

طراحی و ساخت نانوکامپوزیت‌های شیشه‌ای زیست تخریب پذیر با قابلیت کاربری در مهندسی بافت استخوان

افسانه امیری*^۱ و فروغ حافظی^۲

چکیده

به دلیل نارسایی‌های پلیمرها و سرامیک‌ها به صورت تک‌جزیی در ترمیم و بازسازی عیوب استخوانی، توجه زیادی به توسعه‌ی کامپوزیت‌های دوجزییی پلیمر-سرامیک معطوف شده است، تا با ترکیب این دو دسته از مواد، تلفیقی از خواص هدایت استخوانی، قابلیت پیوند با استخوان، پایداری مکانیکی سرامیک‌ها به همراه انعطاف پذیری و خواص مکانیکی دینامیکی پلیمرها به دست آید. در این پژوهش شیشه بیواکتیو حاوی منیزیم به روش سل-ژل ساخت و مشخصه‌یابی شده است. اکسید منیزیم در این نوع از شیشه بیواکتیو سنتز شده هیچ تاثیر مخربی بر مراحل آماده سازی و عملیات حرارتی نداشته، بلکه از پوکی استخوان در مکان‌های آسیب دیده جلوگیری می‌کند. آزمایش پراش اشعه الکترونی (XRD) و طیف سنجی مادون قرمز انتقال فوریه (FTIR) نشان می‌دهد که نانو بیوشیشه‌ی سنتز شده آمورف و دارای ترکیب شیمیایی استوکیومتری شیشه بیواکتیو است. تصاویر TEM و SEM نشان می‌دهد که میانگین اندازه ذرات شیشه‌ی بیواکتیو در ۷۰-۲۰ نانومتر است و نتایج نانو شیشه‌های زیست سازگار و زیست تخریب می‌تواند جایگزین بسیار مناسب کاشت و ترمیم استخوان باشد.

واژه‌های کلیدی: نانو شیشه، زیست تخریب پذیر، مهندسی بافت، استخوان

^۱ - استادیار گروه شیمی دانشگاه آزاد اسلامی واحد تهران مرکزی، تهران، ایران

^۲ - دانشجوی کارشناسی ارشد شیمی کاربردی

*- نویسنده مسئول مقاله: afsaamiri@gmail.com

پیشگفتار

شیشه‌های بیواکتیو، دسته‌ی مهمی از موادی هستند که قادر به ایجاد پاسخ‌های بیولوژیک خاص درون بطنی در نتیجه‌ی تشکیل پیوند قوی میان بافت زنده مانند استخوان و ماده بیوشیشه (45S5) با ترکیبی از SiO_2 ، CaO و P_2O_5 عضوی در خانواده‌ی شیشه‌های بیواکتیو است. در جدول ۱ فهرستی از ترکیبات شیشه‌های بیواکتیو ارائه شده است [۱].

یکی از مزیت‌های قابل توجه شیشه بیواکتیو، امکان برقراری پیوند آن با هر دو بافت نرم و سخت می‌باشد. هم‌چنین نتایج پژوهش‌ها نشان داده مواد حاصل از تجزیه شیشه بیواکتیو سبب تحریک بیان ژنی در سلول‌های استخوانی و رگ‌زایی می‌شود. بنابراین، شیشه بیواکتیو می‌تواند به عنوان یکی از مواد قابل توجه در توسعه ترکیب‌های بیواکتیو در مهندسی بافت استخوان به شمار آید [۲ و ۱]. ترکیب شیشه‌های بیواکتیو در ساختار داربست‌ها سبب ایجاد استخوان‌زایی و بیواکتیویته بسیار عالی، توانایی هدایت سلولی و کنترل زیست تخریب‌پذیری در آنها می‌شود [۳]. از میان بیوسرامیک‌ها، شیشه‌های بیواکتیو توانایی اتصال به بافت‌های زنده بدن را از راه تشکیل یک لایه در فصل مشترکشان با بافت‌های زنده دارند. از شیشه‌های بیواکتیو به‌گونه موفقیت‌آمیزی به عنوان پرکننده‌های استخوانی در ارتوپدی و جراحی دندان استفاده شده است [۴ و ۵]. به‌گونه‌ی خلاصه، وارد نمودن یک سرامیک کلسیم فسفاتی یا شیشه‌ای به داخل یک داربست پلیمری زیست تخریب پذیر، مزایای زیر را برای مهندسی بافت استخوان به همراه خواهد آورد:

- ۱) ایجاد محیطی مناسب‌تر جهت عملکردهای سلولی ویژه به دلیل خواص هدایت استخوانی سرامیک [۶ و ۷].
- ۲) خنثی شدن اثر محصولات اسیدی ناشی از تخریب برخی از پلیمرها به‌وسیله فسفات کلسیم [۶ و ۷].

۳) تشکیل آپاتیت بیولوژیکی که به‌گونه طبیعی در استخوان حضور دارد [۶].

۴) توزیع یکنواخت‌تر محصولات ناشی از تخریب در سراسر ساختار ریز متخلخل [۶].

۵) بهبود خواص مکانیکی داربست به لحاظ استحکام [۵ و ۶].

برخی از شیشه‌ها در سیستم $\text{Na}_2\text{O}-\text{CaO}-\text{SiO}_2-\text{P}_2\text{O}_5$ می‌توانند با استخوان طبیعی، پیوند تشکیل دهند [۷].

وابستگی در پیوند استخوانی و پیوند بافت نرم برای $\text{SiO}_2 - \text{Na}_2\text{O} - \text{CaO} - \text{P}_2\text{O}_5$ در شکل ۱ شرح داده شده است. همه شیشه‌ها در شکل زیر دارای ۶٪ وزنی ثابت P_2O_5 هستند. همه ترکیبات در وسط شکل ۱ (منطقه A) بیواکتیو هستند و با استخوان پیوند ایجاد می‌نمایند [۸]. بنابراین، منطقه A مرز پیوندی استخوان و کاشتنی بیواکتیو را مشخص می‌نماید. شیشه‌های سیلیکاتی در منطقه B (مانند شیشه پنجره، بطری یا اسلاید میکروسکوپ) رفتاری مشابه مواد خنثی را دارا هستند و منجر به شکل‌گیری لایه فیبروزی غیر چسبنده در فصل مشترک بافت/کاشتنی می‌شوند که بافت و کاشتنی را از یکدیگر متمایز می‌نماید. شیشه‌ها در منطقه C قابل جذب هستند و در طی ۱۰ تا ۳۰ روز پس از کاشت ناپدید می‌شوند. در منطقه D کلژن بافت نرم می‌تواند شدیداً به شیشه سیلیکاتی بیواکتیو در محدوده‌ی ترکیبی نشان داده شده بچسبد [۸] شیشه‌ها و شیشه سرامیک‌هایی بر پایه‌ی سیستم $\text{SiO}_2-\text{CaO}-\text{P}_2\text{O}_5$ جزء گروه حائز اهمیتی از مواد بشمار می‌روند که دارای کاربردهای گسترده‌ای در پزشکی به عنوان ایمپلنت‌های استخوان هستند. این مواد می‌توانند در یک ارگانسیم زنده، از راه تشکیل لایه‌ی آپاتیت بر سطح ایمپلنت، با استخوان پیوند دهند. جایگزینی استخوان و ایمپلنت‌های استخوانی در سال‌های اخیر از طرف پژوهشگران دارای اهمیت زیادی بوده‌اند، چرا که نیاز به آنها بسیار مشاهده شده است [۹ و ۱۰]. پژوهش‌های انجام شده روی کاشت (in-vivo)

آنها را آسان تر می نماید. مطالعات اخیر نشان داد که محصولات تخریب پذیر شیشه بیواکتیو می تواند در تولید فاکتورهای رشد و تکثیر سلولی و نیز ظهور ژن استئوبلاست فعالیت کنند و هم چنین افزایش سطح مخصوص و حجم حفرات بیوشیشه ممکن است فرآیند رسوب هیدروکسی آپاتیت را تسریع بخشد. اما اگرچه این مواد زیست سازگارند و قابلیت استخوان زایی دارند و تحت فشار و تراکم، بسیار خوب عمل کرده اما آنها به اندازه‌ی کافی قوی نیستند تا بتوانند نیروهای خمشی و پیچشی را تحمل کنند [۸].

مبنای خاصیت اتصال استخوان به شیشه‌ها، واکنش پذیری شیمیایی شیشه در مایعات بدن است. واکنش‌های شیمیایی سطحی منجر به تشکیل یک لایه هیدروکسی آپاتیت می شود که می تواند به استخوان پیوند بخورد. اتصال در نتیجه ترتیبی از واکنش‌ها رخ می دهد. با غوطه ور کردن یک شیشه بیواکتیو در یک محلول آبی، سه فرآیند عمومی رخ می دهد: شسته شدن، حل شدن و رسوب کردن [۱۲].

شسته شدن معمولا با رهایش عناصر قلیایی و قلیایی خاکی به وسیله تعویض کاتیونی با یون‌های H^+ یا H_3O^+ مشخص می شود. به دلیل این که این کاتیون‌ها جزئی از شبکه شیشه نیستند و تنها شبکه را با تشکیل پیوندهای اکسیژنی غیر پل زن دگرگون می کنند، تعویض یونی آسان خواهد بود. رهایش یون‌های دگرگون ساز شبکه برای شیشه‌های واقع در ناحیه ترکیبی بیواکتیو سریع است. این فرآیند تعویض یونی منجر به افزایشی در pH فصل مشترک تا مقادیر بیشتر از ۷/۴ می شود.

به دلیل واکنش یون‌های هیدروکسیل، با شکسته شدن پیوندهای Si-O-Si-O-Si و حل شدن شبکه اتفاق می افتد. شکستگی شبکه به گونه موضعی رخ می دهد و سیلیس به شکل اسید سیلیسیک $Si(OH)_4$ به داخل محلول رها می شود. سرعت حل شدن سیلیس خیلی به ترکیب شیشه بستگی دارد. سرعت حل شدن برای ترکیب-

نشان می دهند که این ترکیب‌ها هیچ سمیت موضعی در بدن ایجاد نمی کنند و هم چنین واکنش جسم خارجی در آنها مشاهده نشده است [۱].

