

The Effect of Chemical Composition on Sintering Process and Microstructural, Mechanical, and Biological Properties of HA/ Borate Glass Composites*

Research Article

Zeinab Ebrahimi Kahoo¹ Negar Akrami²
Mehrnosh Ghanad³ Simin Nazarnezhad⁴
Saed Kargozar⁵ Sahar Mollazadeh Beidokhti⁶.

1- Introduction

Nowadays, using bioactive ceramics for repairing damaged tissues has received much attention. One group of bioceramics used to repair damaged tissues, especially hard tissues, is calcium phosphates. Hydroxyapatite (HA) is a form of calcium phosphates with a low rate of reactivity and adsorption in the body environment. Bioactive glasses, which have antimicrobial properties and a high ion release, can be used as a sintering aid to solve the sintering problems of HA containing bodies. Adding bioactive glass to the HA scaffold can reduce the final sintering temperature and improve the biological properties of the scaffold.

The scaffold created with HA and borate bioactive glass is a more promising candidate than silicate bioactive glass for regenerating both soft tissues and hard tissues. Borate glass has several advantages over silicate glass, including a faster conversion rate into HA in the body environment, sintering at a lower temperature, and angiogenic properties due to the presence of boron. The present study focuses on the preparing of the porous scaffolds containing different weight percentages of HA/borate glass nanoparticles. Study objectives include reducing sintering temperature, increasing mechanical properties, controlling ion release, and enhancing the bioactivity of scaffolds.

2- Experimental

1. Amorphous borate compound synthesis

All raw materials, including calcium nitrate, magnesium nitrate, potassium nitrate, sodium nitrate, boric acid,

phosphoric acid, and glycine, were dissolved in the least possible amount of water to synthesize amorphous borate compound. The final solution was synthesized at different temperatures.

2. HA synthesis

HA nanopowder was synthesized using the solution combustion method. Briefly, an aqueous solution of calcium nitrate, glycine, and ammonium phosphate was prepared and heated at 330 °C.

3. Preparation of HA/ borate glass composition

Borate glass and HA nanopowders were mixed at different weight ratios. Then, to obtain proper porosity in the scaffold and adhesion between the particles in green bodies 0.04 g of 3.33 wt.% gelatin solution was added to the mixture. Subsequently, the mixture was pressed into disks and sintered at different times and temperatures (Table 1) to find the most favorable condition.

Borate glass powder was characterized using MTT assay, x-ray diffraction analysis (XRD), and particle size analysis (PSA). To study the scaffolds, XRD, inductively coupled plasma optical emission spectroscopy (ICP-OES), field emission scanning electron microscopy (FESEM) and diametral tensile strength test (DTS) were conducted.

3- Results and Discussion

1. Amorphous borate compound

The XRD results of the synthesized glass powders in the presence of glycine as fuel are shown in Figure 1. Contrary to the samples synthesized at 200 °C (G200) and 300 °C (G300), the sample synthesized at 400 °C has an amorphous nature (G400). The diffraction pattern of the sample which has been calcined at 700 °C (G700) indicates that the sample has a crystalline phase.

The mean values of particle size and particle size distribution of the G400 are demonstrated in Figure 2. The G400 powder has a particle size ranging from 20 to 40 nm based on the synthesis method.

Table 1. Sample codes, T: sintering temperature, and t: sintering time.

HA wt.%	T and t				
	600 °C, 1 h	650 °C, 0.5 h	650 °C, 1 h	700 °C, 0.5 h	700 °C, 1 h
20	20H-600-1	20H-650-0.5	20H-650-1	20H-700-0.5	20H-700-1
50	50H-600-1	50H-650-0.5	50H-650-1	50H-700-0.5	50H-700-1
80	80H-600-1	80H-650-0.5	80H-650-1	80H-700-0.5	80H-700-1
100	100H-600-1	100H-650-0.5	100H-650-1	100H-700-0.5	100H-700-1

* Manuscript received; 8 November 2021, Revised, 12 February 2022, Accepted, 10 May 2022.

¹ M.S.c, Department of Materials Engineering, Faculty of Engineering, Ferdowsi University of Mashhad, Mashhad, Iran.

² M.S.c Student, Department of Materials Engineering, Faculty of Engineering, Ferdowsi University of Mashhad, Mashhad, Iran.

³ M.S.c Student, Department of Materials Engineering, Faculty of Engineering, Ferdowsi University of Mashhad, Mashhad, Iran.

⁴ P.hD Student, Tissue Engineering Research Group (TERG), Department of Anatomy and Cell Biology, School of Medicine, Mashhad University of Medical Sciences, Mashhad, Iran.

⁵ Associate Professor, Tissue Engineering Research Group (TERG), Department of Anatomy and Cell Biology, School of Medicine, Mashhad University of Medical Sciences, Mashhad, Iran.

⁶ Corresponding Author, Associate Professor, Department of Metallurgy, Faculty of Engineering, Ferdowsi University of Mashhad.

Email: mollazadeh.b@um.ac.ir

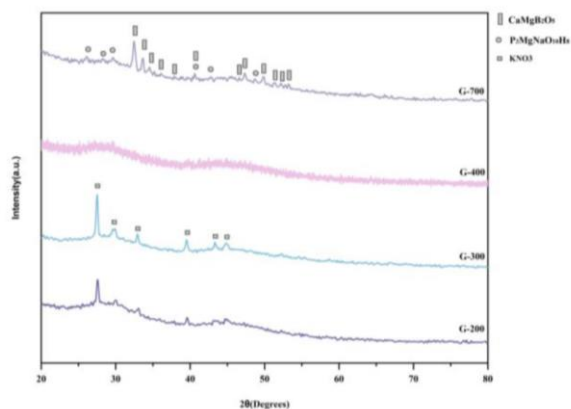


Figure 1. XRD patterns of synthesized borate compounds.

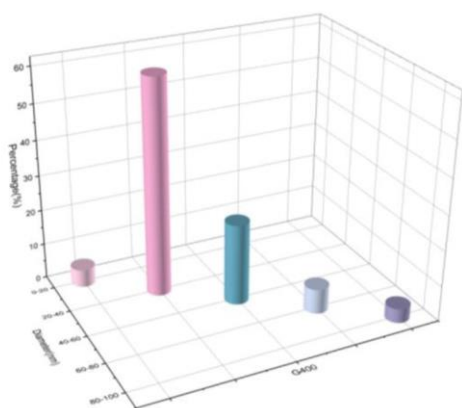


Figure 2. Particle size distribution of the G400 sample.

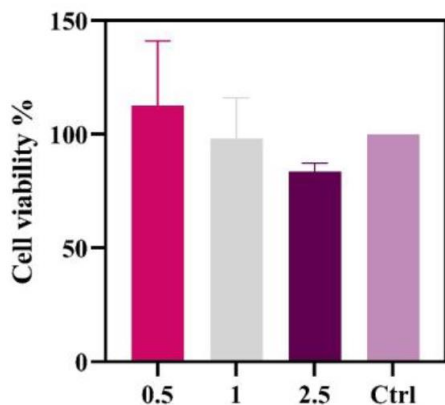


Figure 3. MTT results of the G400 sample.

The results of the MTT test for the G400 sample at different concentrations on the fibroblast cells (3T3) are shown in Figure 3. The results indicate that this sample is not toxic and contributes to more cell proliferation than the control group.

2. Composite scaffolds

According to Figure 4, DTS results show that with increasing the borate glass content, sintering time and

temperature, the tensile strength will increase. Consequently, the sample with 20 wt.% HA, which was sintered at 700 °C for 1 hour (20H-700-1), accounts for the highest tensile strength (4.87 ± 0.02 MPa).

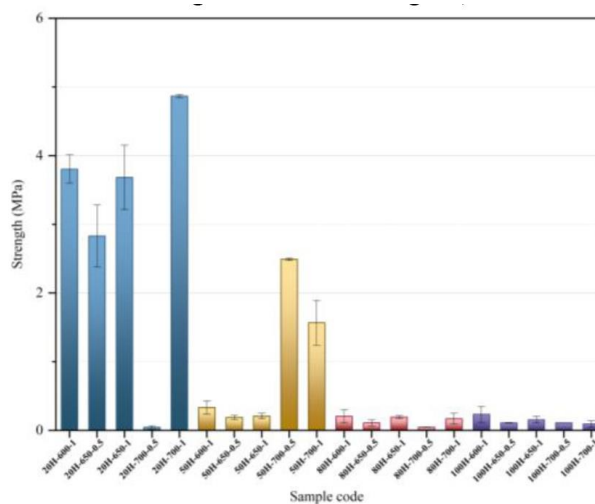


Figure 4. DTS results of the scaffolds.

The XRD patterns of the samples containing 20 wt.% HA are depicted in Figure 5. The graph illustrates the transition of the crystalline structure to an amorphous structure by increasing the sintering temperature. This might be due to the formation of borate glass viscous flow, which covers the HA crystals. The reason is that the borate glass is stable up to approximately 650 °C.

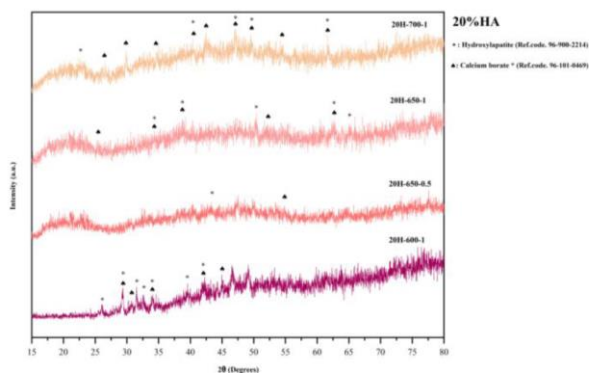


Figure 5. XRD patterns of the scaffolds with 20 wt.% HA.

FESEM images shown in Figure 6, explain that the HA crystals are covered by an amorphous phase. Additionally, crack path observation suggests brittle fracture within the samples.

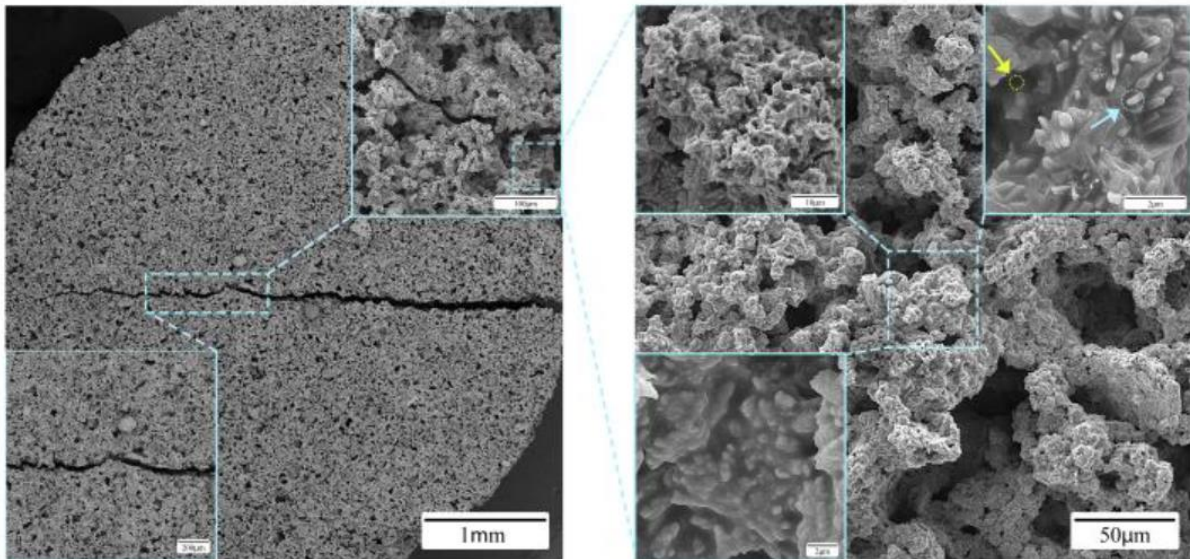


Figure 6. FESEM images of the 20H-650-1 sample.

Table 2. ICP results of the 20H-700-1 sample.

Ions	Ca ²⁺	Na ⁺	Mg ²⁺	K ⁺	BO ₃ ³⁻	PO ₄ ³⁻
Concentration (PPM)	118.73	2465.89	53.16	624.79	61.94	19.59

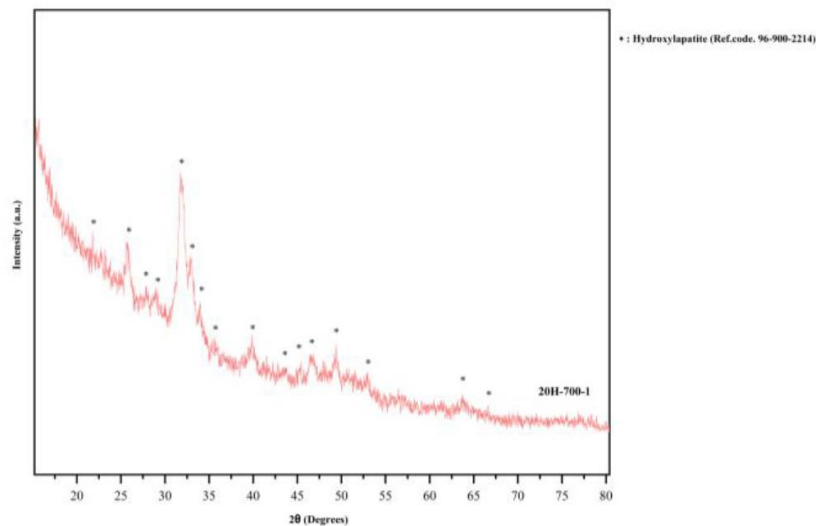


Figure 7. XRD pattern of immersed sample in SBF after 7 days.

