

اثر ضدباکتریایی نانوذرات شیشه زیست فعال تهیه شده به روش سل ژل

زهرا ناظمی¹؛ مهدی مهدیکhani نهرخلجی^{2*}؛ معصومه حقیقینظرپاک³؛ حمید استاجی⁴

چکیده

زمینه: عفونت از جمله مشکلات عمده‌ای است که بیومواد ایجاد می‌کنند. شیشه‌های زیست فعال خاصیت همبندی با استخوان و قابلیت جذب مناسبی داشته و برخی از آن‌ها خواص ضدباکتریایی نیز نشان داده‌اند. بنابراین این مواد گزینه‌ای مناسب در کاربردهای ارتوپدی و دندان‌پزشکی می‌باشند. هدف از این تحقیق بررسی اثر ضدباکتریایی نانوذرات شیشه زیست فعال بود. روش‌ها: در این مطالعه تجربی ترکیب شیشه‌های 37S و 58S به روش سل ژل سنتز شدند. پودرهای تهیه شده با تکنیک‌های پراش اشعه ایکس (XRD)، میکروسکوپ الکترونی روبشی (SEM) و فلورسانس اشعه ایکس (XRF) مشخصه‌یابی شدند. فعالیت ضدباکتریایی این ترکیبات بر روی باکتری‌های گرم منفی اشریشیاکلی (*Escherichia coli*) و باکتری گرم مثبت استافیلوکوکوس اورئوس (*Staphylococcus aureus*) بررسی شد. اثر ضد باکتریایی نمونه‌ها در غلظت‌های 25، 50 و 100 میلی‌گرم پودر در هر میلی‌لیتر محیط کشت بررسی شد.

یافته‌ها: اندازه ذرات نمونه‌ها عمدتاً کمتر از 100 نانومتر بود. شیشه 37S بیشترین فعالیت ضدباکتریایی و حداقل غلظت باکتری‌کشندگی (MBC) را در غلظت 25 mg/ml و بر هر دو باکتری نشان داد. شیشه 58S در غلظت‌های کمتر از 100mg/ml فعالیت ضدباکتریایی نداشت، هرچند که در این غلظت باکتری‌های اشریشیاکلی را کاملاً از بین برد و رشد باکتری‌های استافیلوکوکوس اورئوس را نیز کاهش داد.

نتیجه‌گیری: با توجه به اثر ضدباکتریایی این شیشه‌های زیست فعال بر دو گونه مهم باکتریایی، می‌توان این مواد را در کاربردهای ارتوپدی کاندیدی مناسب جهت کاربرد در زمینه‌های درمان عیوب استخوانی و دندان‌پزشکی در نظر گرفته و تحت بررسی بیشتر قرار داد.

کلیدواژه‌ها: فعالیت ضدباکتریایی، شیشه زیست فعال، نانوذرات

«دریافت: 1393/3/12 پذیرش: 1393/7/8»

1. دانشکده بیوفناوری، دانشگاه سمنان

2. گروه مهندسی پزشکی، دانشکده فنی و مهندسی، دانشگاه اصفهان

3. پژوهشگاه فناوری‌های نو، دانشگاه امیرکبیر

4. دانشکده دامپزشکی، دانشگاه سمنان

* عهده‌دار مکاتبات: اصفهان، خیابان هزارجریب، دانشگاه اصفهان، دانشکده فنی و مهندسی، گروه مهندسی پزشکی. کد پستی: 81746-73441. تلفن:

Email: m.mehdikhani@eng.ui.ac.ir, me.mehdikhani@gmail.com

دورنگار: 03137934515

مقدمه

سخت‌تر است، چراکه به استفاده طولانی مدت آنتی‌بیوتیک و گاهاً تکرار عمل جراحی نیاز دارند که هزینه‌های بالینی و اقتصادی زیادی دربردارد (1 و 2). استافیلوکوک‌ها به‌ویژه استافیلوکوکوس اورئوس عمده‌ترین میکروارگانیسم‌هایی هستند که کاشتنی‌های ارتوپدی را عفونی می‌کنند. باکتری اشریشیاکلی نیز

استفاده از کاشتنی‌ها تقریباً در همه زمینه‌های پزشکی به نیازی ضروری و غیرقابل اجتناب تبدیل شده است. البته وسایل پزشکی می‌توانند آسیب‌های جدی ناشی از عفونت‌های باکتریایی و قارچی را نیز موجب شوند. کنترل عفونت‌های مرتبط با کاشتنی‌های جراحی عموماً

اورتوسیلیکات (TEOS, Merck)، تری اتیل فسفات (Ca(NO₃).4H₂O, Merck)، اتانول (Merck) و اسید هیدروکلریک بودند. شیشه‌های زیست فعال مورد مطالعه به سیستم SiO₂-CaO-P₂O₅ با ترکیبات 37S و 58S تعلق دارند.

