Archive of SID

ساخت و ارزیابی خواص زیست فعالی الیاف شیشه سیلیکاتی کلسیم فسفاتی تهیه شده به‌روش الکتروریسی

مهدی شمسی[1]، نادر نظافتی[2*]، سیامک زواره[1] و علی زمانیان[2]

۱ گروه شیمی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه مراغه

۲ گروه بیومواد، پژوهشکده نانوتکنولوژی و مواد پیشرفته، پژوهشگاه مواد و انرژی، کرج

(دریافت مقاله: ۱۳۹۳/۱۰/۱۵ دریافت نسخه نهایی: ۱۳۹۴/۰۳/۰۶)

چکیده — الیاف شیشه زیست فعال بر پایه ترکیب (۶۴ درصد مولی سیلیکا، ۳۱ درصد مولی اکسید کلسیم و ۵ درصد مولی اکسید فسفر) به‌روش سل ژل و با استفاده از فرایند الکتروریسی تهیه شدند. برای بررسی ترکیب فازی شیشه، پیوندهای موجود در ترکیب، ریخت (مورفولوژی) و سطح ویژه الیاف به‌ترتیب از تکنیک‌های پراش پرتو ایکس، طیف سنجی مادون قرمز و میکروسکوپ الکترونی رویشی استفاده شد. تصاویر به‌دست آمده از میکروسکوپ الکترونی رویشی، نانومتری بودن قطر الیاف بعداز عملیات حرارتی را تأیید کرد. آزمونهای پراش پرتو ایکس و طیف سنجی مادون قرمز به‌ترتیب غیربلورین (آمورف) بودن ساختار و حضور گروه‌های سیلانول در ترکیب شیشه را اثبات کرد. برای بررسی زیست فعالی و تخریب‌پذیری، الیاف شیشه زیست فعال درون مایع شبیه‌سازی شده بدن برای دوره‌های زمانی گوناگون غوطه‌ور شدند. تشکیل لایه هیدروکسی آپاتیت بر روی سطح الیاف، به کمک روش‌های شناسایی مختلف تایید شد. میزان تخریب‌پذیری نیز با اندازه گیری وزن نمونه‌ها قبل و بعد از غوطه‌وری در مایع شبیه‌سازی شده بدن صورت گرفت که نتایج آن نیز تشکیل هیدروکسی آپاتیت روی الیاف را تأیید کرد. در ادامه سلول‌های استئویلاست استخوانی انسان از نوع MG-64 بروی سطح الیاف شیشه زیست فعال کشت داده شد. از میکروسکوپ الکترونی رویشی برای بررسی اتصال و چسبندگی سلول‌ها استفاده شد. نتایج تصاویر حاصل، اتصال و چسبندگی مناسب سلول‌ها بر روی سطح نمونه را نشان داد. نتایج آزمون‌های تکثیر سلولی و فعالیت آلکالین فسفاتاز حاکی از آن بود که سلول‌ها از قابلیت رشد و تکثیر مناسبی بر روی الیاف برخوردار بودند.

واژگان کلیدی: الیاف شیشه زیست فعال، الکتروریسی، هیدروکسی آپاتیت، کشت سلول

Synthesis and Characterization of Silicate Calcium Phosphate Bioactive Glass Prepared by Electrospinning Method

M. Shamsi[1], N. Nezafati[2*], S. Zavareh[1] and A. Zamanian[2]

1- Department of Chemistry, Faculty of Science, Maragheh University, Eastern Azerbaijan, Iran
2-Department of Nanotechnology and Advanced Materials, Materials and Energy Research Center, Karaj, Alborz, Iran

* مسئول مکاتبات پست الکترونیکی: n.nezafati@merc.ac.ir

www.SID.ir

Archive of SID

Abstract: *Ternary (%mol) ($64SiO_2$-$31CaO$-$5P_2O_5$) system of sol-gel derived bioactive glass fibers was prepared by electrospinning method. X-ray Fourier transform infrared spectroscopy (FTIR), scanning electron microscopy (SEM) and nitrogen adsorption test (BET) analyses were performed to investigate the phase and chemical group of the composition, morphology of the surface and specific surface area of the fibers, respectively. SEM observations confirmed that the fibers were nano size. The amorphous nature and the presence of silanol groups in the composition were confirmed by XRD and FTIR, respectively. Apatite formation and biodegradability of the fibers were studied using various analyses after different days of soaking in simulated body fluid (SBF). The results affirmed the presence of apatite layers on the surface of the fibers. Cell culture evaluation indicated that MG-64 human osteoblast-like cells were attached and spread well on the surface. Furthermore, cell viability and cell growth demonstrated that the cells were grown and reproduced well on the fibers.*

Keywords: *Bioactive glass fibers, Electrospinning, Hydroxyapatite, Cell culture*

۱- مقدمه

مواد زیستی گروهی از مواد طبیعی و یا مصنوعی هستند که از آنها برای جایگزینی بخشی از بدن انسان یا موجود زنده یا برای کارکرد درتماس با بافت زنده استفاده می‌شود [۱]. شیشه زیست فعال از جزء مواد زیستی است که توانایی پیوند شیمیایی با بافت سخت و نرم را دارد [۲ ، ۳]. یکی از انواع شیشه‌های زیست‌فعال که توانایی ایجاد پیوند با استخوان را دارند، شیشه بر پایه سیستم سه جزئی (اکسید سیلیسیوم، اکسید کلسیم و اکسید فسفر) است. این شیشه در برابر محلول شبیه‌سازی شده بدن تشکیل هیدروکسی آپاتیت می‌دهد و در بسیاری از موارد بالینی که نیاز به تولید و ترمیم استخوان است می‌تواند کاربرد داشته باشد [۴، ۵]. شیشه زیست‌فعال را می‌توان به دو روش ذوبی و سل ژل تهیه نمود. اما روش سل ژل به‌دلیل دمای تولید پایین‌تر، کنترل آسان بر روی متغیرها، خلوص بالا و همگن بودن ترکیب بیش‌تر مورد توجه قرار گرفته است [۶، ۷]. شیشه زیست‌فعال تولید شده به‌روش سل ژل دارای زیست سازگاری بالاتری است. این افزایش خاصیت زیست سازگاری به‌دلیل تخلخل‌هایی با ابعاد نانو و افزایش سطح است که موجب افزایش سرعت انحلال و تسریع مکانیسم‌های زیست سازگاری است [۸]. تاکنون شیشه زیست فعال در بیشتر بررسی‌ها به‌صورت پودری و توده‌ای (بالک) بررسی و ارزیابی شده است. در بررسی‌هایی نیز که به بررسی ساخت شیشه‌های زیست فعال به‌صورت الیاف پرداخته شده، اندازه‌ها در مقیاس میکرون درنظر گرفته شده است [۹، ۱۰]. روش‌های بسیاری برای تولید نانو الیاف مواد زیستی وجود دارد که شامل روش‌های کشش، ساخت با قالب، تفکیک فازی، خود اتصالی و الکتروریسی می‌شود. روش الکتروریسی به‌دلیل مزیت‌هایی چون تولید الیاف در مقیاس نانو و کنترل ابعاد الیاف، سهولت اجرا و تکرار پذیری یکی از بهترین گزینه‌ها در نظر گرفته شده است. در الکتروریسی از ایجاد یک میدان الکتریکی قوی بین دو الکترود برای کشیدن یک سیال پلیمر و تبدیل به الیاف استفاده می‌شود. تنظیمات اولیه شامل ولتاژ اعمالی، منبع تغذیه پلیمر، جمع‌کننده و فاصله بین جمع‌کننده و نازل است [۱۱]. متغیرهای مهمی بر فرایند الکتروریسی و ریخت (مورفولوژی) الیاف تأثیر دارند که شامل متغیرهای محلول (گرانروی، ضریب هدایت الکتریکی، وزن مولکولی محلول و هدایت الکتریکی) و متغیرهای فرایند (ولتاژ اعمال شده، نرخ تغذیه، نوع جمع کننده، فاصله نازل از جمع کننده و شرایط محیطی) است [۱۱]. الیاف شیشه زیست فعال تولید شده به این روش به‌دلیل سطح ویژه بالا و ابعاد مقیاس نانو می‌تواند چسبندگی سلولی را بیش‌تر و در نتیجه قابلیت اتصال با بافت طبیعی را تسریع کنند.

