

بررسی تأثیر افزودن نانوذرات گرافن اکساید بر خواص مکانیکی و بیولوژیکی سیمان کلسیم فسفاتی

نگار نصراللهی^۱، سیده سارا شفیعی^{۱*}، رضا کلانتری نژاد^۲، عباس جمشیدی زاد^۱

^۱ پژوهشگاه ملی مهندسی ژئوتک و زیست فناوری، تهران، ایران

^۲ مرکز تحقیقات و توسعه شزان، پارک فناوری پردیس، تهران، ایران

* shafiei@nigeb.ac.ir

چکیده:

در مطالعه حاضر، تأثیرات افزودن نانوذرات گرافن اکساید بر خواص فیزیکی-مکانیکی-بیولوژیکی سیمان کلسیم فسفاتی مورد بررسی قرار گرفته است. پاسخ سلولی بر روی رده سلولی MG63 و واکنش‌های بافتی پس از کاشت سیمان تقویت شده با نانوذرات گرافن اکساید در استخوان آهیانه موش صحرایی ویستار بررسی شد. سیمان کلسیم فسفاتی از نوع برآشیتی از مخلوط کردن پودر بتاتری کلسیم فسفات و مونوکلسیم فسفات مونو‌هیدرات تهیه شد. افزودن گرافن اکساید در غلظت‌های ۰، ۰/۵، ۲، ۵ درصد وزنی به فاز سیمان کلسیم فسفاتی باعث کاهش زمان گیریش و افزایش قابل توجه استحکام مکانیکی (۲ درصد وزنی) شد. همچنین رشد بلورهای جدید آپاتیتی پس از قرارگیری نمونه‌ها در محلول شبیه سازی شده بدن به مدت ۷ و ۱۴ روز مشاهد شد که حاکی از زیست فعالی نمونه‌های تقویت شده با گرافن اکساید چسبندگی سلول میکروسکوپ الکترونی رویشی از نمونه‌ها نشان داد که سیمان تقویت شده با گرافن اکساید چسبندگی سلول را تسهیل می‌کند. علاوه بر این، فعالیت آلکالین فسفاتاز در مقایسه با سیمان خالص بهبود یافته است. تجزیه و تحلیل ارزیابی بافت شناسی نشان داد که حضور گرافن اکساید باعث افزایش کارایی استخوان زایی در مقایسه با سیمان خالص شد. از این رو، می‌توان تنجیجه گرفت که سیمان برآشیتی در ترکیب با گرافن اکساید با درصد مشخص، باعث تقویت خواص مکانیکی و بیولوژیکی آن می‌شود و گزینه‌ی مناسبی در درمان‌های بالینی استخوان محسوب شود.

اطلاعات مقاله:

دربافت: ۳ بهمن ۱۳۹۷

پذیرش: ۱۶ اردیبهشت ۱۳۹۸

کلید واژه:

گرافن اکساید، سیمان کلسیم فسفاتی، استخوان زایی.

طلولانی را در بدن دوام بیاورند. افزایش طول عمر این کاشتنی‌ها، چالش جدیدی را در رابطه با نقص کارکردی آن‌ها در طول زمان به وجود می‌آورد. برای رفع این مشکل، بیومتریال‌های تخریب پذیر، توجه زیادی را به خود جلب

۱- مقدمه

امروزه به دلیل افزایش جمعیت میانسال و کهنسال در جامعه، نیاز به کاشتنی‌های استخوان در جراحی‌های ارتوپدی افزایش یافته است. این کاشتنی‌ها باستثنی بتوانند مدت زمان



جایگزینی برای اتوگرفت در نظر گرفته شود. علاوه بر این کلسیم فسفات‌ها می‌توانند توسط سلول‌های استخوانی تخریب و جایگزین استخوان جدید شوند. این موضوع به عنوان امتیازی ویژه برای کلسیم فسفات‌ها در مقایسه با موادی که توسط سلول‌های استخوانی تخریب نمی‌شوند، محسوب می‌شود. امروزه سیمان‌های کلسیم فسفاتی به طور گسترده به دلیل خواص ویژه و منحصر بفردشان مانند شباهت زیاد به استخوان، زیست فعالی، زیست سازگاری و جذب آهسته شان به عنوان گرفت استخوانی استفاده می‌شوند. این نوع سیمان‌ها باعث نفوذ مایعات زیستی به درون سیمان می‌شود که به جذب و جایگزینی استخوان کمک فراوانی می‌کند. به طور کلی از آنجا که سیمان‌ها هنگام مخلوط شدن مایع هستند، می‌توانند در روش‌های جراحی کم‌تهاجمی به کار روند، ولی محدودیت عمدۀ آنها استحکام کم آنهاست و از این رو کاربرد آنها به نواحی غیر متحمل بار نظیر نقایص فکی-جمجمه‌ای محدود می‌شود[۵و۶]. استفاده از نانوذرات زیست سازگار، راهبرد جدیدی برای رفع محدودیت‌های سیمان‌های کلسیم فسفاتی است[۷]. هنوز تعریف یکتایی برای نانوذرات وجود ندارد، ولی معمولاً این نام به دسته‌ای از مواد اطلاق می‌شود که اندازه‌ی آن‌ها در یک بعد زیر ۱۰۰ نانومتر باشد و می‌توان استنباط کرد که موادی در این مقیاس دارای خواص منحصر بفردی، در مقایسه با موادی از همین جنس، اما در مقیاس‌های دیگر هستند. در کامپوزیت‌ها، درجه‌ی استحکام مکانیکی در محصول نهایی بستگی به نوع ترکیب شیمیایی نانوذره، نسبت سطح به حجم، پراکندگی و واکنش بین سطحی نانوذره با کامپوزیت دارد. برای دستیابی به

کرده است. پر کردن حفرات خالی استخوان، یکی از گزینه‌های مصرف کاربردی این گونه مواد است[۱]. با استفاده از مواد تخریب پذیر که با گذشت زمان جایگزین بافت جدید استخوانی می‌شوند، می‌توان به نقص ایمپلنت‌های دائمی فائق آمد. تعداد استخوان‌های یک فرد بالغ، مجموعاً ۲۰۶ عدد است. استخوان بافتی پویا است که در طول زندگی فرد، بازشکل‌گیری خود را ادامه می‌دهد. سلول‌های تشکیل دهنده‌ی این بافت (استئوبلاست‌ها، استئوکلاست‌ها و استئوسیت‌ها)، استخوان پیر و غیرعملکردی را با استخوان جدید جایگزین می‌کنند. نقایص استخوانی زیادی مانند استئوسارکوما، شکستگی‌های غیرمتعدد و عفونت این چرخه‌ی طبیعی را مختل می‌کنند و به این طریق ضایعه‌ی ایجاد شده به طور کامل ببهود نمی‌یابد[۲و۳]. امروزه راه حل طلایی برای جایگزینی استخوان، استفاده از اتوگرفت است. در این روش استخوان‌های سالم در نواحی که متحمل بار نیست، برداشت می‌شود و به خود شخص پیوند زده می‌شود. استفاده از اتوگرفت محدودیت‌هایی شامل درد و ناخوشی در محل برداشت بافت سالم، نیازمندی به دو عمل جراحی برای پیوند بافت به خود شخص و احتمال بیشتر عفونت را دارد. علاوه بر این استفاده از اتوگرفت، به دلیل استفاده از توده‌ی استخوانی سست، حمایت ساختاری کافی را برای استخوان فراهم نمی‌کند. برای حل این مشکلات، استفاده از مواد ایمپلنت سنتزی مشابه استخوان، راه چاره است[۴]. قسمت معدنی استخوان ۶۰-۷۰٪ آن را تشکیل می‌دهد. این بخش عمده‌ای شامل ترکیبات کلسیم فسفاتی در مقیاس نانو است. بنابراین مواد کلسیم فسفاتی می‌تواند به عنوان



زیست سازگاری مورد توجه قرار گرفته که در نهایت موجب افزایش زیست سازگاری و کاهش سمیت شده است. علاوه بر این وجود لایه های نازک گرافنی در غلظت های پایین موجب بهبود خواص مکانیکی پلیمرها به طور چشمگیر شده است. در این راستا، پلی اتیلن گلیکول به عنوان یک پلیمر زیست سازگار عامل دار، به طور گستردگی برای اصلاح نanolوله ها و گرافن و دیگر نانومواد در طراحی سیستم دارورسانی استفاده شده است [۱۱]. همچنین با استفاده ای ۰/۵ -٪ وزنی گرافن اکساید در داربست ژلاتین-هیدروکسی آپاتیت، خواص مکانیکی و تمایز استخوانی داربست بهبود یافت. به طوری که بدون وجود محیط تمایزی سلول های بنیادی به استخوان تمایز پیدا کردند. همچنین داربست دارای گرافن اکساید تردی^۲ کمتری نسبت به داربست بدون گرافن اکساید از خود نشان می دهد [۱۲]. با ترکیب گرافن اکساید و سایر مواد، مانند کلاژن [۱۳] و هیدروژل [۱۴] نتایج قابل قبولی از عملکرد گرافن اکساید روی خواص مکانیکی و زیستی داربست ها به دست آمده است. طبق گزارش وو^۳ و همکاران با ترکیب گرافن اکساید و بتاتری کلسیم فسفات خواص استخوان زایی درون تنی و برون تنی بیوسرامیک حاصل به طور قابل ملاحظه ای بهبود یافت. طبق این گزارش فعال سازی مسیر پیام رسانی^۴ Wnt/B-catenin عامل القای خاصیت استخوان زایی در سلول های بنیادی مغز استخوان بوده است [۱۵]. دانشمندان چینی رفتار مطلوب داربست گرافن اکساید و PLGA) چینی رفتار مطلوب داربست گرافن اکساید و (poly lactic-co-glycolic acid) را به دو خاصیت مهم

خاصیت مکانیکی بهتر، نسبت سطح به حجم بالای نیاز است [۸].