Moreover, Scaffolds were immersed in simulated body fluid (SBF) for 7 days. The results indicate that the release of Ca²⁺ ions and their reaction with PO₄³⁻ ions from the SBF solution leads to HA nucleation and growth, which is in accordance with XRD results (Figure 7). By comparing different ion concentrations in this study (Table 1) with other works, it can be concluded that the

scaffold has a higher ion release than the HA scaffold and a lower ion release than borate glass fibers.

4- Conclusion

XRD pattern and particle size analysis show that the G400 sample has an amorphous nanostructure, in addition, biological assays explain the positive effects of this sample on fibroblast cells (3T3). To fabricate a scaffold,

which can bond to both hard and soft tissue, G400 and HA powders were mixed and sintered. XRD patterns depict that with increasing the sintering time and temperature, the crystalline structure transforms into an amorphous structure. The highest tensile strength belongs to the 20H-

700-1 sample. FESEM images reveal the effect of borate glass as a sintering aid, which covers HA particles and binds them together. The ICP results show the controlled ion release of the scaffolds. Furthermore, HA was the only phase formed on the scaffold after immersion.

تأثیر ترکیب شیمیایی بر رفتار زیترینگ و خواص ریزساختاری، مکانیکی و بیولوژیکی کامپوزیت‌های هیدروکسی آپاتیت/شیشه بوراتی*

مقاله پژوهشی

زینب ابراهیمی کاھو^(۱) نگار اکرمی^(۲) مهنوش قنادر^(۳) سیمین نظرنژاد^(۴) سعید کارگذار^(۵) سحر ملازاده بیدختی^(۶)

چکیده در پژوهش حاضر، از روش احتراقی در محلول جهت سنتز ترکیب آمورف بوراتی زیست‌فعال استفاده شد. آنالیز *FTIR*، *XRD* و *PSA* با هدف مشخصه‌یابی فازی، تشخیص پیوند و تعیین اندازه ذرات انجام شد. از آزمایش‌های *MTT* و *Migration* به منظور تعیین زیست‌سازگاری پودرها استفاده شد. پودر سنتز شده دارای ابعاد نانو، ساختار آمورف و تأثیر مثبت بر تکثیر و مهاجرت سلول‌ها است. ترکیب آمورف بوراتی با نانوذرات هیدروکسی آپاتیت به منظور ایجاد داربست‌های کامپوزیتی، در درصد‌های وزنی متفاوت ترکیب شده و در دماهای ۶۰، ۶۵، ۷۰ و ۷۵°C به مدت زمان‌های ۰/۵ و ۱ ساعت زیتر شدند. مطالعه الگوی تفرق اشعه ایکس به منظور تشخیص فازها و تست استحکام کششی قطری به منظور سنجش استحکام مکانیکی انجام شد. تصویربرداری *FESEM* از نمونه‌های شکسته شده در تست استحکام کششی قطری به منظور مشاهده مسیر ترک، میزان تخلخل و نحوه تأثیر شیشه بوراتی بر زیتر انجام شد. نمونه با ۲۰ wt.% هیدروکسی آپاتیت و ۸۰ wt.% شیشه بوراتی، زیتر شده در ۷۰۰°C به مدت ۱ ساعت، دارای بالاترین استحکام به مقدار $4/AV \pm 0/02$ است. آنالیز *ICP-OES* نمونه با ۲۰ wt.% هیدروکسی آپاتیت زیتر شده در ۷۰۰°C به مدت ۱ ساعت بعد از ۷ روز غوطه‌وری در مایع شبیه سازی شده بدن، نشان دهنده افزایش رهایش یون در مقایسه با هیدروکسی آپاتیت خالص زیتر شده است. همچنین کنترل و کاهش رهایش یونی قابل ملاحظه شیشه بوراتی از طریق کامپوزیت و زیتر شدن در مشاهده شد. کامپوزیت ساخته شده دارای قابلیت پیوند با بافت نرم و سخت است.

واژه‌های کلیدی هیدروکسی آپاتیت، شیشه زیست‌فعال، شیشه بوراتی، زیتر، داربست، کامپوزیت، نانوذره، استحکام کششی، رهایش یون.

مقدمه

زنوگرافت هستند [1-3]. به منظور حل مشکلات گفته شده از روش‌های جدید مانند سنتز مواد سازگار با بدن از جمله سرامیک‌های زیست‌فعال بر پایه کلسیم فسفات، به خصوص هیدروکسی آپاتیت و قرار دادن آن‌ها در داخل بدن استفاده می‌شود. هیدروکسی آپاتیت ماده‌ای مناسب با ترکیب شیمیایی مشابه ۶۵ درصد بافت استخوان است [2]، [4]. این ترکیب خاصیت استخوان‌زایی دارد و داربست متشکل از آن سطح مناسبی را برای رشد استخوان فراهم می‌کند. علی‌رغم خواص مناسب هیدروکسی آپاتیت، سرعت واکنش و جذب آن در دما (۳۷°C) و PH بدن کم است و با سرعت ترمیم بافت برابر نیست، بنابراین نرخ و سرعت پیوند کمی با استخوان دارد [3]، [5]، [6]. به علاوه استفاده آن در حالت بالک و داربست در مکان‌هایی که

درمان عیب‌های استخوانی ناشی از برداشتن تومور و سوانح یکی از مشکلات مرسوم کلینیکی است و راه‌های متفاوتی برای این منظور و پیوند بافت پیشنهاد شده است. از جمله روش‌های پیشنهاد شده می‌توان به مواردی که ذکر می‌شوند اشاره نمود: ۱. آتوگرافت که در آن بافت مدنظر برای پیوند از بدن خود بیمار برداشته می‌شود، ۲. آلوگرافت که منبع بافت پیوند زده شده از بدن هم‌نوع بیمار است، ۳. زنوگرافت که بافت از بدن جاندار غیرهم‌نوع بیمار برداشته می‌شود. روش‌های ذکر شده دارای معایبی مانند: ایجاد زخم و جراحی، سالم نبودن محل دهنده‌ی بافت و کمبود بافت احیا کننده برای آتوگرافت؛ احتمال انتقال عفونت و پس زده شدن توسط سیستم ایمنی برای آلوگرافت و

* تاریخ دریافت مقاله ۱۴۰۰/۸/۱۷ و تاریخ پذیرش آن ۱۴۰۱/۲/۲۰ می‌باشد.

(۱) فارغ التحصیل مقطع کارشناسی، رشته مهندسی مواد و متالورژی، دانشگاه فردوسی مشهد.

(۲) دانشجوی مقطع کارشناسی ارشد، گرایش شناسایی و انتخاب مواد مهندسی، دانشگاه فردوسی مشهد.

(۳) دانشجوی مقطع کارشناسی ارشد، گرایش شناسایی و انتخاب مواد مهندسی، دانشگاه فردوسی مشهد.

(۴) دانشجوی مقطع دکتری تخصصی مهندسی بافت، گروه علوم تشریح و بیولوژی سلولی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی مشهد.

(۵) استادیار مهندسی بافت، گروه علوم تشریح و بیولوژی سلولی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی مشهد.

(۶) نویسنده مسئول، استادیار گروه مهندسی مواد و متالورژی، دانشکده مهندسی، دانشگاه فردوسی مشهد.

Email: mollazadeh.b@um.ac.ir

بیشتر شده است زیرا سرعت تبدیل کامل شیشه 45S5 به هیدروکسی آپاتیت در SBF (مایع شبیه‌سازی شده به مایع بدن) کمتر از شیشه بوراتی است و بعد از مدتی لایه غنی از سیلیکا روی سطح آن تشکیل می‌شود که از تخریب کامل و تبدیل کامل آن به هیدروکسی آپاتیت جلوگیری می‌کند. مکانیزم تبدیل شیشه بوراتی به هیدروکسی آپاتیت در بدن و یا SBF شامل واکنش بین Ca^{2+} آزاد شده از شیشه و PO_4^{3-} از محیط، در نتیجه تشکیل لایه کلسیم فسفات آمورف و سپس تبدیل به هیدروکسی آپاتیت بلوری است [16]. علاوه بر دلایل گفته شده، زیتر شیشه 45S4 نیز مشکل‌تر است [17].

شیشه بوراتی 13-93B3 با ترکیب $6 Na_2O, 8 K_2O, 8 MgO, 22 CaO, 54 B_2O_3, 2 P_2O_5$ (درصد مولی) در مقایسه با شیشه 45S5 زیست‌سازگاری، تخریب‌پذیری و زیست‌فعالی بیشتری دارد و مانند 45S5 قابلیت ترمیم زخم را دارد. واکنش شیشه 13-93B3 با SBF، ۵ برابر سریع‌تر از واکنش شیشه 45S5 است [18]. شیشه بوراتی به دلیل عدد هم‌آرایی سه‌ی عنصر B در مقایسه با عنصر Si (که عدد هم‌آرایی ۴ دارد) نمی‌تواند به طور کامل یک شبکه سه بعدی تشکیل دهد، بنابراین شیشه بوراتی از دوام شیمیایی کمتری برخوردار است و از این رو سرعت انحلال بیشتری دارد [19].

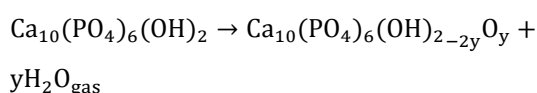
در اثر انحلال شیشه سیلیکاتی در محیط بدن، سیلیسیوم آزاد می‌شود که باعث تشکیل استخوان می‌شود، در حالی که $B(OH)_3$ (یون بورات) و کلسیم آزاد شده از شیشه بوراتی باعث رگ‌زایی می‌شود [16], [18], [20].

در نتیجه از مهم‌ترین خواص شیشه بوراتی می‌توان به ارتباط بسیار مناسب با بافت نرم به علت واکنش‌پذیری بالا و خاصیت رگ‌زایی (ایجاد رگ‌های خونی) اشاره کرد. با توجه به تخریب کامل شیشه بوراتی در SBF مخصوصاً در محیط استاتیک و ثابت در زمان اندک، نه تنها رهایش سریع و زیاد یون‌ها باعث تغییر PH در آن ناحیه و ممانعت از تکثیر سلولی می‌شود، بلکه رهایش سریع آنیون بورات ممکن است باعث مسمومیت شود [17], [21].

در این پروژه، نانوذرات هیدروکسی آپاتیت و شیشه 13-93B3 (نانوذرات به علت مرزخانه زیاد باعث چسبندگی و تکثیر سلولی زیادی می‌شوند و بدنه زیتر شده از آن‌ها به علت ریزدانه بودن، خواص مکانیکی بهتری دارد [22]) با درصدهای متفاوت وزنی با هم ترکیب و کامپوزیت می‌شوند و داربست متخلخل

تحمل بار مطرح است توصیه نمی‌شود زیرا نیاز به دمای بالا برای زیتر شدن دارد و عملکرد مکانیکی آن مناسب نیست (مانند چقرمگی شکست پایین) [7-9].

دمای مناسب برای زیتر هیدروکسی آپاتیت معمولاً بین $1150^{\circ}C$ تا $1350^{\circ}C$ است [10]. پدیده‌ی دی‌هیدروکسیل شدن هیدروکسی آپاتیت از دمای $800^{\circ}C$ آغاز می‌شود و تا $1350^{\circ}C$ ادامه می‌یابد که با آزاد کردن H_2O گازی و تشکیل اکسی‌هیدروکسی آپاتیت به شرح واکنش زیر همراه است:



زمانی که در واکنش بالا $y=1$ باشد، اکسی‌آپاتیت تشکیل می‌شود $(Ca_{10}(PO_4)_6O)$. اگر دما بالاتر از $1360^{\circ}C$ باشد، تجزیه دمایی شروع شده و تری‌کلسیم فسفات (TCP) و تراکلسیم فسفات (TTCP) تشکیل می‌شوند [11,12]. دی‌هیدروکسیل شدن هیدروکسی آپاتیت با آزاد شدن بخار آب همراه است. بخار آب در پروسه زیتر در داخل تخلخل‌های بسته به دام می‌افتد و ایجاد فشار می‌کند، این امر باعث افزایش حجم می‌شود و متراکم شدن در حین زیتر را سخت می‌کند. در ادامه با افزایش دما، تجزیه باعث تغییر خواص مکانیکی، شیمیایی و بیولوژیکی هیدروکسی آپاتیت می‌شود و زیست‌فعالی آن را کم می‌کند [13]. برای رفع مشکلات ذکر شده اعم از جذب کم در محیط بدن و خواص مکانیکی ضعیف، می‌توان از شیشه‌های زیست‌فعال در کنار هیدروکسی آپاتیت برای مهندسی بافت استفاده کرد، نتیجتاً زیست‌فعالی ترکیب نهایی و پیوند آن با استخوان قابل کنترل و بهینه کردن خواهد بود. بعلاوه محصولات حل شده از شیشه‌های زیستی در مایع بدن خاصیت ضد میکروبی دارند و این امر فرآیند ترمیم را سرعت می‌بخشد [2]. شیشه‌های توضیح داده شده دارای خاصیت پیوند با استخوان (Osteogenesis)، استخوان‌زایی، زیست‌فعالی و زیست‌تخریب‌پذیری بالایی هستند. برای ارتباط مناسب داربست با بافت نرم می‌توان از شیشه‌های زیست‌فعال استفاده کرد زیرا باعث تحریک رشد و تکثیر سلول بافت نرم می‌شوند [14]. اولین شیشه زیست‌فعال 45S5 توسط Hench در سال ۱۹۶۹ اختراع شد که دارای ترکیب $46/1 SiO_2, 24/4 Na_2O, 26/9 CaO, 2/6 P_2O_5$ (درصد مولی) [15], [2]. به تازگی تمرکز روی شیشه بوراتی به دلیل برتری‌های آن نسبت به 45S5

