



The Effect of Bioactive Glass Synthesis Method on the Flowability and Structural Stability of the Injectable Pastes Prepared from It

Shokoufeh Borhan ^{1*}, Javad Esmailzadeh ²

¹ Assistant Professor, Department of Materials, Chemical and Polymer Engineering, Buein Zahra Technical University, Buein Zahra, Qazvin, Iran

² Assistant Professor, Department of Materials and Chemical Engineering, Esfarayen University of Technology, Esfarayen, North Khorasan, Iran

*Corresponding Author's Email: shkfborhan@bzte.ac.ir (Sh. Borhan)

Paper History:

Received: 2022-12-19

Revised in revised form: 2023-01-18

Scientific Accepted: 2023-01-29

Keywords:

Bioactive Glass,
Melting Method,
Sol-Gel,
Rheology,
Wash-Out

Abstract The present project primarily aims to investigate the effect of synthesis method of the bioactive glass powder on the flowability and structural stability of the pastes from it. In this study, 45S5 bioactive glass was synthesized by melting and sol-gel methods. The rheological properties, injectability, washout resistance, and behavior of calcium phosphate deposition formation in the simulated body solution after 21 days were investigated using UV-visible spectroscopy, inductively coupled plasma atomic emission spectroscopy, and scanning electron microscopy. Finally, the cytotoxicity test was carried out, and its dependence on the concentration of the ions released from different pastes was evaluated. The bioactive glass powder prepared through the melting method was non-porous with a specific surface area of about $3 \text{ m}^2\text{g}^{-1}$ while the powder prepared by the sol-gel method was porous with a specific surface area of about $12 \text{ m}^2\text{g}^{-1}$. The values of the yield stress, viscosity, and thixotropy in the paste prepared by the sol-gel glass were higher than those of the sample prepared by melting method, and the injection force increased by about five times. Use of sol-gel glass led to the formation of pastes with lower washing resistance and for this reason, the dissolution and release rate of the ions from the paste containing sol-gel glass was higher than those of the same sample with molten glass. Increasing the specific surface area of the powder led to faster formation of the apatite layer on the surface of the samples; however, the rate of cell proliferation decreased due to the high concentration of ions in the environment.



<https://doi.org/10.30501/jamt.2023.376241.1259>

URL: https://www.jamt.ir/article_166008.html

1. INTRODUCTION

With the development of non-invasive surgeries, the need for injectable materials has been increasingly felt in recent years. Injectable pastes are used in the cases where accessibility to the defect is limited or made possible through a narrow path. In case the damaged area is irregular in shape, the injectable pastes are required for accurately replacement [1].

In the previous research [2], the composite paste consists of bioactive glass and polycaprolactone microspheres as the drug carriers that was introduced as a successful injectable system. Considering that different glass synthesis methods affect the physical characteristics, this research aims to investigate and compare the flow properties, structural stability, and bioactivity of the pastes prepared from bioactive glasses based on the melting and sol-gel methods. So far, the effect of different parameters such as type and concentration of the liquid phase, particle size of solid phase, solid-to-liquid ratio, chemical composition, and additives on the properties of injectable pastes has been investigated. In this research, the effect of the synthesis method of bioactive glass powder on the stability and injectability of the resulting paste will be studied.

2. MATERIALS AND METHODS

Bioactive glass 45S5 with the chemical composition of 45 wt % SiO_2 , 24.5 wt % CaO , 24.5 wt % Na_2O and 6 wt % P_2O_5 was prepared through melting (M-BG) and sol-gel (S-BG) methods. The morphology of the glass particles was studied using a scanning electron microscope. The specific surface area of the powder was measured through the absorption and desorption curves of nitrogen gas through the BET method at the temperature of 77 K. Then, 60 wt % of bioactive glass powder (M-BG or S-BG) and 40 wt % of PCL microspheres were mixed with 4 % w/v sodium alginate aqueous solution at the fixed solid-to-liquid ratio of 2.5 g/m to prepare an injectable paste.

The rheological properties of the pastes were investigated in the static state using MC-R300 Anton Paar rheometer with parallel flat plates at room temperature. The required force for injection was generated by a mechanical test device (SANTAM STM-20). In vitro assessments were done to check the stability of the paste in Simulated Body Fluids (SBF), and the ability of the apatite formation was investigated based on the XRD, FTIR, and SEM analyses. The amount of sodium alginate released from the composites was measured using a UV-visible spectrometer (PerkinElmer Lambda25 Us). Variations in the concentration of Ca and Si elements in the SBF solution were measured during 21 days using inductively

Please cite this article as: Borhan, Sh., Esmailzadeh, J., "The effect of bioactive glass synthesis method on the flowability and structural stability of the injectable pastes prepared from it", *Journal of Advanced Materials and Technologies (JAMT)*, Vol. 12, No. 1, (2023), 1-15. (<https://doi.org/10.30501/jamt.2023.376241.1259>).



coupled plasma atomic emission spectroscopy (ICP-AES ARL 3410).

3. RESULTS AND DISCUSSION

Melt-derived bioactive glass powder was non-porous with a specific surface area of $3.8 \text{ m}^2\text{g}^{-1}$ while the porous sol-gel bioactive glass powder was reported to be porous with a specific surface area of $11.908 \text{ m}^2\text{g}^{-1}$.

Both pastes exhibit thixotropy behavior and the amount of thixotropy can be estimated considering the hysteresis loop area. The paste prepared from the sol-gel glass (S-BG) has larger area than that prepared through the melting method (M-BG). Here, the viscosity decreases with an increase in the shear rate; for this reason, the pastes exhibit shear thinning behavior. The viscosity and yield stress values of S-BG are higher than those of M-BG mainly because the porosity affects the permeability of the powder, which is a measure of the plasticity of the paste. The required force to inject the S-BG paste is quite high (about 206 N), which is unreasonable for surgeries, while only 93 % of the paste can be injected. Upon using the melt-derived glass, the injection force will be reduced by 45 N that facilitates the injection of all the paste.

Structural disintegration occurs in the S-BG paste over time, and the particles of the paste have been separated, however, it did not happen in M-BG paste. The amount of the released sodium alginate from the S-BG paste is more than that in M-BG paste. Since the washout resistance of these pastes depends on the presence of the sodium alginate phase, which acts as a carrier in the composite composition, the lower stability of the S-BG paste can be attributed to the faster removal of sodium alginate phase.

The results of the ICP test indicated that the release amount of calcium ion into the environment is higher in S-BG paste than that in others. The difference in the release rate depends on the physical properties of the powders, higher specific surface area, and higher dissolution rate. As a result, calcium phosphate

precipitation and apatite crystallization happen faster on the surface of the paste containing sol-gel bioactive glass. Consequently, a layer with a spherical morphology consisting of nano-sized crystallites can be detected in the SEM images that can be attributed to hydroxyapatite.

The rate of cell proliferation in the vicinity of the S-BG is lower than the cell growth in the vicinity of the M-BG sample, given the essential role of the Ca and Si ions in the proliferation of bone cells and their limited concentration in the culture medium.

4. CONCLUSION

In the present research, the sol-gel glass powder proved to be more porous with a higher specific surface area than the melt-derived glass; hence, their resulting paste was characterized by higher yield stress, viscosity, and injection force than its counterpart. The paste prepared through the sol-gel glass had a higher degradation rate and less structural stability due to the fast release of sodium alginate and ions; however, its apatite formation ability is better than that of the paste containing melt-derived glass.

5. ACKNOWLEDGEMENT

The authors would like to thank the officials of the Biomaterials Laboratory of the Materials and Energy Research Center for providing the necessary equipment to conduct this research.

REFERENCES

1. Chen, F., Liu, C., Wei, J., Chen, X., Zhao, Z., Gao, Y., "Preparation and characterization of injectable calcium phosphate cement paste modified by polyethylene glycol-6000", *Materials Chemistry and Physics*, Vol. 125, (2011) 818–824. <https://doi.org/10.1016/j.matchemphys.2010.09.050>
2. Borhan, Sh., Hesarak, S., Behnamghader, A. A., Ghasemi, E., "Rheological evaluations and in vitro studies of injectable bioactive glass–polycaprolactone–sodium alginate composites", *Journal of Material Science: Materials in Medicine*, Vol. 27, (2016), 137-152. <https://doi.org/10.1007/s10856-016-5745-y>



مقاله کامل پژوهشی

تأثیر روش سنتز شیشه زیست‌فعال بر جریان‌یابی و پایداری ساختاری خمیرهای تزریق‌پذیر تهیه شده از آن

شکوفه برهان^{۱*}، جواد اسماعیل‌زاده^۲

^۱استادیار، گروه مهندسی مواد، شیمی و پلیمر، مرکز آموزش عالی فنی و مهندسی بوئین‌زهره، بوئین‌زهره، قزوین، ایران
^۲استادیار، دانشکده مهندسی مواد و شیمی، مجتمع آموزش عالی فنی و مهندسی اسفراین، اسفراین، خراسان شمالی، ایران

تاریخچه مقاله:

ثبت اولیه: ۱۴۰۱/۰۹/۲۸

دریافت نسخه اصلاح‌شده: ۱۴۰۱/۱۰/۲۸

پذیرش علمی: ۱۴۰۱/۱۱/۰۹

کلیدواژه‌ها:

شیشه زیست‌فعال،

روش ذوبی،

سل-ژل،

رئولوژی،

آب‌شویی

چکیده هدف از این پروژه، بررسی اثر روش سنتز پودر شیشه زیست‌فعال بر خصوصیات جریان‌یابی و پایداری ساختاری خمیرهای تهیه شده از آن می‌باشد. سنتز شیشه زیست‌فعال 45S5 به روش ذوبی و سل-ژل صورت گرفت. خصوصیات رئولوژیکی، تزریق‌پذیری، مقاومت به آب‌شویی و رفتار تشکیل رسوب کلسیم‌فسفاتی در محیط شبیه‌سازی شده بدن بعد از ۲۱ روز، با بهره‌گیری از روش‌های طیف‌سنجی جذب نوری، طیف‌سنجی گسیل اتمی و برانگیختگی به کمک پلاسما و میکروسکوپ الکترونی روبشی مورد بررسی قرار گرفت و در نهایت آزمون سمیت سلولی و بررسی وابستگی آن به غلظت یون‌های رهایش‌یافته از خمیرهای مختلف انجام شد. پودر شیشه زیست‌فعال تهیه شده به روش ذوبی، غیرمتخلخل با اندازه سطح‌ویژه حدود ۳ مترمربع بر گرم بود؛ در صورتی که پودر تهیه شده به روش سل-ژل، متخلخل و اندازه سطح‌ویژه آن، حدود ۱۲ مترمربع بر گرم بود. در خمیر تهیه شده با شیشه سل-ژل مقدار تنش تسلیم، ویسکوزیته و تیکسوتروپی نسبت به نمونه تهیه شده به روش ذوبی بیشتر بود، همچنین نیروی تزریق حدود ۵ برابر افزایش یافت. استفاده از شیشه سل-ژل منجر به تشکیل خمیرهایی با مقاومت آب‌شویی کمتر شد؛ به طوری که سرعت انحلال و رهایش یون‌ها از خمیر حاوی شیشه سل-ژل بیشتر از نمونه مشابه با شیشه ذوبی بود. افزایش سطح‌ویژه پودر منجر به تشکیل سریع‌تر لایه آپاتیتی روی سطح نمونه‌ها شد؛ اما میزان تکثیر سلولی به دلیل بالا بودن غلظت یون‌ها در محیط، کاهش یافت.



