

Preparation, Characterization and Biological Assessment of Polycaprolactone/Starch Composites for Bone Tissue Engineering Applications

Soheila Ali Akbari Ghavimi¹, Mehran Solati-Hashjin^{2*}, Mohammad Hossein Ebrahimzadeh³, Mohammad Ali Shokrgozar⁴, Fateme Fayyaz Bakhsh⁵

- 1- M.Sc., Department of Biomaterial, Faculty of Biomedical Engineering, Amirkabir University of Technology (Iran Poly technique), Tehran, Iran
- 2- Associated Professor, Department of Biomaterial, Faculty of Biomedical Engineering, Amirkabir University of Technology (Iran Poly technique), Tehran, Iran
- 3- Associated Professor, Orthopedic Research Center, Faculty of Medicine, Mashhad University of Medical Sciences, Mashhad, Iran
- 4- Associated Professor, Cell Culture and Tissue Engineering Lab, Iran Cell Bank, Pasteur Institute of Iran, Tehran, Iran
- 5- Ph.D. Student, Department of Biomaterial, Faculty of Biomedical Engineering, Amirkabir University of Technology (Iran Poly technique), Tehran, Iran

*Corresponding Address: P.O.Code: 1591634311, Department of Biomaterial, Faculty of Biomedical Engineering, Amirkabir University of Technology (Iran Poly technique) No. 424 Hafez Ave., Tehran, Iran
Email: solati@aut.ac.ir

Received: 24/Feb/2012, Accepted: 08/Sep/2012

Abstract

Objective: Biodegradable polycaprolactone/starch composites can be used for bone tissue engineering applications. The effect of the ratio of components on composite properties is of tremendous importance.

Methods: Polycaprolactone/starch composite of 80/20 and 70/30 ratios were fabricated by dissolving them in chloroform followed by evaporation of the solvent.

Results: The composites were characterized by fourier transform infrared spectroscopy. Their bioactivity was evaluated by studying the apatite formation ability after immersing the specimens in simulated body fluid. The results of compressive test on samples showed that the composite's modulus and strength approximated that of human trabecular bone. Mass loss in distilled water and starch degradation rate in PBS was evaluated, which showed that the starch ratio was effective in composite degradation. MTT analysis and alkaline phosphatase levels showed that this composite had no toxicity and could increase G-299 cell line osteoblastic activities.

Conclusion: The increase in cellular osteoblastic activities and the ability for apatite formation on the composite surface, in addition to the polycaprolactone/starch samples' mechanical properties shows their capability to be used as substitutes for bone. Because this composite degradation rate is controlled by changing the starch ratio, it has the potential for use in bone tissue engineering applications. Samples that have a 70/30 ratio are considered optimal due to their enhanced cellular response and better mechanical properties.

Keywords: Bone tissue engineering, Polycaprolactone/starch composites, Bioactivity, MTT test, Alkaline phosphatase test

Modares Journal of Medical Sciences: *Pathobiology*, Vol 15, No 3, Autumn 2012, Pages: 37-48

ساخت و مشخصه یابی و ارزیابی زیستی کامپوزیت پلی کاپرولاکتون / نشاسته به منظور کاربردهای مهندسی بافت استخوان

سهیلا علی اکبری قومی^۱، مهران صولتی هنجین^{۲*}، محمدحسین ابراهیمزاده^۳، محمدعلی شکرگزار^۴، فاطمه فیاض بخش^۵

- ۱- کارشناس ارشد، گروه بیومتریال، دانشکده مهندسی پزشکی، دانشگاه صنعتی امیرکبیر (پلی تکنیک تهران)، تهران، ایران
- ۲- دانشیار، گروه بیومتریال، دانشکده مهندسی پزشکی، دانشگاه صنعتی امیرکبیر (پلی تکنیک تهران)، تهران، ایران
- ۳- دانشیار، مرکز تحقیقات جراحی ارتوپدی و تروما، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی مشهد، مشهد، ایران
- ۴- دانشیار، آزمایشگاه‌های کشت سلول و مهندسی بافت، بانک سلولی ایران، انستیتو پاستور ایران، تهران، ایران
- ۵- دانشجوی دکتری تخصصی، گروه بیومتریال، دانشکده مهندسی پزشکی، دانشگاه صنعتی امیرکبیر (پلی تکنیک تهران)، تهران، ایران

*آدرس نویسنده مسئول: تهران، کدپستی: ۱۵۹۱۶۳۴۳۱۱، تقاطع خیابان سمیه و حافظ، دانشگاه صنعتی امیرکبیر، دانشکده مهندسی پزشکی، آزمایشگاه نانوبیومتریال
Email: solati@aut.ac.ir

پذیرش مقاله: ۹۱/۰۶/۱۸

دریافت مقاله: ۹۰/۱۲/۰۶

چکیده

هدف: کامپوزیت زیست تخریب پذیر پلی کاپرولاکتون/نشاسته می تواند به منظور مهندسی بافت استخوان مورد استفاده قرار گیرد. تأثیر ترکیب درصد اجزا بر خواص این کامپوزیت دارای اهمیت است.

مواد و روش‌ها: کامپوزیت پلی کاپرولاکتون/نشاسته با ترکیب درصد پلی کاپرولاکتون ۸۰/نشاسته ۲۰، پلی کاپرولاکتون ۷۰/نشاسته ۳۰ از طریق حل کردن در کلروفرم و تبخیر حلال ساخته شد.

نتایج: ترکیب شیمیایی کامپوزیت پلی کاپرولاکتون/نشاسته به کمک انتقال فوریه فرسوخ مشخصه‌یابی شد. به منظور بررسی زیست‌فعالی کامپوزیت پلی کاپرولاکتون/نشاسته ایجاد هیدروکسی آپاتیت روی سطح در محلول شبیه‌سازی شده بدن ارزیابی شد. نتایج حاصل از آزمون فشاری بیانگر این بود که ضریب کشسانی و استحکام فشاری این داربست در حد استخوان تراکولار انسان است. میزان کاهش جرم نمونه‌ها در آب و همچنین سرعت تخریب نشاسته در محلول بافر فسفات سالیین ارزیابی شد و بررسی‌ها بیانگر این بود که وجود جزء نشاسته و درصد آن بر سرعت تخریب تأثیر می‌گذارد. همچنین آزمون‌های MTT و آلكالین فسفاتاز نشان داد که این کامپوزیت سمیتی ندارد و فعالیت‌های استخوانی سلول‌های استئوسارکوما رده G-299 را افزایش می‌دهد.

