

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 می دهد که بیماران در انتظار برای گرفتن عضو پیوندی جدید هستند. مهندسی بافت می تواند به حل تعداد زیادی از این مشکلات کمک کند و این کار با کاشت سلول های یک بافت خاص در ساختاری سه بعدی به نام داربست، به منظور بازگشت عملکرد طبیعی اندام مورد نظر صورت می گیرد. در این مطالعه شیشه های زیستی از تترا اتیل ارتوسیلیکات، تری اتیل فسفات و کلسیم نترات 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 رشته ها نشان داد. به منظور ارزیابی زیست فعالی، غوطه وری نمونه ها در محلول شبیه سازی بدن به مدت ۲ هفته انجام شد. آزمون های طیف سنجی تبدیل فوریه مادون قرمز و پراش 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

مشکلات بشر است [۱]. با کاربرد مواد زیستی تخریب پذیر در مهندسی بافت به خصوص مهندسی بافت استخوان، امکان بازسازی بافت های آسیب دیده فراهم شده است. مهندسی بافت

امروزه ترمیم صدمات وارد شده به استخوان ناشی از تصادفات و سوانح رانندگی، نقص مادرزادی و یا از بین رفتن استخوان توسط بیماری و سرطان های مختلف یکی از بزرگ ترین

[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 الکترورسی تهیه می‌شوند به علت 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 الکترورسی به منظور کاربرد در داربست مهندسی بافت تهیه می‌گردد. تغییر پارامترهای گوناگون الکترورسی بر خواص نانو الیاف مورد بررسی قرار می‌گیرند. ارزیابی مورفولوژی الیاف با استفاده از میکروسکوپ الکترونی روبشی و میکروسکوپ نیروی اتمی صورت می‌گیرد. 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 می‌گردد. پتانسیل سطحی داربست و بررسی رشد و تکثیر سلولی به ترتیب با دستگاه زتا سایزر و روش MTT ارزیابی می‌شوند.

۲- مواد و روش‌ها

۲-۱- مواد

تترا اتیل ارتوسیلیکات (TEOS)، تری اتیل فسفات (TEP)، کلسیم نترات ۴ آبه $(Ca(NO_3)_2 \cdot 4H_2O)$ ، 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

علم طراحی و تولید بافت‌های جدید برای ترمیم اندام‌های آسیب‌دیده و جایگزینی قسمت‌های ازدست‌رفته به علت عوامل مختلف می‌باشد [۲]. در بین بافت‌های بدن، استخوان پتانسیل بالایی برای تولید مجدد دارد و از این رو یک نمونه مناسب برای مهندسی بافت به شمار 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 به عنوان 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. به تدریج 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 طور کلی شیشه‌های زیست‌فعال که از سیلیسیوم، کلسیم و فسفر تشکیل شده‌اند به استخوان متصل و باعث ترمیم آن می‌شوند. هر چند کاربردهای این شیشه‌ها به علت 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، به دلیل زیست سازگاری و زیست‌فعال بودن عالی‌شان در مهندسی بافت به کار گرفته می‌شوند

(محلول شماره ۱). در ظرفی دیگر، به میزان ۵/۲ میلی لیتر تترایلیت ارتوسیلیکات (TEOS) به ۱/۶۸ میلی لیتر آب و ۱/۳۶ میلی لیتر اتانول (C₂H₅OH) اضافه گردید (محلول شماره ۲). نسبت مولی بین H₂O:TEOS و C₂H₅OH: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 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 می‌گشت [۱۱].

برای تهیه محلولی که قابلیت ریسندهی 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 میلی متر 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 (SEM) (VEGA TESCAN-LMU, USA) و میکروسکوپ نیروی اتمی (AFM) (JPK CO Germany) استفاده شد.

۲-۳-۱- ارزیابی مورفولوژی جهت مطالعه مورفولوژی الیاف شیشه زیست‌فعال، قبل و بعد از عملیات کلسینه کردن، از میکروسکوپ الکترونی روبشی

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 پلاسما خون است که در جدول ۲ به ترکیبات و مقدار آنها اشاره شده است [۱۲].

