

## ساخت و ارزیابی داربست ابریشم-کیتوسان به عنوان ابزار کشت سه بعدی سلول‌های شبه استخوانی

شاهین روحی<sup>۱</sup>، دکتر محمد رفیعی‌نیا<sup>۲</sup>، دکتر حسین صالحی<sup>۳</sup>، دکتر الهه پورعزیزی<sup>۴</sup>

### مقاله پژوهشی

#### چکیده

**مقدمه:** کشت و تکثیر سلول‌های شبه استخوانی، با هدف استفاده در مطالعات پژوهشی و درمانی همواره از اهمیت زیادی برخوردار است. در این بین، مطالعات نشان داده است که کشت سلول‌ها در یک محیط سه بعدی با هندسه‌ی مهندسی شده، در مقایسه با کشت در محیط دو بعدی، اثرات بهتری بر روی سلول‌ها دارد. هدف از پژوهش حاضر، ساخت و ارزیابی داربستی با ویژگی‌های مناسب، برای کشت سه بعدی سلول‌های شبه استخوانی بود.

**روش‌ها:** داربست ابریشم-کیتوسان به روش خشکاندن انجمادی تهیه گردید. ساختار داربست‌ها با استفاده از میکروسکوپ الکترونی روبشی بررسی شد. خواص مکانیکی داربست‌ها توسط تست فشار و تخریب پذیری داربست‌ها با ارزیابی درصد کاهش وزن آن‌ها در محلول Phosphate buffer salin سنجیده شد. تأثیر جزء ابریشمی داربست بر روی درصد بقای سلولی با استفاده از آزمون MTT [3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide] و چسبندگی سلولی با کشت سلول‌های شبه استخوانی MG۶۳ بر روی بستر ابریشمی ارزیابی شد.

**یافته‌ها:** تصاویر میکروسکوپ الکترونی- روبشی، وجود تخلخل‌های سطحی مناسب برای نفوذ سلول به داخل ساختار داربست و به هم‌پیوستگی مناسب تخلخل‌ها برای انتقال متابولیت‌ها و سیگنال‌های شیمیایی را نشان داد. متوسط قطر تخلخل‌های سطحی داربست‌ها،  $46/75 \pm 200/90$  میکرومتر به دست آمد که این اندازه، در مقایسه با میانگین قطر سلول‌ها (۹۵ میکرومتر)، بسیار بزرگ‌تر بود. خواص مکانیکی داربست برای استفاده به عنوان ابزار کشت سه بعدی سلول مناسب بود؛ به طوری که میانگین مدول فشاری داربست‌ها  $0/8 \pm 0/6$  مگاپاسکال به دست آمد. همچنین، نتایج تست تخریب پذیری نشان داد که میزان تخریب داربست‌ها با افزایش درصد وزنی جزء کیتوسان افزایش می‌یابد. نتایج آزمون MTT و کشت سلولی، نشان داد ابریشم استفاده شده در ساختار داربست‌های کامپوزیتی برای سلول‌ها سمیت ندارد و سلول‌ها توانایی چسبیدن به سطح ابریشم را دارند.

**نتیجه‌گیری:** داربست ابریشم-کیتوسان ساخته شده به روش خشکاندن انجمادی، می‌تواند ابزاری مناسب برای کشت سه بعدی سلول‌های شبه استخوانی باشد.

**واژگان کلیدی:** داربست، ابریشم، کیتوسان، کشت سه بعدی

**ارجاع:** روحی شاهین، رفیعی‌نیا محمد، صالحی حسین، پورعزیزی الهه. ساخت و ارزیابی داربست ابریشم-کیتوسان به عنوان ابزار کشت

سه بعدی سلول‌های شبه استخوانی. مجله دانشکده پزشکی اصفهان ۱۳۹۴؛ ۳۳ (۳۴۲): ۱۱۱۹-۱۱۰۷

۱- گروه مهندسی بافت، واحد نجف‌آباد، دانشگاه آزاد اسلامی، نجف‌آباد، ایران

۲- مرکز تحقیقات بیوسنسور، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران

۳- گروه علوم تشریحی، دانشکده‌ی پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران

۴- گروه بیوشیمی، واحد نجف‌آباد، دانشگاه آزاد اسلامی نجف‌آباد، ایران

## مقدمه

از دیرباز همواره بافت استخوان به دلیل قرارگیری در معرض انواع تنش‌های مکانیکی، با آسیب دیدگی‌های زیادی مواجه بوده است (۱). پس از آسیب دیدگی، ترمیم سریع و طبیعی بافت استخوان موضوع مهمی تلقی می‌شود. چنانچه بافت استخوان به صورت طبیعی ترمیم شود، نیاز به کاشتنی‌های مصنوعی از بین می‌رود. در نتیجه، مشکلات ناشی از این کاشتنی‌های مصنوعی نیز حذف می‌گردد. از این رو، مطالعات معاصر بر روی دو عنصر ترمیم طبیعی و سریع تر بافت استخوان متمرکز شده است (۲).

سلول‌های MG۶۳ شباهت زیستی زیادی به استئوبلاست‌ها دارند. این شباهت‌ها باعث می‌شود تا بتوان از آن‌ها به جای استئوبلاست استفاده کرد. سلول‌های MG۶۳، سلول‌هایی سرطانی هستند و به دلیل سرعت تکثیر بالاتر این سلول‌ها، در مقایسه با استئوبلاست‌ها، در بسیاری از مطالعات از این سلول‌ها استفاده می‌شود. بنابراین، کشت این سلول‌ها از اهمیت زیادی برخوردار است (۳-۴).

به طور معمول در آزمایشگاه، سلول‌های جانوری به دو روش دو بعدی و سه بعدی کشت می‌شوند. در روش دو بعدی، سلول‌ها بر روی ساختاری دو بعدی و در کشت سه بعدی در داخل ساختاری متخلخل قرار داده می‌شوند. ظروف کشت سلولی و داربست‌ها به ترتیب اصلی‌ترین ساختارهای کشت دو بعدی و سه بعدی محسوب می‌شوند. محیط‌های سه بعدی در مقایسه با محیط‌های دو بعدی، مزایایی از جمله امکان شبیه‌سازی محیط واقعی سلول‌ها در بدن، انتقال مؤثرتر مواد غذایی و دیگر سیال‌ها بین سلول‌ها را دارند (۵-۷). چنین مزایایی باعث افزایش روزافزون

استفاده از داربست‌هایی از جنس‌های مختلف شده است (۸). نداشتن اثر سمیت بر روی سلول‌ها، اولین ویژگی لازم برای داربست محسوب می‌شود (۹). همچنین، سلول‌ها باید توانایی نفوذ به داخل توده‌ی داربست را داشته باشند. در مرحله‌ی بعد، سلول‌های نفوذ کرده باید به دیواره‌ها بچسبند (۱۰). برای یک داربست ایده‌آل، معماری متخلخل‌ها باید به گونه‌ای باشد که منافذ داربست به یکدیگر راه داشته باشند. در صورت وجود چنین خاصیتی، عوامل سیال می‌توانند از یک سلول به سلول دیگر انتقال یابند. به عنوان مثال، اکسیژن و مواد غذایی می‌توانند به راحتی به عمق داربست انتقال یابند (۱۱).