هدف از ساخت الیاف شیشه زیست فعال، استفاده از آن به‌عنوان فاز تقویت کننده زیست فعال در زمینه‌های مختلف سیمانی و فاز زمینه جایگزین استخوان است. با وجود آنکه گزارش‌هایی مبنی بر ساخت الیاف پلیمری مختلف به‌روش الکتروریسی گزارش شده است، اما تا کنون گزارشی در مورد ساخت الیاف شیشه زیست فعال با استفاده از روش الکتروریسی با چنین ترکیبی بیان نشده است. در این پژوهش،

www.SID.ir

Archive of SID

این نوع شیشه که دارای سیستم سه جزئی اکسید فسفر، اکسید سیلسیم و اکسید کلسیم با ترکیب مشخص است با استفاده از روش سل ژل تهیه و الیاف مورد نظر به‌روش الکتروریسی تولید شدند. در حین الکتروریسی تأثیر متغیرهای مهم الکتروریسی در قطر و ریخت الیاف مورد بررسی و ارزیابی قرار گرفت. سپس با تعیین، بهینه متغیرهای مؤثر، آزمونهای زیست فعالی و کشت سلولی بروی الیاف شیشه زیست فعال صورت گرفت.

۲- فعالیت‌های تجربی

۲ ۱ مواد و تجهیزات مورد استفاده

مواد اولیه مورد استفاده در این پژوهش عبارت بودند از تری اتیل فسفات[۱]، تترا اتیل اورتوسیلیکات[۲]، هیدروکلریک اسید[۳]، کلسیم نیترات[۴]، پلی وینیل پیرولیدون[۵] و اتانول[۶] که به‌عنوان حلال استفاده شد. تمامی مواد از شرکت مرک آلمان تهیه شدند. تجهیزات مورد استفاده در این پژوهش عبارتنداز دستگاه pH (Istek P25، کره جنوبی)، دستگاه الکتروریسی (ANSTCO-RN/I، ایران)، خشک کن دیجیتال (Memmert UNB400 ، آلمان)، کوره الکتریکی (Azar Furnace-F11L-1250، ایران)، انکوباتور (Memmert-Inc. 108، آلمان)، طیف‌سنج پراش انرژی پرتو ایکس[۷] متصل شده به میکروسکوپ الکترونی روبشی[۸] (CamScan MV2300، آلمان)، طیف سنجی فروسرخ[۹] (Spectrum 400 Perkin Elmer ، آمریکا)، پراش پرتو ایکس[۱۰] (Unisantis-Xmd 300، آلمان).

۲ ۲ ساخت سل شیشه زیست فعال

در ابتدا مقدار ۷/۱۸ میلی‌لیتر تترا اتیل اورتوسیلیکات به ۵۰ میلی‌لیتر اتانول (حلال) افزوده و توسط همزن مغناطیسی به‌مدت ۲۰دقیقه به آرامی هم‌زده شد. سپس ۰/۵۴میلی‌لیتر هیدروکلریک اسید به محلول فوق اضافه و به‌مدت ۲۰ دقیقه دیگر نیز هم‌زده شد تا محلول کاملاً یکنواخت و همگن به‌دست آید. مجدداً مقدار ۰/۵ میلی‌لیتر تترا اتیل فسفات به محلول افزوده و محلول نیز ۱۰دقیقه هم‌زده شد. درنهایت مقدار ۱/۴۸ گرم کلسیم نیترات چهارآبه، به محلول اضافه و به مدت ۲ ساعت دیگر هم‌زده شد. پس زمان معین هم‌خوردن، محلول کاملاً شفاف، همگن و بدون رسوب تشکیل شد. برای ممانعت از خروج مواد در اثر تبخیر، درب ظرف حاوی سل شیشه زیست فعال آب‌بندی شد.

۲ ۳ ساخت محلول پلیمری شیشه زیست فعال برای الکتروریسی

برای تهیه محلول پلیمری مناسب برای الکتروریسی مقدار ۶ گرم پلی وینیل پیرولیدون به ۵۰ میلی‌لیتر اتانول اضافه شد. محلول فوق توسط همزن مغناطیسی به مدت ۳۰ دقیقه برای حل شدن کامل پلی وینیل پیرولیدون هم‌زده شد. پس از حل شدن کامل پلی وینیل پیرولیدون و شفاف شدن محلول، مقدار ۲۵ میلی‌لیتر سل شیشه زیست فعال به آرامی به محلول اشاره شده افزوده و در نهایت به مدت ۴ ساعت دیگر نیز هم‌زده شد. برای تسریع فرایند آماده‌سازی محلول، دمای ۵۰ درجه سانتی‌گراد توسط همزن، به محلول اعمال شد. غلظت محلول در این پژوهش مطابق با رابطه۱ ارزیابی شد. بر اساس محاسبات انجام شده، غلظت محلول ۰/۰۸۴ گرم بر میلی‌لیتر به‌دست آمد. مقدار pH محلول نیز اندازه گرفته شده و برابر ۱/۵ ثبت شد.

$$\text{غلظت محلول} = \frac{\text{(گرم) مقدار پلی وینیل پیرولیدون}}{\text{(میلی‌لیتر) (حجم سل + حجم اتانول)}} \quad (۱)$$

۲ ۴ الکتروریسی محلول پلیمری شیشه زیست فعال

برای تهیه الیاف از دستگاه الکتروریسی استفاده شد. محلول در یک سرنگ پلاستیکی ۱۰ میلی‌لیتر مخصوص دستگاه با سرسوزنی از جنس فولاد زنگ نزن با قطر خارجی ۲۴ گیج (معادل ۰/۵۶۵۲ میلی‌متر) که به یک منبع ولتاژ بالا نصب است انتقال داده شد. تنظیمات دستگاه به‌صورت ولتاژ ۱۹ کیلو ولت، نرخ تغذیه ۰/۸ میلی‌لیتر بر ساعت و

www.SID.ir

Archive of SID

شکل ۱- تصویر الیاف شیشه زیست فعال پس از الکتروریسی با ولتاژ ۱۹ کیلو وات، نرخ تغذیه ۰/۸ میلی‌لیتر بر ساعت و فاصله نازل تا جمع‌کننده (جمع‌کننده ثابت) ۱۰۰ میلی‌متر

فاصله نازل تا جمع کننده (جمع کننده ثابت) ۱۰۰ میلی‌متر درنظر گرفته شد. در ضمن، یک تکه ورقه آلومینیومی برای تمیز بودن فرایند و جمع کردن الیاف تولید شده، روی جمع‌کننده پوشانده شد. باید توجه داشت که این تنظیمات با آزمایش‌های بسیار زیادی برای سهولت در ریسندگی و تولید الیاف با کیفیت بالا ارزیابی و به ثبت رسید.

شکل ۱، تصویری از الیاف شیشه زیست فعال تهیه شده به روش الکتروریسی را نشان می‌دهد. پس از آن الیاف حاصل از الکتروریسی توسط خشک‌کن، خشک و برای کلسینه کردن و حذف پلیمر درون کوره در دمای ۶۰۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱ ساعت قرار داده شد. نرخ افزایش دما ۵ درجه بر دقیقه بود.

۲ ۵ مشخصه یابی الیاف شیشه زیست فعال

برای بررسی ریخت و اندازه‌گیری قطرالیاف پیش و پس از عملیات حرارتی، از میکروسکوپ الکترونی روبشی استفاده شد. هنگام بررسی ریخت و ریزساختار، برای بررسی و تعیین عناصر موجود در شیشه زیست فعال بعداز عملیات حرارتی، از تحلیل عنصری استفاده شد. برای بررسی گروه‌های شیمیایی شیشه زیست فعال، آزمون طیف سنجی فروسرخ در گستره طول موج ۴۰۰-۴۰۰۰ (بر سانتی‌متر) و نیز برای بررسی ساختار و تحلیل فازی، آزمون پراش پرتو ایکس در گستره زاویه بین ۱۰ الی ۹۰ درجه با ولتاژ ۴۵ کیلو ولت و جریان ۳۰ میلی آمپر با کاتد مس صورت گرفت.

