

ساخت و ارزیابی سازگاری سلولی و زیست‌تخریب پذیری برون‌تن کامپوزیت PGS/CaTiO₃ برای کاربرد به عنوان Conduit عصبی

رضا ناصر^۱، دکتر انوشه زرگر خرازی^۲

مقاله پژوهشی

چکیده

مقدمه: Poly(glycerol sebacate) (PGS) پلیمری زیستی و نوین برای کاربردهای زیست‌پزشکی با سازگاری زیستی بالا و خواص مکانیکی نزدیک به بافت‌های نرم بدن و همچنین قابلیت تنظیم خواص در حین ساخت می‌باشد؛ اما این پلیمر، به تخریب زیستی به نسبت سریعی دچار می‌شود که به طور معمول، از نرخ بازسازی اعصاب محیطی بالاتر است و برای کاربرد به عنوان Conduit عصبی نیاز به بهبود خواص تخریبی دارد.

روش‌ها: ابتدا، پیش‌پلیمر PGS سنتز و سپس معادل ۵ درصد وزنی آن سرامیک کلسیم تیتانات (CaTiO₃) که سازگاری زیستی بالایی دارد، به آن اضافه شد و مخلوط حاصل تحت عملیات پخت قرار گرفت تا استحکام آن افزایش یابد. بیوکامپوزیت حاصل، مورد تصویربرداری میکروسکوپ الکترونی روبشی، طیف‌سنجی تبدیل Fourier فرسوخ (FTIR یا Fourier transform infrared spectroscopy)، آزمون تخریب زیستی برون‌تن و ارزیابی سمیت سلولی با سلول L929 قرار گرفت.

یافته‌ها: در نهایت، کامپوزیتی با توزیع ذرات بالا به دست آمد که آزمون تبدیل Fourier فرسوخ از ایجاد پیوندی شیمیایی بین دو پیش‌ساز آن حکایت داشت. زمان تخریب زیستی برون‌تن، ۲۳ درصد کاهش در افت وزن دوره‌ی ۶۰ روزه‌ی تخریب کامپوزیت نسبت به پلیمر خالص را نشان داد. نتایج کشت سلول، زیستایی بالای ۹۰ درصد پس از ۵ روز کشت برای این کامپوزیت نشان داد.

نتیجه‌گیری: با توجه به نرخ تخریب زیستی، وزن مولکولی و سازگاری سلولی، می‌توان این کامپوزیت را برای کاربرد Conduit عصبی مورد ارزیابی‌های بیشتری قرار داد.

واژگان کلیدی: Poly(glycerol sebacate)، کامپوزیت زیستی، کلسیم تیتانات

ارجاع: ناصر رضا، زرگر خرازی انوشه. ساخت و ارزیابی سازگاری سلولی و زیست‌تخریب پذیری برون‌تن کامپوزیت PGS/CaTiO₃ برای

کاربرد به عنوان Conduit عصبی. مجله دانشکده پزشکی اصفهان ۱۳۹۴؛ ۳۳ (۳۶۱): ۲۰۹۱-۲۰۸۴

مقدمه

در آسیب‌های به نسبت بلندتر، اصلاح مستقیم عصب (شامل بخیه زدن دو انتهای رشته) مطرح می‌شود؛ اما این روش تا جایی کاربرد دارد که طول شکاف در حدی باشد که دو انتهای رشته را تحت تنش بالایی قرار ندهد؛ تعداد بخیه‌ها نیز به شدت محدود است و دو رشته باید به طور کامل جهت یافته قرار گیرند. این محدودیت‌ها در عمل این روش را به اصلاح شکاف‌هایی با طول کمتر از ۵ mm محدود می‌کند (۵).

همچنان که طول ضایعه افزایش می‌یابد، استفاده از Autograft برای ترمیم مطرح می‌شود. استفاده از اتوگرافت محدود به شکاف‌هایی با طول کمتر از ۵۰ mm می‌باشد و در حال حاضر، به نسبت بهترین نتایج درمانی برای بازسازی را به همراه دارد. در این رویکرد، از اعصابی

آسیب‌های اعصاب محیطی، سالیانه حدود یک میلیون نفر در سراسر جهان را دچار مشکل می‌کند. این آسیب‌ها می‌توانند موجب کاهش عملکرد حرکتی و کاهش دریافت حسی گردند. آسیب در اعصاب محیطی در هر دو جوامع صنعتی و در حال توسعه دیده می‌شود و می‌تواند در اثر قطع رشته‌ی عصبی طی یک حادثه، سوختگی با درجات مختلف و یا مشکلات نورودژنراتیو (Neurodegenerative) ایجاد شود (۱-۲). در شکاف‌های با فواصل به نسبت کوتاه، امکان بازسازی خود به خودی وجود دارد. در حالی که با دراز شدن طول شکاف، اصلاحات ریز جراحی برای ترمیم عصب به شکل جدی‌تری مطرح می‌شوند (۳-۴).

