

مطالعه خواص زیستی شیشه زیست فعال 68S پایدار شده در دماهای °C ۸۰۰-۶۰۰ به منظور

ارتقای زیست سازگاری آن در کاربردهای درمانی مهندسی بافت استخوان

راحیل اشرف زاده شیمی، امیرحسین مغنیان*، مرتضی ثقفی یزدی و نیلوفر کولیوند

دانشکده مهندسی مواد، دانشگاه بین المللی امام خمینی (ره)، قزوین، ایران

(تاریخ دریافت: ۱۴۰۳/۲/۲۳؛ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۳/۵/۱۶)

چکیده: در این پژوهش شیشه زیست فعال 68S آلاینش یافته با استرانسیم، در دماهای پایدارسازی ۶۰۰ تا ۸۰۰ درجه سانتی گراد به روش سل-ژل سنتز شد و تأثیر دمای پایدارسازی بر خواص زیست فعالی برون تنی آن، قبل و پس از ۱۴ روز غوطه‌وری در محلول شبیه‌سازی شده بدن توسط آزمون‌های زیستی بررسی شد. طبق نتایج حاصل از آزمون‌های حرارتی، کاهش وزن نمونه تا دمای ۶۲۰ درجه سانتی گراد به دلیل خروج نیترات از ساختار شیشه زیست فعال و ثبات کاهش وزن آن در دمای ۷۰۰ درجه سانتی گراد مشاهده گردید. همچنین نتایج آزمون‌های طیف‌سنجی پراش پرتو ایکس، طیف‌سنجی تبدیل فوریه فروسرخ و تصاویر حاصل از میکروسکوپ الکترونی روبشی، حاکی از تشکیل لایه هیدروکسی آپاتیت در روز سوم و پنجم غوطه‌وری و افزایش ارتفاع آن‌ها تا روز ۱۴ غوطه‌وری به ترتیب در نمونه 68S7C و 68S8C بود. ضمن این‌که با توجه به نتایج آزمون طیف‌سنجی پلاسمای جفت‌شده القایی، نرخ بالاتر تشکیل لایه هیدروکسی آپاتیت بر روی سطح نمونه 68S7C نسبت به نمونه 68S8C تأیید گردید. علاوه بر این طبق نتایج آزمون‌های سمیت سلولی و فعالیت فسفات قلیایی، رشد و تکثیر سلولی سلول‌های استخوان‌ساز MC3T3-E1 در نمونه 68S7C نسبت به نمونه 68S8C به ترتیب ۱۳ و ۷ درصد بهبود یافت. بنابراین با توجه به نتایج آزمون‌های مذکور، نمونه 68S7C به دلیل پایدارسازی در دمای بهینه ۷۰۰ درجه سانتی گراد، داشتن نرخ بالاتر تشکیل لایه هیدروکسی آپاتیت، بهبود رشد و تکثیر سلولی سلول‌های استخوان‌ساز MC3T3-E1 و به تبع آن ارتقا زیست‌سازگاری آن، به‌عنوان یک گزینه قابل اعتماد به‌منظور کاربردهای درمانی مهندسی بافت استخوان انتخاب و معرفی گردید.

واژه‌های کلیدی: شیشه زیست فعال 68S، استرانسیم، پایدارسازی، زیست‌سازگاری، مهندسی بافت.

* مسئول مکاتبات، پست الکترونیکی: moghanian@eng.ikiu.ac.ir

Study of the Biological Properties of 68S Bioactive Glass Stabilized at Temperatures of 600-800 °C to Improve its Biocompatibility in Bone Tissue Engineering Therapeutic Applications

R. Ashrafzadeh Shimi, A.H. Moghanian*, M. Thaghafi Yazdi and N. Kolivand

Department of Materials Engineering, Imam Khomeini International University, Qazvin, Iran

ABSTRACT

In this research, 68S bioactive glass contaminated with strontium was synthesized at stabilization temperatures of 600-800 °C by sol-gel method, and the effect of stabilization temperature on the in vitro bioactive properties, before and after 14 days of immersion in Simulated Body Fluid was investigated by characterization tests and bioassays. According to the results of thermal tests, the weight loss of the sample up to 620 °C was observed due to the removal of nitrate from the bioactive glass structure and the stability of its weight loss at 700 °C. The results of X-ray Diffraction, Fourier Transform Infrared Spectroscopy, and Scanning Electron Microscopy indicated the formation of hydroxyapatite layer on the 3rd and 5th day of immersion and their height increase until the 14th day of immersion for 68S7C and 68S8C samples, respectively. Also, according to the results of the Inductively Coupled Plasma test, the higher formation rate of hydroxyapatite layer on the surface of the 68S7C sample compared to the 68S8C sample was confirmed. In addition, according to the results of cytotoxicity and alkaline phosphatase tests, the growth and cell proliferation of MC3T3-E1 osteogenic cells in the 68S7C sample compared to the 68S8C sample improved by 13% and 7%, respectively. Therefore, according to the results of the tests, the 68S7C sample due to its stabilization at the optimal temperature of 700 °C, the controlled rate of destruction of the glass network, having a higher formation rate of hydroxyapatite layer, improving the growth and cell proliferation of MC3T3-E1 bone-forming cells and consequently improving its biocompatibility, was selected and introduced as a reliable option for bone tissue engineering therapeutic applications.

Keywords: 68S bioactive glass, Strontium, Stabilization, Biocompatibility, Tissue engineering.

۱- مقدمه

افزایش سن جمعیت و به تبع آن افزایش نرخ ابتلا به بیماری‌های استخوانی نظیر عفونت‌های استخوان، تومورهای استخوان، بروز زخم و آسیب، منجر به احساس نیاز به پیدایش روشی کم تهاجمی به منظور ترمیم^۱ و بازسازی استخوان گردید. به عبارت دیگر روش‌های پیوند استخوان و مواد مورد استفاده برای پرکردن نقایص استخوانی برای بازگرداندن شکل و عملکرد استخوان از بین رفته، معمولاً به دلیل مشکلات خاصی نظیر پس زدن پیوند، افزایش زمان عمل، بروز عفونت، درد و در نهایت مرگ و میر احتمالی با محدودیت همراه هستند (۱). در این راستا با پیشرف علم در حوزه زیست پزشکی و ارائه راه‌حلی نظیر به‌کارگیری مواد زیستی بر پایه هیدروکسی‌آپاتیت^۲ به منظور تسریع در روند بهبود و درمان بیماری‌های بافت سخت^۳، منجر به کاهش زمان دوره التیام شکستگی‌ها و درمان بیماری‌های استخوان در جراحی ارتوپدی^۴

گردید. ضمن این‌که مواد سرامیکی نظیر هیدروکسی‌آپاتیت و تری‌کلسیم فسفات^۵ به‌عنوان جایگزین‌های بالقوه پیوند استخوانی به‌طور گسترده‌ای مورد مطالعه قرار گرفته است. همچنین در پزشکی بازساختی^۶ با کمک روش‌های سلول درمانی و مهندسی بافت^۷، راهکار جدیدی را برای بهبود آسیب‌های جبران ناپذیر استخوانی ایجاد گردید (۲). به عبارت دیگر از سرامیک‌های زیستی به‌عنوان دسته‌ای از مواد زیستی، به‌منظور ترمیم و بازسازی بخش‌هایی از بافت آسیب‌دیده بدن انسان استفاده شد. ضمن این‌که سرامیک‌های زیستی بر اساس پیوند شیمیایی آن‌ها با بافت‌های بدن به سه دسته زیست‌ختی^۸، زیست‌تخریب‌پذیر^۹ و زیست‌فعال^{۱۰} دسته‌بندی می‌شوند. علاوه بر این شیشه‌های زیست‌فعال^{۱۱} به‌عنوان یکی از زیرگروه‌های اصلی سرامیک‌های زیستی، با رهایش یون‌ها از سطح خود و انجام واکنش‌های سلولی، منجر به تسریع در روند استخوان‌زایی^{۱۲} می‌شوند (۳). همچنین شیشه‌های زیست‌فعال از

