

## امکان‌سنجی و بررسی ساخت داربست کاپا-کاراگینان/ نانوالیاف فیبروئین ابریشم به منظور

## استفاده در مهندسی بافت استخوان

فهیمة روشن فر\*<sup>۱</sup>، آرش مزیدی<sup>۲</sup>، علی‌رضا نوری<sup>۱</sup> و فریده روشن فر<sup>۳</sup>

<sup>۱</sup>دانشگاه تهران، دانشکده علوم و فنون نوین، تهران، ایران.

<sup>۲</sup>دانشگاه گلستان، دانشکده مهندسی کامپیوتر، گرگان، ایران.

<sup>۳</sup>آداره کل فنی و حرفه ای استان گلستان، گرگان، ایران.

تاریخ ثبت اولیه: ۱۳۹۷/۲/۱۵، تاریخ دریافت نسخه اصلاح شده: ۱۳۹۷/۵/۱۶، تاریخ پذیرش قطعی: ۱۳۹۷/۶/۱۸

**چکیده** آسیب استخوانی یکی از چالش‌های علم پزشکی است که هر ساله هزینه زیادی را در دنیا برای درمان به خود اختصاص داده است. امروزه، ساخت داربست مناسب جهت درمان آسیب استخوانی استفاده می‌شود. در این مقاله، داربست‌های جدید کامپوزیتی زیست‌فعال، برپایه پلی‌ساکارید کاپا-کاراگینان و نانوالیاف فیبروئین به منظور استفاده در کاربردهای بازسازی استخوانی، سنتز و مشخصه‌یابی شده است. نانوالیاف فیبروئین با روش الکترورسی تهیه و به عنوان فاز تقویت‌کننده در مقادیر مختلف به محلول کاپا-کاراگینان ۰/۵٪ وزنی اضافه شده و داربست‌های سه‌بعدی توسط فریز-درایر ساخته شده‌اند. نتایج حاصل از میکروسکوپ الکترونی روبشی وجود ساختار متخلخل با ارتباط درونی و درصد تخلخل و میانگین اندازه حفرات مناسب با سلول‌های استخوانی را نشان داده است. علاوه بر این، نتایج آنالیز طیف‌سنجی پراکنده انرژی پرتو ایکس از داربست‌های قرار گرفته در محلول شبیه‌سازی شده بدن، تشکیل لایه‌ای از کلسیم فسفات بر روی سطح داربست‌ها را نشان داده است.

**کلمات کلیدی:** بایوکامپوزیت، کلسیم فسفات، کاپا-کاراگینان، نانوالیاف فیبروئین، مهندسی بافت استخوان.

## Investigation of Fabrication and Synthesis of Cappa-Carrageenan/Silk Fibroin Nanofibers Scaffolds for Bone Tissue Engineering

Fahimeh Roshanfar<sup>\*1</sup>, Arash Mazidi<sup>2</sup>, alireza noori<sup>1</sup> and Farideh Roshanfar<sup>3</sup>

<sup>1</sup>University of Tehran, Department of Life Science Engineering, Tehran, Iran.

<sup>2</sup>Golestan University, Department of Computer Engineering, Gorgan, Golestan, Iran.

<sup>3</sup>Technical and Vocational Department, Gorgan, Iran.

**Abstract** Bone defect is one of the important challenges of medical science. Today, the synthesis of a suitable scaffold has been developed. In this paper, new bioactive composite scaffolds based on kappa-carrageenan/fibroin nanofibers were synthesized and characterized for bone regeneration applications. The fibroin nanofibers were prepared by electrospinning, then the chopped electrospun nanofibers were incorporated to Kappa-carrageenan solution (0.5% w/v) in different ratios as a reinforcer. Finally, 3D scaffolds were fabricated by Freeze-drying. The results of scanning electron microscopy showed the highly porous structure with the interconnected porous. The porosity percentage and average pore size of the scaffolds were suitable for bone cells implantation and propagation. In addition, Energy Dispersive X ray (EDS) technique has proved Precipitation of Ca-P on the surfaces. The biocompatibility evaluation of fabricated scaffolds was done using MTT indirect assay.

**Keywords:** biocomposite, Calcium Phosphate, K-Carrageenan, Silk Fibroin Nanofiber, Bone Tissue Engineering.

در آب داغ و در دمای بالاتر از ۷۰ درجه سانتی‌گراد حل می‌شوند. ژل حاصل از کاپا-کاراگینان شکننده است در حالی که ژل حاصل از آیوتا-کاراگینان خاصیت کشسانی بیشتری دارد. نوع لامبدا کاراگینان در آب سرد حل می‌شود. در مجموع، از مهم‌ترین موارد کاربرد کاراگینان‌ها می‌توان به استفاده از آن در تولید فرآورده‌های لبنی، انواع دسرها و موارد مشابه در صنایع غذایی و حوزه مهندسی پزشکی در ساخت داربست‌های مهندسی بافت و سیستم‌های رهایش دارو اشاره نمود [۱۱ و ۱۰]. در سال ۲۰۱۰، داربست ژلاتین/کاپا-کاراگینان توسط آقای youn lim و همکاران مورد بررسی قرار گرفت. داربست‌های متخلخل مرکب از ژلاتین/کاپا-کاراگینان با استفاده از روش فریز-درایر ساخته شدند. نتایج بافت‌شناسی و خون نشان می‌دهد که اسفنج‌های GC زیست‌سازگاری خوبی دارند و آنتی‌ژن‌سیته‌ی پایین نشان می‌دهد که می‌توانند به منظور کاربردهای مهندسی بافت، ایمن، بی‌خطر و موثر باشند [۱۲].