در این میان، نانوذرات گرافن و مشتقاتش به دلیل خواص فیزیکی و زیستی ویژه، توجه محققین بسیاری را به خود جلب کرده اند. با توجه به ساختار منحصر بفرد و هندسی این ماده، می توان انتظار داشت گرافن دارای خواص فیزیکی و شیمیایی قابل توجه از جمله؛ مدول یانگ بالا، استحکام شکست بالا، هدایت بسیار عالی الکتریکی و گرمایی، تحرک سریع از بارها، سطح بزرگ و زیست سازگاری بالا باشد. این خواص، گرافن را به عنوان یک ماده ایده ال در زمینه های مختلف، مانند؛ فیزیک کوانتموم، نانوالکترونیک، تحقیقات انرژی، تجزیه و مهندسی نانوکامپوزیت ها و موارد زیستی معرفی می کند [۹].

جهت استفاده از گرافن و اکسید گرافن در کاربردهای بالینی بسیاری از گزارش ها نشان می دهد که گرافن و سازه ترکیبی از مشتقات گرافنی برای حمل دارو، بیو سنسور^۱ ها و مهندسی بافت استخوان سمیت کمی از خود نشان داده اند. در سال های اخیر استفاده از ترکیبات گرافنی مانند گرافن اکساید (GO)، نانوپلیت های گرافن (GNPs) و گرافن اکساید کاهش یافته (rGO) برای تقویت عملکرد مکانیکی سرامیک ها مورد توجه قرار گرفته است [۰۱]. مطالعات نشان می دهد که افزایش حلالت و پراکندگی گرافن و مشتقاتش موجب افزایش زیست سازگاری می شود. با این حال اکسید گرافن با داشتن گروه های آبدوست اپوکسی، هیدروکسیل و اسیدی، زیست سازگاری قابل قبولی ارائه داده است. راهبرد تشکیل هیبرید گرافن و مشتقاتش با پلیمرها برای بهبود

² Brittleness

³ Wu

⁴ Signaling

¹ Biosensor



شده در این پژوهش است.

۲- فعالیت‌های تجربی

۱-۱- سنتز بتا تری کلسیم فسفات (B-TCP)

از میان روش‌های گوناگون و متنوعی که برای سنتز بتا تری کلسیم فسفات وجود دارد در این پژوهش از روش کمکی مایکروویو^۵ استفاده شد. این روش شامل استفاده از اشعه مایکروویو خانگی به منظور تسريع در روند پیرسازی^۶ و تولید پودر یکنواخت است به گونه ای که هر دو فاز پودری با هم ساخته می‌شوند[۱۸]. در ابتدا محلول یک مولار از هیدروکسید کلسیم و فسفریک اسید تهیه شد. برای سنتز، نسبت مولی $\text{Ca}/\text{P} = ۱/۵۱$ انتخاب شد. سپس، فسفریک اسید به صورت قطره قطره به محلول حاوی هیدروکسید کلسیم در حال گردش، اضافه شد. pH پی اچ توسط هیدروکسید سدیم و نیتریک اسید، در دمای اتاق در محدوده ۶ تنظیم شد. سپس نمونه به مدت ۴۵ دقیقه تحت عملیات پیرسازی درون مایکروویو قرار گرفت. سپس، رسوب با آب دیونیزه مورد شست و شو قرار گرفت و برای خشک شدن به مدت ۲۴ ساعت در آون با دمای ۹۰ درجه‌ی سانتی گراد قرار گرفت. درنهایت عملیات حرارتی در دمای ۹۰۰ برروی ماده انجام شد.

۲-۲- ساخت نانوذرات گرافن اکساید (GO)

از میان روش‌های گوناگون سنتز نانوذرات گرافن اکساید

گرافن اکساید نسبت دادند. اولاً گرافن اکساید با افزایش عملکرد آبدوستی سطح داربست، جذب پروتئین‌ها و القاکنده را افزایش می‌دهد، ثانیاً چسبندگی و تکثیر سلول‌های بنیادی مزانشیمی را بهبود می‌بخشد. اخیراً تولید نانوکامپوزیت هیدرورکسی آپاتیت و گرافن اکساید کاهش یافته، نشان داد که این ترکیب توانایی قابل توجه‌ای برای استخوان زایی دارد. لی^۱ و همکارانش با سنتز نانوهیدرورکسی آپاتیت روی گرافن اکساید، زیست سازگاری بیشتر سلول‌ها را گزارش کردند[۱۶]. همچنین زنگ^۲ و گروه تحقیقاتی اش نشان دادند، کامپوزیت هیدرورکسی آپاتیت و نانوپلیت‌های گرافن موجب بهبود خواص مکانیکی و زیستی ترکیب حاصل می‌شود[۱۷].

به طور کلی گرافن اکساید با بهبود خواص هدایت^۳ و القای^۴ استخوانی عملکرد ترکیبات همراه را ارتقا می‌بخشد. به عنوان مثال استفاده از نانولوله‌های کربنی (CNT) که از روی هم قرارگیری صفحات گرافنی به صورت کروی، حاصل می‌شود و یا افزودن گرافن اکساید کاهش یافته، به سیمانی با پایه‌ی کلسیم سیلیکات، موجب بهبود خواص زیستی و مکانیکی سیمان‌های کامپوزیت گردیده است[۱۰]. موضوع مورد بررسی در این پژوهش، ساخت و مشخصه یابی سیمان استخوانی تقویت شده با نانوذرات گرافن اکساید است. تمرکز اصلی در بحث سیمان استخوانی، معطوف به تولید سیمان اسیدی، تحت نام کلی سیمان برآشیتی است. خواص فیزیکی، شیمیایی، مکانیکی و زیستی سیمان کامپوزیت، در محیط درون‌تنی و برون‌تنی از عوامل بررسی

¹ Li

² Zhang

³ Osteoconductivity

⁴ Osteoinductivity

⁵ Microwave assisted

⁶ Aging time



مانده پنج بار توسط ۷۵ ml از اسید کلریدریک ۱۰٪ شست و شو داده شد. لازم به ذکر است که عملیات رسوب گیری توسط ساتریفیوژ انجام شد. گرافیت اکساید با غلظت ۲ ۵mg/ml در آب دیونیزه حل شد و سپس به مدت ۲ ساعت توسط دستگاه اولتراسونیکیتور پرروب دار^۲ با دامنه ۷۵ و سیکل ۵/۰ سونیکیت شد. بدین ترتیب سوسپانسیون گرافن اکساید در آب به دست آمد.

برای ساخت سیمان کامپوزیت علاوه بر بتاتری کلسیم فسفات و گرافن اکساید از مونوکلسیم فسفات مونوهیدرات که به صورت آماده خریداری شد، استفاده گردید. دو فاز کلسیم فسفاتی سیمان استخوانی به نسبت مولی مشخص درصدهای وزنی مشخص گرافیت اکساید (۰/۰ - ۰/۵٪) - (۰/۲ - ۰/۵٪) پس از وزن کشی به فاز سیمان اضافه شدند. سپس فاز مایع محتوی سیتریک اسید به فاز پودری که قبلاً به خوبی مخلوط شده بود، اضافه گردید. فاز مایع و پودری به مدت یک دقیقه به خوبی با هم مخلوط شد و برای آزمایش‌های بعدی سریعاً به قالب تفلونی برای گیرش نهایی ریخته شد.

۳-۲- روش‌های ارزیابی

۱-۳-۲- پراش پرتو ایکس^۳ (XRD)

شناخت فازهای موجود در پودر سنتز شده به وسیله تکنیک پراش پرتو ایکس صورت گرفت. الگوهای پراش پرتو ایکس با استفاده از دستگاه پراش سنج مدل D5000 ساخت شرکت SIEMENS با پرتو CuKa به طول موج

روش اصلاح شده هامر^۱ برای این منظور انتخاب شد. اسید سولفوریک ۹۸٪ به حجم ۲۴ ml، سدیم نیترات به وزن ۵۰۰ mg و گرافیت به وزن ۲۵ mg به ارلن افزوده شد و متعاقباً محتويات ارلن به مدت ۳۰ دقیقه مورد هم خوردن قرار گرفت. سپس یک دماسنجد وارد مواد داخل ارلن شد و ارلن درون حمام آب و یخ و قرار گرفت. پرمنگنات پتاسیم به مقدار ۱۵۰۰ mg، به صورت ذره و طی مدت ۴۵ دقیقه به مواد افزوده شد. در طی این مرحله، رنگ محتويات ارلن از مشکی به یشمی تغییر پیدا کرد. پس از آن ظرف محتوی مواد درون حمام آب گرم قرار گرفت، و دمای همزن مغناطیسی طوری تنظیم شد که دمای حمام بر روی ۳۶°C درجه و دمای محتويات ارلن روی ۳۴°C ثابت بماند. ترکیبات حاصل به مدت ۳ روز دیگر در این دما مورد هم خوردن قرار گرفت. در پایان روز چهارم، دمای حمام آب گرم به ۷۰°C رسانده شد و متعاقباً آب دیونیزه در حجم ۷۵ ml به مواد اضافه شد. دمای دماسنجد به سرعت به ۹۵°C افزایش یافت و سپس کاهش پیدا کرد. پس از سپری شدن یک ساعت، حجم ۶۰ آب دیونیزه دو بار و در فواصل نیم ساعت در حالی که ارلن هنوز داخل حمام ۷۰°C قرار داشت به آن افزوده شد. نیم ساعت بعد یعنی پس از گذشت دو ساعت از اولین باری که آب به مواد افزوده شد، دمای حمام آب گرم به ۷۰°C رسانده شد و آب اکسیژنه در حجم ۲/۵ ml به آن اضافه شد. یک هفته بعد، رنگ محلول درون ارلن کاملاً شفاف شد و رسوب قهقهه‌ای رنگ در ته آن به وجود آمد. در این مرحله مایع شفاف رویی به آرامی جدا شد و رسوب باقی

² Probe-type ultrasonicator

³ X-ray diffraction

¹ Modified Hummer Method



متر در دقیقه (1mm/min) تنظیم شد. برای هریک از درصدهای سیمان به طور جداگانه چهار مرتبه این آزمون تکرار شد و نمودار تنش^۲ - کرنش^۳ نتایج با نرم افزار excel رسم شدند.

