

Preparation and Rheological Properties of Bioactive Glass-Polyvinyl Alcohol Nanocomposites to Repair Bone Defects

Sh. Borhan¹, S. Hesaraki^{2*}

¹Ph.D student, Nanotechnology and Advanced Materials Research Department, Materials & Energy Research Center, Alborz, Iran.
shkfborhan@yahoo.com

²Associate Professor, Nanotechnology and Advanced Materials Research Department, Materials & Energy Research Center, Alborz, Iran.

Abstract

Bioactive glasses with different compositions have been extensively used as substitute for defective bones. Injectable biomaterial is important in clinical applications that involve defects with limited accessibility or when using minimally invasive surgical techniques. In this study bioactive glass nanopowder was synthesized by acid-base catalyzed sol-gel process and used as solid phase of injectable non-setting pastes. Morphological characteristics of powder were found by TEM. To prepare paste the powder was mixed with hyaluronic acid and polyvinyl alcohol solutions. Stability of pastes was determined by soaking in simulated body fluid. Rheological behaviours of paste in both rotation and oscillation modes were also measured. The results showed that particle size of glass powder was 20-30 nm. According to rheometry, these nano composites exhibited non-Newtonian shear thinning behaviour. By adding polyvinyl alcohol more stable paste with increased hysteresis loop area is obtained. The oscillatory tests revealed that these pastes were viscoelastic with more elastic character. The biocomposite can potentially be used as bioactive paste for the treatment of hard and even soft tissues.

Keywords: Nano composit, Bioactive glass, Polyvinyl alcohol, Hyaluronic acid, Rheology.

* Corresponding author

Address: Nanotechnology and Advanced Materials Research Department, Materials & Energy Research Center, Alborz, Iran

Tel: +982636280040-7

E-mail: s-hesaraki@merc.ac.ir

تهیه نانو کامپوزیت‌های شیشه‌زیست فعال تخریب‌پذیر و قابل تزریق و بررسی ویژگی‌های آنها

شکوفه برهان^۱، سعید حصارکی^{۲*}

^۱ دانشجوی دکتری مهندسی مواد، پژوهشکده فناوری نانو و مواد پیشرفته، پژوهشگاه مواد و انرژی، کرج shkfborhan@yahoo.com

^۲ استادیار، پژوهشکده فناوری نانو و مواد پیشرفته، پژوهشگاه مواد و انرژی، کرج

چکیده

امروزه شیشه‌های زیست فعال با ترکیبات مختلف برای ترمیم نقیصه‌های استخوانی کاربردهای وسیعی یافته‌اند. بیومواد تزریق پذیر در مواردی که جراحی باز با مشکلات فراوانی همراه باشد و یا محل آسیب به آسانی در دسترس نباشد، مورد توجه قرار گرفته‌اند. در این پژوهش نانو پودر شیشه زیست فعال به روش سل-ژل اسید و باز تهیه شد و به عنوان فاز جامد خمیرهای تزریق پذیر غیر قابل گیرش مورد استفاده قرار گرفت. ویژگی‌های پودر تهیه شده نیز با روش‌های مختلف بررسی شد. برای تهیه نانو کامپوزیت‌ها، شیشه‌زیست فعال با نسبت‌های مختلف محلول‌های هیالورونیک اسید و پلی وینیل الکل مخلوط شد. پایداری خمیرها در برخورد با محیط فیزیولوژیک بدن، به صورت کیفی مشاهده شد. رفتار رئولوژیک خمیرها در دو مد چرخشی و نوسانی بررسی شد. نتایج نشان دادند که اندازه ذرات پودر شیشه ۲۰-۳۰ nm است و این نانوکامپوزیت‌ها رفتار غیر نیوتنی shear thinning دارند. با افزودن پلی وینیل الکل پایداری خمیرها بیشتر شده، مساحت حلقه هیستریزس افزایش می‌یابد. آزمون‌های رئولوژی نوسانی مشخص کردند خمیرها رفتار ویسکوالاستیک داشته؛ ولی قسمت الاستیک آن غالب‌تر است. به طور کلی می‌توان از این بیو کامپوزیت به عنوان خمیر زیست فعال برای درمان بافت سخت و حتی بافت نرم استفاده کرد.

