خون
فصلنامه پژوهشی
دوره ۱۵ شماره ۴ زمستان ۹۷ (۲۸۶-۲۷۲)

مقاله پژوهشی

# اثرات نانو ذرات شیشه زیست فعال 45S5 سنتزی بر رشد و تمایز سلول‌های بنیادی مزانشیمی مغز استخوان انسان به بافت استخوانی در محیط برون تن

*مهدی شمس[۱]، علی سلیمی[۲]، مرضیه قلاسی[۳]، راحله حلبیان[۴]*

## چکیده

### سابقه و هدف

**شیشه‌ها و شیشه – سرامیک‌ها، گروهی از مواد زیستی هستند که در برابر محلول شبیه‌سازی شده بدن، تشکیل هیدروکسی آپاتیت می‌دهند و در بسیاری از موارد بالینی که نیاز به تولید و ترمیم استخوان است، می‌توانند کاربرد داشته باشند. هدف از این پژوهش، ساخت نانوذرات شیشه زیست فعال ۴۵S۵ و بررسی تاثیر آن در رشد، تکثیر و تمایز سلول‌های بنیادی مزانشیمی به سلول‌های استخوانی بود.**

### مواد و روش‌ها

**در این پژوهش تجربی، شیشه زیست فعال ۴۵S۵ به روش ذوبی ساخته شده، با آسیاب سیاره‌ای به ساختار نانو تبدیل و سپس خواص فیزیکوشیمیایی و ساختاری آن بررسی گردید. ویژگی زیست فعالی آن با استفاده از محلول شبیه‌سازی شده بدن مورد ارزیابی قرار گرفت. قابلیت رشد، تکثیر و تمایز سلول‌های بنیادی مزانشیمی در مجاورت نانو ذرات بررسی گردید.**

### یافته‌ها

**ارزیابی شیشه زیست فعال ۴۵S۵، از تشکیل هیدروکسی آپاتیت بر روی نانوذرات پس از غوطه‌وری در مایع شبیه‌سازی شده بدن حکایت داشت. آزمایش‌های سلولی نیز، عدم سمیت نانو ذرات شیشه، رشد و تمایز سلول‌های مزانشیمی به سلول‌های استخوانی را تایید کرد. در تمایز استخوانی میزان فعالیت آلکالین فسفاتاز نانوذره شیشه پس از ۱۴ روز تمایز، ۰/۰۷ ± ۰/۵۵ بیان شد، در حالی که در نمونه کنترل، ۰/۰۳ ± ۰/۱۵ بود.**

### نتیجه گیری

**با توجه به نتایج می‌توان گفت که سلول‌های بنیادی مزانشیمی قابلیت تکثیر و رشد بر روی نانو ذرات شیشه زیست فعال ساخته شده را دارند و نانو ذره فوق علاوه بر آن که سمیت نداشته، بلکه باعث تحریک و القاء رشد سلول‌ها می‌شوند.**

***کلمات کلیدی:*** **نانوذره‌ها، سلول‌های بنیادی مزانشیمی، شیشه**

*تاریخ دریافت: ۹۷/۴/۱۳*
*تاریخ پذیرش: ۹۷/۶/۱۱*

۱- کارشناس ارشد نانوتکنولوژی ـ پژوهشکده نانوتکنولوژی و مواد پیشرفته پژوهشگاه مواد و انرژی ـ کرج ـ ایران
۲- دکترای نانوتکنولوژی ـ استادیار مرکز تحقیقات نانوتکنولوژی ـ دانشگاه علوم پزشکی بقیه‌اله(عج) ـ تهران ـ ایران
۳- دکترای بیوشیمی ـ استادیار گروه زیست‌شناسی سلولی مولکولی ـ دانشکده علوم زیست‌شناسی دانشگاه خوارزمی ـ تهران ـ ایران
۴- مؤلف مسئول: دکترای بیوتکنولوژی پزشکی ـ استادیار مرکز تحقیقات میکروب‌شناسی کاربردی ـ مؤسسه زیست‌شناسی و انستیتو مسمومیت‌ها ـ دانشگاه علوم پزشکی بقیه‌اله(عج) ـ تهران ـ ایران ـ صندوق پستی: ۴۴۷۱۱-۱۴۳۵۹



[ Downloaded from bloodjournal.ir on 2026-11-18 ]

**مقدمه**

برای ترمیم ضایعات و نقایص استخوانی می‌توان از امکانات مهندسی بافت بهره برد. در این ارتباط، با طراحی داربست مناسب و گذاشتن سلول‌های دارای پتانسیل تولید استخوان بر روی این داربست‌ها و سپس پیوند در محل ضایعه، می‌توان قابلیت ترمیم ضایعه را افزایش داد(۱). سرامیک‌های فسفات کلسیمی(از قبیل: شیشه و شیشه- سرامیک‌ها) به علت این که ساختاری مشابه با بخش غیر آلی ترکیب استخوان دارند، به عنوان داربست سلولی مورد استفاده قرار گرفته‌اند. این شیشه‌ها در برابر محلول شبیه‌سازی شده بدن تشکیل هیدروکسی کربنات آپاتیت می‌دهند و در بسیاری از موارد بالینی که نیاز به تولید و ترمیم استخوان است، می‌توانند کاربرد داشته باشند(۳، ۲). شیشه‌های زیستی هنگامی که در بدن قرار می‌گیرند، به راحتی با سیال‌های فیزیولوژیکی واکنش داده و تشکیل یک پیوند قوی با بافت‌های نرم و سخت در حین فعالیت سلولی می‌دهند(۴). اولین ترکیبی که بیشترین مطالعه‌ها بر روی آن انجام شده است، شیشه ۴۵S۵ ساخته شده به روش ذوبی می‌باشد که ترکیب آن بر حسب درصد وزنی اجزا شامل: ۴۵ درصد اکسید سیلسیم، ۲۴/۵ درصد اکسید سدیم، ۲۴/۴ درصد اکسید کلسیم و ۶ درصد پنتوکسید فسفر است(۵). شیشه‌های زیست فعال را می‌توان به دو روش ذوبی و سل ژل تهیه نمود(۷، ۶). ساخت شیشه ۴۵S۵ در مقیاس نانو بسیار دشوار است، استفاده از روش سل- ژل نیز برای ساخت این نوع شیشه، به دلیل وجود سدیم در ترکیب خود، امکان‌پذیر نیست چراکه سدیم باعث سمیت و مرگ سلولی می شود. بنابراین روش ذوبی برای ساخت این نوع نانوذره بهترین گزینه است، لازم به ذکر است روش ساخت ذوبی، باعث تولید ذرات با ساختار میکرو می‌شود.

سلول‌های بنیادی مزانشیمال سلول‌های بنیادی چند قوه‌ای بوده که دارای قدرت تکثیر و خود نوسازی بالا و هم چنین پتانسیل تمایز به رده‌های مختلف سلولی از جمله سلول‌های استئوبلاست، هندروسیت، آدیپوسیت، سلول‌های اندوتلیال، سلول‌های عصبی، سلول‌های میوسیت قلبی، سلول‌های هپاتوسیت و سلول‌های پانکراس می‌باشند(۱۱-۸).

کارآیی این سلول‌ها در درمان بیماری ژنتیکی استئوژنزیس امپرفکتا(Osteogensis Imperfecta)، بهبود خونسازی در بیماران سرطانی تحت درمان، بازسازی استخوان، ترمیم بافت نکروز شده در بیماران انفارکتوس قلبی و درمان بیماری‌های مفصلی به خوبی نشان داده شده است (۱۳، ۱۲). سه منبع اصلی برای جداسازی سلول‌های بنیادی مزانشیمی، برای مطالعه‌ها و درمان بیماری‌ها وجود دارد که می‌توان به مغز استخوان، بند ناف و بافت چربی اشاره کرد. سلول‌های بنیادی مشتق شده از مغز استخوان انسان مشابه مورفولوژی و فنوتیپ حاصل از بافت چربی هستند(۱۵، ۱۴).

محیط کشت مورد استفاده نیز عامل مهمی در توانایی تمایز استئوژنیک است. استفاده از محیط‌های پایه از قبیل؛ DMEM+ F, DMEM+ High, DMEM+ Low و افزودن فاکتورهای رشد فیبروبلاست، دگزامتازون، اسید اسکوربیک و گلیسرول فسفات به محیط پایه از عواملی هستند که تاثیر به سزایی در تمایز استخوانی دارند(۱۸-۱۶، ۱۴).

از موارد دیگری که بر تمایز سلول‌های بنیادی مزانشیمی تاثیر دارد؛ اتصال سلول به ماتریکس(داربست) خارج سلولی است. این ماتریکس(داربست) از مواد آلی و غیر آلی از قبیل کلاژن I و نمک‌های کلسیم به فرم شیشه زیست فعال، هیدروکسی آپاتیت، نمک‌های فلورید، فسفات و سیترات تشکیل یافته است(۲۰، ۱۹).

