

# ایجاد پوشش دولایه nHydroxyapatite/Poly(lactic-co-glycolic)acid بر منیزیم و بررسی خواص

## خوردگی و زیست‌سازگاری

عبودزاده\*، ندا<sup>۲</sup> / محمدی بردیزاده، مینا<sup>۱</sup> / خاوندی، علیرضا<sup>۳</sup> / ایوانی، علیرضا<sup>۴</sup>

۱. دانشجو کارشناسی ارشد دانشکده مهندسی مواد و متالورژی، دانشگاه علم و صنعت ایران، تهران، ایران
۲. دکتری دانشکده مهندسی مواد و متالورژی، دانشگاه علم و صنعت ایران، تهران، ایران
۳. استاد دانشکده مهندسی مواد و متالورژی، دانشگاه علم و صنعت ایران، تهران، ایران
۴. دانشیار دانشکده مهندسی مواد و متالورژی، دانشگاه علم و صنعت ایران، تهران، ایران

### چکیده:

در این تحقیق با هدف کنترل خوردگی و امکان کاربرد کلینیکی منیزیم، پوشش دولایه هیدروکسی‌آپاتیت- پلی‌لاکتیک‌گلایکولیک اسید به ترتیب با روش‌های رسوب دهی الکتریکی و غوطه‌وری بر نمونه منیزیمی اعمال گردید. مشخصه‌یابی پوشش‌ها با کمک پراش پرتو ایکس و میکروسکوپ الکترونی روبشی، نشان دهنده تشکیل یکنواخت پوشش‌ها با ضخامت  $20 - 30 \mu\text{m}$  بر سطح منیزیم است. آزمون الکتروشیمیایی پلاریزاسیون Tafel بر نمونه‌ها نشان داد که با اعمال پوشش دو لایه هیدروکسی‌آپاتیت- پلی‌لاکتیک‌گلایکولیک اسید بر منیزیم، پتانسیل خوردگی از  $1/82 \text{ V}$  به  $1/4 \text{ V}$  افزایش و چگالی جریان خوردگی از  $2/3 \mu\text{A}/\text{cm}^2$  به  $0/37 \mu\text{A}/\text{cm}^2$  کاهش می‌یابد. نتایج آزمون MTT نیز نشان داد که مقدار تکثیر سلولی در مجاورت عصاره ۴۸ ساعته نمونه‌های منیزیمی با پوشش دو لایه بیشتر شده است، که حکایت از کاهش مقدار یون آزاد شده از سطح منیزیم با کمک اعمال این پوشش‌ها است.

**واژه‌های کلیدی:** منیزیم، هیدروکسی‌آپاتیت، پلی‌لاکتیک‌گلایکولیک‌اسید، زیست‌سازگاری، خوردگی

### Preparation of a Bilayer Coating of nHydroxyapatite/Poly(lactic-co-glycolic)acid on Mg and Investigation of Corrosion Properties and Biocompatibility

#### Abstract

In this study, intending to control the corrosion of magnesium and its clinical application, a double-layer coating of Hydroxyapatite- Poly lactic-co-glycolic acid was applied on Mg by means of electrodeposition and dip method, respectively. X-ray diffraction (XRD) and scanning electron microscopy (SEM) are used to characterize the phase and morphology of the coatings. The results show a homogeneous coating with a thickness of  $20-30 \mu\text{m}$ . Potentiodynamic polarization of the samples revealed that the double-layer coating exhibited a significant increase in corrosion potential, ranging from  $-1.82$  to  $-1.4 \text{ V}$ , and a decrease in corrosion current, ranging from  $2.3$  to  $0.37 \mu\text{A}/\text{cm}^2$ . Moreover, the MTT assay of the samples revealed that the amount of cell proliferation in the vicinity of the 48-hour extract of magnesium samples with double-layer coating had increased, indicating a decrease in the amount of ions released from the surface of magnesium by applying this coating.

**Keywords:** Magnesium, Hydroxyapatite, Poly lactic-co-glycolic acid, Double-layer coating, Corrosion, Biocompatibility

منیزیم و آلیاژهای آن، به دلیل اینکه چگالی، مدول الاستیک و چقرمگی شکست نزدیک به استخوان دارند و از پدیده‌ی سپر تنشی<sup>۱</sup> و خطر پوکی استخوان جلوگیری می‌کنند، گزینه مناسبی در زمینه تجهیزات ارتوپدی هستند [۱، ۲]. ایمپلنت‌های منیزیمی باید به نحوی مهندسی شوند که در طول مدت زمان ترمیم استخوان (۱۲ تا ۱۸ هفته)، یکپارچگی مکانیکی خود را در بدن حفظ کنند و پس از آن تخریب شوند یا با بافت طبیعی استخوان جایگزین شوند [۲، ۳]. منیزیم و آلیاژهای آن به دلیل فعالیت بالای الکتروشیمیایی و پتانسیل خوردگی کم، مستعد واکنش با یون‌های کلرید در مایعات بدن هستند، در نتیجه سرعت تخریب بالایی در پلاسمای خون و مایعات بدن دارد، لذا ممکن است در طول درمان، خواص مکانیکی آن تحلیل رود [۲، ۴، ۵]. از جمله تمهیداتی که برای کنترل نرخ خوردگی منیزیم و در نتیجه بهبود زیست‌سازگاری آن در نظر گرفته شده است، خالص‌سازی [۶]، آلیاژسازی و پوشش‌دهی سطح [۷] است. از این میان، اصلاح سطح و نشانیدن پوشش بر منیزیم و آلیاژهای آن یکی از ساده‌ترین و کاربردی‌ترین روش‌ها برای کاهش تماس آن با محیط خورنده و در نتیجه کاهش سرعت تخریب اولیه آن است که در سال‌های اخیر مورد توجه قرار گرفته است [۸-۱۰].

