

## سنتر و مشخصه یابی پوشش نانو کامپوزیت هیدروکسی آپاتیت/کیتوسان جهت پوشش دهی ایمپلنت دندان

سید یحیی رهنمایی<sup>۱</sup>، سید خطیب الاسلام صدرنژاد<sup>۲\*</sup>، محمدعلی شکرگزار، مرتضی مهرجو

- ۱- دانشجوی کارشناسی ارشد دانشکده مهندسی و علم مواد، دانشگاه صنعتی شریف
- ۲- عضو هیئت علمی دانشکده مهندسی و علم مواد، دانشگاه صنعتی شریف
- ۳- دانشیار، بانک سلولی ایران، انستیتو پاستور ایران
- ۴- فارغ التحصیل، بانک سلولی ایران، انستیتو پاستور ایران

### چکیده

از جمله مشکلات رایج در استفاده از ایمپلنت دندان پوشش دار، استحکام چسبندگی پایین برای پوشش زیست فعال ایمپلنت می باشد. از این رو هدف این مقاله سنتر نانو کامپوزیت هیدروکسی آپاتیت/کیتوسان به روش رسوب دهی درجای هیدروکسی آپاتیت در کنار زنجیره های کیتوسان و ایجاد پوشش با استحکام چسبندگی بالا از این پودر بوده است. پودر سنتر شده توسط آزمون های MTT, FESEM, XRD و Pin on disk مشخصه یابی شد. نتایج نشان داد که اندازه کریستالیت هیدروکسی آپاتیت رسوب داده شده، ۳۰ نانومتر و اندازه ذرات آن در حدود ۷۰ نانومتر می باشد. نتایج تست سمیت نشان داد که پوشش با ۲۰ درصد وزنی کیتوسان مقداری سمی بوده و پودر قبل از پوشش دهی باید رقیق شود. استحکام چسبندگی پوشش بدست آمده افزایش قابل ملاحظه ای نسبت به پوشش هیدروکسی آپاتیت دارد.

واژه های کلیدی: نانو کامپوزیت، هیدروکسی آپاتیت، کیتوسان، ایمپلنت دندان

شاخه تخصصی: نانومواد

## مقدمه

پوشش دهی ایمپلنت دندان با لایه های زیست فعال منجر به اتصال و فعل و انفعال بیولوژیکی بین استخوان و ایمپلنت می گردد که می تواند استخوان سازی و اتصال ایمپلنت به استخوان را بهبود بخشد. مهمترین پوشش مورد استفاده برای ایمپلنت دندان، پوشش های زیست فعال هیدروکسی آپاتیت می باشد. در مقاله ای فنگ و همکارانش گزارش کردند که در کنار مشخصه های سطحی ایمپلنت، تعداد گروه های هیدروکسیل بر روی سطح تیتانیم، بر رفتار استئوبلاست های در تماس با سطح تیتانیم تاثیر می گذارد [۱]. علیرغم تمام مزایای پوشش های هیدروکسی آپاتیت، استحکام پیوندی فصل مشترک هیدروکسی آپاتیت با ایمپلنت دندان تیتانیومی می تواند به صورت بالقوه در ایمپلنت ضعیف باشد. مطالعات قبلی بر روی پیوند بین پوشش هیدروکسی آپاتیت و استخوان نشان داده که استحکام چسبندگی هیدروکسی آپاتیت به ایمپلنت در این مورد از اهمیت زیادی برخوردار است [۲]. از طرف دیگر در کاربردهای بالینی، طبیعت ترد پوشش هیدروکسی آپاتیت اغلب منجر به سایش سریع و شکست زودرس لایه پوشش می شود. این مشکل در ایمپلنت دندان و هنگام کاشت آن در استخوان فک بیشتر اهمیت پیدا می کند. برای غلبه بر این مشکل تلاش های زیادی صورت گرفته است. یکی از راه حل های پیشنهاد شده، استفاده از پوشش های کامپوزیتی می باشد. کامپوزیت های شامل کلسیم فسفات ها و بیوپلیمرهای طبیعی به طور وسیعی به عنوان بیومواد برای مهندسی بافت و پوشش ها استفاده می شوند.

