

پوشش دهی آلیاژ Ti-6Al-4V با نانوکامپوزیت شیشه زیست فعال - نقره به روش الکتروفوریتیک و بررسی خواص زیست فعالی، آنتی باکتریال و سلول سازگاری

مهدی طالع پور اردکانی و سید علی حسن زاده تبریزی*

مرکز تحقیقات مواد پیشرفته، دانشکده مهندسی مواد، واحد نجف آباد، دانشگاه آزاد اسلامی، نجف آباد، ایران

تاریخ ثبت اولیه: ۱۳۹۶/۰۴/۲۵، تاریخ دریافت نسخه اصلاح شده: ۱۳۹۶/۰۷/۱۰، تاریخ پذیرش قطعی: ۱۳۹۶/۰۹/۲۰

چکیده

در پژوهش حاضر، اثر افزودن نقره (۳، ۵ و ۷٪ وزنی) بر رفتار زیست فعالی، آنتی باکتریال و سلول سازگاری شیشه زیست فعال لایه نشانی شده بر زیرلایه آلیاژ تیتانیوم (Ti-6Al-4V) مورد ارزیابی قرار گرفت. شیشه زیست فعال در این پژوهش به روش سل-ژل تهیه شد و توسط XRD، TEM و FTIR مشخصه یابی گردید. فرآیند پوشش دهی کامپوزیت شیشه زیست فعال-نقره به روش الکتروفوریتیک انجام شد و قابلیت زیست فعالی نمونه ها درون محلول SBF در بازه زمانی ۲۱ روزه مورد آزمایش قرار گرفت. مورفولوژی پوشش ها قبل و بعد از قرار گرفتن درون SBF به کمک SEM بررسی شد. دو رده باکتریایی E. coli و S. aureus به منظور آزمون آنتی باکتریال پوشش تولیدی مورد استفاده قرار گرفتند. علاوه بر این، سمیت سلولی پوشش های تولیدی توسط آزمون MTT بر رده سلولی استئوبلاست MG63 ارزیابی شد. با افزوده شدن نقره به ساختار شیشه زیست فعال، میزان زیست فعالی و سلول سازگاری پوشش کامپوزیت تولیدی کاهش می یابد. همچنین حداقل غلظت لازم به منظور خواص آنتی باکتریالی پوشش کامپوزیتی حاوی ۳، ۵ و ۷٪ وزنی نقره ۰/۱ میلی گرم بر میلی لیتر در معرض باکتری های S. aureus و ۰/۱ میلی گرم بر میلی لیتر برای کامپوزیت حاوی ۳، ۵ و ۷٪ وزنی نقره در معرض باکتری های E. coli بدست آمد. شیشه زیست فعال حاوی ۵٪ وزنی نقره پوشش داده شده بر زیرلایه Ti-6Al-4V با داشتن خواص آنتی باکتریال کارآمد و عدم سمیت سلولی در مقایسه با نمونه های دیگر دارای پتانسیل بالاتری می باشد و می تواند به عنوان کاشتنی استخوانی دارای خواص آنتی باکتریالی در کاربردهای مهندسی بافت استخوان مورد استفاده قرار گیرد.

واژه های کلیدی: شیشه زیست فعال، نقره، الکتروفوریتیک، آنتی باکتریال، مهندسی بافت استخوان، سلول سازگاری.

۱- مقدمه

گسترده ای به عنوان کاشتنی های استخوانی مورد استفاده قرار گرفته اند. متاسفانه، کاشتنی های فلزی (تیتانیوم و فولاد زنگ نزن) در دسته مواد زیست خنثی دسته بندی می شوند، بنابراین پس از کاشته شدن در محیط بدن توسط بافت

در دهه های اخیر، تیتانیوم و آلیاژهای آن بدلیل خواص مکانیکی مناسب و عدم ایجاد سمیت در بافت میزبان به طور

* عهده دار مکاتبات: سید علی حسن زاده تبریزی

نشانی: نجف آباد، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد نجف آباد، دانشکده مهندسی مواد، مرکز تحقیقات مواد پیشرفته

تلفن: ۰۳۱-۴۲۲۹۱۱۱۱، دورنگار: ۰۳۱-۴۲۲۹۱۱۱۱، پست الکترونیکی: hassanzadeh@pmt.iaun.ac.ir

استفاده از فرآیند تر در الکتروفوریتیک، به آسانی می‌توان ضخامت و مورفولوژی فیلم لایه‌نشانی شده را از طریق تنظیم زمان نشست و پتانسیل اعمالی کنترل نمود [۶].

یکی از مشکلات کاشت‌های استخوانی، عفونت پس از عمل جراحی می‌باشد. در صورت عدم درمان مناسب، این عفونت‌ها به یک مشکل جدی تبدیل شده و عمل جراحی ثانویه را به همراه خواهند داشت. به‌طور معمول پزشکان پس از کاشت داربست یا کاشت‌های استخوانی اقدام به تجویز داروهای آنتی‌بیوتیک می‌نمایند که به دلیل خون‌رسانی ضعیف در بافت استخوان، نیاز به غلظت‌های بالایی از دارو می‌باشد. این راهکار باعث مسمومیت دارویی و مشکلات کبدی کلیوی می‌گردد [۷]. یکی از راهکارهای موثر جایگزین که توجه پژوهشگران را به خود جلب نموده استفاده از عوامل آنتی‌باکتریال در داربست‌های استخوانی می‌باشد. این عوامل قادر به جلوگیری از رشد باکتری به صورت موضعی در محل کاشت می‌باشند [۸].

از آنجائیکه مقاوم شدن باکتری‌ها به آنتی‌بیوتیک‌ها یکی دیگر از نگرانی‌های موجود در فرآیند درمان به شمار می‌رود، نقره به عنوان یک عامل آنتی‌باکتریال با پتانسیل بالا بسیار مورد توجه واقع شده است و قادر به حل این مشکل است. نقره در گستره وسیعی از کاربردهای آنتی‌باکتریالی در مقابل باکتری‌های گرم مثبت (مانند استافیلوکوکوس اورئوس) و گرم منفی (مانند اشرشیا کلی) مورد ارزیابی قرار گرفته است. قابل ذکر است که اثر آنتی‌باکتریالی نقره در غلظت‌های بسیار پایین و بدون اعمال اثر سمیت سلولی انجام‌پذیر می‌باشد و در پوشش‌های آلی و معدنی گوناگونی مورد استفاده قرار گرفته است. جالب‌تر آن که، نانوذرات نقره دارای مساحت سطحی بزرگتری نسبت به سلول‌های باکتری می‌باشند که باعث افزایش سرعت واکنش بین این دو می‌گردد [۹]. در سال‌های اخیر اثر افزودن یون‌های نقره، مس و روی بر رفتار آنتی‌باکتریال HAp بررسی گشته است. همچنین اثر افزودن یون‌های مس، نقره و روی به ترکیب بتا تری‌کلسیم فسفات (TCP) و رفتار آنتی‌باکتریال آن توسط

فیروزی احاطه می‌گردند. در نتیجه، این موضوع منجر به توزیع نامناسب تنش در فصل مشترک بافت-کاشتنی و افت خواص مکانیکی کاشتنی می‌شود [۱]. علاوه بر این، کاشت‌های فلزی در محیط فیزیولوژیک بدن وابسته به نوع، دچار خوردگی می‌گردند و محصولات خوردگی می‌تواند باعث التهاب، سمیت و در نهایت مرگ بافت گردد [۲]. برای حل این مشکل و اتصال بین کاشتنی و بافت استخوان، این کاشت‌های فلزی را می‌توان با مواد زیست‌فعال پوشش داد [۳].

