

بررسی خصوصیات حرارتی کامپوزیت پلی لاکتیک اسید با ذرات شیشه زیست فعال 45S5 و هیدروکسی آپاتیت (HA) به منظور استفاده در پیچ های تداخلی قابل جذب

محمد خورسندقاینی^۱، علیرضا صادقی اول شهر^{۲*}، سمیرا نوحاسته^۳، امیر مهدی مولوی^۴، حسین امینی^۵ مشهدی

۱- کارشناس ارشد، علوم و تکنولوژی پلیمر و عضو گروه پژوهشی مواد، سازمان جهاد دانشگاهی خراسان رضوی، مشهد، ایران

۲- دانشجوی دکتری مهندسی پزشکی و عضو گروه پژوهشی مواد، سازمان جهاد دانشگاهی خراسان رضوی، مشهد، ایران

۳- کارشناس ارشد، مهندسی پزشکی و عضو گروه پژوهشی مواد، سازمان جهاد دانشگاهی خراسان رضوی، مشهد، ایران

۴- دانشجوی دکتری، مواد و سرامیک و عضو گروه پژوهشی مواد، سازمان جهاد دانشگاهی خراسان رضوی، مشهد، ایران

۵- دکتر، مهندسی مواد و عضو گروه پژوهشی مواد، سازمان جهاد دانشگاهی خراسان رضوی، مشهد، ایران

*sadeghi_alireza@jdm.ac.ir

(تاریخ دریافت: ۱۳۹۵/۰۴/۱۹، تاریخ پذیرش: ۱۳۹۵/۰۸/۰۱)

چکیده

در ساخت کاشتنی های پزشکی جایگزینی فلزات با پلیمرها و به ویژه کامپوزیت های پلیمری قابل جذب، نتایج بسیار امیدوار کننده ای را به همراه داشته است. در طرح حاضر جهت ساخت پیچ های کامپوزیتی پلی لاکتیک اسید از ذرات شیشه زیست فعال 45S5 و نیز ذرات سرامیکی هیدروکسی آپاتیت استفاده شد. به همین منظور، پس از اختلاط ذرات افزودنی مذکور با مذاب پلیمر در دستگاه مخلوط کن داخلی، نمونه ها تحت پرس گرم با فشار ۰/۵ مگا پاسکال قرار گرفته و سپس خرد شدند. در نهایت، پودرهای کامپوزیتی به دست آمده توسط یک دستگاه تزریق پلاستیک دو مرحله ای در یک قالب چهار حفره ای تزریق گردیدند. خصوصیات حرارتی و ریز ساختار کامپوزیت های حاصله به کمک آزمون های آنالیز حرارتی افتراقی (DTA)، وزن سنجی حرارتی (TG)، میکروسکوپ الکترونی روبشی (SEM) و سنجش اندازه ذرات (PSA) مورد بررسی قرار گرفت. همچنین به منظور بررسی میزان فعالیت استخوان سازی نمونه ها از آزمون های رنگ آمیزی آلزارین قرمز و آلکالین فسفاتاز (ALP) استفاده شد و ارزیابی سمیت سلولی به کمک آزمون MTT صورت پذیرفت. در قیاس با نمونه پلیمری پلی لاکتیک اسید، پایداری حرارتی کامپوزیت پلی لاکتیک اسید با ذرات هیدروکسی آپاتیت افزایش و نمونه های پلی لاکتیک اسید با شیشه 45S5 کاهش نشان دادند. نتایج حاصل از آزمون های سلولی حاکی از عدم سمیت و فعالیت استخوان سازی مناسب در هر دو گروه کامپوزیت می باشد.

واژه های کلیدی:

پیچ قابل جذب، کامپوزیت ارتوپدی، پلی لاکتیک اسید، هیدروکسی آپاتیت، شیشه زیست فعال.

مهمترین گروه از پلیمرهای قابل جذب در بدن که اخیراً در

۱- مقدمه

مهمترین محدودیت‌های آن جهت تولید در مقیاس وسیع صنعتی است. کوپلیمر کردن، آمیخته‌سازی و استفاده از پرکننده‌ها می‌تواند باعث افزایش مقاومت حرارتی این پلیمرها شده و زیست‌سازگاری آن‌ها را تا حدود زیادی بهبود بخشند. در این رابطه، به دلیل بهبود خواص فیزیکی، زیستی و مکانیکی بهتر در مقایسه با پلیمرهای خالص، کامپوزیت‌های پر شده با ذرات زیست‌فعال به طور چشمگیری برای کاربرد به عنوان ایمپلنت‌ها و داربست‌های مهندسی بافت مطرح شده‌اند [۶-۷]. شیشه‌ها و سرامیک‌های زیست‌فعال دو مورد از مواد زیست‌فعال پرمصرف در این حوزه هستند. شیشه‌های زیست‌فعال ضریب زیست‌فعالی بالا و توانایی پیوند با بافت‌های نرم و سخت را دارند در حالی که سرامیک‌هایی نظیر هیدروکسی‌آپاتیت، ضریب زیست‌فعالی کمتری را نشان داده و تنها با بافت‌های سخت پیوند می‌دهند [۸-۱۰].

شیشه زیست‌فعال 45S5 که با نام تجاری Bioglass® (ترکیب وزنی ۴۵٪ SiO_2 ، ۲۴٪ Na_2O ، ۲۴٪ CaO و ۶٪ P_2O_5) در جهان شناخته می‌شود، دارای تاییدیه سازمان غذا و داروی آمریکا (FDA) بوده و در حال حاضر به طور وسیع به عنوان پرکننده استخوانی مورد استفاده قرار گرفته است. استفاده از این ماده و ترکیب آن با پلیمرهای طبیعی و سنتزی در مقاله مروری بوک‌چینی و همکاران [۱۱] به تفصیل ارائه شده است. هیدروکسی‌آپاتیت $(\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2)$ جزء معدنی اصلی در بافت‌های سخت انسانی بوده (۶۹٪ وزنی) و در مورد استفاده و تأثیر آن بر خواص حرارتی و زیست‌سازگاری کامپوزیت‌های PLLA مقالات بسیاری ارائه شده است [۱۲-۱۴]. با این حال تاکنون مقایسه‌ای بطور خاص بین خواص حرارتی و زیست‌فعالی این دو نوع کامپوزیت در کارهای تحقیقاتی مشاهده نمی‌گردد. به همین جهت و در راستای افزایش فعالیت استخوان‌سازی پلیمر زیست‌تخریب‌پذیر PLLA، در پژوهش حاضر این ذرات به ماتریس پلیمری اضافه و در نهایت نتایج برخی از خواص آن‌ها با هم مقایسه شد.

