سنتز و ارزیابی سمیت سلولی نانوالیاف شیشه‌ی زیستی تهیه شده به روش الکتروریسی جهت ساخت داربست مهندسی بافت

ایمان یزدانی چم زینی*[۱]، محمد رفیعی نیا[۲]، بهروز موحدی[۳]، حسین صالحی[۴]

۱- دانشجوی کارشناسی ارشد مهندسی نانو، دانشکده علوم و فناوری های نوین، دانشگاه اصفهان، اصفهان، ایران

۲- استادیار، مرکز تحقیقات بیوسنسور، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران

۳- استادیار، گروه مهندسی نانوفناوری، دانشکده علوم و فناوری های نوین، دانشگاه اصفهان، اصفهان، ایران

۴- استادیار، گروه علوم تشریح، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران

*Yazdani999@yahoo.com

(تاریخ دریافت: ۹۳/۰۲/۱۰، تاریخ پذیرش: ۹۳/۰۵/۱۴)

چکیده

هر ساله هزاران مرگ در حالی رخ می‌دهد که بیماران در انتظار برای گرفتن عضو پیوندی جدید هستند. مهندسی بافت می‌تواند به حل تعداد زیادی از این مشکلات کمک کند و این کار با کاشت سلول‌های یک بافت خاص در ساختاری سه بعدی به‌نام داربست، به منظور بازگشت عملکرد طبیعی اندام مورد نظر صورت می‌گیرد. در این مطالعه شیشه‌های زیستی از تترا اتیل ارتوسیلیکات، تری اتیل فسفات و کلسیم نیترات ۴ آبه به روش سل ژل سنتز و سپس از پلیمر پلی وینیل الکل به عنوان تسهیل کننده فرآیند الکتروریسی و در مرحله آخر از ستریل آمونیوم برماید به عنوان سورفکتانت در تولید نانو الیاف استفاده شد. نمونه تولید شده در دمای ۶۰۰ درجه سانتیگراد کلسینه شد و با تهیه محلول شبیه سازی شده بدن (SBF)، زیست فعالی آن مورد بررسی قرار گرفت. با تغییر پارامترهای مؤثر بر روی الکتروریسی مانند ولتاژ دستگاه، میزان تغذیه محلول، قطر سوزن، فاصله نوک سوزن و جمع کننده و بررسی تصاویر میکروسکوپ الکترونی روبشی، الیافی با قطر ۳۰۰ نانومتر تا یک میکرومتر تولید گردید. آنالیز تصاویر میکروسکوپ نیروی اتمی وجود منافذی در حدود ۲ نانومتر را در سطح رشته‌ها نشان داد. به منظور ارزیابی زیست فعالی، غوطه وری نمونه ها درمحلول شبیه سازی بدن به مدت ۲ هفته انجام شد. آزمون های طیف سنجی تبدیل فوریه مادون قرمز وپراش اشعه ایکس، بیانگر تشکیل هیدروکسی آپاتیت بر روی داربست می باشد. پتانسیل زتای ترکیب شیشه زیست فعال برابر ۱۰/۱- میلی ولت است. بر اساس بررسی رشد و تکثیر سلولی با روش MTT، هیچ نوع سمیتی در سلولهای MG63 مشاهده نشد. بنابراین می توان از نانو رشته های شیشه زیست فعال به دلیل توانایی در اتصال به سلولهای استخوانی و تشکیل هیدروکسی آپاتیت بر روی سطحشان به عنوان داربست مهندسی بافت استفاده نمود.

واژه های کلیدی:

نانو رشته، شیشه زیست فعال، مهندسی بافت، سل ژل.

۱- مقدمه

امروزه ترمیم صدمات وارد شده به استخوان ناشی از تصادفات و سوانح رانندگی، نقص مادرزادی و یا از بین رفتن استخوان توسط بیماری و سرطان‌های مختلف یکی از بزرگ‌ترین مشکلات بشر است[۱]. با کاربرد مواد زیستی تخریب‌پذیر در مهندسی بافت به‌خصوص مهندسی بافت استخوان، امکان بازسازی بافت‌های آسیب‌دیده فراهم شده است. مهندسی بافت

