

ساخت و بررسی زیست سازگاری غشاهای پلیمری بر پایه نانوکامپوزیت پلی هدرال الیگومریک سیلکسکویی اکسان (POSS) و پلی کربنات یورتان (PCU)

بهروز کرمی^{۱*}، محمد ایمانی^۲، اسکندر سیفعلیان^۳، محمد علی شکرگزار^۴، شاهین بنکدار^۵ و علیرضا خاوندی^۶

۱. دانشکده مهندسی مواد و متالورژی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد نجف آباد، اصفهان

۲. گروه سامانه‌های نوین داروسازی، پژوهشگاه پلیمر و پتروشیمی ایران، تهران

۳. دانشگاه لندن

۴. بانک سلولی ایران، انستیتو پاستور ایران

۵. دانشکده مهندسی پزشکی، دانشگاه صنعتی امیرکبیر

۶. دانشکده مهندسی مواد و متالورژی، دانشگاه علم و صنعت

(دریافت مقاله: ۱۳۸۹/۱۱/۰۹ - دریافت نسخه نهایی: ۱۳۹۱/۰۴/۳۱)

(POSS)	L929	(SEM)	MTT	چکیده - (PCU)
	FTIR	L929		
	POSS			
L929				
SEM				

POSS MTT Assay

واژگان کلیدی :

* : مسئول مکاتبات، پست الکترونیکی: be.karami@gmail.com

Fabrication and Biocompatibility Evaluation of Polymeric Membranes based on Polyhedral Oligomeric Silsesquioxane (POSS)/Poly (Carbonate-Urea) Urethane (PCU) Nanocomposite

B. Karami^{*1}, M. Imani², A. Seifalian³, M.A.Shokrgozar⁴, S.Bonakdar⁵ and A. Khavandi⁶

1. Department of Materials & Metallurgical Engineering, Islamic Azad University-Najaf Abad Branch, Isfahan, Iran

2. Novel Drug Delivery Systems Dept., Iran Polymer & Petrochemical Institute, Tehran, Iran

3. Centre for Nanotechnology & Regenerative Medicine, University College London, UK

4. National Cell Bank, Pasteur Institute of Iran, Tehran, Iran

5. Department of Biomedical Engineering, Amirkabir University of Technology, Tehran, Iran

6. Department of Materials & Metallurgical Engineering, Iran University of Science & Technology, Tehran, Iran

Abstract: *This study aims to characterize and evaluate the applicability of Polyhedral Oligomeric Silsesquioxane (POSS)/Poly (carbonate-urea) Urethane (PCU) nanocomposite films as a temporary skin substitute by means of FTIR, MTT assay, cell proliferation assay and SEM studies. FTIR spectra showed all the characteristic peaks of POSS/PCU nanocomposite. The indirect cytotoxicity of membranes was investigated by MTT assay. In MTT test, L929 mouse fibroblasts were exposed to the extract of the films for 24 h. MTT results showed no sign of cell cytotoxicity for the extracts at the extraction times up to 14 days. Meanwhile, it was found that POSS nanocages have a stimulating effect on L929s. In cell proliferation assay, L929s were cultured on the films for 3, 7 and 14 days. The cells showed a high rate of proliferation in direct contact with the biomaterial after 7 and 14 days. Morphology and density of the cells on the nanocomposite surface was investigated through SEM observations. SEM micrographs showed that the cells adhered well on the surface after 3 days of culture. Moreover, after 7 days, cell density increased so substantially that a cell layer was formed on the membranes.*

Keywords: *Biocompatibility, Cell proliferation, MTT assay, Nanocomposite, POSS*

(استفاده از پوست بدن گونه انسانی ولی از شخصی غیر از شخص آسیب دیده) نیز به این منظور استفاده شده است اما به دلیل خطرات پس‌زدگی از طرف سیستم ایمنی و ناسازگاری با بافت میزبان و همچنین احتمال سرایت بیماری‌ها تنها در موارد موقتی مناسب‌اند. تحقیقات در مورد جایگزین‌های پوستی^۱ از دهه ۱۹۴۰ میلادی شروع شده و تاکنون محصولات متنوعی به صورت تجاری تولید و عرضه شده‌اند. این جایگزین‌ها به دو دسته کلی دائم و موقت تقسیم بندی می‌شوند، که ممکن است زنده یا غیر زنده باشند [۲].

اگرچه تا کنون هیچ جایگزین دائمی ایدئالی طراحی نشده اما چند محصول تجاری موجودند که می‌توانند به ترمیم کامل اپیدرم، درم و یا هر دو کمک کنند. از جمله جایگزین‌های پوستی دائم می‌توان به صفحات کراتینوسیت اتوگرافت اشاره کرد که در آن‌ها با استفاده از تکه کوچکی از پوست بدن انسان (که به‌تازگی جدا شده است) ورقه‌هایی از سلول‌های کراتینوسیت با سطحی حدود ۳۰ سانتیمتر مربع و با ضخامت ۲ تا ۸ ردیف سلول ساخته می‌شود. نمونه‌های تجاری این روش مواد پیشرفته در مهندسی، سال ۳۲، شماره ۱، بهار ۱۳۹۲

۱- مقدمه

پوست بزرگ‌ترین ارگان بدن است که اندازه آن در بزرگسالان به ۱/۵ تا ۲ متر مربع می‌رسد. ساختار کامپوزیتی و پیچیده پوست عملکردهای مختلفی را برای آن پدید می‌آورد که برای حفظ هوموستاز بدن بسیار ضروری‌اند. از مهم‌ترین آن‌ها اینکه پوست مانع خروج آب و الکترولیت‌های بدن شده و همچون سدی در برابر عوامل بیماری‌زا از بدن حفاظت می‌کند [۱]. سوختگی‌های ناشی از گرما، عوامل شیمیایی و الکتریکی می‌توانند صدمات جبران‌ناپذیری را به پوست وارد سازند که در صورت عدم رسیدگی به موقع حتی می‌توانند منجر به مرگ - شوند. روش معمول در درمان صدمات پوستی مبتنی بر استفاده از اتوگرافت‌ها است. اتوگرافت تکه‌هایی از پوست خود شخص است که از دیگر قسمت‌های بدن جدا شده و در موضع آسیب دیده قرار داده می‌شود. این روش همراه با مشکلاتی از قبیل نیاز به جراحی، وارد آمدن نقص به قسمت اهداکننده، سختی روش، گران بودن و خطر بالا برای بیمار است. پیوندهای آلژینیک

یک جایگزین ایدئالی پوست یکی امکان ساخت آن‌ها در ضخامت‌های بسیار کم و در عین حال حفظ خواص مکانیکی و دیگری زیست‌سازگاری مناسب آن‌هاست. این‌گونه فیلم‌های پلیمری از مزیت‌های مختلفی برخوردارند از جمله اینکه یک گرافت نازک از درجه بالای انعطاف پذیری برخوردار بوده در نتیجه به راحتی با مورفولوژی بستر زخم مطابقت پیدا می‌کند. این امر تماس بین گرافت و بافت زیرین را به حداکثر رسانده و در نتیجه درصد پذیرش فیلم پلیمری از جانب بستر زخم افزایش می‌یابد. همچنین یک فیلم نازک امکان بر همکنش بیوشیمیایی خوبی را بین گرافت و بافت فراهم می‌آورد که در نتیجه آن انتشار عوامل غذایی و فاکتورهای رشد و دفع عوامل زاید به طور مؤثرتری صورت می‌پذیرد [۱]. یک فیلم پلیمری فوق نازک جرم پلیمر کاشته شده را کاهش می‌دهد، بنابراین در مورد پلیمرهای زیست تخریب پذیر از محصولات حاصل از تخریب کاسته و در نتیجه از واکنش شدید سیستم ایمنی بدن جلوگیری می‌شود [۴]. از دیگر مزیت‌های استفاده از پلیمرها در مقایسه با غشاهای طبیعی می‌توان به تولید و فراوری آسان‌تر و سریع‌تر فیلم‌های پلیمری، امکان ساخت آن‌ها در ابعاد و تعداد مورد نیاز و همچنین ارزان بودن نسبی آن‌ها اشاره کرد.

