



ساخت و مشخصه‌یابی داربست نانوکامپوزیتی فیبرین و نانوذرات شیشه زیست‌فعال به منظور کاربرد در مهندسی بافت استخوان

علی رضا نوری^{۱،۲*}، سید جمال اشرفی^۲، زهرا محمدی^۲، جواد محمد نژاد آروق^۲، عبدالرضا شیخ مهدی مسگر^{۲،*}

^۱ گروه مهندسی بافت و علوم سلولی کاربردی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی سمنان، سمنان، ایران

^۲ گروه مهندسی علوم زیستی، دانشکده علوم و فنون نوین، دانشگاه تهران، تهران، ایران

^۳ گروه نانوتکنولوژی در پزشکی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی شاهرود، شاهرود، ایران

*نویسنده‌ی مسئول: علی رضا نوری، گروه مهندسی بافت و علوم سلولی کاربردی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی سمنان، سمنان، ایران؛ گروه

مهندسی علوم زیستی، دانشکده علوم و فنون نوین، دانشگاه تهران، تهران، ایران. تلفن: ۰۹۱۸۸۱۵۵۲۴۳

پست الکترونیکی: alireza.noori@semums.ac.ir

*نویسنده‌ی مسئول: عبدالرضا شیخ مهدی مسگر، گروه مهندسی علوم زیستی، دانشکده علوم و فنون نوین، دانشگاه تهران، تهران، ایران. تلفن: ۰۹۱۲۲۱۱۴۹۱۵

پست الکترونیکی: asmesgar@ut.ac.ir

دریافت: ۱۴۰۲/۰۸/۱۳ پذیرش: ۱۴۰۳/۰۳/۱۲

چکیده

مقدمه: مهندسی بافت استخوان یکی از راهبردهای نوظهوری است که با هدف ترمیم استخوان ناحیه آسیب‌دیده بدون برانگیختن واکنش ایمنی نامطلوب گسترش یافته است. در این زمینه، ضروری است که داربست مهندسی بافت تا حد ممکن به بافت استخوان طبیعی شبیه باشد. از آن‌جا که استخوان از منظر علم مواد نانوکامپوزیتی از جنس هیدروکسی آپاتیت و کلاژن است، ساخت داربست‌های نانوکامپوزیتی به عنوان گزینه‌ای ایده‌آل برای ترمیم بافت استخوانی مورد توجه محققان قرار گرفته است. این مواد کامپوزیتی در بسیاری از موارد شامل یک فاز معدنی زیست‌فعال و یک فاز پلیمری زیست‌تخریب‌پذیر هستند.

اهداف: هدف از مطالعه کنونی ساخت و مشخصه‌یابی یک داربست کامپوزیتی جدید برای کاربردهای مهندسی بافت استخوان، با استفاده از نانوذرات شیشه‌ای زیست‌فعال (nBG) و فیبرین بود.

مواد و روش‌ها: نانوذرات شیشه‌ای زیست‌فعال مورد استفاده در این مطالعه بر اساس سیستم ترکیب شیمیایی 70:30:CaO-SiO₂ بود که با روش سل ژل سنتز شد. آنالیز میکروسکوپ الکترونی روبشی، بلورنگاری پرتوی ایکس و طیف‌سنجی تبدیل فوریه فروسرخ برای مشخصه‌یابی نانوذرات ساخته شده به کار گرفته شد. از سوی دیگر، کل خون کیسه خون دو بار در 3000 × g سانتریفیوژ شد تا پلاسما از خون جدا شده و طی مراحل بعدی فیبرینوژن و ترومبین از پلاسما عاری از پلاکت جدا شود. سپس این اجزا با nBG مخلوط شد تا یک داربست کامپوزیتی قابل تزریق ایجاد شود. مشخصه‌یابی فیزیکی-شیمیایی مانند تخریب پذیری و سرعت تشکیل لخته بر روی کامپوزیت انجام شد. بعلاوه، با استفاده از رده سلول‌های شبه استئوبلاست انسانی (رده سلولی G-292) زیست‌سازگاری داربست بررسی شد و با تست MTT میزان تکثیر سلول‌ها و تست فعالیت آلکالین فسفاتاز، تمایز سلول‌ها سنجیده شد.

نتایج: در مورد نانو ذرات شیشه زیست‌فعال، آنالیز میکروسکوپی تشکیل نانوذرات کروی شکلی را تایید کرد که ۵۰ الی ۱۱۰ نانومتر قطر داشتند. آنالیز بلورنگاری پرتوی ایکس ماهیت غیربلورین آن را نشان داد و طیف‌سنجی تبدیل فوریه فروسرخ وجود گروه‌های عاملی Si-O-Si و O-H را به اثبات رساند. بررسی‌های انجام‌شده بر روی کامپوزیت فیبرین و نانوذرات شیشه زیست‌فعال نشان داد که افزودن nBG به هیدروژل فیبرین پایداری آن را بهبود بخشیده و نرخ تخریب داربست را تا حدود ۴۰ درصد آهسته‌تر می‌نماید. کشت سلول‌های G-292 نشان داد که گنجاندن nBG در هیدروژل فیبرین، تکثیر سلولی را تا حدود ۱۵۰ درصد و فعالیت آلکالین فسفاتاز آن‌ها را هم تا حدود ۴۵ درصد افزایش می‌دهد.

نتیجه‌گیری: گرچه کاربرد ژل فیبرین در مهندسی بافت استخوان امری متداول است، اما یافته‌های ما نشان داد که ترکیب آن با نانوذرات شیشه زیست‌فعال، سودمندی آن در ترمیم استخوان آسیب‌دیده را بیش از پیش افزایش می‌دهد.

واژگان کلیدی: مهندسی بافت استخوان، فیبرینوژن، ترومبین، فیبرین، نانوذرات شیشه زیست‌فعال

۱. مقدمه

شکستگی‌های استخوان یک چالش پیش روی سلامتی انسان در تمام دنیا است که از جنبه‌های مختلف اقتصادی، اجتماعی و روانی فرد و جامعه را تحت تاثیر قرار میدهد (۱، ۲). راهبردهای متداول فعلی درمان آسیب‌های استخوانی از جمله پیوندهای اتوگرفت و آلوگرفت، علی‌رغم مزایایی که دارند با چالش‌هایی مانند امکان بروز عارضه در محل برداشت استخوان، محدودیت در میزان استخوان قابل برداشت و کیفیت غالباً نامناسب استخوان بیماران و سالخوردگان در اتوگرفت و امکان انتقال بیماری، ایجاد پاسخ ایمنی و فقدان سلول‌های زنده در پیوند آلوگرفت روبرو هستند (۳، ۴). بنابر محدودیت‌های ذکر شده، مهندسی بافت استخوان به عنوان یک رویکرد جدید با هدف غلبه بر چالش‌های مذکور مورد توجه قرار گرفته است (۵، ۶). به طور کلی، مهندسی بافت استخوان از اجزای داربست، سلول و فاکتور رشد برای ترمیم و بازسازی نقایص استخوانی بهره می‌گیرد. سلول‌ها به عنوان واحدهای اصلی سازنده بافت، نقش مهمی در ترمیم و بازسازی بافت آسیب‌دیده ایفا میکنند. داربست ساختاری را فراهم میکند که سلول‌ها در آن رشد و تمایز یابند و فاکتورهای رشد فعل و انفعالات سلولی را به نحو مطلوب راهبری می‌نمایند (۷).

یک شاخه مهم از مهندسی بافت استخوان، طراحی، ساخت و مشخصه‌یابی داربست‌هایی است که عمل ترمیم را تسهیل نموده و سرعت بخشند. مواد مورد استفاده در ساخت داربست استخوان، گستره وسیعی از پلیمرها، سرامیک‌ها، فلزات و کامپوزیت آن‌ها را در برمی‌گیرد. در این میان و به تقلید از ساختار طبیعی استخوان (استخوان متشکل از کامپوزیتی از سرامیک هیدروکسی آپاتیت و پلیمر کلاژن است)، استفاده از داربست‌های کامپوزیتی که در آن نانو ذرات سرامیکی در رشته‌های پلیمری پراکنده شده‌اند بر دیگر مواد ارجحیت دارد (۸).

در بین مواد سرامیکی، شیشه زیست‌فعال (bioactive glasses) با خواص منحصر به فردی همچون زیست‌سازگاری، زیست‌فعالی بالا، تحریک استخوان‌سازی و رگ‌سازی و قابلیت تغییر در ترکیب به منظور دستیابی به خواصی همچون آنتی‌باکتریال و... جایگاه ویژه‌ای دارد (۹، ۱۰). تحقیقات آزمایشگاهی و درون تنی نشان از برتری شیشه‌های زیست‌فعال بر دیگر سرامیک‌های زیست‌فعال، مانند هیدروکسی آپاتیت، دارد چرا که آهنگ تشکیل استخوان در این نوع سرامیک‌ها از بقیه سریعتر است (۱۱، ۱۲). اگر چه اکثر مطالعات انجام‌شده بر روی شیشه‌های زیست‌فعال، ذراتی با ابعاد میکرو را در نظر گرفته، توجه روزافزونی در

بین محققان برای استفاده از نانوذرات دیده می‌شود. در واقع انتظار می‌رود که این نانوذرات با در اختیار گذاشتن سطح ویژه تماس بالاتر، منجر به بهبود خواص و عملکرد شیشه‌های زیست‌فعال میکرونی متداول شوند. سطح ویژه بالاتر از طرفی آهنگ حل‌شوندگی و آزاد شدن یون‌ها از شیشه‌ها را زیاد می‌کند و از طرف دیگر جذب پروتئین‌ها بر روی زیست‌ماده را افزایش می‌بخشد که هر دوی این امور منجر به افزایش زیست‌فعالی می‌شود (۱۳، ۱۴).

