آماده سازی سطحی ایمپلنت دندانی تیتانیم به روش شیمیایی با محلول اسیدی سه‌تایی

امیر زارعی دوست*، مردعلی یوسف پور*#، بهروز قاسمی*
* استادیار گروه مواد، دانشکده مهندسی مواد-صنایع دانشگاه سمنان
تاریخ ارائه مقاله : ۸۹/۵/۳ – تاریخ پذیرش : ۸۹/۱۱/۱۹

Surface Modification of Titanium Dental Implants Due to Chemical Method By a Mixed Solution of Three Acids

Amir Zareidoost*, MardAli Yousefpour*#, Behrooz Ghaseme*
** Assistant Professor, Dept of Materials Science & Engineering, Semnan University, Semnan, Iran.*
Received: 25 July 2010; Accepted: 8 Februry 2011

Introduction: The aim of this study was surface modification of titanium by a mixed solution of three acids and to see if the roughness created and morphology changes of the titanium surfaces after various exposure times in acid solution could be associated with the biological performance.
Materials & Methods: In this experimental study, the surface topography, chemistry and biocompatibility of polished titanium surfaces treated with mixed solution of three acids containing 80%HCl-10%HF and 10%H_3PO_4 dealing with the acid solution condition time were studied. Fifty-four experimental cases and nine controls were considered. Osteoblast cell line (MG-63) was cultured on titanium surfaces. Also, in order to investigate titanium surfaces, SEM, AFM analyses were carried out. The data were analysed by *t*-test and One-Way ANOVA.
Results: The results revealed that time variation in the aforementioned mixed solution of three acids, had a significant effect on the morphology and surface roughness. In addition, by conducting some changes in immersion time of the mixed solution acid with aforementioned composition, it was derived that time increments up to 120 seconds caused an increase in surface roughness even though in upper periods of time the trend was not regular, as the highest values of R.M.S and R_a were reached after 210 seconds. Biological evaluation results demonstrated that morghology and surface roughness had a significant effect on biocompatibility and osseointegration of titanium.
Conclusion: The treatment of titanium by a mixed solution of three acids is an easy and low-cost method for providing the porous titanium surface with bioactive properties for the bone-bonding ability in bio-medical applications.
Key words: Biomaterials, titanium implant, surface roughness, biocompatibility.
 # Corresponding Author: mardaliyousefpour@yahoo.com
J Mash Dent Sch 2011; 35(2): 85-98.

چکیده

مقدمه: هدف از این پژوهش آماده سازی سطحی تیتانیم با استفاده از محلول اسیدی سه‌تایی و بررسی تأثیر پارامتر زمان بر ایجاد زبری و تغییرات مورفولوژی در سطح این ایمپلنت و ارزیابی این موضوع بر رفتار بیولوژیکی تیتانیم است.

مواد و روش ها: در این مطالعه آزمایشگاهی، مورفولوژی و زیست سازگاری سطوح تیتانیم پولیش شده و اصلاح شیمیایی شده با محلول اسیدی، ۸۰٪ اسید کلریدریک- ۱۰٪ اسید فلوئوریدریک- ۱۰٪ اسید فسفریک تحت شرایط تغییر زمان عملیات بررسی شد. تعداد ۵۴ نمونه جهت اصلاح شیمیایی سطح و ارزیابی های بیولوژیکی و همچنین ۹ نمونه به عنوان شاهد استفاده گردید. برای بررسی مورفولوژی، توپوگرافی و زبری سطوح، آنالیزهای میکروسکوپ الکترونی و میکروسکوپ نیروی اتمی به‌عمل آمد. از سلول‌های استخوان‌ساز (MG-63) استفاده شد. داده ها با استفاده از تست های آماری *t*-test و آنالیز واریانس یک طرفه، آنالیز گردید.

 # مولف مسؤول، نشانی: سمنان، دانشکده مهندسی مواد-صنایع، گروه مواد، تلفن: ۰۲۳۱۳۳۶۶۳۸۵ ، ۰۹۱۲۷۳۲۴۳۱۳
E-mail: mardaliyousefpour@yahoo.com

یافته‌ها: نتایج نشان داد که تغییر زمان عملیات شیمیایی تأثیر قابل ملاحظه‌ای بر مورفولوژی و زبری سطح تیتانیم داشت. به‌علاوه، با انجام عملیات شیمیایی توسط محلول اسیدی سه‌تایی و با ترکیب فوق الذکر مشاهده شد که افزایش زمان تا ۱۲۰ ثانیه باعث افزایش زبری سطح گردید. اما در زمان‌های بالاتر این روند منظم نبود، به‌طوری‌که در مدت زمان ۲۱۰ ثانیه حداکثر مقدار R.M.S و R_a ایجاد شد. همچنین نتایج ارزیابی بیولوژیکی نشان داد که مورفولوژی و زبری سطح بر زیست سازگاری و قابلیت همبندی با استخوان تیتانیم نقش مهمی دارد، لذا، بیشترین مقدار رشد و تکثیر و چسبندگی سلول برای زمان ۲۱۰ ثانیه بدست آمد.

نتیجه گیری: محلول اسیدی سه‌تایی با ترکیب ذکر شده، روشی آسان و در عین حال کم‌هزینه جهت زیست فعال نمودن سطح ایمپلنت تیتانیم با قابلیت پیوند بافت در کاربردهای زیستی پزشکی است.

واژه‌های کلیدی: بیومواد، ایمپلنت تیتانیم، زبری سطح، زیست سازگاری.

مجله دانشکده دندانپزشکی مشهد / سال ۱۳۹۰ دوره ۳۵ / شماره ۲ : ۹۸-۸۵.

مقدمه

تحقیقات گسترده‌ای در مورد اصلاح سطح تیتانیم جهت بهبود کارایی آن در کاربردهای دندانپزشکی صورت گرفته است. در این راستا بررسی‌ها در دهه اخیر بر روی روش‌های شیمیایی اصلاح سطح متمرکز شده است. با توجه به بررسی‌های انجام شده، مشاهده می‌شود که اهداف دنبال شده در جهت افزایش قابلیت زیست‌فعال شدن و بهبود چسبندگی استخوان به سطح ایمپلنت تیتانیم متمرکز شده است.[۸-۱] تحقیقات نشان می‌دهد که روش‌های آماده سازی سطحی در بهبود زیست فعال شدن تیتانیم دارای تأثیر قابل ملاحظه‌ای بوده است.[۹] همچنین مروری بر تحقیقات انجام شده در این زمینه نشان می‌دهد، که محققان سعی بر بهینه کردن روش‌های اصلاح سطح دارند.[۱۱و۱۰] در همین رابطه می‌توان به فرآیند حکاکی سطوح گریت بلاست شده اشاره نمود. در این روش از اصلاح سطح، ابتدا یک مرحله بلاست با ذرات سرامیکی بر روی سطح تیتانیم انجام می‌شود و سپس از محلول اسیدی جهت ایجاد زبری بالاتر در سطح استفاده می‌شود.[٦] همچنین در اصلاح شیمیایی سطح با محلول قلیایی، مدت زمان عملیات بیست و چهار ساعت به طول می‌انجامد، این امر در حالی است که بر روی سطح عملیاتی شده با محلول قلیایی، هیچ‌گونه عملیات حرارتی و یا استفاده از روش‌های اصلاح سطح دیگری به عنوان مکمل استفاده نشود.[۱] بنابراین، در این پژوهش سعی بر آن است که با محلول اسیدی متشکل از اسیدهای سه‌تایی و تنها با یک مرحله عملیات شیمیایی بتوان سطح تیتانیم را اصلاح نمود و این مرحله منفرد بتواند تأثیر قابل ملاحظه‌ای در رفتار زیست فعال شدن سطح تیتانیم بر جای گذارد. به‌علاوه، تحقیقات نشان داده‌اند که مورفولوژی و توپوگرافی سطح ایمپلنت تیتانیم در تثبیت زیست‌مکانیکی و پیوند آن با بافت اطراف تاثیر بسزایی دارد.[۱۵-۱۲] تغییرات توپوگرافی در مقیاس میکرون، ماکزیمم قفل بین استخوان و سطح ماده کاشتنی را ایجاد می‌نماید. در همین رابطه یک نگرش تئوریک پیشنهاد می‌کند که سطح ایده‌آل بایستی دارای حفره‌هایی به شکل نیم‌کره با عمق ۱/۵ میکرون و قطر ٤ میکرون باشد. این موضوع در تحقیقی دیگر حفراتی را با اندازه‌ی ٦ تا ۱۰ میکرون مناسب می‌داند.[٦] در همین راستا حضور توپوگرافی در مقیاس نانو بر روی سطح ایمپلنت تیتانیم می‌تواند، فعالیت زیستی و پیوند ایمپلنت-استخوان را بهبود دهد.[١٤]

