

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 ژنتیک و زیست فناوری، تهران، ایران
^۲ مرکز تحقیقات و توسعه سزان، پارک فناوری پردیس، تهران، ایران

* shafiei@nigeb.ac.ir

اطلاعات مقاله:

دریافت: ۳ بهمن ۱۳۹۷
 پذیرش: ۱۶ اردیبهشت ۱۳۹۸

کلید واژه:

گرافن اکساید، سیمان کلسیم فسفاتی، استخوان زایی.

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 و بیستار بررسی شد. سیمان کلسیم فسفاتی از نوع برآشیتی از مخلوط کردن پودر بتا تری کلسیم فسفات و مونوکلسیم فسفات مونو هیدرات تهیه شد. افزودن گرافن اکساید در غلظت‌های ۰، ۰/۵، ۲ و ۵ درصد وزنی به فاز سیمان کلسیم فسفاتی باعث کاهش زمان گیرش و افزایش قابل توجه استحکام مکانیکی (۲ درصد وزنی) شد. همچنین رشد بلورهای جدید آباتیتی پس از قرارگیری نمونه‌ها در محلول شبیه سازی شده بدن به مدت ۷ و ۱۴ روز مشاهده شد که حاکی از زیست فعالی نمونه‌های تقویت شده با گرافن است. تصاویر میکروسکوپ الکترونی روبشی 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 نتیجه 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.

۱- مقدمه

طولانی 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

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



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، باز شکل‌گیری 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 غیرمتحد و عفونت این چرخه‌ی طبیعی را مختل می‌کنند و به این طریق ضایعه‌ی ایجاد شده به طور کامل بهبود نمی‌یابد [۲ و ۳]. امروزه راه حل‌های زیادی 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 ۷۰-۶۰٪ آن را تشکیل می‌دهد. این بخش عمدتاً شامل ترکیبات کلسیم فسفاتی در مقیاس نانو است. بنابراین مواد کلسیم فسفاتی می‌تواند به عنوان

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 عمده آنها استحکام کم آنهاست و از این رو کاربرد آنها به نواحی غیر متحمل بار نظیر نقایص فکی-جمجمه‌ای محدود می‌شود [۵ و ۶]. 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



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

در این میان، نانو ذرات گرافن و مشتقاتش به دلیل خواص فیزیکی و زیستی ویژه، توجه محققین بسیاری را به خود جلب کرده‌اند. با توجه به ساختار منحصر بفرد و هندسی این ماده، می‌توان 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 آل در زمینه‌های مختلف، مانند؛ فیزیک کوانتوم، نانوالکترونیک، تحقیقات انرژی، تجزیه و مهندسی نانوکامپوزیت‌ها و موارد زیستی معرفی می‌کند [۹].

جهت استفاده از گرافن و اکسید گرافن در کاربردهای بالینی بسیاری از گزارش‌ها نشان می‌دهد که گرافن و سازه ترکیبی از مشتقات گرافنی برای حمل دارو، بیوسنسورها و مهندسی بافت استخوان سمیت کمی از خود نشان داده‌اند. در سال‌های اخیر استفاده از ترکیبات گرافنی مانند گرافن اکساید (GO)، نانوپلیت‌های گرافن (GNPs) و گرافن اکساید کاهش یافته (rGO) برای تقویت عملکرد مکانیکی سرامیک‌ها مورد توجه قرار گرفته است [۱۰]. مطالعات نشان می‌دهد که افزایش حلالیت و پراکندگی گرافن و مشتقاتش موجب افزایش زیست سازگاری می‌شود. با این حال اکسید گرافن با داشتن گروه‌های آبدوست اپوکسی، هیدروکسیل و اسیدی، زیست سازگاری قابل قبولی ارائه داده است. راهبرد تشکیل هیبرید گرافن و مشتقاتش با پلیمرها برای بهبود

زیست سازگاری مورد توجه قرار گرفته که در نهایت موجب افزایش زیست سازگاری و کاهش سمیت شده است. علاوه بر این وجود لایه‌های نازک گرافنی در غلظت‌های 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 گسترده برای اصلاح نانولوله‌ها و گرافن و دیگر نانومواد در طراحی سیستم دارورسانی استفاده شده است [۱۱]. همچنین با استفاده از ۵/۰٪ - ۱٪ وزنی گرافن اکساید در داربست ژلاتین-هیدروکسی آپاتیت، خواص مکانیکی و تمایز استخوانی داربست بهبود یافت. به طوری که بدون وجود محیط تمایزی سلول‌های بنیادی به استخوان تمایز پیدا کردند. همچنین داربست دارای گرافن اکساید تردی^۲ کمتری نسبت به داربست بدون گرافن اکساید از خود نشان می‌دهد [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 داربست‌ها 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 سلول‌های بنیادی مغز استخوان بوده است [۱۵]. دانشمندان چینی رفتار مطلوب داربست گرافن اکساید و PLGA (poly lactic-co- glycolic acid) را به دو خاصیت مهم

² Brittleness

³ Wu

⁴ Signaling

¹ Biosensor



گرافن اکساید نسبت دادند. اولاً گرافن اکساید با افزایش عملکرد آبدوستی سطح داربست، جذب پروتئین‌ها و القاکننده را افزایش می‌دهد، ثانیاً چسبندگی و تکثیر سلول‌های بنیادی مزانشیمی را بهبود می‌بخشد. اخیراً تولید نانوکامپوزیت هیدروکسی آپاتیت و گرافن اکساید کاهش یافته، نشان داد که این ترکیب توانایی قابل توجه‌ای برای استخوان زایی دارد. لی^۱ و همکارانش با سنتز نانوهیدروکسی آپاتیت روی گرافن اکساید، زیست سازگاری بیشتر سلول‌ها را گزارش کردند [۱۶]. همچنین زنگ^۲ و گروه تحقیقاتی اش نشان دادند، کامپوزیت هیدروکسی 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 برایشیتی است. خواص فیزیکی، شیمیایی، مکانیکی و زیستی سیمان کامپوزیت، در محیط درون‌تنی و برون‌تنی از عوامل بررسی

شده در این پژوهش است.

۲- فعالیت‌های تجربی

۲-۱- سنتز بتا تری کلسیم فسفات (β-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 اشعه‌ی مایکروویو خانگی به منظور تسریع در روند پیرسازی^۶ و تولید پودر یکنواخت است به گونه‌ای 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 $\text{Ca/P} = 1/51$ 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. در نهایت عملیات حرارتی در دمای ۹۰۰ برروی ماده انجام شد.

