

## ایجاد پوشش نانو ذرات نقره/هیدروکسی آپاتیت/بتا تری کلسیم فسفات بر

### تیتانیم به روش سل ژل

بی بی راه نجات، ناهید حسن زاده نعمتی

گروه مهندسی پزشکی، واحد علوم و تحقیقات، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران

سید خطیب الاسلام صدرنژاد

دانشکده مهندسی و علم مواد، دانشگاه صنعتی شریف، تهران، ایران

محمد علی شکرگذار

بخش بانک سلولی ایران، انستیتو پاستور ایران، تهران، ایران

(دریافت مقاله: ۱۴۰۰/۰۶/۰۸ - پذیرش مقاله: ۱۴۰۰/۱۰/۱۵)

#### چکیده

زیست فعالی و خواص آنتی باکتریال از فاکتورهای موثر بر موفقیت آمیز بودن کاشتنی تیتانیومی مورد استفاده در ارتوپدی است. در پژوهش حاضر بررسی عوامل مذکور با پوشش دهی تیتانیم توسط پوشش کامپوزیتی HP (پوشش حاوی نسبت یکسان هیدروکسی آپاتیت (HA) و بتا تری کلسیم فسفات ( $\beta$ -TCP)) و نانوذرات نقره مورد مطالعه قرار گرفت. برای این منظور پوشش کامپوزیتی یکنواخت HP و nAg از طریق سل ژل بر تیتانیم اعمال شد. مشخصه یابی پوشش کامپوزیتی با استفاده از میکروسکوپ الکترونی روبشی (SEM) به همراه آنالیز پراش انرژی پرتو ایکس (EDX)، آزمون زنده‌مانی سلولی و چسبندگی باکتریایی انجام شد. نتایج نشان داد که تیتانیم با پوشش nAg/HP علاوه بر بهبود خواص آنتی باکتریایی و زیست فعالی، در نسبت برابر از HA و  $\beta$ -TCP، زنده‌مانی و تکثیر سلولی را نسبت به نمونه بدون پوشش افزایش داده است. نتایج کلی حاصل از ارزیابی‌های بیولوژیکی نشان داد، پوشش سل ژل حاوی HP ( $\beta$ -TCP:HA = 50:50) همراه با ۲ درصد وزنی nAg بر ورقه های Ti یک کاندید مناسب برای مطالعات بعدی می‌باشد.

واژه‌های کلیدی: تیتانیم، نقره، هیدروکسی آپاتیت، بتا تری کلسیم فسفات، سل ژل.

## Preparation of Nano Silver/Hydroxyapatite/ $\beta$ -Tricalcium Phosphate Coating on Titanium Surface by Sol-gel Method

**Bibi Rahnejat, Nahid Hassanzadeh Nemati**

*Department of Biomedical Engineering, Science and Research Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran*

**S.K. Sadrnezhad**

*Department of Materials Science and Engineering, Sharif University of Technology, Tehran, Iran*

**Mohammad Ali Shokrgozar**

*National Cell Bank of Iran, Pasteur Institute of Iran, Tehran, Iran*

(Received 30 August 2021, accepted 5 January 2022)

#### Abstract

Bioactivity and antibacterial properties have been recognized as important factors which can result in the success of titanium-based replacements in the orthopedic surgeries. In the present study, silver nanoparticles (nAg) and HP particles (containing the same ratio of hydroxyapatite (HA) and  $\beta$ -tricalcium phosphate ( $\beta$ -TCP)) were coated on titanium substrate through using sol-gel method to induce both bioactivity and antibacterial properties. The prepared composite coating then was characterized via scanning electron microscopy (SEM) equipped with X-ray diffraction (EDX), bioactivity assessment, anti-bacterial evaluation, and 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) test. The obtained results showed that HP/nAg coating on titanium substrate enhanced bioactivity, anti-bacterial performance, and cell viability comparable with pure titanium. The overall results indicated that the coated substrate containing HP ( $\beta$ -TCP/HA = 50:50) with 2% nAg on Ti plates can be a reliable candidate for further studies.

**Keywords:** Titanium; Silver; Hydroxyapatite;  $\beta$ -tricalcium phosphate; Sol-gel.

**E-mail of Corresponding author:** *hasanzadeh@yahoo.com*.

## مقدمه

مناسب، زیست سازگاری بالا و انعطاف پذیری می‌تواند در ترکیب با پوشش نانوکامپوزیتی HP، سبب بهبود انعطاف پذیری و استحکام شکست شود. همچنین، ترکیب پلیمر PVA با ذرات هیدروکسی آپاتیت و بتاتری کلسیم فسفات سبب خواهد شد تا چسبندگی بهتر در نقطه اتصال با سطح تیتانیم شکل بگیرد. در نتیجه، پوشش نانوکامپوزیتی قادر خواهد بود تا در برابر تنش‌های ممکن در ناحیه ایمپلنت، سازگاری و ماندگاری مناسب نشان دهد [۹]. از سوی دیگر، پوشش‌های پایه سرامیک، احتمال رد ایمپلنت را به دلیل افزایش میل به باکتری که همراه با قابلیت هدایت استخوان سازی است، افزایش می‌دهد و ایمپلنت پوشش داده شده با کلسیم فسفات در معرض خطر انتشار باکتری نسبت به ایمپلنت بدون پوشش است [۱۰].