کاراگینان‌ها چندین خواص دارویی هم‌چون ضد انعقادی، ضدسرطانی، کاهش‌دهنده سطح چربی در خون و تعدیل‌کننده فعالیت‌های سیستم ایمنی را از خود نشان داده‌اند. آزمایش‌های سلولی درون‌آزمایشگاهی<sup>۳</sup> نشان می‌دهند که کاراگینان‌ها ممکن است تاثیرات ضدویروسی و جلوگیری از تکرار و کپی از ویروس هپاتیت A داشته باشند. هم‌چنین در مقایسه با ترکیبات مختلف دیگر، آشکار شده است که کاراگینان‌ها به‌عنوان مانع و جلوگیری‌کننده قوی از عفونت در انتقال عفونت‌ها و ویروس‌های جنسی عمل می‌کنند. کاراگینان‌ها هم‌چنین فعالیت آنتی‌اکسیدانی، فعالیت جستجو و دست‌یابی به رادیکال‌های آزاد را از خود نشان می‌دهند و یک رابطه مثبت بین مقدار سولفات و فعالیت آنتی‌اکسیدانی وجود دارد. این پلیمر نیز به‌علت دارا بودن ویژگی‌هایی نظیر زیست‌سازگاری بالا، خاصیت ضدباکتریایی و ضدقارچی ذاتی بسیار مورد توجه قرار گرفته است [۱۳]. هم‌چنین کاراگینان به‌دلیل دارا بودن گروه‌های سولفات‌ه جوانه‌زنی آپاتیت<sup>۴</sup> را ترغیب می‌کند. در واقع وجود گروه سولفات‌ه استر در کاراگینان به‌دلیل دارا بودن بار منفی جوانه‌زنی گروه هیدروکسی آپاتیت را افزایش می‌دهد.

به‌تازگی از زیست‌مواد ابریشمی در مهندسی بافت برپایه سلول‌های بنیادی بسیار استفاده می‌شود که این زمینه تحقیقاتی بسیار فعالی است. مطالعات نشان داده است که ابریشم، علاوه بر حمایت از رشد سلول‌ها، با تاثیر بر متابولیسم آنها تمایز سلول‌های بنیادی را به سلول‌های مطلوب سبب می‌شود. یکی از مزایای ابریشم به‌عنوان یک پلیمر طبیعی امکان اصلاح این ماده برای کاربردهای مورد نظر است. قابلیت اصلاح‌پذیری و شکل‌پذیری ابریشم، ساخت انواع ساختارها با خواص مطلوب را ممکن می‌کند.

ترکیب الیاف ابریشم ساختاری با چگالی کم (حدود  $1.3 \text{ gr/cm}^3$ ) و استحکام بالا (تا  $4.8 \text{ GPa}$ ) به‌عنوان محکم‌ترین لیف شناخته شده در طبیعت و چقرمگی بسیار شاخص و قابلیت کشسانی خوب (بیشتر از ۳۵٪) ایجاد می‌کنند. برای مثال، استحکام کششی نوعی ابریشم کابلی با استحکام بالا با الیاف سنتزی مانند کولار<sup>۱</sup>-۴۹ قابل مقایسه است در حالی که قابلیت کشسانی آن سه تا چهار برابر بیشتر از کولار است. علاوه بر این، الیاف ابریشمی پایداری دمایی خوب تا  $250^\circ \text{C}$  دارند که انجام فرآیندهایی با دمای بالا را ممکن می‌کند. با توجه به موارد ذکر شده، الیاف ابریشم یکی از بهترین کاندیدا برای ساخت داربست در مکان‌های تحت بار مانند استخوان می‌باشد [۹].

یکی دیگر از پلیمرهای طبیعی مورد استفاده، کاراگینان (CG)<sup>۲</sup> است. کاراگینان یک نام عمومی برای خانواده‌ای از پلی ساکاریدهای سولفات‌ه با وزن مولکولی بالا است که از تکه‌های مشخصی از جلبک‌های دریایی قرمز استخراج می‌شود و ترکیبی از واحدهای گالاکتوز و آنیدروگالاکتوز است که توسط واحدهای گلایکوسیدیک به هم متصل شده‌اند. در واقع کاراگینان صمغی است که از جلبک قرمز دریایی استخراج می‌شود و صدها سال است که به‌عنوان افزودنی مواد غذایی مورد استفاده قرار می‌گیرد. انواع مختلفی از کاراگینان موجود است که برحسب کاربرد به دسته‌های مختلفی هم‌چون کاپا-کاراگینان، آیوتا-کاراگینان و لامبدا-کاراگینان تقسیم می‌شوند. هر کدام از کاراگینان‌های ذکر شده دارای حلالیت و خواص ژل‌کنندگی متفاوتی می‌باشند. کاپا-کاراگینان و آیوتا-کاراگینان

<sup>3</sup> In vitro<sup>4</sup> Apatite<sup>1</sup> Kevlar<sup>2</sup> Carrageenan

جدول ۱. پارامترهای مربوط به فرآیند الکترورسی.

متغیر فرآیند	محدوده تغییرات
غلظت محلول	۱۳٪ وزنی
ولتاژ اعمالی	۲۰ کیلوولت
فاصله سر سوزن	۱۲-۱۳ سانتی متر
دبی خروجی	۰/۲۵ ml/hr

برای تولید نانوالیاف ابریشم محلول ۱۳٪ وزنی فیبروین آماده‌سازی شده توسط حلال فرمیک اسید در سرنگ ۱ cc با سوزن G-۲۰ ریخته شد. کلیه تجهیزات مربوط به الکترورسی تحت هود عایق نگه‌داری و استفاده شده است. به دلیل اینکه الیاف تولید شده پایداری کمی دارند، اصلاح با متانول به صورت قرار گرفتن کامل شبکه الیاف تولیدی در حمام متانول برای ایجاد پایداری در ساختار و شکل نانوالیاف انجام شده است. سپس الیاف از درون حمام متانول جمع‌آوری شده و در محیط خشک شدند.

### ۳-۲ ساخت داربست

برای تهیه محلول کاپا-کاراگینان ۰/۵٪ وزنی، ۰/۵ گرم از پودر کاراگینان را در ۱۰۰ میلی‌لیتر آب مقطر حل کرده و بر روی هم‌زن در دمای ۶۰°C به مدت ۳۰ دقیقه زمان داده شد تا محلول کاملاً یکنواختی حاصل شود. در این پژوهش، دو نمونه متخلخل کامپوزیتی از قطعات ریز نانوالیاف فیبروین الکترورسی شده در بستر کاپا-کاراگینان ساخته شد. بدین منظور ابتدا مقادیر متفاوت یک و دو میلی‌گرم از نانوالیاف فیبروین را به ۱ ml از محلول کاپا-کاراگینان اضافه کرده و هم‌چنین سه میکرولیتر از گلو تارآلدئید ۲۵٪ به‌عنوان عامل شبکه‌ای‌کننده<sup>۴</sup> به هر کدام از سیستم‌ها افزوده شده است. هم‌چنین یک نمونه کاپا-کاراگینان خالص به‌عنوان نمونه کنترل در نظر گرفته شده است. در جدول (۲) کد و ترکیب داربست‌های ساخته شده آورده شده است.

