



Ferdowsi
University of
Mashhad

Journal of Metallurgical and Materials Engineering

<https://jmme.um.ac.ir/?lang=en>

ISSN 2008-1962



JOURNAL OF
METALLURGICAL
AND MATERIALS
ENGINEERING

Gelatin-Calcium Phosphate Composite Scaffold: From Fabrication to Mechanical and Biological Properties Investigation*

Research Article

Faezeh Darvishian Haghighi¹, Sahar Moaveni², Sahar Mollazadeh Beidokhti³, Samaneh Sahebian Saghi⁴

Zahra Tayarani Najaran⁵

DOI: [10.22067/jmme.2022.71323.1019](https://doi.org/10.22067/jmme.2022.71323.1019)

1. Introduction

The demand for fabricating bone-healing materials is increasing. However, the creation of the most similar structure to the bone with appropriate mechanical, physical, and biological characteristics is challenging. Bone is a natural nanocomposite containing collagen and hydroxyapatite as the matrix and the reinforcement parts of the bone composite, respectively. The presence of the interconnected porous structure in the range of 200-600 nm is necessary for cell activities. The present research aims to fabricate and characterize the gelatin-calcium phosphate composite scaffolds which have promising roles in bone tissue engineering applications. In this regard, the reinforcing bioglass particles (SCP) in the $\text{SiO}_2\text{-CaO-P}_2\text{O}_5$ system were synthesized by the sol-gel method. The reinforcing synthesized particles were subjected to heat treatment at 1100 °C to create the crystalline calcium phosphate phases in the chemical composition of the reinforcing particles. Composite scaffolds were fabricated by conventional solvent casting and freeze-drying method using gelatin as the organic matrix and heat-treated bioglasses (glass-ceramics) as the reinforcing phase. Finally, a non-polymeric silica coverage was applied on the surface of the produced scaffolds to improve the mechanical and biological properties of the scaffolds. Besides, the bioactivity behavior of the mentioned composite scaffolds has been investigated in the simulated body fluid (SBF). The cytocompatibility of the covered gelatin/ calcium phosphate composite scaffolds was investigated when they are incubated with dental pulp stem cells.

2. Materials and Methods

Tetraethyl orthosilicate (TEOS), calcium nitrate tetrahydrate, and triethyl phosphate (TEP) were used as precursors of SiO_2 , CaO, and P_2O_5 , respectively. Nitric

acid (65%, HNO_3) and ammonia (NH_4OH) were used as the catalyst during the sol-gel synthesis process in $64\text{SiO}_2\text{-}28\text{CaO-}8\text{P}_2\text{O}_5$ ternary system. Food grade gelatin was used for the fabrication of the composite scaffolds. The prepared particles then were heat-treated at 1100°C. Then, the scaffolds were fabricated via solvent casting and freeze-drying methods. The DTA/TG, FTIR, and AFM analyzes of the as-synthesized particles (SCP) were performed to study the physical behavior of the particles. FESEM analysis, three-point flexural test, Resazurin Red Assay, and immersing the scaffolds in SBF media were also carried out to study the physical, biological, and mechanical behavior of the scaffolds.

3. Results and Discussion

Fig.1 shows the thermogravimetric and differential thermal (DTA/TG) results of the as-synthesized SCP particles. The first endothermic peak at the range of 50–200 °C could be attributed to the volatilization of residual water and ethanol. The exothermic peak around 250–300 °C could be related to the condensation process. The TGA results also showed a drop in weight of the SCP samples at 250–300 °C corresponding to the removal of H_2O . An exothermic peak right after the condensation process, starting at 300 °C, corresponds to the removal of nitrate groups. There is also an exothermic peak around 800 °C which could be attributed to the phase crystallization.

The XRD graph of the SCP particles heat-treated at 1100 °C is depicted in Fig.2. The formation of calcium phosphate and calcium silicate phases was consistent in the SCP particles. According to the mentioned graph, the crystallization of $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ and Ca_2SiO_4 phases occurred based on ICCD 00-009-0348 and ICCD01-077-0420, respectively.

* Manuscript received: 6 July 2021, Revised, 7 June 2022, Accepted, 9 October 2022.

1- PhD student, Department of Material Science and Engineering, Ferdowsi University of Mashhad, Mashhad, Iran.

2- Pharmacological Research Center of Medicinal Plants, University of Medical Sciences, Mashhad, Iran.

3- Corresponding Author, Assistant Professor, Department of Material Science and Engineering, Ferdowsi University of Mashhad, Mashhad, Iran. **Email:** Mollazadeh.b@um.ac.ir.

4- Assistant Professor, Department of Material Science and Engineering, Ferdowsi University of Mashhad, Mashhad, Iran.

5- Professor, Pharmacological Research Center of Medicinal Plants, University of Medical Sciences, Mashhad, Iran.

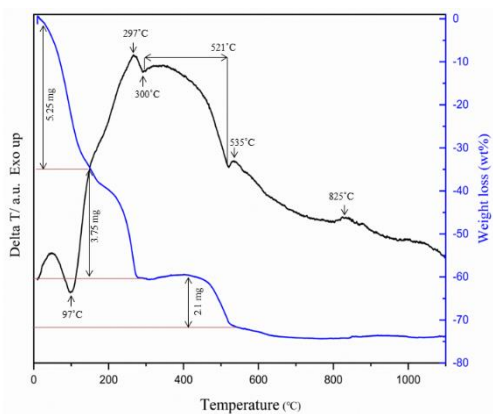


Figure 1. The DTA-TG graph of the SCP particles.

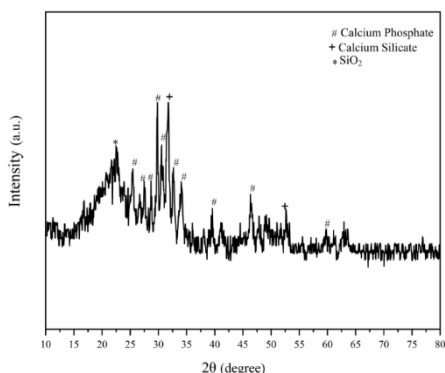


Figure 2. The XRD graph of the SCP particles.

The AFM images of the surface of the SCP particles were depicted in Fig.3. The roughness of the particles was 17.32nm which could be efficient in the mechanical interlockings between the SCP particles and the gelatin matrix in the composite.

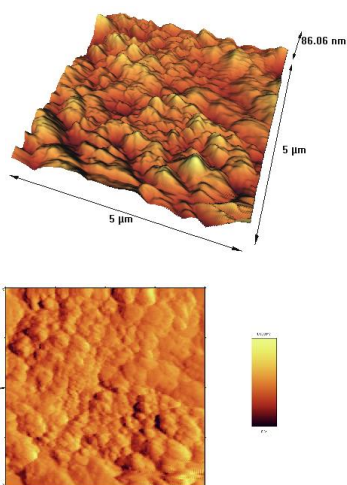


Figure 3. AFM microscopy of the SCP particles.

According to the flexural test of the composite scaffolds, the final strength of the scaffolds was 15 MPa which was closed to the natural bone. The presence of silica coverage was a beneficial parameter for improving the mechanical properties of the scaffolds. Fig.4 illustrates the FESEM images of the composite scaffolds before and after cell culture with interconnected pores. In addition, Resazurin

Red Assay confirmed the viability of 78% of stem cells on the scaffolds after 5 days of seeding. Immersion of the scaffolds in the simulated body fluid (SBF) caused the controlled release of the Ca^{2+} , Si^{4+} , and PO_4^{3-} ions (Fig.5).

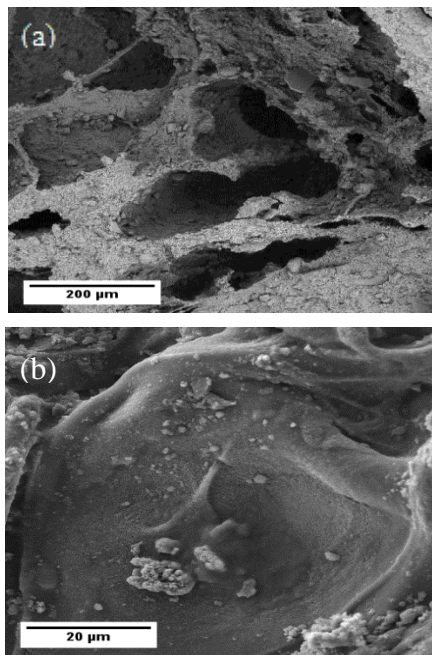


Figure 4. FESEM images of the composite scaffolds (a)before and (b)after cell culture.

