Original Article

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

Soheila Ali Akbari Ghavimi[1], Mehran Solati-Hashjin[2*], Mohammad Hossein Ebrahimzadeh[3], Mohammad Ali Shokrgozar[4], Fateme Fayyaz Bakhsh[5]

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

[Downloaded from mjms.modares.ac.ir on 2024-10-12]

مقاله اصیل

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

سهیلا علی‌اکبری‌قویمی[1]، مهران صولتی‌هشجین[2*]، محمدحسین ابراهیم‌زاده[3]، محمدعلی شکرگزار[4]، فاطمه فیاض‌بخش[5]

۱- کارشناس ارشد، گروه بیومتریال، دانشکده مهندسی پزشکی، دانشگاه صنعتی امیرکبیر (پلی‌تکنیک تهران)، تهران، ایران
۲- دانشیار، گروه بیومتریال، دانشکده مهندسی پزشکی، دانشگاه صنعتی امیرکبیر (پلی‌تکنیک 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 (پلی‌تکنیک تهران)، تهران، ایران

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

دریافت مقاله: ۹۰/۱۲/۰۶ پذیرش مقاله: ۹۱/۰۶/۱۸

چکیده

هدف: کامپوزیت زیست تخریب‌پذیر پلی کاپرولاکتون/ نشاسته می‌تواند 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 فروسرخ 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 ترابکولار انسان است. میزان کاهش جرم نمونه‌ها در آب و همچنین سرعت تخریب نشاسته در محلول بافر فسفات سالین ارزیابی شد و بررسی‌ها بیانگر این بود که وجود جزء نشاسته و درصد آن بر سرعت تخریب تأثیر می‌گذارد. همچنین آزمون‌های MTT و آلکالین فسفاتاز نشان داد که این کامپوزیت سمّیتی 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 آلکالین فسفاتاز

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

[Downloaded from mjms.modares.ac.ir on 2024-10-12]

مقدمه

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 (Biocompatibile) 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 بسیارنرم 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 زمینهٔ 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 محدودهٔ 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 دستهٔ طبیعی و مصنوعی 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 ٦٠- درجه سانتی‌گراد و دمای ذوب آن در محدودهٔ ٥٧-٦٤ درجه سانتی‌گراد قرار دارد [١-٤]. 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 [٥]. این پلیمر در مهندسی پزشکی کاربرد فراوانی دارد [٥-٧]. از ویژگی‌های جالب این پلیمر توانایی آن در ترکیب شدن با مواد گوناگون است [٣، ٤]. 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 [٥، ٨، ٩]. رفتار این پلیمر به شدت تابع جزیی است که با آن ترکیب می‌شود [١٠]. 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 [١١]. ترکیبات نشاسته پتانسیل زیادی برای استفاده در زمینه مهندسی پزشکی دارد؛ چرا که این مواد زیست‌تخریب‌پذیر، ارزان قیمت (نسبت به سایر پلیمرهای زیست‌تخریب‌پذیر) و قابل دسترس است [١٢]. ترکیب نشاسته با پلی‌استرها مانند پلی‌کاپرولاکتون پتانسیل فراوانی به منظور استفاده در سیمان‌های استخوانی، هیدروژل‌های (Hydrogels) مهندسی بافت استخوان، جایگزین‌های استخوانی و... دارد [١٣].

نتایج بسیار خوبی از ترکیب پلی‌کاپرولاکتون و نشاسته (Starch Polycaprolacton: SPCl) به منظور استفاده در مهندسی بافت به‌دست آمد. داربست‌های SPCl دارای خواص

[Downloaded from mjms.modares.ac.ir on 2024-10-12]