هنگامی که داربست در محیط کشت غوطه‌ور می‌شود، این امکان وجود دارد که بر اثر فشار محیط کشت، دیواره‌ی متخلخل آن بر روی هم بخوابد. به علاوه، هر داربست باید قبل از استفاده به منظور قرارگیری در فضای محدود ظروف کشت، به قطعات کوچک‌تری بریده شود. از این رو، چنانچه داربست از استحکام مکانیکی مناسب برخوردار نباشد، در حین چنین دستکاری‌هایی پاره یا له می‌شود و ساختار آن آسیب می‌بیند. بنابراین، یک استحکام مکانیکی حداقل برای داربست لازم است (۱۲، ۱۰).

ویژگی لازم دیگر در مورد یک داربست، تخریب پذیر بودن آن است. در حالت ایده‌آل، بهتر است داربست پس از ایفای نقش خود تخریب شود و تنها سلول‌ها یا بافت تازه ساخته شده باقی بماند (۱۳-۱۵). این موضوع در شرایطی که داربست به همراه سلول در محیط درونی بدن نیز استفاده می‌شود، صادق است (۱۶). در تحقیق پیش رو، از پلیمرهای ابریشم و کیتوسان برای ساخت داربست

استفاده شد. داربست‌های ساخته شده در این مطالعه، برای کاربرد در کشت سه بعدی سلول‌های استخوانی طراحی شده‌اند. از آن جایی که ابریشم خواص مکانیکی بسیار بالا و تخریب پذیری بسیار آهسته‌ای دارد (۱۷-۱۸) و در مقابل، کیتوسان خواصی عکس ابریشم را دارد (۱۹). با هدف متعادل شدن هم‌زمان استحکام و نرخ تخریب داربست، از این دو ماده به شکل کامپوزیت استفاده شد. در برخی موارد، وجود ناخالصی‌هایی نظیر سربسین در الیاف ابریشم باعث می‌شود تا سلول‌ها سازگاری مناسبی نسبت به ابریشم از خود نشان ندهند (۲۰-۲۱)؛ بنابراین، در حالت معمول همواره یک فرایند چند مرحله‌ای هزینه‌بر و وقت‌گیر را برای جدا کردن کامل و بی‌نقص سربسین از الیاف ابریشم انجام می‌دهند که به فرایند بازیافت معروف است (۲۲-۲۳، ۱۸).

در این مطالعه به دلیل استفاده از ابریشم غیر بازیافتی، ویژگی‌هایی نظیر عدم سمیت سلولی و چسبندگی سلولی در مورد ابریشم استفاده شده مورد ارزیابی قرار گرفت. با توجه به مطالب پیش‌گفته، هدف از انجام این مطالعه، ساخت داربست‌های کامپوزیتی از دو ماده ابریشم و کیتوسان بود؛ به گونه‌ای که این ساختارها تمامی ویژگی‌های لازم پیش‌گفته را داشته باشند.

### روش‌ها

برای انجام این مطالعه، نخ ابریشم مرغوب از بازار و کیتوسان با وزن مولکولی متوسط از شرکت سیگما و اسید فرمیک آزمایشگاهی با درصد خلوص بالای ۹۸ درصد از شرکت Merck آلمان خریداری شد. به منظور سربسین‌زدایی سطح نخ‌ها، تمامی

کلافه‌ها به مدت ۱ ساعت در ۲ لیتر محلول ۰/۰۲ مولار کربنات سدیم جوشانده شدند. سپس توسط آون در دمای ۵۰ درجه‌ی سانتی‌گراد، خشک شدند. برای تهیه‌ی محلول ابریشم با غلظت ۴ درصد وزنی، نخ‌های ابریشم به قطعات بسیار کوچکی بریده و در اسید فرمیک حل شد. کیتوسان نیز با غلظت ۱ درصد وزنی در اسید فرمیک حل گردید. پس از این مرحله، محلول‌های ابریشم و کیتوسان به گونه‌ای با یکدیگر ترکیب شدند تا چهار محلول با درصدهای وزنی ۱۰۰/۰۰، ۸۰/۲۰، ۵۰/۵۰ و ۲۰/۸۰ به ترتیب از ابریشم و کیتوسان به دست بیاید.

تمامی محلول‌ها به لوله‌ی فالکن ۵۰ منتقل و در مدت زمان ۴۸ ساعت در دمای ۷۵- درجه‌ی سانتی‌گراد به طور کامل منجمد گردید. در ادامه، توسط دستگاه خشک‌کن انجمادی (مدل Vaco5-E ساخت آلمان) پس از ۲۴ ساعت به طور کامل خشک شد. به منظور حذف اسید باقی مانده در ساختار داربست‌ها، تمامی داربست‌ها توسط سدیم هیدروکسید با غلظت ۰/۱ مولار خنثی‌سازی گردید و چندین بار با آب مقطر شستشو داده شد (۲۶-۲۷).

از آن جا که در این مطالعه از نخ ابریشم به جای پیله‌ی ابریشم در ساختار داربست کامپوزیتی استفاده شده است، به منظور حصول اطمینان از تقلبی نبودن نخ ابریشم مورد استفاده، طیف FTIR (Fourier transform infrared spectroscopy) بستر فیلمی تهیه شده از این نخ، توسط دستگاه طیف‌نگار فروسرخ تبدیل فوریه (مدل JASCO۶۳۰۰ ساخت کشور ژاپن) تهیه شد.

جهت بررسی مورفولوژی و معماری ریزساختار داربست‌ها از میکروسکوپ الکترونی روبشی مدل

نشده است، به منظور اطمینان از سمی نبودن ابریشم و توانایی چسبیدن سلول‌های استخوانی به آن، بستریایی به شکل فیلم از ابریشم به کار رفته ساخته شد و از سلول‌های MG63 کشت داده شده بر روی این بسترها آزمون MTT [3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide] به عمل آمد.

همچنین، توانایی چسبیدن سلول‌ها به سطح بسترها توسط میکروسکوپ الکترونی روبشی مشاهده شد. برای این منظور، ابتدا بستریایی به شکل فیلم توسط روش ریخته‌گری حلال ساخته شد. سپس فیلم‌های ابریشمی در ابعاد خانه‌های ظروف ۲۴ خانه، بریده شدند.

پس از استریل کردن فیلم‌ها با اتانول ۷۰ درصد و اشعه‌ی فرابنفش (UV یا Ultraviolet)، معادل ۰/۸ میکرولیتر محیط کشت حاوی سلول، که شامل تعداد ۵۰۰۰ سلول بود، بر روی هر یک از فیلم‌ها ریخته شد و مدت زمان ۲۰ دقیقه به سلول‌ها درون انکوباتور زمان داده شد تا به بستر ابریشمی بچسبند.