۲ ۶ ارزیابی زیست فعالی و تخریب‌پذیری الیاف شیشه زیست فعال

برای ارزیابی زیست فعالی الیاف شیشه زیست فعال از مایع شبیه‌سازی شده بدن[11] استفاده شد. مایع شبیه‌سازی شده بدن طبق دستورالعمل کوکوبو[12] تهیه شد.

الیاف شیشه زیست فعال به‌وسیله هاون عقیق، آسیاب و به پودر تبدیل شد. نمونه‌هایی از پودر الیاف با وزن ۱ گرم در دوره‌های زمانی ۷، ۱۴ و ۲۱ روز به‌صورت مجزا در ۱۰ میلی‌لیتر مایع شبیه‌سازی شده بدن غوطه‌ور و در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد درون انکوباتور قرار داده شد. پس از پایان دوره، نمونه‌ها از مایع شبیه‌سازی شده بدن جدا و برای خارج کردن نمک‌ها با آب مقطر شستشو و درون خشک‌کن در دمای ۳۷ درجه خشک شد. پس از خشک شدن کامل، برای هر نمونه، آزمون میکروسکوپ الکترونی روبشی، طیف سنجی مادون قرمز و تحلیل پراش پرتو ایکس انجام شد. آزمون تخریب‌پذیری نیز با اندازه‌گیری وزن الیاف‌ها قبل و بعداز غوطه‌وری در محلول ارزیابی شد.

۲ ۷ بررسی آزمون کشت سلولی

برای انجام کشت سلولی نمونه ای دیسکی شکل (قطر ۵ میلی‌متر و ضخامت ۳ میلی‌متر) از الیاف شیشه زیست فعال ساخته شد. برای ساخت نمونه از دستگاه پرس، با اعمال تنظیمات دستگاه با فشار ۵ بار و دور موتور ۵۰۰ دور بردقیقه استفاده شد. در ادامه برای کشت سلول تعداد 10^4 سلول استخوان استئوبلاست انسانی نوع MG-64 روی قطعه دیسکی

www.SID.ir

Archive of SID

شکل قرار داده شد. برای چسبیدن سلول‌ها، نمونه‌ها به‌مدت ۳ ساعت درون انکوباتور کشت سلولی با دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد، حاوی ۵٪ دی اکسید کربن و۸۸٪ رطوبت قرار داده شدند. پس از سپری شدن زمان فوق، به‌میزان ۵۰۰ میکرو لیتر محیط کشت یاد شده به هر خانه اضافه و پلیت مد نظر به‌مدت ۴۸ ساعت دیگر درون انکوباتور با شرایط فوق قرار داده شد. پس از سپری شدن زمان یاد شده، کلیه محیط کشت موجود در هر خانه از پلیت، خارج و به هر خانه به میزان ۵۰۰ میکرو لیتر گلوترآلدهید ۴٪ برای فیکس سلول‌ها اضافه شد. پلیت به‌مدت ۳۰ دقیقه در دمای محیط قرار داده شده، سپس محلول اشاره شده خارج شد. در نهایت هر دیسک، با استفاده از محلول فسفات بافر سالین[۱۳] سه مرتبه شستشو داده شد. برای بررسی اتصال و چسبندگی سلول‌های استخوانی به سطح نمونه، از آزمون میکروسکوپ الکترونی روبشی استفاده شد. برای بررسی کمی سمیت سلولی، و یا به‌عبارتی زیست سازگاری نمونه‌ها، از آزمون تکثیر سلولی استفاده شد. فعالیت آلکالین فسفاتاز نیز برای بررسی فعالیت سلول‌ها مورد ارزیابی واقع شد. این آزمایش‌ها برای نمونه شاهد (پلی استایرن) و نمونه الیاف شیشه زیست فعال، چهار بار تکرار و در نهایت نتایج به ثبت رسید.

۳- نتایج و بحث

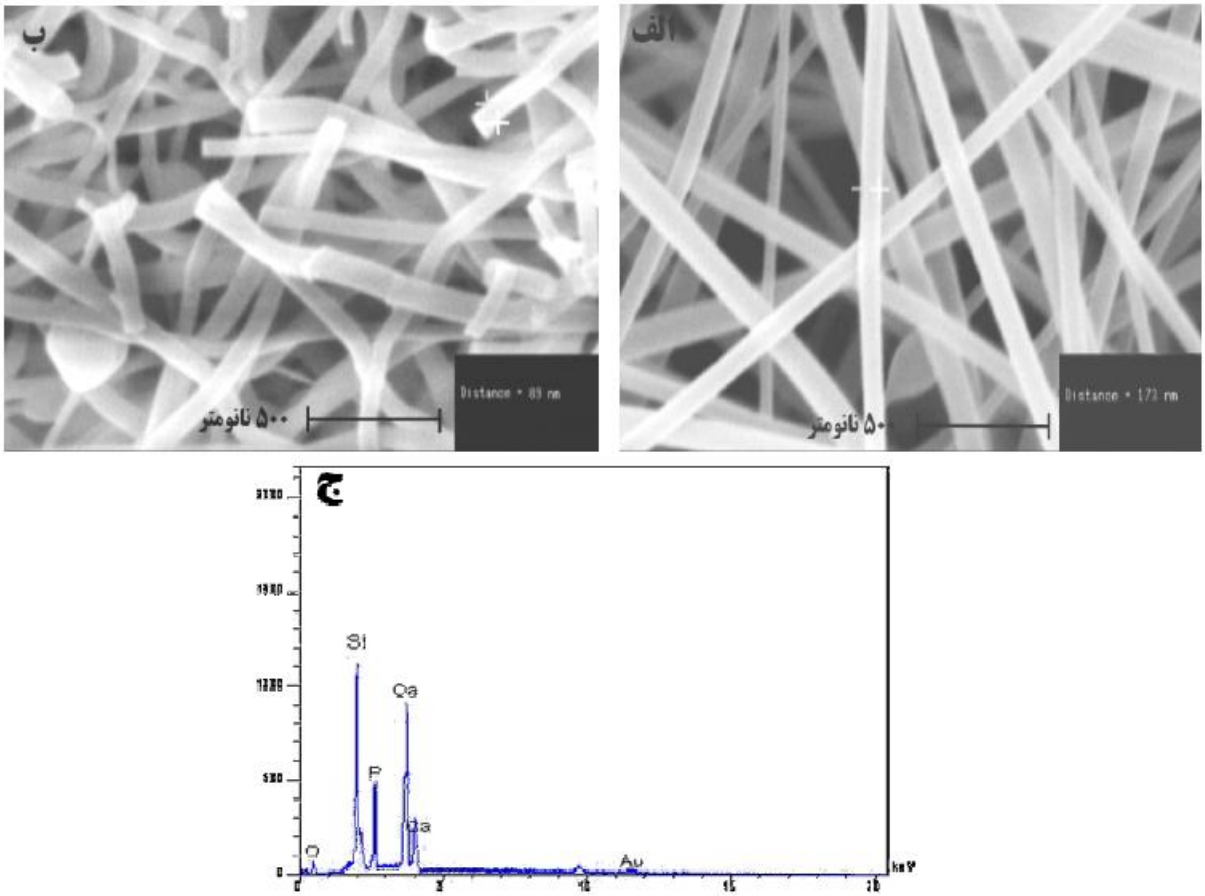
شکل ۲، تصاویر به‌دست آمده با میکروسکوپ الکترونی روبشی از الیاف شیشه زیست فعال را پیش و پس از عملیات حرارتی نشان می‌دهد. در این تصاویر، شیشه زیست فعال کاملاً به‌صورت الیاف قابل رویت است. همان‌طور که در شکل مشاهده می‌شود، میانگین قطر الیاف تولید شده پیش از عملیات حرارتی در حدود ۱۳۹ نانومتر است (تصویر الف)، که این قطر پس از عملیات حرارتی یا کلسینه کردن در دمای ۶۰۰ درجه سانتی‌گراد به‌دلیل حذف پلیمر موجود در محلول، به ۸۹ نانومتر رسیده است (تصویر ب). این امر گویای آن است که روش سل ژل و فرایند الکترویسی قابلیت تولید الیاف در مقیاس نانو را دارند. این مقدار قطر به‌دست آمده یک مزیت بزرگ برای ایجاد یک ترکیب نانو ساختار به‌شمار می‌آید. همان‌طور که در تصاویر مشاهده می‌شود، الیاف الکتروریسی شده، فاقد گره و به‌صورت یکنواخت و پیوسته هستند. وجود گره در الیاف عیب محسوب می‌شود که دلیل ایجاد آن مربوط به متغیرهای محلول و فرایند است. به‌طور مثال اگر ولتاژ و فاصله نازل از جمع‌کننده کم باشد، علاوه بر آنکه بر قطر و ریخت الیاف تأثیر می‌گذارد، باعث به‌وجود آمدن گره نیز می‌شود. همچنین، چنانچه ولتاژ و فاصله نازل زیاد باشد، مقدار گره کم‌تر خواهد شد [۱۱، ۱۲]. مقدار نرخ تغذیه اثر چندانی بر گره ندارد. این متغیر بیش‌تر بر قطر الیاف تأثیر دارد و هرچه زیادتر باشد، قطر نیز افزایش پیدا می‌کند. گرانروی و وزن مولکولی نیز بر قطر و ریخت الیاف تأثیر دارند. درگیری‌های زنجیره‌های پلیمری تأثیر مهمی بر گره‌دار شدن الیاف دارد، به‌طوری که چنانچه درگیری زنجیری پلیمر بالا باشد، مقدار گره تولیدی کم‌تر می‌شود. درگیری زنجیره‌های پلیمری با افزایش وزن مولکولی در حلال و افزایش گرانروی به‌وجود می‌آید. عموماً وزن مولکولی بالا در حلال، گرانروی و گیرش زنجیره‌ای بالاتری را سبب می‌شود. گرانروی کم باعث گره دار شدن الیاف می‌شود، و بر عکس با افزایش آن مقدار گره کم‌ترخواهد بود. البته گرانروی نباید تا حدی بالا باشد که مایع، هنگام خروج از نازل خشک شود [۱۳، ۱۴]. غلظت محلول نیز بر ریخت الیاف تأثیر دارد، به‌طوری‌که با افزایش غلظت میزان گرانروی محلول افزایش می‌یابد و در اثر افزایش گرانروی، قطر الیاف افزایش می‌یابد، زیرا افزایش در گرانروی محلول به معنای مقاومت محلول در مقابل کشیده شدن وتوسط بارهای وارد شده بروی جریان شتابدار محلول است [۱۵].