هدف از این پژوهش اصلاح سطح تیتانیم با استفاده از محلول اسیدی سه‌تایی و بررسی تأثیر پارامتر زمان بر ایجاد زبری و تغییرات توپوگرافی در سطح این ماده

ایمپلنت و ارزیابی این موضوع بر رفتار بیولوژیکی تیتانیم بود. لازم به ذکر است که انتخاب نوع محلول اسیدی جهت اصلاح سطح تیتانیم به تحقیقات نویسندگان مقاله در این زمینه برمی‌گردد.

مواد و روش‌ها

روش به‌کار رفته در این تحقیق از نوع آزمایشگاهی بود. جهت بررسی مورفولوژی سطوح تیتانیم پولیش شده و اصلاح شیمیایی شده، قطعاتی با ابعاد ۳mm×۱۰×۲۰ به تعداد ۹ عدد تهیه شد و همچنین به منظور ارزیابی‌های بیولوژیکی قطعاتی با ابعاد ۱mm×٤×٤ به تعداد ٥٤ عدد، توسط عملیات برش از ورق تیتانیم خالص تجاری (گرید ۱، کوبه استیل ژاپن) تهیه گردید. پس از برش قطعات، چربی‌گیری در محلول استن انجام شد. سپس با استفاده از سنباده تا شماره ٦۰۰ سطح نمونه‌ها، مورد عملیات پولیش قرار گرفت.[1] جهت حذف آلودگی‌های سطحی و به دست آوردن یک سطح تمیز برای انجام عملیات شیمیایی بر روی سطح تیتانیم، نمونه‌ها در محلول الکل اتانول و سپس آب مقطر توسط اولتراسونیک به مدت ۱۰ دقیقه شستشو داده شدند و نهایتاً در درجه حرارت ۱۰۰ درجه سانتیگراد خشک شدند. نمونه‌های تیتانیم خالص تجاری تمیز شده، در محلول اسیدی شامل ۸۰٪ اسیدکلریدریک- ۱۰٪ اسیدفلوئوریدریک- ۱۰٪ اسیدفسفریک در زمان‌های۳۰، ٦۰، ۹۰،۱۲۰، ۱٥۰، ۱۸۰، ۲۱۰ و ۲٤۰ (ثانیه) و در درجه حرارت محیط قرار گرفتند. پس از عملیات، نمونه‌های تیتانیم از محلول‌ها خارج شده و با آب مقطر و سپس با استون شستشو داده شده و بعد با استفاده از خشک‌کن الکتریکی سطح نمونه‌ها در هوای معمولی خشک شد و در دسیکاتور قرار گرفتند تا بررسی‌های لازم بر روی سطح آنها، صورت گیرد. جهت بررسی مورفولوژی سطح نمونه‌های تیتانیم اصلاح شده از میکروسکوپ الکترونی (SEM, Phillips XL30) با ولتاژ ۲۰ کیلو ولت استفاده شد. همچنین توسط میکروسکوپ نیروی اتمی (AFM AUTOPROBE, PARK[1] SCIENTIFIC INSTRUMENTS, USA) بررسی توپوگرافی و زبری سنجی از سطح تیتانیم با استفاده از نرم‌افزار انجام شد.

ارزیابی‌های بیولوژیکی

سلول استخوان‌ساز (MG-63) با استفاده از محیط کشت (DMEM,GIBCO,Scotland) و افزودن ۱۰٪ سرم جنین گوساله (Fetal calf serum Seromed, germany) به همراه آنتی‌بیوتیک به میزان $۱۰۰^{IU}/_{ml}$ پنی‌سیلین و $۱۰۰^{\mu g}/_{ml}$ استرپتومایسین (Sigma, USA) تکثیر گردید.[15] لازم به ذکر است که کلیه ارزیابی‌های بیولوژیکی در آزمایشگاه کشت سلولی انستیتوپاستور ایران انجام شد.

آزمایش تکثیر سلول

جهت بررسی میزان رشد و تکثیر سلول‌ها بر روی سطح تیتانیم، زمان ۳ و ۷ روز انتخاب شد. برای این منظور، تعداد $۱۰^{٤}\ {}^{Cell}/_{cm^2}$ بر روی سطح نمونه‌های تیتانیم کشت شد. با توجه به تکرار آزمایش‌ها تا سه مرتبه در زمان مربوط از شش محفظه صفحه‌ای شکل دارای نود و شش حفره استفاده گردید. در هر کدام از آن‌ها یک دسته از گروه‌های تیتانیم انتخابی A تا D با توجه به جدول ۱ قرار داده شد.

1. Atomic force microscopy

جدول ۱ : گروه‌های انتخاب شده برای بررسی بیولوژیکی

دلایل انتخاب	نوع عملیات	نمونه
مقایسه با سطوح اصلاح شده از نظر رفتار بیولوژیکی	پولیش (بدون عملیات شیمیایی)	A
کمترین زبری سطح+ حداقل زمان	۸۰ درصد اسید کلریدریک- ۱۰درصد اسید فلوئوریـدریک – ۱۰ درصد اسید فسفریک، (۳۰ ثانیه)	B
زبری سطح تقریباً بالا + زمان متوسط عملیات	۸۰ درصد اسید کلریدریک- ۱۰ درصد اسید فلوئوریدریک – ۱۰ درصد اسید فسفریک، (۱۲۰ ثانیه)	C
بالاترین زبری سطح + زمان بالاتری از عملیات	۸۰ درصد اسید کلریدریک- ۱۰ درصد اسید فلوئوریدریک – ۱۰ درصد اسید فسفریک، (۲۱۰ ثانیه)	D

به منظور ارزیابی میزان رشد و تکثیر سلولی روش MTT[1] به کار رفت. روش MTT معمولاً برای بررسی بقاء 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 نا محلول می‌باشد. 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. جهت تهیه محلول MTT به غلظت $۵^{mg}/_{ml}$، مقدار ۵۰mg از پودر MTT در ۱۰mg از PBS ۰/۱۵ مولار حل می‌شود. هنگام استفاده از آن در رنگ آمیزی، با PBS تا ۱۰ برابر رقیق می‌گردد تا محلول MTT $۰/۵^{mg}/_{ml}$ 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 در حالی که در محفظه‌های صفحه‌ای شکل با دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد و ۵ درصد دی اکسید کربن انکوبه شده بودند، با محلول MTT $۰/۵^{mg}/_{ml}$ رنگ‌آمیزی می‌شوند. پس از ۳ تا ۵ ساعت انکوباسیون در ۳۷ درجه سانتی‌گراد مایع رویی سلول‌ها برداشته می‌شود و بجای 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[2] در ۵۷۰ نانومتر خوانده می‌شود.