پس از این زمان، ۴۰۰ میکرولیتر محیط کشت، به هر چاهک اضافه شد. تمامی نمونه‌ها به دو گروه تقسیم شدند: یک گروه، برای آزمایش سمیت و گروه دیگر برای آزمایش چسبندگی مورد مطالعه قرار گرفتند. در گروه آزمایش سمیت، در روزهای ۱، ۴ و ۷ محیط کشت رویی سلول‌ها خارج شد و محیط جدید، بدون سرم و ۴۰ میکرولیتر محلول MTT با غلظت ۰/۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر به هر چاهک اضافه شد. پس از گذشت ۴ ساعت، محلول رویی تخلیه شد و به هر چاهک ۴۰۰ میکرولیتر Dimethyl sulfoxide اضافه گردید.

(LEO۴۳۵VP) ساخت کشور آمریکا استفاده گردید. سطح مقطع داربست‌ها قبل از تهیه‌ی تصویر توسط لایه‌ی نازکی از طلا پوشش داده شد.

برای تعیین خواص مکانیکی داربست‌ها، مدول فشاری آن‌ها که ارتباط مستقیمی با استحکام فشاری دارد، مورد سنجش قرار گرفت. برای این منظور، تمامی داربست‌ها در ابعاد به طور تقریبی یکسان با ارتفاع میانگین ۲۱/۴ میلی‌متر و قطر میانگین ۳۰/۹ میلی‌متر بریده شدند و توسط دستگاه کشش-فشار Houns field (مدل H۲۵KS ساخت کشور آمریکا) تحت بارگذاری ۳۰ نیوتنی و با نرخ ۱ میلی‌متر بر دقیقه قرار گرفتند. سپس مدول فشاری هر داربست، توسط نرم‌افزار نصب شده روی دستگاه محاسبه گردید.

برای ارزیابی نرخ تخریب داربست‌ها، تمامی داربست‌ها در مقدار مساوی PBS (Phosphate buffered saline) غوطه‌ور شد و در انکوباتور با دمای ۳۷ درجه‌ی سانتی‌گراد قرار گرفت. سپس، میزان کاهش وزن آن‌ها در روزهای ۴، ۱۲ و ۲۱ نسبت به وزن اولیه‌ی آن‌ها در روز اول توسط رابطه‌ی زیر محاسبه شد.

[رابطه‌ی ۱]  $\times 100 =$  درصد تخریب داربست

$$\frac{\text{وزن ثانویه داربست} - \text{وزن اولیه داربست}}{\text{وزن اولیه داربست}}$$

در رابطه‌ی بالا، وزن ثانویه‌ی داربست‌ها بیانگر وزن خشک آن‌ها در روزهای ۴، ۱۲ و ۲۱ است.

آزمون ارزیابی سمیت و چسبندگی سلولی: از آن جا که برای ابریشم مورد استفاده در این مطالعه، فرایندهای معمول جداسازی کامل ناخالصی‌ها انجام

مقایسه‌ی داده‌ها (میانگین  $\pm$  انحراف معیار) از حیث معنی‌دار بودن، با استفاده از نرم‌افزار SPSS (SPSS Inc., Chicago, IL) و آزمون‌های آنالیز واریانس یک طرفه (Analysis of variance) یا ANOVA) و Tukey انجام شد. مقادیر  $P < 0/05$  به عنوان سطح معنی‌دار در نظر گرفته شد.

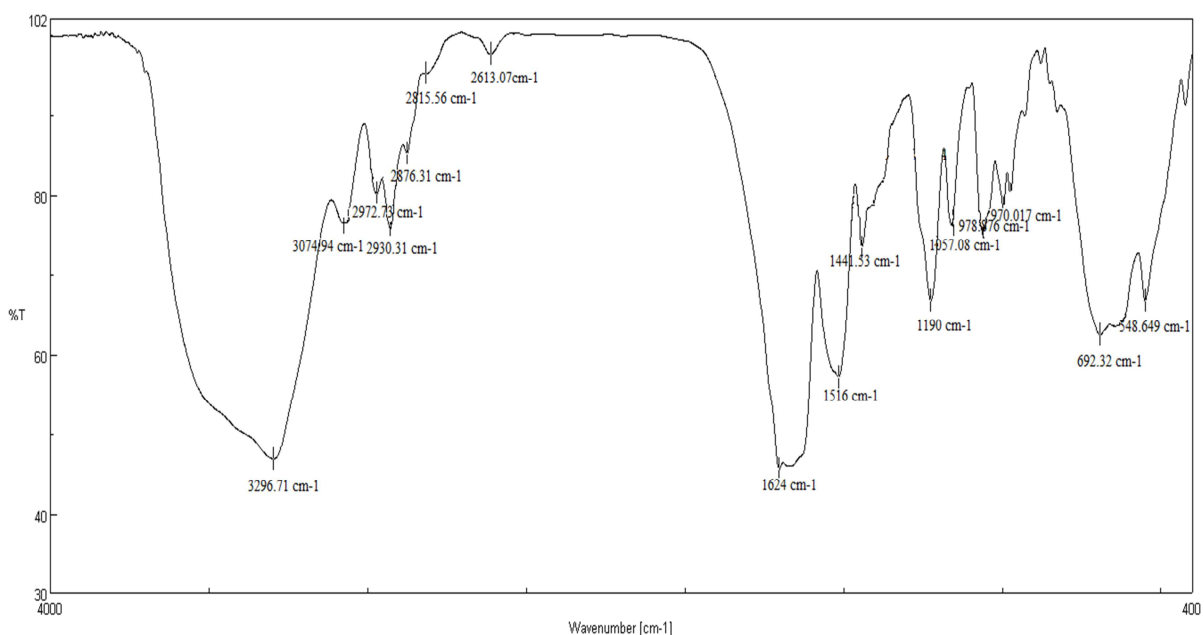
### یافته‌ها

نتایج طیف FTIR از بستر فیلمی تهیه شده از نخ‌ها در شکل نمایش داده شده است. همان‌طور که در شکل مشاهده می‌شود، طیف FTIR نخ‌ها دارای سه پیک شاخص و اساسی ابریشم نوع Mulberry یعنی  $1190 \text{ cm}^{-1}$ ،  $1516 \text{ cm}^{-1}$  و  $1624 \text{ cm}^{-1}$  بود (۲۴). با استفاده از تصاویر میکروسکوپ الکترونی روبشی، ریز ساختار داربست‌ها از سه نقطه نظر تخلخل‌های سطحی، ارتباط درونی تخلخل‌ها با یکدیگر و میانگین اندازه‌ی تخلخل‌ها بررسی شدند.