<https://doi.org/10.30501/jamt.2023.376241.1259> URL: https://www.jamt.ir/article_166008.html

۱- مقدمه

هنگام استفاده باید محل عیب را با شکل کاشتینه منطبق کند یا بافت اطراف را برای رسیدن به شکل مطلوب تخریب نماید. این امر موجب اتلاف استخوان سالم بیمار، آسیب بافت اطراف و طولانی شدن زمان جراحی می‌شود [۲].

با توسعه روش‌های غیرهجومی مانند جراحی‌های زیرپوستی، مواد تزریق‌پذیر مورد نیاز خواهند بود. کاربرد خمیرهای تزریق‌پذیر در مواردی است که دسترسی به محل عیب محدود است و یا از طریق یک مسیر باریک، امکان‌پذیر است. همچنین در مواردی که نیاز به جایگزینی دقیق خمیر در محل

سرامیک‌های کلسیم‌فسفاتی معمولاً به عنوان مواد ترمیمی استخوان شناخته شده‌اند و به شکل بلوک یا گرانول استفاده می‌شوند. متأسفانه کاربردهای بالینی این مواد با مشکلاتی مواجه است. پر کردن کامل عیوب استخوانی با بلوک‌های سرامیکی امکان‌پذیر نیست، همچنین مواد گرانول پس از کاشت به بافت اطراف حرکت می‌کنند [۱]. بزرگ‌ترین عیب کاشتینه‌های^۱ ارتوپدی نیز شکل ازپیش تعیین شده آنهاست، از این رو، جراح

^۱ Implants

*عهده دار مکاتبات: شکوفه برهان

نشانی: ایران، قزوین، بوئین‌زهره، مرکز آموزش عالی فنی و مهندسی بوئین‌زهره، گروه مهندسی مواد، شیمی و پلیمر، تلفن: ۰۹۱۲۷۸۴۷۱۲۶، دورنگار: -

پیام‌نگار: shkfborhan@bzte.ac.ir

آسیب‌دیده باشد، از خمیرهای تزریق‌پذیر استفاده می‌شود. بر طبق گزارش‌ها، تزریق مواد استخوانی به روش‌های غیرمخرب برای درمان شکستگی مهره‌های ستون فقرات کاربردهای بالینی دارد [۳]. مواد تزریق‌پذیر استخوانی باید تمام ویژگی‌های عمومی بیومواد قابل‌استفاده در بدن را داشته باشند. از جمله: عدم سمیت، زیست‌فعالی و قابلیت تشکیل پیوند با استخوان، قابلیت تحریک به استخوان‌سازی، زیست‌تخریب‌پذیری در زمان مناسب و قابلیت تحمل بار در مناطقی از بدن که تحت فشار قرار می‌گیرند. علاوه بر این ویژگی‌ها، در روش‌های غیرمخرب جراحی، به یک خمیری نیاز است که بتوان به راحتی با آن کار کرد. قابلیت تزریق بالا، ویسکوزیته مناسب و پایداری قابل قبول نیز از ویژگی‌های موردنیاز است [۴].

ویژگی عمده‌ای که شیشه‌های زیست‌فعال^۱ (BG) را از سایر سرامیک‌های زیست‌فعال متمایز می‌کند، سرعت بالای واکنش سطحی است که منجر به اتصال مستقیم به استخوان از طریق تشکیل هیدروکسی‌آپاتیت^۲ (HA) بر سطح کاشتنه می‌شود [۵]. همچنین این شیشه‌ها به دلیل رهایش یون سیلیسیم (Si) که باعث بهبود فعالیت آلكالین فسفاتاز و فرایندهای استخوان‌سازی می‌شود، نسبت به کلسیم فسفات‌هایی مانند هیدروکسی‌آپاتیت و تری‌کلسیم فسفات ارجحیت دارند [۶]. شیشه‌های زیست‌فعال در سیستم P_2O_5 , Na_2O , CaO , SiO_2 رفتار زیستی^۳ بهتری دارند؛ زیرا یون‌های سدیم، واکنش‌های تعویض یونی بین سطح شیشه و مایعات بدن را سرعت می‌بخشند و باعث رسوب سریع‌تر ترکیبات کلسیم فسفاتی بر سطح شیشه می‌شوند [۷].

تاکنون تلاش‌های زیادی برای ترکیب شیشه‌های زیست‌فعال با پلیمرهای زیست‌تخریب‌پذیر به منظور ایجاد داربستی با زیست‌سازگاری عالی، زیست‌فعالی و زیست‌تخریب‌پذیری صورت گرفته است. استخوان طبیعی از یک فاز آلی مانند کلاژن و یک فاز معدنی شبیه به هیدروکسی‌آپاتیت تشکیل شده است. بنابراین کامپوزیت‌های سرامیک-پلیمر جایگزین‌های مناسبی برای بازسازی استخوان هستند؛ به شرطی که استحکام مکانیکی مناسب و زیست‌فعالی خوبی داشته باشند. پلیمرهای سنتزی مختلفی مانند

پلی‌لاکتیک‌اسید، پلی‌کاپرولاکتون، پلی‌لاکتیدوگلیکولید و کوپلیمرهای آنها به دلیل زیست‌سازگاری و زیست‌تخریب‌پذیری در کاربردهای ترمیم استخوان استفاده می‌شوند [۷]. در این میان، پلی‌کاپرولاکتون یک پلی‌استر نیمه بلورین است که حین تخریب محیط اسیدی ایجاد نمی‌کند [۸]. علاوه بر این، این پلیمر به دلیل زیست‌سازگاری بالا، سرعت تخریب پایین، انعطاف‌پذیری و چقرمگی بالا گزینه مناسبی برای کاربردهای طولانی‌مدت می‌باشد [۹]. با این حال، زیست‌فعالی ضعیف و طبیعت آب‌گریز پلی‌کاپرولاکتون کاربرد آن را به‌تنهایی در ترمیم استخوان محدود کرده است. ترکیب این پلیمر با یک فاز غیرآلی زیست‌فعال شبیه به بخش معدنی استخوان مانند هیدروکسی‌آپاتیت، تری‌کلسیم فسفات و یا شیشه زیست‌فعال راه‌حل مناسبی برای غلبه بر این نقطه‌ضعف است. ضمن این‌که از این طریق، تردی مواد سرامیکی کاهش می‌یابد؛ زیرا پلی‌کاپرولاکتون خصوصیت الاستیک به مواد می‌دهد [۱۰]. پلی‌کاپرولاکتون تأییدیه سازمان غذا و دارو را دارد و برای رهایش کنترل‌شده دارو در فرمول‌بندی‌های مختلف به کار می‌رود؛ زیرا با طیف وسیعی از داروها سازگار است. میکرو یا نانوکرات معمول‌ترین شکل برای کپسوله کردن دارو است، زیرا کرات نسبت به سایر شکل‌ها پایدارتر بوده، به دلیل سطح-ویژه بالا قابلیت حمل مقدار بیشتری دارو را داشته و سرعت رهایش از آن قابل‌کنترل است [۱۱ و ۱۲].

علاوه بر ترکیب شیشه، روش سنتز آن نیز بر ویژگی‌های محصول نهایی تأثیرگذار است. شیشه‌های زیست‌فعال معمولاً به دو روش ذوبی و یا سل-ژل تهیه می‌شوند. در روش ذوبی، شیشه از ذوب ترکیبات اکسیدی در دماهای بالا تهیه می‌شود؛ اما در روش سل-ژل محلول حاوی پیش‌ماده‌های اولیه تحت واکنش‌های بسپارش^۴ در دمای اتاق تشکیل یک ژل می‌دهد. ژل‌ها شبکه‌های پلیمری هستند که قابلیت نگهداری مقدار زیادی حلال را در ساختمان خود دارند. این شبکه از سیلیکاهایی با پیوند کووالانسی تشکیل شده که در نهایت، حلال موجود در آن خشک شده و برای مثال در دمای ۶۰۰ درجه سلسیوس حرارت داده می‌شود تا به شیشه تبدیل شود. شیشه‌های زیست‌فعال تهیه شده به روش سل-ژل سطح‌ویژه بالاتری نسبت به انواع تهیه شده به روش معمول ذوبی دارند که منجر به بهبود فعالیت سلولی،

³ Biological
⁴ Polymerization

¹ Bioactive Glass
² Hydroxyapatite

۲-۲- سنتز و مشخصه‌یابی شیشه‌ها

شیشه زیست‌فعال 45S5 با ترکیب شیمیایی SiO_2 ۴۵٪، CaO ۲۴.۵٪، Na_2O ۲۴.۵٪ و P_2O_5 ۶٪ (درصد وزنی) به دو روش ذوبی و سل-ژل تهیه شد. در روش ذوبی براساس روش مقاله [۱۷] مقادیر مناسبی از مواد اولیه SiO_2 ، Na_2CO_3 ، CaCO_3 و P_2O_5 به مدت یک ساعت در آسیاب سیاره‌ای مخلوط شدند. سپس پودر حاصل در بوته آلومینایی در ۱۴۰۰ درجه سلسیوس به مدت ۲ ساعت ذوب شد. مذاب بر روی یک سطح فلزی کونج شد تا به سرعت در دمای محیط سرد شود و شیشه آمورف به دست آید. فریت حاصل به مدت ۳ ساعت در آسیاب سیاره‌ای با سرعت ۲۵۰ دور در دقیقه آسیاب شد تا پودر شیشه موردنظر به دست آمد.

تهیه شیشه زیست‌فعال به روش سل-ژل براساس روش ارائه‌شده در مقاله [۱۸] صورت گرفت. ابتدا آب و اتانول با

نسبت $\frac{\text{آب}}{\text{اتانول}} = ۲/۵$ با هم مخلوط شدند، سپس با در نظر گرفتن

نسبت $\frac{\text{آب}}{\text{TEOS}} = ۲۱/۶$ ، TEOS به آرامی به محلول فوق در دمای محیط اضافه شد. به منظور تسریع آب‌کافت TEOS، کاتالیزور

اسیدنیتریک ۲ مولار با نسبت $\frac{\text{اسید}}{\text{TEOS}} = ۰/۰۵$ افزوده شد.

به‌همین ترتیب، سایر مواد یعنی TEP، نمک سدیم و نمک کلسیم برحسب درصد مولی شیشه 45S5 اضافه شدند و عمل هم‌زدن به مدت یک ساعت با سرعت ثابت ۲۰۰ دور در دقیقه ادامه پیدا کرد تا سل شفاف حاصل شود. تشکیل ژل با استفاده از کاتالیزور بازی آمونیاک ۲ مولار تسریع شد و نهایتاً ژل خشک شده در دمای ۷۰۰ درجه سلسیوس در اتمسفر هوا عملیات حرارتی شد.

