مجله علوم پزشکی مدرس: آسیب‌شناسی زیستی
دوره ۱۳، شماره ۳: از ۱۱-۲۱
پاییز ۱۳۸۹

افزایش زیست‌فعالی هیدروکسی آپاتیت از طریق جانشینی سیلیسیم

عالیه امینیان[۱]، مهران صولتی‌هشجین[۲*]، علی صمدی‌کوچک‌سرایی[۳]، فرهاد بخشی[۴]، ارغوان فرزادی[۵]

۱- کارشناسی ارشد، گروه بیومتریال، دانشکده مهندسی پزشکی، دانشگاه صنعتی امیرکبیر (پلی تکنیک تهران)، تهران، ایران
۲- دانشیار، گروه بیومتریال، دانشکده مهندسی پزشکی، دانشگاه صنعتی امیرکبیر (پلی تکنیک تهران)، تهران، ایران
۳- استادیار، گروه بیوتکنولوژی، مرکز تحقیقات سلولی مولکولی، دانشگاه علوم پزشکی ایران، تهران، ایران
۴- دانشجوی دکتری تخصصی، گروه بیومتریال، دانشکده مهندسی پزشکی، دانشگاه صنعتی امیرکبیر (پلی تکنیک تهران)، تهران، ایران
۵- کارشناسی ارشد، گروه بیومتریال، دانشکده مهندسی پزشکی، دانشگاه صنعتی امیرکبیر (پلی تکنیک تهران)، تهران، ایران

دریافت مقاله: ۸۹/۰۲/۲۴ پذیرش مقاله: ۸۹/۰۵/۰۲

چکیده

هدف: سیلیسیم یک عنصر مؤثر در فرآیند بلوری شدن استخوان است، بنابراین هیدروکسی آپاتیت با جانشینی سیلیسیم می‌تواند یک بیوسرامیک مناسب به‌عنوان ماده جایگزین استخوان باشد.

مواد و روش‌ها: هیدروکسی آپاتیت استوکیومتری (HA) و هیدروکسی آپاتیت با جانشینی سیلیسیم (Si-HA) محتوی مقادیر متفاوتی از سیلیسیم جانشین شده با موفقیت به روش هیدروترمال با استفاده از مواد اولیهٔ $Ca(NO_3)_2$، $(NH_4)_3PO_4$ یا $(NH_4)_2HPO_4$ و تترا اتوکسی سیلان $[Si(OCH_2CH_3)_4]$ سنتز شد.

نتایج: بخش‌های بلوری، ترکیب شیمیایی، ریزساختار و ریخت‌شناسی نمونه‌های سنتزشده، با استفاده از روش‌های پراش پرتو ایکس (XRD)، انتقال فوریه فروسرخ (FTIR)، پلاسمای جفت شدهٔ القایی (ICP-AES) و میکروسکوپ الکترونی روبشی (SEM) بررسی شد. نتایج، جانشینی سیلیسیم در ساختار آپاتیت را تأیید کرد و نشان داد که برای حفظ تعادل بار در اثر جانشینی گروه سیلیکات (SiO_4^{4-}) به‌جای گروه فسفات (PO_4^{3-})، بخشی از گروه هیدروکسیل (OH^-) موجود در ساختار حذف شده و ثوابت شبکهٔ آن نیز در مقایسه با آپاتیت استوکیومتری تغییر می‌کند.

نتیجه‌گیری: جانشینی سیلیسیم در ساختار آپاتیت، رشد ذرات هیدروکسی آپاتیت با جانشینی سیلیسیم را محدود و باعث کاهش بلورینگی آن نیز می‌شود؛ بنابراین انحلال‌پذیری هیدروکسی آپاتیت با جانشینی سیلیسیم افزایش یافته و در نتیجه هیدروکسی آپاتیت با جانشینی سیلیسیم رفتار زیست‌فعالی بهتری نسبت به هیدروکسی آپاتیت استوکیومتری دارد. براساس بررسی‌های زیستی، انکوباسیون نمونه‌ها در مایع شبیه‌سازی شدهٔ بدن و آزمون MTT (آزمون دی‌متیل تیازول)، هیدروکسی آپاتیت با جانشینی سیلیسیم رفتار زیست‌فعالی بهتری در مقایسه با هیدروکسی آپاتیت خالص دارد.

کلید واژگان: هیدروترمال، هیدروکسی آپاتیت، جانشینی، سیلیسیم، زیست‌فعالی

۱- مقدمه

در بین بیومتریال‌های (Biomatherials) سرامیکی (بیوسرامیک‌ها: Bioceramics)، خانوادهٔ کلسیم- فسفات‌ها از

***نشانی مکاتبه:** تهران، دانشگاه صنعتی امیرکبیر، دانشکده مهندسی پزشکی، خیابان حافظ، شماره ۴۲۴، کدپستی: ۱۵۹۱۶۳۴۳۱۱
Email: solati@aut.ac.ir

[Downloaded from mjms.modares.ac.ir on 2024-10-12]

اهمیت بیشتری در بین مواد جایگزین استخوان برخوردارند، زیرا کلسیم- فسفات‌ها از نظر ساختاری و شیمیایی به بافت سخت بدن (استخوان‌ها و دندان‌ها) بسیار شبیه هستند. یکی از معروف‌ترین اعضای این مجموعه، هیدروکسی آپاتیت (Hydroxyapatite: HA) با فرمول شیمیایی $Ca_{10}(PO_4)_6(OH)_2$ است. این دسته از بیوسرامیک‌ها از زیست‌سازگاری (Biocompatibility) فوق‌العاده بالایی برخوردارند، به همین دلیل از این مواد- به‌خصوص HA- به‌طور گسترده‌ای در مهندسی پزشکی و جانشینی بافت سخت استفاده می‌شود [۱-٤]. با وجود خواص مطلوب HA، از جمله زیست‌سازگاری و عدم سمیت، میزان زیست‌فعالی (Bioactivity) و استخوان‌زایی (Osteogenesis) آن در مقایسه با برخی شیشه‌های زیست‌فعال و شیشه- سرامیک‌ها کم است که این نکته استفاده از این ماده را در برخی کاربردها محدود می‌کند [۵].