پس از هم‌زدن به مدت ۱۰ دقیقه و پخش همگن و یکنواخت نانوالیاف در محلول، محلول در درون قالب‌های پلی‌استری ۲۴ خانه ریخته شد. در ابتدا قالب‌ها در دمای ۴°C به مدت ۲۴ ساعت نگه‌داری شده‌اند و پس از آن در دمای ۲۰°C در فریزر به مدت ۴۸ ساعت نگه‌داری شدند. در نهایت،

وقتی جوانه آپاتیت شکل می‌گیرد، با جذب یون‌های فسفات و کلسیم از محیط فیزیولوژی بدن رشد می‌کند [۱۴].

هدف کلی این مقاله، سنتز و ساخت یک داربست با خواص مکانیکی و بیولوژیکی مناسب شامل دو پلیمر طبیعی کاپا-کاراگینان و نانوالیاف فیبروین ابریشم، برای کاربردهای مهندسی بافت استخوان است.

در ادامه این مقاله، در بخش ۲، روش انجام تحقیق شامل مواد مورد استفاده و ساخت داربست آورده شده است. در بخش ۳ روش‌های شناسایی و آزمون‌های مربوط به داربست‌ها معرفی شده و در بخش ۴ نتایج حاصل از آزمایش‌ها و بحث بر روی آنها پرداخته شده و در نهایت، در بخش ۵ به نتیجه‌گیری مقاله و هم‌چنین پیشنهادات خود برای کارهای آینده خواهیم پرداخت.

## ۲- روش تحقیق

### ۱-۲ مواد

در این مقاله، پیله‌های کرم ابریشم از جهاد کشاورزی استان گلستان تهیه شد. کاپا-کاراگینان ( $C_{24}H_{36}O_{25}S_2$ )، سدیم کربنات ( $Na_2CO_3$ ) و غشای دیالیز از شرکت سیگما<sup>۱</sup> آمریکا خریداری شد. لیتیوم برماید (LiBr)، فرمیک اسید ( $HCO_2H$ )، گلو تارآلدئید ( $CH_2(CH_2CHO)_2$ )، هیدروکلریک اسید (HCl)، سدیم هیدروکسید (NaOH) و سدیم کلرید (NaCl) از شرکت مرک<sup>۲</sup> آلمان خریداری شدند.

### ۲-۲ نانوالیاف فیبروین

تخلیص فیبروین از پیله‌های کرم ابریشم براساس روش انجام شده در پژوهش‌های قبلی ما انجام شد و در نهایت این فیبروین حاصل، توسط عملیات سرماخشک‌سازی<sup>۳</sup> به صورت داربست‌های اسفنجی آماده‌سازی شدند [۱۵]. از فیبروین اسفنجی به‌دست‌آمده از مراحل سرماخشک‌سازی در این مرحله برای الکترورسی استفاده شد. بدین صورت که برای تهیه محلول الکترورسی ۱۳٪ وزنی، فیبروین اسفنجی در فرمیک اسید (۹۸٪) حل شد. پارامترهای الکترورسی شامل ولتاژ، فاصله و نرخ تغذیه به‌صورت جدول (۱) می‌باشد.

<sup>۱</sup> Sigma

<sup>۲</sup> Merck

<sup>۳</sup> Freeze Drying

<sup>۴</sup> Cross Linker

معادله (۱)  $W_1 - \left(\frac{W_2}{1+SR}\right) = \text{میزان رسوب کلسیم فسفات}$

که در آن،  $W_1$  و  $W_2$  به ترتیب وزن تر و خشک داربست پس از غوطه‌وری در محلول SBF و SR میزان تورم برای هر نمونه است که براساس رابطه (۲) محاسبه می‌شود.

معادله (۲)  $SR = \frac{W_s - W_0}{W_0}$

در رابطه (۲)،  $W_s$  وزن تر داربست پس از غوطه‌وری و  $W_0$  وزن خشک داربست قبل از غوطه‌وری در آب می‌باشند.

### ۳-۴ بررسی تخلخل‌ها

میزان و اندازه تخلخل پارامترهای بسیار مهمی در تعیین خواص مکانیکی و زیست‌سازگاری داربست‌ها می‌باشند. برای محاسبه اندازه حفرات و درصد تخلخل داربست‌های تهیه شده از نرم‌افزار Image J استفاده شده است. بدین منظور، برای هر نمونه سه تصویر SEM گرفته شد. اندازه حفرات با استفاده از این نرم‌افزار اندازه‌گیری و میانگین اندازه حفرات محاسبه شده است. درصد تخلخل داربست با استفاده از رابطه (۳) محاسبه می‌شود.

معادله (۳)  $\text{درصد} = \frac{A_p}{A_T} \times 100$

در رابطه (۳)،  $A_p$  برابر مساحت کل تخلخل‌ها و  $A_T$  در هر مقطع برابر مساحت کل هر مقطع است. برای هر نمونه حداقل سه تصویر SEM آنالیز شده و میانگین میزان تخلخل برای هر دسته از تصاویر محاسبه شده است [۱۸].

### ۳-۵ زمون‌های سلولی<sup>۶</sup> در مجاورت سلول‌های استئوبلاست

برای بررسی‌های زیست‌سازگاری و یا میزان بقای سلول‌ها از آزمون عصاره‌گیری غیرمستقیم<sup>۷</sup> براساس استاندارد ایزو ۱۰۹۹۳-۵ استفاده شده است. در این پژوهش از سلول‌های استئوسارکوما<sup>۸</sup> MG-63 استفاده شد.  $2 \times 10^4$  سلول درون پلیت کشت سلولی ۹۶ چاهکی ریخته شد. بدین صورت که به ازای پنج میلی‌گرم داربست، یک سی‌سی محیط کشت افزوده گردید و نمونه‌ها در انکوباتور تحت رطوبت ۹۰٪ و گاز  $CO_2$  ۵٪ نگهداری شدند. سپس در فواصل زمانی ۳، ۷ و ۱۴

نمونه‌ها به مدت ۷۲ ساعت فریزدرایر شدند نمونه کاپا-کاراگینان خالص هم به‌عنوان نمونه کنترل در نظر گرفته شد.