کیتوسان از استیلن زدایی کتین بدست می آید. کتین و کیتوسان از پلیمرهای نیمه کریستالی می باشند. هر دوی آنها شامل مونومرهای یکسان می باشند و تفاوت آنها در محتوای مونومرهای استیلن دار یا استیلن زدایی شده می باشد. کتین و کیتوسان به علت دارا بودن خواص مطلوبی همچون خواص ضد باکتریایی، زیست سازگاری و تسهیل کردن فرآیندهای حیاتی در درمان زخم ها و جراحات ها مواد امیدبخشی در زمینه کاربردهای پزشکی می باشند [۳]. در سال های اخیر تمایل به تولید کامپوزیت هیدروکسی آپاتیت/کیتوسان بطور چشمگیری افزایش یافته است. شاهد بر این ادعا افزایش تعداد مقالات در این زمینه می باشد. رسو و همکاران [۴] نیز این کامپوزیت را با درصدهای متنوع کیتوسان به صورت رسوب همزمان و گام به گام سنتز کردند. ایده بعدی برای این کامپوزیت ایجاد نانو کریستال های هیدروکسی آپاتیت در کنار لایه های کیتوسان بوده است. هدف از این رویکرد دستیابی به ساختاری شبیه به استخوان طبیعی می باشد [۵]. کاربرد کامپوزیت هیدروکسی آپاتیت / کیتوسان بیشتر مربوط به داربست های استخوانی و پیوندهای استخوانی بوده است. از طرف دیگر، مشکل عمده پوشش های زیست فعال برای ایمپلنت دندان، به خواص مکانیکی ضعیف آن و چسبندگی ضعیف آن به زیرلایه های فلزی بر می گردد، لذا در این مقاله سعی شده برای برطرف کردن ضعف در چسبندگی و خواص مکانیکی پوشش زیست فعال هیدروکسی آپاتیت، توانایی نانو کامپوزیت هیدروکسی آپاتیت / کیتوسان به عنوان پوشش ایمپلنت دندان بررسی شود.

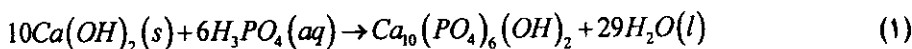
## مواد و روش ها

آلیاژ Ti-6Al-4V (ISO 5832-3) به عنوان زیرلایه انتخاب شد. پودر هیدروکسی آپاتیت میکروساختار (مرک) جهت مقایسه با پودر نانو کامپوزیت سنتز شده در این پروژه استفاده شد. کیتوسان با درجه استیلن زدایی ۸۵٪ (شرکت آلد ریچ)،

انجمن علمی نانوفناوری پزشکی ایران

اسید استیک با درصد خلوص ۹۹٫۸٪ (مرک)، هیدروکسید کلسیم  $(Ca(OH)_2)$  (مرک) و اسید فسفریک با خلوص ۸۵٪ (مرک) مواد مورد استفاده بوده است. تمام محلول ها در این پروژه با آب دی یونیزه ساخته شد.

