Original Article

10.18502/ijds.v18i4.12103

Crossref

Journal of Isfahan Dental School

2022; 18(4): 423-30

Cytotoxicity Effects of Polyhydroxybutyrate/Chitosan/Bioglass Nanocomposite Scaffolds on Human Osteoblast-like Cells (SAOS-2 Cells)

Batool Hashemi-Beni[1]
Maryam Khoroushi[2]
Saeed Karbasi[3]
Fariba Heidari[4]
Mohamad Reza Foroughi[5]

1. **Corresponding Author:** Professor, Dental Research Center, Department of Anatomical Sciences, Dental Research Institute, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, Iran.
Email: hashemibeni@med.mui.ac.ir
2. Professor, Dental Materials Research Center, Department of Operative Dentistry, Dental Research Institute, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, Iran.
3. Professor, Department of Biomaterials and Tissue Engineering, School of Advanced Technologies in Medicine, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, Iran.
4. Bachelor of Sciences Microbiology, Dental Research Center, Dental Research Institute, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, Iran.
5. PhD Student, Dental Materials Research Center, Dental Research Institute, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, Iran.

Abstract

Introduction: In tissue engineering, a porous material is applied as the extracellular matrix or scaffold for cell growth. Then growth factors are added to this scaffold whose cytotoxicity must be assessed. In this study, the cytotoxicity effects of polyhydroxybutyrate/chitosan/bioglass nanocomposite scaffolds on human osteoblast-like cells (SAOS-2 cells) are explored.

Materials & Methods: This study was experimental and was done in Isfahan Dental School. The polyhydroxybutyrate/chitosan/bioglass nanocomposite scaffold was fabricated using the electrospinning method. Scanning Electron Microscopy (SEM) analysis was used to evaluate the morphological characteristics of the nanofibers and their diameter distribution. Additionally, bioglass nanoparticles in the fibers were identified via SEM. The MTT assay was performed to assess cell viability after 3, 5, and 7 days. The collected data were analyzed using SPSS 20.0 through statistical tests including Kruskal-Wallis test (p value ≤ 0.05).

Results: According to SEM images, the scaffold fibers were fully porous and no beads were observed. Furthermore, the polyhydroxybutyrate/chitosan/bioglass scaffold showed greater cell viability and proliferation compared to the groups lacking bioglass.

Conclusion: The polyhydroxybutyrate/chitosan/bioglass scaffold has no cytotoxic effect on osteoblast– like cells.

Key words: Hydroxybutyrate; Bioglass; Chitosan; Osteoblast; Cytotoxicity.

Received: 03.08.2022 **Revised**: 03.11.2022 **Accepted:** 06.12.2022

How to cite: Hashemi-Beni B, Khoroushi M, Karbasi S, Heidari F, Foroughi MR. Cytotoxicity Effects of Polyhydroxybutyrate/Chitosan/Bioglass Nanocomposite Scaffolds on Human Osteoblast-like Cells (SAOS-2 Cells). J Isfahan Dent Sch 2022; 18(4): 423-30.

مقاله اصیل پژوهشی

10.18502/ijds.v18i4.12103
Crossref

مجله دانشکده دندانپزشکی اصفهان
۱۴۰۱؛ ۱۸(۴): ۴۲۳ تا ۴۳۰

بررسی سمیت سلولی داربست نانوکامپوزیتی پلی هیدروکسی بوتیرات/کیتوسان/بیوگلاس روی سلول‌های شبه استئوبلاست انسان (رده سلولی SAOS-2)

بتول هاشمی‌بنی [۱]
مریم خروشی [۲]
سعید کرباسی [۳]
فریبا حیدری [۴]
محمدرضا فروغی [۵]

۱. **نویسنده مسؤول:** استاد، مرکز تحقیقات دندان‌پزشکی، گروه علوم تشریحی، دانشکده‌ی پزشکی، پژوهشکده‌ی تحقیقات دندان‌پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران. Email: hashemibeni@med.mui.ac.ir
۲. استاد، مرکز تحقیقات مواد دندانی، گروه آموزشی ترمیمی زیبایی، دانشکده‌ی دندان‌پزشکی، پژوهشکده‌ی تحقیقات دندان‌پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران.
۳. استاد، گروه بیومواد، نانوتکنولوژی و مهندسی بافت، دانشکده‌ی فناوری‌های نوین پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران.
۴. کارشناس میکروبیولوژی، مرکز تحقیقات دندان‌پزشکی،کارشناس آزمایشگاه میکروبشناسی و کشت سلول، پژوهشکده‌ی تحقیقات دندان‌پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران.
۵. دانشجوی PhD مرکز تحقیقات مواد دندانی، دکترای پژوهش محور دانشکده‌ی دندان‌پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران.

