

ساخت و بررسی خواص زیست‌سازگاری نانوکامپوزیت HA/UHMWPE برای کاربرد در مهندسی پزشکی

سید علی میرصالحی^۱، علیرضا خاوندی^۱، شمس الدین میردامادی^۱، محمدرضا نعیمی جمال^۲، سید محمد کلانتری^۱

^۱ دانشکده مهندسی مواد و متالورژی، دانشگاه علم و صنعت ایران، ^۲ دانشکده شیمی، دانشگاه علم و صنعت ایران

Khavandi@iust.ac.ir

اطلاعات مقاله:

دریافت: ۲۸ فروردین ۱۳۹۴

پذیرش: ۷ تیر ۱۳۹۴

چکیده:

امروزه نانوکامپوزیت‌ها بخصوص کامپوزیت‌های زمینه پلیمری به دلیل خواص نزدیک به بافت استخوان کاربردهای فراوانی به عنوان جایگزین استخوان در پزشکی پیدا کرده‌اند. در این پژوهش، ابتدا نانوکامپوزیت به روش اختلاط در فاز مذاب با کمک روغن پارافین با درجه‌ی پزشکی به عنوان کمک ذوب فاز زمینه و با استفاده از دستگاه مخلوط‌کن داخلی با مقادیر مختلف ۱۰، ۲۰، ۳۰، ۴۰ و ۵۰ wt.% از نانو ذرات هیدروکسی‌آپاتیت در دمای ۱۸۰°C، ساخته شد. در ادامه، خواص زیست‌سازگاری نمونه‌ها توسط آزمون‌های آلیزارین رد، آکالین فسفاتاز و چسبندگی سلولی با استفاده از سلول‌های استئوبلاست با رده‌ی سلولی MG-63، مورد ارزیابی قرار گرفت. نتایج به دست آمده از آزمون‌های زیست‌سازگاری و بررسی‌های انجام شده توسط میکروسکوپ الکترونی روبشی نشان دهنده عدم سمیت، زیست‌سازگاری و برهمکنش مناسب بین سطح نمونه‌ها و سلول‌های MG-63، بخصوص نمونه با ۵۰ wt.% نانوذرات هیدروکسی‌آپاتیت، است.

کلید واژه:

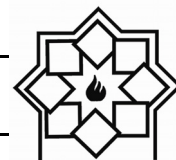
نانوکامپوزیت، خواص زیست‌سازگاری، آلیزارین رد، آکالین فسفاتاز، سلول استئوبلاست

۱- مقدمه

در سال‌های اخیر، تحول اساسی در استفاده و کاربرد سرامیک‌ها به منظور بهبود کیفی عمر بشر پدید آمده است. اغلب کاربردهای کلینیکی بیوسرامیک‌ها مرتبط با سیستم اسکلتی بدن، استخوان، دندان‌ها، مفاصل و بازسازی بافت نرم و سخت بدن است. بیوسرامیک‌ها در انواع شکل‌ها با فازهای مختلف تولید می‌شوند و عملکرد متفاوتی در ترمیم بدن ارائه می‌کنند. در بسیاری از کاربردها، سرامیک‌ها به

شکل قطعه‌ای با شکل ویژه مصرف می‌شوند که به آن‌ها کاشتنی (ایمپلنت) گفته می‌شود، همچنین بیوسرامیک‌ها گاهی نیز به صورت پودر به عنوان پرکننده و برخی اوقات به صورت پوشش بر روی یک زیرلایه‌ی فلزی و یا به عنوان فاز تقویت‌کننده در کامپوزیت‌ها مورد استفاده قرار می‌گیرند [۱].

ترکیب استخوان انسان شامل ۵۰ تا ۷۰ درصد وزنی فاز معدنی، ۲۰ تا ۴۰ درصد وزنی فاز آلی، ۵ تا ۱۰ درصد وزنی آب و کمتر از ۳ درصد وزنی انواع چربی است. فاز آلی



استخوان به‌طور عمده شامل فیبرهای کلاژن I است که ۹۰ درصد وزنی فاز آلی استخوان را تشکیل می‌دهد [۲-۶]. کلسیم فسفات‌ها بخش عمده‌ای از فاز معدنی استخوان را تشکیل می‌دهند. کلسیم فسفات‌ها به سه دسته کامل، جزئی و عدم جذب‌شونده در محیط بیولوژیکال تقسیم‌بندی می‌شوند. مقدار جذب‌شوندگی آن‌ها در محیط بدن به نسبت استوکیومتری کلسیم به فسفات وابسته است. به‌عنوان مثال هیدروکسی‌آپاتیت (HA) پایداری بیشتری نسبت به تری کلسیم فسفات (TCP) در محیط بیولوژیک از خود نشان می‌دهد [۷-۹]. HA با فرمول شیمیایی $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ تشکیل دهنده ۶۰ تا ۷۰ درصد وزنی از فاز معدنی استخوان انسان است [۱۰، ۱۱]. از این رو، HA به‌عنوان یک ماده زیست‌سازگار برای کاربردهایی نظیر سیمان استخوانی، جایگزین استخوان، داربست‌های مهندسی بافت و ... شناخته شده است [۱۰، ۱۲-۱۴]. HA دارای خواصی نظیر زیست‌سازگاری، زیست‌فعال^۱، استئوکاندکتیویته^۲، عدم سمیت [۱۵، ۱۶] شباهت ساختاری و بیولوژیکی به بافت استخوان [۱۳، ۱۷] و توانایی برهم‌کنش با بافت‌های بدن بدون ایجاد پاسخ التهابی [۱۸] است. زیست‌فعال عبارت است از توانایی برقراری پیوند مستقیم شیمیایی با سلول‌های بدن و به قابلیت هدایت رشد استخوانی، استئوکاندکتیویته می‌گویند [۱۹]. به عبارتی این ماده توانایی آن را دارد که وقتی در محیط بدن قرار می‌گیرد، بازسازی بافت استخوان از دست رفته را تسهیل و تشویق کند [۲۰، ۲۱].

بررسی‌های درون‌تنی^۳ در زمینه سرامیک‌های کلسیم فسفاتی توسط محققان مشخص کرد که نیاز به نرخ کم جذب‌شوندگی در محیط بدن توسط این سرامیک‌ها برای انجام برهم‌کنش بین بافت و کاشت، مدل‌سازی مجدد بافت‌های فیبری ارتباطی^۴ و استئوکاندکتیویته، وجود دارد [۲۲].

اگرچه استفاده از HA به تنهایی در پزشکی به‌عنوان زیست‌ماده به دلایلی نظیر، تردی، سفتی بالا، پدیده حفاظت تنشی^۵، استحکام مکانیکی نامناسب، چگالی بالا محدود شده است [۴، ۲۳]، اما یک راه مناسب برای غلبه بر محدودیت‌های این ماده پرکاربرد در پزشکی، استفاده از آن به‌عنوان فاز تقویت‌کننده در کامپوزیت‌ها با کاربردهای زیست‌پزشکی است [۱۸، ۲۴، ۲۵].

پلی‌اتیلن (PE) یک ماده‌ی آلی است که به سه دسته پلی‌اتیلن با چگالی پایین (LDPE)، پلی‌اتیلن با چگالی زیاد (HDPE) و پلی‌اتیلن با وزن مولکولی بسیار بالا (UHMWPE) تقسیم‌بندی می‌شود. تمامی پلیمرهای خانواده PE کاربردهای فراوانی در ساخت کامپوزیت و نانوکامپوزیت‌های پزشکی دارند [۴، ۶، ۸، ۱۲، ۱۴، ۲۴، ۲۶، ۲۷]. میانگین وزن مولکولی UHMWPE بیش از یک میلیون گرم بر مول است [۲۸]. UHMWPE به دلیل دارا بودن خواصی مثل مقاومت به سایش، ضریب اصطکاک کم، پایداری شیمیایی، جذب رطوبت پایین و زیست‌سازگاری کاربرد گسترده‌ای در مهندسی بافت دارد [۲۷، ۲۹-۳۱]. مکانیزم چسبندگی این پلیمر به بافت استخوان به‌طور

³ In-vivo

⁴ Fibrous connective tissues

⁵ Stress shielding

¹ Bioactivity

² Osteoconductivity



آلدريج امريكا با جرم مولكولى متوسط 600000 g/mol - 300000 و چگالى 0.94 g/mol در دماى 25°C و نانو ذرات هيدروكسى آپاتيت با چگالى 3 g/cm^3 كه از پيش ماده‌هاى $\text{Ca(NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ و P_2O_5 با روش سل-ژل سنتز شد [۱۹، ۳۳] و روغن پارافين با درجه‌ى پزشكى ساخت شركت Merck آلمان با كد تجارى ۱۰۷۱۷۴، چگالى 0.86 g/cm^3 در دماى 20°C و گرانبوى MPa.s ۳۰-۴۰ استفاده شد.

