



vabasaeri@yahoo.com

مهندس وحید بصائری،
نویسنده مسئول مقاله،
دانشگاه علم و صنعت ایران

بررسی اثر هیدروکسی آپاتیت طبیعی و سنتزی در داربست ۳ جزئی، HA، نانولوله کربنی و ژلاتین

علیرضا خاوندی^۱، وحید بصائری^{۲*}

^۱ استاد دانشکده مواد و متالورژی، دانشگاه علم و صنعت

^۲ دانشجوی کارشناسی ارشد، دانشگاه علم و صنعت

چکیده: در طول دهه‌های اخیر تلاش‌های قابل توجهی جهت یافتن جایگزینی مناسب استخوان از سوی پژوهشگران صورت گرفته است. در آغاز راه توجه پژوهشگران به جایگزین‌های فلزی بوده است. خوردگی فلزات را می‌توان یکی از اصلی‌ترین نقاط ضعف در استفاده این مواد به عنوان جایگزینی استخوان دانست. از آنجا که پدیده خوردگی فلزات در بدن انسان علاوه بر کاهش خواص مکانیکی سبب آزاد شدن یون‌های شدیداً سمی فلزی می‌کند که این امر موجب واکنش‌های التهابی در بدن فرد می‌شود. بر همین اساس در سال‌های اخیر تلاش قابل توجهی برای جایگزینی ماده‌ای مناسب‌تر صورت گرفته است که این امر سبب باز شدن دروازه‌ای به نام مهندسی بافت استخوان شده است. تأثیر هیدروکسی آپاتیت طبیعی و سنتزی بر خواص مکانیکی و زیستی داربست ساخته شده از هیدروکسی آپاتیت- نانولوله کربنی و ژلاتین مورد بررسی قرار گرفته است. از استخوان‌های ران شتر، گوسفند، گاو و تیغه استخوان ماهی سفید به عنوان منابع هیدروکسی آپاتیت طبیعی استفاده شده است. نتایج بدست آمده نشان داد شدت پیک‌های حاصل شده در نمونه‌های HA طبیعی نسبت به HA سنتزی، افزایش محسوسی داشته است که این افزایش در هیدروکسی آپاتیت طبیعی بدست آمده از استخوان شتر بیشترین میزان است. همچنین طبق تصاویر SEM بدست آمده از سطح مقطع داربست، نمونه‌ها دارای حفراتی در محدوده ۱۵۰-۴۰۰ μm است که جهت کاربردهای مهندسی بافت استخوان، محدوده‌ای مناسب است. همچنین ارتباط حفرات در نمونه‌های حاوی هیدروکسی آپاتیت طبیعی بدست آمده از استخوان‌های شتر، گاو و ماهی وضعیت مطلوبی را دارا هستند. اطلاعات بدست آمده از آزمون MTT نشان می‌دهد شانس زنده ماندن سلول‌ها در داربست‌های تهیه شده از هیدروکسی آپاتیت طبیعی نسبت به هیدروکسی آپاتیت سنتزی بیشتر است که این امر در داربست تهیه شده از هیدروکسی آپاتیت طبیعی بدست آمده از استخوان شتر با میزان ۹۶٪ وضعیت مطلوب‌تری را دارا است.

کلمات کلیدی: مهندسی بافت استخوان، داربست، هیدروکسی آپاتیت، نانولوله کربنی.