چکیده

مقدمه: در مهندسی بافت، یک ماده متخلخل به عنوان ماتریکس خارج سلولی یا داربست برای رشد سلول‌ها تهیه شده و سپس عوامل رشد روی آن‌ها قرار می‌گیرند و ارزیابی سمیت داربست‌های تهیه شده ضرورت دارد لذا در این مطالعه سمیت سلولی داربست نانوکامپوزیتی پلی هیدروکسی بوتیرات/کیتوسان/بیوگلاس بر سلول‌های شبه استئوبلاست انسان (رده‌ی سلولی SAOS-2) مورد بررسی قرار گرفت.

مواد و روش‌ها: این مطالعه از نوع تجربی– آزمایشگاهی بوده و در سال‌های ۱۳۹۶–۱۳۹۷ در دانشکده‌ی دندان‌پزشکی دانشگاه علوم پزشکی اصفهان انجام شد. داربست نانوکامپوزیتی پلی هیدروکسی بوتیرات/ کیتوسان/ بیوگلاس به روش الکتروریسی تهیه گردید. بررسی مورفولوژی و پراکندگی قطر نانوالیاف و شناسایی نانوذرات بیوگلاس در ساختار الیاف با روش SEM انجام گرفت. در روزهای ۳، ۵، ۷ بقاء سلول‌ها از طریق MTT assay بررسی گردید. در این مطالعه روش آنالیز آماری واریانس یک طرفه Kruskal-wallis مورد استفاده قرارگرفت.

یافته‌ها: نتایج تصاویر میکروسکوپ الکترونی نشان دادکه الیاف داربست ساختاری کاملاً متخلخل وبدون هیچ گونه بید داشته و یکنواختی الیاف مشخص است. به علاوه در داربست پلی هیدروکسی بوتیرات/کیتوسان/ نانوذرات بیوگلاس در مقایسه با گروه‌های بدون بیوگلاس با افزایش زمان کشت بقاء و تکثیر سلولی افزایش داشته است ($p\ value \leq ۰/۰۵$).

نتیجه‌گیری: داربست پلی هیدروکسی بوتیرات/ کیتوسان/ نانوذرات بیوگلاس بر سلول‌های رده شبه استئوبلاست تاثیر سمی ندارد و می‌تواند به عنوان کاندید مناسبی جهت کاربرد در مهندسی بافت مورد استفاده قرار گیرد.

کلید واژه‌ها: هیدروکسی بوتیرات؛ بیوگلاس؛ کیتوسان؛ استئوبلاست؛ سمیت سلولی.

تاریخ ارسال: ۱۴۰۱/۵/۱۲ **تاریخ اصلاح:** ۱۴۰۱/۸/۱۲ **تاریخ پذیرش:** ۱۴۰۱/۹/۱۵

استناد به مقاله: هاشمی‌بنی بتول، خروشی مریم، کرباسی سعید، حیدری فریبا، فروغی محمدرضا. بررسی سمیت سلولی داربست نانوکامپوزیتی پلی هیدروکسی بوتیرات/کیتوسان/بیوگلاس روی سلول‌های شبه استئوبلاست انسان (رده سلولی SAOS-2). مجله دانشکده دندانپزشکی اصفهان. ۱۴۰۱؛ ۱۸(۴): ۴۶۰-۴۲۳.

مقدمه

از آن‌جا که بیماری‌ها و آسیب‌های استخوانی از جمله شکستگی‌های استخوانی در طی تصادفات و تروماها در همه‌ی جوامع شیوع فراوانی دارد و در اکثر موارد استخوان خرد شده قادر به ترمیم نمی‌باشد، همچنین روش‌های درمانی مختلف از جمله پیوند بافت استخوانی به صورت آلوگرافت و اتوگرافت خطرات و مشکلاتی را به دنبال دارد، از این‌رو طراحی بافت استخوانی و پیوند آن به بیماران ضروری به نظر می‌رسد. به همین دلیل، ضرورت تأمین یک منبع بافت استخوانی، برای ترمیم ناحیه، غیرقابل انکار است. یکی از راه‌های درمان، استفاده از سلول‌های استخوانی خود فرد، کشت آن‌ها بر روی داربست مناسب و انتقال به بیمار می‌باشد. از آن‌جا که کشت سلول‌ها به عوامل حمایتی از قبیل محیط، زمان و داربست مناسب نیاز دارد، لذا جداسازی سلول‌های استئوبلاست از استخوان خرد شده و کشت آن‌ها بر روی داربست مناسب برای رسیدن به حداکثر تعداد استئوبلاست (در فاصله زمانی کمتر) ضروری به نظر می‌رسد. سپس در صورت امکان با انتقال هر چه سریع‌تر این سلول‌ها به محل شکستگی، شاید بتوان موجبات ترمیم سریع‌تر استخوان را فراهم نمود (۱).

