

ارزیابی خواص آنتی باکتریال نانوکامپوزیت‌های پلی لاکتیک اسید- پلی کاپرولاکتون- حاوی نانوذرات هیدروکسی آپاتیت و اکسید روی در داربست‌های قابل جذب بافت سخت

فرناز دهقانی فیروزآبادی^۱، احمد رضانی سعادت‌آبادی^{۲*} و آزاده آصف نژاد^۱

۱- گروه مهندسی پزشکی واحد علوم و تحقیقات، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران

۲- گروه مهندسی شیمی نفت، دانشگاه صنعتی شریف، تهران، ایران

(دریافت مقاله: ۱۴۰۰/۸/۱۰- دریافت نسخه نهایی: ۱۴۰۰/۱۲/۱۸)

چکیده- امروزه افراد بسیاری به دلیل صدمات وارده به بافت استخوان نیاز به استفاده و کاشت ثابت کننده‌های استخوانی دارند. به دلیل تحریک سیستم ایمنی پس از کاشت، عفونت در محل عمل بسیار رایج است که باعث ایجاد تورم و درد در ناحیه عمل می‌شود. استفاده از نانوذرات اکسید روی باعث کاهش عفونت در محل عمل و کاهش نیاز بیمار به مصرف آنتی بیوتیک می‌شود. هدف از انجام این پژوهش ساخت و مشخصه‌یابی اتصالات پلیمری آنتی باکتریال قابل جذب جهت کاربرد در بافت سخت است که بتواند نیاز بیمار به جراحی مجدد جهت خروج اتصالات دائمی را برطرف کند. برای این منظور از پلیمرهای زیست تخریب پذیر پلی لاکتیک اسید و پلی کاپرولاکتون و نانوذرات هیدروکسی آپاتیت و اکسید روی و همچنین حلال کلروفرم استفاده شد. برای ساخت نمونه‌ها از روش محلولی استفاده شد و با استفاده از هم حمام فراصوت و همزن مغناطیسی نمونه‌ها ساخته شد. جهت بررسی مورفولوژی داربست‌های ساخته شده از میکروسکوپ الکترونی روبشی گسیل میدانی استفاده شد. ارزیابی سمیت نمونه‌ها توسط آزمون MTT بررسی شد. رفتار نانوکامپوزیت‌ها در مقابل باکتری‌های اشریشیاکلای (ای کلای) و استافیلوکوکوس اورئوس (اس آرئوس) توسط اندازه‌گیری قطر هاله عدم رشد بررسی شد. نتایج نشان داد که میزان قطر هاله عدم رشد در زمینه پلیمری در برابر باکتری ای کلای 0.219 ± 0.1479 میلی‌متر و برای زمینه بهینه 0.341 ± 0.3872 میلی‌متر بود. همچنین میزان قطر هاله عدم رشد در برابر باکتری اس آرئوس در زمینه پلیمری 0.32 ± 0.1742 میلی‌متر و برای ماتریس بهینه 0.318 ± 0.3997 میلی‌متر اندازه‌گیری شد که نشان از فعالیت آنتی باکتریال نانوذرات اکسید روی دارد. همچنین مشاهده شد که سلول‌های فیبروبلاست روی سطح داربست‌های اصلاح شده زنده‌مانی بیشتری نسبت به داربست پلیمری داشتند. این نتایج نشان داد که اصلاح داربست‌ها با نانوذرات باعث مهار رشد باکتری در محیط کشت می‌شود. این مطالعه نشان داد که اضافه کردن نانوذرات اکسید روی باعث بهبود خاصیت ضد باکتریایی داربست‌ها و همچنین بهبود زنده‌مانی سلول‌ها و کاهش سمیت داربست می‌شود.

واژه‌های کلیدی: هیدروکسی آپاتیت، اکسید روی، آنتی باکتریال، اشریشیاکلای، استافیلوکوکوس اورئوس.

*: مسئول مکاتبات، پست الکترونیکی: ramazani@sharif.edu

۱- مقدمه

پلیمرها به‌طور موفقیت‌آمیزی در زمینه‌های مختلف پزشکی مثل ضربان‌ساز قلب، دریچه‌های قلبی و لنزهای تماسی استفاده می‌شوند. اگرچه به دلیل مقاومت کم پلیمرها استفاده از آنها در محل‌هایی که بارگذاری وجود دارد، با محدودیت روبه‌رو است. به‌طور مشابه در مورد سرامیک‌ها که مواد زیست‌فعال هستند و توانایی برقراری پیوند با استخوان را دارند به دلیل مقاومت کششی کم و همچنین مقاومت به شکست پایین به‌طور خالص برای کاشتنی‌هایی که تحت بارگذاری هستند استفاده نمی‌شوند. اگرچه ترکیب این دو زیست‌ماده به‌عنوان یک انتخاب جدید دارای مزایایی از جمله عدم ایجاد پدیده سپر تنش و رهایش یون از کاشتنی‌های فلزی است [۱]. کاشتنی‌های غیردائمی، زیست‌تخریب‌پذیر یک جایگزین امیدوارکننده برای بیماران ارائه می‌دهند. کاشتنی‌های زیست‌تخریب‌پذیر به دلیل هم‌زمانی تخریب با تشکیل بافت، و در نتیجه، عدم نیاز به جراحی ثانویه جایگزین امیدوارکننده‌ای برای بیماران هستند [۲]. به دلیل موقتی بودن کاشتنی‌های زیست‌تخریب‌پذیر در بافت میزبان التهاب درازمدت کمتری در مقایسه با کاشتنی‌های دائمی مشاهده می‌شود، زیرا مدت ماندگاری آنها در بدن موقتی است [۲].

در چند سال اخیر پلی‌کاپرولاکتون^۱ به‌عنوان داربست در مهندسی بافت مورد استفاده قرار گرفته است [۳]. اگرچه استفاده از پلی‌کاپرولاکتون خالص به دلیل خواص مکانیکی ضعیف و زیست‌تخریب‌پذیری کم معمول نیست [۴]. در مطالعه‌ای که توسط بیکان و همکارانش انجام شد، داربست کامپوزیتی پلی‌کاپرولاکتون / بتا تری‌کلسیم فسفات ساخته و ارزیابی شد. نتایج نشان داد که این داربست قابلیت استفاده در بافت استخوان را دارد [۵].

پلی‌لاکتیک اسید^۲ خواص مکانیکی ضعیفی دارد. برای بهبود خواص مکانیکی از مواد متفاوتی استفاده می‌شود. یکی از این مواد هیدروکسی‌آپاتیت است. هیدروکسی‌آپاتیت زیست‌سازگار است و باعث ترغیب استخوان‌ها به استخوان‌سازی می‌شود. زیرا

حدود ۶۵ درصد بافت استخوان از هیدروکسی‌آپاتیت تشکیل شده است. هیدروکسی‌آپاتیت^۳ در اندازه نانو به دلیل نسبت سطح به حجم بالا خواص ویژه‌ای دارد. از جمله افزایش در میزان چسبندگی پروتئین‌ها و چسبندگی استئوبلاست‌ها روی ذرات سرامیکی با اندازه نانو که توسط و بستر و همکارانش گزارش شده است [۶].

تخریب پلی‌لاکتیک اسید در بدن باعث اسیدی شدن بافت اطراف و در نتیجه پاسخ‌های التهابی می‌شود. اضافه کردن هیدروکسی‌آپاتیت می‌تواند محصولات اسیدی را به بافر تبدیل کند [۶].

چندین سال است که نانوساختارهای اکسیدروی^۴ به علت قیمت پایین، دسترسی راحت، زیست‌سازگاری و راحتی اصلاح سطحشان به علت گروه‌های عاملی مختلف مورد توجه محققان قرار گرفته است. نانوساختارهای اکسیدروی خواص فیزیکی و شیمیایی ویژه‌ای مثل جذب ماوراءبنفش متمرکز و یا فعالیت ضد میکروبی در pH در محدوده ۷-۸ حتی در غیاب نور دارند [۷]. اکسیدروی فعالیت ضد میکروبی بالاتری روی پاتوژن استافیلوکوکوس اورئوس نسبت به بقیه اکسیدهای فلزی دارد. علاوه بر این، نانوساختارهای اکسیدروی غیرسمی هستند و طبق مطالعاتی که اخیراً انجام شده است این نانوساختارها باعث تخریب در دی ان ای (DNA) سلول‌های انسانی نمی‌شوند [۸].

استافیلوکوکوس اورئوس یکی از مهم‌ترین پاتوژن‌ها برای افراد است. این پاتوژن آغازگر بسیاری از بیماری‌ها برای افراد است که از عفونت ساده تا سطح متوسطی از عفونت را شامل می‌شود مانند بثورات پوستی، تاول، دمل، گل‌مژه، آبسه تا سطح تهدیدکننده مانند: ذات‌الریه، مننژیت، کورک استخوانی، اندوکاردیت و عفونت خون که هر ساله در تمام نقاط جهان افراد زیادی به علت مقاومت به آنتی‌بیوتیک جان خود را از دست می‌دهند. در بعضی مطالعات انجام شده محققان متوجه شدند که نانوذرات اکسیدروی، اثر مهارری روی بعضی باکتری‌های پاتوژنیک مثل استافیلوکوکوس اورئوس دارد [۹]. از

نانوذرات اکسید روی می‌توان برای بهبود خواص مکانیکی و ضد میکروبی پلیمرهایی از جمله پلی‌اتراکتون، پلی‌لاکتیک اسید و پلی‌کاپرولاکتون استفاده کرد [۱۰].

در مطالعه‌ای فعالیت ضد میکروبی نانوذرات اکسید روی در مقابل باکتری‌های گرم مثبت و گرم منفی بررسی شد. باکتری‌های مورد استفاده در این آزمایش اشرشیا کلسی و استافیلوکوکوس اورئوس بودند. تأثیر اندازه و غلظت روی خواص ضد میکروبی نانوذرات بررسی شد. مشخص شد که فعالیت ضد میکروبی نانوذرات اکسید روی با کاهش اندازه ذرات و افزایش غلظت پودر افزایش می‌یابد. همچنین مشخص شد که اکسید روی به صورت توده خاصیت ضد میکروبی چندانی ندارد [۱۱].

