

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

مهدی شمسی^۱، نادر نضافتی^{۲*}، سیامک زواره^۱ و علی زمانیان^۲

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) به روش 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 به ترتیب از تکنیک‌های پراش پرتو ایکس، طیف سنجی مادون قرمز و میکروسکوپ الکترونی روبشی استفاده شد. تصاویر به دست آمده از میکروسکوپ الکترونی روبشی، نانومتری بودن قطر الیاف بعد از عملیات حرارتی را تأیید کرد. آزمونهای پراش پرتو ایکس و طیف سنجی مادون قرمز به ترتیب غیربلورین (آمورف) بودن ساختار و حضور گروه‌های سیلانول در ترکیب شیشه را اثبات کرد. برای بررسی زیست فعالی و تخریب پذیری، الیاف شیشه زیست فعال درون مایع شبیه سازی شده بدن برای دوره‌های زمانی گوناگون غوطه‌ور شدند. تشکیل لایه هیدروکسی آپاتیت بر روی سطح الیاف، به کمک روش‌های شناسایی مختلف تأیید شد. میزان تخریب پذیری نیز با اندازه گیری وزن نمونه‌ها قبل و بعد از غوطه‌وری در مایع شبیه سازی شده بدن صورت گرفت که نتایج آن نیز تشکیل هیدروکسی آپاتیت روی الیاف را تأیید کرد. در ادامه سلول‌های استئوبلاست استخوانی انسان از نوع MG-64 بروی سطح الیاف شیشه زیست فعال کشت داده شد. از میکروسکوپ الکترونی روبشی 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 آلكالین 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. Shamsi¹, N. Nezafati^{2*}, S. Zavareh¹ and A. Zamanian²

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

Abstract: Ternary (%mol) ($64\text{SiO}_2\text{-}31\text{CaO-}5\text{P}_2\text{O}_5$) 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 در تماس 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 زیست فعال 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 شبیه سازی 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 زیست فعال را می‌توان به دو روش ذوبی و سل ژل تهیه نمود. اما روش سل ژل به دلیل دمای تولید پایین تر، کنترل آسان بر روی متغیرها، خلوص بالا و همگن بودن ترکیب بیش تر مورد توجه قرار گرفته است [۶، ۷]. شیشه زیست فعال تولید شده به روش سل ژل دارای زیست سازگاری بالاتری است. این افزایش خاصیت زیست سازگاری به دلیل تخلخل هایی با ابعاد نانو و افزایش سطح است که موجب افزایش سرعت انحلال و تسریع مکانیسم های زیست سازگاری است [۸]. تاکنون شیشه زیست فعال در بیشتر بررسی ها به صورت پودری و توده ای (بالک) بررسی و ارزیابی شده است. در بررسی هایی نیز که به بررسی ساخت شیشه های زیست فعال به صورت الیاف پرداخته شده، اندازه ها در مقیاس میکرون در نظر گرفته شده است [۹، ۱۰]. روش های بسیاری برای تولید نانو

الیاف مواد زیستی وجود دارد که شامل روش های کشش، ساخت با قالب، تفکیک فازی، خود اتصالی و الکتروریسی می شود. روش الکتروریسی به دلیل مزیت هایی چون تولید الیاف در مقیاس نانو و کنترل ابعاد الیاف، سهولت اجرا و تکرار پذیری یکی از بهترین گزینه ها 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 می شود. تنظیمات اولیه شامل ولتاژ اعمالی، منبع تغذیه پلیمر، جمع کننده و فاصله بین جمع کننده 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 به دلیل سطح ویژه بالا و ابعاد مقیاس نانو می تواند چسبندگی سلولی را بیش تر و در نتیجه قابلیت اتصال با بافت طبیعی را تسریع کنند.

