



## مقاله پژوهشی

# مطالعه خصوصیات بیولوژیکی، ترکیبی و توپوگرافی سطحی داربست گرانوله هیدروکسی آپاتیت/ پوسته تخم شتر مرغ برای مهندسی بافت استخوان

فریده اله‌گاهی<sup>۱</sup>، اسماعیل فتاحی<sup>۱\*</sup>، محسن سعیدی<sup>۲</sup>، میرمحمد مرتضوی<sup>۳</sup>

۱- گروه زیست‌شناسی، واحد آیت ... آملی، دانشگاه آزاد اسلامی، آمل، ایران

۲- مرکز تحقیقات سلول بنیادی، دانشگاه علوم پزشکی گلستان، گرگان، ایران

۳- گروه تحقیقاتی بیومدیکال، انیستیتوی پژوهشی چیترا، دانشگاه پزشکی کرایا SCTIMST، تیرو وانانتاپورام، هندوستان

\*مسئول مکاتبات: e.fattahi@iaumol.ac.ir

تاریخ پذیرش: ۱۳۹۹/۱۱/۰۲

تاریخ دریافت: ۱۳۹۹/۰۸/۱۵

## چکیده

هدف از این مطالعه بررسی شکل هندسی و توانایی این داربست در ترکیب با سلول مزانشیمی و شبه فیبرو بلاستی و سنجش واکنش سمیت آن نسبت به سلول می‌باشد. بدین لحاظ چند نسبت متفاوت از داربست هیدروکسی آپاتیت/ پوسته تخم شتر مرغ ایجاد گردید تا بتوان خصوصیات سطحی و پاسخگویی سلول را نسبت به انواع مختلف ترکیبی هیدروکسی آپاتیت/پوسته تخم شتر مرغ (نسبت‌های ۱-۰، ۲-۱، ۱-۱، ۲-۲، ۱-۱) سنجید. بیومتریال‌های طبیعی منجمله پوسته تخم شتر مرغ که دارای مواد معدنی مثل کربنات کلسیم نقش عمده‌ای در ساخت داربست مربوط به بافت‌های سخت و تحقیقات امروزه را ایفا می‌کنند. مشخصه یابی سطحی با استفاده از SEM و خصوصیات ترکیبی داربست بوسیله XRD و FTIR مورد بررسی قرار گرفت و در نهایت برای کاربرد این ترکیب در بافت‌های بیولوژیکی تست تماس مستقیم (سمیت) به همراه سلول‌های شبه فیبروبلاستی (L929) انجام گرفت. بعد از تست سمیت داربست آماده تست‌های درون آزمایشگاهی (اینویترو) پذیرش سلول‌های بنیادی مزانشیمی جدا شده از بافت چربی خرگوش سفید نیوزیلندی (RADMSCs) می‌گردد. نتایج این پژوهش نشان داد که این داربست دارای بهترین زیست‌سازگاری و بیشترین لاکونا‌های سطحی برای جذب سلول به خود در گروه هیدروکسی آپاتیت/ پوسته تخم شتر مرغ با نسبت ۱-۲ می‌باشد و این ترکیب بیومتریال طبیعی با مواد سنتتیک می‌تواند در پیشبرد مهندسی بافت استخوان کاربرد فراوان داشته باشد.

کلمات کلیدی: مهندسی بافت، داربست هیدروکسی آپاتیت، پوسته تخم، شتر مرغ، سلول شبه فیبرو بلاستی.

## مقدمه

می‌کند. مهندسی بافت بر اساس درک ساختار و نحوه تشکیل بافت در بدن استوار است و هدفش آن است که بافت‌های عملکردی تولید کند. از عوامل ضروری برای انجام مهندسی بافت استخوان شامل سلول،

مهندسی بافت یک حوزه تحقیقاتی بین رشته‌ای است که با استفاده از اصول مهندسی و علوم زیستی، برای ساخت و توسعه جایگزین‌های بیولوژیک به منظور برگرداندن، حفظ و بهبود عملکرد اعضای بدن تلاش

کرد (۳۵). اما در مقابل این ماده شکننده است که مقاومت آن در گذر زمان کم می‌شود. اما ترکیب این ماده با بیومتریال طبیعی مثل پوسته تخم شترمرغ می‌تواند باعث کاهش ضریب شکنندگی هیدروکسی آپاتیت گردد (۲۴). پوسته تخم شترمرغ بعنوان ضایعات زیستی مفید دارای مقادیر بسیار زیادی از مواد معدنی است که اثر مقاومتی برای داربست و سطوحی مضرس برای چسبیدن سلول به داربست به ارمغان می‌آورد (۸، ۴۱).

رکن بعدی مهم در مهندسی بافت نقش سلول‌ها و طریقه ارتباط آنها با داربست می‌باشد. در این میان سلول‌های بنیادی مزانشیمی یکی از بهترین کاندیداها برای تست کردن رفتار سلول با داربست کاربرد دارد. سلول‌های مزانشیمی دارای پتانسیل بسیار قوی برای درمان اختلالات اسکلتی و ماهیچه‌ای می‌باشند و دارای ظرفیت تکثیر، خواص سرکوبگر سیستم ایمنی و توانایی تمایز به استخوان و غضروف می‌باشند (۳۱، ۴۲). در مطالعات میتزیتورنا و همکاران، کوبولاک و همکاران سلول‌های مزانشیمی اتولوگوس منشا گرفته از مغز استخوان در شکستگی‌ها، بیماری ارثی استئوزنزیس ایمپرکتا و بیماری متابولیک استخوان بکار گرفته شد و تشکیل استخوان و ماهیچه مشاهده گردیده است (۲۰، ۲۶). بعلاوه سلول‌های مزانشیمی همچنین با داربست‌هایی ترکیب می‌شوند، که القاء کننده یا سازنده مسیری هدایت شده به سلول‌های مزانشیمی در جهت ترمیم و درمان بافت آسیب دیده باشد. مطالعات درون آزمایشگاهی آچاتز و همکاران ۲۰۱۶ و پژوهش‌های حیوانی آریان و همکاران ۲۰۱۷ نشان دادند که سلول‌های مزانشیمی پتانسیل بسیار خوبی برای ترمیم استخوان دارند و بهترین انتخاب می‌باشند (۱، ۲۹). به هر حال در مقایسه با مطالعات قبلی تعداد بیمارانی که برای مراحل درمانی از سلول‌های بنیادی بهره جستند بسیار پایین می‌باشد و نیز

