

## مقایسه خواص برون تنی، فیزیکی-شیمیایی و ضدباکتریایی شیشه های زیست فعال ۶۸S و ۵۸S سنتز شده به روش سل-ژل

امیر حسین مغنیان<sup>۱\*</sup>، محمدامین ظهورفاضلی<sup>۲</sup>

۱- استادیار گروه مهندسی مواد، دانشکده فنی و مهندسی، دانشگاه بین المللی امام خمینی (ره)، قزوین، ایران

۲- کارشناسی مهندسی مواد، دانشکده فنی و مهندسی، دانشگاه بین المللی امام خمینی (ره)، قزوین، ایران

\*مسئول مکاتبات: moghanian@eng.ikiu.ac.ir

(تاریخ دریافت: ۱۳۹۷/۱۰/۱۳، تاریخ پذیرش: ۱۳۹۷/۱۲/۱۸)

**چکیده:** هدف اصلی این پژوهش، مقایسه ترکیب شیمیایی شیشه های زیست فعال ۵۸S و ۶۸S و بررسی تاثیر میزان CaO بر تشکیل برون تنی (in vitro) هیدروکسی آپاتایت، سمیت و تکثیر سلولی سلول های استخوانی MC3T3 و همچنین خواص ضدباکتریایی سیستم سه جزئی  $\text{SiO}_2\text{-CaO-P}_2\text{O}_5$  سنتز شده به روش سل-ژل است. به این منظور ابتدا، دو نوع شیشه زیست فعال ۵۸S ( $\text{mol\%: } 60\% \text{SiO}_2 - 36\% \text{CaO} - 4\% \text{P}_2\text{O}_5$ ) و ۶۸S ( $\text{mol\%: } 70\% \text{SiO}_2 - 26\% \text{CaO} - 4\% \text{P}_2\text{O}_5$ ) با مقدار ثابت  $\text{P}_2\text{O}_5$  به روش سل-ژل تهیه شدند. سپس، تاثیر میزان CaO در ترکیبات آن ها بر زیست فعالی به صورت برون تنی با غوطه ور کردن پودرهای ۵۸S و ۶۸S در محلول شبیه سازی شده بدن (SBF) برای دوره های زمانی تا ۱۴ روز مورد بررسی قرار گرفت. بررسی ترکیب محلول SBF با آنالیز طیف سنجی پلاسمای جفت شده القایی (ICP-AES) اندازه گیری شد. همچنین، طیف سنجی تبدیل فوریه مادون قرمز (FTIR)، پراش اشعه X (XRD) و میکروسکوپ الکترونی روبشی (SEM) برای بررسی تشکیل هیدروکسی آپاتایت روی سطوح شیشه های زیست فعال انجام شد. همچنین، آزمون های رنگ آمیزی سلولی زنده/مرده، زولیم برماید (MTT) و آزمون الکالین فسفاتاز (ALP) به ترتیب به منظور بررسی کیفیت و کمیت زیست پذیری سلول ها، تکثیر سلول های MC3T3 در حضور شیشه های زیست فعال ۵۸S، ۶۸S انجام شد. در نهایت، بر اساس نتایج مشاهده شده، شیشه زیست فعال ۵۸S، با تکثیر سلولی و فعالیت (ALP) سلول های MC3T3 افزایش یافته، زیست فعالی قابل قبول و ضد باکتریایی چشمگیر بالا در برابر باکتری (MRSA)، به عنوان یک ماده زیستی مناسب تر نسبت به شیشه زیست فعال ۶۸S به منظور بهبود عملکرد رهایش یون های درمانی و فاکتورهای رشد برای مهندسی بافت استخوانی معرفی می گردد.

### واژه های کلیدی:

فرآیند سل-ژل، هیدروکسی آپاتایت، شیشه زیست فعال، فعالیت ضد باکتریایی، تکثیر سلولی MC3T3

### ۱- مقدمه

می کنند، درون بدن مستقیماً با محیط بافت استخوانی پیوند برقرار- کند [۳-۴]. این رفتار اتصال به استخوان از سوی شیشه های زیست فعال، به عنوان "زیست فعالی" نام برده می شود [۵]. اولین شیشه زیست فعال در سیستم 46/1%  $\text{SiO}_2$ , 26/9%  $\text{CaO}$ , 2/6%  $\text{P}_2\text{O}_5$  در سال ۱۹۷۰ توسط پروفیسور هنج به روش

شیشه زیست فعال یکی از زیر گروه های اصلی مواد زیست پذیر استخوان ساز است که بخاطر ویژگی های منحصر به فرد آن در مهندسی بافت استخوان مشهور است [۱-۲]. شیشه های زیست فعال این قابلیت را دارند که با تشکیل لایه هیدروکسی آپاتایت روی سطوح و آزاد شدن یون ها که تکثیر سلول استخوانی را ترغیب

بافت پیشنهاد شده‌اند [۱۳-۱۴]. همچنین در فعالیت‌های بالینی شیشه‌های زیست فعال، یکی از مسائل بحرانی عفونت باکتریایی می باشد که می تواند بعد از قرار دادن مواد زیستی نظیر شیشه زیست فعال در جراحی مهندسی بافت، مهلک باشد [۱۵]. باکتری استافیلوکوک اورئوس مقاوم به متی سیلین، یکی از جدیترین باکتری ها، از مهم ترین دلیل عفونت های بیمارستانی باشد که اخیرا در جامعه شایع شده است [۱۶]. این در حالی است که فعالیت باکتریایی شیشه های زیست فعال مقابل محدوده وسیعی از باکتری ها بیان شده است [۱۷]. بنابراین، تصور شیشه زیست فعال به عنوان یک عامل ضد باکتری یک ایده خلاقانه در جراحی های مربوط به مواد کاشتی می باشد. در سال های اخیر مطالعات زیادی در زمینه سنتز، ترکیب شناسی، تحقیقات زیستی و ضدباکتریایی شیشه های زیست فعال سنتز شده به روش سل-ژل در سیستم  $\text{SiO}_2\text{-CaO-P}_2\text{O}_5$  مانند شیشه های ۶۸S و ۵۸S انجام شده است [۱۸-۱۹] اما هیچ مطالعه جامعی به منظور بررسی تاثیر مقادیر متفاوت CaO در شیشه های زیست فعال ۵۸S، ۶۸S بر تشکیل هیدروکسی آپاتایت برون تنی، مطالعات زیستی و باکتریایی انجام نشده است. هدف اصلی این مطالعه، تحقیق درباره میزان تاثیر CaO بر زیست فعالی برون تنی، سمیت میزان ضدباکتریایی شیشه زیست فعال سه جزئی تهیه شده به روش سل-ژل است. به این منظور، دو شیشه زیست فعال در سیستم سه جزئی با میزان ترکیبات متفاوت ۵۸S ( $60\% \text{SiO}_2$ ) mol%:  $70\% \text{SiO}_2\text{-}26\% \text{CaO}$  و ۶۸S ( $36\% \text{CaO}\text{-}4\% \text{P}_2\text{O}_5$ ) و  $4\% \text{P}_2\text{O}_5$  با میزان فسفر یکسان به روش سل-ژل سنتز شدند. سپس، تاثیر میزان CaO بر تشکیل برون تنی هیدروکسی آپاتایت توسط طیف سنجی پلاسمای جفت شده القایی (ICP-AES)، طیف سنجی تبدیل فوریه مادون قرمز (FTIR)، پراش الکترون ایکس (XRD) و میکرو سکوپ الکترونی روبشی (SEM) مورد تحقیق قرار گرفت. همچنین تکنیک های رنگ آمیزی سلولی مانند رنگ آمیزی زنده/مرده و ارزیابی های زیستی مانند MTT و ALP به ترتیب به عنوان آزمون های کیفی و کمی برای زیست پذیری و تفکیک سلول ها و مشاهده مورفولوژی هسته سلول های

ذوبی سنتز شد [۶]. در فرآیند ذوبی شیشه های زیست فعال به روش ذوبی و مخلوط کردن اکسیدها در ترکیب هایی نظیر سیلیسیم، کلسیم، فسفر و سدیم در دما های بالا، که وابسته به نوع شیشه زیست فعال بین ۱۲۰۰ تا ۱۵۰۰ درجه سانتی گراد هست، سنتز می شود.

از سوی دیگر، روش سل-ژل در دهه اخیر مطرح شده است [۷] که شامل مخلوط کردن نمک های غیر آلی فلزها به عنوان مواد اولیه می باشد [۸]. شیشه های زیست فعال می توانند به روش جدید سل-ژل یا روش قدیمی ذوبی تهیه شود. همینطور، مزیت های فراوان روش سل-ژل نسبت به روش ذوبی نظیر دمای کار پایین تر، خلوص و همگن بودن بیشتر به سبب تبخیر کمتر  $\text{P}_2\text{O}_5$  گزارش شده است [۹].

