

ساخت نانوکامپوزیت فیبروئین ابریشم حاوی یون مس برای القای رگ‌زایی توسط سلول‌های اندوتلیال

زهرا افضلی^۱، Ph.D.، اکبر کارخانه^۱، Ph.D.، فاطمه متقی‌طلب^۲، Ph.D.، مهدی فرخی^{۳*} Ph.D.

- ۱- دانشگاه صنعتی امیرکبیر، دانشکده مهندسی پزشکی، گروه بیومتریال، تهران، ایران
- ۲- دانشگاه علوم پزشکی تهران، دانشکده داروسازی، مرکز تحقیقات نانو تکنولوژی، تهران، ایران
- ۳- بانک سلولی، انستیتو پاستور ایران، تهران، ایران

* پست الکترونیک نویسنده مسئول: fmottaghtalab@sina.tums.ac.ir، m_farokhi@pasteur.ac.ir

تاریخ پذیرش: ۱۴۰۰/۸/۱۱

تاریخ دریافت: ۱۴۰۰/۳/۱۰

چکیده

هدف: هدف از پژوهش حاضر ساخت نانوکامپوزیت فریزدرای بر پایه‌ی ابریشم و نانوذرات ابریشم حاوی مس برای ره‌ایش کنترل شده‌ی یون مس برای بهبود رگ‌زایی می‌باشد.

مواد و روش‌ها: در این پژوهش، از داربست نانوکامپوزیتی فیبروئین ابریشم حاوی یون مس برای تحریک رگ‌زایی توسط سلول اندوتلیال استفاده شد. ابتدا مقادیر مشخص مس سولفات به‌محلول فیبروئین افزوده شده و با روش حلال‌پوشی نانوذرات حاوی مس ساخته شدند. سپس با استفاده از روش خشک کن انجمادی، داربست‌های ابریشم حاوی نانوذرات ساخته شدند. اندازه و بار سطحی نانوذرات با استفاده از آزمون dynamic light scattering (DLS)، مورفولوژی داربست و نانوذرات با آزمون scanning electron microscopy (SEM) ترکیب شیمیایی نانوذرات با آزمون fourier transform infrared spectroscopy (FTIR)، اندازه‌گیری ره‌ایش یون مس با آزمون atomic absorption spectroscopy (AAS) و مطالعات سلولی با آزمون‌های MTT و SEM مورد بررسی قرار گرفتند.

نتایج: با افزودن غلظت‌های مختلف یون مس، اندازه‌ی نانوذرات از ۱۲۸ نانومتر به ۱۸۵، ۲۲۰ و ۲۸۲ تغییر کرد. هم‌چنین، با استفاده از داربست‌های تهیه شده، میزان تکثیر و حیات سلول‌های اندوتلیال HUVEC تا ۱۴۰ درصد نسبت به نمونه‌ی کنترل افزایش پیدا کرد.

نتیجه‌گیری: نتایج حاصل از این مطالعه بیان‌گر تاثیر مثبت استفاده از یون مس بارگذاری شده در نانوذرات ابریشم برای القای رشد سلول‌های اندوتلیال و متعاقباً رگ‌زایی می‌باشند.

واژگان کلیدی: فیبروئین ابریشم، یون مس، نانوذره، رگ‌زایی، سلول‌های اندوتلیال

مقدمه

از جمله چالش‌های اصلی برای ترمیم زخم و بازسازی بافت‌ها تشکیل عروق خونی برای رسانش مواد مغذی و دفع مواد زائد در محل است (۱). رگ‌زایی در مهندسی بافت از اهمیت زیادی برخوردار است. هومئوستاز هر بافت وابستگی اساسی به تامین مقادیر کافی اکسیژن و مواد غذایی به وسیله‌ی عروق خونی دارد. به دلیل محدودیت نفوذ اکسیژن، سلول‌ها باید حداکثر در فاصله‌ی ۱۰۰-۲۰۰ میکرومتری از عروق خونی قرار بگیرند تا بتوانند زنده بمانند و به درستی کار کنند، پس وجود شبکه‌ی عروق برای حیات بافت‌های تولیدی ضروری است. اما سازه‌های مهندسی بافت تاکنون موفق به ایجاد شبکه‌ی بهینه از عروق نشده‌اند. از آن‌جا که فاکتورهای رشد و سیگنال‌هایی که عمدتاً سبب القای رگ‌زایی می‌شوند از نظر اقتصادی و بازدهی با محدودیت‌های جدی مواجه‌اند، محققین به دنبال جایگزین مواد کارآمدتر برای آن‌ها هستند (۲، ۳). به نظر می‌رسد در حال حاضر بهترین و مقرون به صرفه‌ترین مواد برای القای رگ‌زایی یون‌های معدنی هستند که هم در دسترس‌اند و هم مکانیسم اثر آن‌ها تا حدی شناخته شده است (۴-۶). رگ‌زایی کارآمد، مستلزم آن است که عوامل رگ‌زایی با عوامل مشتق شده از ریز محیط اطراف از جمله یون‌های معدنی هم‌کاری داشته باشند. از میان انواع یون‌های ذکر شده نقش یون مس به صورت مستقیم و یا با واسطه از اهمیت زیادی برخوردار است. فاکتورهای رگ‌زایی معدنی مانند یون مس به علت قیمت پایین و پایداری بالا در کنار استفاده از پروتئین‌های نو ترکیب و راهکارهای ژنتیکی، در پزشکی بازساختی و مهندسی بافت مورد توجه قرار گرفته‌اند (۷، ۸). تاکنون روش‌های گوناگونی برای به کارگیری یون مس در رگ‌زایی به کار گرفته شده‌اند: استفاده‌ی مستقیم از نمک‌های حاوی مس، بارگذاری یون مس در انواع داربست‌های فلزی، داربست‌های سرامیکی (۸)، و داربست‌های پلیمری (۹) و یا استفاده از نانوذرات اکسید مس (۱۰). تاکنون مطالعات صورت گرفته در رساندن یون مس به سلول‌ها، محدود به استفاده‌ی مستقیم از نمک‌ها، استفاده از نانوذرات اکسید فلزی و استفاده از نمک یون در بسترهای سرامیکی و فلزی و پلیمری سنتتیک است. استفاده از به کارگیری نانوذرات پلیمری طبیعی برای رهایش یون مس کم‌تر مورد توجه قرار گرفته است. در این مطالعه، از نانوذرات ابریشم برای بارگذاری یون مس استفاده شده است. نانوذرات ابریشم از قابلیت‌های بی‌ظرفی برخوردار هستند که از آن‌جمله می‌توان به زیست سازگاری و نرخ زیست تخریب‌پذیری مناسب، ظرفیت بالای بارگذاری مولکول‌های زیستی مختلف، قابلیت اندوسیتوز به داخل سلول، رهایش کنترل شده بیومولکول و نیمه عمر بالا در سیستم گردش خون اشاره نمود (۱۱، ۱۲). علاوه بر طراحی و ساخت نانوذرات، استفاده از داربست ابریشم می‌تواند تأثیر به‌سزایی در میزان رگ‌زایی در شرایط درون‌تنی داشته باشد (۱۳). ابریشم به‌طور عمومی به‌عنوان پلیمر پروتئینی شناخته می‌شود که توسط کرم ابریشم، عنکبوت، کرم پنیر و یا حشرات ریسیده می‌شود. بیش از چند دهه است که به‌مقدار زیادی به‌عنوان ساختارهای زیست پزشکی مورد استفاده قرار می‌گیرد. هم‌چنین، استفاده از ابریشم در داربست‌هایی که به‌منظور مهندسی بافت ساخته می‌شوند بسیار مورد توجه قرار گرفته است. ابریشم به‌علت ریست سازگاری و زیست تخریب‌پذیری مناسب، تخلخل و اندازه منافذ قابل قبول، ایمنوژنیسیته پایین و استحکام مکانیکی بالا گزینه ایده آلی برای کاربردهای مهندسی بافت و دارورسانی به‌شمار می‌رود (۱۳). ثابت شده است که افزودن فاکتورهای رگ‌زایی به‌سازه‌ی مهندسی بافت شده می‌تواند رگ‌زایی آن را پس از کاشت افزایش دهد. فاکتورهای رگ‌زایی می‌تواند برای تحریک مراحل مختلف شکل‌گیری رگ مورد استفاده قرار گیرد تا رگ‌زایی در گرافت بافتی افزایش یابد. در مرحله اول، تشکیل عروق جدید می‌تواند توسط عوامل رشد، مانند فاکتور رشد اندوتلیال عروقی (Vascular endothelial growth factor; VEGF) و فاکتور رشد فیبروبلاست پایه (b-fibroblast growth factor; bFGF) افزایش یابد زیرا باعث تحریک حرکت و به‌کارگیری سلول‌های پیش‌ساز اندوتلیال و در نتیجه سرعت بخشیدن به شروع رگ‌زایی می‌شود (۱۵).

(۱۶). اگرچه استفاده از این فاکتورهای رشد به طور کلی باعث افزایش رگ‌زایی می‌شود، اما عروق به دست آمده اغلب سازمان‌دهی نشده، نشت کننده و دارای خون‌ریزی هستند. علاوه بر این، دوز فاکتور رشد باید شدیداً کنترل شود زیرا مقادیر بیش از حد VEGF نشان داده شده است که باعث نشت شدید عروق و افت فشار خون می‌شود (۱۴). علاوه بر استفاده از فاکتورهایی که به طور مستقیم تشکیل یا بلوغ عروق را تحریک می‌کند، روش‌های غیرمستقیم دیگری نیز مطالعه شده است، شامل رهایش عواملی مانند sonic hedgehog homolog; SHH (۱۵)، فاکتور الفا هیپوکسی ۱ (Hypoxia-inducible factor 1; HIF-1) (۱۶) و پروتئین مورفوژنیک استخوان (Bone morphogenetic protein; BMP) (۱۷) همه‌ی این‌ها سلول‌های نزدیک به محل رگ‌زایی را تحریک می‌کنند تا فاکتورهای رگ‌زایی تولید کنند.

