

سنتر و ارزیابی نانوپودر منیزیم هیدروکسی آپاتیت و تاثیر آن در رمینرالیزاسیون ضایعات اولیه ی

پوسیدگی مینای دندان

حمیده بصیری^۱، علی ابوعی مهریزی^{۱*}، فرهاد بخشی^۲

^۱دانشگاه تهران، دانشکده علوم و فنون نوین، گروه مهندسی علوم زیستی، تهران، ایران.

^۲دانشگاه امیرکبیر، دانشکده مهندسی پزشکی، تهران، ایران.

تاریخ ثبت اولیه: ۱۳۹۶/۲/۱۶، تاریخ دریافت نسخه اصلاح شده: ۱۳۹۶/۹/۱۳، تاریخ پذیرش قطعی: ۱۳۹۶/۱۱/۲۸

چکیده در این تحقیق به بررسی و مطالعه توانایی نانوذرات سرامیکی هیدروکسی آپاتیت (HA) و منیزیم هیدروکسی آپاتیت (MgHA) در ترمیم مینای دندان آسیب دیده پرداخته شده است. به این منظور، نانوذرات به روش سنتر شیمیایی تر تهیه شدند. به منظور تشخیص ساختار فازی و گونه های شیمیایی موجود در نمونه های تهیه شده از آنالیز پراش XRD و FTIR استفاده شد. اندازه ی بلورکها برای نمونه HA و MgHA به ترتیب ۲۳/۸۸ و ۲۵/۵۹ نانومتر و میزان بلورینگی ۴۶/۱۵ و ۲۶/۶۷ درصد با استفاده از داده های پراش پرتو ایکس محاسبه و با نمونه HA استوکیومتری مقایسه شد. مورفولوژی و اندازه ذره نمونه های تهیه شده توسط SEM مورد بررسی قرار گرفت. بررسی نتایج به دست آمده نشان داد که عنصر منیزیم به ترکیب شیمیایی و ساختار پودر سنتر شده الحاق شده است و ذرات پودری HA با اندازه ذره حدود ۵۵/۷۹ نانومتر و MgHA با اندازه ذره حدود ۳۹/۵۲ نانومتر با موفقیت سنتر شدند. با توجه به نتایج حاصل، حضور یون منیزیم در ساختار HA باعث کاهش اندازه ی بلورها، ذرات و همچنین کاهش میزان بلورینگی می گردد. به منظور ارزیابی کارایی ذرات تهیه شده در فرآیند رمینرالیزاسیون و شبیه سازی فرآیند پویای دمنرالیزاسیون-رمینرالیزاسیون، از روش pH-cycling و آزمون میکروسختی استفاده شد. علاوه بر این، سطح نمونه های دندان، توسط SEM مورد بررسی قرار گرفت. نتایج به دست آمده در این بخش از تحقیق نشان می دهد که نانوذرات HA و MgHA بر روی سطوح مینا جذب و باعث تغییر در خواص مکانیکی دندان شد و با تشکیل یک لایه ی جدید بر سطح مینا و پر کردن تمامی حفرات، رمینرالیزاسیون دندان را بهبود بخشید. به عبارتی دیگر، ترمیم مینای دندان آسیب دیده با نانوذرات MgHA نسبت به HA، به میزان ۱۲ درصد بهبود یافت و به علت پتانسیل بالا در رمینرالیزاسیون دندان می تواند به طور گسترده در محصولات بهداشت دهان و دندان مانند دهان شویه ها و خمیر دندان به کار روند.

کلمات کلیدی: هیدروکسی آپاتیت، منیزیم هیدروکسی آپاتیت، نانوساختار، بیومیمتیک، رمینرالیزاسیون.

Synthesis and Characterization of Magnesium Hydroxyapatite Nanopowders for Enamel Remineralization of Initial Caries Lesions

Hamideh Basiri¹, Ali Abouei Mehrizi^{1*}, Farhad Bakhshi²

¹University of Tehran, Department of New Science and Engineering, Tehran, Iran.

²Amirkabir University of Technology, Department of Biomedical Engineering, Tehran, Iran.

Abstract Hydroxyapatite (HA) and magnesium hydroxyapatite (MgHA) were successfully prepared and its ability to enhance the remineralization of initial enamel lesions was investigated in this study. For this purpose, the nanoparticles were prepared by the wet chemical synthesis. XRD and FTIR were applied to characterize phase structure and chemical species in the prepared samples. The crystallite size and crystallinity index of HA and MgHA samples were 43.88 and 29.59 nm and 46.15 and 26.67% respectively, which were calculated using XRD data and compared with stoichiometric HA sample. SEM was used to investigate the morphology and mean size of the nanoparticles. According to the results of physicochemical characterization, magnesium was detected in the crystal structure of the nanoparticles and nanoparticles of HA with mean particle size of 55.79 nm, MgHA with mean particle size of 39.52 nm were successfully synthesized. In addition, it is revealed that substitution of magnesium in the crystal structure of HA results in the reduction of crystalline and particle sizes, and also, reduce the crystallinity. A pH-cycling regime was used to simulate the dynamic demineralization-remineralization conditions and performance of the prepared materials in enamel remineralization was characterized by surface microhardness (SMH) measurement. Finally, surface of the enamel samples was further characterized by SEM investigations. According to the results of experiments, HA and MgHA can strongly adsorb on the enamel surface and improve the SMH of the substrate due to improvement of the dental remineralization. The improvement of dental remineralization can be attributed to the development of a new biomimetic apatite mineral deposition which progressively fills the surface scratches. According to the results of the present research work, MgHA shows 12% higher remineralization ability compared to that of HA and can be effectively used as remineralization agents in dental hygiene products such as toothpaste, mouthwashes, and oral health compounds.

Keywords: Hydroxyapatite, Magnesium Hydroxyapatite, Nano-Structure, Biomimetic, Remineralization.

۱- مقدمه

پوسیدگی دندان، یک بیماری عفونی دندانی مزمن و همه‌گیری است که در صورت جدی بودن و عدم رسیدگی، منجر به از دست دادن دندان‌ها می‌شود و می‌تواند نحوه زندگی فرد را دچار اختلال کند. بنا به گزارش آسیب‌شناس‌ها، بسیاری از مشکلات حاملگی، بیماری‌های قلبی و عروقی و دیابت قندی ممکن است مربوط به باکتری‌هایی باشد که در پوسیدگی‌های دندانی لانه کرده‌اند و از طریق سیستم گوارش و سپس نفوذ به سیستم گردش خون به تمام نقاط بدن منتقل می‌شوند [۱]. پوسیدگی دندان به دلیل عملکرد اسیدهایی است که قادر به انحلال ساختار معدنی دندان هستند. علت اصلی این انحلال جزئی سطح مینای دندان، حلالیت HA در pH کم است.

