

# ارزیابی رفتار خوردگی، زیست فعالی و سمیت سلولی پوشش نانوساختار هاردستونیت روی زیر لایه تیتانیوم

رسول عسگریان

علی دوست محمدی

دانشکده مواد، دانشگاه آزاد نجف آباد

گروه مهندسی مواد، دانشکده فنی مهندسی، دانشگاه شهرکرد

( دریافت مقاله ۹۴/۰۳/۲۰ - پذیرش مقاله : ۹۵/۰۲/۱۱ )

## چکیده

هدف از این پژوهش، اعمال پوشش هاردستونایت ( $\text{Ca}_2\text{ZnSi}_2\text{O}_7$ ) به روش لایه نشانی الکتروفوریتیک روی زیر لایه تیتانیومی (Ti-6Al-4V) بود. ابتدا هاردستونایت به روش سل-ژل تهیه گردید. ساختار، شکل و آنالیز عنصری پودر تولید شده، به کمک میکروسکوپ الکترونی روبشی (SEM)، میکروسکوپ الکترونی عبوری (TEM)، پراش پرتو ایکس (XRD) و طیف سنج توزیع انرژی پرتو ایکس (EDAX) بررسی شد. سمیت نانوذرات نیز به روش MTT بررسی گردید. پوشش دهی زیرلایه تیتانیومی به روش الکتروفوریتیک و در محلول متانول انجام شد. نمونه های پوشش داده شده به کمک میکروسکوپ الکترونی روبشی بررسی شد. جهت بررسی قابلیت تشکیل آپاتیت روی پوشش، نمونه ها در محلول شبیه سازی شده بدن (SBF) غوطه ور شدند و تشکیل آپاتیت بر روی آن ها توسط میکروسکوپ الکترونی مورد بررسی قرار گرفت. جهت بررسی مقاومت خوردگی پوشش ها از آزمون پلاریزاسیون تافل استفاده شد. آزمون غوطه وری حاکی از زیست فعالی نمونه ها در محلول شبیه سازی شده بدن بود. بررسی نتایج آزمون تافل نشان داد که مقاومت در برابر خوردگی نمونه دو بار پوشش داده شده با ولتاژ ۵۰، در مقایسه با زیر لایه تیتانیومی بدون پوشش افزایش یافته است. نتایج آزمون سمیت سنجی سلولی نیز، عدم سمیت نانوذرات هاردستونایت و زیستایی سلول های بنیادی مغز استخوان را تأیید کرد. نتایج به دست آمده در این پژوهش نشان داد که پوشش هاردستونایت به روش الکتروفوریتیک روی زیر لایه تیتانیومی قابل اعمال است. همچنین رفتار خوردگی و زیستی زیرلایه پوشش داده بهبود خواهد یافت و هاردستونیت می تواند به عنوان یک پوشش بیوسرامیکی نوین مورد توجه قرار گیرد.

واژه های کلیدی: هاردستونیت، پوشش دهی الکتروفوریتیک، رفتار خوردگی، زیرلایه تیتانیومی، سمیت سلولی.

## Evaluation of Corrosion Behavior, Bioactivity and Cytotoxicity of Nanostructured Hardystonite Coating on Ti-6Al-4V Substrate

R. Asgarian

Department of Materials Engineering, Azad University of Najaf Abad

A. Doost-Mohammadi

Department of Materials Science and Engineering, Faculty of Engineering, University of Shahrekord

(Received 10 June 2015, accepted 30 April 2016)

### Abstract

In this study, Hardystonite powders were coated on Ti-6Al-4V alloy using electrophoretic deposition (EPD). Hardystonite was made by sol-gel technique. Structure, morphology and elemental analysis of produced Hardystonite were investigated by X-ray diffraction (XRD), scanning electron microscopy (SEM) and energy dispersive spectroscopy (EDS). Cytotoxicity of Hardystonite nanoparticles was investigated (MTT assay). Nano Hardystonite powder was electrophoretically deposited on titanium substrates. The coated samples were observed by SEM. In order to investigate bioactivity, coated substrates were immersed in simulated body fluid (SBF) for 7, 14 and 21 days. Scanning electron microscope (SEM) was used to study structure and morphology of layer before and after immersing in simulated body fluid (SBF). Tafel polarization test was used to evaluate the corrosion and protection properties of coatings. The bioactivity of the coating was confirmed using immersion test. The tafel results showed that the corrosion resistance of substrate increases by Hardystonite coating. The results of MTT assay confirmed the cell compatibility of hardystonite nanoparticles. The obtained results of this research showed that Hardystonite can be coated on Ti substrate using electrophoretic deposition. Also, corrosion behavior and biological properties of Ti substrate is improved and Hardystonite Coating can be used as a novel bioceramic coating.

**Keywords:** Hardystonite, Electrophoretic deposition, Corrosion behavior, Ti-6Al-4V substrate, Cytotoxicity.

**E-mail of corresponding author:** Alidstm@gmail.com.

## مقدمه

گیرند تا مقاومت خوردگی را افزایش دهند و در برخی از موارد برای ایجاد سطحی جدید که خواص ایمپلنت را ارائه دهد و کاملاً متفاوت با وسیله بدون پوشش باشد به کار رفته است [۲،۷].

ترکیب هیدروکسی آپاتیت اولین ماده ای بود که به دلیل شباهت آن به بخش معدنی ساختار استخوان و دندان برای پوشش دادن ایمپلنت های فلزی مورد استفاده قرار گرفت و با وجود پاسخ نسبتاً خوب بافت به سطوح ایمپلنت فلزی مثل لایه اکسید تیتانیوم رویین موجود بر تیتانیوم، می توان با پوشش دادن هیدروکسی آپاتیت بر روی ایمپلنت بدن، سطحی فراهم ساخت که برای تشکیل استخوان ویا برقراری پیوند با ایمپلنت مناسب باشد.

یکی از دلایل استفاده از پوشش هیدروکسی آپاتیت یا کلسیم دارهای مشابه، ایجاد پایداری و تثبیت سریع تر کاشتنی در استخوان اطراف آن است. برای مثال در مورد یک ایمپلنت دندانی، زمان التیام و درمان کوتاه تر می شود و پروتز یا عضو مصنوعی چسبنده را می توان سریعتر در محل خود قرار داد و دلیل دیگر طولانی تر کردن عمر، دوام و عمل عضو مصنوعی است [۸،۹].

علت کند شدن رشد استخوانها و برخی عیوب رایج در بافت سخت انسانها و حیوانات کمبود روی (Zn) بوده است. مطالعات نشان داده اند که عنصر روی نقش فیزیولوژیکی در رشد و معدنی شدن بافت استخوان دارد. مقدار روی با افزایش سن تحلیل رفته و بار استخوان بتدریج کاهش می یابد. نتایج نشان داده است که بیومواد حاوی روی می توانند فعالیت سلولهای استخوان ساز را تحریک کرده و تشکیل استخوانهای جدید را نیز آسان کنند.