مکانیکی و فیزیکی- شیمیایی مناسبی برای مهندسی بافت است؛ از رشد و تمایز سلول‌های بنیادی مزانشیمی (Mesenchymal Stem Cells: MSCs) حمایت می‌کند و زمینهٔ مناسبی برای سلول‌های اندوتلیال (Endothelial Cells) به‌وجود می‌آورد [۱۲]. ترکیب پلیمری SPCl همزمان از مزایای یک پلیمر طبیعی و یک پلیمر مصنوعی بهره می‌برد. SPCl یک پلیمر با پایهٔ 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 لیپاز تسریع می‌شود [۱٤]. زیست‌تخریب‌پذیری پلی‌کاپرولاکتون در حضور نشاسته به علت افزایش سطح تماس برای حملهٔ میکروبی افزایش می‌یابد. مهم‌ترین محدودیت کامپوزیت پلی‌کاپرولاکتون/ نشاسته چسبندگی کم این دو پلیمر به یکدیگر به علت ترکیب یک پلی‌ساکارید هیدروفیل و یک پلی استر هیدروفوب است [۱۵]. فاز نشاسته به خوبی در زمینه پلی‌کاپرولاکتون پراکنده شده ولی به علت آب‌دوست بودن نشاسته برهمکنش دو فاز در فصل مشترکشان ضعیف است. این برهمکنش ضعیف منجر به افزایش جذب آب در شبکه پلی‌کاپرولاکتون می‌شود و سرعت تخریب پلی‌کاپرولاکتون را افزایش می‌دهد [۱۵-۱۷]. کامپوزیت پلی‌کاپرولاکتون/ نشاسته پاسخ التهابی شدیدی در کوتاه مدت و بلند مدت ایجاد نمی‌کند [۱۲] و با بررسی کمی اثر نشاسته روی میزان تخریب پلی‌کاپرولاکتون، می‌توان سرعت تخریب داربست را کنترل کرد [۱۵-۱۷]. کامپوزیت پلی‌کاپرولاکتون/ نشاسته دارای ضریب کشسانی (Module Elastic) و استحکام فشاری بهتری نسبت به پلی‌کاپرولاکتون است [۱۸].

با توجه به مطالب بیان شده، در این تحقیق کامپوزیت پلی‌کاپرولاکتون/ نشاسته با دو درصد جرمی مختلف، از طریق حل کردن در حلال مشترکشان ساخته شد. پس از مشخصه‌یابی 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 پلی‌کاپرولاکتون/ نشاسته از طریق حل کردن در کلروفرم (Chloroform)، مواد اولیه پلی‌کاپرولاکتون 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 پلی‌کاپرولاکتون/ نشاسته با دو درصد جرمی پلی‌کاپرولاکتون ۸۰/ نشاسته ۲۰ و پلی‌کاپرولاکتون ۷۰/ نشاسته ۳۰، ابتدا پلی‌کاپرولاکتون در کلروفرم درون یک حمام آب ٦۰ درجهٔ سانتی‌گراد، 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 ٤ درجه سانتی‌گراد 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 cm^{-1} ٤۰۰۰-٤۰۰ استفاده شد. در این آزمون از پتاسیم بروماید (KBr) به عنوان رقیق کننده استفاده شد.

[Downloaded from mjms.modares.ac.ir on 2024-10-12]

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، ٤، ۸، ١٦ ساعت و ۱، ۲، ٤، ۸، ١٦ روز، هر بار از داخل ظرف خارج و پس از خشک شدن وزن شد. در انتهای آزمایش کاهش جرم با استفاده از رابطه زیر به‌دست آمد.

$$\text{درصد کاهش جرم} = \frac{m_0 - m_t}{m_0} \times ۱۰۰$$

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 کمّی 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 ۷/٤ 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 رهایش 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 (Dinitrosalicyclic asid: DNS) مخلوط شد و محلول حاصل به مدت ۵ دقیقه در مجاورت بخار آب ۱۰۰ درجهٔ 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 به‌دست آوردن 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 لایهٔ 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 شبیه‌سازی‌شدهٔ 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 درجهٔ سانتی‌گراد قرار گرفت. کامپوزیت‌ها پس از ۳، ۷، ١٤ 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

[Downloaded from mjms.modares.ac.ir on 2024-10-12]

اندازه‌گیری شد.

