



سنتز، ارزیابی برون‌تنی و مطالعه رفتار زیستی شیشه زیست فعال 58S حاوی مس

فصلنامه
سرامیک ایران

فائزه نوالقدر، آرمان صدقی*، سعید باغشاهی، امیرحسین مغنیان

دانشکده فنی و مهندسی، دانشگاه بین‌المللی امام خمینی (ره)، قزوین، ایران



نویسنده مسئول:

دکتر آرمان صدقی

دانشکده فنی و مهندسی، دانشگاه

بین‌المللی امام خمینی (ره)، قزوین،

ایران

نوع مقاله: پژوهشی

صفحه‌های: ۴۰ تا ۴۸

شاپا چاپی: ۱۷۳۵-۳۳۵۱

شاپا الکترونیکی: ۳۰۹۷-۲۷۸۳

زبان نشریه: فارسی

دسترس‌پذیر در نشانی:

www.JICERS.ir

تاریخ دریافت:

۱۴۰۰/۱۰/۱۱

تاریخ پذیرش:

۱۴۰۰/۱۱/۲۴

sedghi@eng.ikiu.ac.ir

DOR: 20.1001.1.17353351.1400.17.0.9.8

چکیده: شیشه‌های زیست‌فعال 58S جایگزین‌شده با مس ($10\% \text{ mol CuO}$) به روش سل-ژل سنتز شد و تأثیر جایگزینی مس به جای کلسیم بر تخریب‌پذیری زیستی، تشکیل آپاتیت برون‌تنی، تکثیر سلولی، فعالیت آلکالین فسفاتاز سلول استئوبلاست MC3T3-E1 و فعالیت ضدباکتریایی مورد بررسی قرار گرفت. نتایج پراش اشعه ایکس (XRD) و طیف‌سنجی مادون قرمز تبدیل فوریه (FTIR) تشکیل لایه‌ای از آپاتیت بر روی نمونه‌ها پس از ۷ روز غوطه‌وری در محلول شبیه‌سازی شده بدن (SBF) را تأیید کرد. آنالیز سطحی با استفاده از SEM نشان داد با افزایش مس در ساختار مقدار آپاتیت تشکیل‌شده بر روی سطح کاهش یافت. ارزیابی پاسخ سلولی با روش MTT و فعالیت آلکالین فسفاتاز نشان داد که تکثیر و تمایز سلول‌های MC3T3-E1 در شیشه 58S جایگزین‌شده با ۵ درصد مولی CuO بالاترین مقدار را در مقایسه با سایر نمونه‌ها داشت در حالی که جایگزینی ۱۰ درصد مولی CuO در ترکیب منجر به کاهش تکثیر و تمایز سلول‌ها و بروز سمیت سلولی شد. علاوه بر این، شیشه‌های حاوی مس اثر ضد باکتریایی قابل توجهی در برابر باکتری‌های اشرشیا کلی (E.coli) و استافیلوکوکوس اورئوس (S.aureus) نشان دادند، به طوری که ضریب فعالیت ضد باکتریایی در برابر باکتری E.coli در شیشه 58S حاوی ۵ درصد مولی CuO نسبت به شیشه پایه تا دو برابر افزایش یافته و بیش از ۹۹ درصد بود ($p\text{-value} < 0.01$). در مجموع، شیشه 58S حاوی ۵ درصد مولی CuO به دلیل زیست‌فعالی در شرایط برون‌تنی، تحریک تکثیر و تمایز سلولی MC3T3-E1 و فعالیت ضد باکتریایی، برای استفاده در ترمیم نقایص استخوانی در مهندسی بافت به عنوان یک ماده زیستی با قابلیت بالا پیشنهاد می‌شود.

کلمات کلیدی: سنتز سل‌ژل، آپاتیت، مس، خاصیت ضدباکتریایی، تکثیر سلولی.

۱- مقدمه

در سال‌های اخیر، استفاده از مواد زیست‌سازگار^۱ مصنوعی به عنوان روشی مناسب برای بهبود و ترمیم عیوب استخوانی توجه زیادی را در مهندسی بافت به خود جلب کرده است [۱]. در میان این مواد زیستی، شیشه زیست‌فعال به دلیل زیست تخریب‌پذیری^۲ و قابلیت تشکیل هیدروکسی‌آپاتیت در سطح آن (در اثر واکنش‌های شیمیایی) از اهمیت ویژه‌ای برخوردار است [۲]. شیشه‌های زیست‌فعال با روش‌های سل-ژل و ذوبی سنتز می‌شوند [۳]. روش سل-ژل به دلیل مزایایی مانند دمای سنتز پایین‌تر، قابلیت افزودن مقادیر کمی از یون‌های فلزی در طول فرآیند تولید و دستیابی به خلوص بالاتر مورد توجه قرار گرفته است [۲]. افزودن یون‌های فلزی مانند استرانسیوم، روی، منیزیم، لیتیم و نقره به ترکیب شیشه به عنوان روشی مؤثر در

¹ Biocompatible

² Biodegradation



تولید شیشه‌های زیست‌فعال چند منظوره در نظر گرفته می‌شود [۲، ۴-۶]. آزاد شدن این یون‌های فلزی در طی انحلال شیشه باعث تحریک اثرات متابولیک و در نتیجه بهبود خواص استخوان‌زایی^۱، رگ‌زایی^۲ و ضد باکتریایی می‌شود [۷]. یون‌های مس نقش مؤثری در بهبود تکثیر و تمایز سلول‌های استئوبلاست دارند [۸]. علاوه بر این، فعالیت آلکالین فسفاتاز سلول‌های بنیادی مزانشیمی در شیشه‌های زیست‌فعال حاوی مس افزایش می‌یابد [۹]. از سوی دیگر، حضور یون‌های مس در ترکیب منجر به تسریع رگ‌زایی و بازسازی استخوان در داخل بدن می‌شود [۱۰]. استفاده از شیشه‌های زیست‌فعال چندمنظوره در بازتولید استخوان می‌تواند از عفونت‌های جراحی جلوگیری کند. وجود مس در ترکیب می‌تواند فعالیت ضد باکتریایی را در برابر باکتری‌های اشریشیا کلی^۳، استافیلوکوکوس اورئوس^۴ و استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس^۵ بهبود بخشد [۱۰]. آزاد شدن یون‌های مس از ترکیب شیشه زیست‌فعال به محیط کشت می‌تواند منجر به تشکیل رادیکال‌های هیدروکسیل سمی از طریق واکنش‌های کاهش-اکسایش و بروز سمیت سلولی شود [۹] بنابراین انتخاب ترکیب شیمیایی مناسب برای دستیابی به سرعت آزادسازی بهینه یون مس مهم است. هدف از پژوهش حاضر بررسی اثر جایگزینی CuO به جای CaO در ترکیب شیشه زیست‌فعال 58S سنتز شده به روش سل-ژل بر خواص زیستی، فعالیت آلکالین فسفاتاز، اثرات ضد باکتریایی و زیست‌سازگاری و سنتز شیشه زیست‌فعال با خواص بهینه بود.

