

تأثیر زیست فعال سازی آلیاژ نیکل-تیتانیوم

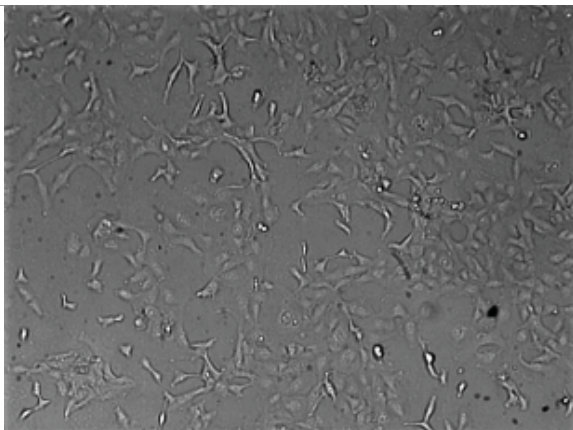
بر سلول‌های MDA-MB231 برای کاربرد در ایمپلنت بافت سخت ستون فقرات

نیکل از سطح آلیاژ Ni-Ti بکاهد و موجب افزایش زیست‌فعالی و یکپارچگی با بافت استخوان شود. زیست‌فعالی در آلیاژهای نایتینول می‌تواند به روش‌های مختلفی همچون عملیات گرمایی، پاشش پلاسمایی، تابش پرتو یونی، تکنیک سل-ژل، اصلاح سطح شیمیایی با محلول اسیدی یا قلیایی مانند هیدروکسید سدیم و عملیات اکسیداسیون با محلول پراکسید هیدروژن افزایش یابد. عملیات قلیایی سبب تشکیل لایه تیتانات سدیم بر سطح نمونه می‌شود. درحالی‌که عملیات با پراکسید هیدروژن تشکیل لایه ژلی از تیتانیا روی سطح می‌دهد. تیتانات سدیم و ژل تیتانیا توانایی ایجاد رسوب آپاتیت شبه استخوانی در محیط آزمایشگاهی و کلینیکی داشته و از این منظر، زیست فعال تلقی می‌شوند. غوطه‌ور کردن نمونه‌های آلیاژی NiTi در محلول اسیدی حاوی H_2O_2 و HNO_3 و در محلول قلیایی حاوی NaOH از جمله روش‌های اصلاح سطح است که برای زیست‌فعال کردن آلیاژ بعد از قرارگیری در محلول SBF استفاده می‌شود.

در یک تحقیق علمی، نمونه نایتینول تحت اصلاح حرارتی و سپس قلیایی در محلول NaOH با غلظت‌های مختلف در دمای ۱۱۰ درجه سانتیگراد به مدت ۲ ساعت قرار گرفت. افزایش زیست‌فعالی بر اثر اصلاح قلیایی نتیجه شد. نتیجه یک مطالعه دیگر که از روش هیدروترمال و عملیات قلیایی-حرارتی برای افزایش زیست‌فعالی آلیاژ نایتینول، استفاده کرده بود نیز مبین وجود لایه‌ای از اکسید تیتانیوم در سطح و افزایش زیست‌فعالی بوده است. لازم به ذکر است که عملیات قلیایی در زیست‌فعال کردن سطح فلز تانتالیم نیز مؤثر واقع شده است. همچنین پیشنهاد شده است که اصلاح سطح تیتانیم با اج اسیدی می‌تواند تأثیری مثبت بر یکپارچگی کاشتنی‌های استخوانی داشته باشد. محققان در یک مطالعه به این نتیجه رسیدند که اصلاح سطح با محلول‌های اسیدی می‌تواند مورفولوژی سطح را تغییر دهد و باعث افزایش زبری شود که این پدیده خود می‌تواند باعث افزایش پیوند استخوانی در ایمپلنت و کاهش اثر سمی نیکل به واسطه تشکیل یک لایه همگن و پایدار از اکسیدهای تیتانیم در بدن شود و میزان چسبندگی سلولی، رشد و تکثیر گروه اصلاح شده و تغییر قابل ملاحظه‌ای نسبت به سطح اصلاح نشده نشان داد. در مطالعه‌ای دیگر برای ایجاد خاصیت زیست‌فعالی در سطح از اسیدکلریدریک و پراکسید هیدروژن استفاده شد. با این توضیحات،