ساخت قطعات کاشتنی مورد توجه قرار گرفته‌اند پلی‌آلفا-هیدروکسی استرها هستند. این مواد در حقیقت بهترین جایگزین فلزات هستند. قطعات قابل جذب در داخل قسمت تثبیت شده باقی مانده، به تدریج تجزیه شده و تنش‌ها به صورت گرادپانی به بافت در حال درمان منتقل می‌شود. در این شرایط مشکل سپر تنش^۱ و پوکی استخوان پس از طی دوره درمان رخ نمی‌دهد و انطباق مدول الاستیک با بافت مربوطه بیشتر است. همچنین قطعات قابل جذب در بدن نیاز به جراحی مجدد برای خارج کردن ندارند. عدم تداخل در هنگام تصویربرداری با تکنیک‌های نظیر MRI و یا CT از دیگر مزیت‌های این مواد است. مزیت کاهش احتمال پارگی بافت نرم تاندون هنگام نصب پیچ‌های تداخلی قابل جذب در قیاس با انواع فلزی نیز یکی دیگر از مزیت‌های آنهاست [۱]. این مواد که سرانجام توسط گلیه یا از طریق تنفس در شش‌ها از بدن خارج می‌شوند به دلیل تخریب آهسته به پلی‌لاکتیک اسید و پلی‌گلیکولیک اسید تبدیل شده و در محیط اطراف خود حل می‌شوند [۲].

در میان خانواده پلی‌آلفا-هیدروکسی استرها، پلی‌لاکتیک اسید پلیمری نیمه کریستالی با دمای انتقال شیشه‌ای در حدود ۵۵ درجه سانتیگراد، پلیمری ترد و شکننده با کشیدگی جزیی در نقطه شکست است. این پلیمر، از پلیمریزاسیون مونومرهای لاکتیک اسید یا از طریق واکنش پلیمریزاسیون حلقه‌گشای^۲ مونومرهای لاکتاید به دست می‌آید. بسته به خواص نوری زنجیره‌های پلی‌استر به ویژه میزان واحدهای لاکتیک اسید، دمای ذوب آن می‌تواند بالاتر از ۱۷۵ درجه سانتیگراد باشد. به علت زیست‌سازگاری و زیست‌تخریب‌پذیری، از این ماده در بسیاری از کاربردها نظیر تثبیت‌کننده‌های ارتوپدی، زخم‌پوش‌ها، مواد کاشتنی، نخ‌های بخیه قابل جذب، سیستم‌های ره‌ایش دارو و داربست‌های مهندسی بافت استفاده می‌شود [۳-۵].

فقدان فعالیت زیستی خانواده پلی‌استرها یکی از معایب آن‌ها برای کاربرد در حوزه زیست‌مواد پزشکی است. علاوه بر این، مقاومت حرارتی و مکانیکی ضعیف پلی‌لاکتیک اسید از

۲- مواد و روش انجام تحقیق

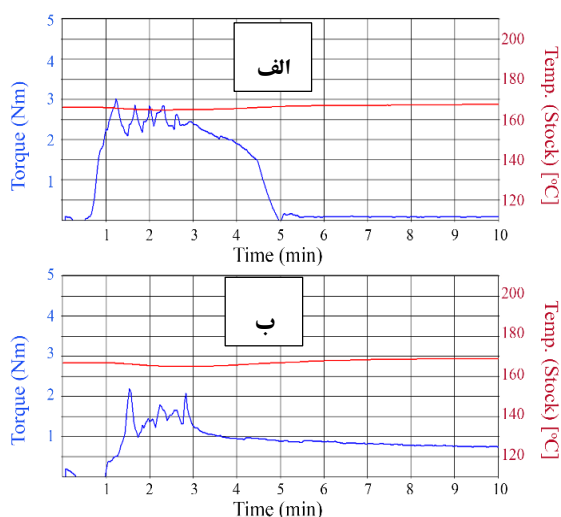
۲-۱- مواد اولیه

پلیمر پلی ال-لاکتیک اسید (PLLA) (وزن مولکولی: ۱۳۰۰۰۰ دالتون، شاخص پراکندگی (PDI): ۱/۸ با چگالی: ۱/۲۴ g.cm^{-۱}) از شرکت jian daigang biomaterial (چین) خریداری شد. شیشه زیست فعال از پژوهشگاه مواد و انرژی ایران و ذرات هیدروکسی آپاتیت از شرکت دانش بنیان نانو زیست آرایه (انستیتو پاستور، ایران) تهیه شدند.

۲-۲- فرآیند تولید

مواد اولیه به منظور تولید کامپوزیت‌هایی شامل ۲۵٪ وزنی، توزین شده و جهت مخلوط کردن مواد و کاهش اندازه گرانول‌های پلیمری، عملیات آسیابکاری با آسیاب ماهواره‌ای (مدل PM100-Retsch ساخت کشور آلمان) مجهز به ظرف عقیق انجام گردید. مخلوط گرانول‌های پلیمری به همراه هر کدام از ذرات شیشه زیست فعال و هیدروکسی آپاتیت به مدت یک ساعت و با میزان چرخش ۳۰۰ دور بر دقیقه آسیابکاری شدند. پس از عملیات آسیابکاری به منظور توزیع یکنواخت ذرات ذکر شده در فاز پلیمری، از دستگاه مخلوط کن داخلی^۳ (brabender مدل W50 ساخت کشور آلمان) استفاده شد. در هنگام ذوب شدن گرانول‌های پلیمری در داخل مخلوط‌کن، پلیمر و ذرات توسط پره دستگاه کاملاً با یکدیگر مخلوط می‌شوند تا توزیع نسبتاً یکنواختی از ذرات در زمینه پلیمری حاصل شود. دمای عملیات ۱۷۰ درجه سانتیگراد و سرعت چرخش پره ۵۰ دور بر دقیقه تنظیم شد. در دستگاه مخلوط کن داخلی، جهت حصول یک توزیع یکنواخت از ذرات در فاز زمینه و به منظور تعیین زمان مناسب مورد نیاز برای اختلاط موثر مذاب پلیمری با فاز تقویتی زمینه، از نمودار گشتاور-زمان استفاده می‌شود. در حقیقت با یکنواخت تر شدن مخلوط، گشتاور مورد نیاز برای هم زدن کاهش یافته و در نهایت ثابت می‌شود. میزان گشتاور توسط مبدل مربوطه ثبت و با توجه به نمودار، زمان کارکرد مناسب دستگاه مشخص می‌شود. پس از

ثابت شدن میزان گشتاور که نشان‌دهنده همگن شدن مخلوط است، هم زدن تا مدت زمان ۱۰ دقیقه ادامه یافت (شکل ۱). مواد حاصل سپس تحت پرس گرم با فشار ۰/۵ مگا پاسکال قرار گرفته و بعد از یک مرحله خردایش، در دستگاه قالب‌گیری تزریقی دو مرحله‌ای (ساخت جهاد دانشگاهی مشهد) در یک قالب تزریق چهار حفره‌ای تزریق شده و پیچ‌هایی با قطر ۱۰ mm و طول ۳۴ mm تولید گردیدند.