پوشش HP / نانوذرات نقره (nAg) بر بستر تیتانیم به دلیل پتانسیل ترکیب پذیری بالا و همچنین زیست سازگاری عالی، فعالیت ضد میکروبی و خواص مکانیکی مناسب مورد توجه محققان قرار گرفته است [۱۱-۱۴]. تاکنون روش‌های مختلفی برای ساخت پوشش نانوکامپوزیتی nAg/HP مانند اسپری پلاسما [۱۵]، رسوب با کمک پرتو یون [۱۶]، پاشش مگنترون [۱۷]، اکسیداسیون قوس میکرو [۱۸] استفاده شده است. اما، روش‌های ذکر شده برای پوشش تیتانیم، به دلیل عدم پوشش یکنواخت و همچنین نیاز به تجهیزات پیچیده و در نتیجه هزینه بالا تولید مناسب نیستند. فرایند پوشش‌دهی غوطه‌وری (dip-coating) با روش سل-ژل یکی از معمولترین تکنیک‌های تولید بیومواد به شکل فیلم نازک به شمار می‌رود [۱۹]. مزایای متعدد نظیر نیاز به تجهیزات کمتر، دمای عملیات حرارتی پایین‌تر و امکان کنترل دقیق ریزساختار از دلایل مهم جذابیت این روش در پوشش‌دهی کاشتنی‌های استخوانی است. علاوه بر موارد ذکر شده، استفاده از تکنیک سل-ژل مزایای دیگری را نیز به همراه دارد. به عنوان مثال، نتایج حاصل از مطالعات انجام شده نشان داده است که پوشش سل-ژل سبب بهبود جذب کلسیم فسفات

تیتانیم به دلیل استحکام مکانیکی بالا، مقاومت در برابر خوردگی خوب و زیست سازگاری از جذابیت بالا در ساخت ایمپلنت‌ها مانند پروتز مفصل ران، پروتز مفصل زانو و ایمپلنت‌های دندان‌ی برخوردار است [۱]. با این حال، استفاده از تیتانیم به عنوان جایگزین بافت استخوانی آسیب دیده، به دلیل عدم فعالیت زیستی مناسب، تأثیر مثبت در برهمکنش سلول بافت میزبان با ایمپلنت در شرایط درون تن (*in vivo*) نخواهد داشت. در نتیجه، سلول‌های استئوبلاست استخوانی نمی‌توانند به خوبی بر سطح ایمپلنت فلزی رشد کنند. این امر منجر به ضعف حد فاصل بین ایمپلنت و بافت اطراف خواهد شد که نتایج نشان داده است، شل شدن ایمپلنت ناشی از عدم اتصال با بافت هدف، سبب شکست ایمپلنت فلزی خواهد شد [۲].

پوشش زیست فعال هیدروکسی آپاتیت  $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$  (HA) به دلیل ساختار و ترکیبات مشابه با بافت استخوان، باعث افزایش بازسازی بافت استخوان بر ایمپلنت تیتانیم در شرایط درون تن (*In vivo*) خواهد شد [۳]. هیدروکسی آپاتیت (HA) به دلیل زیست سازگاری بسیار بالا و خواص زیست فعالی مناسب، به طور گسترده در کاربردهای ارتوپدی، دندانپزشکی و جراحی فک و صورت استفاده شده است [۴, ۵]. با این حال، ضعف اصلی HA، ذات شکننده، خواص مکانیکی پایین و همچنین، سرعت تخریب پایین در مقایسه با سرعت بازسازی بافت استخوان است [۶]. بتا تری کلسیم فسفات ( $\beta$ -TCP) سرعت تخریب بالاتری را نسبت به HA در مطالعات برون تن (*in vitro*) نشان داده است. در نتیجه ترکیب مناسب از  $\beta$ -TCP و HA قادر خواهد بود که توانایی زیست فعالی ورقه تیتانیم را افزایش دهد. اما، طبیعت شکننده، خواص مکانیکی پایین و همچنین ضعف شکل‌دهی، استفاده این ترکیبات را در کاربردهای استخوانی کاهش داده است [۷, ۸].

مطالعات نشان داده است که استفاده از پلیمر سنتزی مانند پلی وینیل الکل (PVA) به دلیل زیست تخریب پذیری

استفاده شد. به منظور ارزیابی بیولوژیکی، آزمون‌های سمیت MTT، چسبندگی باکتریایی و تست زیست فعالی انجام شد.

#### مواد و روش‌ها

#### پوشش کامپوزیتی بر تیتانیم خالص

ابتدا صفحات تیتانیم گرید پزشکی به قطعات با ابعاد  $mm^3$   $2 \times 10 \times 5$  برش زده شدند. سپس نمونه‌های فلزی تهیه شده با کاغذهای سمباده کاربرد سیلیسیم شماره های ۴۰۰، ۶۰۰، ۸۰۰، ۱۰۰۰ و ۱۲۰۰ سمباده زده شدند. سپس در مرحله بعد برای زدایش هرگونه آلودگی از سطح، نمونه های فلزی تحت تاثیر محلول اتانول با خلوص بالا (۹۹٪ خالص، مرک آلمان) به مدت ۳۰ دقیقه قرار گرفت و توسط آب مقطر در دمای محیط پاکسازی شد. پس از آن در گرم‌خانه با دمای ۶۰ درجه سانتی گراد خشک شدند. محلول سُل ترکیبی از سه محلول بود. ابتدا محلول‌های نانوذرات نقره (US Research Nanomaterial) در آب دیونیزه با غلظت ۲ درصد وزنی/حجمی، ذرات هیدروکسی آپاتیت و بتا تری کلسیم فسفات با نسبت وزنی برابر در آب دیونیزه با غلظت ۶۰ درصد وزنی/حجمی و محلول PVA (مرک آلمان) در آب دیونیزه با غلظت ۶ درصد وزنی/حجمی به طور جداگانه تهیه شدند. پس از آن برای تهیه محلول سه تایی، هر سه محلول با هم بر روی همزن مغناطیسی در شرایط سرعت همزن ۵۰ rpm، دما ۷۰ درجه سانتی گراد به مدت ۴ ساعت مخلوط شدند. لازم به ذکر است که در مطالعه توسط Urban و همکاران اثبات شد که افزایش نسبت بیشتر از ۲ درصد وزنی nAg در پوشش ساخته شده، سبب سمیت سلولی خواهد شد [۲۷]. سپس ورقه تیتانیمی با استفاده از دستگاه غوطه‌وری مدل DPC-SN-555 داخل محلول سُل با شرایط سرعت حرکت  $mm/min$  ۲۰۰، زمان نگه داشت  $min$  ۵، زاویه غوطه‌وری صفر درجه غوطه ور گردید. بعد از پوشش‌دهی، نمونه‌ها در دمای محیط به مدت ۲۴ ساعت خشک شدند.