نارسایی مهره کمر و سرطان ستون فقرات دو بیماری رایج است که سلامت بسیاری را به خطر انداخته است. پس از بیماری‌های قلبی-عروقی، دومین عامل مرگ‌ومیر در کشورهای پیشرفته و سومین عامل مرگ‌ومیر در کشورهای کمتر توسعه یافته، سرطان است. درد کمر از ۳/۹ در سال ۱۹۹۲ به ۱۴/۳ درصد در سال ۲۰۱۸ افزایش یافته است. تحقیق در زمینه ایمپلنت‌های استخوانی و تأثیر آن‌ها بر رفتار سلول‌های سرطانی می‌تواند به کاهش مشکل کمک کند. از آن جا که مهره‌های کمر وظایف خاصی از جمله حفظ تعادل بدن و بافت‌های نرم سامانه عصبی و ارگان‌های اطراف شکم و لگن دارند، آسیب به این مهره‌ها می‌تواند کیفیت زندگی را دچار اختلال کند. در بعضی موارد دارودرمانی و تمرینات ورزشی در بهبود سلامت فرد اثرگذار نیستند و جراحی ضرورت می‌یابد. ابزارهای ارتوپدی فلزی در دهه‌های اخیر کاربردهای وسیعی در اصلاح نافرمی مهره‌های ستون فقرات یافته‌اند و همواره گزینه مناسبی برای بهبود شرایط بوده‌اند اما توسعه مواد زیست‌سازگار کارا تر بوده و از اهمیت بیشتری برخوردار است.

فلزات به سبب استحکام زیاد، مورد توجه هستند. لکن به سبب مدول یانگ بالاتر از استخوان، باعث ایجاد سپرنشی و در نتیجه شل شدن ایمپلنت می‌شوند. درحالی‌که مدول یانگ استخوان طبیعی ۲۰-۵ GPa است، مدول یانگ آلیاژ کبالت کروم مولیبدن ۲۴۰-۵۰ GPa و نایتینول ۲۰۰-۳۰ GPa است. که باید به نحوی کاهش یابد. ایجاد تخلخل در ایمپلنت‌های فلزی می‌تواند باعث کاهش مدول یانگ و نزدیک‌تر شدن مدول آن‌ها به استخوان شود. ایجاد تخلخل باعث تسریع روند رشد استخوان نیز می‌شود. نایتینول آلیاژی است با ترکیبی از نرمی و سفتی و خواص منحصر به فردی همچون حافظه داری و سوپرالاستیسیته. از جمله خواص این آلیاژ می‌توان به زیست‌سازگاری، خصوصیات مکانیکی مطلوب، مقاومت به سایش و خوردگی خوب، خستگی و فرسایش مناسب، قابلیت کاربرد بایو داشتن و مدول الاستیک پایین آن که نزدیک به استخوان طبیعی است، اشاره کرد. اما در نوع پرنیکل آلیاژ، زیست‌سازگاری تحت تأثیر قرار گرفته و ممکن است پاسخ‌های آلرژیک مشاهده شود. تحقیقات نشان داده‌اند که یون‌های نیکل در طول درمان می‌توانند از آلیاژ رها شوند. اصلاح سطح یکی از راه کارهایی است که می‌تواند از میزان رهاش