ماتریکس خارج سلولی و عوامل و فاکتورهای رشد می‌باشند. به عبارتی دیگر مهندسی بافت استخوان دارای سه رکن اساسی شامل داربست، سلول و فاکتور رشد می‌باشد. ترکیبی از این سه رکن سازه استخوانی را بوجود می‌آورد (۲). مهمترین بخش این سه اصل مهندسی بافت داربست می‌باشد که از قرن گذشته بیومتریال‌های زیادی در زمینه ارتوپدی معرفی شدند اما بهترین جایگزین استخوان در کاربرد ارتوپدی بیومتریال‌های قابل جذب می‌باشند که دارای تخریب پذیری و قیمت پایین تجاری می‌باشد (۵، ۳۶). بهبودی استخوان آسیب دیده دارای هزینه‌های بسیار و بصورت تدریجی است (۱۳). استخوان آسیب دیده دارای تحمل فشار مکانیکی بسیار پایین می‌باشد (۱۱). آسیب‌های جدی استخوانی نمی‌توانند بخودی خود بهبود یابند و هر نوع عفونتی می‌تواند روند بهبودی را به تاخیر بیندازد (۱۵). طبق گزارشات مختلف حدود ۲.۲ میلیون پیوند استخوان تقریباً به قیمت ۳۰۰ میلیون دلار در سال توسط مردم امریکا هزینه می‌گردد (۳، ۴، ۴۰). وظیفه مواد جایگزین استخوانی کاهش مدت بهبودی و افزایش تراکم استخوان در قسمت آسیب دیده می‌باشد (۹، ۱۲). اکثر ایمپلنت‌ها اعم از فلز و آلیاژها یا مواد شبه استخوانی در پیوند با بدن بیمار دچار مشکل هستند (۲۳، ۳۲). اخیراً کاربرد ترکیب بیومتریال‌های طبیعی به همراه بیومتریال‌های سینتتیک نقطه عطفی در زمینه مهندسی بافت می‌باشند (۱۶، ۱۷). یکی از مواد بسیار کاربردی هیدروکسی آپاتیت است که خاصیت استئوکنداکتیویتی (قدرت جذب سلول به داربست) بسیار بالایی می‌باشد، اما این مواد نیازمند ساختاری متخلخل با سطوح مضرس می‌باشند تا بتوانند سلول‌ها را بخود جذب کرده و این سلول‌ها بتوانند ماتریکس خارج سلولی را ترشح نمایند (۳۳). از فواید هیدروکسی آپاتیت میتوان به سازگاری، ضریب مقاومتی و خصوصیات استاتیکی بالا اشاره

اسکن آن بر روی ۲۱ اسکن در دقیقه با وضوح ۴ (cm<sup>-1</sup>) تنظیم گردید. ثبت طیف‌ها برای شناسایی وجود ترکیبات آلی در دمای اتاق انجام گرفت. برای سنجش تغییرات ساختاری و مطالعه عناصر تشکیل دهنده ترکیبات آلی مواد از دستگاه پراش پرتو ایکس (XRD) مدل فیلیپس ۱۷۰۳۰ استفاده گردید. ولتاژ و آمپر آن بر روی ۳۰ کیلوولت و ۴۰ میلی‌آمپر با Cu K $\alpha$  ( $\lambda = 1.540600 \text{ \AA}$ ) تنظیم گردید. این دستگاه می‌تواند پراش اشعه را در دمای اتاق انجام دهد. نرخ روبش معادل ۱ درجه بر دقیقه با زاویه پراش 2 $\theta$  از ۱۵ تا ۷۵ درجه انتخاب گردید و سرعت اسکن آن 3<sup>0</sup> بر دقیقه با گام 0.04<sup>0</sup> درجه در یک ثانیه تنظیم شد. برای سنجش خصوصیات سطحی از دستگاه میکروسکوپ الکترونی روبشی (SEM) استفاده گردید. نمونه‌ها با لایه نازکی از طلا بوسیله دستگاه اسپوترینگ مدل (JEOL, JFC-1200) پوشانده شد. میکروسکوپ الکترونی روبشی مدل هیتاچی SU7000 با وضوح ۰/۸ نانومتر بر ۱۵ کیلوولت بکار برده شد. تست تماس مستقیم (سمیت) برای شروع تست‌های درون آزمایشگاهی (اینیتر) با استفاده از سلول‌های شبه فیروبلستی (L929) بر طبق استاندارد ایزو (۱۰۹۹۳-۲۰۰۷:۱۲) و رفرنس مواد ایزو (۲۰۰۹:۵-۱۰۹۹۳) انجام و تمامی فعالیت‌ها بر طبق مصوبه کمیته اخلاق دانشگاه علوم پزشکی گلستان با شماره ثبت (IR.GOUMS.REC.1397.258) انجام گرفت. با توجه به نتایج بدست آمده تست پذیرش سلول‌های بنیادی مزانشیمی جدا شده از بافت چربی خرگوش سفید نیوزیلندی (RADMSCs) با داربست طراحی شده توسط میکروسکوپ الکترونی روبشی (SEM) انجام گرفت. تمامی نتایج تست‌های انجام شده با نرم-افزار SPSS و تست توکی با  $p < 0/05$  انجام گرفت.

#### نتایج

برای کنترل طولانی کلینیکی نیاز به دسترسی نتایج درمانی بیشتر نیز می‌باشند. هدف اصلی در این پژوهش مطالعه خواص سطحی و سمیت این مواد نسبت به جذب و چسبیدن سلول به داربست می‌باشد.

#### مواد و روش‌ها

**آماده‌سازی مواد:** پوسته تخم شترمرغ در ابعاد ۱\*۱ سانتیمتر بوسیله اره مویی برش داده شده و پوسته داخلی آن بوسیله مته دندانپزشکی جدا گردید. پوسته جدا شده را در محلول یک درصدی تریتون ۱۰۰ به مدت ۲۴ ساعت نگهداری و سپس بوسیله بافر فسفات (PBS) شستشو داده شد. در ادامه با آب مقطر ۲ بار تقطیر شستشو و در نهایت اتوکلاو گردید. تکه جدا شده در محلول هیدروکلرید سدیم قرار داده شد تا مرحله سلول زدایی تکمیل گردد. در مرحله بعدی پوسته جدا شده تخم شترمرغ را در هاون چینی بطور کامل پودر کرده و سپس از صافی ۰/۲ میکرونی عبور داده شد. پودر حاصله را بوسیله گاز اتیلن اکساید (ETO) استریل کرده و در نهایت به مدت ۱۵ دقیقه در ۱۲۰ درجه سانتیگراد اتوکلاو گردید. هیدروکسی آپاتیت (شرکت آپاتک، نانو تکنولوژی، یزد - ایران) با کاربرد پزشکی مورد استفاده قرار گرفت. این پودر با ذرات به بزرگی ۵۰ نانومتر اتوکلاو شده و بعد از آن ۲۴ ساعت تحت اشعه ماورای بنفش قرار گرفت. این دو نوع پودر به نسبت‌های زیر با هم ترکیب گردید تا بتوان خصوصیات سطحی، سمیت و بیولوژیکی آن مورد بررسی قرار گیرد.

**مشخصه‌یابی نمونه‌ها:** برای بررسی ساختاری و مطالعه فازها از روش طیف سنج مادون قرمز (FTIR) بکار برده می‌شود. دستگاه طیف سنج مادون قرمز مدل ترمونیکولت ۳۸۰ گروه‌های عاملی و ساختاری داربست طراحی شده را می‌سنجد. دامنه اسپکتروفتومتر بین ۵۰۰ تا ۴۰۰۰ (cm<sup>-1</sup>) سرعت

فیبروبلاستی (L-929) دیده نشده و این ماده مورد علاقه سلول‌های شبه فیبروبلاستی می‌باشد.

پذیرش داربست توسط سلول‌های بنیادی مزانشیمی RADMSCs میکروگراف‌های میکروسکوپ الکترونی روبشی پذیرش سلول‌های بنیادی با داربست پودری هیدروکسی و پوسته تخم شتر مرغ نشان می‌دهد (شکل ۵). فلش‌های قرمز چسبیدن داربست به دیواره سلول‌های مزانشیمی را نشان می‌دهد و فلش‌های سفید سلول‌های بنیادی مزانشیمی مشتق شده از بافت چربی خرگوش می‌باشد.

