Modares Journal of Biotechnology
Volume 11, Issue 1, Winter 2020
Pages: 61-69
Type: Original Research

A Study on Cytotoxicity, Hemocompatibility, and Antibacterial Properties of Tetracycline Hydrochloride-Loaded PCL-Based Composite Scaffolds for Bone Tissue Engineering Applications

Bohlouli M.[1] MSc, Tamjid E.[*2] PhD, Mohammadi S.[3] PhD, Nikkhah M.[2] PhD,

[1] Biomaterials Department, Interdisciplinary Science & Technology Faculty, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran
[2] Nanobiotechnology Department, Biological Sciences Faculty, Tarbiat Modares, Tehran, Iran
[3] Nano Drug Delivery Research Center, Health Technology Institute, Kermanshah University of Medical Sciences, Kermanshah, Iran

Abstract

Aims: Since one of the main problems in bone tissue repair is bacterial infections, recently the development of drug-eluting nanocomposite scaffolds for bone regenerative medicine applications has attracted significant attention.

Materials & Methods: In the present study, polycaprolactone (PCL)-based composite scaffolds containing 10% V titanium dioxide nanoparticles (21nm), and bioactive glass particles (6µm), were prepared without drug and also loaded by tetracycline hydrochloride (TCH) antibiotic (0.57 and 1.15mg/mL) through solvent casting method for bone tissue engineering applications. Structural characterizations based on scanning electron microscopy and FTIR analysis were utilized to study the chemical bonds of glass/ceramic particles, and antibiotic crystals on the surface. In addition, in vitro cytotoxicity, and antibacterial analysis were performed by MTT, and Agar well-diffusion assays, respectively.

Findings: In this study, polymeric and composite scaffolds were fabricated with TCH clusters decorated on the surface. It was shown that the bioactive glass/PCL scaffolds loaded by 0.57mg/mL of TCH revealed significant antibacterial effect, despite the acceptable cell viability.

Conclusion: These scaffolds seem to be of interest as a potential candidate in drug-eluting scaffolds for bone tissue engineering applications.

Keywords
Composite Scaffold [Not in Mesh];
Bone Tissue Engineering [Not in Mesh];
Tetracycline Hydrochloride [https://www.ncbi.nlm.nih.gov/mesh/?term=Tetracycline+Hydrochloride];
Cytotoxicity [https://www.ncbi.nlm.nih.gov/mesh/68003601];
Antibacterial Effect [Not in Mesh]

[*]Corresponding Author
Tel: +98 (21) 82884746
Fax: +98 (21) 82884717
Post Address: Tarbiat Modares University, Nasr Bridge, Jalal-Al-Ahmad Highway, Tehran, Iran.
Postal Code: 1411713116
tamjid@modares.ac.ir
Received: December 24, 2018 Accepted: October 13, 2019 ePublished: March 14, 2020

In Press

مطالعه سمیت سلولی، خون‌سازگاری و خواص آنتی‌باکتریایی داربست‌های کامپوزیتی بر پایه پلی‌کاپرولاکتون حاوی تتراسایکلین هیدروکلراید برای کاربرد در مهندسی بافت استخوان

مهسا بهلولی MSc
گروه زیست‌مواد، دانشکده علوم و فناوری‌های بین رشته‌ای، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران
الناز تمجید* PhD
گروه نانوبیوتکنولوژی، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران
سهیلا محمدی PhD
مرکز تحقیقات دارورسانی نانو، پژوهشکده فناوری سلامت، دانشگاه علوم پزشکی کرمانشاه، کرمانشاه، ایران
مریم نیکخواه PhD
گروه نانوبیوتکنولوژی، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران

چکیده
اهداف: از آنجا که یکی مشکلات مهم در ترمیم استخوان احتمال بروز عفونت‌های باکتریایی است، در سال‌های اخیر استفاده از داربست‌های نانوکامپوزیتی حاوی آنتی‌بیوتیک در کاربردهای مهندسی بافت استخوان مورد توجه پژوهشگران زیادی قرار گرفته است.
مواد و روش‌ها: در مطالعه حاضر، داربست‌های کامپوزیتی پلی‌کاپرولاکتونی حاوی ۱۰% حجمی از نانوذرات دی‌اکسیدتیتانیم (۲۱نانومتر) و بیوگلاس (٦میکرومتر) به‌صورت فاقد دارو و نیز حاوی غلظت‌های ۰/۵۷ و ۱/۱۵میلی‌گرم بر میلی‌لیتر داروی تتراسایکلین هیدروکلراید به روش ریخته‌گری محلول برای کاربرد در مهندسی بافت استخوان ساخته شدند. مشخصه‌یابی ساختاری با مشاهدات میکروسکوپ الکترونی روبشی و نیز طیف‌سنجی تبدیل فوریه مادون قرمز به‌منظور تایید اتصال ذرات و دارو روی داربست انجام شد. همچنین بررسی سمیت‌سنجی سلولی با استفاده از آزمون MTT و مطالعه خواص آنتی باکتریایی با استفاده از روش نفوذ در چاهک آگار انجام شد.
یافته‌ها: در این مطالعه داربست‌های پلیمری و کامپوزیتی حاوی ذرات داروی توزیع‌شده بر سطح تولید شده‌اند. همچنین مشاهده شد که داربست‌های کامپوزیتی بایوگلاس/پلی‌کاپرولاکتون حاوی ۰/۵۷میلی‌گرم بر میلی‌لیتر تتراسایکلین علاوه بر خواص آنتی باکتریایی مطلوب، میزان قابل قبولی از زنده‌ماندن سلول‌ها را دارند.
نتیجه‌گیری: این داربست‌ها بالقوه می‌توانند به‌عنوان داربست‌های مهندسی بافت با خاصیت آنتی‌باکتریایی مورد توجه قرار گیرند.
کلیدواژه‌ها: داربست کامپوزیتی، مهندسی بافت استخوان، تتراسایکلین هیدروکلراید، سمیت سلولی، خواص آنتی‌باکتریایی

تاریخ دریافت: ۱۳۹۷/۱۰/۳
تاریخ پذیرش: ۱۳۹۸/۷/۲۱
*نویسنده مسئول: tamjid@modares.ac.ir

مقدمه

امروزه استفاده از داربست‌های نانوکامپوزیتی مهندسی بافت به‌عنوان یک راهکار جدید در پزشکی ترمیمی مورد توجه پژوهشگران قرار گرفته است. امروزه تحقیقات گسترده‌ای در زمینه مهندسی بافت استخوان و ساخت داربست‌های پلیمری متخلخل برای تشویق سلول‌های استخوانی به ترمیم بافت انجام می‌شود[1, 2]. هدف از ساخت داربست‌های کامپوزیتی با استفاده از ذرات میکرونی و نانومتری در زمینه پلیمری ایجاد نانوتوپوگرافی، آب‌دوستی، زبری سطح، بهبود چسبندگی و تکثیر و تمایز سلول‌های استخوانی است[3, 4]. شایان ذکر است که افزودن نانوذرات تیتانیا سبب افزایش توپوگرافی در سطح داربست می‌شود. همچنین در اثر قرارگیری داربست‌های کامپوزیتی بایوگلاس در محیط، به‌دلیل وجود درصد بالایی از CaO و SiO_2 در ترکیب آن با انتشار یون‌های سیلسیوم، کلسیم، فسفر و سدیم باعث افزایش خاصیت زیست‌فعالی و رگ‌زایی مطلوب می‌شود[5, 6]. با توجه به نتایج مطالعه هنچ، نسبت بالای CaO به P_2O_5 باعث افزایش واکنش‌پذیری سطح شیشه‌ای در محیط فیزیولوژیک و تحریک استخوان‌سازی می‌شود[7].

