

## خاصیت آنتی باکتریال داربست های متخلخل برای درمان ضایعه استخوانی

دکتر هادی تابش<sup>#</sup>، مریم رضایی<sup>۱</sup>، سعید غلامی چهارشاهی<sup>۲</sup>، سیده نازیلا جعفری فرجام<sup>۳</sup>، دکتر بهزاد هوشمند<sup>۴</sup>

- ۱- استادیار گروه مهندسی علوم زیستی، دانشکده علوم و فنون نوین، دانشگاه تهران، تهران، ایران .  
 ۲- کارشناسی ارشد مهندسی شیمی-زیست پزشکی، دانشکده علوم و فنون نوین، دانشگاه تهران، تهران، ایران  
 ۳- کارشناسی ارشد بیوتکنولوژی، دانشکده علوم و فنون نوین، دانشگاه تهران، تهران، ایران  
 ۴- استاد گروه پرئودانتیکس، دانشکده دندان پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، تهران، ایران

پذیرش مقاله: ۹۹/۵/۲۰

اصلاح نهایی: ۹۹/۳/۱۵

وصول مقاله: ۹۸/۱۰/۳۰

### Development of an antibacterial porous scaffold for bone defect treatment

Hadi Tabesh<sup>1</sup>, Maryam rezaie<sup>2</sup>, Saeed gholami<sup>2</sup>, Nazila Jafari Farjam<sup>3</sup>, Behzad Houshmand<sup>4</sup>

1. Assistant Professor, Department of Life Science Engineering, Faculty of New Science and Technologies, University of Tehran, Tehran, Iran.

2. M.Sc. of Chemical/Biomedical Eng., Department of Life Science Engineering, Faculty of New Science and Technologies, University of Tehran, Tehran, Iran.

3. M.Sc of Biotechnology., Department of Life Science Engineering, Faculty of New Science and Technologies, University of Tehran, Tehran, Iran.

4. Professor, Periodontics Dept, Dental School, Shahid Beheshti University of Medical Sciences, Tehran, Iran.

Received: Dec 2020 ; Accepted: JUNE 2021

#### Abstract

**Background & Aim:** The use of bone scaffolds is one of the new and efficient techniques for repairing bone defects that provide a suitable platform for cell proliferation and growth to repair the target tissue. One of the most important causes of failure of transplants and surgical procedures is the invasion of bacteria at the site of the complication and the development of severe infection. The purpose of this study, which was carried out at the Faculty of New Sciences and Technologies, University of Tehran at 2017-2019, Antibacterial Properties of Porous Scaffolds Made of Gelatin, Calcium Phosphate Zeolite with Loading of Clindamycin.

**Material and methods:** In this study, freeze-drying was made from a combination of gelatin, calcium phosphate, and natural zeolite of bone tissue scaffolds and then the drug was loaded with different amounts of clindamycin. The surface of the scaffold was examined by scanning electron microscopy and antibacterial test and drug release test were performed on the scaffold.

**Results:** The results showed that the aforementioned composite scaffold did not induce growth inhibition in the antibacterial test, However, after loading the drug on the scaffold with a concentration of 0.01 drug, the growth zone was 2 and 4 mm in diameter for Escherichia coli and Staphylococcus aureus, respectively.

**Conclusions:** Addition of the antibacterial agent clindamycin to the bone scaffold made a suitable substrate for drug delivery to bone tissue at the site of removal has been removed to prevent the growth of infection at the scaffold implant during the first period of repair.

**Key words:** Bone Tissue, Scaffold, Antibacterial Drug, clindamycin.

**# Corresponding Author:** hadi.tabesh@ut.ac.ir

J Res Dent Sci. 2021;18(1): 32-40.

**خلاصه:**

**سابقه و هدف:** استفاده از داربست‌های استخوانی یکی از تکنیک‌های جدید و کارآمد جهت ترمیم مشکلات استخوانی است که بستری مناسب برای تکثیر و رشد سلول‌ها را در جهت ترمیم بافت هدف فراهم می‌کند. یکی از مهم‌ترین علل ناموفق بودن پیوندها و عمل‌های جراحی، تهاجم باکتری‌ها در محل عارضه و ایجاد عفونت شدید است. هدف این پژوهش که در سالهای ۱۳۹۷-۱۳۹۵ در دانشکده علوم و فنون نوین، دانشگاه تهران انجام شد به بررسی خواص آنتی‌باکتریایی داربست‌های متخلخل ساخته شده از ژلاتین، کلسیم فسفات و ژئولیت با بارگذاری داروی کلیندامایسین پرداخته است.

**مواد و روش‌ها:** در این پژوهش به روش خشک‌کایش انجمادی از ترکیب ژلاتین، کلسیم فسفات و ژئولیت طبیعی داربست بافت استخوان تولید شد و پس از آن داروی کلیندامایسین با مقادیر مختلف در آن بارگذاری گردید. سطح داربست با میکروسکوپ الکترون روبشی مورد بررسی قرار گرفت و آزمون آنتی‌باکتریال و تست ره‌ایش دارو بر روی داربست انجام شد.

