



## تهیه فوم نانو کامپوزیتی پلی لاکتیک اسید/پلی اتیلن گلیکول/نانو ذرات هیدروکسی آپاتیت به روش متخلخل سازی توده‌ای

آرش گودرزی<sup>۱</sup>، حمزه شاهرجبیان<sup>۲\*</sup>

<sup>۱</sup>- کارشناسی ارشد، مهندسی مکانیک، واحد نجف آباد، دانشگاه آزاد اسلامی، نجف آباد

<sup>۲</sup>- دانشیار، مهندسی مکانیک، واحد نجف آباد، دانشگاه آزاد اسلامی، نجف آباد

\* نجف آباد، صندوق پستی ۸۵۱۴۱-۴۳۱۳۱، h.shahrjabian@pmc.iaun.ac.ir

### چکیده

### اطلاعات مقاله

مقاله پژوهشی کامل

دریافت: تیر ۱۴۰۰

داوری اولیه: ۳۱ شهریور ۱۴۰۰

پذیرش: ۲۷ آبان ۱۴۰۰

### کلیدواژگان:

پلی لاکتیک اسید

نانوذرات هیدروکسی آپاتیت

روش توده‌ای

چگالی فوم

اندازه سلول

در این پژوهش نانو کامپوزیت‌های پلی لاکتیک اسید/پلی اتیلن گلیکول/نانوذرات هیدروکسی آپاتیت (با درصد وزنی ۰، ۳ و ۵) بطور موفقیت آمیزی به روش ریخته‌گری حلال در مخلوط کلروفرم تهیه شدند. به منظور تولید فوم نانو کامپوزیتی از روش توده‌ای با گاز خنثی CO<sub>2</sub> استفاده شد. نمونه‌ها به صورت مجزا درون گلیسرین داغ تحت یکی از شرایط دمایی فوم ۹۰، ۱۱۰، و ۱۲۰ °C با زمان فوم ۵، ۳۷/۵ و ۷۰ ثانیه قرار داده شدند. دمای فوم، زمان فوم و درصد وزنی نانوذرات هیدروکسی آپاتیت به عنوان متغیرهای پژوهش در نظر گرفته شدند. هدف پژوهش آشکارسازی تأثیر پارامترهای فوم سازی بر فوم تولید شده در نمونه‌ها با استفاده از طراحی آزمایش پاسخ سطح بر مبنای مدل باکس-بِنکن می‌باشد. مورفولوژی سلول‌های ایجاد شده توسط میکروسکوپ الکترونی روبشی (SEM) و مقادیر چگالی نانو کامپوزیت‌ها از روش ارشمیدوس مورد بررسی قرار گرفت. نتایج حاصله نشان داد کمترین چگالی مربوط به نمونه حاوی ۳٪ نانوذرات HA با دمای فوم ۱۱۰ °C، زمان فوم ۳۷/۵ ثانیه و چگالی ۰/۶۴۶ g/cm<sup>3</sup> و بیشترین چگالی مربوط به نمونه فاقد نانوذرات HA با دمای فوم ۱۱۰ °C، زمان فوم ۵ ثانیه و چگالی ۰/۹۵۳ g/cm<sup>3</sup> می‌باشد. بیشترین اندازه قطر سلول مربوط به نمونه حاوی ۳٪ نانوذرات HA با دمای فوم ۱۲۰ °C و زمان فوم ۷۰ ثانیه و اندازه قطر سلول ۴۹/۸۶ μm بوده و کوچکترین اندازه قطر سلول مربوط به نمونه فاقد نانو ذرات HA با دمای فوم ۱۲۰ °C، زمان فوم ۳۷/۵ ثانیه و اندازه قطر سلول ۶/۳۲ μm می‌باشد.

## Fabrication of polylactic acid / polyethylene glycol/ hydroxyapatite nanoparticles nanocomposite foam by mass porosity method

Arash Goodarzi, Hamzeh Shahrjabian\*

Department of Mechanical Engineering, Najafabad branch, Islamic Azad University, Najafabad, Iran.

\* P.O.B. 85141-43131 Najafabad, Iran, h.shahrjabian@pmc.iaun.ac.ir

### Article Information

Original Research Paper

Received: 8 July 2021

First Decision: 22 September 2021

Accepted: 18 November 2021

### Keywords:

Polylactic acid,

Hydroxyapatite

Mass method

Foam density

Cell size

### Abstract

In this study, polylactic acid / polyethylene glycol / hydroxyapatite nanoparticles (with weight percentages of 0, 3 and 5) were successfully prepared by solvent casting in chloroform mixture. In order to produce nanocomposite foam, the mass method with neutral CO<sub>2</sub> gas was used. The samples were placed separately in hot glycerin under one of the foam conditions of 90, 110 and 120 °C with foam time of 5, 37.5 and 70 seconds. Foam temperature, foam time and weight percentage of hydroxyapatite nanoparticles were considered as research variables. The aim of this study was to reveal the effect of foam making parameters on the foam produced in the samples using a surface response test design based on the Box-Behnken design. The morphology of the cells created by scanning electron microscopy (SEM) and the density values of the nanocomposites were examined by Archimedes method. The results of analysis of variance showed that the effect of all three factors on the objectives of the experiment (decreasing the density of samples and increasing the diameter of cells) was significant. The results showed that the lowest density of the sample containing 3% HA nanoparticles with foam temperature of 110 °C, foam time of 37.5 seconds and density of 0.646 g/cm<sup>3</sup> and the highest density of the sample without HA nanoparticles with foam temperature of 110 °C, foam time 5 seconds and the density is 0.953 g/cm<sup>3</sup>. The maximum cell diameter of the sample containing 3% HA nanoparticles with foam temperature of 120 °C and foam time of 70 seconds and cell diameter size was 49.86 μm and the smallest cell diameter of the sample without HA nanoparticles with foam temperature of 120 °C The foam time is 37.5 seconds and the cell diameter is 6.32 μm. Evaluation of the results showed that increasing the nanoparticles by up to 3% and foam time up to 70 seconds reduces the density and increases the cell diameter. Increasing the temperature of the foam increases the gas output and decreases the density and increases the cell diameter, but this amount of change is fixed up to a certain temperature.

Please cite this article using:

برای ارجاع به این مقاله از عبارت ذیل استفاده نمایید:

A. Goodarzi, H. Shahrjabian, Fabrication of polylactic acid / polyethylene glycol/ hydroxyapatite nanoparticles nanocomposite foam by mass porosity method, Iranian Journal of Manufacturing Engineering, Vol. 8, No. 9, pp. 37- 49, 2021 (in Persian)

## ۱- مقدمه

پلی لاکتیک اسید<sup>۱</sup> یک پلی استر ترموپلاستیک آلیفاتیک تهیه شده از لاکتیک اسید و یک پلیمر زیست تخریب پذیر و آمورف است. این پلیمر قابل استخراج از منابعی تجدیدپذیر مانند ذرت، چغندر قند و برنج می باشد. PLA به علت خواص مکانیکی مناسب و زیست تخریب پذیری خوب، برای کاربرد در مهندسی بافت، رهایش کنترل شده دارو و نخ بخیه جراحی تولید می شود. از این ماده در تولید داربست برای رشد و تکثیر سلول ها استفاده می شود. از مزایای فوق العاده PLA به عنوان یک بیوپلاستیک، تطبیق پذیری آن با محیط زیست است. PLA وقتی که در معرض محیط قرار می گیرد به طور طبیعی تخریب می شود و در طی تجزیه به محصولاتی غیر سمی تبدیل می شود که این امر سبب کاهش میزان زباله های تولیدی خواهد شد. بنابراین PLA دارای دومین حجم تولید انبوه از هر بیوپلاستیک می باشد [۱]. پلی لاکتیک اسیدها، پلیمرهایی با رشته های بلند پلیمری مستحکم می باشند که با رسیدن آب به رشته های بلند پلیمری آنها، به اسیدهای موجود در بدن انسان تجزیه می شوند. این نوع پلیمر در علم پزشکی به جای پلاتین به عنوان نگه دارنده استخوان های شکسته شده استفاده می شود تا بعد از ترمیم استخوان، پلیمر نیز تجزیه و به صورت آب و دی اکسید کربن از بدن دفع شده و نیازی به جراحی دوباره نباشد [۲-۳]. پلی اتیلن گلیکول<sup>۲</sup> یک ترکیب اتری با کاربردهای فراوان صنعتی و داروسازی است. PEG یک پلیمر شناخته شده غیرسمی است که الاستیسیته بیشتری نسبت به PLA دارد و به عنوان حلال و کمک حلال نیز استفاده می شود [۴، ۵]. PEG در کاهش دمای انتقال شیشه ای (T<sub>g</sub>) PLA تا غلظت معینی موثر است. مقادیر اختلاط PEG ها به عنوان نرم کننده با PLA از نظر وزن و غلظت مولکولی متفاوت است و با افزایش درصد وزنی PEG خصوصیات مکانیکی PLA تغییر می کند [۶]. هدف از انتخاب PEG و ترکیب آن با PLA در داربست استخوانی معمولاً بر اساس تسریع تخریب بهبود کشش، کاهش شکنندگی، سازگاری زیستی و تقویت خواص آبدوستی PLA می باشد [۶، ۷].