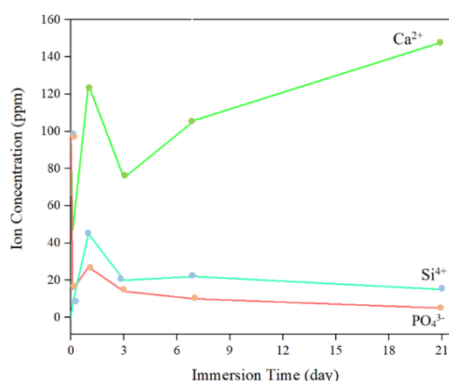


Figure 5. Ion release profiles as a function of time immersion in SBF media for composite scaffolds.

4. Conclusion

In the present research, gelatin-calcium phosphate composite scaffolds were fabricated via freeze-drying methods. The SCP particles were synthesized via a sol-gel route in $64SiO_2-28CaO-8P_2O_5$ (mol%) system. Applying the silica coverage on the composite scaffolds improved the final mechanical strength to 15 MPa which was comparable with the flexural strength of the natural bone. Resazurin Red Assay confirmed the viability of 78% of stem cells on the scaffolds after 5 days of seeding. In addition, degradation studies of the composite scaffolds in SBF media revealed that ion release occurred after 7 and 21 days of immersing the scaffolds in SBF. According to the obtained results, the gelatin-calcium phosphate composite scaffolds can play an important role in bone tissue engineering applications.



داربست‌های کامپوزیتی ژلاتین-فسفات کلسیم: از فرایند ساخت تا بررسی رفتار مکانیکی و زیستی*

مقاله پژوهشی

فائزه درویشیان حقیقی^(۱) سحر معاونی^(۲) سحر ملازاده بیدکhti^(۳) سمانه صاحبیان سقی^(۴) زهرا طیرانی نجاران^(۵)

DOI: 10.22067/jmme.2022.71323.1019

چکیده هدف پژوهش حاضر، ساخت داربست‌های کامپوزیتی از طریق فرایند انحلالی و خشک‌کایش سرمایشی می‌باشد. اولین مرحله، فراوری ذرات کلسیم‌فسفات به روش سل‌ژل و سپس، عملیات حرارتی ذرات در دمای 1100°C است. طبق نتایج آنالیز تعیین اندازه ذرات و پیکنومتری، اندازه ذرات و دانسیته آنها به ترتیب برابر با $37 \pm 5 \text{ nm}$ و 4.06 g/cm^3 می‌باشد. همچنین طبق نتایج حاصل از آنالیز پراش پرتو ایکس (XRD) و آنالیز حرارتی افتراقی (DTA-TG)، تبلور فاز فسفات کلسیم با عبور از دمای 800°C آغاز گردید. پیوندهای ایجادشده در ساختار نیز توسط طیف‌سنجی مادون قرمز تبدیل فوریه (FTIR) شناسایی شد. طبق تصویربرداری توسط میکروسکوپ AFM، زبری سطح ذرات فراوری‌شده 17.32 nm است. به‌منظور درک رفتار مکانیکی و ریزساختاری داربست‌ها آزمون خمش سه‌نقطه و تصویربرداری توسط میکروسکوپ الکترونی روبشی (FESEM) انجام شد. نتایج بررسی‌ها نشان داد که استحکام خمشی نهایی داربست برابر با $15 \pm 1 \text{ MPa}$ بوده و دارای ریزساختاری کاملاً متخلخل می‌باشد. مطالعه رفتار زیستی داربست توسط آنالیز Resazurin Red Assay نیز عدم سمیت، رشد و تکثیر مطلوب سلول‌های بنیادی مغز دندان عقل را در مجاورت با داربست اثبات کرد. همچنین قراردادن داربست‌ها در محلول شبیه‌سازی‌شده بدن با رهایش مطلوب یون‌های Ca^{2+} ، Si^{4+} و PO_4^{3-} همراه بود. بنابراین، می‌توان ادعا کرد داربست‌های ژلاتین-فسفات کلسیم می‌توانند برای ترمیم بافت‌های آسیب‌دیده استخوانی مفید واقع شوند.

واژه‌های کلیدی داربست کامپوزیتی، ژلاتین، کلسیم‌فسفات، کشت سلول‌های بنیادی، خواص مکانیکی و زیستی.

Gelatin-Calcium Phosphate Composite Scaffold: From Fabrication to Mechanical and Biological Properties Investigation

Faezeh Darvishian Haghighi Sahar Moaveni Sahar Mollazadeh Beidokhti Samaneh Sahebian Saghi Zahra Tayarani Najaran

Abstract The fabrication of the most similar structure to the bone with appropriate mechanical, physical, and biological characteristics is challenging. The main aim of the present research is to design, fabricate, and characterize the gelatin-calcium phosphate composite scaffolds. First, calcium phosphate particles (SCP) were synthesized through the sol-gel process. Accordingly, the prepared particles were synthesized via the sol-gel route and heat-treated at 1100°C . Then, the gelatin-calcium phosphate composite scaffolds were fabricated through solvent casting and freeze-drying methods. According to the pycnometer and particle size (PSA) analyses, the density and the particle size of the SCP particles were 4.06 g/cm^3 and $37 \pm 5 \text{ nm}$, respectively. Based on the XRD and DTA-TG results of the particles, crystallization of the calcium phosphate phases has been started at 800°C . The functional groups of the particles have been also studied through FTIR analysis. The roughness of the particles was 17.32 nm based on the AFM microscopy results. According to the three-point flexural test, the final strength of the scaffolds was 15 MPa . Field emission scanning electron microscopy (FESEM) showed that the scaffolds have had completely porous structure with interconnected pores. Resazurin Red Assay confirmed the viability of 78% of stem cells on the scaffolds after 5 days of seeding. Immersion of the scaffolds in the simulated body fluid (SBF) caused the controlled release of the Ca^{2+} , Si^{4+} , and PO_4^{3-} ions. Altogether, the gelatin-calcium phosphate composite scaffolds have a promising role in tissue engineering applications.

Key Words: Bone Scaffold, Gelatin, Calcium phosphate, Stem Cell Culture, Mechanical and Biological Properties.

* تاریخ دریافت مقاله ۱۴۰۰/۴/۱۵ و تاریخ پذیرش آن ۱۴۰۱/۸/۱۰ می‌باشد.

(۱) دانشجوی دکتری مهندسی متالورژی و مواد دانشگاه فردوسی مشهد، ایران.

(۲) دکترای حرفه‌ای داروسازی، دانشگاه علوم پزشکی مشهد، ایران.

(۳) نویسنده مسئول، استادیار گروه مهندسی متالورژی و مواد دانشگاه فردوسی مشهد، ایران.

(۴) استادیار گروه مهندسی متالورژی و مواد، دانشگاه فردوسی مشهد، ایران.

(۵) استاد گروه فارماکولوژی و سم‌شناسی، دانشگاه علوم پزشکی مشهد، ایران.

Email: mollazadeh.b@um.ac.ir

مقدمه

در عصر اخیر، نیاز به جایگزینی بافت استخوان به دلیل افزایش جمعیت سالخورده و مبتلا به سرطان استخوان، آسیب‌های ورزشی و تصادفات افزایش یافته است [1]. به منظور نیل به این هدف، تلاش‌های بسیاری برای طراحی و آماده‌سازی مواد جدید در زمینه مهندسی بافت استخوان انجام شده است. استخوان نانوکامپوزیتی طبیعی شامل کلاژن و هیدروکسی‌آپاتیت است که در آن ذرات فسفات کلسیم و یا آپاتیت به عنوان فاز تقویت‌کننده و پلیمر کلاژن به عنوان فاز زمینه می‌باشد [2]. وجود ساختاری متخلخل با شبکه‌ای به هم پیوسته از حفرات در محدوده ابعادی $200-600 \mu\text{m}$ ساده‌ترین مشخصه بافت استخوان می‌باشد. همچنین استحکام خمشی و مدول فشاری استخوان اسفنجی انسان به ترتیب برابر با 20MPa - 10 و $0.6-0.06 \text{ GPa}$ می‌باشد [3,4]. شناخت کافی و تقلید از ساختار یادشده، در طراحی مواد کارآمد، جهت ترمیم استخوان‌های شکسته مطلوب می‌باشد [5]. مطالعه تاریخچه مواد ترمیم‌کننده استخوان، استفاده از فلزاتی چون فولاد زنگ‌نزن و آلیاژهای تیتانیوم را به عنوان اولین موادی که برای بازسازی ساختار آسیب‌دیده به کاررفته نشان می‌دهد. از جمله معایب فلزات یادشده، استحکام نهایی زیاد، عمرکاری محدود، نیاز به عمل جراحی مجدد به منظور خارج نمودن قطعات از بدن و عدم زیست‌فعالی می‌باشد [6].