طریق ایجاد پیوند شیمیایی قوی با بافت‌های بدن نظیر بافت سخت و نرم، در کاربردهای درمانی مهندسی بافت مورد استفاده قرار گرفته‌اند (۴). ضمن این که سنتز شیشه‌های زیست فعال به دو روش ذوبی^{۱۳} و سل-ژل^{۱۴} قابل انجام می‌باشد که روش سل-ژل نسبت به روش سنتی ذوبی دارای مزایایی نظیر سهولت انجام کار، دستیابی به سطح ویژه بالاتر، همگنی بیشتر و تجهیزات ساده‌تر است (۵). از این رو، شیشه‌های زیست فعال در اواخر دهه ۱۹۶۰ توسط پروفیسور هنج و همکاران (۶-۷) در دانشگاه فلوریدا با سنتز ترکیب شیمیایی شیشه زیست فعال 45S5 توسعه یافتند. علاوه بر این طبق مطالعات پیشین، قرارگیری شیشه زیست فعال در محلول شبیه سازی شده بدن^{۱۶}، منجر به تخریب شبکه شیشه، رهایش یون‌ها از سطح آن و ایجاد یک لایه هیدروکسی آپاتیت شبه استخوانی بر سطح آن می‌گردد که توانایی تحریک ژن و تکثیر سلول‌های استخوان ساز^{۱۷} انسانی را دارد (۸-۹). با این وجود در مطالعاتی بهبود خواص زیستی شیشه‌های زیست فعال و تسریع در روند ترمیم و بازسازی بافت استخوانی پس از آرایش عناصر زیستی نظیر استرانسیم در ترکیب شیمیایی آن‌ها گردید. ضمن این که دمای فرآیند پایدارسازی^{۱۸} در سنتز شیشه‌های زیست فعال، یک عامل تأثیرگذار در بهبود خواص زیست فعالی برون تنی آن‌ها است (۱۰). از این رو طبق مطالعات پیشین، فرآیند پایدارسازی در دماهای زیر دمای تبلور و برای زمان‌های طولانی، منجر به کاهش خواص زیستی شیشه‌های زیست فعال گردید و پایدارسازی در دمای ۶۰۰ °C به عنوان کم‌ترین دمای پایدارسازی آن‌ها پیشنهاد شد (۱۰-۱۱). همچنین در پژوهشی شیشه زیست فعال 45S5 سنتز شده به روش سل-ژل در دمای ۶۰۰ °C و ۷۰۰ °C پایدارسازی شد که طبق نتایج، کنترل هسته‌زایی هیدروکسی آپاتیت و رشد فازهای بلوری از طریق عملیات حرارتی در دمای ۷۰۰ °C، گزارش گردید (۳۱). ضمن این که در پژوهش دنگ و همکاران (۱۲)، شیشه زیست فعال پایه سیلیکاتی سنتز شده به روش سل-ژل، به منظور حذف نیترات‌های باقی مانده در دمای ۷۰۰ °C به مدت سه ساعت تحت عملیات پایدارسازی

قرار گرفت که نتایج حاکی از سطح ویژه بالا، زیست فعالی و زیست سازگاری مطلوب شیشه زیست فعال بود. علاوه بر این در پژوهشی دیگر نانوذرات شیشه‌های زیست فعال سه جزئی و دو جزئی به ترتیب بر پایه $\text{SiO}_2\text{-CaO}$ و $\text{SiO}_2\text{-CaO-P}_2\text{O}_5$ به روش سل-ژل سنتز شد و افزایش نرخ تشکیل لایه هیدروکسی آپاتیت، افزایش زیست فعالی، عدم سمیت سلولی و قابلیت بالا در ترمیم بافت، در نمونه پایدارسازی شده در دمای ۷۰۰ °C گزارش گردید (۳۲). از این رو، در مطالعه چیترا و همکاران (۱۳)، شیشه زیست فعال پایه سیلیکاتی سنتز شده به روش سل-ژل در محدوده دمایی ۶۰۰-۸۰۰ °C پایدارسازی شد و بهبود کانی سازی و کاهش زیست سازگاری آن در افزایش دمای پایدارسازی از ۶۰۰ °C به ۸۰۰ °C گزارش گردید. همچنین در پژوهش توسط توماس و همکاران (۳۳)، شیشه زیست فعال بر پایه $\text{SiO}_2\text{-CaO}$ و $\text{Na}_2\text{O-P}_2\text{O}_5$ سنتز شده به روش سل-ژل، در محدوده دمایی ۷۰۰-۱۰۵۰ °C تحت عملیات پایدارسازی قرار گرفت که نتایج حاکی از ارتقای زیست فعالی نمونه پایدارسازی شده در دمای ۸۰۰ °C به مدت ۱۰ ساعت بود. بنابراین تغییر و بهینه کردن دمای فرآیند پایدارسازی در سنتز شیشه زیست فعال، منجر به بهبود خواص زیستی شیشه سنتز شده به منظور استفاده در کاربردهای درمانی آن‌ها در مهندسی بافت استخوان می‌گردد. ضمن این که در این پژوهش، به مطالعه خواص زیستی شیشه زیست فعال 68S آرایش یافته با استرانسیم و پایدارسازی شده در دماهای ۶۰۰-۸۰۰ °C به منظور ارتقای زیست سازگاری آن در کاربردهای درمانی مهندسی بافت استخوان پرداخته شد. همچنین شیشه زیست فعال 68S آرایش یافته با استرانسیم به منظور معرفی دمای بهینه فرآیند پایدارسازی و دستیابی به بالاترین میزان از زیست فعالی برون تنی^{۱۹}، پس از ۱۴ روز غوطه‌وری در محلول شبیه سازی شده بدن تحت آزمون‌های مشخصه یابی طیفسنجی پراش پرتو ایکس^{۲۰}، طیفسنجی تبدیل فوریه فروسرخ^{۲۱}، میکروسکوپ الکترونی روبشی^{۲۲}، طیفسنجی پلاسمای جفت شده القایی^{۲۳} و آزمون‌های زیستی سمیت سلولی^{۲۴} و فعالیت فسفات قلیایی^{۲۵} مورد بررسی قرار گرفت.

جدول ۱- مواد مورد نیاز به منظور سنتز شیشه زیست فعال 68S آرایش یافته با استرانسیم به روش سل- ژل

کد	ترکیب شیمیایی	ماده
98%, Merck; No.8006581000	TEOS: $\text{Si}(\text{OC}_2\text{H}_5)_3$	تترا اتیل اورتوسیلیکات
99%, Merck; No.8211411000	TEP: $\text{PO}(\text{C}_2\text{H}_5)_3$	تری اتیل فسفات
Merck Company Inc Grade: ACS	$\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	کلسیم نیترات چهار آبه
67%, Merck Company Inc	HNO_3	اسید نیتریک
Merck Company Inc	$\text{Sr}(\text{NO}_3)_2$	استرانسیم نیترات
-	deionized water (H_2O)	آب دو بار تقطیر

۲- مواد و روش تحقیق

۱-۲- معرفی مواد اولیه

در این پژوهش شیشه زیست فعال 68S در شرایط برون تنی به روش سل-ژل با ترکیب شیمیایی بر پایه $70\text{SiO}_2\text{-}26\text{CaO-}4\text{P}_2\text{O}_5$ (درصد مولی) سنتز گردید. همچنین به منظور سنتز نمونه‌ها از پیش ماده‌های تترا اتیل اورتوسیلیکات (TEOS: $\text{Si}(\text{OC}_2\text{H}_5)_3$)، تری اتیل فسفات (TEP: $\text{PO}(\text{C}_2\text{H}_5)_3$)، کلسیم نیترات چهار آبه ($\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$)، اسید نیتریک (HNO_3)، استرانسیم نیترات $\text{Sr}(\text{NO}_3)_2$ و آب دو بار تقطیر (H_2O) استفاده شد که مشخصات آن در جدول (۱) آورده شده است.

۲-۲- سازوکار تهیه محلول شبیه سازی شده بدن

در این پژوهش، محلول شبیه سازی شده بدن به منظور انجام مشخصه یابی های زیستی، مطابق با دستور کار پیشنهادی کوکوبو (۱۴) تهیه گردید. همچنین به منظور تهیه محلول شبیه سازی شده بدن از سدیم کلرید (NaCl)، سدیم هیدروژن کربنات (NaHCO_3)، پتاسیم کلرید (KCl)، دی پتاسیم هیدروژن فسفات سه آبه ($\text{K}_2\text{HPO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$)، منیزیم کلرید شش آبه ($\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$)، کلریدریک اسید (HCl)، کلسیم کلرید (CaCl_2)، سدیم سولفات (Na_2SO_4)، تریس (هیدروکسی متیل) آمینومتان ($(\text{CH}_2\text{OH})_3\text{CNH}_2$) و آب دو بار تقطیر (H_2O) استفاده گردید.

۳-۲- سازوکار سنتز شیشه زیست فعال

طبق مطالعات پیشین، یکی از عوامل حائز اهمیت در میزان زیست فعالی شیشه های زیست فعال، نرخ تشکیل لایه هیدروکسی آپاتیت بر روی سطح شیشه ها پس از غوطه وری در محلول شبیه سازی شده بدن است و آرایش اکسید استرانسیم با شعاع یونی بزرگ تر از کلسیم در ترکیب شیمیایی شیشه زیست فعال، منجر به افزایش سرعت انحلال شبکه شیشه، افزایش نرخ تشکیل لایه هیدروکسی آپاتیت و به تبع آن افزایش زیست فعالی آن ها گردید. همچنین آرایش مقدار پنج درصد مولی اکسید استرانسیم در ترکیب شیمیایی شیشه های زیست فعال به عنوان مقدار بهینه گزارش شد و کاهش زیست فعالی آن ها در حضور مقادیر بالای پنج درصد مولی اکسید استرانسیم تأیید گردید. بنابراین با توجه به نتایج مطالعات پیشین، از آرایش مقدار بهینه پنج درصد مولی اکسید استرانسیم در ترکیب شیمیایی شیشه زیست فعال 68S به منظور ارتقای خواص زیستی آن استفاده شد (۴ و ۱۵). از این رو، برای سنتز شیشه زیست فعال 68S حاوی استرانسیم، ابتدا تترا اتیل اورتوسیلیکات به همراه نیتریک اسید به وسیله همزن مغناطیسی به مدت یک ساعت هم زده شد. سپس تری اتیل فسفات به منظور ایجاد شفافیت در ژل به محلول اضافه و مجدد به مدت ۳۰ دقیقه هم زده شد. همچنین کلسیم نیترات چهار آبه و استرانسیم نیترات در فواصل زمانی ۴۵ دقیقه به ترتیب تحت هم زدن مداوم به محلول اضافه شدند. ذکر این نکته حائز اهمیت است که به منظور تکمیل فرآیند آبکافت^{۲۷} و ورود به مرحله بعدی سنتز،

