

ارزیابی سمیت سلولی و خواص مکانیکی نانوکامپوزیت

فلوئور آپاتیت-شیشه زیست فعال 45S5

نوع مقاله: علمی پژوهشی

فاطمه میرجلیلی^۱، صاحبعلی منافی^{۲*}، ریحانه رشادی^۳^۱ گروه مهندسی مواد سرامیک، واحد میبد، دانشگاه آزاد اسلامی، میبد، ایران^۲ گروه مهندسی مواد سرامیک، واحد شاهرود، دانشگاه آزاد اسلامی، شاهرود، ایران^۳ گروه مهندسی بیومتریال، واحد یزد، دانشگاه آزاد اسلامی، یزد، ایران

* ali_manafi2005@yahoo.com

چکیده:

هدف از این پژوهش، ساخت و مشخصه‌یابی پودر نانوکامپوزیتی از شیشه زیست فعال 45S5/فلوئور آپاتیت (FA) می‌باشد. نانوکامپوزیت‌ها حاوی ۱۰، ۱۵ و ۲۰ درصد وزنی فلوئور آپاتیت با روش سل-ژل سنتز شدند. از آنالیزهای XRD و FTIR جهت مشخصه‌یابی و ارزیابی نانوکامپوزیت‌های تولید شده، استفاده شدند. نتایج بدست‌آمده از آنالیزهای XRD و FTIR نشان‌دهنده سنتز موفقیت‌آمیز نانوکامپوزیت‌های 45S5/FA با خلوص فازی بالا است. نتایج استحکام فشاری افزایش استحکام تا نمونه حاوی ۱۵٪ FA را نشان داد. جهت بررسی سمیت سلولی از آزمون MTT (3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-Diphenyltetrazolium Bromide) بهره گرفته شد نتایج این بخش نشان‌دهنده عدم سمیت سلولی نمونه‌ها، کاهش میزان زنده‌مانی پس از هفت روز بود. کمترین میزان زنده‌مانی مربوط به نمونه فلوئور آپاتیت خالص بود.

اطلاعات مقاله:

دریافت: ۲۰ آبان ۱۳۹۸

پذیرش: ۱۷ دی ۱۳۹۸

کلید واژه:

نانوکامپوزیت، شیشه زیست فعال 45S5 سل-ژل، استحکام فشاری.

۱- مقدمه

اثرات بیماری‌های استخوان، نه تنها خود افراد آسیب‌دیده و خانواده‌ها را تحت تاثیر قرار میدهد بلکه جامعه را بطور وسیعی تحت تاثیر قرار می‌دهد. از یک چشم‌انداز اختلالات استخوانی می‌تواند منتج به محدودیت در فعالیت‌های روزانه و همچنین تحرک شود و کیفیت زندگی را کاهش دهد. از

نقطه نظر جامعه بیماری‌های استخوانی بار اقتصادی مستقیمی بر خانواده و جامعه می‌گذارد. به علاوه به دلیل کاهش مشارکت نیروی کار تاثیر غیرمستقیمی بر اقتصاد جامعه خواهد گذاشت [۱]. با توجه به بار قابل توجهی که از بیماری‌های استخوانی منتج می‌شود و همچنین شیوع بالای این مشکلات توجه بیشتری نسبت به پیشگیری و توسعه



سال ۱۹۵۰ جهت تهیه شیشه‌های چند جزئی به کار رفت. این روش، یک روش سنتز شیمیایی است که شامل آلکوکسیدهای قابل هیدرولیز می‌باشد. این روش در تهیه کامپوزیت‌های زمینه‌سرامیکی بسیار مؤثر شناخته شده است. سرامیک‌های کلسیم فسفات‌ی بدون تشکیل لایه فیروز با بافت میزبان ادغام می‌شوند. مطالعات نشان می‌دهد که این سرامیک‌ها، زیست‌فعال، زیست‌سازگار بوده و خاصیت هدایت استخوانی دارند. هیدروکسی آپاتیت فاز اصلی غیر معدنی بدن انسان است و بطور گسترده‌ای برای جایگزینی استخوان و یا به عنوان ماده ترمیمی استخوان و یا دندان استفاده شده است [۱۶-۱۳]. با توجه به طبیعت شیمیایی، هیدروکسی آپاتیت ماده‌ای است که عناصر دیگر می‌توانند بجای گروه‌های مختلف آن جایگزین شوند و بیشتر این جانشین‌ها عبارت از کربنات، فلوراید و کلراید برای گروه‌های هیدروکسیل در HA، هیدروکسی آپاتیت شامل فلورین یا فلور هیدروکسی آپاتیت (FHA) $(Ca_5(PO_4)_3(OH) I-XFX)$ به گونه‌ای F بطور جزئی جانشین OH در HA شده است و به عنوان یک بیومواد برای ایمپلنت‌های استخوان و دندان معرفی می‌شود. استخوان انسان شامل حدود ۱٪ وزنی فلئور است که به‌عنوان عاملی مؤثر برای مهار پوسیدگی شناخته شده است. تحقیقات نشان داده است که مقدار کمی از فلئور می‌تواند روند تشکیل استخوان را افزایش دهد [۱۹-۱۷]. تحقیقات نشان داد فلئورآپاتیت (FA) در مقایسه با هیدروکسی آپاتیت خواص بیولوژیکی مشابه یا بهتری از خود نشان می‌دهد. جانشینی یون فلوراید در هیدروکسی آپاتیت منجر به افزایش کریستالیت و کاهش انحلال‌پذیری، رسوب بهتر