۱- دانشجوی کارشناسی ارشد، گروه مهندسی پزشکی - زیست‌مواد، دانشکده‌ی فن‌آوری‌های نوین پزشکی و کمیته‌ی تحقیقات دانشجویی، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران

۲- استادیار، گروه بیومتریال، مهندسی بافت و نانوتکنولوژی پزشکی، دانشکده‌ی فن‌آوری‌های نوین پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران

Email: anosh_zargar@yahoo.com

نویسنده‌ی مسؤول: دکتر انوشه زرگر خرازی

PLLA, [Poly (L-lactic Co glycolic acid)] PLGA (Polylactic acid), PCL (Polycaprolactone) و پلی-پورتان، برای ساخت Conduitها به کار رفته اند. در اکثر موارد کلینیک، بازسازی تار عصبی با بازتوانی عصبی در حد درمان با اتوگرافت حاصل نشده است. مهم ترین دلایل این ضعف، تفاوت نرخ زمانی بازسازی با نرخ جذب ماده‌ی کاشتنی، میزان بالای آماس و تغییر شکل در طی تخریب زیستی، تحریک بالای بافت همجوار توسط کاشتنی و پایین بودن تراوایی Conduitها است.

در طول سال‌های گذشته، مواد جدیدتری مانند پلی‌هیدروکسی‌بوتیرات (PHB یا Polyhydroxybutyrate) (۱۹)، پلی‌لاکتیک اسید (PLLA) (۲۰) و Poly(glycerol sebacate) (PGS) (۲۱-۲۲) مطرح شده‌اند که تا حدودی شرایط ترمیم را بهبود بخشیده‌اند، اما این شرایط همچنان نیاز به بهینه‌سازی از طریق مطالعات بیشتر دارند. PGS، الاستومری زیست‌تخریب پذیر و نوین می‌باشد که نخستین بار در سال ۲۰۰۲ در دانشگاه MIT (Massachusetts Institute of Technology) سنتز و معرفی شد (۲۳) و در این پژوهش سنتز و استفاده شده است. دلایل استفاده از این پلیمر در ادامه به شرح زیر می‌باشد:

- نرخ زمانی تخریب این پلیمر با تعیین نسبت مولی مواد آغازگر و همچنین زمان پخت قابل تنظیم است (۲۴).

- مدول الاستیک آن به سختی از ۴ MPa تجاوز می‌کند که این مقدار به مدول تارهای عصبی (۱۵۰ ± ۵۸۰ مگاپاسکال) (۲۵) بسیار نزدیک‌تر از پلیمرهایی مانند PHB (۲/۵۲ GPa) (۲۶) و PLA (۳/۶ ± ۰/۲ گیگاپاسکال) (۲۷) است.

- تخریب آن تنها از سطح انجام می‌گیرد و شکل اولیه‌ی خود را به مدت طولانی در طی تخریب حفظ می‌کند (۲۸).

- پاسخ انتهایی آن بسیار پایین است (۲۹-۳۰).

- وزن مولکولی آن پایین است که تراوایی بالایی به آن می‌دهد (۳۱). این پلیمر، نخستین بار حدود یک دهه قبل به صورت خالص برای Conduit مطرح شد (۲۲)، اما تا به حال، به صورت کامپوزیت نانو ساختار برای استفاده به عنوان Conduit ارزیابی نشده است. همچنین، در نسبت مونومری ۱:۰/۸ برای گلیسرول و سیاسیک اسید در ساختار کامپوزیتی به کار نرفته است.

در پژوهش حاضر، این پلیمر با کلسیم تیتانات (CaTiO₃)، نانو ساختار کامپوزیت شده است که تا حدی خاصیت پیزوالکتریک دارد (۳۲). خاصیت پیزوالکتریک به صورت‌های مختلفی بر رشد بافت و تارهای عصبی تأثیر مثبت دارد (۳۳). همچنین، این سرامیک محتوی یون کلسیم است که در صورت آزاد شدن می‌تواند تأثیر مثبتی بر جوانه‌زنی آکسون از جسم سلولی نورون‌ها داشته باشد (۳۴-۳۵).

با کارکرد کم اهمیت مانند عصب Sural استفاده می‌شود (۶) که البته اشکالات ذاتی این نوع اتوگرافت‌ها مانند نقص عملکردی در عضو دهنده، احتمال ایجاد Neuroma و تفاوت‌های ساختاری بین اعصاب در موارد بسیاری سبب اختلال در درمان می‌شوند (۷).

عصب Sural فقط در ۵۰ درصد از موارد، به درمان موفقیت‌آمیز منجر شده است (۸-۹). این گرافت‌ها، اعصاب حسی هستند؛ چرا که اعصاب حرکتی از هر نظر غیر قابل دسترس می‌باشند. به این دلیل، این گرافت‌ها پتانسیل محدودی برای ترمیم اعصاب حرکتی خالص و اعصاب مختلط مانند سیاتیک دارند. استفاده از اعصاب حسی برای ترمیم شکاف در اعصاب حرکتی دارای مشکلاتی مانند توزیع و جهت‌گیری متفاوت آکسون (۱۰-۱۱)، احتمال ناسازگاری در اندازه (به دلیل این که نورون‌های حرکتی اغلب در حدود ۲۰-۳۰ μm هستند در حالی که نورون‌های حسی در حدود ۱۵-۲۰ μm می‌باشند) (۱۲) و نیاز به حذف ثانویه‌ی آکسون‌ها و میلین‌های آسیب دیده‌ی خود گرافت توسط میزبان می‌باشد (۱۳).

علاوه بر این، مطالعات بافت‌شناسی اخیر، حکایت از تفاوت ریختی- ماهیتی سلول‌های شوان در نورون‌های حرکتی و نورون‌های حسی دارد (۱۴).

