

ساخت و بررسی خواص سیمان کلسیم فسفاتی حاوی داروی جنتامایسین سولفات

معصومه حق بین نظر پاکⁱ؛ مهران صولتی هاشجینⁱⁱ؛ فتح ا... مضطرزادهⁱⁱⁱ و علیرضا میرحبیبی^{iv}

چکیده

امروزه سیمان‌های کلسیم‌فسفاتی به طور گسترده‌ای در ترمیم نقایص استخوانی و دندان‌های به کار می‌روند. این سیمان‌ها خواص زیست‌سازگاری عالی و هدایت رشد استخوان دارند. در این تحقیق، سیمان کلسیم‌فسفاتی از مخلوط کردن جزء پودری Na_2SO_4 و β -TCP، MCPM و جزء مایع Na_2HPO_4 با نسبت مناسب تهیه شد. زمان گیرش اولیه برابر با ۷ دقیقه و گیرش نهایی ۲۰ دقیقه بود. استحکام فشاری نمونه‌ها نیز در زمان‌های مختلف قرارگیری در انکوباتور اندازه‌گیری شد. سپس داروی جنتامایسین سولفات با غلظت 80mg/2ml به نسبت ۱ به ۶ به جزء مایع افزوده شد. ریزساختار ماده در سطح شکست نمونه‌ها با میکروسکوپ الکترونی روبشی (SEM) مطالعه شد. مقدار داروی رها شده در محلول رینگر در زمان‌های مختلف اندازه‌گیری شد. بررسی‌ها نشان داد که میزان رهایش دارو در روز پانزدهم به مقدار بیشینه ۳۵ درصد مقدار اولیه رسیده است.

کلمات کلیدی

سیمان کلسیم فسفات، جنتامایسین سولفات، رهایش دارو

Preparation and Analysis of the Properties of Calcium Phosphate Cement Loaded with Gentamycin Sulfate Drug

M. Haghbin Nazarpak ;M. Solati.; F. Moztarzadeh; A.R. Mirhabibi.

ABSTRACT

Calcium Phosphate Cements are widely used in repairing bone and dental defects recently. These cements exhibit excellent biocompatibility and osteoconductivity. In this research, Calcium Phosphate Cements are prepared with the ratio of $l/p=0.4$ by mixing powder components consists of Na_2SO_4 , β -TCP, MCPM and liquid component Na_2HPO_4 (4 weight percent concentration). The initial setting time was equal to 7 minutes and the final setting time is 20 minutes. The compressive strength of samples is measured in different times of incubation. Then, the gentamycin sulfate drug is added to liquid component with concentration of 80mg/2ml in ratio of 1/6. The results imply that the initial and final setting time of samples are decreased to 5 and 15 minutes, respectively due to the presence of sulfate ion in the drug. However, compressive strength of samples increased after drug addition. Microstructure of the fracture surface is studied with scanning electron microscope (SEM). The amount of the drug released in ringer solution is measured within different incubation times. The analysis revealed the fact that the amount of the drug release reached its maximum value in 15th day that is 35% of its primary value.

ⁱ دانشگاه صنعتی امیرکبیر، دانشکده مهندسی پزشکی: mhaghbin@cic.aut.ac.ir

ⁱⁱ دانشگاه صنعتی امیرکبیر، دانشکده مهندسی پزشکی

ⁱⁱⁱ دانشگاه صنعتی امیرکبیر، دانشکده مهندسی پزشکی

^{iv} دانشگاه علم و صنعت ایران، دانشکده مهندسی مواد و متالورژی

KEYWORDS

Calcium Phosphate Cement, Gentamycine Sulfate, Drug release

۱- مقدمه

هیدروکسی آپاتیت دارای نقص کمبود کلسیم، برآشیتی و کلسیم فسفات آمورف [۲].

در درمان‌های کلینیکی، اگر ناحیه تحت عمل جراحی دچار عفونت شود، تاثیر درمان کاهش می‌یابد؛ از این رو، تحقیقات به سوی استفاده از داروهای مقاوم به عفونت در سیمان و رهایش کنترل شده دارو به منظور افزایش اثر درمان و کاهش اثرات جانبی دارو سوق پیدا کرده است. این روش برای درمان تومورها، پوکی استخوان و نظایر آن؛ که به طور معمول نیاز به درمان‌های طولانی و دردناک دارند، راه حل مناسب و مؤثری است [۱۰]، [۱۱].

