

بررسی تاثیر اصلاح سطحی بر خواص زیستی دی‌فازیک کلسیم فسفات (HA/ β TCP)

فرزاد کرمانی^۱، عباس یوسفی^۲، سعید کارگذار^۳، زهرا طیرانی نجاران^۴، سحر ملازاده بیدختی^۵، محمد هادی موید^۶

^۱ دانشجوی کارشناسی ارشد مهندسی مواد، دپارتمان مهندسی مواد، دانشگاه فردوسی مشهد، مشهد، ایران

^۲ دکترای مهندسی مواد، موسسه تحقیقاتی پرطاووس

^۳ استادیار، دپارتمان علوم و فنون، دانشگاه علوم پزشکی مشهد، مشهد، ایران

^۴ استادیار، دپارتمان فارماکودینامی و سمنشناختی، دانشکده داروسازی، دانشگاه علوم پزشکی مشهد، مشهد، ایران

^۵ استادیار، دپارتمان مهندسی مواد، دانشگاه فردوسی مشهد، مشهد، ایران

^۶ استاد، دپارتمان مهندسی مواد، دانشگاه فردوسی مشهد، مشهد، ایران

* Mollazadeh.b@um.ac.ir

چکیده:

از روش گرانول سازی می‌توان به عنوان یک روش ساده و ارزان برای سنتز نانو ذرات استفاده نمود. در مطالعه‌ی پیش رو از روش گرانول سازی در مخلوط آب، روغن و پلیمر قطبی (بی وی ای) برای سنتز ذرات دو فازی کلسیم فسفات (هیدروکسی‌آپاتیت/تری‌کلسیم فسفات) استفاده گردید. ذرات به دست آمده از این روش برای بررسی‌های زیستی تحت اصلاح سطحی با ترا اتیل اورتو سیلیکات (تتوس) قرار گرفت. نتایج حاصل از آنالیز ریتویلک داده‌های XRD نشانگر تشکیل ۱۶ درصد فاز تری‌کلسیم فسفات در کنار هیدروکسی‌آپاتیت بود. نتایج BET نشانگر وجود حلقه هیستریس و متخلخل بودن ذرات با سطح ویژه ۹۳ سانتی متر مربع بر گرم بود. نتایج آنالیز زتا نشانگر تغییر پتانسیل سطحی ذرات از 1 ± 21 به 42 ± 1 در نتیجه اصلاح سطحی با ۲۵ درصد وزنی تتوس می‌باشد. نتایج تست سمیت نشان داد ذرات سنتز شده در محیط آب و روغن و همچنین اصلاح سطح شده با تتوس سمیتی برای سلول ایجاد نمی‌کند. نتایج تست آلیزارین رد نشان داد که اصلاح سطحی با تتوس باعث افزایش رسوب کلسیم و فسفر به اندازه‌ی ۲۵ درصد شده است. نتایج مدل سازی نرم‌افزاری نشانگر موقفيت روش گرانول سازی در سنتز پودرهای است. مطابق نتایج روش گرانول سازی به همراه اصلاح سطح روئی مناسب و ساده برای سنتز نانو ذرات کلسیم فسفات همراه بهبود خواص زیستی می‌باشد.

اطلاعات مقاله:

دريافت: ۳۰ آذر ۱۳۹۷

پذيرش: ۲۵ تير ۱۳۹۸

كلید واژه:

گرانول سازی، اصلاح سطحی، ذرات دوفازی کلسیم فسفات، ذرات متخلخل، تست‌های زیستی، مدل سازی

مانند زمین شناسی، شیمی، زیست شناسی و پزشکی دارد.

کلسیم فسفات‌ها در پزشکی کاربردهایی نظیر جایگزینی

کلسیم فسفات‌ها کاربردهای گسترده‌ای زمینه‌های علمی

۱- مقدمه



نیز به سمت این مکان‌ها توزیع شده رفته و روند تشکیل هیدروکسی‌آپاتیت در یک واکنش غیر همگن از این سایت‌های فعال واکنش آغاز می‌شود. در حقیقت این نوعی مدل الکترواستاتیک برای تشکیل هیدروکسی‌آپاتیت است. هیدروکسی‌آپاتیت با مورفولوژی سوزنی در بسترها ای به شکل استوانه تشکیل می‌شود. این اتفاق زمانی می‌افتد که بار منفی به عنوان سایت فعال برای یون‌های Ca عمل می‌کند. یون‌های کلسیم می‌توانند با گروه‌های فسفات داخل کپسول استوانه‌ای واکنش دهنند و مورفولوژی استوانه‌ای را تشکیل دهنند. اندازه استوانه‌ها بستگی به میزان انتشار یون‌های واکنش دهنده از طریق بستر پلیمری دارد. [20-22] هیدروکسی‌آپاتیت دارای قابلیت بالای تعویض یونی است به علت این خاصیت خواص اساسی سطح آن می‌تواند با استفاده از یون‌های از قبیل La^{3+} , Sr^{2+} , Mn^{2+} و دیگر یون‌های فلزی مورد اصلاح قرار گیرد اصلاح کننده‌های سطحی افزوده شده با ایجاد بار سطحی مانع آگلومره شدن ذرات می‌شوند. میزان پایداری ذرات در یک سوسپانسیون را می‌توان براساس پتانسیل زتا تعیین نمود.[23]

در مطالعه پیش‌رو ابتدا کلسیم فسفات با روش گرانول‌سازی در حضور روغن آفتتاب‌گردان خوراکی و بستر پلیمری پی‌وی‌ای و بدون حضور این بستر سنتز شده است. کلیه‌ی نمونه‌ها به کمک هیتر ۳۵ درجه و آون ۱۲۰ خشک شده و تاثیر نحوه‌ی خشک کردن و همچنین عملیات حرارتی در دمای ۵۵ درجه در ویژگی‌های ماده مورد بررسی قرار گرفته است. جهت بهبود خواص زیستی نمونه با تنوس مورد اصلاح سطحی قرار گرفت. جهت بررسی خواص بایو موادی