مطالعات قبلی نشان داده است که سرامیکها، شیشه های زیست فعال و شیشه سرامیک های حاوی سیلیسیم و کلسیم خواص زیستی بسیار خوبی دارند. سرامیک های کلسیم-فسفاتی شامل روی به هدایت استخوانی (Osteoconductivity) کمک کرده و تاثیر مناسب بر

طی سه دهه اخیر، تحولی اساسی در استفاده و کاربرد سرامیک ها به منظور بهبود کیفی عمر بشر پدید آمد و توسعه و گسترش طراحی و ساخت بیو سرامیک ها برای درمان بیماری و باز سازی صدمات وارد به بدن و ترمیم اعضا به وقوع پیوست. اغلب کاربردهای کیلینیکی بیوسرامیک ها مرتبط با سیستم اسکلت بدن، استخوان، دندان ها، مفاصل و بازسازی یا بسط و افزایش بافت نرم و سخت بدن است [۱].

بیوسرامیک ها در انواع شکل ها یا فازهای مختلف تولید می شوند و عملکرد متفاوتی در ترمیم بدن ارائه می کنند. در بسیاری از کاربرد ها، سرامیک ها به شکل ماده ای تکه ای با شکل ویژه مصرف می شوند که به آن ها ایمپلنت یا کاشتنی، عضو مصنوعی و یا وسایل اندام مصنوعی گفته می شود [۲]. بیوسرامیک ها گاهی به صورت پودر برای پر کردن فضای و جای خالی به کار می روند تا فرایندهای طبیعی عمل را حفظ کنند و برخی از اوقات به صورت پوشش بر روی یک زیر لایه فلزی کاشتنی یا به صورت فاز ثانویه در یک کامپوزیت دندانی مورد استفاده قرار می گیرند تا خواص هر دو ماده تلفیق شود و ماده جدیدی با خواص مکانیکی بالاتر و خواص شیمیایی-زیستی بهتری فراهم شود [۳،۴].

از آنجا که خواص مکانیکی بیوسرامیک ها محدود است، نباید آن ها را تحت اعمال بار قرار داد و فقط بار گذاری فشاری بر آن ها مجاز است. از طرف دیگر، به منظور تأمین استحکام زیاد مورد نیاز برای ایمپلنت های بدن، این امکان وجود دارد که آلیاژهای فلزی را با پوشش های بیوسرامیکی مثل کلسیم فسفات یا هیدروکسی آپاتیت پوشش داد. توانایی چنین پوشش هایی در برقراری پیوند با استخوان می تواند به نصب و تثبیت پروتزهای شکسته بندی و ایمپلنت های دندانی کمک کند [۵،۶].

پوشش های بیوسرامیکی به منظور اصلاح سطح کاشتنی های بدن بر روی زیر لایه های فلزی مورد استفاده قرار می

ساعت همزده شد و سل حاصل در دمای ۶۰ درجه سانتی -  
 گراد به مدت ۱ روز و در دمای ۱۲۰ درجه سانتی گراد به  
 مدت ۲ روز خشک شد. ژل بدست آمده، در دمای ۱۲۰۰  
 درجه سانتی گراد و به مدت ۳ ساعت تف جوشی شد و  
 پودر نهایی هاردستونایت با اندازه ذرات نانومتری حاصل  
 گردید [۱۰].

ساختار فازی هاردستونیت به کمک آزمون پراش پرتو  
 ایکس (XRD) به منظور تأیید ساختار کریستالی، مورد  
 ارزیابی قرار گرفت [۱۱]. به منظور بررسی شکل و ظاهر  
 ذرات تولید شده و برآورد نسبی از میزان اندازه آن‌ها، از  
 میکروسکوپ الکترونی روبشی (SEM) (SUPRA 40 )  
 (VP FE-SEM, Carl Zeiss AG, Germany) استفاده  
 شد. به منظور بررسی اندازه و شکل ذرات پودر تولید شده  
 نیز، از میکروسکوپ الکترونی عبوری (TEM) (CM200-  
 FEG-Philips)، بهره گرفته شد.

جهت لایه نشانی هاردستونایت از زیرلایه های تیتانیومی  
 (Ti-6Al-4V) به ابعاد  $2\text{cm} \times 1\text{cm} \times 3\text{mm}$  استفاده  
 گردید. نمونه‌های مورد نظر جهت چسبندگی بهتر بوسیله  
 روش‌های آماده‌سازی سطح آماده گردید. سطح نمونه‌ها به  
 ترتیب با سمباده‌های ۶۰، ۱۰۰، ۲۲۰، ۴۰۰ و ۶۰۰ آماده  
 سازی شد و سپس نمونه‌ها جهت چربی زدایی و شستشو  
 به صورت فراصوتی، با محلول استون به مدت ۱۰ دقیقه در  
 دستگاه شستشوی فراصوتی قرار گرفتند. پس از اتمام  
 شستشو، نمونه‌ها بوسیله ششوار خشک شدند. پوشش  
 دهی به روش الکتروفوریتیک انجام شد. برای تولید  
 سوسپانسیون هاردستونایت برای پوشش دهی از متانول  
 ( $\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$ , Merck) به عنوان حلال استفاده شد.  $70\text{ cc}$   
 از حلال مورد استفاده را درون بشر ریخته و سپس در حین  
 هم خوردن ۳ گرم هاردستونایت به حلال اضافه گردید.  
 سپس محلول به مدت ۲۴ ساعت روی هم زن در دمای  
 اتاق قرار گرفت تا تا سوسپانسیون به یکنواختی مطلوبی  
 برسد. سوسپانسیون حاصل به مدت ۳۰ دقیقه درون همزن  
 فراصوت قرار داده شد. از دستگاه الکتروفوریتیک جهت

افزایش سرعت تشکیل استخوان دارند. هاردستونایت  
 ( $\text{Hardystonite}$ ,  $\text{Ca}_2\text{ZnSi}_2\text{O}_7$ ) یک ترکیب سرامیکی  
 سیلیکاتی دارای روی است. از این رو به نظر می‌رسد  
 خواص و عملکرد مناسبی در ترمیم بافت سخت بدن  
 داشته باشد.

رسوب دهی الکتروفوریتیک (Electrophoretic deposition  
 EPD) یکی از فرآیندهای کلوییدی در تولید و پوشش  
 دهی سرامیک‌ها است. مزایای استفاده از آن زمان پوشش  
 دهی کوتاه، سهولت روش و عدم محدودیت شکل زیرلایه  
 است. در مقایسه با سایر روش‌های پوشش دهی، فرآیند  
 EPD پیشرفته تر و بسیار متنوع است و از آن می‌توان به  
 راحتی استفاده کرد و به همین دلایل این روش مورد توجه  
 پژوهشگران قرار گرفته است. در این پژوهش ضمن  
 ساخت و تهیه نانوبیوسرامیک هاردیستونایت، پوشش دهی  
 آن به روش الکتروفوریتیک بر روی زیرلایه تیتانیومی انجام  
 گرفت و رفتار خوردگی زیرلایه ارزیابی گردید.