در تحقیقات صورت گرفته، شیشه زیست فعال را معمولاً به عنوان فاز دوم(تقویت‌کننده زیست فعال) در ساخت کامپوزیت‌ها و داربست‌ها استفاده کرده‌اند که تمامی این مطالعه‌ها، شیشه ۴۵S۵ را با ساختار میکرو مورد بررسی قرار داده‌اند(۲۷-۲۱). علاوه بر آن پژوهشی در زمینه تاثیر اندازه ذرات شیشه فوق‌الذکر با اندازه ذره ۹-۷۵۰ میکرومتر در رشد، تکثیر و تمایز سلول‌های بنیادی مورد بررسی قرار گرفته است. نتایج آن ثابت کرد که هرچه اندازه ذرات ریزتر باشد، تاثیر به سزایی در رشد و تمایز سلول‌ها خواهد داشت(۲۸).



[ Downloaded from bloodjournal.ir on 2026-11-18 ]

با توجه به مباحث شرح داده شده در مقدمه و اهمیت نانو مواد در تمایز سلول‌های بنیادی، هدف از این پژوهش، سنتز نانوذرات شیشه زیست فعال۴۵S۵ و بررسی خواص زیست فعالی و تاثیر آن در تکثیر و تمایز سلول‌های بنیادی مزانشیمی مغز استخوان انسان به سلول‌های استخوانی در محیط برون تن بود. با وجود آن که گزارش‌هایی مبنی بر ساخت شیشه‌های زیست فعال ۴۵S۵ و بررسی سلولی آن گزارش شده است، اما تاکنون گزارشی در مورد ساخت شیشه زیست فعال با این ترکیب و با استفاده از فرآیند آسیاب سیاره‌ای برای ساخت این شیشه در مقیاس نانو و بررسی تکثیر و تمایز سلول‌های بنیادی مزانشیمی بیان نشده است. بنابراین ما در این پژوهش سعی در ساخت نانو ذره شیشه فوق با استفاده از آسیاب سیاره کردیم و با چندین مرتبه آسیاب و انجام آزمایش‌های متعدد، اندازه ذرات را به مقیاس نانو رساندیم.

نتایج آزمایش‌ها ثابت کرد که با استفاده از آسیاب سیاره‌ای می‌توان ساختار نانویی این نوع شیشه را تولید کرد. استفاده از این نوع نانوذرات شیشه به واسطه افزایش نسبت سطح به حجم و یون های زیست فعال، سبب واکنش‌پذیری بهتر این نوع فاز در تکثیر و تمایز سلول‌ها خواهد شد. از مزیت‌ها و کاربرد نانوذرات تولید شده، می‌توان به حل مشکلات کار با داربست و استفاده آن در ارتوپدی‌ها و بیمارستان‌ها جهت بهبود درمان ضایعات استخوانی اشاره کرد.

## مواد و روش‌ها

*ساخت و مشخصه‌یابی نانو ذرات شیشه زیست فعال ۴۵ S۵:*

در این پژوهش تجربی، شیشه زیست فعال به روش ذوبی ساخت و مشخصه‌یابی شد. برای ساخت شیشه زیست فعال ۴۵S۵ ، ۲۲/۰۷ گرم $SiO_2$ و ۵/۸۸ گرم $P_2O_5$، ۲۱/۴۵ گرم $CaCO_3$ (مرک، آلمان) و در نهایت ۲۰/۶ گرم $NaCO_3$ (مرک، آلمان) با هم ترکیب و سپس توسط هاون عقیق، آسیاب گردید. در ادامه با استفاده از ظرف پلی‌اتیلنی دربدار با چند عدد گلوله پلی‌اتیلنی مجدداً مخلوط کردن مواد کامل‌تر انجام شد. مواد فوق با استفاده از دستگاه پرس(تأسیسات صارم ـ ایران ـ T-35) به شکل قرص‌های دایره‌ای با قطر ۱۰ میلی‌متر، پرس گردید. قرص‌های حاصل درون کوره(F11L ، آذرفورناس، ایران) قرار داده شد. تغییرات دمایی کوره بدین صورت تنظیم گردید که ابتدا افزایش دما تا ۹۰۰ درجه سانتی‌گراد با سرعت ۱۰ درجه در دقیقه و ماندن در دمای فوق به مدت ۲/۵ ساعت و مجدداً افزایش دما از ۹۰۰ به ۱۴۰۰ درجه سانتی‌گراد با نرخ ۱۰ درجه در دقیقه و قرار دادن در دمای ۱۴۰۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳ ساعت. در نهایت پس از عملیات مذاب، مواد ذوب شده حاصل از کوره خارج و درون آب مقطر کوینچ شد. شیشه حاصل سپس با استفاده از آون(مرک، آلمان) در دمای ۸۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۵ ساعت خشک گردید. در نهایت با استفاده از آسیاب سیاره‌ای با کاپ زیرکونیا(Petch PM400، آلمان) به مدت ۶ ساعت آسیاب گردید. مجدداً، شیشه زیست فعال طی چند مرحله و در مجموع به مدت ۶۰ ساعت، آسیاب شد تا به ساختار نانو تبدیل گردد.

*ارزیابی زیست فعالی:*

برای ارزیابی زیست فعالی، از مایع شبیه‌سازی شده بدن طبق دستورالعمل کوکوبو(KoKubo) بهره گرفته شد. در این آزمایش نانوذرات شیشه زیست فعال در بازه‌های زمانی۷ و۱۴ روز به صورت مجزا در ۱۰ میلی‌لیتر مایع شبیه‌سازی شده بدن غوطه ور و در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد درون انکوباتور(INC 108 ، ممرت، آلمان)، قرار داده شد. پس از آن محلول مایع شبیه‌سازی شده بدن، خارج و نمک‌ها و سایر اضافات چسبیده به نمونه‌ها، با آب مقطر شستشو داده و خشک گردید.

*طیف سنجی مادون قرمز:*

برای شناسایی پیوندها و گروه‌های شیمیایی نانو ذرات شیشه قبل و بعد از غوطه‌وری در مایع شبیه‌سازی شده بدن، از آزمون طیف‌سنجی مادون قرمز(FTIR)( Spectrum 400 ، پرکین المر، آمریکا) در محدوده ۴۰۰-۴۰۰ بر سانتی‌متر در حالت عبوری استفاده شد.



[ Downloaded from bloodjournal.ir on 2026-11-18 ]

*میکروسکوپ الکترونی روبشی:*

به منظور مطالعه مورفولوژی نانوذرات شیشه قبل و بعد از غوطه‌وری در مایع شبیه‌سازی شده بدن، از میکروسکوب الکترونی روبشی (SEM)(کره، SEM South، سرون تکنولوژی) با ولتاژ ۲۰ کیلوولت، استفاده شد. به علت هدایت الکتریکی ضعیف نمونه‌ها، سطح مقطع آن‌ها قبل از انجام آزمایش، با لایه‌ای بسیار نازک از طلا به روش کندوپاش پوشانده شد.

*ارزیابی رشد و تکثیر سلول‌های بنیادی مزانشیمی:*

جهت بررسی قابلیت رشد و تکثیر سلول‌های بنیادی مزانشیمی، سلول‌ها را در فلاسک کشت سلول ۷۵ ریخته و با استفاده از ۱۲ میلی‌لیتر محیط کشت با گلوکز بالا (DMEM-High G) به همراه ۵ درصد محلول سرم جنین گاوی(FBS) و آنتی‌بیوتیک(پنی‌سیلین و استرپتوماسین)(جیبکو، آلمان) ۱ درصد کشت داده شد. سپس فلاسک به درون انکوباتور(GmibH, MMM-Group، آلمان) با گاز ۵ درصد $CO_2$ در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد به همراه رطوبت منتقل گردید. هر ۲ روز یک بار، محیط کشت تعویض گردید. طی ۶ روز که سلول‌ها رشد پیدا کرده و به تراکم ۹۰ درصد رسیده بودند، پاساژ داده شدند. مراحل انجام پاساژ بدین صورت بود که ابتدا سلول‌ها را درون فلاسک با محلول بافر فسفات سالین(PBS) شستشو داده و سپس با محلول تریپسین/ EDTA (جیبکو، آلمان) ۰/۲ درصد از کف فلاسک جدا شدند.

در ادامه پس از جدا شدن سلول‌ها از کف فلاسک و معلق شدن، مقدار ۳ میلی‌لیتر محیط کشت به منظور خنثی کردن اثر تریپسین به فلاسک اضافه گردید. سپس سوسپانسیون سلول‌ها را به داخل فالکون ۱۵ انتقال و سانتریفیوژ (2-16PK ، سیگما، آلمان) با ۱۲۰۰ دور در دقیقه به مدت ۵ دقیقه در دمای محیط انجام شد. پس از سانتریفیوژ، محلول رویی خالی و مجدداً ۴ میلی‌لیتر محیط کشت درون فالکون افزوده و به منظور جدا شدن و معلق شدن سلول‌ها، چندین بار پیپت انجام شد. سپس به داخل فلاسک کشت سلول انتقال داده شد.

برای انجام آزمایش‌های سلولی باید نمونه‌ها استریل باشند. از این جهت، نمونه‌ها در زیر هود کشت سلولی ((ایران، Jal tajhiz Production ، JTLV C2) با محلول فسفات بافر سالین(PBS) شستشو و به مدت ۲۰ دقیقه تحت اشعه فرابنفش قرار گرفت.

در ادامه آن سلول‌های بنیادی مزانشیمی شمارش و بر روی نمونه‌های درون چاهک‌ها انتقال داده شد. برای شمارش از لام نئوبار استفاده شد. نمونه کنترل نیز استفاده گردید از این جهت سلول‌ها در کف پلیت کشت سلولی، کشت داده شدند.