امروزه پژوهش‌ها در زمینه‌ی واکنش‌های سل - ژل، به دلیل مزایای واضح این روش برای تولید شیشه، شیشه-سرامیک و پودرهای سرامیکی، توجه زیادی را به خود جلب کرده است. این مزایا عبارتند از: اختلاط مولکولی همگن، دمای پایین فرآیند، قابلیت تولید ذرات با اندازه‌ی نانو، انعطاف پذیری شگرف در تهیه‌ی پودرهای نانوبلورین، اجسام جامد بی شکل یکپارچه و فیلم‌های نازک. با وجود استفاده گسترده از روش سل - ژل، این روش محدودیت‌هایی نیز دارد که عمده‌ترین آنها گران بودن پیش ماده‌ی آلکوکسیدی یا نیاز به مراحل پیچیده‌ی گوناگون بمنظور حصول اطمینان کامل از تجزیه و انحلال پیش ماده‌ها برای تهیه‌ی فاز خالص هیدروکسی آپاتیت پس از عملیات حرارتی بعدی است. فرایند سل - ژل بر اساس پلیمر کردن پیش ماده‌های فلزی- آلی $M(OR)_n$ از نوع آلکوکساید است. پس از کنترل آبکافت این آلکوکساید در محلول، تراکم منورما، پل‌های اکسیژنی و سپس اکسیدهای آلی را مهیا می کند. این محلول‌های پلیمری، ژل‌ها را تشکیل می دهند [۸]. شبکه‌های سل - ژل، سیستم‌های مدل بسیار خوبی برای مطالعه و کنترل نمودن واکنش‌های بیوشیمیایی هستند. این گونه به نظر می رسد که در مواد به دست آمده از ژل، افزایش بیواکتیویتی را می توان دید و این به دلیل یون‌های هیدروکسیل باقیمانده، تخلخل‌های میکرونی و سطح مخصوص بالا است [۸]. ثابت شده است که با توجه به محدوده‌ی ترکیبات مورد استفاده برای آماده‌سازی بیوشیشه از راه سل - ژل، افزایشی در سرعت رشد لایه‌ی آپاتیت و هم - چنین بیواکتیویتی بیش تر، مشاهده شده است. علاوه بر این‌ها، از دیگر مزایای استفاده از روش سل - ژل می توان به این نکته اشاره کرد که دمای مورد نیاز برای تولید این شیشه‌ها از دمای ذوب شیشه‌ای با ترکیب مشابه بسیار کمتر بوده و در نتیجه تهیه‌ی

که در جدول ۲ آمده است. وارد کرده و اجازه می‌دهیم روی هم‌زن به مدت ۳۰ دقیقه، عملیات هیدرولیز TEOS به‌وسیله اسید نیتریک انجام گیرد. عوامل زیر هر کدام بعد از ۴۵ دقیقه به محیط اضافه می‌گردند. تری اتیل فسفات (TEP) در مقادیر مشخص شده، سپس کلسیم نیترات تتراهیدرات و بعد از ۴۵ دقیقه، نیترات منیزیم هگزهیدرات و در نهایت اجازه می‌دهیم تا سیستم برای یک ساعت هم زده شود. در طی یک ساعت عملیات هیدرولیز کامل می‌گردد. سل تهیه شده در یک ظرف تفلونی ایزوله شده برای ۱۰ روز نگهداری می‌شود تا عملیات پلی‌کندانسیون و تشکیل ژل آغاز شده و ژل تشکیل گردد. ژل بدست آمده برای مدت ۳ روز در خشک کن دمای ۷۰ درجه سانتیگراد حرارت دهی می‌شود. سپس نمونه‌ها در دمای ۱۲۰ درجه به مدت ۴۸ ساعت حرارت دهی شدند. محصول به دست آمده در هاون ساییده شده و از صافی با اندازه ۹۰ میکرون (مش ۱۷۰) گذر داده شد. سپس در کوره الکتریکی تا دمای ۷۰۰ درجه با گرادیان حرارتی ۵ درجه بر دقیقه حرارت دهی شده و برای مدت ۲۴ ساعت در این دما نگهداری شد تا ترکیب شیشه‌ها تثبیت گشته و کلوخه کلوخه شوند. در پایان جهت انجام عملیات سایش و حصول به اندازه دانه مناسب، محصول به دست آمده در آسیاب ماهواره‌ای به مدت ۳۰ دقیقه قرار داده شد. در پایان در حدود ۲۵ گرم شیشه بیواکتیو جهت ساخت داربست نانوکامپوزیتی بدست می‌آید. شکل ۲ خواص نانو پودر شیشه بیواکتیو سنتز شده در این پروژه با انجام آزمایش‌های زیر بررسی شده است.

طیف سنجی مادون قرمز

آزمون^۱ FTIR در شناسایی گروه‌های عاملی و قطعات سازنده سرامیک بر نمونه شیشه‌ی بیواکتیو انجام شد شکل ۴. بدین منظور مواد مورد آزمایش با پتاسیم برمید (KBr) مخلوط و سپس تحت فشار، قرص تهیه شد و سپس طیف‌بینی با قدرت تفکیک

هایی با مقادیر SiO_2 بیش‌تر از ۶۰٪ مولی بسیار کم می‌شود که به دلیل تعداد زیادتر پیوندهای اکسیژنی پل زن در ساختار شیشه است. سیلیس هیدراته $SiOH$ که روی سطح شیشه تشکیل می‌گردد، با این واکنش‌ها آرایش مجدد به خود می‌گیرد و با پلیمریزاسیون تراکمی سیلانول $SiOH$ ‌های مجاور، غنی از سیلیس را بوجود می‌آورد.

مواد و روش‌ها

جهت ساخت داربست‌های نانو کامپوزتی در این پروژه شیشه‌ی بیواکتیو با ساختار نانو سنتز شد. مواد لازم برای سنتز نانو پودر شیشه‌ی بیواکتیو به روش سل ژل شامل موارد زیر است:

- تتراتیل اورتو سیلیکات (TEOS) از شرکت Merck با کد محصول ۸۰۰۶۵۸ معروف به تتراتوکسی سیلان با فرمول شیمیایی $C_8H_{20}O_4Si$ جهت تامین SiO_2 در ترکیب شیشه.

- تری اتیل فسفات (TEP) از شرکت Merck با کد محصول ۸۲۱۱۴۱ با فرمول شیمیایی $C_6H_{15}O_4P$ برای تامین P_2O_5 در ترکیب شیشه.

- نیترات کلسیم تتراهیدرات $(Ca(NO_3)_2 \cdot 4H_2O)$ از شرکت Merck با کد محصول ۱۰۲۱۲۳ برای تهیه CaO .

- نیترات منیزیم هگزهیدرات $(Mg(NO_3)_2 \cdot 6H_2O)$ از شرکت Merck با کد محصول ۱۰۵۸۵۳ برای تهیه MgO در ترکیب شیشه.

- اسید نیتریک 0.1 مولار از شرکت Merck با کد محصول ۱۰۰۶۳۰ به عنوان محیط سل.

سنتز شیشه‌ی بیواکتیو

فازهای تشکیل دهنده‌ی شیشه‌ی بیواکتیو مشتق شده از روش سل - ژل در این پژوهش عبارتند از: SiO_2 ، CaO ، P_2O_5 و MgO . ۰/۰۶۴ مول (۱۳/۳۳ گرم) تتراتوکسی سیلان (TEOS) را در ۳۰ میلی لیتر اسید نیتریک ۰/۱ مولار به نسبتی

^۱ - Furrier transfer infrared

آمده یک شیشه بشمار می‌رود و شیشه-سرامیک فرض نمی‌شود.

طیف سنجی مادون قرمز (FTIR)

جهت تعیین و اطمینان از درستی ترکیب شیمیایی پودر سنتز شده آزمایش فوق انجام شد. شکل ۴ مقدار عبور پرتو را بر حسب اعداد موجی نمایش می‌دهد. به‌گونه کلی نتیجه‌ی بدست آمده این موضوع را تایید می‌کند که پودر سنتز شده دارای ترکیب شیمیایی و استوکیومتری شیشه بیواکتیو است.

آزمایش میکروسکوپ الکترونی انتقال (TEM)

بمنظور تعیین اندازه‌ی ذرات پودر سنتز شده از TEM واقع در مرکز تحقیقاتی انرژی اتمی (واحد کرج) استفاده شد. شکل ۵ اندازه ذرات را نشان می‌دهد. میانگین اندازه ذرات شیشه‌ی بیواکتیو در ۷۰-۲۰ نانومتر است.

طیف سنجی مادون قرمز

همان‌گونه که گفته شد این آزمایش جهت تعیین و اطمینان از درستی ترکیب شیمیایی پودر سنتز شده انجام شد. با توجه به محدوده‌ی اعداد موجی مشاهده شده در این آزمایش نتیجه‌ی بدست آمده از این آزمایش، تایید کرد که پودر سنتز شده دارای ترکیب شیمیایی استوکیومتری شیشه بیواکتیو است. (شکل ۴) در پژوهش‌های صورت گرفته به‌وسیله مظفری و همکارانش [۱۵] و هنج [۱۳] در آنالیز FTIR در محدوده‌ی موجی مورد انتظار پیک‌ها مشاهده شد که این امر حاکی از درستی ترکیب شیمیایی پودر دارد.

آزمایش پراش اشعه الکترونی (XRD)

پودر شیشه بیواکتیو سنتز شده در دمای ۷۰۰ درجه به‌وسیله XRD مورد بررسی قرار گرفت. نتایج به دست آمده از آزمون XRD مهر صحتی بر

4 cm^{-1} و 32 cm^{-1} روبش در محدوده‌ی عدد موجی دستگاه (ناحیه میانی طیف IR) یعنی cm^{-1} ۴۰۰۰ - ۴۰۰ انجام شده است.

آنالیز تفرق اشعه ایکس

جهت بررسی ساختار کریستالی، نمونه پودر حاصل شده، مورد آنالیز تفرق اشعه ایکس با استفاده از یک دستگاه XRD ساخت شرکت فیلیپس با طول موج $\text{CuK}\alpha = 1.54 \text{ \AA}$ قرار گرفت. زمان اقامت در هر گام یک ثانیه، اندازه گام 0.02 درجه و محدوده روبش بین 20 تا 70 درجه انتخاب شده است.

اندازه‌گیری توزیع اندازه ذرات

بمنظور تعیین اندازه ذرات پودر سنتز شده از میکروسکوپ الکترونی انتقالی^۱ استفاده شد. آزمایش یاد شده در مرکز تحقیقاتی انرژی اتمی کرج انجام شد.

جهت بررسی تشکیل لایه‌ی کلسیم-فسفر بر روی نمونه‌ها از تست میکروسکوپ الکترونی روبشی و آنالیز عنصری^۲ EDAX استفاده گردید. جهت بدست آوردن تصاویر SEM از دستگاه VEGA(LMU) ساخت شرکت TE SCAN و تست EDAX از دستگاه INCA Penta FET ساخت شرکت INCA Analrser استفاده شده است.