جدول ۲- نمونه‌های شیشه زیست فعال 68S آرایش یافته با

استرانسیم سنتز شده به روش سل-ژل	
نام شیشه زیست فعال	دمای فرآیند پایدارسازی (°C)
68S6C	۶۰۰
68S7C	۷۰۰
68S8C	۸۰۰

محللول حاصل به وسیله هم‌زدن مغناطیسی به مدت یک ساعت مخلوط گردید. ضمن این‌که در این مرحله محللولی به نام سل حاصل شد که برای تبدیل به ژل تحت عملیات پیرسازی قرار گرفت. از این‌رو در طی انجام این فرآیند، سل را در بشر ریخته و به مدت هفت روز، در دمای اتاق (۲۵ °C) تحت عملیات پیرسازی طبیعی و سپس با قرارگیری در آن به مدت سه روز در دمای ۷۵ °C تحت عملیات پیرسازی مصنوعی قرار گرفت که به دنبال آن، ژل خشک شده به دست آمد. همچنین به منظور حذف نیترات‌ها و مواد آلی در ژل خشک، نمونه‌ها در دمای ۸۰۰-۶۰۰ °C در فاز شیشه‌ای پایدارسازی شدند. ضمن این‌که نمونه‌ها در هاون آسیاب شدند و به منظور دستیابی به پودری همگن و یک‌دست از صافی فلزی عبور داده شدند. در نتیجه پودر حاصل به منظور انجام مشخصه‌یابی‌های زیستی، به وسیله دستگاه پرس تحت فشار حدوداً ۹ MPa در قالب‌های استوانه‌ای قرار گرفت و قرص‌هایی با مقدار حدوداً ۰/۴۸ gr تهیه گردید. از این‌رو، در جدول (۲)، به معرفی نمونه‌های شیشه زیست فعال 68S آرایش یافته با استرانسیم سنتز شده به روش سل-ژل پرداخته شده است.

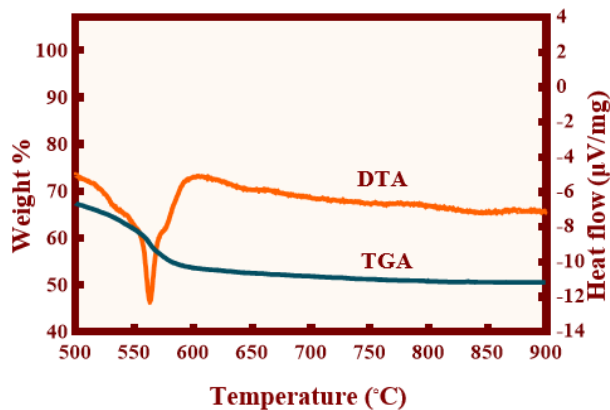
۲-۴- مشخصه‌یابی‌های شیشه زیست فعال

شیشه‌های زیست فعال 68S سنتز شده توسط آزمون‌های حرارتی افتراقی^{۲۸} و تجزیه و تحلیل گرماوزن‌سنجی^{۲۹} در اتمسفر نیتروژن (۵۰ ml/min) با نرخ حرارت‌دهی ثابت ۱۰ °C/min از دمای اتاق تا دمای ۱۱۰۰ °C، در دستگاه Simultaneous Thermal Analyzer مدل STA PT 1600

ساخت کشور آمریکا مورد بررسی قرار گرفتند. همچنین به منظور بررسی زیست‌فعالی نمونه‌ها، سطح قرص‌ها، در بازه‌های زمانی ۱-۱۴ روز در مقادیر ۱۰-۲ cc محلول شبیه‌سازی شده بدن غوطه‌ور گردید. ضمن این‌که بررسی و تأیید تشکیل لایه هیدروکسی‌آپاتیت بر روی سطح نمونه‌ها، با استفاده از پرتو Cu-K α در محدوده ۲θ بین ۲۰-۴۰ °C و با شدت ۴۰ KV و با طول موج ۱/۵۰۴ Å توسط دستگاه آزمون فازی پراش پرتو ایکس مدل (XRD, INEL-Equinox-3000) ساخت کشور فرانسه با استفاده از کارت مرجع JCPDS(NO.09-432) تجزیه و تحلیل شد. علاوه بر این، نمونه‌های شیشه زیست فعال به منظور بررسی ترکیب شیمیایی لایه هیدروکسی‌آپاتیت تشکیل شده بر روی سطح آن‌ها و بررسی ویژگی پیوندهای تشکیل شده، توسط دستگاه طیف‌سنجی تبدیل فوریه فروسرخ ساخت کشور آمریکا مدل (Nicolet Avatar, 600) در محدوده طول موج ۴۰۰-۴۰۰۰ cm⁻¹ و با قدرت تفکیک‌پذیری ۸ cm⁻¹ ارزیابی گردید. همچنین، زمان تشکیل لایه هیدروکسی‌آپاتیت و مطالعه غلظت یون‌های سیلیسیم، کلسیم، فسفر، استرانسیم ره‌ایش یافته از سطح شیشه‌های زیست فعال 68S تا روز ۱۴ غوطه‌وری در محلول شبیه‌سازی شده بدن، به کمک دستگاه طیف‌سنجی پلاسمای جفت‌شده القایی مدل (Varian Vista Pro, Palo Alto) ساخت کشور آمریکا بررسی گردید. ضمن این‌که از میکروسکوپ الکترونی روبشی مدل (Philips XL30) ساخت کشور هلند با شتاب ۲۰ KW به منظور مشاهده سطح نمونه‌ها و ارزیابی تشکیل و رشد لایه هیدروکسی‌آپاتیت بعد از ۱۴ روز غوطه‌وری در محلول شبیه‌سازی شده بدن، استفاده شد.

۲-۵- ارزیابی‌های زیستی شیشه زیست فعال

در ارزیابی سنجش سمیت سلولی شیشه‌های زیست فعال 68S سنتز شده به روش سل-ژل، رشد و تکثیر سلول‌های استخوان‌ساز MC3T3-E1 کشت شده بر روی سطح نمونه‌های شیشه زیست فعال بررسی گردید. از این‌رو، سلول‌ها داخل هر



شکل ۱- نمودار تجزیه و تحلیل حرارتی شیشه زیست فعال 68S با نرخ $5^{\circ}\text{C min}^{-1}$ از دمای 500°C تا 900°C .

۳- بحث و نتایج

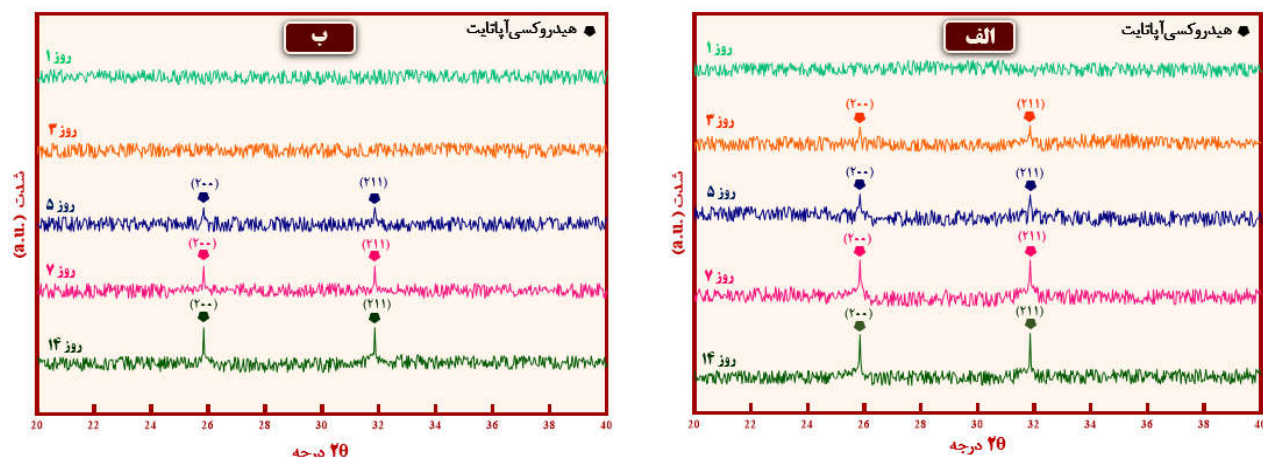
۳-۱- تجزیه و تحلیل حرارتی

در شکل (۱)، نتایج به دست آمده از آزمون‌های حرارتی شیشه زیست فعال 68S آرایش یافته با استرانسیم نشان داده شده است. با توجه به شکل (۱)، کاهش وزن در محدوده دمایی 500°C - 620°C به پیک گرماگیر ناشی از حذف نیترات‌های باقی مانده در ساختار نمونه نسبت داد شد و کاهش وزن نمونه تا پایان نمودار ثابت ماند. طبق پژوهش‌های پیشین و با توجه به نتایج مذکور، علت کاهش دمای انتقال و بلوری شدن با جایگزینی استرانسیم به جای کلسیم در ترکیب شیمیایی شیشه زیست فعال به دلیل یکسان بودن عدد همسایگی استرانسیم و کلسیم و نیز پایین تر بودن استحکام میدان یونی آن به دلیل بزرگ تر بودن شعاع یونی استرانسیم در مقایسه با کلسیم است (۱۵ و ۱۶).