هدف از ساخت الیاف شیشه زیست فعال، استفاده از آن به عنوان فاز تقویت کننده زیست فعال در زمینه های مختلف سیمانی و فاز زمینه جایگزین استخوان است. با وجود آنکه گزارش هایی مبنی بر ساخت الیاف پلیمری مختلف به روش 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،

این نوع شیشه که دارای سیستم سه جزئی اکسید فسفر، اکسید سیلیسیم و اکسید کلسیم با ترکیب مشخص است با استفاده از روش سل ژل تهیه و الیاف مورد نظر به روش 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 نترات^۴، پلی وینیل پیرولیدون^۵ و اتانول^۶ که به عنوان حلال استفاده شد. تمامی مواد از شرکت مرک آلمان تهیه شدند. تجهیزات مورد استفاده در این پژوهش عبارتند از دستگاه pH (Istek P25، کره جنوبی)، دستگاه الکتروریسی (ANSTCO-RN/I، ایران)، خشک کن دیجیتالی (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)، طیف‌سنجی فروسرخ^۹ (Spectrum 400 Perkin Elmer، آمریکا)، پراش پرتو ایکس^{۱۰} (Unisantix-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 به مدت ۲۰ دقیقه به آرامی هم‌زده شد. سپس ۰/۵۴ میلی‌لیتر هیدروکلریک اسید به محلول فوق اضافه و به مدت ۲۰ دقیقه دیگر نیز هم‌زده شد تا محلول کاملاً یکنواخت و همگن به دست آید. مجدداً مقدار ۰/۵ میلی‌لیتر تترا اتیل فسفات به محلول

افزوده و محلول نیز ۰ دقیقه هم‌زده شد. در نهایت مقدار ۱/۴۸ گرم کلسیم نترات 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 رابطه ۱ ارزیابی شد. بر اساس محاسبات انجام شده، غلظت محلول ۰/۰۸۴ گرم بر میلی‌لیتر به دست آمد. مقدار pH محلول نیز اندازه گرفته شده و برابر ۱/۵ ثبت شد.

$$(1) \quad \text{مقدار پلی وینیل پیرولیدون} \\ \text{(میلی‌لیتر) (حجم سل + حجم اتانول)} = \text{محلول غلظت}$$

۲-۴- الکتروریسی محلول پلیمری شیشه زیست فعال

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

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.

۶-۲- ارزیابی زیست فعالی و تخریب‌پذیری الیاف شیشه

زیست فعال

برای ارزیابی زیست فعالی الیاف شیشه زیست فعال از مایع شبیه‌سازی شده بدن^{۱۱} استفاده شد. مایع شبیه‌سازی شده بدن طبق دستورالعمل کوکوبو^{۱۲} تهیه شد.

الیاف شیشه زیست فعال به وسیله هاون عقیق، آسیاب و به پودر تبدیل شد. نمونه‌هایی از پودر الیاف با وزن ۱ گرم در دوره‌های زمانی ۷، ۱۴ و ۲۱ روز به صورت 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 بعد از غوطه‌وری در محلول ارزیابی شد.

۷-۲- 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 بر دقیقه استفاده شد. در ادامه برای کشت سلول تعداد ۱۰^۴ سلول استخوان استئوبلاست انسانی نوع MG-64 روی قطعه دیسکی



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

فاصله نازل تا جمع‌کننده (جمع‌کننده ثابت) ۱۰۰ میلی‌متر در نظر 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 الکترورسی را نشان می‌دهد. پس از آن الیاف حاصل از الکترورسی 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.

۵-۲- 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 بعد از عملیات حرارتی، از تحلیل

شکل قرار داده شد. برای چسبیدن سلول‌ها، نمونه‌ها به مدت ۳ ساعت درون انکوباتور کشت سلولی با دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد، حاوی ۵٪ دی اکسید کربن و ۸۸٪ رطوبت قرار داده شدند. پس از سپری شدن زمان فوق، به میزان ۵۰۰ میکرو لیتر محیط کشت یاد شده به هر خانه اضافه و پلیت مد نظر به مدت 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 گلوترآلدئید ۴٪ برای فیکس سلول‌ها اضافه شد. پلیت به مدت 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 به عبارتی زیست سازگاری نمونه‌ها، از آزمون تکثیر سلولی استفاده شد. فعالیت آکالین 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.