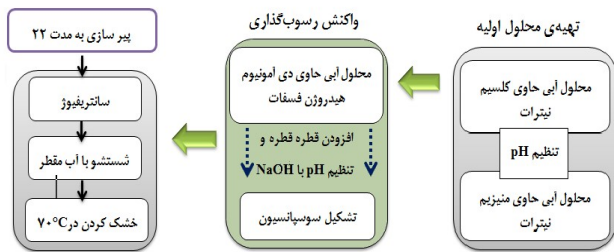
در مقایسه با سایر بافت‌های معدنی مانند استخوان، مینای دندان به دلیل عدم وجود سلول، تحت تأثیر بیماری‌های خاص دندان مانند پوسیدگی، دمینرالیزاسیون و سایش یا شکستگی قادر به ترمیم خود نیست؛ بنابراین، در حال حاضر، تنها راه برای بازگرداندن مینای دندان آسیب‌دیده ترمیم با مواد مصنوعی می‌باشد [۲]. در حال حاضر روش‌های پیشگیری از پوسیدگی با استفاده از ترکیبات فلوراید از جمله راه‌های اصلی کاهش انحلال مینای دندان می‌باشد. یون فلوراید درون ساختار آپاتیت قرار می‌گیرد و باعث کاهش حلالیت آپاتیت می‌گردد. اما فلوراید ایجاد سمیت می‌کند، در کودکان اثرات بسیار منفی بر جای می‌گذارد و در درازمدت منجر به اختلالات عصبی می‌شود [۳]. هم‌چنین فلوراید مشکلاتی برای اعضای بدن (دستگاه گوارش، تناسلی- ادراری و تنفسی) ایجاد می‌کند و مصرف فلوراید به مدت طولانی می‌تواند منجر به فلورسیز دندانی گردد؛ بنابراین، هنوز تلاش برای یافتن ماده‌ای جایگزین و فاقد فلوراید برای درمان کامل پوسیدگی ادامه دارد [۴].

تخریب HA مینا توسط اسیدهای آلی (دمینرالیزاسیون) و بازگشت مواد معدنی به موضع (مینرالیزاسیون) یک فرآیند پویا است که کم و بیش به‌طور مستمر در محیط مطلوب دهان رخ می‌دهد. با این حال، زمانی که دمینرالیزاسیون واقع شده بیش از توانایی ترمیمی رمینرالیزاسیون ترکیب بزاق،

خمیردندان، دهان‌شویه‌ها و غیره باشد دندان‌ها به تدریج حل شده و در نهایت شکسته و یا منجر به پوسیدگی شبیه سوراخ یا حفره می‌گردد. بخش عمده‌ی ترکیبات ساخته‌شده تا به امروز توجه خاص خود را بر روی بهبود فرآیند رمینرالیزاسیون معطوف داشته‌اند [۵ و ۶]. بنابراین نیاز به پیشگیری از ایجاد پوسیدگی به کمک مواد و راهبردهای جدید هم‌چنان باقی‌مانده است.

HA به عنوان یک ماده رمینرالیزه کننده هنگام کاربرد در سطح مینای دندان شناخته شده است [۷-۹]. نانو ذرات HA شبیه‌ترین ترکیب به بافت دندان است. ویژگی‌هایی چون زیست‌سازگاری، پتانسیل رمینرالیزاسیون و اثربخشی آن در کاهش انحلال مینای دندان در شرایط اسیدی به دلیل جذب بیشتر کلسیم بر روی سطح دندان با ضایعات اولیه‌ی پوسیدگی و کاهش ریزش در حفرات دندانی باعث شده تا این ماده در تحقیقات جدید مورد توجه فراوان قرار گیرد [۱۰ و ۱۱]. تبلور و گروه‌های جانمایی که جایگزین اتم‌ها در ساختار آپاتیت می‌شوند در خواص HA بسیار تأثیرگذار است. با در نظر گرفتن جایگزین کاتیونی، منیزیم از جمله مهم‌ترین یون‌های دو ظرفیتی مرتبط با آپاتیت بیولوژیکی می‌باشند [۱۲]. اثر یون‌های منیزیم به‌طور گسترده در HA مصنوعی تهیه‌شده توسط روش رسوب‌گیری، هیدرولیز و یا روش شیمیایی تر مورد بررسی قرار گرفته است [۱۳ و ۱۴]. هرچند مقدار یون منیزیم الحاقی در آپاتیت سنتزی کم است اما باعث تغییر در ساختار بلورشناسی، اندازه بلورها، تبلور، پارامترهای شبکه و پایداری ساختاری آپاتیت می‌شود. وقتی که محتوای منیزیم در آپاتیت سنتزی افزایش می‌یابد، بلورها کوچک‌تر شده و بیشتر نامنظم می‌شوند. نشان داده شده است که یون‌های منیزیم با یون‌های کلسیم در مکان‌های رشد بلورهای آپاتیت مصنوعی رقابت می‌کند و مانع از رشد بیشتر بلور می‌گردد [۱۵ و ۱۶]. نظر به عدم تحقیق کافی در خصوص تاثیر ترکیب MgHA بر روی ضایعات اولیه‌ی پوسیدگی و پیشگیری از پوسیدگی مینای دندان، در پژوهش حاضر به بررسی تاثیر یون منیزیم در ساختار HA و اثربخشی این ترکیب در ترمیم ضایعات اولیه‌ی پوسیدگی پرداخته شد. ترکیب HA و MgHA به روش سنتز

پودر یکنواختی حاصل شد. شکل ۱، مراحل تهیهی پودر MgHA به این روش را نشان می‌دهد.



شکل ۱. مراحل تهیهی پودر MgHA به روش رسوب گذاری.

۳-۲ ارزیابی نانوذرات

شناسایی فازها، پارامتر شبکه، اندازه بلورکها و کریستالینیتی نانوذرات با استفاده از پرتو CuKa مس با طول موج ۰٫۱۵۴۰۶ نانومتر توسط دستگاه پراش سنچ (X'Pert, Highscore, PANalytical, Philips) ساخت کشور هلند با ولتاژ ۴۰ KV و جریان ۳۰ mA اندازه‌گیری شد و سرعت اسکن با در نظر گرفتن گام ۰٫۰۲° و زمان هر گام ۰٫۶۵ ثانیه، معادل ۱٫۸۵ درجه بر دقیقه بود. داده‌های حاصل با نرم‌افزار OriginPro و Xpert High Score بررسی شدند. آنالیز طیف‌سنجی مادون قرمز به روش انتقال فوریه از دستگاه PerkinElmer، مدل Frontier ساخت کشور آمریکا برای شناسایی گروه‌های عاملی استفاده شد. پودرهای مورد نظر با KBr مخلوط و تحت خلأ به صورت قرص درآورده شد. سپس قرص‌ها در محدوده ۴۰۰ تا ۴۰۰۰ cm⁻¹ آنالیز شدند. جهت بررسی مورفولوژی، ریزساختار و تخمین اندازه‌ی ذرات از SEM با دستگاه Hitachi مدل S4160 ساخت کشور ژاپن در محدوده ولتاژ ۳۰-۱ KV و خلأ ۱۰^{-۴} tor استفاده شد.

