

طراحی و ترکیب نانوکامپوزیت‌های نوین کارآمد CMC/MMT/HAP و Fe₃O₄@MCM-41/HAP/APTES برای دارورسانی رهایش کنترل شده: تحویل هدفمند تری پاراتاید در مهندسی بافت استخوان

حمیدرضا حسینی

گروه مهندسی پزشکی، واحد تهران مرکزی، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران

مجید عبودوس*

گروه شیمی، دانشگاه صنعتی امیرکبیر، تهران، ایران

مصطفی گلشکن

مرکز تحقیقات بیوتکنولوژی پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی گیلان، رشت، ایران

پدرام طهرانی

گروه مهندسی پزشکی، واحد تهران مرکزی، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران

چکیده: رویکرد تحویل دارو در مهندسی بافت استخوان به دلیل آناتومی پیچیده استخوان و نیز محدودیت‌های دارورسانی با چالش‌هایی روبرو است. در پاسخ، نانوکامپوزیتهای جدید و کارآمد پاسخگو به pH، شامل نانوذرات مگنتیت (Fe₃O₄)، ترکیب موئیل ماده شماره ۴۱ (MCM-41)، هیدروکسی آپاتیت (HAP)، ۳-آمینو پروپیل (تری اتوکسی سیلان (APTES)، کربوکسی متیل سلولوز (CMC) و مونت موریلونیت (MMT) [(CMC/MMT/HAP) و Fe₃O₄@MCM-41/HAP/APTES] و هیدروژل (CMC/MMT/HAP) برای تحویل دقیق تری پاراتاید (PTH (1-34)) با هدف افزایش حلالیت، پایداری دارو و رهایش کنترل شده توسعه یافته است که جهت کاهش عوارض جانبی، نگرانی‌های ایمنی و ناراحتی ناشی از تزریق‌های مکرر بالقوه‌اند. نانوکامپوزیت‌ها از طریق فنون تحلیلی مختلف، از جمله پراش پرتو ایکس (XRD)، طیف‌سنجی فروسرخ تبدیل فوری (FT-IR)، تجزیه و تحلیل پتانسیل زتا، پراکندگی دینامیک نور (DLS) و میکروسکوپ الکترونی روبشی گسیلی میدانی (FE-SEM)، مورد بررسی قرار گرفتند. قطر بلوری متوسط نانوکامپوزیت‌ها به ترتیب ۴ ± ۲۷,۶ و ۱,۴ ± ۲۹,۲ نانومتر از رابطه شرر محاسبه شد و اندازه قطر هیدرودینامیکی به ترتیب ۸,۳ ± ۴۱۷,۰۲۳ و ۳,۸ ± ۱۹۳,۴۸ نانومتر و بار سطحی پایداریه ترتیب ۳۱- و ۴۰- میلی ولت را نشان دادند. علاوه بر این، بازده بارگذاری و گیرافتادن به ترتیب ۳۷٪ و ۹۰٪ برای نانوکامپوزیت اول و ۳۸٪ و ۸۲٪ برای نانوکامپوزیت دوم تعیین شد. آزمایش‌های انتشار دارو با استفاده از روش دیالیز همراه با تحلیل کروماتوگرافی مایع

*E-mail: phdabdouss44@aut.ac.ir

*عهده‌دار مکاتبات

با کارایی بالا (HPLC)، الگوی رهش پایدار را نشان دادند. با کاهش pH از ۷٫۴ به ۵٫۶، افزایش متناظر در انتشار دارو وجود داشت. نتایج مطالعه سینتیک رهش دارو از مدل هیگچی پیروی کرد که کاملاً با ویژگی‌های هدف آزادسازی نانو حامل‌ها و داروی تری‌پاراتاید مطابقت داشت و حفظ یکپارچگی نانو حامل را تایید کرد. نتایج تست سمیت سلولی طی ۲۴ ساعت روی رده سلولی NIH3T3 نه تنها هیچ سمیتی را نشان نداد بلکه اثر تکثیر و تمایز سلولی را ثبت کرد که این مشاهدات در مورد رده سلولی Saos-2 کنترل و محدود شد. بر اساس این یافته‌ها، نانو کامپوزیت‌های طراحی و ساخته شده با بیشترین تاثیر اجزا در بازسازی بافت استخوان، به عنوان یک سیستم دارورسانی، رویکردی بسیار کارآمد و زیست سازگار را برای افزایش اثربخشی درمانی ارائه و در نتیجه بر محدودیت‌های مرتبط با تحویل دارو غلبه می‌کنند.

واژه‌های کلیدی: نانو حامل‌های دارورسانی، هیدروکسی آپاتیت، نانوذرات مگنتیت، مونت موریلونیت، کربوکسی متیل سلولوز، تری پاراتاید

KEYWORD: Drug Delivery Nanocarriers, Hydroxyapatite, Magnetite Nanoparticles, Montmorillonite, Carboxymethyl cellulose, Teriparatide

مقدمه

شکستگی‌های استخوان، به ویژه در ستون فقرات و استخوان‌های بلند، تاثیر قابل توجهی بر سلامتی بیمار دارند و با نرخ بالای مرگ و میر همراه هستند [۱-۴]. چالش‌های درمان شامل بی‌ثباتی، اثربخشی کم دارو به دلیل فراهمی زیستی ضعیف و نیمه عمر کوتاه، و عوارض جانبی است [۵]. راه حل‌های نوظهور شامل عوامل درمانی نوآورانه [۶]، فناوری‌هایی مانند چاپ سه بعدی و داربست استخوانی [۷-۱۰]، نرم افزار اجزای محدود برای جراحی‌ها [۱۱]، روش‌های افزایش تراکم استخوان [۱۲، ۱۳]، دارورسانی هدفمند [۱۴]، و درمان‌های ترکیبی [۶] است. با توجه به توزیع گسترده استخوان‌ها [۱۵]، درمان‌های سیستمیک به غلظت خون کافی برای اثرات محیطی نیاز دارند که منجر به عوارض جانبی شدید و محدوده درمان بیماری استخوان محدود می‌شود. ارائه داروهای پروتئینی و پپتیدی به دلیل اندازه و حالیت چالش برانگیز است. بنابراین استراتژی‌های نوآورانه تحویل دارو حیاتی هستند. پپتیدهایی که به عنوان عوامل دارویی استفاده می‌شوند به دلیل بی‌ثباتی ذاتی، نیمه عمر کوتاه و فراهمی زیستی^۱ محدود با چالش‌های تحویل مختلفی مواجه می‌شوند. علاوه بر این، راه‌های تجویز تزریقی می‌تواند دست و پا گیر باشد. استراتژی‌های کنونی در حال توسعه فرمول‌های قوی و طولانی‌اثر با استفاده از فناوری‌های تحویل پیشرفته برای افزایش پایداری پپتید و طولانی‌تر کردن اثرات درمانی برای تقویت پایداری بیمار به بهبود است [۱۶].

هیدروکسی آپاتیت (HAP^۲)، گونه‌ای از فسفات‌های کلسیم، در دو دهه گذشته توجه قابل توجهی را در زمینه پزشکی به خود

جلب کرده است [۱۷]. خواص استثنایی آن، از جمله رسانایی استخوانی و زیست سازگاری بالا [۱۸]، آن را به یک ماده ایده‌آل برای کاربردهای متنوع تبدیل می‌کند که شامل پیوند استخوان، داربست، ایمپلنت، پوشش و سیستم‌های تحویل دارو می‌شود [۱۹]. تخلخل و ویژگی‌های سطحی تنظیم شده HAP، آن را به وسیله‌ای قوی برای انتشار کنترل شده دارو در بدن تبدیل می‌کند [۲۰]. قابل توجه است که HAP استفاده اولیه را در دارورسانی هدفمند به سمت مناطق آسیب دیده بافت استخوانی می‌یابد [۲۱].

نانوذرات Fe₃O₄ در پزشکی، زیست‌شناسی و داروسازی مورد توجه قرار گرفته‌اند که به دلیل خواص فوق پارامغناطیس، دمای کوریه پایین، غیر سمی بودن و زیست سازگاری برجسته هستند [۲۲-۲۴]. نانوذرات Fe₃O₄ همراه با میدان مغناطیسی را می‌توان برای ساخت مواد زیستی جدید برای درمان اختلالات استخوانی مرتبط با تحلیل استخوان که در آن تعادل بین سلول‌های استخوان ساز و جذب شونده مختل می‌شود، استفاده کرد [۲۵]. عوامل محافظ برای جلوگیری از لخته شدن و اکسیداسیون نانوذرات مگنتیت حیاتی هستند و پایداری کلونیدی را تضمین می‌کنند. پوشش با مواد آلی یا معدنی بارگذاری، تحویل و انتشار دارو را کنترل می‌کند، سمیت را کاهش می‌دهد و زیست سازگاری را افزایش می‌دهد. پوشش سیلیکا، به عنوان کاربرد رایج در کاتالیزور و دارورسانی، نانوذرات مگنتیت را از تجمع محافظت می‌کند و خواص را بهبود می‌بخشد [۲۶-۲۸]. سیلیکات‌های مزوپور فوایدی مانند مساحت سطح بزرگ، اندازه منافذ متنوع و پایداری را ارائه می‌دهند [۲۷، ۲۹]. پشتیبان‌های سیلیس را می‌توان با گروه‌های عاملی از نظر شیمیایی

(۱) Bioavailability

(۲) Hydroxyapatite (HAP)

با توجه به ویژگی‌ها و پتانسیل منحصر به فرد آن، CMC به طور گسترده در توسعه حامل‌های دارو استفاده می‌شود، زیرا توانایی آن در تشکیل دانه‌های ژل کروی در حضور یون‌های Fe^{3+} یا Al^{3+} است [۵۳، ۵۴]. شباهت ساختاری و شیمیایی آن با ستون فقرات پلی ساکارید کیتوزان، CMC را به یک زیرساخت امیدوارکننده برای چسبندگی سلولی و تکثیر در فرآیندهای ترمیم استخوان تبدیل می‌کند. ترکیب یا رشد هیدروکسی آپاتیت (HAP) در ماتریس CMC می‌تواند خواص فیزیکیوشیمیایی، مکانیکی و زیستی آن را افزایش دهد [۴۶، ۵۵]. با توجه به ویژگی‌های فیزیکیوشیمیایی و زیستی مفید، CMC یک ماتریس آلی مناسب برای ادغام ذرات هیدروکسی آپاتیت است. خواص مواد کامپوزیت تحت تاثیر پیوندهای هیدروژنی بین مولکولی و درون مولکولی و برهمکنش‌های الکترواستاتیکی بین گروه‌های عاملی روی سطح زنجیره‌های پلیمری و پرکننده معدنی است [۵۶]. تری پاراتید یا PTH (1-34)، یکی از داروهای راهبردی و بسیار موثر در بهبود و تراکم استخوانی است که استفاده از آن محدودیت‌هایی دارد و چالش‌هایی را ایجاد می‌کند. این دارو معمولاً از طریق تزریق زیر جلدی تجویز می‌شود که جذب و حذف سریع را نشان می‌دهد و منجر به نیمه عمر کوتاهی می‌شود. دوز استاندارد آن ۲۰ میکروگرم در روز است. پس از تجویز، تری پاراتید به حداکثر غلظت خود در جریان خون می‌رسد که در عرض سه ساعت کاهش می‌یابد. این افزایش گذرا در سطح کلسیم سرم به مدت ۱۶ تا ۲۴ ساعت ادامه می‌یابد و تقریباً ۱۰ درصد از بیماران را تحت تأثیر قرار می‌دهد که منجر به عوارض جانبی مانند سردرد، اختلالات گوارشی و افسردگی می‌شود [۵۷]. علاوه بر این، درمان طولانی مدت با تری پاراتید ممکن است منجر به افزایش میزان کلسیم خون و افزایش خطر تومور بدخیم استخوانی^۴ شود [۵۸]. در داربست‌های زیست پزشکی و سامانه‌های دارورسانی (DDS^۵)، مواد کامپوزیتی حاوی MMT، HAP و CMC به عنوان حامل‌های عامل درمانی امیدوارکننده ظاهر شده‌اند. این پیشرفت‌ها با ادبیات موجود، که نانساختارهای مختلفی را برای مهندسی بافت استخوان بررسی کرده‌اند، همراستا هستند. مانند نانو هیدروکسی آپاتیت/ کیتوزان/ کربوکسی متیل سلولز [۵۴، ۵۹]، نانوکامپوزیت‌های پلی اتیلن/هیدروکسی آپاتیت با چگالی بالا پر شده از مونت موریلونیت اصلاح شده ارگانیک برای کاربردهای زیست پزشکی [۶۰]، نانوکامپوزیت‌های زیست همانندسازی^۶ کربوکسی متیل سلولز-هیدروکسی آپاتیت [۶۱]، مخلوط کربوکسی متیل سلولز/ اسید سیتریک/ شلاک و هیدروکسی آپاتیت خود ضد باکتری (CMC/CA/SHL/HA) برای پانسمان تعاملی زخم [۶۲]،

اصلاح کرد [۳۰-۳۲]. ترکیب موبیل ماده شماره ۴۱ (MCM-41) به عنوان یک حامل برای داروهای کم محلول مورد مطالعه قرار گرفته است [۳۳، ۳۴]. کاربرد جدیدی از مواد مزوپور (MCM-41)، به عنوان بازسازی کننده استخوان گزارش شده است [۳۵]. تحقیقات همچنین بر روش‌های مصنوعی ساده تر و کارآمد برای سیستم‌های رهایش کنترل شده دارو تأکید می‌کند [۲۶، ۳۶-۳۹]. مونت موریلونیت (MMT^۲) یک کانی سیلیکات زیست تخریب پذیر با ساختار ورقه مانند چند لایه است. خاک رس نانساختار یک ماده پرکننده کارآمد است که با مساحت سطح قابل توجه و نسبت ابعاد آن متمایز می‌شود. از طریق تبدیل این داربست‌ها به نانوصفحات گرافن مانند داربست‌های استخوانی را تقویت می‌کند و فرآیندهای تبادل یونی را تسهیل می‌کند [۴۰، ۴۱]. MMT نوید قابل توجهی را در تحویل دارو نشان می‌دهد که به توانایی آن در محصور کردن و رهاسازی مؤثر داروها در حین محافظت از آنها در ماتریس طبقه‌بندی شده خود نسبت داده می‌شود [۴۲]. ویژگی‌های متمایز MMT استحکام مکانیکی را تقویت می‌کند و اجازه می‌دهد که مولکول‌های پلیمری در هم آمیخته شوند [۴۱]. ادبیات علمی به صراحت ثابت می‌کند که ترکیب نانورس در پلیمرها باعث افزایش قابل توجه خواص مکانیکی و حرارتی می‌شود [۴۳-۴۵].