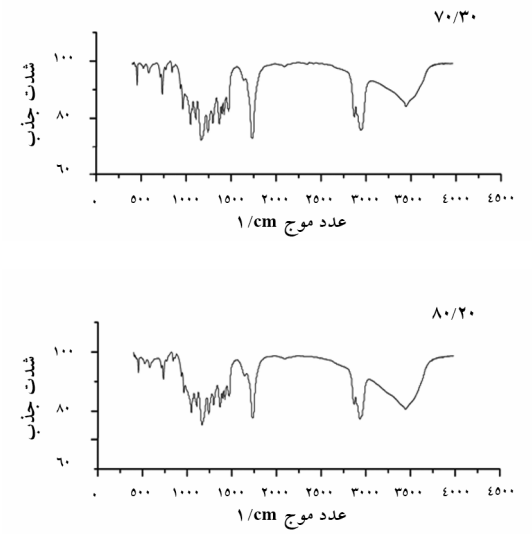
آزمون‌های زیستی

آزمون‌های عملکردی MTT [3-(4,5-Dimethythiazol-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) ردهٔ G-299 استفاده شد. قبل از انجام آزمون‌های سلولی، نمونه‌ها به کمک اشعه فرابنفش استریل شد. به منظور انجام آزمون MTT سلول‌ها به مدت ۲٤ 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 ۸۵۰-۱٤۸۰ و ۷۲۰ قابل شناسایی است [۲۲-۲٤]. نقاط اوج شاخص پلی‌ساکاریدها بین ۹۵۳-۱۱۸۰ قرار گرفته است که با نقاط اوج شاخص پلی‌کاپرولاکتون تداخل دارد. با مقایسهٔ 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 [۲٦]. افزایش پیوند هیدروژنی بین دو جزء کامپوزیت نشان دهندهٔ اتصالات مناسب به منظور ایجاد یک کامپوزیت با خواص بهتر از تک تک اعضا است. همچنین در این شکل یکی از نقاط اوج شاخص باند کربن-کلر در کلروفرم در طول موج ۲۲۱۰ مشاهده نشد که نشان دهندهٔ عدم حضور کلروفرم 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 مقایسهٔ شکل FTIR مربوط به دو نمونهٔ 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 نمونهٔ ۳۰/۷۰ و ۲۰/۸۰ است.



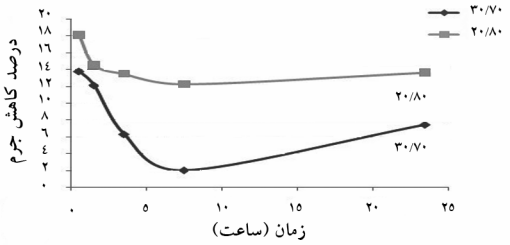
شکل ۱ نمودار FTIR کامپوزیت‌ها

نتایج آزمون کاهش جرم

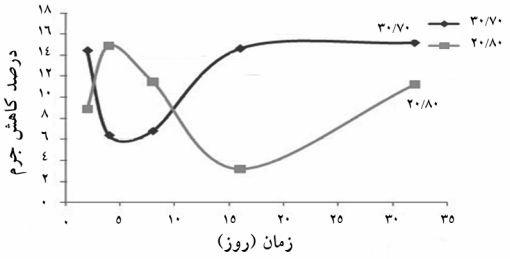
در شکل ۲ و ۳ درصد کاهش جرم به ترتیب در روز اول و ۳۲ روز بعد مشاهده می‌شود. درصد کاهش جرم اندک می‌تواند ناشی از دو پدیدهٔ مکمل باشد: ۱- توانایی جذب آب اندک مواد موجود در کامپوزیت که به ترکیب شیمیایی و بلورینگی آن بستگی دارد و ۲- درصد تخلخل‌های موجود در کامپوزیت [۲٦]. در روز اول پس از غوطه‌وری در آب دوبار تقطیر در

[Downloaded from mjms.modares.ac.ir on 2024-10-12]