۴-۲ آزمون دندانی

۱-۴-۲ آماده‌سازی نمونه‌های دندانی

در این پژوهش، ۳۰ دندان آسیایی تازه کشیده شده جمع‌آوری شد که سالم، بدون پوسیدگی و نقاط دی‌کلسیفیه، فاقد شکستگی و ترک مینایی بودند، انتخاب گردیدند. ابتدا ضایعات چسبیده به دندان‌ها به‌طور کامل جدا شد و سپس در محلول ۰٫۵ درصد کلرامین-تی در کمتر از هفت روز ضد عفونی و در محلول سرم در دمای چهار درجه‌ی سانتی‌گراد در یخچال تا زمان استفاده نگه‌داری شدند [۹]. سپس نمونه‌ها

شیمیایی تر تهیه و مشخصه‌یابی شد. سپس این ترکیب‌ها روی نمونه‌ی دندان سالم در شرایط شبیه‌سازی شده‌ی مینرالیزاسیون و دمینرالیزاسیون طبق استاندارد طلایی Featherstone آزمایش شد و مورد ارزیابی و مطالعه قرار گرفت.

۲- روش تحقیق

۱-۲ مواد

نمک‌های کلسیم نیترات، تتراهیدرات کلسیم نیترات، هگزا هیدرات کلسیم نیترات، منیزیم نیترات، دی‌آمونیم هیدروژن فسفات ((NH₄)₂HPO₄) و سدیم هیدروکسید (NaOH) از شرکت مرک جهت سنتز نانوذرات HA و MgHA تهیه گردید. جهت شبیه‌سازی محلول دمینرالیزاسیون-رمینرالیزاسیون، کلسیم نیترات تتراهیدرات (Ca(NO₃)₂·4H₂O)، پتاسیم دی‌هیدروژن فسفات (KH₂PO₄)، استیک اسید (CH₃COOH)، پتاسیم کلراید (KCl) از شرکت مرک و سدیم کاکودیلایت (NaC₂H₆AsO₂·3H₂O) از شرکت سیگما آلدریج تهیه شد.

۲-۲ سنتز نانوذرات

روش مورد استفاده در این تحقیق برای سنتز HA استوکیومتری، رسوب‌گذاری به روش شیمی تر بود که از نمک‌های دی‌آمونیم هیدروژن فسفات و کلسیم نیترات چهار آبه استفاده شد. در ابتدا محلول‌های نمک فسفاتی و نمک حاوی کلسیم تهیه شد، به‌طوری‌که نسبت مولی بین کلسیم و فسفات برابر با یک به هفت باشد. به منظور وارد کردن یون منیزیم به شبکه بلوری هیدروکسی‌آپاتیت، به محلول نمک حاوی کلسیم، نمک منیزیم نیترات چهار آبه افزوده شد. pH محلول نمک حاوی کلسیم و منیزیم به ۱۱ رسانده شد و محلول نمک فسفاتی دوباره به آن اضافه شد. سپس بعد از اتمام واکنش، سوسپانسیون به‌دست آمده به مدت ۲۲ ساعت بر روی هم‌زن مغناطیسی پیرسازی شد. سپس ترکیبات سانتریفیوژ و توسط آب مقطر گرم شسته شد. فرآیند سانتریفیوژ و شستشو سه بار انجام گردید. رسوب به‌دست آمده به مدت ۲۴ ساعت در آون در دمای ۷۰ °C خشک گردید و توسط هاون چینی

نحوه‌ی سنجش ریزسختی بدین صورت بود که ابتدا سختی اولیه‌ی دندان‌ها (SMH) اندازه‌گیری شد. برای تعیین سختی هر نمونه از میانگین اعداد به‌دست آمده از سه فرورونده با فواصل ۱۰۰ میکرومتر استفاده شد. بعد از قرارگیری نمونه‌ها به مدت ۷۲ ساعت و تشکیل ضایعه‌ی اولیه‌ی پوسیدگی، دوباره سختی دندان‌ها اندازه‌گیری شد (SMH1). هم‌چنین در طی انجام چرخه‌ی pH-cycling، در روزهای سوم، هفتم و چهاردهم ریزسختی دندان‌ها محاسبه شد (SMH3، SMH7 و SMH14).

۲-۴-۴ آنالیز آماری

آنالیز آماری داده‌ها با استفاده از آزمون تحلیل واریانس (ANOVA) یک‌طرفه انجام شد. سپس آنالیز مکمل با استفاده از آزمون توکی برای بررسی مقایسه‌های بین گروه‌ها انجام گردید. سطح معنی‌دار آماری، $P < 0.05$ در نظر گرفته شد. محاسبات آماری با استفاده از نرم‌افزار SPSS ویرایش ۲۰ و رسم نمودارها با استفاده از نرم‌افزار SigmaPlot ویرایش ۱۰ انجام شد.

۲-۴-۵ بررسی نمونه‌های دندانی توسط SEM

جهت بررسی ریزساختار و مورفولوژی نمونه‌های دندانی، از میکروسکوپ الکترونی روبشی استفاده شد. از هر گروه به صورت تصادفی چند نمونه جهت بررسی انتخاب و تصویر دندان اولیه، بعد از ایجاد پوسیدگی و بعد از اتمام فرآیند pH-cycling با دستگاه Hitachi مدل S4160 و در محدوده ولتاژ ۳۰-۱ KV گرفته شد.

۳- نتایج و بحث

۳-۱ آنالیز ساختار، ترکیب و مورفولوژی نانو پودرهای

سنتز شده

الگوی پراش پرتو ایکس مربوط به پودرهای HA و MgHA در شکل ۲ نشان داده شده است. مطابق بررسی انجام شده و مقایسه الگوی پراش پرتو ایکس به‌دست آمده با داده‌های مرجع، الگوی پراش پرتو ایکس پودر سنتز شده با الگوی پراش پرتو ایکس HA خالص (JCPDS No. 09-0432) مطابقت دارد. طبق نتایج حاصل در شکل ۲ (ب)، پیک‌های به دست آمده با زوایای تفرق (2θ) ۳۱/۷۶، ۳۲/۹۲ و ۲۵/۸۸ درجه

جهت برش توسط دستگاه برش بافت Mecatome مدل T201A در رزین مانت شدند. طریقه‌ی مانت کردن به‌گونه‌ای بود که سطح باکال و لینگوال به‌طور کامل مسطح در سطح قرار بگیرند. در ادامه روی هر سطح دندان پنجره‌ای با ابعاد ۳×۳ میلی‌متر مربع توسط لاک مقاوم به اسید ایجاد شد. برای افزایش دقت اندازه‌گیری ریزسختی مینا، هر نمونه توسط کاغذ ساینده‌ی اکسید آلومینیوم ۲۵۰۰، ۲۰۰۰، ۳۰۰۰ و ۵۰۰۰ همراه با آب سمباده گردید. صاف و صیقلی بودن سطوح با میکروسکوپ نوری با بزرگ‌نمایی هزار برابر تأیید گردید.