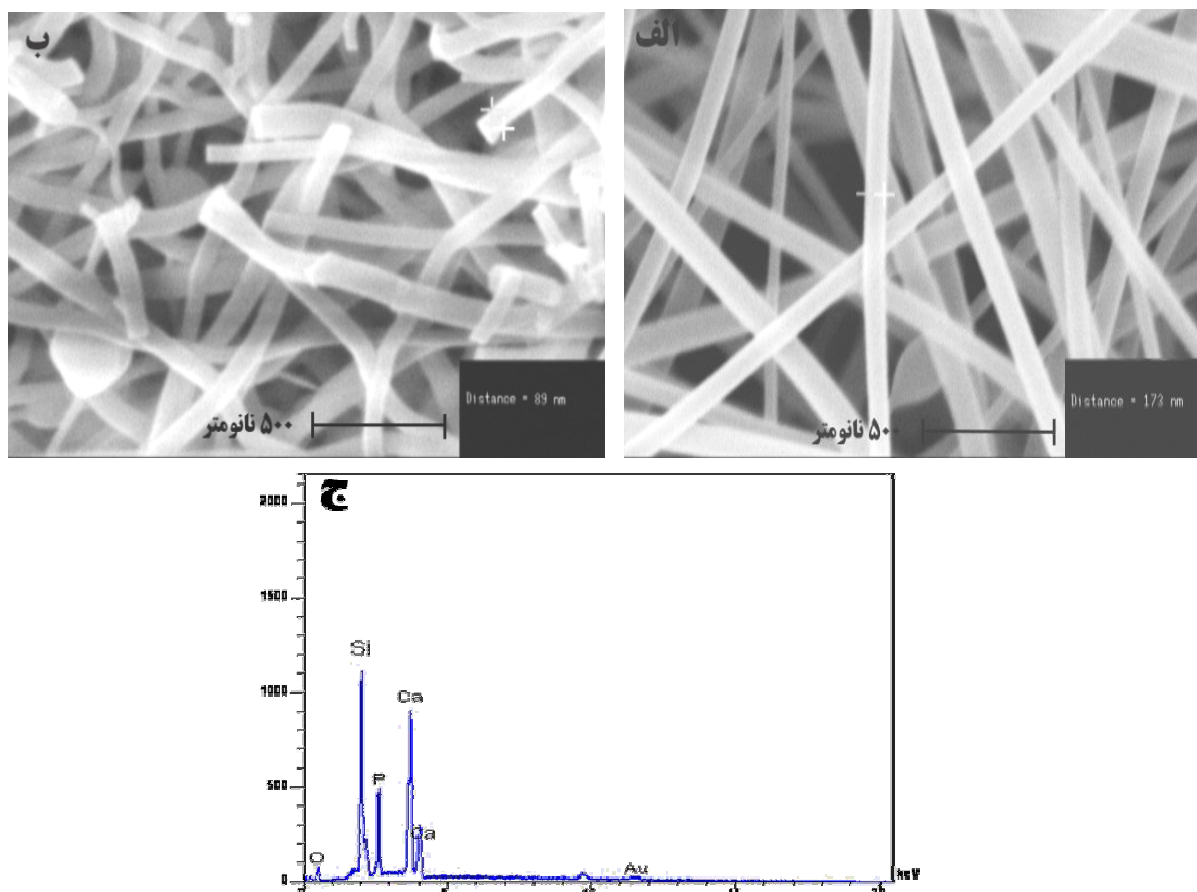
۳- نتایج و بحث

شکل ۲، تصاویر به دست 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 به صورت 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 به دلیل حذف پلیمر موجود در محلول، به ۸۹ نانومتر رسیده است (تصویر ب). این امر گویای آن است که روش سل ژل و فرایند الکترونیسی قابلیت تولید الیاف در مقیاس نانو را دارند. این مقدار قطر به دست آمده یک مزیت