کربوکسی متیل سلولز (CMC^۳) یک پلیمر آنیونی طبیعی است که از سلولز از طریق اصلاح شیمیایی بدست می‌آید [۴۶-۴۸]. که به وفور در زیست توده یافت می‌شود، می‌توان آن را به راحتی از منابع جنگلی در مقادیر قابل توجهی تهیه کرد [۴۹]. ویژگی‌های متمایز آن، از جمله حالیت در آب، شفافیت، آب دوستی، غیرسمی بودن، زیست تخریب پذیری، زیست سازگاری و قابلیت تشکیل فیلم، توجه زیادی را به خود جلب کرده است. CMC کاربردهای گسترده‌ای پیدا کرده است، به ویژه در سیستم‌های دارورسانی و زمینه‌های پزشکی حیاتی [۴۶، ۵۰]. خواص ذاتی آن، مانند ژل شدن توسط پیوندهای هیدروژنی، ظرفیت کلات کردن یون‌های کلسیم از طریق گروه‌های عاملی کربوکسیلیک، و توانایی انتقال از ژل به جامد در دماهای پایین از طریق اتصال متقابل ناشی از حرارت، CMC را به عنوان یک انتخاب استثنایی برای ماتریس پلیمری زیستی تبدیل کرده است [۵۱، ۵۲]. پلیمرهای طبیعی مانند CMC معایب مرتبط با ماکرومولکول‌های مصنوعی مانند پلی لاکتیک اسید، پلی کاپروکس و پلی آکریلات را نشان نمی‌دهند، که ممکن است فاقد زیست سازگاری و حاوی ناخالصی‌های سمی بالقوه باشند [۴۲، ۵۳].

(۱) Mobil Composition of Matter No.41 (MCM-41)

(۳) Carboxymethyl cellulose (CMC)

(۵) Drug Delivery System (DDS)

(۲) Monmorillonite (MMT)

(۴) Osteosarcoma

(۶) Biomimetic

جدول ۱- مواد مورد استفاده در پژوهش

عامل شیمیایی	نام تجاری و خلوص
سدیم کربوکسی متیل سلولز (Mw) (CMC=۹۰,۰۰۰)	شرکت مرک (آلمان)
پودر مونت موریلونیت (MMT)	شرکت سیگما آلدریج
هیدروکسی آپاتیت با خلوص بالا (HAP)	شرکت نیک سرام رازی
تترا اتیل ارتوسیلیکات (TEOS ^(۱))	شرکت مرک (آلمان)
ستیل تری متیل آمونیوم بروماید (CTAB ^(۲))	شرکت مرک (آلمان)
$6H_2O \cdot FeCl_3$	شرکت مرک (آلمان)
$4H_2O \cdot FeCl_3$	شرکت مرک (آلمان)
۳-آمینو پروپیل (تری اتوکسی سیلان) (APTES ^(۳))	شرکت مرک (آلمان)
NH ₃	شرکت مرک (آلمان)
NaOH	شرکت مرک (آلمان)
NaF	شرکت مرک (آلمان)
HCl	شرکت مرک (آلمان)، ۳۷٪
تری پاراتید ^(۴) (PTH (1-34)) (سینوپار)	شرکت سیناژن
آب گرید HPLC	شرکت مرک (آلمان)
اتانول	شرکت مرک (آلمان)، ۹۹٪
متانول	شرکت مرک (آلمان)، ۹۹٪
مونولئات سوربیتان (Span ۸۰)	سیگما آلدریج
روغن پارافین	سیگما آلدریج
محلول نمک فسفات با خاصیت بافری (PBS)	سیگما آلدریج
مجموعه‌ای از محلول‌های نمکی بافر فسفات (PBS) (pH=۷,۴, ۰,۱M)	
آب دیونیزه خالص	تولید شده با استفاده از فناوری اسمز معکوس دوگانه با رسانایی ۰,۰ میکرو زمینس

جدول ۲- تجهیزات و ابزارهای بکار رفته در این پژوهش

ابزار	برند و مدل
طیف سنجی FT-IR	ژاپن، مدل ۴۷۰- در محدوده $4000-400 \text{ cm}^{-1}$
پراش سنجی اشعه ایکس (XRD)	دستگاه X Thermo Scientific ARL EQUINOX 3000
پراکندگی دینامیک نور (DLS) و پتانسیل زتا	Malvern Zetasizer ZS (مالورن، انگلستان)
میکروسکوپ الکترونی روبشی (SEM)	فیلیپس XL 30 و KYKYEM3200
میکروسکوپ الکترونی انتقالی (TEM)	PHILIPS CM10 HT مدل ۱۰۰ کیلو ولت
خشک کن انجمادی	سیستم لیوفیلیزاسیون ^(۵) کریست (آلمان)
حمام فرا صوت	Steelco US 80
پویشگر فراصوت	Hielscher (UP100H)
گرمچال	Genlab Ltd
سانتریفیوژ	Beckman Coulter GmbH
کیسه دیالیز	قطع ۱۲ کیلو دالتون و تریپسین
کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا (HPLC)	1260 Infinity II
انکوباتور	sh، نور صنعت فردوس
pH متر	pH متر دیجیتالی Jenway مجهز به الکتروود ترکیبی شیشه-کالومل

داربست‌های کامپوزیت هیدروکسی آپاتیت متخلخل اصلاح شده با کیتوزان [۶۳]، دانه‌های کامپوزیتی $Fe_3O_4@C$ /کربوکسی متیل سلولز/کیتوزان [۵۳]، کربوکسی متیل سلولز-جی-پلی آکریل آمید/مونتموریلونیت برای دارورسانی هدفمند به کولون [۶۴]، Fe_2O_3 /کیتوزان/مونتموریلونیت برای کوئرستین رسانی [۶۵]، و هیدروژل کیتوزان/لاپونیت RD و پیوندی با هیدروکسی آپاتیت [۶۶]. در این مطالعه، تاکید بر طراحی، تولید و مقایسه نانو کامپوزیت‌های قابل کنترل بود که با ساختارهای هسته-پوسته مشخص می‌شوند. این نانو کامپوزیت‌های با کارایی بالا، ادغام شده با رویکرد مهندسی بافت استخوان و دارای اجزایی با بیشترین اثر در بازسازی بافت استخوان، برای کاهش عوارض جانبی دارو در کل دستگاه گردش خون و رفع محدودیت‌های مرتبط با تحویل دارو، توسعه و تولید شدند. بنابراین آزادسازی کنترل شده و طولانی دارو را ممکن می‌سازند. متعاقباً، نانو کامپوزیت‌ها با ارزیابی‌های ریخت شناسی، اندازه ذرات، کارایی به دام افتادن، نمودارهای رهاسازی دارو و مدل سازی فارماکوکینتیک رهایش دارو، ایجاد سیستم‌های نوین دارورسانی تخصصی و هدفمند را تایید کردند.

بخش تجربی

مواد و دستگاه‌ها

مواد و تجهیزات بکار رفته در این مطالعه در جدول‌های ۱ و ۲ آمده‌اند.

طراحی و ساخت نانو کامپوزیت هسته-پوسته

 $Fe_3O_4@MCM-41/HAP/APTES$ ساخت نانوذرات Fe_3O_4

برای این منظور ساخت نانوذرات مگنتیت به دنبال روش هم رسوبی انجام شد [۶۷، ۶۸]. برای تهیه محلول فروس و فریک کلرید، ۳،۶ گرم $FeCl_3 \cdot 6H_2O$ ۴،۰ گرم $FeCl_2 \cdot 4H_2O$ و ۱،۷ میلی لیتر HCl (۱۲ mol/L) در ۵۰ میلی لیتر آب دیونیزه شده در یک بشر حل شد. محلول سپس با استفاده از گاز آرگون گاز زدایی شد و تا دمای ۸۰ درجه سلسیوس در راکتور گرم شد. به طور همزمان، ۲۵۰ میلی لیتر آمونیاک (۱،۵ mol/L) به تدریج در حالی که با گاز آرگون محافظت شده بود به محلول اضافه شد و با سرعت ۱۰۰۰ دور در دقیقه به شدت هم زده شد. در طول این فرآیند، دمای محلول در ۸۰ درجه سلسیوس حفظ شد و گاز آرگون به طور مداوم برای جلوگیری از نفوذ اکسیژن وارد شد. نانوذرات Fe_3O_4 به دست آمده با استفاده از یک آهن ربای خارجی جمع‌آوری شد و سپس چهار شستشو با ۵۰۰ میلی لیتر آب دوبار مقطر

(۱) Tetraethyl orthosilicate, formally named tetraethoxysilane (TEOS).

(۳) (3-Aminopropyl)triethoxysilane (APTES).

(۵) Christ lyophilization, freeze dryer.

(۲) Cetyltrimethylammonium bromide (CTAB).

(۴) Teriparatide (PTH 1-34) is a medication that includes a sequence of 34 amino acids contained in parathyroid hormone.

در مرحله آخر، HAP فعال شده به دست آمده از مرحله ۲ به تدریج به محلول تهیه شده در مرحله ۱ اضافه شد. مخلوط حاصل با استفاده از دستگاه فراصوت به مدت ۳۰ دقیقه در دمای ۴۰ درجه سلسیوس هم زده شد. پس از آن، رسوب با استفاده از یک آهنربای خارجی جدا شد و در یک کوره ۸۰ درجه سلسیوس آبیگری شد.

اصلاح سطح $Fe_3O_4@MCM-41/HAP$ توسط APTES

نانوکامپوزیت حاصل با APTES برای معرفی گروه آمینه روی سطح آن فعال شد. بنابراین، برای سنتز نمونه عامل دار APTES، ۲۰۰ میلی گرم $Fe_3O_4/MCM-41/HAP$ در ۵۰ میلی لیتر اتانول پراکنده شد. سپس ۳ میلی لیتر APTES به مدت ۲۴ ساعت تحت هم‌زدن شدید مغناطیسی به محلول اضافه شد. پس از آن، رسوب قهوه‌ای با آب دیونیزه سه بار و سپس با متانول چهار بار برای حذف واکنش دهنده‌های اضافی شسته شد و در دمای ۷۰ درجه سلسیوس خشک شد.

بارگیری PTH (1-34) روی نانوکامپوزیت $Fe_3O_4@MCM-41/HAP/APTES$

برای این منظور، ۱۰ میلی لیتر آب مقطر با ۰٫۱ گرم از نانوکامپوزیت ترکیب شد. سپس این مخلوط به مدت ۳۰ دقیقه تحت روش فراصوت در وان قرار گرفت تا از توزیع یکنواخت نانوکامپوزیت اطمینان حاصل شود. سپس محلول نانوکامپوزیت به همزن منتقل شد و ۱ میلی لیتر از دارو با غلظت ۳۰۰ میکروگرم بر میلی لیتر به آن اضافه شد. مخلوط به مدت ۳ ساعت هم زده شد. پس از این، محلول به مدت ۱۰ دقیقه در معرض دستگاه خروج از مرکز قرار گرفت تا هرگونه داروی غیرمتصل حذف شود. در نهایت، نانوکامپوزیت بارگیری شده با دارو به روش منجمد خشک شد.

طراحی و ساخت نانوحامل CMC/MMT/HAP

آزمایش با استفاده از ۰٫۷ گرم از پلیمر کربوکسی متیل سلولز (CMC) به حجم ۳۵ میلی لیتری اتانوتیک اسید ۲ درصد (v/v) آغاز شد. فرآیند انحلال با دقت در دمای اتاق با استفاده از یک همزن گرم کن انجام شد و یک محلول یکنواخت ۲٪ (w/v) از CMC را تشکیل داد. پس از آن، محلول CMC تحت روش فراصوت در حمام مخصوص به مدت ۱۰ دقیقه قرار گرفت. پس از این مرحله، ۳۵ میلی گرم مونت موریلونیت (MMT) با دقت به محلول اضافه شد تا از همگن شدن کامل اطمینان حاصل شود. این فرآیند یکپارچه سازی با استفاده از همزن گرم کن اجرا شد. در مرحله بعدی، ۳۵ میلی گرم هیدروکسی آپاتیت (HAP) به محلول وارد شد. این مرحله با حفظ یکنواختی محلول با دقت و دقت انجام شد.

و اتانول (۵۰:۵۰) انجام شد. در نتیجه، نانوذرات مگنتیت به دست آمده در ۵۰۰ میلی لیتر آب دیونیزه شده بدون گاز معلق شدند، که منجر به غلظت ۶٫۲ میلی گرم در میلی لیتر برای نانوذرات Fe_3O_4 شد. رسوب متعاقباً یک شبه در دمای ۵۰ درجه سلسیوس خشک شد [۶۹].

ساخت $Fe_3O_4@MCM-41$

برای دستیابی به ساختار استاندارد پوسته-هسته، بسیار مهم است که با انتخاب غلظت کم نانوذرات مغناطیسی و قرار دادن آنها در معرض امواج فراصوت شروع شود. این مرحله تضمین می‌کند که اکسید آهن چند غیراشباع در پوسته سیلیس تشکیل نمی‌شود. پس از تکمیل ترکیب تازه، پوشش فوری Fe_3O_4 MNPs با $MCM-41$ برای جلوگیری از اکسیداسیون انجام می‌شود. در طول فرآیند پوشش، نانوذرات Fe_3O_4 (۱٫۵ گرم) و ۵ میلی لیتر (۲۵٪) محلول آمونیاک با ۵۰ میلی لیتر آب مقطر در یک راکتور شیشه‌ای مخلوط شدند. پس از این، مخلوط به مدت ۲ دقیقه در دمای ۴۰ درجه سلسیوس تحت فراصوت قرار گرفت. سپس ۱۰ میلی لیتر محلول TEOS به تدریج به مخلوط اضافه شد. محلول در یک همزن مغناطیسی در دمای ۴۰ درجه سلسیوس به مدت یک ساعت به هم زده شد. پس از آن، ۰٫۹ گرم (۰٫۱ mol/L) NaOH و ۰٫۱۹ گرم NaF اضافه شد و برای یک ساعت دیگر هم زد. پس از آن، ۴ گرم عامل فعال سطح CTAB، به عنوان یک الگو، معرفی و به آرامی اضافه شد و به مدت ۲٫۵ ساعت هم زده شد. سپس ترکیب حاصل به مدت ۴۸ ساعت در یک اتوکلاو تحت پردازش هیدروترمال قرار گرفت تا یک نانوکامپوزیت هسته-پوسته تولید شود. پس از پردازش هیدروترمال، نانوکامپوزیت چندین بار با محلول اتانول و آب دیونیزه (۵۰:۵۰) شستشو شد. در نهایت، رسوب جدا شده در یک کوره در دمای ۶۰۰ درجه سلسیوس کلسینه شد و در نتیجه کامپوزیت مزوپور $Fe_3O_4@MCM-41$ تشکیل شد [۷۰، ۷۱، ۷۲].

