



The Role of Various Ratios of Liquid Phase Constituents on the Setting Time and Strength of Polymethyl Methacrylate Bone Cement

Nader Nezafati^{1*}, Saeed Hesaraki², Shokoufeh Borhan³

¹ Associate professor, Department of Nanotechnology and Advanced Materials, Materials and Energy Research Center, Karaj, Iran.

² Professor, Department of Nanotechnology and Advanced Materials, Materials and Energy Research Center, Karaj, Iran.

³ Assistant professor, Department of Chemical and Materials Engineering, Technical University of Buain Zahra, Qazvin, Iran.

*Corresponding Author's Email: n.nezafati@merc.ac.ir (Nader Nezafati)

Paper History:

Received: 2024-11-18

Revised: 2024-12-24

Accepted: 2025-03-03

Keywords:

Polymethyl Methacrylate Bone Cement,
Liquid Phase,
Mechanical Properties,
Thermometry,
Cytotoxicity

Abstract: In this study, the effect of the ratio of different components of the liquid phase on the properties of polymethyl methacrylate bone cement was investigated. Polymethyl methacrylate microspheres were synthesized through the emulsion method. Scanning electron microscope observations showed that microspheres with a size of 20 microns were obtained. The optimized bone cement, in terms of mechanical strength and setting time, was achieved by changing the molar ratio of methyl methacrylate (as monomer), benzoyl peroxide (as an initiator), and methyl toluene (as an activator). The presence of benzoyl peroxide, methyl toluidine, and hydroquinone (as the inhibitory agent) was confirmed by Fourier transform spectroscopy analysis. The setting time varied from 10 minutes to 24 hours, and the compressive strength and elastic modulus ranged from 7 to 60 MPa and 0.15 to 0.88 GPa, respectively. The results from thermometry analysis showed that the heat of reaction of the cements increased upon increasing the molar ratio of benzoyl peroxide to methyl toluene. The phase analysis of the optimized bone cement confirmed the presence of both amorphous and crystalline phases related to methyl methacrylate. Cell studies showed that the cement was non-toxic and exhibited adequate fibroblast cell adhesion. According to the results, the cement may be appropriate for the treatment of spinal damages, such as vetebroplasty and kyphoplasty.



<https://doi.org/10.30501/jamt.2025.499806.1316>

URL: https://www.jamt.ir/article_216549.html

1. INTRODUCTION

Nowadays, the use of different types of ceramic and polymer bone cements to repair bone injuries is expanding. Among these, methyl methacrylate-based cements have many applications in repairing bone damages in different areas of the body (Corbett et al., 2010).

In this research, the effect of the ratio of different liquid phase components on the properties of polymethyl methacrylate bone cement was investigated.

2. MATERIALS AND METHODS

After synthesizing the powder phase containing polymethyl methacrylate microsphere by emulsion method, the desired cement was produced through changing the molar ratio of benzoyl peroxide, as an initiator, and methyl toluidine, as an activator, in the liquid phase.

3. RESULTS AND DISCUSSION

Scanning Electron Microscope (SEM) observations revealed the formation of microspheres with a size range of 20 microns (Figure 1).

Thermometry values indicated that the heat of reaction of the cements increased upon increasing the molar ratio of the cements increased upon increasing the molar ratio of benzoyl peroxide to methyl toluene. The compressive strength and elastic modulus ranged from 7 to 60 MPa and 0.15 to 0.88 GPa, respectively, as the molar ratios were varied (Figure 2).

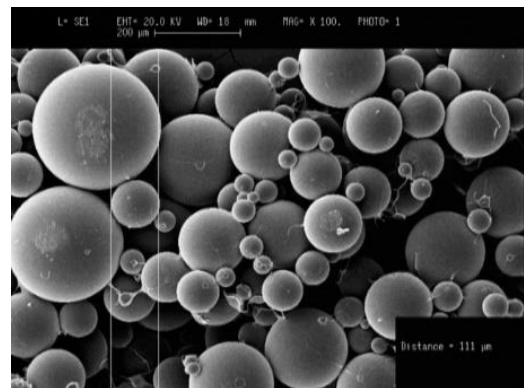


Figure 1. SEM observation of PMMA microspheres

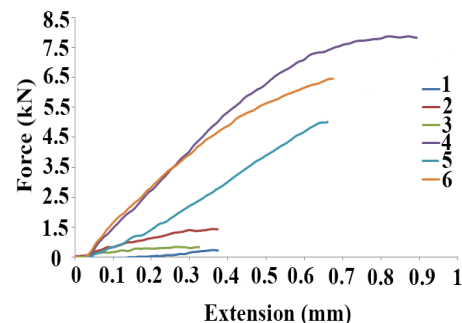


Figure 2. Force-Strain curves of different types of PMMA cements

Please cite this article as: Nezafati, N., Hesaraki, S. & Borhan, Sh. (2024). The Role of Various Ratios of Liquid Phase Constituents on the Setting Time And Strength of Polymethyl Methacrylate Bone Cement. *Journal of Advanced Materials and Technologies*, Vol. 13, No. 4, 1-14. [In Persian]. <https://doi.org/10.30501/jamt.2025.499806.1316>.



The presence of benzoyl peroxide, methyl toluidine, and hydroquinone, as the inhibitors in the liquid phase, was confirmed by Fourier Transform Spectroscopic Infrared (FTIR) analysis (Figure 3).

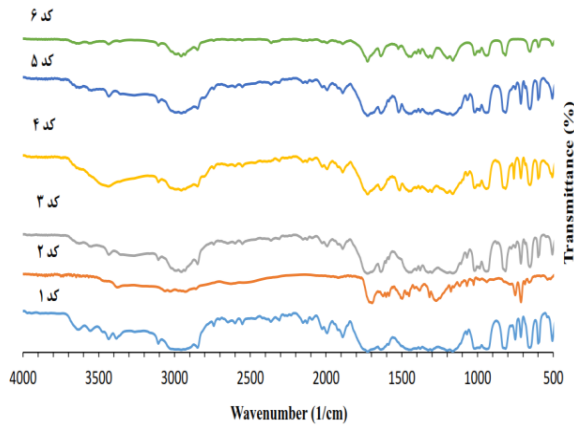


Figure 3. FTIR diagrams of different liquid phases

Phase analysis confirmed the presence of amorphous and crystalline phases related to methyl methacrylate in cement as well (Figure 4).

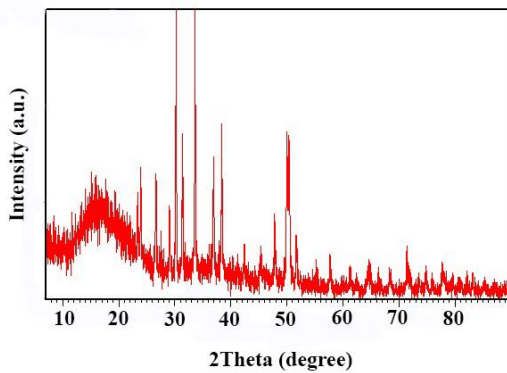


Figure 4. XRD pattern of optimum PMMA cement

Changing the ratio of methyl methacrylate monomer to powder resulted in a different setting time ranging from about 10 minutes to a day. The initial evaluation of fibroblast cell behavior for bone cement with the highest mechanical properties confirmed the basic conditions of biocompatibility (Figure 5).

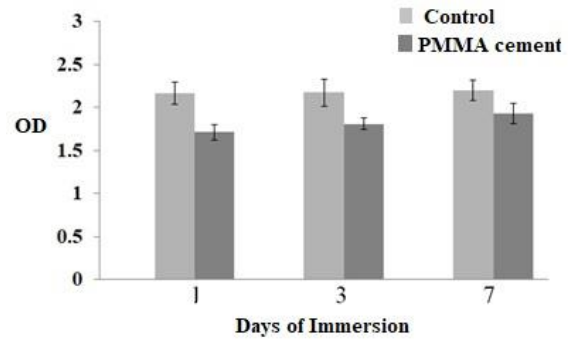
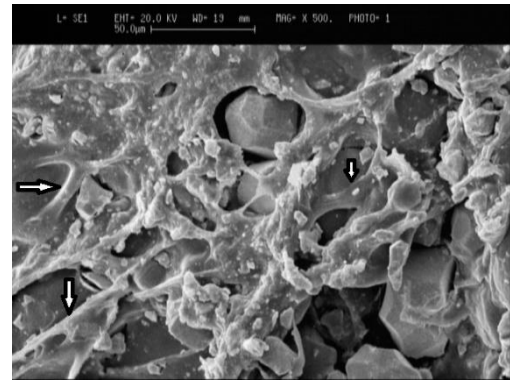


Figure 5. Fibroblast attachment and MMT assay of PMMA cement

4. CONCLUSION

According to the obtained results, this type of cement has the necessary potential to treat spinal repair.

5. ACKNOWLEDGEMENT

The authors would like to acknowledge the Materials and Energy Research Center (MERC) (Grant No.: 791400013) for providing its experimental laboratories for this research work.

