



جمهوری اسلامی ایران  
Islamic Republic of Iran  
سازمان ملی استاندارد ایران

Iranian National Standardization Organization



استاندارد ملی ایران

۹۵۱۵

تجدیدنظر اول

۱۳۹۳

**INSO**

**9515**

**1st.Revision**

**2015**

سایش مواد کاشتنی - ذرات سایشی پلیمر و  
فلز - جداسازی و شناسایی

**Wear of implant materials -  
Polymer and metal wear particles -  
Isolation and characterization**

**ICS: 11.040.20**

## به نام خدا

### آشنایی با سازمان ملی استاندارد ایران

مؤسسه استاندارد و تحقیقات صنعتی ایران به موجب بند یک ماده ۳ قانون اصلاح قوانین و مقررات مؤسسه استاندارد و تحقیقات صنعتی ایران، مصوب بهمن ماه ۱۳۷۱ تنها مرجع رسمی کشور است که وظیفه تعیین، تدوین و نشر استانداردهای ملی (رسمی) ایران را به عهده دارد.

نام موسسه استاندارد و تحقیقات صنعتی ایران به موجب یکصد و پنجاه و دومین جلسه شورای عالی اداری مورخ ۹۰/۶/۲۹ به سازمان ملی استاندارد ایران تغییر و طی نامه شماره ۲۰۶/۳۵۸۳۸ مورخ ۹۰/۷/۲۴ جهت اجرا ابلاغ شده است.

تدوین استاندارد در حوزه های مختلف در کمیسیون های فنی مرکب از کارشناسان سازمان، صاحب نظران مراکز و مؤسسات علمی، پژوهشی، تولیدی و اقتصادی آگاه و مرتبط انجام می شود و کوششی همگام با مصالح ملی و با توجه به شرایط تولیدی، فناوری و تجاری است که از مشارکت آگاهانه و منصفانه صاحبان حق و نفع، شامل تولیدکنندگان، مصرف کنندگان، صادرکنندگان و وارد کنندگان، مراکز علمی و تخصصی، نهادها، سازمان های دولتی و غیر دولتی حاصل می شود. پیش نویس استانداردهای ملی ایران برای نظرخواهی به مراجع ذی نفع و اعضای کمیسیون های فنی مربوط ارسال می شود و پس از دریافت نظرها و پیشنهادات در کمیته ملی مرتبط با آن رشته طرح و در صورت تصویب به عنوان استاندارد ملی (رسمی) ایران چاپ و منتشر می شود.

پیش نویس استانداردهایی که مؤسسات و سازمان های علاقه مند و ذی صلاح نیز با رعایت ضوابط تعیین شده تهیه می کنند در کمیته ملی طرح و بررسی و در صورت تصویب، به عنوان استاندارد ملی ایران چاپ و منتشر می شود. بدین ترتیب، استانداردهایی ملی تلقی می شوند که بر اساس مفاد نوشته شده در استاندارد ملی ایران شماره ۵ تدوین و در کمیته ملی استاندارد مربوط که سازمان ملی استاندارد ایران تشکیل می دهد به تصویب رسیده باشد.

سازمان ملی استاندارد ایران از اعضای اصلی سازمان بین المللی استاندارد (ISO)<sup>۱</sup>، کمیسیون بین المللی الکتروتکنیک (IEC)<sup>۲</sup> و سازمان بین المللی اندازه شناسی قانونی (OIML)<sup>۳</sup> است و به عنوان تنها رابط<sup>۴</sup> کمیسیون کدکس غذایی (CAC)<sup>۵</sup> در کشور فعالیت می کند. در تدوین استانداردهای ملی ایران ضمن توجه به شرایط کلی و نیازمندی های خاص کشور، از آخرین پیشرفت های علمی، فنی و صنعتی جهان و استانداردهای بین المللی بهره گیری می شود.

سازمان ملی استاندارد ایران می تواند با رعایت موازین پیش بینی شده در قانون، برای حمایت از مصرف کنندگان، حفظ سلامت و ایمنی فردی و عمومی، حصول اطمینان از کیفیت محصولات و ملاحظات زیست محیطی و اقتصادی، اجرای بعضی از استانداردهای ملی ایران را برای محصولات تولیدی داخل کشور و/یا اقلام وارداتی، با تصویب شورای عالی استاندارد، اجباری نماید. سازمان می تواند به منظور حفظ بازارهای بین المللی برای محصولات کشور، اجرای استاندارد کالاهای صادراتی و درجه بندی آن را اجباری نماید. همچنین برای اطمینان بخشیدن به استفاده کنندگان از خدمات سازمان ها و مؤسسات فعال در زمینه مشاوره، آموزش، بازرسی، ممیزی و صدور گواهی سیستم های مدیریت کیفیت و مدیریت زیست محیطی، آزمایشگاه ها و مراکز کالیبراسیون (واسنجی) وسایل سنجش، سازمان ملی استاندارد ایران این گونه سازمان ها و مؤسسات را بر اساس ضوابط نظام تأیید صلاحیت ایران ارزیابی می کند و در صورت احراز شرایط لازم، گواهینامه تأیید صلاحیت به آن ها اعطا و بر عملکرد آن ها نظارت می کند. ترویج دستگاه بین المللی یکاها، کالیبراسیون (واسنجی) وسایل سنجش، تعیین عیار فلزات گرانبها و انجام تحقیقات کاربردی برای ارتقای سطح استانداردهای ملی ایران از دیگر وظایف این سازمان است.

1- International Organization for Standardization

2 - International Electrotechnical Commission

3- International Organization of Legal Metrology (Organisation Internationale de Metrologie Legale)

4 - Contact point

5 - Codex Alimentarius Commission

## کمیسیون فنی تدوین استاندارد

### « سایش مواد کاشتنی - ذرات سایشی پلیمر و فلز - جداسازی و شناسایی »

(تجدید نظر اول)

#### رئیس:

دانشگاه صنعتی امیرکبیر

حق بین نظریا، معصومه  
(دکترای مهندسی پزشکی)

#### دبیر:

پژوهشگاه استاندارد - گروه پژوهشی مهندسی پزشکی

فرجی، رحیم  
(فوق لیسانس شیمی تجزیه)

#### اعضا: ( به ترتیب حروف الفبا)

گروه تحقیقاتی صنعتی رنگ امیر کبیر

بزرگی کیسرای، اردلان  
(لیسانس مهندسی شیمی)

پژوهشگاه استاندارد - گروه پژوهشی مهندسی پزشکی

توکلی گلپایگانی، علی  
(دکترای تخصصی مهندسی پزشکی)

گروه تحقیقاتی صنعتی رنگ امیر کبیر

حضر تقلی ثمری، نیما  
(لیسانس مهندسی برق)

شرکت آتیلا ارتوپد

رضائی راد، عارف  
(لیسانس مهندسی صنایع)

پژوهشگاه استاندارد - گروه پژوهشی مکانیک

درایتی، حسین  
(لیسانس مکانیک)

پژوهشگاه استاندارد - گروه پژوهشی مهندسی پزشکی

طیب زاده، سید مجتبی  
(فوق لیسانس مهندسی پزشکی)

مرکز پژوهش متالوژی رازی

عطاریان، میترا  
(فوق لیسانس مهندسی مواد)

شرکت آتیلا ارتوپد

نیکخو، محمد  
(دکتری مهندسی بیو مکانیک)

کارشناس آزاد

محمدپور، محمدحسین

(لیسانس مکانیک)

مرکز پژوهش متالوژی رازی

مولایی، شیوا

(فوق لیسانس مهندسی مواد)

پژوهشگاه استاندارد- گروه پژوهشی مهندسی پزشکی

معینیان، سید شهاب

(فوق لیسانس شیمی)

عضو هیأت علمی دانشگاه شهید بهشتی

نوجه دهیان، هانیه

(دکتری مهندسی پزشکی - بیومواد)

## فهرست مندرجات

صفحه	عنوان
ب	آشنایی با سازمان ملی استاندارد
ج	کمیسیون فنی تدوین استاندارد
و	پیش گفتار
۱	۱ هدف و دامنه کاربرد
۱	۲ اصطلاحات و تعاریف
۲	۳ اصول، واکنشگرها و دستگاه
۲	۳-۱ اصول
۲	۳-۲ واکنشگرها
۲	۳-۳ دستگاهها
۴	۴ روش‌های نمونه برداری و آنالیز ذرات سایشی پلیمر و فلز از نمونه های بافت
۴	۴-۱ ذخیره و آماده سازی نمونه‌ها
۴	۴-۲ روش کار جداسازی ذرات پلیمری
۶	۴-۳ روش جداسازی ذرات فلز
۸	۴-۴ جمع آوری ذرات
۸	۴-۴-۱ ذرات پلی اتیلن
۹	۴-۴-۲ ذرات فلزی
۹	۴-۵ تعیین مشخصات شکل و اندازه ذرات
۹	۴-۵-۱ ذرات پلی اتیلن
۱۰	۴-۵-۲ ذرات فلزی
۱۰	۴-۵-۲-۱ کلیات
۱۰	۴-۵-۲-۲ آنالیز TEM
۱۰	۴-۵-۲-۳ آنالیز SEM
۱۱	۴-۶ شناسایی ذرات
۱۱	۴-۶-۱ ذرات پلی اتیلن
۱۲	۵ روش نمونه برداری و تحلیل ذرات پلیمری و فلزی از روان سازهای شبیه ساز مفصلی
۱۲	۵-۱ کلیات
۱۲	۵-۲-۱ کلیات
۱۲	۵-۲-۲ جذب سرم با هیدروکلریک اسید
۱۲	۵-۲-۳ جذب سرم با سدیم هیدروکسید