از بهترین پوشش‌های مورد استفاده برای منیزیم در سال‌های اخیر، بیوسرامیک‌ها و بیوپلیمرها بوده‌اند. اما باید در نظر داشت که هر ماده به تنهایی مجموعه‌ای از جوانب مثبت و منفی دارد. به عنوان مثال بیوسرامیک‌های کلسیم فسفاتی که معروف‌ترین فاز آن هیدروکسی آپاتیت است [۱۱]، سازگاری سلولی بالایی دارد و باعث تحریک تشکیل استخوان جدید می‌شود [۱۲]. همچنین این ماده پایداری بالایی در محیط‌های فیزیولوژیکی از خود نشان داده و باعث افزایش مقاومت به خوردگی و سایش منیزیم و آلیاژهای آن شده است [۱۳، ۱۴]. لیکن این ماده با چالش‌هایی روبرو است: از جمله اینکه بسیار ترد و شکننده است و تحت تنش‌های مکانیکی تغییر شکل پلاستیک کمی از خود نشان می‌دهد که در نتیجه زمانی که فشار مکانیکی قابل توجهی در طی عملیات جراحی و یا پس از کاشت بر روی ایمپلنت ایجاد می‌شود، لایه‌های پوشش کلسیم فسفاتی از جمله HA که بر روی آن نشانده شده است، به شدت در معرض ترک خوردگی قرار می‌گیرند [۱۵]. در این مسیر، استفاده از بیوپلیمرهای زیست‌تخریب‌پذیر، از جمله پلی L-لاکتید اسید (PLLA)، پلی لاکتید گلایکولید اسید (PLGA) و پلی کاپرولاکتون (PCL)، به تنهایی به عنوان پوشش نیز مزایا و معایبی وجود دارد، از جمله اینکه، برخلاف سرامیک‌های کلسیم فسفاتی مانند HA، انعطاف‌پذیری بالایی دارند و فشارهای مکانیکی اعمال شده بر ایمپلنت فلزی را بهتر تحمل می‌کنند [۱۶]. لیکن اغلب به دلیل چسبندگی و پیوند نسبتاً ضعیف بین پوشش پلیمری و ایمپلنت‌های منیزیمی، جدایش لایه‌ای در سطح ایمپلنت اتفاق می‌افتد و این موضوع باعث می‌شود این ایمپلنت‌ها در برابر خوردگی تهاجمی محافظت نشوند [۱۷]. بنابراین برای کنترل موفقیت‌آمیز تخریب منیزیم و افزایش زیست‌سازگاری و زیست‌فعالی آن باید بر چالش‌های عیوب پوششی غلبه کرد. به همین دلیل پوشش‌های دولایه و یا کامپوزیتی سرامیک-پلیمر روی آلیاژهای منیزیم توصیه شده‌اند که هم زیست‌فعالی عالی سرامیک‌ها و هم انعطاف‌پذیری بالای پلیمرها را به همراه دارند.

تحقیقات کمی در زمینه پوشش‌های دو لایه بر منیزیم انجام شده است، به عنوان مثال، در تحقیق انجام شده توسط دیاز و همکاران [۱۸] پوشش دولایه HA/PLLA بر زیرلایه WE43 به روش ابتدا مستقیم با واکنش شیمیایی برای HA و سپس غوطه‌وری برای PLLA ایجاد گردید، نتایج تحقیق آنها نشان داد مقاومت خوردگی بهتری با ایجاد پوشش حاصل گردید. همچنین بخششی راد و همکاران [۱۹] نشان دادند پوشش دولایه nHA/PCL ایجاد شده به روش رسوب‌دهی الکترونیکی و سپس غوطه‌وری، بر Mg-Ca سرعت تخریب را در شرایط آزمایشگاهی کاهش خواهد داد. با این حال، مطالعات کمی در مورد اصلاح سطح آلیاژهای

<sup>۱</sup> Stress shielding

منیزیم توسط پوشش دولایه سرامیک- پلیمر، به ویژه پوشش دهی شده به روش رسوب دهی الکتروشیمیایی گزارش شده است. روش رسوب دهی الکتریکی دارای مزایای منحصر به فردی است، که از آن جمله می توان به امکان تشکیل یک پوشش یکنواخت بر روی یک بستر متخلخل یا پوششی با شکل پیچیده، که در ایمپلنت های بیومتریال رایج است، اشاره کرد. علاوه بر این، کنترل ضخامت و ترکیب شیمیایی پوشش با تنظیم پارامترها از دیگر مزایای این روش است. در این پژوهش، یک پوشش دولایه nHA-PLGA بر روی منیزیم خالص ایجاد گردید تا پوشش بهتری در مقایسه با پوشش nHA یا پوشش PLGA به تنهایی، باشد. PLGA با این امید انتخاب شد که ساختار یکنواخت آن می تواند به حفظ یکپارچگی پوشش HA برای مدت طولانی تری کمک کند. در مقابل HA می تواند از تماس مستقیم PLGA و زیرلایه منیزیمی و در نتیجه تعامل منفی آن ها جلوگیری کند. علاوه بر این PLGA با زیست سازگاری خوب باعث می شود این پوشش ترکیبی یک حامل دارویی امیدوارکننده نیز باشد. بنابراین هدف از این کار کاهش سرعت تخریب منیزیم و افزایش زیست سازگاری آن با ایجاد پوشش دولایه nHA-PLGA از طریق روش رسوب دهی الکتریکی پالسی و سپس غوطه وری در محلول پلیمری است.

## ۲- مواد و روش تحقیق

### ۲-۱- آماده سازی نمونه

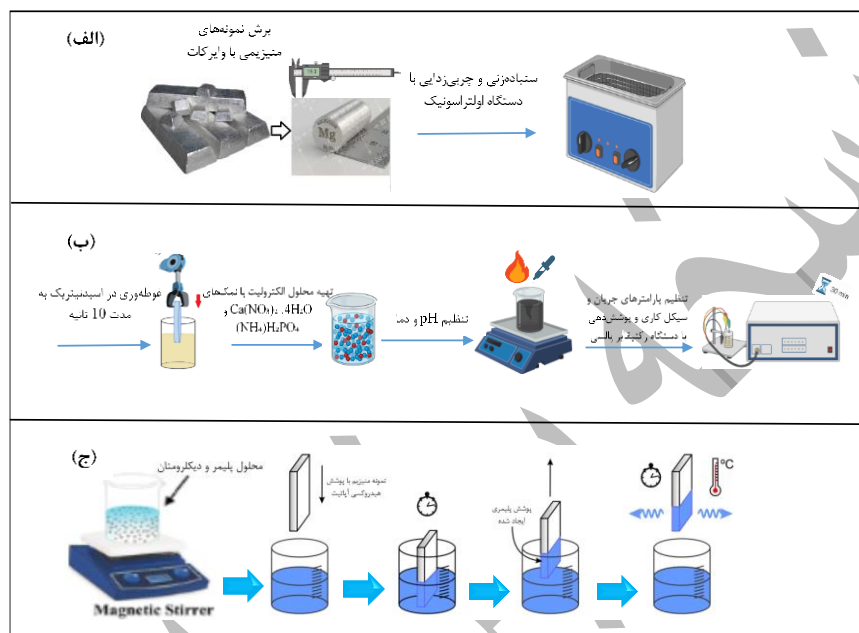
مراحل مختلف اعمال پوشش در شکل ۱ به طور شماتیک نشان داده شده است. ابتدا نمونه های منیزیم خالص به شکل استوانه با قطر ۱۰ میلی متر و ضخامت ۱۰ میلی متر، با کمک دستگاه وایرکات برش داده شد و توسط سمباده از جنس SiC از ۴۰۰ تا ۱۲۰۰ سمباده زنی شد. جهت چربی زدایی از سطح به مدت ۳ دقیقه در استون توسط دستگاه اولتراسونیک شسته شد. در مرحله بعد نمونه ها به مدت ۱۰ ثانیه در محلول اسید نیتریک ( $HNO_3$ ) جهت فعال سازی سطح، غوطه ور شدند. در پایان نمونه ها با آب مقطر شسته و خشک شدند.