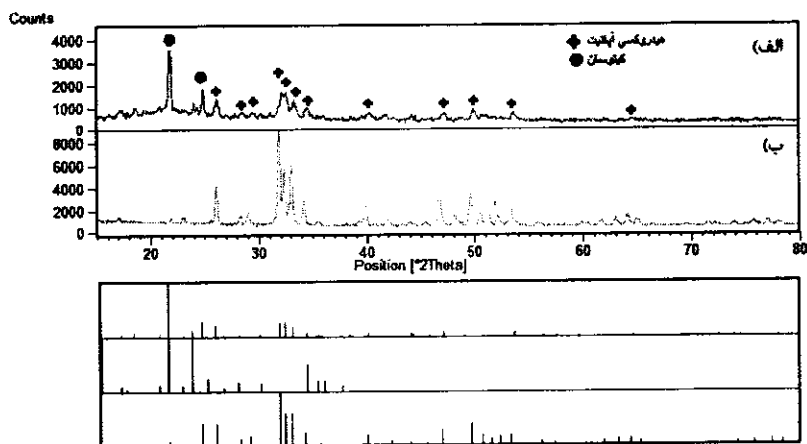
برای تهیه نانوکامپوزیت فوق، ابتدا محلول ۱٫۵ درصد حجمی اسید استیک در آب دی یونیزه تهیه شد. سپس مقدار ۱ گرم پودر کیتوسان به محلول ۱٫۵ درصد حجمی اسید استیک اضافه شد و محلول حاصل برای ۲ ساعت تا انحلال کامل کیتوسان و بدست آوردن محلول شفاف بر روی هم زن مغناطیسی هم زده شد. در ادامه برای تهیه محلول هیدروکسی آپاتیت، محلول کیتوسان به محلول ۵٫۸ درصد وزنی اسید فسفریک بر روی هم زن اضافه گردید. با این کار pH محلول، به حدود ۵ رسید. در ادامه محلول کیتوسان / اسید فسفریک بدست آمده در دمای محیط و با سرعت ۳ cc/min قطره قطره به سوسپانسیون ۷٫۴۱ درصد وزنی هیدروکسید کلسیم  $(Ca(OH)_2)$  در آب دی یونیزه، تحت هم زدن اضافه شد. مقادیر مولی آغازگر کلسیم و فسفر به ترتیب ۰٫۰۶ و ۰٫۱ انتخاب شد تا نسبت مولی Ca/P در نانوکامپوزیت برابر ۱٫۶۷ یعنی معادل این مقدار در هیدروکسی آپاتیت شود. واکنش تشکیل هیدروکسی آپاتیت با آغازگرهای فوق به این ترتیب می باشد.



pH دوغاب حاصل در حدود ۹ بود. دوغاب حاصل جهت به دست آمدن نانوکامپوزیت تا حد امکان همگن، برای ۲۴ ساعت بر روی همزن تحت هم زدن پیوسته قرار گرفت. سپس دوغاب بدست آمده برای ۲۴ ساعت دیگر در دمای اتاق برای پیرسازی رها شد. رسوب سفید به دست آمده چندین بار تا رسیدن به pH خنثی به وسیله آب دی یونیزه شسته شد و تحت فیلتراسیون قرار گرفت. نهایتاً رسوب حاصل در آون در دمای ۱۲۵ درجه سانتیگراد برای خروج کامل حلال قرار گرفت و پودر نانوکامپوزیت جهت مشخصه یابی های اولیه بدست آمد. برای پوشش دهی ابتدا پودر سنتز شده به آب دی یونیزه اضافه شد و برای جداسازی آگلومره ها و ایجاد پراکندگی مناسب، به مدت ۲ ساعت اولتراسونیک و به صورت متناوب با این مرحله توسط همزن همزده شد. نمونه های تیتانیومی آماده شده روش پوشش دهی سل-ژل غوطه وری بود. سرعت غوطه وری با کنترل ولتاژ موتور دستگاه، بر روی سرعت ۵ cm/min تنظیم شد. دمای پوشش دهی دمای محیط و زمان توقف نمونه در محلول ۲۰ ثانیه بود. نمونه های نانوکامپوزیت هیدروکسی آپاتیت/کیتوسان، پس از گذراندن مرحله پوشش دهی، به مدت ۱ ساعت در دمای ۱۲۵ درجه سانتیگراد برای خروج کامل حلال در آون قرار گرفت.