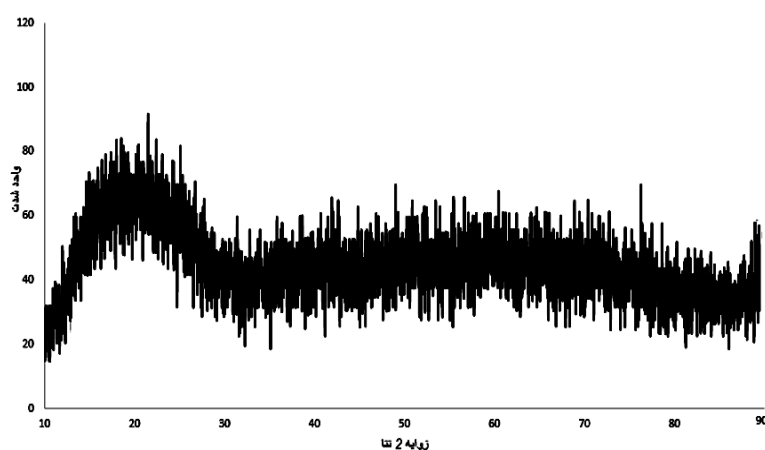
بزرگ برای ایجاد یک ترکیب نانو ساختار به شمار می‌آید. همان‌طور که در تصاویر مشاهده می‌شود، الیاف الکترونیسی شده، فاقد گره و به صورت یکنواخت و پیوسته هستند. وجود گره در الیاف عیب محسوب می‌شود که دلیل ایجاد آن مربوط به متغیرهای محلول و فرایند است. به‌طور مثال اگر ولتاژ و فاصله نازل از جمع‌کننده کم باشد، علاوه بر آنکه بر قطر و ریخت الیاف تأثیر می‌گذارد، باعث به وجود 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. گرانیروی 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 گرانیروی به وجود می‌آید. عموماً وزن مولکولی بالا در حلال، گرانیروی و گیرش زنجیره‌ای بالاتری را سبب می‌شود. گرانیروی کم باعث گره دار شدن الیاف می‌شود، و بر عکس با افزایش آن مقدار گره کم‌تر خواهد بود. البته گرانیروی نباید تا حدی بالا باشد که مایع، هنگام خروج از نازل خشک شود [۱۳، ۱۴]. غلظت محلول نیز بر ریخت الیاف تأثیر دارد، به‌طوری که با افزایش غلظت میزان گرانیروی محلول افزایش می‌یابد و در اثر افزایش گرانیروی، قطر الیاف افزایش می‌یابد، زیرا افزایش در گرانیروی محلول به معنای مقاومت محلول در مقابل کشیده شدن و توسط 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



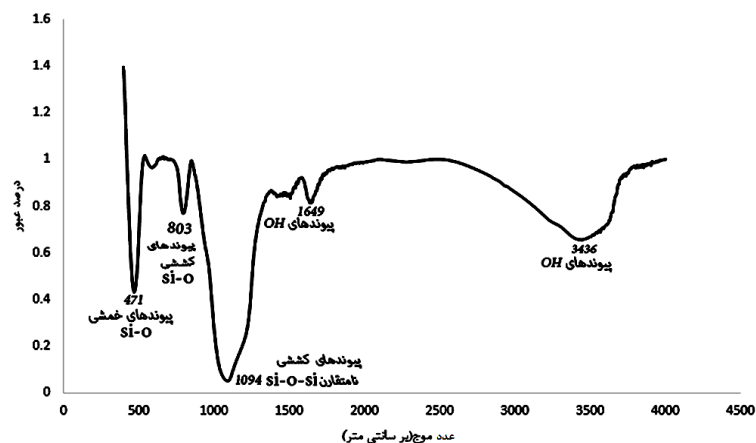
شکل ۲- تصاویر میکروسکوپی الکترونی روبشی از الیاف شیشه زیست فعال پس از الکتروریسی: (الف) پیش از عملیات حرارتی با میانگین قطر ۱۳۹ نانومتر، (ب) پس از عملیات حرارتی با میانگین قطر الیاف ۸۹ نانومتر و (ج) تحلیل عنصری الیاف پس از عملیات حرارتی