در این پژوهش، پس از ساخت نانو کامپوزیت ابریشم حاوی یون مس و ارزیابی فیزیکی و شیمیایی داربست، توانایی آن در رهایش بهینه مس و متعاقباً تاثیر آن در تکثیر و مهاجرت سلول‌های اندوتلیال مورد بررسی قرار گرفت. علاوه بر آن، تاثیر مس رهایش یافته از نانو کامپوزیت ابریشم در القای رگ‌زایی تحت ارزیابی قرار گرفت.

مواد و روش‌ها

صمغ‌زدایی از ابریشم: اولین مرحله‌ی تهیه‌ی فیبروئین ابریشم، جدا کردن پوشش پروتئین سربسین یا به اصطلاح صمغ‌زدایی از ابریشم است. بدین منظور، پیل‌های ابریشم سالم (تهیه شده از دانشکده نساجی، دانشگاه گیلان) انتخاب، بریده و کرم از آن‌ها خارج شدند. ۵ گرم پیل به محلول ۰/۰۲ مولار Na_2CO_3 در حال جوش اضافه و به مدت ۳۰ دقیقه هم‌زده شدند. الیاف را از محلول خارج کرده و به مدت ۲۰ دقیقه ۳ بار با آب دیونیزه شست‌وشو داده شدند. برای اطمینان از خروج سربسین مراحل فوق مجدداً تکرار شدند. برای خروج آب، ابریشم به مدت ۲۴ ساعت در آن ۳۷ درجه سانتی‌گراد (Memmert, Germany) قرار داده شد. سپس، ابریشم صمغ‌زدایی به مدت ۴ ساعت در دمای ۶۰ درجه سانتی‌گراد در محلول ۹/۳ مولار لیتیوم برماید حل شد. محلول غلیظ و زرد رنگ به دست آمده به مدت ۷۲ ساعت در مقابل آب دیونیزه دیالیز شد (۱۱).

ساخت نانو ذرات فیبروئین ابریشم حاوی مس: برای ساخت نانو ذرات ابریشم حاوی یون مس، ابتدا مقدار مشخص از مس سولفات $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ (Carlo Erba Reagents, France) در ۷/۵ میلی‌لیتر آب دیونیزه حل شد و سپس به حجم برابر از محلول فیبروئین ۴ درصد اضافه و به مدت ۱۵ دقیقه روی استیرر قرار داده شد تا یکنواخت شود. محلول فیبروئین-مس با نسبت ۳۰ به ۷۰ قطره قطره به استون خالص (Merck, Germany) که بر روی استیرر با دور بسیار کم قرار داشت اضافه شد. مخلوط کدر رنگ حاوی ذرات به مدت ۱۰ دقیقه با دور ۲۳۰۰۰ سانتریفیوژ (5810, eppendorf, USA) شد. برای شست‌وشوی سوپرناتانت، مخلوط مجدداً با دور ۱۳۴۰۰ به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفیوژ شد. سپس، محلول به دست آمده به مدت ۱ دقیقه با حالت ۱ ثانیه روشن و ۱ ثانیه خاموش با شدت ۲۵ درصد به وسیله اولتراسوند سونیکاتور پروبی (QSONICA, Germany) در معرض امواج صوتی قرار گرفت. مخلوط ابتدا در فریزر ۲۰- درجه سانتی‌گراد و سپس حداقل ۲۴ ساعت در فریزر ۷۰- درجه سانتی‌گراد قرار داده شد تا منجمد شود. به مدت ۲۴ ساعت در دستگاه خشک کن انجمادی (ALPHA1-2 LO, CHRiST, USA) قرار گرفت تا آب تصعید و پودر نانوذرات حاصل شود. سپس، اندازه ذرات و پتانسیل زتای نانوذرات با استفاده از دستگاه (3000, HS, Malvern, UK) اندازه‌گیری شد. مورفولوژی نانوذرات نیز با استفاده از FESEM (TESCAN MIRA3 LMV) مورد بررسی قرار گرفت. در نهایت، ساختار شیمیایی نانوذرات حاوی مس و فاقد مس توسط FTIR در مد عبوری در عدد موجی بین $400\text{-}1400\text{ cm}^{-1}$ انجام

گرفت. (FTIR 8400s, Shimadzu, Japan). بارگذاری مس در نانوذرات در مرحله‌ی ساخت انجام شد. مقدار ۲/۵، ۶/۴ و ۱۰/۲ میلی‌گرم سولفات مس به ۱۵ میلی‌لیتر محلول فیروئین ابریشم ۲ درصد اضافه و به مدت ۳۰ دقیقه روی استیرر هم‌زده شد. نانوذرات با استفاده از تکنیک اشاره شده ساخته و سانتیفریوژ شدند.

بررسی رهایش یون مس از نانوذرات در محیط برون تنی: برای بررسی رهایش یون مس از نانوذرات، ۱۰ میلی‌گرم از نانوذرات حاوی یون مس در ۱ میلی‌لیتر محیط کشت بدون سرم پراکنده و درون کیسه دیالیز ریخته شد. سپس کیسه دیالیز در شیشه‌ی کوچک حاوی ۲ میلی‌لیتر محیط کشت بدون سرم معلق شد و روی شیکر انکوباتور با دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد و دور ۶۰ rpm قرار گرفت. در فواصل زمانی ۱، ۳، ۶، ۱۲ ساعت و ۱-۱۴ روز کل محیط رهایش با محیط کشت جدید جایگزین شد. غلظت یون مس در نمونه‌های جمع‌آوری شده پس از رقیق کردن با نیتریک اسید و هیدروژن پراکساید با استفاده از اسپکتروسکوپی جذب اتمی (Shimadzu aa-6300, Japan) اندازه‌گیری و نمودار تجمعی رهایش یون مس در زمان رسم شد.

ساخت نانوکامپوزیت فیروئین ابریشم: ابتدا نانوذرات تحت امواج پروب سونیکاتور قرار گرفتند تا بتوانند به‌طور یک‌نواخت در داربست پراکنده شوند. ۲ میلی‌لیتر محلول فیروئین ۴ درصد در هرخانه‌ی پلیت ۲۴ خانه ریخته و نانوذرات به آن اضافه شدند و با دور پایین روی استیرر هم‌زده شدند. برای ساخت نانوکامپوزیت، محلول سونیکیت شده ابتدا به مدت یک شبانه روز در فریزر ۷۰- درجه سانتی‌گراد و سپس به دستگاه خشک‌کن انجمادی منتقل شد تا حلال تصعید شده و داربست نانوکامپوزیتی حاصل شود. سپس، مورفولوژی داربست با استفاده از FESEM مورد بررسی قرار گرفت.

بررسی نرخ تورم (جذب آب) داربست: برای محاسبه‌ی جذب آب، داربست در فواصل زمانی ۲۰ و ۶۰ دقیقه و ۱، ۲، ۴، ۶ ساعت در آب قرار گرفته و هر بار توزین شد و نمودار جذب آب بر حسب زمان رسم شد. میزان جذب آب بر اساس معادله زیر محاسبه شد:

$$\text{میزان جذب آب} = \frac{W_t - W_0}{W_0}$$

در رابطه‌ی بالا W_0 وزن داربست خشک و W_t وزن داربست در هر زمان است.

بررسی رهایش یون مس از داربست ابریشم در محیط برون تنی: ابتدا داربست حاوی ۱۰ میلی‌گرم از نانوذرات حاوی یون مس در شیشه‌ی کوچک حاوی ۲ میلی‌لیتر محیط کشت بدون سرم معلق شد. سیستم به شیکر انکوباتور با دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد و دور ۷۰ rpm منتقل شد. در فواصل زمانی ۱، ۳، ۶، ۱۲ ساعت و ۱-۱۴ روز کل محیط رهایش با محیط کشت جدید جایگزین شد. غلظت یون مس در نمونه‌های جمع‌آوری شده با استفاده از اسپکتروسکوپی جذب اتمی (Shimadzu aa-6300, Japan) اندازه‌گیری و نمودار تجمعی رهایش یون مس در زمان رسم می‌شد.

بررسی زیست‌سازگاری داربست: برای بررسی میزان زیست‌سازگاری داربست‌های ساخته شده، آزمون سمیت سلولی برای هر نمونه با استفاده از سلول‌های اندوتلیال HUVEC در روز ۱، ۳، ۷ و ۱۴ با ۶ بار تکرار انجام شد. فرایند عصاره‌گیری براساس استاندارد ایزو ۵-۱۰۹۹۳ انجام شد. شرایط محیط کشت عصاره‌گیری تا حد امکان مشابه بدن، دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد و pH خنثی بود. میزان محیط کشت عصاره‌گیری نسبت به داربست براساس محاسبات طبق استاندارد اشاره شده، ۲ میلی‌لیتر به‌ازای هر داربست تعیین شد. ابتدا ۵۰۰۰ سلول HUVEC درون هر خانه از پلیت کشت سلولی ۹۶ خانه ریخته شده و حجم نهایی با محیط کشت به ۱۰۰ میکرولیتر رسانده می‌شود. پلیت به مدت ۲۴ ساعت در انکوباتور ۳۷ درجه سانتی‌گراد قرار گرفت تا سلول‌ها به کف پلیت بچسبند. محیط کشت را خارج کرده و ۱۰۰ میکرولیتر از عصاره گرفته شده و یا رقت‌های آن از هر نمونه را به هر خانه افزوده

و سلول‌ها به مدت ۲۴ ساعت در مجاورت این عصاره‌ها قرار گرفتند. پس از آن عصاره خارج شده و ۱۰۰ میکرولیتر از محلول MTT به هر چاهک اضافه شد. پس از گذشت ۴ ساعت و تشکیل رسوب فورمازان، محلول روی سلول‌ها خارج شده و ایزوپروپانول به آن‌ها اضافه شد تا بلورهای بنفش رنگ ایجاد شده را حل کند. سپس مقدار غلظت ماده‌ی حل شده در ایزوپروپانول براساس OD جذب در طول موج ۵۴۵ نانومتر محاسبه شده و در نهایت میزان زنده‌مانی سلولی از رابطه زیر به دست می‌آید:

$$Cell\ viability\ (\%) = \frac{OD_s}{OD_c}$$

OD_s برابر میانگین چگالی نوری هر نمونه در زمان موردنظر و OD_c برابر میانگین چگالی نوری گروه کنترل است.

