

اصلاح سازی سطحی آلیاژ Ti-6Al-4V به وسیله پوشش نانوکامپوزیتی ژلاتین -

نانوذرات فلوئورآپاتیت دوپ شده با سیلیسیم و منیزیم

حجت الله آقاسی، تهمنه احمدی

گروه مهندسی مواد، دانشگاه آزاد اسلامی واحد شهرضا، شهرضا، اصفهان، ایران

مجید تقیان

فرید نعیمی

مرکز تحقیقات مواد پیشرفته، دانشکده مهندسی مواد، واحد نجف آباد، دانشگاه آزاد اسلامی، نجف آباد، ایران

(دریافت مقاله: ۹۸/۰۱/۲۷ - پذیرش مقاله: ۹۸/۰۳/۲۰)

چکیده

هدف از انجام این پژوهش ایجاد پوشش نانوکامپوزیتی ژلاتین-نانوذرات فلوئورآپاتیت دوپ شده با سیلیسیم و منیزیم و همچنین پوشش ژلاتین بر روی آلیاژ Ti-6Al-4V در جهت بهبود اصلاح خواص زیستی این آلیاژ بود. برای این منظور ابتدا پوشش نانوکامپوزیتی و همچنین پوشش ژلاتینی به روش غوطه‌وری ایجاد شد. سپس خواص فیزیکی، خوردگی و زیستی پوشش ایجاد شده توسط روش‌های مختلف بررسی شدند. نتایج حاکی از ایجاد پوشش نانوکامپوزیتی یکنواخت با ضخامتی حدود ۶٫۲۶ میکرومتر با ساختار و فازهای مناسب و افزایش زبری با افزودن نانوذرات به پوشش ژلاتین بود. اندازه‌گیری‌های الکتروشیمیایی نشان داد نمونه Ti-6Al-4V با پوشش ژلاتین همراه با نانوذرات دارای مقاومت پلاریزاسیون $R_p = 5.349 \times 10^5 \Omega \text{cm}^2$ است که نسبت به نمونه با پوشش ژلاتینی با مقاومت پلاریزاسیون $R_p = 1.191 \times 10^5 \Omega \text{cm}^2$ و نمونه بدون پوشش با مقاومت پلاریزاسیون $R_p = 5.2453 \times 10^4 \Omega \text{cm}^2$ از مقاومت پلاریزاسیون بالاتری برخوردار است. آزمون سمیت سلولی نشان دهنده عدم سمیت سلولی پوشش‌ها بود. همچنین رشد و تکثیر سلولی نمونه با پوشش نانوکامپوزیتی نسبت به نمونه بدون پوشش، تفاوت آماری معنی‌دار دارد. چسبندگی سلولی بر روی نمونه با پوشش نانوکامپوزیتی نیز نسبت به نمونه بدون پوشش و نمونه با پوشش ژلاتین بسیار بهتر بود.

واژه‌های کلیدی: اصلاح‌سازی سطحی، پوشش نانوکامپوزیتی، آلیاژ تیتانیوم، روش غوطه‌وری.

Surface Modification of Ti-6Al-4V Alloy by Gelatin/Silicon and Magnesium Co-Doped Fluorapatite Nanocomposite Coating

Hojjat Allah Aghasi, Tahmineh Ahmadi

Department of Materials, Shahreza branch, Islaic Azad University, Shahreza, Iran

Farid Naeimi

Department of Materials, Najafabad Branch, Islamic Azad University, Iran

Majid Taghian

Department of Materials Engineering, Isfahan University of Technology, Isfahan

(Received 16 April 2019, accepted 10 June 2019)

Abstract

The purpose of this study was to synthesis gelatin/silicon and magnesium co-doped fluorapatite nanocomposite coating and also gelatin coating on Ti-6Al-4V alloy in order to improve and modify the biological properties of this alloy. For this aim, nanocomposite coating and gelatin coating were first fabricated by dip-coating method. Then, the physical, corrosion and biological properties of the created coatings were investigated by different methods. The results indicated that a uniform nanocomposite coating with a thickness of about 6.26 microns was formed with appropriate structure and phases and increased roughness by adding nanoparticles to gelatin coating. Electrochemical measurements showed that nanocomposite-coated Ti-6Al-4V specimen with a polarization resistance of $R_p = 5.349 \times 10^5 \Omega \text{cm}^2$ has higher polarization resistance in comparison with the gelatine coating with a polarization resistance of $R_p = 1.191 \times 10^5 \Omega \text{cm}^2$ and the non-coated specimen with a polarization resistance of $R_p = 5.2453 \times 10^4 \Omega \text{cm}^2$. The cytotoxicity test showed no cell cytotoxicity of the coatings. Also, cell growth and proliferation of the nanocomposite-coated specimen showed statistically significant difference compared to the non-coated sample. Cell adhesion to the nanocomposite-coated specimen was also much better than the non-coated sample and gelatin-coated sample.

Key words: Surface modification, Nanocomposite coating, Titanium alloy, Dip-coating method.**E-mail of Corresponding author:** tahmadi56@yahoo.com.

مقدمه

ایجاد یک لایه اکسید محافظ بر روی تیتانیم، عملیات سطحی شیمیایی برای افزایش زیست فعالی تیتانیم و آلیاژهای آن، بکارگیری روش سل-ژل برای تامین لایه یکنواخت اکسید تیتانیم بر روی سطح و ایجاد سطح زیست فعال بر روی آلیاژ تیتانیم با روش غوطه‌وری در محلول شیمیایی روش‌های مورد استفاده در جهت اصلاح سطحی و بهبود استحکام پیوند استخوان با کاشتنی تیتانیمی از طریق عملیات شیمیایی و عملیات حرارتی این آلیاژ کاشتنی است [۸-۱۲].

بررسی مقالات و مطالب متعدد منتشر شده دلالت بر این دارد که پوشش‌های هیدروکسی‌آپاتیت عمدتاً بر روی زیر لایه تیتانیم یا آلیاژهای تیتانیم بکار برده شده است [۱۳]. بیشتر توجه، انتظارات و خواسته‌های پژوهشگران مختلف نیز شامل پیوند با استخوان، ترویج رشد استخوان، پایداری و تثبیت بهتر کاشتنی در بدن و ایجاد فصل مشترک چسبنده و زیستی بوده است [۱۴]. افزایش مقاومت خوردگی، کاهش چگالی جریان خوردگی در بدن مورد توجه و نظر پژوهشگران مختلف بوده است [۱۵].

جایگزینی یون‌های مختلف در ساختار هیدروکسی‌آپاتیت به منظور فراهم آوردن خواص مطلوب جدید و یا بهینه کردن برخی خواص موجود در طی سالیان اخیر توجه بسیاری از محققین را برانگیخته است. بر اساس نتایج تحقیقات صورت گرفته، جانشینی گروه هیدروکسیل توسط یون فلئوئور باعث افزایش میزان بلورینگی شده و پایداری شیمیایی بهتر ترکیب در محیط اسیدی و همچنین کاهش نرخ انحلال آن در محیط فیزیولوژیک بدن شده و پایداری حرارتی را نیز افزایش می‌دهد [۱۶]. همچنین جایگزینی منیزیم و سیلیسم به جای یون‌های کلسیم و فسفات در ساختار فلئوئورآپاتیت، موجب افزایش انحلال‌پذیری و جذب بیشتر یون‌های Ca^{+2} بر سطح ماده FA-Si-Mg می‌گردد [۱۷].