استخوان‌های دهان، فک، صورت، جراحی ستون فقرات و همچنین سیستم‌های داروسانی به عنوان یک زمینه زیست فعال برای رساندن عامل درمانی به ناحیه مورد نظر است دارند[1-6]. اشکال مختلف کلسیم فسفات‌ها با توجه به نسبت مولی Ca/P تعیین می‌شوند. در زمینه بایو مواد هیدروکسی‌آپاتیت $[\text{HA}; \text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2]$ با نسبت کلسیم به فسفر $67/1$ ($\text{Ca}/\text{P}=1.67$) به عنوان پایدارترین نوع کلسیم فسفات و بتا تری کلسیم فسفات $[\beta\text{-TCP}]$ ($\text{Ca}/\text{P}=1.5$) با نسبت کلسیم به فسفر $5/1$ ($\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$) کاربردهای بیشتری دارند[1,6-13]. نتایج تحقیقات نشان می‌دهد HA در بدن انسان بسیار پایدارتر از $\beta\text{-TCP}$ است. زیست تخریب‌پذیری کامل HA کریستالین در بدن بیش از ۱۰ سال به طول می‌انجامد. از سوی دیگر $\beta\text{-TCP}$ سریعتر از تشکیل استخوان جدید حل می‌شود، بنابراین استفاده از HA و $\beta\text{-TCP}$ به طور جداگانه منجر به نتیجه نامطلوب می‌شود. از این رو به کارگیری همزمان HA^+ - $\beta\text{-TCP}$ به عنوان دی فازیک کلسیم فسفات (biphasic TCP) نتایج مطلوب‌تری خواهد داشت. از بستر های پلیمری استفاده شده در سنتز هیدروکسی‌آپاتیت می‌توان به PVA (پلی‌ونیل الکل) اشاره نمود [13-19]. PVA یک پلیمر قطبی محلول در آب با گروه‌های جانبی CH_2 و OH [20] است. در غیاب بستر پلیمری یون‌های کلسیم و فسفات در یک واکنش همگن باعث تشکیل کریستال‌های هیدروکسی‌آپاتیت می‌شوند. ولی در حضور بستر پلیمری پی‌وی‌ای، بستر پلیمری پس از یونیزاسیون گروه‌های سطحی با بار منفی مکان‌های فعالی برای اتصال با یون کلسیم را به وجود می‌آورند. آنیون فسفات



تست سمیت: زنده بودن سلولی سلولهای نرمال در نمونه ای انتخاب شده با استفاده از روش آلاماربلو تعیین شد. پس از سه پاساز سلولی سلولهای NIH-3T3 (تهیه شده از انستیتو پاستور ایران) به میزان ۳۰۰۰ سلول در هر خانه پلیت ۶ کشت داده شد. سپس در انکوباتور ۵ درصد CO_2 نگهداری شد. بعد از ۲۴ ساعت غلظت‌ها در پلیت اضافه گردید. بررسی سمیت نمونه‌ها با استفاده از اثر رنگ‌سنگی انجام گردید. تعیین میزان زنده بودن سلولی توسط دستگاه Epoch device (USA) انجام گردید.

تست بايو اكتيويته: به منظور بررسی بايوакتيو بودن نمونه‌ها ابتدا محلول SBF مطابق روش کوکوبو تهیه شد. مقدار ۰/۰۷۵ گرم از پودر انتخاب شده و اصلاح سطح شده با تئوس در ۵۰ سی سی محلول SBF ریخته شد و سپس در دستگاه شیکر با سرعت ۶۰ rpm و دمای ۳۷ درجه قرار گرفت. بعد از ۱۴، ۷ و ۲۱ روز محلول SBF از روی نمونه‌ها برداشته شد و مقدار ۱ سی سی استون به منظور توقف تست روی پودرها ریخته شد و بعد از ۵ دقیقه استون برداشته شد و نمونه‌ها در آون با دمای ۴۰ درجه به مدت ۱ ساعت کاملاً خشک گردید. به منظور بررسی میزان استخوان سازی نمونه‌ها از آنالیز MIRA3 – Ceska republika (FESEM) استفاده شد.

تست آليزارين رد: به منظور بررسی میزان استخوان سازی نمونه‌ها و بررسی میزان رسوب کلسیم و فسفر از تست آليزارین رد استفاده شد. تست آليزان رد مطابق استاندارد و مطابق کار مننشر شده پیشین [1] روی سلول SaOS_2 (تهیه شده از انستیتو پاستور) انجام پذیرفت.

تست پايداري pH: به منظور بررسی کاربرد ماده‌ی

نمونه تست‌های سمیت، بايو اكتيويته، آليزارین رد و پايداري پیچ برای نمونه‌ی کلسیم فسفات دوفازی (HA+ β TCP) اصلاح سطح شده مورد بررسی قرار گرفت.

۲- فعالیت‌های تجربی

پروسه سنتز با روش گرانول سازی با استفاده از پیش‌ماده‌های روغن خوارکی، بستر پلیمری پلی‌ونیل الكل، کلسیم فسفات و آمونیوم دی‌هیدروژن فسفات و همچنین اصلاح سطحی با تئوس با مواد اولیه تهیه شده از برنده مرک آلمان (Merk, Germany) مطابق توضیحات کار مننشر شده پیشین [1] صورت پذیرفت. به منظور تعیین فاز XRD (X'Pert PW 3040/60 Philips) نمونه‌ها از آنالیز (Band) استفاده گردید. تعیین ثوابت، حجم شبکه و نیز کریستالیت سایز با آنالیز Rietveld محاسبه گردید. شناسایی بند FTIR (Thermo Nicolet AVATAR 370, USA) اندازه و مورفولوژی ذرات با استفاده از آنالیز TEM (CM120 Philips, Holland) تعیین بار سطحی نمونه‌ها آنالیز Zeta Compact (Zeta Compact CAD, France) مورد استفاده قرار گرفت. تعیین سطح BET/BJH (PHS-BET/BJH 1020, China) انجام گردید.

طراحی آزمایش با مدل Response surface **methodology (RSM)**: به منظور تعیین نمونه با بالاترین مقدار زتا پس از اصلاح سطحی از مدل RSM استفاده شد. نرمافزار Design expert 9, USA بدین منظور مورد استفاده قرار گرفت.



