J. of
مجله علوم و فنون هسته اي
شماره ۲۸، صفحات Nuclear Sci. and Tech.
No. 28, pp. 23-27, 2005

اثر دز استريل‌كننده پرتو گاما برخواص سطح فيلم پلي يورتان

نسرين شيخ*
مركز تابش گاما، سازمان انرژي اتمي ايران، صندوق پستي: ۳۴۸۶- ۱۱۳۶۵، تهران - ايران

چكيده: در اين كار پژوهشي اثر روش استريل‌كردن با پرتو گاماي تابنده از راديوايزوتوپ كبالت ۶۰ بر روي ساختار سطح فيلم پلي يورتان و مسموميت سلولي آن بررسي شده است. براي اين منظور، ابتدا نوعي پيش پليمر يورتان از واكنش بين تولوئن دي ايزوسيانات و مخلوط پلي‌ال شامل پلي اتيلن گلايكول/كستراويل (۵۰/۵۰ وزني) تهيّه شد. سپس در اثر واكنش پيش پليمر سنتز شده با رطوبت محيط، فيلمهاي جامدي ساخته شد. اين فيلمها به وسيلة پرتو گاما با دز ۲۵ كيلوگري استريل شدند. ساختار فيزيكي سطح نمونة فيلم پلي يورتان استريل شده به وسيلة ميكروسكوپ الكتروني پويشي (SEM) وارسي و با نمونه استريل نشده مقايسه گرديد. همچنين مسموميت سلولي احتمالي فيلمهاي استريل شده به روش كشت سلّولهاي فيبروبلاست L929 مورد بررسي قرار گرفت و هيچ نشانه‌اي از مسموميت در آنها مشاهده نشد.

واژه هاي كليدي: *استريل‌كردن، پرتو گاما، فيلم پلي يورتان، مسموميت سلولي، سلول فيبروبلاست*

The Effect of Radiosterilization on Surface Properties of Polyurethane Film

N. Sheikh*

Gamma Irradiation Center, AEOI, P. O. Box : 11365-3486, Tehran - Iran

Abstract: In this paper the effect of sterilization method by gamma-ray on structure and cytotoxicity of polyurethane film surface has been investigated. For this purpose reactive urethane prepolymer was synthesized by the reaction between TDI with a mixture of PEG and Castor oil (50/50, w/w). The cured prepolymer films were prepared due to the reaction of reactive prepolymer with air moisture under ambient conditions. The polyurethane films were sterilized by gamma-ray (25 kGy). The surface structure of sterilized polyurethane film was observed by SEM and compared to that of the unsterilized film. Also, the in vitro interaction of fibroblast L929 cells and sterilized polyurethane film was evaluated. Results showed no signs of cell toxicity.

Keywords: ***sterilization, gamma-ray, polyurethane film, cytotoxicity, fibroblast cell***

تاریخ دریافت مقاله: ۱۳۸۱/۹/٤ تاریخ پذیرش مقاله: ۱۳۸۲/٥/٤

*email: nasheikh@aeoi.org.ir

۱- مقدمه

استریل کردن وسایل و مو ۲۳ پزشکي به وسیله پرتودهي، امروز به عنوان روشي مطمئن و صنعتي شناخته شده است که نسبت به روشهاي دیگر مزایایي دارد [۱ و ۲]. از جمله مي‌توان به سادگي عمل، که فقط با متغیّر زمان کنترل مي‌شود، و به نفوذ زیاد پرتو گاما در مادّه که آلودگي میکروبي محصولات پزشکي را درون بسته‌بندي‌ها از بین برده و محصول بسته‌بندي شده نهایي را استریل مي‌کند، اشاره نمود.

در مورد موادّي که کاربرد پزشکي دارند، چون خروج اجزاي مضر و سمّي از درون آنها تحت شرایط کاربرد نباید صورت گیرد، انجام آزمون مسمومیت سلّولي بر روي وسایل و مواد استریل‌شده، به منظور بررسي تأثیر احتمالي روش استریل‌کردن، ضروري است.

