

## فرآیندهای نوین در مهندسی مواد

ma.iaumajlesi.ac.ir

بررسی تأثیر میزان یون استرانسیوم بر خواص حرارتی، زیست فعالی، ضد باکتریایی و رفتار سلول‌های استئوبلاست MC3T3-E1 شیشه زیست فعال پایه سیلیکاتی

نوشین نانکلی<sup>۱</sup>، امیرحسین مغنیان<sup>۲\*</sup>، مرتضی ثقفی یزدی<sup>۳</sup>

۱- دانشجوی کارشناسی ارشد، مهندسی مواد، گروه مهندسی مواد و متالورژی، دانشگاه بین‌المللی امام خمینی (ره)، قزوین، ایران.

۲- استادیار، گروه مهندسی مواد و متالورژی، دانشگاه بین‌المللی امام خمینی (ره)، قزوین، ایران.

۳- استادیار، گروه مهندسی مواد و متالورژی، دانشگاه بین‌المللی امام خمینی (ره)، قزوین، ایران.

\* moghanian@eng.ikiu.ac.ir

اطلاعات مقاله	چکیده
دریافت: ۱۳۹۹/۱۱/۳۰	شیشه‌های زیست فعال قابلیت اتصال با بافت‌های بدن را نیز دارند، از این نظر می‌توان آن‌ها را موادی مناسب برای کاربردهایی نظیر مهندسی بافت استخوان دانست. در این پژوهش ابتدا به سنتز و بررسی تغییرات ساختاری، زیست سازگاری، زیست فعالی، رفتار زیستی و خاصیت ضد باکتریایی شیشه‌های زیست فعال پایه سیلیکاتی جانشین شده با استرانسیوم و بدون استرانسیوم پرداخته شد. برای بررسی زیست فعالی، پودر شیشه‌ها در زمان‌های ۱، ۳، ۷ و ۱۴ روز در محلول شیشه‌سازی شده با محیط بدن قرار داده شدند و قبل و بعد از بازه‌های زمانی مذکور، تغییرات و روند تشکیل لایه هیدروکسی‌آپاتیت روی سطح آن‌ها، با استفاده از پراش پرتو ایکس، مطالعات طیف‌سنجی فرسوخ، بررسی نرخ رهایش عناصر مختلف شیشه، تغییرات pH و مطالعات ریزساختار با استفاده از میکروسکوپ الکترونی روبشی، بررسی شد. نتایج آزمون‌های پراش پرتو ایکس و مطالعات طیف‌سنجی فرسوخ، تغییرات ایجاد شده روی لایه هیدروکسی‌آپاتیت بلورین را نشان داد. همچنین نتایج آزمون زنده/مرده، بررسی ریزساختار هسته و ریز رشته‌های اکسین سلول‌های استئوبلاست MC3T3-E1 نشان داد که ۵ درصد استرانسیوم در شیشه زیست فعال پایه سیلیکاتی منجر به رشد، تکثیر و فعالیت سلول‌های استئوبلاست MC3T3-E1 شد. نتایج آزمون سمیت سلولی و ارزیابی فعالیت فسفات قلیایی نشان داد که جایگزینی استرانسیوم بجای کلسیم در ترکیب شیشه زیست فعال پایه سیلیکاتی نه تنها سمیت سلولی ایجاد نکرد بلکه باعث تکثیر قابل ملاحظه و فعالیت سلول‌های استئوبلاست MC3T3-E1 شد. بهبود خاصیت ضد باکتریایی شیشه زیست فعال حاوی استرانسیوم بر علیه باکتری مرسا در قیاس با شیشه زیست فعال بدون استرانسیوم دیده شد.
پذیرش: ۱۴۰۰/۰۴/۰۶	
<b>کلید واژگان:</b>	
شیشه زیست فعال پایه سیلیکاتی	
هیدروکسی‌آپاتیت	
استرانسیوم	
ضد باکتریایی	
سلول‌های استئوبلاست MC3T3-E1	

### Investigation of the Effect of Strontium Ion Content on Thermal, Bioactivity, Antibacterial Properties and Behavior of MC3T3-E1 Osteoblast Cells in Silicate-Based Bioactive Glass

Noushin Nankali<sup>1</sup>, Amir Hossein Moghanian<sup>2\*</sup>, Morteza Saghafi Yazdi<sup>3</sup>

1-Master student, Materials Engineering, Department of Materials Engineering and Metallurgy, Imam Khomeini International University, Qazvin, Iran.

2- Assistant Professor, Department of Materials and Metallurgy Engineering, Imam Khomeini International University, Qazvin, Iran.

3- Assistant Professor, Department of Materials and Metallurgy Engineering, Imam Khomeini International University, Qazvin, Iran.

\* moghanian@eng.ikiu.ac.ir

#### Article Information

Original Research Paper

Doi:

10.30495/apme.2021.1923822.2032

#### Keywords:

Bioactive Silicate Glass

Hydroxyapatite

Strontium

Antibacterial

MC3T3-E1 Osteoblast Cells

#### Abstract

Bioactive glass (BG), is able to bind to body tissues, in this regard, it can be considered suitable material for applications such as bone tissue engineering. In this study, we first synthesized and studied the structural changes, biocompatibility, in vitro bioactivity, biological behavior and antibacterial properties of silicate-based BG containing with strontium. To evaluate the bioactivity, the BG powder was placed in a simulated body fluid (SBF) solution for 1, 3, 7 and 14 days and then before and after the mentioned time periods, the changes and the process of forming a hydroxyapatite (HA) layer on their surface was studied by using X-ray diffraction (XRD), Fourier transform infrared spectroscopy (FTIR), release rates of various ions elements, pH changes and scanning electron microscopy (SEM). The results of X-ray diffraction tests and infrared spectroscopy studies confirmed the formation of crystalline HA layer on the BG surface. Moreover, the results of live/dead assay, nucleus microstructure and actin microfilaments of MC3T3-E1 osteoblast cells showed that 5% of strontium in silicate-based bioactive glass led to the growth, proliferation and activity of MC3T3-E1 osteoblast cells. The results of cytotoxicity test and evaluation of alkaline phosphate activity showed that substitution of strontium instead of calcium in silicate-based bioactive glass composition not only did not cause cytotoxicity but also caused significant proliferation and activity of MC3T3-E1 osteoblast cells. Meanwhile, improvements in the antibacterial properties of strontium-containing bioactive glass against MRSA bacteria were observed in comparison with strontium-free bioactive glass.

برای ارجاع به این مقاله از عبارت ذیل استفاده نمایید:

#### Please cite this article using:

Noushin Nankali, Amir Hossein Moghanian, Morteza Saghafi Yazdi, Investigation of the Effect of Strontium Ion Content on Thermal, Bioactivity, Antibacterial Properties and Behavior of MC3T3-E1 Osteoblast Cells in Silicate-Based Bioactive Glass, New Process in Material Engineering, 2021, 15(3), 81-95.

## ۱- مقدمه

یکی از مهم‌ترین چالش‌ها در زمینه مهندسی بافت استخوان<sup>۱</sup>، ترمیم<sup>۲</sup> عیوب<sup>۳</sup> استخوانی ناشی از افزایش سن، تصادفات، عفونت‌ها، تومورها و حتی عیوب مادرزادی است [۱]. امروزه بیماری‌های استخوانی نظیر پوکی استخوان<sup>۴</sup> بخش عظیمی از جامعه انسانی را دچار مشکلات زیادی از جهت افت کیفیت زندگی کرده است. در ایالات متحده آمریکا سالیانه بالغ بر ۶.۲ میلیون شکستگی استخوان گزارش شده است و هزینه‌های مستقیم شکستگی‌های ناشی از پوکی استخوان تنها در ایالات متحده آمریکا رقمی بالغ بر ۲۰ میلیارد دلار در سال تخمین زده می‌شود [۲]. زیست فعالی<sup>۵</sup> به معنای توانایی یک ماده در القای یک پاسخ زیستی<sup>۶</sup> سودمند در بدن در طی عمل کاشتن<sup>۷</sup> است. زیست فعالی برای اولین بار توسط هنج و همکارانش در سال ۱۹۷۱ در دانشگاه فلوریدا معرفی گردید [۳]. یکی از مواد زیستی سنتز شده که در مهندسی بافت استخوان کاربردهای بالینی<sup>۸</sup> بسیار گسترده‌ای دارد، شیشه‌های زیست فعال<sup>۹</sup> است [۴]، که توانایی اتصال به بافت‌های نرم و بافت‌های سخت را دارا می‌باشند. شیشه‌های زیست فعال در محلول‌های زیستی<sup>۱۰</sup>، سطح مشترک چسبنده‌ای با بافت ایجاد می‌کنند که در برابر نیروهای مکانیکی مقاومت خوبی از خود نشان می‌دهند [۵]. زیست فعالی به معنی توانایی تشکیل لایه هیدروکسی آپاتایت<sup>۱۱</sup> روی فصل مشترک ماده و محلول شبیه‌سازی شده با محیط بدن<sup>۱۲</sup> به واسطه تحریک رشد و تکثیر سلول‌های استخوانی<sup>۱۳</sup> بدون استفاده از داروها یا عوامل زیستی گنج‌انیده شده<sup>۱۴</sup> در ماده است [۶]. تشکیل لایه ژل غنی از سیلیکا و در نهایت تشکیل شدن لایه هیدروکسی آپاتایت روی سطح آن، به عنوان دو مرحله ضروری برای پیوند شیشه با بافت زنده بدن چه در شرایط برون تنی<sup>۱۵</sup> و چه در شرایط درون تنی<sup>۱۶</sup> شناخته شده است. این شیشه‌ها تفاوت چشمگیری را نسبت به سایر کاشتنی‌ها به ارمغان آورده است، چرا که از به وجود آمدن لایه فیبری احاطه‌کننده عضو که باعث ایجاد جدایی بین کاشتنی و استخوان می‌گردد تا حد بسیار زیادی جلوگیری می‌کند [۷].