روش‌های درمانی موثرتر در این جهت مورد نیاز است. بر طبق تعریف موسسه ملی سلامت آمریکا، هر ماده یا ترکیبی از مواد به غیر از دارو که به صورت طبیعی یا مصنوعی برای هر بازه زمانی می‌تواند جایگزین یا عامل افزایش هر بافت، ارگان یا عملکردی از بدن به‌طور کامل یا جزئی، به منظور بهبود کیفیت زندگی هر فرد شود، بیومواد گفته می‌شود [۲]. اصطلاح بیوکامپوزیت اشاره به موادی دارد که در مهندسی زیستی به کار گرفته می‌شود [۵-۳]. شیشه‌های زیست‌فعال از جمله بیومواد سخت و غیرمتخلخل هستند که معمولاً از ترکیب اکسید سدیم، اکسید کلسیم و دی‌اکسید سیلیکون تشکیل شده‌اند. در چند دهه گذشته سرامیک‌ها به دلیل زیست‌سازگاری و پایداری شیمیایی عالی در بدن انسان بطور گسترده‌ای توسعه یافته‌اند. بیوسرامیک‌ها عناصر سمی در بدن آزاد نمی‌کنند، حتی اگر برای مدت طولانی در معرض مایعات بدن باشند. شیشه‌ها و شیشه سرامیک‌ها در حوزه مواد زیست‌فعال وارد بیومواد می‌شوند به طوری که سطح مشترک که سطح مشترک چسبنده‌ای با بافت ایجاد می‌نمایند که در برابر نیروهای مکانیکی مقاومت خوبی از خود نشان می‌دهد. از مزیت‌های اصلی شیشه‌های زیست‌فعال سرعت بالای واکنش سطحی در آن‌ها می‌باشد که منجر به پیوند سریع با بافت می‌گردد [۹-۶]. شیشه زیست‌فعال تشکیل لایه هیدروکسی آپاتیت را در هنگام تماس با مایع فیزیولوژیک بدن تسهیل می‌کند. در هنگام تماس شیشه زیست‌فعال با استخوان یک لایه آپاتیت شبه استخوان با خواص چسبندگی مناسب در سطح شکل می‌گیرد [۱۲-۱۰]. یکی دیگر از روش‌های تهیه شیشه‌ها و شیشه‌های زیست‌فعالی، روش سل-ژل می‌باشد. این روش اولین بار در



کریستال نانو آپاتیت در طول شکل‌گیری شیشه زیست فعال از طریق فرآیند سل-ژل بود [۲۵]. هدف از این پژوهش سنتز کامپوزیت‌های فلئورآپاتیت-45S5 با درصد‌های متفاوت شیشه بایوگلاس می‌باشد. از آنجایی که در این تحقیق از فلئورآپاتیت استفاده شده است باعث افزایش تشکیل بافت استخوانی نسبت به آپاتیت خواهد شد. نوآوری این تحقیق، توسعه، تهیه و ارزیابی نانو کامپوزیت شیشه سرامیکی حاوی شیشه زیست فعال و فلئورآپاتیت با خواصی نزدیک به خواص استخوان و خواص زیست‌سازگاری مطلوب به عنوان ماده جایگزین سازنده استخوان است. به این منظور نانو کامپوزیت‌های فلئورآپاتیت-45S5 با درصد‌های مختلف فلئورآپاتیت تهیه گردید و بررسی‌های فازی و ریزساختاری و تست سمیت و استحکام فشاری نانو کامپوزیت‌ها مورد بررسی قرار گرفت.

۲- فعالیت‌های تجربی

۲-۱- تهیه نانوذرات شیشه زیست فعال 45S5

به منظور سنتز شیشه زیست فعال 45S5 از پیش ماده‌های نیتریک اسید، TEOS (تترا اتیل اورتوسیلیکات)، کلسیم نترات چهارآبه $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ ، سدیم نترات NaNO_3 دی آمونیوم هیدروژن فسفات $(\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4)$ استفاده شد. در ابتدا ۱۴/۵۴ گرم از پیش ماده TEOS (تترا اتیل اورتوسیلیکات) به ۱۰۰ میلی‌لیتر محلول اسیدی یک مولار نیتریک اسید که آماده شده بود اضافه گردید. این محلول در دمای محیط در مدت زمان یک ساعت به قدری همزده شد تا محلولی شفاف بدست آید. در ادامه سه محلول با پیش ماده‌های مختلف در ۱۰۰ میلی‌لیتر آب دیونیزه تهیه شده‌اند

و جذب پروتئین بیشتر آن می‌شود. همچنین فلئورآپاتیت پایداری حرارتی بهتری نسبت به هیدروکسی آپاتیت داراست [۲۲-۲۰]. الفزال و همکارانش کنترل محتوای فلئورید را در محلول جامد فلئور هیدروکسی آپاتیت با مقادیر تری اتانول آمین $(\text{N}(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{OH})_3)$ و اسید تری فلئوراستاتیک (CH_3COOH) در محلول‌های مرکب اتانول $(\text{Ca}(\text{NO}_3)_2)$ و $\text{PO}(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{OH})_x(\text{OH})_{3-x}$ با نسبت Ca/P ، ۱/۶۷ گزارش کردند. بعد از تبخیر محلول مرکب اتانول در دمای 150°C روی صفحه داغ، پودر حاصله که شامل ترکیب همگن کریستالیت‌های نترات کلسیم و فسفات کلسیم بی‌شکل است، در دمای 500°C یا 900°C به مدت یک ساعت حرارت داده می‌شود تا به فاز آپاتیت خالص تبدیل گردد [۲۳].