وجود اجزای تشکیل‌دهنده الیاف شیشه زیست فعال، که در طی فرایند سل ژل وارد ساختار شیشه شده بودند، توسط تحلیل عنصری، در تصویر (ج) مشاهده می‌شود. همان‌طور که در تصویر دیده می‌شود عناصر سیلیسیوم، کلسیم و فسفر در ترکیب شیشه وجود دارد.

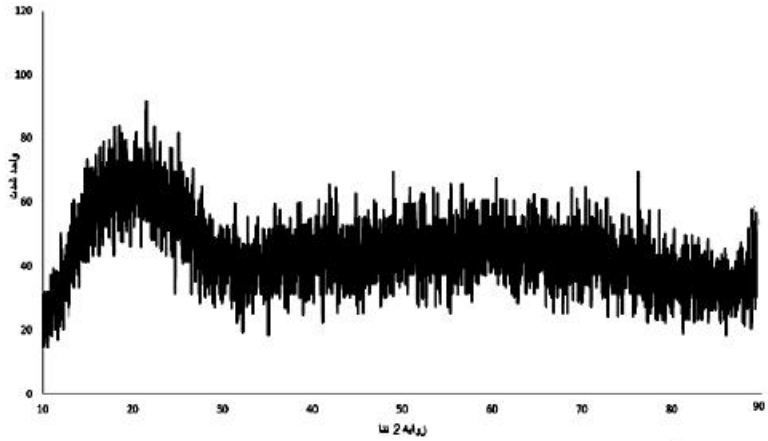
شکل ۳ الگوی پراش پرتو ایکس الیاف شیشه زیست فعال

www.SID.ir

Archive of SID



شکل ۲- تصاویر میکروسکوپی الکترونی روبشی از الیاف شیشه زیست‌فعال پس از الکتروریسی: الف) پیش از عملیات حرارتی با میانگین قطر ۱۳۹ نانومتر، ب) پس از عملیات حرارتی با میانگین قطر الیاف ۸۹ نانومتر و ج) تحلیل عنصری الیاف پس از عملیات حرارتی



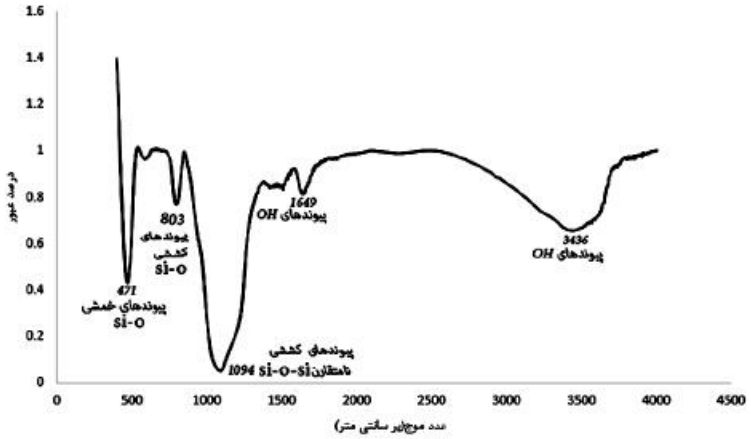
شکل ۳- الگوی پراش پرتو ایکس از الیاف شیشه زیست فعال قبل غوطه‌وری در محلول

را نشان می‌دهد. همان‌طور که در قله‌ها مشخص است ساختار الیاف شیشه کاملاً به‌صورت غیربلورین بوده است. این مطلب با نتایج سایر پژوهشگران توافق دارد که روش سل ژل قادر به تولید ساختار غیربلورین است [۱۶].