۱- مقدمه

در گذشته تهیه و استفاده از بیومتریال‌ها بر پایه اصول علمی بنا نشده بوده است و عموماً مواد به کار برده شده به روش سعی و خطا در بدن انسان یا حیوان مورد آزمایش قرار می‌گرفته است. با گذشت زمان و پیشرفت‌های ایجاد شده در زمینه شناخت مواد، با بهره‌مندی از بیومتریال‌های مناسب در بدن انسان، شاهد رشد کیفی و کمی بسیار بالایی در این حوزه بوده‌ایم. معمولاً هر مجموعه مهندسی بافت از سه جز اصلی سلول، عوامل رشد و داربست تشکیل می‌شود [۱]. البته تحقیقات انجام شده در این زمینه نشان داده است که جز چهارمی نیز در این بین باید لحاظ گیرد که مربوط به مکانیزم اجزای سه‌گانه فوق با یکدیگر است و می‌توان آن‌را در غالب جریان ترکیبات مغذی و تغذیه مناسب سلول‌ها بیان نمود. این عامل شرط لازم جهت بقا و رشد آن‌ها مخصوصاً در لایه‌های داخلی تر داربست است. به‌طور کلی سه گروه پلیمرها (طبیعی یا مصنوعی)، سرامیک‌ها و کامپوزیت‌ها نامزدهای ماده‌ای داربستی هستند [۲]. در این پژوهش سعی شده است با ساخت داربست و کامپوزیت سه جزئی هیدروکسی آپاتیت، ژلاتین و نانولوله‌های کربنی و بررسی تأثیر هیدروکسی آپاتیت طبیعی (استخراج شده از حیوانات) و سنتزی به کار رفته در کامپوزیت، به بررسی خواص مکانیکی و زیستی داربست فوق که مشابه ماتریس خارج سلولی است، پرداخته شود.

۲- انتخاب مواد اولیه

در این پژوهش جهت ساخت کامپوزیت و داربست از سه ماده اولیه ژلاتین، نانولوله کربنی چند جداره عامل دار و نانوپودر طبیعی و سنتز شده HA استفاده شده است. وجود ژلاتین و هیدروکسی آپاتیت در کامپوزیت توانایی شبیه سازی ویژگی های ماتریس خارج سلولی استخوان از جمله زیست سازگاری، زیست تخریب پذیری و زیست فعالی را دارا است. همچنین از نانولوله کربنی نیز جهت افزایش خواص مکانیکی کامپوزیت استفاده شده است. برای دستیابی به هیدروکسی آپاتیت طبیعی از استخوان های ران گوسفند، گاو، شتر و تیغه میانی استخوان ماهی سفید استفاده شده است. در این پژوهش از دی آمونیوم هیدروژن فسفات، کلسیم نیترات، آمونیاک ۲۵ درصد، پودر ژلاتین (Microbiology grade)، سولفوریک اسید، نیتریک اسید، هیدروکلریک اسید و محلول EDC ساخته شده شرکت Merck و نانولوله کربنی چند جداره Arkema استفاده شد.

۲-۱- سنتز هیدروکسی آپاتیت

برای سنتز ذرات هیدروکسی آپاتیت از روش رسوب شیمیایی که تحت فشار اتمسفر است، استفاده شد. در این روش از کلسیم نیترات به عنوان منبع غنی از کلسیم و دی آمونیوم هیدروژن فسفات به عنوان منبع غنی از فسفر و همچنین از محلول آمونیاک ۲۵٪، جهت سنتز نانو ذرات هیدروکسی آپاتیت استفاده شد [۳]. اضافه کردن محلول آمونیاک به منظور تثبیت pH محلول روی عدد ۱۰ بود. بعد از اضافه کردن دو محلول حاوی نمک به یکدیگر، محلول حاصل یک ساعت در دمای ۴۰ درجه و با دور ۴۰۰ rpm تحت استیرر قرار گرفت. بعد از گذشت یک ساعت محلول شیری رنگ به دست آمده تحت پیر سازی به مدت ۲۴ ساعت در دمای محیط قرار گرفت. رسوب به دست آمده بعد از مدت زمان پیر سازی با آب مقطر توسط دستگاه سانتریفیوژ تحت شست و شو قرار گرفت. این پروسه طی دو مرحله با دور ۴۰۰۰ rpm و مدت زمان دو دقیقه صورت گرفت. بعد از خارج کردن رسوب از فالتون ها، آن ها به مدت ۴ ساعت در دمای ۷۰ درجه در آن قرار داده و خشک شد. در نهایت پودر حاصله در دمای ۸۰۰ درجه ی سانتیگراد (با نرخ افزایش ۱۰ درجه سانتیگراد بر دقیقه) به مدت سه ساعت کلسینه شد.