شکل (۱): نمودارهای گشتاور به دست آمده از دستگاه مخلوط کن داخلی: (الف) نمونه کامپوزیت شیشه زیست فعال و (ب): نمونه کامپوزیت هیدروکسی آپاتیت

سه گروه نمونه تولید شده عبارتند از: نمونه‌های بدون فاز تقویتی (PLLA)، نمونه‌های تقویت شده با ذرات هیدروکسی آپاتیت با ۲۵٪ وزنی (PLLA-HA)، و نمونه‌های تقویت شده با ۲۵٪ وزنی شیشه 45S5 (PLLA-45S5).

۲-۳- آزمون اندازه ذرات

اندازه ذرات با استفاده از دستگاه آنالیزگر اندازه ذرات^۴ (SHIMADZU مدل SALD-2101 ساخت کشور ژاپن) تعیین شد. بدین منظور ابتدا ذرات درون آب دیونیزه پراکنده شده و به مدت ۱۰ دقیقه تحت اولتراسونیک قرار گرفتند. سپس جهت تعیین اندازه ذرات، مقداری از محلول حاصل درون دستگاه وارد

و نتایج حاصل از آن ثبت شد.

قرمز ۲٪ (۴/۳ - ۴/۱) pH) قرار گرفتند. در انتها سلول‌ها دو بار با محلول کلرید سدیم ۰/۹٪ شستشو شدند و مقدار جزء معدنی رنگ شده به وسیله میکروسکوپ نوری مشاهده شد.

۲-۴- بررسی مورفولوژی سطحی نمونه‌ها با SEM

به منظور سنجش نحوه توزیع ذرات افزودنی در بستر پلیمری، از سطح شکست نمونه‌ها با استفاده از میکروسکوپ الکترونی روبشی (SEM, LEO-VP 1450) تصویربرداری شد. در مرحله آماده‌سازی برای تهیه تصاویر SEM، سطح نمونه‌های کامپوزیتی توسط دستگاه لایه نشانی پاششی با لایه‌ای از طلا پوشانده شد.

۲-۵- آزمون‌های حرارتی (DTA & TGA)

ارزیابی رفتار گرمایی کامپوزیت‌های تهیه شده با استفاده از دستگاه آنالیز حرارتی (BAHR STA 503، ساخت آلمان) صورت گرفت. حدود ۱۵ میلی گرم از هر کدام از نمونه‌ها وزن و سپس درون بوته‌هایی از جنس آلومینیوم قرار گرفتند. نمونه‌ها با نرخ گرمایش ۱۰ °C بر دقیقه تا دمای ۵۰۰ °C حرارت داده شده و نمودارهای مربوطه ثبت گردید.

۲-۶- آزمون‌های برون تنی (in-vitro)

۲-۶-۱- رنگ آمیزی به روش آلیزارین قرمز

آلیزارین قرمز در آزمون‌های بیوشیمیایی برای تعیین و اندازه‌گیری حضور رسوبات کلسیم توسط سلول‌های استخوان‌ساز به کار می‌رود. این رنگ می‌تواند در مراحل اولیه معدنی شدن ماتریس خارج سلولی استفاده شود که در این زمان ماتریس خارج سلولی، مشابه با استخوان واقعی آهکی می‌گردد. نحوه انجام رنگ آمیزی:

تعداد ۵×۱۰^۳ سلول در مجاورت عصاره نمونه‌ها و محیط کشت استاندارد به عنوان شاهد به همراه ۱۰٪ سرم جنین گاوی^۵ به مدت سه روز نگهداری شد. در روز سوم محیط روی سلول‌ها خارج گردید و دو بار با محلول کلرید سدیم ۰/۹٪ شستشو شد. سپس فرآیند تثبیت سلول‌ها به کمک پارافرمالدئید ۱٪ (۱ گرم در ۱۰۰ میلی لیتر) به مدت ۱۰ دقیقه انجام گرفت. در مرحله بعد، سلول‌ها در دمای اتاق به مدت ۴۵ دقیقه در مجاورت محلول آلیزارین

۲-۶-۲- آلكالين فسفاتاز (ALP)

آزمایش آلكالين فسفاتاز از خانواده آئزيم‌های هیدرولیز کننده است که به طور طبیعی در تمامی بافت‌های بدن یافت می‌شود. این آزمون به کمک دستگاه اتوانالایزر و کیت شرکت پارس آزمون ایران انجام شد که طی آن تعداد ۱۰^۴ سلول استتوبلاست بر روی نمونه‌ها ریخته شد و میزان ترشح الكالين فسفاتاز از سلول‌ها در فواصل زمانی یک، هفت و چهارده روز محیط کشت سلول‌ها ارزیابی شد [۳].