جهت تهیه شیشه ابتدا حجم مورد نظر از آب، اتانول و تری اتیل اورتوسیلیکات به همراه اسید هیدروکلریک 2 نرمال به هم اضافه شده و به مدت 30 دقیقه در دمای محیط بر روی همزن مغناطیسی قرار گرفتند. سپس تری اتیل فسفات به سل اسید سیلیکا و پس از 20 دقیقه، کلسیم نترات چهار آبه به عنوان پیشساز کلسیم به محلول اضافه شدند. محلول مذکور یک ساعت دیگر روی همزن مغناطیسی قرار گرفت.

سل حاصل برای پیرسازی به اون در دمای 60 درجه سانتی گراد و به مدت 52 ساعت انتقال داده شد. پس از پیرسازی، پودر سفید رنگ حاصل به مدت 48 ساعت در اون با دمای 130 درجه سانتی گراد قرار گرفت.

در مرحله بعد پودر خشک شده جهت فرآیند کلسیناسیون، به مدت 1 ساعت در کوره الکتریکی با دمای 600 درجه سانتی گراد قرار گرفت (13).

مشخصه‌یابی نانوذرات:

کریستالینیتی نانوذرات حاصل با طیف سنج پراش اشعه ایکس (XRD) دارای مشخصات D8-ADVANCE Bruker و با طول موج 0/15406nm با زاویه‌ی 2θ در گستره 80-20 درجه بررسی شد.

مورفولوژی و اندازه ذرات نانوسرامیک‌های شیشه زیست فعال با میکروسکوپ الکترونی روبشی (SEM)، با دستگاه (KYKY-EM3200) مطالعه شد.

برای تأیید ترکیب شیشه زیست فعال آزمون فلورسانس پرتو ایکس (XRF) با دستگاه PHILIPS مدل X-Unique2 انجام شد.

آزمایش فعالیت ضدباکتریایی:

در این مرحله از کار ابتدا سوسپانسیونی از نانوپودرها در محیط کشت تریپتون سویا براث

دومین عامل گرم منفی مطرح در زمینه عفونت‌های ارتوپدی است (3 و 4).

شیشه‌های زیست فعال بیوسرامیک‌هایی با ویژگی هدایت و ترغیب استخوانی هستند (5). ترکیبات پایه‌ای بیشتر شیشه‌های زیست فعال SiO₂, Na₂O, CaO و P₂O₅ است. این مواد در کاربردهای کلینیکی مختلفی از جمله تهیه مواد دندان، ترمیم ستون فقرات، کاربردهای ارتوپدی و حامل داروها و به شکل پودر، پوشش و ماده بالک به کار گرفته شده‌اند (6 و 7). این مواد بدون تشکیل بافت فیروز در سطح با استخوان و بافت‌های زنده اطراف پیوند برقرار می‌کنند (8). یون‌های حاصل از تجزیه شیشه‌های زیست فعال، افزایش تکثیر استئوبلاست‌های انسان، بیان فاکتور رشد شبه انسولین mRNA II و القای سنتز پروتئین‌ها را موجب می‌شوند (9).

برخی از شیشه‌های زیست فعال نیز اثر ضدباکتریایی نشان داده‌اند. برای نمونه می‌توان به اثر ضدباکتریایی شیشه Bioglass[®] بر باکتری‌های دهانی (10)، استفاده از شیشه زیست فعال S53P4 در درمان ازدیاد حساسیت دندان‌ها و التهاب سینوس‌ها (11) و یا پوشش‌های شیشه‌ای حاوی نقره در بخیه‌های جراحی اشاره کرد (12).

با توجه به اهمیت شیشه‌های زیست فعال در کاربردهای کلینیکی و خاصیت ضدباکتریایی برخی از آن‌ها، در این مطالعه اثر ضدباکتریایی شیشه‌های زیست فعال 37S و 58S روی دو گونه باکتریایی مهم کلینیکی مورد بررسی قرار گرفت. باکتری گرم مثبت استافیلوکوکوس اورئوس و گرم منفی اشیریشیاکلی برای این منظور انتخاب شدند و حداقل غلظت باکتری‌کشندگی آن‌ها نیز تعیین شد.

