Available online: www.jnmr.ir/papers
مجله تحقیقات مواد نانوکامپوزیتی: ۱:۱ (۱۳۸۸) ۳۱-۲۷
Journal of
مجله تحقیقات مواد نانوکامپوزیتی
Nanocomposite Materials Research

بررسی زیست سازگاری نانو داربست زیست تخریب پذیر بتا تری کلسیم فسفات/ پلی اتیلن (ß-TCP/PE) با سلول های استئوبلاست انسان

مهدی فرخی[۱،۲،*]، محمد علی شکرگزار[۱]، مجتبی باقری[۳]، فرزاد رجایی[۲]، اسماعیل قاسمی[۲] و شاهین بنکدار[۴]

۱- بانک سلولی انستیتو پاستور ایران
۲- دانشگاه علوم پزشکی قزوین
۳- دانشگاه علم و صنعت ایران
۴- دانشگاه صنعتی امیرکبیر

* نویسنده مسئول مکاتبات: مهدی فرخی (E-mail: mehdi13294@yahoo.com)

چکیده

مهندسی بافت در زمینه استخوان و غضروف این امکان را فراهم می آورد که بتوان ناهنجاری های مختلف بافتی را به روش پیوند Autologous درمان نمود. در تحقیق حاضر، برای ساخت نانو داربست ß-TCP/PE از پودر مخصوص ß-TCP استفاده شد که بعد از حرارت دادن آن اقدام به خنک نمودن تدریجی نموده و در نهایت با پلی اتیلن ترکیب کرده تا نانو داربست فوق تهیه گردد. بعد از تهیه نانو داربست، سلول های استئوبلاست جدا شده از استخوان فک انسان را در مجاورت عصاره تهیه شده نانو داربست قرار داده و بعد از آن با استفاده از آزمون MTT اقدام به بررسی زیست سازگاری نانو داربست فوق پرداخته شد. یافته های این مطالعه نشان داد نانو داربست مورد نظر باعث افزایش زیست سازگاری سلول های استئوبلاست شده است. با توجه به نتایج به دست آمده در این مطالعه می توان بعد از تایید آزمون های *In vivo*، اقدام به ترمیم بافت های آسیب دیده با استفاده از نانو داربست ذکر شده نمود.

واژه‌های کلیدی: **ß-TCP/PE، زیست سازگاری، نانوکامپوریت های پلیمری، استئوبلاست.**

Abstract

Tissue engineering in the field of bone and cartilage can provide autologous graft method for tissue disorder. In this research, β-TCP/PE scaffold has been synthesized by using β-TCP powder, after heating, gradual cooling and finally mix poly-ethylene. Osteoblast that isolated from human mandible used in this scaffold and after that evaluated biocompatibility of this scaffold by MTT assay. These findings indicated that nano β-TCP/PE scaffold are biocompatible, nontoxic, and act to stimulate proliferation of osteoblast cells. According to the finding in this study, after verifying in vivo tests, we can reconstruct and healing injured with this nano-scaffold.

۱- مقدمه

ترمیم و بازسازی بافت استخوان در جراحی های ارتوپدی و فک - صورت از مهمترین چالش های درمانی به حساب می آید. بسیاری از ناهنجاری های استخوانی (تومور، عفونت، تروما، اختلالات بیوشیمیایی و غیره) نیاز به مداخله جراحی دارند. برای درمان بسیاری از این ناهنجاری ها از روش پیوند استخوان استفاده می شود.

دو روش مرسوم برای پیوند وجود دارد که شامل پیوند Allogeneic و Autologous می باشد. در روش

Allogeneic نمونه بافتی از شخصی غیر از بیمار گرفته می شود ولی در روش پیوندAutologous نمونه بافتی از خود بیمار تهیه می شود. در سال های اخیر پیوند Autologous بهترین گزینه برای ترمیم بافت های آسیب دیده می باشد. از مزایای این روش، شکل گیری بافت استخوانی بدون ایجاد پاسخ ایمنی و همچنین تحریک سلول های مزانشیمی در جهت تمایز به سمت سلول های استخوان ساز است [۱]. مهندسی بافت در زمینه استخوان و غضروف این امکان را فراهم می آورد که بتوان ناهنجاری های مختلف بافتی را از طریق روش پیوند Autologous درمان نمود.