استفاده از مجراهای راهنمای رشته‌ی عصبی (Nerve conduit)، رویکرد دیگری برای اصلاح این آسیب‌ها می‌باشد که کمبودهای پیش‌گفته را به همراه ندارد. مجرای راهنمای عصب در حقیقت گذرگاهی لوله‌ای برای بلند شدن آکسون و بازسازی آن برای الحاق مجدد به نورون‌های جدا مانده از آن می‌باشد. این ابزار پزشکی ترمیمی، قابلیت شکل‌دهی در اندازه‌ی مناسب و همچنین قابلیت تولید انبوه دارند. استفاده از مجرا برای اتصال اعصاب محیطی مبحثی نوین نیست و برای نخستین بار در سال ۱۸۸۱ عصب سیاتیک سگ با استفاده از قسمتی از رگ بازویی با موفقیت مورد ترمیم قرار گرفت (۱۵).

استفاده از Conduit‌های عصبی مزایای فراوانی دارد که از این جمله می‌توان به کاهش نفوذ میوفیبروبلاست، کاهش نروما و اثر زخم، کاهش جوانه‌زنی انحرافی، تهاجم کمتر به بافت‌های سالم و تسهیل بارگذاری، قابلیت الحاق عوامل رشد و در نهایت هدایت جوانه‌ی ترمیمی در امتداد هدف دیستال اشاره کرد (۱۶). با این وجود، استفاده از Conduit‌های توخالی محدود به شکاف‌های با طول تقریبی کمتر از ۴ cm است (۱۷).

Conduitها، با وجود موفقیت‌های موردی، از نظر بالینی در مقایسه با اتوگرافت‌ها موفقیت‌های درمانی محدودتری داشته‌اند و بهبود عملکردی کمتری را رقم زده‌اند (۱۸).

در بین پلیمرهای زیست تخریب پذیر و تأیید شده توسط FDA (Food and drug administration)، (Polyglycolic acid) PGA،

روش‌ها

سنتز کلسیم تیتانات با کمی تغییرات به روش Sol-gel گرفته است (۴۱-۴۰). پودر به دست آمده در دمای 750°C تحت عملیات پخت قرار گرفت تا با رشد بلور اثر پیزوالکتریک افزایش و همچنین سمیت آن کاهش یابد.

مواد اولیه برای سنتز پیش‌پلیمر شامل PGS گلیسرول (۹۹ درصد)، سیاسیک اسید (۹۹ درصد) (Merck, Germany) به عنوان مواد پیش‌ساز بود. برای ساخت کامپوزیت از تتراهیدروفوران (۹۹ درصد) (Merck, Germany) به عنوان حلال پیش‌پلیمر استفاده شد. برای اندازه‌گیری وزن مولکولی این پیش‌پلیمر، از آزمون کروماتوگرافی ژل تراوایی (Gel permeation chromatography یا GPC) با حجم تزریقی ۰/۰۲ ml استفاده شد که در آن، THF (Tetrahydrofuran) به عنوان حلال به کار گرفته شده است.

سنتز PGS و ساخت کامپوزیت: برای سنتز پیش‌پلیمر، ابتدا گلیسرول در بالن سه دهنه تحت حرارت 135°C به طور غیر مستقیم در حمام گلیسرین قرار گرفت. سپس، سیاسیک اسید به نسبت مولی ۰/۸ نسبت به گلیسرین به ظرف اضافه گردید تا به طور کامل در آن حل گردد.

طبق مطالعه‌ی Guo و همکاران، در این نسبت مولی، الاستومر دارای انعطافی مطلوب و جذب آب پایین‌تری است (۳۶). این محلول، به مدت ۲۴ ساعت تحت جریان ملایمی از گاز نیتروژن و دور ملایمی از همزن مغناطیسی و دمای 120°C در حمام گلیسرین قرار گرفت تا پیش‌پلیمر بسیار غلیظ PGS به دست آید (۳۷). ماده‌ی خمیری به دست آمده در THF پس از سرد شدن، قابلیت انحلال بالایی دارد. پس از انحلال مقداری از این ماده در THF، تحت سرعت بالایی از همزن مغناطیسی، سرامیک به نسبت ۵ درصد وزنی به محلول اضافه شد.

سپس، برای بهبود توزیع و رسیدن به یک سوسپانسیون پایدار، مخلوط حاصل در حمام فراصوت به مدت ۲۰ دقیقه قرار گرفت. آن گاه سوسپانسیون حاصل تحت دمای 50°C و هم زدن شدید قرار گرفت تا THF به طور کامل تبخیر گردد. ماده‌ی حاصل پس از سرد شدن در پتری‌دیش قرار گرفت و به مدت ۲۴ ساعت در دمای 155°C در آون تحت خلأ ۴۰ mTorr قرار گرفت تا در آن اتصالات عرضی ایجاد شود و استحکام آن افزایش یابد. برای مقایسه‌ی کامپوزیت حاصل، پیش‌پلیمر PGS بدون سرامیک نیز در همان شرایط در پتری‌دیش تحت پخت قرار گرفت.

برای ارزیابی سنتز الاستومر PGS و کامپوزیت PGS/CaTiO₃ از آزمون طیف‌سنجی تبدیل Fourier فرسرخ FTIR یا Fourier transform infrared spectroscopy در حالت بازتابش

کامل تضعیف شده (Jasco/FTIR-6000) و در دامنه‌ی $4000-650\text{ cm}^{-1}$ استفاده شد. توزیع ذرات در زمینه نیز با به کارگیری تصویر میکروسکوپ الکترونی روبشی محیطی (ESEM) یا (Environmental scanning electron microscope) بررسی گردید.