خواهد شد [۲۰]. در حقیقت، حضور گروه‌های هیدروکسیل بر سطح، سبب خواهد شد تا خواص زیست فعالی و شکل‌گیری لایه آپاتیت افزایش یابد [۲۱]. تکنیک سل-ژل یک روش پایه شیمیایی-مرطوب (wet-chemical) برای ساخت مواد شیشه‌ای یا سرامیکی است که در آن هیدرولیز کنترل شده و پلی‌کندانساسیون (polycondensation) الکوکسیدها در محلول آبی، سبب تولید اکسید یا گونه‌های پیش‌ساز مرتبط با آن خواهد شد که متعاقباً رسوب در سطح‌های مختلف را تشکیل خواهد داد [۲۲-۲۴].

در مطالعه‌ای که توسط Kim و همکاران انجام شد، ورقه تیتانیم با پوششی از هیدروکسی آپاتیت و تیتانا ( $TiO_2$ ) از طریق سل-ژل اصلاح سطح شد. نتایج نشان داد که استفاده از روش مذکور سبب بهبود چسبندگی ذرات هیدروکسی آپاتیت و تیتانا به ورقه تیتانیم شد و زیست فعالی و زیست سازگاری نسبت به ورقه بدون پوشش افزایش چشمگیر نشان داد [۲۵]. در مطالعه دیگر اثبات شد که پوشش TCP- $\beta$  باعث افزایش چسبندگی پوشش به ورقه تیتانیم خواهد شد که در نتیجه سبب بهبود خواص مکانیکی و مقاومت در برابر شکست، علاوه بر بهبود خواص زیست فعالی و زیست سازگاری خواهد شد [۲۶]. همچنین در یک پژوهش، نتایج حاصل از پوشش سطح با روش سل-ژل به همراه درون‌پوشانی ذرات نقره و هیدروکسی آپاتیت سبب بهبود خواص آنتی‌باکتریال، زیست فعالی و زیست سازگاری ورقه تیتانیم شد [۲۳].

هدف از این پژوهش تهیه پوشش کامپوزیتی HP/nAg بر ورقه تیتانیم با روش سل-ژل لایه نشانی غوطه‌وری است که از PVA به عنوان ژل برای بهبود چسبندگی ذرات سرامیکی به ورقه تیتانیم استفاده شد تا خواص آنتی‌باکتریال و همزمان عملکرد سلول‌های استئوبلاست افزایش یابد. برای بررسی خواص فیزیکوشیمیایی سطوح پوشش کامپوزیتی ورقه‌های پایه Ti از میکروسکوپ الکترونی روبشی (SEM) و آنالیز پراش انرژی پرتو ایکس (EDX)

نشده، در محیط کشت DMEM غوطه‌ور شدند. در این پژوهش از سلول‌های استئوبلاست انسانی MG-36 استفاده شد. این سلول‌ها به صورت کشت چسبنده از بانک سلولی انستیتو پاستور تهران تهیه و تکثیر شدند. سلول‌ها با چگالی اولیه ۵۰۰۰ سلول در هر محفظه، در یک صفحه ۲۴ محفظه‌ای در معرض محیط کشت حاوی نمونه‌ها قرار گرفتند. آزمون MTT در بازه زمانی ۴۸ و ۷۲ ساعت به منظور ارزیابی زیست‌سازگاری (میزان بقا) سلول‌ها انجام شد. در هر نقطه زمانی، پس از تخلیه محیط کشت و شستشو با PBS، حدود ۴۰۰ میکرولیتر محیط کشت همراه با ۴۰ میکرولیتر محلول MTT (۵ میلی گرم بر میلی لیتر) به هر چاهک کشت اضافه گردید. سپس به مدت ۴ ساعت در انکوباتور در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد نگه داری شد. بعد از آن، محیط کشت به آرامی تخلیه شد و به منظور انحلال فرمازون، ۲۰۰ میکرولیتر دی متیل سولفوکساید به چاهک‌ها اضافه شد. جذب نوری در طول موج ۵۷۰ نانومتر بررسی شد. داده‌ها به صورت میانگین  $\pm$  انحراف معیار (MEAN $\pm$ SD) به دست آمد و برای تحلیل اماری از نرم افزار SPSS (ویرایش ۱۶) استفاده شد، سطح معنی دار بودن اختلافات با  $P < 0.05$  محاسبه شد.

## نتایج و بحث

### بررسی ریزساختار نمونه پوشش کامپوزیتی HP/nAg

تصویر میکروسکوپ الکترونی از سطح پوشش کامپوزیتی HP/nAg ایجاد شده بر صفحه تیتانیومی در شکل ۱ آمده است. همانطور که از شکل پیداست پوششی همگن از ترکیب یاد شده بر بستر تیتانیومی ایجاد شده است. تصاویر نقشه عنصری آمده در تصاویر (الف-خ) از شکل ۱ نیز این توزیع همگن را تایید می کند. این توزیع همگن مرتبط با روش پوشش دهی (روش سل-ژل) است [۲۳-۲۶]. با استفاده از PVA نقطه ی ضعف این روش که اتصال پایین پوشش به ماده زمینه است مرتفع گردید [۳۱-۳۳]. علاوه

این عملیات ۳ بار تکرار شد تا پوشش با ضخامت نازک و یکنواخت در سطح تشکیل شود.