در سال‌های اخیر، به منظور غلبه بر محدودیت‌های یادشده، ایده ساخت و استفاده از داربست‌های کامپوزیتی پلیمر-سرامیک مطرح شده است. در واقع داربست ساختاری سه‌بعدی است که از تکثیر، رشد و پراکنده شدن سلول‌ها حمایت کرده و به گسترش و ترمیم بافت کمک می‌کند [7]. ساخت و به کارگیری ساختار یادشده در مهندسی بافت بسیار حائز اهمیت می‌باشد [8]. به منظور پرهیز از ایجاد تنش، خواص مکانیکی داربست‌ها نیز بایستی مشابه با محدوده بافت مجاور باشد [5]. امروزه، تنوعی در کامپوزیت‌های بایوپلیمر/بایوسرامیک مانند هیدروکسی‌آپاتیت-کلاژن، هیدروکسی‌آپاتیت-چیتوسان و هیدروکسی‌آپاتیت-ژلاتین/اسیدپولی‌لاکتیک مشاهده می‌شود [9]. کامپوزیت‌های پایه ژلاتین نیز در شکل‌های متنوعی شامل داربست‌های متخلخل، نانوالیاف و هیدروژل، تولید و برای بازسازی استخوان قابل استفاده‌اند [2]. لیلا بختیاری و همکارانش داربست‌های سه‌بعدی ژلاتین-فسفات کلسیم را با حفراتی در محدوده اندازه $200-100 \mu\text{m}$ با استفاده از پودر نفتالن و نیز فریزدرای تولید کردند [10].

قابل ذکر است که استفاده از نفتالن به منظور تولید حفرات در ساختار، رفتار زیستی را با مشکل مواجه می‌کند و بنابراین توصیه نمی‌شود. مهدی کاظم‌زاده و همکارانش نیز داربست‌های ژلاتین-هیدروکسی‌آپاتیت را با استحکام فشاری نهایی 32MPa به کمک استفاده از دستگاه فریزدرایر تولید کردند [11]. هانگ‌گین لو و همکارانش داربست‌های نانوکامپوزیتی شیشه زیست‌سازگار-ژلاتین را ساختند. طبق نتایج، با اعمال پوشش ژلاتینی، استحکام فشاری داربست از 45kPa به 138kPa به بیشترین مقدار خود رسیده است [12]. قربانی و همکاران نیز بیشترین مقدار استحکام فشاری داربست‌های هیدروکسی‌آپاتیت-ژلاتین حاوی دگزامتازون را برابر با $2/45 \text{MPa}$ گزارش کردند [13]. متعالم و همکارانش ابتدا با استفاده از شیشه‌های زیست‌سازگار 45S5، داربست‌هایی سه‌بعدی به کمک روش چاپ سه‌بعدی ساختند. سپس تأثیر نوع پوشش پلیمری را بر رفتار مکانیکی و زیستی داربست مطالعه کردند. بیشترین استحکام فشاری نهایی داربست‌های پوشش داده‌شده با چیتوسان و ژلاتین به ترتیب 14MPa و 8MPa گزارش شده است [14].

همچنین اخیراً ساخت داربست‌های کامپوزیتی زیست‌سازگار با استفاده از روش‌های پیشرفته مانند استفاده از پرینترهای سه‌بعدی توجه زیادی را به سمت خود جلب کرده است. اگرچه ساخت داربست‌های استخوانی به کمک پرینتر سه‌بعدی، ایجاد ساختاری یکنواخت با حفراتی در ابعاد مورد نظر را تأمین می‌کند، اما تجاری‌سازی محصول حاصل از آن، از لحاظ اقتصادی مقرون-به‌صرفه نیست. در حالی که در روش‌های سنتی مانند خشک‌کایش سرمایشی و تصفیه ذرات نمک می‌توان به سهولت فراوری، نیاز به حداقل تجهیزات و هزینه بسیار اندک تولید اشاره کرد. بنابراین، بهینه‌سازی روش‌های قدیمی موجود توسط روش‌های مهندسی ساده-اصلاح و بهبود روش‌های سنتی- و نیز تلفیق علوم پزشکی و مهندسی می‌تواند بر ضعف‌های ناشی از آنها غلبه کند.

هدف از پژوهش حاضر، ساخت داربست‌های ژلاتین-فسفات کلسیم به کمک روش سنتی فرایند انحلالی و نیز استفاده از خشک‌کن سرمایشی می‌باشد. اصلاح و بهبود روش سنتی مذکور و نیز اعمال پوشش سیلیسی بر روی داربست به منظور بهبود رفتار مکانیکی و زیستی از جمله نوآوری‌های پژوهش حاضر است. بدین منظور مشخصه‌یابی‌های مکانیکی، فیزیکی و زیستی کامل داربست‌های یادشده و نیز مشخصه‌یابی‌های حرارتی

تا پیرو سازی ساختار رخ داده و نیز حداکثر میزان واکنش های هیدرولیز و تراکم انجام شود. در مرحله بعد، ژل یاد شده به مدت یک روز در خشک کن با دمای 80°C خشک شد. پس از آن خردایش اولیه ذرات توسط هاون پرسلانی انجام و نمونه ها درون بوته سرامیکی ریخته شد. سپس بوته، درون کوره قرار گرفته و با سرعت $11^{\circ}\text{C}/\text{min}$ در دمای 110°C عملیات حرارتی و سپس در کوره خاموش سرد گردید. در مرحله بعد، نمونه عملیات حرارتی شده با هاون پرسلانی خرد و با الک دارای مش بندی $400\mu\text{m}$ ، الک گردید. در نهایت نیز ذرات کلسیم فسفات به مدت امروز در بشر شیشه ای قرار گرفت تا نیروهای الکترواستاتیک موجود در آن حذف شوند و از توده ای شدن ذرات در حین کامپوزیت سازی جلوگیری شود.

ساخت داربست های ژلاتین - کلسیم فسفات

داربست های ژلاتین - کلسیم فسفات حاوی 60% درصد وزنی فاز تقویت کننده شیشه سرامیکی است. به منظور ساخت کامپوزیت ها از فرایند انحلالی استفاده شد. بدین ترتیب از ژلاتین خوراکی، آب دی یونیزه و ذرات کلسیم فسفاتی فراوری شده در مرحله قبل، استفاده گردید. ابتدا محلول ژلاتین 7% وزنی به کمک روش اعمال حرارت غیر مستقیم - در محدوده 40°C تا 50°C - تهیه گردید. پس از گذشت 20 دقیقه، محلول حاصل سه مرتبه با کمک آلتراسون پروبی با شرایط زمانی 350 ثانیه، تعداد سیکل 10 عدد و توان 20 وات آلتراسون شد.

سپس با رعایت نسبت 60% درصد وزنی، پودر شیشه - سرامیک SCP به محلول ژلاتین اضافه و در دمای محیط هم زده شد. مخلوط حاصل به قالب های پلی اتیلنی منتقل شده و بلافاصله درون یخچال قرار گرفت. پس از گذشت 48 ساعت، نمونه ها از درون قالب خارج و پوشش دهی بر روی آنها انجام شد. بدین - ترتیب که نسبت برابر تئوس و آب بایکدیگر مخلوط و به مدت حداقل نیم ساعت در دمای محیط هم زده شد. با افزودن آمونیاک، ژل شدن سل اتفاق افتاد. سپس نمونه های کامپوزیتی به کمک اسپاتول، درون سل حاصل، غوطه ور گردیده و پوشش دهی شد. در نهایت نمونه ها به یخچال منتقل شد. پس از گذشت حداقل 3 ساعت، نمونه ها به فریزر با دمای 18°C - منتقل و 24 ساعت در آن نگهداری گردید. در نهایت تمامی نمونه ها به مدت 24 ساعت در فریزر درایر مدل FD-10V در دمای 50°C - قرار گرفت.

و فیزیکی ذرات تقویت کننده کلسیم فسفات نیز گزارش شده است.

مواد و روش تحقیق

مواد اولیه

همه مواد شیمیایی مورد استفاده در این آزمایش، بدون نیاز به استفاده از فرایند تخلیص بودند. به منظور سنتز ذرات کلسیم - فسفات SCP در سیستم های سه تایی $64\text{SiO}_2 - 28\text{CaO} - 8\text{P}_2\text{O}_5$ از پیش ماده هایی حاوی اکسیدهای سیلیسیم، کلسیم و فسفر استفاده - گردید. پس از آماده سازی نهایی ذرات، ساخت کامپوزیت های ژلاتین - کلسیم فسفات با استفاده از ژلاتین خوراکی انجام گرفت. مواد اولیه به کاررفته در فراوری ذرات بایوگلس در جدول (۱) آمده است.