از آنجا که یکی از عوامل مشکل‌زا در ترمیم بافت استخوان احتمال بروز عفونت‌های باکتریایی پس از جراحی است، در سال‌های اخیر توجه پژوهشگران به استفاده از داروهای آنتی‌بیوتیکی به‌صورت موضعی در محل قرارگیری ماده کاشتنی معطوف شده است[8]. یکی از روش‌های موثر در ایجاد خاصیت آنتی‌باکتریال در مواد کاشتنی، ایجاد پوشش دارویی بر روی آنها و رهایش آهسته و موضعی دارو است[9, 10]. به این منظور و برای مطالعه اثرگذاری بیشتر دارو و عدم ایجاد عوارض جانبی، حامل‌های طبیعی یا سنتزی دارویی مختلفی مورد بررسی قرار گرفته‌اند. *گودسن* و همکاران[11] رهایش کنترل‌شده دارو را در قسمت پاکت پریودنتال بررسی کردند و نشان دادند که رهایش کنترل‌شده دارو باعث ایجاد خواص آنتی‌باکتریایی در مدت‌زمان‌های طولانی‌تر می‌شود. در پژوهشی دیگر که توسط *چهال* و همکاران[12] انجام شد، اثرات سیتریک‌اسید، تتراسایکلین و داکسی‌سایکلین در سلول‌های ریشه دندانی و فیبروبلاست لثه در آزمایشات برون‌تنی بررسی شد. آنها نشان دادند که داروی تتراسایکلین باعث افزایش چسبندگی و رشد سلول‌های فیبروبلاست لثه و همچنین مهار هورمون پاراتیرویدی ناشی از تحلیل استخوان می‌شود. همچنین اثرات مطلوبی در مقایسه با داروهای دیگر مانند داکسی‌سایکلین دارد. ٦٥% دارو با پروتئین‌های پلاسما تشکیل باند (کوتاه) می‌دهد و این باند باعث اثربخشی سریع و بلندمدت دارو می‌شود. تتراسایکلین‌ها با عبور از غشای سلول باکتری و اتصال به ریبوزوم‌ها و اختلال در عملکرد tRNA باکتری‌ها مانع سنتز پروتئین‌ها می‌شوند و باکتری‌ها را از بین می‌برند. نفوذپذیری تتراسایکلین هیدروکلراید به اغلب بافت‌ها و مایعات بدن باعث اثربخشی سریع و مطلوب دارو می‌شود. همچنین به‌تازگی گزارش‌هایی از تحریک سلول‌های استخوان‌ساز توسط این دارو منتشر شده است[13, 14]. لازم به ذکر است که استفاده از تتراسایکلین‌ها با دوز بالا در تست‌های سلولی برون‌تنی موجب سمیت و مرگ سلولی می‌شود[11].

در سال‌های اخیر حامل‌های دارویی مختلفی مانند غشاهای پلیمری، ژل‌ها، سیستم‌های تزریقی، میکروذرات و داربست‌های مختلف مهندسی بافت معرفی شده‌اند. از محدودیت‌های این

روش‌ها می‌توان به محدودیت شکل‌پذیری، محدودیت بارگذاری دارو و عدم کنترل عوامل اثرگذار اشاره کرد[11]. پلی‌کاپرولاکتون یکی از پلیمرهای زیست‌سازگار و دارای تاییدیه سازمان غذا و داروی ایالات متحده است که به‌عنوان یکی از گزینه‌های مناسب برای داربست‌هایی با قابلیت رهایش دارو مورد توجه پژوهشگران قرار گرفته است[15, 16]. *کیم* و همکاران[15] آزمون رهایش داروی تتراسایکلین هیدروکلراید و خواص مکانیکی داربست‌های متخلخل هیدروکسی‌آپاتیت پوشش‌دهی‌شده با پلی‌کاپرولاکتون و پودر هیدروکسی‌آپاتیت (HA) در مهندسی بافت استخوان را بررسی کردند. در این مطالعه بارگذاری دارو، با غوطه‌وری داربست در محلول پلیمری حاوی دارو و با نسبت وزنی/وزنی ۰/۱ و آزمون رهایش دارو با غوطه‌وری داربست‌های پوشش‌دهی‌شده حاوی دارو در محلول بافر فسفات‌سالین (PBS) و در دمای ۳۷°C به مدت ۷ روز انجام شد. *خودیر* و همکاران[16] داروی تتراسایکلین هیدروکلراید را در غلظت‌های مختلف دارویی ۵-۱% وزنی/وزنی به محلول کیتوسان اضافه کردند و داربست‌های کامپوزیتی پلی‌کاپرولاکتون/نانوذرات کیتوسان را به روش الکتروریسی ساختند. نتایج مطالعه آنها نشان داد که استفاده از داربست‌های کامپوزیتی علاوه بر بهبود خواص مکانیکی، سبب رهایش کنترل‌شده دارو و همچنین بهبود خواص استخوان‌سازی در کاربردهای مهندسی بافت می‌شود. *شاو* و همکاران[17] خاصیت آنتی‌باکتریایی داروی تتراسایکلین هیدروکلراید را به روش نفوذ دیسک بر روی غشاهای کامپوزیتی سلولزی بررسی کردند. فیلم‌های سلولزی در محلول دارویی تتراسایکلین هیدروکلراید در غلظت‌های ۰/۰۱، ۰/۰۵، ۰/۱، ۰/۳ و ۰/۵گرم بر لیتر به مدت ۲٤ ساعت غوطه‌ور شدند. از باکتری‌های گرم مثبت *استافیلوکوکوس اورئوس* و گرم منفی *اشریشیا کلی* برای مطالعات آنتی‌باکتریایی استفاده شد. گزارش شد که با افزایش غلظت داروی تتراسایکلین هیدروکلراید، شعاع هاله عدم رشد باکتری افزایش می‌یابد. بهترین نتیجه آزمون آنتی‌باکتریایی مربوط به غشاهای کامپوزیتی سلولزی حاوی دارو با غلظت ۰/۵گرم بر لیتر بود. اندازه قطر هاله عدم رشد باکتری‌های *اشریشیا کلی* و *استافیلوکوکوس اورئوس* در این غلظت دارویی به ترتیب ٤/۵۷ و ۳/۸۵سانتی‌متر گزارش شد.

اگرچه بارگذاری دارو بر داربست‌های استخوانی اخیراً مورد توجه قرار گرفته است[18, 19]، اما مطالعات سمیت‌سنجی سلولی و یا مطالعات خون‌سازگاری روی داربست‌های حاوی داروی تتراسایکلین هیدروکلراید تاکنون مورد غفلت قرار گرفته است. با توجه به اهمیت انتخاب غلظت دارویی مناسب که دارای خواص آنتی‌باکتریایی موثر باشد و در عین حال اثر نامطلوبی بر زنده‌ماندن سلول‌ها نداشته باشد، در مطالعه حاضر برای اولین‌بار داربست‌های پلی‌کاپرولاکتونی متخلخل حاوی نانوذرات تیتانیا و میکروذرات بایوگلاس حاوی داروی تتراسایکلین مورد مطالعه قرار گرفتند. اثر نانوذرات تیتانیا و ذرات میکرونی بیوگلاس در حضور و عدم حضور دارو در غلظت‌های مختلف بر میزان خون‌سازگاری و زنده‌ماندن سلول‌ها به ترتیب با استفاده از آزمون‌های همولیز و MTT بررسی شد. غلظت بهینه دارو برای تهیه داربست‌های نانوکامپوزیتی با خواص آنتی‌باکتریایی ارایه شد.