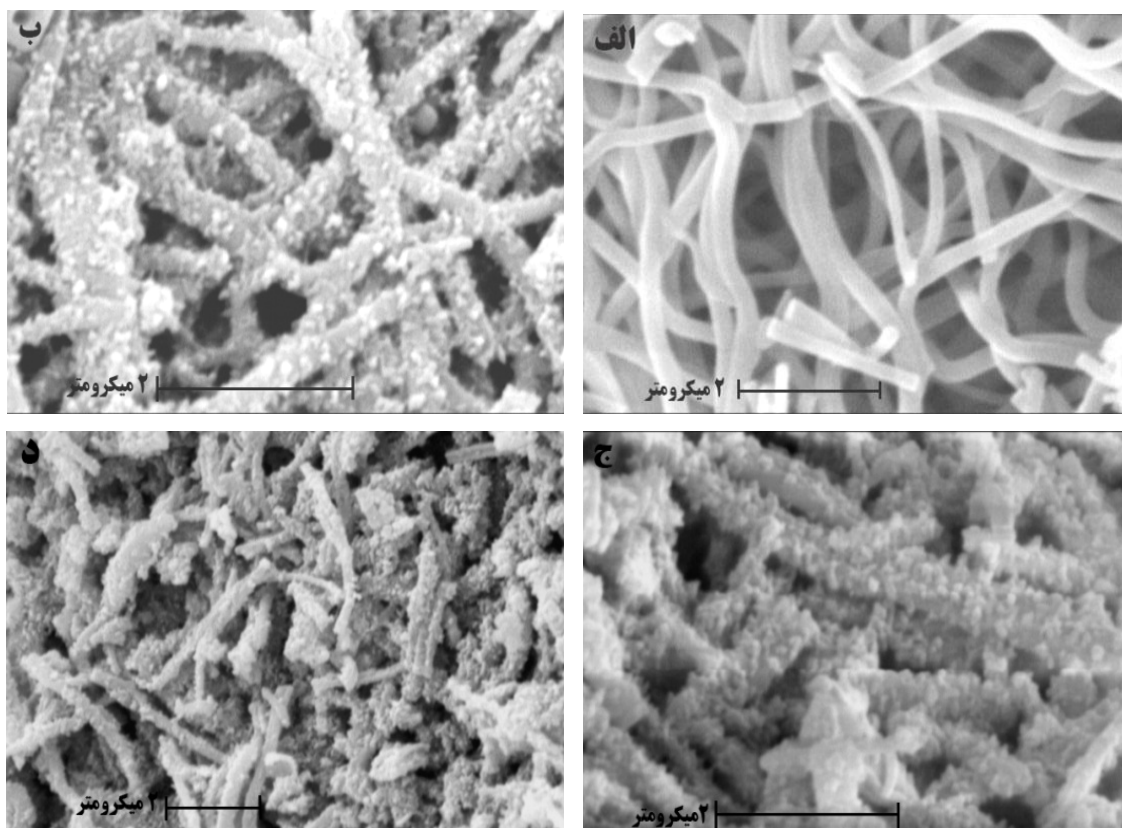
شکل ۳- الگوی پراش پرتو ایکس از الیاف شیشه زیست فعال قبل غوطه‌وری در محلول

را نشان می‌دهد. همان‌طور که در قله‌ها مشخص است ساختار الیاف شیشه کاملاً به صورت 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



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



شکل ۵- تصاویر میکروسکوپی الکترونی روبشی الیاف شیشه زیست فعال: (الف) پیش از غوطه‌وری، (ب) پس از ۷ روز غوطه‌وری، (ج) پس از ۱۴ روز غوطه‌وری و (د) پس از ۲۱ روز غوطه‌وری

وجود 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

مواد پیشرفته در مهندسی، سال ۳۵، شماره ۱، بهار ۱۳۹۵

غوطه‌وری در مایع شبیه‌سازی شده بدن، در مدت زمان‌های ۷، ۱۴ و ۲۱ 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 به مقدار ۰/۰۳ گرم افزایش وزن پیدا کرده است. این تغییر وزن به دلیل تشکیل بلورهای آپاتیت روی سطح الیاف است. در نمونه (ب) که ۱۴ روز غوطه‌ور شده بود، این تغییرات بیش‌تر به چشم می‌خورد، اما نمونه (ج) به دلیل 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 زیست فعال 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 گروه‌های فسفات است که پس از غوطه‌وری در مایع شبیه‌سازی شده بدن، تغییراتی در آن‌ها به وجود 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 ۱۴ نیز 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 به دلیل انحلال این فاز با افزایش زمان غوطه‌وری است.

