفاده در ارتوپدی یا دندانپزشکی کاربرد فراوان پیدا کرده است [20] با وجود این، استفاده از این ماده در داربست‌های مهندسی بافت استخوان به شکل مستقل محدود شده است زیرا این زیست سرامیک استحکام کششی ضعیفی دارد [21].

جایگزینی گروه هیدروکسیل در ساختار هیدروکسی آپاتیت با یون‌های مختلف مانند مس، منیزیم، کبالت، روی و نقره انجام می‌گیرد [22, 23]، که در این میان فلئور منجر به شکل‌گیری و تشکیل زیست سرامیک جدید با عنوان فلئورآپاتیت می‌شود که نسبت به پودر هیدروکسی آپاتیت خالص در محیط بیولوژیکی، مزایایی چون تشکیل سریع‌تر آپاتیت، جذب بهتر پروتئین و سلول‌های استخوان ساز بر روی سطح و نرخ انحلال کمتر دارد [24]. علاوه بر این، فلئورآپاتیت پایداری شیمیایی و ساختاری بیشتری نسبت به هیدروکسی آپاتیت دارد [25].

در برابر زیست سرامیک‌ها، زیست پلیمرها مطرح می‌شوند که انواع زیست سازگار آن‌ها انعطاف پذیر هستند و به آسانی تغییر شکل می‌دهند. از معروف‌ترین و پرکاربردترین پلیمرهای زیست تخریب پذیر و زیست سازگار در مهندسی بافت و سیستم‌های رهایش دارو کیتوسان، کلاژن، سدیم آلجینات و کولیمیر پلی لاکتیک کو گلایکولیک اسید می‌باشند. در میان این مواد آلزینات که یک بیوپلیمر طبیعی است، به طور عمده از جلبک قهوه‌ای و به میزان کمتر

از باکتری‌ها استخراج می‌شود [26]. آلزینات به دلیل برخورداری از توانایی ذاتی در ایجاد فیبرها، کامپوزیت‌ها و ژل‌های الاستیک مورد توجه قرار گرفته است. علاوه بر این، ژل‌های آلزیناتی قادر به ایجاد محیطی مناسب برای حفظ زنده-مانی سلول‌های بنیادی مغز استخوان می‌باشند [27, 28]. با این حال، از مهمترین عیوب مرتبط با آلزینات، عدم برهمکنش مناسب سلول‌ها بر روی آلزینات و خواص مکانیکی ضعیف می‌باشد که کاربرد آن را در ساخت داربست محدود می‌کند [29].

در این مطالعه داربست‌های کامپوزیتی پلیمر-سرامیکی، از سدیم آلزینات و ذرات فلئورهیدروکسی آپاتیت با استفاده از روش خشک‌کشی انجمادی آماده شدند. به این منظور ابتدا محلول سدیم آلزینات برای ایجاد تخلخل‌های مورد نیاز تهیه شد و سپس پودر فلئورهیدروکسی آپاتیت (40، 50 و 60 درصد وزنی) به منظور بهبود خواص مکانیکی و زیست سازگاری به محلول پلیمری اضافه شد. سپس تاثیر نسبت‌های مختلف فلئورهیدروکسی آپاتیت بر مورفولوژی و فعالیت بیولوژیکی داربست‌ها بررسی و مقایسه گردید. هدف از این تحقیق ساخت و توسعه داربستی زیست فعال و مناسب برای کاربردهای مهندسی بافت استخوان می‌باشد.

## 2- فعالیت‌های تجربی

### 2-1- مواد اولیه

برای تهیه پودر فلئورهیدروکسی آپاتیت به روش هم‌رسوبی و ساخت داربست‌های کامپوزیتی سدیم آلزینات-فلئورهیدروکسی آپاتیت به روش خشک‌کشی انجمادی، مواد اولیه پنتا اکسید فسفر<sup>1</sup>، اسید هگزا فلئور فسفریک<sup>2</sup>، کلسیم نیترات تتراهیدرات<sup>3</sup>، آمونیاک، کلرید کلسیم، فسفات بافر سالین<sup>4</sup> و سدیم آلزینات بیولوژیک از شرکت مرک<sup>5</sup> آلمان و مواد مورد نیاز برای کشت سلولی از شرکت سیگما<sup>6</sup> آمریکا خریداری شدند.

### 2-2- تهیه پودر فلئورهیدروکسی آپاتیت

در این مطالعه به منظور تهیه پودر فلئورهیدروکسی آپاتیت از روش هم‌رسوبی استفاده شد. به این صورت که ابتدا پودرهای پنتا اکسید فسفر و اسید هگزا فلئور فسفریک با نسبت مولی 3 به 1 در 250 ml آب مقطر حل شدند. سپس میزان اسیدیته محلول فسفاتی با استفاده از آمونیاک به 12 رسید. در ادامه محلول فسفاتی به صورت قطره قطره به محلول کلسیم نیترات تتراهیدرات (نسبت کلسیم به فسفر 1.67 مول) اضافه گردید. محلول حاصل پس از 4 ساعت قرارگیری بر روی همزن مغناطیسی، از صافی عبور داده شد و رسوبات حاصل با آب مقطر شست و شو داده شدند و بعد از خشک شدن، در دمای 700 °C کلسینه شدند.

### 2-3- تهیه داربست کامپوزیتی آلزینات-فلئورهیدروکسی آپاتیت

برای تهیه داربست‌های کامپوزیتی، پودر آلزینات بیولوژیک در آب مقطر به خوبی حل شد تا محلولی با غلظت 12.33 درصد وزنی- حجمی ایجاد شود. پس از انحلال کامل آلزینات، پودر فلئورهیدروکسی آپاتیت سنتز شده به روش هم‌رسوبی، با درصد‌های وزنی معین به محلول فوق اضافه گردید و به خوبی هم زده شد تا ذرات فلئورهیدروکسی آپاتیت به طور کاملاً یکنواخت در محلول آلجینات پراکنده شوند. با تغییر مقادیر فلئورهیدروکسی آپاتیت افزوده شده،

<sup>4</sup> Phosphate buffered saline

<sup>5</sup> Merck

<sup>6</sup> Sigma

<sup>1</sup> P<sub>2</sub>O<sub>5</sub>

<sup>2</sup> HPF<sub>6</sub>

<sup>3</sup> Ca(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>·4H<sub>2</sub>O

#### 7-2- طیف سنجی پرتو فروسرخ (FTIR)

تجزیه و تحلیل شیمیایی با استفاده از طیف سنجی پرتو فروسرخ (FTIR) در محدوده عدد موج  $500-4000 \text{ cm}^{-1}$ ، به منظور تکمیل و تایید نتیجه‌های بدست آمده از الگوی پراش پرتو ایکس، در دمای اتاق انجام شد.

#### 8-2- فلئورسنس پرتو ایکس (XRF)

به منظور مشخصه‌یابی، ارزیابی ویژگی‌های فلئورهیدروکسی آپاتیت تولید شده، به ویژه اثبات حضور یون فلئور در ساختار فلئورهیدروکسی آپاتیت از آزمون فلئورسنس پرتو ایکس (XRF) استفاده شد.

#### 9-2- آزمون‌های حرارتی (TG و DSC)

ارزیابی رفتار گرمایی کامپوزیت‌های تهیه شده با استفاده از دستگاه آنالیز حرارتی صورت گرفت. حدود 15 mg از نمونه‌ها وزن و سپس درون بوته‌هایی از جنس آلومینیوم قرار گرفتند. نمونه‌ها با نرخ گرمایشی  $25 \frac{^{\circ}\text{C}}{\text{min}}$  تا دمای  $1400^{\circ}\text{C}$  حرارت داده شدند و نمودارهای مربوطه ثبت گردید.

#### 10-2- میکروسکوپ الکترونی روبشی (SEM) و آنالیز EDS

عامل‌هایی مانند شکل و اندازه تخلخل‌های ایجاد شده در داربست‌ها، برآورد کیفی راه به در بودن تخلخل‌ها در داربست‌های بدست آمده، ارزیابی دیواره‌های بین حفرات و توپر بودن آن‌ها و بسیاری از اطلاعات دیگر پیرامون ساختار داربست‌های متخلخل را می‌توان با استفاده از تصویرهای بدست آمده از میکروسکوپ الکترونی روبشی مورد مطالعه و بررسی قرار داد. به منظور بررسی مورفولوژی سطح نمونه‌ها، تحلیل میکروسکوپ الکترونی روبشی با ولتاژ 20 Kv انجام گردید. علاوه بر این به کمک آنالیز EDS، فازهای تشکیل شده در نمونه‌ها تعیین شد. علاوه بر این توسط نرم‌افزار ایمج جی<sup>۴</sup>، به طور تصادفی 20 تصویر انتخاب و میانگین قطر متوسط تخلخل‌های داربست‌های کامپوزیتی اندازه‌گیری شد.