۲-۴-۲ ایجاد ضایعات اولیه‌ی پوسیدگی و روش pH-cycling

جهت بررسی فرآیند رمینرالیزاسیون با استفاده از چرخه‌ی pH-cycling از محلول‌های شبیه‌ساز دیمینرالیزاسیون- رمینرالیزاسیون استفاده شد. ابتدا نمونه‌ی دندان در محلول دیمینرالیزاسیون به مدت ۷۲ ساعت در دمای ۳۷°C در انکوباتور به منظور تشکیل ضایعه‌ی اولیه‌ی پوسیدگی قرار گرفت. سپس دندان‌ها به‌طور تصادفی به سه گروه HA (۱۰ wt/.)، گروه MgHA (۱۰ wt/.) و گروه آب دیونیزه (DW) تقسیم شدند و در هر گروه ۱۰ دندان جهت آزمون pH-cycling قرار گرفت. چرخه‌ی pH-cycling طبق روش Featherstone که به عنوان روش استاندارد طلایی جهت بررسی رمینرالیزاسیون دندان است، به‌کار گرفته شد [۱۷]. چرخه‌ی pH-cycling به مدت ۱۴ روز طبق جدول ۱ تکرار شد.

جدول ۱. چرخه‌ی pH-cycling بر مبنای مدل Featherstone

مرحله	چرخه‌ی pH-cycling	زمان
بک	شستشو با آب مقطر	
دو	محلول تیمار	۳ دقیقه
سه	محلول دیمینرالیزاسیون	۶ ساعت
چهار	محلول تیمار	۳ دقیقه
پنج	شستشو با آب مقطر	
شش	محلول رمینرالیزاسیون	۱۶ ساعت

۲-۴-۳ آزمون میکروسختی

برای آزمایش میکروسختی نمونه‌های دندان، پارامترهای میکروسختی مانند بار اعمالی ۰/۹۸۱ نیوتن و زمان ۱۰ ثانیه توسط دستگاه SCTMC مدل HVS-1000z در نظر گرفته شد.

$$X_c = 1 - (V_{112/300}/I_{300}) \quad (\text{معادله ۱})$$

در این رابطه I_{300} شدت پیک مربوط به صفحات از نوع (۳۰۰)، $V_{112/300}$ عمق دره‌ی بین پیک‌های مربوط به صفحات از نوع (۱۱۲) و (۳۰۰) و X_c میزان بلورینگی می‌باشد. جدول ۲ مقادیر بلورینگی پودرهای تهیه شده و مینا را نشان می‌دهد. جانشینی منیزیم باعث کاهش اندازه‌ی بلورک‌ها می‌گردد. به عبارتی می‌توان گفت افزایش منیزیم در ساختار HA باعث جلوگیری از رشد دانه‌ها می‌شود. [۲۲]. هم‌چنین بلورینگی مینا نسبت به پودرهای سنتزی بسیار بالاتر است که این نکته با کارهای گزارش شده مطابقت دارد [۲].

جدول ۱. میزان بلورینگی پودرهای تهیه شده و مینای دندان.

نمونه	2θ	متغیر	شدت	بلورینگی (%)
HA	۳۲٫۷۸	V112/300	۵۶	
	۳۲٫۹۲	I300	۱۰۴	۴۶٫۱۵
MgHA	۳۲٫۷۸	V112/300	۸۵	
	۳۲٫۹	I300	۱۱۹	۲۶٫۶۷
مینا	۳۲٫۷۴	V112/300	۲۹	
	۳۲٫۹۲	I300	۹۰	۶۷٫۷۸

اندازه بلور نمونه‌های مختلف با استفاده از داده‌های به دست آمده از آنالیز XRD، براساس فرمول شرر در معادله ۲ تعیین گردید [۲۳]. بدین منظور از داده‌های مربوط به هر یک از پیک‌های (۰۰۲)، (۳۱۰) و (۲۲۲) استفاده شد [۲۴]:

$$i_{kl} = K \lambda / \beta_{1/2} \cos\theta \quad (\text{معادله ۲})$$

جدول ۲. اندازه‌ی بلورک‌های پودرهای تهیه شده و مینای دندان.

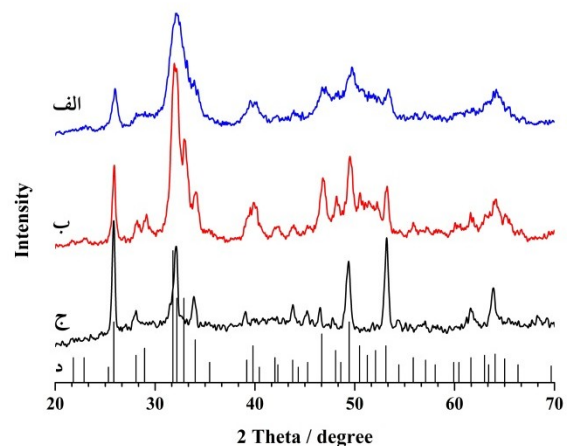
نمونه	اندازه بلورک‌ها (nm)		
	(۲۲۲)	(۳۱۰)	(۰۰۲)
HA	۴۳٫۵۶	۴۷٫۲۹	۴۰٫۸۰
MgHA	۲۵٫۷۱	۲۳٫۵۲	۲۷٫۵۳
مینا	۳۴٫۹۱	۲۶٫۱۹	۳۱٫۸۷

در این رابطه λ طول موج پرتو ایکس متناظر با $CuK\alpha$ و برابر با 1.5406 \AA ، θ زاویه‌ی مربوط به صفحه‌ی (hkl) موردنظر، $\beta_{1/2}$ پهنای پیک مربوط به صفحه‌ی (hkl) موردنظر 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

به ترتیب منطبق بر پیک‌های تفرق صفحات بلوری (۲۱۱)، (۳۰۰) و (۰۰۲) HA با ساختار بلوری هگزاگونال می‌باشند.

مطابق با شکل ۲ (الف)، پیک‌های به دست آمده در پودر MgHA با زوایای تفرق (2θ) ۳۱٫۷۸، ۳۲٫۹۲ و ۲۵٫۹۶ درجه به ترتیب منطبق بر پیک‌های تفرق صفحات بلوری (۲۱۱)، (۳۰۰) و (۰۰۲) HA با ساختار بلوری هگزاگونال می‌باشند. درعین حال، همان‌گونه که مشاهده می‌شود، پیک‌های نشان داده شده پودر MgHA در مقایسه با الگوی پراش پرتو ایکس فاز HA خالص، کوتاه‌تر و درعین حال پهن‌تر شده است که این موضوع بیانگر کاهش بلورینگی هیدروکسی‌آپاتیت در اثر افزودن منیزیم است و در توافق با گزارش‌های ارائه شده قبلی می‌باشد [۱۸، ۱۹]. حضور منیزیم در ساختار HA مانع از رشد دانه‌ها شده است و لذا سبب کاهش بلورینگی یا تبلور می‌شود [۲۰]. به منظور مقایسه فازی ساختار پودرهای سنتز شده با ساختار معدنی مینای دندان طبیعی، الگوی XRD مینای دندان مورد آنالیز و نتایج حاصل در شکل ۲ (ج) نشان داده شده است. همان‌گونه که انتظار می‌رود الگوی پراش پرتو ایکس فاز دندان منطبق بر الگوی پراش پرتو ایکس فاز HA می‌باشد.