نانو کامپوزیت همان کامپوزیت است که یک یا چند قسمت از مواد تشکیل دهنده آن، دارای ابعادی کمتر از ۱۰۰ نانومتر را داشته باشد [۸]. تقویت کننده های نانومتری به علت داشتن نسبت طول به قطر زیاد، ابعاد بسیار کوچک و میزان سطح بسیار بالا در مقایسه با تقویت کننده های معمولی نظیر الیاف شیشه و

تالک، در سطح بارگذاری کمتری باعث بهبود خواص مورد نظر می گردد. نانو کامپوزیت ها در مقایسه با کامپوزیت ها این مزیت را دارند که با افزودن نانوفیلر، مدول یانگ افزایش می یابد ولی وضعیت تنش تسلیم و چقرمگی چندان نامطلوب نمی شود. این نوع خاصیت که بهبود یک ویژگی مفید، ویژگی مفید دیگری کاهش ندهد برتری نانو کامپوزیت ها بر کامپوزیت ها است [۸، ۹]. نانوذرات هیدروکسی آپاتیت<sup>۳</sup> سنتزی و طبیعی، ترکیب شیمیایی و خواص بلورشناسی مشابه استخوان طبیعی انسان دارد [۱۰، ۱۱]. هدف از استفاده از نانوذرات هیدروکسی آپاتیت در فوم تولید شده تسریع در تخریب، افزایش نرخ تخریب، زیست سازگاری و قابلیت تحریک سلول های هدف در بدن انسان می باشد [۱۲، ۱۳]. نانو کامپوزیت های ساخته شده از یک پلیمر زیست تخریب پذیر، به عنوان مثال، پلی لاکتیک اسید و نانوذرات هیدروکسی آپاتیت در زمینه ارتوپدی بسیار مورد استفاده هستند. لیکن بدست آوردن چنین کامپوزیت هایی چالش برانگیز است، زیرا نانوذرات تمایل به تجمع دارند و دستیابی به پیوند خوب بین سرامیک آب دوست و پلیمر آبگریز دشوار است [۱۴]. استخوان های بدن از بافت سخت و محکمی به نام بافت استخوانی همبند تشکیل شده اند. استخوان یک بافت زنده و در واقع یک اندام است. رشد می کند، تغذیه می کند، تغییر شکل می دهد و می میرد. استخوان از سلول هایی به نام استخوان یاخته (استئوسیت) تشکیل شده است. این سلول ها در کنار یکدیگر قرار نداشته و از هم فاصله زیادی دارند. فاصله بین این یاخته ها را ماده ای بنام ماده میان یاخته ای (بین سلولی) پر کرده است که به این ماده را داربست (ماتریکس) می گویند. داربست و شبکه سه بعدی از پروتئین و مواد قندی بخصوصی تشکیل شده که روی آن املاح کلسیم رسوب کرده است. این املاح کلسیم، عمدتاً از جنس HA هستند. استخوان سخت ترین بافت همبند یا پیوندی است. بافت استخوانی در دو نوع، متراکم و اسفنجی است. داربست های ترکیبی معمولاً شامل ترکیب داربست های پلیمری و سرامیکی است که برای کاهش معایب هر یک از آنها، تولید می شوند و همچنین این داربست ها خصوصیت مرکب بودن استخوان طبیعی را شبیه سازی می کنند [۱۵]. ترکیب HA به عنوان عامل پرکننده درون زمینه PLA عملکرد نانو کامپوزیت تولید شده را به میزان قابل توجهی افزایش می دهد. افزودن HA به نانو کامپوزیت با زمینه PLA چسبندگی و تکثیر سلول های بافت هدف را افزایش می دهد. نانو کامپوزیت های PLA/HA متخلخل شده دارای استحکام کششی عالی، خواص

<sup>1</sup> Polylactic Acid (PLA)<sup>2</sup> Polyethylene Glycol (PEG)<sup>3</sup> Hydroxyapatite (HA)

حاصله بسیار متخلخل است، اما به دلیل تخلیه سریع گاز بین منافذ این ساختار منفذ بسته است. برای ایجاد ارتباط متقابل بهتر بین منافذ در روش توده‌ای نمونه اشباع شده داخل گلیسرول داغ گرم (دمای فوم) می‌شود. در طی این مرحله تعداد بسیار زیادی هسته تشکیل شده و رشد می‌کنند. رشد حباب‌ها با نگهداری نمونه در دمای فوم با زمان مشخصی (زمان فوم) کنترل می‌شود و در مرحله آخر نمونه فوم شده بلافاصله در محلول آب و یخ قرار داده می‌شود تا از رشد بیشتر فوم جلوگیری شود [۲۲]. در فرآیند فوم کردن با گاز CO<sub>2</sub> از درجه حرارت‌های بالا استفاده نمی‌کنند، بنابراین فعالیت مولکول زیست فعال بدون تغییر باقی می‌ماند. فرآیند فوم کردن نه تنها تخلخل پلیمر را تغییر می‌دهد بلکه خواص دیگری مانند نقطه ذوب، تبلور یا دمای انتقال شیشه‌ای پلیمر را نیز تغییر می‌دهد [۲۱]. به هر حال نمی‌توان از این روش برای تولید فوم‌های پلیمری که پلیمر آن تمایل بسیار کمی برای اشباع با گاز CO<sub>2</sub> دارند استفاده کرد زیرا نیاز اصلی فرآیند این است که بتوان گاز CO<sub>2</sub> را به مقدار کافی در پلیمر حل کرد [۲۳]. تحقیقات متعددی وجود دارد که تأثیر نانو پرکننده‌ها را بر تراکم، اندازه سلول و خصوصیات مکانیکی فوم‌های نانوکامپوزیت بررسی می‌کنند. از این رو بسته به نوع پلیمر به کار رفته نحوه تولید فوم آن متفاوت است. آنچه که در مورد فوم‌های مختلف اهمیت دارد نوع پلیمر و گاز مورد استفاده است [۲۴].

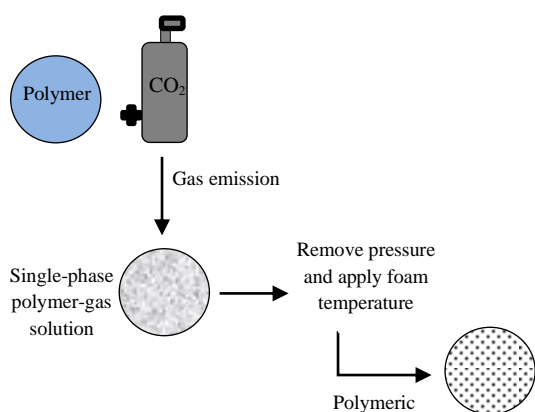


Fig. 1 Mass porosity method

شکل ۱ روش متخلخل سازی توده‌ای

فاز تقویت‌کننده‌ای که در نانوکامپوزیت‌های زمینه پلیمری استفاده می‌شود شامل نانوذرات، نانوصفحات، نانوالیاف و نانولوله‌ها می‌باشد. نانوذرات بیشترین کاربرد را به عنوان ماده تقویت‌کننده در نانوکامپوزیت‌ها دارند. با استفاده از مقدار کمی نانوذرات می‌توان فرآیند هسته سازی حباب را ایجاد و تسهیل

آنتی‌اکسیدانی مناسب و دارای خواص ضد باکتریایی هستند [۱۶]. از فاکتورهای مهم برای تولید داربست‌های استخوانی اندازه خلل و فرج می‌باشد. در راهبرد مهندسی بافت، سلول‌ها در داخل یک چارچوب قرارداده می‌شوند که در واقع به عنوان یک الگو عمل کرده و رشد سلول‌ها را راهنمایی می‌کنند. به همین منظور داربست باید بتواند با عملکردی مناسب بافت آسیب دیده را بازسازی کند [۱۷، ۱۸]. یک داربست مناسب باید بتواند بافت‌های بدن را با حداقل الزامات، برای رشد سلولی، عروق، تکثیر و ادغام میزبان ترمیم کند و در نهایت، مواد به طور طبیعی در طول یا پس از فرآیند ترمیم تخریب شوند [۱۹]. از این رو می‌توان با تولید این نوع فوم‌ها از مزایا و فواید آن‌ها در مهندسی بافت به عنوان داربست‌های استخوانی بهره جست.

ایده تولید حباب‌های بسیار ریز توسط جوانه‌زنی با گاز در پلاستیک‌ها ابتدا توسط مارتینی در انستیتو تکنولوژی ماساچوست در اوایل دهه هشتاد میلادی به عنوان راهی برای کاهش قیمت در تولید پلاستیک‌های دسته ای، ارائه گردید. روش تولید فوم‌های میکروسلولی، تئوری‌های تشکیل و رشد حبابها و نرخ جوانه زنی در سیستم اشباع گاز-پلیمر توسط مارتینی بررسی شد. او همچنین رشد سلول‌ها و اندازه قطر سلول را بعنوان تابعی از زمان مورد بررسی قرار داد [۲۰]. تکنولوژی تولید فوم‌های پلیمری را می‌توان به فوم سازی محلولی و فوم سازی واکنشی یا فوم سازی فیزیکی و فوم سازی شیمیایی طبقه‌بندی کرد. عوامل حباب زای فیزیکی با تغییر حالت فیزیکی، گاز لازم برای انبساط پلیمر را تولید می‌کنند. عوامل حباب زای شیمیایی ترکیباتی هستند که تحت شرایط فرآیند تولید فوم در اثر تجزیه حرارتی یا واکنش شیمیایی، گاز آزاد می‌کنند. فوم سازی با روش توده‌ای یک زیر گروه از روش فوم سازی فیزیکی است. روش توده‌ای از سه مرحله جذب گاز، جوانه زنی و رشد سلول تشکیل شده است. در روش توده‌ای همانند شکل ۱، نمونه پلیمری جامد توسط یک گاز خنثی مانند CO<sub>2</sub> در فشار بالا اشباع می‌شود. با گذشت زمان مولکول‌های گاز در پلیمر نفوذ کرده، در آن حل می‌شوند تا پلیمر از گاز اشباع گردد. این تکنیک محققان را قادر می‌سازد تا با کنترل شرایط پردازش مانند غلظت گاز، دما و میزان افت فشار، ساختار منافذ را کنترل کنند [۲۱]. در مرحله بعد فشار به فشار محیط کاهش می‌یابد تا بی‌ثباتی ترمودینامیکی فاز گازی ایجاد شود. گاز شروع به جدا شدن از پلیمر و انرژری آزاد می‌کند. سپس مولکول‌های گاز شروع به خوشه بندی می‌کنند و باعث ایجاد منافذ می‌شوند. منافذ توسط مولکول‌های گاز منتشر و پخش می‌شوند. ساختار

کرد [۲۶، ۲۵].

داربست‌های ساخته شده PLA/HA با ۱۰wt.% پرداختند. هدف از این مطالعه بررسی نقش HA در بهبود فعالیت زیستی کامپوزیت‌های PLLA/HA بود. نتایج نشان داد که داربست‌های HA/PLA با ۱۰wt.% از HA باعث استخوان‌زایی و ساخت غضروف می‌شود که این امر با بهبود سنتز و ترشح پروتئین‌های ماتریکس خارج سلولی مخصوص استخوان و بافت غضروف مفصلی همراه بود [۳۴].