شیشه زیست‌فعال با ترکیب اکسیدی و فرمول شیمیایی $\text{SiO}_2\text{-Na}_2\text{O-CaO-P}_2\text{O}_5$ اولین بار در سال ۱۹۷۱ توسط هنج گسترش یافت و در کاربردهای وسیعی از جمله پوشش مواد ارتوپدیک و داربست‌های مهندسی بافت استخوان مورد استفاده قرار گرفت. مکانیزم زیست‌فعالی در این ترکیب به این گونه است که انحلال در شبکه شیشه باعث تشکیل لایه سیلیکا ژل بر سطح می‌گردد و متعاقباً لایه‌نشانی آپاتیت بر سطح شیشه صورت می‌گیرد [۴]. در سال‌های اخیر، روش‌های گوناگونی از جمله ترمال اسپری، لعاب کاری و غوطه‌وری برای پوشش‌دهی شیشه زیست‌فعال بر زیرلایه‌های فلزی مورد بررسی قرار گرفته است، ولی روش الکتروفوریتیک کمتر بدین منظور استفاده شده است [۵].

روش الکتروفوریتیک یکی از فرآیندهای کلوییدی در تولید و پوشش‌دهی سرامیک‌ها و کامپوزیت‌ها است که مزایای از قبیل زمان کوتاه لایه‌نشانی، نیاز به تجهیزات ساده و لایه‌نشانی زیرلایه‌ها با اشکال هندسی گوناگون را داراست. مکانیزم پوشش‌دهی در این روش بدین گونه است که ذرات باردار غوطه‌ور شده در محلول توسط میدان الکتریکی به سمت زیرلایه حرکت کرده و لایه‌نشانی صورت می‌گیرد. در مقایسه با سایر روش‌های شکل‌دهی پیشرفته، فرآیند الکتروفوریتیک بسیار گوناگون بوده و به آسانی می‌تواند برای کاربردهای خاص اصلاح شود. برای مثال، لایه‌نشانی می‌تواند به صورت مسطح، استوانه‌ای یا سایر اشکال و با اندکی تغییر در محل و طراحی الکترودها حاصل شود، به ویژه در هنگام

آماده‌سازی سطح آماده گردید. سطح نمونه‌ها به ترتیب با سمباده‌های ۶۰، ۱۰۰، ۲۲۰، ۴۰۰ و ۶۰۰ آماده‌سازی شد و سپس نمونه‌ها جهت چربی‌زدایی و شستشو به صورت فراصوتی، با محلول استون به مدت ۱۰ دقیقه در دستگاه شستشوی فراصوتی قرار گرفت. پس از اتمام شستشو نمونه‌ها توسط ششوار خشک گردید.

۲-۲- فرآیند تولید و لایه‌نشانی

۲-۲-۱- تولید شیشه زیست‌فعال به روش سل-ژل

به منظور تهیه سل، ابتدا آب بدون یون با اسید کلریدریک دو نرمال مخلوط و توسط همزن مغناطیسی به مدت نیم ساعت هم زده شد. سپس TEOS به همراه واسطه الکلی اتانول و با نسبت مولی مساوی به مخلوط فوق افزوده شد. مخلوط به مدت نیم ساعت دیگر هم زده شد. نسبت مولی آب بدون یون به TEOS ۱۶ در نظر گرفته شد ($(\text{TEOS}/\text{آب})=16$). ماده بعدی که به محلول افزوده شد، TEP بود که پس از اضافه شدن آن، محلول بیست دقیقه هم زده شد. سرانجام کلسیم نترات نیز به محلول افزوده شد و محلول به مدت دو ساعت دیگر توسط همزن مغناطیسی و با سرعت متوسط هم زده شد. در کلیه مراحل تهیه سل دمای محلول حدود 30°C بود. پس از گذشت این زمان و ژله‌ای شدن اولیه محلول، ژل تشکیل شده در دمای 60°C و به مدت ۱۰ ساعت تحت عملیات خشک شدن قرار گرفت. به منظور تکمیل عملیات خارج شدن کامل گازهای اضافی از ترکیب، یک عملیات حرارتی ۱۵ ساعته در دمای 130°C نیز بر روی ژل انجام گرفت. سرانجام، ژل خشک شده در دمای 900°C و به مدت دو ساعت حرارت داده شد. محصول نهایی این عملیات دانه‌های ریز و سفید رنگ شیشه زیست‌فعال بود [۱۲].

۲-۲-۲- تهیه کامپوزیت شیشه زیست‌فعال/نقره

برای تولید کامپوزیت شیشه زیست‌فعال/نقره، با درصدهای ۳، ۵ و ۷ درصد وزنی نقره، پودر شیشه زیست‌فعال، نترات نقره و گلوکز به عنوان عامل احیاء طبق نسبت‌های درون جدول ۱

ماتسوموتو و همکاران بررسی گردید و نتایج آن حاکی از این بود که کامپوزیت AgCu-TCP و AgZn-TCP از لحاظ آنتی باکتریالی فعال تر از کامپوزیت Ag-TCP می‌باشند [۱۰]. پوشش‌دهی لایه لایه فیلم‌های کایتوسان-نانوذرات نقره و هیارین توسط فو و همکاران انجام شد و نشان‌دهنده اثرات قابل توجه آنتی باکتریالی بدون سمیت سلولی بر سلول‌های استخوان‌ساز بود [۱۱]. در پژوهش حاضر لایه‌نشانی کامپوزیت شیشه زیست‌فعال (45S5)-نانوذرات نقره توسط روش الکتروفورتیک بر زیرلایه آلیاژ تیتانیومی انجام شده است و قابلیت زیست‌فعالی، سلول‌سازگاری و رفتار آنتی باکتریال پوشش در مقابل باکتری‌های استافیلوکوکوس اورئوس و اشرشیا کلی مورد ارزیابی قرار گرفته است. به منظور مشخصه‌یابی کامپوزیت تولیدی و پوشش، آزمون‌های پراش اشعه ایکس (XRD)، میکروسکوپ الکترونی روبشی (SEM)، میکروسکوپ الکترونی عبوری (TEM) انجام شد. در واقع جنبه نوآوری پژوهش حاضر بررسی اثر افزودن نانوذرات نقره بر زیست‌فعالی، سلول‌سازگاری شیشه زیست‌فعال و بررسی خواص آنتی باکتریال آن در مقابل دو گروه باکتریایی اشرشیا کلی و استافیلوکوکوس اورئوس می‌باشد.

۲- فعالیت‌های تجربی

۲-۱- مواد اولیه مورد استفاده

پیش‌ماده‌های مورد استفاده جهت تولید شیشه زیست‌فعال (45S5) و کامپوزیت آن با نانوذرات نقره شامل کلسیم نترات چهار آبه $(\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}, \text{Merck})$ ، تری اتیل فسفات (TEP) $(\text{C}_2\text{H}_5\text{O})_3\text{PO}$ ، Aldrich)، تترا اتیل اورتوسیلیکات (TEOS) $(\text{Si}(\text{OC}_2\text{H}_5)_4, \text{Aldrich})$ ، نترات نقره $(\text{AgNO}_3, \text{Aldrich})$ و گلوکز (Aldrich) می‌باشد. در این پژوهش از زیرلایه آلیاژ تیتانیومی (گرید ۵) با ابعاد 30×10 میلی متر مربع و ضخامت ۵ میلی متر استفاده شد. نمونه‌های مورد نظر جهت چسبندگی بهتر توسط روش‌های

جدول ۱: درصد وزنی مواد اولیه جهت ساخت کامپوزیت شیشه زیست فعال/نقره.

کد نمونه	درصد وزنی	شیشه زیست فعال (g)	نیترات نقره (g)	گلوکز (g)
A	۳	۲	۰/۰۹۶	۰/۴۹۹
B	۵	۲	۰/۱۶۴	۰/۸۵۳
C	۷	۲	۰/۲۳۷	۱/۲۳۱

جدول ۲: مقادیر درصد وزنی شیشه زیست فعال و نقره در سوسپانسیون.