تاکنون غشاهای پلیمری گوناگونی به عنوان زخم پوش مورد مطالعه قرار گرفته‌اند که از آن جمله می‌توان به پلی‌لاکتیک اسید^۵ (PLA) [۵]، پلی‌کربولاکتون^۶ (PCL) [۶-۷]، کلاژن [۸]، ژلاتین [۶]، هیدروژل [۹] و کوپلیمر پلی‌لاکتیک-گلیکولیک اسید و پلی‌کربولاکتون (PLGA/PCL)^۷ [۱۰] اشاره کرد. در این پژوهش کارایی احتمالی نوعی نانوکامپوزیت پلیمری جدید بر پایه کوپلیمر پلی هیدرال الیگومریک سیلسسکوئی اکسان^۸ (POSS) و پلی کربنات یورتان^۹ (PCU) به عنوان جایگزین موقت پوست مورد بررسی قرار می‌گیرد. POSS یک نانوساختار هیبرید آلی-معدنی است که استفاده از آن به‌تازگی در ساخت گونه‌های جدید نانوکامپوزیت‌ها با کاربردهای مختلف به شدت

با نام‌های *Epicl* و *Epidex* عرضه شده‌اند. محدودیت عمده این دسته از گرافت‌ها این است که فقط حاوی سلول‌های کراتینوست بوده و بنابراین تنها قابل استفاده به عنوان لایه اپیدرم هستند، این در حالی است که در مورد سوختگی‌های شدید و گسترده نیاز به جایگزینی هر دو قسمت اپیدرم و درم پوست می‌باشد. *Integra* نوع دیگری از جایگزین‌های دائمی مورد استفاده در سوختگی‌هاست که ساختاری دو لایه دارد. جزء اپیدرمی آن شامل کلاژن گاوی نوع یک بوده که با گلیکوزآمینوگلیکان^۱ (GAG) و کوندروتین^۶ سولفات^۳ شبکه‌ای شده و یک لایه سیلیکونی به عنوان اپیدرم بر آن قرار می‌گیرد. نتایج حاکی از آن است که استفاده از *Integra* سبب تسریع بهبود زخم شده، انقباض پوست را کاهش داده و از لحاظ به‌جا ماندگی‌های جای زخم و ظاهر نیز بهتر از اتوگرافت‌ها عمل می‌کند. به‌علاوه اینکه اتصال بسیار خوبی با بافت اطراف برقرار کرده و قابل استفاده در کودکان نیز هست. مشکل اصلی در استفاده از *Integra* نیاز آن به عمل جراحی دوباره، احتمال سرایت آلودگی و گران بودن آن است [۲]. از دیگر جایگزین‌های دایم تجاری می‌توان به *Dermagraft Alloderm* و *Laserskin* اشاره کرد [۳].

وظیفه اصلی جایگزین‌های موقت پوست (در بعضی از مراجع از آن‌ها به عنوان زخم پوش^۴ یاد می‌شود) جلوگیری از خروج آب و مایعات حیاتی بدن و همچنین نفوذ عوامل بیماری‌زا به محل زخم تا بهبود کامل پوست و یا اعمال جایگزین‌های دائمی است. زخم پوش‌ها نیز انواع مختلفی را شامل می‌شوند که از جمله آن‌ها می‌توان به آلوگرافت‌های تهیه شده از بافت مرده، پیوندهای حاوی سلول‌های آلوگرافت به همراه کلاژن (که *Orcel* و *Apligraf* دو نمونه تجاری آن هستند) و زنوگرافت‌ها اشاره کرد. از پلیمرهای مصنوعی هم به عنوان زخم‌پوش استفاده می‌شود که در بعضی از موارد با سلول‌های زنده ترکیب شده که در این حالت به آن‌ها غشاهای هیبرید گفته می‌شود [۲].

پارامترهای کلیدی در استفاده از فیلم‌های پلیمری به عنوان

با مولکول‌های دی‌ال یا دی‌آمین حاصل می‌شود در حالی که قسمت نرم می‌تواند حاوی گروه‌های استری یا اتری باشد [۲۰-۲۱]. در پلی‌کربنات یورتان (PCU) قسمت نرم پلی‌یورتان به منظور استحکام بخشی بیشتر با گروه‌های کربناتی جایگزین شده است.

با وارد کردن نانوپرکننده POSS در زنجیره PCU، نانوکامپوزیت هیبرید آلی-معدنی POSS/PCU با هدف کاربرد به عنوان عروق مصنوعی طراحی و ساخته شد که تا کنون نیز نتایج امیدوار کننده‌ای را به همراه داشته است [۲۲-۲۵]. فیلم‌های پلیمری ساخته شده از این نانوکامپوزیت از شفافیت بسیار بالایی برخوردارند. این خاصیت منحصربه‌فرد آن‌ها را گزینه مناسبی برای کاربرد به عنوان زخم پوش می‌سازد زیرا امکان مشاهده مستقیم زخم و اطلاع از نحوه ترمیم پوست امکانپذیر خواهد بود. لذا در مطالعه حاضر بر آنیم که خواص بیولوژیک این فیلم‌های پلیمری را با هدف کاربرد به عنوان جایگزین پوستی و به کمک سلول‌های L929 مورد بررسی قرار دهیم.

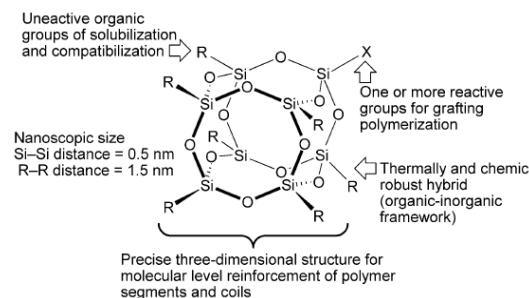
۲- مواد و روش تحقیق

۲-۱- ساخت فیلم پلیمری

روش ساخت نانوکامپوزیت POSS/PCU قبلاً به طور مفصل در مراجع شرح داده شده است [۲۳ و ۲۵]، اما به طور خلاصه مخلوط پلی‌کربنات پلی‌ال و POSS در حضور متیلن دی‌ایزوسیانات^{۱۱} (MDI) گرما داده می‌شود تا به صورت محلول درآید. سپس دی‌متیل استامید^{۱۳} (DMAC) به محلول اضافه شده و در نهایت به پیش پلیمر حاصل دی‌متیل آمین افزوده می‌شود تا نانوکامپوزیت پلیمری تشکیل شود.

برای تهیه فیلم از نانوکامپوزیت پلیمری ابتدا درصد فاز جامد محلول پلیمری محاسبه شد. بدین ترتیب که مقداری از محلول پلیمری پس از توزین بر روی فویل آلومینیومی به مدت ۱۲ ساعت در دمای ۶۰ درجه سانتی‌گراد در آون نگهداری شد. سپس وزن پلیمر به‌جا مانده روی سطح فویل اندازه‌گیری و با توجه به وزن پلیمرتر، درصد جامد محلول به‌دست آمد. با استفاده از درصد جامد محلول مقدار پلیمری که می‌بایست برای تهیه فیلم با

مواد پیشرفته در مهندسی، سال ۳۲، شماره ۱، بهار ۱۳۹۲



شکل ۱- ساختمان شیمیایی نانوساختار POSS

افزایش یافته است. ساختمان مولکولی آن شامل دو حلقه مکعبی متشکل از اتم‌های سیلیسیوم و اکسیژن با فرمول شیمیایی $(RSiO_{1.5})_n$ است که n (تعداد اتمهای سیلیکون هسته) می‌تواند ۸، ۱۰ و ۱۲ باشد، شکل (۱) [۱۱ و ۱۲]. گروه‌های عاملی مختلفی می‌توانند از طریق اتم‌های سیلیسیوم به این هسته مکعبی شکل متصل شوند. این گروه‌های عاملی اجازه می‌دهند که POSS به راحتی در ساختار انواع مختلفی از پلیمرها قرار گرفته و سبب بهبود خواص آن‌ها شود. این گروه‌های آلی دامنه وسیعی از ترکیبات شامل بوتادین، استایرن، متیل اکریلات، اپوکسی‌ها، پلی‌آمیدها و پلی‌اولفین‌ها را شامل می‌شوند [۱۳-۱۵]. درجه سازگاری POSS با ماتریس پلیمری که در آن قرار می‌گیرد وابسته به همین گروه‌های آلی متصل به آن است. این گروه‌های آلی می‌توانند واکنش‌پذیر (فعال) یا واکنش‌ناپذیر (غیر فعال) باشند. چنانچه این گروه‌ها حاوی عوامل واکنش‌دهنده باشند می‌توانند با ماتریس پلیمری پیوند کولانسی برقرار کنند؛ اما اگر واکنش‌ناپذیر باشند سازگاری POSS با پلیمر زمینه بستگی به مشابهت‌های ساختاری یا بر همکنش‌های قطبی پیدا می‌کند [۱۶-۱۹].

