

ساخت و بهینه سازی کانال هدایت عصبی ژلاتین / نانو شیشه زیستی جهت ترمیم عصب محیطی

معصومه فروتن کودهی *، فائزه قانع زاده **، دکتر افسانه امیری ***، دکتر عباسعلی ایمانی فولادی ****
دکتر محمدرضا نورانی *****

دریافت: ۹۲/۹/۲، پذیرش: ۹۳/۲/۳۰

چکیده:

مقدمه و هدف: صدمه به عصب محیطی در بیماران مبتلا به تروما شایع است و ۴/۵٪ از آسیب های وارده به بافت نرم با نقص اعصاب محیطی همراه می باشد. آسیب اعصاب محیطی منجر به کاهش عملکرد و تغییر شکل دائمی عصب می گردد. طراحی کانالهای تشکیل شده از مواد طبیعی و مصنوعی، در حال حاضر برای بازسازی بافت آسیب دیده به طور گسترده ای مورد استفاده قرار می گیرد. در این مطالعه کانال هدایت عصبی تشکیل شده از ژلاتین و نانو شیشه زیستی برای ترمیم عصب محیطی سنتز شد.

روش کار: در این مطالعه تجربی کانال های هدایت عصبی از مخلوط محلول آبی ژلاتین با پودر نانو ساختاری شیشه ی زیستی فعال سنتز شده به روش سل ژل، تهیه شد. بعد از تهیه محلول، قالب مورد نظر را در داخل محلول غوطه ور کرده و توسط فرآیند خشک سازی انجمادی، محتوای آب آن توسط تصعید خارج گردید. کانال ها با قطر داخلی و خارجی به ترتیب ۱/۶ و ۲/۲ میلی متر و طول ۱۲ میلی متر طراحی شدند. جهت بررسی میزان زیست سازگاری کانال های تهیه شده از دو تست سمیت، توسط سلول های تخمدان همستر چینی و تست MTT توسط سلول های Miapaca-2 (سلولهای رده سرطان پانکراس) استفاده شد.

نتایج: ویژگی های پودر نانو شیشه زیستی و کانال ها با استفاده از میکروسکوپ انتقال الکترونی، میکروسکوپ الکترونی روبشی، طیف سنجی مادون قرمز و پراش اشعه ایکس مشخص شد. نتایج دو تست سمیت سلولی نشان داد که کانال ها سمیت نداشتند و سلول ها به دیواره کانال متصل شده بودند.

نتیجه نهایی: بر اساس نتایج بدست آمده، کانال نانو شیشه زیستی / ژلاتین کاندیدای مناسبی برای انجام مطالعات ترمیم عصب محیطی می باشد.

کلید واژه ها: اعصاب محیطی / ژلاتین / مهندسی بافت / نانو شیشه زیستی

مقدمه:

مصدومیت های ورزشی که منجر به آسیب اعصاب محیطی می گردد، علاوه بر هزینه های سنگین درمان، پیامدهای ناگواری چون قطع عضو، معلولیت های مادام العمر، از دست دادن شغل و موقعیت اجتماعی را به همراه دارند. تحقیقات نشان می دهد سالانه بیش از ۹۰ هزار نفر در

یکی از معضلاتی که جوامع بشری با آن مواجه اند، عوارض جبران ناپذیر آسیب به سیستم عصبی است. جراحات های ناشی از عوارض جنگ، حوادث رانندگی، سوانح شغلی، بلایای طبیعی مانند زلزله و حتی

* کارشناسی ارشد مرکز تحقیقات آسیب های شیمیایی دانشگاه علوم پزشکی بقیه الله تهران

** کارشناس ارشد بیوشیمی دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم و تحقیقات تهران

*** استاد گروه شیمی دانشگاه آزاد اسلامی واحد تهران مرکز

**** دانشیار مرکز تحقیقات میکروبیولوژی کاربردی دانشگاه علوم پزشکی بقیه الله تهران

***** دانشیار مرکز تحقیقات نانویوتکنولوژی دانشگاه علوم پزشکی بقیه الله تهران (r.nourani@yahoo.com)

آکسون می باشد. هم اکنون چندین نوع کانال هدایت عصبی از مواد زیستی متفاوت پلی گلایکولیک اسید PGA (۸) پلی لاکتیکو گلایکولیک اسید (PLGA) (۹،۱۰) کلاژن (۱۳-۱۰) و ژلاتین (۱۴،۱۵) ساخته شده است. از آنجایی که تحقیقات حکایت از پتانسیل آنتی ژنی اندکی در مورد کلاژن دارند، در چند سال اخیر پژوهشگران گرایش به استفاده از ژلاتین به جای کلاژن یافته اند. ژلاتین، کلاژن هیدرولیز شده است که در شرایط فیزیولوژیکی و بیولوژیکی هیچگونه تحریک سیستم ایمنی از خود نشان نمی دهد (۱۶). این ماده به راحتی در شرایط درون بدن انسان جذب می شود و خواص فیزیکی و شیمیایی آن به طور مناسبی قابل تنظیم و تعدیل است به علاوه نسبت به کلاژن ارزان تر می باشد (۱۶،۱۷). ژلاتین به تنهایی استحکام کافی برای این منظور را ندارد و بایستی با یک جزء دیگر با خاصیت زیست تخریب پذیری مخلوط گردد.

