DOI: 10.22041/ijbme.2011.13148

Extraction and characterization of Bombyx Mori silk for medical application

S.Mobini[1]*, M.Solati-Hashjin[2], H.Peirovi[3], A.Samadikochaksaraei[4]

[1]Assistant Professor, Reproductive Biotechnology Research Center of Ebne Sina, Medical Research Institute of New Technology, Sahba.Mobini@gmail.com

[2]Associate Professor, Biomaterial group, Faculty of Biomedical Engineering, Amirkabir University of Technology, Solati@aut.ac.ir

[3]Professor, Nanomedicine and tissue engineering research center, Shahid Beheshti University, dhpsurgery@sbmu.ac.ir

[4] Associate Professor, Cellular and Molecular Research Center, Tehran University of Medical Sciences, ali.samadi01@imperial.ac.uk

Abstract

Silk fibroin is fibrous proteins with excellent mechanical properties which are produced by wide group of animals such as Bombyx Mori. Silk fibroin with specific molecular structure can be processed into a diverse set of morphologies. Additionally, biotechnologically produced silk proteins will allow the preparation of a new generation of protein-based bio-polymeric materials with programmed properties for a wide variety of exciting medical applications. In this study, silk protein was extracted from Bombyx Mori's cocoons and evaluated by FTIR and XRD methods. Results showed sharp amide peaks in 1655 cm^{-1} and 1530 cm^{-1} wavelength in FTIR spectrum pattern confirming existence of fibroin. SEM images of the fibers showed continuous fibers with cross-section between 14 to 24 µm. Biocompatibility tests were carried out through seeding osteoblasts cell line G292 on 2D film as well as fibers. Adhesion and proliferation of osteoblasts were investigated by MTT assay which showed no cytotoxicity. Therefore, fibroin appears to be remarkable material for prospect application in biomedicine.

Keywords: Bombyx Mori's cocoons, Natural polymers, fibroin, Biomaterials, Environmental compatibility.

* **Corresponding author**
Address: *Sahba Mobini, Reproductive Biotechnology Research Center of Ebne Sina, Medical Research Institute of New Technology Tehran, Iran*
Tel: *+98 21 22432020*
Fax: *+98 21 22432021*
E-mail: *Sahba.Mobini@gmail.com*

© Copyright 2012 ISBME, http://www.ijbme.org

DOI: 10.22041/ijbme.2011.13148

استحصال و بررسی خواص فیبروئین ابریشم بومبیکس‌موری برای کاربردهای پزشکی

صهبا مبینی*[۱]، مهران صولتی هشجین[۲]، حبیب‌الله پیروی[۳]، علی صمدی‌کوچکسرایی[۴]

[۱] دانشجوی دکتری تخصصی بیومتریال، آزمایشگاه نانوبیومتریال، دانشکده مهندسی‌پزشکی، دانشگاه صنعتی امیرکبیر
Sahba.Mobini@gmail.com
[۲] دانشیار گروه بیومتریال، دانشکده مهندسی‌پزشکی، دانشگاه صنعتی امیرکبیر
Solati@aut.ac.ir
[۳] استاد دانشگاه شهیدبهشتی، مرکز تحقیقات نانوپزشکی و مهندسی‌بافت
dhpsurgery@sbmu.ac.ir

چکیده

فیبروئین ابریشم، پروتئینی فیبری با خواص مکانیکی بسیار مطلوب است که توسط دسته بزرگی از جانوران از جمله کرم بومبیکس‌موری به شکل رشته‌ای ساخته می‌شود. ساختار منحصر به فرد ابریشم، تنوع فرآوری، زیست‌سازگاری، در دسترس بودن آن به شکل‌های گوناگون، امکان اعمال مهندسی ژنتیک بر روی گونه‌های مختلف، قابلیت استریل‌شدن، شیمی سطح مناسب و تخریب پذیری کنترل‌شده، ابریشم را در کاربردهای بالینی، پزشکی، آرایشی-بهداشتی و غذایی به ماده‌ای بی‌نظیر بدل کرده است. در پژوهش حاضر استحصال و بررسی پروتئین فیبروئین از تار ابریشم بومبیکس‌موری با هدف کاربردهای پزشکی و بهداشتی انجام شد. خواص فیزیکی، شیمیایی و ساختاری ابریشم توسط FTIR، XRD و SEM مورد بررسی قرار گرفت. سلول‌های استئوبلاستی G292 به منظور بررسی خواص زیستی این بیومتریال بر روی آن کشت داده شد. نمودار طیف FTIR فیبروئین استخراج شده است که پیک‌هایی را در ۱۶۵۵ cm^{-1}، ۱۵۳۰ cm^{-1}، ۶۹۹ cm^{-1} و ۱۲۳۹ cm^{-1} نشان می‌دهد. فیبروئین ابریشم همچنین پس از استخراج و پس از بازیابی با متانول از نظر میزان بلورینگی با دستگاه XRD مورد بررسی قرار گرفت که ظهور پیک در نمونه بازیابی شده نشان از تشکیل مجدد صفحات بتا داشت. از الیاف ابریشم نیز قبل و بعد از صمغ‌زدایی با SEM تصویربرداری شد و قطر نسبی الیاف ابریشم بین ۱۴ تا ۲۴ میکرومتر تعیین شد. آزمون‌های زیست‌سازگاری بیرون‌تنی MTT برای بررسی قابلیت کاربرد آن در بدن انجام شد و سازگاری سلول‌ها در مجاورت فیبروئین به اثبات رسید. استئوبلاست‌های چسبیده بر روی داربست‌ها توسط SEM مورد بررسی قرار گرفت. بررسی‌های فیزیکی و زیستی اولیه بر روی پروتئین فیبروئین سازگاربودن آن با سیستم‌های زیستی را تایید کرد. به نظر می‌رسد پروتئین حاضر می‌تواند پیش‌ماده مناسبی برای تولید مواد مرتبط با سیستم‌های زیستی باشد.

کلیدواژگان: ابریشم بومبیکس‌موری، پلیمر طبیعی، پروتئین فیبروئین، بیومتریال، زیست‌سازگاری.