پوشش‌های پلیمری نیز بر روی کاشتنی‌های فلزی استفاده می‌شوند. دلایل متعددی از جمله ایجاد خواص ضدسایش

تیتانیم و آلیاژهای آن برای تهیه مفصل مصنوعی زانو، وسایل شکسته‌بندی داخلی برای درمان شکستگی استخوان و نیز کاشتنی دندان بکار می‌رود. تمایل به استفاده از تیتانیم و آلیاژهای آن به دلیل آن‌که در مقایسه با فولاد زنگ‌نزن و آلیاژهای پایه کبالت مقاومت خوردگی بالاتر، نسبت استحکام به وزن بیشتر، ضریب کشسانی کمتر و سازگاری زیستی عالی‌تر دارند، افزایش یافته است. تیتانیم و آلیاژهای آن بالاترین سازگاری زیستی را در بین زیست‌مواد فلزی دارند و به طور گسترده به عنوان کاشتنی بدن در ارتوپدی و دندانپزشکی مصرف می‌شوند [۱]. مقاومت خوردگی و سازگاری زیستی تیتانیم در دمای اتاق، دهان و بدن موجود زنده به دلیل تشکیل یک لایه اکسید پایدار با ضخامتی کمتر از یک نانومتر است. واکنش منفی بافت در تماس با تیتانیم یا آلیاژهای آن شدیداً اندک است و رشد استخوان یا همبندی با استخوان می‌تواند پدید آید [۲].

ترکیب شیمیایی عامل اصلی و اساسی تعیین‌کننده خواص و سازگاری زیستی است [۳]. به همین سبب از میان انواع بسیار متنوع از فلزات و آلیاژهای مختلف، تعداد محدودی همچون تیتانیم و آلیاژهای آن، به عنوان زیست‌ماده فلزی شناخته شده‌اند [۴ و ۵]. ترکیب شیمیایی و ریزساختار کاشتنی فلزی عامل اصلی تعیین‌کننده خواص و رفتار فلز در محیط زیستی است اما شرایط سطحی، تمیزی یا آلودگی، زبری و به طور کلی ریخت‌شناسی سطح، تاریخچه و چگونگی آماده‌سازی سطحی و ساختار سطحی در حصول نتیجه نهایی موثر است [۶]. مشکل عمده تیتانیم و آلیاژهای آن، عفونت‌های باکتریایی و ارتباط‌های ضعیف ساختاری و عملکردی بین استخوان زنده و سطح کاشتنی است [۷]. به همین دلیل پژوهش‌های زیادی برای رفع این نواقص انجام شده است. این تحقیقات شامل انجام عملیات‌های سطحی مختلف و پوشش‌های گوناگون می‌باشد. آماده‌سازی سطح از طریق

تحقیق اصلاح زیستی سطحی این آلیاژ با استفاده از پوشش نانوکامپوزیتی ژلاتین-نانوذرات فلئورآپاتیت دوپ شده با سیلیسیم و منیزیم و بررسی خواص خوردگی و زیستی آن است.

مواد و روش تحقیق

مواد اولیه و فرایند پوشش دهی

در این پژوهش، از آلیاژ تیتانیم Ti-6Al-4V به عنوان زیرلایه با ابعاد $10 \times 10 \times 5$ میلی متر استفاده شد. نمونه‌ها مرحله به مرحله تا سنباده‌زنی ۴۰۰ سنباده‌زنی شدند تا صافی سطح یکسان و مناسب برای فرایند پوشش دهی حاصل شود. سپس به منظور رفع آلودگی‌های سطحی و چربی زدایی، نمونه‌ها در سه محیط استون، اتانول و آب مقطر هر کدام به مدت ۲۰ دقیقه در حمام آلتراسونیک شستشو داده شده و در نهایت در دمای محیط خشک و آماده‌ی عملیات پوشش دهی شدند.

به منظور ساخت نانوذرات فلئورآپاتیت دوپ شده با سیلیسیم و منیزیم (FA-Si-Mg) مخلوطی از CaF_2 ، SiO_2 ، Mg(OH)_2 ، Ca(OH)_2 و P_2O_5 (مرک) در یک آسیای گلوله‌ای سیاره‌ای (Fretch pulverisette) با محفظه‌ی زیرکونیایی به حجم ۱۲۵ میلی لیتر همراه با چهار گلوله‌ی زیرکونیایی ریخته شد. آلیاژسازی مکانیکی با استفاده از نسبت گلوله به پودر ۱:۲۵ و سرعت چرخش ۲۵۰ دور بر دقیقه انجام گردید. آسیاکاری به مدت ۱۲ ساعت انجام شد. مقادیر مواد طبق جدول ۱ طوری انتخاب شدند که Mg^{+2} به جای Ca^{+2} و SiO_4^{-4} به جای PO_4^{-3} قرار گیرد به طوری که ترکیب $\text{Ca}_{9.5}\text{Mg}_{0.5}(\text{PO}_4)_{5.5}(\text{SiO}_4)_{0.5}\text{F}_{1.5}$ بدست آید. پودر حاصل با جایگزینی توأم Si و Mg - FA-Si-Mg نامیده می‌شود [۱۷]. همچنین در پژوهش حاضر از ژلاتین SIGMA TYPE A استفاده شده است.

(استفاده از پوشش پلی اتیلن با وزن مولکولی فرا زیاد بر روی Ti-6Al-4V) ایجاد مقاومت در برابر خوردگی (پوشش نانوکامپوزیتی ژلاتین- نانوذرات فلئورآپاتیت دوپ شده به وسیله سیلیسیم و منیزیم بر روی آلیاژ Mg [۱۸]) بهبود زیست سازگاری، بهبود شیمی سطح و تغییر خواص الکتریکی سطح (استفاده از پوشش پلیمر هادی پلی پیرول بر روی Ti باعث چسبندگی سلولی بهتر استئوبلاست‌ها می‌شود) برای استفاده از این پوشش‌ها بر روی کاشتنی‌های فلزی وجود دارد [۷]. در بین بیوپلیمرها، ژلاتین به دلیل داشتن خواص جالب توجه استفاده زیادی را در کاربردهای وسیع پزشکی پیدا نموده است [۱۹]. ژلاتین شبیه به کلاژن خواص زیست‌سازگاری و زیست‌تخریب پذیری نشان داده و جزء اساسی زمینه خارج سلولی بدن موجودات است [۲۰]. همچنین ژلاتین مکان مناسبی برای چسبندگی، رشد و تکثیر سلولی بوده و بدین وسیله ترمیم بافت را تسریع می‌بخشد [۲۱]. بعضی از محدودیت‌های این ماده نظیر استحکام مکانیکی ضعیف، کاربردهای آن را محدود نموده است. کارایی ژلاتین با اضافه نمودن ذرات سرامیکی یا فازهای اکسیدی می‌تواند بهبود یابد [۱۹].

یکی از روش‌های پوشش دهی برای کاشتنی‌ها، پوشش دهی غوطه‌وری است، که در اصل بر مبنای تشکیل یک محلول از مواد مورد پوشش است که سطح مورد پوشش به صورت فرو رفتن در این محلول و غوطه‌ور شدن در آن مورد پوشش قرار می‌گیرد. در ابتدا نمونه داخل محلول فرو رفته و غوطه‌ور می‌شود. سپس با خیس شدن سطح نمونه یک لایه از پوشش محلول مورد نظر بر سطح آن می‌نشیند، و بعد با کشیدن نمونه به بیرون از داخل محلول مورد پوشش، حلال‌ها و اضافات محلول با بخار شدن و ریزش از سطح نمونه حذف می‌شوند [۱۸].

