تاثیر عملیات سطحی مکانیکی و شیمیایی ایمپلنت های تیتانیومی بر چسبندگی و بقای سلول های فیبروبلاست

علی رجایی #[1] دکتر مرتضی دلیری جوپاری [2]

۱- کارشناس ارشد بیومواد دانشگاه آزاداسلامی واحد علوم و تحقیقات

۲- استادیار پژوهشگاه ملی مهندسی ژنتیک و زیست فناوری

خلاصه:

سابقه و هدف: نحوه تقابل سلولها با تیتانیوم نقش اساسی در موفقیت بالینی ایمپلنتهای استخوانی و دندانی دارد. آماده‌سازی سطحی به روش مکانیکی یا شیمیایی به چسبندگی سلولها به ایمپلنت کمک میکند.هدف از این مطالعه بررسی اثر دو نوع اماده سازی سطحی (سندبلاست و اسید-اچ)بر چسبندگی سلولی و بقای فیبروبلاستها بود.

مواد و روش ها: این مطالعه تجربی جهت بررسی رفتار فیبروبلاستها(۹۲۹- L) در تقابل با سه گروه ایمپلنت تیتانیومی شامل: سندبلاست شده، اسیداچ شده و تیتانیوم خالص تجاری در سه گروه ده تایی در محیط ازمایشگاهی انجام شد. میکروسکوپ الکترونی جهت ارزیابی میکروتوپوگرافی ومیزان چسبندگی و مورفولوژی سلولها مورد استفاده قرار گرفت.بقای سلولی با روشMTT ارزیابی شد.تعداد سلولهای زنده شمارش شده و با استفاده از انالیز واریانس یکطرفه و ازمون Tukeyمورد مقایسه قرار گرفتند.

یافته ها: بررسی میکروسکوپ الکترونی تفاوت قابل توجهی در میکرو توپوگرافی سطحی در سه گروه نشان داد. تراکم سلولی فیبروبلاست‌ها و چسبندگی انها در نمونه سندبلاست شده بیشتر از سایر گروه ها بود.نتایج ازمون MTT نشان دادسلولهای زنده ثبت شده در گروه سندبلاست ۱/۲۸ ±۰/۵۸ بوده و بطور معناداری بیشتر از گروه اسید اچ ۰/۹۵ ±۰/۲۳و تیتانیوم خالص ۱/۱۶ ±۰/۱۷ بود.($P < ۰/۰۵$)

نتیجه گیری: اماده سازی سطحی ایمپلنت بر چسبندگی و بقای سلولهای فیبروبلاست تاثیر دارد وسطوح سندبلاست شده بهترین سطح را از نظر چسبندگی و بقای سلولی نسبت به سطوح اسید-اچ شده و یا تیتانیوم خالص فراهم میکند.

کلید واژه ها: ایمپلنت تیتانیوم، سند بلاست شده، اسید-اچ شده، چسبندگی سلولی، بقای سلولی MTT، فیبروبلاست

وصول مقاله: ۸۹/۷/۲۱ اصلاح نهایی: ۸۹/۸/۲۷ پذیرش مقاله: ۸۹/۹/۳۰

نویسنده مسئول مکاتبات: علی رجایی ، تهران- تهرانپارس-خیابان وفادار غربی-کوچه ۲۲۴غربی-پلاک۱۴ تلفن: ۰۹۱۲۳۲۶۶۶۴۵ Email: rajaee.ali@gmail.com

[Downloaded from jrds.ir on 2026-11-13]

[DOR: 20.1001.1.20084676.1389.7.4.8.6]

مقدمه:

تیتانیوم یک فلز نسبتا سبک است که مقاومت خوردگی عالی، نسبت استحکام به وزن بالا و رفتار فیزیکی- مکانیکی خوب در دمای بالا دارد. حضور لایه چسبنده و محافظ اکسید تیتانیوم بر سطح این فلز، مقاومت خوردگی عالی حتی تا دمای ۵۳۵ درجه سانتی گراد را تامین می کند.[۱]

دربین آلیاژها و موادی که برای ساخت و تهیه کاشتنی های بدن به کار می رود، تیتانیوم و آلیاژهای آن خاصیت همبندی با استخوان را دارند و ضمن ترویج رشد استخوان، امکان رشد استخوان از روی سطح به درون حفره های کاشتنی را میسر می سازند، در حالی که در مورد سایر فلزات، بافت رشته ای موسوم به غشاء، اطراف کاشتنی (بین استخوان و کاشتنی)، پدید می آید که برای طول عمر و دوام کاشتنی مضر است. نیروهای اعمال شده بدون هیچگونه تحریک پاتولوژیکی از کاشتنی عبور کرده و به استخوان انتقال می یابند. تیتانیوم در تماس با مایعات بدن به سرعت لایه اکسیدی رویین تشکیل می دهد و خوردگی زیستی را متوقف می سازد. [۲]

خارجی ترین لایه سطحی یک ماده که در بر گیرنده ۱ تا ۱۰ اتم خارجی است، می تواند تا حد زیادی با بقیه حجم ماده متفاوت باشد. این تفاوتها مربوط به ساختار الکترونی، ساختار کریستالی و فاصله لایه اتمی می باشد. چون فعل و انفعالات شیمیایی اولیه ای که بین یک ایمپلنت و بافت میزبان اتفاق می افتد در شعاع چند اتمی می باشند، تغییرات حاصله در ترکیب خارجی ترین لایه اتمی سطح ماده تاثیر فراوانی بر تطابق بیولوژیکی آن خواهد داشت. ترکیب شیمیایی سطح ماده به ویژه در تمایل سطح برای جذب ملکولها یا اتمهای خارجی اهمیت دارد، بنابراین سطوح مختلف از ویژگیهای جذب سطحی بسیار متفاوتی برخوردار می باشند. [۳-۵]