۲-۲- تولید هیدروکسی آپاتیت طبیعی

پس از برش مناسب، شستشو و جداسازی اجزای چسبیده به استخوان جهت پاکسازی استخوان ها، تمامی استخوان ها به مدت ۳ ساعت در آب در حال جوش قرار داده شدند. جهت خشک شدن نمونه ها، استخوان ها به مدت ۲۴ ساعت در آن در دمای ۴۰ درجه سانتیگراد قرار داده شدند. در نهایت جهت کلسینه شدن استخوان ها و خروج مواد آلی، تمامی نمونه ها به مدت ۳ ساعت در کوره با دمای ۸۰۰ درجه سانتیگراد (با نرخ افزایش دمای ۱۵ درجه بر دقیقه) قرار داده شدند. در نهایت با خروج نمونه ها از کوره، و کوبیدن ابتدایی نمونه ها در هاون، برای تبدیل شدن پودر هیدروکسی آپاتیت به ذرات نانوسایز، تمامی نمونه ها به صورت جداگانه در آسیاب سیاره ای به مدت ۴ ساعت با سرعت ۴۰۰ rpm به روش Wet Grinding قرار داده شدند. در نهایت با خروج محتویات جاره ای سرامیکی آسیاب و قراردادی نمونه ها در آن به مدت ۲۴ ساعت تحت دمای ۶۰ درجه سانتیگراد، پودر نانوذرات هیدروکسی آپاتیت طبیعی از استخوان های مختلف بدست آمد.

۲-۳- سنتز CNT کربوکسیل

انرژی سطحی زیاد، اندازه ی نانومتری و سطح ویژه بالا و در نتیجه نیروهای واندرالس روی سطح نانولوله های کربنی، دلیل تمایل ذاتی خوشه ای شدن آن ها است. این آگلومره شدن و پراکنده نشدن آن ها در زمینه، سبب کاهش ویژگی های نانوکامپوزیت می گردد [۴]. بنابراین دستیابی به ویژگی های مورد نظر در نانوکامپوزیت های حاوی نانولوله ی کربن، وابسته به پراکندگی یکنواخت نانولوله ها در زمینه است. از میان روش های مورد استفاده برای اصلاح سطح نانولوله های کربنی، روش اکسایش نانولوله ها با استفاده از اکسیدان ها و محیط های اسیدی قوی به عنوان روش مفید در نظر گرفته شده است.

۲-۴- روش ساخت داربست

به منظور تولید داربست کامپوزیتی و تقلید از اجزای آلی و معدنی استخوان طبیعی، ذرات نانولوله کربن و HA در ماتریس ژلاتینی پراکنده شدند. برای ساخت داربست از نسبت ۷۰٪ هیدروکسی آپاتیت و ۳۰٪ ژلاتین استفاده شد. همچنین میزان نانولوله کربنی