هنج<sup>۱۷</sup> در سال ۱۹۷۱ شیشه‌ای با ترکیب  $45\% \text{SiO}_2$  -  $24.5\% \text{Na}_2\text{O}$  -  $24.5\% \text{CaO}$  -  $6\% \text{P}_2\text{O}_5$  (برحسب درصد مولی) را با نام اختصاری ۴۵S۵ به عنوان اولین شیشه زیست فعال معرفی نمود [۸]. پس از آن انواع مختلفی از شیشه‌های زیست فعال سنتز گردید که یکی از مهم‌ترین آن‌ها، شیشه زیست فعال پایه سیلیکاتی با ترکیب شیمیایی  $60\% \text{SiO}_2$  -  $36\% \text{CaO}$  -  $4\% \text{P}_2\text{O}_5$  (برحسب درصد مولی) است که در بسیاری از جوانب بر شیشه زیست فعال ۴۵S۵ برتری دارد [۹]. شیشه‌های زیست فعال پایه سیلیکاتی برای کاربردهای بازسازی استخوان و ارتوپدی گزینه‌های مطلوبی هستند [۱۰]. شیشه‌های زیست فعال پایه سیلیکاتی تا سال ۱۹۸۰ اکثراً به روش ذوبی تهیه می‌شدند و در سال ۱۹۹۱، هنج نشان داد که شیشه زیست فعال پایدار در سیستم  $60\% \text{SiO}_2$  -  $36\% \text{CaO}$  -  $4\% \text{P}_2\text{O}_5$  به روش سل-ژل نیز قابل تهیه است. به دلیل مزایایی چون یکنواختی شیمیایی در سیستم‌های چند ترکیبی، سطح ویژه بالای ژل‌ها و پودرهای تولید شده که باعث کاهش دمای تف جوشی می‌شود، خلوص بالای ماده سنتز شده، عدم تبخیر و حذف فسفر از ترکیب و قابلیت دستیابی به محصولات با ترکیبات استوکیومتری دقیق نسبت به روش ذوبی مطلوب تر است [۱۱].

عنصر استرانسیوم به گروه دوم جدول تناوبی تعلق دارد و به صورت کاتیون دو ظرفیتی است. تأثیر استرانسیوم در بدن مشابه با کلسیم است که علت آن تشابه شیمیایی این دو عنصر از گروه دو است. از آنجاکه میزان اتصال استرانسیوم به پروتئین در پلاسمای خون و سایر مایعات زیستی شبیه به کلسیم است و هر دو آن‌ها رفتار تمایل به استخوان<sup>۱۸</sup> دارند، استرانسیوم می‌تواند جایگزین<sup>۱۹</sup> کلسیم در بافت‌های سخت شود [۱۲]. مطالعات پیشین مشخص کرد که عنصر استرانسیوم با خاصیت استخوان‌زایی<sup>۲۰</sup>، در درمان بیماری پوکی استخوان نیز مفید است [۱۳]. استرانسیوم در بافت‌های انسان وجود دارد که میزان آن در اسکلت بدن ۰/۳۳۵ درصد میزان کلسیم موجود در آن است. این نکته قابل توجه است که یون‌های استرانسیوم برای بیمارانی که از بیماری پوکی استخوان رنج می‌برند مفید است، به دلیل اینکه از فعالیت سلول‌های استخوان‌خوار جلوگیری می‌کند [۱۴].

فرآیند سل-ژل سنتز شده است. جدول (۱) ترکیبات شیمیایی شیشه زیست فعال پایه سیلیکاتی حاوی استرانسیوم (S5) و بدون استرانسیوم (S0) را نشان می‌دهد. این مواد شیمیایی از شرکت مرک آلمان تهیه گردید.

جدول (۱): ترکیبات شیمیایی شیشه زیست فعال پایه سیلیکاتی حاوی استرانسیوم و بدون استرانسیوم.

شیشه زیست فعال (mol. %)	60SiO <sub>2</sub> - 31CaO - 4P <sub>2</sub> O <sub>5</sub> - 5SrO	60SiO <sub>2</sub> - 36CaO - 4P <sub>2</sub> O <sub>5</sub>
نام‌گذاری	S5	S0
SiO	60	60
CaO	31	36
P <sub>2</sub> O <sub>5</sub>	4	4
SrO	5	0

برای تهیه ۲۵ گرم پودر شیشه، آب مقطر و اسید نیتریک و تترا اتیل اورتوسیلیکات (TEOS) توسط همزن مغناطیسی مخلوط شدند و سپس برای به دست آمدن محلول شفاف تری اتیل فسفات (TEP) به محلول اضافه و به مدت نیم ساعت هم‌زده شد. در مرحله بعد نیترات کلسیم چهار آبه و نیترات استرانسیوم به ترتیب با فاصله زمانی ۴۵ دقیقه اضافه و به مدت یک ساعت برای انجام هیدرولیز کامل هم‌زده شدند. پس از تهیه سل‌هایی با ترکیب شیمیایی موردنظر، آن‌ها را به منظور پیرسازی (ژل شدن)، به مدت ۵ روز در دمای ۳۷ °C و سپس ژل‌ها به مدت ۳ روز در خشک‌کنی با دمای ۷۵ °C قرار گرفتند. ژل‌های خشک‌شده در آسیاب ماهواره‌ای با گلوله‌های آلومینایی به مدت ۱۰ دقیقه با سرعت چرخش ۲۰۰ دور بر دقیقه آسیاب شدند. پودرهای به‌دست آمده تحت عملیات پایدارسازی در مدت زمان ۶ ساعت به دمای ۷۰۰ °C رسید و ۳ ساعت در دمای فوق ثابت باقی ماند و در نهایت پس از سرد شدن، پودرها از کوره خارج شده و مجدداً آسیاب شدند.

## ۲-۲- تهیه محلول شبیه‌سازی شده با محیط

### بدن

ساخت محلول شبیه‌سازی شده با محیط بدن مطابق با دستورالعمل پیشنهادی کوکوبو<sup>۲۸</sup> انجام شد [۱۸]. برای تهیه ۱۰۰۰ میلی‌لیتر محلول شبیه‌سازی شده با محیط بدن ابتدا ۷۵۰ میلی‌لیتر آب دو بار تقطیر در ظرف ریخته و توسط همزن

یک راهکار عملی برای رساندن مقادیر یکنواخت یون استرانسیوم در این بیمارها به کارگیری شیشه‌های زیست فعال حاوی استرانسیوم است [۲]. شیشه‌های زیست فعال حاوی استرانسیوم اخیراً به‌طور چشمگیری در انواع کاربردهای اورتوپدی مورد توجه قرار گرفته است که اولین مقاله علمی در این زمینه در سال ۱۹۹۵ توسط گالیانو و همکاران<sup>۲۱</sup> انتشار یافت [۱۵]. کریستی و همکاران<sup>۲۲</sup> نیز در سال ۲۰۱۷ گزارشی کردند که جایگزینی CaO با SrO در شیشه‌های زیست فعال حاوی فسفات تأثیر بسیار ناچیزی بر حلالیت شیشه دارد [۱۶]. نوموتس و همکاران<sup>۲۳</sup> در سال ۲۰۱۷ با بررسی تأثیر عنصر استرانسیوم در شیشه زیست فعال گزارش کردند که جایگزینی استرانسیوم به جای کلسیم در ساختار شیشه منجر به افزایش زیست فعالی می‌گردد [۱۷].

با توجه به مطالب مذکور در بررسی شیشه‌های زیست فعال پایه سیلیکاتی حاوی استرانسیوم، هدف از انجام این پژوهش شناخت نقش جایگزینی ۵ درصد مولی استرانسیوم<sup>۲۴</sup> جای کلسیم روی تشکیل لایه هیدروکسی‌آپاتایت شیشه زیست فعال چهار جزئی 60%SiO<sub>2</sub>-31%CaO-4%P<sub>2</sub>O<sub>5</sub>-5%SrO سنتز شده به روش سل-ژل، مطالعه زیستی برای سنجش سمیت سلولی<sup>۲۵</sup> و فعالیت سلول‌های استوبلاست MC3T3-E1 و همچنین آزمون ضد باکتریایی<sup>۲۶</sup> علیه باکتری مرسا<sup>۲۷</sup> در مجاورت شیشه‌ی زیست فعال چهار جزئی 60% SiO<sub>2</sub>-31%CaO-4%P<sub>2</sub>O<sub>5</sub>-5%SrO می‌باشد. در نهایت با مشاهده عدم سمیت سلولی، افزایش میزان رشد و تکثیر سلولی، تشکیل سریع لایه هیدروکسی‌آپاتایت و برتری خاصیت ضد باکتریایی، شیشه حاوی S5 در مهندسی بافت استخوان معرفی می‌شود.

## ۲- مواد و روش‌های انجام پژوهش

### ۲-۱- مواد اولیه و سنتز شیشه زیست فعال

مواد تترا اتیل ارتو سیلیکات (TEOS: Si(OC<sub>2</sub>H<sub>5</sub>)<sub>4</sub>)، تری اتیل فسفات (TEP: PO(C<sub>2</sub>H<sub>5</sub>)<sub>3</sub>)، نیترات کلسیم چهار آبه (Ca(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>.4H<sub>2</sub>O) و نیترات استرانسیوم (Si(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>) در شیشه زیست فعال پایه سیلیکاتی حاوی استرانسیوم از طریق

رسانده شد. در جدول ۲ مقایسه غلظت یون‌های موجود در محلول شبیه‌سازی شده با محیط بدن و پلاسما خون انسان مشاهده می‌گردد [۱۹].

مغناطیسی هم زده و دمایش به  $37^{\circ}\text{C}$  رسانده شد. سپس pH محلول با افزودن هیدروکسی‌متیل‌آمینومتان و اسید کلریدریک در دمای  $37^{\circ}\text{C}$  به ۷.۴ تثبیت و در نهایت با افزودن آب دو بار تقطیر، حجم آن به ۱۰۰۰ میلی‌لیتر

جدول (۲): مقایسه غلظت یونهای موجود در محلول شبیه‌سازی شده با محیط بدن و پلاسما خون انسان.

Ion	K <sup>+</sup>	Na <sup>+</sup>	Ca <sup>+2</sup>	Mg <sup>+</sup>	Cl <sup>-</sup>	HCO <sup>-3</sup>	SO <sub>4</sub> <sup>-2</sup>	HPO <sub>4</sub> <sup>-2</sup>
Simulated body fluid (SBF)	142	5.0	1.5	2.5	147.8	4.2	1.0	0.5
(mmol.L <sup>-1</sup> ) Plasma	142	5.0	1.5	2.5	103.0	27.0	1.0	0.5

در این مرحله برای انتخاب دما و زمان حرارت‌دهی<sup>۲۹</sup> در مرحله پایدارسازی، از نمونه‌های منتخب شیشه‌های زیست فعال به‌منظور آنالیز حرارتی هم‌زمان (TGA/DTA)<sup>۳۰</sup> نمونه‌گیری شد. آنالیز حرارتی با استفاده از آلومینا به‌عنوان ماده مرجع از دمای اتاق تا  $1000^{\circ}\text{C}$  با آهنگ افزایش دمای ثابت  $5^{\circ}\text{C}$  بر دقیقه توسط دستگاه Shimadzu DSC-50 ساخت کشور ژاپن انجام شد.