هدف این پژوهش آشکارسازی تأثیر پارامترهای فوم سازی بر فوم PLA/PEG تقویت شده با نانوذرات هیدروکسی آپاتیت می‌باشد. طبق مطالعات صورت گرفته اضافه کردن PEG به ماتریس PLA سبب بهبود انعطاف پذیری PLA و اضافه کردن نانوذرات HA سبب بهبود خواص مکانیکی، بیومکانیکی PLA و در نهایت بهبود کارایی PLA می‌شود. از منظر نوآوری براساس مطالعات و تحقیقات انجام شده مشخص شد که تاکنون پژوهشی در زمینه متخلخل سازی نانو کامپوزیت PLA/PEG/HA به روش توده‌ای با گاز خنثی CO<sub>2</sub> انجام نشده است. از این‌رو در این تحقیق جهت ساخت فوم نانو کامپوزیتی PLA/PEG تقویت شده با نانوذرات HA با درصد‌های وزنی ۰، ۳ و ۵ از روش ریخته گری حلال همراه با متخلخل سازی به روش توده‌ای تحت گاز خنثی CO<sub>2</sub> استفاده شد. از ضرورت‌هایی که در هنگام تهیه نانو کامپوزیت‌ها باید در نظر گرفته شود، بدست آوردن مقدار بهینه نانوذرات در بستر نانو کامپوزیت برای رسیدن به خواص مطلوب است. مقادیر زیادتر از حد نانوذرات، ممکن است خواص مطلوب را کاهش دهد. یکی از دلایل کاهش خواص، چسبیدن ذرات به همدیگر یا کلوخه شدن ذرات است، اما بسته به نوع کاربرد و روش سنتز و نوع فیلر و ... عوامل دیگری نیز در انتخاب درصد بهینه موثراند [۳۵]. اثر متغیرهای ورودی شامل درصد نانوذرات، دمای فوم و زمان فوم بر پارامترهای خروجی شامل اندازه سلول و چگالی نمونه فوم شده مورد بررسی قرار گرفت. به منظور کمینه کردن آزمایش‌ها از طراحی آزمایش به روش طراحی پاسخ سطح باکس-بنکن<sup>۱</sup> استفاده شد.

## ۲- مواد و آزمایش

### ۲-۱- مواد

در این مطالعه PLA مورد نیاز از شرکت صنایع پتروشیمی خلیج فارس ایران با وزن ملکولی ۱۸۰۰۰۰ g/mol، چگالی ۱/۳ g/cm<sup>3</sup> و نقطه ذوب ۱۶۰°C خریداری شد. PEG با گرید ۴۰۰، جرم مولکولی ۳۸۰-۴۲۰ g/mol و چگالی ۱/۱۳ g/cm<sup>3</sup>، کلروفورم با جرم

گوینگ و همکاران دریافتند که تبلور PLA تحت فشار ۶/۸۵ مگاپاسکال و دمای ۱۰۰ درجه سانتیگراد تا ۳۸/۳ درصد و تبلور نمونه‌های فوم شده تحت فشار مگاپاسکال و دمای ۶۰ و ۸۰ درجه سانتی‌گراد به ترتیب به مقادیر ۲۹/۷ و ۳۱/۴ درصد کاهش یافته است. که این موضوع بیانگر تأثیر درجه حرارت فوم بر بلورینگی است [۲۷]. محسن بزموز و امیرحسین بهروش به بررسی آماری و تجربی در مورد فوم سازی PLA-PU تقویت شده با نانوالیاف سلولزی پرداختند. نتایج حاصل از این پژوهش نشان داد که فشار اشباع بالا و زمان اشباع باعث افزایش قطر سلول و تراکم سلول می‌شود [۲۸]. یوایما و همکارانش به پژوهش در مورد فرآوری فوم و ساختارهای سلولی نانو کامپوزیتی با زمینه PLA پرداختند. آنها به این امر پی بردند که افزودن ۲ درصد وزنی نانوسلیس به ماتریس PLA می‌تواند نمونه‌های فوم شده با تراکم سلولی تا ۱۰<sup>۸</sup> سلول در سانتی متر مکعب را ایجاد کند [۲۹]. دانگ جنگ کانگ و همکارانش به بررسی و پژوهش پیرامون فوم کامپوزیت‌های تخریب‌پذیر PLA تقویت شده با محتوای مختلف پودر فیبروین ابریشم با درصد‌های مختلف وزنی با استفاده از روش فرآوری محلول در دی‌کلرومتان با گاز CO<sub>2</sub> پرداختند. آنها به این نتیجه رسیدند که با افزایش دما و فشار اشباع، اندازه سلول‌ها افزایش یافته و همچنین چگالی سلول‌ها و هم چگالی نمونه فوم شده کاهش می‌یابد [۳۰]. ماتونا و عمر فاروک به بررسی فوم کامپوزیتی PLA / آرد چوب با استفاده از CO<sub>2</sub> از طریق یک فرآیند فوم سازی ریزسلولی پرداختند. آنها دریافتند که پودر چوب بطور قابل توجهی بر کاهش انبساط ماتریس PLA موثر است [۳۱]. بن یه چن و همکارانش به بررسی اثرات PEG و نمک بر ساختار و خاصیت ترکیبات مبتنی بر PLA و همچنین تخلخل، اندازه منافذ، اتصال متقابل و آبگریزی داربست‌های متخلخل پرداختند. در این پژوهش مشخص شد که اختلاط PEG و نمک با PLA به طور قابل توجهی باعث کاهش چگالی کامپوزیت می‌شود [۳۲]. پاویا و همکارانش به بررسی امکان تولید داربست‌های متخلخل PLLA/HA از طریق جداسازی فاز حرارتی (TIPS) برای بکارگیری در مهندسی بافت پرداختند. آنها چندین نسبت وزنی PLLA/HA را مورد آزمایش قرار دادند و داربست‌های بدست آمده از طریق SEM و XRD را مورد بررسی قرار دادند. تجزیه و تحلیل مورفولوژیکی نمونه‌ها، یک ساختار باز با منافذ به هم پیوسته و همچنین ذرات HA تعبیه شده در ماتریس پلیمر را نشان داد [۳۳]. کریستوف ماریکس و همکارانش به بررسی

<sup>1</sup> Box-Behnken design

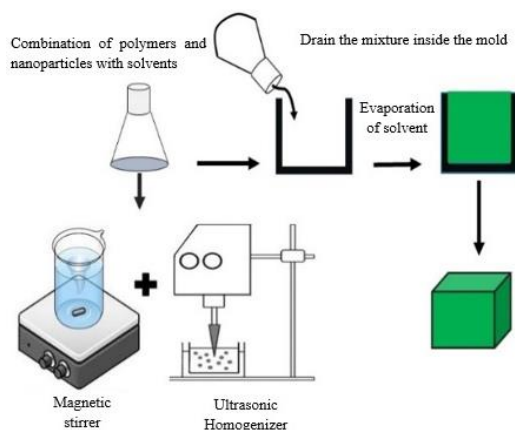


Fig. 2 The sample preparation process

شکل ۲ فرآیند تهیه نمونه

Chcl3 (ml)	HA (gr)	PEG (gr)	PLA (gr)	فیلم
۲۲۰	-	۲/۵	۲۱/۷	۰٪
۲۱۵	۰/۷۲۳	۲/۳۴	۲۱/۰۱	۳٪
۲۱۰	۱/۲۱	۲/۲۹	۲۰/۵۷	۵٪

جدول ۱ مقدار مواد استفاده شده برای هر فیلم

Table 1 The amount of material used in each film

### ۲-۲-۲-۲- تهیه فوم نانو کامپوزیتی

جهت تهیه فوم نانو کامپوزیتی PLA / PEG حاوی نانوذرات HA با درصدهای وزنی ۳، ۵ و ۱۰ از روش فوم سازی توده‌ای با گاز خنثی CO<sub>2</sub> استفاده شد. ابتدا نمونه‌ها درون یک مخزن توسط گاز خنثی CO<sub>2</sub> با فشار (P = 2.5 MPa) و دمای ۸۰°C، اشباع می‌شوند. با گذشت زمان (۶ ساعت) مولکول‌های گاز درون پلیمر نفوذ کرده و در آن حل می‌شوند. پس از اشباع، جذب متوقف شده و توزیع گاز درون قطعه، یکنواخت می‌شود. زمان ماندگاری نمونه درون مخزن به جنس پلاستیک، قابلیت نفوذ گاز استفاده شده در پلیمر، ضخامت فیلم، دمای اشباع و فشار گاز بستگی دارد. پس از آنکه نمونه‌ها از گاز اشباع شدند، نسبت فشار مخزن به فشار محیط کاهش می‌یابد تا بی‌ثباتی ترمودینامیکی فاز گازی ایجاد شود. سپس نمونه‌ها را از مخزن تحت فشار بیرون آورده می‌شوند. در این مرحله نمونه اشباع شده درون حمام گلیسرول داغ تا دمای فوم شدن ۹۰، ۱۱۰ و ۱۲۰°C که بالاتر از دمای شیشه‌ای PLA (Tg = 60-50 °C) می‌باشد به مدت زمان ۵، ۳۷/۵ و ۷۰ ثانیه گرم می‌شود. در طی این مرحله تعداد بسیار زیادی هسته تشکیل شده و رشد می‌کند. رشد حباب‌ها با نگهداری در دمای فوم شدن با طول زمانی مشخص کنترل می‌شود [۳۸]. به منظور جلوگیری از رشد و گسترش حباب درون نمونه‌ها بلافاصله آنها را درون آب یخ قرار داده می‌شود.

ملکولی ۱۱۹/۳۸ g/mol، چگالی ۱/۴۸ g/cm<sup>3</sup>، خریداری و تهیه شد. نانو پودر هیدروکسی آپاتیت سنتزی به عنوان تقویت کننده با وزن ملکولی ۵۰۲/۳۱ g/mol و چگالی ۳/۱۴ g/cm<sup>3</sup> تولید شرکت فنی مهندسی نیک سرام رازی خریداری و تهیه شد.