نتیجه‌گیری: با توجه به افزایش رشد و فعالیت سلول‌های استخوانی و توانایی تشکیل آپاتیت روی سطح کامپوزیت و همچنین خواص مکانیکی آن، این کامپوزیت دارای این پتانسیل است که به عنوان جایگزین‌های استخوان استفاده شود. به علاوه سرعت تخریب‌پذیری کامپوزیت پلی کاپرولاکتون/نشاسته با تغییر در ترکیب درصد اجزای سازنده آن قابل کنترل است و می‌توان از این کامپوزیت به عنوان داربست مهندسی بافت استخوان استفاده کرد. نمونه با درصد جرمی ۳۰/۷۰ به علت پاسخ سلولی مناسب‌تر و خواص مکانیکی بهتر نسبت به نمونه ۲۰/۸۰ بهینه محسوب می‌شود.

کلیدواژگان: مهندسی بافت استخوان، کامپوزیت پلی کاپرولاکتون/نشاسته، زیست‌فعالی، آزمون MTT، آزمون آلكالین فسفاتاز

مجله علوم پزشکی مدرس: آسیب‌شناسی زیستی، دوره ۱۵، شماره ۳، پاییز ۱۳۹۱، صفحات: ۳۷-۴۸

مهندسی بافت (Tissue Engineering) در حال حاضر به عنوان روشی به منظور ترمیم بافت‌های آسیب دیده بدن مورد توجه قرار گرفته است. یک داربست ایده‌آل به منظور استفاده در مهندسی بافت باید دارای ویژگی‌هایی چون عدم سمیت سلولی و خواص متناسب با بافت مورد نظر باشد. در مورد مهندسی بافت استخوان (Bone Tissue Engineering)، خواص زیستی و خواص مکانیکی اهمیت زیادی دارد. در ارتباط با خواص زیستی، مواد به کار رفته باید کاملاً زیست‌سازگار (Biocompatible) باشد. از سوی دیگر؛ برای تقلید از استخوان طبیعی، باید تا حد ممکن هم از نظر ترکیب و هم از نظر ساختار مشابه آن باشد. به‌علاوه؛ این ماده باید دارای یک نرخ تخریب قابل کنترل باشد تا بتوان نرخ تخریب داربست را با نرخ تکثیر سلول‌ها و زمان لازم برای جایگزینی بافت تنظیم کرد. از لحاظ مکانیکی داربست باید توانایی تحمل وزن را در طول مدت تخریب و جایگزینی بافت داشته باشد، زیرا بافت اولیه تولید شده در فرایند ترمیم بسیار نرم و انعطاف‌پذیر بوده و به راحتی تغییر شکل می‌دهد. به مرور زمان این بافت خون مانند استحکام بیشتری پیدا می‌کند که همزمان با تحلیل رفتن داربست و ضعف خواص مکانیکی آن است. از سوی دیگر خواص مکانیکی داربست و استخوان نباید اختلاف زیادی داشته باشد زیرا منجر به تمرکز تنش شده و عدم ترمیم و تحلیل رفتن بافت سالم را در پی دارد.

پلیمرها کاربرد فراوانی در زمینه پزشکی دارد. از جمله این کاربردها ساخت داربست‌های مورد استفاده در مهندسی بافت‌های مختلف است. طراحی داربست‌های پلیمری نقش عمده‌ای در رشد مناسب سلول‌ها دارد؛ از این رو باید به خواص زیست‌سازگاری، زیست تخریب‌پذیری و استحکام مکانیکی توجه نمود. به دلیل محدوده وسیعی از خواص که توسط پلیمرها به نمایش گذاشته می‌شود، معمولاً با کامپوزیت کردن (Composite) دو یا چند پلیمر می‌توان خواص مطلوب را در اختیار داشت. پلیمرها به دو دسته طبیعی و مصنوعی

کامپوزیت پلی‌کاپرولاکتون نشاسته برای کاربردهای مهندسی بافت استخوان

تقسیم می‌شود و کامپوزیت‌های این دو گروه پلیمر خواص منحصر به فردی از خود به نمایش می‌گذارد.

پلی‌کاپرولاکتون (Polycaprolactone) یک پلی استر نیمه بلورین است که دمای گذار شیشه‌ای آن حدوداً ۶۰- درجه سانتی‌گراد و دمای ذوب آن در محدوده ۵۷-۶۴ درجه سانتی‌گراد قرار دارد [۱-۴]. این پلیمر به راحتی در دماهای پایین فرآوری می‌شود ولی به علت ماهیت نیمه بلورین و آب‌گریزی شدید، تخریب پلی‌کاپرولاکتون بسیار کند است. آرایش ماکرومولکول‌ها در سطح بدنه‌های ساخته شده از پلی‌کاپرولاکتون از نفوذ مایعات به حجم ماده جلوگیری می‌کند [۵-۷]. این پلیمر در مهندسی پزشکی کاربرد فراوانی دارد [۵-۷]. از ویژگی‌های جالب این پلیمر توانایی آن در ترکیب شدن با مواد گوناگون است [۳، ۴]. مشکل اساسی این ماده ترشوندگی ضعیف، تخریب آرام در محیط بدن و تکثیر سلولی ضعیف بر سطح آن است که استفاده از این پلیمر را در ساخت داربست‌های مهندسی بافت محدود می‌کند [۵، ۸، ۹]. رفتار این پلیمر به شدت تابع جزئی است که با آن ترکیب می‌شود [۱۰]. به همین دلیل معمولاً پلی‌کاپرولاکتون را می‌توان با سایر پلیمرها به صورت کامپوزیت استفاده کرد تا هم باعث کنترل و افزایش سرعت تخریب و هم بهبود خواص چسبندگی سلولی آن شود.

نشاسته یک پلیمر طبیعی، نیمه بلورین و بسیار آب‌دوست است [۱۱]. ترکیبات نشاسته پتانسیل زیادی برای استفاده در زمینه مهندسی پزشکی دارد؛ چرا که این مواد زیست تخریب‌پذیر، ارزان قیمت (نسبت به سایر پلیمرهای زیست تخریب‌پذیر) و قابل دسترس است [۱۲]. ترکیب نشاسته با پلی استرها مانند پلی‌کاپرولاکتون پتانسیل فراوانی به منظور استفاده در سیمان‌های استخوانی، هیدروژل‌های (Hydrogels) مهندسی بافت استخوان، جایگزین‌های استخوانی و... دارد [۱۳]. نتایج بسیار خوبی از ترکیب پلی‌کاپرولاکتون و نشاسته (Starch Polycaprolacton: SPCl) به منظور استفاده در مهندسی بافت به دست آمد. داربست‌های SPCl دارای خواص