REFERENCES

1. Corbett, K. L., Losina, E., Nti, A. A., Prokopetz, J. J. Z., & Katz, J. N. (2010). Population-based rates of revision of primary total hip arthroplasty: a systematic review. *PLoS One*, 5, e13520. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0013520>



مقاله‌ی کامل پژوهشی

بررسی اثر نسبت اجزای فاز مایع بر زمان گیرش و استحکام سیمان استخوانی پلی متیل متاکریلات

نادر نضافتی^{۱*}، سعید حصارکی^۲، شکوفه برهان^۳

^۱دانشیار، پژوهشکده‌ی فناوری نانو و مواد پیشرفته، پژوهشگاه مواد و انرژی، کرج، ایران

^۲استاد، پژوهشکده‌ی فناوری نانو و مواد پیشرفته، پژوهشگاه مواد و انرژی، کرج، ایران

^۳استادیار، گروه مهندسی مواد، شیمی و پلیمر، مرکز آموزش عالی فنی و مهندسی بوئین‌زهر، قزوین، ایران

تاریخچه‌ی مقاله:

ثبت اولیه: ۱۴۰۳/۱۱/۰۲

بازنگری: ۱۴۰۳/۱۱/۲۱

پذیرش قطعی: ۱۴۰۳/۱۲/۱۳

کلیدواژه‌ها:

سیمان استخوانی پلی متیل متاکریلات،

فاز مایع،

خواص مکانیکی،

گرمای واکنش،

سمیت سلولی

چکیده در این تحقیق، تأثیر نسبت اجزای مختلف فاز مایع بر خواص سیمان استخوانی پلی متیل متاکریلات بررسی شد. میکروسفرهای پلی متیل متاکریلات به روش امولسیون سنتز شدند. مشاهدات میکروسکوپ الکترونی روشی نشان داد که میکروسفرهایی با اندازه‌ی ۲۰ میکرومتر به دست آمده است. سیمان استخوان بهینه‌شده از نظر استحکام مکانیکی و زمان گیرش، با تغییر نسبت مولی متیل متاکریلات (به‌عنوان مونومر)، بنزوئیل پراکسید (به‌عنوان آغازگر) و متیل تولوئیدین (به‌عنوان فعال‌کننده) به دست آمد. حضور بنزوئیل پراکسید، متیل تولوئیدین و هیدروکینون (به‌عنوان عامل بازدارنده‌ی واکنش) با طیف‌سنجی تبدیل فوریه تأیید شد. زمان گیرش از ۱۰ دقیقه تا ۲۴ ساعت و مقاومت فشاری و مدول الاستیک به ترتیب از ۷ تا ۶۰ مگاپاسکال و ۰/۱۵ تا ۰/۸۸ گیگاپاسکال بود. نتایج آنالیز دماسنجی نشان داد که گرمای واکنش سیمان‌ها با افزایش نسبت مولی بنزوئیل پراکسید به متیل تولوئیدین افزایش می‌یابد. آنالیز فازی سیمان استخوانی بهینه‌شده وجود هر دو فاز آمورف و بلوری مربوط به متیل متاکریلات را تأیید کرد. مطالعات سلولی نشان داد که سیمان غیرسمی است و سلول‌های فیبروبلاست چسبندگی مناسبی روی سطح نشان دادند. با توجه به نتایج، این سیمان می‌تواند برای درمان آسیب‌های ستون فقرات مانند ورتیروپلاستی و کایفوپلاستی مناسب باشد.



<https://doi.org/10.30501/jamt.2025.499806.1316>

URL: https://www.jamt.ir/article_216549.html

۱- مقدمه

امروزه استفاده از انواع مختلف سیمان‌های استخوانی پایه‌ی سرمایی و پلیمری برای ترمیم ضایعات استخوانی در حال گسترش است. از این میان، سیمان‌های پایه‌ی متیل متاکریلات کاربردهای زیادی در ترمیم ضایعات استخوانی در نواحی مختلف بدن را دارند (Corbett et al., 2010). پلی‌متیل متاکریلات نوعی پلیمر اکریلاتی است که شامل دو بخش مونومر مایع متیل متاکریلات و پودر پایه‌ی اکریلاتی است. هنگامی که دو بخش با یکدیگر مخلوط می‌شوند، مونومر مایع اطراف ذرات پودری پیش‌پلیمریزه‌شده پلیمریزه می‌شود تا در نهایت سیمان پلی‌متیل متاکریلات گیرش یافته حاصل شود (Saleh et al., 2016). در طی فرایند، به دلیل واکنش گرمای، حرارت ایجاد می‌شود. در این بین، مطالعات مختلفی در خصوص افزودن انواع مواد سرمایی به فاز پودری برای تغییر خواص فیزیکی، مکانیکی و زیستی انجام شده است (Paz et al., 2019; Cui et al., 2017; Li et al., 2015; Wang et al., 2021; Zaki et al., 2018; Soleymani et al., 2020; Prokopovich et al., 2015).

پلی‌متیل متاکریلات در حضور افزودنی‌های مختلف یک مخلوط با مجموعه‌ای از ویژگی‌های فیزیکی و شیمیایی ارائه می‌دهد. قرارگیری در معرض نور یا دمای بالا می‌تواند به فاز مایع اضافه می‌شود تا پلیمر و مونومر را ترغیب کنند تا در دمای

امروزه استفاده از انواع مختلف سیمان‌های استخوانی پایه‌ی سرمایی و پلیمری برای ترمیم ضایعات استخوانی در حال گسترش است. از این میان، سیمان‌های پایه‌ی متیل متاکریلات کاربردهای زیادی در ترمیم ضایعات استخوانی در نواحی مختلف بدن را دارند (Corbett et al., 2010). پلی‌متیل متاکریلات نوعی پلیمر اکریلاتی است که شامل دو بخش مونومر مایع متیل متاکریلات و پودر پایه‌ی اکریلاتی است. هنگامی که دو بخش با یکدیگر مخلوط می‌شوند، مونومر مایع اطراف ذرات پودری پیش‌پلیمریزه‌شده پلیمریزه می‌شود تا در نهایت سیمان پلی‌متیل متاکریلات گیرش یافته حاصل شود

عهده‌دار مکاتبات: نادر نضافتی

نشانی: ایران، کرج، پژوهشگاه مواد و انرژی، پژوهشکده‌ی فناوری نانو و مواد پیشرفته، گروه بیومواد

پیام‌نگار: n.nezafati@merc.ac.ir

(CAS 8.43869; Sigma code: 89-5; 5) سدیم دودسیل سولفات (CAS 436143; Sigma code: 151-21-3; 3) No.: ۸۰ توئین (CAS 8.22187; Sigma code: 9005-65-6; 6) No.: سولفات باریم (CAS No.: 7727-43-7; Sigma code: 202762)

۲-۲- سنتز میکروکرات پلی متیل متاکریلات

تهیه‌ی میکروکرات پلی متیل متاکریلات به روش تبخیر حلال امولسیون روغن/ آب انجام شد. ابتدا پلی متیل متاکریلات در دی کلرومتان (DCM) در دمای اتاق حل شد و در یخچال ۴ درجه‌ی سلسیوس نگهداری شد. محلول آبی پلی وینیل الکل با جرم مولکولی ۷۲۰۰۰ تهیه شد و ماده‌ی پراکنده‌ساز مناسب (SDS یا Tween 80) به مقدار یک درصد وزنی پلی متیل متاکریلات به محلول اضافه شد تا مانع چسبیدن میکروکرات به یکدیگر شود. برای تهیه‌ی امولسیون روغن/ آب فاز آلی یعنی محلول PMMA قطره‌قطره (با سرعت ۱۰ میلی متر بر دقیقه) توسط بورت به محلول آبی PVA تحت هم زدن با سرعت ۱۰۰۰ دور بر دقیقه توسط همزن مکانیکی اضافه شد تا به حالت تعلیق درآید. نسبت حجمی فاز پلیمری به فاز آبی به‌طور ثابت ۰/۴ در نظر گرفته شد. هم زدن امولسیون تا تبخیر کامل فاز آلی دی کلرومتان و سخت شدن میکروکرات به مدت ۲ ساعت در دمای اتاق ادامه پیدا کرد. میکروکرات سخت شده توسط کاغذ صافی ۲ میکرومتری با پمپ خلأ جمع‌آوری شدند و با آب دیونیزه شست‌وشو داده شدند تا دی کلرومتان اضافی از سطح میکروکرات پاک شود. به‌منظور خارج کردن هرگونه ماده‌ی آلی باقی‌مانده میکروکرات به مدت ۷۲ ساعت در فریزدرایر ۶۰ درجه‌ی سلسیوس خشک شدند و نهایتاً در ۴ درجه‌ی سلسیوس نگهداری شدند.

۲-۳- سنتز فاز مایع سیمان

در این روش از بالن ته‌گرد سه‌دهانه استفاده شد که گاز نیتروژن به‌عنوان عامل بازدارنده‌ی واکنش از یک مسیر وارد بالن شد و یک دهانه مبرد قرار گرفت. در یک مسیر دیگر مواد اولیه وارد راکتور شد. در این طرح از ۶ ترکیب مختلف استفاده شد. بر اساس تغییر متغیرهایی از جمله نسبت مونومر به فعال‌ساز واکنش، حضور یا عدم‌حضور عامل بازدارنده‌ی این ترکیب‌ها طراحی شدند. درصد ترکیب اجزای سازنده شامل فاز مایع و فاز پودری در جدول ۱ ارائه شده است.

اتاق پلیمریزه شوند (Lieberman et al., 2005).

به‌منظور رادیوپایک کردن سیمان، از عامل کنتراست، که معمولاً زیرکونیا یا باریم سولفات است، استفاده می‌شود. زیرکونیا حلالیت کمتری از باریم سولفات دارد و اثرگذاری مثبت آن بر خواص مکانیکی سیمان کمتر است. سیستیک گیرش این نوع سیمان استخوانی به عوامل متعددی از جمله نسبت پودر به مایع، اندازه‌ی ذرات پودر، میزان آغازگر و همچنین نسبت آغازگر به عامل فعال‌کننده‌ی فرایند در فاز مایع بستگی دارد (He et al., 2005; Lieberman et al., 2015).

با وجود تحقیقات مختلفی که در زمینه‌ی ساخت سیمان‌های متیل متاکریلاتی انجام شده است، آنچه در ساخت این نوع سیمان حائز اهمیت است تأثیرگذاری هم‌زمان فاز پودر و مایع است؛ بدین معنی که به‌منظور دستیابی به یک سیمان با زمان کارپذیری و درنهایت، ویسکوزیته و گیرش مناسب می‌بایست تأثیر پارامترهای مؤثر بر ساخت فازهای پودر و مایع را توأمان بررسی کرد. ممکن است که در سنتز هر فاز به خواص نسبتاً مطلوبی از جمله ریخت‌شناسی فاز پودر، جریان‌پذیری قابل قبول فاز مایع و جلوگیری از پلیمریزاسیون زودهنگام رسید، اما زمانی که این دو فاز با یکدیگر برهم‌کنش انجام می‌دهند، نتایج دلخواه حاصل نشود. بنابراین، هدف از انجام این پروژه بررسی تأثیرگذاری هم‌زمان فاز پودر و فاز مایع برای رسیدن به شرایط استاندارد موجود در سیمان‌های استخوانی است که مطابق با مطالعات انجام‌شده تا کنون پژوهشی در این رابطه انجام نشده است.