#### مواد و روش تحقیق

نانوذرات بیوسرامیک هاردستونایت به کمک روش سل-ژل  
 تهیه شد. در این روش نیترات کلسیم  
 چهارآبه ( $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ )، نیترات روی شش  
 آبه ( $\text{Zn}(\text{NO}_3)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ )، اسیدنیتریک ( $\text{HNO}_3$ )، تترااتیل  
 اورتوسیلیکات ( $(\text{C}_2\text{H}_5\text{O})_4\text{Si}$ , TEOS) و آب دوبار تقطیر  
 به عنوان مواد اولیه مورد استفاده قرار گرفت.

برای تهیه نانوذرات هاردستونایت، اسیدنیتریک و آب مقطر  
 به همراه تترااتیل اورتوسیلیکات به مدت ۳۰ دقیقه در  
 همزن مغناطیسی با سرعت ۱۰۰ دور در دقیقه مخلوط  
 شدند و عمل هیدرولیز انجام شد. در این مرحله واکنش  
 هیدرولیز باعث جایگزین شدن گروه‌های الکوکسید با گروه  
 های هیدروکسیل می‌شود و باندهای Si-O-Si در حین  
 فرآیند متراکم شدن بعدی شکل می‌گیرند. سپس نیترات  
 کلسیم و نیترات روی با فاصله زمانی ۷ دقیقه به آن اضافه  
 شد. جهت کامل شدن واکنش هیدرولیز، محلول به مدت ۵

رویشی Hitachi S4160 (Cold Field Emission) استفاده شد.

به منظور ارزیابی رفتار خوردگی، آزمون الکتروشیمیایی تافل بر روی نمونه‌های پوشش داده شده در محلول نمک (۳ درصد NaCl) انجام شد. نمونه‌ها عنوان الکترو د کاری و الکترو د کالومل اشباع و الکترو د پلاتینی به عنوان الکترو د های مرجع و شمارنده جهت تکمیل مدار و انجام آزمایش به کار گرفته شدند. برای تنظیم دما از سیستم گرمایشی شامل المنت حرارتی و ترمومتر استفاده گردید. از دستگاه پتانسیواستات-گالوانواستات IVIUMSTAT جهت انجام آزمون استفاده شد. از نرم افزار اجرایی IVIUMSOFT نیز جهت اندازه گیری های الکتروشیمیایی به روش پلاریزاسیون الکتروشیمیایی استفاده شد. پس از حصول نمودارهای پلاریزاسیون کاتدی و آندی برای هر نمونه، پتانسیل خوردگی آن مشخص شد و مقدار چگالی جریان خوردگی نیز به روش برون یابی تافل تعیین گردید. سپس مقدار میانگین چگالی جریان خوردگی مربوط به هر گروه از نتایج محاسبه شد.

برای بررسی سمیت سنجی پودر هاردستونایت از روش MTT استفاده شد. ابتدا نانوذرات هاردستونایت به کمک دستگاه اتوکلاو استریل شدند، تعداد ۱۰۰۰ سلول (سلول بنیادی مغز استخوان) در هر خانه پلیت ۲۴ چاهکی در شرایط استاندارد در انکوباتور کشت داده شد و سپس غلظت های ۵، ۵۰، ۱۰۰ و ۲۰۰ میکروگرم در میلی لیتر از پودر هاردستونایت در DMEM تهیه شد. محیط کشت سلول ها یک روز در میان تعویض شد. سلول های بنیادی با دانسیته ی اولیه ی  $10^3 \times 5$  در هر چاهک از پلیت ۲۴ چاهکی در DMEM حاوی ذرات کشت داده شدند. بعد از گذشت ۲۴، ۷۲ و ۹۶ ساعت از زمان کشت، زیستایی سلول های بنیادی توسط آزمون MTT ارزیابی شد. در هر نقطه ی زمانی، ۵۰ میکرو لیتر از محلول MTT (۵ میلی گرم در میلی لیتر در DMEM) به هر چاهک اضافه شد. پس از سپری شدن هر دوره زمانی، محیط رویی هر چاهک تخلیه و به منظور انحلال بلورهای فورمازان ۲۰۰ میکرو لیتر دی متیل سولفوکسید به آن ها اضافه و به مدت ۲ ساعت در

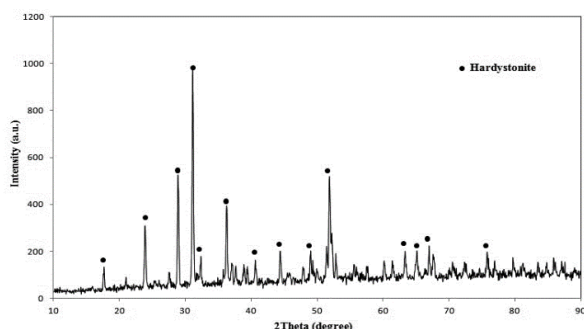
پوشش دهی نمونه های تیتانیومی (Ti-6Al-4V) استفاده شد. در حین پوشش دهی، آند در ۱ سانتی متری کاتد قرار گرفت. زمان پوشش دهی نمونه ها ۳ دقیقه و ولتاژ پوشش دهی ۳۰ و ۵۰ ولت انتخاب گردید تا یک پوشش با ضخامت مناسب حاصل شود. سپس زیر لایه های پوشش داده شده به منظور افزایش چسبندگی پوشش به زیر لایه، در دمای ۸۰۰ درجه سانتی گراد به مدت ۲ ساعت در کوره تف جوشی شد.