۱۳	۴-۲-۵ جمع آوری ذرات
۱۳	۵-۲-۵ تعیین مشخصات شکل و اندازه ذرات
۱۳	۶-۲-۵ تعیین ذرات
۱۳	۳-۵ روش تعیین ذرات فلزی
۱۳	۲-۳-۵ جذب سرم
۱۶	۳-۳-۵ جمع آوری ذرات
۱۶	۴-۳-۵ خصوصیات شکل و اندازه ذرات
۱۶	۱-۴-۳-۵ کلیات
۱۶	۲-۴-۳-۵ آنالیز TEM
۱۶	۳-۴-۳-۵ آنالیز SEM
۱۷	۵-۳-۵ تعیین ذرات فلزی
۱۷	۴-۵ روش تعیین ذرات سرامیکی
۱۷	۶ گزارش آزمون
۱۹	پیوست الف (اطلاعاتی) کتابنامه

## پیش‌گفتار

استاندارد «سایش مواد کاشتنی- ذرات سایشی پلیمر و فلز- جداسازی و شناسایی» نخستین بار در سال ۱۳۸۶ تدوین شد. این استاندارد براساس پیشنهادهای رسیده و بررسی توسط سازمان ملی استاندارد ایران و تایید کمیسیون‌های مربوط برای اولین بار مورد تجدید نظر قرار گرفت و در چهارصد و هفتاد و چهارمین اجلاس کمیته ملی استاندارد مهندسی پزشکی مورخ ۱۳۹۳/۱۱/۰۷، تصویب شد اینک این استاندارد به استناد بند یک ماده ۳ قانون اصلاح قوانین و مقررات استاندارد و تحقیقات صنعتی ایران مصوب بهمن ماه ۱۳۷۱، به عنوان استاندارد ملی ایران منتشر می‌شود.

برای حفظ همگامی و هماهنگی با تحولات و پیشرفت‌های ملی و جهانی در زمینه صنایع، علوم و خدمات، استانداردهای ملی ایران در مواقع لزوم تجدید نظر خواهد شد و هر گونه پیشنهادی که برای اصلاح یا تکمیل این استاندارد ارائه شود، هنگام تجدید نظر در کمیسیون فنی مربوط مورد توجه قرار خواهد گرفت. بنابراین باید همواره از آخرین تجدید نظر استانداردهای ملی ایران استفاده کرد.

این استاندارد جایگزین استاندارد ملی ایران شماره ۹۵۱۵: سال ۱۳۸۶ می‌شود.

منبع و مآخذی که برای تهیه این استاندارد به کار رفته به شرح زیر است:

ISO 17853 :2011, Wear of implant materials — Polymer and metal wear particles - Isolation and characterization

## سایش مواد کاشتنی - ذرات سایشی پلیمر و فلز - جداسازی و شناسایی

### ۱ هدف و دامنه کاربرد

هدف از تدوین این استاندارد، تعیین روش‌های نمونه برداری از ذرات سایشی ایجاد شده در کاشتنی‌های کامل مفصلی انسان و شبیه سازهای مفصلی می‌باشد. این استاندارد، دستگاه‌ها، واکنشگرها و روش‌های آزمون برای جداسازی و شناسایی ذرات سایشی پلیمر و فلز را که از نمونه‌های بریده شده بافت در اطراف کاشتنی مفصلی در عمل اصلاحی یا پس از مرگ بیمار، هم‌چنین از نمونه‌های سیال آزمون شبیه ساز مفصلی بدست آمده‌اند را مشخص می‌کند. برخی از این روش‌ها می‌توانند به طور مشخص برای جداسازی و شناسایی ذرات سایشی حاصل از مایعات بیولوژیکی انسان (به عنوان مثال مربوط به مایع زلالی<sup>۱</sup>) مناسب باشند.

روش‌های ارائه شده در این استاندارد، مقدار کمی سایش ناشی از کاشتنی‌ها را تعیین نمی‌کند و هم‌چنین مقدار سایش هر سطح مشخص را تعیین نمی‌کند. این استاندارد اثرات بیولوژیکی ذرات سایش یا تهیه روشی برای ارزیابی ایمنی بیولوژیکی کاربرد ندارد.

### ۲ اصطلاحات و تعاریف

در این استاندارد، اصطلاحات و تعاریف زیر به کار می‌رود.

۱-۲

#### ذرات سایشی پلیمر<sup>۲</sup>

ذراتی که از سایش اجزاء پلیمری کاشتنی ایجاد می‌شوند.

۲-۲

#### ذرات سایشی فلز

ذرات محصولات ناشی از خوردگی که از سایش اجزاء فلزی یک کاشتنی ایجاد می‌شوند.

۳-۲

#### ذرات سایشی سرامیکی<sup>۳</sup>

ذراتی که از سایش اجزاء سرامیکی کاشتنی ایجاد می‌شوند.

---

1- Synovial fluid  
2- Polymer wear particle  
3- Ceramic wear particle



## ۳ اصول، واکنشگرها و دستگاهها

### ۳-۱ اصول

ذرات سایش پلیمر و فلز با روش جذب از نمونه های بافت و مایعات شبیه ساز جدا می شوند. سپس ذرات حاصله با حذف باقی مانده های آلی، خالص می گردد.

یادآوری- روش های به کار رفته برای جداسازی ذرات پلیمری و فلزی متفاوت بوده و به ترتیب در بندهای ۲-۴ و ۳-۴ توضیح داده شده است.

ذرات جمع آوری شده به وسیله میکروسکوپ الکترونی روبشی (SEM<sup>۱</sup>) و میکروسکوپ الکترونی انتقالی (TEM<sup>۲</sup>) مشخص و تعداد آنها محاسبه می شوند.

### ۳-۲ واکنشگرها

برای آنالیز، تنها از واکنشگرهایی با درجه آنالیز مشخص و آب مقطر یا آبی با درجه خلوص معادل آن استفاده کنید. مگر اینکه به صورت دیگری بیان شده باشد. جهت جلوگیری از آلوده شدن نمونه ها بوسیله ذرات خارجی، همه محلول های واکنشگر باید قبل از استفاده، از صافی با اندازه منفذ  $0.2 \mu\text{m}$  یا کمتر، عبور داده شوند.

#### ۳-۲-۱ الکل مطلق

۳-۲-۲ استون، ۱۰۰ درصد یا با کسر حجمی ۸۰ درصد رقیق شده با آب مقطر.

#### ۳-۲-۳ آب مقطر

۳-۲-۴ تثبیت کننده، برای مثال فرمالین با کسر حجمی ۱۰٪ فرمالین رقیق شده با آب مقطر.

۳-۲-۵ محلول هیدرو کلریک اسید، (HCl)، با غلظت  $1 \text{ mol/l}$ .

۳-۲-۶ مخلوط آب-ایزو پروپانول، با دانسیته  $\rho = 0.96 \text{ g/cm}^3$  و  $\rho = 0.90 \text{ g/cm}^3$ .

۳-۲-۷ محلول پاپاین<sup>۳</sup>،  $4/8$  واحد بر  $1/5 \text{ ml}$  از بافر سدیم فسفات  $250 \text{ mM}$ ، شامل  $25 \text{ mM}$  محلول اتیلن دی آمین تترا استیک اسید (EDTA<sup>۴</sup>)،  $\text{pH} = 7.4$

۳-۲-۸ بافر سدیم فسفات، با غلظت  $250 \text{ mM}$ ، شامل  $25 \text{ mM}$  محلول اتیلن دی آمین تترا استیک اسید (EDTA)،  $\text{pH} = 7.4$

۳-۲-۹ پروتئیناز K،  $2 \text{ g/ml}$  از بافر  $50 \text{ mM}$  (TRIS-HCl<sup>۵</sup>)،  $\text{pH} = 7.6$ .

- 
- 1- Scanning Electron Microscopy
  - 2- Transmission Electron Microscopy
  - 3- Papain solution
  - 4- EthyleneDiamineTetraacetic Acid
  - 5- THAM(Tris hydroxymethyl)aminomethane )

یادآوری- برای ذرات جدا شده از مایع سرم شبیه ساز مفصل، بهتر است مقدار براساس درصد سرم مایع و حجم سرم اولیه از ذراتی که جدا شده‌اند، تنظیم شود. به بند ۵-۳-۲ مراجعه شود.

۳-۲-۱۰ رزین، اپوکسی، نظیر Embed 812.

۳-۲-۱۱ سولفات دودسیل سدیم (SDS)<sup>۱</sup>، ۲/۵ g بر ۱۰۰ ml آب مقطر یا ۳ g بر ۱۰۰ ml از ۸۰٪ استون.

۳-۲-۱۲ سدیم هیدروکسید، NaOH، محلول یا قرص، با غلظت ۵ مولار.

۳-۲-۱۳ محلول‌های قندی، با دانسیته  $۱,۰۲ \text{ g/cm}^3$ ،  $۱,۰۴ \text{ g/cm}^3$ ،  $۱,۰۸ \text{ g/cm}^3$ ،  $۱,۱۷ \text{ g/cm}^3$ ،  $۱,۳۵ \text{ g/cm}^3$ ،  $\rho =$

۳-۲-۱۴ بافر (TRIS-HCl) ۵۰ mM، pH = ۷,۶.

۳-۳ دستگاه‌ها

باید همه دستگاه‌ها تمیز شده و با آب مقطر سه بار شستشو داده شوند. به منظور حذف هر نوع ذره آلودگی این آب باید قبل از استفاده از صافی با اندازه منفذ  $۰,۲ \mu\text{m}$  (به بند ۳-۳-۶ مراجعه شود) یا کمتر، عبور داده شوند.

۳-۳-۱ پایه آلومینیومی<sup>۲</sup>.

۳-۳-۲ ترازو، با دقت ۰/۱ میلی گرم.

۳-۳-۳ کاغذ برچسب کربنی.