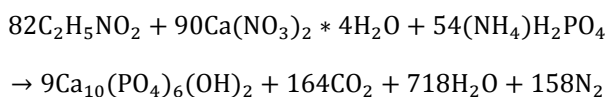
مواد و روش تحقیق

سنتز ترکیب آمورف بوراتی

به منظور سنتز احتراقی در محلول، تمامی مواد اولیه شامل نیترات کلسیم، نیترات منیزیم، نیترات پتاسیم، نیترات سدیم، اسید بوریک، اسید فسفریک و گلیسین از شرکت سیگما آلدریج تهیه شد. به منظور سنتز ترکیب بوراتی آمورف ($6 \text{ Na}_2\text{O}, 8 \text{ K}_2\text{O}, 8 \text{ (MgO, 22 CaO, 54 B}_2\text{O}_3, 2 \text{ P}_2\text{O}_5)$)، ابتدا تمامی نیترات‌ها (نیترات منیزیم، نیترات کلسیم، نیترات سدیم و نیترات پتاسیم) را در کمترین مقدار آب دی‌یونیزه در داخل بشر ریخته و روی استیرر در دمای محیط قرار داده تا به طور کامل در آب حل شوند. در بشر دیگری اسید بوریک، سوخت (گلیسین) و اسید فسفریک را نیز در داخل آب دی‌یونیزه ریخته و روی استیرر قرار داده تا محلولی همگن حاصل شود. در نهایت محتوای هر دو بشر را باهم ترکیب کرده و بر روی هات پلیت با دماهای متفاوت قرار دادند، سپس به مقدار لازم زمان داده تا سنتز به طور کامل صورت گیرد.

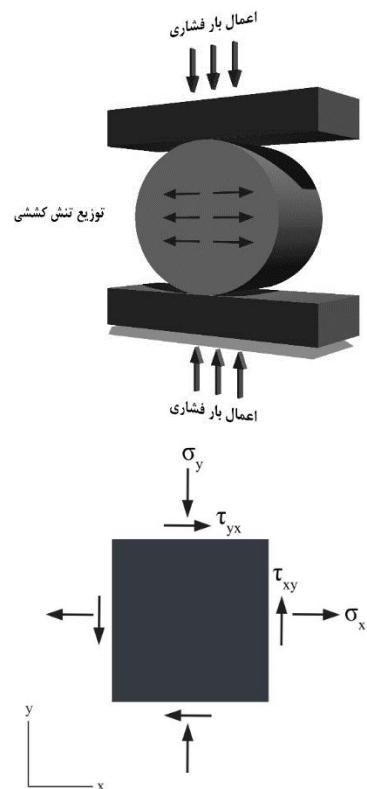
سنتز هیدروکسی آپاتیت

سنتز هیدروکسی آپاتیت ($\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$) توسط روش سنتز احتراقی در محلول انجام شد [27]. برای انجام واکنش، مواد اولیه به مقدار لازم طبق واکنش استوکیومتری زیر برداشته شد.



ابتدا مقدار لازم کلسیم نیترات ۴ آبه ($\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$) و گلیسین ($\text{C}_2\text{H}_5\text{NO}_2$) به آب دی‌یونیزه اضافه سپس روی استیرر مغناطیسی گذاشته می‌شود و زمان داده می‌شود تا مواد در آب حل شوند. در مرحله بعد نیتریک اسید (HNO_3) به محلول اضافه می‌شود تا PH محلول به میزان ۰-۱ برسد. در قدم آخر، مونوآمونیم فسفات ($(\text{NH}_4)_2\text{H}_2\text{PO}_4$) به محلول افزوده می‌شود و زمان می‌دهیم تا محلول همگن شود. محلول به بوته منتقل شده و هیدروکسی آپاتیت جامد روی هات‌پلیت با دمای 330°C در طی فرآیند سنتز احتراقی در محلول در زیر هود و اتمسفر اتاق، تشکیل می‌شود.

(تخلخل تا حدی مناسب است زیرا مانند بافت استخوان است و بافت می‌تواند از میان آن رشد کند [23]. این مقدار برای بافت سخت بیشتر از ۵۰ درصد پیشنهاد شده [23].) ساخته می‌شود، تا ارتباط مناسب نه تنها با بافت سخت، بلکه با بافت نرم نیز برقرار شود. به علاوه با ترکیب کردن این دو ماده می‌توان رهاپیش یون و تخریب سریع شیشه بوراتی را کنترل کرد. و در نهایت می‌توان از این شیشه به عنوان کمک زینتر برای زینتر هیدروکسی آپاتیت استفاده کرد و از افت خواص مکانیکی بدنه زینتر شده توسط دی‌هیدروکسیله و تجزیه شدن جلوگیری کرد. در این تحقیق، ترکیب پودرها به صورت قرص درآمده و پرس شده‌اند و در آخر نیز زینتر شدند. تست استحکام کششی قطری و یا DTS (Diametral tensile strength) جهت ارزیابی خواص مکانیکی روی قرص‌ها، انجام شد. این تست برای ارزیابی استحکام کششی مواد ترد و دارای مقاومت کششی پایین به کار می‌رود. در این تست بار فشاری به دو سر قرص اعمال می‌شود و باعث ایجاد تنش کششی مطابق شکل (۱)، در صفحه قطری می‌شود [24-26].



شکل ۱ تست استحکام کششی قطری: شماتیک تست در سمت راست، و المان و توزیع تنش در شکل سمت چپ، نمایش داده شده‌اند

تهیه کامپوزیت هیدروکسی آپاتیت / شیشه بوراتی

هر دو ترکیب (هیدروکسی آپاتیت و شیشه بوراتی) به صورت جداگانه در هاون آگات نرم ساب شدند تا پودرهای نانوذره به دست آید. سپس پودرها با درصد وزنی‌های متفاوت، مطابق جدول (۱) ترکیب شدند (وزن کل ۰/۰۸ گرم بوده است).

به منظور عملکرد به عنوان چسب و ایجاد تخلخل در نمونه‌های کامپوزیتی، از محلول wt.% ۳/۳۳ ژلاتین استفاده شد. جهت آماده سازی این محلول، ۱ گرم ژلاتین در ۳۰ گرم یا ۳۰ میلی‌لیتر آب مقطر حل شد و پس از آن در ۵۰ °C حرارت داده شد تا محلولی همگن حاصل شود. به ترکیب پودرها ۰/۰۲ گرم از محلول ژلاتین افزوده شد. سپس ترکیب‌ها در قالبی استوانه‌ای به قطر ۱ cm و فشار ۱/۶۵ MPa پرس می‌شوند تا به صورت

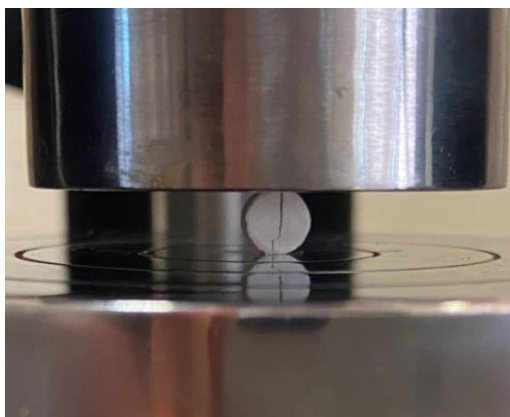
قرص دربیابند. ۰/۰۱ گرم از محلول wt.% ۳/۳۳ ژلاتین به سطوح پشتی و جلوی قرص‌های کامپوزیتی اضافه شد. سپس جهت ایجاد استحکام، قرص‌ها در دمای ۷۰۰ °C به مدت ۱۵ دقیقه در آذر کوره تحت عملیات حرارتی قرار گرفتند. پس از آن، نمونه‌ها از کوره خارج و در اتمسفر محیط سرد شدند. در گام بعد، به منظور بررسی زینتر پذیری کامپوزیت‌ها در شرایط متفاوت، ترکیب‌ها با درصد وزنی متفاوت هیدروکسی آپاتیت با توجه به توضیحات و الگوی تفرق اشعه ایکس کامپوزیت‌های عملیات حرارتی شده در ۷۰۰ °C به مدت ۱۵ دقیقه، انتخاب شدند و صورت قرص خام تهیه و سپس به توضیح جدول (۲) زینتر شدند

جدول ۱ ترکیب کامپوزیت‌های شیشه/ هیدروکسی آپاتیت

نام نمونه	درصد وزنی هیدروکسی آپاتیت	درصد وزنی شیشه بوراتی
H۱۰	۱۰	۹۰
H۲۰	۲۰	۸۰
H۳۰	۳۰	۷۰
H۴۰	۴۰	۶۰
H۵۰	۵۰	۵۰
H۶۰	۶۰	۴۰
H۷۰	۷۰	۳۰
H۸۰	۸۰	۲۰
H۹۰	۹۰	۱۰
H۱۰۰	۱۰۰	۰

جدول ۲ شرایط زینتر و نحوه کدگذاری ترکیب‌های انتخاب شده

دما و زمان زینتر نمونه	۷۰۰ °C و ۱ ساعت	۷۰۰ °C و ۰/۵ ساعت	۶۵۰ °C و ۱ ساعت	۶۵۰ °C و ۰/۵ ساعت	۶۰۰ °C و ۱ ساعت
۲۰H	۲۰H-۷۰۰-۱	۲۰H-۷۰۰-۰/۵	۲۰H-۶۵۰-۱	۲۰H-۶۵۰-۰/۵	۲۰H-۶۰۰-۱
۵۰H	۵۰H-۷۰۰-۱	۵۰H-۷۰۰-۰/۵	۵۰H-۶۵۰-۱	۵۰H-۶۵۰-۰/۵	۵۰H-۶۰۰-۱
۸۰H	۸۰H-۷۰۰-۱	۸۰H-۷۰۰-۰/۵	۸۰H-۶۵۰-۱	۸۰H-۶۵۰-۰/۵	۸۰H-۶۰۰-۱
۱۰۰H	۱۰۰H-۷۰۰-۱	۱۰۰H-۷۰۰-۰/۵	۱۰۰H-۶۵۰-۱	۱۰۰H-۶۵۰-۰/۵	۱۰۰H-۶۰۰-۱



شکل ۲ شکست نمونه در طی تست استحکام کششی قطری

مشخصه یابی، آنالیز فازی، ارزیابی ریزساختار، تست

مکانیکی، بقا و مهاجرت سلولی

به منظور آنالیز فازی نمونه‌های کامپوزیتی، مطالعه‌ی الگوی پراش اشعه ایکس (XRD) (دستگاه: X' Pert PW 3040/60) انجام شد. زاویه تفرق $2\theta = 15-70^\circ$ بود. میزان افزایش زاویه در تست XRD در هر قدم 0.02° درجه بوده است. تست مکانیکی استحکام کششی قطری با سرعت بارگذاری 0.2 میلی‌متر بر دقیقه انجام شد تا نمونه‌های هیدروکسی آپاتیت و کامپوزیت هیدروکسی آپاتیت/شیشه دچار شکست شوند (شکل ۲) سپس مشاهده‌ی ریزساختار و مسیر رشد ترک، توسط میکروسکوپ الکترونی روبشی نشر میدانی (FESEM) با ولتاژ شتاب دهنده 15 کیلوولت (مدل دستگاه: TESCAN, MIRA3) انجام شد. به این منظور سطح نمونه‌ها با لایه نازک طلا برای ایجاد رسانایی، پوشش داده شدند. به هدف اندازه‌گیری زیست‌فعالی کامپوزیت‌ها توسط ایجاد فازهای حاوی کلسیم و میزان تمایل ایجاد پیوند آن‌ها با استخوان و بافت نرم، نمونه‌ها در مایع شبیه‌ساز بدن (SBF) به مدت هفت روز به روش کوکوبو غوطه‌ور شدند تا فازهای حاوی کلسیم مشخص شوند [28]. غوطه‌وری در دستگاه شیکر انکوباتور (shaker incubator) با دمای 37°C انجام شد. طیف سنجی پلاسمای جفت شده‌ی القایی (ICP-OES, Spectro) (Arcos, Germany) به منظور مشخص کردن غلظت یون‌های Ca^{2+} , K^+ , Mg^{2+} , PO_4^{3-} , BO_3^{3-} و Na^+ در مایع شبیه‌ساز بدن بعد از برداشتن نمونه‌ها، انجام شد. نمونه‌های جدا شده توسط آنالیز XRD (Explorer GNR, Italy) به منظور مشخص کردن فازهای تشکیل شده پس از غوطه‌وری، در زوایای $2\theta = 15-80^\circ$ مورد مطالعه قرار گرفتند. به منظور مشخصه‌یابی ترکیب آمورف بوراتی، طیف سنجی مادون قرمز تبدیل فوریه (FTIR) در محدوده $2400-600$ عدد موج (cm^{-1}) به منظور تشخیص گروه‌های عاملی ایجاد شده در پروسه سنتز انجام شد (Thermo Nicolet, AVATAR 370 FT-IR). آنالیز سایز ذرات به هدف اندازه‌گیری سایز ذرات شیشه بوراتی انجام شد (CORDOUAN, Vasco3)، به منظور انجام تست 0.1 گرم پودر در آب مقطر توسط دستگاه آلتراسونیک حل شد.