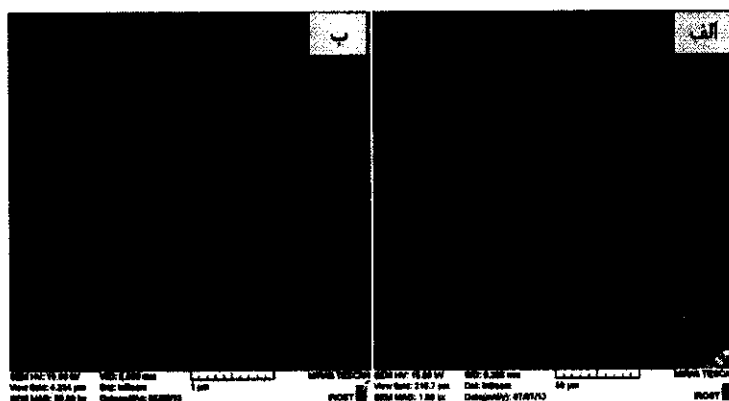
به منظور بررسی فازی نمونه، از آنالیز تفرق اشعه ایکس (XRD) (مدل D-64295 ساخت کمپانی STOE کشور آلمان) استفاده شد. جهت بررسی مورفولوژی پوشش های حاصل، از میکروسکوپ الکترونی روبشی شدت میدانی (FESEM) (مدل MIRA II TESCAN&IROST) و برای بررسی سمیت نمونه از کشت سلولی و تست MTT استفاده شد. در نهایت برای بررسی استحکام چسبندگی پوشش ایجاد شده با نانوکامپوزیت فوق بر روی آلیاژ تیتانیوم، دستگاه Pin On Disk به کار برده شد.

شکل (۱)، الگوی تفرق اشعه ایکس برای پودر نانو کامپوزیت سنتز شده و پودر هیدروکسی آپاتیت میکروساختار را نشان می دهد. همانطور که در شکل نشان داده شده است در هر دو پودر طیف های مربوط به فاز هیدروکسی آپاتیت دیده می شود.

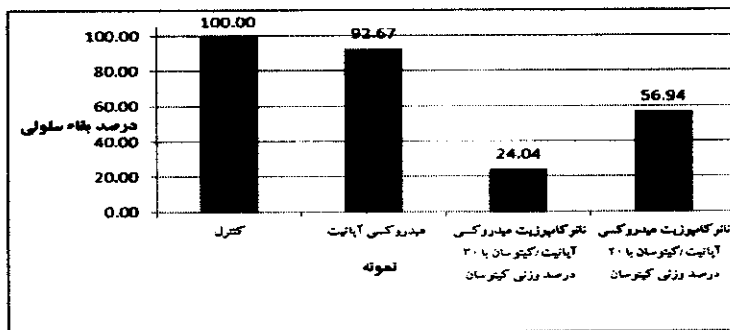


شکل (۱): الگوی تفرق اشعه ایکس برای الف) پودر نانو کامپوزیت هیدروکسی آپاتیت/کیتوسان سنتز شده، ب) پودر هیدروکسی آپاتیت میکروساختار.

