

بررسی خواص پوشش با ساختار تغییرات تدریجی اکسید تیتانیوم/هیدروکسی اپتایت، اعمال شده به روش الکتروفوریتیک بر روی آلیاژ تیتانیوم Ti-6Al-4V

علیرضا عراقی^۱، محمد جعفر هادیان فرد^{۲*}، طاهره طلایی خوزانی^۳، مهسا ثانی^۴

۱- دانشجوی دکتری، بخش مهندسی مواد، دانشکده مهندسی، دانشگاه شیراز، شیراز، ایران

۲- استاد، بخش مهندسی مواد، دانشکده مهندسی، دانشگاه شیراز، شیراز، ایران

۳- دانشیار، بخش آناتومی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی شیراز، شیراز، ایران

۴- کارشناسی ارشد، بخش آناتومی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی شیراز، شیراز، ایران

* hadianfa@shirazu.ac.ir

(تاریخ دریافت: ۱۳۹۴/۰۷/۱۱، تاریخ پذیرش: ۱۳۹۴/۰۷/۳۰)

چکیده

در تحقیق حاضر پوشش های تک لایه هیدروکسی اپتایت (HA)، اکسید تیتانیوم (TiO_2) و پوشش با ساختار تغییرات تدریجی اکسید تیتانیوم/هیدروکسی اپتایت به روش الکتروفوریتیک بر روی آلیاژ تیتانیوم Ti-6Al-4V اعمال گردید. مورفولوژی پوشش ها با استفاده از میکروسکوپ الکترونی روبشی (SEM) بررسی شد. همچنین ترکیب پوشش ها با استفاده از آنالیزهای پراش اشعه ایکس (XRD) و طیف سنجی پراش انرژی اشعه ایکس (EDX) مورد بررسی قرار گرفت. نتایج نشان داد که در پوشش با ساختار تغییرات تدریجی اکسید تیتانیوم/هیدروکسی اپتایت، ترکیب پوشش از ۱۰۰ درصد اکسید تیتانیوم/صفر درصد هیدروکسی اپتایت در سطح زیر لایه، به صفر درصد اکسید تیتانیوم/۱۰۰ درصد هیدروکسی اپتایت در سطح خارجی پوشش تغییر کرده است. به منظور بررسی زیست سازگاری پوشش های اعمال شده، کشت سلول های بنیادی بند ناف بر روی آنها صورت گرفت. نتایج نشان داد که پوشش با ساختار تغییرات تدریجی و پوشش تک لایه هیدروکسی اپتایت نسبت به پوشش تک لایه اکسید تیتانیوم از زیست سازگاری به مراتب بالاتری برخوردار هستند. علاوه بر این میزان چسبندگی پوشش ها به وسیله آزمون برشی بررسی گردید و نتایج نشان داد که پوشش با ساختار تغییرات تدریجی از استحکام چسبندگی به مراتب بالاتری (۳۱ MPa) در مقایسه با پوشش تک لایه هیدروکسی اپتایت (۱۱ MPa) برخوردار است.

واژه های کلیدی:

الکتروفوریتیک، کشت سلولی، هیدروکسی اپتایت، ساختار تغییرات تدریجی.

۱- مقدمه

تیتانیوم و آلیاژهای آن به علت خواص مکانیکی بسیار خوب، زیست سازگاری، مقاومت به خوردگی و غیر سمی بودن، کاربرد وسیعی در ارتوپدی و دندان پزشکی دارند [۱-۴]. از بین آلیاژهای تیتانیوم، آلیاژ Ti-6Al-4V به خاطر مقاومت به سایش و مدول یانگ بسیار بالا نسبت به استخوان، در ارتوپدی به عنوان ایمپلنت بیشترین کاربرد را داراست [۱]. این آلیاژ به علت

حضور یک لایه میانی از اکسید تیتانیوم در مقایسه با پوشش هیدروکسی اپتایت (به تنهایی) بر روی زیر لایه آلیاژ تیتانیوم، بهبود می یابد [۱-۲].

تحقیقات زیادی در زمینه پوشش های تک لایه هیدروکسی اپتایت و دولایه اکسید تیتانیوم- هیدروکسی اپتایت بر روی زیر لایه های مختلف انجام شده است [۱-۳]. اما در خصوص پوشش با ساختار تغییرات تدریجی اکسید تیتانیوم/ هیدروکسی اپتایت تحقیقات بسیار کمی صورت گرفته است. همچنین در اکثر تحقیقات انجام شده از اتانول، استون و آب برای ایجاد محلول سوسپانسیون به منظور اعمال پوشش به روش الکتروفوریتیک استفاده شده است [۱-۶]. در تحقیق حاضر پوشش با ساختار تغییرات تدریجی اکسید تیتانیوم/ هیدروکسی اپتایت به روش الکتروفوریتیک بر روی زیر لایه آلیاژ تیتانیوم Ti-6Al-4V به منظور بهبود خواص چسبندگی اعمال گردیده است. همچنین از استیل استون برای ایجاد محلول سوسپانسیون استفاده شده است. علاوه بر این پوشش، پوشش های تک لایه از هیدروکسی اپتایت و اکسید تیتانیوم نیز اعمال گردید و خواص زیست سازگاری و چسبندگی پوشش با ساختار تغییرات تدریجی اکسید تیتانیوم/ هیدروکسی اپتایت با این پوشش ها مقایسه شده است.

۲- مواد و روش انجام تحقیق

ورق آلیاژ تیتانیوم Ti-6Al-4V به ضخامت ۱ mm به ابعاد mm ۸×۳۰ برش داده شد و به عنوان زیر لایه مورد استفاده قرار گرفت. از پودر های هیدروکسی اپتایت (merck، آلمان، مینگین اندازه ذرات ۱۸۰ μm) و اکسید تیتانیوم (sigma-aldrich، آمریکا، مینگین اندازه ذرات ۸۵ μm) به همراه استیل استون (sigma-aldrich، آمریکا) برای ایجاد محلول سوسپانسیون به منظور اعمال پوشش با فرآیند الکتروفوریتیک استفاده گردید. همچنین از پلی اتیلن ایمین (PEI) و ید به ترتیب به عنوان پیوند دهنده و پخش کننده در محلول سوسپانسیون استفاده شد.