۴-۳-۲- تعیین زمان گیرش

زمان گیرش سیمان استخوانی توسط دستگاه ویکات تحت استاندارد ASTM به شماره‌ی C187-98 اندازه‌گیری شد (ASTM, 2004). به این منظور خمیر سیمان، به صورت استوانه‌ای در ابعاد 10×5 میلی متر قالب‌گیری شدند. زمان گیرش نهایی هنگامی حاصل می‌شود که در شرایط رطوبت ۱۰۰٪ و دمای ۳۷ درجه‌ی سانتی‌گراد، سوزن دستگاه، متصل به وزنه‌ی ۳۰۰ گرمی بیشتر از ۱ میلی متر در سیمان نفوذ نکند. قطر سوزن دستگاه یک میلی‌متر است. دستگاه ویکات مورد استفاده ساخت شرکت آزمون، کشور ایران بود. این آزمایش برای هر نمونه سه مرتبه تکرار شد و میانگین نتایج حاصل گزارش شد.

پس از گیرش نهایی، نمونه‌های سیمان در ابعاد 12×6 میلی متر به شکل استوانه، در محلول PBS قرار داده شدند. سپس نمونه‌ها برای خشک شدن ۲۴ ساعت در زیر هود قرار داده شدند و وزن نمونه‌های خشک و خیس با ترازو اندازه‌گیری شد. طبق معادلات تخلخل نمونه‌ها به روش تبخیر آب^۴ اندازه‌گیری شد.

$$\rho = \frac{m}{v}$$

که در این رابطه ρ چگالی محلول PBS، m وزن نمونه‌ی

۱/۵۴۰.۵۱ و ولتاژ شتاب دهنده‌ی ۳۵ kv در محدوده ۲۰ تا ۷۰ با طول ۰،۰۲ گام تهیه شد. داده‌های به دست آمده توسط نرم افزار Excel رسم شد.

۲-۳-۲- میکروسکوپ نیروی اتمی (AFM)^۱

در این پژوهش برای بررسی خواص و ساختار سطحی گرافن اکساید از میکروسکوپ نیروی اتمی استفاده شد. برای این منظور گرافن اکساید رقیق شده در محلول دی کلرومتان (۱۰ میلی گرم بر میلی لیتر)، بر روی طلق نسوز نهشین شد و تصاویر با استفاده از میکروسکوپ نیروی (AFM, Nanoscope III Multimode, VEECO) به ثبت رسید.

جهت بررسی ساختار سیمان و نیز ارزیابی شکل و مورفولوژی سلول‌های کشت شده بر روی نمونه‌ها تهیه از دستگاه میکروسکوپ الکترونی روبشی (SEM) روبشی مدل ALS2100 ساخت شرکت SERON کره جنوبی به همراه پوشش طلا استفاده شد.

۲-۳-۳- خواص مکانیکی سیمان

جهت بررسی خواص مکانیکی سیمان‌ها از دستگاه Santam Tensile/ Comperssion ساخت شرکت استفاده شد. برای این منظور درصدهای مختلف سیمان استخوانی در قالب استوانه‌ای به ابعاد 12×6 میلی متر ساخته شدند. سپس به مدت بیست و چهار ساعت در دمای ۳۷ درجه‌ی سانتی‌گراد، در محلول PBS قرار داده شدند و پس از آن در دمای اتاق خشک شدند. سپس در فک‌های بالا و پایین دستگاه قرار گرفتند. سرعت حرکت فک‌ها یک میلی

² Stress

³ Strain

⁴ Water evaporation

¹ Atomic force microscope



میلی متر، بر طبق این یافته، همه‌ی سیمان‌ها به مدت یک هفته مورد تیمار قرار گرفتند. پس از گذشت یک روز از زمان دانه پاشی، سلول‌ها توسط گلوتار آلدهید ۲/۵٪ فیکس شدند و پس از آبگیری با درجات صعودی الکل، مورد بررسی با میکروسکوپ الکترونی روبشی قرار گرفتند.

۷-۳-۲- آزمون بررسی فعالیت آلکالین

۲-۳-۲-۲- فسفاتاز^۲

در روزهای ۳ و ۷ ام بعد از کشت سلولی، میزان فعالیت آلکالین فسفاتاز سلول‌ها بر روی سیمان استخوانی با استفاده از کیت (abcam ab83369) سنجیده شد. این کیت حاوی بافر سنجش آلکالین فسفاتاز، pNPP^۳، آنزیم آلکالین فسفاتاز و stop solution است. تمامی مراحل از جمله آماده‌سازی نمونه‌ها، تهیه محلول استاندارد و روش خواندن طبق پروتوكل موجود در کیت، صورت گرفت.

۲-۳-۲-۳-۲- بررسی‌های درون‌تنی

برای این منظور، موش صحرایی ماده ۱۲۰ روزه با نژاد ویستار^۴ انتخاب شد. موش‌ها از مرکز پرورش حیوانات آزمایشگاهی انسیتو پاستور ایران خریداری شد. آن‌ها به طور تصادفی به دو گروه تقسیم شدند و در شرایط استاندار حیوان خانه (۱۲ ساعت روشنایی، ۱۲ ساعت تاریکی و دمای ۲۴ درجه سانتی گراد) مورد مراقبت قرار گرفتند. پروتکل این مطالعه مطابق اصول اخلاقی مورد تایید کمیته‌های بین‌المللی حمایت از حقوق حیوانات آزمایشگاهی، طراحی شد. موش‌ها توسط تزریق درون صفاتی کتابین (۱۰٪) و Zalikozin (۲٪) ساخت شرکت Alfasan، Woerden-

خیس و ۷ حجم مایع تبخیر شده است. سپس تخلخل نمونه‌ها با توجه به رابطه‌ی زیر محاسبه گردید:

$$\varphi(\%) = \frac{v}{V}$$

که در رابطه‌ی فوق Φ تخلخل نمونه و V حجم کلی استوانه است.

۲-۳-۲-۴- آزمون زیست فعالیت

برای بررسی زیست فعالی، سیمان‌های قالب گیری شده، پس از گیرش نهایی در بازه‌ی زمانی هفت و چهارده روز در دمای ۳۷ درجه‌ی سانتی گراد در محلول SBF^۱ که محیط سرم بدن را تقلید می‌کند، تیمار شدند. سپس به وسیله‌ی میکروسکوپ الکترونی برای بررسی‌های بعدی مطالعه شدند.

۲-۳-۲-۵- بررسی چسبندگی سلولی

در این پژوهش برای بررسی چسبندگی، سلول‌های MG63 روی درصدهای مختلف سیمان کامپوزیت دانه پاشی شدند. مطالعات کمی در مورد تاثیرات سیمان بر ارشیتی در محیط برون‌تنی برروی سلول‌ها صورت گرفته است. در این خصوص جمشیدی و همکارانش نشان دادند، که وجود دی کلسیم سیترات که یک ترکیب واسطه در سیمان‌های بر ارشیتی است، مانع چسبندگی سلولی در محیط برون‌تنی می‌شود. تیمار سیمان به مدت یک هفته با DMEM این ترکیب واسطه را از بین برد و با ظهور ذرات هیدروکسی آپاتیت، چسبندگی سلولی از روز شش آم به طور چشمگیری افزایش می‌یابد [۱۹].

پس از قالب گیری سیمان‌ها به شکل استوانه در ابعاد 3×1

² Alkaline phosphatase (ALP)
³ p-nitrophenyl phosphate (pNPP)

⁴ Rat vistar

¹ simulated body fluid



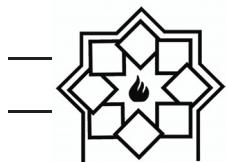
سترنز شده است. پیک $211 = 31.823^\circ$, پیک اصلی هیدروکسی آپاتیت و پیک $210 = 31.175^\circ$, پیک اصلی بتا تری کلسیم فسفات است [۱۹]. با توجه به الگوی به دست آمده، شدت پیک 210 نشان دهندهٔ غالب بودن فاز بتا تری کلسیم فسفات است. سترنز گرافن اکساید از گرافیت خالص به روش هامر اصلاح شده صورت گرفت. طیف XRD نشان دهندهٔ صحت اکسیداسیون گرافیت و تولید گرافیت اکساید است. همان طور که در شکل ۳-a مشخص است. پیک $2\theta = 26.8$ شاخصهٔ حضور گرافیت خالص است. در الگوی گرافیت اکساید شاهد تغییر پیک شاخص، به $12.9 = 2\theta$ هستیم. در طول اکسیداسیون گرافیت، گروههای عاملی اکسیژن دار روی سطح گرافیت ایجاد می‌شود. گروههای عاملی ایجاد شده در سطح و لبه‌های جانبی، باعث کاهش نیرروی واندروالسی صفحات می‌شوند و به این طریق لایه‌ها طی سونیکاسیون، راحت‌تر از یکدیگر جدا می‌شوند. برای مطالعه اندازه و مورفولوژی نانو صفحات گرافن اکساید، تصویر AFM نمونه روی طلق نسوز در شکل ۳-b مشاهده می‌شود. نانو صفحات اشکال نامنظم و اندازه جانبی متفاوتی را نشان می‌دهند. مقدار برابر با ضخامت $2-3 \mu\text{m}$ ($0.001 \mu\text{m}^2$)، بررسی داده‌های ارتفاع نشان دهندهٔ ضخامت $1/5$ نانومتری صفحات است. این است. طیف XRD نمونه‌های حاوی گرافن اکساید پس از ۲۴ ساعت قرارگیری در محلول PBS در دمای 37°C سانتیگراد، در شکل ۴ نشان داده شده است. داده‌ها نشان دهندهٔ حضور فاز مونیت در هردو نمونه است که علت عدمه آن جلوگیری از رشد فاز برآشیت به علت حضور اسید

Holland بیهوده شدند. ترکیب $2/0\%$ این دو ماده برای بیهوده‌ی به کار رفت. سپس توسط متنهٔ مخصوص جراحی دو حفره با قطر تقریبی 5 میلی متر در ناحیهٔ استخوان کاسه‌ی سر^۱ ایجاد شد، به طوری که لایه‌ی دوم پرده‌ی منثر دچار آسیب نشود. یکی از این حفره‌ها در هر موش با نمونهٔ سیمان استخوانی و دیگری با لخته‌ی خون خود موش (به عنوان کنترل) پر شد و محل برش جراحی، بخیه شد (شکل ۱). دو گروه آزمایشی شامل 2 موش با سیمان استخوانی 0% (بدون گرافن اکساید) و 2 موش دیگر با سیمان $0/5\%$ (حاوی $0/5\%$ گرافن اکساید) در نظر گرفته شدند. سپس موش‌ها به منظور ارزیابی‌های هیستوپاتولوژی، پس از مدت یک ماه توسط بیهوده‌ی استنشاقی، آسان‌کشی شدند. نمونه‌های استخوانی در محلول فرمالین 10% به منظور ثبیت قرار گرفتند و سپس کلسیم زدایی شدند. برش‌های بافتی تهیه شده با روش هماتوکسیلین-ائوزین رنگ آمیزی شدند و با میکروسکوپ الکترونی مورد مطالعه قرار گرفتند.