نتایج

آزمایش پراش اشعه الکترونی (XRD)

پودر شیشه‌ی بیواکتیو سنتز شده در دمای 700 درجه به‌وسیله XRD مورد بررسی قرار گرفت. با توجه به نمودار XRD در شکل ۳ می‌توان گفت بیوشیشه آمورف است و هیچ پیک خاصی مشاهده نمی‌شود. در نتیجه شیشه‌ی سنتز شده در دمای 700 درجه کریستالی نشده است و پودر به دست

¹ - Transmission electron microscope (TEM)

² - Energy Dispersive X-Ray Analyses

چگونگی توزیع پودر سرامیکی در فاز پلیمری اثرگذار هستند که از جمله می‌توان شکل و اندازه ذرات تقویت کننده، ساختار فاز زمینه و روش ساخت کامپوزیت را برشمرد. توزیع مناسب و همگن پودر سرامیکی در کامپوزیت‌های پایه پلیمری و یکنواختی توزیع در بهبود خواص مکانیکی موثر است. اگرچه با کاهش اندازه ذرات و افزایش نسبت ظاهری در ذرات سرامیکی، تمایل به کلوخه شدن در آنها به شدت افزایش می‌یابد و تشکیل بخش‌های کلوخه شده در ساختار کامپوزیتی افت خواص مکانیکی کامپوزیت را به دنبال خواهد داشت. نتایج آزمایش میکروسکوپ الکترونی روبشی ذرات شیشه بیواکتیو در زمینه کامپوزیت پلیمری در شکل ۸ آورده شده است. توزیع پودر شیشه بیواکتیو در زمینه ژلاتین با تمهیدات به کار رفته در هنگام اختلاط دو فاز، توزیع نسبتاً مناسبی را دارا می‌باشند، و به گونه کلی اختلاط مناسب ذرات سرامیکی با زمینه پلیمری توزیع مناسبی از پودر شیشه بیواکتیو در زمینه کامپوزیت را موجب شده است.

بررسی بیواکتیویته و تشکیل لایه‌ی Ca-P بر روی سطوح حاوی شیشه بیواکتیو در محلول SBF¹

برای بررسی تشکیل لایه‌ی هیدروکسی آپاتیت بر روی سطح نمونه‌های کامپوزیتی از نمونه حاوی شیشه بیواکتیو پس از قرار گرفتن ۱، ۳، ۷، ۱۴ و ۲۱ روز در محلول SBF آزمایش میکروسکوپ الکترونی روبشی و آزمایش آنالیز و توزیع عناصر کلسیم، فسفر و سیلیسیم به عمل آمد. با توجه به دلایل ذکر شده در بخش قبل، آزمایش میکروسکوپ الکترونی روبشی و EDAX تنها بر روی کامپوزیت حاوی ۳۰٪ شیشه جهت بررسی رفتار بیواکتیویته انجام گردید (شکل‌های ۹ تا ۲۰). بررسی‌ها پس از روزهای متوالی نشان دهنده افزایش مقدار کلسیم و فسفر در سطح داربست می‌باشند که نمایانگر تشکیل لایه‌ی Ca-P بر روی سطح نمونه‌ها است و همان گونه که در شکل ۱۶ نشان داده شده است، پس

آمورف بودن شیشه بیواکتیو و عدم وجود فازهای بلوری است. (شکل ۳)

هنج [۱۳] نیز با انجام آنالیز XRD هیچ پیکی مشاهده نکردند که همه‌ی این موارد مهر تاییدی بر نتیجه‌ی به دست آمده در این پروژه است.

آزمایش TEM

بمنظور تعیین اندازه ذرات پودر سنتز شده از TEM استفاده شد (شکل ۵). میانگین اندازه ذرات شیشه بیواکتیو در این کار پژوهشی در محدوده‌ی ۷۰-۲۰ نانومتر بود. مظفری و همکارانش [۱۹] اندازه‌ی ذرات پودر شیشه‌ی بیواکتیو سنتز شده نیز با استفاده از میکروسکوپ الکترونی انتقال (TEM) سنجیده و آن را کمتر از ۸۰ nm گزارش کردند. مرتضوی و همکاران نیز اندازه ذرات شیشه بیواکتیو را نیز با استفاده از میکروسکوپ الکترونی انتقالی (TEM) سنجیده و در محدوده‌ی ۲۰-۹۰ nm گزارش کردند که تاییدی بر نتیجه‌ی به دست آمده در این پروژه است [۱۴].

بررسی توزیع ذرات شیشه بیواکتیو در زمینه پلیمری کامپوزیت

توزیع عناصر سیلیسیم و کلسیم در کامپوزیت ژلاتین - شیشه بیواکتیو به عنوان شاخصی، نمایانگر حضور شیشه بیواکتیو در ساختار کامپوزیت می‌باشند. شکل ۶ سطحی از کامپوزیت حاوی ۳۰٪ شیشه بیواکتیو را نشان می‌دهد که با توجه به تصاویر تراکم عناصر سیلیسیم و کلسیم در محل، وجود ذرات شیشه بیواکتیو قابل مشاهده می‌باشد. شکل ۷ نیز آنالیز عنصری EDAX عناصر را در مقطع مشخص شده نشان می‌دهد. ذراتی که در زمینه دیده می‌شود با توجه به تراکم مقادیر شیشه بیواکتیو توزیع شده در شبکه‌ی پلیمری است.

پراکندگی عناصر فسفر و کلسیم در سطح کامپوزیت حاوی ۳۰٪ وزنی شیشه بیواکتیو در زمینه‌ی ژلاتین نشان از توزیع مناسب ذرات سرامیکی در ساختار دارد. پارامترهای متعددی در

¹ -SBF: Simulated Body Fluid

تهیه شده مربوط به چگونگی رشد سلول‌های فیبروبلاست را نشان می‌دهد. به‌گونه کلی نتایج بدست آمده حاکی از زیست‌سازگاری نمونه‌ها بود. علاوه بر کنترل معمول از ژلاتین خالص نیز به این منظور استفاده شده است.

بحث و نتیجه گیری

در این پژوهش، پودر شیشه بیواکتیو به روش سل-ژل سنتز گردید. نتایج بدست آمده از آزمون FTIR و XRD تایید کننده صحت ترکیب شیمیایی و استوکیومتری بودن پودر سنتز شده هستند. و نتایج XRD مهر صحتی بر آمورف بودن شیشه بیواکتیو و عدم وجود فازهای کریستالی است. توزیع اندازه ذرات پودر نیز با استفاده از آزمون Static Light Scattering سنجیده شد که نتیجه آن نشان می‌دهد، اولاً توزیع اندازه ذرات بشکل گوسی بوده، ثانیاً حدود ۵۰٪ ذرات دارای قطری حدود $5\mu\text{m}$ ، که ۲۵٪ حدود 550nm و ۲۵٪ دیگر نیز حدود 350nm هستند. البته به نظر می‌رسد با اعمال فرایندهای جداسازی ذرات در محلول مانند اعمال مافوق صوت می‌توان اندازه قطر ذرات را کاهش داد. زیرا وجود ذرات ریزتر از بازه‌ی مشاهده شده در آزمایش یاد شده، در حدود حتی کمتر از 100nm در تصاویر SEM تایید کننده این واقعیت است که ذرات تمایل به کلوخه شدن دارند. تصاویر SEM نیز نشان دادند که ذرات بشکل میله‌ای متمایل به کروی بوده و اندازه آنها غالباً کمتر از 400nm هستند. در شیشه بیواکتیو سنتز شده جهت استفاده در کامپوزیت، شامل جزء MgO می‌باشد که ترکیبی غیرمعمول نسبت به سایر شیشه‌های بیواکتیو جهت کاربرد در بدن است. ولی با توجه به پژوهش‌های انجام شده به‌وسیله سایر محققین بر روی این نوع از شیشه، حاکی از آن است که در تمامی مراحل آماده‌سازی، عملیات حرارتی و آزمایش بیواکتیویتی هیچ تاثیر مخربی نداشته است و تنها اثر اصلی آن تعویق در بیواکتیویتی در حد بسیار کمی بوده است. در عوض با توجه به اثرات

از قرار گرفتن داربست در SBF با گذشت زمان نسبت Ca/P رو به افزایش بوده و به استخوان طبیعی نزدیک‌تر می‌گردد. هم‌چنین نمایش عناصر سیلیسیم، کلسیم و فسفر، توزیع مناسب این ذرات در فاز ژلاتین را نشان می‌دهد.

تصاویر ۹ و ۱۱ که قرارگیری ۱ و ۳ روزه را در SBF نشان می‌دهند، نیز حاکی از آن هستند که در همان روزهای ابتدایی به دلیل حضور شیشه بیواکتیو در ساختار داربست کامپوزیتی باعث شروع و جوانه‌زنی هیدروکسی آپاتیت در سطح داربست شده‌اند. هم‌چنین حضور منیزیم در ترکیب این نوع از شیشه هیچ اثر مخربی بر روی بیواکتیویتی داربست نگذاشته است و می‌توان از این عنصر به عنوان یک ترکیب مفید برای محیط بدن و استخوان‌ها استفاده نماییم. [15] همان‌گونه که در شکل ۱۴ مشاهده می‌شود یک لایه از هیدروکسی آپاتیت بر روی سطح داربست را به‌گونه کامل پوشانده است و نسبت Ca/P در روز ۲۱ ام به مقدار طبیعی آن در استخوان طبیعی که $1/67$ است. بسیار نزدیک شده است و در حدود $1/684$ می‌باشد [16]. هم‌چنین اندازه آپاتیت‌ها که در شکل ۱۶ بعد از ۲۱ روز قرارگیری در محلول SBF مشاهده می‌شود در حدود $300-1000$ نانومتر بوده که به اندازه‌ی آپاتیت‌های استخوان طبیعی که در حدود $40-200$ نانومتر می‌باشد تا حدودی نزدیک است [17].