شیشه های زیستی به عنوان یک بیوسرامیک توانایی اتصال به بافت های زنده بدن را از طریق تشکیل یک لایه در فصل مشترکشان با بافت های زنده دارند. در تحقیقی نشان داده شد که الیاف شیشه زیستی در درون یک کانال زیست سازگار می تواند باعث هدایت آکسونهای محیطی در محیط بدن شوند (۱۸). شیشه ی زیستی، بواسطه ی زیست سازگاری و زیست تخریب پذیری و خاصیت مکانیکی مناسب آن، بطور موثری در مهندسی بافت مورد استفاده قرار می گیرد (۱۹،۲۰). شیشه ی زیستی با ترکیبی از دی اکسید سیلیکون (SiO_2) اکسید کلسیم (CaO) و پنتا اکسید دی فسفر (P_2O_5) عضوی از خانواده ی شیشه های زیست فعال می باشد. یکی از مزیت های قابل توجه شیشه های زیست فعال امکان برقراری پیوند آن با هر دو بافت نرم و سخت می باشد، بنابراین با توجه به ویژگیهای ژلاتین و نانو شیشه زیستی کانال هدایت عصبی سنتز شد و همچنین مراحل ساخت و بهینه سازی کانال هدایت عصبی نانو شیشه زیستی / ژلاتین برای ترمیم عصب محیطی، به عنوان هدف این مطالعه مورد بررسی قرار گرفت.

روش کار:

در این مطالعه تجربی جهت ساخت کانال هدایت عصبی، شیشه زیست فعال با ساختار نانو سنتز شد. مواد لازم برای سنتز نانو پودر شیشه زیست فعال به روش سل

سراسر دنیا دچار آسیب های ناشی از سیستمهای عصبی می شوند (۱). از این رو فعالیت در زمینه ترمیم و بازسازی عصب به طوریکه امکان بازگشت فعالیت های عملکردی نورون پس از جراحت و یا تخریب عصبی امکان پذیر باشد، به سرعت در حال رشد است.

اعصاب محیطی برخلاف سیستم عصبی مرکزی دارای ظرفیت هایی برای ترمیم می باشد اما به شرایط محیطی مناسب و فاکتورهای رشد حمایت کننده نیاز دارد. اتوگرافت عصبی، روش استاندارد طلایی برای ترمیم فواصل بین دو قطعه است (۲) اما برداشت یک عصب زنده از یک منطقه سالم، به دلیل محدودیت دسترسی به بافت عصب و خطرگسترش بیماری ایده آل نیست. بنابراین کانال های راهنمای عصب (Nerve guidance conduits; NGCs) که به صورت لوله های طبیعی یا سنتتیک وجود دارند، به عنوان جانشین برای اتوگرافت مطرح شده اند (۳،۴). کانال های طبیعی یا مصنوعی راهنمای عصب کانال هایی هستند که شکاف بین دو انتهای عصب بریده شده را پل می زنند و علاوه بر کمک به رشد آکسون، تشکیل بافت اسکار را به حداقل می رسانند و کشش را در ناحیه ترمیم عصب کاهش می دهند (۵). مواد به کار رفته در ساخت کانال ها باید از نقطه نظر خواص شیمیایی، فیزیکی، مکانیکی و زیست شناختی مشابه بافت زنده مورد نظر انتخاب شود. از خصوصیات این کانال ها: ۱- به آسانی به شکل لوله با قطری مطلوب در آیند ۲- مواد استفاده شده جهت ساخت کانال زیست سازگار باشند یعنی نباید پاسخ التهابی بافت را برانگیزد ۳- کانال ها باید دارای تخلخل های باز و به هم پیوسته باشند و درصد تخلخل باید بالا بوده و نسبت سطح به حجم بالایی را تامین نمایند تا رشد سلولی و رگ زایی را سهولت بخشند (۶،۷) ۴- بعد از شکل گیری و رشد عصب داخل کانال، تخریب شده تا از ایجاد عفونت و پاسخ های التهابی جلوگیری شود ۵- در ضمن جاگذاری و فعالیت و حرکت طبیعی، دیواره هایش روی هم نخوابد، بنابراین مواد بکار برده شده باید طوری طراحی شوند که تمام ویژگی های مورد نظر برای سنتز کانال را دارا باشند.

امروزه مبحث مهندسی بافت از جایگاه بسیار مهمی در زمینه علوم و فناوری برخوردار است، بطوری که مطالعات و تحقیقات بسیاری را در سرتاسر دنیا، به ویژه در اکثر محافل علمی و پژوهشی، به خود معطوف کرده است. یکی از آنها، ساخت کانال هدایت عصبی برای رشد و هدایت

قرار داده شدند. غلظت ژلاتین در محلول اولیه ۱۰٪، شیشه بیواکتیو ۳۰٪ و غلظت محلول گلو تار آلدهید ۵/۰٪، متغیرهای اعمال شده در این مطالعه بودند. گلو تار آلدهید با ایجاد اتصالات بین زنجیره‌ای در ساختار پلیمری ژلاتین باعث افزایش استحکام و کاهش انحلال پذیری آن در آب می‌شود، بنابراین در این پروژه محلول گلو تار آلدهید را با آب مقطر رقیق کرده و به مدت ۲۴ ساعت کانال ها را در گلو تار آلدهید ۵/۰٪ قرار دادیم. بدین ترتیب کانال هدایت عصبی با قطر داخلی ۱/۶ و قطر خارجی ۲/۲ به طول ۱۲ میلی متر ساخته شد (شکل ۱ الف) (۲۲).

خواص نانو پودر شیشه ی زیستی سنتز شده با انجام تستهای زیر بررسی گردید:

آنالیز تفرق اشعه ایکس (X-ray diffraction ; XRD): جهت بررسی ساختار کریستالی، نمونه پودر سنتز شده مورد آنالیز تفرق اشعه ایکس با استفاده از دستگاه XRD ساخت شرکت فیلیپس با طول موج $\text{CuK}\alpha = 1.54 \text{ \AA}$ قرار گرفت. زمان اقامت در هر گام یک ثانیه، اندازه گام ۰/۰۲ درجه و محدوده روبش بین ۲۰ تا ۷۰ درجه انتخاب گردید.

طیف سنجی مادون قرمز (Fourier Transform Infrared Spectroscopy ; FTIR): آزمون طیف سنجی مادون قرمز در شناسایی گروه‌های عاملی و قطعات سازنده سرامیک بر نمونه شیشه ی بیواکتیو انجام شد. به این منظور مواد مورد آزمایش با پتاسیم برمید (KBr) مخلوط و سپس تحت فشار، قرص تهیه شد و سپس طیف بینی با قدرت تفکیک 4 cm^{-1} و 32 cm^{-1} روبش در محدوده ی عدد موجی دستگاه (ناحیه میانی طیف IR^{45}) یعنی $4000 - 400 \text{ cm}^{-1}$ انجام شد.