ریخت‌شناسی ذرات شیشه توسط میکروسکوپ الکترونی روشی (SEM, Stereoscan S 360 Cambridge) که با ولتاژ شتاب‌دهنده ۱۵ کیلوولت کار می‌کرد، مشاهده شد. یک لایه نازک طلا بر سطح نمونه مورد بررسی به روش کندوپاش پوشش داده شد. اندازه سطح ویژه پودر از طریق منحنی‌های جذب و واجذب گاز نیتروژن به روش BET^۶ (BET, ASAP 2010) و

رسوب سریع تر هیدروکسی‌آپاتیت و پیوند با بافت می‌شود [۸]. سل-ژل یک فرایند دمابیین است که امکان کنترل، یکنواختی و خلوص ترکیب در آن بالاتر است [۱۳]. روش سل-ژل به شرایط فرایند مانند نوع حلال، نوع پیش‌ماده‌ها، استوکیومتری آب به آلکوکسید و نوع کاتالیزور بسیار حساس است [۱۴]. تفاوت فیزیکی بین شیشه‌های ذوبی و سل-ژل این است که شیشه‌های سل-ژل تخلخل‌های ذاتی دارند؛ درحالی‌که شیشه‌های ذوبی متراکم هستند. نانوتخلخل‌ها به دلیل سطح خاص خود باعث بهبود رفتار سلولی می‌شوند [۱۵].

در تحقیقات گذشته [۱۶] خمیر کامپوزیتی متشکل از شیشه زیست‌فعال و میکروکرات پلی‌کاپرولاکتون حامل دارو به‌عنوان یک سیستم تزریق‌پذیر موفق معرفی شد. از آنجایی‌که روش‌های متفاوت سنتز شیشه بر روی ویژگی‌های فیزیکی آن اثرگذار است، هدف از این تحقیق بررسی و مقایسه خواص جریان‌یابی، پایداری ساختاری و زیست‌فعالی خمیرهای تهیه شده از شیشه‌های زیست‌فعال به روش ذوبی و سل-ژل است. تاکنون اثر پارامترهای متفاوتی مانند نوع و غلظت فاز مایع، اندازه ذرات فاز جامد، نسبت جامد به مایع، ترکیب شیمیایی و نوع افزودنی بر خواص خمیرهای تزریق‌پذیر بررسی شده است، در این تحقیق تأثیر روش سنتز پودر شیشه زیست‌فعال بر پایداری و جریان‌یابی خمیر حاصل از آن مطالعه خواهد شد.

۲- روش تحقیق

۲-۱- مواد اولیه مورد نیاز

مواد اولیه مورد نیاز برای ساخت شیشه‌ها به روش ذوبی، دی‌اکسید سیلیسیم SiO_2 ، کربنات سدیم Na_2CO_3 ، کربنات کلسیم CaCO_3 و پنتااکسید فسفر P_2O_5 هستند که همگی از شرکت مرک^۱ خریداری شدند. تترااتیل اورتوسیلیکات^۲ (TEOS)، تری‌اتیل فسفات^۳ (TEP) و نیترات کلسیم چهارآبه از شرکت مرک برای ساخت شیشه سل-ژل تهیه شدند. میکروکرات پلی‌کاپرولاکتون^۴ (PCL) براساس روش گفته شده در مقاله پیشین سنتز شدند [۱۶]. سدیم‌آلژینات با ویسکوزیته متوسط از شرکت سیگما آلد ریچ^۵ تهیه شد.

^۴ Polycaprolactone

^۵ Sigma-Aldrich

^۶ Brunauer-Emmett-Teller Analysis

^۱ Merck

^۲ Tetraethyl Orthosilicate

^۳ Triethyl Phosphate

تشکیل آپاتیت خمیر که نشان دهنده توانایی تشکیل پیوند با استخوان است، انجام شد. برای مطالعه رفتار برون تنی خمیرها، ۱ گرم از هر کامپوزیت در ۱۰۰ میلی لیتر محلول SBF به مدت ۲۱ روز غوطه ور شد. SBF هر ۴۸ ساعت تعویض شد.

برای بررسی مقاومت به آب شوئی، خمیرهای تزریق شده بلافاصله در SBF غوطه ور شدند و درون گرم خانه ۳۷ درجه سلسیوس قرار گرفت. رفتار خمیر بعد از ۲۱ روز غوطه وری در SBF به صورت کیفی با دوربین دیجیتال ثبت شد.

میزان رهائش سدیم آلزینات از کامپوزیت ها در محلول SBF طی ۲۱ روز توسط دستگاه طیف سنجی جذب نوری (UV-visible spectrometer- PerkinElmer Lamda25 Us) اندازه گیری شد.

تغییرات غلظت عنصرهای کلسیم و سیلیسیم در محلول SBF طی ۲۱ روز با استفاده از طیف سنجی گسیل اتمی و برانگیختگی به کمک پلاسما (ICP-AES ARL 3410) اندازه گیری شد.

۲-۶- مشاهده ریزساختار، آنالیز فازی و گروه های شیمیایی
ریخت شناسی سطح خمیر خشک شده قبل و بعد از غوطه وری در SBF توسط میکروسکوپ الکترونی روبشی مورد مطالعه قرار گرفت.

آنالیز فازی خمیرها قبل و بعد از ۲۱ روز غوطه وری در SBF توسط پراش سنجی پرتوی ایکس (XRD, Philips PW3710) با تابش Cu-K α که با ولتاژ ۴۰ کیلوولت و جریان ۳۰ میلی آمپر کار می کرد، در محدوده $50 \leq 2\theta \leq 10$ درجه انجام شد.

شناسایی پیوندها و گروه های شیمیایی موجود در خمیرها قبل و بعد از ۲۱ روز غوطه وری در SBF توسط طیف سنجی مادون قرمز (FTIR, BRUKER VECTOR 33) در حالت عبوری صورت گرفت. ۱۰ میلی گرم از پودر نمونه با ۸۰۰ میلی گرم پودر پتاسیم برمید (KBr) مخلوط شده و به شکل قرص پرس شد. قرص ها در محدوده $4000-400 \text{ cm}^{-1}$ با وضوح 2 cm^{-1} آنالیز شدند.

(Micromeritics, USA) در دمای ۱۹۶- درجه سلسیوس اندازه گیری شد.

۲-۳- ساخت خمیرها

فاز جامد خمیر شامل ۶۰ درصد وزنی پودر شیشه زیست فعال 45S5 تهیه شده به روش ذوبی^۱ (M-BG) یا تهیه شده به روش سل-ژل^۲ (S-BG) به همراه ۴۰ درصد وزنی میکروکرات پلی کاپرولاکتون بود. فاز مایع، محلول آبی سدیم-آلزینات ۴ درصد وزنی به حجمی انتخاب شد. خمیرها با مخلوط کردن فاز پودر و مایع با نسبت ثابت ۲/۵ گرم بر میلی لیتر تهیه شدند.

۲-۴- ویژگی های جریان یابی

خصوصیات رئولوژیکی خمیرها در حالت چرخشی با استفاده از رئومتر (Anton Paar MC-R300) با صفحات تخت موازی در دمای اتاق بررسی شد. برای هر آزمون، ۳ گرم از خمیر تهیه شده و بعد از هم زدن به مدت ۱ دقیقه، بر مرکز صفحه پایینی قرار داده شد؛ درحالی که فاصله بین صفحات ۱ میلی متر تنظیم شد. اندازه گیری پارامترهای رئولوژی پایدار در حالت سرعت برشی ($\dot{\gamma}$) کنترل شده صورت گرفت؛ به طوری که سرعت برشی در ۱۸۰ ثانیه از 0.1 s^{-1} تا 1000 s^{-1} افزایش و سپس در همان زمان به صفر کاهش یافت. منحنی های تنش برشی (σ) و ویسکوزیته (η) به عنوان تابعی از سرعت برشی رسم شدند. به تنش برشی در سرعت برشی صفر، تنش تسلیم (σ_0) گفته می شود. این مقدار، از برون یابی منحنی $\sigma - \dot{\gamma}$ به دست می آید.

برای بررسی تزریق پذیری، خمیر تهیه شده به درون یک سرنگ ۳ میلی لیتر منتقل شد و تحت بار فشاری عمود بر سطح پیستون قرار گرفت. نیرو توسط دستگاه آزمون مکانیکی (SANTAM STM-20) با سرعت ۳۰ میلی متر بر دقیقه اعمال و نمودار نیروی اعمالی در برابر جابجایی پیستون رسم شد.

۲-۵- بررسی تخریب و انحلال

آزمایشات برون تنی به منظور بررسی پایداری خمیر در تماس با محلول شبیه به مایعات بدن^۳ (SBF) و همچنین توانایی

³ Simulated Body Fluid

⁴ Incubator

¹ Melt-Derived Bioactive Glass

² Sol-Gel-Derived Bioactive Glass

۷-۲- آزمون تکثیر سلولی

برای بررسی اثر نمونه‌های تهیه شده بر زنده بودن سلول‌های استئوبلاست، آزمون رنگ‌سنجی MTT (3-dimethylthiazol-2,5-diphenyltetrazolium bromide) با استفاده از سلول‌های انسانی NCBI C555 MG-63 و عصاره هر نمونه انجام شد. عصاره نمونه‌ها با افزودن پودر خمیر خشک شده به محیط کشت RPMI 1640 با نسبت ۲۰۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر تهیه شد. بعد از ۷۲ ساعت نگهداری در گرم‌خانه ۳۷ درجه سلسیوس، مخلوط سانتریفیوژ و سپس فیلتر شد. عصاره خالص (۱۰۰ درصد حجمی) با افزودن RPMI 1640 تا ۷۵، ۵۰ و ۲۵ درصد حجمی رقیق شد. تعداد ۱۰۰۰۰ سلول در ظروف ۹۶ خانه‌ای در محیط کشت RPMI 1640 حاوی ۱۰ درصد سرم جنین گاوی^۱ (FBS)، ۱۰۰ unit/ml پنی‌سیلین و ۱۰۰ unit/ml استرپتومایسین کشت داده شد و در گرم‌خانه ۳۷ درجه سلسیوس تحت اتمسفر ۵ درصد گاز کربنیک به مدت ۲۴ ساعت نگهداری شد. بعد از چسبیدن سلول‌ها، محیط کشت خارج و عصاره نمونه‌ها با ۱۰ درصد FBS به خانه‌ها اضافه شد. چاهک بدون عصاره به‌عنوان نمونه کنترل انتخاب شد. بعد از ۴۸ ساعت، ریخت‌شناسی سلول‌ها در مجاورت عصاره‌ها توسط یک میکروسکوپ نوری معکوس (Olympus CKX41) مشاهده شد. به‌منظور شمارش تعداد سلول‌های زنده بعد از نگهداری در گرم‌خانه ۳۷ درجه سلسیوس به مدت ۲ روز، محیط خارج شد و ۱۰۰ میکرولیتر MTT حل شده در RPMI 1640 (۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر) به هر چاهک اضافه شد. ۴ ساعت زمان برای تشکیل کریستال‌های فورمازان لازم است. سپس رنگ واکنش کرده خارج شده و کریستال‌های فورمازان بنفش در ۱۰۰ میکرولیتر دی‌متیل‌سولفوکساید حل شدند. بعد از انحلال کامل، دانسیته نوری محلول توسط میکروپلیت ریدر^۲ (BIO-TEK Elx 808, Highland park, USA) در طول موج ۵۷۰ نانومتر اندازه‌گیری شد. تعداد سلول‌ها بر اساس نمودار استاندارد تهیه شده از نمونه‌هایی با دانسیته سلولی مشخص تعیین شدند. تصویر سلول‌ها در مجاورت عصاره‌ها توسط میکروسکوپ نوری ثبت شد.