۲- روش تحقیق

۲-۱- مواد و روش‌ها

بخش پودری سیمان شامل بتا-تری کلسیم فسفات (β -TCP)، منوکلسیم فسفات منوهیدرات (MCMP) و سولفات سدیم است. پودر β -TCP از ترکیب یک مول دی کلسیم فسفات دی هیدرات و یک مول کربنات کلسیم تهیه شد که با آب مقطر به مدت ۲ ساعت بالمیل شدند تا توزیع ذرات یکنواختی به دست آید؛ سپس به مدت ۲ ساعت تادمای 100°C حرارت داده شدند و تادمای 900°C در بوته آلومینایی با آهنگ $\text{min گرمایش} / \text{C}^\circ$ ۱۰ حرارت داده شدند و به مدت ۲ ساعت در این دما ماندند و سپس به آن اجازه دادیم تا به دمای اتاق برسد [۱۲] سپس همراه با منوکلسیم فسفات منوهیدرات (Fluka 21053) و سولفات سدیم (Merck No.1.0664) به ترتیب با درصد های وزنی $4/78$ ، $9/20$ و $7/0$ با جزء مایع (Na_2HPO_4) استفاده شد. داروی مورد استفاده، آنتی بیوتیک جنتامایسین سولفات به نام تجاری "جنتامایسین ۸۰" به صورت آمپول ۲ میلی لیتری (داروسازی اکسیر) بود.

۲-۲- تهیه سیمان

ابتدا جزء پودری به مدت یک ساعت در ظرف پلی اتیلن در آسیاب ماهواره‌ای قرار داده شد تا پودری همگن به دست آید. سپس مقدار معینی پودر و مایع با نسبت مایع به پودر برابر با $4/0$ در یک ظرف شیشه‌ای با یکدیگر مخلوط شد. به منظور اطمینان از تهیه سیمان یکنواخت، خمیر سیمان با اسپاچول ورز داده شد.

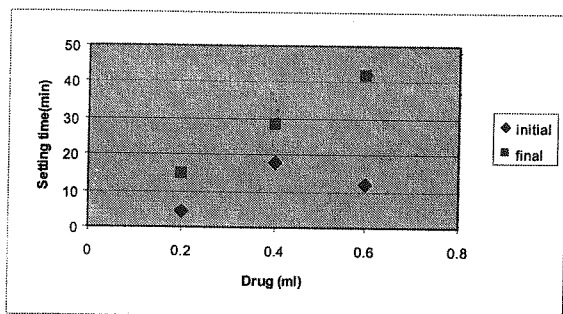
اندازه گیری زمان گیرش به وسیله سوزن گیلنور طبق استاندارد ASTM C266 [۱۳] انجام شد. برای گیرش اولیه از

تحقیقات برای یافتن ماده‌ای مناسب برای ترمیم یا جانشینی استخوان آسیب دیده بدن انسان بیش از یک قرن سابقه دارد؛ اما هنوز هم استخوان خود بیمار مناسب ترین ماده برای پیوند به شمار می‌رود. با این وجود، ضمن داشتن محدودیت‌هایی نظیر کمبود ذخیره پیوند استخوانی (به ویژه در کودکان)، به جراحی ثانویه (در مکان برداشت پیوند) نیاز دارد [۱]، [۲]. پیوند از شخص دیگر نیز خطر بزرگ انتقال بیماری‌هایی نظیر هپاتیت و HIV را در بر دارد؛ از این رو، به منظور حذف این مشکلات، تلاش‌ها به سمت یافتن ماده جایگزین مناسب استخوان معطوف شد [۱].