آنالیز طیف‌سنجی پراش اشعه ایکس XRD: شکل ۲ طیف‌های XRD گروه‌های تست را نشان می‌دهد. پیک‌های گروه‌های پایه که شامل هیدروکسی آپاتیت و پوسته تخم شتر مرغ می‌باشد قابل مقایسه با گروه تست A، B و C می‌باشد بر طبق همین شکل و اطلاعات استخراج شده از جدول شماره ۳ بر طبق استاندارد مرکز بین‌المللی اطلاعات پراش (ICDD) و الگوی پراش اشعه ایکس برای گروه D با ترکیب کلسیت (JCPDS card No.00-047-1743) و کرنبات کلسیم (۰۰-۰۰۲-۰۶۲۹) و الگوی پراش گروه E برای هیدروکسی آپاتیت با رفرنس (JCPDS) ICDD (card No.09-0432) و هیدروکسید فسفات کلسیم (۰۱-۰۸۴-۱۹۹۸) و سولفات کلسیم هیدراته (۰۱-۱۷۴۶-۰۰-۰۰۲-۰۶۲۹) دقیقاً با هم یکسان می‌باشند (۲۷، ۴۳).

طیف سنج مادون قرمز FTIR: به منظور بررسی حضور گروه‌های عاملی موجود در داربست طراحی شده هیدروکسی آپاتیت/پوسته تخم شتر مرغ و همچنین چگونگی اثر بخشی این گروه‌ها به هنگام ترکیب این مواد با یکدیگر، آزمون FTIR انجام شد. نتایج حاصل از این آزمون در شکل ۱ ارائه شده است. پیک جذب نمودارهای گروه D و E به عنوان مواد پایه‌ای برای ساخت داربست ترکیبی بکار برده شده‌اند. نزدیکی این پیک‌ها با پیک‌های گروه‌های آزمایشی (A، B، C) نشان‌دهنده حضور این دو ماده پایه‌ای در ترکیب این گروه‌ها می‌باشد. پیک‌های مشاهده شده در ترکیبات گروه‌های آزمایشی در جدول ۲ ذکر گردیده است.

آنالیز دستگاه میکروسکوپ الکترونی روبشی SEM: برای مقایسه ترکیبات مختلف، داربست تحت آنالیز میکروسکوپ الکترونی قرار گرفت. میکروگراف‌های آنالیز میکروسکوپ الکترونی با درشت‌نمایی kX ۱۰۰ ساختار سطحی و لاکونا‌های نانوگرانول‌ها را نشان داد. سایز گرانول‌ها از ۲۴ نانومتر تا ۵۰ نانومتر متغیر می‌باشد (شکل ۳: A، B، C، D، E). گرانول‌های پوسته تخم شتر مرغ دارای قطعات شبه صفحه‌ای می‌باشند (شکل ۳ D).

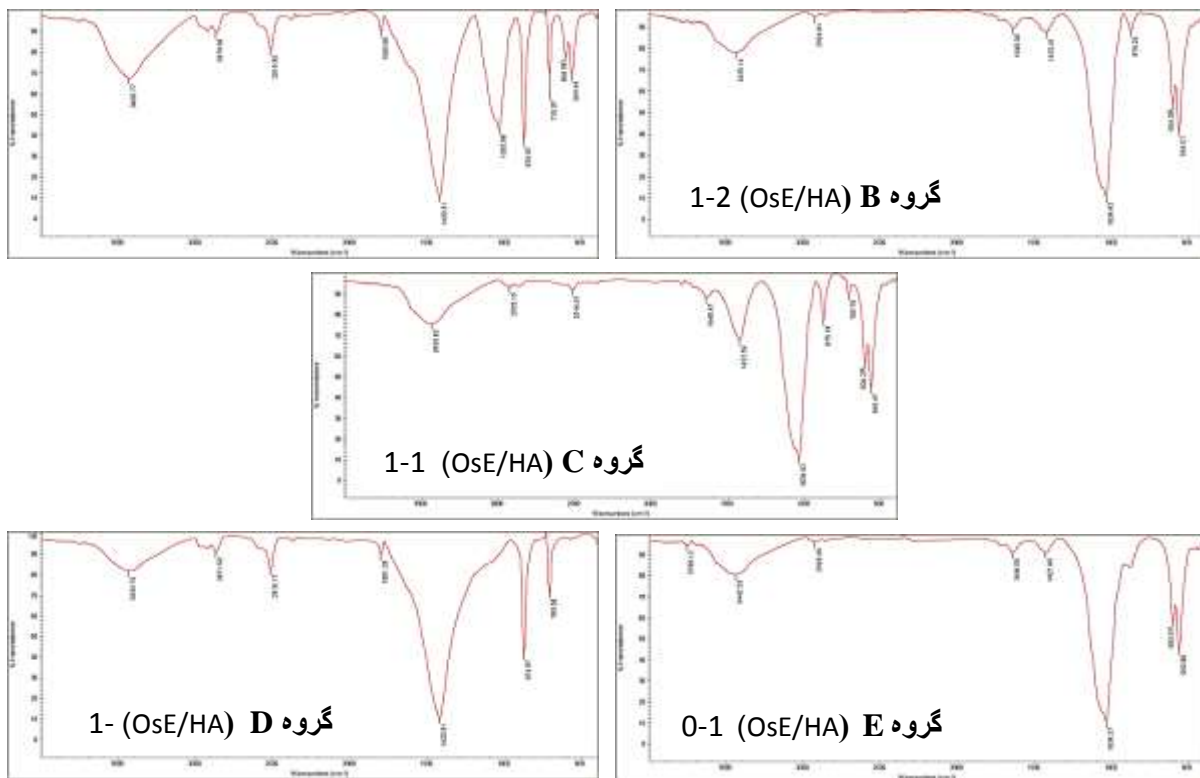
تست سمیت مواد: ارزیابی تست سمیت نشان داد که هیچ واکنش سمی بوسیله مواد نسبت به سلول‌های