کد نمونه	درصد شیشه زیست فعال	درصد نقره
BG	۱۰۰	۰
A	۹۷	۳
B	۹۵	۵
C	۹۳	۷

۲-۳- آماده سازی محیط کشت باکتری ها و آزمون

آنتی باکتریال

به منظور بررسی خواص آنتی باکتریال پوشش تولیدی از گونه های باکتری شامل باکتری های گرم منفی اشرشیا کلی و باکتری های گرم مثبت استافیلوکوکوس اورئوس استفاده شد. این باکتری ها قبل از استفاده در شرایط هوازی و در محیط مولر هینتون برات برای مدت ۲۴ ساعت در دمای 37°C گرما گذاری شدند. پس از کشت ۲۴ ساعته باکتری ها، غلظتی معادل استاندارد ۰/۵ مک فارلند تهیه و توسط سوآپ استریل بار و شکست خطی بر روی پلیت حاوی محیط کشت مولر هینتون آگار، کشت یکنواخت داده شد. سپس غلظت های مختلفی از نمونه ها به درون پتری دیش های کشت مولر هینتون آگار حاوی باکتری اشرشیا کلی و باکتری استافیلوکوکوس اورئوس به صورت جداگانه منتقل گردیدند. در نهایت پتری دیش های کشت مولر هینتون آگار به مدت زمان ۱۸ ساعت به داخل انکوباتور با دمای 37°C انتقال یافتند.

۲-۴- تعیین زیست فعالی در محلول شبیه سازی شده

بدن (SBF)

به منظور بررسی قابلیت و توانایی پوشش نانو کامپوزیتی در تشکیل آپاتیت، از آزمون غوطه وری در SBF بهره گرفته شد. نمونه ها قبل از قرار گرفتن در SBF آماده سازی شدند. به صورتی که مساحت ۱ سانتی متر مربع از هر نمونه در نظر گرفته شد و بقیه نمونه با لاک به صورت کامل پوشیده شد تا در تماس با محلول SBF نباشد و مساحت موثر برای تاثیر بر این آزمون مشخص باشد. در هر ظرف ابتدا زیر لایه پوشش

درون ۲۰ میلی لیتر آب مقطر ریخته و روی همزن مغناطیسی به خوبی هم زده شد تا باهم ترکیب شده و ترکیبات حاصله را در دماهای ۲۰۰، ۴۰۰ و 600°C به مدت ۲ ساعت قرار داده تا نقره روی سطح شیشه زیست فعال تشکیل شود. قابل ذکر است که شرایط کلسیناسیون شامل اتمسفر آرگون و آهنگ افزایش دمای کوره بر $2^{\circ}\text{C}/\text{min}$ تنظیم شد.

۲-۲-۳- پوشش دهی به روش الکتروفور تیک

برای تولید سوسپانسیون شیشه زیست فعال/نقره از حلال متانول ($\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$, Merck) استفاده شد. 100 cc از حلال مورد استفاده (متانول) درون بشر ریخته شد و در حین هم خوردن ۲ گرم پودر کامپوزیتی شیشه زیست فعال/نقره به حلال اضافه گردید. مقادیر و نسبت وزنی شیشه زیست فعال و نقره در جدول ۲ نشان داده شده است. سپس محلول به مدت ۱۰ دقیقه روی همزن قرار گرفت تا ذرات در حلال به خوبی توزیع شوند. پس از آن ۱ گرم فنول اتانول آمین به سوسپانسیون مورد نظر اضافه شد. در نهایت ظرف حاوی مواد مورد نظر به مدت ۲۴ ساعت روی همزن مغناطیسی در دمای اتاق قرار گرفت تا سوسپانسیون به یکنواختی مطلوبی برسد. پس از آن سوسپانسیون به مدت ۳۰ دقیقه درون همزن فراصوت قرار داده شد. پس از آن، ترکیبات کامپوزیتی شیشه زیست فعال/نقره به روش لایه نشانی الکتروفور تیک بر روی زیر لایه های آلیاژ تیتانیومی پوشش داده شدند. زمان پوشش دهی نمونه ها ۵ دقیقه انتخاب شد. فاصله آند و کاتد یک سانتی متر و ولتاژ پوشش دهی ۵۰ ولت انتخاب شد تا یک پوشش با ضخامت مناسب حاصل شود.

از MTT به هر چاهک افزوده شد. برای حل شدن بهتر رسوب MTT، پلیت به مدت ۱۵ دقیقه بر دستگاه شیکر قرار گرفت. در نهایت با استفاده از دستگاه الیزاریدر (STATFAX2100, USA) و طول موج ۵۴۵ نانومتر میزان تغییرات رنگی ارزیابی شد. چاهک دارای سلول‌های بیشتر چگالی نوری (OD) بالاتری نسبت به چاهک با سلول کمتر نشان می‌دهد. این آزمون برای رده سلولی MG63 (سلول‌های سرطان استخوان) از انستیتو پاستور ایران و به روش عصاره‌گیری و در مدت زمان هفت روز انجام شد.

۲-۶- مشخصه‌یابی

مورفولوژی و ساختار پوشش‌های تولیدی با استفاده از آنالیز میکروسکوپ الکترونی روبشی (SEM) مدل Philips ESEM XL30 مورد ارزیابی قرار گرفت. ترکیب فازی توسط پراش اشعه ایکس (XRD) مدل Philips TW3710 مشخصه‌یابی گردید. مورفولوژی، ساختار و بررسی پیوندهای شیمیایی شیشه زیست‌فعال تولید شده به ترتیب با استفاده از میکروسکوپ الکترونی عبوری (TEM) (JEM-100CX) و طیف‌سنجی فروسرخ (FTIR) (JASCO 6300) مورد آنالیز قرار گرفت. همچنین آزمون طیف‌سنجی پلاسمای جفت شده القایی (ICP) به منظور بررسی غلظت یون کلسیم موجود در SBF در فرآیند آزمون زیست‌فعالی استفاده گردید.

۳- نتایج و بحث

۳-۱- مشخصه‌یابی شیشه زیست‌فعال

۳-۱-۱- بررسی نتیجه XRD

شکل ۱، الگوی پراش اشعه ایکس با زاویه زیاد پودر اولیه شیشه زیست‌فعال را که به‌طور مستقیم از روش سل-ژل بدست آمده و در دمای 900°C عملیات حرارتی شده است را نشان می‌دهد. این الگو هیچ فاز بلورینه‌ای جز پیک و وسیع موجود در گستره $25-35^{\circ}\text{C}$ که اشاره به مشخصه ساختار

داده شده قرار داده شد و سپس حجم مشخصی از SBF به آن افزوده شد.

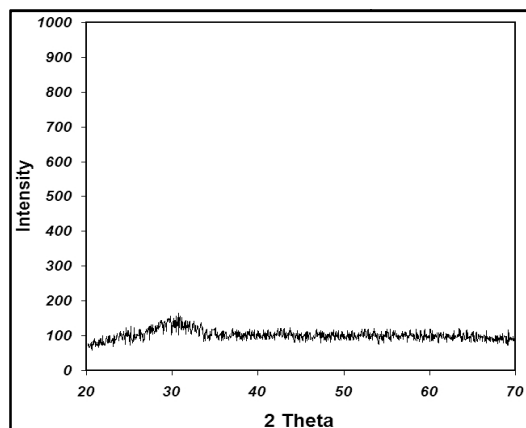
۲-۵- ارزیابی سلول‌سازی

۲-۵-۱- آماده‌سازی محیط کشت

پودر DMEM حاوی ال‌گلوتامین به میزان ۱۰ گرم به همراه ۳/۷ گرم پودر بی‌کربنات سدیم، درون ارلن حاوی ۹۰۰ میلی‌لیتر آب دی‌یونیزه ریخته شده و به ازای هر میلی‌لیتر ۱۰۰ میکروگرم استریتوما سین و ۱۰۰ واحد پنی‌سیلین به آن اضافه گردید. پس از انحلال کامل پودر، pH محلول مورد نظر با استفاده از هیدروکلریدریک اسید ۱ مولار، به مقدار ۷/۲ تنظیم گردید. سپس محلول به حجم ۱۰۰۰ میلی‌لیتر رسانده شد. در انتها محیط کشت ساخته شده در فضای استریل زیر هود توسط فیلتر ۰/۲۲ میکرون استریل گردید و داخل ظروف شیشه‌ای استریل در دمای 4°C نگهداری شد.

