

بررسی رفتار سلول استئوبلاست G292 بر روی فولاد ۳۱۶L پوشش داده شده با کربن شبه الماسی به منظور کاربرد در کاشتنی‌های پزشکی

سید محمدرضا درخشنده^۱، محمدجواد اشراقی^{۲*}، سید محمدمهدی هادوی^۳، مسعود مظفری^۳، معصومه جواهری^۱

^۱پژوهشگاه مواد و انرژی، پژوهشکده سرامیک، کرج، ایران.

^۲پژوهشگاه مواد و انرژی، پژوهشکده نیمه‌هادی‌ها، کرج، ایران.

^۳پژوهشگاه مواد و انرژی، پژوهشکده نانو، کرج، ایران.

تاریخ ثبت اولیه: ۱۳۹۶/۰۲/۰۴، تاریخ دریافت نسخه اصلاح شده: ۱۳۹۶/۰۳/۰۱، تاریخ پذیرش قطعی: ۱۳۹۶/۰۴/۱۱

چکیده در این تحقیق، رشد لایه‌های کربن شبه‌الماسی (DLC) با استفاده از روش رسوب‌دهی شیمیایی از فاز بخار به کمک پلاسما (PECVD) بر روی زیرلایه‌ی AISI 316L انجام شد. به‌منظور بهبود چسبندگی این پوشش بر روی فولاد قبل از فرآیند پوشش‌دهی، از عملیات نیتروکربوراسیون پلاسمایی استفاده شد. رفتار سلول استئوبلاست G292 بر فولاد فاقد پوشش، فولاد نیتروکربور شده و فولاد پوشش داده شده با DLC مقایسه شد. نتایج حاصل از طیف‌سنجی رامان نشان داد که این پوشش از ۳۹٪ پیوندهای الماسی یا sp^3 برخوردار می‌باشد. نتایج حاصل از آزمون سمی بودن سلولی نمونه‌ها نشان داد که در فولاد ۳۱۶L حدود ۲۹ درصد از سلول‌های استئوبلاست زنده مانده‌اند که دارای زیست‌سازگاری مناسبی نمی‌باشد. فرآیند نیتروکربوراسیون و پوشش‌دهی DLC به دلیل زیست-سازگاری و پایداری شیمیایی آن به عنوان مانعی برای رهایش عناصر سمی در آلیاژ عمل کرده و زیست‌سازگاری این فولاد را تا حد زیادی بهبود می‌بخشد. بدین صورت که پس از فرآیند نیتروکربوراسیون و پوشش‌دهی DLC درصد زنده ماندن سلول‌های استئوبلاست به حدود ۴۰ درصد و ۷۱ درصد افزایش یافت.

کلمات کلیدی: کربن شبه‌الماسی، پوشش، زیست‌سازگاری، نیتروکربوراسیون پلاسمایی، رسوب‌دهی شیمیایی بخار به کمک پلاسما.

G 292 Osteoblastic Cell Behavior on DLC Coated 316L Stainless Steel for Medical Implants

Mohammad Reza Derakhshandeh¹, Mohammad Javad Eshraghi^{2*}, Seyed Mohammad Mehdi Hadavi³, Masoud Mozafari³, Masoumeh Javaheri¹

¹Materials and Energy Research Center, Department of ceramic, Karaj, Iran.

²Materials and Energy Research Center, Department of semiconductors, Karaj, Iran.

³Materials and Energy Research Center, Department of Nano and Advanced Materials, Karaj, Iran.

Abstract In this research diamond-like carbon (DLC) films were deposited on AISI316L stainless steel by plasma enhanced chemical vapor deposition (PECVD) method. In order to improve adhesion of the coating, plasma nitrocarburizing method was performed on substrates before DLC deposition. Raman spectra of the coating showed that sp^3 fraction of the film was 39%. Biological properties of the uncoated, plasma nitrocarburized and DLC coated samples were analyzed. MTT results showed that 316L stainless steel didn't have appropriate biocompatibility and nitrocarburizing process and DLC deposition improved the biocompatibility of the samples due to preventing the release of toxic elements such as nickel. Cell viability of the uncoated, plasma nitrocarburized and DLC coated samples was about 29%, 40% and 71% respectively.

Keywords: Diamond-like carbon, Coating, Biocompatibility, Plasma nitrocarburizing, Plasma enhanced chemical vapor deposition.

۱- مقدمه

شد. کیم^۲ و همکارانش [۸] به منظور بررسی اثر پوشش DLC بر مقاومت به خوردگی فولاد ۳۱۶L در محیط شبیه سازی شده بدن، رفتار خوردگی الکتروشیمیایی این پوشش در محلول حاوی NaCl ۰/۸۹٪ را بررسی کرد. نتایج حاصل از این پژوهش نشان داد که با پوشش دهی DLC چگالی جریان خوردگی فولاد زنگ نزن ۳۱۶L از محدوده 10^{-7} A/cm² به 10^{-8} A/cm² کاهش پیدا کرده است.

پوشش های DLC یک شکل آمورف و فرآپایدار از کربن می باشد که هیبریداسیون پیوندی آن مخلوطی از sp² و sp³ است که سبب پیدایش ویژگی هایی از جمله سختی بالا، پایداری شیمیایی، مقاومت الکتریکی زیاد، ضریب اصطکاک پایین، شفافیت نوری بالا، ثابت دی الکتریک پایین و مقاومت به سایش زیاد شده است. البته این خواص با توجه به درصد پیوندهای sp³ متغیر می باشد [۲].

در اصل، لایه نشانی DLC به دو روش رسوب دهی فیزیکی و یا شیمیایی از فاز بخار در دمای پایین انجام می شود. از جمله روش های لایه نشانی کربن شبه الماسی می توان به لایه نشانی پرتو یونی، لایه نشانی لیزر پالسی، کاشت یونی، کندوپاش و رسوب دهی شیمیایی از فاز بخار به کمک پلاسما (PECVD) اشاره کرد. رسوب دهی شیمیایی از فاز بخار به کمک پلاسما یک روش متداول برای لایه نشانی کربن شبه الماسی می باشد [۳]. از مزایای استفاده از روش PECVD می توان به پایین بودن دمای لایه نشانی، چسبندگی مناسب به زیرلایه، سرعت لایه نشانی بالا، تنش های کمتر لایه به دلیل درجه حرارت پایین لایه نشانی و امکان لایه نشانی قطعات در ابعاد صنعتی اشاره کرد [۴]. خواص لایه های DLC پوشش داده شده به روش PECVD، به شرایط لایه نشانی وابسته است. از مهم ترین متغیرهای این روش می توان به فشار، ولتاژ، دمای لایه نشانی، سیکل کاری و نوع و نسبت گازها اشاره کرد. در لایه نشانی DLC به روش PECVD می توان از گازهای هیدروکربنی مختلف و با فشار بخار مناسب از قبیل متان، استیلن، بنزن، بوتان و... به عنوان منبع کربنی استفاده نمود [۵]. از مهم ترین متغیرهای لایه نشانی به روش رسوب دهی شیمیایی از فاز بخار به کمک پلاسما می توان به فشار، ولتاژ، نسبت گازها، سیکل کاری، فرکانس و دمای لایه نشانی اشاره کرد [۵، ۶].