جدول ۲- طیف جذبی مادون قرمز برای داربست پودری

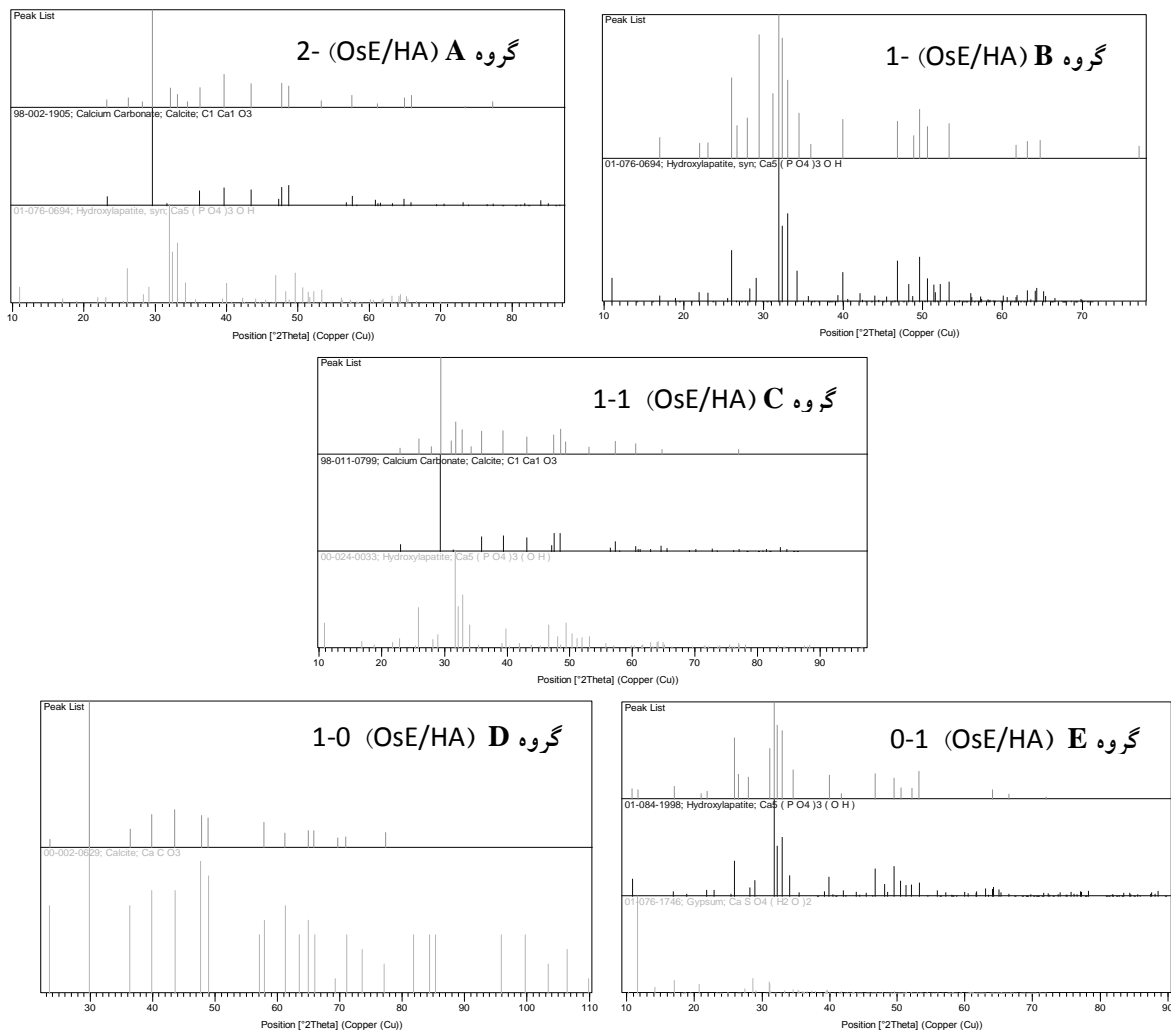
گروه عاملی	دامنه ارتعاش (-۱)
PO <sub>4</sub> <sup>-3</sup> bend v <sub>4</sub>	۵۶۳/۳۰۶
CO <sub>3</sub> <sup>-2</sup>	۷۰۹، ۸۷۵، ۱۴۲۷، ۱۶۴۴، ۱۸۰۱، ۲۵۱۶، ۲۸۷۱
PO <sub>4</sub> <sup>-3</sup> bend v <sub>3</sub>	۱۰۳۶
O <sub>H</sub>	۲۹۲۵، ۳۴۴۲
SO <sub>4</sub> <sup>-2</sup> bend v <sub>4</sub>	۶۰۳

جدول ۳- رفرنس الگوی XRD برای ۳ نوع از گروه‌های آزمایشی (A, B & C) و دو ماده اصلی رفرنس گروه (D و E)

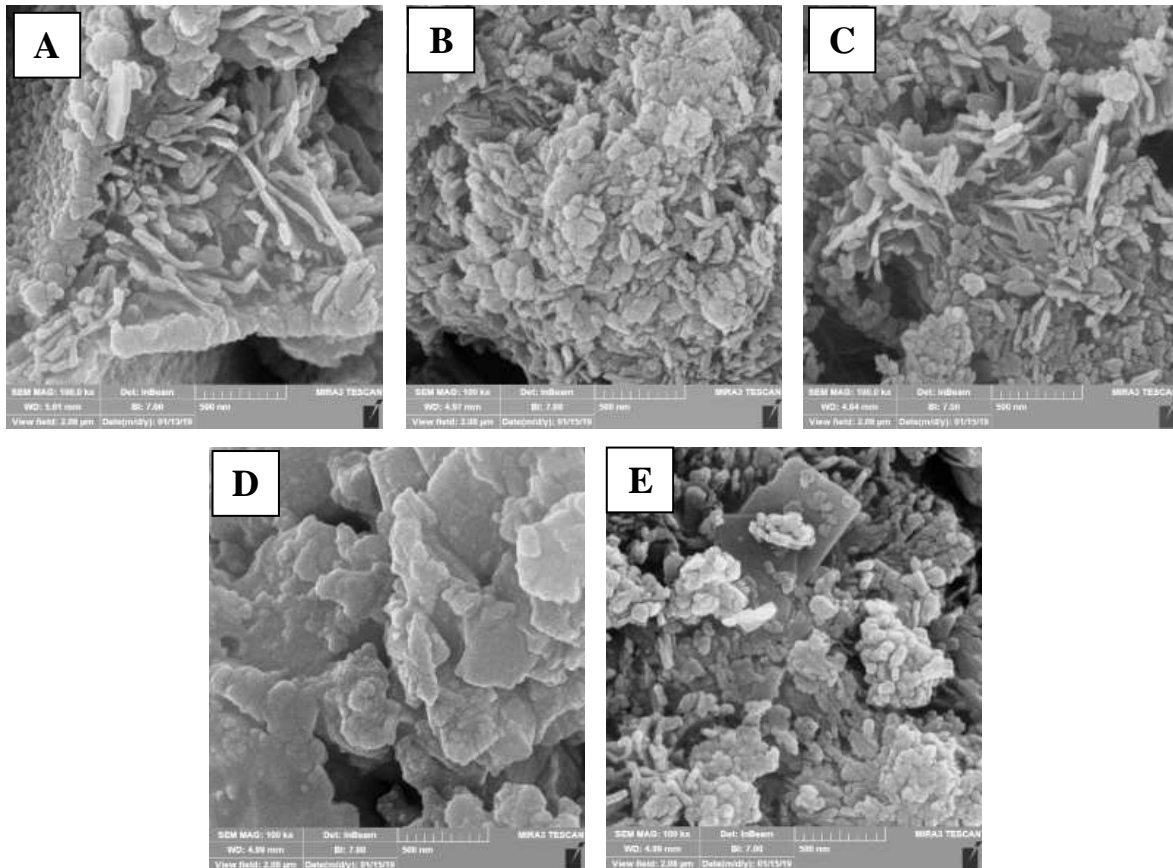
گروه‌های تست	کد رفرنس	امتیاز	اسم ترکیب	جابجایی [°2Th.]	Scale Factor	فرمول شیمیایی	رفرنس
A	۹۸-۰۰۲-۱۹۵	۸۹	کلسیت	۰/۲۲۰	۱/۰۹۷	C1Ca1O3	(۳۰، ۳۴)
	۰۱-۰۷۶-۰۶۹۴	۴۴	هیدروکسید کلسیم فسفات	۰/۲۰۰	۰/۲۷۶	Ca5 (PO4)3OH	(۲۸)
B	۰۱-۰۷۶-۰۶۹۴	۶۵	هیدروکسید کلسیم فسفات	۰/۱۳۶	۱/۱۰۹	Ca5 (PO4)3OH	(۲۸)
	۹۸-۰۱۱-۰۷۹۹	۹۲	کلسیت	-۰/۰۲۸	۱/۰۵۷	C1Ca1O3	(۳۰، ۳۴)
C	۰۰-۰۲۴-۰۰۳۳	۸۳	هیدروکسید کلسیم فسفات	-۰/۰۱۰	۰/۴۰۰	Ca5(PO4)3 (OH)	(۲۸)
	۰۰-۰۰۲-۰۶۲۹	۷۵	کربنات کلسیم	۰/۳۳۵	۰/۳۲۴	CaCO3	(۳۰)
D	۰۱-۰۸۴-۱۹۹۸	۶۶	هیدروکسید کلسیم فسفات	۰/۰۱۳	۰/۹۶۰	Ca5(PO4)3 (OH)	(۲۸)
	۰۱-۰۷۶-۱۷۴۶	۴۸	هیدرات سولفات کلسیم	-۰/۰۸۹	۰/۱۹۴	CaSO4(H2O)2	(۲۸)