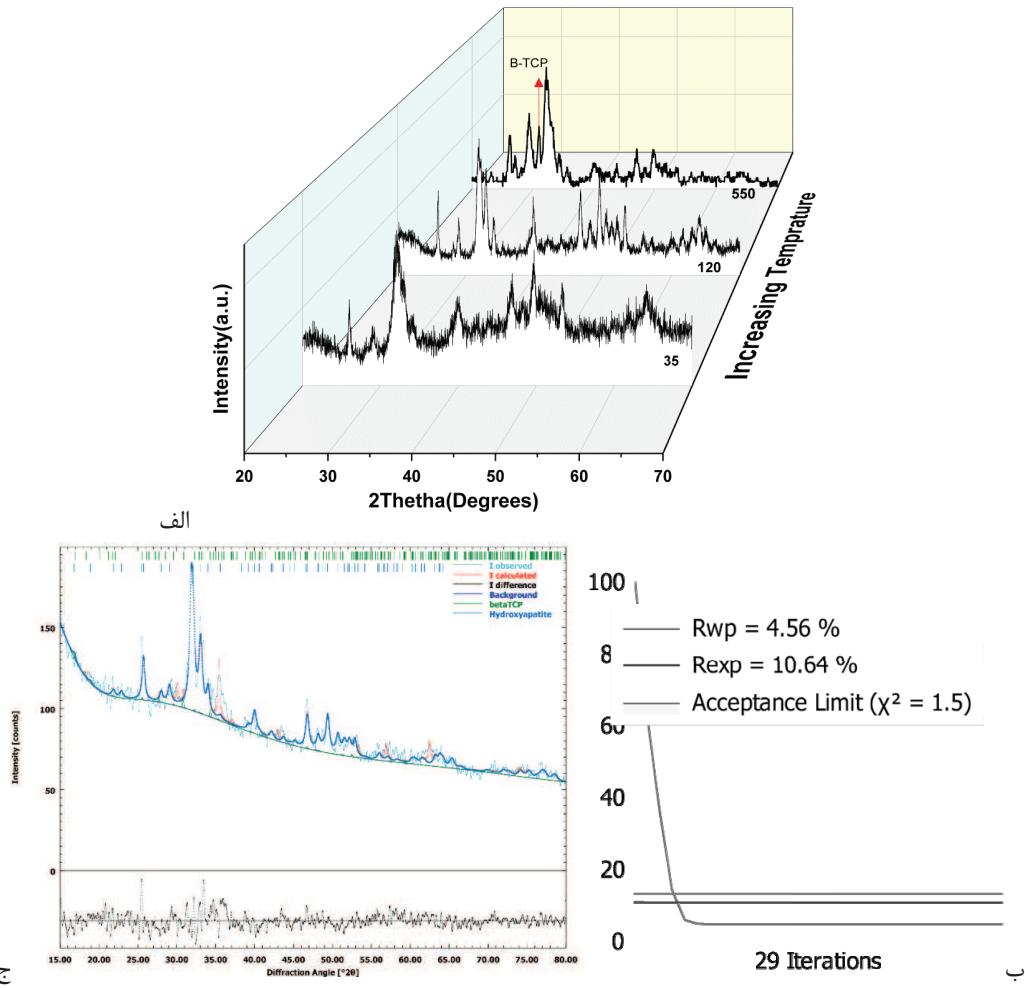
۳- نتایج و بحث

۱-۳- آنالیز XRD

شکل ۱ (الف) تغییرات فازی نمونه از آمورف به بلورین را با افزایش دما نشان می‌دهد. مطابق این شکل و فازیابی انجام شده در نمونه‌های خشک شده در دمای پایین فقط فاز هیدروکسی آپاتیت قابل مشاهده است. با افزایش تا 550°C درجه شاهد ایجاد فاز بتانتری کلسیم فسفات هستیم. نمونه عملیات حرارتی شده در دمای 550°C به منظور بررسی دقیق‌تر تحت آنالیز ریتولید قرار گرفت.

سترنز شده در بدن نمونه‌ها در مدت ۱۴، ۷ و ۲۱ روز در مجاورت محیط SBF قرار گرفتند. pH محلول SBF قبل و بعد از حضور ماده‌ی سنتزی در بازه‌های مشخص اندازه pH گیری شد. اندازه‌گیری pH توسط دستگاه یونیورسال pH (universal pH meter, USA) انجام گردید.

تست آماری: تمامی آنالیز‌های عددی شامل تست سمیت، آنالیز زتا، استخوان‌سازی حداقل ۳ بار تکرار شد. این تست‌ها توسط آنالیز آماری Two-way ANOVA توسط نرم‌افزار Graph pad prism 7.03 USA) مورد ارزیابی قرار گرفت.



شکل ۱- (الف): نتایج آنالیز XRD در دمای‌های مختلف، (ب): آنالیز ریتولید و پروفایل‌های آن، (ج): بررسی صحت آنالیز ریتولید



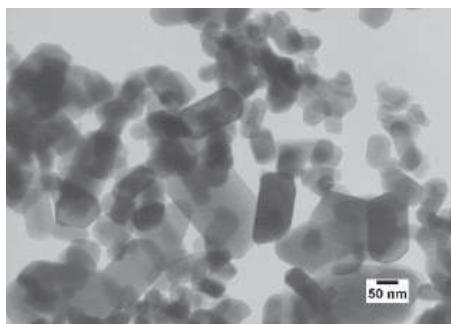
می باشد. شکل ۱ (ج) آزمون صحت سنجی ریتویلد را نشان می دهد مطابق این آزمون آنالیز ریتویلد با دقت بالا انجام شده و فاز یابی دقیق است. (در معیار استاندار $R_{WP} < 10$ باید باشد). جدول شماره ۱ میزان ثوابت شبکه، حجم و همجنین کریستالیت سایز نمونه مستخرج از آنالیز ریتویلد را نشان می دهد. مطابق این جدول نمونه نانو ساختار می باشد.