با توجه به نیاز آلیاژ تیتانیم به اصلاح سازی سطحی و همچنین با توجه به خواص زیستی منحصر به فرد ژلاتین و نانوذرات سیلیسیم-منیزیم-فلئورآپاتیت، هدف از این

جدول ۱. مقادیر وزنی ترکیب‌های استفاده شده برای ساخت FA-Si-

[۱۷] Mg

نمونه	Ca(OH) ₂	P ₂ O ₅	CaF ₂	Mg(OH) ₂	SiO ₂
مقادیر وزنی	۲,۲۵۸۶	۱,۴۰۰۷	۰,۲۸	۰,۱۰۶۲۳	۰,۱۰۷۸

پس از آماده‌سازی نمونه‌ها، ابتدا نانوذرات FA-Si-Mg به میزان ۰/۰۵ گرم در آب به عنوان حلال به مدت ۲ ساعت در دمای محیط با استفاده از همزن همزده شد. سپس به آن ۰/۵ گرم ژلاتین اضافه گردید و مجدداً به مدت ۲۴ ساعت همزده شد. پس از آماده‌سازی محلول، میزان ۰/۱۶ گرم ethyl-3 dimethyl aminopropyl carbodiimide-1- در حلال حاوی ۹ سی‌سی اتانول و ۱ سی‌سی آب به محلول به منظور ایجاد اتصالات عرضی در ژلاتین اضافه گردید. سپس به مدت ۸ ساعت بر روی همزن قرار داده شد. در مرحله‌ی بعد، پوشش‌دهی زیر لایه‌های تیتانیم Ti-6Al-4V به روش غوطه‌وری انجام گردید. در این روش زیر لایه‌ها با سرعت مشخص درون محلول نانوکامپوزیتی ژلاتین- نانوذرات فلئور آپاتیت دوپ شده با سیلیسیم و منیزیم فرو برده شده و با سرعت مشخص از آن خارج می‌گردید. در همه‌ی مراحل سرعت ورود و خروج زیر لایه به درون سل مقدار ثابت ۱۰ میلی‌متر بر ثانیه و زاویه‌ی ورود زیر لایه به درون سل پوشش‌دهی ۹۰ درجه انتخاب شد. به منظور تهیه پوشش بهتر و بهینه فرآیند پوشش‌دهی سه مرتبه انجام گردید.

مشخصه‌یابی

به منظور بررسی مورفولوژی سطح و همگن بودن پوشش نانوکامپوزیتی ژلاتین- نانوذرات فلئور آپاتیت دوپ شده با سیلیسیم و منیزیم و همچنین تعیین ضخامت پوشش از میکروسکوپ الکترونی روبشی (SEM، مدل Mira3-xum) استفاده گردید.

به منظور بررسی چسبندگی پوشش بر روی زیر لایه‌ی آلیاز تیتانیم Ti-6Al-4V از آزمون چسبندگی به روش استاندارد ASTM D3359 استفاده شد، شبکه‌ی ای با تعداد مربع‌های مساوی بر روی سطح پوشش نانوکامپوزیتی ژلاتین- نانوذرات فلئور آپاتیت اعمال شد (به وسیله خطوط افقی و عمودی) و سپس چسب نواری حساس به فشار بر روی خراشها اعمال و با سرعت از روی آن جدا شد، میزان جدا شدن پوشش از سطح به صورت درصد بیان شده است، بنابراین نمونه‌ی ای که درصد کنده شدن پوشش از آن ۰ درصد باشد بهترین نمونه است.

توپوگرافی سطحی و محاسبه زبری سطحی نمونه‌های مورد آزمایش با استفاده از میکروسکوپ نیروی اتمی (AFM، مدل DME Dual Scope 3026) بررسی شد.

از دستگاه پراش اشعه‌ی ایکس (XRD، مدل Bruker D8Advance) در جهت تشخیص و تعیین فازهای موجود در پوشش نانوکامپوزیتی ژلاتین- نانوذرات فلئور آپاتیت دوپ شده با سیلیسیم و منیزیم که به روش غوطه‌وری انجام شد، استفاده گردید. در این تکنیک از لامپ CuK_α با طول موج ۱/۵۴۲ آنگستروم و طول گام ۰/۰۲ درجه و زمان هر گام معادل با ۱ ثانیه استفاده گردید. الگوهای بدست آمده با الگوهای پراش استاندارد JCPDS موجود در نرم افزار Expert Highscore مقایسه گردید.

از آزمون طیف سنجی فروسرخ با تبدیل فوریه (FTIR، مدل Perkin Elmer Spectrum 65) جهت بررسی گروه‌های عاملی موجود در پوشش نانوکامپوزیتی ژلاتین- نانوذرات فلئور آپاتیت دوپ شده با سیلیسیم و منیزیم استفاده شد.

به منظور ارزیابی و مقایسه رفتار خوردگی نمونه‌ها در محیط شبیه‌سازی شده‌ی بدن، از آزمون پلاریزاسیون تافل استفاده شد. برای این منظور از دستگاه گالوانو استات/ پتانسیواستات IVIUM با کنترل رایانه‌ای، مجهز به نرم افزار خوردگی استفاده شد. سل خوردگی شامل نمونه به عنوان الکتروود کاری، الکتروود پلاتین به عنوان الکتروود

سلول‌ها ب) پاساژ دادن سلول‌ها ج) شمارش سلولی و د) کشت سلولی. آزمون MTT در روزهای ۱ و ۳ به صورت زیر انجام گرفت: ۱- تهیه محلول ۰/۵ mg/ml پودر MTT در PBS استریل ۲- خارج سازی محیط کشت از سطح سلول‌های کشت شده تحت نمونه‌های مختلف و کنترل و قراردادن آن‌ها در معرض ۵۰۰ میکرولیتر محلول MTT ۳- قرارگیری به مدت ۴ ساعت در انکوباتور CO₂ در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد به منظور تشکیل فورمازان ۴- خارج سازی محلول MTT و انحلال فورمازان با استفاده از محلول DMSO استریل ۵- اندازه‌گیری جذب محلول DMSO در طول موج ۴۹۰ نانومتر توسط دستگاه الیزا ریدر (مدل: Bio Rad, Mode 1680 instruments) ۶- محاسبه درصد زنده ماندن سلول‌ها. همچنین به منظور تثبیت سلولی به منظور مشاهده با میکروسکوپ الکترونی مراحل زیر انجام گرفت: ۱- تهیه محلول ۲/۵ درصد حجمی از گلو تار آلدئید در محلول بافر فسفات ۲- خارج سازی محیط کشت از سطح نمونه‌ها بعد از سه روز کشت و شستشو با محلول بافر فسفات استریل ۳- قرار دادن نمونه‌های حاوی سلول در معرض ۸۰۰ میکرولیتر محلول گلو تار آلدئید ۲/۵ درصد حجمی ۴- نگهداری نمونه‌ها به مدت ۳ ساعت در یخچال ۵- شستشوی نمونه‌ها با آب دو بار تقطیر، دو مرتبه ۶- دهیتراته کردن نمونه‌ها در محلول‌های اتانول با رقت‌های مختلف (به ترتیب ۳۰، ۵۰، ۷۰، ۹۰ و ۱۰۰ درصد حجمی)، هر کدام ده دقیقه ۷- نگهداری نمونه‌ها در دسیکاتور به منظور خشک شدن کامل و در نهایت تصاویر میکروسکوپی الکترونی روبشی از چسبندگی سلولی در سطح نمونه‌ها تهیه شد.