تا به امروز مواد مختلفی از جمله پلیمرهای با منشأ طبیعی یا مصنوعی به منظور ساخت داربست‌های مهندسی بافت استفاده شده‌اند. پلی‌هیدروکسی آلکانوات در گروه پلیمرهای زیست تخریب‌پذیر می‌باشد که به صورت ترکیب یا به تنهایی در کاربردهای پزشکی (ترمیم بافت، رهایش دارو، پچ‌ها) مورد استفاده قرار گرفته است. این گروه پلی‌استری، توسط میکروارگانیسم‌ها به روش‌های متفاوت سنتز و تولید می‌شود (۲، ۳). یکی از اعضاء خانواده‌ی پلی‌هیدروکسی آلکانوات، پلی‌هیدروکسی بوتیرات می‌باشد که نسبت به پلیمرهای گروه پلی آلفا هیدروکسی اسیدها (مثل پلی‌لاکتیک اسید یا پلی‌لاکتیک گلایکولیک اسید) دارای زمان تخریب طولانی‌تری می‌باشد (۴). پلی‌هیدروکسی بوتیرات، درجات خوبی از زیست‌سازگاری در برابر سلول‌های مختلف از خود نشان داده است. البته، در کنار مزایایی که این پلیمر از خود نشان می‌دهد، معایبی نظیر آب‌دوستی و نرخ تخریب پایین نیز دارد که باعث محدود شدن استفاده از این پلیمر در ساخت داربست‌های مهندسی بافت می‌شود (۵-۷). یکی از روش‌های اصلاح این عیوب، استفاده از پلیمرهای طبیعی است.

کیتوسان به دلیل دارا بودن بار سطحی مثبت قادر است از رشد سلولی حمایت نماید و به دلیل خاصیت آب‌دوستی، چسبندگی سلولی، تکثیر و تمایز را تسهیل می‌بخشد (۸). علاوه بر این، کیتوسان دارای فعالیت ضدباکتری نیز می‌باشد و حداقل واکنش خارجی را با بافت میزبان از خود نشان می‌دهد. در نتیجه باعث عدم عفونت در محل کاشته شده می‌شود.

شیشه‌های زیست فعال به دلیل توانایی که در اتصال به بافت‌های اطرافشان، از خود نشان داده‌اند، تاکنون به میزان گسترده‌ای مورد مطالعه قرار گرفته‌اند. در واقع این اتصال ناشی از تشکیل لایه‌ی هیدروکسی آپاتیت کربنات بر روی سطح شیشه‌ی زیست‌فعال می‌باشد. شیشه‌های زیست‌فعال نسبت به کلسیم فسفات‌ها زیست سازگاری بهتری دارند (۹).

در مطالعه‌ی Daranarong و همکاران داربست PHBV/ کیتوسان به روش الکتروریسی به منظور بازسازی پوست ساخته شد و با استفاده از سلول‌های L929 چسبندگی فیبروبلاست، زنده ماندن سلول و تکثیر مورد ارزیابی قرار گرفت که این داربست عملکرد مناسبی را در بهبود زخم در موش صحرایی (Rat) از خود نشان داد (۱۰).

در این طرح، سمیت سلولی داربست نانوکامپوزیتی پلی‌هیدروکسی بوتیرات/کیتوسان/بیوگلاس روی سلول‌های شبه استئوبلاست انسان (رده‌ی سلولی SAOS-2) مورد بررسی قرار گرفت.

در این مطالعه فرضیه‌ی صفر مبنی بر اینکه با ساخت داربست کامپوزیتی پلی‌هیدروکسی بوتیرات/کیتوسان/بیوگلاس می‌توان به خواص مکانیکی و بیولوژیکی بهتری نسبت به داربست‌های پلی‌هیدروکسی بوتیرات دست یافت به اثبات رسید.