۲-۲- ساخت نانو كامپوزيت

در اين پژوهش براى ساخت كامپوزيت از دستگاه مخلوط‌كن داخلى مدل پلاستيك اوردر ساخت شركت برابندر آلمان استفاده شد. قبل از مخلوط كردن پليمر و نانو پودر هيدروكسى آپاتيت (Nano-HA) با دستگاه مخلوط‌كن داخلى، روغن پارافين و پليمر با نسبت ۱:۳ [۳۴] به صورت دستى در دماى 100°C با هم مخلوط شدند. اين كار به منظور جذب سطحى روغن توسط پودر پليمر صورت گرفته است. سپس مخلوط به دست آمده درون مخلوط‌كن داخلى با دماى 180°C و سرعت 120 دور بر دقيقه ريخته شد. پس از ذوب كامل پليمر، سرعت دستگاه به 80 دور بر دقيقه تقليل داده شد و پودر Nano-HA به مذاب پليمر اضافه شد و اين دو جزء به مدت 10 دقيقه با هم مخلوط شدند و مخلوط در هوا سرد شد. پس از ساخت كامپوزيت‌ها به منظور تهيه‌ى نمونه‌هاى با توزيع مناسب ذرات فاز دوم در زمينه پليمرى و ساخت موادى با تركيب همگن، كامپوزيت‌هاى ساخته شده توسط دستگاه بال ميل نيمه صنعتى مدل Retsch ZM200، پودر شدند. در جدول ۱ تركيب وزنى نمونه‌ها مشخص شده است.

طبيعى به دليل پايين بودن خاصيت استئواينتگریشن^۱ در اين پليمر، به صورت مكانيكى است [۱۴]. محققان زيادى نظير نعيمى و همكاران [۱۲]، فانگ و همكاران [۳۲]، همايى گوهر و همكاران [۱۴] و... از اين پليمر به دليل داشتن خواص مكانيكى و زيست‌سازگارى مناسب به‌طور همزمان، با اضافه كردن مواد زيست‌فعالى مانند TCP و HA به آن، در كاربردهاى مهندسى بافت از آن استفاده كردند.

كامپوزيت‌هاى ساخته شده بر پايه‌ى اين پليمر در صنايع زيادى شامل مهندسى شيمى، مهندسى بافت، ساخت كاغذ، داروسازى، مهندسى حمل و نقل و مهندسى كشاورزى كاربرد دارد [۲۹].

در اين تحقيق ابتدا، نانو كامپوزيت به روش اختلاط در فاز مذاب با كمك روغن پارافين با درجه‌ى پزشكى به‌عنوان كمك ذوب UHMWPE و براى غلبه بر گرانبوى بالاي اين پليمر در حالت مذاب و با استفاده از دستگاه مخلوط‌كن داخلى با مقادير مختلف ۱۰، ۲۰، ۳۰، ۴۰ و $50 \text{ wt.}\%$ از نانو ذرات هيدروكسى آپاتيت در دماى 180°C ، ساخته شد. در ادامه، خواص زيست‌سازگارى نمونه‌ها توسط آزمون‌هاى آليزارين رد^۲، الكالين فسفاتاز^۳ و چسبندگى سلولى با استفاده از سلول‌هاى استئوبلاست با رده‌ى سلولى MG-63، مورد ارزيابى قرار گرفت.

۲- فعاليت‌هاى تجربى

۲-۱- مواد اوليه

در اين تحقيق از پليمر UHMWPE ساخت شركت سيگما

¹ Osteointegration

² Alizarin red staining (ARS)

³ Alkaline phosphatase (ALP) activity



۳- خشک کردن و حذف استون: به منظور حذف استون پودرهای شست و شو شده درون خشک‌کن با دمای 100°C و به مدت ۲۴ ساعت قرار گرفتند [۳۵-۴۰].

۴- شست و شو نمونه‌های آزمون‌های زیست‌سازگاری: بعد از ساخت نمونه‌های آزمون‌های زیست‌سازگاری، به منظور حذف پارافین احتمالی موجود بر روی سطح نمونه‌ها، آن‌ها را توسط استون با استفاده از دستگاه التراسونیک با دمای 40°C به مدت ۳۰ دقیقه شسته و برای حذف استون، نمونه‌ها به مدت یک ساعت در خشک‌کن با دمای 100°C قرار داده شدند.

۲-۴- ساخت نمونه‌های آزمون‌های زیست‌سازگاری

نمونه‌های آزمون‌های زیست‌سازگاری با استفاده از پرس گرم ساخته شدند. بدین منظور ابتدا کامپوزیت پودر شده درون قالب به شکل قرص با ضخامت ۵ mm و قطر ۱۰ mm ریخته شد و تحت پرس گرم با فشار ۳/۸ MPa و دمای 200°C به مدت ۳۰ دقیقه قرار گرفت. بدین منظور ابتدا کامپوزیت‌های پودر شده درون قالب ریخته شدند و تحت فشار کم قرار گرفتند تا مواد ضمن نرم شدن تمامی حفره‌های احتمالی را پر کنند و به خوبی در قالب پخش شوند. سپس نیرو را افزایش و تحت شرایط اشاره شده به مدت ۳۰ دقیقه قرار گرفتند. سپس مواد تحت فشار تا دمای اتاق سرد شده تا کیفیت کامپوزیت ساخته شده حفظ شود. پس از آن، قالب از زیر پرس و نمونه از داخل آن خارج شد.

۲-۵- آزمون‌های زیست‌سازگاری

به‌منظور بررسی خواص زیست‌سازگاری نانو کامپوزیت

جدول ۱- ترکیب وزنی نمونه‌ها

کد نمونه	درصد وزنی Nano HA (wt.%)	درصد وزنی UHMWPE (wt.%)	چگالی (gr/cm ³)
شاهد	۰	۱۰۰	۰/۹۴
H1	۱۰	۹۰	۱/۱۶۶
H2	۲۰	۸۰	۱/۳۹۲
H3	۳۰	۷۰	۱/۶۱۸
H4	۴۰	۶۰	۱/۸۴۴
H5	۵۰	۵۰	۲/۰۷

۲-۳- خارج کردن پارافین

بعد از ساخت کامپوزیت‌ها، روغن پارافین اضافه شده به‌طور کامل از آن‌ها به صورتی که در زیر توضیح داده می‌شود، خارج شد:

۱- پرس گرم: ابتدا کامپوزیت‌ها توسط دستگاه پرس گرم تحت پرس با دمای 100°C و فشار ۳/۸ MPa به مدت ۱ ساعت قرار گرفتند. به دلیل کمتر بودن چگالی پارافین ($0/86 \text{ g/cm}^3$ در دمای 20°C) از پلیمر ($0/94 \text{ g/ml}$ در دمای 25°C) و HA ($3/2 \text{ g/cm}^3$)، پارافین بر روی سطح جمع شد و مقدار زیادی از پارافین اضافه شده، به این روش خارج شد.