۳-۳-۴ لوله‌های دستگاه سانتریفوژ، با اندازه‌های متفاوت.

۳-۳-۵ دستگاه سانتریفوژ.

۳-۳-۶ صافی‌ها، با منفذهایی به اندازه  $۰,۲ \mu\text{m}$ ، برای صاف کردن واکنشگرها و آب مقطر.

۳-۳-۷ واحد فیلتراسیون.

۳-۳-۸ قالب توری با پوشش مسی، با ۲۰۰ سوراخ برای آنالیز TEM.

۳-۳-۹ دستگاه اسپکتروسکوپی مادون قرمز تبدیل فوریه (FTIR).

۳-۳-۱۰ صفحه گرم کن.

۳-۳-۱۱ پارچه بدون پرز.

۳-۳-۱۲ پیپت‌ها، میکروپیپت‌ها و سر آن‌ها<sup>۳</sup>.

---

1- Sodium dodecyl sulfate

2 - Aluminium stub.

3- Tips

۳-۳-۱۳ میکروسکوپ نوری پلاریزه.

۳-۳-۱۴ صافی‌های باغشاء پلی کربنات با منفذهایی به اندازه  $1\mu\text{m}$ ،  $10\mu\text{m}$ ،  $0.1\mu\text{m}$ ،  $0.05\mu\text{m}$  و  $0.15\mu\text{m}$  برای جمع آوری ذرات.

۳-۳-۱۵ میکروسکوپ الکترونی روبشی، SEM، با آنالیز (EDAX<sup>۱</sup>) با انرژی پاشنده اشعه ایکس.

۳-۳-۱۶ ظروف پتری دیش سترون، با درب.

۳-۳-۱۷ سرنگ با سوزن با قطر بزرگ.

۳-۳-۱۸ آسیاب بافت با درب<sup>۲</sup> شیشه-تفلون.

۳-۳-۱۹ میکروسکوپ الکترونی انتقالی، TEM، با آنالیز (EDAX) با انرژی اشعه ایکس پاشنده.

۳-۳-۲۰ جداکننده سلولی اولتراسونیک<sup>۳</sup>، مجهز به پروب تیتانیومی.

۳-۳-۲۱ حمام اولتراسونیک.

۳-۳-۲۲ حمام آب، با همزن کنترل دما.

#### ۴ روش‌های نمونه برداری و آنالیز ذرات سایشی پلیمر و فلز از نمونه های بافت

##### ۴-۱ نگهداری و آماده سازی نمونه‌ها

بافت را به صورت منجمد در فریزر در دمای  $-70^{\circ}\text{C}$  درجه سلسیوس (یا کمتر) یا در دمای اتاق در تثبیت کننده نظیر فرمالین با کسر حجمی ۱۰٪ رقیق شده با آب مقطر نگهداری کنید. در صورت نیاز، قبل از ادامه روش استخراج، بافت را گرم کرده و کاملاً با آب مقطر شستشو دهید. بافت آب کشی شده را توسط پارچه بدون پرز (به بند ۳-۳-۱۱ مراجعه شود) خشک کنید.

با بافت تثبیت نشده تحت شرایط کلی باید کار شود.

در زمان آلودگی باید نوع تجهیزات جراحی استفاده شده برای بازیابی نمونه گزارش داده شود.

یادآوری- به خاطر منشأ نمونه، تنوع نمونه برداری مجاز است.

##### ۴-۲ روش کار جداسازی ذرات پلیمری

۴-۲-۱ جذب بافت، روش‌های زیادی برای جداسازی ذرات پلی اتیلن از بافت اندام‌های مصنوعی وجود دارد. روش‌های ذکر شده در اینجا برپایه منابع ذکر شده در مرجع ۱۰ کتابنامه می‌باشند.

1- Energy Dispersive X-ray Analysis

2- Potter

3- Ultrasonic cell disrupter,

قبل از جذب جهت بالا بردن زمان جذب، با استفاده از چاقوی کوچک جراحی و تیغ، بافت را به تکه های کوچک تری برش دهید، بافت را با قراردادن در مخلوط کلروفورم: متانول (نسبت حجمی ۲:۱) به مدت ۲۴ ساعت یا تا زمانی که بافت غوطه ور شده و به کف ظرف برسد، چربی ها را استخراج کنید. بافت را خارج کرده و با بافر سدیم فسفات، بشوئید.

سدیم هیدروکسید ۵M (به نسبت ده میلی لیتر از سدیم هیدروکسید ۵M به ۱ گرم از بافت) را به بافت اضافه کرده و به مدت ۲۴ ساعت در حمام آب دارای همزن کنترل دما در دمای  $65^{\circ}\text{C}$  قرار دهید تا جذب شود. جذب کامل زمانی صورت می گیرد که ذرات بافت در سوسپانسیون قابل مشاهده نباشد.

#### ۲-۲-۴ خالص سازی باقیمانده ذرات پلیمر

##### ۱-۲-۲-۴ کلیات

ذرات پلیمر می توانند از بافت جذب شده با یکی از روش ها خالص سازی شوند. از روش های توصیف شده در این بندها ۲-۲-۲-۴ یا ۳-۲-۲-۴ استفاده کنید.

#### ۲-۲-۴ خالص سازی ذرات پلیمر به روش سانتریفوژ کردن در سرعت بالا

این روش قادر است تا همه اندازه ذرات را در گستره نانومتر تا چندین میلی متر در طول، حجم سایش کلی ذرات جدا شده را کنترل کند. بافت سرد شده را تا  $4^{\circ}\text{C}$  خنک کنید. حجم معادل آن از الکل مطلق فوق العاده سرد اضافه کنید. در این نقطه نمک ها ممکن است رسوب کنند. در این حالت آب فوق خالص را تا حل شدن کامل نمک ها اضافه کنید. و به مدت یک شب در دمای  $4^{\circ}\text{C}$  در حالت هم زدن در انکوباتور قرار دهید. محلول را در  $20000\text{g}$  در دمای  $4^{\circ}\text{C}$  سانتریفوژ کنید. مایع شناور در سطح محلول را به یک لوله تمیز انتقال دهید و قبل از صاف کردن با  $400\text{ml}$  آب مقطر فوق خالص رقیق کنید.

#### ۳-۲-۲-۴ خالص سازی ذرات پلیمر با سانتریفوژ دور بالا

تقریباً سه چهارم لوله ها را با  $2\text{ml}$  از هر محلول قند با ( $1.02\text{ g/cm}^3$ ،  $1.04\text{ g/cm}^3$ ،  $1.08\text{ g/cm}^3$ ،  $1.17\text{ g/cm}^3$ ) را در لوله های دستگاه سانتریفوژ قرار دهید به طوری که پر شود، و مقدار اندازه گیری شده سوسپانسیون بافت جذب شده را به سطح محلول قندی در هر لوله اضافه کنید. در دمای  $5^{\circ}\text{C}$  به مدت سه ساعت آن ها را تحت نیروی  $100000\text{g}$  در سانتریفوژ دور بالا قرار دهید. لایه بالایی را به دقت درون یک لوله سترون جمع آوری کرده و با آب مقطر  $65^{\circ}\text{C}$  رقیق کنید تا به رقیق شدن محلول قندی باقیمانده کمک شود. با استفاده از دستگاه التراسونیک به مدت ده دقیقه، ذرات متراکم شده را شکسته و سپس به مدت یک ساعت در دمای  $80^{\circ}\text{C}$  قرار دهید تا قندها حل شوند.

حجم های اندازه گیری شده سوسپانسیون را به دولا به مخلوط آب - ایزوپروپانول با دانسیته  $0.90\text{ g/cm}^3$  و  $0.96\text{ g/cm}^3$  که در لوله های دستگاه سانتریفوژ تشکیل شده، اضافه کنید. آن ها را تحت نیروی گریز از مرکز  $100000\text{g}$  در دمای  $20^{\circ}\text{C}$  به مدت یک ساعت قرار دهید. پس از خارج کردن لوله ها از دستگاه روتور سانتریفوژ با دور بالا، بهتر است لایه ای از ذرات سفید رنگ در حد وسط دو لایه مشاهده شود. با استفاده از پیپت شیشه ای با سر ظریف که در لایه ایزوپروپانول بالایی وارد می شود، این لایه که حاوی ذرات پلی اتیلن

با وزن مولکولی بسیار بالا را زدوده و در یک لوله استریل قرار دهید. با استفاده از دستگاه التراسونیک به مدت ده دقیقه، هر نوع توده ای را بشکنید.

استفاده از مدت زمان و سرعت‌های متفاوت در دستگاه سانتریفوژ با دور بالا مجاز است، به شرط آنکه میزان جداسازی آن‌ها یکسان نشان داده شده و نتایج تأیید روش کار ثبت شده باشد.

**یادآوری ۱** - مرحله اول دستگاه سانتریفوژ با دور جداسازی ذرات سبک‌تر سایش پلی اتیلن از جزءهای سنگین‌تر است. مرحله دوم دستگاه سانتریفوژ با دور بالا، خالص سازی حاصل از ذرات پلی اتیلن از طریق قراردادن آن‌ها در یک گرادیان چگالی ضعیف‌تر می‌باشد.

**یادآوری ۲** - این روش ممکن است در برابر اندازه های بزرگ‌تر تولید شده پلی اتیلن تبعیض قایل شود و در نتیجه حجم سایش نهایی ممکن نیست جدا شود.

#### ۳-۴ روش جداسازی ذرات فلز

به علت قابلیت حل شدن فلزات در اسیدهای قوی و بازها روش جذب آنزیمی نیاز است که مورد استفاده قرار گیرد. روش پائین بوسیله منابع ذکر شده در کتابنامه توصیف شده است و شبیه روش توسعه داده شده قبلی به وسیله همان نویسنده برای جدا سازی ذرات از مایع شبیه ساز مفصل (بند ۵)، با تفاوت کمی فقط در مراحل اولیه به علاوه کنسانتره های آنزیمی دلیل موجه برای استفاده از بافت به جای سرم روان ساز<sup>۱</sup> می‌باشد.