ساخت $Fe_3O_4@MCM-41/HAP$

این ترکیب از طریق یک فرآیند سه مرحله‌ای انجام شد. در مرحله اول، ۰٫۷ گرم $Fe_3O_4@MCM-41$ در ۱۰ میلی لیتر آب دیونیزه (pH=۵، تنظیم شده با HCl) پراکنده شد و روی همزن در دمای ۴۰ درجه سلسیوس به مدت ۶۰ دقیقه حرارت داده شد. با حرکت به مرحله ۲، HAP با افزودن آن به ۱۰ میلی لیتر آب دیونیزه (pH=۸٫۵، تنظیم با NaOH)، با استفاده از نسبت وزنی HAP به $Fe_3O_4@MCM-41$ (به نسبت ۱ به ۵) فعال شد. مخلوط به مدت یک ساعت در دمای ۴۰ درجه سلسیوس به هم زده شد و سپس پالایش و خشک شدن فاز جامد انجام شد.

مطالعه انتشار دارو در شرایط آزمایشگاهی

انتشار دارو از نانوحامل‌ها با استفاده از روش دیالیز بررسی شد. آزمایش‌ها با غوطه‌ور کردن غشای دیالیز حاوی نانوکامپوزیت‌های بارگیری شده با دارو در آب نمک بافر فسفات در دمای ۳۷ درجه سلسیوس با سطوح pH برابر ۷٫۴ و ۵٫۶ انجام شد. نمونه‌ها در فواصل منظم ۰، ۱، ۲، ۳، ۶، ۱۲ و ۲۴ ساعت جمع‌آوری شد و هر بار ۱ میلی‌لیتر از محلول PBS اطراف قبل از افزودن بافر تازه استخراج شد. سپس محیط رهاسازی با استفاده از کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا (HPLC) برای اندازه‌گیری غلظت PTH (1-34) مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت. هر آزمایش سه بار تکرار شد و درصد رهاسازی PTH (1-34) از نانوکامپوزیت‌ها در دو pH مورد ارزیابی قرار گرفتند. تجزیه و تحلیل آماری (ANOVA) برای تأیید رفتار انتشار پاسخگو به pH پلت فرم سنتز شده انجام شد.

$$\text{PTH (1 - 34) released (\%)} = \frac{\text{Amount of PTH released at time "t"}}{\text{Amount of PTH loaded in the nanocomposite}} \times 100 \quad (3)$$

سنجش سمیت سلولی

سمیت سلولی دو نانوکامپوزیت مورد بررسی در این مطالعه، با استفاده از روش MTT^۲ مطابق دستورالعمل‌های ذکر شده در مطالعات قبلی ارزیابی شد [۵۸]. برای این منظور از رده سلولی نرمال فیبروبلاست جنین موش NIH3T3 و نیز رده سلولی Saos-2 استفاده شد. میزان زنده ماندن سلول با استفاده از معادله ۴ محاسبه گردید.

$$\text{Cell Viability (\%)} = \frac{\text{Sample absorption}}{\text{Control absorption}} \times 100 \quad (4)$$

نتایج و بحث

ارزیابی نانوکامپوزیت‌های تولید شده

نانوکامپوزیت‌ها به طور جامع با استفاده از فنون مختلف از جمله FT-IR، XRD، DLS، پتانسیل زتا و SEM مورد ارزیابی قرار گرفتند. برای تجزیه و تحلیل پیوندهای شیمیایی و گروه‌های عاملی موجود استفاده شد. برای تجزیه و تحلیل XRD از پراش سنج بروکر دی-۲ فازر^۳ مجهز به تابش CuK α ، فیلتر نیکل و ابزار بروکر لینکسی^۴ استفاده شد. این تجزیه و تحلیل با هدف کشف ویژگی‌های سطح و ماهیت بلوری مواد انجام شد. اندازه‌گیری‌ها در محدوده ۲ θ از ۱۰ تا ۸۰ درجه، با سرعت اسکن در ۰٫۰۵ درجه بر ثانیه انجام شد. میانگین ابعاد بلور با استفاده از تقریب شرر تعیین شد [۶۵]. تجزیه و تحلیل DLS برای ارزیابی توزیع اندازه و پایداری کلئیدی

بارگیری PTH (1-34) روی نانوحامل توسط روش امولسیون دوگانه

هیدروژل در ابتدا با PTH (1-34) تزریق شد تا به غلظت نهایی ۵ میکروگرم در میلی‌لیتر برسد. پس از آن، این مخلوط تحت یک انکوباسیون ۳۰ دقیقه‌ای بر روی یک همزن گرم شده برای تسهیل بارگذاری قرار گرفت. در نتیجه، یک هیدروژل CMC/MMT/HAP یکپارچه حاوی PTH (1-34) تولید شد. در مرحله بعدی، یک سرنگ ۱۵ میلی‌لیتر از هیدروژل بارگیری شده با تری پاراتید به فاز آبگریز وارد شد که شامل ۴۵ میلی‌لیتر روغن پارافین حاوی ۲٪ عامل فعال سطح Span80^۱ بود. در حالی که با استفاده از یک همزن مغناطیسی به شدت همزده می‌شد، هیدروژل به تدریج برای تولید نانوحامل‌هایی که دارو را در یک پیکربندی کروی در فاز آبگریز محصور می‌کرد، اضافه شد. پس از یک فاصله ۱۰ دقیقه‌ای، حجم معادلی از فاز آبگریز (۴۵ میلی‌لیتر) به دقت قطره قطره به آب مقطر (فاز آبی) وارد شد تا یک امولسیون ایجاد شود. پس از ۱۵ دقیقه، مخلوط از همزن جدا و اجازه داده شد به مدت ۵ دقیقه بماند و لایه بندی لایه‌ها را امکان پذیر کند. پس از آن، فاز لیپیدی با استفاده از دستگاه نمونه برداری استخراج و نانوحامل دارو از طریق دستگاه خروج از مرکز با دور ۴۵۰۰ به مدت ۱۵ دقیقه از حالت آبی، بیشتر جدا شد. یک دستگاه انجماد خشک کردن برای خشک کردن هر نمونه از طریق فازهای مجزا استفاده شد. در ابتدا نمونه با انجماد در یخچال در دمای ۲۰- درجه سلسیوس جامد شد. پس از آن، فرآیند خشک کردن انجمادی آغاز شد.

تعیین کارایی کپسولاسیون (EE) و بارگذاری دارو (DL)

برای ارزیابی اثربخشی بارگذاری دارو و کپسوله‌سازی، ۱ میلی‌گرم از نانوحامل‌های خشک شده به روش انجمادی Fe₃O₄@MCM-41/HAP/APTES/PTH (1-34) و CMC/MMT/HAP@PTH (1-34) در ۱ میلی‌لیتر سالیین بافر فسفات (PBS) حل شدند. سپس نانوحامل‌ها با ۱ میلی‌لیتر اتیل استات مخلوط شدند تا هم نانوکامپوزیت و هم دارو استخراج شود. معادلات ۱ و ۲، به ترتیب برای محاسبه درصد کپسوله‌سازی و راندمان بارگذاری دارو استفاده شدند.

$$\text{Encapsulation Efficiency (\%)} = \frac{(\text{Total Amount of PTH}) - (\text{Free Amount of PTH})}{\text{Total Amount of PTH}} \times 100 \quad (1)$$

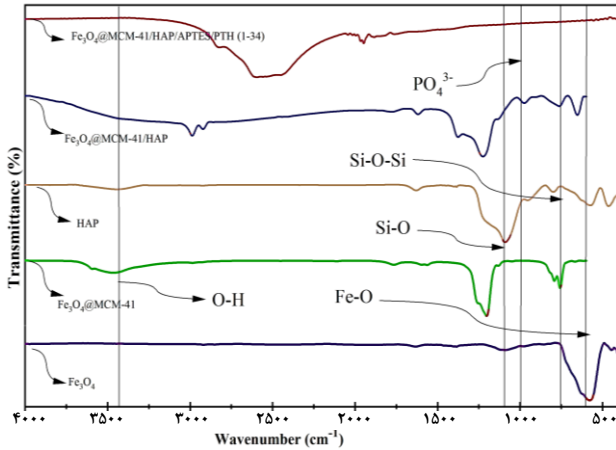
$$\text{Loading Efficiency (\%)} = \frac{(\text{Total Amount of PTH}) - (\text{Free Amount of PTH})}{\text{Total Amount of Nanocomposite}} \times 100 \quad (2)$$

(۱) Surfactant

(۳) Bruker D2 Phaser

(۲) MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide)

(۴) Bruker Lynxeye



شکل ۱- طیف‌های FT-IR اجزای مختلف درون نانوکامپوزیت $Fe_3O_4@MCM-41/HAP/APTES/PTH (1-34)$ و نمایش ارتعاشات مربوطه.

طیف FT-IR طیف‌های یکسانی را برای هر دو نمونه Fe_3O_4 و $Fe_3O_4@MCM-41$ نشان داد که ساخت موفقیت‌آمیز آنها را تأیید می‌کند. علاوه بر این، در شکل ۱، حضور $PTH (1-34)$ از طریق یک اتصال آمید قوی با گروه $C=O$ واقع در عدد موج 1749.2 cm^{-1} مشهود بود. برهمکنش بین خمش $N-H$ و کشش $C-N$ گروه $C-N-H$ منجر به پیوند کششی در عدد موج 1435 cm^{-1} شد [۱۶].

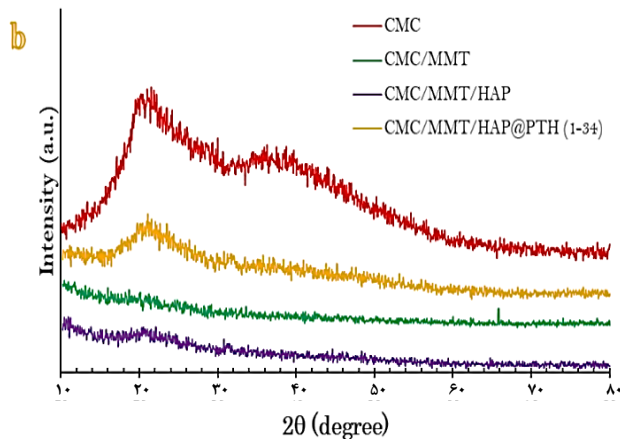
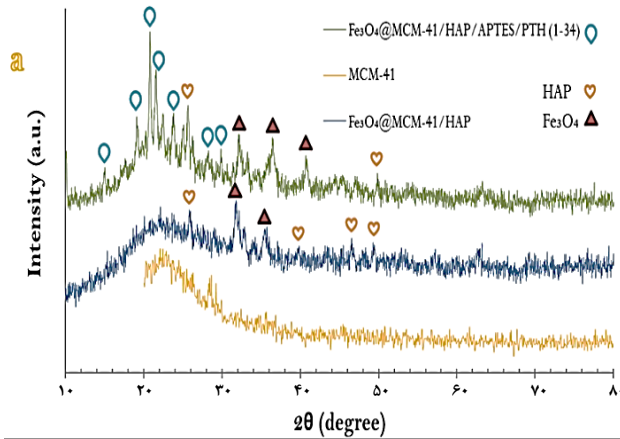
در مورد نانو کامپوزیت $CMC/MMT/HAP@PTH (1-34)$ هنگام تجزیه و تحلیل طیف مادون قرمز (IR) هیدروکسی آپاتیت خالص (HAP)، مونت موریلونیت (MMT)، کربوکسی متیل سلولز (CMC) (شکل ۲- a، b، و c)، و نانوکامپوزیت نهایی، آشکار می‌شود که اوج‌های متمایز موجود در HAP، CMC، و MMT خالص نیز در طیف نانوکامپوزیت $CMC/MMT/HAP@PTH (1-34)$ ظاهر می‌شوند. همانطور که در شکل ۲- نشان داده شده است، طیف MMT خالص نوارهایی را در 527 cm^{-1} و 1031 cm^{-1} نشان می‌دهد که به ترتیب مربوط به تغییر شکل $Si-O-Al$ و کشش $Si-O$ است. یک نوار کمتر برجسته، نسبت داده شده به خمش OH مربوط به H_2O ، در 1629 cm^{-1} مشاهده می‌شود. نوار مرتبط با کشش ساختاری OH در 3622 cm^{-1} است [۶۳]. تجزیه و تحلیل FT-IR از CMC خالص یک اوج جذب گسترده 3445 cm^{-1} نشان می‌دهد، که نشان‌دهنده بسامد کشش مرتبط با گروه‌های OH است. قله‌های 2932 cm^{-1} و 1065 cm^{-1} به ترتیب با ارتعاشات کششی پیوندهای $C-H$ و $C-O$ مطابقت دارند [۷۳]. همچنین دو نوار در اعداد موج 1630 cm^{-1} و 1410 cm^{-1} مشاهده می‌شود که اولی به ارتعاش متقارن و دومی به ارتعاش نامتقارن COO^- (گروه کربوکسیلات) نسبت داده می‌شود [۷۴].

مورد استفاده قرار گرفت و بینش ارزشمندی را در مورد پراکندگی ذرات در نمونه ارائه کرد. اندازه‌گیری‌های پتانسیل زتا برای ارزیابی پایداری میدان الکترواستاتیک، که برای درک ویژگی‌های پراکندگی نمونه حیاتی است، انجام شد. علاوه بر این، SEM و FE-SEM برای بررسی ریخت شناسی نانوساختار، شناسایی ترکیبات شیمیایی خاص، و تجزیه و تحلیل تقارن، جهت‌گیری و نقص‌های بلوری موجود در ماده مورد استفاده قرار گرفت. این ارزیابی کامل و چند بعدی، درک جامعی از خواص و ویژگی‌های نانوکامپوزیت‌ها ارائه داد.