به منظور بررسی قابلیت و توانایی پوشش بیوسرامیکی هاردستونایت در تشکیل آپاتیت، از آزمون غوطه وری در محلول شبیه سازی شده بدن (SBF) استفاده شد. نمونه ها قبل از قرار گرفتن در محلول شبیه سازی شده بدن آماده - سازی شد. مساحت ۱ سانتی متر مربع از هر نمونه در نظر گرفته شد و بقیه نمونه با لاک به صورت کامل پوشانده شد تا در تماس با محلول شبیه سازی شده بدن نباشند و مساحت موثر برای تاثیر بر این آزمون مشخص باشد. در هر ظرف ابتدا زیر لایه پوشش داده شده قرار داده شد و سپس حجم مشخصی از محلول شبیه سازی شده بدن به آن افزوده شد. این حجم با توجه به رابطه زیر که توسط کوکوبو و تاکاداما ارائه شده است، مشخص می شود:

$$V_s = \frac{S_a}{10}$$

که در این رابطه  $V_s$  حجم محلول شبیه سازی شده بدن بر حسب میلی لیتر و  $S_a$  مساحت سطح پوشش بر حسب میلی متر مربع است. برای پوشش، حجم مایع شبیه سازی شده بدن بایستی بیشتر از  $V_s$  محاسبه شده باشد. در اینجا حدود ۱۰ میلی لیتر از محلول شبیه سازی شده بدن به هر ظرف اضافه شد. پس از مسدود کردن درب ظروف با درپوش پلاستیکی، ظروف در حمام آب گرم با دمای ثابت  $37 \pm 0.1$  درجه سانتی گراد قرار گرفتند. تمامی نمونه ها پس از ۷، ۱۴ و ۲۱ روز از محلول خارج شدند و سپس پوشش ها ابتدا با آب مقطر شستشو داده شدند و در دمای محیط به مدت ۲۴ ساعت خشک شدند. جهت بررسی کیفیت پوشش اعمال شده و مشاهده ی شکل و ساختار پوشش تشکیل شده قبل و بعد از قرار گیری در محلول شبیه سازی شده بدن (SBF) از میکروسکوپ الکترونی

[۱۳، ۱۰]. آنالیز عنصری هاردستونایت در جدول ۱ و همچنین شکل ۳ نشان داده شده است. این نتایج وجود عناصر اصلی روی (Zn)، سیلیسیم (Si) و کلسیم (Ca) در



شکل ۱. الگوی پراش پرتو ایکس هاردستونایت.

هاردستونایت را با مقادیر مورد نظر در ترکیب نهایی اثبات نمود. اندازه و شکل ذرات بیوسرامیک حاصل از فرایند سل-ژل در تشکیل پوششی همگن و یکنواخت مؤثر است. نتایج بررسی اندازه و شکل ذرات پودر تولید شده، به کمک میکروسکوپ الکترونی عبوری (TEM) در شکل ۴ آورده شده است. اندازه نانومتری ذرات به خوبی در شکل دیده می شود. شکل و محدوده اندازه ذرات (کمتر از ۱۰۰ نانومتر) با نتایج سایر پژوهشگران نیز مطابقت دارد [۱۴]. تولید نانوذرات هاردستونایت صرف نظر از فوایدی که در تشکیل پوشش همگن دارد، از جهات دیگر نیز حائز اهمیت است. در بسیاری از موارد نیاز به انحلال پودر سرامیک در محلول های دیگر نظیر سل سیلیکا به منظور پوشش دهی به روش سل-ژل است. برخی محققین به منظور پوشش دهی شیشه زیست فعال بر روی زیر لایه فلزی از این روش بهره گرفته اند [۱۵]. در این روش پودر بیوسرامیک در اندازه های بزرگ تر از ۱۰۰ نانومتر در محلول مورد نظر غیر قابل حل بوده و حتی در مقادیر بسیار ناچیز نیز امکان انحلال آن وجود نخواهد داشت.

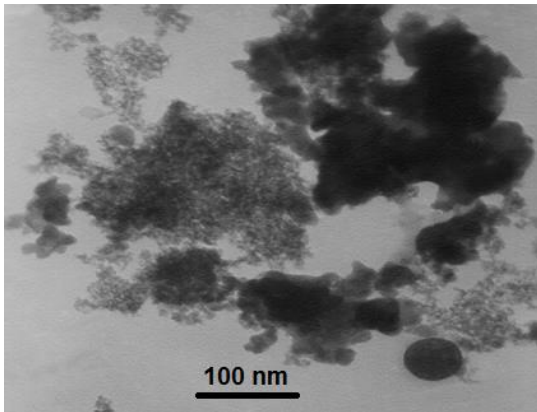
دمای اتاق در تاریکی قرار داده شد. دانسیته‌ی نوری در طول موج ۵۷۰ نانومتر به روش اسپکترومتری خوانده تخلیه و به منظور انحلال بلورهای فورمازان ۲۰۰ میکرولیتر دی متیل سولفوکسید به آن‌ها اضافه و به مدت ۲ ساعت در دمای اتاق در تاریکی قرار داده شد. دانسیته نوری در طول موج ۵۷۰ نانومتر به روش اسپکترومتری خوانده شد. فرآیند مشابهی برای نمونه حاوی سلول‌های بنیادی بدون نانوذرات هاردستونایت به عنوان نمونه کنترل انجام گرفت.

تمامی آزمون‌ها برای حداقل سه نمونه انجام گرفت ( $n=3$ ) و تمامی نتایج به صورت میانگین و انحراف از معیار ارائه شد و روش آنالیز واریانس یک طرفه (ANOVA) برای مقایسه نتایج استفاده گردید. مقدار (p-value) در مقادیر کمتر از ۰/۰۵ از نظر آماری معنی دار تلقی شد.

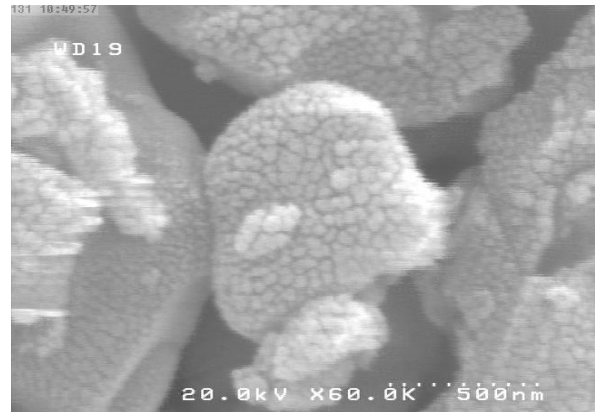
## نتایج و بحث

(شکل ۱) نتایج ارزیابی ساختار فازی هاردستونایت به کمک آزمون پراش پرتو اشعه ایکس نشان می دهد. در شکل، فقط پیک‌های فاز هاردستونایت وجود دارد که نشان از تشکیل فاز خالص و کاملاً کریستالی هاردستونایت دارد. قوی‌ترین پیک هاردستونایت در حدود  $2\theta=31^\circ$  مشاهده شده است.