۳- نتایج و بحث

۳-۱- مشخصات پودر شیشه ذوبی و سل-ژل سنتز شده

شکل ۱- تصویر میکروسکوپ الکترونی روبشی (SEM)

و منحنی‌های جذب و واجذب گاز نیتروژن پودر شیشه زیست‌فعال تهیه شده به‌روش ذوبی و سل-ژل را نشان می‌دهد. ریخت‌شناسی پودر شیشه ذوبی در تصویر SEM ذرات چندوجهی غیرمنظم با اندازه ۱۰-۴ میکرومتر را نشان می‌دهد که ذرات کوچک‌تر اگلومره شده‌اند. حجم کلی و میانگین شعاع تخلخل‌ها به ترتیب ۲/۹ سانتی‌متر مکعب بر گرم و ۷۷/۹۳ نانومتر تخمین زده شد؛ بنابراین تخلخل پودر کم اما در محدوده ماکرو (نانومتر $a > 50$) قرار دارد. اندازه سطح ویژه پودر به‌روش BET ۳/۸ مترمربع بر گرم اندازه‌گیری شد.

شکل ۱-الف نشان می‌دهد که منحنی‌های جذب و واجذب بر روی هم منطبق می‌باشند. طبق طبقه‌بندی آیوپاک^۴ ایزوترم جذب مطابق با ایزوترم نوع III می‌باشد که معرف ماده‌ای غیرمتخلخل با انرژی جذب پایین است [۱۹]. اندازه سطح ویژه پودر سل-ژل به‌روش BET، ۱۱/۹۰۸ مترمربع بر گرم، شعاع تخلخل‌های مزوحفره ۳۳/۸۱ نانومتر و حجم کلی تخلخل‌ها ۰/۱۲ سانتی‌متر مکعب بر گرم گزارش شد.

در شکل ۱-ب منحنی‌های جذب و واجذب بر روی هم منطبق نیستند و تشکیل حلقه پسماند^۵ می‌دهند. طبق طبقه‌بندی آیوپاک، ایزوترم جذب مطابق با ایزوترم نوع V می‌باشد و حلقه پسماند تشکیل شده شبیه به منحنی نوع ۱ (H1) است که شاخه‌های جذب و واجذب تقریباً عمودی و موازی هستند. این شکل، معرف ماده‌ای با تخلخل‌های مزوحفره و انرژی جذب پایین، اما بدون تخلخل‌های به هم مرتبط می‌باشد [۱۹]. ریخت‌شناسی پودر شیشه سل-ژل در تصویر SEM، ذرات چندوجهی غیرمنظم اگلومره با اندازه تقریبی کوچک‌تر از ۱۰ میکرومتر را نشان می‌دهد. بنابراین با اینکه در هر دو روش ذوبی و سل-ژل، ریخت‌شناسی و اندازه ذرات تقریباً مشابه است؛ اما روش سل-ژل منجر به تولید پودری با تخلخل بالاتر و در نتیجه سطح ویژه بالاتر شده است.

⁴ IUPAK

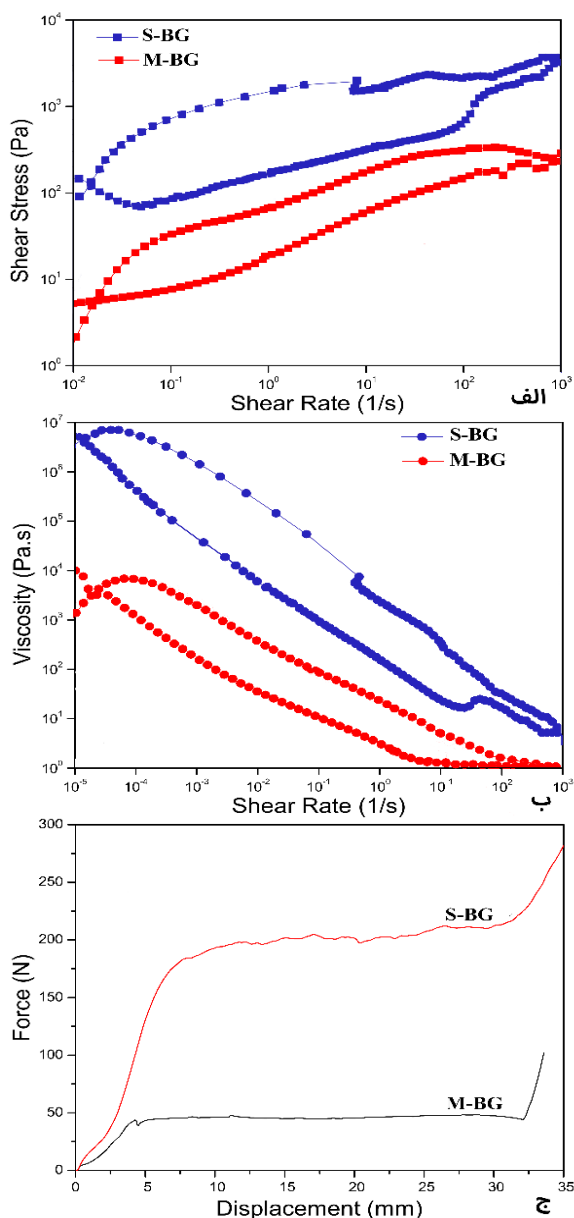
⁵ Hysteresis

¹ Fetal Bovine Serum

² Microplate Reader

³ Scanning Electron Microscope

شکستن ساختار داخلی شکل گرفته است. این ساختارها به دلیل برهم کنش ذرات با هم و با مولکول های آلزینات تشکیل شده اند. هر چه مساحت حلقه بزرگ تر باشد، پیوندهای ایجاد شده قوی ترند و انرژی مورد نیاز برای شکستن آنها بیشتر است. بنابراین از آزمون رئولوژی می توان برای پیش بینی پیوندهای موجود در خمیر استفاده کرد.

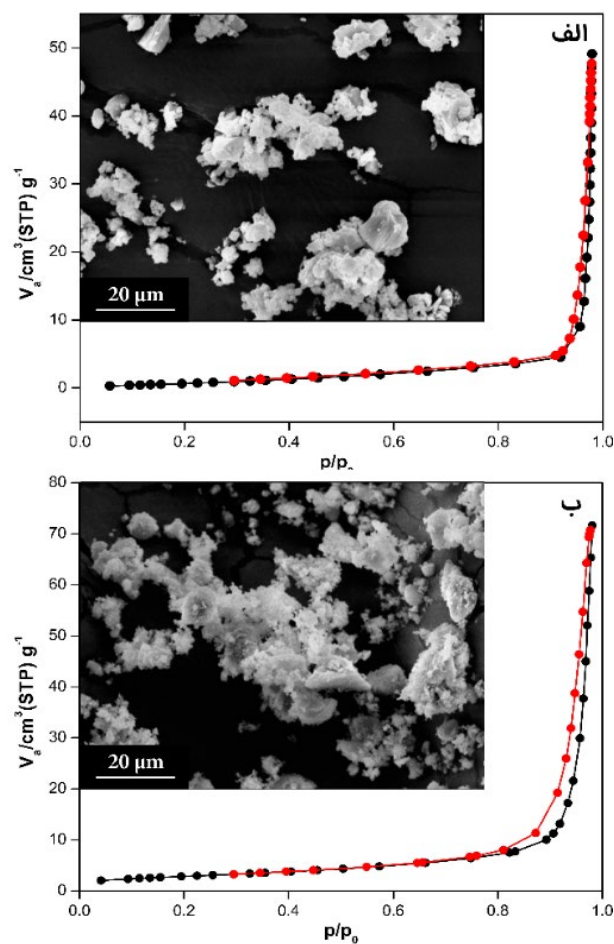


شکل ۲. منحنی الف) تنش برشی-سرعت برشی ب) ویسکوزیته-سرعت برشی و ج) تزریق پذیری خمیرهای مختلف

در هر دو خمیر، با افزایش سرعت برشی، ویسکوزیته کاهش می یابد؛ از این رو، خمیرها رفتار رقیق برشی دارند. رفتار رقیق برشی مشخص می کند که در تنش بزرگتر از تنش تسلیم، ماده به آسانی جریان می یابد. این رفتار باعث می شود که خمیر

۲-۳- خصوصیات جریان یابی خمیرها

شکل ۲-الف و ۲-ب منحنی تنش برشی و ویسکوزیته برحسب سرعت برشی خمیرهای تهیه شده از شیشه ذوبی و سل-ژل را نشان می دهد. منحنی رفت و برگشت، تشکیل یک حلقه پسماند داده است که نشان دهنده ویژگی تیکسوتروپی این مواد است. هر دو خمیر رفتار تیکسوتروپی مثبت دارند به این معنی که منحنی بازگشت نسبت به منحنی رفت در یک سرعت برشی ثابت، تنش برشی کمتری دارد. مقدار تیکسوتروپی را می توان با مساحت حلقه پسماند تخمین زد؛ به عبارت دیگر، ناحیه بزرگتر، تیکسوتروپی بیشتر خمیر را نشان می دهد [۱۶].



شکل ۳. تصویر SEM و ایزوترم جذب و واجذب پودر شیشه تهیه شده به روش الف) ذوبی و ب) سل-ژل

مشاهده می شود که خمیر تهیه شده با شیشه سل-ژل تیکسوتروپی بیشتری نسبت به خمیر تهیه شده به روش ذوبی دارد. درجه تیکسوتروپی متناسب با انرژی مورد نیاز برای

جامد به مایع دارند. تخلخل‌ها دلیل اصلی نفوذپذیری پودر است؛ به عبارت دیگر، نفوذ مولکول‌های مایع به درون حفرات، مقدار آب موجود بین ذرات را کاهش می‌دهد؛ در نتیجه، اصطکاک داخلی بین اجزاء خمیر و اصطکاک خارجی بین خمیر و دیواره سرنگ افزایش می‌یابد و حرکت دشوار می‌شود. همچنین سطح ویژه بالاتر پودر باعث واکنش بیشتر ذرات با مایع سدیم آلزینات شده، در نتیجه ویسکوزیته افزایش می‌یابد. علاوه بر این، شیشه ذرات چندوجهی غیرمنظم با گوشه‌های تیز دارد. این ریخت‌شناسی، برهم‌کنش بین ذرات را افزایش می‌دهد و حرکت آنها را سخت‌تر می‌کند. نیروی تزریق بالاتر شیشه سل-ژل، توسط تنش تسلیم و ویسکوزیته بالاتر آن نسبت به شیشه ذوبی نیز تأیید می‌شود.