**یادآوری ۱** - توانایی استفاده از یک روش در جداسازی و شناسایی مشخصات ذرات از بافت‌ها و روان ساز شبیه ساز مفصل، ما را قادر به مقایسه دقیق و درست ذرات جدا شده می‌سازد به عنوان مثال برای صحنه گذاری شبیه ساز مفصل که مهم است. یکی از مزایای خاص این روش می‌باشد.

الف- با استفاده از تیغه یا چاقوی کوچک جراحی بافت را به تکه های کوچک جهت بالابردن سرعت زمان هضم برش دهید. چندین تکه کوچک را (در حدود  $(2 \times 2 \times 2)$  mm) در لوله های ۲ میلی لیتری معلق کنید. **یادآوری ۲** - وزن بافت به کل سایش‌های مشاهده شده در بیمار به علاوه قطعه بافتی مورد استفاده برای جداسازی ذره بستگی دارد.

(به عنوان مثال گرانول، کپسول).

وزن مرطوب توصیه شده mg (۱۰۰ تا ۱۵۰) می‌باشد اما ممکن است در صورت ضرورت تنظیم شود.

ب- چهار بار به مدت ۲ min در بافر سدیم فسفات با  $\text{pH} = 7.4$  بشوئید.

پ- تکه های بافت را در یک میلی لیتر از SDS (به بند ۳-۲-۱۱ مراجعه شود)  $(2.5 \text{ mg})$  در ۱۰۰ ml آب مقطر) دوباره غوطه ور کرده و به مدت ۱۰ min بجوشانید. در حالیکه می‌جوشانید تکه های بافت را در محلول با استفاده از ساینده بافت شیشه - تفلون هر ۲ min همگن کنید.

ت- در دمای اتاق به مدت ۱۰ min خنک کنید.

ث- لوله‌ها را با نیروی ۱۶۰۰۰g به مدت ۱۰ min سانتریفوژ کنید.

ج- یکبار دیگر با ۱ ml استون (به بند ۳-۲-۲ مراجعه شود) رقیق شده با آب مقطر با کسر حجمی ۸۰٪ استون بشوئید و به مدت ۱۰ min با نیروی ۱۶۰۰۰g سانتریفوژ کنید.

<sup>۱</sup> - Serum lubricant

- چ- سه بار با بافر سدیم فسفات ۲۵۰ mM حاوی ۲۵ mM EDTA، با  $\text{PH}=7.4$  بشویید. در هر بار به مدت ۱۰ min با نیروی ۱۶۰۰۰g سانتریفوژ کنید.
- ح- در ۱ ml از بافر سدیم فسفات ۲۵۰ mM حاوی ۲۵ mM EDTA، با  $\text{PH}=7.4$  به مدت (۲۰ تا ۲۵) s استفاده از یک دستگاه التراسونیک جداساز سلولی مجهز به میکرو پروب یا در حمام آب به مدت ۳۰ min قرار دهید.
- استفاده از دستگاه التراسونیک خیلی موثرتر است، اما دستگاه مناسب با نوک پروب خورده نشده/ آسیب ندیده و تمیز بهتر است جهت جلوگیری از آلودگی بالقوه با تیتانیوم از نوک پروب، استفاده شود.
- خ- ۰.۵ ml از بافر سدیم فسفات ۲۵۰ mM حاوی ۲۵ mM EDTA، با  $\text{PH}=7.4$  و پاپائین (به بند ۳-۲-۷ مراجعه کنید) (۴/۸ واحد بر ۱/۵ ml از بافر سدیم فسفات) به مدت ۲۴h در دمای  $65^{\circ}\text{C}$  در یک حمام آب در حال به هم خوردن قرار دهید.
- د- لوله‌ها را با نیروی ۱۶۰۰۰g به مدت ده دقیقه سانتریفوژ کنید.
- ذ- مایع را با استفاده از میکروپیپت بدون تماس با قرص‌ها در پائین لوله‌ها با دقت بردارید.
- ر- قرص‌ها را در یک میلی لیتر SDS (۲/۵ گرم بر ۱۰۰ میلی لیتر آب مقطر) دوباره معلق کنید.
- ز- به مدت ۱۰ دقیقه بجوشانید.
- ژ- در دمای اتاق به مدت ۱۰ دقیقه خنک کنید.
- س- لوله‌ها را با نیروی ۱۶۰۰۰g به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفوژ کنید.
- ش- مایع را با استفاده از میکروپیپت بدون لمس کردن قرص‌ها در پائین لوله‌ها با دقت بردارید.
- ص- قرص‌ها را با یک میلی لیتر از بافر TRIS-HCL، ۵۰ mM، (به بند ۳-۲-۴ مراجعه شود) ( $\text{PH}=7.6$ ) بشوئید. لوله‌ها را به مدت ۱۰ دقیقه با نیروی ۱۶۰۰۰g سانتریفوژ کنید. مایع را با استفاده از میکروپیپت بدون تماس با قرص‌ها در پائین لوله‌ها با دقت بردارید.
- ض- مرحله ض را یکبار دیگر تکرار کنید.
- ط- قرص‌ها را در یک میلی لیتر از محلول بافر TRIS-HCL، ۵۰ mM، دوباره معلق کنید و به مدت ۳۰s با استفاده از یک دستگاه التراسونیک جداساز سلولی مجهز به میکروپروب یا در حمام آب به مدت ۳۰ min قرار دهید.
- یکبار دیگر استفاده از دستگاه التراسونیک خیلی موثر می‌باشد، اما دستگاه مناسب با نوک ردیاب ضد زنگ/ آسیب ندیده و تمیز بهتر است جهت جلوگیری از آلودگی بالقوه با تیتانیوم از نوک ردیاب، استفاده شود.
- ظ- پروتئناز k (به بند ۳-۲-۹ مراجعه شود) (۲ گرم بر میلی لیتر از بافر TRIS-HCL) اضافه کنید و به مدت ۲۴ ساعت در  $55^{\circ}\text{C}$  در حمام آب همزن دار قرار دهید.
- ع- لوله‌ها را به مدت ۱۵ دقیقه با نیروی ۱۶۰۰۰g سانتریفوژ کنید.
- غ- مایع را با استفاده از میکروپیپت بدون لمس کردن قرص‌ها در پائین لوله‌ها با دقت بردارید.
- ف- قرص‌ها را در یک میلی لیتر SDS (۲/۵ گرم بر ۱۰۰ میلی لیتر آب مقطر) دوباره معلق کنید.
- ق- به مدت ۱۰ دقیقه بجوشانید.
- ک- در دمای اتاق به مدت ۱۰ دقیقه خنک کنید.

گ- لوله‌ها را به مدت ۱۰min با نیروی ۱۶۰۰۰g سانتریفوژ کنید.

الف- مایع را با استفاده از میکروپیپت بدون تماس با قرص‌ها در پائین لوله‌ها با دقت بردارید.

ب ب- قرص‌ها را با یک میلی لیتر از بافر TRIS-HCL، ۵۰mM، (به بند ۳-۲-۴ مراجعه شود) ( $\text{pH} = 7.6$ ) لوله‌ها را به مدت ۱۰ دقیقه با نیروی ۱۶۰۰۰g سانتریفوژ کنید. مایع را با استفاده از میکروپیپت بدون تماس با قرص‌ها در پائین لوله‌ها با دقت بردارید.

پ پ- با ۰.۵ml از استون ۸۰٪ حاوی ۳٪ SDS (به بند ۳-۲-۱۱ مراجعه شود) (۳ گرم بر ۱۰۰ میلی لیتر در استون کسر حجمی ۸۰٪ استون) بشویید و به مدت ۱۰min با نیروی ۱۶۰۰۰g سانتریفوژ کنید. مایع را با استفاده از میکروپیپت بدون تماس با قرص‌ها در پائین لوله‌ها با دقت بردارید.

ت ت- با یک میلی لیتر آب مقطر بشوئید. و به مدت ۱۰min با نیروی ۱۶۰۰۰g سانتریفوژ کنید و مایع را با استفاده از میکروپیپت بدون لمس کردن قرص‌ها در پائین لوله‌ها با دقت بردارید.

ث ث- الکل مطلق (به بند ۳-۲-۱ مراجعه شود) را اضافه کنید و در دمای  $4^{\circ}\text{C}$  تا جمع آوری ذرات (به بند ۴-۴-۲ مراجعه شود) ذخیره کنید.

یادآوری- به طور متناوب مراحل چ تا خ را ممکن است با استفاده از ۵۰ mM بافر TRIS-HCL انجام شود. اثر آنزیم پاپائین بهتر است تصدیق شود.

#### ۴-۴ جمع آوری ذرات

#### ۱-۴-۴ ذرات پلی اتیلن

ذرات روی صافی با اندازه منفذ ۰.۱ میکرومتر بعد از صافی با منافذ ۰.۱۵ میکرومتر جمع آوری کنید. برای ذرات جدا شده به وسیله سانتریفوژ با سرعت بالا یا جائیکه کل حجم سایش ضروری است. تمام نمونه‌ها وارد شده در بند ۴-۲-۲-۲ را با استفاده از سیستم صاف کردن مکشی، صاف کنید. برای ذرات جدا شده از سانتریفوژ دور بالا (به بند ۴-۲-۲-۳)، بین  $100$  و  $300$   $\mu\text{m}$  به دو قسمت مساوی تقسیم از ذرات معلق یا حجم بزرگی از ذرات رقیق شده تقسیم کنید.