سمیت سلولی

بمنظور بررسی زیست‌سازگاری داربست‌های تهیه شده، چنانچه در بخش عملی ذکر شد، از آزمون سمیت‌سنجی با سلول‌های فیبروبلاست استفاده گردید. با توجه به اینکه ترکیب‌های موجود در داربست ساخته شده شامل ژلاتین و شیشه بیواکتیو هر دو به عنوان مواد زیست‌سازگار شناخته می‌شوند، لذا به نظر می‌رسد تنها احتمال بروز سمیت در این داربست‌ها می‌تواند ناشی از حضور باقیمانده محلول گلوکوتارآلدئید استفاده شده جهت ایجاد اتصالات عرضی پلیمری باشد. شکل ۲۱ تصویر

- polyglycolic acid mesh and bioactive glass for soft-tissue engineering scaffolds". *Biomaterials*. 25(27): p. 5857-66. 2004.
5. W. Linhart, F. Peters, W. Lehmann, K. Schwarz, A. Schilling, M. Amling, J.M. Rueger, M. Epple, "Biologically and chemically optimized composites of carbonated apatite and polyglycolide as bone substitution materials." *J Biomed Mater Res*. 54(2): p. 162-171, 2001.
 6. R. Family, M. Solati-Hashjin, S.H. Namjoy, N. A. Nemati, "Comparison Between Hydroxyapatite-Alumina-Zirconia, Nanocomposite Coating in two Methods of Dip-coating and Spin-coating", *Nanomaterials* 3:8 123, 2012.
 7. V. Maquet, L. Pravata, I. Notingher, R. Jerome "Porous poly (alpha-hydroxyacid)/Bioglas composite scaffolds for bone tissue engineering. I: Preparation and in vitro characterisation." *Biomaterials*. 25(18): p. 4185-94, 2004.
 8. M. Azami, M. Tahriri, "Preparation, characterization and mechanical properties of controlled porous gelatin/hydroxyapatite nanocomposite through layer solvent casting combined with freeze-drying." *Journal of Porous Materials*. 17(3): p. 313-320, 2010.
 9. A. Maquet, L. Pravata, I. Notingher, R. Jerome, "Preparation, characterisation and in vitro degradation of bioresorbable and bioactive composites based on bioglass-filled polylactide foams". *J. Biomed. Mater. Res.*, 66(A): p. 335-346, 2003.
 10. A. Balamurugan, J. Faure, V. Banchet and L. Wortham, "Synthesis and characterisation of sol gel derived bioactive glass for biomedical applications". *Mater Lett*: (29, 30) 60. p. 3752-3757, 2006.
 11. M. Mozafari, M. Azami, S. Maleknia, "Biomimetic formation of apatite on the surface of porous gelatin/bioactive glass nanocompositescaffolds". *Applied Surface Science*. 257(5): p. 1740-1749, 2010.
 12. Jones, J.R., "Optimising bioactive glass scaffolds for bone tissue engineering". *Biomaterials*. 27(7): p. 964-973, 2006.

مفیدی که این یون می‌تواند در ترکیب شیشه‌های بیواکتیو از جمله جلوگیری از پوکی استخوان در مکان‌های آسیب دیده که استعداد بالایی برای ابتلا به آن را دارند، قابل قبول و قابل تحمل است. [۹]

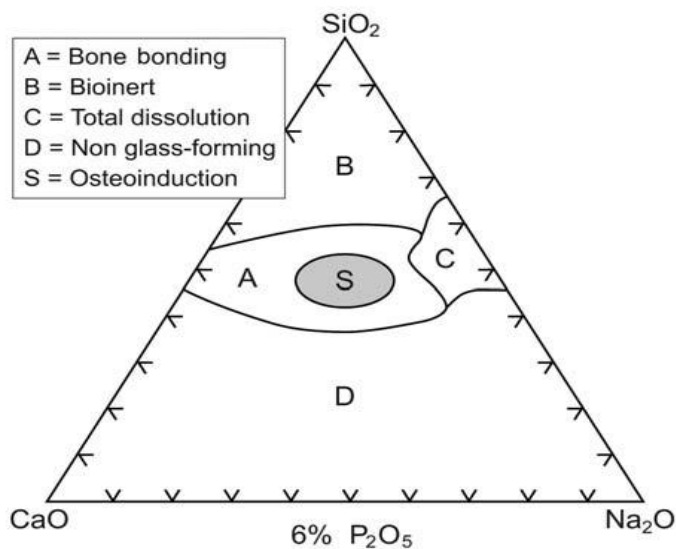
ارزیابی‌های انجام شده بر روی خواص نانو پودر سنتز شده، خواص داربست تهیه شده، نشان می‌دهد که داربست‌های نانوبیو شیشه زیست سازگار و زیست تخریب می‌توانند جایگزین بسیار مناسب ایمپلنت‌ها در ترمیم استخوان باشند. قرار دادن شیشه بیواکتیو در ساختار کامپوزیت، از همان روزهای ابتدایی در محیط SBF ساختارهای کریستالین هیدروکسی آپاتیت شروع به رشد کرده و در یک حد بیشینه ثابت می‌شوند. هم‌چنین مقدار کلسیم به فسفات که معیار مناسبی برای تشخیص هیدروکسی آپاتیت مشابه بدن می‌باشد نزدیک به استخوان طبیعی بوده است. اندازه آپاتیت‌های تشکیل شده نیز در حدود ۳۰۰-۱۰۰ نانومتر بوده که به اندازه آپاتیت‌های استخوان طبیعی نزدیک است و پیش بینی می‌شود در محیط واقعی بدن نیز نتایج فوق حاصل شود.

References

1. W. C. Wu, F. Wei and C. Jiang, "Functional mesoporous bioactive glass nanospheres: synthesis, high loading efficiency, controllable delivery of doxorubicin and inhibitory effect on bone cancer cells", *J. Mater. B*, 1, 2710-2718, 2013
2. Z. Yufang Zhu, S. Fangjian Shang, L. Bo Li, D. Yu, L. Yunfei, M. R. Lohe, N. Hanagata, and S. Kaskel, "Magnetic mesoporous bioactive glass scaffolds: preparation, physicochemistry and biological properties", *J. Mater. B*, 1, 1279-1288, 2013
3. V. Sophie, B. Maquet Veronique, Hench Larry, B. Aldo "PDLLA/Bioglass composites for soft-tissue and hard-tissue engineering: an in vitro cell biology assessment." *Biomaterials*, 25(15): p. 3013-3021, 2004.
4. D. Richard, R. Judith, A. Forbes, L. Hench, S. Gabe, "Assessment of

- lamination technique for bone tissue engineering". *Ceramics International*. 36: p. 2431–2439, 2010.
16. S. Vanapavan, "Mesoporous calcium silicate glasses: I synthesis." *J Non-Cryst Sol.*, 318: p. 1-13, 2003.
 17. A. Leu and J.K. Leach, "Proangiogenic potential of a collagen/bioactive glass substrate." *Pharm Res.*, 25(5): p. 1222-1229, 2008.
 13. L. Hench, "The story of Bioglass". *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*. 17(11): p. 967-978, 2005.
 14. V. Mortazavi, H. Fathi, S. Mousavi, N. Esfahani, "Antibacterial effects of sol-gel-derived bioactive glass nanoparticle on aerobic bacteria". *J Biomed Mater Res A*. 94(1): p. 160-168, 2010.
 15. M. Mozafari , M. Rabiee , M. Azami , and S.Maleknia , Z. Moztarzadeh , N. Nezafati "Development of macroporous nanocomposite scaffolds of gelatin/bioactive glass prepared through layer solvent casting combined with

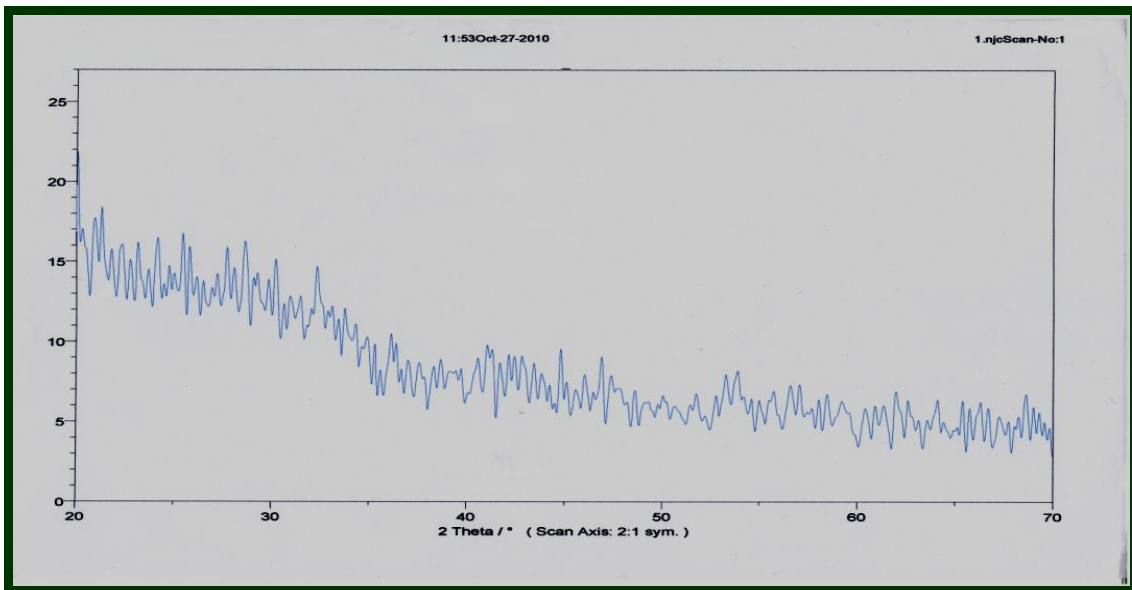
پیوست‌ها



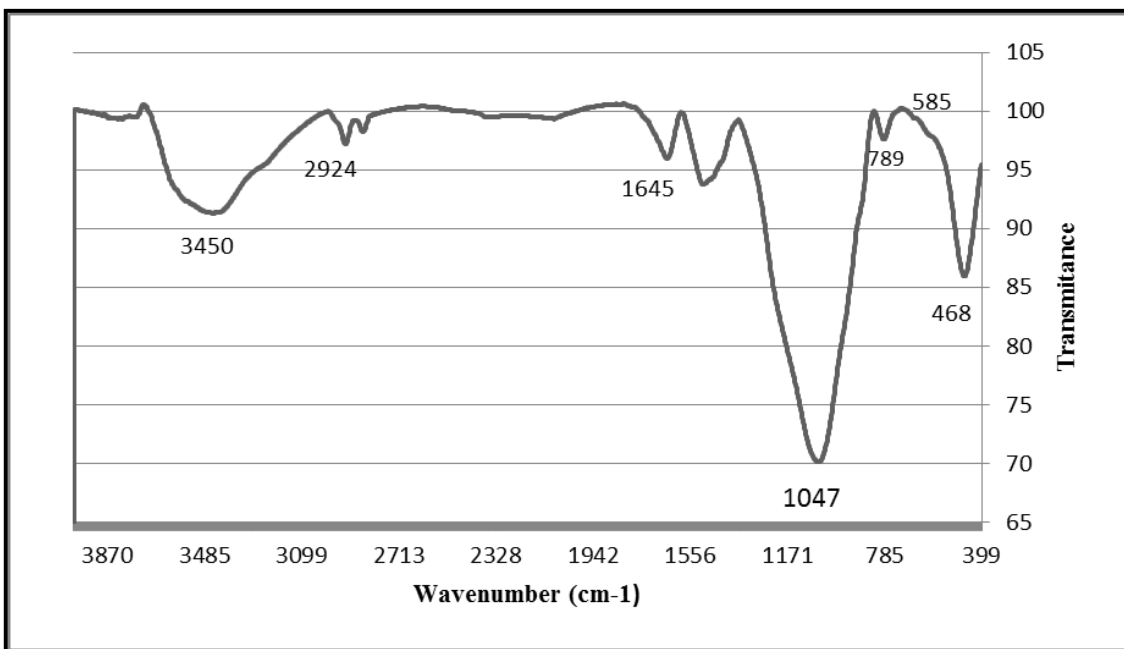
شکل ۱- وابستگی ترکیبی بیواکتیویته و تشکیل آپاتیت در شیشه های سیستم $CaO - P_2O_5 - SiO_2$ در مایع شبیه سازی شده (SBF) (زمان خیس دادن: ۳۰ روز)