۳-۲- بررسی طیف‌سنجی پراش پرتو ایکس

الگوهای طیف‌سنجی پراش پرتو ایکس نمونه‌های شیشه زیست فعال 68S آرایش یافته با استرانسیم و پایدارسازی شده در دماهای 700°C و 800°C در شکل (۲) ارائه شده است. از این رو طبق مطالعات پیشین، عدم حضور پیک‌های مشخصه در الگوهای پراش پرتو ایکس قبل از غوطه‌وری در محلول شبیه‌سازی شده بدن، حاکی از عدم حضور لایه

چاهک ظرف ۹۶ خانه‌ای با چگالی 6×10^3 به مدت ۲۴ ساعت کاشته و در انکوباتور قرار داده شدند و در بازه‌های زمانی یک، سه و هفت روز از محیط کشت بیرون آورده و به محیط کشت جدید انتقال داده شدند. سپس مقدار $100 \mu\text{L}$ از 5 mg/mL محلول MTT (سیگما آدریج) به نمونه‌های کشت شده اضافه شد و پس از قرائت در بازه زمانی ۴ ساعته در دمای 37°C در انکوباتور، توسط پیت 3° بیرون آورده شدند. همچنین اندازه‌گیری میزان چگالی نوری 31 بلورهای حل شده به کمک دستگاه طیف‌سنج مدل (EL312e Biokinetics) ساخت شرکت Biotek با طول موج 570 nm انجام گردید. ضمن این‌که تکثیر و تمایز سلول‌های استخوان‌ساز MC3T3-E1 و به دنبال آن تحریک تمایز سلول‌های استخوانی اولیه به کمک سلول‌های استخوان‌ساز رشد یافته بر روی سطح شیشه‌های زیست فعال و ارزیابی فعالیت فسفات قلیایی انجام شد. به عبارت دیگر، سلول‌های استخوان‌ساز MC3T3-E1 با چگالی $1 \times 10^4 \text{ cells/cm}^2$ و به مدت زمان یک، سه و هفت روز در انکوباتور نگهداری و بر روی سطح شیشه‌های زیست فعال رشد کردند. همچنین لایه سلولی با محلول نمک فسفات با خاصیت بافری 33 با ظرفیت و آهسته شسته شد و به دنبال آن یک میلی‌لیتر محلول پی-نیتروفنیل-فسفات 33 و یک میلی‌لیتر تریس بافر 34 به آن افزوده گردید و پس از پنج دقیقه در دمای 37°C در انکوباتور پی-نیتروفنیل آزاد شد و توسط دستگاه خوانش گر میکروپلیت 35 با طول موج 410 nm اندازه گرفته شد. همچنین بررسی‌های آماری برای تعیین میزان تفاوت آماری و نیز مقایسه نتایج به صورت کمی، توسط نرم‌افزار Prism GraphPad (GraphPad Software, V.3.0، ایالات متحده) انجام گردید. ذکر این نکته حائز اهمیت است که داده‌ها در نتیجه انجام حداقل سه آزمایش مستقل به صورت عدد صحیح به دست آمد و با میانگین \pm انحراف معیار، به صورت تفاوت قابل ملاحظه آماری مقدار احتمال $p < 0.05$ ، $p < 0.01$ ، $p < 0.001$ و $p < 0.0001$ گزارش گردید.



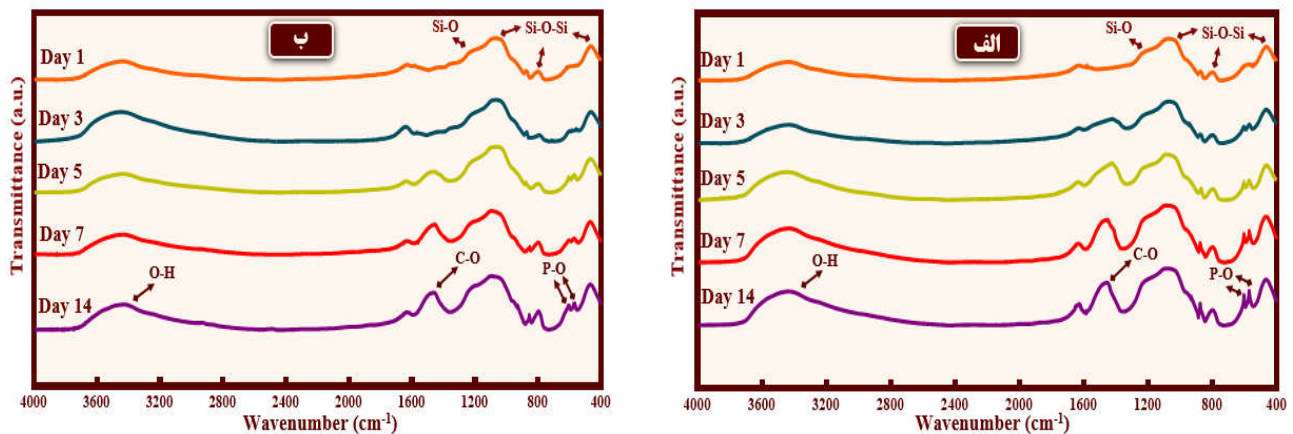
شکل ۲- الگوهای طیفسنجی پراش پرتو ایکس الف) نمونه 68S7C و ب) نمونه 68S8C.

دماهای 700°C و 800°C در شکل (۳) ارائه شده است. با توجه به الگو طیفسنجی نمونه‌های شیشه زیست فعال 68S، نوارهای نمایان شده در محدوده $470\text{--}455\text{ cm}^{-1}$ با حالت خمشی Si-O-Si مطابقت دارد و اعداد موج $1059\text{--}604\text{--}567\text{ cm}^{-1}$ مربوط به ارتعاشات خمشی پیوند P-O و تشکیل لایه کلسیم فسفات روی سطح شیشه‌های زیست فعال است. همچنین نوار موجود در عدد موج 793 cm^{-1} نشان‌دهنده حالت نوسان کششی پیوند Si-O-Si، نوار کم عمق Si-O نشان‌دهنده پیوند اکسیژن‌های غیر پل زن با سیلیسیم و نوار عمیق Si-O-Si نشان‌دهنده پیوند اکسیژن‌های پل زن با سیلیسیم می‌باشد. ضمن این‌که طبق مطالعات پیشین، تغییرات در عمق نوارها به دلیل تغییر شکل در ساختار شیشه، کاهش پیوند بین اکسیژن‌های غیر پل زن با سیلیسیم در اثر حذف مواد فرار پس از عملیات پایدارسازی، افزایش چشمگیر پیوند بین اکسیژن‌های پل زن با سیلیسیم و نیز افزایش تعداد اکسیژن‌های پل زن و تقویت شبکه شیشه گزارش گردید (۱۷). بنابراین طبق الگوهای طیفسنجی، نوار مربوط به عدد موج 3423 cm^{-1} نشان‌دهنده نوسان کششی پیوند O-H گروه‌های هیدروکسیل در ساختار شیشه زیست فعال می‌باشد که عمق کم آن به دلیل جذب رطوبت از محیط اطراف در ژل خشک پس از خارج نمودن آن از کوره می‌باشد (۱۸). علاوه بر این، در الگوهای طیفسنجی شیشه‌های زیست فعال، نوار دیگری نزدیک به عدد موج 1465 cm^{-1} مربوط به حالت نوسان کششی

هیدروکسی آپاتیت بر روی سطح شیشه‌های زیست فعال است (۲۰-۱۸). همچنین دو پیک مشخصه در بازه 2θ برابر با $25/8$ و $31/8$ درجه به ترتیب مربوط به صفحات اتمی (200) و (211) ، بیانگر تشکیل لایه هیدروکسی آپاتیت بر روی سطح نمونه‌ها است که تشکیل این لایه بر روی سطح نمونه‌های 68S7C و 68S8C به ترتیب در روزهای سه و پنج غوطه‌وری در محلول شبیه‌سازی شده بدن، توسط مشاهده پیک‌های مذکور در الگوی طیفسنجی نمونه‌های شیشه زیست فعال تأیید شد (۲۰ و ۲۱). ضمن این‌که، حضور یک شبکه نامنظم با پهنای باند پراش گسترده و شدت کم در الگوهای پراش پرتو ایکس نمونه 68S8C و ارتفاع کم پیک‌ها با افزایش زمان غوطه‌وری تا ۱۴ روز، حاکی از نرخ پایین تشکیل لایه هیدروکسی آپاتیت بر روی سطح نمونه مذکور است. علاوه بر این، مشاهده پیک‌های مشخصه هیدروکسی آپاتیت پس از روز سه غوطه‌وری در الگوی پراش نمونه 68S7C و نیز افزایش ارتفاع پیک‌ها تا روز ۱۴ غوطه‌وری، حاکی از نرخ بالای تشکیل لایه هیدروکسی آپاتیت در نمونه 68S7C نسبت به نمونه 68S8C است (۲۵).