*عهده‌دار مکاتبات
نشانی: تهران، خیابان حافظ، دانشگاه صنعتی امیرکبیر، دانشکده مهندسی پزشکی، آزمایشگاه نانو بیومتریال
تلفن: ۶۴۵۴۲۳۶۹ ، **دورنگار:** ۶۶۴۶۸۱۸۶ ،**پیام نگار:** Sahba.Mobini@gmail.com

© Copyright 2012 ISBME, http://www.ijbme.org

۱-مقدمه

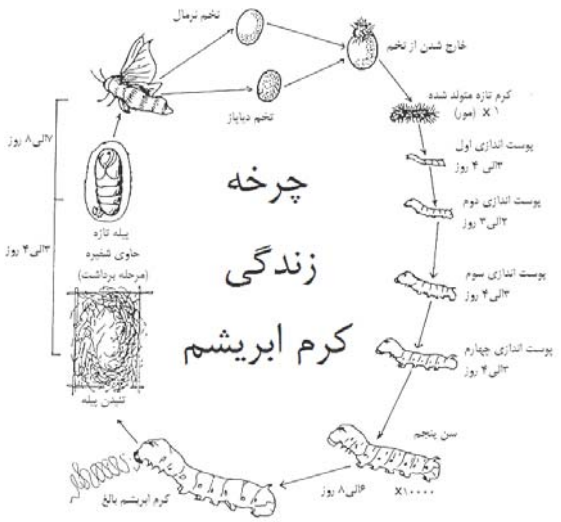
ابریشم پروتئینی است که توسط برخی از بندپایان از جمله عنکبوت‌ها (بیش از ۳۰،۰۰۰ نوع عنکبوت که از جمله معروف‌ترین آنها می‌توان به نفیلا کلاویپس[۱] اشاره کرد.)، عقرب‌ها، ککها و برخی از کرم‌های رسته پَشیزبالان[۲] از جمله کرم پنیر، پروانه‌ها و بیدها، به صورت تار تنیده می‌شود. این جانوران از تارهای ابریشم برای اهداف گوناگونی از جمله پناه‌گاه، لانه، محافظ تخم، وسیله حمل و نقل و ابزار شکار استفاده می‌کنند. ابریشم‌ها بنابر منشاء تولید و کاربردشان ساختارهای گوناگون و خواص متفاوتی دارند. عنکبوت‌ها و حشرات، ابریشمی غنی از گلایسین[۳] ترشح می‌کنند که بر حسب نوع کاربردشان اختصاصی می‌شوند. این ابریشم‌ها با ابریشم تولید شده توسط کرم‌های بومبیکس‌موری[٤]، از جهات بسیاری متفاوت است. ابریشمِ عنکبوت به دلیل سبکی، استحکام فوق‌العاده بالا، انعطاف و مقاومت در برابر ضربه، گزینه بسیار قابل توجهی به عنوان بیومتریال است[۱،۲،۳،٤]. خلاصه‌ای از مهم‌ترین خواص و تفاوت‌های ابریشم عنکبوت-ها و ابریشم کرم‌ابریشم در جدول ۱ آمده است.

به رغم اینکه تار ابریشم عنکبوت در مقایسه با ابریشم کرم‌ابریشم خواص مکانیکی برتری دارد، هنوز برای کاربردهای مهندسی‌پزشکی تجاری نشده است. مهمترین دلایل این امر، وحشی بودن طبیعت عنکبوت‌ها و اندک بودن میزان تولید تار ابریشم توسط این جانوران است. به منظور فائق آمدن بر این مانع فنی تحقیقات در این زمینه به سمت تولید پروتئین تار عنکبوت با استفاده روش‌های زیست-فناوری[٤]سوق پیدا کرده است [۵]. از میان تمام جانورانی که ابریشم تولید می‌کنند، کرم ابریشم بومبیکس‌موری از نظر اقتصادی بسیار به صرفه‌تر است. زیرا اهلی کردن آن امکان-پذیر بوده و دسترسی مناسبی به منابع تامین‌کننده این ابریشم وجود دارد[۲]. از این رو تحقیقات زیادی برای درک ساختار، فرآوری و خواص آن به عنوان بیومتریال انجام شده است. نگاهی به چرخه زندگی کرم ابریشم بومبیکس‌موری نشان می‌دهد، این کرم در طی مدت دگردیسی پیله‌ای محافظ از جنس ابریشم به دور خود می‌تند. چرخه حیات این کِرم در شکل ۱ نشان داده شده است[٦].

جدول۱- خواص مکانیکی ابریشم ها در مقایسه با یکدیگر و برخی الیاف مصنوعی [۲]

ماده	استحکام نهایی **GPa**	کرنش نهایی	چقرمگی **MJm^{-3}**
ابریشم بومبیکس موری	٦/۰	۱۸/۰	۷۰
ابریشم عنکبوت دیادماتئوس	۱/۱	۲۷/۰	۱٦۰
نایلون	۹۵/۰	۱۸/۰	۸۰
کولار ٤۹	٦/۳	۰۲۷/۰	۵۰
فولاد	۵/۱	۰۰۸/۰	٦