نتایج و بحث

تصویر میکروسکوپی الکترونی روبشی از سطح و از مقطع پوشش نانوکامپوزیتی ژلاتین- نانوذرات فلئور آپاتیت دوپ شده با سیلیسیم و منیزیم بعد از سه مرتبه عملیات غوطه‌وری، به ترتیب در شکل ۱ الف و ب نشان داده

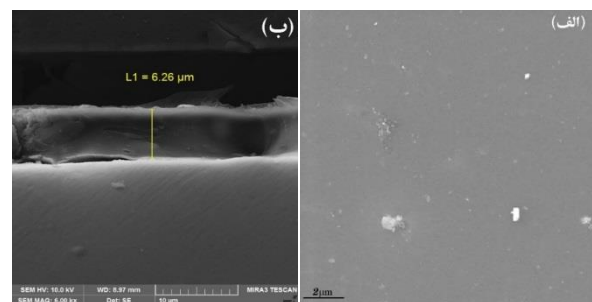
کمکی و یک الکتروود مرجع Hg/Hg₂Cl₂ بود. سطح تماس نمونه‌ها یک سانتی متر مربع در نظر گرفته شد و دیگر سطح‌های نمونه، به وسیله یک ماده‌ی عایق غیر حلال پوشیده شد. لازم به ذکر است که قبل از انجام آزمون الکترو شیمیایی خوردگی، فقط نمونه‌ی آلیاژ تیتانیوم بدون پوشش تا سنباده‌ی ۲۰۰۰ پولیش داده شد. هر نمونه در ۵۰۰ میلی‌لیتر محلول شبیه‌سازی شده‌ی سیال بدن در دمای ۳۷ درجه‌ی سانتی‌گراد غوطه‌ور گردید. در تمامی موارد، ثبت داده‌های آزمون الکترو شیمیایی پس از یک ساعت غوطه‌وری نمونه‌ها در الکترو لیت صورت گرفت. علت این کار در ثبات نسبی تغییرات اختلاف پتانسیل نمونه و مرجع (کمتر از ± 5 میلی ولت تغییر در طول ۵ دقیقه) پس از یک ساعت استراحت تمامی نمونه‌ها در الکترو لیت بود [۲۲]. سپس منحنی‌های پلاریزاسیون در محدوده‌ی ± 250 میلی ولت نسبت به پتانسیل مدار باز (ocp) با نرخ روبش 1 mV.S^{-1} بدست آمد. برای هر نوع از نمونه‌ها آزمون سه مرتبه تکرار شد. مقادیر پتانسیل خوردگی و چگالی جریان خوردگی با استفاده از روش برون‌یابی تافل بدست آمد. میانگین سه آزمون به عنوان پتانسیل خوردگی و چگالی جریان خوردگی برای هر گروه از نمونه‌ها در نظر گرفته شد.

ارزیابی سمیت سلولی در طی دو روز بر روی سلول‌های MG63 انجام شد. به این منظور ابتدا نمونه‌ها درون محلول ۷۰ درصد وزنی اتانول به مدت ۲ ساعت و در ادامه در نور ماورای بنفش به مدت ۴ ساعت استریل شد. سپس نمونه‌ها درون پلیت کشت سلولی ۲۴ خانه‌ای همراه با محیط کشت کامل شامل DMEM- low+10%FBS+1%penestrep به مدت ۲۴ ساعت قرار داده شدند. در نهایت آزمون MTT و مشاهدات میکروسکوپی انجام گرفت. به منظور رشد و تکثیر سلول‌ها برای رسیدن به تعداد مورد نیاز، کشت آن‌ها در داخل فلاسک‌های مخصوصی در محیط آزمایشگاه انجام شد. این مراحل شامل موارد زیر است: الف) دفریز کردن

مرتبه به ترتیب برابر با ۱۳، ۹، ۰، ۱۱ و ۱۶ هستند. از اینرو با وجود آنکه همه پوشش‌ها میزان چسبندگی مناسبی را از خود نشان می‌دهند، اما پوشش با سه مرتبه غوطه‌وری در بین بقیه پوشش‌ها بالاترین استحکام چسبندگی را دارا است زیرا اصلاً توسط چسب از زیر لایه جدا نشده است. پیوندهای مکانیکی به دلیل ناهمواری‌های سطحی، نفوذ محلول غوطه‌وری در این نواحی و شکل خاص ملکولی ژلاتین و پیوندهای قطبی به دلیل نوع پیوندهای ملکولی ویژه ژلاتین که منجر به دو قطبی گشته و موجب ایجاد اتصال الکترواستاتیکی می‌گردد، از جمله عوامل ایجاد استحکام پوشش با زیرلایه هستند [۲۳-۲۶]. شاید بتوان ذکر نمود که در پوشش‌های کمتر از سه بار غوطه‌وری اتصالات مکانیکی حائز اهمیت است و در پوشش‌های بالاتر از سه بار غوطه‌وری اتصالات از نوع قطبی درجه‌ی اهمیت بالاتری داشته اما به دلیل ضعیف شدن اتصالات مکانیکی و قطبی در نهایت میزان چسبندگی پوشش کاهش می‌یابد. در پوشش با سه بار غوطه‌وری میزان اتصالات مکانیکی و نیروهای الکترواستاتیکی با توازن خاص نسبت به بقیه پوشش‌ها مناسب‌تر بوده و منجر به استحکام بالاتری می‌گردد. البته توصیف و اثبات دقیق و مطمئن‌تر نیاز به آزمایش‌های بیشتر دارد.

شکل‌های ۲ الف، ب و ج تصاویر میکروسکوپی نیروی اتمی به ترتیب از نمونه‌های بدون پوشش، با پوشش ژلاتین و پوشش ژلاتین-نانوذرات را نشان می‌دهد. نتایج عددی حاصل از این تصاویر در جدول ۲ آورده شده است. وجود و اندازه‌ی زبری سطح در میزان چسبندگی و رشد سلولی اهمیت دارد. مشاهده‌ی تصاویر و همچنین نتایج مستخرج حاضر در جدول ۲ نشان می‌دهد که زبری سطحی نمونه تیتانیومی بدون پوشش زیادتر از نمونه‌های دیگر است. این زبری همان‌طور که قبلاً ذکر شد باعث ایجاد اتصالات و قفل‌های مکانیکی بین زیرلایه و پوشش می‌گردد. بعد از پوشش دادن ژلاتین بر روی آلیاژ تیتانیم،

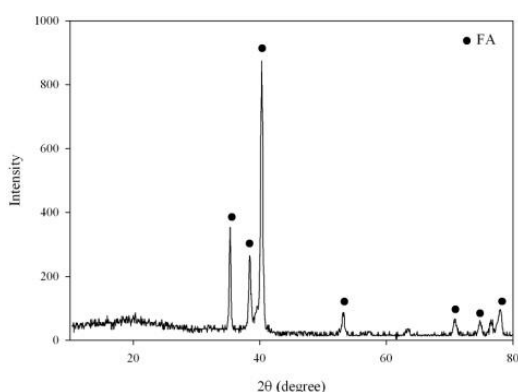
ذرات سفید رنگ در شکل ۱ الف نانوذرات فلئور آپاتیت دوپ شده با سیلیسیم و منیزیم بوده که در زمینه ژلاتین قرار گرفته‌اند. همان‌طور که مشخص است، علاوه بر متراکم و عاری از ترک بودن پوشش، این نانوذرات به طور یکنواخت و تا حدودی با حفظ اندازه‌ی خود در ابعاد نانومتری در بستر پوشش توزیع شده‌اند. به منظور بررسی و اطمینان از یکنواخت بودن ضخامت، از نمای جانبی پوشش نیز تصویر میکروسکوپی گرفته شد. این تصویر همان‌طور که در شکل ۱ ب نشان داده شده است، دارای ضخامتی یکنواخت با اندازه‌ی حدود ۶ میکرومتر است. تراکم پوشش، یکنواختی ضخامت، توزیع مناسب فاز ثانویه و همچنین عدم وجود ریزترک‌ها از خواص این پوشش است. معمولاً ایجاد نشدن خواص فوق در پوشش‌ها باعث از بین رفتن استحکام، پوسته‌ای شدن پوشش و کاهش خواص خوردگی و همچنین کاهش خواص زیستی نمونه‌ی مورد نظر می‌گردد. از اینرو مشاهده‌های میکروسکوپی بسیار حائز اهمیت است.