مقاومت بالای خوردگی و غیر سمی بودن، با بدن انسان سازگاری بالایی دارد، اما به سلول های استخوانی اجازه رشد را نمی دهد. به عبارت دیگر این آلیاژ زیست سازگار است ولی زیست فعال نیست [۱-۴]. برای بر طرف کردن این عیب، بر روی این آلیاژ پوشش هایی با قابلیت زیست فعالی اعمال می کنند. از جمله این پوشش ها پوشش هیدروکسی اپتایت می باشد که از اجزاء اصلی استخوان است و به سلول های استخوانی اجازه رشد را می دهد [۳، ۵-۶]. یکی از روش های پوشش دهی هیدروکسی اپتایت بر روی زیر لایه های فلزی، روش الکتروفوریتیک می باشد و تحقیقات بسیاری در این زمینه انجام شده است [۷-۹]. این روش پوششی یکنواخت و متخلخلی از هیدروکسی اپتایت در اختیار قرار می دهد که برای رشد سلولی بسیار مناسب است اما تحقیقات انجام شده نشان می دهد که چسبندگی پوشش ایجاد شده توسط این روش با زیر لایه فلزی پایین است و از مشکلات روش الکتروفوریتیک می باشد [۱-۲]. برخی از محققین به منظور بهبود خواص چسبندگی پوشش هیدروکسی اپتایت، از روش های با دمای بالا برای پوشش دهی استفاده کرده اند. روش هایی از قبیل پلازما اسپری، اسپری حرارتی، پلازما لیزر و غیره. تحقیقات انجام شده نشان می دهد که استفاده از این روش ها خواص چسبندگی هیدروکسی اپتایت را بهبود زیادی می بخشد [۲-۱۰] اما به علت دمای بسیار بالا در حین اعمال پوشش، هیدروکسی اپتایت تجزیه شده و خاصیت زیست فعالی خود را از دست می دهد (در دمای بالا، هیدروکسی اپتایت به CaO و Ca₃PO₄ که زیست سازگار نیستند، تجزیه می گردد) [۱-۱۱].

برای جلوگیری از تجزیه حرارتی هیدروکسی اپتایت و از طرف دیگر بهبود خواص چسبندگی این پوشش با آلیاژ تیتانیوم به عنوان زیر لایه، می توان از یک لایه میانی که خواص مشابه تری با آلیاژ تیتانیوم دارد، استفاده نمود و فرآیند پوشش دهی را با روش الکتروفوریتیک انجام داد. در سال های اخیر تحقیقاتی با محوریت این ایده صورت گرفته است. نتایج این تحقیقات نشان می دهد که خواص چسبندگی پوشش هیدروکسی اپتایت در

فرآیند پوشش دهی به روش الکتروفوریتیک طی ۴ مرحله قرار گرفت. برای ایجاد این پوشش، فرآیند الکتروفوریتیک به ترتیب با استفاده از محلول های شماره ۱، ۲، ۳ و ۴ به طور پشت سر هم و بدون وقفه، با اعمال ولتاژ ۲۰ V و مدت زمان ۳۰ s برای هر مرحله انجام شد. طی این فرآیند چهار مرحله ای پوشش با ساختار تغییرات تدریجی شامل چهار لایه ایجاد گردید که تغییرات تدریجی در ترکیب از سطح زیر لایه تا سطح پوشش را حاصل نمود. پس از تهیه پوشش های خام به روش الکتروفوریتیک، هر یک از پوشش های خام در لوله های شیشه ای از جنس کوآرتز و تحت مکش پمپ خلاء کپسوله شدند. شکل ۱ نمونه ای از پوشش خام که در شرایط خلاء کپسوله شده است را نشان می دهد. سپس نمونه های کپسوله شده در کوره الکتریکی تحت عملیات تفت جوشی قرار گرفتند. سرعت گرمایش کوره ۲ درجه سانتی گراد بر دقیقه بود و نمونه ها پس از عملیات تفت جوشی، تا دمای محیط در کوره سرد شدند. نمونه های خام در دمای ۹۰۰ درجه سانتی گراد و طی مدت زمان ۱ ساعت، تحت عملیات تفت جوشی قرار گرفتند.

به منظور تولید پوشش با ساختار تغییرات تدریجی اکسید تیتانیوم/هیدروکسی اپتایت و پوشش های تک لایه هیدروکسی اپتایت و اکسید تیتانیوم، محلول های سوسپانسیون مختلفی آماده گردید. مشخصات و ترکیب این محلول ها در جدول ۱ ارائه شده است. این محلول ها قبل از فرآیند پوشش دهی به مدت ۳۰ دقیقه تحت مخلوط سازی با دستگاه مافوق صوت میله ای قرار گرفتند.

زیر لایه آلیاژ تیتانیوم ابتدا تا سمباده شماره ۱۰۰۰ سمباده زده شد و سپس با اتانول کاملاً شستشو داده شد و در فرآیند پوشش دهی به روش الکتروفوریتیک به عنوان کاتد مورد استفاده قرار گرفت. از ورق فولاد زنگ نزن ۳۱۶L به ابعاد ۳۰×۳۰×۰/۵ به عنوان آند استفاده گردید. برای ایجاد پوشش تک لایه اکسید تیتانیوم از محلول شماره ۱ استفاده گردید. ولتاژ و مدت زمان فرآیند الکتروفوریتیک برای ایجاد این پوشش به ترتیب ۲۰ V و ۱۲۰ s بود. برای ایجاد پوشش تک لایه هیدروکسی اپتایت از محلول شماره ۴ طی فرآیند الکتروفوریتیک با ولتاژ و مدت زمان مشابه استفاده شد. به منظور ایجاد پوشش با ساختار تغییرات تدریجی اکسید تیتانیوم/هیدروکسی اپتایت، زیر لایه آلیاژ تیتانیوم تحت



شکل (۱): نمونه ای از پوشش خام که در شرایط خلاء درون لوله شیشه ای از جنس کوآرتز کپسوله شده است

جدول (۱): مشخصات محلول های استفاده شده برای اعمال پوشش های مختلف به روش الکتروفوریتیک

شماره محلول سوسپانسیون	Acetylacetone (ml)	TiO ₂ (g)	HA (g)	PEI (g/L)	Iodine (g/L)	پتانسیل زتا (mV)
۱	۵۰	۱	-	۴	۰/۶	۲۷/۸۶
۲	۵۰	۰/۶۵	۰/۳۵	۴	۰/۶	۲۴/۴۵
۳	۵۰	۰/۳۵	۰/۶۵	۴	۰/۶	۲۹/۷۶
۴	۵۰	-	۱	۴	۰/۶	۳۱/۱۸