جدول ۲. کد و ترکیب داربست‌های ساخته شده.

کد نام‌گذاری	کاپا-کاراگینان ۵۰٪ (ml)	مقدار نانوالیاف (mg/ml)
SF1-CG	۱	۱
SF2-CG	۱	۲
CG	۱	۰

### ۳-۲ روش‌های شناسایی و آزمون‌های داربست‌ها

#### ۳-۱-۱ طیف‌سنجی پراکندگی انرژی پرتو ایکس<sup>۱</sup>

طیف‌سنجی پراش پرتو انرژی ایکس یک روش تحلیلی است که برای تجزیه و تحلیل ساختاری یا خصوصیات شیمیایی یک نمونه به‌کار می‌رود. این روش به‌طور کلی بر اساس این اصل است که هر عنصر دارای یک ساختار اتمی منحصر به فرد است که مجموعه مشخصه‌ای از قله‌ها<sup>۲</sup> را در طیف پرتو ایکس آن به‌وجود می‌آورد [۱۴]. این آنالیز توسط دستگاه INCA ساخت کمپانی آکسفورد انگلستان<sup>۳</sup>، بر روی نمونه‌های قرار داده شده در محلول SBF<sup>۴</sup> به منظور سنجش میزان کلسیم فسفات تشکیل شده بر روی سطح داربست‌ها، انجام گرفته است.

#### ۳-۲-۲ مطالعات میکروسکوپی الکترونی روبشی (SEM<sup>۵</sup>)

برای بررسی مورفولوژی و ساختار داربست کامپوزیتی ترکیبی از کاپا-کاراگینان و نانوالیاف فیروین، تشکیل و چسبندگی سلولی نمونه‌ها بعد از آماده‌سازی توسط طلا در خلا پوشش‌دهی شدند و در بزرگنمایی‌های مختلف توسط میکروسکوپ الکترونی روبشی AIS2100 ساخت کمپانی Seron Technology مورد بررسی قرار گرفتند.

#### ۳-۳-۳ محاسبه میزان کلسیم فسفات تشکیل شده بر روی داربست

مقدار کلسیم فسفات تشکیل شده بر روی داربست‌ها با معادله (۱) محاسبه می‌شود.

<sup>۱</sup> Energy Dispersive X ray (EDS)

<sup>۲</sup> Peaks

<sup>۳</sup> Oxford instruments

<sup>۴</sup> Simulated body fluid

<sup>۵</sup> Scanning Electron Microscope

<sup>۶</sup> In vitro

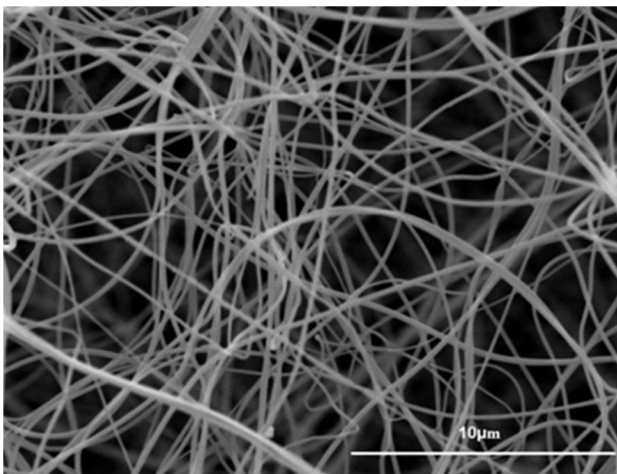
<sup>۷</sup> MTT

<sup>۸</sup> Osteosarcoma

#### ۴- نتایج و بحث

##### ۴-۱ تصاویر SEM نانوالیاف فیرویین الکترورسی شده

غلظت ۱۳ درصد وزنی برای الکترورسی فیرویین ابریشم به دلیل دارا بودن ویسکوزیته مناسب و به دنبال آن، درگیری مناسب زنجیره‌های پلیمری برای حفظ تداوم جریان شتاب‌دار محلول فرآیند در طول الکترورسی، انتخاب شد [۲۰]. در نهایت، با اعمال شرایط بهینه الکترورسی، الیافی با اندازه میانگین برابر  $7.8 \pm 298.682$  نانومتر و بیشترین توزیع قطر در محدوده ۲۱۰-۳۷۰ نانومتر به دست آمده که در شکل (۱) نشان داده شده است. شکل (۱) نشان‌دهنده رسیدن به قطر نانو در الیاف فیرویین ابریشم می‌باشد. همچنین شکل (۲) تصویر نانوالیاف فیرویین قرار گرفته شده در درون ساختار داربست‌های کاپا-کاراگینانی را نشان می‌دهد.



شکل ۱. تصویر SEM نانوالیاف فیرویین الکترورسی شده اولیه.

##### ۴-۲ مطالعات میکروسکوپی مربوط به داربست

شکل (۳) تصاویر ریزساختار داربست‌های ساخته شده با درصد‌های مختلف فیرویین ابریشم-کاراگینان را نشان می‌دهد. همان‌طور که مشاهده می‌شود داربست‌ها دارای حفرات باز می‌باشند که با یکدیگر ارتباط دارند و نانوالیاف فیرویین درون بستر هیدروژلی پراکنده شدند و بین تخلخل‌ها گیر افتاده‌اند. استفاده از روش فریزدرایر برای ساخت داربست موجب پیدایش تخلخل در داربست‌ها شده است. تصاویر میکروسکوپ الکترونی روبشی در شکل (۳) و نتایج حاصل از آنالیز داده‌ها با استفاده از نرم‌افزار Image J نشان می‌دهد که کمترین میانگین قطر تخلخل مربوط به داربست SF2-CG برابر