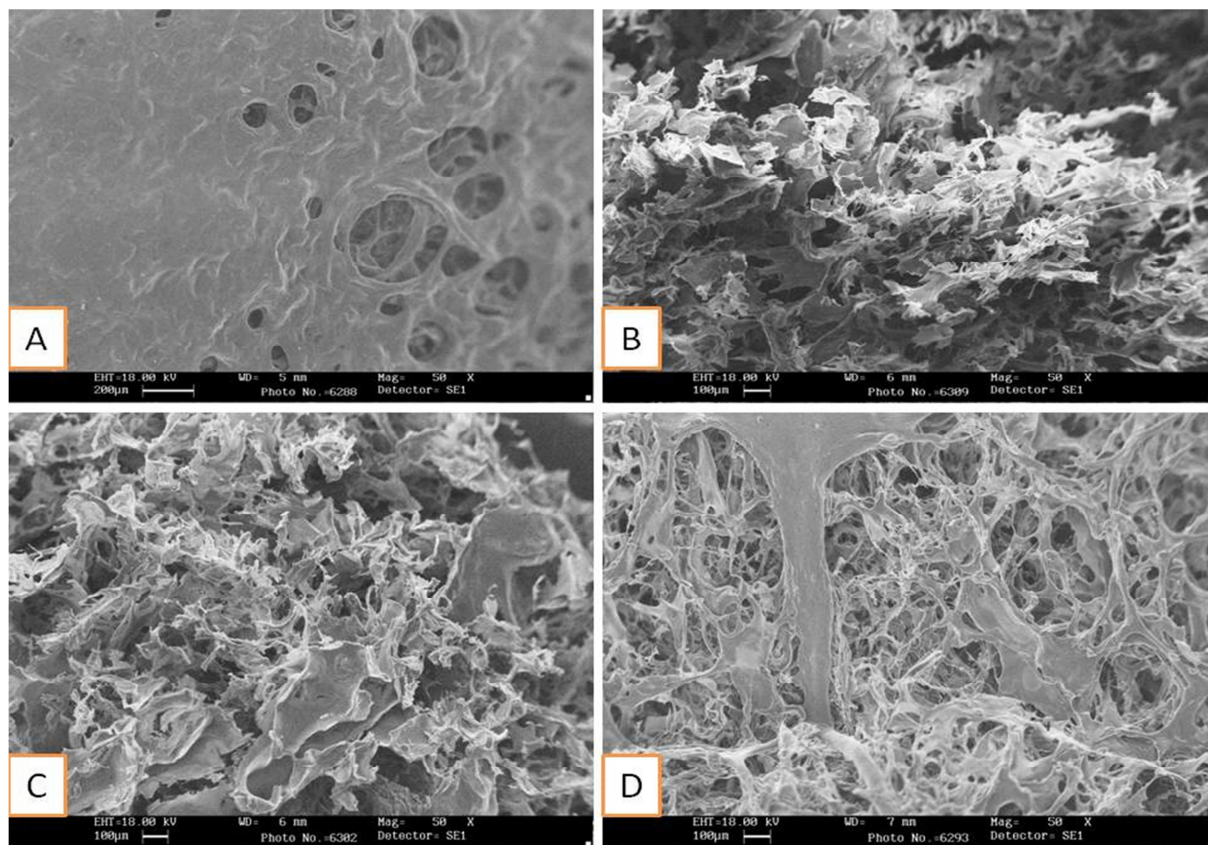
برای خارج شدن بهتر کریستال‌های ارغوانی فورمازان، تمامی چاهک‌ها چندین بار پیت شدند. در پایان، میزان چگالی نوری نمونه‌ها (OD یا Optical density) توسط دستگاه Micro plate reader (مدل Bio-Rad, Hercules, CA, USA) در طول موج ۵۴۵ نانومتر اندازه‌گیری شد. برای ارزیابی چسبندگی سلول‌های MG۶۳، فیلم‌های ابریشمی حاوی سلول در روزهای ۱ و ۷ توسط محلول گلو تار آلدئید با غلظت ۳ درصد تثبیت گردیدند و توسط شیب غلظت ۵۰، ۷۰، ۹۰ و ۱۰۰ درصد از اتانول آب‌گیری شدند.

پس از پوشش‌دهی با طلا، سلول‌های قرار گرفته بر روی سطوح، توسط میکروسکوپ الکترونی روبشی مورد مطالعه قرار گرفتند.

چگالی نوری هر نمونه، سه بار اندازه‌گیری شد و میانگین به دست‌آمده از هر سه تکرار، به عنوان چگالی نوری هر نمونه در نظر گرفته شد. سپس



شکل ۱. طیف FTIR (Fourier transform infrared spectroscopy) بستر فیلمی تهیه شده از نخ‌های مورد استفاده در این تحقیق



شکل ۲. تصویر میکروسکوپ الکترونی روبشی از سطح داربست‌های تهیه شده، A نسبت وزنی ۱۰۰/۰، B نسبت وزنی ۸۰/۲۰، C نسبت وزنی ۵۰/۵۰ و D نسبت وزنی ۲۰/۸۰ از کیتوسان/ابریشم را نشان می‌دهند.

برای مقایسه‌ی اندازه‌ی سلول‌های MG۶۳ با قطر حفرات و ارزیابی امکان نفوذ سلول‌های MG۶۳ به داخل ساختار داربست، میانگین قطر سلول‌های MG۶۳ کشت داده شده بر روی کف ظروف کشت و فیلم ابریشمی پس از ۷ روز کشت، برای سلول‌هایی که بیشترین پهن شدگی را داشتند، از روی تصاویر میکروسکوپ نوری و میکروسکوپ الکترونی روبشی محاسبه شد و قطر میانگینی معادل ۹۵ میکرومتر برای آن‌ها به دست آمد.

ارتباط درونی تخلخل‌های داربست‌ها از سطح به عمق در شکل ۳ نشان داده شده است. بر اساس این تصاویر، در تمامی داربست‌ها، همه‌ی تخلخل‌ها به یکدیگر راه داشتند؛ به‌گونه‌ای که عوامل سیال نظیر

شکل ۲، تصاویر سطح داربست‌های ساخته شده را نمایش می‌دهد. همان‌طور که در شکل ۲ به وضوح قابل مشاهده است، سطح تمامی داربست‌ها متخلخل بود. میانگین اندازه‌ی حفره‌های سطحی برای تمامی داربست‌ها که توسط نرم‌افزار Image J محاسبه گردید، در جدول ۱ آمده است.