شکل۱. چرخه حیات کرم بومبیکس‌موری



© Copyright 2012 ISBME, http://www.ijbme.org

مایع ویسکوزی که از غدد واقع در سر کرم‌ابریشم برای تنیدن پیله ترشح می‌شود، فیبروئین نام دارد. فیبروئین با ترشح دیگری که سریسین[5] نام دارد و از دو غده متقارن دیگر تراوش می‌کند، پوشیده می‌شود. این دو ماده در کنار هم در معرض هوا سخت می‌شوند و در مجموع این فرآیند تارهایی حاوی فیبروئین و سریسین را به وجود می‌آورد[۷]. سریسین که صمغ ابریشم[6] نیز نامیده می‌شود، پروتئینی زرد رنگ، ترد و غیر الاستیک است که ۲۵ تا ۳۰ درصد از تار ابریشم را تشکیل می‌دهد. این پروتئین به دور فیبروئین پیچیده و لایه چسبنده‌ای را ایجاد می‌کند که در نهایت به شکل‌گیری پیله کمک می‌کند. سریسین آنتی‌اکسیدان، آنتی‌باکتریال و مقاوم در برابر پرتو فرا بنفش است اما معمولاً حاوی ناخالصی‌هایی چون موم، چربی و رنگدانه است. بنابراین باید به طور کامل از سیستم خارج شود چون حضور آن در مواد در تماس با بدن مانند نخ‌های بخیه سبب برانگیختن پاسخ‌های ایمنی و التهابی شده و حساسیت ایجاد می‌کند[۸]. به جدا کردن سریسین از الیاف ابریشم صمغ‌زدایی می‌گویند. این پروتئین در حلال‌های قطبی از جمله آب حل می‌شود، در محلول‌های اسیدی یا قلیایی هیدرولیز شده و در معرض پروتئازها تجزیه می‌شود. با این وجود پپتیدهای هیدرولیز شده سریسین خواص مرطوب‌کنندگی فوق‌العاده‌ای دارند و پپتیدهای سبک‌تر آن (کمتر از ۲۰ کیلودالتون) در صنایع آرایشی از قبیل محصولات مراقبت پوست و مو، صنایع بهداشتی و داروسازی به‌کار می‌روند. پپتیدهای سنگین‌تر (بیشتر از ۲۰ کیلودالتون) به عنوان بیومتریال‌های تخریب‌پذیر، پلیمرهای و غشاهای زیستی ، هیدروژل‌ها کاربرد دارند[٦]. این کاربردها و کابردهای دیگر سریسین در مقاله بسیار مفیدی توسط زانگ مرور شده است[۹]. فیبروئین، یک پروتئین رشته‌ای[6] و نامحلول در آب است که به طور متوسط ۷۸٪ وزن پیله را به خود اختصاص داده است[۳]. امروزه مشخص شده است اجزاء تشکیل‌دهنده ساختار ابرمولکولی تارهای ابریشم ماکروفیبریل‌هایی[7] هستند که عرضشان به ۱۰۵×۵/٦ نانومتر می‌رسد و به نوبه خود از نانوفیبرل‌های[8] تابیده‌ای با قطر ۹۰ الی ۱۷۰ نانومتر تشکیل شده‌اند که نقش مهمی را در ایجاد استحکام ابریشم دارند. اما از دیدگاه مولکولی ، پروتئین فیبروئین متشکل از دو رشته سنگین و سبک پروتئینی با نسبت‌های مساوی است. رشته سنگین ۳۷۰ کیلودالتون وزن دارد و عمدتاً از ماکرومولکول‌های آبگریز بسیار منظم ساخته شده است که طول آن ۱۵۰ نانومتر است. رشته سبکتر ۲٦ کیلودالتون وزن دارد و تشکیل‌دهنده‌های اصلی آن آمینو اسیدهای قطبی هستند. زنجیره کوچک، ٤٥/۰ نانومتر طول دارد. ٪۹۰ پروتئین فیبروئین از توالی و تکرار سه اسید آمینه اصلی گلایسین(٪٤۳)، آلانین[9] (٪۳۰) و سرین[10] (٪۱۲) به‌وجود آمده است[۱۰]. ساختمان ثانویه فیبروئین از طریق برهمکنش‌های گوناگونی شکل می‌گیرد که مهم‌ترین آن ایجاد پیوندهای هیدروژنی بین گروه‌های عاملی زنجیرهای پپتیدی و زنجیره‌های جانبی ابرمولکول است. وجود همین پیوندهای هیدروژنی دلیل اصلی استحکام کششی فوق‌العاده فیبروئین است. ترکیب بلوک‌های آبگریز منظم با بلوک‌های نسبتاً نامنظم آبدوست، سبب افزایش الاستیسیته و چقرمگی فیبروئن می‌شود[۳]. خواص مکانیکی ابریشم در مجموع با بهترین الیاف مصنوعی، از جمله کولار[11]، قابل رقابت است[۱۱].

خواص مکانیکی الیاف ابریشم تلفیق بسیار مناسبی از سبکی (۳/۱ gcm^{-1}) و استحکام کششی زیاد است. امروزه سه ساختار ثانویه اصلی برای فیبروئین مشخص شده است که در محل‌های بلورین به شکل پیچ‌آلفا و صفحات‌بتا است و به ترتیب به آنها Silk I و Silk II می‌گویند. در محل‌های آمورف این ساختار به صورت ترکیب نامنظمی از گلبول‌های تصادفی است(Silk III). ساختار فیبروئین تنیده شده به طور متوسط ٪٥٦ صفحات‌بتا و ٪۵/۱۳ از پیچ‌آلفا تشکیل شده‌است[۱۰].ابریشم غیربلورین، در تماس با متانول یا کلرید پتاسیم تغییر شکل داده و به ساختاری با صفحات بتا تبدیل می‌شود.

[5] Sericin
[6] fibrous protein
[7] macrofibrils
[8] nanofibrils
[9] Alanine (Ala)
[10] Serine (Ser)
[11] Kevlar

© Copyright 2012 ISBME, http://www.ijbme.org

این رفتار امکان بازیابی ساختار غیربلورین فیبروئین محلول در آب را امکان‌پذیر می‌سازد. فیبروئین پس از بازیابی مجدداً ساختار نامحلول در آب پیدا می‌کند. دلیل این امر آن است که ساختارهای صفحه‌ای بتا نامتقارن بوده و در یک سمت شامل زنجیره‌های جانبی هیدروژن از گلایسین و در سوی دیگر با گروه‌های متیلِ آلانین احاطه شده‌اند که در آب و سایر محیط‌های حاوی اسید یا قلیای ضعیف حل نمی-شوند[۲،۱۲،۱۳]. این واقعیت آنجا اهمیت می‌یابد که سبب می‌شود اشکال متنوعی از ابریشم را تولید کرد. توانایی فیبروئین در خودآرایی و امکان فرآوری آن در اشکال گوناگونی مانند، داربست، ژل، فوم، فیلم، کپسول و غیره [۲،۱٤،۱۵] در نهایت سبب شده تا برای این ماده زیست-سازگار کاربردهای فراوانی در زمینه‌های نوین پزشکی فرض شود.