از سوی دیگر، پژوهش های پیشین نشان داده اند که شیشه های سنتز شده به روش سل-ژل دارای سرعت بیشتر تشکیل هیدروکسی آپاتایت در مقایسه با شیشه های تهیه شده بوسیله روش ذوبی است [۱۰-۱۱]. پنج گام زیر، به ترتیب برای تشکیل برون تنی یا درون تنی لایه هیدروکسی آپاتایت بر روی سطوح شیشه های زیست فعال در محلول شبیه سازی شده بدن پیشنهاد شده است [۱۲].

۱- تشکیل سیلانول (Si-OH) روی سطوح شیشه زیست فعال با تعویض کاتیونی سریع یون های مثبت  $\text{Ca}^{2+}$  با  $\text{H}^+$  از محلول SBF.  
۲- شکستن پیوندهای Si-O-Si و تشکیل Si-OH در شیشه زیست فعال در تماس با محلول SBF.

۳- بازپلیمرسازی لایه حاوی سیلیسیم در سطوح شیشه زیست فعال با متراکم شدن گروه های Si-OH.

۴- تشکیل لایه آمورف  $\text{CaO-P}_2\text{O}_5$  بر روی لایه حاوی سیلیسیم با انتقال گروه های  $\text{Ca}^{2+}$  و  $\text{PO}_3^{4-}$  از SBF.

۵- کریستالیزه شدن  $\text{CaO-P}_2\text{O}_5$  با ترکیب شدن هیدروکسیل ها و کربنات ها از محلول SBF.

تاکنون انواع مختلفی از شیشه های زیست فعال با ترکیبات شیمیایی مختلف مانند ۵۸S، ۶۸S و VVS برای فعالیت های زیست درمانی همانند دندان پزشکی، ارتوپدی و دارو در زمینه مهندسی

۹MPa پرس شد و به قرص هایی به قطر ۸ سانتی متر و ارتفاع ۳ سانتی متر تبدیل گردید.

برای تحقیقات زیستی، محلول SBF (مشابه ترین محلول به پلاسمای خون انسان) با توجه به دستور پیشنهاد شده توسط (kokubo) تهیه گردید [۲۰]. در ابتدا ماده های کلسیم کلرید ( $\text{CaCl}_2$ )، فسفات مونوپتاسیم ( $\text{K}_2\text{HPO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ )، پتاسیم کلرید ( $\text{KCl}$ )، سدیم کلرید ( $\text{NaCl}$ )، سدیم بی کربنات ( $\text{Na}_2\text{SO}_4$ )، منگنز کلرید-۶ آب ( $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ ) و سدیم سولفات ( $\text{Na}_2\text{SO}_4$ ) درون آب مقطر اضافه و تنظیم کردن PH با اضافه کردن Tris- buffer (trishydroxymethylaminomethane) و هیدروکلریک اسید انجام شد.

تمام مواد شیمیایی از شرکت مرک آلمان خریداری شد و مورد استفاده قرار گرفت. مقایسه یون های عنصری در محلول SBF در مقایسه با پلاسمای خون انسان در جدول (۲) نشان داده شده است.

جدول (۲): مقادیر یون های عنصری در محلول SBF و پلاسمای خون انسان (بر حسب  $\text{mmol.L}^{-1}$ )

| Ion                 | Plasma ( $\text{mmol.L}^{-1}$ ) | SBF ( $\text{mmol.L}^{-1}$ ) |
|---------------------|---------------------------------|------------------------------|
| $\text{Na}^+$       | 142/0                           | 142/0                        |
| $\text{K}^+$        | 5/0                             | 5/0                          |
| $\text{Mg}^+$       | 1/5                             | 1/5                          |
| $\text{Ca}^{+2}$    | 2/5                             | 2/5                          |
| $\text{Cl}^-$       | 103/0                           | 147/8                        |
| $\text{HCO}_3^-$    | 27                              | 4/2                          |
| $\text{HPO}_4^{-2}$ | 1/0                             | 1/0                          |
| $\text{SO}_4^{-2}$  | 0/5                             | 0/5                          |

## ۲-۲-۲- مشخصه یابی شیشه های زیست فعال سنتز شده

### ۲-۲-۱- اندازه گیری های دانسیته و محاسبات دانسیته اکسیژن

روش جایگزینی مایع به منظور اندازه گیری دانسیته شیشه زیست فعال با غوطه ور کردن پودرهای شیشه زیست فعال در آب دیونیزه در ۲۵ میلی لیتر pycnometer (Gay-Lussac, Germany) همان طور که قبلاً تشریح شده است، انجام گردید [۲۱]. بعلاوه، برای بررسی ارتباط شبکه ایی در شیشه های زیست فعال سنتز شده و

MC3T3 و فیبرهای اکترین در حضور شیشه های ۵۸S و ۶۸S انجام شد. علاوه بر این، فعالیت های ضد باکتریایی شیشه های زیست فعال سنتز شده، در برابر باکتری استافیلوکوک اورئوس مقاوم به متی سیلین با نمونه کنترل به روش تشکیل کلونی مقایسه شد. نهایتاً با توجه به زیست فعالی برون تنی، تکثیر سلولی، آزمون الکالین فسفاتاز و نتایج فعالیت های ضد باکتریایی، مقدار بهینه CaO در شیشه های زیست فعال با مقدار ثابت  $\text{P}_2\text{O}_5$  (۴٪) پیشنهاد می شود.

## ۲- مواد و روش انجام تحقیق

### ۲-۱- سنتز شیشه زیست فعال و SBF

دو شیشه زیست فعال ۵۸S و ۶۸S به روش سل-ژل سنتز شدند. ترکیبات شیمیایی در جدول (۱) نشان داده شده است.

جدول (۱): ترکیبات شیمیایی دو شیشه زیست فعال ۵۸S و ۶۸S (بر حسب

درصد مولی)

| Bioactive glass | Label | $\text{SiO}_2$ | CaO | $\text{P}_2\text{O}_5$ |
|-----------------|-------|----------------|-----|------------------------|
| BG-58S          | (58S) | 60             | 36  | 4                      |
| BG-68S          | (68S) | 70             | 26  | 4                      |

به طور خلاصه، تترااتیل اورتو سیلیکات  $\text{TEOS: Si(OC}_2\text{H}_5)_3$  به عنوان پیش ماده سیلیسیم با آب تحت شرایط اسیدی هیدرولیز شد و در ادامه به منظور ایجاد سل همگن و شفاف، تری اتیل فسفات ( $\text{TEP: PO(OC}_2\text{H}_5)_3$ ) و کلسیم نترات چهار آب ( $\text{Ca(NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ ) به ترتیب ۵۴/۱ سی سی، ۵/۵ سی سی و ۳۴/۳ گرم برای سنتز ۲۵ گرم شیشه ۵۸S و همچنین ۶۲/۷ سی سی، ۵/۴ سی سی و ۲۴/۶ گرم برای سنتز ۲۵ گرم شیشه ۶۸S اضافه گردید، سپس سل های سنتز شده به مدت ۳ روز در دمای  $37^\circ\text{C}$  مورد پیرسازی قرار گرفت و برای ۲۴ ساعت در دمای  $75^\circ\text{C}$  درجه خشک شد و به مدت ۳ ساعت در دمای  $700^\circ\text{C}$  در کوره به منظور حذف مواد آلی و نترات باقی مانده نگه داری شد. سپس، ژل سنتز شده به منظور بررسی های بایولوژیکی تحت فشار هیدرولیک معادل

شد. سپس از PH سنج مدل ۳۴۰ Corning بعد از هر بازه زمانی غوطه‌وری برای سنجیدن میزان PH استفاده گردید.

### ۲-۳-۲- رزیابی زیستی

#### ۲-۳-۱- سمیت سلولی

به منظور بررسی غیر سمی بودن پودرهای شیشه‌های زیست فعال و زیست پذیری سلول‌های MC3T3 آزمون MTT انجام شد. ابتدا، سلول‌های MC3T3 با دانسیته  $6 \times 10^3$  در هر چاهک بطور منظم در محل‌های کشت کاشته شدند و داخل انکوباتور قرار داده شدند. سپس بعد از ۱، ۳ و ۷ روز محیط کشت با  $100 \mu\text{L}$  از  $5 \text{ mg/mL}$  محلول (Sigma Aldrich) MTT جایگزین شد و در انکوباتور به مدت ۷۲ ساعت نگه داری شد. در آخر مقادیر دانسیته نوری کریستال‌های تسریع شده حل شده فورمازان با یک طول موج  $570 \text{ nm}$  با استفاده از دستگاه (multi-well microplate reader 312e Biokinetics reader, Biotek Instruments) اندازه گیری شد.