برای ساخت موادی که در بازسازی استخوان به کار گرفته می‌شوند باید از فرآیند های رشد سلولی، خصوصیات فنوتیپی و بیان ژنی سلول ها با اطلاع بود، تا با در نظر گرفتن این موارد بتوان از پاسخ سلول با مواد زیستی مختلف آگاهی یافت [۲,۳].

سلول های تولید کننده استخوان یا همان استئوبلاست ها از سلول های بنیادی مزانشیمی به وجود می آیند [۴,۵]. این سلول ها می‌توانند با دو روش استخوان سازی درون غشایی که در آن سلول های مزانشیمی مستقیم به سلول های استئوبلاستی تبدیل می شوند و یا روش استخوان سازی درون غضروفی که در آن سلولهای مزانشیمی ابتدا غضروف را ایجاد می کنند و بعد از آن بافت غضروف به استخوان تبدیل می شود، فرآیند استخوان سازی را انجام دهند.

در طی دو دهه اخیر توجهات زیادی در جهت استفاده از مواد جایگزین در زمینه علم پزشکی شده است [۲,۶-۸]. بعضی از این مواد در زمینه مهندسی بافت به کار گرفته شده است. با توجه به این موضوع که این مواد کاربرد های وسیعی در زمینه علم پزشکی دارند، تلاش های زیادی در جهت تولید پلیمرهای زیست تخریب پذیر ساخته شده از مونومرهای مختلف برای تکثیر سلولی صورت گرفته است [۹,۱۰]. یکی از این ترکیبات که در پر کردن مکانیکی و بیولوژیکی استخوان امروزه بکار گرفته می شود، ترکیبات تری کلسیم فسفات می باشد که کاربردهای وسیعی در ترمیم بافت‌های استخوانی دارد [۱۱].

۲- فعالیت‌های تجربی

۲-۱- ساخت نانو داربست بتا تری کلسیم فسفات با زمینه پلی اتیلن ß-TCP/PE

به طور خلاصه برای تبدیل پودر مخصوص به ترکیب بتا تری کلسیم فسفات (ß-TCP)، ابتدا آن را داخل سیلندر استوانه ای شکل ریخته و سپس تحت حرارت ۱۲۵۰ درجه سانتیگراد به مدت ۲ ساعت قرار داده شد. بعد از آن ترکیب فوق برای سرد کردن تدریجی در کوره مخصوص گذاشته و سپس اقدام به ساییدن آن کرده و در نهایت برای ارزیابی کار از روش تفرق اشعه X (XRD) استفاده شد. در ادامه برای ترکیب ß-TCP با پلی اتیلن (PE)، ابتدا پودر سرامیک را با ذرات پلی اتیلن ترکیب کرده تا ساختاری هموژن و یکنواخت حاصل شود [۱۲]. سپس ترکیب فوق را در قالب های مخصوص برای ایجاد شکل مناسب قرار داده شدند. قابل ذکر است که ترکیب فوق در ۵ نمونه با درصد های مختلف ۰، ۵، ۱۰، ۱۵و ۲۰٪ بتا تری کلسیم فسفات ساخته شد.

۲-۲- جدا سازی سلول های استئوبلاست

نمونه های استخوانی استفاده شده در این مطالعه با استفاده از دستگاه رانژور (Rangeur) از افراد بین ۲۰ تا ۳۰ سال که برای کشیدن دندان سوم آسیا به دانشکده دندانپزشکی دانشگاه شهید بهشتی مراجعه کرده بودند، تهیه شد. پس از انتقال بلوک های استخوانی به آزمایشگاه کشت سلولی، به کمک تیغ جراحی استخوان مورد نظر به ابعاد میلی متری خرد شدند.

