

## تأثیر میزان درصد گلو تار آلدهید و مونت موریلونیت بر ویژگی‌های داربست نانوکامپوزیتی آگار / مونت موریلونیت / گزانتان در دارورسانی آندرونا ت به سلول‌های مزانشیمی

دکتر ژاله ورشوساز<sup>۱</sup>، دکتر ناصر توکلی<sup>۲</sup>، دکتر شهناز رضوی<sup>۳</sup>، دکتر بهاره فاتح برومند<sup>۴</sup>، دکتر مجید شاکری<sup>۴</sup>

### چکیده

**مقدمه:** گلو تار آلدهید با ایجاد اتصالات عرضی و ترکیبات مختلف سیلیکا باعث استحکام داربست‌های نانوکامپوزیتی پلیمری می‌شوند. هدف از مطالعه‌ی حاضر، تعیین تأثیر مقدار گلو تار آلدهید و مونت موریلونیت بر خصوصیات فیزیکوشیمیایی داربست‌های آگار/مونت موریلونیت/گزانتان گام بارشده با آندرونا ت بود که جهت بازسازی موضعی بافت استخوان در آسیب‌های ناشی از استئوپروز و سایر شکستگی‌ها به کار می‌روند.

**روش‌ها:** ۱۳ فرمولاسیون با استفاده از روش طراحی فاکتوربال سه سطحی تهیه شد. اثر دو متغیر غلظت‌های گلو تار آلدهید و مونت موریلونیت بر بارگیری دارو، آزادسازی، بیودگراسیون و تورم‌پذیری نانوکامپوزیت مطالعه گردید. مورفولوژی داربست بهینه توسط Scanning electron microscope (SEM) بررسی شد و توانایی آن برای رشد سلول‌های مزانشیمی به روش MTT اندازه‌گیری گردید.

**یافته‌ها:** تغییر غلظت گلو تار آلدهید و مونت موریلونیت اثر قابل توجهی بر میزان داروی بارگیری شده در داربست نداشت. بر خلاف مونت موریلونیت افزایش میزان گلو تار آلدهید، میزان آزادسازی دارو را افزایش داد. افزایش غلظت هر دو متغیر مورد مطالعه تورم‌پذیری و بیودگراسیون نانوکامپوزیت‌ها را کاهش داد. داربست‌ها به صورت بارز، رشد سلول‌های مزانشیمی را نسبت به گروه شاهد بیشتر کردند.

**نتیجه‌گیری:** مونت موریلونیت ۳ درصد و گلو تار آلدهید ۱ درصد بهترین نسبت برای ساخت داربست‌های سه بعدی آگار/مونت موریلونیت/گزانتان هستند و به طور معنی‌دار سبب رشد سلول‌های مزانشیمی می‌شوند.

**واژگان کلیدی:** داربست، مونت موریلونیت، گلو تار آلدهید، سلول‌های مزانشیمی

### مقدمه

محل التیام یافته برای خارج کردن پلیمر غیر قابل تجزیه از یک طرف و عوارض جانبی ناشی از پاسخ بافت به پلیمرهای تخریب‌پذیر از طرف دیگر، از جمله محدودیت‌های مهم برای انتخاب ماده‌ی مناسب جهت دارورسانی به بافت استخوان می‌باشد. از این رو انتخاب ترکیب چند ماده‌ی (کامپوزیت) آلی و معدنی جهت فراهم کردن کارایی بهتر و خصوصیات مطلوب‌تر امری مهم به شمار می‌آید (۱). کامپوزیت‌ها

مواد مختلف از پلیمرهای پایدار یا قابل تجزیه گرفته تا مواد معدنی مانند شیشه و سرامیک برای دارورسانی موضعی بافت استخوان به کار رفته‌اند. انتظار می‌رود موادی که برای دارورسانی استخوان به کار می‌رود دارای آزادسازی قابل پیش‌بینی، سازگاری زیستی و مکانیکی با بافت استخوان اطراف خود داشته باشند. عدم تجزیه شدن ماده و لزوم جراحی مجدد روی

<sup>۱</sup> استاد، گروه فارماسیوتکس، دانشکده‌ی داروسازی، مرکز تحقیقات سیستم‌های نوین دارورسانی، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران

<sup>۲</sup> دانشیار، گروه فارماسیوتکس، دانشکده‌ی داروسازی، مرکز تحقیقات سیستم‌های نوین دارورسانی، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران

<sup>۳</sup> استاد، گروه آناتومی، دانشکده‌ی پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران

<sup>۴</sup> گروه فارماسیوتکس، دانشکده‌ی داروسازی، مرکز تحقیقات سیستم‌های نوین دارورسانی، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران

مواد یا غشاهایی هستند که دارای دو جزء آلی و معدنی باشند. نانوکامپوزیت‌ها پلیمرهای ترموپلاستیکی هستند که جزء معدنی آن‌ها حدود ۸-۲ درصد وزن آن‌ها را شامل می‌شود و ابعاد نانومتری دارند. نانوکامپوزیت‌ها مزایای مواد معدنی نظیر پایداری دمایی و سختی و مواد آلی نظیر انعطاف‌پذیری، عایق بودن و مفتول‌پذیری را دارا می‌باشند (۲).

نانوکامپوزیت‌های پلیمری سیلیکا تفاوت‌های مهمی را با پلیمرهای معمولی پر شده با سایر مواد دارند؛ چرا که ابعاد فاز پراکنده شده در محدوده‌ی نانومتری هستند و خواص بسیار بهتری در مقایسه با کمپوزیت‌های رزینی معمولی نشان می‌دهند. مساحت سطحی زیاد، پراکندگی میکروسکوپی خاک سیلیکا در ماتریکس پلیمری و برقراری پیوندهای یونیک بین پلیمر آلی و سیلیکای غیر آلی از جمله علت‌های وجود این خواص نانوکامپوزیت‌ها هستند (۳).

Bisphosphonateها (BP) آنالوگ‌های صنایعی غیر قابل هیدرولیز پیروفسفات می‌باشند که از دو دهه‌ی پیش جهت درمان انواع بیماری‌های استخوان و متابولیسم کلسیم به کار می‌رود (۴). این دسته‌ی دارویی مهارکننده‌ی تحلیل استخوان در بدن می‌باشند. در BPها باند اکسیژنی که دو گروه فسفات را به یکدیگر متصل می‌کند (P-O-P) توسط اتم کربن جایگزین شده است (P-C-P) (۵-۶). این ساختار BPها را از شکست آنزیمی محافظت می‌کند و سبب اتصال محکم به استخوان به علت تمایل بالا به فسفات کلسیم می‌شود. آلدروونات سدیم یک BP حاوی نیتروژن است و نسل دوم BPها به حساب می‌آید (۷). استئوپروز یک بیماری سیستمی اسکلتی است. این بیماری با توده‌ی کم استخوان و زوال در حد میکرونی

بافت استخوان مشخص می‌شود که نتیجه‌ی آن افزایش پوکی استخوان و در نتیجه افزایش شکستگی‌ها است (۸).

در مطالعه‌ی حاضر ضمن تهیه‌ی داربست‌های نانوکامپوزیتی سه بعدی از آگار/سیلیکا/گزانتان گام/پلی‌وینیل استات جهت بازسازی بافت استخوانی آسیب دیده در استئوپروز یا سایر شکستگی‌ها به طریق دارورسانی موضعی آلدروونات، تأثیر متغیرهای عامل کراس لینک‌کننده (گلو تار آلدهید) و میزان مونت موریلونیت بر روی خصوصیات فیزیکوشیمیایی آن، بررسی شد.