از میان مواد سنتزي، پلي یورتان به سبب دارابودن خواص فیزیکي و مکانیکي مطلوب و زیست - سازگاري مناسب، رایج ترین مادّه در کاربردهاي مختلف پزشکي بوده و هست [۳]. در هر صورت، اغلب تحقیقاتي که تا بحال روي این مادّه به انجام رسیده‌اند بیشتر جنبه بررسي اثر پرتو روي خواص مکانیکي این مادّه را داشته‌اند. به همین جهت، در این کار پژوهشي، "اثر پرتو گاما با دز استریل‌کننده" بر مسمومیت سلّولي فیلم یورتان مورد بررسي قرار گرفته است.

۲- مواد و روشها

۲-۱- مواد شیمیایي و محیط کشت

کستر اویل و پلي‌اتیلن گلایکول ۱۰۰۰ (سیگما-آلدریچ) به عنوان پلي‌اُل بکار رفته‌اند. این پلي‌اُل‌ها قبل از بکارگیري، به منظور آبگیري کامل، در دماي ۸۰°C و در خلاء قرار داده شدند. ۲ و ٤ تولوئن دي ایزوسیانات (Riedel de Haen) به همان صورت دریافت شده مورد استفاده قرار گرفت.

سلّولهاي فیبروبلاست تیره سلّولي L-۹۲۹، که از بافت همبند موش تهیّه شده بود، از بانك سلّول انسیتو پاستور ایران دریافت شد. محیط کشت RPMI۱٦٤۰ حاوي ۱۰٪ سرم جنین گاو (FCS)، ۱۰۰ units/mL پنیسیلین و ۱۰۰ µg/mL استرپتومایسین (Gibco BRL Lab.) بود. پس از رشد سلّولها به صورت تك لایه، آنها را توسّط تریپسین برداشته و امولسیون سلّولي با غلظت ٤×۱۰۰ cells/mL تهیّه شده است.

۲-۲- سنتز

سنتز یورتان بر اساس روش پیش پلیمري انجام گرفت. ابتدا دستگاه واکنشگر آماده‌سازي شد. سپس با توجّه به روش محاسبهٔ هم‌ارزي وزني براي مخلوط پلي‌ال و تولوئن دي ایزوسیانات [٤ و ٥]، مقدار۰/۲ هم‌ارز وزني پلي- اُل آبگیري شده (حاوي ٥۰ درصد وزني پلي اتیلن گلایکول و ٥۰ درصد وزني کستر اویل) به واکنشگر وارد و در حالیکه جریان ملایم گاز ازت از آن مي‌گذشت همزني و حرارت‌دهي شد. سپس مقدار ۰/٤ هم‌ارز وزني تولوئن دي ایزوسیانات به مخلوط پلي‌اُل مذاب در حال همزدن افزوده شد. بدین ترتیب، واکنش بین گروههاي هیدروکسیل و مقدار اضافي گروههاي ایزوسیانات در واکنشگر، منجر به تشکیل پیش پلیمر یورتان با گروههاي ایزوسیانات آزاد شد [٦]. به دلیل حساسیت عمل سنتز پیش پلیمر به حرارت، در مدّت پیشرفت واکنش مراقبت شد تا دما تحت کنترل دقیق قرار گیرد. در پایان واکنش، مایعي غلیظ محتوي درصد گروههاي ایزوسیانات آزاد، محاسبه شده بر مبناي هم‌ارزي با NCO آزاد، بدست آمد [٤]. سپس پیش پلیمر سنتز شده تحت فرایند تخلیص قرار گرفت، به این منظور که تولوئن دي ایزوسیانات واکنش

نكرده به روش تبخير لايه نازك از آن خارج شود.