#### ۲-۳-۲- فعالیت فسفات قلیایی

ALP یک نشانگر تمایزی موثر برای حالت استخوان سازها (osteoblasts) مبنی بر روش Lawry و همکاران می باشد [۲۳]. کیت آنزیم ALP برای اندازه گیری فعالیت الکلین فسفاتاز با توجه به پروتکل شرکت سازنده (Biotek, Heidelberg, German) استفاده شد.

بطور خلاصه، سلول‌های MC3T3-E1 بر روی شیشه‌های زیست فعال با دانسیته  $1 \times 10^4 \text{ cells/cm}^2$  کاشته شدند و به مدت ۱، ۳ و ۷ روز در انکوباتور رشد یافتند. بعد از هر بار نگه داری در انکوباتور، لایه سلولی به آرامی با محلول PBS شسته شد و  $1 \text{ mL}$  از Tris buffer و  $1 \text{ mL}$  محلول phosphate p-nitrophenyl (Sigma, 16 pNPP,  $1 \text{ mmol.L}^{-1}$ ) به آن اضافه شد. بعد از ۵ دقیقه نگه داری در انکوباتور در دمای  $37 \text{ }^\circ\text{C}$  p-nitrophenyl آزاد شده بوسیله microplate reader با طول موج  $410 \text{ nm}$  اندازه گیری شد [۲۴].

برای مقایسه غلظت آنها، دانسیته اکسیژن های ۶AS و ۵AS با توجه به رابطه زیر محاسبه شد [۲۲].

$$\rho_0 = \frac{M_0 \times (2x_{\text{SiO}_2} + x_{\text{CaO}} + 5x_{\text{P}_2\text{O}_5})}{[x_{\text{SiO}_2} M_{\text{SiO}_2} + x_{\text{CaO}} M_{\text{CaO}} + x_{\text{P}_2\text{O}_5} M_{\text{P}_2\text{O}_5}] \times \rho_{\text{glass}}^{-1}} \quad (1)$$

که  $M_0$  جرم اتمی اکسیژن می باشد برای مثال:  $M_{\text{SiO}_2}$ ،  $M_{\text{CaO}}$  و  $M_{\text{P}_2\text{O}_5}$  به ترتیب جرم مولکولی  $\text{SiO}_2$ ،  $\text{CaO}$  و  $\text{P}_2\text{O}_5$  است. همچنین  $x_{\text{SiO}_2}$ ،  $x_{\text{CaO}}$  و  $x_{\text{P}_2\text{O}_5}$  به ترتیب کسر مولی  $\text{SiO}_2$ ،  $\text{CaO}$  و  $\text{P}_2\text{O}_5$  است.

### ۲-۲-۲- آنالیزهای XRD، FTIR و SEM

هیدروکسی آپاتیت تشکیل شده در سطح شیشه‌ها با آنالیز پراش اشعه ایکس (XRD, INEL-Equinox-3000) ساخت کشور فرانسه با استفاده از پرتو  $\text{Cu-K}\alpha$  با محدوده  $2\theta$  در محدوده  $15^\circ$  تا  $40^\circ$  با سرعت اسکن  $1/2^\circ$  آنالیز شد ( $\lambda = 1.5405 \text{ \AA}$ ). در ادامه ساختار شیمیایی هیدروکسی آپاتیت تشکیل شده در سطوح ۶AS، ۵AS با استفاده از تکنیک FTIR با دستگاه مدل (Nicolet Avatar 660) ساخت کشور امریکا در محدوده طول موج  $4000-400$  نانومتر مشخصه‌یابی شد. دستگاه میکروسکوپ الکترونی روبشی مدل (Philips XL30) ساخت کشور هلند برای مشاهده مورفولوژی هیدروکسی آپاتیت تشکیل شده بر روی شیشه‌های زیست فعال بعد از دوره‌های زمانی غوطه‌وری تا ۱۴ روز استفاده شد.

### ۲-۲-۳- طیف سنجی پلاسمای جفت شده القایی (ICP-AES)

بررسی انحلال یون‌ها در دمای  $37^\circ\text{C}$  با غوطه‌ور کردن قرص‌ها با یک نسبت ثابت از محیط سطح به حجم  $0.1 \text{ mL}$  SBF پس از غوطه‌وری در روزهای ۱، ۳، ۷ و ۱۴ انجام شد. غلظت یون‌های کلسیم، سلنیم و فسفر با دستگاه طیف سنجی پلاسمای جفت شده القایی (ICP) مدل (Varian Vista Pro, Palo Alto) ساخت کشور امریکا بررسی

## ۳-۳-۲- رنگ آمیزی سلولی زنده و مرده

برای ارزیابی زیست سازگاری شیشه های زیست فعال سنتز شده با استفاده از کیت آزمون زیست پذیری سلولی زنده/مرده (سیگما-الدریج)، از روش سلول زنده / مرده استفاده شد. به طور خلاصه، سلول های MC3T3-E1 با تراکم  $15000$  سلول بر سانتی متر مربع در نمونه های ۵۸S و ۶۸S کاشته شدند. ۱ و ۷ روز پس از کشت، شیشه های زیست فعال با سلول های متصل، ۳ بار به آرامی با محلول PBS شست و شو داده شد و به مدت ۱۵ دقیقه در تاریکی با  $200$  میکرولیتر از  $2$  میلی لیتر کلکسین-اتوکسی متیل استر (calcein-AM) و  $4 \mu\text{L}$  اتیدیم هومویدیم-۱ (EthD-1) در اتمسفر  $\text{CO}_2$  ۵٪ و رطوبت ۹۵٪ در دمای  $37^\circ\text{C}$  در انکوباتور گذاشته شدند. در نهایت، میکروسکوپ فلورسنس (USA, Olympus) با یک دوربین دیجیتال Zeiss AxioCam برای تصویر برداری که بیانگر سلول های MC3T3 زنده (فلورسنت سبز) و مرده (فلورسنت قرمز) بودند، استفاده شد.

## ۴-۲-۲- مطالعات ضد باکتری

برای مقایسه فعالیت ضد باکتریایی نمونه های ۵۸S و ۶۸S با نمونه کنترل ( $\text{SiO}_2$  پایدار با اثر ضد باکتری ضعیف)، در مرحله اول، باکتری MRSA تقریباً به میزان  $10^8 \times 0.5$  تا  $10^8 \times 2$  رقیق شد و سپس یک میلی لیتر سوسپانسیون باکتری به مخلوطی از  $0.9$  میلی لیتر LB متوسط و  $10$  میلی گرم از هر شیشه زیست فعال و سپس ۱ ساعت به کشت در  $37^\circ\text{C}$  اضافه شد. سپس  $100 \mu\text{L}$  از سوسپانسیون های نهایی بر روی صفحات LB-agar ریخته شد و به مدت ۱۲ ساعت در تاریکی در دمای  $37^\circ\text{C}$  در انکوباتور قرار داده شد [۲۵] و در نهایت واحد نهایی تشکیل کلونی در هر میلی لیتر (CFU / mL) به عنوان درصد باکتریایی به صورت زیر محاسبه شد [۲۵-۲۶].

(تعداد باکتری های زنده مانده)

درصد ضد باکتریایی =  $1 - \frac{\text{تعداد کل باکتری ها}}{\text{تعداد باکتری های زنده مانده}}$ 

(۲)

## ۵-۲- تحلیل آماری

تمامی آزمایشات با یولوژیکی در حداقل سه دوره ی تکثیر انجام شد. داده ها به صورت میانگین  $\pm$  انحراف معیار ارائه شدند. علاوه بر این، با استفاده از نرم افزار GraphPad Prism، نسخه ۳.۰ (USA, GraphPad Prism)، تجزیه و تحلیل آماری انجام شد. مقدار احتمال (p-Value) کمتر از  $0.05$  ( $p < 0.05$ ) به عنوان تفاوت قابل ملاحظه آماری در نظر گرفته شد.

## ۳-۳- نتایج و بحث

## ۱-۳-۳- دانسیته شیشه زیست فعال و دانسیته اکسیژن (OD)

دانسیته اکسیژن به عنوان یک معیار برای بررسی تراکم شبکه شیشه زیست فعال استفاده شد [۲۷]. مقادیر OD برای ۵۸S و ۶۸S سنتز شده در جدول (۳) ارائه شده است. نتایج نشان داد که دانسیته اکسیژن محاسبه شده با توجه به سیلیس ( $\text{SiO}_2$ ) بیشتر در ترکیب شیشه زیست فعال به عنوان شبکه سازها، در ۶۸S با توجه به ۵۸S افزایش یافته است. در همین حال، لازم به ذکر است که تفاوت دانسیته اکسیژن ( $\text{gr.cm}^{-3}$ ) بین ۵۸S و ۶۸S از نظر آماری قابل توجه است ( $p < 0.05$ ).