کلیدواژگان: نانو کامپوزیت، شیشه‌زیست فعال، پلی وینیل الکل، هیالورونیک اسید، رئولوژی

* عهده دار مکاتبات

نشانی: کرج، مشکین دشت، بلوار امام خمینی، پژوهشگاه مواد و انرژی، پژوهشکده فناوری نانو و مواد پیشرفته، کدپستی: ۳۱۷۸۷-۳۱۶

تلفن: ۰۲۶-۳۶۲۸۰۰۴۰-۷، پیام نگار: s-hesaraki@merc.ac.ir

۱- مقدمه

هدف از انجام این تحقیق، تهیه خمیرهای قابل تزریق از جنس نانو ذرات شیشه زیست فعال و محلول پلی وینیل الکل و بررسی ویژگی‌های رئولوژیک و پایداری خمیرهای حاصل در برخورد با مایعات فیزیولوژیک است. پلی وینیل الکل ترکیبی پلیمری زیست سازگار است که در ترمیم آسیب‌های بافت نرم به صورت افزودنی یا به صورت بالک (ژل) تهیه و استفاده می‌شود. هیالورونیک اسید نیز یک ماده پلیمری با رفتار ویسکوالاستیک است که در ایجاد شبکه برون سلولی نقش دارد [۱۲،۱۱]. تاکنون این نوع بیو کامپوزیت تزریق پذیر غیر قابل گیرش بر پایه نانو ذرات شیشه زیست فعال بررسی نشده است. در این پژوهش اثر غلظت پلی وینیل الکل و هیالورونیک اسید بر پایداری خمیرها در برخورد با محیط فیزیولوژیک به صورت مقایسه‌ای و همچنین ویژگی‌های رئولوژیک آنها مطالعه شده است.

۲- روش انجام تحقیق

۲-۱- تهیه پودر شیشه زیست فعال

ابتدا شیشه زیست فعال بر پایه سیستم $\text{SiO}_2\text{-CaO-P}_2\text{O}_5$ به روش سل-ژل به عنوان فاز جامد خمیر تهیه شد. به طور خلاصه، برای سنتز شیشه زیست فعال، تترا اتیل اورتو سیلیکات^۴ و تری اتیل فسفات^۵ به محلول اسید نیتریک^۱ 0.1 M اضافه شدند و به مدت ۱ ساعت در دمای اتاق هم زده شدند تا هیدرولیز اسید صورت بگیرد. سپس نیترات کلسیم^۶ به محلول TEOS اضافه شد و به منظور انجام کامل واکنش، به مدت ۳۰ دقیقه هم زده شد. بعد از افزودن نهایی، برای کامل شدن هیدرولیز مخلوط به مدت ۱ ساعت هم زده شد. محلول 0.2 M آمونیا قطره قطره به سل اضافه شد تا ژل به دست آمد.

۲-۲- تعیین ویژگی‌های پودر شیشه زیست فعال

به منظور بررسی ساختار فازی پودر شیشه، تحلیل پراش اشعه X با استفاده از دیفراکتومتر^۸ انجام شد. برای تخمین دمای تصعید، دمای کریتالیزاسیون و سایر پدیده‌های حرارتی - که در شیشه‌ها اتفاق می افتد - تحلیل حرارتی افتراقی (DTA) و توزین حرارتی (TG) تا دمای ۱۲۰۰ درجه سانتیگراد بر شیشه انجام شد. اندازه‌گیری با دستگاه PL-STA 1600 با سرعت گرمایش

امروزه شیشه‌های زیست فعال با ترکیبات مختلف برای ترمیم نقیصه‌های استخوانی کاربردهای وسیعی یافته‌اند. این ترکیبات قادرند با برقراری پیوند شیمیایی با بافت آسیب دیده و در نهایت انسجام بسیار مناسب با آن ترمیمی موفقیت‌آمیز ایجاد کنند [۱،۲]. این مواد معمولاً به صورت بلوک، گرانول یا خمیرهای تزریق پذیر وجود دارند. بزرگترین مشکل بلوک‌ها استفاده از آنها در مکان‌هایی است که شکل مشخصی ندارند. شکل دهی این مواد ترد معمولاً با مشکلاتی از جمله شکست همراه است. گرانول‌ها نیز می‌توانند بعد از کاشت محل عیب را ترک کرده؛ در بافت اطراف ایجاد التهاب کنند. استفاده از بیومواد تزریق پذیر مشکل بلوک‌ها و گرانول‌ها را حل کرده است [۳،۴].