جدول ۱. میانگین اندازه‌ی حفره‌های سطحی داربست‌ها

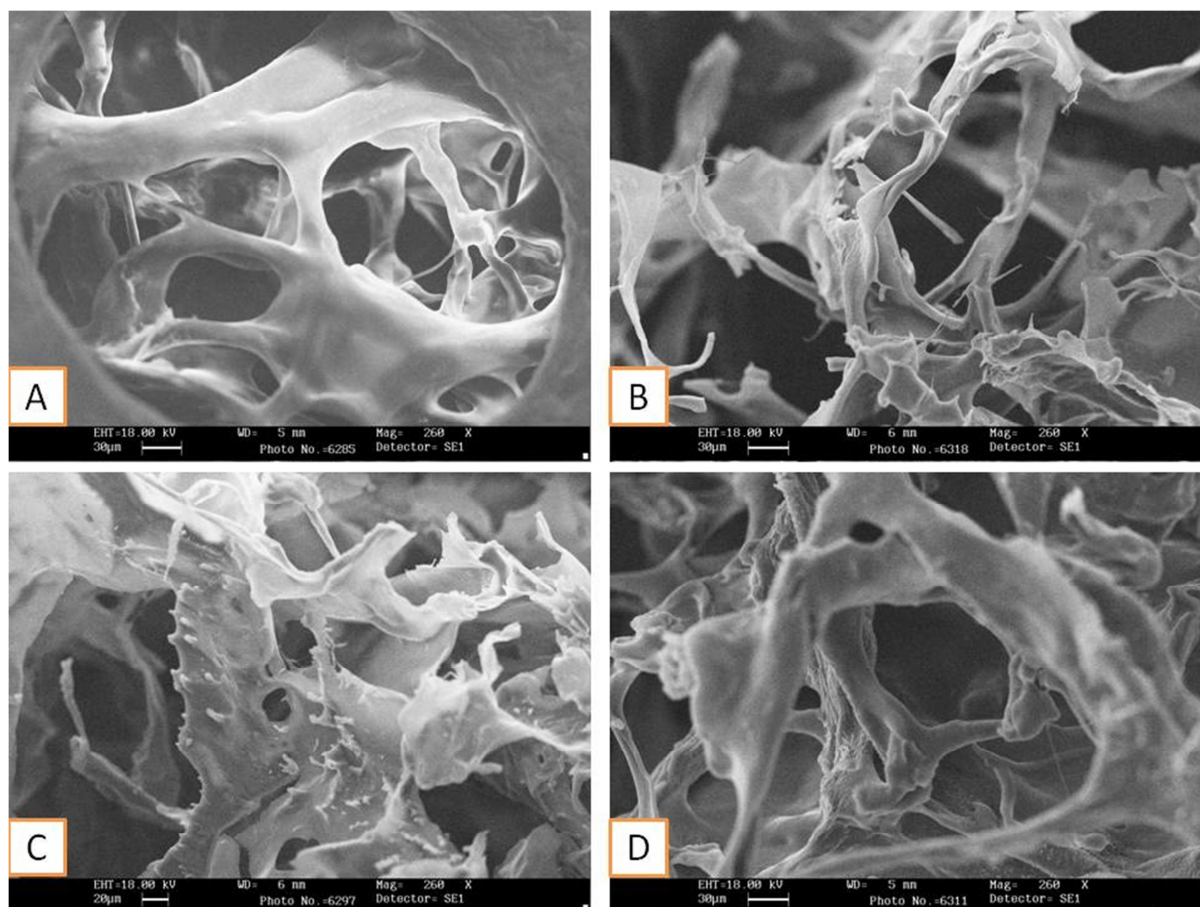
درصد وزنی کیتوسان/ابریشم	میانگین اندازه‌ی تخلخل‌ها (μm)
۱۰۰/۰	۲۲۴/۲۰ ± ۲۳/۵۵
۸۰/۲۰	۱۳۱/۱۲ ± ۵/۱۷
۵۰/۵۰	۱۹۰/۶۰ ± ۹/۵۶
۲۰/۸۰	۲۵۷/۷ ± ۳۶/۳۵

نتایج آزمون MTT در شکل ۴ گزارش شده است. بر اساس این نتایج، OD ثبت شده در روزهای ۴ و ۷ نسبت به روز اول به ترتیب با اختلاف معنی دار  $P < 0/050$  و  $P < 0/010$  افزایش یافت. این در حالی است که اختلاف OD بین روزهای ۴ و ۷ معنی دار نبود.

همچنین، شکل ۵ تصاویر میکروسکوپ الکترونی سلول‌های MG۶۳ کشت داده شده بر روی بسترهای ابریشمی را در روزهای ۱ و ۷ کشت نشان می‌دهد. بر اساس این تصاویر، به نظر می‌رسد پهن شدگی سلول‌ها بر روی بستر در روز ۷، نسبت به روز ۱ بهبود یافته است.

محیط کشت، سیگنال‌های شیمیایی تولید شده توسط سلول‌ها، متابولیت‌های سلولی و ... امکان جابه‌جایی از میان تخلخل‌ها را داشتند. همچنین، میانگین اندازه‌ی تخلخل‌های لایه‌های درونی داربست‌ها در جدول ۲ آمده است.

برای به دست آمدن استحکام داربست‌ها، مدول فشاری هر یک از آن‌ها توسط آزمایش فشار محاسبه شد. نتایج این ارزیابی، در جدول ۳ آمده است. به منظور ارزیابی امکان حذف و تخریب تدریجی داربست‌ها، نرخ تخریب داربست‌ها در روزهای ۴، ۱۲ و ۲۱ پس از قرارگیری در محلول PBS در جدول ۴ آمده است.



شکل ۳. تصاویر میکروسکوپ الکترونی رویشی از مقطع عرضی داربست‌ها به منظور نشان دادن ارتباطات درون ساختاری تخلخل‌ها با یکدیگر، نسبت وزنی A، ۱۰۰/۰، B نسبت وزنی ۸۰/۲۰، C نسبت وزنی ۵۰/۵۰ و D نسبت وزنی ۲۰/۸۰ از کیتوسان/ابریشم را نشان می‌دهند.

جدول ۳. مدول فشاری داربست‌ها

درصد وزنی کیتوسان/ ابریشم	مدول فشاری داربست‌ها (Mp)
۱۰۰/۰	۲/۱۰
۸۰/۲۰	۰/۲۸
۵۰/۵۰	۰/۱۴
۲۰/۸۰	۰/۱۲

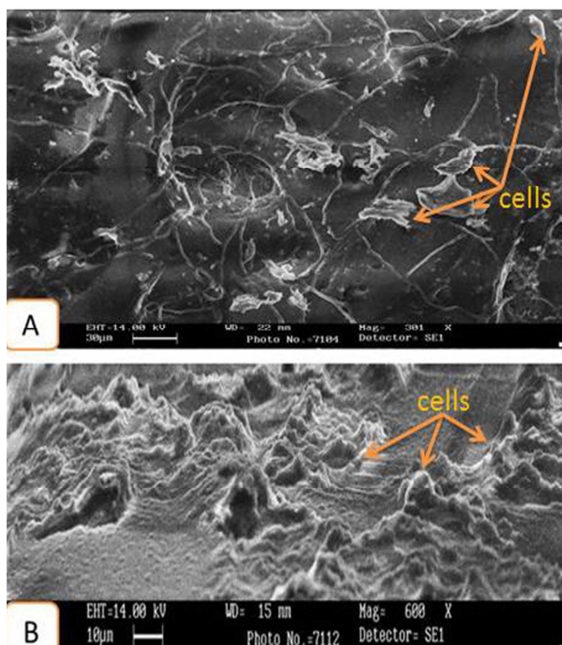
جدول ۲. میانگین اندازه‌ی حفره‌ها در مقطع عرضی داربست‌ها