شکل ۱ (ب) الگوی ریتویلد نمونه عملیات حرارتی شده در دمای 550°C را نشان می دهد. مطابق این شکل و انجام عملیات کمی سازی میزان فاز بتانتری کلسیم فسفات 84 ± 0.05 درصد وزنی و فاز هیدروکسی آپاتیت ۱۵ درصد وزنی از فاز بلورین را تشکیل می دهنند. میزان فاز آمورف این نمونه با استفاده از استاندار خارجی آناتاز ۱۵ درصد

جدول ۱ - اطلاعات به دست آمده از آنالیز ریتویالد

کریستالیت سایز		ثوابت شبکه		حجم		درصد فازهای بلورین مشاهده شده	
۰۰۲	۳۰۰	(۰۰۲)/(۳۰۰)	a	c		HA	β -TCP
۱۴/۹	۱۲/۸	۱/۱۶	۹/۲۳	۶/۶۳	۴۸۹/۵۴	۸۴	۱۶

می افتد که بار منفی به عنوان سایت فعال برای یون های Ca^{2+} عمل می کند. یون های کلسیم می توانند با گروه های فسفات داخل کپسول استوانه ای واکنش دهند و مورفولوژی استوانه ای را تشکیل دهند. اندازه استوانه ها بستگی به میزان انتشار یون های واکنش دهنده از طریق بستر پلیمری دارد. اندازه ای پارتیکل سایز نمونه ها با پردازش تصویر توسط نرم افزار Image-J انجام گردید. اندازه ای پارتیکل های نمونه این 50 nm تا 70 nm با توجه به این پردازش به دست آمده است. لذا مطابق نتایج این آنالیز و نتایج XRD نمونه نانو ذره و نانو ساختار است.



شکل ۲- تصویر TEM نمونه [1,2]

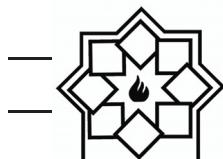
آنالیز TEM: شکل ۲ تصویر TEM نمونه را نشان می دهد و مطابق این تصویر ذرات دارای مورفولوژی هگزاگونالی هستند. علت وجود چنین مورفولوژی ای علاوه بر ساختار خود هیدروکسی آپاتیت به مکانیزم تشکیل در حضور بستر پلیمری نیز مرتبط می شود. نحوهی قرار گیری مولکولهای پلیمری و اصلاح کننده ها می توانند اندازه، شکل، مورفولوژی و پراکندگی پلی کریستال های هیدروکسی آپاتیت را کنترل می کند. غلظت بالای پلیمر باعث ایجاد محلهایی با واکنش پذیری زیاد حاوی گروه های مانند هیدروکسیل و کربوکسیل می شود. این مکان ها می توانند با کلسیم پیوند برقرار کنند. افزایش این مکان ها می توانند منجر به ایجاد هسته های زیادی از هیدروکسی آپاتیت شود، با این حال شکل گیری تعداد زیادی از این هسته ها باعث کاهش غلظت کلسیم شده تا جاییکه هسته نمی تواند زیاد رشد کند. هیدروکسی آپاتیت با مورفولوژی سوزنی در بسترهایی به شکل استوانه تشکیل می شود. این اتفاقی زمانی



نشانگر تاثیر افزایش روغن در درصد فازی در حضور و یا عدم حضور PVA است. گراف (C₁) نشانگر تغییرات درصد فازی با افزایش روغن بدون حضور PVA است. تبلور قابل توجه β -TCP با افزودن روغن در این گراف دیده می‌شود. مطابق این گراف β -TCP به میزان ۴۴ درصد در این سیستم متبلور شده است. گراف C₂ نشانگر تغییرات درصد فازی با افزایش روغن در حضور PVA به میزان ۵۰ درصد است. مطابق گراف A₂ با افزایش روغن به این سیستم- β -TCP به میزان ۱۶ درصد متبلور خواهد شد. لذا طبق این گرفها روغن باعث تبلور β -TCP می‌شود. قسمت D شکل نشانگر تاثیر افزایش پلیمر در تغییرات درصد فازی در حضور و یا عدم حضور روغن است. گراف D₁ نشانگر تغییرات درصد فازی با افزایش مقادیر PVA بدون حضور روغن است. مطابق این گراف با افزایش بستر پلیمری فاز β -TCP متبلور خواهد شد. گراف D₂ نشانگر تغییرات درصد فازی با افزایش مقادیر PVA در حضور روغن به میزان ۵۰ درصد است. مطابق این گراف اندازه ذرات تبلور β -TCP با افزایش روغن به سیستم شروع خواهد شد و تا ۱۶ درصد β -TCP متبلور خواهد شد. مطابق این گرافها علت تبلور β -TCP حضور روغن در سیستم است.