مواد و روش‌ها

ساخت و مشخصه‌یابی داربست‌ها

در مطالعه حاضر، داربست‌های کامپوزیتی با زمینه پلی‌کاپرولاکتون $C_6H_{10}O_2$ (سیگما آلدریچ؛ ایالات متحده) با M_w= ۸۰۰۰۰ و افزودن نانوذرات تیتانیا با اندازه ۲۱نانومتر (دگوسا؛ آلمان) و میکروذرات بایوگلاس (US Biomaterials؛ ایالات متحده) با اندازه ٦میکرومتر و داروی تتراسایکلین هیدروکلراید $C_{22}H_{25}ClN_2O_8$ (آلفا ایسر؛ آلمان) به روش ریخته‌گری محلول ساخته شدند. به این منظور، محلول شفافی از انحلال پلی‌کاپرولاکتون در حلال دی‌متیل‌کربنات $C_3H_6O_3$ (مرک؛ آلمان) با غلظت ۱۰% حجمی با استفاده از همزن مغناطیسی مجهز به گرم‌کننده تهیه شد. دور همزن ۳۵۰دور بر دقیقه، دمای گرم‌کننده ۴۰°C و زمان انحلال ۶ ساعت بود. برای تهیه سوسپانسیون‌های کامپوزیتی محلول پلی‌کاپرولاکتون حاوی ۱۰% حجمی از ذرات تهیه شد و برای توزیع کامل نانوذرات و جلوگیری از کلوخه‌شدن آنها، از حمام مافوق صوت (Sonica؛ ایتالیا) استفاده شد. به این ترتیب که ابتدا ذرات و حلال دی‌متیل‌کربنات به مدت ۱۵ دقیقه همگن شدند. پس از اختلاط با محلول پلیمری نیز مجدداً به مدت ۱۵ دقیقه همگن‌سازی انجام شد. سپس به‌منظور ایجاد خاصیت آنتی‌باکتریایی در داربست‌های ساخته‌شده، محلول دارویی تتراسایکلین هیدروکلراید (آلفا ایسر؛ آلمان) در حلال آب تزریقی در غلظت‌های صفر، ۰/۵۷ و ۱/۱۵میلی‌گرم بر میلی‌لیتر تهیه شد. به‌منظور بارگذاری دارو روی داربست‌ها، دارو از همان ابتدای مرحله آماده‌سازی به محلول‌های پلیمری و کامپوزیتی اضافه و سپس ریخته‌گری انجام شد. در مرحله بعد به‌منظور حذف حلال از بیوفیلم‌ها، از دسیکاتور به مدت ۲۴ ساعت استفاده شد. شناسایی و مشخصه‌یابی نانوذرات تیتانیا و میکروذرات بایوگلاس و سایز حفرات با استفاده از میکروسکوپ الکترونی روبشی KYKY-EM3200 (KYKY؛ سوییس) استفاده شد. برای این منظور داربست‌های کامپوزیتی با لایه نازکی از طلا پوشش داده شدند. برای تعیین ترکیب شیمیایی و بررسی گروه‌های عاملی نانوذرات تیتانیا و میکروذرات بایوگلاس موجود در داربست و همچنین چگونگی برهم‌کنش این گروه‌ها با یکدیگر، دستگاه طیف‌سنجی تبدیل فوریه فروسرخ PerkinElmer Frontier؛ ایالات متحده) در محدوده عدد موجی ۴۰۰۰-۴۰۰ مورد استفاده قرار گرفت. نتایج آزمون توسط نرم‌افزار OriginPro E93 (OriginLab؛ ایالات متحده) ترسیم شد.

آزمون سمیت‌سنجی سلولی

سنجش MTT یکی از متداول‌ترین روش‌های رنگ‌سنجی برای بررسی میزان سمیت مواد بر حیات سلول است. این مساله با سنجش قدرت احیای رنگ تترازولیوم (MTT) زردرنگ پس از نفوذ

به سلول‌های زنده توسط آنزیم سوکسینات‌دهیدروژناز میتوکندریایی و تبدیل آن به بلورهای فورمازان بنفش‌رنگ مورد بررسی قرار می‌گیرد. پس از حل‌کردن این کریستال‌ها به کمک DMSO، میزان جذب این محلول در طول موج ۵۷۰نانومتر را می‌توان به میزان زنده‌بودن سلول‌ها ارتباط داد. بررسی سمیت سلولی بر عصاره داربست‌های پلیمری، کامپوزیتی و حاوی دارو با استفاده از آزمون MTT برای یافتن حد بهینه عامل دارویی تتراسایکلین هیدروکلراید در غلظت‌های مختلفی از دارو (صفر و ۱/۱۵میلی‌گرم بر میلی‌لیتر) و در بازه زمانی ۲۴ ساعت انجام شد. برای عصاره‌گیری از داربست‌ها، ابتدا هر کدام از نمونه‌ها در پلیت‌های ۴۸خانه‌ای قرار گرفتند و ۵۰۰میکرولیتر بافر فیزیولوژی PBS به هر کدام از نمونه‌ها اضافه شد. نمونه‌ها به مدت ۷۲ ساعت در دمای ۳۷°C با سرعت ۵۰دور بر دقیقه هم زده شدند. سپس ۲۰میکرولیتر از این عصاره‌ها برای انجام آزمون‌های زیستی مورد استفاده قرار گرفت. برای بررسی اثر احتمالی pH بر نتایج سمیت سلولی، pHسنجی عصاره‌ها در حمام با دمای ۳۷°C توسط دستگاه pHمتر مدل اینولب (WTW؛ آلمان) انجام شد و انحراف معنی‌داری از pH فیزیولوژیک در هیچ یک از عصاره‌های مختلف مشاهده نشد. رده سلول فیبروبلاست L929 (مرکز ذخایر ژنتیکی و زیستی ایران؛ ایران) در محیط کشت DMEM (حاوی ۱۰% سرم جنین گاوی یا FBS، ۱% آنتی‌بیوتیک پنی‌سیلین (۱۰۰واحد بر میلی‌لیتر) و استرپتومایسین (۱۰۰میلی‌گرم بر میلی‌لیتر) در فلاسک کشت سلول T25 کشت داده شد و به انکوباتور با هوای مرطوب، غلظت ۵% CO_2 و دمای ۳۷°C منتقل شد. شایان ذکر است که سلول‌های L929 از نوع سلول‌های چسبنده بودند و به‌عنوان سلول‌های استاندارد در آزمون‌های سمیت‌سنجی سلولی این نوع داربست‌ها مورد استفاده قرار می‌گیرند[20]. برای انجام آزمون MTT، ابتدا سلول‌های L929 در پلیت ۹۶ خانه به تعداد ۱۰۰۰۰ سلول در هر خانه کشت داده شدند. ۲۴ ساعت بعد، محیط کشت با محیط کشت بدون سرم و آنتی‌بیوتیک تعویض و ۲۰میکرولیتر از عصاره هر کدام از نمونه‌ها به حجم ۸۰میکرولیتر محیط کشت اضافه شد. پس از گذشت ۲۴ ساعت از مجاورت عصاره نمونه‌ها با سلول‌ها، ۵میلی‌گرم بر میلی‌لیتر از MTT به هر چاهک به گونه‌ای اضافه شد که بیش از ۱/۱۰ حجم محیط کشت نشود. سپس سلول‌ها مجدداً به مدت ۴ ساعت به انکوباتور ۳۷°C منتقل شدند. در مرحله بعد محیط کشت روی سلول‌ها به‌آرامی برداشته و ۱۰۰میکرولیتر DMSO به هر چاهک اضافه شد. پس از انحلال کامل کریستال‌های فورمازان جذب محلول‌های هر چاهک به کمک دستگاه خوانشگر الایزا مدل µQuant™ (BioTek Instruments, Inc.؛ ایالات متحده) در طول موج ۵۷۰نانومتر ثبت شد. لازم به ذکر است که به سلول‌ها در چاهک‌های کنترل فقط بافر PBS اضافه شد.

آزمایش همولیز

برای بررسی عملکرد عصاره‌ها در ایجاد اختلال در غشا، از آزمایش همولیز استفاده شد. برای این منظور، ۲میلی‌لیتر خون گرفته‌شده از داوطلب که در تیوب حاوی EDTA جمع‌آوری شده بود، به مدت ۲ دقیقه با سرعت ۱۳۰۰۰دور بر دقیقه سانتریفیوژ شد تا گلبول‌های قرمز از پلاسما جدا شوند. سپس گلبول‌های قرمز ۳ بار به کمک بافر PBS شست‌وشو داده شدند. پس از آخرین شست‌وشو، گلبول‌های قرمز در میکروتیوب‌های مجزا تقسیم شدند، به گونه‌ای که در هر میکروتیوب ۱۰۰میلیون گلبول قرمز ریخته شد. سپس حجم نهایی در هر یک از نمونه‌ها با استفاده از PBS با pH برابر ۷/۴ و مقادیر ۵، ۳۰، ۵۰ و ۲۰۰میکرولیتر از عصاره‌ها به ۱میلی‌لیتر رسانده و به مدت یک ساعت در دمای ۳۷°C با سرعت ۵۰دور بر دقیقه انکوبه شد. سپس تیوب‌ها ۵ دقیقه با سرعت ۱۳۰۰۰دور بر دقیقه سانتریفیوژ شدند و پس از آن جذب محلول رویی در طول موج ۵۴۰نانومتر اندازه‌گیری شد. گلبول‌های قرمز تیمارشده با محلول ۱% تریتون به‌عنوان کنترل مثبت و با بافر به‌عنوان کنترل منفی در این آزمایش مورد استفاده قرار گرفتند. هر آزمون ۳ بار تکرار شد و نتایج به‌صورت میانگین آماری گزارش شدند. در هر دو آزمون سمیت‌سنجی و همولیز معنی‌داربودن تفاوت در داده‌های گزارش‌شده با استفاده از نرم‌افزار آماری پریزم GraphPad Prism 7/04 آنالیز شدند.