در سال ۲۰۱۱ مطالعه‌ای تحت عنوان سنتز نانوذرات فلئور آپاتیت-هیدروکسی آپاتیت و بررسی سمیت آن‌ها انجام شد. در این مطالعه، نانوذرات کلسیم فسفات با دو فاز فلئور آپاتیت و هیدروکسی آپاتیت با استفاده از روش سل-ژل تهیه شدند. در ادامه اتیل فسفات، نترات کلسیم هیدراته و فلوراید آمونیوم، به عنوان پیش ماده به ترتیب برای Ca ، P و F با نرخ $\text{Ca}/\text{P}=1/72$ مورد استفاده قرار گرفت. مواد بدست آمده از طریق سل-ژل بعد از خشک کردن در دما 80°C و سپس عملیات حرارتی در دمای 550°C مورد بررسی قرار گرفتند [۲۴]. در سال ۲۰۱۵ آجیتا و همکاران در مطالعه‌ای به بررسی شکل‌گیری نانو کریستال‌های آپاتیت در شیشه زیست فعال بدست آمده از روش سل-ژل پرداختند. هدف از این مطالعه درک فرآیند درگیر در تشکیل یک فاز



این سه محلول عبارتند از:

- ۸/۹۷ گرم کلسیم نیترات چهارآبه $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ در ۱۰۰ میلی لیتر آب دیونیزه.
- ۱/۲۳ گرم سدیم نیترات NaNO_3 در ۱۰۰ میلی لیتر آب دیونیزه.
- ۱/۲۳ گرم دی آمونیوم هیدروژن فسفات در ۱۰۰ میلی لیتر آب دیونیزه.

بعد از آن این سه محلول به ترتیب و به صورت قطره قطره روی محلول اول ریخته و هم زده شد تا سل اولیه حاصل گردد. سل بدست آمده برای مدت زمان ۱۴ روز در دمای محیط نگهداری شد تا به ژل تبدیل گردد. بعد از گذشت این مدت زمان، ژل بدست آمده با کمک خشک کن انجمادی در دمای 51°C و فشار ۰/۵ تور به مدت دو روز خشک شد. در ادامه بر روی ژل خشک شده در دمای 620°C به مدت ۱/۵ ساعت با سرعت گرمادهی $10^\circ\text{C}/\text{min}$ عملیات حرارتی انجام شد و پودر سفید رنگ شیشه زیست فعال حاصل گردید. در مرحله نهایی به منظور کاهش اندازه ذرات پودر بدست آمده این پودر به مدت ۶ h در دستگاه آسیاب گلوله‌ای با کاپ زیرکونیا با سرعت ۳۰۰ rpm آسیاب شد.

۲-۲- تهیه نانوذرات فلئورآپاتیت

نخست سه محلول با مشخصات ذیل تهیه می‌گردد:

- ابتدا ۱۱/۸۲ گرم از پیش ماده کلسیم نیترات چهار آبه در ۵۰ میلی لیتر از محلول اتانول-آب (۷۵-۲۵٪) تهیه گردید سپس ۲/۷۳ گرم از پیش ماده تری اتیل فسفات (TEP) در ۵۰ میلی لیتر از محلول اتانول-آب (۷۵-۲۵٪) تهیه شد و در نهایت ۰/۵۶ گرم از پیش ماده NH_4F در ۵۰ میلی لیتر از محلول اتانول-آب تهیه گردید. محلول‌های فوق با ترتیب

ذکر شده و به آرامی ضمن همزدن و اعمال دمای 30°C باهم ترکیب شده و پس از اختلاط کامل به مدت ۲۴ h همزده تا سل مادر حاصل شود. سل حاصل به مدت ۱۴ روز در دمای محیط نگهداری می‌گردد تا اینکه به ژل یکنواخت و شفاف تبدیل شود. ژل حاصل سپس به مدت ۴۸ ساعت در دمای 51°C و فشار ۰/۵ تور با استفاده از خشک کن انجمادی Freeze dryer خشک گردید. ژل خشک شده در دمای 650°C به مدت ۱ ساعت کلسینه شده تا پودر سفید رنگ فلئورآپاتیت حاصل گردد.

۲-۳- تهیه نانوکامپوزیت شیشه زیست فعال 45S5-فلئورآپاتیت

برای سنتز نانوکامپوزیت‌های شیشه زیست فعال 45S5-فلئورآپاتیت با درصد وزنی‌های ۱۰، ۱۵ و ۲۰ در صد وزنی فلئورآپاتیت، در ابتدا سل ذکر شده در روش سنتز شیشه زیست فعال و همچنین سل تهیه شده در روش سنتز فلئورآپاتیت به نسبت‌های وزنی مشخص با هم ترکیب شدند و به مدت ۲ ساعت با استفاده از همزن مغناطیسی همزده شدند. سه سل بدست آمده با نسبت وزنی‌های متفاوت برای مدت زمان ۱۴ روز در دمای محیط نگهداری شدند تا به ژلی یکنواخت و شفاف تبدیل شدند. ژل‌های شفاف حاصل شده بوسیله خشک کن انجمادی در دمای معادل 51°C و فشار ۰/۵ Torr به مدت دو روز خشک شدند.

در نهایت ژل خشک شده در دمای 620°C به مدت ۱ h عملیات حرارتی انجام شد تا نانوکامپوزیت‌های مربوطه حاصل گردد. در جدول ۱ علائم اختصاری مربوط به مواد سنتز شده که در متن آورده شده قابل مشاهده است.



۲-۵- ارزیابی میزان زنده‌مانی سلول

توسط آزمون MTT

مطالعه زنده‌مانی سلول‌ها و نیز تکثیر آنها از مهمترین المان‌ها برای سلامت یک سلول به شمار می‌آیند. به منظور آماده‌سازی نمونه‌ها برای سنجش به دلیل پودری بودن نمونه‌ها از آنها عصاره‌گیری به عمل آمد. در این آزمون از لاین سلولی L-929 که سلول‌های فیروپلاست موش هستند در آزمایشگاه کشت سلولی دانشگاه تربیت مدرس استفاده گردید. برای آماده‌سازی نمونه‌ها ۵ میلی‌گرم از هر یک از نمونه‌ها در محیط کشت مخلوط شده و به مدت ۷۲ h در دمای ۳۷ °C انکوبه شدند.