۲- شرح مسئله

تولید ابریشم از دیرباز یکی از صنایع بومی منطقه شمال کشورمان (ایران) بوده [۱٦] که نزدیک به ٪۱۰۰ تولید آن در صنعت نساجی بکارگرفته می‌شود. کشف قابلیت‌های بی-همتای ابریشم حضور این الیاف تاریخی را در عرصه‌های نوین علم و تکنولوژی بسیار پرنگ‌تر از گذشته کرده است. وجود ویژگی‌های منحصربفردی چون زیست‌سازگاری، شکل‌پذیری، تخریب‌پذیری کنترل‌شده و استحکام مکانیکی بالا سبب تمایل به استفاده از این ماده در فن‌آوری‌های نوین از جمله زیست‌پزشکی شده‌است. این پژوهش با هدف دست‌یابی به ماده اولیه قابل فرآوری از پروتئین ابریشم در زمینه‌های زیست‌پزشکی از جمله مهندسی‌بافت استخوان و پوست انجام شد. الیاف صمغ‌زادیی شده ابریشم یا رشته‌های فیبروئین با ساختار مستحکم صفحات بتا (silk II) در آب نامحلول هستند. بنابراین باید ساختار سوم و دوم آن به فرم پیچ آلفا (silk I) قابل حل در آب تبدیل شود تا امکان تهیه محلول و به تبع آن اشکال دیگر از جمله ژل‌ها و اسفنج‌ها (برای کاربردهای مهندسی بافت) از آن ممکن شود. استفاده از محلول نمک‌های غلیظ برای بر هم‌زدن تعادل برهمکنش‌های میان زنجیره‌های پروتئین یکی از راه‌های باز کردن زنجیره‌ها و حل کردن آن است. در این فرآیند از محلول لیتیم برماید با غلظت بالای یون‌ها استفاده می‌شود تا ساختار فضایی فیبروئین را بر هم بریزد. استفاده از غشاء دیالیز در نهایت این امکان را به دست می‌دهد که مولکول های درشت فیبروئین از نمک غلیظ جدا شده و خالص و قابل حل گردند. فیبروئین بدست آمده از این روش قابل شکل دادن به صورت‌های گونگون است. اما برای بازیابی قابلیت‌های اصیل فیبروئین ساختار باید بار دیگر به شکل صفحات بتا تغییر کند تا خواص مطلوب حاصل شود. نظم زنجیره‌های سبک و سنگین و حوزه‌های آبگریز و آبدوست این پروتئین در مجاورت متانل بازیابی می‌شود. مشخصه‌یابی فیزیکی و زیستی فیبروئینی که به این روش از پیله‌های کرم بومبیکس موری تولید داخل بدست‌آمده است موضوع پژوهش حاضر است.

۳- داده‌ها و روش‌حل

۱-۳- مواد

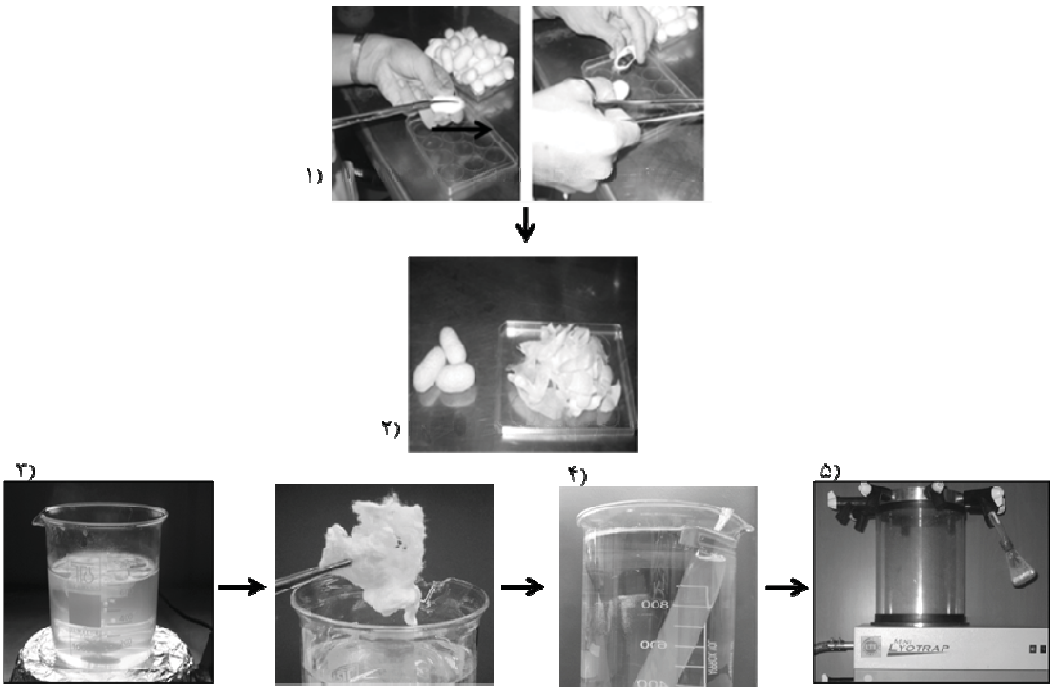
برای صمغ‌زدایی و استحصال فیبروئین نمک‌های کربنات سدیمNa2CO3، برمیدلیتیم LiBr با خلوص بالای ۹۹/۹٪ از شرکت (Merck، آلمان) تهیه شد. تیوب دیالیز با قابلیت عبور وزن مولکولی KDa ۱٤-۱۲ از شرکت (Sigma، آلمان) خریداری شد. آب دوبار تقطیر فوق خالص با ضریب هدایت کمتر از µS/cm ۰۰۵/۰ توسط دستگاه تهیه آب فوق خالص(UPW) ساخت شرکت (Sartorius، آلمان) تهیه شد.