عامل‌دار شده نیز ۱٪ برای تمامی نمونه‌ها استفاده شد. اساساً ژلاتین خشک ماده‌ای غیرقابل شکل‌دهی است و زمانی که از طریق انحلال در آب مقطر تا حدود پنج تا ۳۰ درصد مقدار وزنی خود، به حالت سل‌ژل تبدیل شده و می‌تواند به‌آسانی قابل ریختگی یا شکل‌دهی شود. بدین ترتیب ابتدا ۱ گرم ژلاتین را در ۱۰۰cc آب مقطر با دمای ۶۵°C حل کرده و هم‌زدن توسط همزن مغناطیسی به مدت سی دقیقه صورت پذیرفت. هم‌زمان ۰/۰۳gr نانولوله کربنی به طور جداگانه در ۱۰ml آب دیونیزه تعلیق شده، حمام اولتراسونیک به مدت ۴۵ دقیقه قرار گرفت و بعد به محلول ژلاتینی افزوده شد. هم‌زدن در همزن مغناطیسی به مدت ۲ ساعت دیگر ادامه پیدا کرد. در این حین ۲/۳gr پودر هیدروکسی‌آپاتیت سنتز شده را نیز در ۱۰ml آب مقطر حل کرده و به مخلوط فوق اضافه و هم‌زدن به مدت ۱۲ ساعت دیگر ادامه یافت. این عملیات ۴ بار دیگر به صورت مشابه برای سایر نمونه‌ها انجام شد و صرفاً در مرحله پایانی هیدروکسی‌آپاتیت‌های طبیعی به مخلوط ژلاتین و نانولوله‌های کربنی افزوده شد. مخلوط‌های حاصل سوسپانسیون‌هایی بودند که در نهایت هرکدام جداگانه در سرنگ‌هایی با حجم ۵ml در حد اشباع ریخته‌شدند و با اندکی فشار هوای اضافی موجود در آن گرفته شد و در پایان هم نمونه‌ها به مدت یک شبانه‌روز با دمای ۲۰°C- در فریزر نگهداری شدند. به‌منظور تثبیت شبکه پلیمری ژلاتین جهت کاهش زیست‌تخریب‌پذیری و بالابردن خواص زیست‌مکانیکی آن برای ترمیم بافت، محلول ۱٪ EDC در آب مقطر تهیه گردید. هرکدام از نمونه‌ها بلافاصله پس از خارج‌شدن از سرنگ که به صورت استوانه‌های یخ‌زده بودن، به مدت ۴ ساعت در این محلول غوطه‌ور شدند تا تثبیت شبکه پلیمری صورت بگیرد. پس از غوطه‌وری نمونه‌ها، کاملاً با آب مقطر شستشو داده شده تا EDC اضافی آن‌ها خارج شود و دوباره به فریزر انتقال داده شدند. (برای ساخت داربست در این پژوهش از روش خشک‌کردن انجمادی انتخاب و مورد استفاده شد) [۵].

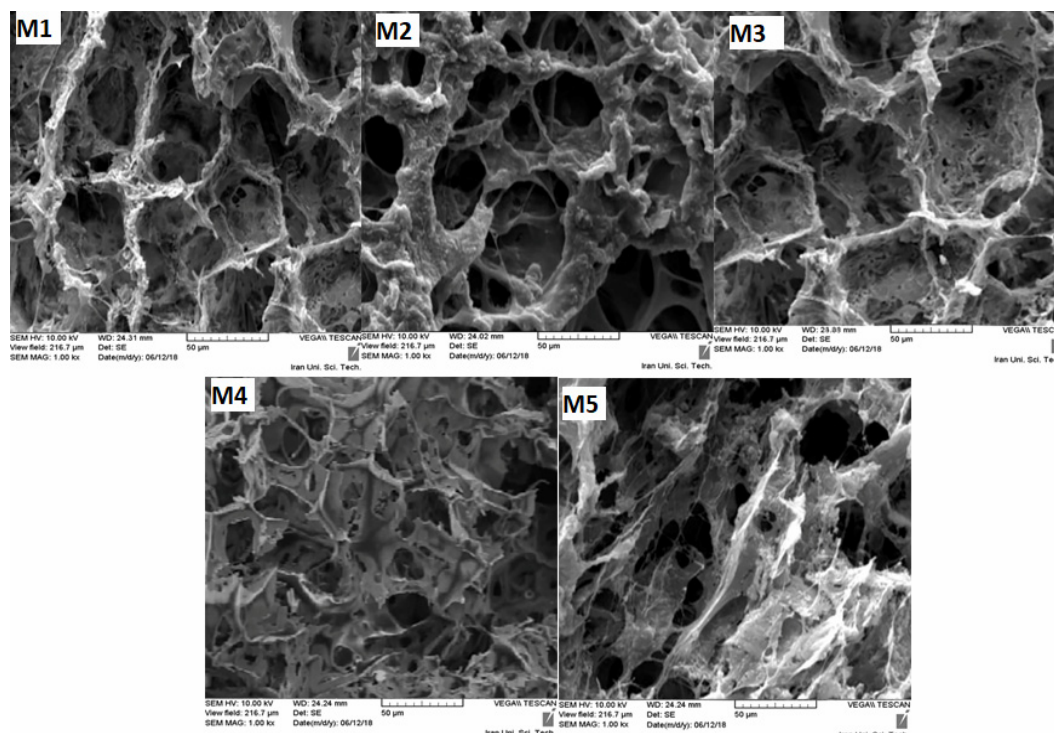
جدول ۱- اجزای تشکیل‌دهنده کامپوزیتی ساخته‌شده