۲- مواد و روش تحقیق

۲-۱- مواد اولیه‌ی مورد استفاده برای سنتز فاز مایع سیمان

عبارت هستند از مونومر متیل متاکریلات (CAS No.: 80-62-) (6; Sigma code: M55909) بنزوئیل پروکساید (CAS No.: 94-) (36-0; Sigma code: 801641) دی‌متیل تولوئیدن (CAS No.: 99-97-8; Sigma code: 822040) و هیدروکینون (CAS No.: 123-31-9; Sigma code: 822333).

مواد اولیه‌ی مورد استفاده برای سنتز فاز جامد سیمان عبارت هستند از پلیت‌های پلی متیل متاکریلات (CAS No.: 9011-14-) (7; Sigma code: 433640) دی کلرومتان (CAS No.: 75-09-) (2; Sigma code: 270997) پلی وینیل الکل (CAS No.: 9002-)

جدول ۱. متغیرهای مورد بررسی در سنتز سیمان

کد نمونه	۱	۲	۳	۴	۵	۶
فاز پودر	پودر پلی‌متیل متاکریلات + باریم سولفات (۵ درصد وزنی) + هیدروکینون (۰/۲ درصد وزنی)					
فاز مایع	مونومر متیل متاکریلات (میلی‌لیتر)	۱۰۰	۱۰۰	۳۰	۳۰	۳۰
	بنزوئیل پروکساید (گرم)	۱	۲	۱	۰/۳	۱
	دی‌متیل تولوئیدن (میلی‌لیتر)	۲	۱/۵	۲	۰/۵	۲
	هیدروکینون (گرم)	--	۰/۰۱	--	--	۰/۲۵

۲-۴- تهیه سیمان پلی‌متیل متاکریلات

برای تهیه سیمان از فاز پودر و فاز مایع درون پتری دیش شیشه‌ای با هم مخلوط شدند. میزان ۰/۳ گرم از میکروکرات تهیه شده با ۰/۰۵ گرم باریم سولفات به منظور ایجاد خاصیت رادیوپاویته در سیمان‌ها مخلوط شد. سپس، با توجه به کارپذیری خمیرها، میزان حدود ۰/۲ تا ۰/۴ میلی‌لیتر از مایع با کدهای مختلف با پودر فوق مخلوط شد. در واقع، فرایند سیمانی شدن بدین‌نحو است که زمانی که دو جزء پودر و مایع با یکدیگر مخلوط می‌شوند، بنزوئیل پروکساید در کنار دی‌متیل تولوئیدن در فرایند واکنش احیا شرکت می‌کنند که به ایجاد رادیکال آزاد و شروع پلیمریزاسیون افزایشی مونومر متیل متاکریلات منجر می‌شود. میزان گیرش، کارپذیری به مفهوم چسبناک بودن خمیر و گرمایی واکنش بررسی شدند. بر اساس نتایج حاصل برای ادامه‌ی آزمون‌ها از مایع کد ۴ استفاده شد (شکل ۱).



شکل ۱. تصویری از سیمان‌های گیرش‌یافته سنتز شده

۲-۵- روش‌های شناسایی به‌کاررفته در این پژوهش

۲-۵-۱- پراش پرتو ایکس (XRD)

آنالیز فازی سیمان تهیه شده بررسی شد. بدین ترتیب که سیمان گیرش‌یافته خرد شد و توسط پراش‌سنجی پرتو ایکس (XRD, Philips PW3710) با تابش $\text{Cu-K}\alpha$ ، که با ولتاژ ۴۰ کیلوولت و جریان ۳۰ میلی‌آمپر کار می‌کرد، در محدوده‌ی $10^\circ \leq 2\theta \leq 80^\circ$ آنالیز شد.

۲-۵-۲- طیف‌سنجی مادون قرمز تبدیل فوریه (FTIR)

آنالیز طیف‌سنجی مادون قرمز بر روی فاز پودر، فاز مایع و سیمان‌های تهیه شده توسط طیف‌سنجی مادون قرمز (FTIR, BRUKER VECTOR 33) در حالت عبوری انجام شد. ۱۰ میلی‌گرم از پودر نمونه با ۸۰۰ میلی‌گرم پودر بورید پتاسیم مخلوط و به شکل قرص پرس شد. قرص‌ها در محدوده‌ی ۵۰۰-۴۰۰۰ (بر سانتی‌متر) با رزولوشن ۲ (بر سانتی‌متر) آنالیز شدند.

۲-۵-۳- زمان گیرش

اندازه‌گیری زمان گیرش اولیه سیمان‌ها با استفاده از سوزن گیل‌مور و بر اساس استاندارد ASTM C266-99A انجام شد. زمان گیرش اولیه مدت زمانی است که از شروع مخلوط کردن فاز جامد و مایع می‌گذرد تا زمانی که یک سوزن به وزن ۱۱۳/۵ گرم، که قطر نوک آن ۲ میلی‌متر است، نتواند هیچ اثری بر سطح سیمان ایجاد کند. برای این آزمایش ابتدا قالب فلزی با ابعاد $75 \times 10 \times 8$ میلی‌متر روی صفحه‌ی شیشه‌ای قرار داده شد و داخل آن از خمیر سیمان پر شد و به مدت ۳۰ ثانیه پس از شروع اختلاط سوزن با دقت و به آهستگی به‌طور عمودی روی سطح سیمان گذاشته شد. این کار هر ۳۰ ثانیه به‌طور متوالی، تا زمانی که فرورفتن سوزن در سیمان به‌کلی متوقف شود، انجام شد. در زمان‌های متوالی فرورفتن سوزن، اگر لازم باشد، باید سوزن تمیز شود.

۲-۵-۴- اندازه‌گیری گرمای واکنش

پس از مخلوط کردن فاز پودر و مایع و دستیابی به چسبندگی مناسب خمیر دمای واکنش با استفاده از دماسنج دیجیتالی اندازه‌گیری شد.

۲-۵-۵- استحکام فشاری

برای اندازه‌گیری استحکام فشاری سیمان‌ها طبق استاندارد ISO-5833 ابتدا خمیر سیمان داخل یک قالب استوانه‌ای شکل از جنس تفلون (به قطر ۶ و ارتفاع ۱۲ میلی‌متر) شکل‌دهی شد. نمونه‌های استوانه‌ای شکل پس از گیرش کامل از قالب خارج شدند و پس از ۲۴ ساعت استحکام فشاری نمونه‌ها با استفاده از دستگاه Zwick/Roell-HCR 25/400 با سرعت حرکت فک ۲۵ میلی‌متر بر دقیقه اندازه‌گیری شدند (Cyphert et al., 2018). سه نمونه از هر ترکیب سیمان آزمایش شد.

۲-۵-۶- ریخت‌شناسی سطح

ریخت‌شناسی سطح نمونه‌های سیمانی و اندازه‌ی میکروکرات سنتز شده توسط میکروسکوپ الکترونی روبشی (SEM, Stereoscan S 360 Cambridge)، که با ولتاژ شتاب‌دهنده‌ی ۱۵ کیلووات کار می‌کرد، بررسی شد. یک لایه‌ی نازک طلا بر سطح نمونه به روش کندوپاش پوشش داده شد.

۲-۵-۷- بررسی سمیت سلولی

به‌منظور بررسی اثر سمیت سلولی سیمان سنتز شده از تکنیک نورسنجی استفاده شد. این روش بر فعالیت آنزیم سوکسینات دهیدروژناز میتوکندریایی سلول‌های زنده مبتنی است که محلول زردرنگ MTT را به بلورهای بنفش‌رنگ فورمازان تبدیل می‌کند. بر این اساس می‌توان بلورهای غیرمحلول فورمازان را در حلال مناسبی مانند دی‌متیل سولفوکساید (DMSO) حل کرد و سپس توسط روش الایزا ریدر سنش و ارزیابی کرد. برای انجام تست MTT، از سلول فیبروبلاست HDF استفاده شد.

این سلول‌ها کشت داده شدند تا کف فلاسک را پر کنند. برای این منظور، فلاسک حاوی سلول‌ها داخل انکوباتور قرار می‌گیرد و رشد سلول‌ها و محیط آن‌ها (RPM-1640) به‌طور مرتب بررسی می‌شود. زمانی که سلول‌ها کف فلاسک را پر کردند (تراکم در حدود ۷۰-۸۰ درصد)، سلول‌ها به آرامی با نمک بافر فسفات‌ی شست‌وشو داده شدند. سپس، آنزیم تریسپین اضافه شد و فلاسک حدود ۳ دقیقه در انکوباتور قرار داده شد تا به

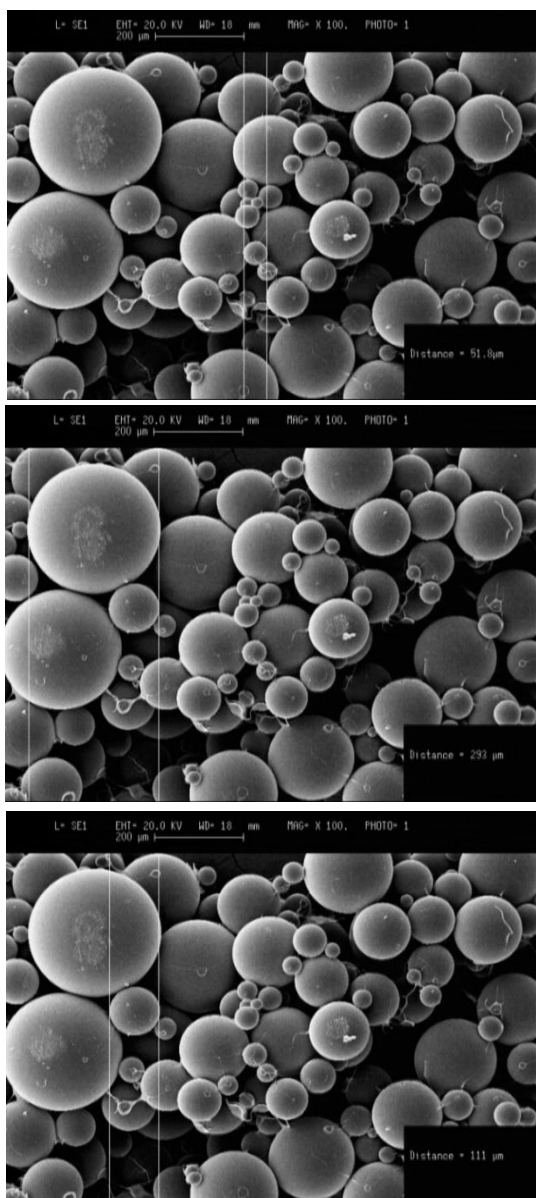
سلول‌ها برای جدا شدن از کف فلاسک فرصت داده شود. محلول حاوی سلول‌های جدا شده به درون یک فالکون ریخته و سانتریفیوژ شد تا سلول‌ها در کف فالکون تجمع یابند. پس از دور ریختن مایع رویی، سرم جنین گاوی به رسوب حاصل اضافه و به‌خوبی پیناژ شد.