برای ارزیابی زیست‌فعالی، مقدار یک گرم الیاف شیشه، که در دمای 60°C کلسینه شده بود را در ۱۰۰ میلی لیتر محلول SBF غوطه‌ور کرده، سپس محلول فوق را در ارلن پلی اتیلنی در بسته قرار داده و محلول بر روی شیکر (ساخت شرکت DRAGON LAB، مدل SK-180-PRO) با دمای 37°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 6000 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)

مقدار (g)	نام ماده
۰/۳۵	NaHCO_3
۷/۹۶۶	NaCl
۰/۲۲۴	KCl
۰/۲۲۸	$\text{K}_2\text{HPO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$
۰/۳۰۵	$\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$
۰/۲۷۸	CaCl_2
۰/۰۷۱	Na_2SO_4
۶/۰۵۷	$\text{Tris}[(\text{CH}_2\text{OH})_3\text{CNH}_2]$
	محلول HCl ۱ مولار
۷/۴	pH

۲-۳-۳- ارزیابی پتانسیل سطحی

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

۲-۳-۴- بررسی رشد و تکثیر سلولی به روش MTT

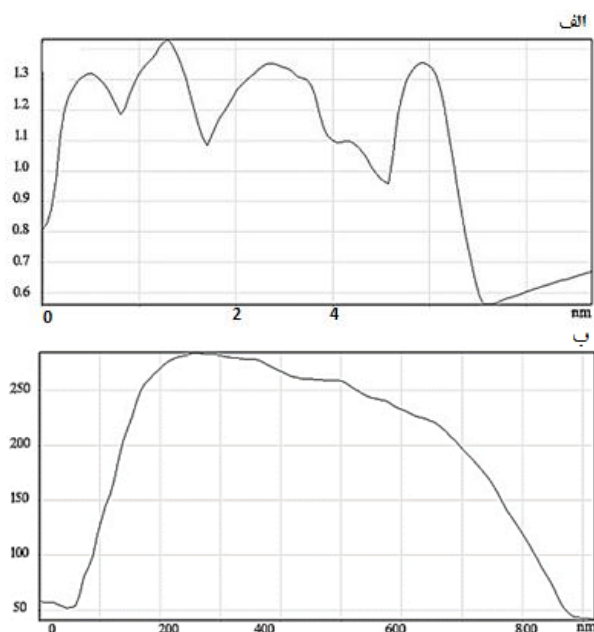
جهت انجام این آزمون پس از قرار دادن داربست در چاهکهای پلیت ۲۴ خانه، سلول‌های استئوبلاست انسانی رده MG-63 (پاساژ ۲۷-۲۶) با تراکم 5×10^4 سلول در هر میلی لیتر برای هر چاهک، روی داربستها کشت داده شدند. پس از دوره‌های زمانی ۱، ۳ و ۷ روز، $40 \mu\text{l}$ از محلول MTT (۳- (4, 5- dimethylthiazol- 2- yl)- 2, 5-diphenyltetrazolium bromide) به هر چاهک اضافه و سلولها برای ۴ ساعت در انکوباتور با $5\% \text{CO}_2$ نگهداری شدند. سپس با اضافه کردن دی‌متیل سولفوکسید (DMSO) پس از ۱۵ دقیقه، محیط رویی هر چاهک ۲۴ خانه به دو چاهک ۹۶ خانه انتقال داده شد و جذب نوری نمونه‌ها در طول موج 570 nm با استفاده از دستگاه (Hiperion mpr+Roedermark, Germany) ELISA reader اندازه‌گیری گردید.

۳- نتایج و بحث

۳-۱- بررسی مورفولوژی نانوالیاف

جهت مطالعه مورفولوژی الیاف تهیه شده، قبل و بعد از کلسینه کردن از آنالیزهای 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 الکترورسی همچون نسبت وزنی پلیمر:بیوگلاس، میزان تغذیه محلول، فاصله نوک سوزن تا جمع کننده، ولتاژ اعمالی به محلول و زمان مخلوط کردن محلول