۲-۶-۳- تعیین زنده‌مانی سلول‌ها با استفاده از MTT Assay

در این مطالعه ابتدا حدود ۱×۱۰^۴ سلول در هر کدام از چاهک‌های ظرف کشت ۹۶ چاهکی ریخته و حدود ۱۰۰ میکرولیتر محیط کشت به هر یک از آن‌ها اضافه گردید. سپس ظرف کشت به مدت ۲۴ ساعت در داخل انکوباتور قرار گرفت. پس از چسبیدن سلول‌ها و اطمینان از سلامتی آن‌ها، محیط کشت به طور کامل خارج شد و ۹۰ میکرولیتر عصاره میکروذرات خریداری شده، به همراه ۱۰ میکرولیتر سرم جنین گاوی به سلول‌ها اضافه گردید. یک نمونه نیز به عنوان شاهد در مجاورت محیط کشت استاندارد قرار داده شد. مجدداً ظرف کشت به مدت ۲۴ ساعت به انکوباتور منتقل گردید. در روز سوم، کل محیط به طور کامل خارج و ۱۰۰ میکرولیتر محلول MTT (۰/۵ میلی گرم بر میلی لیتر) بر روی سلول‌ها ریخته شد. سپس ظرف کشت به مدت ۴ ساعت در داخل انکوباتور قرار گرفت. در ادامه MTT خارج گردید و ۱۰۰ میکرولیتر ایزوپروپانول (Sigma, USA) برای انحلال رسوب سیاه رنگ حاصل از MTT به هر چاهک افزوده شد. برای حل شدن بهتر رسوب MTT، پلیت به مدت ۱۵ دقیقه بر روی دستگاه شیکر قرار گرفت. در نهایت با

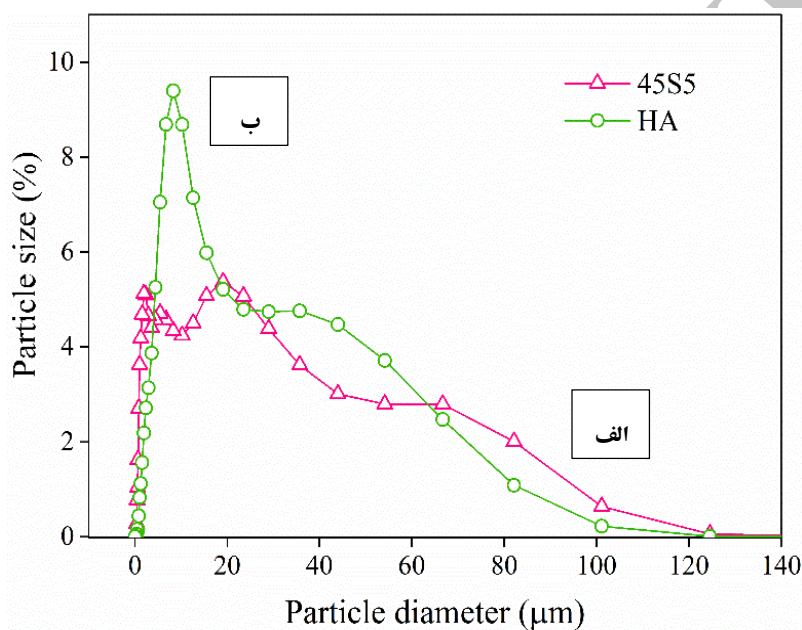
۲ آورده شده است به وضوح می توان دید که توزیع اندازه ذرات هیدروکسی آپاتیت در مقایسه با ذرات شیشه زیست فعال یکنواخت تر بوده و میزان حضور ذرات کوچکتر در آن بیشتر است. میانگین اندازه ذرات به دست آمده برای ذرات شیشه زیست فعال در حدود ۱۷/۲۲ میکرومتر و برای ذرات هیدروکسی آپاتیت در حدود ۷/۴۹ میکرومتر است.

استفاده از دستگاه الیزا (STAT FAX 2100, USA) و طول موج ۵۴۵ نانومتر میزان تغییرات رنگی ارزیابی شد. این آزمون برای رده سلولی MG63 و در سه نوبت عصاره گیری یک، هفت و چهارده روز انجام شد.

۳- نتایج و بحث

۳-۱- اندازه ذرات

با توجه به نتایج حاصل از آزمون تعیین اندازه ذرات که در شکل

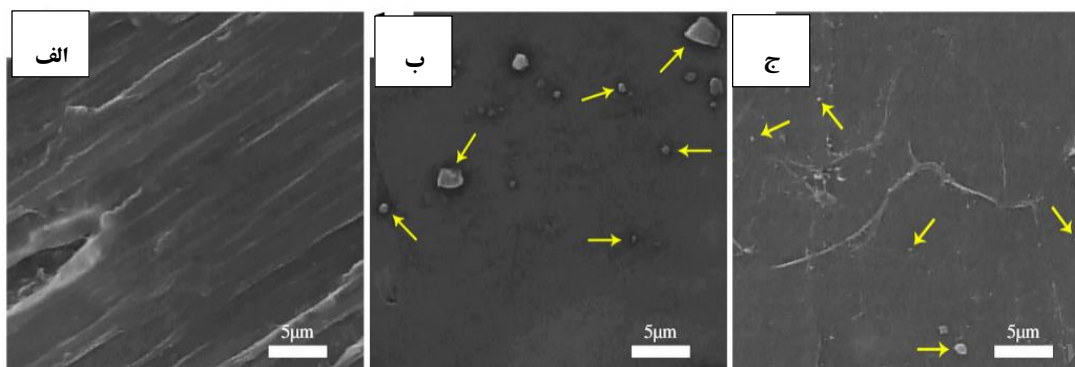


شکل (۲): نمودار آنالیز اندازه ذرات مورد استفاده در کامپوزیت سازی: (الف): ذرات شیشه زیست سازگار 45S5 و (ب): ذرات HA

آپاتیت حضور ذره‌های افزودنی که تعدادی از آن‌ها با پیکان مشخص شده‌اند به وضوح قابل مشاهده است.

۳-۲- مشاهدات SEM

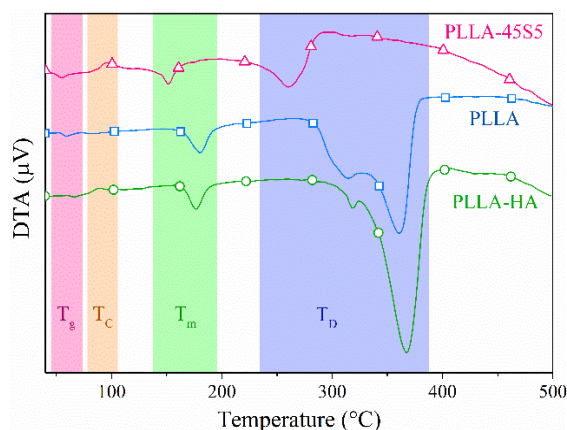
تصاویر SEM سطح مقطع نمونه‌های کامپوزیتی در شکل ۳ آورده شده است. همان‌طور که در شکل مشاهده می‌شود نمونه پلیمر خالص دارای هیچ‌گونه ذره افزودنی نیست در حالی که نمونه‌های کامپوزیت شده با شیشه زیست فعال و هیدروکسی



شکل (۳): تصاویر SEM نمونه های: (الف): PLLA، (ب): PLLA-45S5 و (ج): PLLA-HA

آپاتیت به پلی لاکتیک اسید.