### مطالعه مورفولوژیکی سطح و خاصیت زیست فعالی پوشش

بررسی مورفولوژیکی سطح و خاصیت زیست فعالی پوشش با استفاده از میکروسکوپ الکترونی روبشی (FESEM, XL30, Philips, Holland) مجهز به EDX مدل EDX-7000P انجام شد. برای بررسی خاصیت زیست فعالی پوشش کامپوزیتی، ابتدا محلول شبیه‌سازی بدن SBF مطابق با پروتکل گزارش شده توسط Kokubo و همکاران [۲۸] تهیه شد. برای مشاهده توانمندی تشکیل آپاتیت بر نمونه پوشش کامپوزیتی HP/nAg بر ورقه تیتانیوم به مدت دو هفته در محلول SBF قرار گرفته شد.

### بررسی فعالیت آنتی باکتریال

برای بررسی خواص آنتی‌باکتریالی پوشش کامپوزیتی ایجاد شده از استاندارد ISO 20660 [۲۹] استفاده گردید. برای این منظور نمونه پوشش داده شده و نمونه پوشش داده نشده (نمونه کنترل) از سمت پشت و رو به مدت ۲۰ دقیقه با استفاده از پرتو UV استریل گردید. باکتری های مورد استفاده در آزمون مذکور *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*)، *aeruginosa Pseudomonas* (*P. aeruginosa*) و *Escherichia coli* (*E. coli*) بودند. برای این ارزیابی غلظت نیم مک فارلند معادل  $1.5 \times 10^8$  باکتری در هر میلی لیتر کشت داده شد. هر کدام از نمونه‌ها به صورت مجزا در پلیت‌استریل قرار داده شد و به مدت ۱ ساعت با حجم ذکر شده تماس داده شد.

### بررسی زنده مانی سلولی

آزمون میزان زنده مانی سلولی (MTT) مطابق پروتکل رعایت شده استاندارد ISO 10993-5 [۳۰] انجام شد. برای این منظور نمونه پوشش داده شده و نمونه پوشش داده

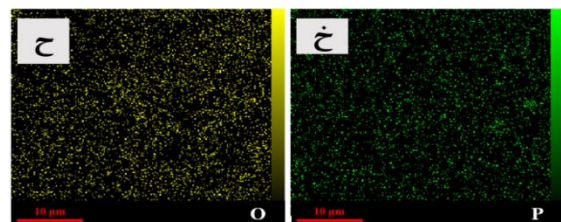
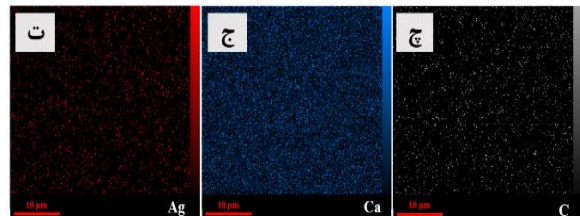
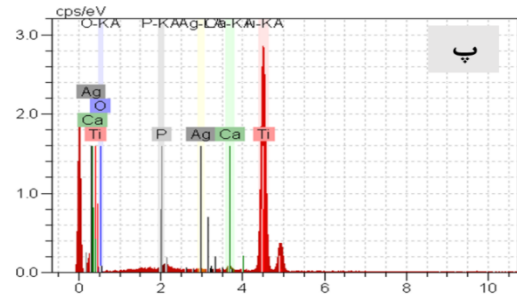
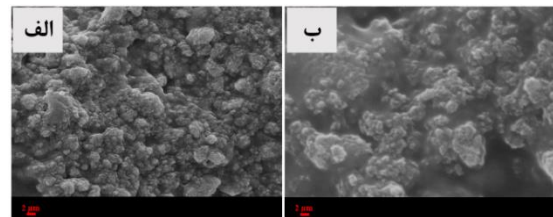
جدول ۱. نتایج حاصل از طیف EDX گرفته شده از سطح نمونه‌ی پوشش داده شده

عناصر	درصد وزنی عناصر	درصد اتمی عناصر
اکسیژن	۴۲٫۹۸	۵۵٫۲۰
فسفر	۲٫۵۲	۱٫۶۷
کلسیم	۳۴٫۵۲	۱۷٫۷۰
تیتانیوم	۲٫۳۱	۰٫۹۹
نقره	۳٫۸۰	۰٫۷۲
کربن	۱۳٫۸۶	۲۳٫۷۱

### بررسی خواص آنتی باکتریالی پوشش کامپوزیتی HP/nAg

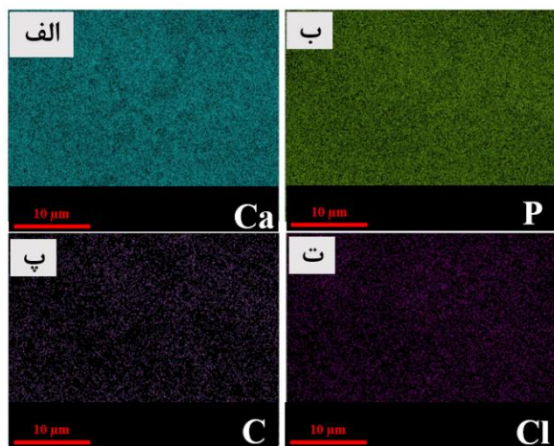
نتایج آزمون آنتی‌باکتریال براساس میزان فعالیت آنتی باکتریالی نمونه‌ها در جدول ۲ گزارش شده است. همانطور که از یافته‌ها پیداست میزان فعالیت آنتی‌باکتریالی نمونه‌های تیتانیومی بدون پوشش در مقابل هر سه باکتری گرم مثبت *S. aureus* و گرم منفی *E. Coli* و *P. aeruginosa* ۴۰ درصد بود. اما با ایجاد پوشش کامپوزیتی HP/nAg میزان فعالیت آنتی باکتریالی نمونه پوشش داده شده به بالای ۹۵ درصد در مقابل هر سه نوع باکتری رسید که در اینجا نقش تعیین کننده نانوذرات نقره قابل توجه است. اثر آنتی باکتریال عنصر نقره در انواع پوشش‌ها در چندین مطالعه گذشته به اثبات رسیده است [۳۴، ۳۵]. این مهم در اثر فعل و انفعالات اتفاق افتاده بین یون نقره و غشاء سلولی باکتری‌ها می باشد [۳۶، ۳۷]. البته میزان نقره حاصل از پوشش می تواند در کیفیت رفتار آنتی باکتریال پوشش تاثیر گذار باشد. مقدار کم آن موجب تضعیف این خواص و مقدار زیاد آن (بیش از ۲ درصد) موجب مرگ سلولی در سلول‌های سالم نیز می شود [۲۷، ۲۳]. از اینرو عدد ۲ درصد