۳- نتایج و بحث

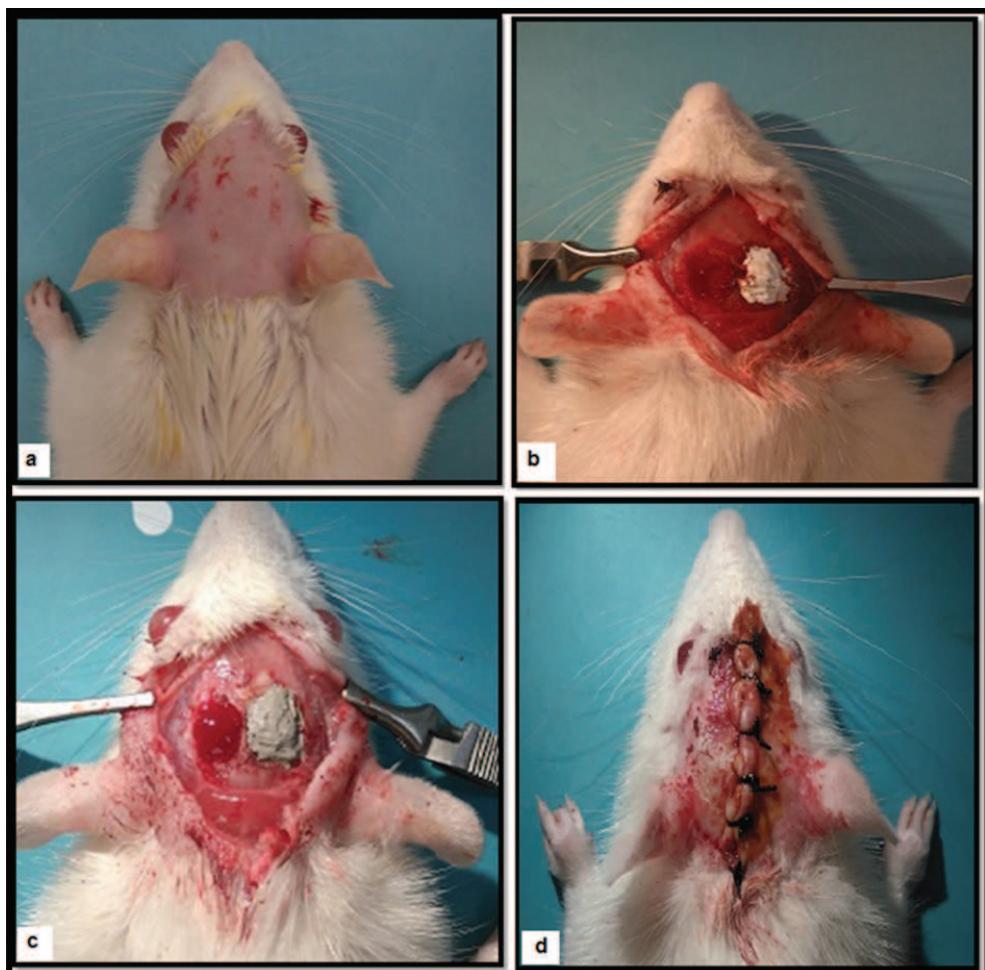
اولین مرحله از ساخت سیمان نانوکامپوزیت سترنز β -TCP با روش کمکی ماکروویو است. با مقایسهٔ الگوی استاندارد (JCPDS 09-0432) طیف هیدروکسی آپاتیت به شناسه‌ی و الگوی استاندارد طیف بتا تری کلسیم فسفات به شناسه‌ی (JCPDS 09-0169)، داده‌های XRD حاصل نشان می‌دهد که ذرات مذکور با موفقیت سترنز شده‌اند (شکل ۲). پیک‌های پراش تیز، نشان دهندهٔ بلورینگی بالای پودر

^۱ Skull

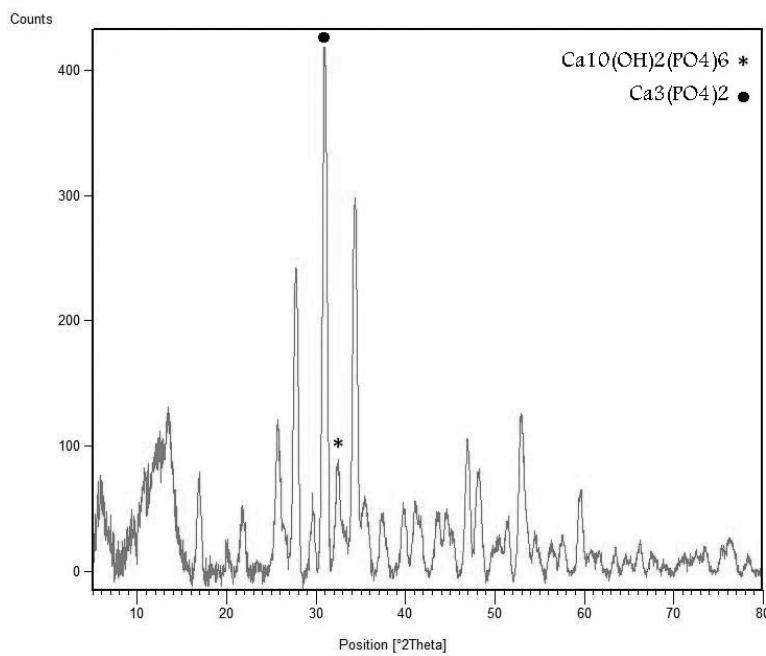
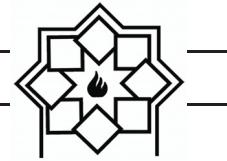


گرافن اکساید فاز ثانویه می‌باشد در حالی که در نمونه حاوی گرافن ۵٪ درصد وزنی فاز فرعی هیدروکسی آپاتیت است، به نظر می‌رسد که حضور گرافن اکساید جوانه زنی و رشد هیدروکسی آپاتیت را ترغیب کرده است.

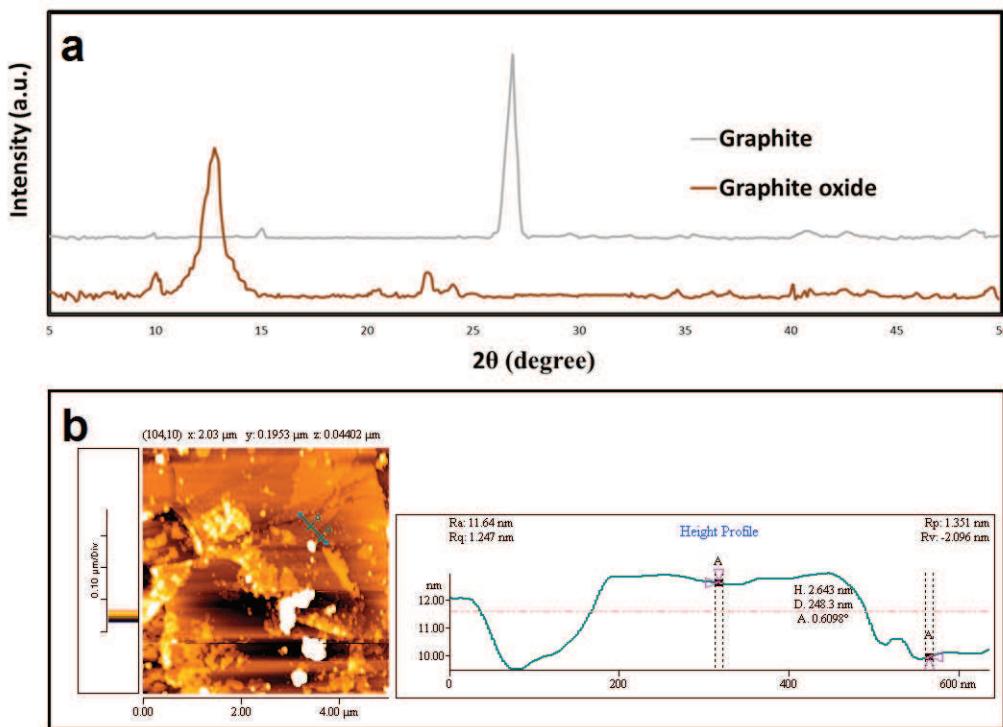
سیتریک است. اگرچه مونتیت فاز غالب سیمان است اما مطالعات قبلی نشان داده است حضور فاز مونتیت باعث بهبود خواص مکانیکی سیمان می‌شود [۲۰]. پس از مونتیت، کلسیم پیروفسفات ($\text{CaH}_2\text{P}_2\text{O}_7$) در نمونه سیمان بدون