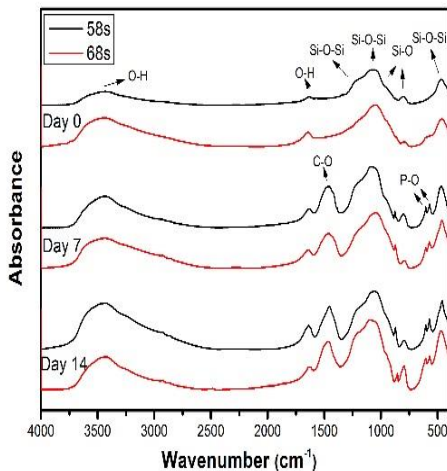
جدول (۳): مقادیر دانسیته اکسیژن برای دو شیشه زیست فعال ۵۸S و ۶۸S ( $\text{gr.cm}^{-3}$ )

| Bioactive glass | ۵۸S                | ۶۸S                |
|-----------------|--------------------|--------------------|
| Oxygen density  | $0.756 \pm 0.0098$ | $0.776 \pm 0.0069$ |

## ۲-۳-۳- تجزیه و تحلیل فازها و گروه های ساختاری

همان طور که در شکل ۱ دیده می شود، پیک مشخصه هیدروکسی آپاتایت (JCPDS (شماره ۰۹-۴۳۲)) در الگوهای XRD، ۵۸S و ۶۸S پس از ۷ روز غوطه وری در محلول SBF تشخیص داده شد، در حالی که قبل از غوطه وری در محلول SBF، به دلیل ساختار آمورفی آن ها، هیچ پیک مشخصه ای در الگوهای XRD آن ها مشاهده نشد (شکل ۱).

تشکیل هیدروکسی آپاتایت نسبتا بالاتری بود. به عبارت دیگر، ۵۸S زیست فعالی برون تنی بیشتری نسبت به ۶۸S دارد. طیف های FTIR ۵۸S و ۶۸S قبل و پس از غوطه‌وری در محلول SBF برای ۷ و ۱۴ روز در شکل (۲) آورده شده است.



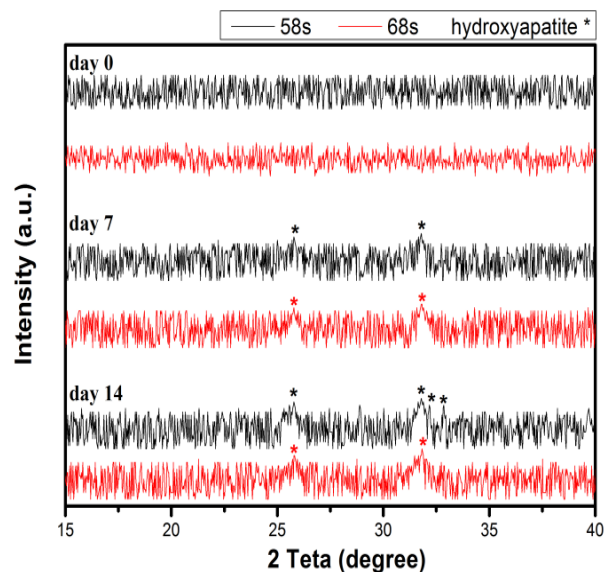
شکل (۲): طیف FTIR برای شیشه های زیست فعال ۵۸S و ۶۸S قبل و بعد از ۷ و ۱۴ روز غوطه‌وری در SBF

قبل از غوطه‌وری در SBF، باند کششی Si-O-Si در طیف FTIR هر دو شیشه های زیست فعال مشاهده شد. پیک های مشخصه در نزدیکی  $470\text{ cm}^{-1}$ ،  $790\text{ cm}^{-1}$ ،  $1000\text{ cm}^{-1}$  و  $1250\text{ cm}^{-1}$  به ترتیب با باند خمشی Si-O-Si [۲۹]، باند کشش متقارن Si-O، کشش متقارن Si-O-Si و کشش نامتقارن Si-O-Si مطابقت داشت [۳۰]. با افزایش زمان غوطه‌وری تا ۷ روز، باندهای جذب فسفات مربوط به حالت خمش نامتقارن گروه  $\text{PO}_4^{3-}$  در  $570\text{ cm}^{-1}$  و  $603\text{ cm}^{-1}$  که نوار مشخصه ی فسفات در فازهای بلوری هستند، شناسایی شدند [۷]. علاوه براین، پیدایش باندهایی در  $870\text{ cm}^{-1}$  و  $1455\text{ cm}^{-1}$  به اتصال C-O در گروه های کربنات جایگزین شده با گروه های فسفات در شبکه آپاتایت نسبت داده شد [۳۱-۳۲] و همچنین دو باند ظاهر شده در  $3500\text{ cm}^{-1}$  و  $1651\text{ cm}^{-1}$  مربوط به حالت کشش گروه OH بود [۳۳]. تشخیص پیوندهای C-O و P-O در طیف FTIR ۵۸S و ۶۸S تشکیل یک کلسیم فسفات در سطوح آنها پس از ۷ روز

بر طبق (JCPDS (شماره ۰۹-۴۳۲))، پیک های مشخصه هیدروکسی آپاتایت مربوط به صفحه (۲۰۰) در زاویه  $2\theta = 25.8^\circ$  و صفحه (۲۱۱) در زاویه  $31.8^\circ$  مشاهده گردید.

(HA; JCPDS 09-432).

همچنین علاوه بر پیک های مشخصه هیدروکسی آپاتایت، دو پیک جدید مربوط به صفحه های اتمی (۱۱۲) و (۳۰۰) به ترتیب در زوایای  $2\theta$  برابر با  $32.18^\circ$  و  $32.86^\circ$  مشاهده می شود که بیانگر بلوغ و رشد هیدروکسی آپاتایت است [۲۸].

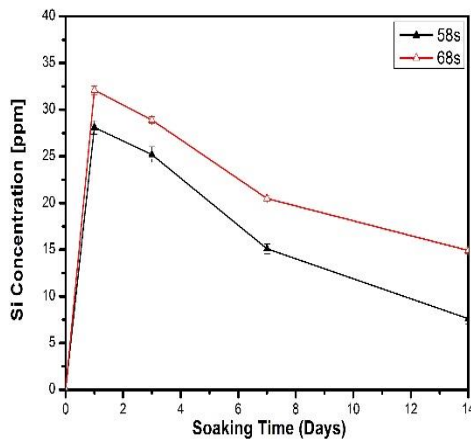


شکل (۱): الگوهای XRD برای شیشه های زیست فعال ۵۸S و ۶۸S قبل از غوطه‌وری و بعد از ۷ و ۱۴ روز غوطه‌وری در SBF

ظهور پیک ها در  $2\theta$  برابر با  $25.8^\circ$  و  $31.8^\circ$  درجه مربوط به صفحات (۲۰۰) و (۲۱۱) در هفتمین روز غوطه‌وری در محلول SBF، تشکیل هیدروکسی آپاتایت بلوری بر روی سطوح را تایید کرد. با افزایش زمان غوطه‌وری به ۱۴ روز، شدت دو پیک ذکر شده بیشتر شد. در همین حال، رشد لایه هیدروکسی آپاتایت تشکیل شده در ۵۸S با تشخیص دو پیک جدید در  $2\theta$  برابر با  $32.18^\circ$  و  $32.86^\circ$  درجه که به ترتیب به کریستالیزه شدن صفحات اتمی (۱۱۲) و (۳۰۰) شبکه آپاتایت مربوط بود، تایید شد [۲۸]. نتایج XRD نشان داد که هر دو ۵۸S و ۶۸S دارای قابلیت زیست فعالی برون تنی هستند. این در حالی است که، ۵۸S دارای توانایی

مشخص شد که کلسیم بیشتری از ۵۸S به نسبت ۶۸S آزاد می شود. از سوی دیگر، پس از آن، غلظت کلسیم به سرعت کاهش یافت که بیانگر این است که ۵۸S زیست فعالی برون تنی (in vitro) بیشتری نسبت به ۶۸S دارد.

شکل (۴) نشان می دهد که Si رفتاری مشابه به Ca دارد. همان طور که دیده می شود، رهایش Si با افزایش میزان SiO<sub>2</sub> در ترکیب شیشه زیست فعال به دلیل دانسیته اکسیژن بالاتر، کاهش یافته است. در نتیجه، در روز اول غوطه وری، محلول SBF در تماس با ۵۸S، محتوای Si بیشتری در مقایسه با ۶۸S از خود نشان داد. از سوی دیگر، با افزایش زمان غوطه وری تا ۱۴ روز، غلظت Si به علت ته نشینی Si به شکل یک زیر لایه ی غنی SiO<sub>2</sub> بر روی سطح شیشه های زیست فعال، کاهش یافت.