۲-۲- ساخت نانوذرات گرافن اکساید (GO)

از میان روش‌های گوناگون سنتز نانو ذرات گرافن اکساید

¹ Li

² Zhang

³ Osteoconductivity

⁴ Osteoinductivity

⁵ Microwave assisted

⁶ Aging time



روش اصلاح شده هامر^۱ برای این منظور انتخاب شد. اسید سولفوریک ۹۸٪ به حجم ۲۴ ml، سدیم نیترات به وزن ۲۵۰ mg و گرافیت به وزن ۵۰۰ mg به ارلن افزوده شد و متعاقباً محتویات ارلن به مدت ۳۰ دقیقه مورد هم خوردن قرار گرفت. سپس یک دماسنج وارد مواد داخل ارلن شد و ارلن درون حمام آب و یخ و قرار گرفت. پرمنگنات پتاسیم به مقدار ۱۵۰۰ mg، به صورت ذره ذره و طی مدت ۴۵ دقیقه به مواد افزوده شد. در طی این مرحله، رنگ محتویات 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 محتویات 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 دماسنج به سرعت به ۹۵°C افزایش یافت و سپس کاهش پیدا کرد. پس از سپری شدن یک ساعت، حجم ۶۰ ml 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 قهوه‌ای رنگ در ته آن به وجود آمد. در این مرحله مایع شفاف رویی به آرامی جدا شد و رسوب باقی

مانده پنج بار توسط ۷۵ ml از اسید کلریدریک ۱۰٪ شست و شو داده شد. لازم به ذکر است که عملیات رسوب گیری توسط سانتریفیوژ انجام شد. گرافیت اکساید با غلظت ۵ mg/ml در آب دیونیزه حل شد و سپس به مدت ۲ ساعت توسط دستگاه اولتراسونیکیتور پروب دار^۲ با دامنه ۷۵ و سیکل ۰/۵ 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 (MCPM/B-TCP = 45/55) وزن شدند و مخلوط شدند. درصدهای وزنی مشخص گرافیت اکساید (۰٪ - ۰/۵٪ - ۲٪ - 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.

۲-۳- روش‌های ارزیابی

۲-۳-۱- 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 CuKα به طول موج

^۲ Probe-type ultrasonicator

^۳ X-ray diffraction

^۱ Modified Hummer Method



۱/۵۴۰۵۱ و ولتاژ شتاب دهنده‌ی ۳۵ kv در محدوده ۲۰ تا ۵ 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 (۰/۱ میلی گرم بر میلی لیتر)، بر روی طلق نسوز ته نشین شد و تصاویر با استفاده از میکروسکوپ نیروی اتمی (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 Tensile/ Compression ساخت شرکت Santam استفاده شد. برای این منظور درصدهای مختلف سیمان استخوانی در قالب استوانه‌ای به ابعاد ۶×۱۲ 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

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.

۲-۳-۴- 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 ۱۰×۵ 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 ۱۲×۶ 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

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 گلوکار آلدهید ۲/۵٪ فیکس شدند و پس از آبیگری با درجات صعودی الکل، مورد بررسی با میکروسکوپ الکترونی روبشی قرار گرفتند.

۲-۳-۷- آزمون بررسی فعالیت آلکالین فسفاتاز^۲ ALP

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 پروتوکل موجود در کیت، صورت گرفت.

۲-۳-۸- بررسی‌های درون‌تنی

برای این منظور، موش صحرایی ماده ۱۲۰ روزه با نژاد ویستار^۴ انتخاب شد. موش‌ها از مرکز پرورش حیوانات آزمایشگاهی انستیتو پاستور ایران خریداری شد. آن‌ها به طور تصادفی به دو گروه تقسیم شدند و در شرایط استاندارد 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 صفاقی کتامین (۱۰٪) و زایلوزین (۲٪) ساخت شرکت Woerden- Alfasan،

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.

۲-۳-۵- آزمون زیست‌فعالی

برای بررسی زیست‌فعالی، سیمان‌های قالب‌گیری 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.

۲-۳-۶- 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 برآشیتی در محیط برون‌تنی بر روی سلول‌ها صورت گرفته است. در این خصوص جمشیدی و همکارانش نشان دادند، که وجود دی‌کلسیم سیترات که یک ترکیب واسطه در سیمان‌های برآشیتی است، مانع چسبندگی سلولی در محیط برون‌تنی می‌شود. تیمار سیمان به مدت یک هفته با DMEM این ترکیب واسطه را از بین برده و با ظهور ذرات هیدروکسی آپاتیت، چسبندگی سلولی از روز شش ام به طور چشمگیری افزایش می‌یابد [۱۹].

پس از قالب‌گیری سیمان‌ها به شکل استوانه در ابعاد ۳×۱

2 Alkaline phosphatase (ALP)

3 p-nitrophenyl phosphate (pNPP)

4 Rat vistar

¹ simulated body fluid



Holland بیهوش شدند. ترکیب ۰/۲٪ این دو ماده برای بیهوشی به کار رفت. سپس توسط مته‌ی مخصوص جراحی دو حفره با قطر تقریبی ۵ میلی متر در ناحیه‌ی استخوان کاسه‌ی سر^۱ ایجاد شد، به طوری که لایه‌ی دوم پرده‌ی مننژ دچار آسیب نشود. یکی از این حفره‌ها در هر موش با نمونه‌ی 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 ۲ موش با سیمان استخوانی ۰٪ (بدون گرافن اکساید) و ۲ موش دیگر با سیمان ۰/۵٪ (حاوی ۰/۵٪ گرافن اکساید) در نظر گرفته شدند. سپس موش‌ها به منظور ارزیابی‌های هیستوپاتولوژی، پس از مدت یک ماه توسط بیهوشی استنشاقی، آسان‌کشی شدند. نمونه‌های استخوانی در محلول فرمالین ۱۰٪ به منظور تثبیت قرار گرفتند و سپس کلسیم زدایی شدند. برش‌های بافتی تهیه شده با روش هماتوکسیلین-آئوزین رنگ آمیزی شدند و با میکروسکوپ الکترونی مورد مطالعه قرار گرفتند.