بر این مسئله حضور کربن در ساختار PVA منجر به محتمل شدن ایجاد ساختارهای هیدروکسی آپاتیت کربناتی می گردد که این ترکیب تعاملات بهتری می تواند با بافت استخوانی میزان داشته باشد [۳۳]. وجود عنصر کربن در پوشش به وسیله‌ی نتایج عنصری حاصل از طیف عنصری EDX در جدول ۱ آمده است.



شکل ۱. تصاویر میکروسکوپ الکترونی روبشی (SEM) از سطح کلی پوشش کامپوزیتی نانو ذرات نقره-هیدروکسی آپاتیت و بتا تری کلسیم فسفات بر تیتانیوم خالص (الف و ب)، نتایج حاصل از EDX (پ) و تصویر نقشه عنصری از سطح قطعه تیتانیوم پوشش داده شده (ت-خ).

فسفات بهبود یابد [۳۸]. همچنین، در گزارش مشابه که توسط باطبی و همکاران انجام شد نتایج نشان داد که پوشش ورقه تیتانیم با روش سل-ژل هیدروکسی آپاتیت سبب بهبود خواص زیست فعالی شد [۳۶]. در نتیجه، یک ایمپلنت ایده‌آل در کاربردهای استخوانی باید به صورت زیستی فعال باشد. به عبارتی، ایمپلنت باید قادر باشد تا محیط مناسب برای شکل‌گیری لایه کلسیم فسفات را شبیه سازی کند که سبب خواهد شد تا خطر رد ایمپلنت به دلیل ضعف در نقطه اتصال کاهش یابد [۳۹]. یکی از روش‌های قابل اعتماد در بررسی پتانسیل اتصال استخوان در شرایط محیطی، انکوبه کردن در شرایط شبیه ساز محیط بدن یعنی SBF است تا پتانسیل شکل‌گیری لایه کلسیم فسفات بررسی شود [۴۰]. بررسی زیست فعالی پوشش کامپوزیتی حاصل از بررسی عنصری پس از دو هفته غوطه وری در محلول شبیه ساز بدن نشان داد (شکل ۲) که با توجه به نتایج حاصل می‌توان ترکیبات پوشش کامپوزیتی را تایید کرد چرا که در نتایج حاصل از EDX، نسبت کلسیم/فسفر برابر با ۲.۰۷ مشخص شده است. همچنین بررسی تصویر نقشه عنصری از عناصر نشان داد که از توزیع یکنواخت و همگن در سطح پوشش خبر می‌دهد.



مقدار غلظت انتخابی مناسب در این پژوهش انتخاب گردید.

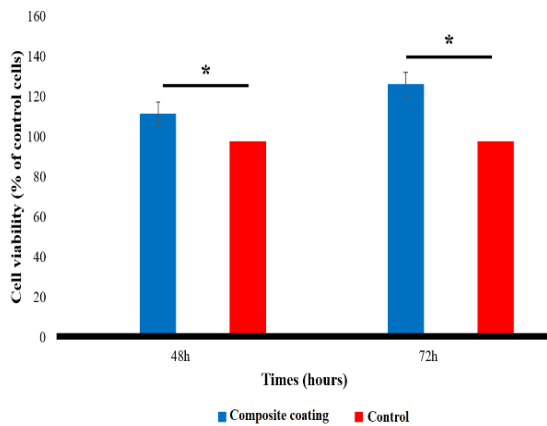
جدول ۲. فعالیت آنتی باکتریال سطح پوشش کامپوزیتی نانو ذرات نقره-هیدروکسی آپاتیت و بتا تری کلسیم فسفات بر تیتانیم خالص در مقایسه با ورقه تیتانیم نسبت به باکتری‌های *S. aureus*، *E. coli* و *P. aeruginosa*

نمونه ها	<i>S. aureus</i>	<i>E. coli</i>	<i>P. aeruginosa</i>
پوشش کامپوزیتی	٪ ۹۵.۲	٪ ۹۶	٪ ۹۹.۹۹
ورقه تیتانیم	٪ ۴۰	٪ ۴۰	٪ ۴۰

#### بررسی خواص زیست فعالی نمونه پوشش کامپوزیتی HP/mAg

علاوه بر مبحث ذکر شده (خواص آنتی باکتریالی) توانایی ایجاد لایه زیست فعال کلسیم فسفاتی بعد از غوطه وری در محلول شبیه‌سازی بدن SBF به مدت زمان دو هفته مورد بررسی قرار گرفته شد که تصاویر میکروسکوپ الکترونی SEM و نتایج EDX گرفته شده از سطح نمونه در شکل ۲ آورده شده است. دلیل اصلی استفاده از فاز سرامیکی در پوشش کامپوزیتی اصلاح خواص فیزیکی، شیمیایی و زیستی در کاربردهای متناسب با بافت استخوان است. سرامیک‌ها به دلیل پتانسیل مناسب در ارتقاء خواص بیولوژیکی مانند تکثیر و زنده مانی سلولی ارتقاء یافته قابل توجه محققان قرار گرفته‌اند. به عنوان مثال، در تحقیقی که توسط Chien و همکاران انجام شد، سطح ورقه تیتانیم با ذرات نقره و هیدروکسی آپاتیت توسط روش سل-ژل پوشش داده شد. مطالعات نشان داد که حضور نانو ذرات هیدروکسی آپاتیت سبب بهبود زیست فعالی ورقه تیتانیم شد و نتایج حاصل اثبات کرد که لایه کلسیم فسفات بر ورقه تیتانیم شکل گرفت. در حقیقت، حضور یون‌های کلسیم و فسفات بر ورقه پوشش داده شده تیتانیم سبب شد تا بعد از قرارگیری در محیط SBF، شکل‌گیری لایه کلسیم