TEOS (Tetraethyl orthosilicate), HNO ₃ + water
TEP (3-Ethyl Phosphate)
Calcium nitrate
Magnesium nitrate
Hydrolysis (one hour)
Polycondensation
SOL
GEL

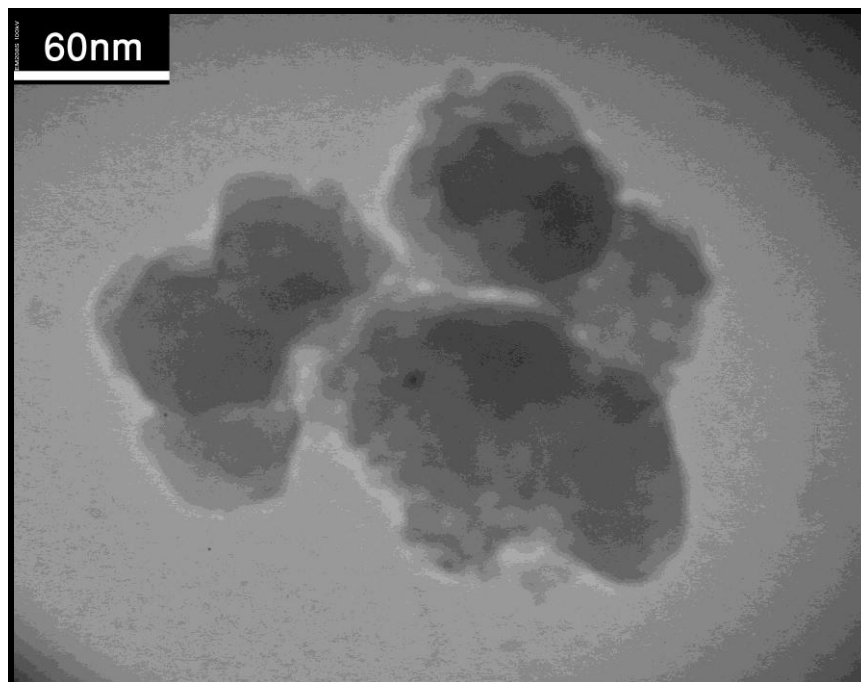
شکل ۲- مراحل سنتز شیشه ی بیواکتیو



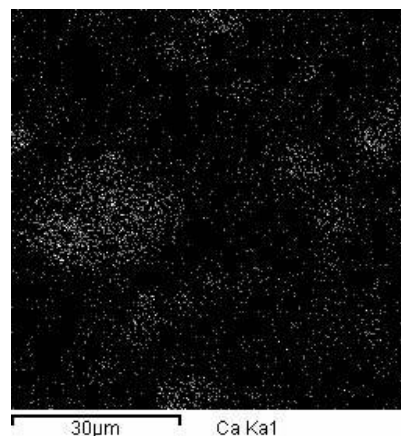
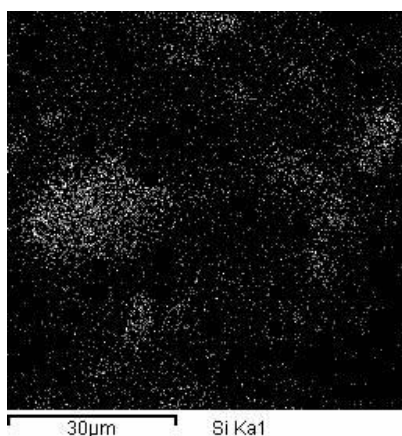
شکل ۳- الگوی XRD شیشه بیواکتیو سنتز شده



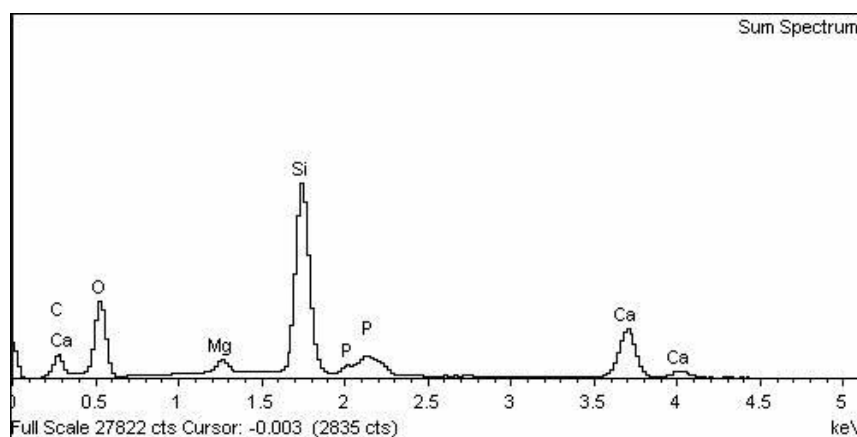
شکل ۴- طیف FTIR مربوط به ذرات نانو شیشه زیستی سنتز شده Si—O—Si در ناحیه عدد موجی 1047 cm^{-1} و 8460 cm^{-1} و Si—O در ناحیه 1645 cm^{-1} ، 789 cm^{-1} و OH در 3450 cm^{-1}



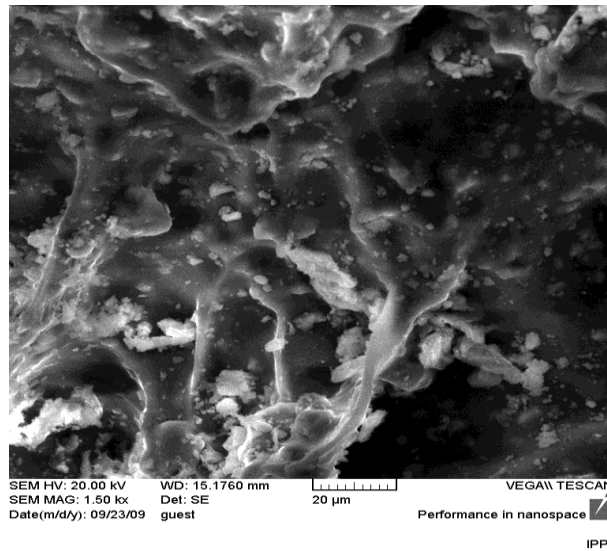
شکل ۵- نتایج آزمایش TEM مربوط اندازه‌ی ذرات نانو شیشه زیستی سنتز شده



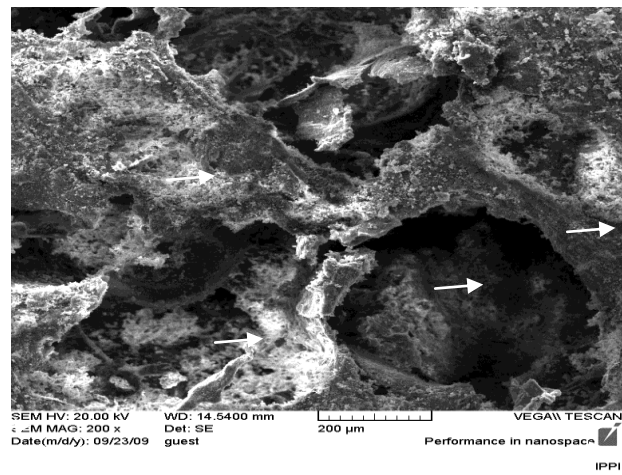
شکل ۶- توزیع عناصر Si و Ca در نمونه‌ی کامپوزیتی با ۳۰٪ شیشه بیواکتیو با بزرگ‌نمایی $\times 2500$



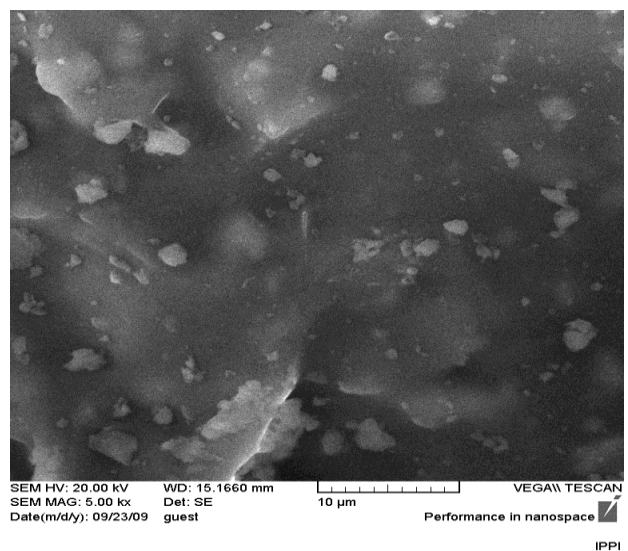
شکل ۷- عناصر موجود در سطح نمونه کامپوزیتی حاوی ۳۰٪ شیشه بیواکتیو (آزمون EDAX)



(الف)