این نمونه‌ها برای جلوگیری از آلودگی فیلتر می‌گردند و عصاره‌گیری انجام می‌گیرد. پس از عصاره‌گیری سلول‌های مورد نظر در پلیت کشت داده می‌شوند. تعدادی از چاهک‌ها به عنوان شاهد و تعدادی به عنوان نمونه آزمایش در نظر گرفته می‌شود. پس از اتمام زمان مورد نظر محیط کشت دور ریخته می‌شود و حجم معینی از محلول بر روی سلول‌ها ریخته می‌شود و سپس سلول‌ها در این محلول انکوبه می‌شود. در این زمان حلقه MTT شکسته می‌شود، شکسته شدن این حلقه موجب ایجاد کریستال‌های ارغوانی رنگ می‌شود، میزان این رنگ با سلول‌های زنده رابطه مستقیم دارد. در انتها جذب محلول توسط دستگاه اسپکتروفوتومتر محاسبه می‌شود [۲۶-۲۸]. سپس از فرمول زیر به منظور بررسی میزان زنده‌مانی استفاده می‌شود:

$$\text{Cell Viability\%} = \frac{\text{OD}_s}{\text{OD}_c}$$

که در آن OD_s اپتیکال دنسیته نمونه و OD_c اپتیکال دنسیته کنترل است.

جدول ۱- علائم اختصاری مربوط به مواد سنتز شده.

علامت اختصاری	نوع ماده سنتز شده
BG-100%	نانوذرات شیشه زیست فعال خالص
FA-100%	نانوذرات فلئور آپاتیت خالص
FA-10%	نانوکامپوزیت شیشه زیست فعال-فلئور آپاتیت حاوی ۱۰٪ وزنی FA
FA-15%	نانوکامپوزیت شیشه زیست فعال-فلئور آپاتیت حاوی ۱۵٪ وزنی FA
FA-20%	نانوکامپوزیت شیشه زیست فعال-فلئور آپاتیت حاوی ۲۰٪ وزنی FA

۲-۴- مشخصه‌یابی نمونه‌ها

در این تحقیق برای بررسی تبلور و ساختار بلوری نانوذرات سنتز شده از تکنیک پراش پرتو ایکس (XRD) استفاده شد. دستگاه XRD مورد استفاده مدل Siemens D-500 با تابش $\text{CuK}\alpha$ ($\lambda=1.5406 \text{ \AA}$) می‌باشد. برای بررسی گروه‌های عاملی، از طیف‌سنج مادون قرمز تبدیل فوریه (FT-IR) مدل PerkinElmer Spectrum RXI و در محدوده عدد موجی $4000-400 \text{ cm}^{-1}$ استفاده شد. برای محاسبه استحکام فشاری نانوکامپوزیت شیشه زیست فعال حاوی درصد وزنی‌های متفاوتی از فلئور آپاتیت در ابتدا نمونه‌های تولید شده در یک قالب به شکل استوانه با وارد کردن فشار تا ۶ بار و مدت ۱۰ s به شکل این قالب در اندازه $8 \times 4 \text{ mm}^2$ در آمدند. نمونه‌ها به شکل استوانه‌ای قالب‌گیری در نهایت با اعمال نیرویی معادل با نرخ 0.2 mm/min بوسیله دستگاه استجکام فشاری (SANTAM STM-20) سنجش شدند.



۳- نتایج و بحث

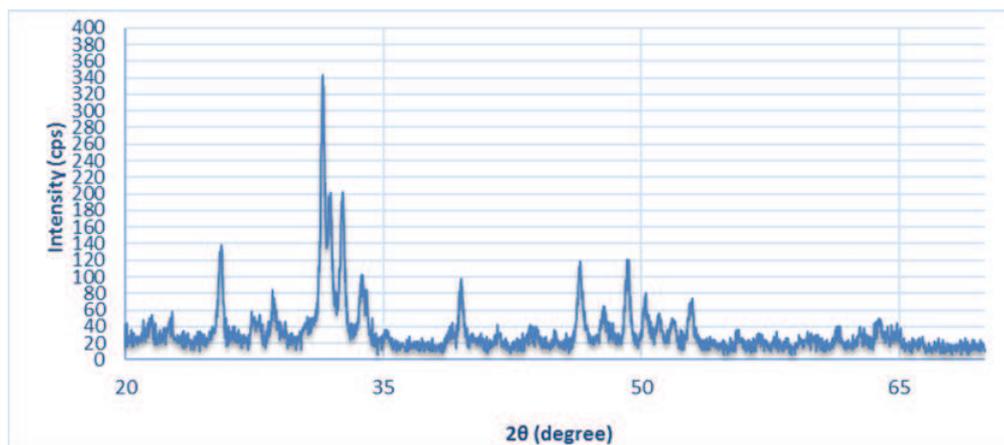
۳-۱- الگوی پراش اشعه ایکس

الگوی پراش XRD نانوکامپوزیت FA-BG (فلوئورآپاتیت-شیشه زیست فعال 45S5) متشکل از ۱۵٪ وزنی فلوئورآپاتیت عمدتاً نشان دهنده پیک‌های غالب فاز زمینه یا نانوذرات فلوئورآپاتیت می‌باشد. با بررسی کلی الگوها می‌توان گفت که به دلیل همپوشانی پیک آمورف مشخصه فاز شیشه با پیک‌های آپاتیت در گستره ۲۵ تا ۳۵°C، پیک آمورف شیشه چندان قابل تمیز نمی‌باشد. افزودن فاز شیشه به فلوئورآپاتیت، پهن‌شدگی تدریجی پیک‌های پراش را به دنبال داشته که آن هم بر کاهش بلورینگی و کاهش اندازه بلور بر مبنای داده‌های XRD تاثیر خواهد می‌گذارد.