شماره نمونه	مقدار و نوع هیدروکسی‌آپاتیت به کار رفته	ژلاتین	نانولوله کربنی عامل‌دار شده
M ₁	سنتزی - ۶۹٪	۳۰٪	۱٪
M ₂	طبیعی - استخوان شتر - ۶۹٪	۳۰٪	۱٪
M ₃	طبیعی - استخوان گاو - ۶۹٪	۳۰٪	۱٪
M ₄	طبیعی - استخوان تیغه ماهی سفید - ۶۹٪	۳۰٪	۱٪
M ₅	طبیعی - استخوان گوسفند - ۶۹٪	۳۰٪	۱٪

۳- نتایج و تفسیر

۳-۱- تصاویر SEM سطح مقطع داربست

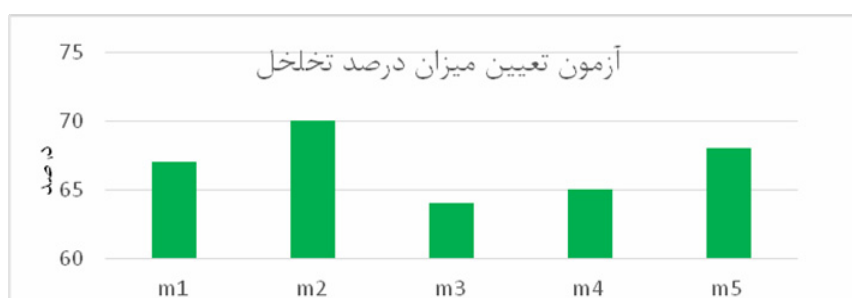
جهت بررسی ساختار داربست‌های تهیه شده از نظر مورفولوژی، اندازه و نحوه ارتباط تخلخل‌ها، تصاویر به کمک میکروسکوپ الکترونی روبشی از سطح مقطع داربست‌ها تهیه شد. طبق مطالعات صورت‌گرفته، یک اندازه حفره بهینه در محدوده ۵۰۰-۱۰۰ μm است. این اندازه تخلخل برای گسترش سلول‌ها نیز مناسب است. تصاویر گرفته‌شده از سطح مقطع داربست وجود ارتباطی میان تخلخل‌ها را نشان می‌دهد. این ارتباط و امتداد تخلخل‌ها به درون داربست، فضای مناسبی را برای سلول به جهت تبادلات شیمیایی فراهم می‌آورد. تصاویر SEM بدست‌آمده نشان می‌دهد، می‌توان حفراتی با اندازه متفاوت را مشاهده کرد. همچنین با توجه به شکل تخلخل‌ها و اندازه و میزان آن‌ها می‌توان احتمال داد، جایگزینی هیدروکسی‌آپاتیت طبیعی به جای نانوپودر سنتزی HA، سبب منظم‌تر شدن و کاهش اندازه حفرات شده‌است. جوانه‌زنی مناسب‌تر هیدروکسی‌آپاتیت طبیعی می‌تواند یکی از عوامل این اتفاق باشد. طبق تصاویر ذرات هیدروکسی‌آپاتیت و نانولوله‌های کربنی عامل‌دار به طور یکنواخت در ماتریس ژلاتین پخش شده‌اند. نمونه‌ها با حفراتی در محدوده ۴۰-۱۵۰ μm است که جهت کاربردهای مهندسی بافت استخوان، محدوده‌ای مناسب است. طبق تصاویر مشخص شده‌است، ارتباط حفرات در نمونه‌های حاوی هیدروکسی‌آپاتیت طبیعی بدست‌آمده از استخوان‌های شتر، گاو و ماهی وضعیت مطلوبی را دارا هستند.