در مطالعه‌ای که توسط آیان و همکارانش انجام شده بود مشخص شد که نانوذرات اکسید روی توانایی تحریک سلول‌های اندوتلیال به رشد و مهاجرت را دارند. همچنین می‌توانند باعث هدایت آنها به سمت شکل‌گیری رگ‌های خونی جدید شوند. نانوذرات اکسید روی نیمه هادی هستند و دارای الکترون‌های آزاد مرتبط با جاهای خالی آنیونی در شبکه کریستالی هستند [۱۲]. گونه‌های اکسیژن واکنش‌پذیر ($^{\circ}\text{ROS}$) به‌ویژه پراکسید هیدروژن می‌تواند باعث تحریک رشد سلولی، بهبود زخم و فعالیت فاکتورهای رشد شود. گونه‌های اکسیژن واکنش‌پذیر در غلظت‌های کم می‌تواند باعث تحریک سلول‌های اندوتلیال به رشد و مهاجرت شوند [۱۳].

ذرات با اندازه کوچک‌تر (۱۲ نانومتر) در مقایسه با ذرات با بزرگ‌تر دارای خواص ضد میکروبی بیشتری هستند. این مسئله به رهایش گونه‌های اکسیژن واکنش‌پذیر بر روی سطح نانوذرات اکسید روی تحت نور مرئی و نور ماورای بنفش نسبت داده شده است و رهایش گونه‌های اکسیژن واکنش‌پذیر باعث ایجاد جراحات باکتریایی مرگبار می‌شود [۱۴]. یکی از مکانیزم‌های مهم در مورد خاصیت ضد باکتریایی نانوذرات اکسید روی رهایش یون‌های روی (Zn^{2+}) در محیط شامل باکتری و نانوذرات اکسید روی است. یون‌های روی رها شده

تأثیر بسیار مهمی در جلوگیری از انتقال فعال دارند [۱۳]. میرحسینی و همکاران در سال ۲۰۱۲ اثرات ضد باکتریایی اکسید روی را بر روی دو باکتری اشرشیا کلاسی و استافیلوکوکوس اورئوس بررسی کردند. نتایج نشان داد که باکتری استافیلوکوکوس اورئوس نسبت به اشرشیا کلاسی در مقابل اکسید روی مقاومت کمتری دارد [۱۴]. پس از کاشت داربست‌های استخوانی در بدن در بسیاری از مواقع سیستم ایمنی تحریک شده و عفونت در محل کاشت ایجاد می‌شود که باعث تورم و درد در ناحیه مورد نظر می‌شود که نیاز بیمار به مصرف طولانی مدت آنتی‌بیوتیک را در پی دارد. به دلیل خون‌رسانی ضعیف بافت استخوان نیاز به مصرف آنتی‌بیوتیک‌ها در دوزهای بالا و زمان‌های طولانی وجود دارد که می‌تواند باعث بیماری‌هایی برای کلیه و کبد شود. از این‌رو استفاده از نانوذراتی با خاصیت ضد باکتریایی که بتواند میزان عفونت در محل کاشت داربست را کاهش دهد بسیار مورد توجه است [۱۵ و ۱۶].

با توجه به این مطلب که آمار آسیب‌های استخوانی در اثر حوادث بالا است، بسیاری از بیماران برای تثبیت شکستگی نیاز به استفاده از اتصالات فلزی مانند انواع پین، پیچ و ... دارند. یکی از مشکلات استفاده از اتصالات دائمی نیاز به جراحی دوم جهت خروج این کاشتنی‌ها از بدن است که باعث تحمیل درد و هزینه اضافی به بیمار می‌شود. بنابراین استفاده از کاشتنی‌های زیست‌تخریب‌پذیر به دلیل تخریب کاشتنی متناسب با بازسازی بافت آسیب دیده باعث عدم نیاز بیمار به جراحی دوم می‌شود. استفاده از پلیمرهای زیست‌تخریب‌پذیر که بتواند خواص مکانیکی مناسب بافت سخت را تأمین کند و همچنین آنتی‌باکتریال نیز باشد از چالش‌های مهم این کار بود.

هدف پژوهش حاضر ساخت داربست‌های نانوکامپوزیتی پلیمر پلی‌لاکتیک اسید / پلی‌کاپرولاکتون اصلاح شده با نانوذرات هیدروکسی آپاتیت و اکسید روی و ارزیابی خواص ضد باکتریایی داربست‌های نانوکامپوزیتی در مقابل دو سویه باکتری اشرشیا کلاسی و استافیلوکوکوس اورئوس است.

۲- مواد و روش تحقیق

مدت ۴۸ ساعت زیر هود قرار گرفت.

۲-۱-۲- اصلاح داربست کامپوزیتی با نانوذرات اکسید روی

نانوکامپوزیت پلیمری با ۱/۵، ۱ و ۳ درصد وزنی نانوذرات اکسید روی تهیه شد. ابتدا پلی‌لاکتیک اسید/پلی‌کاپرولاکتون با نسبت ۱:۴ توسط ۱۰۰ میلی‌لیتر کلروفرم با قرار گرفتن روی همزن مغناطیسی در دمای ۶۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۵ ساعت کاملاً حل شد. در ادامه، جهت دستیابی به انحلال بهتر نمونه در دمای محیط به مدت ۳۰ دقیقه در حمام فراصوت تحت تابش امواج با فرکانس ۴۵ کیلوهرتز، قدرت ۶۰ وات قرار گرفت. میزان ۱ درصد وزنی نانوذرات هیدروکسی آپاتیت با ۱۰ میلی‌لیتر اسیداولئیک جهت پخش بهتر نانوذرات هیدروکسی آپاتیت روی همزن مغناطیسی به مدت ۱۵ دقیقه هم زده شد و سپس به مدت ۱۵ دقیقه در دمای محیط در حمام فراصوت با فرکانس ۴۵ کیلوهرتز و قدرت ۶۰ وات قرار گرفت. به‌طور همزمان میزان ۰/۱ درصد نانوذره اکسید روی در ۱۰ میلی‌لیتر کلروفرم ریخته شد و به مدت ۱۵ دقیقه تحت تابش امواج فراصوت تحت شرایط یکسان با نانوذرات هیدروکسی آپاتیت قرار گرفت. مخلوط نانوذرات هیدروکسی آپاتیت و اکسید روی به محلول پلیمر اضافه شد. در ادامه جهت اطمینان از پخش همگن نانوذرات هیدروکسی آپاتیت و نانوذرات اکسید روی در زمینه پلیمری مخلوط به مدت ۱۵ دقیقه در دمای محیط در حمام فراصوت با فرکانس ۴۵ کیلوهرتز و قدرت ۶۰ وات قرار گرفت و سپس نمونه به ظرف مورد نظر منتقل شد و جهت خروج کامل حلال برای ساخت سایر درصدهای وزنی همین مراحل انجام شد. ترکیب شیمیایی نمونه‌ها در جدول (۱) آورده شده است.

۲-۲- مشخصه‌یابی داربست‌ها

۲-۲-۱- بررسی مورفولوژی سطح نانوکامپوزیت‌ها

برای بررسی مورفولوژی سطح از میکروسکوپ الکترونی روبشی گسیل میدانی (FESEM) مدل (Tescan VEGA II Czech Republic)

پلیمر پلی‌لاکتیک اسید با وزن ملکولی ۱۸۲۰۰۰ گرم بر مول از سیگما آلدریج تهیه شد. پلیمر پلی‌کاپرولاکتون با وزن ملکولی ۸۰۰۰۰ گرم بر مول از شرکت سیگما آلدریج تهیه شد. نانوذرات هیدروکسی-آپاتیت با فرمول شیمیایی $Ca_{10}(PO_4)_6OH_2$ دارای نسبت مولی کلسیم به فسفات ۱/۶۷ از شرکت پردیس پژوهان فناوران یزد تهیه شد. کلروفرم از شرکت مرک تهیه شد. اسیداولئیک از شرکت مرک تهیه شد. نانوذرات اکسید روی با خلوص بیش از ۹۹ درصد و طول ۳۵-۴۵ نانومتر از شرکت Nanomaterials, INC تهیه شد.

۲-۱-۲- ساخت داربست‌های پلیمری به روش محلولی

در این مطالعه ابتدا پلی‌لاکتیک اسید و پلی‌کاپرولاکتون با نسبت ۱:۴ توسط ۱۰۰ میلی‌لیتر کلروفرم^۶ با قرار گرفتن روی همزن مغناطیسی در دمای ۶۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۵ ساعت کاملاً حل شد. در ادامه جهت دستیابی به انحلال بهتر نمونه در دمای محیط به مدت نیم ساعت در حمام فراصوت تحت تابش امواج با فرکانس ۴۵ کیلوهرتز، قدرت ۶۰ وات قرار گرفت. نمونه به ظرف مورد نظر منتقل شد و جهت خروج کامل حلال به مدت ۴۸ ساعت زیر هود قرار گرفت.