مکانیکی و فیزیکی - شیمیایی مناسبی برای مهندسی بافت است؛ از رشد و تمایز سلول‌های بنیادی مزانشیمی (Mesenchymal Stem Cells: MSCs) حمایت می‌کند و زمینه مناسبی برای سلول‌های اندوتلیال (Endothelial Cells) به وجود می‌آورد [۱۲]. ترکیب پلیمری SPCI همزمان از مزایای یک پلیمر طبیعی و یک پلیمر مصنوعی بهره می‌برد. SPCI یک پلیمر با پایه طبیعی است که ممکن است از طریق هیدرولیز در بدن تخریب شود. البته هیدرولیز این کامپوزیت پلیمری در حضور برخی آنزیم‌ها مانند آلفا آمیلاز و لپاز تسریع می‌شود [۱۴]. زیست تخریب پذیری پلی کاپرولاکتون در حضور نشاسته به علت افزایش سطح تماس برای حمله میکروبی افزایش می‌یابد. مهم ترین محدودیت کامپوزیت پلی کاپرولاکتون/ نشاسته چسبندگی کم این دو پلیمر به یکدیگر به علت ترکیب یک پلی ساکارید هیدروفیل و یک پلی استر هیدروفوب است [۱۵]. فاز نشاسته به خوبی در زمینه پلی کاپرولاکتون پراکنده شده ولی به علت آب دوست بودن نشاسته برهمکنش دو فاز در فصل مشترکشان ضعیف است. این برهمکنش ضعیف منجر به افزایش جذب آب در شبکه پلی کاپرولاکتون می‌شود و سرعت تخریب پلی کاپرولاکتون را افزایش می‌دهد [۱۵-۱۷]. کامپوزیت پلی کاپرولاکتون/ نشاسته پاسخ التهابی شدیدی در کوتاه مدت و بلند مدت ایجاد نمی‌کند [۱۲] و با بررسی کمی اثر نشاسته روی میزان تخریب پلی کاپرولاکتون، می‌توان سرعت تخریب داربست را کنترل کرد [۱۵-۱۷]. کامپوزیت پلی کاپرولاکتون/ نشاسته دارای ضریب کشسانی (Module Elastic) و استحکام فشاری بهتری نسبت به پلی کاپرولاکتون است [۱۸].

با توجه به مطالب بیان شده، در این تحقیق کامپوزیت پلی کاپرولاکتون/ نشاسته با دو درصد جرمی مختلف، از طریق حل کردن در حلال مشترکشان ساخته شد. پس از مشخصه یابی کامپوزیت با استفاده از طیف سنجی مادون قرمز میزان زیست فعال بودن، خواص مکانیکی و رشد سلول‌های استخوانی در مجاورت این کامپوزیت به منظور بررسی پتانسیل آن برای

استفاده در مهندسی بافت استخوان بررسی شد.

مواد و روش‌ها

مواد اولیه

برای ساخت کامپوزیت پلی کاپرولاکتون/ نشاسته از طریق حل کردن در کلروفرم (Chloroform)، مواد اولیه پلی کاپرولاکتون با وزن مولکولی ۸۰ هزار گرم بر مول، نشاسته با منشأ گیاهی ساگو (Sago) و کلروفرم از شرکت Merck آلمان تهیه شد.

روش ساخت کامپوزیت

برای ساخت کامپوزیت پلی کاپرولاکتون/ نشاسته با دو درصد جرمی پلی کاپرولاکتون ۸۰/ نشاسته ۲۰ و پلی کاپرولاکتون ۷۰/ نشاسته ۳۰، ابتدا پلی کاپرولاکتون در کلروفرم درون یک حمام آب ۶۰ درجه سانتی گراد، همزمان ذوب و حل شد و در نهایت مایع ویسکوز (Viscose) و سفید رنگی حاصل شد. همزمان نشاسته در کلروفرم در دمای اتاق حل شد و به مایع ویسکوز اولیه اضافه و همگن شد. ترکیب نهایی در قالب‌های پلاستیکی ریخته شد و در دمای ۴ درجه سانتی گراد قرار گرفت تا کلروفرم باقی مانده فرصت زمانی کافی برای خروج از ساختار کامپوزیت را داشته باشد. پس از سه روز قرص‌های نهایی به علت کاهش قطر ناشی از خروج کلروفرم از ساختار و آرایش مجدد زنجیره‌های پلیمری از قالب خارج شد.

طیف‌سنجی مادون قرمز

برای بررسی طیف فروسرخ نمونه‌ها از دستگاه مدل PE1760x، در محدوده $4000-400 \text{ cm}^{-1}$ استفاده شد. در این آزمون از پتاسیم برومید (KBr) به عنوان رقیق کننده استفاده شد.

میزان تخریب داربست‌ها و آزادسازی نشاسته از نمونه‌ها، نمودار حاصل با یک نمودار استاندارد مقایسه شد. برای رسم نمودار استاندارد آزادسازی نشاسته ابتدا یک گرم نشاسته با ۱۰۰ میلی‌لیتر PBS مخلوط شد و محلول استاندارد نامیده شد. مطابق جدول ۱ این محلول رقیق شده و به حجم یک میلی‌لیتر رسانده شد. سپس به هرکدام از محلول‌ها ۵ میلی‌لیتر DNS اضافه شد و نمودار استاندارد با استفاده از پرتو با طول موج ۵۷۰ نانومتر دستگاه UV-Visible Spectrophotometer رسم شد [۱۹].

آزمون بررسی میزان زیست‌فعالی (Bioactivity) کامپوزیت

یک ماده زیست فعال باید توانایی اتصال به بافت‌های بدن را داشته باشد. در مورد یک جایگزین استخوانی توانایی تشکیل لایه هیدروکسی آپاتیت (Hydroxyapatite) در سطح ساختار می‌تواند معیار مناسبی از زیست‌فعالی زیست‌مواد باشد [۲۰]. به منظور اندازه‌گیری زیست‌فعالی کامپوزیت پلی‌کاپرولاکتون/نشاسته توانایی آن در ایجاد لایه آپاتیت روی سطح نمونه‌ها در مایع شبیه‌سازی‌شده بدن (Simulated Body Fluid: SBF) سنجیده شد. بدین منظور SBF به کمک دستور کوکوبو (Kokubo) [۲۱] تهیه شد و دو نمونه در یک پلیت در مجاورت مایع SBF و درون انکوباتور با دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد قرار گرفت. کامپوزیت‌ها پس از ۳، ۷، ۱۴ و ۲۱ روز از محلول خارج و تصاویر میکروسکوپ الکترونی روبشی (Scanning Electron Microscopy: SEM) از سطح آن‌ها گرفته شد.