از طرف دیگر، زیست‌پلیمر فیبرین (Fibrin) از خون خود فرد بیمار هم می‌تواند به دست آید و بنابراین به عنوان محصولی زیست‌سازگار، ارزان‌قیمت و با قابلیت دسترسی فراوان توجه محققان را به خود جلب کرده است (۱۵، ۱۶). فیبرین زیست‌پلیمری طبیعی است که طی فرایند انعقاد، از کراس‌لینک کردن فیبرینوژن (Fibrinogen) توسط ترومبین (Thrombin) به دست می‌آید. اولین کارکرد فیبرین در فرایند انعقاد و ترمیم زخم، بندآوری خون در محل آسیب است. بعد از دستیابی به این مورد، فیبرین در محل آسیب به مثابه داربستی موقتی عمل کرده که فرایند ترمیم بافت را شروع و آن‌گاه حمایت میکند. در واقع فیبرین داربستی را برای مهاجرت، چسبندگی و تکثیر سلول‌های درگیر در فرایند ترمیم زخم فراهم می‌کند (۱۷). با این وجود هیدروژل فیبرینی به تنهایی هادی یا القاکننده رشد استخوان نیست و این خاصیت باید به طریقی در آن تقویت شود (۱۸)؛ چرا که در بسیاری از موارد، درمان آسیب استخوانی با فیبرین تنها عملاً فرق چندانی با گروه درمان‌نشده ندارد (۱۹). راهبردهای گوناگونی برای ارتقا خاصیت استخوان‌سازی فیبرین انجام شده است که به عنوان نمونه میتوان به افزودن سلول‌های استخوان‌ساز و فاکتورهای رشد به فیبرین اشاره کرد (۱۵). افزودن سرامیک‌های زیست‌فعال به فیبرین هم یک راه‌حل مورد توجه محققان بوده است. این سرامیک‌ها پس از قرارگیری در بدن با سیال فیزیولوژیک واکنش داده و پیوند محکمی را با استخوان اطراف از طریق به هم پیوستگی رشته‌های کلاژنی با سطح سرامیک‌ها به وجود می‌آورد (۱۰). در این زمینه Zhao و همکاران گزارش کردند که افزودن نانوذرات بتاتری کلسیم فسفات به فیبرین، تکثیر و تمایز سلول‌های بنیادی مزانشیمال را افزایش می‌دهد (۲۰). در مورد دیگری Osathanon و همکاران تاثیر نانو هیدروکسی آپاتیت بر استخوان‌سازی داربست فیبرینی را مورد بررسی قرار دادند و مشاهده نمودند که بیان ژن‌های استئوبلاستی و میزان استخوان‌سازی در آهیانه موش نسبت به گروه فیبرین تنها،

افزایش معنی‌داری پیدا کرد (۲۱).

با این وجود، داربست کامپوزیتی که در آن نانوذرات شیشه زیست‌فعال در بستری از فیبرینی که از خون تک‌واحدی به‌دست آمده، پراکنده شده باشد کمتر مورد بررسی قرار گرفته است. مزیت مهم خون تک‌واحدی آن است که می‌تواند از خون خود بیمار هم تهیه شده و به عنوان منبعی ارزان و ایمن برای تهیه فیبرینوژن و ترومبین مورد استفاده قرار بگیرد. لذا در این مطالعه پس از تهیه و مشخصه‌یابی اجزای سرامیکی و پلیمری، کامپوزیت فیبرین/نانو ذرات شیشه زیست‌فعال ساخته شد. ارزیابی‌های ساختاری، فیزیکی و زیستی انجام شده بر روی داربست نشان داد که کامپوزیت فیبرین/نانو ذرات شیشه زیست‌فعال قابلیت کاربرد در آسیب‌های استخوانی، به خصوص در مناطقی از بدن که تحت اعمال بار مکانیکی نیستند را دارد.

۲. مواد و روش‌ها

۱.۲. سنتز نانوذرات

برای سنتز نانو ذرات شیشه زیست‌فعال از روش Wei Xia و همکاران استفاده شد (۲۲). تمامی پیشسازها و محلول‌های لازم از شرکت مرک آلمان خریداری شدند. شیشه با ترکیب $\text{SiO}_2:\text{CaO}:70:30$ (بر اساس درصد مولی) مد نظر بود. ابتدا $28/7$ میلی‌لیتر تترا اتیل اورتوسیلیکات (Tetraethyl orthosilicate: TEOS) به همراه $3/7$ میلی‌لیتر محلول نیتریک اسید و $18/5$ میلی‌لیتر آب مقطر در $66/5$ میلی‌لیتر اتانول حل شد. محلول حاصل بر روی همزن مغناطیسی قرار گرفته و به مدت ۴۵ دقیقه با سرعت متوسط و در دمای اتاق مخلوط شد تا هیدرولیز TEOS در محیط اسیدی به خوبی انجام گیرد. پس از آن، کلسیم نترات به سل سیلیکاتی حاصله اضافه گشته و هم زدن تا به دست آمدن محلولی شفاف ادامه یافت. در مرحله بعد، $13/3$ میلی‌لیتر آمونیاک ۱ مولار را قطره‌قطره به محلول در حال هم خوردن اضافه کرده تا ژل مطلوب در عرض چند دقیقه به دست آید. پس از تشکیل ژل، آن را به مدت ۳۶ ساعت در دمای ۷۵ درجه سانتیگراد قرار داده تا آب و اتانول موجود در آن تبخیر شود. در پایان نانوذرات به‌دست آمده، به مدت ۲ ساعت در کوره حرارتی با دمای ۷۵۰ درجه سانتیگراد و آهنگ حرارت‌دهی ۵ درجه بر دقیقه، کلسینه شدند. پودر حاصله پس از سرد کردن خرد شد.

۲.۲. مشخصه‌یابی نانوذرات شیشه زیست‌فعال

مورفولوژی و ریزساختار نانوذرات سنتز شده به‌وسیله میکروسکوپ الکترونی روبشی بررسی شد. دستگاه مورد

استفاده Hitachi بود که با ولتاژ ۳۰ کیلوولت کار میکرد. توزیع اندازه ذرات به‌دست آمده با نرم‌افزار آنالیز تصویر [Image] انجام گرفت (۲۳). ساختار کریستالی پودرهای ساخته شده به وسیله آنالیز طیف‌سنج پراش پرتو ایکس X-Ray Diffraction Diffraction (XRD) بررسی شد. نوع دستگاه مورد استفاده Phillips بود که با ولتاژ ۴۰ کیلوولت و شدت جریان ۳۰ میلی‌آمپر عمل میکرد. محدوده زاویه مورد اسکن بین ۱۰ و ۱۱۰ درجه انتخاب گردید و اندازه گام برابر $0/02$ درجه و سرعت اسکن ۲ درجه بر دقیقه بود. طیف جذب نانوذرات شیشه زیست‌فعال به وسیله آنالیز طیف‌سنج مادون قرمز تبدیل فوریه Fourier-transform infrared spectroscopy (FTIR) مورد ارزیابی قرار گرفت. برای انجام تست از دستگاه Prekin Elmer Spectrum استفاده شد و محدوده عدد موج بین 400 تا 14000 cm^{-1} در نظر گرفته شد.

ارزیابی زیست‌فعالی نانوذرات سنتز شده بر اساس کار Lee و همکارانش و مبتنی بر غوطه‌وری آن‌ها در محیط کشت، انجام شد (۲۴). ۲۵۰ میلی‌گرم از پودر شیشه، پس از استریل شدن با اتوکلاو، در داخل پلیت ۶ خان‌های حاوی ۵ میلی‌لیتر محیط کشت DMEM با/بدون پروتئین‌های سرم جنین گاوی (Fetal bovine serum :FBS) که با فیلتر $0/22$ میکرون استریل شده بود، غوطه‌ور گشته و پلیت مذکور در انکوباتور ۳۷ درجه سانتیگراد و با رطوبت ۹۰ درصد و فشار دی اکسید کربن ۵ اتمسفر قرار داده شد. پس از ۴ روز، پلیت از انکوباتور بیرون آورده شد و پودرها به وسیله سانتریفیوژ (۱۵ دقیقه با دور $\times 3000\text{ g}$) جدا شده و سه مرتبه با آب مقطر شسته و خشک گردیدند. تشکیل هیدروکسی‌آپاتیت بر سطح نمونه‌ها به وسیله میکروسکوپ الکترونی روبشی مورد بررسی قرار گرفت.

۳.۲. تهیه فیبرینوژن

همانطور که گفته شد، برای ساخت فیبرین ابتدا باید فیبرینوژن و ترومبین را تهیه کرد. فیبرینوژن بر طبق پروتکول Thorn و همکاران به دست آمد (۲۵). نخست کل خون کیسه خون به مدت ۱۵ دقیقه و با دور $\times 3000\text{ g}$ در دمای اتاق سانتریفیوژ شده تا به سه جز پلاسما، سلول‌های خون و لایه مرزی بین این دو تقسیم شود. سپس پلاسما به وسیله پپت جدا شده و به منظور ترسیب فیبرینوژن به هر میلی‌لیتر از آن، ۱۰۰ میکرولیتر اتانول خالص افزوده و پس از کمی هم زدن به مدت ۲۵ الی ۳۰ دقیقه در آب و یخ انکوبه شد. محلول حاصله به مدت ۱۵ دقیقه و این بار در دمای ۰ الی ۴ درجه سانتی‌گراد سانتریفیوژ شد. در پایان این مرحله فیبرینوژن (به همراه پروتئین‌های دیگری مانند فیبرونکتین، آلبومین و...) به شکل رسوب سفید رنگی قابل

نمودار OD بر حسب زمان، تعریف میشود (۲۷).

۲.۶.۲. تخریب پذیری

میزان تخریب و تجزیه شبکه فیبرینی (با یا بدون نانوذرات شیشه زیست‌فعال) در محیط کشت سلول با استفاده از پروتوکل گسترش یافته به وسیله Zhao و همکارانش بررسی شد (۲۷). این روش امکان بررسی نحوه تخریب هیدروژل فیبرینی را در حالت طبیعی خود بدست میدهد. بدین‌منظور فیبرین پس از ژل‌های شدن، در چاهک‌های پلیت ۲۴ خان‌های و حضور ۵۰۰ میکرولیتر از محیط کشت قرار گرفت. ۵ روز بعد محیط کشت از روی داربست‌ها برداشته شد و پروتئین آزاد شده در آن با Nanodrop (Thermo Scientific™ 2000c) تعیین گردید، زیرا گروه عاملی فنیل پروتئین‌ها در ۲۸۰ نانومتر جذب دارد. همچنین جذب محیط کشت کامل (بدون فیبرین) در ۲۸۰ نانومتر اندازه‌گیری شد و مقدار پروتئین‌های موجود در آن کل پروتئین‌ها کسر گردید تا فقط پروتئین‌های حاصل از تخریب فیبرین در محاسبات در نظر گرفته شود.