نتایج حاصل از آزمون گرما وزن سنجی (TGA) و آنالیز حرارتی افتراقی (DTA) کامپوزیت های به دست آمده به ترتیب در شکل های ۴ و ۵ آورده شده است.



شکل (۵): نتایج حاصل از آزمون آنالیز حرارتی افتراقی

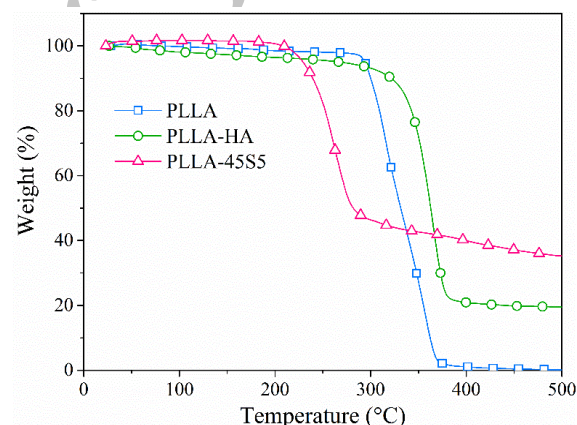
(حدود ۲۳۶/۲۴ درجه) در حالی که حضور ذره های هیدروکسی آپاتیت باعث بالارفتن دمای شروع تخریب کامپوزیت (دمای ۳۱۷/۴۸) می شود. وزن خاکستر باقیمانده نمایانگر میزان حضور ذره های افزودنی یا ناخالصی در ماتریس پلیمری است. طی آنالیز حرارتی ماتریس پلیمری خالص کاملاً تخریب می شود. حضور ذرات معدنی در ماتریس پلیمری رفتار گرمایی کامپوزیت را تغییر می دهد [۱۵]. در مورد نمونه کامپوزیت شده با هیدروکسی آپاتیت، افزایش خواص حرارتی ماده را می توان به علت حضور ذرات در ماتریس پلیمری دانست. در مقایسه با پلیمر خالص، ثابت انتقال حرارت در ذرات هیدروکسی آپاتیت

۳-۳- آنالیزهای حرارتی

کامپوزیت سازی و افزودن ذرات معدنی به ماتریس های پلیمری به منظور افزایش خواص زیستی مطلوب، یکی از زمینه های تحقیقاتی مهم در سال های اخیر بوده است.

در این تحقیق، آزمون های حرارتی به صورت ویژه به دو منظور زیر مورد استفاده قرار گرفته اند:

۱- بررسی تاثیر افزودن ذرات شیشه زیست فعال و هیدروکسی



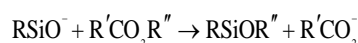
شکل (۴): نتایج حاصل از آنالیز حرارتی

همان گونه که در این شکل ها ملاحظه می گردد، این ذرات افزودنی منجر به تغییر رفتار حرارتی پلیمر گشته که بر روی وزن مولکولی محصول تاثیر می گذارد. این امر نیز در هنگام قرار گرفتن در محیط بیولوژیکی به نوبه خود در خواص نظیر نرخ تخریب و استحکام مکانیکی محصول نهایی تاثیر گذار بوده و می تواند در مراحل بعدی جهت تولید و ارزیابی های خواص مکانیکی و فیزیکی محصول مورد استفاده قرار گیرد.

در مقایسه با پلیمر خالص که دمای شروع تخریب آن ۲۹۲/۷۷ درجه سانتیگراد است، شکل ۴ نشان می دهد که افزودن شیشه زیست فعال باعث کاهش چشمگیر مقاومت حرارتی ماده شده

یک شانه بزرگ مشاهده می شود، حال آن که در مورد نمونه PLLA-HA یک پیک تخریب تیز به همراه یک شانه کوچک و در مورد نمونه PLLA-45S5 تنها یک پیک تخریب وسیع و گسترده مشاهده می شود.

در مورد ذرات شیشه زیست فعال میزان کاهش مقاومت حرارتی ماده را می توان توسط واکنشی که توسط بلاکر و همکاران پیشنهاد شده توجیه نمود. این واکنش که بین شیشه زیست فعال و پلی استر صورت می گیرد در نهایت در دماهای بالا منجر به تخریب سریعتر ماده می شود [۱۵،۹]:



شیشه های بر پایه سیلیکا مثل شیشه زیست فعال 45S5 شامل پیوندهای Si-O-Si هستند که در سطح حاوی گروه های هیدروکسیل هستند. این گروه ها در معرض رطوبت می توانند به SiO^- شکسته شده و در عوض به یون های مخالف Na^+ بیونند، که می توانند باعث برش اتفاقی زنجیره های پلیمر شوند. در نتیجه این عمل جرم مولکولی زنجیر پلیمری، بدون کاهش جرم چشم گیر در وزن ماده، کاهش می یابد و در نهایت این امر باعث کاهش خواص حرارتی ماده می شود [۹].

مسیر غالب تخریب گرمایی PLLA از طریق واکنش های تبادل استری و حذف سیس است. تبادل استری باعث تشکیل الیگومرهای حلقوی می شود در حالی که محصول نهایی حذف سیس آکریلیک اسید است [۱۷،۹].

طبق تحقیقی از مک نیل و لیپر^۶ [۱۷]، مکانیزم های متفاوتی برای تخریب گرمایی پلی لاکتیک اسید گزارش شده اند. بر طبق این پژوهش مسیرهای تخریب پلی لاکتیک به مسیرهای غیر رادیکالی و مسیرهای رادیکالی تقسیم می شوند. آن ها بیان کرده اند که عمده ترین مکانیزم های تخریب حرارتی PLLA در دسته مکانیزم های غیر رادیکالی قرار می گیرند. این دسته از واکنش ها در قالب تبادل استری و از طریق گاز زدن از پشت^۷ به دلیل حضور گروه های انتهایی هیدروکسیل است. بسته به طول زنجیر

متفاوت است در نتیجه به عنوان موانع انتقال حرارت عمل کرده و حفره هایی را تشکیل می دهند که تخلخل سیستم را تعیین می کنند [۱۶]. به عبارت دیگر، به دلیل عدم هدایت ثابت گرما در نتیجه حضور ذرات هیدروکسی آپاتیت و تخلخل، نمونه کامپوزیت شده در مقایسه با پلیمر خالص در محدوده درجه حرارت آزمون دارای مقاومت حرارتی بیشتری است.