۲-۳- تهيّه فيلم

براي تهيّه فيلم از پيش پليمر سنتز شده، ابتدا پيش پليمر مايع روي سطح شيشه گسترده شد تا به صورت لاية نازك درآيد. اين لايه‌ها به مدّت معيّن ۲۰ روز در شرايط آزمايشگاهي (دماي ۲٤ºC و رطوبت ۵۳%) نگهداري شدند تا لايه پيش پليمر، در اثر واكنش گروههاي ايزوسيانات آزاد با رطوبت هوا، جامد و به فيلم تبديل شود. براي تعيين مدّت لازم واكنش بين تمام گروههاي ايزوسيانات آزاد در پيش پليمر و رطوبت هوا، از طيف‌سنج فروسرخ استفاده شد؛ بدين ترتيب كه لاية نازكي از پيش پليمر بر روي قرص پتاسيوم برمايد گسترده و در شرايط زمايشگاهي (دماي ۲٤ºC و رطوبت ۵%) نگهداشته شد. در بازه‌هاي زماني مشخّص، طيف فروسرخ نمونه تهيّه و مقدار تغييرات حاصل در شدّت جذب گروه NCO (cm^{-1} ۲۲۷۲) نسبت به گروه CH_2 (cm^{-1} ۲۹۲۱) پيگيري شد. ضريب جذب ايزوسيانات از رابطه زير بدست آمد:

Isocyanate index = A(۲۲۷۲ cm^{-1}) / A(۲۹۲۱cm^{-1})

پس از پايان يافتن مدّت نگهداري صفحات شيشه‌اي آغشته با پيش پليمر در شرايط آزمايشگاهي، فيلم بدست آمده از سطح شيشه جدا شد و از آن قرصهايي به قطر ۱۵ mm بريده شدند و تحت پرتودهي گاما با دز ۲۵ كيلوگري قرار گرفته و استريل گرديدند.

۲-٤- بررسي ساختار فيزيكي سطح

به منظور بررسي ساختار ميكروسكوپي، سطح نمونه‌هاي فيلم اوّليه و استريل شده توسّط يك پوشش دهنده پراكنشي با طلا پوشش داده شد، سپس به وسيلة ميكروسكوپ الكتروني (Phillips-XL30) مشاهده و تصويربرداري صورت گرفت.

۲-۵- بررسي مسموميت سلّولي

براي بررسي سمّي‌شدن نمونه فيلم يورتان استريل شده، آزمون كشت سلول بر طبق استاندارد ASTM-F813 انجام گرفت. فيلم يورتان به شكل قرص درون ظرف مشبك قرار گرفت و ۵ mL از امولسيون سلّولي روي سطح آن ريخته و به مدّت ۵ روز در انكوباتور نگهداري شد. علاوه بر نمونه يورتان، نمونه‌هايي از جنس پلي‌استايرن ظروف كشت (TCPS-Nunc) و لاتكس به ترتيب به عنوان كنترل منفي و كنترل مثبت نيز بكار برده شدند. پس از خارج‌كردن نمونه‌ها از انكوباتور، سلّولهاي چسبيده به سطوح پليمري، به وسيلة محلول اتانول تثبيت شدند و رنگ‌آميزي آنها با محلولهاي كريستال ويولت و گيمسا صورت گرفت. براي مشاهده سلّولهاي چسبيده به سطح و چگونگي رشد آنها از نمونه‌هاي آماده شده، توسّط ميكروسكوپ نوري با بزرگنمايي ۲۰۰ تصويربرداري شد.

۳- نتايج و بحث

در اين بررسي، به هنگام سنتز بجز تكپارها (مونومرها) افزودني ديگري بكار برده نشد زيرا محتمل بود كه مواد افزودني با جرم مولكولي كم، به مرور زمان از درون پليمر مهاجرت كرده و باعث كاهش خاصيت زيست- سازگاري آن شوند [۷]. علاوه بر اين، پيش پليمر يورتاني سنتز شده به سبب دارا بودن گروههاي NCO آزاد قادر به واكنش با رطوبت هوا مي‌باشد و محصول واكنش آن، فيلم متخلخل پلي يورتان است. تشكيل تخلخل‌ها به علّت ايجاد گاز CO_2 و خروج آن از درون پليمر است:

$$RNCO + H_2O \rightarrow R\text{-}NH_2 + CO_2\uparrow$$
$$RNCO + R\text{-}NH_2 \rightarrow RNHCONHR$$