## روش‌ها

جهت تهیه‌ی فیلم‌های نانوکامپوزیتی، مخلوط ۲/۵ درصد وزنی - حجمی گزانتان گام و ۰/۱ درصد وزنی - حجمی آلدروونات به مخلوط ۰/۵، ۱/۷۵ و ۳ درصد وزنی - حجمی مونت موریلونیت و ۳ درصد وزنی - حجمی آگار اضافه گردید و در دمای ۴۰ درجه‌ی سانتی‌گراد به مدت یک ساعت به هم زده شد. سپس غلظت‌های ۰/۲۵، ۰/۶۳ و ۱ درصد حجمی - حجمی گلو تار آلدهید به کمک سمپلر به آن‌ها اضافه گردید و به مدت ۳۰ دقیقه با هم مخلوط شدند. به این مخلوط ۱۰ میلی‌لیتر محلول پلی‌وینیل استات اضافه گردید و یک شبانه روز به هم زده شد. ۲۰ گرم از این مخلوط در یک پتری دیش ریخته شد و به مدت ۲۴ ساعت در آن در دمای ۶۰ درجه‌ی سانتی‌گراد قرار گرفت و سپس ۸ ساعت تحت آن خلأ در ۶۰ درجه‌ی سانتی‌گراد خشک شد تا فیلم‌ها به دست آیند (۹). از کلیه‌ی فرمولاسیون‌های Blank فاقد دارو، مطابق روش بالا تهیه گردید.

آزادسازی یا Release efficiency ( $RE_{24h}$ ) که در واقع سطح زیر منحنی آزادسازی دارو در زمان معین نسبت به سطح کل زیر منحنی تا آزادسازی ۱۰۰ درصد آن می‌باشد، جهت مقایسه‌ی آزادسازی دارو از فرمولاسیون‌ها مورد استفاده قرار گرفت. این پارامتر در واقع سطح زیر منحنی در زمان معین نسبت به سطح کل زیر منحنی تا آزادسازی ۱۰۰ درصد دارو می‌باشد و طبق فرمول زیر محاسبه می‌شود (۱۰).

$$RE\% = \frac{\int_0^t y dt}{y_{100} \times t} \times 100$$

برای بررسی رفتار تورم‌پذیری فیلم‌ها، قطعات خشک با وزن معین از فیلم‌ها در ۱۰ میلی‌لیتر بافر فسفات با  $pH = 7/4$  در یک بشر قرار داده شد و در فواصل زمانی صفر، ۲، ۲۴، ۴۸، ۷۲، ۹۶، ۱۲۰، ۱۴۴ و ۱۶۸ ساعت خارج و خشک شدند و به طور مجدد توزین شدند. سپس دوباره نمونه‌ها داخل بافر فسفات قرار گرفت. این کار تا زمانی ادامه پیدا کرد که به وزن ثابت رسیده باشند. این کار برای هر فرمولاسیون سه مرتبه تکرار گردید. درجه‌ی تورم از معادله‌ی زیر حساب گردید (۹).

$$SW\% = (W_w - W_d) / W_d \times 100$$

در این معادله  $SW$  درجه‌ی تورم‌پذیری،  $W_w$  وزن فیلم مرطوب و  $W_d$  وزن فیلم خشک می‌باشد.

برای بررسی بیودگراداسیون فیلم‌ها، قطعات خشک با وزن معین از فیلم‌ها در ۱۰ میلی‌لیتر بافر فسفات که  $pH$  آن توسط اسید استیک به ۵/۲ رسیده بود و حاوی ۰/۰۱ درصد وزنی - حجمی آنزیم لیزوزیم بود قرار داده شد و به مدت ۱، ۴، ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت در ۳۷ درجه‌ی سانتی‌گراد انکوبه گردید. بعد از این مدت فیلم‌ها خارج شدند و با آب دیونیزه شستشو داده شدند و به مدت ۲۴ ساعت در آن با دمای

برای تعیین میزان بارگیری دارو در داربست‌ها محتوای کامل یک پتری دیش در ۱۰۰ میلی‌لیتر بافر فسفات با  $pH = 7/4$  ریخته شد و به مدت ۲۴ ساعت به هم زده شد. مخلوط به دست آمده به مدت ۲۰ دقیقه با ۷۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفوژ گردید. سپس محلول رویی توسط فیلتر سر سرنگی ۰/۲ میکرون فیلتر گردید. ۳۰۰ میکرولیتر از محلول فیلتر شده با ۳۰۰ میکرولیتر محلول تازه تهیه شده‌ی ۵ میلی‌مولار  $FeCl_3$  مخلوط گردید و توسط اسپکتروفتومتر (Shimadzu, Japan) جذب آن در طول موج ۳۰۶/۵ نانومتر تعیین شد (۴).

برای بررسی آزادسازی دارو از نانوکامپوزیت‌ها، قطعات با وزن معین از فیلم بار شده، در یک بشر حاوی ۲۰ میلی‌لیتر بافر فسفات با  $pH = 7/4$  درون سبد چرخان دستگاه تست انحلال با اندازه‌ی مش ۴۰ قرار گرفت. بشر در بن ماری شیکردار در دمای ۳۷ درجه‌ی سانتی‌گراد و ۵۰ دور در دقیقه قرار داده شد. در فواصل زمانی صفر، ۲، ۸، ۲۴، ۴۸، ۷۲، ۹۶، ۱۲۰، ۱۴۴ و ۱۶۸ ساعت، از محیط ۳۰۰ میکرولیتر نمونه گرفته شد و با بافر تازه جایگزین گردید. جذب نمونه‌ها بعد از ایجاد کمپلکس ۱ به ۱ با یون آهن سه ظرفیتی به روش اسپکتروفتومتری در ۳۰۶/۵ نانومتر اندازه‌گیری شد (۴). جذب نمونه‌های فاقد دارو (Blank) در همان زمان از جذب فرمولاسیون‌های حاوی دارو کسر گردید تا جذب اجزای فرمولاسیون حذف شود و با استفاده از معادله‌ی غلظت - جذب به دست آمده در محیط بافر غلظت هر نمونه تعیین شد. این تست برای هر فرمولاسیون ۳ بار تکرار شد و میانگین و انحراف معیار و درصد داروی آزاد شده از هر فرمولاسیون محاسبه گردید. پارامتر کارایی

۳۷ درجه‌ی سانتی‌گراد خشک و توزین گردید. این کار برای هر فرمولاسیون سه مرتبه تکرار شد. درجه‌ی دگراداسیون از معادله‌ی زیر حساب گردید (۹):

$$DR\% = (W_0 - W_1) / W_0 \times 100$$

DR% درصد بیودگراداسیون،  $W_0$  وزن اولیه و  $W_1$

وزن ثانویه‌ی فیلم‌ها می‌باشد.

فرمولاسیون بهینه توسط نرم‌افزار Design-Expert نسخه‌ی US ۷/۲ تعیین گردید. اثر غلظت‌های مختلف گلو تار آلدهید و مونت موریلونیت بر روی هر یک از پاسخ‌ها بررسی شد. مورفولوژی فرمولاسیون بهینه توسط میکروسکوپ الکترونی نگاره (Seron technology 2008, Korea) بررسی گردید. در انتها سلول‌های مزانشیمی که از بافت چربی نمونه‌های لیپوساکشن به دست آمد بر روی این فرمولاسیون کشت داده شد.