۲-۵-۲- آزمون MTT

در این پژوهش ابتدا حدود 1×10^4 سلول در هر کدام از چاهک‌های ظرف کشت ۹۶ چاهکی ریخته شد و حدود ۱۰۰ میکرولیتر محیط کشت به هر یک از چاهک‌ها اضافه گردید. سپس پلیت در داخل انکوباتور به مدت ۲۴ ساعت قرار گرفت. پس از چسبیدن سلول‌ها و اطمینان از سلامتی آنها، محیط کشت به‌طور کامل خارج شد و ۹۰ میکرولیتر عصاره پوشش‌های اعمال شده بر زیرلایه آلیاژ تیتانیومی، به همراه ۱۰ میکرولیتر FBS به سلول‌ها اضافه گردید. یک نمونه نیز به عنوان شاهد در مجاورت محیط کشت استاندارد قرار داده شد. مجدداً ظرف کشت به مدت ۲۴ ساعت به انکوباتور منتقل گردید. در روز سوم، محیط به‌طور کامل خارج و ۱۰۰ میکرولیتر محلول MTT (۰/۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر) بر روی داخل انکوباتور قرار گرفت. بعد از این زمان، MTT خارج گردید و ۱۰۰ میکرولیتر ایزوپروپانول (Aldrich, USA) سلول‌ها ریخته شد. سپس ظرف کشت به مدت ۴ ساعت در برای انحلال رسوب سیاه رنگ حاصل



شکل ۱: الگوی پراش اشعه ایکس شیشه زیست فعال.

۳-۲-۲- مشخصه یابی کامپوزیت شیشه زیست فعال/نقره

۳-۲-۱- بررسی نتایج XRD

شکل ۴، الگوی XRD نمونه B که حاوی ۵ درصد وزنی نقره می باشد را در دماهای مختلف عملیات حرارتی شده را نشان می دهد. با توجه به الگوی کامپوزیت قبل از عملیات حرارتی که با نام Bioglass در تصویر ۴ مشخص است، نیترات نقره اضافه شده به همان صورت باقی مانده و هیچ نقره ای تشکیل نشده است. در دمای 100°C ، پیک های ضعیف نقره تشکیل شده که این مساله نشان دهنده تشکیل شدن نقره از نیترات نقره می باشد. با افزایش دما، پیک های مربوط به نقره قوی تر شده و به شدت آنها افزوده شده است به طوری که قوی ترین پیک های نقره در دمای 400°C وجود دارد. پیک های موجود در زوایای 2θ ، $38/2$ ، $44/3$ ، $64/4$ ، $77/5$ و $81/5$ به ترتیب نماینده صفحات بلورین (۱۱۱)، (۲۰۰)، (۲۲۰)، (۳۱۱) و (۲۲۲) مربوط به نقره می باشند و با کارت JCPDS با شماره ۰۷۸۳-۰۰۵ مربوط به الگوی پراش اشعه ایکس Ag در تطابق هستند. قابل ذکر است که پس از افزایش دما از 400°C به 600°C ، شدت پیک های نقره کاهش پیدا کرده است که می توان به واکنش نقره با گروه های فسفاتی موجود در ترکیب شیشه زیست فعال نسبت داد. همان گونه که در الگوی اشعه ایکس نمونه کلسینه شده در دمای 600°C مشاهده می شود، پیک به نسبت ضعیفی در زاویه 2θ ، $33/24$ به وجود آمده که مربوط به صفحه (۲۱۰)

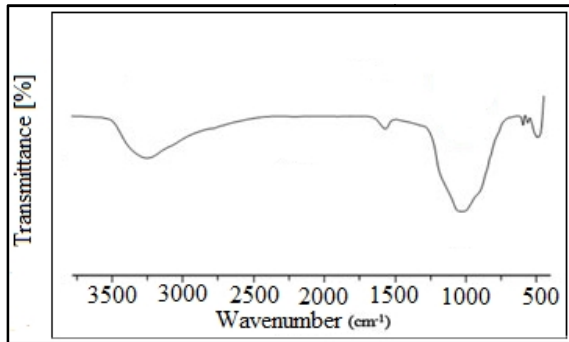
مواد آمورف پایه سیلیکاتی دارد، نشان نمی دهد و نتیجه این آزمون حصول ساختار شیشه ای را در شیشه زیست فعال ساخته شده را تایید می کند.

۳-۱-۲- ارزیابی شیشه زیست فعال تولیدی توسط TEM

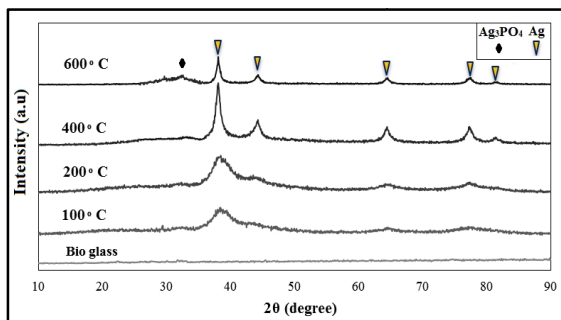
نتایج بررسی اندازه و شکل ذرات پودر تولید شده، به کمک TEM در شکل ۲ آورده شده است. شکل و گستره اندازه ذرات (کمتر از 100 nm) با نتایج سایر پژوهشگران نیز مطابقت دارد که برای دستیابی به یک پوشش نانو ساختار و یکنواخت ضروری است [۱۳]. تولید نانوذرات شیشه زیست فعال صرف نظر از فوایدی که در تشکیل پوشش همگن دارد، از جهات دیگر نیز حائز اهمیت است. در بسیاری از موارد نیاز به انحلال پودر سرامیک در محلول های دیگر به منظور پوشش دهی به روش سل-ژل است. برخی محققین به منظور پوشش دهی شیشه زیست فعال روی زیرلایه فلزی از این روش بهره گرفته اند. در این روش پودر زیست سرامیکی در اندازه های بزرگتر از 100 nm در محلول مورد نظر غیر قابل حل بوده و منجر به تولید پوشش ناهمگن شده است [۱۳].

۳-۱-۳- بررسی نتیجه FTIR

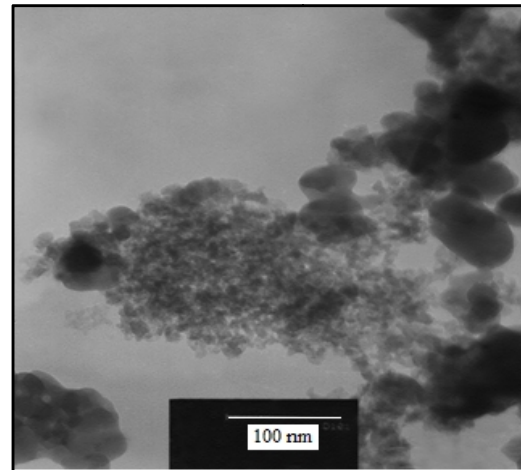
شکل ۳، طیف فروسرخ شیشه زیست فعال را نشان می دهد. به طور معمول، FTIR به منظور ارزیابی بیشتر شیمی سطح و مشخصه های مواد مورد استفاده قرار می گیرد [۱۴]. پیک موجود در عدد موجی 500 cm^{-1} مربوط به ارتعاشات خمشی نامتقارن PO_4^{3-} می باشد. پیک با شدت بالا در عدد موجی 1112 cm^{-1} اشاره به ارتعاشات کششی نامتقارن گروه های Si-O-Si دارد. همچنین وجود پیک های موجود در عدددهای موجی 1635 و 3250 cm^{-1} به ترتیب به پیوندهای خمشی مربوط به مولکول آب و پیوند کششی بین گروه های هیدروکسیدی مولکول آب اشاره دارد [۱۵، ۱۶]. در واقع وجود پیک های جذب مربوط به آب را می توان به جذب بخار آب نسبت داد [۱۷].