فولاد زنگ نزن AISI 316L به دلیل مقاومت به خوردگی بالا و همچنین زیست سازگاری به طور گسترده ای در صنایع پزشکی مانند کاشتنی ها، پیچ های مورد استفاده در بدن و از این قبیل مورد استفاده قرار می گیرد. اگرچه این فولاد مقاومت به خوردگی بالایی دارد، اما قابلیت خوردگی حفره ای در این نوع فولاد وجود دارد. در مطالعات گذشته نیز به خوردگی حفره ای فولاد 316L در محیط بدن اشاره شده است [۱]. بنابراین، محققین تلاش های بسیاری را در جهت بهبود مقاومت به خوردگی حفره ای این نوع فولاد انجام داده اند. از فعالیت هایی که در این زمینه انجام شده است می توان به روش های اصلاح سطحی مثل کاشت یونی، نیتریده کردن، نیتروکربوره کردن، پوشش دهی و... اشاره کرد [۲ و ۳].

پوشش های کربن شبه الماسی (DLC) به دلیل خاصیت زیست سازگاری، مقاومت شیمیایی بالا، ضریب اصطکاک پایین و مقاومت بالا نسبت به سایش، در پوشش کاشتنی ها مانند مفصل ران و زانو کاربرد دارند. در کلیه پوشش های مورد استفاده در بدن، نیاز اصلی چسبندگی مناسب پوشش، زیست سازگاری و رها نشدن ذرات باقی مانده ناشی از سایش می باشد. مطالعات عمیق تر نیز بر روی این پوشش ها از قبیل آزمون های زیست سازگاری، عدم سمی بودن سلولی، جذب سلولی و پروتئینی، خوردگی در محیط شبیه سازی شده بدن و... انجام گرفته است [۴-۷]. گزارش های زیادی در مورد زیست سازگاری و مقاومت به خوردگی پوشش های DLC در محیط های بیولوژیکی به ثبت رسیده است. بوسیگا^۱ و همکارانش [۷] در سال ۲۰۱۵ خواص زیست سازگاری، سمی بودن سلولی پوشش های DLC و همچنین، پوشش های DLC کامپوزیت شده با نانوذرات نقره لایه نشانی شده بر روی فولاد پزشکی ۳۱۶LVM در محیط سلولی استخوانی انسان را بررسی کردند. آن ها دریافتند که پوشش DLC خود به تنهایی دارای خاصیت زیست سازگاری مناسبی بوده و نانوذرات نقره حتی می تواند این خاصیت را تضعیف کند. اما در درصد خاصی از ذرات نقره در پوشش، زیست سازگاری بهبود داده

² Kim¹ Bociaga

نیتروکربوراسیون استفاده شد. جهت بررسی ساختاری پوشش ایجاد شده و مطالعه پیوندهای کربنی از آزمون طیف‌سنجی رامان استفاده شد. برای این منظور از دستگاه طیف‌سنج رامان با لیزر Nd:YLF با طول موج ۵۳۲ nm، توان ۲۵ mW و حد تفکیک 4cm^{-1} استفاده شد. درصد پیوندهای sp^3 پوشش با استفاده از رابطه‌ی (۱) محاسبه گردید [۹]:

$$\text{sp}^3 = 0.24 - 48.9(\omega_G - 0.1580) \quad \text{رابطه (۱)}$$

که در این رابطه ω_G مربوط به محل پیک G در طیف رامان با واحد μm^{-1} می‌باشد. هم‌چنین، می‌توان مدول الاستیک و چگالی لایه‌ها را با استفاده از رابطه (۲) و (۳) محاسبه کرد [۱۰]:

$$\rho\left[\frac{\text{g}}{\text{cm}^3}\right] = 0.257 + 0.011.FWHM_G[\text{cm}^{-1}] \quad \text{رابطه (۲)}$$

$$E[\text{GPa}] = -511 + 4.66.FWHM_G[\text{cm}^{-1}] \quad \text{رابطه (۳)}$$

به‌منظور بررسی ریزساختار و مورفولوژی ترکیب شیمیایی نمونه‌های پوشش داده شده از میکروسکوپ الکترونی روبشی گسیل میدانی (FESEM) مدل TESCAN-mira3 و آزمون EDS استفاده شد.

برای ارزیابی و مقایسه میزان بقاء سلولی (MTT)، ابتدا هر یک از نمونه‌های مورد بررسی در معرض اتانول ۷۰٪ به مدت یک شب قرار گرفت. سپس، به کمک اشعه UV برای مدت سه ساعت استریل گشته و پس از آن سه مرتبه با سرم PBS شستشو داده شد. پودر MTT با غلظت پنج میلی‌گرم در یک میلی لیتر PBS تهیه و در دمای 4°C و در تاریکی نگه داری شد. در این آزمون از سلول‌های استئوبلاست رده‌ی G-292 موجود در بانک انستیتو پاستور ایران استفاده شد. سلول‌ها به تعداد $1.3 \times 10^4 \text{ cell/well}$ در محفظه‌های ۲۴ خانه‌ای که نمونه‌های موردنظر در آن قرار داشتند، کشت داده شدند و به مدت ۲۴ و ۷۲ ساعت در انکوباتور با دمای 37°C و رطوبت ۹۰٪ نگه‌داری شدند. (محیط کشت RPMI 1640، حاوی ۱۰٪ FBS و یک درصد آنتی‌بیوتیک Pen strep). پس از گذشت زمان‌های موردنظر، محیط کشت سلول‌ها از انکوباتور خارج و به هر خانه ۱۰۰ میکرولیتر محیط کشت حاوی ۱۰٪ محلول MTT اضافه شد و سپس، به مدت چهار ساعت در تاریکی در دمای 37°C انکوبه شد. درنهایت، محیط MTT از