محیط کشت مورد استفاده برای سلول‌های مزانشیمی محیط کشت DMEM کامل حاوی ۱۰ درصد FBS (Fetal bovine serum)، ۱ درصد آنتی‌بیوتیک و ضد قارچ (پنی‌سیلین ۱۰۰ واحد در میلی‌لیتر، استرپتومایسین ۱۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر و آمفوتریسین B ۰/۲۵ میکروگرم در میلی‌لیتر) و ۲ میلی‌مولار ال-گلو تامین، بود. برای تهیه‌ی آن ابتدا ۴۵ میلی‌لیتر محیط کشت آماده در فالكون ۵۰ میلی‌لیتری ریخته شد. سپس ۵ میلی‌لیتر FBS به آن اضافه شد. بعد ۵۰۰ میکرولیتر از مخلوط آنتی‌بیوتیک‌های ذکر شده در بالا به آن اضافه شد و در یخچال نگهداری گردید.

سلول‌های مزانشیمی از نوع سلول‌هایی هستند که به محیط کشت می‌چسبند. با توجه به رشد مناسب آن‌ها هر دو روز یک بار نیاز به تعویض محیط است. برای انجام این کار ابتدا محیط کشت قبلی به وسیله‌ی پیپت پاستور خارج شد. سپس ۲ بار با PBS شستشو

داده شد تا اضافه‌ی محیط کشت حذف شود. پس از آن ۱/۵ میلی‌لیتر Tripsin-EDTA به آن اضافه شد و به مدت سه دقیقه در دمای ۳۷ درجه‌ی سانتی‌گراد قرار گرفت تا سلول‌ها از ته فلاسک جدا شوند. در این مرحله سلول‌ها از شکل کشیده به شکل کروی در زیر میکروسکوپ تغییر شکل دادند. سپس ۱/۵ میلی‌لیتر محیط کشت به آن اضافه گردید و سپس به وسیله‌ی پیپت به درون فالكون ۱۵ میلی‌لیتری ریخته شد و با سرعت ۱۶۰۰ دور در دقیقه و به مدت ۵ دقیقه سانتریفیوژ شد (Hettich EBA 20, Germany). محلول رویی دور ریخته شد و ۴ میلی‌لیتر محیط کشت کامل به آن اضافه شد و خوب تکان داده شد تا سلول‌های رسوب کرده دوباره سوسپانسیون شوند. سپس این سوسپانسیون به داخل ۲ یا ۳ فلاسک ۲۵ میلی‌لیتری ریخته شد و درون انکوباتور در دمای ۳۷ درجه‌ی سانتی‌گراد، ۵ CO<sub>2</sub> درصد و رطوبت ۱۰۰ درصد قرار داده شد تا رشد نمایند.

در مرحله‌ی بعد فیلم‌ها ابتدا به قطعات مربع شکل ۱ × ۱ بریده و در پلیت ۲۴ خانه قرار دادند و به مدت ۲۴ ساعت زیر لامپ فرابنفش قرار گرفتند تا استریل گردند. سپس به آن ۵۰ میکرولیتر محیط کشت اضافه شد و ۲۵ میکرولیتر سلول با غلظت ۱۰<sup>۶</sup> سلول در میلی‌لیتر به آن اضافه گردید و به مدت ۳۰ دقیقه در ۳۷ درجه‌ی سانتی‌گراد قرار داده شد و ۲۵۰ میکرولیتر محیط کشت اضافه شد و به مدت ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت در انکوباتور در دمای ۳۷ درجه‌ی سانتی‌گراد، ۵ CO<sub>2</sub> درصد و رطوبت ۱۰۰ درصد قرار داده شد. بعد از روز اول، دوم و سوم ابتدا محیط کشت خارج شد. سپس ۲۰۰ میکرولیتر محیط کشت و ۲۰ میکرولیتر MTT به آن اضافه گردید و به مدت ۴

برای هر فرمولاسیون در جدول ۱ آورده شده است. همان طور که در جدول می‌بینیم بیشترین میزان بارگیری مربوط به فرمولاسیون  $G_{0.25}M_3$  و کمترین میزان آن مربوط به فرمولاسیون  $G_{0.25}M_{1.75}$  می‌باشد. پس از بررسی نتایج توسط نرم‌افزار Design-Expert نمودار تأثیر فاکتور گلو تار آلدهید و مونت موریلونیت بر درصد کارایی بارگیری دارو ترسیم شد که در شکل ۱ نشان داده شده است. آزادسازی داروی بارگیری شده از فرمولاسیون‌های مختلف تهیه شده در محیط بافر فسفات در مدت زمان ۱۶۸ ساعت با  $pH = 7.4$  بررسی شد و نمودار درصد انباشته‌ی آزادسازی دارو نسبت به زمان در شکل ۲ آورده شده است. این مقادیر شامل میانگین سه بار تکرار آزمایش می‌باشد.

ساعت در انکوباتور قرار داده شد. سپس محیط کشت خارج گردید و ۲۰۰ میکرولیتر DMSO به آن اضافه شد و به مدت ۹۰ دقیقه در تاریکی قرار داده شد. ۱۰۰ میکرولیتر از محلول حاصل به پلیت ۹۶ خانه منتقل شد و جذب آن با استفاده از دستگاه ELISA (Hiterion MTR 4+, Germany) در طول موج ۵۴۰ نانومتر اندازه‌گیری گردید (۱۱).

کلیدی این مراحل جهت فیلم‌های بدون دارو نیز انجام پذیرفت. جهت تعیین عدم سمیت فیلم‌ها برای سلول کلیدی مراحل فوق بدون فیلم نیز انجام پذیرفت که شاهد نامیده شد.