۳.۶.۲. تست سمیت سلولی

به منظور بررسی رفتار سلول‌ها در کامپوزیت، ابتدا سمیت احتمالی داربست‌ها بر روی سلول‌ها مورد ارزیابی قرار گرفت. نخست همانطور که در بخش‌های قبلی آورده شد، ژل فیبرین-شیشه زیست‌فعال در پلیت ۱۲ خان‌های ساخته و ۱ میلی‌لیتر محیط کشت کامل بر روی آن ریخته شد. سپس پلیت مزبور در انکوباتور قرار گرفته و پس از ۴ روز محیط روئین آن کشیده شده و پس از استریل با فیلتر سرنگی ۰/۲۲ میکرون، عصاره به‌دست آمده تا زمان استفاده در ۴ درجه نگهداری شد. سلول‌های شبه استئوبلاستی رده G-292 خریداری شده از انستیتو پاستور ایران، با دانسیته ۵۰۰۰ سلول بر هر چاهک در پلیت ۹۶ خان‌های ریخته شده و پلیت یک شبانه‌روز در انکوباتور قرار داده شد تا سلول‌ها به کف پلیت بچسبند. پس از آن محیط کشت سلول‌ها با عصاره حاوی محصولات ناشی از انحلال فیبرین تعویض شده، پس از ۲۴ و ۷۲ ساعت سلول‌ها از نظر مورفولوژیکی و تکثیر به ترتیب با میکروسکوپ نوری فاز معکوس و تست MTT (3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide; Sigma, USA) بررسی شد. در نمونه کنترل تست MTT، از محیط کشت معمولی سلول بدون افزودنی استفاده شد. برای انجام این تست، ابتدا ۱۵۰ میکرولیتر محلول MTT با غلظت ۱ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر به چاهک‌ها افزوده و پلیت ۴ ساعت در ۳۷ درجه و با رطوبت نسبی ۹۰ درصد انکوبه گشت. سپس پلیت را بیرون آورده و پس از کشیدن محلول MTT، ۱۰۰ میکرولیتر

مشاهده بود. جز سفیدرنگ به‌وسیله فریز درایر خشک شده و پودر فیبرینوژن حاصل در آب مقطر به میزان یک پنجم حجم اولیه دوباره حل شد.

۴.۲. تهیه ترومبین

برای تهیه ترومبین از پروتوکل Franco و همکاران تغییرات مختصری استفاده شد (۲۶). به‌طور خلاصه، به هر میلی‌لیتر پلاسمای فیلترشده و عاری از پلاکت، ۴۰ میکرولیتر از محلول کلسیم کلرید ۱۰ درصد اضافه شد. در گام بعدی، پلاسمای ۱۵ دقیقه در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد انکوبه‌شده و پس از آن به مدت ۱۰ دقیقه با دور 800 × g و در دمای اتاق سانتریفیوژ گردید. در انتهای این مرحله، پلاسمای فیبرین و پلاسمای غنی از ترومبین تشکیل شده بود که جز اخیر با پیپت به فالكون دیگری منتقل شد. دیالیز مانند محلول فیبرینوژن انجام شد.

۵.۲. تهیه کامپوزیت فیبرین و شیشه زیست‌فعال

فیبرینوژن/ترومبین به نسبت ۵۰/۵۰ درصد حجمی در چاهک‌های پلیت ۲۴ خان‌های ریخته شده، به سرعت و با دقت مخلوط شدند و ژل حاصل به منظور کامل شدن فرایند پلیمریزاسیون در دمای ۳۷ درجه به مدت ۱ ساعت انکوبه گردید. در نمونه‌های حاوی شیشه، ابتدا آگلومره‌های احتمالی نانوذرات به‌وسیله ۳۰ دقیقه اولتراسونیک نمودن در آب مقطر از بین برده شد. سپس از غلظت ۱۰۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر از دوغاب حاصله، ۱۰، ۲۰ و ۳۰ درصد حجمی به محلول ترومبین اضافه شده و در مرحله بعد به همان ترتیب بالا با محلول فیبرینوژن مخلوط گردید. بدین ترتیب کامپوزیت‌هایی حاوی ۵، ۱۰ و ۱۵ درصد حجمی از نانوذرات شیشه زیست‌فعال به‌دست آمد.

۶.۲. مشخصه یابی کامپوزیت

۱.۶.۲. تعیین زمان انعقاد

پس از مخلوط کردن فیبرینوژن (با یا بدون مقادیر مختلفی از نانوذرات شیشه زیست‌فعال) و ترومبین در دمای اتاق، لخته فیبرینی پس از چند دقیقه تشکیل شد. به‌طوری‌که با گذشت زمان محلول سیالیت خود را از دست داده و به هیدروژلی تیره تبدیل شد. خواص ساختاری و قابلیت دستوری هیدروژل تا حد زیادی به زمان تشکیل لخته بستگی دارد. با استفاده از UV-VIS spectrophotometer (Jenway 6405, England) پروسه ژل‌های شدن محلول مانیتور شد. بدین منظور پس از مخلوط کردن اجزا، میزان جذب محلول در طول موج ۵۵۰ نانومتر به وسیله دستگاه اندازه‌گیری شد. زمان انعقاد به عنوان ماکزیمم مشتق

۴۰۵ نانومتر به وسیله microplate reader خوانده شد.

۷.۲. آنالیز آماری

آزمونهای تخریب پذیری و کشت سلولی ۳ مرتبه تکرار شدند و نتایج به صورت میانگین \pm خطای استاندارد ارائه شد. معنی دار بودن آماری اختلاف میانگینها به وسیله آزمون ANOVA یک طرفه یا در مورد تست MTT بر روی عصاره داربستها که پارامترهای تکثیر سلولی و زمان مد نظر بودند به وسیله آزمون ANOVA دوطرفه بررسی شد و برای یافتن تفاوت معنی دار بین گروهها، از آزمون توکی استفاده شد. از نرم افزار SPSS برای انجام آزمونها استفاده شد. مقدار $P < 0/05$ معنادار در نظر گرفته شد. علامت * به معنای $P < 0/05$ و علامت *** به معنای $P < 0/001$ است.

۳. نتایج

۱.۳. ساخت و مشخصه یابی نانوذرات شیشه زیست فعال

در این مطالعه نانوذرات شیشه زیست فعال با روش «سل-ژل سریع به واسطه بازی شدن محلول» سنتز شد (۲۲). تصویر الف ارزیابی طیف جذبی نانوذرات به وسیله FTIR را نشان میدهد. باند 1470-cm را میتوان به پیوند متقارن خمشی Si-O-Si نسبت داد در حالی که باند 1100-cm مربوط به پیوند نامتقارن کششی Si-O-Si است. حضور کاتیون کلسیم در ساختار شبکه، تشکیل باند را از 1-cm 450 در سیلیکای خالص به 1-cm 470 در شیشه دوجزئی تغییر داده است. همچنین باند مشاهده شده در 1-cm 930 را میتوان به پیوند سیلیسیوم با اکسیژن غیر پیوندی SIONBO (non-bonding oxygen, NBO) نسبت داد. بالاخره پیک وسیع 1-cm 3400 در نمودار مربوط به مد کششی O-H است که نشان دهنده رطوبت جذب شده بر روی نانوذرات شیشه زیست فعال است (۲۸). تصویر اب الگوی XRD نانوذرات سنتز شده را نشان میدهد. همانطور که مشاهده میشود ساختار به دست آمده آمورف است و هیچ پیک خاصی که معرف بلورینگی ماده باشد، در نمودار قابل تشخیص نیست (۲۲).

تصویر (۱) مورفولوژی نانو ذرات به دست آمده را نشان میدهد که اغلب ذرات کره‌های شکل بوده و با اندازه زیر 100 نانومتر به صورت آگلومره قابل مشاهده است. آنالیز توزیع اندازه ذرات با استفاده از نرم افزار ImageJ که به صورت اندازه گیری قطر 70 ذره به طور تصادفی انجام گرفت، نشان داد که توزیع اندازه ذرات در بازه 50 الی 110 نانومتر قرار گرفته و متوسط مقدار آن 76 نانومتر بود (تصویر ۱).

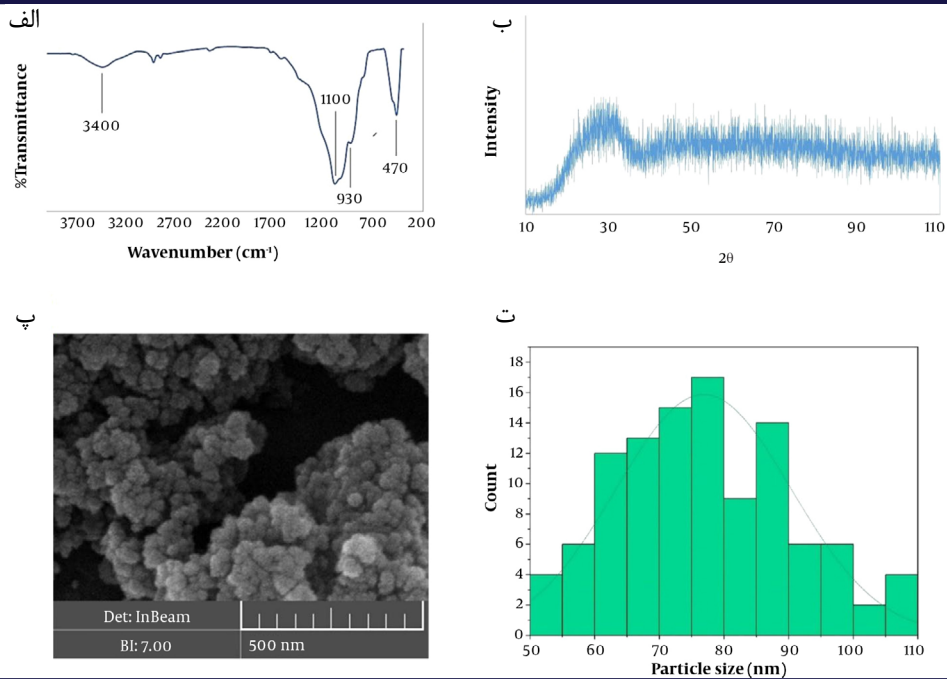
DMSO به چاهکها اضافه شد. فرمازان حل شده به پلیت جدید منتقل و جذبش در 570 نانومتر با (microplate reader (Bio-Tek Instruments, Inc خوانده شد.