۳-۳- بررسی طیفسنجی تبدیل فوریه فروسرخ

الگوهای طیفسنجی تبدیل فوریه فروسرخ نمونه‌های شیشه زیست فعال 68S آرایش یافته با استرانسیم و پایدارسازی در



شکل ۳- الگوهای طیفسنجی تبدیل فوریه فروسخ (الف) نمونه 68S7C و (ب) نمونه 68S8C.

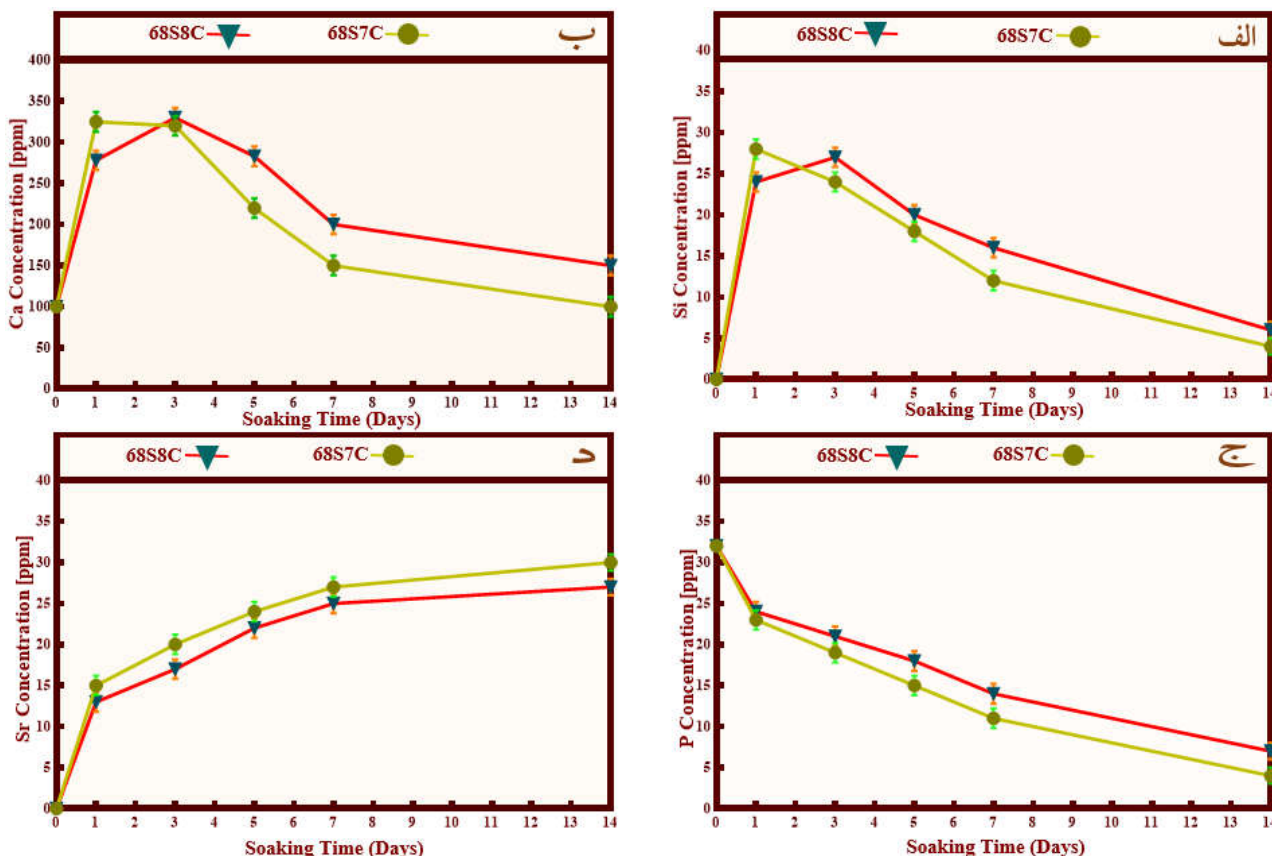
نمونه‌های 68S7C و 68S8C به ترتیب در روزهای سه و پنج غوطه‌وری مشاهده گردید که طبق مطالعات پیشین این امر حاکی از تشکیل لایه هیدروکسی‌آپاتیت بر روی سطح نمونه‌های مورد پژوهش در روزهای مذکور است. همچنین میزان رهایش یون سیلیسیم در نمونه 68S7C نسبت به نمونه 68S8C در بازه زمانی ۷ تا ۱۴ روز غوطه‌وری در محلول شبیه‌سازی شده بدن، بیش‌تر کاهش یافت که این امر به دلیل افزایش پیوند یون‌های سیلیسیم با اکسیژن‌های پل‌زن، ته‌نشین شدن آن به شکل زیر لایه غنی از SiO_2 بر روی سطح نمونه‌ها، سپس تقویت شبکه شیشه و تشکیل لایه هیدروکسی‌آپاتیت بر روی سطح شیشه می‌باشد (۲۲ و ۲۳). ضمن این‌که با توجه به شکل (۴-ج)، غلظت یون‌های فسفر در هر دو نمونه مورد بررسی تا روز ۱۴ غوطه‌وری کاهش یافت که نرخ کاهشی آن به دلیل مصرف یون‌های فسفات در تشکیل لایه هیدروکسی‌آپاتیت بر روی سطوح شیشه زیست‌فعال 68S می‌باشد و افزایش روند کاهشی آن در نمونه 68S7C، حاکی از افزایش تشکیل لایه هیدروکسی‌آپاتیت بر روی سطح نمونه مذکور نسبت به نمونه 68S8C است (۲۴).

علاوه بر این طبق شکل (۴-د)، غلظت یون‌های استرانسیم رهایش یافته از سطح شیشه زیست‌فعال تا روز هفت غوطه‌وری در محلول شبیه‌سازی شده بدن در هر دو نمونه مورد بررسی افزایش یافت و در بازه زمانی ۷-۱۴ روز غوطه‌وری این روند

پیوند C-O به دلیل جابجایی گروه‌های کربنات با گروه‌های فسفات در ساختار لایه هیدروکسی‌آپاتیت قابل مشاهده است که وجود آن تأییدی بر تشکیل لایه هیدروکسی‌آپاتیت بر روی سطح شیشه زیست‌فعال است. همچنین طبق مطالعات پیشین، افزایش زمان غوطه‌وری در محلول شبیه‌سازی شده بدن به ۱۴ روز و افزایش در عمق باند C-O حاکی از افزایش میزان تبلور لایه هیدروکسی‌آپاتیت است که در الگوی طیف‌سنجی تمام نمونه‌های مورد بررسی مشاهده گردید (۲۱-۱۹). ضمن این‌که نوارهای فسفات و کربنات در نمونه 68S7C در روز سه غوطه‌وری و در نمونه 68S8C در روز پنج غوطه‌وری مشاهده شد. ذکر این نکته حائز اهمیت است که ارتفاع باند فسفات در روز ۱۴ غوطه‌وری در نمونه 68S7C در مقایسه با نمونه 68S8C بیش‌تر بود که این امر حاکی از تشکیل بیش‌تر لایه هیدروکسی‌آپاتیت بر روی سطح نمونه 68S7C است.

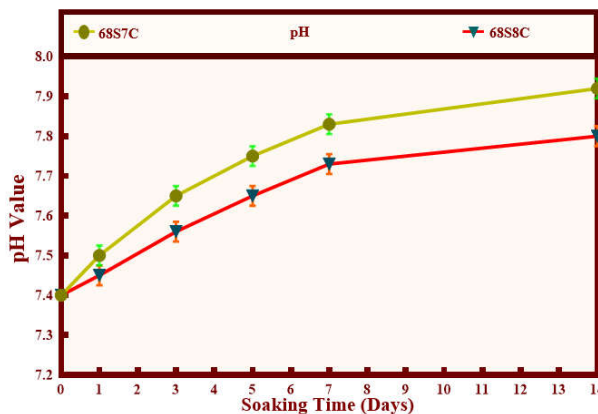
۳-۴- شیمی یونی محلول شبیه‌سازی شده بدن

تحلیل غلظت یون‌های سیلیسیم، کلسیم، فسفر، استرانسیم رهایش یافته از سطح شیشه زیست‌فعال 68S و نیز نتایج به‌دست آمده از اندازه‌گیری pH نمونه‌های قبل و پس از ۱۴ روز غوطه‌وری در محلول شبیه‌سازی شده بدن، در شکل‌های (۴) و (۵) نشان داده شده است. از این‌رو، افزایش و سپس کاهش غلظت سیلیسیم (شکل ۴-الف) و کلسیم (شکل ۴-ب) در



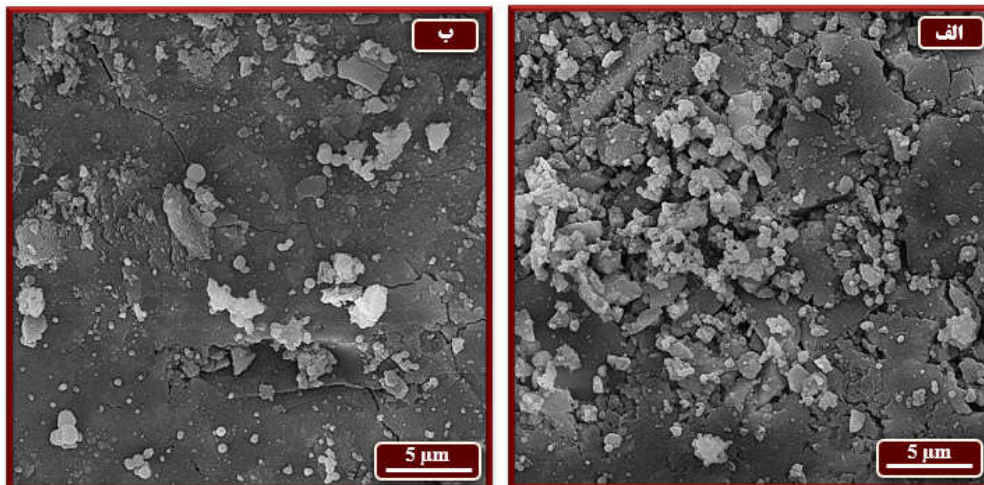
شکل ۴- غلظت یون الف) سیلیسیم، ب) کلسیم، ج) فسفر و د) استرانسیم در نمونه‌های شیشه زیست فعال 68S قبل و بعد از یک، سه، هفت و چهارده روز غوطه‌وری در محلول شبیه‌سازی شده بدن.