خواص مکانیکی

نحوه رفتار کامپوزیت پلی‌کاپرولاکتون/نشاسته در آزمون استحکام فشاری بررسی شد. استحکام فشاری کامپوزیت‌ها طبق استاندارد (F2150 ASTM) توسط دستگاه Zwick/ Roel

آزمون کاهش جرم

به منظور بررسی میزان جذب آب قرص‌ها و اندازه‌گیری کاهش جرم آن‌ها، در ابتدا قرص‌ها وزن شد و در آب مقطر درون انکوباتور با دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد قرار گرفت. قرص‌ها پس از ۱، ۲، ۴، ۸، ۱۶ ساعت و ۱، ۲، ۴، ۸، ۱۶ روز، هر بار از داخل ظرف خارج و پس از خشک شدن وزن شد. در انتهای آزمایش کاهش جرم با استفاده از رابطه زیر به دست آمد.

$$\text{درصد کاهش جرم} = \frac{m_0 - m_t}{m_0} \times 100$$

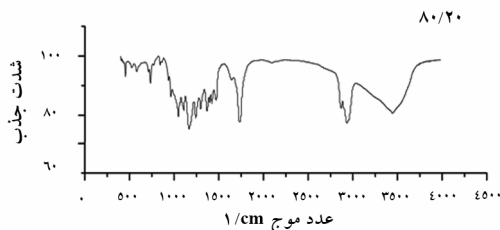
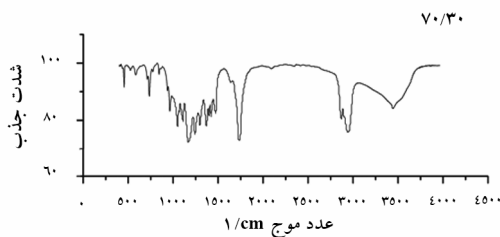
که در این رابطه m_0 و m_t به ترتیب جرم نمونه‌ها قبل از قرار گرفتن در آب و جرم نمونه‌های خشک در زمان t پس از قرار گرفتن در آب است.

اندازه‌گیری کمی میزان تخریب نشاسته

تخریب نشاسته به عنوان شاخصی برای تخریب کامپوزیت پلی‌کاپرولاکتون/نشاسته در نظر گرفته شد. به منظور بررسی تخریب این کامپوزیت، نمونه‌ها در محلول بافر فسفات سالین (Phosphate Buffer Saline: PBS) با pH ۷/۴ که حاوی آنزیم آلفا آمیلاز با غلظتی مشابه غلظت آن در سرم انسانی (۱۵۰ واحد در لیتر) است، غوطه‌ور شد. سرعت تخریب نشاسته با اندازه‌گیری میزان غلظت نشاسته رهائش یافته در محلول PBS به مدت ۲۱ روز بررسی شد. بدین منظور نمونه‌ها به مدت ۲۱ روز درون انکوباتور قرار گرفت و هر روز ۱ میلی‌لیتر از محلول PBS خارج شد. تعداد تکرارها برای این آزمایش ۳ بار برای هر نمونه بود. پس از پایان ۲۱ روز هر کدام از محلول‌ها با ۵ میلی‌لیتر محلول دی نیترو سالیسیلیک اسید (Dinitrosalicylic acid: DNS) مخلوط شد و محلول حاصل به مدت ۵ دقیقه در مجاورت بخار آب ۱۰۰ درجه سانتی‌گراد قرار گرفت و در دمای اتاق سرد شد. سپس این نمونه‌ها با دستگاه UV-Visible Spectrophotometer در مجاورت پرتو ۵۷۰ نانومتر قرار گرفت. برای به دست آوردن

اندازه‌گیری شد.

ایجاد یک کامپوزیت با خواص بهتر از تک تک اعضا است. همچنین در این شکل یکی از نقاط اوج شاخص باند کربن-کالر در کلروفورم در طول موج ۲۲۱۰ مشاهده نشد که نشان دهنده عدم حضور کلروفورم در داخل کامپوزیت‌هاست. بقیه نقاط اوج مربوط به این حلال در نواحی ۳۰۰۰ و ۱۲۰۰ و ۷۰۰ نانومتر به علت وجود سایر نقاط اوج قابل بحث و تحلیل نیست. با مقایسه شکل FTIR مربوط به دو نمونه ۳۰/۷۰ و ۲۰/۸۰ می‌توان پی برد که تفاوت این دو شکل فقط در شدت جذب است که علت این پدیده درصد جرم‌های مختلف اجزای کامپوزیت در دو نمونه ۳۰/۷۰ و ۲۰/۸۰ است.



شکل ۱ نمودار FTIR کامپوزیت‌ها

نتایج آزمون کاهش جرم

در شکل ۲ و ۳ درصد کاهش جرم به ترتیب در روز اول و ۳۲ روز بعد مشاهده می‌شود. درصد کاهش جرم اندک می‌تواند ناشی از دو پدیده مکمل باشد: ۱- توانایی جذب آب اندک مواد موجود در کامپوزیت که به ترکیب شیمیایی و بلورینگی آن بستگی دارد و ۲- درصد تخلخل‌های موجود در کامپوزیت [۲۶]. در روز اول پس از غوطه‌وری در آب دوبار تقطیر در

آزمون‌های زیستی

آزمون‌های عملکردی MTT [3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-Diphenyl Tetrazolium Bromide] و آلکالین فسفاتاز (Alkaline Phosphatase) برای بررسی رفتار زیستی کامپوزیت پلی‌کاپرولاکتون/نشاسته انجام گرفت. در این آزمون‌های سلولی از سلول‌های استئوسارکوما (Osteosarcoma) رده G-299 استفاده شد. قبل از انجام آزمون‌های سلولی، نمونه‌ها به کمک اشعه فرابنفش استریل شد. به منظور انجام آزمون MTT سلول‌ها به مدت ۲۴ ساعت در مجاورت عصاره ۷ روزه گرفته شده از نمونه‌ها قرار گرفتند. برای انجام آزمون آلکالین فسفاتاز سلول‌ها در مجاورت عصاره نمونه‌ها قرار گرفتند و پس از ۳ و ۷ روز میزان آلکالین فسفاتاز ترشح شده از سلول‌ها اندازه‌گیری و با نمونه کنترل که محیط کشت بدون عصاره بود، مقایسه شد.