مواد مختلفی، به ویژه سرامیک‌ها، برای درمان نقایص استخوانی استفاده شده‌اند که از آن جمله می‌توان به سرامیک‌های کلسیم فسفاتی شامل هیدروکسی آپاتیت، تری کلسیم فسفات یا کامپوزیت‌های آنها اشاره کرد. این ترکیبات دارای ویژگی تشویق رشد استخوان عالی، زیست‌سازگاری بسیار مناسب، غیرسرطان‌زایی و اتصال مستقیم با بافت هستند [۲] و به علت شباهت زیاد با فاز مینرالی استخوان، بیواکتیو بودن و هدایت رشد استخوان، به منظور بازسازی استخوان به کار می‌روند [۴]. این مواد به شکل‌های مختلف مانند ذره یا قطعه متراکم یا متخلخل استفاده می‌شوند. از جمله محدودیت‌های استفاده به صورت قطعه، مشکل جورشدن شکل قطعه با شکل نقص استخوان است. استفاده از ذرات نیز با مشکل مهاجرت دیر یا زود ذرات از مکان ایمپلانت به بافت اطراف مواجه است. در این میان سیمان‌های کلسیم فسفاتی یک کشف مهم در جراحی بازسازی نقص استخوانی محسوب می‌شوند [۲]، [۵]، [۶].

اساس عملکرد سیمان‌های کلسیم فسفاتی، واکنش کلسیم فسفات‌های اسیدی و بازی در حضور یک فاز مایع است. ترکیب سیمان از دو جزء ضروری مایع و پودر تشکیل می‌شود. جزء پودری، مخلوطی از ذرات کلسیم فسفات خشک است و جزء مایع نیز با آب دیونیزه تولید می‌شود. مخلوط کردن این دو جزء به نسبت مناسب، سبب فوق‌اشباع شدن مایع و تشکیل رسوبی می‌شود که یک جرم خودگیر است. از درهم گیر کردن کریستال‌های رسوب، توده سیمان استحکام می‌یابد. زمان گیرش سیمان را می‌توان با افزودن ترکیبات معین به محیط مایع کنترل کرد [۷]-[۹] بر اساس محصول نهایی واکنش گیرش، چهار نوع سیمان کلسیم فسفاتی وجود دارد: آپاتیتی،

سپس با افزودن حجم‌های مختلف داروی جنتامایسین سولفات با نسبت $l/p=0/4$ به جزء مایع، جزء پودری و مایع با یکدیگر مخلوط شده و زمان‌های گیرش اولیه و نهایی اندازه‌گیری شد. مشاهده شد که در مقدار ۰/۲ ml دارو، زمان گیرش اولیه ۵ دقیقه و زمان گیرش نهایی ۱۵ دقیقه است. نتایج به دست آمده در شکل (۲) ارائه شده است.



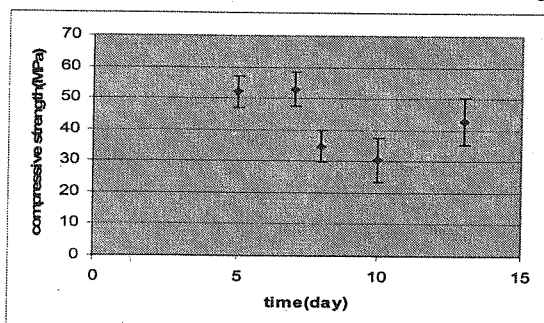
شکل (۲): اندازه‌گیری زمان گیرش اولیه و نهایی سیمان با افزودن مقادیر مختلف دارو

از مقایسه زمان‌های گیرش قبل و بعد از افزودن دارو می‌توان دریافت که حضور یون سولفات در دارو سبب کاهش زمان گیرش سیمان می‌شود و مقدار زمان گیرش را به مقادیر قابل قبول برای کاربردهای کلینیکی نزدیک می‌سازد.

۲-۳-۲ استحکام فشاری

از میان خواص مکانیکی مواد پرکننده استخوان، استحکام فشاری بیش از سایر خواص بررسی شده است. مقدار استحکام فشاری سیمان استخوان به عوامل متعددی نظیر اندازه ذرات پودر، مواد افزودنی و نسبت l/p و غلظت جزء مایع بستگی دارد.

مقدار استحکام فشاری نمونه‌های سیمان فاقد دارو پس از قرارگیری در انکوباتور پس از گذشت ۵، ۱۰، ۷ و ۱۳ روز اندازه‌گیری شد که نتایج آن در شکل (۳) مشاهده می‌شود. همان‌طور که از داده‌ها برمی‌آید، اعداد حاصل در یک محدوده قرار دارند و با گذشت زمان تغییر قابل توجهی در استحکام مشاهده نمی‌شود.