از طرف دیگر دانشمندان دریافتند که حضور یون‌های دیگر در ترکیب و ساختار آپاتیت بدن (آپاتیت بیولوژیک) منجر به انحراف آن نسبت به HA استوکیومتری (Stoichiometric) سنتز شده می‌شود. به‌عبارت دیگر، جانشینی یون‌های مختلف از قبیل سدیم (Na)، منیزیوم (Mg)، پتاسیم (K)، مس (Cu)، آلومینیوم (Al)، آهن (Fe)، کلر (Cl)، فلوئور (F) و سیلیسیم (Si) در ترکیب شیمیایی و ساختار آپاتیت باعث ایجاد نوعی آپاتیت غیراستوکیومتری می‌شود. با وجود این‌که حضور این یون‌ها در ساختار آپاتیت بسیار ناچیز و گاهی حتی کمتر از ۱ درصد است، این یون‌ها نقش بسیار مهمی را در فعالیت‌های بیولوژیکی HA در بدن ایفا می‌کند [۲، ۵-۱۳].

با توجه به مطالب بیان شده، امروزه سعی بر آن است که HA سنتز شده شباهت بیشتری با آپاتیت بیولوژیک داشته باشد. به همین منظور تحقیقات گسترده‌ای در زمینه جانشینی عناصر مختلف در ساختار آپاتیت در حال انجام است. نکتهٔ جالب توجه این است که جانشینی یون‌های دیگر در ساختار آپاتیت نه تنها منجر به بهبود زیست‌سازگاری، زیست‌فعالی، خواص مکانیکی و تشابه آن با آپاتیت بدن از لحاظ ترکیب شیمیایی می‌شود، بلکه دورهٔ درمان و ترمیم استخوان در برخی جانشینی‌ها از جمله جانشینی Si را به مقدار قابل توجهی کوتاه‌تر می‌کند [۲].

یکی از عناصری که بررسی‌های فراوانی در مورد اثر جانشینی آن در ساختار آپاتیت انجام می‌شود، Si است. تحقیقات نشان می‌دهد عنصر Si اولین جزء دخیل در فرآیند تبلور زیستی (Biomineralization) استخوان است و در مکان‌های فعال در حال آهکی‌شدن (Calcification)، تجمع می‌یابد و حضور Si محلول نشان داده شده است که به‌طور مستقیم در فرآیند کانی‌شدن (Mineralization) استخوان نقش دارد [۲، ۵-۱۳]. نقش بیولوژیک Si اولین بار توسط کارلیسل (Carlisle) کشف شد [١٤]. در واقع Si باعث افزایش سرعت استخوان‌سازی می‌شود. در اثر کمبود Si، استخوان‌ها تغییر شکل می‌دهند و میزان کلاژن موجود در استخوان و غضروف کاهش می‌یابد [١٤-١٨]. در حقیقت حضور Si در ساختار HA سبب افزایش زیست‌فعالی آن می‌شود [۲-۹]. این بدان معناست که توانایی کاشتنی (Implant) برای برقراری اتصال شیمیایی با استخوان افزایش می‌یابد. این جانشینی استخوان‌سازی و اجرای درست نقش کاشتنی را تضمین می‌کند. دانشمندان زیادی روی این موضوع کار کرده‌اند و اصرار دارند که در این جایگزینی Si یا SiO_4^{4-} جایگزین فسفات یا PO_4^{3-} می‌شود [۲-۸، ۱۱-۲۵].

روش‌های زیادی برای سنتز هیدروکسی آپاتیت با جانشینی سیلیسیم (Si-substituted Hydroxyapatite: Si-HA) بیان شده است که از میان آن‌ها می‌توان به سل- ژل [۱]، واکنش حالت جامد [۷]، شیمی تر (wet chemistry) [۱۲] و هیدروترمال (Hydrothermal) [۱۸] اشاره کرد که هرکدام از آن‌ها، مزایا و محدودیت‌های خاص خود را دارند. اما روش هیدروترمال معمولاً سبب تولید موادی با بلورینگی بالاتر و نسبت کلسیم (Ca) به فسفر (Ca/P) نزدیک به میزان استوکیومتری (Stoichiometric) (۱/٦۷) می‌شود [۱۸، ۲٦].

در این تحقیق سعی شده HA استوکیومتری و HA غیراستوکیومتری با جانشینی Si با استفاده از روش هیدروترمال

[Downloaded from mjms.modares.ac.ir on 2024-10-12]

سنتز شود و سپس تغییرات رفتار زیست‌فعالی آن در اثر حضور Si مورد بررسی قرار گیرد. افزون بر آن، در این کار از دو ماده اولیه متفاوت به‌عنوان منبع فسفر برای سنتز HA و Si-HA استفاده و نتایج آن‌ها با یکدیگر مقایسه شده است.

۲- مواد و روش‌ها

۲-۱- مواد اولیه

HA استوکیومتری و HA غیراستوکیومتری با جانشینی Si توسط روش هیدروترمال با استفاده از مواد اولیه، تری‌آمونیوم فسفات ۳ آبه $[(NH_4)_3PO_4.3H_2O]$ (Ridel-de Haen) (برای تهیه گروه اول نمونه‌ها) یا دی‌آمونیوم هیدروژن فسفات $[(NH_4)_2HPO_4]$ (Merck) (برای تهیه گروه دوم نمونه‌ها) به‌عنوان منبع فسفر (P)، کلسیم- نیترات ٤آبه $[Ca(NO_3)_2.4H_2O]$، (Prolabo Merck Eurolab) به‌عنوان منبع Ca، تترا اتوکسی سیلان [:Tetra Ethoxy Silane) TEOS)، $[(C_8H_{20}O_4Si)]$، (Merck) به‌عنوان منبع Si سنتز شد.