تقریبا در مورد تمام فلزاتی که ما به عنوان ماده ایمپلنت انتخاب می نماییم، سطح فلز توسط یک لایه اکسید به ضخامت چند نانومتر پوشیده شده است. این لایه اکسید سطحی از تماس مستقیم بین محیط و فلز جلوگیری نموده و به مقدار زیادی موجب حفاظت آن می گردد. به این ترتیب در ایمپلنت های فلزی هیچ گاه بین فلز ایمپلنت و بافت میزبان تماس برقرار نمی شود بلکه این تماس بین بافت و اکسید سطح ایمپلنت برقرار می شود.[۲]

سازگاری بیولوژیک به صورت توانایی ماده برای استفاده در یک کاربرد خاص که با واکنش مناسبی از سوی میزبان همراه باشد تعریف می شود. به این ترتیب برای اینکه یک ماده بتواند در محیط های بیولوژیک به خوبی عمل نماید بایستی زیست سازگار باشد. وجود سازگاری بیولوژیک به صورت قطعی و مطلق برای یک ماده ممکن است در حد یک رویا باشد چرا که احتمالا هیچ ماده ای وجود ندارد که بر روی بافتها کاملا بی تاثیر باشد. به این ترتیب باید گفت که در مواد زیست سازگار میزان واکنش متقابل بین آنها و بافت زنده به قدری محدود می باشد که هیچ یک از این دو، تاثیر زیان آوری بر روی یکدیگر ندارند.[۶]

ارتقاء سازگاری زیستی فلزات و آلیاژها با استفاده از علم و فن آوری مهندسی سطح و به کمک ایجاد پوشش بر روی سطح و یا از طریق عملیات اصلاح سازی سطح صورت می گیرد.[۲]

واکنش بافت در تماس با تیتانیوم و آلیاژهای آن بسیار اندک است و رشد استخوان یا همبندی با استخوان می تواند پدید آید.[۱]

به طور کلی عوامل تعیین کننده سازگاری و تطابق بیولوژیکی ایمپلنت را می توان به دو دسته عوامل تعیین کننده مربوط به ایمپلنت و عوامل تعیین کننده مربوط به میزبان تقسیم نمود.[۴]

[Downloaded from jrds.ir on 2026-11-13]

[DOR: 20.1001.1.20084676.1389.7.4.8.6]

برای شناخت تطابق بیولوژیکی بیومتریالها، درک وضعیت و شناخت وقایع ناحیه تماس بین بیومتریال و سیستم بیولوژیک میزبان اهمیت دارد. در چنین سطوح تماسی ساختمان ملکولی سیستم بیولوژیک با ساختار بیومتریال وارد واکنش متقابل شده و این واکنشهای اولیه، در حد ملکولی و در ناحیه تماس خیلی باریکی به عرض کمتر از یک نانومتر اتفاق می افتند. بدین لحاظ هنگام بحث در مورد بیومتریالها، خصوصیات سطحی در حد اتمی در مرکز توجه قرار می گیرند و به ویژه ترکیب و ساختار لایه سطحی بیومتریال نقش مهمی در رخدادهای ناحیه تماس بازی می کند. [۵]

هدف از انجام این تحقیق، بررسی تاثیر عملیات سطحی مکانیکی و شیمیایی ایمپلنت های تیتانیومی بر چسبندگی و سمیت سلولی به روش MTT می باشد.

مواد و روش ها:

تهیه نمونه

مطالعه به روش تجربی و از نوع آزمایشگاهی بوده و نمونه های مورد مطالعه به صورت وایرهایی به قطر ۱/۵ میلیمتر از شرکت Biohorizon آمریکا خریداری شدند جمعاً ۳۰ نمونه و از جنس تیتانیوم خالص و فاقد هرگونه عملیات سطحی بودند و به صورت سه گروه ده تایی وارد مطالعه شدند.

نمونه ها به منظور انجام آزمایشات به سه گروه نمونه اسید اچ، نمونه سندبلاست شده و نمونه تیتانیوم خالص، گروه بندی شدند و همچنین با توجه به مطالعات مشابه، از لاتکس به عنوان گروه کنترل مثبت و از محیط کشت به عنوان گروه کنترل منفی استفاده شد[۶]

علت انتخاب این دو گروه علاوه بر گروه های مورد آزمایش، امکان بررسی و مقایسه صحیح آزمون کشت سلولی بر روی گروه های مختلف آلیاژی می باشد.

آماده سازی نمونه های مورد استفاده:

۱ -نمونه اسید اچ شده:

در این نمونه نوع اسید به کار رفته، محلول Kroll بوده، که این محلول شامل آب مقطر، اسید نیتریک و اسید هیدروفلوریک می باشد.

غالبا بیشتر از ۹۰ درصد وزنی این محلول از آب تشکیل شده و تنها کمتر از ۱۰ درصد، از اسیدهای ذکر شده می باشد.

مدت زمان در معرض قرار گیری اسید با نمونه برای این نمونه ها فوق العاده حائز اهمیت است، چرا که با افزایش این مدت خلل و فرج سطحی افزایش یافته و ساختار مورفولوژیکی سطح آلیاژ را تحت تاثیر خود قرار می دهد.

در این نمونه ها مدت در معرض قرارگیری نمونه ها با اسید ۱۵ ثانیه بود.[۷]

۲ -نمونه سندبلاست شده:

ذرات مورد استفاده برای سندبلاست در این آلیاژ، آلومینیوم اکساید با قطر متوسط ۳ میکرون بود.

نحوه انجام سندبلاست به صورت دمش خودکار با فشار معین بوده و از طرفی نمونه ها با سرعت ۱ دور در دقیقه در محوطه سندبلاست مورد چرخش قرار می گرفتند.

[Downloaded from jrds.ir on 2026-11-13]

[DOR: 20.1001.1.20084676.1389.7.4.8.6]

۳ -نمونه تیتانیوم خالص تجاری:

این نمونه که اصطلاحا به آن Cp-Titanium (Commercial Pure Titanium) گفته می شود فاقد هر گونه عملیات سطحی بوده و به صورت خالص به شکل وایرهایی به قطر ۱/۵ میلیمتر از شرکت Biohorizon آمریکا خریداری گردید.