پلی‌یورتان‌ها^{۱۰} در واقع کوپلیمرهایی با ساختمان قطعه‌ای هستند که از بخش‌های متناوب سخت (بلورین) و نرم (آمورف) تشکیل شده‌اند. مواد اولیه برای تشکیل پلی‌یورتان‌ها عبارت‌اند از: دی‌ایزوسیانات‌ها، پلی‌ال‌ها و زنجیره گستراننده‌های^{۱۱} دی‌ال و دی‌آمین. قسمت سخت پلی‌یورتان از واکنش ایزوسیانات‌ها

ضخامت مورد نظر در فیلم کش (Braive Instruments) تغذیه می شد به دست آمد. در ادامه یک فیلم نچسب از جنس پلی اتیلن ترفتالات^{۱۴} (PET) بر روی پلیت شیشه-ای با ابعاد ۷/۵×۱۵ سانتیمتر ثابت شد. فاصله لبه فیلم کش تا سطح زیرین در ۲۰۰ میکرومتر تنظیم و روی فیلم نچسب قرار داده شد. با تغذیه محلول پلیمری و حرکت آرام و یکنواخت فیلم کش، فیلم روی سطح لایه نچسب تشکیل شد. سپس به منظور خارج کردن حلال، فیلم پلیمری به مدت ۱۲ ساعت در دمای ۶۰ درجه سانتی گراد در آون تحت خلأ نگهداری شد. پس از گذشت این مدت پلیت از آون خارج و فیلم پلیمری به آرامی از سطح لایه نچسب جدا شد. فیلم ها برای بررسی های زیست سازگاری در ابعاد مورد نظر بریده و توسط اتوکلاو استریل شدند.

۲-۱- طیف سنجی تبدیل فوریه زیر قرمز^{۱۵} (FTIR)

به منظور بررسی طیف تبدیل فوریه زیر قرمز نانوکامپوزیت از دستگاه Bruker مدل Equinox 55 استفاده شد. بدین ترتیب که فیلم پلیمری تهیه شده پس از بریده شدن در ابعاد مناسب در نگهدارنده دستگاه قرار داده شد و مورد تحلیل FTIR قرار گرفت.

۲-۲- کشت سلولی

سلول های L929 در محیط کشت RPMI^{۱۶} حاوی ۱۰ درصد سرم جنین گاوی^{۱۷} (FBS) و تحت شرایط استاندارد ۳۷ درجه سانتی گراد و ۵٪ دی اکسید کربن کشت داده شدند. به منظور انجام آزمایش ها این سلول ها با استفاده از آنزیم تریپسین^{۱۸} ۰/۲۵٪ از سطح فلاسک جدا و سوسپانسیون حاصل به مدت ۵ دقیقه و در ۱۴۰۰ دور بر دقیقه سانتریفیوژ شد.

۲-۳- آزمون سمیت سلولی^{۱۹}

برای بررسی سمیت سلولی غیرمستقیم فیلم های پلیمری از روش MTT Assay^{۲۰} استفاده شد. به منظور تهیه عصاره، فیلم های تهیه شده در ابعاد ۲×۶ سانتیمتر بریده و بعد از بسته

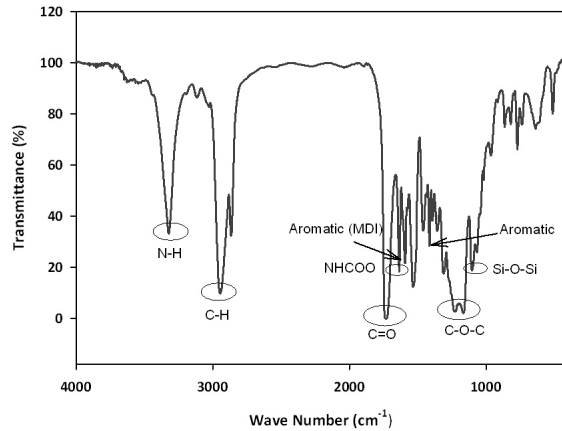
بندی در فویل های آلومینیومی در دستگاه اتوکلاو قرار گرفتند. نمونه های استریل شده در مدت زمان های ۳، ۷ و ۱۴ روز در حجم مشخصی از محیط کشت و بر اساس استاندارد ISO 10993-5 (۶-۵٪ سانتی متر مربع به ازای هر میلی لیتر محیط کشت) در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد انکوبه شدند. به منظور مطالعه اثر غلظت عصاره بر میزان بقای سلولی، عصاره های خالص (۱۰۰٪ حجمی) به دست آمده در نسبت های معین با محیط کشت رقیق و بدین ترتیب دو نوع عصاره دیگر با غلظت های ۵۰ و ۷۵ درصد حجمی تهیه شد.

در آزمون MTT ابتدا تعداد ۲۰۰۰۰ سلول در هر یک از چاهک های پلیت پلی استایرنی ۹۶ حفره ای (TCPS^{۲۱}) ریخته و محیط کشت به میزان کافی اضافه شد. پس از گذشت ۲۴ ساعت که سلول ها چسبندگی لازم را با کف پلیت به دست آوردند، محیط کشت به طور کامل خارج و ۱۰۰ میکرولیتر از عصاره به دست آمده از فیلم های پلیمری به سلول ها افزوده و سلول ها به مدت ۲۴ ساعت دیگر در شرایط استاندارد انکوبه شدند. در ادامه محیط کشت به طور کامل خارج و به جای آن ۱۰۰ میکرولیتر از رنگ حیاتی MTT به پلیت اضافه و به مدت ۴ ساعت در انکوباتور نگهداری شد. سپس محلول MTT به طور کامل خارج و ۱۰۰ میکرولیتر ایزوپروپانول اسیدی به سلول ها افزوده شد. پس از گذشت ۱۵ دقیقه میزان جذب نور توسط دستگاه اسپکتروفوتومتر در طول موج ۵۴۵ نانومتر اندازه گیری شد. میزان بقای سلولی^{۲۲} به صورت مقایسه ای و در مقایسه با نمونه کنترل محاسبه شد. به این ترتیب که میزان بقای سلولی برای نمونه کنترل ۱۰۰٪ در نظر گرفته شد و نتایج حاصل از آزمون برای هر گروه با توجه به نمونه کنترل بهنجار و سپس گزارش شد. محیط کشت RPMI خالص (فاقد هر گونه عصاره) که در شرایط و مدت زمان مشابه با عصاره ها نگهداری شده بود نیز به عنوان نمونه کنترل انتخاب شد.

۲-۴- آزمون تکثیر سلولی^{۲۳}

برای بررسی میزان رشد و تکثیر سلول ها بر سطح

پلیمری به شکل مربعی با مساحت تقریبی ۱ سانتیمتر مربع در پلیتهای ۱۲ حفره‌ای قرار داده شده و تعداد ۲۰۰۰ سلول L929 بر سطح نمونه‌ها ریخته و به مدت زمان‌های ۳ و ۷ روز کشت داده شدند. محیط کشت هر ۲۴ ساعت تعویض می‌شد. پس از گذشت مدت زمان مورد نظر نمونه‌ها با محلول گلوترآلدئید^{۲۵} ثابت شده و با الکل با درصد‌های افزایش یابنده ۱۰، ۳۰، ۷۰، ۸۰، ۹۰ و ۹۵ و اتانول خشک شدند. بعد از خشک شدن، نمونه‌ها با لایه‌ای از طلا پوشش داده شده و از آن‌ها تصاویر میکروسکوپ الکترونی تهیه شد.