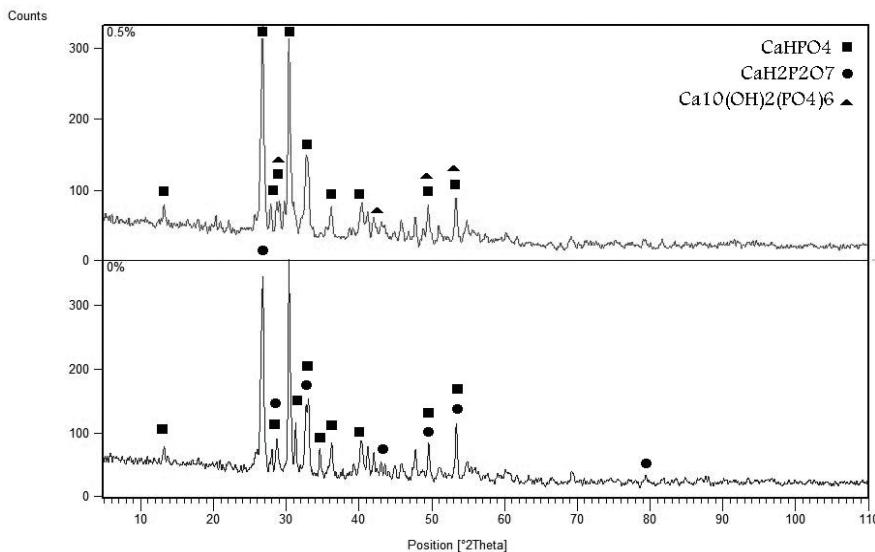
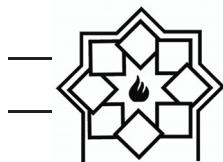
شکل ۱ - مراحل جراحی موش‌ها (a) تراشیدن کاسه سر (b) ایجاد حفره و کاشت سیمان بدون گرافن اکساید، (c) کاشت نمونه حاوی ۵٪ درصد گرافن اکساید و (d) بخیه محل کاشت



شکل ۲- الگوی XRD نمونه‌ی بتا تری کلسیم فسفات



شکل ۳- طیف XRD و تصویر AFM نانوصفحات گرافن اکساید



شکل ۴- الگوی پراش پرتو ایکس نمونه های ۰ و ۵/۰ درصد گرافن اکساید پس از قرار گیری در محلول PBS به مدت ۲۴ ساعت.

سیمان برآشیتی می شود. داده ها در جدول ۱ ارائه شده است. یکی از علل کاهش زمان گیرش سیمان همانطور که در منابع ذکر شده این است که جذب آب توسط گرافن اکساید باعث کاهش نسبت مایع به پودر می شود و همین مسئله باعث کاهش زمان گیرش می شود، از طرفی چون حضور فاز گرافن اکساید باعث جوانه زنی فاز آپاتیتی می شود می تواند به کاهش زمان گیرش کمک کند[۱۵].

جدول ۱- مقادیر پارامترهای مکانیکی، تخلخل و زمان گیرش مربوط به نمونه های حاوی مقادیر ۰، ۰/۵ و ۵ درصد گرافن اکساید

زمان گیرش (دقیقه)	تخلخل (%)	مذول یانگ (گیگاپاسکال)	استحکام فشاری (مگاپاسکال)	گرافن اکساید (%)
۰/۸ ± ۳۰	۶۱	۰/۴	۱۲	٪۰
۱/۴ ± ۲۶	۶۱	۰/۸	۴۰	٪۰/۵
۰/۹ ± ۲۳	۶۲	۰/۸	۴۲	٪۲
۱/۱ ± ۱۷	۶۳	۰/۰۴	۲	٪۵

۱-۳- نتایج آزمون زمان گیرش سیمان کامپوزیت

با افزایش درصد گرافن اکساید در سیمان، زمان گیرش کاهش پیدا کرد. به طوری که کاهش زمان گیرش از ۳۰ دقیقه به ۱۷ دقیقه با افزایش درصد وزنی گرافن اکساید از صفر درصد به پنج درصد را شاهد بودیم. به طور کلی می توان نتیجه گرفت که گرافن اکساید باعث کاهش زمان گیرش



بدین صورت از انتشار ترک جلوگیری می‌شود. با افزودن گرافن اکساید، نسبت سطح به حجم در سیمان افزایش می‌یابد که موجب انتقال موثرتر نیرو به گرافن می‌شود. به این طریق مقاومت سیمان کامپوزیت به تنفس وارد شده نیز افزایش می‌یابد. این بهمود تنهایاً در محدوده ای از درصد وزنی گرافن اکساید قابل مشاهده است. در نمونه‌ی حاوی ۵٪ وزنی، مقادیر منحنی تنفس به کرنش به طور قابل ملاحظه‌ای افت پیدا کرده است. زیرا با افزایش درصد وزنی گرافن اکساید، مقادیری از نانوذره که با سیمان وارد واکنش نشده است، مراکز غیریکنواختی را در سیمان کامپوزیت به وجود می‌آورند. نواحی غیریکنواخت، مراکز تجمع تنفس را به وجود می‌آورند و مقاومت کامپوزیت در صورت وارد شدن تنفس، در این نواحی ضعیفتر از سایر نواحی است.

جدول ۱ تاثیر افزودن گرافن اکساید بر مدول یانگ نمونه را نشان می‌دهد. همان‌طور که مشخص است بیشترین میزان مدول یانگ متعلق به نمونه‌های ۵٪ و ۲٪ وزنی گرافن اکساید است.

۴-۳- بررسی زیست فعالی

تصاویر FESEM سیمان کامپوزیت که در دو بازه‌ی زمانی ۷ و ۱۴ روز با SBF تیمار شده، با دو بزرگنمایی، به ترتیب در شکل ۶ و ۷ ارائه شده است. همان‌طور که مشخص است، ویژگی‌های سطحی با تغییر درصد گرافن اکساید، تفاوت کرده است. افزایش درصد گرافن اکساید موجب تقویت رشد هیدروکسی آپاتیت به شکل نانوصفحه^۲ شده است. در صورتی که رشد هیدروکسی آپاتیت روی سیمان کلسیم فسفاتی بدون گرافن اکساید به شکل کریستال‌های کرمی^۳ و یا کروی

² Nanosheet
³ Worm-like

۲-۳- تخلخل سنجی سیمان

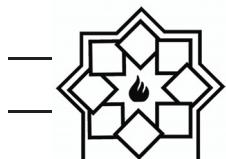
همانطور که ذکر شد، تخلخل سنجی با استفاده از روش جابجایی مایع انجام شد. نمونه‌ها قبل و بعد از قرارگیری در PBS وزن شدند و درصد تخلخل آن‌ها با استفاده از فرمول ذکر شده محاسبه شد.

باتوجه به نتایج ارائه شده در جدول ۱، درصد تخلخل نمونه‌ها تفاوت چشمگیری با یکدیگر ندارد و می‌توان نتیجه گرفت که تخلخل سیمان کلسیم فسفاتی با افزودن صعودی درصدهای گرافن اکساید، افزایش بسیار جزئی دارد.

۳-۳- خواص مکانیکی

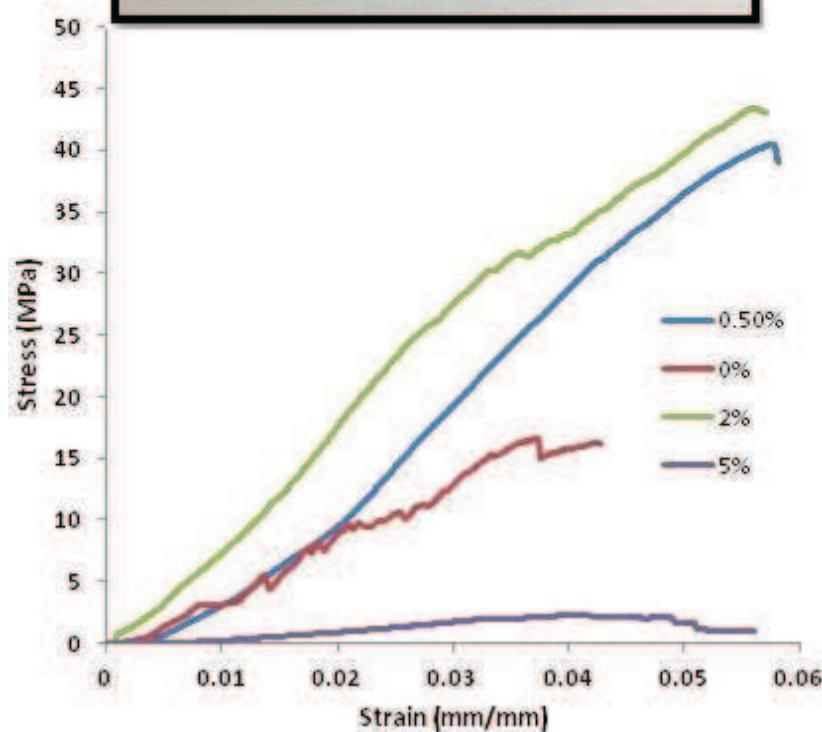
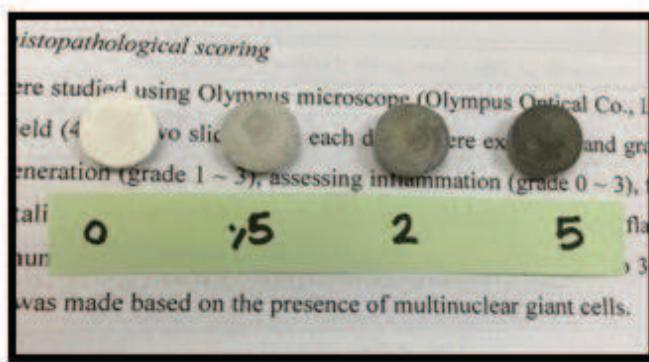
در شکل ۵ نمودار تنفس-کرنش درصدهای مختلف سیمان کامپوزیت مشاهده می‌شود. همان‌طور که مشخص است، با افزایش نیم و دو درصدی گرافن اکساید در سیمان، استحکام مکانیکی افزایش پیدا کرده و به ترتیب به ۴۰ و ۴۲ مگاپاسکال رسیده است، اما با افزایش گرافن اکساید به میزان پنج درصد، استحکام مکانیکی کاهش چشمگیری یافته که با توجه به یافته‌هایی که از پژوهش‌های سایر محققین به دست آمده است، تمام ترکیبات سرامیکی که با مشتقات گرافنی ترکیب شده‌اند، تمایل کمتری به شکسته شدن دارند. این ویژگی در ارتباط با ساختار ترکیبات گرافنی است که به روش‌های گوناگون از واکنش‌های منجر به ترک در کامپوزیت جلوگیری می‌کنند [۱۰]. در پس این پدیده مکانیسم انحراف ترک^۱ پشنهد شده است به این معنی که ترک پس از رسیدن به فصل مشترک نانوذره و سیمان منحرف شده و از انرژی انتشار آن کاسته می‌شود و