درصد وزنی کیتوسان/ ابریشم	میانگین اندازه‌ی تخلخل‌ها ( $\mu\text{m}$ )
۱۰۰/۰	$198/80 \pm 8/95$
۸۰/۲۰	$129/95 \pm 8/15$
۵۰/۵۰	$119/90 \pm 9/28$
۲۰/۸۰	$121/22 \pm 7/39$

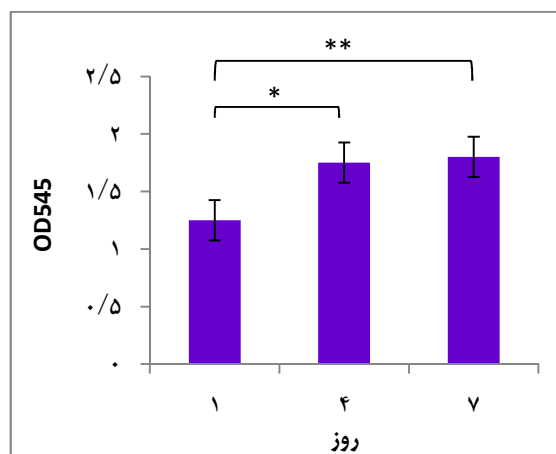
جدول ۴. درصد کاهش وزن داربست‌ها در روزهای مختلف نسبت به وزن اولیه

درصد وزنی کیتوسان/ ابریشم	درصد کاهش وزن داربست در روز ۴ نسبت به وزن اولیه	درصد کاهش وزن داربست در روز ۱۲ نسبت به وزن اولیه	درصد کاهش وزن داربست در روز ۲۱ نسبت به وزن اولیه
۱۰۰/۰	۰	۰	۰
۸۰/۲۰	٪۳۰/۰	٪۳۸/۰	٪۳۹/۰
۵۰/۵۰	٪۱۱/۶	٪۷۲/۰	٪۸۳/۰
۲۰/۸۰	٪۶/۴	٪۶۹/۰	٪۷۳/۰

Eri و Mullbery اغلب به عنوان زیست مواد به کار می‌روند (۲۴-۲۵).



شکل ۵. تصاویر میکروسکوپ الکترونی روبشی از سلول‌های MG۶۳ کشت داده شده بر روی بستر ابریشمی در روزهای ۱ (A) و ۷ (B) کشت



شکل ۴. نتایج آزمون MTT [۳-(۴،۵-dimethylthiazol-2-

*dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide*] مقایسه‌ی

میانگین چگالی نوری (OD یا Optical density) ثبت شده در روزهای ۱، ۴ و ۷ برای سلول‌های کشت شده بر روی بستر ابریشمی

اختلاف‌های معنی‌دار:  $P < 0/050^*$  و  $P < 0/010^{**}$

## بحث

ابریشم در طبیعت انواع بسیار گوناگونی دارد. این گوناگونی بر اساس منبع تهیه‌ی ابریشم به وجود می‌آید. در بین گونه‌های مختلف ابریشم، دو گونه‌ی



ساخته شده، استحکام مکانیکی بالایی دارند و پس از قرار گرفتن در محیط مایع کشت و یا تحت مواجهه با تنش‌های برشی، دستخوش تغییرات هندسی نمی‌شوند و شکل آن‌ها ثابت می‌ماند. تغییر نیافتن شکل کلی داربست‌ها، می‌تواند نشان دهنده‌ی عدم تغییر شکل تخلخل‌های درونی آن‌ها باشد. هر چند بررسی صحت این مسأله، نیاز به آزمایش‌های تجربی دارد، اما می‌توان انتظار داشت بر اساس مدول فشاری گزارش شده، تا قبل از زمان شروع فرایند تخریب، معماری و اندازه‌ی تخلخل‌ها برای تمامی داربست‌های این مطالعه بدون تغییر باقی بماند.

نتایج سنجش نرخ تخریب پذیری داربست‌ها نیز بیانگر این است که با افزایش درصد وزنی کیتوسان، نرخ تخریب داربست به میزان زیادی افزایش یافته است، اما در حالت عکس، افزایش درصد وزنی ابریشم در ساختار کامپوزیتی داربست، باعث کاهش نرخ تخریب می‌شود؛ تا آن جا که برای داربستی که فقط از ابریشم ساخته شده است، هیچ گونه تخریبی مشاهده نمی‌شود.

پس می‌توان گفت در شرایطی که هدف فرایند کشت، باقی ماندن سلول‌ها به تنهایی و حذف کامل ماده‌ی داربست باشد، بهتر است داربست‌هایی با درصد وزنی بالا از جزء کیتوسان ساخته شود و به طور عکس، زمانی که هدف از سیستم کشت سه بعدی، حفظ طولانی مدت سلول‌ها در یک موضع مکانی مشخص در حالت درون‌تنی باشد، بهتر است داربست‌هایی با نسبت وزنی بالا از جزء ابریشم ساخته شود.

نکته‌ی مهم دیگری که حایز اهمیت است، نتایج به دست آمده از ارزیابی سمیت و چسبندگی ابریشم

نتیجه‌ی به دست آمده از طیف FTIR، ثابت کرد که در این مطالعه، نخ مورد استفاده از جنس ابریشم بود. بر اساس پیک‌های ظاهر شده در شکل ۱، احتمال می‌رود نخ‌های مورد استفاده، ترکیبی از دو ابریشم Eri و Mulberry هستند؛ چرا که پیک‌های مشخصه‌ی ابریشم Mulberry به وضوح دیده می‌شود. از طرفی، پهن بودن دامنه‌ی پیک‌های ظاهر شده، این احتمال را مطرح می‌کند که ممکن است در ساختار نخ مورد استفاده، ابریشم Eri هم به کار رفته باشد.

با توجه به تصاویر میکروسکوپی، داربست‌ها از هر حیث، تخلخل‌های مناسبی دارند. همچنین، مقایسه‌ی قطر به دست آمده برای سلول‌ها، با اندازه‌ی تخلخل‌های سطحی گزارش شده برای داربست‌ها، بیانگر این مطلب است که تمامی سلول‌ها از حیث اندازه، توانایی نفوذ از سطح داربست به داخل آن را داشتند. با این وجود، با توجه به تصاویر سطح داربست‌ها، به نظر می‌رسد داربست ۱۰۰/۰ از کیتوسان/ابریشم در مقایسه با داربست‌های دیگر، مناطق سطحی فاقد تخلخل بیشتری دارد.

این مسأله، می‌تواند برای ابزارهای کشت سلولی نظیر داربست‌ها مهم باشد؛ چون از آن جا که سلول‌ها همواره از لایه‌های سطحی وارد ساختار سه بعدی داربست می‌شوند، وجود مناطق سطحی فاقد تخلخل، شانس ورود سلول‌ها به داخل داربست را کاهش می‌دهد. در واقع، تنها آن دسته از سلول‌هایی که بر روی تخلخل‌های سطحی قرار بگیرند، نفوذ می‌کنند و این ویژگی، می‌تواند بازده داربست به کار گرفته شده برای کشت سه بعدی سلول را کاهش دهد.