یادآوری- رقیق سازی مناسب موقعی که سوسپانسیون به طور تقریبی پاک شده به نظر می‌رسد، معمولاً در رقیق سازی بین ۱ به ۱ و ۱۰۰ قابل دسترس است هدف ایجاد غلظتی از ذرات روی صافی است که چنان سنگین نباشند به طوری که ایجاد تصویری از ذرات مجزا به وسیله SEM مشکل شود. اما در عین حال تعداد معقول از ذرات برای آنالیز (حداقل ۱۰۰ ذره) فراهم نماید.

در صورت رقیق کردن کامل، میزان رقت را برای هر نمونه ثبت کنید. جهت صاف کردن حجم مشخصی از ذرات معلق را به سرنگ (به بند ۳-۳-۱۷ مراجعه شود) وارد کنید و انتهای سرنگ را به صافی (به بند ۳-۳-۷ مراجعه شود) متصل نمائید. فشار کمی را به سرنگ اعمال کنید به طوری که آب را از یک طرف صافی به طرف دیگر با سرعت حدود یک قطره (۰.۴۵ میلی لیتر) برثانیه منتقل نماید. روش زیر را بر روی هر صافی استفاده کنید. صافی و سرنگ را با آب مقطر بشوئید. در پایان صافی را با هوا در همان جهت بشوئید به طوری که صاف شدن قبل از برداشتن آن از دستگاه انجام شود، با استفاده از انبرک، صافی را برداشته و بگذارید در یک ظرف کوچک کشت سترون خشک شود.

به علت کوچک بودن ذرات بهتر است از صافی‌های با اندازه منفذ کوچک‌تر از  $0.1$  میکرومتر استفاده شود. اگر موجود باشد. در چنین مواردی ممکن است رعایت ترتیب فیلتراسیون جهت اجتناب از بسته شدن منفذها ضروری باشد.

#### ۲-۴-۴ ذرات فلزی

ذرات را در اتانول (از پروتکل جداسازی توصیف شده در بند ۴-۳) به مدت  $20\text{ min}$  با نیروی  $16000\text{ g}$  سانتریفوژ کنید. مایع شناور را بردارید و به آن  $0.5\text{ ml}$  از رزین  $100$  درصد استون: اپوکسی (به بند ۳-۲-۱۰ مراجعه شود)  $1:1$  اضافه کنید. لوله‌ها را در نگهدارنده لوله قرار داده و در دمای اتاق به مدت یک شب بچرخانید (این مرحله می‌تواند در صورت امکان برای قرص‌های کوچک، کوتاه شود). ذرات را به مدت  $20\text{ min}$  در  $16000\text{ g}$  سانتریفوژ کنید. مایع را با استفاده از میکروپیپت و بدون لمس قرص‌ها در ته لوله با دقت بردارید. لوله‌ها را تحت مکش به مدت  $1\text{ h}$  جهت برداشتن استون قرار دهید.  $1\text{ ml}$  رزین اپوکسی (به بند ۳-۲-۱۰ مراجعه شود) اضافه کنید و لوله‌ها را به مدت  $3\text{ h}$  تحت مکش قرار دهید. جهت پلیمریزاسیون رزین، لوله‌ها را در به مدت  $48\text{ h}$  در دمای  $60^\circ\text{C}$  قرار دهید. برای بدست آوردن رزین جامد با ذرات قرص در ته، لوله‌های پلاستیکی را بردارید. این پروتکل قادر می‌سازد که رزین از قرص و ذرات جدا شده تصفیه شود. مقطع قرص‌ها را با استفاده از چاقوی الماسی برش دهید و آن‌ها را (با ضخامت حدود  $100\text{ nm}$  تا  $120\text{ nm}$ ) بر روی توری مسی پوشیده شده با اندازه توری  $200$  {مرجع ۵} {مرجع ۶} جدا کنید. مقطع قرص‌ها به گونه ای باشد که نشانگر همه ذراتی باشد که می‌توانند بروی توری مسی مشخص شوند (در صورت امکان مقطع کل قرص).

**یادآوری-** ذرات فلزی می‌توانند به وسیله صافی مکشی بر روی غشاء صافی به اندازه  $0.15$  میکرومتر برای آنالیز با SEM با قدرت تفکیک بالا، جمع آوری شود. اما موقعی که از این روش استفاده می‌شود، لازمست کاربر انباشتگی بالقوه ذرات و اکسید شدن آن‌ها بر روی صافی را بررسی کند و از اتلاف بالقوه ذرات آگاه باشد.

#### ۵-۴ تعیین مشخصات شکل و اندازه ذرات

##### ۱-۵-۴ ذرات پلی اتیلن

فیلتر را به همراه ذرات روی آن با استفاده از برچسب کربنی بر روی SEM برای تصویربرداری از ذرات، قرار دهید. فیلتر را با طلا یا سایر فلزات هادی مثل پلاتین/پالادیم روکش دهید تا ذرات هادی شوند. ضخامت روکش باید  $3$  تا  $5\text{ nm}$  باشد. تصویربرداری ذرات پلیمری را تحت ولتاژ با شتاب  $10\text{ keV}$  انجام دهید.

و برای ذرات فلزی بیشتر از  $0.1$ ، حوزه‌های تصادفی غیر هم پوشاننده ای را بر روی صافی با بزرگ نمایی حداقل  $5000 \times$  انتخاب کنید تا در مجموع از  $100$  ذره تصویربرداری شود. برای ذرات بزرگ‌تر از  $10$  میکرومتر از بزرگ نمایی پایین‌تری نظیر  $5000 \times$  استفاده کنید.

تعیین خصوصیت اندازه، شکل و مساحت ذرات را با استفاده از یک سری توضیحات از پیش تعریف شده نظیر طول، عرض، قطر دایره معادل (قطر دایره ای با مساحتی برابر مساحت ذره)، مساحت، محیط، ضریب دید (طول به عرض) و گردی ( $1/4\pi$  محیط  $\times$  مساحت)، به طوری که در استاندارد ASTM F 1877-05، توصیف



شده، تعیین کنید. با بزرگنمایی که در آن آنالیز اندازه و شکل صورت گرفته، بهتر است در گزارش آزمون بیان شود.

برای تعیین خصوصیت ذرات فلزی کوچکتر از  $0.1 \mu\text{m}$  از SEM با قدرت تفکیک بالا استفاده کنید. از بزرگ نمایی تا  $100000\times$  تحت ولتاژ شتاب دهنده ای  $3 \text{ keV}$  استفاده کنید.

یادآوری ۱- تفکیک بین ذرات پلیمری فیبری و گرد نیز ممکن است مفید باشد.

یادآوری ۲- از نرم افزار کامپیوتری یا دستی آنالیز تصویر می توان برای تعیین اندازه و شکل ذره استفاده کرد.

یادآوری ۳- ممکن است از تحلیل گرهای ذره، در صورتی که محدودیت تفکیک پذیری  $0.1 \mu\text{m}$  وجود داشته باشد، به هر حال خطر تخمین حد بالای اندازه ذره، به واسطه متراکم شدن ذرات وجود دارد.

#### ۴-۵-۲ ذرات فلزی

##### ۴-۵-۲-۱ کلیات

به طوری که در بند ۴-۴-۲ ذکر شده، ذرات به وسیله TEM آنالیز شده اند. اما می توانند به وسیله SEM نیز آزمون شوند.

##### ۴-۵-۲-۲ آنالیز TEM

ذرات فلزی را با استفاده از TEM در یک ولتاژ شتاب دهنده حدود  $80 \text{ KV}$  و بزرگ نمایی حداقل  $21000\times$  (بزرگ نمایی بهتر است در گزارش بیان شود) تصویر برداری کنید.

تعیین خصوصیت ذرات فلزی برحسب اندازه و شکل با آنالیز تصویر برداری دستی نشانگر ریزنگارهای TEM (حداقل  $150$  ذره، در مورد سایش کمتر،  $300$  یا بزرگتر، اگر مجاز باشد) انجام شود. خصوصیت همه ذرات از هر میکروگراف به طوری که دارای نشانگر بدون اریب و بهتر از اندازه های ذرات مختلف باشد، تعیین می شود. حداکثر ابعاد (یا طول) هر یک از ذرات همراه با حداکثر ابعاد قائم (یا عرض) تعیین می شود. مقادیر نسبی طول روی عرض  $r$ ، اطلاعات روی شکل ذره را مشخص می کند. ذرات می توانند به طور دلخواه در صورتی که  $r < 5$  باشد دایره ای یا بیضی، اگر  $2/5 < r < 1/5$  و سوزنی شکل اگر  $r \leq 2/5$  باشد تقسیم بندی شوند. برنامه نرم افزاری مشتری می تواند برای اتوماسیون فرآوری داده ها نوشته شود.

یادآوری - ولتاژ شتاب دهنده TEM ممکن است. در صورت نیاز برای بهینه سازی تصویر برداری ذرات تنظیم شود. از نرم افزار آنالیز تصویر برداری بهینه سازی شده برای توصیف صفات اختصاصی استفاده کنید اما بهتر است دقت آن (به عنوان مقایسه آنالیز حداقل یک نمونه با استفاده از آنالیز دستی و بهینه سازی شده) بررسی شود. آنالیز تصویر برداری دستی ترجیح داده می شود و بسیار توصیه می شود.