تهیه عکسهای میکروسکوپ الکترونی

آماده سازی نمونه‌ها جهت SEM:

در مرحله اول چون هدف دیدن سطح نمونه بود و نمونه های ما نیز فلزی بودند، نیازی به آماده سازی سطحی نداشتیم ولیکن در مرحله دوم این مطالعه، پس از فرآیند تثبیت سلولی، برای مشاهده سلولها روی سطح نیاز به پوشش دهی بود که این پوشش به روش رسوب دهی فیزیکی بخار (Physical Vapor Deposition) صورت پذیرفت[۶]. این روش جهت بررسی چسبندگی سلولی به سطوح مورد استفاده قرار گرفت. سلول های فیبروبلاست با مورفولوژی دوکی و کشیده نشانه سلول های زنده با چسبندگی بیشتر و سلول های کروی نشانه سلول های با چسبندگی کمتر بود. نرم افزار (imagej) در بررسی کیفی یافته ها مورد استفاده قرار گرفت.[۵]

پس از انتقال نمونه ها به محل انجام آزمون SEM، نمونه ها توسط چسب روی پایه تثبیت شده و داخل محفظه قرار گرفتند و پس از آن داخل محفظه خلا ایجاد شده و عکس های مورد نظر تهیه شد.

اتوکلاو کردن نمونه ها

پس از تهیه عکس های SEM به دلیل احتمال وجود آلودگی سطحی بر روی نمونه ها از اتوکلاو برای استریل کردن نمونه ها استفاده شد. نمونه های ما در این مطالعه با استفاده از دستگاه AD7 تحت دمای ۱۲۱ درجه سانتیگراد و فشار۱۵ پوند و به مدت ۲۰ دقیقه تحت اتوکلاو قرار گرفتند.

آزمایش زیست سازگاری

ما در این مطالعه از روش تماس مستقیم نمونه (Direct Contact)، استفاده کردیم که روش کار به این صورت بود که، نمونه های سندبلاست شده، اسیداچ شده، تیتانیوم خالص و کنترل منفی و کنترل مثبت هر کدام در یک محیط کشت جداگانه و در تماس مستقیم با سلول‌ها قرار داده شدند. و سپس به مدت حداقل ۱ روز و در دمای (۱± ۳۷) در محیطی مرطوب در انکوباتور قرار داده شدند. پس از آن نمونه ها برداشته شده و سلول‌ها تثبیت می شوند، و سپس با استفاده از ارزیابی های میکروسکوپی، مورفولوژی و تعداد سلول‌های چسبیده به سطح، زیست سازگاری ماده بررسی می شود. [۹،۸]

در این آزمایش از سلول های فیبروبلاست موش (Mouse C_{34}/connective tissue-L929) تهیه شده از بانک سلولی انستیتو پاستور ایران استفاده گردید. ابتدا سلول ها به صورت انبوه در محیط کشت RPMI-1640 دارای ۵۰ واحد پنی سیلین و ۵۰ میکرو گرم استرپتومایسین در میلی لیتر محیط کشت تکمیل شده با ۱۰٪ سرم جنین گوساله در فلاسک کشت در انکوباتور دمای ۳۷ درجه سانتیگراد و ۵٪ گاز کربنیک با رطوبت ۸۵٪ کشت داده شدند. بعد از مدت ۳ الی ۴ روز (تشکیل لایه سلولی) سلول ها بوسیله آنزیم EDTA تریپسین (۰/۲۵٪) از سطح فلاسک کنده شدند و بصورت سوسپانسیون با غلظت ۱×۱۰^{۵} سلول در میلی لیتر تهیه شدند.[۱۰]

[Downloaded from jrds.ir on 2026-11-13]

[DOR: 20.1001.1.20084676.1389.7.4.8.6]

تثبیت سلول:

در این مطالعه از گلوتارآلدئید (Glutaraldehyde) به عنوان فیکساتیو استفاده شد.

گلوتارآلدئید باعث ایجاد پیوندهای متقاطع با پروتئین ها، چربی ها،کربوهیدراتها واسیدهای نوکلئیک می شود که این امر منجر به ایجاد یک شبکه شده وهمه چیزدرجای خود فیکس می شوند.

تثبیت سلول با استفاده از گلوتارآلدئید (Glutaraldehyde) ۲۵درصد و به مدت ۲۴ ساعت در دمای محیط انجام شد.

پس از تثبیت، نمونه ها ۳ مرحله در محلول PBS شستشو داده شدند. از این مرحله به بعد آبگیری نمونه ها در غلظت های افزایش یابنده الکل انجام شد. (به ترتیب به مدت ۳ دقیقه در الکل های ۵۰، ۶۰، ۷۰، ۸۰ و در نهایت نیز ۳ دقیقه در الکل ۱۰۰ درصد). [۱۱]

آزمون سمیت سلولی:

تست MTT (3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide) روشی است که می توان به وسیله آن میزان سلولهای زنده و نحوه تکثیر و ازدیاد سلولی را در اثر در معرض قرارگیری سلول با عوامل خارجی مورد ارزیابی قرار داد. کاهش نمک tetrazolium در حال حاضر به طور گسترده به عنوان یک راه قابل اعتماد برای بررسی گسترش و تکثیر سلولی پذیرفته شده است. تست MTT فعالیت آنزیم دهیدروژناز سلول را اندازه گیری می کند.[۱۲]

مراحل آماده کردن نمونه ها جهت انجام آزمون سمیت سلولی:

پس از انجام مراحل پرداخت، قبل از آزمایش، مراحل تمیز کردن نمونه های آلیاژ به شرح زیر صورت گرفت:

۱ -قرار گرفتن در فسفات بافرسالین (pH=۷/۴) و گذاشتن داخل دستگاه اولتراسونیک (Decon ساخت انگلستان) به مدت ۳۰ دقیقه.

۲ -شستشو با آب مقطر.

۳ -قرار گرفتن در الکل اتانول ۷۰٪ و گذاشتن داخل دستگاه اولتراسونیک (۵ دقیقه).

۴ -شستشو با آب مقطر.

۵ -قرار گرفتن در استون و گذاشتن در دستگاه اولتراسونیک (۱۰ دقیقه).