شکل ۳: طیف فرسوخ شیشه زیست فعال.



شکل ۴: الگوی پراش اشعه ایکس از کامپوزیت شیشه زیست فعال- ۵٪ وزنی نقره کلسینه شده در دماهای گوناگون.



شکل ۵: تصویر میکروسکوپ الکترونی عبوری از نانوذرات شیشه زیست فعال.

ترکیب Ag_3PO_4 می‌باشد. در نتیجه دمای بهینه برای عملیات حرارتی کامپوزیت و تشکیل نقره از نترات نقره دمای $400^\circ C$ انتخاب شد و عملیات حرارتی نمونه‌های کامپوزیتی دیگر در دمای $400^\circ C$ انجام گردید.

۳-۲-۲- بررسی تصاویر SEM

شکل ۵، تصاویر SEM از پوشش‌های اعمال شده شامل شیشه زیست فعال و کامپوزیت شیشه زیست فعال و درصد‌های گوناگون نقره با دو بزرگنمایی را بر زیرلایه آلیاژ تیتانیومی نشان می‌دهند. قابل ذکر است که نمونه‌های پوشش داده شده بر سطح صاف و صیقلی زیرلایه به روش الکتروفوریتیک چسبندگی مناسبی ندارند، بنابراین برای بهبود چسبندگی پوشش به زیرلایه باید نمونه‌های پوشش داده شده تحت عملیات حرارتی قرار گیرند. با توجه به نتایج آزمون XRD، دمای بهینه برای کلسیناسیون کامپوزیت مذکور $400^\circ C$ می‌باشد و به منظور مقایسه پوشش شیشه زیست فعال بدون نقره، این نمونه به همراه بقیه نمونه‌ها در همین دما مورد عملیات حرارتی قرار گرفت. شرایط کوره نیز شامل اتمسفر آرگون و مدت زمان نیز ۲ ساعت انتخاب گردید. طبق تصاویر بدست آمده در ساختار پوشش بدون نقره ترک به وجود آمده است که می‌توان دلیل آن را در اختلاف ضریب انبساط حرارتی شیشه زیست فعال و زیرلایه و خواص

مکانیکی ضعیف شیشه زیست فعال جستجو کرد. اما پس از افزوده شدن نقره ترکی در ساختار پوشش مشاهده نمی‌گردد. سینگ و همکاران گزارش کردند که افزودن فاز ثانویه فلزی یا سرامیکی به ترکیب هیدروکسی آپاتیت که دارای خواص مکانیکی ضعیفی به منظور پوشش‌دهی می‌باشد، می‌تواند خواص مکانیکی آن را بهبود بخشیده و از ایجاد ترک در ساختار جلوگیری کند [۱۸]. پس به نظر می‌رسد افزودن نقره به ترکیب شیشه زیست فعال هم همین نقش را در بهبود مقاومت به ترک در این کامپوزیت بازی کند. قابل ذکر است که افزایش درصد نقره در ساختار پوشش باعث افزایش اندازه ذرات پوشش شده است و در نمونه حاوی ۷ درصد وزنی نقره، ساختار پوشش کمترین یکنواختی را پیدا کرده است. نکته حائز اهمیت عدم وجود ترک در ساختار پوشش سه نمونه کامپوزیتی می‌باشد. حصول یک پوشش منسجم، یکنواخت و بدون عیوب ظاهری از مهمترین اهداف فرآیند پوشش‌دهی به روش الکتروفوریتیک است. وجود چنین پوششی جهت رسیدن به خواص خوردگی و زیستی مناسب

برای زیرلایه بسیار لازم و ضروری خواهد بود. همچنین توزیع اندازه ذرات در سطح پوشش‌ها باعث به وجود آمدن تخلخل شده است که می‌تواند به افزایش آهنگ تبادل یونی ساختار پوشش با محیط اطراف آن گردد که به تسریع فرآیند زیست‌فعالی کمک می‌کند [۱۹].