## ۲-۳-۲- مشخصه‌یابی و بررسی خواص شیشه‌های سنتز شده

### ۲-۳-۲-۱- اندازه‌گیری و محاسبه دانسیته اکسیژن

دانسیته اکسیژن شیشه‌های زیست فعال سنتز شده به‌عنوان معیاری برای ارزیابی فشردگی شبکه شیشه‌های زیست فعال بکار برده می‌شود و از طریق رابطه ۱ قابل محاسبه است [۲۰].

### ۲-۳-۲-۲- آنالیز حرارتی

$$\rho_0 = \frac{M_0 \times (2x_{\text{SiO}_2} + x_{\text{CaO}} + 5x_{\text{P}_2\text{O}_3} + x_{\text{SrO}})}{[x_{\text{SiO}_2} M_{\text{SiO}_2} + x_{\text{CaO}} M_{\text{CaO}} + x_{\text{P}_2\text{O}_3} M_{\text{P}_2\text{O}_3} + x_{\text{SrO}} + M_{\text{SrO}}] \times \rho_{\text{glass}}^{-1}} \quad (1)$$

بدن مطالعات IR بر روی نمونه‌های سنتز شده انجام شد و توسط دستگاه طیف‌سنج Thermo Nicolet مدل Avatar 660 ساخت کشور آمریکا طیف‌های جذبی موجود در شیشه زیست فعال در محدوده عدد موج  $4000-400\text{ cm}^{-1}$  بررسی شدند.

### ۲-۳-۲-۳- آنالیز پلاسما جفت شده القایی-طیف‌سنجی نشر اتمی<sup>۳۳</sup>

بررسی نرخ انحلال و رهائش یون‌های کلسیم، سیلیسوم، فسفر و استرانسیوم قبل و پس از غوطه‌وری نمونه‌ها در محلول شبیه‌سازی شده با محیط بدن در زمان‌های مختلف توسط دستگاه طیف‌سنج نشری پلاسما جفت شده القایی مدل Varian Vista Pro, Palo Alto ساخت کشور آمریکا انجام گرفت.

### ۲-۳-۲-۳- آنالیز پراش پرتو ایکس<sup>۳۱</sup>

به‌منظور بررسی ترکیب فازی شیشه زیست فعال سنتز شده به روش سل-ژل و نیز بررسی تغییرات حاصل از قرارگیری نمونه‌ها در محلول شبیه‌سازی شده با محیط بدن انجام شد. قبل از انجام آنالیز سطح نمونه‌ها با آب مقطر شستشو خشک شدند و توسط دستگاه INEL-Equinox-3000 ساخت کشور فرانسه با پرتو Cu-ka به عدد موج  $1/54.05$  آنکستروم در محدوده‌های  $2\theta$  بین  $20-50^{\circ}$ ، شناسایی پیک‌های مربوط به هیدروکسی‌آپاتایت با استفاده از کارت‌های مرجع JCPDS (No. 09-432) انجام گرفت.

### ۲-۳-۲-۴- طیف‌سنجی تبدیل فوریه فروسرخ<sup>۳۲</sup>

به‌منظور تعیین گروه‌های شیمیایی موجود در شیشه زیست فعال سنتز شده به روش سل-ژل و نیز بررسی تأثیر محلول شبیه‌سازی شده با محیط بدن بر روی ترکیب شیشه انجام شد. قبل و پس از قرار گرفتن در محلول شبیه‌سازی شده با محیط

### ۲-۳-۶- بررسی تغییرات pH

اثر ترکیب شیمیایی بر pH نمونه‌ها قبل ( $pH_{S0,SS} > 7/40$ ) و سپس ( $pH_{S5} > 7/47, 7/69 > pH_{S0} > 7/47$ ) (۷/۸) از قرارگیری در محلول شبیه‌سازی شده با محیط بدن توسط Corning pH meter 340 ساخت کشور آمریکا بررسی شد.

### ۲-۳-۷- بررسی ریزساختار سطح

پس از قرارگیری نمونه‌ها در محلول شبیه‌سازی شده با محیط بدن ریزساختار و تغییرات شیشه زیست فعال سنتز شده به روش سل-ژل توسط میکروسکوپ‌های الکترونی روبشی<sup>۳۴</sup> مدل Seron AIS-2100 ساخت کشور کره و مدل XL30 ساخت شرکت فیلیپس هلند مورد بررسی قرار گرفت.

### ۲-۴-۱- آزمون‌های زیستی

#### ۲-۴-۱-۱- قابلیت زیستی سلول‌ها<sup>۳۵</sup>

برای ارزیابی زنده ماندن سلول‌ها، از زوج رنگ‌های فلورسانسی زنده/مرده<sup>۳۶</sup> استفاده گردید. سلول‌های استئوبلاست MC3T3-E1 با دانسیته  $15000 \text{ cells/cm}^2$  بر روی نمونه‌ها کاشته<sup>۳۷</sup> شد و محیط کشت<sup>۳۸</sup> هر ۴۸ ساعت تعویض گردید. در روزهای ۱ و ۷ محیط کشت توسط پیت خارج شده و سلول‌های کاشت شده بر روی نمونه‌ها دوباره به آرامی توسط محلول نمک فسفات با خاصیت بافری<sup>۳۹</sup> شستشو شدند. سپس  $200 \mu\text{L}$  از محلول Calcin acetoxymethyl ester با غلظت  $2 \mu\text{M}$  و اتیدیوم هومیدور با غلظت  $4 \mu\text{M}$  به سلول‌ها اضافه شد و مجموعه به مدت ۱۵ دقیقه در انکوباتور در دمای  $37^\circ\text{C}$  در اتمسفر مرطوب نگهداری شد. نهایتاً سلول‌ها دوباره به آرامی با محلول PBS شسته شد و سلول‌های رنگ آمیزی شده (سلول‌های زنده به رنگ سبز و سلول‌های مرده به رنگ قرمز) توسط میکروسکوپ فلورسانس مدل Olympus ساخت کشور آمریکا بررسی و تصاویر میکروسکوپی توسط دوربین دیجیتال مدل Zeiss Axiocam ثبت گردید.

### ۲-۴-۲- قابلیت تکثیر سلول‌ها<sup>۴۰</sup>

بررسی سمیت سلولی توسط آزمایش MTT انجام گرفت. جهت انجام این آزمون سلول‌های استئوبلاست MC3T3-E1 در پلیت‌های ۹۶ خانه کاشته شد و به مدت ۲۴ ساعت در انکوباتور قرار گرفت. پس از طی مدت‌زمان‌های لازم ۱، ۳ و ۷ روز محیط سلول‌ها خارج و محیط جدید به همراه  $100 \mu\text{L}$  محلول MTT با غلظت ۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر به هر چاهک افزوده و به مدت ۷۲ ساعت کریستال‌های نامحلول فرمازان<sup>۴۱</sup> حل شده در سلول دی‌متیل سولفواکسید<sup>۴۲</sup> در انکوباتور قرار داده شد و در نهایت مقدار جذب نوری نمونه‌ها<sup>۴۳</sup> توسط دستگاه اسپکتروفوتومتر<sup>۴۴</sup> با عدد موج ۵۷۰ نانومتر مدل EL312e Biokinetics اندازه‌گیری شد.

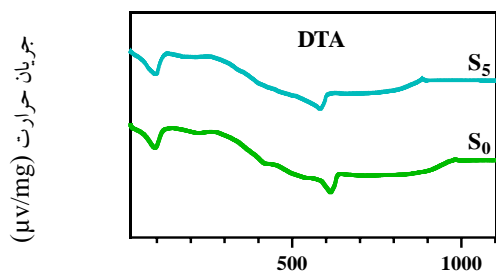
### ۲-۴-۳- بررسی فعالیت فسفات قلیایی<sup>۴۵</sup>

به منظور اندازه‌گیری فعالیت فسفات قلیایی داخل سلولی [۲۱] مطابق با شیوه لاری و همکاران انجام شد [۲۲]. بدین منظور سلول‌های استئوبلاست MC3T3-E1 با دانسیته  $1 \times 10^4 \text{ cells/cm}^2$  در مجاورت شیشه‌های زیست فعال در دمای  $37^\circ\text{C}$  و در داخل انکوباتور به مدت ۱ و ۷ روز کشت شد. در روزهای مذکور، محیط کشت با پیت بیرون کشیده شد و سطح سلول‌ها به آرامی با محلول PBS شسته شد و با یک میلی‌لیتر محلول بافر تریس<sup>۴۶</sup> و یک میلی‌لیتر از محلول پارا-نیتروفنیل فسفات با غلظت  $16 \text{ mol/L}$  به آن اضافه شد. محلول فوق به مدت ۵ دقیقه در دمای  $37^\circ\text{C}$  قرار گرفت. در نهایت فعالیت فسفات قلیایی داخل سلولی با عدد موج ۴۱۰ نانومتر توسط دستگاه اسپکتروفوتومتر اندازه‌گیری شد [۲۳].

### ۲-۵-۱- بررسی خاصیت ضد باکتریایی

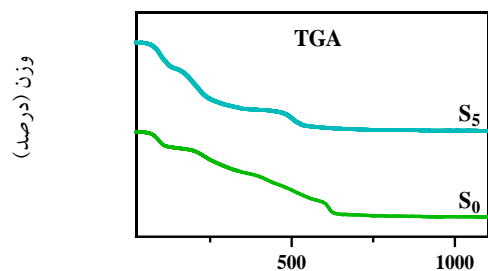
باکتری‌های مرسا در محیط LB<sup>۴۷</sup> مایع کشت داده و غلظت آن به حدود  $0.5 \times 10^8$  تا  $2 \times 10^8$  رسانده شد. برای بررسی خاصیت ضد باکتریایی شیشه زیست فعال سنتز شده با نمونه کنترل، سپس ۰.۹ میلی‌لیتر از محیط کشت LB به ۱۰ میلی‌گرم از انواع پودر شیشه‌های زیست فعال سنتز شده اضافه و به مدت ۱ دقیقه توسط همزن هم‌زده شد تا محلول

علت کاهش دماهای انتقال و بلوری با جایگزینی استرانسیوم به جای کلسیم در ترکیب شیشه به دلیل یکسان بودن عدد همسایگی استرانسیوم و کلسیم و همچنین پایین تر بودن استحکام میدان یونی<sup>۵۱</sup> آن به دلیل بزرگ تر بودن شعاع یونی استرانسیوم در مقایسه با کلسیم است.