جدول ۱ مواد اولیه مورد نیاز به منظور تهیه ذرات شیشه در سیستم سه تایی $\text{SiO}_2 - \text{CaO} - \text{P}_2\text{O}_5$

نام ماده	فرمول شیمیایی	نام شرکت	علت استفاده
تترا اتیل اورتوسیلیکات	$\text{C}_8\text{H}_{20}\text{O}_4\text{Si}$	Merck	پیش ماده SiO_2
کلسیم نترات چهارآبه	$\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	Merck	پیش ماده CaO
تری اتیل فسفات	$\text{C}_6\text{H}_{15}\text{O}_4\text{P}$	Merck	پیش ماده P_2O_5
اسید نیتریک	HNO_3	Merck	کاهش pH
اتانول (۹۶٪)	$\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$	پارس الکل	حلال
آمونیاک	NH_4OH	اوربیتال	افزایش pH

فراوری ذرات فسفات کلسیم SCP

ابتدا ذرات کلسیم فسفات به روش سل ژل در سیستم سه تایی $64\% \text{SiO}_2 - 28\% \text{CaO} - 8\% \text{P}_2\text{O}_5$ (درصد مولی) با استفاده از پیش ماده های یاد شده فراوری شد [15]. سل های مورد نیاز از پیش ماده های مذکور، آماده و به منظور انجام واکنش هیدرولیز، سه روز در دمای محیط نگهداری شد. برای انجام واکنش هیدرولیز از اتانول، آب دیونیزه و نیز اسید نیتریک به عنوان کاتالیزور باهدف سرعت بخشیدن به واکنش استفاده شد. پس از مخلوط سل های TEOS و TEP، منبع اکسید کلسیم به سل های اولیه، اضافه شد. به منظور وقوع فرایند تراکم و ژل شدن سل، pH به 11 رسانده شد. سپس ژل حاصل به مدت 14 روز در دمای محیط نگهداری شد

مشخصه‌یابی ذرات کلسیم‌فسفات (SCP)

بررسی رفتار حرارتی ذرات فسفات کلسیم آنالیز حرارتی افتراقی DTA و نیز وزن‌سنجی حرارتی TG توسط دستگاه (TG/DTA) Thermogravimetric/Differential Thermal Analyzer مدل Pyris Diamon انجام شد. آنالیز مذکور بر روی ذرات SCP فراوری شده با نرخ $10^{\circ}\text{C}/\text{min}$ و تا دمای 1100°C انجام گردید. به منظور تعیین گروه‌های ساختاری ذرات از آنالیز Fourier Transform Infrared Spectroscopy (FTIR) توسط دستگاه Thermo Nicolet مدل AVATAR 370 FT-IR استفاده شد. بدین صورت که مقدار جزئی از نمونه پودری به همراه ماده مرجع برید پتاسیم قرصی ساخته شده و تحت تابش نور مادون قرمز قرار گرفت. آنالیز فازی پراش پرتو ایکس XRD (X-ray diffraction) نیز به منظور تعیین فازهای متبلور شده در ذرات SCP توسط دستگاه PHILIPS PW1730 با مشخصات $\lambda=1/540598^{\circ}$ و $2\theta=10-80$ انجام شد. به منظور تعیین زبری سطح ذرات نیز از میکروسکوپ نیروی اتمی (AFM) با دستگاه Atomic Force Microscope مدل Full plus استفاده شد. تعیین اندازه ذرات با آنالیز تعیین اندازه ذرات (PSA) توسط دستگاه Particle Size Analyzer-CORDOUAN مدل Vasco3 انجام شد. برای این کار، مقدار جزئی از نمونه در 10 ml (0.1 g) در لیتر) آب دی‌یونیزه توسط آلتراسون پروبی توزیع و آنالیز انجام شد. همچنین دانسیته و پتانسیل زتای ذرات یادشده نیز به ترتیب توسط دستگاه پیکنومتر گازی و دستگاه تعیین پتانسیل زتا (ZP) بررسی گردید. به منظور تعیین دانسیته ذرات SCP، ابتدا ذرات داخل هاون پرسیلانی خرد شدند. سپس به منظور تعیین حجم، ذرات در داخل محفظه پیکنومتر و در معرض گاز بی‌اثر هلیوم قرار داده شد. در مرحله نهایی، با استفاده از رابطه بین حجم و فشار، دانسیته ذرات اندازه‌گیری شد. از دستگاه پتانسیل زتا نیز به منظور اندازه‌گیری بار سطحی ذرات استفاده گردید. بدین منظور ذرات جامد درون آب توزیع شده و با اعمال ولتاژ توسط دستگاه، بار موجود بر سطح ذرات SCP اندازه‌گیری گردید.

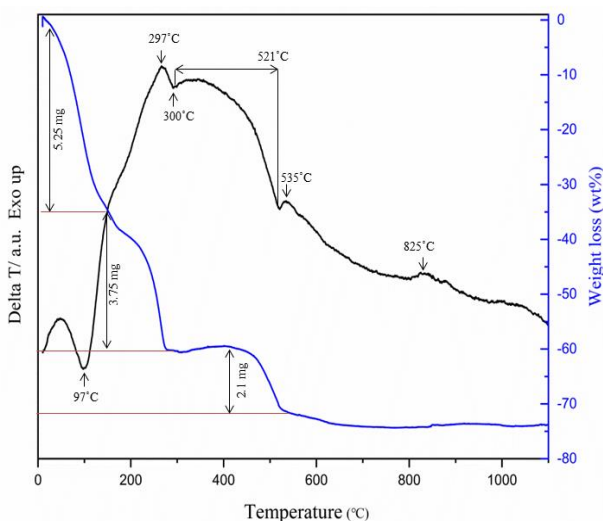
مشخصه‌یابی داربست‌های ژلاتین-کلسیم‌فسفات

آزمون استحکام خمشی سه نقطه توسط دستگاه SANTAM، فاصله دو تکیه‌گاه برابر با 15 mm و با سرعت $0.2\text{ mm}/\text{min}$ برای داربست‌ها با ابعاد $27\text{ mm} \times 4\text{ mm} \times 8\text{ mm}$ با تکرار انجام شد.

بررسی‌های ریزساختاری میکروسکوپی از سطح شکست داربست‌های ژلاتین-فسفات کلسیم پس از آزمون خمش توسط میکروسکوپ الکترونی روبشی LEO - Germany مدل VP 1450 نمونه‌ها انجام شد. همچنین به منظور بررسی رفتار زیستی داربست، از آنالیز Resazurin Red Assay و مجاورت داربست با سلول‌های بنیادی مغز دندان عقل استفاده شد. بدین صورت که ابتدا کشت و رشد کافی سلول‌های یادشده در محیط کشت DMEM در انکوباتور با دمای 37°C و حاوی 5% گاز CO_2 انجام و از سلول‌ها در پاساژ پنجم استفاده شد. سپس داربست‌ها به کمک اتانول 70% و نیز محلول شست‌وشوی PBS استریل شدند. پس از آن داربست‌های استریل شده درون میکروتیوب‌های 2 ml گذاشته شد. سپس $500\text{ }\mu\text{l}$ سوسپانسیون سلولی با غلظت 2×10^4 سلول بر روی داربست‌ها ریخته شد و به مدت 5 ساعت درون انکوباتور نگهداری گردید. پس از آن، محتویات داخل هر میکروتیوب به یک خانه از ظروف 24 خانه منتقل و داربست‌ها به مدت زمان 5 روز درون انکوباتور نگهداری شدند. در مرحله نهایی با هدف تعیین درصد سلول‌های زنده بر روی داربست‌ها از آنالیز Resazurin Red Assay استفاده شد. بدین منظور پس از گذشت مدت زمان معین از ریختن رنگ آلاماریلو بر روی داربست‌ها، از دستگاه Microplate - Reader برای خوانش عدد جذب استفاده شد. پس از کشت سلول نیز مجدداً ریزساختار داربست توسط میکروسکوپ FESEM مورد بررسی قرار گرفت. همچنین به منظور بررسی رفتار زیست‌سازگاری داربست‌ها از مجاورت آنها با محلول شبیه‌سازی شده بدن (SBF) در مدت زمان‌های 3 ساعت، 1 ، 3 ، 7 و 21 روز استفاده شد. محلول استاندارد یادشده از انحلال پیش‌ماده‌های NaCl ، NaHCO_3 ، KCl ، K_2HPO_4 ، $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ و CaCl_2 در آب دیونیزه آماده شد. غلظت‌های یونی محلول SBF مشابه با پلاسما خون انسان است. پس از آماده‌سازی محلول، نمونه‌ها به مدت 3 ساعت، 1 ، 3 ، 7 و 21 روز درون محلول یادشده و داخل انکوباتور چرخشی با دمای 37°C قرار گرفتند. پس از گذشت زمان‌های مذکور، آنالیز پلاسما جفت‌شده القایی (ICP) و نیز آنالیز XRD به ترتیب بر روی محلول SBF مجاورشده با داربست و نیز داربست انجام شد. بررسی میزان رهایش یون‌های سیلیسیم، کلسیم و فسفر درون محلول و نیز میزان تبلور فازی بر روی داربست، اهداف اصلی انجام دو آنالیز یادشده است.