روز محیط کشت را از پلیت خارج کرده و بر روی سطح سلول‌ها ریخته شد و مقدار مشخصی محیط کشت نیز به‌عنوان نمونه شاهد در نظر گرفته شد. همچنین شرایط محیط عصاره‌گیری تا حد امکان مشابه با شرایط محیط بدن (دمای  $37^{\circ}\text{C}$  و pH خنثی) در نظر گرفته شد. سپس از هر نمونه به چاهک کشت افزوده و سلول‌ها به مدت ۲۴ ساعت دیگر در مجاورت این عصاره‌ها قرار گرفتند. پس از آن محیط کشت خارج شد و ۱۰۰ میکرولیتر RPMI بدون رنگ به اضافه‌ی ۱۰ میکرولیتر محلول MTT با غلظت ۱۲ میلی‌مولار به هر چاهک وارد شد. پس از گذشت چهار ساعت محلول روی سلول‌ها خارج شد و ۱۰۰ میکرولیتر ایزوپروپانول به آن‌ها اضافه گردید تا بلورهای بنفش رنگ ایجاد شده حل شود. سپس مقدار غلظت ماده حل شده در ایزوپروپانول در طول موج ۵۴۵ نانومتر محاسبه شد و در نهایت میزان زنده‌مانی سلولی از رابطه (۴) به دست آمده است.

$$\text{معادله (۴)} \quad = \frac{OD_s}{OD_c} = \text{درصد زنده‌مانی}$$

در رابطه (۴)،  $OD_s$  برابر میانگین چگالی نوری هر نمونه در زمان مورد نظر و  $OD_c$  برابر میانگین چگالی نوری گروه کنترل می‌باشند.

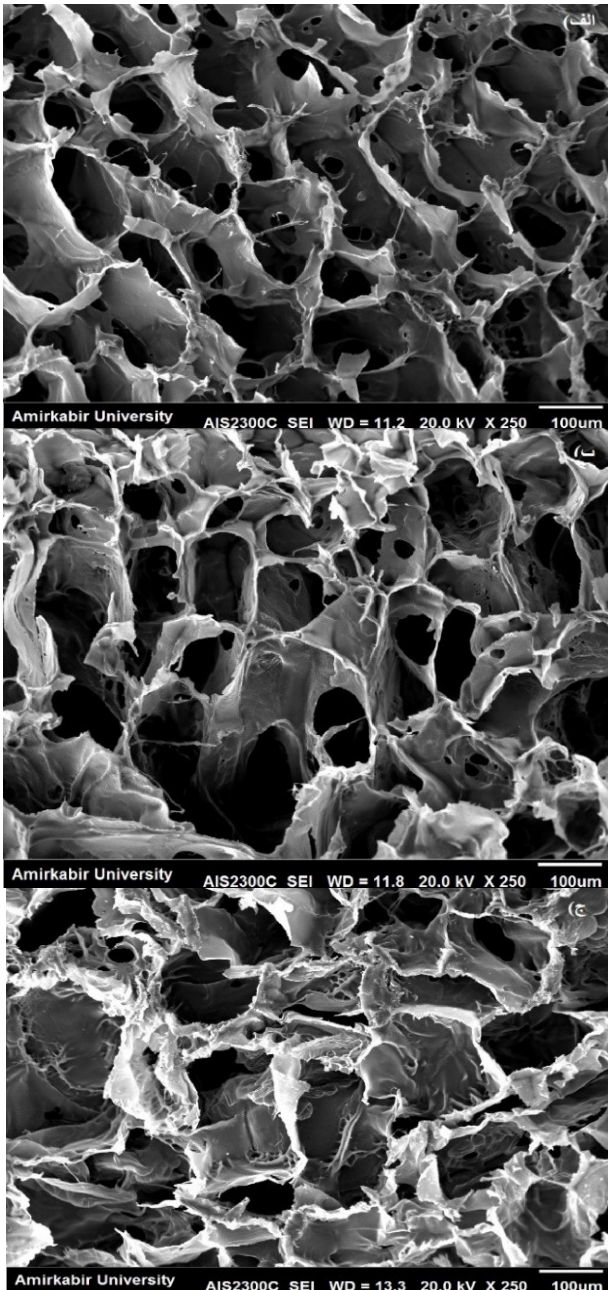
##### ۳-۶ مورفولوژی سلول

به منظور بررسی مورفولوژی سلول‌های کشت داده شده بر روی داربست تهیه شده،  $5 \times 10^4$  سلول بر روی سطح (۱)  $\text{cm}^2$  داربست قرار داده و پس از آن برای تثبیت سلول‌ها از محلول گلوآلدهید ۴٪ استفاده شد. بنابراین، ابتدا محیط کشت اطراف نمونه‌ها را خارج کرده و سپس محلول گلوآلدهید ۴٪ را روی داربست ریخته تا حدی که سطح نمونه را بپوشاند. پس از گذشت یک ساعت، محلول گلوآلدهید اطراف نمونه را خارج کرده و با محلول اتانول ۴۰، ۵۰، ۶۰، ۷۰، ۸۰ و ۹۶٪؛ هر کدام به مدت پنج دقیقه شسته می‌شود [۱۹]. در انتها نمونه‌ها به مدت دو ساعت در زیر هود قرار گرفته تا خشک شوند. بعد از اطمینان از خشک شدن نمونه‌ها، ابتدا روی سطح آنها را با لایه‌ای از طلا پوشانده و سپس با استفاده از میکروسکوپ الکترونی روبشی<sup>۱</sup> مورد آنالیز قرار گرفتند.