¹ Crack Deflection

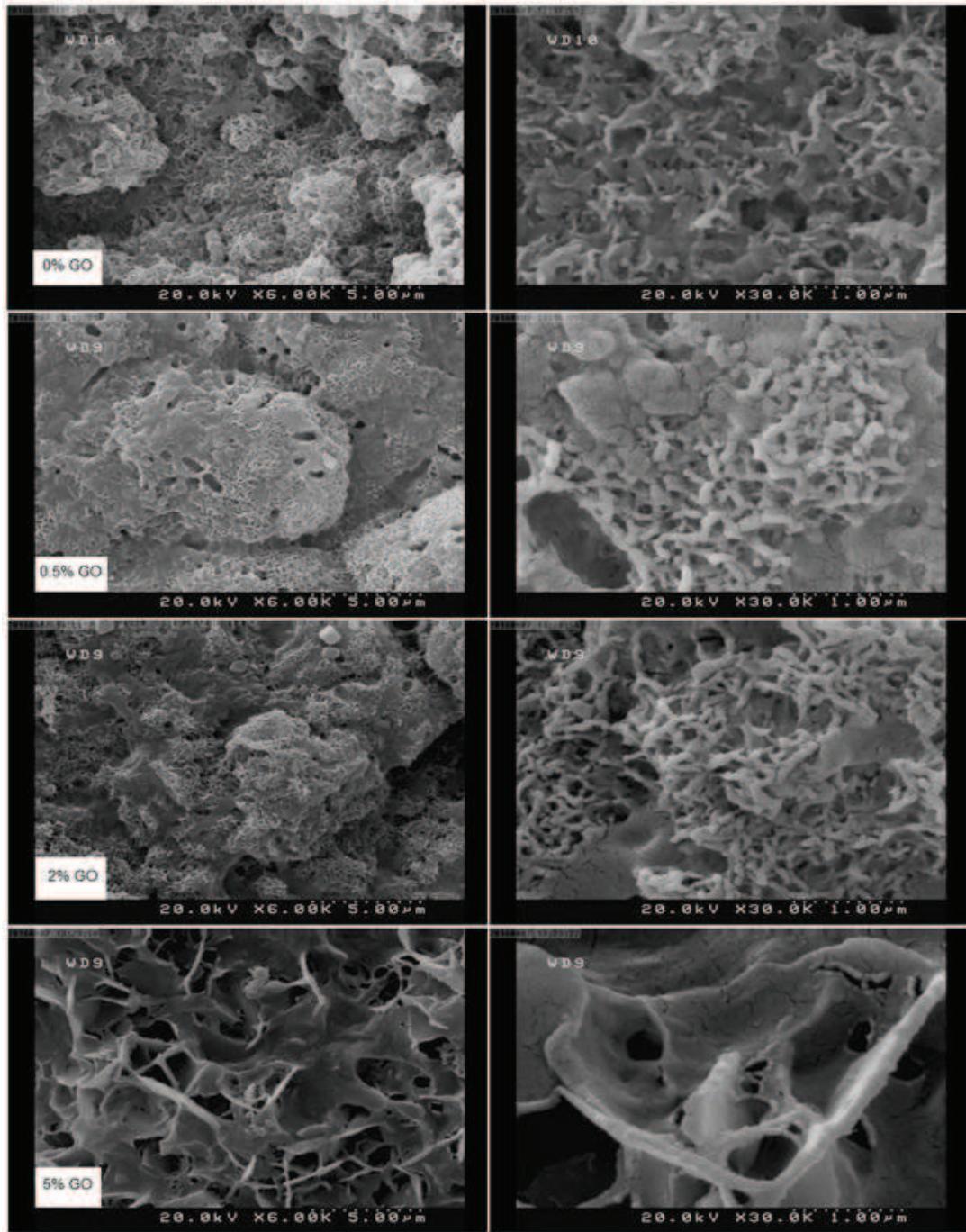


گذشت ۱۴ روز تیمار با SBF در مقایسه با نمونه‌های روز ۷ بیشتر است. به نظر می‌رسد ریزشکستگی‌های ایجاد شده به واسطه‌ی چروکیدگی و خشک شدن نمونه‌های خیس، در فضای آزاد باشد. آن چه مسلم است، اشاره به این نکته است که وجود گرافن اکساید در سیمان نه تنها، مانع تشکیل هیدروکسی آپاتیت نشده است، بلکه جوانه زنی رشد آن را تقویت کرده است.

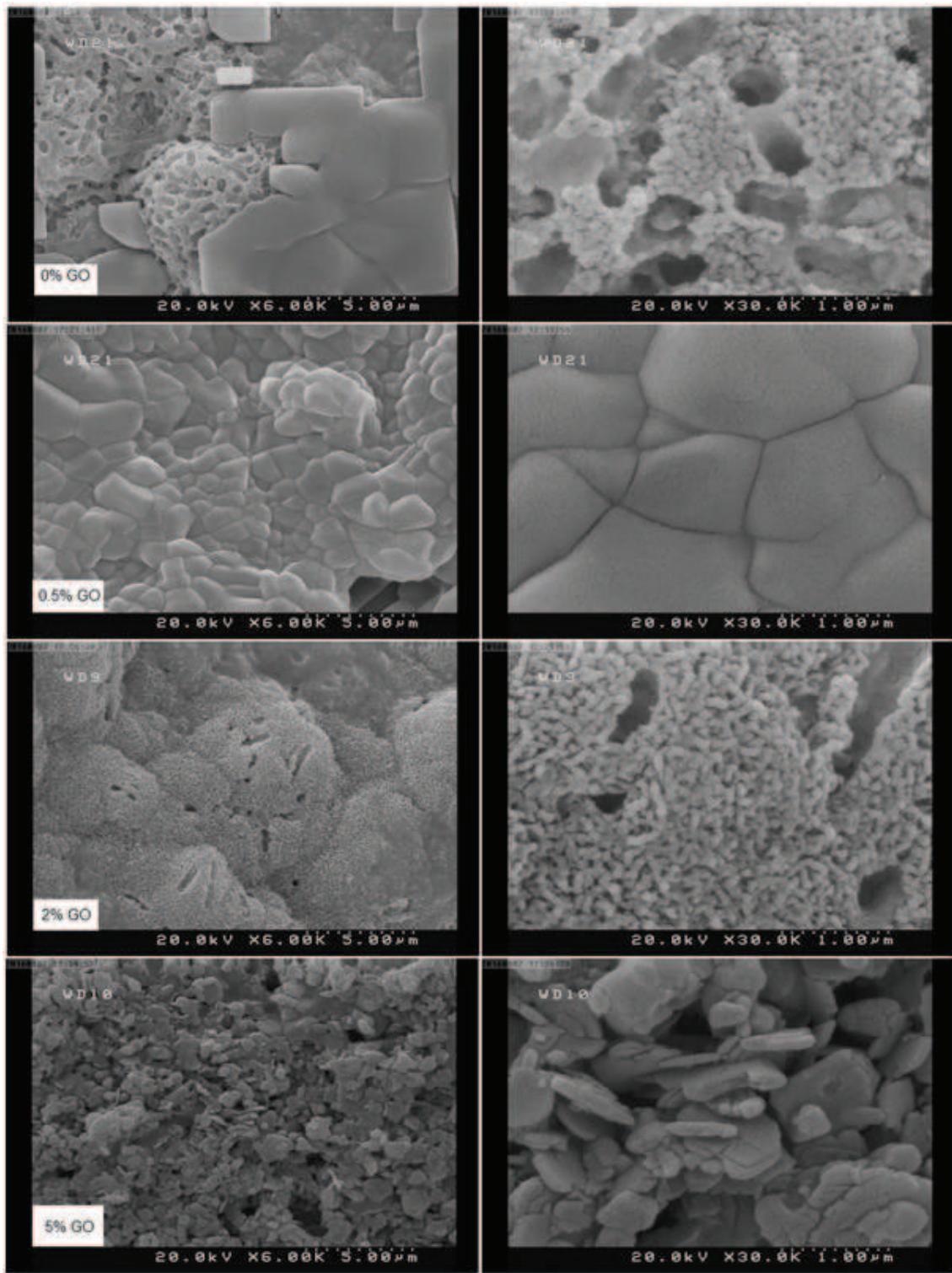
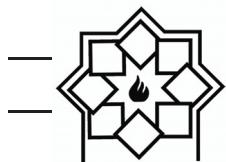
است. با افزایش درصد گرافن اکساید رشد هیدروکسی آپاتیت از فرم کروی به تدریج به سمت میله‌ای تغییر پیدا کرده است^[۱۰]. بعد از ۱۴ روز، لایه‌های هیدروکسی آپاتیت به صورت متراکم تری روی سطوح را فرا گرفته‌اند. به طور کلی نمونه‌های دارای گرافن اکساید تراکم و مقدار هیدروکسی آپاتیت بیشتری در مقایسه با نمونه‌های سیمان خالص دارند. همچنین تراکم هیدروکسی آپاتیت پس از



شکل ۵- نمودار منحنی تنش- کرنش سیمان کامپوزیت



شکل ۶- تصاویر FESEM از تشکیل هیدروکسی آپاتیت روی سیمان کامپوزیت در محلول SBF پس از گذشت ۷ روز



شکل ۷- تصاویر FESEM از تشکیل هیدروکسی آپاتیت روی سیمان کامپوزیت در محلول SBF پس از گذشت ۱۴ روز