۲- شست و شو با استون: در مرحله بعد کامپوزیت‌ها توسط دستگاه بال میل Retsch ZM200 پودر شدند و برای حذف پارافین هر ترکیب کامپوزیت پودر شده ۳ مرتبه با استون خالص ساخت شرکت مرک آلمان، به این صورت که مخلوط استون و کامپوزیت پودر شده در بشر ریخته شد و توسط همزن مکانیکی با سرعت ۵۰۰ دور بر دقیقه به مدت ۹۰ دقیقه و با دمای $35-50^{\circ}\text{C}$ (دمای جوش استون 60°C) هم‌زده و شست و شو شد. این کار برای هر ترکیب ۳ بار تکرار شد.



مشخصی محیط کشت به عنوان کنترل در نظر گرفته شد.

۲-۸- شرایط سلول‌های استخوانی

با توجه به نوع کارکرد نانوکامپوزیت ساخته شده از سلول‌های استئوبلاست با شماره‌ی پرونده‌ی سلولی MG-63 (NCBI C555) گرفته شده از بانک سلولی انستیتو پاستور ایران استفاده شد. پس از خارج کردن سلول‌ها از حالت منجمد شده، آن‌ها را به فلاسک حاوی محیط کشت منتقل کرده و سپس فلاسک، در انکوباتور با دمای ۳۷ درجه‌ی سانتی‌گراد، رطوبت ۹۰٪ و غلظت اکسیژن ۵٪ نگهداری شدند. قابل اشاره است که محیط کشت هر ۳-۴ روز تعویض گردید.

۲-۹- آلیزارین رد^۲

جهت انجام این آزمون تعداد ۱۰۰۰ عدد سلول MG-63 را درون پلیت‌های شش خانه^۳ ریخته و به مدت دو هفته در معرض نمونه‌های ساخته شده، قرار داده شدند. سلول‌ها درون انکوباتور با دمای ۳۷ درجه و رطوبت ۸۸٪ به همراه ۵٪ دی‌اکسید کربن نگهداری شدند. جهت رشد سلول‌ها از محیط کشت RPMI به میزان FBS، ۱۰٪ بهره گرفته شد. پس از سپری شدن مدت زمان یاد شده، ابتدا محیط کشت موجود بر روی سلول‌ها خارج شد و سلول‌ها را با استفاده از محلول نمکی حاوی ۰/۹٪ NaCl شستشو داده و سپس محلول فرم آلدئید ۱۰٪ را به مدت ۳۰-۲۰ دقیقه جهت ثابت کردن سلول‌ها اضافه شد.

پس از سپری شدن مدت زمان یاد شده، سلول‌ها را با استفاده از محلول نمکی، دو تا سه بار شستشو داده و در

HA/UHMWPE در محیط برون‌تنی^۱ از آزمون‌های بیولوژیکی گوناگونی نظیر آلیزارین رد، آکالین فسفاتاز و بررسی چسبندگی سلولی به سطح کامپوزیت، بر اساس استاندارد ISO 10993-5 استفاده شد. به این منظور، رده‌ی سلولی استئوبلاست با مشخصات پرونده MG-63 (NCBI C555) بکار گرفته شد.

پس از استریل کردن نمونه‌ها آن‌ها را در محیط کشت (10%FBS, DMEM) که قبلاً آماده شده بود قرار داده و با در نظر گرفتن زمان‌های از پیش تعیین شده، آزمون‌های اشاره شده انجام شد.

۲-۶- فرایند استرلیزه کردن

جهت استرلیزه کردن، ابتدا نمونه‌ها را در داخل فالکون گذاشته و سپس آن‌ها درون دستگاه اتوکلاو با فشار $1/5 \text{ kg/cm}^2$ و دمای ۱۲۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۶۰ دقیقه، قرار داده شد.

پس از استریل کردن، جهت انجام فرایند عصاره‌گیری، نمونه‌ها را درون محیط کشت قرار داده و در بازه‌های زمانی مشخص، محیط کشت از روی آن‌ها برداشته شده و مورد ارزیابی قرار گرفتند.

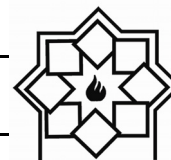
۲-۷- عصاره‌گیری از نمونه‌ها

به منظور بررسی سمیت نمونه‌ها و تاثیر آن‌ها بر رشد و تکثیر سلول‌ها فرایند عصاره‌گیری از نمونه انجام شد که طی آن به ازای هر 3 cm^2 سطح، ۱ میلی‌لیتر محیط کشت به ظرف حاوی نمونه افزوده شد. سپس در فواصل زمانی ۳، ۷ و ۱۴ روز محیط خارج و به سلول‌ها اضافه شد و مقدار

^۲ Alizarin red

^۳ Well plate

^۱ In-vitro



ادامه به میزان ۲ میلی‌لیتر از محلول رنگی آلیزارین رد را بر روی نمونه‌ها ریخته و نمونه‌ها به مدت ۳۰-۴۵ دقیقه در دمای اتاق و در محلی تاریک قرار داده شدند. پس از زمان بالا محلول رنگی را خارج کرده و سلول‌ها با استفاده از محلول نمکی یاد شده، ۲ بار شستشو داده شد و در ادامه در زیر میکروسکوپ نوری رنگ پذیری سلول‌ها، نسبت به نمونه‌ی کنترل مورد ارزیابی قرار گرفت.

۲-۱۰- آکالین فسفاتاز

جهت انجام آزمون آکالین فسفاتاز ابتدا نمونه‌ها به روش اشاره شده، استریل گشت. در ادامه تعداد ۱۰۰۰۰ عدد سلول استئوبلاست با رده‌ی MG-63 به هر خانه از پلیت ۶ خانه اضافه گردید و به میزان ۲ میلی‌لیتر محیط کشت RPMI به همراه ۱۰٪ سرم جنین گاوی به هر خانه اضافه شد. قابل اشاره است که یک خانه از پلیت مذکور تحت عنوان کنترل حاوی سلول بدون نمونه در نظر گرفته شد.

پلیت مذکور به مدت ۲ هفته درون انکوباتور حاوی گاز دی‌اکسید کربن ۵٪ و دمای کشت ۳۷ درجه سانتی‌گراد قرار گرفت. هر هفته یک بار به میزان یک میلی‌لیتر از محیط کشت موجود بر روی هر خانه خارج و به یک میکروتیوپ ۱/۵ میلی‌لیتری استریل منتقل شده و جهت انجام آزمایش در روزهای آینده درون فریزر با دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد قرار داده شدند.

۲-۱۱- چسبندگی سلولی

هر نمونه در یک خانه از پلیت ۲۴ خانه قرار گرفت. سپس ۴۰۰۰-۵۰۰۰ عدد سلول با حجم ۵۰ μL روی سطح هر نمونه ریخته شد و پلیت در انکوباتور^۱ به مدت ۴-۵ ساعت قرار گرفت.

بعد از چسبیدن سلول‌ها، مقدار مشخصی از محیط کشت که شامل ۱۰٪ سرم جنین گاو (FBS) بود ($10\% \text{FBS, DMEM}$)، به هر خانه اضافه شد. بعد از ۱ و ۳ روز، محلول روی نمونه‌ها خارج شد و نمونه‌ها با سالیین بافر شده با فسفات^۲ شسته شدند و سپس از ۲/۵٪ گلوئارآلدهید^۳ برای ثابت کردن سلول‌ها استفاده شد.

ثابت کردن سلول‌ها به این صورت انجام شد که، بعد از ریختن مقدار مشخص از تثبیت کننده روی هر نمونه، نمونه‌ها در فریزر به مدت ۲۴ ساعت قرار گرفتن و سپس ماده تثبیت کننده از روی نمونه‌ها خارج شده و نمونه‌ها با الکل ۵۰، ۷۰، ۹۵ و ۱۰۰٪ به ترتیب شسته شدند. در نهایت سلول‌های چسبیده به نمونه‌ها توسط SEM مشاهده و عکس‌برداری شدند.

۲-۱۲- بررسی آماری

بررسی آماری توسط نرم‌افزار SPSS انجام شد. داده‌ها به صورت $\text{mean values} \pm \text{standard deviation (SD)}$ گزارش شدند.