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 با درصد جرمی ۳۰/۷۰ بیشتر است، مشاهده می‌شود که درصد کاهش جرم در تمامی ساعات اندازه‌گیری در نمونهٔ با درصد جرمی ۲۰/۸۰ بیشتر است. میانگین کاهش جرم در نمونهٔ ۲۰/۸۰ در روز اول ۱۴/۴۳ درصد و در نمونهٔ 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 شبکهٔ فیزیکی و در نتیجه ممانعت از جذب آب می‌شود [۲۷]. نمونهٔ ۳۰/۷۰ پس از گذشت ٤ ساعت از مجاورت کامپوزیت با سرعت بیشتری شروع به کاهش جرم می‌کند که نشان دهندهٔ آغاز نفوذ آب به شبکه‌های فیزیکی است.

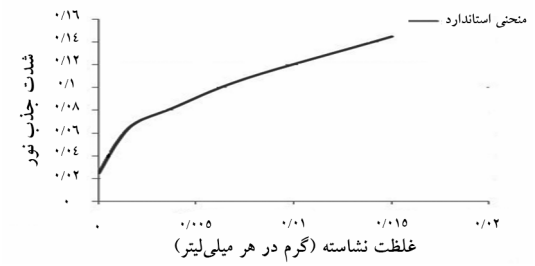


شکل ۲ نمودار درصد کاهش جرم در روز اول پس از مجاورت با آب مقطر

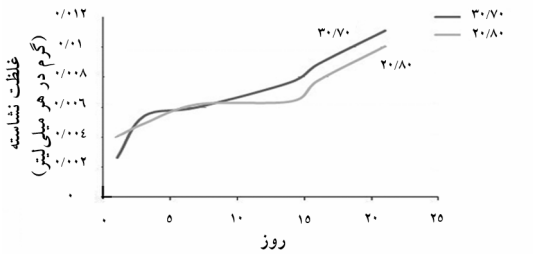


شکل ۳ درصد کاهش جرم در ۳۲ روز اول پس از مجاورت با آب

با بررسی کاهش جرم در روز دوم به بعد با توجه به شکل ۳ مشاهده می‌شود که در نمونهٔ ۳۰/۷۰ پس از کاهش جرم ناگهانی به علت از بین رفتن شبکه‌های فیزیکی درصد کاهش جرم کاهش می‌یابد. اما در روز ۳ تا ٦ 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 لایهٔ زیرین است. این تخلخل‌ها ناشی از خروج نشاسته است. سرعت این تغییرات در نمونهٔ ۳۰/۷۰ به علت ازدیاد درصد نشاسته در دسترس بیشتر است. میانگین کاهش جرم در نمونهٔ 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 نمونهٔ ۳۰/۷۰ قابل پیش‌بینی بود.