تأثیر ترکیب آمورف بوراتی بر بقا، رشد و تکثیر سلول‌های 3T3 (سلول‌های فیروبلاست موش، تهیه شده از انستیتو پاستور ایران) توسط آزمایش رنگ سنجی ام تی تی ((۳-۴) و ۵-دی‌متیل-۲-تيازولیل)-۲ و ۵-دی‌فنیل تترازولیوم برمید)) انجام شد (Sigma-Aldrich, USA). تعداد 5000 سلول در هر خانه در پلیت ۹۶ خانه‌ای (SPL Lifesciences, Korea) در محیط کشت DMEM با گلوکز بالا که با 1.0% سرم جنین گاوی (FBS) و 1% پنی‌سیلین/استرپتومایسین (Gibco, USA) تقویت شده است، کشت شدند. بعد از 24 ساعت، محیط کشت، توسط محیط کشت آماده شده از افزودن پودر ترکیب آمورف بوراتی (استریل شده با فرابنفش) به میزان 0.5 ، 1 و 2.5 میلی‌گرم به 1 میلی‌لیتر از DMEM با گلوکز بالا، تقویت شده با 1.0% سرم جنین گاوی (FBS) و 1% پنی‌سیلین/استرپتومایسین، جایگزین شد. سپس انکوباسیون به همراه تکان دادن به مدت 3 ساعت با سرعت 100 دور بر دقیقه انجام شد. بعد از 24 ساعت ام‌تی‌تی (5 میلی‌گرم بر لیتر) افزوده شد و در 37°C و 5% کربن دی‌اکسید انکوباسیون به مدت 4 ساعت انجام شد. سپس تمام محیط کشت جدا شد و با دی‌متیل سولفوکساید (Sigma-Aldrich, USA) جایگزین شد و پلیت به مدت 10 دقیقه با سرعت 20 دور بر دقیقه در تاریکی تکان داده شد. در نهایت چگالی نوری خانه‌های پلیت با دستگاه میکروپلیت ریدر (Synergy HT, BioTek, USA) در 570 با طول موج مرجع 630 نانومتر مشخص شد. همچنین تأثیر محتوای حاوی ترکیبات آمورف بوراتی بر پویایی سلول‌های 3T3 ارزیابی شد. به طور خلاصه، در پلیت 24 خانه‌ای تعداد 10^4 سلول در

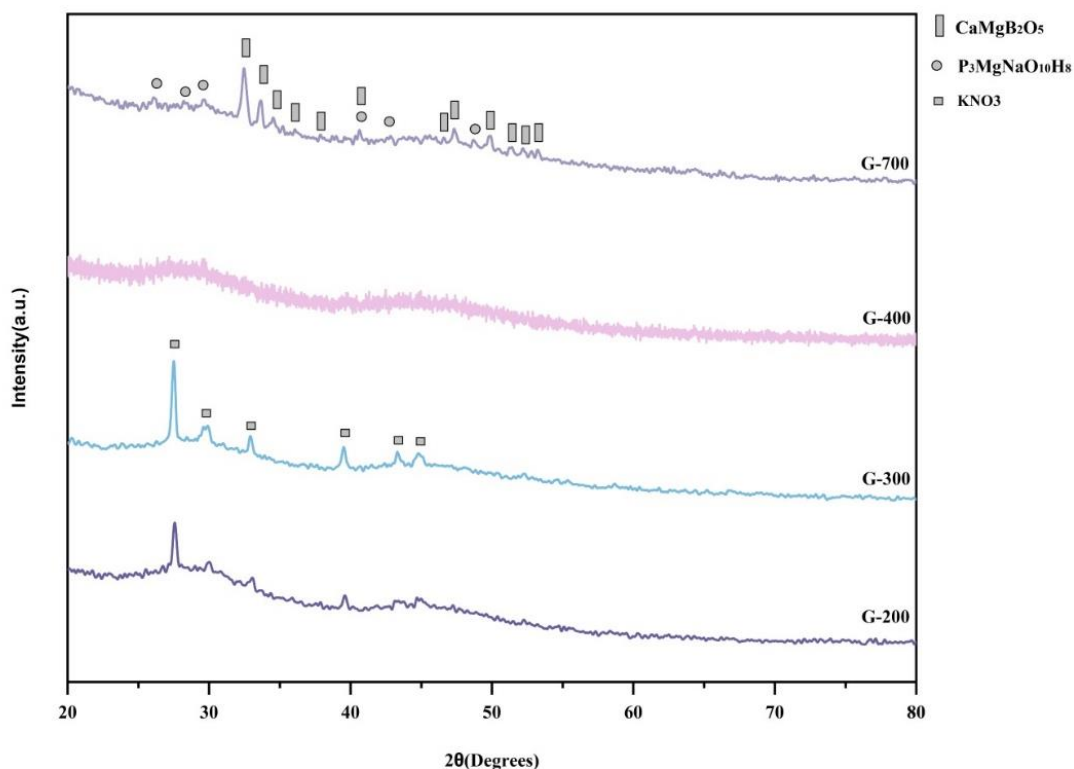
شده است. در نمونه‌های سنتز شده در دماهای 200°C و 300°C شاهد پیک‌هایی با شدت نسبتاً زیاد مربوط به ماده اولیه پتاسیم نیترات (کد مرجع: ۴۶۲۳-۲۱۰-۹۶) بوده‌ایم که احتمال می‌رود با توجه به دمای تجزیه بالاتر این نیترات نسبت به بقیه نیترات‌ها که حدود 400°C می‌باشد [29] و از طرفی دیگر حلالیت کمتر این نیترات نسبت به بقیه نیترات‌ها در آب که در نتیجه باعث برهم خوردن هموژنیتته نیز می‌شود، بتوان این نتایج را توجیه نمود. با افزایش بیشتر دما و در دمای 400°C به دلیل غلبه‌ی دما بر عدم وجود هموژنیتته و همچنین رسیدن به دمای تجزیه تمامی نیترات‌ها، شاهد الگو XRD کاملاً آمورف در این نمونه بوده‌ایم. همانطور که گراف G700 در شکل ۳ نشان می‌دهد نگهداری نمونه‌ها به مدت ۱ ساعت در دمای 700°C منجر به تبلور فاز CaMgB_2O_5 [30] (کد مرجع: ۰۷۲۳-۹۰۱-۹۶) به همراه پیک‌هایی با شدت کم از فاز $\text{P}_3\text{MgNaO}_{10}\text{H}_8$ (کد مرجع: ۹۶-۲۲۰-۱۷۵۹)، شده است.

هر خانه، در محیط DMEM-F12 حاوی ۵٪ FBS و ۱٪ pen/strep کشت داده شد. سلول‌ها به مدت ۲۴ ساعت در دمای 37°C انکوبه شدند تا لایه‌ای از سلول‌ها به دست آید. سپس لایه سلولی با نوک پیپت به صورت مستقیم خراشیده شد و تصاویر زمان صفر در زیر میکروسکوپ کانفوکال گرفته شد. پس از آن، محیط حاوی ترکیبات آمورف بوراتی حاوی ۱٪ FBS و ۱٪ pen/strep به هر خانه اضافه شد و در دمای 37°C به مدت ۲۴ ساعت انکوبه شد. مقدار مهاجرت سلولی با مقایسه تصاویر گرفته شده در زمان ۰ و ۲۴ ساعت با استفاده از نرم افزار Image J (NIH، ایالات متحده آمریکا) اندازه گیری شد.

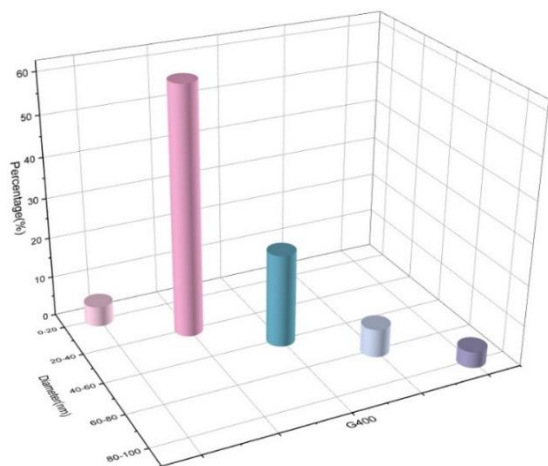
نتایج و بحث

ترکیبات آمورف بوراتی

مطالعه الگوی پراش اشعه ایکس (XRD). در شکل ۳ الگوی XRD نمونه‌های سنتز شده در دماهای 200°C ، 300°C و 400°C پس از فرآیند کلسیناسیون در دمای 700°C نمایش داده



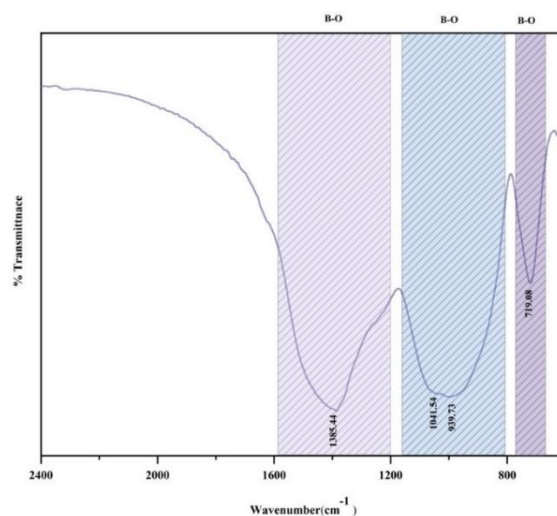
شکل ۳ الگو تفرق اشعه ایکس نمونه‌های سنتز شده.



شکل ۵ نمودار بررسی اندازه ذرات نمونه سنتز شده در دمای ۴۰۰ °C

مطالعه طیف سنجی مادون قرمز تبدیل فوریه (FTIR).

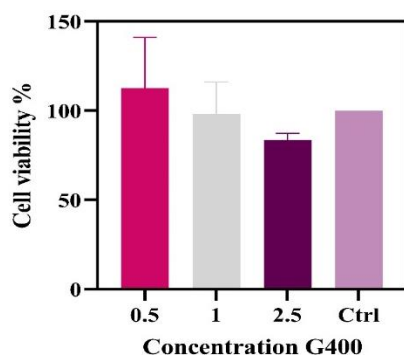
مطالعات پیشین در رابطه با ترکیبات بوراتی چند جزئی حاوی اکسیدهای قلیایی و قلیایی خاکی، نشان دهنده تمایل اتم بور به پیوند با سه یا چهار اتم اکسیژن و در نتیجه تشکیل واحدهای ساختاری BO_3 و BO_4 می‌باشد. شکل (۴) گراف مربوط به طیف سنجی FTIR ترکیب بوراتی آمورف سنتز شده در دمای ۴۰۰ °C را نشان می‌دهد. همانطور که در شکل (۴) نشان داده شده است این گراف شامل سه منطقه مجزا می‌باشد. منطقه بین $600-700\text{ cm}^{-1}$ که به ارتعاشات خمشی گروه‌های مختلف بورات (BO_3 و BO_4) اختصاص داده می‌شود. باندهای بین $800-1200\text{ cm}^{-1}$ مربوط به ارتعاش کششی B-O واحدهای BO_4 است. و در نهایت منطقه بین $1200-1600\text{ cm}^{-1}$ به دلیل ارتعاش کششی نامتقارن B-O از واحدهای BO_3 است [31]. در نتیجه به وضوح شاهد باندهای B-O در گراف های FTIR خواهیم بود.



شکل ۴ گراف طیف سنجی مادون قرمز تبدیل فوریه‌ی نمونه سنتز شده در دمای ۴۰۰ °C

مطالعه بررسی سمیت (MTT).

در شکل (۶) نتایج تست MTT برای نمونه سنتز شده در دمای ۴۰۰ °C نمایش داده شده است. نتایج نشان می‌دهد که پودرهای تهیه شده در غلظت‌های مختلف 0.5 ، 1 و 2.5 میلی گرم/میلی لیتر پس از ۱ روز، هیچ اثر مخربی بر روی رشد و تکثیر رده سلول‌های 3T3 (سلول‌های فیبروبلاست موش) ندارند و در غلظت‌های 0.5 و 1 میلی گرم/میلی لیتر شاهد تکثیر بیشتر سلول‌ها نسبت به گروه کنترل به دلیل وجود یون‌های درمانی مانند کلسیم، بور و ... بوده‌ایم [32]. علاوه بر این با توجه به این که روش سنتز ذکر شده باعث به وجود آمدن ذراتی با ابعاد نانو شده است و نانوذرات دارای سطح ویژه بالاتر، بار سطحی بالاتر و رهایش سریع‌تر نیز هستند، می‌توانند عملکرد بیولوژیکی بهتری را از خود نشان دهند [33]. عملکرد بیولوژیکی بهتر به معنی تشکیل سریع‌تر لایه هیدروکسی آپاتیت و همچنین خاصیت رگ‌زایی ناشی از رهایش عنصر بور است [16].



شکل ۶ نتایج تست MTT برای نمونه سنتز شده در دمای ۴۰۰ °C.