علم طراحی و تولید بافت‌های جدید برای ترمیم اندام‌های آسیب‌دیده و جایگزینی قسمت‌های ازدست‌رفته به‌علت عوامل مختلف می‌باشد[۲]. در بین بافت‌های بدن، استخوان پتانسیل بالایی برای تولید مجدد دارد و از این‌رو یک نمونه مناسب برای مهندسی بافت به‌شمار می‌رود. در شکستگی و عیوب بزرگ، روند درمان که توسط بدن انجام می‌شود، کارساز نبوده و پیوند استخوان لازم می‌شود[۳]. دانشمندان از سال‌ها قبل قادر به کشت سلولی خارج از بدن بودند، ولی فناوری رشد شبکه‌های پیچیده و سه بعدی سلولی برای جایگزینی بافت آسیب دیده اخیراً توسعه یافته است. برای ساخت یک بافت به شیوه‌های مهندسی نیاز به طراحی یک داربست با ساختار فیزیکی مناسب با امکان چسبندگی سلول‌ها به آن، مهاجرت سلولی، تکثیر و تمایز سلولی و در نهایت رشد و جایگزینی بافت جدید است. در مهندسی بافت ابتدا یک ماده متخلخل به‌عنوان زمینه خارج سلولی یا داربست برای رشد سلول‌ها تهیه شده و سپس عوامل رشد بر روی آن قرار می‌گیرند. پس از رشد مناسب سلول‌ها در فضای تخلخل‌ها، داربست از محیط آزمایشگاهی به درون بدن موجود زنده منتقل می‌شود. به‌تدریج رگ‌ها به داربست نفوذ می‌کنند تا بتوانند سلول‌ها را تغذیه نمایند. داربست‌های مورد استفاده در مهندسی بافت استخوان باید دارای تخلخل بالا و خواص زیست‌فعالی و خواص زیست‌تخریب‌پذیری مناسب و در عین حال خواص مکانیکی خوبی باشند[۴]. لازم به ذکر است که خواص مکانیکی داربست به مواد تشکیل دهنده داربست و نوع سنتز آن بستگی دارد[۵-۶]. به طورکلی شیشه‌های زیست‌فعال که از سیلیسیوم، کلسیم و فسفر تشکیل شده‌اند به استخوان متصل و باعث ترمیم آن می‌شوند. هر چند کاربردهای این شیشه‌ها به‌علت استحکام و پایداری شیمیایی پایینی که دارند، محدود است، می‌توان برای رفع این مشکل پس از سنتز با یک ترکیب پلیمری و یا یک ماده طبیعی در استخوان مانند کلاژن ترکیب نمود. شیشه‌های زیست‌فعال سنتز شده به روش سل-ژل، به‌دلیل زیست سازگاری و زیست‌فعال بودن عالی‌شان در مهندسی بافت به کار گرفته می‌شوند [۷]. مطالعات انجام شده در این زمینه نشان می‌دهند که این نوع از شیشه‌های زیست‌فعال، پاسخ سلولی خوبی را در توسعه بافت‌های موجودات زنده و تشکیل استخوان در بدن نشان می‌دهند[۸ -۹]. از طرف دیگر داربست‌های ساخته شده از این مواد می‌توانند محیط‌های مناسبی را جهت رشد و کشت سلول‌های زیستی و یا بنیادی فراهم کنند. نانورشته‌هایی که از روش الکتروریسی تهیه می‌شوند به‌علت سطح ویژه بالا و ساختار متخلخلی که دارند، در ساخت داربست‌های مهندسی بافت استفاده می‌شوند[۷, ۱۰].

در این پژوهش نانو رشته های شیشه زیست فعال با روش الکتروریسی به منظور کاربرد در داربست مهندسی بافت تهیه می‌گردد. تغییر پارامترهای گوناگون الکتروریسی بر خواص نانو الیاف مورد بررسی قرار می گیرند. ارزیابی مورفولوژی الیاف با استفاده از میکروسکوپ الکترونی روبشی ومیکروسکوپ نیروی اتمی صورت می گیرد. ارزیابی زیست‌فعالی الیاف و داربست در محلول شبیه سازی شده بدن و با استفاده از آنالیز پراش پرتو ایکس و طیف‌سنجی مادون قرمز تبدیل فوریه انجام می گردد. پتانسیل سطحی داربست و بررسی رشد و تکثیر سلولی به ترتیب با دستگاه زتا سایزر و روش MTT ارزیابی می شوند.

۲- مواد و روش‌ها

۲-۱- مواد

ترا اتیل ارتوسیلیکات (TEOS)، تری اتیل فسفات (TEP)، کلسیم نیترات ۴ آبه ($Ca(NO_3)_2.4H_2O$)، پلی وینیل الکل (PVA) (M_W=72000)، ستریل آمونیوم برماید (CTAB)، اسید کلریدریک و اتانول (C_2H_5OH) از شرکت مرک آلمان خریداری شدند.

۲-۲- ساخت داربست

به منظور ایجاد نانوالیاف متخلخل، مقدار ۶۱۰ میکرولیتر تری اتیل فسفات با ۱ میلی لیتر محلول اسید کلریدریک با اسیدیته ۱/۵ مخلوط شد و اجازه داده شد تا هیدرولیز صورت گیرد

(محلول شماره ۱). در ظرفی دیگر، به میزان ۵/۲ میلی لیتر تترا اتیل ارتوسیلیکات (TEOS) به ۱/۶۸ میلی لیتر آب و ۱/۳۶ میلی لیتر اتانول (C_2H_5OH) اضافه گردید (محلول شماره ۲). نسبت مولی بین H_2O:TEOS و C_2H_5OH:TEOS در محلول شماره ۲، به ترتیب (۴:۱) و (۱:۱) بوده و در مدت ۴ ساعت با یکدیگر مخلوط شدند. سپس محلول شماره ۱ به محلول شماره ۲ افزوده گردید و بعد از ۲ ساعت هم‌زدن مقدار ۱/۹۶ گرم کلسیم نیترات ۴ آبه به محلول اضافه شد و به مدت ۱ ساعت محلول روی هم-زن مغناطیسی (ALFA، مدل D-500) به هم زده شد. ۱۰۰ میلی-لیتر محلول، حاوی مقدار ۰/۱ گرم ستریل آمونیوم برماید در داخل محلول ۵۰:۵۰ (اتانول: محلول اسیدی با pH=۱/۵) تهیه شد و به مدت ۲ ساعت به هم زده شد.

محلول حاوی سورفکتانت CTAB به صورت آرام آرام به محلول پیش‌ماده شیشه که از قبل تهیه شده بود اضافه گردید و محلول به مدت ۴۸ ساعت روی هم‌زن مغناطیسی، هم زده شد. سپس محلول حاصل، ۲۴ ساعت در دمای ۴۰ درجه سانتیگراد و سپس ۱۲ ساعت در دمای ۶۰ درجه سانتیگراد قرار داده شد (محلول شماره ۳). محلول نباید بیشتر از زمان ذکر شده در دمای ۶۰ درجه سانتیگراد باقی می ماند چراکه این امر منجر به ژله‌ای شدن محلول می گشت[۱۱].