مورفولوژی و چسبندگی سلول بر روی داربست: برای بررسی مورفولوژی و چسبندگی سلول‌های کشت داده شده بر روی داربست، بایستی سلول‌ها روی سطح داربست تثبیت شوند تا بتوان با استفاده از میکروسکوپ الکترونی روبشی از آن‌ها تصویر تهیه کرد. برای تثبیت سلول‌ها روی داربست از محلول گلو تار آلدهید ۴ درصد استفاده شد. ابتدا حدود ۱۰۰۰۰۰ عدد از سلول‌های اندوتلیال را روی داربست ریخته و به مدت ۱ روز در انکوباتور با دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد قرار گرفتند. محیط کشت اطراف نمونه‌ها خارج و با محلول فسفات بافر سالین شست‌وشو داده شدند. سپس محلول گلو تار آلدهید ۴ درصد را بر روی داربست‌ها اضافه شد. پس از گذشت یک ساعت، محلول گلو تار آلدهید اطراف نمونه را خارج کرده و با گرادیان غلظتی از اتانول ۲۰ تا ۱۰۰ درصد هر کدام به مدت ۲۰ دقیقه شست‌وشو داده شدند. در انتها نمونه‌ها به مدت ۲ ساعت در زیر هود قرار گرفتند تا خشک شوند. پس از اطمینان از خشک شدن نمونه‌ها روی سطح آن‌ها را با لایه‌ای از طلا پوشانده و سپس با استفاده از میکروسکوپ الکترونی روبشی از آن‌ها تصویربرداری شد.

آنالیز آماری

بررسی‌های آماری با استفاده از نرم‌افزار Origin Pro و تست‌های One-Way ANOVA و Tukey انجام شد. سنجش سمیت سلولی با ۶ بار تکرار بود و تفاوت معنی‌دار نشان‌دهنده‌ی P-value کم‌تر از ۰/۰۵ است.

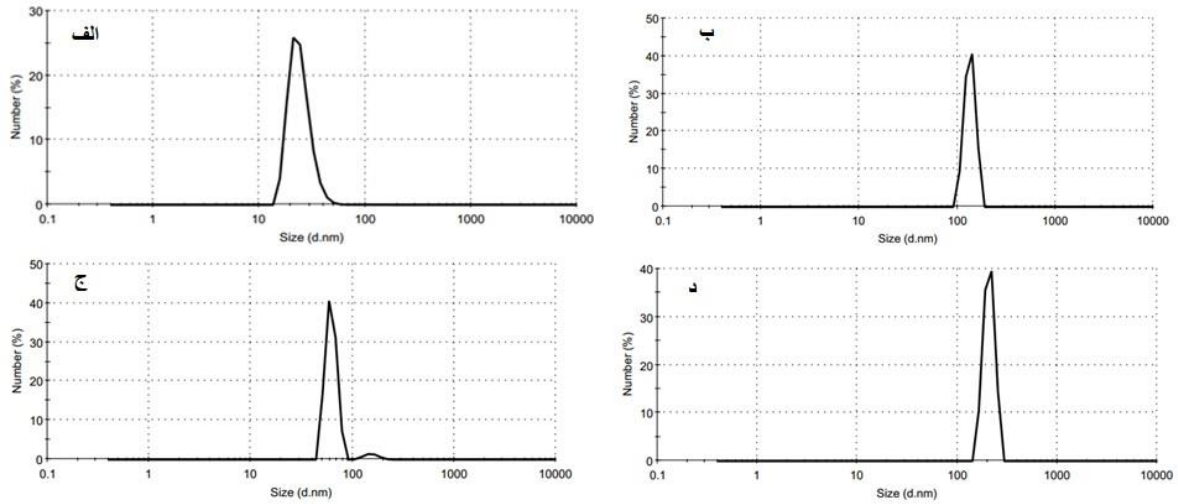
نتایج

بررسی بازده و بارگذاری نانوذرات

همان‌گونه که در قسمت روش‌ها توضیح داده شد، مقدار یون مس مورد استفاده برای نانوذرات به ترتیب ۲/۵، ۶/۴ و ۱۰/۲ میلی‌گرم بود. بر این اساس، بازده انکپسولاسیون یون مس در داخل نانوذرات ابریشم به ترتیب ۶۹/۶ درصد، ۸۹/۶ درصد و ۹۵/۵ درصد برای غلظت‌های ۲/۵، ۶/۴ و ۱۰/۲ میلی‌گرم محاسبه شد. براساس نتایج به دست آمده، با افزایش مقدار یون مس، بازده ساخت نانوذرات نیز افزایش پیدا کرده است. این پدیده به دلیل کوردیناسیون مس با زنجیره‌های فیبروئین و افزایش هسته‌گذاری و کم شدن نیروی دافعه‌ی بین زنجیره‌ها در حضور یون مس رخ می‌دهد. سوپرناتانت اول و سوپرناتانت شست‌وشوی نانوذرات برای محاسبه‌ی مقدار بارگذاری یون مس در هر نمونه، جدا شد و تحت آنالیز جذب اتمی قرار گرفت. به ترتیب ۰/۵۰۷، ۳/۲۷۲ و ۵/۷۹۶ میلی‌گرم مس در سوپرناتانت نانوذرات تعیین شد. با افزایش مقدار مس اولیه، بازده بارگذاری مس (EE%) از ۷۹/۷ درصد، ۴۸ درصد و ۴۳ درصد به ترتیب کاهش و ظرفیت بارگذاری (LC%) ۰/۹۴ درصد، ۱/۱ درصد و ۱/۵ درصد افزایش یافت.

بررسی اندازه و شاخص پراکندگی نانوذرات فیبروئین ابریشم

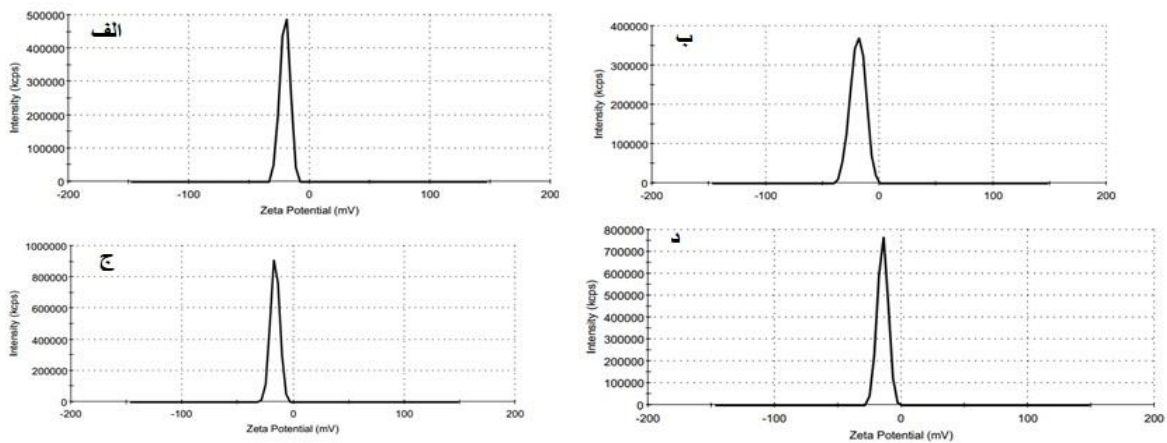
برای دستیابی به توزیع اندازه‌ی ذرات فیبروئین و اندازه‌ی ذرات فیبروئین حاوی مس، تست پراکندگی تفرق نور دینامیکی در ماده‌ی پراکنه‌ی آب در شرایط دمایی اتاق گرفته شد. نتایج مربوط به تست نانوذرات فیبروئین و ذرات فیبروئین حاوی ۲/۵، ۶/۴ و ۱۰/۲ مس به ترتیب در شکل ۱ آمده است.



شکل ۱: الف) نانوذرات فیبروئین، ب) نانوذرات فیبروئین حاوی ۲/۵ میلی گرم مس، ج) نانوذرات فیبروئین حاوی ۶/۴ میلی گرم مس، د) نانوذرات فیبروئین حاوی ۱۰/۲ میلی گرم مس.