۲- فعالیت‌های تجربی

شیشه‌های زیست‌فعال چهارتایی در سیستم SiO₂-CaO-P₂O₅-CuO به روش سل-ژل سنتز شدند. تترااتیل ارتوسیلیکات (TEOS)، تری‌اتیل فسفات (TEP)، نیترات کلسیم تتراهیدرات (Ca(NO₃)₂·4H₂O)، نیترات مس تری‌هیدرات (Cu(NO₃)₂·3H₂O) و اسید نیتریک به عنوان پیش‌ساز برای فرآیند سل-ژل انتخاب شدند. ترکیب شیمیایی شیشه‌های زیست‌فعال جایگزین شده با مس در جدول ۱ نشان داده شده است. در ابتدا، TEOS، آب مقطر و اسید نیتریک ۲ مولار به مدت ۱ ساعت با یک همزن مغناطیسی در دمای اتاق مخلوط شدند. سپس TEP، نیترات کلسیم و نیترات مس به ترتیب به محلول اضافه شد. محلول سنتز شده به مدت ۳ روز در دمای ۳۷°C قرار داده شد و برای حذف نیترات و مواد آلی سه ساعت در دمای ۷۰°C حرارت داده شد. محصول نهایی آسیاب شده و سپس با استفاده از پرس هیدرولیک به شکل دیسک (۳×۱۰ میلی‌متر) آماده شد تا برای مطالعات آزمایشگاهی مورد استفاده قرار گیرد.

جدول ۱- ترکیب شیشه‌های حاوی مس (برحسب درصد مولی)

شیشه	کد نمونه	SiO ₂	CaO	P ₂ O ₅	CuO
58S-0% CuO	C-0	60	36	4	0
58S-5% CuO	C-5	60	31	4	5
58S-10% CuO	C-10	60	26	4	10

برای ارزیابی فعالیت زیستی شیشه‌های سنتز شده، نمونه‌ها در مایع بدن شبیه‌سازی شده (SBF) به مدت ۱، ۳، ۷ و ۱۴ روز غوطه ور شدند. سطح نمونه‌ها بعد از ۷ روز غوطه‌وری در SBF توسط پراش اشعه ایکس (XRD، PANalytical، هلند) در 2θ محدوده ۵۰-۲۰ درجه و طیف‌سنجی فرسرخ تبدیل فوریه (FTIR، PerkinElmer، Spectrum RX I، آمریکا) در محدوده ۴۰۰-۴۰۰۰ cm⁻¹ بررسی شد. برای بررسی شکل آپاتیت تشکیل شده بر روی سطح شیشه میکروسکوپ الکترونی روبشی (VEGA، TESCAN-LMU، چک) استفاده شد. پس از خارج کردن نمونه‌ها از محلول SBF غلظت عناصر کلسیم و فسفر در محلول با استفاده از طیف‌سنجی نشر اتمی پلاسما جفت‌شده القایی (ICP-OES، Varian، 730-ES، آمریکا) آنالیز شد. اثر جایگزینی CuO بر زیست‌سازگاری شیشه زیست‌فعال 58S با استفاده از سلول‌های MC3T3-E1 مورد مطالعه قرار گرفت. اثر سلولی در یک اتمسفر مرطوب (CO₂ ۵٪، هوا) با استفاده از α-MEM مکمل با ۱۰٪ سرم جنین گاو (FBS، Sigma-)، اثر