۳-۳- بررسی تخریب و انحلال خمیرها

حالت فیزیکی خمیرهای فوق بلافاصله بعد از تزریق و ۲۱ روز بعد از غوطه‌وری در SBF در شکل ۳-الف نشان داده شده است. خمیر تهیه شده از شیشه سل-ژل با گذشت زمان دچار ازهم‌پاشیدگی ساختاری شده و ذرات خمیر از هم جدا شده‌اند. اما در خمیر تهیه شده با شیشه ذوبی آب‌شویی اتفاق نیفتاده و بیشتر پدیده بادکردگی و تورم مشاهده می‌شود که ناشی از جذب مولکول‌های آب در شبکه پلیمری کامپوزیت می‌باشد. خمیری که برای کاربردهای بالینی استفاده می‌شود باید توانایی پایدار ماندن در محل تزریق را در طول درمان داشته باشد و با مایعات زیستی^۲ به سایر قسمت‌ها حرکت نکند. گزارش شده است که مهاجرت ذرات ریز خمیر باعث ایجاد مشکلاتی در بافت‌های اطراف و ایجاد واکنش‌های التهابی در آنها می‌شود [۸]. از آنجایی که هیچ واکنش گیرشی در خمیر حاوی شیشه زیست‌فعال اتفاق نمی‌افتد، پایداری ساختاری آن با محلول پلیمری اضافه شده تأمین می‌شود. به نظر می‌رسد که سدیم آلزینات گزینه مناسبی برای غلبه بر آب‌شویی این خمیرهاست. سدیم آلزینات گروه‌های عاملی COO^- و OH^- دارد. گروه‌های باردار COO^- در محلول با یون‌های Ca^{2+} سطح ذرات شیشه، پیوند الکترواستاتیک برقرار می‌کند. علاوه بر این، یون‌های Ca^{2+} موجود در محیط حاصل از انحلال شیشه، با آنیون‌های پلیمری

رفتار جریان‌یابی خوبی حین تزریق داشته باشد و حین تزریق همگن بماند. در خمیر حاوی شیشه سل-ژل میزان ویسکوزیته و تنش تسلیم نسبت به حالتی که از شیشه ذوبی استفاده شده، بیشتر می‌باشد. خصوصیات رئولوژیکی خمیر به ویژگی‌های فیزیکی پودر استفاده شده خصوصاً تخلخل‌ها و اندازه ذرات بستگی دارد. این عوامل بر روی نفوذپذیری پودر که معیاری از حد پلاستیک خمیر است، تأثیرگذار است. از مقایسه این دو خمیر می‌توان نتیجه گرفت که هرچه حجم تخلخل‌ها بیشتر باشد (شیشه سل-ژل) نفوذپذیری بیشتر است و برهم‌کنش بین ذرات بیشتر می‌شود؛ چون مایع به جای آنکه بین ذرات قرار گیرد در تخلخل‌ها نفوذ کرده است. در نتیجه، در خمیر تهیه شده از شیشه سل-ژل تنش تسلیم و ویسکوزیته که معیاری از انرژی لازم برای جریان‌یابی خمیر است، افزایش پیدا کرده است.

در شکل ۲-ج منحنی تزریق خمیرها به صورت نیروی اعمالی در برابر جابجایی پیستون رسم شده است. در هر دو خمیر نیروی اعمالی در ابتدای تزریق به سرعت افزایش می‌یابد تا بر اصطکاک بین دیواره‌های سرنگ و خمیر غلبه کند، پس از آن، تزریق با نیروی ثابت ادامه می‌یابد و به دلیل پیوستگی بین ذرات شیشه و محلول سدیم آلزینات جدایش فازی اتفاق نمی‌افتد. در پایان نمودار، افزایش شدید نیرو می‌تواند به دلیل رسیدن پیستون به انتهای سرنگ و یا به عبارتی پایان تزریق باشد و یا ممکن است مسیر تزریق به دلیل جدایش فاز جامد و مایع (پدیده فیلترپرس) بسته شده باشد.

نیروی موردنیاز برای تزریق خمیر حاوی شیشه سل-ژل بسیار بالاست (حدود ۲۰۶ نیوتن) که برای اعمال جراحی غیرمنطقی است؛ ضمن این‌که تنها ۹۳ درصد خمیر می‌تواند تزریق شود. با استفاده از شیشه ذوبی نیروی تزریق به ۴۵ نیوتن کاهش می‌یابد و تمام خمیر تزریق می‌شود. طبق تعریف بوهرنر^۱ خمیرهایی که نیروی تزریق آنها بیش از ۱۰۰ نیوتن و همچنین حجم خمیر خارج شده از سرنگ کمتر از ۹۰ درصد باشد، تزریق‌پذیر نیستند [۲۰].

همان‌طور که نتایج BET نشان داد ذرات شیشه زیست‌فعال سل-ژل مورد استفاده تقریباً متخلخل بودند. تخلخل‌های موجود در ذرات شیشه اثری مانند افزایش نسبت

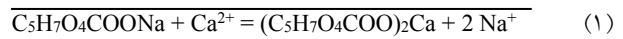
² Biologic

¹ Bohner

خمیر تهیه شده با شیشه سل-ژل بیشتر از مقدار آن در خمیر تهیه شده با شیشه ذوبی می‌باشد. از آنجاکه مقاومت به آب‌شویی در این خمیرها به حضور فاز سدیم‌آلژینات که به‌عنوان یک محمل در ترکیب کامپوزیت عمل می‌کند، بستگی دارد، می‌توان مقاومت کمتر خمیر تهیه شده به روش سل-ژل را به خروج این فاز سدیم‌آلژینات نسبت داد.

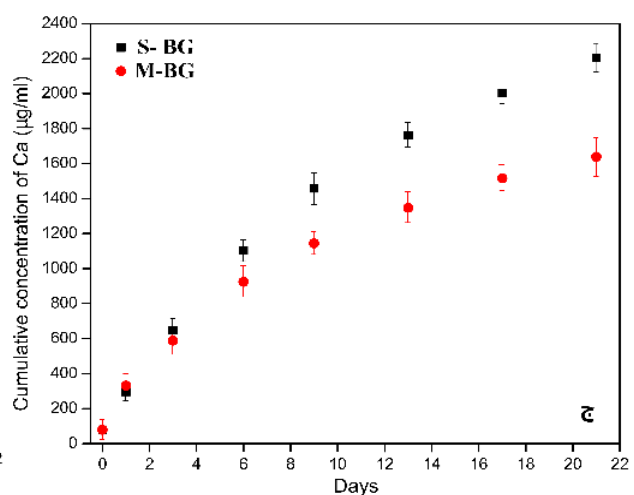
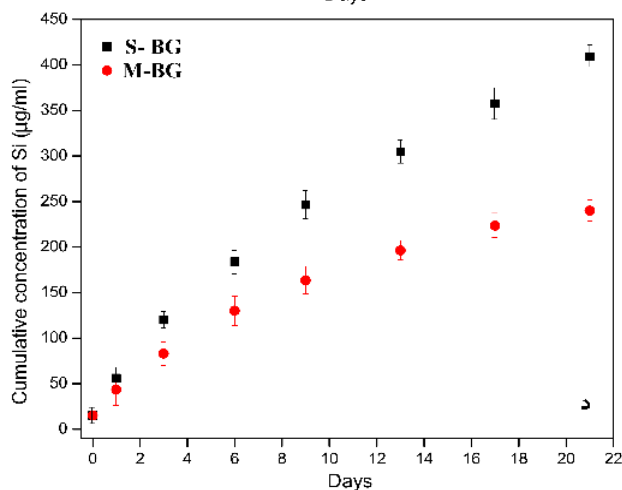
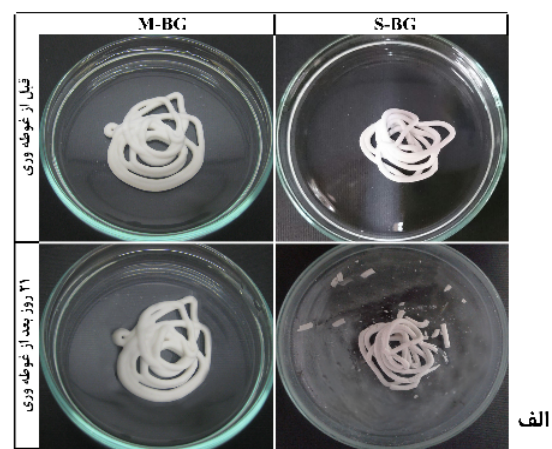
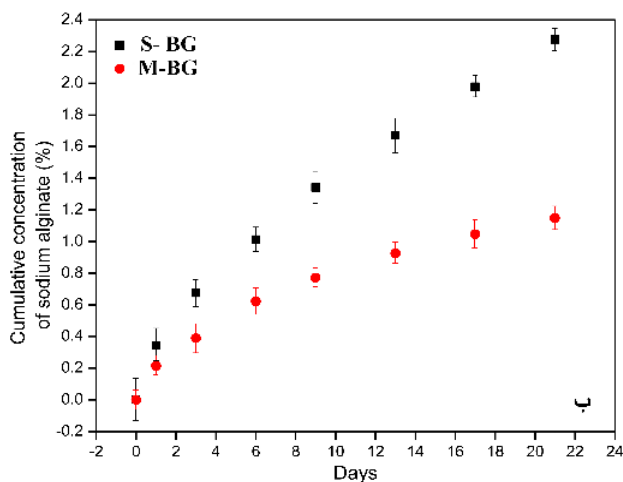
شکل ۳-ج و ۳-د غلظت عناصر کلسیم و سیلیسیم ره‌ایش‌یافته از خمیر تهیه شده با شیشه سل-ژل و ذوبی را بعد از ۲۱ روز غوطه‌وری در SBF مقایسه می‌کند. غلظت کلسیم در SBF اولیه قبل از غوطه‌ور کردن نمونه‌ها حدود ۷۸ میلی‌گرم بر لیتر است. برای هر دو نمونه ره‌ایش یون‌ها در روزهای اولیه با سرعت بیشتری آغاز شده و بعد از دو هفته، ره‌ایش کاهش می‌یابد. این روند روبه‌کاهش در نمونه ذوبی بیشتر است. همان‌طور که شکل ۳-الف گویای آب‌شویی بیشتر خمیر تهیه شده با شیشه سل-ژل است، ره‌ایش یون‌ها نیز در این خمیر با سرعت و مقدار بیشتری صورت گرفته است.

طبق معادله (۱) واکنش داده و ژل آلژینات کلسیم را به دور ذرات شیشه تولید می‌کند [۶].



سدیم‌آلژینات توانایی بالایی در ایجاد پیوند با Ca^{2+} و ایجاد ژل آلژینات کلسیم دارد. این ژل یک کمپلکس نامحلول در آب بوده که از پخش شدن و گسستگی خمیر در مایعات فیزیولوژیک جلوگیری می‌کند.