بررسی پتانسیل زتای نانوذرات فیبروئین ابریشم

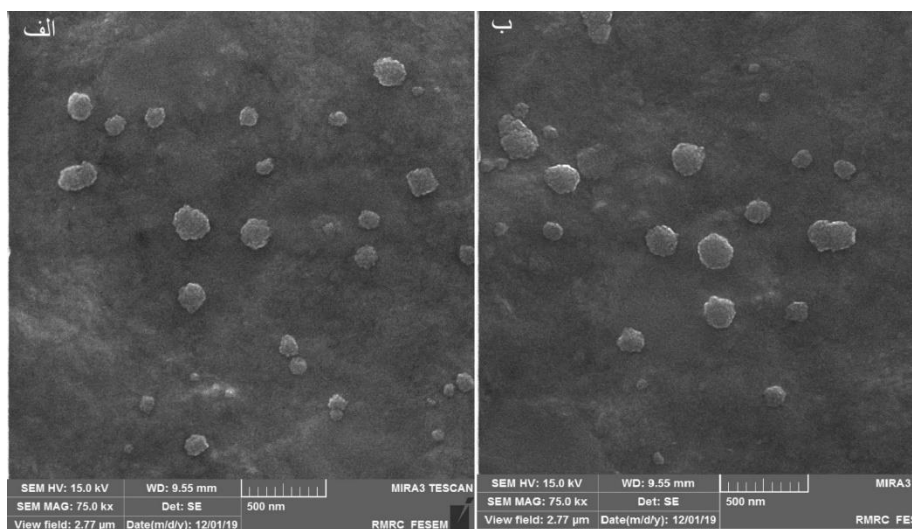
اندازه‌ی پتانسیل زتای نانوذرات فیبروئین ابریشم خالص در pH اسیدی (pH=4) تا pH بازی (pH=9) از ۲۶/۳- تا ۴۶/۰- میلی-ولت تغییر می‌کند. با توجه به آزمون پتانسیل زتا برای نانوذرات حاوی مس (شکل ۲)، با افزایش بارگذاری مس، پتانسیل زتا کاهش یافت و بار سطحی نانوذرات مثبت تر شد و از ۲۰- به ۱۴- افزایش پیدا کرد.



شکل ۲: الف) پتانسیل زتای نانوذرات فیبروئین، ب) پتانسیل زتای نانوذرات فیبروئین حاوی ۲/۵ میلی گرم مس، ج) پتانسیل زتای نانوذرات فیبروئین حاوی ۶/۴ میلی گرم مس، د) پتانسیل زتای نانوذرات فیبروئین حاوی ۱۰/۲ میلی گرم مس.

بررسی مورفولوژی نانوذرات فیبروئین ابریشم

تصاویر میکروسکوپ الکترونی روبشی از نانوذرات نشان‌دهنده‌ی کروی بودن ساختار نانوذرات است (شکل ۳). هیچ‌گونه تجمع خوشه‌ای در ذرات مشاهده نمی‌شود که می‌تواند به دلیل بار منفی روی سطح ذرات و در نتیجه دافعه‌ی میان آن‌ها باشد. این تصاویر اندازه ذره‌ای که از DLS به دست آمد را نیز تایید می‌کند.

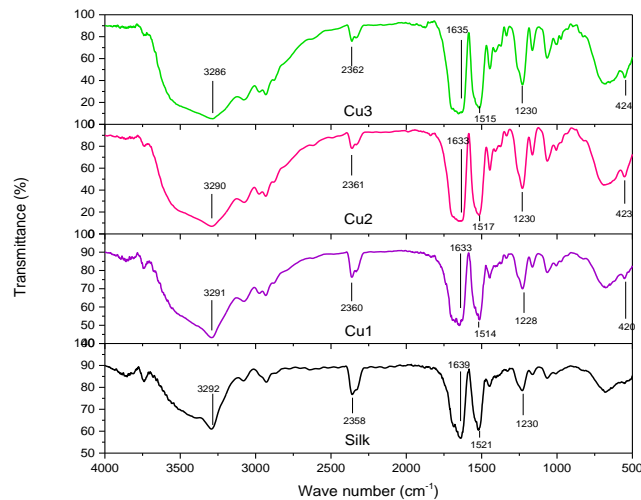


شکل ۳: الف) تصویر SEM نانوذره‌ی فیبروئین، ب) تصویر SEM نانوذره‌ی فیبروئین حاوی یون مس.

بررسی طیف‌سنجی مادنی قرمز (FTIR) نانوذرات

کاتیون‌های فلزی که به پروتئین‌ها متصل می‌شوند مانند آهن، روی، مس، کلسیم، منیزیم و منگنز سبب کاتالیز انتقال الکترون و پایدار شدن ساختار می‌شوند. همراهی یون فلزی و پروتئین از طریق برهم‌کنش‌های الکترواستاتیک و کوردیناسیون یون با آمینواسیدهای حاوی جایگاه اتصال یون صورت می‌پذیرد. برهم‌کنش یون و پلی‌پپتید بر انرژی تاخوردگی‌های پروتئین تاثیر می‌گذارد و آرایش فضایی آن را تنظیم می‌کند (۱۸). محدوده‌ی آمید II و آمید III در فیبروئین ابریشم با باندهای گروه جانبی اسیدآمینها تداخل ایجاد می‌کند و آنالیز تغییر کانفورماسیون پروتئین را سخت می‌کند، بنابراین برای تخمین ساختار دوم این پروتئین از ناحیه‌ی آمید I استفاده می‌شود. عدد موجی $1600-1700 \text{ cm}^{-1}$ محدوده مربوط به آمید I است که بیش‌تر تحت تاثیر ارتعاشات کششی پیوند $\text{O}=\text{C}$ می‌باشد و پیک 1645 cm^{-1} که در این بازه قرار دارد مربوط به خمش پیوند $\text{H}-\text{O}-\text{H}$ می‌باشد. محدوده آمید I حساس به ساختار ثانویه پروتئین است و برای بررسی‌های میزان ورقه‌های بتا و ساختار مارپیچی آلفا موجود در ساختار فیبروئین ابریشم تحلیل می‌شود. بازه‌ی $1480-1575 \text{ cm}^{-1}$ مربوط به آمید II است که حاصل خمش $\text{H}-\text{N}$ در صفحه و کشش $\text{N}-\text{C}$ می‌باشد. بازه‌ی مختص آمید III $1230-1330 \text{ cm}^{-1}$ است. محدوده‌ی $3250-3300 \text{ cm}^{-1}$ مربوط به آمید A می‌باشد که حاصل رزونانس آمید II با ارتعاشات کششی $\text{H}-\text{N}$ است (۱۹). برای آنالیز تغییرات جزئی در ساختار پروتئین می‌توان روی ناحیه‌ی آمید I دکانولوشن انجام داد. باندهای بین $1642, 1638, 1632, 1627, 1624$ همگی نشان‌دهنده‌ی ساختار بتا

هستند. باندهای بین ۱۶۸۸، ۱۶۸۰، ۱۶۷۲، ۱۶۶۶ مربوط به ساختار پیچ بتا هستند. باند ۱۶۶۵، ۱۶۵۴ به ساختار مارپیچ آلفا مربوط هستند (۲۰). نتایج حاصل از طیف‌سنجی مادون قرمز در شکل ۴ نشان داده شده است.



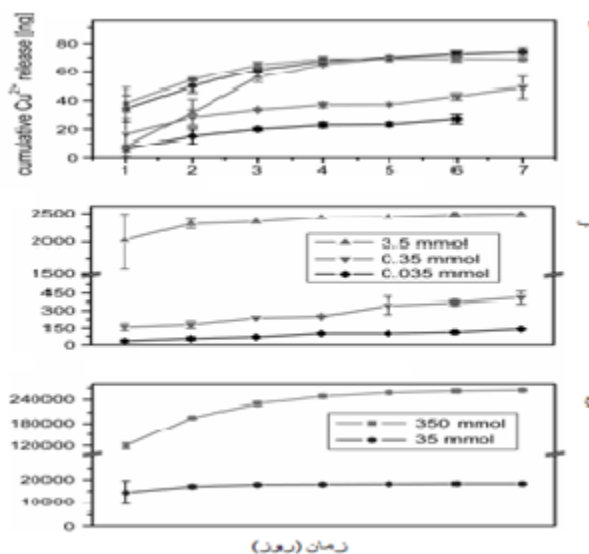
شکل ۴: طیف‌سنجی مادون قرمز از داربست ابریشم در حضور و عدم حضور یون مس.

مقادیر مشخصی از مس می‌تواند در فیبروئین ابریشم تغییرات کانفورماسیون از Silk I به Silk II ایجاد کند. این تغییرات از مکانیسم تجمع وابسته به هسته‌گذاری تبعیت می‌کنند. مس اثر حیاتی روی تا خوردن و باز شدن بسیاری از پپتیدها و پروتئین‌ها دارد. ایزوفرم سلولی پروتئین پرپون که توالی شبیه بعضی قسمت‌های فیبروئین ابریشم دارد، در حضور یون مس و pH ضعیف اسیدی از ساختار غنی از مارپیچ آلفا Silk I به ساختار غنی از صفحات بتا Silk II تغییر کانفورماسیون می‌دهد. احتمالاً مس با دو اسید آمینه هیستیدین در توالی AHGGYSGY پیوند می‌دهد و یک پل میان مولکولی تحت شرایط اسیدی ضعیف ایجاد و در نتیجه محتوی صفحات بتا را افزایش می‌دهد (۲۰). با توجه به طیف‌های FTIR در نمونه‌ی ابریشم بدون حضور مس پیک آمید III در 1230 cm^{-1} شدت کم‌تری دارد و پیک آمید I در 1680 cm^{-1} یک شانه دارد که نشان‌دهنده‌ی آرایش فضایی حدواسط مارپیچ تصادفی و صفحات بتا است. اضافه شدن مقدار مس سبب گسترده‌تر شدن باند آمید I در 1630 cm^{-1} و حذف شانه و تقویت پیک آمید III در 1230 cm^{-1} می‌شود (شکل ۴). این نشان‌دهنده‌ی تغییر کانفورماسیون از Silk I به Silk II و القای ساختار صفحات بتا است.

