

رفتار سلول استخوان ساز MG-63 بر روی سطح تیتانیوم اصلاح شده با محلول اسیدی

مردعلی یوسف پور*، امیر زارعی دوست** و امیر امان زاده*
دانشکده مهندسی مواد - صنایع، دانشگاه سمنان
انستیتو پاستور ایران، بانک سلولی ایران، آزمایشگاه مهندسی بافت

(دریافت مقاله: ۱۳۸۹/۳/۶ - دریافت نسخه نهایی: ۱۳۸۹/۱۰/۱۲)

چکیده -

MG-63
EDS AFM SEM

واژگان کلیدی :

Osteoblastic Cell MG-63 Behavior on Titanium Implant Surfaces Treated with Acidic Solution

M. Yousefpour, A. Zareidoost and A. Amanzadeh

Materials – Industrial Engineering Department, Semnan University
Pasteur Institute of Iran, National Cell Bank of Iran, Tissue Engineering Lab

Abstract: *The osseointegration of oral implants is related to the early interactions between osteoblastic cells and titanium surface. Chemical surface modification of titanium (Ti) implants is used to improve peri-implant bone growth, bone-to-implant contact, and adhesion strength. Thus, in this study, the surface topography, chemistry, and biocompatibility of polished titanium surface treated with mixed solution of three acids containing hydrochloric acid (HCl)- hydrofluoric acid (HF)- phosphoric acid*

** - دانشجوی کارشناسی ارشد

* - استادیار

(H₃PO₄) were studied under different concentration conditions. Moreover, Osteoblast cell (MG-63) was cultured on the and treated polished titanium surface. Also, in order to investigate titanium surface, SEM, AFM and EDS analyses were carried out. The results revealed that the surface of titanium treated with mixed solution containing the aforesaid acids had higher roughness, cell attachment, and proliferation than the controls

Keywords: Biomaterial; Titanium; Surface modification; proliferation; biocompatibility.

۱- مقدمه

غیر از سرامیکهای زیست فعال، شیشه زیست فعال، هیدروکسی آپاتیت و شیشه سرامیک که مستقیماً با استخوان زنده پیوند برقرار می‌کنند، تیتانیم کاشتنی به عنوان یک بیوماده نمی‌تواند مستقیماً با استخوان زنده ارتباط برقرار کند [۱ و ۲]. یک بافت رشته‌ای (کپسول فیبروزه‌ای) معمولاً در فصل مشترک کاشتنی تیتانیم و استخوان طبیعی تشکیل می‌شود [۲ - ۴]. با این وجود، اگر چه هیدروکسی آپاتیت به سرعت با استخوان پیوند برقرار می‌کند. اما، خواص مکانیکی ضعیف آن استفاده‌اش را در بسیاری از کاربردهای ارتوپدی محدود می‌کند [۱].

به منظور تهیه یک ماده کاشتنی با هر دو خاصیت مکانیکی و زیست فعالی بالا، مطالعه‌ای برای تولید تیتانیم زیست فعال انجام شد. معمولاً هیدروکسی آپاتیت به عنوان پوشش بر روی زیر لایه فلزی به منظور افزایش زیست فعالی استفاده می‌شود. برای این منظور، از فرایندهای زیادی برای ایجاد لایه نازک هیدروکسی آپاتیت بهره برده می‌شود که می‌توان به پاشش پلاسمایی، رسوب الکتروفوریتیک و رسوب الکتروشیمیایی اشاره کرد [۵ و ۶ و ۱]. نتیجه اجرای فرایندهای فوق، معمولاً منجر به تشکیل لایه نازک شبه آپاتیت می‌شود. فرایندهایی که برای ایجاد لایه نازک شبه آپاتیت بر روی زیر لایه تیتانیم به کار می‌روند و برای اعمال پوشش نیاز به داشتن دمای بالا در محیط فرایند است و نیاز به انجام فرایند تفجوشی دارند، ممکن است باعث تجزیه لایه هیدروکسی آپاتیت و یا تخریب زیر لایه فلزی شوند [۱]. بنابراین، به منظور اصلاح سطح تیتانیم و آلیاژهای آن در حالت کلی می‌توان، از روشهای مکانیکی، شیمیایی و فیزیکی بهره جست [۷ و ۸]. از جمله این روشها می‌توان به فرایند پاشش در جریان پلازما، سل-ژل، اکسیداسیون آنودی،

الکتروفوریتیک، روشهای بیوشیمیایی، رسوب فیزیکی بخار، رسوب شیمیایی بخار، لیزر، عملیات شیمیایی با محلول قلیایی و اسیدی اشاره کرد [۸ و ۱۳].

برای غلبه بر مشکلات فوق، در سالهای اخیر، علاقه فزاینده‌ای برای تشکیل لایه سطحی زیست فعال بر روی سطح تیتانیم پدید آمده است تا بتواند به تشکیل لایه آپاتیت در محلول شبیه سازی شده بدن (SBF) و یا محیط زنده بیولوژیکی کمک کند، [۱۴ - ۱۶]. هدف از این پژوهش بررسی تغییر شرایط محلول اسیدی و تاثیر آن بر مورفولوژی، توپوگرافی و شیمی سطح تیتانیم است که می‌تواند تاثیر به‌سزایی در رفتار زیست فعال شدن سطح تیتانیم به وجود آورد.

این بررسی از روشهای نوین در زیر کردن سطح تیتانیم بوده و تاثیر بسیار مهمی در قابلیت رفتار زیست فعال شدن سطح تیتانیم می‌تواند پدید آورد. لازم به ذکر است که استفاده از محلول اسیدی با ترکیبی از اسیدهای فوق در زیست فعال کردن سطح تیتانیم تاکنون تحقیق نشده است و نتایج حاصل نشان دهنده قابلیت بالای این محلول اسیدی در زیست فعال کردن سطح تیتانیم است.

۲- مواد و روش تحقیق

۲-۱- آماده سازی

قطعاتی به ابعاد $3 \times 10 \times 20 \text{ mm}^3$ برای اجرای عملیات شیمیایی و همچنین قطعاتی به ابعاد $1 \times 4 \times 4 \text{ mm}^3$ برای ارزیابیهای بیولوژیکی توسط عملیات برش از تیتانیم خالص تجاری (کوبه استیل، ژاپن)^۱ تهیه شد که در جدول (۱)، ترکیب شیمیایی آن آمده است [۱۷]. پس از برش قطعات، چربی‌گیری در محلول استن انجام شد.

جدول ۱- ترکیب شیمیایی تیتانیم خالص تجاری [۱۷].

عناصر	هیدروژن	کربن	نیتروژن	اکسیژن	آهن	تیتانیم
درصد وزنی	۰/۰۱۵	۰/۱	۰/۰۳	۰/۱۸	۰/۲	باقیمانده

جدول ۲- گروه بندی نمونه‌های تیتانیم برای عملیات شیمیایی

نمونه‌های تیتانیم	محلول اسیدی
A (کنترل)	-
B	۱۰۰ درصد اسید فلئوریدریک
C	۸۰ درصد اسید کلریدریک- ۶ درصد اسید فلئوریدریک- ۱۴ درصد اسید فسفریک
D	۸۵ درصد اسید کلریدریک- ۶ درصد اسید فلئوریدریک- ۹ درصد اسید فسفریک
E	۸۰ درصد اسید کلریدریک- ۱۰ درصد اسید فلئوریدریک- ۱۰ درصد اسید فسفریک

بشرهای پلاستیکی تهیه شدند و به مدت یک روز نگهداری شدند. سپس نمونه‌های تیتانیم خالص تجاری در هر کدام از محلول اسیدی با غلظت‌های مشخص در مدت زمان ۱۲۰ ثانیه مورد عملیات شیمیایی قرار گرفتند، جدول (۲). بعد از آن نمونه‌های تیتانیم از محلولها خارج شده و با آب مقطر و سپس با استون در محفظه التراسونیک شستشو داده شده و بعد با استفاده از خشک کن الکتریکی سطح نمونه‌ها در هوای معمولی خشک شد و مجددا در دسیکاتور قرار داده شدند تا بررسیهای لازم بر روی سطح آنها، صورت گیرد.