آزمایش چسبندگی سلول

به‌منظور آزمون چسبندگی سلول، تعداد ۱×۱۰^{۳} سلول بر روی سطح هر نمونه قرار گرفت و به مدت ۵ روز بر روی سطح نمونه‌های تیتانیم کشت داده شد. برای آزمون فوق از روش تریپان بلو استفاده شد. در این روش غشاء سلول‌های زنده اجازه ورود رنگ‌های غیر الکترولیت را به درون سلول نمی‌دهند، اما سلول‌های مرده به خوبی رنگ می‌گیرند. با افزودن محلول تریپان بلو به PBS ۰/۱۵ مولار

1 . Dimethylthiazol diphenyl tetrazolium bromide

2. Elisa-reader, organon- teknika, netherland

و سپس قرار دادن بر روی سطوح کشت داده شده درون حفرات پیلت، سلول‌های مرده رنگ گرفته و از سلول‌های زنده (بی‌رنگ) قابل تمایز هستند. سپس بلافاصله به کمک یک هیستومتر (لام نئوبار) تعداد سلول‌های رنگ گرفته (مرده) و تعداد سلول‌های زنده (بدون رنگ) تعیین شدند.

جهت مقایسه نتایج حاصل از ارزیابی بیولوژیکی از آزمون آنالیز واریانس یک طرفه و آزمون توکی استفاده شد. سطح معنی‌داری در آزمون‌ها ۰/۰۵ در نظر گرفته شد.

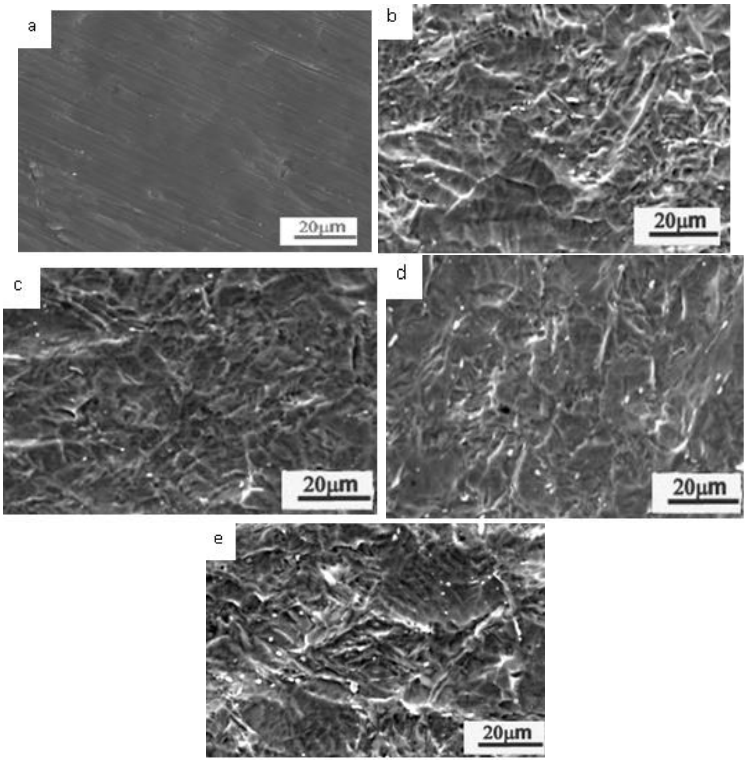
یافته‌ها

نتایج عملیات شیمیایی اصلاح سطح: هدف از بررسی تغییرات زمان بر روی محلول اسیدی مورد نظر، بررسی تأثیر زمان بر تغییر مورفولوژی حفره‌ها و زبری سطح در دو مقیاس میکرون و نانو می‌باشد.

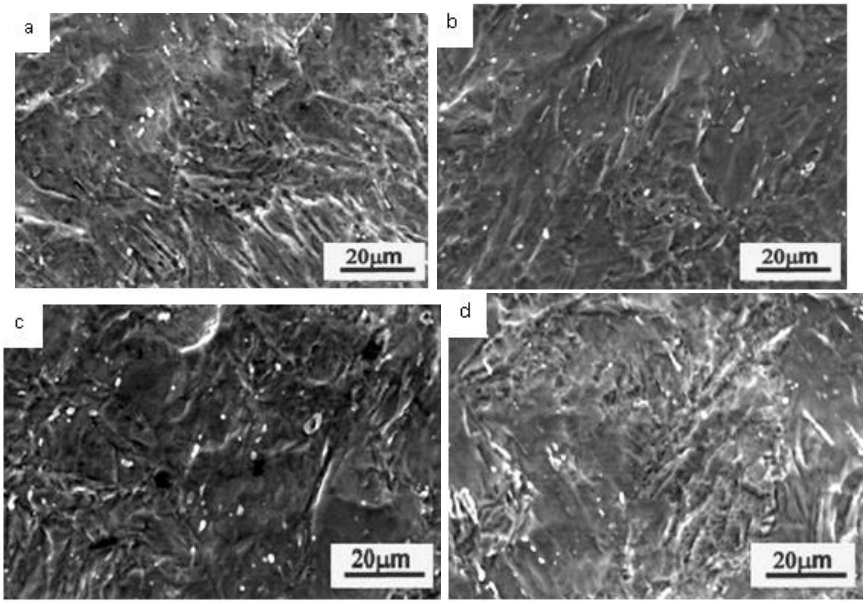
تصویر میکروسکوپ الکترونی مربوط به سطح تیتانیم پولیش شده در تصویر (۱-a) آمده است. با بررسی این تصویر ملاحظه می‌شود که سطح از حداقل زبری برخوردار بوده و تنها شیارهای موازی مربوط به خطوط پولیش در آن نشان داده شده است. اما سطح تیتانیم پس از عملیات شیمیایی در مدت زمان ۳۰ ثانیه، حفره‌های به شکل نیم‌کره را نشان داد که در این حالت سطح دارای حداکثر بافت سطحی از لحاظ تشابه مورفولوژی بود (تصویر ۱-b). با افزایش زمان تا ٦٠ ثانیه زبری سطح افزایش یافت و همین‌طور که در تصویر (۱-c) مشخص است، سطح زبر با مورفولوژی کروی شکل جای خود را به حفرات ریزتری داد که از حالت کروی شکل انحراف نشان دادند. در تصویر (۱-d) مورفولوژی سطح، خود را به شکل شیارهای میکرونی نزدیک کرد که با افزایش بیشتر زمان تا ۱۲۰ ثانیه، شیارهای میکرونی سطح را به طور کامل فرا گرفت (تصویر ۱-e).

مشخص است که سطح تیتانیم در زمان ۳۰ ثانیه حاوی حداکثر حفرات سطحی به شکل نیم‌کره و در زمان ۱۲۰ ثانیه دارای حداکثر حفرات سطحی به شکل شیارهای میکرونی بوده است که بافت سطحی بالایی را نشان می‌دادند.