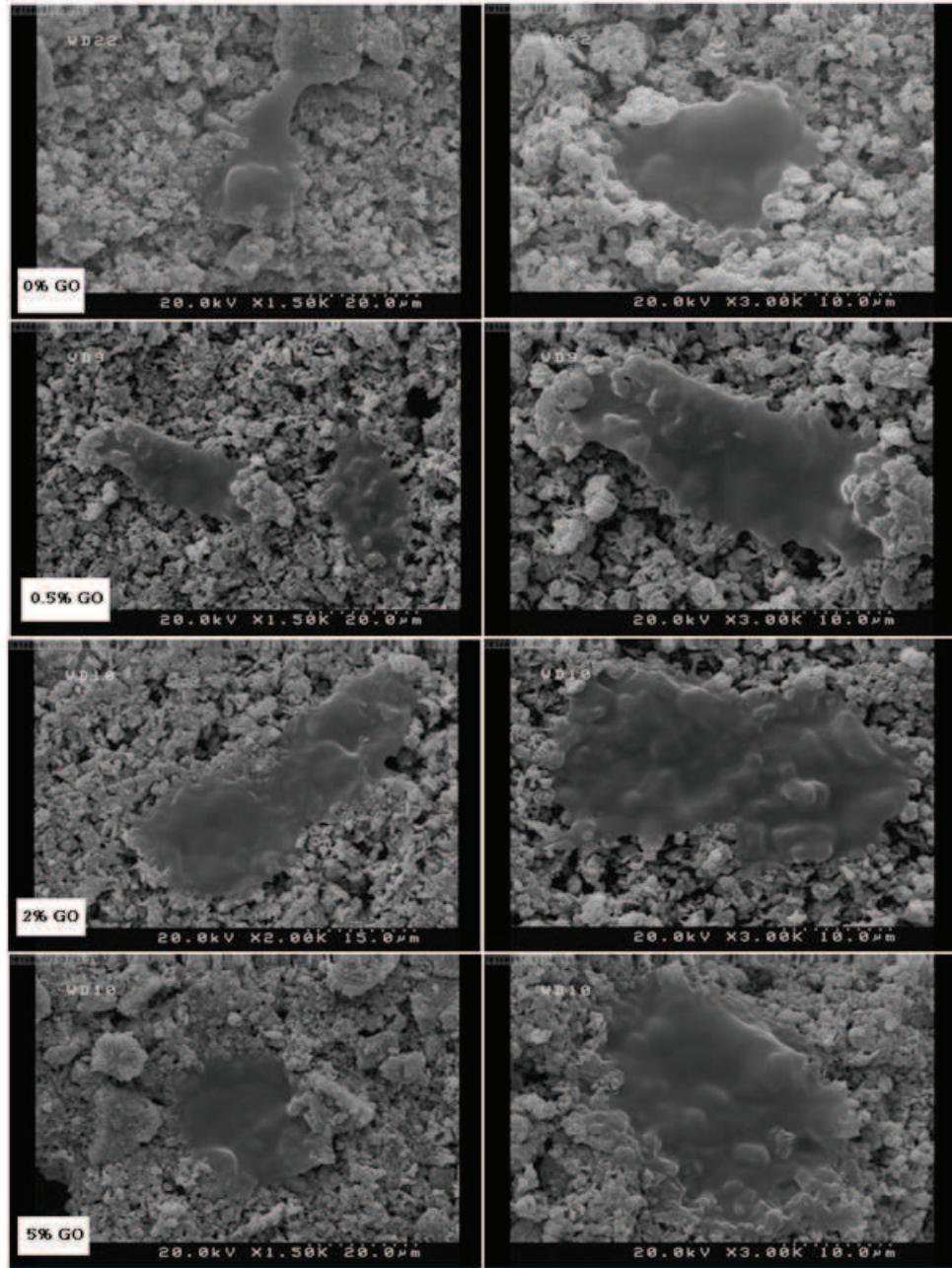


سلولی بر روی سطح نقش مهمی در تمایز استخوانی

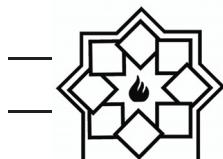
سلول‌ها در محیط بدن دارد.

۳-۵- ارزیابی‌های سلولی

تصاویر ارائه شده در شکل ۸ با دو بزرگنمایی، بررسی چسبندگی سلول‌ها روی سیمان کامپوزیت است. چسبندگی



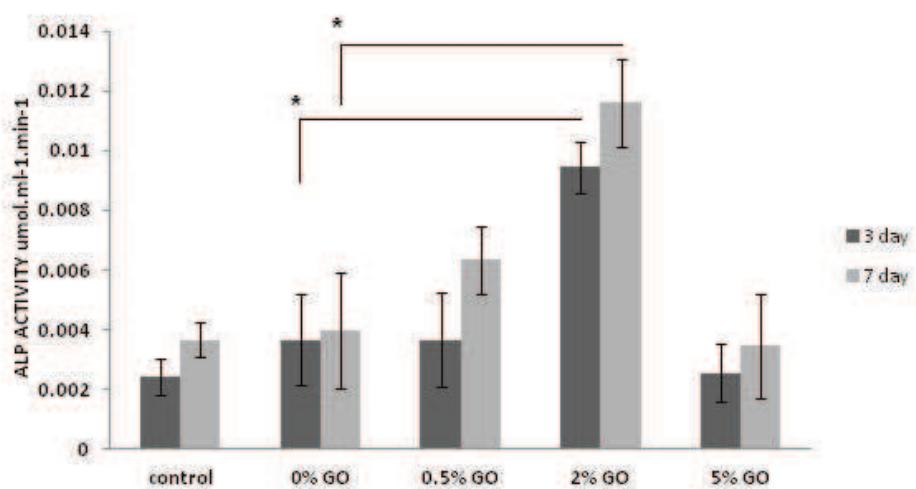
شکل ۸- تصاویر FESEM چسبندگی سلول‌های MG63 روی سطح سیمان کامپوزیت پس از گذشت ۱ روز



تخمین میزان فعالیت استئوبلاست‌ها، ترشح آلکالین فسفاتاز، آزمونی مهم است. در واقع فعالیت آنزیم آلکالین فسفاتاز نشانه‌ای از فعالیت تمایزی استئوبلاست‌ها است. در این پژوهه اندازه‌گیری فعالیت آنزیم آلکالین فسفاتاز با استفاده از سوبستراپ پارا نیترووفنیل فسفات صورت گرفت. این سوبستراپ تحت تأثیر آنزیم آلکالین فسفاتاز به پارانیترووفنل که یک ترکیب زرد رنگ است تبدیل می‌شود. این واکنش در حضور یون‌های Mg^{2+} که به عنوان گیرنده فسفات عمل می‌کند، انجام می‌شود. شدت رنگ تولید شده متناسب با فعالیت آنزیم است. نمودار فعالیت آنزیم آلکالین فسفاتاز در شکل ۹ نمایش داده شده است. همانطور که در نمودار مشخص است، میزان فعالیت آنزیم در روز ۷ نسبت به روز ۳، در تمامی نمونه‌ها افزایش داشته و این افزایش در نمونه حاوی ۲٪ گرافن اکساید مشهودتر است. به نظر می‌رسد کاهش فعالیت آنزیم در نمونه‌ی ۵٪ تاثیر سوء افزایش درصد وزنی گرافن اکساید باشد.

سیمان‌های براشیتی باید قبل از دانه پاشی سلول‌ها، به مدت یک هفته مورد تیمار با DMEM قرار بگیرند. با وجود اینکه چسبندگی سلول‌ها در محیط برون‌تنی در روزهای ابتدایی روی این نوع از سیمان‌ها ضعیف است، ولی این موضوع در محیط درون‌تنی مشکل عمدۀ ایجاد نمی‌کند و به نظر می‌رسد پویایی محیط بدن موجودات این مشکل را برطرف می‌کند [۱۹]. همان طور که در تصاویر مشخص است، در تمامی نمونه‌ها، پس از گذشت یک روز سلول‌ها توانسته‌اند به خوبی روی سطح قرار بگیرند و از حالت کروی خارج شوند. پهن شدگی سلول‌ها در تمامی نمونه‌ها حاکی از این است که درجات صعودی گرافن اکساید تاثیر مخربی بر چسبندگی سلولی ندارد.

آلکالین فسفاتاز به وسیله سلول‌های استئوبلاست تولید می‌شود. برخی معتقدند که این آنزیم در تخریب پیروفسفات معدنی مشارکت می‌کند تا یک غلظت موضعی کافی از فسفات یا پیروفسفات معدنی، به منظور فرایند معدنی شدن، فراهم نماید. در میان آزمون‌های زیستی مختلف برای



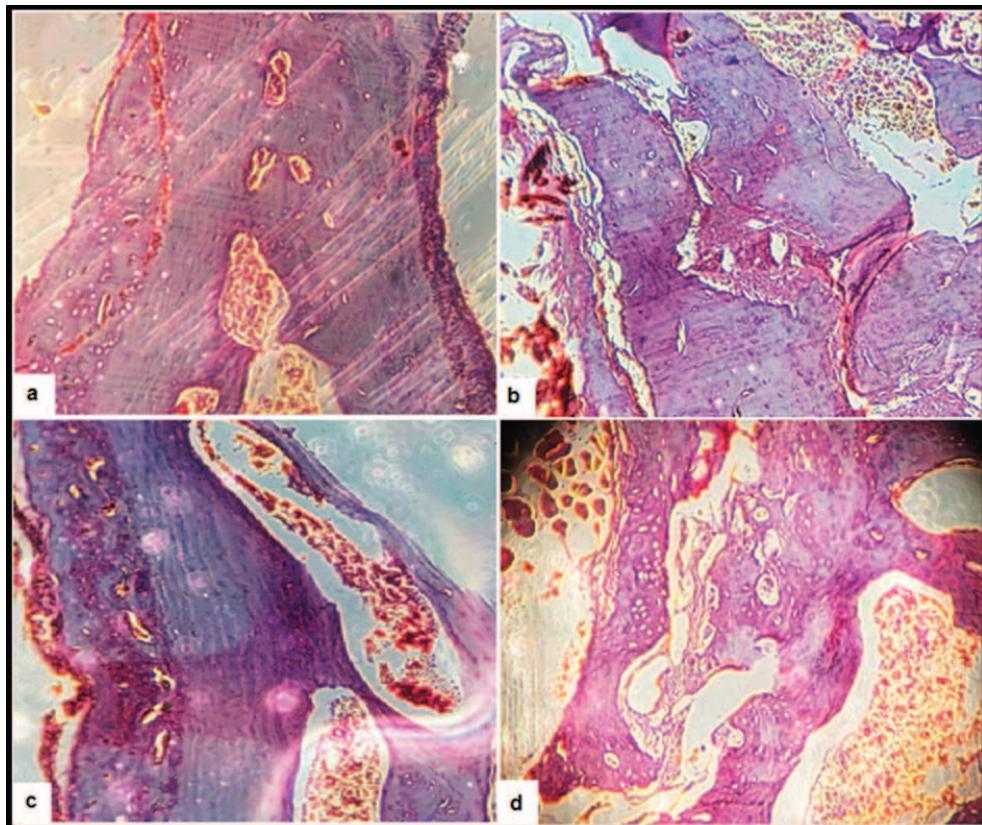
شکل ۹ - نمودار فعالیت آنزیم آلکالین فسفاتاز در دو بازه‌های زمانی سه و هفت روز