شکل ۲- طیف FTIR فیلم پلیمری POSS/PCU

۲-۶- بررسی‌های آماری

نتایج به‌دست آمده از بررسی‌های زیست‌سازگاری در نمودارهای ستونی به همراه انحراف معیار هر نمونه ارائه شده است. به منظور بررسی قابل ملاحظه بودن یا نبودن اختلاف بین گروه‌ها از آزمون آماری تحلیل واریانس یک طرفه ANOVA^{۲۶} استفاده و مقادیر p کوچکتر از ۰/۰۵ به عنوان اختلاف قابل ملاحظه در نظر گرفته شد.

۳- یافته‌ها و بحث

۳-۱- طیف سنجی تبدیل فوریه زیر قرمز

طیف حاصل از آزمون طیف سنجی فیلم پلیمری مورد مطالعه در حالی که کلیه قله‌های مشخصه نانوکامپوزیت POSS/PCU را نشان می‌دهد در شکل (۲) آمده است. پلی‌کربنات یورتان دارای یک بخش آمورف پلی‌کربناتی است که جذب اصلی آن در دو طول موج 1750 cm^{-1} و 1253 cm^{-1} دیده می‌شود. جذب اول مربوط به پیوند $\text{C}=\text{O}$ گروه کربنات و جذب دوم مربوط به پیوند $\text{C}-\text{O}$ در $\text{C}-\text{O}-\text{C}$ است [۲۶]. یک مربوط به پیوند $\text{C}-\text{O}-\text{C}$ در طول موج ۱۳۰۰ خود را نشان داده است. گروه کربونیل یورتانی (NHCOO) سبب پدید آمدن جذب در طول موج 1640 cm^{-1} شده است [۲۷]. قله‌ای که در طول موج 3340 cm^{-1} دیده می‌شود مربوط به ارتعاشات پیوند $\text{N}-\text{H}$ است. این پیوند می‌تواند مربوط به گروه‌های اوره و

مواد پیشرفته در مهندسی، سال ۳۲، شماره ۱، بهار ۱۳۹۲

نانوکامپوزیت، فیلم‌های پلیمری پس از استریل شدن توسط اتوکلاو به شکل دیسک‌هایی بریده و در پلیتهای ۱۲ حفره‌ای قرار داده شدند. سپس تعداد ۲۰۰۰ سلول L929 بر روی نمونه‌ها ریخته و اجازه داده شد به مدت ۲ ساعت در شرایط استاندارد انکوبه شوند. پس از این مدت و ایجاد چسبندگی نسبی سلول‌ها به سطح، محیط کشت RPMI حاوی ۱۰٪ FBS به هر یک از نمونه‌ها اضافه شد. پلیت پلی استایرنی کشت سلول نیز به عنوان نمونه کنترل انتخاب شد. سلول‌ها به مدت ۳، ۷ و ۱۴ روز بر روی نمونه‌ها قرار داشته و محیط کشت هر ۲۴ ساعت تعویض می‌شد. پس از مدت زمان ذکر شده محیط کشت به طور کامل برداشته شده و نمونه‌ها به مدت ۳ دقیقه تریپسین شدند. سوسپانسیون حاصل که حاوی سلول‌های جدا شده از سطح نمونه‌ها بود به مدت ۵ دقیقه و با ۱۴۰۰ دور بر دقیقه سانتریفیوژ شده و سلول‌ها به روش تریپان بلو شمارش شدند. برای هر نمونه آزمایش‌ها ۳ بار تکرار شد.

۲-۵- مطالعات میکروسکوپی الکترونی روبشی

(SEM)

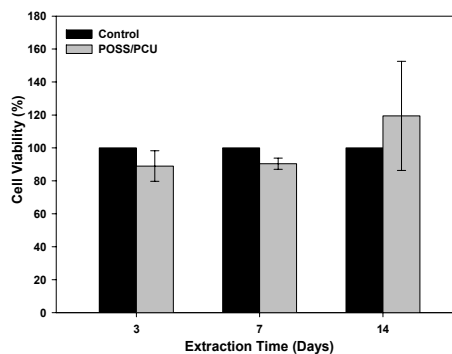
به منظور بررسی مورفولوژی سلول‌های L929 و کیفیت تعامل آن‌ها با سطح فیلم پلیمری مطالعات میکروسکوپ الکترونی روبشی صورت پذیرفت. به این ترتیب که فیلم‌های

یا یورتان باشد. قله بزرگی که در طول موج 2960 cm^{-1} دیده می‌شود مربوط به ارتعاشات پیوند C-H گروه‌های متیلن موجود در زنجیره پلیمری است. قله کناری آن که در طول موج 2865 cm^{-1} دیده می‌شود ناشی از ارتعاشات پیوندهای C-H متصل به گروه‌های NH_3 است. قله‌های کوچکی که در طول موج‌های بین 1430 تا 1625 cm^{-1} دیده می‌شود مربوط به ارتعاشات گروه‌های آروماتیک موجود در ساختار است. حضور POSS با رخ دادن جذب در طول موج 1100 cm^{-1} به اثبات می‌رسد. پیوندهای Si-O موجود در POSS سبب پدیدار شدن این قله در طول موج ذکر شده می‌شوند [۲۸].

۲-۳- آزمون سمیت سلولی

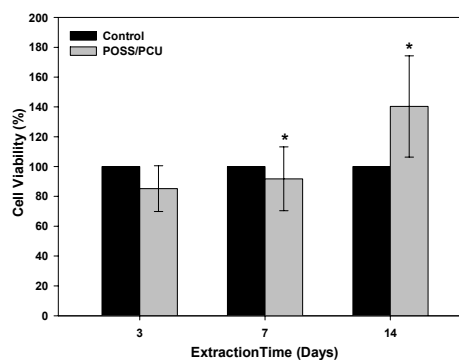
نتایج حاصل از آزمون MTT برای سه غلظت متفاوت از عصاره‌ها به صورت نمودارهای ستونی در شکل (۳) نشان داده شده است. همان‌طور که در شکل (۳-الف) در مورد عصاره با غلظت ۵۰ درصد حجمی قابل ملاحظه است. میزان بقای سلولی عصاره‌های ۳ و ۷ روزه مقدار مشابهی را در حدود ۸۵٪ نشان می‌دهند. اگرچه این مقدار پایین‌تر از نمونه کنترل است اما بررسی‌های آماری اختلاف عمده‌ای را نشان نداد. با طولانی‌تر شدن زمان عصاره‌گیری تا ۱۴ روز بقای سلولی با افزایش قابل ملاحظه‌ای به حدود ۱۲۰٪ رسید. در مورد عصاره با غلظت ۷۵ درصد حجمی، شکل (۳-ب) مجدداً اختلاف قابل ملاحظه‌ای بین روزهای ۳ و ۷ مشاهده نشد، اما در روز ۱۴ بقای سلولی افزایش قابل ملاحظه‌ای را از لحاظ آماری نسبت به روزهای پیشین نشان داد و به ۱۴۰٪ رسید. زمانی که سلول‌ها در معرض عصاره خالص قرار گرفتند شکل (۳-ج) بقای سلولی در روز ۷ با افزایش شدیدی نسبت به روز ۳ به ۱۲۰٪ رسید. این در حالی است که بر خلاف عصاره‌های رقیق شده تفاوت قابل ملاحظه‌ای بین روزهای ۷ و ۱۴ مشاهده نشد.