### ۲-۲-۲- آزمایش

#### ۲-۲-۱- آماده سازی نمونه‌ها

برای ترکیب PLA/PEG و نانوذرات HA با درصدهای ۳، ۵ و ۱۰ از روش ریخته‌گری حلال با کلروفورم استفاده شد [۳۶، ۳۷]. نسبت و درصد وزنی (wt.%) اختلال PLA و PEG ۹۰ به ۱۰ درصد می‌باشد [۶]. به این مخلوط پلیمری درصدهای ۳، ۵ و ۱۰ نانوذرات HA اضافه شد. بررسی شده که با افزایش PEG، با یک روند معمول نشان داده می‌شود که: ضریب یانگ (E) و مقاومت در برابر کشش ( $\sigma$ ) کاهش می‌یابد، در حالی از دیداد طول تا پارگی پلیمر ( $\epsilon$ ) افزایش می‌یابد [۶]. به عنوان مثال هنگامی که از PEG با گرید ۴۰۰ و نسبت وزنی ۹۵ به ۵، ضریب یانگ (E = 2.5 GPa) و مقاومت در برابر کشش ( $\sigma = 41.6$  MPa) و از دیداد طول تا پارگی پلیمر ( $\epsilon = 1.5$  %) حاصل می‌شود در حالی که همین تغییر با ۱۰ درصد وزنی PEG با گرید ۴۰۰ ضریب یانگ (E = 1.2 GPa) و مقاومت در برابر کشش ( $\sigma = 2.5$  MPa) و از دیداد طول تا پارگی پلیمر ( $\epsilon = 140$  %) حاصل می‌شود [۶]. برای تولید فیلم‌های بدون نانوذرات همانند شکل ۲ مقدار مشخصی از PLA/PEG مطابق جدول ۱ درون کلروفورم به مدت ۵ ساعت با همزن مغناطیسی هم زده شد، سپس ترکیب به درون قالب‌های شیشه‌ای ریخته شده و به منظور تبخیر حلال به مدت ۲۴ ساعت در دمای اتاق قرار گرفت. برای تولید فیلم‌های همراه نانوذرات مقدار مشخصی از PLA/PEG درون کلروفورم به مدت ۵ ساعت با همزن مغناطیسی به صورت جداگانه هم زده شد و جهت پراکندگی بهتر ذرات HA درون محلول کلروفورم به صورت جداگانه، به مدت ۳۰ دقیقه به وسیله دستگاه فراصوت Hielscher مدل UP400 S ساخت آلمان تحت فرآیند فراصوتی قرار گرفتند. در ادامه محلول PLA/PEG و سوسپانسیون نانوذرات با در نظر گرفتن نسبت‌های اختلاط از پیش تعیین شده با یکدیگر مخلوط شده و به مدت 30 دقیقه با همزن مغناطیسی و با دستگاه فراصوت عمل‌آوری شدند. پس از ساخت تمامی فیلم‌ها، فیلم‌ها به مدت یک هفته درون اون خلاء با دمای ۵۰ درجه سانتی‌گراد قرار داده شدند تا باقیمانده حلال به طور کامل حذف شود. مقادیر استفاده شده از هر یک از مواد برای تولید یک فیلم در جدول ۱ نشان داده شده است.

شکل ۳ شماتیک فرآیند فوم سازی را نشان می‌دهد.

برای تعیین میانگین قطر سلول استفاده شد.  $N$  تعداد سلول و  $D$  قطر هر سلول در تصویر SEM است [۲۷-۳۹].

$$D_{avg}^3 = \frac{1}{N} \sum_{i=1}^N D_i^3 \quad (2)$$

### ۲-۲-۵- طراحی آزمایشات

روش پاسخ سطح یک روش مدل سازی آماری تجربی است که به منظور ارزیابی چندین پارامتر و تعامل آنها به منظور به حداقل رساندن تعداد آزمایش‌های تجربی است. در این مطالعه از روش پاسخ سطح باکس-بنکن<sup>۴</sup> برای بهینه سازی و مطالعه تأثیر متغیرهای مستقل از قبیل دمای فوم و زمان فوم استفاده گردید. طرح‌های باکس-بنکن معمولاً دارای نقاط طراحی کمتری نسبت به طرح‌های مرکب مرکزی هستند، بنابراین، اجرای آنها با همان تعداد عوامل منجر به تسهیل روند تحقیق، کاهش زمان و هزینه‌های پژوهش می‌شود. برای یافتن تأثیر متغیرهای ورودی بر پارامترهای پاسخ (چگالی و اندازه سلول نمونه فوم شده) در فرآیند فوم کردن، سه متغیر ورودی مختلف شامل درصد نانوذرات HA، زمان فوم و دمای فوم در نظر گرفته شد. این آزمایشات بر اساس یک طرح مرکب مرکزی با عوامل فوق و سه سطح طبق جدول ۳ انجام شد. نتایج اندازه‌گیری چگالی و اندازه سلول در جدول ۳ آمده است.

### جدول ۳ طراحی آزمایش و نتایج

Table 3 Design of experiments and results

نمونه	درصد نانوذرات	زمان فوم (s)	دمای فوم (°C)	چگالی (gr/cm <sup>3</sup> )	اندازه سلول (μm)
۱	۳	۵	۹۰	۰/۹۰۴	۸/۲۴
۲	۳	۳۷/۵	۱۱۰	۰/۶۴۶	۴۷/۶۳
۳	۳	۷۰	۱۲۰	۰/۶۵۳	۴۹/۸۶
۴	۰	۵	۱۱۰	۰/۹۵۳	۷/۳۵
۵	۳	۷۰	۹۰	۰/۶۷۹	۴۳/۴۱
۶	۵	۷۰	۱۱۰	۰/۸۲۵	۳۸/۳۲
۷	۰	۷۰	۱۱۰	۰/۸۴۱	۱۶/۲۳
۸	۰	۳۷/۵	۱۲۰	۰/۹۱۴	۱۶/۳۲
۹	۵	۳۷/۵	۱۲۰	۰/۷۹۴	۲۴/۸۳
۱۰	۳	۵	۱۱۰	۰/۷۱۹	۴۲/۴
۱۱	۰	۳۷/۵	۹۰	۰/۸۳۰	۱۱/۸۴
۱۲	۵	۵	۱۱۰	۰/۹۳۱	۸/۱۱
۱۳	۵	۳۷/۵	۹۰	۰/۸۸۰	۲۱/۸۱

### ۲-۲-۶- آنالیز واریانس

آنالیز واریانس (ANOVA) مجموعه‌ای از مدل‌های آماری است

### ۲-۲-۳- اندازه‌گیری چگالی

چگالی نمونه‌ها با استفاده از روش ارشمیدس اندازه‌گیری شد. در این روش، نمونه در آب با چگالی نرمال شناور شده و آب تمام سطح نمونه را می‌پوشاند. چگالی نمونه شناور با استفاده از معادله (۱) قابل محاسبه است.  $Mb$  نشانگر جرم،  $Vb$  نشانگر حجم و  $\Delta m$  نشانگر تغییر جرم حجم معادل آب نمونه شناور می‌باشد. چگالی نمونه‌ها قبل از فوم کردن در جدول ۲ نشان داده شده است.

$$\rho b = \frac{Mb}{Vb} = \left( \frac{Mb}{\Delta m} \right) * \rho w \quad (1)$$

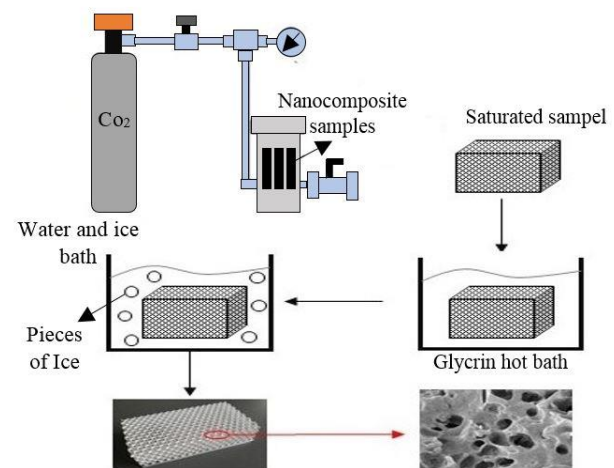


Fig. 3 The Schematic view of gas foam process

شکل ۳ نمای شماتیک فرآیند فوم سازی

جدول ۲ چگالی نمونه‌ها قبل از شروع فرآیند فوم سازی

Table 2 Density of samples before starting the gas foam process

چگالی (gr/cm <sup>3</sup> )	درصد نانو
۱/۲۸۴	۰
۱/۲۹۳	۳
۱/۳۰۲	۵

### ۲-۲-۴- اندازه‌گیری اندازه سلول

به منظور بررسی ریزساختارهای نمونه‌ها، جهت ایجاد شکست ترد ابتدا نمونه‌های فوم شده درون نیتروژن مایع قرار داده شدند. مورفولوژی نمونه‌های فوم شده با استفاده از میکروسکوپ الکترونی روبشی LEO با ولتاژ شتاب دهنده ۱۵ کیلوولت و بزرگنمایی ۱۰ μm ارزیابی شدند. قطر سلول نمونه‌ها به وسیله تصاویر SEM و با استفاده از نرم افزار LEO MESSAGE – ANNOT / MEAS اندازه‌گیری و محاسبه گردید. از معادله (۲)

نانوذرات HA تا نمونه‌های حاوی ۳ درصد وزنی HA از  $0.88 \text{ g/cm}^3$  به  $0.72 \text{ g/cm}^3$  کاهش و سپس مقادیر چگالی در نمونه‌های حاوی ۵٪ HA به  $0.85 \text{ g/cm}^3$  افزایش یافته است. این عمر بیانگر این موضوع است که نانوذرات HA به عنوان مکان‌هایی هسته‌زا عمل کرده و سبب افزایش تعداد سلول‌ها و در نهایت کاهش چگالی در نمونه‌های حاوی نانوذرات HA شده است. مقادیر ۵٪ نانوذرات، سبب افزایش چگالی نسبت به نمونه‌های ۳٪ شده که این امر می‌تواند ناشی از تجمع ذرات در بستر نانو کامپوزیت باشد. از سویی دیگر وقتی چگالی نمونه‌ای فوم بررسی شود، چگالی بالاتر این دسته نمونه مشاهده می‌شود که با توجه به شرایط یکسان فوم سازی این امر قابل پیش‌بینی بود. اثر زمان فوم بروی چگالی به این ترتیب است که مقادیر چگالی در نمونه‌ها به ترتیب از  $0.87 \text{ g/cm}^3$  (مربوط به زمان فوم ۵ ثانیه) به  $0.81 \text{ g/cm}^3$  (مربوط به زمان فوم ۳۷/۵ ثانیه) و سپس  $0.75 \text{ g/cm}^3$  (مربوط به زمان فوم ۷۰ ثانیه) کاهش یافته است. با افزایش زمان فوم سلول‌های ایجاد شده فرصت تکثیر و رشد را پیدا می‌کنند که این موضوع سبب افزایش تعداد سلول‌ها و در نهایت موجب کاهش چگالی در نمونه‌ها می‌شود. اثر دمای فوم بروی چگالی نیز به این ترتیب است که مقادیر چگالی در نمونه‌ها با دمای فوم ۹۰ و  $110^\circ\text{C}$  با اندکی تغییر از  $0.82 \text{ g/cm}^3$  به  $0.81 \text{ g/cm}^3$  رسیده و سپس با افزایش دمای فوم تا  $120^\circ\text{C}$  چگالی نمونه تا  $0.78 \text{ g/cm}^3$  کاهش یافته است که این امر نشانگر تأثیرگذاری اندک پارامتر دمای فوم بر مقادیر چگالی در نمونه‌ها می‌باشد. با افزایش دمای فوم میزان خروج گاز از درون زمینه بیشتر می‌شود و به دلیل نرم شدن زمینه و گرما نرم بودن زمینه نفوذ گاز بهتر می‌شود و چگالی کاهش می‌یابد.