۴.۶.۲. تکثیر سلولی

پس از حصول اطمینان از عدم سمیت داربستهای ساخته شده، تکثیر سلولی در درون داربستهای ساخته شده بررسی شد. پس از تهیه سوسپانسیون سلولی با غلظت $10^4 \times 5$ سلول بر میلی لیتر، مقدار 20 میکرولیتر از محیط کشت را به 150 میکرولیتر فیبرینوزن اضافه کرده و پس از چند بار پیمپتاژ به منظور توزیع یکنواخت سلولها در داربست، ترومبین با حجم 150 میکرولیتر به آن افزوده شد (قبل از این مرحله در گروه حاوی نانوذرات شیشه زیست فعال، پس از سونیکت کردن شیشهها در آب مقطر استریل با غلظت 100 میلی گرم بر میلی لیتر، مقدار 15 ، 30 ، 45 میکرولیتر دوغاب شیشه‌ای به ترومبین اضافه شد). با اضافه شدن محلولهای فیبرینوزن و ترومبین به یکدیگر، ژل فیبرین پس از یک ساعت قرارگیری در انکوباتور و دمای 37 درجه سانتیگراد قوام گرفت و آن گاه 1 میلی لیتر محیط کشت کامل بدان اضافه شد. محیط کشت سلولها هر سه یا چهار روز یکبار تعویض شد و سلولها تا زمان معین در انکوباتور قرار داده شد. پس از گذشت 7 روز، تست MTT مشابه با روش ذکر شده در قسمت قبل، انجام شد.

۵.۶.۲. تمایز سلولی

کشت سلولی در این مرحله دقیقاً مشابه با آنچه در قسمت تکثیر سلولی بیان شد، انجام گرفت. پس از گذشت 10 روز از کشت سلولها در داربست فیبرینی، پلت بیرون آورده و محیط رویی آن کشیده شد. سپس ژلها دو مرتبه با آب مقطر شسته شد تا پروتئینهای محیط کشت سلولی بر روی آن باقی نماند. در مرحله بعد ژلها به میکروتیوب منتقل شده و 500 میکرولیتر از محلول تریتون X- 100 (تهیه شده از شرکت مرک آلمان) در آب مقطر (۲ درصد حجمی) بر روی آن ریخته شد. ژل حاوی سلول فریز شده را دوباره در دمای 37 درجه سانتیگراد قرار داده و آن گاه به مدت 30 دقیقه سونیکت شد تا غشای سلولها کاملاً تخریب شده و سنجش آلکالین فسفاتاز (Alkaline phosphatase: ALP) درون سلولی امکان پذیر گردد. محصول به دست آمده 5 دقیقه در دور $1000 \times g$ سانتریفیوژ شده و 50 میکرولیتر از مایع رویی آن با 250 میکرولیتر از معرف نیتروفنیل فسفاتاز (تهیه شده از شرکت پارس آزمون، ایران) مخلوط شد. محلول به دست آمده، چند ساعت در دمای 37 درجه سانتیگراد انکوبه گشت و آن گاه جذب رنگ زرد تولید شده در طول موج

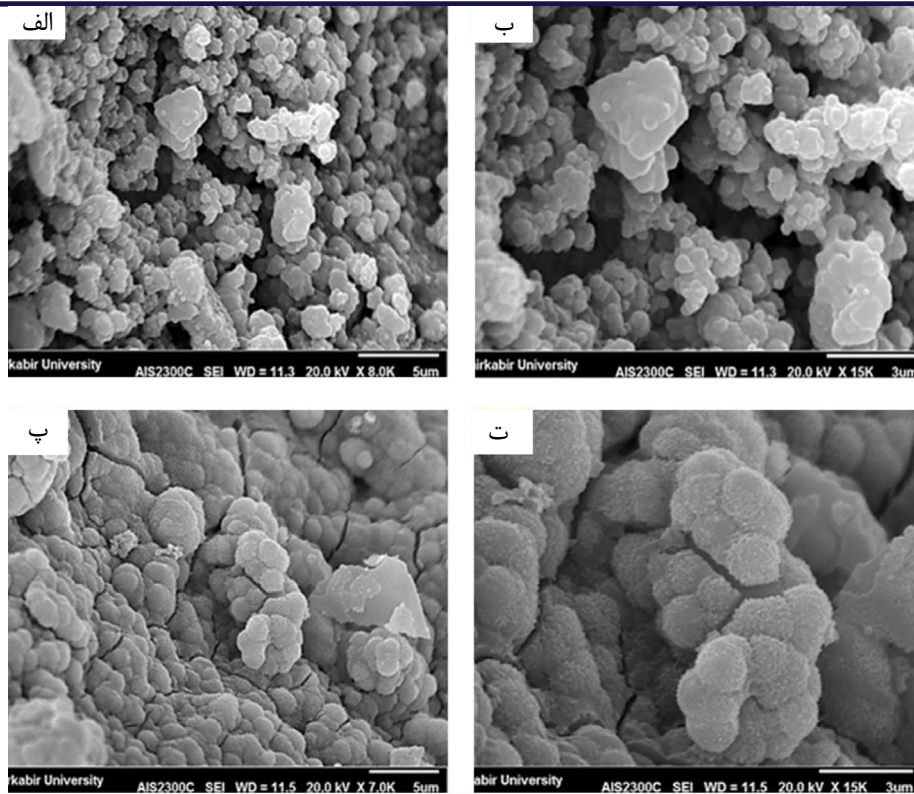


شکل ۱. مشخصه یابی شیشه‌های زیست فعال (الف) طیف FTIR و (ب) نمودار XRD نانوذرات سنتز شده. (پ) تصویر SEM از مورفولوژی و (ت) توزیع اندازه نانوذرات.

۲.۳. ارزیابی زیست‌فعالی نانوذرات شیشه زیست‌فعال

زیست‌فعال در حضور (تصویر ۲ الف و ب) و یا عدم حضور پروتئین (تصویر ۲ پ و ت) بر روی آن‌ها تشکیل می‌شود، هرچند مورفولوژی و اندازه ذرات تشکیل‌شده و همچنین نحوه پوشش سطح تحت تاثیر حضور پروتئین قرار گرفته است.

همانطور که در تصویر ۲ مشاهده می‌شود لایه هیدروکسی‌آپاتیت ۴ روز پس از غوطه‌وری نانوذرات شیشه

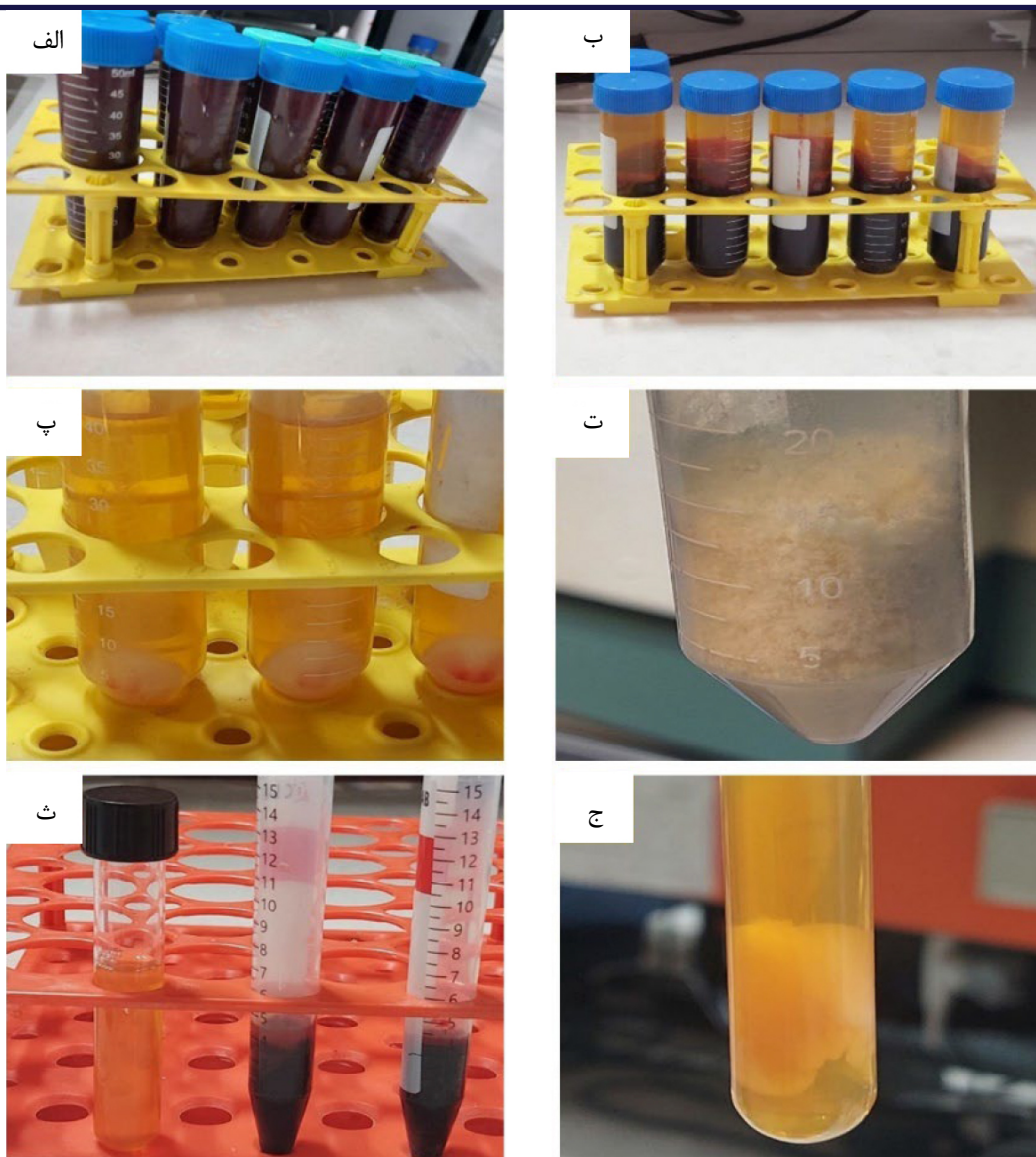


شکل ۲. تشکیل لایه هیدروکسی‌آپاتیت بر روی نانوذرات شیشه زیست فعال در محیط کشت کامل (الف و ب) و محیط کشت بدون پروتئین (پ و ت)

۳.۳. تهیه فیبرین

فریز درایر خشک‌شده و تا زمان مصرف در یخچال نگهداری میشود (تصویر ۳ ت). ترومبین هم پس از اضافه کردن کلسیم کلرید به پلاسما و فعال‌سازی آبشار انعقادی در آن به وجود آمده و جداسازی میشود (تصویر ۳ ج).