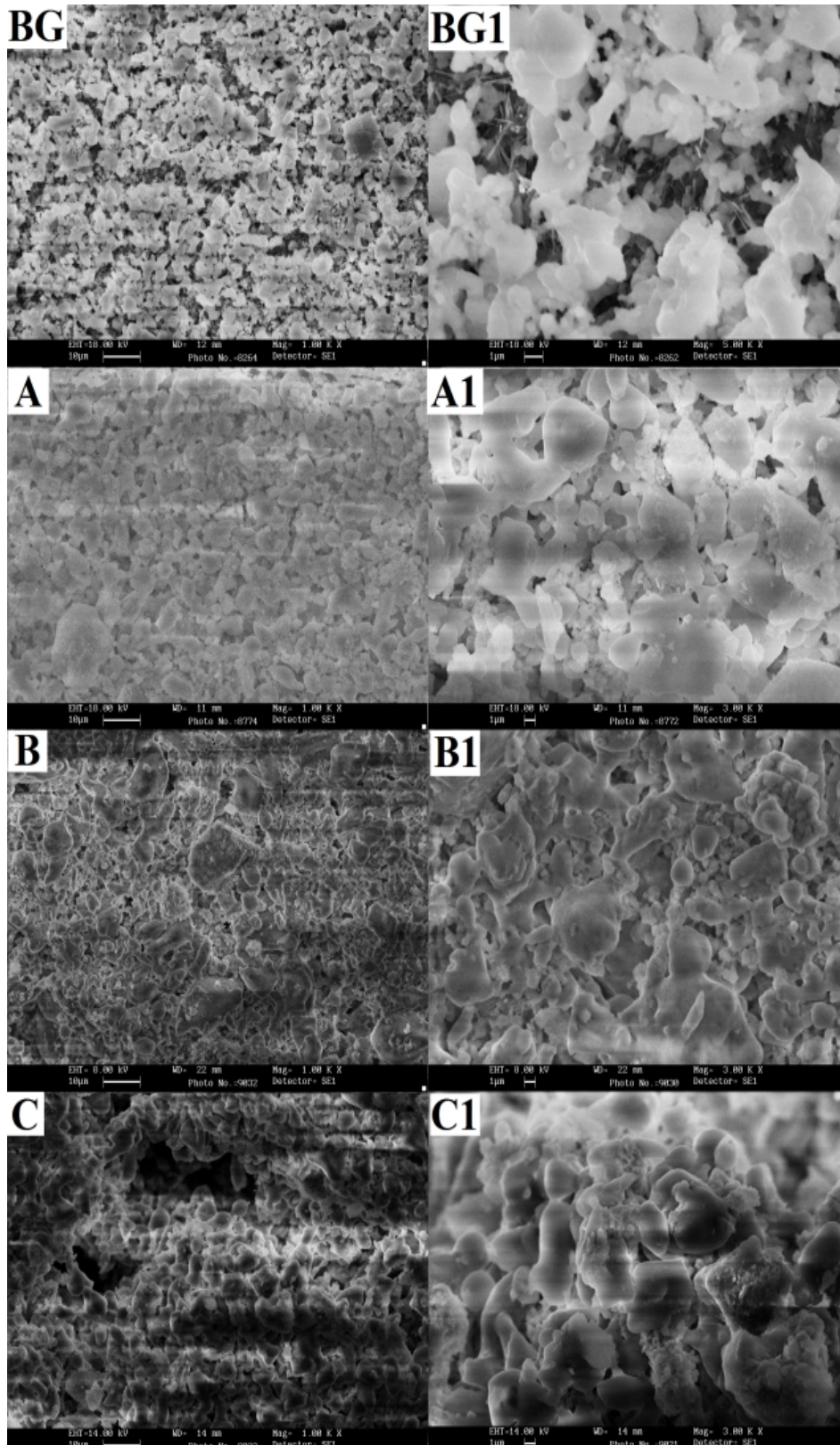
۳-۲-۳- بررسی زیست‌فعالی پوشش‌ها در SBF

شکل ۶، تصاویر SEM از پوشش‌های اعمال شده شامل شیشه زیست‌فعال و کامپوزیت شیشه زیست‌فعال و درصدهای گوناگون نقره پس از ۲۱ روز غوطه‌وری درون SBF با دو بزرگمایی را بر زیرلایه آلیاژ تیتانیومی نشان می‌دهند. مکانیزم لایه‌نشانی آپاتیت طی پروسه غوطه‌وری شیشه‌های زیست‌فعال درون SBF شامل سه قسمت است: ۱- لیچینگ ۲- انحلال ۳- رسوب گذاری. در قسمت اول به‌طور عمومی تبادل یونی بین یون‌های H^+ یا H_3O^+ و عناصر قلیایی یا قلیایی خاکی رخ می‌دهد. این تبادل یونی به راحتی انجام می‌شود چون این عناصر مانند کلسیم، جزو شبکه شیشه نیستند و به منظور اصلاح وارد شبکه آن شده‌اند و در نهایت در این بخش pH محیط افزایش می‌یابد. در قسمت دوم انحلال شبکه با شکستن پیوند سیلیکون و اکسیژن رخ می‌دهد و سیلیکون موجود در سطح با گروه‌های هیدروکسیلی واکنش می‌دهد و تشکیل سیلیکا ژل بر سطح انجام می‌شود. در قسمت سوم یا واکنش رسوب‌گذاری، یون‌های کلسیم و فسفات رها شده از شبکه شیشه، به همراه یون‌های کلسیم و فسفر موجود درون محلول پایه SBF، یک لایه غنی از کلسیم فسفات را بر سطح ایجاد می‌کنند و با گذشت زمان و پیوستن آنیون‌های کربنات به کلسیم فسفات رسوب کرده بر سطح، این ترکیب بلورینه می‌گردد [۳،۴]. همان‌گونه که در تصویر ۶ مشاهده می‌شود، بلورهای آپاتیت بر سطوح تمامی پوشش‌ها شامل شیشه زیست‌فعال خالص و کامپوزیت آن با درصد گوناگون نقره به‌طور واضح قابل تشخیص است. اما به منظور درک مناسب قابلیت زیست‌فعالی پوشش‌ها از آزمون ICP بهره گرفته شد. نتایج این آزمون در جدول ۳ پس از ۲۱ روز غوطه‌وری به

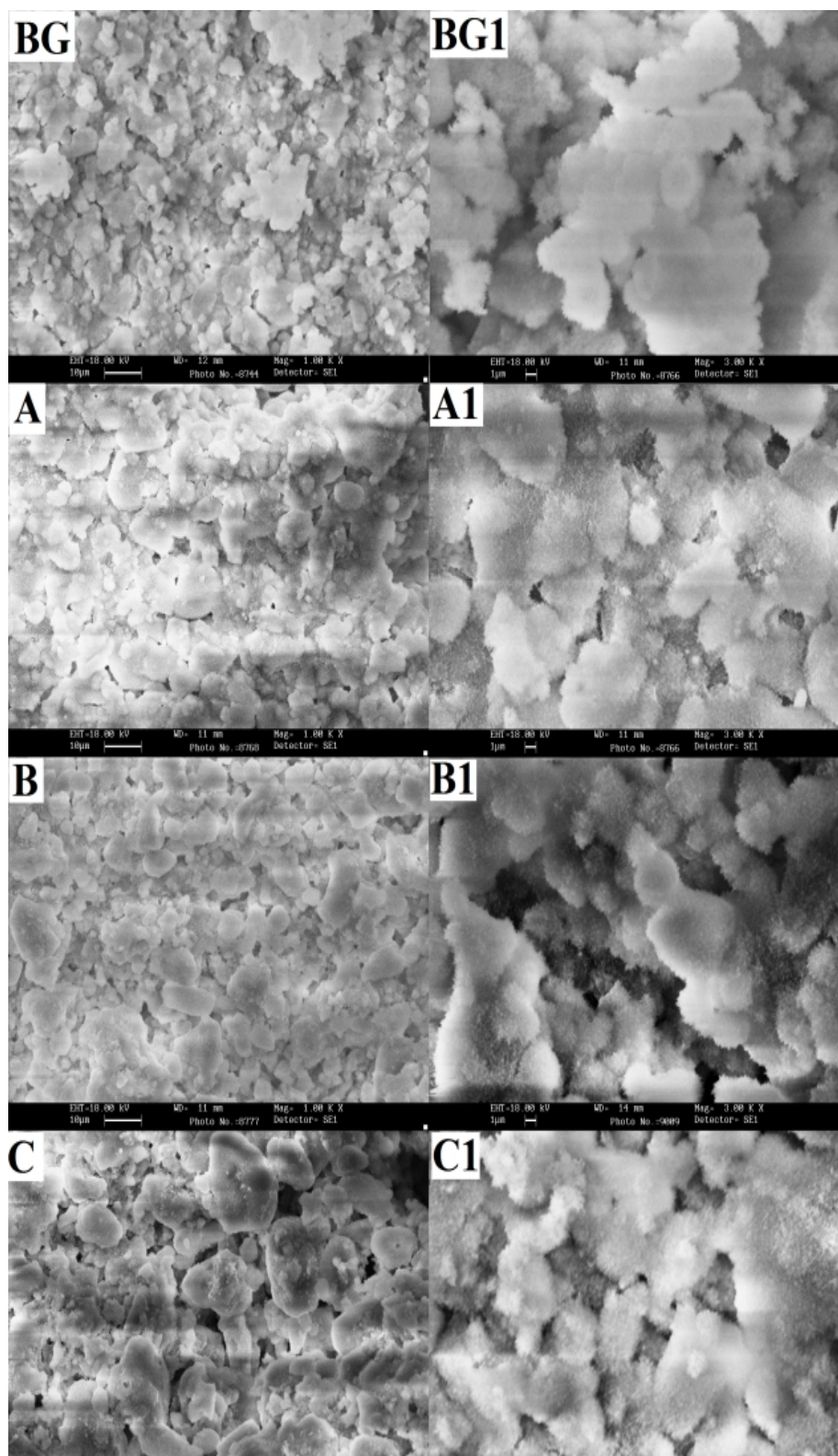
نمایش درآمده است. غلظت یون‌های کلسیم در SBF قبل از پروسه غوطه‌وری در حدود ۱۰۰ ppm می‌باشد [۲۰]. همان‌گونه که توضیح داده شد، پس از غوطه‌وری نمونه‌ها درون SBF انحلال یون‌های کلسیم صورت می‌گیرد و غلظت آن درون محلول افزایش می‌یابد و این افزایش تا جایی ادامه می‌یابد که محلول اشباع شده و فرآیند رسوب‌گذاری رخ دهد و در نتیجه آن غلظت یون‌های کلسیم رو به کاهش می‌گذارد. پس با توجه به غلظت یون‌های کلسیم می‌توان قابلیت زیست‌فعالی نمونه‌ها را مورد قیاس قرار داد. با توجه به جدول ۳، با افزودن نقره به ساختار شیشه زیست‌فعال از قابلیت زیست‌فعالی آن کاسته شده ولی همچنان کامپوزیت‌های مذکور قابلیت زیست‌فعالی را دارا می‌باشند. دلیل کاهش قابلیت زیست‌فعالی کامپوزیت‌ها را می‌توان به کاهش نسبت شیشه به نقره در کامپوزیت‌ها نسبت داد.