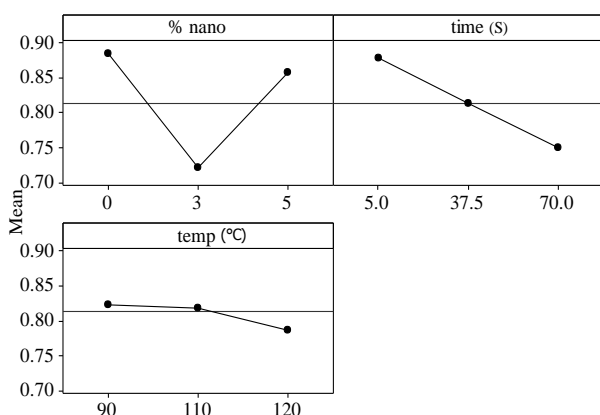


Fig. 4 The effect of parameters on density

شکل ۴ تأثیر پارامترها بر چگالی

نتایج مربوط به تجزیه و تحلیل آنالیز واریانس چگالی در

که به بررسی میانگین در گروه‌ها و توابع وابسته به آن‌ها (مثل واریانس در یک گروه یا بین چند گروه) می‌پردازد. ANOVA با مقایسه میانگین متغیر پاسخ در سطوح مختلف فاکتور، اهمیت یک یا چند عامل را ارزیابی می‌کند. در ساده‌ترین شکل آن، ANOVA آزمون آماری را فراهم می‌کند که برابری میانگین‌های گروه‌های متفاوت را می‌آزماید، و در نتیجه آزمون t را به بیش از دو گروه تعمیم می‌دهد. از مزایای استفاده از آنالیز واریانس ANOVA این است که تنها با انجام یک بار آزمون، اختلاف بین میانگین‌های کلیه گروه‌های موجود در آزمایش، مورد بررسی قرار می‌گیرد. سطح معناداری آزمون‌ها کمتر از ۰/۰۵ در نظر گرفته شد. هر ۳ متغیر این پژوهش دارای ۳ سطح هستند.

### ۳- نتایج و بحث

#### ۳-۱- نتایج چگالی نمونه‌های فوم شده

نتایج مربوط به چگالی در جدول ۳ آمده است. همان‌طور که از داده‌های جدول مشخص است چگالی نمونه‌های حاوی ۴٪ نانوذرات HA بعد از فوم‌سازی به روش توده‌ای کمتر از نمونه‌های حاوی ۵٪ نانوذرات HA و نمونه‌های بدون نانوذرات HA است. همان‌طور که از داده‌های جدول مشخص است کمترین چگالی مربوط به نمونه‌های شماره ۲ و ۳ حاوی ۳٪ نانوذرات HA به ترتیب با دمای فوم  $110^\circ\text{C}$  و  $120^\circ\text{C}$  و زمان فوم ۳۷/۵ ثانیه می‌باشد و بیشترین چگالی مربوط به نمونه شماره ۴ بدون نانوذرات HA و نمونه شماره ۱۲ حاوی ۵٪ نانوذرات HA به ترتیب با دمای فوم  $110^\circ\text{C}$  و زمان فوم ۵ ثانیه می‌باشد. توجه به جدول ۴، نمونه‌های بدون نانوذرات HA نسبت به نمونه‌های حاوی نانوذرات HA چگالی بیشتری را دارا می‌باشند. نانوذرات HA به عنوان عاملی هسته‌زا در این نمونه‌ها عمل کرده و باعث افزایش تعداد و قطر سلول‌ها و کاهش چگالی در نمونه‌های حاوی نانوذرات HA شده است. همان‌گونه که مطرح شد مقادیر زیادتر از حد نانوذرات، ممکن است خواص مطلوب را کاهش دهد. در نمونه‌های حاوی ۵٪ نانوذرات HA، به علت افزایش نانو ذرات HA و کلوخه‌ای شدن آنها در بستر زمینه با افزایش سلول‌ها، سلول‌های به وجود آمده از رشد و تکثیر سلول‌های دیگر جلوگیری کرده و سبب افزایش چگالی نسبت به نمونه‌های حاوی ۳٪ نانوذرات HA شده است.

شکل ۴ نتایج اثر متغیرهای اصلی پژوهش اعم از درصد نانوذرات، دمای فوم و زمان فوم بر چگالی نمونه‌ها است. همان‌طور که در شکل ۴ مشاهده می‌شود تأثیر درصد نانوذرات بر چگالی به این گونه است که مقادیر چگالی در نمونه‌های بدون



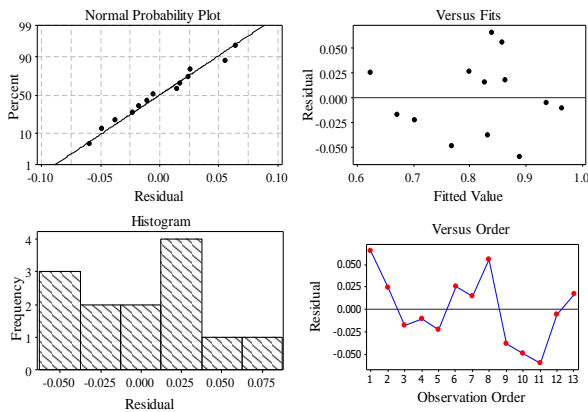


Fig. 5 The results of density

شکل ۵ نمودار نتایج چگالی

### ۲-۳- نتایج اندازه‌گیری اندازه سلول

نتایج جدول ۳ برای اندازه سلول نشان می‌دهد اندازه قطر سلولی در نمونه‌های حاوی ۳٪ نانوذرات HA نسبت به نمونه‌های حاوی ۵٪ نانوذرات HA و نمونه‌های فاقد نانوذرات بزرگتر است. همان‌طور که از داده‌های جدول مشخص است بزرگترین اندازه قطر سلول مربوط به نمونه‌های شماره ۲ و ۳ حاوی ۳٪ نانوذرات HA به ترتیب با دمای فوم ۱۱۰ و ۱۲۰°C و زمان فوم ۳۷/۵ و ۷۰ ثانیه و کوچکترین اندازه سلول مربوط به نمونه‌های بدون نانو ذرات HA شامل نمونه‌های شماره ۴ و ۸ به ترتیب با دمای فوم ۱۱۰ و ۱۲۰°C و زمان فوم ۵ و ۳۷/۵ ثانیه می‌باشد. علت کوچک بودن قطر سلول‌های ایجاد شده در نمونه‌های حاوی ۵٪ نانوذرات HA نسبت به نمونه‌های حاوی ۳٪ نانوذرات HA مربوط به این موضوع است که نانوذرات HA به عنوان مکان‌هایی هسته زا در عمل کرده است. با افزایش نانوذرات در نمونه‌های ۵٪ و احتمال جمع شدگی ذرات در بستر مقادیر سلول‌ها افزایش یافته، این موضوع سبب جلوگیری سلول‌های به وجود آمده از رشد و تکثیر سلول‌های دیگر می‌شود و همین امر سبب کوچک شدن قطر سلول در این نمونه‌ها شده است. از سویی دیگر داده‌های جدول ۳ نمایانگر این موضوع است که استفاده از فشار و زمان اشباع بالاتر در فرآیند فوم می‌تواند عاملی برای افزایش قطر سلول شود.

نتایج حاصل از عکس برداری میکروسکوپ الکترونی روبشی SEM شکل ۶ با بزرگ‌نمایی ۱۰ μm برابر نشان داده شده است. با توجه به شکل ۷ مشاهده می‌شود که مورفولوژی سلول‌ها با افزودن نانوذرات HA تغییر می‌کند. در نمونه‌های حاوی ۵٪ نانوذرات HA تعداد حفره‌ها نسبت به نمونه‌های حاوی ۳٪ نانوذرات HA و نمونه‌های فاقد نانوذرات HA بیشتر شده و اندازه قطر سلول در نمونه‌های حاوی ۵٪ HA و نمونه‌های فاقد نانوذرات HA نسبت به نمونه‌های حاوی ۳٪ نانوذرات HA

جدول ۴ آورده شده است. مقادیر P-Value و F-Value نشان دهنده تأثیر گذاری هر پارامتر می‌باشند. سطح معنادار P-Value در این پژوهش کمتر از ۰/۰۵ در نظر گرفته شده است. مقادیر P-Value کمتر از ۰/۰۵ نشان‌دهنده موثر بودن آن پارامتر بروی پاسخ می‌باشد و مقادیر بزرگتر از آن نشان دهنده احتمال خطا است. آماره آزمون برای ANOVA دارای توزیع F است و بزرگ بودن مقدار F نشانه‌ای برای رد فرض صفر و کوچک بودن مقدار F بیانگر معنا دار نبودن اختلاف بین میانگین گروه‌ها است. متغیر درصد نانوذرات HA دارای P-Value برابر با ۰/۰۴ و F-Value برابر ۱۵/۲۲، متغیر زمان فوم دارای P-Value برابر با ۰/۰۲۴ و F-Value برابر ۷/۴۴ و متغیر دمای فوم دارای P-Value برابر با ۰/۲۵۰ و F-Value برابر ۱/۷۶ می‌باشد. این اعداد بیانگر تأثیر گذاری بالاتر متغیرهای درصد نانوذرات و زمان فوم نسبت به متغیر دمای فوم است.