دما (سانتی گراد)

شکل (۲): نمودار DTA نمونه S0 و S5 با نرخ  $5^{\circ}\text{C min}^{-1}$  از دمای اتاق تا  $1100^{\circ}\text{C}$ .



دما (سانتی گراد)

شکل (۳): نمودار TGA نمونه S0 و S5 با نرخ  $5^{\circ}\text{C min}^{-1}$  از دمای اتاق تا  $1100^{\circ}\text{C}$ .

### ۳-۳- آنالیز پراش پرتو ایکس

الگوی پراش پرتو ایکس مربوط به زیست فعالی شیشه‌ها به صورت برون تنی، با مشاهده صفحات بلوری هیدروکسی آپاتایت بلورین شیشه‌های سنتز شده به روش سل-ژل قبل و بعد از قرارگیری نمونه‌ها در بازه‌های زمانی مختلف ۱، ۳، ۷ و ۱۴ روز در محلول شیشه‌سازی شده با محیط بدن در شکل ۴ نشان داده شده است.

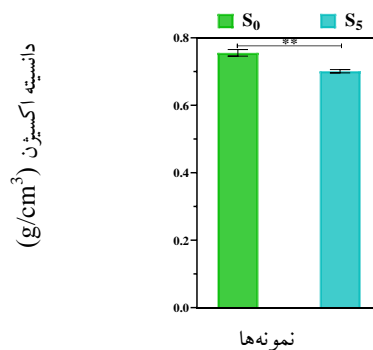
یک دست حاصل شود. پس از رقیق کردن متوالی، ۰.۱ میلی لیتر از سوسپانسیون<sup>۴۸</sup> حاصله بر روی محیط کشت آگار<sup>۴۹</sup> به مدت ۱ روز در  $37^{\circ}\text{C}$  کشت داده شد. درصد بازدهی ضد باکتریایی<sup>۵۰</sup> طبق رابطه ۲ محاسبه گردید [۲۴].

$$(2) \quad \text{درصد ضد باکتریایی} = 1 - \frac{\text{تعداد ضد باکتری‌های زنده مانده}}{\text{تعداد کل باکتری‌ها}}$$

### ۳- نتایج و بحث

#### ۳-۱- بررسی دانسیته اکسیژن در شیشه‌های زیست فعال

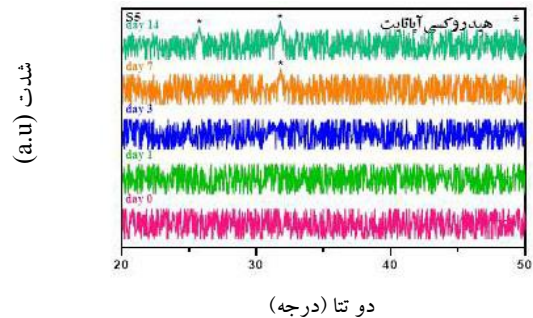
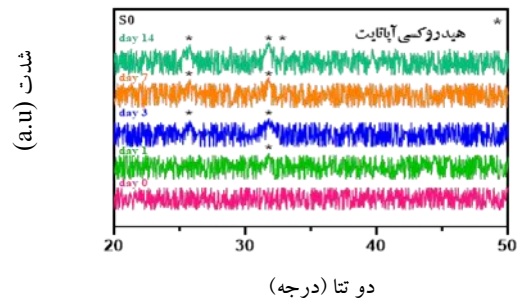
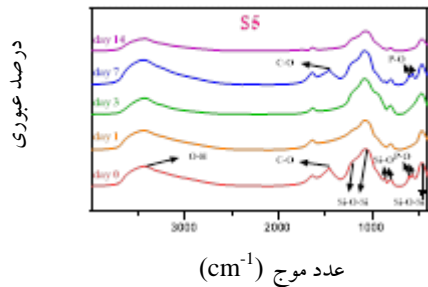
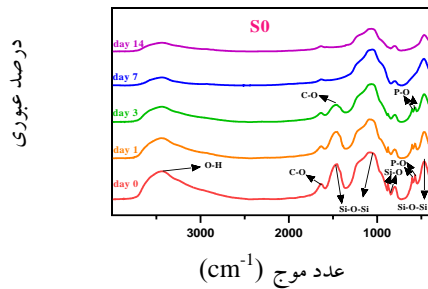
حضور عناصر اصلاح کننده در ساختار شیشه زیست فعال منجر به تغییر فشردگی شبکه و دانسیته اکسیژن آن می‌شود که این تغییرات منجر به تغییر انحلال شیشه می‌شود [۲۵]. با جایگزین شدن یون کوچک تر به جای یون بزرگ تر، ساختار شیشه فشرده تر می‌شود و به تبع آن دانسیته اکسیژن افزایش می‌یابد [۲۶]. با جایگزینی استرانسیوم به جای کلسیم در ترکیب شیشه زیست فعال، دانسیته شیشه کاهش می‌یابد. نتایج در شکل ۱ نشان می‌دهد که دانسیته اکسیژن مربوط به شیشه زیست فعال حاوی S5 کمتر از شیشه S0 است که تفاوت قابل ملاحظه‌ای در دانسیته اکسیژن برای نمونه S5 در قیاس با نمونه S0 مشاهده شد ( $p < 0.01$ ).



شکل (۱): تغییرات دانسیته شیشه‌های زیست فعال سنتز شده.

#### ۳-۲- آنالیز حرارتی

نمودارهای مربوط به آنالیز حرارتی TGA /DTA نمونه‌های S0 (شیشه سه جزئی بدون حضور استرانسیوم) و S5 (شیشه چهار جزئی با حداکثر مقدار استرانسیوم) به ترتیب در شکل‌های ۲ و ۳ آورده شده است. با توجه به این نمودارها



شکل (۵): الگوی طیف سنجی تبدیل فوریه فروسرخ شیشه‌های زیست فعال، قبل و پس از قرارگیری در محلول شبیه‌سازی شده با محیط بدن در بازه‌های زمانی ۰، ۱، ۳، ۷ و ۱۴ روز در انکوباتور در دمای  $37^{\circ}\text{C}$  و رطوبت نسبی ۱۰۰ درصد.

شکل (۴): الگوی پراش پرتو ایکس دو نمونه  $S_0$  و  $S_5$  قبل و پس از قرارگیری در محلول شبیه‌سازی شده با محیط بدن در بازه‌های زمانی ۰، ۱، ۳، ۷ و ۱۴ روز در انکوباتور در دمای  $37^{\circ}\text{C}$  و رطوبت نسبی ۱۰۰ درصد.

پیش از غوطه‌وری، باندهای کششی و خمشی مربوط به Si-O-Si در طیف همه نمونه‌ها که بیانگر مقدار غالب سیلیسیوم در ترکیب شیشه‌های زیست فعال سنتر شده است، مشاهده می‌گردد. پس از یک روز غوطه‌وری در محلول شبیه‌سازی شده با محیط بدن، در طیف‌های مورد نظر هیچ یک از نمونه‌ها پیک‌های خمشی P-O که به عنوان یکی از مدارک تشکیل هیدروکسی آپاتایت است، مشاهده نمی‌گردد. با افزایش زمان ظهور پیک‌های C-O و P-O از روز سوم غوطه‌وری در شیشه بدون استرانسیوم به روز هفتم غوطه‌وری در شیشه حاوی استرانسیوم، بیانگر به تعویق افتادن بیشتر تشکیل لایه هیدروکسی آپاتایت در سطح شیشه زیست فعال حاوی استرانسیوم است. نتایج حاکی بر آن است که حضور استرانسیوم در ترکیب شیشه زیست فعال پایه سیلیکاتی، تأثیر غالبی در به تأخیر انداختن رشد و بلوغ هیدروکسی آپاتایت دارد. شباهت الگوی طیف سنجی تبدیل فوریه فروسرخ شیشه‌های زیست فعال بیانگر بلوغ یکسان هیدروکسی آپاتایت برای شیشه‌های مذکور در روز چهاردهم غوطه‌وری در محلول شبیه‌سازی شده با محیط بدن

در الگوی پراش اشعه ایکس نمونه‌ی  $S_0$ ، پس از یک روز غوطه‌وری در محلول شبیه‌سازی شده با محیط بدن، پیک مشخصه مربوط به هیدروکسی آپاتایت ظاهر می‌شود (HA; JCPDS 09-432) و شدت این پیک با افزایش زمان غوطه‌وری تا روز ۱۴ افزایش می‌یابد؛ اما در نمونه  $S_5$  پس از هفت روز غوطه‌وری در محلول شبیه‌سازی شده با محیط بدن، پیک مشخصه مربوط به هیدروکسی آپاتایت ظاهر می‌شود و تا روز ۱۴ افزایش می‌یابد.

### ۳-۴- طیف سنجی تبدیل فوریه فروسرخ

شکل ۵ الگوی طیف سنجی تبدیل فوریه فروسرخ مربوط به عدد موج برخی از گروه‌های شیمیایی موجود در شیشه زیست فعال قبل و پس از قرارگیری نمونه‌ها در بازه‌های زمانی مختلف ۰، ۱، ۳، ۷ و ۱۴ روز در محلول شبیه‌سازی شده با محیط بدن می‌باشد.

سوم کاهش ناگهانی و تا روز هفتم کاهش تدریجی می‌یابد. همچنین غلظت کلسیم در نمونه S<sub>5</sub> تا روز سوم به صورت تدریجی افزایش و از روز سوم تا هفتم به صورت تدریجی کاهش می‌یابد. با جایگزینی استرانسیوم به جای کلسیم در شبکه شیشه زیست فعال، نرخ رهائش سیلیسیوم افزایش پیدا می‌کند؛ به عبارت دیگر شیشه‌های S<sub>5</sub> دارای حلالیت بیشتری نسبت به S<sub>0</sub> هستند.