مواد و روش‌ها

آماده‌سازی پودرها:

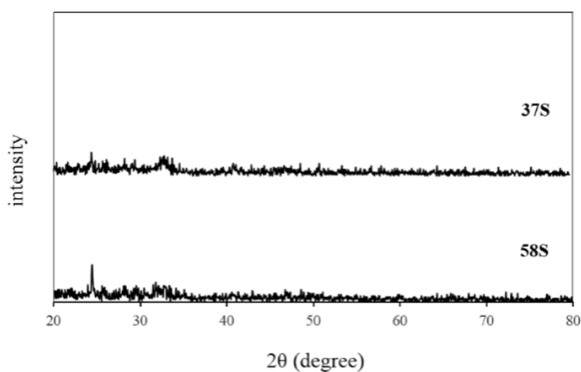
مواد اولیه مورد استفاده جهت سنتز نانوذرات شیشه زیست فعال در این مطالعه تجربی، تری اتیل

ساختارهای آمورف تخریب پذیری بیشتری دارند که در نتیجه شویش ماده در فلویید مورد نظر و رهایش محصولات را نسبت به ساختار کریستالی تسهیل می کند (تصویر 1).

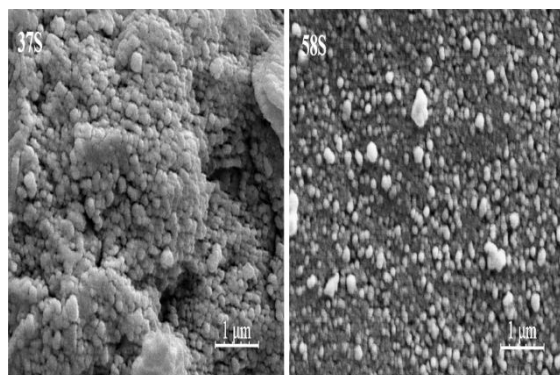
بر اساس نتایج آزمون XRF، نمونه های شیشه ای 37S و 58S به ترتیب با ترکیب $36/9\text{SiO}_2$ ، $57/6\text{CaO}$ ، $4/24\text{P}_2\text{O}_5$ (درصد وزنی) و $58/2\text{SiO}_2$ ، 34CaO ، $7/1\text{P}_2\text{O}_5$ (درصد وزنی) به دست آمدند.

طبق تصاویر میکروسکوپ الکترونی اندازه ذرات در گستره 30-100 نانومتر به دست آمده است. ذرات تقریباً کروی بوده و مورفولوژی آنها مشابه است (تصویر 2). فعالیت ضدباکتریایی نانوذرات:

نتایج حاصل از آزمون ضدباکتریایی نمونه ها به صورت نمودار ترسیم شد. شیشه 58S در غلظت های کم تر از 100mg/ml اثر ضدباکتریایی نداشته و رفتاری مشابه نمونه کنترل نشان داد. با افزایش غلظت این شیشه



تصویر 1- منحنی XRD شیشه های زیست فعال



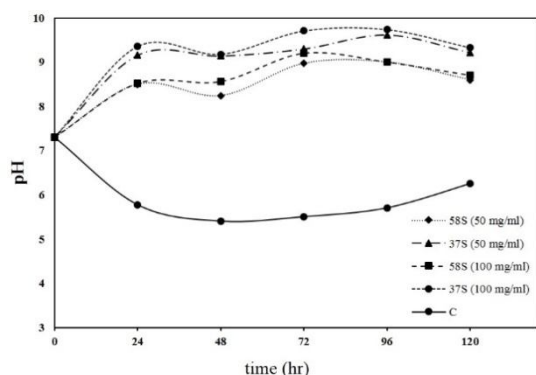
تصویر 2- تصاویر میکروسکوپ الکترونی روبشی نمونه ها