هم‌چنین مطابق نتایج به دست آمده، پیک‌های تشکیل‌دهنده‌ی الگوی پراش پرتو ایکس فاز مینا بسیار تیزتر و کم‌عرض‌تر از پیک‌های مربوط به پودرهای سنتز شده می‌باشند که این موضوع نشان‌دهنده‌ی بلورینگی بالای مینا است [۲۱].



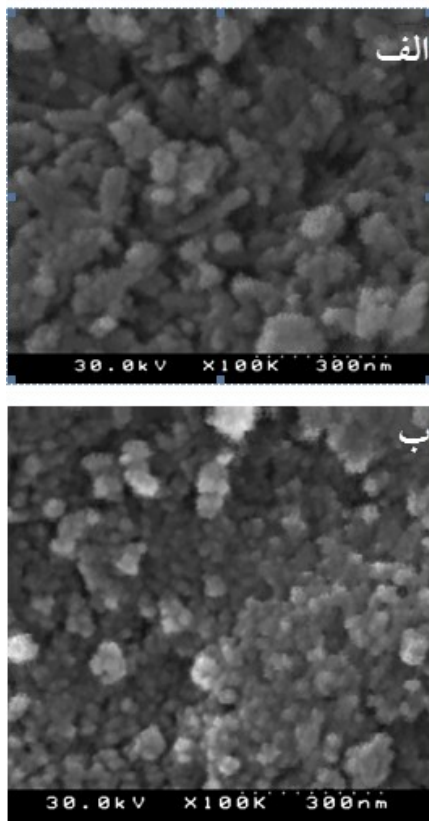
شکل ۱. الگوی XRD (الف) نمونه‌ی MgHA، (ب) HA، (ج) مینای دندان و (د) الگوی پراش پرتو ایکس HA خالص.

میزان بلورینگی پودرهای HA و MgHA سنتز شده و نیز مینا با استفاده از داده‌های XRD و براساس معادله ۱ محاسبه شد.

مطابق شکل ۳ (ب)، پیکهای مربوط به گروههای فسفات و هیدروکسیل در طیف FTIR نمونه MgHA ناشی از ساختار آپاتیت است. همچنین با توجه به پیکهای مشخص شده جانشینی یون کربنات در ساختار MgHA مشهود است. در اثر حضور یون منیزیم شدت پیک OH در 3570 cm^{-1} و 634 cm^{-1} به نسبت HA کاهش یافته است و باندهای فسفات نیز نسبت به HA پهنای بیشتری دارند که این موضوع با کارهای گزارش شده مطابقت دارد [۲۶، ۲۷].

۳-۳ نتایج آنالیز SEM

تصاویر SEM پودر HA سنتز شده در شکل ۳ (الف) نشان داده شده است.



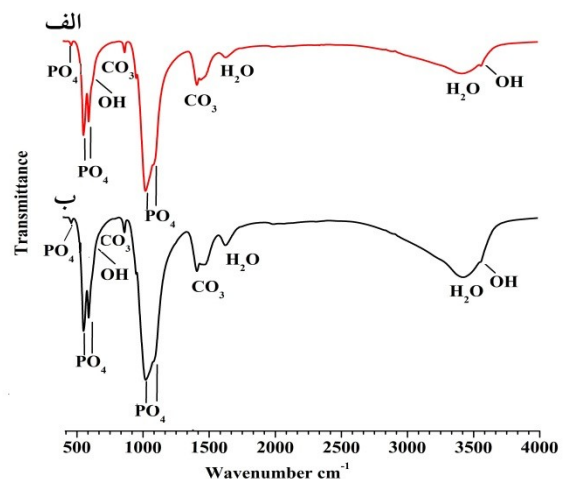
شکل ۳. تصویر SEM از ریزساختار پودر (الف) HA و (ب) MgHA با بزرگنمایی $\times 100000$.

مطابق با توجه به شناسایی فازها در بخشهای پیشین، مشخص شد که نمونههای HA حاوی مقداری کربنات نیز هستند که این کربنات در ساختار آنها جانشین شده است؛ بنابراین انتظار می رود که اندازهی ذرات حاصل در مقایسه با اندازهی ذرات HA در کارهای گزارش شده (160 nm) کوچکتر باشد [۲۸]. به منظور بررسی توزیع و اندازه متوسط

شده است و Dhkl اندازهی بلورک در پیک مربوط به صفحهی (hkl) موردنظر است. مقادیر عددی مربوط به اندازه بلور نمونههای مختلف و مینا در جدول ۳ ارائه شده است.

۲-۳ نتایج آنالیز FTIR

شکل طیف FTIR مربوط به نمونهی HA تهیه شده در شکل ۲ (الف) نشان داده شده است. همانگونه که مشاهده می شود نتایج حاصل از آزمون FTIR در توافق با نتایج آزمون XRD است. مطابق شکل ۳ (الف) طیف FTIR نمونه HA شامل پیکهای گروه هیدروکسیل در 3569 cm^{-1} و نیز پیکهای گروههای فسفات در 472 ، 564 ، 603 ، 962 cm^{-1} و 1032 cm^{-1} است. با توجه به اینکه پودرهای آپاتیت سنتز شده سطح ویژه بالایی دارند، مقداری آب بر روی سطح نمونهها جذب می شود. مطابق نتایج حاصل پیکهای پهن تشخیص داده شده در محدودهی $3500-3000\text{ cm}^{-1}$ و نیز پیک تند ایجاد شده در 1640 cm^{-1} ناشی از جذب آب بر روی سطح نمونهها است. همچنین به دلیل مجاورت محلول سنتز با هوا و لذا جذب و انحلال کربن دی اکسید موجود در محیط اطراف، مقداری کربنات در ساختار HA جانشین شده است که با پیکهای نشان داده شده در 875 ، 1422 و 1451 cm^{-1} مشخص شده است. از آنجا که ورود و جانشینی گروه کربنات با کاهش گروه هیدروکسیل همراه است، این موضوع با افزایش شدت پیک کربنات در 875 cm^{-1} و نیز کاهش شدت پیک گروه هیدروکسیل به صورت یک کناره در 633 cm^{-1} دیده می شود [۱۴، ۲۵].



شکل ۲. طیف FTIR نمونه (الف) HA و (ب) MgHA.

بحرانی و در شرایط اسیدی HA مینا حل می‌شود. در این زمان، اگر مقادیر یون‌های کلسیم و فسفات به میزان کافی در محلول وجود داشته باشد، محلول حالت فوق اشباع پیدا می‌کند و در صورت برقراری حالت فوق اشباع نسبت به کلسیم و فسفات در محیط مینا، ضایعات پوسیدگی اولیه قبل از ایجاد حفره برگشت پذیر هستند و این قابلیت وجود دارد که این یون‌ها روی سطوح بقایای بلوری به جای مانده از دمنیرالیزاسیون، دوباره کریستالیزه شوند و فرآیند رمنیرالیزاسیون تکمیل شود. زمانی که نمونه‌های دندان در دوغاب نانوذرات HA قرار گیرند، مناطق سطح مینا که به علت قرارگیری ۷۲ ساعته در محلول دمنیرالیزاسیون دچار میکروتخلخل‌های بسیاری شده است، پتانسیل جذب نانوذرات HA با میانگین اندازه ذرات ۵۵/۷۹ نانومتر و MgHA با میانگین اندازه ذرات ۳۲/۵۹ نانومتر را بر روی سطح فعال خود دارند. [۲۹].