در زمینه خمیرهای تزریق پذیر، ویژگی‌های رئولوژیک اهمیت بسزایی دارند؛ زیرا این مواد باید بدون مقاومت نسبت به جریان و یا جدایش فازی تزریق شوند. ویژگی‌ها رئولوژیک خمیرهای تزریق پذیر قابل گیرش در پژوهش‌های مختلف بررسی شده است [۵،۶]. همچنین ویژگی‌های رئولوژیک خمیرهای غیر قابل گیرش مانند سوسپانسیون $\beta\text{-TCP}$ را بارود^۱، بوهنر^۲ و همکارانشان بررسی کرده‌اند [۷،۸]. در این تحقیقات به نقش عوامل اصلی مانند نسبت پودر به مایع، اندازه ذره و ویسکوزیته مایع بر رفتار جریان‌یابی توجه شده است.

شیشه زیست فعال تهیه شده به روش سل-ژل سطح ویژه بالا و در نتیجه زیست فعالی زیادی دارد. این مواد از طریق تشکیل لایه آپاتیت بر روی سطح خود با استخوان و یا بافت نرم پیوند شیمیایی برقرار می‌کنند. مزیت دیگر شیشه زیست فعال در مقایسه با کلسیم فسفات‌ها حضور عنصر Si در ترکیبات آن است که تکثیر و فعالیت سلول‌های استئوبلاست را بهبود می‌بخشد [۹]. پودر شیشه می‌تواند با محلول‌های پلیمری ویسکوز مخلوط شود. ویژگی‌های رئولوژیک خمیرها با تغییر پارامترهای فیزیکی ذرات شیشه از جمله مورفولوژی آن، تغییر می‌کند. کوتو^۳ و همکارانش مخلوطی از هیدروژل کایتوسان و نانو ذرات شیشه زیست سازگار تهیه و ویژگی‌های رئولوژیک آن را مطالعه کرده‌اند [۱۰].

^۱Baroud
^۵TEP, Merck 821141

^۲Bohner
^۶Merck 101518

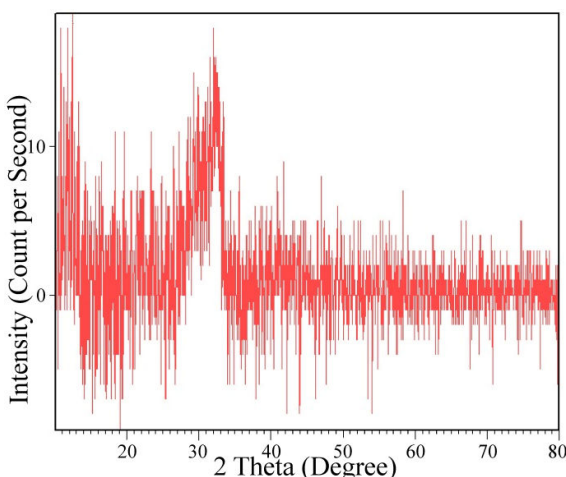
^۳Couto
^۷Merck 2069

^۴TEOS, Merck 800658
^۸PhilipsPW3710

در مد نوسانی، ابتدا یک کرنش نوسانی سینوسی با دامنه کم به خمیر اعمال شد و سپس تنش حاصل از آن، اندازه‌گیری شد. نسبت تنش به کرنش مدول مختلط (G^*) را به دست می‌دهد. به دلیل اختلاف فاز بین دو موج سینوسی، مدول ذخیره (G') و مدول اتلاف (G'') با رابطه (۱) توضیح داده می‌شود:

$$G^* = G' + iG'' \quad (1)$$

حالت کرنش ثابت ابتدا برای تعیین کرنش معین در محدود ویسکوالاستیک خطی انجام شد. برای تمامی خمیرها کرنش ۰/۱ در نظر گرفته شد. سپس حالت فرکانس ثابت در محدوده ویسکوالاستیک خطی و ناحیه پایدار انجام شد. شایان ذکر است مد فرکانس ثابت در کرنش و دمای ثابت انجام شد.