سپس، حجم معینی از محیط، که به‌طور تقریبی حاوی ۱۲۰۰۰ سلول بود، در هر چاهک از پلیت ۹۶ خانه ریخته شد و برای هر نمونه ۳ بار تکرار انجام شد. سپس، پلیت‌ها به مدت ۲۴، ۷۲ و ۱۶۸ ساعت در انکوباتور قرار گرفتند. پس از این مدت، محیط رویی چاهک‌ها خارج شد و به هر یک از چاهک‌ها ۱۵۰ میکرولیتر از محلول رنگ MTT با غلظت ۰/۵ میکروگرم بر میلی‌لیتر اضافه شد. پلیت توسط فویل آلومینیمی پوشانده شد تا نور به چاهک‌ها نرسد و سپس به مدت ۴ ساعت در انکوباتور قرار گرفت. به عبارت دیگر، در طول این ۴ ساعت به سیستم سوکسینات دهیدروژناز، که یکی از آنزیم‌های چرخه‌ی تنفسی میتوکندری است، فرصت داده شد تا احیا شود.

در نتیجه، بلورهای آبی‌رنگ فورمازان تشکیل شدند که به راحتی به‌وسیله‌ی میکروسکوپ نوری قابل مشاهده بودند. بعد از این مدت، مایع رویی چاهک‌ها خارج شد و به هر کدام ۳۵۰ میکرولیتر DMSO اضافه و به‌خوبی پیناژ شد تا بلورهای آبی‌رنگ تترازولیوم به فورمازون بنفش‌رنگ محلول تبدیل شوند. در پایان نیز، محیط چاهک‌ها به چاهک‌های دیگری انتقال داده شد و، با کمک دستگاه الایزا ریدر، جذب آن‌ها در طول موج ۵۷۰ نانومتر خوانده شد و با گروه کنترل مقایسه شد.

۲-۵-۸- کشت سلول فیبروبلاست

در این تحقیق، از سلول‌های فیبروبلاست انسانی استفاده شد. سلول‌ها در محیط DMEM به همراه ۱۰ درصد سرم جنین گاوی، ۱۰۰ واحد پنی‌سیلین و ۱۰۰ واحد استرپتومایسین کشت شدند. انکوباسیون محیط کشت در دمای ۳۷ درجه‌ی سلسیوس و در اتمسفر مرطوب حاوی ۵ درصد دی‌اکسید کربن انجام شد. محیط کشت هر دو روز یک بار عوض شد. نمونه‌ی سیمانی به‌صورت قرصی شکل با قطر تقریبی ۶ میلی‌متر تهیه شد. استریل نمونه در اتانول ۷۰ درصد و سپس شست‌وشو با محلول سالین فسفات استریل به مدت ۳۰ دقیقه انجام شد تا اتانول باقی‌مانده خارج شود. سپس، نمونه در محیط کشت قرار گرفت. پس از نگهداشتن نمونه در محیط کشت به مدت ۳ روز، محیط کشت



شکل ۲. تصاویر میکروسکوپ الکترونی روبشی از میکرات کرات سنتز شده به روش امولسیون در یک بزرگ‌نمایی با تعیین اندازه‌ی مختلف ذرات

پیک در محدوده‌ی ۱۲۲۰ مربوط به کششی C-O و در عدد موج حدود ۱۰۰۰ احتمالاً مربوط به ارتعاشی کششی O-O است (Al-Janabi et al., 2021). گروه‌های NH (عدد موج ۳۴۰۰)، CH (عدد موج‌های محدوده‌ی ۳۰۱۵ تا ۳۱۰۰ و ۲۸۰۰ تا ۲۹۸۰)، آروماتیک C=C (عدد موج‌های محدوده‌ی ۱۵۲۰ تا ۱۶۲۰)، خمشی CH₃ (عدد موج ۱۴۵۰)، کششی CN (عدد موج ۱۲۶۰) مربوط به دی‌متیل تولوئیدن قابل رؤیت است. همچنین، پیک‌های مشخصه‌ی هیدروکینون در نمونه‌های کد ۲، ۵ و ۶ در عدد موج‌های حدود ۳۴۰۰، ۳۸۰۰، ۱۳۵۰، ۷۰۰ تا ۹۰۰ مشاهده می‌شود (Al-Janabi et al., 2021; Zheng et al., 2021).

خالی شد و نمونه با محلول سالین فسفات شست‌وشو داده شد. سپس، سلول‌ها توسط محلول گلوکارآلدهید ۳ درصد تثبیت شدند. پس از ۳۰ دقیقه، نمونه بار دیگر با محلول سالین شست‌وشو داده شد و در دمای ۴ درجه‌ی سلسیوس در این محلول نگه داشته شد. در نهایت، با استفاده از اسیمم تتروکساید تثبیت شد.

پس از انجام عملیات تثبیت سلول‌ها بر روی سطح، نمونه با محلول اتانول آب‌زدایی شد. پس از آن، در هوا خشک شد تا پوشش طلا بر روی آن اعمال شود و برای مشاهده توسط میکروسکوپ الکترونی روبشی مهیا شود.

۲-۵-۹- آنالیز آماری

در بررسی‌های انجام شده برای زمان گیرش، خواص مکانیکی و سمیت سلولی حداقل ۳ نمونه برای هر گروه در نظر گرفته شد و سپس، با استفاده از نرم‌افزار اکسل و روش آنوا، نمودارها رسم شدند، انحراف معیار محاسبه شد و نوار خط کشیده شد.

۳- نتایج و بحث

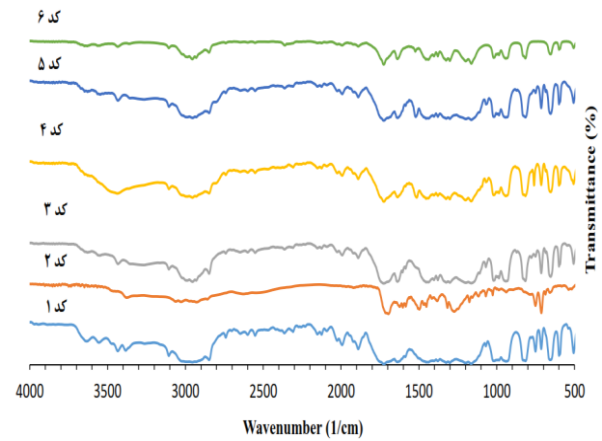
۳-۱- تصاویر میکروسکوپ الکترونی روبشی از میکروکرات سنتز شده

مطابق شکل ۲، با کنترل پارامترهای مؤثر بر سنتز میکروکرات به روش امولسیونی، میکروکراتی در محدوده‌ی اندازه‌ی ۵۰ تا ۲۰۰ میکرون به دست آمد. همان‌طور مشاهده می‌شود، ریخت‌شناسی ذرات کاملاً کروی بوده و سطح آن‌ها صاف و بدون تخلخل است.

۳-۲- FTIR مایع‌های سنتز شده

حضور اجزای سازنده‌ی مایع سیمان در تمامی کد نمونه‌ها قابل مشاهده است (شکل ۳). برای مثال، پیک مشخصه‌ی مونومر متیل متاکریلات در محدوده‌ی عدد موج ۱۳۲۰ (بر سانتی‌متر) مربوط به باند ارتعاشی-کششی C-O-C گروه استری آلیفاتیک است. همچنین، حضور C=O استر در عدد موج حدود ۱۷۳۰ قابل مشاهده است. در محدوده‌ی بین ۲۹۰۰ تا ۳۰۰۰ باند CH- و جذب وینیل (C=C) و =CH در حدود ۱۶۷۰ و ۳۱۰۰ دیده می‌شود. وجود بنزوئیل پراکساید در عدد موج‌های حدود ۱۷۵۰ و ۱۷۸۰ (بر سانتی‌متر) مربوط به باند کششی C=O، باند در ۱۶۰۰ (بر سانتی‌متر) ارتعاشی حلقه‌ی فنیل را گزارش می‌دهد.