از وقوع تراکم گروه‌های سیلانول و نیز گروه‌های P-OH باشد [16].

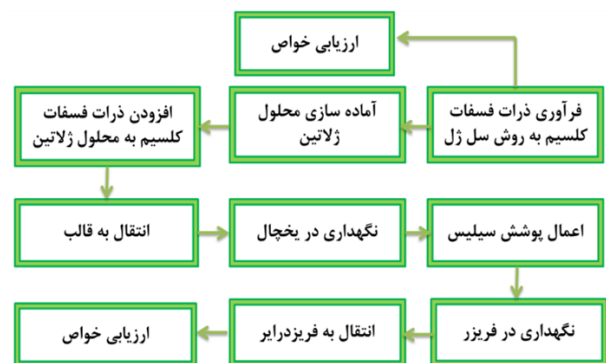
همچنین واضح است که در اثر استفاده از کلسیم‌نترات چهارآبه به عنوان پیش‌ماده اکسید کلسیم، مقدار قابل توجهی نترات نیز به ساختار وارد شده است. همان‌گونه که پیشتر ذکر شد، خروج نترات‌ها و نیز سایر مواد باقیمانده اضافی در ساختار پیش‌ماده اکسید فسفر (تری‌اتیل فسفات) پس از وقوع تراکم و طی یک واکنش گرمای قوی تا قبل از رسیدن به دمای 550°C بوده است. زیرا با رسیدن به دمای مذکور، طبق نمودار TG کاهش جرم در ساختار متوقف شده و پایداری قابل توجهی در نمودار نمونه قابل مشاهده است. طبق گزارش تمام مراجع مطالعه‌شده، پس از وقوع پدیده‌ها و واکنش‌های مذکور، اصلی‌ترین اتفاق‌هایی که در ساختار می‌افتد، شیشه‌ای شدن و نیز شروع تبلور است. در بالاتر از دمای 800°C ، طی پدیده‌ای گرمازا برای هر دو نمونه بلورینگی آغاز شده است.



شکل ۲ نمودار آنالیز حرارتی DTA-TG ذرات SCP

نتایج آنالیز FTIR ذرات SCP در شکل (۳) آمده است. برای یک شیشه زیستی 45S5، قله‌های جذب در $520-450\text{ cm}^{-1}$ متناظر با حالت‌های خمشی Si-O-Si و O-Si-O و به اشتراک‌گذاری ممکن گروه‌های O-P-O می‌باشد. قله‌های مشاهده‌شده در $820-720\text{ cm}^{-1}$ می‌تواند متناظر با کشش متقارن Si-O-Si در اکسیژن‌های پلزن (BO) باشد. همچنین قله‌های موجود در محدوده $980-920\text{ cm}^{-1}$ متناظر با کشش Si-O با

نمودار شماتیک مراحل ساخت و مشخصه‌یابی داربست‌های مذکور در شکل (۱) آمده است.



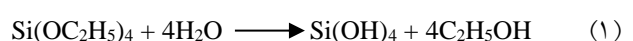
شکل ۱ نمایش مراحل ساخت و مشخصه‌یابی داربست‌های ژلاتین-کلسیم فسفات

نتایج و بحث

مشخصه‌یابی ذرات کلسیم فسفات SCP

آنالیز حرارتی DTA-TG بر روی ذرات SCP انجام شده و نتایج آنالیز مذکور بر روی ذرات SCP در شکل (۲) آمده است. طبق نتایج، در ابتدا وقوع یک پدیده گرماگیر قابل مشاهده است. مرحله که با کاهش جرمی در محدوده 50°C تا 200°C همراه است، مربوط به خروج آب جذب‌شده به صورت فیزیکی و نیز خروج آب و الکلی است که طی مراحل خشک نمودن، قادر به خروج نبوده و در ساختار باقی مانده‌اند. جدایش مولکول‌های آب یادشده در دمای کم‌تر از 100°C به وقوع می‌پیوندد. آب تبلور یافته موجود در ساختار نیز که به طور شیمیایی با پل‌های Si-O-Si دارای پیوند است، در دماهای بالاتری از ساختار حذف می‌گردد. این رخداد با حدود $5/25\text{ mg}$ کاهش جرم در نمونه همراه است [15].

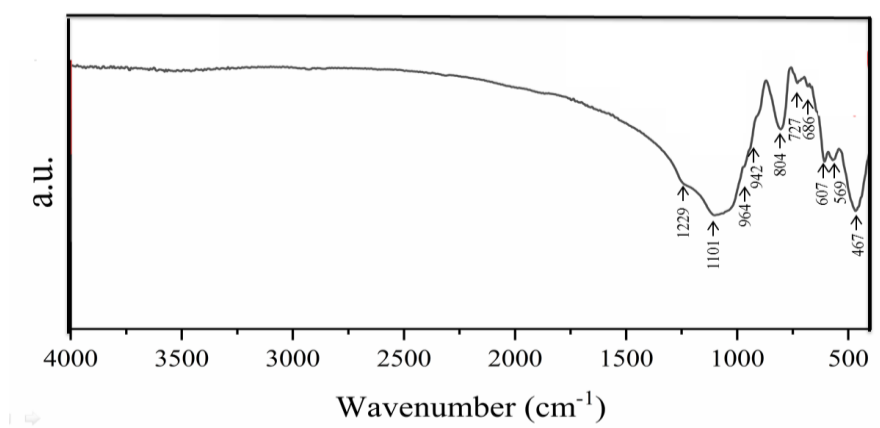
در مرحله هیدرولیز طبق واکنش (۱)، سیلانول‌ها (گروه‌های SiOH) تشکیل می‌شوند.



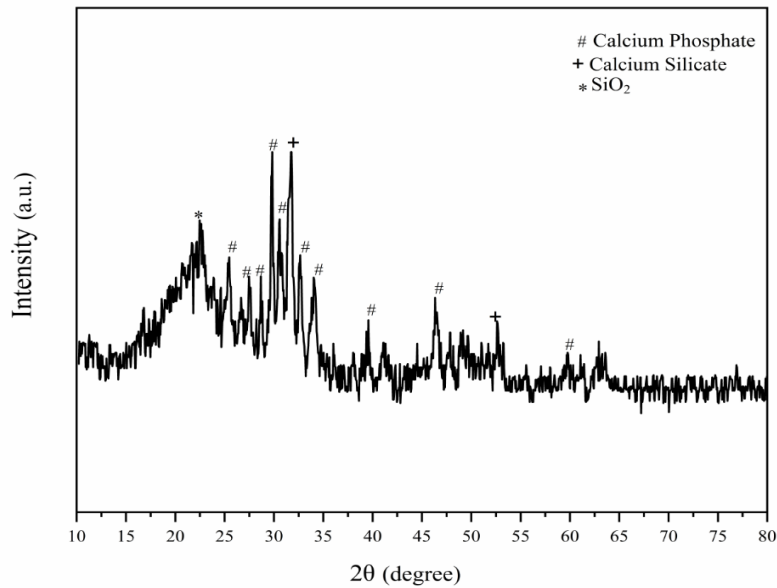
پس از هیدرولیز با افزایش pH و نیز طی یک پدیده گرمازا، متراکم شدن ساختار رخ می‌دهد. بدین صورت که سیلانول‌های تشکیل شده در مرحله قبل، به سیلیس و آب تجزیه می‌شوند. کاهش وزن موجود در این مرحله می‌تواند به دلیل رهایش ناشی