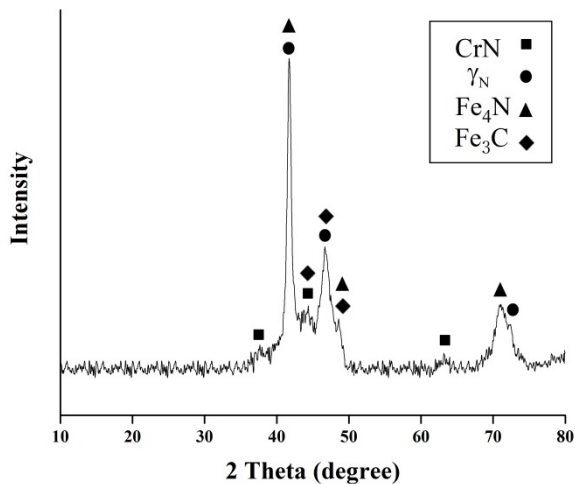
در این تحقیق، سنتز و لایه‌نشانی کربن شبه‌الماسی به روش PECVD مدنظر قرار گرفته است. به‌منظور بهبود چسبندگی پوشش، قبل از فرآیند پوشش‌دهی، زیرلایه تحت عملیات نیتروکربوراسیون پلاسمایی قرار گرفته شد. جهت مقایسه رفتار زیست‌سازگاری فولاد و فولاد نیتروکربوره‌شده و فولاد پوشش داده‌شده، رفتار سلول استئوبلاست G292 بر روی این نمونه‌ها مورد بررسی و مطالعه قرار گرفته شد. لازم به‌ذکر است که نوآوری این تحقیق استفاده از فرآیند نیتروکربوراسیون پلاسمایی به منظور افزایش چسبندگی پوشش DLC و هم‌چنین امکان‌سنجی استفاده فولاد ۳۱۶L صنعتی پوشش داده شده با DLC برای کاربردهای پزشکی جهت کاهش هزینه‌ها می‌باشد.

۲- روش تحقیق

در این تحقیق، از ورقه‌های AISI 316L به‌عنوان زیرلایه استفاده شد. قبل از لایه‌نشانی، سطح نمونه‌ها با خمیر الماسه یک میکرون پولیش شد. به منظور عملیات چربی‌زدایی نمونه‌ها در حمام اولتراسونیک در محیط استون به مدت ۱۰ دقیقه قرار داده شد و پس از آن با آب دی‌یونیزه شست‌وشو داده و خشک شد. فرآیند لایه‌نشانی با استفاده از دستگاه PECVD انجام گرفت. بعد از قرار گرفتن نمونه‌ها در دستگاه با روشن کردن پمپ خلاء و رسیدن به فشار اولیه 2×10^{-2} torr، تمیزکاری نهایی نمونه‌ها با پلاسمای آرگون در فشار 7.5×10^{-2} torr به مدت ۲۰ دقیقه انجام گرفت. به‌منظور افزایش چسبندگی پوشش‌های DLC، قبل از فرآیند پوشش‌دهی زیرلایه‌های فولادی تحت عملیات نیتروکربوراسیون پلاسمایی قرار گرفت. شرایط نیتروکربوراسیون پلاسمایی به این صورت بود که ابتدا زیرلایه‌ها به مدت یک ساعت نیتریده شده و به مدت سه ساعت نیتروژن‌دهی و کربن‌دهی به صورت هم‌زمان بر روی زیرلایه‌ها اعمال شد. لایه‌نشانی DLC با استفاده از گاز متان و آرگون با نسبت آرگون به متان چهار به یک در دمای 100°C به مدت دو ساعت انجام شد. شرایط نیتروکربوراسیون و پوشش‌دهی DLC در جدول ۱ آورده شده‌است.

به منظور تعیین ترکیب شیمیایی فولاد مورد مطالعه از آن آزمون کوانتومتری (مدل Foundry Master UV) گرفته‌شد. هم‌چنین، از آزمون پراش پرتوی ایکس (XRD، مدل Philips X'Pert) به‌منظور شناسایی فازی پس از فرآیند

نمایان می‌شود [۱۱]. دلیل آن نفوذ عنصر نیتروژن به درون ساختار FCC آستنیت و افزایش ثابت شبکه بلوری آن می‌باشد. با افزایش ثابت شبکه می‌توان گفت که طبق رابطه‌ی براگ، پراش در زاویه‌های کمتری اتفاق می‌افتد. با توجه به اینکه الگوی فاز γ_N در نرم‌افزارهای شناسایی فازی XRD وجود نداشت، شناسایی این فاز طبق یافته‌های مقالات علمی مختلف انجام گرفت [۱۲ و ۱۳].



شکل ۱. الگوی XRD فولاد زنگ‌نزن ۳۱۶L پس از فرآیند نیتروکربوراسیون.

همان‌طور که در تصویر FESEM سطح مقطع نمونه CN_3 آورده شده در شکل ۲ (الف) مشاهده می‌شود، فرآیند نیتروکربوراسیون باعث ایجاد دولایه‌ی نفوذی در فولاد شده است که با توجه به آنالیز EDS خطی آورده شده در شکل ۲ (ب) مشاهده می‌شود که از سطح نمونه تا عمق ۳/۵ میکرومتر از سطح (لایه‌ی نفوذی بالایی) عنصر کربن نفوذ کرده و از درصد بالایی برخوردار می‌باشد و با افزایش فاصله از سطح رفته‌رفته از درصد عنصر کربن کاسته می‌گردد و در فاصله‌ی بیشتر از چهار میکرومتر از سطح درصد عنصر کربن به حدود صفر می‌رسد. اما با توجه به آزمون EDS خطی عنصر نیتروژن مشاهده می‌گردد که این عنصر تا عمق ۱۰/۵ میکرومتر از سطح نمونه حضور دارد. بنابراین، می‌توان نتیجه گرفت که عنصر نیتروژن حدود ۷ میکرومتر بیشتر از عنصر کربن در فولاد نفوذ کرده‌است که این نشان دهنده‌ی میزان نفوذ بیشتر نیتروژن در سطح زیرلایه نسبت به کربن می‌باشد. با توجه به مقایسه‌ی ضریب نفوذ این دو عنصر در آلیاژ فولاد زنگ‌نزن، مشاهده می‌شود که ضریب نفوذ کربن و نیتروژن در محدوده دمای $^{\circ}C$

انکوباتور خارج شده و ۱۰۰ میکرولیتر حلال دی‌متیل سولفوکساید (DMSO) به آن اضافه شد تا بلورهای آبی رنگ تشکیل شده در آن حل شوند. بعد از گذشت ۱۵ دقیقه حلال موجود در هریک از خانه‌ها پیپتاژ شده و سپس، توسط دستگاه الیزاریدر در طول موج ۵۷۰ نانومتر خوانش صورت گرفته شد. لازم به ذکر است، به‌منظور بررسی دقیق‌تر، این آزمون برای هر نمونه و در هر زمان مورد بررسی، سه بار تکرار شد. در نهایت سلول‌های رنگ‌آمیزی‌شده با استفاده از میکروسکوپ نوری مشاهده شدند.