۲-۱-۱- اصلاح داربست‌های پلیمری با نانوذرات

هیدروکسی آپاتیت

پلیمر پلی‌لاکتیک اسید/پلی‌کاپرولاکتون با نسبت ۱:۴ مطابق روش ذکر شده برای نمونه ۱ تهیه شد. میزان ۱ درصد وزنی نانوذرات هیدروکسی آپاتیت با ۱۰ میلی‌لیتر اسیداولئیک^۷ جهت پخش بهتر نانوذرات هیدروکسی آپاتیت روی همزن مغناطیسی به مدت ۱۵ دقیقه هم زده شد و به مخلوط پلیمری اضافه شد. در ادامه جهت اطمینان از پخش همگن نانوذرات هیدروکسی آپاتیت در زمینه پلیمری مخلوط به مدت ۱۵ دقیقه در دمای محیط در حمام فراصوت با فرکانس ۴۵ کیلوهرتز و قدرت ۶۰ وات قرار گرفت. نمونه به ظرف مورد نظر منتقل شد و جهت خروج کامل حلال به

جدول ۱- ترکیب شیمیایی نمونه‌ها

نمونه	PLA/PCL	HA	ZnO
PLA-PCL	۵ گرم	-	-
PLA-PCL-HA	۵ گرم	۱ درصد وزنی	-
PLA-PCL-HA-0/1 % ZnO	۵ گرم	۱ درصد وزنی	۱/۰ درصد وزنی
PLA-PCL-HA-0/5% ZnO	۵ گرم	۱ درصد وزنی	۵/۰ درصد وزنی
PLA-PCL-HA-1%ZnO	۵ گرم	۱ درصد وزنی	۱ درصد وزنی

تیازول ۲ و ۵ دی‌فنیل تترازولیوم برمید) و یا دیگر نمک‌های تترازولیوم است. با اندازه‌گیری میزان جذب توسط اسپکتوفتومتر در طول موج‌های ۶۳۰-۵۴۰ نانومتر می‌توان درصد سلول‌های زنده مانده را مشخص کرد. این درصد از طریق رابطه (۱) محاسبه می‌شود:

$$(1) \quad \text{درصد زنده مانی} = \frac{OD_S}{OD_C}$$

در رابطه (۱) OD_S بیانگر چگالی نوری هر نمونه در زمان مورد نظر و OD_C بیانگر میانگین چگالی نوری گروه کنترل است. اساس این روش مبتنی بر شدت رنگ تولید شده در اثر فعالیت میتوکندری سلول‌ها است که در طول موج ۵۴۰ تا ۶۳۰ نانومتر اندازه‌گیری می‌شود و به‌طور مستقیم با تعداد سلول‌های زنده متناسب است. برای این منظور یک فلاسک L929 را زیر هود برده و در شرایط کاملاً استریل محیط رویی سلول خالی شد. سپس سطح سلول‌ها با بافر فسفات سالیین (^{11}PBS) شستشو داده و سپس به آن تریپسین افزوده شد تا سلول‌ها از حالت کشیده و فیروبلاستیک خارج شده و به شکل کروی درآیند. سپس محیط حاوی ۱۰ درصد حجمی سرم جنین گاوی (^{12}SBF) روی آنها ریخته شد تا تریپسین خنثی شود. پس از آن سلول‌ها درون لوله فالكون ریخته شد و با دور ۱۲۰۰ دور بر دقیقه به مدت ۵ دقیقه سانتریفیوژ شد. سلول‌ها از محیط جدا شد و در کف فالكون قرار گرفت. سپس لوله فالكون را از سانتریفیوژ خارج کرده و محیط رویی آن دور ریخته می‌شود و روی آن محیط حاوی ۱۰ درصد حجمی سرم جنین گاوی ریخته و توسط لام نئوبار شمارش سلولی انجام می‌شود. به ازای

استفاده شد. برای این منظور ابتدا نمونه‌ها به قطعات کوچک بریده شدند و سپس با طلا پوشش‌دهی شدند. جهت بررسی چگونگی پراکنش نانوذرات در زمینه پلیمری تصاویر نقشه عنصری از نانوکامپوزیت بهینه تهیه شد. در راستای تأیید حضور نانوذرات پراش پرتو اشعه ایکس^۹ از نانو ساختار بهینه تهیه شد.

۲-۲-۲- آماده‌سازی محیط کشت باکتری‌ها

از باکتری‌های اشریشیاکلائی (ای‌کلائی) و استافیلوکوکوس اورئوس (اس‌آرئوس) برای بررسی میزان هاله عدم رشد نمونه‌ها استفاده شد. این باکتری‌ها قبل از استفاده در شرایط هوازی و در محیط مولر هیتتون برات به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد درون انکوباتور قرار گرفتند. پس از گذشت ۲۴ ساعت غلظتی معادل نیم مک فارلند تهیه شد و توسط سوپ استریل روی پلیت حاوی محیط کشت مولر هیتتون آگار کشت خطی و یکنواخت داده شد. نمونه‌ها توسط تابش نور ماورای بنفش سترون شد. سپس نمونه‌ها به درون پلیت-های حاوی محیط کشت قرار داده شد. نمونه‌ها به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد در انکوباتور نگهداری شد.

۲-۲-۳- بررسی زیست‌سازگاری و میزان بقاء سلول‌ها (کشت سلول)

یکی از روش‌های مرسوم و سریع برای سنجش سمیت سامانه-های پلیمری/ دارویی، روش ^{10}MTT است که اساس آن تشکیل رنگ فورمازان به دلیل احیای ترکیب MTT (دی‌متیل

پلیمر غیرقابل امتزاج هستند و این عدم امتزاج خودش را به صورت وجود حفره در سطح نشان می‌دهد. اندازه تخلخل‌ها در محدوده ۱/۵۸ تا ۱/۹۱ میکرومتر است. سطح نمونه‌ها کاملاً صاف است و هیچ‌گونه ترکی روی سطح مشاهده نمی‌شود. همچنین در شکل (۱-ج، د، ه، و)، برش عرضی نانو ساختارهای کامپوزیتی مشاهده می‌شود. همان‌طور که در تصاویر مشاهده می‌شود نانوذرات هیدروکسی آپاتیت و اکسید روی با پیکان زرد در تصویر مشخص شده‌اند. نانوذرات اکسید روی به صورت سوزنی شکل و نانوذرات هیدروکسی آپاتیت به صورت استوانه‌های کوچک در زمینه پلیمری پخش شده‌اند. این نتایج با نتایج تحقیقاتی که توسط وانگ و همکاران، اکاموتو و همکاران همچنین لبنز و همکاران انجام شده بود در تطابق است [۱۷، ۱۸ و ۱۹]. این مورفولوژی اصطلاحاً به جزیره - دریا معروف است. به این صورت که حوزہ‌های کروی پلی‌کاپرولاکتون در زمینه پلی‌لاکتیک اسید پراکنده می‌شود [۱۹]. در سال‌های اخیر از پلی‌لاکتیک اسید و پلیمرهای زیست تخریب‌پذیر دیگر در بازسازی بافت نرم زانو و شانه استفاده شده است که نتایج موفقیت آمیزی داشته است. اگرچه پلی‌لاکتیک اسید نتایج امیدوارکننده‌ای در بحث ثابت‌کننده‌های استخوانی از خود نشان داد ولی این دو نقص مهم را نیز از خود نشان داده است: ۱- پلی‌لاکتیک اسید مقاومت مکانیکی پایینی دارد و در جاهایی که تحت بارگذاری هستند به تنهایی نمی‌تواند مورد استفاده قرار بگیرد. ۲- پلی‌لاکتیک اسید وقتی به‌طور خالص استفاده شود در کاربردهای کلینیکی پاسخ‌های بیولوژیکی ضعیفی از خود نشان می‌دهد [۲۰]. به عبارت دیگر تجهیزات ارتوپدی باید ترکیبی از پلیمر و تقویت‌کننده‌های غیرآلی مانند بتا تری‌کلسیم فسفات و یا هیدروکسی آپاتیت باشند تا بتوانند خواص مناسب مکانیکی و بیولوژیکی داشته باشند. بسیاری از محققان علاقه‌مند به استفاده از هیدروکسی آپاتیت هستند. به این خاطر که ساختار هیدروکسی آپاتیت شباهت زیادی به ساختار طبیعی استخوان دارد و استفاده از هیدروکسی آپاتیت در زمینه پلیمری علاوه بر بهبود خواص مکانیکی باعث افزایش زیست‌فعالی، زیست

هر خانه از یک پلیت ۲۴ خانه‌ای تعداد 5×10^4 سلول در نظر گرفته شد. نمونه‌های استریل شده توسط تابش اشعه UV در مرکز هر خانه از پلیت قرار گرفت و سوسپانسیون سلولی به آن اضافه شد. نمونه‌ها به مدت ۲۴ ساعت در انکوباتور در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد تحت ۵ درصد گاز دی‌اکسید کربن قرار داده شد. طبق استاندارد بعد از ۲۴ ساعت محیط رویی سلول برداشته شد و با بافر فسفات سالین لایه رویی سلول شستشو داده شد و سپس محلول MTT به میزان ۱ میلی‌گرم/میلی‌لیتر روی لایه سلولی ریخته شد. پلیت کشت به مدت ۳-۵ ساعت درون انکوباتور در تاریکی قرار گرفت. پس از مدت زمان گفته شده سلول‌ها با بافر فسفات سالین شستشو داده شد تا MTT واکنش نکرده خارج شود. محصول فورمازان ایجاد شده توسط اضافه کردن دی‌متیل‌سولفوکسید^{۳۳} (D2650, Sigma, Saint Louis, USA) حل شد و جذب هر خانه در ۵۹۰ نانومتر توسط دستگاه الیزا ریدر (Stat Fax-2100; GMI, Inc., Miami, FL, USA) خوانده شد.