مواد و روش‌ها

این مطالعه از نوع تجربی– آزمایشگاهی بوده و در سال‌های ۱۳۹۶-۱۳۹۷ در دانشکده‌ی دندان‌پزشکی دانشگاه علوم پزشکی اصفهان با کد تحقیقاتی ۲۹۵۱۸۲ انجام شد.

تهیه‌ی داربست: به منظور تهیه‌ی داربست‌ها، از محلول پلیمری پلی هیدروکسی بوتیرات (سیگما آلدریچ، آمریکا) با غلظت ثابت استفاده گردید. به این صورت که محلول ۹ درصد پلیمر پلی‌هیدروکسی بوتیرات در حلال تری فلورواستیک اسید (مرک، آلمان) و در دمای ۴۰ درجه‌ی سانتی‌گراد تهیه شد. پس از انحلال کامل، کیتوسان (سیگما آلدریچ، آمریکا) به میزان ۱۵ درصد به عنوان جزء دوم سازنده‌ی داربست کامپوزیتی به محلول‌های پلیمری پلی‌هیدروکسی بوتیرات در دمای ۴۰ درجه‌ی سانتی‌گراد اضافه گردید. سپس نانو ذرات شیشه زیست‌فعال (سیگما آلدریچ ،آمریکا) به میزان ۷/۵ و ۱۰ درصد به محلول پلیمری/ کیتوسان اضافه و مجدداً روی همزن به مدت ۳۰ دقیقه قرار گرفت. سپس برای توزیع یکنواخت و بهتر ذرات در محلول و جلوگیری از آگلومره شدن ذرات، محلول برای ۲۰ تا ۳۰ دقیقه توسط هموژنایزر شیک (کمپانی JP SELECTA، اسپانیا) مخلوط شد و بلافاصله الکتروریسی (الکتروریس، ایران) انجام گرفت. در نهایت داربست‌ها با ابعاد ۰/۳ میلی‌متر ضخامت و قطر ۸ میلی‌متر آماده گردید.

SEM برای ارزیابی الیاف الکتروریسی شده، نمونه‌ها با محلول PBS (BIO-IDEA، تهران، ایران) شستشو داده شد و برای تثبیت نمونه‌ها از گلوتارالدئید (مرک، آلمان) ۲/۵ درصد (۲ ساعت) آبگیری با اتانول (مرک، آلمان) ۷۰، ۸۰، ۹۰، ۱۰۰ و ۱۰۰ درجه (هر مرحله ۳۰-۴۰ دقیقه) استفاده گردید. سپس نمونه‌ها توسط پوشش کربنی پوشیده شد و تصاویر SEM تهیه گردید.

تکثیر، پاساژ و شمارش سلول‌ها: برای بررسی چسبندگی، رشد و تکثیر بر روی داربست‌های متخلخل، از ویال‌های حاوی سلول‌های شبه استئوبلاست انسان (رده‌ی سلولی SAOS-2) مشتق شده از استئوسارکومای استخوان از انستیتو پاستور ایران استفاده گردید. در ابتدا سلول‌ها دفریز شده و در ۱۲ میلی‌لیتر محیط DMEM حاوی ۲ میلی‌مولار ال-گلوتامین، ۲۰ درصد سرم گاوی، ۱ درصد پنی‌سیلین- استرپتومایسین BIO-IDEA تهران، ایران) و در فلاسک‌های مخصوص (T75)، کشت داده شد. پس از تکثیر سلول‌ها و اشغال حداقل ۸۰ درصد کف فلاسک، سلول‌ها به چند فلاسک انتقال یافتند. مراحل پاساژ دادن به ترتیب زیر انجام شد: محیط رویی فلاسک تخلیه گردید. سلول‌ها دو مرتبه با ۲ میلی‌لیتر بافر فسفات سالین شستشو داده شدند. یک میلی‌لیتر محلول تریپسین- EDTA به فلاسک اضافه شد و به مدت ۳ دقیقه در دمای ۳۷ درجه انکوبه شدند. برای توقف فعالیت آنزیم تریپسین، یک میلی‌لیتر محیط DMEM دارای FBS به فلاسک اضافه شد. با عمل پیپت کردن، سلول‌های جدا شده از کف فلاسک به صورت تک تک و شناور در آمدند. سوسپانسیون سلولی در لوله‌های فالکون ۱۵ میلی‌لیتری ریخته شد و به مدت ۸ دقیقه با دور ۱۴۰۰rpm سانتریفوژ شد. رسوب سلولی در یک میلی‌لیتر محیط کشت سوسپانسیون شد و سپس به سه فلاسک ۲۵ سانتی‌متر مربع حاوی ۴ میلی‌لیتر محیط کشت دارای ۱۰ درصد سرم جنینی گوساله انتقال یافت. فلاسک‌ها در انکوباتور با دمای ۳۷ درجه‌ی سانتی‌گراد و ۵CO2 درصد نگهداری شد.