#### 11-2- ارزیابی دی متیل تiazول دی فنیل تترازولیوم بروماید (MTT)

برای بررسی میزان سمیت و تکثیر سلولی از آزمون دی متیل تiazول دی فنیل تترازولیوم بروماید (MTT) استفاده شد. بدین ترتیب که ابتدا  $10^4$  سلول درون پلیت کشت سلولی 96 چاهکی ریخته شد و سپس به مدت 24 ساعت در انکوباتور در دمای  $37^{\circ}\text{C}$  قرار گرفت تا سلول‌ها به کف پلیت بچسبند. عصاره گرفته شده از هر نمونه به چاهک کشت افزوده شد و سلول‌ها برای مدت 24 ساعت دیگر در مجاورت این عصاره‌ها قرار گرفتند. پس از آن محیط کشت خارج شد و  $100 \mu\text{l}$  دی متیل تiazول دی فنیل تترازولیوم بروماید (MTT) با غلظت  $0/5 \frac{\text{mg}}{\text{ml}}$  به هر چاهک اضافه شد. پس از گذشت 4 ساعت محلول روی سلول‌ها خارج شد و ایزوپروپانول برای حل شدن کریستال‌های فرامان تشکیل شده درون سلول‌ها به هر چاهک وارد شد. پس از نیم ساعت شدت رنگ ایجاد شده در طول موج 545 nm محاسبه شد. چاهک دارای سلول‌های بیشتر، چگالی نوری بالاتری نسبت به چاهک با سلول کمتر نشان می‌دهد. بنابراین می‌توان از رابطه (1) چاهک دارای مقدار سلول بیشتر را مشخص کرد و با نمونه شاهد مقایسه نمود.

نسبت‌های وزنی مختلف 40، 50 و 60 درصد فلئورهیدروکسی آپاتیت به ترتیب برای نمونه S1، S2 و S3 طبق جدول 1 بدست آمد.

#### جدول 1 ترکیب شیمیایی داربست‌های کامپوزیتی

Table 1 Chemical composition of composite scaffolds

نمونه	درصد وزنی فلئورهیدروکسی آپاتیت
S1	40
S2	50
S3	60

سپس هریک از مخلوط‌های آلزینات-فلئورهیدروکسی آپاتیت به ظرف پتری جداگانه منتقل شدند و به داخل یخچال با دمای  $4^{\circ}\text{C}$  انتقال یافتند و به مدت 10 دقیقه نگهداری گردیدند و سپس در دمای  $57^{\circ}\text{C}$  و به مدت 24 ساعت نمونه‌ها تحت عملیات خشک‌کاهش انجام‌دهی قرار گرفتند. پس از انجماد بچ ریخته شده، لایه بدست آمده به ابعاد مطلوب بریده شد و در درجه حرارت اتاق به مدت 24 ساعت رها شد تا کاملاً خشک گردد. سپس هریک از قطعات حاصله به مدت 24 ساعت در محلول کلسیم کلرید (عامل شبکه‌ای کننده) قرار داده شدند تا در این فاصله اتصالات عرضی لازم در شبکه آلزیناتی رخ دهد و آن را تبدیل به آلزینات نامحلول نماید. پس از شبکه‌ای شدن آلزینات، نمونه‌ها جهت شست و شو و حذف بقایای کلسیم کلرید، به مدت 1 ساعت در آب مقطر شست و شو داده شدند که در این مدت هر 20 دقیقه یکبار آب مقطر تعویض گردید. سپس نمونه‌ها به مدت 2 ساعت در درجه حرارت اتاق رها شدند تا رطوبت اولیه آن‌ها گرفته شود. نهایتاً داربست‌های سدیم آلزینات-فلئورهیدروکسی آپاتیت در محدوده دمایی  $1000-1300^{\circ}\text{C}$  به مدت 2 ساعت زینتر شدند.

#### 4-2- آماده سازی داربست‌ها برای کشت سلولی

داربست‌های کامپوزیتی آلزینات-فلئورهیدروکسی آپاتیت با استفاده از اتانول 70٪ استریل شدند و سه بار درون ظرف کشت با محلول فسفات بافر سالین شست و شو داده شدند. سپس قبل از کشت سلولی زیر هود خشک شدند.

#### 5-2- کشت سلولی

سلول استخوان ساز رده‌ی ام جی - 63<sup>۱</sup> با استفاده از محیط کشت دی ام ای ام<sup>۲</sup> و افزودن 10٪ سرم جنین گوساله<sup>۳</sup> به همراه آنتی بیوتیک به میزان  $100 \frac{\text{IU}}{\text{ml}}$  پنی سیلین و  $100 \frac{\mu\text{g}}{\text{ml}}$  استرپتومایسین<sup>۴</sup> تکثیر گردید تا سلول برای دو نوع ارزیابی چسبندگی و رشد و تکثیر سلولی آماده گردد.

#### 6-2- پراش پرتو ایکس (XRD)

به منظور تعیین ساختار کریستالی و ترکیب شیمیایی فلئورهیدروکسی آپاتیت، آلزینات و داربست‌های کامپوزیتی، از روش پراش پرتو ایکس (XRD) استفاده شد. الگوهای پراش با سرعت روبش  $0/0058 \frac{\text{rad}}{\text{s}}$  در محدوده زاویه‌ای  $10-90^{\circ}$  تهیه شدند و شناسایی الگوها با استفاده از کارت‌های مرجع تشخیص فاز<sup>۵</sup> انجام گرفت.

<sup>4</sup> Streptomycin

<sup>5</sup> JCPDS

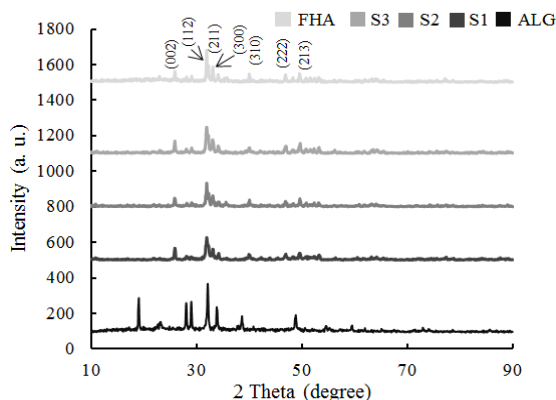
<sup>6</sup> Image-j

<sup>1</sup> MG-63

<sup>2</sup> Dulbecco's modification of Eagle medium

<sup>3</sup> Fetal Calf Serum

فلوئورسنس پرتو ایکس در کنار پراش پرتو ایکس استفاده شد. با توجه به الگوی استاندارد هیدروکسی آپاتیت با شماره کارت 009-0432 و نتایج بدست آمده، مشاهده شد که به جز فاز آپاتیت سایر فازهای ناخواسته در ترکیب پودر تهیه شده به روش هم‌رسوبی حضور ندارند. مشخص است که برخی پیک‌ها با ورود یون فلوئور به ساختار آپاتیتی، به سمت زوایای بالاتر شیفت پیدا می‌کنند. شیفت پیک‌های مشخصه آپاتیت در اثر حضور یون فلوئور در ساختار آپاتیت ناشی از کاهش پارامتر شبکه *a* در اثر جایگزینی نسبی یون فلوئور به جای گروه‌های هیدروکسیل، که دارای شعاع یونی بزرگتری نسبت به یون فلوئور هستند، می‌باشد. با توجه به شکل 1 و الگوی پراش بدست آمده از داربست‌های کامپوزیتی، حضور سدیم آلزینات و فلوئورهیدروکسی آپاتیت در ترکیب داربست تایید می‌گردد. الگوی پراش بدست آمده از داربست‌های کامپوزیتی نشان دهنده تشکیل نوعی فاز بلوریت ولی از آنجا که فاز آپاتیتی آمیخته با سدیم آلزینات است شدت قله‌های بدست آمده نسبت به قله‌های فلوئورهیدروکسی آپاتیت پایین هستند. بررسی قله‌های ثبت شده در مقایسه با کارت‌های الگوی پراش پرتو ایکس مربوط به ترکیبات کلسیم فسفاتی 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 فاز آپاتیت تشکیل شده از نوع فلوئورهیدروکسی آپاتیت است و از طرفی به دلیل غالب بودن درصد وزنی فلوئورهیدروکسی آپاتیت به سدیم آلزینات در ترکیب داربست‌ها، قله‌های موجود در الگوی پراش اشعه ایکس داربست‌های کامپوزیتی که مربوط به فلوئورهیدروکسی آپاتیت می‌باشند، قابل رویت هستند. نهایتاً با بررسی و تحلیل نتایج حاصل از نمونه‌های تهیه شده، مشخص گردید که پودرهای فلوئورهیدروکسی آپاتیت و سدیم آلزینات عاری از هر گونه ناخالصی می‌باشند و پیک نامشخصی که بیانگر ترکیب اضافه در ترکیب داربست‌های کامپوزیتی باشد مشاهده نگردید.