در زمان ۱۲۰ ثانیه، سطح تیتانیم به طور کامل شیارهای میکرونی را نشان داد اما، افزایش زمان سبب از بین رفتن آن‌ها شده بود. در زمان ۱۵۰ ثانیه (تصویر ۲-a)، لایه‌برداری از سطح اتفاق افتاده بود اما، هنوز درصدی از شیارهای میکرونی مشاهده می‌شدند، با این تفاوت که علاوه بر وجود شیارهای میکرونی، حفره‌های بسیار ریزی بر روی سطح ایجاد شده بود. زمان‌های بالاتر (۱۸۰، ۲۱۰ و ۲٤۰ ثانیه) نیز این مطلب را تائید می‌نمایند. در زمان ۲۱۰ ثانیه حداکثر حفره‌های سطحی در بین زمان‌های بالاتر از ۱۲۰ ثانیه مشاهده می‌شد (تصویر ۲-c). محلول اسیدی مورد نظر در زمان ۱۲۰ ثانیه سطح را به‌طور کامل دارای شیارهای میکرونی می‌نمود، اما در زمان ۲۱۰ ثانیه اندازه شیارهای سطحی کاهش یافت، به‌علاوه حفره‌های بسیار ریز در سطح قابل مشاهده بود. به عبارت دیگر سطح فوق‌العاده زبر شده بود. با افزایش زمان تا ۲٤۰ ثانیه، مجدداً لایه برداری موضعی از سطح صورت گرفته و از درصد حفره‌های میکرونی در سطح کاسته شد (تصویر ۲-d).



تصویر ۱ : تصویر میکروسکوپ الکترونی از سطح تیتانیم (a): پولیش شده، اصلاح شده با محلول۸۰ درصد اسید کلریدریک-۱۰ درصد اسید فلوئوریدریک-۱۰ درصد اسید فسفریک در زمان‌های (b):۳۰ ثانیه، (c):٦٠ ثانیه، (d):۹۰ ثانیه، (e):۱۲۰ ثانیه



تصویر ۲ : تصویر میکروسکوپ الکترونی از سطح تیتانیم اصلاح شده با محلول ۸۰ درصد اسیدکلریدریک- ۱۰ درصد اسید فلوئوریدریک- ۱۰ درصد اسید فسفریک در زمان‌های (a): ۱۵۰ ثانیه، (b): ۱۸۰ ثانیه، (c): ۲۱۰ ثانیه، (d): ۲٤۰ ثانیه

تصویر ۳، تصاویر میکروسکوپ اتمی از سطح تیتانیم اصلاح شده را تا زمان ۱۲۰ ثانیه نشان می‌دهد. در این راستا توپوگرافی سطح تیتانیم در تصویر (۳-a)، شیارهایی را نشان می‌دهد که درون شیارها حفرات هم‌شکلی دیده می‌شود. به‌علاوه فرورفتگی و برجستگی‌های سطحی در مقیاس مورد نظر در تصویر مشخص است. اما، افزایش زمان تا ٦٠ ثانیه (تصویر ۳-b)، مورفولوژی کاملاً متفاوت ایجاد نمود. سطح حاصل، حالت شبکه‌ای شکل (کلونی شکل) به خود گرفت که مرز بین هر کلونی را فرورفتگی جدا می‌کرد. این حالت در زمان ۹۰ ثانیه نیز دیده می‌شد. در زمان ٦٠ ثانیه، کلونی‌ها حاوی فرورفتگی و برآمدگی‌های بسیار ریز بود ولی در زمان ۹۰ ثانیه کلونی‌ها مجموع تعدادی شیار در راستای هم بود. به‌علاوه، در زمان ۹۰ ثانیه، سطح به شکل به هم پیچیده شده به نظر می‌رسید که تأثیر محلول اسیدی را با افزایش زمان مشخص می‌ساخت. همچنین در تصویر میکروسکوپ اتمی در زمان ۱۲۰ ثانیه (تصویر ۳-d) کلونی‌ها از بین رفته و شیارهایی بزرگ مشاهده می‌شد، که فرورفتگی و برجستگی بیشتری داشت.

تصاویر (٤-a) و (٤-b)، مورفولوژی تقریباً مشابهی را نشان می‌دهند. این دو زمان از بین رفتن حفره‌های سطحی را به‌خوبی نشان داده‌اند. در زمان ۲۱۰ ثانیه (تصویر ٤-c)، سطحی به شدت زبر نشان داده شده است. در این زمان حفره‌ها تقریباً مورفولوژی مشابهی داشتند و حالت کندگی در تصویر نیز مشخص نبود. اما، در زمان۲٤۰ ثانیه سطح مجدداً حالت کلونی شکل به خود گرفت و سطحی مشابه زمان ۹۰ ثانیه ایجاد شد. در زمان ۲۱۰ ثانیه علاوه بر سطحی زبر با مورفولوژی همگن، ارتفاع برجستگی‌ها و فرورفتگی‌ها بر روی سطح تیتانیم به بیشترین مقدار خود در بین تمام حالت‌های گروه رسید.

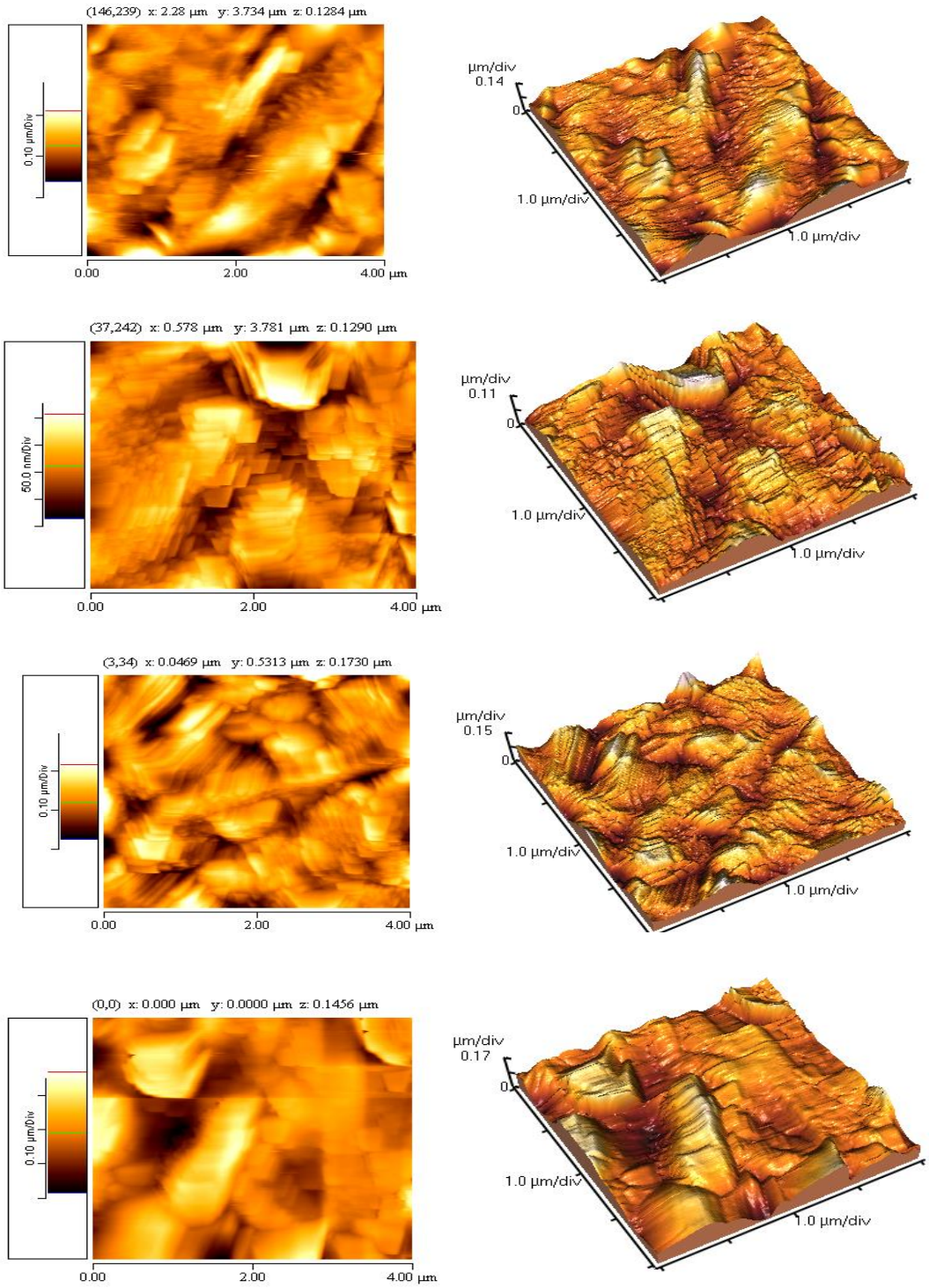
به منظور بررسی تأثیر شرایط اعمال شده در اصلاح سطح تیتانیم با هدف افزایش زیست سازگاری تیتانیم، ارزیابی‌های بیولوژیکی انجام شد. برای این منظور گروه‌هایی از تیتانیم جهت این ارزیابی انتخاب شدند که در جدول ۱ به همراه علت انتخاب آن‌ها ذکر شده‌اند.