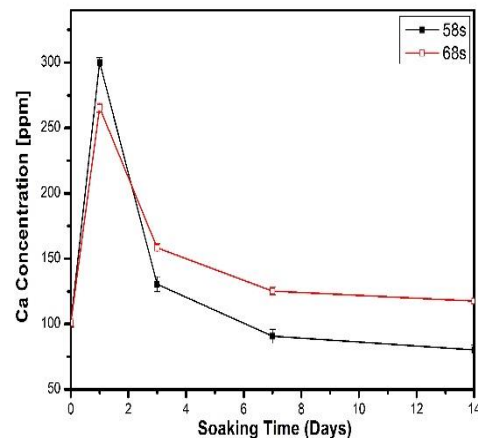
شکل (۴): تغییرات غلظت یونی در SBF حین غوطه وری برای سیلیسیم

شکل ۵ نشان می دهد غلظت فسفر P در طی غوطه وری به طور مداوم کاهش یافته است، که نشان دهنده مصرف این یون برای تشکیل هیدروکسی آپاتیت است و می تواند به عنوان یک معیار برای تخمین میزان رسوبگذاری HA استفاده شود. از شکل (۵) مشاهده میشود که ۶۸S در SBF غلظت P بیشتری نسبت به ۵۸S با توجه به میزان تشکیل HA کمتر، داشت.

غوطه وری در SBF را تایید می کند. شدت پیک های ذکر شده از روز ۷ تا ۱۴م غوطه وری افزایش یافت. در حالی که، ۵۸S پیک هایی با شدت بیشتری نسبت به شیشه زیست فعال ۶۸S نشان داد. نتایج FTIR مطابقت خوبی با نتایج XRD داشت که تشکیل هیدروکسی آپاتیت روی سطوح ۵۸S و ۶۸S پس از غوطه وری در محلول SBF به مدت ۷ روز را تایید کرد.

### ۳-۳- شیمی یونی محلول SBF

شکل های ۳، ۴، ۵ و ۶ تغییرات غلظت یونی Ca، Si و P را در محلول SBF و مقادیر pH با زمان غوطه وری برای ۱، ۳، ۷ و ۱۴ روز را نشان می دهد. همان طور که در شکل (۳) دیده می شود، غلظت Ca در محلول SBF برای ۵۸S و ۶۸S به ترتیب از ۱۰۰ و ۳۰۰ به ۲۶۵ ppm به سرعت افزایش یافت.

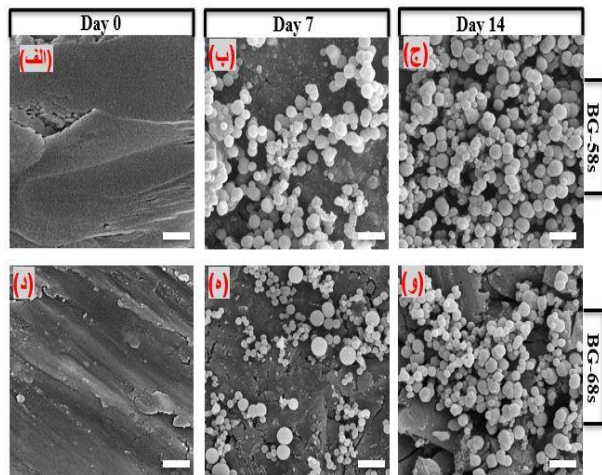


شکل (۳): تغییرات غلظت یونی در SBF حین غوطه وری برای کلسیم

این مرحله به دلیل تبادل کاتیونی از سطوح شیشه های زیست فعال به محلول SBF در مرحله اول شکل گیری HA که قبلا شرح داده شد، رخ داد. در روز سوم غوطه وری، مقادیر غلظت Ca ذکر شده از ۵۸S و ۶۸S به ترتیب به میزان ۱۳۰ و ۱۵۸ ppm به شدت کاهش یافت که احتمالا به علت شروع ته نشینی ترکیبات کلسیم فسفات است. در مقایسه با روند تغییرات غلظت کلسیم ۵۸S و ۶۸S،

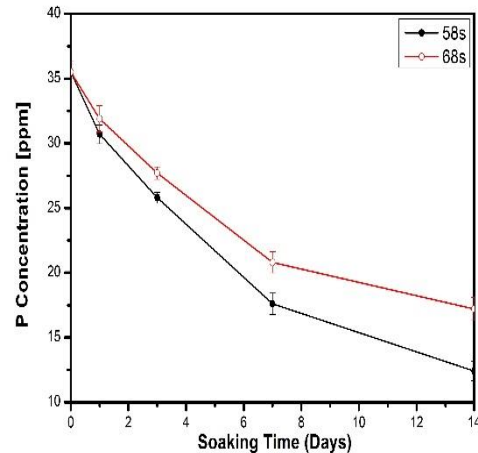
### ۳-۴- مورفولوژی سطح

فعالیت بیولوژیک برون تنی شیشه های زیست فعال سنتز شده در محلول SBF برای دوره های زمانی مختلف تا ۱۴ روز مورد بررسی قرار گرفت. شکل (۷)، مورفولوژی SEM از سطوح ۵۸S و ۶۸S قبل و بعد از غوطه وری در محلول SBF را برای ۷ و ۱۴ روز نشان می دهد.



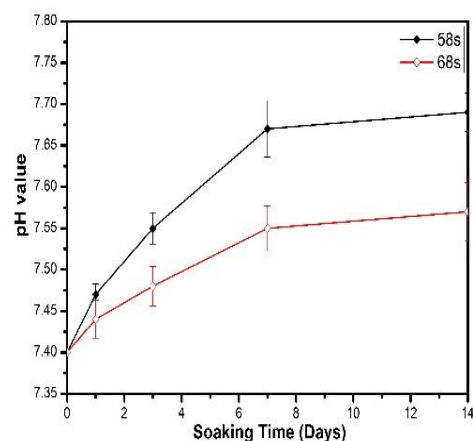
شکل (۷): مورفولوژی SEM برای سطوح شیشه های زیست فعال ۵۸S و ۶۸S قبل و بعد از غوطه وری در SBF برای ۷ و ۱۴ روز (خط مقیاس در همه ی عکس ها ۲ میکرومتر می باشد)

همان طور که قبل از غوطه وری دیده شد (شکل (۷-الف) و (۷-د))، هیچ هیدروکسی آپاتیت کروی شکلی بر روی سطوح آنها تشکیل نشده است. پس از یک روز غوطه وری در محلول SBF، ذرات کوچک کروی هیدروکسی آپاتیت بر روی سطح شیشه های زیست فعال تشکیل شد (شکل (۷-ب) و (۷-ه))، در حالی که ۵۸S توانایی تشکیل هیدروکسی آپاتیت تقریباً بالاتری نسبت به ۶۸S نشان داد که تناسب خوبی با شدت پیک های مشخص هیدروکسی آپاتیت در الگوهای XRD آنها داشت. با افزایش زمان غوطه وری به ۱۴ روز، مقدار هیدروکسی آپاتیت ایجاد شده برای هر دو ۵۸S و ۶۸S افزایش یافت. در همین حال، سطح ۵۸S به طور کامل توسط دانه های کروی کوچک از هیدروکسی آپاتیت پوشانده شده بود، در حالی که در سطح ۶۸S



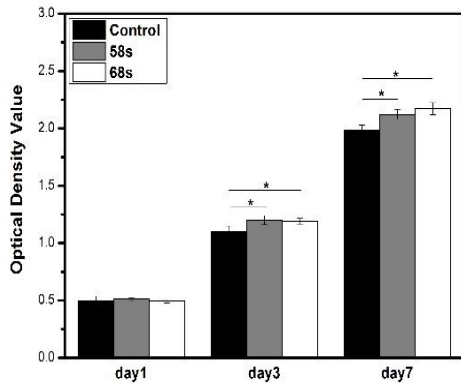
شکل (۵): تغییرات غلظت یونی در SBF حین غوطه وری برای فسفر

تغییرات PH در SBF به عنوان تابعی از زمان غوطه وری در شکل (۶) نشان داده شده است. دیده می شود که مقادیر PH محلول SBF به سرعت به علت تبادل کاتیونی بین یون های  $H^+$  و  $Ca^{2+}$  به ترتیب از شیشه زیست فعال و محلول SBF افزایش یافت. شکل ۷ نشان می دهد که ۵۸S مقادیر PH بالاتری در مقایسه با ۶۸S به علت تبادل یونی بیشتر با توجه به انسجام شبکه پایین تر، دارد. در مجموع، نتایج ICP-AES متناسب منطقی خوبی با نتایج تراکم اکسیژن داشت که تأیید کرد ۵۸S با تراکم اکسیژن کمتر، دارای حلالیت بالاتری نسبت به ۶۸S بود.