شکل ٤ نمودار استاندارد غلظت نشاسته



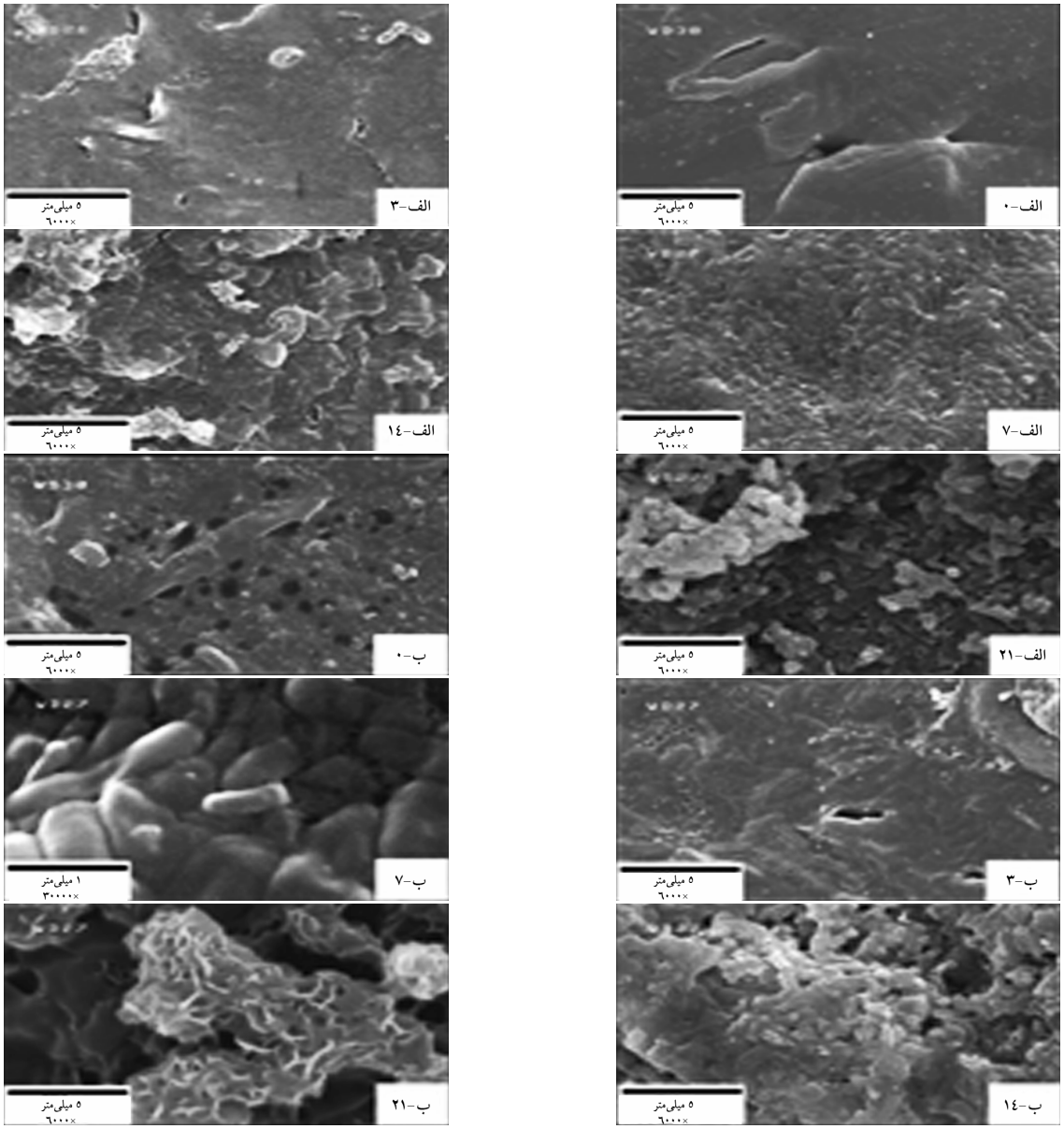
شکل ۵ نمودار غلظت نشاسته در محلول PBS در طول ۲۱ روز

نتایج اندازه‌گیری کمّی میزان تخریب نشاسته

در شکل ٤ 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

[Downloaded from mjms.modares.ac.ir on 2024-10-12]

استاندارد نمودار ۵ ترسیم شد. در شکل ۵ میزان رهایش نشاسته در روزهای متفاوت مشاهده می‌شود. همان‌طور که در شکل ۵ مشاهده می‌شود، در روز اول میزان نشاسته آزاد شده در محلول‌ها برای نمونهٔ ۲۰/۸۰ بیشتر است که با توجه به نتایج مربوط به کاهش وزن، دلیل این مشاهدات ایجاد یک شبکهٔ فیزیکی در نمونهٔ ۳۰/۷۰ است که مانع جذب آب می‌شود، پس میزان نشاسته رها شده در این نمونه کمتر است. در روزهای سوم به بعد میزان رهایش نشاسته در نمونهٔ ۳۰/۷۰ بیشتر از نمونهٔ ۲۰/۸۰ است که به دلیل درصد بیشتر نشاسته در این نمونه است.