در شکل ۳-ب غلظت تجمعی آلژینات موجود در محلول SBF حاوی نمونه‌ها براساس زمان ارائه شده است. در آزمون جذب نور مرئی، پیک ایجاد شده در محدوده طول‌موج ۲۵۰-۲۶۰ نانومتر مربوط به جذب گروه کربونیل ایجاد شده در اثر شکستن زنجیره اصلی و باز شدن حلقه موجود در ساختمان سدیم‌آلژینات است [۲۱]. مقدار سدیم‌آلژینات ره‌ایش‌یافته از



شکل ۳. الف) حالت فیزیکی خمیرهای تزریق‌شده قبل و بعد از ۲۱ روز غوطه‌وری در SBF، ب) غلظت تجمعی سدیم آلزینات رهایش‌یافته، ج)

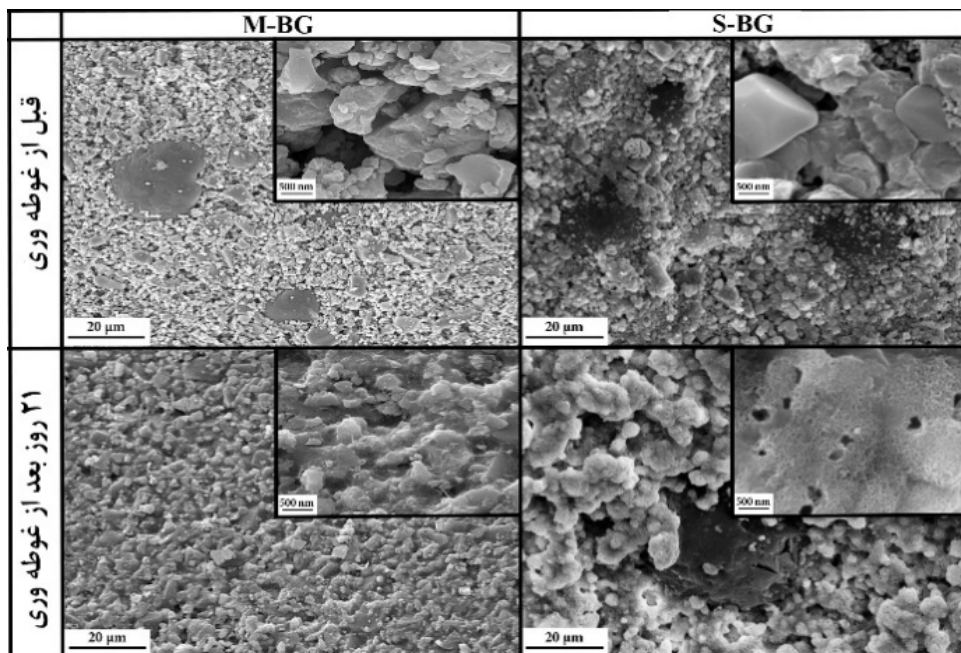
غلظت کلسیم و د) غلظت سیلیسیم رهایش‌یافته از خمیرهای مختلف در محلول SBF

از گذشت ۲۱ روز بر روی سطح خمیر حاوی شیشه زیست‌فعال، یک لایه با ریخت‌شناسی کروی متشکل از تیغه‌های نانوسایز درهم‌فرورفته، تشکیل شده است. این ریخت‌شناسی به هیدروکسی‌آپاتیت موسوم است. حفرات ایجادشده بین کریستال‌های میله‌ای شکل آپاتیت مربوط به تخریب فاز شیشه زیست‌فعال می‌باشد. بر روی ذرات شیشه، آپاتیت تشکیل شده است؛ اما بر سطح میکروکرات پلی‌کاپرولاکتون فاز جدیدی مشاهده نمی‌شود. تغییرات ایجاد شده در سطح خمیر حاوی شیشه ذوبی بعد از ۲۱ روز غوطه‌وری در SBF، حاکی از رسوب یک لایه جدید می‌باشد؛ اگرچه در بزرگنمایی بالاتر هنوز سوزنی‌های مربوط به کریستالیت‌های آپاتیت مشاهده نمی‌شود. در خمیری که سایر محققان [۲۲] از شیشه زیست‌فعال بوراتی و کایتوسان تهیه کرده‌اند، تشکیل آپاتیت بر روی سطح بعد از حدود ۶۰ روز قابل تشخیص است که این امر زیست‌فعالی بیشتر ترکیب شیشه زیست‌فعال مورد بررسی در این تحقیق را نشان می‌دهد؛ گرچه در خمیر تهیه شده در این تحقیق سدیم آلزینات باعث به تأخیر افتادن تشکیل آپاتیت شده است.

نتایج آزمون ICP^۱ بیان می‌کنند که میزان رهایش یون کلسیم در محیط از خمیر تهیه شده با شیشه سل-ژل بیشتر است؛ از این رو، سرعت رسوب لایه کلسیم فسفاتی در این خمیرها بیشتر از نمونه ذوبی مشابه است. این اختلاف در سرعت رهایش به خصوصیات فیزیکی دو پودر بستگی دارد. سرعت انحلال بالاتر خمیر شیشه سل-ژل ناشی از سطح ویژه بالاتر این پودر است. در نتیجه رسوب کلسیم فسفات و تبلور آپاتیت سریع‌تر اتفاق می‌افتد.

۳-۴- ریخت‌شناسی سطح

تصاویر SEM خمیرهای خشک‌شده قبل و بعد از غوطه‌وری به مدت ۲۱ روز، در دو بزرگنمایی مختلف در شکل ۴ نشان داده شده است. ریزساختار از ذرات شیشه که به یکدیگر فشرده شده‌اند و میکروکرات پلی‌کاپرولاکتون که به صورت نقاط سیاه دیده می‌شوند، تشکیل شده است. توزیع یکنواخت ذرات و پیوند حامل آلی با سطح ذرات شیشه قابل مشاهده است. سدیم آلزینات باعث ایجاد پیوستگی در سیستم شده است. بعد



شکل ۴. تصویر SEM خمیرهای مختلف قبل و بعد از ۲۱ روز غوطه‌وری در SBF

^۱ Inductively Coupled Plasma-Atomic Emission Spectroscopy

سریع‌تر اتفاق افتاده و پیک‌های فاز آپاتیت در XRD با شدت بیشتری ظاهر شده‌اند. زیرا تشکیل آپاتیت در محلول شبیه به مایعات بدن، مقیاسی از واکنش‌پذیری سطح ماده مورد بررسی می‌باشد.

طیف‌های FTIR خمیر تهیه شده از شیشه زیست‌فعال ذوبی و سل-ژل قبل و بعد از غوطه‌وری در شکل ۵-ب آورده شده است. تمام پیک‌های مشخصه شیشه زیست‌فعال و پلی‌کاپرولاکتون در طیف FTIR مربوط به خمیر کامپوزیت آنها نیز مشاهده می‌شود. پیک 1016 و 746 cm^{-1} مربوط به پیوند کششی غیرمتقارن Si-O-Si می‌باشد؛ درحالی‌که پیک 498 cm^{-1} حالت خمشی این پیوند را نشان می‌دهد [۲۷]. حالت کششی پیوند P-O در گروه فسفات با پیک 606 cm^{-1} مشخص شده است [۲۸]. پیک پهن در حدود 3423 cm^{-1} به دلیل ارتعاش پیوند O-H آب جذب شده می‌باشد. حضور گروه‌های CH_2 ، CH_3 و C=O مؤید وجود پلی‌کاپرولاکتون در ترکیب هستند. علاوه بر این، پیوند ارتعاشی کششی COO^- گروه کربوکسیلات آلزینات نیز در 1630 cm^{-1} حضور دارد.

زیرا طبق گزارش‌ها لایه کلسیم فسفاتی آمورف بعد از ۱ روز غوطه‌وری در SBF بر روی سطح شیشه زیست‌فعال تشکیل می‌شود و بعد از ۳ روز، تبلور این لایه انجام می‌شود [۲۳]. می‌توان این‌گونه توضیح داد که ژل کلسیم آلزینات تشکیل شده در اطراف ذرات، محل‌های فعال برای جوانه‌زنی هیدروکسی آپاتیت (HA) را مسدود می‌کند؛ چنانچه طبق گزارش‌ها نیز سدیم آلزینات در خمیرهای سیمانی کلسیم فسفاتی از طریق جذب بر روی سطح سیمان باعث افزایش زمان گیرش و به تأخیر افتادن تشکیل آپاتیت می‌شود [۲۴].

۳-۵- آنالیز فازی و گروه‌های شیمیایی

الگوی پراش اشعه ایکس^۱ (XRD) خمیرهای مختلف قبل و بعد از ۲۱ روز غوطه‌وری در SBF در شکل ۵-الف آورده شده است. شیشه استفاده شده در خمیرها کاملاً آمورف است. پیک‌های اصلی دیده شده در زوایای 21 و 23 درجه مربوط به صفحات اتمی (110) و (200) پیک‌های مشخصه پلی‌کاپرولاکتون هستند [۲۵]. در نمونه حاوی شیشه ذوبی، تفاوت چشمگیری در الگوی پراش اشعه ایکس قبل و بعد از غوطه‌وری مشاهده نمی‌شود. طبق این نتایج، هیچ فاز بلورین منسوب به آپاتیت بر روی نمونه قابل شناسایی نیست. گرچه براساس نتایج SEM و FTIR^۲ می‌توان نتیجه گرفت که لایه تشکیل شده بر سطح خمیر آمورف است و قابل شناسایی با XRD نیست. اما در نمونه حاوی شیشه سل-ژل بعد از ۲۱ روز غوطه‌وری، پیک ایجاد شده در زاویه $31/8$ درجه بیانگر پراش از صفحه اتمی (211) فاز کلسیم فسفاتی رسوب کرده بر سطح خمیر می‌باشد. می‌توان نتیجه گرفت که فاز رسوب کرده بر سطح خمیر حاوی پودر شیشه سل-ژل، بلورین بوده؛ در صورتی که فاز کلسیم فسفاتی تشکیل شده بر سطح خمیر حاوی پودر شیشه ذوبی، آمورف است و توسط XRD قابل شناسایی نیست.