با ارزیابی و مقایسه هر سه نمودار با یکدیگر به این نتیجه کلی می‌رسیم که با افزایش زمان عصاره‌گیری میزان بقای سلولی



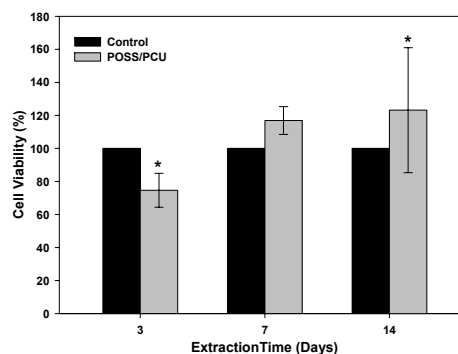
شکل ۳-الف- درصد بقای سلول‌های L929 کشت

داده شده در عصاره‌های با غلظت ۵۰ درصد حجمی به مدت ۲۴ ساعت در مقایسه با نمونه کنترل



شکل ۳-ب- درصد بقای سلول‌های L929 کشت

داده شده در عصاره‌های با غلظت ۷۵ درصد حجمی به مدت ۲۴ ساعت در مقایسه با نمونه کنترل ؛ $p\text{-value} < 0.05$ *



شکل ۳-ج- درصد بقای سلول‌های L929 کشت داده شده

در عصاره‌های خالص به مدت ۲۴ ساعت در مقایسه با نمونه کنترل ؛ $p\text{-value} < 0.05$ *

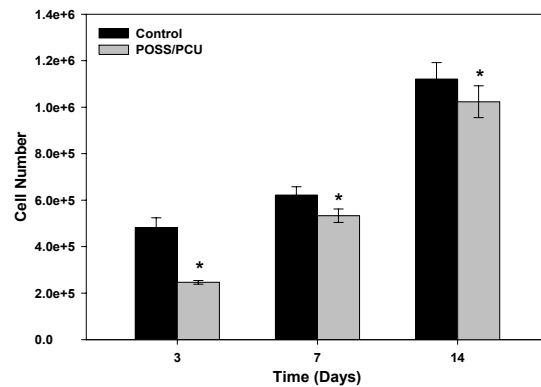
مواد پیشرفته در مهندسی، سال ۳۲، شماره ۱، بهار ۱۳۹۲

جزیی که شانس بیشتری برای آزاد شدن در محیط کشت طی عمل عصاره‌گیری را دارد نانوذرات POSS هستند که با افزایش زمان عصاره‌گیری غلظتشان در محیط افزایش می‌یابد. از این رو افزایش بقای سلولی با افزایش زمان عصاره‌گیری در واقع نشان دهنده رابطه مستقیم نانوذرات POSS با میزان فعالیت سلولی و به این معنی است که این نانوساختارها از قابلیت برانگیختگی سلول‌های L929 برخوردارند. پیش از این نیز اثر القایی POSS بر رشد و تکثیر سلولی در محیط *in vitro* توسط بعضی از محققان گزارش شده بود [۳۰].

مقایسه درصد بقای سلولی در زمان‌های عصاره‌گیری یکسان اما در غلظت‌های متفاوت عصاره نیز به خوبی می‌تواند آشکار کننده نقش POSS باشد. همان‌طور که ذکر شد در مورد عصاره‌های رقیق شده تفاوت چندانی بین روزهای ۳ و ۷ مشاهده نشد در حالی که در مورد عصاره خالص بقای سلولی در روز ۷ افزایش چشمگیری را نسبت به روز ۳ نشان داد و به ۱۲۰٪ رسید. ثبت درصد بقا سلولی‌ای بیشتر از نمونه کنترل، خود نشان از برانگیختگی سلول‌هاست. این بار هم با توجه به پایداری PCU، افزایش غلظت عصاره به معنی افزایش مقدار ذرات POSS در محیط است که به واسطه اثر القایی‌شان قادر به افزایش نرخ تکثیر سلولی علی‌رغم زمان کوتاه‌تر عصاره‌گیری خواهند بود.

۳-۳- آزمون تکثیر سلولی

نتایج حاصل از آزمون تکثیر سلولی بر سطح نانوکامپوزیت POSS/PCU در شکل (۴) نشان داده شده است. همان‌طور که مشاهده می‌شود سلول‌های شمارش شده پس از ۳ روز کشت بر فیلم پلیمری، کمتر از نصف نمونه کنترل هستند. بررسی‌های آماری نیز نشان داد که اختلاف عمده‌ای بین غشای پلیمری و نمونه کنترل وجود دارد. این امر را می‌توان به این موضوع نسبت داد که در طی مدت ۳ روز، سلول‌ها در حال وفق دادن^{۲۸} خود با سطح نانوکامپوزیت بوده و از این‌رو هنوز مورفولوژی و عملکرد طبیعی خود را به دست نیاورده اند [۳۱]. مطالعات نشان



شکل ۴- تعداد سلول‌های L929 پس از ۳، ۷ و ۱۴ روز کشت بر سطح نانوکامپوزیت POSS/PCU در مقایسه با نمونه کنترل * p-value < 0.001؛ (TCPS)

نیز افزایش یافته است. افزایش بقای سلولی در آزمون MTT در واقع بیان کننده افزایش فعالیت سلولی و شاخصی از رشد و تکثیر سلول‌های تحت کشت است. بنابراین می‌توان گفت که با افزایش زمان عصاره‌گیری برانگیختگی سلول‌ها نیز افزایش یافته است. این امر نشان می‌دهد که در طی عمل عصاره‌گیری ذراتی از فیلم‌های پلیمری آزاد شده که برانگیختگی سلول‌های L929 را به همراه داشته است.

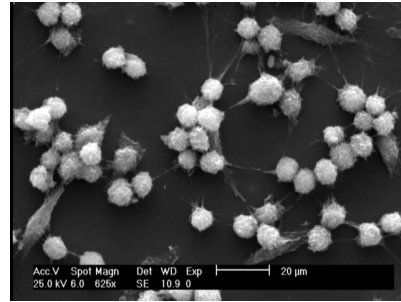
مطالعات انجام گرفته بر PCU حاکی از آن است که این ماده از پایداری بالایی در برابر تخریب در محیط‌های بیولوژیک برخوردار است [۲۶ و ۲۹]. زیرا همان‌طور که ذکر شد قسمت نرم پلی‌یورتان که عمدتاً از گروه‌های استری یا اتری تشکیل شده است و آسیب پذیرترین بخش پلی‌یورتان است، در PCU با گروه‌های کربناتی جایگزین شده است. اگرچه گروه‌های استری مقاومت به اکسیداسیون بالایی دارند اما در برابر هیدرولیز بسیار ضعیف‌اند؛ از سوی دیگر گروه‌های اتری هم در برابر بعضی از آنزیم‌ها از جمله میلوپراکسیدازها^{۲۷} مقاومت اکسیداسیون کمی دارند. در این میان استفاده از گروه‌های کربناتی نشان داده که با افزایش پیوندهای هیدروژنی بین بخش‌های مختلف پلیمر سبب بهبود پایداری پلی‌یورتان می‌شود [۲۹]. در این صورت می‌توان نتیجه گرفت که تنها

پس از گذشت ۷ روز، به نظر می‌رسد که سلول‌ها بر سطح نانوکامپوزیت وارد فاز تکثیر شده به طوری که اختلاف قابل ملاحظه‌ای با نمونه کنترل مشاهده نمی‌شود. این نرخ بالای تکثیر در روز ۱۴ نیز ادامه یافته است. ملاحظات آماری نشان می‌دهد که تعداد سلول‌های شمارش شده به طور قابل ملاحظه‌ای از روز ۳ به ۷ و از روز ۷ به ۱۴ افزایش یافته است که بیان‌کننده این مطلب است که در این مدت سلول‌ها توانسته‌اند خود را با شرایط سطحی نانوکامپوزیت وفق داده و نرخ تکثیری نزدیک به نمونه کنترل از خود بروز دهند. این نرخ تکثیر با در نظر گرفتن آب‌گریز بودن سطح نانوکامپوزیت بسیار قابل توجه است. آزمون تکثیر سلولی نشان داد که سطح نانوکامپوزیت POSS/PCU به خوبی قادر به زنده نگه داشتن سلول‌های L929 در دوره‌های کشت طولانی مدت بوده، ضمن اینکه قابلیت ذاتی سلول‌ها در تکثیر نیز دستخوش تغییر چندانی نمی‌شود. حفظ قابلیت‌های رشد و تکثیر سلول‌ها از ویژگی‌های اساسی و مورد نیاز یک جایگزین پوستی موفق است.