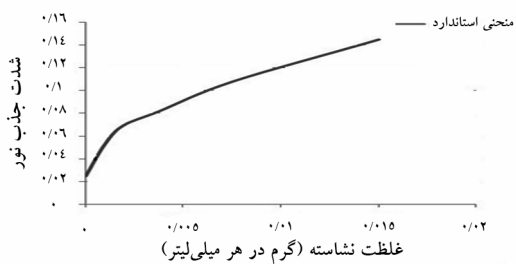
نتایج

بررسی نمودارهای FTIR (Fourier Transform Infrared Spectroscopy)

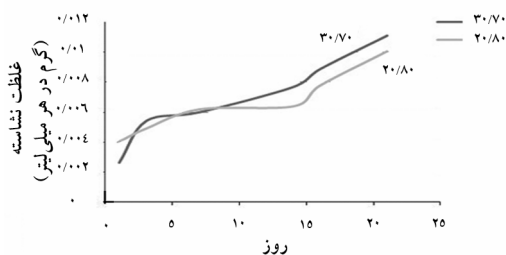
شکل ۱ طیف FTIR نمونه‌های ۳۰/۷۰ و ۲۰/۸۰ را نشان می‌دهد. نقاط اوج (Peaks) شاخص پلی‌کاپرولاکتون در ۳۳۰۰-۳۷۰۰ و ۱۷۳۷ و ۸۵۰-۱۴۸۰ و ۷۲۰ قابل شناسایی است [۲۲-۲۴]. نقاط اوج شاخص پلی‌ساکاریدها بین ۹۵۳-۱۱۸۰ قرار گرفته است که با نقاط اوج شاخص پلی‌کاپرولاکتون تداخل دارد. با مقایسه این نقاط با نقطه اوج پلی‌کاپرولاکتون خالص در این بازه حضور نشاسته و نقاط اوج آن قابل تشخیص است [۲۵]. از طرفی افزایش پیوند هیدروژنی در طول موج‌های ۲۸۸۷-۲۹۱۹ و ۹۹۲-۹۹۹ به صورت یک نقطه اوج دوگانه قابل مشاهده است [۲۶]. افزایش پیوند هیدروژنی بین دو جزء کامپوزیت نشان دهنده اتصالات مناسب به منظور

کامپوزیت پلی‌کاپرولاکتون نشاسته برای کاربردهای مهندسی بافت استخوان

با بررسی کاهش جرم در روز دوم به بعد با توجه به شکل ۳ مشاهده می‌شود که در نمونه ۳۰/۷۰ پس از کاهش جرم ناگهانی به علت از بین رفتن شبکه‌های فیزیکی درصد کاهش جرم کاهش می‌یابد. اما در روز ۳ تا ۶ هر دو کامپوزیت دچار کاهش شدیدی در میزان جذب آب می‌شوند. دلیل این مشاهدات تخریب کامل نشاسته موجود در سطح و ایجاد تخلخل‌های سطحی و رسیدن به لایه زیرین است. این تخلخل‌ها ناشی از خروج نشاسته است. سرعت این تغییرات در نمونه ۳۰/۷۰ به علت ازدیاد درصد نشاسته در دسترس بیشتر است. میانگین کاهش جرم در نمونه ۳۰/۷۰ و ۲۰/۸۰ پس از ۳۲ روز به ترتیب ۱۱/۵۰ و ۹/۹۳ بود که با توجه به درصد نشاسته بیشتر در نمونه ۳۰/۷۰ قابل پیش‌بینی بود.



شکل ۴ نمودار استاندارد غلظت نشاسته

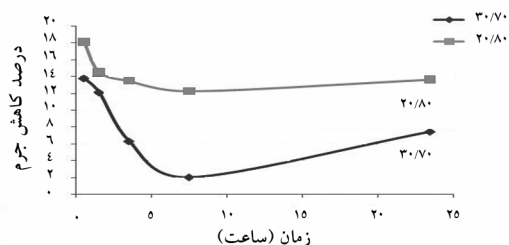


شکل ۵ نمودار غلظت نشاسته در محلول PBS در طول ۲۱ روز

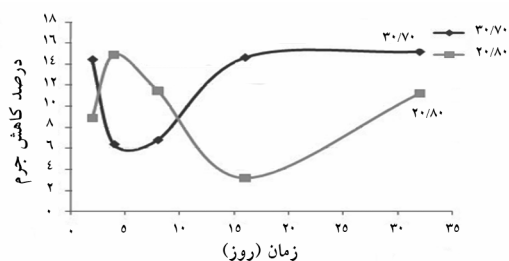
نتایج اندازه‌گیری کمی میزان تخریب نشاسته

در شکل ۴ منحنی استاندارد غلظت نشاسته مشاهده می‌شود. با اندازه‌گیری میزان جذب نور محلول نمونه‌ها در ۲۱ روز اول پس از تخریب و مقایسه با جذب نور در محلول

محیط انکوباتور، چون هیچ‌گونه تخلخلی در سطح وجود ندارد، کاهش جرم فقط مربوط به توانایی اجزای کامپوزیت در جذب آب می‌شود. پلی‌کاپرولاکتون به علت ماهیت آب‌گریز در ساعات اولیه کمتر آب جذب می‌کند، اما نشاسته با سرعت در آب حل شده و هیدرولیز می‌شود. اما در روز اول با این‌که درصد نشاسته در نمونه به درصد جرمی ۳۰/۷۰ بیشتر است، مشاهده می‌شود که درصد کاهش جرم در تمامی ساعات اندازه‌گیری در نمونه با درصد جرمی ۲۰/۸۰ بیشتر است. میانگین کاهش جرم در نمونه ۲۰/۸۰ در روز اول ۱۴/۴۳ درصد و در نمونه ۳۰/۷۰، ۸/۳۲ درصد است که به دلیل برهمکنش قوی‌تر به خاطر پیوندهای هیدروژنی بیشتر در کامپوزیت ۳۰/۷۰ است که باعث ایجاد یک شبکه فیزیکی و در نتیجه ممانعت از جذب آب می‌شود [۲۷]. نمونه ۳۰/۷۰ پس از گذشت ۴ ساعت از مجاورت کامپوزیت با سرعت بیشتری شروع به کاهش جرم می‌کند که نشان دهنده آغاز نفوذ آب به شبکه‌های فیزیکی است.