شکل (۳): استحکام فشاری اندازه‌گیری شده پس از گذشت روزهای مختلف انکوباسیون

سوزنی به قطر 0.05 ± 0.12 mm و طول ۵ mm و وزنه 113.4 ± 0.5 گرمی و برای گیرش نهایی از سوزنی به قطر 0.05 ± 0.06 mm و طول ۵ mm و وزنه 453.6 ± 0.5 گرمی استفاده شد.

نمونه‌های استحکام به قطر ۱۰ mm و ارتفاع ۱۲ mm در قالب فولادی با اعمال فشار ۱۲ MPa شکل داده شدند و پس از ۲۴ ساعت قرارگیری در انکوباتور (دمای 37°C و رطوبت ۱۰۰ درصد) در محلول رینگر در همین شرایط قرار گرفتند. پس از گذشت زمان‌های مختلف، استحکام فشاری نمونه‌ها با دستگاه Zwick/Roell Universal testing machine با آهنگ اعمال نیروی ۱ mm/min اندازه‌گیری شد.

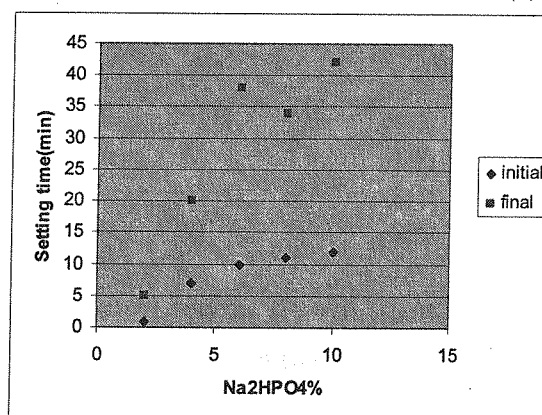
مطالعات آنالیز فازی پراش پرتو ایکس و طیف سنجی مادون قرمز و مشاهده ریز ساختار نیز بر روی نمونه‌ها انجام گرفت.

برای تعیین میزان رهایش دارو، هر یک از نمونه‌های استوانه‌ای در ۲۵ ml محلول رینگر در انکوباتور (دمای 37°C و رطوبت ۱۰۰ درصد) قرار گرفتند و پس از گذشت زمان‌های مختلف، مقدار داروی آزاد شده، به وسیله تکنیک کروماتوگرافی با کارایی بالا (HPLC)، با استفاده از روش [۱۴] اندازه‌گیری شد.

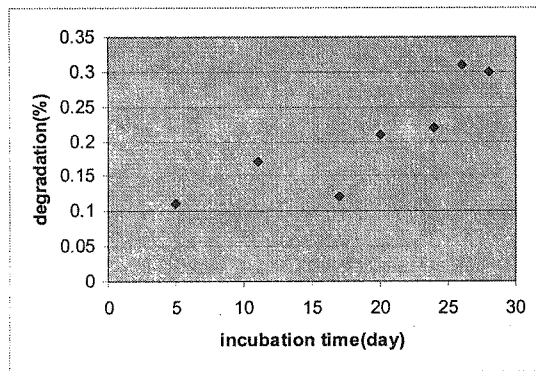
۲-۳-۳ نتایج و بررسی

۲-۳-۱ زمان گیرش

مقدار مشخص پودر سیمان با نسبت $l/p=0/4$ با جزء مایع Na_2HPO_4 در غلظت‌های مختلف در یک ظرف شیشه‌ای مخلوط شد و خمیر سیمان در چهار قالب برنجی مکعبی با اضلاع ۱۰ mm قرار داده شد و زمان گیرش اولیه و نهایی با استفاده از سوزن گیلور تعیین شد. در Na_2HPO_4 ۴٪، زمان گیرش اولیه ۷ دقیقه و گیرش نهایی ۲۰ دقیقه به دست آمد که در شکل (۱) ارائه شده است.