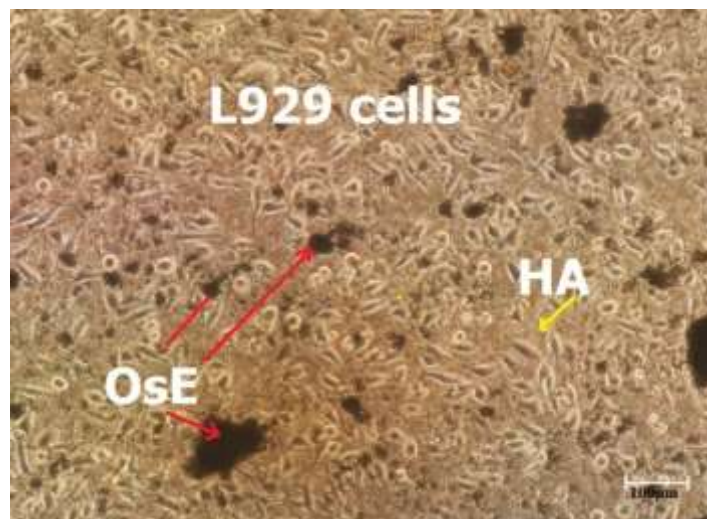
شکل ۱- آنالیز طیف سنجی مادون قرمز (FTIR) گروه‌های آزمایشی داربست پودری



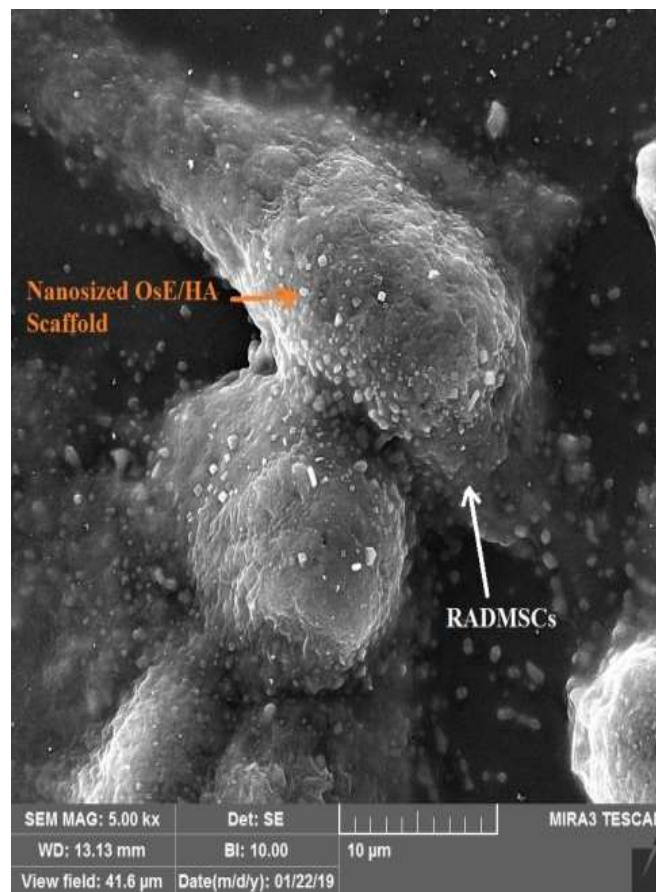
شکل ۲- آنالیز طیف سنجی پراش اشعه ایکس (XRD) - گروه‌های آزمایشی داربست



شکل ۳- تصویر میکروسکوپ الکترونی روشنی انواع گروه‌های داربست OsE/HA. بزرگنمایی ۱۰۰kX



شکل ۴- تست سمیت داربست یا استفاده از سلول‌های شبه فیروپلاستی



شکل ۵- میکروگراف میکروسکوپ الکترونی روبشی از رفتار سلول با داربست- فلش قرمز نشان‌دهنده داربست پودری و فلش سفید نشان‌دهنده سلول مزانشیمی خرگوش می‌باشد. بزرگنمایی 5kX.

### بحث

دیگری که همپوشانی با گروه فسفات به نام گروه سولفات ( $SO_4^{2-}$ ) با طول موج‌های ۶۰۳ و ۱۰۳۶  $cm^{-1}$  وجود دارد (۴۳). الگوی پیک‌ها در گروه‌های A, B, و C حضور هیدروکسی آپاتیت و پوسته تخم شترمرغ را آشکار می‌کنند. در گروه A بزرگترین پیک شبیه پیک‌های پوسته تخم شترمرغ با فرکانس ۸۷۵ و ۱۴۲۰  $cm^{-1}$  می‌باشد که حضور کلسیت را آشکار می‌کند. پهنای منحنی کمتر از ۵۶۴، ۱۰۳۵ برای فسفات می‌باشد که پیک اصلی هیدروکسی آپاتیت می‌باشد (۶، ۳۹). خمیدگی جزئی منحنی در گروه D در گروه A هم دیده شد. این اطلاعات حضور بیشتر بیومتریال پوسته تخم شترمرغ (OsE) نسبت به هیدروکسی آپاتیت را در گروه A اثبات می‌کند. در گروه B

طیف‌های سنج مادون قرمز نشان داد که بیشترین پیک جذبی در ۸۷۴، ۷۰۹، ۱۴۲۰، ۱۸۰۱، ۲۵۱۶  $cm^{-1}$  متعلق است به گروه کربنات  $CO_3^{2-}$  از کربنات کلسیم ( $CaCO_3$  (calcite)) در گروه D پوسته تخم شترمرغ (شکل ۱) می‌باشد. پیک اصلی برای کلسیت در طول موج ۸۷۴، ۱۴۲۰  $cm^{-1}$  در پوسته تخم شترمرغ درج گردید. پیک اصلی هیدروکسی آپاتیت در طول موج ۵۶۳، ۶۰۳ فسفات ( $PO_4^{3-}$ ) با انحراف ۷۴ و فسفات با انحراف ۷۳ و طول موج ۱۰۳۶ می‌باشد. گروه OH هیدروکسی آپاتیت یک پیک جزئی در طیف ۳۴۴۲  $cm^{-1}$  را نشان می‌دهد. گروه هیدروکسیل (OH) در هر دو ماده پوسته تخم شترمرغ و هیدروکسی آپاتیت وجود دارد. در ماده هیدروکسی آپاتیت یک پیک



کلسیم فسفات می‌باشد که طراحی صحیح این ماده ترکیبی را از منابع رفرنس بیان می‌کند. در متریا ل گروه C الگوی XRD تقریباً امتیاز برابری برای هر دو ترکیب اصلی که شامل کربنات کلسیم و هیدروکسید کلسیم فسفات می‌باشد که طراحی صحیح این ماده ترکیبی را از منابع رفرنس بیان می‌کند (۳۸).