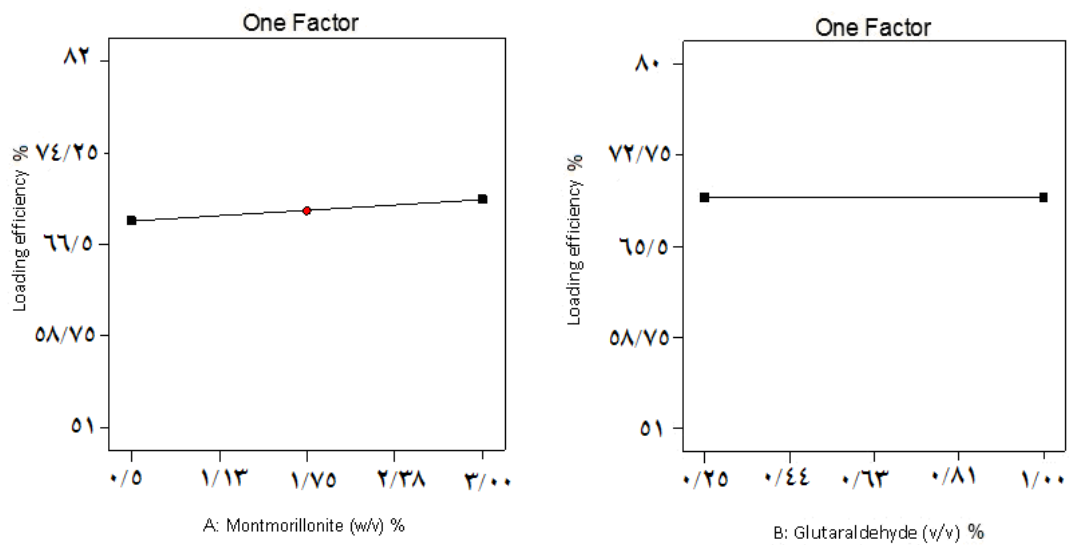
#### یافته‌ها

مقادیر به دست آمده برای درصد کارایی بارگیری دارو

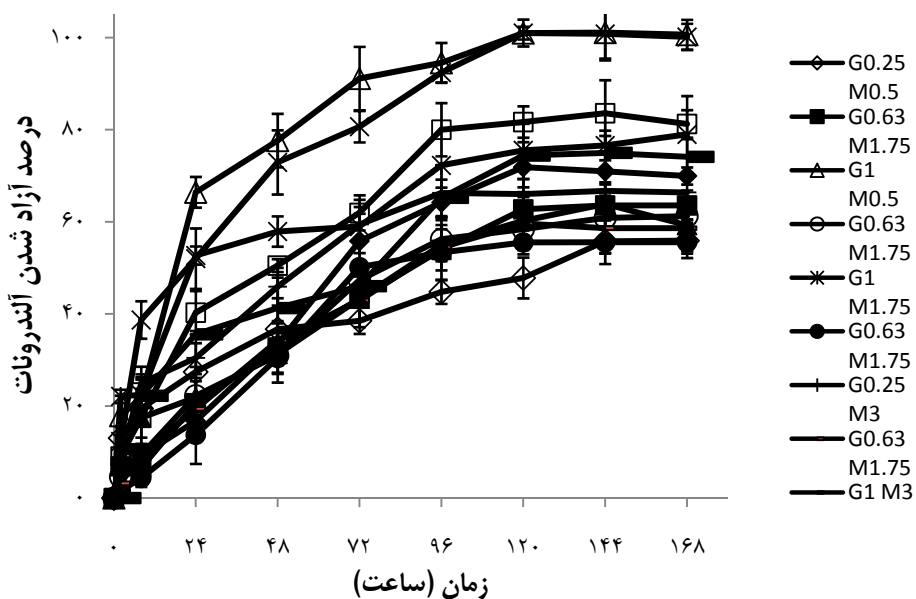
جدول ۱. خصوصیات فیزیکوشیمیایی نانو کامپوزیت‌های آگار/مونت موریلونیت/گزناتان گام بار شده با آلدرونات

کد فرمولاسیون	مونت موریلونیت درصد وزنی - حجمی	گلو تار آلدهید درصد وزنی - حجمی	درصد کارایی بارگیری انحراف معیار ± میانگین	RE <sub>24%</sub> انحراف معیار ± میانگین	درصد تورم پذیری تعادلی انحراف معیار ± میانگین	درصد بیودگراداسیون تعادلی انحراف معیار ± میانگین
$G_{0.25}M_{0.5}$	۰/۵	۰/۲۵	۷۴/۱ ± ۲/۳	۴۰/۸ ± ۲/۱	۱۱۶۹/۵ ± ۶۳/۶	۱۳/۴ ± ۳/۲
* $G_{0.63}M_{1.75}$	۱/۷۵	۰/۶۳	۷۳/۵ ± ۳/۶	۵۱/۲ ± ۳/۰	۱۱۴۳/۱ ± ۷۷/۵	۹/۲ ± ۲/۳
$G_1M_{0.5}$	۰/۵	۱	۵۳/۷ ± ۲/۵	۷۵/۸ ± ۲/۵	۹۱۳/۵ ± ۳۲/۹	۹/۲ ± ۰/۷
* $G_{0.63}M_{1.75}$	۱/۷۵	۰/۶۳	۷۶/۷ ± ۰/۴	۵۳/۳ ± ۰/۹	۱۱۵۴/۷ ± ۳۴/۳	۹/۶ ± ۲/۱
$G_1M_{1.75}$	۱/۷۵	۱	۷۷/۵ ± ۵/۸	۷۶/۹ ± ۱/۶	۸۳۳/۲ ± ۱۱۹/۷	۸/۶ ± ۱/۳
* $G_{0.63}M_{1.75}$	۱/۷۵	۰/۶۳	۷۰/۴ ± ۴/۸	۲۳/۷ ± ۲/۷	۱۱۵۶/۵ ± ۲۹/۹	۹/۵ ± ۰/۸
$G_{0.25}M_3$	۳	۰/۲۵	۷۹/۴ ± ۳/۸	۶۴/۱ ± ۱/۷	۸۹۱/۶ ± ۷۴/۹	۸/۰ ± ۰/۴
* $G_{0.63}M_{1.75}$	۱/۷۵	۰/۶۳	۶۹/۳ ± ۱/۸	۵۰/۱ ± ۳/۵	۱۱۱۷/۵ ± ۴۹/۹	۸/۳ ± ۲/۹
$G_1M_3$	۳	۱	۶۹/۳ ± ۳/۳	۵۳/۴ ± ۱/۶	۴۴۴/۳۲ ± ۳۳/۲	۷/۲ ± ۱/۷
$G_{0.63}M_3$	۳	۰/۶۳	۵۸/۶ ± ۰/۹	۴۱/۶ ± ۰/۱	۸۹۳/۱۲ ± ۳۶/۰	۷/۸ ± ۰/۱
$G_{0.25}M_{1.75}$	۱/۷۵	۰/۲۵	۵۱/۶ ± ۰/۸	۵۵/۹ ± ۳/۰	۱۱۶۰/۲ ± ۵۰/۲	۱۰/۳ ± ۱/۸
* $G_{0.63}M_{1.75}$	۱/۷۵	۰/۶۳	۷۳/۹ ± ۱/۱	۵۱/۵ ± ۲/۱	۱۱۵۵/۷ ± ۹۵/۸	۸/۵ ± ۲/۶
$G_{0.63}M_{0.5}$	۰/۵	۰/۶۳	۷۴/۰ ± ۳/۴	۱۰۴/۵ ± ۲/۲	۱۱۶۰/۳ ± ۵۸/۶	۳/۸ ± ۰/۵

\*: نقاط کنترل تکراری (Check point) پیشنهاد شده توسط نرم‌افزار Design-Expert که برای افزایش دقت اندازه‌گیری‌ها و تکرار نتایج به کار رفته است.



شکل ۱. اثر غلظت‌های مختلف موریلونیت (A) و گلو تارآلدئید (B) بر روی درصد کارایی بارگیری آندرونت در داربست‌های نانو کامپوزیتی آگار/مونت موریلونیت/گزانتان گام



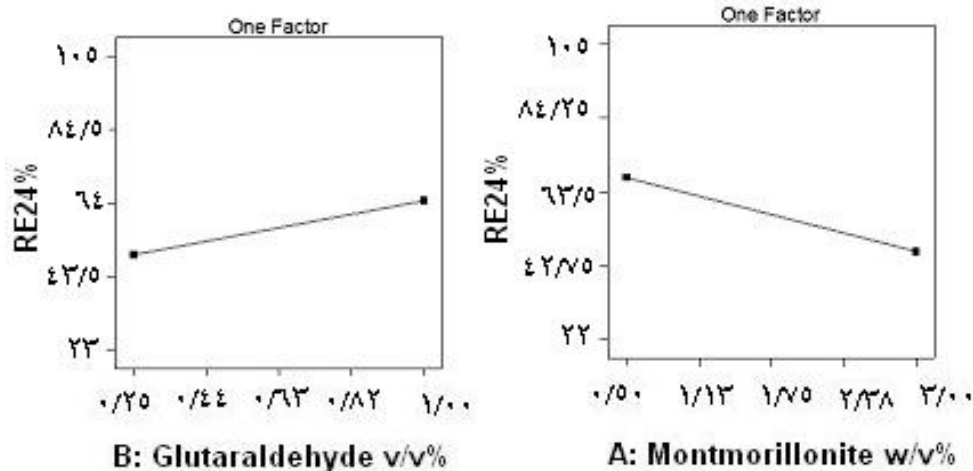
شکل ۲. درصد آندرونت آزاد شده از داربست‌های نانو کامپوزیتی آگار/مونت موریلونیت/گزانتان گام تهیه شده در محیط بافر فسفات (pH = 7/4) نسبت به زمان (n = 3)