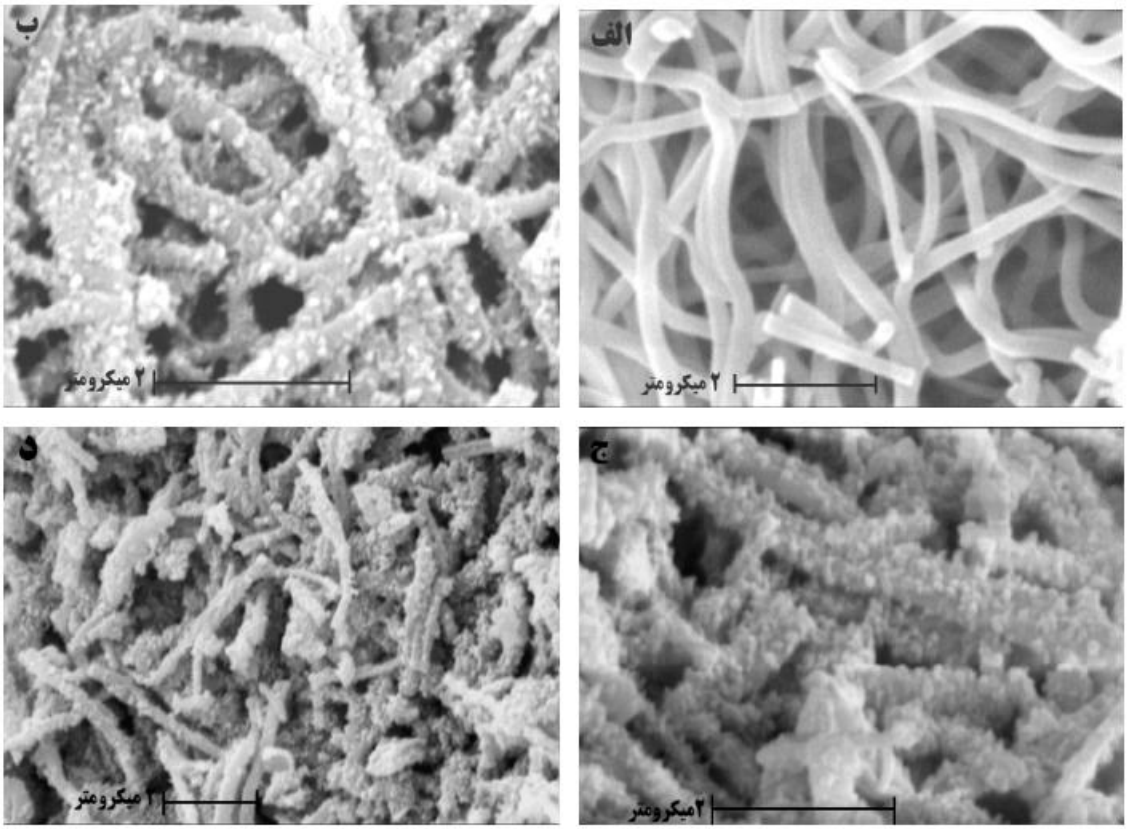
شکل ۴ الگوی طیف سنجی مادون قرمز الیاف شیشه زیست فعال قبل از غوطه‌وری را نشان می‌دهد. قله‌های

www.SID.ir

Archive of SID



شکل ۴- الگوی طیف سنجی مادون قرمز نانو الیاف شیشه زیست‌فعال قبل از غوطه‌وری در محلول شبیه‌سازی شده بدن



شکل ۵- تصاویرمیکروسکوپی الکترونی روبشی الیاف شیشه زیست‌فعال: الف) پیش از غوطه‌وری، ب) پس از ۷ روز غوطه‌وری، ج) پس از ۱۴ روز غوطه‌وری و د) پس از ۲۱ روز غوطه‌وری

موجود در الیاف شیشه زیست فعال عبارت از عدد موج ۴۷۱ (بر سانتی‌متر) مربوط به ارتعاشات خمشی، ۸۰۳ (بر سانتی‌متر) مربوط به ارتعاشات کششی پیوند Si-O و ۱۰۹۴ (بر سانتی‌متر) مربوط به ارتعاشات کششی نامتقارن پیوندهای Si-O-Si است. قله‌های با عدد موج ۳۴۳۶ و ۱۶۴۹ (بر سانتی‌متر) نیز مربوط به پیوندهای OH است [۱۷، ۱۸].

شکل ۵ تصاویر به‌دست آمده از میکروسکوپ الکترونی روبشی نمونه‌های الیاف شیشه زیست فعال پیش و پس از

www.SID.ir

Archive of SID

غوطه‌وری در مایع شبیه‌سازی شده بدن، در مدت زمان‌های ۷، ۱۴ و۲۱ روز را نشان می‌دهد. همان‌طور که در شکل مشاهده می‌شود، بعد از غوطه‌وری در محلول، بلورهای هیدروکسی آپاتیت بر روی سطح الیاف شیشه زیست فعال به‌خوبی تشکیل شده است. دیده می‌شود که ذرات آپاتیت در تمام سطح الیاف به‌طور یکنواخت و پیوسته رشد کرده است. با افزایش زمان غوطه‌وری تشکیل ذرات هیدروکسی آپاتیت به‌میزان بالاتری افزایش پیدا کرده است. اما این میزان در روز ۲۱ تغییر چندانی نداشته، که دلیل آن انحلال فاز آپاتیت است.

میزان تخریب‌پذیری الیاف شیشه زیست فعال در جدول ۱ نشان داده شده است. همان‌طور که دیده می‌شود، نمونه (الف) پس از ۷ روز غوطه‌وری به‌مقدار۰/۰۳ گرم افزایش وزن پیدا کرده است. این تغییر وزن به‌دلیل تشکیل بلورهای آپاتیت روی سطح الیاف است. در نمونه (ب) که ۱۴ روز غوطه‌ور شده بود، این تغییرات بیش‌تر به‌چشم می‌خورد، اما نمونه (ج) به‌دلیل انحلال فاز آپاتیت کاهش وزن پیدا کرده اما هم‌چنان از مقدار اولیه الیاف قبل از غوطه‌وری بیش‌تر است .

شکل (۶)، الگوی پراش پرتو ایکس از نمونه‌های الیاف شیشه زیست‌فعال پس از غوطه‌وری را نشان می‌دهد. حضور قله‌ها در زوایای ۲۶، ۳۲ و ۴۴، گویای وجود بلورهای هیدروکسی آپاتیت است. این قله‌ها پس از ۷ روز غوطه‌وری قابل مشاهده است. پس از ۱۴ روز غوطه‌وری شدت قله‌ها افزایش پیدا کرده است درحالی‌که با گذشت ۲۱ روز غوطه‌وری از شدت آن کاسته شده است.

الگوی طیف سنجی مادون قرمز الیاف شیشه زیست فعال پس از غوطه‌وری در شکل ۷ نشان داده شده است. الگوها تشکیل لایه‌های آپاتیت بر روی الیاف شیشه زیست فعال را تأیید کرد. قله‌های ۶۰۷ و ۵۶۷ (بر سانتی‌متر) مربوط به پیوندهای P-O گروهای فسفات است که پس ازغوطه‌وری در مایع شبیه‌سازی شده بدن، تغییراتی در آن‌ها به‌وجود آمده است. عددهای موج ۴۷۰ و ۸۰۷ (بر سانتی‌متر) مربوط به ارتعاشات کششی و خمشی پیوندهای Si-O و ۱۰۸۸ (بر سانتی‌متر) مربوط به ارتعاشات کششی نامتقارن پیوندهای Si-O-Si است. قله‌های با عدد موج ۳۴۳۶ و ۱۰۳۶ (بر سانتی‌متر) نیز مربوط به پیوندهای OH است[۱۷، ۱۸]. با بررسی الگوها و مقایسه آن‌ها با الگوی قبل از غوطه‌وری، مشخص می‌شود که باند مربوط به پیوند P-O شدت بیش‌تری پیدا کرده است. هم‌چنین، با مقایسه دقیق الگوی نمونه‌های ۷، ۱۴ و ۲۱ روز غوطه‌وری مشخص می‌شود که پس از هفت روز غوطه‌وری قله‌های مربوط به پیوند P-O افزایش پیدا کرده است و در روز ۱۴نیز بر شدت آن افزوده شده است، بدین معنی که فاز هیدروکسی آپاتیتی بیش‌تری تشکیل شده است. البته شدت این قله‌ها پس از ۲۱ روز غوطه‌وری کم شده است که دلیل آن نیز کاهش فاز هیدروکسی آپاتیت به‌دلیل انحلال این فاز با افزایش زمان غوطه‌وری است.

نتایج به‌دست آمده از الگوی طیف سنجی مادون قرمز، به همراه نتایج آزمون پراش پرتوایکس، میکروسکوپ الکترونی و آزمون تخریب پذیری، تطابق و صحت این موضوع را تأیید می‌کند.