مراحل تهیه فیبرینوژن و ترومبین از خون کامل در تصویر ۳ ارائه شده است. جز سفیدرنگ ترسیب‌یافته به‌وسیله اتانول که غنی از پروتئین قابل‌لخته فیبرینوژن است به‌وسیله



شکل ۳. تهیه فیبرینوژن و ترومبین از خون کامل. خون کامل به داخل فالکون‌ها ریخته شده (الف) و سانتریفیوژ می‌شود (ب). فیبرینوژن پلاسما توسط اتانول ترسیب داده شده (پ) و به‌وسیله فریز درای خشک می‌شود (ت) به باقیمانده پلاسما کلسیم کلرید اضافه کرده (ث) و ترومبین اطراف لخته جدا می‌شود (ج)

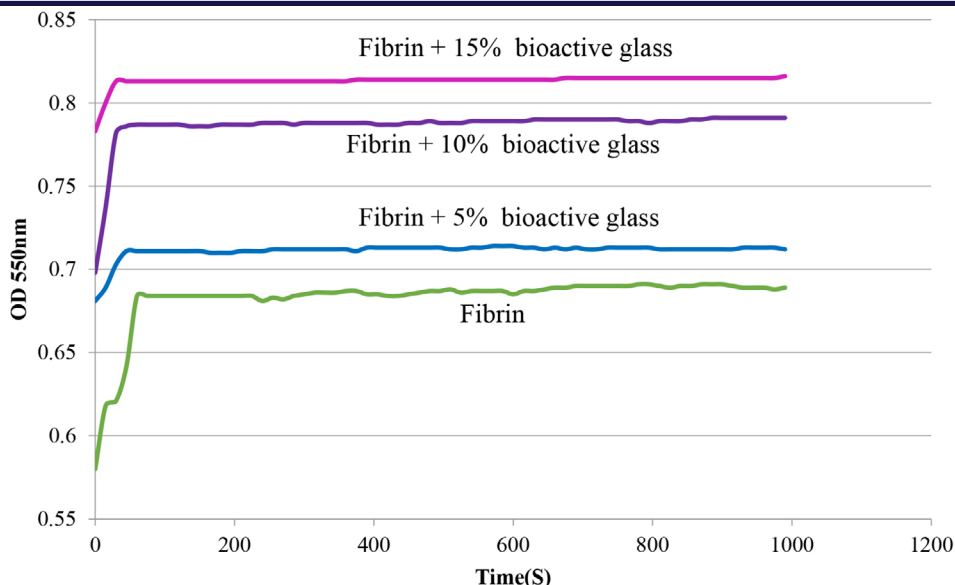
هیدروژل که ارتباط مستقیمی با تیرگی آن دارد در حضور نانوذرات شیشه زیست‌فعال افزایش می‌یابد. با توجه به شکل ۴، زمان تشکیل لخته فیبرینی پس از مخلوط کردن فیبرینوژن و ترومبین ۴۵ ثانیه است. این زمان با افزودن شیشه زیست‌فعال به ترکیب کاهش می‌یابد، به طوری که برای کامپوزیت حاوی ۵ یا ۱۵ درصد نانو پودر زمان ۱۵ ثانیه و برای فیبرین حاوی ۱۰ درصد شیشه زیست‌فعال، زمان انعقاد ۳۰ ثانیه ثبت شد.

۴.۳. داربست فیبرین-شیشه زیست‌فعال

به منظور ساخت داربست، ابتدا هر یک از اجزای آن جداگانه سنتز شد و در مرحله بعد جز شیشه‌ای به محلول ترومبین اضافه‌شده و با فیبرینوژن مخلوط گردید و پس از گذشت چند ثانیه ژل مورد نظر تشکیل شد.

۵.۳. زمان انعقاد

همانگونه که در تصویر ۴ دیده میشود، شدت جذب

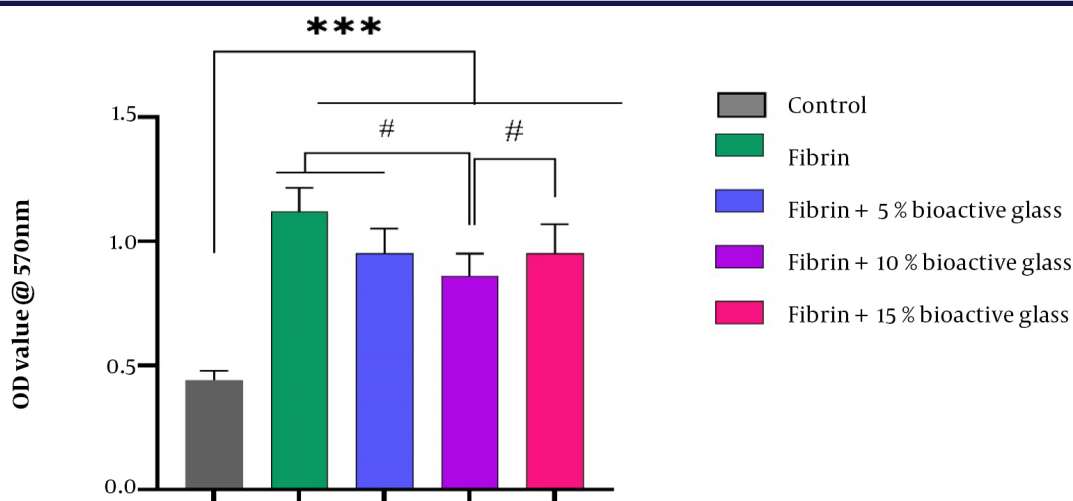


شکل ۴. تصویر. زمان انعقاد داربست‌های فیبرینی در حضور مقادیر متفاوتی از شیشه‌های زیست‌فعال.

۶.۳. تخریب پذیری داربست

گروه‌های داربست سلولی تفاوت بسیار معنی‌داری با گروه کنترل دارد که به روشنی بر حضور محصولات پروتئینی ناشی از تخریب داربست فیبرینی دلالت دارد ($P < 0.001$) در مورد اختلافات درون گروه‌های داربست نکته قابل توجه این است که شدت جذب گروه فیبرینی حاوی ۱۰ درصد شیشه زیست‌فعال به طرز معنی‌داری از دیگر گروه‌ها کمتر است ($P < 0.05$) و سایر موارد اختلافی به لحاظ آماری معنی‌دار نیستند ($P < 0.05$).

آنالیز تخریب داربست ۵ روز پس از قرار گرفتن در محیط کشت سلولی انجام شد و نتایج آن در تصویر ۵ آورده شده است. نمودار مربوط به گروه محیط کشت شدت جذب ۰/۴۴ را نشان می‌دهد و با در نظر داشتن این نکته که هیچ‌گونه داربستی در این گروه وجود نداشته، می‌توان نتیجه گرفت که میزان پروتئین مشاهده‌شده مربوط به محیط کشت سلولی است. از سوی دیگر شدت جذب همه

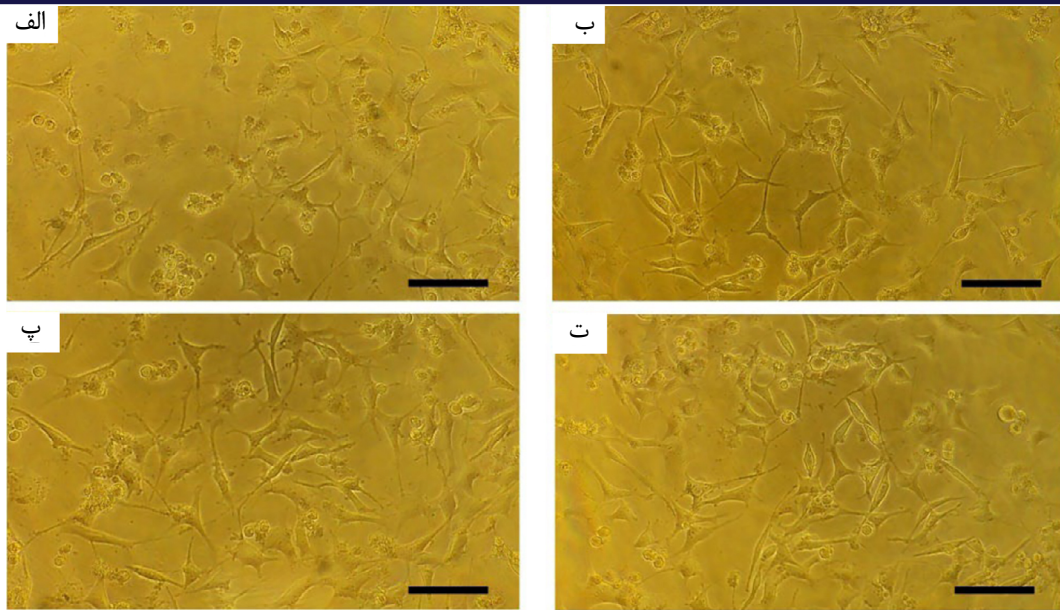


شکل ۵. تخریب پذیری داربست ۵ روز پس از غوطه‌وری در محیط کشت سلولی. علامت # به معنی تفاوت معنی‌دار بین گروه‌های حاوی داربست و محیط کشت کنترل و علامت # به معنی تفاوت معنی‌دار بین خود گروه‌های داربست است.

۷.۳. کشت سلولی

در گروه‌های مختلف ۲۴ ساعت پس از قرارگیری در معرض عصاره داربست‌ها آورده شده است. همانطور که در تصاویر دیده می‌شود، هیچ کدام از داربست‌ها سمیتی از خود بروز ندادند و مورفولوژی همه سلول‌ها طبیعی و دوکی شکل بود.