۶ -شستشو با آب مقطر و خشک کردن آن.

۷ -قرار دادن مجدد در استون و بردن در دستگاه اولتراسونیک (۱۰ دقیقه).

۸ -بردن نمونه‌ها به زیر هود لامینار (مدل BSC-126 شرکت بعثت قم - ایران)، شتسشو با آب مقطر استریل و خشک کردن آنها.

انجام آزمون MTT:

پس از آماده سازی، نمونه های مورد آزمایش به پلیت ۲۴ خانه حاوی ۲۴ خانه یا چاهک سلولی (ساخت Nunc دانمارک) منتقل شدند و به هر چاهک ۰/۵ cc محیط کشت RPMI-1640 (شرکت Gibco، آمریکا) اضافه گردید.

سپس درب آن را محکم بسته و درون فویل آلومینیوم پیچیده و به دستگاه Shaker (HANA - ایتالیا) منتقل گردید. نمونه ها

[Downloaded from jrds.ir on 2026-11-13]

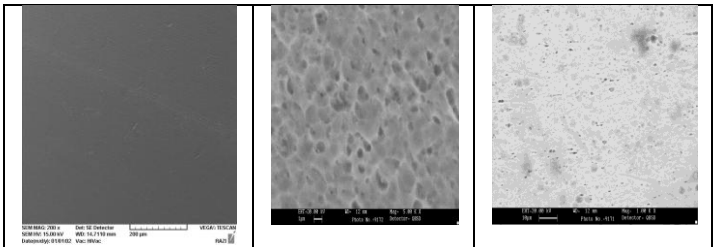
[DOR: 20.1001.1.20084676.1389.7.4.8.6]

بمدت ۵ روز در دمای ۳۷ درجه در این دستگاه تحت لرزش قرار گرفتند با این کار آزاد سازی بیشتر عناصر ازآلیاژ صورت گرفت.
سلولهای فیبروبلاست موش (۹۲۹- L) که از انیستیتو پاستور ایران تهیه شده بودند، در ظرف ۹۶ خانه (Nunc – دانمارک) قرار داده شدند به گونه ای که ۱۰۰۰ سلول در ۲۰۰ میکرولیتر محیط کشت داخل هر خانه (چاهک سلولی) قرار داده شد. سپس ۲۴ ساعت داخل انکوباتور (LEEC – انگلستان) قرار گرفت تا سلولها به کف چاهک سلولی بچسبند. (ویژگی سلولهای فیبروبلاست آن است که دارای استطاله هایی از اطراف هستند که به کمک آن به جداره ظرف می چسبند). پس از گذشت ۲۴ ساعت محیط کشت به وسیله سمپلر (ساخت Gilson فرانسه) از چاهکهای ۹۶ خانه آسپیره گردید و محیط کشت حاوی عناصر آزاد شده که در ظرف ۲۴ خانه تهیه گردیده بودند به ظرف ۹۶ خانه حاوی سلولهای فیبروبلاست با رقت ۲۰۰ میکرولیتر محیط کشت حاوی عناصر آزاد شده، افزوده شده و به مدت ۴۸ ساعت در مجاورت سلولهای فیبروبلاست داخل انکوباتور قرار گرفت. پس از گذشت زمان لازم، ظرف ۹۶ خانه از انکوباتور خارج گردیده و ۲۰ میکرولیتر محلول MTT (شرکت Millipore) به شرح ذیل:
۵ میلی گرم MTT در ۱ میلی لیتر فسفات بافر سالین Merck آلمان به هر چاهک افزوده شد. از آن جا که محلول MTT به نور حساس هست، ظرف ۹۶ خانه توسط فویل پوشانده شد وداخل انکوباتور بمدت ۳ الی ۴ ساعت قرار گرفت. پس ازآن، ظرف ۹۶ خانه از انکوباتور خارج گردیده و هر یک از خانه ها (چاهک های سلولی) آسپیره گردید و ۲۰۰ میکرولیتر DMSO (دی متیل سولفوکساید) [Sigma همراه با ۲۵ میکرولیتر بافر گلایسین Nacl (pH = ۱۰/۵) [SIGMA] جهت حل کردن بلورهای فرومازان به هر یک از خانه ها اضافه شد. سپس ۳ الی ۵ دقیقه تحت لرزش قرار گرفت و نهایتاً در دستگاه [STATEAX Microplate reader – آمریکا] در طول موج ۵۷۰ نانومتر میزان جذب نمونهها اندازه گیری شد. شدت جذب نور، نسبت مستقیم با تعداد سلولهای زنده دارد.[۱۲]

تولید فورامازان با تجزیه و حل شدن آن و اندازه گیری Optical Density(O.D) محلول حاصل، به صورت کمی بررسی شد.
محاسبات آماری جهت مقایسه بین دادهها در گروههای مورد بررسی در برنامه نرمافزاری رایانهای SPSS از طریق آزمون ANOVA و Tukey انجام شد و مقادیر P≤۰/۰۵ از نظر آماری معنیدار در نظر گرفته شد.

یافته ها:

نتایج مطالعه به صورت شکل های ۸-۱ و نمودار ۱ دیده می شود.



نمونه اسیداچ	نمونه سندبلاست	تیتانیوم خالص

شکل ۱- نمونه وایر های مورد آزمایش پس از آماده سازی سطحی. میکروسکوپ الکترونی (SEM) بزرگنمایی x ۱۰۰۰

همانطور که در شکل ۱ دیده می شود نمونه تیتانیوم خالص دارای سطحی صاف و صیقلی و نمونه اسید اچ شده دارای سطحی با

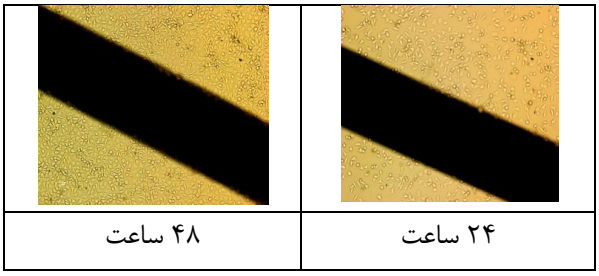
[Downloaded from jrds.ir on 2026-11-13]
[DOR: 20.1001.1.20084676.1389.7.4.8.6]

تخلخلهای ناهمگن و عمق زیاد و نمونه سندبلاست شده دارای سطحی با خلل و فرجهای همگن و کم عمق می باشد.