**یافته‌ها:** نتایج نشان دادند که داربست کامپوزیتی ذکر شده بدون دارو در محیط کشت باکتری‌ها هاله عدم رشد ایجاد نکرد، ولی پس از بارگذاری دارو بر روی داربست با غلظت ۰/۰۱ دارو هاله عدم رشد به قطر ۲ و ۴ میلی‌متری به ترتیب برای باکتری‌های اش‌ریشیاکلی و استافیلوکوکوس اورئوس شد.

**نتیجه‌گیری:** افزودن عامل ضد باکتریایی کلیندامایسین به داربست استخوانی ساخته شده بستر مناسبی برای دارورسانی به بافت استخوان در محل بافت حذف شده است تا از رشد عفونت در محل کاشت داربست در دوره اول ترمیم جلوگیری کند.

**کلید واژه‌ها:** بافت استخوان، متخلخل، آنتی‌باکتریال، کلیندامایسین.

**مقدمه:**

احاطه شد، درمان با واکنش التهابی مواجه می‌شود که به عدم ترمیم مناسب استخوان منتهی می‌گردد. عفونت موجب مشکلات زیادی برای بدن می‌شود. عفونت می‌تواند بافت‌ها را از بین ببرد<sup>(۱)</sup>؛ همچنین احتمال گسترش عفونت در بدن و مبتلا شدن دیگر قسمت‌های بدن به آن می‌تواند بسیار خطرناک باشد. یکی از شایع‌ترین میکروب مولد عفونت استخوان باکتری به نام استافیلوکوک طلائی است.<sup>(۲)</sup>

یکی از مرسوم‌ترین راه درمان استفاده از داروی آنتی‌بیوتیک که از دو راه طبیعی و مصنوعی به دست می‌آیند. آنتی‌بیوتیک‌ها در سطوح متفاوتی در درمان عفونت‌ها ایفای نقش می‌کنند<sup>(۳)</sup>. برای مثال کلیندامایسین شکل‌گیری گلایکوکالیکس را کاهش می‌دهد و به رشد فاگوسیت‌ها سرعت می‌دهد و عفونت را سرکوب می‌کند<sup>(۴)</sup> کلیندامایسین در مقابل ارگاناسم‌هایی نظیر *Plasmodium*, *Toxoplasma Babesia*, and *Pneumocystis spp.* واکنش بسیار مناسبی از خود نشان می‌دهد. استفاده موثر از آنتی‌بیوتیک‌ها در درمان استئومیلیت نیاز به شناخت مشخصه‌های پاتو فیزیولوژیک این بیماری دارد. *Staphylococcus* و *Pseudomonas* مهم‌ترین پاتوژن‌های

در حال حاضر داربست‌های استخوانی ساخته شده از مواد معدنی و طبیعی، تا حد زیادی جایگزین پیوندهای استخوانی در درمان آسیب‌های استخوانی شده‌اند. مواد انتخاب شده در داربست‌های استخوانی بر اساس خواص مکانیکی-زیستی انتخاب شده‌اند. از مهم‌ترین ویژگی داربست‌های ساخته شده می‌توان به زیست‌فعالی و زیست‌تخریب‌پذیر بودن آن‌ها اشاره کرد.<sup>(۱،۲)</sup>

امروزه یکی از اصلی‌ترین چالش‌ها در زمینه کاشت داربست و ایمپلنت در بدن، عفونت ایجاد شده در محل کاشت است که منجر به خطرات و عوارض جانبی زیادی می‌گردد. عفونت ناشی از باکتری‌ها در ترمیم بافت استخوان یک عارضه نگران‌کننده است؛ زیرا که خطر تخریب استخوان را بالا می‌برد<sup>(۱)</sup> قرارگرفتن داربست به عنوان جسم خارجی در استخوان، رقابتی بین پاتوژن‌های عفونت‌زا و دفاع سلولی بدن به راه می‌اندازد. اگر باکتری‌ها در این رقابت برنده شوند، یک لایه بیوفیلم بر روی داربست تشکیل می‌دهند که آن‌ها را از آنتی‌بیوتیک محافظت می‌کند، بنابراین به راحتی به رشد خود ادامه می‌دهند. همین که گرفتار استخوانی به واسطه میکروب‌ها

متوقف می‌کند<sup>(۱۰)</sup>؛ که در این پژوهش به عنوان یک آنتی بیوتیک موثر بر روی داربست ساخته شده بارگذاری شده است.

#### مواد و روش ها:

مواد استفاده شده به همراه فرمول شیمیایی و شرکت سازنده در ساخت این داربست، به شرح جدول زیر است.