خواص مکانیکی تأثیرگذار باشد عبارت هستند از میکروکرات پیش پلیمره شده پلی متیل متا کریلات، اتصال میکروکرات با زمینه پلیمری، ذرات رادیوپاپک و حفرات. همان‌طور که در خصوص سایر خواص سیمان از جمله زمان گیرش و گرمای واکنش صحبت شد، نسبت مولی بنزوئیل پراکساید به دی‌متیل تولوئیدن نقش مهمی در خواص مکانیکی بازی می‌کند، به طوری که با توجه به نمودار تنش-کرنش، تغییرات کرنش نیز تحت تأثیر قرار می‌گیرد (Hasenwinkel et al., 1999). در این تحقیق، با تغییر نسبت آغازگر به فعال‌کننده و همچنین نسبت فاز پودر به فاز مایع تغییر در خواص مکانیکی قابل مشاهده است، به طوری که بیشترین مقدار خواص مکانیکی مربوط به نمونه‌های با کدهای ۴ و ۶ است. با وجود مدول الاستیک کمتر نمونه‌ی ۴ نسبت به نمونه‌ی ۶، اما استحکام فشاری و همچنین میزان کرنش آن بیشتر است و، از آنجایی که در این نوع سیمان‌ها، قابلیت ارتجاعی بودن نیز اهمیت بسزایی دارد، بنابراین نمونه‌ی ۴ برای ادامه‌ی بررسی‌ها در نظر گرفته شد. در مجموع، مطابق با سایر پژوهش‌ها، با افزایش میزان پودر به مایع، مدول الاستیک و استحکام فشاری افزایش یافته است (Lewis et al., 2006). آنچه می‌بایست در فرایند سنتز مد نظر قرار گیرد وزن مولکولی سیمان سفت شده است، به گونه‌ای که پلیمریزاسیون زمینه‌ی پلیمری قادر به تولید زنجیره‌های پلیمری طولی‌تر از زنجیره‌های موجود در میکروکرات پلی متیل متا کریلاتی باشد. از طرف دیگر، هر چه تخلخل در محلول سیمانی واکنش‌کننده با فاز پودری کمتر باشد، بر روی خواص مکانیکی نهایی اثرگذار خواهد بود. نکته‌ی دیگر که مهم است، نقش مونومر باقی‌مانده تا حد قابل قبول، در کنترل کرنش‌پذیری سیمان است، به طوری که ثابت شده است درجه‌ی تبدیل مونومر به پلیمر به تغییر در تغییرات کرنش منجر می‌شود. وجود مونومر باقی‌مانده‌ی اضافی همانند پلاستیسایزر عمل می‌کند که می‌تواند سبب افزایش میزان کرنش در نمونه‌ها شود. در این تحقیق، با کنترل میزان آغازگر و رسیدن به درجه‌ی پلیمریزاسیون مناسب، در کد نمونه‌ی ۴، علاوه بر دارا بودن استحکام فشاری بالا و تا حدی کرنش‌پذیری بیشتر از سایر نمونه‌ها، میزان سمیت سلولی نیز، که در بخش‌های بعدی صحبت خواهد شد، منطقی بوده است. مطابق شکل ۴ و اطلاعات جدول ۲ خواص مکانیکی، بیشترین استحکام فشاری در عین حال کرنش بیشتر مربوط به نمونه‌ی کد ۴ است.



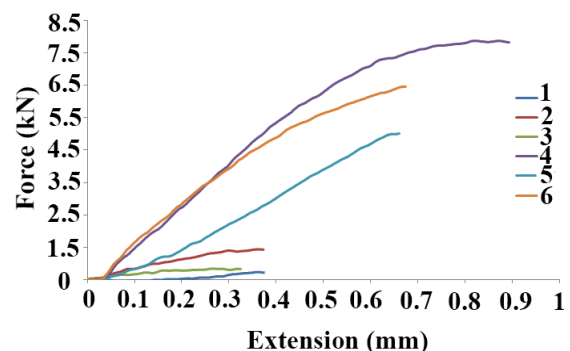
شکل ۳. آنالیز FTIR مایع‌های سنتز شده

۳-۳- دستیابی به سیمان بهینه از نظر مطلوب‌ترین خواص مکانیکی

در شکل ۴، نمودار نیرو در برابر کرنش سیمان تهیه شده رسم شده است. استحکام فشاری، مدول الاستیک و درصد کرنش سیمان‌ها در جدول ۲ گزارش شده است.

جدول ۲. نتایج خواص مکانیکی سیمان‌های سنتز شده با درصد ترکیب‌های مختلف فاز مایع

کد نمونه	استحکام فشاری (مگاپاسکال)	مدول یانگ (گیگاپاسکال)	کرنش (%)
۱	6 ± 0.6	0.15	3/87
۲	13 ± 0.4	0.40	3/25
۳	7 ± 0.6	0.19	3/51
۴	71 ± 0.8	0.79	8/89
۵	48 ± 0.3	0.42	6/42
۶	59 ± 0.4	0.88	6/71



شکل ۴. نمودار نیرو-جاب‌جایی سیمان‌های سنتز شده با درصد

ترکیب‌های مختلف فاز مایع

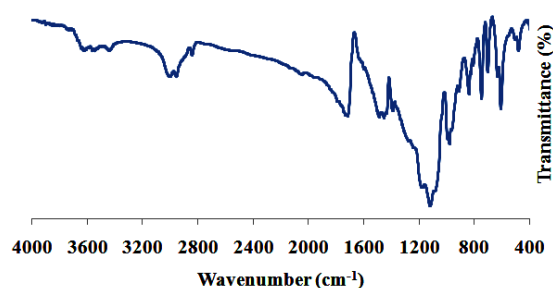
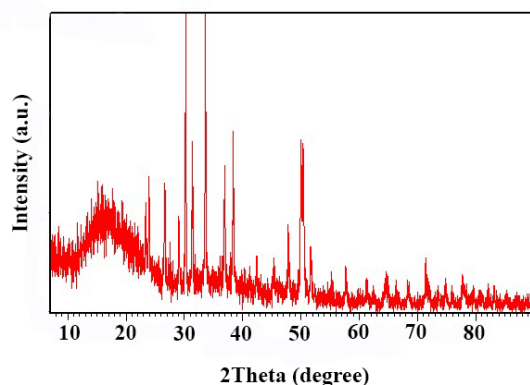
نقش عملکردی سیمان استخوانی به منظور برقراری تثبیت پایدار و بادوام کاشتنی با استخوان حائز اهمیت است. در سیمان‌های بر پایه‌ی پلی متیل متا کریلات، عواملی که می‌تواند بر

۴-۳- مشخصه‌یابی فیزیکی و شیمیایی سیمان بهینه

۳-۴-۱- آنالیز فازی

شکل ۵ وجود فازهای بلورین و آمورف مربوط به پلی‌متیل

متاکریلات را نشان می‌دهد.



شکل ۵. پراش پرتو ایکس و FTIR سیمان بهینه

حضور پیک‌های مشخصه‌ی بلورین در محدوده‌ی ۱۲، ۳۰

و ۳۲ مربوط به فواصل صفحات اتمی (d) به ترتیب ۷/۱ و ۲/۹۳

و ۲/۷۹ قابل مشاهده است. مطابق با منابع، شکل اولین پیک

جدول ۳. زمان گیرش، کارپذیری و گرم‌زایی سیمان‌های مختلف

کد نمونه‌ها	زمان مخلوط‌سازی (دقیقه)	زمان انتظار (دقیقه)	زمان کارپذیری (دقیقه)	زمان گیرش (دقیقه)	گرم‌زایی واکنش	توضیحات
کد ۱	۳	۷	۲۰	بیش از یک روز	بدون ایجاد گرما	امکان مخلوط کردن بدون ایجاد حالت چسبناکی
کد ۲	۴	۹	۲۵	بیش از ۱ روز	بدون ایجاد گرما	امکان مخلوط کردن بدون ایجاد حالت چسبناکی
کد ۳	۵	۱۰	۳۰	بیش از ۵ ساعت	گرمای ناچیز و غیرقابل گزارش	امکان مخلوط کردن بدون ایجاد حالت چسبناکی
کد ۴	۱	۳	۶	۱۲	در محدوده‌ی ۶۰-۶۲ درجه‌ی سلسیوس	امکان مخلوط کردن همراه با حالت چسبناکی در حدود ۳ دقیقه
کد ۵	۴	۸	۲۶	بیش از ۷ ساعت	در محدوده‌ی ۶۱-۶۲ درجه‌ی سلسیوس	امکان مخلوط کردن با چسبناکی ناچیز
کد ۶	۱	۴	۷	۱۵	در محدوده‌ی ۶۲-۶۴ درجه‌ی سلسیوس	امکان مخلوط کردن همراه با حالت چسبناکی در حدود ۴ دقیقه

انعکاس‌دهنده‌ی فشردگی منظم زنجیره‌های پلیمری است، درحالی‌که شکل پیک دوم بیانگر نظم داخل زنجیره‌های اصلی است (Ahmad et al., 2007).

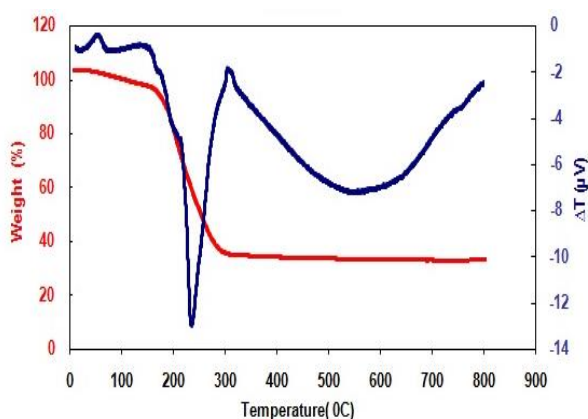
۳-۴-۲- طیف‌سنجی تبدیل فوریه فروسرخ سیمان

مطابق شکل، پیک‌های در محدوده‌ی عدد موج بین ۲۸۵۰ و ۲۹۵۰ (بر سانتی‌متر) مربوط به کششی متیلن و متیل، در عدد موج ۱۴۰۰ و ۱۴۵۰ (بر سانتی‌متر) برای گروه‌های متیل، بین ۱۳۰۰ و ۱۵۰۰ برای خمشی CH، در ۱۷۳۰ برای کششی C=O، در ۱۲۴۰ برای کششی C-C-O؛ در ۱۱۴۰ برای کششی O-C-C و در محدوده‌ی بین ۱۳۰۰ و ۹۰۰ برای کششی C-O است (Machado et al., 2016; Parra et al., 2005). از طرفی، پیک‌های موجود در مونومر متیل متاکریلات در محدوده‌های باند ۱۶۷۰ و ۳۱۰۰ (بر سانتی‌متر) در سیمان بسیار کم‌رنگ شده است که می‌تواند نشان از پلیمریزاسیون موفق باشد. در جدول ۳، ترکیبات مختلف بر اساس زمان گیرش و کارپذیری (چسبناک بودن خمیر) و همچنین گرم‌زایی واکنش مقایسه شدند. زمانی که پودر و مایع با یکدیگر مخلوط می‌شوند، دو فرایند اتفاق می‌افتد. پودر پلیمری با مایع مونومری مخلوط می‌شود و خمیری تشکیل می‌شود. این اتفاق با فرایند تورم و انحلال مونومر و پودر پلیمری معنی پیدا می‌کند. فرایند شیمیایی نیز آغاز می‌شود که مسئول گیرش و سفت شدن سیمان است.