تحلیل تبدیل فوریه مادون قرمز (FT-IR)

شکل ۱- طیف‌های FT-IR اجزای مختلف درون نانوکامپوزیت $Fe_3O_4@MCM-41/HAP/PTH (1-34)$ را نشان می‌دهد که شواهدی برای ساختار شیمیایی نانوکامپوزیت‌های تولید شده ارائه می‌کند. قله‌های گسترده‌ای از اعداد موج 3250 تا 3450 مشاهده شدند که مربوط به ارتعاشات خمشی $O-H$ سطح OH^- و آب جذب شده است. همچنین، در حدود 1600 cm^{-1} ، نوسانات در حال گسترش این پیوندها وجود داشت. همه ترکیبات مزوپور جذب مشخصه ساختار $MCM-41$ را در 475 cm^{-1} ، 820 cm^{-1} و 1089 cm^{-1} نشان دادند که از حالت‌های خمشی و کششی متقارن و نامتقارن پیوندهای $Si-O-Si$ ناشی می‌شوند [۷۲]. اعداد موج 563 cm^{-1} و 503 cm^{-1} به ترتیب با ارتعاشات $Fe-O$ در سایت‌های چهار وجهی و هشت وجهی همراه بودند. علاوه بر این، یک قله برجسته در 1100 cm^{-1} ارتعاش کششی $Si-O$ را در پوسته سیلیسی غیر متبلور^۱ تأیید کرد و حضور Fe_3O_4 را به عنوان هسته مغناطیسی تأیید کرد. مقایسه طیف‌ها برای $Fe_3O_4@MCM-41$ ، $Fe_3O_4@MCM-41/HAP$ و $Fe_3O_4@MCM-41/HAP/APTES/PTH (1-34)$ نشان دادند که در مورد نانوحامل $Fe_3O_4@MCM-41/HAP/APTES/PTH (1-34)$ طیف مربوطه حضور دی‌اکسید سیلیکون ناشی از تشکیل پیوند $Fe-O-Si$ از طریق TEOS و همچنین حضور گروه‌های هیدروکسیل را نشان داد. این طیف همچنین ارتعاشات کششی و خمشی $C-H$ تری‌آلکوکسی ارگانوسیلان‌های نوع پایانی $(R_1O)_3SiR_2$ منسجم از TEOS را در اعداد موج $3000-2800\text{ cm}^{-1}$ و 1400 cm^{-1} نشان می‌دهد [۶۸]. مناطق با شدت بالا در حدود 1000 cm^{-1} نشان‌دهنده ارتعاش کششی گروه‌های PO_4^{3-} در طیف‌های FT-IR نانوحامل‌های $Fe_3O_4@MCM-41/HAP/APTES/PTH$ و $Fe_3O_4@MCM-41/HAP$ (1-34) است. طیف نانوحامل نهایی نوارهای ضعیف را در 1531 cm^{-1} و حدود 2900 cm^{-1} نشان می‌دهد که به ترتیب مربوط به گروه‌های آمین و کشش $C-H$ گروه‌های پروپیل هستند.

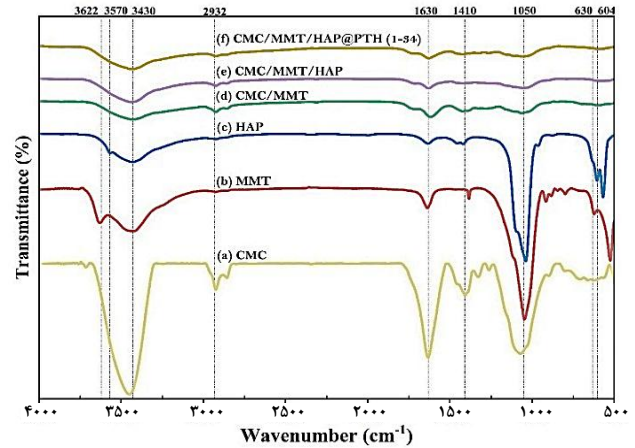
(۱) Amorphous



شکل ۳- الگوهای XRD، تجزیه و تحلیل کیفی و کمی اجزای نانوکامپوزیت‌های $\text{Fe}_3\text{O}_4@MCM-41/HAP/APTES/PTH (1-34)$ (a) و $CMC/MMT/HAP@PTH (1-34)$ (b)

با الگوی خالص خود (فایل JCPDS شماره ۱۹-۰۶-۲۹ و ۰۱-۰۷۴-۰۵۶۶ کمیته مشترک استانداردهای پراش پودر به ترتیب مربوط به نانو ذرات مگنتیت و هیدروکسی آپاتیت)، نشان می‌دهند. همچنین سیلیس (MCM-41) در حالت بی شکل در ترکیب دو فازی و بیشتر ($\text{Fe}_3\text{O}_4@MCM-41$) وجود دارد که منجر به ظهور و افزایش پس زمینه الگوی پراش می‌گردد.

شکل ۳-b الگوهای پراش اشعه ایکس برای CMC و نانوکامپوزیت آماده شده دوم را نشان می‌دهد. مطابق شکل HAP، با ترکیب استوکیومتری $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ و ساختار بلورشناسی شش ضلعی، همان‌طور که توسط کد مرجع ۰۱-۰۷۴-۰۵۶۶ تایید شده است، با موفقیت سنتز شد. در مقابل، اوج‌های مربوطه نسبت داده شده به HAP در طیف‌نگارهای نانوکامپوزیت $CMC/MMT/HAP$ و نانوحامل‌های $CMC/MMT/HAP/APTES@PTH (1-34)$ کاهش قابل توجهی در شدت، همراه با یک جابجایی جزئی را نشان می‌دهند. در شکل ۳-b قله‌های پراش قابل تشخیص، تقریباً در ۱۹، ۲۷ و ۳۴ درجه،

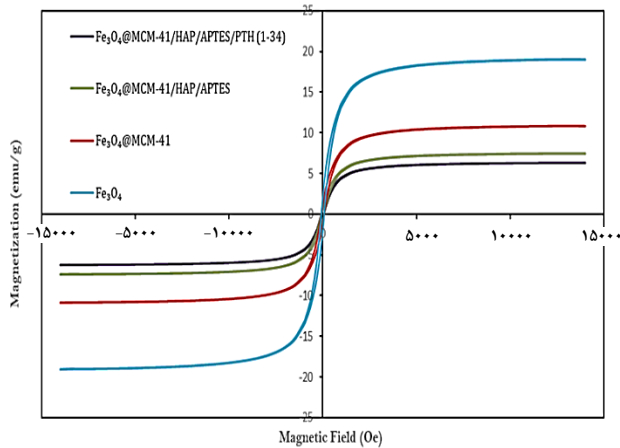


شکل ۲- طیف‌های FT-IR اجزای مختلف درون نانوکامپوزیت $CMC/MMT/HAP/PTH (1-34)$ و نمایش ارتعاشات مربوطه

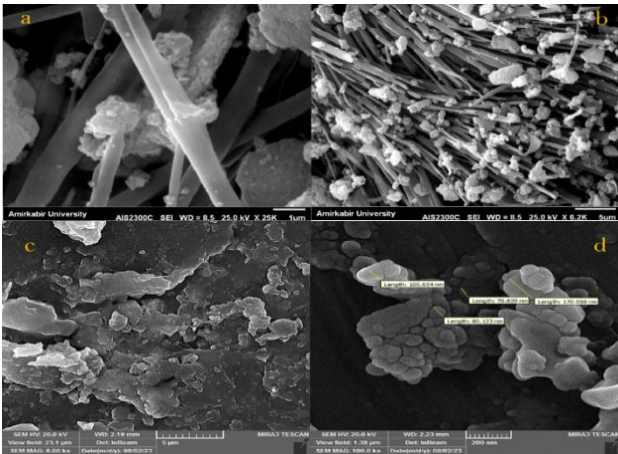
در طیف CMC/MMT ، قله 1613 cm^{-1} مرتبط با گروه هیدروکسیل MMT به دلیل ادغام آن با باند 1630 cm^{-1} مربوط به CMC گسترش می‌یابد. علاوه بر این، ستون فقرات CMC شدت افزایش یافته را در باند $3460-2920 \text{ cm}^{-1}$ نشان می‌دهد [۴۲]. در هر دو نمونه $CMC/MMT/HAP@PTH (1-34)$ و $CMC/MMT/HAP$ مشاهده شده است که نوسانات طولیل شدن فسفات (PO_4^{3-}) مربوط به هیدروکسی آپاتیت (HAP)، در ابتدا در 1039 cm^{-1} و 1050 cm^{-1} ، به عدد موج‌های بالاتر تغییر مکان داد [۷۵]. همچنین، در دو نمونه فوق، ارتعاشات مرتبط با خمش فسفات در 604 cm^{-1} و 567 cm^{-1} رخ می‌دهد. نوارهای 3570 cm^{-1} و 630 cm^{-1} به ترتیب با الگوهای کششی و خمشی OH مطابقت دارند. یک نوار ظریف در 1643 cm^{-1} نیز شناسایی شده است که به کشش آب جذب شده نسبت داده می‌شود [۷۶]. ادغام PTH (1-34) روی نانوکامپوزیت $CMC/MMT/HAP$ توسط اوج‌های متمایز در 1087 cm^{-1} و 3430 cm^{-1} تایید شده است. این اوج‌ها وجود گروه‌های اضافی $-\text{NH}_2$ و $-\text{COOH}$ را نشان می‌دهند که از اسیدهای آمینه موجود در PTH (1-34) نشأت می‌گیرند [۷۷].

مطالعه ساختارهای بلوری

XRD به عنوان یک ابزار ارزشمند برای توصیف ساختار بلوری نانوکامپوزیت‌های پلیمری عمل می‌کند [۷۸]. شکل ۳-a الگوی XRD ترکیبات نانوکامپوزیت اول قله‌هایی را نشان می‌دهند که مربوط به هر دو ساختار مزوپور و نانوذرات Fe_3O_4 است و ساختار بلوری جذاب در طول فرآیند سنتز بدون تغییر باقی می‌ماند. و نیز، تایید شده است که نانوذرات مگنتیت و نانو ذرات هیدروکسی آپاتیت در کل نمونه حضور دارند، این مشخصه یابی توسط اشکالی در الگوی پراش نمونه‌ها علامتگذاری شده‌اند و انطباق قابل قبولی را



شکل ۴- منحنی پسماند مغناطیسی اجزای نانو حامل
VSM از $\text{Fe}_3\text{O}_4@MCM-41/HAP/APTES/PTH (1-34)$



شکل ۵- تصاویر SEM نانو کامپوزیت
Fe-SEM از نانو کامپوزیت $\text{Fe}_3\text{O}_4@MCM-41/HAP/APTES/PTH (1-34)$ و تصاویر (c,d) تصاویر (SEM a,b) نانو کامپوزیت $\text{CMC/MMT/HAP@PTH (1-34)}$

نشان می‌دهد. با بررسی تصاویر SEM شکل ۵-a,b مشاهده شد که بلورهای HAP شکلی یکنواخت و میله‌مانند، البته با اندازه‌های متفاوت، از خود نشان می‌دهند. به طور خاص، اندازه بلور HAP از سطوح زیر میکرون تا میکرون، با طول‌های بین ۴۰۰ نانومتر تا ۳ میکرومتر و عرض‌های بین ۵۰ تا ۱۰۰ نانومتر متغیر بود. افزودن HAP به سطح میکروکره‌های $\text{Fe}_3\text{O}_4@MCM-41$ منجر به تجمع قابل توجهی شد. لایه بیرونی یک سیستم تحویل دارو (DDS) نقشی اساسی در تأثیرگذاری بر ویژگی‌های رهاسازی دارو ایفا می‌کند. با توجه به شکل ۴-c,d هیدروژل یک پیکربندی بسیار متخلخل را نشان می‌دهد که با منافذ به هم پیوسته که میکروکره‌های کوچک را

به ترتیب مربوط به صفحات (۲۱۱)، (۰۰۴) و (۰۰۶) نشان دهنده ساختار MMT هستند (JCPDS شماره ۰۰-۱۲-۰۰۴). همچنین اوج‌های تقریباً ۲۱ و ۲۶,۳ درجه مشخصه کوارتز (Q) در نمونه MMT هستند (JCPDS شماره ۰۰-۰۳۳-۰۰۰) [۷۹]. این به منشأ معدنی طبیعی مواد نسبت داده می‌شود که ذاتاً اجزای سیلیسی را در خود جای داده است که قابل جداسازی نیستند. در الگوهای XRD مربوط به CMC خالص (شکل ۲-b)، یک قله گسترده در $2\theta = 20^\circ$ ، ساختار آمورف آن را نشان می‌دهد [۸۰]. مطالعات قبلی نشان داده‌اند که الگوی پراش پرتو ایکس پودر داروی تری‌پاراتید (XRD) سنبله‌های بلوری ناقص را در زوایای 2θ برابر ۸,۹۰ و ۲۰,۲ درجه نشان می‌دهد [۱۶]. در این مطالعه، طیف XRD نانوحامل $\text{CMC/MMT/HAP@PTH (1-34)}$ کاهش شدت اوج قابل توجهی در زاویه پراش ۲۰,۲ درجه در مقایسه با اوج مربوطه در منحنی پراش اشعه ایکس داروی تری‌پاراتید به شکل خالص آن نشان می‌دهد.

مطالعه خواص مغناطیسی

خواص مغناطیسی لایه‌های مختلف در نانوکامپوزیت با استفاده از یک مغناطیس سنج نمونه ارتعاشی در دمای اتاق ارزیابی شد. همان‌طور که در شکل ۴- نشان داده شده است، مغناطش اشباع شده و نمونه‌های سوپرپارامغناطیس مورد بررسی قرار گرفتند. در میان اجزای نانوذرات Fe_3O_4 در مرکز نانو کامپوزیت بالاترین مقدار مغناطیسی اشباع را ثبت کردند در حالی که اجزای لایه‌های نانوحامل مقادیر رو به کاهش Ms را به تدریج به سوی سطح نانوحامل نشان دادند. مغناطش اشباع احتمالاً به دلیل حضور لایه MCM-41 و پوسته‌های HAP/APTES پوشش داده شده روی نانوذرات Fe_3O_4 کاهش می‌یابد. بخش‌های غیر مغناطیسی $\text{HAP/APTES/PTH (1-34)}$ بر روی سطح تکیه‌گاه مغناطیسی بارگذاری شدند و توضیح معقولی برای مقدار کمتر Ms نانوکامپوزیت نهایی دارند. با این حال، توجه به این نکته مهم است که مقدار Ms واقعی نانوکامپوزیت به اندازه کافی بالا باقی مانده است و جداسازی مغناطیسی با استفاده از آهنربای استاندارد امکان پذیر بود.

تجزیه و تحلیل ریز ساختاری

شکل ۵-a,b تصویر میکروسکوپ الکترونی روبشی (SEM) نانوکامپوزیت مزوپور مگنتیت (MMNPs^1) سنتز شده $\text{Fe}_3\text{O}_4@MCM-41/HAP/APTES/PTH (1-34)$ و شکل ۵-c,d تصویر میکروسکوپ الکترونی روبشی گسیل میدانی FE-SEM مربوط به نانو کامپوزیت $\text{CMC/MMT/HAP@PTH (1-34)}$ را

(۱) Mesoporous Magnetite Nanocomposites (MMNPs)

نشان می‌دهد. نمونه‌های Fe_3O_4 NPs، Fe_3O_4 @MCM-41، Fe_3O_4 @MCM-41/HAP/APTES/PTH و Fe_3O_4 @MCM-41/HAP/APTES (1-34) به ترتیب دارای قطر متوسط تقریباً ۵۷، ۱۷۱، ۳۳۶ و ۴۱۷ نانومتر بودند. همانطور که انتظار می‌رفت، قطر لایه های نانوکامپوزیت در طول فرآیند ساخت به دلیل پوشش متوالی هر لایه افزایش یافت که به خوبی با یافته‌های تحلیل SEM همسو می‌شود. به عنوان مثال، محدوده میانگین قطر بدست آمده از SEM نانوکامپوزیت نهایی حامل دارو در حدود ۲۷۲ نانومتر، و کمتر از نتایج DLS بود. این اختلاف به این دلیل است که DLS قطر هیدرودینامیکی ذرات کلئیدی در آب را اندازه‌گیری می‌کند، در حالی که SEM قطر ذرات خشک شده را فراهم می‌کند. به طور معمول، لایه حل‌پذیری متراکم است، و نانوذرات تمایل به تجمع دارند، که در نتیجه یک بعد هیدرودینامیکی بزرگ‌تر است که توسط DLS در سوسپانسیون آبی اندازه‌گیری می‌شود [۸۵].