۳- نتایج و بحث

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

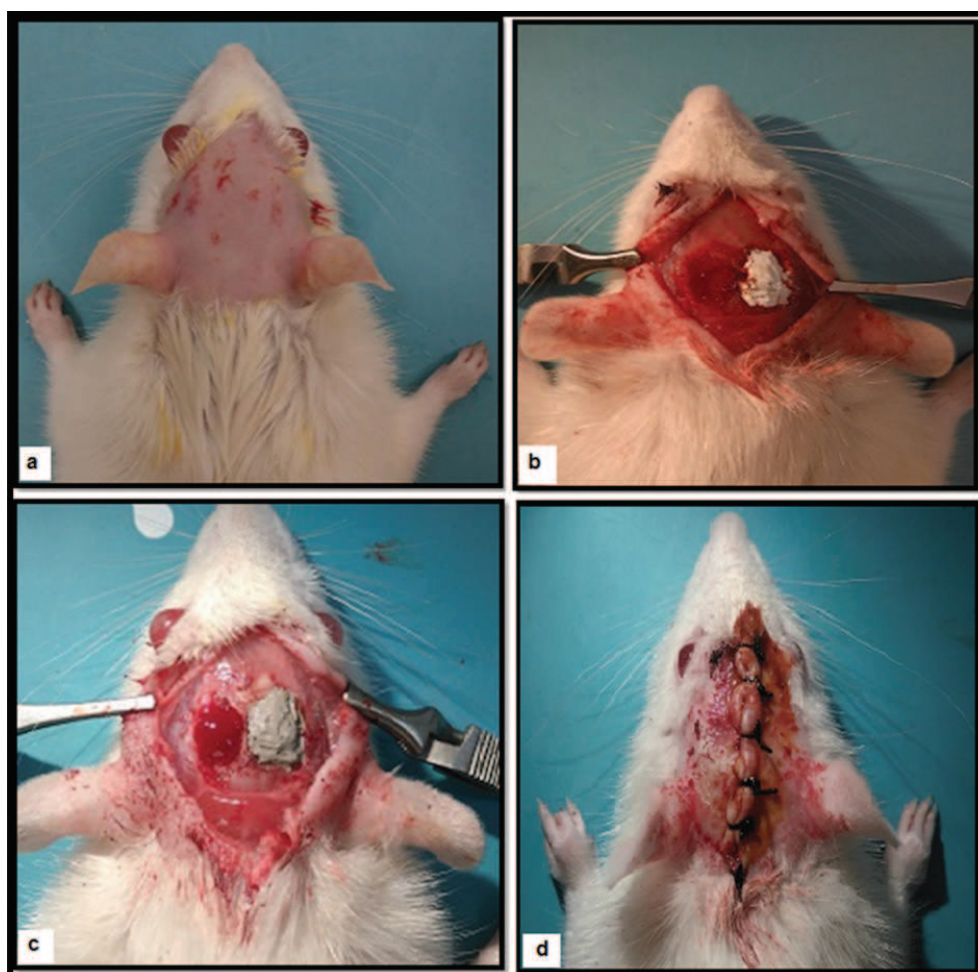
سنتز شده است. پیک ۲۱۱ در $2\theta = 31.823^\circ$ ، پیک اصلی هیدروکسی آپاتیت و پیک ۲۱۰ در $2\theta = 31.175^\circ$ ، پیک اصلی بتا تری کلسیم فسفات است [۱۹]. با توجه به الگوی به دست آمده، شدت پیک ۲۱۰ نشان دهنده‌ی غالب بودن فاز بتا تری کلسیم فسفات است. سنتز گرافن اکساید از گرافیت خالص به روش هامر اصلاح شده صورت گرفت. طیف XRD نشان دهنده‌ی صحت اکسیداسیون گرافیت و تولید گرافیت اکساید است. همان طور که در شکل ۳-a مشخص است. پیک $2\theta = 26.8^\circ$ شاخصه‌ی حضور گرافیت خالص است. در الگوی گرافیت اکساید شاهد تغییر پیک شاخص، به $2\theta = 12.9^\circ$ 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 نیروی 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. $(2\mu\text{m}^2 - 0.001\mu\text{m}^2)$. بررسی داده‌های ارتفاع نشان دهنده‌ی ضخامت ۳-۱/۵ نانومتری صفحات است. این مقدار برابر با ضخامت ۳-۲ لایه از صفحات گرافن اکساید است. طیف XRD نمونه‌های حاوی گرافن اکساید پس از ۲۴ ساعت قرارگیری در محلول PBS در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد، در شکل ۴ نشان داده شده است. داده‌ها نشان دهنده حضور فاز مونیتیت در هردو نمونه است که علت عمده آن جلوگیری از رشد فاز براشیت به علت حضور اسید

¹ Skull

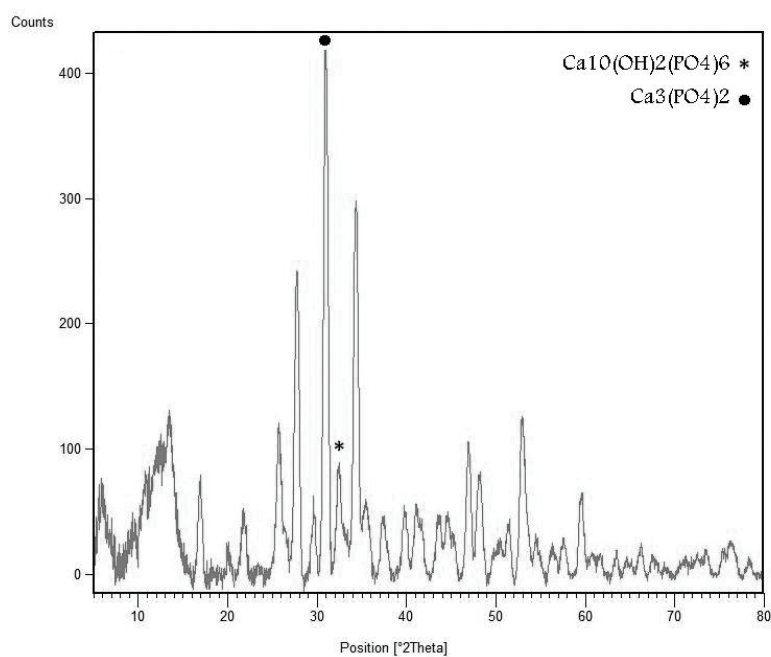
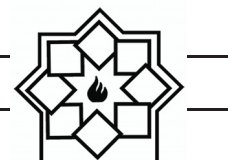


گرافن اکساید فاز ثانویه می باشد در حالی که در نمونه حاوی گرافن ۰/۵ درصد وزنی فاز فرعی هیدروکسی آپاتیت است، به نظر می رسد که حضور گرافن اکساید جوانه زنی و رشد هیدروکسی آپاتیت را ترغیب کرده است.