سنجش تخریب پذیری برون‌تن، با رهایش نمونه‌هایی به ابعاد $2\text{ mm} \times 10\text{ mm} \times 10\text{ mm}$ در محلول بافر فسفات (PBS) یا Phosphate-buffered saline) به میزان ۵ cc و قرار دادن نمونه‌ها در دمای 37°C انجام شد. برای جلوگیری از اثر محصولات تخریب بر کیفیت حلال و الگوی کاهش وزن نمونه‌ها، هر ۲۴ ساعت یک بار، محلول بافر به طور کامل تعویض شد. قبل از وزن کردن نیز ابتدا نمونه‌ها به مدت ۲ ساعت در دمای 50°C و در آون خلأ خشک شدند. کل فرایند در طول مدت ۶۰ روز انجام گرفت.

برای بررسی میزان سمیت سلولی نمونه‌ها، از سلول‌های L929، رده‌ای از سلول‌های فیروبلاست موش، استفاده شد. سلول‌ها درون محیط DMEM (Dulbecco's modified eagle medium) همراه با ۱۰ درصد FBS (Fetal bovine serum) نگهداری شدند. سلول‌ها پس از دو بار شستشو با PBS درون چاهک‌های پلیت ۹۶ تایی در دمای 37°C ، رطوبت ۹۰ درصد و غلظت اکسیژن ۵ درصد قرار گرفتند.

در چاهک‌ها، ۱۰۰ میکرولیتر محیط کشت DMEM ریخته و به مدت ۲۴ ساعت در انکوباتور قرار داده شد تا سلول‌ها در کف ظرف پایدار شوند. پس از قرار دادن یک لایه‌ی ژل آگار به روی سلول‌ها، نمونه‌های کامپوزیتی و پلیمری به اندازه‌ی $2\text{ mm} \times 5\text{ mm} \times 5\text{ mm}$ و استریل شده به مدت ۳۰ دقیقه با پرتو فرابنفش، بر روی ژل آگار قرار گرفتند و روی نمونه‌ها نیز محیط کشت ریخته شد و نمونه‌ها برای مدت ۳ و ۵ روز در انکوباتور قرار گرفتند. هر ۲ روز یک بار، محیط کشت به طور کامل تعویض شد.

پس از طی این دوره‌ها، نمونه‌ها، ژل آگار و محیط کشت خارج و به چاهک‌ها $100\text{ }\mu\text{l}$ محلول ۰/۵ درصد MTT (3-(4,5)-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide) در PBS اضافه و به مدت ۴ ساعت پلیت در انکوباتور قرار گرفت. آن گاه $100\text{ }\mu\text{l}$ محلول ایزوپروپانول به آن‌ها اضافه شد. پس از مدت ۲۰ دقیقه در انکوباتور، مقدار غلظت ایزوپروپانول با دستگاه ELISA (Enzyme-linked immunosorbent assay) در طول موج nm ۵۴۵ خوانده شد.

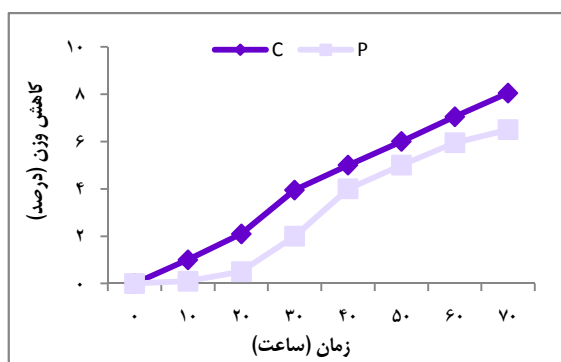
یافته‌ها

آزمون GPC برای تعیین وزن مولکولی، مقدارهای میانگین عددی و میانگین وزنی به ترتیب ۱۷۴۵ و ۲۱۸۹ دالتون را نشان داد. شکل ۱، منحنی FTIR کامپوزیت PGS/CaTiO₃ را در مقایسه

شکل ۲ تصویر Environmental scanning electron microscope (ESEM) سطح کامپوزیت PGS/CaTiO₃ را نشان می‌دهد که در حالت الکترون‌های بازگشتی (Backscattered mode) گرفته شده است. در این گونه تصاویر، نقاط با سفتی بالاتر، الکترون‌ها را با انرژی بالاتری بازتاب می‌کنند و در نتیجه، این نقاط روشن‌تر دیده می‌شوند (۳۹). با توجه به این توضیح، در شکل ۲ نقاط سفید رنگ نشان از حضور ذرات سرامیکی است و زمینه تیره، مرحله‌ی پلیمری را نشان می‌دهد که توزیع کیفی ذرات را می‌توان از این تصویر تشخیص داد.

آزمون زیست‌تخریب پذیری

شکل ۳، نمودار تخریب ۶۰ روزه‌ی نمونه‌ها را نشان می‌دهد. در این نمودار، مشخص است که تخریب PGS به صورت خطی در طول زمان انجام گرفته است. اما در روند تخریب PGS/CaTiO₃ ابتدا یک مرحله‌ی تأخیری دیده می‌شود و پس از این دوره، تخریب با آهنگ سریع‌تر و به صورت خطی ادامه می‌یابد. در انتهای ۶۰ روز، کامپوزیت و پلیمر به ترتیب ۶/۳۸ و ۸/۲۸ درصد از وزن خود را از دست دادند ($P < 0/05$).