بزرگ‌تر از کلسیم و نیز جایگزینی آن با کلسیم پس از غوطه‌وری در محلول شبیه‌سازی شده بدن، منجر به افزایش انحلال یونی و به تبع آن افزایش غلظت یون‌های رهائش یافته از سطح شیشه زیست فعال در محلول شبیه‌سازی شده بدن می‌گردد (۲۵). ضمن این که غلظت یون‌های سیلیسیم، کلسیم و استرانسیم در روز اول غوطه‌وری نمونه‌های شیشه زیست فعال در محلول شبیه‌سازی شده بدن، با نرخ بالایی افزایش یافت که این امر حاکی از تخریب شبکه شیشه به دلیل شکستن پیوندهای سیلیسیم با اکسیژن‌های پل‌زن، رهائش یون‌ها از سطح شیشه و به تبع آن افزایش غلظت آن‌ها در محلول شبیه‌سازی شده بدن است و با تشکیل لایه هیدروکسی‌آپاتیت، این افزایش غلظت یون‌ها روند کاهشی داشت که با توجه به شکل (۵)، pH محلول شبیه‌سازی شده بدن در هر دو نمونه سنتز شده تا روز ۱۴



شکل ۵- مقدار pH نمونه‌های شیشه زیست فعال 68S قبل و بعد از یک، سه، هفت و چهارده روز غوطه‌وری در محلول شبیه‌سازی شده بدن.

افزایش غلظت به ثبات رسید. همچنین حضور پنج درصد مولی اکسید استرانسیم در ترکیب شیشه زیست فعال، با شعاع یونی



شکل ۶- ریزساختار سطح الف) نمونه 68S7C و ب) نمونه 68S8C.

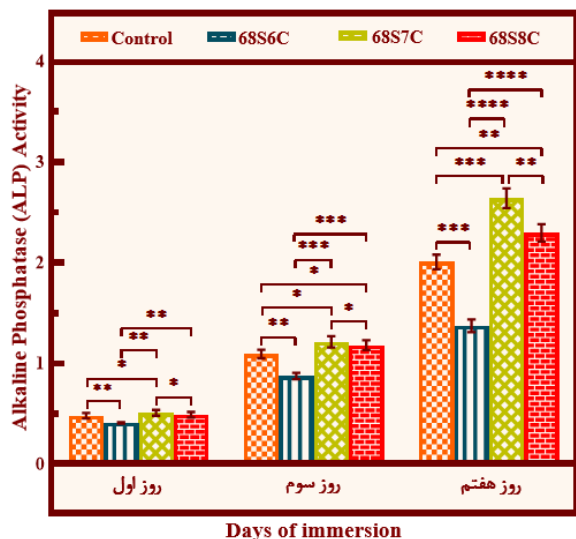
۳-۶- سنجش سمیت سلولی

در شکل (۷) نتایج به دست آمده از آزمون سمیت سلولی شیشه‌های زیست فعال سنتز شده به روش سل-ژل، آرایش یافته با استرانسیم و پایدارسازی شده در دماهای 600°C ، 700°C و 800°C در روزهای یکم، سوم و هفتم در محیط کشت برون تنی نسبت به نمونه کنترل ارائه شده است. از این رو طبق شکل (۷)، فعالیت زیستی سلول‌های استخوان‌ساز MC3T3-E1 در روز یکم، سوم و هفتم کشت، در نمونه 68S6C نسبت به نمونه کنترل کاهش ($p < 0.001$ ، $***p < 0.001$) و در نمونه 68S7C ($p < 0.01$ ، $**p < 0.001$) و نمونه 68S8C ($p < 0.01$ ، $**p < 0.001$) نسبت به نمونه کنترل افزایش یافت. همچنین در روز سه کشت، فعالیت زیستی سلول‌های استخوان‌ساز MC3T3-E1 در نمونه 68S8C نسبت به نمونه کنترل و نمونه 68S7C به ترتیب افزایش ($p < 0.001$) و کاهش ($p < 0.05$) یافت که این روند با افزایش زمان کشت به هفت روز نیز مشاهده گردید ($p < 0.001$ ، $**p < 0.01$). طبق پژوهش‌های پیشین، تأثیر حضور پنج درصد مولی استرانسیم در شیشه‌های زیست فعال به صورت بهبود در خواص زیست‌فعالی برون تنی، افزایش رشد و همچنین تکثیر سلول‌های استخوان‌ساز MC3T3-E1 و عدم ایجاد سمیت سلولی با افزایش زمان کشت در محیط کشت برون تنی گزارش شد و در

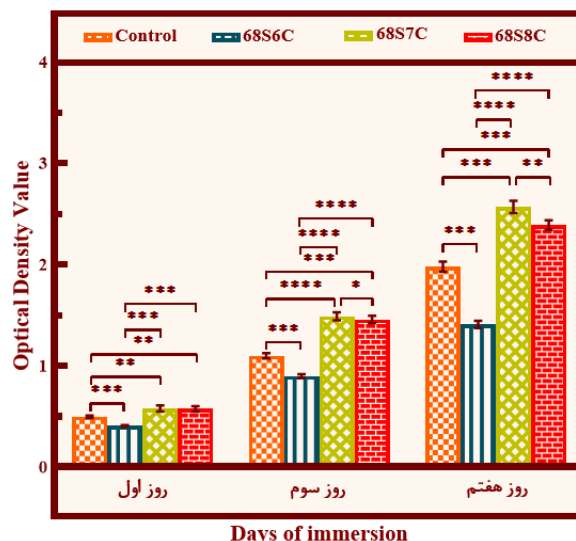
غوطه‌وری به دلیل تعویض یون‌های قلیایی با یون‌های H^+ و رهایش یون‌ها از سطح نمونه‌ها، افزایش یافت (۲۶).

۳-۵- ریخت‌شناسی سطح

در شکل (۶)، ویژگی‌های ساختاری نمونه‌های شیشه زیست فعال پایدارسازی شده در دماهای 700°C و 800°C پس از ۱۴ روز غوطه‌وری در محلول شبیه‌سازی شده بدن ارائه شده است که با توجه به آن، ریزساختار سطح ذرات هیدروکسی‌آپاتیت در هر دو نمونه به شکل کروی مشاهده شد (۲۴). همچنین طبق مطالعات پیشین، شکل کروی ذرات هیدروکسی‌آپاتیت، به دلیل حضور پیش‌ماده کلسیم در ترکیب شیمیایی شیشه‌های زیست فعال گزارش گردید (۲۵). ضمن این‌که، نرخ تشکیل لایه هیدروکسی‌آپاتیت بر روی سطح نمونه 68S7C نسبت به نمونه 68S8C بالاتر بود که این امر حاکی از تشکیل بهینه لایه مذکور بر روی سطح نمونه 68S7C تا روز ۱۴ غوطه‌وری در محلول شبیه‌سازی شده بدن بود. علاوه بر این، نرخ بالاتر تشکیل لایه هیدروکسی‌آپاتیت در نمونه 68S7C به عنوان معیاری از زیست‌فعالی شیشه‌های زیست فعال، با توجه به مشاهده پیک‌های مشخصه هیدروکسی‌آپاتیت، باندهای فسفات و کربنات و نیز تغییرات غلظت یون‌های رهایش یافته از سطح شیشه نیز تأیید گردید (۱۸-۲۵).



شکل ۸- نتایج فعالیت فسفات قلیایی نمونه‌های شیشه زیست فعال 68S پس از یک، سه و هفت روز کشت در محیط حاوی سلول‌های استخوان‌ساز MC3T3-E1.



شکل ۷- نتایج رشد، تکثیر و عدم سمیت سلول MC3T3-E1 نمونه‌های شیشه زیست فعال 68S پس از یک، سه و هفت روز کشت در محیط حاوی سلول‌های استخوان‌ساز MC3T3-E1.