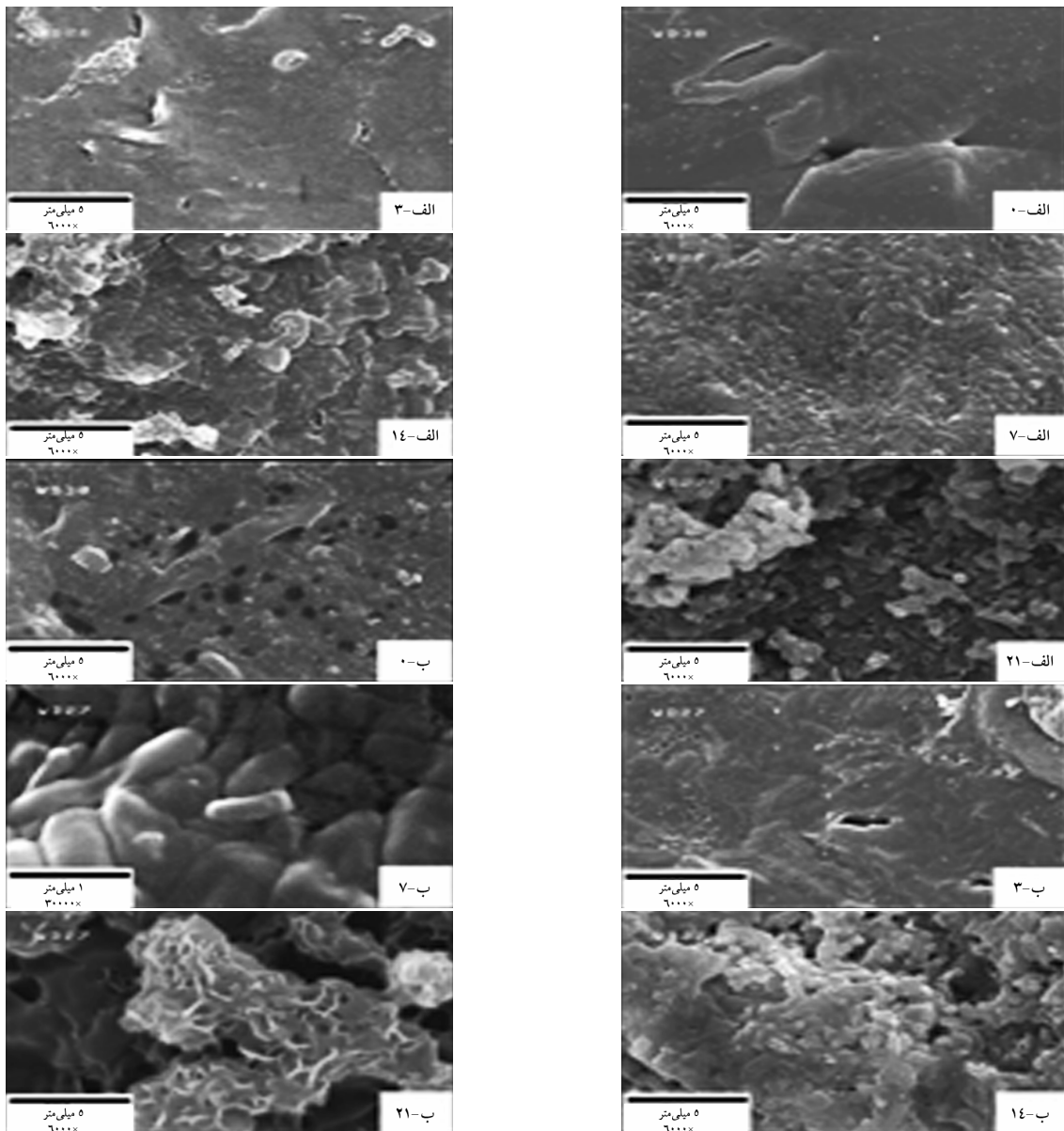
شکل ۶ نمودار درصد کاهش جرم در روز اول پس از مجاورت با آب مقطر



شکل ۷ درصد کاهش جرم در ۳۲ روز اول پس از مجاورت با آب

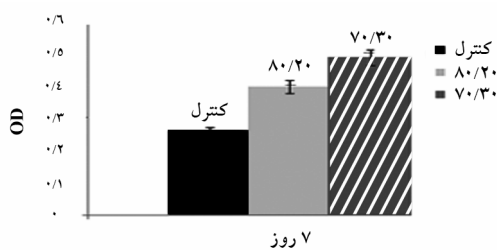
فیزیکی در نمونه ۳۰/۷۰ است که مانع جذب آب می شود، پس میزان نشاسته رها شده در این نمونه کمتر است. در روزهای سوم به بعد میزان رهایش نشاسته در نمونه ۳۰/۷۰ بیشتر از نمونه ۲۰/۸۰ است که به دلیل درصد بیشتر نشاسته در این نمونه است.

استاندارد نمودار ۵ ترسیم شد. در شکل ۵ میزان رهایش نشاسته در روزهای متفاوت مشاهده می شود. همان طور که در شکل ۵ مشاهده می شود، در روز اول میزان نشاسته آزاد شده در محلول ها برای نمونه ۲۰/۸۰ بیشتر است که با توجه به نتایج مربوط به کاهش وزن، دلیل این مشاهدات ایجاد یک شبکه

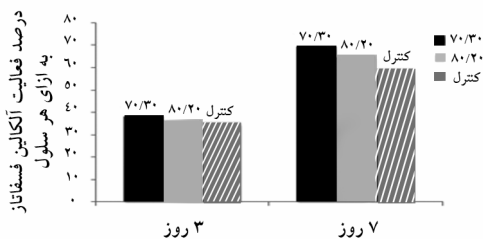


شکل ۶ تصاویر میکروسکوپ الکترونی روشی سطح نمونه ها پس از مجاورت با SBF؛ تصاویر الف کامپوزیت پلی کاپرولاکتون /۸۰ نشاسته ۲۰ و تصاویر ب کامپوزیت پلی کاپرولاکتون /۷۰ نشاسته ۳۰ را به ترتیب در روزهای ۰ تا ۲۱ در مجاورت با SBF نشان می دهد.

کامپوزیت) بود و دو نمونه نسبت به نمونه کنترل جذب نوری (Optical Density: OD) بیشتری داشتند. همچنین نمونه ۳۰/۷۰ نسبت به نمونه ۲۰/۸۰ نتایج بهتری را نشان داد. آزمون MTT به تنهایی برای بررسی رفتار سلولی در مجاورت نمونه‌ها کافی نیست اما بیانگر این موضوع است که کامپوزیت‌ها برای رده سلولی G-299 سمیتی ندارد و وجود عصاره این کامپوزیت در محیط کشت باعث افزایش تکثیر سلول‌ها و افزایش فعالیت میتوکندری آن‌ها می‌شود. این آزمون برای هر نمونه ۳ بار تکرار شد.