۲- بررسی میزان حضور ذرات در ماتریس پلیمری با توجه به وزن باقیمانده در آزمون TGA میزان در صد وزن باقی مانده در نمونه های کامپوزیتی نشان دهنده میزان حضور ذرات در نمونه های مورد آزمون است که برای نمونه کامپوزیت شیشه زیست فعال در حدود ۳۵/۲۵٪ و برای نمونه کامپوزیت هیدروکسی آپاتیت ۱۹/۴۷٪ به دست آمده است. نمودار آنالیز حرارتی افتراقی در شکل ۵ و نتایج حاصل از آن در جدول ۱ آورده شده اند.

جدول (۱): نتایج حاصل از نمودارهای DTA

T _D (\$)	T _m (\$)	T _m	T _C (\$)	T _g	
۳۶۰/۸۸	۱۸۰/۲۷	۱۶۴/۱۰	-	۵۳/۴۹	PLLA
۲۶۰/۳۶	۱۵۱/۶۴	۱۴۶/۲۹	۹۵/۶۹	۴۹/۴۵	PLLA-45S5
۳۶۷/۴۹	۱۷۶/۶۸	۱۶۴/۶۳	۸۹/۳۲	۶۱/۳۲	PLLA-HA

(\$) این نتایج از ماکزیم پیک های مربوطه به دست آمده اند.

با توجه به این نتایج به وضوح می توان مشاهده نمود که افزودن شیشه زیست فعال به ماتریس پلیمری به جز در دمای تبلور سرد (T_c)، باعث کاهش دیگر خواص حرارتی کامپوزیت حاصله شده در حالی که افزودن هیدروکسی آپاتیت به ماتریس پلیمری به جز در ماکزیم دمای ذوب (T_m)، در بقیه موارد باعث افزایش خواص حرارتی کامپوزیت به دست آمده می شود. همچنین در مقایسه با گرانول اولیه به وضوح می توان ظهور دو پیک تبلور سرد را در نمونه های کامپوزیت شده مشاهده نمود. در مورد نمونه PLLA یک پیک تخریب (T_D) پهن به همراه

که در نمونه دارای هیدروکسی آپاتیت، فرآیند تخریب گرمایی بیشتر به سمت حذف سیس میل می کند. کاسته شدن از پهنای پیک شانه و افزایش در قدرت پیک اصلی تخریب را نیز شاید بتوان دلیلی بر این امر دانست.

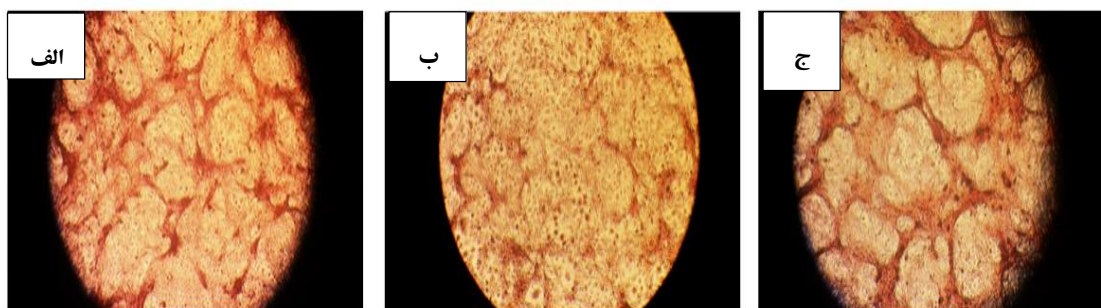
۳-۴- نتایج حاصل از آزمون‌های برون‌تنی

۳-۴-۱- آزمون رنگ آمیزی آلزارین قرمز

میزان کلسیم ترشح شده از سلول‌ها توسط آزمون آلزارین قرمز مورد ارزیابی قرار گرفت. شکل ۶ نتایج آزمون کیفی رنگ آمیزی آلزارین قرمز را نشان می‌دهد.

در گیر در این مکانیزم لاکتاید، الیگومرها، یا استالدهید به همراه مونوکسید کربن تولید می‌شوند.

ظهور پیک گسترده و دارای شانه در نمودارهای DTA نشان‌دهنده پیچیده بودن روند تخریب گرمایی نمونه توسط ترکیبی از مکانیزم‌های ذکر شده در بالاست [۹]. به نظر می‌رسد ظهور پیک پهن و دارای شانه بزرگ در نمونه پلیمر خالص می‌تواند به دلیل تخریب توسط دو مکانیزم اصلی تبادل استری و تا حدودی حذف سیس باشد. ذکر شده است که تبادل استری انرژی فعال‌سازی کمتری از حذف سیس دارد [۸]. حضور هیدروکسی آپاتیت در ماتریس PLLA باعث شروع تخریب در دماهای بالاتر شده است. با استفاده از این مطلب به نظر می‌رسد



شکل (۶): نتایج حاصل از آزمون آلزارین قرمز برای: (الف): نمونه PLLA، (ب): نمونه PLLA-45S5 و (ج): نمونه PLLA-HA

است. این آنزیم در فرآیند آهکی شدن و تولید پروتئین همراه با ماتریس استخوان دخیل است. بنابراین هنگام تولید ماتریس استخوانی توسط استئوبلاست‌ها، میزان فعالیت این آنزیم به مقدار زیادی بالا رفته و از آن به عنوان یک عامل مشخصه جهت تشخیص فعال بودن استئوبلاست‌ها در فرآیند استخوان‌سازی استفاده می‌کنند [۲۰]. برطبق مقالات مطالعه شده انتظار می‌رفت شیشه زیست فعال و هیدروکسی آپاتیت باعث افزایش استخوان سازی در کامپوزیت‌های نهایی شوند، نتایج این آزمون کاهش فعالیت استخوان‌سازی این نمونه‌ها را در مقایسه با PLLA خالص در زمان‌های ذکر شده است.