جدول ۱. شرایط نیتروکربوراسیون پلاسمایی و لایه‌نشانی DLC.

کد نمونه	V (V)	P (Pa)	T ($^{\circ}C$)	CH ₄ (sccm)	Ar (sccm)	N ₂ (sccm)	H ₂ (sccm)
CN ₃	۶۰۰	۴۰۰	۵۰۰	۴	-	۲۰	۸۰
DLC-P2	۵۵۰	۴۰	۱۵۰	۱۰	۴۰	-	-

۳- نتایج و بحث

جدول ۲ نتایج حاصل از آزمون کمی کوانتومتری از ترکیب شیمیایی فولاد ۳۱۶L را نشان می‌دهد که این نتایج با محدوده ترکیب شیمیایی برای فولاد ۳۱۶L ذکر شده در استاندارد ASTM A240 مطابقت دارد.

جدول ۲. نتایج آزمون کمی فولاد زنگ نزن ۳۱۶L با استفاده از آزمون کوانتومتری.

عناصر آلیاژی	Si	Mn	Mo	Ni	Cr	C	S	P
Wt%	۰/۴	۱/۴	۲/۴	۱۱/۵	۱۷	۰/۳	۰/۰۲	۰/۰۱
	۱/۰±	۳/۰±	۵/۰±	۶/۰±	۴/۰±	۰/۱۰±	۰/۱۰±	۰/۱۰±

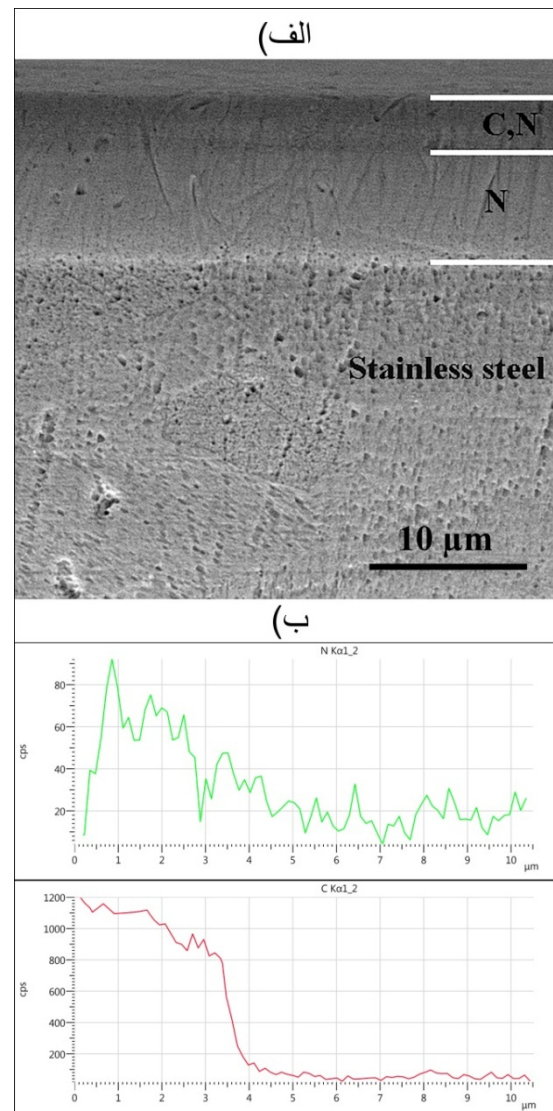
شکل ۱ الگوی XRD نمونه‌ی CN_3 را نشان می‌دهد. با بررسی الگوی XRD این نمونه مشاهده می‌شود که فازهای CrN ، Fe_4N یا Fe_3C (γ') و γ_N در فرآیند نیتروکربوراسیون تشکیل شده است. لازم به ذکر است که فاز CrN ، Fe_4N و Fe_3C با کارت‌های مرجع به شماره‌های به ترتیب ۲۲۹۴-۰۷۶-۰۱، ۱۲۱۹-۰۰۱، ۱۱۱۳-۰۲۳ مطابقت دارند. فاز γ_N یا فاز آستنیت غنی‌شده از نیتروژن به‌طور معمول در فرآیندهای نیتروکربوراسیون فولادهای آستنیتی در دماهای کمتر از $500^{\circ}C$ به‌وجود می‌آید. الگوی XRD این فاز مشابه با فاز آستنیت می‌باشد با این تفاوت که پیک‌های فاز γ_N در زاویه‌های کمتر

مجزا با غلظت‌های متفاوت عناصر گشته است. بنابراین، می‌توان گفت که در لایه‌ی سطحی نفوذی، فاز کاربید آهن به‌همراه فازهای نیتریدی و در لایه‌ی پایینی، تنها فازهای نیتریدی تشکیل شده‌اند.

ماروسیچ (Marušić) و همکاران به‌تازگی سطح فولاد کربنی غیرآلیاژی را به‌منظور بهبود خواص مکانیکی، خوردگی و مقاومت در برابر سایش تحت فرآیند نیتروکربوراسیون قرار دادند [۱۵]. آن‌ها پیشنهاد دادند که نیتروکربوراسیون می‌تواند به بهبود ویژگی‌های سطحی فولاد کمک کند که روند نفوذ نیتروژن و کربن با نتایج به‌دست آمده در این پژوهش مطابقت دارد.