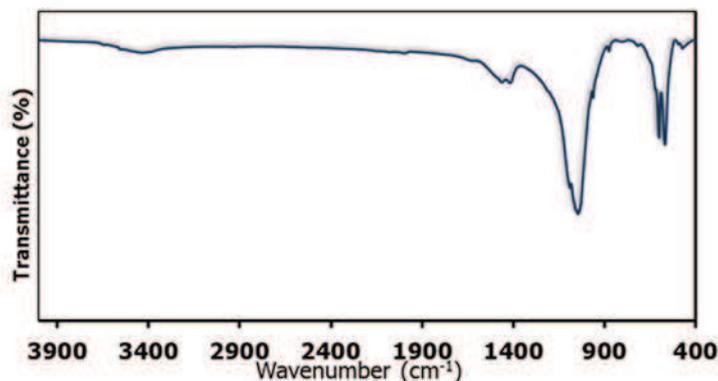
۳-۲- ارزیابی FT-IR نانوکامپوزیت فلوئورآپاتیت-45S5

طیف FTIR نانوکامپوزیت‌های BG-FA (شیشه زیست فعال 45S5-فلوئورآپاتیت) حاوی ۱۵ وزنی فلوئورآپاتیت در

شکل ۲ قابل مشاهده است. این طیف‌ها فقط دارای قله‌های مربوط به دو ماده اولیه بوده و عدم وجود ناخالصی در مواد سنتز شده را تأیید می‌کنند. همان‌طور که در شکل مشخص است طیف‌ها مربوط به سه نمونه حاوی مقادیر متفاوت از FA هستند. پیک واقع در 464 cm^{-1} مربوط به ارتعاشات خمشی گروه Si-O-Si می‌باشد و باند جذبی 803 cm^{-1} مختص ارتعاشات کششی O-Si در شبکه سیلیکاتی شیشه می‌باشد. پیک پهن موجود در 1047 cm^{-1} که شدیدترین پیک موجود در ساختار است متعلق به ارتعاشات کششی از گروه فسفات تتراهدرال (PO_4^{3-}) است می‌باشد، و نهایتاً دو پیک تیز واقع در 567 و 607 cm^{-1} متعلق به ارتعاشات گروه PO_4^{3-} می‌باشند. دو پیک پهن و نسبتاً کشیده با مرکزیت 1640 cm^{-1} و نیز 3461 cm^{-1} متعلق به O-H می‌باشند [۳۱-۲۹]. نتایج مطالعات منافی و همکاران [۳۲] نشان می‌دهد الگوی پراش کامپوزیت‌های سنتز شده، مؤید شیشه سرامیک بودن کامپوزیت‌ها می‌باشد. وجود شیشه در ساختار ماده باعث پهن‌شدگی الگوی پراش مواد گشته است.



شکل ۱- الگوی پراش پرتو ایکس (XRD) نانوکامپوزیت فلوئورآپاتیت-45S5 حاوی ۱۵ درصد وزنی فلوئورآپاتیت.



شکل ۲- طیف‌نگاری فرسرخ نانوکامپوزیت شیشه زیست فعال-فلوئورآپاتیت حاوی ۱۵ درصد وزنی فلوئورآپاتیت.

نکته ضروری است که استحکام فشاری به اندازه ذرات و نیز توزیع ذرات در کامپوزیت نیز وابسته است. علت کاهش استحکام بعد از افزایش ۱۵٪ فلورآپاتیت به علت قانون مخلوطها کاهش می‌یابد. در ضمن با افزایش درصد فلورآپاتیت و کاهش درصد شیشه زیست فعال باعث می‌شود که تفجوشی توسط سیلان ناروان به راحتی صورت نگیرد و ذرات به خوبی بهم نچسبند به همین دلیل استحکام کاهش می‌یابد.

۳-۴-۱- آزمون سمیت سلولی (3-MTT) (4,5-Dimethylthiazol-2-YI)-2,5-Diphenyltetrazolium Bromide)

نتایج آزمون سمیت سلولی نانوذرات 45S5 و فلوئورآپاتیت خالص و نیز نانوکامپوزیت‌های BG-FA (شیشه زیست فعال 45S5-FA) متشکل از ۱۰، ۱۵ و ۲۰٪ وزنی فلوئورآپاتیت طی ۲۴ ساعت و ۷ روز در شکل‌های ۵ و ۶ آورده شده است. آزمون MMT به تنهایی برای بررسی رفتار سلولی در مجاورت نمونه‌ها کافی نیست اما بیانگر این موضوع است که نانوکامپوزیت نانوکامپوزیت‌های 45S5-FA سمیتی ندارند. همان‌طور که مشاهده می‌گردد نتایج آزمون سمیت بعد از ۷ روز حاکی از افزایش دانسیته نوری با

۳-۳- ارزیابی FE-SEM نانوکامپوزیت 45S5/FA

شکل ۳ تصویر FE-SEM نانوکامپوزیت‌های FA-BG (فلوئورآپاتیت-شیشه زیست فعال 45S5) متشکل از ۱۵ وزنی فلوئورآپاتیت نشان دهنده سنتز ذرات نانومتری با مورفولوژی کروی هستند. تصویر همچنین گویای ساختار متخلخل و آگلومره نانوذرات حکایت دارد. قطر متوسط اندازه ذرات در نانوکامپوزیت در گستره ۳۰-۶۰ nm برآورد می‌شود.