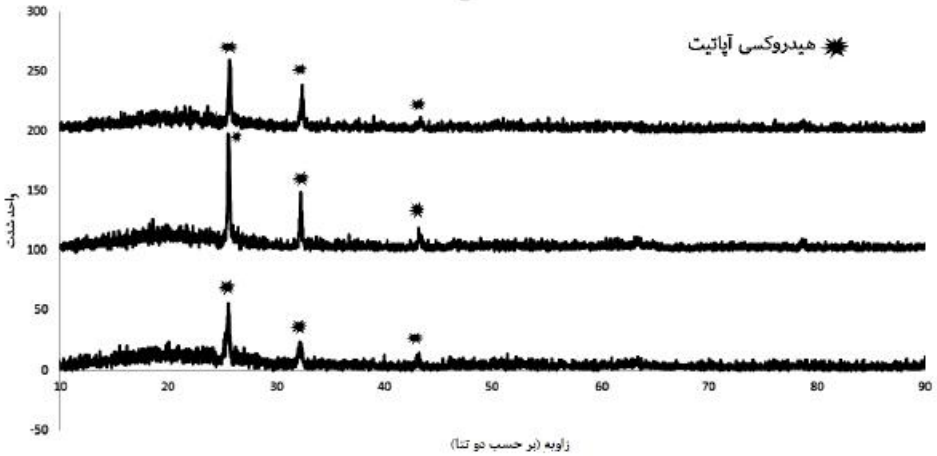
بنابراین، با توجه به بررسی نتایج آزمون‌های یاد شده در این پژوهش، می‌توان تشکیل فاز هیدروکسی آپاتیت بر روی الیاف شیشه زیست‌فعال را در چند مرحله توضیح داد. هنگام قرار دادن الیاف شیشه‌ای تهیه‌شده به‌روش سل‌ژل در محلول آبی به‌طور کلی می‌توان گفت سه فرایند لیچینگ، انحلال و رسوب اتفاق می‌افتد. لیچینگ از طریق رهاشدن عناصر قلیایی، قلیایی خاکی و مبادله آنها با کاتیون‌های H^+ و H_3O^+ انجام می‌شود. مبادله یونی به‌راحتی انجام می‌شود، زیرا این کاتیون‌ها جزء شبکه شیشه نیستند و فقط از طریق تشکیل پیوندهای اکسیژن غیر پل‌زن شبکه را اصلاح می‌کنند. رها شدن یون‌های اصلاح‌کننده شبکه در شیشه‌های زیست فعال، سریع انجام می‌شود. چنین تبادل یونی باعث افزایش pH در فصل مشترک تا مقادیر بیش‌تر از ۷/۴ می‌شود [۱۹، ۲۰]. سپس انحلال با شکستن پیوندهای Si-O-Si ناشی از عمل کردن یون‌های هیدرواکسیل اتفاق می‌افتد. شکستن شبکه به‌طور موضعی رخ

www.SID.ir

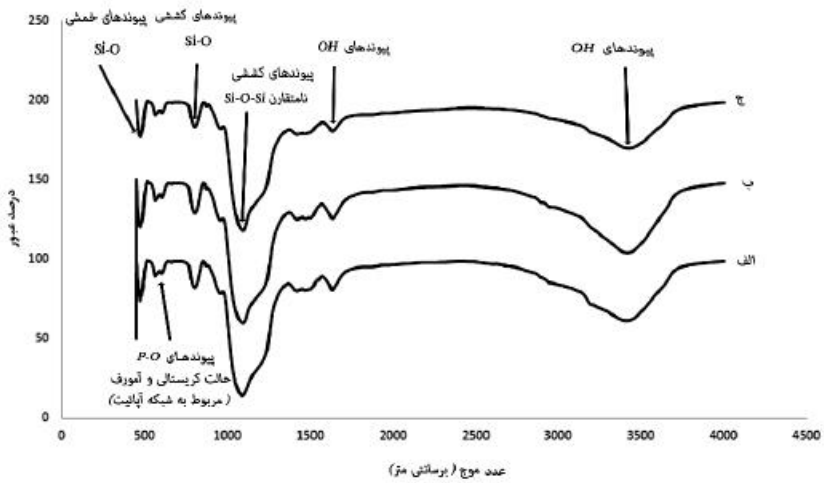
Archive of SID

جدول ۱- میزان تخریب پذیری نمونه‌ها پس از غوطه‌وری در مایع شبیه‌سازی شده بدن به مدت:
الف) ۷ روز، ب) ۱۴ روز و ج) ۲۱ روز

نمونه	وزن الیاف پیش از غوطه‌وری	وزن الیاف پس از غوطه‌وری	تغییرات وزن (گرم)
الف	۰/۲	۰/۲۳	۰/۰۳
ب	۰/۲	۰/۲۷	۰/۰۷
ج	۰/۲	۰/۲۵	۰/۰۵



شکل ۶- الگوی پراش پرتوی ایکس از الیاف شبشه پس از الف) ۷ روز، ب) ۱۴ روز و ج) ۲۱ روز غوطه‌وری



شکل ۷- الگوی طیف سنجی مادون قرمز نانو الیاف شبشه زیست فعال پس از الف) ۷ روز، ب) ۱۴ روز و ج) ۲۱ روز غوطه‌وری

می‌دهد و باعث رها شدن سیلیکا به داخل محلول و تشکیل اسید سیلیسیک $Si(OH)_4$ خواهد شد. سرعت حل شدن سیلیکا به‌شدت به ترکیب شیشه بستگی دارد. در ادامه فرایند به‌دلیل متراکم شدن سیلانل های مجاور، سیلیکای هیدراته (Si-OH) که از طریق این واکنش‌ها بر روی سطح شیشه تشکیل شده بود، دچار آرایش مجدد شده، لایه‌ای غنی از ژل سیلیکا تشکیل می‌شود [۱۹]. در مرحله رسوب، یون‌های کلسیم و فسفات از شیشه رها می‌شوند و همراه با یون‌های موجود در محلول، یک

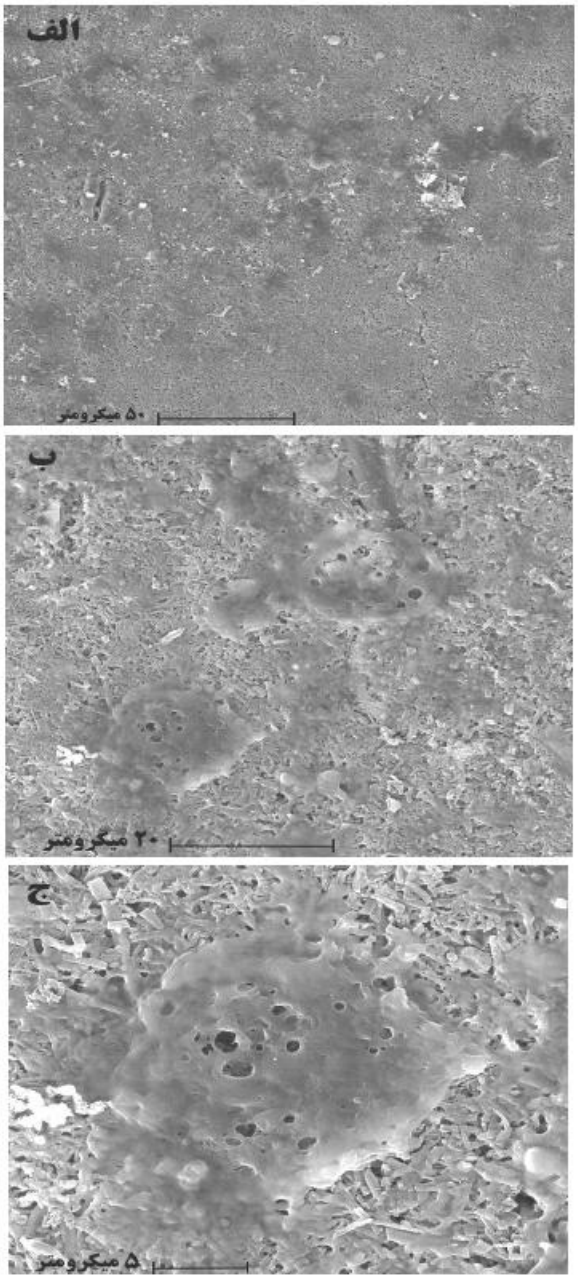
www.SID.ir

Archive of SID

لایه غنی از کلسیم- فسفات بر روی سطح تشکیل می‌دهند. فاز فسفات کلسیم که در سطح ژل تجمع می‌کند در ابتدا غیربلورین است. این فاز غیربلورین، با اضافه شدن یون‌های کربنات از محلول به ساختار آن به ساختار هیدروکسی کربنات آپاتیت بلورین تبدیل می‌شود. مکانیزم جوانه زنی و رشد لایه هیدروکسی کربنات آپاتیت در آزمون‌های آزمایشگاهی و در بدن مشابه است و با حضور سیلیکای هیدراته تسریع می‌شود [۱۹].