پیله‌های کرم بومبیکس‌موری از طرف مرکز تحقیقات ابریشم ایران در قالب هدیه تحقیقاتی دریافت شد. برای انجام آزمون‌های زیست‌سازگاری، سلول‌های استئوبلاست انسانی رده G292 از بانک سلولی انستیتو پاستور ایران تهیه شد. محیط کشت DMEM کم‌گلوکز آماده، پنسیلین / استرپتومایسین، سرم جنین گاویFBS، Trypsin/EDTA از شرکت (Gib-Co.، آمریکا) و محلول آماده MTT وDMSO از شرکت (Sigma، آلمان) خریداری شدند.

© Copyright 2012 ISBME, http://www.ijbme.org

۲-۳- صمغ‌زدایی و استحصال فیبروئین

پیله‌های کرم بومبیکس موری در روز پنجم برداشت و شفیره‌ها داخل آن با بخار آب داغ کشته شدند. به منظور صمغ‌زدایی الیاف ابریشم، سه عدد پیله کرم بومبیکس‌موری باز و محتوی آن را خارج شد. سپس پیله‌ها در۷۵۰ میلی‌لیتر Na2CO3 ۰۲/۰ مولار به مدت یک ساعت قرارداده شد. الیاف بدست آمده ۳ بار با یک لیتر آب دیونیزه سرد و گرم به خوبی آب‌کشی و به مدت یک شب در زیر هود خشک شد. برای تهیه فیبروئین محلول در آب، الیاف صمغ‌زدایی شده‌ی ابریشم به نسبت ٪۱۰ وزنی در محلول ۳/۹ مولار لیتیم برماید به مدت ۵ ساعت در ۵۵ درجه سانتی‌گراد حل شد. محلول غلیظ نمک و فیبروئین به مدت ۳٦ ساعت در غشاء دیالیز با ضریب خروج ۱۲۰۰۰ دالتون در یک لیترآب فوق خاص قرار داده شد. آب ظرفی که کیسه دیالیز در آن قرار داشت ٦ بار به طور منظم تعویض شد. محلول باقی‌مانده در غشاء دیالیز به مدت ۱۲ ساعت در فریزدارير خشک شد تا فیبروئین خالص قابل حل در آب بدست آید. فیبروئین استحصال شده به این روش به صورت پودر سفید رنگ و قابل نگهداری در دمای محیط است. شکل ۲ مراحل تهیه فیبروئین را نشان می‌دهد. برای بازیابی ساختار صفحات بتا فیبروئین باید به مدت حداقل ۳۰ دقیقه در مجاورت متانل ٪۹۹ قرار گیرد.



شکل۲. مراحل استخراج فیبروئین ۱،۲) تمیز کردن پیله‌ها ۳) صمغ‌زدایی ٤) دیالیزکردن محلول غلیظ نمک و الیاف ۵) فریزدرای کردن و تهیه پودر

© Copyright 2012 ISBME, http://www.ijbme.org

۳-۳- مشخصه یابی فیزیکی و شیمیایی

به منظور تایید حضور پیوندهای آمینی ویژه پروتئین فیبروئین، آزمون طیف‌سنجی تبدیل فوریه مادون قرمز توسط دستگاه FTIR مدلEQUINOX 55 در بازه cm^{-1} ۴۰۰۰-۵۰۰ طبق استاندارد ASTM E1252-07 انجام شد. برای انجام این آزمون از پودر فیبروئین و پودر KBr قرص‌هایی نازکی تهیه شد و در دستگاه قرار گرفت. برای بررسی میزان بلورینگی و مطالعه تغییرات قبل و بعد از تاثیر متانول بر ساختار ثانویه مولکولی و بلورینگی فیبروئین، آزمایش پرایش پرتو ایکس توسط دستگاه XRD مدلSIMENS D5000 در بازه ۲Θ : ۵°-۷۰° درجه بر روی فیبروئین قبل و پس از بازیابی انجام شد. تارهای ابریشم قبل و پس از صمغزدایی توسط میکروسکپ الکترونی روبشی، دستگاه SEM مدل XL Philips 30/ESEM در وضعیت فیلدامیژن با مد الکترون ثانویه(SE) مورد بررسی قرار گرفتند.