##### ۴-۵-۲-۳ آنالیز SEM

فیلتر را به همراه ذرات روی آن با استفاده از بر چسب کربنی بر روی SEM برای تصویر برداری از ذرات متصل کنید. فیلتر را با طلا یا سایر فلزات هادی مثل پلاتین/پالادیم روکش دهید تا ذرات هادی شوند. ضخامت

روکش باید (۳ تا ۵) نانومتر باشد. از SEM با قدرت تفکیک بالا در بزرگ نمایی بین ۶۰۰۰۰ و ۱۵۰۰۰۰ در یک ولتاژ شتاب دهنده حدود ۸۰KeV عکس ذرات را در یک سطح تصادفی از صافی ثبت نمایید. تعیین خصوصیت ذرات فلزی برحسب اندازه و شکل با آنالیز تصویر برداری دستی نشانگر ریزنگارهای TEM (حداقل ۱۵۰ ذره) انجام شود. حداکثر ابعاد (یا طول) هر یک از ذرات همراه با حداکثر ابعاد قائم (یا عرض) تعیین می‌شود. مقادیر نسبی طول روی عرض،  $r$ ، اطلاعات روی شکل ذره را مشخص می‌کند. ذرات می‌توانند به طور دلخواه در صورتی که  $1 \leq r < 1.5$  باشد دایره ای یا بیضی، اگر  $1.5 \leq r < 2.5$  و سوزنی شکل اگر  $r \leq 2.5$  باشد تقسیم بندی شوند. سطح ذرات همچنین می‌تواند اندازه گیری شود. برنامه نرم افزاری مشتری می‌تواند برای اتوماسیون فرآوری داده‌ها نوشته شود.

برای آنالیز TEM از نرم افزار آنالیز تصویر برداری بهینه سازی شده برای توصیف صفات اختصاصی استفاده کنید اما بهتر است دقت آن (به عنوان مقایسه آنالیز حداقل یک نمونه با استفاده از آنالیز دستی و بهینه سازی شده) بررسی شود. آنالیز تصویر برداری دستی ترجیح داده می‌شود و خیلی توصیه می‌شود.

#### ۴-۶ شناسایی ذرات

##### ۴-۶-۱ ذرات پلی اتیلن

با استفاده از دستگاه طیف سنجی مادون قرمز تبدیل فوریه FTIR تأیید هویت ذرات بازیابی شده طیف سنجی تحت عنوان پلی اتیلن انجام شود. ذرات باید از طریق خشک کردن و تحت فشار قراردادن دیسک‌های برمید پتاسیم یا با اتصال به میکروسکوپ، آماده گردند.

برای دستگاه طیف سنجی مادون قرمز تبدیل فوریه FTIR با پیک غالب طیف مرجع پلی اتیلن با وزن مولکولی فرا زیاد (UHMWPE)، FTIR چنانچه پیک غالب در طیف نمای مانند طیف حاصل از پودر پزشکی قابل قیاس پلی اتیلن با وزن مولکولی بسیار بالا مقایسه گردید، ذرات را باید به عنوان پلی اتیلن با وزن مولکولی بسیار بالا در نظر گرفت.

شاید از ریخت شناسی ذرات به عنوان یک مبنای اضافی برای تشخیص ذرات پلی اتیلن با وزن مولکولی بسیار بالا از طریق ارجاع به تصاویر منتشر شده از ذرات پلی اتیلن با وزن مولکولی بسیار بالا استفاده شود.

یادآوری - برای فراهم کردن یک حجم کافی از مواد برای تحلیل طیف سنجی مادون قرمز تبدیل فوریه FTIR ممکن است ذرات نمونه های مختلف نیاز به آگیری داشته باشند.

##### ۴-۶-۲ ذرات فلزی

مشخصات ذرات فلزی باید با استفاده از طیف نمای تفرق دهنده انرژی (EDXA) تعیین گردد. الگوی پراش همچنین می‌تواند در تایید مشخصات استفاده شود.

## ۵ روش نمونه برداری و تحلیل ذرات پلیمری و فلزی از روان سازهای شبیه ساز مفصلی

### ۱-۵ کلیات

حجم سرم گاوی به کار رفته به عنوان سیال آزمون در شبیه سازی مفصلی می تواند بین شبیه سازها و بین آزمون ها تغییر کند. همان طوری که فرآیندسازی کل حجم سرم برای تحلیل ذره غیرعملی است، بهتر است نمونه های واکنشگر سرم را به صورت فرآورده هایی از سیال آزمون خوب مخلوط شده در نظر گرفت و تا زمان نیاز به صورت منجمد نگه داشته شود. با تراشیدن مواد ته نشین از سطوح و مخلوط کردن سیال آزمون قبل از نمونه گیری، از اینکه نمونه گرفته شده واکنشگر سیال آزمون است، اطمینان حاصل کنید.

### ۲-۵ روش کار

#### ۱-۲-۵ کلیات

به علت جذب بافتی روش جداسازی ذرات از نمونه های روان کننده مشابه متفاوت از روش توصیف شده در بند ۴-۲ می باشد. دو روش منتشر شده به وسیله آزمون آزمایشگاهی در سراسر دنیا، ثابت شده اند. انتخاب روش مناسب به مواد ذره ای جدا شده بستگی دارد.

#### ۲-۲-۵ جذب سرم با هیدروکلریک اسید

روش زیر به وسیله اسکات و همکارانش منتشر شده است و فقط برای مواد پلی اتیلن با وزن مولکولی بسیار بالا استفاده می شود. جداسازی سایر مواد از قبیل PEEK و سرامیک ها با روش جذب اسیدی موفقیت آمیز می باشد. اما مقاومت اسید کلریدریک برای سایر مواد به غیر از UHMWPE بهتر است به دقت بررسی شود.

الف- ۱۰ میلی لیتر نمونه سرم به ۴۰ ml اسید کلریدریک (۳۷٪ کسر حجمی)،

ب- با یک همزن به مدت تقریباً ۱h در دمای ۵۰ °C به هم زنید.

یادآوری- مایع چرخیده شده رنگ ارغوانی کم رنگ دارد.

پ- ۱۰۰ ml متانول را به ۰/۵ ml محلول جذب اضافه کنید.

#### ۳-۲-۵ جذب سرم با سدیم هیدروکسید

روش زیر براساس انتشارات کمبل و همکارانش و ریچارد و همکارانش می باشد:

الف- نمونه های روان کننده بهتر است با سدیم هیدروکسید ۵ M در دمای ۶۰ °C در حمام آب همزن دار به مدت حداقل ۲۴ h جذب شوند یا به طور کامل جذب شوند. نمونه ها را به مدت حداقل ۲ h در دمای ۴ °C خنک کنید. از خنک شدن کامل نمونه ها اطمینان حاصل کنید.

ب- حجم یکسانی از کلروفرم: متانول (۱:۲) در هر نمونه اضافه کنید و در انکوباتور دمای اتاق به مدت ۲۴ h حرارت دهید.

پ- نمونه ها جذب شده را در ۵۰۰g به مدت ۱۰ min در دمای اتاق سانتیفریژ کنید و مایع شناور بر روی سطح را به یک لوله تمیز منتقل کنید.

ت- مراحل ب تا پ را سه تا چهار بار تا زمان شفاف شدن مایع شناور بر روی سطح تکرار کنید.

ث- نمونه‌ها را ترکیب کنید و حجم معادل از اتانول مطلق تا رسوب پروتئین‌ها اضافه کنید.  
ج- آب فوق خالص را تا شفاف شدن محلول اضافه کنید و نمونه‌ها را به مدت یک شبانه روز در  $4^{\circ}\text{C}$  در حالت همزدن در یک انکوباتور قرار دهید.

چ- نمونه‌ها را در  $20000\text{g}$  به مدت  $2\text{h}$  در  $4^{\circ}\text{C}$  سانتیفوژ کنید.

ح- مایع شناور بر روی سطح را به یک لوله تمیز سرریز کنید و حجم معادل آن آب فوق خالص قبل از فیلتراسیون اضافه کنید.

#### ۴-۲-۵ جمع آوری ذرات

ذرات را به وسیله صافی غشائی پلی کربنات  $0.105\text{ Mm}$  میکرومتر جمع آوری کنید. صافی‌های با اندازه منافذ کوچک‌تر از قبیل  $0.115$  میکرومتر ممکن است از مواد شناخته شده برای ایجاد در اندازه ذرات نانو ضروری باشد. به طور متناوب صافی با اندازه‌های کوچک‌تر به ترتیب پیش رونده به عنوان مثال  $10\ \mu\text{m}$  ،  $1\ \mu\text{m}$  و  $0.115\ \mu\text{m}$  ، بهتر است برای روان کننده‌های شبیه ساز به سختی بارگذاری شده جهت مشاهده ذرات منحصر به فرد استفاده شود.

#### ۵-۲-۵ مشخصات شکل و اندازه ذرات

تصویر برداری SEM ذرات بهتر است ثبت شود. برای گنمائی تصویر برداری بسته به اندازه ذرات و انواع آن‌ها بین بزرگنمایی  $500$  و  $150000$  تغییر می‌کند. حداقل  $100$  ذره بهتر است مطابق با روش توصیف شده در بند ۴-۵-۱ بررسی شود.

#### ۶-۲-۵ تعیین ذرات

هویت ذرات باید با استفاده از طیف سنجی مادون قرمز فوریه به طوری که در بند ۴-۶-۱ توصیف شده تعیین شود.

#### ۳-۵ روش تعیین ذرات فلزی

۱-۳-۵ به علت حل شدن فلزات در اسیدهای قوی و بازها نیاز هست روش جذب آنزیمی مورد استفاده قرار گیرد. روش توصیف شده در بند ۳-۵-۲ که در مرجع ۱۰ کتابنامه ذکر شده است. برخی تنظیمات جزئی که به وسیله نویسنده ایجاد شده در مقایسه با روش اولیه توسعه داده شده است. به این ترتیب حجم‌های بزرگی از سرم در برگیرنده بیشتر آلودگی‌های آلی جهت همسان سازی استفاده می‌شود.