ارزیابی‌های بیولوژیکی

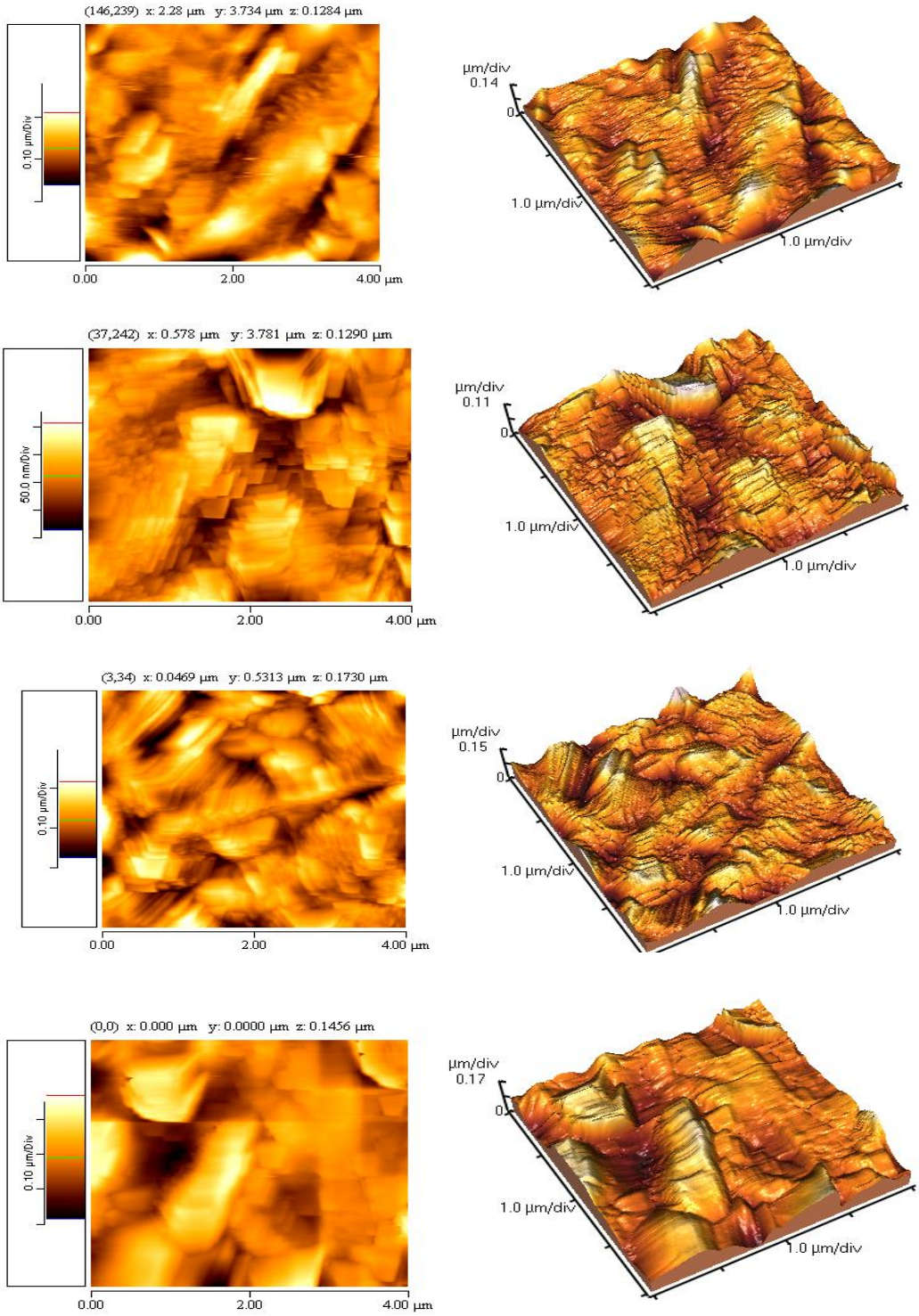
نمودار ۱، نتایج حاصل از رشد و تکثیر سلول استخوان‌ساز MG-63 در روز سوم را نشان می‌دهد. نتایج نشان می‌دهد که تفاوت معنی‌داری بین نمونه D و نمونه‌های C و B در روز سوم وجود داشته است (n=۳، $P<۰/۰۵$). همین‌طور بین گروه تیتانیم D نیز با گروه تیتانیم کنترل A تفاوت معنی‌داری نشان داده شده است (n=۳ و $P<۰/۰۰۱$).

گروه کنترل در روز هفتم نسبت به روز سوم کاهش رشد و تکثیر سلولی را بر روی سطح خود نشان داد و سلول‌های استخوان ساز نتوانستند بر روی سطح رشد و تکثیر یابند. این امر در حالی است که تمام سطوح اصلاح شده افزایش رشد و تکثیر را با افزایش زمان نشان می‌دادند. مجداً نمونه D که در روز سوم بالاترین میزان رشد و تکثیر را داشت، در روز هفتم نیز تفاوت معنی‌داری را با گروه‌های تیتانیم اصلاح شده نشان داد (n=۳، $P<۰/۰۱$) (نمودار ۲).

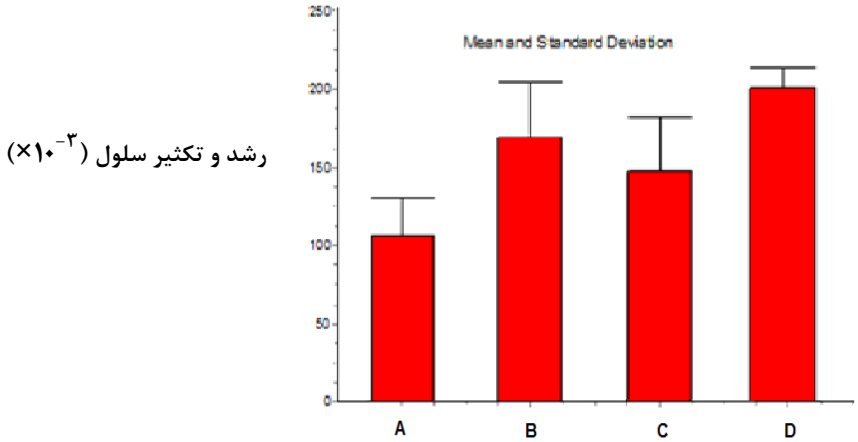
نمودار ۳، تعداد سلول‌های چسبیده را به سطح نمونه‌های کشت داده شده نشان می‌دهد. مشخص است که نمونه D دارای بالاترین میزان چسبندگی سلول است. در حالی‌که نمونه کنترل (A) از حداقل چسبندگی سلول برخوردار است.