جهت شمارش سلولی پس از تکثیر، با جدا شدن سلول‌ها از کف فلاسک تحت تأثیر آنزیم تریپسین، سوسپانسیون سلولی به دست آمده در لوله‌های فالکون ۱۵ میلی‌لیتری به مدت ۸ دقیقه و با دور ۱۴۰۰rpm سانتریفوژ شد. پس از سوسپانسیون شدن رسوب سلولی در ۱ میلی‌لیتر محیط کشت، ۱۰ میکرولیتر از آن با استفاده از سمپلر ۱۰ میکرولیتری به زیر لامل روی لام نئوبار به آرامی تزریق شد و در زیر میکروسکوپ نوری شمارش گردید. با توجه به ابعاد داربست‌ها حدود در نظر گرفته شد.

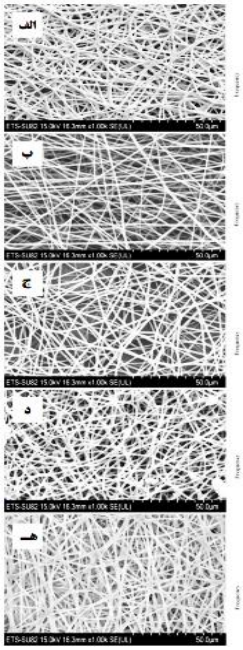
پس از این مرحله، ۴ گروه شامل (۱) سلول‌ها در کف

فلاسک (کنترل)، (۲) داربست PHB، (۳) داربست PHB/chitosan، (۴) داربست بهینه PHB/chitosan/10n BG در نظر گرفته شد و در مدت زمان‌های ۳، ۵ و ۷ روز با حداقل ۳ بار تکرار و تعداد ۲×۱۰^{۴} سلول شبه استئوبلاست به ازای هر داربست در چاهک‌های پلیت ۱۲ خانه کشت داده شد.

MTT-assay: برای بررسی بقا و تکثیر این سلول‌ها بر روی داربست‌ها، روش MTT-assay (Methyl Thiazol Tetrazolium-assay) استفاده شد. در این تست فعالیت آنزیم دهیدروژناز میتوکندری سلولی و در نهایت میزان احیای نمک تترازولیوم که شاخصی از رشد سلولی است، مورد بررسی قرار گرفت. پس از گذشت زمان‌های ذکر شده برای انجام آزمون MTT، پس از تخلیه مدیوم، شستشو با PBS به هر چاهک حدود ۴۰۰µl مدیوم خالص و ۴۰µl محلول MTT (Sigma-USA) (با غلظت ۵mg/ml) اضافه شده و به مدت ۴ ساعت در انکوباتور (Memert, Germany) قرار گرفت. سپس به آرامی مدیوم تخلیه شده و ۴۰۰µl DMSO (سیگما آلدریچ، آمریکا) اضافه گردید و در تاریکی به مدت ۱ ساعت در دمای آزمایشگاه نگهداری شده و پس از پیپت کردن مقدار ۱۰۰µl از محلول به چاهک پلیت ۹۶خانه منتقل و در طول موج ۵۴۰nm توسط دستگاه اسپکتروفوتومتر ELISA reader (BioTek, Canada) میزان جذب نور OD نمونه‌ها قرائت شد. نتایج حاصل از روش MTT توسط نرم‌افزار SPSS نسخه‌ی ۱۸ (version 18, SPSS Inc., Chicago, IL) با روش آنالیز آماری واریانس یک طرفه Kruskal-wallis مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت. p value ≤ ۰/۰۵ به عنوان سطح معنی‌داری در نظر گرفته شد.