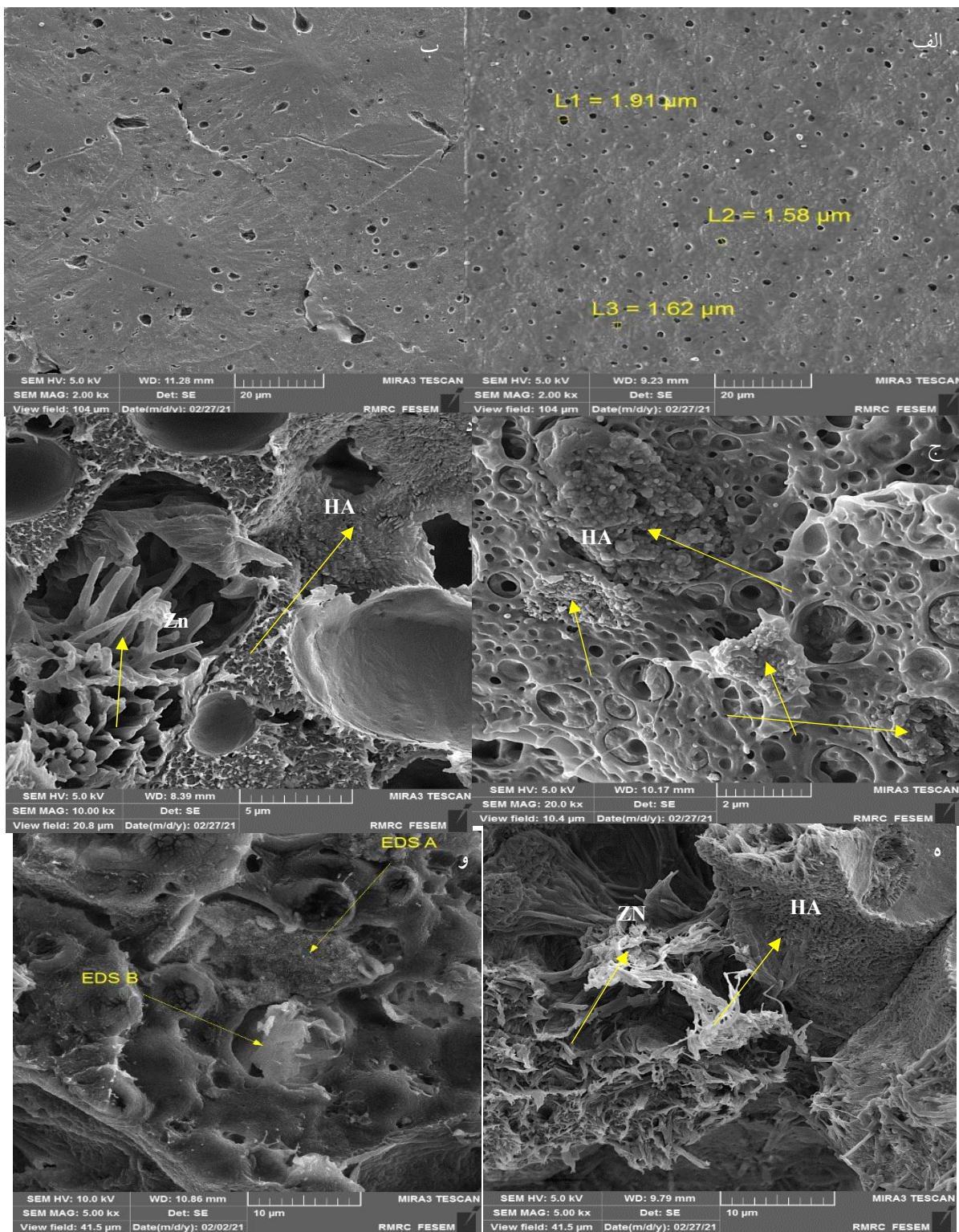
۳-۲- تحلیل آماری

تمام داده‌های تجربی گزارش شده بر اساس میانگین و انحراف معیار (\pm انحراف معیار) مرتب شدند. برای این منظور، از نرم افزار SPSS (ویرایش ۱۶) و آزمون ANOVA یک طرفه برای ارزیابی داده‌های سلولی استفاده شد. لازم به ذکر است که $p \leq 0.05$ از نظر آماری قابل توجه تشخیص داده شد.

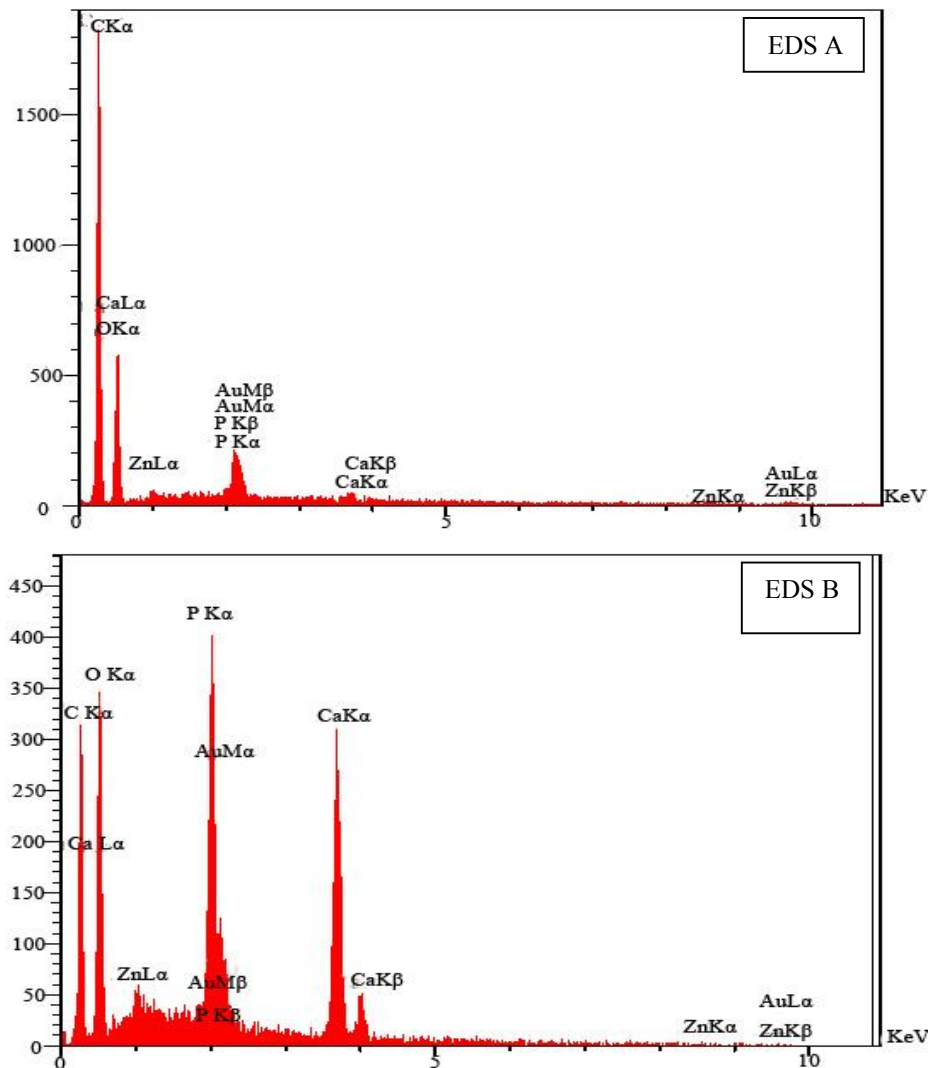
۳- نتایج و بحث

۳-۱- بررسی مورفولوژی سطح نانوکامپوزیت‌ها

برای بررسی مورفولوژی سطح نانوکامپوزیت‌ها از میکروسکوپ الکترونی روبشی گسیل میدانی استفاده شد. همان‌طور که در شکل (۱-الف و ب) مشاهده می‌شود سطح زمینه پلیمری PLA-PCL و PLA-PCL-1%ZnO متخلخل است. علت ایجاد تخلخل به تفاوت در پارامترهای انحلال پلیمرهای پلی‌لاکتیک اسید و پلی‌کاپرولاکتون مربوط است. اصولاً این دو



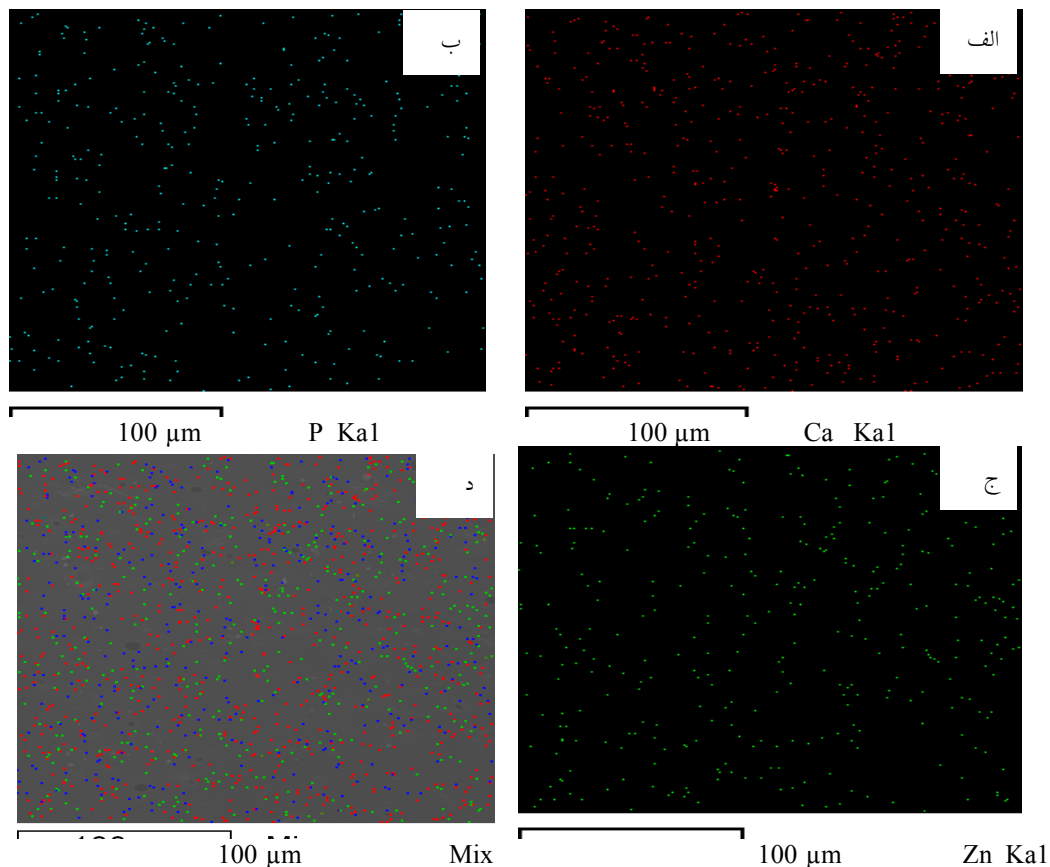
شکل ۱- تصاویر میکروسکوپی الکترونی روبشی گسیل میدانی از: الف) سطح زمینه پلیمری PLA-PCL، ب) سطح نانوکامپوزیت PLA-PCL-HA-1% ZnO، برش عرضی از نانوکامپوزیت، ج) PLA-PCL-HA، د) PLA-PCL-HA-0.1%ZnO، ه) PLA-PCL-HA-0.5%ZnO، و) PLA-PCL-HA-1%ZnO