آزمون بررسی خواص آنتی‌باکتریایی

در مطالعه حاضر، میزان قطر هاله عدم رشد باکتری توسط غلظت‌های مختلف عصاره داربست‌های حاوی دارو و بدون دارو روی باکتری گرم منفی *اشریشیا کلی* و گرم مثبت *استافیلوکوکوس اورئوس* کشت‌داده‌شده روی محیط کشت LB آگار به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷°C به روش چاهک‌زدن در آگار یا انتشار چاهک در آگار بررسی شد. به‌منظور مقایسه‌پذیری نتایج این آزمون، از OD یکسان برای هر دو سویه گرم مثبت و منفی استفاده شد. به این منظور ۲۴ ساعت پس از ایجاد چاهک روی پلیت و انتقال ۲۵میکرولیتر عصاره نمونه‌ها به داخل هر چاهک، با یک خط‌کش دقیق میزان قطر هاله عدم رشد باکتری توسط عصاره نمونه‌های مختلف روی پلیت‌ها بر حسب سانتی‌متر اندازه‌گیری و گزارش شد. میزان قطر هاله عدم رشد معیاری برای اثر آنتی‌باکتریایی است[21].

یافته‌ها

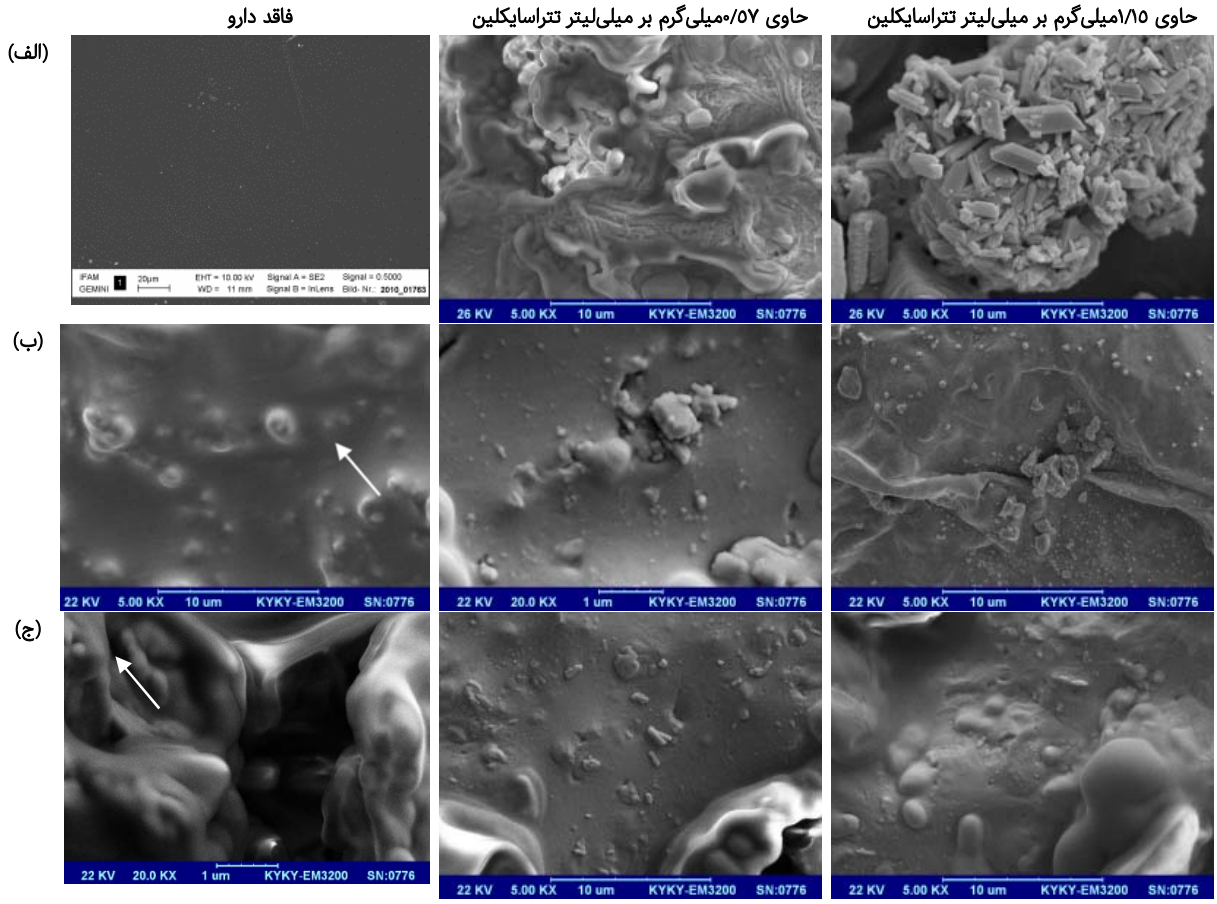
ساختار داربست‌ها

تصاویر میکروسکوپ الکترونی از سطح داربست‌های پلیمری، کامپوزیتی و حاوی دارو در شکل ۱ نشان داده شده است. همان‌طور که مشاهده می‌شود سطح داربست پلی‌کاپرولاکتونی یکنواخت و فاقد پستی و بلندی‌های قابل توجه است. با افزودن ذرات بایوگلاس میکرونی و پوشش‌دهی داروی تتراسایکلین هیدروکلراید، سطح داربست ناهموار و به‌صورت جزایر متصل به هم دیده می‌شود. همچنین مشاهده می‌شود که داربست کامپوزیتی نسبت به پلیمر خالص تخلخل زیادی دارد. مشاهدات در بزرگ‌نمایی بالا نشان داد که ذرات بایوگلاس در زمینه پلیمر پلی‌کاپرولاکتون به‌خوبی توزیع شده‌اند و کلوخه‌شدن قابل توجهی مشهود نیست. تتراسایکلین هیدروکلراید به‌دلیل خاصیت آب‌دوستی به‌خوبی در سطح داربست پوشش داده شد و به‌صورت بلورهای دارو دیده می‌شود[5].