شکل ۱- سطح مقطع داربست کامپوزیت ساخته شده از هیدروکسی آپاتیت سنتزی و طبیعی حیوانات مختلف

۳-۲- میزان درصد تخلخل

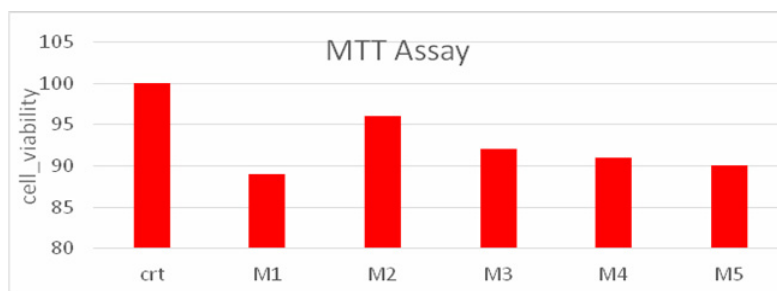
میزان و اندازه تخلخل، پارامتر بسیار مهمی در تعیین خواص مکانیکی و زیست سازگاری داربست‌ها است. ویژگی تخلخل مبتنی بر حضور حفرات باز است که خواصی نظیر نفوذپذیری و مساحت سطح ساختار متخلخل مرتبط است. تخلخل کلی داربست با استفاده از روش جابجایی مایع تقریب زده شده است. طبق نتایج بدست آمده، تخلخل داربست در داربست‌های ساخته شده بین ۶۵٪-۷۰ است که تفاوت چندانی در داربست‌های ساخته شده از هیدروکسی آپاتیت طبیعی و سنتزی مشاهده نشده است (تصاویر SEM نشان داد اندازه تخلخل‌ها در این داربست‌ها نیز در مقایسه با داربست دارای هیدروکسی آپاتیت سنتزی، کوچک‌تر است). دلیل این پدیده می‌تواند در نقش تعیین کننده ژلاتین در ایجاد تخلخل باشد که در تمامی داربست‌ها میزان ژلاتین برابر بوده است.



شکل ۲- میزان درصد تخلخل در داربست‌های ساخته شده

۳-۳- سمیت سلولی

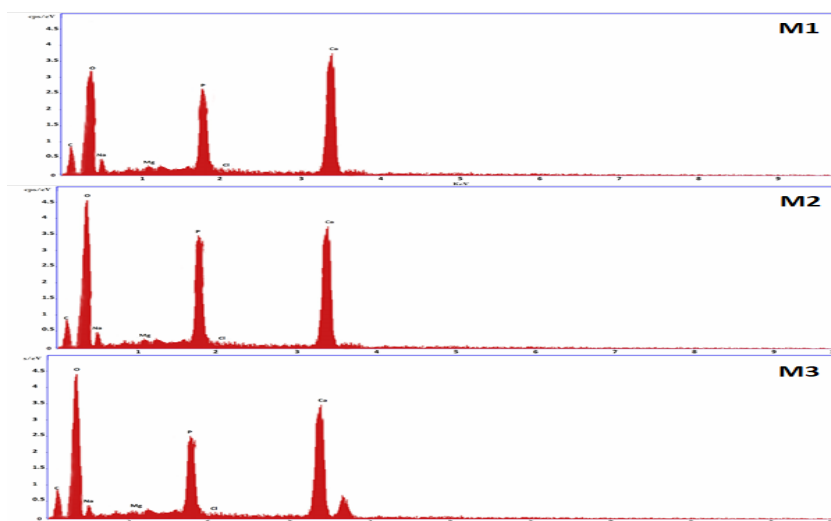
اطلاعات بدست آمده از آزمون MTT نشان می‌دهد که اولاً تمامی نمونه‌ها همانگونه که انتظار می‌رفت از زیست سازگاری مناسبی برخوردار هستند. همچنین شانس زنده ماندن سلول‌ها در داربست‌های تهیه شده از هیدروکسی آپاتیت طبیعی نسبت به هیدروکسی آپاتیت سنتزی بیشتر است که این امر در داربست تهیه شده از هیدروکسی آپاتیت طبیعی بدست آمده از استخوان شتر وضعیت مطلوب‌تری را دارا است.