شرکت سازنده	فرمول شیمیایی	ماده شیمیایی
شرکت سازنده ( Exir AUSTRIA)	Ca <sub>3</sub> (PO <sub>4</sub> ) <sub>2</sub>	پودر β-TCP
Merck (GERMNY)	C <sub>6</sub> H <sub>12</sub> O <sub>6</sub>	ژلاتین
Merck (GERMNY)	SiO <sub>2</sub>	گلوکار آلدهاید با خلوص ۲۵٪
UNIVERSITY OF TEHRAN	H <sub>2</sub> O	آب دی یونیزه
ماده معدنی	(NaKCa) <sub>2</sub> - 3[Al <sub>3</sub> (AlSi) <sub>2</sub> Si <sub>13</sub> O <sub>36</sub> ].12H <sub>2</sub> O	پودر زئولیت کلینیپتولولیت
Merck (GERMNY)	C <sub>18</sub> H <sub>33</sub> ClN <sub>2</sub> O <sub>5</sub> S	داروی کلیندامایسین

#### ساخت داربست

ابتدا میزان ۰.۹۹ گرم ژلاتین در ۱۰ سی سی آب دیونیزه دوبار تقطیر حل گردیده و به مدت ۲ ساعت بر روی استیرر با دمای ۵۰ درجه سانتی‌گراد قرار گرفت. سپس زئولیت طبیعی و تری کلسیم فسفات برای انحلال بهتر هرکدام در بشر های جداگانه به میزان ۰/۵ گرم در ۱۵ سی سی آب دیونیزه در دستگاه اولتراسونیک (TOPSONIC (IRAN)) به مدت ۳۰ دقیقه حل گردید. سپس مواد به ترتیب با یکدیگر اختلاط یافتند و گلوکار آلدهید به میزان ۰.۵ درصد حجمی-حجمی به آن افزوده شد و در نهایت داروی کلیندامایسین به آرامی و با توجه به مقادیر جدول شماره ۲ به آن افزوده شد که در نتیجه داربست تهیه شده و به مدت ۲۴ ساعت در فریزر قرار گرفت. سپس به مدت ۴۸ ساعت در فریزر (Operon- FDB-5503 (model (KOREA) در دمای ۸۳- درجه سانتی‌گراد و فشار ۰/۹۱۳ mbar گنجانده شد. در این مرحله آب میان صفحات داربست مستقیماً تبخیر شده و باعث تشکیل حفرات و ایجاد تخلخل در داربست می‌شود. داربست پس از خروج از فریز

مسئول این عفونت در بدن انسان است. در ۹۰ درصد مواقع عفونت استئومیلیت به همراه ایمپلنت‌گذاری‌ها در محل با پاتوژن *Staphylococcus* حادث می‌شود<sup>(۶،۵)</sup>. از طرفی این روش درمان هم به علت خورسانی ضعیف به بافت استخوان با غلظت های زیاد دارو خوراکی و یا تزریقی انجام و همراه با چالش‌ها و مشکلات زیادی است.

با سیستم داروسازی و قرص‌های سنتی میزان دارو در خون پس از هربار استعمال بالا می‌رود و سپس تا استعمال بعدی دارو، این میزان افت می‌کند و در هر بار استفاده دوره‌ای دارو، غلظت آن گاهی کمتر از حد موثره و پس از استعمال به بیش از حد موثره که سمی است، می‌رسد. در سامانه های داروسازی کنترل شده، میزان دارو در خون برای یک دوره طولانی بین حالت مطلوب حداکثر و حداقل حد موثره به طور نسبتاً ثابت باقی می‌ماند.

در انجام این پژوهش، β-TCP مورد استفاده قرار گرفته است که به دلیل شباهت با ساختار استخوان طبیعی در ترمیم استخوان بسیار پرکاربرد بوده ولی در مقابل، بسیار تخریب پذیر است و بخاطر شکنندگی و تردی، خواص مکانیکی ضعیفی دارد<sup>(۷)</sup>. در طرف مقابل از ژلاتین بهره گرفته شد؛ که خواصی نظیر زیست‌سازگاری خوب، سادگی کار با آن، ارزانی، عدم نیاز به حلال‌های آلی و غیره را داراست<sup>(۸)</sup> تخلخل خود به خودی ژلاتین، سبب به وجود آمدن خلل و فرج می‌گردد و از طرف دیگر در ساخت این داربست بیش از پیش روش خشکایش انجمادی مورد استفاده قرار می‌گیرد که در نتیجه پژوهش مورد نظر ما را نیز به همین سمت سوق داده است. زئولیت طبیعی نیز دیگر ماده‌ی مورد استفاده در این فرآیند است به خاطر ویژگی سطحی مناسب، داشتن خلل فرج و تاثیرگذاری در سامانه های رهایش دارو و همینطور خواص استحکامی مناسب‌تر نسبت به HA، مورد تحلیل قرار می‌گیرد<sup>(۹)</sup>.

کلیندامایسین به گروه دارویی آنتی بیوتیک های لینکوسامید یا لینکومایسین تعلق دارد که با مهار تولید پروتئینی که باکتری‌ها برای پخش عفونت در بدن نیاز دارند، فعالیت باکتری‌ها را