شکل ۲- طیف پراش انرژی پرتو ایکس از نانوساختار کامپوزیتی: EDS A، PLA-PCL-HA-1% ZnO: نانوذرات هیدروکسی آپاتیت شامل کلسیم و فسفر، EDS B: نانوذرات اکسید روی

در شکل بیان‌کننده نوع نانوذره به کار رفته در زمینه پلیمری است. همان‌طور که در شکل (۲) مشاهده می‌شود قله‌های مربوط به روی (Zn)، کلسیم (Ca) و فسفر (P) در طیف پراش انرژی پرتو ایکس مشخص است که با نتیجه تحقیق واسیل و همکاران در تطابق است [۲۳]. همچنین نحوه پراکنش نانوذرات در سطح نانوساختارهای کامپوزیتی توسط نقشه عنصری گزارش شد. همان‌طور که در شکل (۳) مشخص است پخش همگن و یکنواخت نانوذرات کلسیم، فسفر و روی در سطح نانوکامپوزیت PLA-PCL-HA-1% ZnO به‌عنوان نانوکامپوزیت بهینه مشاهده

سازگاری و هدایت استخوانی می‌شود [۲۱]. در مطالعات درون تنی روی گوسفند اثر استفاده از هیدروکسی آپاتیت در زمینه پلیمری پلی‌لاکتیک اسید در پیچ‌های قابل جذب بررسی شد. نتایج نشان داد که نمونه کامپوزیتی در مقایسه با نمونه استاندارد پلیمر پلی‌لاکتیک اسید در میزان شکل‌گیری استخوان و کاهش التهاب بهتر بوده است [۲۲]. جهت بررسی نانوذرات در تصاویر میکروسکوپی الکترونی روبشی گسیل میدانی و مشخص کردن نوع نانوذره طیف‌سنجی پراش انرژی پرتو ایکس از نانوکامپوزیت PLA-PCL-HA-1% ZnO انجام گرفت. قله‌های مشخص شده



شکل ۳- تصاویر نقشه عنصری از سطح نانوکامپوزیت PLA-PCL-HA-1%ZnO و نحوه پراکنش نانوذرات: الف) کلسیم، ب) فسفر، ج) روی و د) مخلوط نانوذرات

رنگدانه کاروتنوئیدی است که استافیلوزانتین نام دارد. این رنگدانه در نقش یک آنتی‌اکسیدان مانع از تخریب باکتری در مقابل رادیکال‌های آزاد اکسیژن می‌شود. این رادیکال‌های آزاد اکسیژن توسط گلبول‌های سفید میزبان برای از بین بردن باکتری ایجاد می‌شود. باکتری گرم مثبت *اس آرئوس* یکی از باکتری‌های شایع جهت ایجاد عفونت‌های پس از زخم در بیمارستان‌ها است. باکتری *اشرشیا کلای* که به ای کلای معروف است به‌عنوان باکتری گرم منفی در این تحقیق مورد استفاده قرار گرفت. به *اشرشیا کلای* باسیل هم گفته می‌شود. یک باکتری گرم منفی، هوازی، بی‌هوازی و متحرک است. در واقع قابلیت رشد در محیط‌های هوازی و بی‌هوازی را دارا است. این باکتری در حالت عادی بیماری‌زا نیست و در دستگاه گوارش انسان موجود است. در شرایط خاص گونه‌های خاص از این باکتری

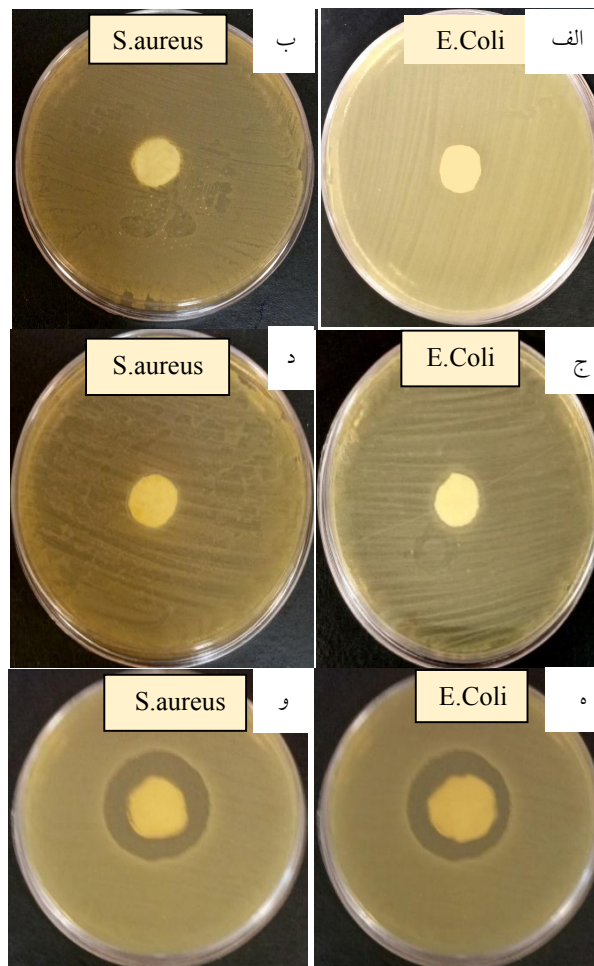
می‌شود که نشان می‌دهد فرایند ساخت و اختلاط نانوذرات در زمینه پلیمری به‌خوبی صورت گرفته است.

۲-۳- آماده‌سازی محیط کشت باکتری‌ها و آزمون اندازه‌گیری قطر هاله عدم رشد

از سویه‌های باکتری‌های گرم مثبت *استافیلوکوکوس اورئوس* (ATTC 25922) و گرم منفی *اشریشیا کلای* (ATTC 25923) برای بررسی رفتار آنتی‌باکتریال نمونه‌ها استفاده شد. پس از انجام کشت نمونه‌ها زیر نور قرار گرفتند و اندازه‌گیری قطر هاله عدم رشد آنها انجام شد. *استافیلوکوکوس آرئوس* که به اختصار *اس آرئوس* نامیده می‌شود یک باکتری بی‌هوازی است. این باکتری یکی از شایع‌ترین باکتری‌های بیماری‌زا است. این باکتری کلنی‌های زرد رنگی ایجاد می‌کند که ناشی از تولید

جدول ۲- قطر هاله عدم رشد نانوساختارهای کامپوزیتی در مقابل باکتری ای کلای و اس آرئوس

S. aureus (mm)	E. coli (mm)	نمونه
$17/42 \pm 0/320$	$14/79 \pm 0/219$	PLA-PCL
$19/35 \pm 0/218$	$20/82 \pm 0/209$	PLA-PCL-HA
$39/97 \pm 0/318$	$38/72 \pm 0/341$	PLA-PCL-HA-1%ZnO



شکل ۴- تصاویر هاله عدم رشد: الف، ب) PLA-PCL، ج، د) PLA-PCL-HA، ه، و) PLA-PCL-HA-1% ZnO

در مقابل باکتری ای کلای و اس آرئوس

نانوذرات اکسیدروی نسبت به طیف گسترده‌ای از باکتری‌ها رفتار آنتی‌باکتریال از خود نشان می‌دهند. اندازه ناحیه ممانعت‌کننده از رشد باکتری‌ها در جدول (۲) آورده شده است. تصاویر مربوطه در شکل (۴- الف، و) آورده شده است. همان‌طور که در تصاویر مشاهده می‌شود برای ماتریس پلیمری (شکل ۴- الف، ب) هاله عدم رشدی دیده نمی‌شود.

می‌تواند بیماری‌زا باشد. اکسید روی یکی از ترکیبات روی است که مورد تأیید سازمان غذا و داروی آمریکا است [۲۴]. فعالیت ضدباکتریایی نانوذرات اکسید روی با استفاده از روش آگار دیسک یا اندازه‌گیری هاله عدم رشد بررسی شد. برای این منظور قطعه دایره‌ای شکل از ماتریس پلیمری و نانوساختارهای کامپوزیتی بریده شد و در محیط کشت باکتری قرار گرفت.

جدول ۳- میزان زنده مانی سلول‌های L929 در تماس با نانوساختارهای کامپوزیتی

نمونه	درصد زنده‌مانی بعد از ۲۴ ساعت	درصد زنده‌مانی بعد از ۷۲ ساعت
PLA-PCL	۲۸/۵۲±۰/۷۸۲	۲۲/۱۸±۰/۶۲۳
PLA-PCL-HA	۶۳/۳۵±۰/۰۳۲	۵۷/۸۲±۰/۲۵۱
PLA-PCL-HA-0.5%ZnO	۷۱/۸۹±۰/۲۱۸	۶۷/۹۳±۰/۲۰۹
PLA-PCL-HA-1%ZnO	۷۳/۲۸±۰/۳۲۰	۷۰/۰۳±۰/۲۴۹