شکل ۳- نتایج آزمون MTT

۳-۴- خاصیت زیست فعالی

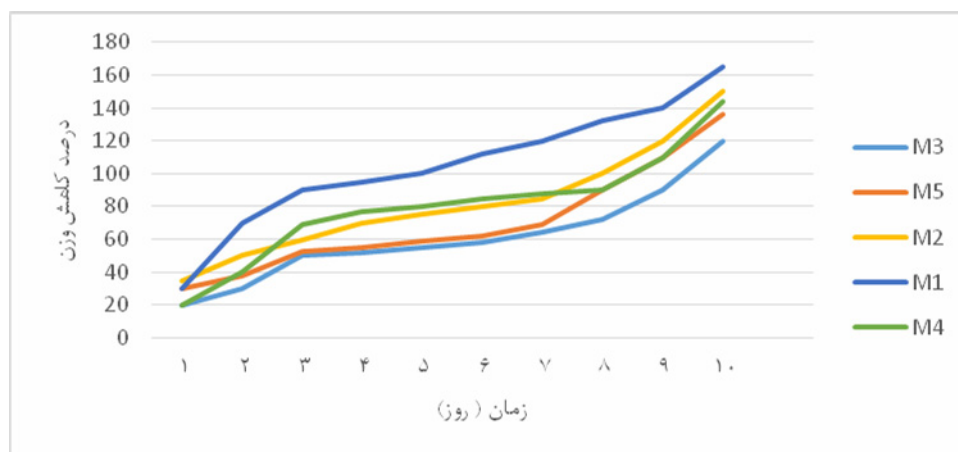
رسوب HA بر سطح CNT به زیست‌سازگاری آن از طریق یکپارچگی بهتر با استخوان جدید تشکیل یافته می‌افزاید. اطلاعات بدست‌آمده از آنالیز EDAX نشان‌دهنده افزایش شدت پیک‌های عناصر تولیدکننده هیدروکسی‌آپاتیت در داربست‌های دارای هیدروکسی‌آپاتیت طبیعی است که این امر بیان‌کننده تشکیل مناسب‌تر رسوب هیدروکسی‌آپاتیت در نمونه‌های طبیعی نسبت به سنتزی است. داربست دارای هیدروکسی‌آپاتیت طبیعی بدست‌آمده از استخوان شتر وضعیت مناسب‌تری دارند، در آنالیز EDAX نیز میزان عناصر رسوب یافته نسبت به نمونه‌ی دارای هیدروکسی‌آپاتیت طبیعی بدست‌آمده از استخوان گاو، بیشتر است.



شکل ۴- آنالیز EDAX رسوب هیدروکسی‌آپاتیت تشکیل شده در داربست‌های مختلف

۳-۵- میزان تخریب‌پذیری

همان‌طور که در تصویر ۵ مشخص است، نرخ کاهش وزن برای داربست دارای هیدروکسی‌آپاتیت سنتزی، بالاترین مقدار را داشته و داربست دارای هیدروکسی‌آپاتیت طبیعی بدست‌آمده از استخوان شتر نرخ تخریب تقریباً یکنواختی را داشته است. تخریب سریع نمونه‌ها را می‌توان به خاصیت زیست‌تخریب‌پذیری هیدروکسی‌آپاتیت و ژلاتین نسبت داد که به دلیل داشتن خاصیت جذب آب بالا، آب بیشتری می‌تواند به داخل داربست نفوذ کرده و زنجیره‌های بین فازها را شکسته و با تولید زنجیره‌های کوتاه از زنجیره‌های بلند، تخریب‌پذیری افزایش یابد. همچنین می‌توان تخمین زد در داربست‌های دارای هیدروکسی‌آپاتیت طبیعی که قابلیت جذب آب کمتری داشته‌اند، از سرعت تخریب کمتری نیز برخوردارند. از این رو میزان تخریب داربست دارای هیدروکسی‌آپاتیت بدست‌آمده از استخوان گاو دارای تخریب کمتری نسبت به سایر داربست‌ها است. این مطلب نشان می‌دهد که داربست‌های دارای هیدروکسی‌آپاتیت طبیعی، پایداری شیمیایی بهتری از خود نشان می‌دهند.