¹.Osteogenesis

² Angiogenesis

³ E.coli

⁴ S.aureus

⁵ S.epidermidis

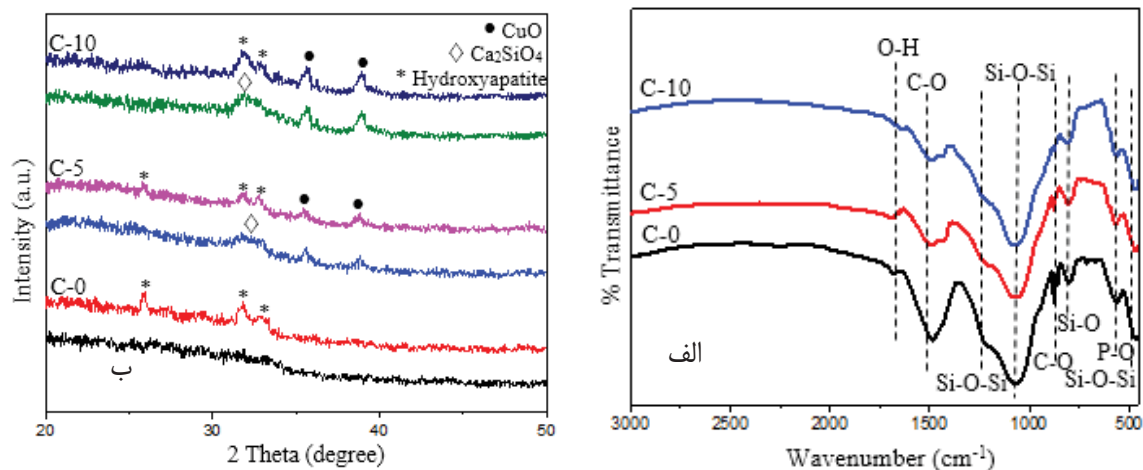


Aldrich، انگلستان)، ۱٪ آنتی‌بیوتیک، ۲mM گلوتامین و ۰/۱٪ پنی‌سیلین - استرپتومایسین انجام شد. از روش MTT برای ارزیابی اثر شیشه‌های زیست‌فعال حاوی CuO بر تکثیر سلول‌های استوبلاست استفاده شد. برای این منظور، سلول‌های MC3T3-E1 روی نمونه‌ها در یک صفحه ۲۴ چاهکی با چگالی 6×10^3 cells/well با D-MEM و به مدت ۱، ۳ و ۷ روز کشت داده شدند. با تخلیه محیط کشت در پایان هر دوره زمانی، $100 \mu\text{l}$ از محلول MTT (Sigma-Aldrich) به هر چاهک اضافه شد. انکوباسیون در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد به مدت ۷۲ ساعت در اتمسفر مرطوب (CO_2 ۵٪، ۹۵٪ هوا) انجام شد. سپس محیط خارج شد و از DMSO (دی‌متیل سولفوکسید) برای حل کردن فورمازان تشکیل شده استفاده شد و در نهایت چگالی نوری (OD) در طول موج ۵۷۰ نانومتر اندازه‌گیری شد. به منظور ارزیابی فعالیت آلكالین فسفاتاز (ALP) در شرایط برون‌تنی، سلول‌های MC3T3-E1 در یک صفحه ۲۴ چاهکی با چگالی 1×10^4 cells/cm² قرار داده شدند و در مرحله بعد سلول‌ها روی نمونه‌ها در اتمسفر مرطوب (CO_2 ۵٪، ۹۵٪ هوا) در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد کشت داده شدند. در پایان هر بازه زمانی، پس از حذف مایع رویی و شستشوی لایه سلولی با PBS، همگن‌سازی با ۱ ml بافر TRIS انجام شد. مقدار کمی از $20 \mu\text{l}$ در حجم‌های مساوی از ۱ ml محلول p-نیتروفیل فسفات (pNPP, Sigma) قرار داده شد و انکوباسیون در دمای ۳۰ درجه سانتیگراد به مدت حداکثر ۵ دقیقه انجام شد. در نهایت به منظور ارزیابی فعالیت ALP نمونه‌ها، جذب در طول موج ۴۱۰ nm اندازه‌گیری شد. برای بررسی رفتار ضد باکتریایی نمونه‌ها فعالیت ضد باکتریایی در برابر دو باکتری اشرشیا کلی (E.coli) و استافیلوکوکوس اورئوس (S.aureus) مورد بررسی قرار گرفت. از کشت تازه باکتری مورد نظر سوسپانسیونی معادل غلظت نیم مک‌فارلند ($1/5 \times 10^8$ CFU/ml) تهیه و از آن‌ها مجدداً غلظت ($1/5 \times 10^6$ CFU/ml) تهیه شد. سطح نمونه‌ها با سوسپانسیون باکتری‌ها به مدت ۲۴ تماس داده شد. فعالیت ضد باکتریایی پس از کشت و انکوباسیون در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد به مدت ۲۴ ساعت به دست آمد.

۳- نتایج و بحث

شکل ۱ (الف-ب) طیف FTIR و الگوی XRD نمونه‌های C-0، C-5 و C-10 را بعد از ۷ روز غوطه‌وری در SBF نشان می‌دهد. در طیف FTIR تمام نمونه‌ها (شکل ۱-الف) مشخصه شبکه سیلیکاتی به دلیل وجود SiO_2 به عنوان سازنده اصلی شبکه مشاهده شد. پیک ارتعاش خمشی Si-O-Si در طول موج نزدیک به 470 cm^{-1} و پیک‌های کشش متقارن Si-O-Si و کشش نامتقارن Si-O-Si در چهاروجهی SiO_4 به ترتیب در طول موج 806 cm^{-1} و $1100-1000 \text{ cm}^{-1}$ مشاهده شد [۱۱]. وجود پیک کشش متقارن O-H در طول موج 1630 cm^{-1} نشان‌دهنده جذب رطوبت توسط شیشه بود. پیک‌های 570 cm^{-1} و 605 cm^{-1} مربوط به ارتعاش خمشی P-O و پیک‌های ارتعاشات کششی C-O در 876 cm^{-1} و $1470-1420 \text{ cm}^{-1}$ در تمام نمونه‌ها پس از ۷ روز غوطه‌وری در SBF نشان‌دهنده تشکیل هیدروکسی‌آپاتیت کربناته بر روی سطح شیشه است. شدت پیک‌های مذکور در نمونه‌های C-5 و C-10 کمتر از C-0 بود. بر اساس الگوی XRD نمونه‌ها (شکل ۱-ب)، قبل از غوطه‌وری در SBF شیشه 58S ساختار آمورف داشته و در الگوی XRD نمونه‌های C-5 و C-10، پیک‌هایی در $35/8$ و $38/8$ درجه وجود داشت که مربوط به حضور اکسید مس در ساختار شیشه بود. با افزایش مقدار مس از ۵ به ۱۰ درصد مولی در ترکیب شیشه شدت این پیک‌ها افزایش یافت. علاوه بر این، در این نمونه‌ها پیک‌هایی نزدیک به ۳۲ درجه مشاهده شد که مربوط به تشکیل Ca_2SiO_4 بود. در شیشه‌های زیست‌فعال معمولاً تبلور در دمای ۸۰۰ درجه سانتیگراد و بالاتر اتفاق می‌افتد و فرآیند کلسینه‌شدن در دمای حدود ۷۰۰ درجه سانتیگراد منجر به حفظ ساختار بی‌شکل شیشه می‌شود [۱۲] با این حال، در برخی از سیستم‌های چند جزئی، تبلور پس از حرارت دادن ترکیب شیشه تا دمای ۷۰۰ درجه سانتیگراد مشاهده شده است [۱۳]. بجارانو و همکاران [۱۳] نشان دادند که تمایل به تبلور در شیشه‌های سیلیکاتی حاوی مس به شدت به ترکیب سیستم بستگی دارد. ایشان رفتار تبلور شیشه‌های سیلیکاتی سه‌جزئی و چهارجزئی در حلال مس سنتز شده به روش سل ژل را بررسی کرده و دریافتند جوانه‌زنی فازهای CuO و Ca_2SiO_4 و سایر سیلیکات‌های کلسیم در هر دو سیستم رخ داد. هم‌چنین لی و همکاران [۱۴] نشان دادند که افزودن ۵-۲۰ mol % مس به ترکیب شیشه سیلیکاتی منجر به تشکیل کریستوبالیت و CaSiO_3 شد. در پژوهش حاضر افزودن مس به ترکیب شیشه منجر به جداسازی و تشکیل فازهای جدید شده است که احتمالاً علت آن پتانسیل یونی بالاتر یون‌های مس و ایجاد دافعه کولمبی بین یون‌های مس