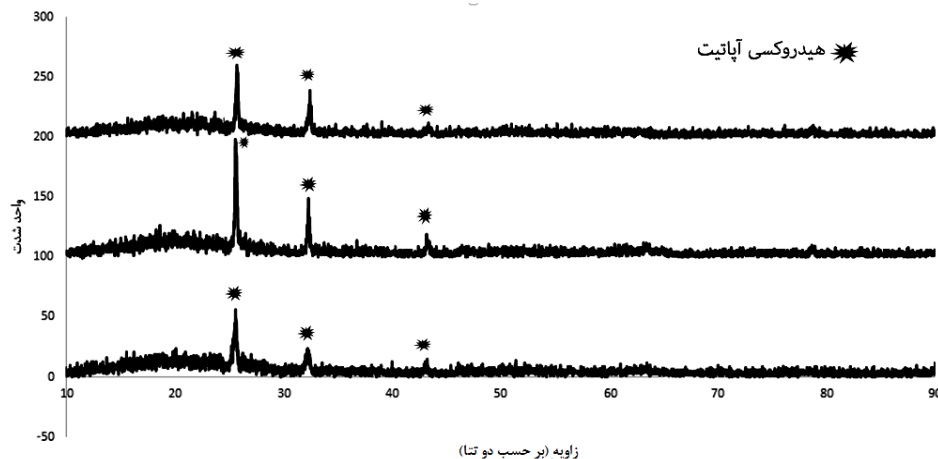
نتایج به دست آمده از الگوی طیف سنجی مادون قرمز، به همراه نتایج آزمون پراش پرتو ایکس، میکروسکوپ الکترونی و آزمون تخریب پذیری، تطابق و صحت این موضوع را تأیید می‌کند.

بنابراین، با توجه به بررسی نتایج آزمون‌های یاد شده در این پژوهش، می‌توان تشکیل فاز هیدروکسی آپاتیت بر روی الیاف شیشه زیست فعال را در چند مرحله توضیح داد. هنگام قرار دادن الیاف شیشه‌ای تهیه شده به روش سل ژل در محلول آبی به‌طور کلی می‌توان گفت سه فرایند لیچینگ، انحلال و رسوب اتفاق می‌افتد. لیچینگ از طریق رها شدن عناصر قلیایی، قلیایی خاکی و مبادله آن‌ها با کاتیون‌های H^+ و H_3O^+ انجام می‌شود. مبادله یونی به راحتی انجام می‌شود، زیرا این کاتیون‌ها جزء شبکه شیشه نیستند و فقط از طریق تشکیل پیوندهای اکسیژن غیر پل زن شبکه را اصلاح می‌کنند. رها شدن یون‌های اصلاح کننده 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 هیدرواکسید اتفاق می‌افتد. شکستن شبکه به‌طور موضعی رخ

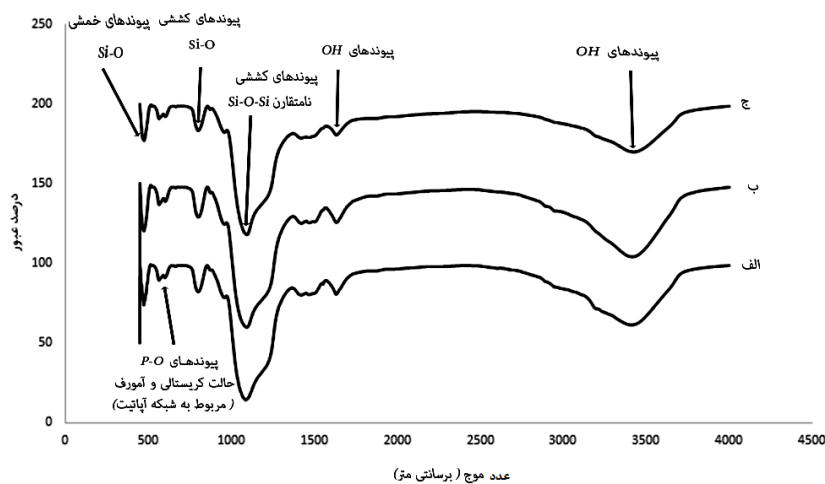
جدول ۱- میزان تخریب پذیری نمونه‌ها پس از غوطه‌وری در مایع شیشه‌سازی شده بدن به مدت:

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



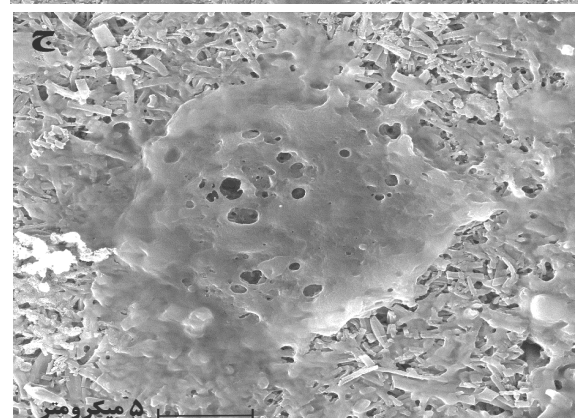
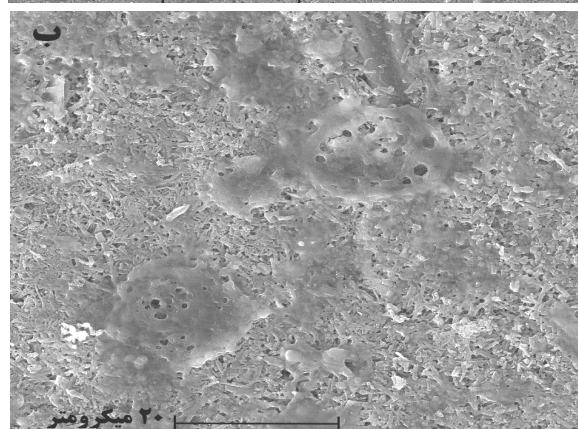
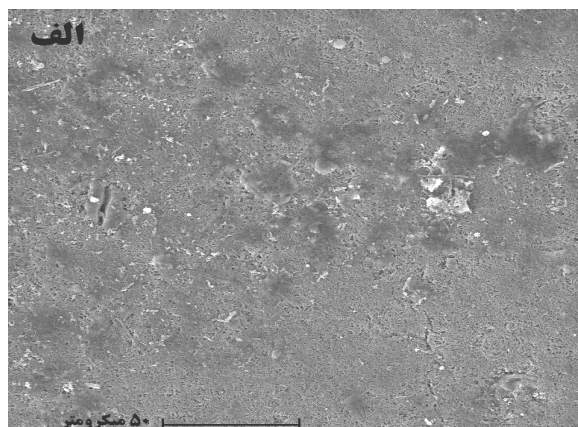
شکل ۶- الگوی پراش پرتوی ایکس از الیاف شیشه پس از الف) ۷ روز، ب) ۱۴ روز و ج) ۲۱ روز غوطه‌وری



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

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

می‌دهد و باعث رها شدن سیلیکا به داخل محلول و تشکیل اسید سیلیسیک Si(OH)_4 خواهد شد. سرعت حل شدن سیلیکا به شدت به ترکیب شیشه بستگی دارد. در ادامه فرایند به دلیل متراکم شدن سیلانل‌های مجاور، سیلیکای هیدراته (Si-OH) که



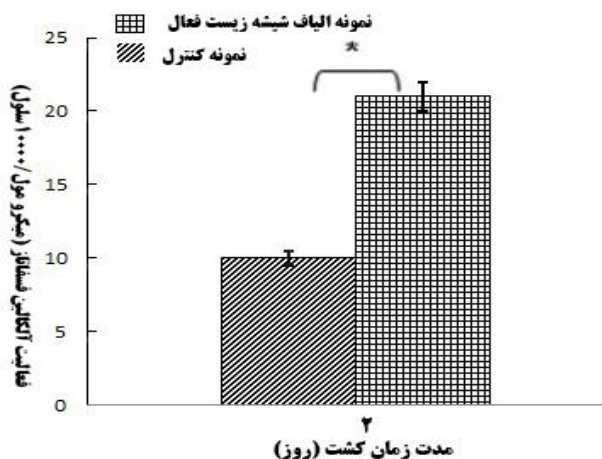
شکل ۸- تصاویر میکروسکوپی الکترونی رویشی در بزرگ‌نمایی‌های مختلف از سلول‌های استخوان استئوبلاست انسانی نوع MG-64 پس از ۴۸ ساعت قرارگیری کشت بر روی الیاف شیشه زیست‌فعال