آغازگر بنزوئیل پروکساید و فعال‌کننده‌ی دی‌متیل تولوئیدن با یکدیگر واکنش می‌دهند که به تولید رادیکال‌های آزاد به‌واسطه‌ی واکنش شروع پلیمریزاسیون منجر است. این رادیکال‌ها مسئول آغاز پلیمریزاسیون متیل متاکریلات هستند. این امر به رشد زنجیر پلیمری و تشکیل ماکرومولکول منجر می‌شود. به‌خاطر تشکیل تعداد زیادی از رادیکال‌های آزاد، بسیاری از زنجیره‌های پلیمری در حال رشد به‌سرعت شکل می‌گیرند که به تبدیل متیل متاکریلات به پلی‌متیل متاکریلات منجر می‌شود. زمانی که دو زنجیره‌ی پلیمری به یکدیگر برخورد می‌کنند، به‌صورت یکپارچه درمی‌آیند و به‌اصطلاح اختتام اتفاق می‌افتد و مولکول پلیمری غیرفعال پدید می‌آید (Niculescu et al., 2016). فرایند پلیمریزاسیون واکنشی گرمازا است که تحت تأثیر عواملی چون ترکیب شیمیایی سیمان، نسبت پودر به مایع و حضور ماده‌ی رادیوپاک است (Bellare et al., 2007).

۳-۵- آنالیز حرارتی

مطابق نمودار شماره ۶، دمای شروع تخریب حدود ۱۹۰ درجه‌ی سلسیوس است (با کاهش حدود ۱۰ درصد). مطابق شکل ۶، تا دمای حدود ۷۰ درجه‌ی سلسیوس، هیچ‌گونه کاهش وزن مشاهده نمی‌شود و، پس از آن، کاهش وزن اتفاق می‌افتد که می‌تواند به‌دلیل خروج آب فیزیکی متصل به پلیمر و دهیدراته شدن آن باشد. از طرفی، وجود پیک آگزوترمیک در دمای پایین (حدود ۷۰ درجه‌ی سلسیوس) می‌تواند مربوط به تبخیر مونومرهای واکنش‌نکرده در دماهای بالاتر از نقطه‌ی شیشه‌ای شدن مونومر متیل متاکریلات باشد (Elshereksi et al., 2014). از طرف دیگر، نمودار کاهش وزن تک‌مرحله‌ای حدود ۶۰ درصدی را نشان می‌دهد که در محدوده‌ی دمایی ۱۹۰ تا ۲۹۰ درجه‌ی سلسیوس رخ می‌دهد. این کاهش وزن در کنار حضور پیک‌های اندوترمیک می‌تواند به‌دلیل شکست رندوم زنجیره‌های پلیمری و احتراق و تجزیه‌ی مولکول‌های آلی باشد (Fazli et al., 2015; Akat et al., 2008). اصولاً فرایند اکسیداسیون در محدوده‌ی ۲۰۰ تا ۸۰۰ درجه‌ی سلسیوس برای ترکیبات آلی می‌تواند به سه مرحله‌ی قطعه‌قطعه شدن ترکیب، اکسیداسیون و سوختن باقی‌مانده‌ی کربونیزه تقسیم‌بندی شود (Rymuszka et al., 2017).



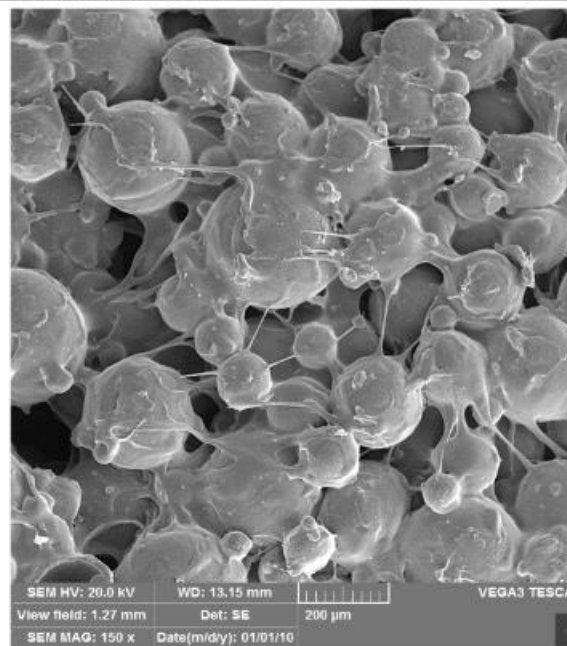
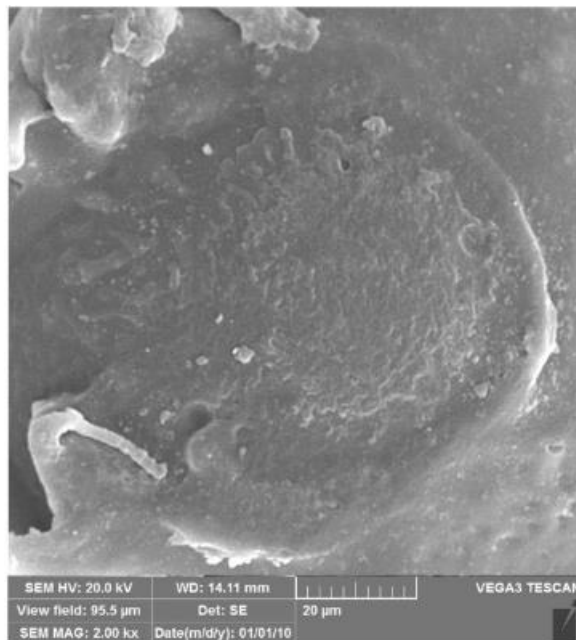
شکل ۶. آنالیز حرارتی سیمان سنتز بهینه

در این پژوهش، زمان گیرش قابل‌قبول سیمان حاصله بین ۱۰ تا ۱۵ دقیقه است. این بدین معنی است که با تغییر نسبت مونومر به پودر، سیمان‌هایی با زمان‌های گیرش متفاوت به دست می‌آید، به‌طوری که نمونه‌های با کد ۴ و ۶ در محدوده‌ی کارپذیری اورتوپدی هستند. این پژوهش نشان می‌دهد که زمان گیرش بر اساس غلظت‌های آغازگر و فعال‌کننده نیز تغییر می‌کند (Hasenwinkel et al., 1999).

اصولاً کارپذیری و گیرش سیمان چهار فاز مختلف دارد: فاز اول فاز مخلوط‌سازی است که در این مرحله، پودر مونومر و مایع همگن‌سازی می‌شوند. فاز دوم فاز انتظار است که در این مرحله سیمان چسبناک است و، بسته به نوع سیمان و دمای کارکرد، چند دقیقه زمان می‌برد. فاز سوم فاز کارپذیری است که جراح می‌بایست سیمان را درون محل ضایعه قرار دهد که مستلزم داشتن ویسکوزیته‌ی مناسب از نظر مقاومت در برابر فشار خون محل ضایعه و همچنین جریان‌پذیری مناسب است. حین فاز انتظار، تورم میکروکرات اتفاق می‌افتد و این شروع پلیمریزاسیون را رقم می‌زند و سبب افزایش ویسکوزیته می‌شود و خمیری چسبناک به دست می‌آید. فاز کارپذیری زمانی اتفاق می‌افتد که دیگر خمیر حالت چسبناک ندارد، اما به‌اندازه‌ی کافی ویسکوز است تا جراح بتواند سیمان را دستکاری کند و در محل مناسب ضایعه قرار دهد. حین این فاز، پلیمریزاسیون زنجیره‌ها ادامه می‌یابد و همچنین افزایشی در ویسکوزیته مشاهده می‌شود

۳-۶- ریخت‌شناسی سطح سیمان

در شکل ۷، ریخت‌شناسی سطح سیمان تهیه‌شده با مایع کد ۴ بررسی شده است. اندازه‌ی میکروکرات در محدوده‌ی ۲۰ میکرومتر است که در روی سطح قابل تشخیص هستند و ذرات در زمینه‌ی فاز مایع پوشیده شده‌اند.



شکل ۷. ریخت‌شناسی سطح سیمان بهینه

درواقع، سیمات سفت‌شده شامل میکروکرات از جنس پلی‌متیل متاکریلات پیش‌پلیمرشده یا کوپلیمرهای جوش‌خورده با مونومر متیل متاکریلات پلیمریزه‌شده و ماده‌ی رادیوپاک به همراه حفرات و ذرات آغازگر باقی‌مانده است. این بخش‌ها می‌تواند به ایجاد ترک‌های در ساختار نهایی

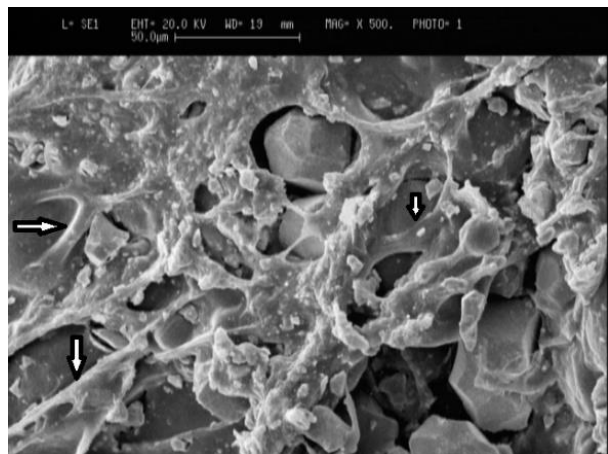
سیمان منجر شود. برای مثال، حضور ماکرو-میکرو حفرات می‌تواند نقش مهمی در کاهش خواص مکانیکی سیمان داشته باشد. از طرف دیگر، حضور ماده‌ی رادیوپاک به‌واسطه‌ی اتصال با میکروکرات موجود در ماتریس یا درون حفرات در تعیین خواص مکانیکی نقش دارند (Reckling et al., 1977; Kuehn et al., 2005). در این پژوهش، سیمانی با میکروساختار همگن با کمترین میزان تخلخل به دست آمد.

۳-۷- ارزیابی چسبندگی سلول

بازسازی استخوان بر اساس این فرضیه است که سلول‌های پروژنیاتور، چه از طریق انتقال چه تشکیل در محل آسیب‌دیده بتوانند در نهایت به بازسازی بافت صدمه‌دیده یا ازدست‌رفته منجر شوند. این امکان فراهم است تا داربست‌های سه‌بعدی سرعت بازسازی استخوان را با ایجاد فضایی که مهاجرت، تکثیر و تمایز سلول‌های پروژنیاتور را تسهیل کند، افزایش دهند (Declercq et al., 2004; Zhang et al., 2006).