شکل ۱) تصویر سلول‌های MDA-MB231 در فلاسک کشت

به منظور بررسی تأثیر بیولوژیکی نمونه‌های نایتینول بر سلول‌های MDA-MB231، نمونه‌ها با رعایت شماره در دو خانه پلیت قرار داده شدند و سپس ۴ میلی لیتر محیط کشت کامل به همراه مقدار مشخصی سلول در هر خانه ریخته شد به این صورت که روی سطح نمونه‌ها را به طور کامل پر کند. سپس پلیت در انکوباتور قرار گرفت، بعد از ۴ ساعت پلیت را زیر میکروسکوپ معکوس قرار داده و از چسبندگی سلول‌های MDA-MB231 اطمینان حاصل شد. سپس پلیت را مجدداً به انکوباتور بازگردانده و ۲۴ ساعت در آنجا قرار دادیم. روز بعد نمونه‌ها را به یک پلیت عاری از محیط کشت و سلول منتقل کرده و از فرمالدهید ۰/۰۷ درصد به منظور فیکس کردن سلول‌ها و آماده‌سازی برای تصویربرداری استفاده شد. به منظور مشاهده بهتر سلول‌ها توسط میکروسکوپ الکترونی گسیل میدانی مدل VEGA\TESCAN-LMU، ورقه نازک طلا را به عنوان پوشش رسانا روی سطح نمونه‌ها قرار داده و تصویربرداری انجام شد.

نتایج و بحث

شکل ۲ سطح نمونه شاهد پس از صیقلکاری را نشان می‌دهد. روی شکل تنها تصویر خطوط سناده دیده می‌شود؛ درحالی‌که شکل ۳ تصویر فرورفتگی‌های حاصل از تأثیر محلول ۱:۳:۵ نظر می‌رسد اصلاح سطح، باعث ایجاد زبری و تخلخل سطحی بر نمونه نایتینول شده است. براساس تحقیقات قبلی، عملیات سطحی با محلول‌های حاوی اسید فلئوریدریک می‌تواند سبب ایجاد حفرات نانو در سطح شود. هیدروژن پراکسید به دلیل دارا بودن اکسیژن فعال با سطح تیتانیوم واکنش داده و باعث به وجود آمدن ژل اکسید تیتانیوم روی سطح آلیاژ شده و به عنوان یک مانع شیمیایی در برابر رهایش یون نیکل در کاشتنی عمل خواهد کرد. اما اسید نیتریک با نیکل آلیاژ واکنش داده و ضمن ایجاد خلل و

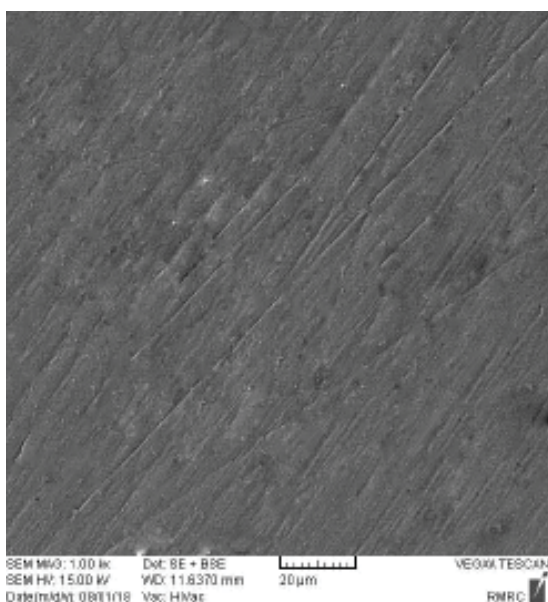
مشخص می‌شود که تحقیق برای اصلاح سطح و ارتقا زیست‌فعالی آلیاژ نایتینول تاکنون سیر تکاملی داشته است. هدف این پژوهش، ارتقاء باز هم بیشتر زیست‌فعالی از طریق بررسی اثر محلول‌های اسیدی قوی و به دنبال آن عملیات قلیایی-حرارتی بر سطح با تعیین تأثیر تغییرات سطحی بر افزایش قابلیت زیست‌فعالی آلیاژ است.