(TSB, Merck) تهیه شد. در مرحله بعد لوله های حاوی سوسپانسیون نمونه ها در اتوکلاو استریل شدند. غلظت نهایی انتخابی برای پودرها 25، 50 و 100 میلی گرم در هر میلی لیتر از محیط کشت بود. رقت براث باکتریایی بر اساس استانداردهای آزمایشگاهی کمیته بین المللی برای کاربردهای کلینیکی یعنی M7-T2 برای تعیین MBC انتخاب شد. نمونه کنترل (C) نیز فقط حاوی محیط کشت و بدون پودر شیشه بود. سپس بر اساس استاندارد نیم مک فارلند مقدار لازم از هر یک از باکتری ها به سوسپانسیون نمونه ها ($1/5 \times 10^8$ CFU/ml) اضافه گردید. آزمایش ها با استفاده از باکتری گرم منفی اشیریشیا کلی (ATCC 25922) و باکتری گرم مثبت استافیلوکوکوس اورئوس (ATCC 29213) انجام شدند. زیست پذیری باکتری ها با کشت دادن آنها در پنج روز متوالی یعنی به فواصل زمانی 24، 48، 72، 96 و 120 ساعت بر روی پلیت آگار بررسی شد. برای این کار از محیط نوترینت آگار و رقت 0/1 میلی لیتر استفاده شد. این آزمون به ازای هر نمونه سه بار تکرار شد. میزان رشد باکتری ها پس از کشت روی نوترینت آگار در دمای 37 درجه سانتی گراد و به مدت 24 ساعت بررسی شد. عدم حضور باکتری روی صفحات کشت نمایانگر اثر باکتری کشندگی نمونه مورد نظر بود (صفر). جمعیت بسیار کم و پراکنده، جمعیت کم و متوسط (به ترتیب 1، 2 و 3) کلونی های باکتریایی نیز نشانگر اثر ممانعت کنندگی نمونه بر رشد باکتری بودند. جمعیت انبوه باکتری ها بر روی صفحه نیز نشان دهنده عدم تأثیر ضدباکتریایی نمونه بود (4، 13 و 14). تغییرات pH براث حاوی نانوذرات شیشه زیست فعال (در غلظت 50mg/ml و 100) در فواصل زمانی ذکر شده اندازه گیری شد.

یافته ها

مشخصات نانوذرات:

منحنی XRD نمونه ها را نشان می دهد. همان طور که در شکل دیده می شود، شیشه ها ساختاری آمورف دارند.



تصویر 4 - تغییرات pH برات حاوی نانوذرات شیشه زیست فعال

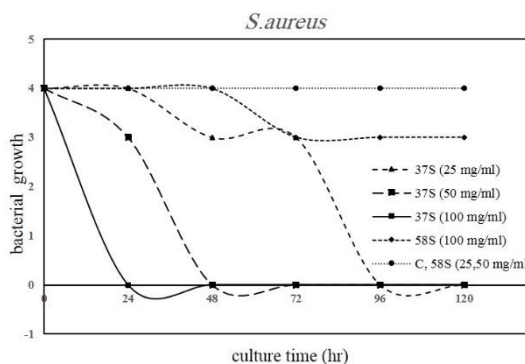
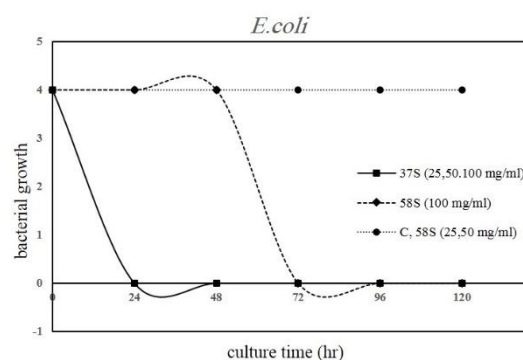
تغییرات pH برات حاوی نانوذرات شیشه زیست فعال را نشان می‌دهد. pH اولیه برات 7/3 می‌باشد. برای برات حاوی نانوذرات 37S به ترتیب در غلظت‌های 50 mg/ml و 100 mg/ml پس از 24 ساعت تا 9/16 و 9/36 افزایش یافت. pH این نمونه‌ها در هر دو غلظت و در تمام فواصل اندازه‌گیری همواره بیش از 9 بود. pH نمونه‌های حاوی نانوذرات 58S پس از 24 ساعت به 8/5 و 8/52 به ترتیب در غلظت‌های 50mg/ml و 100 افزایش یافت. در این نمونه‌ها نیز در روز چهارم به 9 رسید اما دوباره افت کرد (تصویر 4).