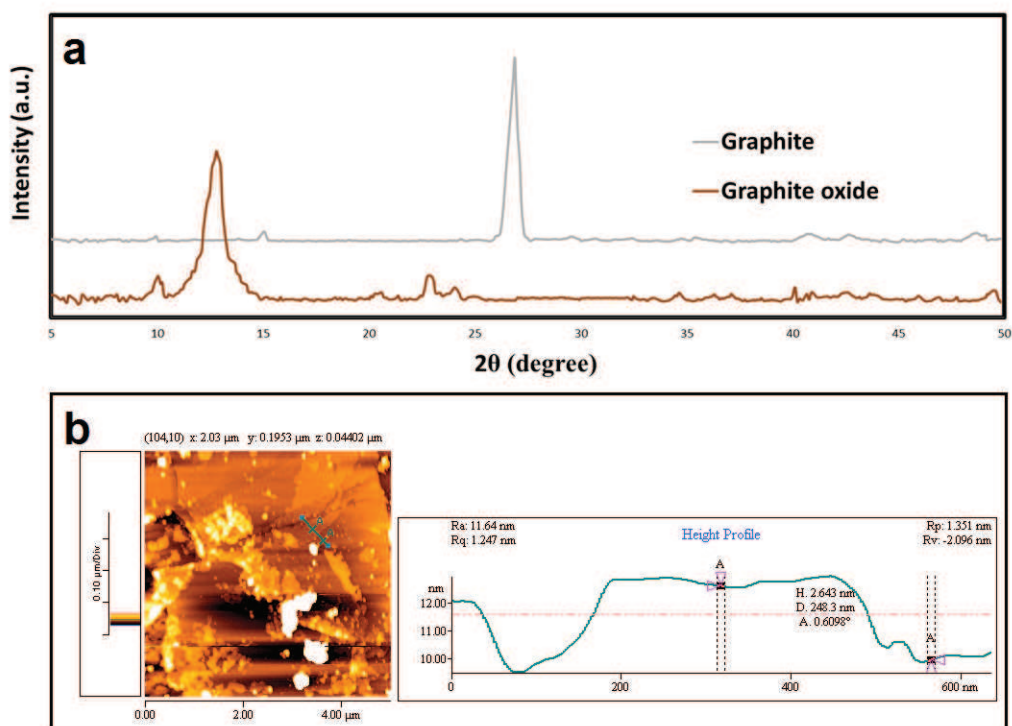
سیتریک است. اگرچه مونیتیت فاز غالب سیمان است اما مطالعات قبلی نشان داده است حضور فاز مونیتیت باعث بهبود خواص مکانیکی سیمان می شود [۲۰]. پس از مونیتیت، کلسیم پیروفسفات ($\text{CaH}_2\text{P}_2\text{O}_7$) در نمونه سیمان بدون



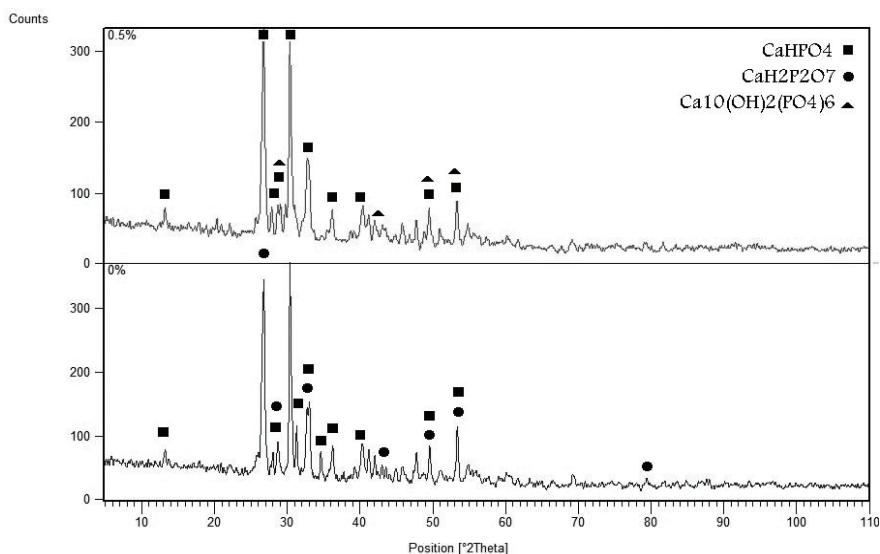
شکل ۱- مراحل جراحی موش ها (a) تراشیدن کاسه سر (b) ایجاد حفره و کاشت سیمان بدون گرافن اکساید، (c) کاشت نمونه حاوی ۰/۵ درصد گرافن اکساید و (d) بخیه محل کاشت



شکل ۲- الگوی XRD نمونه‌ی بتا تری کلسیم فسفات



شکل ۳- طیف XRD و تصویر AFM نانوصفات گرافن اکساید



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

۳-۱- 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 می‌توان نتیجه گرفت که گرافن اکساید باعث کاهش زمان گیرش

سیمان برآشیتی می‌شود. داده‌ها 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 می‌شود و همین مسئله باعث کاهش زمان گیرش می‌شود، از طرفی چون حضور فاز گرافن اکساید باعث جوانه زنی فاز آپاتیتی می‌شود می‌تواند به کاهش زمان گیرش کمک کند [۱۵].

جدول ۱- مقادیر پارامترهای مکانیکی، تخلخل و زمان گیرش مربوط به نمونه‌های حاوی مقادیر ۰، ۰/۵، ۲ و ۵ درصد گرافن اکساید

زمان گیرش (دقیقه)	تخلخل (%)	مدول یانگ (گیگاپاسکال)	استحکام فشاری (مگاپاسکال)	گرافن اکساید (%)
0.8 ± 30	۶۱	۰/۴	۱۲	٪۰
1.4 ± 26	۶۱	۰/۸	۴۰	٪۰/۵
0.9 ± 23	۶۲	۰/۸	۴۲	٪۰/۲
1.1 ± 17	۶۳	۰/۰۴	۲	٪۰/۵



۳-۲- 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 تنش- 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 پیشنهاد 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

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 تنش وارد شده نیز افزایش می‌یابد. این بهبود تنها در محدوده ای از درصد وزنی گرافن اکساید قابل مشاهده است. در نمونه‌ی حاوی ۵٪ وزنی، مقادیر منحنی تنش 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 تنش را به وجود می‌آورند و مقاومت کامپوزیت در صورت وارد شدن تنش، در این نواحی ضعیف‌تر از سایر نواحی است.