شکل ٦ تصاویر میکروسکوپ الکترونی روبشی سطح نمونه‌ها پس از مجاورت با SBF؛ تصاویر الف کامپوزیت پلی‌کاپرولاکتون ۸۰/ نشاسته ۲۰ و تصاویر ب کامپوزیت پلی‌کاپرولاکتون ۷۰/ نشاسته ۳۰ را به ترتیب در روزهای ۰ تا ۲۱ در مجاورت با SBF نشان می‌دهد.

[Downloaded from mjms.modares.ac.ir on 2024-10-12]

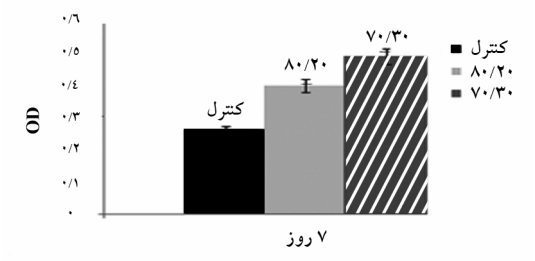
نتایج بررسی زیست‌فعال بودن کامپوزیت پلی‌کاپرولاکتون/ نشاسته

در شکل ٦ تصاویر گرفته شده به کمک میکروسکوپ الکترونی روبشی از سطح کامپوزیت‌ها پس از ۳، ۷، ١٤ و ۲۱ روز مجاورت با مایع SBF مشاهده می‌شود. نتایج به‌دست آمده برای هر دو نمونهٔ 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 ١٤ در نمونهٔ 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 نمونهٔ 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].

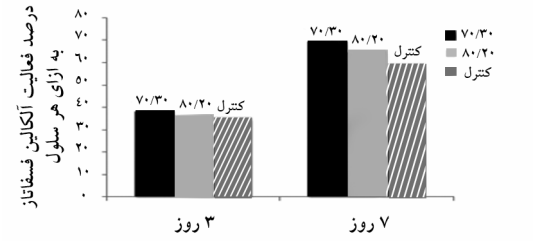
آزمون‌های سلولی

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 مقایسهٔ نمونه‌ها کمتر از ۰/۰۱ بود که در نتیجه می‌توان به داده‌های موجود با درجه اطمینان بالای ۹۹ درصد استناد کرد. در هر دو نمونهٔ ۳۰/۷۰ و ۲۰/۸۰ میزان فعالیت میتوکندری بیشتر از نمونهٔ کنترل (محیط کشت فاقد عصاره کامپوزیت) بود و دو نمونه نسبت به نمونه کنترل جذب نوری (Optical Density: OD) بیشتری داشتند. همچنین نمونهٔ ۳۰/۷۰ نسبت به نمونهٔ 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 ردهٔ 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 عصارهٔ ۷ روزهٔ 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 و۷ روز مجاورت با نمونه‌ها اندازه‌گیری شد. این آزمون برای هر نمونه ۳ بار تکرار شد. شکل ۸ نشان دهندهٔ نتایج این آزمون است. میزان آلکالین فسفاتاز ترشح شده از

[Downloaded from mjms.modares.ac.ir on 2024-10-12]

هردو نمونه بیشتر از نمونهٔ کنترل بود و همچنین نمونـهٔ ۳۰/۷۰ نتایج بهتری را نشان داد. ترشح بیشتر آلکـالین فـسفاتاز توسـط سلول‌ها پس از مجاورت با عصاره کامپوزیـت بیـانگر توانـایی این کامپوزیت در افزایش فعالیت استخوانی سلول‌های G-299 است که منجر به تولید بیشتر این آنزیم توسط سلول‌هـا نـسبت به نمونه کنترل (محیط کشت فاقد عصاره کامپوزیت) می‌شود.