آنالیز دستگاه میکروسکوپ الکترونی روبشی نشان داد که پودر هیدروکسی آپاتیت به اشکال مختلف منجمه بصورت میله‌ای نامنظم بین صفحات گرانول‌های پوسته تخم شتر مرغ پخش می‌باشد (شکل ۳-۳). این حالت برای چسبندگی سلول مفید بوده و گرانول‌های پودر پوسته تخم شتر مرغ کمک بیشتری به اضافه شدن سلول به این نوع داربست می‌شود. لاکوناها و تخلخل موجود در گروه (B ۱-۲ OsE/HA) بیشتر از گروه‌های دیگر می‌باشد. این پدیده بخاطر وجود میله‌های زیاد و قطور هیدروکسی آپاتیت در لابلای صفحات گرانولی پوسته تخم شتر مرغ می‌باشد. این بدین معنی است که مساحت بیشتری را برای چسبیدن سلول به داربست فراهم می‌کند. هر آنچه که میزان میله‌های هیدروکسی بیشتر باشد سطح افزایش می‌یابد. در این حالت پدیکل‌های سلول در بین لاکوناها رفته و سلول می‌تواند دیواره سیستوپلاسمی خود را کاملاً کشیده و توسط این زوائد سیستوپلاسمی کاملاً به داربست بچسبد (۱۴، ۳۴).

در تست سمیت مشاهدات فلاسک کشت بافتی نشان داد که هیچگونه آپاتیزیس سلولی و یا ایجاد هاله‌ای در اطراف داربست وجود ندارد. سلول‌ها کاملاً به داربست چسبیده‌اند. سلول‌ها واکنش نکرده و این بدان معنی است که این ترکیب قابل قبولی بوسیله سلول‌ها است. کنترل کشت سلولی (پاساژ ۳) در طی ۲۴ و ۴۸ ساعت اولیه با تراکم سلولی  $10^6$  \*۱ بعد از کشت با داربست پوسته تخم شتر مرغ با هیدروکسی آپاتیت، غیر سمی بودن این مواد را تایید کرد و کاربرد

طیف مادون قرمز مربوط به گروه فسفات با طول موج ۵۶۴ و  $1036 \text{ cm}^{-1}$  شبیه منحنی موجود در هیدروکسی آپاتیت می‌باشد. بقیه پیک‌های گروه B نشان از حضور ضعیف پوسته تخم شتر مرغ در طیف ۸۷۶ .  $1423 \text{ cm}^{-1}$  می‌باشد (۷). این نشان‌دهنده حضور قویتر هیدروکسی آپاتیت در مقابل OsE در این ترکیب می‌باشد. بر طبق جدول شماره ۲ مقدار وزن مولکولی هیدروکسی آپاتیت در این ترکیب دو برابر می‌باشد. طیف‌های بهتری از هر دو ماده در ترکیب گروه C موجود می‌باشد. پیک‌های این داربست پودری در این گروه مربوط به فسفات با طول موج‌های ۵۶۴ و  $1036 \text{ cm}^{-1}$  و کلسیت با طول موج‌های ۸۷۵،  $1422 \text{ cm}^{-1}$  بسیار قویتر بودند. این مقادیر ثابت می‌کنند که از هر دو نوع ماده پایه به مقدار مساوی در این داربست بکار رفته است (۲۱).

در آنالیز طیف سنجی پراش اشعه ایکس کربنات کلسیم برای ماده پوسته تخم شتر مرغ و هیدروکسید کلسیم فسفات برای هیدروکسی آپاتیت هستند که بعنوان دو جزء اصلی و سازنده ترکیبات نمونه A, B & C می‌باشند که بوسیله XRD ردیابی شدند. این نتایج ثابت کرد که در نمونه A اندازه کلسیت بیشتر از هیدروکسید کلسیم فسفات می‌باشد که بوسیله جدول ۳ و شکل ۲ مورد تایید قرار گرفته است. امتیاز کلسیت در نمونه A توسط نرم افزار XRD، ۸۹ بود در مقایسه با هیدروکسید کلسیم فسفات که امتیاز آن ۴۴ شد (۱۸، ۲۲). در گروه تست B پیک‌های هیدروکسید کلسیم فسفات در مقایسه با کربنات کلسیم قابل مشاهده بود. و این داده‌ها بوسیله جدول ۳ که امتیاز هیدروکسید کلسیم فسفات ۶۵ بود که در حالیکه منحنی داربست پودری تخم شتر مرغ بسیار ضعیف نمایان شد، مورد تایید قرار گرفت. در متریا ل گروه C الگوی XRD تقریباً امتیاز برابری برای هر دو ترکیب اصلی که شامل کربنات کلسیم و هیدروکسید

پودری نانوبه دیواره سیتوپلاسم چسبیده و سیتوپلاسم ایجاد پدیكل‌های سلولی می‌کند این در میکروگراف میکروسکوپ الکترونی روبشی با بزرگنمایی بالا قابل مشاهده است. این خصوصیات داربست باعث کاربرد بیشتر آن در حالت اینویترو و اینویومی‌شود (۲۵، ۳۷). در پژوهش‌های دیگر پوسته تخم مرغ به همراه هیالورونان بکار گرفته شد که در نتیجه فعالیت استخوانسازی آن در حالت اینویترو آشکار گردید و چسبندگی و تکثیر خوبی به داربست پوسته تخم مرغ هیالورونان نشان داد (۲۸). در پژوهشی دیگر استخراج فسفات کلسیم از پوسته تخم شتر مرغ به همراه پوشش یون روی بر روی سطح تیتانیومی نشان از زیست‌سازگاری بسیار بالا و عدم ایجاد سمیت در تمامی نمونه‌ها بود. ترکیب یون روی با هیدروکسی آپاتیت باعث تشکیل آپاتیت شبه استخوانی گردید (۱۸).

این مطالعات نشان داد که ترکیب هیدروکسی آپاتیت با پوسته تخم شتر مرغ باعث ایجاد بستری مناسب برای چسبندگی و تکثیر سلول‌های مزانشیمی و کاهش زمان بهبودی در مقایسه با مواد دیگر را دارا می‌باشد.

#### نتیجه‌گیری

در این مطالعه داربست پودری ترکیبی پوسته تخم شتر مرغ - هیدروکسی آپاتیت با نسبت‌های مختلف به عنوان جایگزینی برای مواد استخوانی و تحریک به استخوان‌سازی در محیط اینویترو مورد بررسی قرار گرفت. نتیجه بررسی خصوصیات شمیایی، بیولوژیکی و توپوگرافی سطحی نشان از ایجاد سطحی مضرس و به همراه لاکونا‌های مختلف در گروه‌های متفاوت بود که بیشترین سطح و لاکونا مربوط به نسبت OsE/HA 1-2 می‌باشد که این تکنیک‌ها شامل FTIR، XRD، SEM و تست سمیت تست پذیرش و رفتار سلولی مزانشیمی با داربست پودری OsE/HA می‌باشد. تست

ان در حالت *in vitro* و *in vivo* بی‌خطر می‌باشد و دارای ظرفیت بالایی از پذیرش سلول و بدون هیچ‌گونه اثرات سمی می‌باشد (۱۹، ۳۰).

با توجه به شکل ۴ بیشترین میزان چسبندگی سلول با داربست دیده می‌شود. در تحقیقات و بررسی‌های دیگر محققین بیشتر بر ایزوله کردن هیدروکسی آپاتیت از پوسته تخم شتر مرغ تمرکز پیدا کرده است در حالیکه در این مطالعه بر نحوه کیفیت چسبیدن سلول بر داربست پوسته تخم شتر مرغ/هیدروکسی آپاتیت تمرکز گردیده است. در بعضی مطالعات دیگر این مواد مدل خوبی برای پیوند در استخوان حذقه چشم بکار رفته است. و در تمامی آزمایشات حیوانی با کمترین میزان التهاب همراه بوده است (۱۰).