۲-۲- روش سنتز پودر

برای سنتز HA و Si-HA ابتدا به‌عنوان منبع تأمین کنندهٔ Ca، محلول ۰/۵ مولار از نمک کلسیم- نیترات ٤ آبه تهیه و سپس مقدار کمی PEG (Polyethylene Glycol) (پلی اتیلن گلایکول با شناسه Sigma Aldrich No.25322-68-3) به این محلول اضافه شد. سپس با استفاده از آمونیاک ۳۲ درصد (هیدروکسید آمونیم (NH_4OH)، با شناسه Merck No.1.05426) pH محلول کلسیمی حدوداً به بالای ۱۰ رسانده شد (حدود ۲-۵ سی‌سی). همزمان در یک بشر دیگر به‌عنوان منبع تأمین کنندهٔ P، محلول ۰/۲۵ مولار از نمک دی‌آمونیوم هیدروژن فسفات یا نمک تری‌آمونیوم فسفات سه آبه تهیه شد. مجدداً با استفاده از آمونیاک، pH این محلول نیز حدوداً به بالای ۱۱ رسانده شد (حدود ۲۵-۳۰ سی‌سی). برای سنتز Si-HA با توجه به درصد جانشینی Si به مقدار لازم TEOS نیز به محلول دوم اضافه شد [۱، ۲، ۱۸].

مقدار نمک‌های هر محلول طوری تنظیم می‌شود که نسبت مولی بین Ca و P یا نسبت مولی بین Ca و P به اضافهٔ Si برابر با ۱/٦۷ (مطابق با فرمول شیمیایی HA) باشد. آنگاه محلول فسفری به‌صورت قطره قطره (Drop wise) به محلول کلسیمی اضافه شد. سپس محلول نهایی به داخل محفظه‌های اتوکلاو (Autoclave) ریخته و داخل خشک‌کن (Oven) با دمای ۲۰۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۸ ساعت، تحت شرایط هیدروترمال قرار گرفت. روی رسوب خارج شده از محفظه‌های اتوکلاو به وسیلهٔ سانتریفوژ، عملیات شستشو و تغلیظ انجام شد [۱-٤]. سپس رسوب به‌دست آمده، ۱۲ ساعت در آون هوا (در دمای ۱۰۰ درجه سانتی‌گراد) خشک شد [۲، ۷، ۱۸]. میزان لازم از هریک از مواد اولیه برای سنتز پودر با درصد مشخص از جانشینی Si در جدول‌های (۱- الف) و (۱- ب) آمده است.

جدول ۱ درصد مواد اولیه به‌کار برده شده برای سنتز ۱- الف) نمونه‌های گروه اول (دی‌آمونیوم هیدروژن فسفات)، ۱- ب) نمونه‌های گروه دوم (تری‌آمونیوم فسفات)

۱- الف			
نمونه‌های سنتزشده با دی‌آمونیوم هیدروژن فسفات	**تعداد $(Ca(NO_3)_2)$ بر مول**	**تعداد $((NH_4)_3PO_4)$ بر مول**	**تعداد (TEOS) بر مول ($\times 10^{-4}$)**
HA خالص D0.0SC*	۰/۰۲۵	۰/۰۱۵۰	۰/۰۰
۰/۸ درصد وزنی Si در HA D0.8SC*	۰/۰۲۵	۰/۰۱٤۳	۰/۷۱
۱/۵ درصد وزنی Si در HA D1.5SC*	۰/۰۲۵	۰/۰۱۳۲	۱/۳٤

[Downloaded from mjms.modares.ac.ir on 2024-10-12]

۱- ب

نمونه‌های سنتزشده با تری‌آمونیوم فسفات	تعداد $(Ca(NO_3)_2)$ بر مول	تعداد $((NH_4)_3PO_4)$ بر مول	تعداد (TEOS) بر مول ($\times 10^{-4}$)
HA خالص T0.0SC*	۰/۰۲۵	۰/۰۱۵۰	۰/۰۰
۰/۸ درصد وزنی Si در HA T0.8SC*	۰/۰۲۵	۰/۰۱۴۳	۰/۷۱
۱/۵ درصد وزنی Si در HA T1.5SC*	۰/۰۲۵	۰/۰۱۳۲	۱/۳۴
۱/۵ درصد وزنی Si در HA T1.5SR**	۰/۰۲۵	۰/۰۱۳۲	۱/۳۴

*: کلسینه شده

**: کلسینه نشده

۲-۳- مشخصه‌یابی پودرهای به‌دست آمده

ترکیب شیمیایی نمونه‌ها با استفاده از روش پلاسمای جفت شدهٔ القایی (Inductively Coupled Plasma Atomic Emission Spectroscopy: ICP-AES) (ICP–AES ARL–3410) تعیین شد. بخش‌ها و گروه‌های عاملی موجود در نمونه‌ها به‌ترتیب با استفاده از روش‌های پراش پرتو ایکس (X-Ray Diffraction: XRD) (Siemens D500 Diffractometer) و انتقال فوریه فروسرخ (Fourier Transform Infrared Spectroscopy: FTIR) (Vector 33) بررسی شد. برای مطالعه ریخت‌شناسی (Morphology) و ریزساختار نمونه‌ها، میکروسکوپ الکترونی روبشی (Scanning Electron Microscope: SEM) (Philips XL30) به‌کار گرفته شد. سرانجام برای بررسی میزان زیست‌فعالی و عدم سمیت، نمونه‌ها در انکوباتور در مایع شبیه‌سازی شدهٔ بدن (Simulated Body Fluid: SBF) [۲۷] قرار گرفت و آزمون MTT (3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-Diphenyltetrazolium Bromide) [۱۶] نیز روی آن‌ها انجام شد.