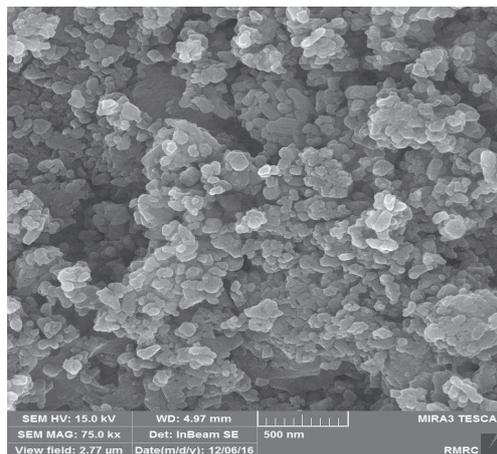
۳-۴- استحکام فشاری

نتایج استحکام فشاری در شکل ۴ قابل مشاهده است این نتایج به خوبی بیانگر این موضوع است که با افزایش فاز دوم به فاز زمینه شیشه زیست فعال باعث بهبود خواص فشاری این کامپوزیت شده است. همچنین می‌توان دریافت که نتایج این آزمون نشان دهنده استحکام فشاری بالاتر در نمونه حاوی ۱۵٪ وزنی فلوئورآپاتیت است. که به علت افزایش تفجوشی توسط سیلان ناروان به علت افزایش فاز شیشه می‌باشد که باعث چسبیدن ذرات به یکدیگر و افزایش استحکام می‌گردد. در اینجا می‌توان این نمونه را نمونه بهینه از لحاظ استحکام فشاری معرفی کرد. ذکر این

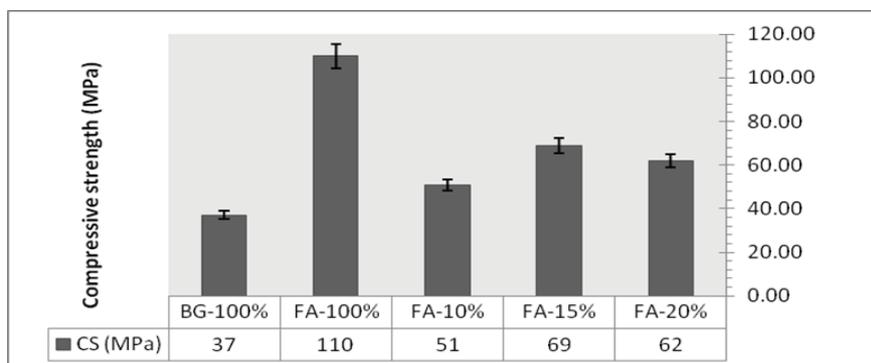


را به توازن برقرار شده در این نوع کامپوزیت از حیث رهایش یون و سمیت نسبی متعاقب آن نسبت داد به علاوه مقدار ۱۵٪ وزنی فلئور در کامپوزیت با زمینه شیشه سرامیک پهنه‌ترین مقدار وزنی در بین باقی نمونه‌ها را از لحاظ رهایش یون داراست. در مقایسه با خود نمونه شاهد، تمامی این نمونه‌ها طی این بازه زمانی زنده‌مانی سلولی کمتری داشته‌اند، دلیل این امر را می‌توان در رهایش یون‌های متعدد از نمونه‌ها دانست که هر چند سمیتی را به دنبال ندارند ولی مانع از افزایش چشمگیر در رشد سلول‌ها می‌شود.

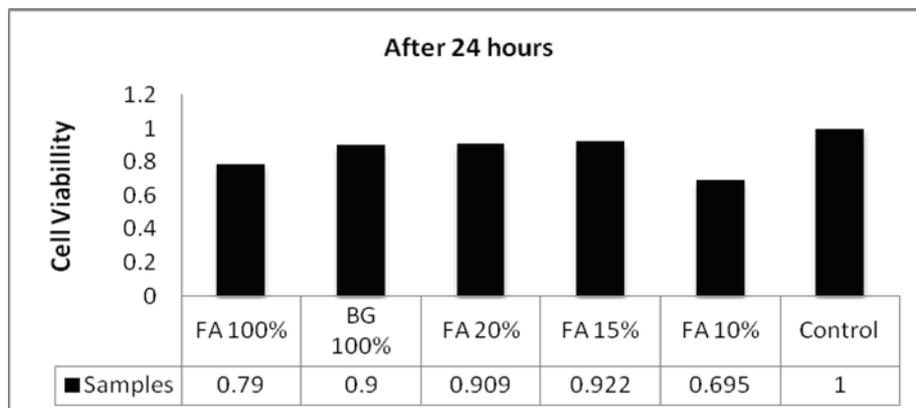
گذر زمان می‌باشد که می‌تواند گواه بر افزایش رشد سلول‌ها در مجاورت نانوذرات و نانوکامپوزیت‌ها و عدم سمیت سلولی آن‌ها باشد. بعد از گذشت هفت روز نمونه حاوی فلئورآپاتیت خالص میزان زنده‌مانی سلولی کمتری نسبت به بقیه نمونه‌ها داشته که دلیل آن رهایش یون فلئور در محیط است حضور مقادیر زیاد یون فلئور نه تنها به زیست فعالی کمی نمی‌کند بلکه ایجاد سمیت می‌کند و این مساله به خوبی بعد از هفت روز نمایان شده است. در بین تمام نمونه‌ها، نمونه حاوی ۱۵٪ وزنی فلئورآپاتیت رفتار بهتری نسبت به سایر نمونه‌ها از خود نشان می‌دهد که می‌توان آن