نتایج حاصل از آزمایشات زیست سازگاری

نتایج آزمایشات زیست سازگاری پس از ۲۴ و ۴۸ ساعت در سه گروه اصلی و گروه کنترل در شکل های ۵-۲ دیده می شوند لازم به ذکر است خطوط سیاه مورب وسط شکل نشان دهنده نمونه ها می باشند که به دلیل عدم امکان عبور نور از آنها در زیر میکروسکوپ نوری به این شکل مشاهده می شوند.

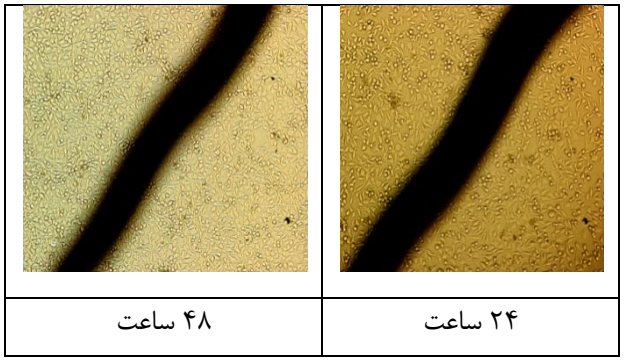
نمونه سند بلاست شده:



شکل ۲- نمونه سند بلاست شده پس از ۲۴ ساعت و ۴۸ ساعت میکروسکوپ (Nikon TE 100) بزرگنمایی x ۲۰۰

همانطور که در شکل ۲ مشهود است، سلول های موجود در اطراف نمونه، حاکی از این امر می باشد که نمونه سند بلاست شده پس از ۲۴ و ۴۸ ساعت، از زیست سازگاری مناسبی برخوردار می باشد و سلولها به خوبی در اطراف نمونه رشد کرده اند. با افزایش زمان نیز هیچگونه تغییری در روند رشد سلولی در مقایسه با نمونه کنترل منفی دیده نمی شود.

نمونه اسیداچ:



شکل ۳- نمونه اسید اچ شده پس از ۲۴ ساعت و ۴۸ ساعت میکروسکوپ (Nikon TE 100) بزرگنمایی x ۲۰۰

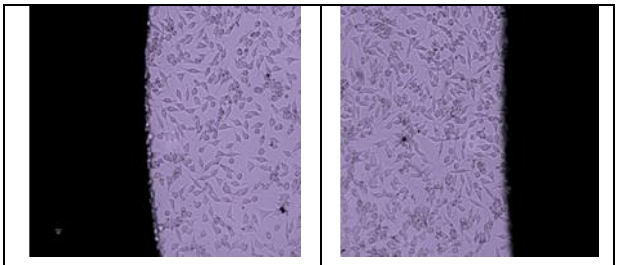
تعداد و مورفولوژی سلول های موجود در اطراف نمونه اسیداچ نیز حاکی از این امر می باشد که نمونه اسیداچ شده پس از ۲۴ و ۴۸ ساعت از زیست سازگاری مناسبی برخوردار می باشد.

همانطور که در تصویر ۳ مشاهده می شود، رشد سلولی در اطراف نمونه اسیداچ شده نیز همانند نمونه سندبلاست شده، مناسب و قابل قبول می باشد.

[Downloaded from jrds.ir on 2026-11-13]

[DOR: 20.1001.1.20084676.1389.7.4.8.6]

نمونه تیتانیوم خالص تجاری:

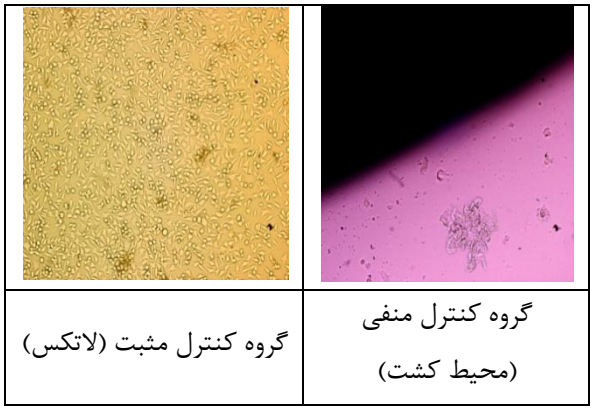


۲۴ ساعت	۴۸ ساعت

شکل ۴- نمونه تیتانیوم خالص پس از ۲۴ ساعت و ۴۸ ساعت میکروسکوپ (Nikon TE 100) بزرگنمایی x ۲۰۰

در شکل ۴ همانطور که مشاهده می شود تعداد زیادی سلول بر روی فصل مشترک بین محیط کشت و فلز قرار دارند.

گروههای کنترل:



گروه کنترل منفی (محیط کشت)	گروه کنترل مثبت (لاتکس)

شکل ۵- گروه های کنترل پس از ۲۴ ساعت و ۴۸ ساعت میکروسکوپ (Nikon TE 100) بزرگنمایی x ۲۰۰

در این آزمون برای این که بتوانیم معیاری جهت مقایسه میزان زیست سازگاری نمونه ها داشته باشیم از محیط کشت کـه نشـانگر رشد کامل سلول می باشد، به عنوان گروه کنترل منفی و از لاتکس که یک ماده سمی است و باعث مرگ سلول هـا مـی شـود، بـه عنوان گروه کنترل مثبت استفاده شد.

طی بررسی در مطالعات قبلی، از آنجایی که لاتکس پلیمری می باشد که سلول روی آن رشد نمی کند،از این ماده به عنـوان نمونـه کنترل مثبت استفاده کردیم.[۱۳]

در عکس گرفته شده از محیط کشت، می توان به مورفولوژی سلول فیبروبلاست L -۹۲۹ موشی پی برد.