*بررسی سمیت سلولی با استفاده از آزمایش سنجش MTT:*

برای انجام آزمونMTT حدود $۳\times۱۰^{۴}$ هزار سلول به هر چاهک در پلیت ۲۴ خانه‌ای حاوی نمونه‌های استریل شده انتقال داده شده و ۳۰۰ میکرولیتر محیط کشت به هر چاهک اضافه گردید. این آزمون در فواصل زمانی ۱، ۳، ۵ و ۷ روز در حضور نانو ذرات شیشه زیست فعال بررسی گردید و محیط کشت هر ۲ روز یک بار تعویض شد. در این آزمایش پس از اتمام هر دوره، محیط رویی سلول‌ها خارج و با فسفات بافر سالین شتسشو داده و به مقدار ۲۰۰ میکرولیتر محیط کشت با گلوکز بالا ( DMEM-High G) حاوی۲۰ میکرولیتر محلول MTT (آمریکا، سیگما، آلدریچ) اضافه گردید. سپس سلول‌ها، به مدت ۴ ساعت درون انکوباتور ۳۷ درجه سانتی‌گراد و رطوبت ۹۸ درصد و میزان رطوبت ۵ درصد گاز $CO_۲$ در تاریکی قرار داده شدند.

س از ۴ ساعت انکوباسیون، مجدداً محیط رویی، خارج و میزان ۱۰۰ میکرولیتر دی متیل سولفوکساید (DMSO)(آمریکا، سیگما، آلدریچ) اضافه گردید تا کریستال‌های فورمازان حل شده و یک محلول بنفش رنگ به دست آید. در نهایت میزان جذب نوری (OD) رنگ حاصله که رابطه مستقیم با تعداد سلول‌های فعال از نظر متابولیکی دارد، به وسیله دستگاه الایزا ریدر(اتریش، Sunrise-basic tecan) با طول موج ۵۷۰ نانومتر، اندازه‌گیری شد.



[ Downloaded from bloodjournal.ir on 2026-11-18 ]

*قابلیت زنده ماندن سلول ها با آزمون آکریدین اورنج (Acridin Orang):*

قابلیت زنده‌ماندن سلول‌ها با رنگ‌آمیزی آکریدین اورنج بعد از ۵ روز کشت سلول مورد بررسی قرار گرفت. در این آزمایش محلول رنگ‌آمیزی فلورسنت دوگانه به مقدار ۱ میکرولیتر اتیدیوم بروماید(آمریکا، سیگما، آلدریچ) حاوی ۱۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر محلول آکریدین اورنج(آمریکا، سیگما، آلدریچ)به هر چاهک افزوده و سپس با فسفات بافر سالین شستشو داده شد. در ادامه با استفاده از میکروسکوپ فلورسنت(آلمان، Leica 090-135002) با بزرگ‌نمایی ۱۰۰میکرومتر تصویربرداری شد.

*بررسی تمایز سلول‌های بنیادی مزانشیمی به سلول‌های استخوانی:*

جهت بررسی تمایز استخوانی باید از محیط تمایزی استفاده شود. از این جهت، سلول‌ها را بر روی نمونه‌ها کشت داده و پس از ۲ روز به اندازه‌ای که سلول‌ها رشد کرده بودند، محیط کشت رویی خارج گردید. سپس نمونه‌ها و سلول را با فسفات بافر سالین شستشو و محیط تمایزی اضافه شد. محیط تمایزی از ۴۵ میلی‌لیتر محیط کشت(DMEM-High G)، ۵ میلی‌لیتر سرم جنین گاوی(FBS) و ۵۰۰ میکرولیتر بتا گلیسرول، ۵۵ میکرولیتر آسکوربیک اسید و ۳ میکرولیتر دگزامتازون (آمریکا، سیگما، آلدریچ) ساخته شد. محیط تمایزی هر ۲ روز یک بار تعویض گردید.

*ارزیابی فعالیت آلکالین فسفاتاز (ALP) :*

این آزمون در فواصل زمانی ۷ و۱۴روز بررسی شد. پس از اتمام هر دوره، ۲۰۰ میکرولیتر بافر ریپا به درون چاهک افزوده شد. در ادامه ویال‌ها، ۴ بار و هر ۵ دقیقه یک بار به مدت ۲۰ دقیقه ورتکس گردید. برای جدا کردن پروتئین‌ها از بقایای سلول‌ها و داربست، این محلول به مدت ۱۵ دقیقه با ۱۵۰۰۰ دور بر دقیقه در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد، سانتریفیوژ شد. از این جهت ۵۰ میکرو لیتر از عصاره بالایی را درون پلیت ۹۶ خانه‌ای انتقال داده و ۱۵۰ میکرولیتر کیت آلکالین فسفاتاز با نسبت ۴ به ۱ محلول $\frac{R1}{R2}$ به آن اضافه گردید(پارس آزمون، ایران). در نهایت با استفاده از دستگاه الایزا ریدر با طول موج ۴۵۰ نانومتر، مقدار فعالیت آلکالین فسفاتاز هر نمونه اندازه‌گیری شد.

*ارزیابی رسوب کلسیم به روش آلیزارین قرمز( Alizarin red):*

برای بررسی تمایز استخوانی نمونه‌ها، از رنگ‌آمیزی آلیزارین قرمز استفاده شد. رنگ‌آمیزی در روزهای ۷ و ۱۴ تمایز، بر روی نمونه‌ها صورت گرفت. به این منظور، محیط کشت تمایزی را برداشته و سلول‌ها با محلول فسفات بافر سالین شستشو داده شدند. سپس سلول‌ها به مدت ۲۰ دقیقه در فرمالدئید ۴ درصد(مرک، آلمان) قرار گرفتند. مجدداً، سلول‌ها با محلول فسفات بافر سالین شستشو داده و با رنگ آلیزارین قرمز(مرک، آلمان) ۱ درصد به مدت ۵ دقیقه رنگ‌آمیزی شدند. رنگ‌های اضافی خارج و چندین بار با آب مقطر شستشو داده و در نهایت با استفاده از میکروسکوپ نوری، از سلول‌های استخوانی رنگ شده که نشان‌دهنده رسوب کلسیم است، تصویربرداری شد.

*آنالیز بیان ژن (Real time-PCR):*

سلول‌های تمایز یافته از نظر بیان ژن‌های اختصاصی استخوان: آلکالین فسفاتاز، استئوکلسین، کلاژن I، استئونکتین، Runx 2 مورد بررسی قرار گرفتند. جهت نرمالیز(یکسان‌سازی نتایج) از ژن خانه‌دار*HPRT* استفاده شد. در این آزمایش ابتدا RNA کل موجود پس از ۷ و ۱۴ روز از تمایز استخراج شدند. نمونه‌های RNA استخراج شده تحت تیمار با آنزیم DNase 1 قرار گرفتند تا آلودگی احتمالی مربوط به DNA حذف گردد. سپس خلوص و غلظت RNA استخراج شده با روش اسپکتروفتومتری (نانودراپ) تعیین گردید. در ادامه cDNA ساخته شد. از این جهت ۵ میکرولیتر RNA را برداشته و با استفاده از کیت سنتز cDNA ( Thermo Scientific ، آمریکا) در واکنش رونویسی معکوس با



[ Downloaded from bloodjournal.ir on 2026-11-18 ]

استفاده از آغازگرهای رندوم هگزامر و آنزیم ترانس کریپتاز(Revers transcriptaz) معکوس مطابق دستورالعمل کیت cDNA، سنتز گردید. پس از آن روی cDNA به دست آمده Real time- PCR صورت گرفت. بدین منظور ۱ میکرولیتر از cDNA ، ۱۰ میکرولیتر Master low rox mix real time (آمپلیکون، دانمارک) و ۱ میکرولیتر از آغازگر جلوبرنده و معکوس (آلکالین فسفاتاز، استئوکلسین، استئونکتین، کلاژن I، Runx 2) را داخل ویال‌های Real time -PCR ریخته و در نهایت با استفاده از آب دوبار تقطیر حجم آن به ۲۰ میکرولیتر رسانده شد. ژن *HPRT* به عنوان کنترل داخلی استفاده گردید. دمای PCR با استفاده از دستگاه RT-PCR (Rotor Gene Q ، آلمان) به صورت زیر تنظیم گردید: دمای ۹۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۵ دقیقه، ۴۰ چرخه شامل: دمای ۹۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲۰ ثانیه، دمای آنیلینگ ۵۹ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳۰ ثانیه و در نهایت در دمای۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳۰ ثانیه.

*آنالیز آماری:*

در این پژوهش تمامی آزمایش‌ها برای هر نمونه، ۳ بار تکرار گردید و میانگین نتایج به صورت ± انحراف معیار گزارش شد. از نرم‌افزار SPSS نسخه ۱۱ برای تجزیه و تحلیل واریانس یک طرفه جهت تعیین میزان معنادار بودن استفاده شد. $p\leq ۰/۰۵$ مرز معنادار بودن تغییرات در نظر گرفته شد. برای رسم نمودارها از نرم‌افزار اکسل مایکروسافت آفیس ۲۰۱۰ استفاده شد.