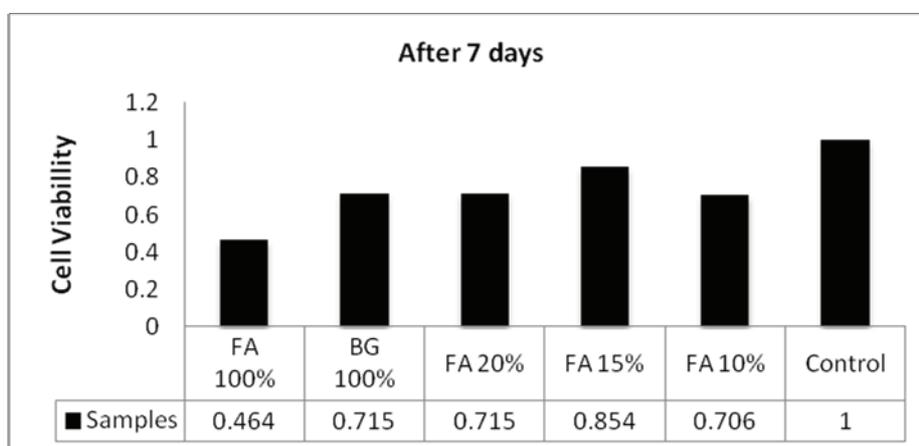
شکل ۳- تصویر میکروسکوپی FE-SEM نانوکامپوزیت شیشه زیست فعال-فلئورآپاتیت حاوی ۱۵ درصد وزنی فلئورآپاتیت.



شکل ۴- تغییرات استحکام فشاری مواد سنتز شده.



شکل ۵- سمیت سلولی مواد مورد مطالعه بعد از گذشت ۲۴ ساعت.

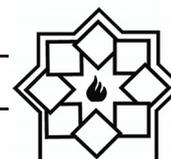


شکل ۶- سمیت سلولی مواد مورد مطالعه بعد از گذشت هفت روز.

کاهش جزئی استحکام با افزودن ۲۰٪ وزنی فلئورآپاتیت بودند که به نوع توزیع نانوذرات فلئورآپاتیت در فاز زمینه شیشه نسبت داده شد. آزمون سمیت سلولی MTT بر روی نانوذرات 45S5 و فلئورآپاتیت خالص و نیز نانوکامپوزیت‌های متشکل از ۱۰، ۱۵ و ۲۰٪ وزنی فلئورآپاتیت طی هفت روز حاکی از کاهش رشد سلولی بود. نانوکامپوزیت حاوی ۱۵٪ وزنی فلئورآپاتیت رفتار بهتری نسبت به سایر نمونه‌ها از خود نشان داد که به نظر می‌رسد به دلیل توازن برقرار شده در این نوع کامپوزیت از حیث رهاش یون و سمیت نسبی متعاقب آن باشد.

۴- نتیجه‌گیری

نانوکامپوزیت‌های شیشه زیست فعال 45S5-فلئورآپاتیت، با درصد وزنی‌های متفاوت ۱۰، ۱۵ و ۲۰٪ توسط روش سل-ژل سنتز شدند. تشکیل نانوکامپوزیت‌ها به وسیله تکنیک XRD تأیید شد. نتایج طیف‌سنجی تبدیل فوریه فروسرخ حضور تمام عناصر شیمیایی بدون حضور ناخالصی را تأیید کرد. تأیید عدم وجود ناخالصی با توجه به این آزمون مؤید نتایج بدست‌آمده از تکنیک XRD است. آزمایش‌های استحکام فشاری حاکی از افزایش استحکام نانوکامپوزیت‌های با افزایش درصد فاز تقویت‌کننده فلئورآپاتیت تا ۱۵٪ سپس



مراجع

- tissue", *Biomedical Materials*, Vol. 6, pp. 1-11, 2011.
- [9] D. Bellucci, R. Salvatori and J. Giannatiempo, "A new bioactive glass/collagenhybrid composite for application in dentistry", *Materials*, Vol. 12, pp. 2079-2085, 2019.
- [10] M. Rizwan, M. Hamidi and W. Basirun, "Bioglass®45S5-Based Composites for Bone Tissue Engineering and Functional Applications", *Journal of Biomedical Materials Research Part A*, Vol. 105, pp. 3197-3223, 2017.
- [11] G. Conoscent, "In vitro degradation and bioactivity of composite poly-L-lactic (PLLA)/bioactive glass (BG) scaffolds: comparison of 45S5 and 1393BG compositions", *Journal of Materials Science*, Vol. 53, No. 4, pp. 2362-2374, 2018.
- [12] M. Taherian, "Effect of different sol-gel synthesis processes on microstructural and morphological characteristics of hydroxyapatite-bioactive glass composite nanopowders", *Journal of Advanced Ceramics*, Vol. 3, pp. 207-214, 2014.
- [13] C. J. Tredwin, "Hydroxyapatite, fluor-hydroxyapatite and fluorapatite produced via the sol-gel method: bonding to titanium and scanning electron microscopy", *Dental Materials*, Vol. 29, pp. 521-529, 2013.
- [14] M. Kheradmandfard and M. Fathi, "Preparation and characterization of Mg-doped fluorapatite nanopowders by sol-gel method", *Journal of Alloys and Compounds*, Vol. 504, pp. 141-145, 2010.
- [15] E. Landi, "Densification behaviour and mechanisms of synthetic hydroxyapatites", *Journal of the European Ceramic Society*, Vol. 20, pp. 2377-2387, 2000.
- [16] M. Plewiniski, "The effect of crystallization of bioactive bioglass 45S5 on apatite formation and degradation", *Dental Materials*, Vol. 29, No. 12, pp. 1256-1264, 2013.
- [1] B. Lowe, M. P. Ottensmeyer, C. Xu, Y. He, Q. Ye and M. J. Troulis, "The regenerative applicability of bioglass and beta tricalcium phosphate in bone tissue engineering. A transformation perspective", *J Funct Biomater*, Vol. 10, No. 1, pp. 1-16, 2019.
- [2] N. Shankhwar and G. Kothiyal, "Influence of phosphate precursors on the structure, crystallization behaviour and bioactivity of sol-gel derived 45S5 bioglass", *RSC Advances*, Vol. 5, pp. 100762-100768, 2015.
- [3] N. Montazeri and R. Jahandideh, "Synthesis of fluorapatite-hydroxyapatite nanoparticles and toxicity investigations", *International journal of nanomedicine*, Vol. 6, pp. 197-201, 2011.
- [4] S. Seyedmajidi, S. Seyedmajidi, H. Alaghehmand, K. Hajian-Tilaki and S. Haghanifar, "Evaluation of antibacterial properties of hydroxyapatite/bioactive glass and fluorapatite/bioactive glass nanocomposite foams as a cellular scaffold of bone tissue", *Eurasian J Anal Chem*, Vol. 13, pp. 17-256-270, 2018.
- [5] D. Woolf, "The bone and joint decade 2000-2010, Annals of the rheumatic diseases", Vol. 59, No. 2, pp. 81-82, 2000.
- [6] Sculean, "Clinical evaluation of an enamel matrix protein derivative combined with a bioactive glass for the treatment of intrabony periodontal defects in humans", *Journal of periodontology*, Vol. 73, No. 4, pp. 401-408, 2002.
- [7] E. Tamjid, "Effect of particle size on the in vitro bioactivity, hydrophilicity and mechanical properties of bioactive glass-reinforced polycaprolactone composites", *Materials Science and Engineering: C*, Vol. 31, pp. 1526-1533, 2011.
- [8] El-Ghannam, "Synthesis and characterization of template material for optimal in vitro synthesis of bone-like