روش تحقیق

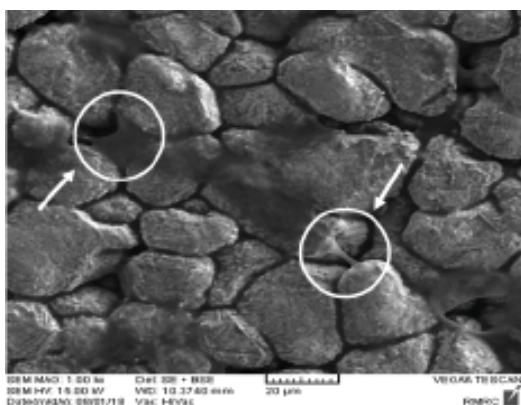
آلیاژ نایتینول استفاده شده در این تحقیق به روش ذوب القایی شمش نیکل کاتدی با خلوص ۹۹/۹ درصد وزنی و تیتانیوم اسفنجی با خلوص ۹۹/۵ درصد وزنی تهیه شد. جزئیات روش ساخت در مقاله دیگری ذکر شده است. با نورد داغ شمش تولیدی، ورق NiTi به ضخامت یک میلیمتر مطابق روش ذکر شده در فرانس تولید شد و سپس تحت برش دقیق توسط دستگاه وایرکاتر به نمونه‌های قرصی شکل دارای قطر دو میلیمتر بریده شد. سپس سطح نمونه‌ها با استفاده از سناده مورد عملیات صیقلکاری مکانیکی قرار گرفته و با استن شسته شد. عملیات اصلاح سطح با استفاده از محلول حاوی $\text{HF-HNO}_3\text{-H}_2\text{O}_2$ در شرایطی مشابه با روش ذکر شده در فرانس انجام شد. نمونه شماره ۱ در ۹ میلی لیتر محلول $\text{HF-HNO}_3\text{-H}_2\text{O}_2$ با نسبت‌های ۱:۳:۵ به مدت ۸ دقیقه غوطه‌ور شد. سپس نمونه از محلول خارج شده و بلافاصله به منظور از بین رفتن آلودگی‌های سطحی در ۴ بازه زمانی ۳۰ دقیقه‌ای به‌طور مجزا به ترتیب در ml استون، پروپانول، الکل و آب دی یونیزه در محفظه اولتراسونیک شستشو داده شد و با استفاده از خشک‌کن الکتریکی سطح نمونه در هوای معمولی خشک شد. نمونه تمیز و خشک آنگاه درون ظرف تفلون حاوی محلول ۵ مولار NaOH قرار گرفته و ظرف را داخل محفظه اتوکلاو به مدت ۴ ساعت در آن با دمای ۱۲۰ درجه گرم نگه داشته شد. سپس ظرف حاوی نمونه را از اتوکلاو خارج کرده و برای خشک شدن، ۲۴ ساعت در دمای محیط قرار دادیم. نمونه شماره ۲، که به عنوان شاهد در نظر گرفته شد، تحت عملیات سناده زنی و شستشوی اولتراسونیک، مشابه نمونه ۱، قرار گرفت.

بررسی مورفولوژی سطح نمونه‌ها با میکروسکوپ الکترونی گسیل میدانی مدل MIRA3TESCAN-XMU (FESEM) انجام شد. سلول‌های سرطانی MDA-MB231، با استفاده از محیط کشت (DMEM, GIBCO, England) و افزودن ۱۰٪ سرم جنین گوساله (FBS, GIBCO, England) و ۱٪ پنی سیلین - استرپتومایسین (GIBCO, England) کشت داده شدند تا سلول برای چسبندگی و رشد و تکثیر آماده شود. علت استفاده از سلول سرطانی، در اختیار بودن سلول به علاوه سعی بر ایجاد شرایط رشد سریعتر به منظور افزایش دقت تشخیص بود. شکل ۱ نشانگر سلول‌ها در فلاسک کشت است که با میکروسکوپ معکوس و بزرگنمایی X200 گرفته شده است.