## یافته‌ها

*طیف سنجی مادون قرمز:*

در الگوی شیشه زیست فعال ۴۵S۵ ، پیک‌های ظاهر شده عبارت بودند از؛ عدد موج ۴۹۷ و ۱۰۳۰بر سانتی‌متر مربوط به ارتعاشات کششی متقارن و نامتقارن پیوندهای Si-O-Si (شکل ۱). باند ظاهر شده در عدد موج ۶۹۶ بر سانتی‌متر مربوط به ارتعاشات خمشی P-O و باند ۹۳۰ بر سانتی‌متر مربوط به پیوندهای Si-O است. باند با عدد موج ۱۴۵۶ بر سانتی‌متر نیز مربوط به باند کربنات $Ca_3^{-2}$ – می‌باشد. پیک‌های ظاهر شده در الگوی نانوذرات شیشه زیست فعال بعد از غوطه‌وری در مایع شبیه‌سازی شده بدن، وجود باندهای فسفات P-O که نشان‌دهنده تشکیل لایه هیدروکسی آپاتیت(HA) می‌باشد را در طول موج ۶۱۵-۵۹۰ بر سانتی‌متر نشان می‌دهند. با بررسی و مقایسه الگوها با هم ملاحظه می‌شود که قله‌های مربوط به آپاتیت در روز ۱۴ نسبت به روز ۷، از شدت بیشتری برخوردار است و بیانگر این است که مقدار آپاتیت بیشتری تشکیل شده و می‌توان گفت نانوذرات ساخته شده، از زیست فعالی بالایی برخوردار است. لازم به ذکر است بقیه باندها نیز مربوط به گروه‌ها و پیوندهای شیشه می‌باشد که به آن‌ها اشاره گردید.

*ارزیابی کیفیت نانو ذرات شیشه زیست فعال توسط میکروسکوپ الکترونی:*

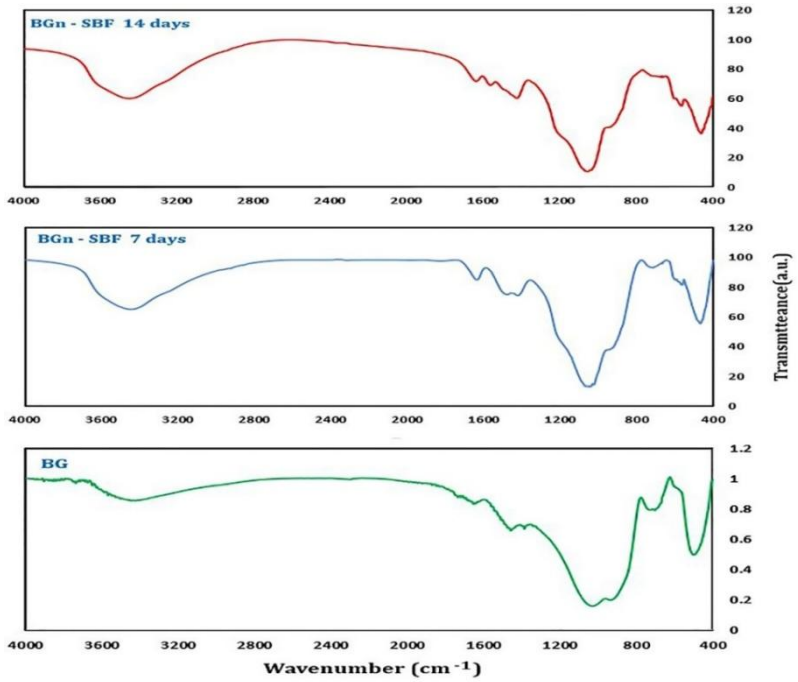
تصاویر میکروسکوپ الکترونی روبشی، نانو ذرات شیشه زیست فعال، قبل و بعد از غوطه وری در مایع شبیه‌سازی شده بدن را نشان می‌دهد(شکل ۲). همان طور که مشخص است، مورفولوژی و اندازه دانه‌های شیشه ساخته شده در مقیاس نانو می‌باشد و میانگین اندازه دانه‌ها کمتر از ۸۰۰ نانومتر است. شکل‌های 2b و 2C آپاتیت تشکیل شده بر روی نانوذرات شیشه پس از غوطه‌وری در مایع شبیه‌سازی شده بدن در مدت زمان‌های ۷ و ۱۴ روز را نشان می‌دهد. همان طور که مشاهده می‌شود خوشه‌های آپاتیت بر روی نانوذرات شیشه زیست فعال تشکیل شده و در تمام سطح به طور یکنواخت و پیوسته رشد پیدا کرده است.

*بررسی عدم سمیت سلولی نانوذرات شیشه با آزمایش سنجش MTT:*

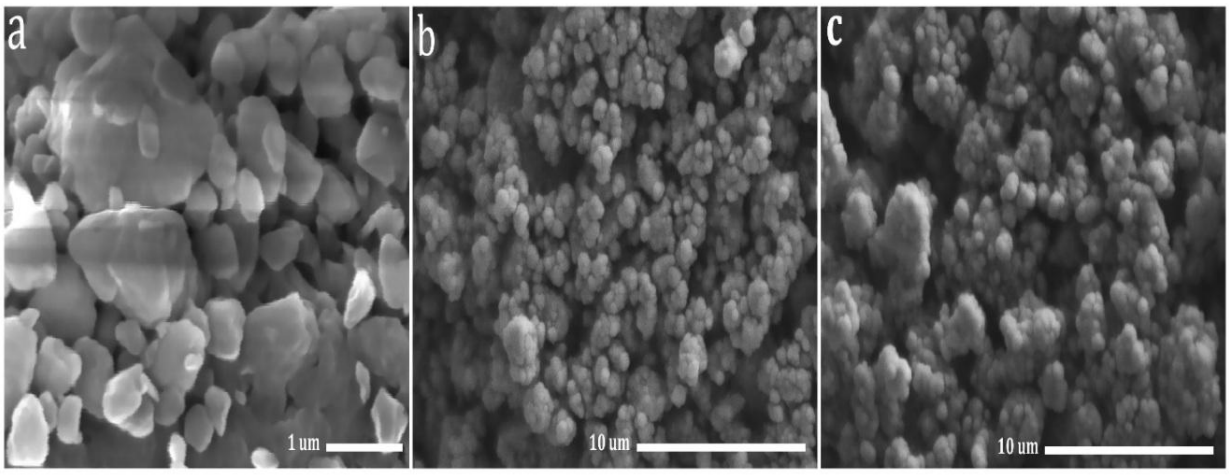
نتایج، بیشترین حیات سلولی، مربوط به نمونه نانوذرات شیشه زیست فعال را گزارش می‌دهد(شکل ۳). این روند در همه فواصل زمانی مورد آزمایش بدین ترتیب بوده است. نتایج حاکی از این است که نانوذرات شیشه زیست فعال ساخته شده، هیچ‌گونه سمیت سلولی ندارد.



[ Downloaded from bloodjournal.ir on 2026-11-18 ]




**شکل ۱: الگوی طیف‌سنجی مادون قرمز(FTIR) نانو ذرات شیشه زیست فعال ۴۵S۵: قبل و بعد از غوطه‌وری در مایع شبیه‌سازی شده بدن**




**شکل ۲: تصاویر میکروسکوب الکترونی روبشی(SEM) نانوذرات شیشه زیست فعال ۴۵S۵ a) قبل از غوطه‌وری در مایع شبیه‌سازی شده بدن b) بعد از ۷ روز غوطه‌وری و c) بعد از ۱۴ روز غوطه‌وری**

*بررسی تصاویر آکریدین اورنج:*

تصاویر میکروسکوپ فلورسنت از مورفولوژی سلول‌های بنیادی مزانشیمی بعداز ۳ روز کشت در مجاورت نمونه‌ها در شکل ارائه شده است(شکل ۴).

در این آزمون سلول‌هایی که مرده‌اند رنگ آکریدین اورنج را از خود عبور داده و دارای هسته سبز و سیتوپلاسم قرمز یا نارنجی می‌باشند، اما در صورتی که هسته و سیتوپلاسم کاملاً سبز باشد، سلول‌ها زنده هستند. مطابق تصاویر مرگ سلولی رخ نداده و هسته و سیتوپلاسم سلول‌ها کاملاً سبز می‌باشند. وجود این سلول‌ها در نمونه نانوذرات شیشه با تراکم بالا به خوبی قابل رؤیت است(شکل 4b).