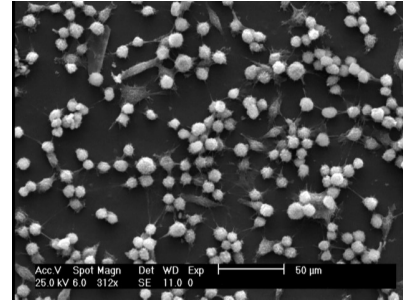
۳-۴- بررسی مورفولوژی سلولی

شکل (۵) سلول‌های L929 را پس از ۳ روز کشت بر سطح غشای پلیمری را نشان می‌دهد. ملاحظه می‌شود که سلول‌ها چسبندگی خوبی به سطح نمونه پیدا کرده‌اند. این موضوع با مشاهده زواید سیتوپلاسمی که در همه‌ی جهت‌ها بر سطح نانوکامپوزیت رشد کرده‌اند به اثبات می‌رسد. رشد زواید سلولی در جهت‌های مختلف باعث می‌شود که با گذشت زمان سلول‌ها در تمامی سطح ماده توزیع و پراکنده شده و در نهایت منجر به تشکیل یک لایه سلولی شوند [۳۶].

اگرچه تشکیل یک اتصال محکم بین سلول و سطح زیرین از اهمیت بالایی برخوردار است، اما لازم است که سلول‌ها نیز از تعامل مناسبی با یکدیگر برخوردار باشند [۳۵]. همان‌طور که مشاهده می‌شود در بعضی نقاط سلول‌ها به یکدیگر نزدیک شده و زواید سیتوپلاسمی شروع به رشد کرده‌اند. ارتباط سلول‌ها به



(الف)



(ب)

شکل ۵- تصاویر SEM سلول‌های L929 پس از ۳ روز کشت بر سطح نانوکامپوزیت POSS/PCU در دو بزرگ‌نمایی مختلف

داده که حضور POSS بر سطح ماده سبب افزایش آب‌گریزی آن می‌شود [۳۲ و ۳۳]. این مطلب نیز به خوبی پذیرفته شده که سلول‌ها تمایل بیشتری برای رشد و تکثیر بر سطح مواد آب دوست نسبت به مواد آب‌گریز از خود نشان می‌دهند [۳۴]. بنابراین در مورد غشای نانوکامپوزیتی POSS/PCU مدت زمانی به طول می‌انجامد تا سلول‌ها شکل و عملکرد طبیعی خود را به دست آورده و وارد فاز تکثیر شوند. این در حالی است که ظروف پلی استایرنی به نحوی طراحی و ساخته شده‌اند که علاوه بر آب‌دوست بودن بتوانند محیط ایدئالی را برای کشت سلول و بافت فراهم کنند [۳۵]. در نتیجه به دلیل شرایط مساعد سلول‌ها به خوبی بر سطح TCPS چسبیده و در مدت کوتاهی شروع به رشد و تکثیر می‌کند. در این میان نرخ تکثیر بسیار بالای سلول‌های L929 نیز مزید بر علت شده و سبب می‌شود که تفاوت بین نمونه نانوکامپوزیتی و TCPS به‌خصوص در دوره‌های زمانی کوتاه‌تر، بارزتر شود.

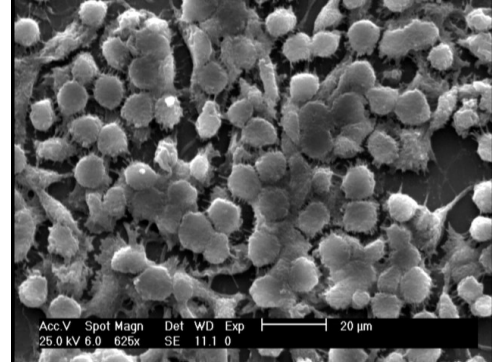
مواد پیشرفته در مهندسی، سال ۳۲، شماره ۱، بهار ۱۳۹۲

از خود نشان می‌دهند که مورفولوژی طبیعی سلول‌های L929 نیست. به هم خوردن مورفولوژی سلول‌ها تا حدی می‌تواند از آب‌گریز بودن سطح ماده ناشی شده باشد. اما به احتمال قویتر این تغییر مورفولوژی در حین عملیات ثابت کردن سلول‌ها رخ داده است. موزارلی و همکارانش در سال ۲۰۰۵ در حین بررسی زیست‌سازگاری دی بوتیریل چیتین^{۲۹} به عنوان زخم پوش گزارش کردند که مناسب نبودن شرایط محیطی در حین ثابت کردن سلول‌های L929 منجر به از دست رفتن مورفولوژی طبیعی آن‌ها شد [۴۳]. در پژوهش حاضر نیز بر این عقیده‌ایم که pH محیط در حین عملیات آماده سازی نمونه‌ها برای بررسی‌های SEM در سطح مناسبی نبوده و این امر سبب تغییر مورفولوژی و منقبض شدن غشای سلول‌ها شده است.

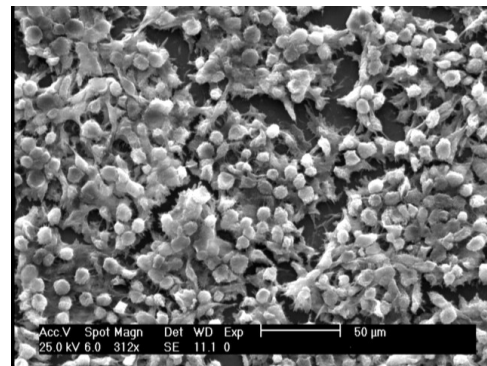
همان‌طور که در شکل (۶) نشان داده شده پس از گذشت ۷ روز دانسیته سلولی چندین برابر شده به طوری که می‌توان گفت یک لایه سلولی بر سطح پلیمر تشکیل شده است. این مشاهدات در تطابق خوبی با نتایج آزمون تکثیر سلولی است که طی آن افزایش قابل ملاحظه‌ای در سلول‌های شمارش شده در روز ۷ نسبت به روز ۳ مشاهده شد. همچنین نشان دهنده این مطلب است که تغییر مورفولوژی سلول‌ها در حدی نبوده که مانع عملکرد طبیعی آن‌ها شود؛ و نیز امکان منقبض شدن غشای سلول‌ها در حین عملیات آماده سازی را تأیید می‌کند. ملاحظه می‌شود که این بار سلول‌ها مورفولوژی تختی به خود گرفته‌اند. طبق مطالعات انجام گرفته حضور نانوذرات POSS بر سطح می‌تواند باعث کاهش کشش سطحی [۴۴] شود که آن هم در نهایت منجر به تخت شدن سلول‌ها بر سطح می‌شود.

۴- نتیجه‌گیری

در این تحقیق غشاهای پلیمری ساخته شده از نانوکامپوزیت POSS/PCU برای کاربرد به عنوان جایگزین موقت پوست تحت بررسی‌های زیست‌سازگاری قرار گرفتند. آزمون سمیت سلولی نشان داد که ترکیبات آزاد شده از فیلم پلیمری در محیط بیولوژیک و در یک دوره به نسبت بلند مدت ۱۴ روزه نه تنها



(الف)



(ب)

شکل ۶- تصاویر SEM سلول‌های L929 پس از ۷ روز کشت بر سطح نانوکامپوزیت POSS/PCU در دو بزرگنمایی مختلف

یکدیگر ضمن چسبندگی به سطح زیرین می‌تواند نشانه‌ای از مطلوب بودن شرایط سطحی ماده برای رشد و تکثیر سلولی باشد. اتصال خوب سلول‌ها به سطح نانوکامپوزیت (علی‌رغم آب‌گریز بودن آن) را می‌توان ناشی از حضور نانو پرکننده POSS در سطح دانست؛ چراکه گزارش شده این نانوذرات علاوه بر افزایش زبری سطح پلیمر [۳۳، ۳۷-۴۰] سبب پدید آمدن برآمدگی‌هایی در مقیاس نانومتری می‌شوند که می‌توانند به عنوان تکیه گاهی برای سلول‌های L929 عمل کنند [۴۱-۴۲]. یک اتصال مطلوب به سطح در مراحل اولیه می‌تواند رشد و تکثیر بهتر سلول‌ها در مراحل بعدی را به همراه داشته باشد. متأسفانه سلول‌ها بر سطح نانوکامپوزیت مورفولوژی مدوری را

که حضور ذرات POSS در سطح باعث بهبود چسبندگی سلول‌ها به فیلم پلیمری می‌شود. همچنین مشاهده شد که شرایط سطحی مطلوب نانوکامپوزیت POSS/PCU در نهایت می‌تواند منجر به تشکیل یک لایه سلولی شود. در مجموع ارزیابی‌های صورت گرفته نتایج امیدوار کننده‌ای را مبنی بر پتانسیل بالای این نانوکامپوزیت در کاربرد به عنوان یک جایگزین پوستی به دست می‌دهد؛ اگرچه هنوز لازم است که تحقیقات بیشتری در این زمینه صورت پذیرد.