پس از شستشو با محلول فسفات بافر سالین (PBS)، نمونه ها به پلیت ۲۴ خانه که حاوی محیط کشت DMEM/ F12، FBS ٪۱۰، ۱۰۰ واحد در لیتر پنی سیلین، ۵۰ میکروگرم در میلی لیتر استرپتومایسین و ۵۰ میکروگرم در میلی لیتر اسید آسکوربیک ۲ فسفات بود منتقل و سپس پلیت مورد نظر به همراه سلول ها در انکوباتور ۳۷ درجه با ۵٪ دی اکسید کربن قرار داده شد. تقریباً پس از هر ۱۴ روز کشت، سلول های استئوبلاست شروع به خروج از نمونه های استخوانی کردند.

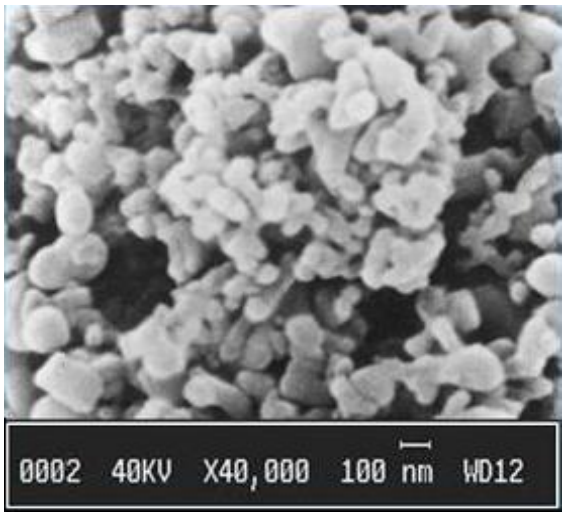
۲-۳- بررسی میزان زیست سازگاری (تکثیر سلول ها) در مجاورت نانو داربست

جهت بررسی میزان زیست سازگاری از سنجش میزان تکثیر سلولی با استفاده از رنگ حیاتی یا 3-[4,5-dimethylthiazol-2yl] 2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) استفاده شد. به طور خلاصه ابتدا حدود ۱۰۰۰۰ سلول در هر کدام از چاهک های پلیت ۹۶ خانه قرار داده شد و سپس سلول به مدت ۲۴ ساعت برای ایجاد چسبندگی با کف پلیت در انکوباتور قرار گرفتند. بعد از این زمان حدود ۱۰۰µl از عصاره نانو داربست ها به هر چاله از پلیت ۲۴ خانه اضافه شد. قابل ذکر است که برای عصاره گیری، نانو داربست ها را به مدت ۳، ۷ و ۱۴ روز در محیط کشت قرار داده و بعد از زمان های تعیین شده، محیط کشت را درون فالکن ریخته و مورد استفاده قرار می دهیم، همچنین برای تهیه عصاره ۵۰٪، باید به میزان ۵۰٪ از عصاره تهیه شده را با ۵۰٪ محیط کشت تازه مخلوط کنیم. پلیت به مدت ۲۴ ساعت در حرارت ۳۷ درجه سانتی گراد و CO_2 ۵ درصد انکوبه شدند. پس از این مدت عصاره ها خارج و به جای آن حدود ۱۰۰µl از محلول MTT را به مدت ۴ ساعت بر روی سلول ها قرار داده و بعد از این زمان، محلول MTT را از محیط خارج و ۱۰۰ µl ایزوپروپانول به هرچاله اضافه و ۳۰ دقیقه نگه داشتیم. در مرحله بعد با استفاده از sampler، نمونه های هر خانه به یکی از چاله های پلیت ۹۶ خانه منتقل شده و با استفاده از Spectrophotometric ELISA Plate Reader با طول موج ۵۷۰nm تحت بررسی قرار گرفتند.