و کمترین میزان آن مربوط به فرمولاسیون  $G_{0.63} M_{1.75}$  بود. نتایج به دست آمده از آزاد سازی دارو که به شکل  $RE_{24\%}$  تفسیر گردید، توسط نرم‌افزار Design-Expert مورد آنالیز قرار گرفت و مدل 2FI

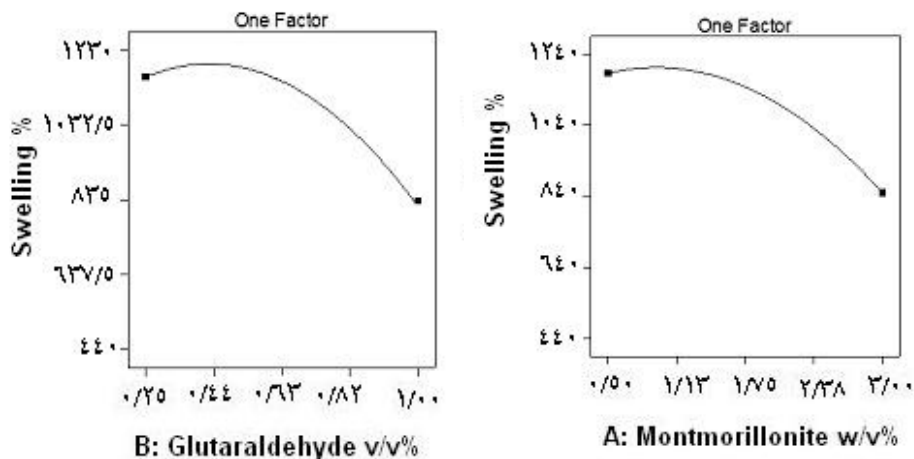
کارایی تست آزادسازی از روی داده‌های آزادسازی محاسبه گردید که نتایج آن در جدول ۱ آورده شده است. همان طور که در جدول می‌بینیم بیشترین میزان کارایی تست انحلال مربوط به فرمولاسیون  $G_{0.63} M_{0.5}$

برای آن پیشنهاد شد. اثر هر یک از متغیرهای مورد مطالعه در شکل ۳ آورده شده است. همان طور که دیده می شود بر خلاف گلو تار آلدئید افزایش مونت موریلونیت کارایی رهش دارو را کاهش می دهد. نتایج رفتار تورم پذیری فیلم ها در جدول ۱ دیده می شود. بیشترین میزان تورم پذیری تعادلی مربوط به فرمولاسیون  $G_{0.25}M_{0.5}$  و  $1169/53$  درصد و کمترین میزان مربوط به فرمولاسیون  $G_1M_3$  و  $444/32$  درصد بود. نتایج به دست آمده از تورم پذیری فیلم ها توسط نرم افزار Design-Expert مورد آنالیز قرار گرفت و مدل Quadratic برای آن پیشنهاد شد. اثر هر یک از پارامترهای مورد مطالعه بر تورم پذیری فیلم ها در شکل ۴ آورده شده است.

اثر هر یک از متغیرهای مورد مطالعه در شکل ۳ آورده شده است. همان طور که دیده می شود بر خلاف گلو تار آلدئید افزایش مونت موریلونیت کارایی رهش دارو را کاهش می دهد. نتایج رفتار تورم پذیری فیلم ها در جدول ۱ دیده می شود. بیشترین میزان تورم پذیری تعادلی مربوط به

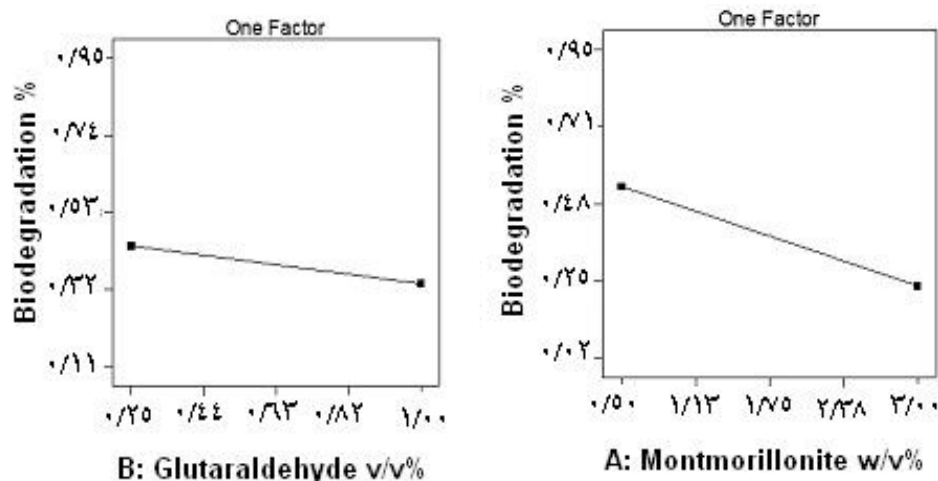


شکل ۳. اثر غلظت های مختلف مونت موریلونیت (A) و گلو تار آلدئید (B) بر روی آزادسازی آندرونات از داربست ها



شکل ۴. اثر غلظت های مختلف مونت موریلونیت (A) و گلو تار آلدئید (B) بر روی تورم پذیری فیلم های نانو کامپوزیتی آگار/مونت موریلونیت/گزانتان گام در محیط بافر فسفات  $pH = 7/4$





شکل ۵. اثر غلظت‌های مختلف مونت موریلونیت (A) و گلو تار آلدهید (B) بر روی بیودگراسیون فیلم‌های نانوکامپوزیتی آگار/مونت موریلونیت/گزانتان گام در محیط بافر فسفات حاوی آنزیم لیزوزیم

مونت موریلونیت بود، به عنوان فرمولاسیون بهینه تعیین گردید.

عکس‌های تهیه شده از فرمولاسیون بهینه ( $G_1M_3$ ) با بزرگ‌نمایی مختلف توسط میکروسکوپ الکترونی از فیلم‌ها در دو حالت خشک و مرطوب گرفته شده است. جهت مرطوب کردن، فیلم‌ها ابتدا ۵ دقیقه در آب مقطر قرار داده شد و سپس توسط دستگاه تحت خلأ خشک گردیدند و بعد از روکش دادن با طلا از آن‌ها عکس تهیه شد. در شکل ۶ عکس‌های تهیه شده، دیده می‌شوند.