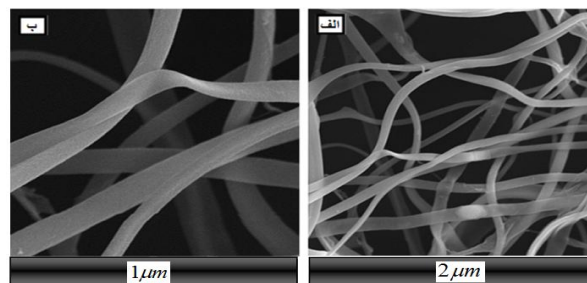


شکل (۳): تجزیه و تحلیل تصاویر مقطعی AFM نانو الیاف شیشه زیست فعال مربوط به نمونه ۱۵ بعد از کلسینه کردن با بزرگنمایی‌های مختلف

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 زیست فعال است، نشان می‌دهد. حضور این پیکها، ترکیب سه جزئی شیشه زیست فعال را تایید می‌کند. از طرف دیگر پیک کربن متعلق به پلی وینیل الکل است. پلی وینیل الکل در ترکیب با ساختار شیشه، فرآیند الکترو رسی را تسهیل نمود. در این طیف، عنصر کلر نیز مشاهده می‌شود، که احتمالاً به دلیل حضور اسید کلریدریک، به عنوان کاتالیست، در تهیه پیش ماده 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 می‌گردد 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

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

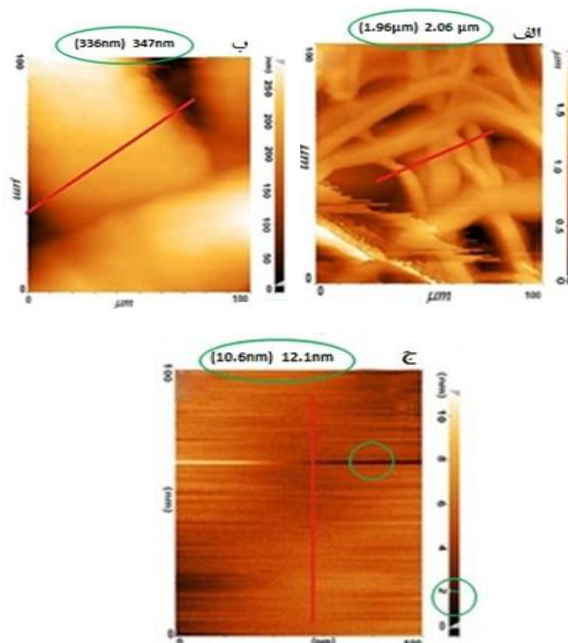


شکل (۱): تصاویر میکروسکوپ الکترونی روبشی نمونه ۱۵ بعد از کلسینه کردن

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 شیشه‌های زیست فعال، منافذی در حدود ۲ nm مشاهده شد (شکل ۲. ج).

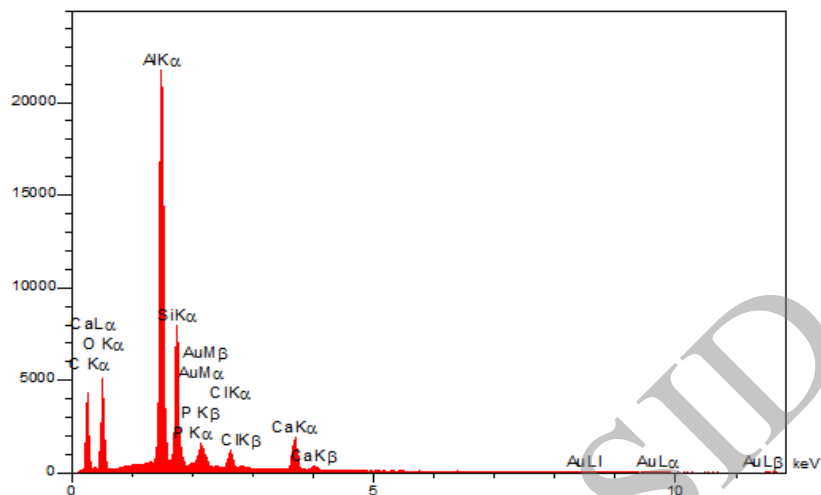
البته می‌توان از تفره‌های مشاهده شده در تصویر سطح مقطع نانو رشته‌ها (شکل ۳) نیز به این نتیجه رسید.