شکل (۶): تغییرات PH در SBF حین غوطه وری





شکل (۹): تکثیر سلولی خط سلولی استخوان مانند، MC3T3، بر روی شیشه های زیست فعال ۵۸S و ۶۸S برای ۱ و ۳ و ۷ روز

### ۳-۵-۲- تکثیر سلولی

در شکل (۹)، تکثیر سلول های استئوبلاستی MC3T3-E1 که به مدت ۱، ۳ و ۷ روز بر روی ۵۸S و ۶۸S کشت شده، نشان داده شده است. در روز اول کشت، تفاوت قابل ملاحظه آماری در تشکیل فورمازون بین نمونه ها، ۵۸S و ۶۸S مشاهده نشد ( $p > 0.05$ ). در حالی که با افزایش زمان کشت تا ۳ روز، هر دو ۵۸S و ۶۸S از لحاظ آماری به طور قابل ملاحظه ای مقادیر دانسیته نوری (OD) بیشتری نسبت به نمونه کنترل داشتند ( $p < 0.05$ ). در حالی که، اختلاف آماری قابل توجهی بین شیشه زیست فعال ۵۸S و ۶۸S وجود نداشت ( $p < 0.05$ ). همان طور که در شکل ۱۰ دیده می شود، پس از ۷ روز از کشت، سلول های MC3T3-E1 در سطح ۵۸S و ۶۸S به حداکثر تکثیر خود در روز ۷ بدون تفاوت آماری معنی داری بین شان رسیدند ( $p < 0.05$ ). در همین حال، توکلی زاده و همکاران قبلا افزایش قابل توجهی در جمعیت و فعالیت سلول های بنیادی از نوع USSC را در حضور ۵۸S گزارش کرده بودند [۳۴].

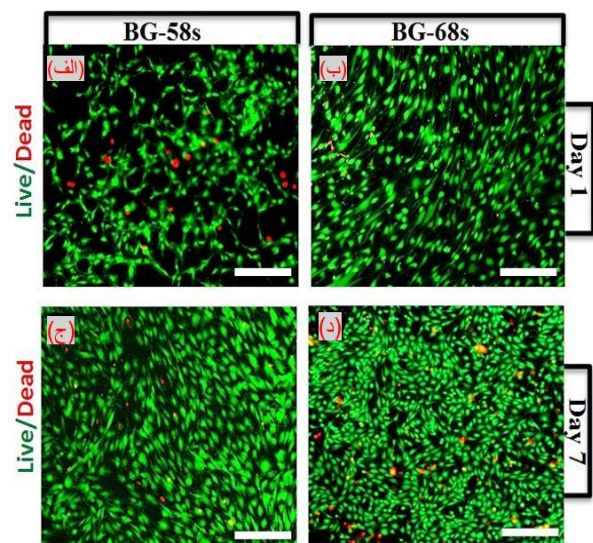
نتایج MTT نشان داد که ۵۸S و ۶۸S نه تنها زیست سازگار بودند (هیچ سمیتی نداشتند) بلکه هر دو آنها افزایش قابل توجهی در تکثیر سلول های MC3T3-E1 نشان دادند. به عبارت دیگر، حضور CaO بیشتر در ترکیب  $\text{SiO}_2\text{-CaO-P}_2\text{O}_5$  (سهم ۳۶ درصد

مقدار نسبتا کمتری هیدروکسی آپاتایت کروی ایجاد شده بود. فعالیت زیستی نسبتا پایین تر ۶۸S به دلیل میزان جوانه زنی کمتر و به تبع آن اشباع کمتر گروه هایی است که منجر به تشکیل HA می باشد، است. این نتیجه سرعت آزادسازی یون سیلیسیم و کلسیم (نتیجه ICP-AES) را که در بخش قبلی مورد بحث قرار گرفت، تایید می کند (شکل ۳ و ۴).

### ۳-۵-۳- ارزیابی زیستی برون تنی

#### ۳-۵-۳-۱- آزمایش زنده / زنده

تصاویر فلورسنت زنده / مرده سلول های MC3T3-E1 پس از کشت برای ۱ و ۷ روز بر روی سطح ۵۸S و ۶۸S در شکل (۸) دیده می شود. پس از یک روز کشت، ۵۸S و ۶۸S تقریبا الگوی رنگ آمیزی یکسانی با سلول های زنده فلورسنت سبز رنگ و تعداد نسبتا کمی از سلول های مرده فلورسنت قرمز رنگ نشان داد. همانگونه که مشاهده شد، با افزایش زمان کشت تا ۷ روز، میانگین تعداد سلول های زنده در مقایسه با روز اول کشت برای ۵۸S و ۶۸S افزایش یافت. در همین حال، آزمایش زنده / مرده با نتایج MTT تطابق خوبی داشت (شکل ۹). آزمایش سلولی زنده / مرده برون تنی مشخص کرد که ۵۸S و ۶۸S دارای زیست سازگاری تقریبا مشابه و قابل قبولی هستند.

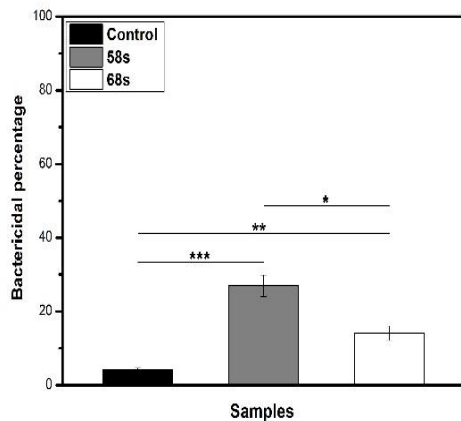


شکل (۸): سلول های MC-3T3 دو بعدی در حضور شیشه های زیست فعال ۵۸S و ۶۸S (خط مقیاس در تمام عکس ها ۱۰۰ میکرون می باشد).

با توجه به نتایج MTT و فعالیت آلکالین فسفاتاز، ۵۸S تکثیر و فعالیت استئو بلاستی MC3T3-E1 های نسبتا بیشتری با توجه به ۶۸S داشت.

#### ۳-۵-۴- مطالعات ضد باکتریایی

درصد ضد باکتریایی شیشه زیست فعال ۵۸S و ۶۸S سنتز شده در شکل (۱۱) نشان داده شده است. همان طور که مشاهده شد، هر دو ۵۸S و ۶۸S اثرات ضد باکتریایی قابل توجهی را نسبت به باکتری MRSA در مقایسه با نمونه کنترل نشان دادند (در مقدار ثابت  $10^6 \text{ gmL}^{-1}$ ). نمونه ۶۸S افزایش قابل توجهی در کارایی باکتریسته در برابر باکتری های MRSA ( $p < 0.01$ ) نشان داد در حالی که، ۵۸S در مقایسه با نمونه کنترل تفاوت قابل ملاحظه معناداری داشت ( $p < 0.01$ ).



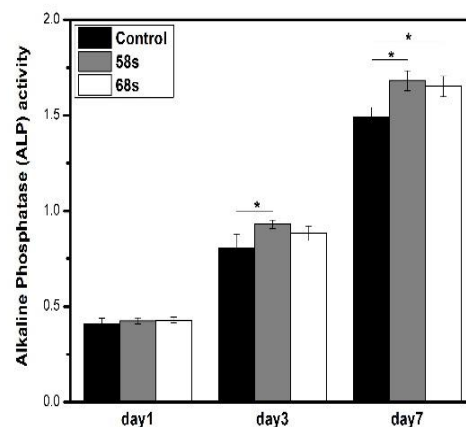
شکل (۱۱): درصد ضد باکتریایی  $10 \text{ mg/ml}$  از  $\text{SiO}_2$  (به عنوان کنترل)، شیشه های زیست فعال ۵۸S و ۶۸S

مکانیزم دقیق اثر ضد باکتری شیشه زیست فعال هنوز کشف نشده است [۳۵]. اما مطالعات قبلی گزارش دادند که حضور کلسیم [۳۵]، فسفر [۳۵] و نیز مقادیر PH [۲۵] بالاتر ممکن است دلیل داشتن خواص ضد باکتری شیشه های زیست فعال باشد. مطالعات ضد باکتریایی نشان داد که شیشه زیست فعال ۵۸S دارای اثر ضد باکتری بالاتری نسبت به باکتری MRSA نسبت به ۶۸S

مولی در ۵۸S در مقابل ۲۶ درصد مولی در ۶۸S هیچ تاثیر مهم مثبتی بر تکثیر سلول های MC3T3-E1 نداشت.