جدول ۱ تأثیر 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.

۳-۴- 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

^۲ Nanosheet

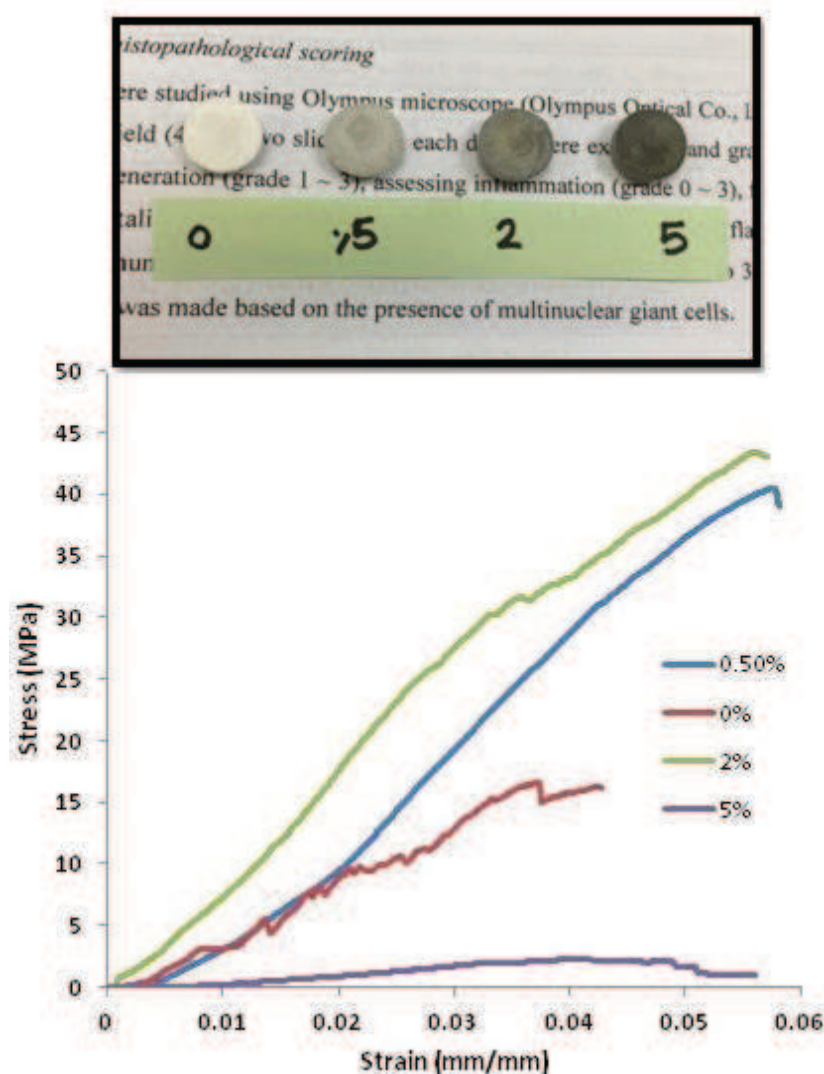
^۳ Worm-like

^۱ Crack Deflection

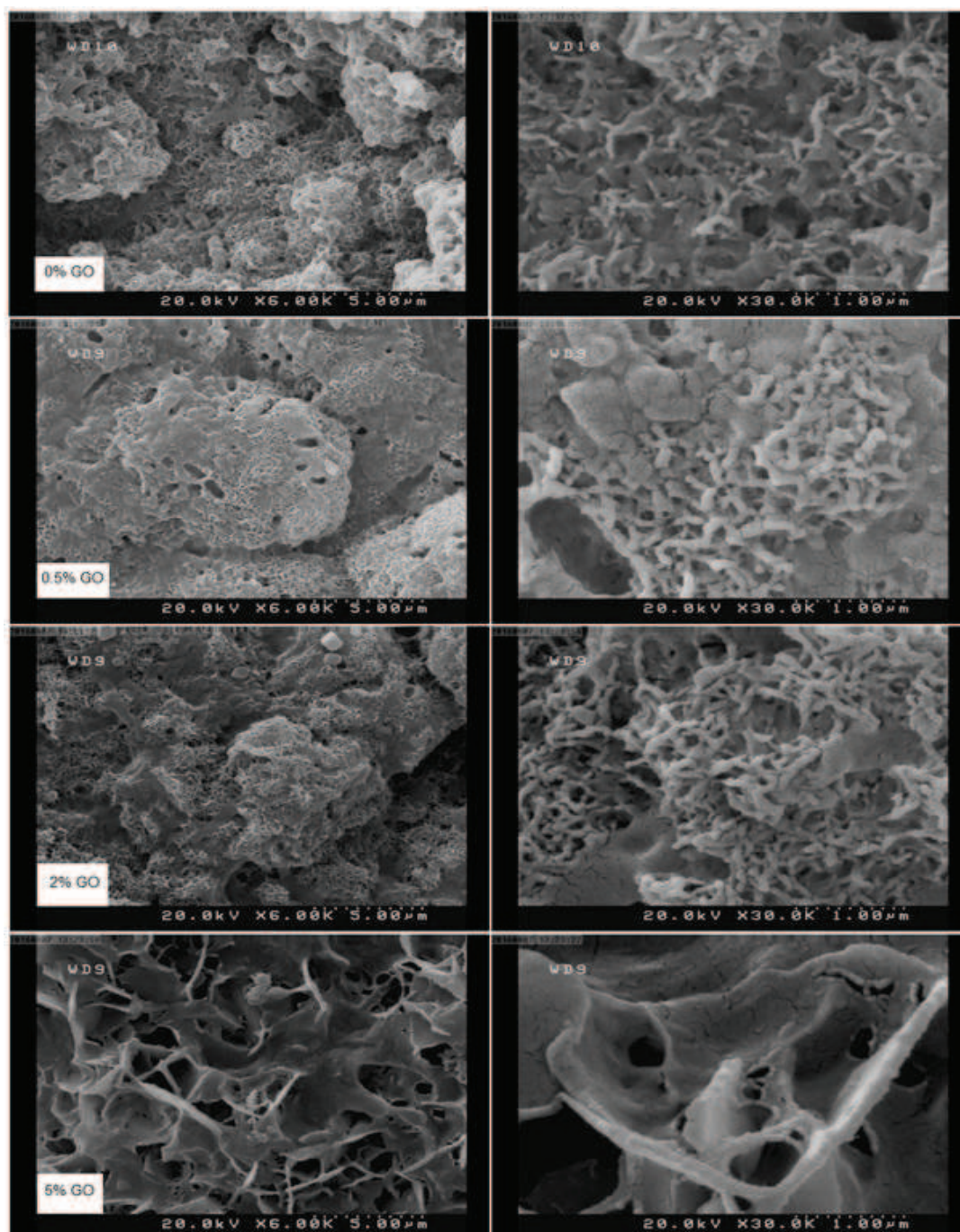
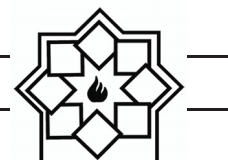