مقایسه شد و زمانیکه که کدورت هر دو محلول یکسان بودند، بوسیله سوآپ استریل از محلول باکتری برداشته و روی پتری دیش حاوی محیط کشت آگار به صورت چمنی کشت داده شد. داربست‌های تهیه شده از ژئولیت طبیعی و تری کلسیم فسفات و ژلاتین به همراه داروی کلیندامایسین در غلظت‌های مختلف و بدون دارو به صورت مساوی برش داده و پس از شست و شو در آب مقطر به مدت ۲۰ دقیقه در ۵ سانتی متری نور UV قرار داده شدند، سپس داربست‌ها با فاصله از هم روی محیط کشت حاوی باکتری در ۳ تکرار قرار داده شدند. پتری دیش‌ها به مدت دو ساعت درون یخچال قرار داده شدند و سپس به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد نگهداری شدند. کلیندامایسین از دیسک به محیط اطراف منتشر شده و مانع از رشد باکتری‌های مورد استفاده می شود. با اندازه گیری قطر هاله عدم رشد به سادگی می توان حساسیت باکتری را نسبت به داربست‌های مختلف که حاوی داروی کلیندامایسین هستند را تعیین نمود. هاله عدم رشد باکتری در اطراف داربست‌ها روی محیط کشت باکتری نشان دهنده خاصیت آنتی‌باکتریال نمونه‌ها است. قابل ذکر است که مقدار حداقل غلظت مهار کلیندامایسین با توجه به پژوهش‌ها ۶۴ میلی گرم بر لیتر گزارش شده است<sup>(۱۱)</sup>

#### ساخت محلول استاندارد نمودار کالیبراسیون

برای تهیه محلول استاندارد برای رسم نمودار کالیبراسیون ابتدا ۱ گرم از داروی کلیندامایسین را در ۱۰۰ میلی لیتر آب دیونیزه حل کرده و سپس با استفاده از روابط استوکیومتری آن را تا رقت ۱ mg/ml رقیق کرده و پس از آن با توجه به نتایج اسپکتروفوتومتری در نرم افزار اکسل، نمودار کالیبراسیون آن رسم می‌شود.

#### آنالیز رهائش دارو

برای انجام آنالیز رهائش دارو، محلول PBS به دلیل شباهت زیاد به پلاسما به عنوان محیط رهائش انتخاب شد<sup>(۱۲)</sup>. پس از ساخت داربست‌ها، دایره‌هایی با قطر ۱ سانتی متر که تقریباً وزن یکسانی داشته‌اند را از داربست‌ها برش داده و در محلول PBS بصورت معلق قرار گرفتند. جهت توزیع یکنواخت دارو در

درایر وسه بار شست و شو داده شد و به وسیله آون خشک گردید. در جدول انواع داربست‌های ساخته شده در این پژوهش آورده شده‌است.

جدول - انواع داربست‌های ساخته شده

نام اختصاری	GTZ-A	GTZ-B	GTZ-C
مقدار دارو (g)	۰	۰.۰۱	۰.۰۰۱
مقدار گرم ژلاتین	۰.۹۹ g	۰.۹۹ g	۰.۹۹ g
مقدار گرم کلسیم فسفات	۰.۵ g	۰.۵ g	۰.۵ g
مقدار گرم ژئولیت	۰.۵ g	۰.۵ g	۰.۵ g

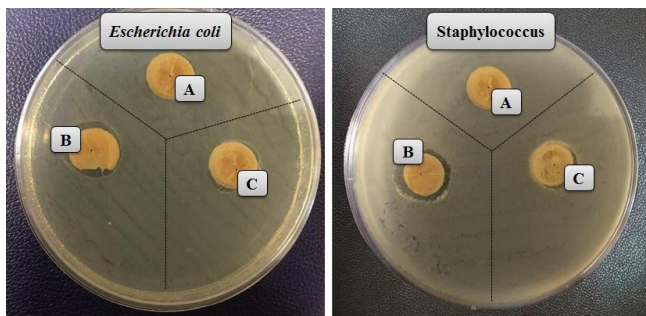
#### آنالیز میکروسکوپ الکترونی روبشی (SEM)

آنالیز SEM با استفاده از میکروسکوپ الکترونی مدل AIS2100 (Scanning Electron Microscope) شرکت سازنده SERON TECHNOLOGIES کشور کره جنوبی مورد بررسی قرار گرفته است. از این دستگاه جهت بررسی خلل و فرج داربست، درصد تخلخل و توپوگرافی سطح داربست استفاده شده است.

#### انجام تست آنتی‌باکتریال به روش دیسک دیفیوژن

برای تشخیص فعالیت ضد میکروبی داربست ژئولیت طبیعی و تری کلسیم فسفات و ژلاتین به همراه داروی کلیندامایسین در برابر باکتری‌های گرم مثبت بر روی *Staphylococcus aureus* (استافیلوکوکوس اورئوس ATCC ۳۳۵۹۱) و باکتری‌های گرم منفی بر روی *Escherichia coli* (اشریشیا کولی ATCC ۲۳۵۹۱) با استفاده از روش انتشار دیسک در آگار بررسی شدند. ابتدا در زیر هود بیولوژیک، مقدار یک تا دو تک کلنی از باکتری‌های رشد یافته بر روی محیط کشت آگار را با لوپ استریل برداشته و در سرم فیزیولوژی استریل موجود در لوله آزمایش حل شد؛ پس از گذشت چند دقیقه کدورت محلول با محلول استاندارد ۰/۵ مک فارلند

در اطراف داربست رشد کرده‌اند. در داربست C باکتری در زیر داربست نتوانسته است رشد کند و هاله عدم رشد قابل درکی در اطراف داربست مشاهده نمی‌شود. در داربست B که میزان داروی بارگذاری شده بیشتر از داربست C است هاله عدم رشد در اطراف داربست قابل مشاهده است بطوریکه قطر هاله عدم رشد ۲ و ۴ میلی‌متری به ترتیب برای باکتری‌های اشرشیاکلی و استافیلوکوکوس اورئوس اندازه‌گیری شد که با توجه به جدول به ترتیب دارای حساسیت میانی و بالا بودند. با افزایش غلظت دارو، افزایش خواص آنتی باکتریال قابل مشاهده است.