جدول ۴ تجزیه و تحلیل واریانس چگالی

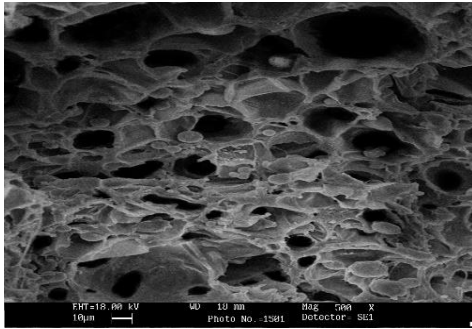
Table 4 Analysis of variance of density

پارامتر	DF	Seq SS	Adj SS	Adj MS	F-value	P-value
درصد نانوذرات	۲	۰/۰۷۱۴۲	۰/۰۸۷۹۹	۰/۰۴۴۰۰	۱۵/۲۲	۰/۰۰۴
زمان فوم	۲	۰/۰۳۹۴۰	۰/۰۴۲۹۸	۰/۰۲۱۴۹	۷/۴۴	۰/۰۲۴
دمای فوم	۲	۰/۰۱۰۴۸	۰/۱۰۱۸۰	۰/۰۵۰۹۰	۱/۷۶	۰/۲۵۰
خطا	۶	۰/۰۱۷۳۴	۰/۱۷۳۴۰	۰/۰۰۲۸۹		
S = 0.0537585 R R-Sq = 87.47% R-Sq(adj) = 74.93%						

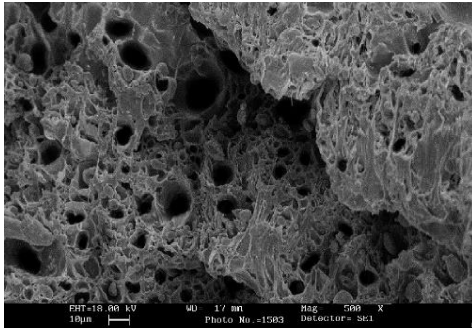
شکل ۵ نمودارهای مربوط آنالیز واریانس چگالی می‌باشد. نمودار احتمال طبیعی روشی است که با استفاده از آن می‌توان پی برد که داده‌ها با یک توزیع نرمال متناسب است. خط مستقیم در نمودار احتمال طبیعی نشان می‌دهد که داده‌ها با توزیع احتمال طبیعی متناسب است یا خیر. تصویر نمودار احتمال طبیعی توزیع نرمال داده‌ها بیانگر این موضوع است که داده‌ها دارای یک توزیع طبیعی و متناسب است. نمودار ورسوس فیت نمودار باقیمانده‌ها را بر روی محور y و مقادیر نصب شده را روی محور x ترسیم می‌کند. داده‌های موجود در این نمودار بیانگر وجود خطا در بازه ۰/۰۵- تا ۰/۰۵+ است و داده‌ها در یک محدوده منطقی قرار دارند. نمودار هیستوگرام باقیمانده‌ها توزیع باقی مانده‌ها را برای همه مشاهدات نشان می‌دهد. با استفاده از هیستوگرام، می‌توان داده‌های حاشیه ای دورتر را تعیین کرد. هیستوگرام مقادیر نمونه را به فواصل زیادی تقسیم می‌کند و فرکانس مقادیر داده را در هر بازه با یک نوار نشان می‌دهد.



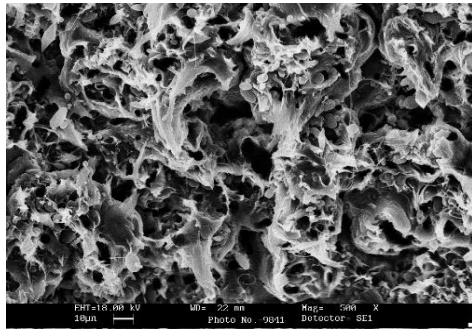
کوچکتر می‌شود. حضور نانوذرات HA در نمونه‌ها باعث عدم توزیع یکنواخت سلول‌های بوجود آمده می‌باشد، به گونه‌ای که در نمونه‌های حاوی ۳٪ نانوذرات HA اندازه قطر سلول افزایش می‌یابد ولی در نمونه‌های حاوی ۵٪ نانوذرات HA اندازه قطر سلول‌ها کاهش می‌یابد. نمونه‌های حاوی ۳٪ نانوذرات HA، مورفولوژی سلول تقریباً یکنواخت‌تر را به همراه دیواره‌های سلول نازکتر و قطر سلولی بزرگتری را در نمونه‌ها نشان می‌دهد.



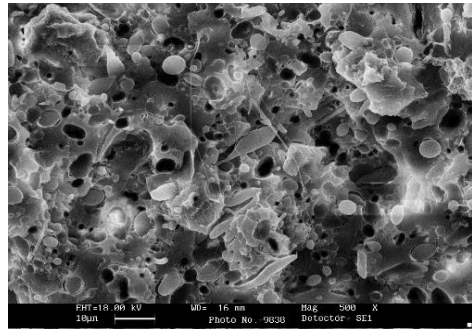
ث) نمونه ۵



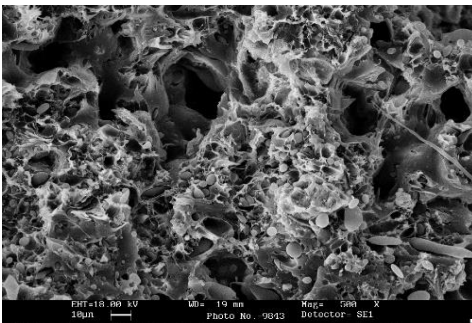
ج) نمونه ۶



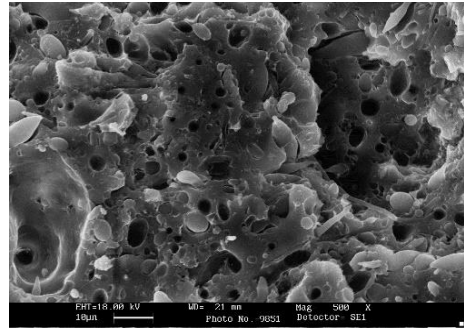
چ) نمونه ۷



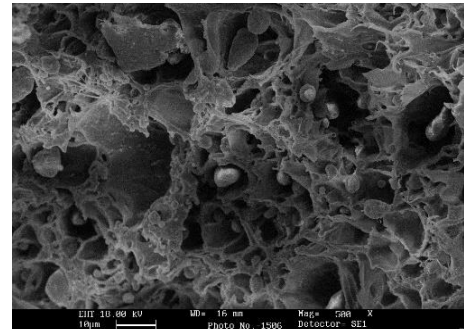
ح) نمونه ۸



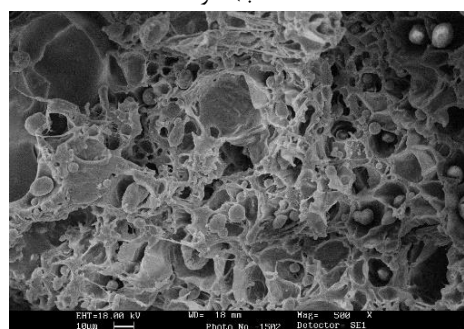
خ) نمونه ۹



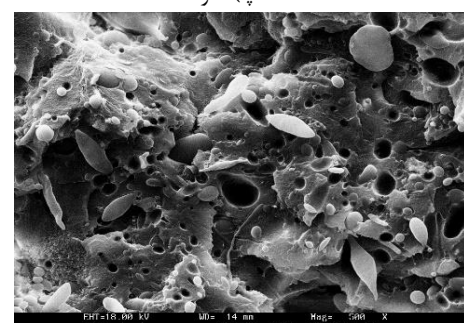
الف) نمونه ۱



ب) نمونه ۲



پ) نمونه ۳



ت) نمونه ۴

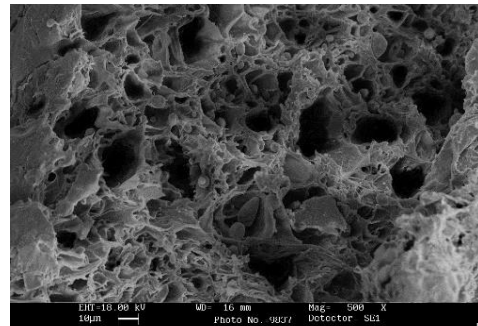
P-Value برابر با ۰/۰۵ و F-Value برابر ۱۴/۰۱ متغیر زمان فوم دارای P-Value برابر با ۰/۰۲۶ و F-Value برابر ۷/۱ و متغیر دمای فوم دارای P-Value برابر با ۰/۱۳۸ و F-Value برابر ۲/۸۱ می‌باشد این اعداد بیانگر تأثیرگذاری بالاتر متغیرهای درصد نانوذرات و زمان فوم نسبت به متغیر دمای فوم است.

جدول ۵ تجزیه و تحلیل واریانس اندازه قطر سلول

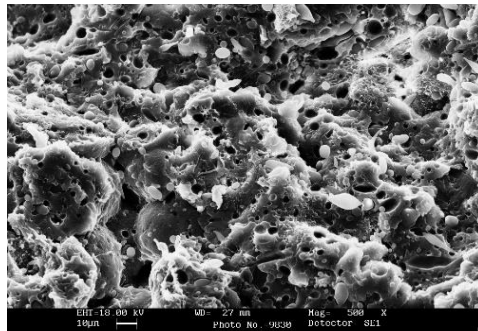
Table 5 Analysis of variance for cell diameter size

P-value	F-value	Adj MS	Adj SS	Seq SS	DF	پارامتر
۰/۰۰۵	۱۴/۰۱	۱۰۱۲/۱۱	۲۰۲۴/۲۲۱۷۴۵/۷۲		۲	درصد نانوذرات
۰/۰۲۶	۷/۱۰	۵۱۳/۰۲	۱۰۲۶/۰۴ ۸۵۱/۹۷		۲	زمان فوم
۰/۱۳۸	۲/۸۱	۲۰۳/۱۹	۴۰۶/۳۸ ۴۰۶/۳۸		۲	دمای فوم
		۷۲/۲۶	۴۳۳/۵۷ ۴۳۳/۵۷		۶	خطا
S = 0.0537585 R		R-Sq = 87.47%		R-Sq(adj) = 74.93%		

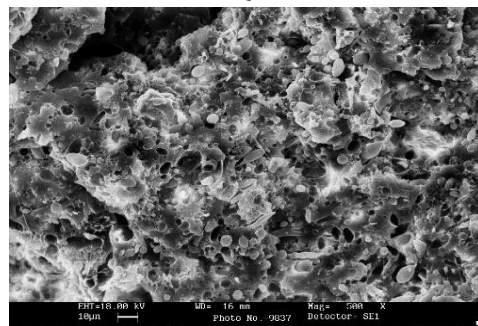
شکل ۷ نتایج اثر متغیرها بر اندازه قطر سلول است. همان‌طور که در شکل مشاهده می‌شود، اندازه قطر سلول در نمونه‌های بدون نانوذرات HA برابر  $10 \mu\text{m}$ ، اندازه قطر سلول در نمونه‌های حاوی ۳٪ نانوذرات HA برابر  $40 \mu\text{m}$  و اندازه قطر سلول در نمونه‌های حاوی ۵٪ نانوذرات HA برابر  $24 \mu\text{m}$  می‌باشد. این اعداد بیانگر بزرگتر بودن اندازه قطر سلول در نمونه‌های حاوی ۳٪ نانوذرات نسبت به نمونه‌های حاوی ۵ درصد نانوذرات و نمونه‌ای فاقد نانوذرات می‌باشد. نانوذرات HA در بستر نانوکامپوزیت به عنوان عاملی پفزا و هسته‌زا عمل کرده است لیکن با افزایش درصد نانوذرات HA در نمونه‌های حاوی ۵٪ نانوذرات HA، سلول‌های ایجاد شده سبب جلوگیری از رشد دیگر سلول‌ها می‌شود. اثر متغیر زمان فوم به این ترتیب است که اندازه قطر سلول در نمونه‌ها با زمان فوم ۵ ثانیه برابر  $15 \mu\text{m}$  در نمونه‌ها با زمان فوم ۳۷/۵ ثانیه برابر  $23 \mu\text{m}$  در نمونه‌های با زمان فوم ۷۰ ثانیه برابر  $39 \mu\text{m}$  است. این اعداد بیانگر این امر است که با افزایش زمان فوم سلول‌ها فرصت رشد، تکثیر و شکل‌گیری پیدا کرده و هر چه این زمان بیشتر شود گازها فرصت خروج و سلول‌ها فرصت گسترش و افزایش قطر را دارند. اثر متغیر دمای فوم بر روی اندازه قطر بدین گونه است که اندازه قطر سلول در نمونه‌ها با دمای فوم  $90^\circ\text{C}$  برابر  $22 \mu\text{m}$ ، نمونه‌ها با دمای فوم  $110^\circ\text{C}$  برابر  $26 \mu\text{m}$  و نمونه‌ها با دمای فوم  $120^\circ\text{C}$  اندازه قطر سلول با اندکی تغییر به  $27 \mu\text{m}$  رسیده است. هر چه میزان دمای فوم بالاتر باشد میزان خروج گاز از درون زمینه بیشتر می‌شود. از این سو می‌توان نتیجه گرفت که با افزایش دمای فوم، اندازه‌ی قطر سلول‌ها را تا حدی می‌توان افزایش داد