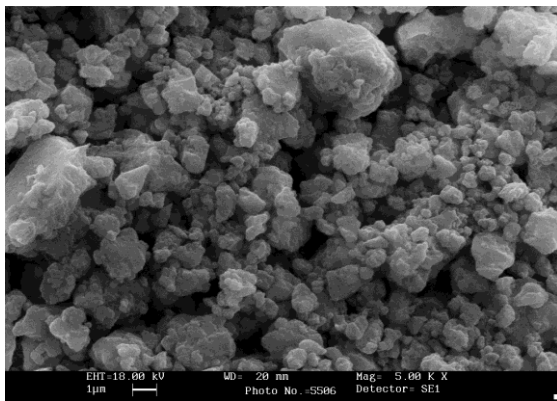
تصاویر گرفته شده به کمک میکروسکوپ الکترونی روبشی، شکل و اندازه ذرات سرامیک‌های هاردستونایت را (شکل ۲) نشان می دهد. شکل ۲ نشان می دهد که نانوذرات در ابعاد بسیار کوچک ( $<70\text{ nm}$ ) و یا آگلومره‌های درشت شکل گرفته‌اند که با نتایج مطالعات پیشین نیز تطابق دارد [۱۲، ۱]. حصول این شکل و اندازه برای ذرات هاردستونایت به دلیل روش تهیه این ذرات (روش سل-ژل) است [۱۲] و با نتایج سایر پژوهشگران تطابق دارد



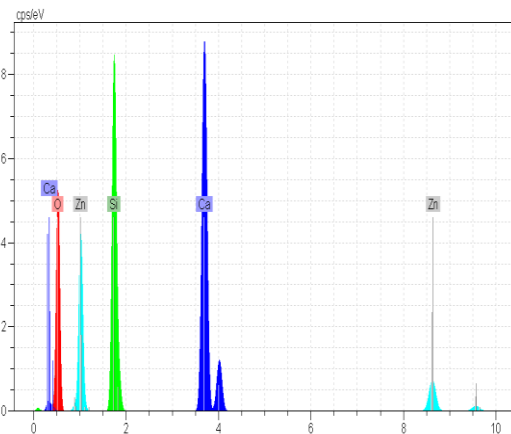
شکل ۴. تصویر گرفته شده به کمک میکروسکوپ الکترونی عبوری (TEM) از نانو ذرات هاردستونایت.



شکل ۲. تصویر گرفته شده به کمک میکروسکوپ الکترونی روبشی از شکل و اندازه ذرات هاردستونایت.



شکل ۵. تصویر گرفته شده به کمک میکروسکوپ الکترونی روبشی SEM مربوط به پوشش هاردستونایت، عملیات حرارتی شده در دمای ۸۰۰ درجه سانتی-گراد با بزرگنمایی ۵۰۰۰ برابر.



شکل ۳. آنالیز عنصری هاردستونایت، اندازه گیری شده به کمک طیف سنجی توزیع انرژی پرتو ایکس.

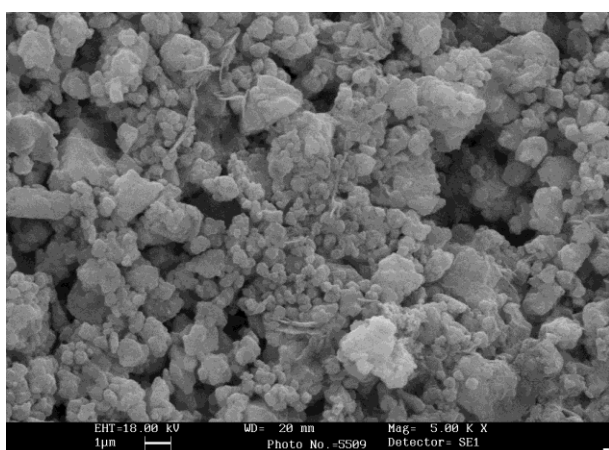
جدول ۱. درصد وزنی عناصر تشکیل دهنده هاردستونایت، اندازه گیری شده به کمک طیف سنجی توزیع انرژی پرتو ایکس.

غلظت (wt%)	عنصر
۲۰,۲۰	سیلیسیم (Si)
۲۲,۱۴	روی (Zn)
۳۲,۵۲	کلسیم (Ca)
۳۱,۳۵	اکسیژن (O)

(SBF) یک روش کارآمد برای ارزیابی زیست فعالی و تعیین شکل‌گیری هیدروکسی آپاتیت روی سطح سرامیک‌ها می‌باشد، با این وجود میزان اطمینان این روش به گروهی از بیوسرامیک‌ها منحصر می‌شود.

بیوسرامیک‌های پایه سیلیکاتی مانند آکرمانیت، مرونیت و دیوپسید توانایی تشکیل هیدروکسی آپاتیت خیلی خوبی را از خود نشان دادند. بیوسرامیک‌های پایه فسفاتی، پایه کربناتی و پایه سولفاتی تشکیل آپاتیت را پس از غوطه‌وری در محلول شبیه سازی شده بدن (SBF) روی سطح خود نشان نمی‌دهند.

بنابراین، این آزمون به تنهایی نمی‌تواند برای این نوع سرامیک‌ها به منظور مشخص نمودن زیست فعالی کافی باشد. بیوسرامیک‌های پایه سیلیکاتی با استخوان میزبان از طریق شکل‌گیری لایه‌های آپاتیت شبیه استخوان در طی حل شدن یون  $Ca^{+2}$  یا دیگر یون‌های فلزی پیوند برقرار می‌کند. پدیده انحلال و رسوب کردن در حقیقت در محلول شبیه سازی شده بدن برای بیوسرامیک‌های پایه سیلیکاتی اتفاق می‌افتد. سرامیک‌های هیدروکسی آپاتیت و  $\beta$ -TCP زینتر شده نیز می‌توانند بطور مستقیم با استخوان میزبان پیوند برقرار نمایند.



شکل ۶. تصویر گرفته شده به کمک میکروسکوپ الکترونی روبشی مربوط به نمونه شماره (۱)، غوطه ور شده در محلول شبیه سازی بدن (SBF)، به مدت هفت روز با بزرگنمایی ۵۰۰۰ برابر.

ساختار و شکل (۵) پوشش هاردستونایت که در بزرگنمایی ۵۰۰۰ برابر به کمک میکروسکوپ الکترونی روبشی (SEM) گرفته شده در شکل ۵ آورده شده است. با توجه به شکل ۵ مشخص است، پوشش هاردستونایت اعمال شده به روش الکتروفوریتیک، پوششی با ساختار یکنواخت و بدون ترک می‌باشد. می‌توان نتیجه گرفت که با روش الکتروفوریتیک می‌توان پوششی با ساختار یکنواخت و بدون ترک بر روی زیر لایه های فلزی اعمال کرد. این نتیجه با نتایج سایر محققین نیز تطابق دارد [۱۶]. حصول یک پوشش منسجم، یکنواخت و بدون عیوب ظاهری از مهمترین اهداف فرایند پوشش دهی به روش الکتروفوریتیک است. وجود چنین پوششی جهت رسیدن به خواص خوردگی و زیستی مناسب برای زیرلایه بسیار لازم و ضروری خواهد بود.