بررسی رهایش مس از داربست و نانوذرات فیبروئین

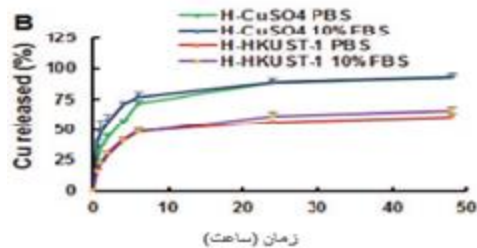
برهم‌کنش یون مس و هیستیدین فیبروئین ابریشم و هم‌چنین افزایش ساختار صفحات بتا القا شده به‌وسیله‌ی یون مس در ابریشم سبب کند شدن رهایش می‌شود. مدل‌های مختلفی برای اتصال مس به فیبروئین ابریشم پیشنهاد شده است مثل کوردیناسیون (2N2O)، (3N1O)، (2N1O1S). در دیدگاه مرسوم اتم نیتروژن از امیدآزول هیستیدین و اتم‌های نیتروژن و اکسیژن از گلايسين زنجیره‌ی اصلی محل اتصال یون مس را فراهم می‌کنند.

ایمیدآزول هیستیدین تمایل زیادی برای یون مس از خود نشان می‌دهد و می‌تواند از طریق ایجاد یک پل بین زنجیره‌ها اتصال برقرار کند (۲۱). برای داشتن رهایش مس در بازه‌ی مورد نیاز باید مقدار مس موجود در نمونه‌ها از میزان مس درگیر با فیبروئین بیشتر باشد. مقدار تئوری مس درگیر در پیوند در $pH=5.2$ با نسبت $0.76/1$ به 1 حدود $0.1/1$ میلی‌گرم است بنابراین با در نظر گرفتن این مقدار و مقدار مورد نیاز مس برای رگ‌زایی در ساخت نانوذرات از مقدار $2/5$ میلی‌گرم به بعد استفاده شد. با توجه به نمودار نانوذرات رهایش بسیار سریعی دارند که این به دلیل عدم استفاده از کراس‌لینکر و برهم‌کنش بالای میان نانوذرات و محیط کشت تحت دما و شیک است (شکل ۵).



شکل ۵: نمودار رهایش یون مس از نانوذرات در محیط فسفا بافر سالین (الف) و محیط کشت (ب و ج)

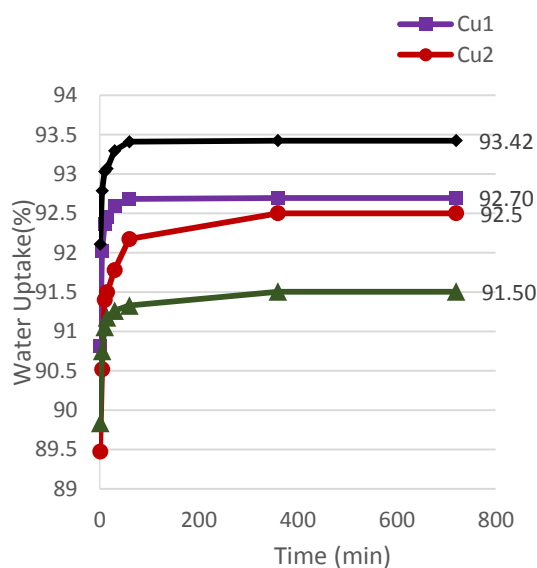
رهایش مس از نانوذرات سریع‌تر از رهایش از داربست بود. در طی ۲۴ ساعت، ۸۸ و ۸۹ درصد محتوی مس نانوذرات پلیمری در محیط رها شد در حالی که از بستار داربست حدود ۵۶ و ۶۱ درصد رهایش صورت گرفت (شکل ۶).



شکل ۶: مقایسه‌ی نمودار رهایش یون مس از نانوذرات و داربست. رهایش مس از نانوذرات سریع‌تر از رهایش از داربست است.

بررسی میزان جذب آب داربست

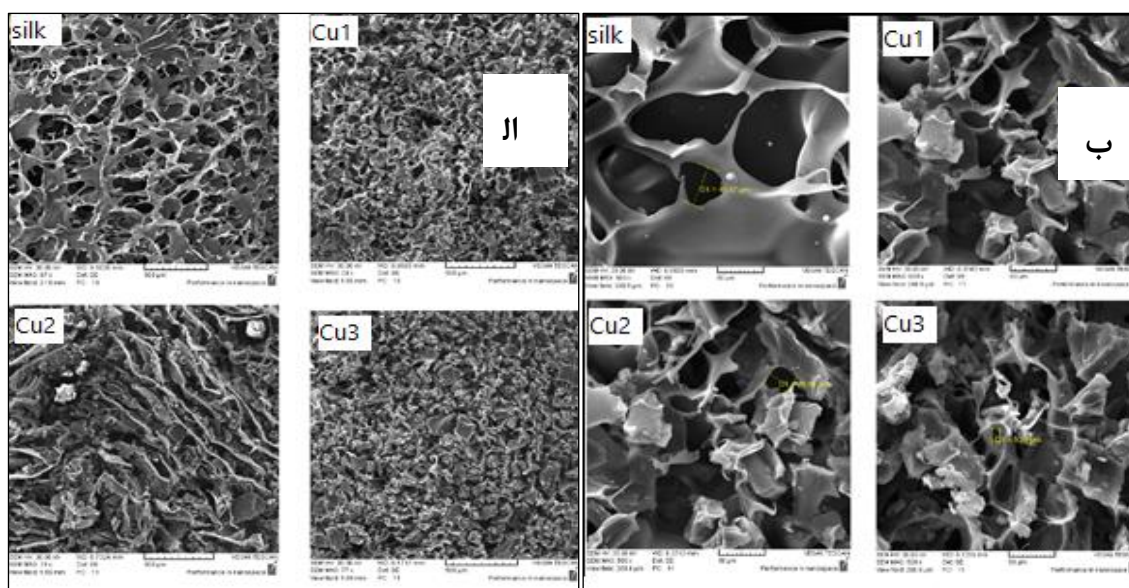
میزان جذب آب داربست‌ها یکی از فاکتورهای مهم و تاثیرگذار در بررسی داربست‌ها می‌باشد. همان‌طور که اشاره شد فیبروئین از بخش‌های آب‌دوست و آب‌گریز تشکیل شده است. میزان جذب آب فیبروئین وابسته به تعادل آب‌دوستی/آب‌گریزی، مقدار پیوند عرضی در ساختار فیبروئین و میزان یونیزه‌شدن شبکه می‌باشد. تحقیقات نشان داده که با افزایش غلظت فیبروئین در داربست میزان تورم کاهش پیدا می‌کند (۲۲). تمامی داربست‌ها در دقیقه‌ی اول قسمت عمده‌ی آب را جذب می‌کنند و در ساعت اول به‌اشباع می‌رسند که این به‌دلیل ماهیت فیزیکی شیمیایی آب‌دوست آن‌ها است. با افزایش یون مس جذب آب در نمونه‌ها کاهش می‌یابد. کاهش جذب آب می‌تواند مربوط به کاهش میزان تخلخل‌ها در داربست باشد (شکل ۷) (۲۳).



شکل ۷: نمودار جذب آب توسط داربست. با افزایش یون مس جذب آب در نمونه‌ها کاهش می‌یابد. کاهش جذب آب می‌تواند مربوط به کاهش میزان تخلخل‌ها در داربست باشد.

بررسی مورفولوژی داربست

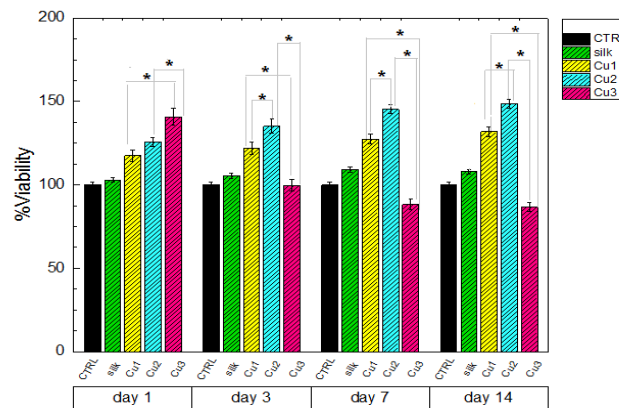
برای بررسی مورفولوژی داربست‌ها، تصاویر میکروسکوپ الکترونی در دو بزرگ‌نمایی تهیه شد. همان‌گونه که در شکل ۸ نشان داده شده است، داربست‌های ابریشم حاوی مقادیر متفاوت یون مس از تخلخل مناسبی برخوردار بوده و بدین سبب می‌توانند نقش موثری در چسبندگی، رشد و تکثیر سلول‌های اندوتلیال داشته باشند. در مطالعات قبلی نشان داده شده بود که تخلخل بالای داربست ابریشم می‌تواند در پراکندگی مناسب سلول‌ها در سطح و عمق داربست، پیش‌برد تمایز سلولی و افزایش تکثیر سلولی نقش داشته باشد. این‌درحالی است که تخلخل خیلی بالای داربست می‌تواند باعث کاهش چسبندگی سلولی در مقایسه با ساختارهایی باشد که میزان تخلخل مناسب‌تری دارند.