برای تهیه محلولی که قابلیت ریسندگی در دستگاه الکتروریسی (ساخت شرکت فناوران نانو مقیاس-ایران) داشته باشد، ۳/۵ میلی لیتر محلول آبی حاوی ۱۳ درصد وزنی پلیمر PVA به محلول شماره ۳ اضافه گردید. محلول حاصل در داخل یک سرنگ ۲/۵ میلی لیتری با قطر داخلی ۸/۵ میلی‌متر ریخته شد و با تغییر شرایط آورده شده در جدول ۱ تحت عملیات الکتروریسی قرار گرفت.

جدول (۱): مشخصات نمونه‌های سنتز شده

نمونه	ولتاژ (kv)	میزان تغذیه (ml/h)	فاصله (cm)	PVA13% BG (v/v)	سر سرنگ	زمان مخلوط کردن (h)
۱	۸/۸	۰/۳	۱۰	۳/۵:۳/۷۵	G۲۲	۱
۲	۸/۸	۰/۴	۱۰	۳/۵:۳/۷۵	G۲۲	۱
۳	۸/۸	۰/۴	۱۱	۳/۵:۳/۷۵	G۲۲	۱
۴	۸/۸	۰/۴	۱۱	۳/۵:۳/۷۵	G۲۲	۱
۵	۸/۸	۰/۴	۱۱	۳/۵:۳/۷۵	G۲۲	۱
۶	۸/۸	۰/۵	۱۲	۳/۵:۳/۷۵	G۲۲	۱
۱۳	۸/۸	۰/۵	۱۳	۳/۵:۳/۷۵	G۲۲	۱
۱۴	۸/۸	۰/۵	۱۳	۳/۵:۳/۷۵	G۲۲	۱
۱۵	۸/۸	۰/۵	۱۴	۳/۵:۳/۷۵	G۲۲	۱
۱۶	۸/۸	۰/۵	۱۴	۳/۵:۳/۷۵	G۲۲	۱۵

۲-۳-آزمون‌ها

۲-۳-۱- ارزیابی مورفولوژی

جهت مطالعه مورفولوژی الیاف شیشه زیست‌فعال، قبل و بعد از عملیات کلسینه کردن، از میکروسکوپ الکترونی روبشی (VEGA TESCAN-LMU, USA) (SEM) و میکروسکوپ نیروی اتمی (JPK CO Germany) (AFM) استفاده شد.

۲-۳-۲- ارزیابی شیمیایی و زیست‌فعالی

ارزیابی زیست‌فعالی الیاف و داربست در محلول شبیه سازی شده بدن (SBF) انجام گرفت. این محلول دارای غلظتی مشابه با غلظت یون‌های موجود در پلاسمای خون است که در جدول ۲ به ترکیبات و مقدار آنها اشاره شده است[۱۲].

برای ارزیابی زیست فعالی، مقدار یک گرم الیاف شیشه، که در دمای ۶۰۰°C کلسینه شده بود را در ۱۰۰ میلی لیتر محلول SBF غوطه‌ور کرده، سپس محلول فوق را در ارلن پلی اتیلنی دربسته قرار داده و محلول بر روی شیکر (ساخت شرکت DRAGON LAB، مدل SK-180-PRO) با دمای ۳۷ °C به مدت ۴، ۷ و ۱۵ روز هم‌زده شد. محلول SBF دو بار در هفته عوض شد و سپس الیاف شیشه، به کمک سانتریفیوژ ۶۰۰۰ دور بر دقیقه (ساخت شرکت Froilabo، مدل دستگاه SW14R) به مدت ۱۰ دقیقه جدا شدند و سپس آنالیز پراش پرتو ایکس (XRD) (به وسیله دستگاه Diffractometer, XRD Bruker, D8advance, Germany) و طیف‌سنجی مادون قرمز تبدیل فوریه (FTIR) (به وسیله دستگاه Jasco FT-IR 6300 Spectrophotometer) انجام شد، تا تشکیل هیدروکسی آپاتیت و سرعت تشکیل آن در روزهای مختلف مورد بررسی قرار گیرد[۱۱-۱۳].

جدول (۲): مشخصات محلول شبیه سازی شده بدن (SBF)

نام ماده	مقدار (g)
$NaHCO_3$	۰/۳۵
NaCl	۷/۹۶۶
KCl	۰/۲۲۴
$K_2HPO_4 \cdot 3H_2O$	۰/۲۲۸
$MgCl_2.6H_2O$	۰/۳۰۵
$CaCl_2$	۰/۲۷۸
Na_2SO_4	۰/۰ ۷۱
$Tris[(CH_2OH)_3CNH_2]$	۶/۰۵۷
محلول HCl ۱ مولار	
pH	۷/۴

۲-۳-۳- ارزیابی پتانسیل سطحی

جهت بررسی پتانسیل سطحی داربست از اندازه‌گیری پتانسیل زتا (دستگاه زتا سایزر ساخت شرکت Malvern) استفاده شد.

۲-۳-٤- بررسی رشد و تکثیر سلولی به روش MTT

جهت انجام این آزمون پس از قرار دادن داربست در چاهکهای پلیت ۲۴ خانه، سلول های استئوبلاست انسانی رده MG-63 (پاساژ ۲۷-۲۶) با تراکم $۱۰^۴ \times ۵$ سلول در هر میلی لیتر برای هر چاهک، روی داربستها کشت داده شدند. پس از دوره های زمانی ۱، ۳ و ۷ روز، ۴۰ µl از محلول MTT (3- (4, 5- dimethylthiazol- 2- yl)- 2, 5-diphenyltetrazolium bromide) به هر چاهک اضافه و سلولها برای ۴ ساعت در انکوباتور با CO_2 ۵٪ نگهداری شدند. سپس با اضافه کرن دی متیل سولفوکسید (DMSO) پس از ۱۵ دقیقه، محیط رویی هر چاهک ۲۴ خانه به دو چاهک ۹۶ خانه انتقال داده شد و جذب نوری نمونه ها در طول موج ۵۷۰ nm با استفاده از دستگاه ELISA reader (Hiperion mpr+Roedermark, Germany) اندازه گیری گردید.