شکل ۷ نمودار MTT برای رده سلولی G-299 در مجاورت عصاره ۷ روزه کامپوزیت‌ها



شکل ۸ نمودار نتایج آلکالین فسفاتاز پس از ۳ و ۷ روز مجاورت با کامپوزیت

آزمون آلکالین فسفاتاز

در این آزمون میزان آلکالین فسفاتاز ترشح شده از سلول‌ها پس از ۳ و ۷ روز مجاورت با نمونه‌ها اندازه‌گیری شد. این آزمون برای هر نمونه ۳ بار تکرار شد. شکل ۸ نشان دهنده نتایج این آزمون است. میزان آلکالین فسفاتاز ترشح شده از

نتایج بررسی زیست‌فعال بودن کامپوزیت

پلی‌کاپرولاکتون / نشاسته

در شکل ۶ تصاویر گرفته شده به کمک میکروسکوپ الکترونی روبشی از سطح کامپوزیت‌ها پس از ۳، ۷، ۱۴ و ۲۱ روز مجاورت با مایع SBF مشاهده می‌شود. نتایج به دست آمده برای هر دو نمونه ۳۰/۷۰ و ۲۰/۸۰ تقریباً مشابه بود. پس از سه روز مجاورت با SBF جوانه‌های آپاتیت و رشد آن‌ها با ریخت‌شناسی (Morphology) میله‌ای در سطح هر دو نمونه مشاهده شد. پس از ۷ روز رشد این جوانه‌ها به قدری بود که سرتاسر سطح نمونه پوشیده از آپاتیت با ریخت‌شناسی میله‌ای شد و نیز تعدادی از جوانه‌های هیدروکسی آپاتیت در جهت عمود بر سطح رشد کرد. در روز ۱۴ در نمونه ۲۰/۸۰ در قسمت‌هایی از سطح، میله‌های رشد کرده آغاز به چسبیدن به یکدیگر کرده و در سطح نمونه به چشم می‌خورد. در حالی که در نمونه ۳۰/۷۰ ذرات بزرگتری تشکیل شده است و ذرات چسبیده شده به هم در همه جای سطح مشاهده می‌شود. در روز ۲۱ سطح ۲۰/۸۰ مانند سطح ۳۰/۷۰ شده و در سرتاسر سطح رشد میله‌های به هم چسبیده به چشم می‌خورد. این تصاویر نمود خوبی برای این نتیجه‌گیری است که کامپوزیت پلی‌کاپرولاکتون / نشاسته از زیست‌فعالی خوبی برخوردار است و در صورت قرارگیری در بدن می‌تواند به کمک لایه‌ای از کلسیم فسفات به بافت استخوانی اتصال یابد [۲۸].

آزمون‌های سلولی

آزمون MTT

شکل ۷ نمودار میله‌ای MTT سلول‌های رده G-299 در مجاورت عصاره کامپوزیت‌ها به مدت ۷ روز را نشان می‌دهد. مقدار P برای مقایسه نمونه‌ها کمتر از ۰/۰۱ بود که در نتیجه می‌توان به داده‌های موجود با درجه اطمینان بالای ۹۹ درصد استناد کرد. در هر دو نمونه ۳۰/۷۰ و ۲۰/۸۰ میزان فعالیت میتوکندری بیشتر از نمونه کنترل (محیط کشت فاقد عصاره

هر دو نمونه بیشتر از نمونه کنترل بود و همچنین نمونه ۳۰/۷۰ نتایج بهتری را نشان داد. ترشح بیشتر آلکالین فسفاتاز توسط سلول‌ها پس از مجاورت با عصاره کامپوزیت بیانگر توانایی این کامپوزیت در افزایش فعالیت استخوانی سلول‌های G-299 است که منجر به تولید بیشتر این آنزیم توسط سلول‌ها نسبت به نمونه کنترل (محیط کشت فاقد عصاره کامپوزیت) می‌شود.

بحث

کامپوزیت پلی‌کاپرولاکتون/نشاسته از طریق حل کردن دو جزء پلیمری در کلروفرم و قالب‌گیری کردن با دو درصد جرمی ۲۰/۸۰ و ۳۰/۷۰ ساخته شد. به منظور بررسی پتانسیل این کامپوزیت برای استفاده در جایگزین‌های استخوانی، زیست‌فعال بودن این کامپوزیت پلیمری با قرار دادن در محلول SBF به مدت ۲۱ روز سنجیده شد. تشکیل آپاتیت با ریخت‌شناسی میله‌ای روی سطح کامپوزیت نشان می‌دهد که این کامپوزیت دارای این پتانسیل است که در بدن نیز از طریق تشکیل لایه هیدروکسی آپاتیت روی سطح با بافت استخوانی اطراف همگن شود. همچنین طبق مشاهدات، آپاتیت روی سطح نمونه با درصد جرمی ۳۰/۷۰ با سرعت بیشتری تشکیل می‌شود. نتایج حاصل از آزمون‌های سلولی روی عصاره ۷ روزه کامپوزیت نشان می‌دهد که ترکیب پلی‌کاپرولاکتون/نشاسته باعث تحریک رشد سلول‌های G299 رده استئوسارکوما می‌شود که با افزایش درصد نشاسته میزان رشد سلول‌ها افزایش پیدا می‌کند که به علت خاصیت هدایت استخوانی این پلیمر

منابع

طبیعی است. به علاوه؛ رشد و فعالیت بهتر سلول‌ها نسبت به نمونه کنترل (محیط کشت فاقد عصاره کامپوزیت) گواهی بر این مدعاست که کلروفرم به طور کامل ساختار را ترک می‌کند و هیچ‌گونه سمیتی ندارد. ضریب کشسانی و استحکام فشاری این کامپوزیت به منظور استفاده به عنوان جایگزینی برای استخوان تراپکولار مناسب است. به علاوه با افزایش درصد نشاسته در کامپوزیت ضریب کشسانی و استحکام فشاری کامپوزیت افزایش پیدا می‌کند که دلیل آن طبق شواهد موجود در نمودار FTIR، افزایش درصد پیوندهای هیدروژنی بین نشاسته و پلی‌کاپرولاکتون است. این پیوند قوی هیدروژنی از آزمون جذب آب نیز قابل استنتاج است. در نمونه با درصد جرمی ۳۰/۷۰ به علت پیوند قوی‌تر بین نشاسته و پلی‌کاپرولاکتون یک شبکه فیزیکی ایجاد می‌شود که مانع جذب آب در ساعات اولیه می‌شود. اما به مرور زمان چون درصد نشاسته در این نمونه بیشتر است و سرعت هیدرولیز نشاسته بسیار بالاست، کاهش جرم افزایش می‌یابد؛ بنابراین سرعت تخریب این کامپوزیت را می‌توان با تغییر درصد جرمی نشاسته تنظیم کرد.