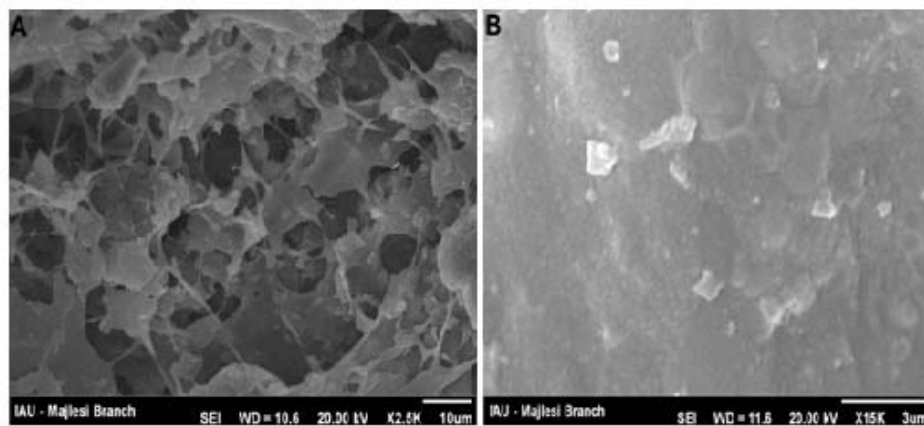
برای این که بتوان فیلم‌ها را در استخوان به کار برد باید سلول‌ها توانایی رشد بر روی این فیلم‌ها را داشته باشند؛ به عبارت دیگر سلول‌ها بتوانند بر روی فیلم‌ها رشد کنند و فیلم‌ها اثر سمی بر روی سلول‌ها نداشته باشند. جهت بررسی این امر از سلول‌های مزانشیمی انسانی استفاده گردید. بعد از رشد سلول‌ها بر روی فیلم‌ها جهت تعیین میزان سلول‌های زنده از روش MTT استفاده گردید. بعد از اضافه کردن MTT رنگ بنفش تولید می‌گردد، هر چه جذب نوری محیط

در جدول ۱ نتایج رفتار بیودگراسیون تعادلی فیلم‌ها نیز نشان داده شده است. همان طور که در جدول مشاهده می‌شود بیشترین میزان بیودگراسیون پس از ۲۴ ساعت مربوط به فرمولاسیون  $G_{0.25}M_{0.5}$  با ۱۳/۴۳ درصد و کمترین میزان مربوط به فرمولاسیون  $G_{0.63}M_{0.5}$  با ۳/۷۹ درصد بود. نتایج به دست آمده از بیودگراسیون فیلم‌ها توسط نرم‌افزار Design-Expert مورد آنالیز قرار گرفت و مدل 2FI برای آن پیشنهاد شد. تأثیر هر یک از پارامترهای مورد مطالعه و تداخل آن‌ها بر بیودگراسیون فیلم‌ها در شکل ۵ دیده می‌شود. فرمولاسیون بهینه توسط نرم‌افزار Design-Expert با طراحی به روش فاکتوریل در سه سطح طراحی و محدوده‌ی هر یک از پاسخ‌های مطلوب برای یافتن فرمولاسیون بهینه به این ترتیب در نظر گرفته شد که کلیه‌ی پاسخ‌ها در محدوده‌ی به دست آمده‌ی نتایج قرار گرفت و بر اساس آن بهینه‌سازی انجام شد. مقایسه‌ی نتایج واقعی و پیش‌بینی شده توسط نرم‌افزار در جدول ۱ دیده می‌شود. به این ترتیب فرمولاسیون  $G_1M_3$  که حاوی ۱ درصد گلو تار آلدهید و ۳ درصد

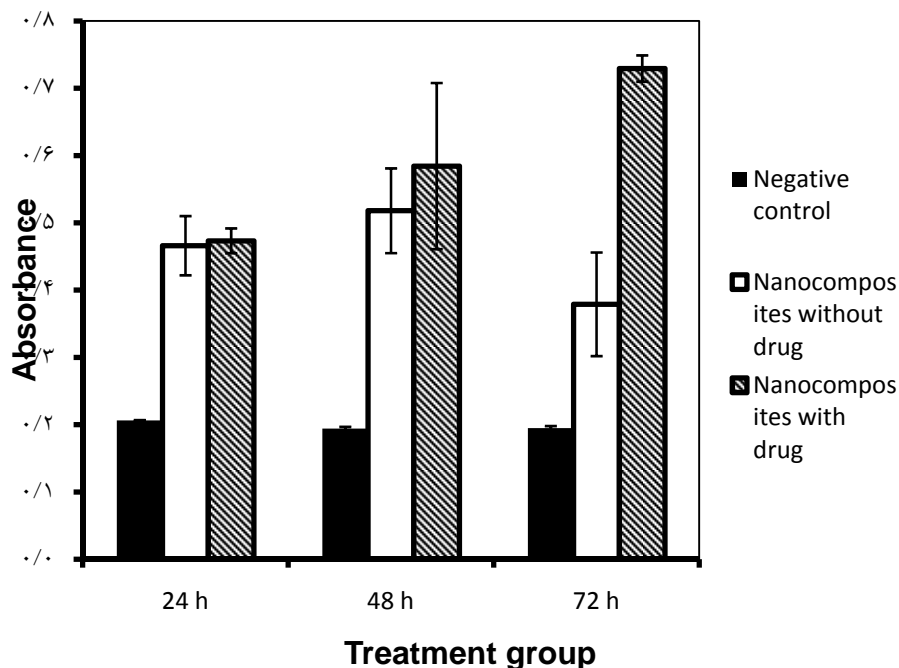


دارو، بدون دارو و نیز جذب نوری محیط کشت سلول‌های گروه شاهد که بدون فیلم بودند، در ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت بعد از تماس سلول با فیلم‌ها را نشان می‌دهد.

کشت‌های حاوی این رنگ بیشتر باشد نشان دهنده‌ی این است که کریستال‌های فورامازان بیشتری تولید شده است، در نتیجه تعداد سلول زنده بیشتر می‌باشد. شکل ۷ جذب نوری محیط کشت فیلم‌های حاوی



شکل ۶. تصویر میکروسکوپ الکترونی نانوکامپوزیت آگار/مونت موریلونیت/گزانتان گام بهینه (G1M3) در دو حالت (A) مرطوب و (B) خشک



شکل ۷. میزان جذب نوری ناشی از انحلال کریستال‌های فورامازان حاصل از MTT پس از تماس سلول‌های مزانشیمی انسانی با محیط کشت حاوی فیلم‌های نانوکامپوزیتی دارای آلدروئات، فیلم‌های بدون دارو و گروه شاهد (فقط سلول و محیط کشت) پس از ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت از تماس فیلم‌ها با سلول‌های مزانشیمی (n = ۳)

## بحث

بر اساس نتایج به دست آمده از جدول ۱ مشاهده می‌گردد که موقع تعیین بارگیری دارو مقدار کمتری نسبت به مقدار به کار رفته اندازه‌گیری شده است. این کاهش مقدار عملی دارو را می‌توان از بین رفتن دارو در اثر عامل کراس لینک کننده‌ی گلو تار آلدهید دانست؛ Soundrapandian و همکاران (۱) و Lee و همکاران (۱۲) بیان کرده‌اند که در طول فرایند کراس لینک شدن میزان دارو ممکن است کاهش پیدا کند. علت دیگر این امر را می‌توان واکنش دادن بخشی از آندروونات با سایر اجزای فرمولاسیون و ایجاد پیوندهای بین آن‌ها دانست؛ به طوری که دارو از دسترس ما خارج می‌گردد و نمی‌توان آن را اندازه‌گیری کرد. همان طور که در شکل ۱ دیده می‌شود غلظت‌های مختلف گلو تار آلدهید اثری بر روی میزان بارگیری دارو ندارد. به عبارت دیگر، با افزایش یا کاهش میزان گلو تار آلدهید درصد کارایی بارگیری تغییر نمی‌کند. اثر غلظت‌های مختلف مونت موریلونیت نیز به همین صورت می‌باشد.