روش توسعه داده شده قبلی به وسیله همان نویسنده برای جدا سازی ذرات از مایع شبیه ساز مفصل (بند ۴)، با تفاوت کمی فقط در مراحل اولیه به علاوه کنسانتره‌های آنزیمی دلیل موجه برای استفاده از بافت به جای روان کننده سرم می‌باشد.

یادآوری ۱- توانایی استفاده از یک روش در جداسازی و شناسایی مشخصات ذرات از بافت‌ها و روان ساز شبیه ساز مفصل، ما را قادر به مقایسه دقیق و درست ذرات جدا شده می‌سازد به عنوان مثال برای صحنه گذاری شبیه ساز مفصل که مهم است. این موضوع یکی از مزایای خاص این روش می‌باشد.

**یادآوری ۲-** روش توصیف شده در بند ۵-۳-۲ برای جداسازی ۹۵ درصد ذرات از روان کننده سرم به طور ابتدائی توسعه یافته بود. بنابراین می‌تواند برای جداسازی مایعات با محتویات پروتئین زیاد مورد استفاده قرار گیرد.

**یادآوری ۳-** این روش می‌تواند به طور مشخص برای جداسازی و شناسائی ذرات از مایعات بیولوژیکی انسانی (به عنوان مثال مایع زلالی) تطبیق داده شده زیرا مراحل جذب چندگانه آن برای انواع مختلف ترکیبات آلی هست.

### ۵-۳-۲ جذب سرم

الف- ۱۵ میلی لیتر نمونه سرم را به مدت ۱۰ دقیقه با نیروی ۱۶۰۰۰g در یک لوله شیشه ای ۲۵ ml سانتریفوژ کنید (لوله شیشه ای جهت اجتناب از چسبیدن ذرات به دیواره ترجیح داده می‌شود).

ب- سرم را در حدود ۱/۵ ml با دقت بردارید. قرص را در ۱/۵ ml از سرم معلق کنید و محلول را تا ۲ ml به لوله میکرو سانتریفوژ انتقال دهید.

پ- و به مدت ۱۰min با نیروی ۱۶۰۰۰g سانتریفوژ کنید. مایع را با استفاده از میکروپیپت بدون تماس با قرص‌ها در پائین لوله‌ها با دقت بردارید.

ت- قرص‌ها را در یک میلی لیتر SDS (۲/۵ گرم بر ۱۰۰ میلی لیتر آب مقطر) دوباره معلق کنید. ث- به مدت ۱۰ min بجوشانید.

ج- در دمای اتاق به مدت ۱۰ min خنک کنید.

چ- به مدت ۱۰min با نیروی ۱۶۰۰۰g سانتریفوژ کنید.

ح- مایع را با استفاده از میکروپیپت بدون تماس با قرص‌ها در پائین لوله‌ها با دقت بردارید.

خ- قرص‌ها را با یک میلی لیتر میلی لیتر از استون ۸۰٪ رقیق شده با آب بشوئید. لوله‌ها را به مدت ۱۰min با نیروی ۱۶۰۰۰g سانتریفوژ کنید. مایع را با استفاده از میکروپیپت بدون تماس با قرص‌ها در پائین لوله‌ها با دقت بردارید.

د- ۱ml از بافر سدیم فسفات ۲۵۰ mM حاوی ۲۵ mM EDTA، با pH = ۷٫۴ و با استفاده از دستگاه التراسونیک جداساز سلولی مجهز به میکروپروب به مدت (۱۰ تا ۱۵) s یا در یک حمام آب به مدت ۱۰s قرار دهید.

ذ- لوله‌ها را با نیروی ۱۶۰۰۰g به مدت ده دقیقه سانتریفوژ کنید.

ر- مایع را با استفاده از میکروپیپت بدون تماس با قرص‌ها در پائین لوله‌ها با دقت بردارید.

ز- مرحله خ را تکرار کنید.

استفاده از دستگاه التراسونیک خیلی موثرتر است، اما جهت جلوگیری از آلودگی بالقوه با تیتانیوم از میکرو پروب، دستگاه مناسب با میکروپروب بدون خوردگی/آسیب و تمیز بهتر است استفاده شود.

ژ- ۰٫۵ میلی متر از آلودگی بالقوه بافر سدیم فسفات ۲۵۰ mM حاوی ۲۵ میلی مول EDTA، با pH = ۷٫۴ و پائین (۴/۸ واحد بر ۱/۵ میلی لیتر از بافر سدیم فسفات) به مدت ۲۴h در دمای ۶۵°C در یک حمام آب همزن دار قرار دهید.

س- لوله‌ها را به مدت ۱۰min با نیروی ۱۶۰۰۰g سانتریفوژ کنید. مایع را به کمک میکروپیپت بدون تماس با قرص‌ها در پائین لوله‌ها با دقت بردارید.

ش- مایع را به کمک میکروپیپت بدون لمس کردن قرص‌ها در پائین لوله‌ها با دقت بردارید.

موقعی که چندین حجم سرم از هر ۱۵ میلی لیتر به طور ابتدایی استفاده می‌شود (در مواردی که سایش کم است)، قرص‌ها بهتر است در آب مقطر دوباره معلق شوند و در یک لوله با یک میلی لیتر آب مقطر ترکیب شوند. در پایان بهتر است لوله را به مدت ۱۰ دقیقه با نیروی ۱۶۰۰۰g سانتریفوژ کنید و مایع را با استفاده از میکروپیپت بدون لمس کردن قرص‌ها در پائین لوله‌ها با دقت بردارید.

ص- قرص‌ها را در یک میلی لیتر SDS (۲/۵ گرم بر ۱۰۰ میلی لیتر آب مقطر) دوباره معلق کنید.

ض- به مدت ۱۰ دقیقه بجوشانید.

ط- در دمای اتاق به مدت ۱۰ دقیقه خنک کنید.

ظ- لوله‌ها را با نیروی ۱۶۰۰۰g به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفوژ کنید.

ع- مایع را با استفاده از میکروپیپت بدون لمس کردن قرص‌ها در پائین لوله‌ها با دقت بردارید.

غ- قرص‌ها را با یک میلی لیتر از ۵۰ mM TRIS-HCL (به بند ۳-۲-۴ مراجعه شود) (pH = ۷/۶) بشوئید. مایع را با استفاده از میکروپیپت بدون لمس کردن قرص‌ها در پائین لوله‌ها با دقت بردارید.

ف- مرحله ظ را یکبار دیگر تکرار کنید.

ق- قرص‌ها را در یک میلی لیتر از محلول ۵۰ mM TRIS-HCL دوباره معلق کنید و به مدت ۳۰ ثانیه در دستگاه التراسونیک جداساز سلولی مجهز به میکرو پروب و در حمام آب به مدت ۳۰ دقیقه قرار دهید. استفاده از دستگاه التراسونیک خیلی موثرتر است، اما جهت جلوگیری از آلودگی بالقوه با تیتانیوم از نوک ردیاب، دستگاه مناسب میکروپروب بدون خوردگی/آسیب ندیده و تمیز بهتر است استفاده شود.

ک- پروتئیناز k (به بند ۳-۲-۹ مراجعه شود) (۰/۹ گرم بر میلی لیتر از بافر TRIS-HCL) اضافه کنید و به مدت ۲۴ ساعت در ۵۵ درجه سلسیوس در حمام آب همزن دار قرار دهید.

گ- لوله‌ها را به مدت ۱۵ دقیقه با نیروی ۱۶۰۰۰g سانتریفوژ کنید.

م- مایع را با استفاده از میکروپیپت بدون لمس کردن قرص‌ها در پائین لوله‌ها با دقت بردارید.

الفالف- قرص‌ها را در یک میلی لیتر SDS (۲/۵ گرم بر ۱۰۰ میلی لیتر آب مقطر) دوباره معلق کنید.

بب- به مدت ۱۰ دقیقه بجوشانید.

پپ- در دمای اتاق به مدت ۱۰ دقیقه خنک کنید.

تت- لوله‌ها را با نیروی ۱۶۰۰۰g به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفوژ کنید.

ثث- مایع را با استفاده از میکروپیپت بدون لمس کردن قرص‌ها در پائین لوله‌ها با دقت بردارید.

جج- قرص‌ها را با یک میلی لیتر از ۵۰ mM TRIS-HCL (به بند ۳-۲-۴ مراجعه شود) (pH = ۷/۶) بشوئید. لوله‌ها را به مدت ۱۰ دقیقه با نیروی ۱۶۰۰۰g سانتریفوژ کنید. مایع را با استفاده از میکروپیپت بدون لمس کردن قرص‌ها در پائین لوله‌ها با دقت بردارید.

چچ- یکبار دیگر با ۰/۵ میلی لیتر از استون ۸۰ درصد حاوی ۳ درصد SDS (به بند ۳-۲-۱۱ مراجعه شود) (۳ گرم بر ۱۰۰ میلی لیتر در استون ۸۰ درصد). به مدت ۱۰ دقیقه با نیروی ۱۶۰۰۰g سانتریفوژ کنید و مایع را با استفاده از میکروپیپت بدون لمس کردن قرص‌ها در پائین لوله‌ها با دقت بردارید.

خ-خ- با یک میلی لیتر آب مقطر بشوئید. به مدت ۱۰ دقیقه با نیروی ۱۶۰۰۰g سانتریفوژ کنید و مایع را با استفاده از میکروپیپت بدون لمس کردن قرص‌ها در پائین لوله‌ها با دقت بردارید.  
ح- الکل مطلق (به بند ۳-۲-۱ مراجعه شود) را اضافه کنید و در دمای °C ۴ تا جمع آوری ذرات (به بند ۴-۴-۲ مراجعه شود) ذخیره کنید.