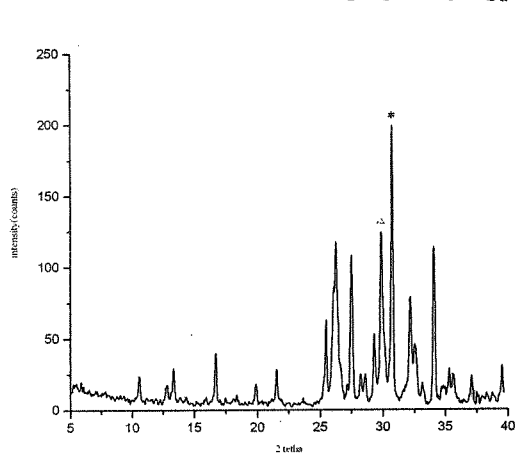
شکل (۱): زمان گیرش اولیه و نهایی سیمان در غلظت‌های مختلف جزء مایع



شکل (۶): درصد تخریب نمونه ها در زمانهای مختلف انکوباسیون

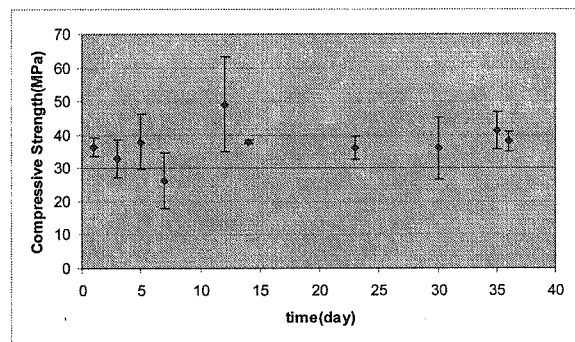
۲-۳-۵ آنالیز فازی

پیک های پراش پرتو ایکس نمونه ها پس از قرار گیری به مدت های ۲، ۹ و ۱۶ روز در محلول رینگر بررسی شد. همانطور که در شکل های (۷) تا (۹) مشاهده می شود وجود پیک های واضح و بلند β -TCP طبق JCPDS 9-169 در $d=2.88, 2.61, 3.21, 3.45, 1.73$ و $d=2.96, 3.35, 3.37, 2.72$ در JCPDS 9-80 نیز طبق 1.85 تایید کننده فاز نهایی تشکیل شده مونیتیت β -TCP می باشد. این نتایج با طیف سنجی مادون قرمز نیز بررسی شدند که در شکل (۱۰) ارائه شده است. وجود پیک های متعلق به مونیتیت شامل پیک مربوط به آب در 1620 cm^{-1} و پیک مربوط به HPO_4^- در 533 cm^{-1} و نیز پیک های 3200 cm^{-1} و 1630 cm^{-1} مربوط به OH^- و 1070 cm^{-1} و 962 cm^{-1} مربوط به PO_4 و سه گانه خمشی PO_4 در 635 cm^{-1} و 605 cm^{-1} و 575 cm^{-1} تایید کننده این امر است [۱۵].



شکل (۷): الگوی پراش پرتو ایکس پس از ۲ روز قرارگیری در محلول رینگر

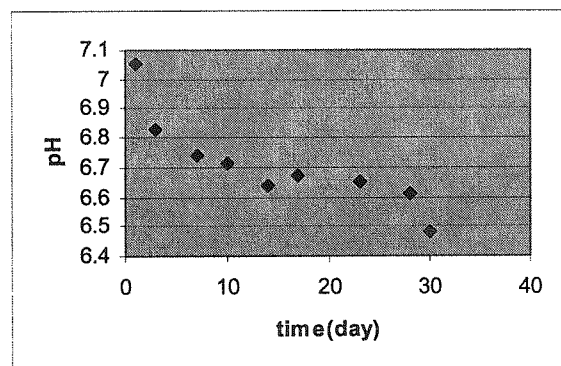
در مرحله بعد مقدار 0.2 ml دارو به نمونه ها افزوده شد و سپس مقدار استحکام فشاری پس از گذشت ۰.۱، ۰.۵، ۰.۷، ۱.۲، ۱.۴، ۲.۳، ۳.۵ و ۳.۶ روز اندازه گیری شد که نتایج حاصل در شکل (۴) مشاهده می شود. همانطور که مشاهده می شود اعداد به دست آمده در روزهای مختلف تفاوت چندانی ندارند.