۲-۳- تحلیل سطح نمونه‌های تیتانیم

۲-۳-۱- بررسی مورفولوژی سطح تیتانیم

برای بررسی مورفولوژی سطح نمونه‌های تیتانیم اصلاح شده از میکروسکوپ الکترونی (SEM) با ولتاژ ۲۰ کیلو ولت (مدل Philips XL30، کشور هلند) استفاده می‌شود. همچنین به منظور بررسی توپوگرافی در مقیاس نانو و تهیه تصاویر در حالت دو وسه بعدی از سطح تیتانیم، میکروسکوپ نیروی اتمی (AFM) مدل CP، کشور USA، شرکت PSI به کار می‌رود.

۲-۳-۲- بررسی شیمی سطح تیتانیم

علاوه بر ارزیابیهای مربوط به مورفولوژی سطح، برای مقایسه میزان حضور عنصر فسفر ناشی از وجود اسید فسفریک

سپس با استفاده از سنباده‌های با شماره‌های به ترتیب ۲۸۰، ۳۲۰، ۵۰۰ و ۶۰۰ سطح نمونه‌ها، مورد عملیات پولیش قرار گرفت [۱]. برای حذف آلودگیهای سطحی و به دست آوردن یک سطح تمیز برای انجام عملیات شیمیایی بر روی سطح تیتانیم، نمونه‌ها در یک محفظه التراسونیک شستشو داده شدند. به این ترتیب که نمونه‌های پرداخت شده، با ۴۰ درصد حجمی هیدروکسید سدیم (NaOH) و ۵۰ درصد حجمی اسیدنیتریک (HNO₃) در محفظه التراسونیک شستشو داده شده، سپس با تخلیه محلول شستشو مجددا نمونه‌ها با آب مقطر در محفظه التراسونیک مورد عملیات شستشو قرار گرفتند. در پایان تعدادی از نمونه‌های فوق برای ارزیابیهای بیولوژیکی در دمای محیط در الکل اتانول ۷۰ درصد حجمی در اتوکلاو نگهداری شدند [۱۸].

۲-۲- اجرای عملیات شیمیایی بر روی سطح تیتانیم

نمونه‌های تیتانیم خالص تجاری تمیز شده، برای قرار گرفتن در محلول اسیدی سه‌تایی اسید کلریدریک- اسید فلئوریدریک- اسید فسفریک آماده شدند. برای بررسی تغییرات زبری و توپوگرافی سطح تیتانیم حاصل از تغییر غلظت اسیدها در محلول اسیدی متشکل از آنها، غلظت‌های مورد نظر که در جدول (۲) آمده است، انتخاب شدند. محلولهای اسیدی با ترکیب فوق الذکر به حجم ۱۰ سی سی در

در ترکیب محلول شیمیایی اصلاح سطح تیتانیم حاصل از تغییرات غلظت محلول اسیدی، ارزیابی نیمه کمی EDS (VEGAN/TESCAN)، مرکز پژوهش متالورژی رازی (ایران) از سطح به عمل می‌آید.

۳- ارزیابیهای بیولوژیکی

۳-۱- انجام آزمایشات سلولی

سلول استخوان‌ساز (MG-63) با کد (NCBI C555) از بانک سلولی انستیتو پاستور ایران تهیه شد. این سلول از گونه انسان بوده و از بیماری سارکوم به دست آمده است. همچنین دارای موفولوژی فیروبلست و بافت استخوان است بدین ترتیب، با استفاده از محیط کشت (DMEM, GIBCO, Scotland)^۲ و افزودن ۱۰٪ سرم جنین گاوی (FCS, Seromed, Germany)^۳ به همراه آنتی‌بیوتیک به میزان $100 \frac{\text{IU}}{\text{ml}}$ پنی سیلین و $100 \frac{\mu\text{g}}{\text{ml}}$ استرپتومایسین (Sigma, USA) تکثیر شد تا سلول استخوان‌ساز برای دو ارزیابی زیر آماده شود [۱۹].

۳-۱-۲- ارزیابی تکثیر سلولی

جهت بررسی میزان رشد و تکثیر سلولها بر روی سطح تیتانیم، زمان ۳ و ۷ روز انتخاب شد. برای این منظور، تعداد $10^4 \frac{\text{cell}}{\text{cm}^2}$ بر روی سطح نمونه‌های تیتانیم کشت شد. لذا، با توجه به تکرار آزمایشها تا سه مرتبه در زمان مربوط از شش محفظه صفحه‌ای شکل دارای نود و شش حفره استفاده شد. در هر کدام از آنها یک دسته از گروه‌های تیتانیم انتخابی A تا E با توجه به جدول (۲) قرار داده شد.

به منظور ارزیابی میزان رشد و تکثیر سلولی روش MTT^۴ به کار رفت [۲۰]. روش MTT معمولاً برای بررسی بقای سلولها به کار می‌رود. در این روش از نمک زرد رنگ تترازولیوم استفاده می‌شود. وقتی که سلولها جذب آن شوند، تغییر رنگ ایجاد شده و این نمک به حالت بنفش رنگ در

می‌آید. دلیل تغییر رنگ تشکیل کریستالهای نامحلول است. این کریستالها در خارج از سلول با افزودن یک شوینده حل شده و جدا می‌شوند. این تغییر رنگ با روشهای طیف‌سنجی قابل تشخیص است. برای هر سلول یک رابطه خطی میان تعداد سلولهای زنده و میزان جذب اندازه‌گیری شده وجود دارد که جهت تهیه محلول MTT به غلظت $0.5 \frac{\text{mg}}{\text{ml}}$ ، مقدار ۵۰ mg از پودر MTT در ۱۰ mg از PBS ۰/۱۵ مولار حل می‌شود. هنگام استفاده از آن در رنگ آمیزی تا ۱۰ برابر با PBS رقیق می‌شود تا محلول $0.05 \frac{\text{mg}}{\text{ml}}$ MTT به دست آید. لازم به ذکر است که پس از تهیه PBS، محلول در اتوکلاو نگهداری می‌شود. پس از انکوباسیون سلولهای MG-63 بر روی سطح نمونه‌ها در فواصل زمانی ۳، ۷ روز قرار داده شده در محفظه‌های صفحه‌ای شکل که در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد و ۵ درصد دی‌اکسید کربن انکوبه شده بودند با محلول $0.05 \frac{\text{mg}}{\text{ml}}$ MTT رنگ آمیزی می‌شوند. پس از ۳ تا ۵ ساعت انکوباسیون در ۳۷ درجه سانتی‌گراد مایع رویی سلولها برداشته می‌شود و به جای آن ۲۰۰ میکرولیتر محلول ایزوپروپانال (Merck, Germany) به حفره‌های مربوط اضافه می‌شود. بدین ترتیب، محفظه‌های صفحه‌ای مربوط به مدت ۱۰ الی ۱۵ دقیقه روی شیکر قرار می‌گیرند. سپس محتوای آنها توسط یک میکروتیتر ریدر^۵ در ۵۷۰ نانومتر خوانده می‌شود [۲۱].

۳-۱-۳- بررسی مورفولوژی سلول

برای تعیین مورفولوژی سلول کشت داده شده بر روی سطح اصلاح شده تیتانیم تحت شرایط تغییر غلظت اسیدها از میکروسکوپ الکترونی روبشی^۶ استفاده می‌شود. بدین منظور، ابتدا نمونه‌های مورد نظر با ابعاد $4 \times 4 \times 1 \text{mm}$ به تعداد پنج عدد تهیه گردیده‌اند. سپس در اتوکلاو استریلیزه شده و برای ایجاد کشت بر روی آنها، در محفظه‌های حاوی نود و شش حفره کشت سلول قرار داده شدند. به دلیل آن که سلول استخوان ساز (MG-63) از نوع سلولهای چسبنده است. لذا، این سلول در

معنی دار است. چنانچه مقدار پارامتر p از 0.01 کمتر باشد، اختلاف بسیار معنی دار است.