این پروتکل برای استخراج ذرات از سرم ۹۵ درصد موثر است. در مورد سرم‌های با درصد کمتر برخی مراحل می‌تواند در صورت امکان برداشته شود. لکن اگر مقایسه ذرات از روان کننده شبیه ساز مفصل ذرات بافت انجام می‌شود، همان روش بهتر است برای مقایسه دقیق استفاده شود.

یادآوری- به طور متناوب مراحل د تا ز را ممکن است با استفاده از بافر TRIS-HCL، ۵۰ mM، انجام شود. اثر آنزیم پاپائین بهتر است بعداً تصدیق شود.

### ۵-۳-۲ جذب سرم

حجم سرم بسته به حجم سایش کلی اندازه گیری شده از کاشتنی در ارتباط با شبیه ساز اتصالات بستگی دارد. ۱۵ میلی لیتر از سرم را از ۱۰۰ میلی لیتر تقسیم شده که حاوی حجم سایش کلی در حدود تا  $0.4 \text{ mm}^3$  تا  $0.8 \text{ mm}^3$  است. یک قرص از ذرات را تهیه می‌کند. اگر حجم سایش کم باشد چندین نمونه ۱۵ میلی لیتر می‌تواند استفاده شود و بعد از جذب با پائین (مرحله صفر) متصل شود.

### ۵-۳-۳ جمع آوری ذرات

لوله‌ها را با نیروی ۱۶۰۰۰g به مدت ۲۰min در الکل و روش توصیف شده را برای ذرات ترکیب شده در رزین اپوکسی و در بخش قرص دنبال کنید.

یادآوری- به طور متناوب، ذرات ممکن است با فیلتراسیون به طوری که در بند ۴-۴-۲ توصیف شده جمع آوری شود.

### ۵-۳-۴ تعیین خصوصیات شکل و اندازه ذرات

#### ۵-۳-۴-۱ کلیات

به طوری که در بند ۴-۴-۲ توصیف شده، ذرات را به وسیله TEM آنالیز کنید، اما آنها می‌توانند به سیله SEM نیز آنالیز شوند.

#### ۵-۳-۴-۲ آنالیز TEM

به طوری که در آنالیز TEM هست شناسایی در یک ولتاژ شتاب دهنده حدود ۸۰KV و بزرگ نمایی حداقل  $21000\times$  (بزرگ نمایی بهتر است در گزارش بیان شود) به طوری که در بند ۴-۵-۲-۲ توصیف شده، تصویر برداری کنید.

تعیین خصوصیت ذرات فلزی برحسب اندازه و شکل دستی نشانگر ریزنگارهای TEM (حداقل ۱۵۰ ذره، در مورد سایش کمتر، ۳۰۰ یا بزرگ‌تر، اگر مجاز باشد) به طوری که در بند ۴-۵-۲-۲ توصیف شده، انجام شود.

### ۵-۳-۴-۳ آنالیز SEM

فیلتر را به همراه ذرات روی آن با استفاده از بر چسب کربنی بر روی کنده آلومینیومی SEM برای تصویربرداری از ذرات متصل کنید. فیلتر را بپوشانید و با SEM با قدرت تفکیک بالا به طوری که در بند ۴-۳-۲-۵ مشاهده کنید.

مثل آنالیز TEM، به طوری که در بند ۴-۳-۲-۵ توصیف شده، شناسایی با آنالیز تصویر برداری صورت می‌گیرد.

### ۵-۳-۵ تأیید ذرات فلزی

ترکیب ذرات فلزی باید با استفاده از طیف‌نمای تفرق دهنده انرژی (EDXA) تعیین گردد. به طوری که در بند ۴-۶-۲ توصیف شده، الگوی پراش همچنین می‌تواند در تایید مشخصات استفاده شود.

### ۵-۴-۵ روش تعیین ذرات سرامیکی

این استاندارد بر روی روش‌های جداسازی و شناسایی پلیمرها ذرات سایش مواد از بافت و مایعات آزمون از شبیه سازهای اتصالات تمرکز می‌کند. اما برخی از این روش‌ها همچنین برای جداسازی و شناسایی ذرات سرامیکی کاربرد دارد. توصیه زیر را در نظر بگیرید.

به علت دانسیته مواد سرامیکی مورد استفاده در ارتوپدی، ذرات سایش سرامیکی نمی‌توانند به وسیله روش قلیائی توصیف شده در بالا (به بند ۳-۲-۵ مراجعه شود) یا با روش بکارگیری سانتی‌فوج دانسیته ای (به طوری که در بند ۴-۲-۲-۳ توصیف شده) جدا شود. توصیه می‌شود ذرات سرامیکی با روش جذب اسید کلریدریک توصیف شده در بالا (به بند ۲-۲-۲ مراجعه شود) یا با استفاده از پروتکل جذب آنزیمی توصیف شده در ۳-۲-۵ جدا شوند. لکن اگر جذب اسید کلریدریک استفاده می‌شود. مقاومت در برابر اسید بهتر است بررسی شود.

## ۶ گزارش آزمون

گزارش آزمون باید شامل اطلاعات زیر باشد:

- الف- هویت نمونه های آزمون (جزئیات بدون نام بیمار در مورد نمونه های بافت، محل نمونه های بافت، شناسایی نمونه های پس از مرگ، جزئیات آزمون در مورد سیال‌های آزمون شبیه ساز مفصلی)؛
- ب- نوع مواد کاشتنی و جزئیات سوابق جراحی قبلی، در صورت وجود؛
- پ- ظاهر کاشتنی بازبایی شده برای اطلاعات در زمینه منبع تولید ذره یا عیب مواد کاشتنی، نظیر اصابت؛ گردن ران در دیواره آن یا لق شدن میله؛
- ت- جرم نمونه بافت، یا حجم کل روان ساز به کار رفته برای مفصل؛
- ث- نتایج مطالعه کنترلی؛
- ج- داده‌هایی در مورد اندازه، شکل، تعداد و توزیع داده‌ها؛
- چ- ترکیب ذرات فلزی؛
- ح- تعداد ذرات تحلیل شده؛



- خ- تحلیل اندازه و شکل ذرات TEM یا SEM بزرگ نمایی به کار رفته برای شمارش ذرات؛
- د- در مورد نمونه های بافت، ماهیت ابزارهای جراحی به کار رفته برای بازیابی نمونه؛
- ذ- در صورت وجود آلودگی، فهرستی از منابع احتمالی ذرات فلز/پلیمر.

## پیوست الف

### (اطلاعاتی)

#### کتابنامه

- [1] BILLI, F., BENYA, P., EBRAMZADEH, E. and MCKELLOP, H.A. An accurate and extremely sensitive method to isolate and display nanoparticulate metallic wear debris for morphometric analysis. Transactions 54th Annual Meeting Orthopaedic Research Society, 2008, 1929
- [2] CAMPBELL, P.A., MA, S., YEOM, B., MCKELLOP, H.A., SCHMALZRIED, T.P. and AMSTUTZ, H.C. Isolation of predominantly submicron-sized UHMWPE wear particles from periprosthetic tissues. Journal of Biomedical Materials Research, 29(1), pp. 127-131, 1995
- [3] TIPPER, J.L., INGHAM, E., HAILEY, J.L., BESONG, A.A., WROBLEWSKI, B.M., STONE, M. and FISHER, J. Quantitative analysis of polyethylene wear debris, wear rate and head damage in retrieved Charnley hip prostheses, Journal of Material Science: Materials in Medicine, 11, pp. 117-124, 2000
- [4] RICHARDS, L., BROWN, C., STONE, M.H., FISHER, J., INGHAM, E. and TIPPER, J.L. Identification of nanometer sized ultra high molecular weight polyethylene wear particles in samples retrieved in vivo, Journal of Bone and Joint Surgery, 90B, pp. 1106-1113, 2008
- [5] CATELAS, I., CAMPBELL, P.A., BOBYN, J.D., MEDLEY, J.B. and HUK, O.L. Wear particles from metal-on-metal total hip replacements: Effects of implant design and implantation time. The Proceedings of the Institution of Mechanical Engineers, Part H, Journal of Engineering in Medicine, Special Issue: Development of monolithic and surface replacement metal-on-metal hip replacements, 220, pp. 195-208, 2006
- [6] CATELAS, I., BOBYN, J.D., MEDLEY, J.B., KRYGIER, J., ZUKOR, D.J. and HUK, O.L. Size, shape and composition of wear particles from metal-metal hip simulator testing: Effects of alloy and number of loading cycles, Journal of Biomedical Materials Research, 67A(1), pp. 312-327, 2003
- [7] CATELAS, I., MEDLEY, J.B., CAMPBELL, P.A., HUK, O.L. and BOBYN, J.D. Comparison of in vitro with in vivo characteristics of wear particles from metal-metal hip implants, Journal of Biomedical Materials Research – Applied Biomaterials, 70B(2), pp. 167-178, 2004
- [8] BROWN, C., WILLIAMS, S., TIPPER, J.L., FISHER, J. and INGHAM, E. Characterisation of wear particles produced by metal-on-metal and ceramic-on-metal hip prostheses under standard and microseparation simulation, Journal of Material Science: Materials in Medicine, 18, pp. 819-827, 2007
- [9] ASTM F 1877-05, Standard Practice for Characterization of Particles
- [10] SCOTT, M., MORRISON, M., MISHRA, S.R. and JANI, S. Particle analysis for the determination of UHMWPE wear, Journal of Biomedical Materials Research B – Applied Biomaterials, 73(2), pp. 325-337, 2005

[11] CATELAS, I., BOBYN, J.D., MEDLEY, J.B., KRYGIER, J.J., ZUKOR, D.J., PETIT, A. and HUK, O.L. Effects of digestion protocols on the isolation and characterization of metal-metal wear particles. I. Analysis of particle size and shape, *Journal of Biomedical Materials Research*, 55(3), pp. 320-329, 2001