شکل (۴): استحکام فشاری نمونه های حاوی دارو پس از گذشت روزهای مختلف

۲-۳-۳ تغییر pH

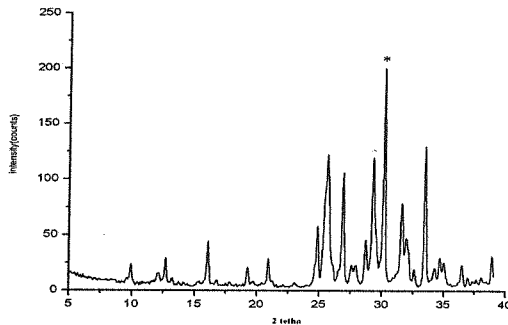
نمونه های استوانه ای سیمان در 25 ml محلول مشابه بدن PBS قرار گرفتند و میزان pH آنها پس از زمان های مختلف اندازه گیری شد که در شکل (۵) ارائه شده است. کاهش میزان pH تا رسیدن به pH تعادلی با افزایش زمان انکوباسیون مشاهده می شود که به علت رهاسدن اسید با پیشرفت واکنش گیرش سیمان است.



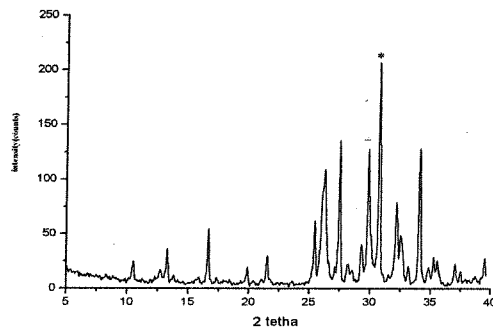
شکل (۵): تغییرات pH با افزایش زمان غوطه وری

۲-۳-۴ تخریب سیمان

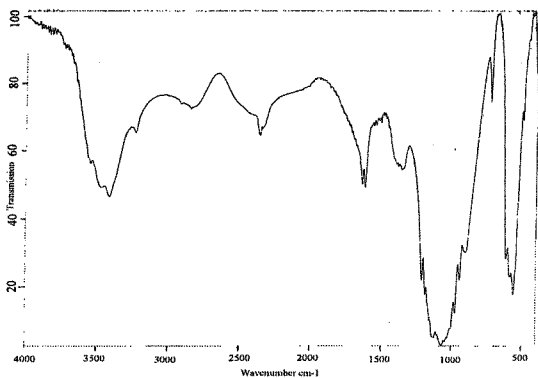
میزان تخریب سیمان در محلول مشابه بدن (PBS) با توزین نمونه های استوانه ای سیمان در زمان های مختلف محاسبه شد. همانطور که در شکل (۶) مشاهده می شود با افزایش زمان انکوباسیون، میزان تخریب افزایش می یابد.



شکل (۸): الگوی پراش پرتو ایکس پس از ۹ روز قرارگیری در محلول رینگر



شکل (۹): الگوی پراش پرتو ایکس نمونه ها پس از ۱۶ روز قرارگیری در محلول رینگر



شکل (۱۰): طیف سنجی مادون قرمز پس از ۹ روز قرارگیری در محلول رینگر

بررسی‌های آنالیز فازی بیانگر این است که ترکیب سیمان تشکیل شده حاوی فازهای مونتیت و تری‌کلسیم فسفات است. دلایل این امر به طور خلاصه به شرح زیر است:

- (۱) استفاده از آسیاب سیاره‌ای پرانرژی با اعمال نیروی مکانیکی شدید به MCPM، مشوق تغییر فاز آن می‌شود و فاز نهایی، بسته به نسبت Ca/P، مونتیت یا هیدروکسی آپاتیت است.
- (۲) اعمال فشار در شکل‌دهی سیمان سبب خروج آب شده و مانع ایجاد محیط مناسب برای تشکیل

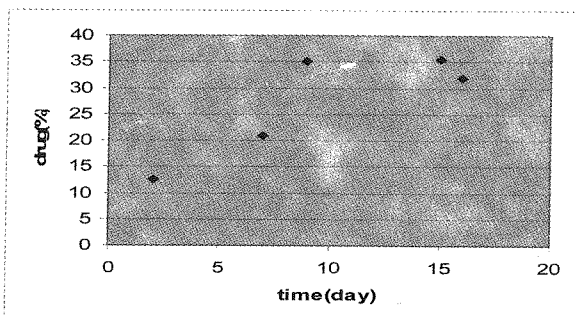
براشیت می‌شود.