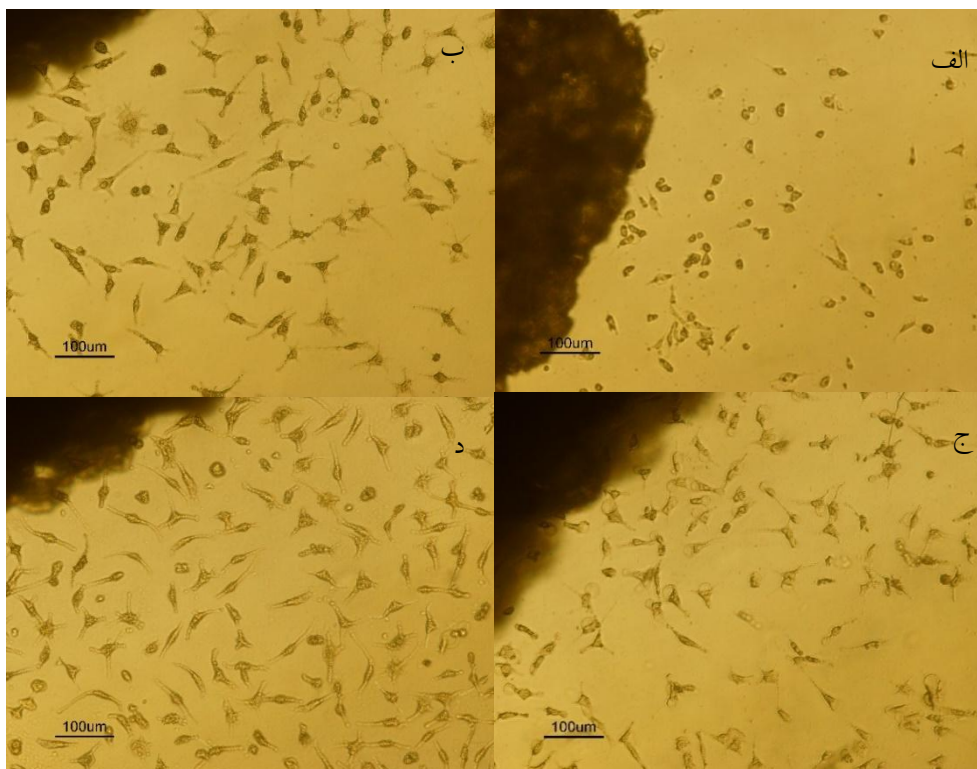
تطابق است [۲۶ و ۲۷]. همچنین، فعالیت‌های ضدباکتریایی نانوکامپوزیت حاوی نانوذرات اکسید روی نه تنها شامل تأثیر مستقیم نانوذرات اکسید روی است، بلکه با مکانیسم آزادسازی یون‌های روی و همچنین تولید گونه‌های اکسیژن فعال بهبود یافته است [۲۷ و ۲۸]. میزان هاله عدم رشد ماتریس پلیمری در مقابل باتری ای کلای ۰/۲۱۹ ± ۱۴/۷۹ میلی‌متر است که در ماتریس بهینه به ۰/۳۴۱ ± ۳۸/۷۲ میلی‌متر رسیده است. همین‌طور در مقابل باکتری اس آرئوس از ۰/۳۲ ± ۱۷/۴۲ در ماتریس پلیمری به عدد ۰/۳۱۸ ± ۳۹/۹۷ میلی‌متر رسید که نشان از فعالیت ضدباکتریایی بهبود یافته ماتریس بهینه نسبت به ماتریس پلیمری به‌عنوان نمونه کنترل دارد.

۳-۳- بررسی زیست‌سازگاری و میزان بقاء سلول‌ها

برای بررسی زیست‌سازگاری و میزان بقاء سلول‌ها از آزمون MTT طبق استاندارد ISO ۱۰۹۹۳-۵ در بازه‌های زمانی یک و سه روز انجام شد. هر آزمایش سه بار تکرار شد و میانگین داده‌ها گزارش شد. نتایج به‌صورت درصد زنده مانی سلول‌های فیروبلاست L929 در جدول (۳) و شکل (۵) بعد از گذشت ۱ روز و ۳ روز مشاهده می‌شود.

پلی‌لاکتیک اسید خالص و پلی‌کاپرولاکتون به‌عنوان مواد زیست‌سازگار شناخته می‌شوند و بدیهی است که پلی-کاپرولاکتون یا پلی‌لاکتیک اسید می‌توانند با سلول‌ها تعامل داشته باشند. با این حال، هیدروکسی‌آپاتیت گنجانیده شده تأثیر مثبتی بر تعامل سلول / داربست دارد. علاوه بر این، اضافه کردن نانوذرات اکسید روی باعث القای زنده ماندن سلولی می‌شود، که ممکن است به دلیل آب‌دوستی بهتر و همچنین عامل

البته لازم به ذکر است که هیچ کلونی باکتری روی سطح ماتریس پلیمری رشد نکرده است. هنگامی که به ماتریس پلیمری نانوذرات هیدروکسی‌آپاتیت اضافه شده است (شکل ۴-ج، د) هاله کم رنگی اطراف نانوکامپوزیت مشاهده می‌شود. البته قادر به از بین بردن باکتری‌های گرم منفی و گرم مثبت نبوده است ولی فعالیت آنتی‌باکتریال ضعیفی در تصویر دیده می‌شود. در مطالعه‌ای که توسط ماریوز و همکارانش انجام گرفت مشاهده شد که با اضافه شدن درصد نانوذرات اکسید روی قطر هاله عدم رشد افزایش یافت [۲۵]. در این مطالعه نیز با اضافه شدن نانوذرات اکسید روی در نانوساختارهای کامپوزیتی رفتار آنتی‌باکتریال نانوکامپوزیت‌ها بهبود یافت. در نانوکامپوزیت حاوی ۱ درصد وزنی نانوذرات اکسید روی (شکل ۴-ه، و) وجود یک منطقه مهارکننده به وضوح اثر ضد باکتریایی نانوذرات اکسیدروی را نشان می‌دهد. رفتار آنتی‌باکتریال نانوذرات اکسید روی در مقابل باکتری‌های گرم مثبت در مقایسه با باکتری‌های گرم منفی بهتر است. این مسئله به دلیل غشای دولایه باکتری‌های گرم منفی در مقابل غشای تک لایه باکتری گرم مثبت است که نفوذ نانوذرات به درون غشا را راحت‌تر کرده است. در مطالعه‌ای که توسط ردی و همکارانش انجام شد خاصیت آنتی‌باکتریال نانوذرات اکسید روی در مقابل باکتری‌های اس آرئوس و ای کلای بررسی شد. نتایج نشان داد که هاله عدم رشد نانوذرات اکسید روی در مقابل باکتری‌های گرم مثبت بیش از باکتری‌های گرم منفی بود. از این‌رو اندازه ناحیه مهارکنندگی با توجه به نوع باکتری، اندازه و غلظت نانو ذرات اکسید روی متفاوت است. این نتایج با نتایج تحقیقاتی که توسط محققان مختلف انجام شده است در



شکل ۵- تصاویر میکروسکوپی نوری معکوس:

الف) PLA-PCL، ب) PLA-PCL-HA، ج) PLA-PCL-HA-0.5% ZnO، د) PLA-PCL-HA-1% ZnO

نانوذره درصد زنده مانی افزایش یافته است. میزان زنده مانی به 0.249 ± 0.070 بعد از گذشت ۷۲ ساعت رسیده است. تصاویر میکروسکوپی نوری معکوس در شکل (۵) آورده شده است. این نتایج با نتایج تحقیقی که توسط داوودی و همکاران انجام شد در تطابق است [۳۲]. میزان زنده مانی سلول‌ها در مجاورت ماتریس پلیمری بعد از ۲۴ و ۷۲ ساعت نسبت به نمونه بهینه در سطح معنی داری $P < 0.005$ دارای تفاوت معنی دار است.

۴- نتیجه‌گیری

با بررسی مورفولوژی نانوساختارها و همچنین بررسی خواص آنتی‌باکتریال، نمونه بهینه مشخص شد. نانوساختار بهینه شامل ۱ درصد وزنی نانوذرات هیدروکسی آپاتیت و ۱٪ وزنی نانوذرات اکسید روی بود. نتایج نشان داد که اضافه کردن نانوذرات به زمینه پلیمری خواص مکانیکی و زیستی را بهبود

کوفاکتور عملکردی برای برخی آنزیم‌ها باشد که با فعال کردن بازسازی استخوان بر بیومارکرهای استخوانی تأثیر می‌گذارد [۲۹]. علاوه بر این، یون‌های روی به‌عنوان یک عامل مهم برای تقویت بازسازی استخوان سالم شناخته شده است [۳۰]. بنابراین، می‌توان ثابت کرد که سلول‌ها با دریافت این یون‌ها از نانوکامپوزیت تحت تأثیر مثبت قرار داده می‌شوند [۳۱]. بررسی نتایج زنده مانی سلول‌ها نشان می‌دهد که میزان زنده مانی سلول‌ها در مجاورت زمینه کامپوزیتی اصلاح نشده پایین‌ترین میزان بوده است. با اضافه کردن نانوذرات هیدروکسی آپاتیت به ماتریس پلیمری میزان زنده مانی سلول‌ها از مقدار 0.623 ± 0.2218 به 0.251 ± 0.5782 بعد از گذشت ۷۲ ساعت افزایش یافته است. با اضافه کردن نانوذرات اکسید روی رفتار سلولی کمی بهبود یافته است که می‌تواند ناشی از افزایش میزان آبدوستی نانوساختار کامپوزیتی و هم به دلیل رهایش یون‌های روی و کلسیم در محیط حاوی سلول باشد. با افزایش میزان

خاصیت آنتی‌باکتریایی خود نیاز بیمار به مصرف آنتی‌بیوتیک را کاهش می‌دهد.

تشکر و سپاسگزاری

از کلیه عزیزانی که ما را در انجام این تحقیق یاری کردند سپاسگزاریم.