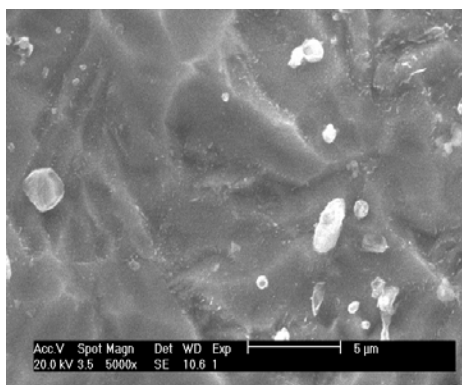
۵- نتایج و بحث

در شکل (۱)، تصاویر میکروسکوپ الکترونی از سطح تیتانیم پرداخت شده و سطح اصلاح شیمیایی شده با اسید فلئوریدریک منفرد و اسیدهای سه تایی آمده است. با بررسی تصاویر این شکل مشاهده می شود که سطح تیتانیم پولیش شده، کاملاً صاف است و از حداقل زبری سطح برخوردار است. به عبارت دیگر، با اجرای این عملیات سطح زبر نشده است، شکل (۱-الف)). شکل (۱-ب)، سطح تیتانیم را پس از قرار گرفتن در محلول اسید فلئوریدریک به مدت 120 ثانیه و در دمای محیط نشان می دهد. این تصویر نشان می دهد که اسید ذکر شده در بالا بر روی سطح ایجاد فرورفتگی و برآمدگی در مقیاس میکرون می کند. همچنین حفرات ایجاد شده، کاملاً به شکل نامنظم بوده و از شکل هندسی خاصی پیروی نمی کنند. لذا بافت سطح دارای حداقل میزان فرورفتگی با شکلهای یکنواخت است. شکل (۱-ج)، حفره هایی را نشان می دهد که از حالت پهن شده (کشیده) تا حدودی خارج شده و تقریباً به شکل نیم کره در آمده اند. اما، بایستی به گستردگی حفره های موجود بر سطح تیتانیم حاصل از این محلول اسیدی اشاره کرد. به گونه ای که در شکل (۱-د) مشخص است، اندازه حفره های کروی ایجاد شده از حدود 0.5 تا 7 میکرون است. بنابراین، از مقایسه فوق، مشاهده می شود که محلول اسیدی سه تایی علاوه بر ایجاد سطحی زبر بر روی تیتانیم، سبب افزایش اندازه قطر حفره ها هم می شود. این موضوع در تحقیق دیگر آمده است [۱]. با توجه به شکل (۱-د)، حفره ها به صورت یکنواخت تر تشکیل یافته اند. این موضوع نشان می دهد، گستردگی حفره هایی که در عملیات اصلاح سطح ذکر شده، ایجاد شده اند، در این حالت کمتر بوده و اندازه ی تخلخلها از 0.5 تا 3 میکرون است. به علاوه، حفره ها به شکل نیم کره های بسیار کوچک و دارای شکل مشابه اند. همچنین شکل (۱-ه)، بر روی سطح، شیارهای را در ابعاد

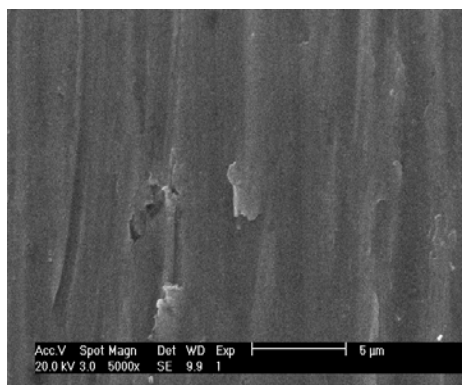
هنگام نگهداری در ظروف کشت به کف ظرف چسبیده و علاوه بر آن سلولها نیز به یکدیگر می چسبند. بنابراین در هنگام شمارش سلول برای ریختن مقدار معین آن بر روی سطح تعداد آنها با مشکل مواجه می شود. لذا، برای غلبه بر مشکل فوق، آنزیم تریپسین با غلظت 0.25% که دارای (EDTA) با غلظت 0.05% (Sigma, USA) است به سرم فیزیولوژی یا فسفات بافر سالین (PBS) که دارای $pH=7.4$ است، افزوده می شود. در نهایت سلولها با استفاده از لام نئوبار مورد شمارش قرار می گیرند. پس از شمارش سلولها، در نهایت تعداد $10^4 \frac{\text{cell}}{\text{cm}^2}$ انتخاب می شود. و برای کشت به انکوباتور در دمای 37 درجه سانتی گراد حاوی 5 درصد گاز دی اکسید کربن انتقال می یابد. بدین ترتیب، پس از گذشت 32 ساعت از زمان کشت تصویر برداری توسط میکروسکوپ الکترونی صورت می گیرد. بدین ترتیب، سلولها در ابتدا با استفاده از گلو تار آلدئید 0.25% در سرم فیزیولوژی (PBS) 0.2 مولار برای مدت دو ساعت تثبیت شدند. سپس فرایند آب گیری تدریجی و خشک کردن سطوح کشت داده شده، از الکل اتانول دارای 40 تا 95 در صد انجام می شود. در نهایت از الکل خالص برای آب گیری تدریجی استفاده می شود. مراحل عملیات آب گیری و خشک کردن سطح نمونه ها در مرجع [۱۸] و جزییات مربوط آمده است. بدین ترتیب، نمونه های مورد مطالعه با لایه ای نازک از طلا پوشش داده می شوند. سپس با استفاده از میکروسکوپ الکترونی تصاویر مربوط تهیه می شود.

۴- ارزیابیهای آماری

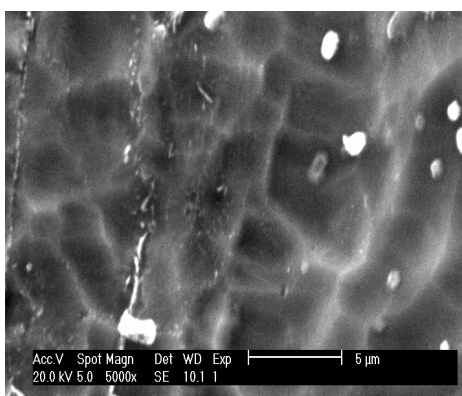
برای بررسی آماری نتایج حاصل از ارزیابیهای بیولوژیکی روش آماری انواع ۶ به کار می رود. برای این منظور، مقدار پارامتر p که نشان دهنده اختلاف معنی دار از لحاظ آماری بین دو گروه مورد مطالعه است، تعیین می شود [۱۵ و ۱۸]. بدین ترتیب اگر بین دو گروه مورد مطالعه اختلاف، مقدار پارامتر p بیشتر از 0.05 باشد، نشان دهنده کاهش اختلاف بین دو گروه است. در حالی که اگر پارامتر p از 0.05 کمتر باشد، اختلاف



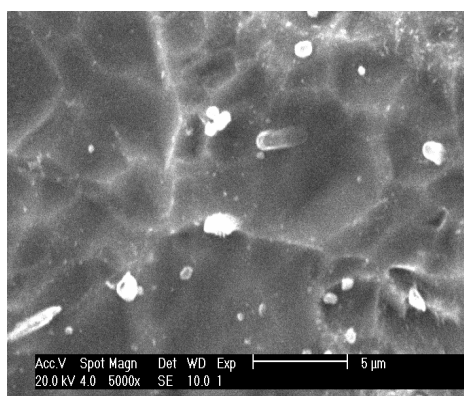
(ب)



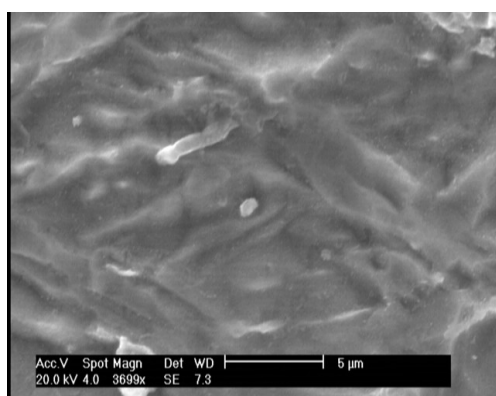
(الف)



(د)



(ج)



(ه)

شکل ۱- تصویر میکروسکوپ الکترونی از سطح تیتانیم (الف): پولیش شده و اصلاح شده با (ب): ۱۰۰ درصد اسید فلئوریدریک (ج): ۸۰ درصد اسید کلریدریک- ۶ درصد اسید فلئوریدریک-۱۴ درصد اسید فسفریک (د): ۸۵ درصد اسید کلریدریک-۶ درصد اسید فلئوریدریک-۹ درصد اسید فسفریک (ه): ۸۰ درصد اسید کلریدریک- ۱۰ درصد اسید فلئوریدریک- ۱۰ درصد اسید فسفریک، به مدت ۱۲۰ ثانیه و در درجه دمای محیط.