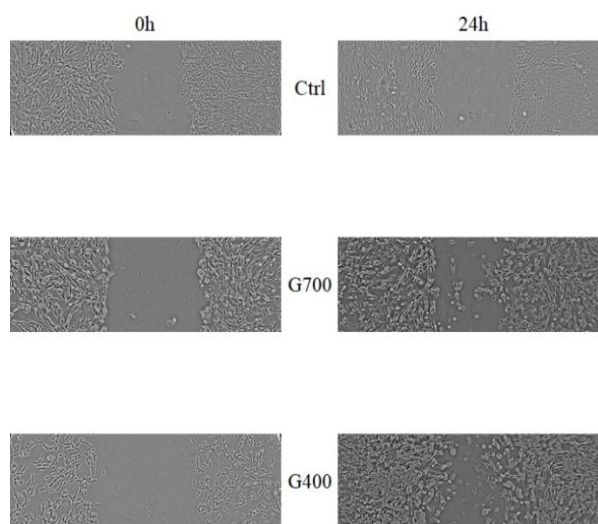
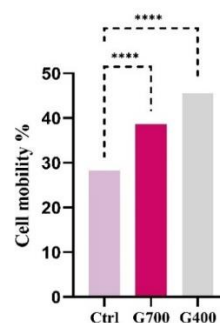
مطالعه بررسی اندازه ذرات (PSA).

توزیع اندازه ذرات پودرهای تهیه شده در دمای ۴۰۰ °C، در شکل (۵) نشان داده شده است. این نتایج نشان می‌دهد که به دلیل استفاده از روش سنتز ذکر شده، تمام ذرات سنتز شده دارای توزیع اندازه ذرات بسیار ریز و در حد نانومتری هستند. همچنین همانطور که در شکل (۵) نمایش داده شده است بیشتر اندازه ذرات در بازه‌ی ۲۰ تا ۴۰ نانومتر هستند.

کامپوزیت بیشتر شده است، تجزیه آن فاز نیز بیشتر بوده و باعث ایجاد بورات کلسیم شده است. پیک بورات کلسیم در 26° ، 30° ، 42° ، 62° در نمونه‌های $10H$ تا $70H$ قابل مشاهده است، شدت این پیک‌ها با افزایش درصد وزنی شیشه بوراتی بیشتر می‌شود و در مقابل شدت پیک‌های هیدروکسی آپاتیت کمتر می‌شود. در نمونه $10H$ تا $70H$ ، تجزیه شیشه بیشتر بوده است. این امر را می‌توان از مقایسه الگوی پراش نمونه‌های $10H$ تا $70H$ با الگوی نمونه $80H$ دریافت. الگوی نمونه $80H$ در زاویه 42° و 26° درجه پیکی ندارد، اما این پیک‌ها در نمونه‌های $10H$ تا $70H$ مشاهده می‌شود که نشانه تبلور کلسیم بورات به میزان بالاتر است. در نمونه $80H$ پیکی که نشانگر ترکیبات پیچیده‌ی بورات کلسیم است، در $21^\circ = 2\theta$ مشاهده می‌شود. همچنین در نمونه $10H$ ، فاز آمورف بوراتی به میزان بالایی با توجه به پیک‌ها تجزیه شده است که مطلوب نمی‌باشد. با توجه به نتایج به دست آمده از الگوی XRD، نمونه‌ها با $20\text{ wt.}\%$ و $80\text{ wt.}\%$ هیدروکسی آپاتیت برای بررسی در تحقیق حاضر انتخاب شدند. به منظور مشاهده اثر شیشه بر روند زیتر، نمونه‌های کامپوزیتی که حاوی $50\text{ wt.}\%$ و $100\text{ wt.}\%$ هیدروکسی آپاتیت هستند (در $50\text{ wt.}\%$ هیدروکسی آپاتیت فاز زمینه هیدروکسی آپاتیت نمی‌باشد)، نیز انتخاب شدند. دلیل این انتخاب زیتر نشدن هیدروکسی آپاتیت خالص در 700°C به مدت 15 دقیقه است [11].

نتایج الگوی تفرق اشعه ایکس نمونه‌های کامپوزیت شده در دماها و زمان‌های متفاوت که در جدول (۲) توضیح داده شده در شکل (۹) نشان داده شده است. در نمونه‌ها با $20\text{ wt.}\%$ هیدروکسی آپاتیت (گراف a)، در نمودار $1-600-20H$ ، تبلور و پیک‌های هیدروکسی آپاتیت و فاز غیر سمی کلسیم بورات را داریم که نشان دهنده‌ی تجزیه شیشه است [34]. در نمونه‌های حاوی $20\text{ wt.}\%$ هیدروکسی آپاتیت، تعداد کم پیک‌های هیدروکسی آپاتیت می‌تواند به علت مقدار کم آن باشد. در نمودار $5-650-20H$ و $1-650-20H$ شدت پیک‌ها نسبت به نمودار $1-600-20H$ کمتر است که این امر می‌تواند به دلیل فراگرفته شدن فاز متبلور هیدروکسی آپاتیت توسط جریان ویسکوز شیشه آمورف [35] (دمای پایداری شیشه مورد استفاده در این تحقیق حدود 600°C است)، به هنگام بالا رفتن دما تا 650°C باشد. افزایش شدت و تعداد پیک‌های کلسیم بورات در

مطالعه تست مهاجرت سلولی (Migration). شکل (۷) پتانسیل مهاجرت سلول‌های 3T3 انکوبه شده با محتوای حاوی ترکیبات آمورف بوراتی را پس از 24 ساعت نشان می‌دهد. همانطور که مشاهده می‌شود، سلول‌های 3T3 گروه کنترل نرخ مهاجرت $28/24\%$ را پس از 24 ساعت نشان دادند، در حالی که میزان پویایی سلول‌ها مربوط به گروه‌های G700 و G400 به ترتیب $38/59\%$ و $45/56\%$ ثبت شد.



شکل ۷ نتایج تست Migration برای نمونه‌های G700 و G400

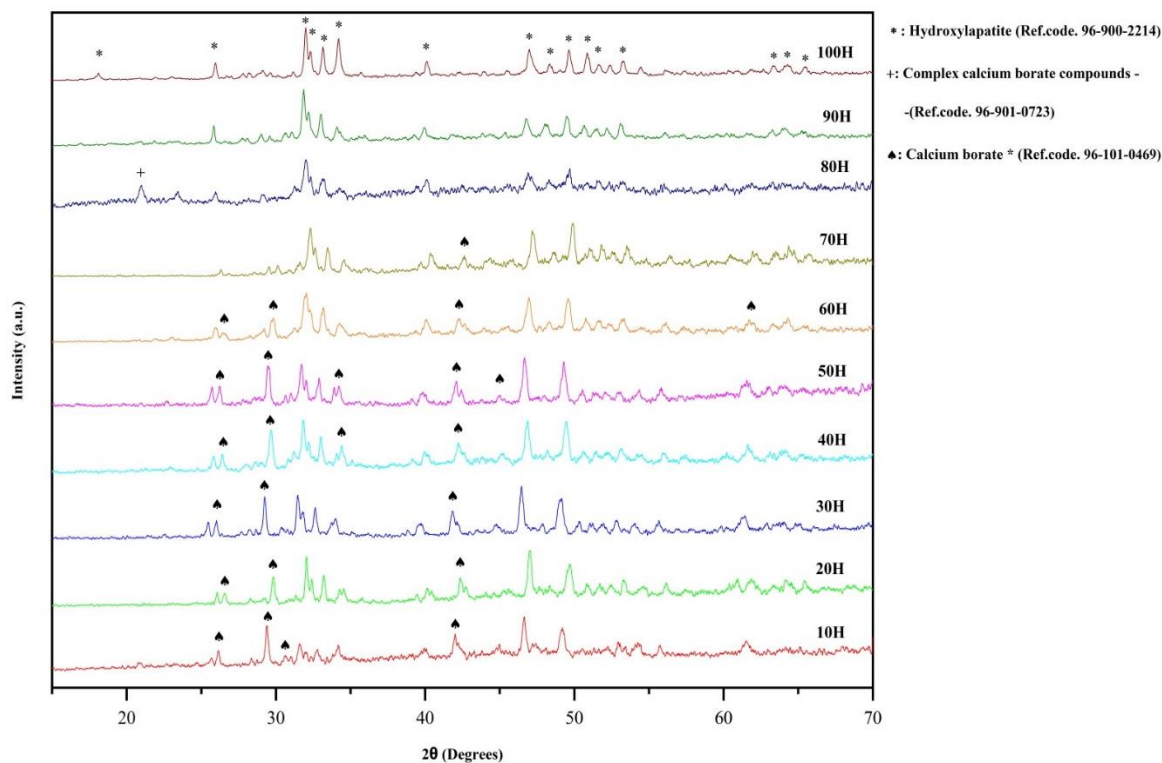
کامپوزیت هیدروکسی آپاتیت/شیشه بوراتی

مطالعه الگوی پراش اشعه ایکس (XRD). به منظور انتخاب و دستیابی به کامپوزیت با استحکام مکانیکی بالا، ریزساختار مناسب و قابلیت زیتر شدن در زمان کم، پودرهای هیدروکسی آپاتیت و آمورف بوراتی (به عنوان افزودنی و کمک زیتر) $100-0\text{ wt.}\%$ با هم ترکیب شدند و تحت عملیات حرارتی (700°C به مدت 15 دقیقه) قرار گرفتند. نتایج آنالیز فازی XRD در شکل (۸) ارائه شده است. شکل بیانگر این امر است که هرچه ترکیب بوراتی در

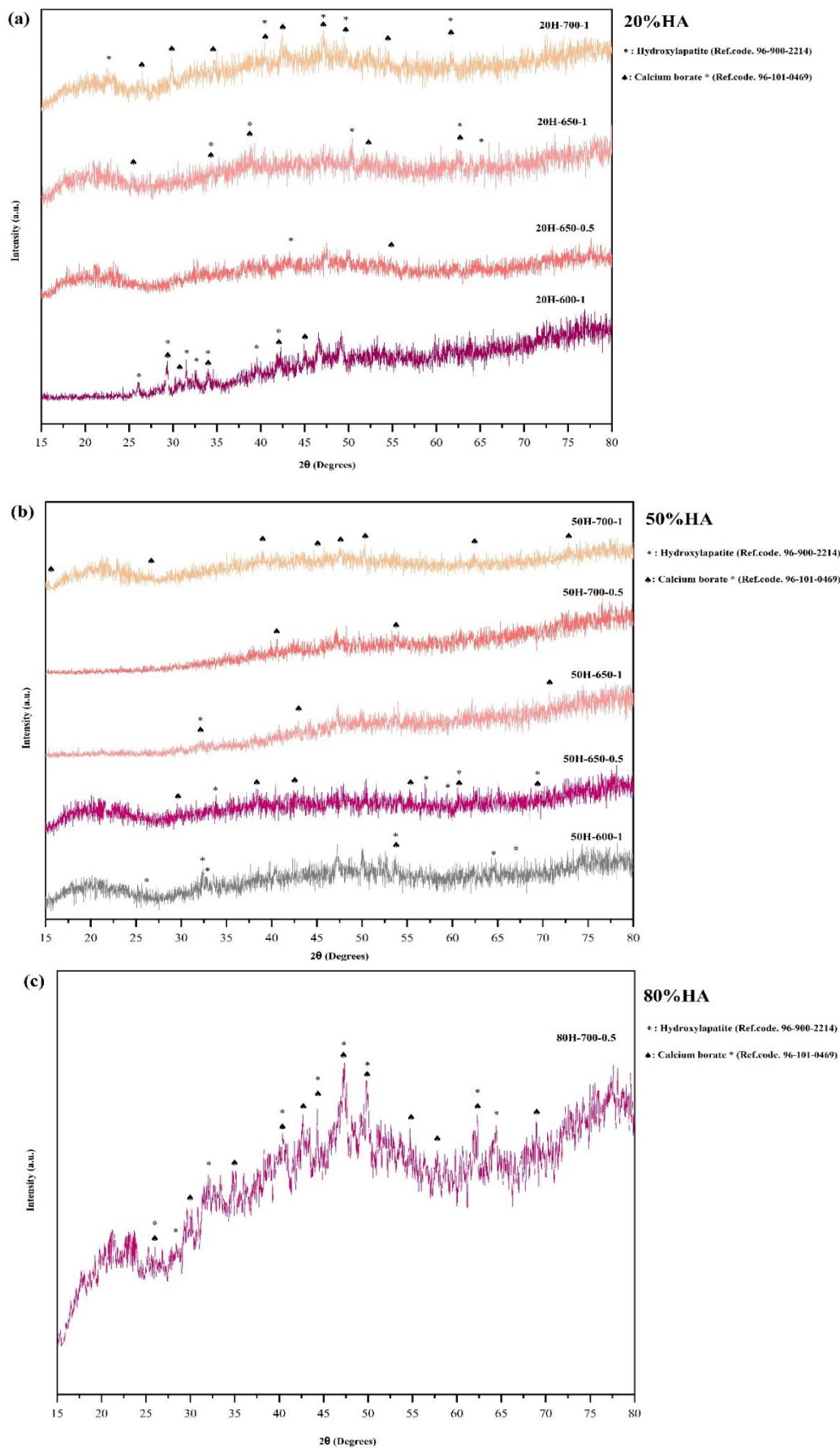
نمودار ۲۰H-۷۰۰-۱ نسبت به دو نمودار ۲۰H-۶۵۰-۰/۵ و ۱-۲۰H-۶۵۰-۰/۵ ممکن است نشان دهنده تبلور بیشتر شیشه است. در نمونه‌های حاوی ۵۰ wt.% هیدروکسی آپاتیت (گراف b)، در نمودار ۵۰H-۶۰۰-۱ هر دو فاز کلسیم بورات و هیدروکسی آپاتیت متبلور شده‌اند. با ثابت گرفتن زمان و بالا بردن دما تا ۶۵۰ (نمودار ۵۰H-۶۰۰-۱ و ۵۰H-۶۵۰-۱)، شدت پیک‌ها کم شده است. این امر ممکن است به دلیل احاطه شدن فاز کریستالی توسط شیشه آمورف و یا کاهش بلورینگی فاز شیشه باشد (شیشه سیال ویسکوز شده و دور فاز کریستالی را گرفته است و به علت سیال ویسکوز شدن و در پی آن انجماد سریع، شیشه آمورف شده است و تبلور کمتری نسبت به نمودار ۵۰H-۶۰۰-۱ داشته). از مقایسه نمودار ۵۰H-۶۵۰-۰/۵ و ۵۰H-۶۵۰-۱ تاثیر زمان مشخص می‌شود (در دمای ثابت) که همانند توضیح قبل باعث کاهش شدت پیک شده است. مقایسه نمودار ۵۰H-۶۵۰-۰/۵ و