به علت دسترسی بهتر لایه سطحی مینا به یون‌های محیط، میزان اشباع کلسیم، فسفات و منیزیم در سطح دندان بیشتر است و احتمال ایجاد حالت رمنیرالیزاسیون در این ناحیه زیاد است و احتمال دمنیرالیزاسیون کمتر است. به این ترتیب به مرور زمان میزان زیادی هیدروکسی‌آپاتیت مقاوم به اسید در لایه سطحی تشکیل می‌شود که این امر منجر به افزایش سختی دندان می‌شود. تشکیل لایه سطحی در برابر ادامه حل شدن مواد معدنی زیرین اثر حفاظتی دارد و علاوه بر این خروج یون‌های کلسیم و فسفات از دندان و نیز نفوذ یون‌های هیدروژن و اسید را به نواحی زیر سطح محدود می‌کند و در نتیجه گسترش ضایعه و ایجاد حفره در دندان را به تعویق می‌اندازد.

نانوذرات HA به چند طریق می‌توانند از انحلال مینا جلوگیری کنند: (۱) کاهش نفوذ و تبادل H^+ با یون‌های کلسیم و فسفات بین محلول و مینا، (۲) تشکیل لایه‌ای جدید بر سطح مینا که در برابر حمله‌ی اسیدی مانند یک بافر عمل می‌کند و از انحلال مینا پیشگیری می‌کند. با تشکیل شدن این لایه از تماس مستقیم محلول اسیدی با مینا جلوگیری می‌شود و در ابتدا این لایه به جای مینا حل می‌گردد، (۳) نانوذرات HA سطح کافی از یون‌های موثر مانند کلسیم و فسفات برای رمنیرالیزاسیون را به صورت موضعی فراهم می‌کند و با ایجاد یک شرایط فوق اشباع در نزدیکی سطح مینا از نیروی محرکه‌ی انحلال یعنی شرایط زیر حد اشباع جلوگیری می‌کنند [۱۱].

ذرات سنتز شده از نرم‌افزار Gatan Digital Micrograph استفاده شد با توجه به نتایج به دست آمده متوسط اندازه‌ی ذرات پودر HA، ۵۵/۷۹ نانومتر است. شکل ۳ (ب) ریزساختار پودر MgHA را نشان می‌دهد. علاوه بر منیزیم مقداری کربنات نیز در ساختار پودر در MgHA جانشین شده است و متوسط اندازه ذرات نمونه MgHA، ۳۲/۵۹ نانومتر است.

۳-۴ نتایج آنالیز میکروسختی

در جدول ۴ نتایج درصد بهبود میکروسختی و در شکل ۴ نمودار درصد بهبود میکروسختی نمونه‌های دندانی نشان داده شده است. درصد بهبود میکروسختی (%SMHR) طبق معادله ۳ محاسبه شده است.

$$\text{(معادله ۳)} \quad (\%SMHR) = (SMH_n - SMH_1) /$$

$$(SMH - SMH_1) \times 100 \quad [n=3, 7, 14]$$

جدول ۳. درصد بهبود میکروسختی نمونه‌های دندانی در طی چرخه‌ی pH-cycling

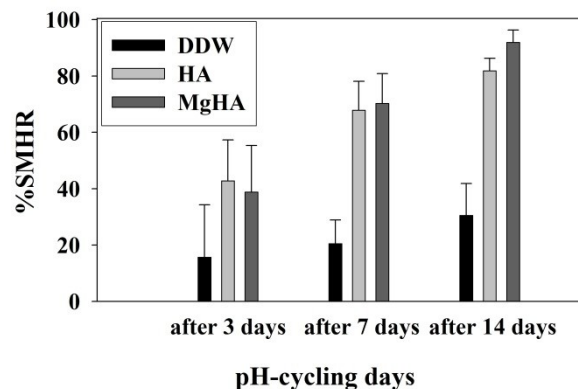
روز	HA	MgHA	DW
بعد از گذشت ۳ روز	۴۲٫۷۵±۱۴٫۵۸ ^a	۳۸٫۸۰±۱۶٫۵۱ ^{a,b}	۱۵٫۶۲±۱۸٫۶۵ ^{b,c}
بعد از گذشت ۷ روز	۶۷٫۸۴±۱۰٫۱۴ ^{a,c}	۷۰٫۲۵±۱۰٫۵۷ ^a	۲۰٫۴۶±۱۸٫۴۵ ^c
بعد از گذشت ۱۴ روز	۸۲٫۱۹±۱۶٫۵۱ ^c	۹۱٫۹۱±۱۴٫۵۸	۲۹٫۵۰±۱۸٫۶۵

حروف مشابه (a و b) نشان می‌دهد که تفاوت معناداری در مدت زمان

یکسان برای نمونه‌های مختلف در $p < 0.05$ وجود ندارد.

حرف (c) نشان می‌دهد که تفاوت معناداری در زمان‌های مختلف در $p < 0.05$

برای هر نمونه وجود ندارد.