الگوی تفرق اشعه ایکس نشان می دهد که بلورینگی هیدروکسی آپاتیت با اضافه شدن کیتوسان و تولید نانو کامپوزیت هیدروکسی آپاتیت/کیتوسان نسبت به هیدروکسی آپاتیت نانو ساختار کاهش یافته است. با توجه به شکل می توان دید که شدت پیک های هیدروکسی آپاتیت در نمونه کامپوزیتی کاهش یافته است. علت به عملیات حرارتی نمونه برمی گردد. نمونه نانو کامپوزیتی نهایتاً تحت دمای ۱۵۰ در آون قرار گرفت که این باعث می شود هیدروکسی آپاتیت سنتزی اکثراً به شکل آمورف باشد. از طرفی چون دمای تجزیه کیتوسان حدود ۲۵۰ می باشد و می توان گفت پلیمر دمای بالایی را دیده است لذا پیک مربوط به کیتوسان در  $2\theta = 20^\circ$ ، دارای یک پیک تیز می شود که نشان دهنده آنست که این پلیمر نیمه کریستالی در قسمت هایی از زنجیر خود به خوبی نظم یافته است. پهن شدگی پیک تفرق با اندازه کریستالیت رابطه عکس دارد. پهنای پیک مربوط به هیدروکسی آپاتیت در پودر نانو کامپوزیت هیدروکسی آپاتیت/کیتوسان بیشتر از پودر هیدروکسی آپاتیت میکروساختار می باشد. این بدان معنی است که، با افزودن کیتوسان به هیدروکسی آپاتیت اندازه کریستالیت بلورهای هیدروکسی آپاتیت کاهش می یابد. اندازه کریستالیت به دست آمده از نرم افزار X'Pert برای هیدروکسی آپاتیت موجود در نانو کامپوزیت ۳۰ نانومتر بدست آمد. در نتیجه یکی از کاربردهای نانو کامپوزیت ساخته شده در نزدیک کردن اندازه کریستالیت هیدروکسی آپاتیت به این مقدار در آپاتیت زیستی (۲۰ نانومتر) می باشد. شکل (۲) تصاویر میکروسکوپ الکترونی از سطح پوشش نانو کامپوزیت هیدروکسی آپاتیت/کیتوسان می باشد. در تصویر (الف)، دیده می شود سطح پوشش با حفظ یکپارچگی دارای تخلخل های میکرومتری می باشد علت این امر وجود رشته های کیتوسان در کنار ذرات نانومتری هیدروکسی آپاتیت و هم چنین ذات روش سل-ژل می باشد که پوششی متخلخل را بوجود می آورد.



شکل (۲): تصویر FESEM از سطح ایمپلنت دندان پوشش داده شده با پوشش نانوکامپوزیت هیدروکسی آپاتیت/کیتوسان با تخلخل های نانومتری و میکرومتری، در بزرگنمایی های مختلف. در تصویر (ب)، دیده می شود که ذرات هیدروکسی آپاتیت در کنار رشته های کیتوسان قرار گرفته اند و هم ذرات و هم تخلخل ها دارای اندازه نانومتری می باشند. دارند. همانطور که دیده می شود، وجود رشته های کیتوسان مانعی برای آگلومره شدن ذرات هیدروکسی آپاتیت شده و ساختاری چارچوب مانند برای رشد سلول های استخوانی فراهم کرده است. از طرف دیگر عدم عملیات حرارتی در دماهای بالا، باعث شده اکثر تخلخل های میکرومتری و نانومتری بدست آمده از روش سل-ژل در پوشش نهایی حفظ شود.

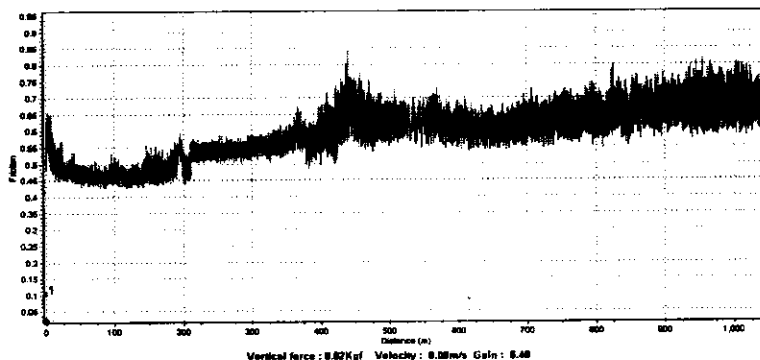


شکل (۳): درصد بقاء سلولی بر روی پودرهای سنتز شده با درصد وزنی متفاوت از کیتوسان.