شکل ۵- درصد کاهش وزن داربست‌های ساخته شده به منظور تعیین میزان تخریب

۴- نتیجه گیری

- طبق تصاویر SEM بدست‌آمده از سطح مقطع داربست، نمونه‌ها دارای حفراتی در محدوده $40-150 \mu m$ است که جهت کاربردهای مهندسی بافت استخوان، محدوده‌ای مناسب است. همچنین ارتباط حفرات در نمونه‌های حاوی هیدروکسی‌آپاتیت طبیعی بدست‌آمده از استخوان‌های شتر، گاو و ماهی وضعیت مطلوبی را دارا هستند.
- تخلخل داربست در داربست‌های ساخته‌شده بین $65-70\%$ است که تفاوت چندانی در داربست‌های ساخته‌شده از هیدروکسی‌آپاتیت طبیعی و سنتزی مشاهده نشده است. همچنین داربست دارای هیدروکسی‌آپاتیت طبیعی بدست‌آمده از استخوان شتر دارای بیشترین تخلخل به میزان 70% درصد است.
- اطلاعات بدست‌آمده از آزمون MTT نشان می‌دهد شانس زنده ماندن سلول‌ها در داربست‌های تهیه شده از هیدروکسی‌آپاتیت طبیعی نسبت به هیدروکسی‌آپاتیت سنتزی بیشتر است که این امر در داربست تهیه شده از هیدروکسی‌آپاتیت طبیعی بدست‌آمده از استخوان شتر با میزان 96% وضعیت مطلوب‌تری را دارا است.
- اطلاعات بدست‌آمده از آنالیز EDAX نشان‌دهنده افزایش شدت پیک‌های عناصر تولیدکننده هیدروکسی‌آپاتیت در داربست‌های دارای هیدروکسی‌آپاتیت طبیعی است که این امر نشان‌دهنده تشکیل مناسب‌تر رسوب هیدروکسی‌آپاتیت در نمونه‌های طبیعی نسبت به سنتزی است. همچنین پیک‌های حاصله در داربست دارای هیدروکسی‌آپاتیت طبیعی بدست‌آمده از استخوان شتر، دارای شدت بالاتری است.
- نرخ کاهش وزن برای داربست دارای هیدروکسی‌آپاتیت سنتزی بالاترین مقدار را داشته (165%) و داربست دارای هیدروکسی‌آپاتیت طبیعی بدست‌آمده از استخوان شتر نرخ تخریب تقریباً یکنواختی در درصد کاهش وزن است. میزان تخریب داربست دارای هیدروکسی‌آپاتیت بدست‌آمده از استخوان گاو دارای تخریب کمتری نسبت به سایر داربست‌ها است (120%).

مراجع

- [1] Burg K.J.L., et al., "Biomaterial Developments for Bone Tissue Engineering", Biomater., Vol. 21, pp 2347-2359, 2000.
- [۲] محمدرضا رفیعی‌نیا، شاهین بنکدار، "بیومتریال‌ها اصول و کاربردها"، تهران، دانشگاه صنعتی امیرکبیر، سال ۱۳۹۴، ۱۵۹-۱۸۲.
- [3] A. N.-I. J. of C. Research and U., "Hydroxyapatite synthesis methodologies: an overview", 2010.
- [4] J. N. Coleman, U. Khan, W. J. Blau, and Y. K. Gun'ko, "Small but strong: a review of the mechanical properties of carbon nanotube-polymer composites," *Carbon N. Y.*, vol. 44, no. 9, pp. 1624-1652, 2006.
- [5] Jiazhen Zhang, Jingyi Nie, Qirong Zhang, Youliang Li, Zhengke Wang, Preparation and characterization of bionic bone structure chitosan/hydroxyapatite scaffold for bone tissue engineering., *J Biomaterial.sci, Polymer*, Ed.Vol,25,No1,pp61-74(2013)