شکل ۳ الگوی رامان به‌دست آمده از پوشش DLC را نشان می‌دهد. به‌طور معمول ساختارهای کربنی دارای خصوصیتی مشترک در طیف رامان خود در محدوده cm^{-1} ۲۰۰۰-۱۰۰۰ می‌باشند که در الگوی رامان این ساختارهای کربنی در محدوده‌ی cm^{-1} ۱۳۶۰ و cm^{-1} ۱۵۶۰ قله‌هایی دیده می‌شود. همان‌گونه که در شکل (۲) مشاهده می‌شود طیف دارای دو قله در محدوده cm^{-1} ۱۵۴۸ و cm^{-1} ۱۳۹۳ می‌باشد. قله‌ی نخست که در محدوده cm^{-1} ۱۵۴۸ قرار گرفته است باند G و دومین قله که در محدوده‌ی cm^{-1} ۱۳۶۹ قرار دارد باند D نامیده می‌شود. باند G مربوط به پیوند های sp^2 مربوط به دو اتم در ساختارهای حلقوی و زنجیره‌ای کربن و باند D مربوط به عیوب بین صفحه‌ای و بی‌نظمی در ساختار حلقوی کربن می‌باشد [۱۶-۱۸]. موقعیت، شدت و پهنای هرکدام از این قله‌ها مشخصات جالب توجهی از ساختارهای کربنی را ارائه می‌دهند [۱۹]. با بررسی این نمودار مشخص می‌شود که این پوشش دارای نسبت $I(D)/I(G)$ برابر با ۰/۷ و پهنای پیک G در نیمه‌ی ارتفاع برابر با cm^{-1} ۱۹۱ است. از آنجا که این مقدار از cm^{-1} ۵۰ بیشتر و هم‌چنین $I(D)/I(G)$ کمتر از عدد یک می‌باشد، می‌توان گفت که پوشش دارای ساختار به‌طور کامل بی‌نظم است. هم‌چنین، پیوندهای sp^2 بیشتر در ساختارهای زنجیره‌ای و خوشه‌ای سازمان یافته‌اند و میزان پیوندهای sp^2 سازمان یافته در حلقه‌ها نسبت به زنجیره‌ها کمتر می‌باشد [۱۹]. با محاسبه درصد پیوندهای sp^3 طبق رابطه‌ی ۱ مشخص می‌شود که این پوشش دارای ۳۹ درصد پیوند sp^3 و ۶۱ درصد پیوند sp^2 است. بنابراین، انتظار می‌رود که این پوشش از

در این آلیاژ به‌طور تقریبی برابر است و در محدوده‌ی cm^2/s 10^{-13} قرار دارد [۱۴].



شکل ۲. (الف) تصویر FESEM از سطح مقطع نمونه‌ی CN_3 پس از فرآیند نیتروکربوراسیون پلاسمایی (ب) آزمون EDS خطی از عناصر نیتروژن و کربن از سطح مقطع نمونه‌ی CN_3 .

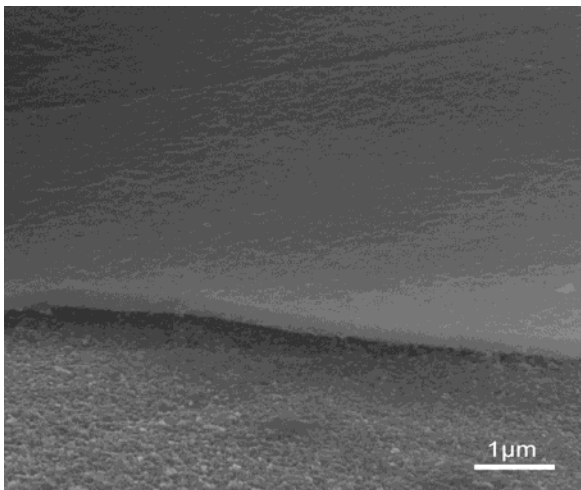
از آنجا که نفوذ تابع زمان و دما می‌باشد و فرآیند نیتروکربوراسیون در دمای ثابت انجام شده است و با توجه به اینکه زمان نفوذ نیتروژن نسبت به کربن یک ساعت بیشتر بوده می‌توان گفت که نیتروژن به مقدار بیشتری در عمق نفوذ کرده است. از طرفی، اگر ضریب نفوذ این دو عنصر در فولاد ثابت فرض شود، طبق قانون اول فیک، عامل تأثیرگذار بر نفوذ، غلظت عناصر می‌باشد و چون در این آزمایش حجم گاز نیتروژن وارد شده به محفظه واکنش حدود پنج برابر حجم گاز متان بوده است، می‌توان نتیجه گرفت که شار نفوذی نیتروژن نسبت به کربن بیشتر بوده و سبب پدید آمدن دولایه نفوذی

همانطور که مشاهده می‌شود، پوشش DLC دارای ساختاری یکپارچه و یکنواخت می‌باشد. لازم به ذکر است که در سطح پوشش هیچ‌گونه تخلخل و حفره‌های ریزی دیده نمی‌شود. همچنین، آزمون EDS از سطح نمونه‌ی CN3 حضور عناصر کربن و نیتروژن را نشان می‌دهد که طیف آن در شکل (۲) و نتایج کمی حاصل از این آزمون در جدول ۴ آورده شده است.

جدول ۴. نتایج کمی به دست آمده از آزمون EDS از سطح نمونه‌ی CN3.

عنصر	Fe	Cr	Ni	C	Si	N	Mo	Mn
Wt%	۶۲٫۷۴	۱۶٫۴۳	۹٫۹۶	۳٫۷۷	۰٫۳۱	۳٫۵۸	۲٫۱۱	۱٫۱۰

شکل ۵ تصویر FESEM سطح مقطع این پوشش را نشان می‌دهد. میانگین ضخامت این پوشش حدود ۳۷۵±۳۲ nm محاسبه گردید. بنابراین، سرعت لایه‌نشانی را می‌توان با استفاده از ضخامت پوشش و زمان لایه‌نشانی محاسبه نمود. از آنجا که زمان لایه‌نشانی ۱۲۰ دقیقه بوده است، می‌توان گفت که سرعت لایه‌نشانی در پوشش برابر با ۳٫۱ nm/min می‌باشد.



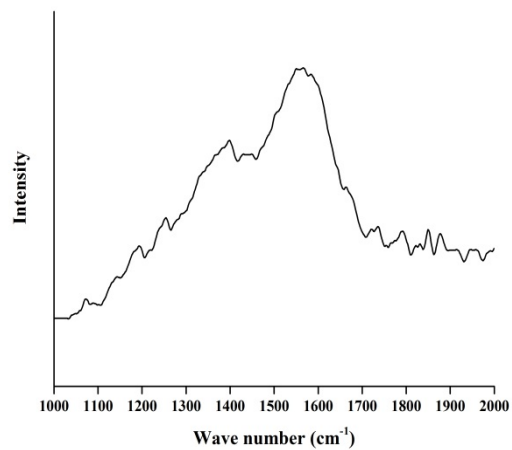
شکل ۵. تصویر FESEM از سطح مقطع پوشش DLC-P2.