این سلولها دوکی شکل و وابسته به سطح می باشند و با تراکم نسبتا یکنواختی روی سطح رشد کرده اند و هیچگونه گرانـولی روی سطح مشاهده نمی شود. در نمونه لاتکس، هیچگونه سلولی روی سطح رشد نکرده است. (شکل ۵)

عکسهای SEM:

برای مقایسه بهتر از سطوح در معرض قرار گرفته شده با محیط کشت از میکروسکوپ الکترونی استفاده شد.

[Downloaded from jrds.ir on 2026-11-13]

[DOR: 20.1001.1.20084676.1389.7.4.8.6]

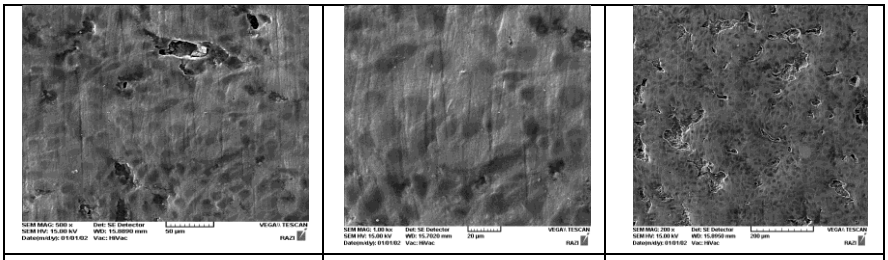
علت انتخاب حالت برگشتی در این نمونه ها نفوذ بیشتر به داخل سطوح نمونه های فلزی بوده و با توجه به آلودگی های به وجود آمـده در نمونه پس از در معرض قرارگیری با محیط کشت این حالت بهینه ترین حالت جهت ایجاد تصاویر می باشد.

ضمنا ذکر این نکته حائز اهمیت است که نمونه ها جهت انجام آزمون میکروسکوپ الکترونی قبل از مرحله کشت سلول هیچ مرحلـه آمـاده سازی را نپذیرفته و پوشش دهی نشده اند و همچنین جهت انجام آزمون میکروسـکوپ الکترونـی بعـد از مرحلـه کشـت و تثبیـت سـلول، پوشش دهی به روش PVD انجام شد.

در بررسی تمام تصاویر SEM از لحاظ تعداد سلول موجود بر روی فصل مشترک آلیاژ و محـیط کشـت، مشـاهده شـد کـه تعـداد بیشترین سلول چسبیده شده به سطح آلیاژ بر روی نمونه های سند بلاست شده موجود بود.

نتایج SEM (میکروسکوپ الکترونی روبشی) حاصل از آزمایشات تثبیت سلولی:

نمونه اسید اچ شده

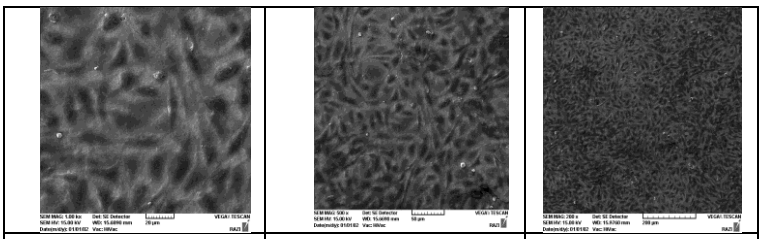


بزرگنمایی ۲۰۰	بزرگنمایی ۵۰۰	بزرگنمایی ۱۰۰۰

شکل ۶- نمونه اسید اچ شده پس از تثبیت سلول

همانطور که در شکل ۶ مشاهده می شود یک مونولایر روی سطح تشکیل شده است و سلولها به داخل حفرات رشد نکرده اند.

نمونه سندبلاست شده



بزرگنمایی ۲۰۰	بزرگنمایی ۵۰۰	بزرگنمایی ۱۰۰۰

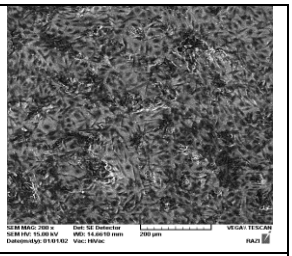
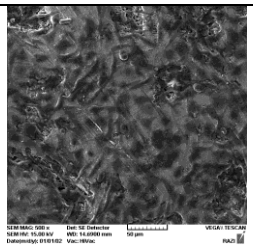
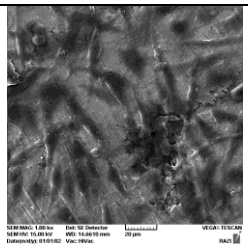
شکل ۷- نمونه سندبلاست شده پس از تثبیت سلول

مطالعه SEM نشان داد که سلولها در مجاورت نمونه سندبلاست شده چسبندگی بیشتری نسبت به نمونه اسـید اچ شـده و نمونـه تیتانیوم خالص تجاری داشتند. سلولها در مجاورت نمونه سندبلاست شده بیشتر کشیده بودند و تعداد سلولهای دوکـی بطـور معنـا داری از مورفولوژی کروی بالاتر بود، درصورتی که سلولها در مجاورت نمونه اسید اچ شده از پراکندگی کمتری برخوردار بودند.

[Downloaded from jrds.ir on 2026-11-13]

[DOR: 20.1001.1.20084676.1389.7.4.8.6]

نمونه تیتانیوم خالص

		
بزرگنمایی ۲۰۰	بزرگنمایی ۵۰۰	بزرگنمایی ۱۰۰۰

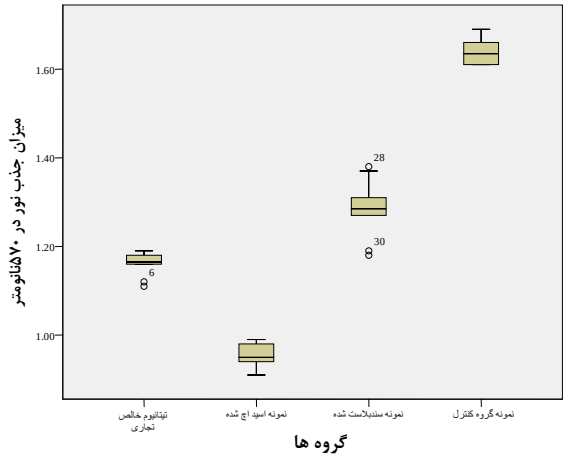
شکل ۸- نمونه تیتانیوم خالص پس از تثبیت سلول

در تصویر ۸ سطح تیتانیوم خالص تجاری، مشخص گردید که رشد و تمایز سلولی روی این سطح، به صورت غیر یکنواخت انجام شده است.