#### ۳-۵-۳- فعالیت ALP

فعالیت آلکالین فسفاتاز (ALP) سلول های MC3T3-E1 کشت شده بر روی شیشه های زیست فعال ۵۸S و ۶۸S پس از ۱، ۳ و ۷ روز، در شکل (۱۰) ارائه شده است. همان طور که مشاهده شد فعالیت ALP سلول های MC3T3-E1 بر روی هر دو شیشه زیست فعال ۵۸S و ۶۸S با افزایش زمان کشت از ۱ تا ۷ روز، افزایش یافت. در روز اول کشت، سطح ALP از لحاظ آماری تفاوت قابل ملاحظه ای برای ۵۸S و ۶۸S نداشت ( $p < 0.05$ ). پس از ۳ روز از کشت، فعالیت ALP سلول های MC3T3-E1 در حضور ۵۸S و ۶۸S تقریبا دو برابر نسبت به روز ۱ افزایش یافت. در حالی که، در روز سوم، حداکثر فعالیت ALP به ۵۸S با اختلاف آماری چشمگیری ( $p < 0.05$ ) نسبت به نمونه کنترل نسبت داده شد، در حالیکه تفاوت قابل توجهی بین شیشه زیست فعال ۶۸S و نمونه کنترل وجود نداشت ( $p < 0.05$ ). در نهایت، ۷ روز پس از کشت، هر دو ۵۸S و ۶۸S افزایش قابل توجهی در تمایز MC3T3-E1 ها نسبت به نمونه ی کنترل ( $p < 0.05$ ) داشتند و بدون هیچ تفاوتی بین خودشان نشان دادند ( $p < 0.05$ ).



شکل (۱۰): فعالیت فسفاتاز قلیایی خط سلولی استخوان مانند، MC3T3، کاشت شده بر روی شیشه های زیست فعال ۵۸S و ۶۸S برای ۱ و ۳ و ۷ روز

CaO در سیستم سه گانه  $\text{SiO}_2\text{-CaO-P}_2\text{O}_5$  برای دستیابی زیست فعالی برون تنی بالاتر، تکثیر و همچنین تمایز سلولی، موثرتر بود. در نهایت، شیشه زیست فعال ۵۸S (۳۶%  $\text{SiO}_2$ -۶۰% mol%  $\text{CaO-4\%P}_2\text{O}_5$ ) با زیست فعالی برون تنی و پتانسیل ضد باکتریایی بالاتر به عنوان یک ماده زیست سازگار برای اصلاح و عملکرد کاربردی تر برای فراهم کردن رهایش یون های درمانی و عوامل دارویی / رشد مانند پروتئین مورفوژنیک استخوان (BMP)، فاکتور رشد اندوتلیال عروقی (VEGF) و دگزامتازون و غیره، که برای تحریک یا احیا و بازسازی بافت استخوان است، پیشنهاد می گردد.

#### ۵- مراجع

- [1] Hench, "The story of Bioglass®", Journal of Materials Science: Materials in Medicine, Vol. 17, No. 11, pp. 967-978, 2006.
- [2] Hench, "Bioceramics: from concept to clinic", Journal of the american ceramic society, Vol. 74, No. 7, pp. 1487-1510, 1991.
- [3] P. Saravanapavan, "Bioactivity of gel-glass powders in the CaO- SiO<sub>2</sub> system: A comparison with ternary (CaO□P<sub>2</sub>P<sub>5</sub>- SiO<sub>2</sub>) and quaternary glasses (SiO<sub>2</sub>- CaO- P<sub>2</sub>O<sub>5</sub>- Na<sub>2</sub>O)", Journal of Biomedical Materials Research, Vol. 66, No. 1, pp. 110-119, 2003.
- [4] م. خورسند قاینی، "بررسی خصوصیات حرارتی کامپوزیت پلی لاکتیک اسید با ذرات شیشه زیست فعال 45S5 و هیدروکسی آپاتیت (HA) به منظور استفاده در پیچ های تداخلی قابل جذب"، فصلنامه علمی-پژوهشی فرآیندهای نوین در مهندسی مواد، سال یازدهم، شماره ۴، صفحه ۵۶-۵۵، ۱۳۹۶.
- [5] F. Sharifianjazi, N. Parvin & Tahriri, "Formation of apatite nano-needles on novel gel derived SiO<sub>2</sub>-P<sub>2</sub>O<sub>5</sub>-CaO-SrO-Ag<sub>2</sub>O bioactive glasses", Ceramics International, Vol. 43, No. 17, pp. 15214-15220, 2017.
- [6] X. Lu et al., "Mixed network former effect on structure, physical properties, and bioactivity of

( $p < 0.05$ \*) به علت غلظت بالاتری از یون های Ca و P در محلول های SBF (داده های ICP-AES، شکل ۳ و ۵) و همچنین مقادیر pH بالاتر (شکل ۶) بود.

#### ۴- نتیجه گیری

تاثیرات مقادیر CaO در دو سری شیشه ی زیست فعال سنتز شده به روش سل ژل سنتز شده در سیستم سه تایی  $\text{SiO}_2\text{-CaO-P}_2\text{O}_5$  با مقادیر ثابت  $\text{P}_2\text{O}_5$  بر زیست فعالی برون تنی، سمیت سلول های MC3T3، و تکثیر و همچنین اثر ضد باکتریایی مورد بررسی قرار گرفت. نتایج نشان داد که میزان انحلال شیشه های زیست فعال با افزایش دانسیته اکسیژن آن ها کاهش می یابد. به عبارت دیگر شیشه زیست فعال ۶۸S دارای انحلال بیشتری از شیشه ۵۸S است. علاوه بر این، تجزیه و تحلیل آزمون های XRD و FTIR نشان داد که زیست فعالی برون تنی (in vitro) به دلیل وجود مقادیر CaO کمتر، در ترکیب شیشه زیست فعال ۶۸S کاهش بیشتری نسبت به شیشه زیست فعال ۵۸S دارد. بعلاوه، داده های ICP-OES نشان داد که مقدار بیشتر CaO و  $\text{SiO}_2$  در شیشه زیست فعال  $\text{SiO}_2\text{-CaO-P}_2\text{O}_5$  به ترتیب سبب افزایش و کاهش حلالیت شیشه های ۵۸S و ۶۸S شده که به دانسیته اکسیژن آنها مربوط می شود. بنابراین، فعالیت زیستی پایین ۶۸S در مقایسه با ۵۸S، با درجه کمتر فوق اشباع آن قابل توجیه است که می تواند باعث کاهش نرخ رشد هسته و رشد هیدروکسی آپاتیت در سطوح آن شود. هیچ کدام از ۵۸S و ۶۸S تاثیر سمیتی بر سلول های MC3T3-E1 نداشتند. همچنین آزمایش زنده/مرده به طور کیفی نشان داد که در روز اول کشت، ۵۸S و ۶۸S تقریباً الگوی رنگ آمیزی یکسانی داشتند که زیست سازگاری قابل قبول آن ها را تایید کرد، و همچنین ۷ روز پس از کشت، سلول ها در ۵۸S تکثیر می شوند و تقریباً به یک رشد اشباع شده با میزان سلول های مرده نسبتاً کمتری در مقایسه با ۶۸S می رسد. علاوه بر این، هر دو ۵۸S و ۶۸S پتانسیل ضد باکتری در برابر باکتری های MRSA نشان دادند، در حالی که ۵۸S تفاوت آماری قابل ملاحظه ای نسبت به شیشه زیست فعال ۶۸S داشت ( $p < 0.05$ \*) در مجموع، مقدار