شکل ۲- تصاویر قطر هاله رشد در حضور دو نوع باکتری

در جدول ۳ با استفاده از نرم افزار Image J قطر هاله رشد برای هر داربست در حضور هر دو باکتری اندازه‌گیری و نشان داده شده است. با توجه به جدول زیر داربست GTZ-B با بیشترین غلظت دارو، بیشترین هاله عدم رشد را دارا است.

جدول ۳. اندازه‌گیری قطر هاله رشد داربست‌ها

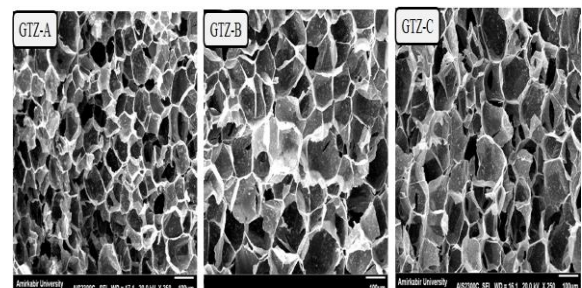
نام داربست	قطر هاله باکتری استافیلوکوکوس اورئوس (mm)	قطر هاله باکتری اشرشیاکلی (mm)	قطر هاله استاندارد (mm) [۱۳]
G			S>18
TZ-A			
GTZ-B	۴/۱۴+۰۰۷	۲/۱۴+۰۰۱	16<I<17
GTZ-C	۱۴+۰/۸۸	۰/۱۴+۵۱	R<15

محیط رهایش، نمونه‌ها بر روی شیکر اوربیتال با دور ۸۰ rpm قرار گرفتند. پس از هر بار نمونه‌برداری که ۷ روز هر ۲۴ ساعت یکبار انجام شد، محلول PBS تازه جایگزین محلول قبلی می‌شد و توسط دستگاه اسپکتروفوتومتر ( NanoDrop 2000/2000c Spectrophotometer. V1.0 User Manual) میزان جذب نوری اندازه‌گیری شده و سپس با کمک نمودار استاندارد غلظت داروهای رها شده در محلول محاسبه می‌شود.

## یافته‌ها

### آنالیز میکروسکوپ الکترونی روبشی

با توجه به شکل ۱، خلل و فرج‌های باز و بهم پیوسته با اندازه متناسب برای رشد و عبور سلول‌ها، کمک شایانی به تمایز سلولی و رگ‌زایی در بافت می‌کند. سایز اندازه حفرات با توجه به مقیاس تصاویر ۲۵۰-۵۰ میکرومتر مشاهده شده است که امکان ورود سلول به داخل داربست و همچنین دفع ضایعات سلولی را فراهم می‌کند



شکل ۱- تصویر SEM داربست استخوانی کلسیم

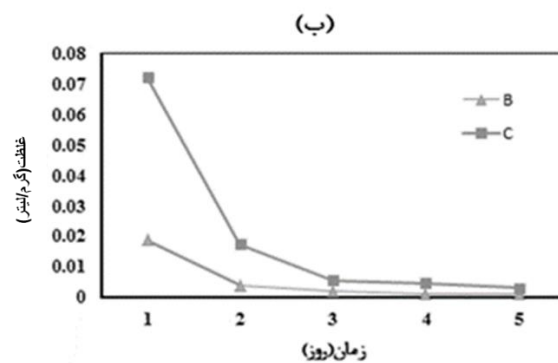
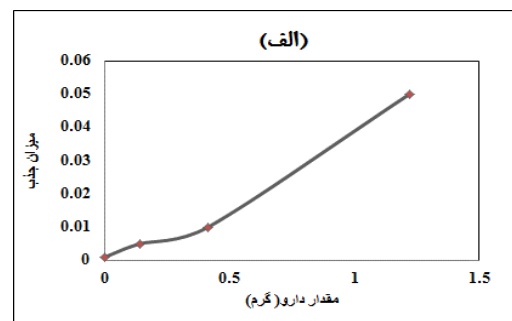
فسفات اژلاتین/ژئولیت و داربست به‌همراه داروی کلیندامایسین

### تست آنتی باکتریال

نتایج حاصل از بررسی داربست‌های ساخته شده با غلظت‌های مختلف در برابر باکتری گرم منفی اشرشیاکلی و گرم مثبت استافیلوکوکوس اورئوس در شکل ۲ آمده است. همانطور که در شکل ۲ مشاهده می‌کنید، داربست A که دارویی در آن بارگذاری نشده، هاله عدم رشدی تشکیل نشده است؛ و باکتری‌ها