فاقد هر گونه سمیت شدید و خطرناک‌اند بلکه نانوذرات POSS به دلیل اثر القایی خود می‌توانند سبب بهبود رشد و تکثیر سلولی شوند. به عنوان یک جایگزین پوستی لازم است که فیلم پلیمری توانایی زنده نگه داشتن سلول‌ها و حفظ قابلیت‌های رشد و تکثیر آن‌ها را در تماس مستقیم داشته باشد. این قابلیت طی آزمون تکثیر سلولی مورد بررسی قرار گرفت و مشاهده شد که بعد از گذشت ۷ روز سلول‌ها با به دست آوردن عملکرد طبیعی خود نرخ تکثیر مطلوبی را در مقایسه با ظرف پلی استایرنی از خود نشان دادند. در مطالعات SEM مشخص شد

واژه نامه

- | | | |
|---|---|--|
| 1. skin substitutes | 13. dimethylacetamide (DMAC) | 21. polystyrene tissue-culture plates |
| 2. glycosaminoglycans | 14. poly (ethylene terephthalate) | 22. viability |
| 3. chondroitin 6-sulfate | 15. fourier transform Infra red (FTIR) | 23. cell proliferation assay |
| 4. wound dressing | 16. roswell park memorial Institute (RPMI) | 24. scanning electron microscopy (SEM) |
| 5. poly(lactic acid) | 17. fetal bovine serum (FBS) | 25. glutaraldehyde |
| 6. polycaprolactone | 18. trypsin | 26. one way analysis of variance (ANOVA) |
| 7. poly(lacto-co-glycolic acid) | 19. cell cytotoxicity assay | 27. myeloperoxidase |
| 8. polyhedral oligomeric silsesquioxane | 20. 3-dimethylthiazol-2,5-diphenyltetrazolium bromide | 28. adaptation |
| 9. poly carbonate urethane | | 29. dibutyl chitin |
| 10. polyurethanes | | |
| 11. chain extenders | | |
| 12. methylene di-isocyanate | | |

مراجع

- Narayan, R., Ed., *Biomedical Materials*. Springer, 2009.
- Ratner, B. D., Hoffman, A. S., Schoen, F. J., and Lemons, J. E., *Biomaterials Science: an Introduction to Materials in Medicine*. Elsevier Inc., 2004.
- Fisher, J. P., Mikos, A. G., and Bronzino, J. D., *Tissue Engineering*. CRC Press, 2007.
- Reis, R. L., and Román, J. S., *Biodegradable Systems in Tissue Engineering and Regenerative Medicine*. CRC Press, 2004.
- Lee, H.-Y., Jin, G.-Z., Shin, U. S., Kim, J.-H., and Kim, H.-W., "Novel Porous Scaffolds of Poly(lactic Acid) Produced by Phase-separation Using Room Temperature Ionic Liquid and the Assessments of Biocompatibility," *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, Vol. 23, pp. 1271-1279, 2012.
- Dubsky, M., Kubinova, S., Sirc, J., Voska, L., Zajicek, R., Zajicova, A., Lesny, P., Jirkovska, A., Michalek, J., Munzarova, M., Holan, V., and Sykova, E., "Nanofibers prepared by Needleless Electrospinning Technology as Scaffolds for Wound Healing," *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, Vol. 23, pp. 931-41, 2012.
- Bruin, P., Smedinga, J., Pennings, A. J., and Jonkman, M. F., "Biodegradable Lysine Diisocyanate-Based Poly (glycolide-Co-Epsilon-Caprolactone)-Urethane Network in Artificial Skin," *Biomaterials*, Vol. 11, pp. 291-295, 1990.
- Chikazu, D., Taguchi, T., Koyama, H., Hikiji, H., Fujihara, H., Suenaga, H., Saijo, H., Mori, Y., Seto, I., Iino, M., and Takato, T., "Improvement in Wound Healing by a Novel Synthetic Collagen-Gel Dressing in Genetically Diabetic Mice," *Asian Journal of Oral and Maxillofacial Surgery*, Vol. 22, pp. 61-67, 2010.
- Reno, F., Rizzi, M., and Cannas, M., "Gelatin-Based Anionic Hydrogel as Biocompatible Substrate for