رخ می‌دهد [17]. عدد موج 1101cm^{-1} مربوط به کشش Si-O-Si در ساختارهای خطی است [20]. همچنین آنالیز فازی XRD بر روی ذرات SCP، به‌منظور تعیین فازهای ایجادشده در ساختار پس از عملیات حرارتی در دمای 1100°C انجام شده‌است. نمودار آنالیز XRD ذرات کلسیم‌فسفات در شکل (۴) آمده است. نتایج نشان می‌دهد که تبلور فازهای کلسیم‌فسفات و کلسیم‌سیلیکات در نمونه آغاز شده‌است. در $2\theta=30^\circ$ فازهای کلسیم‌سیلیکات با فرمول شیمیایی Ca_3SiO_5 و کلسیم‌فسفات با فرمول $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ ، به ترتیب به استناد کارت‌های ICSD 00-009-0348 و ICSD 00-016-0406 تبلور یافته‌اند. فاز کلسیم‌فسفات متبلور شده در $2\theta=31^\circ$ به کمک شناسایی با کارت‌های ICSD 01-086-1585 و ICSD 00-009-0348 به ترتیب می‌تواند کلسیم‌فسفات‌هایی از خانواده Ca_2SiO_4 ، توسط کارت ICSD 01-077-0420 تبلور یافته‌است. فازهای کلسیم‌فسفاتی مطابق با شماره کارت‌های ذکر شده قبلی، در $2\theta=34^\circ$ و $2\theta=35^\circ$ نیز متبلور شده‌است. همچنین قله‌های ضعیفی که نشان‌دهنده تبلور فازهای مشابه می‌باشد، در زوایای $2\theta=25^\circ$ ، $2\theta=27^\circ$ و $2\theta=46^\circ$ قابل مشاهده است. تطابق زاویه قله‌های ضعیف یادشده با کارت‌های ICSD 00-009-0348 و ICSD 01-086-1585 نشانی بر این مدعاست.

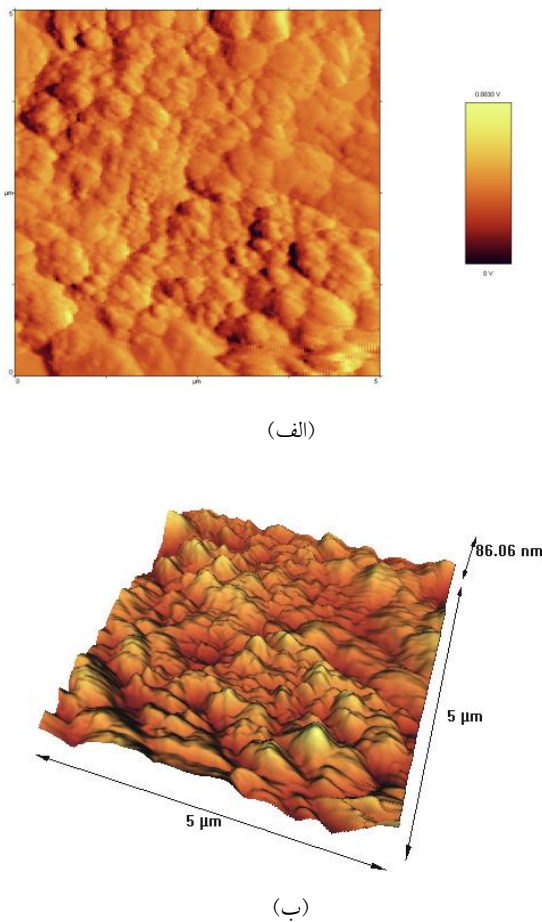
اکسیژن‌های غیرپلزن (NBO) و به اشتراک‌گذاری ممکن ارتعاش‌های P-O-P می‌باشد. قله‌های مشاهده‌شده در 1129cm^{-1} و 1101cm^{-1} نیز متناظر با کشش نامتقارن اکسیژن‌های پلزن (BO) در داخل فضای تتراهدرال و نیز به اشتراک‌گذاری ممکن گروه‌های یونی P-O⁻ است. قله موجود در 1460cm^{-1} متناظر با ارتعاش‌های گروه‌های کربناتی است و قله 1640cm^{-1} مربوط به ارتعاشات مولکولی OH در آب است. باندهای پهن در محدوده عدد موج 2840cm^{-1} – 3450cm^{-1} می‌تواند متناظر با گروه‌های هیدروکسیل یا آب و یا ارتعاشات SiOH و POH باشد. همچنین فرض می‌شود که باندهای گروه‌های فسفات که مقدارشان نیز محدود است، با باندهای ارتعاشی در محدوده عدد موج 450cm^{-1} – 1200cm^{-1} متناظر باشند [17]. نمودار FTIR ذرات SCP فراوری شده در شکل (۳) نیز نشان می‌دهد که در عدد موج 467cm^{-1} ارتعاش خمشی در پیوند Si-O رخ می‌دهد [18]. کشش متقارن P-O نیز در عدد موج 569cm^{-1} اتفاق می‌افتد. همچنین وقوع خمش P-O در گروه‌های PO_4^{3-} مربوط به عدد موج 607cm^{-1} می‌باشد [19]. در اعداد موج 727cm^{-1} و 804cm^{-1} کشش متقارن پیوند Si-O-Si در اکسیژن‌های پلزن (BO) دیده می‌شود [17]. کشش Si-O با اکسیژن‌های غیرپلزن (NBO) و به اشتراک‌گذاری ممکن ارتعاش‌های P-O-P نیز مربوط به عدد موج 964cm^{-1} می‌باشد. در عدد موج 964cm^{-1} نیز ارتعاش کششی P-O



شکل ۳ نمودار آنالیز FTIR ذرات کلسیم‌فسفات SCP



شکل ۴ آنالیز فازی ذرات کلسیم فسفات SCP



شکل تصاویر تهیه شده توسط میکروسکوپ نیروی اتمی (AFM):
 (الف) سطح ذرات و (ب) توپوگرافی سطحی ذرات SCP

نتایج بررسی زبری سطحی ذرات کلسیم فسفات SCP که توسط میکروسکوپ نیروی اتمی AFM تهیه شده، در شکل (۵) آمده است. طبق بررسی‌ها، زبری سطح ذرات یادشده برابر با ۱۷/۳۲ است. در واقع هر چه سطح زبرتر باشد، شرایط بهتری برای برقراری قفل‌های مکانیکی با زمینه پلیمری ژلاتین فراهم می‌شود. طبق بررسی‌های میکروسکوپی توسط میکروسکوپ AFM، سطح ذرات SCP از زبری مناسبی برخوردار می‌باشد. بنابراین انتظار می‌رود که استحکام نهایی داربست حاوی ذرات SCP مطلوب باشد. طبق مطالعات، ساختار کامپوزیتی ساختاری است که دو یا چند فاز کاملاً نامتجانس کنار هم قرار می‌گیرند. حضور دو فاز نامتجانس و کاملاً متفاوت در کنار هم نیاز به یک اتصال قوی در فصل مشترک دارد. راه‌های بسیاری برای افزایش ارتباط میان فاز زمینه و تقویت‌کننده وجود دارد. یکی از آنها وجود سطحی زبر در فاز تقویت‌کننده است. حضور پستی‌ها و بلندی‌های سطحی سبب فراهم‌نمودن شرایطی در افزایش قفل‌های مکانیکی بین فازهای زمینه و تقویت‌کننده است. زبری سطح ذرات SCP که توسط میکروسکوپ AFM شناسایی و اندازه‌گیری شده می‌تواند عاملی مؤثر در اتصال ذرات به فاز زمینه ژلاتینی، بهبود استحکام فصل مشترک و افزایش استحکام نهایی داربست کامپوزیتی باشد [21].

نتایج تصویربرداری توسط میکروسکوپ FESEM از سطح شکست داربست پس از آزمون خمش سه نقطه نشان می‌دهد ساختاری کاملاً متخلخل در داربست ژلاتین-کلسیم فسفات ایجاد شده است. حضور حفرات به هم پیوسته در این ساختار می‌تواند مکان‌های مناسبی برای فعالیت‌های سلولی از جمله چسبندگی، تکثیر و پراکندگی سلولی فراهم کند. شکل (۶-الف-ج) تصویر ساختار متخلخل داربست را قبل از بررسی رفتار زیستی نشان می‌دهد. حضور حفرات به هم پیوسته در ابعاد گوناگون با علامت پیکان در شکل مشخص شده است. همچنین پس از ۵ روز کشت سلول‌های بنیادی بر روی داربست نیز حضور سلول‌های یادشده بر روی دیواره‌های داربست قابل مشاهده است. شکل (۶-د) تصویر داربست یادشده را پس از کشت سلول نشان می‌دهد که حضور سلول بنیادی بر دیواره داربست در شکل مشخص گردیده است. همچنین نتایج آنالیز Resazurin Red Assay حضور ۷۸٪ سلول زنده را بر روی داربست و نیز داخل حفرات موجود در آن تأیید کرد.