### ۳-۶- بررسی تغییرات pH

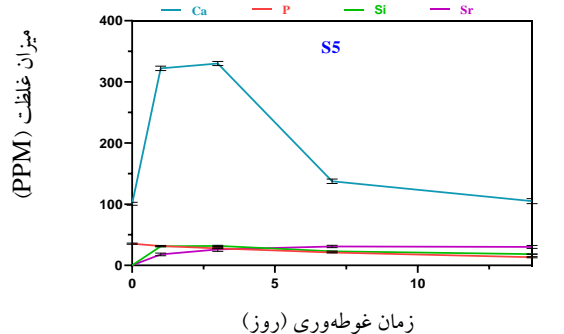
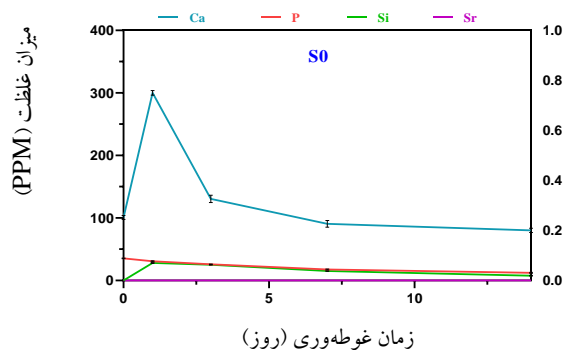
شیشه‌های زیست فعال در سیستم SiO<sub>2</sub>-CaO-P<sub>2</sub>O<sub>5</sub> پس از غوطه‌وری در محلول‌های آبی عموماً سبب افزایش pH محلول می‌شوند. همچنین، تشکیل لایه هیدروکسی آپاتایت روی سطح شیشه‌های زیست فعال بسیار به تغییرات pH حساس است [۲۸]. برای بررسی روند تغییرات pH با افزایش زمان غوطه‌وری با توجه به شکل ۷ می‌توان تحلیل کرد که افزایش مقادیر pH در روزهای اول غوطه‌وری در محلول شیشه‌سازی شده با محیط بدن، بیانگر تعویض کاتیونی بین Ca<sup>2+</sup> و Sr<sup>2+</sup> از شیشه زیست فعال حاوی استرانسیوم با یون‌های H<sup>+</sup> از محلول شیشه‌سازی شده با محیط بدن است. با افزایش زمان غوطه‌وری، تشکیل لایه هیدروکسی آپاتایت با جذب شدن یون‌های فسفات (PO<sub>4</sub><sup>3-</sup>) و کربنات (CO<sub>3</sub><sup>2-</sup>) از محلول شیشه‌سازی شده با محیط بدن روی سطح شیشه طبق اصل لوشاتلیه واکنش به سمت تولید محصولات رفته در نتیجه H<sup>+</sup> زیاد می‌شود و به تبع آن روند افزایش pH کم می‌شود. با تشکیل لایه هیدروکسی آپاتایت به دلیل عدم نفوذپذیری محلول شیشه‌سازی شده با محیط بدن به داخل ساختار شیشه‌ها، تعویض کاتیونی متوقف می‌شود. شیشه S<sub>0</sub> به دلیل عدم حضور استرانسیوم در ترکیب شیمیایی آن، دارای کمترین مقادیر pH در مقایسه با شیشه S<sub>5</sub> است. از طرفی در شیشه چهار جزئی حاوی استرانسیوم با افزایش مقادیر استرانسیوم در شیشه، مقادیر pH افزایش می‌یابد.

است. راجع به تأخیر افتادن تشکیل لایه هیدروکسی آپاتایت در حضور استرانسیوم، حصارکی و همکاران [۲۷] در سال ۲۰۱۰ به بررسی تأثیر جایگزینی CaO توسط SrO پرداختند. نتایج نشان داد که عنصر استرانسیوم با به تأخیر انداختن تبادل کاتیونی بین سطح شیشه و محلول شیشه‌سازی شده با محیط بدن، نرخ رسوب لایه هیدروکسی آپاتایت در ترکیب شیشه زیست فعال (64SiO<sub>2</sub>-31CaO-5P<sub>2</sub>O<sub>5</sub>(mol%)) را کاهش می‌دهد.

### ۳-۵- آنالیز پلاسمای جفت شده القایی-

#### طیف‌سنجی نشر اتمی

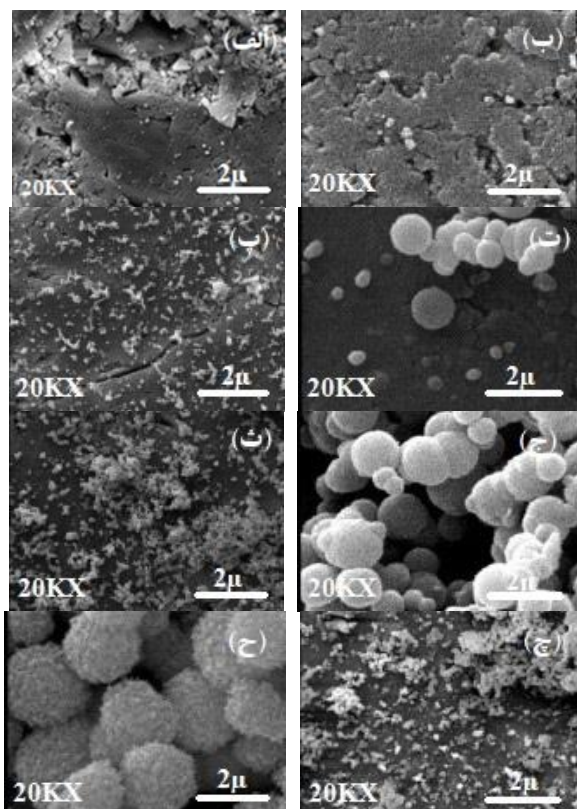
بررسی نرخ رهائش عناصر مختلف شیشه‌های زیست فعال چهار جزئی حاوی ۵ درصد استرانسیوم در مقایسه با نمونه کنترل (S<sub>0</sub>) در شکل ۶ نشان داده شده است.



شکل (۶): نمودار تغییرات غلظت عناصر شیشه‌های سنتز شده قبل و بعد از قرارگیری در محلول شیشه‌سازی شده با محیط بدن در زمان‌های ۱، ۳، ۷ و ۱۴ روز در انکوباتور با دمای ۳۷ °C.

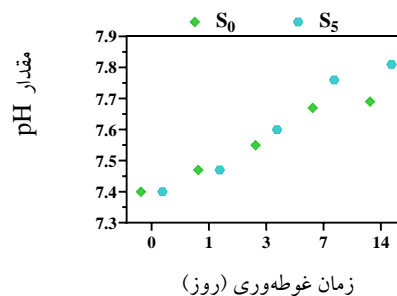
با توجه به شکل ۶ غلظت عناصر کلسیم و سیلیسیوم در هر دو نمونه تا روز اول افزایش ناگهانی می‌یابد و از روز هفتم تا چهاردهم ثابت می‌ماند. غلظت کلسیم در نمونه S<sub>0</sub> تا روز





شکل (۸): ریزساختار لایه هیدروکسی آپاتایت ایجاد شده روی سطح  $S_0$  (الف و ب) قبل از غوطه‌وری، پ و ت) پس از ۱ روز غوطه‌وری، ج و ح) پس از ۷ روز غوطه‌وری و چ و ز) پس از ۱۴ روز غوطه‌وری در محلول شبیه‌سازی شده با محیط بدن.

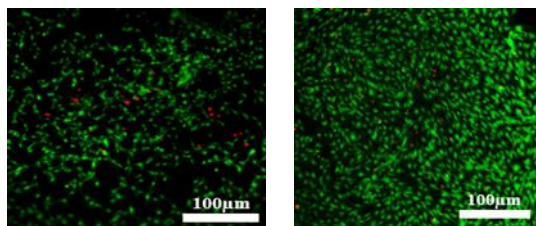
برای بررسی تأثیر استرانسیوم در ترکیب شیمیایی شیشه‌های زیست فعال حاوی استرانسیوم نسبت به نمونه کنترل ( $S_0$ ) به مقایسه ریزساختار هیدروکسی کربنات آپاتایت تشکیل شده در شکل‌های ۹ و ۱۰ پرداخته می‌شود. مشاهدات حاکی بر آن است که ریزساختار هیدروکسی آپاتایت در حضور استرانسیوم، مخلوط کروی و میله‌ای است. طاهر خانی و همکاران<sup>۵۲</sup> [۲۹] ادعا کرده بودند که حضور استرانسیوم در شیشه زیست فعال  $60\%SiO_2-36\%(CaO/SrO)-4\%P_2O_5$  ممکن است منجر به تشکیل غیرمنتظره هیدروکسی آپاتایت میله‌ای شکل شود [۳۰]. اندازه بزرگ‌تر هیدروکسی آپاتایت میله‌ای شکل در سطح  $S_0$ ، بیانگر نرخ جوانه‌زنی کمتر در حضور استرانسیوم بیشتر است.



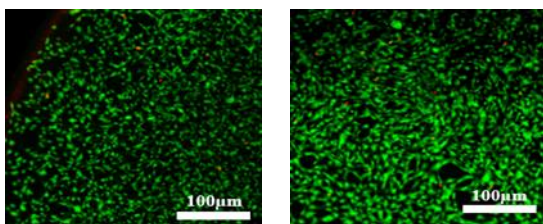
شکل (۷): نمودار تغییرات pH محلول شبیه‌سازی شده با محیط بدن در تماس با شیشه‌های سنتز شده در بازه‌های زمانی ۱، ۳، ۷ و ۱۴ روز در انکوباتور در  $37^\circ C$ .