۲-۱۳- بررسی ریزساختار، نحوه ساخت و

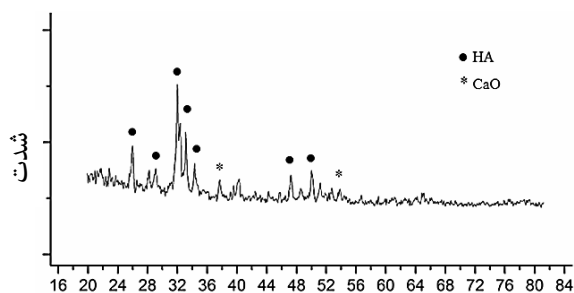
خواص زیست‌سازگاری

به منظور بررسی ریزساختار و نحوه توزیع فاز تقویت‌کننده در زمینه‌ی پلیمری از آزمون‌های طیف‌سنجی اشعه ایکس (XRD)، طیف سنجی مادون قرمز (FTIR) و میکروسکوپ SEM استفاده شد. همچنین آزمون‌های آلیزارین رد، آکالین فسفاتاز و چسبندگی سلولی برای بررسی خواص زیست‌سازگاری نمونه‌های تولید شده به روش اختلاط در فاز مذاب توسط دستگاه مخلوط‌کن داخلی، بکار گرفته شدند.

^۲ Phosphate-buffered saline

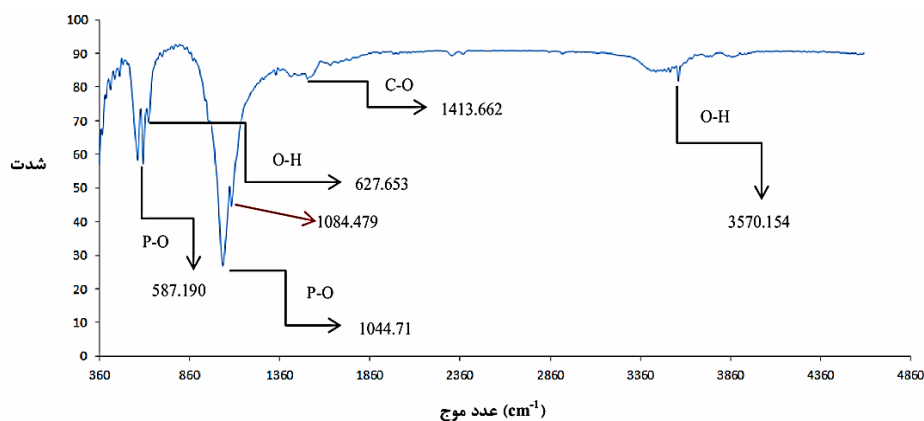
^۳ Glutaraldehyde

^۱ Incubator



شکل ۱- طیف XRD نانو ذرات HA سنتز شده
به روش سل-ژل

در گراف بدست آمده از نمونه‌ی نانو پودر هیدروکسی آپاتیت سنتز شده، پیک شدید و پهن بین $900-1100\text{ cm}^{-1}$ مربوط به PO_4^{3-} است. مدهای کششی و خمشی PO_4^{3-} بین $560-600\text{ cm}^{-1}$ به وضوح دیده می‌شوند. پیک حدود 1400 cm^{-1} نیز مربوط به ارتعاش کششی گروه کربنات است که احتمالاً ناشی از حضور پیش ماده‌ها و یا به دلیل جذب شیمیایی CO_2 محیط می‌باشد.



شکل ۲- طیف FTIR نانو پودر HA سنتز شده به روش سل-ژل

که در شکل ۳ مشاهده می‌شود ذرات فاز تقویت کننده به خوبی و تقریباً همگن در زمینه پلیمری توسط روش اختلاط در فاز مذاب با کمک دستگاه مخلوط کن داخلی، پراکنده

۳- نتایج و بحث

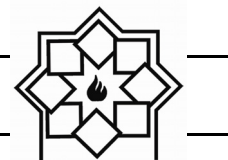
۳-۱- بررسی ریزساختار

به منظور بررسی فازی و شیمیایی نانوذرات سنتز شده، از آزمون‌های XRD و FTIR استفاده شد. همانطور که در شکل ۱ دیده می‌شود اغلب پیک‌های اصلی از جمله پیک‌ها با شدت ۱۰۰ و ۸۰ مربوط به فاز HA می‌باشد. الگوی XRD نشان می‌دهد که تنها ترکیب اصلی موجود در پودر سنتز شده فاز هیدروکسی آپاتیت بلوری است، با این حال آثار ضعیف احتمالی از ترکیب CaO را نیز می‌توان شناسایی کرد.

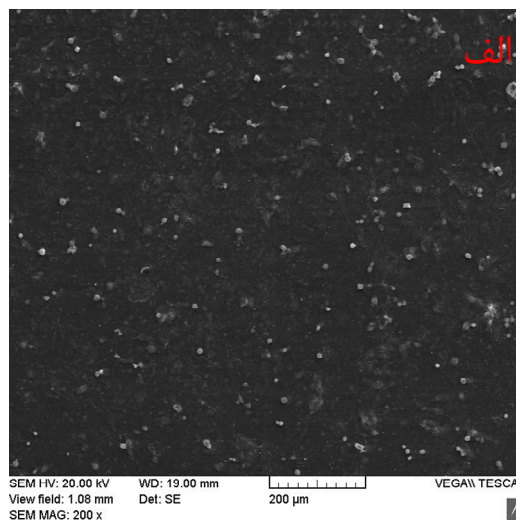
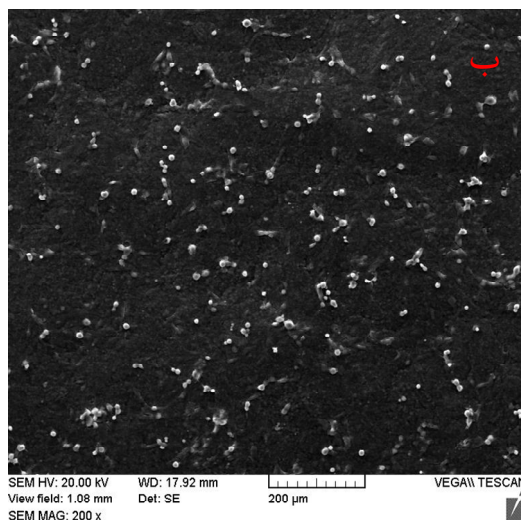
شکل ۲، تغییرات ساختار شیمیایی نانو پودر هیدروکسی آپاتیت سنتز شده را نشان می‌دهد. ساختار آپاتیت در نمونه نانو پودر با مدهای ارتعاشی P-O (610 cm^{-1}) و 560 و $1100-1000\text{ cm}^{-1}$ مشاهده می‌شود. در 627 cm^{-1} نیز پیک مربوط به OH آپاتیت در HA خالص به وضوح مشخص است.

۳-۲- بررسی نحوه توزیع فاز تقویت کننده

به منظور بررسی نحوه توزیع نانوذرات HA در زمینه‌ی UHMWPE از میکروسکوپ SEM استفاده شد. همانطور



می‌یابد که این عامل باعث افزایش انرژی داخلی ماده با افزایش انرژی سطحی ناشی از وجود نانو ذرات می‌شود و در نتیجه برای کاهش انرژی درونی و پایداری بیشتر، واکنش بین ذرات تقویت کننده با هم، افزایش یافته و این ذرات به هم چسبیده و آگلومره می‌شوند.



شکل ۳- نحوه توزیع نانو ذرات HA در زمینه UHMWPE، (الف) نمونه H1 و (ب) نمونه H5

ترکیب آن‌ها شبیه به ترکیب مواد معدنی استخوان طبیعی می‌باشد پس ایجاد این لایه باعث افزایش میل سلول‌های MG-63 برای چسبیدن به ذراتی است که این لایه بر روی آن‌ها تشکیل شده است، می‌شود.