در آزمون MTT زنده ماندن سلول‌های استخوانی در نمونه‌های DLC، نمونه‌های فولادی ۳۱۶L بدون پوشش و همچنین نمونه‌های فولادی ۳۱۶L نیتروکربوره‌شده، پس از ۲۴ ساعت و ۷۲ ساعت ماندگاری، نسبت به نمونه شاهد (چاهک‌های محفظه‌ی ۲۴ خانه‌ای) به عنوان معیاری برای زیست‌سازگاری نمونه‌ها در نظر گرفته شد. شکل ۶ تصاویر میکروسکوپی نوری مربوط به نمونه‌های شاهد، فولاد ۳۱۶L

چگالی و خواص مکانیکی بالایی برخوردار باشد. با توجه به رابطه‌ی ۲ و ۳ ملاحظه می‌گردد که چگالی پوشش ۲٫۳۶ g/cm³ و مدول الاستیسیته ۳۸۳ GPa می‌باشد. نتایج مستخرج از طیف‌سنجی رامان پوشش DLC در جدول ۳ آورده شده است.

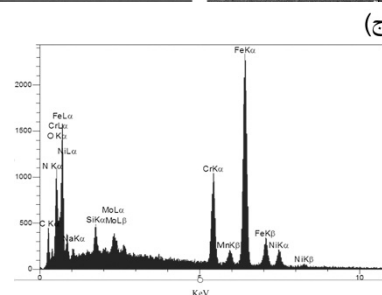
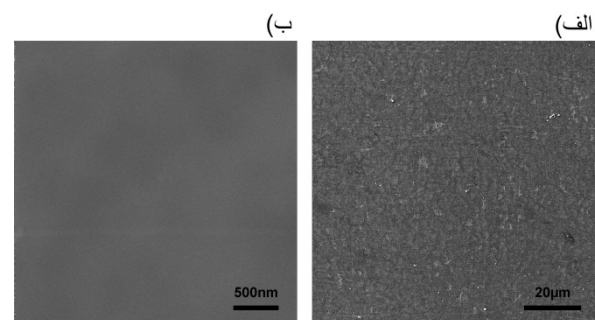
جدول ۳. نتایج حاصل از طیف‌سنجی رامان پوشش DLC.

ρ (g/cm ³)	E (GPa)	FWHM _G (cm ⁻¹)	I(D)/I(G)	ω_G (cm ⁻¹)	ω_D (cm ⁻¹)	sp ³ (%)
۲٫۳۶	۳۸۳	۱۹۱	۰٫۷	۱۵۴۸	۱۳۹۳	۳۹



شکل ۳. الگوی رامان پوشش DLC لایه‌نشانی شده به روش PECVD.

شکل ۴ (الف) تصویر FESEM از سطح نمونه نیتروکربوره‌شده و شکل ۴ (ب) پوشش DLC-P2 را نشان می‌دهد.



شکل ۴. تصاویر FESEM از سطح نمونه‌های الف) CN3 ب) DLC-P2 ج) آزمون EDS از سطح نمونه‌ی CN3.

اگر درصد زنده ماندن سلول‌ها نسبت به نمونه‌ی شاهد بالای ۷۰ درصد باشد، می‌توان گفت که نمونه سمی نیست و زیست‌سازگار می‌باشد. بر این اساس، می‌توان اظهار نمود که پوشش DLC بر روی زیرلایه‌های نیتروکربوره شده تحت شرایط CN3 زیست‌سازگار بوده و فولاد ۳۱۶L دارای سمی بودن سلولی می‌باشد. همچنین، علی‌رغم این‌که درصد سلول‌های زنده مانده در نمونه‌ی CN3 نسبت به فولاد ۳۱۶L افزایش یافته است (یا به عبارت دیگر زیست‌سازگاری بهبود یافته است)، اما چون درصد سلول‌های زنده مانده در این نمونه نیز زیر ۷۰ درصد می‌باشد، می‌توان گفت که نمونه‌ی CN3 نیز مانند نمونه‌ی فولادی ۳۱۶L زیست‌سازگار نمی‌باشد. به طور کلی در زیست‌سازگاری یک آلیاژ، عوامل متعددی مثل، مقاومت به خوردگی در محیط بدن و سرعت رهایش عناصر موجود در آن و همچنین عدم سمی بودن عناصر تشکیل‌دهنده‌ی آلیاژ تأثیرگذار است [۲۱]. این قضیه که پوشش DLC، از نظر زیستی خنثی بوده و دارای سمی بودن سلولی نمی‌باشد یا به عبارت دیگر زیست‌سازگار می‌باشد، در پژوهش‌های دیگران نیز به اثبات رسیده است [۲۲]. بنابراین، در مورد افزایش زیست‌سازگاری فولاد ۳۱۶L با پوشش DLC می‌توان گفت، از آنجایی‌که این پوشش از نظر زیستی دارای سمی بودن نمی‌باشد و از پایداری شیمیایی بالایی برخوردار می‌باشد، به عنوان یک مانع از رهایش یون‌های فلزی آلیاژ به خصوص نیکل که عنصری سمی می‌باشد [۲۳] جلوگیری کرده و موجب زنده ماندن سلول‌های استخوانی شده است. در مورد نمونه‌ی نیتروکربوره شده مشاهده می‌شود که زیست‌سازگاری نسبت به نمونه‌ی فولاد ۳۱۶L افزایش پیدا کرده است. پیدایش این قضیه، دلایل مختلفی می‌تواند داشته باشد. در فرآیند نیتروکربوراسیون، عناصر کربن و نیتروژن وارد ساختار سطحی فولاد ۳۱۶L شده است. از آنجاکه این عناصر، زیست‌سازگار می‌باشند [۲۲]، افزایش زیست‌سازگاری نمونه‌ی نیتروکربوره شده نسبت به فولاد ۳۱۶L دور از انتظار نمی‌باشد. البته ایجاد تنش فشاری در سطح ناشی از فرآیند نیتروکربوراسیون نیز می‌تواند دلیل دیگری برای جلوگیری از رهایش عناصر سمی به خصوص نیکل به محیط سلولی باشد و در نهایت، طبق جدول ۴ می‌توان گفت که فرآیند نیتروکربوراسیون، موجب کاهش درصد سطحی عناصر سمی