یافته‌ها

نتایج بررسی الیاف با SEM: نتایج حاصل از بررسی با میکروسکپ الکترونی از داربست‌های تهیه شده در شکل ۱ مشخص است. الیاف PHB ساختاری کاملاً متخلخل و بدون هیچ گونه بید داشته و متوسط قطر الیاف ۱۱۵ ± ۸۵۸ نانومتر می‌باشد (الف)، حضور کیتوسان در زمینه‌ی PHB سبب ایجاد الیافی نازک شده است. متوسط قطر الیاف ۷۲ ± ۳۵۴ نانومتر گزارش شد (ب)، در داربست PHB/ nBG قطر الیاف حدود ۱۴۲ ± ۴۱۰ نانومتر است (ج). داربست PHB/Chitosan/7.5 nBG با قطر الیاف ۱۰۵ ± ۷۲۲ نانومتر به دست آمد (د) در حالی‌که در داربست PHB/Chitosan/10 nBGقطر الیاف ۸۳ ± ۵۶۳ نانومتر می‌باشد.



شکل ۱: نتایج بررسی SEM مربوط به الیاف نانوکامپوزیتی: الف- PHB، ب- PHB/Chitosan، ج- PHB/nBG، د- PHB/Chitosan/7.5nBG، ه- PHB/Chitosan/10 nBG

نتایج سمیت سلولی: به منظور بررسی بقا و تکثیر سلول‌ها بر روی نانو الیاف مورد استفاده و تعیین میزان سمیت داربست‌ها، از آزمون MTT استفاده شد (جدول ۱). آنالیز آماری تغییر میزان جذب نوری و بقای سلول‌ها در روزهای سوم، پنجم و هفتم را نشان داده است. بر اساس آزمون صورت گرفته، تفاوت بین گروه شاهد و گروه‌های تجربی معنی‌دار بود و بقای سلولی در گروه

جدول ۱: نتایج بررسی سمیت سلولی به صورت میانگین جذب نوری در گروه‌های مختلف

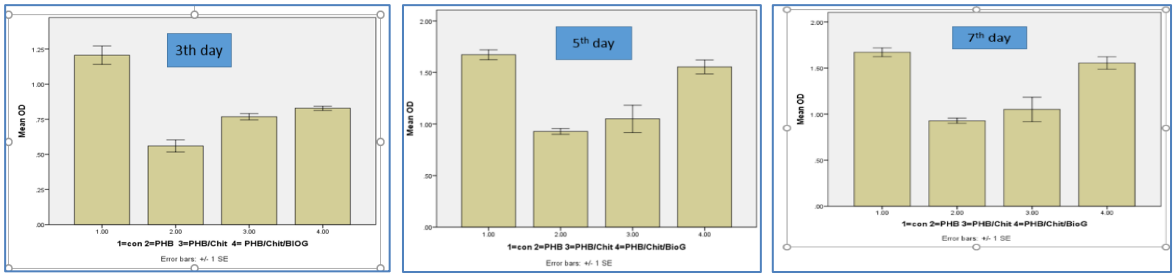
روز	میزان جذب نوری			
	شاهد	پلی‌هیدروکسی بوتیرات	پلی‌هیدروکسی بوتیرات/کیتوسان	پلی‌هیدروکسی بوتیرات/کیتوسان/بیوگلاس
سوم	۱/۰۲۶ ± ۰/۰۶۵	۰/۰۵۶۲ ± ۰/۰۴۳	۰/۷۶۵ ± ۰/۰۲۲	۰/۸۲۶ ± ۰/۰۵۱
پنجم	۱/۶۷ ± ۰/۰۴۷	۰/۹۸۲ ± ۰/۰۲۷	۱/۰۵ ± ۰/۰۱۳	۵۵/۱ ± ۱/۰۶۷
هفتم	۸۶/۱ ± ۰/۰۳۷	۰/۴۵۲ ± ۰/۰۱۱	۰/۶۹۲ ± ۰/۰۴۶	۱/۶۲ ± ۰/۰۱۲

PHB/Chi/BioG در مقایسه با داربست‌های دیگر افزایش داشت (p value ≤ ۰/۰۵) (شکل ۲). همانگونه که در نمودار مشخص است، داربست دارای کیتوسان- نانو ذرات بیوگلاس در زمان‌های مختلف نسبت به دیگر داربست‌ها از نظر بقای سلولی به گروه شاهد نزدیک است و با گذشت زمان از تکثیر سلول‌ها حمایت می‌کند.