منع تأمین سلول برای کاربرد مهندسی بافت استخوان می‌تواند براساس وضعیت تمایز آن‌ها تقسیم‌بندی شود؛ که بر این اساس می‌توان به سه نوع بنیادی، مغز استخوان یا سلول‌های استخوان‌ساز طبقه‌بندی شوند. سلول‌های استخوان‌ساز با قابلیت تمایز از جنبه‌ی تولید بیشتر ماتریس خارج سلولی مؤثرتر هستند (Zhang et al., 2009; Zhang et al., 2010).

مطابق تصویر میکروسکوپ الکترونی روبشی (شکل ۸)، سلول‌ها (پس از ۳ روز کشت) به‌خوبی به سطح چسبیده‌اند و دارای تکثیر یکنواخت هستند و توانسته‌اند پاهای کاذب با ریخت‌شناسی چندوجهی ایجاد کنند.

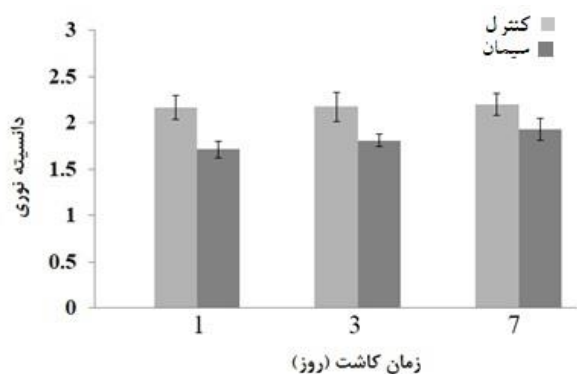


شکل ۸. تصویر میکروسکوپ الکترونی روبشی از سلول کشت‌شده

روی سیمان بهینه

دارد.

در مجموع، در مواد زیستی سنتز شده با استفاده از روش‌های پلیمریزاسیون، آنچه می‌تواند بر حیات سلولی تأثیرگذار باشد وجود رادیکال‌های آزاد و همچنین ترکیب شیمیایی ماده و به‌طور مشخص‌تر میزان مونومر آزاد آن است (Hamajima et al., 2020; Kojima et al., 2008; Yamada et al., 2008; Yamada et al., 2009; Aita et al., 2010; Minamikawa et al., 2010; Ueno et al., 2011). رادیکال‌های آزاد به‌واقع سبب ایجاد تنش اکسیداتیو بر روی سلول‌های محیط کشت می‌شوند و اثر بیولوژیکی مخرب خود را ایفا می‌کنند؛ اما از آنجایی که آغازگرها خیلی فعال و اصولاً مولکول‌هایی ناپایدار با عمر کوتاه هستند، احتمال کمی وجود دارد که در عصاره حضور داشته باشند. بنابراین، منطقی آن است که علت کاهش حیات سلولی در ترکیبات ماده، که در این تحقیق سیمان است، جست‌وجو شود که یکی از این موارد مونومر آزاد است.



شکل ۹. تست MTT سیمان بهینه در روزهای مختلف غوطه‌وری در محیط کشت

۴- نتیجه‌گیری

در این طرح، با بررسی پارامترهای مؤثر بر سنتز مایع سیمان و ترکیب آن با فاز پودر، ویژگی‌های سیمان بررسی شد. مطابق با نتایج، زمان گیرش با میزان مونومر استفاده‌شده، نسبت آغازگر به فعال‌ساز و دمای واکنش رابطه‌ی مستقیم دارد، به‌طوری که نسبت بالای آغازگر به فعال‌ساز امکان گیرش سیمان را فراهم نمی‌کند. با توجه به حصول مقادیر بهینه از اجزای سازنده‌ی مایع، زمان گیرش و استحکام سیمان به مقادیر قابل‌قبولی می‌رسند. همچنین، میزان چسبندگی و حیات سلولی سیمان به‌دست‌آمده مطلوب است. با توجه به نتایج گزارش‌شده، مایع سنتز شده در واکنش با فاز پودری می‌تواند سیمانی با قابلیت و پتانسیل استفاده در ترمیم ضایعات ارتوپدی را فراهم کند.

همچنین، همان‌طور که دیده می‌شود، سلول‌ها ردپاهایی از ماتریس خارج‌سلولی از خود به جا گذاشته‌اند. این موضوع می‌تواند نشان از فراهم شدن بستر یکپارچه‌ی استخوانی به‌واسطه‌ی جذب پروتئین و چسبندگی سلولی باشد.

اصولاً برای بررسی درجه‌ی زیست‌سازگاری، برای تکثیر سلولی و اتصال چهار مرحله در نظر گرفته می‌شود که عبارت هستند از مرحله‌ی چسبیدن یا اتصال، مرحله‌ی ظاهر شدن پاهای دروغین، مرحله‌ی شبکه‌ای شدن و مرحله‌ی پهن شدن سلول. مطابق با مشاهدات، داربست حاضر از نظر زیست‌سازگاری در وضعیت درجه‌ی چهارم است.

۳-۸- بررسی سمیت سلولی داربست‌ها

تکثیر و چسبندگی سلول بر حسب زمان بر روی بیومتریال نشان‌دهنده‌ی زیست‌سازگاری و مناسب بودن داربست برای کاربردهای مهندسی بافت است. در این پژوهش، سمیت سلولی سیمان پلی‌متیل متاکریلات به‌کمک آزمون MTT بررسی شد (شکل ۹). برای نمونه‌ی سیمانی، یک کنترل در نظر گرفته شد که فقط دارای محیط کشت مربوطه بود. مقدار جذب کنترل منفی به‌عنوان شرایطی که در آن سلول‌ها بدون مداخله‌ی عامل خارجی رشد یافته‌اند صددرصد محسوب شد. نتایج با رقیق‌سازی عصاره حدود ۳۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر پاسخ بهتری داد.

می‌توان این‌گونه برداشت کرد که وجود مونومر باقی‌مانده به‌عنوان مواد رهائش‌یافته از ماتریس سیمانی با عملکرد میتوکندری سلول ارتباط دارد؛ بدین معنی که عصاره‌ی این سیمان به کاهش توانایی متابولیسمی فورمازان سلول منجر می‌شود که این اثر را می‌توان با رقیق کردن محیط بهتر کرد و بنابراین با بررسی غلظت‌های مختلف، از جمله ۱۰ تا ۵۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر تا غلظت ۳۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر، سیمان حیات سلولی تقریباً یکسانی از خود نشان داد و با افزایش بیشتر این میزان کاهش یافت. طبق استاندارد ISO 10993-5، برای بررسی‌های برون‌تنی، اگر ماده‌ای باعث سمیت و مرگ ۳۰ درصد یا بیشتر از سلول‌ها شود، ماده‌ی سمی در نظر گرفته می‌شود. بنابراین، حداقل درصد زنده ماندن سلول‌ها برای اینکه گفته شود ماده‌ی مورد آزمایش زیست‌سازگار است ۷۰ درصد است (ISO, 2009). به‌دلیل اینکه درصد زنده ماندن سلول‌ها پس از گذشت روزهای مختلف به‌ترتیب بالای ۸۰، ۸۳ و ۸۸ است، می‌توان گفت که سیمان سنتز شده زیست‌سازگاری قابل‌قبولی

۵- سپاسگزاری

نویسندگان این تحقیق، از حمایت‌های پژوهشگاه مواد و انرژی به‌واسطه‌ی در اختیار قرار دادن آزمایشگاه‌ها و امکانات (شماره‌ی گرنت: ۷۹۱۴۰۰۱۳) تشکر می‌کنند.