شکل (۱)- الگوی XRD پودر شیشه تهیه شده

۳- نتایج و بحث

۳-۱- ویژگی‌های پودر شیشه زیست فعال

داده‌های XRD ((شکل (۱))) نشان می‌دهد که پودر شیشه تهیه شده در اصل، آمورف است؛ زیرا هیچ پیک پراشی مشاهده نشده است. شکل (۲) منحنی DTA و TG پودر شیشه را نشان می‌دهد. پدیده‌های گرماگیر در ۹۰ و ۵۲۵-۵۵۰ درجه سانتیگراد به ترتیب مربوط به خروج آب جذب شده و گروه‌های آلکیل و نترات هستند. پیک گرماگیر در ۴۳۰ درجه سانتیگراد به علت خروج گروه‌های NH_3 است و خروج این ترکیبات با کاهش

صورت گرفت و پودر آلومینا به عنوان ماده مرجع در نظر گرفته شد. مورفولوژی ذرات پودر شیشه نیز با استفاده از میکروسکوپ الکترونی عبوری^۹ مشاهده شد.

۳-۲- تهیه خمیر نانو کامپوزیت

ابتدا محلول پلی وینیل الکل^{۱۰} و هیالورونیک اسید^{۱۱} ۳٪ برای استفاده به عنوان فاز مایع تهیه شد. سپس به منظور ساخت خمیرهای بیو کامپوزیت، پودر شیشه زیست فعال با فاز مایع ویسکوز پلیمری مخلوط شد. ترکیب فاز مایع و کدگذاری نمونه‌ها در جدول (۱) آمده است. خمیرها با نسبت جامد به مایع ۰/۴g/mL تهیه شده‌اند.

جدول (۱)- ترکیب فاز مایع و کد نمونه‌های تهیه شده

کد نمونه	درصد حجمی PVA	درصد حجمی HAc
P100	۱۰۰	۰
P75H25	۷۵	۲۵
P50H50	۵۰	۵۰
P25H75	۲۵	۷۵
H100	۰	۱۰۰

۴-۲- بررسی ویژگی‌های رئولوژیک خمیرهای نانو کامپوزیت

مقاومت ساختاری خمیرهای تهیه شده در برخورد با سیالات شبیه به مایعات بدن به صورت کیفی بررسی شد. بدین منظور مقدار ۰/۲ گرم از خمیر تهیه شده داخل SBF^{12} قرار گرفت و بعد از گذشت ۱ ساعت از نمونه‌ها عکس برداری شد.

اندازه‌گیری‌های رئولوژیک خمیرهای نانو کامپوزیت تهیه شده با استفاده از رئومتر physica MCR 301^{۱۳} با دو صفحه موازی با قطر ۲۵ mm انجام شد. برای هر اندازه‌گیری، ۲ گرم از خمیر هموزن تهیه شده به مرکز صفحه پایینی منتقل و فاصله بین صفحات ۱ mm تنظیم شد؛ بعد از ۱ دقیقه آزمون انجام شد. برای اندازه‌گیری تنش برشی و ویسکوزیته خمیر سرعت برشی $\dot{\gamma}$ در حالت چرخشی مد ثابت به صورت زیر تغییر کرد:

$$\dot{\gamma}: 0 \xrightarrow{250s} 1000 \xrightarrow{250s} 0$$

⁹ TEM (GM200 PEG Philips)

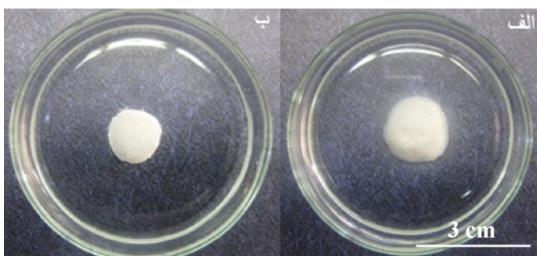
¹⁰ PVA

¹¹ HAc (Jinan Haohua Co., China)

¹² simulated body fluid

¹³ ساخت شرکت اتریشی (Anton paar)