به خوردگی و سایش بر سطح نمونه تشکیل شده و سبب بهبود خواص سطحی و بیولوژیکی نمونه می‌شود. این لایه مخلوطی از دو ترکیب TiO_2 و TiO است که زیست‌سازگاری بهتری نسبت به Ti دارد. وجود لایه سطحی TiO_2 می‌تواند مانع آزاد شدن بالقوه نیکل شود. شکل ۴ تصویر سطح آلیاژ نایتینول بدون عملیات اصلاح سطح (نمونه شاهد) را پس از کشت سلول نشان می‌دهد. چسبندگی و رشد سلول قابل توجهی در این تصویر ملاحظه نمی‌شود. در حالی که تصویر نمونه ۱ پس از عملیات هیدروترمال و کشت سلولی (شکل ۵)، بیانگر چسبندگی و زنده‌مانی قابل ملاحظه سلول‌ها است. هر سه پدیده ایجاد لایه اکسید، افزایش تخلخل سطحی و بیشتر شدن زبری می‌توانند عامل افزایش چسبندگی و زنده‌مانی سلولی محسوب شوند.



شکل ۴) تصویر سطح نمونه شماره ۲ پس از کشت سلول

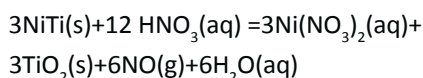


شکل ۵) سطح نمونه شماره ۱ اصلاح شده بعد از کشت سلول

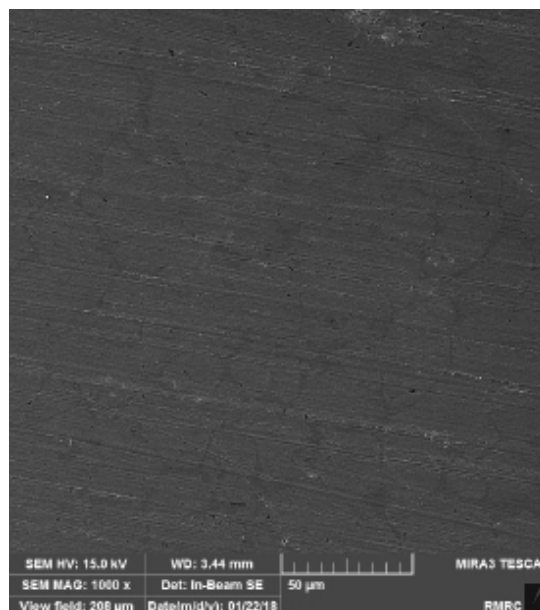
به طور کلی در حدود چند دهه پیش، مطالعاتی برای گسترش

فرج‌های ریز سطحی، لایه‌ای حاوی اکسید تیتانیوم بر سطح آلیاژ باقی می‌گذارد.

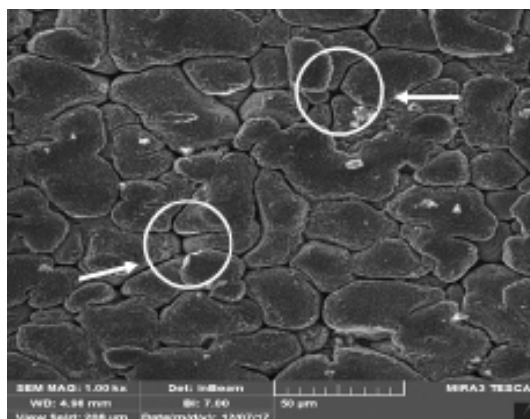
(۱)



در ادامه نشان داده خواهد شد که این تغییرات باعث افزایش چسبندگی، زیست‌فعالی و تسریع روند رشد استخوان خواهند شد.