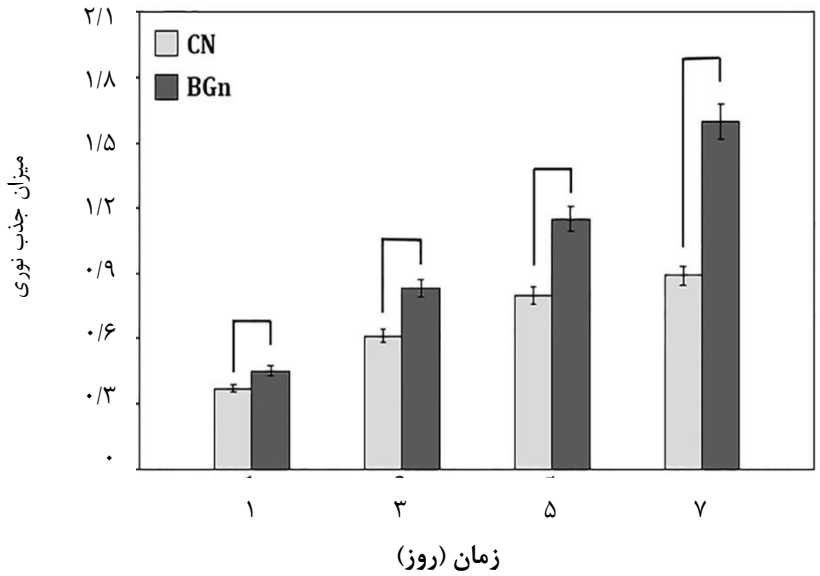
[ Downloaded from bloodjournal.ir on 2026-11-18 ]

*۳-۵- بررسی نتایج آلکالین فسفاتاز:*

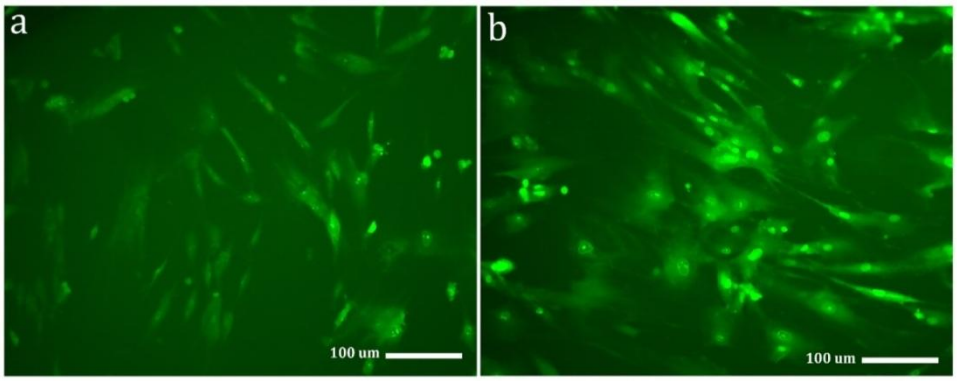
آلکالین فسفاتاز به وسیله سلول‌ها تولید می‌شود و به عنوان شاخصی جهت تفکیک سلول‌های استخوان‌ساز به کار می‌رود. همان طور که از نتایج شکل ۵ الف مشخص است، مقدار فعالیت آلکالین فسفاتاز نمونه نانوذرات شیشه زیست فعال ۴۵S۵ ، پس از ۷ و ۱۴ روز قرارگیری در محیط تمایزی، بالاتر از نمونه‌های کنترل است. این اختلاف معنادار اولاً بیانگر تمایز سلول‌های مزانشیمی به سلول‌های استئوبلاست است در ثانی اثر مثبت نانوذرات شیشه در تمایز استخوان زایی سلول‌های بنیادی مزانشیمی را مشخص می‌کند.

*۳-۶- بررسی نتایج رنگ آلیزارین قرمز:*

رنگ آلیزارین قرمز بیانگر رسوبات کلسیم می‌باشد که تایید کننده حضور سلول‌های استخوانی است. بیشترین مقدار رسوب کلسیم که با رنگ قرمز رنگ‌آمیزی شده، مربوط به نمونه نانوذرات شیشه زیست فعال می‌باشد که حاکی از تمایز سلول‌های بنیادی مزانشیمی به رده استئوبلاستی است(شکل ۵a ب). در نمونه کنترل بدون نانو ذره تمایز به مقدار کمتری انجام شده است(شکل ۵b ب).




**شکل ۳: رشد و تکثیر سلول‌های بنیادی مزانشیمی مغز استخوان انسان در آزمون MTT بعد از ۱، ۳، ۵ و ۷ روز قرارگیری در محیط کشت (DMEM(h) + FBS + Pen/sterp)؛ نمونه کنترل(CN) و نانوذرات شیشه زیست فعال ۴۵S۵(BG)**

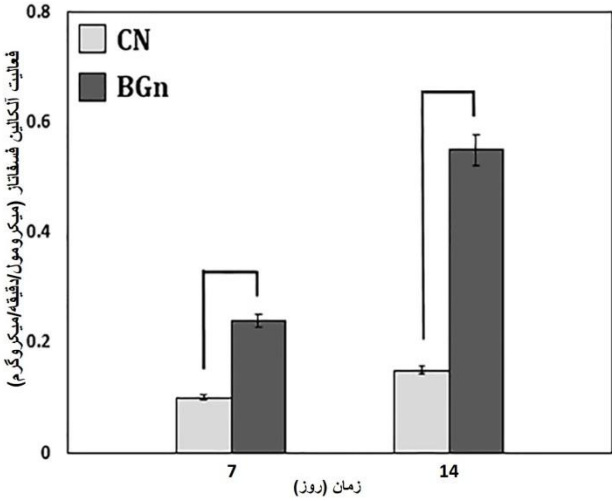



**شکل ۴: تصاویر میکروسکوب فلورسنت از سلول‌های بنیادی مزانشیمی پس از ۳ روز کشت: a) نمونه کنترل و b) نانوذرات شیشه زیست فعال ۴۵S۵ (بزرگ‌نمایی تصاویر ۱۰۰ میکرون می‌باشد)**

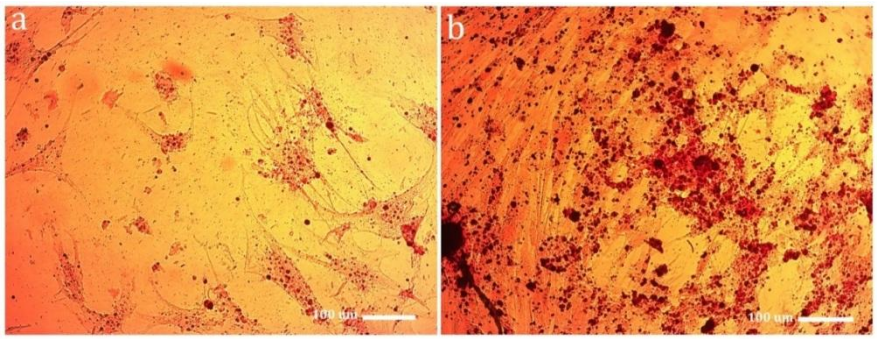


[ Downloaded from bloodjournal.ir on 2026-11-18 ]

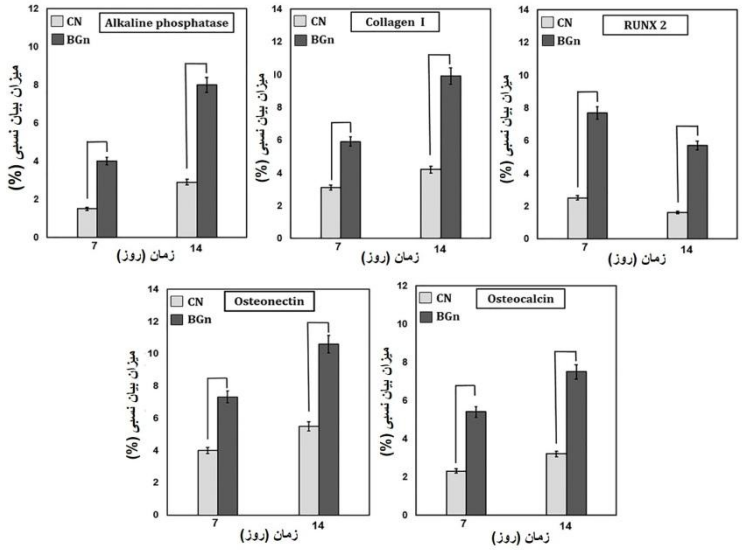
الف




ب




**شکل ۵ الف: فعالیت آلکالین فسفاتاز(ALP) سلول‌های بنیادی مزانشیمی بعد از ۷ و ۱۴ روز قرارگیری در محیط تمایزی؛ نمونه کنترل(CN) و نانو ذرات شیشه زیست فعال ۴۵S۵ (BG). شکل ۵ ب: تصاویر میکروسکوب نوری در آزمون آلیزارین قرمز(Alizarin red) از سلول‌های بنیادی مزانشیمی پس از ۱۴ روز قرارگیری در محیط تمایزی: a) نمونه کنترل و b) نانو ذرات شیشه زیست فعال ۴۵S۵ (بزرگ‌نمایی تصاویر ۱۰۰ میکرون می‌باشد).**




**شکل ۶ : بیان ژن‌های تمایز استخوان با استفاده از Real time-PCR : بیان نسبی ژن‌های آلکالین فسفاتاز، استئوکلسین، استئونکتین، کلاژن I و Runx 2 پس از ۷ و ۱۴ روز تمایز سلول‌های بنیادی مزانشیمی در مجاورت نانو ذرات شیشه زیست فعال ۴۵S۵ و نمونه کنترل. نمونه کنترل (CN) و نانو ذرات شیشه زیست فعال ۴۵S۵ (BG)**



[ Downloaded from bloodjournal.ir on 2026-11-18 ]

*۳-۷- ارزیابی مقدار بیان ژن:*

بیان کمی ژن‌های استخوانی(آلکالین فسفاتاز، استئوکلسین، کلاژن I، استئونکتین، Runx 2) cDNA حاصل از تمایز سلول‌های مزانشیمی در مجاورت نانو ذارت شیشه ۴۵S۵ و نمونه کنترل، در شکل ۶ نشان داده شده است. نتایج بیان ژن‌ها مربوط به نانوذرات شیشه در روزهای ۷ و ۱۴ تمایز نسبت به نمونه کنترل افزایش قابل ملاحظه‌ای داشته و این در تمامی ژن‌های استخوانی به غیر از Runx 2 قابل رؤیت است. این نشان‌دهنده اثر تحریکی نانوذرات شیشه زیست فعال در تمایز استخوانی می‌باشد که باعث افزایش بیان ژن‌ها شده است.