خاصیت آنتی باکتریال و زیست فعالی می‌تواند در کاربردهای ارتوپدی مورد توجه قرار بگیرد. جهت بررسی میزان سمیت سلولی، پوشش نانوکامپوزیتی با روش سل-ژل با نسبت یکسان هیدروکسی آپاتیت و بتا تری کلسیم فسفات به همراه نانوذرات نقره بر ورقه تیتانیوم از تست MTT استفاده شد. برای این منظور نمونه پوشش داده شده به مدت ۴۸ و ۷۲ ساعت مورد آزمون تماس مستقیم قرار گرفت. نتیجه تست سمیت MTT بدست آمده از این تحقیق، هیچ سمیتی برای پوشش کامپوزیتی نشان نداد و نتایج به دست آمده از نمودار مربوط به تست MTT، افزایش رشد و تکثیر سلولی را در حضور هیدروکسی آپاتیت، بتا تری کلسیم فسفات و نقره نشان می‌دهد. همچنین، نتایج حاصل افزایش چشم‌گیر زنده مانی و تکثیر سلولی را بر پوشش کامپوزیتی نسبت به ورقه تیتانیوم نشان داده است که دلیل آن حضور یون‌های سرامیکی بر ورقه تیتانیوم است [۴۱].

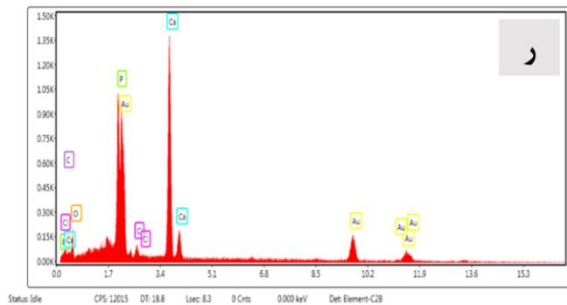
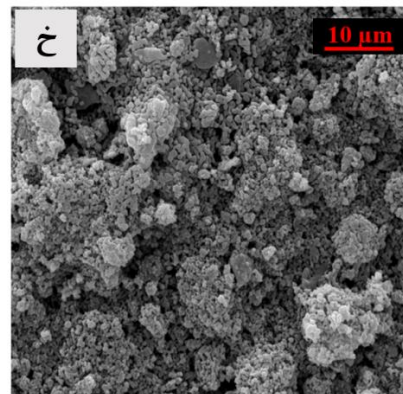
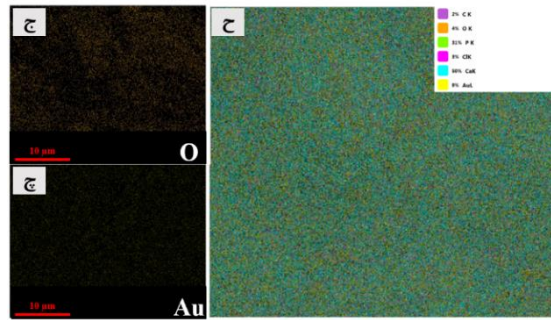


شکل ۳. نمودار نتایج حاصل از تست MTT بر سطح پوشش

کامپوزیتی نانو ذرات نقره-هیدروکسی آپاتیت و بتا تری کلسیم فسفات بر تیتانیوم خالص در مقایسه با ورقه تیتانیوم.

### نتیجه‌گیری

با توجه به نتایج آزمون‌های انجام شده بر پوشش کامپوزیتی HP/nAg می‌توان نتیجه گرفت:



شکل ۴. تصاویر نقشه عنصری (الف-ح)، تصویر میکروسکوپ الکترونی روبشی (SEM) (خ)، طیف آنالیز EDX (ز) از نمونه تیتانیومی پوشش داده شده با کامپوزیت HP/nAg بعد از غوطه‌وری در محلول SBF به مدت ۱۴ روز.

### بررسی زنده مانی سلولی بر پوشش کامپوزیتی HP/nAg

نتایج زنده مانی سلولی گرفته شده از آزمون MTT در شکل ۳ آورده شده است. همانطور که از شکل پیداست درصد زنده مانی سلولی در نمونه‌های پوشش داده شده با پوشش کامپوزیتی HP/nAg نسبت به نمونه کنترل (نمونه بلون پوشش) بیشتر بوده است که با گذشت زمان زنده مانی سلولی نیز افزایش می‌یابد. لذا زنده مانی سلولی همراه با

*hydroxyapatite: process development*. *Biomaterials*, 22(13)( 2001)1721-1730.

6. M. Ferraz, F. Monteiro, and C. Manuel, *Hydroxyapatite nanoparticles: a review of preparation methodologies*. *Journal of Applied Biomaterials and Biomechanics*, 2(2)( 2004) 74-80.

7. D.W. Hutmacher, J.T. Schantz, C.X. F. Lam, K.C. Tan and T.C. Lim, *State of the art and future directions of scaffold- based bone engineering from a biomaterials perspective*. *Journal of tissue engineering and regenerative medicine*, 1(4)( 2007) 245-260.

8. S. Wu, X. Liu, K. Yeung, C. Liu and X-J Yang, *Biomimetic porous scaffolds for bone tissue engineering*. *Materials Science and Engineering: R: Reports*, 80(2014)1-36.