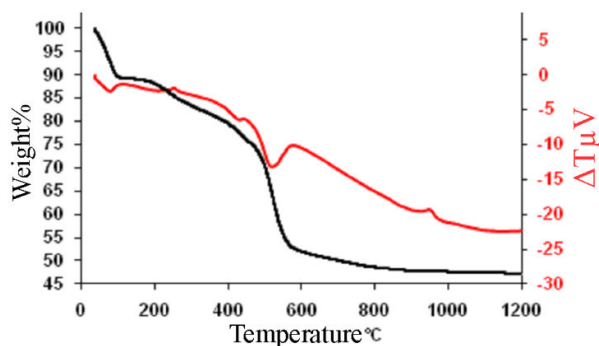
شکل (۴) نشان می‌دهد مقاومت به آبشویی خمیر در صورت استفاده از PVA بیشتر است در حالی که خمیر تهیه شده با HAC/۱۰۰ بعد از قرارگیری در محیط مایعات بدن دچار از هم پاشیدگی و بادکردگی می‌شود. از آنجایی که خمیرهای مورد مطالعه غیر سیمانی بوده‌اند و واکنش سفت شدن در ساختار خمیر اتفاق نمی‌افتد پایداری نسبی خمیر در SBF ناشی از حضور PVA و واکنش مولکول‌های PVA با ذرات شیشه است.



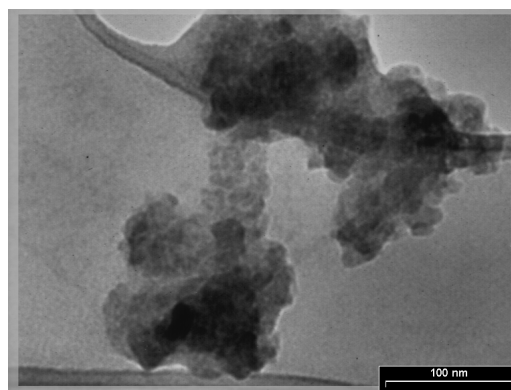
شکل (۴) - خمیر تهیه شده با الف (HAc) و ب (PVA) بعد از یک ساعت غوطه‌وری در SBF

شکل‌های (۵) و (۶) منحنی‌های تنش برشی و ویسکوزیته را بر حسب سرعت برشی نشان می‌دهند. با افزایش سرعت برشی، تنش برشی افزایش می‌یابد. منحنی‌های رفت و برگشت خمیر H100 بر یکدیگر منطبق شده که نشان‌دهنده عدم خاصیت تیکسوتروپی در این خمیرها است؛ اما با افزودن پلی وینیل الکل دو منحنی از یکدیگر فاصله گرفته‌اند و حلقه هیستریزس^{۱۴} تشکیل شده است. مساحت این حلقه متناسب با پایداری خمیر است و در صورت استفاده از ۵۰٪ پلی وینیل الکل و ۵۰٪ هیالورونیک اسید بیشترین مقدار خود را دارد. نتایج آزمون رئولوژی تحت مد چرخشی مشخص می‌کنند که بر خلاف سیمان‌های کلسیم فسفاتی، خمیرهای تهیه شده از شیشه زیست فعال و محلول هیالورونیک اسید، تیکسوتروپ نیستند و این به معنای نبودن برهم‌کنش قوی بین ذرات شیشه و مولکول‌های هیالورونیک اسید است. افزایش مقدار هیالورونیک اسید باعث افزایش ویسکوزیته و تنش تسلیم خمیر شده است؛ اما مساحت حلقه ویسکوزیته کاهش پیدا کرده است. در تمام خمیرها با افزایش سرعت برشی، کاهش ویسکوزیته اتفاق می‌افتد که نشان‌دهنده رفتار shear thinning این خمیرها است. رفتار shear

وزن مشاهده شده در منحنی TG تأیید می‌شود.