### ۲-۲- اعمال پوشش هیدروکسی آپاتیت به روش رسوب دهی الکتریکی پالسی

جهت ایجاد پوشش nHA بر نمونه های منیزیمی آماده شده، ابتدا الکترولیت تهیه شد. بدین منظور، مقدار  $0.025 \text{ mol/l}$  از نمک  $NH_4H_2PO_4$  به عنوان منبع فسفر و مقدار  $0.042 \text{ mol/l}$  از نمک  $Ca(NO_3)_2 \cdot 4H_2O$  به عنوان منبع تامین کننده کلسیم به آب مقطر اضافه گردید. در الکترولیت مذکور از نمک  $NaNO_3$  به عنوان عامل رسانا در الکترولیت استفاده شد و pH محلول نهایی نیز با استفاده از دستگاه pH متر و با افزودن آمونیاک و اسید نیتریک رقیق بر عدد ۵ تنظیم گردید. چگالی جریان، سیکل کاری و زمان آبکاری به ترتیب ۴۰ میلی آمپر بر سانتیمتر مربع، ۰/۱ و ۱۰ میلی ثانیه تنظیم شد. برای ایجاد پوشش از دستگاه رکتیفایر پالسی مدل SL10/120PRCT استفاده شد. الکترودهای گرافیتی به قطب آند و نمونه بدون پوشش به قطب کاتد دستگاه متصل شده و در محلول الکترولیت در دمای ۷۵ درجه سانتیگراد و به مدت ۳۰ دقیقه پوشش دهی انجام شد. در حین فرآیند پوشش دهی از یک همزن مغناطیسی و حمام آب جهت یکنواختی محلول و دمای آن استفاده شد. پس از اتمام عملیات پوشش دهی، نمونه ها از داخل محلول خارج، با آب مقطر شسته و به مدت ۲۴ ساعت در هوا خشک شدند.

### ۳-۲- اعمال پوشش پلیمری به روش غوطه‌وری

جهت ایجاد پوشش پلیمری بر نمونه‌های پوشش داده شده در مرحله قبل، پلی لاکتید گلایکولید اسید (PLGA) با وزن مولکولی ۶۰۰۰۰-۳۰۰۰۰ (ساخت شرکت سیگما) در دی‌کلرومتان با غلظت ۱۰ درصد حل شد. نمونه‌های با پوشش هیدروکسی‌آپاتیت (Mg-H)، در محلول پلیمری ذکر شده در دمای اتاق و به مدت یک دقیقه غوطه‌ور شدند و سپس خارج شده و در دمای اتاق خشک شدند و بدین ترتیب نمونه‌های (Mg-HPL) تهیه شدند.



شکل ۱- شماتیکی از مراحل مختلف پوشش دهی (الف) آماده سازی نمونه (ب) ایجاد پوشش nHA (ج) ایجاد پوشش PLGA

### ۲-۴- مشخصه‌یابی نمونه های منیزیمی پوشش داده شده

#### ۲-۴-۱- آنالیز ساختاری

فاز یابی پوشش با روش تکنیک پراش پرتو ایکس (XRD) و با استفاده از دستگاه X'Pert PRO MPD انجام گرفت. مورفولوژی سطح، ضخامت و ترکیب عناصر موجود در نمونه‌های پوشش‌دار، با بکارگیری دستگاه میکروسکوپ الکترونی روبشی (SEM: TESCAN VEGA Czech) با ولتاژ شتاب‌دهنده ۳۰ kV که مجهز به طیف‌سنجی پراش انرژی اشعه ایکس نیز بود، انجام گردید.

#### ۲-۴-۲- آنالیز خوردگی

جهت بررسی و مقایسه رفتار خوردگی پوشش‌ها و نمونه بدون پوشش، از روش پولاریزاسیون پتانسیودینامیکی استفاده شد. این آزمایش در محلول شبیه‌سازی شده بدن (SBF) تهیه‌شده طبق روش کوکوبو انجام شد. برای این منظور یک سیستم سه الکترودی مرسوم به کار گرفته شد. در این سیستم کالومل اشباع (SCE) به عنوان الکترود مرجع، پلاتین به عنوان الکترود کمکی و نمونه مورد بررسی به عنوان الکترود کاری، مورد استفاده قرار گرفت. پولاریزاسیون پتانسیودینامیک برای نمونه‌های پوشش‌دار و بدون پوشش در نرخ روبش ۱ میلی ولت بر ثانیه و در محدوده پتانسیل ۲۰۰- تا +۵۰۰ میلی ولت نسبت به پتانسیل مدار باز (OCP)، انجام گرفت. و در انتها چگالی جریان و پتانسیل خوردگی و شیب‌های تافل آندی و کاتدی، از منحنی‌های پولاریزاسیون بدست آمد.

## ۲-۴-۳- آنالیز سمیت سلولی

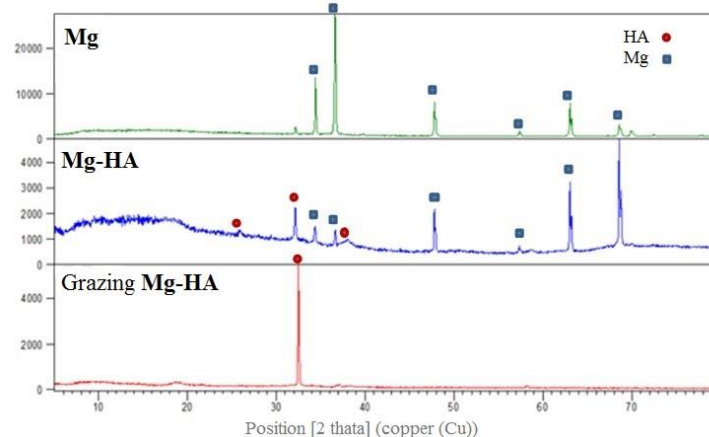
برای بررسی سمیت نمونه‌ها، روش غیر مستقیم عصاره‌گیری انتخاب شد. فرآیند عصاره‌گیری بر اساس استاندارد ISO-۱۰۹۹۳ ۱۲ انجام شد که طی آن ابتدا نمونه‌ها با استفاده از اتوکلاو استریل شده و سپس هر نمونه به طور جداگانه در محیط کشت DMEM با گلوکز بالا همراه با ۱۰٪ سرم جنین گاوی (FBS; Gibco) اضافه شد و سپس در فاصله زمانی ۴۸ ساعت محیط خارج و نگهداری شد. در ادامه سلول‌های MC3T3 به مدت ۲۴ ساعت در محیط‌های کشت سلولی کشت داده شدند و محیط آن‌ها با عصاره‌ها جایگزین شد و ۲۴ ساعت در انکوباتور قرار داده شدند. چاهک‌های بدون عصاره به عنوان کنترل در نظر گرفته شدند. بعد از گذشت مدت مشخص شده محیط کشت خارج شد و ۱۰۰ میکرولیتر MTT با غلظت ۰/۵ میلی گرم بر میلی لیتر در هر چاهک ریخته شد و مجدداً به مدت ۴ ساعت در انکوباتور قرار داده شد. پس از گذشت ۴ ساعت، محلول روی سلول‌ها خارج و ایزوپروپانول به آنها اضافه شد تا بلورهای بنفش رنگ ایجاد شده حل شوند. جهت انحلال بهتر رسوب MTT، پلیت به مدت ۱۵ دقیقه روی دستگاه مخلوط کن قرار گرفت. سپس مقدار غلظت ماده حل شده در ایزوپروپانول با استفاده از دستگاه الیزاریدر در طول موج ۵۷۰ نانومتر محاسبه شد. تست برای هر نمونه سه بار تکرار شد. با کمک رابطه زیر میزان سمیت و توانایی زندگی سلول‌ها در مجاورت عصاره نمونه‌های تهیه شده محاسبه و با نمونه شاهد مقایسه گردید.