همان‌گونه که در بخش مشخصه‌یابی زیستی ذرات نیز ذکر شد، داربست‌های ژلاتین-فسفات کلسیم در محلول شبیه‌سازی شده بدن (SBF) قرار داده شدند تا رهایش یونی مورد بررسی قرار بگیرد. شکل (۷) نمودار رهایش یون‌های Ca^{2+} ، Si^{4+} و PO_4^{3-} را در زمان‌های مختلف نشان می‌دهد. مقایسه کلی نمودار نشان می‌دهد که افزایش زمان ماندگاری داربست تا ۲۱ روز سبب افزایش غلظت یون کلسیم و کاهش غلظت یون‌های سیلیسیم و فسفر شده است. همان‌گونه که واضح است، مقدار 100 ppm از یون‌های Ca^{2+} و PO_4^{3-} در ابتدا در محلول SBF وجود دارد. به دلیل تشکیل فازهای فسفاتی طی قرارگیری داربست‌های یادشده در محلول SBF، یون PO_4^{3-} مصرف شده و مقدار آن با گذشت زمان کاهش یافته است. یون‌های Si^{4+} نیز رفتاری مشابه با گروه فسفاتی از خود نشان می‌دهند. بنابراین تشکیل فازهای حاوی سیلیکات نیز بعد از گذشت ۲۱ روز محتمل می‌باشد. رهایش یون‌های مذکور، اثباتی بر وجود ویژگی زیست‌فعالی و کمک به بازسازی بافت آسیب‌دیده استخوانی توسط داربست‌های ژلاتین-فسفات کلسیم پژوهش حاضر است [21].

هدف از تعیین دانسیته، اندازه ذرات و پتانسیل زتای ذرات فسفات کلسیم، شناخت خواص فیزیکی ذرات SCP و نیز تأثیر آن بر خواص نهایی داربست‌های تقویت‌شده توسط آنها می‌باشد. همچنین علت تعیین پتانسیل زتای ذرات، تعیین میزان تمایل ذرات به توده‌ای شدن می‌باشد. هرچه پتانسیل زتای ذرات منفی‌تر باشد، تمایل ذرات به توده‌ای شدن و تجمع آنها کمتر خواهد بود. از طرفی با کاهش ابعاد ذرات، به دلیل افزایش نسبت سطح به حجم، چسبندگی سلولی نیز افزایش خواهد یافت. نتایج دانسیته، اندازه و پتانسیل زتای ذرات در جدول (۲) آمده است. همچنین انجام عملیات حرارتی در دمای 110°C سبب وقوع بلورینگی و افزایش میزان نظم‌های بلندبرد در پیوندهای ایجادشده در ساختار ذرات نسبت به حالت آمورف می‌شود. کاهش تعداد پیوندهای شکسته و ناکامل و افزایش پیوندهای Si-O-Si سبب کاهش فاصله بین اتمی و افزایش نظم و تراکم اتمی می‌گردد. به عبارت دیگر، افزایش تراکم ساختار سبب افزایش دانسیته ذرات می‌شود [21].

جدول ۲ دانسیته، اندازه و پتانسیل زتای ذرات فسفات کلسیم SCP

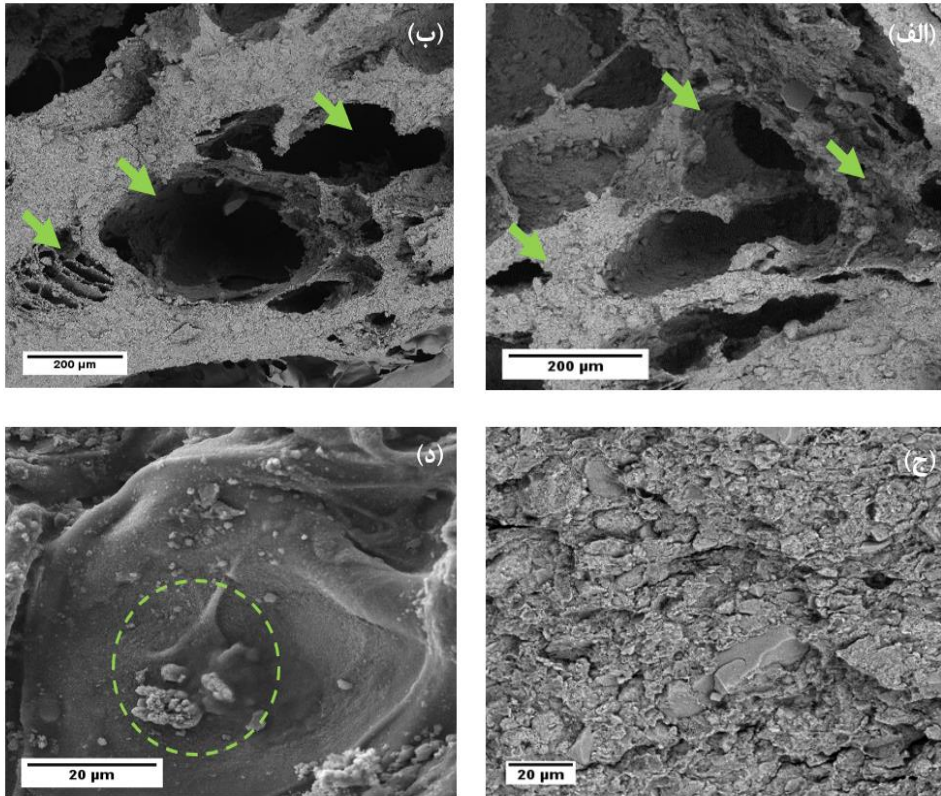
دانسیته (g/cm^3)	اندازه ذرات (nm)	پتانسیل زتا (mv)
۴/۰۶	37 ± 5	-۶۷

مشخصه‌یابی داربست‌های ژلاتین-کلسیم فسفات

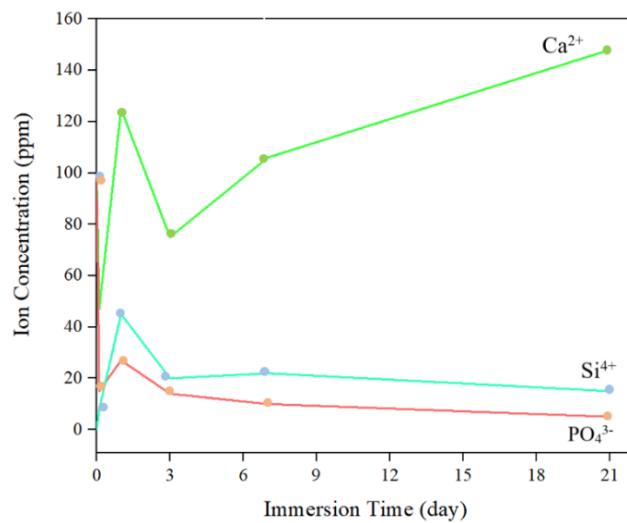
نتایج بررسی رفتار مکانیکی داربست در جدول (۳) آمده است. بررسی رفتار مکانیکی داربست یادشده طی آزمون خمش سه نقطه نشان داد اعمال پوشش سیلیسی سبب افزایش قابل توجه استحکام مکانیکی و مدول خمشی داربست در مقایسه با پژوهش قبل شده است. همچنین استحکام خمشی استخوان طبیعی در محدوده $10\text{--}20\text{ MPa}$ گزارش شده است و استحکام نهایی داربست‌های ساخته‌شده در پژوهش حاضر در این محدوده قرار می‌گیرد که یکی از دستاوردهای مهم پژوهش حاضر محسوب می‌شود [22]. همچنین همان‌گونه که بررسی زبری سطحی توسط میکروسکوپ AFM نشان داد، زبری سطح ذرات SCP سبب افزایش سطح ارتباط با ژلاتین، افزایش قفل‌های مکانیکی و در نتیجه بهبود استحکام نهایی داربست می‌شود.