از آنجا که ملاک عدم سمیت، درصد بقاء سلولی بالای ۷۰ درصد می باشد، طبق نمودار بالا می توان گفت پودر با ۳۰ درصد وزنی کیتوسان نانوکامپوزیت هیدروکسی آپاتیت/کیتوسان علائم سمیت را نشان داده است. با اندازه گیری pH هم دیده شد که در این درصد وزنی کیتوسان، محلول اسیدی است. علت دیگر سمی بودن نتیجه به خاصیت آب گریزی کیتوسان برمیگردد. با بالا بردن دمای اعمالی به پوشش تا دمای ۱۵۰ برای خروج کامل حلال و رساندن درصد وزنی کیتوسان به ۲۰ درصد سمیت کاهش یافت. نتایج نشان دادند که بهترین درصد وزنی برای کیتوسان در این نانوکامپوزیت، ۱۰ درصد است. در این درصد وزنی، pH محلول خنثی می شود. مطابق شکل (۴) پوشش نانوکامپوزیتی بعد از اینکه بین مسافتی در حدود ۴۵۰ متر بر روی آن چرخیده، کاملاً از زیر لایه جدا شد. در حالی که پوشش هیدروکسی آپاتیت در همان زمان های اولیه یعنی با طی مسافتی در حدود ۱۰۰ متر از بین رفت. می توان نتیجه گرفت

انجمن علمی نانوفناوری پزشکی ایران

که پوشش نانوکامپوزیت هیدروکسی آپاتیت/کیتوسان نسبت به پوشش هیدروکسی آپاتیت مقاومت به سایش و استحکام چسبندگی بهتری دارد. این نتیجه گیری با ایجاد خراش بر روی هر دو نوع پوشش هم به راحتی دیده می شود. پوشش نانوکامپوزیتی از استحکام چسبندگی قابل توجهی برخوردار بود. علت این استحکام به باندهای ایجاد شده توسط رشته های پلیمری بر می گردد.



شکل (۴): تغییرات ضریب اصطکاک بر حسب فاصله طی شده توسط پین بر روی نمونه با پوشش نانوکامپوزیت هیدروکسی آپاتیت/کیتوسان

نتیجه گیری

در این مقاله سعی شد با ایجاد پوشش نانوکامپوزیت هیدروکسی آپاتیت/کیتوسان مشکل استحکام چسبندگی پوشش ایمپلنت دندان برطرف شود. با سنتز درجای هیدروکسی آپاتیت در حضور رشته های کیتوسان نانو ساختاری یکپارچه با اندازه دانه در حدود ۷۰ نانومتر و اندازه کریستالیت ۳۰ نانومتر برای هیدروکسی آپاتیت بدست آمد. نتایج نشان داد که با سنتز نانوکامپوزیت با ۱۰ درصد وزنی کیتوسان می توان پوششی با چسبندگی خوب برای سلول ها به علت تخلخل های زیاد بدست آورد و از طرفی مشکل سمیت نیز برطرف شود. این پوشش نانوکامپوزیتی نسبت به پوشش هیدروکسی آپاتیت استحکام چسبندگی بسیار بالاتری را ارائه می دهد.

مراجع

- [1] B. Feng, J. Weng, B.C. Yang, S.X. Qu, X.D. Zhang, Characterization of surface oxide films on titanium and adhesion of osteoblast, *Journal of Biomaterials* 24, (2003) 4663.
- [2] BC. Wang, TM. Lee, E. Chang, CY. Yang, The shear-strength and the failure mode of plasma-sprayed hydroxyapatite coating to bone—the effect of coating thickness, *Journal of Biomed Mater Res* 27, (1993) 1315–27.
- [3] RA. Muzzarelli, Chitins and chitosans for the repair of wounded skin, nerve, cartilage and bone, *Journal of Carbohydrate Polym* 76, (2009) 167–182.
- [4] V.M. Rusu, Ng. Chuen-How, M. Wilke, B. Tiersch, P. Fratzl, M.G. Peter, Size-controlled hydroxyapatite nanoparticles as self-organized organic–inorganic composite materials, *Journal of Biomaterials* 26, (2005) 5414–5426.
- [5] B.M. Chesnutt, A.M. Viano, Y. Yuan, Y. Yang, T. Guda, M.R. Appleford, J.L. Ong, W.O. Haggard, J.D. Bumgardner, Design and characterization of a novel chitosan/nanocrystalline calcium phosphate composite scaffold for bone regeneration, *Journal of Biomed Mater Res A* 88, (2009) 491–502.