<sup>۱</sup> SEM



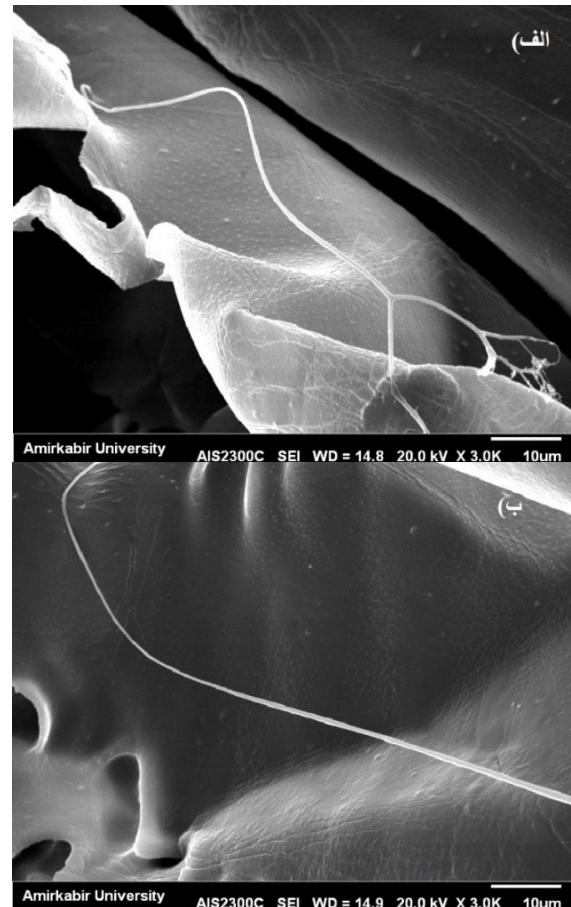
حضور P و Ca بر روی تمام نمونه ها را نشان می‌دهد و بیشترین میزان آن مربوط به نمونه SF2-CG است که نسبت P/Ca تشکیل شده بر روی آن -۱/۶۶ می‌باشد که نزدیک به حالت آپاتیته شدن می‌باشد.



شکل ۳. تصاویر SEM با بزرگنمایی  $100\times$  در داربست‌های الف)-SF2-CG (ب) SF1-CG (ج) CG.

شکل (۵) میزان رسوب کلسیم فسفات بر روی داربست های ساخته شده با درصدهای مختلف نانوالیاف فیبروین ابریشم/کاپا-کاراگینان را برحسب گرم نشان می‌دهد.

با  $131.6247\pm 5/02$  میکرومتر است که جهت استفاده در مهندسی بافت استخوان مناسب می‌باشند. میانگین اندازه درصد تخلخل داربست‌ها در جدول (۳) نشان داده شده است.



شکل ۲. تصاویر نانوالیاف فیبروین درون داربست‌ها با بزرگنمایی  $3000\times$  الف) SF2-CG (ب) SF1-CG.

جدول ۳. میانگین اندازه تخلخل و درصد تخلخل در داربست‌ها.

داربست	میانگین اندازه تخلخل	درصد تخلخل
SF2-CG	$131.6247\pm 5/02$	$63.472\pm 1/9$
SF1-CG	$155.5818\pm 2/6$	$67.016\pm 2/1$
CG	$183.5452\pm 3/2$	$71.898\pm 3/9$

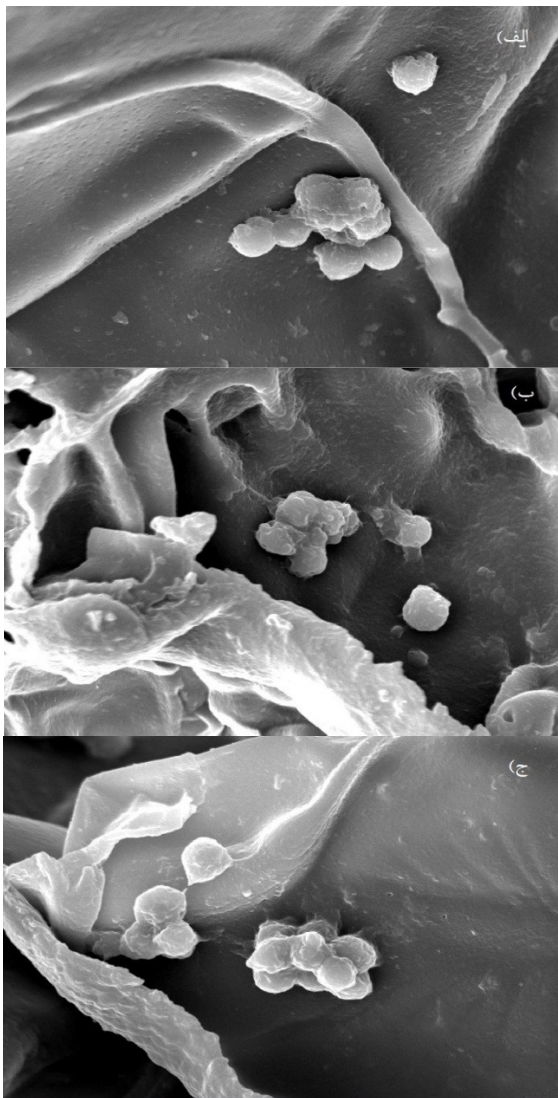
#### ۳-۴ بررسی رسوب کلسیم فسفات

جوانه‌زنی کلسیم فسفات بر روی داربست‌ها، هفت روز پس از غوطه‌وری در محلول SBF با استفاده از آنالیز EDS نمودار شکل (۴)، به تایید رسیده است. برای تشخیص و شناسایی عناصر P و Ca جهت بررسی تشکیل کلسیم فسفات از آنالیز SEM-EDS استفاده شده است. نتایج آنالیز EDS

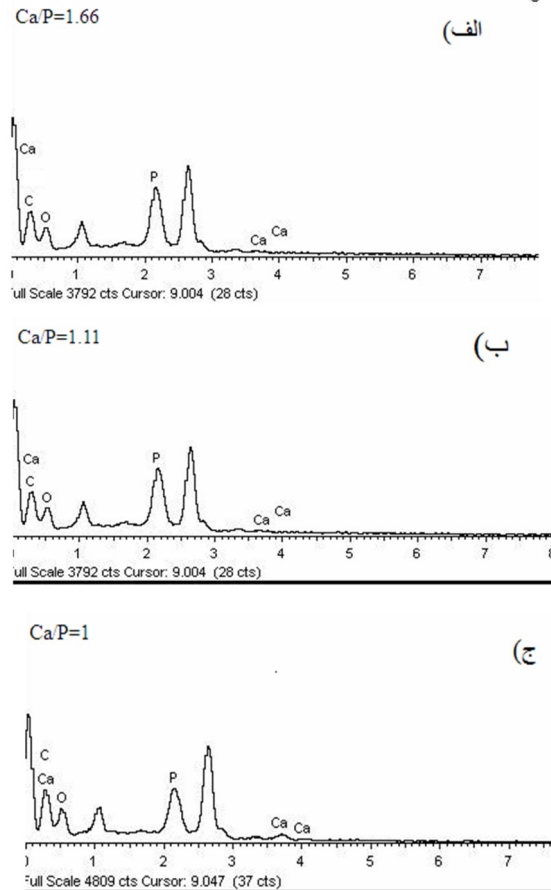
در پلیمر کاراگینان است که سبب جذب یونهای کلسیم و فسفر و جوانه‌زنی آپاتیت می‌شود. وجود نانوالیاف درون بستر، ساختار داربست‌ها را تا حد زیادی شبیه ماده زمینه‌ای خارج سلولی بافت استخوان کرده است که سبب افزایش تشکیل رسوب کلسیم‌فسفات می‌شود. وجود گروه‌های سولفات در کاراگینان، سبب ترغیب و جوانه‌زنی کلسیم‌فسفات روی سطح نمونه‌ها می‌شود. با گذشت زمان جوانه‌های کلسیم‌فسفات ایجاد شده با جذب یونهای  $Ca^{2+}$ ،  $PO_4^{3-}$  و  $CO_3^{2-}$  از محیط SBF رشد می‌کنند.