شکل ۱. تصویر میکروسکوپی الکترونی از الف) نمای بالا و ب) سطح مقطع پوشش نانوکامپوزیتی ژلاتین-نانوذرات فلئور آپاتیت دوپ شده با سیلیسیم و منیزیم

به منظور اطمینان بیشتر از چسبندگی مناسب پوشش به زیرلایه از آزمون چسبندگی استفاده شد. نتایج این آزمایش نشان داد که میزان استحکام چسبندگی بر حسب درصد کنده شدن پوشش از روی زیرلایه توسط چسب برای تعداد دفعات پوشش یک، دو، سه، چهار و پنج

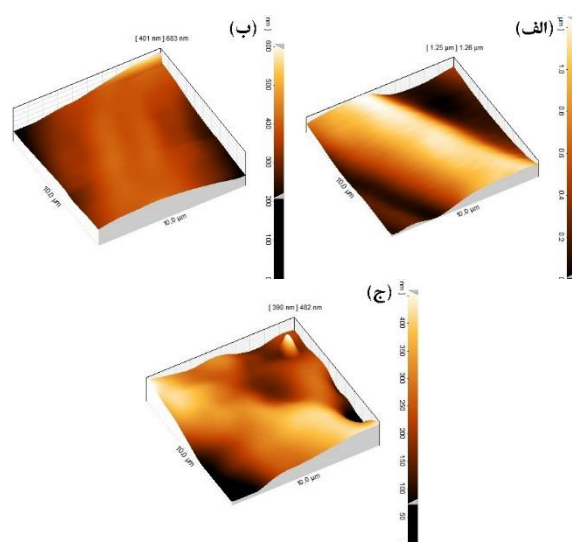
شکل ۳ الگوی پراش پرتوی ایکس پوشش نانوکامپوزیتی ژلاتین- نانوذرات فلئورآپاتیت دوپ شده با سیلیسیم و منیزیم روی نمونه‌ی آلیاژ تیتانیوم Ti-6Al-4V به روش غوطه‌وری را نشان می‌دهد. همان‌طور که ملاحظه می‌شود در این طیف فقط پیک‌های مربوط به فاز فلئورآپاتیت مطابق با کارت استاندارد #15-0876 مشاهده می‌شود. عدم وجود فازهای مربوط به پلیمر مورد استفاده (ژلاتین) به دلیل آمورف بودن این فاز و همچنین عدم رویت پیک- های مربوط به آلیاژ تیتانیوم می‌تواند مربوط به ضخامت قابل ملاحظه‌ی پوشش ایجاد شده باشد.



شکل ۳. الگوی پراش پرتوی ایکس از پوشش نانوکامپوزیتی ژلاتین- نانوذرات فلئورآپاتیت دوپ شده با سیلیسیم و منیزیم

طیف فروسرخ با تبدیل فوریه بدست آمده از پوشش ژلاتین و پوشش نانوکامپوزیتی ژلاتین-نانوذرات فلئورآپاتیت دوپ شده با سیلیسیم و منیزیم به روش غوطه‌وری در شکل ۴ a و b قابل مشاهده است. گروه‌های عاملی که در شکل ۴ مشخص شده‌اند، مربوط به تشکیل فلئورآپاتیت هستند. پیک‌های موجود در cm^{-1} ۱۱۰۰-۱۰۰۰ و همچنین پیک‌های موجود در حوالی cm^{-1} ۹۶۲^۱ - ۶۰۰ مربوط به گروه P-O هستند. پیک‌های موجود در محدوده‌ی cm^{-1} ۱۷۵۰-۱۷۰۰ مربوط به آمید ۱ و آمید ۲ بوده که به دلیل وجود ژلاتین مورد استفاده در پوشش می‌باشد. پیک موجود در محدوده‌ی cm^{-1} ۳۵۰۰- نشان دهنده‌ی آب سطحی جذب شده در پودر فلئورآپاتیت می‌باشد. گروه عاملی کربنات که در آپاتیت

زبری سطحی بدلیل پوشیده شدن شیارها و ناهمواری‌های سطحی و در نتیجه صاف شدن سطح، کاسته شده است. پس از اضافه شدن نانوذرات به پوشش ژلاتینی، زبری سطحی افزایش یافته است. این افزایش به دلیل اندازی کوچک نانوذرات، به مقدار خیلی کمی بوده و از مقدار ۶۲ به ۱۰۵٫۶ نانومتر تغییر پیدا نموده است. بررسی دقیق این تصاویر که معرف توپوگرافی موضعی سطح است، نیز چگونگی توزیع فازهای ثانویه و نایکنواختی‌های سطحی را که در پوشش نانوکامپوزیتی همان توزیع نانوذرات است، نشان می‌دهد. مشاهده این تصاویر نشان داد (هرچند که در شکل ۲ قابل استنباط نیست) که نانوذرات توزیع شده در بستر ژلاتین از توزیع خوبی برخوردار است.



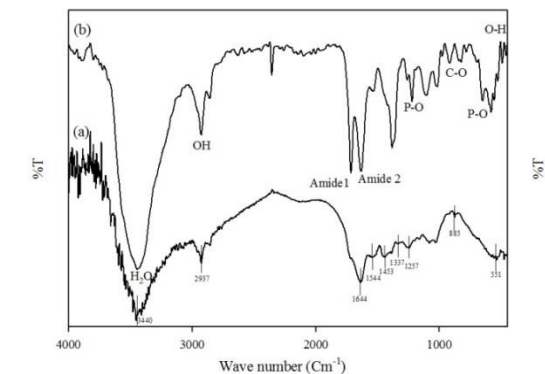
شکل ۲. تصاویر میکروسکوپی نیروی اتمی از نمونه‌های الف) بدون پوشش، ب) پوشش ژلاتین و ج) پوشش نانوکامپوزیتی ژلاتین- نانوذرات FA-Si-Mg بر روی Ti-6Al-4V

جدول ۲. زبری نمونه‌های Ti-6Al-4V، پوشش ژلاتین و پوشش نانوکامپوزیتی ژلاتین-نانوذرات (FA-Si-Mg) بر روی Ti-6Al-4V

نمونه	زبری
بدون پوشش	۳۲۱٫۵ nm
پوشش ژلاتین	۶۲ nm
پوشش ژلاتین-نانوذرات	۱۰۵٫۶ nm

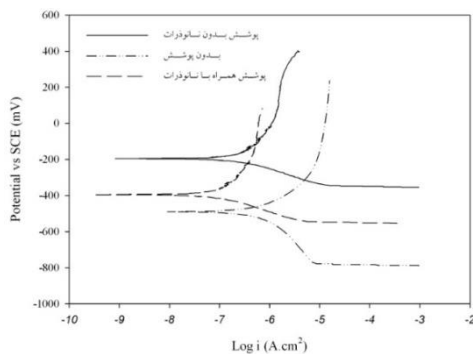
زیستی وجود دارد و گروه هیدروکسیل در الگوی ارائه شده قابل مشاهده است. شیفت باند 1337 cm^{-1} در ژلاتین تایید کننده ایجاد پیوند شیمیایی بین یونهای هیدروکسیل در ژلاتین و آپاتیت است. در فرآیند کامپوزیت کردن نانوذرات آپاتیت با ژلاتین، یونهای Ca^{2+} باند کووالانسی با یونهای R-COO^- ایجاد می کنند [۲۷].