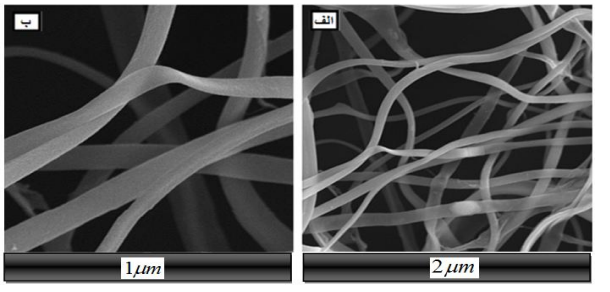
۳- نتایج و بحث

۳-۱- بررسی مورفولوژی نانوالیاف

جهت مطالعه مورفولوژی الیاف تهیه شده، قبل و بعد از کلسینه کردن ازآنالیزهای SEM و AFM استفاده شده است که نتایج آن در ادامه می‌آید. به منظور بررسی مناسب بودن این داربست - برای مهندسی بافت از اندازه‌گیری پتانسیل زتا استفاده شد، که نتایج بیانگر آن است که این مواد به دلیل شباهت زیادی که پتانسیل زتا آنها با پتانسیل زتای بافت استخوان و سلول‌های استئوبلاست دارد، مواد مناسبی برای داربست‌های مهندسی بافت استخوان هستند (جدول ۳).

با تغییر پارامترهای دستگاه الکتروریسی همچون نسبت وزنی پلیمر:بیوگلاس، میزان تغذیه محلول، فاصله نوک سوزن تا جمع کننده، ولتاژ اعمالی به محلول و زمان مخلوط کردن محلول

PVA و BG مشاهده شده در جدول ۱ الیاف نسبتا صافی تولید گردید (شکل ۱).

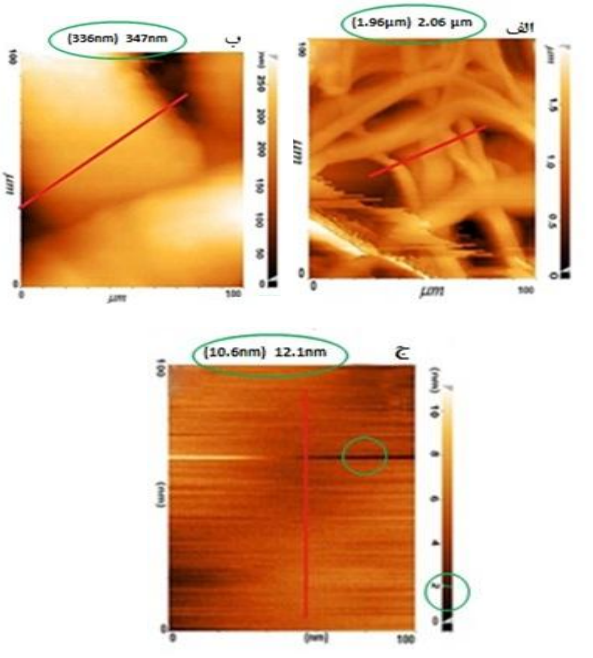


شکل (۱): تصاویر میکروسکوپ الکترونی روبشی نمونه ۱۵ بعد از کلسینه کردن

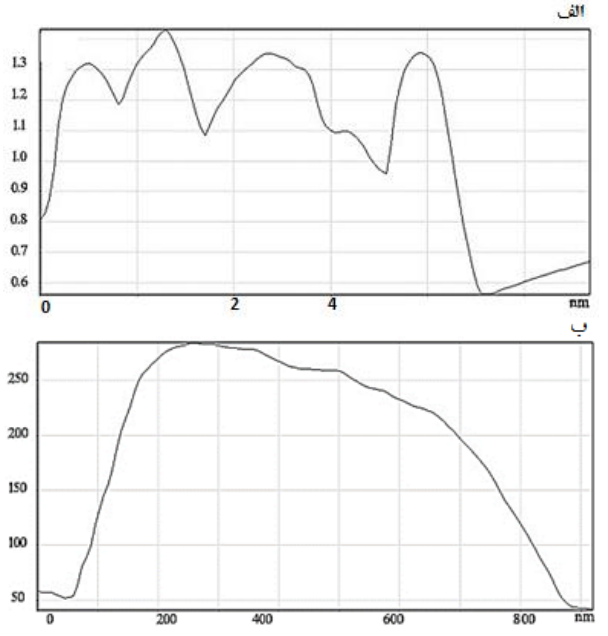
شکل ۲.الف، پروفایل چند لیف، که در کنار همدیگر قرار گرفته‌اند را نشان می‌دهد.

با کلسینه کردن در دمای ۶۰۰°C، پلیمر و سورفکتانت از بین رفته و قطر الیاف کاهش یافت و به ۳۰۰nm تا ۱ µm رسید (شکل ۲.ب) و به دلیل جدایی پلیمر از شیشه های زیست فعال، منافذی در حدود ۲ nm مشاهده شد (شکل ۲.ج).

البته می توان از تقعرهای مشاهده شده در تصویر سطح مقطع نانو رشته ها(شکل ۳) نیز به این نتیجه رسید.