در ارزیابی نانوکامپوزیت دوم، مطابق شکل ۶-c پتانسیل زتا منفی نانوکامپوزیت CMC/MMT/HAP@PTH (1-34) در -40 mV به بار منفی بالای یون فسفات و پلیمر آنیونی CMC نسبت داده می‌شود. این کاهش بار سطحی نشان‌دهنده پایداری عالی نانوحامل‌ها است، زیرا ذرات با بارهای سطحی بالاتر، پایداری عالی‌تری از خود نشان می‌دهند [۸۱]. بار منفی HAP برهمکنش‌های الکترواستاتیکی بین ذرات را تقویت می‌کند و باعث پراکندگی ذرات با بار مثبت در سیستم می‌شود. مولکول‌های دارو مستقیماً با گروه‌های هیدروکسیل HAP پیوندهای کووالانسی ایجاد می‌کنند که پیوندهای الکترواستاتیک و هیدروژنی نقش مهمی در این فرآیند دارند [۸۳]. نتایج اثربخشی روش عامل‌سازی کووالانسی را همان‌طور که در نظر گرفته شده است تأیید می‌کند. علاوه بر این، با توجه به همسویی نانوکامپوزیت با سیستم گردش خون طراحی‌شده، نتایج آزمایش پتانسیل زتا بار منفی بهترین نتیجه پایداری را به همراه دارد (منسوب به پروتئین‌های پلاسما با بار منفی در خون [۸۶]). شکل ۶-d به صورت بصری توزیع اندازه ذرات را در محلول کلئیدی برای نانوکامپوزیت دوم نشان می‌دهد. قطر هیدرودینامیکی CMC/MMT/HAP@PTH (1-34) همان‌طور که با تجزیه و تحلیل DLS تعیین شد، در حدود 3.8 ± 193.48 نانومتر اندازه‌گیری شد.

بنابراین، استفاده از یک مخلوط کلئیدی آبی/روغنی/آبی، که نیوزومی است، مزایای اضافی افزایش پایداری نانوحامل را ارائه می‌کند. علاوه بر این، استفاده از این فناوری ساخت، در کاهش اندازه ذرات و دستیابی به نانوکامپوزیت‌های هیدروژل با اندازه یکنواخت سودمند است.

در خود محصور می‌کنند، مشخص می‌شود. ترکیب یک فاز آبگریز (متشکل از روغن پارافین/ Span 80 در ۲٪ v/v) در تشکیل این نانوحامل‌ها حیاتی است. معرفی مواد Span 80 در سطح مشترک آب‌گریز-آب‌دوست منجر به کاهش قابل توجه کشش سطحی می‌شود. در نتیجه، این امر باعث تشکیل قطرات کوچک در مقیاس نانو می‌شود. همچنین، این مکانیسم یکنواختی آنها را افزایش می‌دهد و به طور همزمان اندازه کلی آنها را کاهش می‌دهد.

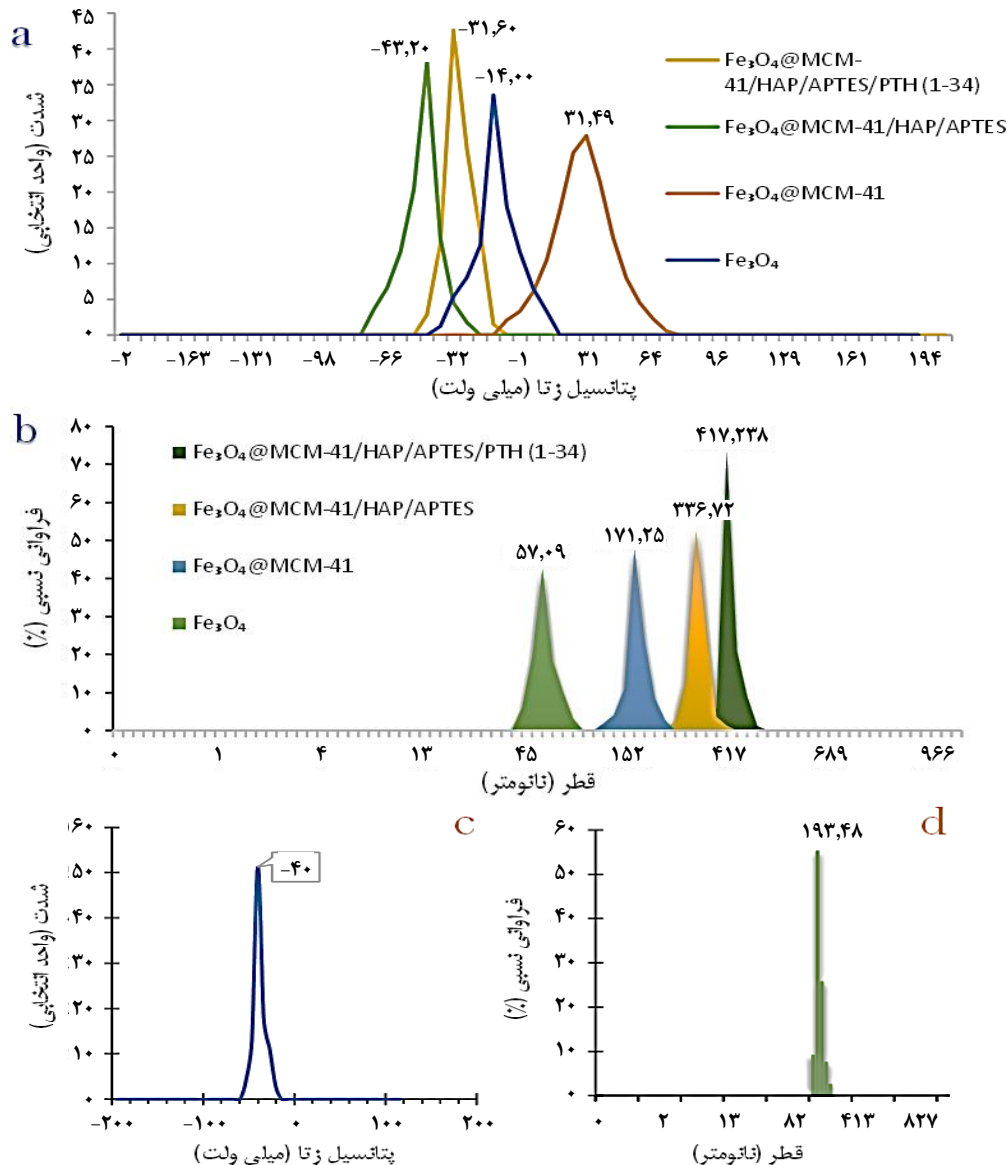
پراکندگی نور دینامیک (DLS) و پتانسیل زتا

شکل ۶-a مقادیر پتانسیل زتا اجزای نانوکامپوزیت Fe_3O_4 @MCM-41/HAP/APTES/PTH (1-34) را نشان می‌دهد که از طریق الکتروفورز لیزری داپلر، در محدوده ولتاژ تقریباً ± 200 میلی‌ولت تعیین می‌شود. هدف از آزمایش پتانسیل زتا بررسی هرگونه تغییر بار سطحی بود که در طول ساخت نانوکامپوزیت رخ داد. در ابتدا، مقدار پتانسیل زتا نانوذرات Fe_3O_4 (NPs) در -14 mV اندازه‌گیری شد. با این حال، با معرفی یک پوشش سیلیکا از طریق عامل سیلان و عامل فعال سطح کاتیونی CTAB، بار سطحی به $+32$ میلی‌ولت افزایش یافت که نشان‌دهنده اجرای موفقیت‌آمیز روش اصلاح سطح کووالانسی است. بار سطحی Fe_3O_4 @MCM-41/HAP مقدار منفی -43 میلی‌ولت را نشان داد که به بار منفی بالای یون فسفات نسبت داده می‌شود. برای نانوکامپوزیت Fe_3O_4 @MCM-41/HAP/APTES/PTH (1-34)، این مقدار به -31 میلی‌ولت کاهش یافت. این کاهش بار سطحی نشان‌دهنده پایداری عالی نانوحامل‌ها است، زیرا ذرات با بارهای سطحی بالاتر تمایل به پایداری بیشتری دارند [۸۱، ۸۲]. بار منفی HAP منجر به برهمکنش‌های الکترواستاتیکی بین ذرات می‌شود و پراکندگی ذرات با بار مثبت در سیستم را تسهیل می‌کند. مولکول‌های دارو مستقیماً با گروه‌های هیدروکسیل HAP پیوندهای کووالانسی برقرار می‌کنند که پیوندهای الکترواستاتیک و هیدروژنی نقش مهمی در این فرآیند دارند [۸۳]. بر اساس نتایج، روش عامل‌سازی کووالانسی، همان‌طور که در نظر گرفته شده بود، مؤثر است.

برای تعیین اندازه ذرات و توزیع آنها، تجزیه و تحلیل پراکندگی نور پویا (DLS) با استفاده از مالورن نانو-زتاسایزر^۲ (UK) 90 با زاویه پراکندگی ۱، ۱۷۶، مطابق با روش مطالعه قبلی انجام شد [۸۴]. قطر گزارش شده نشان‌دهنده اندازه ذرات (میانگین z) بوده و میانگین وزنی شدت دو مشاهده است که خطای تخمینی آن بیش از ۲٪ نیست. شکل ۶-b توزیع اندازه ذرات کلئیدها را

(۱) Dynamic light scattering (DLS).

(۲) Malvern Nano-Zetasizer ZS



شکل ۶- پتانسیل زتا و توزیع اندازه ذرات نانو حامل‌های (a,b) $\text{Fe}_3\text{O}_4@MCM-41/HAP/APTES/PTH (1-34)$ و (c,d) $CMC/MMT/HAP@PTH (1-34)$

جدول ۳- مقایسه بارگذاری دارو و راندمان کپسوله سازی گزارش شده برای نانو حامل‌های بارگذاری شده با $PTH (1-34)$

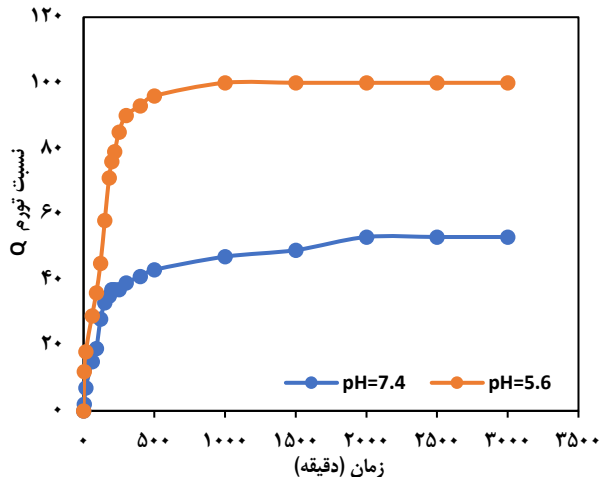
نانوحامل	راندمان بارگذاری (%)	راندمان گیرافتادن (%)	مرجع
Chitosan nanoparticles	...	۴۰,۰	[۷۷]
polyelectrolyte complexes	...	۴۹/۰	[۵۷]
PLGA microspheres	...	۶۲,۷	[۸۷]
$\text{Fe}_3\text{O}_4@MCM-41/HAP$	۳۱,۰	۷۳,۰	[۷۱]
PHBV/PLGA blend nanoparticles	۵,۰	۸۹,۵	[۱۶]
$\text{Fe}_3\text{O}_4@MCM-41/APTES/HAP$	۳۷/۰	۹۰,۰	مطالعه حاضر
CMC/MMT/HAP	۳۸,۰	۸۲,۰	مطالعه حاضر

بررسی بازده بارگذاری و گیر افتادن دارو (%LE و %EE)

جدول ۳ مقایسه‌ای از راندمان بارگذاری (%LE) و راندمان کپسولاسیون (%EE) نانوفرمولاسیون‌های مختلف بارگذاری شده با داروی تری پاراتاید را در مورد مقادیر به دست آمده در این مطالعه ارائه می‌دهد. این مقایسه بر برتری نسبی نانوکامپوزیت‌های معرفی شده در مطالعه حاضر تاکید می‌کند.

مطالعه بر روی انتشار دارو

شکل ۷ نتایج انتشار در شرایط آزمایشگاهی $PTH (1-34)$ را طی ۲۴ ساعت در pH نرمال (۷,۴) و pH اسیدی (۵,۶) در دمای 37°C معادل دمای فیزیولوژیکی بدن انسان نشان می‌دهد. انتخاب pH اسیدی بر اساس نمایش بهتر آن از ریزمحیط زیر جلدی و ارزیابی حساس به pH بود.



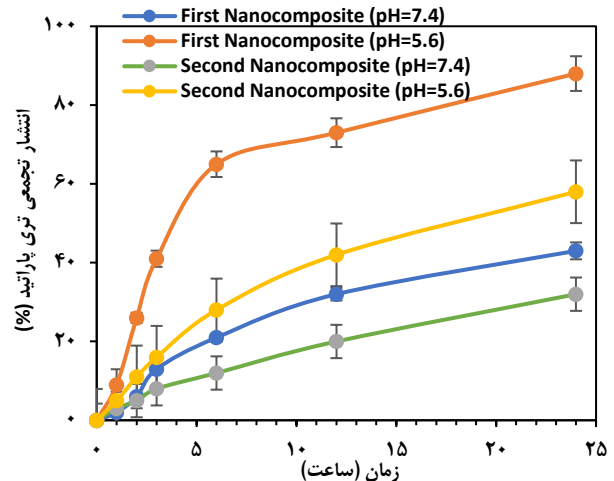
شکل ۸ - میزان جذب آب نانوکامپوزیت هیدروژلی CMC/MMT/HAP@PTH (1-34) در محلول PBS

نانوژل‌ها به دلیل سطح بزرگ خود سریع‌تر به تغییرات واکنش نشان می‌دهند و ظرفیت تورم بیشتری را نسبت به هیدروژل‌های سنتی نشان می‌دهند. در نانوکامپوزیت‌های هیدروژلی، وابسته به نوع نانوپرکننده، غلظت و پراکندگی در ماتریس پلیمری، رفتار تورم متفاوت است. عوامل سطحی نانوپرکننده‌ها می‌توانند جذب آب را کاهش دهند، که این باعث کمتر شدن انعطاف‌پذیری مولکولی شبکه می‌شود. شکل ۸ نشان می‌دهد که تورم هیدروژل حامل دارو در دو محیط با pH مختلف چگونه تغییر می‌کند. مشاهده می‌شود که تورم در محیط اسیدی به طور قابل توجهی بیشتر از محیط بافت طبیعی است، که نشان‌دهنده واکنش آن به pH است. در ابتدا، هیدروژل به سرعت آب جذب می‌کند، اما با گذشت زمان، افزایش حجم چشم‌گیری را نشان می‌دهد. CMC، که شامل مقدار زیادی کربوکسیلیک اسید و گروه‌های هیدروکسیل است، می‌تواند بسیاری از آب را جذب کند. در محیط با pH پایین‌تر، گروه‌های کربوکسیلات و هیدروکسیل پروتونه می‌شوند که باعث افزایش پیوندهای هیدروژنی و نسبت تورم می‌شود. اما با افزایش pH، سرعت تورم کاهش می‌یابد چرا که گروه‌های کربوکسیلیک اسید کمتر تفکیک می‌شوند، که باعث کاهش فشار اسمزی می‌شود.