افزایش قابل ملاحظه‌ای در رشد و تکثیر سلول‌های استخوان‌ساز MC3T3-E1 و فعالیت فسفات قلیایی گردید (۲۹). بنابراین طبق مطالعات پیشین و نتایج به‌دست آمده از آزمون مذکور، نمونه 68S7C نسبت به نمونه‌های سنتز شده در این پژوهش با داشتن میزان بالاتری از رشد و تکثیر سلول‌های استخوان‌ساز MC3T3-E1، منجر به ارتقای فعالیت فسفات قلیایی گردید ($p < 0.001$, $p < 0.0001$) (۳۰).

۴- نتیجه‌گیری

در این پژوهش، شیشه زیست فعال 68S آلاینش یافته با استرانسیم با ترکیب شیمیایی بر پایه $70\text{SiO}_2-26\text{CaO}-4\text{P}_2\text{O}_5$ (درصد مولی) به روش سل-ژل سنتز گردید و تأثیر دمای فرآیند پایدارسازی (در دماهای $600-800^\circ\text{C}$) بر روی تشکیل برون‌تنی لایه هیدروکسی‌آپاتیت و نیز خواص زیستی آن به کمک آزمون‌های حرارتی، طیف‌سنجی تبدیل فوریه فروسرخ، طیف‌سنجی پراش پرتو ایکس، طیف‌سنجی پلاسمای جفت شده القایی، میکروسکوپ الکترونی روبشی، آزمون‌های زیستی سمیت سلولی و فعالیت فسفات قلیایی بررسی شد که می‌توان

این پژوهش نیز، نمونه 68S7C، منجر به رشد و تکثیر سلول‌های استخوان‌ساز MC3T3-E1 گردید (۲۷ و ۲۸).

۳-۷- فعالیت فسفات قلیایی

در شکل (۸) میزان فعالیت فسفات قلیایی شیشه‌های زیست فعال سنتز شده به روش سل-ژل، آلاینش یافته با استرانسیم و در دماهای پایدارسازی 600°C ، 700°C و 800°C در روزهای یکم، سوم و هفتم در محیط کشت برون‌تنی نسبت به نمونه کنترل ارائه شده است. از این رو طبق شکل (۸)، فعالیت فسفات قلیایی در نمونه 68S6C پس از یک، سه و هفت روز کشت نسبت به نمونه کنترل کاهش ($p < 0.01$, $p < 0.001$) و در نمونه 68S7C در بازه زمانی مذکور نسبت به نمونه کنترل افزایش یافت ($p < 0.05$, $p < 0.001$). ضمن این‌که فعالیت فسفات قلیایی در نمونه 68S8C پس از سه و هفت روز کشت نسبت به نمونه کنترل افزایش یافت ($p < 0.05$, $p < 0.01$). همچنین طبق پژوهش آیزاک و همکاران، جایگزینی پنج درصد مولی استرانسیم به جای CaO در ترکیب شیشه زیست فعال بر پایه $\text{SiO}_2-\text{CaO}-\text{P}_2\text{O}_5$ ، منجر به

نتایج زیر را ارائه کرد:

۱) طبق نتایج حاصل از آزمون‌های حرارتی، کاهش وزن در محدوده دمایی °C ۶۲۰-۵۰۰ به پیک گرماگیر ناشی از حذف نیترات‌های باقی مانده و سایر ترکیبات سمی از ساختار شیشه زیست فعال نسبت داد شد و ثبات کاهش وزن در دمای °C ۷۰۰ شروع شد و تا پایان نمودار نیز ثابت ماند.

۲) طبق نتایج حاصل از آزمون طیف‌سنجی پراش پرتو ایکس، مشاهده پیک‌های مشخصه هیدروکسی‌آپاتیت در روز سوم غوطه‌وری در محلول شبیه‌سازی شده بدن در نمونه 68S7C، حاکی از تشکیل سریع‌تر لایه هیدروکسی‌آپاتیت بر روی سطح نمونه مذکور نسبت به نمونه 68S8C است. همچنین افزایش ارتفاع پیک‌ها در هر دو نمونه مورد بررسی تا روز ۱۴ غوطه‌وری، بیانگر افزایش نرخ تشکیل لایه هیدروکسی‌آپاتیت بر روی سطح نمونه‌ها با افزایش زمان غوطه‌وری است. ضمن این‌که، نتایج مذکور توسط نتایج حاصل از طیف‌سنجی تبدیل فوریه فرسرخ، مبنی بر مشاهده نوارهای فسفات و کربنات به‌عنوان معیاری از تشکیل لایه هیدروکسی‌آپاتیت، در روز سه و پنج غوطه‌وری به‌ترتیب در نمونه‌های 68S7C و 68S8C و افزایش ارتفاع باندها با افزایش زمان غوطه‌وری تا ۱۴ روز تأیید گردید.

۳) طبق نتایج حاصل از آزمون طیف‌سنجی پلاسمای جفت‌شده القایی، افزایش و کاهش غلظت سیلیسیم و کلسیم، نرخ افزایش غلظت استرانسیم، کاهش غلظت فسفر و افزایش غلظت pH تا ۱۴ روز غوطه‌وری، حاکی از تشکیل لایه هیدروکسی‌آپاتیت در هر دو نمونه مورد بررسی، تسریع در تشکیل و افزایش نرخ تشکیل لایه مذکور در نمونه 68S7C نسبت به نمونه 68S8C

واژه‌نامه

است که نتایج مذکور توسط تصاویر حاصل از میکروسکوپ الکترونی روبشی نیز تأیید و ریزساختار آن، کروی گزارش گردید.

۴) طبق نتایج حاصل از آزمون‌های سمیت سلولی (۰/۰۰۱ < p < ۰/۰۰۱، ***p < ۰/۰۰۱) و فعالیت فسفات قلیایی (۰/۰۰۱ < p < ۰/۰۰۰۱) پس از هفت روز کشت در محیط کشت برون‌تنی، رشد و تکثیر سلولی سلول‌های استخوان‌ساز MC3T3-E1 در نمونه 68S7C نسبت به نمونه 68S8C با اختلاف قابل ملاحظه آماری به‌ترتیب ۱۳ و ۷ درصد افزایش یافت.

۵) بنابراین با توجه به نتایج حاصل از آزمون‌های مشخصه‌یابی و ارزیابی‌های زیستی، نمونه 68S7C به دلیل پایدارسازی در دمای بهینه °C ۷۰۰، داشتن نرخ بالاتر تشکیل لایه هیدروکسی‌آپاتیت، افزایش ۱۳ درصدی رشد و تکثیر سلولی سلول‌های استخوان‌ساز MC3T3-E1، افزایش ۷ درصدی فعالیت فسفات قلیایی و به تبع آن ارتقای زیست‌سازگاری آن، به‌عنوان یک گزینه قابل اعتماد به‌منظور کاربردهای درمانی مهندسی‌بافت استخوان انتخاب و معرفی گردید.

تشکر و سپاسگزاری

این تحقیق حمایت خاصی از مؤسسات عمومی، صنعتی و غیرانتفاعی دریافت نکرده است.

تضاد منافع

نویسندگان مقاله اذعان دارند هیچ‌نوع تضاد منافی با شخص، شرکت یا سازمانی برای این پژوهش ندارند.

1. recovery
2. hydroxyapatite
3. hard tissue
4. orthopedics
5. tricalcium phosphate
6. reconstruction
7. tissue engineering

8. bio-inert
9. biodegradable
10. bioactive
11. bioactive glasses
12. osteogenesis
13. melting
14. sol-gel

15. simulated body fluid (SBF) solution
16. osteoblasts
17. stabilization
18. in-vitro
19. X-ray diffraction (XRD)
20. Fourier transform infrared spectroscopy (FTIR)
21. scanning electron microscope (SEM)
22. inductively coupled plasma atomic emission spectroscopy (ICP-AES)
23. -3(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide assay
24. alkaline phosphatase (ALP)
25. hydrolysis
26. differential thermal analysis (DTA)
27. thermogravimetric analysis (TGA)
28. pipette
29. optical Density (OD)
30. phosphate buffered saline (PBS)
31. P-nitrophenyl phosphate
32. tris buffer
33. microplate reader