$$\text{cell viability} = \frac{\text{OD sample}}{\text{OD control}} \times 100$$

## ۳- نتایج و بحث

### ۳-۱- آنالیز ساختاری

الگوی پراش پرتو ایکس (XRD) منیزیم خالص و سطح پوشش هیدروکسی آپاتیت روی نمونه منیزیمی به روش رسوبدهی الکتریکی پالسی در شکل ۲ نشان داده شده است و نشانگر حضور HA بر زیر لایه منیزیم خالص است. همانگونه که مشاهده می‌شود، به دلیل تداخل و ضخامت اندک پوشش، پیک‌های مربوط به منیزیم در الگوی آنالیز نمونه پس از پوشش هم ظاهر شده‌است.



شکل ۲- آنالیز پراش اشعه X، مقایسه نمونه‌ی پوشش داده شده با HA و بدون پوشش

در حین رسوب‌دهی الکتریکی و اعمال ولتاژ، واکنش‌های زیر در سطح کاتد (منیزیم) غوطه‌ور در الکترولیت ممکن است رخ دهد [۲۰]، که در نتیجه آنها، pH موضعی الکترولیت در اطراف کاتد افزایش می‌یابد.



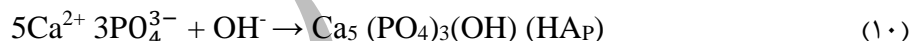
نمک فسفاتی مورد استفاده در الکترولیت نیز با اعمال جریان در آب طی واکنش‌های (۴-۶) تجزیه می‌شود و سبب ایجاد یونهای  $\text{HPO}_4^{2-}$  و  $\text{PO}_4^{3-}$  می‌شود.



افزایش pH اطراف الکترود نیز می‌تواند طی واکنش‌های (۷-۸) نیز منجر به تجزیه نمک فسفاتی در مجاورت الکترود گردد:



در حین رسوب‌دهی، یون‌های موجود در الکترولیت مثل  $\text{Ca}^{2+}$  (که از تجزیه نمک کلسیمی در آب ایجاد شده است) و  $\text{H}^+$ ، به دلیل شیب میدان الکتریکی، به سمت کاتد حرکت می‌کنند، در حالی که یون‌های  $\text{HPO}_4^{2-}$  موجود، به دلیل غلظت متفاوت بین سطح کاتد و الکترولیت بالک، در لایه نفوذ باقی می‌مانند. با افزایش فاصله از سطح الکترود غلظت این یون‌ها ممکن است افزایش یابد. غلظت متفاوت می‌تواند به عنوان نیروی محرکی برای یون‌های  $\text{HPO}_4^{2-}$  عمل کند تا از طریق الکترولیت بالک به سمت لایه نفوذ، انتشار یابد تا به سطح کاتد برسد. یون‌های کلسیم با یون‌های  $\text{HPO}_4^{2-}$  و  $\text{PO}_4^{3-}$  واکنش می‌دهند تا فازهای مختلف کلسیم فسفاتی را تشکیل دهند. مثل OCP، DCPD، HA<sub>P</sub> و TCP [۲۱]

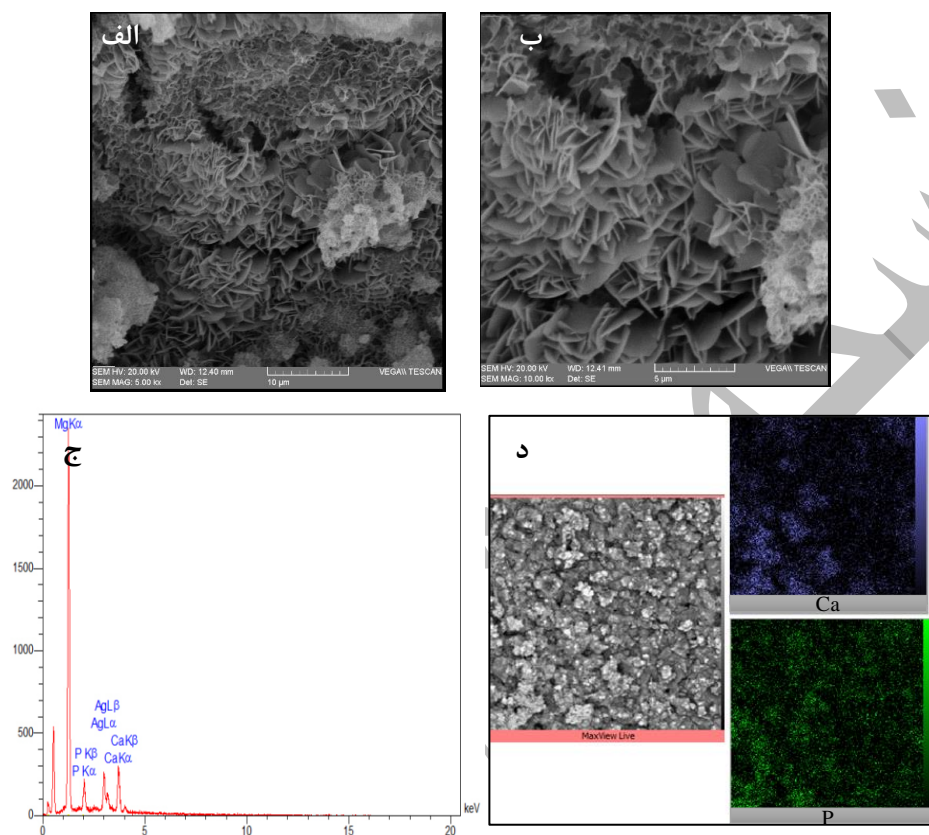


همانگونه که در نتایج حاصل از آنالیز فازی پوشش نشان داده شده است، پارامترهای تعیین شده برای پوشش دهی منتهی به رسوب فاز کلسیم فسفاتی، هیدروکسی آپاتیت بر سطح منیزیم شده است.

ریز ساختار سطح منیزیم با پوشش هیدروکسی آپاتیت و تجزیه عنصری<sup>۲</sup> و نقشه عنصری<sup>۳</sup> آن در شکل ۳ نشان داده شده است. همانطور که مشاهده می‌شود، پوشش دهی به صورت یکنواخت انجام شده و عاری از هرگونه ترک است. تصویرها در شکل ۳ نشان می‌دهند که ساختار پوشش متخلخل با مورفولوژی تیغه‌ای شکل است، که طبق تحقیقات دیگر پژوهشگران مورفولوژی مناسبی

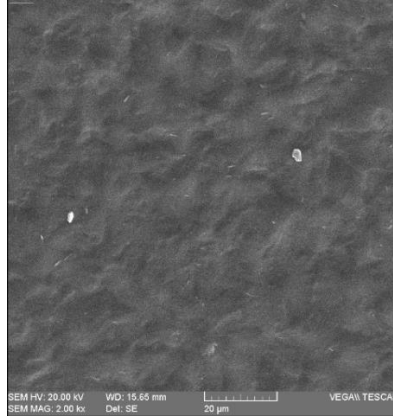
<sup>۲</sup> EDS  
<sup>۳</sup> MAP

جهت رشد استخوان و در نتیجه تسريع بهبود استخوان آسیب‌دیده است [۲۲]. از نتایج آنالیز عنصری (شکل ۳-ج) می‌توان دید که پیک‌های کلسیم، فسفر و اکسیژن که سه عنصر اساسی تشکیل‌دهنده‌ی هیدروکسی‌آپاتیت هستند در ساختار پوشش وجود دارد. شکل ۳-د نیز نشان می‌دهد که توزیع عناصر Ca و P در سطح مورد بررسی یکنواخت است.