بحث

در این مطالعه اثر ضدباکتریایی شیشه‌های زیست فعال 37S و 58S بر روی دو گونه مهم باکتریایی در کاربردهای کلینیکی بررسی گردید. این شیشه‌ها به روش سل-ژل تهیه شدند. این روش در عین سادگی، ذراتی با اندازه بسیار کوچک در مقیاس نانومتری تولید می‌کند. ابعاد ذرات در خاصیت ضدباکتریایی آنها تأثیرگذار خواهد بود. در حقیقت با کاهش اندازه ذرات و در نتیجه افزایش سطح در دسترس، تماس با محیط محلول اطراف افزایش یافته و در نتیجه حلالیت نیز افزایش خواهد یافت.

از طرفی فعالیت ضد باکتریایی شیشه‌های زیست فعال تحت تأثیر تغییرات فشار اسموزی و افزایش pH ناشی از رهائش یون‌های قلیایی و قلیایی خاکی

و در غلظت 100 mg/ml رشد باکتری اشریشیاکلی پس از 72 ساعت به طور کامل متوقف شده و هیچ کلونی‌ای روی صفحات کشت دیده نشد؛ تعداد کلونی‌های باکتری استافیلوکوکوس اورئوس بر روی صفحه کشت نیز پس از 72 ساعت کمتر از تعداد اولیه شده بود و در روزهای بعد نیز این تعداد کلونی تغییری نکرد (تصویر 3). بنابراین MBC این نمونه برای باکتری اشریشیاکلی 100 mg/ml به دست آمد. مطابق شکل در هر سه غلظت انتخابی برای شیشه 37S پس از 24 ساعت رشد باکتری اشریشیاکلی به طور کامل متوقف گردیده و هیچ باکتری‌ای روی صفحات کشت دیده نشد. این شیشه از رشد باکتری استافیلوکوکوس اورئوس پس از 24 و 48 و 96 ساعت به ترتیب در غلظت‌های 100، 50 و 25 میلی‌گرم در هر میلی‌لیتر، جلوگیری کرد. بنابراین MBC این نمونه برای هر دو باکتری 25mg/ml به دست آمد (تصویر 3).



تصویر 3 - اثر ضدباکتریایی نانوذرات بر رشد باکتری‌های

اشریشیاکلی و استافیلوکوکوس اورئوس

نهایی با تعادل این دو واکنش به دست می آید. ترکیب شیشه زیست فعال 37S حاوی مقدار بیشتری اکسید کلسیم می باشد بنابراین با گذشت زمان و تجزیه بیشتر، اکسید قلیایی بیشتری را به محیط اطراف آزاد می کند که منجر به افزایش pH می شود. از سویی دیگر نمونه 58S حاوی مقدار بیشتری دی اکسید سیلیسیم است که رهایش آن نیز کاهش pH را نتیجه می دهد. بر اساس مطالعه میونکا و همکارانش نیز اثر ضدباکتریایی شیشه های زیست فعال (تهیه شده به روش سل ژل) حاوی مقادیر زیاد اکسید کلسیم نسبت به سایر نمونه ها بیشتر بود (14).

در بسیاری از مطالعات از نقره در ترکیب شیشه های زیست فعال یا سایر بیومواد استفاده کرده اند تا اثر ضدباکتریایی مطلوب حاصل شود. گرچه به این ترتیب به نتیجه مطلوب می توان دست یافت اما اثرات سمیت سلولی نقره را نیز نمی توان نادیده گرفت (19 و 20). در چنین شرایطی به جای این که عفونت رفع شود مشکلی دیگر ایجاد می شود که خود مانعی در برابر ایجاد یک اتصال استخوانی محکم و مناسب می باشد (21). بنابراین دستیابی به ترکیباتی که خودشان به تنهایی و بدون افزودن عناصری که رهایش آن ها خطر سمیت سلولی را داشته باشد حائز اهمیت است.

غلظت های مختلفی از شیشه های زیست فعال در کاربردهای کلینیکی استفاده می شوند. برای مثال در درمان ازدیاد حساسیت دندان ها از ترکیباتی با غلظت 1/67 گرم پودر در هر میلی لیتر مایع استفاده شده است (22). در برخی موارد نیز غلظت ماده مصرفی حتی بیش از این مقدار بوده است (23). مواد آزمایشی در این مطالعه در غلظت هایی کم تر از مقادیری که قبلاً به دست آمده اثر ضدباکتریایی نشان داده اند.