همان طور که در شکل ۳ دیده می‌شود با افزایش میزان گلو تار آلدهید میزان آزادسازی دارو افزایش یافت. در حالی که با افزایش میزان مونت موریلونیت میزان آزادسازی کاهش پیدا کرد. ممکن است با افزایش گلو تار آلدهید تخلخل فیلم‌ها بیشتر شده باشد و آزادسازی دارو از فیلم‌ها نیز افزایش یابد. کاهش آزادسازی در اثر افزایش مونت موریلونیت را می‌توان به دلیل پیوندهای قوی هیدروژنی بین آندروونات و گروه‌های هیدروکسیل در سطح مونت موریلونیت دانست (۱۳).

میزان جذب آب یک فاکتور مهم برای داربست‌ها

می‌باشد؛ چرا که نشان‌دهنده‌ی اندازه‌ی منافذ، شرایط اتصال مواد به یکدیگر و حجم داربست‌ها می‌باشد (۱۴-۱۵). Haroun و همکاران مشاهده کردند در نانوکامپوزیت‌های ژلاتین/ مونت موریلونیت/ سلولز با افزایش میزان گلو تار آلدهید و مونت موریلونیت تورم‌پذیری کاهش پیدا می‌کند (۹).

در طرح حاضر نیز با افزایش میزان گلو تار آلدهید و مونت موریلونیت تورم‌پذیری کاهش پیدا کرده است (شکل ۴). به دلیل اثر ممانعت لایه‌های نانوذره‌ای مونت موریلونیت، واکنش بین آگار و گزانتان گام و مولکول‌های آب محدود شده است که در نتیجه روی مقدار آب جذب شده (درصد تورم‌پذیری) تأثیر گذاشته است (۱۶).

رفتار بیودگراسیون مواد زیستی در شرایط فیزیولوژیکی نقش مهمی در فرایند مهندسی بافت بازی می‌کند. در طرح حاضر نشان داده شده است که با افزایش میزان گلو تار آلدهید و مونت موریلونیت بیودگراسیون کاهش پیدا می‌کند (شکل ۵). علت کاهش بیودگراسیون در اثر افزایش میزان گلو تار آلدهید را می‌توان ناشی از کاهش میزان گروه‌های آمینی و کربوکسیل آب‌دوست در غلظت‌های بالای گلو تار آلدهید دانست. علت کاهش بیودگراسیون در اثر افزایش میزان مونت موریلونیت نیز ممکن است ناشی از تداخل قوی شاخه‌های آگار و گزانتان گام فرمولاسیون در صفحات مونت موریلونیت دانست؛ به طوری که گروه‌های آب دوست را می‌پوشاند و برداشت حلال را کاهش می‌دهد و از هیدرولیز ماکرومولکول‌ها محافظت می‌کند. حضور مونت موریلونیت محل‌های اتصال فیزیکی فراهم می‌کند که پایداری شبکه‌ی داربستی را افزایش می‌دهد (۱۷، ۹).

نتایج حاصل از تعیین رفتار بیودگرادسیون بیوفیلم‌ها طی ۲۴ ساعت نشان می‌دهد که فرسایش نانوکامپوزیت‌ها به طور کامل متأثر از اتصال به مونت موریلونیت می‌باشد. این تأثیر می‌تواند با تنظیم کردن مقدار مونت موریلونیت قابل کنترل باشد.

ساختار مناسب منافذ داربست‌ها یک نکته‌ی کلیدی جهت نشان دادن کارایی داربست‌ها می‌باشد و شامل خصوصیات نظیر اندازه‌ی منافذ، میزان تخلخل، اتصال داخلی بین منافذ و نسبت سطح به حجم می‌باشد (۱۸). تخلخل داربست‌ها به مقدار کافی باید زیاد باشد تا رگ‌های خونی بتوانند از درون آن‌ها رشد کنند و تبادل مواد مغذی و مواد زاید امکان‌پذیر باشد و در نتیجه زنده ماندن سلول‌ها را تضمین کند (۱۸).

همان طور که در شکل ۶ دیده می‌شود در تصاویر فیلم فرمولاسیون بهینه ( $G_1M_3$ ) در حالت خشک هیچ گونه منفذی دیده نمی‌شود، ولی همین فیلم وقتی که مرطوب می‌شود به مقدار بسیار زیاد متخلخل می‌شود؛ به طوری که منافذی با قطر ۱۰ میکرومتر ایجاد می‌کند که برای رشد سلول‌ها و تبادل مواد، فیلم بسیار ایده‌آلی را فراهم می‌کند.

کاهش MTT به عنوان یک آزمایش تعیین فعالیت کاهندگی میتوکندریایی سلول‌های کشت شده می‌باشد. MTT ماده‌ای زرد کم رنگ می‌باشد که وقتی با سلول‌های زنده انکوبه شود در اثر سوکسینات دهیدروژناز میتوکندریایی کریستال‌های فورمازان بنفش رنگ تولید می‌کند. بنابراین میزان تولید فورمازان بیانگر تعداد سلول‌های زنده می‌باشد؛ یعنی هر چه این رنگ پر رنگ‌تر باشد، بیانگر تولید فورمازان بیشتر و در نتیجه تعداد سلول زنده‌ی بیشتری است. میزان رنگ تولید شده توسط روش اسپکتروفتومتری در طول موج

۵۴۰ نانومتر تعیین می‌شود (۱۷).

همان طور که در شکل ۷ دیده می‌شود در هر سه روز تفاوت بین میزان سلول‌های زنده در گروه شاهد که بدون فیلم بود و فیلم‌های با دارو و بدون دارو بارز است. دلیل این امر را می‌توان رشد بیشتر سلول بر روی داربست‌ها دانست که یک شرایط مناسب برای رشد سلول را فراهم می‌کند، در حالی که در پلیت بدون فیلم این شرایط برای رشد سلول چندان مناسب نیست. همچنین مشاهده می‌شود میزان سلول‌های زنده در زمانی که فیلم‌ها حاوی آلدروونات باشند با افزایش زمان افزایش می‌یابد. این افزایش میزان سلول‌های زنده را می‌توان ناشی از افزایش تمایل و سازگاری زیستی بالای سلول‌ها با فیلم‌ها در اثر گذشت زمان دانست؛ به طوری که در مقایسه با گروه شاهد که سلول‌ها در تماس با هیچ فیلمی نبودند، این میزان رشد سلول بسیار شاخص بود.

Zhuang و همکاران نانوکامپوزیت‌های ژلاتین/مونت موریلونیت/کیتوزان تهیه کردند و مشاهده نمودند با افزایش زمان در روزهای دوم، پنجم و نهم تعداد سلول‌های زنده افزایش یافته است (۱۷).

### نتیجه‌گیری

نتایج به دست آمده نشان می‌دهد نانوکامپوزیت‌های آگار/گزانتان گام/مونت موریلونیت که به آن پلی‌وینیل استات اضافه شده و با گلو تار آلدهید کراس لینک شده است، سیستم مناسبی جهت انتقال آلدروونات به بافت استخوانی آسیب دیده می‌باشد. نانوکامپوزیت‌های تهیه شده با ۳ درصد آگار، ۲/۵ درصد گزانتان گام، ۳ درصد مونت موریلونیت و ۲/۸۱ درصد پلی‌وینیل استات که با ۱ درصد گلو تار آلدهید

این فیلم‌ها قابلیت رشد دارند.

### تشکر و قدردانی

از حمایت مالی معاونت تحقیقات و فناوری دانشگاه علوم پزشکی اصفهان در انجام این طرح پژوهشی قدردانی می‌شود.