می باشد. در موش های گروه دوم ۰/۵٪ گرافن اکساید، استخوان متراکم اولیه در حال شکل گیری است و فضاهای بین استخوان های نابالغ متراکمتر شده است. همچنین بافت استخوانی تازه تشکیل شده از تراکم بیشتری، نسبت به گروه سیمان ۰٪ برخوردار است. در هر دو گروه حفره های خالی که به عنوان شاهد در نظر گرفته شده بود، متشکل از استخوان های نابالغ و لاملا ر بود. این در حالی است که در نقیصه های پرشده با سیمان، استخوان نابالغ کمتر مشاهده شد و عمدتاً شاهد حضور استخوان لاملا ر بودیم (شکل ۱۰).

۶-۳- بررسی های درون تنی

در حین عمل جراحی و در طول مدت زمان نگهداری موش ها هیچ گونه مرگی مشاهده نشد. در ارزیابی هیستوپاتولوژی نشانه ای از التهاب در هیچ یک از گروه ها مشاهده نشد. ارزیابی جایگاه ترمیم با رنگ آمیزی هماتوکسیلین - ائوزین، پس از یک ماه در موش های گروه ۰٪ گرافن اکساید، نشان داد که نقیصه ای ایجاد شده به وسیله ای استخوان نابالغ پرشده است. استخوان تازه تشکیل شده نابالغ در محل اتصال آن با استخوان قدیمی، توسط استخوان تیغه ای اولیه در حال جایگزینی



شکل ۱۰- رنگ آمیزی هماتوکسیلین - ائوزین نمونه های استخوانی. (a, b) نقیصه پرشده با سیمان ۰٪ گرافن اکساید. (c, d) نقیصه پرشده با سیمان ۵٪ گرافن اکساید



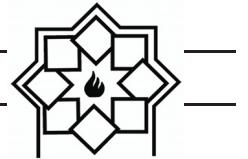
- matrix scaffolds. Annual review of biomedical engineering, 13, 27-53,2011.
- [3] URIST, M. R., DELANGE, R. J. & FINERMAN, G. Bone cell differentiation and growth factors. *Science*, 220, 680-686, 1983.
- [4] LANZA, R., LANGER, R. & VACANTI, J. P. Principles of tissue engineering ,Academic press, 2011.
- [5] DRIESSENS, F., BOLTONG, M., BERMUDEZ, O., PLANELL, J., GINEBRA, M. & FERNANDEZ, E. Effective formulations for the preparation of calcium phosphate bone cements. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, 5, 164-17,1994.
- [6] PALMER, I., NELSON, J., SCHATTON, W., DUNNE, N. J., BUCHANAN, F. J. & CLARKE, S. A. Biocompatibility of calcium phosphate bone cement with optimized mechanical properties. *Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials*, 104, 308-315,2016.
- [7] WANG, P., ZHAO, L., LIU, J., WEIR, M. D., ZHOU, X. & XU, H. H. Bone tissue engineering via nanostructured calcium phosphate biomaterials and stem cells. *Bone research*, 2, 14017,2014.
- [8] YANG, Q., TROCZYNSKI, T. & LIU, D.-M. Influence of apatite seeds on the synthesis of calcium phosphate cement. *Biomaterials*, 23, 2751-2760,2002.
- [9] LIU, J., CUI, L. & LOSIC, D. 2013a. Graphene and graphene oxide as new nanocarriers for drug delivery applications. *Acta biomaterialia*, 9, 9243-9257,2013.
- [10] MEHRALI, M., MOGHADDAM, E., SHIRAZI, S. F. S., BARADARAN, S., MEHRALI, M., LATIBARI, S. T., METSELAAR, H. S. C., KADRI, N. A., ZANDI, K. & OSMAN, N. A. A. Synthesis, mechanical properties, and in vitro biocompatibility with osteoblasts of calcium silicate-reduced graphene oxide composites. *ACS applied materials & interfaces*, 6, 3947-3962,2014.

۴- نتیجه‌گیری

در این پژوهش، سیمان استخوانی کلسیم فسفاتی با ترکیب دو جز پودری بتا تری کلسیم فسفات و مونوکلسیم فسفات مونوهیدرات با نسبت‌های مشخص با موفقیت در آزمایشگاه تهیه شد. افزودن مقادیر مشخص از گرافن اکساید سنتز شده به فاز سیمان تهیه شده و بررسی تأثیرات آن بر روی خواص مکانیکی، فیزیکی و بیولوژیکی سیمان نشان داد که گرافن اکساید تا درصد مشخصی (۲درصد) باعث افزایش استحکام مکانیکی سیمان شد و علاوه بر این زمان گیرش سیمان کوتاه‌تر، درحالیکه تخلخل سیمان تغییر محسوسی نداشت. درکنار بهبود خواص زیست فعالی، افزایش گرافن اکساید خواص زیستی سیمان نظیر استخوان زایی را افزایش داد و همچنین در مطالعات درون تنی باعث افزایش استخوان سازی و ایجاد استخوان مترافق در مقایسه با نمونه سیمان بدون گرافن شد. در مجموع، با توجه به تمامی آنالیزهای انجام شده در سیمان‌های نانوکامپوزیتی سنتز شده، می‌توان نتیجه گرفت که این سیمان‌ها به دلیل بهبود خواص مکانیکی و زیستی، کاندید مناسبی در مهندسی بافت استخوان و جراحی‌های ارتوپدی به عنوان پرکننده به شمار می‌آیند.

مراجع

- [1] BUDDECKE JR, D., LILE, L. N. & BARP, E. A. Bone grafting. Principles and applications in the lower extremity. *Clinics in podiatric medicine and surgery*, 18, 109-45, 2001.
- [2] BADYLAK, S. F., TAYLOR, D. & UYGUN, K. Whole-organ tissue engineering: decellularization and recellularization of three-dimensional



- BAKHSI, F. & AMINIAN, A. Synthesis and characterization of hydroxyapatite/ β -tricalcium phosphate nanocomposites using microwave irradiation. *Ceramics International*, 37, 65-71, 2011.
- [19] JAMSHIDI, P., BRIDSON, R. H., WRIGHT, A. J. & GROVER, L. M. 2013. Brushite cement additives inhibit attachment to cell culture beads. *Biotechnology and bioengineering*, 110, 1487-1494.
- [20] Şahin E, Çiftçioğlu M. Monetite promoting effect of citric acid on brushite cement setting kinetics. *Materials Research Innovations*, 18, 138-145, 2014.
- [11] ZHANG, W., GUO, Z., HUANG, D., LIU, Z., GUO, X. & ZHONG, H. Synergistic effect of chemo-photothermal therapy using PEGylated graphene oxide. *Biomaterials*, 32, 8555-8561, 2011.
- [12] NAIR, M., NANCY, D., KRISHNAN, A. G., ANJUSREE, G., VADUKUMPULLY, S. & NAIR, S. V. Graphene oxide nanoflakes incorporated gelatin-hydroxyapatite scaffolds enhance osteogenic differentiation of human mesenchymal stem cells. *Nanotechnology*, 26, 161001, 2015.
- [13] NISHIDA, E., MIYAJI, H., TAKITA, H., KANAYAMA, I., TSUJI, M., AKASAKA, T., SUGAYA, T., SAKAGAMI, R. & KAWANAMI, M. Graphene oxide coating facilitates the bioactivity of scaffold material for tissue engineering. *Japanese Journal of Applied Physics*, 53, 06JD04, 2014.
- [14] XIE, X., HU, K., FANG, D., SHANG, L., TRAN, S. D. & CERRUTI, M. Graphene and hydroxyapatite self-assemble into homogeneous, free standing nanocomposite hydrogels for bone tissue engineering. *Nanoscale*, 7799-8004, 2015.
- [15] WU, C., XIA, L., HAN, P., XU, M., FANG, B., WANG, J., CHANG, J. & XIAO, Y. Graphene-oxide-modified β -tricalcium phosphate bioceramics stimulate in vitro and in vivo osteogenesis. *Carbon*, 93, 116-129, 2015.
- [16] LEE, J. H., SHIN, Y. C., LEE, S.-M., JIN, O. S., KANG, S. H., HONG, S. W., JEONG, C.-M., HUH, J. B. & HAN, D.-W. Enhanced osteogenesis by reduced graphene oxide/hydroxyapatite nanocomposites. *Scientific reports*, 5, 2015.
- [17] ZHANG, L., LIU, W., YUE, C., ZHANG, T., LI, P., XING, Z. & CHEN, Y. A tough graphene nanosheet/hydroxyapatite composite with improved in vitro biocompatibility. *Carbon*, 61, 105-115, 2013.
- [18] FARZADI, A., SOLATI-HASHJIN, M.,