و کلسیم موجود در ترکیب شیشه است [۱۵]. پس از ۷ روز غوطه‌ور شدن شیشه C-0 در SBF، پیک‌هایی در ۲۵/۸، ۳۱/۸ و ۳۲/۸ درجه مشاهده شد که با صفحات بلوری (۲۰۰)، (۲۱۱) و (۳۰۰) هیدروکسی‌آپاتیت (HA- JCPDS 432-09) مطابقت داشت. با مقایسه الگوی XRD نمونه‌ها می‌توان دریافت که افزودن مس به ترکیب شیشه 5S باعث کاهش شدت پیک‌های آپاتیت شده به نحوی که در نمونه C-5 شدت پیک واقع در ۲۵/۸ نسبت به C-0 کم‌تر بوده و در نمونه C-10 پس از ۷ روز غوطه‌وری پیکی در ۲۵/۸ مشاهده نشد. بجارانو و همکاران [۱۳] نشان دادند که افزودن مس به ترکیب شیشه سیلیکاتی اثر بازدارندگی بر تشکیل آپاتیت روی سطح دارد. همچنین اسریواستاوا و همکاران [۱۶] گزارش کردند که فعالیت زیستی شیشه 45S5 حاوی بیش از یک درصد وزنی CuO کاهش یافت. از سویی دیگر ژنگ و همکاران [۱۱] نشان دادند که افزودن مس تا ۱۵ درصد مولی به ترکیب نانوذرات شیشه زیست‌فعال، تشکیل آپاتیت را تسریع می‌کند. در شیشه‌های حاوی مس، رقابت بین یون‌های مس و کلسیم برای تشکیل گونه‌های فسفات ممکن است توانایی تشکیل آپاتیت را کاهش دهد. همچنین تراکم شبکه شیشه در اثر جایگزینی کلسیم با مس (به دلیل شعاع یونی کوچک‌تر مس) می‌تواند منجر به کاهش نفوذ SBF شود [۱۷]. شکل ۲ (الف-ب) پروفیل غلظت یون‌های کلسیم و فسفر را در SBF پس از غوطه‌وری نمونه‌ها به مدت ۱، ۳، ۷ و ۱۴ روز نشان می‌دهد. در اولین مراحل غوطه‌وری، وقوع یک واکنش شیمیایی سطحی و تبادل یونی بین شیشه و محلول SBF منجر به افزایش غلظت کلسیم در محلول SBF شد. در روز اول غوطه‌وری نمونه C-0 نسبت به نمونه C-5 و C-10 مقدار کلسیم بیش‌تری آزاد کرد. انتشار یون‌های کلسیم از شیشه به محلول SBF و رسوب ترکیبات حاوی کلسیم بر روی سطح شیشه، غلظت کلسیم را در محلول SBF تعیین می‌کند [۲].

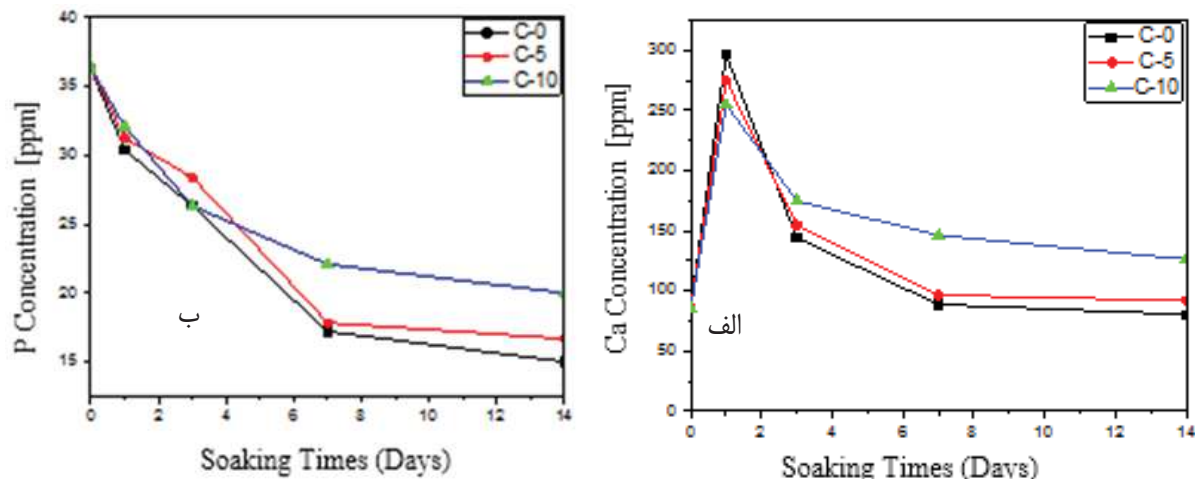


شکل ۱ (الف) طیف FTIR و (ب) الگوی XRD نمونه‌های C-10، C-5 و C-0 بعد از ۷ روز غوطه‌وری در SBF