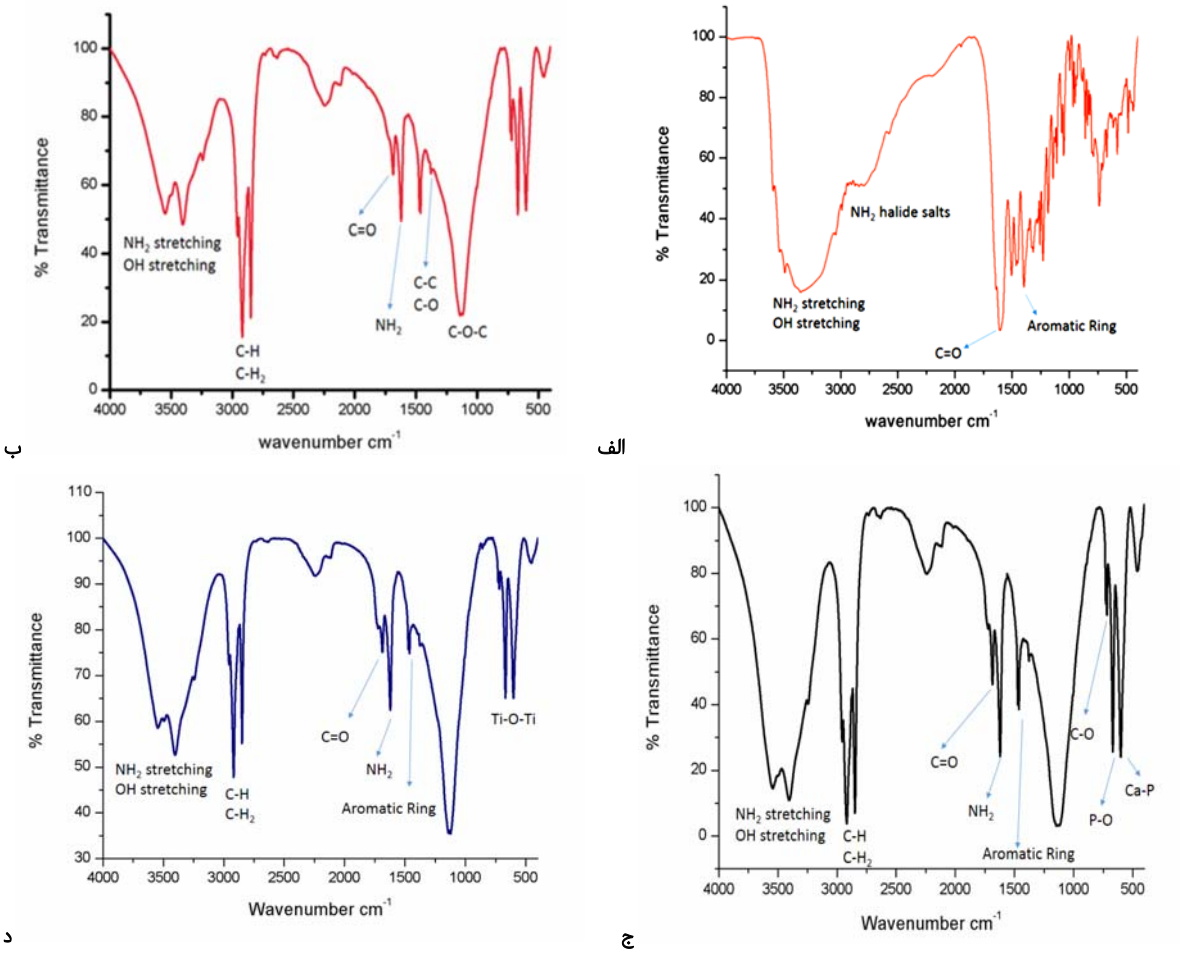
پیوندهای شیمیایی

دستگاه طیف‌سنجی فروسرخ به‌منظور تعیین ترکیب شیمیایی و مطالعه ساختار مولکولی مورد استفاده قرار گرفت. نمودار ۱ نشان می‌دهد که داروی تتراسایکلین هیدروکلراید دارای گروه‌های عاملی آمین، کربونیل، NH_2 کششی، OH کششی و باند ارتعاشی حلقه آروماتیک است. بنابراین در آزمون طیف‌سنجی فروسرخ ۴ پیک شاخص دارد.

همان‌طور که در نمودار ۱- الف ملاحظه می‌شود، در آزمون طیف‌سنجی تتراسایکلین هیدروکلراید مورد استفاده در این پروژه پیک‌های ۱۶۷۰cm^{-1} مربوط به گروه آمید و ۱۶۲۰cm^{-1} مربوط به گروه کربونیل است. NH_2 کششی و OH کششی در محدوده cm^{-1} ۳۱۰۰-۳۳۵۰ و گروه آمین نمک‌های هالیدی در ۲۶۰۰-۲۸۰۰cm^{-1} و باند ارتعاشی حلقه آروماتیک در ۱۴۶۴cm^{-1} دیده شد. پلیمر پلی‌کاپرولاکتون دارای گروه‌های عاملی CH_2 کششی، کربونیل، C-O، O-C و C-C است. بنابراین در مقایسه مشاهده می‌شود که در ترکیب پلیمری حاوی دارو، پیک‌های شاخص دارو که شامل گروه‌های عاملی NH_2 و OH کششی بودند، در محدوده ۳۵۰۰cm^{-1}-۳۴۰۰، گروه‌های عاملی C-O-C در ۱۱۳۹cm^{-1} و همچنین گروه‌های عاملی C-O و C-C در محدوده ۱۱۳۹-۱۳۷۷cm^{-1} مشاهده شده‌اند (نمودار ۱- ب). همان‌طور که در نمودار ۱- ج مشاهده می‌شود، در آنالیز طیف‌سنجی فروسرخ کامپوزیت میکروذرات بایوگلاس حاوی دارو علاوه بر باندهای مربوط به پلی‌کاپرولاکتون، باندهای Ca-P و P-O به ترتیب در ۶۰۲/۴-۶۶۹/۲۴cm^{-1} و همچنین باند Si-O-Si در ۱۱۴۰cm^{-1} ظاهر شدند که موید حضور بیوگلاس هستند. همچنین پیک‌های مربوط به داروی تتراسایکلین هیدروکلراید که شامل گروه‌های عاملی NH_2 کششی و OH کششی بودند، در محدوده ۳۴۰۰-۳۵۴۳cm^{-1}، حلقه آروماتیک در ۱۱۴۰cm^{-1} و پیک $C-H_2$ پلی‌کاپرولاکتون در محدوده ۲۸۰۰-۲۹۰۰ دیده شدند[22]. در طیف‌سنجی فروسرخ پودر تیتانیا باند پهن ارتعاشی Ti-O-Ti در محدوده ۶۶۷/۵cm^{-1} پیک شاخص است که در نمودار ۱- د مشاهده می‌شود. با مقایسه نمودارهای ۱- الف و ۱- د مشاهده می‌شود که پیک‌های مربوط به داروی تتراسایکلین هیدروکلراید، شامل گروه‌های عاملی NH_2 کششی و OH کششی در محدوده cm^{-1} ۳۴۰۰-۳۵۴۳، حلقه آروماتیک در ۱۱۴۰cm^{-1} و پیک $C-H_2$ پلی‌کاپرولاکتون در محدوده ۲۸۰۰-۲۹۰۰ دیده شدند[23]. این پیک‌ها از شماره موج مورد نظر شیفت قابل توجهی داشته‌اند. بنابراین می‌توان نتیجه گرفت که تغییرات ایجادشده در طیف فروسرخ مربوط به جاذبه الکترواستاتیک بین مراکز پرالکترون دارو و پلیمر با مراکز کم‌الکترون بایوگلاس و تیتانیا است (نمودار ۱).



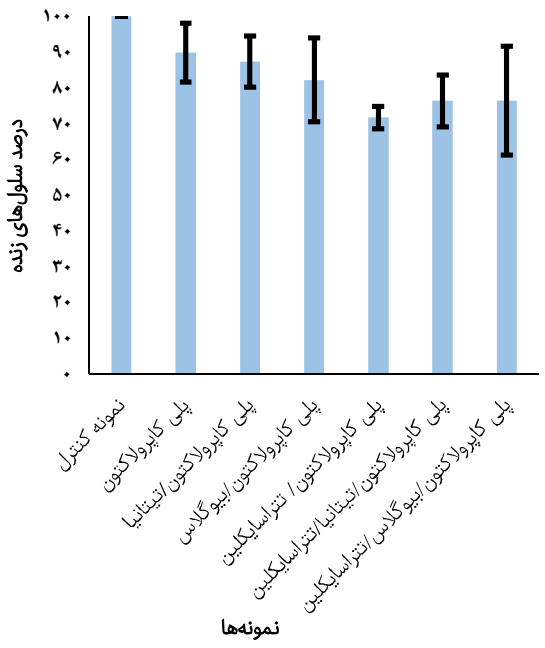
شکل ۱) مشاهدات میکروسکوپ الکترونی روبشی سطح داربست‌های پلی‌کاپرولاکتون (الف)؛ پلی‌کاپرولاکتون/بیوگلاس (ب) و پلی‌کاپرولاکتون/تیتانیا (ج) فاقد دارو و حاوی دو غلظت ۰/۵۷ و ۱/۱۵میلی‌گرم در میلی‌لیتر تتراسایکلین هیدروکلراید؛ (ذرات بیوگلاس و تیتانیا با فلش سفید مشخص شده‌اند.)