مراجع

- Ahmad, S., Ahmad S., & Agnihotry, S. A. (2007). Synthesis and characterization of in situ prepared poly(methyl methacrylate) nanocomposites. *Bulletin of Materials Science*, 30(1), 31–35. <https://doi.org/10.1007/s12034-007-0006-9>
- Aita, H., Tsukimura, N., Yamada, M., Hori, N., Kubo, K., Sato, N., Maeda, H., Kimoto, K., & Ogawa, T. (2010). N-acetyl cysteine prevents polymethyl methacrylate bone cement extract-induced cell death and functional suppression of rat primary osteoblasts. *Journal of Biomedical Materials Research A*, 92, 285–296. <https://doi.org/10.1002/jbm.a.32336>
- Akat, H., Tasdelen, M. A., Prez, F., & Yagci, Y. (2008). Synthesis and characterization of polymer/clay nanocomposites by intercalated chain transfer agent. *European Polymer Journal*, 44(7), 1949–1954. <https://doi.org/10.1016/j.eurpolymj.2008.04.018>
- Al-Janabi, S. K., Al-Maamori, M. H., & Braihi, A. J. (2021). Developing of PMMA Bone Cement Performance by Modified TiO₂NPs. *IOP Conference Series: Materials Science and Engineering*, (Vol. 1094, No. 1, p. 012150). IOP Publishing. <https://doi.org/10.1088/1757-899X/1094/1/012150>
- Bellare, A., et al., (2007). Orthopaedic bone cement, The Adult Hip, 2nd edn. Lippincott Williams & Wilkins, 144–155. https://doi.org/10.1007/978-3-319-12460-5_42
- Corbett, K. L., Losina, E., Nti, A. A., Prokopetz, J. J. Z., & Katz, J. N. (2010). Population-based rates of revision of primary total hip arthroplasty: a systematic review. *PLoS One*, 5, e13520. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0013520>
- Cui, X, Huang, C. C., Zhang, M., Ruan, C., Peng, S., Li L., Liu, W., Wang, T., Li, B., Huang, W., Rahaman, M. N., Lu, W.W. & Pan, H. (2017). Enhanced osteointegration of poly(methylmethacrylate) bone cements by incorporating strontium-containing borate bioactive glass. *Journal of the Royal Society Interface*, 14(131), 20161057. <https://doi.org/10.1098/rsif.2016.1057>
- Cyphert, E. L., Learn, G. D., Hurley, S. K., Lu, C. y., & von Recum, H. A. (2018). An additive to PMMA bone cement enables postimplantation drug refilling, broadens range of compatible antibiotics, and prolongs antimicrobial therapy. *Advanced Healthcare Materials*, 7(21), 1800812. <https://doi.org/10.1002/adhm.201800812>
- Declercq, H., Van den Vreken, N., De Maeyer, E., Verbeeck, R., Schacht, E., De Ridder, L., & Cornelissen, M. (2004). Isolation, proliferation and differentiation of osteoblastic cells to study cell/biomaterial interactions: comparison of different isolation techniques and source. *Biomaterials*, 25(5), 757-768. [https://doi.org/10.1016/s0142-9612\(03\)00580-5](https://doi.org/10.1016/s0142-9612(03)00580-5)
- Elshereksi, N. W., Mohamed, S. H., Arifin, A., & Ishak, Z. A. M. (2014). Thermal Characterisation of Poly(Methyl Methacrylate) Filled with Barium Titanate as Denture Base Material. *Journal of Physical Science*, 25(2), 15–27. <https://www.researchgate.net/publication/269987579>
- Fazli, Y., Kulani, E., Khezri, K., & Alijani, H. (2015). PMMA-grafted silica aerogel nanoparticles via in situ SR&NI ATRP: Grafting through approach. *Microporous and Mesoporous Materials*, 214, 70–79. <https://doi.org/10.1016/j.micromeso.2015.04.028>
- Hamajima, K., Ozawa, R., Saruta, J., Saita, M., Kitajima, H., Taleghani, S. R., Usami, D., Goharian, D., Uno, M., Miyazawa K., & Ogawa, T. (2020). The Effect of TBB, as an Initiator, on the Biological Compatibility of PMMA/MMA Bone Cement. *International Journal of Molecular Sciences*, 21(11), 4016. <https://doi.org/10.3390/ijms21114016>
- Hasenwinkel, J. M., Lautenschlager, E. P., Wixson, R. L., & Gilbert, J. L. (1999). A novel high-viscosity, two-solution acrylic bone cement: Effect of chemical composition on properties. *Journal of Biomedical Materials Research*, 47, 36-45. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-4636\(199910\)47:1<36::AID-JBM5>3.0.CO;2-R](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-4636(199910)47:1<36::AID-JBM5>3.0.CO;2-R)
- He, Z., Zhai, Q., Hu, M., Cao, C., Wang, J., Yang H., & Li B. (2015). Bone cements for percutaneous vertebroplasty and balloon kyphoplasty: Current status and future developments. *Journal of Orthopaedic Translation*, 3, 1-11. <https://doi.org/10.1016/j.jot.2014.11.002>
- ISO 10993, Biological evaluation of medical devices-Part 5: Tests for in vitro cytotoxicity. International Standards Organization, 2009. <https://www.iso.org/standard/36406.html>
- Kojima, N., Yamada, M., Paranjpe, A. N. Tsukimura, Kubo, K., Jewett, A., & Ogawa, T. (2008). Restored viability and function of dental pulp cells on poly-methylmethacrylate (PMMA)-based dental resin supplemented with N-acetyl cysteine (NAC). *Dental Materials*, 24, 1686–1693. <https://doi.org/10.1016/j.dental.2008.04.008>
- Kuehn, K. D., Ege, W., & Gopp, U. (2005). Acrylic bone cements: mechanical and physical properties. *Orthopedic Clinics of North America*, 36(1), 29–39. <https://doi.org/10.1016/j.ocl.2004.06.011>
- Lewis, G. (2006). Injectable Bone Cements for Use in Vertebroplasty and Kyphoplasty: State-of-the-Art Review. *Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials*, 76(2), 456–468. <https://doi.org/10.1002/jbm.b.30398>
- Li, T., Weng, X., Bian, Y., Zhou, L., Cui, F., & Qiu, Z. (2015). Influence of Nano-HA Coated Bone Collagen to Acrylic (Polymethylmethacrylate) Bone Cement on Mechanical Properties and Bioactivity. *PLoS ONE*, 10(6), e0129018. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0129018>
- Lieberman, I. H., Togawa, D., & Kayanja, M. M. (2005). Vertebroplasty and kyphoplasty: filler materials. *The Spine Journal*, 5, 305S–316S. <https://doi.org/10.1016/j.spinee.2005.02.020>
- Machado, R. A. F., Oliveira, P. F., Barth, D., & Acosta E. D. (2016). Dispersion polymerization of methyl methacrylate in supercritical carbon dioxide using vinyl terminated poly(dimethylsiloxane). *Chemical Engineering and Processing: Process Intensification*, 103, 46-52. <https://doi.org/10.1016/j.ccep.2015.10.022>
- Minamikawa, H., Yamada, M., Iwasa, F., Ueno, T., Deyama, Y., Suzuki, K., Yawaka, Y., & Ogawa, T. (2010). Amino acid derivative-mediated detoxification and functionalization of dual cure dental restorative material for dental pulp cell mineralization. *Biomaterials*, 31, 7213–7225. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2010.06.018>
- Niculescu, M., Solomon, B. L., Viscopoleanu, G., & Antoniac I. V. (2016). Evolution of Cementation Techniques and Bone Cements in Hip Arthroplasty. In: Antoniac, I. (eds) *Handbook of Bioceramics and Biocomposites*. Springer, 859–899. https://doi.org/10.1007/978-3-319-09230-0_42-1
- Parra, C., Gonzales, G., & Albano, C. (2005). Synthesis and characterization of poly(methyl methacrylate) obtained by ultrasonic irradiation. *e-Polymers*, 025, 1-11. <https://doi.org/10.1515/epoly.2005.5.1.273>
- Paz, E., Ballesteros, Y., Forriol, F., Dunne, N. J., & Real, J. C. D. (2019). Graphene and graphene oxide functionalisation with silanes for advanced dispersion and reinforcement of PMMA-based bone cements. *Materials Science and Engineering C: Materials for Biological Applications*, 104, 109946. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2019.109946>
- Prokopovich, P., Köbrick, M., Brousseau, E., & Perni, S. (2015). Potent antimicrobial activity of bone cement encapsulating silver nanoparticles capped with oleic acid. *Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials*, 103(2), 273-281. <https://doi.org/10.1002/jbm.b.33196>
- Reckling, F. W., & Dillon, W. L. (1977). The bone-cement interface temperature during total joint replacement. *Journal of Bone Joint Surgery*, 59(1), 80–82. <https://doi.org/10.2106/00004623-197759010-00014>
- Rymuszka, D., Terpiłowski, K., Sternik, D., Tomczyńska-Mleko, M., & Goncharuk, O. (2017). Wettability and thermal analysis of hydrophobic poly(methyl methacrylate)/silica nanocomposites. *Adsorption Science & Technology*, 35(5–6), 560–571. <https://doi.org/10.1177/0263617417701922>
- Saleh, K. J., Othmani, M. M. E., Tzeng, T. H., Mihalko, W. M., Chambers, M. C., & Grupp, T. M. (2016). Acrylic bone cement in total joint arthroplasty: A review. *Journal of Orthopaedics Research*, 34(5), 737. <https://doi.org/10.1002/jor.23184>

30. Soleymani, S., Bakhtiari, E., Bakhsheshi-Rad, H. R., Karbasi, S., Tavakoli, M., Razzaghi, M., Ismail, A. F., Krishna, S. R., & Berto, F. (2020). Polymethyl Methacrylate-Based Bone Cements Containing Carbon Nanotubes and Graphene Oxide: An Overview of Physical, Mechanical, and Biological Properties. *Polymers* (Basel), 12(7), 1469. <https://doi.org/10.3390/polym12071469>
31. Ueno, T., Yamada, M., Igarashi, Y., & Ogawa, T. (2011). N-acetyl cysteine protects osteoblastic function from oxidative stress. *Journal of Biomedical Materials Research A*, 99, 523-531. <https://doi.org/10.1002/jbm.a.33211>
32. Wang, H., Maeda, T., & Miyazaki, T. (2021). Preparation of bioactive and antibacterial PMMA-based bone cement by modification with quaternary ammonium and alkoxysilane. *Journal of Biomaterials Applications*, 36(2), 311-320. <https://doi.org/10.1177/08853282211004413>
33. Yamada, M., Kojima, N., Paranjpe, A., Att, W., Aita, H., Jewett, A. & Ogawa, T. (2008). N-acetyl cysteine (NAC)-assisted detoxification of PMMA resin. *Journal of Dental Research*, 87, 372-377. <https://doi.org/10.1177/154405910808700417>
34. Yamada, M., & Ogawa, T. (2009). Chemodynamics underlying N-acetyl cysteine-mediated bone cement monomer detoxification. *Acta Biomaterialia*, 5, 2963-2973. <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2009.04.027>
35. Zaki, D.Y. (2018). Investigation of the in vitro bioactivity of poly methyl methacrylate bone cement loaded with hydrated and anhydrous white Portland cement powder. *Future Dental Journal*, 4(2), 99-104. <https://doi.org/10.1016/j.fdj.2018.11.001>
36. Zhang, W., Frank Walboomers, X., van Kuppevelt, T. H., Daamen, W. F., Bian, Z., & Jansen, J. A. (2006). The performance of human dental pulp stem cells on different three-dimensional scaffold materials. *Biomaterials*, 27(33), 5658-5668. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2006.07.013>
37. Zhang, Z. Y., Teoh, S. H., Chong, W. S., Foo, T. T., Chng, Y. C., & Choolani, M. (2009). A biaxial rotating bioreactor for the culture of fetal mesenchymal stem cells for bone tissue engineering. *Biomaterials*, 30(14), 2694-2704. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2009.01.028>
38. Zhang, Z. Y., Teoh, S. H., Chong, M. S., Lee, E. S., Tan, L. G., & Mattar, C. N. (2010). Neo-vascularization and bone formation mediated by fetal mesenchymal stem cell tissue-engineered bone grafts in critical-size femoral defects. *Biomaterials*, 31(4), 608-620. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2009.09.078>
39. Zheng, Z., Chen, S., Liu, X., Wang Y., Bian Y., Feng, B., Zhao, R., Sun, Y., Zhang H., Cui, F., Yang, X., & Weng, X. (2021). A bioactive polymethylmethacrylate bone cement for prosthesis fixation in osteoporotic hip replacement surgery. *Materials & Design*, 209, 109966. <https://doi.org/10.1016/j.matdes.2021.109966>