۴-۳- آزمون زیست‌سازگاری

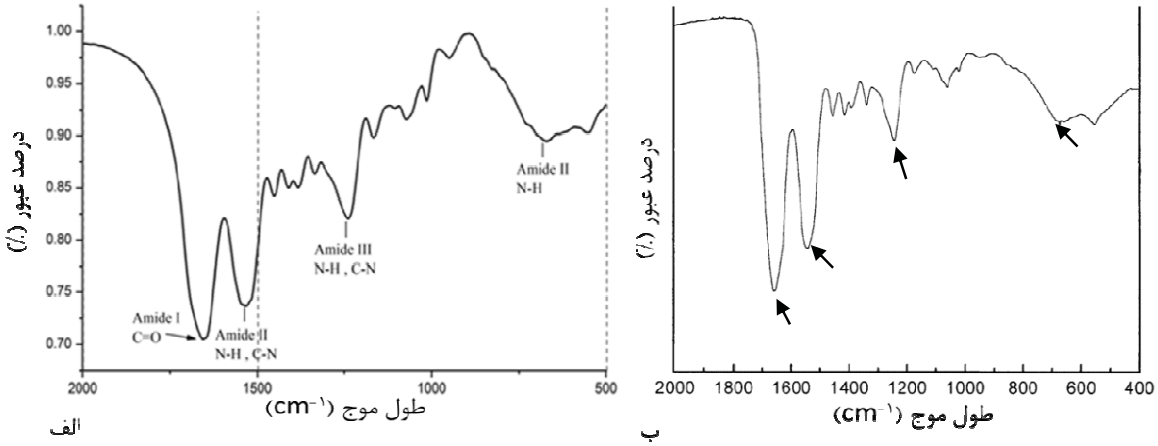
برای انجام آزمون زیست‌سازگاری بر روی فیبروئین فیلم فیبروئینی بازیابی شده تهیه شد. برای ایجاد یک لایه نازک فیبروئینی بر کف ظرف کشت ۱۰۰ میکرولیتر از محلول ٪۸ وزنی فیبروئین در داخل چاهک ظرف کشت پخش شد و به مدت یک شبانه روز زیر هود استریل خشک شد. برای بازیابی ساختاری و نامحلول کردن آن در آب، لایه نازک فیبروئینی به مدت ۳۰ دقیقه در مجاورت متانل ٪۹۹ قرار گرفت و سپس ۲ بار به طور کامل با PBS شستشو داده شد. برای بدست آوردن تعداد سلول‌های مورد نیاز سلول‌های استئوبلاست انسانی رده‌G292 در محیط کشت DMEM کم گلوکز حاوی ۱۰ واحد در میلی‌لیتر پنیسیلین و ۱۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر استرپتومایسین، ۹٪ سرم جنین گاویFBS در ۳۷ درجه سانتی‌گراد در انکوباتور مرطوب حاوی ٪۵ CO_2 / ٪۹۵ هوا ، تکثیر شد. برای انجام آزمون، ظرف کشت حاوی لایه‌های نازک با الکل ۷۰ درجه و تابش UV استریل شد. ۱۰۰,۰۰۰ سلول استئوبلاستی در چاهک پوشش داده شده و به مقدار مساوی در چاهک کنترل ریخته شد. به مدت ۴۸ ساعت در انکوباتور مرطوب در شرایط دمایی ۳۷درجه سانتی‌گراد و فشار٪۵ CO_2 قرار گرفت. ۲۰۰ میکرولیتر از محلول ٪۱۰ MTT (با غلظت ۵ mg/ml) در محیط کامل به هر چاهک اضافه و به مدت ٤ ساعت در ۳۷ درجه سانتی‌گراد انکوبه شد. پس از افزودن DMSO، شدت رنگ فورمازان ایجاد شده، توسط دستگاه الایزا با طول موج ۵۷۳ نانومتر مورد بررسی قرار گرفت. داده‌های خروجی دستگاه توسط نرم افزار SpSS 17.0 مورد تحلیل قرار گرفت. سلول‌های استئوبلاست G292 که روی فیلم‌های فیبروئینی کاشته شده بوند پس از ٤ روز ، توسط میکروسکپ الکترونی روبشی مورد بررسی مورفولوژیک قرار گرفتند. برای تهیه نمونه فیلم‌ها به مدت ۲ ساعت در گلوتارآلدهید ٪۵/۲ در PBS قرار داده شد. پس از شستشوی کامل با PBS در اوزمیوم‌تتراکساید ٪۱/۰ درPBS ۱/۰مولار به مدت ۳۰ دقیقه قرار داده شد و بار دیگر به دقت با PBS شتسشو داده شد. فرآیند آبگیری با استفاده از سری محلول‌های رقیق شده آستون با آب تکمیل‌شد. پس از آبگیری، نمونه‌ها به مدت ۱۲ ساعت در ۴۰- تا ۷۵- درجه سانتی‌گراد فریزدرای و در آخر، با لایه نازکی از طلا پوشیده شدند.

٤- تفسیر و تحلیل نتایج

به طور کلی چهار نوع مختلف از پیک‌های ارتعاشی مربوط به گروه‌های آمیدی در پروتئین‌ها وجود دارد. پروتئین-ها پیک‌های شاخصی را در فاصله cm^{-1} ۱۶۳۰ تا cm^{-1} ۱۶۵۰برای آمیدI (C=Oکششی)، در فاصلهcm^{-1} ۱۵۲۰ تا cm^{-1} ۱۵٤۰ برای آمیدII (NH ثانویه، خمشی) و در فاصله cm^{-1} ۱۲۳۰ تا cm^{-1} ۱۲۷۰ برای آمیدIII (N-H, C-Nگروه-های عاملی) در طیف IR خود نشان می‌دهند [۱۷]. بررسی طیف IR پلی‌پپتیدها را در ساختارهای مختلف در باندهای آمیدI وII نشان می‌دهد پیک پلی‌پپتیدها در فرم α-هلیکس برای باندهای آمیدI را در cm^{-1} ۱۶۵۵ ظاهر می‌شود. آمیدII نیز در فرم صفحات موازی در cm^{-1} ۱۵۳۰ پیک نشان می-دهد. پیک cm^{-1} ۱۶۵۵ نیز برای آمیدI در فرم پیچ‌های درهم پروتئین‌هایی که گروه‌های پپتیدی آنها با گروه‌های مجاور

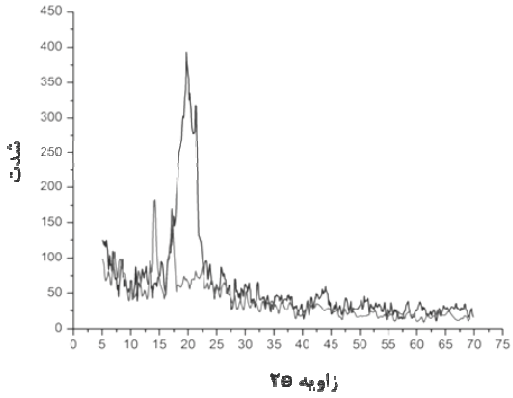
© Copyright 2012 ISBME, http://www.ijbme.org

پیوند هیدروژنی برقرار کرده‌اند دیده می‌شود[۱۸،۱۹]. شکل۳ الف طیف FTIR بدست آمده از پژوهش حاضر است؛ حضور بارز باندهای آمیدI در $^{-1}$ cm ۱۶۵۵ و آمیدII در $^{-1}$ cm ۱۵۳۰ و تایید آن در $^{-1}$ cm ۶۹۹ و آمیدIII در cm^{-1} ۱۲۳۹ وجود پروتئین را در ساختار مارپیچی و پیچ‌های درهم کاملاً تایید می‌کند. با مقایسه این نمودار و طیف FTIR ابریشم بوبیکس‌موری بدست آمده توسط دیگر محققان[۲۰] این اطمینان حاصل می‌شود که پروتیئن حاضر فیبروئین است(شکل ۳ ب).