(۳) وجود محیط غیر اشباع از یون‌های Ca^{2+} ، HPO_4^- سبب انحلال سیمان براشیتی می‌شود؛ به این معنی که در صورت ثابت نگاه نداشتن غلظت و شرایط محیط غوطه‌وری و استاتیک بودن محیط، سیمان دیگر حل نمی‌شود که این امر را سایر محققان نیز تایید کرده‌اند [۱۶].

(۴) وجود محلول‌های بافر حاوی یون‌های ارتوفسفات سبب تبدیل براشیت به مونتیت حتی در دمای اتاق و pH های متوسط می‌شود. در حالی که عموماً تصور بر این است که تبدیل براشیت به مونتیت تنها در دمای بالای 60°C و pH بسیار کم در حضور اسید اضافی صورت می‌گیرد [۱۷].

۲-۳-۶ رهایش دارو

میزان داروی رها شده در محلول رینگر پس از قرارگیری نمونه‌های استوانه‌ای در ۲۵ ml محلول رینگر در زمان‌های ۲، ۷، ۹، ۱۵ و ۱۶ روز اندازه‌گیری شد. نتایج در شکل (۱۱) آورده شده است.



شکل (۱۱): اندازه‌گیری میزان داروی رها شده در محلول رینگر در زمان‌های مختلف

همان طور که در شکل مشاهده می‌شود، مقدار داروی رها شده به تدریج افزایش یافته و در روز پانزدهم به مقدار بیشینه خود رسیده و ۳۵ درصد از کل داروی مصرفی وارد محلول شده است. پس از طی این مدت، روند رهایش دارو کاهش تدریجی است.

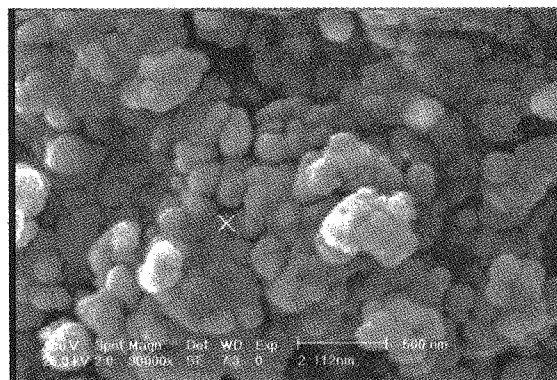
۲-۳-۷ مشاهده ریزساختار

پس از اندازه‌گیری استحکام، ریزساختار نمونه‌های سیمان در سطح شکست در زمان‌های ۱۳، ۱۵ و ۲۰ روز در انکوباتور و نیز ۱۴، ۱۶ و ۲۱ روز قرارگیری در محلول رینگر مطالعه شد. همانطور که در شکل های (۱۲-الف) و (۱۲-ب) مشاهده می‌شود ساختار سیمان حفرات به هم پیوسته دارد و با گذشت زمان ذرات سیمان با اتصال به یکدیگر تشکیل ذرات بزرگتری می‌دهند و از حالت کروی به شکل میله‌ای درمی‌آیند.

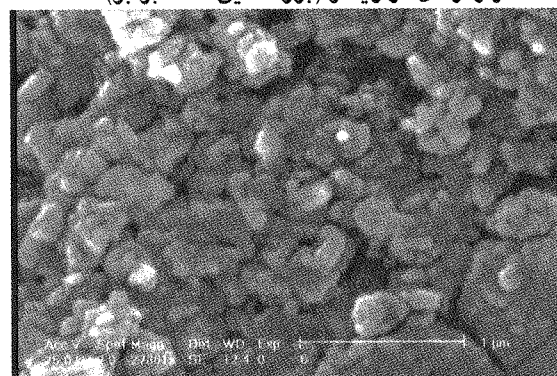
۳- نتیجه

سیمان کلسیم فسفاتی با موفقیت تهیه شد و خواص مکانیکی و گیرش آن بررسی شد. سپس اثر افزودن داروی جنتامایسین سولفات بر روی خواص سیمان مطالعه شد. نتایج بررسی‌ها نشان داد افزودن دارو سبب بهبود خواص گیرش و استحکام فشاری سیمان می‌شود که این پدیده را می‌توان به حضور یون سولفات در دارو نسبت داد. در ادامه، مقدار داروی ره‌اشده در زمان‌های مختلف اندازه‌گیری شد. نتایج این پژوهش نشان داد که افزودن داروی جنتامایسین سولفات به ترکیب سیمان، نه تنها اثر سوء بر خواص سیمان ندارد؛ بلکه به بهبود آن نیز کمک می‌کند.