مطابق شکل (۲-ب) غلظت فسفر در SBF برای همه نمونه‌ها با افزایش زمان غوطه‌وری به طور پیوسته کاهش یافت. جذب یون‌های کلسیم و فسفر منجر به تشکیل لایه‌ای از فسفات کلسیم و متعاقباً هیدروکسی‌آپاتیت کربنات بر روی سطح شیشه می‌شود [۶]. نرخ کاهش غلظت فسفر در محلول SBF را به می‌توان به عنوان معیاری برای مقایسه نرخ تشکیل آپاتیت در نظر گرفت [۶]. با افزایش مقدار مس در ترکیب شیب تغییر غلظت فسفر کاهش یافته و بر این اساس می‌توان پیشنهاد کرد که افزایش مقدار محتوای مس نرخ رسوب آپاتیت را کاهش داده است. مطالعات قبلی نشان داده است که ورود مس به ترکیب شیشه بر خواص ساختاری شبکه و رفتار زیست تخریب‌پذیری آن اثر دارد. افزایش اعوجاج شبکه همراه با تغییر ترکیب شیمیایی و تغییر قطبیت‌پذیری یون‌های اکسیژن موجود در اطراف یون‌های مس به عنوان عوامل مهم در تأثیر مس بر ساختار شیشه مطرح شده‌اند [۱۸]. وانگ و همکاران [۱۸] نشان دادند که افزودن مس به شیشه بوروسیلیکات منجر به کاهش اکسیژن غیر پل‌زن، تشکیل گونه‌های پایدارتر در ساختار و افزایش اتصالات شبکه شیشه شد. همچنین هوپ و همکاران [۱۹] بیان کردند که وجود مس در شیشه 45S5 به دلیل تفاوت خلصت کووالانسی باندهای Cu-O و Ca-O منجر به پلیمریزاسیون مجدد باندهای Si-NBO شد. قواعد فاجانس^۱ در ارتباط با قطبیت‌پذیری آنیون‌ها، قدرت قطبی‌کنندگی کاتیون‌ها و تأثیر آن در کاهش خلصت یونی و

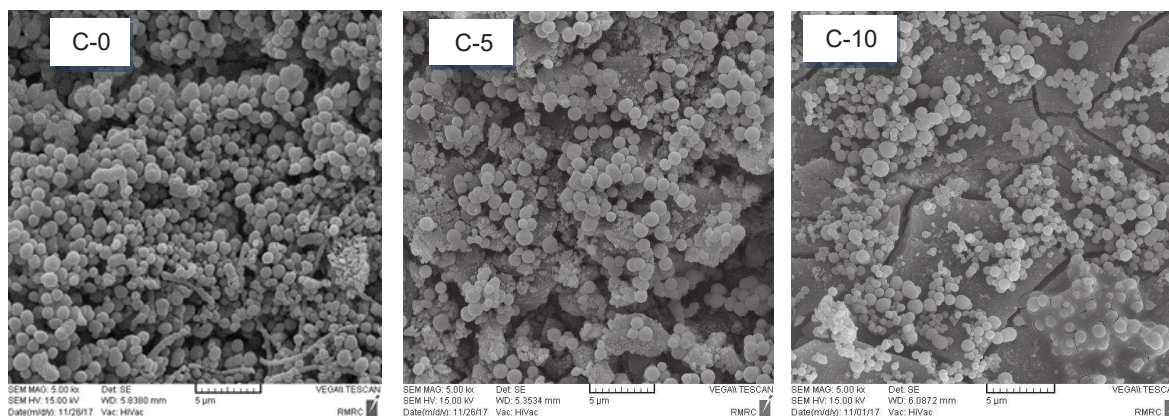
^۱ Fajans Rules

افزایش خصلت کووالانسی در ترکیبات یونی وضع شده است و بر اساس آن شعاع کوچک‌تر یون‌های مس در مقایسه با یون‌های کلسیم منجر به افزایش خصلت کووالانسی در پیوند Cu-O نسبت به Ca-O می‌شود. همچنین ابونیل و همکاران نشان دادند که افزودن CuO تا ۱۰ درصد مولی در شیشه‌های زیست‌فعال نرخ تخریب‌پذیری را به علت افزایش چگالی اتصالات عرضی کاهش داد [۲۰].



شکل ۲- تغییرات غلظت (الف) کلسیم و (ب) فسفر نمونه‌های C-0، C-5 و C-10 بعد از ۷، ۳، ۱ و ۱۴ روز غوطه‌وری در SBF

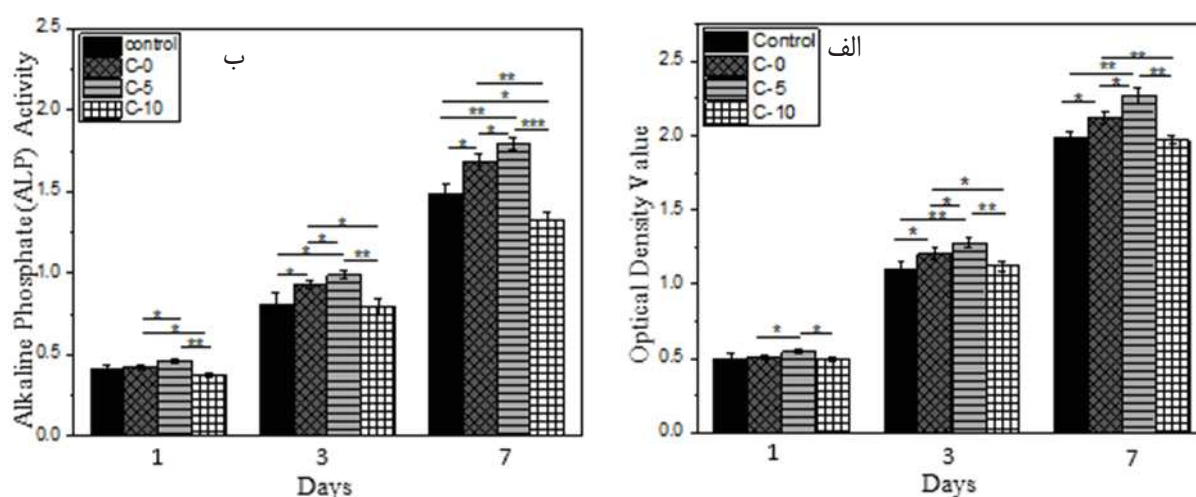
شکل ۳ تصاویر SEM سطح نمونه‌های C-0، C-5 و C-10 را پس از ۱۴ روز غوطه‌وری در SBF نشان می‌دهد. وجود ذرات کروی در سطح همه نمونه‌ها پس از غوطه‌وری در SBF نشان‌دهنده تشکیل فاز جدید آپاتیت است. در نمونه C-0 پس از ۱۴ روز غوطه‌وری سطح کاملاً توسط ذرات کروی آپاتیت پوشیده شده و با افزایش محتوای مس در ترکیب مقدار آپاتیت تشکیل شده کاهش یافت که می‌توان آن را به تفاوت سرعت انحلال شیشه و آزاد شدن یون‌های کلسیم (شکل ۲) و در نتیجه تفاوت فوق‌اشباع گروه‌های درگیر در تشکیل هیدروکسی آپاتیت نسبت داد [۶]. تشکیل ذرات کروی آپاتیت در شیشه‌های زیست‌فعال حاوی مس قبلاً گزارش شده است [۱۵]. ورس و همکاران [۲۱] نشان دادند که شکل ذرات آپاتیت تشکیل شده بر روی سطح شیشه زیست‌فعال حاوی مس تقریباً شبیه شکل آپاتیت سطحی روی شیشه بدون مس است.