**Fig. 1** X-ray diffraction patterns of alginate (ALG), composite scaffolds (S1, S2 and S3) and fluorhydroxyapatite (FHA)

شکل 1 الگوهای پراش پرتو ایکس آلزینات (ALG)، داربست‌های کامپوزیتی (S1، S2 و S3) و فلوئورهیدروکسی آپاتیت (FHA)

### 2-3- نتایج آزمون FTIR

با توجه به طیف بدست آمده از سدیم آلزینات، باندهای جذبی در نواحی  $1610$ ،  $1416$   $\text{cm}^{-1}$  مربوط به ارتعاشات نامتقارن و متقارن گروه‌های

$$(1) \quad \text{در رابطه (1)، } OD_S \text{ برابر میانگین چگالی نوری هر نمونه در زمان مورد نظر و } OD_C \text{ برابر میانگین چگالی نوری گروه کنترل می‌باشد.}$$

در رابطه (1)،  $OD_S$  برابر میانگین چگالی نوری هر نمونه در زمان مورد نظر و  $OD_C$  برابر میانگین چگالی نوری گروه کنترل می‌باشد.

### 12-2- سنجش فعالیت آلكالین فسفاتازی (ALP)

در این پژوهش میزان آلكالین فسفاتاز ترشح شده از سلول‌های استئوبلاست قرار گرفته در مجاورت داربست‌ها پس از 7 روز ارزیابی شد. برای اندازه‌گیری ابتدا  $10^4$  سلول را بر روی هر کدام از داربست‌ها ریخته شد و  $100 \mu\text{l}$  محیط کشت به هر کدام از داربست‌ها اضافه گردید و پس از 3 ساعت نیز  $1 \text{ ml}$  محیط کشت اضافه شد تا سلول‌ها بتوانند به داربست بچسبند و تکثیر شوند. پس از 24 ساعت،  $1 \text{ ml}$  از محیط کشت به نمونه‌ها اضافه گردید و با جمع آوری محیط کشت روی نمونه‌ها بعد از 7 روز، نهایتاً میزان آلكالین فسفاتاز موجود در نمونه‌ها اندازه‌گیری شد.

### 13-2- بررسی استحکام فشاری

به منظور بررسی خواص مکانیکی داربست‌های تولید شده و تعیین تاثیر فلوئورهیدروکسی آپاتیت در بهبود ویژگی‌های مکانیکی داربست‌های کامپوزیتی آلزینات-فلوئورهیدروکسی آپاتیت، آزمایش فشار بر روی نمونه‌های استوانه‌ای شکل صورت گرفت. به همین منظور داربست‌های کامپوزیتی با سنباده مخصوص پرداخته شده و به صورت نمونه‌های استاندارد برای آزمون استحکام مکانیکی در آمدند. سه نمونه با درصد‌های وزنی متفاوت و اندازه‌های مشخص (قطر  $15 \text{ mm}$  و ارتفاع  $15 \text{ mm}$ ) از فلوئورهیدروکسی آپاتیت (40، 50، 60 درصد وزنی) آماده شدند و نمودار مرتبط با استحکام فشار نمونه‌ها رسم شد. آزمایش‌ها برای هر نمونه 3 بار تکرار شد و در این تحقیق مقدار میانگین گزارش شده است.

### 14-2- آنالیز آماری داده‌ها

برای تحلیل نتایج حاصل از ارزیابی‌های زیستی از آزمون آنالیز واریانس یک طرفه استفاده شد. سطح معنی داری در آزمون‌ها  $0/05 \leq \text{پی}$  - مقدار<sup>1</sup>، در نظر گرفته شد.

### 3- نتایج و بحث

#### 1-1- نتایج آزمون پراش پرتو ایکس (XRD)

نتایج پراش اشعه ایکس برای پودر فلوئورهیدروکسی آپاتیت، آلزینات و داربست‌های کامپوزیتی در شکل 1 نشان داده شده است. با توجه به الگوی پراش بدست آمده از سدیم آلزینات، سه پیک کریستالی در  $2\theta = 13.7^\circ$ ،  $23^\circ$  و  $40^\circ$  قابل رویت است. در حالی که با توجه به مطالعات دیگر [30، 31]، الگوی پراش آلجینات تنها نواحی کریستالی  $2\theta = 13.7^\circ$  و  $23^\circ$  را شامل می‌شود. این تفاوت به دلیل مقادیر متفاوت گلورونیک و مانورونیک اسید موجود در نمونه‌های مختلف سدیم آلزینات می‌باشد. با توجه به شکل 1 اغلب قله‌های اصلی مربوط به فاز آپاتیت از جمله قله‌های (112)، (002)، (300) و (211) (بین قله‌های (112) و (300)) به وضوح دیده می‌شوند. به دلیل تشابه زیاد ساختار بلوری و ابعاد واحد شبکه، همه قله‌های فلوئور آپاتیت و هیدروکسی آپاتیت به طور دقیق قابل تمایز از یکدیگر نیستند به همین دلیل در این پژوهش از آنالیز

<sup>1</sup> P-Value

### 3-3- نتایج آزمون فلورسانس پرتو ایکس

آنالیز عنصری به روش فلورسانس پرتو ایکس بر روی پودر فلورید هیدروکسی آپاتیت تهیه شده به روش هم‌رسوبی و به منظور تأیید حضور اکسیدها در ترکیب مطابق درصد وزنی مورد نظر، انجام گرفت. نتایج به دست آمده از جدول 2 با تقریب قابل قبولی مشابه درصدهای وزنی محاسبه شده در نمونه می‌باشد.

جدول 2 نتیجه آنالیز عنصری پرتو ایکس و درصد مولی اکسیدهای فلورید هیدروکسی آپاتیت

Table 2 Results of XRF and mole percentage of oxides of flourohydroxy apatite

اکسید	درصد مولی
CaO	62.08
P <sub>2</sub> O <sub>5</sub>	33.09
F	4.20

### 4-3- نتایج آزمون میکروسکوپ الکترونی روبشی، توزیع قطر تخلخل‌ها و EDS

شکل 3 تصویرهای میکروسکوپ الکترونی روبشی از داربست‌های متخلخل آلزینات-فلورید هیدروکسی آپاتیت را با درصدهای متفاوت از فلورید هیدروکسی آپاتیت نمایش می‌دهد. با توجه به تصاویر میکروسکوپ الکترونی روبشی بدست آمده از داربست‌های کامپوزیتی آلزینات-فلورید هیدروکسی آپاتیت در شکل 3 (S1, S2 و S3) و توزیع قطر تخلخل‌ها در شکل 4، مشاهده شد که قطر اغلب حفرات در محدوده 200-600 μm قرار دارد و تنها 15% حفرات دارای قطر بیشتر از 600 μm می‌باشند. همچنین شکل 3 و پراکندگی اندازه تخلخل‌ها روی نمودار شکل 4 نشان می‌دهند که با افزایش میزان فلورید هیدروکسی آپاتیت در ساختار داربست‌ها، توزیع تخلخل‌ها به سمت تخلخل‌های با قطر کمتر می‌رود. با توجه به تصاویر بدست آمده از داربست‌های کامپوزیتی، ملاحظه شد که نمونه‌ها دارای ساختاری متخلخل هستند و همه آن‌ها دارای تخلخل‌هایی از نوع تخلخل‌های باز می‌باشند. شکل 3 به خوبی وجود ارتباط داخلی (به هم پیوستگی) بین خلل و فرج که نقش مهمی در تغذیه رسانی سلول، دفع پسماندهای حاصل از سلول و رشد و تکثیر سلول بازی می‌کند [32] را در هر سه داربست کامپوزیتی با درصدهای وزنی متفاوت از فلورید هیدروکسی آپاتیت نشان می‌دهد. همچنین انتخاب و آماده‌سازی ماده مناسب برای کاربرد-های مورد نیاز با توجه به نتایج میکروسکوپ الکترونی روبشی می‌تواند انجام گیرد. علاوه بر این مورفولوژی سلول‌ها پس از قرارگیری داربست‌ها به مدت 7 روز در محیط کشت در شکل 3 نشان داده شده است. با توجه به شکل 3 (C1) و (C2) مشاهده می‌شود که سلول‌ها بوسیله پیک‌های کاذب به درون تخلخل‌ها نفوذ کرده‌اند و به سطح داربست چسبیده‌اند و تشکیل لایه‌های سلولی را داده‌اند. همچنین ریخت شناسی سلول‌ها نیز نشانگر پهن شدن آن‌ها روی داربست‌ها است که تأیید می‌کند سطح تخلخل‌ها هم از نظر اندازه و هم از نظر نوع مواد به کار رفته برای قرارگیری سلول‌ها مناسب است، همچنین نتایج حاصل از آنالیز EDS در شکل 3 (E) نیز حضور ترکیبات کلسیم، فسفات و سدیم را در ترکیب داربست‌های کامپوزیتی تأیید می‌کند. در مجموع با توجه به نوع داربست‌ها، بازه اندازه تخلخل‌ها، ارتباط حفره‌ها به یکدیگر و میزان چسبندگی و نفوذ سلولی، می‌توان نتیجه گرفت داربست‌های کامپوزیتی بدست آمده از این نظر، تا حد زیادی خصوصیات یک داربست مطلوب و قابل قبول مورد استفاده در مهندسی بافت استخوان را دارا می‌باشند.