اسید فلئوریدریک تنها برای زبری سطح استفاده شود، این تغییرات سطحی در مقیاس میکرون به وجود نمی آید. در آن حالت سطح بافت ضعیفی از حفره های یک شکل را نشان می دهد. لذا در این راستا، مشخص است که ترکیب اسید فلئوریدریک همراه دو اسید دیگر تاثیر فوق العاده ای از نظر

میکرون نشان می دهد. در این حالت با افزایش درصد اسید فلئوریدریک خوردگی از حالت متمرکز خارج شده و به جای این که حفرات سطحی بسیار کوچک ایجاد کند، حفره هایی با اندازه بزرگتری تشکیل می یابند که در درون این حفره ها شیارهایی را به ابعاد میکرون ملاحظه می شود. اما، زمانی که از

تنوع مورفولوژی بر روی سطح تیتانیم ایجاد می‌کند. اهمیت این موضوع در قابلیت زیست‌فعال شدن سطح تیتانیم در بررسی‌های محققان دیگر هم آمده است [۲۲].

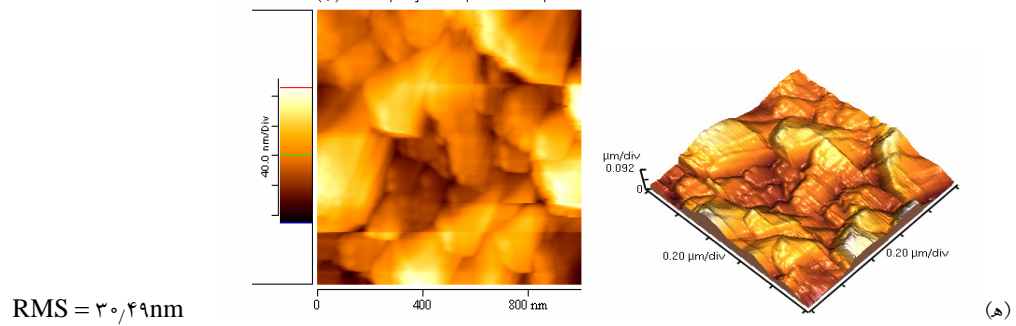
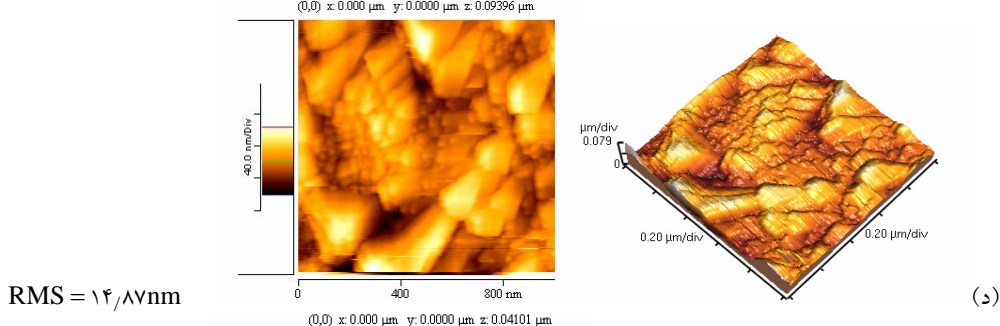
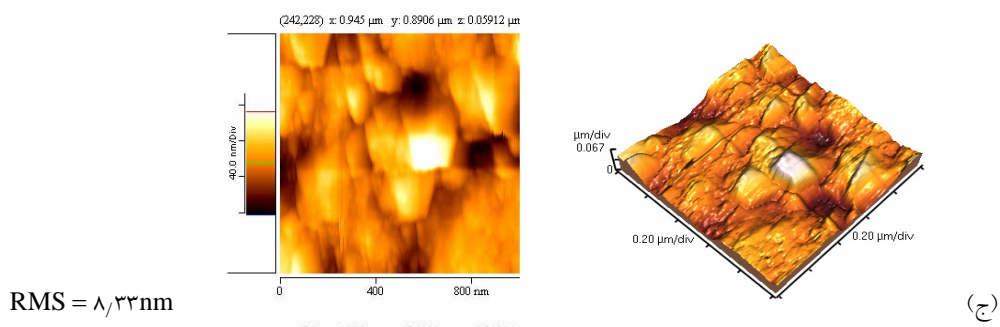
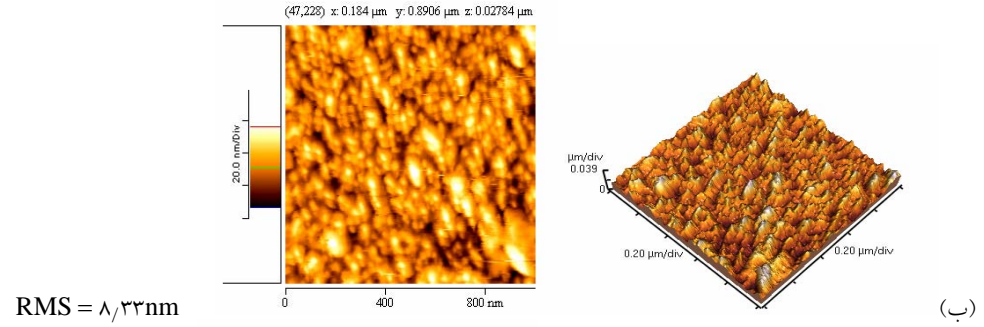
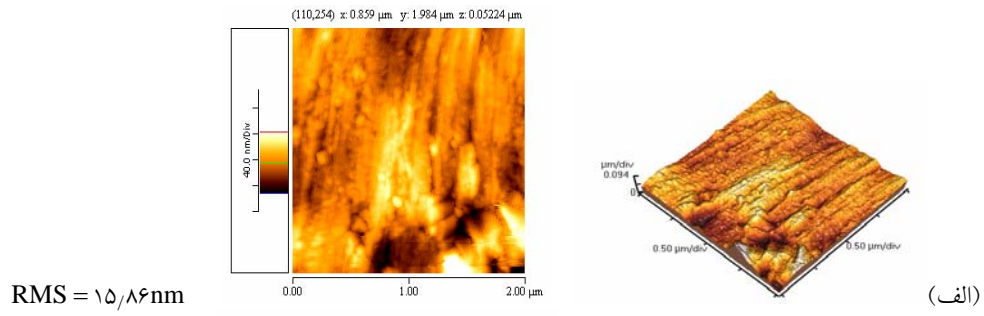
از بررسی تصاویر (SEM) از سطح اصلاح شده توسط سه محلول ۸۰ درصد اسید کلریدریک - ۶ درصد اسید فلئوریدریک - ۱۴ درصد اسید فسفریک، ۸۵ درصد اسید کلریدریک - ۶ درصد اسید فلئوریدریک - ۹ درصد اسید فسفریک و ۸۰ درصد اسید کلریدریک - ۱۰ درصد اسید فلئوریدریک - ۱۰ درصد اسید فسفریک ملاحظه می‌شود که تغییر غلظت اسیدها نسبت به یکدیگر در محلول اسیدی، اندازه و مورفولوژی حفرات سطحی را تغییر می‌دهد. به طوری که افزایش درصد اسید فلئوریدریک همراه با کاهش غلظت اسید فسفریک حفره‌های سطحی به حالت شیار در آورده و از حالت نیم کروی کامل خارج شده‌اند. علت این روند را می‌توان مربوط به تغییر انرژی سطحی تیتانیم در تماس با اسید فلئوریدریک مرتبط دانست [۲۳].