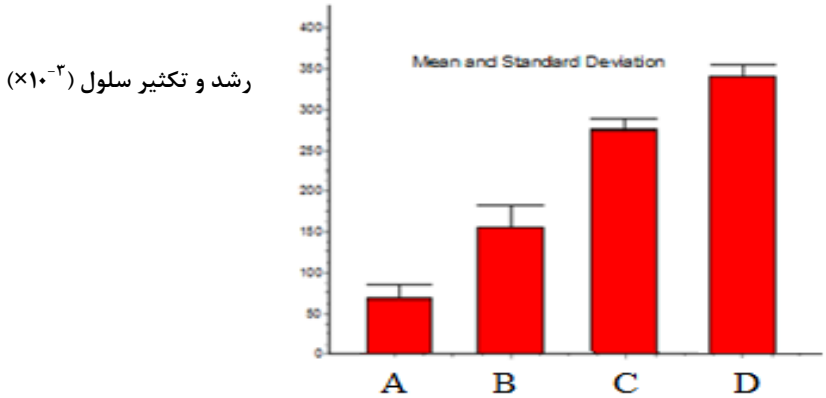
تصویر ۳ : تصویر میکروسکوپ نیروی اتمی از سطح تیتانیم اصلاح شده با محلول ۸۰ درصد اسیدکلریدریک- ۱۰ درصد اسید فلوئوریدریک- ۱۰ درصد اسید فسفریک در زمان‌های (a): ۳۰ ثانیه، (b): ٦۰ ثانیه، (c): ۹۰ ثانیه، (d): ۱۲۰ ثانیه، ($٤\times٤\mu m^{٢}$).



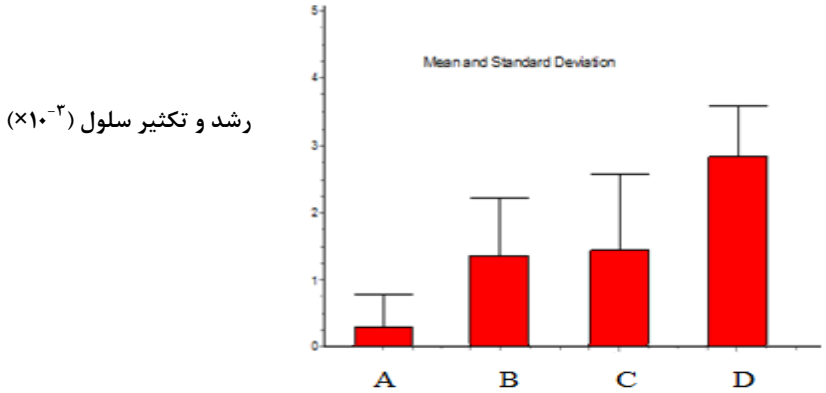
تصویر ٤ : تصویر میکروسکوپ نیروی اتمی دو بعدی و سه بعدی از سطح تیتانیم اصلاح شده با محلول ۸۰ درصد اسیدکلریدریک-۱۰ درصد اسید فلوئوریدریک-۱۰ درصد اسید فسفریک در زمان‌های (a):۱۵۰ ثانیه، (b):۱۸۰ ثانیه، (c): ۲۱۰ ثانیه، (d):۲٤۰ ثانیه، ($٤\times٤\mu m^{٢}$).



نمودار ۱ : فعالیت حیاتی/ رشد و تکثیر سلول‌های استخوان‌ساز بر روی سطوح تیتانیم اصلاح شده و گروه کنترل پس از سه روز کشت.



نمودار ۲ : فعالیت حیاتی/ رشد و تکثیر سلول‌های استخوان‌ساز بر روی سطوح تیتانیم اصلاح شده و گروه کنترل پس از پنج روز کشت.



نمودار ۳ : تعداد سلول‌های استخوان ساز چسبیده بر روی سطوح تیتانیم اصلاح شده و گروه کنترل پس از هفت روز کشت.

بحث

عملیات اسیدی اغلب به منظور رفع اکسیدها و آلودگی‌های سطحی برای به دست آوردن سطح نهایی تمیز و یکنواخت استفاده شده است. ترکیبی از اسیدها اغلب به عنوان عملیات اولیه جهت اصلاح سطح تیتانیم استفاده می‌شوند؛ از آن جمله می‌توان به محلول متشکل از ۱۰-۳۰ درصد حجمی اسید نیتریک و ۱-۳ درصد حجمی اسید فلوئوریدریک در آب مقطر، به عنوان یک محلول استاندارد برای اصلاح سطح با محلول اسیدی اشاره نمود.[۱و۱۶-۱۸] اسید فلوئوریدریک به آسانی به اکسید تیتانیم حمله کرده و برای تشکیل فلوئوریدهای تیتانیم با آن واکنش نشان می‌دهد.[۱۷] تاکوچی، کارایی ضدعفونی سه اسید، $Na_2S_2O_8$، H_2SO_4 و HCL را برای سطح تیتانیم بررسی کرد و دریافت از آنجایی که اسیدکلریدریک می‌تواند به آسانی نمک‌های تیتانیم را حل کرده و کمترین تخریب سطحی را در تیتانیم ایجاد نماید، یک عامل ضدعفونی کننده عالی می‌باشد.[۱۲و۱۸] به طورکلی اچ کردن با اسید منجر به ایجاد یک لایه اکسید سطحی نازک به ضخامت کمتر از ده نانومتر می‌شود. نشان داده شده است که این لایه‌های اکسیدی به آهستگی در هوا رشد کرده و از حدود ۳ نانومتر در طول یک دوره ۴۰۰ روزه به حدود ٦ نانومتر می‌رسند که در این حالت اکسید غالب TiO_2 است. اما تصویر میکروسکوپ الکترونی از سطح پس از حکاکی، پسماندهای محلول اسیدی را نشان می‌دهند که خصوصاً در این ارتباط مواد شیمیایی شامل فلورین مشاهده می‌شوند.[۱۸] ون، گزارش کرد که زیست فعالی آلیاژهای تیتانیم می‌تواند توسط بکارگیری عملیات شیمیایی دو مرحله‌ای (اسیدکلریدریک + اسیدسولفوریک) و سپس استفاده از محلول قلیایی بهبود یابد.[۱۸] بنابراین، اچ کردن با اسیدهای قوی (به عنوان مثال اسید کلریدریک، اسید سولفوریک، اسیدنیتریک، اسید فسفریک و اسید فلوئوریدریک) نگرشی نوین برای زبر کردن سطح کاشتنی تیتانیم است.[۶و۱۳و۱۹] حکاکی با اسید حفرات کوچکی با اندازه‌هایی در محدوده ۰/۵ تا ۲ میکرون بر روی سطح کاشتنی دندانی تیتانیم تولید می‌نماید. این حفرات بطور زیادی قابلیت همبندی با استخوان را افزایش می‌دهند. قرارگرفتن کاشتنی‌های تیتانیمی برای چند دقیقه در یک محلول متشکل از اسید کلریدریک و اسیدسولفوریک گرم شده در بالای ۱۰۰ درجه سانتیگراد (حکاکی با محلول اسیدی دوتایی) در جهت تولید یک سطح با زبری میکرون به کار گرفته شده است. چنین سطحی سرعت همبندی با استخوان را افزایش می‌دهد. حکاکی با اسیدهای دوتایی قابلیت هدایت رشد استخوان را بالا برده که باعث تشکیل مستقیم استخوان بر روی سطح ماده کاشتنی می‌شود.[٦] مطالعات تجربی متعددی نشان داده‌اند که استفاده از محلول‌های اسیدی منجر به تماس بالاتر استخوان با ماده کاشتنی شده و از عدم جذب استخوان در مقایسه با سطوح پاشش پلاسمایی شده یا ماشین‌کاری شده، جلوگیری می‌کند.[۱۵] اخیراً روش‌های اصلاح سطح با محلول اسیدی به منظور افزایش چسبندگی سلولی و تشکیل استخوان جدید بهبود یافته است. دمای بالای محلول اسیدی، میکرو حفرات سطحی همگنی را با تماس بالاتری از استخوان-کاشتنی نسبت به سطوح پاشش پلاسمایی شده، در بررسی‌های تجربی ایجاد کرده است. ترشوندگی سطح همچنین درجهت چسبندگی بالاتر پروتئین‌ها پیشنهاد شده است. چسبندگی پروتئین‌ها، مهاجرت سلول‌های استخوان‌ساز در طول سطح را هدایت می‌کند. یک روش دیگر، اصلاح سطح کاشتنی‌های تیتانیم دندانی با محلول فلوراید است. تیتانیم در مقابل یون‌های فلوراید بسیار فعال بوده و تترا فلوئورید تیتانیم را تشکیل می‌دهد. سطح تولید شده دارای توپوگرافی با زبری میکرون، می‌باشد. به هر حال، عملیات اکسیداسیون اسیدی