کربوکسیل می‌باشند. باند پهن ظاهر شده در  $3430\text{ cm}^{-1}$  مربوط به ارتعاشات گروه‌های هیدروکسیل می‌باشد. علاوه بر این به دلیل شبکه‌ای شدن آلزینات با کلرید کلسیم، کاتیون‌ها به صورت یونی با گروه‌های  $\text{COO}^-$  از اسید گلوکونیک و اسید مانورونیک ارتباط برقرار می‌کنند تا بصورت پیوند متصل شوند. همچنین، شیفت باند جذبی ممکن است به دلیل شبکه‌ای شدن یونی گروه‌های  $\text{COOH}$  باشد، زیرا زنجیره‌های گلوکونیک اسید بواسطه یون کلسیم با یکدیگر اتصال برقرار می‌کنند. با توجه به شکل 2 باندهای قابل مشاهده در  $2925\text{ cm}^{-1}$ ،  $1629\text{ cm}^{-1}$ ،  $1316\text{ cm}^{-1}$ ،  $820\text{ cm}^{-1}$  و  $3445\text{ cm}^{-1}$  مربوط به سدیم آلزینات می‌باشند و حضور آلجینات در سه داربست کامپوزیتی تهیه شده با درصدهای متفاوتی از فلورید هیدروکسی آپاتیت قابل استنباط است. با توجه به طیف بدست آمده از پودر فلورید هیدروکسی آپاتیت، پیک اضافی که بیان‌کننده جایگزینی گروه‌های عاملی ناخواسته در ترکیب آپاتیت یا حضور ناخالصی‌ها باشد، وجود ندارد. در فلورید هیدروکسی آپاتیت سنتز شده ساختار آپاتیت با طول موج‌های  $560\text{--}610\text{ cm}^{-1}$  و  $950\text{--}1100\text{ cm}^{-1}$  مشاهده می‌شود. همچنین یک باند کوچک در طول موج  $963\text{ cm}^{-1}$  که مربوط به باند فسفاتی ساختار آپاتیت است در ساختار فلورید هیدروکسی آپاتیت دیده می‌شود. در واقع آنچه ساختار هیدروکسی آپاتیت را از فلورید هیدروکسی آپاتیت متمایز می‌کند، باندهای مرتبط با گروه‌های هیدروکسیل شبکه‌ای در طول موج‌های  $633\text{ cm}^{-1}$  و  $3570\text{ cm}^{-1}$  می‌باشد. باند مشاهده شده در موقعیت  $745\text{ cm}^{-1}$  مشخصه زنجیر هیدروکسیلی است که در ساختار آپاتیت، تأییدی بر جایگزین شدن کامل گروه‌های هیدروکسیل در ساختار آپاتیت با یون فلورید که در نتایج سایر پژوهش‌ها نیز حضور این پیک گزارش شده است، می‌باشد. همچنین در شکل 2 با توجه به طیف‌های بدست آمده از داربست‌های کامپوزیتی، باندهای موجود در نواحی  $874\text{ cm}^{-1}$  و  $1639\text{ cm}^{-1}$ ، به ترتیب مربوط به گروه‌های هیدروکسیل و کربوکسیل می‌باشند که دلیل آن واکنش بین اتم‌های کلسیم از فلورید هیدروکسی آپاتیت با اتم‌های اکسیژن آلجینات می‌باشد، همچنین باند موجود در  $1032\text{ cm}^{-1}$  و باندهای موجود در  $564\text{ cm}^{-1}$  و  $604\text{ cm}^{-1}$  به ترتیب مربوط به کشش و ارتعاش پیوند فسفاتی می‌باشند. نهایتاً نتایج بدست آمده از طیف‌های داربست‌های کامپوزیتی حاکی از حضور آلزینات، فلورید هیدروکسی آپاتیت و تشکیل پیوند بین این دو ماده در ترکیب داربست‌های آلزینات-فلورید هیدروکسی آپاتیت می‌باشد.

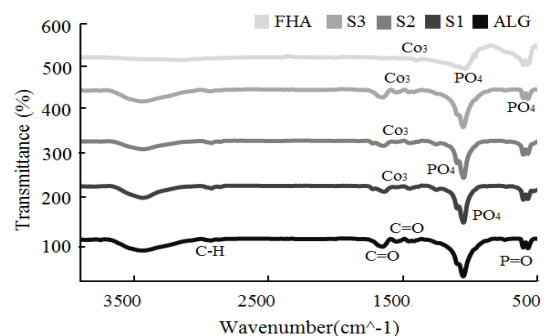
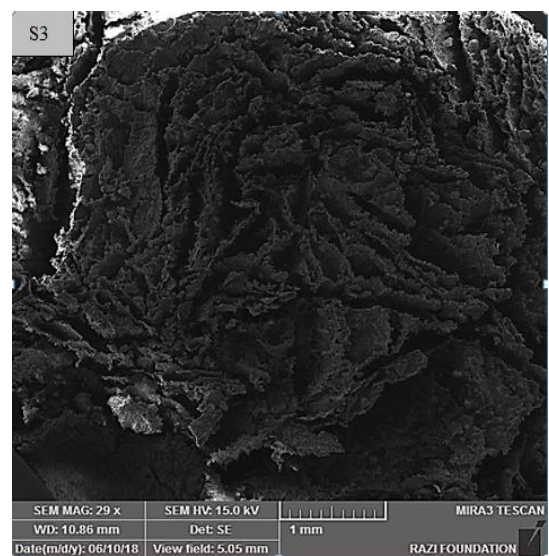
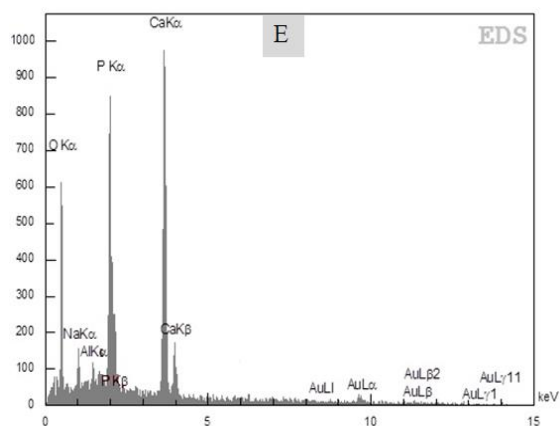
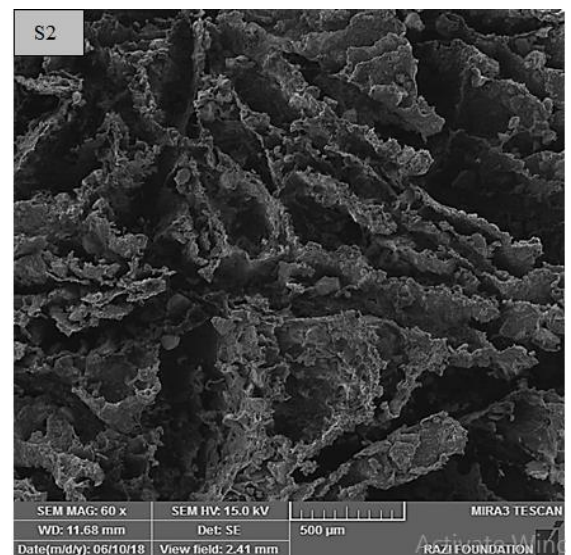
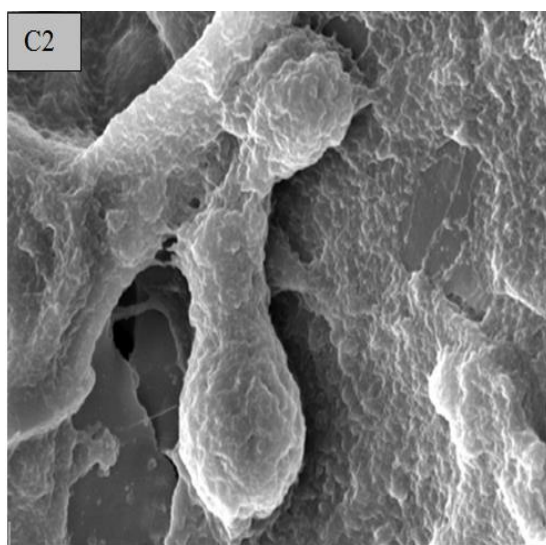
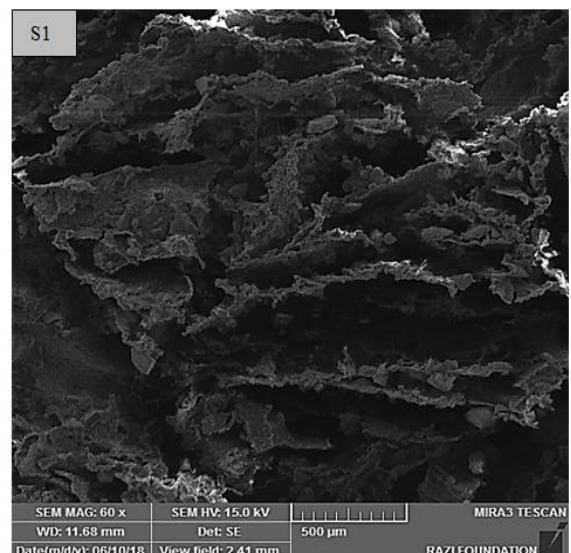
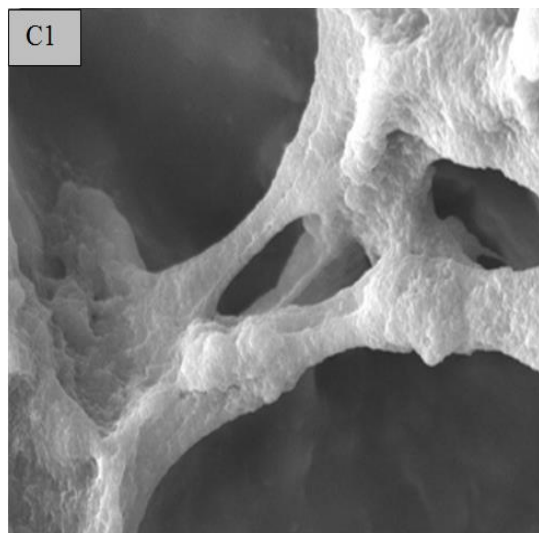