تشکر و قدردانی

نویسندگان این مقاله کمال تشکر و قدردانی خود را از مرکز تحقیقات ارتوپدی و ترومای دانشگاه علوم پزشکی مشهد و انستیتو پاستور ایران به خاطر حمایت‌ها و یاری ایشان در این تحقیق اعلام می‌دارند.

- [1] Dillow A, Lowman A. Biomimetic Materials And Design: Biointerfacial Strategies, Tissue Engineering And Targeted Drug Delivery. Philadelphia: CRC Press, 2002; p: 290-2.
- [2] Shalumon K, Aulekha KH, Chennazhi KP, Tamra H, Nair SV, Jayakumar R. Fabrication of

Chitosan/poly(caprolacton) nanofibrous scaffold for bone and skin tissue engineering. Int J Biol Macromol 2011; 48(4): 571-6.

- [3] Chandra R, Rustgi R. Biodegradable polymers. Progr Polym Sci 1998; 23: 1273-335.
- [4] Okada M. Chemical syntheses of biodegradable

- polymers. *Prog Polym Sci* 2002; 27(1): 87-133.
- [5] Puppi D, Chiellini F, Piras AM, Chiellini E. Polymeric materials for bone and cartilage repair. *Prog Polym Sci* 2010; 35(4): 403-40.
- [6] Hutmacher DW. Scaffolds in tissue engineering bone and cartilage. *Biomaterials* 2000; 21(24): 2529-43.
- [7] Gunatillake PA, Adhikari R. Biodegradable synthetic polymers for tissue engineering. *Eur Cells Mater* 2003; 5: 1-16.
- [8] Mano JF, Sousa RA, Boesel LF, Neves NM, Reis RL. Bioinert, biodegradable and injectable polymeric matrix composites for hard tissue replacement: state of the art and recent developments. *Comp Sci Tech* 2004; 64(6): 789-817.
- [9] Nair LS, Laurencin CT. Biodegradable polymers as biomaterials. *Prog Polym Sci* 2007; 32(8-9): 762-98.
- [10] Woodruff MA, Hutmacher DW. The return of a forgotten polymer-Polycaprolactone in the 21st century. *Prog Polym Sci* 2011; 35(10): 1217-56.
- [11] Liu H, Xie F, Yu Long, Chen L, Li L. Thermal processing of starch-based polymers. *Prog Polym Sci* 2009; 34(12): 1348-68.
- [12] Santos MI, Unger RE, Sousa RA, Reis RL, Kirkpatrick CJ. Crosstalk between osteoblasts and endothelial cells co-cultured on a polycaprolactone-starch scaffold and the in vitro development of vascularization. *Biomaterials* 2009; 30(26): 4407-15.
- [13] Puppi D, Chiellini F, Piras AM, Chiellini E. Polymeric materials for bone and cartilage repair. *Prog Polym Sci* 2010; 35(4): 403-40.
- [14] Alves NM, Saiz-Arroyo C, Rodriguez-Perez MA, Reis RL, Mano JF. Microhardness of starch based biomaterials in simulated physiological conditions. *Acta Biomater* 2007; 3(1): 69-76.
- [15] Singh RP, Pandey JK, Rutot D, Degée P, Dubois P. Biodegradation of poly(epsilon-caprolactone)/starch blends and composites in composting and culture environments: the effect of compatibilization on the inherent biodegradability of the host polymer. *Carbohydr Res* 2003; 338(17): 1759-69.
- [16] Rosa DS, Lopes DR, Calil MR. Thermal properties and enzymatic degradation of blends of poly(epsilon-caprolactone) with starches. *Polym Test* 2005; 24(6): 756-61.
- [17] Ishiaku US, Pang KW, Lee WS, Mohd Ishak ZA. Mechanical properties and enzymic degradation of thermoplastic and granular sago starch filled poly(epsilon-caprolactone). *Euro Pol J* 2002; 38(2): 393-401.
- [18] Avella M, Errico ME, Laurienzo P, Martuscelli E, Raimo M, Rimedio R. Preparation and characterisation of compatibilised polycaprolactone/starch composites. *Polymer* 2000; 41(10): 3875-81.
- [19] Su J, Chen L, Li L. Characterization of polycaprolactone and starch blends for potential application within the biomaterials field. *Afr J Biotechnol* 2012; 11(3): 694-701.
- [20] Park JB, Lakes RS. *Biomaterials: An Introduction*. New York: Springer, 2007; p: 134-46.
- [21] Kokubo T, Takadama H. How useful is SBF in predicting in vivo bone bioactivity? *Biomaterials* 2006; 27(15): 2907-15.
- [22] Campos A, Marconcini JM, Martins-Franchetti SM, Mattoso LHC. The influence of UV-C

- irradiation on the properties of thermoplastic starch and polycaprolactone biocomposite with sisal bleached fibers. *Polym Degrad Stab* 2012; 97(10): 1948-55.
- [23] Wu CS. Physical properties and biodegradability of maleated-polycaprolactone/starch composite. *Polym Degrad Stab* 2003; 80(1): 127-34.
- [24] Wang J, Cheung MK, Mi Y. Miscibility and morphology in crystalline/amorphous blends of poly(caprolactone)/poly(4-vinylphenol) as studied by DSC, FTIR, and ^{13}C solid state NMR. *Polymer* 2002; 43(4): 1357-64.
- [25] Liu H, Chaudhary D, Yusa SI, Tadé MO. Glycerol/ starch/ Na^+ - montmorillonite nanocomposites: A XRD, FTIR, DSC and ^1H NMR study. *Carbohydr Polym* 2011; 83(4): 1591-97.
- [26] Duarte ARC, Mano JF, Reis RL. Enzymatic degradation of 3D scaffolds of starch-poly-(ϵ -caprolactone) prepared by supercritical fluid technology. *Polym Degrad Stab* 2010; 95(10): 2110-7.
- [27] di Franco CR, Cyrasa VP, Busalmen JP, Ruseckaite RA, Vázquez A. Degradation of polycaprolactone/starch blends and composites with sisal fibre. *Polym Degrad Stab* 2004; 86(10): 95-103.
- [28] Pan H, Zhao X, Darvell BW, Lu WW. Apatite-formation ability--predictor of "bioactivity"? *Acta Biomater* 2010; 6(11): 4181-8.
- [29] Yang S, Leong KF, Du Z, Chua CK. The design of scaffolds for use in tissue engineering. Part I. Traditional factors. *Tissue Eng* 2001; 7(6): 679-89.
- [30] Huttmacher DW, Schantz JT, Lam CX, Tan KC, Lim TC. State of the art and future directions of scaffold-based bone engineering from a biomaterials perspective. *J Tissue Eng Regen Med* 2007; 1(4): 245-60.