گذشت ۱۴ روز تیمار با SBF در مقایسه با نمونه‌های روز ۷، بیشتر است. به نظر می‌رسد ریزشکستگی‌های ایجاد شده به واسطه‌ی چروکیدگی و خشک شدن نمونه‌های خیس، در فضای آزاد باشد. آن چه مسلم است، اشاره به این نکته است که وجود گرافن اکساید در سیمان نه تنها، مانع تشکیل هیدروکسی آپاتیت نشده است، بلکه جوانه زنی رشد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

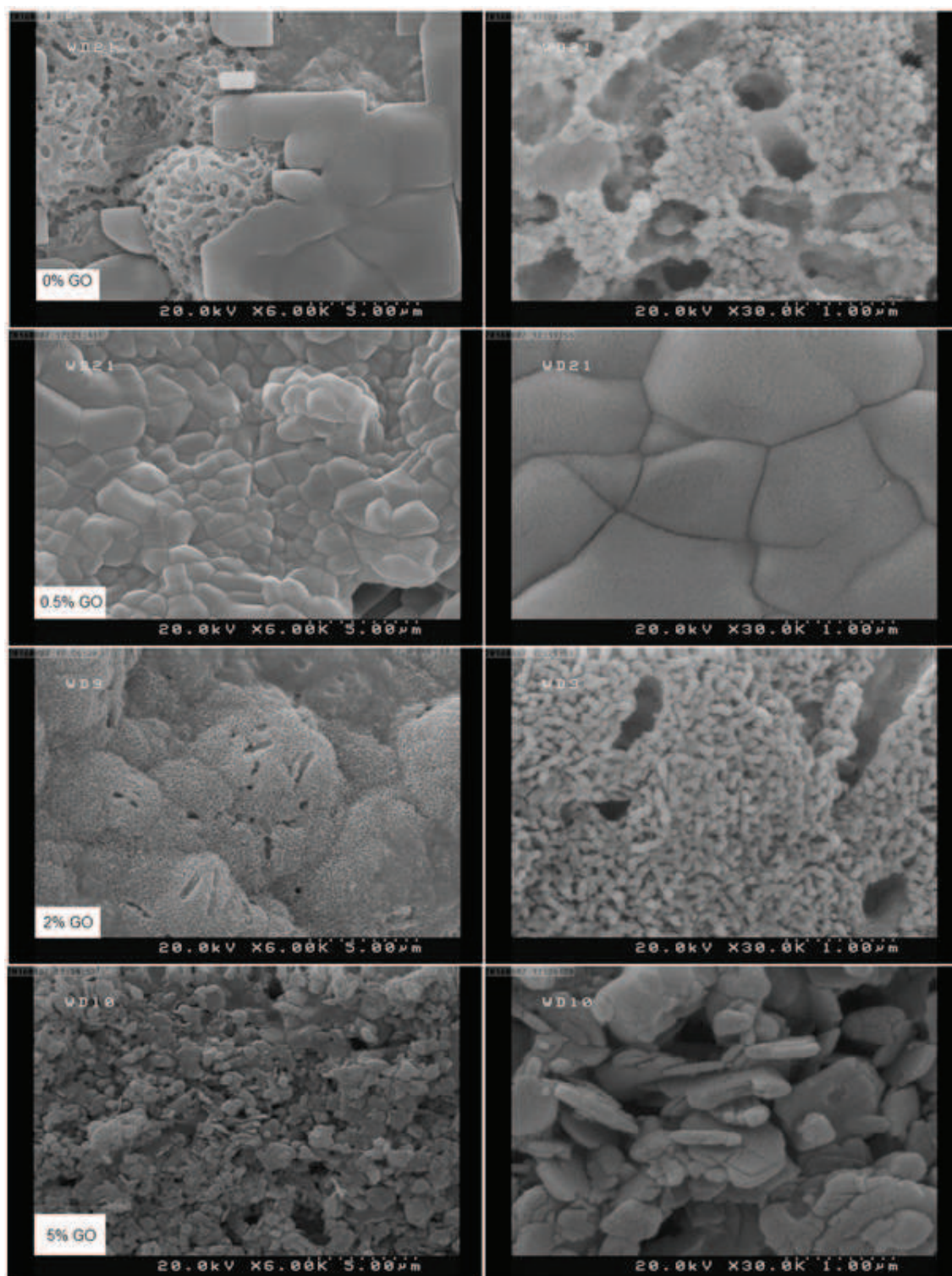
است. با افزایش درصد گرافن اکساید رشد هیدروکسی آپاتیت از فرم کروی به تدریج به سمت میله‌ای تغییر پیدا کرده است [۱۰]. بعد از ۱۴ روز، لایه‌های هیدروکسی آپاتیت به صورت متراکم تری روی سطوح را فرا گرفته‌اند. به طور کلی نمونه‌های دارای گرافن اکساید تراکم و مقدار هیدروکسی آپاتیت بیشتری در مقایسه با نمونه‌های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



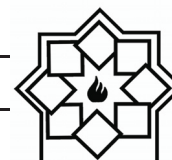
شکل ۵- نمودار منحنی تنش- کرنش سیمان کامپوزیت