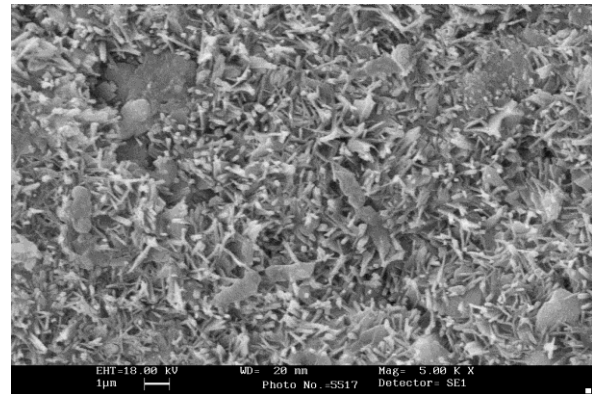
شکل های (۶)، (۷) و (۸) تصاویر نمونه های پوشش داده شده پس از غوطه وری در محلول شبیه سازی بدن را نشان می‌دهد. طبق تصاویر نمونه شماره (۱) که به مدت ۷ روز در محلول شبیه سازی بدن (SBF) غوطه ور بوده و مقایسه آن با تصاویر پوشش قبل از قرار گیری در محلول شبیه سازی بدن (SBF)، مشاهده شد که تغییر خاصی در مورفولوژی پوشش ایجاد نشده و ظاهراً هیچ گونه آپاتیتی بر روی پوشش تشکیل نشده است. در تصاویر نمونه شماره (۲) که به مدت ۱۴ روز در محلول شبیه سازی بدن (SBF) غوطه ور بوده، کاملاً مشخص است که آپاتیت سوزنی شکل جوانه زنی کرده است. از تصاویر میکروسکوپ الکترونی روبشی مربوط به نمونه شماره (۳) این چنین برداشت می‌شود که آپاتیت سوزنی تشکیل شده در مدت ۱۴ روز با افزایش زمان تا ۲۱ روز، کاملاً رشد یافته و آپاتیت به ساختار مطلوب گل کلمی نزدیک شده است. نتایج نشان داد که پوشش هاردستونایت توانایی تشکیل آپاتیت در محلول شبیه‌سازی شده بدن را دارد، هرچند میزان تشکیل آپاتیت در زمان های اولیه بسیار ناچیز است. روش استفاده از محلول شبیه‌سازی شده بدن

چگالی جریان خوردگی و پتانسیل خوردگی زیر لایه تیتانیومی بدون پوشش در محلول سرم نمکی که به کمک نمودارهای پلاریزاسیون و روش برون یابی تافل تعیین شده در جدول ۲ ارائه شده است. با توجه به جدول ۲ و شکل ۹ ملاحظه می شود که تیتانیوم (Ti-6Al-4V) بدون پوشش، چگالی جریان خوردگی بیشتری در محلول نمک نرمال نشان می دهد ( $I_{corr}=1/92\mu A/cm^2$ ) [۱۸].

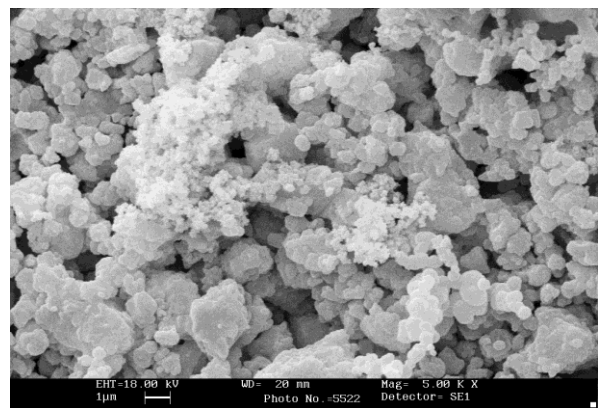
چگالی جریان خوردگی تیتانیوم (Ti-6Al-4V) پوشش داده شده با هاردستونایت در محلول نمک نرمال کاهش یافته است ( $I_{corr}=0/88\mu A/cm^2$ ). در شکل ۹ منحنی شماره (۱) مربوط به نمونه پوشش داده شده به مدت ۳ دقیقه در ولتاژ ۳۰ و منحنی شماره (۲) مربوط به نمونه دو بار پوشش داده شده به مدت ۳ دقیقه در ولتاژ ۳۰ می باشد. نتایج در جدول ۲ خلاصه شده است. با مقایسه نمودارها مشاهده شد که با اعمال پوشش هاردستونایت، پتانسیل به سمت مقادیر مثبت تر میل می کند و چگالی جریان خوردگی کاهش می یابد. مقدار پتانسیل نمونه پوشش دار (نمونه ۳)، ( $mV vs. SCE$ ) 173 در مقایسه با نمونه بدون پوشش ( $126 mV vs. SCE$ )، افزایش نشان داده است. با توجه به شکل ۹ و جدول ۲، ملاحظه می شود که دانسیته جریان نمونه یکبار پوشش با ولتاژ ۳۰ (نمونه ۱) نسبت به زیرلایه بدون پوشش افزایش یافته است.

دلیل این افزایش را می توان حصول پوشش متخلخل با منافذ زیاد دانست که موجب خوردگی حفره ای و موضعی زیرلایه می گردد. در نمونه دو بار پوشش با ولتاژ ۳۰ (نمونه ۲)، دانسیته جریان خوردگی نسبت به دانسیته جریان نمونه بدون پوشش کاهش یافته است و در واقع پوشش در بهبود رفتار خوردگی زیر لایه موفق عمل کرده است.

علت این کاهش میتواند کم شدن تخلخل و منافذ موجود در پوشش به دلیل دو بار پوشش دادن زیر لایه باشد. دانسیته



شکل ۷. تصویر گرفته شده به کمک میکروسکوپ الکترونی روبشی مربوط به نمونه شماره (۲)، غوطه ور شده در محلول شبیه ساز بدن (SBF)، به مدت چهارده روز با بزرگنمایی ۵۰۰۰ برابر.



شکل ۸. تصویر گرفته شده به کمک میکروسکوپ الکترونی روبشی مربوط به نمونه شماره (۳)، غوطه ور شده در محلول شبیه ساز بدن (SBF)، به مدت ۲۱ روز با بزرگنمایی ۵۰۰۰ برابر.