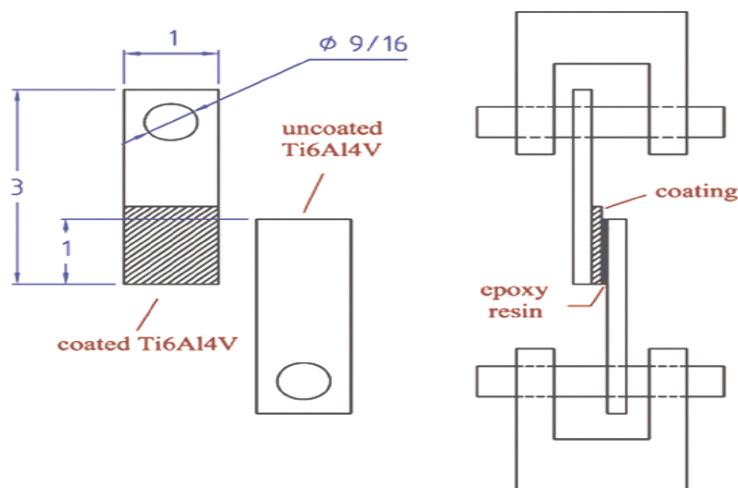
AMEM شامل ۱٪ گلوتامین (L-glutamine)، ۱٪ پنسیلین (Penicillin) و ۱۰٪ FBS (Fetal Bovin Serum) ریخته شد. سپس نمونه ها درون انکوباتور تحت دمای ۳۷ درجه سانتی گراد و ۵٪ گاز دی اکسید کربن به مدت ۱۰ روز قرار گرفتند. طی این مدت زمان، سلول های بنیادی از تکه های بند ناف شروع به تکثیر کرده و به کف ظرف می چسبند. بعد از انجام این مرحله، سلول های تکثیر یافته از کف ظرف با اضافه کردن تریپسین (Trypsin)، این ماده چسبندگی سلول به کف ظرف را از بین برده و باعث معلق شدن سلول ها می گردد (جمع آوری شده و پس از شستشو با AMEM برای مرحله دوم تکثیر به ظرف های جدید انتقال داده شدند. این مرحله با اضافه کردن ۱۰ میلی لیتر از محیط کشت به ظرف و قرار گیری در انکوباتور آغاز گردید. به منظور بالا بردن خلوص سلول های بنیادی مرحله سوم کشت سلولی بر روی نمونه ها، مشابه مرحله دوم تکرار شد. پس از آن در مرحله چهارم، هر یک از نمونه های پوشش داده شده به عنوان داربست در کف خانه های (well) ظرف ۲۴ خانه ای مطابق شکل ۳ قرار داده شد. تعداد برابر از سلول ها بر روی هر یک از داربست ها قرار گرفت و به آنها محیط کشت اضافه گردید و به مدت ۱۰ روز در انکوباتور قرار داده شدند. پس از آن به منظور بررسی میزان رشد و تکثیر سلولها در مجاورت داربست های مختلف (پوشش های مختلف)، بر روی نمونه های کشت شده آزمون MTT (Microculture Tetrazolium Test) صورت گرفت. برای این منظور ۵ mM از محلول نمک تترازولایوم به نسبت ۱ به ۱۰ با محیط کشت (فاقد FBS) رقیق گردید. سپس محیط کشت سلولی با مقدار ۴۰۰ µl از این

ترکیب تمامی پوششها با استفاده از روش های XRD تحت تابش Cu Kα و دقت زاویه ای ۰/۰۵° و EDX مورد مطالعه قرار گرفت. مورفولوژی، ریز ساختار و برش عرضی پوشش ها با استفاده از میکروسکوپ الکترونی روبشی بررسی گردید و از نرم افزار ImageJ برای بررسی و تعیین درصد سطحی تخلخلها در پوشش های مختلف استفاده شد. میزان چسبندگی پوششها پس از عملیات تفت جوشی، با استفاده از آزمون برشی طبق استاندارد ASTM F1044-05 با یکدیگر مقایسه شد. برای این منظور سطح نمونه پوشش داده شده به وسیله چسب اپوکسی (3M Scotch-weld DP410) به ورق آلایژ تیتانیوم بدون پوشش با ابعاد یکسان متصل گردید و سپس به وسیله دستگاه کشش (Santam STM-250) تحت نیروی برشی قرار گرفت تا پوشش از سطح نمونه کنده شود. شکل ۲ شماتیک این آزمون را نشان می دهد. ماکزیم نیروی بدست آمده از نمودار کشش در این آزمون، بر سطح پوشش مربوطه تقسیم شد و میزان تنش برشی بدست آمده به عنوان استحکام برشی پوشش گزارش گردید.

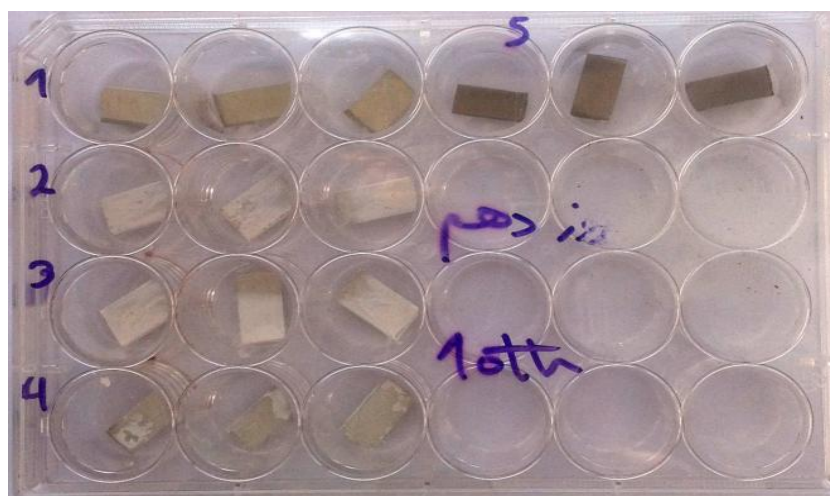
به منظور بررسی خواص زیست سازگاری پوشش های ایجاد شده، آزمون کشت سلولی بر روی پوشش ها انجام شد. از سلول های بنیادی مزانشیمی بند ناف در این آزمون استفاده گردید. به منظور تهیه، جدا سازی و تکثیر این سلولها، نمونه بندناف تهیه شده، در محلول PBS (Phosphate Buffer Saline) شستشو داده شد تا خون موجود در بند ناف به طور کامل جدا گردد. سپس قسمت ژله ای بند ناف از بند ناف (Wharton's jelly) جدا شد و به قطعه های ۵ mm برش داده شد. قطعه ها درون بشقاب قرار گرفتند و بر روی آنها ۱۰ میلی لیتر از محیط کشت

رنگ بنفش در آمده، از هر یک از خانه ها به طور مجزا خارج شد و با دستگاه طیف سنجی، میزان جذب نور در طول موج ۵۵۰ nm برای هر یک محلولها اندازه گیری شد. میزان جذب نوری در این طول موج به عنوان معیار کمی از تعداد سلول های زنده بر روی داربست های مختلف پس از کشت سلولی، گزارش شده است.