۵۰H-۷۰۰-۰/۵ تاثیر دما را در زمان ثابت مشخص می‌کند که افزایش دما باعث کاهش شدت پیک‌ها به دلیل کم شدن بلورینگی شیشه و احاطه شدن فاز کریستالی توسط شیشه می‌شود (با بالا رفتن دما شیشه سیال ویسکوز شده و دور فاز کریستالی را فراگرفته). در نمونه با ۸۰ wt.% هیدروکسی آپاتیت (گراف c)، تاثیر افزایش درصد وزنی هیدروکسی آپاتیت نسبت به دو گراف قبل (a و b) با افزایش تعداد و شدت پیک‌های هیدروکسی آپاتیت مشخص می‌شود. از مقایسه این نمودار با نمودار ۵۰H-۷۰۰-۰/۵ در گراف b می‌توان به این امر پی برد. احتمال زینتر و تجزیه شدن نمونه‌ها با ۸۰ wt.% هیدروکسی آپاتیت در دماهای زیر ۷۰۰ بسیار کم است و به همین علت این دما برای مطالعه انتخاب شده است. الگوی تفرق اشعه ایکس برای نمونه‌های حاوی ۱۰۰ wt.% هیدروکسی آپاتیت مطالعه نشده، زیرا این نمونه‌ها در زیر ۱۰۰۰ °C تجزیه و زینتر نمی‌شوند [11].

۱۰۰۰ °C تجزیه و زینتر نمی‌شوند [11].



شکل ۸ الگوی تفرق اشعه ایکس، دما و زمان زینتر به ترتیب ۷۰۰ °C و ۱۵ دقیقه

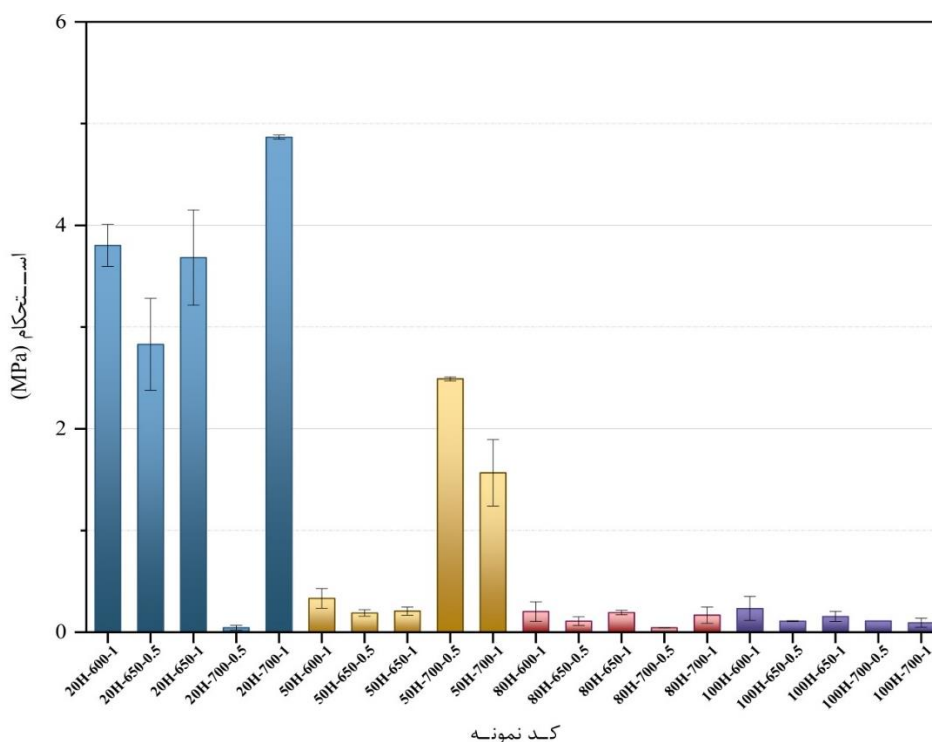


شکل ۹ الگوی تفرق اشعه ایکس نمونه‌های زینتر شده در جدول (۲) تصویر (a) ۲۰ wt. %، (b) ۵۰ wt. % و (c) ۸۰ wt. % هیدروکسی آپاتیت

نتایج مطالعات بر روی خواص مکانیکی (استحکام کششی

قطری). میانگین نتایج استحکام کششی نمونه‌های زینتر شده طبق جدول ۲ در شکل ۱۰ آورده شده‌اند. با مقایسه نمونه‌های زینتر شده در 700°C می‌توان نتیجه گرفت که هرچه درصد وزنی شیشه بیشتر شده، استحکام نیز بالا رفته است. این امر را می‌توان به عملکرد مناسب شیشه در جهت سهولت زینتر، نسبت داد. ماکسیمم استحکام کششی در بین نمونه‌های گفته شده، متعلق به نمونه ۱- $20\text{H}-700$ به میزان 2 ± 0.187 مگاپاسکال، شامل $20\text{ wt.}\%$ هیدروکسی آپاتیت است که با توجه به مقدار شیشه این مقدار استحکام مطلوب است. مینیمم استحکام کششی متعلق به نمونه $100\text{H}-1-700$ شامل $10\text{ wt.}\%$ هیدروکسی آپاتیت است که فاقد کمک زینتر بوده. روند افزایشی در استحکام را می‌توان با ثابت در نظر گرفتن شرایط زینتر و افزایش درصد وزنی شیشه مشاهده کرد. تغییرات نمونه $20\text{H}-700-0.5$ از روند گفته شده پیروی نمی‌کند و خطا در آزمون حساب می‌شود و دلیل این امر می‌تواند فشار کم پرس، اندازه پودر اولیه بسیار ریز و در نتیجه عدم فشردن شدن مناسب باشد. در هم شکستن تخلخل‌های پودر ریز در پرس سخت‌تر و نیازمند فشار بیشتری است و این امر ممکن موجب کاهش استحکام با توجه به فشار پرس کم باشد

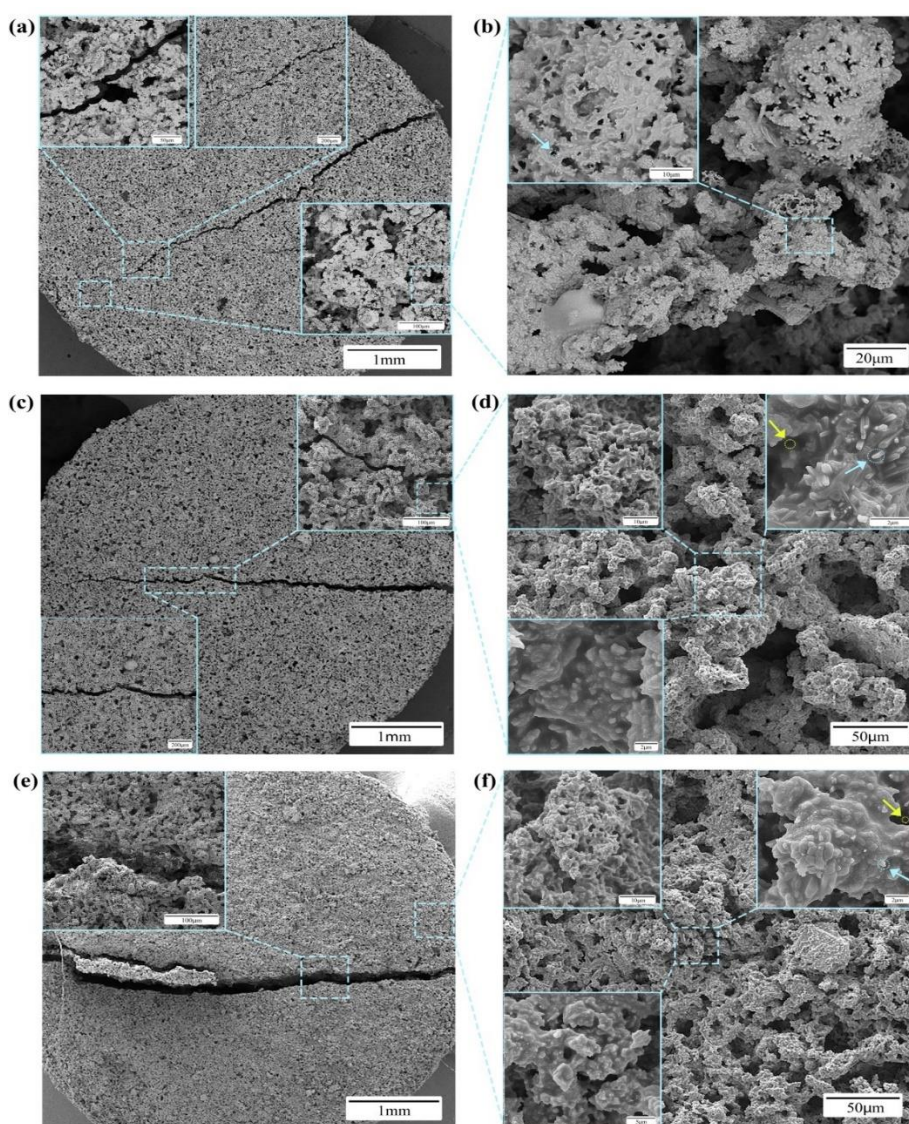
[36]. با بالا رفتن دما و زمان زینتر در نمونه‌ها با درصد وزنی یکسان هیدروکسی آپاتیت، استحکام افزایش می‌یابد به جز نمونه‌های دارای $80\text{ wt.}\%$ و $100\text{ wt.}\%$ هیدروکسی آپاتیت که به علت کم داشتن کمک زینتر (شیشه)، به طور مناسب زینتر نشده‌اند. نمونه‌ها حاوی $20\text{ wt.}\%$ هیدروکسی آپاتیت دارای بالاترین استحکام کششی در شرایط یکسان زینتر نسبت به سایر نمونه‌ها هستند. کاهش استحکام در نمونه‌های $1-600\text{H}-50$ ، $5-650\text{H}-0$ و $1-650\text{H}-50$ می‌تواند به دلیل کاهش مقدار شیشه و زینتر نامناسب باشد. مقادیر کم استحکام به دلیل استفاده از کامپوزیت‌ها در ترمیم بافت نرم و عیوب سطحی، نگران کننده نیست. نمونه $1-700\text{H}-20$ بهینه است و دارای بالاترین استحکام به دست آمده در در تحقیق حاضر است. در تحقیقی دیگر استحکام فشاری شیشه بوراتی زینتر شده در 575°C به مدت ۴۵ دقیقه به میزان 1.5 ± 0.2 مگاپاسکال گزارش شده است [37]. با توجه به اینکه استحکام کششی نمونه با $20\text{ wt.}\%$ هیدروکسی آپاتیت و $80\text{ wt.}\%$ شیشه بوراتی، بالاتر از استحکام فشاری گزارش شده در تحقیق اشاره شده است، می‌توان دریافت که هیدروکسی آپاتیت تاثیر بسیاری در افزایش استحکام دارد.



شکل ۱۰ نتایج تست استحکام کششی قطری

نمونه‌های ۲۰H-۶۵۰-۱ و ۵۰H-۷۰۰-۱ می‌توان دریافت که فاز آمورف در نمونه ۲۰H-۶۵۰-۱ به میزان کمتر باعث زیتر و اتصال ذرات شده است. نتایج الگو تفرق اشعه ایکس نیز در راستای توضیح گفته شده است و در نمونه ۵۰H-۷۰۰-۱ پیک هیدروکسی آپاتیت مشاهده نشده است. در حالی که در نمونه ۱-۲۰H-۶۵۰ پیک هیدروکسی آپاتیت مشاهده شده است. این مشاهده می‌تواند به دلیل بالا رفتن دما و کم شدن گرانیوی شیشه باشد، بنابراین سطح ذرات هیدروکسی آپاتیت آسان‌تر توسط شیشه تر و پوشیده می‌شود و سپس جریان ویسکوز ذکر شده در حین سرمایش به آمورف تبدیل می‌شود.