همانطور که در شکل ۴ مشاهده می‌شود نمونه‌ی H5 نسبت به سایر نمونه‌ها و همچنین نمونه‌ی شاهد و کنترل (پلیت کشت از جنس پلی‌استایرن) میزان بیشتری کلسیم در ماتریس خارج سلولی ترشح کرده‌است. به‌طور کل می‌توان گفت که افزایش میزان ترشح یون کلسیم با افزایش درصد نانو ذرات HA به دلیل افزایش مقدار وزنی و حجمی این ذرات و در نتیجه افزایش بیواکتیویته‌ی و مکان‌های مناسب برای چسبندگی، رشد و تکثیر سلول‌ها می‌باشد.

شده‌اند. همانطور که در شکل ۳ مشخص است نانو ذرات HA به هم چسبیده و به شکل آگلومره در آمده‌اند که دلیل این امر این است که به دلیل نانو بودن ذرات تقویت کننده، سطح تماس بین فیلر و زمینه نسبت به حالت میکرونی و بزرگتر، افزایش می‌یابد در نتیجه انرژی سطح آزاد افزایش

۳-۳- بررسی نتایج آلیزارین رد

نتایج مربوط به آزمون آلیزارین رد در شکل ۴ نمایش داده شده است. همانطور که در شکل ۴ مشاهده می‌شود با زیاد شدن درصد نانو ذرات HA در نمونه‌ها میزان رنگ قرمز افزایش پیدا کرده است که این امر نشان دهنده‌ی آن است که میزان ترشح یون کلسیم در ماتریس خارج سلولی (ECM^1) افزایش یافته‌اند.

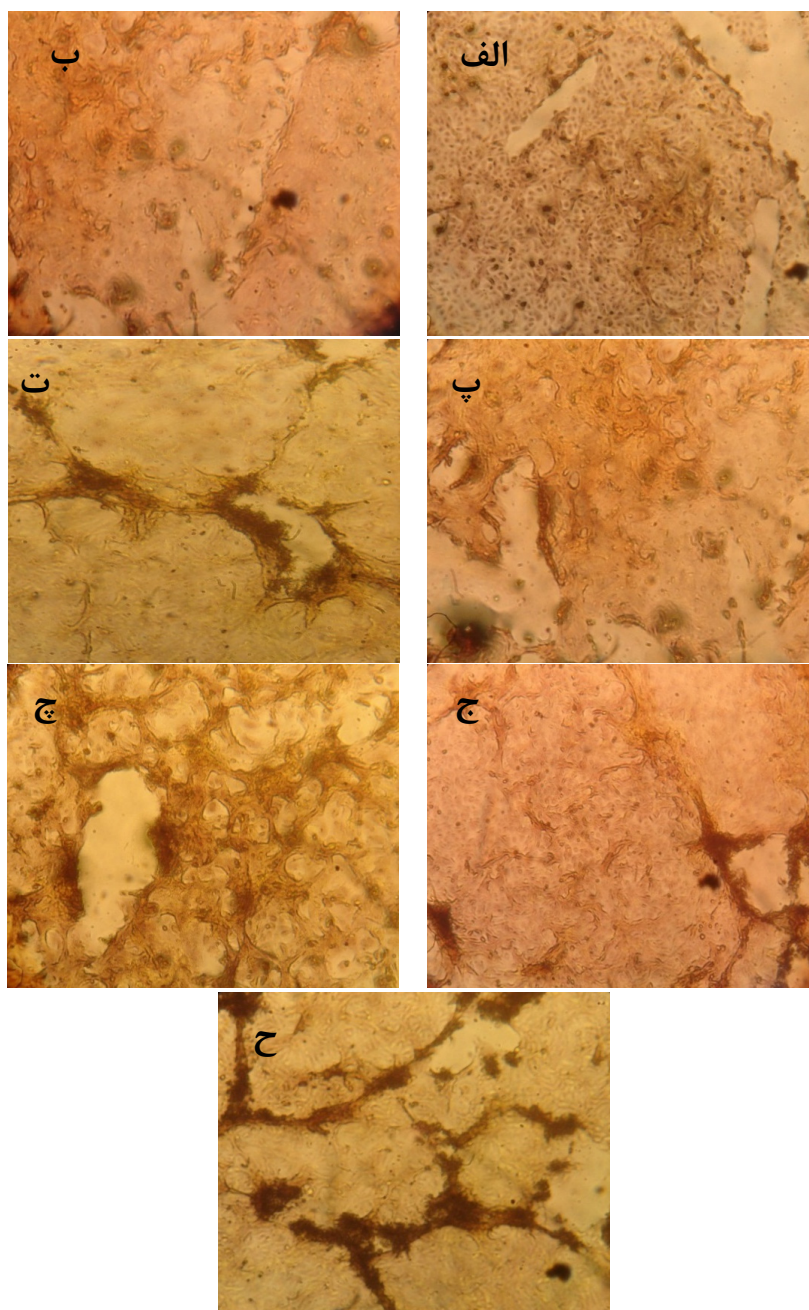
یون‌های کلسیم آزاد شده بر روی ذرات موجود در کامپوزیت نشسته و یک لایه کلسیمی بر روی سطح آن‌ها تشکیل می‌دهند. این لایه مکان‌های مناسب زیست‌فعالی هستند که

¹ Extracellular matrix



پلیمر زمینه می‌شود. این مکان‌ها با گذشت زمان با سلول‌های استئوبلاست پر می‌شوند.

اضافه کردن بیوسرامیک HA به زمینه‌ی UHMWPE باعث فراهم شدن مکان‌های زیست‌فعالی بر روی سطح

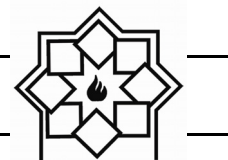


شکل ۴- نتایج به‌دست آمده از آلیزارین رد،

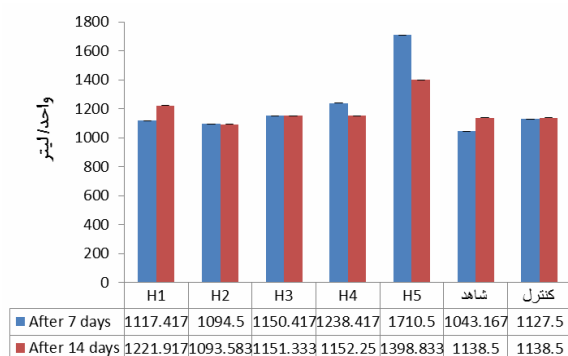
الف) شاهد، ب) پلیت کشت (کنترل)، پ) H1، ت) H2، ج) H3، چ) H4 و ح) H5

بدن قرار می‌گیرد، بازسازی بافت استخوان از دست رفته

به عبارتی HA توانایی آن را دارد که وقتی در محیط



کامپوزیت‌های ساخته شده توسط آزمون ALP بعد از ۷ و ۱۴ روز مورد بررسی قرار گرفت. نتایج به‌دست آمده در شکل ۵ نشان داده شده است.



شکل ۵- نتایج آزمون آلکالین فسفاتاز بعد از ۷ و ۱۴ روز

با توجه به شکل ۵ میزان ترشح آنزیم آلکالین فسفاتاز توسط سلول‌های MG-63 برای نمونه‌های H4 و H5 بعد از گذشت ۱۴ روز نسبت به ۷ روز کاهش پیدا کرده است که این میزان افت برای نمونه‌ی H4 مقدار زیادی نیست ولی در نمونه‌ی H5 این کاهش، قابل ملاحظه می‌باشد، به طوری که میزان ترشح آنزیم آلکالین فسفاتاز بعد از گذشت ۱۴ روز نسبت به ۷ روز برای نمونه‌ی H5 به میزان ۱۸/۲۲٪ کاهش یافته است. همچنین میزان ترشح این آنزیم برای نمونه‌های H2 و H3 بعد از گذشت ۷ و ۱۴ روز تقریباً برابر و برای نمونه‌های شاهد و H1 میزان ترشح این آنزیم بعد از گذشت ۱۴ روز نسبت به ۷ روز مقدار کمی افزایش داشته است.