محلول برای هر یک از خانه های ظرف حاوی داربست جایگزین شد. نمونه ها به مدت ۳ ساعت و ۳۰ دقیقه در انکوباتور قرار گرفتند. پس از طی این مدت زمان محیط کشت سلولها تخلیه شد و به هر خانه ۱۰۰ μl از (Dymethyl Sulfoxide) DMSO و ۱۰ μl بافر گلايسين اضافه گردید. محلول اضافه شده و سلولها با دقت با یکدیگر مخلوط گردیدند. در این مرحله محلول که به



شکل (۲): شماتیک آزمون استحکام برشی به منظور تعیین استحکام چسبندگی پوشش ها [۳]



شکل (۳): ظرف ۲۴ خانه ای و قرار گیری نمونه ها در آن به منظور انجام آزمون کشت سلولی

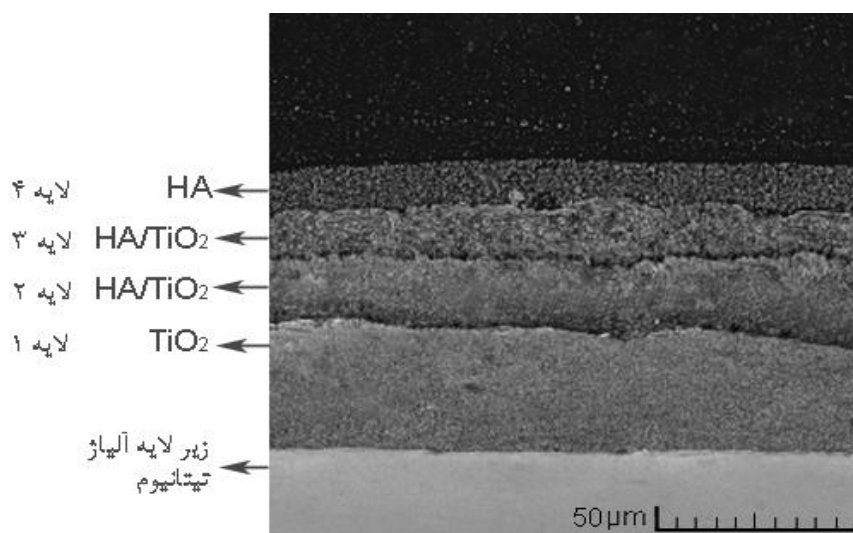
در ترکیب می باشد که شامل ۴ لایه مختلف است. لایه اول از اکسید تیتانیوم، لایه دوم با ساختار کامپوزیتی از اکسید تیتانیوم/هیدروکسی اپتایت، لایه سوم با ساختار کامپوزیتی از هیدروکسی اپتایت/اکسید تیتانیوم و لایه چهارم از هیدروکسی

۳- نتایج و بحث

شکل ۴ تصویر میکروسکوپ الکترونی از برش عرضی پوشش با ساختار تغییرات تدریجی اکسید تیتانیوم/هیدروکسی اپتایت را نشان می دهد. این پوشش دارای ساختاری با تغییرات تدریجی

ریز ساختار با دانه های درشتتری است (شکل ۵-الف و د). همچنین مشاهده می گردد که لایه های میانی (شکل ۵-ب و ج) دارای ریز ساختاری شامل دانه بندی های درشت و ریز هستند. این امر تایید کننده حضور همزمان ذرات هیدروکسی اپتایت و اکسید تیتانیوم در این لایه ها و ایجاد ساختاری کامپوزیتی می باشد. همانگونه که مشاهده می گردد، درصد حضور ذرات اکسید تیتانیوم در لایه میانی اول (شکل ۵-ب) بیشتر از لایه میانی دوم است (شکل ۵-ج). بنابراین تغییرات تدریجی در ترکیب این پوشش از سطح زیر لایه تا سطح بیرونی پوشش با توجه به تصویر برشی از سطح مقطع کاملاً قابل مشاهده است.

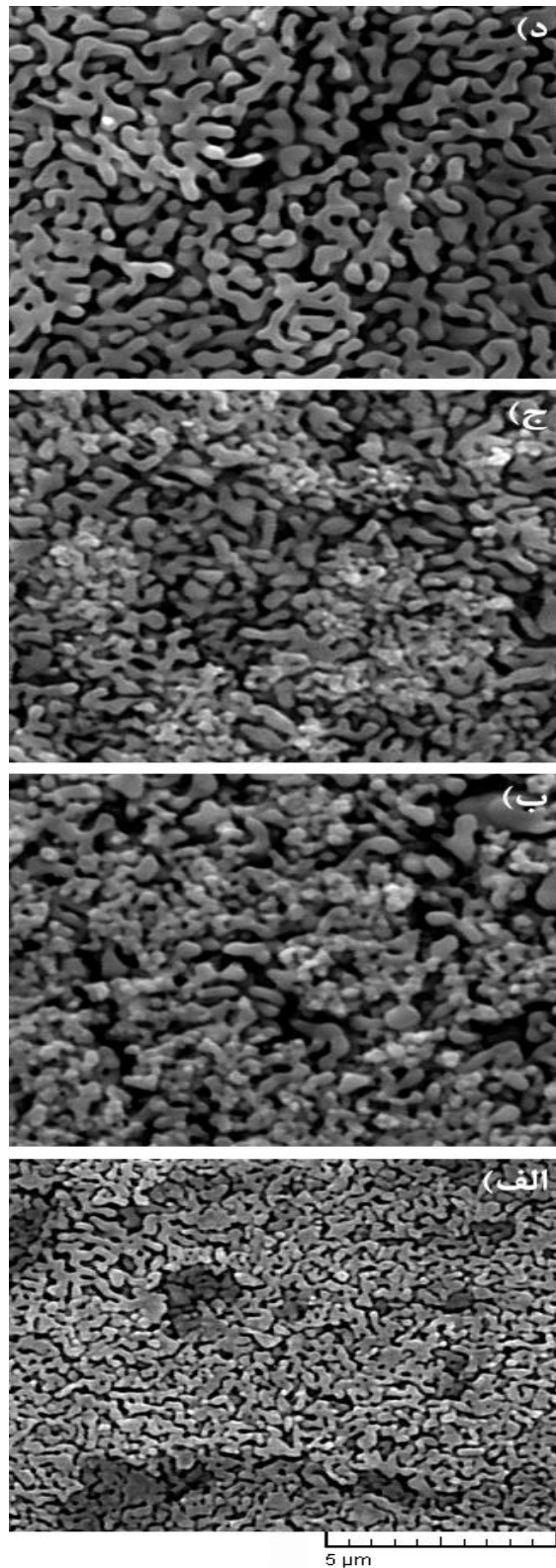
اپتایت. با توجه به این تصویر لایه های مختلف پوشش با ساختار تدریجی، از یکنواختی نسبتاً مناسبی برخوردار بوده و پوششی عاری از ترک با ضخامت تقریبی $80\mu\text{m}$ را ایجاد نموده اند. همچنین مشاهده می گردد که لایه های مختلف پوشش از بهم پیوستگی مطلوبی برخوردارند و عدم اتصال در بین لایه ها مشاهده نمی گردد. مورفولوژی و ریز ساختار هر یک از این لایه ها در این پوشش، پس از عملیات تفت جوشی در شکل ۵ به تفکیک ارائه شده است. با توجه به اینکه میانگین اندازه ذرات پودر اولیه هیدروکسی اپتایت نسبت به اکسید تیتانیوم درشت تر است، ساختار این لایه نیز در مقایسه با لایه اکسید تیتانیوم دارای