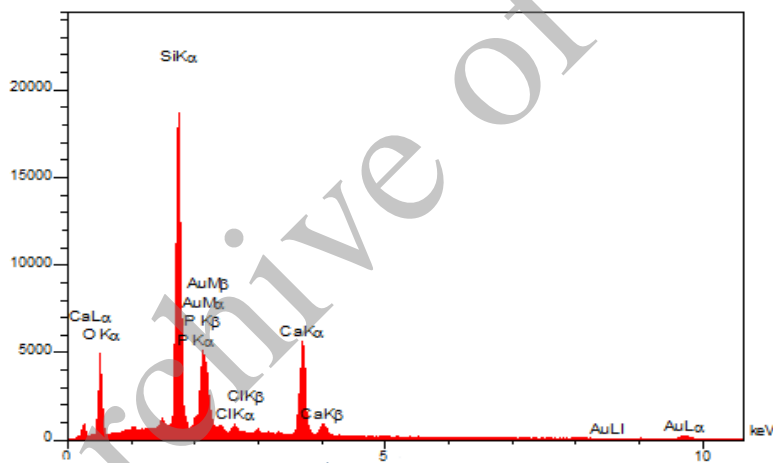
شکل (۲): تصاویر AFM از الیاف شیشه زیست فعال نمونه ۱۵ با بزرگنمایی‌های مختلف

آن از بین رفت و بنابراین ترکیب به جا مانده فقط یک ترکیب شیشه زیست فعال با ترکیب Si، P، Ca و O است.

بعد از کلسینه شدن نشان می دهد. با توجه به این شکل، زمانی که نمونه در دمای 600°C تحت عملیات حرارت قرار گرفت، پلیمر