۳- نتایج و بحث

۳-۱- بررسی مورفولوژی

به منظور بررسی مورفولوژی ذرات تری کلسیم فسفات از دستگاه SEM مدل JXA – 840 استفاده شد. به منظور آماده سازی نمونه ها، ابتدا پودر بررسی زیست سازگاری سلول ها استئوبلاست مورد نظر بر روی یک پایه قرار گرفت، سپس پوششی از طلا روی آن اعمال شد. شکل ۱ تصویر مربوط به این ذرات را در بزرگنمایی های ۴۰۰۰۰ برابر نشان می دهد. میانگین اندازهٔ ذرات حدود ۱۰۰nm تخمین زده شد. همانطور که مشاهده می شود، ذرات بیشتر بصورت آگلومره می باشند و کمتر بصورت دانه های مستقل و جدا از هم مشاهده می‌شود.



شکل ۱: تصویر SEM از نانوذرات سنتز شدهٔ β – TCP.

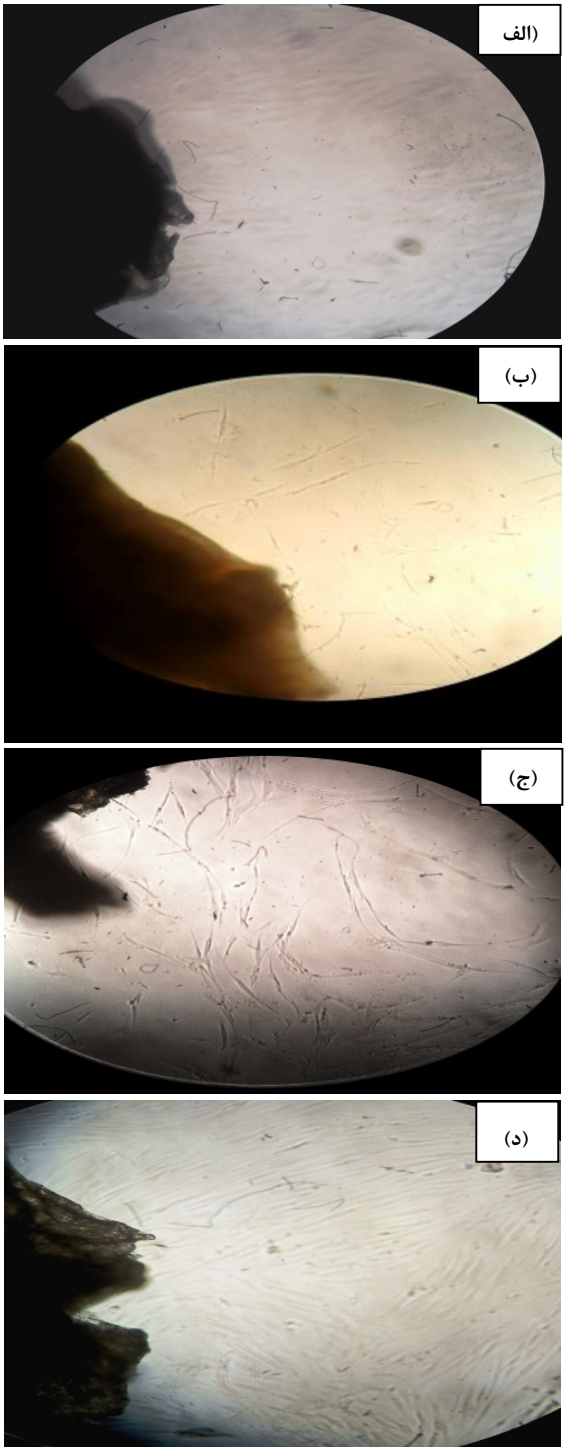
۳-۲- کشت سلولی

مشاهدات صورت گرفته حاکی از جدا سازی و کشت موفقیت آمیز سلول های استئوبلاست انسانی در محیط خارج بدن In vitro بود. شکل ۲ نشان دهنده مورفولوژی و خروج استئوبلاست ها از نمونه استخوانی در مدت ۱ ماه است. همانطور که در تصویر الف مشاهده می شود در روز اول هیچگونه مهاجرت سلولی از تکه استخوانی صورت نگرفته است اما در تصویر ب که نشان دهنده روز ۱۴ است خروج اولیه سلول ها به وضوح مشهود می باشد. تصویر ج نیز اشاره به روز ۲۸ کشت دارد که سلول های بیشتری با مورفولوژی فیبروبلاستی از تکه های استخوانی خارج شده اند. نهایتاً تصویر حکایت از تراکم بالای استئوبلاست ها در روز ۳۵ دارند تا جایی که مورفولوژی آنها نیز تحت تاثیر قرار گرفته است.