در این آزمون میزان ترشح آنزیم آلكالین فسفاتاز توسط سلول‌ها ارزیابی می‌گردد. نتایج حاصل از این آزمون در شکل ۷ آورده

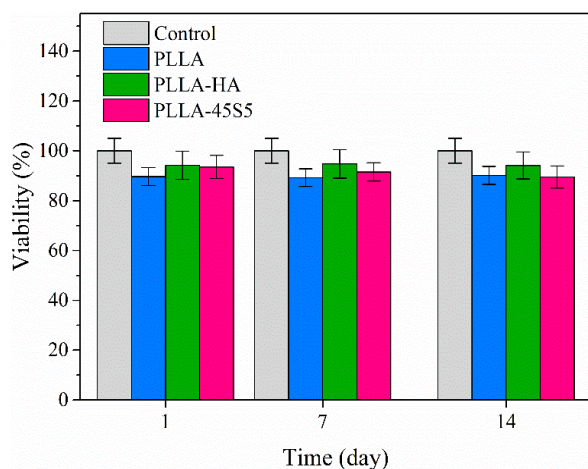
فعالیت استخوان‌سازی سلول‌ها در همه تصاویر با رنگ قرمز قابل مشاهده است. همان‌طور که در شکل مشاهده می‌شود سلول‌های نشانده شده روی پلیمر خالص و نمونه‌های کامپوزیت شده، فعالیت استخوان‌سازی نشان داده‌اند.

۳-۴-۲- آزمون آلكالین فسفاتاز

استفاده از آزمون ALP جهت ارزیابی فعالیت استخوان‌سازی سلول‌ها بسیار رایج است [۱۸، ۳-۱۹]. آنزیم آلكالین فسفاتاز در اکثر سلول‌ها از نوع آنزیم‌های غشاء سلولی بوده و تا کنون غلظت‌های بالای آن در سلول‌های کبدی، کلیوی، استخوانی (استئوبلاست) و جفت گزارش شده است. عمل این آنزیم، کاتالیز هیدرولیز استرهای منوفسفریک در یک محیط قلیایی

محصولات نهایی جهت کاربردهای زیست پزشکی استفاده شود، پی بردن به پایداری حرارتی و رفتار تخریب پلیمرها بسیار حائز اهمیت است [۵، ۸-۹]. در این پژوهش، نتایج ارزیابی آزمون زنده مانی سلول‌های استئوبلاست ثابت کرده اند که کامپوزیت‌های به دست آمده سمی نبوده و طی فرآیند قالب‌گیری حرارتی و تشکیل کامپوزیت هیچ گونه ماده جانبی سمی که باعث از بین رفتن سلول‌ها شود ایجاد نمی‌گردد.

نتایج به دست آمده از آزمون زنده مانی سلول‌ها در مجاورت کامپوزیت‌های به دست آمده که در شکل ۸ نشان داده شده است، زنده ماندن سلول‌ها در مجاورت نمونه PLLA-، PLLA-45S5 و نمونه PLLA-HA را تایید می‌کنند. هیچ گونه سمیت و کاهش جمعیت سلولی در مقایسه با ظرف کشت مشاهده نمی‌شود.



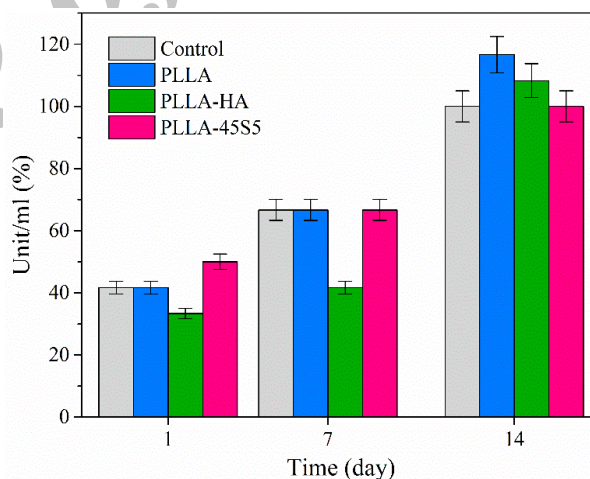
شکل (۸): نتایج حاصل از آزمون MTT

هم نشان نمی‌دهند ممکن است همزمان با افزایش در یک فعالیت، فعالیت دیگر کاهش یافته باشد و بالعکس. به عنوان مثال می‌توان با مقایسه نمونه کنترل PLLA با نمونه PLLA-HA مشاهده کرد که در حالی که زنده مانی و تکثیر در مورد نمونه دارای هیدروکسی آپاتیت افزایش یافته است، ترشح آنزیم آلکالین فسفاتاز نسبت به نمونه PLLA کاهش یافته است.

شده است. این نتایج افزایش فعالیت استخوان سازی سلول‌ها را در مواجهه با کامپوزیت‌های به دست آمده در بازه‌های زمانی ذکر شده نشان می‌دهد. با استناد به تصویر می‌توان گفت که فعالیت آنزیم آلکالین فسفاتاز برای همه نمونه‌ها در بازه‌های زمانی ذکر شده افزایش داشته است.

۳-۴-۳- آزمون زنده مانی سلولها (MTT)

پلی استرهای زیست تخریب پذیر و کopolymerهای آن‌ها بسیار مستعد تولید با فرآیندهای گرمایی نظیر قالب‌گیری تزریقی، قالب‌گیری دمشی، شکل دهی حرارتی و اکستروژن هستند [۹]. علاوه بر تاثیر چشمگیر این فرآیندها بر برخی خواص مهم مواد (به عنوان مثال خواص مکانیکی)، هر فرآیند فرآورده جانبی ناشی از تخریب گرمایی در طی فرآیند نیز می‌تواند در محیط بدن اثرات سمی داشته باشد. بنابراین هنگامی که از این فرآیندها در تولید



شکل (۷): نتایج حاصل از آزمون آلکالین فسفاتاز

به صورت ذاتی سلول‌ها در حال ترشح یا تکثیر هستند. در واقع هر دو کار را به صورت همزمان انجام نمی‌دهند و انرژی خود را در هر زمان صرف یکی از این دو می‌نمایند. آزمون زنده مانی سلولی نشان دهنده میزان تکثیر آن‌ها و از سوی دیگر آزمون ALP نشان دهنده میزان ترشح آلکالین فسفاتاز از سلول‌ها است. به عبارت دیگر از آنجایی که سلول‌ها رفتار تکثیر و ترشح را با

مهندسی مواد، شماره ۱، صفحات ۷۱-۸۹، ۱۳۹۵.