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



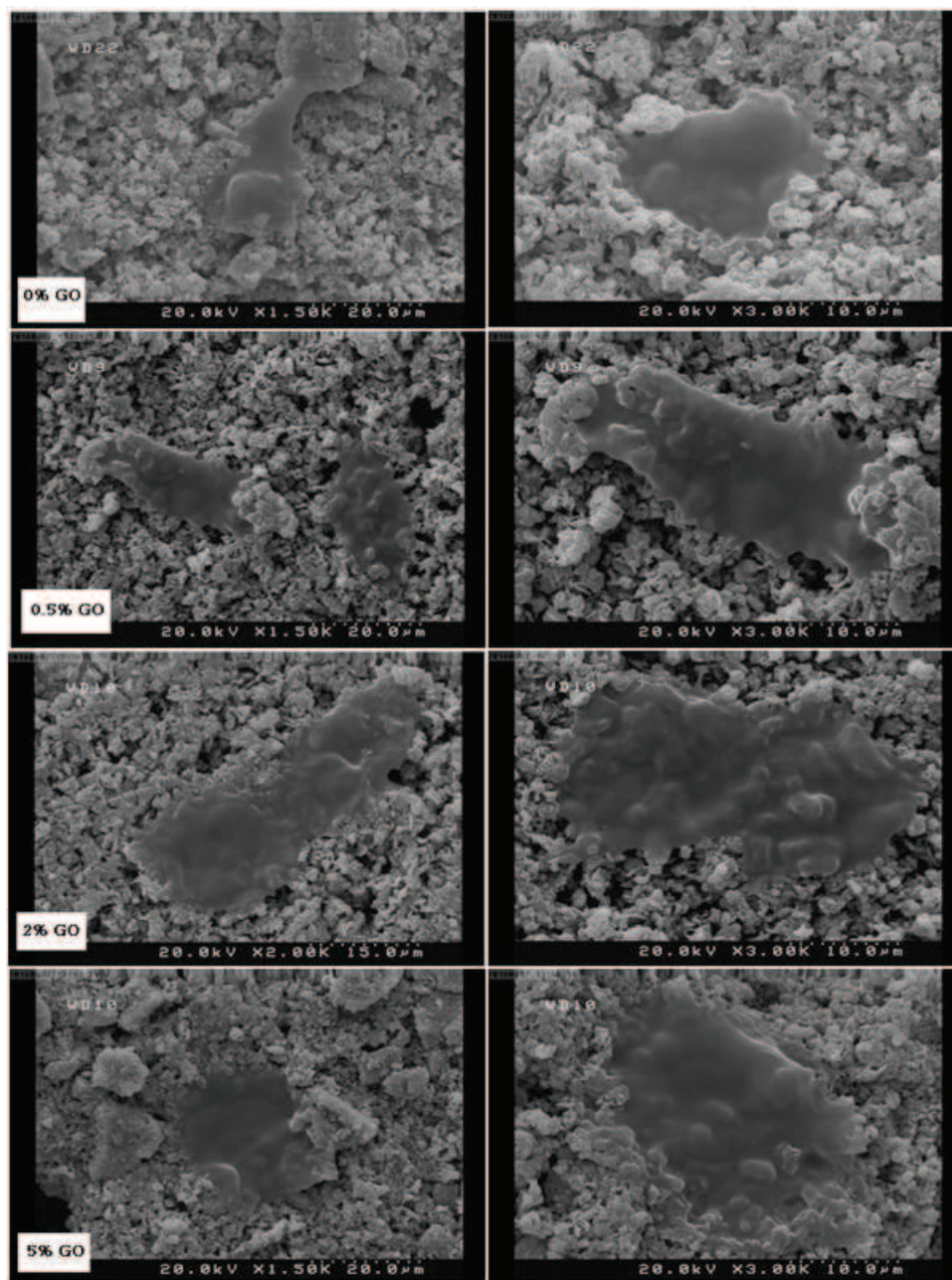
۳-۵- ارزیابی‌های سلولی

سلولی بر روی سطح نقش مهمی در تمایز استخوانی

سلول‌ها در محیط بدن دارد.

تصاویر ارائه شده در شکل ۸ با دو بزرگنمایی، بررسی

چسبندگی سلول‌ها روی سیمان کامپوزیت است. چسبندگی



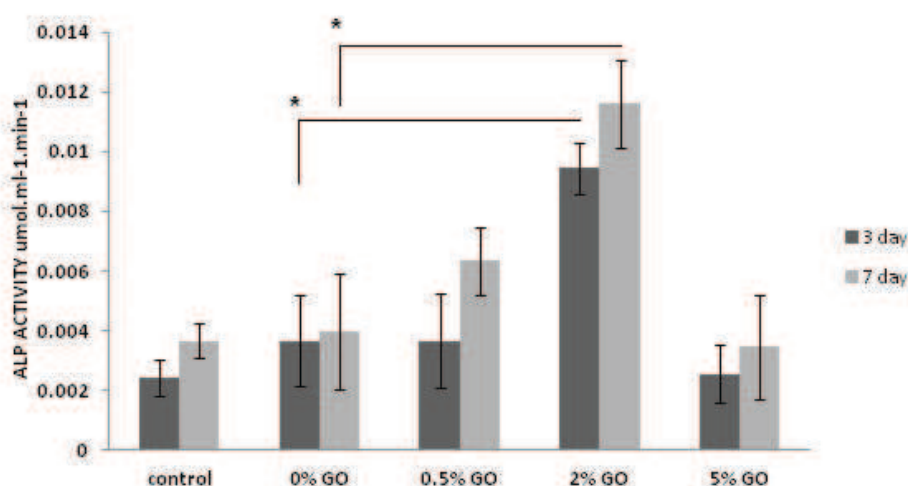
شکل ۸- تصاویر FESEM چسبندگی سلول‌های MG63 روی سطح سیمان کامپوزیت پس از گذشت ۱ روز



تخمین میزان فعالیت استئوبلاست‌ها، ترشح آلكالين فسفاتاز، آزمونی مهم است. در واقع فعالیت آنزيم آلكالين فسفاتاز نشانه ای از فعالیت تمایزی استئوبلاست‌ها است. در این پروژه اندازه‌گیری فعالیت آنزيم آلكالين فسفاتاز با استفاده از سوبسترای پارا نیترو فیل فسفات صورت گرفت. این سوبسترا تحت تأثیر آنزيم آلكالين فسفاتاز به پارانیتروفیل 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 آنزيم است. نمودار فعالیت آنزيم آلكالين فسفاتاز در شکل ۹ نمایش داده شده است. همانطور که در نمودار مشخص است، میزان فعالیت آنزيم 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 آنزيم در نمونه‌ی ۵٪ تأثیر سوء افزایش درصد وزنی گرافن اکساید باشد.