همانطور که در شکل ۵ مشاهده می‌شود میزان ترشح آنزیم آلکالین فسفاتاز برای نمونه‌ی H5 بعد از گذشت ۷ روز ۶۳/۹۷٪ بیشتر از نمونه‌ی شاهد و ۵۱/۷۰٪ بیشتر از نمونه‌ی کنترل و بعد از ۱۴ روز ۲۲/۸۶٪ بیشتر از نمونه‌ی کنترل و شاهد می‌باشد. همچنین میزان ترشح

را تسهیل و تشویق کند. به گزارش هوانگ^۱ و همکاران [۴۱] در مجله Nature، می‌توان علت این پدیده را به پروتئین استئوکلسین^۲، که مهمترین پروتئین غیر کلاژنی استخوان است، منسوب کرد. این پروتئین نقش سیگنال‌دهنده را برای سلول‌های استئوبلاست و استئوکلاست^۳ بازی می‌کند. استئوکلسین به HA گرایش دارد و به آن می‌چسبد. بررسی‌های ساختاری این پروتئین نشان داده‌است که سطح این پروتئین بار منفی دارد و در آن یون‌های کلسیم به صورتی جهت‌گیری کرده‌اند که دقیقاً مکمل یون‌های کلسیم موجود در HA هستند [۴۱].

عابدی و همکاران [۴۲] گزارش کردند که اضافه کردن نانوذرات HA قابلیت استئواینتگریشن کامپوزیت را افزایش می‌دهد. همچنین وب‌استر^۴ و همکاران [۴۳] تاثیر مثبت HA را روی تشکیل سلول‌های استئوبلاست را گزارش کردند.

۳-۴- بررسی نتایج آلکالین فسفاتاز

آلکالین فسفاتاز یک آنزیم فعال است که بوسیله سلول‌های استئوبلاست تولید می‌شود. یکی از وظایف این آنزیم تخریب پیروفسفات‌های معدنی است تا یک غلظت موضعی کافی از فسفات یا پیروفسفات ایجاد شود. همچنین مقدار این آنزیم نشان دهنده‌ی میزان فعالیت سلول‌های استئوبلاست می‌باشد.

در این تحقیق فعالیت آنزیم آلکالین فسفاتاز در مجاورت نانو

¹ Hoang

² Osteocalcin

³ Osteoclast

⁴ Webster



۳-۵- چسبندگی سلولی

بررسی‌ها بر روی چسبندگی سلول‌های MG-63 توسط SEM انجام شد. شکل ۶ نشان می‌دهد که سلول‌های MG-63 با مورفولوژی طبیعی می‌توانند به سطح بچسبند و تکثیر شوند.

همانطور که در شکل ۶ مشاهده می‌شود سلول‌ها به سطح تمامی نمونه‌ها توسط پایک‌هایی (زوائد سیتوپلاسمی) چسبیده‌اند. با افزایش درصد نانو ذرات HA، بیواکتیویته نمونه‌ها به دلیل زیست‌فعالی بالای این ذرات و همچنین مکان‌های مناسب برای چسبیدن سلول‌ها بر روی سطح افزایش می‌یابد. همچنین به دلیل نانو بودن ذرات HA سطح مناسب بیشتری در اختیار سلول‌ها برای چسبیدن نسبت به ذرات با ابعاد میکرونی و بزرگتر وجود دارد. علاوه بر این موارد، وجود پروتئین‌های فیبرونکتین^۲ و ویترونکتین^۳ از عوامل اصلی چسبندگی مناسب سلول‌های استخوانی به سطح می‌باشد [۴۵، ۴۶].

با توجه به شکل ۶، در نمونه H5 به دلیل اکتیویته‌ی بالای سطح، سلول به خوبی توسط پایک‌هایی به سطح چسبیده است. به طور کل می‌توان بیان کرد که سطح نمونه‌ها پایداری لازم و مناسب برای حمایت از چسبندگی و تکثیر سلول‌ها را دارد.

سوزوکی^۴ و همکاران [۲۲] اثبات کردند که میزان یون کلسیم در فصل مشترک کامپوزیت و سلول استئوبلاست تاثیر زیادی در حمایت کردن از رشد این سلول‌ها دارد. به همین دلیل است که سلول‌ها با شکل فنوتایپیک خود

این آنزیم بعد از گذشت ۱۴ روز برای نمونه‌ی شاهد برابر نمونه‌ی کنترل است.

همایی‌گوهر و همکاران [۱۴] گزارش دادند که ممکن است دلیل کاهش آزادسازی آنزیم آلکالین فسفاتاز توسط سلول‌های MG-63 بعد از گذشت ۱۴ روز نسبت به ۷ روز، پر شدن فضاهای خالی خانه‌های پلیت کشت توسط سلول‌ها به دلیل تکثیر و تمایز بعد از گذشت ۷ روز و در نتیجه‌ی کاهش نرخ تمایز سلولی بعد از ۱۴ روز نسبت به ۷ روز باشد. این امر می‌تواند نشان دهنده این باشد که سرعت رشد، تکثیر و تمایز در کامپوزیت‌ها با افزایش درصد نانو ذرات HA افزایش چشم‌گیری می‌یابد و همچنین کاهش اندازه‌ی ذرات تقویت‌کننده از اندازه‌های بزرگتر از نانو به نانو باعث افزایش قابلیت چسبندگی، تکثیر، رشد و تمایز سلول‌های استخوانی به دلیل افزایش سطح مناسب، می‌شود.

نتایج به‌دست آمده از آزمون ALP همچنین نشان دهنده‌ی آن است که نانو کامپوزیت‌های HA/UHMWPE تاثیر مضر بر روی ترشح آنزیم آلکالین فسفاتاز توسط سلول‌های MG-63 نمی‌گذارند.

عامل دیگری که می‌تواند بر روی میزان ترشح این آنزیم موثر باشد، اندازه ذرات فاز تقویت‌کننده است. مرگان^۱ و همکاران [۴۴] سلول‌های استئوبلاست را در مجاورت نانو و میکرو ذرات HA در شرایط استاندارد و یکسان کاشتند و گزارش کردند که آنزیم آلکالین فسفاتاز به مقدار قابل توجهی بیشتر در مجاورت نانو ذرات در مقایسه با میکرو ذرات HA ترشح شدند.