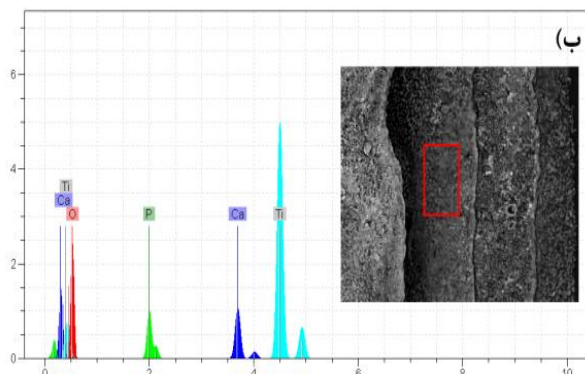
شکل (۴): تصویر میکروسکوپ الکترونی از برش عرضی پوشش با ساختار تغییرات تدریجی اکسید تیتانیوم/هیدروکسی اپتایت پس از تفت جوشی

کند. شکل ۷ نتایج بدست آمده از آزمون XRD بر روی لایه های مختلف این پوشش را نشان می دهد. با توجه به این شکل لایه اول تنها شامل پیک های مربوط به اکسید تیتانیوم و لایه چهارم پوشش، تنها دارای پیک های مرتبط با هیدروکسی اپتایت است. این در حالیست که در شکل های ۷-ب و ج دو دسته پیک مشاهده می گردد که مربوط به حضور همزمان هیدروکسی اپتایت و اکسید تیتانیوم در این لایه ها می باشند.

شکل ۶ نتایج آنالیز نقطه ای از آزمون EDX بر روی لایه های مختلف پوشش با ساختار تغییرات تدریجی اکسید تیتانیوم/هیدروکسی اپتایت را نشان می دهد. ملاحظه می شود که درصد وزنی عناصر کلسیم و فسفر (عناصر اصلی تشکیل دهنده هیدروکسی اپتایت، $(\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2)$ به ترتیب از لایه اول تا لایه چهارم افزایش یافته است و به طور عکس، درصد وزنی عنصر تیتانیوم روندی نزولی دارد. نتایج این آزمون، تغییرات تدریجی در ترکیب این پوشش که در تصاویر میکروسکوپ الکترونی (شکل ۵) کاملاً مشهود است را تایید می



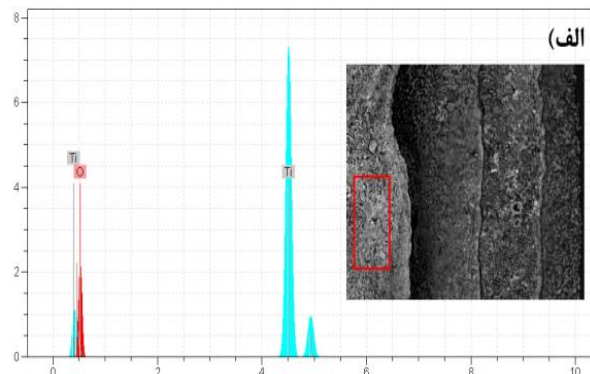
شکل (۵): مورفولوژی و ریز ساختار هریک از این لایه های پوشش با ساختار تغییرات تدریجی اکسید تیتانیوم/هیدروکسی اپتایت پس از تفت جوشی: (الف): لایه اول (TiO_2), (ب): لایه دوم (کامپوزیت HA-TiO_2), (ج): لایه سوم (کامپوزیت HA-TiO_2) و (د): لایه چهارم (HA)



Spectra: TiO₂/HA layer 1

Element	Series	unn. C [wt.-%]	norm. C [wt.-%]
Oxygen	K series	36.28	37.91
Phosphorus	K series	5.61	5.86
Calcium	K series	12.68	13.25
Titanium	K series	41.13	42.98

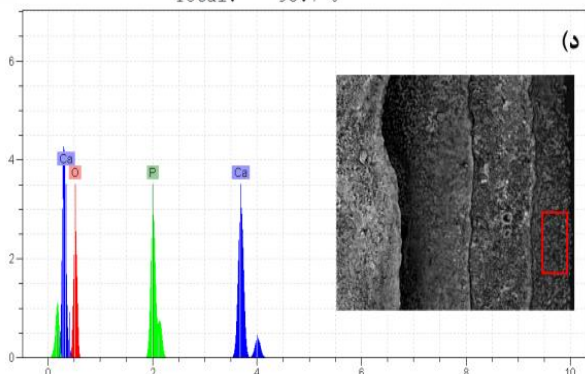
Total: 95.7 %



Spectra: TiO₂ layer

Element	Series	unn. C [wt.-%]	norm. C [wt.-%]
Oxygen	K series	35.73	36.16
Titanium	K series	63.07	63.84

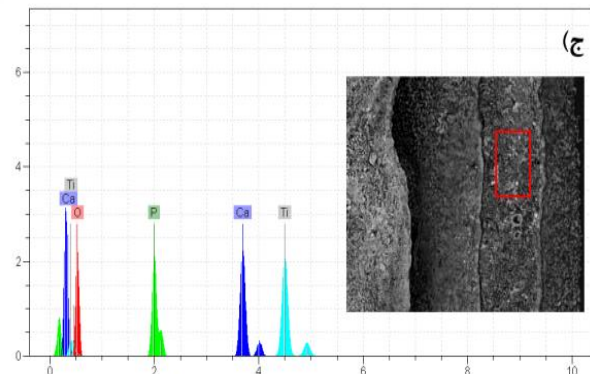
Total: 98.8 %



Spectra: HA layer

Element	Series	unn. C [wt.-%]	norm. C [wt.-%]
Oxygen	K series	42.77	43.16
Phosphorus	K series	17.54	17.70
Calcium	K series	38.79	39.14

Total: 99.1 %



Spectra: TiO₂/HA layer 2

Element	Series	unn. C [wt.-%]	norm. C [wt.-%]
Oxygen	K series	39.72	41.00
Phosphorus	K series	11.78	12.15
Calcium	K series	25.97	26.80
Titanium	K series	19.43	20.05