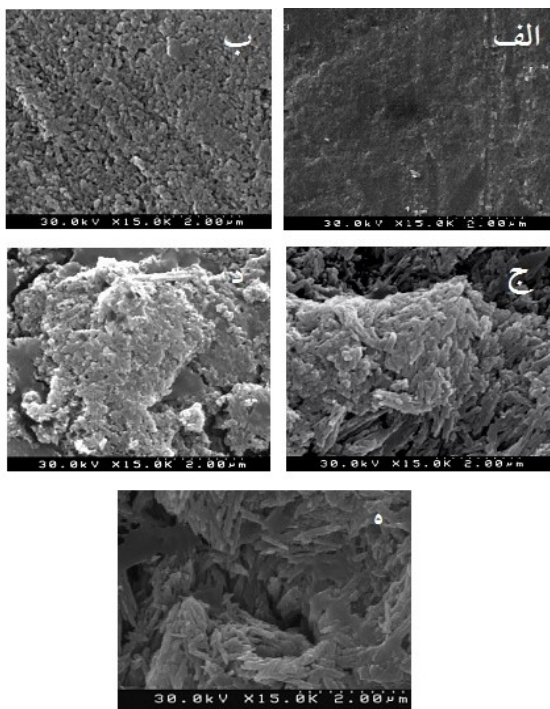


شکل ۴. نمودار %SMHR نمونه‌های دندان در فرایند pH-cycling

با قرار دادن نمونه‌های دندان در محلول دمنیرالیزاسیون

با $pH=4/4$ ، به زیر pH بحرانی افت می‌کند. در زیر pH

(ب) مشخص است، سطح مینا بر اثر ضایعه پوسیدگی دچار میکروتخلخل‌های بسیار و ساختار سلولی شده است. حضور اسید باعث تغییر ریزساختار و از بین رفتن ساختار منشوری و بین منشوری مینا می‌گردد. بعد از قرارگیری نمونه‌های دندان در محلول نانوذرات HA و MgHA، نانوبلورهای آپاتیتی بر روی سطح رسوب می‌کنند و حفره‌ها و نواقص سطح کاهش می‌یابد. شکل ۵ (ج) تشکیل یک لایه از نانو HA بر روی سطح مینا را نشان می‌دهد. این پوشش ناشی از اتصال شیمیایی نانوذرات HA کربناتی است که ساختار مینا را از لحاظ ترکیب، ساختار، اندازه و مورفولوژی تقلید می‌کند. شکل ۵ (د) پوشش MgHA را بر سطح مینا نشان می‌دهد. مشابه با HA، ذرات منیزیم آپاتیت در نقاط فعال سطح جذب شده‌اند و پوششی مقاوم و با سختی بالا بر روی سطح تشکیل داده‌اند. شکل ۵ (ه) مینای دندانی را که تنها با استفاده از آب دیونیزه تیمار شده نشان می‌دهد. آب دیونیزه به دلیل عدم وجود یون‌های موثر، قابلیت ترمیم دندان را ندارد و میکروتخلخل‌های در سطح مینا به‌طور کامل مشهود است.



شکل ۵. تصویر SEM (الف) از مینای دندان سالم قبل از شروع فرآیند pH-cycling، (ب) مینای دندان دیمینرالیزه بعد از ۷۲ ساعت قبل از شروع فرآیند pH-cycling، (ج) مینای دندان تیمار شده با نانوذرات هیدروکسی آپاتیت بعد از اتمام فرآیند pH-cycling، (د) مینای دندان تیمار شده با نانوذرات منیزیم هیدروکسی آپاتیت بعد از اتمام فرآیند pH-cycling، (ه) مینای دندان تیمار شده با آب دیونیزه بعد از اتمام فرآیند pH-cycling

HA مینای دندان قادر به تعویض یونی چندگانه و الحاق یون‌های زیادی از جمله کربنات و مقدار کمی از یون‌های منیزیم، فلئور و روی است. همان‌طور که بررسی شد منیزیم تأثیر زیادی بر ساختار بلوری آپاتیت دارد و از رشد بلورهای آپاتیت جلوگیری می‌کند و باعث کاهش اندازه بلورها می‌شود. با توجه به شکل ۵ سختی نمونه‌های دندان در گروه MgHA نسبت به گروه HA افزایش پیدا کرده است. افزایش سختی نمونه‌های دندان حاکی از اثرگذاری این یون بر روی مینا است. رشد بلورهای آپاتیتی در طول محور C اتفاق افتاده است و طبق تحقیقات انجام شده یون منیزیم از رشد بلورهای دندان در طول محور C جلوگیری می‌کند [۳۰]. منیزیم با جانشینی یون کلسیم در بلورهای سطحی مینا و تشکیل بلورهای کوچک‌تر آپاتیتی بر روی سختی دندان اثرگذار بوده است. همچنین بافت مینرالی در افراد جوان به‌طور معمول از سطح منیزیم بالاتر و اندازه بلوری کوچک‌تری به نسبت افراد مسن برخوردار است. طبق بررسی‌های انجام شده با افزایش سن، سطح منیزیم به ویژه در بزاق و بافت‌های معدنی افت می‌کند. همچنین شکننده شدن بافت سخت و اندازه بلوری بزرگ‌تر در افراد مسن می‌تواند ناشی از کمبود منیزیم باشد [۳۱]. علاوه بر این نتایج حاصل نشان می‌دهد که افزودن یون منیزیم به ساختار آپاتیت علاوه بر اثر موثر در کاهش پوسیدگی و بهبود رمینرالیزاسیون، در جوان نگه داشتن این بافت سخت کمک شایانی می‌کند.

۳-۶ نتایج آنالیز SEM از نمونه‌های دندانی

تصویر SEM مینای دندان سالم در شکل ۶ (الف) نشان داده شده است که هنوز در مجاورت محلول پوسیدگی قرار نگرفته است. سطح مینا به‌طور کامل صاف و عاری از میکروتخلخل‌های پوسیدگی است. با قرارگیری نمونه‌ها به مدت ۷۲ ساعت در محلول دیمینرالیزاسیون به علت افت pH به زیر pH بحرانی و نفوذ اسید به ساختار آپاتیت مینا، ماده‌ی معدنی مینا یعنی آپاتیت شروع به حل شدن می‌کند. در طول پیشروی پوسیدگی اولیه، انحلال مستقیم سطح مینا باعث ایجاد فضاهای بزرگ بین بلوری بر روی سطح مینا می‌شود که منجر به تسهیل نفوذ اسید و یون‌های معدنی به داخل و خارج از ساختار مینای متخلخل می‌گردد. همان‌طور که در شکل ۶

۴ - نتیجه گیری

- Combined effects of nano-hydroxyapatite and NaF on remineralization of early caries lesion, *Key Engineering Materials*, 330 (2007) 1347-1350.
8. Tschoppe, P., Zandim, D.L., Martus, P. and Kielbassa, A.M., Enamel and dentine remineralization by nano-hydroxyapatite toothpastes, *Journal of dentistry*, 39(6) (2011) 430-437.
 9. Esteves-Oliveira, M., Meyer-Lueckel, H., Rodrigues, J.A., Santos, N.M. and Wierichs, R.J., Caries-preventive effect of anti-erosive and nano-hydroxyapatite-containing toothpastes in vitro, *Clinical oral investigations*, 21(1) (2017) 291-300.
 10. Park, S.W., Kim, Y.U., Kim, K.N., Choi, H.J., Lee, Y.K., Kim, M.C. and Choi, B.J., The effect of hydroxyapatite on the remineralization of dental fissure sealant, *Key Engineering Materials*, 284 (2005) 35-38.
 11. Hornby, K., Evans, M., Long, M., Joiner, A. and Laucello, M., Salvaderi, A., Enamel benefits of a new hydroxyapatite containing fluoride toothpaste, *International Dental Journal*, 59 (2009) 325-331.
 12. Ishiwata, Y., Mishima, M., Kazama, H., Hoshiai, T. and Niwa, M., Zinc and magnesium content in human teeth. Nihon eiseigaku zasshi, *Japanese Journal of Hygiene*, 34(5) (1979) 697-705.
 13. Legfros, R.Z., Sakae, T., Bautista, C., Retino, M. and LeGeros, J.P., Magnesium and Carbonate in Enamel and Synthetic Apatites, *Advances in Dental Research*, 10(2) (1996) 225-231.
 14. Farzadi, A., Bakhshi, F., Solati-Hashjin, M., Asadi-Eydivand, M. and abuOsman, N.A., Magnesium incorporated hydroxyapatite: Synthesis and structural properties characterization, *Ceramics International*, 40(4) (2014) 6021-6029.
 15. Abdallah, M.N., Surface Reactivity of Tooth Enamel with Dyes, Oxidizing Agents and Magnesium Ions and Its Effect on Tooth Color, in Faculty of Dentistry 2013, McGill University: Montreal, Canada.
 16. Fadeev, I., Shvorneva, L.I., Barinov, S.M. and Orlovskii, V.P. Synthesis and structure of magnesium-substituted hydroxyapatite, *Inorganic Materials*, 39(9) (2003) 947-950.
 17. Stookey, G.K., The Featherstone laboratory pH cycling model: A prospective, multi-site validation exercise, *American Journal of Dentistry*, 24(5) (2011) 322.
 18. Landi, E., Tampieri, A., Mattioli-Belmonte, M., Celotti, G., Sandri, M., Gigante, A., Fava, P. and Biagini, G., Biomimetic Mg-and Mg₂CO₃ substituted hydroxyapatites: synthesis characterization and in vitro behaviour, *Journal of the European Ceramic Society*, 26(13) (2006) 2593-2601.
 19. Suchanek, W.L., Byrappa, K., Shuk, P., Riman, R.E., Janas, V.F. and TenHuisen, K.S., et al., Preparation of magnesium-substituted hydroxyapatite powders by the mechanochemical-hydrothermal method, *Biomaterials*, 25(19) (2004) 4647-4657.
 20. Kannan, S. and Ferreira, J., Synthesis and thermal stability of hydroxyapatite-β-tricalcium phosphate composites with cosubstituted sodium, magnesium, and fluorine, *Chemistry of materials*, 18(1) (2006) 198-203.
 21. Gawda, H., Sekowski, L. and Trebacz, H., In vitro examination of human teeth using ultrasound and X-ray diffraction, *Acta of Bioengineering and Biomechanics*, 6(1) (2004) 41-50.
 22. Venkatasubbu, G.D., Ramasamy S, Ramakrishnan, V., and Kumar, J., Nanocrystalline hydroxyapatite and zinc-doped hydroxyapatite as carrier material for controlled delivery of ciprofloxacin, *3 Biotech*, 1(3) (2011) 173-186.
 23. Pang, Y. and Bao, X., Influence of temperature, ripening time and calcination on the morphology and crystallinity