خوردگی پایین تر) میل نموده اند. به عبارتی افزوده شدن پوشش ژلاتینی به سطح آلیاژ موجب کاهش شدت جریان خوردگی و یا به عبارتی مقاومت به خوردگی بالاتر گشته است. نتایج موجود در جدول ۳ در تصدیق رفتار مشاهده شده از منحنی ها هستند. در این جدول β_a و β_c به ترتیب شیب شاخه های آندی و کاتدی، i_{corr} دانسیته جریان خوردگی، E_{corr} پتانسیل خوردگی نمونه ها، و R_p مقاومت پلاریزاسیون است. مقادیر مقاومت پلاریزاسیون برای نمونه ی بدون پوشش، پوشش ژلاتین و پوشش ژلاتین-نانوذرات به ترتیب برابر با 5.2453×10^4 ، 1.191×10^5 و $5.349 \times 10^5 \Omega \cdot \text{cm}^2$ هستند. مقاومت پلاریزاسیون پایین تر پوشش ژلاتین نسبت به پوشش ژلاتین-نانوذرات نشانگر افزایش مقاومت به خوردگی با افزودن نانوذرات است. در حقیقت مقاومت به خوردگی بالاتر پوشش نانوکامپوزیتی می تواند از یکسو به دلیل تاثیر ژلاتین به عنوان یک عایق الکتریکی که سطح فلزی را از یون های الکترولیت حفظ می نماید باشد. از سوی دیگر این بالاتر بودن مقاومت به خوردگی پوشش نانوکامپوزیتی می تواند به دلیل پوشش یکنواخت و عاری از ترک پوشش نانوکامپوزیتی همان -طور که در شکل ۱ ملاحظه گردید، باشد. وجود نانوذرات FA-Si-Mg به عنوان مکان های خنثی در بستر ژلاتین می تواند به فشردگی بالاتر پوشش با پرمودن نواقص ریز کمک کند [۲۹].



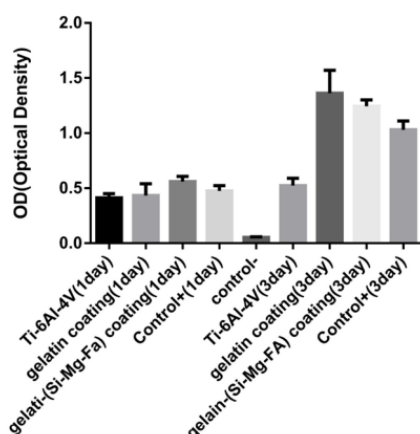
شکل ۴. الگوی تبدیل فوریه مادون قرمز (a) ژلاتین و (b) پوشش نانوکامپوزیتی ژلاتین-نانوذرات فلئور آپاتیت دوپ شده با سیلیسیم و منیزیم

آزمون پلاریزاسیون پتانسیودینامیکی بعد از قرار دادن نمونه ها در محلول شبیه سازی شده بدن به عنوان محیط خورنده به منظور رسیدن به حالت پایا با الکترولیت و ثبت کردن مقادیر پتانسیل مدار باز آغاز گردید. منحنی های حاصل از آزمون پلاریزاسیون تافل در شکل ۵ نشان داده شده است. نتیجه ی حاصل از این آزمون، اطلاعاتی پیرامون مقادیر پتانسیل خوردگی (E_{corr}) و دانسیته جریان خوردگی (i_{corr}) بدست می دهد که در جدول ۳ آورده شده است. در منحنی های پلاریزاسیون پتانسیودینامیکی این آلیاژ، رها شدن هیدروژن و انحلال تیتانیم به ترتیب در محدوده ی پلاریزاسیون کاتدی و آندی اتفاق می افتد. چگالی جریان خوردگی پایین تر و پتانسیل خوردگی بالاتر به مفهوم مقاومت به خوردگی بالاتر است [۲۸]. همان -گونه که در این منحنی ها مشخص است، منحنی های مربوط به نمونه های پوشش داده شده به سمت بالا (پتانسیل های مثبت تر) و به سمت چپ (شدت جریان



شکل ۵. نتایج حاصل از آزمون خوردگی مربوط به نمونه های آلیاژ Ti-6Al-4V بدون پوشش و آلیاژ Ti-6Al-4V با پوشش ژلاتین (G) و نمونه پوشش داده شده با ژلاتین و نانوذرات FA-Si-Mg

پوشش نانوکامپوزیتی نیز همین موضوع را نشان می دهد. چسبندگی سلولی موضوع مهمی است زیرا چسبندگی، بر رویدادهای دیگر مثل گسترده شدن سلولی، مهاجرت سلولی و اغلب بر تمایز و عملکرد سلولی مقدم است [۳۱]. ژلاتین حاوی محل های پیوند اینتگرین زیادی برای چسبندگی سلولی، مهاجرت و تمایز است که در کلاژن طبیعی و دیگر پروتئین های ماتریس خارج سلولی یافت می شود. نشان داده شده است، ژلاتین حاوی توالی شبه RGD (Arg-Gly-Asp) است که چسبندگی سلولی و مهاجرت سلولی را بهبود می دهد [۳۲ و ۳۳].



شکل ۶. نتایج آزمون MTT برای تعیین سمیت آلیاژ Ti-6Al-4V، آلیاژ Ti-6Al-4V پوشش داده شده با ژلاتین و آلیاژ Ti-6Al-4V با پوشش ژلاتین نانوذرات فلئور آپاتیت دوپ شده با سیلیسیم و منیزیم، پس از یک و سه روز

شکل ۷ تصاویر میکروسکوپی الکترونی روبشی مربوط به چسبندگی سلولی بر روی آلیاژ Ti-6Al-4V بدون پوشش، آلیاژ Ti-6Al-4V با پوشش ژلاتین (G) و نمونه پوشش داده شده با ژلاتین و نانوذرات FA-Si-Mg را نشان می دهد. با ایجاد پوشش ژلاتین بر روی آلیاژ Ti-6Al-4V به نظر می رسد چسبندگی سلولی و پهن شدن سلول ها به دلیل چسبندگی سلولی بهتر ژلاتین نسبت به تیتانیم افزایش یافته است. با افزودن نانوذرات سیلیسیم-منیزیم فلئور آپاتیت می توان چسبندگی سلول ها را افزایش داد. زبری سطح پوشش و قابلیت آب دوستی در اثر حضور

جدول ۳. جدول نتایج حاصل از تحلیل منحنی های پلاریزاسیون نمونه های آلیاژ Ti-6Al-4V بدون پوشش، آلیاژ Ti-6Al-4V با پوشش ژلاتین و آلیاژ Ti-6Al-4V با پوشش ژلاتین-نانوذرات فلئور آپاتیت دوپ شده با سیلیسیم و منیزیم در محلول شبیه سازی شده بدن