## تست رهایش دارو

نتایج آزمون رهایش دارو در شکل ۳ آورده شده است. نمودار الف نمودار کالیبراسیون دارو در محیط رهایش، و نمودار ب رهایش دارو در طی پنج روز اول را نشان می‌دهد. با توجه به شکل با افزایش غلظت داروی بارگذاری شده در داربست، بازه رهایش دارو افزایش یافته اگر چه در داربست GTZ-B در روز اول یک رهایش انفجاری در حدود ۰/۰۷ گرم دارو مشاهده شده است که با توجه به مقدار MIC ذکر شده در بالا، مقدار رهایش از این مقدار بیشتر بوده است. در ادامه یک رهایش پیوسته‌ای از دارو به مقدار ۰/۱۵ گرم در طول بازه پنج روزه که دوره اول التهاب استخوان است، را شاهد بوده‌ایم.



شکل ۳- نمودار الف: کالیبراسیون دارو کیلیندامایسین با غلظت‌های ۰/۰۱، ۰/۰۴، ۰/۱، ۰/۳ گرم، نمودار ب: رهایش دارو در دو غلظت ۰/۱ و ۰/۰۱ گرم کیلیندامایسین

## بحث

در سال‌های اخیر مطالعات زیادی بر روی استفاده از ژئولیت بر روی داربست‌های استخوانی انجام شده است.<sup>(۱۳،۱۴)</sup> Saheban و همکاران<sup>(۱۲)</sup> به بررسی اثر ژئولیت بر رفتار

خوردگی، زیست سازگاری و فعالیت ضد میکروبی داربست متخلخل منیزیم / ژئولیت پرداختند. یافته‌های این پژوهش نشان می‌دهد که افزودن ژئولیت به داربست متخلخل منیزیم، منجر به مقاومت در فشاری بالاتر و مقاومت در برابر خوردگی شده است. اثر خاصیت آنتی‌باکتری داربست ژئولیت/منیزیم/نقره در برابر باکتری گرم مثبت استافیلوکوک اورئوس (استافیلوکوکوس اورئوس) و گرم منفی اشرشیا کلی (E. coli) حاکی از این است که ترکیب نقره/ژئولیت نقش به‌سزایی در جلوگیری رشد باکتری‌ها داشته‌است. در مطالعه دیگری پس از طراحی و ساخت داربست کیتوسان/ژلاتین/ کلینوپتیلوئیت-نانوهیدروکسی آپاتیت به بررسی تاثیر آن بر مهندسی بافت استخوان پرداختند. اندازه تخلخل این داربست  $200 \pm 100$  میکرومتر بوده است و همچنین هیچ سمیتی بر روی سلول‌ها نداشته است.<sup>(۱۳)</sup> در مطالعه دیگری پژوهشگران دانشگاه علوم و تکنولوژی استامبول ترکیه موفق به ساخت داربست کامپوزیتی clinoptilolite/alumina/bovine hydroxyapatite (Cp - A12O3 - BHA) composite با استفاده از روش پرس فیزیکی و سپس پخت در دمای ۱۳۰۰ درجه سانتی‌گراد شدند که زیست‌سازگاری آن را در محیط SAOS-2 مورد بررسی قرار دادند و همینطور در دیگر آزمایش‌ها نشان داده شد که داربست ساخته شده اثرات سمی ندارد<sup>(۱۵،۱۶)</sup>. در تحقیقی دیگر، پژوهشگران داربستی با حضور مواد Clinoptilolite/PCL-PEG-PCL به منظور کاربرد در بافت استخوان تهیه نمودند که نتایج حاصل از آن نشان داد که حضور CLI سبب افزایش استحکام داربست، ارتقا تخلخل از ۵۵ به ۷۶ درصد و زیست سازگاری بهتر و همینطور جذب آب کمتر را سبب گردید. در نهایت نیز با سلول‌های human fetal osteoblasts cells آزمون برون تنی نشان داد حضور CLI سبب افزایش تکثیر سلولی گردید<sup>(۱۷)</sup>. همچنین تحقیقات متعددی نشان داده است که سلول‌ها در داربست‌های متخلخل رشد و تمایز بهتری از خود نشان داده‌اند<sup>(۱۸)</sup>

با این وجود استفاده از داربست‌های زیست سازگار به منظور درمان نقایص استخوانی همواره با چالش‌های زیادی از جمله

داربست برای جلوگیری از التهاب و عفونت در روزهای اول ترمیم است، به نوعی متمرثر واقع شده است؛ چرا که در روز اول سیل عظیمی از ماکروفاژها به محل بافت هدف روانه می‌شوند و این رهایش بالای دارو می‌تواند کمک شایانی به کاهش التهاب کند. علت این نوع رهایش را میتوان داروی قرار گرفته روی سطح داربست و رهایش آن به محض قرار گیری و نفوذ آب به داخل داربست دانست. نسبت رهایش دو داربست در روزهای بعد به ۴ رسیده و ثابت مانده است. بنابراین یک رهایش پیوسته و آهسته را از داربست شاهد بوده‌ایم.