مراجع

1. Anand A, Kankova H, Hajovska Z, Galusek D, Boccaccini A, Galuskova D. Bio-response of copper-magnesium co-substituted mesoporous bioactive glass for bone tissue regeneration. *Mater Chem B*. 2024;12(1):1875-1891. <https://doi.org/10.1039/D3TB01568H>.
2. Fendi F, Abdullah B, Suryani S, Raya I, Tahir D, Iswahyudi I. Hydroxyapatite based for bone tissue engineering: innovation and new insights in 3D printing technology. *Polym Bull*. 2024; 81(1):1097-1116. <https://doi.org/10.1007/s00289-023-04794-6>.
3. Baghban eslaminezhad MR, Nejati E, Zandi M, Zomorodian E, Bagheri F. Study of mesenchymal stem cell proliferation and bone differentiation on composite scaffolds of PLLA and Nano Hydroxyapatite with different morphologies. *Cell J*. 2011; 122(12):469-476. <https://sid.ir/paper/556932/en>.
4. Negut I, Ristoscu C. Bioactive Glasses for Soft and Hard Tissue Healing Applications-A Short Review. *Appl Sci*. 2023; 13(10):6151. <https://doi.org/10.3390/app13106151>.
5. Nishikawa T, Kokubu M, Kato H, Imai K, Tanaka A. Confocal laser scanning microscopy in study of bone calcification. *Appl Surf Sci*. 2012; 262(82):64-68. <https://doi.org/10.1016/j.apsusc.2012.01.163>.
6. Hench L. Bioceramics: from concept to clinic. *Am Ceram Soc*. 1991; 74(18):1487-1510. <https://doi.org/10.1111/j.1151-2916.1991.tb07132.x>.
7. Vafa E, Tayebi E, Abbasi M, Azizli MJ, Bazargan-Lari R, Talaiekhosani A. A better roadmap for designing novel bioactive glasses: effective approaches for the development of innovative revolutionary bioglasses for future biomedical applications. *Environ Sci Pollut Res*. 2023; 30(1): 116960-116983. <https://doi.org/10.1007/s11356-022-24176-1>.
8. Dziadek M, Dziadek K, Checinska K, Zagrajczuk B, Cholewa-Kowalska K. Bioactive Glasses Modulate Anticancer Activity and Other Polyphenol-Related Properties of Polyphenol-Loaded PCL/ Bioactive Glass Composites. *ACS Appl Mater Interfaces*. 2024; 16(19):24261-24273. <https://doi.org/10.1021/acsami.4c02418>.
9. Balbinot GS, Leitune VGB, Bahlis EAC, Ponzoni D, Visioli F, Collares FM. Niobium-containing bioactive glasses modulate alkaline phosphatase activity during bone repair. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater*. 2023; 111(6):1224-1231. <https://doi.org/10.1002/jbm.b.35227>.
10. Deliormanli A, Yildirim M. Sol-gel synthesis of 1393 bioactive glass powders containing therapeutic agents. *J Aust Ceram Soc*. 2016; 52(21):9-19. <https://aperta.ulakbim.gov.tr/record/57399>.
11. Ghaebi Panah N, Atkin R, Timothy B. Effect of low temperature crystallization on 58S bioactive glass sintering and compressive strength. *Ceram Int*. 2021; 47(21):30349-30357. <https://doi.org/10.1016/j.ceramint.2021.07.215>.
12. Dang T, Bui T, Guseva E, Ta A, Nguyen A, Hoang T. Characterization of bioactive glass synthesized by sol-gel process in hot water. *Cryst*. 2020; 10(2):529-541. <https://doi.org/10.3390/cryst10060529>.
13. Shivalingam Ch, Purushothaman B, Dhinasekaran D, Padmanaban R, Subramanian B. Role of sintering temperature dependent crystallization of bioactive glasses on erythrocyte and cytocompatibility. *Process Appl Ceram*. 2019; 13(1):12-23. <http://dx.doi.org/10.2298/PAC1901012C>.
14. Kokubo T, Kushitani H, Sakka S, Kitsugi T, Yamamuro T. Solutions able to reproduce in vivo surface-structure changes in bioactive glass-ceramic A-W3. *J Biomed Mater Res*. 1990; 24(6):721-734. <https://doi.org/10.1002/jbm.820240607>.
15. Zhao R, Wang Z, Gu L, Ma Z, Zheng H, Wang Q. Unraveling the relationship between the structural features and solubility properties in Sr-containing bioactive glasses. *Ceram Int*. 2024; 50(3):4245-4255. <https://doi.org/10.1016/j.ceramint.2023.07.240>.
16. Ma J, Chen C, Wang D, Hu J. Synthesis, characterization and in vitro bioactivity of magnesium-doped sol-gel glass and glass-ceramics. *Ceram*. 2011; 37(5):1637-1644. <https://doi.org/10.1016/j.ceramint.2011.01.043>.
17. Hesaraki S, Alizadeh M, Nazarian H, Sharifi D. Physico-chemical and in vitro biological evaluation

- of strontium/calcium silicophosphate glass. *Mater Sci.* 2010; 21(2):695–705. <https://doi.org/10.1007/s10856-009-3920-0>.
18. Hesaraki S, Gholami M, Vazehrad S, Shahrabi S. The effect of Sr concentration on bioactivity and biocompatibility of sol–gel derived glasses based on $\text{SiO}_2\text{--P}_2\text{O}_5\text{--CaO--SrO}$ quaternary system. *Mater Sci Eng C.* 2010; 30(3):383-390. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2009.12.001>.
 19. Gupta N, Santhiya D, Aditya A, Badra K. Dendrimer templated bioactive glass-ceramic nanovehicle for gene delivery applications. *RSC Adv.* 2015; 5(70):56794-56807. <https://doi.org/10.1039/C5RA04441C>.
 20. Chen X, Guo C, Zhao N. Preparation and characterization of the sol-gel nano-bioactive glasses modified by the coupling agent gamma-aminopropyltriethoxysilane. *Appl Surf Sci.* 2008; 255(2):466–468. <https://doi.org/10.1016/j.apsusc.2008.06.061>.
 21. Veres R, Vanea E, Gruian C, Baia L, Simon V. The effects of PEG assisted synthesis and zinc addition on gamma irradiated bioactive glasses. *Compos B Eng.* 2014; 66(1): 83-88. <https://doi.org/10.1016/j.compositesb.2014.05.006>.
 22. Chen J, Ma C, Wang D, Hu J. Effect of magnesia on structure, degradability and in vitro bioactivity of $\text{SiO}_2\text{--CaO--MgO--P}_2\text{O}_5$ system ceramics. *Mater Lett.* 2011; 65(1):130–133. <https://doi.org/10.1016/j.matlet.2010.09.040>.
 23. Ereiba K, Abd Raboh A, Mostafa A. Characterization of some bioactive glasses based on $\text{SiO}_2\text{--CaO--P}_2\text{O}_5\text{--SrO}$ quaternary system prepared by sol–gel method. *Nat Sci.* 2014;12(5):97-105. <http://dx.doi.org/10.1080/15533174.2013.783869>.
 24. Wu X, Meng G, Wang S, Wu F, Huang W, Gu Z. Zn and Sr incorporated 64S bioglasses: material characterization, in-vitro bioactivity and mesenchymal stem cell responses. *Mater Sci Eng C.* 2015; 52(1):242–250. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2015.03.057>.
 25. Sharifianjazi F, Parvin N, Tahriri M. Formation of Apatite Nano-Needles on Novel Gel Derived $\text{SiO}_2\text{--P}_2\text{O}_5\text{--CaO--SrO--Ag}_2\text{O}$ Bioactive Glasses. *Ceram Int.* 2017; 43(17): 15214–15220. <https://doi.org/10.1016/j.ceramint.2017.08.056>.
 26. Liu J, Rawlinson S, Hill R, Fortune F. Strontium-substituted bioactive glasses in vitro osteogenic and antibacterial effects. *Dent Mater.* 2016; 32(3):412–422. <https://doi.org/10.1016/j.dental.2015.12.013>.
 27. Isaac J. Effects of strontium-doped bioactive glass on the differentiation of cultured osteogenic cells. *Eur Cell.* 2011; 21(1473-2262): 130–14307. <https://doi.org/10.22203/ecm.v021a11>. PMID: 21305476.
 28. Jiménez M, Abradelo C, San Román J, Rojo L. Bibliographic review on the state of the art of strontium and zinc based regenerative therapies. Recent developments and clinical applications. *J Mater Chem B.* 2019; 7(12):1974–1985. <https://doi.org/10.1039/C8TB02738B>.
 29. Sourav D, Bavya D, Sanjay G, Biswanath K, Vamsi K, Mangal R. Mechanical and in Vitro Degradation Behavior of Magnesium-bioactive Glass Composites Prepared by SPS for Biomedical Applications. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater.* 2019; 107(2):352–65. <https://doi.org/10.1002/jbm.b.34127>.
 30. Tabiaa Z, El Mabrouk Kh, Brichaa M, Nouneh Kh. Mesoporous Bioactive Glass Nanoparticles Doped with Magnesium: Drug Delivery and Acellular in Vitro Bioactivity. *RSC Adv.* 2019; 9(22):12232-12246. <https://doi.org/10.1039/C9RA01133A>.
 31. Nawaz Q, Pablos-Martin A, Souza e Silva JM, Hurle K, Jaimes A, Brauer D, Boccaccini A. New insights into the crystallization process of sol-gel-derived 45S5 bioactive glass. *Am Ceram Soc.* 2020; 103(8):4234-4247. <https://doi.org/10.1111/jace.17124>.
 32. Fandzloch M, Bodylska W, Augustyniak AW, Roszek K, Jaromin A, Lukowiak A. Bioactive nanoglasses and xerogels ($\text{SiO}_2\text{--CaO}$ and $\text{SiO}_2\text{--CaO--P}_2\text{O}_5$) as promising candidates for biomedical applications. *Ceram Int.* 2023; 49(5):7438-51. <https://doi.org/10.1016/j.ceramint.2022.10.225>.
 33. Luz G, Mano J. Preparation and characterization of bioactive glass nanoparticles prepared by sol–gel for biomedical applications. *Nanotechnol.* 2011;22(49):344-417. <https://doi.org/10.1088/0957-4484/22/49/494014>.
 34. Thomas A, Bera J. Sol–gel synthesis and in vitro bioactivity of glass–ceramics in $\text{SiO}_2\text{--CaO--Na}_2\text{O--P}_2\text{O}_5$ system. *J Sol-Gel Sci Technol.* 2016; 80(2): 411-416. <https://doi.org/10.1007/s10971-016-4110-4>.