- Human Keratinocyte Growth,” *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, Vol. 23, pp. 565-571, 2012.
10. Franco, R. A., Nguyen, T. H., and Lee, B.-T., “Preparation and Characterization of Electrospun PCL/PLGA Membranes and Chitosan/Gelatin Hydrogels for Skin Bioengineering Applications,” *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, Vol. 22, pp. 2207-18, 2011.
 11. Chen, D., Yi, S., Fang, P., Zhong, Y., Huang, C., and Wua, X. “Synthesis and Characterization of Novel Room Temperature Vulcanized (RTV) Silicone Rubbers Using Octa[(Trimethoxysilyl)Ethyl]-POSS as Cross-Linker,” *Reactive and Funcional Polymers*, Vol. 71, pp. 502-511, 2011.
 12. Kannan, R. Y., Salacinski, H. J., Buttler, P. E., and Seifalian, A. M., “Polyhedral Oligomeric Silsesquioxane Nanocomposites: The Next Generation Material for Biomedical Applications,” *Accounts of Chemical Research*, Vol. 38, pp. 879-884, 2005.
 13. Xu, W., Chung, C., and Kwon, Y., “Synthesis of Novel Block Copolymers Containing Polyhedral Oligomeric Silsesquioxane (POSS) Pendent Groups Via Ring-opening Metathesis Polymerization (ROMP)” *Polymer*, Vol. 48, pp. 6286-6293, 2007.
 14. Pu, K. Y., Zhang, B., Ma, Z., Wang, P., Qi, X. Y., Chen, R. F., Wang, L. H., Fan, Q. L., and Huang, W., “Synthesis, Morphology and Photophysics of Novel Hybrid Organic-Inorganic Polyhedral Oligomeric Silsesquioxane-Tethered Poly(Fluorenyleneethynylene),” *Polymer*, Vol. 47, pp. 1970-1978, 2006.
 15. Chen, D., Yi, S., Wu, W., Zhong, Y., Liao, J., Huang, C., and Shi, W., “Synthesis and Characterization of Novel Room Temperature Vulcanized (RTV) Silicone Rubbers Using Vinyl-POSS Derivatives as Cross Linking Agents,” *Polymer*, Vol. 51, pp. 3867-3878, 2010.
 16. Sánchez-Soto, M., Schiraldi, D. A., and Illescas, S., “Study of the Morphology and Properties of Melt-Mixed Polycarbonate-POSS Nanocomposites,” *European Polymer Journal*, Vol. 45, pp. 341-352, 2009.
 17. Teo, J. K. H., Toh, C. L., and Lu, X., “Catalytic and Reinforcing Effects of Polyhedral Oligomeric Silsesquioxane (POSS)-Imidazolium Modified Clay in an Anhydride-Cured Epoxy,” *Polymer*, Vol. 52, pp. 1975-1982, 2011.
 18. Song, J., Chen, G., Wu, G., Cai, C., Liu, P., and Li, Q., “Thermal and Dynamic Mechanical Properties of Epoxyresin/Poly (Urethane-Imide)/Polyhedral Oligomeric Silsesquioxane Anocomposites,” *Polymers for Advanced Technologies*, Vol. 10, pp. 1722-1727, 2010.
 19. Kuo, S. W., and Chang, F. C., “POSS Related Polymer Nanocomposites,” *Progress in Polymer Science*, Vol. 36, pp. 1649-1696, 2011.
 20. Madbouly, S. A., and Otaigbe, J. U., “Recent Advances in Synthesis, Characterization and Rheological Properties of Polyurethanes and POSS/Polyurethane Nanocomposites Dispersions and Films,” *Progress in Polymer Science*, Vol. 34, pp. 1283-1332, 2009.
 21. Chattopadhyay, D. K., and Raju, K. V. S. N., “Structural Engineering of Polyurethane Coatings for High Performance Applications,” *Progress in Polymer Science*, Vol. 32, pp. 352-418, 2007.
 22. G Punshon, G., Vara, D. S., Sales, K. M., Kidane, A. G., Salacinski, H. J., and Seifalian, A. M., “Interactions Between Endothelial Cells and a Poly (Carbonate-Silsesquioxane-Bridge-Urea)Urethane,” *Biomaterials*, Vol. 26, pp. 6271-6279, 2005.
 23. Kannan, R. Y., Salacinski, H. J., Edirisinghe, M. J., Hamilton, G., and Seifalian, A. M., “Polyhedral Oligomeric Silsequioxane-Polyurethane Nanocomposite Microvessels for an Artificial Capillary bed,” *Biomaterials*, Vol. 27, pp. 4618-4626, 2006.
 24. Kannan, R. Y., Salacinski, H. J., Sales, K. M., Butler, P. E., and Seifalian, A. M., “The Endothelialization of Polyhedral Oligomeric Silsesquioxane Nanocomposites,” *Cell Biochemistry and Biophysics*, Vol. 45, pp. 129-136, 2006.
 25. Salacinski, H. J., Handcock, S., and Seifalian, A. M., “Polymer for use in Conduits and Medical Devices,” WO2005070998, 2005.
 26. Seifalian, A. M., Salacinski, H. J., Tiwari, A., Edwards, A., Bowald, S., and Hamilton, G., “In vivo Biostability of a Poly(Carbonate-Urea)Urethane Graft,” *Biomaterials*, Vol. 24, pp. 2549-2557, 2003.
 27. Kannan, R. Y., Salacinski, H. J., Odlyha, M., Butler, P. E., and Seifalian, A. M., “The Degradative Resistance of Polyhedral Oligomeric Silsesquioxane Nanocore Integrated Polyurethanes: An in Vitro study,” *Biomaterials* Vol. 27 pp. 1971-1979, 2006.
 28. Kannan, R. Y., Salacinski, H. J., Odlyha, M., Butler, P. E., and Seifalian, A. M., “The Degradative Resistance of Polyhedral Oligomeric Silsesquioxane Nanocore Integrated Polyurethanes: An in Vitro Study,” *Biomaterials*, Vol. 27, pp. 1971-1979, 2006.
 28. Olbrich, M., Punshon, G., Frischauf, I., Salacinski, H. J., Rebollar, E., Romanin, C., and Seifalian, A. M., “UV Surface Modification of a New Nanocomposite Polymer to Improve Cytocompatibility,” *Journal of Biomaterials Science: Polymer Edition.*, Vol. 18, pp. 453-468, 2007.
 29. Salacinski, H. J., Odlyha, M., Hamilton, G., and Seifalian, A. M., “Thermo-Mechanical Analysis of a Compliant Poly(Carbonate-Urea)Urethane after Exposure to Hydrolytic, Oxidative, Peroxidative and Biological Solutions,” *Biomaterials*, Vol. 23, pp. 2231-2240, 2002.
 30. Ghanbari, H., Cousins, B. G., and Seifalian, A. M., “A Nanocage for Nanomedicine: Polyhedral Oligomeric

- Silsesquioxane (POSS)," *Macromolecular Rapid Communications*, Vol. 32, pp. 1032–1046, 2011.
31. Luo, Y., Wang, Y., Niu, X., and Shang, J., "Evaluation of the Cytocompatibility of Butanediamine and RGDS-Grafted Poly(DL-Lactic acid)," *European Polymer Journal*, Vol. 44, pp. 1390–1402, 2008.
 32. Kannan, R. Y., Salacinski, H. J., Groot, J. D., Clatworthy, I., Bozec, L., Horton, M., Butler, P. E., and Seifalian, A. M., "The Antithrombogenic Potential of a Polyhedral Oligomeric Silsesquioxane (POSS) Nanocomposite," *Biomacromolecules*, Vol. 7, pp. 215–223, 2006.
 33. Misra, R., Fu, B. X., and Morgan, S. E., "Surface Energetics, Dispersion, and Nanotribomechanical Behavior of POSS/PP Hybrid Nanocomposites," *Journal of Polymer Science Part B: Polymer Physics*, Vol. 45, pp. 2441–2455, 2007.
 34. Marques, A. P., Reis, R. L., and Hunt, J. A., "The Biocompatibility of Novel Starch-based Polymers and Composites: in Vitro Studies," *Biomaterials*, Vol. 23, pp. 1471–1478, 2002.
 35. Neamark, A., Sanchavanakit, N., Pavasant, P., Rujiravanit, R., and Supaphol, P., "In Vitro Biocompatibility of Electrospun Hexanoyl Chitosan Fibrous Scaffolds Towards Human Keratinocytes and Fibroblasts," *European Polymer Journal*, Vol. 44, pp. 2060–2067, 2008.
 36. Lobo, A. O., Antunes, E. F., Machado, A. H. A., Pacheco-Soares, C., Trava-Airoldi, V. J., and Corat, E. J., "Cell Viability and Adhesion on as Grown Multi-Wall Carbon Nanotube Films," *Materials Science and Engineering C*, Vol. 28, pp. 264–269, 2008.
 37. Zhao, F., Huang, Y., Liu, L., Bai, Y., and Xu, L., "Formation of a Carbon Fiber/Polyhedral Oligomeric Silsesquioxane/Carbon Nanotube Hybrid Reinforcement and its Effect on the Interfacial Properties of Carbon Fiber/Epoxy Composites," *Carbon*, Vol. 49, pp. 2624–2632, 2011.
 38. Kim, E. H., Myoung, S. W., Jung, Y. G., and Paik, U., "Polyhedral Oligomeric Silsesquioxane-Reinforced Polyurethane Acrylate," *Progress in Organic Coating*, Vol. 64, pp. 205–209, 2009.
 39. Lai, Y. S., Tsai, W., Yang, H. W., Wang, G. P., and Wua, K. H., "Structural and Electrochemical Properties of Polyurethanes/Polyhedral Oligomeric Silsesquioxanes (PU/POSS) Hybrid Coatings on Aluminum Alloys," *Materials Chemistry and Physics*, Vol. 117, pp. 91–98, 2009.
 40. Zhao, F., and Huang, Y., "Improved Interfacial Properties of Carbon Fiber/Epoxy Composites Through Grafting Polyhedral Oligomeric Silsesquioxane on Carbon Fiber Surface," *Materials Letters*, Vol. 64, pp. 2742–2744, 2010.
 41. Wu, J., and Mather, P. T., "POSS Polymers: Physical Properties and Biomaterials Applications," *Polymer Reviews*, Vol. 49, pp. 25–63, 2009.
 42. Ghanbari, H., Kidane, A. G., Burriesci, G., Ramesh, B., Darbyshire, A., and Seifalian, A. M., "The Anti-Calcification Potential of a Silsesquioxane Nanocomposite Polymer under in Vitro Conditions: Potential Material for Synthetic Leaflet Heart Valve," *Acta Biomaterialia*, Vol. 6, pp. 4249–4260, 2010.
 43. Muzzarelli, R. A. A., Guerrieri, M., Goteri, G., Muzzarelli, C., Armeni, T., Ghiselli, R., and Cornelissen, M., "The Biocompatibility of Dibutylryl Chitin in the Context of Wound Dressings," *Biomaterials*, Vol. 26, pp. 5844–5854, 2005.
 44. Wang, W. S., Guo, Y. L., and Otaigbe, J. U., "The Synthesis, Characterization and Biocompatibility of Poly (Ester Urethane)/ Polyhedral Oligomeric Silsesquioxane Nanocomposites," *Polymer*, Vol. 50, pp. 5749–5757, 2009.