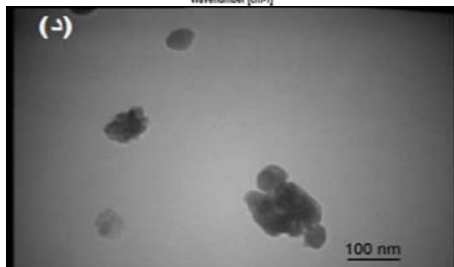
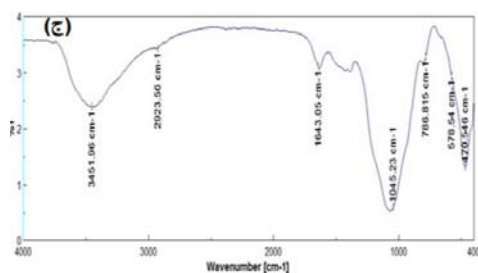
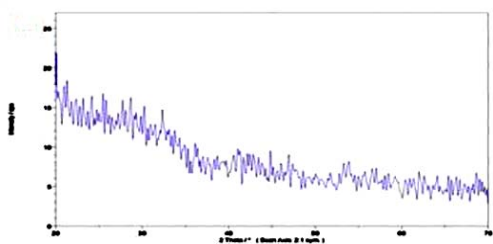
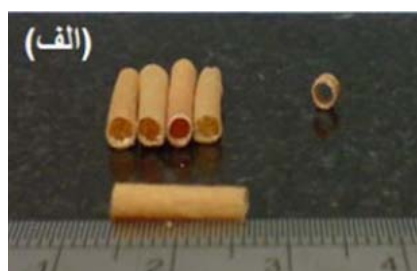
اندازه گیری توزیع اندازه ذرات (Transmission Electron Microscope; TEM): به منظور تعیین اندازه ذرات پودر سنتز شده از میکروسکوپ الکترونی انتقال Philips CM120 استفاده گردید. جهت آماده سازی نمونه، ۰/۱ گرم پودر سنتز شده در ۱۰ میلی لیتر اتانول برای ۱۵ دقیقه اولتراسوند شد. آزمایش سمیت سلولی بر روی کانال: در ابتدا جهت استریل کردن کانال ها از نور ماوراء بنفش (UV) فیلیپس در طول موج ۲۵۴ نانومتر به مدت دو ساعت استفاده شد. به منظور بررسی میزان زیست سازگاری کانال های تهیه شده از سلول های تخمدان همستر چینی (Chinese hamster ovary cell; CHO) استفاده گردید. این سلول ها پیش از انجام آزمایش سمیت سلولی در محیط کشت DMEM به

ژل شامل این موارد بود: تترا اتوکسی سیلان (TEOS) تری اتیل فسفات (TEP) نیترات کلسیم و اسید نیتریک ۰/۱ مولار که همگی از شرکت Merck آلمان خریداری شد. از ژلاتین نوع میکروبیولوژی و محصول شرکت Merck با کد محصول استفاده شد و محلول گلو تار آلدهید ($\text{C}_3\text{H}_8\text{O}_2$) ۲۵ درصد به عنوان عامل ایجاد کننده اتصالات بین زنجیره‌ای در ژلاتین از شرکت Merck آلمان خریداری گردید.

سنتز شیشه زیستی: شیشه زیستی به روش سل ژل سنتز شد. در ابتدا ۰/۰۶۴ مول تترا اتوکسی سیلان را به ۳۰ میلی لیتر اسید نیتریک ۰/۱ مولار اضافه کرده و اجازه می دهیم روی همزن به مدت ۳۰ دقیقه، عملیات هیدرولیز تترا اتوکسی سیلان توسط اسید نیتریک انجام گیرد، سپس ۰/۰۰۵ مول تری اتیل فسفات و در نهایت ۰/۰۳۱ مول کلسیم نیترات تترا هیدرات به محیط اضافه می گردند و اجازه می دهیم تا عملیات هیدرولیز کامل گردد. سل تهیه شده در یک ظرف تفلونی ایزوله شده برای ۱۰ روز نگهداری می شود تا عملیات پلی کندانسسیون و تشکیل ژل آغاز شده و ژل تشکیل گردد. ژل بدست آمده در خشک کن با دمای ۷۰ درجه سانتیگراد حرارت دهی می شود و سپس نمونه ها در دمای ۱۲۰ درجه ساعت حرارت دهی میشوند، متعاقباً در کوره الکتریکی تا دمای ۷۰۰ درجه حرارت دهی شده و برای مدت ۲۴ ساعت در این دما نگهداری می شوند. نهایتاً محصول به دست آمده در آسیاب ماهواره ای قرار داده می شود (۲۱).

ساخت کانال های هدایت عصبی: از آب مقطر یون زدایی شده جهت تهیه محلول استفاده شد. به این منظور، ژلاتین با نسبت ۱۰٪ پس از توزین دقیق به مرور به محلول آبی با درجه حرارت حدود 40°C در حال به هم خوردن با همزن مغناطیسی اضافه شد. پس از نفوذ آب به داخل شبکه و تورم کامل ژلاتین در محلول، پودر شیشه زیستی سنتز شده به محلول اضافه شد و جهت حصول یک محلول همگن به مدت ۴۵ دقیقه به همان روال قبلی همزده شد. سپس به روش غوطه وری، قالب تفلونی را درون محلول شناور کرده تا لایه ای از محلول بر سطح قالب قرار بگیرد. مرحله ی بعد اعمال فرآیند خشک سازی انجمادی به نمونه‌ها است. این فرآیند ضمن این که باعث حذف آب از مجموعه می‌شود، ایجاد حفره و یا به عبارت دیگر تخلخل نیز می‌نماید. پس از این مرحله به منظور افزایش استحکام کانال های به دست آمده، نمونه‌ها در محلول گلو تار آلدهید