شکل (۲): تصاویر AFM از الیاف شیشه زیست فعال نمونه ۱۵ با بزرگنمایی های مختلف

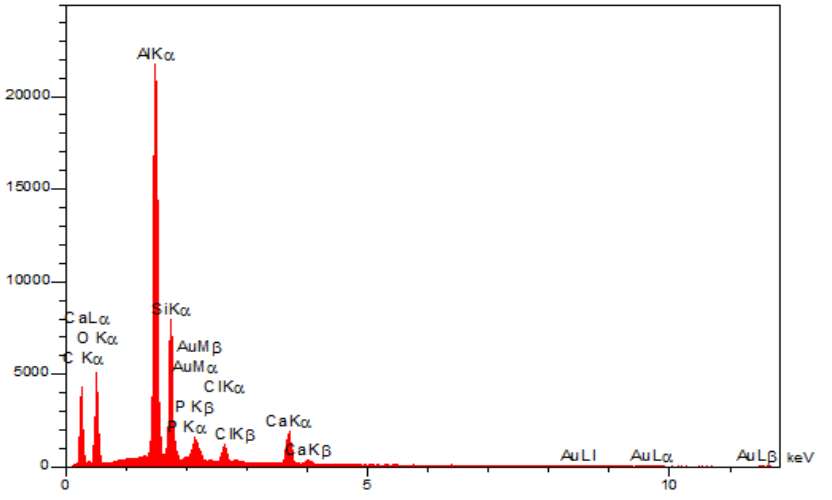


شکل (۳): تجزیه و تحلیل تصاویر مقطعی AFM نانو الیاف شیشه زیست فعال مربوط به نمونه ۱۵بعد از کلسینه کردن با بزرگنمایی‌های مختلف

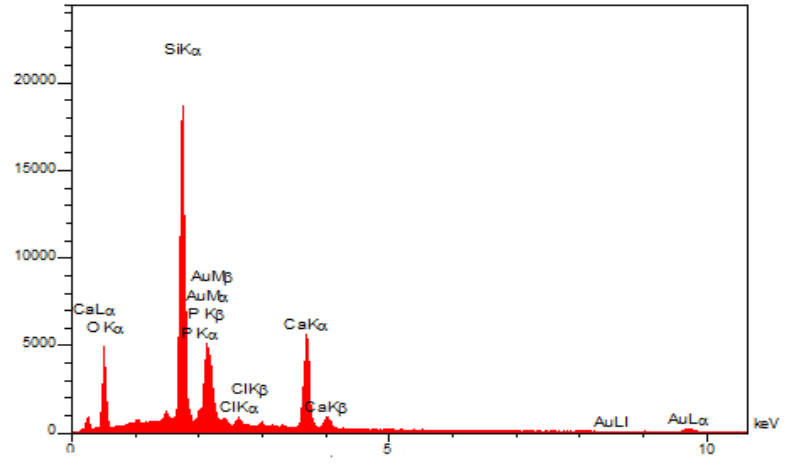
۳-۲- ترکیب شیمیایی و زیست فعالی نانوالیاف

به منظور بررسی ترکیب شیمیایی شیشه زیست فعال از آنالیز EDX استفاده شد که نتایج آن در شکل ۴ ارائه شده است. آنالیز نمونه قبل از کلسینه کردن، پیک‌های Si، P، Ca و O را که مربوط به عناصر موجود در شیشه زیست‌فعال است، نشان می-دهد. حضور این پیکها، ترکیب سه‌جزئی شیشه زیست‌فعال را تایید می کند. از طرف دیگر پیک کربن متعلق به پلی وینیل الکل است. پلی وینیل الکل در ترکیب با ساختار شیشه، فرآیند الکتروریسی را تسهیل نمود. در این طیف، عنصر کلر نیز مشاهده می‌شود، که احتمالا به دلیل حضور اسید کلریدریک، به عنوان کاتالیست، در تهیه پیش‌ماده است که در ساختار شیشه باقی مانده است. عناصر دیگری که در طیف EDX مشاهده می‌شوند عبارتند از دو پیک مربوط به نقره (Au) و آلومینیوم (Al). از نقره برای پوشاندن قسمت نارسانای الیاف استفاده می گردد و پیک آلومینیوم مربوط به زمانی است که الیاف روی فویل آلومینیومی جمع آوری شده اند. بیشترین درصد ترکیب در نمونه، به استثنای عنصر آلومینیوم که مربوط به فویل مورد نظر می‌باشد، مربوط به سیلیوم و کربن می‌باشد. شکل ۵ طیف EDX نمونه را

بعد از کلسینه شدن نشان می دهد. با توجه به این شکل، زمانی‌که نمونه در دمای ۶۰۰ °C تحت عملیات حررات قرار گرفت، پلیمر آن از بین رفت و بنابراین ترکیب به جا مانده فقط یک ترکیب شیشه زیست‌فعال با ترکیب Si، P، Ca و O است.