شکل۳. الف) طیف FTIR فیبروئین استخراج شدهدر این پژوهش، ب) طیف FTIR فیبروئین گزارش شده توسط محققان دیگر

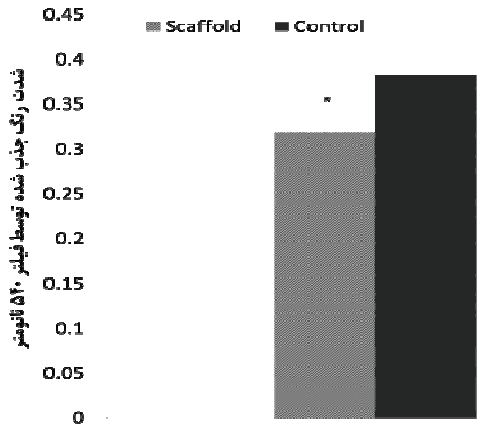
آزمون پراش پرتو ایکس به منظور بررسی تغییر میزان بلورینگی فیبروئین استحصال‌شده در دو مرحله قبل و بعد از بازیابی توسط متانول انجام شد. نتایج آزمون پراش پرتو ایکس در شکل٤ آمده است. دو پیک قوی در طیف مربوط به فیبروئین قبل از قرار گرفتن در متانول در ۲θ=۱٤۰ و ۲θ=٥/٦۰ قابل مشاهده است. این پیک‌ها نمایانگر ساختار silk I هستند[۲۱،۱۹]. در طیف فیبروئین بازیابی شده دو پیک شاخص در ۲θ=۲۰۰ و ۲θ=۲۱۰ دیده می‌شود که نشانه ساختار صفحات‌بتا در فیبروئین بازیابی شده است[۲۲،۲۳]. با توجه به سیستم طبیعی صفحات بتا در ابریشم طبیعی، می‌توان گفت که این الگوی منظم، پس از قرارگرفتن فیبروئین اولیه در متانول تا حد زیادی بازیابی شده است. ابریشم بازیابی‌شده خواص فیزیکی متفاوتی نسبت به فیبروئین اولیه دارد که از جمله می‌توان به عدم انحلال آن در شرایط معمولی در آب اشاره کرد.



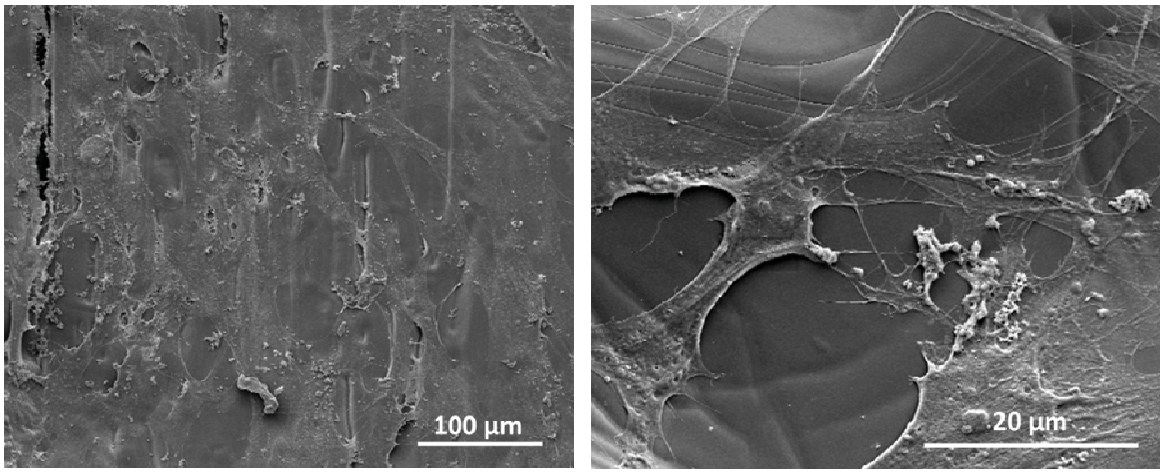
شکل٤. طیف XRD مربوط به فیبروئین قبل و بعد از بازیابی

© Copyright 2012 ISBME, http://www.ijbme.org

نتیجه بررسی چگالی رنگ فورمازان تولید شده توسط سلول‌ها در ۵۷۳ نانومتر توسط دستگاه الایزا و تحلیل داده‌های حاصل از دستگاه توسط نرم افزار SpSS 17.0 در نمودار شکل ۵ نشان داده شده است. با توجه به نمودار و نیز با استناد به غیرمعنی‌دار بودن ارزش p ($p=۲/۰$) می‌توان گفت میزان زنده‌بودن سلول‌ها بر روی لایه فیبروئینی تفاوت محسوسی با کف پلی‌استایرنی ظرف کشت نداشته است و از آنجایی که در انجام تست MTT چندین‌بار شستشو انجام شده، سلول‌ها از چسبندگی خوبی بر روی این سطح برخوردارند. شکل ٦ تصویر سلول‌های استئوبلاست بر سطح فیلم ابریشمی را نشان می‌دهند. سلول‌ها با بازوهای کاذب کشیده بر روی سطح فیلم فیبروئین گسترده شده‌اند و سطح آن را پر کرده‌اند.



شکل۵. مقایسه نتیجه آزمونMTT کنترل پلی استایرنی با فیلم فیبروئینی در برابر سلول‌های استئوبلاست، *ارزشp برابر با ۲/۰



شکل٦. سلول‌های استئوبلاست کشت داده شده روی فیلم فیبروئینی پس از چهار روز

© Copyright 2012 ISBME, http://www.ijbme.org

۵- نتیجه‌گیری

با توجه به کاربردهای نوظهور پروتئین ابریشم در زمینه فناوری‌های نوین از جمله زیست‌پزشکی، استخراج فیبروئین از پیله کرم بومبیکس‌موری به عنوان یک منبع اقتصادی و بومی (ایرانی) ابریشم مورد بررسی قرار گرفت. فیبروئین استحصال شده در این پژوهش دارای خلوص مورد نظر و خواص مطلوبی از جمله شکل‌پذیری و زیست‌سازگاری است. عدم سمیت و رشد سلول‌های استئوبلاست بر روی فیلم‌های تهیه شده از فیبروئین بازیابی شده نشان می‌دهد این ماده برای ساخت مواد مرتبط با سیستم‌های زنده قابلیت‌های بالقوه فراوانی دارد و می‌توان از آن به عنوان یک کاندید مناسب در زمینه‌های مختلف زیست‌پزشکی از جمله ساخت غشاها، داربست‌ها و لایه‌های نازک استفاده کرد.