شکل (۴): طیف EDX نمونه قبل از کلسینه کردن

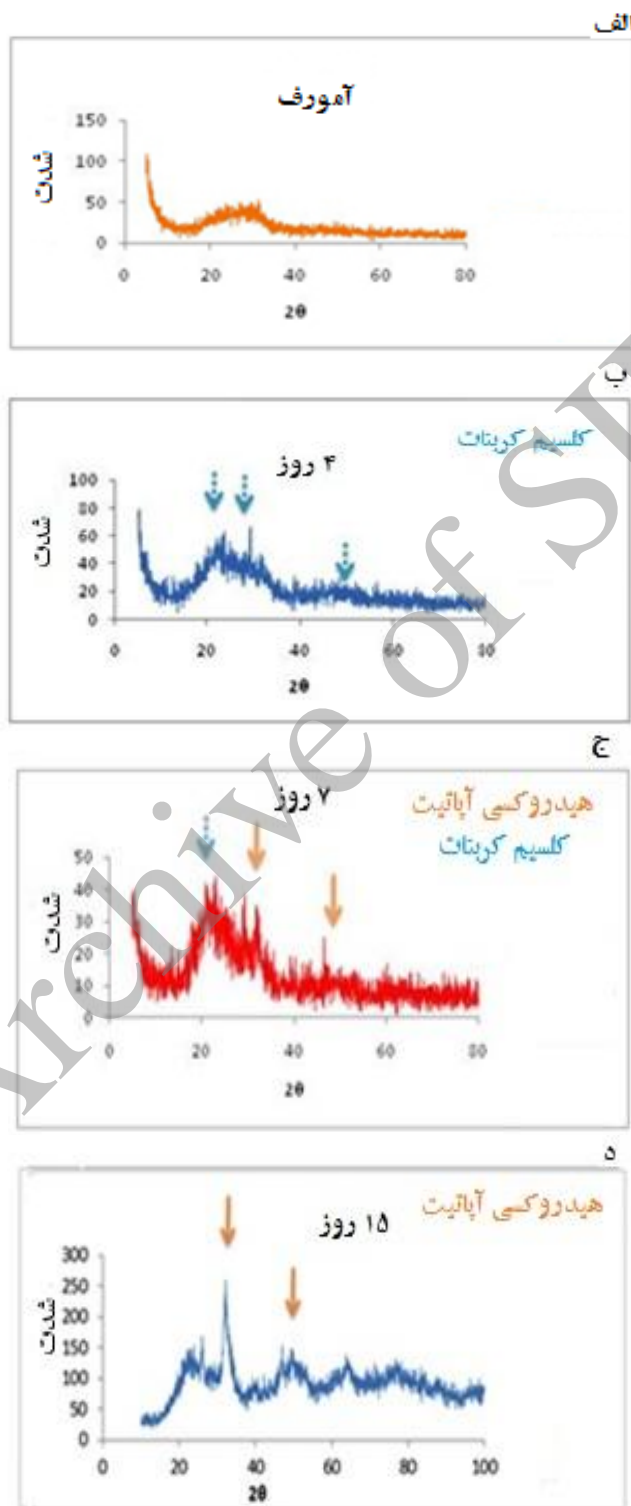


شکل (۵): طیف EDX نمونه بعد از کلسینه کردن در دمای 600°C

سینترینگ در دمای 700°C منجر به افزایش بلورینگی در شیشه زیست فعال شده است که این به خاطر تشکیل فاز بلورین لارنیت است. افزایش بلورینگی شیشه زیست فعال روی میزان زیست-فعالیت و زیست تخریب پذیری آن تاثیر گذار است [۱۴-۱۵] شکل ۶ نتایج حاصل از انجام XRD بر روی نمونه هایی که به مدت ۴، ۷ و ۱۵ روز در سیال شبیه سازی شده بدن (SBF) غوطه ور بوده-اند، را ارائه می دهد. بر این اساس تشکیل بلورهای هیدروکسی آپاتیت روی سطح نمونه ها، بعد از غوطه ور شدن در SBF، تأیید می شود. در روز چهارم غوطه وری (شکل ۶ (ب))، پیک های

برای بررسی تشکیل هیدروکسی آپاتیت از آنالیز پراش پرتو ایکس (XRD) استفاده شد. شکل ۶ (الف) الگوی پودر خام اولیه شیشه زیست فعال را که با روش سل-ژل تهیه شده، نشان می دهد. این طیف به طور کامل نشان می دهد که شیشه زیست فعال 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 زیست فعال به فاز لارنیت (Ca_2SiO_4) است [۱۳]. این امر نشان دهنده آن است که

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



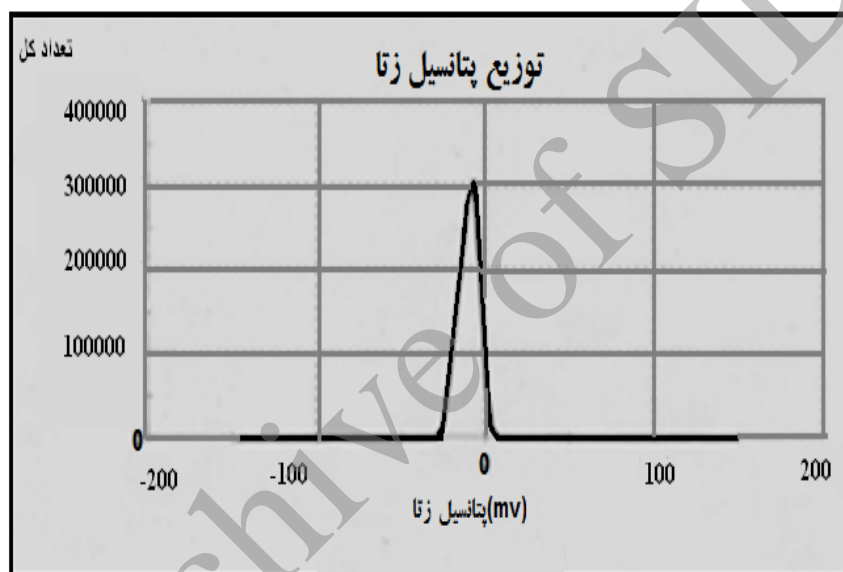
شکل (۶): طیف XRD نمونه شیشه‌ی زیست فعال با ترکیب $70SiO_2-26CaO-4P_2O_5$ (الف): بعد از سینتر کردن، (ب): ۴ روز غوطه‌وری، (ج): ۷ روز غوطه‌وری و (د):

۱۵ روز غوطه‌وری در محلول SBF

۳-۳- پتانسیل سطحی

مقایسه پتانسیل زتا یکی از نمونه های سنتز شده، برخی سرامیک های زیستی (در محلول سالین)، سلول های استئوبلاست و استخوان می پردازد. همان طوری که مشاهده می شود، هیدروکسی آپاتیت (هیدروکسی آپاتیت سینتر شده و سینتر نشده) و بتا-تری کلسیم فسفات برخلاف نانو الیاف شیشه زیست فعال سنتز شده دارای پتانسیل مثبت هستند. بر اساس مطالعات سایر محققان، پتانسیل مثبت در شیشه های زیست فعال 63S مرتبط با ترکیب شیمیایی شیشه، اندازه ذرات و محیط پوشاننده است [۱۶].