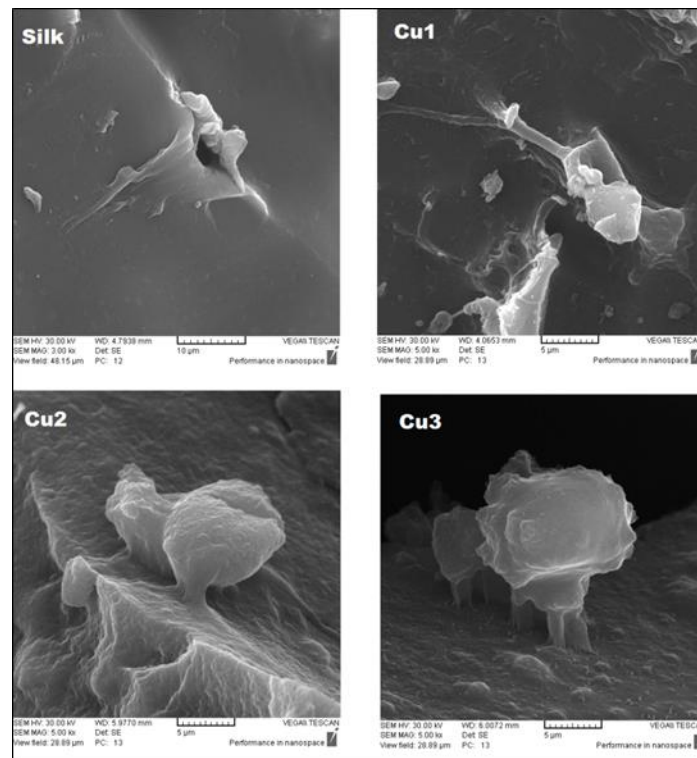
شکل ۸: الف) تصویر SEM داربست‌ها در بزرگ‌نمایی 77x، ب) تصویر SEM داربست‌ها در بزرگ‌نمایی 500x. داربست‌های ابریشم حاوی مقادیر متفاوت یون مس دارای ظاهری متخلخل بوده و نقش موثری در چسبندگی، رشد و تکثیر سلول‌های اندوتلیال داشته‌اند.

بررسی اثر یون مس بر رفتار سلول اندوتلیال با تست MTT

برای بررسی اثر یون مس بر رفتار تکثیر سلول اندوتلیال از سنجش غیرمستقیم MTT استفاده شد. شکل ۹ و ۱۰ نشان‌دهنده‌ی میزان تکثیر سلول‌های HUVEC در ۲۴ ساعت انکوبه شدن با عصاره‌ی ۱، ۳، ۷ و ۱۴ روز حاصل از داربست‌های ابریشم، Cu1، Cu2 و Cu3 است. در همه‌ی روزها نمونه‌ها به جز Cu3 نسبت به محیط‌کشت کنترل تکثیر سلولی بسیار بیشتری دارند. با توجه به شکل و طبق مطالعات آماری، در روز اول نمونه‌ی Cu1 و نمونه‌ی Cu3 و هم‌چنین نمونه‌ی Cu2 و Cu3 نسبت به هم تفاوت معنی‌دار دارند. این یعنی داربست Cu3 در روز اول سبب بهبود زنده‌مانی و تکثیر سلول‌ها نسبت به بقیه‌ی داربست‌ها شده و تاثیر یون مس بر تکثیر سلول‌ها مناسب است. در روز سوم افزایش غلظت مس نمونه‌ی Cu2 هنوز در محدوده‌ی کمک به‌رگزایی و تحریک سلول اندوتلیال قرار دارد و سبب بهبود تعداد سلول‌ها نسبت به فیبروئین می‌شود، اما نمونه‌ی Cu3 کمی غلظت بالاتر نسبت به محدوده‌ی مناسب رگزایی پیدا کرده است و سبب سمیت سلولی شده است. در روز هفتم با توجه به افزایش غلظت‌ها دوز مس Cu3 برای سلول‌ها نسبت به فیبروئین سمی می‌شود و نمونه‌های Cu1، Cu2 و Cu3 نسبت به هم اختلاف معنی‌داری دارند. با توجه به اتمام رهاپیش در حدود هفته‌ی اول، روز ۱۴ شرایط تقریباً مشابهی با روز ۷ دارد.



شکل ۹: زیست سازگاری داربست‌های ابریشم خام و حاوی غلظت‌های مختلف یون مس (* به معنای $P\text{-value} < 0.05$).



شکل ۱۰: تصویر میکروسکوپ الکترونی روبشی از چسبندگی سلول‌های HUVEC بر روی سطح داربست ابریشم.

بررسی چسبندگی سلول به داربست

تصویر میکروسکوپ الکترونی برای بررسی چسبندگی سلول به داربست گرفته شد. این تصاویر حاکی از چسبیدن سلول‌های اندوتلیال بر روی بسترهای ابریشم بوده به طوری که این سلول‌ها ضمن حفظ مورفولوژی خود به خوبی بر روی سطح بسترهای ذکر شده چسبیده‌اند (شکل ۱۰). همان‌گونه که در مطالعات قبلی که توسط ما و سایر گروه‌ها بر روی ابریشم انجام شد، دیده

شد که ابریشم از زیست سازگاری بالایی برخوردار بوده و تاثیر مثبتی در چسبندگی سلول‌های استئوبلاست (۲۴)، سلول‌های سینه (۲۵)، سلول‌های عصبی (۲۶) و سلول‌های ریه (۲۷) داشته است. در این مطالعات دیده شد که با بارگذاری سلول‌های فوق الذکر بر روی بستر ابریشمی، سلول‌های به‌درستی بر روی سطح داربست و نانوذرات ابریشمی چسبیده و با نرخ مناسبی تکثیر شده‌اند.

بحث

در این پژوهش از داربست فریزدرای بر پایه‌ی ابریشم و نانوذرات ابریشم حاوی مس برای رهایش کنترل شده‌ی یون مس برای بهبود رگ‌زایی در داربست‌ها استفاده شد. بر اساس نتایج به دست آمده دیده شد که با افزایش مقدار مس اولیه، کسر کم‌تری از آن در نانوذرات به‌دام می‌افتد و به‌حالت اشباعی نزدیک می‌شود که دیگر با افزایش مس نمی‌توان مقدار به‌دام انداختن آن در نانوذرات را بیش‌تر کرد. با افزایش مقدار مس اولیه، کسر وزنی مس در نانوذرات بیش‌تر می‌شود، یعنی در مقدار وزنی مساوی از هر نانوذره محتوی مس افزایش می‌یابد. در مطالعاتی که بر روی یون مس صورت گرفته، دیده شده که میزان اثر بخشی آن بر فعالیت‌های سلولی از جمله تحریک رگ‌زایی وابسته به غلظت می‌باشد. به‌عنوان مثال در مطالعه‌ی گزارش شده که القای بیان FGEV به یون مس حساس است. در غلظت‌های فیزیولوژیکی از سولفات مس، بیان FGEV توسط سلول‌های کراتینوسیت انسانی صورت می‌گیرد و احتمالاً از مسیرهای مربوط به هیپوکسی استفاده می‌کند. در این تحقیق، ۵۲ میکرولیتر از مس سولفات ۵۲ میکرومولار، روزانه به مدت ۵ روز در محل زخم ایجاد شده در یک گروه از موش‌ها تزریق شد. در این گروه، میزان بیان FGEV نسبت به نمونه‌ی کنترل ۲ و ۵ برابر افزایش پیدا کرد (۱۲). در مطالعه دیگری، تفاوت پاسخ بافت به داربست بیوسرامیکی سه بعدی حاوی FGEV و سولفات مس بررسی شد. به این صورت که یک حفره‌ی Y شکل به فاصله‌ی ۷ سانتی‌متر از سطح داربست ایجاد شده و غلظت‌های مختلف یون مس و FGEV در آن بارگذاری شده و رهایش یون مس در دو محیط SBP و محیط کشت اندازه‌گیری شد. نتایج این مطالعه نشان داد که رشد بافت زخم وابسته به مقدار سولفات مس است و در غلظت ۶۵ میلی گرم در هر داربست ماکزیمم رشد رخ می‌دهد (۲۸). در مطالعه حاضر نیز مشخص شد که با افزایش میزان یون مس بارگذاری شده در نانوذرات مس می‌توان به‌طور موثری باعث افزایش فعالیت سلول‌های اندوتلیال و متعاقباً القای رگ‌زایی شد.

باتوجه به نتایج حاصل از DLS، هرچه مقدار مس موجود در نانوذرات ابریشم بیش‌تر می‌شود، سایز نانوذرات از ۱۲۰ نانومتر به ۱۸۵، ۲۲۰ و ۲۸۲ نانومتر افزایش یافت زیرا یون مس با بار مثبت خود از بار منفی سطحی هسته‌های شبه مایسلی نانوذرات ابریشم کم می‌کند و بنابراین نیروی دافعه‌ی میان این شبه مایسل‌ها را کم می‌کند و موجب تجمع و تشکیل ذرات بزرگ می‌شود (۲۹). شاخص پراکندگی نمایان‌گر توزیع اندازه ذرات است و عددی بدون بعد است. در صورتی‌که این عدد بزرگ‌تر از ۰/۱ باشد، نانوذرات از هم‌گونی اندازه برخوردار نیستند و اگر شاخص پراکندگی از ۰/۱ کوچک‌تر باشد، توزیع اندازه‌ی نانوذرات به‌صورت هم‌گون است. به‌طور کلی هرچه این شاخص به‌صفر نزدیک‌تر باشد ذرات توزیع یکنواخت‌تری دارند. هرچه مقدار مس موجود افزایش یابد شاخص پراکندگی کم‌تر و به صفر نزدیک‌تر می‌شود. می‌توان گفت به‌دلیل این‌که با افزایش مقدار یون مس، بار سطحی شبه مایسل‌های تشکیل شده در اندازه‌های مختلف به صفر نزدیک‌تر می‌شود، دافعه‌ی میان آن‌ها کاهش یافته، به‌هم چسبیده و ذرات بزرگ آگلومره ایجاد می‌کنند و در نمونه بیش‌تر ذرات بزرگ آگلومره با اندازه‌ی نزدیک به هم یافت می‌شود (۲۴).