نمونه ها	β_a	β_c	E_{corr} Hg/Hg ₂ Cl ₂ (V)	i_{corr} (A/cm ²)	R_p (ohmcm ²)
بدون پوشش	۰/۸۲۳	۰/۳۵۴	-۰/۵۷۶۰	۲/۰۴۹E-۶	۵/۲۴۵۳E۴
پوشش ژلاتین-نانوذرات	۰/۹۹۷	۰/۳۶۱	-۰/۴۸۲۱	۲/۱۵۴E-۷	۵/۳۴۹E۵
پوشش ژلاتین	۰/۲۳۶	۰/۰۷۹	-۰/۱۹۹	۲/۱۶E-۷	۱/۱۹۱E۵

شیمی سطح و زبری سطح پوشش از جمله مهم ترین عواملی هستند که رفتار سلولی پوشش های فلزی در شرایط آزمایشگاهی را کنترل می کنند. زمینه خارج سلولی طبیعی شامل انواع مختلفی از چند پروتئین می باشد. در نتیجه مجموعه ای از ترکیبات با خصوصیات مختلف ساختاری، فیزیکی و شیمیایی ویژه می تواند خواص ایده آل برای حمایت از رشد و تکثیر سلول ها را ایجاد نماید و در نتیجه رفتار سلولی ارتقا می یابد. چسبندگی سلولی اولیه تحت تاثیر آب دوستی سطحی داربست ها است و سطوح آب دوست چسبندگی سلولی بهتری را نسبت به سطوح آب گریز ایجاد می کنند [۳۰]. شکل ۶ نتایج آزمون MTT را برای تعیین سمیت نمونه های آلیاژ Ti-6Al-4V بدون پوشش، با پوشش ژلاتین (G) و نمونه پوشش داده شده با ژلاتین و نانوذرات پس از ۲۴ و ۷۲ ساعت کشت سلول را نشان می دهد. نمونه هایی که پوشش ژلاتین و پوشش نانوکامپوزیتی دارند از نظر آماری تفاوت معناداری با کنترل مثبت نشان نمی دهد، بدین معنا که سمیت سلولی مشاهده نمی شود. رشد و تکثیر سلولی بر روی نمونه Ti-6Al-4V همراه با پوشش ژلاتین تفاوت آماری معنی داری با نمونه بدون پوشش دارد، یعنی تکثیر سلول های MG63 بر روی پوشش ژلاتینی نسبت به نمونه بدون پوشش به شدت افزایش یافته است. نمونه حاوی

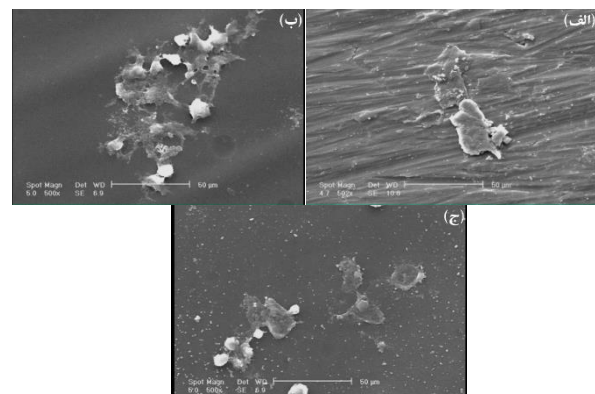
نتیجه گیری

عملیات پوشش دهی نانو کامپوزیتی ژلاتین- نانوذرات فلئور آپاتیت دوپ شده با سیلیسیم و منیزیم به روش غوطه وری بر روی آلیاژ Ti-6Al-4V به صورت موفقیت آمیز انجام شد. پوشش نانوکامپوزیتی با ضخامت یکنواخت با ساختار و ترکیب شیمیایی مناسب دارای ضخامت حدود ۶/۲۶ میکرومتر بود. نتایج آزمون الکتروشیمیایی خوردگی نشان داد که نمونه آلیاژ-Ti-6Al-4V با پوشش نانوکامپوزیتی ژلاتین- نانوذرات فلئور آپاتیت دوپ شده با سیلیسیم و منیزیم کمترین چگالی جریان خوردگی را در بین سایر نمونه ها داراست. نتایج حاصل از آزمون زیست سازگاری در آزمون های آزمایشگاهی برون تنی نشان داد که نمونه آلیاژ-Ti-6Al-4V با پوشش نانوکامپوزیتی ژلاتین- نانوذرات فلئور آپاتیت دوپ شده با سیلیسیم و منیزیم، بیشترین رشد و تکثیر سلولی و بهترین چسبندگی سلولی را از خود نشان داده است.

منابع

1. T. Akahovi and M. Niinomi, *Fracture Characteristics of Fatigued Ti-6Al-4V ELI as an Implant Material*, Materials Science and Engineering, A243 (1998) 237-243, 1998.
2. WJ. O'Brien, *Dental Materials and Their Selection*, 2th ed., Quintessence Publishing Co, Inc., 1997.
3. فتحی محمدحسین، مرتضوی وجیهه السادات، کاربرد پزشکی های بیوسرامیکی ایمپلنت ها، انتشارات ارکان- دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی درمانی استان اصفهان، چاپ دوم ص ص ۱۹۵-۱۴۹، ۱۳۸۱.
4. S. G. Steinmann, *Corrosion of surgical implants-in vivo and in vitro tests*, in: *Evaluation of Biomaterials*, ed. By Gd Winter, JL leray, K deGroot, John Wiley and sons Ltd, 1980.
5. S. G. Steinmann, *Corrosion of titanium and titanium alloys for surgical implants*, Titanium Science and Technology, Munich: Deutsche

نانوذرات بر روی سطح افزایش می یابد و سبب بهبود چسبندگی سلولی داربست می شود [۳۴ و ۳۵]. چسبندگی بهتر و انتشار و تکثیر سلولی بیشتر در سطح پوشش نانوکامپوزیتی می تواند ناشی از سیلیسیم و منیزیم آزاد شده از سیستم و بهبود آب دوستی ترکیب کامپوزیتی در نتیجه تشکیل گروه های یونی در سطح پوشش باشد که نقش اساسی در ارتقای تمایز سلول های بنیادی دارد [۳۶]. برای انجام فرایند معدنی شدن زمینه استخوان، ترکیبی از برهم کنش های زمینه- سطح و سلول- سلول بایستی باشد تا فرایند پیش برود. با افزایش تعداد سلول ها، میزان سیگنال های بین سلولی افزایش می یابد و در نتیجه فرایند معدنی شدن بافت استخوان تسریع می شود. نتایج نشان می دهد که ضریب کشسانی بالا و قابلیت هدایت سلولی نانوذرات منیزیم فلئور هیدروکسی آپاتیت می تواند سبب بهبود خواص پلی کاپرولاکتون برای کاربرد در مهندسی بافت استخوان شده که نتیجه آن تسریع چسبندگی، رشد، تکثیر و معدنی شدن بافت استخوان است. نتایج محققان پیشین نشان می دهد که طبیعت زیست فعال هیدروکسی آپاتیت سبب ارتقای قابلیت تمایز سلول های بنیادی به رده استخوان ساز و افزایش قدرت معدنی شدن بافت استخوان می شود [۳۵].