Fig. 2 FT-IR spectra of alginate (ALG), composite scaffolds (S1, S2 and S3) and flourohydroxyapatite (FHA)

شکل 2 طیف FTIR آلزینات (ALG)، داربست‌های کامپوزیتی S1، S2 و S3 و فلورید هیدروکسی آپاتیت (FHA)





**Fig. 3.** SEM micrographs of composite scaffolds (S1, S2 and S3) and morphology of the cells cultured on the scaffolds (C1 and C2) and EDS analysis

شکل 3 تصاویر میکروسکوپ الکترونی روبشی داربست‌های کامپوزیتی (S1, S2, S3) و مورفولوژی سلول‌های کشت داده شده بر روی داربست‌ها (C1 و C2) و آنالیز EDS

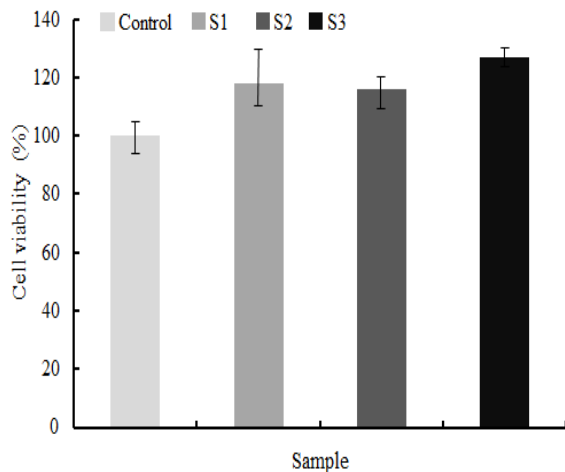


Fig. 5 MTT assay of various Alginate – Flourohydroxyapatite composite scaffolds (S1, S2 and S3) and control sample after 3 days

شکل 5 نمودار MTT داربست‌های مختلف کامپوزیتی آلژینات - فلوئورهیدروکسی آپاتیت (S1, S2, S3) و نمونه شاهد بعد از مدت زمان 3 روز

### 6-3- بررسی فعالیت آلکالین فسفاتازی (ALP) داربست‌های کامپوزیتی

استفاده از آزمون آلکالین فسفاتاز جهت ارزیابی فعالیت استخوان سازی سلول‌ها بسیار رایج است. آنزیم آلکالین فسفاتاز در اکثر سلول‌ها از نوع آنزیم‌های غشاء سلولی بوده و تا کنون غلظت‌های بالای آن در سلول‌های کبدی، کلیوی، استخوانی (استئوبلاست) و جفت گزارش شده است. برخی معتقدند که این آنزیم در تخریب پیروفسفات معدنی مشارکت می‌کند تا یک غلظت موضعی کافی از فسفات یا پیروفسفات معدنی، به منظور فرایند معدنی شدن فراهم نماید. در میان آزمون‌های بیولوژیکی مختلف برای تخمین میزان فعالیت استئوبلاست‌ها درون داربست‌ها، ترشح آلکالین فسفاتاز، آزمونی مهم است. میزان آلکالین فسفاتاز ترشح شده از سلول‌های استئوبلاست قرار گرفته در مجاورت داربست‌های کامپوزیتی ساخته شده از سدیم آلژینات و فلوئورهیدروکسی آپاتیت، با سه نسبت مختلف فلوئورهیدروکسی آپاتیت، پس از 7 روز در شکل 6 نشان داده شده است. این آزمون برای هر نمونه 3 مرتبه تکرار شد. همانطور که در شکل 6 نشان داده شده است. داربست کامپوزیتی آلژینات-فلوئورهیدروکسی آپاتیت با بیشترین درصد وزنی فلوئورهیدروکسی آپاتیت (نمونه S3)، نسبت به دو داربست کامپوزیتی دیگر (نمونه‌های S1 و S2) فعالیت آلکالین فسفاتاز قابل توجهی را نشان می‌دهد. این موضوع به دلیل تاثیر اندازه حفرات و درصدوزنی فلوئورهیدروکسی آپاتیت در هر کدام از داربست‌های کامپوزیتی، بر روی فعالیت آلکالین فسفاتاز می‌باشد. در واقع داربست‌های با درصد‌های وزنی بیشتر از فلوئورهیدروکسی آپاتیت به دلیل ایجاد شرایط بهینه برای رشد، تکثیر و چسبندگی سلولی، می‌توانند فعالیت آلکالین فسفاتاز را ترویج نمایند. علاوه بر این، داربست با اندازه منافذ کوچک‌تر (نمونه S3) یک محیط مطلوب را برای فعالیت فراهم می‌آورد. نهایتاً فعالیت آلکالین فسفاتازی سلول‌های استئوبلاست با توجه به نتایج آزمون سمیت‌زایی، مناسب بودن داربست‌های کامپوزیتی برای فعالیت سلول‌های استخوانی را نشان داد.