شکل ۷ توزیع پتانسیل زتای ترکیب $70\text{SiO}_2-26\text{CaO}-4\text{P}_2\text{O}_5$ را در محدوده مشخص شده نشان می دهد. همان طور که از این شکل مشاهده می شود، ترکیب فوق دارای پتانسیل زتای $10/1\text{mv}$ 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 می باشند چراکه پتانسیل زتای منفی سبب افزایش چسبندگی و تمایز سلولی می شود [۱۶]. جدول ۳ به



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

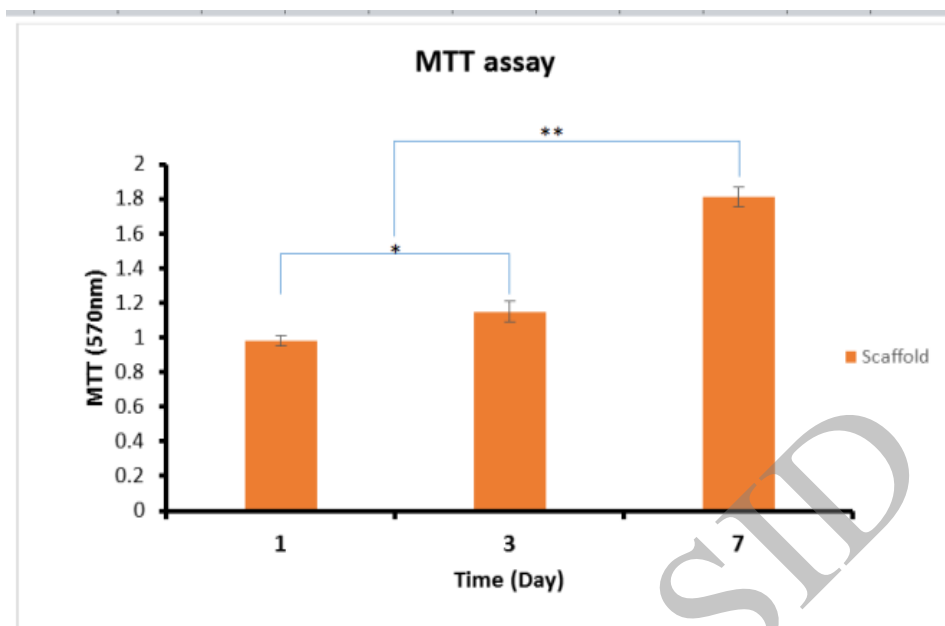
جدول (۳): پتانسیل زتای گزارش شده برای سرامیک های زیستی و سلول های

استخوانی

پتانسیل زتا در سالین فیزیولوژیکی (mV)	نمونه
$4/1 \pm 0/9$	هیدروکسی آپاتیت سینتر شده
$15 \pm 1/2$	هیدروکسی آپاتیت سینتر نشده
$2/4 \pm 0/5$	بتا-تری کلسیم فسفات
40 ± 5	سلول های استئوبلاست
-۷۰	استخوان
-۱۰/۱	نانو الیاف شیشه زیست فعال سنتز شده

۳-۴- رشد و تکثیر سلولی

نظر به اینکه کلیه نمونه ها 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 سلول های 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 ($P < 0.05$)

۴- نتیجه گیری

رشته های شیشه زیست فعال به دلیل ساختار شیمیایی، فیزیکی و زیستی مناسب، یک کاندید مناسب برای استفاده در داربست مهندسی بافت استخوان می باشد.

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. کلسینه کردن در دمای 600°C ، داربست سرامیکی از جنس شیشه زیست فعال 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-63 صورت گرفت و بررسی میزان تکثیر سلولها با روش MTT بر روی داربست نشان دادند که میزان تکثیر سلولها در روزهای ۳ و ۷ نسبت به روز اول افزایش معنی داری ($P < 0.05$) دارند. نانو

۶- 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.

- 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. Poolagasundarampillai, 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.
- [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-

Archive