نتیجه گیری

در این تحقیق نانوذرات شیشه های زیست فعال 37S و 58S با ابعاد کم تر از 100 نانومتر با استفاده از روش

می باشد (15 و 16). بنابراین یک ساختار آمورف با ابعاد نانومتری نسبت به ساختارهایی با اندازه دانه متداول، رهایش بیشتر و سریع تر یونها را نتیجه خواهد داد که می تواند تأثیری مطلوب در ایجاد اثر ضدباکتریایی داشته باشد (17).

همچنین نانوبیومواد برهمکنش بین مواد و سلول را برمی انگیزند. به علاوه، ویژگی های سطحی نانومواد مانند حفرات نانومتری بیشتر، بر نوع و مقدار جذب پروتئین های انتخابی تأثیرگذار بوده، چسبندگی استئوبلاست ها، تکثیر و تمایز آن ها را بهبود می بخشد (18). بنابراین سطوح نانومتری اتصال استخوانی بهتر و محکم تری را ایجاد می کنند.

ایجاد ذراتی با گستره اندازه وسیع در کنار یکدیگر نیز می تواند از دیگر عوامل تأثیرگذار بر اثر ضدباکتریایی باشد که در این تحقیق فراهم شده است. در حقیقت در این شرایط فضایی متخلخل بین ذرات ایجاد می شود که به نفوذ محیط مایع در ساختار و تخریب پذیری سریع تر کمک می کند. چنین ساختاری در محیط درون تنی نیز تماس بهتری با اجزای ارگانیکی همانند کلاژن، هیالورونیک اسید و سایر اجزا خواهد داشت.

ترکیب شیشه های انتخابی در این مطالعه به گونه ای بوده است که درصد بالایی اکسید کلسیم داشته باشند؛ زیرا رهایش این اکسید قلیایی به محیط اطراف افزایش pH را به دنبال دارد که اثری منفی بر رشد و حیات باکتری ها خواهد داشت. pH اندازه گیری شده در برات حاوی نمونه 37S همواره بیش از pH برات حاوی نمونه 58S بود. PH محلول حاوی شیشه های زیست فعال تحت تأثیر یک سری از تعادل های بازی-اسیدی شیمیایی شامل دپروتونه شدن پی در پی یا پروتونه شدن مجدد برخی یون های سیلیکا مانند $(\text{SiO}_4)_4$ ، $(\text{HSiO}_4)_3$ و $(\text{H}_2\text{SiO}_4)_2$ است. در این ترکیبات pH محیط به محض تجزیه SiO_2 کاهش می یابد. به علاوه واکنش CaO با H_2O موجب افزایش pH محیط می شود و مقدار pH

مناسب جهت کاربردهای دندان‌پزشکی و استخوانی تحت بررسی‌های بیشتری قرار داد.

تشکر و قدردانی

نویسندگان این مقاله از خانم کنعانی مسئول آزمایشگاه میکروبیولوژی دانشگاه سمنان که ما را در انجام آزمایش‌های ضدباکتریایی یاری کردند کمال تشکر را دارند.

آسان سل ژل تهیه شدند. نانوذرات شیشه زیست فعال 37S فعالیت ضدباکتریایی قابل توجهی داشتند و MBC آن برای هر دو باکتری مورد بررسی 25mg/ml به دست آمد. در غلظت‌های کمتر از 100mg/ml شیشه زیست فعال 58S فعالیت ضدباکتریایی نشان نداد. این نمونه در غلظت 100mg/ml باکتری اشریشیاکلی را به طور کامل از بین برد اما در مورد باکتری استافیلوکوکوس اورئوس تنها کاهش رشد را نتیجه داد. بنابراین نتایج می‌توان این نانوذرات را به عنوان کاندیدی