در پژوهشی دیگر پوسته تخم شتر مرغ بعنوان منبعی خوب کلسیمی برای ساخت بیومتریال دوفازی پودری استفاده شده است. همانطوری که می‌دانیم بیومتریال‌های زیست فعال نقش بسیار زیادی در محیط‌های بیولوژیکی ایفا می‌کنند. هیچ کار درون بدنی یا آزمایشگاهی دیگری در این زمینه برای ترکیب درصدهای مختلف بیومتریال‌های سنتز شده با بیومواد طبیعی انجام نگرفته بود (۷).

نتایج پذیرش داربست آشکار ساخت که این پدیده بر حسب خاصیت استتوکاندکتیو گرانول‌های مضرص پوسته تخم شتر مرغ ایجاد می‌شود که بر نیچ سلولی سلول‌های مزانشیمی تاثیر مستقیم دارد. این باعث تغییر در ماهیت سلول‌های مزانشیمی می‌گردد. این داربست باعث افزایش تعداد سلول در همه جهات می‌شود که در میکروگراف شکل ۵ قابل مشاهده است. میکروگراف میکروسکوپ الکترونی روبشی نشان داد بر همکنش سلولی در تمامی جهات در گشت سلولی فلاسک وجود دارد. ارتباط سلول به سلول و سلول به ماتریکس خارج سلولی نشان از پذیرش فوق‌العاده ترکیب جدید را دارد. داربست

the Role of Biomaterials and Biophysical Forces on Cell Functionality Through Computational and Structural Biotechnology Analytical Methods. *Computational and Structural Biotechnology Journal*, 17: 591-598.

3. Al-Munajjed A.A. 2009. Development of a Biomimetic Collagen-Hydroxyapatite Scaffold for Bone Tissue Engineering Using a SBF Immersion Technique. *Journal of Biomedical Materials Research. Part B, Applied Biomaterials*, 90(2): 184-191.

4. Anashar Ahmad A., Daoud A. 2019. Evaluation of the Activity of Hen Eggshell Graft in Experimentally Induced Mandibular Defects in Rabbits: Pilot Study. *International Journal of Research in Medical Sciences*, 7(4): 1133-39.

5. Arias J.I., Gonzalez A., Fernandez M.S., Gonzalez C., Saez D., Arias J.L. 2008. Eggshell Membrane as a Biodegradable Bone Regeneration Inhibitor. *Journal of Tissue Engineering and Regenerative Medicine*, 2(4): 228-35.

6. Azami M., Jalilifiroozinezhad S, Mozafari M, Rabiee M. 2011. Synthesis and Solubility of Calcium fluoride/hydroxy-fluorapatite nanocrystals for Dental Applications. *Ceramics International*, 37(6): 27-38.

7. Caliman L B., Nicodemos da Silva S., Accordi Junkes J., Possamai Della Sagrillo V., 2017. Ostrich Eggshell as an Alternative Source of Calcium Ions for Biomaterials Synthesis. *Materials Research*, 20(2): 13-27.

8. Chen X., Li X., He Z., Hou Z., Xu G., Yang N., Zheng J. 2019. Comparative Study of Eggshell Antibacterial Effectivity in Precocial and Altricial Birds Using *Escherichia Coli*. *PLOS ONE*, 14(7): 22-31.

9. Daniel M., Martin A.D., Drinkwater D.T. 1992. Cigarette Smoking, Steroid Hormones, and Bone Mineral Density in Young Women. *Calcified Tissue International*, 50(4): 300-305.

FTIR و XRD گروه‌های عاملی و عناصر داربست-های پودری طراحی شده در این مطالعه را آشکار ساخت. این مطالعه حضور پوسته تخم شتر مرغ وهیدروکسی آپاتیت در تمامی گروه‌های آزمایشی با نسبت‌های مختلف را نشان داد. میکروسکوپ الکترونی روبشی ساختار میکرو تمامی گروه‌های آزمایشی را آشکار ساخت و بهترین لاکونا در گروه آزمایشی B شناخته شد. مطالعات تماس مستقیم (سمیت) سلول با داربست نشان از بی خطر بودن این ماده برای ادامه آزمایشات اینویترو دارد. این تکنیک‌ها نشان داد که این داربست بسیار بی خطر در کاربرد برای جایگزینی مواد استخوانی می‌باشد. تست رفتاری سلول مزانشیمی بادرابست نشان از علاقه سلول به ایجاد زوائد سلولی و در بر گرفتن ذرات داربست در دیواره سیتوپلاسم می‌باشد. این داربست بهترین ماده قابل اعتماد و عملکردی در آینده تحقیقات استخوانی می‌تواند عمل کند.

#### تشکر و قدردانی

این مقاله بر اساس پایان‌نامه دکترای تخصصی دانشجویی در دانشگاه آزاد اسلامی واحد آیت .. آملی و دانشگاه علوم پزشکی گلستان با کد اخلاق IR.GOUMS.REC.1397.258 تهیه شده است. بدین وسیله از کلیه همکارانی که ما را در انجام این پژوهش یاری نمودند قدردانی می‌گردد.

#### منابع

1. Achatz Felix P., Richard Kujat, Christian G. Pfeifer, Matthias Koch, Michael Nerlich, Peter Angele, and Johannes Zellner. 2016. In Vitro testing of scaffolds for mesenchymal stem cell-based meniscus tissue engineering-introducing a new biocompatibility scoring system. *Materials*, 9(4): 27-39.

2. Almouemen N., Kelly H.M., O'Leary C. 2019. Tissue Engineering: Understanding

17. Hosseini, Behnam, Seyed Mehdi Mirhadi, Mehdi Mehrazin, Mohsen Yazdani, and Mahmood Reza Kalantar Motamedi. 2017. Synthesis of Nanocrystalline Hydroxyapatite Using Eggshell and Trimethyl Phosphate. *Trauma Monthly*, 22(5): 47-55.
18. JFerreira J.R.M., Louro L.H.L., Costa A.M., Marçal R.L.S.B., Navarro da Rocha D., Barbosa R.M., Campos J.B., Prado da Silva M.H. 2017. Zinc-doped Calcium Phosphate Coating on Titanium Surface Using Ostrich Eggshell as a Ca<sup>2+</sup> Ions Source. *Biomaterials and Medical Applications*, 1(2): 23-32.
19. Karakecili A., Gönen T., Demirtas T., Satriano C., Gümüşderelioglu M., Marletta G. 2007. Evaluation of L929 Fibroblast Attachment and Proliferation on Arg-Gly-Asp-Ser (RGDS)-Immobilized Chitosan in Serum-Containing/Serum-Free Cultures. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 104(1): 69-77.
20. Kobolak J., Dinnyes A., Memic A., Khademhosseini A., Mobasheri A. 2016. Mesenchymal Stem Cells: Identification, Phenotypic Characterization, Biological Properties and Potential for Regenerative Medicine through Biomaterial Micro-Engineering of Their Niche. *Methods*, 99: 62-68.
21. Komath M., Varma H.K. 2003. Development of a Fully Injectable Calcium Phosphate Cement for Orthopedic and Dental Applications. *Bulletin of Materials Science*, 26(4): 415-22.
22. Kontoyannis C.G., Vagenas N.V. 2000. Calcium Carbonate Phase Analysis Using XRD and FT-Raman Spectroscopy. *Analyst*, 125(2): 251-55.
23. Li Y., Nam C.T., Ooi C.P. 2009. Iron (III) and Manganese (II) Substituted Hydroxyapatite Nanoparticles: Characterization and Cytotoxicity Analysis. *Journal of Physics: Conference Series*, 187: 012-024.
10. Dupoirieux L. 1999. Ostrich Eggshell as a Bone Substitute: A Preliminary Report of Its Biological Behaviour in Animals—a Possibility in Facial Reconstructive Surgery. *The British journal of oral and maxillofacial surgery*, 37(6): 67-79.
11. Einhorn T.A., Gerstenfeld L.C. 2015. Fracture Healing: Mechanisms and Interventions. *Nature reviews. Rheumatology*, 11(1): 45-54.
12. Fernandez de Grado, Gabriel, Laetitia Keller, Ysia Idoux-Gillet, Quentin Wagner, Anne-Marie Musset, Nadia Benkirane-Jessel, Fabien Bornert, and Damien Offner. 2018. Bone Substitutes: A Review of Their Characteristics, Clinical Use, and Perspectives for Large Bone Defects Management. *Journal of Tissue Engineering*, 9: 68-77.
13. Garrison K.R., Donell S., Ryder J., Shemilt I., Mugford M., Harvey I., Song F. 2007. Clinical Effectiveness and Cost-Effectiveness of Bone Morphogenetic Proteins in the Non-Healing of Fractures and Spinal Fusion: A Systematic Review. *Health Technology Assessment*, 11(30): 1-150.
14. Garrison K.R., Donell S., Ryder J., Shemilt I., Mugford M., Harvey I., Song F. 2012. Effects of Surface Microtopography on the Assembly of the Osteoclast Resorption Apparatus. *Journal of the Royal Society Interface*, 9(72): 1599-1608.
15. Goudriaan W.A., Jan Harsevoort G., van Leeuwen M., Franken A.A., Maria Janus G.J. 2018. Incidence and Treatment of Femur Fractures in Adults with Osteogenesis Imperfecta: An Analysis of an Expert Clinic of 216 Patients. *European Journal of Trauma and Emergency Surgery*, 91-102.
16. Hettwer W. 2017. Synthetic bone replacement: Current developments and perspectives. *Der Orthopade*, 46(8): 688-700.