کراس لینک شده‌اند، توانایی بارگیری ۶۹/۳۲ درصد آلندرونات را دارند، ۵۳/۴ درصد از این دارو را طی ۷ روز آزاد می‌کنند و خصوصیات مناسب فیزیکوشیمیایی دارند. میزان تورم‌پذیری آن‌ها طی ۲ روز ۴۴۴/۳۲ درصد و بیودگراسیون ۰/۳ درصد در طی ۱ روز می‌باشد. سلول‌های مزانشیمی انسانی به خوبی بر روی

### References

1. Soundrapandian C, Sa B, Datta S. Organic-inorganic composites for bone drug delivery. *AAPS PharmSciTech* 2009; 10(4): 1158-71.
2. Almasi H, Ghanbarzadeh B, Entezami AA. Physicochemical properties of starch-CMC-nanoclay biodegradable films. *Int J Biol Macromol* 2010; 46(1): 1-5.
3. Mehrabzadeh M, Kamal MR. Polymer clay and polymer blend nanocomposites. *Proceedings of the 9<sup>th</sup> International Seminar on Polymer Science and Technology*; 2009 Oct 17-21; Tehran, Iran.
4. Kuljanin J, Jankovic I, Nedeljkovic J, Prstojevic D, Marinkovic V. Spectrophotometric determination of alendronate in pharmaceutical formulations via complex formation with Fe(III) ions. *J Pharm Biomed Anal* 2002; 28(6): 1215-20.
5. Ezra A, Golomb G. Administration routes and delivery systems of bisphosphonates for the treatment of bone resorption. *Adv Drug Deliv Rev* 2000; 42(3): 175-95.
6. Schott H, Goltz D, Schott TC, Jauch C, Schwendener RA. N(4)-[Alkyl-(hydroxyphosphono)phosphonate]-cytidine-new drugs covalently linking antimetabolites (5-FdU, araU or AZT) with bone-targeting bisphosphonates (alendronate or pamidronate). *Bioorg Med Chem* 2011; 19(11): 3520-6.
7. Christopoulou GE, Stavropoulou A, Anastassopoulos G, Panteliou SD, Papadaki E, Karamanos NK, et al. Evaluation of modal damping factor as a diagnostic tool for osteoporosis and its relation with serum osteocalcin and collagen I N-telopeptide for monitoring the efficacy of alendronate in ovariectomized rats. *J Pharm Biomed Anal* 2006; 41(3): 891-7.
8. Simmons J, Zeitler P, Steelman J. Advances in the diagnosis and treatment of osteoporosis. *Adv Pediatr* 2007; 54: 85-114.
9. Haroun AA, Gamal-Eldeen A, Harding DR. Preparation, characterization and in vitro biological study of biomimetic three-dimensional gelatin-montmorillonite/cellulose scaffold for tissue engineering. *J Mater Sci Mater Med* 2009; 20(12): 2527-40.
10. Higuchi T. Mechanism of sustained-action medication. Theoretical analysis of rate of release of solid drugs dispersed in solid matrices. *J Pharm Sci* 1963; 52: 1145-9.
11. Wiepz GJ, Edwin F, Patel T, Bertics PJ. Methods for determining the proliferation of cells in response to EGFR ligands. *Methods Mol Biol* 2006; 327: 179-87.
12. Lee JY, Nam SH, Im SY, Park YJ, Lee YM, Seol YJ, et al. Enhanced bone formation by controlled growth factor delivery from chitosan-based biomaterials. *J Control Release* 2002; 78(1-3): 187-97.
13. Kevadiya BD, Joshi GV, Patel HA, Ingole PG, Mody HM, Bajaj HC. Montmorillonite-alginate nanocomposites as a drug delivery system: intercalation and in vitro release of vitamin B1 and vitamin B6. *J Biomater Appl* 2010; 25(2): 161-77.
14. Gao J, Niklason L, Langer R. Surface hydrolysis of poly(glycolic acid) meshes increases the seeding density of vascular smooth muscle cells. *J Biomed Mater Res* 1998; 42(3): 417-24.
15. Mikos AG, Lyman MD, Freed LE, Langer R. Wetting of poly(L-lactic acid) and poly(DL-lactic-co-glycolic acid) foams for tissue culture. *Biomaterials* 1994; 15(1): 55-8.
16. John MJ, Thomas S. Biofibers and biocomposites review. *Carbohydr Polym* 2008; 71(3): 343-64.
17. Zhuang H, Zheng JP, Gao H, De Yao K. In vitro biodegradation and biocompatibility of gelatin/montmorillonite-chitosan intercalated nanocomposite. *J Mater Sci Mater Med* 2007; 18(5): 951-7.
18. Zheng JP, Wang CZ, Wang XX, Wang HY, Zhuang H, Yao KD. Preparation of biomimetic three-dimensional gelatin/montmorillonite-chitosan scaffold for tissue engineering. *Reactive and Functional Polymers* 2007; 67(9): 780-8.

## Effects of Glutaraldehyde and Montmorillonite Percentage on Physicochemical Properties of Agar/Montmorillonite/Xanthan Nano-Composite Scaffolds in Bone Delivery of Alendronate

Jaleh Varshosaz PhD<sup>1</sup>, Naser Tavakoli PhD<sup>2</sup>, Shahnaz Razavi PhD<sup>2</sup>,  
Bahareh Fateh Boroumand Pharm D<sup>4</sup>, Majid Shakeri Pharm D<sup>4</sup>

### Abstract

**Background:** Glutaraldehyde (G) is used in cross-linking. Silica clays, like montmorillonite (MMT), enhance the mechanical strength of polymeric nano-composites. The aim of the present study was to determine the effects of G and MMT content on physicochemical properties of alendronate loaded agar/MMT/xanthan nano-composite scaffolds which are useful in regenerating bones in osteoporosis and other defects caused by trauma.

**Methods:** Thirteen different formulations were designed by a three-level factorial design. The effects of two variables, i.e. G and MMT content, on drug loading, release efficiency percentage, swelling, and biodegradation of nano-composites were studied. The morphology of the optimized scaffold and its capability to grow the mesenchymal cells were evaluated by scanning electron microscopy (SEM) and 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) assay, respectively.

**Findings:** Changing the concentration of G and MMT had no significant effects on drug loading in scaffolds. Unlike MMT, increasing the concentration of G increased drug release. Increasing the concentration of both studied variables decreased the swelling and biodegradation of the nano-composites. The scaffolds significantly enhanced the growth of mesenchymal cells.

**Conclusion:** The optimum concentrations of MMT and G for preparing three dimensional scaffolds of agar/MMT/xanthan were 3% and 1%, respectively. These concentrations caused significant growth of mesenchymal cells.

**Keywords:** Scaffold, Glutaraldehyde, Montmorillonite, Mesenchymal cells

<sup>1</sup> Professor, Department of Pharmaceutics, School of Pharmacy AND Novel Drug Delivery Systems Research Center, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, Iran

<sup>2</sup> Associate Professor, Department of Pharmaceutics, School of Pharmacy AND Novel Drug Delivery Systems Research Center, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, Iran

<sup>3</sup> Professor, Department of Anatomy, School of Medicine, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, Iran

<sup>4</sup> Department of Pharmaceutics, School of Pharmacy AND Novel Drug Delivery Systems Research Center, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, Iran

**Corresponding Author:** Jaleh Varshosaz PhD, Email: varshosaz@pharm.mui.ac.ir