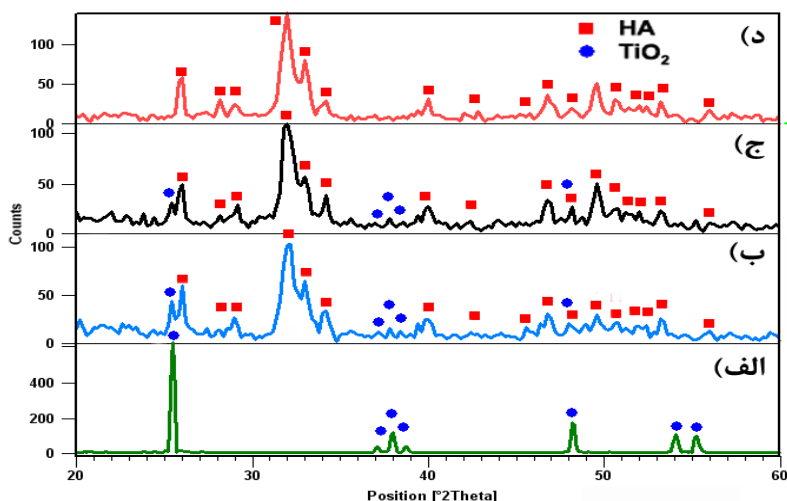
Total: 96.9 %

شکل (۶): نتایج آزمون EDX بر روی لایه های مختلف پوشش با ساختار تغییرات تدریجی اکسید تیتانیوم/هیدروکسی اپتایت: (الف): لایه اول (TiO₂), (ب): لایه دوم (کامپوزیت HA-TiO₂), (ج): لایه سوم (کامپوزیت HA-TiO₂) و (د): لایه چهارم (HA)

صد در صد هیدروکسی اپتایت در سطح خارجی پوشش به تدریج تغییر می نماید.

شکل ۸ تصویر میکروسکوپ الکترونی از سطح پوشش های تک لایه اکسید تیتانیوم، هیدروکسی اپتایت و پوشش با ساختار تغییرات تدریجی اکسید تیتانیوم/هیدروکسی اپتایت را نشان می دهد.

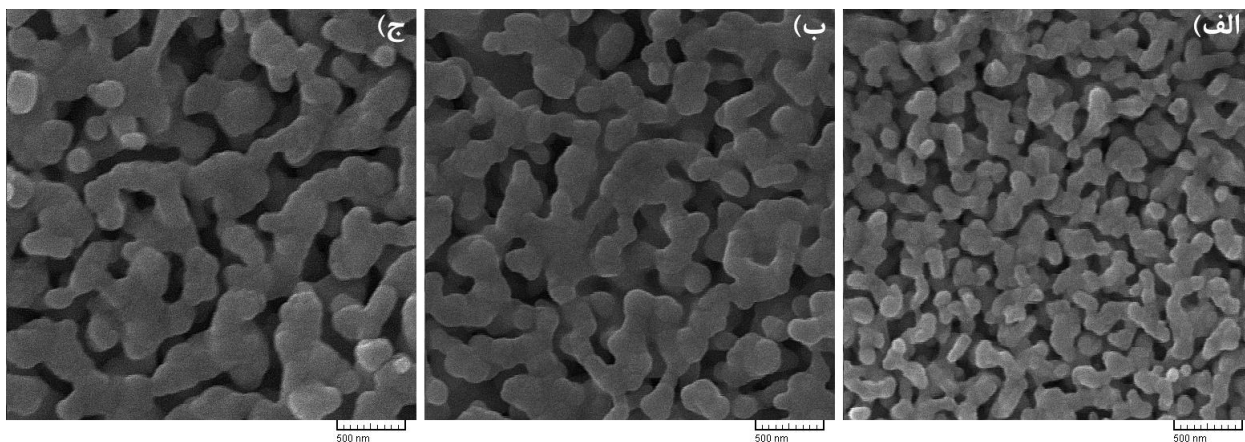
با مقایسه شدت پیک های مرتبط با اکسید تیتانیوم، ملاحظه می گردد که شدت پیکهای اکسید تیتانیوم در شکل ۷-ب بیشتر از شکل ۷-ج است. که این امر تایید کننده تغییر در ترکیب این لایه ها است. بنابراین ملاحظه می گردد که ترکیب پوشش با ساختار تغییرات تدریجی اکسید تیتانیوم/هیدروکسی اپتایت از میزان صد در صد اکسید تیتانیوم در مجاورت زیر لایه تا میزان



شکل (۷): نتایج بدست آمده از آزمون XRD بر روی لایه های مختلف پوشش با ساختار تغییرات تدریجی اکسید تیتانیوم/هیدروکسی اپتایت: (الف): لایه اول (TiO_2)، (ب): لایه دوم (کامپوزیت HA-TiO_2)، (ج): لایه سوم (کامپوزیت HA-TiO_2) و (د): لایه چهارم (HA)

سوی دیگر پوشش تک لایه اکسید تیتانیوم دارای ریز ساختار متفاوتی است به طوریکه اندازه دانه های این پوشش نسبت به دو پوشش دیگر ریزتر می باشد. همچنین میزان و اندازه تخلخل های این پوشش در مقایسه با دو نوع دیگر کمتر و کوچکتر است. این امر به علت ریز بودن پودر اولیه اکسید تیتانیوم نسبت به هیدروکسی اپتایت است که منجر به ایجاد پوششی با دانسیته بالاتر شده است.

این تصاویر پس از عملیات تفت جوشی پوشش ها در دمای ۹۰۰ درجه سانتی گراد به مدت ۱ ساعت، تهیه شده اند. نحوه بدست آمدن شرایط بهینه برای تفت جوشی در تحقیق دیگر نویسندگان این مقاله ارائه شده است [۱۲]. همانگونه که مشاهده می شود، از آنجاییکه سطح خارجی پوشش تک لایه هیدروکسی اپتایت و پوشش با ساختار تغییرات تدریجی را لایه هیدروکسی اپتایت تشکیل می دهد، لذا مورفولوژی سطح این دو نوع پوشش کاملاً شبیه به هم بوده و از ریز ساختار یکسانی برخوردار می باشند. از

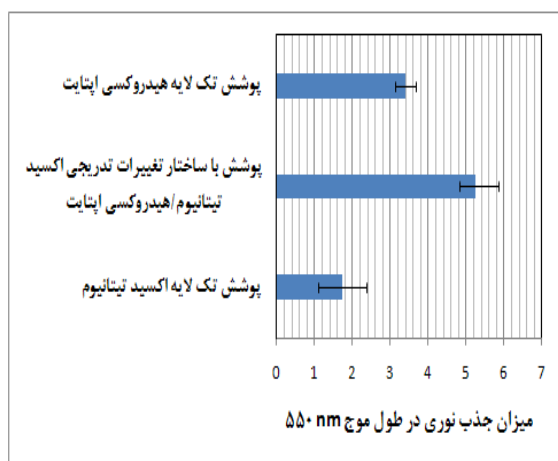


شکل (۸): تصویر میکروسکوپ الکترونی از سطح پوشش های: (الف): تک لایه اکسید تیتانیوم، (ب): تک لایه هیدروکسی اپتایت و (ج): پوشش با ساختار تغییرات تدریجی اکسید تیتانیوم/هیدروکسی اپتایت