References

1. Rabih O, Darouiche MD. Treatment of infections associated with surgical implants. *N Engl J Med*. 2004;350(14):1422-9.
2. von Eiff C, Jansen B, Kohlen W, Becker K. Infections associated with medical devices pathogenesis, management and prophylaxis. *Drugs*. 2005;65(2):179-214.
3. Crémet L, Corvec S, Bémer P, Bret L, Lebrun C, Lesimple B, et al. Orthopaedic-implant infections by *Escherichia coli*: molecular and phenotypic analysis of the causative strains. *J Infect*. 2012;64(2):169-75.
4. Martinez-Pastor JC, Muñoz-Mahamud E, Vilchez F, García-Ramiro S, Bori G, Sierra J, et al. Outcome of acute prosthetic joint infections due to gram-negative bacilli treated with open debridement and retention of the prosthesis. *Antimicrob Agents Chemother*. 2009;53(11):4772-7.
5. Balamurugan A, Balossier G, Kannan S, Michel J, Rebelo AH, Ferreira JM. Development and in vitro characterization of sol-gel derived CaO-P₂O₅-SiO₂-ZnO bioglass. *Acta Biomater*. 2007;3(2):255-62.
6. Habraken WJ, Wolke JG, Jansen JA. Ceramic composites as matrices and scaffolds for drug delivery in tissue engineering. *Adv Drug Deliv Rev*. 2007;59(4):234-48.
7. Couto DS, Hong Z, Mano JF. Development of bioactive and biodegradable chitosan-based injectable systems containing bioactive glass nanoparticles. *Acta Biomater*. 2009;5(1):115-23.
8. Hench LL. Bioceramics. *J Am Ceram Soc*. 1998;81:1705-28.
9. Xynos ID, Edgar AJ, Buttery LD, Hench LL, Polak JM. Ionic products of bioactive glass dissolution increase proliferation of human osteoblasts and induce insulin-like growth factor II mRNA expression and protein synthesis. *Biochem Biophys Res Commun*. 2000;276(2):461-5.
10. Allan I, Newman H, Wilson M. Antibacterial activity of particulate Bioglass against supra- and subgingival bacteria. *Biomaterials*. 2001;22(12):1683-7.
11. Forsback AP, Areva S, Salonen JI. Mineralization of dentin induced by treatment with bioactive glass S53P4 in vitro. *Acta Odontol Scand*. 2004;62(1):14-20.
12. Pratten J, Nazhat SN, Blaker JJ, Boccaccini AR. In vitro attachment of *Staphylococcus epidermidis* to surgical sutures with and without Ag-containing bioactive glass coating. *J Biomater Appl*. 2004;19(1):47-57.
13. Mortazavi V, Nahrkhalaji MM, Fathi MH, Mousavi SB, Esfahani BN. Antibacterial effects of sol-gel-derived bioactive glass nanoparticle on aerobic bacteria. *J Biomed Mater Res A*. 2010;94(1):160-8.
14. Munukka E, Leppäranta O, Korkeamäki M, Vaahtio M, Peltola T, Zhang D, et al. Bactericidal effects of bioactive glasses on clinically important aerobic bacteria. *J Mater Sci Mater Med*. 2008;19(1):27-32.
15. Gubler M, Brunner TJ, Zehnder M, Waltimo T, Sener B, Stark WJ. Do bioactive glasses convey a disinfecting mechanism beyond a mere increase in pH?. *Int Endod J*. 2008;41(8):670-8.
16. Zehnder M, Waltimo T, Sener B, Söderling E. Dentin enhances the effectiveness of bioactive glass S53P4 against a strain of *Enterococcus faecalis*. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*. 2006;101(4):530-5.
17. Waltimo T, Brunner TJ, Vollenweider M, Stark WJ, Zehnder M. Antimicrobial effect of nanometric bioactive glass 45S5. *J Dent Res*. 2007;86(8):754-7.
18. Webster TJ, Siegel RW, Bizios R. Osteoblast adhesion on nanophase ceramics. *Biomaterials*. 1999;20(13):1221-7.

19. Balamurugan A, Balossier G, Laurent-Maquin D, Pina S, Rebelo AH, Faure J, et al. An in vitro biological and anti-bacterial study on a sol-gel derived silver-incorporated bioglass system. *Dent Mater*. 2008;24(10):1343-51.
20. Wu J, Wang L, He J, Zhu C. In vitro cytotoxicity of Cu^{2+} , Zn^{2+} , Ag^+ and their mixtures on primary human endometrial epithelial cells. *Contraception*. 2012;85(5):509-18.
21. Campoccia D, Montanaro L, Arciola CR. The significance of infection related to orthopedic devices and issues of antibiotic resistance. *Biomaterials*. 2006;27(11):2331-9.
22. Leppäranta O, Vaahtio M, Peltola T, Zhang D, Hupa L, Hupa M, et al. Antibacterial effect of bioactive glasses on clinically important anaerobic bacteria in vitro. *J Mater Sci Mater Med*. 2008;19(2):547-51.
23. Stoor P, Söderling E, Salonen JI. Antibacterial effects of a bioactive glasspaste on oral microorganisms. *Acta Odontol Scand*. 1998;56(3):161-5.