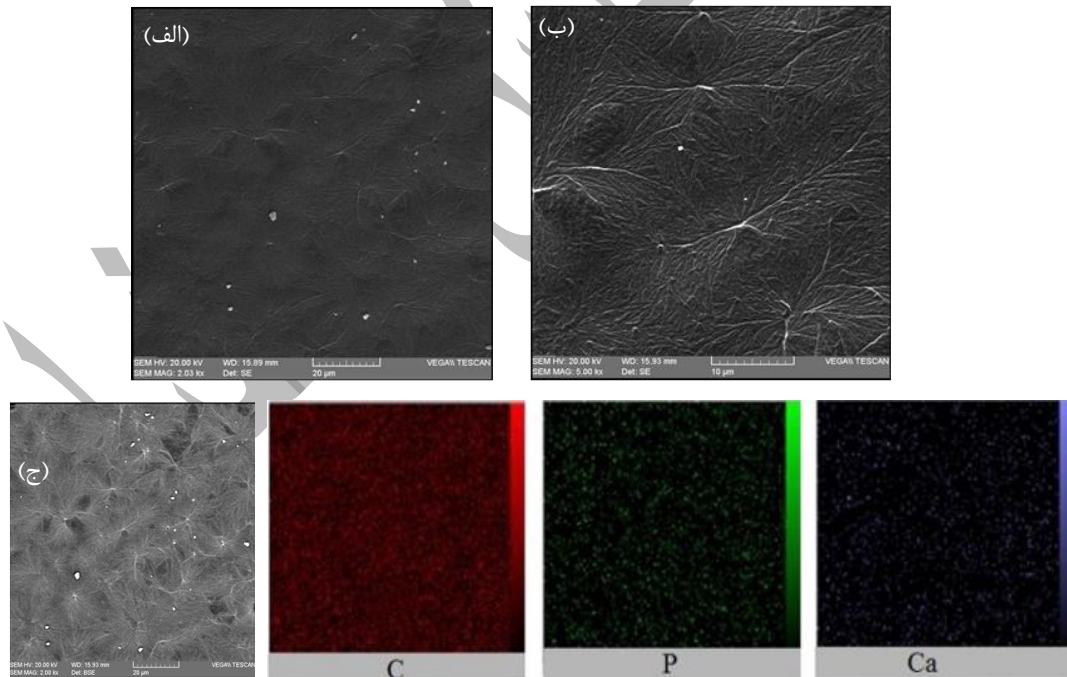
شکل ۳- تصویر SEM از پوشش HA، (الف)  $\times 500$  (ب)  $\times 1000$  (ج) تجزیه عنصری پوشش HA (د) نقشه عنصری پوشش HA

در شکل ۴ ریزساختار سطح منیزیم با پوشش پلیمری نشان داده شده است. همانطور که مشخص است پوشش بدون تخلخل و ترک، کاملاً یکنواخت کل سطح را پوشانده است.



شکل ۴- تصویر SEM از سطح منیزیم با پوشش پلیمری با بزرگنمایی  $200\times$

در شکل ۵ ریزساختار و نقشه عنصری منیزیم با پوشش دولایه سرامیکی-پلیمری آورده شده است. همانطور که مشاهده می‌شود پوشش کاملاً یکنواخت تمام سطح را پوشانده است و پوششی چگال‌تر نسبت به پوشش تک لایه سرامیکی ایجاد می‌شود که باعث می‌شود از تماس با زیرلایه که ممکن بود از طریق تخلخل‌های پوشش هیدروکسی آپاتیت ایجاد شود، جلوگیری کند.

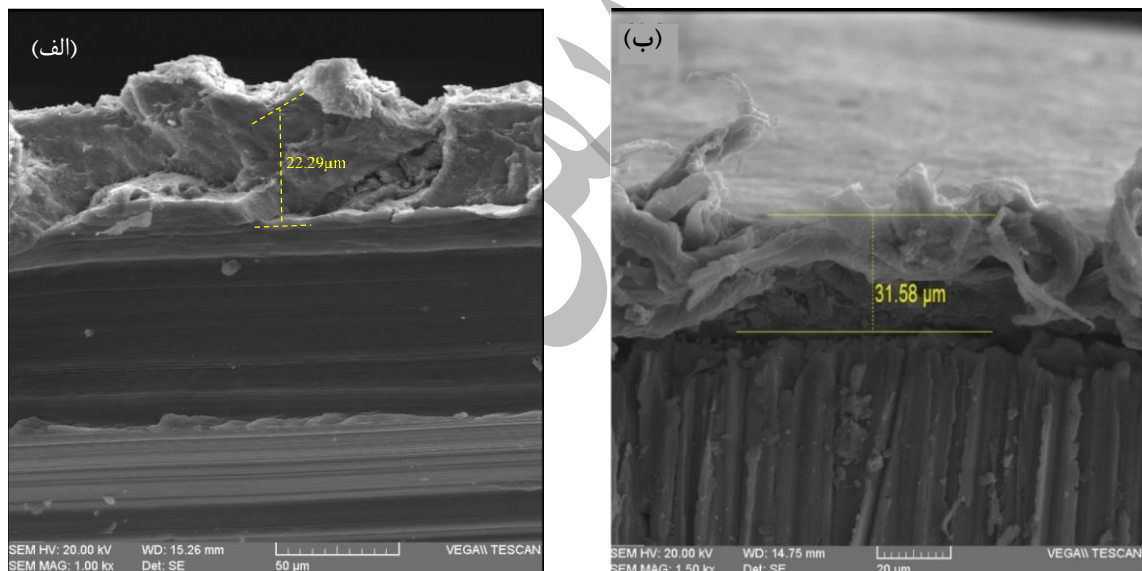


شکل ۵- تصویر SEM از سطح نمونه Mg-HPL با دو بزرگنمایی (الف)  $200\times$  (ب)  $500\times$  (ج) نقشه توزیع عنصری



