

## بررسی زیست‌سازگاری نانو کامپوزیت هیدروکسی آپاتیت / کیتوسان دوپ شده با اکسیدهای فلزی

علیرضا اسماعیل زاده، سعیده حق بین لشت نشانی، فلورا حشمت پور\*

گروه شیمی معدنی، دانشکده شیمی، دانشگاه صنعتی خواجه نصیرالدین طوسی، تهران، ایران

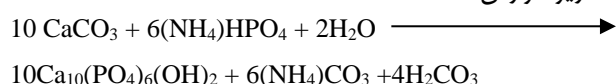
**چکیده:** در این مقاله، کامپوزیت‌های دوپ شده هیدروکسی آپاتیت به وسیله روش هم‌رسوبی با دوپ کردن اکسیدهای فلزی  $MgO$ ،  $ZnO$  و  $CeO_2$  درون ساختار هیدروکسی آپاتیت با موفقیت سنتز شدند. همچنین کیتوسان برای ارتقا و ویژگی زیست تخریب‌پذیری به کامپوزیت‌های هیدروکسی آپاتیت اضافه شد. نتیجه‌ها نشان داد که دوپ کردن اکسیدهای فلزی در ساختار هیدروکسی آپاتیت منجر به تغییر در پارامتر شبکه ساختار هیدروکسی آپاتیت شده است. سرانجام، زیست‌فعالی کامپوزیت‌ها به وسیله ارزیابی  $MTT$  (دی متیل تiazل دی فنیل تترازولیم بروماید) مورد بررسی قرار گرفت. ارزیابی  $MTT$  نشان داد که هیدروکسی آپاتیت‌های دوپ شده سمیت قابل قبولی را در برابر سلول MG-63 از خود بروز داده‌اند. در غلظت‌های بالای ۰/۱ میلی گرم بر میلی لیتر از نانو کامپوزیت، هر سه نمونه تهیه شده درجه سمیت قابل قبولی داشته‌اند. علاوه بر آن در دو غلظت ۰/۴ و ۰/۸ میلی گرم بر میلی لیتر نانو کامپوزیت‌های  $nHA/MgO/CS$  و  $nHA/ZnO/CS$  هیچ‌گونه سمیتی از خود بروز ندادند.

**واژگان کلیدی:** هیدروکسی آپاتیت، اکسید فلزی، زیست‌فعالی، سمیت سلولی

**KEYWORDS:** Hydroxyapatite, Metal oxide, Bioactivity, Cytotoxicity

### مقدمه

زیست فعال، کیتوسان یکی از بهترین انتخاب‌ها در جایگزینی بافت است. کیتوسان یک کوپلیمر طبیعی دارای واحدهای زنجیری  $\beta$ -[۱-۴]-۲-استامیدو-D-گلوکز و  $\beta$ -[۱-۴]-۲-آمینو-D-گلوکز است که به دلیل زیست‌سازگاری، زیست تخریب‌پذیری و ویژگی‌های استئوکانداکتیویتی برای رشد و ترمیم سلول‌های بافت مناسب است [۴]. سنتز هیدروکسی آپاتیت مطابق با واکنش موازنه شده زیر گزارش شده است.



شبکه بین سلولی استخوان طبیعی از یک ترکیب آلی-معدنی ساخته شده است که بخش آلی آن را کلاژن و بخش معدنی را هیدروکسی آپاتیت تشکیل می‌دهد. هیدروکسی آپاتیت به فرمول  $Ca_{10}(PO_4)_6(OH)_2$  یکی از مهم‌ترین زیست‌مواد شناخته شده مورد استفاده در پزشکی و دندان‌پزشکی است که ویژگی‌های یگانه‌ای مانند زیست‌سازگاری، زیست تخریب‌پذیری و ترمیم بافت را دارا است [۱ و ۲]. هیدروکسی آپاتیت خالص ساختار سخت و شکننده‌ای دارد و برای رفع این محدودیت می‌توان از ترکیب هیدروکسی آپاتیت با پلیمرهای زیست‌سازگار استفاده کرد [۳]. در میان پلیمرهای

\* عهده‌دار مکاتبات

+E-Mail: heshmatpour@kntu.ac.ir

بررسی قرار گرفته است. نتیجه‌های بررسی‌های انجام شده نشان داد که اندازه ذره یکنواخت، ریخت شناسی کروی و ویژگی‌های زیستی کامپوزیت هیدروکسی آپاتیت/اکسید منیزیم آن را گزینه مناسبی برای کاربردهای پزشکی کرده است [۱۲].