تصویربرداری میکروسکوپ الکترونی روبشی نشر میدانی. شکل (۱۱) نشان دهنده تصاویر میکروسکوپ الکترونی روبشی نشر میدانی گرفته شده از سطح شکست و گسترش ترک در نمونه‌های ۲۰H-۶۵۰-۱ و ۵۰H-۷۰۰-۱ است. در تصاویر c, a و e شکست ترد کاملاً مشخص است زیرا تغییر شکل مومسان حتی در مقیاس میکرو هم مشاهده نمی‌شود و با روی هم قرار دادن سطوح شکست، شکل قرص اولیه حاصل می‌شود [۳۸، p. 241]، و به علت وجود تخلخل زیاد در نمونه‌ها ترک به صورت پیاپی مسیر خود را عوض می‌کند. عوض شدن پیاپی مسیر ترک باعث بالا رفتن استحکام نمونه می‌شود. از مقایسه تصاویر



شکل ۱۱ تصاویر میکروسکوپ الکترونی روبشی متعلق به نمونه‌های انتخاب شده. تصاویر a, b, c و d متعلق به دو نمونه از گروه ۲۰H-۶۵۰-۱ و تصاویر e و f متعلق به نمونه ۵۰H-۷۰۰-۱. تصاویر a, c و e نشانگر مسیر رشد ترک، و b, d, f نمایشگر فاز آمورف و کریستالی (فاز کریستالی با فلش آبی و فاز آمورف با فلش زرد نشان داده شده‌اند)

طیف سنجی پلاسمای جفت شده‌ی القایی. طیف سنجی پلاسمای جفت شده‌ی القایی (ICP-OES) به منظور مشاهده‌ی میزان رهایش یون انجام شد. نمونه ۱-۷۰۰-۲۰H (دارای بالاترین استحکام مکانیکی و ۲۰ wt.% هیدروکسی آپاتیت) به مدت ۷ روز در مایع شبیه سازی شده‌ی بدن (SBF) غوطه‌ور شد و سپس غلظت یون‌های رها شده در SBF توسط روش ICP-OES مشخص شد و در جدول (۳) گزارش شد. هنگامی که نمونه در SBF غوطه‌ور می‌شود، یون کلسیم (Ca^{2+}) به علت تخریب شدن ساختار شیشه بوراتی آزاد شده و با یون فسفات (PO_4^{3-}) موجود در SBF واکنش می‌دهد و آن را جذب می‌کند و باعث ایجاد کلسیم فسفات آمورف روی نمونه می‌شود [39]. لایه ذکر شده در نهایت به هیدروکسی آپاتیت که ساختار کریستالی دارد تبدیل می‌شود. وجود یون‌های منیزیم، سدیم، پتاسیم باعث بالا رفتن PH محلول SBF می‌شود. از سوی دیگر $B(OH)_3$ موجود در SBF بر اثر تشکیل یون بورات (BO_3^{3-}) دارای خاصیت اسیدی است [40], [19]. به منظور بررسی تغییرات در رفتار هیدروکسی آپاتیت در اثر کامپوزیت و زینتر کردن، غلظت یون فسفات و کلسیم ناشی از وجود نانوپودر هیدروکسی آپاتیت (۶۸ نانومتر) در SBF و میکروپودرهای زینتر شده توسط جرقه پلاسمای در $1050^\circ C$ در SBF، با غلظت‌های گزارش شده در این تحقیق مقایسه شدند. غلظت یون کلسیم و فسفات موجود در SBF در اثر حضور هیدروکسی آپاتیت زینتر شده بعد از ۷ روز به ترتیب $90/18$ و $27/1$ پی‌پی‌ام (از راست به چپ) گزارش شده‌اند [41]. و همچنین غلظت‌های گزارش شده در محلول SBF حاوی پودرهای نانوذره هیدروکسی آپاتیت بعد از ۷ روز، 210 پی‌پی‌ام برای یون کلسیم و 4 پی‌پی‌ام برای یون فسفات است [27]. با توجه به تصاویر به دست آمده از میکروسکوپ الکترونی روبشی نشر میدانی (FESEM) به طور واضح مشخص است که زینتر و اتصال ذرات هیدروکسی آپاتیت به کمک شیشه بوراتی (به عنوان کمک زینتر) انجام شده و خود ذرات هیدروکسی آپاتیت در زینتر به صورت جزیی شرکت کردند. ذرات هیدروکسی آپاتیت به صورت موضعی رشد کرده و از حالت نانوذره به تبدیل میکروذره شدند. با توجه به توضیح گفته شده و این امر که رهایش یون تحت تاثیر ترکیب، ساختار و اندازه ذرات است [42]، افزایش

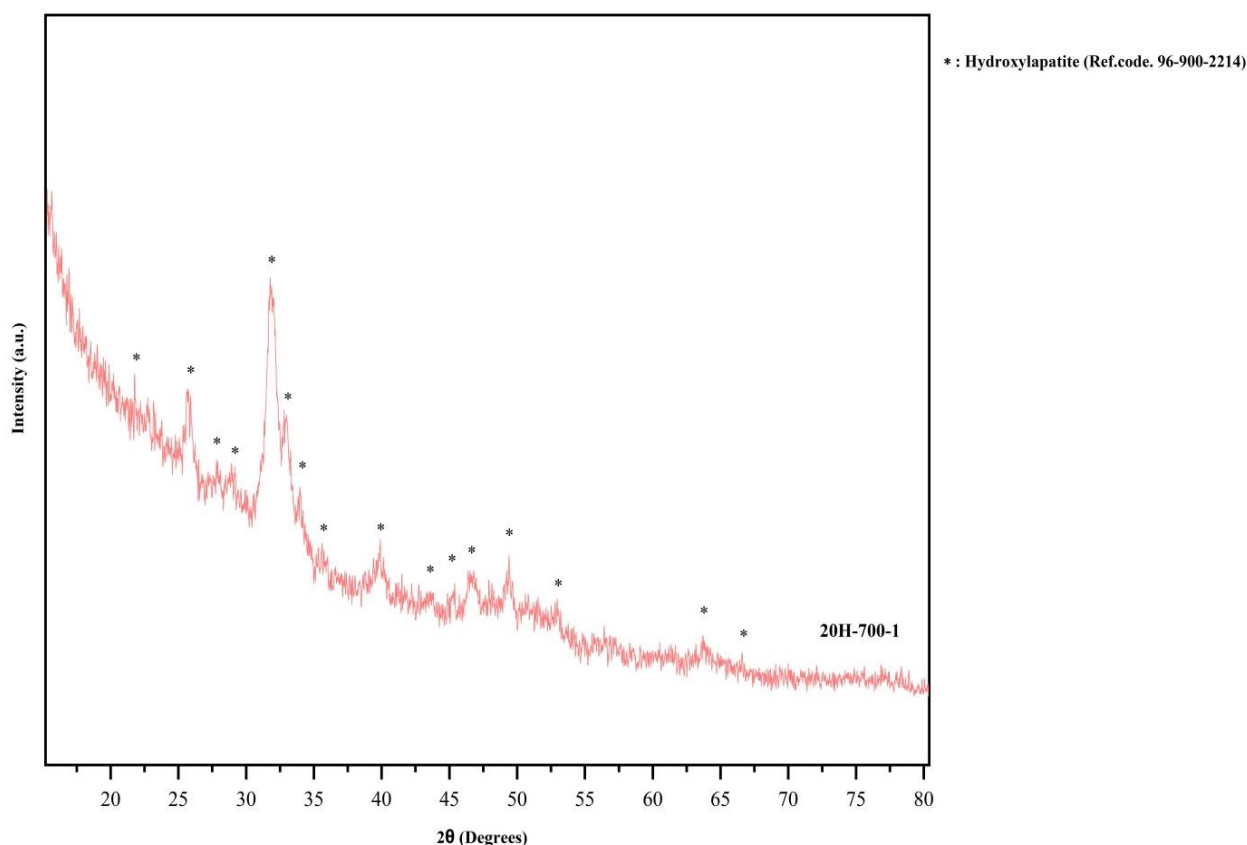
یون کلسیم در SBF در تحقیق حاضر، نسب به حالت زینتر کامل هیدروکسی آپاتیت توسط جرقه پلاسمای می‌تواند به علت کمتر بودن اندازه و میزان رشد ذرات هیدروکسی آپاتیت و کامپوزیت شدن با شیشه بوراتی که به شدت تخریب پذیر است، باشد. همانطور که گفته شد غلظت یون کلسیم در SBF حاوی نانوذرات هیدروکسی آپاتیت در مقایسه با کامپوزیت‌های زینتر شده، بیشتر است و این نتیجه می‌تواند به علت میکروذره بودن و چسبندگی ذرات در کامپوزیت باشد. در نتیجه می‌توان با ساخت کامپوزیت شیشه بوراتی/هیدروکسی آپاتیت، میزان زیست فعالی هیدروکسی آپاتیت را بالا برد و نرخ و میزان رهایش کلسیم را افزایش داد. تخریب پذیری بالا در کنار غلظت بالای یون کلسیم ممکن است در ترمیم بافت نرم تاثیرگذار باشد [40]. غلظت یون فسفات در SBF بر خلاف روند غلظت یون کلسیم بوده و هرچه رهایش Ca^{2+} بیشتر بوده، مصرف یون PO_4^{3-} برای تشکیل لایه آمورف کلسیم فسفات بیشتر و در نتیجه غلظت آن در SBF کم‌تر است. به هدف زیر نظر گرفتن تغییرات در رهایش یونی شیشه بوراتی در اثر کامپوزیت شدن با هیدروکسی آپاتیت، تفاوت غلظت یون کلسیم، بورات و فسفات موجود در SBF در مقایسه با تحقیقی دیگر از میکروفیبر (قطر ۳-۲،۰ میکرومتر) شیشه بوراتی 13-93B3 بعد از ۷ روز غوطه‌وری بررسی شد. غلظت‌های اشاره شده برای یون کلسیم، بورات و فسفات به ترتیب $195/39$ ، $256/74$ و $3/1$ پی‌پی‌ام گزارش شده‌اند [40]. از مقایسه جدول (۳) با غلظت‌های ذکر شده می‌توان دریافت که رهایش یون کلسیم و بورات کامپوزیت‌های ساخته شده، کمتر بوده و دلیل آن می‌تواند کنترل رهایش بر اثر کامپوزیت کردن و کم کردن مقدار شیشه باشد. بیشتر بودن غلظت یون فسفات در محلول SBF حاوی کامپوزیت (۱۹/۵۹ پی‌پی‌ام)، نسبت به غلظت یون فسفات محلول SBF حاوی میکروفیبر شیشه بوراتی (۳/۱ پی‌پی‌ام) می‌تواند به دلیل وجود یون‌های فسفات در هیدروکسی آپاتیت موجود در کامپوزیت باشد. در نتیجه کاملاً طبیعی است که غلظت یون فسفات در SBF شامل کامپوزیت از غلظت یون فسفات در SBF شامل شیشه بوراتی خالص بیشتر باشد. از طرف دیگر، رهایش یون کلسیم باعث استفاده یون فسفات و تشکیل هیدروکسی آپاتیت می‌شود. با توجه به این دو امر که (۱)

به منظور تشخیص فازهای تشکیل شده در سطح نمونه‌ای که در SBF غوطه‌ور بوده، مطالعه XRD انجام شد. شکل (۱۲) نشان‌دهنده الگوی XRD برای نمونه ۲۰H-۷۰۰-۱ پس از ۷ روز غوطه‌وری در SBF است. همانطور که در شکل مشخص است پیک‌های موجود در ۲۶ و $2\theta=32$ مبنی بر وجود فاز هیدروکسی آپاتیت به عنوان تنها فاز متبلور شده روی سطح نمونه است.

کامپوزیت زیتر شده است (به صورت قرص است) و سطح ویژه کمتری نسبت به میکروفیبر دارد و در نتیجه رهایش کمتری دارد و ۲) شیشه بوراتی در SBF سریع‌تر از هیدروکسی آپاتیت از تجزیه می‌شود، رهایش بیشتر یون کلسیم توسط میکروفیبر شیشه بوراتی خالص در مقایسه با کامپوزیت دارای هیدروکسی آپاتیت در ۷ روز اول، باعث استفاده بیشتر یون فسفات می‌شود. نتیجتاً محلول SBF دارای کامپوزیت شیشه بوراتی / هیدروکسی آپاتیت، یون فسفات بیشتری دارد.

جدول ۳ غلظت یون‌ها در مایع شبیه‌سازی شده‌ی بدن بعد از ۷ روز غوطه‌وری

یون	Ca ^{۲+}	Na ⁺	Mg ^{۲+}	K ⁺	BO _۳ ^{۳-}	PO _۴ ^{۳-}
غلظت در مایع شبیه‌ساز بدن (PPM)	۱۱۸/۷۳	۲۴۶۵/۸۹	۳۶/۵۱	۶۲۴/۷۹	۶۱/۹۴	۱۹/۵۹



شکل ۱۲ الگو تفرق اشعه ایکس نمونه ۲۰H-۷۰۰-۱ بعد از ۷ روز غوطه‌وری در مایع شبیه‌سازی شده‌ی بدن

نتیجه گیری

نتایج تست استحکام کششی قطری قرص های زینتر شده نشان می دهد با بالا رفتن درصد وزنی شیشه، دما و زمان زینتر، استحکام نیز بالاتر می رود. بالاترین استحکام ثبت شده، متعلق به نمونه ۱- $20H-700$ ، دارای $20 \text{ wt.}\%$ هیدروکسی آپاتیت و $80 \text{ wt.}\%$ شیشه بوراتی که در دمای 700°C به مدت ۱ ساعت زینتر شده، به مقدار $4/87 \pm 0/02$ مگاپاسکال بود. تصاویر میکروسکوپ الکترونی روبشی نشر میدانی نقش شیشه بوراتی را به عنوان کمک زینر که ذرات هیدروکسی آپاتیت را احاطه کرده و به هم متصل کرده، آشکار می کند. شکست ترد و میزان تخلخل بالا در تصاویر مشخص است. طیف سنجی پلاسمای جفت شده ی القایی بعد از ۷ روز غوطه وری در مایع شبیه سازی شده ی بدن، نشان دهنده افزایش رهایش یون کلسیم از نمونه کامپوزیتی $20H-700-1$ در مقایسه با هیدروکسی آپاتیت خالص زینتر شده، بود. از سوی دیگر رهایش یون های نمونه $20H-700-1$ نسبت به میکروفیبرهای شیشه بوراتی کمتر بوده است. نتایج ایکس آر دی نمونه $20H-700-1$ پس از ۷ روز غوطه وری در SBF نشان دهنده ایجاد فاز بلوری هیدروکسی آپاتیت روی سطح نمونه است. نتایج نشان می دهد کامپوزیت های ساخته شده کاندید مناسب برای برقراری پیوند با بافت سخت و نرم هستند.