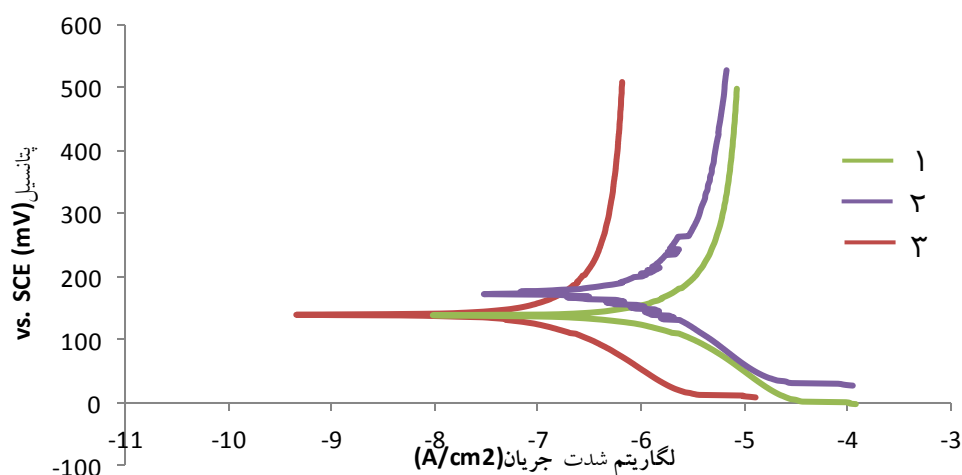
توانایی تشکیل آپاتیت آن‌ها اساساً بستگی به خصوصیات زیترینگ و بلورینگی آن‌ها دارد. انتخاب روش برای ارزیابی زیست فعالی سرامیک‌ها در محیط آزمایشگاهی (in vitro) بستگی به ترکیب شیمیایی بیوسرامیک‌ها و مکانیزم تشکیل استخوان آن‌ها دارد [۱۷].

نمودار پلاریزاسیون تافل نمونه های تیتانیوم (Ti-6Al-4V) بدون پوشش و با پوشش هاردستونایت در محلول سرم نمکی در شکل (۹) مشاهده می شود. مقادیر میانگین



روی زیر لایه افزایش و به تبع آن ضخامت پوشش بیشتر شده است. می توان نتیجه گرفت که مقاومت به خوردگی زیر لایه با افزایش ولتاژ تا ۵۰ ولت و افزایش تعداد دفعات پوشش دهی افزایش می یابد.

جریان خوردگی نمونه دو بار پوشش داده شده با ولتاژ ۵۰ نسبت به سایر نمونه ها کاهش یافته است و این پوشش مناسب تر از دو پوشش قبلی عمل کرده است. به دلیل افزایش ولتاژ پوشش دهی، مقدار سرامیک رسوب کرده



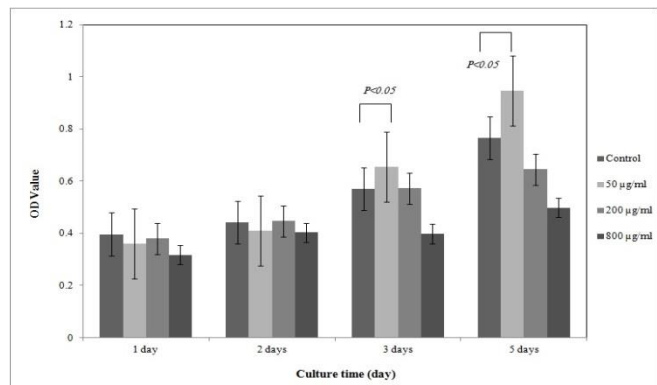
شکل ۹. نمودار حاصل از آزمون پلاریزاسیون Tafel نمونه های پوشش دار، منحنی (۱) نمونه ۱ بار پوشش به مدت ۳ دقیقه در ولتاژ ۳۰، منحنی (۲) نمونه ۲ بار پوشش داده شده در ولتاژ ۳۰، منحنی (۳) نمونه ۲ بار پوشش داده شده در ولتاژ ۵۰.

جدول ۲. مقادیر میانگین پتانسیل و چگالی جریان خوردگی در محلول نمک نرمال در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد.

نمونه مورد آزمایش	E. corr (mV)	I cor( $\mu\text{A}/\text{cm}^2$ )
زیر لایه	۱۲۰	۱/۹۲
زیر لایه ۱ بار پوشش در ولتاژ ۳۰ به مدت ۳ دقیقه	۱۳۷	۲/۴۱
زیر لایه ۲ بار پوشش در ولتاژ ۳۰ به مدت ۳ دقیقه	۱۳۹	۱/۶۱
زیر لایه ۲ بار پوشش در ولتاژ ۵۰ به مدت ۳ دقیقه	۱۷۳	۰/۸۸

## ارزیابی سمیت سلولی

نتایج آزمون MTT ذرات هاردستونایت در شکل ۱۰ نشان داده شده است. همانطور که شکل نشان می دهد، در اولین و دومین روزهای کشت تغییر اساسی در زیستایی و توانایی تکثیر سلول های بنیادی مغز استخوان در تماس با نانوذرات هاردستونایت در غلظت های متفاوت دیده نشد ( $p > 0.05$ ). بعد از گذشت ۳ روز، سلول های موجود در غلظت ۵۰ میکروگرم در میلی لیتر زیستایی و توانایی تکثیر سلولی بیشتری را نسبت به نمونه کنترل از خود نشان دادند ولی در غلظت ۲۰۰ میکروگرم تفاوت قابل توجهی با نمونه کنترل مشاهده نشد ( $p > 0.05$ ). بعد از گذشت ۵ روز، فقط سلول های در تماس با غلظت ۵۰ میلی گرم از ذرات در مقایسه با گروه های دیگر تکثیر سلولی بیشتری از خود نشان داده اند (شکل ۱۰).



شکل ۱۰. زیستایی و توانایی تکثیر سلول های بنیادی مغز استخوان انسان در مجاورت ذرات هاردستونایت.

در نتیجه اینگونه استنباط می شود که غلظت بهینه جهت ارزیابی کشت سلولی برای چنین نمونه هایی غلظت ۵۰ میلی گرم در میلی لیتر و پس از گذشت ۵ روز است. نتایج نشان داد که هاردستونایت زیستایی و توانایی تکثیر سلول های بنیادی را افزایش داده است. گمان می رود که یون های روی آزاد شده از این سرامیک نقش مهمی را در تحریک تکثیر سلولی ایفا می کنند.

غلظت یون سیلیسیم (Si) آزاد شده از سرامیک های پایه سیلیکاتی حاوی روی مانند هاردستونایت برابر غلظت فیزیولوژیک (۰/۰۰۵-۰/۰۲ میکرومولار) این یون در پلاسما است که توسط رفیت (Reffitt) و همکارانش گزارش شده است [۱۹].

گزارش شده است که اورتوسیلیکات اسید در غلظت های فیزیولوژیک، ساخت کلاژن نوع I را در سلول های مشابه سلول های استخوان ساز تحریک کرده و به تمایز سلول های استخوان ساز کمک می کند [۲۰، ۲۱].

در بسیاری از مطالعات شیشه های زیست فعال [۲۱] و بیوسرامیک های سیلیکاتی [۲۲] به عنوان عامل تحریک سلول های استخوانی پیشنهاد شده اند. کلسیم (Ca) یکی دیگر از عناصر اصلی در تشکیل و متابولیسم استخوان بوده که در هاردستونایت موجود است. زیست فعالی نسبتا بالای هاردستونایت به علت حضور یون کلسیم موجود در ترکیب آن مربوط می شود [۱۹، ۲۰].