یکی دیگر از عنصرهایی که به مقدار بسیار جزئی در بافت استخوان وجود دارد عنصر کمیاب سریم است. مطالعه‌هایی که بر روی ترکیب‌های سریم انجام شده است بیانگر این مطلب است که ترکیب‌های سریم به سبب دارا بودن ویژگی‌های ضدباکتریالی و زیستی عملکرد مناسبی در کاربردهای پزشکی دارند [۱۳].

ویرجینیا<sup>۲</sup> و همکاران در سال ۲۰۲۰ میلادی، کامپوزیت جدیدی از سیلیسیم دوپ شده کیتوسان/هیدروکسی آپاتیت (Chi/HAp-Si) را سنتز نمودند. سیلیسیم به مقدار ۷ درصد وزنی با روش حالت جامد به HAp اضافه می‌شود. به‌عنوان مقایسه، HAp-Si در ادامه با کیتوسان با تغییرهای ۰، ۵، ۱۰، و ۱۵ درصد وزنی با هدف افزایش توانایی ضد باکتریالی در برابر باکتری استافیلوکوکوس اورئوس مخلوط می‌شود. نمونه‌های سنتز شده با استفاده از XRD و SEM مشخص شدند. فعالیت ضد باکتریالی کامپوزیت Chi / HAp-Si در برابر باکتری استافیلوکوکوس اورئوس مورد ارزیابی قرار گرفت. افزودن کیتوسان تأثیر زیادی بر زیست سازگاری HAp-Si، به ویژه در باکتری استافیلوکوکوس اورئوس نداشت. با این حال، افزودن کیتوسان به ترکیب ۱۰ درصد وزنی دارای بالاترین ویژگی‌های ضد باکتریالی بود [۱۸]. در سال ۲۰۱۲ میلادی هان<sup>۳</sup> و همکاران، به منظور بهبود زیست فعالی و ویژگی‌های مکانیکی هیدروکسی آپاتیت (HAp)، کیتوسان (Chi) با HAp ترکیب شد تا یک کامپوزیت ساخته شود. سمیت سلولی کامپوزیت HAp / Chi با ارزیابی زنده ماندن فیروبلاست‌های موش (سلول‌های L-929) در معرض عصاره‌های رقیق شده فیلم‌های کامپوزیت مورد مطالعه قرار گرفت [۱۹]. چنگ<sup>۴</sup> و همکاران در سال ۲۰۱۳ میلادی، نانوکامپوزیت HA - CS-GO را تهیه نمودند. سمیت سلولی نانوکامپوزیت‌های آماده شده به ترتیب با استفاده از روش CCK-8 بر روی رده سلولی فیروبلاست L-929 موش و رده سلولی MG-63 شبیه استئوبلاست انسانی مورد بررسی قرار گرفت. هر دو نانوکامپوزیت نرخ تکثیر سلولی بالایی را برای L-929 و MG-63 نشان دادند، و HA - CS-GO می‌تواند زنده ماندن سلولی و فعالیت آکالین فسفاتاز را در مقایسه با کامپوزیت GO-HA

هیدروکسی آپاتیت با داشتن گروه‌های هیدروکسیل و ترکیب‌های فسفات و کربنات قابلیت جایگزینی و اتصال به عنصرهای دوپ‌شونده را دارد. افزودن عنصرهای دوپ‌شونده به ساختار هیدروکسی آپاتیت منجر به تغییر در بلورینگی، پارامتر شبکه، پایداری گرمایی، ویژگی‌های مکانیکی، حلالیت، ویژگی‌های شیمیایی و زیستی هیدروکسی آپاتیت می‌شود [۵ و ۶]. عنصرهای فلزی و اکسیدهای فلزی می‌توانند از طریق دوپ شدن به هیدروکسی آپاتیت ویژگی‌های زیستی هیدروکسی آپاتیت را تغییر دهند. اکسیدهای فلزی مانند MgO، TiO<sub>2</sub>، Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub>، CuO، CeO<sub>2</sub> و ZnO در کاربردهای پزشکی و زیست‌فناوری مورد استفاده قرار گرفته‌اند و فعالیت زیستی مطلوبی از خود نشان داده‌اند [۷ و ۸]. از این رو مطالعه‌های بسیاری بر روی ترکیب اکسیدهای فلزی با هیدروکسی آپاتیت و بررسی ویژگی‌ها و عملکرد آن انجام شده است. برای نمونه ونوگوپال<sup>۱</sup> و همکاران روی اکسید را به هیدروکسی آپاتیت دوپ کردند تا ویژگی ضد باکتریالی هیدروکسی آپاتیت را بهبود ببخشند، همچنین پلیمر اسید پلی لاکتیک - پلی کپرولاکتون را به کامپوزیت هیدروکسی آپاتیت/ روی اکسید اضافه کردند و توانایی ترمیم بافت را به وسیله آزمون برون تنی مورد بررسی قرار دادند [۹]. نتیجه‌ها نشان داد که افزودن روی اکسید و پلیمر سبب بهبود عملکرد هیدروکسی آپاتیت در رشد استخوان و هسته‌زایی سلول می‌شود. به‌طور کلی فلز روی یکی از عنصرهای فلزی ضروری برای رشد سلولی و مدل‌سازی شبکه بین‌سلولی است، ویژگی‌های زیستی فلز روی آن را به یکی از گزینه‌های مناسب برای ترمیم بافت تبدیل کرده است.