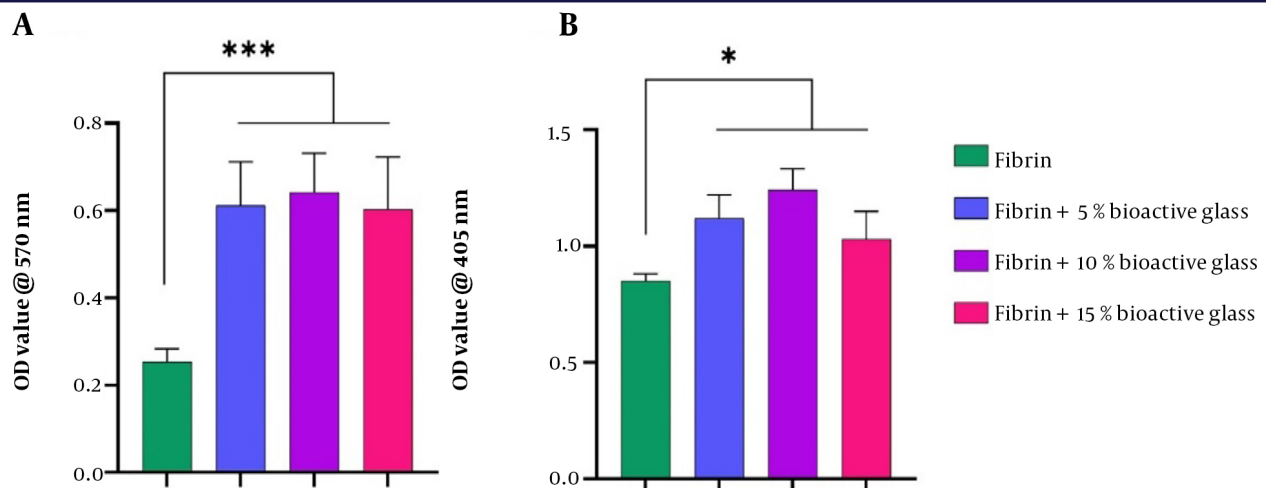
تصویر ۶ یافته‌های تست سمیت سلولی را بر روی عصاره داربست‌ها نشان می‌دهد. در این شکل مورفولوژی سلول‌ها



شکل ۶. مورفولوژی سلول‌های استئوبلاستی ۱ روز پس از قرارگیری در معرض عصاره‌های داربستی: الف) فیبرین، ب) فیبرین-شیشه ۵ درصد، پ) فیبرین-شیشه ۱۰ درصد، ت) فیبرین-شیشه ۱۵ درصد. اندازه \square برابر ۳۰۰ میکرومتر است.

از سوی دیگر، عصاره فیبرینی تاثیر قابل ملاحظه‌ای بر روی رشد و تکثیر سلول‌ها نداشته است اما وجود شیشه‌های زیست‌فعال توانسته است مقداری رشد سلول‌ها را نیز افزایش دهد که این افزایش پس از ۷۲ ساعت در گروه سوم (فیبرین شیشه زیست‌فعال ۱۰ درصد) معنی‌دار نیز شده است ($P < 0/05$).

علاوه بر ارزیابی مورفولوژیکی، از تست MTT به منظور کمی‌سازی رشد سلول‌ها، ۲۴ و ۷۲ ساعت پس از قرارگیری در معرض عصاره‌های گروه‌های مختلف استفاده شد؛ تصویر ۷- به طور کلی، تکثیر سلولی به طور معنی‌داری در روز سوم از روز اول بیشتر است که این امر نشان‌دهنده سلامت شرایط کشت برای رشد سلول-ها است ($P < 0/05$, $1/34f = 0/05$).



شکل ۷. تکثیر سلول‌های G-292 و ۲۴ ساعت پس از قرارگیری در معرض عصاره‌های داربست‌های مختلف. علامت *** به معنای ($P < 0/001$) و اختلاف گروه‌ها با کنترل منفی است و علامت # به معنای $P < 0/05$ بین گروه‌های تیمار است.

۴. بحث

در این تحقیق، برای سنتز نانوذرات شیشه زیست‌فعال از آمونیاک ۱ مولار استفاده شد تا علاوه بر کاهش زمان تشکیل ژل، اندازه ذرات به‌دست آمده ریزتر باشد. زیرا مطالعه Xia و همکارانش نشان داده بود در غلظت ۲ مولار

تصویرهای الف قابلیت تکثیر و ۸ ب تمایز سلول‌های شبه استئوبلاستی را در هیدروژل فیبرینی حاوی مقادیر متفاوتی از نانوذرات شیشه‌زیست‌فعال نشان می‌دهند. این نتایج نشان داد که حضور شیشه‌های زیست‌فعال تکثیر و تمایز سلول‌ها را به نحو معنی‌داری بهبود بخشید ($P < 0/05$), هر چند که تفاوت میان خود گروه‌های حاوی نانوذرات معنی‌دار نبود.

و فعال شدن آبشار انعقادی توسط یون کلسیم و تبدیل پروترومبین به ترومبین حاصل شد (۲۶).

زمان انعقاد (یا زمان ژل‌های شدن) فاکتور مهمی در طراحی داربست‌های تزریق‌پذیر به شمار می‌آید، زیرا ارتباط مستقیمی بین امکان دست‌کاری هیدروژل و زمان انعقاد آن وجود دارد. به عبارت دیگر جراح تا زمانی که محلول به حالت صلب و جامد در نیامده، می‌تواند آن را در محل آسیب دست‌کاری کند. نتایج ما نشان داد که زمان ژل‌های شدن فیبرین با اضافه کردن شیشه زیست‌فعال به آن افزایش می‌یابد (تصویر ۴). این داده‌ها در تقابل با گزارش Zhao و همکارانش قرار می‌گیرد که طبق آن افزودن نانوذرات سرامیکی به فیبرینوژن، موجب به تعویق افتادن زمان انعقاد، شده بود (۲۰). آن‌ها مشاهده خود را این‌گونه تشریح کردند که حضور نانوذرات سرامیکی در محلول فیبرینوژن باعث اختلال در عملکرد ترومبین و عملیات پلیمریزاسیون فیبرین می‌شود. اختلاف موجود بین دو مطالعه را با توجه به تفاوت ماهیت نانوذرات سرامیکی به کار برده شده می‌توان توضیح داد. در واقع خاصیت بندآورندگی خون‌ریزی برای بعضی از ترکیبات شیشه‌های زیست‌فعال به اثبات رسیده است، زیرا شیشه‌ها کاتیون کلسیم که نقش مهمی در فرایند آبشار انعقادی دارد، را آزاد می‌کنند و از طرف دیگر بار منفی SiO_2 فعالیت انعقادی خون را از طریق جذب پلاکت‌ها (که دارای بار مثبت هستند) تسریع می‌بخشد. پس می‌توان نتیجه گرفت که حضور شیشه‌های زیست‌فعال در محلول فیبرینوژن زمان انعقاد و ژل‌های شدن را می‌کاهد (۳۳).

بر طبق داده‌های تصویر ۵ می‌توان نتیجه گرفت که حضور شیشه‌های زیست‌فعال در ساختار هیدروژل‌های فیبرینی، دست کم در بعضی غلظت‌ها، می‌تواند به نحو موثری از تخریب داربست جلوگیری کند. این نتیجه، با یافته‌های دیگر محققان همخوانی دارد. مثلاً El-Fiqi و همکارانش مشاهده نمودند که حضور نانوذرات زیست‌فعال تخریب هیدروژل کلاژنی را به تعویق می‌اندازد (۳۴). آن‌ها دلیل چنین مشاهده‌ای را پیوند شیمیایی میان رشته‌های کلاژنی و نانوذرات و بالتبع تثبیت ساختار هیدروژلی ذکر کرده‌اند. به‌علاوه تجمع نانوذرات بر روی سطح هیدروژل، داربست را از معرض آنزیم‌های مخرب مصون می‌سازد. هر دو احتمال بالا در مورد هیدروژل فیبرینی هم می‌تواند درست باشد. مطالعات نشان داده است که فیبرین در محیط کشت کامل حاوی پروتئین سریع‌تر از محیط کشت معمولی تخریب می‌شود و دلیل آن وجود آنزیم‌های مخرب فیبرین از جمله پلاسمین در FBS ذکر شده است (۲۷). حال ممکن است که در این پژوهش نانوذرات شیشه زیست‌فعال

آمونیاک، ذراتی درشت‌تر از ۱۰۰ نانومتر تشکیل می‌شوند. آنالیز توزیع اندازه ذرات به‌وسیله ImageJ ابعاد نانومتری ذرات را تایید کرد که این مشاهده با یافته‌های دیگر پژوهشگران مطابقت دارد (۲۹).

Kokubo و همکارانش در سال ۱۹۸۷ محلول شبیه‌سازی شده بدن Simulated body solution (SBF) را به‌عنوان جایگزین مناسبی برای ارزیابی‌های درون‌تنی زیست‌مواد ساخته شده معرفی کردند (۳۰). طبق تعریف Kokubo ماده زیست‌فعال ماده‌ای است که پس از غوطه‌وری در محلول شبیه‌سازی شده بدن، لایه‌ای از هیدروکسی آپاتیت بر روی آن تشکیل شود. با این وجود، محققان دیگری نیز بر این باور بودند که بهتر است از محیط کشت سلولی به جای FBS مرسوم برای تست زیست‌فعالی مواد استفاده شود (۲۴). به این ترتیب اولاً پروتئین‌ها، آمینواسیدها، ویتامین‌ها، گلوکز و... در محلول جدید حضور دارند، ثانیاً با گذاشتن محیط کشت در انکوباتور مرطوب، دما و pH محیط به همان نحوی که در بدن تنظیم می‌گردد، کنترل می‌شود. با توجه به مسائل ذکرشده در این پژوهش، محیط کشت در حضور و یا عدم حضور پروتئین به عنوان جایگزین FBS مرسوم انتخاب شد. نتایج تست زیست‌فعالی نشان داد که هیدروکسی آپاتیت بر روی سطح نانوذرات شیشه زیست‌فعال رسوب می‌کند (تصویر ۲-).

مزایای فراوان هیدروژل فیبرینی، آن را به عنوان داربستی ایده‌آل در بسیاری از کاربردهای مهندسی بافت از جمله استخوان مطرح نموده است. به علاوه فیبرین می‌تواند حامل مناسبی برای رهایش کنترل شده و موضعی فاکتورهای رشد گوناگون و یا سلول‌های مختلف در محل آسیب، باشد. تزریق‌پذیری فیبرین علاوه بر کاهش هزینه و عوارض ناشی از جراحی تهاجمی، امکان کاربرد در نقایصی با اشکال پیچیده را به جراح می‌دهد. از آن گذشته، هر دو جز تشکیل‌دهنده فیبرین (فیبرینوژن و ترومبین) به راحتی و طی مدت کوتاهی می‌توانند از خون فرد بیمار به دست آیند (۳۱). چگونگی تهیه اجزای فیبرین از خون در تصویر ۳ آورده شده است. رسوب‌دهی با اتانول روشی بود که در این مطالعه برای جدا کردن فیبرینوژن از پلاسما استفاده شد زیرا فرآیند در مدت زمان کوتاهی انجام‌پذیر است. علاوه بر این بازدهی فرایند به طور قابل توجهی در آن بالاست. Park و همکارانش بیان کردند که اتانول باقیمانده در هنگام بازاحلال فیبرینوژن در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد تبخیر می‌شود. بنابراین حضور اتانول تهدیدی برای زیست‌سازگاری آن به شمار نمی‌آید (۳۲). در این مطالعه، ترومبین هم مانند فیبرینوژن از منبع تک‌واحدی به‌دست آمد. این امر با افزودن کلسیم کلرید به پلاسما

زیست‌فعال و فیبرین برای کاربرد در مهندسی بافت استخوان ساخته شد. نتایج نشان داد که افزودن شیشه زیست‌فعال به فیبرین، موجب کاهش زمان انعقاد و نرخ تخریب آن شد. به‌علاوه داربست‌های مذکور کاملاً زیست‌سازگار بوده و هیچ نشانی از سمیت نشان نداد. از سوی دیگر، افزودن شیشه زیست‌فعال به فیبرین موجب ارتقای خواص زیستی آن از جمله تکثیر و تمایز سلولی گردید. با در نظر داشتن موارد فوق به نظر می‌رسد کامپوزیت فیبرین/شیشه زیست‌فعال داربست مناسبی برای کاربرد در مهندسی بافت استخوان باشد.