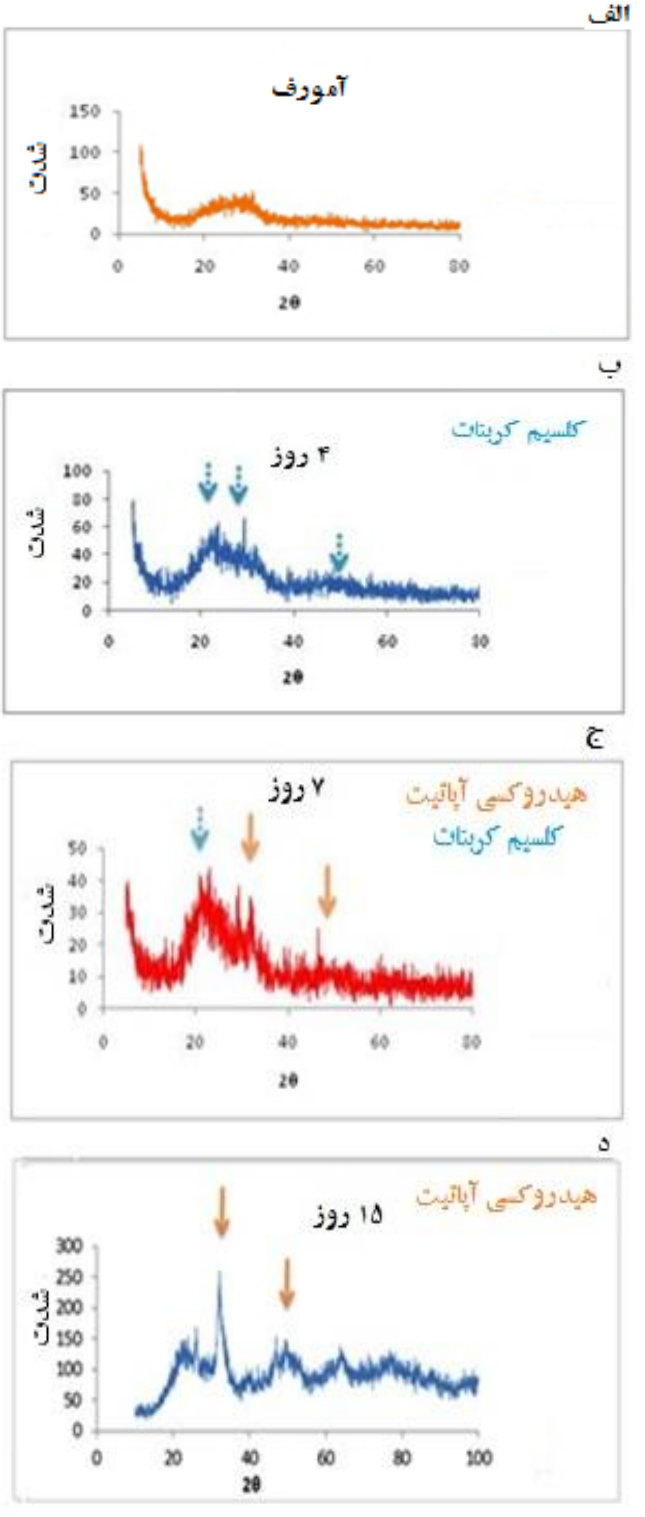
شکل (۴): طیف EDX نمونه قبل از کلسینه‌کردن



شکل (۵): طیف EDX نمونه بعد از کلسینه‌کردن در دمای ۶۰۰ °C

برای بررسی تشکیل هیدروکسی آپاتیت از آنالیز پراش پرتو ایکس (XRD) استفاده شد. شکل۶ (الف) الگوی پودر خام اولیه شیشه زیست‌فعال را که با روش سل-ژل تهیه شده، نشان می‌دهد. این طیف به طور کامل نشان می‌دهد که شیشه زیست‌فعال ساختار آمورف دارد. این نتایج موید این نکته است که روش سل-ژل قادر به تولید شیشه با ساختار آمورف و عاری از هرگونه ناخالصی است[۱۲]. پیک ۲۸ درجه که در الگوی پراش پرتو ایکس وجود دارد، مربوط به تبلور جزئی شیشه زیست‌فعال به فاز لارنیت (Ca_2SiO_4) است[۱۳]. این امر نشان‌دهنده آن است که سینترینگ در دمای ۷۰۰ °C منجر به افزایش بلورینگی در شیشه زیست‌فعال شده است که این به خاطر تشکیل فاز بلورین لارنیت است. افزایش بلورینگی شیشه زیست‌فعال روی میزان زیست-فعالی و زیست‌تخریب‌پذیری آن تاثیر گذار است[۱۴- ۱۵] شکل ۶ نتایج حاصل از انجام XRD بر روی نمونه‌هایی که به مدت ۴، ۷ و ۱۵ روز در سیال شبیه‌سازی شده بدن (SBF) غوطه‌ور بوده-اند، را ارائه می دهد. بر این اساس تشکیل بلورهای هیدروکسی آپاتیت روی سطح نمونه‌ها، بعد از غوطه‌ور شدن در SBF، تائید می‌شود. در روز چهارم غوطه وری (شکل ۶ (ب))، پیک‌های

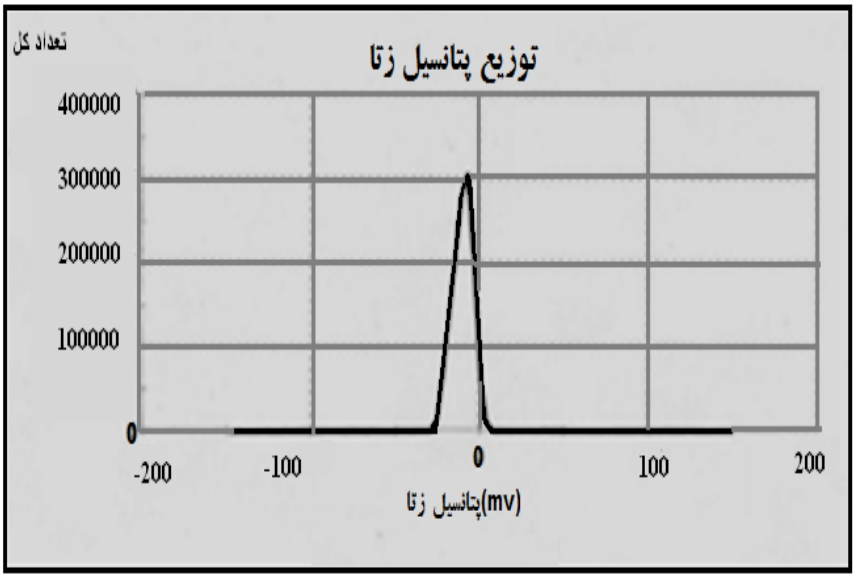
مربوط به کربنات کلسیم ظاهر شده است. بعد از گذشت ۷ و ۱۵ روز از غوطه‌وری ((شکل ۶ (ج) و (د)) پیک مربوط به تشکیل هیدروکسی‌آپاتیت در نمونه به وضوح ظاهر می‌گردد.