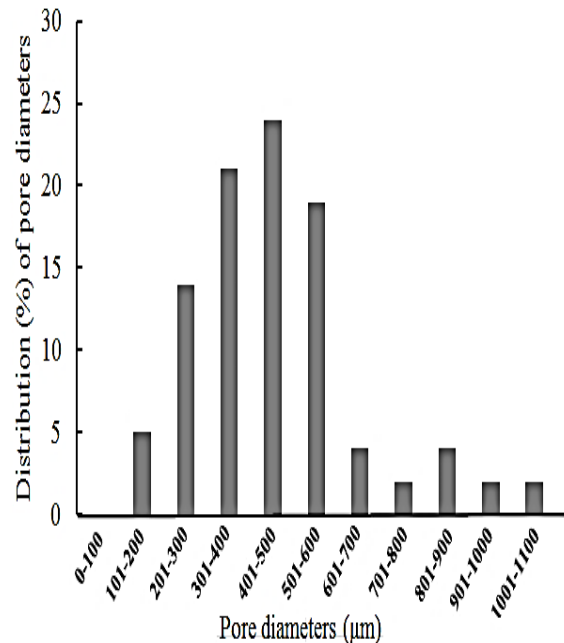


Fig. 4 Pore diameter distribution of composite scaffolds

شکل 4 نمودار توزیع قطر تخلخل داربست‌های کامپوزیتی

### 5-3- بررسی سمیت زایی (MTT) داربست‌های کامپوزیتی

شکل 5 نمودار میزان زنده‌مانی سلول‌های رده ام جی - 63 در مجاورت عصاره کامپوزیت‌ها به مدت 3 روز را نشان می‌دهد. همان‌گونه که در شکل 5 مشاهده می‌شود، حضور داربست‌های کامپوزیتی سبب رشد و تکثیر سلول‌های استئوبلاست نسبت به نمونه کنترل، شده است. در واقع مواد تشکیل دهنده داربست‌های کامپوزیتی، نه تنها اثر سمیت برای سلول‌ها نداشته‌اند، بلکه سبب بهبود عملکرد سلول‌ها، رشد و تکثیر بیشتر آن‌ها شده‌اند. حضور فاز کلسیم فسفاتی در ساختار داربست‌ها نیز به علت تشابه بسیار زیاد ساختار آن با استخوان طبیعی بدن و آزاد سازی مواد و یون‌های مشابه بدن، سبب رشد و تکثیر سلول‌های استخوانی می‌شود [33]. به طوری که داربست کامپوزیتی آلژینات-فلوئورهیدروکسی آپاتیت با بیشترین درصد وزنی فلوئورهیدروکسی آپاتیت (نمونه S3) در مقایسه با دو داربست دیگر، شرایط ایده‌آل‌تر برای کاربرد در مهندسی بافت استخوان و بیشترین زنده‌مانی برای سلول‌ها را نشان می‌دهد. علاوه بر این خلل و فرج‌های داربست برای کاشت سلول به اندازه کافی بزرگ هستند و سطحی به اندازه کافی وسیع برای چسبندگی سلول و نفوذ مواد غذایی و متابولیت‌ها فراهم می‌کنند. آزمون سمیت‌زایی به تنهایی برای بررسی رفتار سلولی در مجاورت نمونه‌ها کافی نیست اما بیانگر این موضوع است که داربست‌های کامپوزیتی برای رده سلولی ام جی - 63 سمیتی ندارند و وجود عصاره این کامپوزیت‌ها در محیط کشت باعث افزایش تکثیر سلول‌ها و افزایش فعالیت میتوکندری آن‌ها می‌شود. لازم به ذکر است که این آزمون برای هر نمونه 3 مرتبه تکرار شد و پی-مقدار برای مقادیر بدست آمده کمتر از 0.05 بود که نشان دهنده‌ی معنی‌دار بودن داده‌های بدست آمده است.

مطابق آنچه برای فلوئورهیدروکسی آپاتیت بیان شد، برای هیدروکسی آپاتیت نیز اتفاق می‌آید و رفتار دی هیدروکسی لاسیون باعث کاهش تعداد گروه‌های هیدوکسیل می‌شود اما این رفتار تاثیر زیادی بر ساختار کریستالی نمی‌گذارد [35].

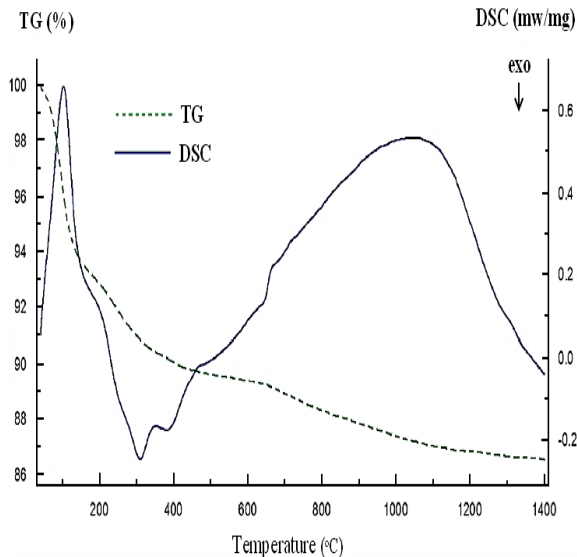


Fig. 7 TG-DSC curves of alginate - fluoroxyapatite composite scaffolds

شکل 7 نمودار TG-DSC داربست‌های کامپوزیتی آلزینات-فلوئورهیدروکسی آپاتیت

### 8-3- بررسی خواص مکانیکی داربست‌ها

اندازه‌گیری خواص فشاری از دیگر فاکتورهای مهم در طراحی داربست برای مهندسی بافت استخوان است. نتایج استحکام فشاری داربست‌های کامپوزیتی آلزینات-فلوئورهیدروکسی آپاتیت در شکل 8 نشان داده شده است. میزان تغییرات استحکام فشاری نمونه‌ها با افزودن درصد‌های مختلف فلوئورهیدروکسی آپاتیت به خوبی قابل مشاهده است. همانطور که در شکل 8 مشاهده می‌شود، با افزایش فلوئورهیدروکسی آپاتیت از 40 درصد وزنی به 60 درصد وزنی در ترکیب داربست‌های کامپوزیتی، استحکام فشاری نمونه به طور قابل توجهی از  $1.1 \pm 0.2 \text{ MPa}$  به  $2.3 \pm 0.5 \text{ MPa}$  افزایش یافته است. علاوه بر این، مطالعات انجام شده بر روی داربست فلوئورهیدروکسی آپاتیت-پلی یورتان [36]، حاکی از خواص ضعیف کامپوزیت مذکور در مقایسه با داربست کامپوزیتی سنتز شده در پژوهش حاضر می‌باشد و این افزایش استحکام به استفاده از فرایند خشک‌کشی انجمادی برای ساخت داربست‌ها، کاهش تشکیل منافذ ریز در دیواره فلوئورهیدروکسی آپاتیت، پایداری بالای شبکه فلوئورهیدروکسی آپاتیت، کاهش تخلخل‌ها (به دلیل افزایش فلوئورهیدروکسی آپاتیت در ترکیب داربست) و سازگاری بسیار مناسب فلوئورهیدروکسی آپاتیت با آلزینات نسبت داده شده است. نهایتاً با مقایسه این داده‌ها می‌توان دریافت که با افزایش میزان فلوئورهیدروکسی آپاتیت در نمونه علاوه بر بهبود فعالیت زیستی داربست‌ها، خواص مکانیکی آن‌ها نیز افزایش یافته است. بنابراین داربست‌های کامپوزیتی متشکل از سدیم آلزینات و فلوئورهیدروکسی آپاتیت دارای استحکام فشاری قابل قبول برای استفاده در مهندسی بافت استخوان می‌باشند.

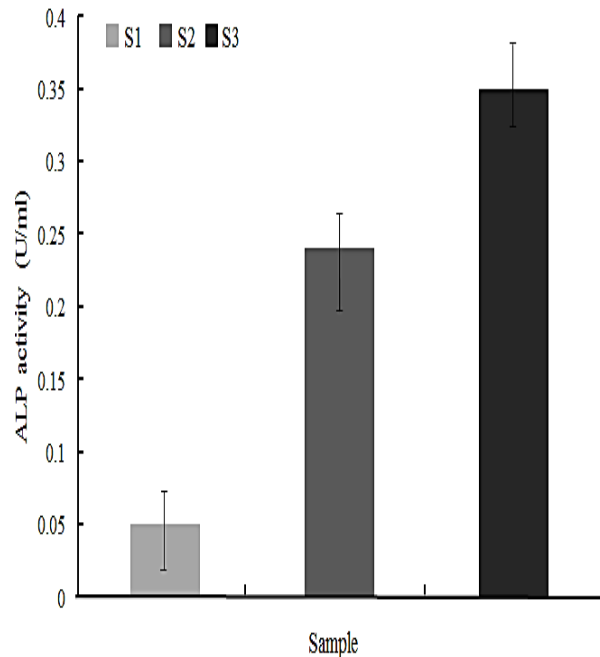
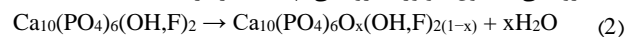


Fig. 6 ALP activity of cells, cultured on various alginate - fluoroxyapatite composite scaffolds after 7 days