## نتیجه گیری

۱) سنتز نانو ذرات هاردستونایت ( $Ca_2ZnSi_2O_7$ ) به روش سل-ژل امکان پذیر می باشد.  
 ۲) می توان نانو ذرات هاردستونایت را به روش لایه نشانی الکترو فورتیک بر روی زیر لایه تیتانیوم (Ti-6Al-4V) پوشش دهی کرد و به پوششی همگن و بدون ترک دست یافت.

۳) افزایش ولتاژ و زمان پوشش دهی باعث ایجاد لایه ضخیم تر و یکنواخت تر روی زیر لایه تیتانیومی می شود.  
 ۴) شرایط بهینه جهت عملیات حرارتی پوشش هاردستونایت برای دست یابی به بهترین استحکام و چسبندگی به زیر لایه در دمای عملیات حرارتی ۸۰۰ درجه سانتی گراد به مدت ۲ ساعت ایجاد می شود.

۵) زیست فعالی هاردستونایت تولید شده در سطح قابل قبولی است بطوریکه پس از ۲۱ روز غوطه وری در

مجموعه خلاصه مقالات ششمین کنگره بین المللی انجمن دندان پزشکیان ایران، ۱۳(۱۳۷۹)۶۳-۷۴.

10. Ch. WU, J. Chang, and W. Zhai, *A novel hardystonite bioceramic: preparation and characteristics*, ceramics, 31(2005)27-31.
11. P. Magnusson, L. Larsson, M. Magnusson, MW. Davie, C. A. Sharp, *Isoforms of bone alkaline phosphatase: characterization and origin in human trabecular and cortical bone*, Bone Miner Res, 14(1999)1926-1933.
12. A. Doostmohammadi, A. Monshi, R. Salehi, M. H. Fathi, G. Gonia, A.U.Daniels, A.U., *Bioactive Glass Nanoparticles with Negative Zeta Potential*, Ceram Intern, 37(2011)2311-2316.
13. M. Zhang, W. Zhai, and J. Chang, *Preparation and characterization of a novel willemite bioceramic*, Mater Sci: Mater Med, 21(2010)1169-1173.
14. M. Czkaa, K. Cholewaa, and A. aCzka-Osyczkab, *Gel-derived powders of CaO-P2O5-SiO2 system as a starting material to production of bioactive ceramics*, Alloys and Compounds, 15(2008)42-51.
15. C. Garcia, S. Cere, A. Duran, *Bioactive coatings prepared by sol-gel on stainless steel 316L*, Non-Crystalline Solids, 348(2004) 218-224.
16. B. Zhang, CT. Kwok, FT. Cheng, Hc. Man, *Fabrication of nano-structured HA/CNT coatings on Ti6Al4V by electrophoretic deposition for biomedical applications*, Nanosci Nanotechnol, vol. 12(2011)10740-10745.
17. C. Wu, Y. Ramaswamy, J. Cheng, J. Woods, H.Zreiqat, *The effect of Zn contents on phase composition, chemical stability and cellular bioactivity in Zn-Ca-Si system ceramics*, 2(2008)346-353.
18. N. Schiffa, B. Grosgeata, M. Lissaca, F. Dalardb, *Influence of fluoride content and pH on the corrosion resistance of titanium and its alloys*, Biomaterials, 23(2002)1995-2002.
19. D. M. Reffitt, N. J. Meenan, D. J. Sanderson, R. Jugdaohsingh J. Powell, R.J.Thompson, *Bone density improves with disease remission in patients with inflammatory bowel disease*, Gastroenterol Hepatol, 15(2003)1267-1273.

محلول شبیه سازی شده بدن، لایه هیدروکسی آپاتیت بر روی آن تشکیل می شود.

۶) پوشش هاردستونایت اثر مطلوبی بر مقاومت خوردگی زیر لایه تیتانیومی داشت و چگالی جریان خوردگی زیر لایه را کاهش داد. این امر به معنای افزایش مقاومت خوردگی کاشتنی و متعاقب آن کاهش آزاد شدن یون های فلزات و اثرات مخرب آن ها بر بافت های بدن انسان است. آلیاژ تیتانیوم پوشش داده شده با هاردستونایت، مقاومت خوردگی بیشتری نسبت به زیر لایه بدون پوشش دارد.

۷) عدم سمیت نانوذرات هاردستونیت در تماس با سلول های بنیادی مغز استخوان تایید شد و مشاهده شد که در غلظت های کم افزایش تکثیر سلولی نیز وجود دارد.

#### مراجع

1. L. L. Hench, *Bioceramics*, Am.ceram.soc, 81(1998)1705-28.
2. L. L. Hench, wilson, *introduction to Bioceramics*, world scientific publishing co, 1(1993)123-125.
3. L. L. Hench, *Bioceramics:from concept to clinic*, Am.ceram.soc, 74(1991)1484-1510.
4. S. F. Hulbert, C. Bokros, L. L. Hench, *ceramics in clinical applications:past,present and future*, The Nethelands, (1987)189-213.
5. M. Jarcho, *calcium phosphate as hard prosthetics*, Clin orthop, 157(1981)259-278.
6. S. D. Cook, K. A. Thomas, J. F.Kay, M. Jarcho, *Hydroxylapatite coated titanium for orthopaedic implant application*, Clin.Orthop.Rel.Res, 232(1988)225-243.
۷. فتحی محمد حسین، مرتضوی وجیهه السادات، کاربرد پزشکی پوششهای بیو سرامیک ایمپلنت ها، نشر ارکان اصفهان(۱۳۷۸)۱۱۱-۱۱۴.
8. T. Yamamuro, L. L. Hench, J. Wilson, *calcium phosphate and hydroxylapatite ceramics*, Hand book of Bioactive ceramics, 2(1990)23-24.
۹. مرتضوی وجیهه السادات، فتحی محمد حسین، نقش پوششهای بیوسرامیکی در موفقیت ایمپلنت ها،

20. Ch. WU, J. Chang, and W.Zhai, *A novel hardystonite bioceramic: preparation and characteristics*, Ceramics, 31(2005)27-31.
21. A. Doostmohammadi, A. Monshi, R. Salehi, M. H. Fathi, G. Golnia, A. U .Daniels, *Bioactive Glass Nanoparticles with Negative Zeta Potential*, Ceram Intern, 37(2011) 2311-2316.
22. C. Wu, J. Chang, *Degradation, bioactivity, and cytocompatibility of diopside, akermanite, and bredigite ceramics*, Biomed. Mater. Res. B Appl. Biomater, 83(2007)153-160.