۴- نتیجه گیری

[۷] ا. یزدانی چم زینی، م. رفیعی نیا، ب. موحدی، و ح. صالحی، "سنتر و رزیابی سمیت سلولی نانوالیاف شیشه ی زیستی تهیه شده به روش الکترورسی جهت ساخت داربست مهندسی بافت"، فرآیندهای نوین در مهندسی مواد، شماره سه، صفحات ۱۴۵-۱۵۴، ۱۳۹۴.

[8] K. Chrissafis & D. Bikiaris, "Can nanoparticles really enhance thermal stability of polymers? Part I: An overview on thermal decomposition of addition polymers", *Thermochim. Acta*, Vol. 523, No. 1-2, pp. 1-24, 2011.

[9] A. Larrañaga & J. R. Sarasua, "Effect of bioactive glass particles on the thermal degradation behaviour of medical polyesters", *Polym. Degrad. Stab*, Vol. 98, No. 3, pp. 751-8, 2013.

[10] Y. Ramot, M. H. Zada, A. J. Domb & A. Nyska, "Biocompatibility and safety of PLA and its copolymers", *Adv. Drug Deliv. Rev*, 2016.

[11] A. R. Boccaccini, M. Erol, W. J. Stark, D. Mohn, Z. Hong & J. F. Mano, "Polymer/bioactive glass nanocomposites for biomedical applications: A review", *Compos. Sci. Technol*, Vol. 70, No. 13, pp. 1764-76, 2010.

[12] I. Armentano, M. Dottori, E. Fortunati, S. Mattioli & J. M. Kenny, "Biodegradable polymer matrix nanocomposites for tissue engineering: A review", *Polym. Degrad. Stab*, Vol. 95, No. 11, pp. 2126-46, 2010.

[13] H. Deplaine, J. L. K. Ribelles G. G. Ferrer, "Effect of the content of hydroxyapatite nanoparticles on the properties and bioactivity of poly(L-lactide) - Hybrid membranes", *Compos. Sci. Technol*, Vol. 70, No. 13, pp. 1805-12, 2010.

[14] K. Kesenci, L. Fambri, C. Migliaresi & E. Piskin, "Preparation and properties of poly(L-lactide)/hydroxyapatite composites", *J. Biomater. Sci. Polym. Ed*, Vol. 11, No. 6, pp. 617-32, 2000.

[15] J. J. Blaker, A. Bismarck, A. R. Boccaccini, A. M. Young & S. N. Nazhat, "Premature degradation of poly(α -hydroxyesters) during thermal processing of Bioglass®-containing composites", *Acta Biomater*, Vol. 6, No. 3, pp. 756-62, 2010.

[16] N. Ignjatovic, E. Suljovrujic, J. Budinski-Simendic, I. Krakovsky & D. Uskokovic, "Evaluation of hot-pressed hydroxyapatite/poly-L-

حضور ذرات شیشه زیست فعال و هیدروکسی آپاتیت بر خواص حرارتی ماتریس پلیمری و رفتار سلول‌هایی که در معرض آن‌ها قرار می‌گیرند، تاثیر می‌گذارد. نشان داده شد که افزایش ذرات هیدروکسی آپاتیت به ماتریس پلیمری باعث بهبود خواص حرارتی کامپوزیت نهایی می‌شود. در حالی که در مورد نمونه دارای شیشه زیست فعال کاهش خواص حرارتی کامپوزیت نهایی چشمگیر است. حضور این مواد در ترکیب کامپوزیت نهایی تا حدودی باعث افزایش ترشح کلسیم می‌شود. آزمون های زیست سازگاری نیز عدم سمیت این مواد در تماس با سلول ها را تایید کردند.

۵- مراجع

[1] P. R. Kurzweil, A. D. Frogameni & D. W. Jackson, "Tibial interference screw removal following anterior cruciate ligament reconstruction", *Arthrosc. J. Arthrosc. Relat. Surg*, Vol. 11, No. 3, pp. 289-91, 1995.

[2] F. J. Buchanan, "Degradation Rate of Bioresorbable Materials", prediction and evaluation, CRC Press, Washington, DC, 2008.

[3] L. Cao, W. Weng, X. Chen, Y. Ding, Y. Yan, H. Li & et al., "Development of degradable and bioactive composite as bone implants by incorporation of mesoporous bioglass into poly(L-lactide)", *Compos. Part B Eng*, Vol. 77, pp. 454-61, 2015.

[4] E. Castro Aguirre, F. Iñiguez-Franco, H. Samsudin, X. Fang & R. Auras, "Poly (lactic acid)—Mass production, processing, industrial applications, and end of life", *Adv. Drug Deliv. Rev*, 2016.

[5] F. Ravari, A. Mashak, M. Nekoomanesh & H. Mobedi, "Non-isothermal cold crystallization behavior and kinetics of poly(L-lactide): Effect of L-lactide dimer", *Polym. Bull*, Vol. 70, No. 9, pp. 2569-86, 2013.

[۶] فرنوش. ح، "رفتار الکتروشیمیایی و چسبندگی پوشش های الکتروفوریک نانوساختار HA-TiO₂", فرآیندهای نوین در

lactide composite biomaterial characteristics”, J. Biomed. Mater. Res. - Part B Appl. Biomater, Vol. 71, No. 2, pp. 284–94, 2004.

- [17] F. D. Kopinke, M. Remmler, K. Mackenzie, M. Möder O. Wachsen, “Thermal decomposition of biodegradable polyesters—II. Poly(lactic acid)”, Polym. Degrad. Stab, Vol. 53, No. 3, pp. 329–42, 1996.
- [18] L. S. Kaplow, “A histochemical procedure for localizing and evaluating leukocyte alkaline phosphatase activity in smears of blood and marrow”, Blood, Vol. 10, No. 10, pp. 1023–9, 1955.
- [19] M. Ngiam, S. Liao, A. J. Patil, Z. Cheng, C. K. Chan & S. Ramakrishna, “The fabrication of nano-hydroxyapatite on PLGA and PLGA/collagen nanofibrous composite scaffolds and their effects in osteoblastic behavior for bone tissue engineering”, Bone, Vol. 45, No. 1, pp. 4–16, 2009.
- [20] J. E. Coleman, “Structure and Mechanism of Alkaline Phosphatase”, Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct, Vol. 21, No. 1, pp. 441–83, 1992.

۶- پی نوشت

- [1] stress shielding
 [2] ring opening
 [3] internal mixer
 [4] particle size analyzer
 [5] fetal bovine serum
 [6] McNeil and Leiper
 [7] back biting