در مرجع [۲۶] نیز اثر اندازه حفرات و سطح ویژه پودر بر رهایش یون کلسیم و ارتباط آن با تشکیل رسوب کلسیم فسفاتی در دو پودر شیشه زیست‌فعال تهیه شده به دو روش مختلف سل-ژل بررسی شده است. در آن تحقیق نیز تبلور رسوب کلسیم فسفاتی در پودری که سطح ویژه و تخلخل بالاتری داشته،

² Fourier Transform Infrared Spectroscopy

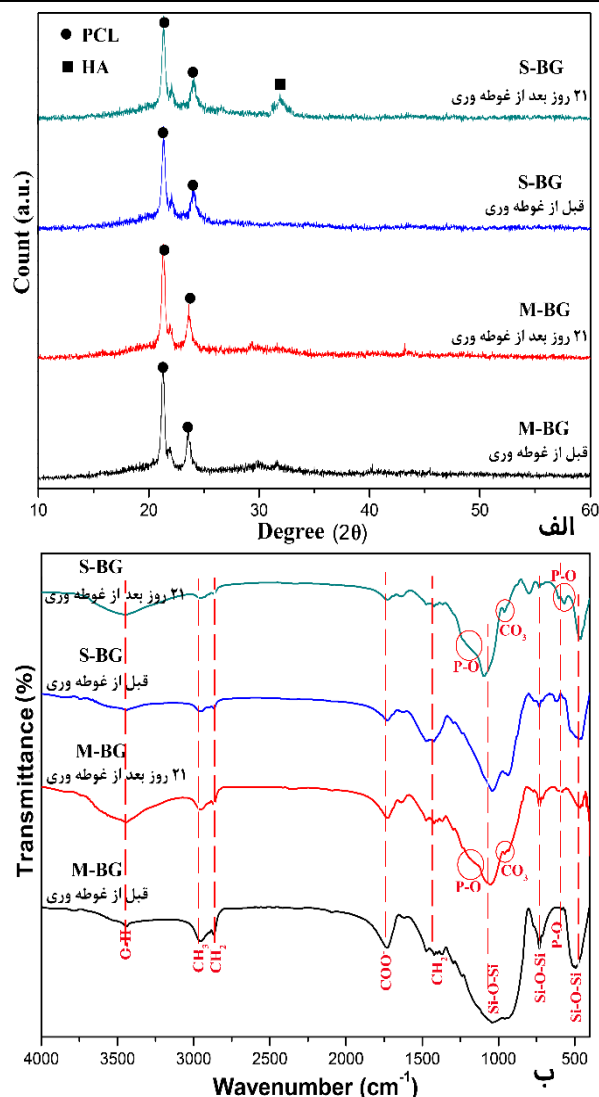
¹ X-Ray Diffraction

ایجاد شده در 870 cm^{-1} نماینده پیوندهای گروه کربنات و در 958 ، 1050 و 1200 cm^{-1} نماینده پیوندهای گروه فسفات در شبکه آپاتیت هستند. گروه‌های شیمیایی خمیر پلی‌کاپرولاکتون بعد از غوطه‌وری در SBF تغییری نداشته است؛ اما از شدت پیک گروه COO^- که معرف حضور سدیم آلزینات در ترکیب است، کاسته شده که نشان‌دهنده خروج آن از خمیر می‌باشد.

۳-۶- تکثیر سلولی

شکل ۶-الف درصد زنده ماندن سلول‌ها بعد از ۲ روز مجاورت با غلظت‌های مختلف عصاره‌های نمونه‌های مختلف را مقایسه می‌کند. برای هر دو نمونه با رقیق شدن عصاره، تعداد سلول‌های زنده افزایش می‌یابد؛ به عبارت دیگر، در نمونه M-BG رقیق کردن عصاره از ۱۰۰ به ۲۵ درصد، حیات سلولی را تا حدود ۵۰ درصد نمونه کنترل افزایش می‌دهد. عصاره ۲۵ درصد نمونه M-BG نتیجه بهتری داشته و تعداد سلول‌های زنده حدود ۹۰ درصد گروه کنترل است. میزان تکثیر سلولی در مجاورت خمیر تهیه شده با شیشه سل-ژل کمتر از رشد سلول‌ها در مجاورت خمیر تهیه شده با شیشه ذوبی است. این اتفاق می‌تواند به دلیل آب‌شوئی بیشتر نمونه سل-ژل و بالا بودن غلظت یون‌ها در محیط باشد.

یون‌های کلسیم و سیلیسیم نقش اساسی در تکثیر سلول‌های استخوانی دارند و غلظت آنها در محیط کشت یک حد بحرانی دارد. برای Ca^{2+} تکثیر سلول‌های استخوان‌ساز مناسب گزارش شده است و در غلظت‌های بیش از ۴۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر اثر سمی بودن مشاهده می‌شود. تکثیر سلول‌های MG-63 در حضور محیط حاوی 160 - 80 میکروگرم بر میلی‌لیتر Ca^{2+} افزایش داشته است؛ در حالی که افزایش مقدار آن به 240 میکروگرم بر میلی‌لیتر فعالیت سلول‌ها را کاهش داده است [۲۹]. غلظت مناسب Si^{4+} جهت تکثیر سلول‌های استخوانی طبق یافته مراجع، 20 میکروگرم بر میلی‌لیتر تعیین شده است [۱۵]. انحلال شیشه زیست‌فعال در سیستم معمول SiO_2 - CaO - P_2O_5 - Na_2O باعث افزایش pH محیط می‌شود؛ زیرا تبادل کاتیونی بین یون‌های سطح شیشه مانند Na^+ و Ca^{2+} با H^+ محیط اتفاق می‌افتد. رهاش بیشتر یون‌های قلیایی باعث ایجاد اثرات سمی در محیط کشت سلول می‌شود.



شکل ۵. الف) الگوی XRD و ب) طیف FTIR نمونه‌های مختلف

قبل و بعد از ۲۱ روز غوطه‌وری در SBF

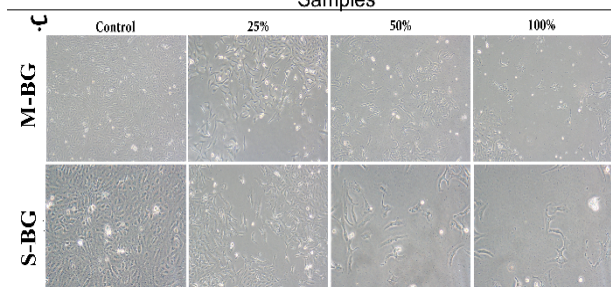
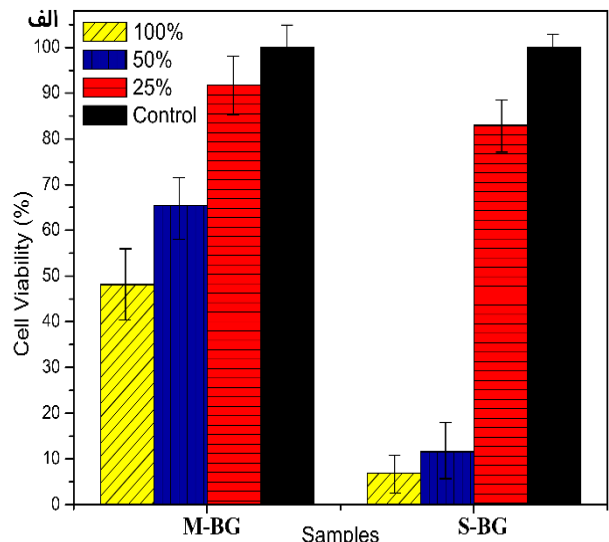
بعد از غوطه‌وری در SBF، نوارهای جذب مربوط به گروه OH آب جذب شده، شدت یافته است که نشان‌دهنده افزایش سطح ویژه خمیر می‌باشد. این افزایش سطح ویژه ناشی از تشکیل یک لایه با ریخت‌شناسی نانوسایز بر سطح خمیر می‌باشد. علاوه بر گروه کربوکسیلات سدیم آلزینات، پیوندهای مشاهده شده در 1415 و 1450 cm^{-1} می‌تواند مربوط به پیوند کششی P-O که حدود 1090 cm^{-1} رخ می‌دهد، با پیک پهن مربوط به Si-O-Si در محدوده 900 - 1200 cm^{-1} هم‌پوشانی دارد، به همین دلیل، به آسانی قابل تشخیص نیست. بعد از ۲۱ روز غوطه‌وری در محلول فیزیولوژیک، پیک دوتایی ایجاد شده در 560 و 604 cm^{-1} نماینده تشکیل پیوند P-O در فاز کلسیم فسفاتی رسوب کرده می‌باشد. با توجه به پهن بودن پیک و میزان دوتایی شدن آن، میزان بلورینگی نسبی را نیز می‌توان مطرح کرد. شانه

کامپوزیت حاوی ۱۰ و ۲۰ درصد 45S5 بیشتر از نمونه حاوی ۵۰ درصد 45S5 بود. بنابر نتایج، کامپوزیت حاوی ۱۰ و ۲۰ درصد شیشه زیست‌فعال نسبت به ترکیب حاوی ۵۰ درصد شیشه، گزینه مناسب‌تری برای تمایز سلول‌های استخوانی بود. این تحقیق ثابت می‌کند که یک حد بحرانی برای مقدار شیشه زیست‌فعال در کامپوزیت وجود دارد؛ زیرا مقدار زیاد شیشه باعث افزایش بیش از حد pH محیط کشت سلول می‌شود؛ در واقع حین فرایندهای انحلال، رسوب و تعویض یونی، یون‌های قلیایی مانند سدیم، سیلیسیم، کلسیم و فسفر از شیشه آزاد شده که باعث افزایش pH محیط می‌شوند [۳۰].

۴- نتیجه‌گیری

با توجه به نتایج به‌دست‌آمده موارد زیر را می‌توان به‌عنوان نتیجه‌گیری بیان کرد:

- پودر شیشه‌های تهیه شده به‌روش ذوبی، غیرمتخلخل هستند اما شیشه تهیه شده به‌روش سل-ژل متخلخل بوده و سطح‌ویژه بالاتری نسبت به‌روش معمول ذوبی دارد.
- خمیرهای ساخته شده، تیکسوتروپ بوده و رفتار رقیق برشی دارند؛ اما تیکسوتروپی خمیر تهیه شده با شیشه سل-ژل بیشتر می‌باشد. استفاده از پودر شیشه تهیه شده به‌روش سل-ژل به جای ذوبی، به دلیل تخلخل و سطح ویژه بالاتر باعث افزایش برهم‌کنش بین ذرات و در نتیجه افزایش تنش تسلیم، ویسکوزیته و نیروی تزریق می‌شود.
- مقدار سدیم آلزینات رهایش‌یافته از خمیر تهیه شده با شیشه سل-ژل بیشتر از مقدار آن در خمیر تهیه شده با شیشه ذوبی می‌باشد. همین امر باعث تخریب سریع‌تر و مقاومت ساختاری کمتر خمیرهای تهیه شده با شیشه سل-ژل شده است.
- زیست‌فعالی خمیری که از شیشه سل-ژل تهیه شده نسبت به خمیری که از شیشه ذوبی تهیه شده، بیشتر است؛ زیرا فرایند انحلال یون‌ها و رسوب در آن سریع‌تر اتفاق می‌افتد و فاز کلسیم‌فسفات رسوب کرده بر سطح آن در شبکه آپاتیت کریستالی می‌شود.



شکل ۶. الف) نتایج آزمون MTT و ب) تصویر میکروسکوپ نوری از سلول‌ها در مجاورت نمونه‌های مختلف

در واقع تعداد سلول‌های زنده کمتر در مجاورت نمونه سل-ژل به دلیل رهایش بیشتر یون‌های Ca^{2+} و Si^{4+} از این نمونه‌ها می‌باشد. به‌همین‌منظور، آزمون MTT در مجاورت عصاره‌های رقیق شده نمونه‌ها نیز انجام گرفت تا غلظت مناسب جهت تکثیر سلول‌های استئوبلاست به‌دست آید. باید توجه داشت که این نتایج، وابستگی تکثیر سلول‌ها را به غلظت یون‌های Ca^{2+} و Si^{4+} اثبات می‌کند و به معنای سمی بودن خمیرهای تولیدشده نیست.

شکل ۶-ب ریخت‌شناسی سلول‌های MG-63 در معرض عصاره خمیرها را نشان می‌دهد. سلول‌های زنده به‌صورت کشیده شده و سلول‌های مرده به‌صورت نقاط سفید دیده می‌شوند.