عنصر حیاتی دیگری که در بدن انسان و در بسیاری از عملکردهای زیستی بدن نقش دارد عنصر منیزیم است [۱۰]. پژوهش‌ها نشان داده است که منیزیم در استخوان نیز نقش مهمی دارد و یکی از عنصرهای جانشین شده در ساختار هیدروکسی آپاتیت زیستی است. غلظت اکسید منیزیم در دندان و استخوان به ترتیب معادل ۱/۲۳٪ و ۰/۷۳٪ درصد وزنی است، از این رو مطالعه‌هایی بر روی افزودن اکسید منیزیم به هیدروکسی آپاتیت سنتزی برای شبیه‌سازی با استخوان طبیعی انجام شده است [۱۱]. در آخرین پژوهش‌های انجام شده هیدروکسی آپاتیت با مقدارهای گوناگونی از منیزیم اکسید به عنوان دوپ شونده سنتز شد و ویژگی‌های ضدباکتریالی و توانایی ترمیم بافت به‌وسیله کامپوزیت سنتزی مورد

(۱) Venugopal

(۳) Han

(۲) Virginia

(۴) Cheng

و به وسیله دستگاه پرس به شکل قرص درآمد. آنالیز پراش پرتو ایکس (XRD) با استفاده از دستگاه X'Pert Pro شرکت Panalytical تحت ولتاژ 40 kv و جریان 30 mA انجام شد. تولید X-Ray در این دستگاه با استفاده از منبع تابش Cu-K $\alpha$  پوشیده شده با نیکل صورت گرفت. میکروسکوپ الکترونی روبشی (SEM) مدل هیتاچی<sup>۲</sup> با استفاده از منبع تابش K $\alpha$  معادل 40 keV و 30 mA با پوشش طلا استفاده شد. طیف سنجی پراش انرژی پرتو ایکس (EDX) با استفاده از دستگاه MIRA III ساخت شرکت TESCAN و فیلپس XL30 به دست آمد.

### روش سنتز نانوکامپوزیت هیدروکسی آپاتیت/کیتوسان دوپ شده با اکسیدهای فلزی

در ابتدا محلول‌های ۵۰ میلی‌لیتر محلول ۰/۵ مولار کلسیم نیترات و ۵۰ میلی‌لیتر آمونیوم فسفات ۰/۳ مولار تهیه و هر محلول به طور جداگانه به مدت ۳۰ دقیقه هم‌زده شدند. در این مرحله ۰/۱ گرم پلیمر کیتوسان در ۵۰ میلی‌لیتر استیک اسید ۲٪ حل شده و به محلول کلسیم افزوده شد. ۵۰ میلی‌لیتر از هر یک از اکسیدهای فلزی (ZnO، MgO و CeO<sub>2</sub>) با غلظت ۰/۰۰۰۱ مولار تهیه و به محلول کلسیم و پلیمر کیتوسان اضافه شد. با استفاده از یک بورت محلول آمونیوم هیدروژن فسفات قطره قطره به محلول کلسیم-کیتوسان-اکسید فلز که به وسیله همزن مغناطیسی در حال به هم خوردن بود، اضافه شد. محلول به دست آمده به مدت یک ساعت هم زده و در ادامه pH محلول با افزودن محلول سدیم هیدروکسید ۰/۱ مولار تا حدود ۱۱ بالا برده شد. محلول به مدت ۳ ساعت به وسیله همزن مغناطیسی هم زده شد. سپس ۲۴ ساعت در دمای اتاق قرار گرفت و رسوب به وسیله سانتریفوژ از حلال جداسازی شد. رسوب به دست آمده از طریق شستشو با آب و استون خالص گردید و به مدت ۵ ساعت در آن ۷۰°C خشک شد.