مطالعه سینتیک رهاسازی نانوحامل‌های

$Fe_3O_4@MCM-41/HAP/APTES/PTH$ (1-34) و CMC/MMT/HAP@PTH (1-34)

برای بررسی سینتیک انتشار، مدل‌های مختلفی از جمله مدل‌های مرتبه صفر^۱، مرتبه اول^۲، هیگوشی^۳ و کورسمایر-پیس^۴ معرفی شده‌اند. شکل ۹ برازش داده‌های انتشار را با مدل‌های مختلف نشان می‌دهد.



شکل ۹- الگوی رهایش داروی تری پاراتاید از نانو کاپوزیت‌های اول (Fe₃O₄@MCM-41/HAP/APTES/PTH (1-34) و دوم (CMC/MMT/HAP@PTH (1-34) در دو سطح pH=۵٫۶ و ۷٫۴

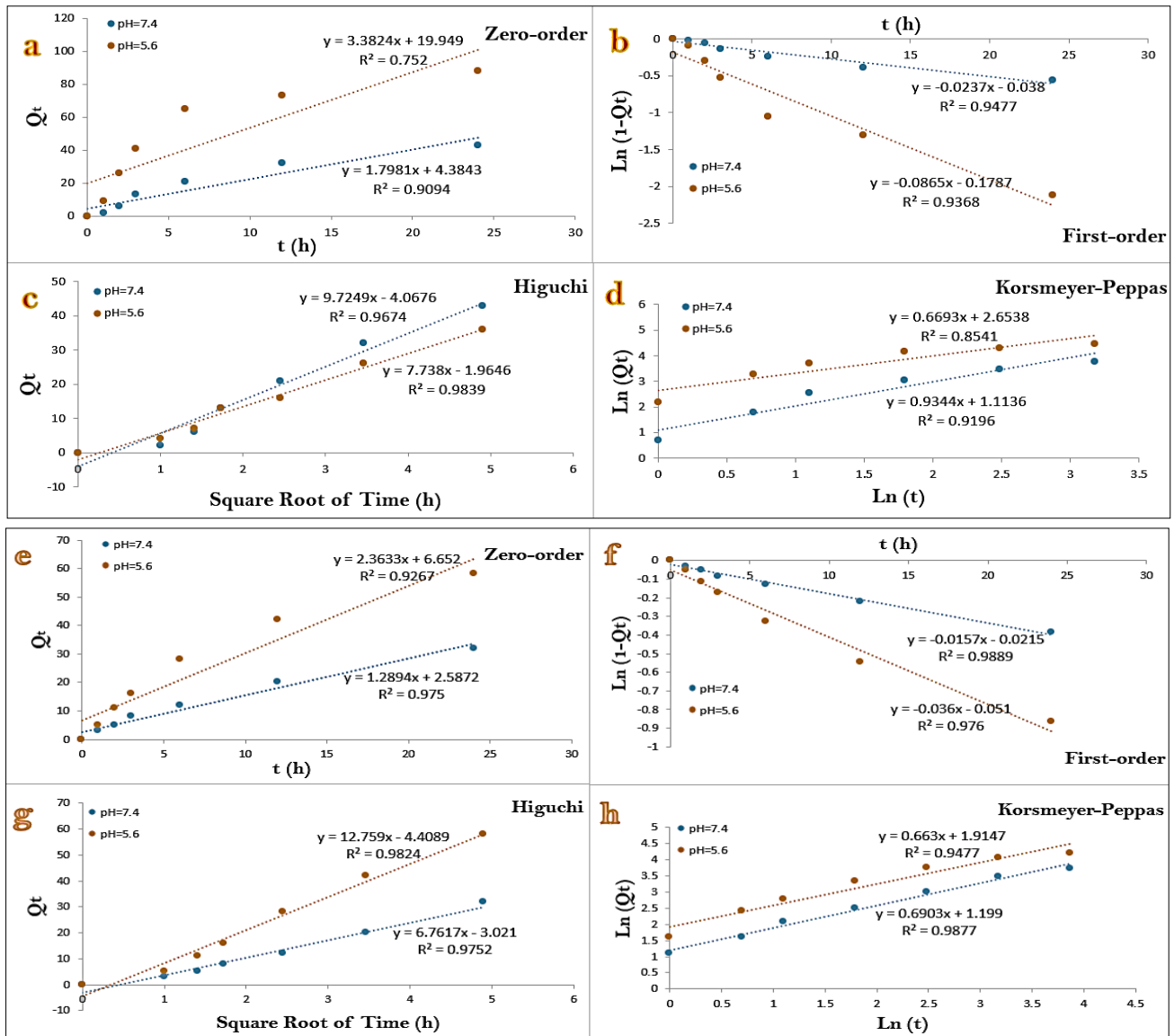
داروی تری پاراتاید نیمه عمر پلاسمایی ۲ تا ۵ دقیقه دارد و عمدتاً توسط کبد و کلیه‌ها دفع می‌شود [۸۸]. طبق نتایج آزادسازی دارو در pH اسیدی در مقایسه با pH طبیعی بعد از ۲۴ ساعت بیشتر بود. کاهش pH به دلیل کاهش یونیزاسیون گروه کربوکسیل، آزادسازی داروی هیدروفیل پپتیدی از نانوحامل را تسهیل کرد. نانوحامل‌های با واکنش‌پذیری pH سازگاری بهتری را نشان داده‌اند و توانایی هدف قرار دادن ریزمحیط‌های اسیدی از جمله سلول‌های سرطانی را نشان داده‌اند [۸۹]. این مطالعه این قابلیت‌ها را در نانوکامپوزیت ساخته شده تأیید کرد. فاز رهاسازی سریع عمدتاً از بخشی از دارو که به سطح نانوکامپوزیت چسبیده است، منشاء می‌گیرد، در حالی که فاز تدریجی ناشی از انتشار است. پس از انفجار اولیه، این رهایش پایدار تحویل کنترل شده دارو را امکان‌پذیر می‌کند، به طور موثر عوارض جانبی بالقوه را کاهش می‌دهد و هدر رفت دارو را به حداقل می‌رساند. نانوحامل‌هایی که دارای واکنش‌پذیری پاسخ‌دهنده به pH هستند، زیست‌سازگاری و توانایی قابل توجهی برای هدف قرار دادن ریزمحیط‌های اسیدی، به ویژه سلول‌های سرطانی نشان داده‌اند [۸۹، ۹۰]. این بررسی این ویژگی‌های قابل توجه در نانوکامپوزیت توسعه‌یافته را اثبات و تأکید می‌کند.

ارزیابی تورم هیدروژل حاوی دارو CMC/MMT/HAP@PTH (1-34)

رفتار تورم در هیدروژل‌ها خاصیتی است که به دلیل نفوذ محلول به فضای خالی درون شبکه پلیمری آنها ایجاد می‌شود. عواملی مانند pH، قدرت یونی و دما می‌توانند بر رفتار تورم تأثیر بگذارند.

(۱) Zero-Order
(۳) Higuchi

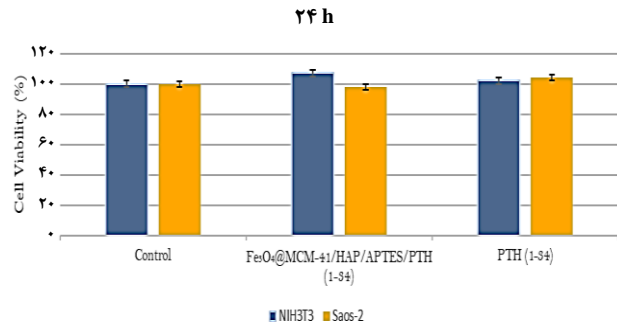
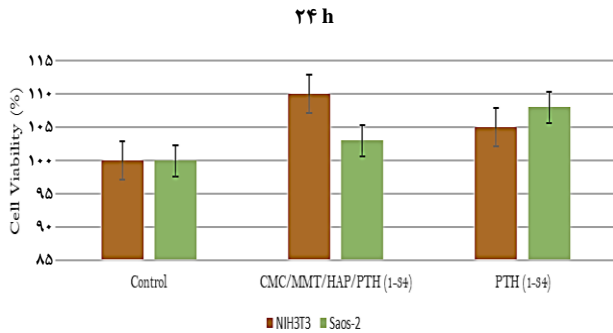
(۲) First-Order
(۴) Korsmeyer-Peppas



شکل ۹- نمودار سینتیکی رهایش داروی تری پاراتاید بر اساس مدل‌های مرتبه صفر، مرتبه یک، هیگوچی و کورسمیر پیپاس (a,b,c,d) نانوکامپوزیت $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{MCM-41}/\text{HAP}/\text{APTES}/\text{PTH}$ (1-34) و (e,f,g,h) نانوکامپوزیت $\text{CMC}/\text{MMT}/\text{HAP}/\text{PTH}$ (1-34)

ویژگی‌های نانوحامل $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{MCM-41}/\text{HAP}/\text{APTES}$ و داروی تری پاراتاید مطابقت دارد. ضرایب همبستگی به دست آمده برای همه روش‌ها در شرایط اسیدی برای نانوکامپوزیت دوم در شکل ۸-e,f,g,h نیز نشان می‌دهد که نمودارهای رهاسازی دارو را می‌توان به طور موثر با استفاده از این مدل‌ها در $\text{pH}=5.6$ به‌ویژه با مدل هیگوچی تقریب زد. این با ساختار نانوحامل ساخته شده و فعل و انفعالات بین اجزای آن هماهنگ است. در واقع، فعل و انفعالات فیزیکی و شیمیایی بین دارو و اجزای آن، یکپارچگی نانوحامل را حفظ کرده و از انحلال آن در شرایط خنثی جلوگیری می‌کند. در نتیجه، مکانیسم انتشار در شرایط خنثی عمدتاً به انتشار متکی است.

برای ارزیابی سینتیک رهایش دارو و شناسایی مناسب‌ترین مدل ریاضی، داده‌های رهاسازی به این مدل‌ها برازش شدند تا بهترین برازش را تعیین کنند. در اینجا، Q_t مقدار تجمعی آزادسازی دارو در زمان t (بر حسب ساعت) را نشان می‌دهد. ضریب همبستگی (R^2) برای هر مدل برازش شده برای سنجش سازگاری آن محاسبه شد. در مورد نانوکامپوزیت اول مطابق شکل ۸-a,b,c,d نتایج نشان دادند که سینتیک رهایش دارو از مدل هیگوچی پیروی می‌کند (بیشترین مقدار R^2 و نزدیکترین مقدار آن به یک). این مدل عمدتاً برای توصیف آزادسازی داروهای محلول یا کم محلول از ماتریس‌های جامد یا نیمه جامد با انتشار فیک استفاده می‌شود که کاملاً با



شکل ۱۰- ارزیابی سمیت سلولی (MTT) دو نانو کامپوزیت حامل داروی اول و دوم طی ۲۴ ساعت با استفاده از دو رده سلولی NIH3T3 و Saos-2

تجزیه و تحلیل FTIR نانو کامپوزیت‌ها برهمکنش‌های قوی جزء-دارو شامل پیوندهای هیدروژن و قطبی را نشان می‌دهد که مانع تبلور و کاهش اندازه بلور می‌شود. پتانسیل زتای بالای نانو کامپوزیت‌ها (تقریباً ۳۰- تا ۴۰- میلی ولت)، پایداری آنها را تأیید می‌کند. راندمان به دام افتادن دارو، درصد بالا و قابل توجهی را برای نانوحامل‌ها نشان داد. این پیشرفت نشان دهنده توسعه سامانه‌های دارورسانی وابسته به pH است و امکان ره‌ایش کنترل شده دارو را فراهم می‌سازد. همچنین آنها می‌توانند توزیع زیستی درمان‌ها را اصلاح کنند، امکان تحویل موضعی دارو را فراهم کنند، اثر درمانی استخوان‌سازی را افزایش دهند، عوارض جانبی داروهای تجویزی در گردش خون را کاهش دهند، نیمه عمر دارو را طولانی‌تر کنند و فراهمی زیستی آن را بهبود بخشند. به طور خلاصه، یافته‌های این مطالعه کاربرد بالقوه قابل توجه نانو کامپوزیت‌های معرفی شده را برای اهداف دارورسانی روشن می‌کند. آنها توانایی دستیابی به تراکم دارویی بالا را نشان می‌دهند و به طور موثر آزادسازی طولانی مدت دارو را امکان پذیر و کنترل می‌کنند.

قدردانی

نویسندگان از ریاست محترم گروه شیمی و کادر فنی آزمایشگاه گروه شیمی دانشگاه صنعتی امیرکبیر تشکر می‌کنند.

تاریخ دریافت: ۱۴۰۲/۱۲/۰۹؛ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۳/۰۳/۲۱

نتایج آزمون سمیت سلولی

همان طوری که در شکل ۱۰ نشان داده شده است نانو کامپوزیت‌های حامل دارو طی ۲۴ ساعت روی رده سلولی فیروبلاست نرمال جنین موش (NIH3T3) نه تنها هیچ اثر سمیتی نشان ندادند، بلکه افزایش تکثیر و تمایز سلولی بیشتری نسبت به داروی آزاد (۲۰ میکروگرم PTH (1-34) مشاهده می‌شود که نشان از زیست سازگاری نانوحامل‌ها است. این مشاهدات در مورد رده سلولی بدخیم استخوانی (Saos-2) محدود شده است که بیانگر عملکرد مطلوب تر نانو کامپوزیت‌ها در مهار تکثیر این سلول‌ها است.

نتیجه‌گیری

ترکیبی از نانوذرات Fe₃O₄ و مواد مزوپور، امکانات متعددی را برای تطبیق مواد با کاربردهای مختلف، از جمله درمان‌های حامل داروی آب‌دوست و آب‌گریز با استفاده از هدف‌گیری مغناطیسی، و همچنین استخراج انتخابی دارو از محیط‌های پیچیده زیستی ارائه می‌کند. ترکیب Fe₃O₄@MCM-41/HAP/APTES ظرفیت بارگیری بالای دارو و توزیع اندازه منافذ باریک را ارائه می‌دهد. همچنین نانو کامپوزیت هیدروژلی جدید CMC/MMT/HAP که برای اولین بار معرفی شد به طور موثری با استفاده از روش امولسیون‌سازی دوگانه ساخته شد که در آن افزودن ماده فعال سطح (Span 80) نقش مهمی در افزایش پایداری نانو کامپوزیت‌ها داشت. علاوه بر این، روش امولسیون دوگانه در کاهش اندازه ذرات در عین حفظ یکنواختی ساختار نانوحامل مفید بود.