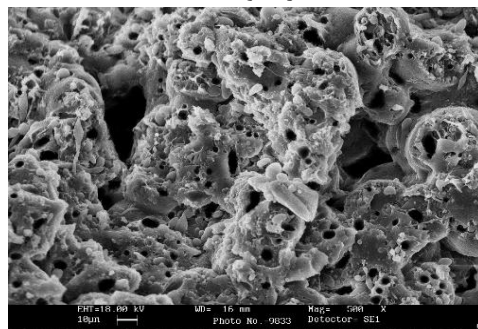
د) نمونه ۱۰



د) نمونه ۱۱



ر) نمونه ۱۲



ز) نمونه ۱۳

Fig. 6 SEM images of foamed samples

شکل ۶ تصاویر SEM نمونه‌های فوم شده

نتایج مربوط به تجزیه و تحلیل آنالیز واریانس اندازه قطر سلول در جدول ۵ آورده شده است. مقادیر P-Value و F-Value نشان دهنده تأثیر گذاری هر پارامتر می‌باشند. سطح معناداری P-Value در این پژوهش کمتر از ۰/۰۵ در نظر گرفته شده است. مقدار P-Value کمتر از ۰/۰۵ نشان‌دهنده موثر بودن آن پارامتر بر روی پاسخ می‌باشد. متغیر درصد نانوذرات HA دارای

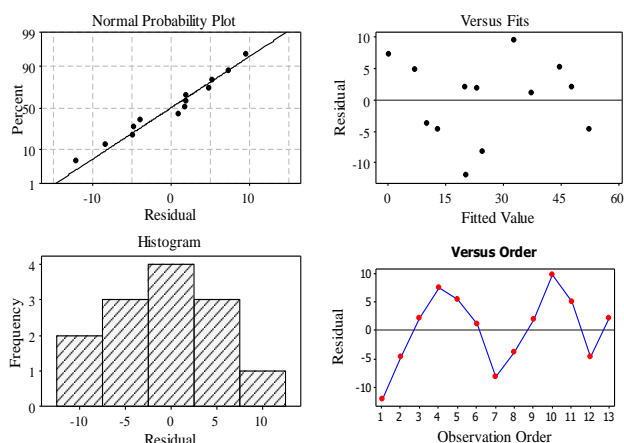


Fig. 8 Diagram of results related to cell size

شکل ۸ نمودار نتایج مربوط به اندازه سلول

تأثیر هر سه پارامتر درصد نانوذرات HA، دمای فوم و زمان فوم بر روی مقادیر چگالی و اندازه قطر سلولی تحلیل و بررسی شد. بررسی نتایج نشان می‌دهد متغیرهای درصد نانوذرات HA و زمان فوم دارای تأثیر گذاری بیشتر در کاهش چگالی و افزایش قطر سلول نسبت به متغیر دمای فوم می‌باشند. نانوذرات HA به عنوان عاملی هسته زا در این نمونه‌ها عمل کرده و باعث افزایش تعداد و قطر سلول‌ها و کاهش چگالی در نمونه‌ها می‌شوند. لیکن مقادیر زیادتر نانوذرات، سبب جمع شدگی ذرات در بستر شده و خواص مطلوب را کاهش دهد. نتایج حاکی از آن بود که با بیشتر شدن زمان فوم میزان چگالی نانوکامپوزیت کاهش و اندازه قطر سلول‌ها افزایش پیدا می‌کند. زمان فوم به سلول‌ها فرصت رشد، تکثیر و شکل گیری می‌دهد و هر چه این میزان بیشتر باشد، گازها فرصت خروج و سلول‌ها فرصت گسترش و افزایش قطر را دارند. با افزایش دمای میزان خروج گاز از درون زمینه بیشتر شده اما این میزان خروج گاز تا دمایی مشخص به یک مقدار ثابت می‌رسد و در دماهای بالاتر از آن دیگر میزان خروج گاز ثابت می‌شود و دیگر تأثیر چندانی بر چگالی و افزایش قطر سلول ندارد. کمترین چگالی مربوط به نمونه‌ی شماره ۲ و ۳ حاوی ۳٪ نانوذرات HA به ترتیب با دمای فوم ۱۱۰ و ۱۲۰°C و زمان فوم ۳۷/۵ ثانیه و بیشترین چگالی مربوط به نمونه شماره ۴ نمونه بدون نانوذرات HA و نمونه شماره ۱۲ حاوی ۵٪ نانوذرات HA با دمای فوم ۱۱۰°C و زمان فوم ۵ ثانیه می‌باشد. بیشترین اندازه قطر سلول مربوط به نمونه‌ی شماره ۲ و ۳ حاوی ۳٪ نانوذرات HA به ترتیب با دمای فوم ۱۱۰ و ۱۲۰°C و زمان فوم ۳۷/۵ و ۷۰ ثانیه با اندازه قطر سلول ۶۳/۴۷ μm و ۴۹/۸۶ μm بوده و کوچکترین اندازه قطر سلول مربوط به نمونه شماره ۴ و ۸، نمونه‌های فاقد نانو ذرات HA به ترتیب با دمای فوم ۱۱۰ و

زیرا هر چقدر دمای فوم شدن بیشتر باشد بدلیل نرم شدن ماده و ریز شدن زنجیره ملکولی میزان نفوذ گاز متغیر است اما این میزان تغییرات تا یک دمای مشخص ثابت می‌ماند و دیگر با افزایش دما تغییر نمی‌کند. از سویی دیگر به هر میزان که دمای فوم افزایش یابد ممکن است قطعه دچار آسیب و اعوجاج شود.

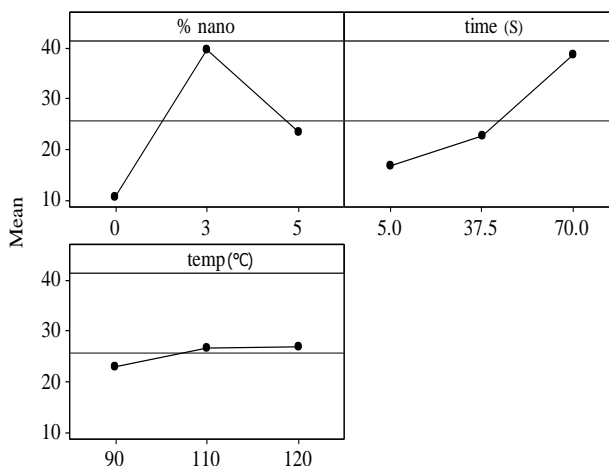


Fig. 7 The effect of parameters on cell size

شکل ۷ تأثیر پارامترها بر اندازه سلول

شکل ۸ نمودارهای مربوط به آنالیز واریانس اندازه قطر سلول می‌باشد. نمودار احتمال طبیعی روشی است که با استفاده از آن می‌توان داده‌ها را با یک توزیع نرمال را بررسی کرد. خط مستقیم در نمودار احتمال طبیعی نشان می‌دهد که داده‌ها با توزیع احتمال طبیعی متناسب است و همان‌طور که از داده‌های نمودار مشهود است داده‌ها دارای یک توزیع نرمال هستند. نمودار ورسوس فیت باقیمانده‌ها را بر روی محور Y و مقادیر نصب شده را روی محور X ترسیم می‌کند و بیانگر وجود خطا در بازه ۱۰- تا ۱۰+ می‌باشد. هیستوگرام مقادیر نمونه را به فواصل زیادی تقسیم می‌کند و فرکانس مقادیر داده را در هر بازه با یک نوار نشان می‌دهد. و می‌توان با استفاده از آن، داده‌های حاشیه‌ای دورتر را تعیین کرد. نمودار هیستوگرام بدست آمده متقارن و دارای شکل زنگوله‌ای است و می‌توان طبیعی بودن آن را پذیرفت.

#### ۴- نتیجه‌گیری

در این پژوهش نمونه‌های نانوکامپوزیتی زمینه PLA/PEG درصد‌های وزنی مختلف نانوذرات HA بوسیله روش ریخته‌گری حلال با کلروفرم، آماده شدند و با استفاده از طراحی آزمایش پاسخ سطح بر مبنای مدل باکس-بنکن مطابق با جدول ۱ به روش توده‌ای با گاز خنثی CO<sub>2</sub> فوم گردیدند.