#### ۴-۴ مورفولوژی سلول

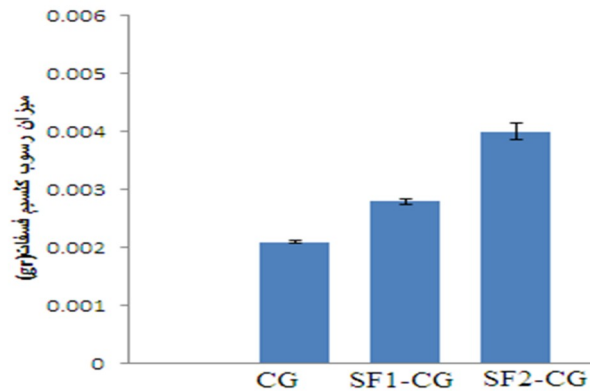
شکل (۶)، مورفولوژی سلول‌های MG-63 پس از قرارگیری داربست‌ها به مدت یک روز در محیط کشت را نشان می‌دهد.



شکل ۶. تصاویر میکروسکوپ الکترونی با بزرگنمایی  $\times 3000$ ، از چسبندگی سلول بر روی داربست‌های الف) SF2-CG ب) SF1-CG ج) CG



شکل ۴. نمودارهای EDS مربوط به داربست‌های الف) SF2-CG ب) SF1-CG ج) CG.



شکل ۵. مقدار رسوب کلسیم‌فسفات بر روی نمونه‌ها برحسب گرم، بعد از هفت روز غوطه‌وری در محلول SBF ( $p < 0.05$ ).

همان‌طور که در نمودار شکل (۵) نشان داده شده است، میزان رسوب کلسیم‌فسفات در داربست CG برابر است با  $10^{-3} \times 0.0021 \pm 0.0020$  و این مقدار در داربست‌های SF1-CG و SF2-CG به ترتیب به مقدارهای  $10^{-3} \times 0.0029 \pm 0.0050$  و  $10^{-3} \times 0.004 \pm 0.0015$  می‌رسد. اعداد به دست آمده نشان می‌دهد که رسوب کلسیم-فسفات بر روی تمام داربست‌ها تشکیل شده است. این امر نیز به دلیل وجود گروه‌های سولفات

زیستی از ماده زمینه‌ای خارج سلولی بافت استخوان، به منظور بازسازی بافت استخوان ارائه شده است. در ابتدا محلول پلیمری کاراگینان با غلظت مناسب تهیه شد و سپس، تخلیص فیبروین از ابریشم انجام شده و نانوالیاف فیبروین الکتروریسی شده به عنوان فاز تقویت‌کننده و گلو تار آلدهید به عنوان عامل شبکه‌ای کننده با مقدار مشخص و مدنظر به سیستم‌ها اضافه شدند. سپس با استفاده از روش فریزدرایر ساخت داربست‌ها با تخلخل مناسب انجام شد. تصاویر میکروسکوپ الکترونی تخلخل‌های باز با اتصال درونی در همه داربست‌ها را نشان داد. نتایج حاصل از SEM-EDS از نمونه‌ها، تشکیل هیدروکسی آپاتیت را بر روی انواع داربست تایید کرده است. همچنین نتایج نشان داده است که در حضور نانوالیاف فیبروین و با افزایش درصد نانوالیاف میزان تشکیل شدن کلسیم فسفات هم افزایش می‌یابد. همچنین تصاویر میکروسکوپ الکترونی روشی حاصل از کشت سلول‌های استئوسارکوما MG-63 بر روی داربست‌ها نشان داد که سلول‌ها به خوبی روی داربست‌ها گسترش یافته و چسبیده‌اند، به طوری که یک لایه سلولی روی سطح داربست‌ها پوشانده شده است.