شکل (۲) مربوط به تصاویر میکروسکوپ نیروی اتمی از سطح تیتانیم پولیش شده و اصلاح شده در دو حالت دو بعدی و سه بعدی است. با بررسی شکل (۲-الف) مشاهده می‌شود، که سطح تیتانیم پولیش شده در مقیاس زیر یک میکرون حاوی خطوط و شیارهای ناشی از عملیات پولیش است. تصویر AFM مربوط به اسید فلئوریدریک نشان می‌دهد که این اسید تاثیر بسزایی در ایجاد سطحی زبر با مقیاس زیر یک میکرون دارد. به علاوه، توپوگرافی سطح یکنواختی داشته و مورفولوژی حالت مخروطی شکل به خود می‌گیرد. بنابراین، اسید فلئوریدریک هم در مقیاس میکرون و هم در مقیاس نانو سبب ایجاد زبری بر روی سطح تیتانیم می‌شود. محققان دیگر هم اصلاح سطح تیتانیم را با اسید فلئوریدریک بررسی کرده و نشان داده‌اند که اسید فلئوریدریک می‌تواند به عنوان یک روش در ایجاد سطح زبر در مقیاس نانو مطرح باشد [۱۸]. تصویر AFM مربوط به شکل (۲-ج) حالت متفاوتی را با شکل (۲-د) نشان می‌دهد. توپوگرافی سطح در این حالت

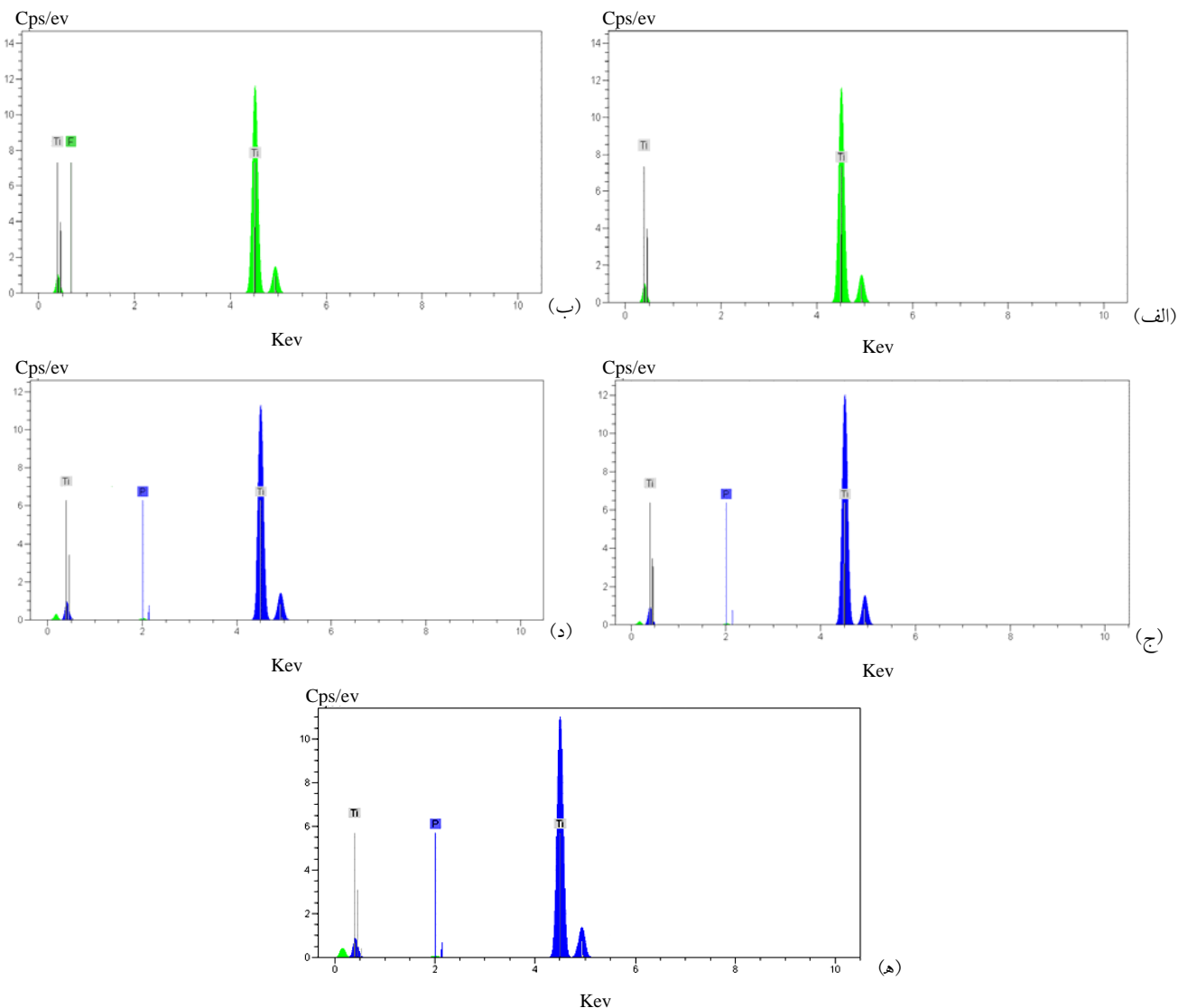
تغییر کرده است. این تصویر فرورفتگی و برآمدگی‌های بزرگتری را در مقیاس زیر میکرون تأیید می‌کند. حفره‌هایی که در تصویر مشاهده می‌شوند حالت یکنواخت داشته و به شکل نیم کره‌اند. توپوگرافی سطحی که در شکل (۲-ه) آمده است، زبری بسیار بالایی را نشان می‌دهد. این امر نشان می‌دهد که محلول سه تایی ۸۰ درصد اسید کلریدریک - ۱۰ درصد اسید فلئوریدریک - ۱۰ درصد اسید فسفریک، به شدت سطح تیتانیم را تحت تاثیر شیمیایی قرار می‌دهد. به نحوی که، فرورفتگی و برجستگی‌های با ارتفاع زیاد نسبت به سایر گروه‌های تغییر غلظت ایجاد می‌کند که گویای سطحی با زبری بسیار بالاست. بنابراین، محلولهای اسیدی ذکر شده در بالا علاوه بر ایجاد زبری در مقیاس میکرون، قابلیت تشکیل توپوگرافی‌های با مقیاس نانو را به علت حضور اسید فلئوریدریک در ترکیب خود دارند. زیرا اسید فلئوریدریک توانایی ایجاد سطوح در مقیاس نانو را دارد [۱۸].

از بررسی تصاویر میکروسکوپ الکترونی ملاحظه می‌شود که تغییر غلظت اسیدها نسبت به یکدیگر تاثیر بسزایی بر روی زبری و مورفولوژی سطح داشته که می‌توان با انتخاب نسبت مناسب از آنها به حداکثر زبری در سطح دست یافت که این عامل می‌تواند نقش فوق‌العاده مهمی در رفتار زیست فعال شدن سطح تیتانیم بر جای گذارد. بنابراین، هدف از تغییر غلظت، نشان دادن تاثیر آن بر روی توپوگرافی و مورفولوژی سطح است.