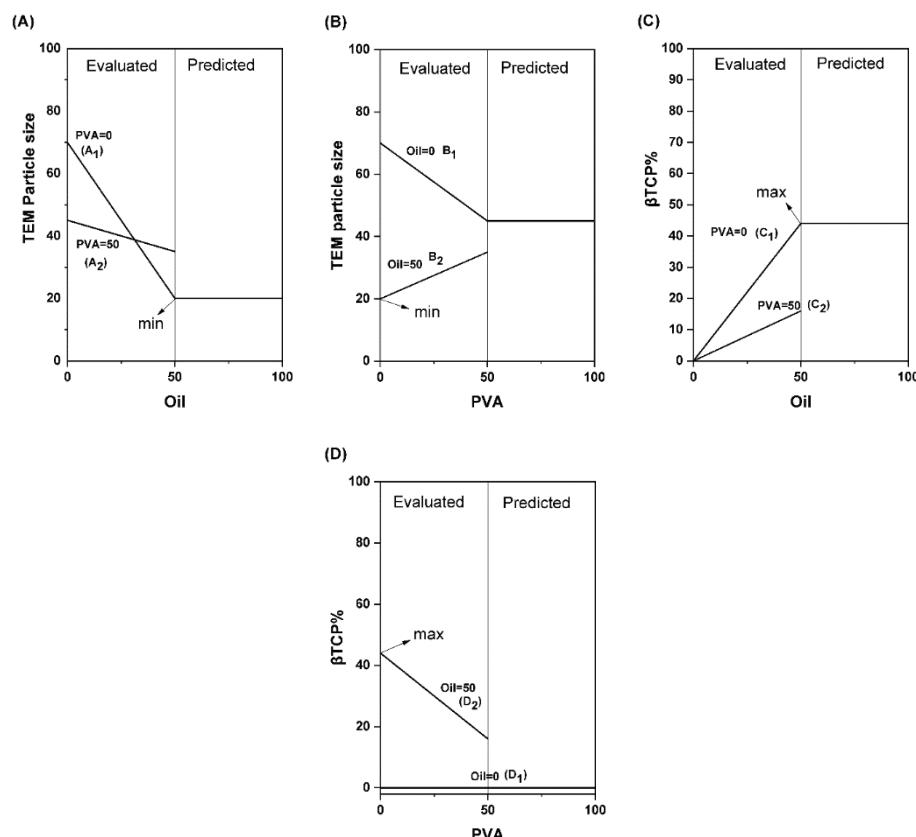
سیستم بهینه اصلاح سطحی با مدل RSM: جهت اصلاح سطحی نمونه با مقادیر مناسب از تتراتیل اورتوسیلیکات روش RSM مورد استفاده قرار گرفت. بنا به این مدل ذرات در درصدهای ۵ تا ۷۵ درصد وزنی از اصلاح کننده مورد اصلاح سطحی واقع شدند و نمونه بهینه توسط آنالیز آماری بهینه سازی بdst آمد. جدول ۲ نشانگر اطلاعات نهایی استخراج شده از این مدل می‌باشد. فرمول

طراحی آزمایش به صورت مقایسه‌ای و همچنین با استفاده از مدل RSM (بررسی علت اهمیت گرانول سازی به صورت درجا): ابتدا مدل سازی برای نشان دادن علت اهمیت نحوه سنتز با استفاده از روغن و بستر پلیمری نسبت به پژوهش‌های پیشین [۱-۵] مورد استفاده واقع شد. نتایج این بررسی در شکل ۳ (A) تا (D) نشان داده شده است. قسمت A نشانگر تاثیر افزایش روغن در تغییر اندازه ذرات در حضور و یا عدم حضور PVA است. گراف (A1) نشانگر تغییرات اندازه ذرات با افزایش روغن بدون حضور PVA است. کاهش قابل توجه اندازه ذرات با افزودن روغن در این گراف دیده می‌شود. مطابق این گراف اندازه ذرات از ۷۰ نانومتر کاهش یافته است. گراف A₂ نشانگر تغییرات اندازه ذرات با افزایش روغن در حضور PVA به میزان ۵۰ درصد است. مطابق گراف A₂ با افزایش روغن به این سیستم اندازه ذرات از ۴۵ به ۳۵ نانومتر کاهش یافته است. لذا طبق این گرفها روغن باعث کاهش اندازه ذرات با حضور و عدم حضور PVA است. قسمت B شکل نشانگر تاثیر افزایش پلیمر در تغییرات اندازه ذرات در حضور و یا عدم حضور روغن است. گراف B₁ نشانگر تغییرات اندازه ذرات با افزایش مقادیر PVA بدون حضور روغن است. مطابق این گراف با افزایش بستر پلیمری اندازه ذرات از ۷۰ به ۴۵ کاهش یافته است. گراف B₂ نشانگر تغییرات اندازه ذرات با افزایش مقادیر PVA در حضور روغن به میزان ۵۰ درصد است. مطابق این گراف اندازه ذرات از ۲۰ به ۳۵ نانو متر افزایش می‌یابد. مطابق این گراف و تصاویر TEM علت افزایش اندازه ذرات افزایش میزان جوانه زنی با افزایش مقادیر PVA است. قسمت C



ولی مشاهدات تجربی مقدار بهینه را ۲۵ درصد تعیین نمود. انحراف این دو حالت بسیار کم می‌باشد. لازم به ذکر است زتای نمونه بدون اصلاح سطحی 20 ± 1 - بوده که در اثر فرآیند اصلاح سطحی به $42/44$ - رسیده است.

۱ فرمول پیشنهادی درجه ۴ توسط نرم‌افزار expert برای محاسبه‌ی زتای نمونه‌ها براساس اصلاح سطحی انجام شده است. مطابق فرمول بهترین حالت اصلاح سطحی $25/26$ درصد اصلاح کننده تتوس می‌باشد



شکل ۳- بررسی علت اهمیت گرانول سازی در تحقیق پیش رو

جدول ۲- بررسی نتایج مدل RSM

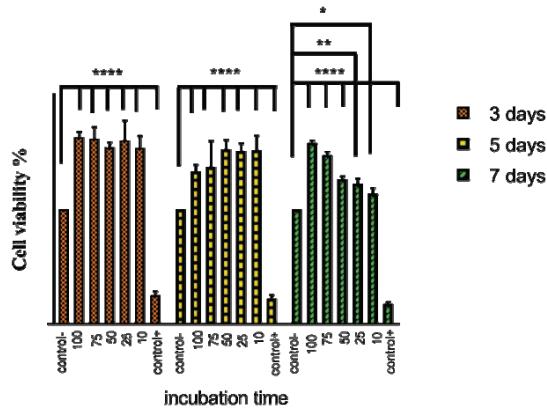
انحراف مدل و کار تجربی	P-value	آمدہ در نتایج تجربی	دست آمده از مدل	بیشترین زتای به دست	مقدار بهینه اصلاح سطحی به دست آمده	اصلاح کننده توسعه نرم‌افزار
<1	<0.0001	۴۲/۴(@25%)	۴۲/۷	۲۶/۲۵	۲۶/۲۵	تعویض

$$\text{Zeta}(\text{mV}) = \sqrt{4114.96664 - 780.08335x + 55.08990x^2 - 1.35631x^3 + 0.010029x^4} \quad (1)$$

$5 < x < 75$ x:Si ion by weight percent



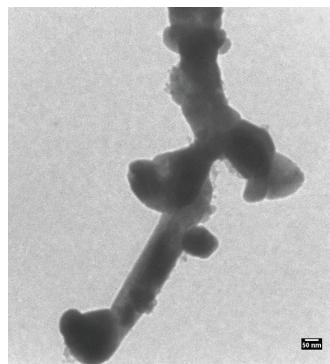
شده در زمان‌های مختلف آزمایش شامل ۳روز، ۵روز و ۷روز سمیتی برای سلول‌های نرمال NIH-3T3 استفاده شده ایجاد نمی‌کند. همچنین نتایج نشان می‌دهد نمونه‌های شامل غلظت‌های بالاتر از ماده سنتزی باعث رشد سلولی نیز شده‌اند. از این تست می‌توان نتیجه گرفت ذرات اصلاح شده با تئوس سمیتی برای سلول ایجاد نکرده و باعث رشد سلولی بهتر شده است.