نمودار ۱) نتایج طیف‌سنجی فروسرخ؛ الف) تتراسایکلین هیدروکلراید؛ ب) داربست پلی‌کاپرولاکتون/تتراسایکلین هیدروکلراید؛ ج) داربست کامپوزیتی پلی‌کاپرولاکتون/بایوگلاس/تتراسایکلین هیدروکلراید؛ د) داربست کامپوزیتی پلی‌کاپرولاکتون/تیتانیا/تتراسایکلین هیدروکلراید

آزمون سمیت‌سنجی

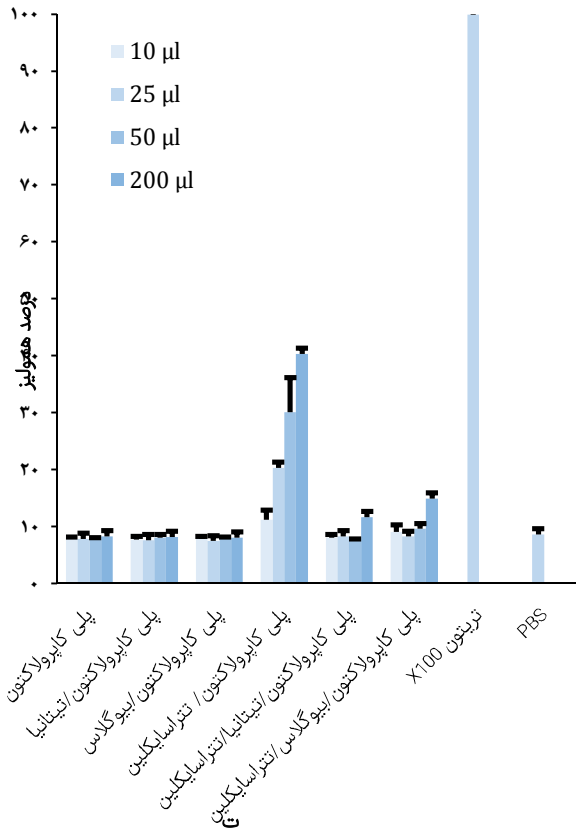
آزمون سمیت‌سنجی در بازه زمانی ۲۴ ساعت انجام شد. ابتدا این آزمون روی سلول‌های کشت‌داده‌شده در عدم حضور عصاره داربست برای درصدهای مختلف دارویی در محدوده ۰/۱ تا ۲میلی‌گرم بر میلی‌لیتر انجام شد. نتایج حاصل نشان داد که دو غلظت ۰/۵۷ و ۱/۱۵میلی‌گرم بر میلی‌لیتر از نظر میزان زنده‌ماندن سلول‌ها قابل قبول هستند. بر این اساس در ادامه کار بالاترین غلظت (۱/۱۵میلی‌گرم بر میلی‌لیتر) برای پوشش‌دهی داربست‌ها انتخاب شد تا حد سمیت سلولی داربست‌های حاوی دارو مورد مطالعه قرار گیرد. سپس آزمون سمیت‌سنجی روی عصاره داربست‌های پوشش‌دهی‌شده با دارو انجام شد. همان‌طور که در نمودار ۲ مشاهده می‌شود، از مقایسه نتایج سمیت‌سنجی نمونه‌های پلیمری و کامپوزیتی تیتانیای فاقد دارو در هیچ یک از غلظت‌ها سمیت قابل توجهی مشاهده نشد و در بازه زمانی ۲۴ ساعت میزان سلول‌های زنده بین ۸۰ تا ۹۰% بودند که مطلوب است. با این حال نتایج آزمون‌های سمیت‌سنجی انجام‌شده بر نمونه‌های حاوی ۱/۱۵میلی‌گرم بر میلی‌لیتر دارو نشان می‌دهد که این غلظت از دارو در نمونه‌های پلی‌کاپرولاکتونی سمی و سبب اندکی کاهش در تعداد سلول‌های زنده شده است (نمودار ۲).



نمودار ۲) آزمون سمیت‌سنجی روی عصاره نمونه‌های بدون دارو و با غلظت دارویی ۱/۱۵میلی‌گرم بر میلی‌لیتر بعد از ۲۴ ساعت ($p<0/02$)

نتایج آزمون همولیز

برای بررسی اثر عصاره داربست‌های حاوی دارو بر خون‌سازگاری، آزمون همولیز در pH فیزیولوژیک روی غلظت‌های مختلف عصاره (حجم‌های ۵، ۳۰، ۵۰ و ۲۰۰میکرولیتر در ۱میلی‌لیتر بافر) انجام شد که نتایج آن در نمودار ۳ نشان داده شده است. همان‌طور که مشاهده می‌شود این نتایج در همه نمونه‌های فاقد دارو بیانگر خون‌سازگاری قابل قبول است و در نمونه‌های حاوی ۱/۱۵میلی‌گرم بر میلی‌لیتر دارو نیز تنها در غلظت ۲۰۰میکرولیتر در میلی‌لیتر، لیز گلبول‌های قرمز پس از سانتریفیوژ مشاهده شد که مقدار آن در نمونه‌های کامپوزیتی حاوی بیوگلاس و تیتانیا کمتر از ۲۰% و در نمونه‌های پلی‌کاپرولاکتونی بیش از ۴۰% بود. به این ترتیب به نظر می‌رسد که این میزان از دارو در نمونه‌های پلی‌کاپرولاکتونی سمی و سبب کاهش قابل توجه در میزان خون‌سازگاری شده است ($p<0/0001$).



نمودار ۳) آزمون همولیز در تیمار با عصاره داربست‌های مورد مطالعه در چهار غلظت ۱۰، ۲۵، ۵۰ و ۲۰۰میکرولیتر بر میلی‌لیتر دارو در میلی‌لیتر بافر ($p<0/0001$)

آزمون تعیین خاصیت آنتی‌باکتریایی

داربست‌های ساخته‌شده با داروی تتراسایکلین هیدروکلراید به‌منظور ایجاد خاصیت آنتی‌باکتریایی با هر دو غلظت دارویی ۰/۵۷ و ۱/۱۵میلی‌گرم بر میلی‌لیتر پوشش‌دهی شدند تا غلظت کمینه دارویی که قادر به مهار رشد باکتری‌ها به‌طور همزمان با حفظ زنده‌ماندن سلول‌ها است تعیین شود. آزمون آنتی‌باکتریایی با استفاده از عصاره‌های داربست پلیمری و کامپوزیتی با درصدهای مختلف دارو روی دو نوع باکتری گرم منفی *اشریشیا کلی*، و گرم مثبت *استافیلوکوکوس اورئوس* در محیط کشت LB آگار انجام شد. نتایج اندازه‌گیری کمی هاله عدم رشد در جدول ۱ آورده شده است. هاله عدم رشد در نمونه‌های پلیمری و کامپوزیتی فاقد دارو مشاهده نشد که نشان‌دهنده عدم وجود خاصیت آنتی‌باکتریایی آنها است. برعکس در همه نمونه‌های حاوی دارو هاله عدم رشد باکتری‌های هر دو سویه مشاهده شد. نکته قابل توجه اثربخشی بیشتر عصاره‌ها بر سویه *استافیلوکوکوس اورئوس* در مقایسه با *اشریشیا کلی* است. البته در آزمایشات انجام‌شده بر هر دو سویه تفاوت قابل توجهی بین اثر غلظت‌های مختلف دارو مشاهده نشد.