### ۷-۳- مطالعات ریزساختار سطح

اشکال ۸ تا ۱۰ ریزساختار تشکیل لایه هیدروکسی آپاتایت در سطح شیشه‌های سنتز شده را نشان می‌دهند. با توجه به شکل ۸ بررسی تغییرات ریزساختار سطح شیشه  $S_0$  قبل و بعد از غوطه‌وری در محلول شبیه‌سازی شده با محیط بدن در روزهای ۱، ۳ و ۷ دیده می‌شود که پیش از غوطه‌وری هیچ فاز جدیدی در شکل ۸ (a و b) تشکیل نشده است و یک سری آلودگی سطحی در بعضی مکان‌ها مشاهده می‌شود. با افزایش زمان غوطه‌وری به یک روز، جوانه‌زنی رسوب شروع شده که در شکل ۸ (c و d) با بزرگنمایی بالاتر کاملاً مشخص است. با توجه به شکل ۸ (e و f) با افزایش زمان غوطه‌وری به سه روز منجر می‌شود که جوانه‌های تشکیل شده در روز اول غوطه‌وری، کاملاً شکل کروی بگیرند و در شکل ۸ (g و h) پس از هفت روز غوطه‌وری، ابعاد فاز آپاتایت تشکیل شده بزرگ‌تر می‌شود. با مقایسه سطح فازهای کروی تشکیل شده بر روی سطح  $S_0$  پس از روزهای سوم و هفتم غوطه‌وری دیده می‌شود که سطح از حالت صاف‌تر به حالت زبرتر تبدیل شده که می‌توان آن را به بلورینگی فاز هیدروکسی آپاتایت کروی روی سطح نسبت داد.

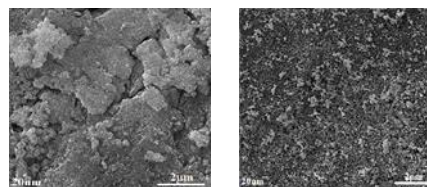


شکل (۱۱): تصاویر فلورسانس دو بعدی (2D) زنده/ مرده سلول‌های MC3T3-E1 کشت شده در مجاورت  $S_0$  به مدت ۱ روز (عکس سمت چپ) و ۷ روز (عکس سمت راست) (خط مقیاس =  $100\mu\text{m}$ ).

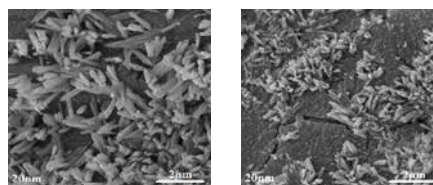


شکل (۱۲): تصاویر فلورسانس دو بعدی (2D) زنده/ مرده سلول‌های MC3T3-E1 کشت شده در مجاورت  $S_5$  به مدت ۱ روز (عکس سمت چپ) و ۷ روز (عکس سمت راست) (خط مقیاس =  $100\mu\text{m}$ ).

شکل ۱۳ و ۱۴ هسته و ریز رشته‌های اکتین سلول‌های استئوبلاست MC3T3-E1 رنگ آمیزی شده در مجاورت شیشه‌های زیست فعال سنتز شده  $S_0$  به‌عنوان نمونه کنترل و  $S_5$  به‌عنوان شیشه زیست فعال حاوی یون  $\text{Sr}^{2+}$  به روش سل-ژل با بالاترین قابلیت زیست زنده ماندن و رشد سلولی را نشان می‌دهد. همان‌طور که مشاهده می‌شود هسته و ریز رشته‌های اکتین سلول‌ها به‌صورت نامنظم پراکنده شده‌اند و جهت‌گیری هذلولی شکل<sup>۵۳</sup> دارند که به‌عنوان ریزساختار عادی و سالم برای سلول‌های استئوبلاست MC3T3-E1 معرفی شده‌اند [۳۲]. مشاهدات هسته و ریز رشته‌های اکتین سلول‌های استئوبلاست MC3T3-E1 رنگ آمیزی شده در مجاورت شیشه‌های زیست فعال  $S_0$  و  $S_5$  حاکی از آن است که حضور ۵ درصد مولی استرانسیوم در ترکیب شیشه زیست فعال پایه سیلیکاتی و به تبع آن، رهاش این یون‌ها در محیط کشت، منجر به افزایش تکثیر سلولی و ایجاد سلول‌ها با ریز رشته‌های اکتین متراکم‌تر می‌شود؛ به‌عبارت‌دیگر حضور یون‌های رها شده از ترکیب شیشه‌های زیست فعال نه تنها سمیت سلولی ایجاد نکرده است بلکه باعث افزایش رشد و تکثیر سلول‌های استئوبلاست MC3T3-E1 می‌شود. تراکم هسته و ریز رشته‌های اکتین سلول‌های استئوبلاست



شکل (۹): ریزساختار لایه هیدروکسی آپاتایت ایجاد شده روی سطح  $S_0$  پس از ۱۴ روز غوطه‌وری در محلول شبیه‌سازی شده با محیط بدن.



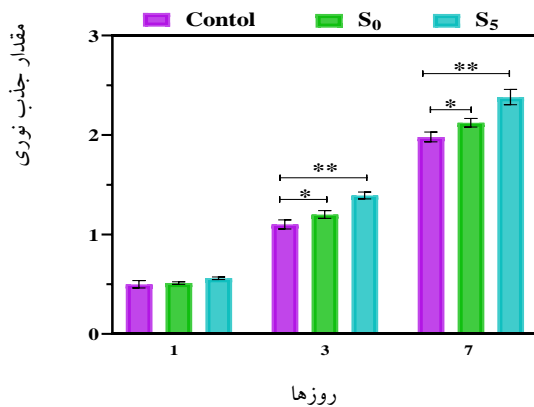
شکل (۱۰): ریزساختار هیدروکسی آپاتایت ایجاد شده روی سطح  $S_5$  پس از ۱۴ روز غوطه‌وری در محلول شبیه‌سازی شده با محیط بدن.

### ۳-۸-۱- آزمون‌های زیستی

#### ۳-۸-۱-۱- قابلیت زیستی و اسکلت سلول‌ها

قابلیت زیست سازگاری شیشه‌های زیست فعال  $S_0$  به‌عنوان نمونه کنترل و  $S_5$  به‌عنوان شیشه زیست فعال حاوی یون  $\text{Sr}^{2+}$  به روش سل-ژل با بالاترین قابلیت تکثیر سلولی، با رنگ‌آمیزی سلول‌های استئوبلاست MC3T3-E1 توسط آزمون زنده/ مرده، در شکل‌های ۱۱ و ۱۲ آورده شده است. نتایج روش زنده/ مرده به‌عنوان روشی سریع برای ارزیابی کیفی سمیت سلولی مواد زیستی [۳۱]، به‌وضوح نشان می‌دهد که در روز اول، سلول‌های کشت شده در مجاورت شیشه زیست فعال  $S_0$  در قیاس با شیشه  $S_5$  دارای رشد و تکثیر کمتر و به تبع آن دانسیته سلول‌های زنده کمتر به همراه تعداد نسبی بیشتری سلول مرده (قرمز رنگ) است؛ اما با گذشت زمان تا روز هفتم رشد و تکثیر سلولی به همراه تعداد نسبی کمتر سلول‌های مرده در نمونه‌های  $S_0$  و  $S_5$  مشاهده می‌شود. نتایج آزمون زنده/ مرده به‌صورت کیفی نشان داد که حضور ۵ درصد مولی استرانسیوم در ترکیب شیشه زیست فعال پایه سیلیکاتی و به تبع آن، رهاش این یون‌ها در محیط کشت، منجر به افزایش تکثیر سلولی با تعداد نسبی سلول‌های زنده بیشتر (کاهش تعداد سلول‌های مرده) می‌شود.

تشکیل شده برای نمونه S<sub>5</sub> در قیاس با S<sub>0</sub> مشاهده نشد (\*p>0.05). همچنین با افزایش زمان کشت تا ۳ و ۷ روز مشاهده گردید که افزایش جذب نوری<sup>۵۴</sup> مربوط به نمونه S<sub>5</sub> در مقایسه با نمونه کنترل قابل ملاحظه بود (0.01<\*p) و به سطح بالاتری از تکثیر سلولی در مقایسه با نمونه کنترل رسیدند. حصارکی و همکاران و لیو و همکاران [۳۳] گزارش کرده‌اند که حضور S<sub>5</sub> تأثیر مثبتی در افزایش تکثیر سلول‌های استخوان‌ساز دارد. به‌طور کلی نتایج MTT حاکی بر آن بود که حضور S<sub>5</sub> سبب افزایش قابل توجه فورمازون تشکیل شده می‌شود که بیانگر افزایش رشد و تکثیر سلولی است.

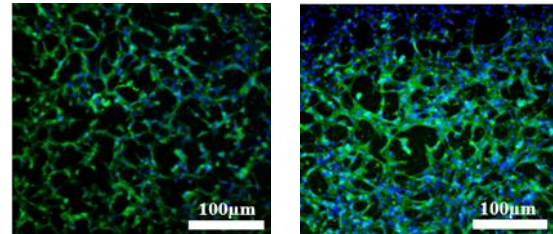


شکل (۱۵): نمودار ستونی نتایج آزمون MTT سلول‌های MC3T3-E1

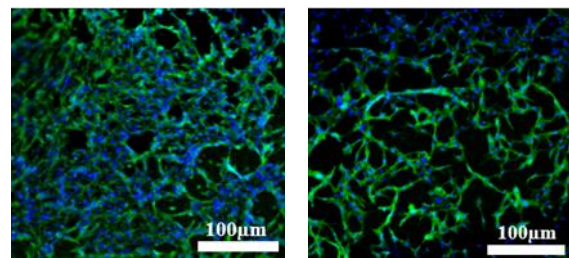
### ۳-۸-۳- بررسی فعالیت فسفات قلیایی

در شکل ۱۶ تکثیر و تمایز سلول‌های استخوانی از طریق اندازه‌گیری میزان جذب نوری آن و فعالیت فسفات قلیایی سلول‌های استئوبلاست MC3T3-E1 کشت شده در تماس با شیشه‌های زیست فعال حاوی S<sub>5</sub> بررسی شد. تحلیل آماری نمونه‌های کشت داده شده به مدت ۳ روز بر روی شیشه زیست فعال تهیه شده به روش سل-ژل و نمونه کنترل، نشان‌دهنده تفاوت قابل ملاحظه فعالیت فسفات قلیایی سلول‌های MC3T3-E1 در مجاورت شیشه‌های زیست فعال است. با توجه به شکل ۱۶ فعالیت فسفات قلیایی سلول‌های استئوبلاست MC3T3-E1 از روز اول تا هفتم و در روز هفتم نسبت به روز اول تقریباً چهار برابر به‌طور قابل ملاحظه

MC3T3-E1 به ترتیب در نمونه‌های S<sub>5</sub> و S<sub>0</sub> مشاهده می‌شود. همچنین نتایج آزمون زنده/مرده در تطابق کامل با نتایج MTT است.