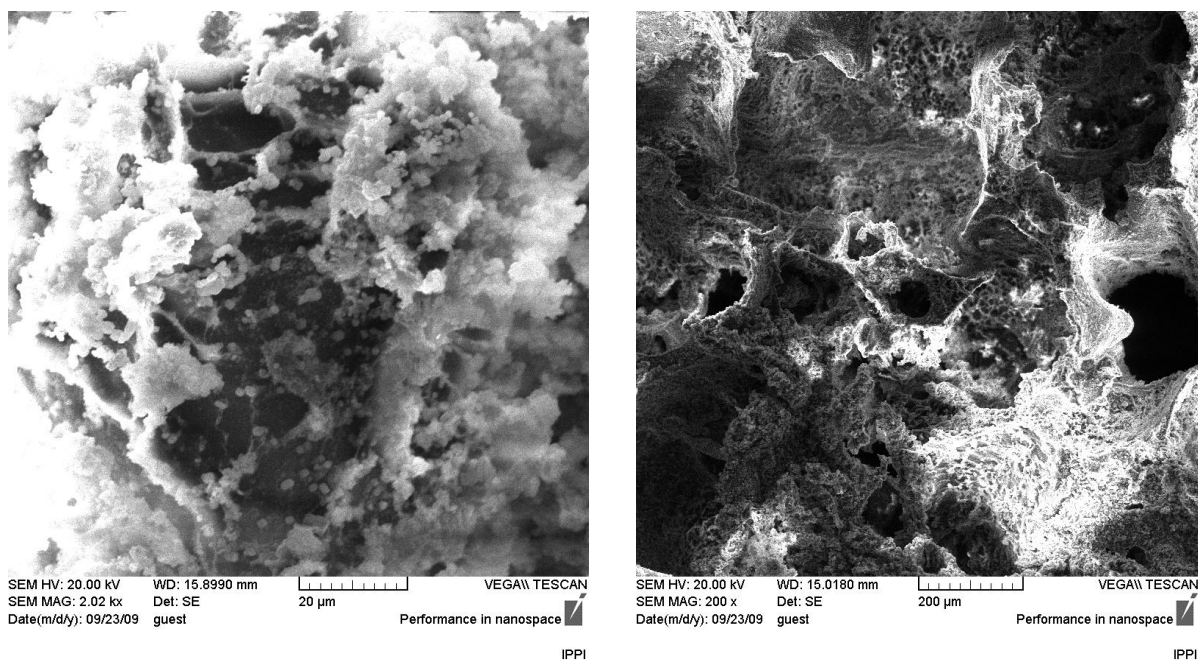
(ب)



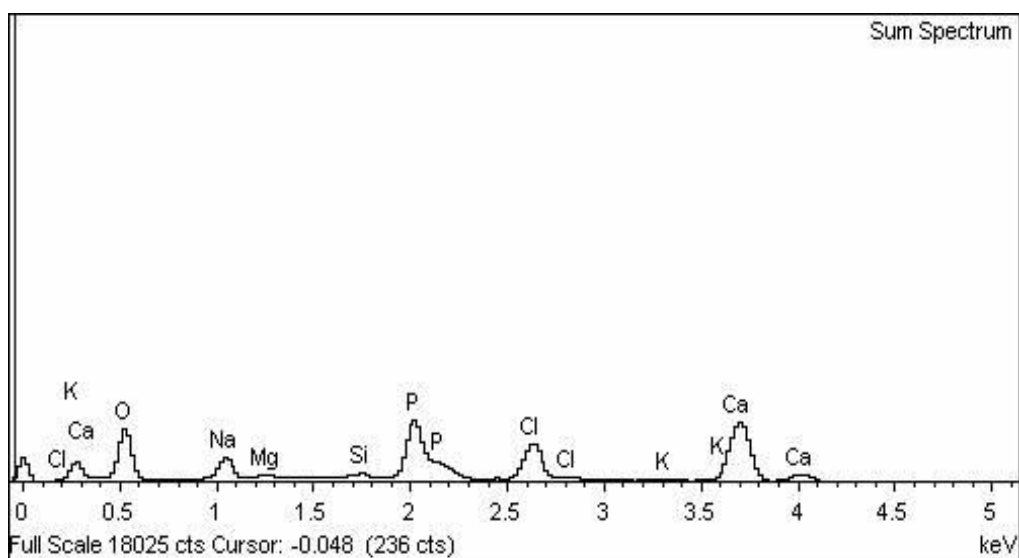
(ج)

شکل ۸- نمایش نتایج آزمایش

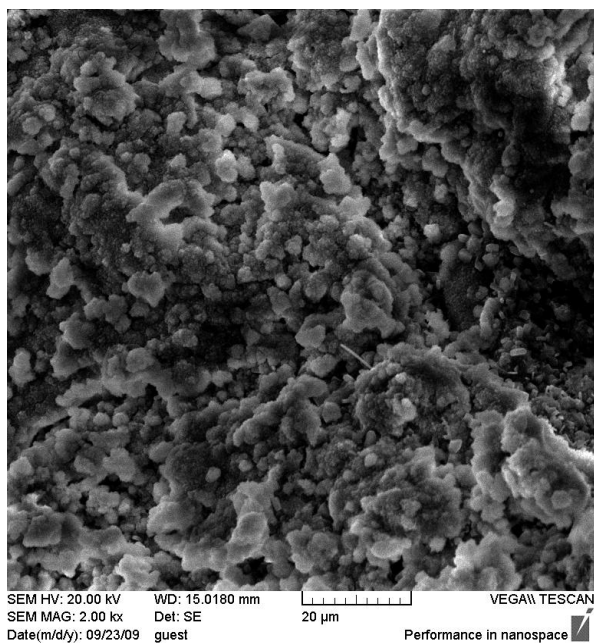
پودر شیشه بیواکتیو در کامپوزیت با ۳۰ درصد وزنی شیشه بیواکتیو با استفاده از میکروسکوپ الکترونی روبشی



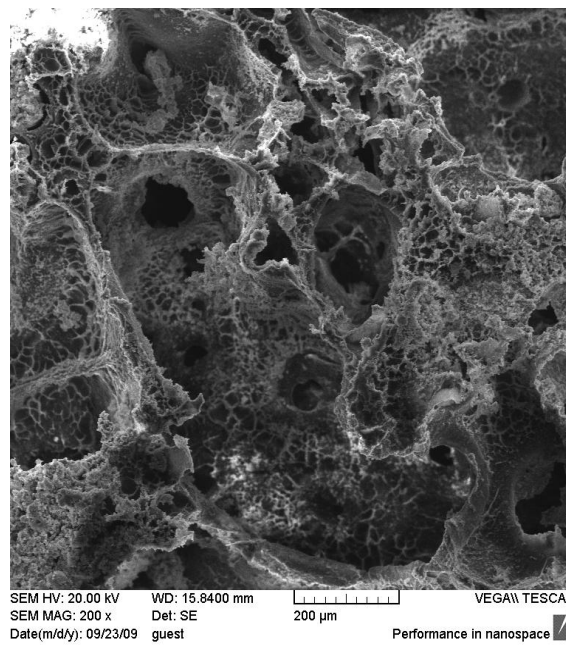
شکل ۹- تصاویر SEM از کامپوزیت با ۳۰٪ شیشه بیواکتیو پس از سپری شدن ۱ روز در SBF، که نشان دهنده جوانه زنی کلسیم فسفات روی سطح داربست از روزهای آغازین است.



شکل ۱۰- توزیع عناصر Ca و P در کامپوزیت با ۳۰٪ شیشه بیواکتیو پس از سپری شدن ۱ روز در SBF (EDAX)

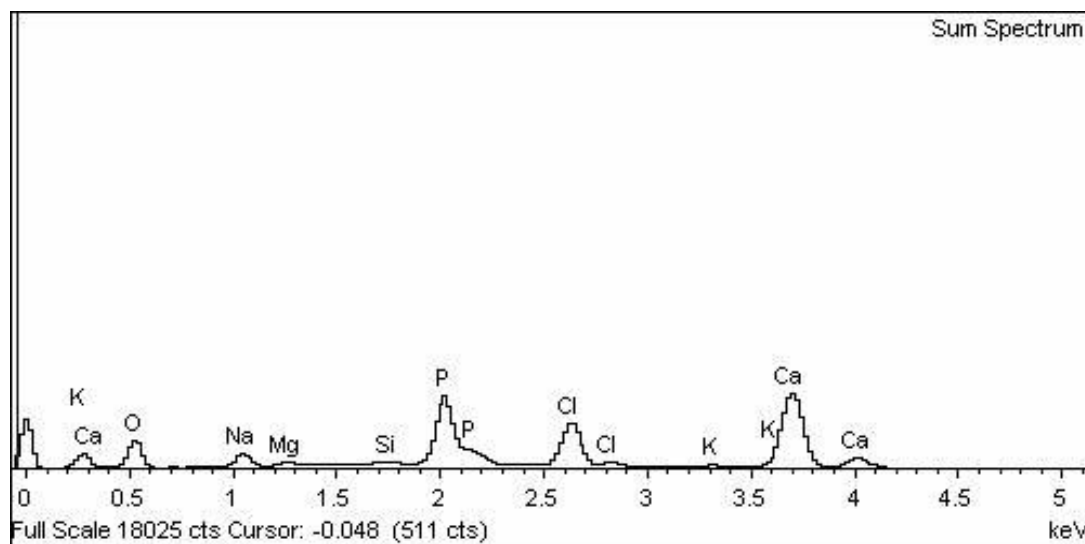


IPPI

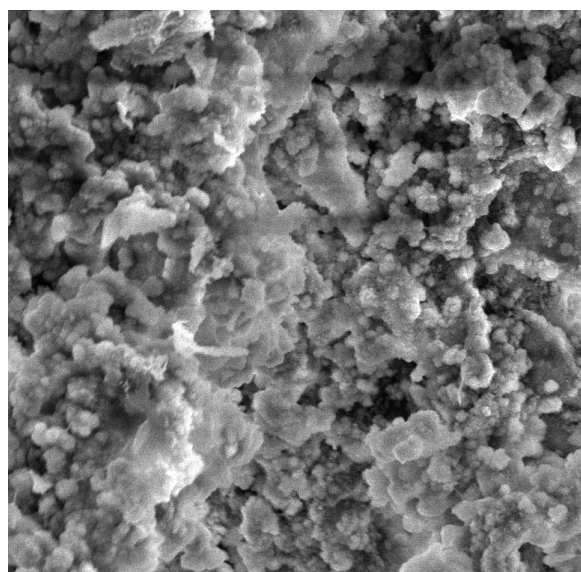


IPPI

شکل ۱۱- تصاویر SEM از کامپوزیت با ۳۰٪ شیشه بیواکتیو پس از سپری شدن ۳ روز در SBF، که تشکیل بیش‌تر کلسیم فسفات روی سطح نسبت به روزهای گذشته مشاهده می‌شود.