مراجع

- [1] Patel D., Wairkar S., *Bone Regeneration in Osteoporosis: Opportunities and Challenges, Drug Delivery and Translational Research*, **13(2)**: 419-432 (2023).

- [2] Somersalo A., Paloneva J., Kautiainen H., LÖNnroos E., HeinÄNen M., Kiviranta I., [Increased Mortality After Lower Extremity Fractures in Patients <65 Years of Age](#), *Acta Orthopaedica*, **87(6)**: 622-625 (2016).
- [3] Riaz S., Shakil Ur Rehman S., Hafeez S., Hassan D., [Effects of Kinect-Based Virtual Reality Training on Bone Mineral Density and Fracture Risk in Postmenopausal Women with Osteopenia: A Randomized Controlled Trial](#), *Scientific Reports*, **14(1)**: 6650 (2024).
- [4] Albrecht B.M., Stalling I., Foettinger L., Recke C., Bammann K., [Adherence to Lifestyle Recommendations for Bone Health in Older Adults with and without Osteoporosis: Cross-Sectional Results of the OUTDOOR ACTIVE Study](#), *Nutrients*, **14(12)**: 2463 (2022).
- [5] Jones M.S., Waterson B., [Principles of Management of Long Bone Fractures and Fracture Healing](#), *Surgery (Oxford)*, **38(2)**: 91-99 (2020).
- [6] Chen J., Ashames A., Buabeid M.A., Fafelelbom K.M., Ijaz M., Murtaza G., [Nanocomposites Drug Delivery Systems for the Healing of Bone Fractures](#), *International Journal of Pharmaceutics*, **585**: 119477 (2020).
- [7] Cometa S., Bonifacio M.A., Tranquillo E., Gloria A., Domingos M., De Giglio E., [A 3D Printed Composite Scaffold Loaded with Clodronate to Regenerate Osteoporotic Bone: In Vitro Characterization](#), *Polymers*, **13(1)**: 150 (2021).
- [8] Russo T., De Santis R., Peluso V., Gloria A., [Multifunctional Bioactive Magnetic Scaffolds with Tailored Features for Bone Tissue Engineering](#), *Magnetic Nanoparticles in Human Health and Medicine*, 87-112 (2021).
- [9] Iranmanesh P., Ehsani A., Khademi A., Asefnejad A., Shahriari S., Soleimani M., Ghadiri Nejad M., Saber-Samandari S., Khandan A., [Application of 3D Bioprinters for Dental Pulp Regeneration and Tissue Engineering \(Porous Architecture\)](#), *Transport in Porous Media*, **142(1)**: 265-293 (2022).
- [10] Karimi M., Asefnejad A., Aflaki D., Surendar A., Baharifar H., Saber-Samandari S., Khandan A., Khan A., Toghraie D., [Fabrication of Shapeless Scaffolds Reinforced with Baghdadite-Magnetite Nanoparticles Using a 3D Printer and Freeze-Drying Technique](#), *Journal of Materials Research and Technology*, **14**: 3070-3079 (2021).
- [11] Pavlychuk T., Chernogorskyi D., Chepurnyi Y., Neff A., Kopchak A., [Application Of CAD/CAM Technology For Surgical Treatment Of Condylar Head Fractures: A Preliminary Study](#), *Journal of Oral Biology and Craniofacial Research*, **10(4)**: 608-614 (2020).
- [12] Momesso G.A.C., Polo T.O.B., da Silva W.P.P., Barbosa S., Freitas G.P., Lopes H.B., Rosa A.L., Cordeiro J.M., Toro L.F., Chiba F.Y., Matsushita D.H., Louzada M.J.Q., da Cruz N.C., Barão V.A.R., Faverani L.P., [Miniplates Coated by Plasma Electrolytic Oxidation Improve Bone Healing of Simulated Femoral Fractures on Low Bone Mineral Density Rats](#), *Materials Science and Engineering, C*, **120**: 111775 (2021).

- [13] Al-Hourani K., Tsang S.-T.J., Simpson A.H.R.W., [Osteoporosis: Current Screening Methods, Novel Techniques, and Preoperative Assessment of Bone Mineral Density](#), *Bone & Joint Research*, **10(12)**: 840-843 (2021).
- [14] Kumar R., Sarkar C., Panja S., Khatua C., Gugulothu K., Sil D., [Biomimetic Nanocomposites for Biomedical Applications](#), «Biorenewable Nanocomposite Materials, Vol. 1: Electrocatalysts and Energy Storage», American Chemical Society, 163-196 (2022).
- [15] Kim T., See C.W., Li X., Zhu D., [Orthopedic Implants and Devices for Bone Fractures and Defects: Past, Present and Perspective](#), *Engineered Regeneration*, **1**: 6-18 (2020).
- [16] Bahari Javan N., Rezaie Shirmard L., Jafary Omid N., Akbari Javar H., Rafiee Tehrani M., Abedin Dorkoosh F., [Preparation, Statistical Optimisation and in Vitro Characterisation of Poly \(3-Hydroxybutyrate-Co-3-Hydroxyvalerate\)/Poly \(Lactic-Co-Glycolic Acid\) Blend Nanoparticles for Prolonged Delivery of Teriparatide](#), *Journal of Microencapsulation*, **33(5)**: 460-474 (2016).
- [17] Verma R., Mishra S.R., Gadore V., Ahmaruzzaman M., [Hydroxyapatite-Based Composites: Excellent Materials for Environmental Remediation and Biomedical Applications](#), *Advances in Colloid and Interface Science*, **315**: 102890 (2023).
- [18] Radulescu D.-E., Vasile O.R., Andronescu E., Fikai A., [Latest Research of Doped Hydroxyapatite for Bone Tissue Engineering](#), *International Journal of Molecular Sciences*, **24(17)**: 13157 (2023).
- [19] Mondal S.K., Dorozhkin S.V., Pal U., [Recent Progress on Fabrication and Drug Delivery Applications of Nanostructured Hydroxyapatite](#), Wiley interdisciplinary reviews. *Nanomedicine and nanobiotechnology*, **10(4)**: e1504 (2018).
- [20] Oni O.P., Hu Y., Tang S., Yan H., Zeng H., Wang H., Ma L., Yang C., Ran J., [Syntheses and Applications of Mesoporous Hydroxyapatite: A Review](#), *Materials Chemistry Frontiers*, **7(1)**: 9-43 (2023).
- [21] Habraken W., Habibovic P., Epple M., Bohner M., [Calcium Phosphates in Biomedical Applications: Materials for the Future?](#), *Materials Today*, **19(2)**: 69-87 (2016).
- [22] Hosseini S.M., Abdouss M., Mazinani S., Soltanabadi A., Kalae M., [Modified Nanofiber Containing Chitosan and Graphene Oxide-Magnetite Nanoparticles as Effective Materials for Smart Wound Dressing](#), *Composites Part B: Engineering* **231**: 109557 (2022).
- [23] Shuai C., Yang W., He C., Peng S., Gao C., Yang Y., Qi F., Feng P., [A Magnetic Micro-Environment in Scaffolds for Stimulating Bone Regeneration](#), *Materials & Design*, **185**: 108275 (2020).
- [24] Khalid A., Ahmed R.M., Taha M., Soliman T.S., [Fe₃O₄ Nanoparticles and Fe₃O₄ @SiO₂ Core-Shell: Synthesize, Structural, Morphological, Linear, and Nonlinear Optical Properties](#), *Journal of Alloys and Compounds*, **947**: 169639 (2023).
- [25] Marycz K., Sobierajska P., Wiglusz R., Idczak R., Nedelec J.-M., Fal A., Kornicka-Garbowska K., [Fe₃O₄ Magnetic Nanoparticles Under Static Magnetic Field Improve Osteogenesis via RUNX-2 and Inhibit Osteoclastogenesis by the Induction of Apoptosis](#), *Int J Nanomedicine* **15**: 10127-10148 (2020).

- [26] Ulu A., Noma S.A.A., Koytepe S., Ates B., [Magnetic Fe₃O₄@MCM-41 Core-Shell Nanoparticles Functionalized with Thiol Silane for Efficient L-Asparaginase Immobilization, Artificial Cells, Nanomedicine, and Biotechnology](#), **46(sup2)**: 1035-1045 (2018).
- [27] Shadabfar M., Abdouss M., Khonakdar H.A., [Synthesis, Characterization, and Evaluation of a Magnetic Molecular Imprinted Polymer for 5-Fluorouracil as an Intelligent Drug Delivery System for Breast Cancer Treatment](#), *Journal of Materials Science*, **55(26)**: 12287-12304 (2020).
- [28] Pourhasan-Kisomi R., Shirini F., Golshekan M., [Introduction of Organic/Inorganic Fe₃O₄@MCM-41@Zr-Piperazine Magnetite Nanocatalyst for the Promotion of the Synthesis of Tetrahydro-4H-Chromene and Pyrano\[2,3-d\]Pyrimidinone Derivatives](#), *Applied Organometallic Chemistry*, **32(7)**: e4371 (2018).
- [29] Venedicto M., Carrier J., Na H., Chang C.-Y., Radu D.R., Lai C.-Y., [Disulfide-Modified Mesoporous Silica Nanoparticles for Biomedical Applications](#), *Crystals*, **13(7)**: 1067 (2023).
- [30] Babaki M., Yousefi M., Habibi Z., Brask J., Mohammadi M., [Preparation of Highly Reusable Biocatalysts by Immobilization of Lipases on Epoxy-Functionalized Silica for Production of Biodiesel from Canola Oil](#), *Biochemical Engineering Journal*, **101**: 23-31 (2015).
- [31] Jafarzadeh A., Sohrabnezhad S., Zanjanchi M.A., Arvand M., [Synthesis and Characterization of Thiol-Functionalized MCM-41 Nanofibers and Its Application as Photocatalyst](#), *Microporous and Mesoporous Materials*, **236**: 109-119 (2016).
- [32] Nayl A.A., Abd-Elhamid A.I., Aly A.A., Bräse S., [Recent Progress in the Applications of Silica-Based Nanoparticles](#), *RSC Advances*, **12(22)**: 13706-13726 (2022).
- [33] Popova T., Tzankov B., Voycheva C., Spassova I., Kovacheva D., Tzankov S., Aluani D., Tzankova V., Lambov N., [Mesoporous Silica MCM-41 and HMS as Advanced Drug Delivery Carriers for Bicalutamide](#), *Journal of Drug Delivery Science and Technology*, **62**: 102340 (2021).
- [34] Trzeciak K., Kaźmierski S., Wielgus E., Potrzebowski M.J., [DiSupLo - New Extremely Easy and Efficient Method for Loading of Active Pharmaceutical Ingredients Into the Pores of MCM-41 Mesoporous Silica Particles](#), *Microporous and Mesoporous Materials*, **308**: 110506 (2020).
- [35] Szewczyk A., Skwira A., Konopacka A., Sądej R., Prokopowicz M., [Mesoporous Silica-Bioglass Composite Pellets as Bone Drug Delivery System with Mineralization Potential](#), *International Journal of Molecular Sciences*, **22(9)**: 4708 (2021).
- [36] Asadi E., Abdouss M., Leblanc R.M., Ezzati N., Wilson J.N., Kordestani D., [Synthesis, Characterization and in Vivo Drug Delivery Study of a Biodegradable Nano-Structured Molecularly Imprinted Polymer Based on Cross-Linker of Fructose](#), *Polymer*, **97**: 226-237 (2016).
- [37] Esmailnejad-Ahramjani P., Kazemeini M., Singh G., Arpanaei A., [Amine-Functionalized Magnetic Nanocomposite Particles for Efficient Immobilization of Lipase: Effects of Functional Molecule Size on Properties of the Immobilized Lipase](#), *RSC Advances*, **5(42)**: 33313-33327 (2015).

- [38] Popescu S., Ardelean I.L., Gudovan D., Rădulescu M., Fikai D., Fikai A., Vasile B.Ş., Andronescu E., [Multifunctional Materials Such as MCM-41/Fe₃O₄/Folic Acid as Drug Delivery System](#), *Rom J Morphol Embryol*, **57(2)**: 483-489 (2016).
- [39] Rao Z., Ge H., Liu L., Zhu C., Min L., Liu M., Fan L., Li D., [Carboxymethyl Cellulose Modified Graphene Oxide as pH-Sensitive Drug Delivery System](#), *International Journal of Biological Macromolecules*, **107**: 1184-1192 (2018).
- [40] Sandomierski M., Buchwald Z., Voelkel A., [Calcium Montmorillonite and Montmorillonite with Hydroxyapatite Layer As Fillers in Dental Composites with Remineralizing Potential](#), *Applied Clay Science*, **198**: 105822 (2020).
- [41] Li D., Li P., Xu Y., Guo W., Li M., Chen M., Wang H., Lin H., [Progress in Montmorillonite Functionalized Artificial Bone Scaffolds: Intercalation and Interlocking, Nanoenhancement, and Controlled Drug Release](#), *Journal of Nanomaterials*, **2022**: 7900382 (2022).
- [42] Hong H.-J., Kim J., Kim D.-Y., Kang I., Kang H.K., Ryu B.G., [Synthesis of Carboxymethylated Nanocellulose Fabricated Ciprofloxacin – Montmorillonite Composite for Sustained Delivery of Antibiotics](#), *International Journal of Pharmaceutics*, **567**: 118502 (2019).
- [43] Dias E., Chalse H., Mutha S., Mundhe Y., Ambhore N., Kulkarni A., Mache A., [Review on Synthetic/Natural Fibers Polymer Composite Filled with Nanoclay and Their Mechanical Performance](#), *Materials Today: Proceedings*, **77**: 916-925 (2023).
- [44] Rangunath S., Rathod M.L., Saravanan K.G., Rakesh N., Kifetew M., [Optimization of Machining Parameters of Natural/Glass Fiber with Nanoclay Polymer Composite Using Response Surface Methodology](#), *Journal of Nanomaterials*, **2023**: 9485769 (2023).
- [45] Shahbaz A., Hussain N., Mahmood T., Iqbal H.M.N., Bin Emran T., Show P.L., Bilal M., [17 - Polymer Nanocomposites for Biomedical Applications](#), in: N. Ali, M. Bilal, A. Khan, T.A. Nguyen, R.K. Gupta (Eds.), *Smart Polymer Nanocomposites*, Elsevier, 379-394 (2023).
- [46] Azzaoui K., Mejdoubi E., Lamhamdi A., Jodeh S., Hamed O., Berrabah M., Jerdioui S., Salghi R., Akartasse N., Errich A., Ríos Á., Zougagh M., [Preparation and Characterization of Biodegradable Nanocomposites Derived from Carboxymethyl Cellulose and Hydroxyapatite](#), *Carbohydrate Polymers*, **167**: 59-69 (2017).
- [47] Pourmadadi M., Rahmani E., Shamsabadipour A., Samadi A., Esmaeili J., Arshad R., Rahdar A., Tavangarian F., Pandey S., [Novel Carboxymethyl Cellulose Based Nanocomposite: A Promising Biomaterial for Biomedical Applications](#), *Process Biochemistry*, **130**: 211-226 (2023).
- [48] Mehrabi A., Jalise S.Z., Hivechi A., Habibi S., Kebria M.M., Haramshahi M.A., Latifi N., Karimi A., Milan P.B., [Evaluation of Inherent Properties of the Carboxymethyl Cellulose \(CMC\) for Potential Application in Tissue Engineering Focusing on Bone Regeneration](#), *Polymers for Advanced Technologies*, **35(1)**: e6258 (2024).