بحث

کامپوزیت پلی‌کاپرولاکتون/ نشاسته از طریق حل کـردن دو جزء پلیمری در کلروفـرم و قالـب‌گیـری کـردن بـا دو درصـد جرمی ۲۰/۸۰ و ۳۰/۷۰ ساخته شد. به منظور بررسـی پتانـسیل ایـن کامپوزیـت بـرای اسـتفاده در جـایگزین‌هـای اسـتخوانی، زیست‌فعال بودن این کامپوزیت پلیمری با قرار دادن در محلول SBF بـه مـدت ۲۱ روز سـنجیده شـد. تـشکیل آپاتیـت بـا ریخت‌شناسی میله‌ای روی سطح کامپوزیت نشان مـی‌دهـد کـه این کامپوزیت دارای این پتانسیل است که در بدن نیز از طریـق تشکیل لایه هیدروکسی آپاتیت روی سطح با بافـت اسـتخوانی اطراف همگن شـود. همچنـین طبـق مـشاهدات، آپاتیـت روی سطح نمونه با درصد جرمی ۳۰/۷۰ با سرعت بیـشتری تـشکیل می‌شود. نتایج حاصل از آزمون‌های سلولی روی عصاره ۷ روزه کامپوزیت نشان می‌دهد که ترکیـب پلـی‌کـاپرولاکتون/ نـشاسته باعـث تحریـک رشـد سـلول‌هـای G299 رده استئوسـارکوما می‌شود که با افزایش درصد نشاسته میزان رشد سلول‌ها افزایش پیدا می‌کند که به علت خاصیت هدایت اسـتخوانی ایـن پلیمـر طبیعی است. به‌علاوه؛ رشد و فعالیت بهتر سلول‌هـا نـسبت بـه نمونه کنترل (محیط کشت فاقد عصاره کامپوزیـت) گـواهی بـر این مدعاست که کلروفرم به طور کامل ساختار را ترک می‌کنـد و هیچ‌گونه سمیتی ندارد. ضریب کشسانی و اسـتحکام فـشاری این کامپوزیت به منظـور اسـتفاده بـه عنـوان جـایگزینی بـرای استخوان ترابکولار مناسب است. به عـلاوه بـا افـزایش درصـد نشاسته در کامپوزیـت ضـریب کشـسانی و اسـتحکام فـشاری کامپوزیت افزایش پیدا می‌کند که دلیل آن طبق شـواهد موجـود در نمودار FTIR، افـزایش درصـد پیونـدهای هیـدروژنی بـین نشاسته و پلی‌کاپرولاکتون است. این پیوند قـوی هیـدروژنی از آزمون جذب آب نیز قابل استنتاج اسـت. در نمونـه بـا درصـد جرمـی ۳۰/۷۰ بـه علـت پیونـد قـوی‌تـر بـین نـشاسته و پلی‌کاپرولاکتون یک شبکه فیزیکی ایجاد می‌شود که مانع جذب آب در ساعات اولیه می‌شود. اما به مـرور زمـان چـون درصـد نشاسته در این نمونه بیشتر است و سـرعت هیـدرولیز نـشاسته بسیار بالاست، کاهش جرم افزایش مـی‌یابـد؛ بنـابراین سـرعت تخریب این کامپوزیت را می‌توان با تغییر درصد جرمی نشاسته تنظیم کرد.

تشکر و قدردانی

نویسندگان این مقاله کمـال تـشکر و قـدردانی خـود 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.

منابع

[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. Fabriation 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

[Downloaded from mjms.modares.ac.ir on 2024-10-12]

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 Polyme 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 vascularizationn. 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 MRThermal properties and enzymatic degradation of blends of poly(ε-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(ε-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 vivobone bioactivity? Biomaterials 2006; 27(15): 2907-15.

[22] Campos A, Marconcini JM, Martins-Franchetti SM, Mattoso LHC. The influence of UV-C

[Downloaded from mjms.modares.ac.ir on 2024-10-12]

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 nano-composites: A XRD, FTIR, DSC and ^{1}H 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 Francoa 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] Hutmacher 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.

[Downloaded from mjms.modares.ac.ir on 2024-10-12]