۳- نتایج

۳-۱- تجزیه و تحلیل ICP

ترکیب شیمیایی نمونه‌های سنتز شده توسط تجزیه و تحلیل ICP بررسی شد که نتایج آن در جدول ۲ آورده شده است. نتایج، حضور Si در ساختار HA را نشان می‌دهد. البته درصد Si جایگزین‌شده در هر دو گروه مواد سنتز شده از درصد مواد اولیهٔ مورد استفاده کمتر است که احتمالاً بخشی از یون‌های Si به‌صورت واکنش نداده در محلول مادر باقی مانده است. از طرفی به دلیل حضور CO_2 در حین انجام واکنش احتمال تشکیل کربنات- HA وجود دارد. از آن‌جا که گروه کربنات می‌تواند جایگزین گروه فسفات در ساختار HA شود، این مطلب بر میزان جانشینی گروه سیلیکات در ساختار آپاتیت مؤثر است [۱، ۱۸]. نتایج نسبت Ca/P و Ca/(P+Si) نشان می‌دهد که اولاً نمونه‌های سنتز شده بسیار نزدیک به حالت استوکیومتری هستند، ثانیاً با مقایسه نسبت Ca/P با Ca/(P+Si) در نمونه‌های Si-HA مشخص می‌شود که به احتمال زیاد Si جایگزین فسفات در ساختار آپاتیت شده است. نکته قابل استنباط دیگر از نتایج حاصل از تجزیه و تحلیل ICP این است که میزان جانشینی Si در نمونه‌هایی که از تری‌آمونیوم فسفات به‌عنوان منبع P در سنتز آن‌ها استفاده شده بیشتر از نمونه‌هایی است که در سنتز آن‌ها به‌عنوان منبع P از دی‌آمونیوم هیدروژن فسفات استفاده شده است.

۳-۲- XRD

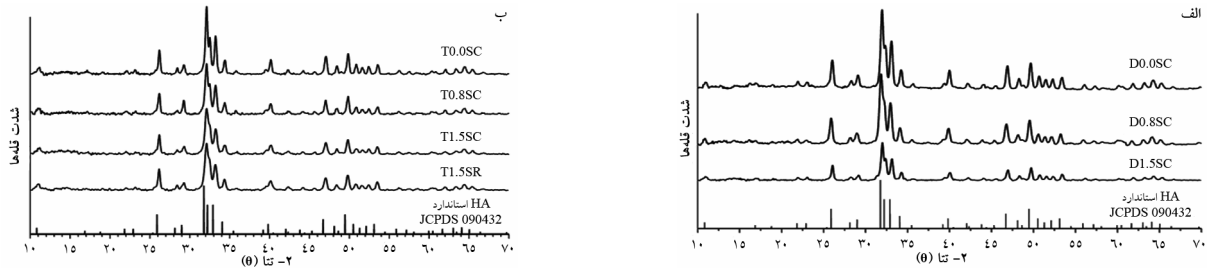
نتایج XRD پودرهای سنتز شده در هر دو گروه در

[Downloaded from mjms.modares.ac.ir on 2024-10-12]

نمودارهای (۱- الف) و (۱- ب) نشان داده شده است. با مقایسه الگوهای XRD پودرهای سنتز شده هر دو گروه با کارت استاندارد الگوی پراش HA استوکیومتری (JCPDS 09-0432) مشخص می‌شود که هیچ قله (Peak) دیگری مربوط به بخش‌های دیگر از جمله اکسید Si یا دیگر کلسیم- فسفات‌ها در الگوهای پراش نمونه‌های سنتز شده، حضور ندارد. در نگاه اول، حضور Si اثری بر ساختار HA نداشته است. اما با دقت بیشتر در الگوهای پراش آشکار می‌شود که حضور Si تا حدی سبب کاهش شدت قله‌ها شده که این مطلب نشانهٔ کاهش بلورینگی ساختار آپاتیت در اثر حضور Si است.

جدول ۲ درصد وزنی عناصر مختلف موجود در نمونه‌های به‌دست آمده از تجزیه و تحلیل ICP و نسبت Ca/P و Ca/(P+Si) نمونه‌ها

نمونه	درصد وزنی عناصر			Ca/(P+Si) (نسبت اتمی)	Ca/P (نسبت اتمی)
	Si	P	Ca		
HA (T0.0SC)	۰/۰۰	۱۸/٤۹	۳۹/۸۸	۱/٦٦۷	۱/٦٦۷
HA در ۰/۸ درصد وزنی Si (T0.8SC)	۰/۷۲	۱۷/۷۷	۳۹/۷۹	۱/٦٥٦	۱/۷۳
HA در ۱/۵ درصد وزنی Si (T1.5SC)	۱/۳٥	۱۷/۱۹	۳۹/۷٥	۱/٦٥۷	۱/۷۸۷
HA (D0.0SC)	۰/۰۰	۱۸/٥٤	۳۹/۷۹	۱/٦٦٦	۱/٦٦٦
HA در ۰/۸ درصد وزنی Si (D0.8SC)	۰/٦٥	۱۷/۹	۳۹/۷۳	۱/٦٤۹	۱/۷۱٥
HA در ۱/۵ درصد وزنی Si (D1.5SC)	۱/۲۷	۱۷/۲۸	۳۹/۷	۱/٦٥٤	۱/۷۷٦



نمودار ۱ الگوهای پراش پرتو ایکس نمونه‌های سنتز شده با **الف)** دی‌آمونیوم هیدروژن فسفات (گروه اول)، **ب)** تری‌آمونیوم فسفات (گروه دوم)

جدول ۳ ثوابت شبکه محاسبه شدهٔ نمونه‌ها با توجه به داده‌های XRD و رابطه (۱)

نمونه	a (آنگستروم)	c (آنگستروم)
D0.0SC	۹/٤۱۸٥	٦/۸۷٤۰
D0.8SC	۹/٤۱٦۰	٦/۸۷٤٦
D1.5SC	۹/٤۱٥۸	٦/۸۷۷٤
T0.0SC	۹/٤۰۸۲	٦/۸۷۳٥
T0.8SC	۹/٤۰٦٥	٦/۸۷٤۰
T1.5SC	۹/٤۰٥٦	٦/۸۷۹۰
T1.5SR	۹/٤۰٦۰	٦/۸۷۹٤

[Downloaded from mjms.modares.ac.ir on 2024-10-12]

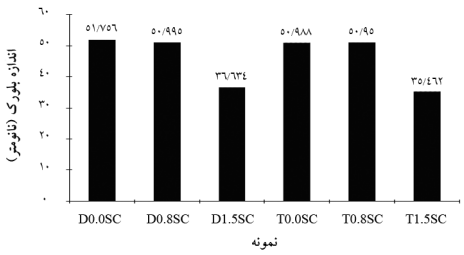
با استفاده از داده‌های تجزیه و تحلیل XRD به‌دست آمده از نمونه‌های سنتز شده و به کمک رابطه (۱) [۲] توسط نرم‌افزار Microsoft Excel 2007 ثوابت شبکهٔ مربوط به هریک از نمونه‌ها محاسبه شد و نتایج در جدول ۳ نشان داده شده است.