شکل ۸ تصاویر به‌دست آمده از میکروسکوپ الکترونی روبشی از اتصال و چسبندگی سلول‌های استخوان استئوبلاست بر روی الیاف شیشه زیست فعال پس از ۴۸ ساعت قرارگیری در محیط کشت را با بزرگ‌نمایی‌های مختلف نشان داده است. تصاویر نشان می‌دهد که سلول‌ها به خوبی به سطح چسبیده، پخش شده‌اند و توانسته‌اند پاهای دروغین با ریخت چندوجهی ایجاد نمایند. هم‌چنین، همان‌طور که دیده می‌شود، سلول‌ها ردپاهایی از ماتریس خارج سلولی از خود به جا گذاشته‌اند. اصولاً برای بررسی درجه زیست‌سازگاری، برای تکثیر سلولی و اتصال، چهار مرحله درنظر گرفته می‌شود که عبارتند از مرحله چسبیدن یا اتصال، مرحله ظاهر شدن پاهای دروغین، مرحله شبکه‌ای شدن و مرحله پهن شدن سلول. بر اساس مشاهدات، الیاف حاضر از نقطه نظر زیست سازگاری در وضعیت درجه چهارم است. از آن‌جا که بحث پذیرش سطح نمونه توسط سلول‌ها از اهمیت ویژه ای برخورداراست، بنابراین هرچه اتصال و چسبندگی سلول‌ها بالا باشد، می‌توان گفت که قابلیت زیست سازگاری و هدایت و رشد استخوان از کیفیت بهتری برخوردار خواهد بود.

شکل ۹ فعالیت آلکالین فسفاتاز نمونه شاهد (پلی استایرن) و نمونه الیاف شیشه زیست‌فعال را نشان داده است. آلکالین فسفاتاز به‌وسیله سلول‌ها تولید می‌شود و به‌عنوان شاخصی برای تفکیک سلول‌های استخوان‌ساز به‌کار می‌رود. همان‌طور که از نتایج مشخص است مقدار فعالیت آلکالین فسفاتاز نمونه الیاف شیشه زیست‌فعال پس از ۴۸ ساعت قرارگیری در محیط کشت



شکل ۸- تصاویر میکروسکوپی الکترونی روبشی در بزرگ‌نمایی‌های مختلف از سلول‌های استخوان استئوبلاست انسانی نوع MG-64 پس از ۴۸ ساعت قرارگیری کشت بر روی الیاف شیشه زیست‌فعال

بالاتر از نمونه شاهد (پلی استایرن) است. وجود اکسید سیلیسیم در ترکیب شیشه‌های زیست فعال از این رو اهمیت دارد که به‌عنوان شبکه ساز در ساختار شیشه عمل می‌کنند. به علاوه

www.SID.ir

Archive of SID

گروه‌های سیلانول حاصل از فرایند تبادل یون‌های کلسیم موجود در ساختار شیشه با هیدرونیوم موجود در محلول، مستعد ایجاد مکان‌هایی برای جوانه زنی کلسیم فسفات هستند [۲۱، ۲۲]. در ضمن، وجود سیلیسیم رهایش یافته از ترکیب شیشه به درون محیط کشت سلول می‌تواند سبب افزایش فعالیت سلولی شود [۲۳، ۲۴]. اکسید فسفر نیز به جوانه‌زنی فاز کلسیم فسفات بر روی سطح شیشه کمک می‌کند [۲۵].

شکل ۱۰ نتایج رشد و تکثیر سلول‌ها را روی نمونه شاهد و نمونه الیاف شیشه زیست‌فعال نشان می‌دهد. همان‌طور که در نتایج مشاهده می‌شود، بیشترین حیات سلولی مربوط به نمونه الیاف شیشه زیست فعال است که بیانگر تکثیر سلول‌ها در مجاورت این نوع نمونه‌ها است. پس می‌توان گفت که الیاف شیشه زیست‌فعال از زیست سازگاری خوبی برخوردار است.

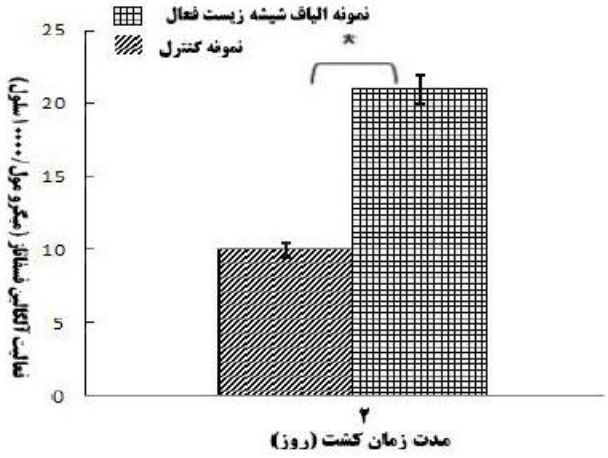
۴- نتیجه‌گیری

دراین پژوهش شیشه زیست‌فعال با ترکیب سه جزئی به‌روش سل ژل تهیه شده، الیاف شیشه زیست فعال به‌روش الکتروریسی با موفقیت از آن تولید شد. نتایج به دست آمده در این پژوهش به‌صورت زیر خلاصه شده است:

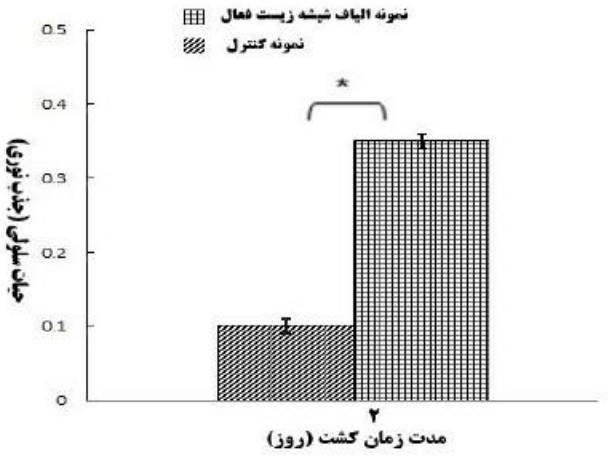
۱- با توجه به نتایج به‌دست آمده در این پژوهش می‌توان گفت که شیشه زیست فعال با ترکیب سه جزئی تهیه شده به‌روش سل ژل با حضور پلیمر پلی وینیل پیرولیدون قابلیت الکتروریسی را دارد.

۲- با غوطه‌وری الیاف شیشه زیست فعال در مایع شبیه‌سازی شده بدن، بلورهای آپاتیت بر روی سطح الیاف تشکیل شد و با افزایش زمان غوطه‌وری میزان تشکیل ذرات آپاتیت بر روی سطح الیاف افزایش پیدا کرد. التبه با افزایش بیش‌تر زمان غوطه‌وری، به‌دلیل انحلال فاز آپاتیت، از مقدار این فاز کاسته شد.

۳- آزمون کشت سلولی نشان داد که سلول‌های استخوان



شکل ۹- فعالیت آلکالین فسفاتاز سلول‌های استئوبلاست استخوان انسانی نوع MG-64، نمونه‌های الیاف شیشه زیست فعال و نمونه شاهد (پلی استایرن) بعداز ۴۸ ساعت قرارگیری در محیط کشت



شکل ۱۰- تکثیر سلولی استئوبلاست استخوان انسانی نوع MG-64 بروی نمونه شاهد (پلی استایرن) و الیاف شیشه زیست فعال بعداز ۴۸ ساعت قرارگیری در محیط کشت

انسانی استئوبلاست نوع MG-64 به‌خوبی بر روی سطح الیاف شیشه زیست فعال به‌صورت یکنواخت رشد پیدا کرده است.