جدول ۱) اندازه قطر هاله عدم رشد باکتری بر حسب سانتی‌متر بر اثر تیمار با عصاره داربست‌های مورد مطالعه در غلظت‌های مختلف دارو (بر حسب میلی‌گرم بر میلی‌لیتر)

باکتری	میزان دارو / نوع داربست	صفر	۰/۵۷	۱/۱۵
اشریشیا کلی	پلی کاپرولاکتون	صفر	۱/۸۲±۰/۰۷	۲/۰۳±۰/۰۳
	پلی کاپرولاکتون/بیوگلاس	صفر	۱/۴۹±۰/۰۳	۲/۰۱±۰/۰۱
	پلی کاپرولاکتون/تیتانیا	صفر	۱/۰۹±۰/۰۶	۱/۷۷±۰/۰۱
استافیلوکوکوس اورئوس	پلی کاپرولاکتون	صفر	۲/۷±۰/۰۱	۲/۸±۰/۰۱
	پلی کاپرولاکتون/بیوگلاس	صفر	۲/۵۹±۰/۰۶	۲/۶۲±۰/۰۲
	پلی کاپرولاکتون/تیتانیا	صفر	۲/۶۵±۰/۰۴	۲/۹±۰/۰۱

بحث

سه نوع داربست پلیمری، کامپوزیتی بایوگلاس و نانوکامپوزیتی تیتانیا بدون دارو و حاوی داروی تتراسایکلین هیدروکلراید ساخته شد. پلیمر پلی‌کاپرولاکتون به‌دلیل خواص مکانیکی، زیست‌سازگاری و نرخ تخریب مطلوب نسبت به سایر پلیمرها به‌عنوان بستر پلیمری استفاده شد. همچنین میکروذرات بایوگلاس و نانوذرات تیتانیا به‌دلیل اثربخشی ذرات در بهبود خواص مکانیکی و افزایش زیست سازگاری مورد استفاده قرار گرفتند. داروی تتراسایکلین هیدروکلراید به‌دلیل خاصیت آنتی‌باکتریایی و جلوگیری از عفونت طی ترمیم بافت به داربست افزوده شد. نتایج این مطالعه در نمونه‌های فاقد دارو نشان می‌دهد که افزودن نانوذرات تیتانیا و بیوگلاس سبب افزایش آب‌دوستی پلیمر می‌شود و میزان زنده‌ماندن سلول‌ها در ۲۴ ساعت قابل قبول بوده است. اما این نتایج در تطابق با پژوهش‌های پیشین و موید این مطلب است که افزودن نانوذرات تیتانیا و ذرات بیوگلاس سبب افزایش آب‌دوستی پلی‌کاپرولاکتون و بهبود خاصیت زیست‌فعالی داربست‌های کامپوزیتی می‌شود[24-29]. اما در داربست‌های حاوی دارو کاهش قابل توجه زنده‌ماندن سلول‌ها به‌خصوص در نمونه‌های پلی‌کاپرولاکتونی مشاهده شده است که به نظر می‌رسد ناشی از رهایش انفجاری دارو از این داربست‌ها باشد. پلی‌کاپرولاکتون یک پلی‌آلفااستر با طبیعت آب‌گریز با زاویه

ترشوندگی ۸۰ درجه است[24]، در حالی که آنتی‌بیوتیک تتراسایکلین هیدروکلراید دارای طبیعت آب‌دوست و قابل انحلال در آب است[8]. این تفاوت در میزان آب‌دوستی همان‌طور که در شکل ۱- الف به‌خصوص در غلظت ۱/۱۵ دارو مشاهده می‌شود، سبب عدم توزیع همگن دارو در داربست شد و به تجمع مقادیر قابل توجه دارو بر سطح داربست پلی‌کاپرولاکتونی و به تبع رهایش انفجاری دارو منجر شده است. حال آنکه به‌دلیل باندهای تشکیل‌شده بین ذرات آب‌دوست بیوگلاس و تیتانیا با دارو در داربست‌های کامپوزیتی که در نتایج آنالیز FTIR نشان داده شده است (نمودار ۱)، انتظار می‌رود چنین رهایش انفجاری در نمونه‌های کامپوزیتی رخ نداده باشد و بنابراین روند رهایش دارو کنترل‌شده‌تر بوده است. به این ترتیب به نظر می‌رسد علت کاهش میزان زنده‌ماندن سلول‌ها در مجاورت عصاره نمونه‌های پلی‌کاپرولاکتونی حاوی ۱/۱۵میلی‌گرم بر میلی‌لیتر دارو در مقایسه با نمونه‌های کامپوزیتی حاوی دارو رهایش انفجاری دارو و سمیت ناشی از آن باشد. همچنین نتایج آزمون همولیز نیز نشان می‌دهد که افزودن دارو سبب کاهش در میزان خون‌سازگاری شده است به‌طوری که بیشترین میزان همولیز در نمونه پلی‌کاپرولاکتونی حاوی ۱/۱۵میلی‌گرم بر میلی‌لیتر دارو قابل مشاهده است. این امر نیز در تطابق با نتایج آزمون MTT و موید رهایش انفجاری دارو از داربست پلی‌کاپرولاکتونی است.

با بررسی نتایج آزمون تعیین خواص آنتی‌باکتریایی بر دو سویه مختلف، به نظر می‌رسد که اثر این دارو بر باکتری گرم مثبت *استافیلوکوکوس اورئوس* بیشتر از باکتری گرم منفی *اشریشیا کلی* باشد که این نتیجه در تطابق با برخی گزارش‌های دیگر است[17, 30, 31]. ضخامت دیواره باکتری *اشریشیا کلی* حدود ۷ تا ۸نانومتر و در مورد *استافیلوکوکوس اورئوس* بین ۲۰ تا ۸۰نانومتر است. اگرچه بر این اساس انتظار می‌رود که باکتری‌های گرم منفی به‌دلیل دیواره سلولی نازک‌تر به عوامل آنتی‌باکتریایی نظیر آنتی‌بیوتیک‌های طبیعی و سنتزی حساس‌تر باشند[26] بر اساس گزارش‌های قبلی[17, 30] به نظر می‌رسد به‌دلیل مقاومت ذاتی باکتری گرم منفی *اشریشیا کلی* و طبیعت داروی تتراسایکلین، دیواره باکتری گرم مثبت *استافیلوکوکوس اورئوس* در مقایسه با سویه گرم منفی *اشریشیا کلی*، به بسیاری از آنتی‌بیوتیک‌ها و مواد شیمیایی دارای خواص آنتی‌باکتریایی حساس‌تر است. مقاومت نسبی ذاتی *اشریشیا کلی* ناشی از لایه لیپوساکاریدی و فضای پری‌پلاسمی آن است[31].

نتیجه‌گیری

مقایسه اثر غلظت دارو بر خاصیت آنتی‌باکتریایی نمونه‌ها نشان می‌دهد که اگرچه غلظت داروی بیشتر در هر دو سویه باکتری سبب افزایش خاصیت آنتی‌باکتریایی شده است اما با درنظرگرفتن نتایج سمیت‌سنجی نمونه‌های حاوی دارو در سه غلظت مختلف به نظر می‌رسد غلظت ۰/۵۷میلی‌گرم بر میلی‌لیتر مناسب‌تر است که این نتیجه در تطابق با نتایج گزارش‌شده توسط *شاو* و همکاران[14] در مطالعه غشاهای سلولزی حاوی تتراسایکلین است. بنابراین با درنظرگرفتن هر دو معیار فوق می‌توان نتیجه‌گیری کرد که داربست کامپوزیتی تیتانیا حاوی ۰/۵۷میلی‌گرم دارو در مقایسه با سایر نمونه‌های مورد بررسی از نظر میزان زنده‌ماندن سلول‌ها و اثر آنتی‌باکتریایی دارای خواص مطلوب‌تری است و می‌تواند به‌عنوان گزینه بالقوه برای ساخت داربست‌های مهندسی بافت با خاصیت آنتی‌باکتریایی مورد توجه قرار گیرد.

تشکر و قدردانی: نویسندگان از معاونت محترم پژوهشی دانشگاه تربیت مدرس برای تامین امکانات لازم برای انجام این مطالعه قدردانی می‌کنند.

تاییدیه‌اخلاقی: کلیه مراحل آزمون‌های زیستی با رعایت ضوابط و مقررات کمیته اخلاق دانشگاه تربیت مدرس انجام شده است.

تعارض منافع: هیچ‌گونه تعارض منافعی وجود ندارد.