بررسی‌ها نشان داد که سیمان تشکیل شده در این تحقیق دارای فازهای موننتیت و تری کلسیم فسفات است.



شکل (۱۲-الف): تصویر ریزساختار نمونه پس از ۱۴ روز قرارگرفتن در رینگر (بزرگنمایی ۳۰۰۰ برابر)



شکل (۱۲-ب): تصویر ریزساختار نمونه پس از ۲۱ روز قرارگرفتن در رینگر (بزرگنمایی ۳۰۰۰ برابر)

۴- مراجع

- | | | | |
|--|------|--|-----|
| <p>Haung, Y, et.al; "Study on the applied properties of Tobramycine-loaded calcium phosphate cement" Key Engineering Materials Vols:853-860:2001.</p> | [۱۰] | <p>Nilsson, m, et.al; "Factors influencing the compressive strength of an injectible calcium sulfate -hydroxyapatite cement" J.Mat.Sci.Mat.Med,14:339-404:2003.</p> | [۱] |
| <p>Bohner, M "Hydraulic calcium phosphate bone cement as antibiotic drug delivery system ", www.limmet.ch/Jmbohner/ABSGS.html. 2004</p> | [۱۱] | <p>Miyamoto, M, et.al; "Basic properties of calcium phosphate cement containing atelocollagen units in liquid or powder phases" Biomaterials,19:707-715:1998.</p> | [۲] |
| <p>Nemati, N., Solati-Hashjin, M., Salahi, E., Moztarzadeh, F., and Marghussian, V; "Preparation and properties of an apatitic calcium phosphate cement", cfi/Ber.DGK Vol.82, No.8, pp.E47-E51,2005.</p> | [۱۲] | <p>Oreffo, R.O.C, et.al; "Growth and differentiation of human bone marrow osteoprogenitors on novel calcium phosphate cements" Biomaterials,19:1845-1854:1998.</p> | [۳] |
| <p>ASTM Standard C266-99; " Standard test method for time of setting of hydraulic cement paste by Gilmore needle". ASTM International 2002.</p> | [۱۳] | <p>Gauthier, O, et.al; "Non invasive bone replacement with a new injectible calcium phosphate biomaterial" J. Biomed.Mater.Res,66A:47-54:2003</p> | [۴] |
| <p>United State Pharmacopia 2006</p> | [۱۴] | <p>Dai, H, et.al; "Properties of the cement materials in αTCP-TTCP-C6H8O7-H2O" Key Engineering materials vols:821-824:2001.</p> | [۵] |
| <p>R.Z.LeGeros; " Calcium phosphates in oral biology and medicine" Basel.S , Karger.A.G:201,1991.</p> | [۱۵] | <p>Ooms, E.M, et.al; "Soft tissue response to injectible calcium phosphate cements" Biomaterials,24:749-757:2003.</p> | [۶] |
| <p>L.M.Grover , et.al; " Invitro aging of brushite calcium phosphate cement" Biomaterials 24 4133-4141,2003.</p> | [۱۶] | <p>Komath, M Varma, HK; "Development of a fully injectible calcium phosphate cement for orthopedic and dental application" Bull.Mater.Sci, vol,26 No4:415-422 :2003.</p> | [۷] |
| <p>M. Bohner "pH variations of a solution after injecting Brushite cement" Key Engineering Materials , Vols 192-195:813816 ,2001</p> | [۱۷] | <p>Drissens, F.C.M, et.al; " The cal/p range of nanoapatitic calcium phosphate cements" Biomaterials,23:4011-4017:2002</p> | [۸] |
| | | <p>Komath, M, et.al; "On the development of an apatitic calcium phosphate bone cement" Bull.Mater.Sci, Vol,23.No2:135-140: 2000</p> | [۹] |