سیمان‌های برایشیتی 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 عمده‌ای ایجاد نمی‌کند و به نظر می‌رسد پویایی محیط بدن موجودات این مشکل را برطرف می‌کند [۱۹]. همان‌طور 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. پهن‌شدگی سلول‌ها در تمامی نمونه‌ها حاکی از این است که درجات صعودی گرافن اکساید تأثیر مخربی بر چسبندگی سلولی ندارد.

آلكالين فسفاتاز به وسیله سلول‌های استئوبلاست تولید می‌شود. برخی معتقدند که این آنزيم 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



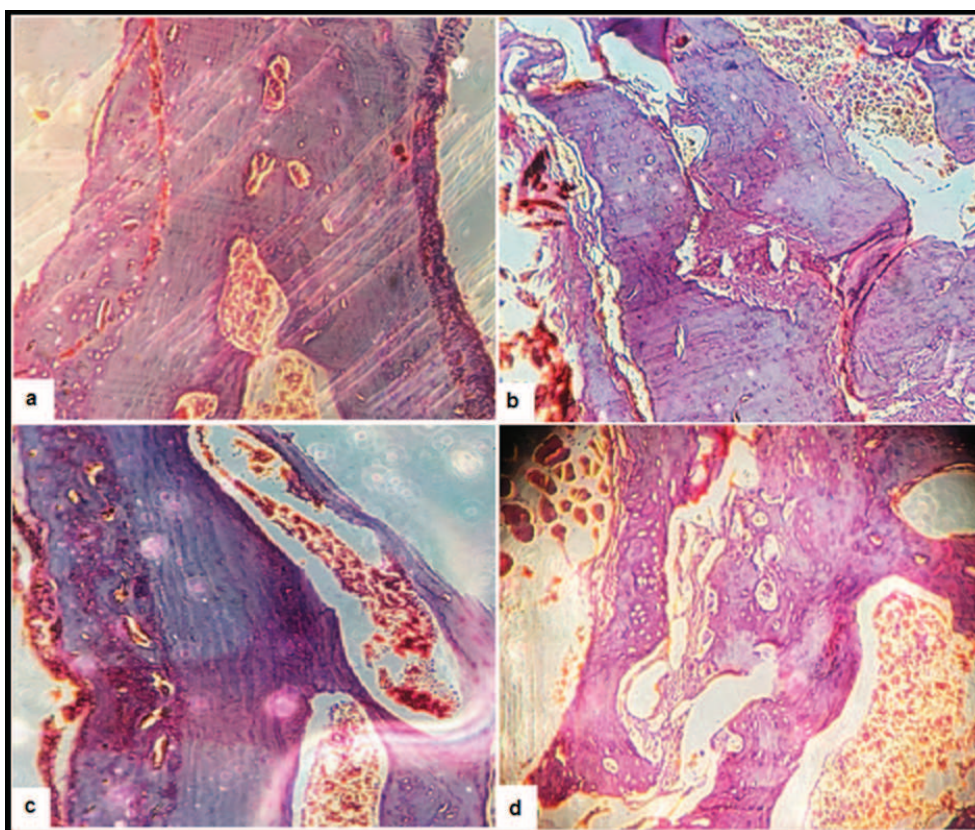
شکل ۹- نمودار فعالیت آنزيم آلكالين فسفاتاز در دو بازه‌های زمانی سه و هفت روز



۳-۶- بررسی‌های درون‌تنی

در حین عمل جراحی و در طول مدت زمان نگه‌داری موش‌ها هیچ گونه مرگی مشاهده نشد. در ارزیابی هیستوپاتولوژی نشانه‌ای از التهاب در هیچ یک از گروه‌ها مشاهده نشد. ارزیابی جایگاه ترمیم با رنگ‌آمیزی هماتوکسیلین - ائوزین، پس از یک ماه در موش‌های گروه ۰٪ گرافن اکساید، نشان داد که نقیصه‌ی ایجاد شده به وسیله‌ی استخوان نابالغ پر شده است. استخوان تازه تشکیل شده‌ی نابالغ در محل اتصال آن با استخوان قدیمی، توسط استخوان تیغه‌ای اولیه در حال جایگزینی

می‌باشد. در موش‌های گروه دوم ۵/۰٪ گرافن اکساید، استخوان متراکم اولیه در حال شکل‌گیری است و فضاهای بین استخوان‌های نابالغ متراکم‌تر شده‌است. همچنین بافت استخوانی تازه تشکیل شده از تراکم بیشتری، نسبت به گروه سیمان ۰٪ برخوردار است. در هر دو گروه حفره‌های خالی که به عنوان شاهد در نظر گرفته شده بود، متشکل از استخوان‌های نابالغ و لاملار بود. این در حالی است که در نقیصه‌های پر شده با سیمان، استخوان نابالغ کمتری مشاهده شد و عمدتاً شاهد حضور استخوان لاملار بودیم (شکل ۱۰).



شکل ۱۰- رنگ‌آمیزی هماتوکسیلین - ائوزین نمونه‌های استخوانی. a, b) نقیصه پر شده با سیمان ۰٪ گرافن اکساید. c, d) نقیصه پر شده با سیمان ۵/۰٪ گرافن اکساید

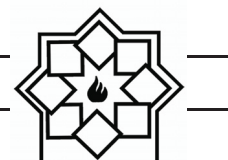


۴- نتیجه گیری

در این پژوهش، سیمان استخوانی کلسیم فسفاتی با ترکیب دو جز پودری بتا تری کلسیم فسفات و مونو کلسیم فسفات مونوهیدرات با نسبت های 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 (۲ درصد) باعث افزایش استحکام مکانیکی سیمان شد و علاوه بر این زمان گیرش سیمان کوتاه تر، در حالیکه تخلخل سیمان تغییر محسوسی نداشت. در کنار 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 متراکم در مقایسه با نمونه سیمان بدون گرافن شد. در مجموع، با توجه به تمامی آنالیزهای انجام شده در سیمان های نانوکامپوزتی سنتز شده، می توان نتیجه گرفت که این سیمان ها به دلیل بهبود خواص مکانیکی و زیستی، کاندید مناسبی در مهندسی بافت استخوان و جراحی های ارتوپدی به عنوان پرکننده به شمار می آیند.

مراجع

- 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.
- [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



- BAKHSHI, 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, Çiftçioglu 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.,