لو^۱ و همکارانش با تهیه کامپوزیت شیشه 45S5 و پلی‌لاکتید-کو-گلیکولید (PLAGA) نشان دادند که رفتار سلول‌های استخوانی به مقدار شیشه زیست‌فعال در کامپوزیت بستگی دارد. رشد و تمایز سلول‌های استخوان‌ساز در مجاورت

¹ Lou

۵- سپاسگزاری

نگارندگان بر خود لازم می‌دانند از مسئولین آزمایشگاه بیومواد پژوهشگاه مواد و انرژی به‌خاطر فراهم آوردن تجهیزات لازم جهت انجام این پژوهش تشکر نمایند.

مراجع

- process", *Colloids & Surfaces A: Physicochemical & Engineering Aspects*, Vol. 445, (2014), 79-91. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfa.2014.01.012>
13. Catteaux, R., Grattepanche-lebecq, I., Désanglois, F., Chai, F., Hornez, J. C., Hampshire, S., Follet-Houttemane, C., "Synthesis, characterization and bioactivity of bioglasses in the Na₂O-CaO-P₂O₅-SiO₂ system prepared via sol gel", *Chemical Engineering Research Design*, Vol. 91, No. 12, (2013), 2420-2426. <https://doi.org/10.1016/j.cherd.2013.05.017>
 14. Rezabeigi, E., Wood-Adams, P. M., Drew, R. A. L., "Synthesis of 45S5 Bioglass® via a straightforward organic, nitrate-free sol-gel process", *Material Science and Engineering C: Materials for Biological Application*, Vol. 40, (2014), 248-252. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2014.03.042>
 15. Jones, J. R., "Review of bioactive glass: From hench to hybrids", *Acta Biomaterials*, Vol. 9, No. 1, (2013), 4457-4486. <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2012.08.023>
 16. Borhan, Sh., Hesaraki, S., Behnamghader, A. A., Ghasemi, E., "Rheological evaluations and in vitro studies of injectable bioactive glass-polycaprolactone-sodium alginate composites", *Journal of Material Science: Materials in Medicine*, Vol. 27, No. 9, (2016), 137-152. <https://doi.org/10.1007/s10856-016-5745-y>
 17. Orsheh, Z., Borhan, Sh., Kafashan, H., "Physical, mechanical and in vitro biological evaluation of synthesized biosurfactant-modified silanated-gelatin/sodium alginate/45S5 bioglass bone tissue engineering scaffolds", *Journal Of Biomaterials Science, Polymer Edition*, Vol. 31, No. 1, (2020), 93-109. <https://doi.org/10.1080/09205063.2019.1675226>
 18. Borhan, Sh., Hesaraki, S., Behnamghader, A. A., Ghasemi, E., "Investigation of sol-gel derived SiO₂-P₂O₅-CaO-Na₂O bioactive glass using various precursors", *Journal of Advanced Materials and Technologies (JAMT)*, Vol. 4, No. 3, (2015), 9-16. (In Farsi). <https://doi.org/10.30501/jamt.2637.70309>
 19. Condon, J. B., Surface area and porosity determinations by physisorption measurements and theory, Elsevier Science, USA, (2006). <https://doi.org/10.1016/B978-0-444-51964-1.X5000-6>
 20. Bohner, M., Baroud, G., "Injectability of calcium phosphate pastes", *Biomaterials*, Vol. 26, No. 13, (2005), 1553-1563. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2004.05.010>
 21. Sundarajan, P., Eswaran, P., Marimuthu, A., Subhadra, L. B., Kannaiyan, P., "One pot synthesis and characterization of alginate stabilized semiconductor nanoparticles", *Bulletin of the Korean Chemical Society*, Vol. 33, No. 10, (2012), 3218-3224. <https://doi.org/10.5012/bkcs.2012.33.10.3218>
 22. Cui, X., Zhang, Y., Wang, H., Gu, Y., Li, L., Zhou, J., Zhao, S., Huang, W., Zhou, N., Wang, D., Pan, H., "An injectable borate bioactive glass cement for bone repair: Preparation, bioactivity and setting mechanism", *Journal of Non-Crystalline Solids*, Vol. 432, (2016), 150-157. <https://doi.org/10.1016/j.jnoncrysol.2015.06.001>
 23. Wetzel, R., Brauer, D. S., "Apatite formation of substituted Bioglass 45S5: SBF vs. Tris", *Materials Letters*, Vol. 257, (2019), 126760. <https://doi.org/10.1016/j.matlet.2019.126760>
 24. Wang, X., Chen, L., Xiang, H., Ye, J., "Influence of anti-washout agents on the rheological properties and injectability of a calcium phosphate cement", *Journal of Biomedical Material Research, Part B: Applied Biomaterial*, Vol. 81, No. 2, (2007), 410-418. <https://doi.org/10.1002/jbm.b.30678>
 25. Balu, R., Kumar, T. S., Ramalingam, M., Ramakrishna, S., "Electrospun polycaprolactone/poly (1,4-butylene adipate-co-polycaprolactam) blends: Potential biodegradable scaffold for bone tissue regeneration", *Journal of Biomaterials and Tissue Engineering*, Vol. 1, No. 1, (2011), 30-39. <https://doi.org/10.1166/jbt.2011.1004>
 26. Sohrabi, M., Hesaraki, S., Kazemzadeh, A., Alizadeh, M., "Development of injectable biocomposites from hyaluronic acid and bioactive glass nano-particles obtained from different sol-gel routes", *Material Science and Engineering C*, Vol. 33, No. 7, (2013), 3730-3744. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2013.05.005>
 27. Fan, J. P., Kalia, P., Di Silvio, L., Huang, J., "In vitro response of human osteoblasts to multi-step sol-gel derived bioactive glass nanoparticles for bone tissue engineering", *Material Science Engineering C*, Vol. 36, (2014), 206-214. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2013.12.009>
 28. Srinivasan, S., Jayasree, R., Chennazhi, K. P., Nair, S. V., Jayakumar, R., "Biocompatible alginate/nano bioactive glass
 1. Liao, H., Walboomers, X. F., Habraken, W. J. E. M., Zhang, Z., Li, Y., Grijpma, D. W., Mikos, A. G., Wolke, J. G. C., Jansen, J. A., "Injectable calcium phosphate cement with PLGA, gelatin and PTMC microspheres in a rabbit femoral defect", *Acta Biomaterial*, Vol. 7, No. 4, (2011), 1752-1759. <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2010.12.020>
 2. Vezenkova, A., Locs, J., "Sudoku of porous, injectable calcium phosphate cements-Path to osteoinductivity", *Bioactive Materials*, Vol. 17, (2022), 109-124. <https://doi.org/10.1016/j.bioactmat.2022.01.001>
 3. Chen, F., Liu, C., Wei, J., Chen, X., Zhao, Z., Gao, Y., "Preparation and characterization of injectable calcium phosphate cement paste modified by polyethylene glycol-6000", *Materials Chemistry and Physics*, Vol. 125, No. 3, (2011), 818-824. <https://doi.org/10.1016/j.matchemphys.2010.09.050>
 4. Mabrouh, H., Noukrati, H., Ben youcef, H., Lefevre, B., Oudadesse, H., Barroug, A., "Physicochemical, setting, rheological, and mechanical properties of a novel bio-composite based on apatite cement, bioactive glass, and alginate hydrogel", *Ceramics International*, Vol. 47, No. 17, (2021), 23973-23983. <https://doi.org/10.1016/j.ceramint.2021.05.106>
 5. Ji, L., Wang, W., Jin, D., Zhou, S., Song X., "In vitro bioactivity and mechanical properties of bioactive glass nanoparticles/polycaprolactone composites", *Material Science Engineering C*, Vol. 46, (2015), 1-9. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2014.09.041>
 6. Sohrabi, M., Hesaraki, S., Kazemzadeh, A., "The influence of polymeric component of bioactive glass-based nanocomposite paste on its rheological behaviors and in vitro responses: Hyaluronic acid versus sodium alginate", *Journal of Biomedical Materials Research, Part B Applied Biomaterials*, Vol. 102, No. 3, (2014), 561-573. <https://doi.org/10.1002/jbm.b.33035>
 7. Lucas-girot, A., Zohra, F., Mami, M., Oudadesse, H., Harabi, A., Le Floch, M., "Sol-gel synthesis of a new composition of bioactive glass in the quaternary system SiO₂-CaO-Na₂O-P₂O₅: Comparison with melting method", *Journal of Non-Crystalline Solids*, Vol. 357, No. 18, (2011), 3322-3327. <https://doi.org/10.1016/j.jnoncrysol.2011.06.002>
 8. Filipović, N., Stevanović, M., Nunić, J., Cundrić, S., Filipič, M., Uskoković, D., "Synthesis of poly (ε-caprolactone) nanospheres in the presence of the preservative agent poly (glutamic acid) and their cytotoxicity, genotoxicity and ability to induce oxidative stress in HepG2 cells", *Colloids Surface B Biointerfaces*, Vol. 117, (2014), 414-424. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2014.03.015>
 9. Kouhi, M., Morshed, M., Varshosaz, J., Fathi, M. H., "Poly (ε-caprolactone) incorporated bioactive glass nanoparticles and simvastatin nanocomposite nanofibers: Preparation, characterization and in vitro drug release for bone regeneration applications", *Chemical Engineering Journal*, Vol. 228, (2013), 1057-1065. <https://doi.org/10.1016/j.cej.2013.05.091>
 10. Mao, D., Li, Q., Li, D., Tan, Y., Che, Q., "3D porous poly(ε-caprolactone)/58S bioactive glass-sodium alginate/gelatin hybrid scaffolds prepared by a modified melt molding method for bone tissue engineering", *Materials & Design*, Vol. 160, (2018), 1-8. <https://doi.org/10.1016/j.matdes.2018.08.062>
 11. Dash, T. K., Konkimalla, V. B., "Poly-ε-caprolactone based formulations for drug delivery and tissue engineering: A review", *Journal of Controlled Release*, Vol. 158, No. 1, (2012), 15-33. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2011.09.064>
 12. Ibraheem, D., Iqbal, M., Agusti, G., Fessi, H., Elaissari, A., "Effects of process parameters on the colloidal properties of polycaprolactone microparticles prepared by double emulsion like

30. Lu, H. H., Tang, A., Oh, S. C., Spalazzi, J. P., Dionisio, K., "Compositional effects on the formation of a calcium phosphate layer and the response of osteoblast-like cells on polymer-bioactive glass composites", *Biomaterials*, Vol. 26, No. 32, (2005), 6323-6334. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2005.04.005>
29. Maeno, S., Niki, Y., Matsumoto, H., Morioka, H., Yatabe, T., Funayama, A., Toyama, Y., Taguchi, T., Tanaka, J., "The effect of calcium ion concentration on osteoblast viability, proliferation and differentiation in monolayer and 3D culture", *Biomaterials*, Vol. 26, No. 23, (2005), 4847-4855. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2005.01.006>
- ceramic composite scaffolds for periodontal tissue regeneration", *Carbohydrate Polymer*, Vol. 87, No. 1, (2012), 274-283. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2011.07.058>