بخشیده است. با بررسی زمینه پلیمری و نانوساختارهای کامپوزیتی مشخص شد که اضافه کردن نانوذرات به ماتریس پلیمری خواص مکانیکی و زیستی را بهبود بخشیده است. بهترین نتیجه در اضافه کردن ۱٪ نانوذرات اکسید روی بوده است که خواص مکانیکی و زیستی بهتری داشته است. با توجه به مدول یانگ نمونه بهینه این نانوساختار کامپوزیتی قابلیت استفاده در بافت استخوان اسفنجی را دارا است و با توجه به

واژه‌نامه

1. Poly(caprolactone)
2. Poly(lactic acid)
3. hydroxyapatite
4. Zinc oxide
5. reactive oxygen species
6. Chloroform
7. Oleic acid
8. Field Emission Scanning Electron Microscope
9. energy dispersive X ray spectroscopy
10. 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide
11. phosphate buffered saline
12. simulated body fluid
13. Dimethyl Sulfoxide (DMSO)

مراجع

1. Ramakrishna, S., "Biomedical Applications of Polymer-Composite Materials: A Review", *Composites science and technology*. Vol. 61, No. 9, pp. 1189-1224, 2001.
2. Wallace, S., "Short-Term and Long-Term Effects of Orthopedic Biodegradable Implants", *Department of Orthopedic Surgery*. Vol. 21, No. 2, pp. 93-122, 2011.
3. Abedalwafa, M., Wang, F., "Biodegradable Poly-Epsilon-Caprolactone (PCL) for Tissue Engineering Applications: A review". *Rev. Adv. Mater. Sci.* Vol. 34, pp. 123-140, 2013.
4. Chen, J.P., Chang, Y. S., "Preparation and Characterization of Composite Nanofibers of Polycaprolactone and Nanohydroxyapatite for Osteogenic Differentiation of Mesenchymal Stem Cells", *Colloids Surf. B: Bio interfaces*. Vol. 86, pp.169-175, 2011.
5. Baykan E., Koc, A., "Evaluation of a Biomimetic Poly (ϵ -Caprolactone)/ β -Tricalcium Phosphate Multispiral Scaffold for Bone Tissue Engineering: in vitro and in vivo studies", *Biointerphases*. Vol. 9, pp. 11-29, 2014.
6. Russias J., Saiz E., "Fabrication and Mechanical Properties of PLA/HA Composites: A Study of In Vitro Degradation", *Mater Sci Eng C Biomim Supramol Syst*. Vol. 26, No. 8, pp. 1289-1295, 2006.
7. Therias, S., Larche, J., "Photochemical Behavior of Polylactide/ZnO Nanocomposite Films", *Biomacromolecules*. Vol.13, pp. 3283-3291, 2012.
8. Sawai, J., "Quantitative Evaluation of Antibacterial Activities of Metallic Oxide Powders (ZnO, MgO and CaO) by Conductimetric Assay", *Microbiol Methods*. Vol. 54, pp. 177-182, 2003.
9. Aleaghill S., Fattahy, E., "Antibacterial Activity of Zinc Oxide Nanoparticles on Staphylococcus Aureus", *International Journal of Advanced Biotechnology and Research*. pp.1569-1575, 2016.
10. Pascual, Diez., "Development and Characterization of Novel Poly (Etherether___Ketone)/ZnO Bionanocomposites", *J. Mater. Chem. B*. Vol. 2, pp. 3065-3078, 2014.
11. Karvani, Z., Chehrazi, P., "Antibacterial Activity of ZnO Nanoparticle on Grampositive and Gram-negative Bacteria", *African Journal of Microbiology Research*. Vol. 5, No. 12, pp. 1368-1373, 2011.
12. Res, M., "In Vivo Evaluation of Electrospun Polycaprolactone Membranes Incorporated with ZnO Nanoparticles as Skin Substitutes", *RSC Adv*. Vol. 4, No. 93, pp. 51528 -51536, 2014.
13. Roy, S., Khanna, S., "Dermal Wound Healing is Subject to Redox Control", *Molecular Therapy*. Vol. 13, No. 1, pp. 211-220, 2006.
14. Sirelkhatim, A., Mahmud, S., "Review on Zinc Oxide Nanoparticles: Antibacterial Activity and Toxicity Mechanism", *Nano-Micro Lett*. Vol. 7, No. 3, pp. 219-242, 2015.
15. Mirhosseini, M., Firouzabadi FB., "Antibacterial Activity of Zinc Oxide Nanoparticle Suspensions on Food-Borne Pathogens", *International Journal of*

- Dairy Technology*. Vol. 65, pp. 1-5, 2012.
16. Arcos D., "Vallet-RegíM. Bioceramics for drug delivery", *Acta Materialia*. Vol. 61, No. 3, pp. 890-911, 2013.
 17. Okamoto, M., John, B., "Synthetic Biopolymer Nanocomposites for Tissue Engineering Scaffolds", *Advanced Polymeric Nanostructured Materials Engineering*. pp. 468-8511, 2013.
 18. Mariusz, C., Jacek, W., "Zink Oxid Nano Particles Cytotoxicity and Newly Formed PMMA-ZnO Nanocomposites Designed for Denture Bases", *Nanomaterials*. Vol. 9, pp.13-18, 2019.
 19. lebenz, R., "The Study of Hydroxyapatite Reinforced Poly(lactic Acid Composites for Orthopedic Applications". *Nanomaterials*. Vol. 4, pp. 23-29, 2014.
 20. Konan, S., Haddad F."A clinical review of bioabsorbable interference screws and their adverse effects in anterior cruciate ligament reconstruction surgery". *The Knee*.16 (1): pp. 6-13, 2009.
 21. Furukawa, T. "Biodegradation behavior of ultra-high-strength hydroxyapatite/poly (l-lactide) composite rods for internal fixation of bone fractures". *Biomaterials*. 21(9): pp. 889-898, 2000.
 22. Sirelkhatim, A., Mahmud, S., "Review on Zinc Oxide Nanoparticles: Antibacterial Activity and Toxicity Mechanism", *Nano-Micro Lett*. Vol.7, pp. 219–242, 2015.
 23. Zhang, C., "Nano-hydroxyapatite/poly (L-lactic acid) composite synthesized by a modified in situ precipitation: preparation and properties". *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*.21 (12): pp. 3077-3083, 2010.
 24. Hunt, J., "Polymer-hydroxyapatite composite versus polymer interference screws in anterior cruciate ligament reconstruction in a large animal model", *Knee Surgery. Sports Traumatology Arthroscopy*. Vol. 7, pp. 655-660, 2008.
 25. Vasile., Râpă., "New PLA/ZnO :Cu/Ag bio nanocomposites for food packaging" , *eXPRESS Polymer Letters* , Vol.11, pp. 531–544, 2017.
 26. Brown, A., "Porous magnesium/PLGA composite scaffolds for enhanced bone regeneration following tooth extraction", *Acta biomaterialia*. Vol.11pp.543-553, 2014.
 27. Kim, K.-J., "Magnesium ions enhance infiltration of osteoblasts in scaffolds via increasing cell motility", *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*. Vol. 28 pp. 96, 2017.
 28. Bigham, A., "Multifunctional nanoporous magnetic zinc silicate-ZnFe₂O₄ core-shell composite for bone tissue engineering applications", *Ceramics International*. Vol.10, pp. 11798-11806, 2018.
 29. Wang, Y.-W., "Superior antibacterial activity of zinc oxide/graphene oxide composites originating from high zinc concentration localized around bacteria", *ACS applied materials & interfaces*. Vol.6, pp. 2791-2798, 2014.
 30. O'Connor, J.P., "Zinc as a therapeutic agent in bone regeneration", *Materials*, Vol.10, pp. 2211, 2020.
 31. Castro-Mayorga, J.L., "The impact of zinc oxide particle morphology as an antimicrobial and when incorporated in poly (3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) films for food packaging and food contact surfaces applications", *Food and Bioprocess Processing*. Vol.101, pp. 32-44, 2017.
 32. Mao, D., Li, Q., "Porous Stable Poly (Lactic Acid)/Ethyl Cellulose/Hydroxyapatite Composite Scaffolds Prepared by a Combined Method for Bone Regeneration", *Carbohydr. Polym*. Vol. 180, pp. 104–111, 2018.
 33. Davoudi's., Oliaei, N., Davachi, S., "Preparation and Characterization of Interface-Modified PLA/Starch/PCL Ternary Blends Using PLLA/Triclosan Antibacterial Nanoparticles for Medical Applications", *RSC Advances*. Vol.6, pp. 39870-39882, 2016.

EVALUATION OF ANTIBACTERIAL PROPERTIES OF POLYLACTIC ACID-POLYCAPROLACTONE-CONTAINING HYDROXYAPATITE AND ZINC OXIDE NANOPARTICLES IN HARD TISSUE ABSORBABLE SCAFFOLDS

F. Deghani Firoozabadi¹, A. Ramazani Saadatabadi^{2*} and A. Asefnejad¹

¹ Department of Biomedical Engineering, Science and Research Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran

² Department of Chemical and Petroleum Engineering, Sharif University of Technology, Tehran, Iran

(Received: 1 November 2021; Accepted: 9 March 2022)

ABSTRACT

Today, many people need to use bone grafts and implants because of damage to bone tissue. Due to the stimulation of the immune system after implantation, infection at the operation site is very common, which causes swelling and pain in the operation area. The use of zinc oxide nanoparticles reduces infection at the operation site and reduces the patient's need for antibiotics. In the present study, the morphology of the scaffolds was investigated by field emission scanning electron microscope (FE-SEM). The toxicity of the samples was evaluated using MTT assay. The behavior of nanocomposites against *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus* was investigated by measuring the diameter of the growth inhibition zone. It was found that modification of scaffolds with nanoparticles caused a growth inhibition in bacterial culture medium. It was also observed that fibroblast cells on the surface of the modified scaffolds had longer survival than polymer scaffolds. This study showed that the addition of oxidizing nanoparticles improves the antibacterial properties of scaffolds and cell viability and reduces scaffold toxicity.

Keywords: Hydroxyapatite, Zinc oxide, Antibacterial, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*.