- Reconstruction in Revision Total Hip Arthroplasty. *EFORT Open Reviews*, 1(12): 431-439.
33. Rahman M.S., Rana M.M., Spitzhorn L.S., Akhtar N., Hasan M.Z., Choudhury N., Fehm T., Czernuszka J.T., Adjaye J., Asaduzzaman S.M. 2019. Fabrication of Biocompatible Porous Scaffolds Based on Hydroxyapatite/Collagen/Chitosan Composite for Restoration of Defected Maxillofacial Mandible Bone. *Progress in Biomaterials*, 8(3): 137-154.
34. Romereim S.M., Conoan N.H., Chen B., Dudley A.T. 2014. A Dynamic Cell Adhesion Surface Regulates Tissue Architecture in Growth Plate Cartilage. *Development*, 141(10): 85-95.
35. Safavi M.S., Etminanfar M. 2019. A Review on the Prevalent Fabrication Methods, Microstructural, Mechanical Properties, and Corrosion Resistance of Nanostructured Hydroxyapatite Containing Bilayer and Multilayer Coatings Used in Biomedical Applications. *Journal of Ultrafine Grained and Nanostructured Materials*, 52(1): 1-17.
36. Sakti Y.M., Magetsari R. 2013. Structural Evaluation and Animal Implantation of Porous Eggshell Wasterderived Hydroxyapatite Graft as Bone Substitution. *Journal of the Medical Sciences*, 45(04): 17-26.
37. Sharma M.B., Limaye L.S., Kale V.P. 2012. Mimicking the Functional Hematopoietic Stem Cell Niche in Vitro: Recapitulation of Marrow Physiology by Hydrogel-Based Three-Dimensional Cultures of Mesenchymal Stromal Cells. *Haematologica*, 97(5): 651-660.
38. Tan Y.H., Abdullah M.O., Nolasco-Hipolito C., Taufiq-Yap Y.H. 2015. Waste Ostrich- and Chicken-Eggshells as Heterogeneous Base Catalyst for Biodiesel Production from Used Cooking Oil: Catalyst Characterization and Biodiesel Yield Performance. *Applied Energy*, 160: 58-70.
24. Magige F., Røskaft E. 2017. Medicinal and Commercial Uses of Ostrich Products in Tanzania. *Journal of Ethnobiology and Ethnomedicine*, 13-22.
25. Martinez-Agosto J.A., Mikkola H.K.A., Hartenstein V., Banerjee U. 2007. The Hematopoietic Stem Cell and Its Niche: A Comparative View. *Genes and Development*, 21(23): 44-60.
26. Mitxitorena I., Infante A., Gener B., Rodríguez C.I. 2019. Suitability and Limitations of Mesenchymal Stem Cells to Elucidate Human Bone Illness. *World Journal of Stem Cells*, 11(9): 578-593.
27. Naga S.M., El-Maghraby H.F., Saad E.A. 2015. Highly Porous Scaffolds Made of Nanosized Hydroxyapatite Powder Synthesized from Eggshells. *Journal of ceramic science and technology*, 6: 37-44.
28. Neunzehn J., Szuwart T., Wiesmann H.P. 2015. Eggshells as Natural Calcium Carbonate Source in Combination with Hyaluronan as Beneficial Additives for Bone Graft Materials, an in Vitro Study. *Head and Face Medicine*, 11: 12.
29. Oryan A., Kamali A., Moshiri A., Eslaminejad M.B. 2017. Role of Mesenchymal Stem Cells in Bone Regenerative Medicine: What Is the Evidence? *Cells Tissues Organs*, 204(2): 59-83.
30. Ozdemir K.G., Yilmaz H., Yilmaz S. 2009. In Vitro Evaluation of Cytotoxicity of Soft Lining Materials on L929 Cells by MTT Assay. *Journal of Biomedical Materials Research. Part B, Applied Biomaterials*, 90(1): 82-86.
31. Persson M., Lehenkari P.P., Berglin L., Turunen S., Finnilä M.A.J., Risteli J., Skrifvars M., Tuukkanen J. 2018. Osteogenic Differentiation of Human Mesenchymal Stem Cells in a 3D Woven Scaffold. *Scientific Reports*, 8: 76-86.
32. Pierannunzii L., Zagra L. 2016. Bone Grafts, Bone Graft Extenders, Substitutes and Enhancers for Acetabular

42. Yorukoglu A.C., Kiter A.E., Akkaya S., Satiroglu-Tufan N.L., Tufan A.C. 2017. A Concise Review on the Use of Mesenchymal Stem Cells in Cell Sheet-Based Tissue Engineering with Special Emphasis on Bone Tissue Regeneration. *Stem Cells International*, 2017: 2374161.
43. Zakaria S.M., Sharif Zein S.H., Othman M.R., Yang F., Jansen J.A. 2013. Nanophase Hydroxyapatite as a Biomaterial in Advanced Hard Tissue Engineering: A Review. *Tissue Engineering. Part B, Reviews*, 19(5): 31-41.
39. Tsai W.T., Hsien K.J., Hsu H.C., Lin C.M., Lin K.Y., Chiu C.H. 2008. Utilization of Ground Eggshell Waste as an Adsorbent for the Removal of Dyes from Aqueous Solution. *Bioresource Technology*, 99(6): 1623-1629.
40. Wang W., Yeung W.K. 2017. Bone Grafts and Biomaterials Substitutes for Bone Defect Repair: A Review. *Bioactive Materials* 2(4): 224-247.
41. Yadao R.A., Lim G., Pe L., Valdez A., Cristobal S., Sunico A.T.C., Romero H. 2004. Ostrich Eggshell as an Onlay Bone-Graft Substitute for Orbital Blow-out Fractures, 29(3): 127-130.