شکل 6 فعالیت ALP سلول‌های کشت داده شده بر روی داربست‌های مختلف کامپوزیتی آلزینات-فلوئورهیدروکسی آپاتیت بعد از 7 روز

### 7-3- نتایج آزمون حرارتی (TG-DSC)

به منظور مطالعه رفتار حرارتی داربست‌های کامپوزیتی آلزینات-فلوئورهیدروکسی آپاتیت، آزمون حرارتی انجام گرفت و نتایج آن در شکل 7 نشان داده شده است. با توجه به شکل 7، نمودار TG تا دمای  $1300^\circ\text{C}$  در سه ناحیه کاهش وزن نشان می‌دهد و بعد از دمای  $1300^\circ\text{C}$  تغییرات وزنی مشاهده نمی‌شود. اولین کاهش وزن (در حدود 6 درصد وزنی) در محدوده دمای اتاق تا  $130^\circ\text{C}$  اتفاق می‌افتد که دلیل آن از دست رفتن آب موجود در داربست‌های کامپوزیتی آلزینات-فلوئورهیدروکسی آپاتیت می‌باشد. دومین کاهش وزن (در حدود 3 درصد وزنی) در محدوده دمایی  $220-400^\circ\text{C}$  مشاهده می‌شود که دلیل آن پیرولیز کلسیم موجود در آلزینات می‌باشد و حضور پیک‌هایی در محدوده دمایی  $300-400^\circ\text{C}$  موید این موضوع است. با توجه به مطالعات مرتبط صورت گرفته در این زمینه، کاهش وزن ایجاد شده در کامپوزیت تا حدودی مشابه با آلزینات خالص می‌باشد [34]. همانطور که در شکل 7 قابل مشاهده است، سومین کاهش وزن در محدوده دمایی  $650-1300^\circ\text{C}$  به دلیل رفتار دی هیدروکسی لاسیون فلوئورهیدروکسی آپاتیت اتفاق می‌افتد. بنابراین با در نظر گرفتن فرمول فلوئورهیدروکسی آپاتیت  $[\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH},\text{F})_2]$ ، پیک پهن در محدوده  $650-1300^\circ\text{C}$  با توجه به رابطه (2) با رفتار دی هیدروکسی لاسیون فلوئورهیدروکسی آپاتیت سازگار است.



در این واکنش، با رسیدن درجه حرارت به محدوده مرتبط با دی هیدروکسی لاسیون ( $650-1300^\circ\text{C}$ )، آب به تدریج از فلوئورهیدروکسی آپاتیت آزاد می‌شود، فلوئورهیدروکسی آپاتیت با کاهش تدریجی در تعداد گروه‌های هیدروکسیل شکل می‌گیرد و یک فاز غیراستوکیومتری ایجاد می‌شود.



نتایج این پژوهش نشان داد که داربست کامپوزیتی آلزینات-فلوئورهیدروکسی آپاتیت می‌تواند ضمن تامین خواص مکانیکی و بیولوژیکی مناسب، بستر مناسب برای رشد سلولی را نیز فراهم کند و بطور بالقوه گزینه‌ای بسیار مناسب جهت استفاده در مهندسی بافت استخوان باشد.

#### 5- مراجع

- [1] Sachlos, E. Czernuszka, JT., "The Application of Solid Freeform Fabrication Technology to the Production of Tissue Engineering Scaffolds", European Cells and Materials, Vol. 05, No. -, pp. 29-39, 2003.
- [2] Cima, L. Vacanti, JP. Vacanti, C. Ingber, D. Mooney, D. Langer, R., "Tissue Engineering by Cell Transplantation Using Degradable Polymer Substrates", Journal of Biomechanical Engineering, Vol. 113, No. 02, pp. 143-149, 1991.
- [3] Takei, J., "Drug Screening, Tissue Engineering and Cancer Biology", Alternatives to Animal Testing and EXperimentation, Vol. 11, No. 03, pp. 170-176, 2006.
- [4] Slaughter, BV. Khurshid, SS. Fisher, OZ. Khademhosseini, A. Peppas, NA., "Hydrogels in Regenerative Medicine", Advanced Materials, Vol. 21, pp. No. 32-33, pp. 3307-3329, 2009.
- [5] Fang, Z. Starly, B. Sun, W., "Computer-Aided Characterization for Effective Mechanical Properties of Porous Tissue Scaffolds", Computer Aided Design, Vol. 37, No. 01, pp. 65-72, 2005.
- [6] Yang, S. Leong, KF. Du, Z. Chua CK., "The Design of Scaffolds for Use in Tissue Engineering. Part I. Traditional Factors", Tissue Engineering, Vol. 07, No. 06, pp. 679-689, 2001.
- [7] Niknejad, H. Periovi, H. Jorian, M. Ahmadiani, A. Ghanavi, J. Seifalian, AM., "Properties of the Amniotic Membrane for Potential use in Tissue Engineering", European Cells & Materials, Vol. 15, No. -, pp. 88-99, 2008.
- [8] Hutamacher, W. Schantz, T. Zien, I. Ng, KW. Teoh, SH. Tan, KC., "Mechanical Properties and Cell Cultural Response of Polycaprolactone Scaffolds Designed and Fabricated via Fused Deposition Modeling", Journal of Biomedical Materials Research, Vol. 55, No. 02, pp. 203-216, 2001.
- [9] Chen, Y. Mak, AFT. Wang, M. Li, J. Wong, MS., "PLLA Scaffolds with Biomimetic Apatite Coating and Biomimetic Apatite/Collagen Composite Coating to Enhance Osteoblastlike Cells Attachment and Activity", Surface and Coatings Technology, Vol. 201, No. 03-04, pp. 575-658, 2006.
- [10] Ishaug, SL. Crane, GM. Miller, MG. Yasko, AW. Yaszemski, MJ. Mikos, AJ., "Bone Formation by Three Dimensional Stormal Osteoblast Culture in Biodegradable Polymer Scaffolds", Journal of Biomedical Materials Research, Vol. 36, No. 01, pp. 17-28, 1997.
- [11] Liu, C. Z. Xia, J. T. Czernuszka., "Design and Development of Three-Dimensional Scaffolds for Tissue Engineering, " International Journal of Chemical Engineering research and design, Vol. 85, No. 07, pp. 1051-1064, 2007.
- [12] Lyons, F. Partap, S. O'Brien, FJ., "Part 1: Scaffolds and Surfaces. Technology and Health Care", Journal of the European Society for Engineering and Medicine, Vol. 16, No. 04, pp. 305-17, 2008.
- [13] Ramakrishna, S. Mayer, J. Wintermantel, E. Leong, KW., "Biomedical Applications of Polymercomposite Materials", Composites Science and Technology, Vol. 61, No. 09, pp. 1189-224, 2001.
- [14] Zhou, H. Lee, J., "Nanoscale Hydroxyapatite Particles for Bone Tissue Engineering", Acta biomaterialia, Vol. 07, No. 07, pp. 2769-81, 2011.
- [15] Kamali, S. Khavandi, A. Shemshad, S. and Malekmohammadi, E., "Effect of Nitinol Addition on the Mechanical Properties and the Microstructure of Natural Hydroxyapatite Obtained From calf Femoral Bone", In Persian, Journal of Science and Technology of Composites, Vol. 05, No. 02, pp. 238-244, 2018.
- [16] Sattary, M. Rafienia, M. Khorasani, MT. Salehi-Rozve, H., "Study of Cell Behavior of the Electrospun Polycaprolactone/Gelatin Scaffold Containing Nanohydroxyapatite and Vitamin D3", In Persian, Journal of Isfahan Medical School, Vol. 35, No. 425, pp. 387-92, 2017.