- [15] J. Liu, "Strontium-substituted bioactive glasses in vitro osteogenic and antibacterial effects", *Dental Materials*, Vol. 32, No. 3, pp. 412-422, 2016.
- [16] J. Moran, "Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in community-acquired skin infections", *Emerging Infectious Diseases*, Vol. 11, No. 6, pp. 928, 2005.
- [17] F. Sharifianjazi, N. Parvin & Tahriri, "Synthesis and characteristics of sol-gel bioactive SiO<sub>2</sub>-P<sub>2</sub>O<sub>5</sub>-CaO-Ag<sub>2</sub>O glasses", *Journal of Non-Crystalline Solids*, Vol. 476, pp. 108-113, 2017.
- [18] M. Taghian Dehaghani, M. Ahmadian & Fathi, "Synthesis, characterization, and bioactivity evaluation of amorphous and crystallized 58S bioglass nanopowders", *International Journal of Applied Ceramic Technology*, Vol. 12, No. 4, pp. 867-874, 2015.
- [19] م. نصراصفهانی، "مقایسه خواص فیزیکی- شیمیایی سه نوع پوشش نانوساختار شیشه زیست فعال و زیست فعالی آنها"، فصلنامه علمی- پژوهشی فرآیندهای نوین در مهندسی مواد، سال سوم، شماره ۳، صفحه ۳۵-۲۹، ۱۳۸۸.
- [20] T. Kokubo & Takadama, "How useful is SBF in predicting in vivo bone bioactivity?", *Biomaterials*, Vol. 27, No. 15, pp. 2907-2915, 2006.
- [21] L. Francis, "Multi-functional P (3HB) microsphere/45S5 Bioglass®-based composite scaffolds for bone tissue engineering", *Acta biomaterialia*, Vol. 6, No. 7, pp. 2773-2786, 2010.
- [22] Brauer & R. Brückner, "Sodium-free mixed alkali bioactive glasses", *Biomedical Glasses*, Vol. 2, No.1, 2016.
- [23] H. M. Elgendy, "Osteoblast-like cell (MC3T3-E1) proliferation on bioerodible polymers: an approach towards the development of a bone-bioerodible polymer composite material", *Biomaterials*, Vol. 14, No. 4, pp. 263-269, 1993.
- [24] Yellowley, "Functional gap junctions between osteocytic and osteoblastic cells", *Journal of Bone*
- 45S5 bioactive glasses: an integrated experimental and molecular dynamics simulation study", *Journal of Physical Chemistry B*, Vol. 122, No. 9, pp. 2564-2577, 2018.
- [7] M. Mozafari, F. Moztarzadeh & Tahriri, "Investigation of the physico-chemical reactivity of a mesoporous bioactive SiO<sub>2</sub>-CaO-P<sub>2</sub>O<sub>5</sub> glass in simulated body fluid", *Journal of Non-Crystalline Solids*, Vol. 356, No. 28-30, pp. 1470-1478, 2010.
- [8] R. Gupta & Kumar, "Bioactive materials for biomedical applications using sol-gel technology", *Biomedical Materials*, Vol. 3, No. 3, p. 034005, 2008.
- [9] N. Li, Q. Jie, S. Zhu & Wang, "Preparation and characterization of macroporous sol-gel bioglass", *Ceramics International*, Vol. 31, No. 5, pp. 61-646, 2005.
- [10] P. Sepulveda, "In vitro dissolution of melt- derived 45S5 and sol- gel derived 58S bioactive glasses", *Journal of Biomedical Materials Research*, Vol. 61, No. 2, pp. 301-311, 2002.
- [11] A. Perardi, "Carbonate formation on sol-gel bioactive glass 58S and on Bioglass® 45S5", *In Studies in Surface Science and Catalysis*, Vol. 155: Elsevier, pp. 461-469, 2005.
- [12] K. Ohura et al., "Bone- bonding ability of P<sub>2</sub>O<sub>5</sub>-free CaO SiO<sub>2</sub> glasses", *Journal of Biomedical Materials Research*, Vol. 25, No. 3, pp. 357-365, 1991.
- [13] J. Ye, "Copper-containing mesoporous bioactive glass coatings on orbital implants for improving drug delivery capacity and antibacterial activity", *Biotechnology Letters*, Vol. 36, No. 5, pp. 961-968, 2014.
- [۱۴] م. نصراصفهانی، "تاثیر تابش نور فرابنفش بر زیست فعالی پوشش های هیبریدی نانوساختار پلی سیلوکسان-تیتانیوم دی اکسید- شیشه زیستی به روش سل- ژل"، فصلنامه علمی- پژوهشی فرآیندهای نوین در مهندسی مواد، سال نهم، شماره ۴، صفحه ۱۳۷-۱۲۹، ۱۳۹۴.

- [34] A. Tavakolizadeh, "Investigation of osteoinductive effects of different compositions of bioactive glass nanoparticles for bone tissue engineering", *ASAIO Journal*, Vol. 63, No. 4, pp. 512-517, 2017.
- [35] D. Khvostenko, "Bioactive glass fillers reduce bacterial penetration into marginal gaps for composite restorations", *Dental Materials*, Vol. 32, No. 1, pp. 73-81, 2016.
- and *Mineral Research*, Vol. 15, No. 2, pp. 209-217, 2000.
- [25] S. Hu, "Study on antibacterial effect of 45S5 Bioglass®", *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, Vol. 20, No. 1, pp. 281-286, 2009.
- [26] S. Hu, "Antibacterial activity of silicate bioceramics", *Journal of Wuhan University of Technology-Mater. Sci. Ed.*, Vol. 26, No. 2, pp. 226-230, 2011.
- [27] M. Tylkowski & Brauer, "Mixed alkali effects in Bioglass® 45S5", *Journal of Non-Crystalline Solids*, Vol. 376, pp. 175-181, 2013.
- [28] S. Shahrabi, S. Hesaraki, S. Moemeni & Khorami, "Structural discrepancies and in vitro nanoapatite formation ability of sol-gel derived glasses doped with different bone stimulator ions", *Ceramics International*, Vol. 37, No. 7, pp. 2737-2746, 2011.
- [29] X. Wu et al., "Zn and Sr incorporated 64S bioglasses: material characterization, in-vitro bioactivity and mesenchymal stem cell responses", *Materials Science and Engineering: C*, Vol. 52, pp. 242-250, 2015.
- [30] X. Zhang & Y. Wu, "Structural characterization of sol-gel composites using TEOS/MEMO as precursors", *Surface and Coatings Technology*, Vol. 201, No. 12, pp. 6051-6058, 2007.
- [31] A. Rainer & S. M. Giannitelli, "Fabrication of bioactive glass-ceramic foams mimicking human bone portions for regenerative medicine", *Acta Biomaterialia*, Vol. 4, No. 2, pp. 362-369, 2008.
- [32] X. Zhao et al., "In vitro assessment of cellular responses to rod-shaped hydroxyapatite nanoparticles of varying lengths and surface areas", *Journal Nanotoxicology*, Vol. 5, No. 2, pp. 182-194, 2011.
- [33] M. Ashok, "Crystallization of hydroxyapatite at physiological temperature", *Materials Letters*, Vol. 57, No. 13-14, pp. 2066-2070, 2003.

## Comparative study on *in vitro*, physico-chemical and antibacterial properties of 58S and 68S bioactive glasses synthesized by sol-gel method

Amirhossein Moghanian<sup>1,\*</sup>, Mohammadamin Zohourfazeli<sup>2</sup>

1- Assistant Professor, Department of Material Science and Engineering, Faculty of Technical and Engineering, Imam Khomeini International University, Qazvin, Iran

2- Msc Student, Department of Material Science and Engineering, Faculty of Technical and Engineering, Imam Khomeini International University, Qazvin, Iran

\*Corresponding Author: moghanian@eng.ikiu.ac.ir

---

### Abstract

The major aim of this study was to evaluate the effect of CaO content on *in vitro* hydroxyapatite formation, MC3T3 cells cytotoxicity and proliferation as well as antibacterial efficiency of sol-gel derived SiO<sub>2</sub>-CaO-P<sub>2</sub>O<sub>5</sub> ternary system. For this purpose, first two grades of bioactive glass (BG); BG-58S (mol%: 60%SiO<sub>2</sub>-36%CaO-4%P<sub>2</sub>O<sub>5</sub>) and BG-68S (mol%: 70%SiO<sub>2</sub>-26%CaO-4%P<sub>2</sub>O<sub>5</sub>) with the fixed P<sub>2</sub>O<sub>5</sub> content were synthesized by sol-gel method. Second, the effect of CaO content in their composition on *in vitro* bioactivity was investigated by soaking the BG-58S and BG-68S powders in simulated body fluid (SBF) for time periods up to 14 days. The evolution of the SBF composition was monitored by inductively coupled plasma atomic emission spectrometry (ICP-AES) analyses. Additionally, Fourier transform infrared (FTIR), X-ray diffraction (XRD) and scanning electron microscopy (SEM) were performed to characterize formed hydroxyapatite on BG's surface. On the other hand, Live/dead staining, 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) and alkaline phosphatase (ALP) activity assays were conducted respectively, as qualitatively and quantitatively assess for cell viability, proliferation and differentiations of MC3T3 cells in presence of 58S and 68S BGs. Taken together, BG-58S with enhanced MC3T3 cells proliferation and ALP activity, acceptable bioactivity and significant high antibacterial effect against MRSA bacteria is suggested as a suitable candidate in order to further functionalizing for delivery of therapeutic ions and growth factors in bone tissue engineering.

### Key words:

Sol-Gel Process, Hydroxyapatite, Bioactive glass, Bacterial Activity, Mc3t3 Proliferation.

---

Journal homepage: [ma.iaumajlesi.ac.ir](http://ma.iaumajlesi.ac.ir)

### Please cite this article using:

Amirhossein Moghanian, Mohammadamin Zohourfazeli, Comparative study on *in vitro*, physico-chemical and antibacterial properties of 58S and 68S bioactive glasses synthesized by sol-gel method, New Process in Material Engineering, 2019, 13(4), 17-30.