در مورد سطح اصلاح شده با اسید فلئوریدریک منفرد، اعتقاد بر این است که ترکیب فلورین بر روی سطح تیتانیم تشکیل می‌شود، شکل (۳-ب). همچنین، سطح اصلاح شده با محلول ۸۰ درصد اسید کلریدریک - ۶ درصد اسید فلئوریدریک - ۱۴ درصد اسید فسفریک از بیشترین درصد اتمی فسفر بر روی سطح خود برخوردار است، شکل (۳-ج). بنابراین، محلولهای اسیدی سه تایی متشکل از اسیدهای ذکر شده علاوه بر ایجاد سطوحی زبر، به دلیل تغییر انرژی سطحی، منجر به ایجاد گروه‌های عاملی فسفردار بر روی سطح می‌شود



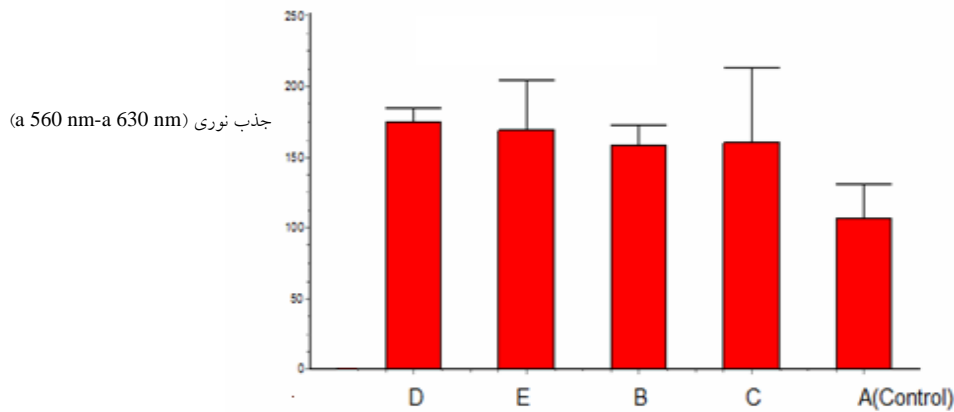
شکل ۲- تصویر میکروسکوپ نیروی اتمی دو بعدی و سه بعدی از سطح تیتانیوم (الف): پولیش شده و اصلاح شده با (ب): ۱۰۰ درصد اسید فلوئوریدریک (ج): ۸۰ درصد اسید کلریدریک- ۶ درصد اسید فلوئوریدریک- ۱۴ درصد اسید فسفریک (د): ۸۵ درصد اسید کلریدریک- ۶ درصد اسید فلوئوریدریک- ۹ درصد اسید فسفریک (ه): ۸۰ درصد اسید کلریدریک- ۱۰ درصد اسید فلوئوریدریک- ۱۰ درصد اسید فسفریک، به مدت ۱۲۰ ثانیه و در دمای محیط.



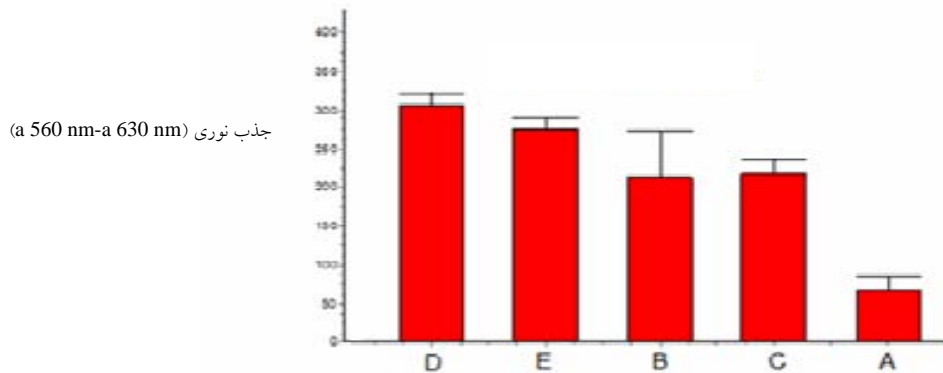
شکل ۳- تحلیل EDS از سطح تیتانیوم (الف): پولیش شده و اصلاح شده با (ب): ۱۰۰ درصد اسید فلئوریدریک (ج): ۸۰ درصد اسید کلریدریک - ۶ درصد اسید فلئوریدریک - ۱۴ درصد اسید فسفریک (د): ۸۵ درصد اسید کلریدریک - ۶ درصد اسید فلئوریدریک - ۹ درصد اسید فسفریک (ه): ۸۰ درصد اسید کلریدریک - ۱۰ درصد اسید فلئوریدریک - ۱۰ درصد اسید فسفریک، به مدت ۱۲۰ ثانیه و در دمای محیط.

سطح تیتانیوم در زیست فعال شدن آن بسیار موثر است [۱]. بنابراین، در این محلول اسیدی علاوه بر حضور اسید فلئوریدریک و اسید کلریدریک که عامل ایجاد زبری سطح در مقیاس نانو هستند، اسید فسفریک نیز به زیست فعال شدن سطح تیتانیوم کمک می‌کند. مکانیزم جذب فسفر بر روی سطح اصلاح شده به صورت یونهای فسفات است. زیرا در داخل محلول اسید سه تایی، اسید فسفریک به صورت یونهای فسفات و یونهای هیدروژن تجزیه می‌شود. بعد از انجام پدیده

که فسفر یکی از عناصر حیاتی در بافتهای سخت بدن انسان به حساب می‌آید. لذا، ایجاد سطح زبر همراه تشکیل گروههای عاملی دارای فسفر از قبیل یون فسفات سبب بهبود قابلیت زیست فعالی سطح می‌شود [۱]. همچنین، تحقیقات انجام شده، نشان می‌دهد که با انجام تحلیل XPS حضور فلئور ناشی از اسید فلئوریدریک در لایه‌های نانومتری بر روی سطح تیتانیوم، تأیید می‌شود [۱۸]. عنصر فسفر از اجزای اصلی استخوان بوده و حضور آن در



شکل ۴- فعالیت حیاتی/تکثیر سلولهای استخوان ساز بر روی سطوح تیتانیم اصلاح شده و گروه کنترل پس از سه روز کشت.



شکل ۵- فعالیت حیاتی/تکثیر سلولهای استخوان ساز بر روی سطوح تیتانیم اصلاح شده و گروه کنترل پس از ۷ روز کشت.

بر روی سطوح به ترتیب زیر قابل ارائه است.

$$(D > E > C > B > A)$$

پس از هفت روز کشت، میزان تکثیر سلولی بر روی سطوح تیتانیم اصلاح شیمیایی شده اختلاف قابل ملاحظه‌ای را با سطح تیتانیم اصلاح نشده داشت شکل (۵). به طوری که ارزیابیهای آماری نشان می‌دهد، تفاوت‌های معنی‌دار بسیار بالایی بین گروه‌های (D و E) با سطح تیتانیم اصلاح نشده (A) وجود دارد، $n=3$ و $P < 0.001$ است. همچنین بین گروه C نیز این تفاوت قابل ملاحظه بود $n=3$ و $P < 0.001$ است. همان‌طور که ذکر شد، با افزایش زمان تا هفت روز میزان تکثیر سلولی روی تمام سطوح تیتانیم اصلاح شده افزایش یافته و اختلاف قابل ملاحظه‌ای را با گروه کنترل داشته‌اند. لازم به ذکر است، در روز هفتم ترتیب زیر برقرار بوده است.

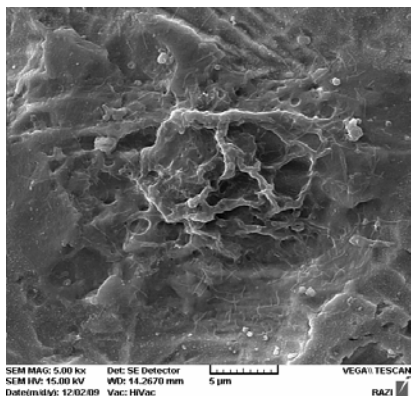
$$(D > E > C > B > A)$$

یونیزاسیون اسید، یونهای فسفات بر اثر ایجاد نیرویهای الکترواستاتیک (نیروهای کولمبی) بین آنها و سطح تیتانیم اصلاح شده هیدروژل‌دار می‌تواند، جذب آن شوند.