### ۳-۲- ضخامت پوشش‌ها

شکل ۶ سطح مقطع عرضی نمونه‌های پوشش‌دار Mg-H و Mg-HPL را نشان می‌دهد. ضخامت پوشش بسیار پر اهمیت است و باید حدی بهینه داشته باشد تا علاوه بر کنترل تخریب پذیری زیرلایه و زیست سازگاری آن با بدن، بتواند منجر به اتصال مناسب ایمپلنت با بافت بدن شود [۲۳]. همانطور که در شکل ۶-الف دیده می‌شود میزان ضخامت پوشش HA حدود ۲۲/۲۹ میکرومتر است و چسبندگی یکنواختی با زیرلایه دارد. ضخامت پوشش دولایه سرامیکی-پلیمری نیز حدود ۳۱/۵۸ میکرومتر است که به دلیل برش ایجاد شده با اره، سطح بالای لایه‌ی پلیمری صاف و یکنواخت نیست و جدایشی بین پوشش و سطح مشاهده می‌شود (شکل ۶-ب). همانگونه که مشاهده می‌شود لایه بالایی (پلیمر)، بدون هیچگونه ترک یا لایه‌برداری‌ای کاملاً به لایه زیرین (سرامیک)، چسبیده است که این یک مورد مهم برای بهبود مقاومت به خوردگی زیرلایه است. ثابت شده است که مقاومت به خوردگی از طریق پوشش‌دهی، متناسب با ضخامت پوشش اعمالی است زیرا لایه ضخیم‌تر و فشرده‌تر، محافظت بیشتری از زیرلایه ایجاد می‌کند [۲۴]. در نتیجه در این پژوهش ایجاد لایه پلیمری از خوردگی بیشتر منیزیم در مواجهه با محلول حاوی کلر جلوگیری می‌کند.

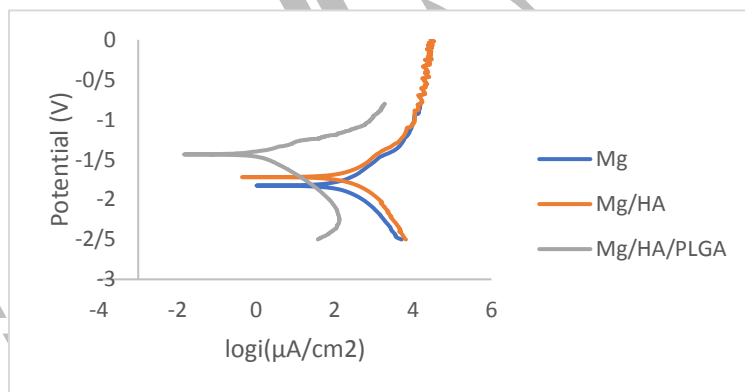


شکل ۶- سطح مقطع عرضی نمونه‌های (الف) Mg-H و (ب) Mg-HPL

### ۳-۳- ارزیابی رفتار خوردگی

نمونه‌های پولاریزا سیون پتانسیودینامیکی نمونه‌های Mg، Mg-H و Mg-HPL در محلول SBF در شکل ۶ مشاهده می‌شود. مقادیر چگالی جریان خوردگی و پتانسیل خوردگی نمونه‌ها در محلول SBF که به کمک نمودارهای پولاریزا سیون و روش برون یابی تافل تعیین شده در جدول ۱ ارائه شده است. با مقایسه رفتار خوردگی منیزیم با نمونه‌های پوشش داده شده با هیدروکسی‌آپاتیت و پلیمر، مشاهده می‌شود که چگالی جریان خوردگی منیزیم در محلول SBF بیشتر از منیزیم با پوشش

هیدروکسی آپاتیت و پوشش دولایه هیدروکسی آپاتیت و پلیمر به ترتیب است. مقایسه شاخه آندی نمودار پلاریزاسیون نمونه Mg-HPL با نمونه های Mg و Mg-H نشان دهنده افزایش آهسته تر و یکنواخت تر دانسیته جریان خوردگی از پتانسیل آزاد جریان خوردگی ( $E_{corr}$ ) هست، همچنین تغییر شیب اتفاق افتاده در پتانسیل  $-1/37 \text{ V vs. SCE}$  در نمونه Mg-H نشان دهنده شکسته شدن پوشش هیدروکسی آپاتیت است در حالیکه که با اعمال پوشش ثانویه پلیمری بر روی آن، از این اتفاق جلوگیری شده است و شیب یکنواخت تری را شاهد هستیم. همچنین مقایسه شاخه کاتدی نمونه ها، که نشان دهنده نرخ ایجاد گاز هیدروژن است در نمونه Mg-HPL شیب کمتری نسبت به نمونه های Mg و Mg-H نشان می دهد. در مجموع پوشش پلیمری تأثیر قابل توجهی بر مقاومت خوردگی زیر لایه فلزی با پوشش هیدروکسی آپاتیت داشته است و چگالی جریان خوردگی زیر لایه فلزی، با پوشش هیدروکسی آپاتیت و پوشش دولایه هیدروکسی آپاتیت/پلیمر به ترتیب در محلول کاهش یافته است. در واقع جریان خوردگی نمونه بدون پوشش  $2/3 \mu\text{A}/\text{cm}^2$  است که با اعمال پوشش سرامیکی به  $2/19 \mu\text{A}/\text{cm}^2$  و در نهایت با پوشش دولایه سرامیکی-پلیمری به  $0/37 \mu\text{A}/\text{cm}^2$  کاهش یافته است. همچنین پتانسیل خوردگی منیزیم بدون پوشش با اعمال پوشش اولیه سرامیکی از  $1/82 \text{ V}$  به  $1/71 \text{ V}$  افزایش یافته است و پس از آن با پوشش دولایه سرامیکی-پلیمری افزایش قابل توجه به  $1/4 \text{ V}$  را داشته است.



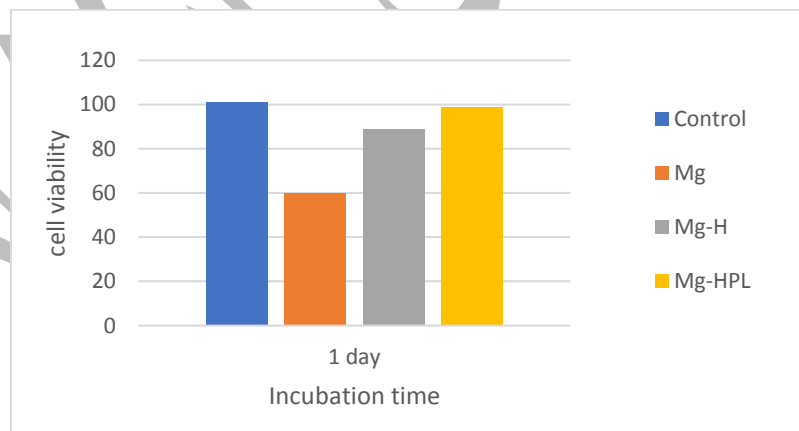
شکل ۷ - نمودار پلاریزاسیون تافل نمونه های فاقد پوشش و پوشش داده شده در محیط شبیه ساز بدن

جدول ۱- نتایج حاصل از منحنی های پلاریزاسیون در ناحیه تافلی

نمونه	دانسیته جریان $i_{corr}(\mu\text{A}/\text{cm}^2)$	پتانسیل خوردگی $E_{corr}(\text{V})$	شیب کاتدی $-\beta_c(\text{V}.\text{dec}^{-1})$	شیب آندی $\beta_a(\text{V}.\text{dec}^{-1})$
Mg	2/3	-1/82	0/39	0/38
Mg-H	2/19	-1/71	0/41	0/39
Mg-HPL	0/37	-1/4	0/37	0/1