تشکر و قدردانی

نویسندگان بر خود لازم می دانند از دانشگاه فردوسی مشهد به دلیل حمایت مالی برای انجام این پژوهش قدردانی کنند.

در تحقیق حاضر ترکیبات بوراتی توسط روش سنتز احتراقی در محلول ساخته شدند. به منظور بررسی پایداری، ترکیب سنتز شده در دمای 400°C ، تحت عملیات حرارتی در 700°C قرار گرفت. نتایج مطالعه الگوی تفرق اشعه ایکس بیانگر ساختار آمورف ترکیب سنتز شده در دمای 400°C بود. همچنین این ساختار در عملیات حرارتی انجام شده در دمای 700°C ، تمایل به کریستالی شدن از خود نشان داد. نتایج مطالعه طیف سنجی مادون قرمز تبدیل فوریه نمونه G400 (ترکیب سنتز شده در دمای 400°C که دارای ساختار آمورف است) وجود پیوندهای بور-اکسیژن در ساختار های BO_3 و BO_4 را تایید می کند. نتایج تست اندازه ذرات، توضیح می دهد که بالغ بر ۵۵ درصد ذرات در بازه ۲۰ تا 40 nm قرار دارند. نتایج تست های سمیت و مهاجرت سلولی انجام شده بر روی سلول های 3T3، تاثیر مثبت محتوای حاوی پودرهای G400 در رشد و مهاجرت سلولی را نسبت به گروه کنترل بیان می کند. بخش دیگر تحقیق به ساخت داربستی که هم با بافت نرم و هم بافت سخت پیوند مناسب برقرار می کند اختصاص داده شد. به این منظور نانوپودرهای G400 و نانوپودرهای سنتز شده هیدروکسی آپاتیت با درصد های متفاوت وزنی کامپوزیت شدند و سپس در دماهای 600°C ، 650°C و 700°C به مدت زمان های $0/5$ و ۱ ساعت زینتر شدند. نتایج XRD نشان می دهد که با بالا رفتن دما و زمان زینتر ساختار بلوری مشاهده نمی شود و دلیل این امر ایجاد سیال ویسکوز شیشه و سپس پوشاندن سطح ذرات هیدروکسی آپاتیت است.

مراجع

- Zhao, S., et al., "Wound dressings composed of copper-doped borate bioactive glass microfibers stimulate angiogenesis and heal full-thickness skin defects in a rodent model", *Biomaterials*, Vol. 53, pp. 379-391, (2015).
- Rizwan, M., Hamdi, M., Basirun, W. J., Kondoh, K., and Umeda, J., "Low pressure spark plasma sintered hydroxyapatite and Bioglass® composite scaffolds for bone tissue repair", *Ceramics International*, Vol. 44, pp. 23052-23062, No. 18, (2018).
- Bellucci, D., et al., "Bioglass and bioceramic composites processed by Spark Plasma Sintering (SPS): Biological evaluation Versus SBF test", *Biomedical Glasses*, Vol. 4, pp. 21-31, No. 1, (2018).
- Canillas, M., Pena, P., De Aza, A. H., and Rodríguez, M. A., "Calcium phosphates for biomedical applications", *Boletín de la Sociedad Española de Cerámica y Vidrio*, Vol. 56, pp. 91-112, No. 3. (2017).
- Yaszemski, M. J., Payne, R. G., Hayes, W. C., Langer, R., and Mikos, A. G., "Evolution of bone transplantation:

- Molecular, cellular and tissue strategies to engineer human bone", *Biomaterials*, Vol. 17, pp. 175-185, No. 2, (1996).
6. Spivak, J. M., and Hasharoni, A., "Use of hydroxyapatite in spine surgery", *European Spine Journal*, Vol. 10, pp. S197-S204, No. SUPPL. 2, (2001).
 7. Bellucci, D., Desogus, L., Montinaro, S., Orrù, R., Cao, G., and Cannillo, V., "Innovative hydroxyapatite/bioactive glass composites processed by spark plasma sintering for bone tissue repair", *J Eur Ceram Soc*, Vol. 37, No. 4, pp. 1723-1733, (2017).
 8. Burg, K. J. L., Porter, S., and Kellam, J. F., "Biomaterial developments for bone tissue engineering", *Biomaterials*, Vol. 21, No. 23, pp. 2347-2359, (2000).
 9. Mollazadeh, S., Javadpour, J., and Khavandi, A., "In situ synthesis and characterization of nano-size hydroxyapatite in poly(vinyl alcohol) matrix", *Ceramics International*, Vol. 33, No. 8, pp. 1579-1583, (2007).
 10. Tampieri, A., Celotti, G., Szontagh, F., and Landi, E., "Sintering and characterization of HA and TCP bioceramics with control of their strength and phase purity", *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, Vol. 8, No. 1, pp. 29-37, (1997).
 11. Bellucci, D., Sola, A., and Cannillo, V., "Hydroxyapatite and tricalcium phosphate composites with bioactive glass as second phase: State of the art and current applications", *Journal of Biomedical Materials Research - Part A*, Vol. 104, No. 4, pp. 1030-1056, (2016).
 12. Liao, C. J., Lin, F. H., Chen, K. S., and Sun, J. S., "Thermal decomposition and reconstitution of hydroxyapatite in air atmosphere", *Biomaterials*, Vol. 20, No. 19, pp. 1807-1813, (1999).
 13. Liu, Y., and Shen, Z., "Dehydroxylation of hydroxyapatite in dense bulk ceramics sintered by spark plasma sintering", *J Eur Ceram Soc*, Vol. 32, No. 11, pp. 2691-2696, (2012).
 14. Gerhardt, L. C., and Boccaccini, A. R., "Bioactive glass and glass-ceramic scaffolds for bone tissue engineering", *Materials*, Vol. 3, No. 7, pp. 3867-3910, (2010).
 15. Hench, L. L., "The story of Bioglass®", in *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, Vol. 17, No. 11, pp. 967-978, (2006).
 16. Schuhladden, K., Wang, X., Hupa, L., and Boccaccini, A. R., "Dissolution of borate and borosilicate bioactive glasses and the influence of ion (Zn, Cu) doping in different solutions", *Journal of Non-Crystalline Solids*, Vol. 502, pp. 22-34, (2018).
 17. Brown, R. F., *et al.*, "Effect of borate glass composition on its conversion to hydroxyapatite and on the proliferation of MC3T3-E1 cells", *Journal of Biomedical Materials Research - Part A*, Vol. 88, No. 2, pp. 392-400, (2009).
 18. Zhou, J., *et al.*, "In vivo and in vitro studies of borate based glass micro-fibers for dermal repairing", *Materials Science and Engineering C*, Vol. 60, pp. 437-445, (2016).
 19. Huang, W., Day, D. E., Kittiratanapiboon, K., and Rahaman, M. N., "Kinetics and mechanisms of the conversion of silicate (45S5), borate, and borosilicate glasses to hydroxyapatite in dilute phosphate solutions", *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, Vol. 17, No. 7, pp. 583-596, (2006).

20. Balasubramanian, P., Hupa, L., Jokic, B., Detsch, R., Grünewald, A., and Boccaccini, A. R., "Angiogenic potential of boron-containing bioactive glasses: in vitro study", *Journal of Materials Science*, Vol. 52, No. 15, pp. 8785-8792, (2017).
21. Balasubramanian, P., *et al.*, "Ion Release, Hydroxyapatite Conversion, and Cytotoxicity of Boron-Containing Bioactive Glass Scaffolds", *International Journal of Applied Glass Science*, Vol. 7, No. 2, pp. 206-215, (2016).
22. Guo, X., Xiao, P., Liu, J., and Shen, Z., "Fabrication of nanostructured hydroxyapatite via hydrothermal synthesis and spark plasma sintering", *Journal of the American Ceramic Society*, Vol. 88, No. 4, pp. 1026–1029, (2005).
23. Ali, A., *et al.*, "Studies on effect of CuO addition on mechanical properties and in vitro cytocompatibility in 1393 bioactive glass scaffold", *Materials Science and Engineering C*, Vol. 93, pp. 341-355, (2018).
24. Zaytsev, D., and Panfilov, P., "Deformation behavior of human enamel under diametral compression", *Materials Letters*, Vol. 136, pp. 130-132, (2014).
25. Horabik, J., Wiącek, J., Parafiniuk, P., Stasiak, P., Bańda, M., and Molenda, M., "Tensile strength of pressure-agglomerated potato starch determined via diametral compression test: Discrete element method simulations and experiments", *Biosystems Engineering*, Vol. 183, pp. 95-109, (2019).
26. Barfi Sistani, P., Mollazadeh Beidokhti, S., and Kiani-Rashid, A., "Crystallization Behavior and Mechanical Properties of In-situ Alumina-Zirconia Composite Bodies", *Advanced Ceramics Progress*, Vol. 4, No. Issue 3-4, pp. 36–42, (2018).
27. Kermani, F., Gharavian, A., Mollazadeh, A., Kargozar, S., Youssefi, A., and Vahdati Khaki, J., "Silicon-doped calcium phosphates; the critical effect of synthesis routes on the biological performance", *Materials Science and Engineering C*, Vol. 111, pp. 110828, (2020).
28. Kokubo, T., and Takadama, H., "How useful is SBF in predicting in vivo bone bioactivity?", *Biomaterials*, Vol. 27, No. 15, pp. 2907-2915, (2006).
29. "CRC handbook of chemistry and physics: 1st student edition: Editor-in-chief: R C Weast. CRC Press, Inc, Boca Raton, Florida and Wolfe Medical Publications, London. 1988. £19.95 ISBN 0-8493-0740-6", *Biochemical Education*, Vol. 17, No. 2, pp. 103, (1989).
30. Kumar, V., Manhas, M., Bedyal, A. K., and Swart, H. C., "Synthesis, spectral and surface investigation of novel CaMgB₂O₅:Dy³⁺ nanophosphor for UV based white LEDs", *Materials Research Bulletin*, Vol. 91, pp. 140-147, (2017).
31. Deliormanli, A. M., "In vitro assessment of degradation and mineralisation of V₂O₅ substituted borate bioactive glass scaffolds", *Materials Technology*, Vol. 29, No. 6, pp. 358–365, Nov. (2014).
32. Jung, S., "Borate Based Bioactive Glass Scaffolds for Hard and Soft Tissue Engineering", (2010).
33. Kermani, F., Mollazadeh, S., Kargozar, S., and Vahdati Khakhi, J., "Solution combustion synthesis (SCS) of theranostic ions doped biphasic calcium phosphates; kinetic of ions release in simulated body fluid (SBF) and reactive oxygen species (ROS) generation", *Materials Science and Engineering C*, Vol. 118, pp. 111533, (2021).

34. Gu, Y., Xiao, W., Lu, L., Huang, W., Rahaman, M. N., and Wang, D., "Kinetics and mechanisms of converting bioactive borate glasses to hydroxyapatite in aqueous phosphate solution", *Journal of Materials Science*, Vol. 46, No. 1, pp. 47-54, (2011).
35. Hu Y., and Miao, X., "Comparison of hydroxyapatite ceramics and hydroxyapatite/borosilicate glass composites prepared by slip casting", in *Ceramics International*, Vol. 30, No. 7, pp. 1787-1791, (2004).
36. Rekhi, S., Saxena, S. K., Atlas, Z. D., and Hu, J., "Effect of particle size on the compressibility of MgO", *Solid State Communications*, Vol. 117, No. 1, pp. 33-36, (2000).
37. Gu, Y., Huang, W., Rahaman, M. N., and Day, D. E., "Bone regeneration in rat calvarial defects implanted with fibrous scaffolds composed of a mixture of silicate and borate bioactive glasses", *Acta Biomaterialia*, Vol. 9, No. 11, pp. 9126-9136, (2013).
38. Paupler, P., "G. E. Dieter. Mechanical Metallurgy. 3rd ed., Mc Graw-Hill Book Co., New York 1986. XXIII + 751 p., DM 138.50, ISBN 0-07-016893-8", *Crystal Research and Technology*, Vol. 23, No. 2, Chap. 8, (1988).
39. Haghghi, F. D., Beidokhti, S. M., Najaran, Z. T., and Sahebani Saghi, S., "Highly improved biological and mechanical features of bioglass-ceramic/ gelatin composite scaffolds using a novel silica coverage", *Ceramics International*, Vol. 47, No. 10, pp. 14048-14061, (2021).
40. Liu, X., Rahaman, M. N., and Day, D. E., "Conversion of melt-derived microfibrillar borate (13-93B3) and silicate (45S5) bioactive glass in a simulated body fluid", *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, Vol. 24, No. 3, pp. 583-595, (2013).
41. Gu, Y. W., Khor, K. A., and Cheang, P., "Bone-like apatite layer formation on hydroxyapatite prepared by spark plasma sintering (SPS)", *Biomaterials*, Vol. 25, No. 18, pp. 4127-4134, (2004).
42. Fathi, M. H., Hanifi, A., and Mortazavi, V., "Preparation and bioactivity evaluation of bone-like hydroxyapatite nanopowder", *Journal of Materials Processing Technology*, Vol. 202, No. 1-3, pp. 536-542, (2008)