نمونه‌ی فولادی نیتروکربوره شده، و نمونه‌ی فولادی پوشش داده شده با DLC پس از ۲۴ ساعت و ۷۲ ساعت در محیط سلولی را نشان می‌دهد. نمونه‌ی شاهد به عنوان یک نمونه‌ی کامل زیست‌سازگار در نظر گرفته شد که نتایج مربوط به تکثیر و یا مرگ و میر سلولی در سایر نمونه‌ها با نمونه‌ی شاهد مقایسه شد. با توجه به این تصاویر، مشاهده می‌گردد که در نمونه‌ی شاهد پس از گذشت ۲۴ ساعت و ۷۲ ساعت سلول‌ها به خوبی تکثیر یافته و رشد کرده‌اند. در این تصاویر، روند افزایشی تعداد سلول‌ها در مجاورت نمونه‌ها پس از نیتروکربوراسیون و پوشش‌دهی DLC، نسبت به نمونه‌ی فولادی ۳۱۶L مشهود است. به این صورت که در نمونه‌ی فولادی ۳۱۶L مشاهده می‌گردد که پس از ۲۴ و ۷۲ ساعت ماندگاری، میزان سلول‌ها نسبت به نمونه‌ی شاهد به طور زیادی کاهش یافته‌اند که نشان‌دهنده‌ی سمی بودن بالاتر این فولاد نسبت به نمونه‌ی شاهد می‌باشد. در نمونه‌ی نیتروکربوره شده نیز مشاهده می‌گردد که درصد سلول‌های زنده مانده نسبت به فولاد ۳۱۶L افزایش یافته است. همچنین در نمونه‌ی پوشش داده شده با پوشش DLC نیز افزایش میزان سلول‌های زنده مانده نسبت به نمونه‌ی نیتروکربوره شده مشاهده می‌گردد به طوری که در این نمونه نسبت به فولاد بدون پوشش و فولاد نیتروکربوره شده پس از گذشت ۷۲ ساعت سلول‌ها به میزان بیشتری تکثیر یافته و رشد کرده‌اند. شکل ۷ نمودار درصد زنده ماندن این سلول‌ها را نسبت به نمونه‌ی شاهد پس از زمان‌های ذکر شده نشان می‌دهد. همان‌طور که مشاهده می‌شود، نتایج حاصل از این نمودار، با نتایج مربوط به تصاویر میکروسکوپی سلول‌ها مطابقت داشته و روند افزایش زیست‌سازگاری فولاد ۳۱۶L پس از نیتروکربوراسیون و همچنین پوشش‌دهی DLC مشاهده می‌گردد. با مقایسه‌ی درصد سلول‌های زنده‌ی نمونه‌ها در زمان‌های مختلف، مشاهده می‌گردد که زیست‌پذیری نمونه‌های فولادی ۳۱۶L بین ۲۸ تا ۲۹ درصد، نمونه‌های فولادی ۳۱۶L نیتروکربوره شده بین ۴۰ تا ۴۲ درصد و نمونه‌های پوشش داده شده با DLC بین ۷۰ تا ۷۱ درصد می‌باشد. مقادیر p-value برای کلیه‌ی نمونه‌ها محاسبه شد. نتایج نشان داد که کلیه تفاوت‌ها در نمونه معنادار می‌باشد و از خطای بسیار پایینی برخوردار می‌باشد و تفاوت‌ها تا حد ۰/۰۱ معنادار است. بر اساس استاندارد ISO-۱۰۹۹۳ قسمت ۵ [۲۰]،

قابل قبولی بهبود بخشید و در صورت انجام پژوهش‌های گسترده و مطالعات عمیق‌تر بر روی خواص زیستی و همچنین خواص مکانیکی این پوشش، نظیر چسبندگی، سختی و مقاومت به سایش آن می‌توان از فولاد ۳۱۶L با پوشش DLC به عنوان جایگزین مناسبی برای فولاد پزشکی LVM ۳۱۶ استفاده نمود و هزینه‌های تولید را تا ۹۰٪ کاهش داد.

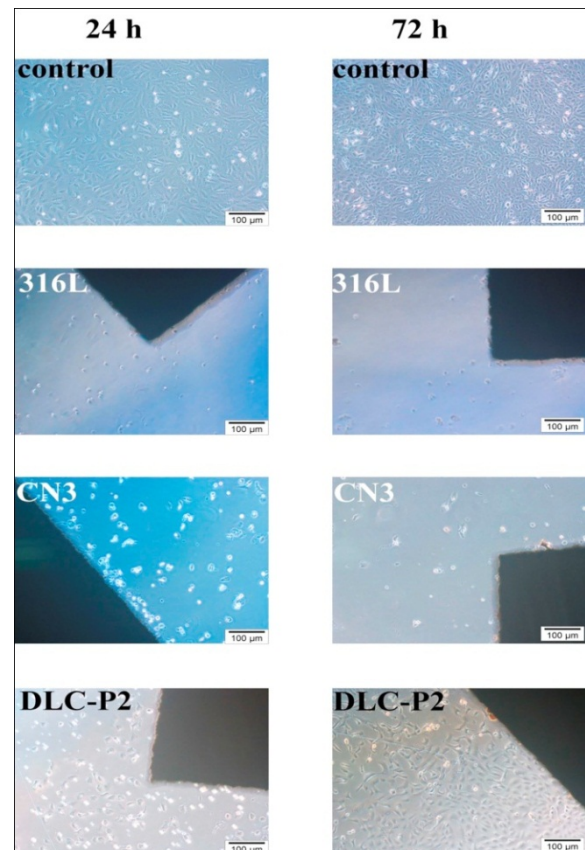
۴- نتیجه‌گیری

فولاد ۳۱۶L صنعتی دارای زیست‌سازگاری مناسبی برای استفاده در کاشتنی‌های پزشکی نبوده و دارای سمی بودن سلولی می‌باشد. در تحقیق حاضر با استفاده از پوشش‌دهی DLC بر روی این فولاد زیست‌سازگاری آن به دلیل زیست‌سازگار بودن این پوشش و جلوگیری از رهائش عناصر سمی از آلیاژ به محیط سلولی افزایش یافت. نتایج حاصل از آزمون سمی بودن سلولی نشان داد که پوشش‌دهی DLC بر روی این فولاد می‌تواند این ماده را از یک ماده سمی به یک ماده زیست‌سازگار تبدیل کند و در صورت بررسی و مطالعات عمیق‌تر در این حوزه می‌توان از فولاد ۳۱۶L پوشش داده شده با پوشش DLC به عنوان جایگزینی برای فولادهای پزشکی ۳۱۶LVM استفاده نمود و هزینه‌های ناشی از تولید فولادهای پزشکی را تا حد زیادی کاهش داد.