طیف سنجی مادون قرمز: به طور کلی نتیجه ی بدست آمده این موضوع را تایید می کند که پودر سنتز شده دارای ترکیب شیمیایی استوکئومتری شیشه زیستی است. محدوده عدد موجی 1047 cm^{-1} ، 468 cm^{-1} مربوط به پیوند Si-O-Si و محدوده ی عدد موجی 1645 cm^{-1} ، 789 cm^{-1} نشانگر پیوند Si-O موجود در پودر سنتز شده است. پیک حاصله در محدوده عدد موجی 585 cm^{-1} و 3450 cm^{-1} به ترتیب مربوط به گروه PO_4^{3-} و OH ساختاری در پودر سنتز شده است (شکل ۱ ج). اندازه گیری توزیع اندازه ذرات: شکل ۱ د اندازه ذرات شیشه زیستی سنتز شده را نشان می دهد، میانگین سایز ذرات شیشه زیستی $80-200$ نانومتر تعیین شد.



شکل ۱: الف: کانال هدایت عصبی بعد از گلو تار زدن
ب: الگوی XRD شیشه زیستی سنتز شده در دمای 700°C
ج: نتیجه آزمون FTIR مربوط به پودر سنتز شده و پیوندهای تشکیل شده در آن د: اندازه سایز ذرات شیشه زیستی سنتز شده توسط TEM

همراه 10% penicillin/ streptomycin (P/S) (v/v) / سرم جنینی پنی سیلین استرپتومایسین و 10% (v/v) / سرم جنینی گوساله (FBS) نگهداری شدند. سوسپانسیون سلولی در هنگام کشت $4 \times 10^5 \text{ cell/ml}$ بود. کانال ها ابتدا به مدت ۴۸ ساعت در آب مقطر نگهداری شدند سپس با اتانول 70% استریل و به ظرف کشت انتقال داده شدند. پس از افزودن سوسپانسیون سلولی تهیه شده به نمونه ها، به مدت ۴۸ ساعت در انکوباتور با دمای 37°C ، رطوبت 90% و گاز CO_2 با غلظت 5% نگهداری شدند. پس از گذشت این زمان نمونه ها خارج شده و مجدداً با محلول PBS (Phosphate Buffered Saline) شستشو داده شده و با استفاده از میکروسکوپ نوری تصاویر مربوطه مشاهده و با بزرگنمایی $200\times$ برابر عکس برداری شدند.

تست MTT بروی کانال: آزمایش MTT یک روش رنگ سنجی است و بر اساس احیا شدن و شکسته شدن کریستالهای زرد رنگ تترازولیوم بوسیله آنزیم سوکسینات دهیدروژناز و تشکیل کریستالهای آبی رنگ نامحلول است. در این آزمایش از سلول های Miapaca-2 (سلول های رده سرطان پانکراس) که از انستیتو پاستور ایران خریداری شد، استفاده گردید. بطور کلی سلول های Miapaca-2 در محیط کشت به صورت چسبیده به پلیت دیده می شوند. در هر چاهک پلیت ۹۶ خانه 8000 سلول اضافه شد پس از گذشت ۲۴ ساعت هر چاهک با مقدار مناسبی از کانال تیمار و پلیت به مدت ۴۸ ساعت انکوبه شد. پس از اتمام زمان انکوباسیون محیط کشت روئی را دور ریخته به هر چاهک 200 میکرولیتر محیط کشت حاوی نیم میلی گرم در میلی لیتر محلول MTT اضافه نموده و به مدت ۴ ساعت در انکوباتور CO_2 در 37°C درجه سانتی گراد گذاشته شد. پس از گذشت زمان انکوباسیون محیط هر چاهک دور ریخته شد و DMSO به منظور حل کردن کریستال های فورمازون به چاهک ها اضافه گردید، در نهایت جذب نوری محلول بدست آمده در طول موج 570 نانومتر قرائت گردید. محلول PBS به عنوان کنترل منفی مورد آزمایش قرار گرفت.

نتایج:

ارزیابی خواص نانو پودر سنتز شده توسط آنالیز تفرق اشعه ایکس: با توجه به نمودار XRD در شکل ۱ ب هیچ پیک خاصی مشاهده نشده بنابر این پودر سنتز شده آمورف بوده و در دمای 700°C درجه کریستالی نشده است و یک نوع شیشه محسوب می شود.

بوده است و در این نمونه‌ها تخلخل‌ها در کنار یکدیگر دیده می‌شوند، در تصاویر تهیه شده از سطح کانال‌ها (شکل ۲ الف و ب) مشاهده می‌گردد که کانال‌های ساخته شده دارای تخلخل‌های نسبتاً منظم و مرتبط با یکدیگر هستند. برای کانال‌های دارای غلظت ۳۰٪ شیشه بیواکتیو قطر متوسط حفرات ما بین ۳۰ تا ۷۰ میکرومتر اندازه‌گیری شدند. طیف سنجی فروسرخ: این آزمایش به منظور بررسی پیوندهای تشکیل شده در کانال حاوی ۳۰ درصد شیشه زیستی انجام شد که نتایج در جدول ۱ و شکل ۲ ج نشان داده شده است. لازم به ذکر است که نمونه یاد شده به مدت ۲۴ ساعت در محلول گلوکار آلدهید ۵٪ جهت ایجاد اتصالات بین زنجیره ای پلیمری قرار گرفته است و بعد از شستشو با آب دو بار تقطیر و به منظور خشک شدن در فریز درایر قرار گرفت.