- [49] Okuda K., Shigemasa R., Hirota K., Mizutani T., [In Situ Crystallization of Hydroxyapatite on Carboxymethyl Cellulose as a Biomimetic Approach to Biomass-Derived Composite Materials](#), *ACS Omega*, **7(14)**: 12127-12137 (2022).
- [50] Hasan A., Waibhaw G., Saxena V., Pandey L.M., [Nano-Biocomposite Scaffolds of Chitosan, Carboxymethyl Cellulose and Silver Nanoparticle Modified Cellulose Nanowhiskers for Bone Tissue Engineering Applications](#), *International Journal of Biological Macromolecules*, **111**: 923-934 (2018).
- [51] Palem R.R., Rao K.M., Shimoga G., Saratale R.G., Shinde S.K., Ghodake G.S., Lee S.-H., [Physicochemical Characterization, Drug Release, and Biocompatibility Evaluation of Carboxymethyl Cellulose-Based Hydrogels Reinforced with Sepiolite Nanoclay](#), *International Journal of Biological Macromolecules*, **178**: 464-476 (2021).
- [52] Saberi Riseh R., Gholizadeh Vazvani M., Hassanisaadi M., Skorik Y.A., [Micro-/Nano-Carboxymethyl Cellulose as a Promising Biopolymer with Prospects in the Agriculture Sector: A Review](#), *Polymers*, **15(2)**: 440 (2023).
- [53] Sun X., Shen J., Yu D., Ouyang X.-k., [Preparation of pH-Sensitive Fe₃O₄@C/Carboxymethyl Cellulose/Chitosan Composite Beads for Diclofenac Sodium Delivery](#), *International Journal of Biological Macromolecules*, **127**: 594-605 (2019).
- [54] Aminatun D., Hikmawati P., Widiyanti T., Amrillah A., Nia W., Firdania I.T., Abdullah C.A.C., [Study of Mechanical and Thermal Properties in Nano-Hydroxyapatite/Chitosan/Carboxymethyl Cellulose Nanocomposite-Based Scaffold for Bone Tissue Engineering: The Roles of Carboxymethyl Cellulose](#), *Applied Sciences*, **10(19)**: 6970 (2020).
- [55] Manjubala I., Basu P., Narendrakumar U., [In Situ Synthesis of Hydroxyapatite/Carboxymethyl Cellulose Composites for Bone Regeneration Applications](#), *Colloid and Polymer Science*, **296(10)**: 1729-1737 (2018).
- [56] Oprea M., Voicu S.I., [Recent Advances in Applications of Cellulose Derivatives-Based Composite Membranes with Hydroxyapatite](#), *Materials*, **13(11)**: 2481 (2020).
- [57] Altaani B.M., Almaaytah A.M., Dadou S., Alkhamis K., Daradka M.H., Hananeh W., [Oral Delivery of Teriparatide Using a Nanoemulsion System: Design, in Vitro and in Vivo Evaluation](#), *Pharmaceutical Research*, **37(4)**: 80 (2020).
- [58] Amani N., Javar H.A., Dorkoosh F.A., Rouini M.R., Amini M., Sharifzadeh M., Boumi S., [Preparation and Pulsatile Release Evaluation of Teriparatide-Loaded Multilayer Implant Composed of Polyanhydride-Hydrogel Layers Using Spin Coating for the Treatment of Osteoporosis](#), *Journal of Pharmaceutical Innovation*, **16(2)**: 337-358 (2021).
- [59] Liuyun J., Yubao L., Chengdong X., [Preparation and Biological Properties of a Novel Composite Scaffold of Nano-Hydroxyapatite/Chitosan/Carboxymethyl Cellulose for Bone Tissue Engineering](#), *Journal of Biomedical Science*, **16(1)**: 65 (2009).

- [60] Balakrishnan H., Husin M.R., Wahit M.U., Abdul Kadir M.R., [Preparation and Characterization of Organically Modified Montmorillonite-Filled High Density Polyethylene/Hydroxyapatite Nanocomposites for Biomedical Applications](#), *Polymer-Plastics Technology and Engineering*, **53(8)**: 790-800 (2014).
- [61] Garai S., Sinha A., [Biomimetic Nanocomposites of Carboxymethyl Cellulose–Hydroxyapatite: Novel Three Dimensional Load Bearing Bone Grafts](#), *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, **115**: 182-190 (2014).
- [62] Lamkhao S., Tandorn S., Thavornytikarn P., Chokethawai K., Rujijanagul G., Thongkorn K., Jarupoom P., Randorn C., [Synergistic Amalgamation of Shellac with Self-Antibacterial Hydroxyapatite and Carboxymethyl Cellulose: An Interactive Wound Dressing for Ensuring Safety and Efficacy in Preliminary in Vivo Studies](#), *International Journal of Biological Macromolecules*, **253**: 126809 (2023).
- [63] Kar S., Kaur T., Thirugnanam A., [Microwave-Assisted Synthesis of Porous Chitosan–Modified Montmorillonite–Hydroxyapatite Composite Scaffolds](#), *International Journal of Biological Macromolecules*, **82**: 628-636 (2016).
- [64] Mahdavinia G.R., Afzali A., Etemadi H., Hoseinzadeh H., [Magnetic/pH-Sensitive Nanocomposite Hydrogel Based Carboxymethyl Cellulose–G-Polyacrylamide/Montmorillonite for Colon Targeted Drug Delivery](#), *Nanomedicine Research Journal*, **2(2)**: 111-122 (2017).
- [65] Ahmadi M., Pourmadadi M., Ghorbanian S.A., Yazdian F., Rashedi H., [Ultra pH-Sensitive Nanocarrier Based on Fe₂O₃/Chitosan/Montmorillonite for Quercetin Delivery](#), *International Journal of Biological Macromolecules*, **191**: 738-745 (2021).
- [66] Heragh B.K., Javanshir S., Mahdavinia G.R., Jamal M.R.N., [Hydroxyapatite Grafted Chitosan/Laponite RD Hydrogel: Evaluation of the Encapsulation Capacity, pH-Responsivity, and Controlled Release Behavior](#), *International Journal of Biological Macromolecules*, **190**: 351-359 (2021).
- [67] Saadatjoo N., Golshekan M., Shariati S., Azizi P., Nemati F., [Ultrasound-Assisted Synthesis of \$\beta\$ -Amino Ketones Via a Mannich Reaction Catalyzed by Fe₃O₄ Magnetite Nanoparticles as an Efficient, Recyclable and Heterogeneous Catalyst](#), *Arabian Journal of Chemistry*, **10**: S735-S741 (2017).
- [68] Saadatjoo N., Golshekan M., Shariati S., Kefayati H., Azizi P., [Organic/Inorganic MCM-41 Magnetite Nanocomposite as a Solid Acid Catalyst for Synthesis of Benzo\[\$\alpha\$ \]Xanthenone Derivatives](#), *Journal of Molecular Catalysis A: Chemical*, **377**: 173-179 (2013).
- [69] Mahdi Eshaghi M., Pourmadadi M., Rahdar A., Díez-Pascual A.M., [Novel Carboxymethyl Cellulose-Based Hydrogel with Core–Shell Fe₃O₄@SiO₂ Nanoparticles for Quercetin Delivery](#), *Materials*, **15(24)**: 8711 (2022).

- [70] Xie W., Zang X., Immobilized Lipase on Core–Shell Structured Fe₃O₄–MCM-41 Nanocomposites as a Magnetically Recyclable Biocatalyst for Interesterification of Soybean oil and Lard, *Food Chemistry*, **194**: 1283-1292 (2016).
- [71] Hosseini H.R., Abdouss M., Golshekan M., Hydroxyapatite Incorporated with Fe₃O₄@MCM-41 Core–Shell: A Promising Nanocomposite for Teriparatide Delivery in Bone Tissue Regeneration, *ACS Omega*, (2023).
- [72] Abbas M., Parvatheeswara Rao B., Nazrul Islam M., Naga S.M., Takahashi M., Kim C., Highly Stable- Silica Encapsulating Magnetite Nanoparticles (Fe₃O₄/SiO₂) Synthesized Using Single Surfactantless- Polyol Process, *Ceramics International*, **40(1, Part B)**: 1379-1385 (2014).
- [73] Zakharov N.A., Ezhova Z.A., Koval' E.M., Kalinnikov V.T., Chalykh A.E., Hydroxyapatite-Carboxymethyl Cellulose Nanocomposite Biomaterial, *Inorganic Materials*, **41(5)**: 509-515 (2005).
- [74] Adinugraha M.P., Marseno D.W., Haryadi, Synthesis and Characterization of Sodium Carboxymethylcellulose from Cavendish Banana Pseudo Stem (Musa Cavendishii LAMBERT), *Carbohydrate Polymers*, **62(2)**: 164-169 (2005).
- [75] Nazeer M.A., Yilgör E., Yilgör I., Intercalated Chitosan/Hydroxyapatite Nanocomposites: Promising Materials for Bone Tissue Engineering Applications, *Carbohydrate Polymers*, **175**: 38-46 (2017).
- [76] Guo X., Yan H., Zhao S., Li Z., Li Y., Liang X., Effect of Calcining Temperature on Particle Size of Hydroxyapatite Synthesized by Solid-State Reaction at Room Temperature, *Advanced Powder Technology*, **24(6)**: 1034-1038 (2013).
- [77] Narayanan D., Anitha A., Jayakumar R., Nair S.V., Chennazhi K.P., Synthesis, Characterization and Preliminary In Vitro Evaluation of PTH 1-34 Loaded Chitosan Nanoparticles for Osteoporosis, *Journal of Biomedical Nanotechnology*, **8(1)**: 98-106 (2012).
- [78] Tariq S., Raza A.R., Khalid M., Rubab S.L., Khan M.U., Ali A., Tahir M.N., Braga A.A.C., Synthesis and Structural Analysis of Novel Indole Derivatives by XRD, Spectroscopic and DFT Studies, *Journal of Molecular Structure*, **1203**: 127438 (2020).
- [79] Laabd M., Brahmi Y., El Ibrahim B., Hsini A., Toufik E., Abdellaoui Y., Abou Oualid H., El Ouardi M., Albourine A., A Novel Mesoporous Hydroxyapatite@Montmorillonite Hybrid Composite for High-Performance Removal of Emerging Ciprofloxacin Antibiotic from Water: Integrated Experimental and Monte Carlo Computational Assessment, *Journal of Molecular Liquids*, **338**: 116705 (2021).
- [80] Yadollahi M., Gholamali I., Namazi H., Aghazadeh M., Synthesis and Characterization of Antibacterial Carboxymethylcellulose/CuO Bio-Nanocomposite Hydrogels, *International Journal of Biological Macromolecules*, **73**: 109-114 (2015).
- [81] Rajabzadeh-Khosroshahi M., Pourmadadi M., Yazdian F., Rashedi H., Navaei-Nigjeh M., Rasekh B., Chitosan/Agarose/Graphitic Carbon Nitride Nanocomposite as an Efficient pH-Sensitive Drug Delivery System for Anticancer Curcumin Releasing, *Journal of Drug Delivery Science and Technology*, **74**: 103443 (2022).

- [82] Joseph E., Singhvi G., Chapter 4 - Multifunctional Nanocrystals for Cancer Therapy: A Potential Nanocarrier, in: A.M. Grumezescu (Ed.), «Nanomaterials for Drug Delivery and Therapy», William Andrew Publishing, 91-116 (2019).
- [83] Mohebbali A., Abdouss M., Afshar Taromi F., Fabrication Of Biocompatible Antibacterial Nanowafers Based On HNT/PVA Nanocomposites Loaded With Minocycline For Burn Wound Dressing, *Materials Science and Engineering, C* **110**: 110685 (2020).
- [84] Abdollahi E., Khalafi-Nezhad A., Mohammadi A., Abdouss M., Salami-Kalajahi M., Synthesis of New Molecularly Imprinted Polymer Via Reversible Addition Fragmentation Transfer Polymerization as a Drug Delivery System, *Polymer*, **143**: 245-257 (2018).
- [85] Strach A., Dulski M., Wasilkowski D., Matus K., Dudek K., Podwórny J., Rawicka P., Grebnevs V., Waloszczyk N., Nowak A., Poloczek P., Golba S., Multifaceted Assessment of Porous Silica Nanocomposites: Unraveling Physical, Structural, and Biological Transformations Induced by Microwave Field Modification, *Nanomaterials*, **14(4)**: 337 (2024).
- [86] Chen X., Chen J., Huang N., The Structure, Formation, and Effect of Plasma Protein Layer on the Blood Contact Materials: A Review, *Biosurface and Biotribology* **8(1)**: 1-14 (2022).
- [87] Eswaramoorthy R., Chang C.-C., Wu S.-C., Wang G.-J., Chang J.-K., Ho M.-L., Sustained release of PTH(1-34) from PLGA microspheres suppresses osteoarthritis progression in Rats, *Acta Biomaterialia*, **8(6)**: 2254-2262 (2012).
- [88] Keegan M.T., 36 - Endocrine Pharmacology, in: H.C. Hemmings, T.D. Egan (Eds.), «Pharmacology and Physiology for Anesthesia (Second Edition)», Elsevier, Philadelphia, 708-731 (2019).
- [89] Samadi A., Pourmadadi M., Yazdian F., Rashedi H., Navaei-Nigjeh M., Eufrazio-da-silva T., Ameliorating Quercetin Constraints in Cancer Therapy with pH-Responsive Agarose-Polyvinylpyrrolidone -Hydroxyapatite Nanocomposite Encapsulated in Double Nanoemulsion, *International Journal of Biological Macromolecules*, **182**: 11-25 (2021).
- [90] Liu Z.-S., Wen J., Huang C.-Y., Zhang P.-W., Miao Y.-L., Cheng H., Li S.-Y., Nanomedicines Based on Responsive Nanocarriers for Cancer Therapy, *Advanced Therapeutics*, **7(2)**: 2300223 (2024).