### آزمون سمیت سلولی

آزمون سمیت سلولی برون تنی<sup>۳</sup> از طریق تست MTT انجام گرفت. این آزمون بر پایه تغییر پودر زرد رنگ تترازولیوم به کریستال‌های نامحلول بنفش فورمازان است. کریستال‌های فورمازان با استفاده از حلال آلی ایزوپروپانول حل شده و چگالی نوری (OD) به دست آمده از آن با استفاده از دستگاه الایزایدر<sup>۴</sup>

به طور چشمگیری فراهم کند [۲۰]. پرزکورا<sup>۱</sup> و همکاران در سال ۲۰۱۹ میلادی، کیتوسان/آگارز/نانوهیدروکسی آپاتیت با تخلخل بسیار بالا تهیه نمودند. نتیجه‌های به دست آمده نیز با شیمی سطح مواد و ترشوندگی برای توضیح پروتئین مشاهده شده و پاسخ سلولی مرتبط بود. نتیجه‌های به دست آمده به روشنی نشان داد که اسکلت نانوکامپوزیتی توسعه یافته با زیست‌سازگاری و رسانایی استخوانی بالا مشخص می‌شوند [۲۱].

در این مطالعه با استناد به پژوهش‌های انجام شده و ویژگی‌های زیستی مورد انتظار اکسیدهای فلزی سه نمونه نانوکامپوزیت هیدروکسی آپاتیت با دوپ کردن روی اکسید، منیزیم اکسید و سریم اکسید سنتز شد. علاوه بر دوپ کردن اکسیدهای فلزی، پلیمر کیتوسان نیز در فرآیند سنتز به هیدروکسی آپاتیت اضافه شده و از این طریق از ویژگی زیست‌سازگاری و زیست تخریب‌پذیری کیتوسان نیز استفاده شد. نانوکامپوزیت‌های سنتزی با استفاده از آنالیز پراش پرتو ایکس (X-Ray)، طیف سنجی پراش انرژی پرتو ایکس (EDX)، طیف‌سنجی تبدیل فوریه فروسرخ (FT-IR) و میکروسکوپ الکترونی روبشی (SEM) مورد شناسایی قرار گرفتند. بررسی میزان سمیت سلولی نانوکامپوزیت‌ها بر روی سلول MG-63 (NCBI C555) و با استفاده از آزمون برون تنی تست دی متیل تیازل دی فنیل تترازولیوم بروماید (MTT) در چهار غلظت گوناگون از نانوکامپوزیت‌ها انجام گرفت. هدف از انجام این پژوهش بررسی سمیت سلولی هیدروکسی آپاتیت‌های دوپ شده به وسیله اکسیدهای فلزی است.

### بخش تجربی

#### مواد شیمیایی

کلسیم نیترات چهار آبه، آمونیوم هیدروژن فسفات، سود، منیزیم اکسید، روی اکسید، سریم اکسید و پلیمر کیتوسان همگی از شرکت سیگما خریداری شد و هیچ‌گونه خالص‌سازی بر روی آن‌ها صورت نگرفت.

#### دستگاه‌های شناسایی و اندازه‌گیری

دستگاه طیف سنج فروسرخ تبدیل فوریه (FT-IR) به وسیله دستگاه ABB-M330 مدل FTLA 200-100 در بازه ۵۰۰ تا ۴۰۰۰ در حالت عبوری ثبت شد. مقداری از نمونه با پودر KBr مخلوط شد

(۱) Przekora

(۳) in vivo

(۲) HITACHI

(۴) ELIZA Reader

شد و سلول‌ها برای مدت ۲۴ ساعت دیگر در مجاورت این عصاره‌ها قرار گرفتند. پس از آن محیط کشت خارج شده و ۱۰۰ میکرولیتر MTT با غلظت ۰/۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر در هر چاهک ریخته شد و به مدت ۴ ساعت در انکوباتور قرار گرفت. پس از گذشت ۴ ساعت محلول روی سلول‌ها خارج شد و ایزوپروپانول به آن‌ها اضافه گردید تا بلورهای بنفش رنگ ایجاد شده حل شود. برای حل شدن بهتر رسوب MTT، صفحه به مدت ۱۵ دقیقه بر روی دستگاه شیکر قرار گرفت. سپس مقدار غلظت ماده حل شده در ایزوپروپانول با استفاده از دستگاه الیزابدر در طول موج ۵۷۰ نانومتر محاسبه شد. چاهک دارای سلول‌های بیشتر چگالی نوری بالاتری نسبت به چاهک با سلول کمتر نشان می‌دهد. بنابراین می‌توان از معادله ۱ چاهک دارای مقدار سلول بیشتر را مشخص کرد و با نمونه شاهد مقایسه نمود.