نظیر اسید فلوئوریدریک می‌توانند جهت ایجاد توپوگرافی‌ها در مقیاس نانو (به عنوان ساختارهایی که حداقل یکی از ابعادشان در محدوده یک تا صد نانومتر است) استفاده شوند.[۲۰و۱۴و۸] این عملیات شیمیایی، علاوه بر ایجاد یک سطح زبر منجر به حضور یون فلوراید در سطح تیتانیم شده که تلفیق آنها به منظور همبندی استخوان کاشتنی تیتانیم با بافت استخوانی مساعد است.[۱۶] اصلاح شیمیایی، سطح تفکیک سلول‌های استخوان‌ساز را در مقایسه با نمونه‌های اصلاح نشده بالا می‌برد. همچنین این فرآیند قادر است پتانسیلی در جهت بهبود بالاتر تکیه‌گاه کاشتنی در استخوان توسط ارائه سطح کاشتنی زیست فعال، ارائه دهد.

اما همان‌طور که در بالا ذکر شد، اصلاح شیمیایی سطح می‌تواند باعث کاهش خواص مکانیکی تیتانیم شود. برای مثال، حکاکی با اسید می‌تواند به حضور هیدروژن در سطح تیتانیم منجر شود که باعث کاهش انعطاف‌پذیری لایه‌های سطحی گشته و در کاهش خواص خستگی کاشتنی‌ها به علت ایجاد ترک‌های میکرونی بر روی سطح موثر می‌باشد. بنابراین، حضور هیدروژن در تیتانیم منجر به تشکیل فاز هیبریدی تُرد شده که باعث کاهش انعطاف‌پذیری تیتانیم در لایه‌های سطحی می‌شود. این پدیده مربوط به وقوع مکانیزم شکست در کاشتنی‌های دندانی است.[۶] به‌منظور مقایسه زبری سطح ایجاد شده در دو حالت گریت بلاست و حکاکی با محلول اسیدی، سطوح تجاری اسئوتایت[1] بیان شده که در یک روند دومرحله‌ای اچ می‌شوند. در این حالت، سطوح دارای یک انحراف ارتفاع با میانگین ۰/۹۴ میکرون، یک طول موج میانگین ۱۱/۶۸ میکرون و یک منطقه سطحی افزایش یافته ۲۰٪ می باشند.[۸]

در اواخر سال ۱۹۸۰، یک سری از مطالعات جهت ارزیابی سطوح تغییر فرم یافته تیتانیم شروع شد. هدف از این مطالعات، گسترش سطوح تیتانیمی غیر پوششی بود که بتواند جایگزین سطح تیتانیم پلاسما اسپری (TPS)[2] برای کاربرد کلینیکی در بیماران شود. پنج سطح تیتانیمی مختلف در استخوان‌های بلند خوک‌های آزمایشگاهی ارزیابی شد و بدین ترتیب، نشان داده شد تشکیل استخوان بر روی سطح سندبلاست و سپس حکاکی با اسید (SLA)[3] بیشتر می‌باشد. همچنین میکروتوپوگرافی می‌تواند بر تعداد و مورفولوژی پاهای کاذب چسبنده سلول و جهت‌گیری سلول‌ها (استئوبلاست‌ها) تاثیر بگذارد و مهاجرت سلول‌ها به داخل حفره‌های موجود در سطح ماده کاشتنی را هدایت کند و رشد استخوان را افزایش دهد. لذا آشکار می‌شود که این خصوصیات با توجه به دارا بودن حفرات با مقیاس میکرون در SLA بیشتر از TPS باشد. لیکن مطالعات نشان دهنده معایبی نیز برای این سطوح می‌باشد. گزارش شده است که جذب فیبرونکتین روی سطوح خشن کمتر از سطوح صاف می‌باشد. فیبرونکتین یک گلیکوپروتئین است که به طور سریعی به سطوح سخت چسبیده و در نتیجه باعث چسبیدن سلول‌های دیگر می‌شود.[۲۱] همچنین در تحقیقی دیگر نشان داده شد که سطوح اصلاح شده با عملیات اسیدی نسبت به عملیات قلیایی دارای تاثیر بارزتری بر نحوه رشد آپاتیت بوده و استوکیومتری نزدیک‌تری از نسبت کلسیم به فسفات (۱/۵۵) در پوشش شبه استخوانی آپاتیت روی سطوح خود ایجاد می‌نماید.[۱] به علاوه، سعی شده است تا به کمک یک روش تک مرحله‌ای اسیدی بتوان سطوحی با زیست‌فعالی بالاتر نسبت به سطوح SLA تولید نمود. همچنین اصلاح تیتانیم با یک روند دو مرحله‌ای (ابتدا حکاکی کردن تیتانیم در اسید کلریدریک و سپس قرار

1. OsseotiteTM

2. Titanium Plasma Spray
3. Sandblasted, Large grit, Acid-etched

دادن آن در محلول قلیایی از هیدروکسید سدیم) روشی مناسب در جهت افزایش قابلیت پیوند استخوان به سطح تیتانیم می‌باشد.[۲۲]

هدف از این پژوهش، مطالعه تاثیر روش شیمیایی بر نحوه اصلاح سطح تیتانیم بود. در این بررسی تأثیر محلول اسیدی سه‌تایی متشکل از اسیدکلریدریک، اسیدفلوئوریدریک و اسید فسفریک بر ایجاد زبری و تغییرات توپوگرافی و مورفولوژی بر روی سطح تیتانیم مورد نظر بود که بتواند تاثیر قابل ملاحظه‌ای بر زیست فعال شدن سطح تیتانیم پدید آورد.