ارزیابی انجام شده برای مدول فشاری داربست‌ها، بیانگر این موضوع است که داربست‌های اسفنجی

است. افزایش معنی دار OD ثبت شده در روزهای ۴ و ۷ نسبت به روز ۱ نشان می‌دهد که ابریشم مورد استفاده در این مطالعه، با وجود داشتن ناخالصی، برای سلول‌ها سمیت ایجاد نکرده بود.

همچنین، با توجه به شکل ۵، افزایش پهن شدگی سلول‌ها با گذشت زمان به معنای چسبندگی مناسب ابریشم است. بنابراین، از مجموع این نتایج می‌توان چنین برداشت کرد که تمامی داربست‌های ساخته شده، به طور تقریبی از حداقل ویژگی‌های لازم به عنوان ابزارهای کشت سلول برخوردار بودند.

امروزه، کشت انواع رده‌های سلولی با هدف ارزیابی تأثیرات داروها، توسعه‌ی سیستم‌های ره‌ایش دارو با بهره‌گیری از سلول‌ها، سلول درمانی، مهندسی بافت و ... بسیار رایج است. در این بین، کشت و تکثیر سلول‌های بافت استخوان به عنوان بافتی که در معرض بیشترین تعداد صدمات قرار دارد و با توجه به این که به طور معمول، دوره‌ی ترمیم آن طولانی است، بسیار حایز اهمیت است. از این رو، وجود یک ساختار سه بعدی، با ویژگی‌های مهندسی شده‌ی مناسب برای رشد و تکثیر سلول‌های استخوانی، می‌تواند کیفیت و بازده کشت این نوع سلول‌ها را افزایش دهد.

ساختارهای سه بعدی باید به گونه‌ای طراحی شوند که متخلخل باشند و تخلخل‌های سطحی آن در ابعادی باشند که سلول‌های استخوانی بتوانند وارد آن‌ها شوند و پس از نفوذ، سلول‌ها توانایی چسبیدن به سطوح تخلخل‌ها را داشته باشند. دیگر این که، عوامل سیال نظیر اکسیژن، محیط کشت و غیره، به راحتی بتوانند از خلال تخلخل‌ها نفوذ کنند و در دسترس تمامی سلول‌ها قرار بگیرند.

نتایج به دست آمده در این مطالعه، نشان می‌دهد که داربست‌های ساخته شده، تمامی این ویژگی‌ها را داشتند و می‌توانند به عنوان ساختارهای مناسب برای کشت سه بعدی سلول‌های استخوانی مورد استفاده قرار بگیرند. مشابه با این مطالعه، She و همکاران (۲۶-۲۷) در دو تحقیق جداگانه با استفاده از روش خشکاندن انجمادی داربست‌هایی از فیبروئین ابریشم و کیتوسان ساخته‌اند. این داربست‌ها، دارای تخلخل‌هایی با اندازه‌ی متوسط بین ۱۵۰-۱۰۰ میکرومتر، میانگین مدول فشاری ۴/۷ مگاپاسکال و نرخ تخریب ۱۹/۲ درصد وزنی در طی بازه‌ی ۸ هفته‌ای بوده‌اند. در مقایسه، داربست‌های ساخته شده در این مطالعه، تخلخل‌هایی با متوسط اندازه‌ی ۱۷۰ میکرومتر و میانگین مدول فشاری ۰/۶ مگاپاسکال داشتند. همچنین، آن‌ها نرخ تخریب بسیار بالاتری را نسبت به داربست‌های ساخته شده توسط She و همکاران (۲۶-۲۷) نشان دادند.

آن چه اهمیت دارد، این است که She و همکاران (۲۶-۲۷)، در مجموع دو تحقیق نشان داده‌اند که مدول فشاری داربست‌ها، با افزایش غلظت ابریشم افزایش می‌یابد. همچنین، کاهش غلظت مجموع دو عنصر ابریشم و کیتوسان در ترکیب محلول کامپوزیت، باعث افزایش اندازه‌ی تخلخل‌ها می‌گردد؛ در حالی که نسبت درصد وزنی اجزای داربست، تأثیری بر روی اندازه‌ی تخلخل‌ها ندارد. در کل، از مجموع نتایج به دست آمده در این مطالعه و دو تحقیق انجام شده توسط She و همکاران (۲۶-۲۷)، می‌توان نتایج زیر را به دست آورد:

داربست‌های ساخته شده توسط فرایند خشکاندن انجمادی از دو ماده‌ی ابریشم و کیتوسان، می‌توانند به

کشت سه بعدی سلول‌های استخوانی و کاربردهای مهندسی بافت ساخت.

### تشکر و قدردانی

بدین وسیله از زحمات بی‌دریغ خانم دکتر میترا نعیمی به خاطر راهنمایی‌های بسیار مفیدشان در زمان انجام این تحقیق و جناب آقای مهندس سهیلی مسئول آزمایشگاه میکروسکوپ الکترونی دانشگاه آزاد نجف‌آباد که با حوصله فراوان در تهیه تصاویر همکاری نمودند سپاس‌گزاری می‌گردد.

عنوان ساختارهای سه بعدی مناسب برای کشت سه بعدی سلول‌های استخوانی مورد استفاده قرار بگیرند. همچنین، افزایش غلظت ابریشم باعث بهبود خواص مکانیکی داربست می‌شود. افزایش درصد وزنی ابریشم در ترکیب کامپوزیت، باعث کاهش چشمگیر نرخ تخریب داربست می‌گردد و افزایش غلظت کلی ابریشم و کیتوسان، موجب کاهش اندازه‌ی تخلخل‌ها می‌شود؛ در حالی که درصد نسبت وزنی اجزای داربست، بر روی این موضوع تأثیری ندارد. از این رو، در کل با توجه به این نتایج، می‌توان داربست‌هایی با ویژگی‌ها و معماری دلخواه به منظور