همچنین در سال‌های اخیر اثر ژئولیت در داربست‌های استخوانی و سیستم رهایش دارو در داربست‌های استخوانی توجه بسیاری از پژوهشگران را به خود جلب کرده‌است به طوری که مطالعاتی بر روی توانایی حمل داروهای ضد التهاب بر روی ژئولیت طبیعی اصلاح شده با داروهای نظیر diclofenac diethylamide و ibuprofen انجام شده است.<sup>(۲۱)</sup> در پژوهش دیگری در سال ۲۰۱۷ دانشمندان از ژئولیت طبیعی به عنوان ماتریسی جهت رهایش داروی Bexarotene که یک داروی ضدسرطان است، استفاده کردند. در این پژوهش ژئولیت طبیعی به عنوان میزبان و با روش wet impregnation بارگذاری دارو بر روی آن انجام شد.<sup>(۲۱)</sup> با توجه به پژوهش‌های گذشته، ژئولیت یکی از کاندیدهای حامل دارو در این داربست است که برای اثبات این ادعا نیاز به پژوهش‌های بیشتری است. ( به دلیل تعداد بالای نمونه‌ها و هزینه بالای آنالیز HPLC از این آنالیز استفاده نشده است.)

### نتیجه‌گیری

افزودن عامل ضد باکتریایی کلیندامایسین به داربست استخوانی ساخته شده بستر مناسبی برای دارورسانی به بافت استخوان در محل بافت حذف شده است تا از رشد عفونت در محل کاشت داربست در دوره اول ترمیم جلوگیری کند.

عدم استحکام، زیست سازگاری پایین، طول عمر پایین سلول‌های روی داربست بوده است. در ترمیم بافت استخوان یکی از اصول اصلی داربستی متخلخل با اندازه حفرات مناسب و تخلخل‌های بهم متصل شده‌است<sup>(۱۹)</sup>؛ چرا که رگ‌زایی و رشد سلول‌ها نیازمند اکسیژن و موادغذایی است. نسبت سطح به حجم بالای داربست و همچنین ارتباط بین منافذ داربست موجب راحتی در انتقال و مهاجرت سلول‌ها در طول داربست شده که در نتیجه منجر به رشد سریع بافت استخوان بر روی داربست می‌شود. بنابراین سائز حفرات برای ورود سلول‌ها به داربست باید مناسب باشد که در بسیاری از پژوهش‌ها اندازه حفرات بین ۳۰ تا ۲۰۰ میکرومتر را مناسب‌ترین اندازه حفرات برای رشد سلول‌های استخوانی دانسته‌اند<sup>(۲۰،۲۱)</sup>. با توجه به مقیاس شکل ۱، ساختارمتخلخل داربست ساخته شده دارای اندازه حفرات در بازه ۵۰ تا ۲۵۰ میکرومتر است، ضمن آن که ارتباط بین خلل و فرج مشاهده می‌شود. از طرفی با توجه به تصاویر، افزودن دارو با غلظت‌های مختلف بر روی داربست، تاثیری بر ساختار فیزیکی داربست و اندازه حفرات آن نداشته است. با توجه به شکل ۲، افزایش غلظت داروی آنتی بیوتیک توامان با افزایش اثر آنتی باکتریال داربست‌ها است. در هر دو باکتری هاله عدم رشد در داربست GTZ-B بیش از داربست دیگر است که می‌توان علت را افزایش رهایش داروی بارگذاری شده از این داربست نسبت به داربست دیگر دانست. در داربست GTZ-C هم به علت کمترین میزان داروی موجود هاله عدم رشد بسیار محدودی تشکیل شده‌است. همچنین عدم رشد هاله در اطراف داربست GTZ-A نشان‌دهنده عدم خاصیت آنتی‌باکتریایی داربست ساخته شده است؛ که در بسیاری از پژوهش‌های دیگر نیز به این نکته توجه کرده‌اند<sup>(۲۰)</sup>

در شکل ۳ نمودار رهایش دارو از داربست‌های ساخته شده نشان داده شده است. با توجه به نمودار داربست GTZ-B در روز اول ۳.۵ برابر داربست GTZ-C رهایش داشته است که نوعی رهایش ناگهانی است. در بیشتر پژوهش‌ها این نوع رهایش را مضر می‌دانند اما به دلیل اینکه بازه رهایش این