### ۳-۴- ارزیابی زیستی

نمودار درصد زنده ماندن سلول برای عصاره نمونه‌های Mg-H, Mg و Mg-HPL بعد از گذشت ۲۴ ساعت نسبت به نمونه‌ی کنترل با سلول‌های استئوبلاست انسانی MC3T3 در شکل ۸ نشان داده شده است. با مقایسه‌ی درصد زنده ماندن سلول‌های زنده نمونه‌ها در زمان‌های مختلف، مشاهده می‌شود که زیست سازگاری منیزیم خالص در زمان ۲۴ ساعت نزدیک ۶۰ درصد، نمونه‌ی با پوشش HA، ۸۹ درصد و نمونه‌ی با پوشش دولایه، ۹۹ درصد است. بر اساس استاندارد ISO-۱۰۹۳۳-۵ اگر درصد زنده ماندن سلول‌ها بالاتر از ۷۰ درصد باشد، ماده قابلیت سمی بودن ندارد و زیست سازگار است. فرآیند خوردگی سریع منیزیم باعث تشکیل هیدروکسید منیزیم می‌شود و pH محیط را از ۸ بالاتر می‌برد که خود مانعی برای چسبندگی و تکثیر سلولی است. در نتیجه، اصلاحات سطحی مانند پوشش دهی با کاهش نرخ خوردگی، انتظار می‌رود که پاسخ سلول را بهبود بخشد [۲۵]. به طور کلی عوامل مختلفی از قبیل مقاومت به خوردگی نمونه در محیط بدن، میزان رهایش عناصر موجود، عدم سمیت عناصر تشکیل دهنده و میزان آبدوست بودن بر میزان زیست سازگاری یک آلیاژ تاثیرگذار است. دلیل افزایش زیست سازگاری نمونه‌های با پوشش HA و HA/PLGA به ترتیب نسبت به نمونه‌ی منیزیم خالص را می‌توان به مورفولوژی متخلخل سطح پوشش و آبدوستی بالا نسبت داد. نتایج زیست سازگاری نمونه‌های Mg-H مطابق با آنچه که شن و همکاران [۲۳] و خو و همکاران [۲۶] هم نشان دادند با حضور HA بهبود یافته است. افزایش زنده ماندن سلول در Mg-H عمدتاً به دلیل پوشش HA بود که می‌تواند به طور قابل توجهی آزاد شدن یون منیزیم را در محیط کشت به تاخیر بیندازد. HA ترکیب شیمیایی و ساختاری مشابه با ترکیب معدنی استخوان طبیعی دارد و از آزاد سازی  $Ca^{2+}$  و  $PO_4^{3-}$  در طول هیدرولیز می‌تواند منجر به تشکیل استخوان جدید گردد. علاوه بر این، یون  $Ca^{2+}$  در سیگنال دهی شیمیایی با سلول‌ها به عنوان عاملی ضروری در نظر گرفته می‌شود. اگرچه HA خاصیت هدایت استخوانی قوی دارد، اما میزان جذب و حل شدن کم آن در داخل بدن و تردی و شکل متخلخل آن مشکل ایجاد می‌کند. با ترکیب HA با پلیمرهای آلی مانند PLGA می‌توان بر این مشکلات غلبه کرد. ترکیب چنین اجزای آلی و غیرآلی یک مسیر مهم و تکاملی برای رشد سطح مشترک آلی-غیرآلی است [۲۷]. این کار را می‌توان مطابق تحقیق حاضر، با اعمال آنها به صورت لایه به لایه انجام داد.



شکل ۸ - درصد زنده ماندن سلول‌های استئوبلاست بر حسب زمان در مجاورت با نمونه‌های کنترل، Mg, Mg-H, Mg-HPL

#### ۴- نتیجه گیری

در این پژوهش، از فلز منیزیم به عنوان زیرلایه استفاده گردید و ابتدا با روش رسوبدهی الکتریکی پالسی لایه‌ی اولیه‌ی پوشش یعنی بیوسرامیک هیدروکسی‌آپاتیت روی زیرلایه نشانده شد و پارامترهای بهینه تعیین گردید و پس از آن برای ایجاد پوشش دولایه‌ی سرامیکی-پلیمری بر روی منیزیم، نمونه پوشش داده شده با HA در محلول ۱۰٪ وزنی پلی لاکتیک گلایکولیک اسید/دی‌کلرومتان غوطه‌ور شد و بدین‌گونه لایه‌ی دوم به روش غوطه‌وری نشانده شد. نمونه‌ها قبل از پوشش‌دهی و در هر مرحله از پوشش، آنالیز فازی و ساختاری شد و مقاومت به خوردگی و زیست‌سازگاری آن‌ها نیز مشخص گردید. و در نهایت نتایج حاصل از این تحقیق را می‌توان به صورت زیر بیان نمود:

- ۱- پوشش بیوسرامیکی هیدروکسی‌آپاتیت به صورت یکنواخت بر روی سطح منیزیم به روش رسوبدهی الکتریکی پالسی ایجاد شد. آنالیز فازی و ریز ساختاری به روش XRD و SEM نشان دهنده تشکیل فاز مناسب HA با مورفولوژی تیغه‌ای بر سطح منیزیم است.
- ۲- پوشش دولایه‌ی سرامیکی-پلیمری بعد از مرحله اول به روش غوطه‌وری اعمال گردید و به کمک SEM ضخامت پوشش‌ها به ترتیب برای پوشش سرامیکی تنها و پوشش دولایه ۲۲/۲۹ و ۳۱/۵۸ میکرومتر تعیین گردید.
- ۳- آزمون پولاریزا سیون جهت ارزیابی مقاومت به خوردگی انجام شد که طبق نتایج اعمال پوشش دولایه سبب بهبود مقاومت به خوردگی منیزیم تا حدود هفت مرتبه گردید.
- ۴- آزمون‌های زیست‌سازگاری انجام شده بر نمونه‌های بدون پوشش و پوشش داده شده نیز نشان می‌دهد که در عصاره تهیه شده از نمونه‌ها سمیتی وجود نداشته و پوشش دولایه نزدیک‌ترین میزان رشد سلولی را به کنترل در طی ۲۴ ساعت زمان آزمایش دارد.