شکل (۲) - منحنی DTA و TG پودر شیشه

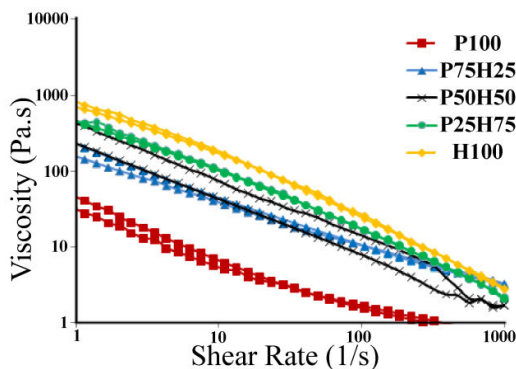


شکل (۳) - تصویر بدست آمده با TEM از ذرات پودر شیشه

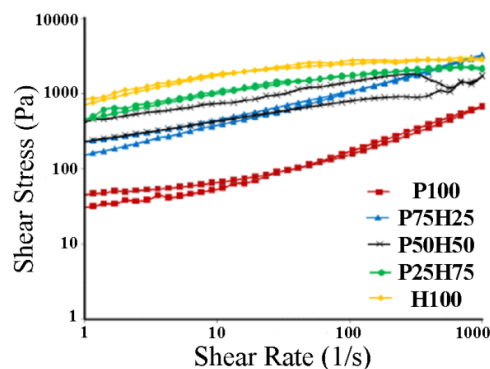
کریستالیزاسیون ساختار شیشه‌ای در 955°C اتفاق می‌افتد؛ لذا وجود پیک گرمازا در این دما تأییدکننده تمایل این شیشه به کریستالیزاسیون است. شکل (۳)، تصویر بدست آمده با TEM از ذرات شیشه را نشان می‌دهد. این ذرات اندازه‌ای حدود 20 nm - 30 دارند و به صورت تجمعی از ذرات در شکل مشاهده می‌شوند.

۲-۳- ویژگی‌های رئولوژیک خمیرهای تهیه شده

یکی از مشکلات خمیرهای تزریق پذیر که کاربرد آنها را محدود کرده از هم گسیختگی آنها در برخورد با خون یا سایر مایعات بدن است؛ بنابراین به عوامل ضد آبشویی توجه زیادی شده است. مدت زمانی که لازم است تا خمیر پیوستگی خود را در محل آسیب‌دیده حفظ کند به عوامل متعددی از جمله سرعت تشکیل و جایگزینی استخوان جدید بستگی دارد.



شکل (۶) - منحنی ویسکوزیته بر حسب سرعت برشی خمیرها با ترکیبات مختلف



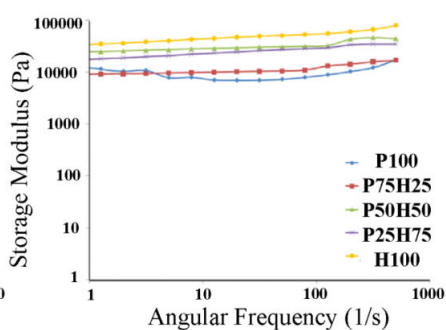
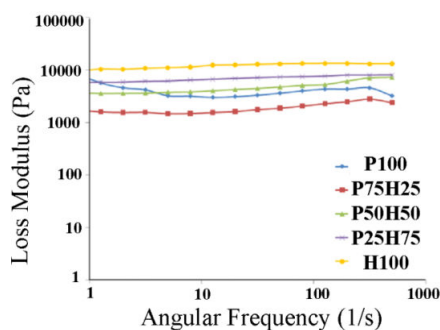
شکل (۵) - منحنی تنش برشی بر حسب سرعت برشی خمیرها با ترکیبات مختلف

۴- نتیجه گیری

روش سل-ژل اسید و باز، روش مناسبی برای تولید نانو ذرات شیشه زیست فعال است. محلول پلیمری هیالورونیک اسید و پلی وینیل الکل می تواند در اختلاط با نانو ذرات شیشه زیست فعال برای تهیه بیو کامپوزیت های تزریق پذیر به کار رود. با تغییر درصد افزودنی ها نیز می توان ویژگی های رئولوژیک را به دلخواه تغییر داد. این بیو کامپوزیت ها مواد ویسکوالاستیکی هستند که رفتار غیر نیوتنی shear thinning دارند. افزودن هیالورونیک اسید، ویسکوزیته خمیر را افزایش می دهد. بعلاوه ویژگی تیکسوتروپی در خمیرهای حاوی پلی وینیل الکل به معنای ایجاد ساختار داخلی در خمیر است که باعث افزایش پایداری خمیر در برخورد با سیالات مشابه مایعات بدن شده است. تمام ترکیبات خمیرها نیز ساختاری ژل مانند دارند. این خمیرهای زیست فعال ممکن است برای تزریق در نواحی آسیب دیده بافت سخت و حتی بافت نرم استفاده شوند؛ اما لازم است

thinning به برهم کنش ضعیف مولکول های پلیمر و ذرات شیشه مربوط می شود. ساختار داخلی خمیر با اعمال تنش برشی شکسته شده و با برداشتن تنش، دوباره ساخته می شود. انطباق نمودارهای رفت و برگشت با افزایش و کاهش سرعت برشی، به این معناست که سرعت تخریب و تشکیل مجدد این ساختارها با یکدیگر برابر است.