۳-۳- بررسی رفتار آنتی باکتریال نمونه‌ها

در این قسمت به بررسی رفتار آنتی باکتریال پوشش‌های شیشه زیست‌فعال و کامپوزیت شیشه زیست‌فعال و درصدهای گوناگون نقره پرداخته خواهد شد. قابل ذکر است که در این پژوهش، دو رده باکتریایی اشرشیا کلی و استافیلوکوکوس اورئوس به منظور ارزیابی رفتار آنتی باکتریال پوشش‌های فوق انتخاب شدند. استافیلوکوکوس اورئوس باکتری گرم مثبت و بی‌هوازی اختیاری است و یکی از شایع‌ترین باکتری‌های بیماری‌زا است. این باکتری بدلیل تولید رنگدانه طلایی کارتنوئیدی به نام استافیلوزانتین، کلنی‌های زرد رنگی را ایجاد می‌نماید. این پیگمان در بیماری‌زایی نقش دارد زیرا به عنوان ماده آنتی اکسیدان عمل کرده و موجب در امان ماندن باکتری در برابر رادیکال‌های آزاد اکسیژن می‌شود. رادیکال‌های آزاد اکسیژن توسط سیستم ایمنی (گلوبول‌های سفید) میزبان برای کشتن باکتری‌ها تولید می‌شوند. این باکتری گستره وسیعی از عفونت‌ها از عفونت‌های ساده پوستی (مانند جوش‌دانه، کورک، کفگیرک، گل‌مژه و آبه) گرفته تا بیماری‌های خطرناک‌تر (مانند پنومونی،



شکل ۵: تصاویر میکروسکوپ الکترونی روبشی از شیشه زیست‌فعال و کامپوزیت آن با درصد گوناگون نقره در دو بزرگنمایی، شیشه زیست‌فعال (BG و BG1)، شیشه زیست‌فعال-۳٪ وزنی نقره (A و A1)، شیشه زیست‌فعال-۵٪ وزنی نقره (B و B1)، شیشه زیست‌فعال-۷٪ وزنی نقره (C و C1). در تصاویر سمت چپ ۱۰ μm و در سمت راست ۱ μm می‌باشد.



شکل ۶: تصاویر میکروسکوپ الکترونی رویشی از شیشه زیست فعال و کامپوزیت آن با درصد گوناگون نقره در دو بزرگنمایی پس از ۲۱ روز غوطه‌وری درون SBF، شیشه زیست فعال (BG و BG1)، شیشه زیست فعال - ۳٪ وزنی نقره (A و A1)، شیشه زیست فعال - ۵٪ وزنی نقره (B و B1)، شیشه زیست فعال - ۷٪ وزنی نقره (C و C1). اسکیل بار در تصاویر ستون سمت چپ ۱۰ میکرومتر و در ستون سمت راست ۱ میکرومتر می باشد.

داده است که نشان دهنده کم اثر بودن این مقدار نقره در غلظت‌های پایین در مقابل باکتری‌های استافیلوکوکوس اورئوس می‌باشد.

این موضوع توسط کیم و همکاران نیز مورد بررسی قرار گرفت و این گروه نیز به نتایج مشابه دست یافتند و دلیل مقاومت بالاتر باکتری‌های استافیلوکوکوس اورئوس نسبت به اشرشیا کلی را به ساختار متفاوت غشایی این رده باکتری نسبت دادند. قابل ذکر است که مکانیزمی که به رفتار آنتی باکتریالی یون‌های نقره نسبت می‌دهند به این گونه است که این یون‌ها در سیستم تنفسی و اسید نوکلئیک‌های باکتری نفوذ می‌کنند و با ایجاد اختلال در آنها باعث مرگ آن می‌شوند [۹].

۳-۴- بررسی رفتار سلول‌سازی نمونه‌ها

به‌طور معمول برای استفاده از یک ماده یا هر وسیله بهداشتی- پزشکی که با بافت موجود زنده مواجهه مستقیم دارد لازم است آزمون سمیت سلولی برای آن انجام شود تا در صورت دارا بودن عدم سمیت سلولی یا میزان پایین‌تر از استانداردهای مربوطه بتواند وارد مراحل بعدی آزمایش بشود. منظور از آزمون‌های سمیت سلولی روش‌هایی هستند که بررسی کننده اثرات ناخواسته ترکیبات مختلف بر سلول هستند. این روش‌ها در محیط برون تنی (کشت سلول) استفاده زیادی دارند. از مهمترین این روش‌ها می‌توان به MTT اشاره کرد. آزمون MTT یکی از روش‌های رنگ‌سنجی متداول برای بررسی میزان سمیت مواد بر حیات سلول است. این مساله با سنجش قدرت احیاء رنگ تترازولیوم توسط آنزیم‌های سلولی و تبدیل آن به بلورهای فورمازان با رنگ بنفش مورد بررسی قرار می‌گیرد. در نتیجه فرآیند احیاء، بلورهای در پژوهش حاضر آزمون سمیت سلولی نمونه‌های مختلف شامل شیشه زیست‌فعال و کامپوزیت شیشه زیست‌فعال و درصد‌های گوناگون نقره در مجاورت با سلول‌های استخوانی MG63، به روش MTT و در دوره زمانی ۷ روز انجام شد. نتایج این

جدول ۳: غلظت یون‌های کلسیم پس از ۲۱ روز فرآیند غوطه‌وری نمونه‌ها درون SBF.

نمونه‌ها	BG	A	B	C
غلظت یون‌های کلسیم (ppm)	۵۲٫۳	۵۸٫۶	۶۲٫۵	۶۶٫۲

منزیت، استئومیلیت، اندوکاردیت، سندرم شوک سمی و سپتی سمی) را ایجاد می‌نماید. استافیلوکوکوس اورئوس به عنوان یکی از ۵ عامل شایع ایجاد کننده عفونت‌های بیمارستانی به ویژه عفونت‌های زخم پس از جراحی است [۲۱].

اشرشیا کلی که به‌طور کلی به باسیل معروف است، باکتری گرم منفی، متحرک، هوازی بی‌هوازی اختیاری (قابلیت رشد در دو محیط) می‌باشد. باکتری اشرشیا کلی به صورت عادی در دستگاه گوارش انسان زندگی می‌کند و معمولاً بیماری‌زا نیست. ولی سویه‌های خاصی از این باکتری تحت شرایط خاص می‌توانند بیماری‌های مختلفی ایجاد کنند [۲۱].

نتایج آزمون آنتی باکتریال شیشه زیست‌فعال و کامپوزیت آن با درصد‌های گوناگون نقره بر دو رده باکتری‌های استافیلوکوکوس اورئوس و اشرشیا کلی به ترتیب در جداول ۴ و ۵ به نمایش درآمده است. همان‌گونه که در جداول ۴ و ۵ مشاهده می‌گردد، غلظت‌های گوناگونی از نمونه‌ها ساخته شده و در معرض باکتری‌های مذکور قرار داده شده است تا حداقل غلظت برای جلوگیری از رشد باکتری‌ها بدست آید. با توجه به نتایج حاصل شده، شیشه زیست‌فعال خالص هیچ‌گونه خاصیت آنتی باکتریالی را از خود نشان نداده است که امری قابل انتظار بود. اما نمونه‌های حاوی نقره (۵ و ۷ درصد) در غلظت ۰/۱ میلی گرم بر میلی لیتر باعث عدم رشد باکتری‌های مذکور شده‌اند و نمونه حاوی ۳ درصد وزنی نقره در غلظت ۰/۲ میلی گرم بر میلی لیتر در مقابل باکتری استافیلوکوکوس اورئوس اثر آنتی باکتریالی از خود نشان داده است و در نقطه مقابل با غلظت ۰/۱ میلی گرم بر میلی لیتر در مقابل باکتری اشرشیا کلی اثر ضد باکتریایی از خود بروز

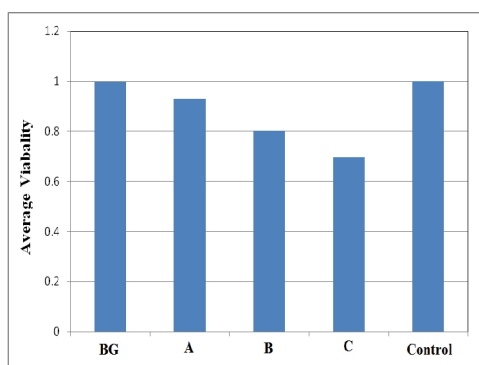
جدول ۴: نتایج آزمون آنتی باکتریال نمونه‌ها در مقابل باکتری‌های استافیلوکوکوس اورئوس (+ نشانه رشد، - نشانه عدم رشد).