۳-۳- بررسی زیست سازگاری سلول های استئوبلاست

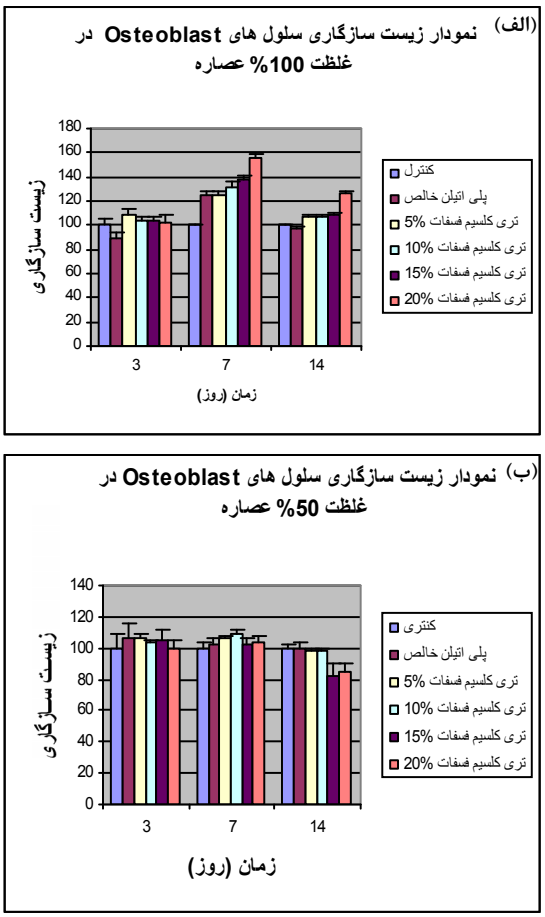
نتایج بدست آمده با استفاده از آزمون MTT حکایت از افزایش رشد سلول ها در استفاده از نانو داربست ß-TCP داشت. به طوری که با توجه به بررسی نمودارهای شکل ۳

می‌توان این افزایش رشد سلولی را معنـی دار تلقـی نمـود ($P< P./.۵$).



شکل ۲: تکه استخوان اسفنجی جدا شده از فک تحتانی: الف) تکه استخوانی در روز ۱ بدون خروج سلول ب) روز ۱۴ خروج اولیه سلول‌ها ج) روز ۲۸ خروج تعداد بیشتر استئوبلاست ها و د) روز۳۵ تراکم بالای سلول‌های استئوبلاست.

همانطور که شکل ۳ (الف) نشان می دهـد، در اسـتفاده از عصاره به صورت ۱۰۰٪ میزان تکثیر سلولی نسبت به گروه کنترل در مقایسه با عصاره ۵۰٪ افزایش بیشتری را نشـان مـی دهـد ($P< P./.۵$). کـه ایـن افـزایش را در اسـتفاده از درصد های مختلف ß-TCP می توان مشاهده نمود.



شکل ۳: نمودار تکثیر سلول های استئوبلاست با استفاده از نانو داربست ß-TCP؛ الف) نمودار زیست‌سازگاری سلول‌های استئوبلاست در غلظت ۱۰۰٪ عصاره ب) در غلظت ۵۰٪ عصاره

۴- نتیجه‌گیری

در مطالعـه حاضـر، زیسـت سـازگاری نـانو داربسـت ß-TCP/PE با سلول های استئوبلاست مورد ارزیـابی قـرار گرفت. مطالعـات صـورت گرفتـه بـر روی سـرامیک هـای کلسیم فسفات با سطوح ناهموار حکایت از روند اسـتخوان سازی بالقوه آنها دارد [۱۳,۱۴] و این به علـت اسـتفاده از ذرات کلسیم فسفات در مطالعه کنونی می باشد. علاوه بـر