شکل ۵- نتایج تست سمیت [1]

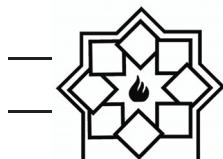
تست با یو اکتیویته: محلول SBF (محیط شبیه ساز مایع داخل بدن) مطابق روش کوکوبو آماده و نمونه‌ها برای بررسی خواص با یو اکتیویته در درون آن قرار گرفتند. نمونه‌ی شکل ۷ (الف) نمونه‌بدون قرار گرفتن در محیط SBF و شکل‌های ۷ (ب تا د) به ترتیب نمونه‌های قرار گرفته در محلول SBF به مدت ۷، ۱۴ و ۲۱ روز را نشان می‌دهد. در نمونه‌های قرار گرفته در SBF شاهد تغییرات مورفولوژی سطحی ذرات و همچنین شاهد شکل گیری ذرات ریز استخوانی هستیم که این ذرات در نمونه‌ی ۲۱ روز از رشد و اندازه‌ی بیشتری برخوردار است. در نمونه‌ی شکل ۱۴ ذرات بعد از ۲۱ روز قرار گیری در محلول SBF نشان داده شده است که رشد بیشتری نسبت به نمونه‌های دیگر

mekanizm اصلاح سطحی: شکل (۴) تصویر TEM نمونه‌ی اصلاح سطح شده با ۲۵ درصد وزنی تئوس را نشان می‌دهد. مورفولوژی ذرات هیدروکسی‌آپاتیت میله‌ای به همراه ذراتی با مورفولوژی کروی کنار آن که مربوط به فاز β -TCP است در شکل دیده می‌شود. در اثر اصلاح سطحی ذرات بسیار ریز Si در اطراف ذرات قابل مشاهده است. مکانیزم اتصال ذرات SiO_2 به ذرات HA اینگونه است که ذرات تئوس بعد از هیدرولیز قطبیت منفی پیدا کرده و با کلسیم موجود در ساختار هیدروکسی‌آپاتیت واکنش می‌دهد و باعث ایجاد ذرات ریز SiO_2 می‌شود.

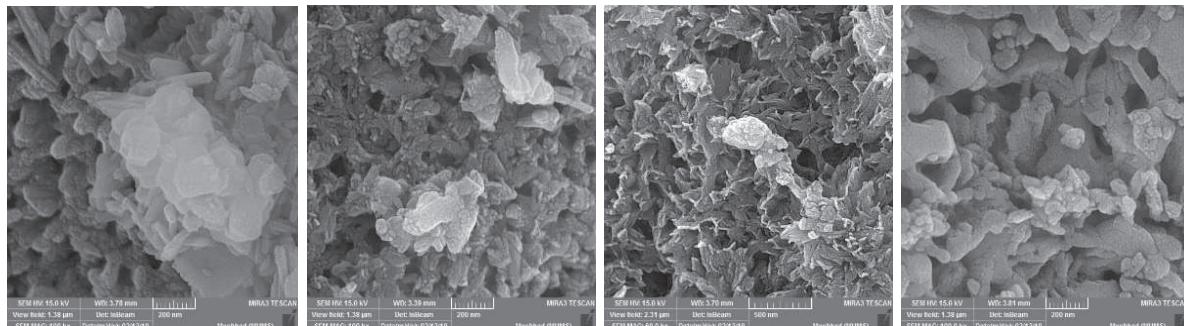


شکل ۶- تصویر TEM نمونه اصلاح سطح شده [2]

تست سمیت: تست سمیت سلولی برای نمونه‌ها با غلظت‌های گوناگون شامل ۱۰۰، ۷۵، ۵۰، ۲۵ و ۱۰ درصد ورنی انجام گردید. نمونه محیط کشت بدون عصاره به عنوان کنترل - (بدون سمیت) و نمونه شامل عامل سمی دکسوروبوسین در دو غلظت به عنوان کنترل + در نظر گرفته شد. نتایج تست نشانگر تغییر رنگ آلاماربلو به رنگ متمایل به صورتی برای تمام خانه‌های دارای عصاره‌ی اضافه شده و کنترل منفی است. همچنین کنترل مثبت به آبی تغییر رنگ داد. نتایج جذب نوری در شکل (۶) نشان داده شده است. نتایج نشانگر این است که عصاره‌ی تهیه

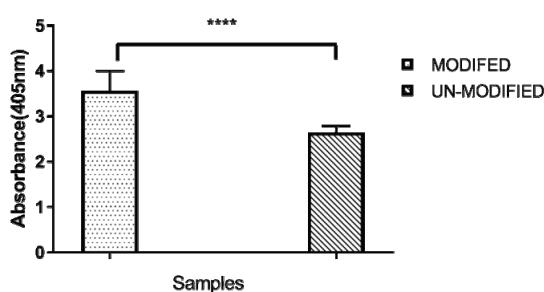


سازی در داخل بدن برای بافت سخت آسیب دیده است. مطابق این تست این ذرات قابلیت پوشش دهنده بر روی ایمپلنت‌ها را دارا می‌باشند.



شکل ۶- نمونه‌های قرار گرفته در SBF به مدت ۰، ۷، ۱۴ و ۲۱ روز.