نتایج آزمونهای زیست‌سازگاری کانال: به منظور بررسی زیست‌سازگاری کانال‌های تهیه شده آزمون سمیت سلولی استفاده شد. با توجه به این که ترکیبات موجود در کانال ساخته شده شامل ژلاتین و شیشه ی زیستی هر دو به عنوان مواد زیست سازگار شناخته می‌شوند، لذا بنظر می‌رسد تنها احتمال بروز سمیت در این کانال‌ها می‌تواند ناشی از حضور باقیمانده محلول گلوکار آلدهید استفاده شده جهت ایجاد اتصالات عرضی پلیمری باشد. به طور کلی نتایج به دست آمده حاکی از رشد سلول در اطراف کانال هدایت عصبی و زیست‌سازگاری نمونه‌ها بود (شکل ۲ د).

با توجه به نمودار تست MTT بدست آمده اختلاف معنی داری در ۲ گروه کنترل و نمونه ی آزمایش (همراه با کانال) مشاهده نشد که حاکی از عدم سمیت کانال سنتز شده و زیست‌سازگاری آن می‌باشد (شکل ۲ ر).

جدول ۱: اعداد موجی و پیوندهای تشکیل شده بین ژلاتین و

شیشه زیستی در کانال هدایت عصبی

ترکیب	نوع پیوند	محدوده عدد موجی (cm ⁻¹)
شیشه زیستی	PO ₄ bend	۵۶۵
شیشه زیستی	O-H ساختاری	۳۳۳۲
شیشه زیستی	Si—O—Si	۱۰۷۹
شیشه زیستی	Si-O	۷۹۱
ژلاتین (Amide III)	N-H	۱۲۳۰
یون کلسیم از شیشه زیستی و کربوکسیل از ژلاتین	Ca-COO	۱۳۵۳
ژلاتین	COO	۱۴۵۰
ژلاتین (Amide II)	N-H bend	۱۵۳۶
ژلاتین (Amide I)	C=O Stretch	۱۶۵۷
فسفر - هیدروژن	P-H	۲۳۴۸
Amide B	C-H	۲۹۵۶
ژلاتین (اسیدهای کربوکسیلیک)	O-H Stretch	۳۳۱۹

ارزیابی خواص کانال تهیه شده: میزان تخلخل کانال با توجه به این که در ساخت کانال‌های کامپوزیتی از درصد‌های مختلفی از شیشه ی بیواکتیو استفاده می‌شود، انتظار می‌رود میزان تخلخل و چگالی نمونه‌ها با یکدیگر متفاوت باشند. در این مطالعه جهت اندازه‌گیری مقادیر تخلخل و چگالی داربست حاوی ۳۰ درصد نانو شیشه زیستی سنتز شده، از فرمول زیر استفاده شد. حجم نمونه‌ها با اندازه‌گیری قطر و ارتفاع آن‌ها و وزن آن‌ها با توزین قابل اندازه‌گیری خواهد بود و با توجه به رابطه زیر (۲۳)

$$\rho = \frac{M}{V} \text{ (gr/cm}^3\text{)}$$

مقدار چگالی محاسبه گردید. برای اندازه‌گیری میزان تخلخل نمونه‌ها نیز، با داشتن چگالی مواد اولیه یعنی ژلاتین و شیشه بیواکتیو، حجم و درصد تخلخل برای مجموعه ی کانال از رابطه ی زیر بدست آمد:

$$V_{Porosity} = V_{conduit} - \frac{M_{gelatin}}{\rho_{gelatin}} - \frac{M_{BGpowder}}{\rho_{BGpowder}}$$

$$porosity = \frac{V_{porosity}}{V_{total}} \times 100$$

که در آن جرم ژلاتین و شیشه ی بیواکتیو از جرم کل و با توجه به درصد اختلاط آنها و حجم کل از طریق اندازه‌گیری ابعاد نمونه استوانه‌ای به دست می‌آید. مقادیر چگالی ژلاتین و پودر شیشه نیز به ترتیب برابر ۱/۳۵ gr/cm³ و ۲/۷ gr/cm³ می‌باشند. حجم کانال مربوطه ۰/۰۴۸ cm³ محاسبه شد. هر چه میزان شیشه ی زیستی بیشتر باشد میزان تخلخل در کانال کمتر است. در این مطالعه ، میزان تخلخل نمونه حاوی ۳۰ درصد وزنی شیشه ی زیستی ، ۶۸/۳۱ تا ۷۳/۸۹٪ محاسبه شد.

اندازه و شکل حفره‌ها: به منظور بررسی مورفولوژی حفره‌ها و تخلخل‌های ایجاد شده از میکروسکوپ الکترونی روبشی (Scanning Electron Microscope; SEM) استفاده شد. لایه‌های نازک از مقاطع بالایی کانال‌های سه بعدی ساخته شده، تهیه گردید و با دستگاه فوق تصویربرداری شدند. روش ساخت کانال در کنار اعمال متغیرهایی از قبیل درصد شیشه ی بیواکتیو باعث ایجاد ساختاری متخلخل با اندازه حفرات مختلف می‌شود. شکل کلی حفره‌ها از یک ساختار عمومی تبعیت می‌کند که البته با افزایش درصد شیشه ی زیستی دچار تحول شده و از این قاعده منحرف می‌شود. از آن جایی که مکانیزم ایجاد حفره در این کانال‌ها فرآیند خشک‌سازی انجمادی