سهم نویسندگان: مهسا بهلولی (نویسنده اول)، نگارنده مقدمه/پژوهشگر اصلی (۲۵%)؛ الناز تمجید (نویسنده دوم)، نگارنده مقدمه/پژوهشگر اصلی/تحلیلگر آماری/نگارنده بحث (۲۵%)؛ سهیلا محمدی (نویسنده سوم)، پژوهشگر کمکی/تحلیلگر آماری (۲۵%)؛ مریم نیکخواه (نویسنده چهارم)، روش‌شناس (۲۵%)

منابع مالی: مطالعه حاضر فاقد هرگونه حمایت مالی از خارج دانشگاه بوده است.

منابع

1- Mouriño V, Boccaccini AR. Bone tissue engineering therapeutics: Controlled drug delivery in three-dimensional scaffolds. J R Soc Interface. 2010;7(43):209-27.
2- Tamjid E, Bagheri R, Vossoughi M, Simchi A. Effect of TiO2 morphology on in vitro bioactivity of polycaprolactone/TiO2 nanocomposites. Mater Lett. 2011;65(15-16):2530-3.
3- Park SA, Lee SJ, Seok JM, Lee JH, Kim WD, Kwon IK. Fabrication of 3D printed PCL/PEG polyblend scaffold using rapid prototyping system for bone tissue engineering application. J Bionic Eng. 2018;15(3):435-42.
4- Ma J, Lin L, Zuo Y, Zou Q, Ren X, Li J, et al. Modification of 3D printed PCL scaffolds by PVAc and HA to enhance cytocompatibility and osteogenesis. RSC Adv. 2019;9(10):5338-46.
5- Chellamani KP, Balaji RV, Sudharsan J. Antibacterial properties of allopathic drug loaded polycaprolactone nanomembrane. J Acad Ind Res. 2013;2(6):341-4.
6- Rezwan K, Chen QZ, Blaker JJ, Boccaccini AR. Biodegradable and bioactive porous polymer/inorganic composite scaffolds for bone tissue engineering. Biomaterials. 2006;27(18):3413-31.
7- Hench LL. The story of Bioglass®. J Mater Sci Mater Med. 2006;17(11):967-78.
8- Demers P, Fraser D, Goldbloom RB, Haworth JC, LaRochelle J, MacLean R, et al. Effects of tetracyclines on skeletal growth and dentition. A report by the Nutrition Committee of the Canadian Paediatric Society. Can Med Assoc J. 1968;99(17):849-54.
9- Chanavaz M. Maxillary sinus: Anatomy, physiology, surgery, and bone grafting related to implantology-eleven years of surgical experience (1979-1990). J Oral Implantol. 1990;16(3):199-209.
10- Kim J, Park SA, Kim J, Lee J. Fabrication and characterization of bioresorbable drug-coated porous

22- El Badry KM, Moustaffa FA, Azooz MA, El Batal FH. Infrared absorption spectroscopy of some bio-glasses before and after immersion in various solutions. Indian J Pure Appl Phys. 2000;38(11):741-61.
23- Kim JH, Lee OJ, Sheikh FA, Ju HW, Moon BM, Park HJ, et al. Fabrication and characterization of PCL/TiO2 nanoparticle 3D scaffold. Polym Korea. 2014;38(2):150-5. [Korean]
24- Tamjid E, Simchi A, Dunlop JW, Fratzl P, Bagheri R, Vossoughi M. Tissue growth into three-dimensional composite scaffolds with controlled micro-features and nanotopographical surfaces. J Biomed Mater Res Part A. 2013;101(10):2796-807.
25- Mavis B, Demirtaş TT, Gümüşderelioğlu M, Gündüz G, Çolak Ü. Synthesis, characterization and osteoblastic activity of polycaprolactone nanofibers coated with biomimetic calcium phosphate. Acta Biomater. 2009;5(8):3098-111.
26- Boccaccini AR, Blaker JJ, Maquet V, Chung W, Jérôme R, Nazhat SN. Poly (d, l-lactide)(PDLLA) foams with TiO 2 nanoparticles and PDLLA/TiO 2-Bioglass® foam composites for tissue engineering scaffolds. J Mater Sci. 2006;41(13):3999-4008.
27- Tamjid E, Bagheri R, Vossoughi M, Simchi A. Effect of particle size on the in vitro bioactivity, hydrophilicity and mechanical properties of bioactive glass-reinforced polycaprolactone composites. Mater Sci Eng C. 2011;31(7):1526-33.
28- Bahniuk MS, Pirayesh H, Singh HD, Nychka JA, Unsworth LD. Bioactive glass 45S5 powders: Effect of synthesis route and resultant surface chemistry and crystallinity on protein adsorption from human plasma. Biointerphases. 2012;7(1-4):41.
29- Radda'a NS, Goldmann WH, Detsch R, Roether JA, Cordero-Arias L, Virtanen S, et al. Electrophoretic deposition of tetracycline hydrochloride loaded halloysite nanotubes chitosan/bioactive glass composite coatings for orthopedic implants. Surf Coat Technol. 2017;327:146-57.
30- Koohsari H, Ghaemi EA, Sheshpoli MS, Jahedi M, Zahiri M. The investigation of antibacterial activity of selected native plants from north of Iran. J Med Life. 2015;8(Spec Iss 2):38-42.
31- Goy RC, Morais ST, Assis OB. Evaluation of the antimicrobial activity of chitosan and its quaternized derivative on E. coli and S. aureus growth. Revista Brasileira De Farmacognosia. 2016;26(1):122-7.
scaffolds for vascular tissue engineering. Materials. 2019;12(9):1438-47.
11- Goodson JM, Holborow D, Dunn RL, Hogan P, Dunham S. Monolithic tetracycline-containing fibers for controlled delivery to periodontal pockets. J Periodontol. 1983;54(10):575-9.
12- Chahal GS, Chhina K, Chhabra V, Bhatnagar R, Chahal A. Effect of citric acid, tetracycline, and doxycycline on instrumented periodontally involved root surfaces: A SEM study. J Indian Soc Periodontol. 2014;18(1):32-7.
13- Ranjbar-Mohammadi M, Zamani M, Prabhakaran MP, Hajir Bahrami S, Ramakrishna S. Electrospinning of PLGA/gum tragacanth nanofibers containing tetracycline hydrochloride for periodontal regeneration. Mater Sci Eng C. 2016;58:521-31.
14- Reichert JC, Saifzadeh S, Wullschleger ME, Epari DR, Schütz MA, Duda GN, et al. The challenge of establishing preclinical models for segmental bone defect research. Biomaterials. 2009;30(12):2149-63.
15- Kim HW, Knowles JC, Kim HE. Hydroxyapatite/poly (ε-caprolactone) composite coatings on hydroxyapatite porous bone scaffold for drug delivery. Biomaterials. 2004;25(7-8):1279-87.
16- Khodir WW, Guarino V, Alvarez-Perez MA, Cafiero C, Ambrosio L. Trapping tetracycline-loaded nanoparticles into polycaprolactone fiber networks for periodontal regeneration therapy. J Bioact Compat Polym. 2013;28(3):258-73.
17- Shao W, Liu H, Wang Sh, Wu J, Huang M, Min H, et al. Controlled release and antibacterial activity of tetracycline hydrochloride-loaded bacterial cellulose composite membranes. Carbohydr Polym. 2016;145:114-20.
18- Trousdale WH, Salib CG, Reina N, Lewallen EA, Viste A, Berry DJ, et al. A drug eluting scaffold for the treatment of arthrofibrosis. Tissue Eng Part C Methods. 2018;24(9):514-23.
19- Palamà IE, Arcadio V, D'Amone S, Biasiucci M, Gigli G, Cortese B. Therapeutic PCL scaffold for reparation of resected osteosarcoma defect. Sci Rep. 2017;7(1):12672.
20- Polish Committee for Standardization. Biological evaluation of medical devices-Part 5: Tests for in vitro cytotoxicity, (ISO 10993-5:2009), part 5. Warsaw: Polish Committee for Standardization; 2009.
21- Balouiri M, Sadiki M, Ibnsouda SK. Methods for in vitro evaluating antimicrobial activity: A review. J Pharm Anal. 2016;6(2):71-9.