## بحث

در این پژوهش، نانو ذرات شیشه زیست فعال ۴۵S۵ به روش ذوبی ساخته و با استفاده از آسیاب سیاره‌ای به ساختار نانو تبدیل گردید. تصاویر میکروسکوپ الکترونی روبشی و الگوی طیف سنجی مادون قرمز به ترتیب مورفولوژی و اندازه دانه‌ها در مقیاس نانو و پیوندهای مربوط به شیشه را تایید کرد. بررسی زیست فعالی در مایع شبیه‌سازی شده بدن نیز تشکیل کریستال‌های آپاتیت بر روی نانو ذرات را مورد تایید قرار داد. نتایج آزمایش‌های سلولی صورت گرفته از قبیل: MTT ، آکریدین اورنج، آلکالین فسفاتاز و آلیزارین قرمز حاکی از عدم سمیت و تاثیر بالقوه این نانو ذرات ساخته شده در رشد و تمایز استخوانی سلول‌های بنیادی مزانشیمی بود.

این روش ساخت(روش ذوبی ساخت) مشخص کرد که تبدیل ساختار میکرو شیشه زیست فعال به ساختاری در مقیاس نانو با استفاده از فرآیند آسیاب سیاره‌ای امکان‌پذیر است.

در سال ۲۰۱۶، تئودور و همکاران نشان دادند که ۴۵S۵ می‌تواند به عنوان یک عامل کمک‌کننده در تمایز استخوان مطرح باشد. اما مشکل این نانو ذره، بزرگ بودن حفرات و عدم پایداری سلول بر روی آن بود. در سال ۲۰۱۱ هیمانشو و همکاران نشان دادند که نانو ذره مذکور، منجر به تمایز استخوانی سلول‌های بنیادی می‌شود. در تحقیقات صورت گرفته، این نوع شیشه را معمولاً به عنوان فاز دوم (تقویت‌کننده زیست فعال) در ساخت کامپوزیت‌ها و داربست‌ها استفاده کرده‌اند، تمامی این مطالعه‌ها، شیشه ۴۵S۵ را با ساختار میکرو مورد بررسی قرار داده‌اند(۲۷-۲۱). علاوه بر آن پژوهشی در زمینه تاثیر اندازه ذرات شیشه فوق‌الذکر با اندازه ذره ۹-۷۵۰ میکرومتر در رشد، تکثیر و تمایز سلول‌های بنیادی مورد بررسی قرار گرفته است. نتایج آن ثابت کرد که هرچه اندازه ذرات ریزتر باشد، تاثیر به سزایی در رشد و تمایز سلول‌ها خواهد داشت(۲۸).

این مطالعه نشان داد که استفاده از نانو ذرات شیشه باعث واکنش‌پذیری، رشد و تمایز سلول‌های بنیادی می‌شود. نتایج آزمایش‌های ارزیابی زیست فعالی نیز مشخص کرد که نانوذرات شیشه زیست فعال ساخته شده، دارای زیست فعالی مناسب بوده به طوری که بعد از ۷ روز غوطه‌وری در مایع شبیه‌سازی شده بدن، هیدورکسی آپاتیت به خوبی بر روی سطح نانوذرات تشکیل شده و با افزایش زمان غوطه وری به مدت ۱۴ روز، توانایی زیست فعالی آن‌ها حفظ شده است. طول موج ۶۱۵-۵۹۰ بر سانتی‌متر مربوط به آپاتیت در نمودار شکل ۴ ، صحت این موضوع را تایید می‌کند(۳۲-۲۹).

بنابراین با توجه به نتایج بررسی زیست فعالی و مشابه کارلی در سال ۲۰۰۴، می توان تشکیل فاز هیدروکسی آپاتیت بر روی نانوذرات شیشه فوق را چنین بیان کرد: مراحل تشکیل لایه سطحی هیدروکسیل کربنات آپاتیت (HCA) به طور کلی در سه مرحله لیچینگ، انحلال و رسوب اتفاق می‌افتد که شامل ایجاد لایه ژل سیلیکاتی و در ادامه هسته‌زایی و رشد فاز کلسیم فسفات آمورف و تبدیل آن به هیدروکسیل کربنات آپاتیت بالغ با گذشت زمان است. لیچینگ از طریق رهاشدن عناصر قلیایی، قلیایی خاکی و مبادله آن ها با کاتیون های $H^+$ و $H_3O^+$ انجام می‌شود. چنین انتشار و تبادل یونی در مدت ۱ تا ۷ روز غوطه‌وری باعث افزایش pH در فصل مشترک تا مقادیر بیشتر از ۷/۴ می‌شود اما مجدداً برای مدت ۷ الی ۲۴ روز با اشباع این یون‌ها، pH دوباره کاهش می‌یابد(۳۴-۳۲). در انحلال، شبکه شیشه منجر به تشکیل لایه غنی از سیلیکا و در پی آن رسوب لایه شبه آپاتیتی



[ Downloaded from bloodjournal.ir on 2026-11-18 ]

می‌شود. لازمه اتصال شیشه‌ها به استخوان، تشکیل لایه‌ای از هیدروکسیل کربنات آپاتیت روی سطح بیومتریال است. کریستال‌های هیدروکسیل کربنات آپاتیت با الیاف کلاژن تقویت شده و سپس لایه اتصال‌دهنده بین ماده زیست فعال و بافت‌های زنده تشکیل می‌شود. مبنای ویژگی اتصال به استخوان شیشه‌های زیست فعال، واکنش شیمیایی شیشه در حضور سیالات بدن است. توالی از واکنش‌های سطحی منجر به تشکیل لایه هیدروکسیل کربنات آپاتیت و پیوند ایمپلنت به بافت می‌شود(۳۴-۳۲).

نتایج آزمون MTT نیز نشان داد که بیشترین مقدار حیات سلولی مربوط به نانوذرات شیشه زیست فعال بوده است و نانوذره فوق هیچ‌گونه سمیتی ندارد. در آزمون آکریدین اورنج نیز سلول‌ها کاملاً سالم بودند و هیچ‌گونه مرگ سلولی رخ نداده بود. در تصاویر، هسته سلول‌ها سبز بودند که نشان‌دهنده سلول‌های زنده است. نانوذرات شیشه با ایجاد محیطی با ساختارهای نانو و تبادل یونی، باعث رشد و تحریک سلول‌های بنیادی مزانشیمی جهت تکثیر می‌شود(۳۵).

طبق مطالعه‌های انجام شده نکته مهم در نانوذره زیست فعال این است که در ترکیب شیشه‌های زیست فعال، وجود اکسید سیلسیوم از اهمیت بالایی برخوردار است چرا که به عنوان شبکه‌ساز در ساختار شیشه عمل می‌کنند به علاوه گروه‌های سیلانول (Si-OH) حاصل از فرآیند تبادل یون‌های کلسیم(موجود در ساختار شیشه) با هیدرونیوم($H_3O^+$)(موجود در محلول)، مستعد ایجاد مکان‌هایی برای جوانه‌زنی کلسیم فسفات هستند(۳۷، ۳۶). در مطالعه پانزاولتا و همکاران در سال ۲۰۰۸ مشخص شده که وجود سیلسیوم رهایش یافته از ترکیب شیشه به درون محیط کشت سلول می‌تواند سبب افزایش فعالیت سلولی شود(۳۹، ۳۸). هم چنین فان و همکاران در سال ۲۰۰۳ نشان دادند که اکسید فسفر نیز به جوانه‌زنی فاز کلسیم فسفات بر روی سطح شیشه کمک می‌کند(۴۰). در این پژوهش از کلسیم و سیلسیوم با تغییر فرآیند ساخت نانوذرات شیشه استفاده شد که آزمون آلیزارین قرمز تاییدکننده تمایز استخوانی بیشتر نانو ذرات شیشه نسبت به نمونه کنترل بود. طبق تصاویر می‌توان این نتیجه را گرفت که نانو ذرات شیشه باعث تشکیل رسوبات کلسیم ناشی از کلسیم و فسفری که در ترکیب خود دارد می‌شود. رسوب کلسیم شامل ترشحات معدنی سلول‌های استئوبلاست به ماتریکس خارج سلولی است و شکل‌گیری این رسوبات، مشخصه مرحله نهایی تمایز استخوانی است. مطالعه‌ها نشان‌دهنده این است که حضور این رسوبات، شاخص خوبی از تمایز استخوانی است. این موضوع در تصاویر آلیزارین قرمز به خوبی قابل رؤیت است.