(ساز و كار سخت شدن پيش پليمر يورتان با رطوبت)

شكل ۱ سه طيف فروسرخ نمونه را به ترتيب در جهت فلش، مربوط به پيش

پليمر اوّليه، فيلم جامد پس از ۲ روز و فيلم جامد پس از ۱۷ روز نگهداري در شرايط آزمايشگاهي نشان مي‌دهد و مؤيّد كاهش گروه NCO آزاد با گذشت زمان است. در جدول ۱ نيز ضريب جذب گروه ايزوسيانات در زمانهاي مختلف بر طبق نتايج آزمون طيفسنجي فروسرخ داده شده است. مقدار صفر براي ضريب جذب ايزوسيانات نشاندهنده عدم حضور گروه ايزوسيانات آزاد در فيلم تشكيل شده است. اين بررسي نشان داد كه پيش پليمر پس از گذشت ۲ روز سخت و جامد شد ولي چون ضريب جذب گروه ايزوسيانات نسبتاً بزرگ بود (۰/۸۹)، نمونه مدّت طولاني‌تري در شرايط آزمايشگاهي (دماي ۲۴°C و رطوبت ۵۳٪) نگهداشته شد و اندازه‌گيري ادامه يافت تا اين كه علاوه بر جامدشدن فيلم، واكنش گروههاي ايزوسيانات آزاد باقيمانده در آن نيز با رطوبت هوا تكميل شود و فيلم غيرفعّالي از نظر شيميايي بدست آيد. بنابراين براي تهيّه فيلمي عاري از ايزوسيانات آزاد، با توجّه به نتايج بدست آمده، قراردادن لاية نازكي از پيش پليمر در دماي ۲۴°C و رطوبت ۵۳٪ به مدّت ۲۰ روز مناسب تشخيص داده شد.

سرعت واكنش جامدشدن پيش پليمر به نوع مواد اوّليه، رطوبت محيط، حضور يا عدم حضور كاتاليزور و ضخامت لايه پيش پليمر بستگي دارد. در اين بررسي به دليل عدم حضور كاتاليزور، همچنين انجام واكنش در مجاورت رطوبت، به طوري كه در تصوير حاصل از ميكروسكوپ الكتروني (شكل ۲) مشاهده مي‌شود، تخلخلهاي سطح فيلم به تعداد اندك و اندازه كوچكند. تصوير ميكروسكوپ الكتروني از سطح نمونه پرتوديده نيز تغيير محسوسي را در تعداد و اندازه تخلخلها در اثر پرتودهي نشان نمي‌دهد.

در بررسي مناسبت روش استريل‌شدن يك پليمر در اثر پرتو گاما، احتمال آزادشدن مواد سمّي از آن بر اساس نتيجه آزمون مسموميت سلّولي ارزيابي مي‌شود. قبلاً گزارش شده كه پلي‌يورتان پليمري زيست- سازگار است [۸]، بنابراين، بايستي اين پليمر پس از استريل‌شدن در اثر پرتو، به آزمون مسموميت سلّولي پاسخ مناسب دهد تا كاربرد اين روش تأييد گردد. شكلهاي ۳ و ٤ و ۵ تصاوير ميكروسكوپ نوري از سلّولهاي فيبروبلاست را پس از ۵ روز رشد روي سطح نمونه‌هاي كنترل و يورتاني پرتوديده نشان مي‌دهند. اين سلّولها روي كنترل منفي كه

طول موج (cm^{-1})

شكل ۱- طيف فروسرخ لاية پيش پليمر نگهداري شده در شرايط آزمايشگاهي ۱- پيش پليمر اوّليه ۲- فيلم جامد يورتان پس از ۲ روز ۳- فيلم جامد يورتان پس از ۱۷ روز