شکل ۳- تصویر SEM سطح نمونه‌های C-0، C-5 و C-10 بعد از ۱۴ روز غوطه‌وری در SBF

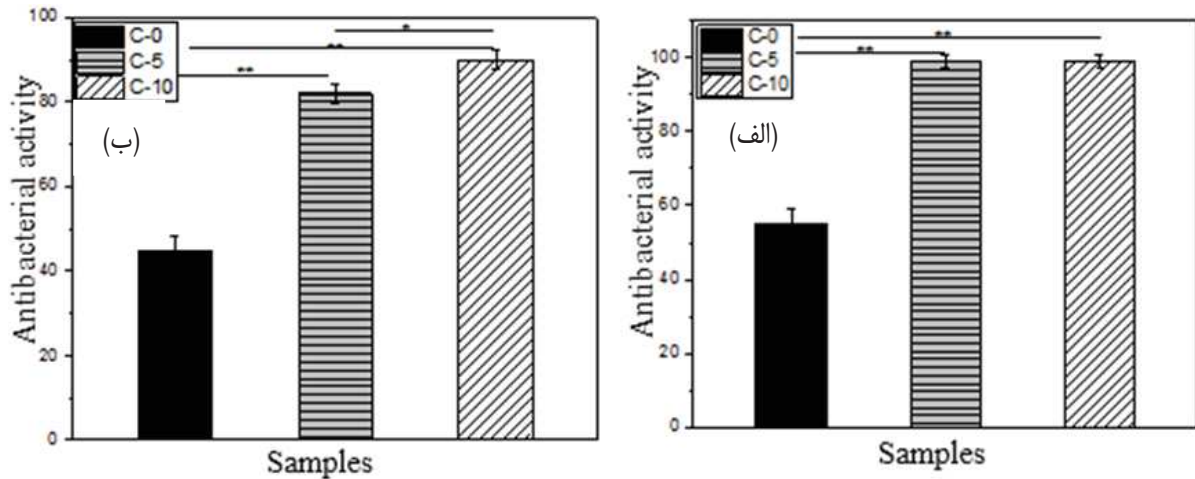
شکل (۴-الف) تکثیر سلول‌های استئوبلاست MC3T3-E1 را نشان می‌دهد که روی نمونه‌ها به مدت ۱، ۳ و ۷ روز با روش MTT اندازه‌گیری شده‌اند. پس از روز اول کشت، تشکیل فورمازان در نمونه C-5 نسبت به نمونه‌های C-0 و C-10 تفاوت آماری معنی داری نشان داد ($p < 0.05$). پس از ۷ روز، مقدار MTT در نمونه C-5 به حداکثر مقدار خود رسید و از نظر آماری تفاوت معنی‌داری در تشکیل فورمازان در C-5 نسبت به کنترل و C-10 ($p < 0.01$) و همچنین C-0 مشاهده شد ($p < 0.05$). از سوی دیگر، مقدار

MTT در C-10 به طور معنی داری کمتر از C-5 و C-0 بود. یون‌های مس نقش مؤثری در تحریک تکثیر سلولی و افزایش فعالیت سلول‌های بنیادی مزانشیمی و استئوبلاست‌ها ایفا می‌کنند. سمیت سلولی شیشه زیست‌فعال تحت تأثیر عوامل مختلفی مانند زمان کشت، غلظت و گرادیان غلظت در محیط کشت و نوع سلول قرار می‌گیرد [۸]. در مطالعه حاضر، افزودن ۵٪ مس به ترکیب شیشه 58S منجر به بهبود تکثیر سلولی شد. از سوی دیگر، در نمونه C-10 اگرچه تعداد سلول‌ها با افزایش زمان کشت افزایش یافت، اما همچنان به طور قابل توجهی کمتر از سایر نمونه‌ها بود. آزاد شدن بیش‌تر یون‌های مس در نمونه C-10 به داخل محیط کشت و تولید رادیکال‌های سمی هیدروکسیل می‌تواند سمیت سلولی این نمونه را توجیه کند [۹]. شکل (۴-ب) فعالیت آلکالین فسفاتاز (ALP) سلول‌های استئوبلاست MC3T3-E1 را نشان می‌دهد که بر روی نمونه‌های C-0، C-5 و C-10 به مدت ۱، ۳ و ۷ روز کشت داده شده‌اند. در روز اول کشت، فعالیت ALP در C-5 به طور معنی داری بیش‌تر از نمونه‌های C-0 و C-10 بود. در روزهای سوم و هفتم کشت، فعالیت ALP در C-5 نسبت به سایر نمونه‌ها تفاوت آماری معنی داری نشان داد و سطح تولید ALP در C-5 در روز هفتم کشت به حداکثر مقدار خود رسید. از طرفی نمونه حاوی ۱۰ درصد CuO کم‌ترین میزان تولید ALP را نشان داد. ژائو و همکاران [۹] بیان کردند که افزودن ۳ درصد CuO به شیشه زیست‌فعال بوروسیلیکات فعالیت ALP سلول‌های بنیادی را افزایش داده و تمایز استخوانی را بهبود می‌بخشد. هم‌چنین وو و همکاران [۱۰] نشان دادند که یون‌های مس نقش مهمی در فعالیت ALP و بیان ژن‌های استخوانی ایفا می‌کنند. بر اساس نتایج MTT و فعالیت ALP در پژوهش حاضر، حداکثر تکثیر و فعالیت ALP سلول‌های استئوبلاستیک MC3T3-E1 با جایگزینی ۵ درصد مس به جای کلسیم در ترکیب شیشه زیست‌فعال 58S به دست آمد