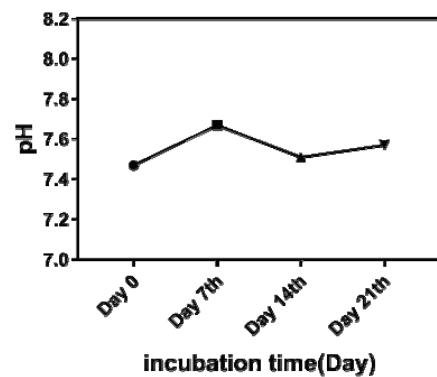
تست آلیزارین رد: شکل ۹ (الف) نتایج کمی‌سازی تست آلیزارین رد را نشان می‌دهد. با توجه به این تست میزان رسوب کلسیم و فسفر روی سلول‌های $SaOS_2$ به طور معناداری با انجام اصلاح سطحی افزایش یافته است. میزان افزایش استخوان سازی در اثر اصلاح سطحی ۲۵ درصد می‌باشد. شکل ۹ (ب) تصویر میکروسکوپی معکوس نمونه‌های (a) کنترل (b) بدون اصلاح سطحی (c) اصلاح سطحی با ۲۵ درصد تئوس بعد از ۱۲ روز را نشان می‌دهد. مطابق این تصویر میزان رسوب کلسیم و فسفر به طور قابل ملاحظه‌ای افزایش را نشان می‌دهد.



شکل ۸- نتایج کمی‌سازی تست آلیزارین رد [1]

دارد. مطابق این تصاویر ذرات کامپوزیت دی‌فازیک کلسیم فسفات تهیه شده از بایو اکتیویته‌ی خوبی برخوردار است. نتایج این تست نشان‌گر تاثیر مثبت ذرات بر فرآیند استخوان

تست پایداری pH: شکل ۸ نتایج پایداری pH نمونه بعد از ۰، ۷، ۱۴ و ۲۱ روز قرار گیری نمونه در مجاورت محیط SBF را نشان می‌دهد. مطابق این تست نمونه باعث تغییر pH محیط نشده و از این جهت کاربرد آن داخل بدن اشکالی ایجاد نمی‌کند.



شکل ۷- نتایج تست پایداری پیاج



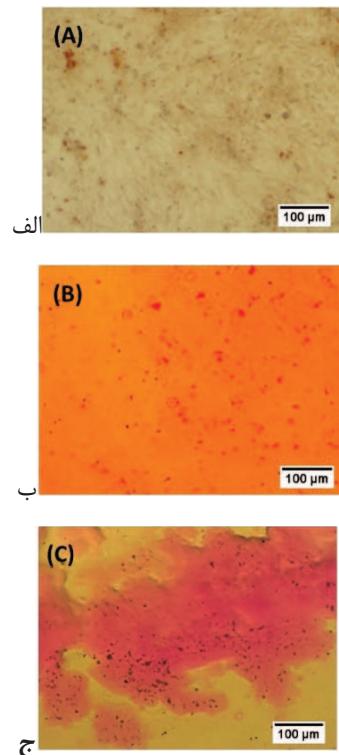
تشکر و قدردانی

نویسنده‌گان بر خود لازم می‌دانند از همکاری آزمایشگاه‌های مواد پیشرفته دانشگاه فردوسی مشهد، آزمایشگاه خوردگی دانشگاه فردوسی مشهد، آزمایشگاه مرکزی دانشگاه علوم پزشکی مشهد و همچنین آزمایشگاه‌های گروه علوم و فنون دانشگاه علوم پزشکی مشهد، آزمایشگاه بایواسی دانشکده داروسازی مشهد، آزمایشگاه میکروبیولوژی دانشکده دارو سازی مشهد و موسسه تحقیقاتی پرطاووس مشهد کمال تشکر و قدردانی را داشته باشند. تمامی آنالیز‌ها و تحلیل‌های مرتبط با XRD توسط مهندس فرزاد کرمانی انجام شده است. راه ارتباطی جهت FarzadKermani73@gmail.com: آنالیز ایمیل: ایمیل: می‌باشد.

مراجع

- [1] Farzad Kermani, Saeid Kargozar, Zahra Tayarani-Najaran, Abbas Yousefi, Sahar Mollazadeh Beidokhti, Mohammad Hadi Moayed , Synthesis of nano HA/βTCP mesoporous particles using a simple modification in granulation method. Msc 96 (2019), 859-871.

- [2] فرزاد کرمانی، سحر ملازاده بیدختی، زهرا طیرانی نجاران، سعید کارگزار، عباس یوسفی، محمد هادی موید. اظهار نامه شماره ۱۴۰۰۳۰۱۴۸۵۴ ۱۳۹۶۵۰ با عنوان "معرفی روشی نوین برای سنتز نانو ذرات



شکل ۹- نتایج میکروسکوپی معکوس نمونه‌های کنترل، بدون اصلاح سطحی و اصلاح سطحی شده [1]

۴- نتیجه‌گیری

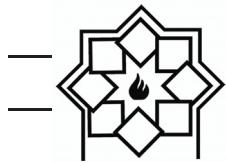
در مطالعه پیش رو سنتز نانو ذرات دوفازی هیدروکسی آپاتیت/ بتاتری کلسیم فسفات با موفقیت با استفاده از گرانول سازی در بستر پلیمری پی‌وی‌ای و رونمای خوراکی انجام شد. درصد بهینه اصلاح سطحی در اصلاح ذرات با این روش در تحقیق پیش رو به میزان ۲۵ درصد ورنی به دست آمد. با اصلاح سطحی با تئوس پتانسیل زتای ذرات از 20 ± 1 -به 42.44 ± 1.1 -افزایش یافت. نتایج تست‌های استخوان سازی و سمیت نشانگر عدم ایجاد سمیت نمونه‌های تهیه شده با این فرآیند در کنار بایوакتیو بودن ذرات است. نتایج تست آلیزارین رد نشان داد رسوب کلسیم و فسفر به میزان ۲۵ درصد در اثر اصلاح سطحی افزایش می‌یابد.