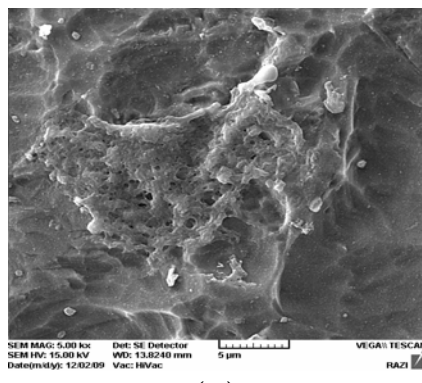
۵-۱- نتایج ارزیابیهای بیولوژیکی

۵-۱-۱- میزان فعالیت حیاتی سلول

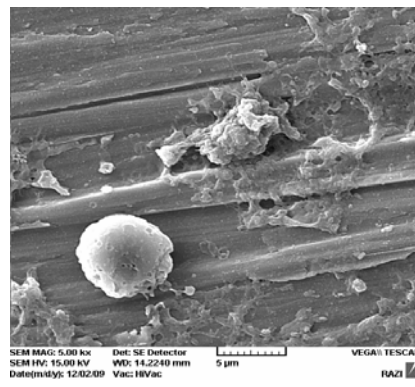
فعالیت حیاتی سلول استخوان ساز (MG-63) به همراه رشد و تکثیر آن بر روی گروه کنترل و سطح تیتانیم اصلاح شیمیایی شده، بررسی شد. لذا در همین راستا، نمودارهای ستونی حاصل از این ارزیابی تهیه شد. نتایج حاصل از تکثیر سلولی در روز سوم نشان داد، شکل (۴)، که تفاوت معنی‌داری بسیار زیادی بین گروه تیتانیم کنترل و نمونه‌های تیتانیم اصلاح شیمیایی شده ایجاد نمی‌شود $n=3$ و $P < 0.05$ است. بر این اساس، میزان تکثیر سلولی در روز سوم



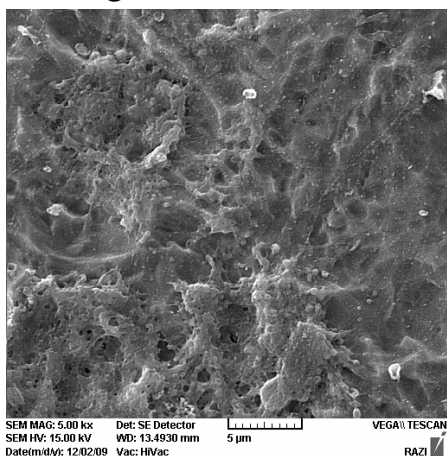
(ج)



(ب)



(الف)



(ه)



(د)

شکل ۶- تصویر میکروسکوپ الکترونی روبشی از نمونه‌های (الف): A (ب): B (ج): C (د): D (ه): E کشت داده شده با سلول MG-63 استخوان ساز در زمان ۳۲ ساعت.

نسبت به گروه‌های تیتانیم اصلاح شده با اسیدهای سه‌تایی نشان می‌داد که نشان از قابلیت محلول اسیدی سه‌تایی در روند فعالیت زیستی تیتانیم دارد.

۵-۱-۲- مورفولوژی سلول

تصاویر مربوط به مورفولوژی سلول (MG-63) بر روی سطوح نمونه‌های تیتانیم در شکل (۶) آمده است. نتایج نشان می‌دهد که سلول استخوانی حالت گسترده و پهن شده بر روی سطح نمونه کنترل (A) دارد. این امر در حالی است که سلول بر روی سطح نمونه‌های اصلاح شده از گستردگی کمتری برخوردار است. اما، دارای ضخامت و چسبندگی بیشتری است. این رفتار از سلولهای استخوان ساز نیز مورد تایید دیگر محققان هم هست [۲۴].

همان‌طوری که از نمودار ستونی مربوط به روز هفتم کشت مشخص است، گروه کنترل نسبت به روز سوم کاهش تکثیر سلولی را بر روی سطح خود نشان می‌دهد و سلولهای استخوان ساز نتوانسته‌اند بر روی سطح تکثیر یابند. این امر در حالی است که تمام سطوح اصلاح شده افزایش تکثیر را با افزایش زمان نشان می‌دهند. نمونه D در روز هفتم نسبت به روز سوم افزایش بیشتر تکثیر سلولی را بر روی سطح خود نشان می‌دهد. بنابراین، نتایج حاصل از تکثیر سلولی نشان داد که اصلاح سطح تیتانیم تاثیر بسزایی را در افزایش این قابلیت دارد. گروه‌های تیتانیم کنترل در تمام زمانهای مورد نظر پایتترین میزان تکثیر سلولی را داشتند. نمونه (B) که با اسید فلئوئوریدریک اصلاح شده بود در روزهای سوم و هفتم مقادیر تکثیر سلولی پایینی را

۵-۱-۳- ارتباط زبری سطح با چسبندگی و تکثیر سلولی

با بررسی نتایج مربوط به چسبندگی و تکثیر سلولی، تعیین شد که نمونه‌ی E که دارای بالاترین زبری سطح (R.M.S) است از چسبندگی و تکثیر سلولی قابل توجهی بر روی خود برخوردار است. این موضوع توسط تحقیقات دیگر محققان نیز تأیید شده که نشان داده‌اند زبری سطح نقش فوق‌العاده مهمی در تکثیر سلولی دارد [۲۳]. از طرفی بایستی به گستردگی حفرات بر روی سطح تیتانیم ناشی از تغییرات غلظت محلول اسیدی اشاره کرد. این مطلب در نمونه D که بیشترین گستردگی را از نظر حفره‌های سطحی داشته (۵/۰ تا ۷ میکرون)، از تکثیر سلولی قابل ملاحظه‌ای برخوردار است. این امر در حالی است که در تحقیقات دیگر مورفولوژی‌های سطحی با اندازه‌های حفرات ۶ تا ۱۰ میکرون و یا ۵/۰ تا ۲ میکرون را به عنوان سطحی ایدئال از تکثیر سلولی در نظر گرفته بوده‌اند [۲۲ و ۲۳]. نمونه اصلاح شده با اسید فلئوئوریدریک منفرد از نظر قابلیت تکثیر سلولی ضعیفتر از محلولهای اسیدی متشکل از اسیدهای سه‌تایی بوده است که می‌توان به نقش دو اسید دیگر در بهبود این قابلیت اشاره کرد. در تمام حالت‌های فوق سطح تیتانیم کنترل از نظر رشد و تکثیر و چسبندگی سلول در مقایسه با سطوح اصلاح شده بسیار ضعیف عمل کرده است.

پروتئین‌هایی مانند فیبرونکتین که سبب چسبندگی سلول به سطح ماده کاشتنی می‌شوند، به‌طور زیادی به زبری سطح در مقیاس نانو وابسته‌اند و مورفولوژی سلول را تحت تاثیر قرار می‌دهند [۲۵]. البته در تحقیقات دیگری که هدف آنها اصلاح سطح تیتانیم بوده و از روش‌های دیگر برای بهبود زیست‌فعال شدن سطح تیتانیم استفاده شده تفاوت‌های معنی‌داری را بین نمونه کنترل و سطوح اصلاح شده نمی‌توان قائل

واژه نامه

- | | | |
|--------------------------------------|---|---------------------------------|
| 1. Kobe Steel Japan | 4. dimethylthiazol diphenyl tetrazolium bromide | teknika, netherland |
| 2. Dulbecco, s modified egels medium | 5. elisa-reader, organon- | 6. scanning electron microscopy |
| 3. fetal calf serum | | 7. Anova |

شد [۱۵]. بنابراین، با توجه به نتایج به‌دست آمده مشخص می‌شود که اصلاح سطح تیتانیم با محلول‌های اسیدی سه‌تایی ($HCL-HF-H_3PO_4$) روشی مفید برای بهبود کارایی تیتانیم در کاربردهای پزشکی و دندانپزشکی است.