- [26] M. Mozafari, F. Moztarzadeh and M. Tahriri, "Investigation of the physico-chemical reactivity of a mesoporous bioactive $\text{SiO}_2\text{-CaO-P}_2\text{O}_5$ glass in simulated body fluid", *Journal of Non-Crystalline Solids*, Vol. 356, pp. 1470-1478, 2010.
- [27] M. N. Rahaman, "Bioactive glass in tissue engineering", *Acta biomaterialia*, 2011, Vol. 7, No. 6, pp. 2355-2373, 2011.
- [28] M. Khaghani, S. Alizadeh and A. Doostmohammadi, "Influence of incorporating fluoroapatite nanobioceramic on the compressive strength and bioactivity of glass ionomer cement". *J Dent Biomater*, Vol. 3, No. 3, pp. 276-283, 2016.
- [29] S. Mohammad, A. Ajely, M. Kareema and M. Rafed, "Preparation and characterization of calcium fluoride nanoparticle for dental applications", *International journal of research-granthaalayah*, Vol. 6, pp. 338-347, 2018.
- [30] N. Purnendu, M. Mayuri, K. Shashi, T. Sucheta, D. Arijit and S. Mitun, "Fluorine substituted nano hydroxyapatite: Synthesis, bio-activity and antibacterial response study", *Ceramic International*, Vol. 14, pp. 22008-22013, 2018.
- [31] X. Chen, C. Guo and N. Zhao, "Preparation and characterization of the sol-gel nano-bioactive glasses modified by the coupling agent gamma-aminopropyltriethoxysilane", *Applied Surface Science*, Vol. 255, pp. 466-468, 2008.
- [32] S. A. Manafi, F. Mirjalili and R. Reshadi, "Synthesis and evaluation of the bioactivity of fluorapatite-45S5 bioactive glass nanocomposite", *Progress in biomaterials*, Vol. 8, pp. 77-89, 2019.
- [17] T. Kokubo and K. Takadama, "How useful is SBF in predicting in vivo bone bioactivity?" *Biomaterials*, Vol. 27, No. 15, pp. 2907-2915, 2006.
- [18] T. H. Qazi, "Comparison of the effects of 45S5 and 1393 bioactive glass microparticles on hMSC behavior", *Journal of Biomedical Materials Research Part A*, Vol. 105, pp. 2772-2782, 2017.
- [19] Bandyopadhyay, "In vivo response of laser processed porous titanium implants for load-bearing implants", *Annals of Biomedical Engineering*, Vol. 45, pp. 249-260, 2017.
- [20] H. Qu, "Incorporation of fluorine ions into hydroxyapatite by a pH cycling method", *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, Vol. 16, pp. 447-453, 2005.
- [21] J. T. Ratnayake and M. D. Mucalo, "Substituted hydroxyapatites for bone regeneration: A review of current trends", *Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials*, Vol. 105, pp. 1285-1299, 2017.
- [22] R. Ebrahimi-Kahrizsang and B. Nasiri-Tabrizi, "Characterization of single-crystal fluorapatite nanoparticles synthesized via mechanochemical method", *Particuology*, Vol. 9, pp. 537-544, 2011.
- [23] M. Elghazel, "Mechanical and tribological properties of Tricalcium Phosphate reinforced with Fluorapatite as coating for orthopedic implant", *Materials Letters*, Vol. 215, pp. 53-57, 2018.
- [24] H. Wang, "Size-controlled synthesis and characterization of fluorapatite nanocrystals in the presence of gelatin", *Powder technology*, Vol. 209, pp. 9-14, 2011.
- [25] J. S. Ajita and S. Saravanan, "Effect of size of bioactive glass nanoparticles on mesenchymal stem cell proliferation for dental and orthopedic applications", *Materials Science and Engineering: C*, Vol. 53, pp. 142-149, 2015.