شکل ۳. دیاگرام تخریب زیستی برون‌تن، C: کامپوزیت

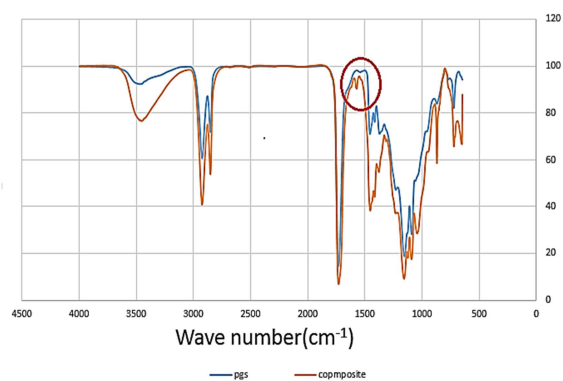
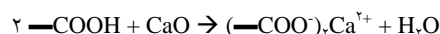
PGS/CaTiO₃: P. پلیمر خالص PGS؛ میانگین و انحراف معیار برای کامپوزیت و پلیمر به ترتیب $0/511 \pm 8/28$ و $0/637 \pm 6/28$ بوده است.

آزمون سمیت سلولی

شکل ۴ میزان چگالی اپتیک اندازه‌گیری شده را به همراه نمونه‌های شاهد نشان می‌دهد.

آزمون ANOVA نشان می‌دهد با وجود این که نتایج کشت ۳ روزه برای نمونه‌های کامپوزیتی در مقایسه با نمونه‌های شاهد تفاوت معنی‌داری داشت ($P < 0/05$)، اما میزان زیستایی $89/35$ درصد بود. همچنین، پس از ۵ روز کشت، میزان سمیت کاهش یافت و این تفاوت معنی‌دار نبود ($P < 0/05$) و میزان زیستایی به $94/24$ درصد رسید ($P < 0/05$).

با الاستومر PGS نشان می‌دهد. قله‌ی به وجود آمده در 1732 cm^{-1} در هر دو ماده، نشان از به وجود آمدن پیوندهای استری بین گلیسرول و سبسیک اسید است. این پیوند، سنتز موفقیت‌آمیز PGS را نشان می‌دهد. پیک پهن در 3455 cm^{-1} به پیوندهای هیدروژنی —OH باز می‌گردد. کاهش پیک‌های موجود در بازه‌ی $1500\text{—}1200 \text{ cm}^{-1}$ در PGS نشان از پایین‌تر بودن اتصالات عرضی در کامپوزیت دارد. با دقت در طیف مربوط به کامپوزیت، پیکی در 1574 cm^{-1} دیده می‌شود که در طیف PGS خالص وجود ندارد. این پیک نشان از پیدایش یک پیوند بین دو مرحله در کامپوزیت است و به تشکیل کلسیم کربوکسیلات مربوط است. این پیوند در مطالعه‌ی Liang و همکاران (۳۸) که در آن PGS و بایوگلاس کامپوزیت شده است، به این صورت بیان می‌گردد:

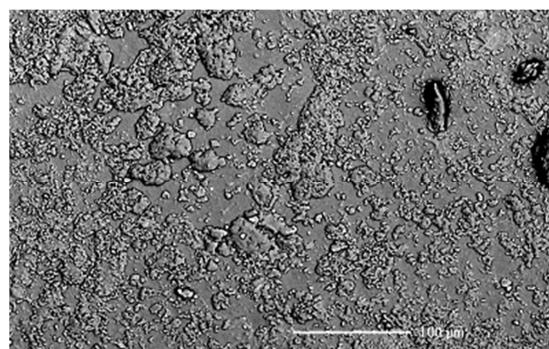


شکل ۱. منحنی طیف Fourier transform infrared spectroscopy (FTIR)

الاستومرهای PGS/CaTiO₃ و PGS

[Poly(glycerol sebacate)] دایره‌ی قرمز تشکیل پیوند بین دو

مرحله را نشان می‌دهد.



شکل ۲. تصویر Environmental scanning electron microscope

(ESEM) در حالت Backscattered mode. سطح کامپوزیت

PGS/CaTiO₃ که در آن نقاط سفید رنگ محل حضور ذرات سرامیکی را نشان می‌دهد.

خارج سلولی توسط سلول‌های شوان مرحله‌ای حیاتی در فراهم آمدن شرایط ترمیم در سیستم اعصاب محیطی است (۴۲). در نتیجه در نخستین گام‌های ترمیم، به دلیل کمبود ماتریکس خارج سلولی، نرخ پایین‌تر تخریب، می‌تواند بافت را تحت حمایت مکانیکی پیوسته‌تری قرار دهد.

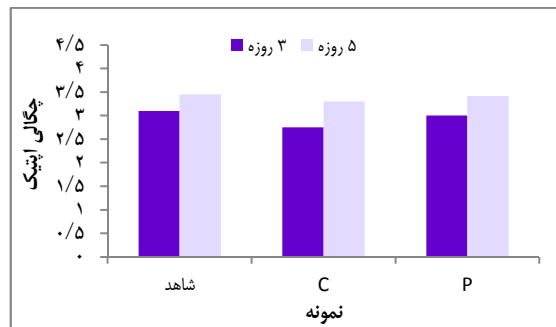
کاهش نرخ تخریب و پیچیدگی بیشتر در آهنگ آن در کامپوزیت به نسبت پلیمر، شاید ناشی از تشکیل پیوند بین دو مرحله باشد؛ چرا که در طول فرایند تخریب، نمونه‌های کامپوزیتی به طور توأم دچار شکست در زنجیره‌های پلیمری و شکست پیوند بین دو مرحله هستند. در حالی که در نمونه‌های پلیمری، شکست پیوندهای استری تنها واکنش در حین تخریب است. پایین آمدن آهنگ کلی تخریب کامپوزیت در مقایسه با پلیمر نیز از مزایای آن است؛ چرا که تخریب PGS در محیط درون‌تن به نسبت سریع انجام می‌شود (۴۳).