² Fibronectin

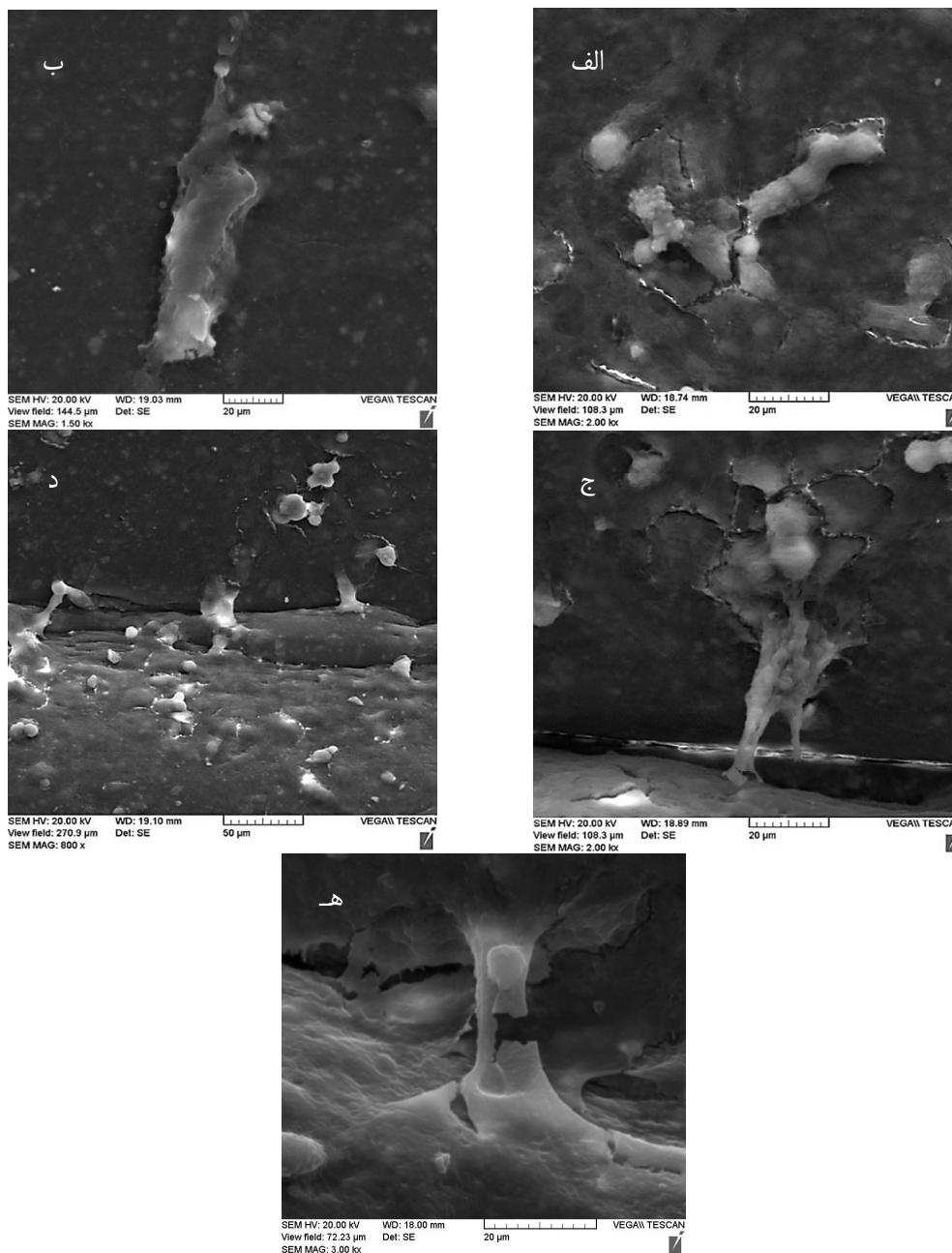
³ Vitronectin

⁴ Suzuki

¹ Murugan



به نمونه‌ها بخصوص نمونه H5 چسبیده و رشد کرده‌اند.



شکل ۶- تصاویر SEM چسبندگی سلولی، الف (H1، ب H2، ج H3، د H4 و ه) H5

فاز مذاب توسط دستگاه مخلوط‌کن داخلی و با استفاده از روغن پارافین با درجه پزشکی و سپس قالب‌گیری فشاری ساخته شدند. در ادامه روغن پارافین از نمونه‌ها خارج شد و

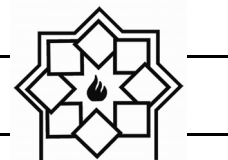
۴- نتیجه‌گیری

در تحقیق حاضر ابتدا نانوکامپوزیت‌ها به روش اختلاط در



مراجع

- [1] M. Kumar, H. Dasarathy, C. Riley, "Electrodeposition of brushite coatings and their transformation to hydroxyapatite in aqueous solutions", *Journal of biomedical materials research*, 45 (1999) 302-310.
- [2] M. Šupová, "Problem of hydroxyapatite dispersion in polymer matrices: a review", *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, 20 (2009) 1201-1213.
- [3] B. Clarke, "Normal bone anatomy and physiology", *Clinical journal of the American Society of Nephrology*, 3 (2008) S131-S139.
- [4] S. Ramakrishna, J. Mayer, E. Wintermantel, K. W. Leong, "Biomedical applications of polymer-composite materials: a review", *Composites Science and Technology*, 61 (2001) 1189-1224.
- [5] M. Yoshimura, "Importance of soft solution processing for advanced inorganic materials", *Journal of materials research*, 13 (1998) 796-802.
- [6] W. Bonfield, M. Grynblas, A. Tully, J. Bowman, J. Abram, "Hydroxyapatite reinforced polyethylene—a mechanically compatible implant material for bone replacement", *Biomaterials*, 2 (1981) 185-186.
- [7] N. Rangavittal, A. Landa-Cánovas, J. González-Calbet, M. Vallet-Regí, "Structural study and stability of hydroxyapatite and β -tricalcium phosphate: Two important bioceramics", *Journal of biomedical materials research*, 51 (2000) 660-668.
- [8] S. Yamada, D. Heymann, J.-M. Boulter, G. Daculsi, "Osteoclastic resorption of calcium phosphate ceramics with different hydroxyapatite/ β -tricalcium phosphate ratios", *Biomaterials*, 18 (1997) 1037-1041.
- [9] K. Vargervik, "Critical sites for new bone formation", *Bone grafts and bone*
- خواص زیست‌سازگاری آن‌ها توسط آزمون‌های ARS، ALP و چسبندگی سلولی مورد ارزیابی قرار گرفت. مهم‌ترین نتایج به‌دست‌آمده عبارتند از:
- بررسی‌های انجام شده توسط SEM نشان دهنده آن است که نانوذرات HA بخوبی در زمینه با روش اختلاط در فاز مذاب پراکنده شده‌اند. اما نانوذرات به هم چسبیده و آگلومره شده‌اند که این امر به دلیل آن است که سطح تماس بین فیلر و زمینه در حالت نانو نسبت به حالت میکرونی و بزرگتر، افزایش می‌یابد در نتیجه انرژی سطح آزاد افزایش می‌یابد که این عامل باعث افزایش انرژی داخلی ماده با افزایش انرژی سطحی ناشی از وجود نانو ذرات می‌شود و در نتیجه برای کاهش انرژی درونی و پایداری بیشتر، واکنش بین ذرات تقویت کننده با هم، افزایش یافته و این ذرات به هم چسبیده و آگلومره می‌شوند.
 - با افزایش میزان نانو ذرات HA میزان ترشح یون کلسیم و فعالیت آنزیم آلکالین فسفاتاز افزایش یافت به‌طوری که نمونه‌ی H5 بیشترین میزان یون کلسیم و آنزیم ALP را از خود نشان داد.
 - تمامی نانوکامپوزیت‌های ساخته شده بخصوص نمونه‌ی H5 زیست‌سازگار بوده و هیچ سمیتی از خود نشان ندادند.
 - سطح تمامی نمونه‌ها بخصوص نمونه با ۵۰ درصد وزنی نانو ذرات HA توانایی حمایت از سلول‌های استئوبلاست MG-63 را بمنظور چسبندگی، رشد و تکثیر آن‌ها را دارد.