1. INTRODUCTION

Polymers have been used successfully in various medical fields such as pacemakers, heart valves, and contact lenses. Polymers do not present good properties and ceramics are brittle. The combination of these two biomaterials as a new choice offers advantages such as no stress shielding and ion release from metal implants [1]. Polylactic acid polymer has poor mechanical properties. Hydroxyapatite improves the mechanical properties of the polymer [2]. Increases in protein adhesion and osteoblast adhesion to nano-sized ceramic particles reported by Webster et al [3]. Zinc oxide nanostructures have been considered by researchers for several years due to their low cost, easy access, biocompatibility, and ease of surface modification due to different functional groups [4]. Zinc oxide has higher antimicrobial activity on the pathogen *Staphylococcus aureus* than other metal oxides [5]. Zinc oxide nanoparticles can be used to improve the mechanical and antimicrobial properties of

*: ramazani@sharif.edu

polymers including polyurethane, polylactic acid, and polycaprolactone [6]. In 2012, Mir Hosseini et al. Investigated the antibacterial effects of zinc oxide on *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*. The results showed that *Staphylococcus aureus* was less resistant to zinc oxide than *Escherichia coli*. [7]. The aim of this study was to fabricate Poly Lactic acid/ Polycaprolactone nanocomposite scaffolds modified with hydroxyapatite and zinc nanoparticles and to evaluate the antibacterial properties of nanocomposite scaffolds against two strains of *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*.

2. MATERIALS AND METHODS

2.1. Materials

Polylactic acid polymer with a molecular weight of 182000 g/mol and Polycaprolactone polymer with a molecular weight of 80,000 g/mol were purchased from Sigma Aldrich. Hydroxyapatite nanoparticles were purchased from Pardis Pajouhan Fanavaran Yazd Company. Chloroform and oleic acid were purchased from Merck

Company .Zinc oxide nanoparticles with a purity of more than 99% and a length of 35-45 nm were purchased from Us Nanomaterials, INC.

2.2. Fabrication and Modification of polymer scaffolds with hydroxyapatite and zinc oxide nanoparticles:

1 wt.% of hydroxyapatite nanoparticles was stirred with 10 ml of oleic acid on stirrer for 15 min and added to the polymer mixture. It was placed in an ultrasonic bath for 15 min, cast and placed under the hood for 48 h to remove the solvent, completely. To make samples containing zinc oxide nanoparticles, 3 wt.%, 0.1 wt.%, 0.5 wt.%, and 1 wt.% nanoparticles were added to the composite matrix. The manufacturing steps of zinc-containing nanocomposites were performed according to the steps mentioned above. The polymer matrix was prepared according to the mentioned method.

Field emission electron microscopy was used to examine the surface morphology. Zone of inhibition test was performed to evaluate the antibacterial properties. Gram-positive strains of *Staphylococcus aureus* and Gram-negative *Escherichia coli* were used to evaluate the antibacterial behavior of the samples. Samples were placed in sterile plates with forceps. The samples were incubated for 24 h at 37 °C. The antibacterial activity of zinc oxide nanoparticles was evaluated using Zone of inhibition method. MTT test according to ISO 5-10993 was used to evaluate the biocompatibility and survival of cells. By measuring the absorbance by spectrophotometer at wavelengths of 540-630 nm, the percentage of surviving cells can be determined. This percentage is calculated by Equation (1)

$$\text{survival rate} = \frac{\text{Average absorption of treated samples}}{\text{Average absorption of control samples}} \quad (1)$$

Where OD_s represents the optical density of sample at the desired time and OD_c represents the average optical density of the control group. This test was performed at intervals of 1 day and 3 days. Each experiment was repeated 3 times and the mean data were reported.

3. RESULTS AND DISCUSSION

3.1. Investigation of surface morphology of nanocomposite

The surface of the samples is completely smooth

and no cracks were observed on the surface. In cross-sectional images, zinc oxide nanoparticles are needle-shaped and hydroxyapatite nanoparticles are scattered in small cylinders in a polymer matrix. As can be seen in the figure 1, hydroxyapatite and zinc oxide nanoparticles are marked with a yellow arrow in the picture. Needle-like zinc oxide nanoparticles and tiny cylinder-like hydroxyapatite nanoparticles are distributed in the polymer matrix. In order to examine nanoparticles in FESEM images and determine the type of nanoparticle, X-ray energy diffraction spectroscopy (EDS) was performed on PLA-PCL-HA-1%ZnO nanocomposite.

3.2. Zone of inhibition test

In the Zone of inhibition test, it was found that the sample containing 1% nanoparticles of zinc oxide had the best results against two strains of gram-positive and gram-negative bacteria. The results showed that the growth inhibition zone of zinc oxide nanoparticles against gram-positive bacteria was 39.97 mm vs 17.42 mm for polymeric matrix. These results are consistent with the results of research conducted by various researchers [8,9,10]. The results are given in figure 2 and table 1.

3.3. Evaluation of biocompatibility and cell survival:

The results showed that cell viability was lowest in the vicinity of the unmodified composite matrix. With increasing nanoparticle content, the survival rate was increased. By adding hydroxyapatite nanoparticles to the polymer matrix, the cell viability increased from 22.18% to 57.82% after 72 hours.

4. CONCLUSION

It was found that the addition of nanoparticles to the polymer matrix improved the mechanical and biological properties. The amount of zone of inhibition of optimal matrix against *Escherichia coli* was 38.72 ± 0.341 mm and it was 39.97 ± 0.318 against *S-aureus*. This value was 14.79 ± 0.219 mm against *Escherichia coli* for the polymer matrix and 17.42 ± 0.320 mm against *S-aureus*. These results show that the optimal matrix has much more antibacterial properties than the matrix without zinc oxide nanoparticles.

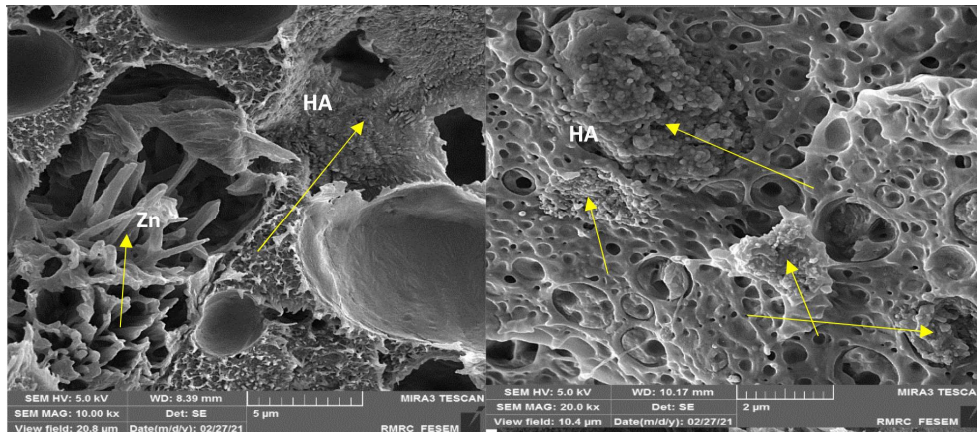


Figure 1. Field emission scanning electron microscopic images of: a) PLA-PCL-HA, b) PLA-PCL-HA-0.1%ZnO

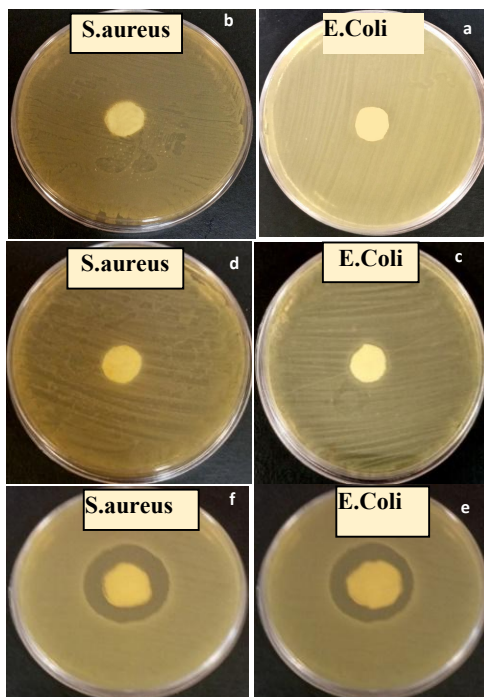


Figure 2. Images of growth inhibition zone: a, b) PLA-PCL, c, d) PLA-PCL-HA, e, and) ZnO PLA-PCL-HA-1% against Escherichia coli and Staphylococcus aureus.

Table 1. A detailed of anti-bacterial performance of PLA-PCL, PLA-PCL-HA, PLA-PCL-HA-1%ZnO against Escherichia coli and Staphylococcus aureus.

Sample	E. coli (mm)	S. aureus (mm)
PLA-PCL	14.79	17.42
PLA-PCL-HA	20.82	19.35
PLA-PCL-HA-1%ZnO	38.72	39.97

ACKNOWLEDGEMENT

We thank all those who helped us in this research.

CONFLICT OF INTERESTS

In connection with the publication of the presented article, they have completely avoided publishing ethics, including plagiarism, misbehavior, data forgery, or duplicate submission and publication.

REFERENCES

- Ramakrishna, S. "Biomedical Applications of Polymer-Composite Materials: A Review", *Composites Science and Technology*, Vol .61, No.1, pp. 1189-1224, 2001.
- Russias J., Saiz E. "Fabrication and Mechanical Properties of PLA/HA Composites: A Study of In Vitro Degradation", *Mater Sci Eng C Biomim Supramol Syst*, September; Vol. 26, No. 8, pp.1289–1295, 2006.
- Therias, S., Larche, J. "Photochemical Behavior of Polylactide/ZnO Nanocomposite Films", *Biomacromolecules*, Vol.13, pp.3283–3291, 2012.
- Sawai, J. "Quantitative Evaluation of Antibacterial Activities of Metallic Oxide Powders (ZnO, MgO and CaO) by Conductimetric Assay", *Microbiol Methods*, Vol .54, pp.177–182, 2003.
- Aleaghill S., Fattahy, E., "Antibacterial Activity of Zinc Oxide Nanoparticles on Staphylococcus Aureus", *International Journal of Advanced Biotechnology and Research*. pp.1569-1575, 2016.
- Pascual, Diez. "Development and Characterization of Novel Poly (Etherether Ketone)/ZnO Bionanocomposites", *J. Mater Chem*.Vol. 2, pp.3065–3078, 2014.
- Sirelkhatim, A., Mahmud, S. "Review on Zinc Oxide Nanoparticles, Antibacterial Activity and Toxicity Mechanism", *Nano-Micro Lett*.Vol. 7, No. 3, pp. 219–242, 2015.