بحث

در این مطالعه، داربست نانوکامپوزیتی پلی‌هیدروکسی بوتیرات/کیتوسان/بیوگلاس تهیه شده با روش الکتروریسی از نظر سمیت سلولی ارزیابی گردید. با توجه به نتایج این مطالعه، فرضیه‌ی صفر مورد تأیید قرار گرفت و مشخص گردید داربست پلی‌هیدروکسی بوتیرات/کیتوسان/ نانوذرات بیوگلاس در مقایسه با داربست‌های فاقد نانوذرات بیوگلاس اثرات سمی بر سلول‌های استئوبلاست ندارد. برخی از ویژگی‌های مکانیکی داربست در گزارش پیشین منتشر شده است (۱۱). تصاویر SEM نشان داد که با افزودن کیتوسان به پلی‌هیدروکسی بوتیرات قطر الیاف کاهش می‌یابد در حالی که با افزودن نانوذرات بیوگلاس هدایت الکتریکی محلول که ناشی از حضور گروه‌های یونی در ساختار است افزایش نشان داد و قطر مناسبی به دست آمد. با استفاده از کیتوسان می‌توان داربست‌هایی با ساختارهای متخلخل، با تخلخل‌هایی به هم مرتبط، برای کاربردهای مهندسی بافت ایجاد کرد. اما کیتوسان از لحاظ مکانیکی به شدت ضعیف و ناپایدار است. به همین دلیل برای افزایش و بهبود خواص مکانیکی یا بیولوژیکی آن، استفاده از مواد بیولوژیکی فعال دیگری همچون هیدروکسی آپاتیت و بیوگلاسدر ترکیب با کیتوسان توسعه یافته است (۹، ۱۲، ۱۳).

نانوالیاف دارای امتیازات زیادی از جمله نسبت سطح به حجم بالا، قابلیت کنترل ترکیب به منظور رسیدن به خواص و عملکرد مناسب و نیز شکل‌پذیری برای ساخت اشکال و اندازه‌های مختلف می‌باشند (۱۴). در روش الکتروریسی در حالت کلی قطره محلول پلیمری که از سر سوزن خارج می‌شود تحت تأثیر میدان الکتریکی تغییر فرم می‌دهد و به شکل مخروط تیلور درمی‌آید؛ حال محلول با خاصیت الکتریکی بالا می‌تواند بار الکتریکی بیشتری جابجا کند که در نهایت منجر به کشیدگی بیشتر و باریک شدن الیاف می‌شود.



شکل ۲: نتایج روش MTT assay نشان داد که بقای سلولی در گروه PHB/Chi/BioG در مقایسه با داربست‌های دیگر در روزهای پنجم و هفتم افزایش دارد و تفاوت معنی‌داری با داربست‌های فاقد نانوذرات بیوگلاس نشان می‌دهد (p value ≤ ۰/۰۵).

نتایج حاصل از آزمون MTT نشان داد وجود نانوذرات بیوگلاس از تکثیر سلولی حمایت می‌کند. داربست‌های نانو از لحاظ فیزیکی شبیه ماتریکس خارج سلولی هستند و می‌توانند بستر مناسبی برای چسبندگی و رشد سلول‌ها باشند. با توجه به نتایج به دست آمده از ارزیابی درصد زنده ماندن سلول‌ها، داربست‌هایی که حاوی نانوذرات بیوگلاس هستند به مراتب دارای ماندگاری سلولی بیشتری نسبت به داربست‌هایی که فاقد نانوذرات هستند، می‌باشند، لذا می‌توان نتیجه گرفت، حضور نانوذرات نقش مهمی در رشد و چسبندگی سلولی دارند (۱۵). از طرفی، داربست‌های نانوالیاف به طور فیزیکی از ماتریس خارج سلولی تقلید می‌کنند بنابراین می‌توانند بستر مناسبی برای چسبندگی و رشد سلول‌ها باشند.

در تحقیقی که در سال ۲۰۱۰ توسط Yang و همکاران انجام شد، تأثیر نانوذرات هیدروکسی آپاتیت را بر روی داربست nHA/Gelatin/PCL بررسی کردند و به این نتیجه رسیدند، حضور نانوذرات خاصیت آبدوستی داربست را افزایش می‌دهد که این امر می‌تواند رشد، تکثیر و چسبندگی سلولی را بهبود بخشد (۱۶).

با توجه به محدودیت بودجه، بررسی ویژگی‌های مختلف داربست در این طرح امکان‌پذیر نبود و تحقیقات بیشتری در زمینه‌ی این داربسیت لازم است به ویژه از نظر زیست‌سازگاری و زیست‌تخریب‌پذیری در مدل‌های حیوانی.