شکل (۶): طیف XRD نمونه شیشه زیست‌فعال با ترکیب $70SiO_2$-$26CaO$-$4P_2O_5$: (الف): بعد از سینتر کردن، (ب): ۴ روز غوطه‌وری، (ج): ۷ روز غوطه‌وری و (د): ۱۵ روز غوطه‌وری در محلول SBF

۳-۳- پتانسیل سطحی

شکل ۷ توزیع پتانسیل زتای ترکیب $70SiO_2$-$26CaO$-$4P_2O_5$ را در محدوده مشخص‌شده نشان می‌دهد. همان‌طور که از این شکل مشاهده می‌شود، ترکیب فوق دارای پتانسیل زتای ۱۰/۱mv- می باشد که این خصوصیتی مثبت برای استفاده از این ماده در مهندسی بافت استخوان بشمار می رود. مشخص گردیده مواد با پتانسیل زتا منفی، دارای اثرات بیولوژیکی مهمی در آزمونهای درون تن می‌باشند چراکه پتانسیل زتای منفی سبب افزایش چسبندگی و تمایز سلولی می‌شود[۱۶]. جدول ۳ به مقایسه پتانسیل زتا یکی از نمونه های سنتز شده، برخی سرامیک‌های زیستی (در محلول سالین)، سلول‌های استئوبلاست و استخوان می‌پردازد. همان‌طوری که مشاهده می‌شود، هیدروکسی‌آپاتیت (هیدروکسی‌آپاتیت سینتر شده و سینتر نشده) و بتا-تری کلسیم فسفات برخلاف نانو الیاف شیشه زیست‌فعال سنتز شده دارای پتانسیل مثبت هستند. بر اساس مطالعات سایر محققان، پتانسیل مثبت در شیشه‌های زیست‌فعال 63S مرتبط با ترکیب شیمیایی شیشه، اندازه ذرات و محیط پوشاننده است[۱۶].



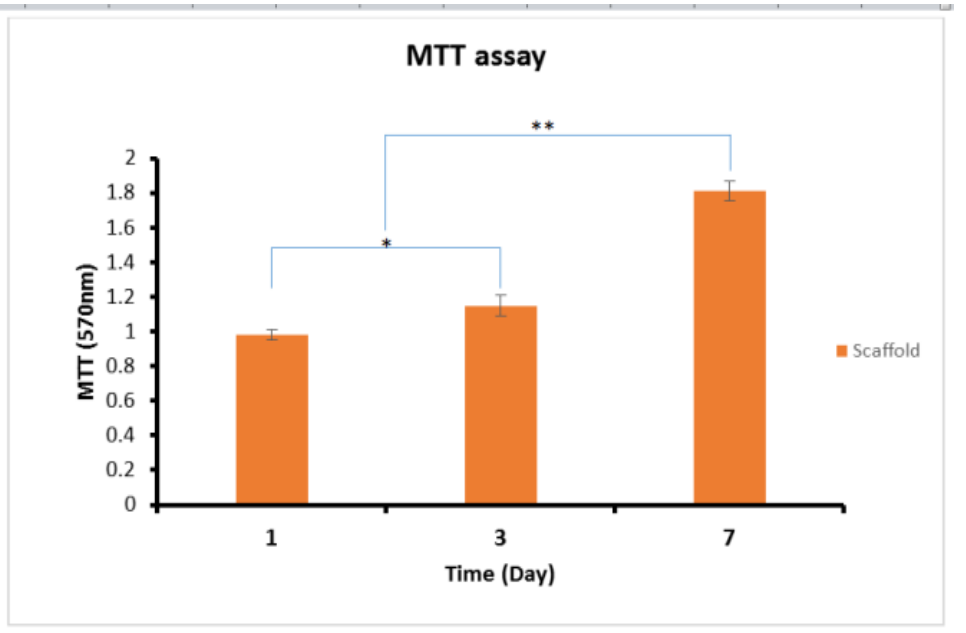
شکل (۷): توزیع پتانسیل زتا در نانو الیاف شیشه زیست فعال

جدول (۳): پتانسیل زتای گزارش‌شده برای سرامیک‌های زیستی و سلول‌های استخوانی

نمونه	پتانسیل زتا در سالین فیزیولوژیکی (mV)
هیدروکسی آپاتیت سینتر شده	+۴/۱±۰/۹
هیدروکسی آپاتیت سینتر نشده	+۱۵±۱/۲
بتا-تری کلسیم فسفات	+۲/۴±۰/۵
سلول‌های استئوبلاست	-۴۰±۵
استخوان	-۷۰
نانو الیاف شیشه زیست فعال سنتز شده	-۱۰/۱

۳-٤- رشد و تکثیر سلولی

نظر به اینکه کلیه نمونه‌ها از ترکیب شیمیایی یکسان برخوردار هستند، بنابراین آزمون رشد و تکثیر سلولی تنها بر روی یک نمونه انجام شد. نتایج آزمون MTT که بر روی نمونه ۱۵ با استفاده از سلولهای MG-63 صورت گرفت، در شکل ۸ ارائه شده است. بررسی میزان تکثیر سلولها با روش MTT بر روی داربست نشان داد که میزان تکثیر سلولها در روزهای ۳ و ۷ نسبت به روز اول افزایش معنی داری داشته است ($P<0/05$).