غلظت نمونه‌ها	(0.2 mg/ml)	(0.1 mg/ml)	(0.05 mg/ml)	(0.025 mg/ml)
C	-	-	+	+
B	-	-	+	+
A	-	-	+	+
BG	+	+	+	+

جدول ۵: نتایج آزمون آنتی باکتریال نمونه‌ها در مقابل باکتری‌های اشرشیا کلی (+ نشانه رشد، - نشانه عدم رشد).

غلظت نمونه‌ها	(0.2 mg/ml)	(0.1 mg/ml)	(0.05 mg/ml)	(0.025 mg/ml)
C	-	-	+	+
B	-	-	+	+
A	-	+	+	+
BG	+	+	+	+

استفاده از نانوذرات نقره می‌تواند استفاده از این نوع کامپوزیت‌ها را از لحاظ اقتصادی توجیه پذیرتر کند.



شکل ۷: میزان زیستایی نمونه‌های گوناگون در بازه ۷ روز.

۴- نتیجه گیری

در این پژوهش، اثر افزودن نقره بر رفتار زیست‌فعالی، آنتی باکتریال و سلول‌سازی نانوذررات شیشه زیست‌فعال به عنوان پوششی بر زیرلایه آلایژ تیتانیومی مورد ارزیابی قرار گرفت. لایه‌نشانی الکتروفوریتیک به عنوان روش پوشش‌دهی اتخاذ شد و نتایج نشان دادند که با افزودن نقره به ساختار شیشه زیست‌فعال، یکپارچگی پوشش بهبود یافته است. اما در نقطه مقابل، از خواص زیست‌فعالی این ترکیب کاسته شده است. همچنین نتایج آزمون سلول‌سازی حاکی از ایجاد

آزمون در شکل ۷ به نمایش درآمده است. با توجه به شکل ۷، نمونه‌های شیشه زیست‌فعال خالص و کامپوزیت آن با درصدهای وزنی ۳، ۵ و ۷ نقره به ترتیب دارای درصد زیستایی ۱۰۰، ۹۲، ۸۰ و ۶۹٪ در مقایسه با نمونه کنترل می‌باشند و گویای این مطلب هستند که با افزوده شدن نقره به ساختار شیشه زیست‌فعال، میانگین زیستایی کاهش پیدا کرده است و با توجه به اینکه درصد قابل قبول برای میزان زیستایی حداقل ۸۰٪ می‌باشد، نمونه حاوی ۷٪ نقره به عنوان ترکیبی که باعث مسمومیت سلولی شده است شناخته می‌شود.

بنفش رنگ فورمازون تشکیل می‌شود. سپس این بلورها در حلال مناسب حل شده و توسط روش‌های اسپکتروفوتومتری مقدارسنجی می‌شوند. مقدار بلور فورمازان ایجاد شده می‌تواند نشان‌دهنده درصد سلول‌های زنده باشد [۲۲].

همانطور که می‌دانیم در مواد نانو نسبت سطح به حجم ذرات بالاست. در تحقیق حاضر این بالا بودن سطح به حجم سبب می‌شود تا شیشه زیست‌فعال سریع‌تر و با راندمان بالاتر با محیط وارد واکنش شود و زیست‌فعالی افزایش یابد. همچنین نانوذرات نقره به علت سطح به حجم بالا سبب می‌شوند تا با کمترین مقدار بیشترین اثر بخشی آنتی باکتریالی را داشته باشند. با توجه به بالا بودن قیمت نقره می‌توان گفت که

[9] J.S. Kim, *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine*, **3**, 2007, 95.
 [10] N. Matsumoto, K. Sato, K. Yoshida, K. Hashimoto, Y. Toda, *Acta Biomaterialia*, **5**, 2009, 3157
 [11] J. Fu, J. Ji, D. Fan, J. Shen, *Journal of Biomedical Materials Research Part A*, **79**, 2006, 665.
 [12] M. Catauro, F. Bollino, R.A. Renella, F. Papale, *Ceramics International*, **41**, 2015, 12578.
 [۱۳] علی دوست‌محمدی، "بهبود سازگاری زیستی ایمپلنت فلزی توسط پوشش شیشه زیست‌فعال"، *مجله علوم و مهندسی سطح*، شماره ۶، ۱۳۸۸، ۲۶-۱۷.

[14] M. Manzano, V. Aina, C.O. Arean, F. Balas, V. Cauda, M. Colilla, M.R. Delgado, M. Vallet-Regi, *Chemical Engineering Journal*, **137**, 2008, 30.
 [15] L. Zhao, X. Yan, X. Zhou, L. Zhou, H. Wang, J. Tang, C. Yu, *Microporous and Mesoporous Materials*, **109**, 2008, 210.
 [16] H. Tavakoli, R. Sarraf-Mamoory, A.R. Zarei, *Journal of Advanced Materials and Processing*, **3**, 2015, 3.
 [17] S.A. Hassanzadeh-Tabrizi, A. Bigham, M. Rafienia, *Materials Science and Engineering C*, **58**, 2016, 737.
 [18] G. Singh, S. Singh, S. Prakash, *Surface & Coatings Technology*, **205**, 2011, 4814.
 [19] S.H. Tsai, Y.C. Yang, *Surface & Coatings Technology*, **231**, 2013, 578.
 [20] B. Sergio, F. Zambuzzi-Willian, D.P. Campos-Daniela, L. Ogeda, C.V. Ferreirab, *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, **78**, 2010, 177.
 [21] N. Hoiby, T. Bjarnsholt, M. Givskov, S. Molin, O. Ciofu, *International Journal of Antimicrobial Agents*, **35**, 2010, 322.
 [22] M.V. Berridge, P.M. Herst, A.S. Tan, *Biotechnology Annual Review*, **11**, 2005, 127.

سمیت سلولی در مقادیر بالاتر از ۵٪ وزنی نقره می‌باشند. این پژوهش نشان داد که پوشش کامپوزیت شیشه زیست‌فعال-نقره تا ۵٪ وزنی می‌تواند همزمان با داشتن قابلیت زیست‌فعال و عدم سمیت سلولی به عنوان یک پوشش آنتی‌باکتریال عمل کند.

مراجع

[1] R. Drevet, N.B. Jaber, J. Faure, A. Tara, A. Ben Cheikh-Larbi, H. Benhayoune, *Surface and Coatings Technology*, **301**, 2016, 94.
 [2] A. Balamurugan, G. Balossier, S. Kannan, S. Rajeswari, *Materials Letters*, **60**, 2006, 2288.
 [3] M. Vallet-Regi, "Bio-ceramics with clinical applications", JohnWiley & Sons Ltd., United Kingdom, 2014.
 [4] E. Mohseni, E. Zalnezhad, A.R. Bushroa, *International Journal of Adhesion and Adhesives*, **48**, 2014, 238.
 [5] A.R. Boccaccini, S. Keim, R. Ma, Y. Li, I. Zhitomirsky, *Journal of The Royal Society Interface*, **7**, 2010, 581.
 [6] M.S. Shakeri, M. Alizadeh, A. Kazemzadeh, T. Ebadzadeh, H. Aghajani, *Journal of Advanced Materials and Processing*, **4**, 2016, 3.
 [7] D. Arcos, M. Vallet-Regi, *Acta Materialia*, **61**, 2013, 890.
 [8] Y. Xie, H.E. Yiping, L. Peter, T. Irwin, J. Tony, K. Jin, *Applied and Environmental Microbiology*, **8**, 2011, 2325.