رابطه (۱): $$\frac{1}{d^2}=\frac{3}{4}*\frac{h^2+hk+k^2}{a^2}+\frac{l^2}{c^2}$$

ثوابت شبکهٔ اندازه‌گیری شده در مورد نمونه‌های حاوی جانشینی Si در مقایسه با HA استوکیومتری تغییری را نشان می‌دهد، به‌طوری که با افزایش میزان Si ورودی a کاهش و c افزایش می‌یابد، این تغییر خود دلیل آشکاری برای اثبات حضور Si در ساختار آپاتیت است.

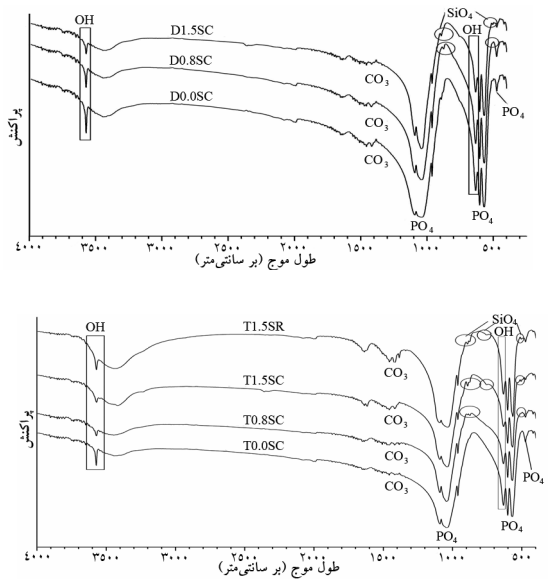
براساس فرمول شرر (Scherrer) [رابطه (۲)] و به کمک نرم‌افزار Microsoft Excel 2003، با استفاده از داده‌های به‌دست آمده از تجزیه و تحلیل XRD، اندازهٔ بلورک‌ها با استفاده از قله‌های (۰۰۲)، (۳۱۰) و (۲۲۲) محاسبه شد.

رابطه (۲): $$D_{hkl}=\frac{k\lambda}{\beta_{1/2}Cos\theta}$$



نمودار ۲ نمودار اندازه بلورک محاسبه شده برای نمونه‌ها با استفاده از داده‌های XRD و فرمول شرر

در رابطهٔ ۲، λ طول موج متناظر با Cu-Kα و برابر با ۱/۵۴۰۶ آنگستروم، θ زاویهٔ مربوط به صفحهٔ (hkl) مورد نظر، $\beta_{1/2}$ پهنای قله مربوط به صفحهٔ (hkl) مورد نظر در نصف شدت بیشینه بر حسب رادیان، k یک عدد ثابت که بسته به ظاهر بلور تغییر می‌کند و در این‌جا ۰/۹ در نظر گرفته شده [۲، ۱۸] و D_{hkl} اندازهٔ بلورک در قله مربوط به صفحهٔ (hkl) مورد نظر است. نتایج به‌دست آمده در نمودار ۲ نشان داده شده است. نتایج نشان می‌دهد که با افزایش میزان جانشینی Si، اندازه بلورک کاهش می‌یابد. در حقیقت حضور Si در ساختار آپاتیت رشد بلورک‌ها را متوقف می‌کند.



نمودار ۳ طیف‌های FTIR نمونه‌های سنتز شده با الف) دی‌آمونیوم هیدروژن فسفات (گروه اول)، ب) تری‌آمونیوم فسفات (گروه دوم)

۳-۳- تجزیه و تحلیل FTIR

طیف‌های FTIR هر دو گروه نمونه‌ها در نمودار (۳- الف) و (۳- ب) آمده است. در کلیهٔ طیف‌ها وجود گروه هیدروکسیل در عدد موج‌های ۳۵۷۱ بر سانتی‌متر (cm^{-1}) و ۶۳۱ بر سانتی‌متر نشان دهندهٔ گروه هیدروکسیل در ساختار HA است و حضور گروه‌های فسفات در عدد موج‌های ۴۶۹ بر سانتی‌متر، ۵۶۴ بر سانتی‌متر، ۵۹۸ بر سانتی‌متر، ۹۵۷ بر سانتی‌متر، ۱۰۳۱ بر سانتی‌متر، ۱۰۸۵ بر سانتی‌متر نشان دهنده گروه‌های فسفات موجود در ساختار HA است. اغلب به دلیل سطح ویژه بالایی که پودرهای آپاتیتی دارد، مقداری آب در سطح آن‌ها جذب می‌شود. این آب جذب شده با یک قله پهن