تشکر و قدردانی:

مقاله بالا، از پایان‌نامه کارشناسی ارشد با عنوان «تهیه مشخصه‌یابی و ارزیابی عملکرد زیستی بیوکامپوزیت فیبرین نانو ساختارهای شیشه‌های به‌عنوان جایگزین استخوان» به شماره IR.UT.830290075 بوده که در دانشکده علوم و فنون دانشگاه تهران انجام شده است. با توجه به آن که پژوهش حاضر، فاقد کارآزمایی بالینی بوده و از هیچ حیوان آزمایشگاهی در آن استفاده نشده است، لذا مشمول تعریف کد اخلاق هم نبوده است.

مشارکت نویسندگان:

علیرضا نوری: انجام آزمایش‌ها، آنالیز داده‌ها و نگارش مقاله. سید جمال اشرفی: همکاری در انجام آزمایش‌ها و آنالیز داده‌ها. زهرا محمدی: طراحی ایده و مشاوره در انجام آزمایش‌ها. جواد محمدنژاد: همکاری در آنالیز و تفسیر نتایج. عبدالرضا شیخ مهدی مسگر: مسولیت ایده و طراحی. همه نویسندگان نتایج را بررسی نموده و نسخه نهایی مقاله را تایید نمودند.

تضاد منافع:

توسط نویسندگان ذکر نشده است.

بازیابی داده‌ها:

توسط نویسندگان ذکر نشده است.

حمایت مالی/معنوی:

توسط نویسندگان ذکر نشده است.

طوری بر روی شبکه فیبرینی قرار گرفته باشد که جایگاه فعال پلاسمین را اشغال نموده و بنابراین تخریب فیبرین را به تعویق انداخته باشد.

تصویر ۶ زیست‌سازگاری داربست‌های ساخته شده را نشان می‌دهد حال آن‌که تصویر ۷ نشان می‌دهد حضور نانوذرات شیشه زیست‌فعال، دست کم در بعضی از غلظت‌ها توانسته است رشد سلول‌ها را به نحو معناداری افزایش دهد. دلیل این افزایش را می‌توان در رهایش یون‌های شیشه زیست‌فعال جستجو کرد که با افزایش میزان نانوذرات، میزان تکثیر هم بهبود یافته است. این مطلب با یافته‌های دیگر محققان هماهنگی دارد. به عنوان مثال، گزارش کرده‌اند که عصاره شیشه زیست‌فعال تکثیر سلول‌های بنیادی مزانشیمال را نسبت به گروه کنترل به نحو معنی‌داری افزایش می‌دهد (۳۵). در واقع رهایش یون‌هایی از جمله SiO_4^{2-} یا Ca^{2+} نه فقط تکثیر سلولی، که تمایز سلول‌های بنیادی به سلول‌های استئوبلاست را نیز افزایش می‌دهد (۳۵). محققان دیگری پیشنهاد کرده‌اند که حضور نانوذرات باعث تغییر توپوگرافی داربست شده و از طریق افزایش زبری سطح، لنگراندازی و چسبندگی سلول‌ها به آن را بهبود می‌بخشد (۳۶). دلیل احتمالی دیگر امکان ارتقای چسبندگی پروتئین و فاکتورهای رشد به گروه عاملی سیانول ایجاد شده بر روی شیشه‌های زیست‌فعال و در نتیجه افزایش تکثیر و تمایز سلولی بر روی داربست‌های حاوی شیشه‌های زیست‌فعال است (۳۷). اگر چه تمامی عوامل ذکر شده، می‌توانند در بهبود تکثیر و تمایز سلول‌ها بر روی داربست فیبرین ساخته شده موثر باشند اما عامل تخریب‌پذیری هم می‌تواند به نوبه خود حائز اهمیت باشد. همانطور که در بخش قبلی مشاهده شد حضور نانوذرات به طور قابل توجهی از تخریب هیدروژل فیبرینی جلوگیری می‌کند و بنابراین نقش موثری در تثبیت ساختار داربست ایفا می‌کند و این امر به نوبه خود می‌تواند فعالیت بیولوژیکی سلول‌ها را به نحو مطلوبی تحت تاثیر قرار دهد. از محدودیت‌های مطالعه حاضر می‌توان به این امر اشاره نمود که چون خون تک‌واحدی تازه صرفاً برای مصارف درمانی و نه تحقیقاتی مورد استفاده قرار می‌گیرد، امکان تهیه فیبرینوزن و ترومبین از پلاسما غنی از پلاکت وجود نداشت. در مطالعات بعدی می‌توان نقش پلاکت‌ها در تکثیر و تمایز سلول‌های استخوان ساز را سنجید. همچنین لازم است توانایی ترمیم آسیب داربست ساخته شده در محیط درون‌تنی مورد ارزیابی قرار گیرد.

۱.۴ نتیجه‌گیری

در این مطالعه نانوکامپوزیتی متشکل از نانوذرات شیشه

References

1. Collaborators GBDMD. Global, regional, and national burden of 12 mental disorders in 204 countries and territories, 1990-2019: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2019. *Lancet Psychiatry*. 2022;9(2):137-50. [PubMed ID:35026139]. [PubMed Central ID:PMC8776563]. [https://doi.org/10.1016/S2215-0366\(21\)00395-3](https://doi.org/10.1016/S2215-0366(21)00395-3).
2. Sahlabadi AS, Bidel H, Rabie H, Moosavi_Kordmiri SH, Balochkhaneh FA. [Relationship between the prevalence of musculoskeletal disorders and postural status and ergonomic risk factors in the workplace]. *Koomesh*. 2021. Persian. <https://doi.org/10.52547/koomesh.23.4.494>.
3. Blokhuis TJ, Arts JJ. Bioactive and osteoinductive bone graft substitutes: definitions, facts and myths. *Injury*. 2011;42 Suppl 2:S26-9. [PubMed ID:21714968]. <https://doi.org/10.1016/j.injury.2011.06.010>.
4. Zimmermann G, Moghaddam A. Allograft bone matrix versus synthetic bone graft substitutes. *Injury*. 2011;42 Suppl 2:S16-21. [PubMed ID:21889142]. <https://doi.org/10.1016/j.injury.2011.06.199>.
5. Zhu G, Zhang T, Chen M, Yao K, Huang X, Zhang B, et al. Bone physiological microenvironment and healing mechanism: Basis for future bone-tissue engineering scaffolds. *Bioact Mater*. 2021;6(11):4110-40. [PubMed ID:33997497]. [PubMed Central ID:PMC8091181]. <https://doi.org/10.1016/j.bioactmat.2021.03.043>.
6. Eslami M, Yazdi HM, Hariri K, Rouhollah F, Nayernia K. [Precision medicine, technologies, and molecular diagnostics]. *Koomesh*. 2022. Persian.
7. Chinnasami H, Dey MK, Devireddy R. Three-Dimensional Scaffolds for Bone Tissue Engineering. *Bioengineering (Basel)*. 2023;10(7). [PubMed ID:37508786]. [PubMed Central ID:PMC10376773]. <https://doi.org/10.3390/bioengineering10070759>.
8. Qu H, Fu H, Han Z, Sun Y. Biomaterials for bone tissue engineering scaffolds: a review. *RSC Adv*. 2019;9(45):26252-62. [PubMed ID:35531040]. [PubMed Central ID:PMC9070423]. <https://doi.org/10.1039/c9ra05214c>.
9. Al-Harbi N, Mohammed H, Al-Hadeethi Y, Bakry AS, Umar A, Hussein MA, et al. Silica-Based Bioactive Glasses and Their Applications in Hard Tissue Regeneration: A Review. *Pharmaceuticals (Basel)*. 2021;14(2). [PubMed ID:33498229]. [PubMed Central ID:PMC7909272]. <https://doi.org/10.3390/ph14020075>.
10. Pereira MM, Jones JR, Hench LL. Bioactive glass and hybrid scaffolds prepared by sol-gel method for bone tissue engineering. *J Advances In Applied Ceramics*. 2005;104(1):35-42. <https://doi.org/10.1179/174367605225011034>.
11. Abodunrin OD, El Mabrouk K, Bricha M. A review on borate bioactive glasses (BBG): effect of doping elements, degradation, and applications. *J Materials Chemistry B*. 2023;11(5):955-73.
12. Shearer A, Montazerian M, Sly JJ, Hill RG, Mauro JC. Trends and perspectives on the commercialization of bioactive glasses. *Acta Biomater*. 2023;160:14-31. [PubMed ID:36804821]. <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2023.02.020>.
13. Boccaccini AR, Erol M, Stark WJ, Mohn D, Hong Z, Mano JF. Polymer/bioactive glass nanocomposites for biomedical applications: a review. *J Composites Sci Technol*. 2010;70(13):1764-76. <https://doi.org/10.1016/j.compotech.2010.06.002>.
14. Misra SK, Mohn D, Brunner TJ, Stark WJ, Philip SE, Roy I, et al. Comparison of nanoscale and microscale bioactive glass on the properties of P(3HB)/Bioglass composites. *Biomaterials*. 2008;29(12):1750-61. [PubMed ID:18255139]. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2007.12.040>.
15. Noori A, Ashrafi SJ, Vaez-Ghaemi R, Hatamian-Zaremi A, Webster TJ. A review of fibrin and fibrin composites for bone tissue engineering. *Int J Nanomedicine*. 2017;12:4937-61. [PubMed ID:28761338]. [PubMed Central ID:PMC5516781]. <https://doi.org/10.2147/IJN.S124671>.
16. Sanz-Horta R, Matesanz A, Gallardo A, Reinecke H, Jorcano JL, Acedo P, et al. Technological advances in fibrin for tissue engineering. *J Tissue Eng*. 2023;14:20417314231190288. [PubMed ID:37588339]. [PubMed Central ID:PMC10426312]. <https://doi.org/10.1177/20417314231190288>.
17. Weisel JW. Fibrinogen and fibrin. *Adv Protein Chem*. 2005;70:247-99. [PubMed ID:15837518]. [https://doi.org/10.1016/S0065-3233\(05\)70008-5](https://doi.org/10.1016/S0065-3233(05)70008-5).
18. Davis HE, Binder BY, Schaecher P, Yakoobinsky DD, Bhat A, Leach JK. Enhancing osteoconductivity of fibrin gels with apatite-coated polymer microspheres. *Tissue Eng Part A*. 2013;19(15-16):1773-82. [PubMed ID:23560390]. [PubMed Central ID:PMC3700018]. <https://doi.org/10.1089/ten.TEA.2012.0288>.
19. Ito K, Yamada Y, Naiki T, Ueda M. Simultaneous implant placement and bone regeneration around dental implants using tissue-engineered bone with fibrin glue, mesenchymal stem cells and platelet-rich plasma. *Clin Oral Implants Res*. 2006;17(5):579-86. [PubMed ID:16958700]. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0501.2006.01246.x>.
20. Zhao H, Ma L, Gao C, Wang J, Shen J. Fabrication and properties of injectable β -tricalcium phosphate particles/fibrin gel composite scaffolds for bone tissue engineering. *J Materials Sci Engineering: C*. 2009;29(3):836-42. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2008.07.033>.
21. Osathanon T, Linnas ML, Rajachar RM, Ratner BD, Somerman MJ, Giachelli CM. Microporous nanofibrous fibrin-based scaffolds for bone tissue engineering. *Biomaterials*. 2008;29(30):4091-9. [PubMed ID:18640716]. [PubMed Central ID:PMC2610368]. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2008.06.030>.
22. Xia W, Chang J. Preparation and characterization of nano-bioactive-glasses (NBG) by a quick alkali-mediated