شکل ۷. تصاویر میکروسکوپی الکترونی روبشی مربوط به چسبندگی سلولی بر روی الف) آلیاژ Ti-6Al-4V بدون پوشش، ب) آلیاژ-Ti-6Al-4V با پوشش ژلاتین (G) نمونه پوشش داده شده با ژلاتین و نانوذرات FA-Si-Mg

16. H. W. Kim, H. E. Kim, and J. C. Knowles, *Fluor-hydroxyapatite sol-gel coating on titanium substrate for hard tissue implants*, *Biomaterials*, 25 (2004) 3351-3358.
17. T. Ahmadi, A. Monshi, V. Mortazavi, et al., *Synthesis and dissolution behavior of nanosized silicon and magnesium co-doped fluorapatite obtained by high energy ball milling*, *Ceramics International*, 4 (2014) 8341-8349.
18. A. Jafarzadeh, T. Ahmadi, M. Taghian Dehaghani, K. Mohemi, *Synthesis, Corrosion and Bioactivity Evaluation of Gelatin/Silicon and Magnesium Co-Doped Fluorapatite Nanocomposite Coating Applied on AZ31 Mg Alloy*, *Russian Journal of Non-Ferrous Metals*, 59 (2018) 458-464.
19. S. A. Sell, P. S. Wolfe, K. Garg, et al., *The Use of Natural Polymers in Tissue Engineering: A Focus on Electrospun Extracellular Matrix Analogues*, *Polymers*, 2 (2010) 522-553.
20. Z. X. Meng, Y. S. Wang, C. Ma, et al., *Electrospinning of PLGA/gelatin randomly-oriented and aligned nanofibers as potential scaffold in tissue engineering*, *Materials Science and Engineering: C.*, 30 (2010) 1204-1210.
21. H. Hajiali, S. shahgasempour, M. R. Naimi-Jamal, et al., *Electrospun PGA/gelatin nanofibrous scaffolds and their potential application in vascular tissue engineering*, *International Journal of Nanomedicine*, 6 (2011) 2133-2141.
۲۲. فتحی ، محمد حسین، مرتضوی، وجیه السادات، خواص و کاربرد پزشکی بیومواد فلزی، انتشارات ارکان، اصفهان، ۱۳۸۲.
23. J. Degner, F. Singer, L. Cordero, A. R. Boccaccini, S. Virtanen, *Electrochemical investigations of magnesium in DMEM with biodegradable polycaprolactone coating as corrosion barrier*, *Applied Surface Science*, 282 (2013) 264-270.
24. C. Wu, Z. Wen, C. Dai, Y. Lu, F. Yang, *Fabrication of calcium phosphate/chitosan coatings on AZ91D magnesium alloy with a novel method*, *Surface and Coatings Technology*, 204 (2010) 3336-3347.
25. P. V. Kozlov, G. I. Burdygina, *The structure and properties of solid gelatin and the principles of their modification*, *Polymer*, 24 (1983) 651-666.
- Gesellschaft Fur Metallkunde e.V, 2 (1985) 1373-1379.
6. B. Kasemo and J. Lausmaa, *Biomaterial and implant surfaces: on the role of cleanliness, contamination, and preparation procedures*, *Journal of Biomedical Materials Research*, 22 (1988) 145-158, 1988.
7. J. R. Smith and D. A. Lamprou, *Polymer coatings for biomedical applications-a review*, *Transactions of the IMF*, 92(2014) 9-19.
8. M. Shirkhazadeh, *Electrochemical preparation of protective oxide coatings on titanium surgical alloys*, *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, 5 (1992) 322-325.
9. H. M. Kim, F. Miyaji, T. Kokubo, and T. Nakamura, *Preparation of bioactive Ti and its alloys via simple chemical surface treatment*, *Journal of Biomedical Materials Research*, 32 (1996) 409-417.
10. J. Breime, E. Eisenbarth, H. Hildebrand, A. Ralison, W. Schulte and J. Meyle, *Modification of the surface of titanium implants for an improved osseointegration*, *proceeding of titanium 95*, Birmingham, Uk, 2 (1995) 1792-1799.
11. H. B. Wen, J. R. de Wijn, F. Z. Cui, and K. de Groot, *Preparation of bioactive Ti6Al4V surfaces by a simple method*, *biomaterials*, *Biomaterials*, 19 (1998) 215-221.
12. J. M. Gomez-Vega, E. saiz, A. P. Tomsia, G. W. Marshall, and S. J. Marshal, *Bioactive Glass coatings with hydroxyapatite and bioglass particles on Ti-based implants. I. processing*, *Biomaterials*, 21 (2000) 105-111.
13. W. Suchanek, M. Yoshimura, *Processing and properties of hydroxyapatite-based biomaterials for use as hard tissue replacement implants*, *Journal of Materials Research*, 13 (1998) 94-117.
14. L. B. Lum, R. beirne and D. A. Curtis, *Histologic evaluation of hydroxyapatite-coated versus uncoated titanium blade implants in delayed and immediately loaded applications*, *The International Journal of Oral & Maxillofacial Implants*, 6 (1991) 456-462.
15. A. Pichat, L. M. Rabbe, J. Rieu, A. Romabert, C. Chabrol, and M. Robelet, *Effect of ion implantation on titanium alloy/polyethylene and 16L stainless steel/polyethylene friction couples running in joint prosthese*, *Surface and Coatings Technology*, 1 (1991) 15-22.

- applications*, Materials letters, 65 (2011) 1931-1934.
36. M. Kharaziha, M. H. Fathi, and H. Edris, *Effects of Surface Modification on the Mechanical and Structural Properties of Nanofibrous Poly(ε-aprolactone)/Forsterite Scaffold for Tissue Engineering Applications*, Material Science and Engineering C, 33 (2013) 4512-4519.
26. M. Djabourov, J. Leblond and P. Papon, *Gelation of aqueous gelatin solutions. I. Structural investigation*, Journal of Physics France, 49 (1988) 319-332.
27. M. Kazemzadeh Narbat, F. Orang, M. Solati Hashtjin and A. Goudarzi. *Fabrication of Porous Hydroxyapatite-Gelatin Composite Scaffolds for Bone Tissue Engineering*, Iranian Biomedical Journal 10 (4): (October 2006) 215-223.
28. X. Cui, Y. Li, Q. Li, et al., *Influence of phytic acid concentration on performance of phytic acid conversion coatings on the AZ91D magnesium alloy*, Materials Chemistry and Physics, 111 (2008) 503–507.
29. H. Ashassi-Sorkhabi, and M. Eshaghi, *Corrosion resistance enhancement of electroless Ni–P coating by incorporation of ultrasonically dispersed diamond nanoparticles*, Corrosion science, 77 (2013) 185–193.
30. Z. X. Meng, Y. S. Wang, C. Ma, W. Zheng, L. Li, and Y. F. Zheng, *Electrospinning of PLGA/gelatin randomly-oriented and aligned nanofibers as potential scaffold in tissue engineering*, Materials Science and Engineering C, 30 (2010) 1204-1210.
31. K. M. Woo, V. J. Chen, and P. X. Ma, *Nano-fibrous scaffolding architecture selectively enhances protein adsorption contributing to cell attachment*, Journal of Biomedical Materials Research A, 167 (2003) 531-437.
32. I. K. Kwon, S. Kidoaki, and T. Matsuda, *Electrospun nano- to microfiber fabrics made of biodegradable copolyesters: structural characteristics, mechanical properties and cell adhesion potential*, Biomaterials, 26 (2005) 3929-3939.
33. Y. Huang, S. Onyeri, M. Siewe, A. Moshfeghian, and S. V. M. ã, *In vitro characterization of chitosan – gelatin scaffolds for tissue engineering*, Biomaterials, 26 (2005) 7616-7627.
34. N. Johari, M. H. Fathi, M. A. Golozar, *Fabrication, characterization and evaluation of the mechanical properties of poly (ε-caprolactone)/nano-fluoridated hydroxyapatite scaffold for bone tissue engineering*, Composites: Part B, 43 (2012) 1671-1675.
35. M. Diba, M. H. Fathi, and M. Kharaziha, *Novel forsterite/polycaprolactone nanocomposite scaffold for tissue engineering*