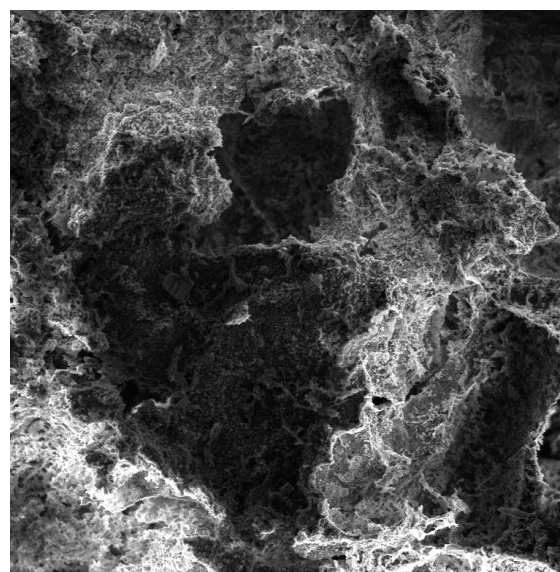


شکل ۱۲- توزیع عناصر P و Ca در کامپوزیت با ۳۰٪ شیشه بیواکتیو پس از سپری شدن ۳ روز در SBF (EDAX)



SEM HV: 20.00 kV WD: 14.2790 mm VEGA\\ TESCAN
SEM MAG: 2.00 kx Det: SE
Date(m/d/y): 09/23/09 guest Performance in nanospace

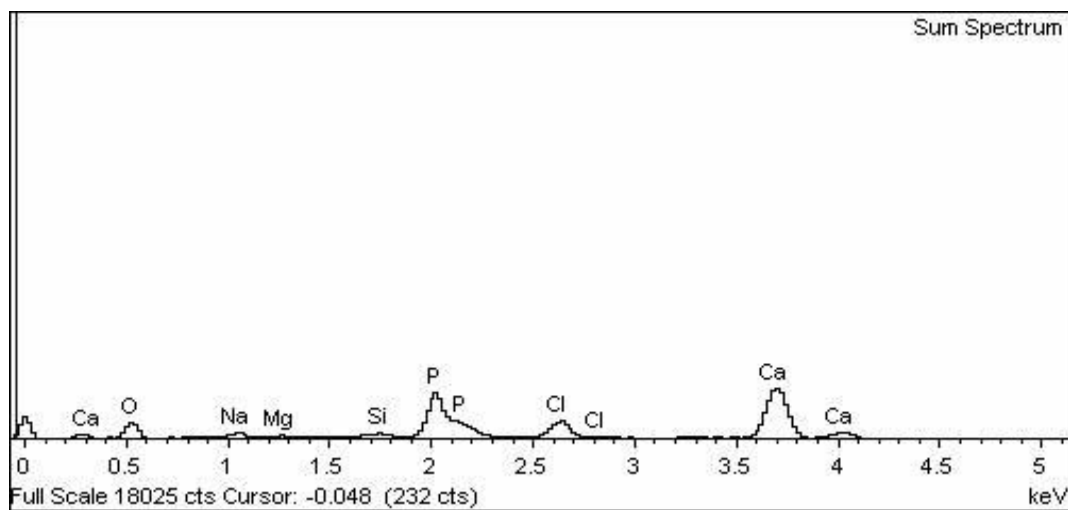
IPPI



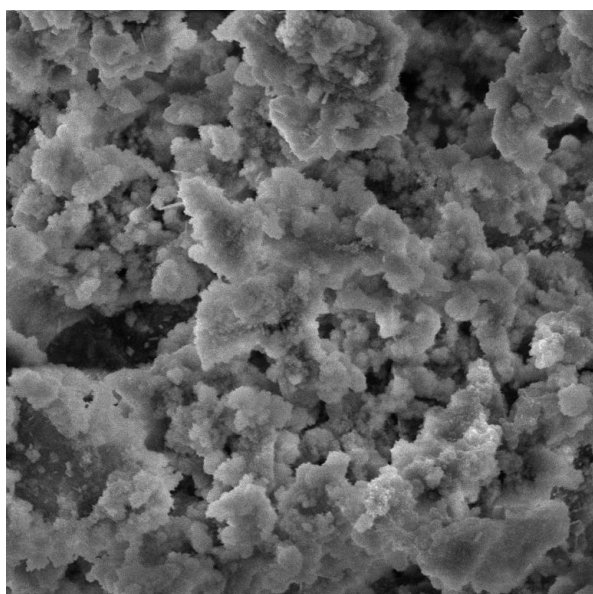
SEM HV: 20.00 kV WD: 14.2790 mm VEGA\\ TESCAN
SEM MAG: 200 x Det: SE
Date(m/d/y): 09/23/09 guest Performance in nanospace

IPPI

شکل ۱۳- تصاویر SEM از کامپوزیت با ۳۰٪ شیشه بیواکتیو پس از سپری شدن ۷ روز در SBF، که تشکیل بیش تر کلسیم فسفات روی سطح نسبت به روزهای گذشته مشاهده می‌شود.

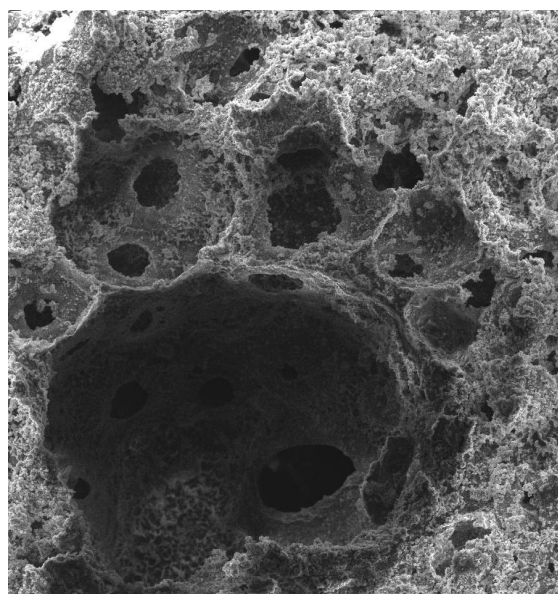


شکل ۱۴- توزیع عناصر Ca و P در کامپوزیت با ۳۰٪ شیشه بیواکتیو پس از سپری شدن ۷ روز در SBF (EDAX)



SEM HV: 20.00 kV SEM MAG: 2.00 kx WD: 14.7480 mm Det: SE Date(m/d/y): 09/23/09 VEGA\\ TESCAN Performance in nanospace

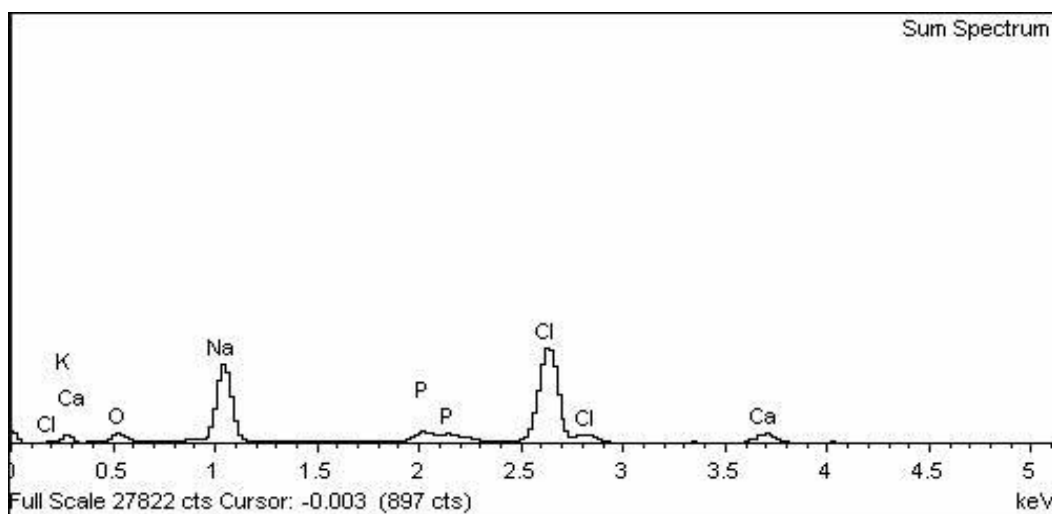
IPPI



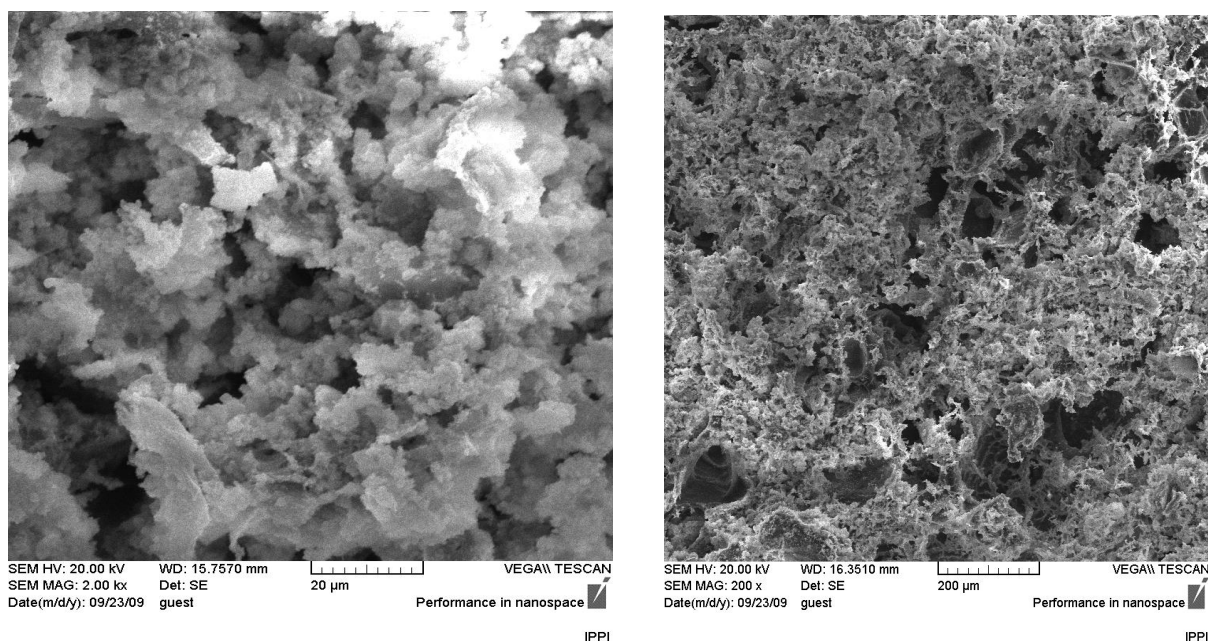
SEM HV: 20.00 kV SEM MAG: 200 x WD: 14.7480 mm Det: SE Date(m/d/y): 09/23/09 VEGA\\ TESCAN Performance in nanospace