شکل ۴- الف) تکثیر سلولی و (ب) فعالیت آلکالین فسفاتاز (ALP) سلول‌های MC3T3-E1 کشت شده بر روی نمونه‌های C-0، C-5 و C-10 (** $p < 0.01$ و * $p < 0.05$)

شکل ۵ (الف-ب) فعالیت ضدباکتریایی نمونه‌های C-0، C-5 و C-10 را در برابر باکتری *E. coli* و *S. aureus* نشان می‌دهد. با افزودن مس به ترکیب شیشه زیست‌فعال عملکرد ضدباکتریایی شیشه در برابر باکتری *E. coli* و *S. aureus* بهبود یافته و در نمونه حاوی ۵ درصد مولی CuO فعالیت ضدباکتریایی علیه *S. aureus* حدود ۹۹/۹ درصد بود. انتشار یون‌هایی مانند کلسیم و فسفات در محیط کشت و افزایش مقدار pH از عوامل مؤثر در بهبود رفتار ضدباکتریایی هستند [۱۰]. در شیشه‌های زیست‌فعال حاوی مس، یون‌های مس با بار مثبت روی دیواره سلولی باکتری جذب شده، با ورود به سلول‌ها بر عملکرد آنزیم‌ها تأثیر گذاشته و به دیواره سلولی آسیب می‌رسانند و در نهایت منجر به تخریب سلول و مرگ باکتری می‌شوند [۲۲]. در پژوهش حاضر ضریب فعالیت ضدباکتریایی در برابر باکتری *E. coli* بهتر از باکتری *S. aureus* بود که می‌توان آن را به تفاوت در ساختار غشایی باکتری *E. coli* (گرم منفی) و *S. aureus* (گرم مثبت) نسبت داد [۲۲].



شکل ۵- فعالیت ضدباکتریایی نمونه‌های C-0، C-5 و C-10 در برابر باکتری (الف) E.coli و (ب) S.aureus

۴- نتیجه‌گیری

شیشه‌های زیست‌فعال 58S جایگزین شده با مس به روش سل-ژل سنتز و اثر افزودن مقادیر مختلف مس بر خواص شیشه بررسی شد. وجود پیک‌های مشخصه مربوط به فاز بلوری آپاتیت در الگوی XRD و باندهای P-O و C-O در طیف FTIR و هم چنین تصاویر SEM تشکیل یک لایه آپاتیت بر روی نمونه‌ها را پس از غوطه‌وری در SBF تأیید کرد. شدت کم‌تر پیک آپاتیت در آنالیز XRD و FTIR شیشه‌های C-5 و C-10 در مقایسه با C-0 و هم‌چنین تصاویر SEM نشان داد که وجود یون‌های مس در ترکیب شیشه باعث کاهش تشکیل آپاتیت روی سطح شد. نتایج ارزیابی‌های زیستی با سلول‌های MC3T3-E1 نشان داد که تکثیر سلولی و فعالیت آلکالین فسفاتاز شیشه 58S جایگزین شده با ۵ درصد مولی CuO بیشتر از سایر نمونه‌ها بود. علاوه بر این، حضور مس در ترکیب شیشه باعث افزایش فعالیت ضدباکتریایی در برابر باکتری E.coli و S.aureus شد؛ بنابراین نمونه 58S-5% CuO به دلیل توانایی در تشکیل آپاتیت، افزایش تکثیر و تمایز سلولی و رفتار ضدباکتریایی مطلوب، به عنوان کاندید مناسبی برای استفاده در ترمیم عیوب استخوانی در مهندسی بافت پیشنهاد می‌شود.

مراجع

- [1] J.R. Jones, "Review of bioactive glass: From Hench to hybrids", *Acta Biomater.*, 2013, 9 [1] 4457-4486.
- [2] Moghanian, A. Sedghi, A. Ghorbanoghli, S. Salari, "The effect of magnesium content on in vitro bioactivity, biological behavior and antibacterial activity of sol-gel derived 58S bioactive glass", *Ceram. Int.*, 2018, 44 [8] 9422-9432.
- [۳] س. شهرابی، س. حصارکی، م. واعظی، ز. همبرد، "فراوری شیشه بر پایه $\text{SiO}_2\text{-CaO-SrO}$ به روش سل-ژل و بررسی زیست فعالی این شیشه"، فصلنامه سرامیک ایران، ۷ [۱] ۸۰-۷۳، ۱۳۹۰.
- [4] X. Wu, G. Meng, S. Wang, F. Wu, "Zn and Sr incorporated 64S bioglasses: Material characterization, in-vitro bioactivity and mesenchymal stem cell responses", *Mater. Sci. Eng. C. Mater. Biol. Appl.*, 2015, 52 [6] 242-250.
- [5] M.S.N. Shahrababak, F. Sharifianjazi, D. Rahban, A. Salimi, "A Comparative Investigation on Bioactivity and Antibacterial Properties of Sol-Gel Derived 58S Bioactive Glass Substituted by Ag and Zn", *Silicon.*, 2019, 11[6] 2741-2751.
- [6] A. Moghanian, S. Firoozi, M. Tahriri, "Synthesis and in vitro studies of sol-gel derived lithium substituted 58S bioactive glass", *Ceram. Int.*, 2017, 43 [15] 12835-12843.
- [7] Hoppe, N.S. Güldal, A.R. Boccaccini, "A review of the biological response to ionic dissolution products from bioactive glasses and glass-ceramics", *Biomaterials*, 2011, 32 [11] 2757-2774.
- [8] Y. Lin, W. Xiao, M.N. Rahaman, "Effect of copper-doped silicate 13-93 bioactive glass scaffolds on the response of MC3T3-E1 cells in vitro and on bone regeneration and angiogenesis in rat calvarial defects in vivo", *Mater. Sci. Eng. C. Mater. Biol. Appl.*, 2016, 67 [1] 440-452.
- [9] S. Zhao, L. Li, H. Wang, Y. Zhang, X. Cheng, "Wound dressings composed of copper-doped borate bioactive glass microfibers stimulate angiogenesis and heal full-thickness skin defects in a rodent model", *Biomaterials.*, 2015, 53 [2] 379-91.
- [10] Wu, Y. Zhou, M. Xu, P. Han, "Copper-containing mesoporous bioactive glass scaffolds with multifunctional properties of angiogenesis capacity, osteostimulation and antibacterial activity", *Biomaterials*, 2013, 34 [2]