جدول ۳ نتایج آزمون خمش سه نقطه بر روی داربست‌های ژلاتین-کلسیم فسفات

کرنش بیشینه	مدول خمشی (MPa)	استحکام خمشی نهایی (MPa)	
۰/۰۵	۲۳۲±۷	۱۵	داربست ژلاتین-کلسیم فسفات
-	-	۱۰-۲۰	استخوان طبیعی



شکل ۶ تصاویر میکروسکوب FESEM مربوط به داربست ژلاتین-فسفات کلسیم: (الف-ج) قبل از کشت سلول و (د) بعد از کشت سلول



شکل ۷ تغییرات غلظت یون‌های Ca²⁺، Si⁴⁺ و PO₄³⁻ با زمان

نتیجه‌گیری

داربست طی آزمون مکانیکی تحمل کرد ۱۵MPa است که مشابه با استحکام خمشی استخوان طبیعی می‌باشد. اندازه نانومتری ذرات تقویت‌کننده کلسیم‌فسفات سبب افزایش سطح ویژه و در نتیجه رفتار زیستی مطلوب‌تر داربست می‌شود. همچنین نتایج بررسی رفتار سلول‌های بنیادی بر روی داربست‌ها نشان داد که امکان فعالیت‌های سلولی از جمله رشد، چسبندگی و تکثیر سلولی بر روی دیواره و نیز داخل حفرات داربست‌های ژلاتین-کلسیم فسفات وجود دارد. قراردادن داربست در محلول شبیه-سازی بدن (SBF) نیز با رهایش مطلوب یون‌های Ca^{2+} ، Si^{4+} و PO_4^{3-} از داربست همراه بود که نشان‌دهنده زیست‌فعالی داربست می‌باشد.

در پژوهش حاضر، ساخت و مشخصه‌یابی داربست‌های ژلاتین-کلسیم‌فسفات به کمک فرایند انحلالی و فریزدرای انجام شده است. بدین منظور ابتدا ذرات کلسیم‌فسفات در سیستم سه‌تایی $64SiO_2-28CaO-8P_2O_5$ به روش سل‌ژل فراوری شده و مورد ارزیابی‌های متنوعی قرار گرفتند. تبلور فازهای فسفات کلسیم و سیلیسیم در ساختار ذرات توسط آنالیزهای XRD و DTA-TGA مشاهده شد. همچنین زبری سطح ذرات توسط میکروسکوپ AFM برابر با ۱۷/۳۲ nm گزارش شد که سبب افزایش قفل‌های مکانیکی با فاز زمینه پلیمری و در نتیجه بهبود استحکام نهایی داربست طی آزمون خمش سه‌نقطه شده است. بیشترین تنش که

مراجع

1. Kanhed, S., Awasthi, S., Goel, S., Pandey, A., Sharma, R., Upadhyaya, R., Balani, K., "Porosity distribution affecting mechanical and biological behaviour of hydroxyapatite bioceramic composites", *Ceramics International*. Vol. 43, pp. 10442–10449, (2017).
2. Kuttappan, S., Mathew, D., Nair, M. B., "Biomimetic composite scaffolds containing bioceramics and collagen/gelatin for bone tissue engineering - A mini review", *International Journal of Biological Macromole*. Vol. 93, pp. 1390–1401, (2016).
3. M. Rizwan, M. Hamdi, W.J. Basirun, K. Kondoh, J. Umeda, Low pressure spark plasma sintered hydroxyapatite and Bioglass® composite scaffolds for bone tissue repair, *Ceramics International*, Vol. 44, pp. 23052–23062, (2018).
4. Kaur, G., Kumar, V., Bains, F., Mauro, J. C., Pickrell, G., Evans, I., Bretcanu, O., "(Mechanical properties of bioactive glasses, ceramics, glass-ceramics and composites: State-of-the-art review and future challenges", *Material Science and engineering C*, pp. 109895, (2019).
5. Fayyazbakhsh, F., Solati-Hashjin, M., Keshtkar, A., Shokrgozar, M. A., Dehghan, M. M., Larijani, B., "Novel layered double hydroxides-hydroxyapatite/gelatin bone tissue engineering scaffolds: Fabrication, characterization, and in vivo study", *Material Science and engineering C*. Vol. 76, pp. 701–714, (2017).
6. Palmero, P., "Ceramic-Polymer Nanocomposites for Bone-Tissue Regeneration", *Journal of Nanocomposites for Musculoskeletal Tissue Regeneration*, Elsevier Ltd, pp. 331-367 (2016).
7. Fayyazbakhsh, F., Solati-Hashjin, M., Shokrgozar, M. A., Bonakdar, S., Ganji, Y., Mirjordavi, N., Ghavimi, S. A., Khashayar, P., "Biological Evaluation of a Novel Tissue Engineering Scaffold of Layered Double Hydroxides (LDHs)", *Key Engineering Materials*, pp. 493–494, 902, (2011).
8. Huh, J. T., Lee, J. U., Kim, W. J., Yeo, M., Kim, G. H., "Preparation and characterization of gelatin/ α -TCP/SF biocomposite scaffold for bone tissue regeneration", *International Journal of Biological Macromolecules*. Vol. 110, pp. 488–496, (2018).

9. Feng, S., He, F., Ye, J., "Hierarchically porous structure, mechanical strength and cell biological behaviors of calcium phosphate composite scaffolds prepared by combination of extrusion and porogen burnout technique and enhanced by gelatin", *Material Science and Engineering C*, Vol. 82, pp. 217–224, (2018).
10. Bakhtiari, L., Reza, H., Mohamad, S., Ali, M., "Investigation of biphasic calcium phosphate / gelatin nanocomposite scaffolds as a bone tissue engineering", *Ceramics International*, Vol. 36, pp. 2421–2426, (2010).
11. Narbat, M. K., Orang, F., Hashtjin, M. S., Goudarzi, A., "Fabrication of Porous Hydroxyapatite-Gelatin Composite Scaffolds for Bone Tissue Engineering", *Iranian Biomedical Journal*, Vol. 10, No.4, Pp. 215–223, (2006).
12. Luo, Yi and Wang, Zhendong and Jin, Shaoqing and Zhang, Bin and Sun, Hongmin and Yuan, Xiaohong and Yang, Weimin, "Synthesis and crystal growth mechanism of ZSM-22 zeolite nanosheets", *Journal of CrystEngComm*, Vol. 18, Issue. 30, pp. 5611-5615 (2016).
13. Ghorbani, F., Nojehdehian, H., Zamanian, A., "Physicochemical and mechanical properties of freeze cast hydroxyapatite-gelatin scaffolds with dexamethasone loaded PLGA microspheres for hard tissue engineering applications", *Material Science and Engineering C*. Vol. 69, pp. 208–220, (2016).
14. Azadeh Motealleh, Siamak Eqtesadi, Fidel Hugo Perera, Antonia Pajares, Fernando Guiberteau, Pedro Miranda, Understanding the role of dip-coating process parameters in the mechanical performance of polymer-coated bioglass robocast scaffolds, *Journal of the Mechanical Behavior of Biomedical Materials*, Vol. 64, pp. 253-261, (2016).
15. M., Catauro, A. Dell'Era, S., Vecchio Cipriotti, "Synthesis, structural, spectroscopic and thermoanalytical study of sol-gel derived SiO₂-CaO-P₂O₅ gel and ceramic materials", *Thermochimica Acta*. Vol. 625, Pp. 20–27, (2016).
16. Taherkhani, S., Moztarzadeh, F., Mozafari, M., Lot, N., "Sol – gel synthesis and characterization of unexpected rod-like crystal fibers based on", Vol. 358, pp. 342–348, (2012).
17. Abdelghany, A.M., ElBatal, H.A., Okasha, A. et al. Compatibility and Bone Bonding Efficiency of Gamma Irradiated Hench's Bioglass. *Journal of Silicon*, Vol. 10, pp. 1533–1541, (2018).
18. Nabian, N., Jahanshahi, M., Mahmood, S., "Synthesis of nano-bioactive glass – ceramic powders and its in vitro bioactivity study in bovine serum albumin protein", *Journal of Molecular Structure*, Vol. 998, pp. 37–41, (2011).
19. Faure, J., Drevet, R., Lemelle, A., Ben Jaber, N., Tara, A., El Btaouri, H., Benhayoune, H., "A new sol – gel synthesis of 45S5 bioactive glass using an organic acid as catalyst Preparation of Powder Gel", *Material science and engineering C*, Vol. 47, pp. 407–412, (2015).
20. Rubio, F., Rubio, J., Oteo, J. L., A FT-IR Study of the Hydrolysis of Tetraethylorthosilicate (TEOS), *Journal of Spectroscopy Letters*, Vol. 31, pp. 199-219, (1998).
21. Darvishian Haghighi, F., Mollazadeh Beidokhti, S., Tayarani Najaran, Z., Sahebian Saghi, S., "Highly improved biological and mechanical features of bioglass-ceramic/ gelatin composite scaffolds using a novel silica coverage", *Ceramics International*, Vol. 47, Issue 10, Part A, pp.14048-14061, (2021).
22. Darvishian Haghighi, F., Mollazadeh Beidokhti, S., Sahebian Saghi, S., Tayarani Najaran, Z., "Effect of manufacturing route on microstructure and mechanical properties of calcium phosphate/gelatin-starch composite scaffold", *Journal of Metallurgical engineering*, Vol. 22, Issue. 2, pp. 84-95, (2019), (In Persion).