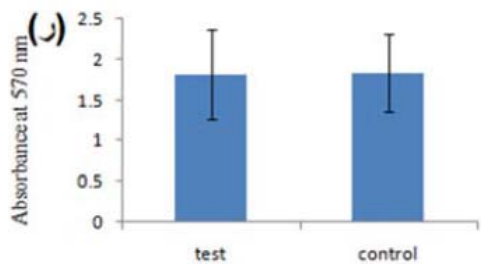
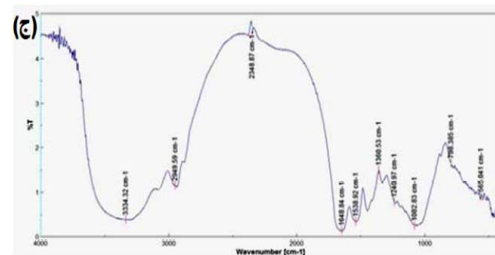
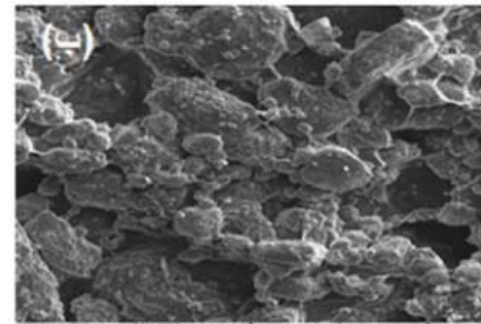
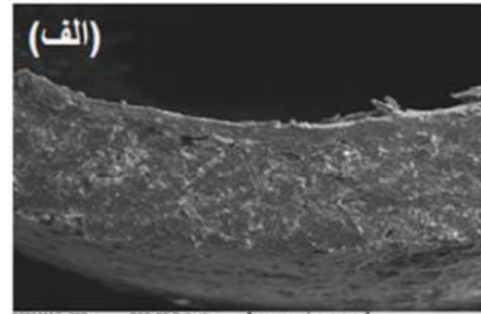
بحث:

کانال هدایت عصبی می تواند جایگزین مناسبی برای گرافت های عصبی باشد و می تواند در اعمال جراحی ما را به استفاده از بافت های دهنده برای پیوند بی نیاز سازد و همچنین با ایجاد پلی در مسیر شکاف های آسیب دیده ی اعصاب محیطی، باعث رشد آکسون و ترمیم عصب گردد. در این مطالعه کانال هدایت عصبی نانو شیشه زیستی / ژلاتین از مخلوط آبی ژلاتین به همراه نانو شیشه زیستی تهیه شد و تمام خصوصیات لازمه کانال های سنتز شده، به عنوان یک ایمپلنت برای ترمیم عصب محیطی، مورد بررسی قرار گرفت.

با توجه به نتیجه ی به دست آمده از تست FTIR و ظهور پیک ها، تایید شد که پودر سنتز شده دارای ترکیب شیمیایی استوکیومتری شیشه زیستی فعال است. در آنالیز FTIR توسط مظفری و همکارانش (۲۴) و هنج و همکاران (۲۵) محدوده ی موجی مورد انتظار پیک ها مشاهده شد که این امر حاکی از درستی ترکیب شیمیایی پودر سنتز شده است. تست FTIR از کانال سنتز شده به منظور بررسی پیوندهای موجود و اعداد موجی و نوع پیوندهای مرتبط به آن ها در نمونه با ۳۰ درصد شیشه زیستی تایید کننده صحت ترکیب شیمیایی کانال شیشه زیستی فعال و ژلاتین ساخته شده بود. نتایج حاصل از تست FTIR، در مطالعه جونز (۲۶) و همچنین اعظمی و همکاران (۲۷) نیز حاکی از درستی ترکیب شیمیایی کانال سنتز شده است.

نتایج بدست آمده از طیف XRD حاکی از آن بود که پودر شیشه زیستی آمورف می باشد و شیشه ی سنتز شده کریستالی نشده است. مظفری و همکارانش نشان دادند که پودر نانو شیشه زیستی کریستاله نشده است همچنین هنج و ساراوانا و همکارانش (۲۸) نیز با انجام آنالیز XRD هیچ پیکی مشاهده نکردند که همه ی این موارد مهر تاییدی بر نتیجه ی به دست آمده از این تست است.

میانگین سایز ذرات شیشه ی زیستی در این کار پژوهشی توسط میکروسکوپ الکترونی انتقال در محدوده ۸۰-۲۰ نانومتر بود. مظفری و همکارانش (۲۳) اندازه ی ذرات پودر شیشه ی زیستی فعال سنتز شده را با استفاده از TEM سنجیدند و آن را کمتر از ۸۰ nm گزارش کردند. حافظی و همکاران (۲۱) و همچنین مرتضوی و همکاران (۲۹) نیز سایز ذرات شیشه ی زیستی



شکل ۲: الف: تصاویر میکروسکوپ الکترونی روبشی مربوط به سطح مقطع کانال با ۳۰٪ وزنی شیشه بیواکتیو، دهانه کانال هدایت عصبی (۲۰۰×)؛ ب: نمایش تخلخل های سطح کانال هدایت عصبی (۳۰۰×)؛ ج: FTIR مربوط به کانال هدایت عصبی با ۳۰٪ شیشه زیستی؛ د: آزمایش سنجش سمیت سلولی و رشد سلولهای تخمدان همستر چینی در کنار کانال هدایت عصبی (۲۰۰×)؛ ز: ارزیابی تست MTT از کانال بعد از ۷۲ ساعت

منابع:

1. He C, Chen Z, Chen Z. Enhancement of motor nerve regeneration by nerve growth factor. *Microsurgery* 1992; 13(3): 151-4.
2. Lundborg G. Nerve regeneration and repair. *Acta Orthopaedica* 1987; 58(2): 145- 169.
3. Hudson TW, Evans GR, Schmidt CE. Engineering strategies for peripheral nerve repair. *Clin Plast Surg* 1999; 26(4): 617-628.
4. Evans GR. Challenges to nerve regeneration. *Semin Surg Oncol* 2000; 19(3): 312-8.
5. Meek MF, Coert H. Clinical Use of nerve conduits in peripheral nerve repair. *J Reconstr Microsurg* 2002; 18(2):97-109.
6. Pfister LA, Christen T, Merkle HP, Papaloizos M, Gander B. Novel biodegradable nerve conduits for peripheral nerve regeneration. *Eur Cell Mater* 2004;7(2):16-7.
7. Verreck G, Chun I, Li Y, Kataria R, Zhang Q, Rosenblatt J, et al. Preparation and physico-chemical characterization of biodegradable nerve guides containing the nerve growth agent sabeluzole. *Biomaterials* 2005; 26(11):1307-15.
8. Wang X, Hu W, Cao Y, Yao J, Wu J, Gu X. Dog sciatic nerve regeneration across a 30-mm defect bridged by a chitosan/PGA artificial nerve graft. *Brain* 2005; 128(Pt 8):1897-910.
9. Oh SH, Kim JH, Song KS, Jeon BH, Yoon JH, Seo TB, et al. Peripheral nerve regeneration within an asymmetrically porous PLGA/Pluronic F127 nerve guide conduit. *Biomaterials* 2008; 29(11): 1601-9.
10. Liu B, Cai SX, Ma KW, Xu ZL, Dai XZ, Yang L, et al. Fabrication of a PLGA-collagen peripheral nerve scaffold and investigation of its sustained release property in vitro. *J Mater Sci Mater Med* 2008; 19(3): 1127-32.
11. Schnell E, Klinkhammer K, Balzer S, Brook G, Klee D, Dalton PV. Guidance of glial cell migration and axonal growth on electrospun nanofibers of poly-epsilon-caprolactone and a collagen/poly-epsilon-caprolactone blend. *Biomaterials* 2007; 28(19): 3012-25.
12. Kim SW, Bae HK, Nam HS, Chung DJ, Choung PH. Peripheral nerve regeneration through nerve conduit composed of alginate-collagen-chitosan. *Macromol* 2006; 14(1):94-100.
13. Waitayawinyu T, Parisi DM, Miller B, Luria S, Morton HJ, Chin SH, et al. A comparison of polyglycolic acid versus type 1 collagen bioabsorbable nerve conduits in a rat model: an alternative to autografting. *J Hand Surg Am* 2007; 32(10):1521-9.
14. Chen MH, Chen PR, Hsieh ST, Huang JS, Lin FH. An in vivo study of tricalcium phosphate and glutaraldehyde crosslinking gelatin conduits in peripheral nerve repair. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater* 2006; 77(1):89-97.
15. Chen YS, Chang JY, Cheng CY, Tsai FJ, Yao CH, Liu BS. An in vivo evaluation of a biode-

را با استفاده از TEM سنجیده و در محدوده ۸۰-۲۰ nm گزارش کردند که تاییدی بر نتیجه ی به دست آمده از این تست می باشد.

در تصاویر تهیه شده از کانال ها با استفاده از میکروسکوپ الکترونی روبشی مشاهده شد که کانال های ساخته شده دارای تخلخل با حفره های هم اندازه هستند. همچنین بسیاری از حفرات با هم در ارتباط بوده و امکان مهاجرت سلول ها به فضای داخلی ساختار را فراهم می کنند. همچنین توزیع ساختارمتخلخل در کانال با سطح یکنواخت و درصد تخلخل ۶۸/۳۱ تا ۷۳/۸۹ با اندازه منافذ در حدود ۳۰ تا ۷۰ میکرومتر نشان داد. نوژه دهیان و همکارانش (۳۰) نیز در تحقیقات خود سایز تخلخل ها را از ۱۰۰-۱۳ میکرومتر گزارش کردند و نشان دادند که حفرات به هم مرتبط هستند، همچنین چانگ و همکارش (۳۱) در تحقیقات خود تخلخل کانال را ۶۸ تا ۷۴٪ محاسبه کردند که این نیز نتایج حاصل از این کار را تایید می کند.

برای بررسی میزان سمیت کانال ها از دو آزمایش برون تنی استفاده شد. یکی از آنها مجاورت کانال با سلول های تخمدان همستر چینی و بررسی میزان زنده ماندن سلولها و دیگری بررسی تست MTT بروی کانال بود. این دو تست به منظور اطمینان از عدم سمیت کانال انجام گردید. در تحقیقاتی که ریبرو و همکارانش (۳۲) و وانگ و همکارانش (۳۳) انجام دادند، دیده شد که سلول قادر به رشد درون کانال هدایت عصبی است و کانال باعث از بین رفتن سلول ها در محیط کشت نشده است. همان طور که مشاهده شد در این پروژه سلول های تخمدان همستر چینی قادر به رشد درون کانال بوده و این حاکی از عدم سمیت کانال های سنتز شده است. یانتوا و همکارانش نیز از آزمون MTT برای ارزیابی زیست سازگاری و سمیت سلولی شیشه زیستی استفاده کردند، نتایج مطالعه آنها نشان داد که کامپوزیت نانو شیشه زیستی فقط یک سمیت سلولی خفیف دارد لیکن در درون بدن سازگار بودند (۳۴).

نتیجه نهایی:

با توجه به خصوصیات لازمه کانال سنتز شده و نتایج بدست آمده، کانال شیشه زیستی / ژلاتین به عنوان کانال هدایت عصبی جدید، کاندیدای مناسبی برای رشد آکسون و بازسازی عصب محیطی میباشد.