تحلیل تصاویر SEM و AFM در مورد تأثیر پارامتر زمان بر اصلاح سطح تیتانیم مشخص کرد که افزایش زمان تا ۱۲۰ ثانیه سبب افزایش زبری سطح شده که با بررسی RMS[1] و R_a[2] این سطوح نیز این امر تائید شد (جدول ۲). در این راستا تحقیقات نشان داده است که افزایش زمان قرار گرفتن تیتانیم در محلول اسیدی سبب افزایش زبری سطح تیتانیم می‌شود.[۶و۱۰]

با بررسی نتایج این تحقیق مشخص گردید که چسبندگی و رشد و تکثیر سلول استخوان ساز MG-63 بر روی نمونه D که دارای بالاترین زبری سطح (R.M.S) بود، حداکثر بوده است. این موضوع در ارتباط با تحقیقات دیگر محققین نیز بوده است که نشان داده‌اند زبری سطح نقش فوق‌العاده مهمی در رشد و تکثیر سلولی دارد.[۱۳] لازم به ذکر است که نقش مورفولوژی حفره‌های سطح نیز از اهمیت خاصی در روند رشد و تکثیر سلول برخوردار است.[۱۱] در تمام حالت‌های فوق سطح تیتانیم کنترل، از نظر رشد و تکثیر و چسبندگی سلول در مقایسه با سطوح اصلاح شده بسیار ضعیف عمل نموده است. پروتئین‌هایی مانند فیبرونکتین که سبب چسبندگی سلول به سطح ماده ایمپلنت می‌شوند، به‌طور زیادی به زبری سطح در مقیاس نانو وابسته هستند.[۲] لذا، مشخص است که در نمونه D که بیشترین زبری را دارا بوده است، چسبندگی و رشد و تکثیر سلولی نسبت به نمونه‌های دیگر افزایش داشته است.

جدول ۲ : مقادیر R.M.S و R_a مربوط به سطح نمونه‌های تیتانیم با تغییر پارامتر زمان

زمان (ثانیه)	R.M.S* (nm)	R_a** (nm)
۳۰	۲۸/۹۶	۲۲/٦٤
٦۰	۳۲/۱۸	۲۵/۲۷
۹۰	۳۲/۰۷	۲۵/۳۰
۱۲۰	۵۸/٤٦	٤۵/۷۲
۱۵۰	٤۲/٦۹	۳۲/۸۳
۱۸۰	۳۲/۱۹	۲۳/۹۳
۲۱۰	٦۵/۸۳	۵۲/۱۷
۲٤۰	۵۵/۲٤	٤٤/۸۰

* R.M.S: Root Mean Square
** R_a: Average Roughness

نتیجه‌گیری

مورفولوژی و توپوگرافی سطح تیتانیم رفتار سلول استخوان ساز را بر روی خود تغییر می‌دهد. افزایش زمان عملیات شیمیایی سبب افزایش زبری سطح تیتانیم می‌شود و این موضوع می تواند قابلیت چسبندگی و رشد و تکثیر سلول را افزایش دهد. استفاده از محلول اسیدی سه‌تایی با غلظت مشخص و زمان بهینه، روشی ساده و در عین حال کم هزینه برای زیست فعال کردن سطح تیتانیم است.

تشکر و قدردانی

نویسندگان مقاله برخود لازم می‌دانند که تقدیر و

1. Average Roughness
2. Root Mean Square

تشکر خود را از دانشگاه سمنان، گروه پژوهشی نانو بایو مواد زیست فعال، شرکت نانونافذ واقع در پارک علم و فناوری این دانشگاه و همچنین انستیتو پاستور ایران به دلیل حمایت از تحقیق و پژوهش حاضر اعلام دارند.

منابع

1. Yousefpour M, Afshar A, Chen J, Xingdong Z. Bioactive layer formation on alkaline-acid treated titanium in simulated body fluid. Materials & Design 2007; 28: 2154-9.
2. Zhu X, Chen J, Scheideler L, Reichl R, Geis-Gerstorfer J. Effects of topography and composition of titanium surface oxides on osteoblast responses. Biomaterials 2004; 25(18): 4087-103.
3. Jayaraman M, Meyer U, Buhner M, Joos U, Wiesmann HP. Influence of titanium surfaces on attachment of osteoblast-like cells *in vitro*. Biomaterials 2004; 25(4): 625-31.
4. Juodzbalys G, Sapragoniene M, Wennerberg A. New Acid Etched Titanium Dental Implant Surface. Stomatologija Baltic Dental and Maxillofacial Journal 2003; 5: 101-5.
5. Conforto E, Caillard D, Aronsson BO, Descouts P. Electron Microscopy on Titanium Implants for Bone Replacement After "SLA" Surface Treatment. European Cells and Materials 2002; 3: 9-10.
6. Le Guehennec L, Soueidan A, Layrolle P, Amouriq Y. Surface treatments of titanium dental implants for rapid osseointegration. Dent Mater 2007; 23(7): 844-54.
7. Liu X, Poon Ray WY, Kwok Sunny CH, K. Paul C, Chuanxian D. Plasma surface modification of titanium for hard tissue replacements. Surface & Coatings Technology 2004; 186(1-2): 227-33.
8. Refai AK. The Effect of titanium surface topography on macrophage behaviour *in vitro* [Doctorate Thesis]. Canada. The University of British Columbia; 2009.
9. Kim H, Choi SH, Ryu JJ, Koh SY, Park JH, Lee IS. The biocompatibility of SLA-treated titanium implants. Biomed Mater 2008; 3(2): 025011.
10. Cooper LF, Zhou Y, Takebe J, Guo J, Abron A, Holmen A, et al. Fluoride modification effects on osteoblast behavior and bone formation at TiO2 grit-blasted c.p. titanium endosseous implants. Biomaterials 2006; 27(6): 926-36.
11. Le Guehennec L, Lopez-Heredia MA, Enkel B, Weiss P, Amouriq Y, Layrolle P. Osteoblastic cell behaviour on different titanium implant surfaces. Acta Biomater 2008; 4(3): 535-43.
12. Takeuchi M, Abe Y, Yoshida Y, Nakayama Y, Okazaki M, Akagawa Y. Acid pretreatment of titanium implants. Biomaterials 2003; 24(10): 1821-7.
13. Ban S, Iwaya Y, Kono H, Sato H. Surface modification of titanium by etching in concentrated sulfuric acid. Dental Mater 2006; 22(12): 1115-20.
14. Mendonca G, Mendonca DB, Aragao FJ, Cooper LF. Advancing dental implant surface technology-From micron to nanotopography. Biomaterials 2008; 29(28): 3822-35.
15. Rausch-fan X, Qu Z, Wieland M, Matejka M, Schedle A. Differentiation and cytokine synthesis of human alveolar osteoblasts compared to osteoblast-like cells (MG63) in response to titanium surfaces. Dent Mater 2008; 24(1): 102-10.
16. Ellingsen JE, Johansson CB, Wennerberg A, Holman A. Improved retention and bone-to-implant contact with fluoride-modified titanium implants. Int J Oral Maxillofac Implants 2004; 19(5): 659-66.
17. Mohsin HM, Gao W. How is the Surface Treatments Influence on the Roughness of Biocompatibility? Trends Biomater Artif Organs 2008; 22(3): 140-53.
18. Liu X, Chu PK, Ding C. Surface modification of titanium, titanium alloys, and related materials for biomedical applications. Materials Science and Engineering 2004; 47: 49-121.
19. Muller FA, Bottino MC, Muller L, Henriques VA, Lohbauer U, Bressiani AH, et al. *In vitro* apatite formation on chemically treated (P/M) Ti–13Nb–13Zr. Dental Mater 2008; 24(1): 50-6.
20. Wang XX, Hayakawa S, Tsuru K, Osaka A. Bioactive titania gel layers formed by chemical treatment of Ti substrate with a H_2O_2/HCl solution. Biomaterials 2002; 23(5): 1353-7.
21. Sargolzaie N, Ghanbary H, Mohammadzadeh Rezaee Y. The effect of two types of implant surface coating on bone and surrounding tissues of prosthesis with implant supporting. J Mash Dent Sch 2008, 32(3): 207-12. (Persian)
22. Takemoto M, Fujibayashi S, Neo M, Suzuki J, Matsushita T, Kokubo T, et al. Osteoinductive porous titanium implants: Effect of sodium removal by dilute HCl treatment. Biomaterials 2006; 27(13): 2682-91.