#### مراجع

- [1]J. Chen, Y. Yang, I.P. Etim, L. Tan, K. Yang, R. Misra, J. Wang, X. Su, "Recent advances on development of hydroxyapatite coating on biodegradable magnesium alloys: a review", *Materials*, vol. 14, no. 19, pp. 5550 (2021).
- [2]L. Ling, S. Cai, Q. Li, J. Sun, X. Bao, G. Xu, "Recent advances in hydrothermal modification of calcium phosphorus coating on magnesium alloy", *Journal of Magnesium and Alloys*, vol. 10, no.1, pp. (2021).
- [3]V. Yadav, M. Sankar, L. Pandey, "Coating of bioactive glass on magnesium alloys to improve its degradation behavior: Interfacial aspects", *Journal of Magnesium and Alloys*, vol. 8, no. 4, pp. 999-1015 (2020).
- [4]R. Karunakaran, S. Ortgies, A. Tamayol, F. Bobaru, M.P. Sealy, "Additive manufacturing of magnesium alloys", *Bioactive Materials*, vol. 5, no. 1, pp. 44-54 (2020).
- [5]B.R. Sunil, T.S. Kumar, U. Chakkingal, V. Nandakumar, M. Doble, V.D. Prasad, M. Raghunath, "In vitro and in vivo studies of biodegradable fine grained AZ31 magnesium alloy produced by equal channel angular pressing", *Materials Science and Engineering: C*, vol. 59, pp. 356-367 (2016).
- [6]G. Song, "Control of biodegradation of biocompatible magnesium alloys", *Corrosion science*, vol. 49, no. 4, pp. 1696-1701 (2007).

- [7]C. Blawert, W. Dietzel, E. Ghali, G. Song, "Anodizing treatments for magnesium alloys and their effect on corrosion resistance in various environments", *Advanced Engineering Materials*, vol. 8, no. 6, pp. 511-533 (2006).
- [8]C. Wen, X. Zhan, X. Huang, F. Xu, L. Luo, C. Xia, "Characterization and corrosion properties of hydroxyapatite/graphene oxide bio-composite coating on magnesium alloy by one-step micro-arc oxidation method", *Surface and Coatings Technology*, vol. 317, pp. 125-133 (2017).
- [9]H. Amiri, I. Mohammadi, A. Afshar, "Electrophoretic deposition of nano-zirconia coating on AZ91D magnesium alloy for bio-corrosion control purposes", *Surface and Coatings Technology*, vol. 311, pp. 182-190 (2017).
- [10]W. Liu, Z. Yan, Z. Zhang, Y. Zhang, G. Cai, Z. Li, "Bioactive and anti-corrosive bio-MOF-1 coating on magnesium alloy for bone repair application", *Journal of Alloys and Compounds*, vol. 788, pp. 705-711 (2019).
- [11]M. Razavi, M. Fathi, O. Savabi, S.M. Razavi, B.H. Beni, D. Vashaei, L. Tayebi, "Controlling the degradation rate of bioactive magnesium implants by electrophoretic deposition of akermanite coating", *Ceramics International*, vol. 40, no. 3, pp. 3865-3872 (2014).
- [12]H. Wang, C. Zhao, Y. Chen, J. Li, X. Zhang, "Electrochemical property and in vitro degradation of DCPD-PCL composite coating on the biodegradable Mg-Zn alloy", *Materials Letters*, vol. 68, pp. 435-438 (2012).
- [13]M. Tomozawa, S. Hiromoto, Y. Harada, "Microstructure of hydroxyapatite-coated magnesium prepared in aqueous solution", *Surface and Coatings Technology*, vol. 204, no. 20, pp. 3243-3247 (2010).
- [14]A. Saberi, H.R. Bakhsheshi-Rad, S. Abazari, A.F. Ismail, S. Sharif, S. Ramakrishna, M. Daroonparvar, F. Berto, "A comprehensive review on surface modifications of biodegradable magnesium-based implant alloy: Polymer coatings opportunities and challenges", *Coatings*, vol. 11, no. 7, pp. 747 (2021).
- [15]S.-M. Kim, M.-H. Kang, H.-E. Kim, H.-K. Lim, S.-H. Byun, J.-H. Lee, S.-M. Lee, "Innovative micro-textured hydroxyapatite and poly (l-lactic)-acid polymer composite film as a flexible, corrosion resistant, biocompatible, and bioactive coating for Mg implants", *Materials Science and Engineering: C*, vol. 81, pp. 97-103 (2017).
- [16]Y.F. Zheng, X.N. Gu, F. Witte, "Biodegradable metals", *Materials Science and Engineering: R: Reports*, vol. 77, pp. 1-34 (2014).
- [17]L. Xu, A. Yamamoto, "Characteristics and cytocompatibility of biodegradable polymer film on magnesium by spin coating", *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, vol. 93, pp. 67-74 (2012).
- [18]M. Diez, M.-H. Kang, S.-M. Kim, H.-E. Kim, J. Song, "Hydroxyapatite (HA)/poly-L-lactic acid (PLLA) dual coating on magnesium alloy under deformation for biomedical applications", *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, vol. 2, no. 7, pp. 1-9 (2016).
- [19]H. Bakhsheshi-Rad, E. Hamzah, M. Abdul-Kadir, S.N. Saud, M. Kasiri-Asgarani, R. Ebrahimi-Kahrizangi, "The mechanical properties and corrosion behavior of double-layered nano hydroxyapatite-polymer coating on Mg-Ca alloy", *Journal of Materials Engineering and Performance*, vol. 24, pp. 4010-4021 (2015).
- [20]M.S. Safavi, F.C. Walsh, M.A. Surmeneva, R.A. Surmenev, J. Khalil-Allafi, "Electrodeposited hydroxyapatite-based biocoatings: Recent progress and future challenges", *Coatings*, vol. 11, no. 1, pp. 110 (2021).
- [21]D. Gopi, J. Indira, L. Kavitha, "A comparative study on the direct and pulsed current electrodeposition of hydroxyapatite coatings on surgical grade stainless steel", *Surface and Coatings Technology*, vol. 206, no. 11-12, pp. 2859-2869 (2012).
- [22]J.-H. Park, Y.-K. Lee, K.-M. Kim, K.-N. Kim, "Bioactive calcium phosphate coating prepared on H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-treated titanium substrate by electrodeposition", *Surface and Coatings Technology*, vol. 195, no. 2-3, pp. 252-257 (2005).

- [23]H. Bakhsheshi-Rad, E. Hamzah, A. Ismail, M. Aziz, M. Kasiri-Asgarani, E. Akbari, S. Jabbarzare, A. Najafinezhad, Z. Hadisi, "Synthesis of a novel nanostructured zinc oxide/baghdadite coating on Mg alloy for biomedical application: In-vitro degradation behavior and antibacterial activities", *Ceramics International*, vol. 43, no. 17, pp. 14842-14850 (2017).
- [24]X. Gu, W. Zheng, Y. Cheng, Y. Zheng, "A study on alkaline heat treated Mg–Ca alloy for the control of the biocorrosion rate", *Acta biomaterialia*, vol. 5, no. 7, pp. 2790-2799 (2009).
- [25]A. Nikbakht, C. Dehghanian, R. Parichehr, "Silane coatings modified with hydroxyapatite nanoparticles to enhance the biocompatibility and corrosion resistance of a magnesium alloy", *RSC advances*, vol. 11 ,no. 42, pp. 26127-26144 (2021).
- [26]L. Xu, F. Pan, G. Yu, L. Yang, E. Zhang, K. Yang, "In vitro and in vivo evaluation of the surface bioactivity of a calcium phosphate coated magnesium alloy", *Biomaterials*, vol. 30, no. 8, pp. 1512-1523 (2009).
- [27]M .Rahman, N.K. Dutta, N. Roy Choudhury, "Magnesium alloys with tunable interfaces as bone implant materials", *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, vol. 8, pp. 564 (2020).