سپاسگزاری

با سپاس فراوان از مسئول محترم وقت مرکز تحقیقات کرم ابریشم ایران، جناب آقای مهندس مواج‌پور، برای تامین پیله ابریشم بومبیکس‌موری و قدردانی ویژه از مرکز تحقیقات نانوپزشکی و مهندسی‌بافت دانشگاه شهیدبهشتی که پژوهش حاضر را مورد حمایت مالی قرار دادند.

مراجع

[1] D. Chow, M.L. Nunalee, D.W. Lim, A. J. Simnick, A. Chilkoti, “Peptide-based biopolymers in biomedicine and biotechnology”, Materials Science and Engineering (2008), R 62, 125–155.

[2] J.G. Hardy, L.M. Romer, T.R. Scheibel, “Polymeric materials based on silk proteins”, Polymer (2008), 49, 4309–4327.

[3] C. Veparia, D.L. Kaplan,” Silk as a biomaterial”, Prog. Polym. Sci. (2007), 32, 991–1007.

[4] O. Hakimi, D.P. Knight, F. Vollrath, P. Vadgama,” Spider and mulberry silkworm silks as compatible biomaterials”, Composites: Part B (2007), 38, 324–337.

[5] M. Yang, J. Kawamura, Z. Zhu, K. Yamauchi, T. Asakura, “Development of silk-like materials based on Bombyx mori and Nephila clavipes dragline silk fibroins”, Polymer (2009), 50, 117–124.

[6] S.C. Kundua, B.C. Dasha, R. Dasha, D. L. Kaplan,” Natural protective glue protein, sericin bioengineered by silkworms: Potential for biomedical and biotechnological applications”, Progress in Polymer Science (2008), 33, 998–1012.

[7] A. Sonthisombat, P.T. Speakman,” Silk: queen of fibers”, Thesis, University of leeds, UK, 2003.

[8] K. Numata, D. L. Kaplan,” Differences in Cytotoxicity of β-Sheet Peptides Originated from Silk and Amyloid β”, Macromolecular Bioscience (2011), 11, 60–64.

[9] Y. Zhang, “Applications of natural silk protein sericin in biomaterials”, Biotechnology Advances (2002), 20, 91–100.

[10] E.S. Sashina, A. M. Bochek, N. P. Novoselov, D.A. Kirichenko, “Structure and Solubility of Natural Silk Fibroin”, Russian Journal of Applied Chemistry (2006), 79, 869–876.

[11] G. Vunjak-Novakovic, R.I. Freshney, “Culture of cells for tissue engineering”, New Jersey, John Wiley & Sons, (2006), 323–330.

[12] S. Louisia, M. Stromboni, A. Meunier, L. Sedel, H. Petite,”Repair of a large segmental diaphyseal defect with coral: Influence of fresh bone marrow on osteogenesis and coral resorption" J. of bone and Joint Surgery (1999), 81, 719–724.

[13] U. Kim, J. Parka, H. J. Kim, M. Wadac, D. L. Kaplan,” Three-dimensional aqueous-derived biomaterial scaffolds from silk fibroin”, Biomaterials (2005), 26, 2775–2785.

[14] G. H. Altman, F. Diaz, C. Jakuba, T.Calabro, R. L. Horan, J. Chen, H. Lu, J. Richmond, D.L. Kaplan,” Silk-based biomaterials”, Biomaterials (2003), 24, 401–416.

[15] J.G. Hardy, T.R. Scheibel, “Composite materials based on silk proteins”, Progress in Polymer Science (2010), 35, 1093–1115.

[۱۶]دکتر مرتضی دهقان نژاد، "صنعت و تجارت ابریشم ایران در عصر زندیه" ، مجله الکترونیکی تاریخ و توسعه دانشگاه صنعتی اصفهان، ۱۳۸۸ .

[17] B.H. Stuart,” Infrared Spectroscopy: Fundamentals and Applications”, England, John Wiley & Sons, (2004),

[18] T. Miyazawa, E.R. Blout,” The Infrared Spectra of Polypeptides in Various Conformations: Amide I and II Bands”, Journal of American Chemical Society (1961), 83, 712–719.

[19] B.B. Mandal, S.C. Kundu,” Non-Bioengineered Silk Gland Fibroin Protein: Characterization and Evaluation of Matrices for Potential Tissue Engineering Applications”, Biotechnology and Bioengineering (2008), 6, 1237–1250.

[20] I.C. Um, H.Y. Kweon, Y. H. Park, S. Hudson,” Structural characteristics and properties of the regenerated silk fibroin prepared from formic acid”, International Journal of Biological Macromolecules(2001), 29, 91–97.

[21] J. Ayutsedea, M. Gandhib, S. Sukigarac, M. Micklusa, H. Chend, F. Ko,” Regeneration of Bombyx mori silk by electrospinning Part 3: characterization of electrospun nonwoven mat”, Polymer (2005), 46, 1625–1634.

[22] Z. H. Zhu, K. Ohgo, T. Asakura, “Preparation and characterization of regenerated Bombyx mori silk fibroin fiber with high strength”, Express Polymer Letters (2008), 12, 885–889.

[23] Y. Iridag, M.t Kazanci,” Preparation and Characterization of Bombyx mori Silk Fibroin and Wool Keratin”, Journal of Applied Polymer Science (2006), 5, 4260–4264.

© Copyright 2012 ISBME, http://www.ijbme.org