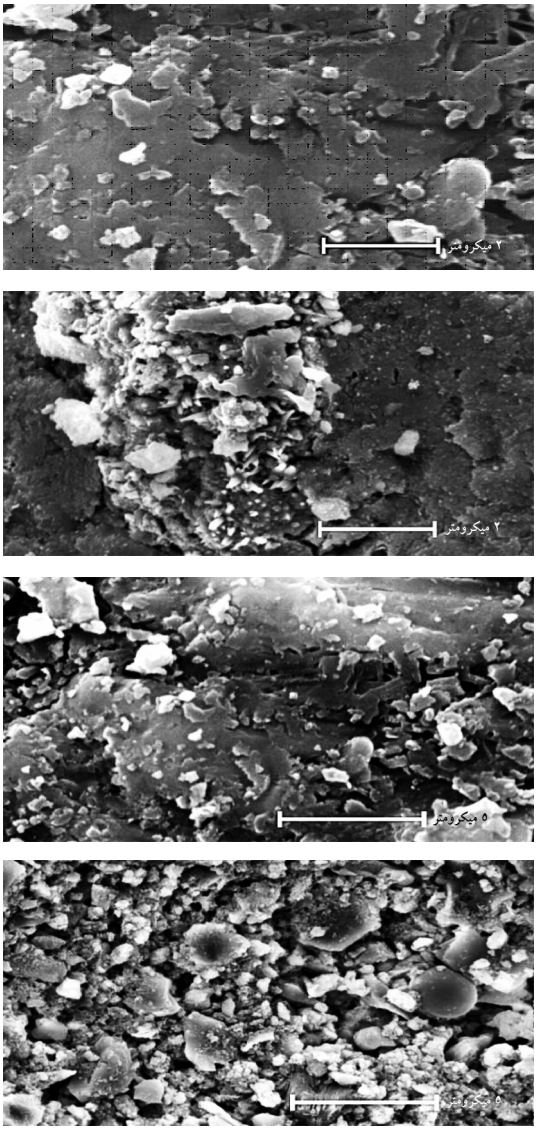
[Downloaded from mjms.modares.ac.ir on 2024-10-12]

در محدودهٔ ۳۰۰۰-۳۵۰۰ بر سانتی‌متر و یک قله تند در ۱۶۳۶ بر سانتی‌متر مشخص شده است [۱، ۳، ٤، ۲۸، ۲۹].

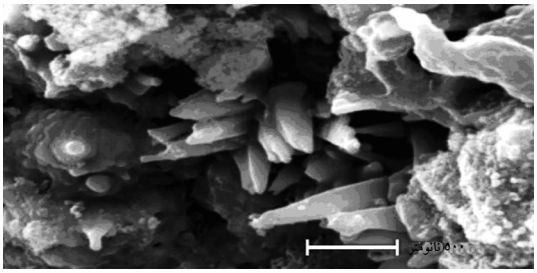
با مقایسه طیف FTIR نمونه‌های Si-HA (D0.8SC, D1.5SC, T0.8SC, T1.5SC) با نمونه‌های HA (D0.0SC, T0.0SC) ۳ قله دیگر نیز در عدد موج‌های ٤۹۰ بر سانتی‌متر، ۷٦۰ بر سانتی‌متر و ۸۸۹ بر سانتی‌متر دیده می‌شود که مربوط به وجود گروه سیلیکات SiO_4^{4-} و پیوند Si-O در ساختار HA به‌دست آمده است [۲، ۱۸، ۱۹، ۳۰، ۳۱].

۳-٤- SEM

همان‌طور که نتایج تجزیه و تحلیل ICP نشان داد، میزان جانشینی Si در گروه دوم پودرهای سنتز شده بیشتر از گروه اول بود، به همین دلیل پودرهای گروه دوم برای بررسی‌های زیستی انتخاب شد. برای بررسی رفتار زیست‌فعالی پودرهای آپاتیتی سنتز شده دارای جانشینی Si (Si-HA) مانند T1.5SC و مقایسه آن با رفتار زیست‌فعالی نمونه‌های فاقد جانشینی Si یعنی آپاتیت‌های استوکیومتری (HA) مانند T0.0SC از روش غوطه‌وری قرص‌های ساخته شده از این پودرها در SBF و سپس خروج آن‌ها در زمان‌های ۸ و ١٤ روز و بررسی سطح آن‌ها با SEM استفاده شد. شکل ۱ تصاویر SEM از سطح نمونه‌های انکوباسیون شده در SBF به‌ترتیب بعد از ۸ و ١٤ روز انکوباسیون را نشان می‌دهد. بعد از ۸ روز جوانه‌زنی آپاتیت در سطح نمونه Si-HA قابل تشخیص است؛ در صورتی که در نمونه HA چندان جوانه‌زنی آپاتیتی دیده نمی‌شود. در هر دو نمونه جوانه‌زنی آپاتیت به‌خصوص بعد از ١٤ روز کاملاً مشخص است. اما در نمونه‌های Si-HA میزان این جوانه‌زنی خیلی بیشتر بود و جوانه‌ها دارای رشد جهت‌دار هستند و شکلی بیشتر شبیه به یک مثلث متساوی‌الساقین دارند. ریخت‌شناسی این جوانه‌ها را می‌توان در شکل ۲ دید. یکی از دلایل جوانه‌زنی بیشتر و سریع‌تر نمونه‌های Si-HA، احتمالاً بلورینگی کمتر این نمونه‌ها نسبت به نمونه‌های استوکیومتری و در نتیجه قابلیت انحلال بیشتر آن‌هاست.



شکل ۱ تصویر SEM نمونه‌های الف) HA و ب) Si-HA بعد از ۸ روز انکوباسیون در SBF ج) HA و د) Si-HA بعد از ١٤ روز انکوباسیون در SBF



شکل ۲ ریخت‌شناسی جوانه‌های آپاتیت تشکیل شده روی نمونه‌های Si-HA سنتز شده

[Downloaded from mjms.modares.ac.ir on 2024-10-12]

۳-۵- آزمون MTT

برای آزمون MTT، سلول‌های استخوان‌ساز (Osteoblast) (تهیه شده از بانک سلولی ایران) روی قرص‌های تهیه شده از پودرهای سنتز شده (گروه دوم) به‌مدت ٤ روز کشت شد و سرعت تکثیر سلول‌ها روی سطح نمونه‌ها با سرعت تکثیر این سلول‌ها روی سطح نمونه شاهد مقایسه شد. کلیه نمونه‌ها عدم سمیت را نشان داد. برای هریک از پودرها (T0.0SC, T0.8SC, T1.5SC) ۸ نمونه برای این منظور آماده شده و آزمون MTT براساس دستورالعمل Sigma انجام پذیرفت و چگالی نوری (Optical Density: OD) برای هریک از نمونه‌ها در طول موج ۵۷۰ نانومتر ثبت شد. نتایج به‌دست آمده در جدول ٤ آورده شده است. نتایج نشان می‌دهد که سرعت تکثیر سلول‌های استخوان‌ساز روی سطح نمونه‌های Si-HA بیشتر از HA استوکیومتری است و میزان بهینه برای درصد جانشینی Si با بیشترین سرعت تکثیر سلولی، ۰/۸ درصد به‌دست آمد.