جدول ۱- تغييرات ضريب جذب گروه ايزوسيانات با زمان براي پيش پليمر در شرايط آزمايشگاهي (۲٤°C و رطوبت ۵۳٪)

زمان (روز)	ضريب جذب گروه ايزوسيانات $A(NCO)/A(CH_2)$
۰	۱/۱۷
۲	۰/۸۹
۳	۰/۷۲
۷	۰/۲۰۰
۱۰	۰/۰۸۷
۱۵	۰/۰۳۳
۱۷	۰/۰۲
۲۰	≈۰

شکل ۲- تصوير ميکروسکوپ الکتروني- سطح فيلم پلي يورتان

شکل ۵- تصوير ميکروسکوپ نوري- پاسخ سلولهاي فيبروبلاست به سطح نمونه پلي‌يورتان پرتوديده

نمونه اي کاملاً سازگار و غيرسمّي است به خوبي چسبيده و رشد و تکثير يافته اند، به طوري که لايه هاي سلّولي به هم پيوسته ايجاد کرده اند (شکل ۳). در حاليکه روي سطح کنترل مثبت فقط تعداد اندکي سلول پوسته شده وجود دارد (شکل ٤) که نشانه مسموميت سلّولي سطح لاتکس است. شکل ٥ سلّولهاي فيبروبلاست رشد يافته روي سطح فيلم يورتان استريل شده با پرتو گاما را نشان مي‌دهد. مشاهده مي‌شود که رفتار سلّولها روي سطح يورتان بسيار شبيه به رفتار آنها روي سطح کنترل منفي است به طوري که سلّولها روي اين سطح چسبيده و رشد يافته اند و کيفيت ريختشناسي طبيعي خود را حفظ کرده اند. اين پاسخ نشاندهنده "سلّول- سازگاري" سطح پلي يورتان پرتو ديده است.

شکل ۳- تصوير ميکروسکوپ نوري- پاسخ سلولهاي فيبروبلاست به سطح نمونه کنترل منفي

٤- نتيجه گيري

در اين بررسي مشخّص شد که تابش پرتو گاما با دز ۲٥ کيلوگري بر فيلم پلي‌يورتان، تأثيري بر ساختار فيزيکي سطح فيلم نداشته و باعث مسموميت سلّولي آن نمي‌شود. بر اساس نتايج حاصل، از جنبه مسموميت سلّولي، استريل‌کردن به وسيلة پرتودهي گاما با اين دز روشي مطمئن و مناسب براي اينگونه فيلمها است.

شکل ٤- تصوير ميکروسکوپ نوري- پاسخ سلولهاي فيبرو بلاست به سطح نمونه کنترل مثبت

References:

1. R. M. Streicher, “Sterilization and long-term aging of medical grade UHMWPE,” Radiat. Phys. Chem., **46**, **4-6**, 893 (1995).

2. Plastics design library, “The effect of sterilization methods on plastics and elastomers,” New York, p. IV (1994).

3. S. Corneillie, P. Lan, E. Schacht, M. Davies, “Polyethylene glycol-containing polyurethanes for biomedical applications,” Polymer International, **46**, 251-259 (1998).

4. E. L. McCaffery, “Laboratory preparation for macromolecular chemistry,” McGraw Hill Inc., New York (1970).

5. D. J. David And H. B. Staley, “Analytical chemistry of the polyurethanes,” Wiley interscience, New York, V. XVI, part III (1969).

6. N. Szycher, “Szycher’s handbook of polyurethanes,” CRC Press, New York (1999).

7. N. Hasirci and A. Burke, “A novel polyurethane film for biomedical use,” Journal of Bioactive and Compatible Polymers, **2**, 131 (1987).

8. D. R. Owen and R. M. Zone, in “Encyclopedia of materials science and engineering,” edited by M. Bever, Pergamon Press, Oxford, **5**, 3799 (1986).