شکل (۱۳): تصاویر فلورسانس دو بعدی DAPI/Actin (2D) سلول‌های MC3T3-E1 کشت شده در مجاورت S<sub>0</sub> به مدت ۱ روز (عکس سمت چپ) و ۷ روز (عکس سمت راست) (ریز رشته‌های اکتین به رنگ سبز و هسته سلول‌ها به رنگ آبی رنگ آمیزی شده است) (خط مقیاس = 100 μm).



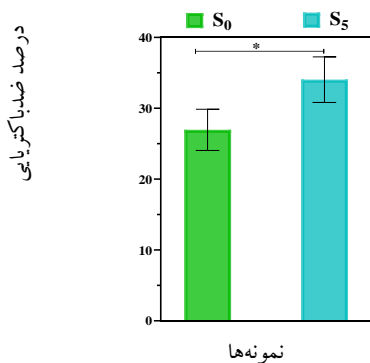
شکل (۱۴): تصاویر فورسانس دو بعدی DAPI/Actin (2D) سلول‌های MC3T3-E1 کشت شده در مجاورت S<sub>5</sub> به مدت ۱ روز (عکس سمت چپ) و ۷ روز (عکس سمت راست) (ریز رشته‌های اکتین به رنگ سبز و هسته سلول‌ها به رنگ آبی رنگ آمیزی شده است) (خط مقیاس = 100 μm).

### ۳-۸-۲- قابلیت تکثیر سلول‌ها

بررسی تأثیر استرانسیوم در ترکیب شیمیایی شیشه‌های زیست فعال بر عدم سمیت سلولی و قابلیت تکثیر سلول‌های استئوبلاست MC3T3-E1 نسبت به نمونه کنترل با استفاده از محیط کشت حاوی سلول‌های استئوبلاست MC3T3-E1 انجام شد. نتایج حاصل از طریق مقدار جذب نوری نمونه‌ها شامل محیط کشت و سلول‌های استئوبلاست MC3T3-E1 در شکل ۱۵ به دست آمده است.

همان‌طور که در شکل ۱۵ مشاهده می‌شود نمونه S<sub>5</sub> در مقایسه با نمونه کنترل پس از یک روز کشت، سبب افزایش رشد و تکثیر سلول‌های استئوبلاست MC3T3-E1 گردیده است. ولی هیچ تفاوت قابل ملاحظه‌ای برای فورمازون

نسبت به نمونه  $S_0$  به طور قابل ملاحظه‌ای بیشتر است ( $p < 0.05$ ).

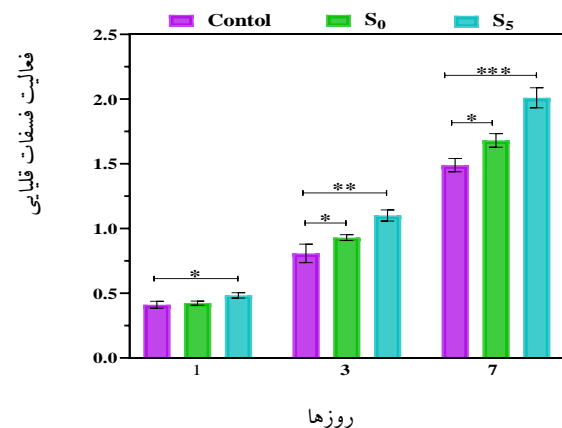


شکل (۱۷): نمودار ستونی درصد بازدهی ضد باکتریایی نمونه‌ها در غلظت ۰.۰۱ g/ml علیه باکتری مرسا

#### ۴- نتیجه گیری

نتایج آزمون‌های پراش پرتو ایکس، طیف‌سنجی تبدیل فوریه فروسرخ و آنالیز پلاسمای جفت شده القایی-طیف‌سنجی نشر اتمی نشان داد که حضور ۵ درصد مولی استرانسیوم در ترکیب شیشه زیست فعال پایه سلیکاتی منجر به کاهش توانایی تشکیل هیدروکسی آپاتایت در سطح شیشه زیست فعال در مجاورت با محلول شبیه‌سازی شده با محیط بدن از سه روز به هفت روز می‌شود. در شیشه‌های زیست فعال پایه سلیکاتی، جانشین شدن بسیار جزئی استرانسیوم بجای کلسیم در شبکه هیدروکسی آپاتایت باعث اشباع سطح شیشه با کاتیون‌های استرانسیوم و اشغال شدن مکان‌های مستعد جوانه زنی هیدروکسی آپاتایت در سطح شیشه‌های زیست فعال حاوی استرانسیوم می‌شود. در این پژوهش تغییرات pH محلول که ناشی از رهایش یون‌هایی نظیر سدیم و کلسیم بود، عامل اصلی خاصیت ضد باکتریایی شیشه زیست فعال حاوی استرانسیوم معرفی گردید. نتایج آزمون زنده/مرده، بررسی ریزساختار هسته و ریز رشته‌های اکتین سلول‌های MC3T3-E1، آزمون MTT، فعالیت فسفات قلیایی و ارزیابی خاصیت ضد باکتریایی شیشه‌های زیست فعال اصلاح شده نشان می‌دهد که مقادیر ۵ درصد مولی استرانسیوم نه تنها سمیت سلولی ایجاد نمی‌کند بلکه منجر به افزایش رشد و تکثیر سلول‌های استئوبلاست MC3T3-E1

ای افزایش پیدا کرده است. همان‌طور که مشاهده می‌شود نمونه  $S_0$  در مقایسه با نمونه کنترل پس از یک روز کشت، سبب افزایش فعالیت فسفات قلیایی سلول‌های استئوبلاست MC3T3-E1 گردیده است ولی هیچ تفاوت قابل ملاحظه‌ای در افزایش فعالیت فسفات قلیایی برای نمونه  $S_0$  در قیاس با کنترل مشاهده نشد ( $p > 0.05$ ). در روز سوم سلول‌های در تماس با نمونه کنترل، در قیاس با هر دو نمونه  $S_0$  ( $p < 0.05$ ) و  $S_5$  ( $p < 0.01$ ) تفاوت قابل ملاحظه‌ای برای افزایش فعالیت فسفات قلیایی از خود نشان دادند. همچنین در روز هفتم، سلول‌های در تماس با نمونه کنترل، در مقایسه با  $S_0$  ( $p < 0.05$ ) و  $S_5$  ( $p < 0.001$ ) از نظر آماری قابل ملاحظه بود. همان‌طور که پیشتر اشاره گردید، تأثیر مثبت  $Si^{2+}$  در ترکیب شیشه زیست فعال منجر به افزایش فعالیت فسفات قلیایی سلول‌های استئوبلاست می‌شود. نتایج نشان داد بررسی فعالیت فسفات قلیایی سلول‌های استئوبلاست MC3T3-E1 کشت شده در تماس با شیشه‌های زیست فعال حاوی  $S_5$  باعث افزایش قابل ملاحظه‌ای در فعالیت فسفات قلیایی سلول‌ها می‌شود.



شکل (۱۶): نمودار ستونی نتایج آزمون ALP سلول‌های MC3T3-E1

#### ۳-۸-۴- ارزیابی خاصیت ضد باکتریایی

حضور ۵ درصد مولی استرانسیوم در ترکیب شیمیایی شیشه زیست فعال پایه سلیکاتی منجر به افزایش قابل توجه خاصیت ضد باکتریایی شیشه‌های زیست فعال می‌شود. در شکل ۱۷ خاصیت ضد باکتریایی شیشه‌های زیست فعال حاوی  $S_5$

[6] م. خورسند قابینی، "بررسی خصوصیات حرارتی کامپوزیت پلی لاکتیک اسید با ذرات شیشه زیست فعال ۴۵S۵ و هیدروکسی آپاتیت (HA) به منظور استفاده در پیچ‌های تداخلی قابل جذب"، فصلنامه علمی- پژوهشی فرآیندهای نوین در مهندسی مواد، سال یازدهم، شماره ۴، صفحه ۵۵-۵۶، ۱۳۹۶.

[7] J. R. Jones, P. D. Lee & L. L. Hench, "Hierarchical porous materials for tissue engineering," Philos. Trans. R. Soc. London A Math. Phys. Eng. Sci., vol. 364, no. 1838, 2006.

[8] M. Vallet-Regí, A. Zavras, D. Greenspan, S. Amar, T. Yamamuro, T. Nakamura, T. Yamamuro, J. Ross, S. A. Goldstein, J. B. Jupiter & D. I. Rosental, "Ceramics for medical applications," J. Chem. Soc. Dalton Trans., vol. 19, no. 2, pp. 97-108, 2001.

[9] I. A. Silver, J. Deas & M. Erecińska, "Interactions of bioactive glasses with osteoblasts in vitro: effects of 45S5 Bioglass®, and 58S and 77S bioactive glasses on metabolism, intracellular ion concentrations and cell viability," Biomaterials, vol. 22, no. 2, pp. 175-185, 2001.

[۱۰] م. نصر اصفهانی، "مقایسه خواص فیزیکی- شیمیایی سه نوع پوشش نانو ساختار شیشه زیست فعال و زیست فعالی آن‌ها"، فصلنامه علمی- پژوهشی فرآیندهای نوین در مهندسی مواد، سال سوم، شماره ۱، صفحه ۲۹-۳۵، ۱۳۸۸.

[11] X. Chen, Y. Meng, Y. Li & N. Zhao, "Investigation on bio-mineralization of melt and sol-gel derived bioactive glasses," Appl. Surf. Sci., vol. 255, no. 2, pp. 562-564, 2008.

[12] D. Arcos, D. C. Greenspan & M. Vallet-Regí, "A new quantitative method to evaluate the in vitro bioactivity of melt and sol-gel-derived silicate glasses," J. Biomed. Mater. Res. Part A, vol. 65A, no. 3, pp. 344-351, 2003.

[13] M. D. O'Donnell, P. L. Candarlioglu, C. A. Miller, E. Gentleman, M. M. Stevens, J. P. Zhong, X. Y. Liu, J. Chang, E. L. Cabarcos, K. D. Luk, W. K. Chan, J. C. Leong & P. J. Meunier, "Materials characterisation and cytotoxic assessment of strontium-substituted bioactive glasses for bone regeneration," J. Mater. Chem., vol. 20, no. 40, p. 8934, 2010.