9. S.T. Bendtsen, S.P. Quinnell, and M. Wei, *Development of a novel alginate polyvinyl alcohol- hydroxyapatite hydrogel for 3D bioprinting bone tissue engineered scaffolds*. *Journal of Biomedical Materials Research Part A*, 105(5)( 2017)1457-1468.

10. T.E. Rams, T.W. Roberts, D. Feik, A. K. Molzan and J. Slots, *Clinical and microbiological findings on newly inserted hydroxyapatite coated and pure titanium human dental implants*. *Clinical oral implants research*, 2(3)( 1991) 121-127.

11. C. S. Ciobanu, S. L. Iconaru, M. C. Chifiriuc, A. Costescu, P. Coustumer, and D. Predoi, *Synthesis of antimicrobial monophase silver-doped hydroxyapatite nanopowders for bone tissue engineering*. *Applied Surface Science*, 257(9)( 2011) 4510-4518.

12. R.K. Saini, L.P. Bagri, and A. Bajpai, *Nano-silver hydroxyapatite based antibacterial 3D scaffolds of gelatin/alginate/poly (vinyl alcohol) for bone tissue engineering applications*. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 177(2019) 211-218.

13. M. U. Aslam Khan, M. Al-Thebaiti, M. U. Hashmi, S. Aftab, S. I. Abd Razak, Sh. Abu Hassan, M. R. Abdul Kadir and R. Amin, *Synthesis of silver-coated bioactive nanocomposite scaffolds based on grafted beta-glucan/hydroxyapatite via freeze-drying method: Anti-microbial and biocompatibility evaluation for bone tissue engineering*. *Materials*, 13(4)( 2020) 971.

14. H. Shi, Z. Zhou, W. Li, Y. Fan, Z. Li and J. Wei, *Hydroxyapatite based materials for bone*

۱. پوشش کامپوزیتی یاد شده دارای خاصیت آنتی باکتریال است. ۲. پوشش کامپوزیتی HP/nAg زیست فعال است. ۳. پوشش کامپوزیتی HP/nAg مانع از سمیت سلولی شده و زنده مانی سلول را در میزان قابل توجهی افزایش یافته است. از همین رو پوشش کامپوزیتی هیدروکسی آپاتیت (HA) و بتا تری کلسیم فسفات ( $\beta$ -TCP) به همراه نانوذرات نقره (nAg) بر ورقه تیتانیوم توانمندی استفاده به عنوان ایمپلنت استخوانی را دارد. این پوشش می‌تواند به عنوان ایمپلنت استخوانی جایگزین استخوان باشد و سبب بهبود زیست فعالی، فعالیت آنتی باکتریایی و افزایش زنده مانی/تکثیر سلول‌های استئوبلاست انسانی شود.

#### مراجع

1. X .Liu, P.K. Chu, and C. Ding, *Surface modification of titanium, titanium alloys, and related materials for biomedical applications*. *Materials Science and Engineering: R: Reports*,. 47(3-4)( 2004) 49-121.

2. C. Mas-Moruno, P. M Dorfner, F. Manzenrieder, S. Neubauer, U. Reuning, R. Burgkart and H. Kessler , *Behavior of primary human osteoblasts on trimmed and sandblasted Ti6Al4V surfaces functionalized with integrin  $\alpha\beta3$ - selective cyclic RGD peptides*. *Journal of biomedical materials research Part A*, 101(1)( 2013) 87-97.

3. W. Chen, S. Oh, A.P. Ong, N. Oh, Y. Liu, H.S. Courtney, M. Appleford and J.L. Ong., *Antibacterial and osteogenic properties of silver- containing hydroxyapatite coatings produced using a sol gel process*. *Journal of Biomedical Materials Research Part A: An Official Journal of The Society for Biomaterials, The Japanese Society for Biomaterials, and The Australian Society for Biomaterials and the Korean Society for Biomaterials*, 82(4)( 2007)899-906.

4. I.S. Kim, and P.N. Kumta, *Sol-gel synthesis and characterization of nanostructured hydroxyapatite powder*. *materials science and Engineering: B*, 111(2-3)( 2004) 232-236.