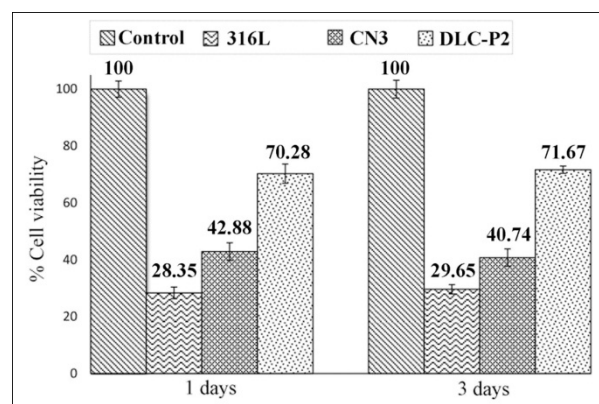
مراجع

1. Walczak, J., Shahgaldi, F. and Heatley, F., In vivo corrosion of 316L stainless-steel hip implants: Morphology and elemental compositions of corrosion products, *Biomaterials*, 19 (1998) 229–237.
2. Sun, Y. and Haruman, E., Effect of carbon addition on low-temperature plasma nitriding characteristics of austenitic stainless steel, *Vacuum*, 81 (2006) 114–119.
3. Fossati, A., Borgioli, F., Galvanetto, E. and Bacci, T., Glow-discharge nitriding of AISI 316L austenitic stainless steel: Influence of treatment time, *Surface and Coatings Technology*, 200 (2006) 3511–3517.
4. Hauert, R., A review of modified DLC coatings for biological applications, *Diamond and Related Materials*, 12 (2003) 583–589.
5. Hauert, R., Thorwarth, G., Müller, U., Stiefel, M., Falub, C.V., Thorwarth, K. and Joyce, T.J., Analysis of the in-vivo failure of the adhesive interlayer for a DLC coated articulating metatarsophalangeal joint, *Diamond and Related Materials*, 25 (2012) 34–39.
6. Wang, L., Su, J.F. and Nie, X., Corrosion and tribological properties and impact fatigue behaviors of TiN- and DLC-coated stainless steels in a simulated

فولاد ۳۱۶L مانند نیکل در نمونه‌ی CN3 شده است که در کاهش روند رهائش این عنصر در محیط سلولی بی‌تأثیر نیست. لازم به ذکر است، از آنجا که فولاد مورد مطالعه در این پژوهش، فولاد ۳۱۶L صنعتی بوده و شرایط تولید آن با فولاد پزشکی LVM ۳۱۶ متفاوت است، از زیست‌سازگاری پایینی برخوردار بوده است.



شکل ۶. تصاویر میکروسکوپی نوری از پراکنندگی و شکل سلول‌ها در مجاورت با نمونه‌های شاهد، فولاد ۳۱۶L، نمونه‌ی CN3 و DLC-P2.



شکل ۷. درصد زنده ماندن سلول‌های استخوانی برحسب زمان در مجاورت با نمونه‌های شاهد، فولاد ۳۱۶L، نمونه‌ی CN3 و DLC-P2.

اما در این پژوهش نشان داده شد، با پوشش DLC بر روی فولاد ۳۱۶L صنعتی، می‌توان زیست‌سازگاری را تا حد

shape memory alloy, *Surface and Interface Analysis*, 42 (2010) 502–509.

- body fluid environment, *Surface and Coatings Technology*, 205 (2010) 1599–1605.
7. Bociaga, D., Komorowski, P., Batory, D., Szymanski, W., Olejnik, A., Jastrzebski, K. and Jakubowski, W., Silver-doped nanocomposite carbon coatings (Ag-DLC) for biomedical applications - Physiochemical and biological evaluation, *Applied Surface Science*, 355 (2015) 388–397.
 8. Kim, H.-G., Ahn, S.-H., Kim, J.-G., Park, S.J., Lee, K.-R., Electrochemical behavior of diamond-like carbon films for biomedical applications, *Thin Solid Films*, 475 (2005) 291–297.
 9. Singha, A., Ghosh, A., Roy, A. and Ray, N.R., Quantitative Analysis Of Hydrogenated Diamondlike Carbon Films By Visible Raman Spectroscopy, *journals Applied Physics*, 100 (2006) 044910.
 10. Donnet, C. and Erdemir, A., Tribology Of Diamond-Like Carbon Films, *journals Applied Physics*, 39 (2006) 311–327.
 11. Campos, M., De Souza, S.D., Martinez, L.G., Dionysio, M.O., Study of Expanded Austenite Formed in Plasma Nitrided AISI 316L Samples, *Material and Methods*, 17 (2014) 1302–1308.
 12. Mingolo, N., Tschiptschin, A.P., Pinedo, C.E., On the formation of expanded austenite during plasma nitriding of an AISI 316L austenitic stainless steel, *Surface and Coatings Technology*, 201 (2006) 4215–4218.
 13. Wang, L., Ji, S., Sun, J., Effect of nitriding time on the nitrided layer of AISI 304 austenitic stainless steel, *Surface and Coatings Technology*, 200 (2006) 5067–5070.
 14. Totten, G.E., Steel heat treatment: metallurgy and technologies, CRC press, (2006).
 15. Marušić, K., Otmačić, H., Landek, D., Cajner, F., Stupnišek-Lisac, E., Modification of carbon steel surface by the Tenifer® process of nitrocarburizing and post-oxidation, *Surface and Coatings Technology*, 201 (2006) 3415–3421.
 16. Ferrari, A. and Robertson, J., Interpretation Of Raman Spectra Of Disordered And Amorphous Carbon, *Physical Review B*, 61 (2000) 14095–14107.
 17. Ferrari, A.C. and Robertson, J., Raman Spectroscopy Of Amorphous, Nanostructured, Diamond-Like Carbon, And Nanodiamond, *Philosophical transactions. Series A, Mathematical, physical, and engineering sciences*, 362 (2004) 2477–2512.
 18. Ferrari, A. and Robertson, J., Resonant Raman Spectroscopy Of Disordered, Amorphous, And Diamondlike Carbon, *Physical Review B*, 64 (2001) 440.
 19. Robertson, J., Diamond-Like Amorphous Carbon, *Materials Science and Engineering: R: Reports*, 374 (2002) 129–281.
 20. Biological evaluation of medical devices, Part 5: Tests for in vitro cytotoxicity, *International Organization for Standardization: ISO*, 3 (2009) 42.
 21. Salahinejad, E., Hadianfard, M.J., Macdonald, D.D., Sharifi, S., Mozafari, M., Walker, K.J., Tahmasbi Rad, A., Madihally, S.V., Vashae, D. and Tayebi, L., Surface modification of stainless steel orthopedic implants by sol-gel ZrTiO₄ and ZrTiO₄-PMMA coatings, *Journal of Biomedical Nanotechnology*, 9 (2013) 1327–1335.
 22. Cui, F.Z., Li, D.J., A review of investigations on biocompatibility of diamond-like carbon and carbon nitride films, *Surface and Coatings Technology*, 131 (2000) 481–487.
 23. Branzoi, I.V., Iordoc, M., Branzoi, F., Vasilescu-Mirea, R., Sbarcea, G., Influence of diamond-like carbon coating on the corrosion resistance of the NITINOL