جدول ٤ نتایج آزمون MTT، ODهای ثبت شده برای نمونه‌ها

نمونه	تعداد نمونه‌ها	قرائت کولوریمتری* میانگین OD (± انحراف معیار)	P value
استئوبلاست روی نمونه کنترل	۸	۰/۹۵۳ (±۰/۰۲۹)	<۰/۰۰۱
استئوبلاست روی نمونه T0.8SC	۸	۰/۷۵۸ (±۰/۰۲)	<۰/۰۰۱
استئوبلاست روی نمونه T1.5SC	۸	۰/۵۹۸ (±۰/۰۳۵)	<۰/۰۰۱
استئوبلاست روی نمونه T0.0SC	۸	۰/۵۲٤ (±۰/۰۲٦)	<۰/۰۰۱

*: Colorimetric reading

٤- بحث

HA استوکیومتری و Si-HA به روش هیدروترمال با موفقیت سنتز شد. الگوهای FTIR نمونه‌ها وجود عنصر Si و همچنین پیوند Si-O در قله‌های ٤۹۰، ۷٦۰ و ۸۸۹ بر سانتی‌متر که نشانگر جانشینی Si در ساختار HA است را اثبات و نتایج ICP نیز این نکته را تأیید می‌کند. مشخص شد که میزان جانشینی Si در ساختار HA هنگامی که از تری‌آمونیوم فسفات به‌عنوان منبع P استفاده شود، در مقایسه با زمانی که از دی‌آمونیوم هیدروژن فسفات استفاده شود، بیشتر است، یعنی درصد Si جایگزین شده نزدیک‌تر به درصد Si ورودی است. با مقایسه الگوهای پراش پرتو ایکس HA و Si-HA، مشخص شد که حضور Si باعث تبدیل ساختار کریستالوگرافی HA به سایر بخش‌ها یا تشکیل بخش‌های دیگر نمی‌شود و تنها باعث کاهش بلورینگی و کاهش اندازه بلورک‌های آپاتیت می‌شود. کاهش بلورینگی به نوبه خود افزایش انحلال‌پذیری و در نتیجه بهبود زیست‌فعالی را در پی دارد. می‌توان نتیجه گرفت که حضور Si رفتار زیست‌فعالی HA را افزایش می‌دهد. حضور Si و ضمناً از دست دادن OH^- به دلیل جانشینی گروه سیلیکات با گروه فسفات سبب تغییر پارامترهای شبکه، کاهش a و افزایش c، می‌شود. تصاویر SEM از سطح نمونه‌های انکوباسیون شده در SBF، تشکیل سریع‌تر و با میزان بیشتر جوانه‌های آپاتیت روی سطح Si-HA در مقایسه با HA استوکیومتری را نشان می‌دهد. نتایج حاصل از انکوباسیون مواد در SBF و کشت سلولی و آزمون MTT نیز بهبود زیست‌فعالی را تأیید می‌کند.

۵- تشکر و قدردانی

نویسندگان این مقاله کمال تشکر و قدردانی خود را از مسئولین «مرکز سلولی مولکولی دانشگاه ایران» و «آزمایشگاه

[Downloaded from mjms.modares.ac.ir on 2024-10-12]

بیوسرامیک دانشگاه صنعتی امیرکبیر» بابت حمایت‌ها و یاری ایشان در این کار اعلام می‌دارند.

٦- منابع

[1] Solati-Hashjin M. Effect of Powder Synthesis Route on Microstructure and Properties of Hydroxyapatite. Presented for the Ph.D., Tehran, Materials and Energy Research Center, 1997. (Persian)

[2] Aminian A. Effect of Silicon Substitution on Bioactivity of Hydroxyapatite Nano-Particles synthesized by Hydrothermal Method. Presented for the M.Sc., Tehran, Amirkabir University of Technology, 2008. (Persian)

[3] Bakhshi F. Biomimetic Synthesis and Characterization of Nanostructure Non-stoichiometric Hydroxyapatite. Presented for the M.Sc., Tehran, Amirkabir University of Technology, 2006. (Persian)

[4] Goudarzi A. Control of Morphology and Size of Wet Chemically Synthesized Hydro-xyapatite (HA). Presented for the M.Sc., Tehran, Amirkabir University of Technology, 2006. (Persian)

[5] Porter AE, Patel N, Skepper JN, Best SM, Bonfield W. Comparison of in vivo dissolution processes in hydroxyapatite and silicon-substituted hydroxyapatite bioceramics. Biomaterials 2003; 24(25): 4609–20.

[6] Best SM, Zou S, Brooks RA, Huang J, Rushton N, Bonfield W. The Osteogenic Behaviour of Silicon Substituted Hydroxyapatite. Key Eng Mater (Bioceramics) 2008; 20: 985-98.

[7] Pietak AM, Reid JW, Stott MJ, Sayer M. Silicon substitution in the calcium phosphate bioceramics. Biomaterials 2007; 28(28): 4023–32.

[8] Landi E, Sprio S, Sandri M, Tampieri A, Bertinetti L, Martra G. Development of Multisubstituted Apatites for Bone Reconstruction. Key Eng Mater (Bioceramics) 2008; 20: 171-4.

[9] Eslami H, Solati-Hashjin M, Tahriri M. The comparison of powder characteristics and physicochemical, mechanical and biological properties between nanostructure ceramics of hydroxyapatite and fluoridated hydroxyapatite. Mater Sci Eng C 2009; 29(4): 1387-98.