(ج)						(ب)						(الف)					
Area	Mean	StdDev	Min	Max	%Area	Area	Mean	StdDev	Min	Max	%Area	Area	Mean	StdDev	Min	Max	%Area
262656	71.32	27.62	0	255	27.41	262143	65.70	22.64	0	255	28.86	261632	83.49	29.66	0	255	20.90

شکل (۹): نتایج بررسی درصد سطحی تخلخلها با استفاده از نرم افزار ImageJ برای پوشش های (الف): تک لایه اکسید تیتانیوم، (ب): تک لایه هیدروکسی اپتایت و (ج): پوشش با ساختار تغییرات تدریجی اکسید تیتانیوم/هیدروکسی اپتایت

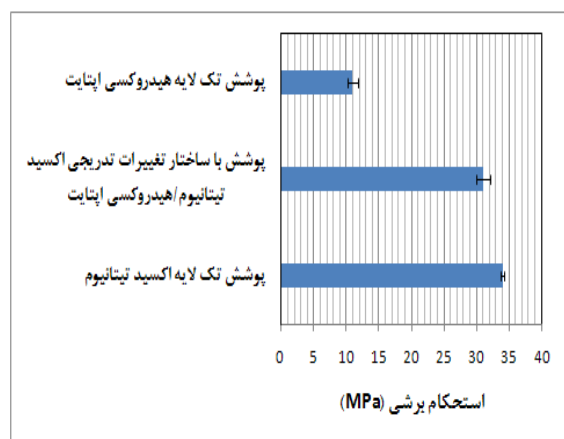
سطح کاملاً صاف و مسطح مکان مناسبی برای رشد و تکثیر سلول نمی باشد [۱۳-۱۴].



شکل (۱۰): نتایج بدست آمده از آزمون MTT پس از کشت سلولی بر روی پوشش های مختلف

شکل ۱۰ نتایج بدست آمده از آزمون MTT بر روی نمونه های کشت سلولی را نشان می دهد. در این آزمون نمک ترازولیوم به محیط کشت سلولی اضافه می گردد. این ترکیب در میتوکندری سلولهای زنده توسط آنزیم DHO (Dehydrogenase) تبدیل به ترکیبی بنفش رنگ و نامحلول به

شکل ۹ نتایج بررسی میزان تخلخل در پوشش های مختلف را نشان می دهد. با توجه به آنالیز تصویری با استفاده از نرم افزار ImageJ مشاهده شد که سطح پوشش تک لایه اکسید تیتانیوم دارای ۲۰/۹۰ درصد سطحی تخلخل می باشد. در حالیکه سطح پوشش های تک لایه هیدروکسی اپتایت و ساختار تغییرات تدریجی به ترتیب به میزان ۲۸/۸۶ و ۲۷/۴۱ درصد سطحی متخلخل می باشند. از آنجاییکه کاربرد اصلی پوشش های هیدروکسی اپتایت در ارتوپدی به عنوان ایمپلنت می باشد، خواص سطحی و مورفولوژی لایه سطحی این نوع از پوشش ها به عنوان یک داربست اهمیت زیادی در رشد و تکثیر سلولها دارد. سلول برای رشد و تکثیر نیازمند دو مورد اساسی است. مورد اول مواد مغذی و مورد دوم دفع فضولات از اطراف سلول می باشد. اهمیت مورفولوژی و خواص سطحی یک داربست در همین دو مورد است [۱۳]. به طوریکه تخلخل های موجود در سطح، نقش ویژه ای در رساندن مواد مغذی، اکسیژن و پروتئین ها به سلول دارند. همچنین حضور تخلخل در سطح داربست مسیر های کانال ماندی را ایجاد کرده که فضولات سلولی از این کانالها به آسانی قابل دفع می باشند. بر همین اساس یک



شکل (۱۱): استحکام برشی پوشش های مختلف بررسی شده در این تحقیق

شکل ۱۱ استحکام برشی پوشش های بررسی شده در این تحقیق را نشان می دهد. نتایج نشان می دهد که پوشش تک لایه اکسید تیتانیوم بالاترین میزان چسبندگی را به خود اختصاص داده است. اکسید تیتانیوم در مقایسه با هیدروکسی اپتایت از لحاظ خواص فیزیکی و شیمیایی به زیر لایه آلیاژ تیتانیوم Ti-6Al-4V نزدیکتر بوده [۲] و همین امر سبب بهبود چسبندگی این پوشش با زیر لایه در مقایسه با پوشش تک لایه هیدروکسی اپتایت می باشد. همچنین، نتایج آزمون چسبندگی نشان می دهد که پوشش با ساختار تغییرات تدریجی اکسید تیتانیوم/هیدروکسی اپتایت از استحکام چسبندگی به مراتب بالاتری در مقایسه با پوشش تک لایه هیدروکسی اپتایت برخوردار است. این امر به سبب تغییرات تدریجی در ترکیب شیمیایی این نوع پوشش است، به طوری که ترکیب شیمیایی این پوشش از میزان ۱۰۰ درصد اکسید تیتانیوم در مجاورت با زیر لایه به میزان ۱۰۰ درصد هیدروکسی اپتایت در سطح بالایی پوشش تغییر می کند. تغییر تدریجی در ترکیب باعث می شود که اختلاف در خواص فیزیکی و شیمیایی از سطح زیر لایه تا سطح فوقانی پوشش به تدریج ایجاد شود و سبب افزایش چسبندگی گردد. این در حالیست که در پوشش تک لایه هیدروکسی اپتایت این اختلاف به صورت شدید در فصل مشترک پوشش و زیر لایه حضور داشته و سبب کمترین میزان چسبندگی در این نوع پوشش در مقایسه با دو نوع دیگر می شود [۱۲].