انتهای آمینی فیبروئین دارای مجموع بار منفی، انتهای کربوکسیلی دارای مجموع بار مثبت و بخش تکرار شونده دارای زنجیره های طولانی آب‌گریز و زنجیره‌های کوتاه آب‌دوست. زنجیره‌ی سبک تعادلی بین دوگانه دوستی و مقدار کمی بار منفی است. بر اساس شاخص PI زیرمجموعه‌ها، باید بار کلی نانوذرات منفی باشد (۳۰). هر قدر یون مس با بار مثبت بیشتر می‌شود از بار منفی زنجیره‌های ابریشم کم می‌کند و بنابراین ذرات بار منفی کم‌تری خواهند داشت. منفی ماندن پتانسیل زتا باتوجه به میزان کم یون مس در نمونه‌ها قابل قبول است.

طبیعی است که در تصاویر SEM به دلیل حذف لایه‌ی هیدرودینامیک اطراف ذرات، اندازه‌ی ذرات کمی کم‌تر از تست DLS باشد در مطالعه‌ای که قبلاً توسط ما انجام شد، دیده شد که نانوذرات ابریشمی که به روش انحلال‌زدایی تهیه می‌شوند، دارای ظاهری کروی با پراکندگی اندازه مناسب می‌باشند (۲۶، ۲۷). این نتیجه نشان دهنده است که مراحل تهیه نانوذره به این روش تاثیر منفی بر ساحتار ابریشم نداشته و نانو ذرات در شرایط بهینه تهیه می‌شوند. در مطالعات زیاد دیگری نیز استفاده از این روش برای تهیه نانوذرات ابریشم گزارش شده است که در اکثر موارد مناسب بودن روش مورد تایید قرار گرفته است.

مطالعات گوناگونی رهایش یون مس در محیط‌های رهایشی متفاوت را مقایسه کرده‌اند. در محیط رهایش فسفات بافر سالین، با وجود تفاوت در میزان مس موجود در نمونه‌ها رهایش یون مس از نمونه‌ها به هم نزدیک است و تنها کسر کوچکی از مقدار کل مس موجود در نمونه (حدود ۰/۰۳ درصد) را تا روز ۷ می‌تواند آزاد کند. این درحالی است که رهایش همین نمونه‌ها در محیط کشت بسیار زیاد است و در طول ۷ روز نزدیک به کل محتوی مس نمونه‌ها رها می‌شود. در مطالعه‌ای، از زخم‌پوش میکروالیافی از شیشه‌ی زیست فعال بوراتی دوپ شده با ۰ تا ۳ درصد وزنی CuO برای القای رگ‌زایی در محیط‌های برون‌تن و درون‌تن استفاده شد. نتایج این مطالعه نشان داد که الیاف وقتی در محیط شبیه‌سازی شده‌ی بدن قرار می‌گیرند تخریب می‌شوند و یون‌های کلسیم، بور و مس را رها می‌کنند و تبدیل به هیدروکسی آپاتیت می‌شوند. مطالعه‌ی برون‌تنی نشان‌دهنده عدم سمیت، تشویق مهاجرت، تشکیل توبول و رهایش VEGF سلول‌های HUVEC بود. مطالعه‌ی درون‌تنی حاکی از رگ‌زایی بیش‌تر توسط الیاف فیبری ۳ درصد وزنی CuO در ۷ و ۱۴ روز پس از جراحی بودند (۳۱). هم‌چنین دیده شد که در اثر رهایش یون مس بیان ژن در شبکه‌ی مویرگ مانند از سلول‌های اندوتلیال SVEC4-10 که در داربست کلاژنی حاوی میکروذرات شیشه‌ای بر پایه‌ی فسفات قرار داده شده‌اند افزایش می‌یابد (۳۲).

در مطالعات مختلفی نشان داده شده است که هر دو یون کوپرو و کوپریک مهاجرت سلول‌های اندوتلیال را القا می‌کنند. این قضیه مورد توجه است زیرا در بدن پاسخ اولیه به القای رگ‌زایی نیز جذب کموتاکسی و مهاجرت و حمله‌ی سلول‌های اندوتلیال به‌غشای پایه و ماتریس خارج سلولی است، بنابراین توانایی مس برای القای مهاجرت در سلول اندوتلیال باعث القای رگ‌زایی نیز می‌شود. در یک مطالعه، با قرار دادن یون مس در شیشه‌های پایه فسفاتی باعث تنظیم ترشح فاکتورهای رشد و سایتوکین‌های سلول در طی ترمیم زخم شدند (۳۳). گیرنده‌ی تیروزین کیناز اندوتلیال، گیرنده‌ی فاکتور رشد فیبروبلاست و اکتیوین شبه رسپتور کیناز پروتئین‌های گیرنده‌ی غشایی هستند که می‌توانند پایداری عروق را کنترل، ترشح پروتازها و فعال‌کننده‌ی پلاسمینوژن توسط سلول اندوتلیال را تحریک و بلوغ رگ توسط مسیر TGF بتا را تنظیم کنند. مس می‌تواند این گیرنده‌های اندوتلیالی را به‌طور مستقیم فعال کند. گیرنده‌های فعال شده مسیرهای سیگنالینگ مختلفی از جمله PI3K (phosphoinositide 3-kinase)/Akt که مربوط به تنظیم مهار آپوپتوزیس است را فعال و از مرگ سلول‌های اندوتلیال جلوگیری و از اندوتلیوم در برابر تحریک مرگ محافظت می‌کند (۳۴). هم‌چنین، افزایش غلظت یون مس باعث افزایش میل اتصال آنژیوژن به سلول‌های اندوتلیال شریان ریوی و اجزای خارج سلولی آن می‌شود. با وجود افزایش درک ارتباط بین

رگ‌زایی و یون مس، داده‌های اندکی در چگونگی نوسان سلول و هومئوستازی فلزی بافت در طول اجرای فرآیند رگ‌زایی در دست است (۳۵).

در مطالعه‌ای، با انجام آزمایشات بر روی سلول‌های توموری کبدی نشان داده شده که کلرید کلسیم به دلیل القای رونویسی از ژن سروپلاسمین سطح mRNA مربوط به VEGF را بالا می‌برد. القای بیان VEGF بسیار حساس به حضور مس است. زخم‌هایی که با سولفات مس تحت درمان قرار می‌گیرند افزایش سطح بیان VEGF را نشان داده و موجب تسریع بسته شدن زخم درم می‌شوند. در مطالعات انجام شده روی هایپرتروفی عضله قلبی نیز مشخص شده است که هایپرتروفی القا شده با یون مس به VEGF وابسته است، هم‌چنین مشخص شده یون مس توزیع گیرنده‌های VEGF بر روی سلول‌های عضله قلبی را مخدوش می‌کند و موجب مهار رشد سلول‌های عضله قلبی و هایپرتروفی آن می‌شود (۳۶).

نتیجه‌گیری

در این پژوهش، داربست مناسب بر پایه‌ی ابریشم و نانوذرات ابریشم برای رهایش کنترل شده‌ی یون مس برای بهبود رگ‌زایی طراحی شد. در مرحله‌ی نخست نانوذرات فیبروئین ابریشم حاوی مس با استفاده از روش حلال‌پوشی به‌وسیله‌ی استون ساخته شد و مشخصه‌یابی اندازه و بار نانوذرات و بررسی میکروسکوپ الکترونی روبشی بر روی آن‌ها انجام شد. در بهترین نمونه اندازه نانوذرات فیبروئین ابریشم محتوی مس در حدود ۱۸۹ نانومتر به‌دست آمد. تصاویر میکروسکوپ الکترونی روبشی حاکی از کروی بودن ذرات بود. سپس داربست‌ها با استفاده از روش خشک‌کن انجمادی ساخته شدند. نتایج به‌دست آمده حاکی از کنترل رهایش یون مس از داربست‌های در شرایط مختلف بود. هم‌چنین، مشخص شد که نانوکامپوزیت حاوی یون مس قادر است به‌طور موثری باعث افزایش رشد و تکثیر سلول‌های اندوتلیال و القای رگ‌زایی شود. با این حال، برای بررسی دقیق‌تر رفتار سلول‌های اندوتلیال در مجاورت داربست‌های تهیه شده به مطالعات درون‌تنی و ارزیابی‌های دقیق‌تر نیاز است.

تشکر و قدر دانی

بدین‌وسیله از حمایت‌های مالی و خدمات دانشگاه علوم پزشکی تهران و انستیتو پاستور ایران جهت انجام پروژه حاضر قدردانی به‌عمل می‌آید.

منابع

1. Eming SA, Brachvogel B, Odorisio T, Koch M. Regulation of angiogenesis: wound healing as a model. *Progress in histochemistry and cytochemistry*. 2007;42(3):115-70.
2. Rouwkema J, Khademhosseini A. Vascularization and angiogenesis in tissue engineering : beyond creating static networks. *Trends in biotechnology*. 2016;34(9):733-45.
3. Laschke M, Menger M. Vascularization in tissue engineering: angiogenesis versus inosculation. *European Surgical Research*. 2012;48(2):85-92.
4. Gu Y, Zhang J, Zhang X, Liang G , et al. Three-dimensional printed Mg-doped β -TCP bone tissue engineering scaffolds: effects of magnesium ion concentration on osteogenesis and angiogenesis in vitro. *Tissue engineering and regenerative medicine*. 2019;16(4):415-29.
5. Lee J-H, Parthiban P, Jin G-Z, Knowles JC, et al. Materials roles for promoting angiogenesis in tissue regeneration. *Progress in Materials Science*. 2020:100732.
6. Šalandová M, van Hengel IA, Apachitei I, Zadpoor AA, et al. Inorganic Agents for Enhanced Angiogenesis of Orthopedic Biomaterials. *Advanced Healthcare Materials*. 2021; 10(12): 2002254.