[10] Eslami H, Solati-Hashjin M, Tahriri M. Synthesis and Characterization of Nano-crystalline Fluorinated Hydroxyapatite Powder by Modified Wet-Chemical Process. J Ceram Process Res 2008; 9: 224-9.

[11] Astala R, Calderin L, Yin X, Stott MJ. Ab Initio Simulation of Si-Doped Hydroxyapatite. Chem Mater 2006; 18(2): 413-22.

[12] Porter AE, Best SM, Bonfield W. Ultrastructural Characterisation of Hydro-xyapatite and Silicon-Substituted Hydro-xyapatite. Key Eng Mater (Bioceramics) 2003; 15: 505-8.

[13] Thian ES, Huang J, Best SM, Barber ZH, Bonfield W. Surface Wettability Enhances Osteoblast Adhesion on Silicon-Substituted Hydroxyapatite Thin Films. Key Eng Mater (Bioceramics) 2007; 19: 877-80.

[14] Kim SR, Lee JH, Kim YT, Riu DH, Jung SJ, Lee YJ, Chung SC, Kim YH. Synthesis of Si, Mg substituted hydroxyapatites and their sintering behaviors. Biomaterials 2003; 24(8):

[Downloaded from mjms.modares.ac.ir on 2024-10-12]

Apatite Fibres by a Homogeneous Precipitation Method and Their Characterization. Key Eng Mater (Bioceramics) 2006; 18: 1129-32.

[22] Marques PAAP, Magalhaes MCF, Correia RN, Vallet-Regi M. Synthesis and Characterisation of Silicon-Substituted Hydroxyapatite. Key Eng Mater (Bioceramics) 2001; 13: 247-50.

[23] Patel N, Follon EL, Gibson IR, Best SM, Bonfield W. Comparison of Sintering and Mechanical Properties of Hydroxyapatite and Silicon-Substituted Hydroxyapatite. Key Eng Mater (Bioceramics) 2003; 15: 919-22.

[24] Botelho CM, Brooks RA, Kawai T, Ogata S, Ohtsuki C, Best SM, Lopes MA, Santos JD, Rushton N, Bonfield W. In Vitro Analysis of Protein Adhesion to Phase Pure Hydroxyapatite and Silicon Substituted Hydroxyapatite. Key Eng Mater (Bioceramics) 2005; 17: 461-4.

[25] Solla EL, Malz F, González P, Serra J, Jaeger C, León B. The Role of Si Substitution into Hydroxyapatite Coatings. Key Eng Mater (Bioceramics) 2008; 20: 175-8.

[26] Andradea MC, Tavares Filgueirasa MR, Ogasawarab T. Hydrothermal nucleation of hydroxyapatite on titanium surface. J European Ceram Soc 2002; 22(4): 505-10.

[27] Ravarian R, Moztarzadeh F, Solati-Hashjin M, Rabiee SM, Khoshakhlagh P, Tahriri M. Synthesis, characterization and bioactivity investigation of bioglass/hydroxyapatite composite. J Ceram Int 2009; 36(1): 291-7.

[28] Hing KA, Revell PA, Smith N, Buckland T. Effect of silicon level on rate, quality and progression of bone healing within silicate-substituted porous hydroxyapatite scaffolds. 1389–98.

[15] Gibson IR, Hing KA, Best SM, Bonfield W. Enhanced in vitro cell activity and surface apatite layer formation on novel silicon substituted hydroxyapatites. In: Ohgushi H, Hastings GW, Yoshikawa T, (Editors). Proceeding of the 12th International Symposium on Ceramics in Medicine, Nara, Japan, 1999; p: 191–4.

[16] Saki M, Narbat MK, Samadikuchaksaraei A, Ghafouri HB, Gorjipour F. Biocompatibility study of a hydroxyapatite-alumina and silicon carbide composite scaffold for bone tissue engineering. Yakhteh 2009; 11(1): 55-60.

[17] Botelho CM, Brooks RA, Best SM, Lopes MA, Santos JD, Rushton N, Bonfield W. Biological and Physical-Chemical Characterization of Phase Pure HA and SI-Substituted Hydroxyapatite by Different Microscopy Techniques. Key Eng Mater (Bioceramics) 2004; 16: 845-8.

[18] Tang XL, Xiao XF, Liu RF. Structural characterization of silicon-substituted hydroxyl-apatite synthesized by a hydrothermal method. J Mater Lett 2005; 59(29-30): 3841-6.

[19] Botelho CM, Lopes MA, Gibson IR, Best SM, Santos JD. Structural analysis of Si-substituted hydroxyapatite: zeta potential and X-ray photoelectron spectroscopy. J Mater Sci Mater Med 2002; 13(12): 1123-7.

[20] Dorozhkin SV, Dorozhkina EI, Oktar FN, Salman S. A Simplified Preparation Method of Silicon-Substituted Calcium Phosphates According to Green Chemistry Principles. Key Eng Mater (Bioceramics) 2007; 19: 55-8.

[21] Aizawa M, Patel N, Porter AE, Best SM, Bonfield W. Syntheses of Silicon-Containing

[Downloaded from mjms.modares.ac.ir on 2024-10-12]

synthetic hydroxyapatites. J European Ceram Soc 2000; 20(14-15): 2377-87.

[31] Shi HB, Zhong H, Liu Y, Zhang FZ, Liang MC, Chen M. Preparation of Silicate Substituted Calcium Deficient Hydroxyapatite by Coprecipitation. Key Eng Mater (Bioceramics) 2007; 19: 83-6.

Biomaterials 2006; 27(29): 5014–26.

[29] Arcos D, Rodríguez-Carvajal J, Vallet-Regí M. The effect of the silicon incorporation on the hydroxylapatite structure. A neutron diffraction study. J Solid State Sci 2004; 6(9): 987-94.

[30] Landi E, Tampieri A, Celotti G, Sprio S. Densification behaviour and mechanisms of

[Downloaded from mjms.modares.ac.ir on 2024-10-12]