کاهش میزان سمیت پس از ۵ روز در مقایسه با ۳ روز برای نمونه‌ی محتوی کلسیم تیتانات، با مطالعه‌ی Dubey و همکاران مطابقت دارد (۴۴). این در حالی است که نمونه‌ی PGS خالص در هیچ کدام از دوره‌های پیش‌گفته، تفاوت معنی‌داری با نمونه‌های شاهد نشان نمی‌دهد. بنا بر این، میزان تفاوت معنی‌دار برای نمونه‌ی کامپوزیتی، ناشی از حضور کلسیم تیتانات است که باید نسبت حضور آن در زمینه کنترل گردد.

با توجه به این که مهاجرت سلول‌های شوان به داخل Conduit و شروع شرکت در فرایند ترمیم پس از حدود ۷ روز آغاز می‌گردد (۱۷)، اندک افت معنی‌دار در زیستایی ۳ روزه که پس از ۵ روز قابل جبران است، برای ترمیم نگرانی عمده ایجاد نمی‌کند. افت ۳ روزه نیز میزان بالایی از زیستایی را نشان می‌دهد که با توجه به زیست‌سازگاری بالای PGS (۲۲)، می‌تواند قابل قبول باشد.

تشکر و قدردانی

این مقاله قسمتی از دستاوردهای پایان‌نامه‌ی دوره‌ی کارشناسی ارشد رضا ناصر به شماره‌ی پایان‌نامه‌ی ۳۹۳۳۳۹ در دانشگاه علوم پزشکی اصفهان است و تحت حمایت مالی این دانشگاه اجرا شده است.



شکل ۴. نمودار چگالی اپتیک آزمون MTT

[3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide] :C کامپوزیت PGS/CaTiO_۳ :P پلیمر خالص PGS چگالی اپتیک ۳ روزه به ترتیب برای کامپوزیت و پلیمر 0.091 ± 0.772 و 0.066 ± 0.26 و چگالی اپتیک ۵ روزه 0.113 ± 0.274 و 0.038 ± 0.462 بوده است.

بحث

هر چه وزن مولکولی یک پلیمر پایین‌تر باشد، ضریب نفوذ مواد آن بالاتر می‌رود. طبق مطالعات، پلیمرهای با وزن مولکولی کمتر از ۵۰ kDa ضمن جلوگیری از نفوذ بافت اسکار، به مواد مغذی اجازه‌ی نفوذ به داخل و به مواد زائد اجازه‌ی خروج می‌دهد (۴۰).

شدت بالاتر بیک OH در کامپوزیت با توجه به این که این پیوند مهم‌ترین دلیل آب‌دوستی PGS می‌باشد (۴۱)، می‌تواند باعث بهبود آب‌دوستی کامپوزیت شود. حضور سرامیک کلسیم تیتانات در زمینه‌ی PGS با پیوندی شیمیایی بین دو مرحله همراه است که منشأ تغییر در خواص شیمیایی و زیستی کامپوزیت PGS/CaTiO_۳ در مقایسه با PGS خالص می‌باشد.

در محیط برون‌تن، فرسایش سطحی تنها مکانیسم تخریب الاستومر PGS است (۲۳). رفتار تأخیری در تخریب کامپوزیت در هفته‌های اول، می‌تواند در فرایند ترمیم بافت، مفید واقع شود؛ چرا که مهاجرت سلول‌های شوان به همراه بعضی از اندوتلیال‌ها و فیبروبلاست‌ها به داخل Conduit، حداقل بعد از یک هفته از کاشت Conduit انجام می‌گیرد (۵، ۱)؛ از آن جایی که تولید ماتریکس

applications and future perspectives of artificial nerve conduits. *Exp Neurol* 2010; 223(1): 86-101.

References

- Mukhatyar V, Karumbaiah L, Yeh J, Bellamkonda RV. Tissue engineering strategies designed to realize the endogenous regenerative potential of peripheral nerves. *Adv Mater* 2009; 21(46): 4670-9.
- Siemionow M, Brzezicki G. Current techniques and concepts in peripheral nerve repair. In: Harris AR, Jenner P. *International review of neurobiology*. London, UK: Academic Press; 2009. p. 141-72.
- Jiang X, Lim SH, Mao HQ, Chew SY. Current applications and future perspectives of artificial nerve conduits. *Exp Neurol* 2010; 223(1): 86-101.
- Siemionow M, Bozkurt M, Zor F. Regeneration and repair of peripheral nerves with different biomaterials: review. *Microsurgery* 2010; 30(7): 574-88.
- Pabari A, Yang SY, Seifalian AM, Mosahebi A. Modern surgical management of peripheral nerve gap. *J Plast Reconstr Aesthet Surg* 2010; 63(12): 1941-8.
- Belkas JS, Shoichet MS, Midha R. Peripheral nerve