### References

- Doblare M, Garcia J, Gomez M. Modelling bone tissue fracture and healing: a review. *Engineering Fracture Mechanics* 2004; 71 (13-14): 1809-40.
- Porter JR, Ruckh TT, Popat KC. Bone tissue engineering: a review in bone biomimetics and drug delivery strategies. *Biotechnol Prog* 2009; 25(6): 1539-60.
- Kim HW, Kim HE, Salih V. Stimulation of osteoblast responses to biomimetic nanocomposites of gelatin-hydroxyapatite for tissue engineering scaffolds. *Biomaterials* 2005; 26(25): 5221-30.
- Price N, Bendall SP, Frondoza C, Jinnah RH, Hungerford DS. Human osteoblast-like cells (MG63) proliferate on a bioactive glass surface. *J Biomed Mater Res* 1997; 37(3): 394-400.
- Justice BA, Badr NA, Felder RA. 3D cell culture opens new dimensions in cell-based assays. *Drug Discov Today* 2009; 14(1-2): 102-7.
- Pampaloni F, Reynaud EG, Stelzer EH. The third dimension bridges the gap between cell culture and live tissue. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2007; 8(10): 839-45.
- Lee J, Cuddihy MJ, Kotov NA. Three-dimensional cell culture matrices: state of the art. *Tissue Eng Part B Rev* 2008; 14(1): 61-86.
- Tibbitt MW, Anseth KS. Hydrogels as extracellular matrix mimics for 3D cell culture. *Biotechnol Bioeng* 2009; 103(4): 655-63.
- Liu L, Tang KL, Yang L, Jing YK, Li QH. Study of biological safety of scaffold material with heterologous deproteinized bone. *Chin J Traumatol* 2006; 9(4): 234-7.
- Hollister SJ. Porous scaffold design for tissue engineering. *Nat Mater* 2005; 4(7): 518-24.
- Moore MJ, Jabbari E, Ritman EL, Lu L, Currier BL, Windebank AJ, et al. Quantitative analysis of interconnectivity of porous biodegradable scaffolds with micro-computed tomography. *J Biomed Mater Res A* 2004; 71(2): 258-67.
- Guan L, Davies JE. Preparation and characterization of a highly macroporous biodegradable composite tissue engineering scaffold. *J Biomed Mater Res A* 2004; 71(3): 480-7.
- Alsberg E, Kong HJ, Hirano Y, Smith MK, Albeiruti A, Mooney DJ. Regulating bone formation via controlled scaffold degradation. *J Dent Res* 2003; 82(11): 903-8.
- Stock UA, Vacanti JP. Tissue engineering: current state and prospects. *Annu Rev Med* 2001; 52: 443-51.
- Gunatillake PA, Adhikari R. Biodegradable synthetic polymers for tissue engineering. *Eur Cell Mater* 2003; 5: 1-16.
- Garg T, Singh O, Arora S, Murthy R. Scaffold: a novel carrier for cell and drug delivery. *Crit Rev Ther Drug Carrier Syst* 2012; 29(1): 1-63.
- Altman GH, Diaz F, Jakuba C, Calabro T, Horan RL, Chen J, et al. Silk-based biomaterials. *Biomaterials* 2003; 24(3): 401-16.
- Vepari C, Kaplan DL. Silk as a Biomaterial. *Prog Polym Sci* 2007; 32(8-9): 991-1007.

19. Chandy T, Sharma CP. Chitosan--as a biomaterial. *Biomater Artif Cells Artif Organs* 1990; 18(1): 1-24.
20. Aramwit P, Kanokpanont S, De-Eknamkul W, Srichana T. Monitoring of inflammatory mediators induced by silk sericin. *J Biosci Bioeng* 2009; 107(5): 556-61.
21. Aramwit P, Kanokpanont S, Nakpheng T, Srichana T. The effect of sericin from various extraction methods on cell viability and collagen production. *Int J Mol Sci* 2010; 11(5): 2200-11.
22. Nazarov R, Jin HJ, Kaplan DL. Porous 3-D scaffolds from regenerated silk fibroin. *Biomacromolecules* 2004; 5(3): 718-26.
23. Hofmann S, Hagenmuller H, Koch AM, Muller R, Vunjak-Novakovic G, Kaplan DL, et al. Control of in vitro tissue-engineered bone-like structures using human mesenchymal stem cells and porous silk scaffolds. *Biomaterials* 2007; 28(6): 1152-62.
24. Muthumanickam A, Subramanian S, Goweri M, Sofi Beaula W, Ganesh V. Comparative study on eri silk and mulberry silk fibroin scaffolds for biomedical applications. *Iran Polym J* 2013; 22(3): 143-54.
25. Andiappan M, Sundaramoorthy S, Panda N, Meiyazhaban G, Winfred S, Venkataraman G, et al. Electrospun eri silk fibroin scaffold coated with hydroxyapatite for bone tissue engineering applications. *Prog Biomater* 2013; 2(1): 1-11.
26. She Z, Zhang B, Jin C, Feng Q, Xu Y. Preparation and in vitro degradation of porous three-dimensional silk fibroin/chitosan scaffold. *Polymer Degradation and Stability* 2008; 93(7): 1316-22.
27. She Z, Jin C, Huang Z, Zhang B, Feng Q, Xu Y. Silk fibroin/chitosan scaffold: preparation, characterization, and culture with HepG2 cell. *J Mater Sci Mater Med* 2008; 19(12): 3545-53.

## Preparation and Characterization of Silk-Chitosan Composite as a Three-Dimensional Tool for Culturing Osteoblast-Like Cells

Shahin Rouhi<sup>1</sup>, Mohammad Rafienia PhD<sup>2</sup>, Hossein Salehi PhD<sup>3</sup>, Elaheh Poorazizi PhD<sup>4</sup>

### Original Article

#### Abstract

**Background:** The culture and proliferation of osteoblast-like cells has an important role in clinical and research use and bone biology. The results have shown that culturing cells in a three-dimensional tissue-like microenvironment with engineered geometrical properties gives a better effect on cell culture than two-dimensional ones. The aim of the present study was construction and evolution of a three-dimensional scaffold with suitable features for the cultivation of osteoblast-like cells.

**Methods:** Silk-chitosan scaffold was prepared via freeze drying method. Scaffolds structure was analyzed using scanning electron microscopy. The mechanical properties of scaffolds were evaluated via measuring the compressive strength and the degradation of them was investigated via incubating the samples in phosphate buffer saline. The cytotoxicity of silk on MG63 cells was assessed using MTT [3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide] assay and cell adhesion was investigated after cell incubation on silk substrate.

**Findings:** Scanning electron microscopy data indicated the appropriate porosity and porous structure (pore size:  $200.90 \pm 46.75 \mu\text{m}$ ) on scaffold surface that might improve nutrient transport, transmission of signal and cell penetration into the scaffolds. The results of mechanical properties showed that the scaffold was appropriate for three-dimensional culture of cells and the compressive strength was  $0.6 \pm 0.8 \text{ MPa}$  at scaffold. Degradation test results showed that increasing the weight ratio of the chitosan raised the rate of the scaffold degradation. The results of MTT assay and cell culturing confirmed non-toxicity of silk and its ability to accommodate cell adhesion.

**Conclusion:** Silk-chitosan scaffold prepared via freeze drying methods can be promising for three-dimensional culture of osteoblast-like cells.

**Keywords:** Scaffold, Silk, Chitosan, Three-dimensional cultures

**Citation:** Rouhi Sh, Rafienia M, Salehi H, Poorazizi E. **Preparation and Characterization of Silk-Chitosan Composite as a Three-Dimensional Tool for Culturing Osteoblast-Like Cells.** J Isfahan Med Sch 2015; 33(342): 1107-19

1- Department of Tissue Engineering, Nagafabad Branch, Islamic Azad University, Isfahan, Iran

2- Biosensor Research Center, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, Iran

3- Department of Anatomical Sciences, School of Medicine, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, Iran

4- Department of Biochemistry, Nagafabad Branch, Islamic Azad University, Isfahan, Iran

**Corresponding Author:** Shahin Rouhi, Email: rouhishahin@yahoo.com