۶- نتیجه گیری

محلول اسیدی متشکل از اسیدهای سه‌تایی ($HCL-HF-H_3PO_4$) منجر به ایجاد حفره‌های در مقیاس میکرون بر روی سطح تیتانیم می‌شود. اسید HF در بروز میکرو-نانو حفره بسیار موثر است. همچنین مورفولوژی سطح را به شدت تغییر می‌دهد. به‌علاوه، حضور اسید کلریدریک و اسید فسفریک با غلظت‌های متفاوت در محلول اسیدی سه‌تایی از اسیدهای فوق تاثیر قابل توجهی را در اندازه و شکل حفره‌های داشتند. به‌طور کلی، ارزیابی‌های کشت سلولی نشان می‌دهد که استفاده از محلول اسیدی سه‌تایی باعث افزایش قابلیت سطح تیتانیم در چسبندگی و تکثیر سلولی می‌شود. بنابراین، استفاده از روش شیمیایی با محلول‌های اسیدی سه‌تایی ذکر شده در بالا روشی آسان در زیست‌فعال کردن سطح تیتانیم می‌تواند، باشد. بدین ترتیب می‌توان از نتایج حاصل از کشت سلولی، برای ارزیابی قابلیت کاربردی مواد زیست‌فعال در شرایط واقعی در داخل بدن استفاده کرد.

تقدیر و تشکر

نویسندگان مقاله بر خود لازم می‌دانند که: از دانشگاه سمنان و گروه پژوهشی بایونانو مواد زیست‌فعال این دانشگاه به دلیل حمایت از تحقیق و پژوهش حاضر تقدیر و تشکر خود را اعلام دارند.

1. Yousefpour, M., Afshar, A., Chen, J., and Xingdong Z., "Bioactive Layer Formation on Alkaline-Acid Treated Titanium in Simulated Body Fluid," *Materials and Design*, Vol. 28, pp. 2154–2159, 2007.
2. Jonasova, L., Muller, F.A., Helebrant, A., Strand J., and Greil P., "Biomimetic Apatite Formation on Chemically Treated Titanium," *Biomaterials*, Vol. 25, pp. 1187–1194, 2004.
3. Kokubo, T., Matsushita T., Takadama H., and Kizuki T., "Development of Bioactive Materials Based on Surface Chemistry," *Journal of the European Ceramic Society*, JECS-7282; No. of Pages 8, 2008.
4. Yousefpour, M., Afshar, A., Yang, X., Li X., Yang, A., Wu, Y., Chen, J., and Zhang, X., "Nano-Crystalline Growth of Electrochemically Deposited Apatite Coating on Pure Titanium," *Journal of Electroanalytical Chemistry*, Vol. 589, pp. 96–105, 2006.
5. Liu, X., Poon, R. W.Y., Kwok, S.C.H., and Chu, P.K., "Chuanxian Ding, Plasma Surface Modification of Titanium for Hard Tissue Replacements," *Surface & Coatings Technology*, Vol. 186, pp. 227– 233, 2004.
6. Yousefpour, M., Afshar, A., Chen, J., and Zhang, X., "Electrophoretic Deposition of Porous Hydroxyapatite Coatings using Polyterafluoroethylene Particles as Templates," *Materials Science and Engineering (C)*, Vol. 27 (5-8), pp. 1482-1487, 2007.
7. Liu, X., Chu, P.K., and Ding, C., "Surface Modification of Titanium, Titanium Alloys, and Related Materials for Biomedical Applications," *Materials Science and Engineering R*, Vol. 47, pp. 49–121, 2004.
8. Mohsin H.M., and Gao W., "How is the Surface Treatments Influence on the Roughness of Biocompatibility?," *Trends Biomater. Artif. Organs*, Vol. 22(3), pp: 140-153, 2008.
9. Vanzillotta, P. S., Sader, M.S., Bastos, I.N., and Soares, G.D.A., "Improvement of in Vitro Titanium Bioactivity by three Different Surface Treatments," *Dental Materials*, Vol. 22, pp. 275–282, 2006.
10. Kim, H.W., Koh, Y.H., Li, L.H., Lee, S., and Kim H.E., "Hydroxyapatite coating on Titanium Substrate with Titania Buffer Layer Processed by Sol-Gel Method," *Biomaterials*, Vol. 25, pp. 2533–2538, 2004.
11. Advincula, M. C., Rahemtulla, F. G., Advincula, R. C., Ada, E.T., Lemons, J.E., and Bellis, S.L., "Osteoblast Adhesion and Matrix Mineralization on Sol-Gel-Derived Titanium Oxide," *Biomaterials*, Vol. 27, pp. 2201–2212, 2006.
12. Takeuchi, M., Abe, Y., Yoshida, Y., Nakayama, Y., Okazaki, M., and Akagawa, Y., "Acid Pretreatment of Titanium Implants," *Biomaterials*, Vol. 24, pp. 1821–1827, 2003.
13. Trtica, M., Gakovic, B., Batani, D., Desai, T., Panjan, P., Radak, B., "Surface Modifications of a Titanium Implant by a Picosecond Nd:YAG Laser Operating at 1064 and 532 nm," *Applied Surface Science*, Vol. 253, pp. 2551–2556, 2006.
14. Takemoto, M., Fujibayashia, S., Neo, M., Suzuki, J., Matsushita, T., Kokubo, T., and Nakamura, T., "Osteoinductive Porous Titanium Implants: Effect of Sodium Removal by Dilute HCl Treatment," *Biomaterials*, Vol. 27, pp. 2682–2691, 2006.
15. Soares, S.A., dos, S.E.A., Soares S.M., Felipe A.M., and de A. S. G., "Response of Osteoblastic Cells to Titanium Submitted to three Different Surface Treatments," *Braz Oral Res*, Vol. 19(3), pp. 203-8, 2005.
16. Jayaraman M., Meyer U., uhner B.M., Joos U., and Wiesmann H.P., "Influence of Titanium Surfaces on Attachment of Osteoblast-Like Cells in Vitro," *Biomaterials*, Vol. 25, pp. 625–631, 2004.
17. American Society for Testing and materials, F67-89, p. 39. 1992.
18. Lamolle, S. F., Monjo, M., Rubert, M., Haugen, H.J., Lyngstadaas, S.P., and Ellingsen, J.E., "The Effect of Hydrofluoric Acid Treatment of Titanium Surface on Nanostructural and Chemical Changes and the Growth of MC3T3-E1cells," *Biomaterials*, Vol. 30, pp. 736–742, 2009.
19. Montanaro, L., Arciola, C.R., Campoccia, D., and Cervellati, M., "In Vitro Effects on MG63 Osteoblast-Like Cells Following contact with Two Roughness-Differing Fluorohydroxyapatite-Coated Titanium Alloys," *Biomaterials*, Vol. 23, pp. 3651–3659, 2002.
20. Soares, S.A., Dos, S.E.A., Soares, S.M., Felipe, A.M., and De, A.S.G., "Response of Osteoblastic Cells to Titanium Submitted to three Different Surface Treatments," *Braz Oral Res*, Vol. 19(3), pp. 203-8, 2005.
۲۱. شکر گزار، م.ع.، زالی، ح.، رضایی طاویرانی، م.، و امان زاده، ا.، "مقایسه دو روش رنگ سنجی MTT و تریپان بلو در تعیین سیتوتوکسیسیته کال پروتکتین بر سلولهای سرطانی معده انسان در شرایط آزمایشگاهی،" *مجله پزشکی کوثر*، سال ۱۲، شماره ۲، ص ۱۳۷–۱۲۷، تابستان ۱۳۸۶.
22. Juodzbalys, G., Sapragnoniene, M., and Wennerberg, A., "New Acid Etched Titanium Dental Implant Surface," *Stomatologija, Baltic Dental and Maxillofacial Journal*, Vol. 5, pp. 101-105, 2003.
23. Guehennec, L.L., Soueidan, A., Layrolle, P., and Amouriq, Y., "Surface Treatments of Titanium Dental Implants for Rapid Osseointegration," *Dental Materials*, Vol. 23, pp. 844–854, 2007.

24. Guehenec, L.L., Lopez, H., Marco, A., Enkel, B., Weiss, P., Amouriq, Y., and Layrolle, P., "Osteoblastic Cell Behaviour on Different Titanium Implant Surfaces," *Acta Biomaterialia*, Vol. 4, pp. 535–543, 2008.
25. Mendonca, G., Mendonca, D.B.S., Aragao, F.J.L., and Cooper, L.F., "Advancing Dental Implant Surface Technology – From Micron to Nanotopography," *Biomaterials*, Vol. 29, pp. 3822–3835, 2008.