بررسی کمی مقدار بیان ژن‌های استخوانی نیز از اثر تحریکی نانوذره شیشه در تمایز استئوژنیک و بیان ژن‌ها دلالت داشت. تشکیل استخوان در سه مرحله اصلی: تمایز استئوبلاست، تشکیل ماتریکس و کانی سازی ماتریکس اتفاق می‌افتد. کوموری و همکاران در سال ۲۰۰۸ اظهار داشتند که بیان ژن آلکالین فسفاتاز در اوایل و اواسط این مرحله‌ها است. هم چنین این گروه در مطالعه خود نشان دادند که بیان Runx 2 در طی این سه مرحله متغیر می‌باشد. آن‌ها نشان دادند که Runx 2 یک تنظیم‌کننده اساسی از تمایز استئوبلاست است و در مرحله اولیه تمایز سطح بیان بالایی دارد، اما به تنهایی کافی نیست(۴۱). با توجه به نتایج این پژوهش، میزان بیان ژن آلکالین فسفاتاز نمونه نانوذره شیشه پس از ۷ روز کشت نسبت به نمونه کنترل، افزایش قابل ملاحظه‌ای داشته، این روند در روز ۱۴ تمایز نیز به همین صورت بود. Runx 2 پس از ۷ روز کشت یعنی در مراحل اولیه بیان ژن سیر صعودی داشت اما در روزهای بعد از روز ۱۴، این روند کاهش پیدا کرده بود. ساندرامورتی و همکاران در سال ۲۰۱۵ نشان دادند که ژن‌های استئوکلسین و استئونکتین نقش مهمی در کانی‌سازی و ایجاد اولیه بلورهای کلسیم ایفا می‌کنند. استئوکلسین یک پروتئین غیر کلاژنی است که توسط استئوبلاست‌های بالغ بیان می‌شود. این ترکیب از سه اسید کربوکسی‌گلوتامیک تشکیل شده است که به جذب کلسیم کمک می‌کند. استئوکلسین مسئول فرآیند استخراج استخوان است(۴۴-۴۲). استئونکتین یک گلیکوپروتئین است که $Ca_2^+$ را درگیر می‌کند، مراحل اولیه رشد کریستال را تنظیم می‌نماید و نقش حیاتی در کانی‌سازی دارد(۴۴).



[ Downloaded from bloodjournal.ir on 2026-11-18 ]

در شکل سطوح بیان استئوکلسین و استئونکتین نمونه نانو ذره شیشه زیست فعال در روزهای ۷ و۱۴ تمایز نسبت به نمونه کنترل، اختلاف معناداری دارد و تقریباً به یک میزان بیان شده‌اند. کلاژن I نیز نقش مهمی در بیومینرالیزاسیون دارد. این ژن نیز در روزهای ۷ و۱۴ تمایز استخوانی بیان قابل ملاحظه‌ای داشته است.

## نتیجه‌گیری

در این پژوهش نانوذرات شیشه زیست فعال ۴۵S۵ به روش ذوبی ساخت و با استفاده از آسیاب سیاره‌ای به ساختار نانو تبدیل گردید. نتایج نشان داد که با غوطه‌وری نانو ذرات شیشه زیست فعال در مایع شبیه‌سازی شده بدن، بلورهای آپاتیت بر روی سطح نانو ذرات شیشه تشکیل شده و با افزایش زمان غوطه‌وری، میزان تشکیل ذرات آپاتیت نیز افزایش پیدا کرده است. بررسی رشد و تکثیر سلولی نشان داد نانو ذرات شیشه زیست فعال، باعث افزایش رشد و تکثیر سلول‌های بنیادی مزانشیمی می‌شود. علاوه بر آن، تمایز سلول‌های مزانشیمی به سلول‌های استخوانی در حضور نانو ذرات شیشه افزایش پیدا کرده است. استفاده از نانو ذرات شیشه به واسطه دارا بودن عناصر زیست فعال و هم چنین افزایش نسبت سطح به حجم به دلیل ساختار نانویی، واکنش‌پذیری بهتر و در نتیجه، افزایش کارآیی تکثیر و تمایز سلول‌های بنیادی می‌گردد. پس نانو ذرات شیشه ساخته شده علاوه بر آن که هیچ‌گونه سمیتی نداشته بلکه باعث تحریک و القاء رشد سلول نیز می‌شود و از آن می‌توان جهت درمان و بهبود سریع ضایعات استخوانی استفاده نمود.

## تشکر و قدردانی

این پروژه در مرکز تحقیقات بیوتکنولوژی و میکروبیولوژی کاربردی دانشگاه علوم پزشکی بقیه‌اله (عج) به انجام رسیده است. از صندوق حمایت از پژوهشگران کشور و ستاد نانوتکنولوژی جهت حمایت در انجام پروژه نهایت قدردانی و تشکر به عمل می‌آید.

## References:

1- Amani M, Amirizadeh N, Soleimani M, Malekan H, Habibi M, Bashtar M. Effect of platelet growth factors gel on proliferation and differentiation of mesenchymal stem cells. Sci J Iran Blood Transfus Organ 2009; 6(2):71-83. [Article in Farsi]
2- Nabian N, Jahanshahi M, Rabiee SM. Synthesis of nano bioactive glass-ceramic powders and it's *in vitro* bioactivity study in bovine serum albumin protein. J Mol Struct 2011; 998(1-3): 37-41.
3- Kokubo T, Takadama H. How useful is SBF in predicting *in vivo* bone bioactivity? Biomaterials 2006; 27(15): 2907-15.
4- Chevalier J and Gremillard L. Ceramics for medical application: A picture for the next 20 years. J Eur Ceram 2009; 29: 1245-55.
5- Hench LL. The Story of Bioglass. J Mater Sci Mater Med 2006; 17(11): 967-78.
6- Sohrabi M, Hesaraki S, Kazemzadeh A and Alizadeh M. The influence of sol-gel processing method on physical properties and acellular *in vitro* reactivity of bioactive glasses based on CaO-SiO2-P2O5: acidic catalyzed single step process versus acid- base two step quick-gelling method. Journal of Advanced Materials and Technologies 2013; 2(3): 31-6. [Article in Farsi]
7- Hench LL, Splinter RJ, Allen WC, Greenlee TK. Bonding mechanisms at the interface of ceramic prosthetic materials. J Biomedical Materials Research Banner 1971; 5: 117-41.
8- Mohammadi Y, Mirzadeh H, Moztarzadeh F, Soleimani M, Jabbari E. Osteogenic differentiation of mesenchymal stem cells on novel three-dimensional poly (L-lactic acid)/chitosan/gelatin/β-tricalcium phosphate hybrid scaffolds. Iranian Polymer Journal 2007; 19(1): 57-69.
9- Risbud MV, Shapiro IM, Guttapalli A, Di Martino A, Danielson KG, Beiner JM, *et al*. Osteogenic potential of adult human stem cells of the lumbar vertebral body and the iliac crest. Spine (Phila Pa 1976) 2006; 31(1): 83-9.
10- Yue WM, Liu W, Bi YW, He XP, Sun WY, Pang XY, *et al*. Mesenchymal stem cells differentiate into an endothelial phenotype, reduce neointimal formation, and enhance endothelial function in a rat vein grafting model. Stem Cells Dev 2008; 17(4): 785-93.
11- Aurich H, Sgodda M, Kaltwasser P, Vetter M, Weise A, Liehr T, *et al*. Hepatocyte differentiation of mesenchymal stem cells from human adipose tissue *in vitro* promotes hepatic integration *in vivo*. Gut 2009; 58(4): 570-81.



[ Downloaded from bloodjournal.ir on 2026-11-18 ]