شکل ۲) تصویر FESEM میکروسکوپ الکترونی سطح نمونه شاهد (شماره ۲)



شکل ۳) تصویر FESEM سطح نمونه NiTi غوطه‌ور شده در محلول HF-HNO3-H2O به مدت ۸ دقیقه (شماره ۱)

مطابق با یافته‌های محققین قبلی، زمانی که نمونه غوطه‌ور در محلول سود داخل بوته تفلانی درون اتوکلاو قرار داده شده و تحت عملیات هیدروترمال قرار می‌گیرد، یک لایه اکسیدی مقاوم

- [1] A. Kamanli, G. Karaca, A. Kaya, M. Koc, H. Yildirim. Conventional physical therapy with lumbar traction; clinical evaluation and magnetic resonance imaging for lumbar disc herniation, Bratisl Lek Listy; 111(10), 2010: 4-541.
- [2] H. Yoshihara. Rods in spinal surgery: a review of the literature, The Spinal Journal, 13, 2013: 1350-1358.
- [3] D. Kok, M. Grevitt, F.H. Wapstra, A.G. Veldhuizen. The Memory Metal Spinal System in a Posterior Lumbar Interbody Fusion (PLIF) Procedure: A Prospective, Non-Comparative Study to Evaluate the Safety and Performance, The Open Orthopedics Journal, 6, 2012: 220-225.
- [4] S.A. Hosseini, S.K. Sadrnezhad, A. Ekrami. Phase transformation behavior of porous NiTi alloy fabricated by powder metallurgical method, Materials Science and Engineering C, 29, 2009: 2203-2207.
- [5] S. Parvizi, V. Hasannaemi, E. Saebnoori, T. Shahrazi, S.K. Sadrnezhad. Fabrication of Porous NiTi Alloy via Powder Metallurgy and Its Mechanical Characterization by Shear Punch Method, Russian Journal of Non-Ferrous Metals, 53(2), 2012: 169-175.
- [6] S. Parvizi, H. R. Hafizpour, S. K. Sadrnezhad, A. Akhondzadeh, M. Abbasi Gharacheh. Neural network prediction of mechanical properties of porous NiTi shape memory alloy, Powder Metallurgy, 54(3), 2011: 450-454.

سطوح تیتانیومی غیرپوششی آغاز شد. گزارش شده است که جذب فیبرونکتین روی سطوح خشن کمتر از سطوح صاف است. فیبرونکتین یک گلیکوپروتئین است که به طور سریعی به سطوح سخت چسبیده و در نتیجه باعث چسبیدن سلول‌های دیگر می‌شود. میکروتوپوگرافی سطح می‌تواند بر تعداد و مورفولوژی پاهای کاذب چسبنده سلول و جهت گیری سلول‌ها تأثیر گذاشته و مهاجرت سلول‌ها به داخل حفره‌های موجود در سطح ماده کاشتنی را هدایت کرده و در نتیجه رشد استخوان را افزایش دهد. این موضوع، با انرژی سطحی کاشتنی و به عبارت دیگر میزان آبدوستی سطح ارتباط دارد. از مطالب بالا می‌توان نتیجه گرفت که زبری و شیمی سطح نقش فوق العاده مهمی را در رفتار سلول بر روی سطح ایمپلنت ایفا می‌کند.

نتیجه گیری

سطح آلیاژ نایتینول ساخته شده به روش ذوب القایی-انجماد شمش-نورد داغ تحت تأثیر محلول اسیدی متشکل از اسیدهای سه تایی ($\text{HF-HNO}_3\text{-H}_2\text{O}_2$) و فرآیند روش هیدروترمال تغییرات مثبت قابل توجهی را متحمل می‌شود. این تغییرات سبب ایجاد تخلخل، زبری و زیست فعالی سطحی شده و آلیاژ را به عنوان گزینه‌ای مناسب برای ترمیم ضایعات بافت سخت، آماده می‌کند. براساس مطالعات کشت سلولی، استفاده از روش اصلاح سطح انتخابی، باعث بهبود چسبندگی، رشد و تکثیر سلولی و اتصال بهتر و ایمن تر کاشتنی ارتوپدی با بافت زنده اطراف خواهد شد.