- regeneration through guidance tubes. *Neurol Res* 2004; 26(2): 151-60.
7. Johnson EO, Soucacos PN. Nerve repair: experimental and clinical evaluation of biodegradable artificial nerve guides. *Injury* 2008; 39(Suppl 3): S30-S36.
 8. Chen MB, Zhang F, Lineaweaver WC. Luminal fillers in nerve conduits for peripheral nerve repair. *Ann Plast Surg* 2006; 57(4): 462-71.
 9. Lee SK, Wolfe SW. Peripheral nerve injury and repair. *J Am Acad Orthop Surg* 2000; 8(4): 243-52.
 10. Kim YT, Haftel VK, Kumar S, Bellamkonda RV. The role of aligned polymer fiber-based constructs in the bridging of long peripheral nerve gaps. *Biomaterials* 2008; 29(21): 3117-27.
 11. Nichols CM, Brenner MJ, Fox IK, Tung TH, Hunter DA, Rickman SR, et al. Effects of motor versus sensory nerve grafts on peripheral nerve regeneration. *Exp Neurol* 2004; 190(2): 347-55.
 12. Kiernan J, Rajakumar R. Barr's the human nervous system: An anatomical viewpoint. 10th ed. Philadelphia, PA: Lippincott Williams and Wilkins; 2013.
 13. Pollard JD, Fitzpatrick L. An ultrastructural comparison of peripheral nerve allografts and autografts. *Acta Neuropathol* 1973; 23(2): 152-65.
 14. Moradzadeh A, Borschel GH, Luciano JP, Whitlock EL, Hayashi A, Hunter DA, et al. The impact of motor and sensory nerve architecture on nerve regeneration. *Exp Neurol* 2008; 212(2): 370-6.
 15. Ijpma FF, Van De Graaf RC, Meek MF. The early history of tubulation in nerve repair. *J Hand Surg Eur Vol* 2008; 33(5): 581-6.
 16. Lundborg G. A 25-year perspective of peripheral nerve surgery: evolving neuroscientific concepts and clinical significance. *J Hand Surg Am* 2000; 25(3): 391-414.
 17. de Ruitter GC, Malessy MJ, Yaszemski MJ, Windebank AJ, Spinner RJ. Designing ideal conduits for peripheral nerve repair. *Neurosurg Focus* 2009; 26(2): E5.
 18. Ribeiro-Resende VT, Koenig B, Nichterwitz S, Oberhoffner S, Schlosshauer B. Strategies for inducing the formation of bands of Bungner in peripheral nerve regeneration. *Biomaterials* 2009; 30(29): 5251-9.
 19. Young RC, Wiberg M, Terenghi G. Poly-3-hydroxybutyrate (PHB): a resorbable conduit for long-gap repair in peripheral nerves. *Br J Plast Surg* 2002; 55(3): 235-40.
 20. Wang S, Cai Q, Hou J, Bei J, Zhang T, Yang J, et al. Acceleration effect of basic fibroblast growth factor on the regeneration of peripheral nerve through a 15-mm gap. *J Biomed Mater Res A* 2003; 66(3): 522-31.
 21. Allen RA, Wu W, Yao M, Dutta D, Duan X, Bachman TN, et al. Nerve regeneration and elastin formation within poly(glycerol sebacate)-based synthetic arterial grafts one-year post-implantation in a rat model. *Biomaterials* 2014; 35(1): 165-73.
 22. Sundback CA, Shyu JY, Wang Y, Faquin WC, Langer RS, Vacanti JP, et al. Biocompatibility analysis of poly(glycerol sebacate) as a nerve guide material. *Biomaterials* 2005; 26(27): 5454-64.
 23. Wang Y, Ameer GA, Sheppard BJ, Langer R. A tough biodegradable elastomer. *Nat Biotechnol* 2002; 20(6): 602-6.
 24. Krooka NM, LeBlona C, Jedlicka SS. In vitro examination of poly(glycerol sebacate) degradation kinetics: Effects of porosity and cure temperature. *MRS Proceedings* 2014; 1621: 87-92.
 25. Borschel GH, Kia KF, Kuzon WM, Jr., Dennis RG. Mechanical properties of acellular peripheral nerve. *J Surg Res* 2003; 114(2): 133-9.
 26. Galego N, Rozsa C, Sanchez R, Fung J, Analia V, Santo Tomas J. Characterization and application of poly(β -hydroxyalkanoates) family as composite biomaterials. *Polymer Testing* 2000; 19(5): 485-92.
 27. Mathew AP, Oksman K, Sain M. Mechanical properties of biodegradable composites from poly lactic acid (PLA) and microcrystalline cellulose (MCC). *Applied Polymer* 2005; 97(5): 2014-25.
 28. Wang Y, Kim YM, Langer R. In vivo degradation characteristics of poly(glycerol sebacate). *J Biomed Mater Res* 2003; 66A(1): 192-7.
 29. Gao J, Ensley AE, Nerem RM, Wang Y. Poly(glycerol sebacate) supports the proliferation and phenotypic protein expression of primary baboon vascular cells. *J Biomed Mater Res A* 2007; 83(4): 1070-5.
 30. Redenti S, Neeley WL, Rompani S, Saigal S, Yang J, Klassen H, et al. Engineering retinal progenitor cell and scrollable poly(glycerol-sebacate) composites for expansion and subretinal transplantation. *Biomaterials* 2009; 30(20): 3405-14.
 31. Liu Q, Tian M, Shi R, Zhang L, Chen D, Tian W. Structure and properties of thermoplastic poly(glycerol sebacate) elastomers originating from prepolymers with different molecular weights. *Appl Polym* 2007; 104(2): 1131-7.
 32. Puli VS, Pradhan DK, Riggs BC, Chrisey DB, Katiyar RS. Investigations on structure, ferroelectric, piezoelectric and energy storage properties of barium calcium titanate (BCT) ceramics. *J Alloy Compd* 2014; 584: 369-73.
 33. Aebischer P, Valentini RF, Dario P, Domenici C, Galletti PM. Piezoelectric guidance channels enhance regeneration in the mouse sciatic nerve after axotomy. *Brain Res* 1987; 436(1): 165-8.
 34. Chierzi S, Ratto GM, Verma P, Fawcett JW. The ability of axons to regenerate their growth cones depends on axonal type and age, and is regulated by calcium, cAMP and ERK. *Eur J Neurosci* 2005; 21(8): 2051-62.
 35. Zhang XF, Kehoe S, Adhi SK, Ajithkumar TG, Moane S, O'Shea H, et al. Composition-structure-property (Zn²⁺ and Ca²⁺ ion release) evaluation of Si-Na-Ca-Zn-Ce glasses: Potential components for nerve guidance conduits. *Mater Sci Eng: C* 2011; 31(3): 669-76.
 36. Guo XL, Lu XL, Dong DL, Sun ZJ. Characterization and optimization of glycerol/sebacate ratio in poly(glycerol-sebacate) elastomer for cell culture application. *J Biomed Mater Res A* 2014; 102(11): 3903-7.
 37. Li Y, Cook WD, Moorhoff C, Huang WC, Chen QZ. Synthesis, characterization and properties of biocompatible poly(glycerol sebacate) pre-polymer and gel. *Polym Int* 2013; 62(4): 534-47.
 38. Liang SL, Cook WD, Thouas GA, Chen QZ. The mechanical characteristics and in vitro biocompatibility