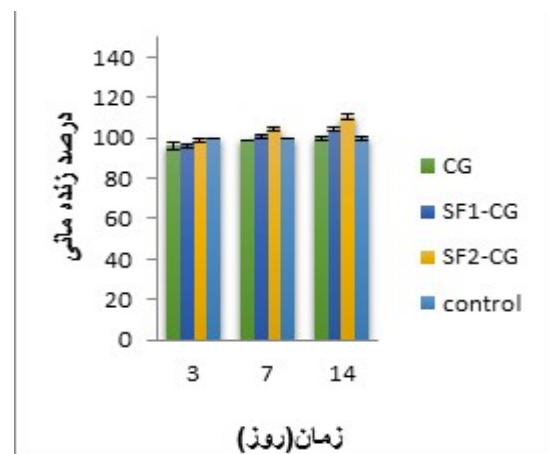
### مراجع

- Blom, A., (V) Which scaffold for which application?, *Current Orthopaedics*, 21 (2007) 280-287.
- Yuan, J., Zhang, W.J., Liu, G., Wei, M., Qi, Z.L., Liu, W., Cui, L., Cao, Y.L., Repair of canine mandibular bone defects with bone marrow stromal cells and coral, *Tissue Engineering Part A*, 16(4) (2010) 1385-1394.
- Wang, J.L., Zin, Y.T., Tzeng, C.C., Lin, C.I., Lin, S.W., Chang, G.L., The assay of bone reaction after implantation of calcium sulfate and a composite of calcium sulfate and calcium phosphate, *Journal of Medical and Biological Engineering*, 23(4) (2003) 205-212.
- مجاهدیان، م.، امکان‌سنجی تشکیل لایه‌ی کلسیم‌فسفات بر روی بستری از کیتوسان سولفونو و بررسی رشد سلول‌های استئوبلاست بر روی آن، کارشناسی ارشد، دانشگاه تهران، (۱۳۹۳).
- Lanza, R., Langer, R., Vacanti, J., Principle of Tissue Engineering, Elsevier Academi press, (2007).
- Puppi, D., Chiellini, F., Piras, A.M., Chiellini, E., Polymeric materials for bone and cartilage repair, *Progress in Polymer Science*, 35(4) (2010) 403-440.
- Peppas, N.A., Hilt, J.Z., Khademhosseini, A., Langer, R., Hydrogels in biology and medicine: from molecular principles to bionanotechnology, *Advanced Materials*, 18(11) (2006) 1345-1360.
- Deng, J., She, R., Huang, W., Dong, Z., Mo, G., Liu, B.,

همان‌طور که در شکل (۶) نشان داده شده است، سلول‌ها به خوبی به وسیله پاهای کاذب روی سطح تمام داربست‌ها چسبیده‌اند و به داخل حفرات نفوذ کرده‌اند. همچنین دیده می‌شود که سلول‌ها خیلی خوب به بستر چسبیده‌اند و مورفولوژی دوکی‌شکلی را از خود به نمایش گذاشته‌اند. همچنین در شکل‌ها مشاهده می‌شود که سلول‌های پهن شده به وسیله لاملی پودیا<sup>۱</sup> خیلی محکم به سطح چسبیده‌اند.

### ۴-۵ اندازه‌گیری میزان سمیت سلولی با روش غیرمستقیم (عصاره‌گیری)

میزان بقای سلولی برای نمونه‌های مختلف با آزمون اندازه‌گیری میزان سمیت سلولی با روش غیرمستقیم در مقایسه با نمونه کنترل و در زمان‌های مختلف انجام شده است. همان‌طور که در شکل (۷) مشاهده می‌شود، زنده‌مانی سلول‌ها بر روی همه داربست‌های بالای ۹۰٪ حاصل شده است.



شکل ۷. نمودار ارزیابی کمی زنده‌مانی سلولی به روش عصاره‌گیری برای انواع داربست‌ها بعد از سه و هفت روز.

تصاویر SEM از چسبندگی سلول‌ها بر روی سطح داربست‌ها و نیز نتایج آزمون MTT نشان می‌دهند که داربست‌های کامپوزیتی ساخته شده با درصد‌های مختلف کاراگینان و نانوالیاف فیبروین ابریشم زیست‌سازگار هستند و مناسب برای کاربردهای مهندسی بافت استخوان می‌باشند.

### ۵ - نتیجه‌گیری

در این مقاله، داربست‌های کامپوزیتی زیست‌فعال جدیدی بر پایه کاپا-کاراگینان/نانوالیاف فیبروین ابریشم با هدف تقلید

<sup>۱</sup> Lamellipodia



- A silk fibroin/chitosan scaffold in combination with bone marrow-derived mesenchymal stem cells to repair cartilage defects in the rabbit knee, *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, 24(8) (2013) 2037-2046.
9. Hardy, J.G., Römer, L.M., Scheibel, T.R., Polymeric materials based on silk proteins, *Polymer*, 49(20) (2008) 4309-4327.
  10. Campo, V.L., Kawano, D.F., da Silva Jr, D.B., Carvalho, L., Carrageenans: Biological properties, chemical modifications and structural analysis—A review, *Carbohydrate Polymers*, 77(2) (2009) 167-180.
  11. Yiu, H., Handbook of food science, technology, and engineering, CRC Press, ISBN 978-1-57444-552-7. (2011).
  12. Lim, Y.M., Gwon, H.J., Choi, J.H., Shin, J., Nho, Y.C., Jeong, S.I., Chong, M.S., Lee, Y.M., Kwon, I.K., Kim, S.E., Preparation and biocompatibility study of gelatin/kappa-carrageenan scaffolds, *Macromolecular Research*, 18(1) (2010) 29-34.
  13. Li, L., Ni, R., Shao, Y., Mao, S., Carrageenan and its applications in drug delivery, *Carbohydrate polymers*, 103 (2014) 1-1.
۱۴. روشن فر، ف.، امکان سنجی و ارزیابی تشکیل کلسیم فسفات بر روی داربست فیبروین ابریشم-کاراگینان حاوی نانوالیاف فیبروین به منظور استفاده در مهندسی بافت استخوان، کارشناسی ارشد، دانشگاه تهران، تهران، (۱۳۹۴).
15. Nourmohammadi, J., Roshanfar, F., Farokhi, M., Nazarpak, M.H., Silk fibroin/kappa-carrageenan composite scaffolds with enhanced biomimetic mineralization for bone regeneration applications, *Materials Science and Engineering: C*, 76 (2017)951-958.
  16. Kokubo, T., Takadama, H., How useful is SBF in predicting in vivo bone bioactivity?, *Biomaterials*, 27(15) (2006) 2907-2915.
  17. Mirahmadi, F., Tafazzoli-Shadpour, M., Shokrgozar, M.A., Bonakdar, S., Enhanced mechanical properties of thermosensitive chitosan hydrogel by silk fibers for cartilage tissue engineering, *Materials Science and Engineering: C*, 33(8) (2013) 4786-4794.
  18. Reignier, J., Huneault, M.A., Preparation of interconnected poly ( $\epsilon$ -caprolactone) porous scaffolds by a combination of polymer and salt particulate leaching, *Polymer*, 47(13) (2006) 4703-4717.
  19. Gomes, M.E., A bone tissue engineering strategy based on starch scaffolds and bone marrow cells cultured in a flow perfusion bioreactor, (2004).
  20. Hadisi, Z., Nourmohammadi, J., Mohammadi, J., Composite of porous starch-silk fibroin nanofiber-calcium phosphate for bone regeneration, *Ceramics International*, 41(9) (2015) 10745-10754.