این ناپایداری سرامیک های کلسیم فسفات خود عاملی در جهت تحریک استخوان سازی و بهبود شرایط شیمیایی برای ایجاد ارتباط و اتصال با استخوان های آسیب دیده در محیط داخل بدن (*in vivo*) است [۱۵]. در مجموع نتایج به دست آمده در مطالعه کنونی حاکی از زیست سازگاری مناسب سلول های استئوبلاست در استفاده از نانو داربست فوق می باشد. به طوری که این افزایش در تکثیر سلول های استئوبلاست در استفاده از عصاره ۱۰۰٪ نسبت به عصاره ۵۰٪ چشمگیرتر بوده که این نتیجه کسب شده با مطالعه قبلی صورت گرفته [۱۲] که در آن ذرات نانو داربست فوق در ابعاد میکرون تهیه گردید همراستا می باشد که شاید بتوان علت آن را اثرات تحریکی ذرات تری کلسیم فسفات در تحریک روند تکثیر سلولی دانست. در نهایت نتایج مطالعه کنونی نشان داد که استفاده از نانو داربست ß-TCP/PE می تواند در روند ترمیم بافت های استخوانی آسیب دیده گزینه ای مناسب به شمار آید.

مراجع

[1] G.J. Meijer, J.D. de Bruijn, R. Koole, C.A. van Blitterswijk, *PLoS Medicine*, 2007, **4**, 9.

[2] L.G. Cima, J.P. Vacanti, C. Vacanti, D. Ingber, D. Mooney, R. Langer, *Journal of Biomechanical Engineering*, **113**, 1999, 143.

[3] M.P. Levin, L. Getter, D.E. Cutright, S.N. Bhaskar, *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology and Endodontics*, **38**, 1974, 344.

[4] B. Auf'mkolk, P.V. Hauschka, E.R. Schwartz, *Calcified Tissue International*, **37**, 1985, 228.

[5] U. Noth, A.M. Osyczka, R. Tuli, N.J. Hickok, K.G. Danielson, R.S. Tuan, *Journal of Orthopaedic Research*, **20**, 2002, 1060.

[6] J.N. Beresford, J.A. Gallagher, J.W. Poser, R.G. Russell, *Metabolism Bone Diseases Related Research*, **5**, 1984, 229.

[7] P.G. Robey, "*Bone matrix proteoglycans and glycoproteins*", In: J.P. Bilezikian, L.G. Raisz, G.A. Rodam, (editors). Principles of bone biology. 1st ed. New York: Academic Press. 1996; pp.155–167.

[8] S. Miyamoto, K. Takaoka, T. Okada, H. Yoshikawa, J. Hashimoto, S. Suzuki, K. Ono, *Clinical Orthopaedics*, **249**, 1993, 333.

[9] I. Grizzi, H. Garreau, S. Li, M. Vert, *Biomaterials*, **16**, 1995, 305.

[10] R. Jalil, J.R. Nixon, *Journal of Microencapsulation*, **7**, 1990, 297.

[11] N. Rangavittal, A.R. Landa-Cánovas, J.M. González-Calbet, M. Vallet-Regí, *Journal of Biomedical Materials Research*, **51**, 2000, 660.

[12] S. SH. Homaeigohar, M.A. Shokergozar, A. Khavandi, A. Yari Sadi, *Journal of Biomedical Materials Research*, **8**, 2007, 491.

[13] H. Yuan, Z. Yang, Y. Li, X. Zhang, J.D. De Bruijn, K. De Groot, *Journal of Materials Science-Materials in Medicine*, **9**, 1998, 723.

[14] J. Goshima, V.M. Goldberg, A.I. Caplan, Clinical Orthopaedics, **262**, 1999, 298.

[15] T. Suzuki, M. Hukkanen, R. Ohashi, Y. Yokogawa, K. Nishizawa, F. Nagata, L. Buttery, J. Polka, *Journal Bioscience Bioengineering*, **89**, 2000, 18.