- of poly(glycerol sebacate)-bioglass elastomeric composites. *Biomaterials* 2010; 31(33): 8516-29.
39. Robinson BW, Nickel EH. A useful new technique for mineralogy; the backscattered-electron/low vacuum mode of SEM operation. *American Mineralogist* 1979; 64(11-12): 1322-8.
40. Evans GR, Brandt K, Katz S, Chauvin P, Otto L, Bogle M, et al. Bioactive poly(L-lactic acid) conduits seeded with Schwann cells for peripheral nerve regeneration. *Biomaterials* 2002; 23(3): 841-8.
41. Yang J, Webb AR, Ameer GA. Novel citric acid-based biodegradable elastomers for tissue engineering. *Adv Mater* 2004; 16(6): 511-6.
42. Bunge RP, Bunge MB. Interrelationship between Schwann cell function and extracellular matrix production. *Trends Neurosci* 1983; 6: 499-505.
43. Liang SL, Yang XY, Fang XY, Cook WD, Thouas GA, Chen QZ. In vitro enzymatic degradation of poly (glycerol sebacate)-based materials. *Biomaterials* 2011; 32(33): 8486-96.
44. Dubey AK, Tripathi G, Basu B. Characterization of hydroxyapatite-perovskite (CaTiO₃) composites: phase evaluation and cellular response. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater* 2010; 95(2): 320-9.

Fabrication and Evaluation of Cell-Compatibility and in-Vitro Biodegradation of PGS/CaTiO₃ Composite for Nerve Conduit Application

Reza Naser¹, Anousheh Zargar-Kharazi PhD²

Original Article

Abstract

Background: Poly(glycerol sebacate) (PGS) is a novel biological polymer for biomedical application with high biocompatibility, mechanical properties near to soft tissues of body and a adaptability of properties during synthesis. But, this polymer tends to undergo rather rapid biodegradation which is usually faster than peripheral nerve regeneration and needs optimization of degradability properties for using as a nerve conduit.

Methods: First, PGS pre-polymer was synthesized and then, equal to 5% of its weight, calcium titanate ceramic, which is highly biocompatible, was added to it and the acquired mixture was exposed to heat in vacuum oven to increase its strength. The obtained biocomposite came under scanning electron microscopy (SEM) image, Fourier transform infrared (FTIR) spectroscopy, in-vitro biodegradation and cytotoxicity evaluation.

Findings: A composite with high particle distribution was obtained which represented a chemical bond between its two precursors. The in-vitro degradation time showed 23% reduction in overall weight loss for the composite in comparison to pure PGS over a period of 60 days degradation. The cell culture showed more than 90% of viability after 5 days of culture for the composite.

Conclusion: Regarding to biodegradation rate, molecular mass and high cytocompatibility, this composite is encouraging enough to merit further investigation for nerve conduit application.

Keywords: Poly(glycerol sebacate), Biocomposite, Calcium titanate

Citation: Naser R, Zargar-Kharazi A. **Fabrication and Evaluation of Cell-Compatibility and in-Vitro Biodegradation of PGS/CaTiO₃ Composite for Nerve Conduit Application.** J Isfahan Med Sch 2016; 33(361): 2084-91

1- MSc Student, Department of Biomedical Engineering and Biomaterials, School of Medicine AND Student Research Committee, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, Iran

2- Assistant Professor, Department of Biomaterials, Tissue Engineering and Medical Nanotechnology, School of Advanced Medical Technology, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, Iran

Corresponding Author: Anousheh Zargar-Kharazi PhD, Email: anosh_zargar@yahoo.com