IPPI

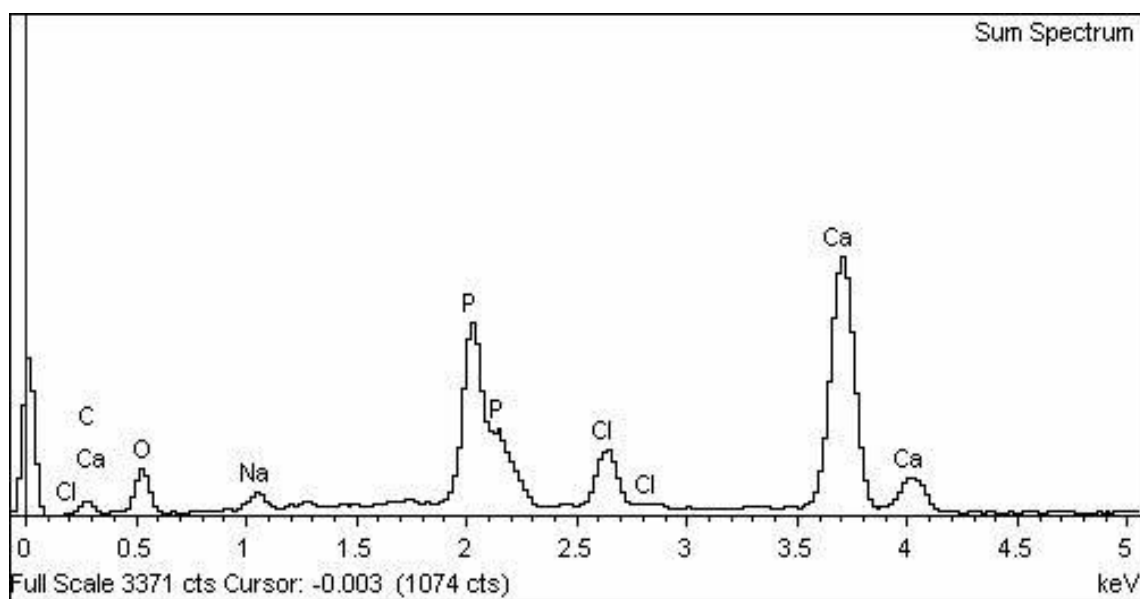
شکل ۱۵- تصاویر SEM از کامپوزیت با ۳۰٪ شیشه بیواکتیو پس از سپری شدن ۱۴ روز در SBF



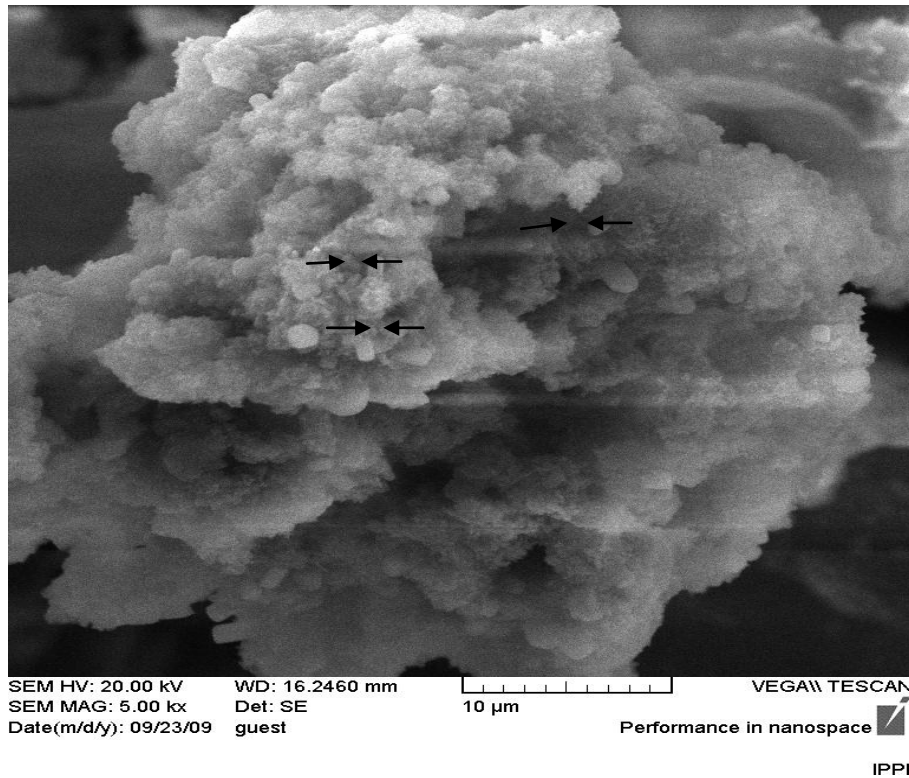
شکل ۱۶- توزیع عناصر P و Ca در کامپوزیت با ۳۰٪ شیشه بیواکتیو پس از سپری شدن ۱۴ روز در SBF (EDAX)



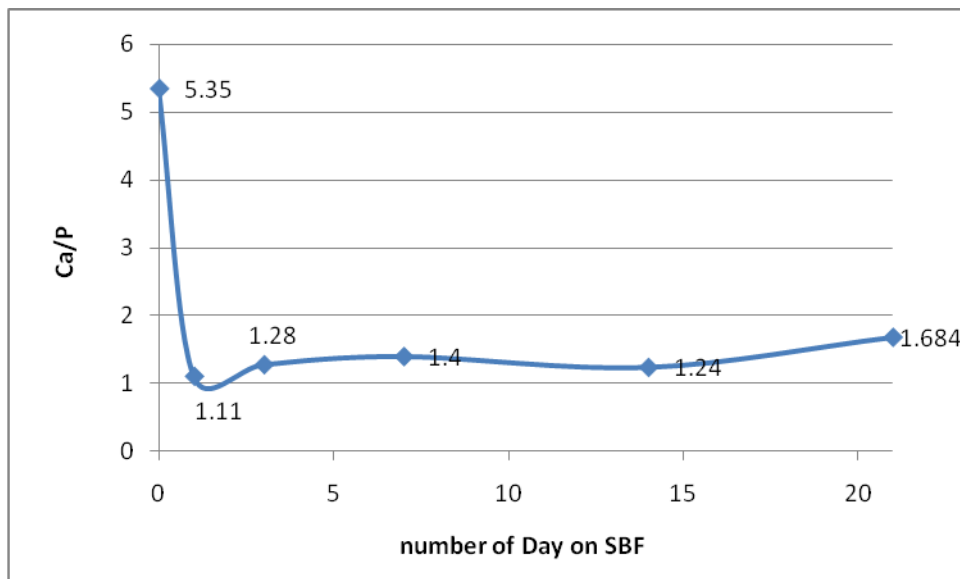
شکل ۱۷- تصاویر SEM از کامپوزیت با ۳۰٪ شیشه بیواکتیو پس از سپری شدن ۲۱ روز در SBF، که نشان دهنده شکل گیری لایه ای غنی از هیدروکسی آپاتیت روی سطح داربست است.



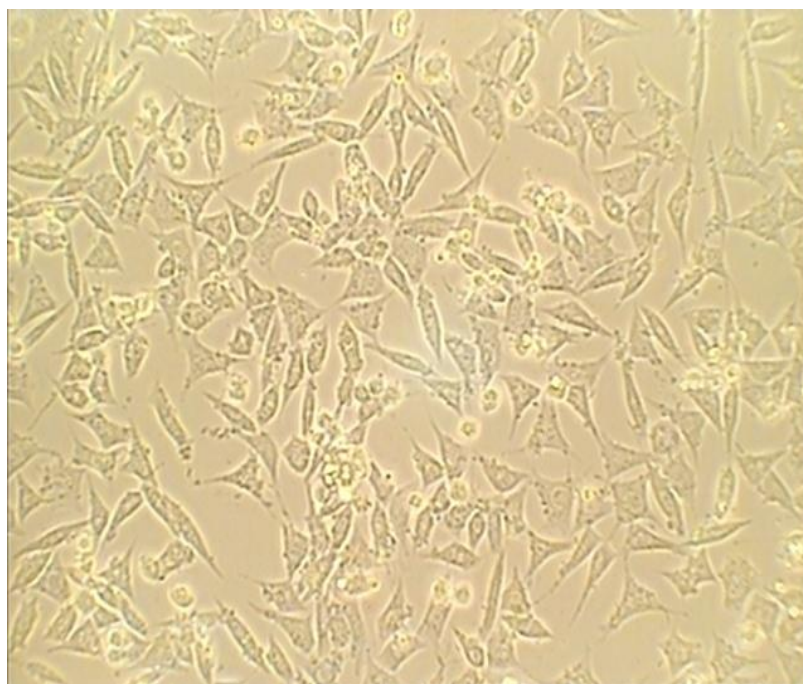
شکل ۱۸- توزیع عناصر Ca و P در کامپوزیت با ۳۰٪ شیشه بیواکتیو پس از سپری شدن ۲۱ روز در SBF (EDAX)



شکل ۱۹- تصویر SEM از کامپوزیت با ۳۰٪ شیشه بیواکتیو پس از قرار گرفتن در SBF به مدت ۲۱ روز، که نشان دهنده شکل گیری هیدروکسی آپاتیت مشابه استخوان با نسبت Ca به P برابر ۱/۶۸۴ است.



شکل ۲۰- مقایسه نسبت کلسیم به فسفات بعد از روزهای گوناگون قرار گیری در SBF



شکل ۲۱- نحوه رشد سلولی سلول‌های فیبروبلاست در آزمایش سنجش سمیت سلولی نانو شیشه‌های زیستی سنتزی

جدول ۱- فهرستی از ترکیبات شیشه‌های بیواکتیو [۱]

K ₂ O	MgO	P ₂ O ₅	Na ₂ O	CaO	SiO ₂	Code	Kind
--	--	۲/۶	۲۶/۳	۲۹	۴۲/۱	۴۲S۵/۶	Bioactive
--	--	۲/۶	۲۴/۴	۲۶/۹	۴۶/۱	(۴۵S۵)۴۶S۵/۲	
--	--	۲/۶	۲۳	۲۵/۳	۴۹/۱	۴۹S۴/۹	
--	--	۲/۶	۲۱/۵	۲۳/۸	۵۲/۱	۵۲S۴/۶	
--	--	۲/۶	۲۰/۵	۲۲/۲	۵۵/۱	۵۵S۴/۳	
--	--	۲/۶	۱۷/۷	۱۹/۶	۶۰/۱	۶۰S۳/۸	
۳-۰/۵	۵-۲/۵	۱۵-۱۰	۱۰-۵	۳۵-۳۰	۵۰-۴۰	Bioactive	Ceravital
۲-۰/۵	۲/۵-۱	۱۲-۷/۵	۷/۵-۳/۵	۳۰-۲۵	۳۵-۳۰	NonBioactive	

جدول ۲- ترکیب شیمیایی و مقادیر تشکیل دهنده شیشه بیواکتیو

Mg(NO ₃) ₂ .6H ₂ O (MgO)	Ca(NO ₃) ₂ .4H ₂ O (CaO)	TEP (P ₂ O ₅)	TEOS (SiO ₂)	ترکیب شیمیایی
۵	۲۶	۵	۶۴	درصد مولی %
۰/۴۲۶	۲/۰۴۴	۰/۳۰۳	۴۳/۷۶	گرم در ۱۰۰ میلی لیتر