[14] K. M. Ereiba, A. S. Abd Raboh & A. G. Mostafa, "Characterization of some bioactive glasses based on SiO<sub>2</sub>-CaO-P<sub>2</sub>O<sub>5</sub>-SrO quaternary

با تعداد نسبی سلول‌های زنده بیشتر (کاهش تعداد سلول‌های مرده) تا روز هفتم در محیط کشت می‌شود. علاوه بر آن، در نمونه‌های S0 و S5 دیده می‌شود که هسته و ریز رشته‌های اکتین سلول‌ها به صورت نامنظم پراکنده شده‌اند و جهت‌گیری هذلولی شکل دارند که به عنوان ریزساختار طبیعی برای سلول‌های استئوبلاست معرفی شده‌اند. همچنین با افزایش زمان کشت از یک روز به هفت روز، افزایشی در حدود چهار برابر در تکثیر و فعالیت سلول‌های استئوبلاست MC3T3-E1، در روز هفتم نسبت به روز اول کشت مشاهده می‌شود. با توجه به مشاهدات تأثیر مثبت ۵ درصد مولی استرانسیوم بر روی خواص زیست فعالی، عدم سمیت سلولی و رشد و تکثیر سلولی می‌توان نمونه ۵۸S جایگزین شده با S5 را به عنوان یک گزینه قابل اعتماد در مهندسی بافت استخوان معرفی کرد، ضمن اینکه می‌توان این نمونه را یک گزینه‌ی مطلوب برای آزمون‌های درون‌تنی در مدل حیوانی موش<sup>۵۵</sup> پیشنهاد کرد.

## ۵- مراجع

[1] Q. Fu, E. Saiz, M. N. Rahaman & A. P. Tomsia, "Bioactive glass scaffolds for bone tissue engineering: state of the art and future perspectives," Mater. Sci. Eng. C, vol. 31, no. 7, pp. 1245-1256, 2011.

[2] E. Gentleman, Y. C. Fredholm, G. Jell, N. Lotfibakhshaiesh, M. D. O'Donnell, R. G. Hill & M. M. Stevens, "The effects of strontium-substituted bioactive glasses on osteoblasts and osteoclasts in vitro," Biomaterials, vol. 31, no. 14, pp. 3949-3956, 2010.

[3] J. R. Jones, "Review of bioactive glass: From Hench to hybrids," Acta Biomater., vol. 9, no. 1, pp. 4457-4486, 2013.

[۴] م. نصر اصفهانی، "تأثیر تابش نور فرابنفش بر زیست فعالی پوشش‌های هیبریدی نانو ساختار پلی سیلوکسان-تیتانیوم دی‌اکسید- شیشه زیستی به روش سل-ژل"، فصلنامه علمی- پژوهشی فرآیندهای نوین در مهندسی مواد، سال نهم، شماره ۴، صفحه ۱۲۹-۱۳۸، ۱۳۹۴.

[5] H. Yuan, K. Kurashina, J. D. De Bruijn, Y. Li, K. De Groot & X. Zhang, "A preliminary study on osteoinduction of two kinds of calcium phosphate ceramics," Biomaterials, vol. 20, no. 19, pp. 1799-1806, 1999.

- [24] C. E. Yellowley, Z. Li, Z. Zhou, C. R. Jacobs & H. J. Donahue, "Functional Gap Junctions Between Osteocytic and Osteoblastic Cells," *J. Bone Miner. Res.*, vol. 15, no. 2, pp. 209–217, 2010.
- [25] S. Hu, C. Ning, Y. Zhou, L. Chen, K. Lin & J. Chang, "Antibacterial activity of silicate bioceramics," *J. Wuhan Univ. Technol. Sci. Ed.*, vol. 26, no. 2, pp. 226–230, 2011.
- [26] R. Brückner, M. Tylkowski, L. Hupa & D. S. Brauer, "Controlling the ion release from mixed alkali bioactive glasses by varying modifier ionic radii and molar volume," *J. Mater. Chem. B*, vol. 4, no. 18, pp. 3121–3134, 2016.
- [27] M. Tylkowski & D. S. Brauer, "Mixed alkali effects in Bioglass® 45S5," *J. Non. Cryst. Solids*, vol. 376, pp. 175–181, 2013.
- [28] S. Hesaraki, M. Gholami, S. Vazehrad & S. Shahrabi, "The effect of Sr concentration on bioactivity and biocompatibility of sol-gel derived glasses based on CaO–SrO–SiO<sub>2</sub>–P<sub>2</sub>O<sub>5</sub> quaternary system," *Mater. Sci. Eng. C*, vol. 30, no. 3, pp. 383–390, 2010.
- [29] X. Lu & Y. Leng, "Theoretical analysis of calcium phosphate precipitation in simulated body fluid," *Biomaterials*, vol. 26, no. 10, pp. 1097–1108, Apr. 2005.
- [30] S. Taherkhani & F. Moztarzadeh, "Influence of strontium on the structure and biological properties of sol-gel-derived mesoporous bioactive glass (MBG) powder," *J. Sol-Gel Sci. Technol.*, vol. 78, no. 3, pp. 539–549, 2016.
- [31] C. G. Simon, C. A. Khatri, S. A. Wight & F. W. Wang, "Preliminary report on the biocompatibility of a moldable, resorbable, composite bone graft consisting of calcium phosphate cement and poly (lactide-co-glycolide) microspheres," *J. Orthop. Res.*, vol. 20, no. 3, pp. 473–482, 2002.
- [32] P. Valerio, M. M. Pereira, A. M. Goes & M. F. Leite, "The effect of ionic products from bioactive glass dissolution on osteoblast proliferation and collagen production," *Biomaterials*, vol. 25, no. 15, pp. 2941–2948, 2004.
- [33] J. Liu, S. C. F. Rawlinson, R. G. Hill & F. Fortune, "Strontium-substituted bioactive glasses in vitro osteogenic and antibacterial effects," *Dent. Mater.*, vol. 32, no. 3, pp. 412–422, 2016.
- system prepared by sol-gel method," *Nat. Sci.*, vol. 12, no. 5, 2014.
- [15] E. Bonnelye, A. Chabadel, F. Saltel & P. Jurdic, "Dual effect of strontium ranelate: Stimulation of osteoblast differentiation and inhibition of osteoclast formation and resorption in vitro," *Bone*, vol. 42, no. 1, pp. 129–138, 2008.
- [16] P. G. Galliano, A. L. Cavaliere & J. M. Porto Lopez, "A study by density measurements and indentation tests of a calcium silicophosphate bioactive glass with different MgO or SrO contents," *J. Non. Cryst. Solids*, vol. 191, no. 3, pp. 311–320, 1995.
- [17] J. Christie & N. De Leeuw, "Effect of strontium inclusion on the bioactivity of phosphate-based glasses," *J. Mater. Sci.*, 2017.
- [18] A. Nommeots-Nomm, S. Labbaf, A. Devlin, N. Todd, H. Geng, A. K. Solanki, H. M. Tang, P. Perdika, A. Pinna, F. Ejeian, O. Tsigkou, P. D. Lee, M. H. N. Esfahani, C. A. Mitchell & J. R. Jones, "Highly degradable porous melt-derived bioactive glass foam scaffolds for bone regeneration," *Acta Biomater.*, vol. 57, pp. 449–461, 2017.
- [19] T. Kokubo, H. Kushitani, S. Sakka, T. Kitsugi & T. Yamamuro, "Solutions able to reproduce in vivo surface-structure changes in bioactive glass-ceramic A-W3," *J. Biomed. Mater. Res.*, vol. 24, no. 6, pp. 721–734, 1990.
- [20] A. Oyane, H.-M. Kim, T. Furuya, T. Kokubo, T. Miyazaki & T. Nakamura, "Preparation and assessment of revised simulated body fluids," *J. Biomed. Mater. Res.*, vol. 65A, no. 2, pp. 188–195, 2003.
- [21] D. S. Brauer, R. Brückner, M. Tylkowski & L. Hupa, "Sodium-free mixed alkali bioactive glasses," *Biomed. Glas.*, vol. 2, no. 1, 2016.
- [22] Y. Gotoh, K. Hiraiwa & M. Nagayama, "In vitro mineralization of osteoblastic cells derived from human bone.," *Bone Miner.*, vol. 8, no. 3, pp. 239–50, 1990.
- [23] H. M. Elgendy, M. E. Norman, A. R. Keaton & C. T. Laurencin, "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.

- |  |   |
|--|---|
| [31] X-Ray Diffraction (XRD)                 | [1] Bone Tissue Engineering   |
| [32] Fourier Transform Infrared Spectroscopy | [2] Repair  |
| [33] ICP-AES                                 | [3] Defects   |
| [34] Scanning Electron Microscope (SEM)      | [4] Osteoporosis  |
| [35] Cell Viability                          | [5] Bioactivity   |
| [36] Live/Dead Assay                         | [6] Biological  |
| [37] Cell Seeding                            | [7] Implantation  |
| [38] Cell Medium                             | [8] Clinical  |
| [39] Phosphate-Buffered Saline (PBS)         | [9] Bioactive Glasses   |
| [40] Cell Proliferation                      | [10] Biological Solutions   |
| [41] Formazan Crystals                       | [11] Hydroxy-Carbonate Apatite (HCA)  |
| [42] Dimethyl Sulfoxide (DMSO)               | [12] Simulated Body Fluid (SBF)   |
| [43] Optical Density (OD)                    | [13] Bone Cell Proliferation  |
| [44] Microplate Reader                       | [14] Incorporated   |
| [45] Alkaline Phosphatase Activity (ALP)     | [15] In Vitro   |
| [46] Tris Buffer                             | [16] In Vivo  |
| [47] Lysogeny Broth (LB)                     | [17] Hench  |
| [48] Suspension                              | [18] Bone Seeking   |
| [49] Agar                                    | [19] Substitute   |
| [50] Antibacterial Efficiency                | [20] Osteogenesis   |
| [51] Ionic Field Strength                    | [21] Galliano et al   |
| [52] Taherkhani et al                        | [22] Christi et al  |
| [53] Spindle-Like                            | [23] Nomeots et al  |
| [54] Optical Absorbance                      | [24] 5 Mol% Sro (S5)  |
| [55] Rat                                     | [25] Cellular Toxicity  |
|  | [26] Antibacterial  |
|  | [27] Methicillin-Resistant Staphylococcus Aureus  |
|  | [28] Tadashi Kokubo   |
|  | [29] Process Monitoring   |
|  | [30] Simultaneous Differential Thermal Analysis (DTA) and Thermogravimetry Analysis (TGA) |