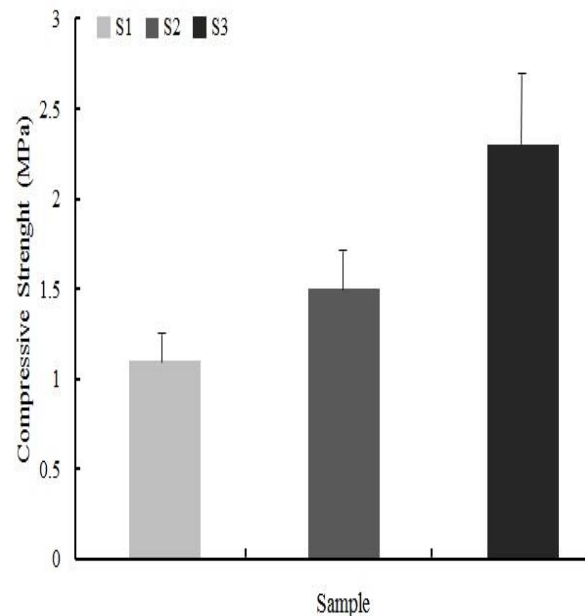


Fig. 8 Compressive strength of the alginate-fluorohydroxyapatite composite scaffolds

شکل 8 استحکام فشاری داربست‌های کامپوزیتی آلزینات-فلوئورهیدروکسی آپاتیت

#### 4- نتیجه گیری

در این پژوهش داربست کامپوزیتی سدیم آلزینات-فلوئورهیدروکسی آپاتیت به روش خشک‌کشی انجمادی تهیه شد. تکنیک مورد استفاده در این تحقیق جهت ساخت داربست‌های کامپوزیتی، یک روش ساده و مقرون به صرفه چه از نظر اقتصادی و چه از نظر زمانی می‌باشد و نیاز به استفاده از حلال‌های سمی وجود ندارد. علاوه بر این، انحلال آلزینات در آب خود فرایندی است که تداخل‌های لازم را در داربست‌ها ایجاد می‌کند، بنابراین نیاز به استفاده از عوامل تداخل ساز نیست. از فلوئورهیدروکسی آپاتیت در کنار سدیم آلزینات به منظور بهبود خواص بیولوژیکی و مکانیکی کامپوزیت بهره گرفته شد.

با توجه به الگوی پراش اشعه ایکس و منحنی تبدیل فوریه مادون قرمز پودر فلوئور هیدروکسی آپاتیت و داربست‌های کامپوزیتی، مشاهده می‌شود که در این پژوهش فلوئور هیدروکسی آپاتیت به صورت موفقیت آمیز با روش هم-رسوبی تهیه شده است و ارتباط مناسبی بین فلوئورهیدروکسی آپاتیت و سدیم آلزینات به عنوان اجزاء تشکیل دهنده‌ی داربست برقرار شده است. تصاویر میکروسکوپ الکترونی، حصول داربست کامپوزیتی با تداخل قابل قبول را تایید نمود.

آزمایش میزان زنده‌مانی و فعالیت آلکالین فسفاتازی سلول‌های استخوانی در بازه‌های زمانی معین، نشان دادند که داربست‌های تولید شده بستر مناسبی برای رشد و تکثیر سلول‌های بافت استخوان هستند، بطوریکه تکثیر و زیستایی سلول‌های استخوانی رده ام جی - 3 در تماس با داربست محتوی 60 درصد وزنی فلوئورهیدروکسی آپاتیت بیشتر از دو داربست دیگر بود. به علاوه نشان داده شد که خصوصیات مکانیکی به دست آمده آزمون فشاری، بسیار برتر بوده و به استخوان اسفنجی بسیار نزدیک می‌باشد.

همچنین، رفتار دی هیدروکسی لاسیون در فلوئورهیدروکسی آپاتیت در محدوده دمایی °C 650-1300 که مرتبط با جاهای خالی ایجاد شده بواسطه یون هیدروکسیل در ساختار است، مورد بررسی قرار گرفت.

- Mechanical Characterization”, International Journal of Nanomedicine, Vol. 6, No. 1, pp. 93-100, 2011.
- [17] Nouri-Niyaraki, M. Ashenai-Ghasemi, F. Ghasemi, I. and Daneshpayeh, S., “Experimental Analysis of Graphene Nanoparticles and Glass Fibers Effect on Mechanical and Thermal Properties of Polypropylene/EPDM Based Nanocomposites”, In Persian, Journal of Science and Technology of Composites, Vol. 05, No. 02, pp. 169-176, 2018.
- [18] Ehterami, A. Saraeian, P. Etemadi Haghghi, Sh. Azami, M., “Preparation and Characterization of Barium Titanate Scaffold for Bone Tissue Engineering”, In Persian, Journal of Modares Mechanical Engineering, Vol. 17, No. 12, pp. 417-422, 2018.
- [19] Azami, M. Moztarzadeh, F. Rabiee, M., “Preparation of Nanocomposite Gelatin/apatite Scaffold Through a Biomimetic Method”, In Persian, Iranian journal of biomedical engineering, Vol. 03, No. 04, pp. 275-284, 2010.
- [20] Hench, L. “Bioceramics: From Concept to Clinic,” Journal of American Ceramic Society, Vol. 102, No. 01, pp. 1487-1510, 1991.
- [21] Öner, M. Yetiz, E. Ay, E. Uysal, U., “Ibuprofen release From Porous Hydroxyapatite Tablets”, Ceramics International, Vol. 37, No. 07, pp. 2117-25, 2011.
- [22] Lima, I.R. Alves, G.G. Soriano, C.A. Campanelli, A.P. Gasparoto, T.H. Ramos, E.S. Sena, L.A. Rossi, A.M. Granjeir, J.M., “Understanding the Impact of Divalent Cationsubstitution on Hydroxyapatite: an in Vitro Multiparametric Study on Biocompatibility”, J. Biomed Mater. Res. Part A, Vol. 98, No. 3, pp. 351-358, 2011.
- [23] Yang, H. Xiao, B. Xu, K.W. “Synthesis and Characterization of Ag/Cu/ HAP with Platelet Morphology”, J. Mater. Sci. Mater. Med, Vol. 20, No. 3, pp. 785-792, 2009.
- [24] Cheng, K. Shen, G. Weng, W. Han, G. Ferreira, M.F. Yang, Juan., “Synthesis of Hydroxyapatite/Fluoroapatite Solid Solution by Sol-Gel Method”, Materials Letters, Vol. 51, No. 01 pp. 37-41, 2001.
- [25] Burg, KJ. Porter, S. Kellam, JF., “Biomaterial Developments for Bone Tissue Engineering”, Biomaterials, Vol. 21, No. 23, pp. 59-2347, 2000.
- [26] Hutmacher, DW., “Scaffolds in Tissue Engineering Bone and Cartilage”, Biomaterials, Vol. 21, No. 24, pp. 2529-43, 2000.
- [27] Jarosz, S. Kamerling, J. Coimbra, M. Andrade, M.Christensen, B. Rudd, P.Videira, P. Pilar Rauter, A. Lindhorst, T., “Carbohydrate Chemistry”, First ed., Royal Society of Chemistry, pp. 227-258, 2011.
- [28] Wang, L. Shelton, RM. Cooper, PR. Lawson, M. Triffitt, JT. Barralet, JE., “Evaluation of Sodium Alginate for Bone Marrow Cell Tissue Engineering”, Biomaterials, Vol. 24, No. 20, pp. 3475-3481, 2003.
- [29] Nasri-Nasrabadi, B. Kaynak, A. Heidarian, P. Komeily-Nia, Z. Mehra, M. Salehi, H. Kouzani, A., “Sodium Alginate/Magnesium Oxide Nanocomposite Scaffolds for Bone Tissue Engineering”, Polym Adv Technol, Vol. 29, No. 9, pp. 1-7, 2018.
- [30] Wang, Q. Hu, X. Du, Y. and Kennedy, J. F., “Alginate/Starch Blend Fibers and Their Properties for Drug Controlled Release,” Carbohydrate Polymers, Vol. 82, No. 03, pp. 842-847, 2010.
- [31] Yang, G. Zhang, L. Peng, T. and Zhong. W., “Effects of Ca<sup>2+</sup> Bridge Cross-Linking on Structure and Pervaporation of Cellulose/ Alginate Blend Membranes,” Journal of Membrane Science, Vol. 175, No. 01, pp. 53-60, 2000.
- [32] Murphy, CM. Haugh, MG. O'Brien, FJ., “The Effect of Mean Pore Size on Cell Attachment, Proliferation and Migration in Collagen-Glycosaminoglycan Scaffolds for Tissue Engineering”, Biomaterials, Vol. 31, No. 3, pp. 461-6, 2010.
- [33] Cowin, C., “Bone Mechanics Handbook”, Second ed., Boca Raton, pp. 70-73, 2000.
- [34] Parhi, P. Ramanan, A. Ray A. R., “Preparation and Characterization of Alginate and Hydroxyapatite-Based Biocomposite”, Journal of Applied Polymer Science, Vol. 102, No. 6, pp. 5162-5165, 2006.
- [35] Ruys, A.J. Wei, M. Sorrell, C.C. Dickson, M.R. Brandwood, A. Milthorpe, B.K., “Sintering Effects on the Strength of Hydroxyapatite”, Biomaterials, Vol. 16, No. 5, pp. 409-415, 1995.
- [36] Asefnejad, A. Behnamghader, A. Khorasani, M. Farsadzadeh, B., “Polyurethane/Fluor-Hydroxyapatite Nanocomposite Scaffolds for Bone Tissue Engineering. Part I: Morphological, physical, and