در مقایسه با سایر بافت‌های معدنی مانند استخوان، مینای دندان به دلیل عدم وجود سلول، تحت تأثیر بیماری‌های خاص دندان مانند پوسیدگی و دمینرالیزاسیون، قادر به ترمیم خود نیست؛ بنابراین، در حال حاضر، تنها راه ترمیم مینای دندان آسیب‌دیده، ترمیم با مواد مصنوعی است. نتایج حاصل از این تحقیق نشان داد که پودر MgHA حاوی منیزیم و کربنات جانشین شده در ساختار است. در اثر حضور یون منیزیم خصوصیات بلوری آپاتیت تغییر کرد و اندازه بلورها به نسبت هیدروکسی‌آپاتیت کاهش یافت. میکروسختی نمونه‌های دندانی در طی فرآیند pH-cycling، افزایش قابل‌ملاحظه‌ای از خود نشان داد که می‌توان نتیجه گرفت که نانوذرات آپاتیتی با تشکیل لایه‌ای جدید بر سطح مینا و پر کردن میکرو-تخلخل‌های ناشی از پوسیدگی به ترمیم ضایعات اولیه‌ی پوسیدگی کمک شایانی می‌کند. حضور یون منیزیم با تغییر در ساختار بلوری هیدروکسی‌آپاتیت همچون کاهش اندازه ذرات نسبت به هیدروکسی‌آپاتیت، رمینرالیزاسیون را بهبود می‌بخشد. با توجه به نتایج حاصل، می‌توان این‌گونه نتیجه‌گیری کرد که استفاده از ترکیبات آپاتیت بیومیمتیک در بهبود فرآیند رمینرالیزاسیون مثبت است و می‌توان از آن‌ها در محصولات پیشگیری‌کننده و ترمیم‌کننده‌ی پوسیدگی بهره برد.

مراجع

1. Slavkin, H.C. and Baum, B.J., Relationship of dental and oral pathology to systemic illness, *JAMA: the journal of the American Medical Association*, 284(10) (2000) 1215-1217.
2. Roveri, N., Foltran, I., Iafisco, M., Palazzo, B., Battistella, E., Foresti, E., Lelli, M. and Rimondini, L., Synthetic biomimetic carbonate-hydroxyapatite nanocrystals for enamel remineralization, *Advanced Materials Research*, 47 (2008) 821-824.
3. Choi, A.L. Sun G, Zhang Y. and Grandjean P., Developmental fluoride neurotoxicity: a systematic review and meta-analysis, *Environmental Health Perspectives*, 120(10) (2012) 1362-1368.
4. Huang, S., Gao, S. and Yu, H., Effect of nano-hydroxyapatite concentration on remineralization of initial enamel lesion in vitro, *Biomedical Materials*, 4(3) (2009) 034104.
5. Dorozhkin, S.V., Calcium orthophosphates in dentistry, *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, 24(6) (2013) 1335-1363.
6. Hellen, A., Quantitative Evaluation of Simulated Enamel Demineralization and Remineralization Using Photothermal Radiometry and Modulated Luminescence, (2010), University of Toronto.
7. Kwon, H., Kim, M.Y., Choi, C.H. and Kim, B.I.,

- of hydroxyapatite nanoparticles, *Journal of the European Ceramic Society*, 23(10) (2003) 1697-1704.
24. Zhai, Y., Cui, F. and Wang, Y., Formation of nano-hydroxyapatite on recombinant human-like collagen fibrils, *Current Applied Physics*, 5(5) (2025) 429-432.
 25. Koutsopoulos, S., Synthesis and characterization of hydroxyapatite crystals: a review study on the analytical methods, *Journal of biomedical materials research*, 62(4) (2002) 600-612.
 26. Kolmas, J., Jaklewicz, A., Zima, A., Bućko, M., Paszkiewicz, Z., Lis, J., Ślósarczyk, A. and Kolodziejcki, W., Incorporation of carbonate and magnesium ions into synthetic hydroxyapatite: the effect on physicochemical properties, *Journal of Molecular Structure*, 987(1) (2011) 40-50.
 27. Salimi, M.N., Bridson, R.H., Grover, L.M. and Leeke, G.A., et al., Effect of processing conditions on the formation of hydroxyapatite nanoparticles, *Powder Technology*, 218 (2012) 109-118.
 28. Elena Landi, A.T., Monica Mattioli-Belmonte, Giancarlo Celotti, Monica Sandri, Antonio Gigante, Paola Fava, Graziella Biagini, Biomimetic Mg- and Mg,CO₃-substituted hydroxyapatites: synthesis characterization and in vitro behavior, *Journal of the European Ceramic Society*, 26 (2006) 2593-2601.
 29. Feagin, F., Koulourides, T. and Pigman, W., The characterization of enamel surface demineralization, remineralization, and associated hardness changes in human and bovine material, *Archives of Oral biology*, 14(12) (1969) 1407-1417.
 30. Spencer, P., Barnes, C., Martini, J., Garcia, R., Elliott, C. and Doremus R., Incorporation of magnesium into rat dental enamel and its influence on crystallization, *Archives of oral biology*, 34(10) (1989) 767-771.
 31. LeGeros, R.Z., Piliero, J.A. and Pentel, L., Comparative properties of deciduous and permanent (young and old) human enamel, *Gerodontology*, 2(1) (1983) 1-8.