7. Gérard C, Bordeleau L-J, Barralet J, Doillon CJ. The stimulation of angiogenesis and collagen deposition by copper. *Biomaterials*. 2010;31(5):824-31.
8. Wu C, Zhou Y, Xu M, Han P, et al. Copper-containing mesoporous bioactive glass scaffolds with multifunctional properties of angiogenesis capacity, osteostimulation and antibacterial activity. *Biomaterials*. 2013;34(2):422-33.
9. Lu Y, Li L, Zhu Y, Wang X, et al. Multifunctional copper-containing carboxymethyl chitosan/alginate scaffolds for eradicating clinical bacterial infection and promoting bone formation. *ACS applied materials & interfaces*. 2018;10(1):127-38.
10. Sahmani S, Shahali M, Nejad MG, Khandan A, et al. Effect of copper oxide nanoparticles on electrical conductivity and cell viability of calcium phosphate scaffolds with improved mechanical strength for bone tissue engineering. *The European Physical Journal Plus*. 2019;134(1):1-11.
11. Rezaei F, Damoogh S, Reis RL, Kundu SC, et al. Dual drug delivery system based on pH-sensitive silk fibroin/alginate nanoparticles entrapped in PNIPAM hydrogel for treating severe infected burn wound. *Biofabrication*. 2020;13(1):015005.
12. Xu Z, Shi L, Yang M, Zhu L. Preparation and biomedical applications of silk fibroin-nanoparticles composites with enhanced properties-a review. *Materials Science and Engineering: C*. 2019;95:302-11.
13. Mehdizadeh H, Sumo S, Bayrak ES, Brey EM, et al. Three-dimensional modeling of angiogenesis in porous biomaterial scaffolds. *Biomaterials*. 2013;34(12):2875-87.
14. Farokhi M, Mottaghitlab F, Ai J, Shokrgozar MA. Sustained release of platelet-derived growth factor and vascular endothelial growth factor from silk/calcium phosphate/PLGA based nanocomposite scaffold. *International journal of pharmaceutics*. 2013;454(1):216-25.
15. Dohle E, Fuchs S, Kolbe M, Hofmann A, et al. Sonic hedgehog promotes angiogenesis and osteogenesis in a coculture system consisting of primary osteoblasts and outgrowth endothelial cells. *Tissue Engineering Part A*. 2010;16(4):1235-7.
16. Chen H, Jia P, Kang H, Zhang H, et al. Upregulating Hif-1 α by hydrogel nanofibrous scaffolds for rapidly recruiting angiogenesis relative cells in diabetic wound. *Advanced healthcare materials*. 2016;5(8):907-18.
17. Geng Y, Duan H, Xu L, Witman N, et al. BMP-2 and VEGF-A modRNAs in collagen scaffold synergistically drive bone repair through osteogenic and angiogenic pathways. *Communications Biology*. 2021;4(1):1-14.
18. Leal SS, Botelho HM, Gomes CM. Metal ions as modulators of protein conformation and misfolding in neurodegeneration. *Coordination Chemistry Reviews*. 2012;256(19-20):2253-70.
19. Garidel P, Schott H. Fourier-transform midinfrared spectroscopy for analysis and screening of liquid protein formulations: Part 1, Understanding infrared spectroscopy of proteins. *BioProcess Int*. 2006; 4(5):40-6.
20. Wang X, Li Y, Liu Q, Chen Q, et al. In vivo effects of metal ions on conformation and mechanical performance of silkworm silks. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects*. 2017;1861(3):567-76.
21. Zong X-H, Zhou P, Shao Z-Z, Chen S-M, et al. Effect of pH and copper (II) on the conformation transitions of silk fibroin based on EPR, NMR, and Raman spectroscopy. *Biochemistry*. 2004;43(38):11932-41.
22. Farokhi M, Mottaghitlab F, Reis RL, Ramakrishna S, et al. Functionalized silk fibroin nanofibers as drug carriers: Advantages and challenges. *Journal of Controlled Release*. 2020;321:324-47.
23. Barud HO, Barud HdS, Cavicchioli M, do Amaral TS, et al. Preparation and characterization of a bacterial cellulose/silk fibroin sponge scaffold for tissue regeneration. *Carbohydrate Polymers*. 2015;128:41-51.

24. Hassani Besheli N, Mottaghitalab F, Eslami M, Gholami M, et al. Sustainable release of vancomycin from silk fibroin nanoparticles for treating severe bone infection in rat tibia osteomyelitis model. *ACS applied materials & interfaces*. 2017;9(6):5128-38.
25. Norouzi P, Motasadizadeh H, Atyabi F, Dinarvand R, et al. Combination Therapy of Breast Cancer by Codelivery of Doxorubicin and Survivin siRNA Using Polyethylenimine Modified Silk Fibroin Nanoparticles. *ACS Biomaterials Science & Engineering*. 2021;7(3):1074-87.
26. Mottaghitalab F, Farokhi M, Zaminy A, Kokabi M, et al. A biosynthetic nerve guide conduit based on silk/SWNT/fibronectin nanocomposite for peripheral nerve regeneration. *PloS one*. 2013;8(9):e74417.
27. Mottaghitalab F, Kiani M, Farokhi M, Kundu SC, et al. Targeted delivery system based on gemcitabine-loaded silk fibroin nanoparticles for lung cancer therapy. *ACS applied materials & interfaces*. 2017;9(37):31600-11.
28. Barralet J, Gbureck U, Habibovic P, Vorndran E, et al. Angiogenesis in calcium phosphate scaffolds by inorganic copper ion release. *Tissue Engineering Part A*. 2009;15(7):1601-9.
29. He Z, Alexandridis P. Ionic liquid and nanoparticle hybrid systems: Emerging applications. *Advances in colloid and interface science*. 2017;244:54-70.
30. Lammel AS, Hu X, Park S-H, Kaplan DL, et al. Controlling silk fibroin particle features for drug delivery. *Biomaterials*. 2010;31(16):4583-91.
31. Zhao S, Li L, Wang H, Zhang Y, et al. Wound dressings composed of copper-doped borate bioactive glass microfibers stimulate angiogenesis and heal full-thickness skin defects in a rodent model. *Biomaterials*. 2015;53:379-91.
32. Stähli C, James-Bhasin M, Nazhat SN. Three-dimensional endothelial cell morphogenesis under controlled ion release from copper-doped phosphate glass. *Journal of Controlled Release*. 2015;200:222-32.
33. Bose S, Fielding G, Tarafder S, Bandyopadhyay A. Understanding of dopant-induced osteogenesis and angiogenesis in calcium phosphate ceramics. *Trends in biotechnology*. 2013;31(10):594-605.
34. Liu C, Fu X, Pan H, Wan P, et al. Biodegradable Mg-Cu alloys with enhanced osteogenesis, angiogenesis, and long-lasting antibacterial effects. *Scientific reports*. 2016;6(1):1-17.
35. D'Andrea LD, Romanelli A, Di Stasi R, Pedone C. Bioinorganic aspects of angiogenesis. *Dalton Transactions*. 2010;39(33):7625-36.
36. Urso E, Maffia M. Behind the link between copper and angiogenesis: established mechanisms and an overview on the role of vascular copper transport systems. *Journal of Vascular Research*. 2015;52(3):172-96.

Fabrication of silk fibroin nanocomposite containing ion copper for inducing angiogenesis by endothelial cells

Afzali Z¹ Ph.D., Karkhaneh A¹ Ph.D., Mottaghitalab F^{2*} Ph.D., Farokhi M^{3*} Ph.D.

1. Department of Biomaterials, Faculty of Medical Engineering, Amirkabir University of Technology, Tehran, Iran
2. Nanotechnology research centre, Faculty of Pharmacy, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, Iran
3. National Cell Bank of Iran, Pasteur Institute of Iran, Tehran, Iran

* Email corresponding author: fmottaghitalab@sina.tums.ac.ir, m_farokhi@pasteur.ac.ir

Received: 31 May. 2021

Accepted: 2 Nov. 2021

Abstract

Aim: The aim of this study was to prepare freeze-dried silk fibroin nanocomposite containing ion copper loaded silk fibroin nanoparticles to induce angiogenesis.

Material and Methods: Here, the silk fibroin nanocomposite scaffold containing ion copper was used to induce angiogenesis in endothelial cells. To prepare the silk fibroin nanoparticles containing ion copper, identified amounts of ion copper were added to the fibroin solution. Then, the nanoparticles were embedded in the freeze-dried silk fibroin scaffold. The size and zeta potential, morphology, and the chemical structure of the nanoparticles were measured by dynamic light scattering (DLS), scanning electron microscopy (SEM), and fourier transform infrared spectroscopy (FTIR). Moreover, the release of ion copper from the scaffold and the biocompatibility of the scaffold were evaluated by atomic absorption spectroscopy (AAS) and MTT assay.

Results: The obtained results showed that adding different concentrations of ion copper to fibroin nanoparticles increased the size of the nanoparticles from 128 nm to 185, 220, and 282 nm. Moreover, the growth and proliferation of HUVEC cells on nanocomposites was increased (140%) compared to the control.

Conclusion: It should be concluded that copper ion doped SFNPs could appropriately induce the proliferation of endothelial cells which consequently influence the angiogenesis.

Keywords: Silk fibroin, Copper ion, Nanoparticle, Angiogenesis, Endothelial cells