5. D.M. Liu, T. Troczynski, and W.J. Tseng, *Water-based sol-gel synthesis of*



23. J. Qu, X. Lu, D. Li, Y. Ding, Y. Leng, J. Weng, S. Qu, B. Feng and F. Watari, *Silver/hydroxyapatite composite coatings on porous titanium surfaces by sol gel method*. Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials, 97(1)(2011)40-48.
24. S. L. Iconaru, P. Chapon, P. L. Coustumer, and D. Predoi, *Antimicrobial activity of thin solid films of silver doped hydroxyapatite prepared by sol-gel method*. The Scientific World Journal, (2014).
25. H. W. Kim, Y. H. Koh, L. Li, S. Lee and H. Kim, *Hydroxyapatite coating on titanium substrate with titania buffer layer processed by sol-gel method*. Biomaterials, 25(13)(2004) 2533-2538.
26. L. D. Piveteau, B. Gasser, and L. Schlapbach, *Evaluating mechanical adhesion of sol-gel titanium dioxide coatings containing calcium phosphate for metal implant application*. Biomaterials, 21(21)(2000) 2193-2201.
27. R. Urban, J. Jacobs, M. Tomlinson, J. Gavrilović, J. Black and M. Péoc'h, *Dissemination of wear particles to the liver, spleen, and abdominal lymph nodes of patients with hip or knee replacement*. JBJS, 82(4)(2000) 457.
28. T. Kokubo, and H. Takadama, *How useful is SBF in predicting in vivo bone bioactivity*. Biomaterials, 27(15)(2006) 2907-2915.
29. K. S. Song, S. Lee, A. Beitollahi, J. S. Choi and I. J. Yu, *Introducing a new international standard ISO/TS 20660 :Specification of characteristics and measurement methods for antibacterial silver nanoparticles*. (2020).
30. A. Shababdoust, M. Zandi, M. Ehsani, P. Shokrollahi and R. Foudazi, *Controlled curcumin release from nanofibers based on amphiphilic-block segmented polyurethanes*. International journal of pharmaceutics, 575(2020) 118947.
31. C. S. Chien, C. W. Liu, and T. Y. Kuo, *Investigation into microstructural properties of fluorapatite Nd-YAG laser clad coatings with PVA and WG binders*. Surface and Coatings Technology, 205(10)(2011) 3141-3146.
32. C. Chien, T. J. Han, T. Hong, T. Kuo and T. Liao, *Effects of different binders on microstructure and phase composition of hydroxyapatite Nd-YAG laser clad coatings*. Applied Surface Science, 257(6)(2011) 2387-2393.
- tissue engineering: A brief and comprehensive introduction*. Crystals, 11(2) (2021) 149.
15. A. A. Vu, S. F. Robertson, D. Ke, A. Bandyopadhyay and S. Bose, *Mechanical and biological properties of ZnO, SiO<sub>2</sub>, and Ag<sub>2</sub>O doped plasma sprayed hydroxyapatite coating for orthopaedic and dental applications*. Acta biomaterialia, 92(2019).325-335.
16. Y-S. Park, K-Y. Yi, I-S. Lee, C-H. Han and Y-C. Jung, *The effects of ion beam-assisted deposition of hydroxyapatite on the grit-blasted surface of endosseous implants in rabbit tibiae*. International Journal of Oral & Maxillofacial Implants, (2005) 20(1)
17. A. Ivanova, M. A. Surmeneva, A. I. Tyurin, T. S. Pirozhkova, I. A. Shuvarin, O. Prymak, M. Epple, M. V. Chaikina and R. A. Surmenev, *Fabrication and physico-mechanical properties of thin magnetron sputter deposited silver-containing hydroxyapatite films*. Applied Surface Science, 360(2016) 929-935.
18. F. Muhaffel, G. Cempura, M. Menekse, A. Czyska-Filemonowicz, N. Karaguler and H. Cimenoglu, *Characteristics of multi-layer coatings synthesized on Ti6Al4V alloy by micro-arc oxidation in silver nitrate added electrolytes*. Surface and Coatings Technology, 307(2016) 308-315.
19. A. Montenero, G. Gnappi, F. Ferrari, M. Cesari, E. Salvioli, L. Mattogno, S. Kaciulis and M. Fini, *Sol-gel derived hydroxyapatite coatings on titanium substrate*. Journal of Materials science, 35(11)(2000) 2791-2797.
20. T. Peltola, M. Päätsi, H. Rahiala, I. Kangasniemi and A. Yli-Urpo, *Calcium phosphate induction by sol-gel derived titania coatings on titanium substrates in vitro*. Journal of Biomedical Materials Research: An Official Journal of The Society for Biomaterials, The Japanese Society for Biomaterials, and the Australian Society for Biomaterials, 41(3)(1998) 504-501.
21. D. Haddow, P. James, and R. Van Noort, *Characterization of sol-gel surfaces for biomedical applications*. Journal of Materials Science: Materials in Medicine, 7(5)(1996) 255-260.
22. S. Jadalannagari, K. Deshmukh, S. R. Ramanan and M. Kowshik, *Antimicrobial activity of hemocompatible silver doped hydroxyapatite nanoparticles synthesized by modified sol-gel technique*. Applied Nanoscience, 4(2)(2014) 133-141.

33. A. El-Hajje, E. C. Kolos, J. K. Wang, S. Maleksaeedi, Z. He, F. Edith Wiria, C. Choong and A. J. Ruys, *Physical and mechanical characterisation of 3D-printed porous titanium for biomedical applications*. Journal of Materials Science: Materials in Medicine, 25(11)(2014)2471-2480.
34. L.S. Nair and C.T. Laurencin, *Silver nanoparticles: synthesis and therapeutic applications*, Journal of biomedical nanotechnology, 3(4)(2007) 301-316.
35. S. Chen, G. Wu, and H. Zeng, *Preparation of high antimicrobial activity thiourea chitosan–Ag<sup>+</sup> complex*. Carbohydrate Polymers, 60(1)(2005)33-38.
36. K. Batebi, B.A. Khazaei, and A. Afshar, *Characterization of sol-gel derived silver/fluorhydroxyapatite composite coatings on titanium substrate*. Surface and Coatings Technology, 352(2018) 522-528.
37. S. Tang and J. Zheng, *Antibacterial activity of silver nanoparticles: structural effects*. Advanced healthcare materials, 7(13)(2018) 1701503.
38. C. Chi-Sheng, T. Liao, T. Hong, T. Kuo, C. Chang, M. Yeh and T. Lee, *Surface microstructure and bioactivity of hydroxyapatite and fluorapatite coatings deposited on Ti-6Al-4V substrates using Nd-YAG laser*. J. Med. Biol. Eng, 34(2)(2014) 109-115.
39. A. Bigham, A. Orash M. Salehi, M. Rafienia, M. R. Salamat, Sh. Rahmati, M. Raucci and L. Ambrosio, *Zn-substituted Mg<sub>2</sub>SiO<sub>4</sub> nanoparticles-incorporated PCL-silk fibroin composite scaffold: A multifunctional platform towards bone tissue regeneration*. Materials Science and Engineering: C, (2021) 112242.
40. A.A. Zadpoor, *Relationship between in vitro apatite-forming ability measured using simulated body fluid and in vivo bioactivity of biomaterials*. Materials Science and Engineering: C, 35(2014) 134-143.
41. A. Jaafar, C. Hecker, P. Árki, and Y. Joseph, *Sol-gel derived hydroxyapatite coatings for titanium implants A review*. Bioengineering, 7(4)(2020)127.