نتایج آزمون MTT:

میزان جذب نور در این آزمون نسبت مستقیم با تعداد سلولهای زنده دارد.نتایج میزان جذب نور در گروه تیتانیوم خالص ۰/۱۷± ۱/۱۶ و در گروه اسید اچ ۰/۲۳± ۰/۹۵ و در گروه سندبلاست ۰/۵۸± ۱/۲۸ و گروه کنترل ۰/۳۲ ± ۱/۶۳ بود که حاکی از آن بود که با توجه به آزمون ANOVA اختلاف بین چهار گروه از لحاظ آماری معنا دار شده است که این تفاوت در بین دو گروه سندبلاست و اسید اچ، معنادار مشاهده گردیده است ($P < ۰/۰۵$)

بعد از نمونه کنترل، به ترتیب نمونه سندبلاست شده، نمونه تیتانیوم خالص تجاری و نمونه اسیداچ شده بیشترین میزان جذب نور را از خود نشان داده اند یعنی به ترتیب بیشترین سلول فیبروبلاست زنده در این گروه ها قرار داشته است و اختلاف معنی داری بین گروه سندبلاست شده با گروه اسید اچ دیده شد ($P < ۰/۰۵$)



نمودار ۱- نتایج آزمون MTT به تفکیک گروه های مورد بررسی

[Downloaded from jrds.ir on 2026-11-13]

[DOR: 20.1001.1.20084676.1389.7.4.8.6]

بحث:

اخیرا مطالعات بسیاری انجام شده است که گزارش می کند، توپوگرافی سطح، زبری سطح، قابلیت ترشوندگی و ترکیب شیمیایی، ممکن است در جذب پروتئین روی سطح تیتانیوم و رفتار سلولی روی سطح تاثیرگذار باشد، اگر چه مکانیزم چگونه تاثیرگذاری آنها روی سلول هنوز به صورت کامل شناخته نشده است. (۱۴)

با توجه به نتایج این مطالعه، کشت سلولی نشان داد که در نمونه هایی که سندبلاست شده بودند، اولاً تراکم سلولها در اطراف این نمونه ها خصوصاً در فصل مشترکشان با محیط سلولی خیلی بیشتر بود که این خود نشان دهنده این می باشد که در مقایسه با سطحی که اسیداچ شده بود، نمونه های دارای تخلخل بیشتر، تعداد سلولهای زنده شان بیشتر بوده است و همچنین می توان این گونه نتیجه گرفت که، اولا سطح نمونه سندبلاست شده دارای زیست سازگاری مناسبی است و دیگر اینکه، هیچگونه مواد یا یونهای آزاد شده از بالک ماده دارای سمیتی نبوده است، زیرا در غیر این صورت، رشد سلولی در محیط کشت اتفاق نمی افتاد.(۱۵)

طی مطالعه صورت گرفته توسط Onuki و همکاران نیز به این مطلب دست یافتند که با توجه به تشکیل لایه اکسید روی سطح تیتانیوم، سمیتی در آن دیده نشده است. (۱۶)

دلیل اسیداچ کردن نمونه، بالا بردن کشش سطحی بوده است که با توجه به بالا رفتن کشش سطحی، می توان انتظار داشت که زاویه تر شوندگی افزایش یابد که با این امر تمایل چسبندگی سلول روی سطح افزایش می یابد و لیکن دلیل عدم رشد مناسب سلول روی سطوح اسیداچ را می توان به عمق زیاد حفرات ایجاد شده روی سطح نمونه مربوط دانست. (۱۴)

از طرفی چون نمونه های مورد استفاده در این مطالعه فلزی بوده اند، امکان مشاهده سطح نمونه توسط میکروسکوپ اینورت نبود و سیاهی مشاهده شده در عکسها نشان دهنده نمونه می باشد و به همین علت سلولها را روی سطح تثبیت کردیم و توسط میکروسکوپ الکترونی مورد ارزیابی قرار دادیم.

با توجه به اینکه در نمونه های سندبلاست شده زبری بیشتری ایجاد شده بود مشخص شد که زبری سطح تاثیر بیشتری در چسبندگی سلولی، رشد سلولی، زیست سازگاری و همچنین تراکم بیشتری از تجمع سلولی را در فصل مشترک می تواند داشته باشد.

پس می توان از این مطالعه این طور نتیجه گرفت که ایمپلنت ها در درجه اول باید از تخلخل سطحی مناسب برخوردار باشند تا اینکه نسبتاً در کشش سطحی پایین تر یا تر شوندگیشان مد نظر قرار گیرد.

تفاوت قابل ملاحظه ای از تعداد سلولها در محیط کشت بین نمونه های تیتانیوم خالص تجاری، تیتانیوم سندبلاست شده و اسیداچ شده دریافت نشد، ولیکن در فصل مشترک بین محیط کشت سلولی و فلز تفاوت قابل ملاحظه ای بود به طوری که در نمونه سندبلاست شده سلولها خیلی راحت تر متراکم شده و روی سطح چسبیده بودند.

این امر نشان دهنده این می باشد که اگر چه در تمامی این نمونه ها، فیلم نازکی از اکسید تیتانیوم روی سطح تشکیل می شود، ولی روند تشکیل این لایه وابسته به زیر ساختی می باشد که اگر این زیر ساختار دارای تخلخل مناسب باشد طبیعتاً لایه اکسید بوجود آمده روی آن نیز دارای تخلخل مناسب خواهد بود و آن تخلخل مناسب می تواند باعث بهبود عملکرد چسبندگی سلول شود.