- sol-gel method. *J Materials Letters*. 2007;61(14-15):3251-3. <https://doi.org/10.1016/j.matlet.2006.11.048>.
23. Kesse X, Vichery C, Nedelec JM. Deeper Insights into a Bioactive Glass Nanoparticle Synthesis Protocol To Control Its Morphology, Dispersibility, and Composition. *ACS Omega*. 2019;4(3):5768-75. [PubMed ID:31459729]. [PubMed Central ID:PMC6648633]. <https://doi.org/10.1021/acsomega.8b03598>.
 24. Lee JT, Leng Y, Chow KL, Ren F, Ge X, Wang K, et al. Cell culture medium as an alternative to conventional simulated body fluid. *Acta Biomater*. 2011;7(6):2615-22. [PubMed ID:21356333]. <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2011.02.034>.
 25. Thorn JJ, Sorensen H, Weis-Fogh U, Andersen M. Autologous fibrin glue with growth factors in reconstructive maxillofacial surgery. *Int J Oral Maxillofac Surg*. 2004;33(1):95-100. [PubMed ID:14690664]. <https://doi.org/10.1054/ijom.2003.0461>.
 26. Franco D, Franco T, Schettino AM, Filho JM, Vendramin FS. Protocol for obtaining platelet-rich plasma (PRP), platelet-poor plasma (PPP), and thrombin for autologous use. *Aesthetic Plast Surg*. 2012;36(5):1254-9. [PubMed ID:22936376]. <https://doi.org/10.1007/s00266-012-9957-3>.
 27. Zhao H, Ma L, Zhou J, Mao Z, Gao C, Shen J. Fabrication and physical and biological properties of fibrin gel derived from human plasma. *Biomed Mater*. 2008;3(1):015001. [PubMed ID:18458488]. <https://doi.org/10.1088/1748-6041/3/1/015001>.
 28. Mačković M, Hoppe A, Detsch R, Mohn D, Stark WJ, Spiecker E, et al. Bioactive glass (type 45S5) nanoparticles: in vitro reactivity on nanoscale and biocompatibility. *J Nanoparticle Res*. 2012;14:1-22. <https://doi.org/10.1007/s11051-012-0966-6>.
 29. Goh YF, Alshemary AZ, Akram M, Abdul Kadir MR, Husain R. Bioactive glass: an in-vitro comparative study of doping with nanoscale copper and silver particles. *J Inter Applied Glass Sci*. 2014;5(3):255-66. <https://doi.org/10.1111/ijag.12061>.
 30. Kokubo T, Ito S, Shigematsu M, Sanka S, Yamamuro T. Fatigue and life-time of bioactive glass-ceramic AW containing apatite and wollastonite. *J Materials Sci*. 1987;22:4067-70. <https://doi.org/10.1007/BF01133359>.
 31. Tawil B. Fibrin and its applications. *J An Introduction Biomate*. 2006:105-20.
 32. Park JJ, Cintron JR, Siedentop KH, Orsay CP, Pearl RK, Nelson RL, et al. Technical manual for manufacturing autologous fibrin tissue adhesive. *Dis Colon Rectum*. 1999;42(10):1334-8. [PubMed ID:10528774]. <https://doi.org/10.1007/BF02234225>.
 33. Ostomel TA, Shi Q, Tsung CK, Liang H, Stucky GD. Spherical bioactive glass with enhanced rates of hydroxyapatite deposition and hemostatic activity. *Small*. 2006;2(11):1261-5. [PubMed ID:17192971]. <https://doi.org/10.1002/smll.200600177>.
 34. El-Fiqi A, Lee JH, Lee EJ, Kim HW. Collagen hydrogels incorporated with surface-aminated mesoporous nanobioactive glass: Improvement of physicochemical stability and mechanical properties is effective for hard tissue engineering. *Acta Biomater*. 2013;9(12):9508-21. [PubMed ID:23928332]. <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2013.07.036>.
 35. Wu C, Chang J, Fan W. Bioactive mesoporous calcium-silicate nanoparticles with excellent mineralization ability, osteostimulation, drug-delivery and antibacterial properties for filling apex roots of teeth. *J Materials Chem*. 2012;22(33):16801-9. <https://doi.org/10.1039/c2jm33387b>.
 36. Misra SK, Ansari T, Mohn D, Valappil SP, Brunner TJ, Stark WJ, et al. Effect of nanoparticulate bioactive glass particles on bioactivity and cytocompatibility of poly(3-hydroxybutyrate) composites. *J R Soc Interface*. 2010;7(44):453-65. [PubMed ID:19640877]. [PubMed Central ID:PMC2842795]. <https://doi.org/10.1098/rsif.2009.0255>.
 37. Zhu H, Liu N, Feng X, Chen J. Fabrication and characterization of silk fibroin/bioactive glass composite films. *J Materials Sci Engineering: C*. 2012;32(4):822-9. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2012.01.033>.



Research Article

Fabrication and Characterization of Fibrin/Bioactive Glass Nanoparticles Composite for Bone Tissue Engineering

Alireza Noori^{1, 2*}, Seyed Jamal Ashrafi³, Zahra Mohammadi², Javad Mohammadnejad Arough², Abdoreza Sheykhmehdi Mesgar^{2**}

¹ Department of Tissue Engineering and Applied Cell Sciences, Faculty of Medicine, Semnan University of Medical Sciences, Semnan, Iran

² Department of Biological Sciences Engineering, Faculty of Modern Sciences and Technologies, University of Tehran, Tehran, Iran

³ Department of Nanotechnology, School of Medicine, Shahrud University of Medical Sciences, Shahrud, Iran

*Corresponding Author: Ali Reza Nouri, Department of Tissue Engineering and Applied Cell Sciences, Faculty of Medicine, Semnan University of Medical Sciences, Semnan, Iran; Department of Biological Sciences Engineering, Faculty of Modern Sciences and Technologies, University of Tehran, Tehran, Iran. Tell: 09188155343; Email: alireza.noori@semums.ac.ir.

**Corresponding authors: Abdolreza Sheikh Mehdi Mesgar, Department of Biological Sciences Engineering, Faculty of Modern Sciences and Technologies, University of Tehran, Tehran, Iran. Tell: 09122114915; E-mail: asmesgar@ut.ac.ir

Received 04/11/2023; Accepted 01/06/2024

Abstract

Introduction: Bone tissue engineering is one of the emerging strategies that has been developed to restore the bone of the damaged area without provoking an adverse immune reaction. In this context, the tissue engineering scaffold must be as similar as possible to the natural bone tissue. Bone is a nanocomposite material composed of hydroxyapatite and collagen; hence, the development of nanocomposite scaffolds has been viewed as an appropriate choice for bone tissue restoration. In many situations, these composite materials combine a bioactive mineral phase with a biodegradable polymer phase. The current study aimed to create and analyze a new composite scaffold for bone tissue engineering applications employing bioactive glass nanoparticles (nBG) and fibrin.

Methods: The nBG used in this study was based on the 70:30: SiO₂-2CaO system, which was synthesized using the sol-gel method. Scanning electron microscopy (SEM), X-ray crystallography (XRD), and Fourier transform infrared (FTIR) spectroscopy were used to characterize the fabricated nanoparticles. On the other hand, the whole blood was centrifuged twice at 3000×g to separate the plasma from the blood, and during the next steps, fibrinogen and thrombin were separated from the platelet-free plasma. These components were then mixed with nBG to create an injectable composite scaffold. The composites were subjected to physicochemical characterization, such as degradability and clot formation rate, while human osteoblast-like cells (G292- cell line) were used to assess the scaffold's biocompatibility as well as cell proliferation and differentiation using the MTT and alkaline phosphatase activity tests, respectively.

Results: In the case of bioactive glass nanoparticles, SEM analysis verified the formation of spherical nanoparticles with a diameter of 50 to 110 nm. XRD analysis showed its non-crystalline nature, and the FTIR spectrum demonstrated the presence of Si-O-Si and O-H functional groups. Investigations on the composite of fibrin and bioactive glass nanoparticles (nBG) revealed that incorporating nBG into the fibrin hydrogel enhances its stability and reduces the degradation rate of the scaffold by approximately 40%. In vitro investigations on G292- cells revealed that including nBG in the fibrin hydrogel improves cell viability, cell proliferation by approximately 150%, and alkaline phosphatase activity by around 45%.

Conclusion: Fibrin gel is widely used in bone tissue engineering applications. However, our studies show that when combined with bioactive glass nanoparticles, it is more effective at repairing damaged bones.

Keywords: Bone, Tissue Engineering, Fibrinogen, Thrombin, Fibrin Bioactive Glass Nanoparticles