12- Baksh D, Song L, Tuan RS. Adult mesenchymal stem cells: characterization, differentiation and application in cell therapy. Mol Med 2004; 8(3): 301-16.
13- Grinnemo KH, Mansson A, Dellgren G, Klingberg D, Wardell E, Drvota V, *et al*. Xenoreactivity and engrafment of human mesenchymal stem cells transplanted into infarcted rat myocardium. J Thorac Cardiovasc Surg 2004; 127(5): 1293-300.
14- Alonso-Goulart V, Ferreira LB, Duarte CA, Lemos de Lima I, Ferreira ER, *et al*. Mesenchymal stem cells from human adipose tissue and bone repair: a literature review. Biotechnology Research and Innovation. Available online 14 Nov 2017.
15- Markarian CF, Frey GZ, Silveira MD, Chem EM, Milani AR, Ely PB, *et al*. Isolation of adipose-derived stem cells: A comparison among different methods. Biotechnol Lett 2014; 36(4): 693-702.
16- Ahearne M, Lysaght J, Lynch AP. Combined influence of basal media and fibroblast growth factor on the expansion and differentiation capabilities of adipose-derived stem cells. Cell Regen (Lond) 2014; 3(1): 13.
17- Langenbach F, Handschel J. Effects of dexamethasone, ascorbic acid and B-glycerophosphate on the osteogenic differentiation of stem cells *in vitro*. Stem Cell Res Ther 2013; 4(5): 117.
18- Langenbach F, Naujoks C, Smeets R, Berr K, Depprich R, Kubler N, *et al*. Scaffold-free microtissues: Differences from monolayer cultures and their potential in bone tissue engineering. Clin Oral Invest 2013; 17(1): 9-17.
19- Hellmich C, Ulm FJ. Average hydroxyapatite concentration is uniform in the extracollagenous ultrastructure of mineralized tissues: evidence at the 1-10um scale. Biomechanic Model Mechanobiol 2003; 2(1): 21-36.
20- Gerstenfeld L, Barnes G, Shea C, Einhorn T. Osteogenic differentiation is selectively promoted by morphologenetic signals from chondrocytes and synergized by a nutrient rich growth envrironment. Connect Tissue Res 2003; 44 Suppl 1: 85-91.
21- Li Z, Khun NW, Tang XZ, Liu E, Khor KA. Mechanical, tribological and biological properties of novel 45S5 Bioglasss composites reinforced with in situ reduced graphene oxide. J Mech Behav Biomed Mater 2017; 65: 77-89.
22- Jurczyk K, Jurczyk M, Niespodziana K. Synthesis and characterization of titanium-45S5 Bioglass nanocomposite. Materials and Design 2011; 32: 2554-60.
23- Stulajterova R, Medvecky L, Giretova M, Sopcak T, Kovalcikova A. Effect of bioglass 45S5 addition on properties, microstructure and cellular response of tetracalcium phosphate/monetite cements. Materials Characterization 2017; 126: 104-15.
24- Leenakul W, Tunkasiri T, Tongsiri N, Pengpat K, Ruangsuriya J. Effect of sintering temperature variations on fabrication of 45S5 bioactive glass-ceramics using rice husk as a source for silica. Mater Sci Eng C Mater Biol Appl 2016; 61: 695-704.
25- Qian J, Kang Y, Wei Z, Zhang W. Fabrication and characterization of biomorphic 45S5 bioglass scaffold from sugarcane. Materials Science and Engineering C 2009; 29: 1361-4.
26- Farnoush H, Muhaffel F, Cimenoglu H. Fabrication and characterization of nano-HA-45S5 bioglass composite coatings on calcium-phosphate containing micro-arc oxidized CP-Ti substrates. Applied Surface Science 2015; 324: 765-74.
27- Romeis S, Hoppe A, Detsch R, Boccaccini AR, Schmidt J, Peukert W. Top-down processing of submicron 45S5 Bioglass® for enhanced *in vitro* bioactivity and biocompatibility. Procedia Engineering 2015; 102: 534-41.
28- Kargozar S, Baino F, Lotfibakhshaiesh N, Hill RG, Milane PB, Hamzehlou S, *et al*. When size matters: Biological response to strontium- and cobaltsubstituted bioactive glass particles. Materials Today: Proceedings 2018; 5: 15768-75.
29- Kokubo T, Hiroaki T. How useful is SBF in predicting in vivo bone bioactivity? Biomaterials 2006; 27: 2907-15.
30- Cheng D, Xie R, Tang T, Jia X, Cai Q, Yang X. Regulating micro-structure and biomineralization of electrospun PVP-based hybridized carbon nanofibers containing bioglass nanoparticles via aging time. RSC Adv 2016; 6: 3870-81.
31- Himanshu T, Singh SP, Sampath KA, Prerna M, Ashish J. Studies on Preparation and Characterization of 45S5 Bioactive GlassDoped with (TiO2 + ZrO2) as Bioactive Ceramic Material. Bioceram Dev Appl 2016; 6(1): 1-7.
32- Theodorou G, Goudouri OM, Kontonasaki E, Chatzistavrou X, Papadopoulou L, Kantiranis N, *et al*. Comparative Bioactivity Study of 45S5 and 58S Bioglasses in Organic and Inorganic Environment. Bioceram DevAppl 2011; 1: 31-5.
33- Chatzistavrou X, Zorba T, Chrissafis K, Kaimakamis G, Kontonasaki E, Koidis P, *et al*. Influence of particle size on the crystallization process and the bioactive behavior of a bioactive glass system. J Thermal Analysis and Calorimetry 2006; 85: 253-9.
34- Kokubo T, Institute of Materials, Minerals, and Mining.; Nihon Medikaru Materiaru Kabushiki Kaisha. Bioceramics and their Clinical Applications. England : CRC Press; 2008. p. 120-8.
35- Li N, Jie Q, Zhu S, Wang R. A New Route to Prepare Macroporous Bioactive Sol Gel Glasse with High Mechanical Strength. Materials Letter 2004; 58(22-23): 2747-50.
36- Vissers CAB, Harvestine JN, Leach JK. Pore size regulates mesenchymal stem cell response to Bioglass-loaded composite scaffolds. J Mater Chem B 2015; 3: 8650-8.
37- Kokubo T, Kushitani H, Sakka S, Kitsugi T, Yamamuro T. Solutions able to reproduce *in vivo* surface-structure changes in bioactive glass-ceramic A-W3. J. Biomed Mater Res 1990; 24: 721-34.
38- Seeman E, Devogelaer JP, Lorenc R, Spector T, Brixen K, Balogh A, *et al*. Strontium Ranelate Reduces the Risk of Vertebral Fractures in Patients With Osteopenia . J Bone Miner Res 2008; 23: 433-8.
39- Panzavolta S, Torricelli P, Sturba L, Bracci B, Giardino R . Setting properties and *in vitro* bioactivity of strontium-enriched gelatin-calcium phosphate bone



[ Downloaded from bloodjournal.ir on 2026-11-18 ]

cements. J Biomed Mater Res A 2008; 84: 965-72.
40- Pietak AM, Reid JW, Stott MJ, Sayer M. Silicon substitution in the calcium phosphate bioceramics. Biomaterials 2007; 28: 4023-32.
41- Phan PV, Grzanna M, Chu J, Polotsky A, El-Ghannam A, Heerden DV, *et al*. The effect of silica-containing calcium-phosphate particles on human osteoblasts *in vitro* . J Biomed Mater Res A 2003; 67: 1001-8.
42- Komori T. Regulation of bone development and maintenance by Runx2. Front Biosci 2008; 13: 898-90.
43- Sundaramurthi D, Jaidev L, Ramana LN, Sethuraman S, Krishnan UM. Osteogenic differentiation of stem cells on mesoporous silica nanofibers. RS Adv 2015; 5: 69205-14.
44- Shin H, Zygourakis K, Farach-Carson MC, Yaszemski MJ, Mikos AG. Modulation of differentiation and mineralization of marrow stromal cell cultured on biomimetic hydrogels modified with Arg-Gly-Asp containing peptides. J Biomed Mater Res A 2004; 69: 535-43.
45- Shahrousvand M, Mir Mohamad Sadeghi G, Shahrousvand E, Ghollasi M, Salimi A. Superficial physicochemical properties of polyurethane biomaterials as osteogenic regulators in human mesenchymal stem cells fates. Colloids Surf B Biointerfaces 2017; 156: 292-304.

[ Downloaded from bloodjournal.ir on 2026-11-18 ]

*Sci J Iran Blood Transfus Organ 2019; 15(4): 272-286*

***Original Article***

# Effect of synthetic biologically activated 45S5 glass nanoparticles on osteogenesis differentiation of mesenchymal human bone marrow

***Shams M.[1], Salimi A.[2], Ghollasi M.[3], Halabian R.[4]***

*[1]Institute of Materials and Energy(MERC), Karaj, Iran*
*[2]Nanobiotechnology Research Center, Baqiyatallah University of Medical Sciences, Tehran, Iran*
*[3]Faculty of Biological Sciences, Kharazmi University, Tehran, Iran*
*[4]Applied Microbiology Research Center, Systems Biology and Poisonings Institute, Baqiyatallah University of Medical Sciences, Tehran, Iran*

## Abstract

***Background and Objectives***

Glasses and glass-ceramics are a group of biological substances that form hydroxyapatite against a simulated solution of the body and can be used in many clinical cases that require the production and repair of bone. The purpose of this study was to create a 45S5 bioactive glass nanoparticle and evaluate its impact on staining and differentiation of mesenchymal stem cells into bone cells.

***Materials and Methods***

In this experimental research, the nanocomposite of the bioaccuminant 45S5 was synthesized by the fusion method and planetary mill was converted to the nanoscale structure; then, its physicochemical and structural properties were investigated. The bioactivity was evaluated using a simulated body solution. The growth, amplification and differentiation of mesenchymal stem cells in the vicinity of nanoparticles were investigated.

***Results***

Biomedical evaluation indicated the formation of hydroxyapatite on nanoparticles after zinc immersion in the body was simulated. Cell experiments also confirmed the lack of toxicity of the glass nanoparticles and its stimulating effect for the growth, proliferation and differentiation of mesenchymal cells in bone cells. In the bone differentiation, the activity of alkaline phosphatase in the glass nanoparticle was expressed after 14 days of differentiation ($0.55 \pm 0.07$), while it was the control sample ($0.15 \pm 0.03$).

***Conclusions***

According to the progenies, mesenchymal stem cells can propagate and grow on the nanoparticles of the synthesized bioactive glass and, in addition to not being toxic, stimulate and stimulate cell growth.

***Key words:*** Nanoparticles, Mesenchymal Stem Cells, Glass

*Received: 4 Jul 2018*
*Accepted: 2 Sep 2018*

*Correspondence:* Halabian R., PhD in Medical Biotechnology. Assistant professor of Faculty of Applied Microbiology Research Center, Systems Biology and Poisonings Institute, Baqiyatallah University of Medical Sieances.
P.O.Box: 14359-44711, Tehran, Iran. Tel: (+9821) 86072709 ; Fax: (+9821) 86072709
E-mail: *r.halabian@yahoo.com*



[ Downloaded from bloodjournal.ir on 2026-11-18 ]