**References:**

- 1-N. Ninan, M. Muthiah, N.A.B. Yahaya, I.-K. Park, A. Elain, T.W. Wong, S. Thomas, Y. Grohens, Antibacterial and wound healing analysis of gelatin/zeolite scaffolds, *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* 115 (2014) 244-252.
- 2-L. Li, Y. Li, J. Li, L. Yao, A.F. Mak, F. Ko, L. Qin, Antibacterial properties of nanosilver PLLA fibrous membranes, *Journal of Nanomaterials* 2009 (2009) 9.
- 3-G.Y. Liu, A. Essex, J.T. Buchanan, V. Datta, H.M. Hoffman, J.F. Bastian, J. Fierer, V. Nizet, *Staphylococcus aureus* golden pigment impairs neutrophil killing and promotes virulence through its antioxidant activity, *Journal of Experimental Medicine* 202(2) (2005) 209-215.
- 4-Y. Shebis, D. Iluz, Y. Kinel-Tahan, Z. Dubinsky, Y. Yehoshua, Natural Antioxidants: Function and Sources, *Food and Nutrition Sciences* 04(06) (2013) 643-649.
- 5-E.H. Abdulkareem, K. Memarzadeh, R. Allaker, J. Huang, J. Pratten, D. Spratt, Anti-biofilm activity of zinc oxide and hydroxyapatite nanoparticles as dental implant coating materials, *Journal of dentistry* 43(12) (2015) 1462-1469.
- 6-M. Balouri, M. Sadiki, S.K. Ibsouda, Methods for in vitro evaluating antimicrobial activity: A review, *J Pharm Anal* 6(2) (2016) 71-79.
- 7-H.R. Ramay, M. Zhang, Biphasic calcium phosphate nanocomposite porous scaffolds for load-bearing bone tissue engineering, *Biomaterials* 25(21) (2004) 5171-80.
- 8- J. Sundaram, T.D. Durance, R. Wang, Porous scaffold of gelatin–starch with nanohydroxyapatite composite processed via novel microwave vacuum drying, *Acta biomaterialia* 4(4) (2008) 932-942.
- 9-N. Ninan, Y. Grohens, A. Elain, N. Kalarikkal, S. Thomas, Synthesis and characterisation of gelatin/zeolite porous scaffold, *European Polymer Journal* 49(9) (2013) 2433-45.
- 10- L. Bi, Y. Hu, H. Fan, G. Meng, J. Liu, D. Li, R. Lv, Treatment of contaminated bone defects with clindamycin-reconstituted bone xenograft-composites, *Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials: An Official Journal of The Society for Biomaterials, The Japanese Society for Biomaterials, and The Australian Society for Biomaterials and the Korean Society for Biomaterials* 82(2) (2007) 418-427.
- 11-D. Algul, A. Gokce, A. Onal, E. Servet, A.I. Dogan Ekici, F.G. Yener, In vitro release and In vivo biocompatibility studies of biomimetic multilayered alginate-chitosan/beta-TCP scaffold for osteochondral tissue, *J Biomater Sci Polym Ed* 27(5) (2016) 431-40.
- 12-M. Saheban, H.R. Bakhsheshi-Rad, M. Kasiri-Asgarani, E. Hamzah, A.F. Ismail, M. Aziz, E. Dayaghi, Effect of zeolite on the corrosion behavior, biocompatibility and antibacterial activity of porous magnesium/zeolite composite scaffolds, *Materials Technology* 34(5) (2019) 258-269.
- 13-A. Sadeghinia, S. Soltani, M. Aghazadeh, J. Khalilifard, S. Davaran, Design and fabrication of clinoptilolite–nanohydroxyapatite/chitosan–gelatin composite scaffold and evaluation of its effects on bone tissue engineering, *Journal of Biomedical Materials Research Part A* 108(2) (2020) 221-33.
- 14-E. Pazarçeviren, Ö. Erdemli, D. Keskin, A. Tezcaner, Clinoptilolite/PCL–PEG–PCL composite scaffolds for bone tissue engineering applications, *Journal of biomaterials applications* 31(8) (2017) 1148-1168.
- 15- A. Uyumaz, L. Ozyegin, N. Buyukakyuz, B. Yesilbek, F.N. Oktar, Evaluation of TCP loaded clinoptilolite use as graft material on rabbit tibia, *Key Engineering Materials, Trans Tech Publ*, 2012, pp. 175-180.
- 16- K. Dahlan, N.A. Nuzulia, S.T. Wahyudi, S. Utami, Effects of Na Alginate in the Porosity of Scaffold Biphasic Calcium Phosphate/Alginate Composites, *Key Engineering Materials* 696 (2016) 183-186.
- 17-M. Azami, S. Tavakol, A. Samadikuchaksaraei, M.S. Hashjin, N. Baheiraei, M. Kamali, M.R. Nourani, A porous hydroxyapatite/gelatin nanocomposite scaffold for bone tissue repair: in vitro and in vivo evaluation, *Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition* 23(18) (2012) 2353-2368.
- 18-B.P. Kumar, V. Venkatesh, K.A.J. Kumar, B.Y. Yadav, S.R. Mohan, Mandibular Reconstruction: Overview, *Journal of Maxillofacial and Oral Surgery* 15(4) (2016) 425-441.
- 19-G. Odin, C. Savoldelli, P.-O. Bouchard, Y. Tillier, Determination of Young's modulus of mandibular bone using inverse analysis, *Medical engineering & physics* 32(6) (2010) 630-637.
- 20- Y. Lan, W. Li, Y. Jiao, R. Guo, Y. Zhang, W. Xue, Y. Zhang, Therapeutic efficacy of antibiotic-loaded gelatin microsphere/silk fibroin scaffolds in infected full-thickness burns, *Acta biomaterialia* 10(7) (2014) 3167-3176.
- 21- L. Ochiuz, C. Ghiciuc, M. Ignat, M. Popa, C.A. Peptu, A. Vasile, Development of a modified-release drug delivery system with bexarotene loaded in clinoptilolite, *Mater. Plast* 54 (2017) 581-585.