- [12] H. Jung, M.I. Kettunen, B. Davletov, K.M. Brindle, Detection of apoptosis using the C2A domain of synaptotagmin, *Journal of Bioconjugate Chem*, Vol. 15, pp. 983-987, 2004
- [13] M. Muzaffari, N. Johari, M.H. Fathi, Polycaprolactone-Hydroxyapatite.Composite Scaffold: Investigation of the effect of hydroxyapatite particles and comparison of nanometer and micrometer size particles and their effect on mechanical properties and biodegradability of scaffolding, *Journal of Polymers for Advanced Technologies*, Vol. 31, No. 5, pp. 1019-1026, 2019. (in Persian فارسی)
- [14] E. Pietrzykowska, B. Romelczyk-Baishya, J.Wojnarowicz, Preparation of a Ceramic Matrix Composite Made of Hydroxyapatite Nanoparticles and Poly(lactic acid) by Consolidation of Composite Granules, *Journal of nanomaterials*, Vol. 10, pp. 2079-4991, 2020
- [15] S.R. Motamedian, P. Iranparvar, G. Nahvi, A. Khojasteh, Bone Tissue Engineering: A Literature Review, *Journal of Regeneration, Reconstruction & Restoration*, Vol. 1, No. 3, pp. 103-120, 2016. (in Persian فارسی)
- [16] Ch.S. Wu, Sh.Sh. Wang, D.Y. Wu, W.L. Shih, Novel composite 3D-printed filament made from fish scale-derived hydroxyapatite, eggshell and polylactic acid via a fused fabrication approach, *Journal of Additive Manufacturing*, Volume 46, ISSN 2214-8604, 2021.
- [17] Z.S. Hashemi, M. and Soleimani, Tissue Engineering Scaffolding: History, *Journal of Iranian Anatomical Sciences*, Vol. 9, No. 35, pp. 146-168, 2011. (in Persian فارسی)
- [18] F.R.A. Rose, R.O.C. Oreffo, Bone tissue engineering: hope vs hype, *Journal of Biochemical and Biophysical Research Communications*, Vol. 292, No. 1, pp. 1-7, 2002.
- [19] T.Y. JOUR, D. Mingdong, Eltom. Abdalla, Zh. Gaoyan, M. Ameen, Scaffold Techniques and Designs in Tissue Engineering Functions and Purposes: A Review, *Journal of Advances in Materials Science and Engineering*, Vol. 2019, SN-1687-8434, 2019
- [20] Y.H. Lee, C.W Lee, C.H. Chou, C.H. Lin, Y.H. Chen, C.W. Chen, T.F Way, S.P. Rwei, Sustainable polyamide elastomers from a bio-based dimer diamine for fabricating highly expanded and facily recyclable microcellular foams via supercritical CO<sub>2</sub> foaming, *Journal of European Polymer Journal*, 110765, ISSN 0014-3057, 2021,
- [21] N. Bhattarai, *Bioscaffolds: Fabrication and Performance*, Chapter 7, A. Lakhtakia, R.J. Martín-Palma, *Handbook of Engineered Biomimicry*, Princeton Carter, Elsevier, Pages 161-188, ISBN 9780124159952, Amsterdam, Netherlands 2013.
- [22] A. Montes, C. Pereyra, E.M de la Ossa, Foaming + Impregnation One-Step Process Using Supercritical CO<sub>2</sub>, *Journal of Advanced Supercritical Fluids Technologies*, chapter.9, March 25th 2020.
- ۱۲۰ °C، زمان فوم ۵ و ۳۷/۵ ثانیه با اندازه قطر سلول ۳۵/۷ μm و ۳۲/۶ μm می باشد.
- ### ۵- مراجع
- [1] F. Sadat Fattahi, A. Khoddami and H Izadian, Review on Production, Properties, and Applications of Poly(lactic acid) Fibers, *Journal of Textile Science and Technology*, Department of Textile Engineering, Vol. 5, No. 1, pp. 11-17, 2015. (in Persian فارسی)
- [2] M.R. Rahimi and E. Qasemi Kafrudi, Simulation of degradation reaction of biodegradable polymer polylactic acid in human body, *Journal of modeling in engineering*, Vo. 9 , No. 24, pp. 0-0, 2011. (in Persian فارسی)
- [3] R.B. Bell, C.S Kindsfater, The use of biodegradable plates and screws to stabilize facial fractures, *Journal of Oral Maxillofacial Surg*, Vol. 64, No. 1, pp. 31-39, 2005.
- [4] S.G. Tuttle, S. Chaudhuri, K. M. Kopp-Vaughan, T. R. Jensen, B. M. Cetegen, M. W. Renfro, J. M. Cohen, Lean blowoff behavior of asymmetrically-fueled bluff body-stabilized flames, *Combustion and Flame*, Vol. 160, No. 9, pp. 1677-1692, 2013.
- [5] X. Zhua, T. Zhonga, R. Huang, A. Wanb, Preparation of hydrophilic poly (lactic acid) tissue engineering scaffold via (PLA)-(PLA-b-PEG)-(PEG) solution casting and thermal-induced surface structural transformation, *Journal of Biomaterials Science Polymer Edition*, Vol. 26, No. 17, pp. 1286-1296, 2015.
- [6] M. Baiardo, G. Frisoni, M. Scandola, M. Rimelen, D. Lips, K. Ruffieux, E. Wintermantel, Thermal and Mechanical Properties of Plasticized Poly(L-lactic acid), *Journal of Applied Polymer Science*, Vol. 90, No. 7, pp.1731-1738, 2003.
- [7] V. Guarino, *Properties of biomedical foams for tissue engineering applications, Part II, Tissue engineering applications of biomedical foams*, L. Ambrosio, *Handbook of Woodhead Publishing*, pp. 40-70, Sawston-Cambridge 2014.
- [8] H. Althues, J. Henle, and S. Kaskel, Functional inorganic nanofillers for transparent polymers, *Journal of Chemical Society Reviews*, Vol. 36, pp. 1454-65, 2007.
- [9] S. Wicker, A. Ghamsari, E. Woldeesenbet, syntactic foam; multi-functional composite utilizing carbon nanotubes-ionic liquid hybrid, *Journal of Composites Part B-engineering*, Vol. 67, pp. 1-8, 2014
- [10] F. Koosha, R.H. Muller, S.S. Davis, Polyhydroxybutyrate as a drug carrier, *Journal of Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems*. Vol. 6 pp. 117-130, No.7, 1989.
- [11] M.C. Denis, U. Mahmood, C. Benoist, D. Mathis, R.Weissleder, Imaging inflammation of the pancreatic islets in type 1 diabetes, *Journal of Pro Natl Acad Sci USA*, Vol. 101(34), pp. 12634-12639, 2004.

- Acid/Polyethylene Glycol (PLA/PEG) Porous Scaffold by Supercritical CO<sub>2</sub> Foaming and Particle, *Journal of Polymer Engineering & Science*, Vol. 55, No. 10, pp. 1339-1348, 2015.
- [33] C. Pavia, G. Conoscenti, S. Greco, V. La Carrubba, G. Gherzi, V. Brucato, Preparation, characterization and in vitro test of composites poly-lactic acid/hydroxyapatite scaffolds for bone tissue engineering, *Journal of Biol Macromol*, 2018.
- [34] K. Marycz, A. Smieszek, S. Targonska, S.A. Walsh, K. Szustakiewicz, R.J. Wiglusz, Three dimensional (3D) printed polylactic acid with nano-hydroxyapatite doped with europium(III) ions (nHAp/PLLA@Eu<sup>3+</sup>) composite for osteochondral defect regeneration and theranostics, *Journal of Materials Science and Engineering*, Volume 110, 2020.
- [35] K.K. Kar, *nanocomposites processing, performance and application*, S. Rana, J. Pandey, *Handbook of polymer Julius Springer*, pp. 13-59, Berlin Heidelberg, Switzerland, 2015.
- [36] J.W. Rhim, S.I. Hong, Tensile, water vapor barrier and antimicrobial properties of PLA/nanoclay composite films, *LWT- Food Science and Technology*, Vol. 42, No. 2, pp. 612-617, 2009.
- [37] M. Roohani, Y. Habibi, N.M. Belgacem, G. Ebrahim, G. Karimi, A. Dufresne, Cellulose whiskers reinforced polyvinyl alcohol copolymers nanocomposites, *Journal of European Polymer*, Vol. 44, pp. 2489-2498, 2008
- [38] C. Foresta, P. Chaumont, P. Cassagnau, B. Swoboda, P. Sonntag, Polymer nano-foams for insulating applications prepared from CO<sub>2</sub> foaming, *Journal of Progress in Polymer Science*, Vol. 41, pp. 122-145, 2015.
- [39] H.Y. Mi, X. Jing, M.R. Salick, W.C. Crone, X.F. Peng, L.S. Turng, Approach to Fabricating Thermoplastic Polyurethane Blends and Foams with Tunable Properties by Twin-Screw Extrusion and Microcellular Injection Molding, *Journal of Advances in Polymer Technology*, Vol. 33, No. 1, pp. 21380-21385, 2014.
- [23] J.E. Martini, *The production and Analysis of Microcellular Form*, Ph.D. thesis in Mechanical Engineering, MIT, January 1981.
- [24] P. Macchiarini, P. Jungebluth, T. Go, M. Asnaghi, L. Rees, T. Cogan, Clinical transplantation of a tissue-engineered airway, *Journal of The Lancet*, Vol. 372, No. 8, pp. 2023-2030, 2008.
- [25] L.J. Lee, C. Zeng, X. Cao, X. Han, J. Shen, G. Xu, Polymer nanocomposite foams, *Journal of Composites science and technology*, Vol. 65, pp. 2344-2363, 2005
- [26] L. Chen, D. Rende, L.S. Schadler, R. Ozisik, Polymer nanocomposite foams, *Journal of Materials Chemistry* Vol. 1, pp. 3837-3850, 2013
- [27] G. Ji, W. Zhai, D. Lin, Q. Ren, W. Zheng, D.W. Jung, Microcellular foaming of poly (lactic acid)/silica nanocomposites in compressed CO<sub>2</sub>: Critical influence of crystallite size on cell morphology and foam expansion, *Journal of Industrial & Engineering Chemistry Research*, Vol. 52, No. 19, pp. 6390-6398, 2013
- [28] M. Barmouz, A.H. Behraves, Statistical and experimental investigation on low density microcellular foaming of PLA-TPU/Cellulose nanofiber bio-nanocomposites, *Journal of Polymer Testing*, Vol. 61, pp. 300-313, 2017 (in فارسی)
- [29] Y. Ema, M. Ikeya, M. Okamoto, Foam processing and cellular structure of polylactide-based nanocomposites, *Journal of Polymer*, Vol. 47, pp. 5350-5359, 2006.
- [30] J.D. Kang, D. Xu, Z.X. Zhang, K. Pal, D.S. Bang, J.K. Kim, Well-Controlled Microcellular Biodegradable PLA/Silk Composite Foams Using Supercritical CO<sub>2</sub>, *Journal of Macromolecular Materials and Engineering*, Vol. 294, pp. 620-624, 2009.
- [31] O. Faruk, L.M. Matuana, Effect of gas saturation conditions on the expansion ratio of microcellular poly(lactic acid)/wood-flour, *Journal of Express Polymer Letters*, Vol. 4, No. 10, pp. 621-631, 2010.
- [32] B.Y. Chen, X. Jing, H.Y. Mi, H. Zhao, W.H. Zhang, X.F. Peng, L.S. Turng, Fabrication of Polylactic