- gradable genipin-cross-linked gelatin peripheral nerve guide conduit material. *Biomaterials* 2005; 26(18):3911-8.
16. Cooperman L, Michaeli D. The immunogenicity of injectable collagen. I. A 1-year prospective study. *J Am Acad Dermatol* 1984; 10(4): 638-46.
 17. Kroschwitz J. *Encyclopedia of polymer science and engineering*. Vol 9. New York : John Wiley & Sons, 1987.
 18. Bunting S, Silvio ID, Deb S, Hall S. Bioresorbable glass fibres facilitate peripheral nerve regeneration. *J Hand Surg Am* 2005;30(3): 242-7.
 19. Albert E. Einige operationen a nerven. *Wien Med Presse* 1967; 22(17): 950-1.
 20. Millesi H. Nerve transplantation for reconstruction of peripheral nerves injured by the use of the microsurgical technic. *Minerva Chir* 1967; 22: 950-951.
 21. Hafezi F, Hosseinnejad F, Imani Fooladi AA, Mohit Mafi S, Amiri A, Nourani MR. Transplantation of nano-bioglass/gelatin scaffold in a non autogenous setting for bone regeneration in a rabbit ulna. *J Mater Sci Mater Med* 2012; 23(11): 2783-92.
 22. Bian YZ, Wang Y, Aibaidoula G, Chen GQ, Wu Q. Evaluation of poly (3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyhexanoate) conduits for peripheral nerve regeneration. *Biomaterials* 2009; 30(2): 217-225.
 23. Mozafari M, Rabiee M, Azami M, Maleknia S, Moztarzadeh Z, Nezafati N. Development of macroporous nanocomposite scaffolds of gelatin/bioactive glass prepared through layer solvent casting combined with lamination technique for bone tissue engineering. *Ceramics Int* 2010; 36: 2431-2439.
 24. Mozafari M, Rabiee M, Azami M, Malekni S. Biomimetic formation of apatite on the surface of porous gelatin/bioactive glass nanocomposite scaffolds. *J Appl Surf Sci* 2010; 257(5): 1740-9.
 25. Hench LL. The story of bioglass. *J Mater Sci Mater Med* 2005; 17(11): 967-978.
 26. Jones JR, Ehrenfried LM, Hench LL. Optimising bioactive glass scaffolds for bone tissue engineering. *Biomaterials* 2006; 27(7): 964-973.
 27. Azami M, Moztarzadeh F, Tahriri M. Preparation, characterization and mechanical properties of controlled porous gelatin/hydroxyapatite nanocomposite through layer solvent casting-combined with freeze-drying and lamination techniques. *J Porous Mater* 2010; 17: 313-20.
 28. Saravanapavan P, Jones JR, Pryce RS, Hench LL. Bioactivity of gel-glass powders in the CaO-SiO₂ system: a comparison with ternary (CaO-P₂O₅-SiO₂) and quaternary glasses (SiO₂-CaO-P₂O₅-Na₂O). *J Biomed Mater Res A* 2003; 66(1):110-9.
 29. Mortazavi V, Nahrkhalaji MM, Fathi MH, Mousavi SB, Esfahani BN. Antibacterial effects of sol-gel-derived bioactive glass nanoparticle on aerobic bacteria. *J Biomed Mater Res A* 2010; 94(1): 160-8.
 30. Nojehdehian H, Moztarzadeh F, Baharvand H, Nazarian H, Tahriri M. Preparation and surface characterization of poly-L-lysine-coated PLGA microsphere scaffolds containing retinoic acid for nerve tissue engineering: in vitro study. *Colloids Surf B Biointerfaces* 2009; 73(1): 23-9.
 31. Chang CJ, Hsu SH. The effect of high outflow permeability in asymmetric poly (DL-lactic acid-co-glycolic acid) conduits for peripheral nerve regeneration. *Biomaterials* 2006; 27(7): 035-1042.
 32. Ribeiro-Resende VT, Koenig B, Nichterwitz S, Oberhoffner S, Schlosshauer B. Strategies for inducing the formation of bands of Bungner in peripheral nerve regeneration. *Biomaterials* 2009; 30(29): 5251-9.
 33. Wang S, Yaszemski MJ, Knight AM, Gruetzmacher JA, Windebank AJ, Lu L. Photocrosslinked poly(epsilon-caprolactone fumarate) networks for guided peripheral nerve regeneration: material properties and preliminary biological evaluations. *Acta Biomater* 2009; 5(5): 42-1531.
 34. Jantova S, Theiszova M, Matejov P, Bakos D. Biocompatibility and cytotoxicity of bioglass-ceramic composite with various P₂O₅ content in Li₂O-SiO₂-CaO-CaF₂-P₂O₅ system on fibroblast cell lines. *Acta Chimica Slovaca* 2011; 4(1): 15-30.

*Original Article***Fabrication and Optimization of Gelatin/ Nano Bioglass Conduits for Peripheral Nerve Regeneration**

M. Foroutan Koudehi, M.Sc.^{*}; F. Ghanezadeh, M.Sc.^{**}; A. Amiri, Ph.D.^{***}
A.A. Imani Fooladi, Ph.D.^{****}; M.R. Nourani, Ph.D.^{*****}

Received: 23.11.2013

Accepted: 20.5.2014

Abstract

Introduction & Objective: Peripheral nerve injury is common in trauma patients and 4.5% of all soft-tissue injuries are accompanied by defects of peripheral nerve. Peripheral nerve injuries can lead to lifetime loss of function and permanent disfigurement. Designed conduits comprised of natural and synthetic materials are now widely used in the construction of damaged tissues. The aim of this project was to prepare nanocomposite conduits from gelatin and bioglass for damaged peripheral nerve reconstruction.

Materials & Methods: In this experimental study, compound water solution of gelatin and nano bioglass synthesized through sol gel method, was made. After preparing the solution, special mandrels were dipped in solution several times and freeze dried in order to be emptied of water via sublimation. The conduits had the following dimensions: internal diameter: 1.6 mm, outside diameter: 2.2 mm and length about 12 mm. In order to evaluate the biocompatibility of conduits we used cytotoxicity test by Chinese ovary cells and MTT assay by Miapaca-2 (pancreatic cancer cell line).

Results: The prepared nano bioglass and conduits were characterized using transmission electron microscopy, scanning electron microscopy, fourier transformed infrared spectroscopy and X-ray diffraction. Results of biocompatibility test showed no sign of cytotoxicity and cells were found to be attached to the pore walls offered by the conduits.

Conclusion: According to the results, nano bioglass conduits could be a good candidate for peripheral nerve regeneration.

(*Sci J Hamadan Univ Med Sci 2014; 21 (2):152-160*)

Keywords: Gelatin / Nano Bioglass / Peripheral Nerves / Tissue Engineering

* M.Sc. Chemical Injury Research Center

Baqiyatallah University of Medical Sciences, Tehran, Iran.

** M.Sc. in Biochemistry, Sciences & Research Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran.

*** Professor of Chemistry, Central Tehran Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran.

**** Associate Professor, Applied Microbiology Research Center

Baqiyatallah University of Medical Sciences, Tehran, Iran.

***** Associate Professor, Nano Biotechnology Research Center

Baqiyatallah University of Medical Sciences, Tehran, Iran. (r.nourani@yahoo.com)