سلولهای فیبروبلاست L -۹۲۹ در مجاورت نمونه سندبلاست شده بیشتر کشیده بودند و تعداد سلولهای دوکی بطور معنا داری از

[Downloaded from jrds.ir on 2026-11-13]

[DOR: 20.1001.1.20084676.1389.7.4.8.6]

مورفولوژی کروی بیشتر بود، درصورتی که سلولها در مجاورت نمونه اسید اچ شده از پراکندگی کمتری برخوردار بودند که این امر نشان دهنده چسبندگی بهتر سلول روی سطح سندبلاست شده می باشد. [۶]

دلیل استفاده از سلول فیبروبلاست در این مطالعه این بود که، اولاً این سلول در پروسه ترمیم اکثر نسوج همبندی مهمترین نقش را دارد و از نظر متابولیک بسیار فعال می باشد. ثانیاً به میزان فراوان در بافت های همبندی حضور دارند و ثالثاً اینکه از نظر تکنیک های کشت سلولی قابل تولید بوده و از خصوصیات لازم برخوردار می‌باشند.

.

نتیجه گیری:

سطوح سندبلاست شده بهترین سطح را از نظر چسبندگی سلولهای فیبروبلاست ۹۲۹- L و همچنین کمترین سمیت سلولی را در مقایسه با سایر نمونه ها، از خود نشان دادند.

آلیاژهای پایه تیتانیوم، آلیاژهای زیست سازگاری می باشند، لیکن با توجه به عملیاتی سطحی مناسب اتصال سلولی بهتری در آن‌ها برقرار می‌شود.

هر کدام از روشهای اصلاح سطح استفاده شده در این مطالعه روی زیست سازگاری سطح تاثیر داشتند، ولیکن اثر سندبلاست در صورتی که سطح منظم و همگنی از خلل و فرج (بین ۵-۲ میکرون) به وجود آید می تواند روند رشد و چسبندگی سلولهای فیبروبلاست۹۲۹- L را بهبود بخشد و همچنین نتایج حاصل از آزمون سمیت سلولی به ما نشان داد که سطوح آلیاژ سندبلاست شده، کمترین میزان سمیت را نسبت به سایر گروه‌ها از خود نشان می دهد.

[Downloaded from jrds.ir on 2026-11-13]

[DOR: 20.1001.1.20084676.1389.7.4.8.6]

References:

1. Ishizawa H, Ogino M. Formation and characterization of anodic titanium oxide films containing Ca and P. J Biomed Mater Res 1995 Jan; 29(1):65-72.

2. Bronzino Joseph D. The Biomedical Engineering Handbook. 2nd Edition: CRC Press: 2000; p: 578-582.

3. Kasemo B, Lausmaa J. The Role of Surface Properties and Processes. Department of Applied Physics Chalmers University of Technology 1994 Oct; 102 Suppl 5:41-5.

4. Kasemo B, Gold J. Implant Surfaces and Interface Processes. Adv Dent Res 1999 Jun;13:8-20

5. Guizzardi S, Gallic, Martini D, Belletis, Tiuti A, Raspatim, etal. Different titanium sutface treatment influences human mandibular osteoblast respouse. J periodontal 2004 Feb; 75(2): 273-82.

6. Carrion J, Colón J, Gonzalez M, Rivera J, Rodriguez G. Biomechanics of Orthopedic Fixations. Applications of Engineering Mechanics in Medicine, GED – University of Puerto Rico, Mayaguez. 2004 May; 1-26.

7. Park J, Lakes RS. Biomaterials 3rd edition 2007. Springer Science; p: 107-113.

8. Ratner BD, Hoffman AS, Schoen FJ, Lemons JE. Biomaterials Science an Introduction to Materials in Medicine, 2nd edition. London: Elsevier Academic Press; 2004: 270-275

9. Pizzoferrato A, Ciapetti G. Cell culture methods for testing Biocompatibility. Laboratory for Biocompatibility Research on Implant Materials 2004; 15(3):173-180.

10. Freshney R I, Freshney MG, Grafström RC. Culture of Epithelial Cells, 2nd edition. John Wiley & Sons, Inc. New York, USA. 2002: 86-93

11. Dadsetan M, Mirzadeh H, Sharifi Sanjani N, Daliri M. Cell behavior on laser surface-modified polyethylene Terephthalate in vitro, John Wiley & Sons, Inc. J Biomed Mater Res. 2001 Nov;57(2):183-9.

12. Sjögren G, Sletten G, Dahl JE. Cytotoxicity of dental alloys, metals and ceramics assessed by Millipore filter agar overlay and MTT tests. J Prosthet Dent 2000 Aug; 84(2):229-36.

13. Uzumaki E.T, Lambert C.S, Santos A.R, Zavaglia C.A.C. Surface properties and cell behaviour of diamond-like carbon coatings produced by plasma immersion. Elsevier. Sep 2006; 515(1): 293-300.

14. Buser D. Effects of various titanium surface configurations on osseointegration and clinical implant stability. Proceedings of the 3rd European Workshop on Periodontology Implant. Quintessence Publ. 1999: 88-101.

15. Ferraris S, Spriano S, Bianchi CL, Cassinelli C, Vernè E. Surface modification of Ti-6Al-4 V alloy for biomineralization and specific biological response: part II, alkaline phosphatase grafting.J Mater Sci Mater Med. 2011 Jun 10. [Epub ahead of print]

16. Onuki H, Sakagami H, Kobayashi M, Hibino Y, Yokote Y, Nakajima H, et al. Effect of Contact with Titanium Alloys on the Proliferation of Mouse Osteoblastic Cells in Culture. In vivo. 2010 Jan-Feb; 24(1):29-37.

[Downloaded from jrds.ir on 2026-11-13]

[DOR: 20.1001.1.20084676.1389.7.4.8.6]

[DOR: 20.1001.1.20084676.1389.7.4.8.6] [Downloaded from jrds.ir on 2026-11-13]