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

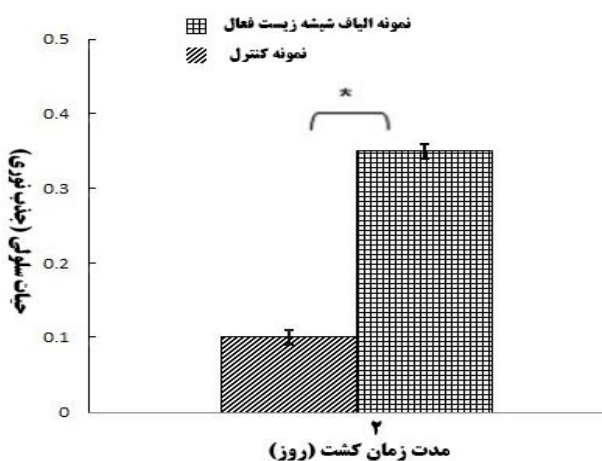
لایه غنی از کلسیم - فسفات بر روی سطح تشکیل می‌دهند. فاز فسفات کلسیم که در سطح ژل تجمع می‌کند در ابتدا غیربلورین است. این فاز غیربلورین، با اضافه شدن یون‌های کربنات از محلول به ساختار آن به ساختار هیدروکسی کربنات آپاتیت بلورین تبدیل می‌شود. مکانیزم جوانه زنی و رشد لایه هیدروکسی کربنات آپاتیت در آزمون‌های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

شکل ۸ تصاویر به‌دست آمده از میکروسکوپ الکترونی رویشی 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 در نظر 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 ویژه‌ای برخوردار است، 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 آلكالین فسفاتاز نمونه شاهد (پلی استایرن) و نمونه الیاف شیشه زیست فعال را نشان داده است. آلكالین فسفاتاز به‌وسیله سلول‌ها تولید می‌شود و به‌عنوان شاخصی برای تفکیک سلول‌های استخوان‌ساز به‌کار می‌رود. همان‌طور که از نتایج مشخص است مقدار فعالیت آلكالین فسفاتاز نمونه الیاف شیشه زیست فعال پس از ۴۸ ساعت قرارگیری در محیط کشت



شکل ۹- فعالیت آلکالین فسفاتاز سلول‌های استئوبلاست استخوان انسانی نوع MG-64، نمونه‌های الیاف شیشه زیست فعال و نمونه شاهد (پلی استایرن) بعد از 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 بعد از 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 بود.

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 زیست فعال 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 زیست فعال از زیست سازگاری خوبی برخوردار است.

۴- نتیجه‌گیری

در این پژوهش شیشه زیست فعال با ترکیب سه جزئی به‌روش سل ژل تهیه شده، الیاف شیشه زیست فعال به‌روش الکترورسی 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 الکترورسی 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. البته با افزایش بیش‌تر زمان غوطه‌وری، به‌دلیل انحلال فاز آپاتیت، از مقدار این فاز کاسته شد.

۳- آزمون کشت سلولی نشان داد که سلول‌های استخوان

استخوانی و نیز در کاربردهای مربوط به بازسازی بافت استخوان استفاده نمود.

۵- با توجه به نتایج این پژوهش، الیاف شیشه زیست فعال تولیدی در این پژوهش دارای زیست فعالی مطلوبی بود و از آن می توان به عنوان فاز تقویت کننده در کامپوزیت های سیمان

واژه نامه

1. (TEP: C₆H₁₅O₄P) (No. 821141)
2. (TEOS: C₈H₂₀O₄Si) (No. 800658)
3. (HCl) (No. 100317)
4. (Ca(NO₃)₂.4H₂O) (No. 22384298)
5. (C₆H₉NO) (No. 1074430)
6. (Ethanol: C₂H₅OH) (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. راهیما، س.، فتحی، م.ح.، ابراهیمی کهریزسنگی، ر. و دوست محمدی، ع.، "ساخت و مشخصه یابی پوشش شیشه زیست فعال- زیرکونیا به روش 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., Hesarak, 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., Hesarak 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*,

- 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 (*Macaca fascicularis*)", *Bone*, Vol. 29, pp. 176-179, 2001.