- 422-433.
- [11] K. Zheng, X. Dai, M. Lu, A.R. Boccaccini, "Synthesis of copper-containing bioactive glass nanoparticles using a modified Stöber method for biomedical applications", *Colloids Surf.*, 2017, 150 [6] 159-167.
 - [12] R.L. Du, J. Chang, S.Y. Ni, W.Y. Zhai, "Characterization and in vitro Bioactivity of Zinc-containing Bioactive Glass and Glass-ceramics", *J. Biomater. Appl.*, 2006, 20 [4] 341-360.
 - [13] J. Bejarano, P. Caviedes, H. Palza, "Sol-gel synthesis and in vitro bioactivity of copper and zinc-doped silicate bioactive glasses and glass-ceramics", *Biomed. Mater.*, 2015, 10 [2] 250-262.
 - [14] J. Li, D. Zhai, F. Lu, Q. Yu, H. Ma, J. Yin, Z. Yi, M. Liu, "Preparation of copper-containing bioactive glass/eggshell membrane nanocomposites for improving angiogenesis, antibacterial activity and wound healing", *Acta Biomaterialia.*, 2016, 36 [6] 254-266.
 - [15] V. Aina, G. Cerrato, G. Martra, "Towards the controlled release of metal nanoparticles from biomaterials: Physico-chemical, morphological and bioactivity features of Cu-containing sol-gel glasses", *Appl. Surf. Sci.*, 2013, 283 [1] 240-248
 - [16] Srivastava, and R. Pyare, "Characterization of CuO substituted 45S5 Bioactive Glasses and Glass - ceramics", *Int. J. Innov. Sci. Res. Technol.*, 2012, 12 [1] 28-41.
 - [17] Karakuzu-Ikizler, P. Terzioğlu, S. Yücel, "Effect of selenium incorporation on the structure and in vitro bioactivity of 45S5 bioglass", *J. Australas. Ceram. Soc.*, 2020, 56 [2] 697-709.
 - [18] H. Wang, S. Zhao, W. Xiao, J. Xue, Y. Shen, "Influence of Cu doping in borosilicate bioactive glass and the properties of its derived scaffolds", *Mater. Sci. Eng. C.*, 2016, 58 [1] 194-203.
 - [19] Hoppe, R. Meszaros, C. Stähli, S. Romeis, "In vitro reactivity of Cu doped 45S5 Bioglass® derived scaffolds for bone tissue engineerin", *J. Mater. Chem. B.*, 2013, 1 [41] 5659-5674.
 - [20] E.A. Abou Neel, I. Ahmed, J. Pratten, S.N. Nazhat, J.C. Knowles, "Characterisation of antibacterial copper releasing degradable phosphate glass fibres", *Biomaterials.*, 2005, 26 [15] 2247-2254.
 - [21] E. Wers, L. Bunetel, H. Oudadesse, P. Pellen-Mussi, "Effect of Copper and Zinc on the Bioactivity and Cells Viability of Bioactive Glasses", *Bioceram. Dev. Appl.*, 2013, 6 [5] 125-130.
 - [22] S. Soltani-Dehnavi, M. Mehdikhani-Nahrkhalaji, M. Rafienia, A. Doostmohammadi, "Copper-doped and copper-free bioactive glass nanopowders cytotoxicity and antibacterial activity assessment", *Sci. Iran., Trans. F.*, 2017, 24 [3] 1706-1716.



Synthesis, in Vitro Evaluation and Biological Studies of Copper-Containing 58S Bioactive Glass

Faezeh Zolghadr, Arman Sedghi*, Saeid Baghshahi, Amirhossein Moghanian

Faculty of Technology and Engineering, Imam Khomeini International University, Qazvin, Iran

*sedghi@eng.ikiu.ac.ir

Abstract: Cu-substituted 58S bioactive glasses (0-10%mol CuO) were synthesized by sol-gel method and the effect of copper substitution for calcium on their biodegradability, bone-like apatite formation, cell proliferation, alkaline phosphatase activity of M3T3-E1 osteoblast cells and antibacterial efficiency were investigated. The results of x-ray diffraction (XRD) and Fourier transform infrared spectroscopy (FTIR) and surface analysis using SEM confirmed the formation of a layer of bone-like apatite on the BGs after 7 days of immersion in SBF. The surface analysis with SEM indicated that the addition of copper to the structure led to a reduction of the amount of apatite formed on the surface. The evaluation of cellular response by MTT assay and alkaline phosphatase activity showed that the proliferation and differentiation of MC3T3-E1 cells in 58S BG substituted with 5 mol% CuO had the highest value compared to other samples while, the substitution of 10 mol% CuO in composition led to a reduction in cell proliferation and differentiation and induction of cell cytotoxicity. In addition, Cu-substituted glasses showed significant antibacterial effect against *Escherichia coli* (*E.coli*) and *Staphylococcus aureus* (*S.aureus*) bacteria so that the antibacterial activity coefficient against *E.coli* in 58S containing 5 mol% CuO has doubled compared to base glass and was more than 99% ($p < 0.01$). Taken together, 58S glass containing 5% mol CuO has been recommended for use in repair of bone defects in tissue engineering due to its *in vitro* bioactivity, stimulation of MC3T3-E1 cell proliferation and differentiation and excellent antibacterial activity.

Keywords: Sol-gel synthesis, apatite, Copper, Antibacterial properties, Proliferation.