نام فرمازان (Formazan) می شود. حال اگر به محیط کشت حلال DMSO اضافه گردد، ترکیب فرمازان توسط این حلال حل شده و محلولی بنفش رنگ را ایجاد می کند [۱۵]. از آنجاییکه این فرآیند تنها توسط سلولهای زنده انجام می شود، هر چه میزان رنگ تولید شده بیشتر باشد نشان دهنده تعداد بیشتر سلول های زنده در محیط کشت است. بنابراین اندازه گیری میزان جذب نوری این رنگ معیاری از تعداد سلول های زنده در محیط کشت می باشد [۱۵]. به طوریکه میزان جذب نوری بیشتر در این آزمون بیانگر رشد و تکثیر سلولی بیشتر برای نمونه مورد نظر است. بر همین اساس، نتایج بدست آمده از آزمون کشت سلولی بر روی پوشش های مختلف به عنوان داربست (شکل ۱۰) نشان می دهد که رشد و تکثیر سلول ها بر روی پوشش های ساختار تغییرات تدریجی اکسید تیتانیوم/هیدروکسی اپتایت و تک لایه هیدروکسی اپتایت در مقایسه با پوشش تک لایه اکسید تیتانیوم به مراتب بیشتر می باشد. به عبارت دیگر پوشش تک لایه اکسید تیتانیوم به عنوان داربست، دارای کمترین میزان تکثیر سلولی در مقایسه با دو پوشش دیگر است. از آنجاییکه هیدروکسی اپتایت جزء اصلی استخوان در بدن می باشد، در مقایسه با اکسید تیتانیوم خواص زیست سازگاری بهتری را ارائه می دهد [۳ و ۶]. از طرف دیگر، همانگونه که اشاره شد، با توجه به شکل های ۸ و ۹ پوشش تک لایه اکسید تیتانیوم از میزان تخلخل کمتری نسبت به سایر پوشش ها برخوردار است و اندازه تخلخل ها نیز در این پوشش کوچکتر از سایر پوشش های بررسی شده در این تحقیق است. به همین سبب مسیر های مناسبی برای دفع فضولات سلولی و رسیدن مواد مغذی به سلول در سطح این نوع پوشش وجود نداشته و تکثیر سلولی بر روی سطح این پوشش در مقایسه با دو نوع دیگر از کمترین میزان برخوردار است.

layers on Ti-6Al-4V alloys for biomedical applications”, *Ceramics International*, Vol. 34, pp. 1843-1847, 2008.

- [5] X. Pang & I. Zhitomirsky, “Electrophoretic deposition of composite hydroxyapatite–chitosan coatings”, *Materials Characterization*, Vol. 58, pp. 339-348, 2007.
- [6] M. Manson, C. J. Nez, C. Morant, P. Herrero & J. M. M. H. Nez-Duart, “Electrodeposition of hydroxyapatite coatings in basic conditions”, *Biomaterials*, Vol. 21, pp. 1755-1761, 2000.
- [7] L. L. Hench, “Bioceramics: from concept to clinic”, *Journal of American Ceramics Society*, Vol. 74, pp. 1485-1510, 1991.
- [8] R. Z. Legeros, “Biodegradation and bioresorption of calcium phosphate ceramics”, *Clinical Materials*, Vol. 14, pp. 65-88, 1993.
- [9] C. F. Koch, S. Johnson, D. Kumar, M. Jelinek, D. B. Chrisey, A. Doraiswamy, C. Jin, R. J. Narayan & I. N. Mihailescu, “Pulsed laser deposition of thin films”, *Materials Science Engineering*, Vol. 27C, pp. 484-494, 2007.
- [10] S. Ding, “Properties and immersion behavior of magnetron-sputtered multilayered hydroxyapatite /titanium composite coatings”, *Biomaterials*, Vol. 24, pp. 4233-4238, 2003.
- [11] W. R. Lacefield, L. L. Hench & J. Wilson (Eds.), “An Introduction to Bioceramics”, World Scientific Publishing Co, Singapore, 1993.
- [12] Araghi & M. J. Hadianfard, “Fabrication and characterization of functionally graded hydroxyapatite/TiO₂ multilayer coating on Ti-6Al-4V titanium alloy for biomedical applications”, *Ceramics International*, Vol. 41, pp. 12668–12679, 2015.
- [13] T. S. Karande, J. L. Ong & C. M. Agrawal, “Diffusion in musculoskeletal tissue engineering scaffolds: design issues related to porosity, permeability, architecture and nutrient mixing”, *Annals of Biomedical Engineering*, Vol. 32, pp. 1728-1743, 2004.
- [14] S. Sosnowski, P. Wozniak & M. Lewandowska-Szumiel, “Polyester scaffolds with bimodal pore size distribution of tissue engineering”, *Macromolecular Bioscience*, Vol. 6, pp. 425-434, 2006.

۴- نتیجه گیری

بررسی خواص سه پوشش تک لایه اکسید تیتانیوم، تک لایه هیدروکسی اپتایت و پوشش با ساختار تغییرات تدریجی اکسید تیتانیوم/هیدروکسی اپتایت در این تحقیق نشان داد که پوشش تک لایه اکسید تیتانیوم از بیشترین استحکام چسبندگی برخوردار است اما خواص زیست سازگاری این پوشش در مقایسه با دو نوع دیگر بسیار پایین است. به طوریکه میزان تکثیر سلولی بر روی این پوشش در مقایسه با دو نوع دیگر کمترین میزان را داراست. به همین سبب اعمال این پوشش بر روی آلیاژ تیتانیوم برای کاربردهای ارتوپدی به عنوان ایمپلنت منطقی نمی باشد. از طرف دیگر پوشش تک لایه هیدروکسی اپتایت که از خواص زیست سازگاری خوبی برخوردار است دارای استحکام چسبندگی بسیار پایینی است که کاربرد این پوشش را در زمینه ارتوپدی محدود می نماید. این در حالیست که پوشش با ساختار تغییرات تدریجی اکسید تیتانیوم/هیدروکسی اپتایت بیشترین میزان تکثیر سلولی را داراست و استحکام چسبندگی این پوشش از پوشش تک لایه هیدروکسی اپتایت بسیار بالاتر است.

۵- مراجع

- [1] L. Mohan, D. Durgalakshmi, M. Geetha, T. S. N. Sankara Narayanan & R. Asokaman, “Electrophoretic deposition of nanocomposite (HAp + TiO₂) on titanium alloy for biomedical applications”, *Ceramics International*, Vol. 38, pp. 3435-3443, 2012.
- [2] P. C. Rath, L. Besra, B. P. Singh & S. Bhattacharjee, “Titania/hydroxyapatite bi-layer coating on Ti metal by electrophoretic deposition: Characterization and corrosion studies”, *Ceramics International*, Vol. 38, pp. 3209-3216, 2012.
- [3] O. Albayrak, O. El-Atwani & S. Altintas, “Hydroxyapatite coating on titanium substrate by electrophoretic deposition method: Effects of titanium dioxide inner layer on adhesion strength and hydroxyapatite decomposition”, *Surface & Coatings Technology*, Vol. 202, pp. 2482-2487, 2008.
- [4] C. Kaya, “Electrophoretic deposition of carbon nanotube-reinforced hydroxyapatite bioactive

- [2] Wharton's jelly
- [3] L-glutamine
- [4] Penicillin
- [5] Fetal Bovin Serum
- [6] Trypsin
- [7] well
- [8] Microculture Tetrazolium Test

- [15] T. R. Mosmann, "Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assay", Journal of Immunological Methods, Vol. 65, pp. 55-63, 1983.

۶- پی نوشت

- [1] Phosphate Buffer Saline