نتیجه‌گیری

با توجه به نتایج حاصل از این مطالعه، داربست پلی‌هیدروکسی بوتیرات/کیتوسان/ نانوذرات بیوگلاس در مقایسه با داربست‌های فاقد نانوذرات بیوگلاس اثرات سمی بر سلول‌های استئوبلاست ندارد و از بقا سلول‌ها حمایت می‌کند.

سپاسگزاری

مقاله‌ی حاضر حاصل نتایج طرح شماره‌ی ۲۹۵۱۸۲ توسط معاونت محترم دانشکده‌ی دندان‌پزشکی اصفهان می‌باشد. نویسندگان مقاله از آن معاونت کمال تشکر و قدردانی را دارند.

References

1. Cai X, Lin Y, Ou G, Luo E, Man Y, Yuan Q, et al. Ectopic osteogenesis and chondrogenesis of bone marrow stromal stem cells in alginate system. Cell Biol Int 2007; 31(8): 776-7.
2. Kurashina K, Kurita H, Wu Q, Ohtsuka A, Kobayashi H. Ectopic osteogenesis with biphasic ceramics of hydroxyapatite and tricalcium Phosphate in rabbits. Biomaterial 2002; 23(2): 407-12.
3. Misra SK, Valappil SP, Roy I, Boccaccini AR. Polyhydroxyalkanoate (PHA)/inorganic phase composites for tissue engineering applications. Biomacromolecules 2006; 7(8): 2249-58.
4. Jacquel N, Lo CW, Wei YH, Wu HS, Wang SS. Isolation and purification of bacterial poly(3-hydroxyalkanoates. Biochem Eng J 2008; 39(1): 15-27.
5. Doyle C, Tanner ET, Bonfield W. In vitro and in vivo evaluation of polyhydroxybutyrate and of polyhydroxybutyrate reinforced with hydroxyapatite. Biomaterials 1991; 12(9): 841-7.
6. Luklinska ZB, Schluckwerder H. In vivo response to HA-polyhydroxybutyrate/polyhydroxyvalerate composite. J Microsc 2003; 211(Pt 2): 121-9.
7. Ravi Kumar MNV. A review of chitin and chitosan applications. React Funct Polym 2000; 46(1): 1-27.
8. Goy RC, de Britto D, Assis OBG. A review of the antimicrobial activity of chitosan. Polímeros 2009; 19(3): 241-7.
9. Sombatmankhong K, Suwantong O, Waleetorncheepsawat S, Supaphol P. Electrospun fiber mats of poly(3-hydroxybutyrate), poly(3-hydroxybutyrate-*co*-3-hydroxyvalerate), and their blends. J Polym Sci B Polym Phys 2006; 44(19): 2923-33.
10. Daranarong D, Chan RTH, Wanandy NS, Molloy R, Punyodom W, Foster LJR. Electrospun polyhydroxybutyrate and poly(L-lactide-co-ε-caprolactone) composites as nanofibrous scaffolds. Biomed Res Int 2014; 2014: 741408.
11. Foroughi MR, Karbasi S, Khoroushi M, Khademi AA. Polyhydroxybutyrate/chitosan/bioglass nanocomposite as a novel electrospun scaffold: fabrication and characterization. J Porous Mater 2017; 24(6): 1447-60.

12. Luklinska ZB, Schluckwerder H. In vivo response to HA-polyhydroxybutyrate/ polyhydroxyvalerate composite. J Microsc 2003; 211(Pt 2): 121-9.
13. Deniz AE. Nanofibrous nanocomposites via electrospining. [Thesis]. Ankara, Turkey: Bilkent University; 2011.
14. Kim HW, Lee HH, Knowles JC. Electrospinning biomedical nanocomposite fibers of hydroxyapatite/poly (lactic acid) for bone regeneration. J Biomed Mater Res A 2006; 79(3): 643-9.
15. Zhang Y, Ouyang H, Lim CT, Ramakrishna S, Huang ZM. Electrospinning of gelatin fibers and gelatin/PCL composite fibrous scaffolds. J Biomed Mater Res B Appl Biomater 2005; 72(1): 156-65.
16. Yang X, Yang F, Walboomers XF, Bian Z, Fan M, Jansen JA. The performance of dental pulp stem cells on nanofibrous PCL/gelatin/nHA scaffolds. J Biomed Mater Res A 2010; 93(1): 247-57.