- Start small, think big, Mater. Today Proc. 5 (2018) 15492–15500.
- [7] Sahar Mollazadeh Beidokhti , J. Javadpour , A. Khavandi , In situ synthesis and characterization of nano-size hydroxyapatite in poly(vinyl alcohol) matrix , Ceramics International , Volume (33) , 2007-1, Pages 1579-1583
- [8] Sahar Mollazadeh Beidokhti, et al. Comparative Evaluation of Crystallization Behavior, Micro Structure Properties and Biocompatibility of Fluorapatite- Mullite Glass- Ceramics. Advances in Bioceramics and Biotechnologies II: Ceramic Transactions, 2014, 247.
- [9] BAINO, Francesco; HAMZEHLOU, Sepideh; KARGOZAR, Saeid. Bioactive Glasses: Where Are We and Where Are We Going?. Journal of functional biomaterials, 2018, 9.1: 25.
- [10] S. Safi, F. Karimzadeh, S. Labbaf, Mesoporous and hollow hydroxyapatite nanostructured particles as a drug delivery vehicle for the local release of ibuprofen, Mater. Sci. Eng. C. 92 (2018) 712–719.
- دوفازی HA/ β TCP (هیدروکسی آپاتیت- بتاتری کلسیم فسفات) جهت مصارف زیستی "، اداره کل ثبت شرکت‌ها و مالکیت صنعتی (1397) فرزاد کرمانی، سحر ملازاده بیدختی، محمدهادی مؤید، بررسی سطح‌ویژه و تاثیر نوع و مقدار اصلاح‌کننده سطحی بر پایداری ذرات هیدروکسی آپاتیت‌نانو متخلف سنتزشده در حضور بستر پلیمری، ششمین کنفرانس بین‌المللی مهندسی مواد و متالورژی و یازدهمین کنفرانس مشترک انجمن مهندسی متالورژی و مواد ایران و انجمن علمی ریخته‌گری ایران، تاریخ: ۱۳۹۶/۰۸/۰۶ سارا شوروزی، فرزاد کرمانی، سحر ملازاده بیدختی، علیرضا کیانی‌رشید، عباس یوسفی، بررسی تاثیر مواد اولیه و عملیات حرارتی در سنتز شیشه - سرامیک‌های آپاتیت-آنورتیت به روش سل - ژل، ششمین کنفرانس بین‌المللی مهندسی مواد و متالورژی و یازدهمین کنفرانس مشترک انجمن مهندسی متالورژی و مواد ایران و انجمن علمی ریخته‌گری ایران، تاریخ: ۱۳۹۶/۰۸/۰۶
- [5] S. Mollazadeh, J. Javadpour, A. Khavandi, In situ synthesis and characterization of nano-size hydroxyapatite in poly(vinyl alcohol) matrix, Ceram. Int. 33 (2007) 1579–1583.
- [6] S. Kargozar, M. Mozafari, Nanotechnology and Nanomedicine:



- surface free energy components of urea–water solutions, *Colloids Surfaces A Physicochem. Eng. Asp.* 538 (2018) 774–780.
- [17] B. Doshi, M. Sillanpää, S. Kalliola, A review of bio-based materials for oil spill treatment, *Water Res.* 135 (2018) 262–277.
- [18] S. Ben Moussa, H. Bachouâ, M. Gruselle, P. Beaunier, A. Flambard, B. Badraoui, Hybrid organic-inorganic materials based on hydroxyapatite structure, *J. Solid State Chem.* 248 (2017) 171–177.
- [19] S. He, H. Yang, X. Chen, Facile synthesis of highly porous silica aerogel granules and its burning behavior under radiation, *J. Sol-Gel Sci. Technol.* 82 (2017) 407–416.
- [20] L. Borum-Nicholas, O.C. Wilson, Surface modification of hydroxyapatite. Part II. Silica, *Biomaterials*. 24 (2003) 3681–3688.
- [21] L. Borum-Nicholas, O.C. Wilson, Surface modification of hydroxyapatite. Part I. Dodecyl alcohol., *Biomaterials*. 24 (2003) 3671–3679.
- [11] B. Zhang, H. Li, L. He, Z. Han, T. Zhou, W. Zhi, X. Lu, X. Lu, J. Weng, Surface-decorated hydroxyapatite scaffold with on-demand delivery of dexamethasone and stromal cell derived factor-1 for enhanced osteogenesis, *Elsevier B.V.*, 89 (2018) 355–370.
- [12] W. Habraken, P. Habibovic, M. Epple, M. Bohner, Calcium phosphates in biomedical applications: Materials for the future?, *Mater. Today*. 19 (2016) 69–87.
- [13] M. Mbarki, P. Sharrock, M. Fiallo, H. ElFeki, Hydroxyapatite bioceramic with large porosity, *Mater. Sci. Eng. C*. 76 (2017) 985–990.
- [14] S. He, Y. Huang, G. Chen, M. Feng, H. Dai, B. Yuan, X. Chen, Effect of heat treatment on hydrophobic silica aerogel, *J. Hazard. Mater.* 362 (2019) 294–302.
- [15] L.J. Fuh, Y.J. Huang, W.C. Chen, D.J. Lin, Preparation of micro-porous bioceramic containing silicon-substituted hydroxyapatite and beta-tricalcium phosphate, *Mater. Sci. Eng. C*. 75 (2017) 798–806.
- [16] A. Terzis, E. Sauer, G. Yang, J. Groß, B. Weigand, Characterisation of acid-base



- [22] H. Zhou, M. Yang, S. Hou, L. Deng, Mesoporous hydroxyapatite nanoparticles hydrothermally synthesized in aqueous solution with hexametaphosphate and tea polyphenols, *Mater. Sci. Eng. C*. 71 (2017) 439–445.
- [23] A. J. Salinas, J. M. Blanco-Bécares, O. Mersinlioglu, L. Casarrubios, D. Fernández-Villa, M.J. Feito, T. Portolés, B. González, M. Vallet-Regí, Synthesis, Characterization and Biocompatibility of Mesolamellar Calcium Phosphate Hybrids Prepared by Anionic Surfactant Templating, *ChemistrySelect*. 3 (2018) 6880–6891.