۴- مشخص شد که الیاف شیشه زیست فعال، تکثیر و فعالیت آلکالین فسفاتاز سلول‌های استخوان‌ساز را تشویق می‌کند. این موضوع، مؤید زیست فعالی مناسب الیاف شیشه زیست فعال برد.

www.SID.ir

Archive of SID

۵- با توجه به نتایج این پژوهش، الیاف شیشه زیست فعال تولیدی در این پژوهش دارای زیست فعالی مطلوبی بود و از آن می‌توان به‌عنوان فاز تقویت کننده در کامپوزیت‌های سیمان استخوانی و نیز در کاربردهای مربوط به بازسازی بافت استخوان استفاده نمود.

واژه‌نامه

1. (TEP: $C_6H_{15}O_4P$) (No. 821141)
2. (TEOS:$C_8H_{20}O_4Si$) (No. 800658)
3. (HCl) (No.100317)
4. ($Ca(NO_3)_2.4H_2O$) (No. 22384298)
5. (C_6H_9NO) (No.1074430)
6. (Ethanol:C_2H_5OH) (No.100983)
7. Energy-Dispersive X-ray (EDX)
8. Scanning Electron Microscopy (SEM)
9. Fourier Transform Infrared Spectroscopy (FTIR)
10. X-ray Diffraction analysis (XRD)
11. Simulated Body Fluid (SBF)
12. Kokubo
13. Phosphate Buffered Saline (PBS)

مراجع

1. Waterstrat, R.M., "Brushing Up on the History of Intermetallics in Dentistry", *Journal of the Minerals, Metals & Materials Society,* Vol. 42, pp. 8-14, 1990.
2. Hench, L.L., "The Story of Bioglass", *Journal of Materials Science: Materials in Medicine,* Vol. 17, pp. 967-978, 2006.

۳. راهپیما، س.، فتحی، م.ح.، ابراهیمی کهریزسنگی، ر. و دوست محمدی، ع.، "ساخت و مشخصه یابی پوشش شیشه زیست فعال- زیرکونیا به‌روش سل ژل روی زیر لایه فولاد زنگ نزن ۳۱۶ ال و ارزیابی زیست سازگاری آن"، *مجله مواد نوین*، جلد ۳، شماره ۲، ص.ص. ۹۳-۱۰۴، زمستان ۱۳۹۱.

4. Nabian, N., Jahanshahi, M. and Rabiee., S.M., "Synthesis of Nano-Bioactive Glass-Ceramic Powders and its in vitro Bioactivity M. Study in Bovine Serum Albumin Protein", *Journal of Molecular Structure*, Vol. 998, pp. 37-41, 2011.
5. Li, R., Clark, A.E. and Hench, L.L., "An Investigation of Bioactive Glass Powders by Sol-Gel Processing", *Journal of Applied Biomaterial*, Vol. 2, pp. 231-239, 1991.
6. Cao, W. and Hench, L.L., "Bioactive Materials", *Ceramics International*, Vol. 22, pp. 493-507, 1996.
7. Salehi, S. and Fathi, M.H., "Fabrication and Characterization of Sol-Gel Derived Hydroxyapatite/ Zirconia Composite Nanopowders with Various Yttria Contents", *Ceramics International*, Vol. 36, pp.1659-1667, 2010.
8. Boccaccini, A.R., *Tissue Engineering Using Ceramics and Polymers*, CRC Press, 2007.
9. Nezafati, N., Moztarzadeh, F., Hesaraki, S. and Mozafari, M., "Synergistically Reinforcement of a Self-Setting Calcium Phosphate Cement with Bioactive Glass Fibers", *Ceramics International*, Vol. 37, pp. 927-934, 2011.
10. Nezafati N., Moztarzadeh F., Hesaraki S., Moztarzadeh Z. and Mozafari M., "Biological Response of a Recently Developed Nanocomposite Based on Calcium Phosphate Cement and Sol-Gel Derived Bioactive Glass Fibers as Substitution of Bone Tissues", *Ceramics International*, Vol. 39, pp. 289-297, 2014.
11. Ramakrishna, S., *An Introduction to Electrospinning and Nanofibers*, World Scientific, Singapore, 2005.
12. Heikkil, P. and Harlin, A., "Parameter Study of Electrospinning of Polyamide-6", *European Polymer Journal*, Vol. 44, pp. 3067-3079, 2008.
13. Zuo, W., Zhu, M., Yang, W., Yu, H., Chen, Y. and Zhang, Y., "Experimental Study on Relationship between Jet Instability and Formation of Beaded Fibers during Electrospinning", *Polymer Engineering & Science*, Vol. 45, pp. 704-709, 2005.
14. Tsou, P., *Electrospinning of Silica Nanofibers Characterization and Application to Biosensing*, A&M University, Texas, 2010.
15. He, J.H., Liu, Y. and Wan, Y.Q., *Electrospun Nanofibers and their Application*, p. 251, Shawbury, UK, 2008.
16. Kokubo, T., Kushitani, H., Sakka, S., Kitsugi, T. and Yamamuro., T., "Solutions Able to Reproduce in vivo Surface-Structure Changes in Bioactive Glass-Ceramic A-W3", *Journal of Biomedical Materials Research*, vol.24, pp. 721-734,1990.
17. Balamurugan, A., Sockalingum, G., Michel, J., Faur, J., Banchet, V., Wortham, L., Bouthors, S., Laurent-Maquin, D. and Balossier, G., " Synthesis and Characterisation of Sol Gel Derived Bioactive Glass for Biomedical Applications", *Materials Letter*,

www.SID.ir

Archive of SID

Vol. 60, pp. 3752-3757, 2006.
18. Kim, I.S. and Kumta, P.N., "Sol-gel Synthesis and Characterization of Nanostructured Hydroxyapatite powder", *Materials Science and Engineering*: B, Vol. 111, pp. 232-236, 2004.
19. Skokubo, T., *Bioceramics and their Clinical Applications*, Wood head Pub. and Maney Pub., Cambridge, 2008.
20. Li, N., Jie, Q., Zhu, S. and Wang, R., "A New Route to Prepare Macroporous Bioactive Sol Gel Glasses with High Mechanical Strength", *Materials Letter*, Vol. 58, pp. 2747-2750, 2004.
21. Seeman, E., Devogelaer, J.P., Lorenc, R., Spector, T., Brixen, K., Balogh, A., Stucki, G. and Reginster, J.Y., "Strontium Ranelate Reduces the Risk of Vertebral Fractures in Patients with Osteopenia", *Journal of Bone and Mineral Research*, Vol. 23, pp. 433-438, 2008 .
22. Panzavolta, S., Torricelli, P., Sturba, L., Bracci, B., Giardino, R. and Bigi., A., "Setting Properties and in Vitro Bioactivity of Strontium-Enriched Gelatin-Calcium Phosphate Bone Cements", *Journal of Biomedical Materials Research: A*, Vol. 84, pp. 965-972, 2008
23. Pietak, A.M., Reid, J.W., Stott, M.J. and Sayer., M., "Silicon Substitution in the Calcium Phosphate Bioceramics", *Biomaterials*, Vol. 28, pp. 4023-4032, 2007.
24. Phan, P.V., Grzanna, M., Chu, J., Polotsky, A., El-Ghannam, A., Heerden, D.V., Hungerford, D.S. and Frondoza, C.G., "The Effect of Silica-Containing Calcium-Phosphate Particles on Human Osteoblasts in Vitro", *Journal of Biomedical Materials Research: A*, Vol. 67, pp.1001-1008, 2003
25. Buehler, J., Chappuis, P., Saffar, J.L., Tsouderos, Y. and Vignery, A., "Strontium Ranelate Inhibits Bone Resorption while Maintaining Bone Formation in Alveolar Bone in Monkeys (Macacafascicularis)", *Bone*, Vol. 29, pp. 176-179, 2001.

www.SID.ir