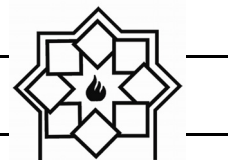


- bone repair scaffolds created via three-dimensional fabrication techniques", *Journal of Biomedical Materials Research Part A*, 67 (2003) 1228-1237.
- [18] K. Akhilesh, J. Patrick, G. Schmidt, "Nanocomposite Polymer Biomaterials for Tissue Repair of Bone and Cartilage", *Journal of A Material Science Perspective*, (2011).
- [۱۹] س. ع. میرصالحی، ع. خاوندی، ش. میردامادی، م. ر. نعیمی-جمال، س. روشنفر، بررسی خواص مکانیکی و سایشی نانوکامپوزیت HA/UHMWPE بعنوان جایگزین استخوان با روش نانوفوذ و نانوخراش. نشریه علمی - پژوهشی علم و مهندسی سرامیک، ۱۳۹۳، ۳(۲): ۱۱-۲۶.
- [20] J. Rieu, P. Goeuriot, "Ceramic composites for biomedical applications", (1993).
- [21] V. M. Mohammad Hossein Fathi, Seyed Iman Roohani Esfahani, "Bioactivity Evaluation of Synthetic Nanocrystalline Hydroxyapatite", *Journal of Dental Research*, (2008).
- [22] T. Suzuki, M. Hukkanen, R. Ohashi, Y. Yokogawa, K. Nishizawa, F. Nagata, L. Buttery, J. Polak, "Growth and adhesion of osteoblast-like cells derived from neonatal rat calvaria on calcium phosphate ceramics", *Journal of bioscience and bioengineering*, 89 (2000) 18-26.
- [23] L. L. Hench, J. Wilson, M. McLaren, D. Niesz, "An introduction to bioceramics", *World Scientific Singapore*, 1993.
- [24] M. Sattari, M. Naimi-Jamal, A. Khavandi, "Interphase evaluation and nano-mechanical responses of UHMWPE/SCF/nano-SiO₂ hybrid composites", *Polymer Testing*, 38 (2014) 26-34.
- [25] H. Tourani, A. Molazemhosseini, A. Khavandi, S. Mirdamadi, M. A. Shokrgozar, M. Mehrjoo, "Effects of fibers and nanoparticles reinforcements on the mechanical and biological properties of hybrid composite substitutes", (1992) 112-120.
- [10] G. Gergely, F. Wéber, I. Lukács, L. Illés, A.L. Tóth, Z.E. Horváth, J. Mihály, C. Balázs, "Nano-hydroxyapatite preparation from biogenic raw materials", *Central European Journal of Chemistry*, 8 (2010) 375-381.
- [11] S. Deville, E. Saiz, A. P. Tomsia, "Ice-templated porous alumina structures", *Acta Materialia*, 55 (2007) 1965-1974.
- [12] S. A. Mirsalehi, A. Khavandi, S. Mirdamadi, M. R. Naimi-Jamal, S. M. Kalantari, "Nanomechanical and tribological behavior of hydroxyapatite reinforced ultrahigh molecular weight polyethylene nanocomposites for biomedical applications", *Journal of applied polymer science*, 132 (2015).
- [13] J. Brandt, S. Henning, G. Michler, W. Hein, A. Bernstein, M. Schulz, "Nanocrystalline hydroxyapatite for bone repair: an animal study", *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, 21 (2010) 283-294.
- [14] S. Homaeigohar, M. Shokrgozar, A. Y. Sadi, A. Khavandi, J. Javadpour, M. Hosseinalipour, "In vitro evaluation of biocompatibility of beta-tricalcium phosphate-reinforced high-density polyethylene; an orthopedic composite", *Journal of Biomedical Materials Research Part A*, 75 (2005) 14-22.
- [15] E. Rigo, A. Boschi, M. Yoshimoto, S. Allegrini Jr, B. Konig Jr, M. Carbonari, "Evaluation in vitro and in vivo of biomimetic hydroxyapatite coated on titanium dental implants", *Materials Science and Engineering: C*, 24 (2004) 647-651.
- [16] R. Roop Kumar, M. Wang, "Biomimetic deposition of hydroxyapatite on brushite single crystals grown by the gel technique", *Materials Letters*, 49 (2001) 15-19.
- [17] T. Dutta Roy, J. L. Simon, J. L. Ricci, E. D. Rekow, V. P. Thompson, J. R. Parsons, "Performance of hydroxyapatite



استفاده از فرایند سل-ژل"، دومین همایش
بین‌المللی و هفتمین همایش مشترک انجمن
مهندسی متالورژی ایران و انجمن علمی ریخته‌گری
ایران، ایران- سمنان، ۱۳۹۲.

- [34] M. G. N. C. Barry Carter, "Ceramic Materials Science and Engineering", (2007), Springer.
- [35] E. Enqvist, "Carbon nanofiller reinforced UHMWPE for orthopaedic applications : optimization of manufacturing parameters", Luleå, (2013) 49.
- [36] W. J. Wood, R. G. Maguire, W. H. Zhong, "Improved wear and mechanical properties of UHMWPE-carbon nanofiber composites through an optimized paraffin-assisted melt-mixing process", Composites Part B: Engineering, 42 (2011) 584-591.
- [37] M. C. Galez, T. Bläß, H. Ruckdäschel, J. K. W. Sandler, V. Altstädt, U. Glatzel, "Carbon nanofibre-reinforced ultrahigh molecular weight polyethylene for tribological applications", Journal of Applied Polymer Science, 104 (2007) 4173-4181.
- [38] Y. Bin, A. Yamanaka, Q. Chen, Y. Xi, X. Jiang, M. Matsuo, Morphological, "Electrical and Mechanical Properties of Ultrahigh Molecular Weight Polyethylene and Multi-wall Carbon Nanotube Composites Prepared in Decalin and Paraffin", Polym. J, 39 (2007) 598-609.
- [39] L. Fang, Y. Leng, P. Gao, "Processing of hydroxyapatite reinforced ultrahigh molecular weight polyethylene for biomedical applications", Biomaterials, 26 (2005) 3471-3478.
- [40] W.-H. Z. Weston Wood Mechanical and Properties of UHMWPE Nanocomposites Filled with Carbon Nanofillers", (2000).
- [41] Q. Q. Hoang, A. J. Sicheri F Fau-Howard, D. S. C. Howard Aj Fau- Yang, D. S. Yang, "Bone recognition mechanism of porcine osteocalcin from crystal structure", (2003).
- polyetheretherketone/short carbon fiber/Nano-SiO₂", Polymer Composites, 34 (2013) 1961-1969.
- [26] M. Sattari, A. Molazemhosseini, M. Naimi-Jamal, A. Khavandi, "Nonisothermal crystallization behavior and mechanical properties of PEEK/SCF/nano-SiO₂ composites", Materials Chemistry and Physics, 147 (2014) 942-953.
- [27] J.-L. Liu, Y.-Y. Zhu, Q.-L. Wang, S.-R. Ge, "Biotribological behavior of ultra high molecular weight polyethylene composites containing bovine bone hydroxyapatite", Journal of China University of Mining and Technology, 18 (2008) 606-612.
- [28] W. Li, C. Guan, J. Xu, J. Mu, D. Gong, Z.-r. Chen, Q. Zhou, "Disentangled UHMWPE/POSS nanocomposites prepared by ethylene< i> in situ</i> polymerization", Polymer, 55 (2014) 1792-1798.
- [29] O. J. C. Zhu, R. Jaskulka, W. Koller, W. Wu, "Effect of counterpart material and water lubrication on the sliding wear performance of crosslinked and non-crosslinked ultra high molecular weight polyethylene", Polymer testing, 23 (2004) 8.
- [30] D. J. Krzypow, C. M. Rimnac, "Cyclic steady state stress-strain behavior of UHMW polyethylene", Biomaterials, 21 (2000) 2081-2087.
- [31] J. Cooper, D. Dowson, J. Fisher, "Macroscopic and microscopic wear mechanisms in ultra-high molecular weight polyethylene", Wear, 162 (1993) 378-384.
- [32] L. Fang, Y. Leng, P. Gao, "Processing and mechanical properties of HA/UHMWPE nanocomposites", Biomaterials, 27 (2006) 3701-3707.
- [۳۳] س.ع. میرصالحی، ع. خاوندی، ح. توسلی، س. روشنفر، "سنتز نانوذرات هیدروکسی‌آپاتیت از پیش‌ماده‌های $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ و P_2O_5 با



- [42] M. Abadi, I. Ghasemi, A. Khavandi, M. Shokrgozar, M. Farokhi, S. S. Homaeigohar, A. Eslamifar, "Synthesis of nano β -TCP and the effects on the mechanical and biological properties of β -TCP/HDPE/UHMWPE nanocomposites", Polymer Composites, 31 (2010) 1745-1753.
- [43] T. J. Webster, C. Ergun, R. H. Doremus, R. W. Siegel, R. Bizios, "Enhanced functions of osteoblasts on nanophase ceramics", Biomaterials, 21 (2000) 1803-1810.
- [44] R. Murugan, S. Ramakrishna, "Development of cell-responsive nanophase hydroxyapatite for tissue engineering", American Journal of Biochemistry and Biotechnology, 3 (2007) 118.
- [45] C. Ergun, H. Liu, J. W. Halloran, T. J. Webster, "Increased osteoblast adhesion on nanograined hydroxyapatite and tricalcium phosphate containing calcium titanate", Journal of Biomedical Materials Research Part A, 80 (2007) 990-997.
- [46] G. Altankov, F. Grinnell, T. "Groth, Studies on the biocompatibility of materials: Fibroblast reorganization of substratum-bound fibronectin on surfaces varying in wettability", Journal of biomedical materials research, 30 (1996) 385-391.