رئولوژی دینامیک رفتار ویسکوالاستیک مواد را تحت نیروی نوسانی بررسی می کند. مدول ذخیره و مدول اتلاف خمیرهای تهیه شده بر حسب فرکانس زاویه ای در شکل (۷) نشان داده شده اند. مدول ذخیره، نشان دهنده بخش الاستیک و مدول اتلاف، نشان دهنده بخش ویسکوز خمیر است. در تمام خمیرها مقدار مدول ذخیره بیشتر از مدول اتلاف است که مشخص می کند در این خمیرهای ویسکوالاستیک، بخش الاستیک غالب است و این نتیجه ساختار ژل مانند خمیرها را تأیید می کند. افزایش درصد هیالورونیک اسید مقدار مدول ها را در خمیر بیشتر کرده به طوری که باعث افزایش ویسکوزیته و تنش تسلیم شده است.



شکل (۷) - مدول ذخیره و مدول اتلاف خمیرهای مختلف بر حسب فرکانس زاویه ای

¹⁴ Hysteresis

- substituted calcium phosphate cement. *ActaBiomaterialia*, 2009; 5:1233–1240.
- [7] Baroud G., Cayer E., Bohner M., Rheological characterization of concentrated aqueous beta-tricalcium phosphate suspensions: the effect of liquid-to-powder ratio, milling time, and additives. *ActaBiomater*, 2005; 1: 357–63.
- [8] Bohner M., Baroud G., Injectability of calcium phosphate pastes. *Biomaterials*, 2005; 26:1553–63.
- [9] Reid J.W., Pietak A., Sayer M., Dunfield D., Smith TJN., Phase formation and evolution in the silicon substituted tricalcium phosphate/apatite system. *Biomaterials*, 2005; 26:2887–2897.
- [10] Couto D.S., Hong Z., Mano JF., Development of bioactive and biodegradable chitosan-based injectable systems containing bioactive glass nanoparticles. *ActaBiomaterialia*, 2009; 5: 115–123.
- [11] Shin D.Y., Hwang E., Cho IH., Moon MH., Molecular weight and structure characterization of sodium hyaluronate and its gamma radiation degradation products by flow field-flow fractionation and on-line multiangle light scattering. *J Chromatogr A*, 2007; 1160(1–2):270–5.
- [12] Kai D., Li D., Zhu X., Zhang L., Fan H., Zhang X., Addition of sodium hyaluronate and the effect on performance of the injectable calcium phosphate
- [13] Cement. *J Mater Sci: Mater Med*, 2009; 20:1595–1602.
- آزمایش‌های *in vivo* و *in vitro* برای تعیین عدم سمی بودن و استئوکانداکتیویته انجام شوند.

۵- مراجع

- [1] Vallet-Regi M., Gonzalez-Calbet J.M., Calcium phosphates as substitution of bone tissues. *Prog Solid State Chem*, 2004; 32:1–31.
- [2] Hench LL., Wilson J., In: Hench LL., Wilson J., editors. *An introduction to bioceramics*. River Edge, Nj: World Scientific, 1993; p.3-8.
- [3] Qi X, Ye J, Wang Y., Improved injectability and *in vitro* degradation of a calcium phosphate cement containing poly (lactide-co-glycolide) microspheres. *ActaBiomater*, 2008; 4:1837–45.
- [4] Hamanishi C., Kitamoto K., Tanaka S., Otsuka M., Doi Y., Kitahashi T., A self-setting TTCP-DCPD apatite cement for release of vancomycin. *J Biomed Mater Res B (ApplBiomater)*, 1996; 33:139–143.
- [5] Farrar D.F., Rose J., Rheological properties of PMMA bone cements during curing. *Biomaterials*, 2001; 22(22):3005–13.
- [6] PinaS ,Olhero SM., Gheduzzi S., Miles AW., Ferreira JMF., Influence of setting liquid composition and liquid-to-powder ratio on properties of a Mg-