شکل (۸): نتایج آزمون MTT بر روی نمونه ۱۵ با استفاده از سلولهای MG-63 در طی ۱، ۳ و ۷ روز (P<۰/۰۵)

٤-نتیجه گیری

در این تحقیق ابتدا شیشه زیست فعال به روش سل ژل سنتز شد و با توجه به اینکه الیاف حاصل از الکتروریسی این ماده غیر پیوسته بود، به همراه سورفکتانت و پلیمر پلی وینیل الکل با تغییر پارامترهایی، مورد الکتروریسی قرار گرفت. با بررسی تصاویر میکروسکوپ الکترونی روبشی، الیاف صافی با قطر ۳۰۰ نانومتر تا یک میکرومتر تولید گردید. کلسینه‌کردن در دمای ۶۰۰°C، داربست سرامیکی از جنس شیشه زیست‌فعال شکل داد. آنالیز AFM وجود منافذی در حدود ۲ نانومتر را در سطح رشته‌ها نشان داد. غوطه وری در SBF و ارزیابی آن با FTIR و XRD، بیانگر تشکیل هیدروکسی آپاتیت بر روی داربست است. با تعیین محدوده پتانسیل زتای ترکیب شیشه زیست فعال و مقدار عددی منفی آن، این نتیجه حاصل شد که این شیشه زیست فعال مستعد کشت سلولی و آزمون های درون بدن می باشد. همچنین با نتایج آزمون MTT که بر روی نمونه ۱۵ با استفاده از سلولهای MG-۶۳ صورت گرفت و بررسی میزان تکثیر سلولها با روش MTT بر روی داربست نشان دادندکه میزان تکثیر سلولها در روزهای ۳ و ۷ نسبت به روز اول افزایش معنی داری (P<۰/۰۵) دارند. نانو رشته های شیشه زیست فعال به دلیل ساختار شیمیایی، فیزیکی و زیستی مناسب، یک کاندید مناسب برای استفاده در داربست مهندسی بافت استخوان می‌باشد.

٦-مراجع

[1] C. Chaput, A. Selmani & C. H. Rivard, “Artificial repair”, Current Opinion in Orthopaedics, Vol. 7, pp. 62-68, 1996.

[2] R. Lanza, R. Langer & J. P. Vacanti, Principles of tissue engineering: Academic press, 2011.

[3] J. O. Hollinger, T. A. Einhorn, B. Doll & C. Sfeir, Bone tissue engineering: CRC Press, 2004.

[4] W. Suchanek & M. Yoshimura, “Processing and properties of hydroxyapatite-based biomaterials for use as hard tissue replacement implants”, Journal of Materials Research, Vol. 13, pp. 94-117, 1998.

[5] R. J. Narayan & C. Boehlert, “Advanced processing of biomaterials”, Materials Science & Engineering C, Vol. 28, pp. 321-322, 2008.

[6] Q. Fu, E. Saiz, M. N. Rahaman & A. P. Tomsia, “Bioactive glass scaffolds for bone tissue engineering: state of the art and future perspectives”, Materials Science and Engineering: C, Vol. 31, pp. 1245-1256, 2011.

[7] A. M. El-Kady, A. F. Ali & M. M. Farag, "Development, characterization, and in vitro bioactivity studies of sol–gel bioactive glass/poly (l-lactide) nanocomposite scaffolds", Materials Science and Engineering: C, Vol. 30, pp. 120-131, 2010.

[8] H. W. Kim, J. H. Song & H. E. Kim, "Bioactive glass nanofiber–collagen nanocomposite as a novel bone regeneration matrix", Journal of Biomedical Materials Research Part A, Vol. 79, pp. 698-705, 2006.

[9] J. R. Jones, O. Tsigkou, E. E. Coates, M. M. Stevens, J. M. Polak & L. L. Hench, "Extracellular matrix formation and mineralization on a phosphate-free porous bioactive glass scaffold using primary human osteoblast (HOB) cells", Biomaterials, Vol. 28, pp. 1653-1663, 2007.

[10] A. Balamurugan, G. Balossier, D. Laurent-Maquin, S. Pina, A. Rebelo, J. Faure & et al, "An in vitro biological and anti-bacterial study on a sol–gel derived silver-incorporated bioglass system", dental materials, Vol. 24, pp. 1343-1351, 2008.

[11] T. Kokubo, H. Kushitani, S. Sakka, T. Kitsugi & T. Yamamuro, "Solutions able to reproduce in vivo surface-structure changes in bioactive glass-ceramic A-W3", Journal of biomedical materials research, Vol. 24, pp. 721-734, 1990.

[12] R. C. Bielby, R. S. Pryce, L. L. Hench & J. M. Polak, "Enhanced derivation of osteogenic cells from murine embryonic stem cells after treatment with ionic dissolution products of 58S bioactive sol-gel glass", Tissue engineering, Vol. 11, pp. 479-488, 2005.

[13] C. Garcia, S. Cere & A. Duran, "Bioactive coatings prepared by sol–gel on stainless steel 316L", Journal of non-crystalline solids, Vol. 348, pp. 218-224, 2004.

[14] J. Liu & X. Miao, "Sol–gel derived bioglass as a coating material for porous alumina scaffolds", Ceramics international, Vol. 30, pp. 1781-1785, 2004.

[15] J. R. Jones, G. Poologasundarampillai, R. C. Atwood, D. Bernard & P. D. Lee, "Non-destructive quantitative 3D analysis for the optimisation of tissue scaffolds", Biomaterials, Vol. 28, pp. 1404-1413, 2007.

[16] A. Doostmohammadi, A. Monshi, R. Salehi, M. H. Fathi, Z. Golniya & A. U. Daniels, "Bioactive glass nanoparticles with negative zeta potential", Ceramics International, Vol. 37, pp. 2311-2316, 2011.