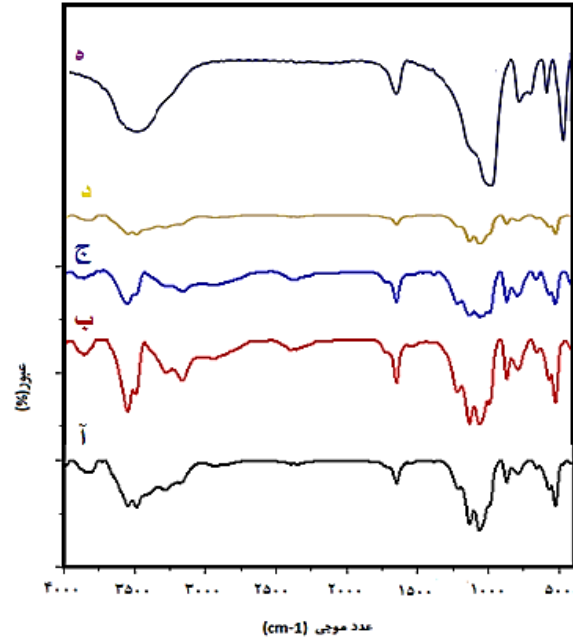
$$\text{Toxicity}\% = \left(1 - \frac{\text{mean OD of sample}}{\text{mean OD of control}}\right) \times 100$$

$$\text{Viability}\% = 100 - \text{Toxicity}\% \quad (1)$$

## نتیجه‌ها و بحث

### نتیجه‌های مطالعه FT-IR

شکل ۱ طیف FT-IR نمونه‌های تهیه شده را نشان می‌دهد. گروه‌های عاملی در طیف nHA (شکل ۱-d) سنتز شده  $\text{PO}_4^{3-}$ ،  $\text{OH}^-$ ،  $\text{CO}_3^{2-}$ ، و همچنین  $\text{HPO}_4^{2-}$  هستند که مشخصه nHA هستند. فرکانس‌های ارتعاشی گروه  $\text{PO}_4^{3-}$  در  $560$ ،  $661$  و  $1062$ – $1126$   $\text{cm}^{-1}$  ظاهر شده‌اند [۱۷]. نوار پهن گروه هیدروکسیل مولکول آب در  $3550$  نسبتاً پهن است، نوار تیز در  $3570$  و  $1645$   $\text{cm}^{-1}$  مربوط به ارتعاش‌های خمشی یون‌های هیدروکسیل است. نوار تیز موجود در  $1530$   $\text{cm}^{-1}$  مربوط به ارتعاش‌های کششی  $\text{CO}_3^{2-}$  است که نشان‌دهنده HAp است [۱۴]. نوار مشاهده شده در ناحیه  $1086$   $\text{cm}^{-1}$ ، نشان‌دهنده پیوندهای اتری در کیتوسان می‌باشد،  $2920$   $\text{cm}^{-1}$  و  $2854$   $\text{cm}^{-1}$  نشان‌دهنده گروه‌های قندی CH در ساختمان کیتوزان می‌باشد (شکل ۱-e). ارتعاش‌های گروه‌های آمین نوع یک و دو در پلیمر کیتوسان خالص در  $3400$ – $3500$   $\text{cm}^{-1}$  ظاهر می‌شوند. همچنین نوار پهن در ناحیه  $3438$  نشان‌دهنده گروه‌های OH موجود می‌باشد. برهمکنش بین هیدروکسی آپاتیت و پلیمر کیتوسان به منزله حضور موثر کیتوسان در نانوکامپوزیت‌های تهیه شده است که باعث جابه‌جایی‌های جزیی هم در نوارها شده است. در ساختار هر سه نانو کامپوزیت تهیه شده نوارهای پلیمر کیتوسان که دلیلی بر برهمکنش آن با هیدروکسی آپاتیت است به خوبی مشاهده شد.



شکل ۱- طیف FTIR نانوکامپوزیت‌های تهیه شده: (ا) nHA/ZnO/CS، (ب) nHA/MgO/CS، (ج) nHA/CeO<sub>2</sub>/CS، (د) nHA، (ه) کیتوسان

خوانده شد. میزان چگالی نوری نسبت مستقیم با غلظت فورمازان داشته که آن هم متناسب با فعالیت متابولیکی سلول‌های زنده است. در این پژوهش از سلول MG-63 (NCBI C555) تهیه شده از بانک سلولی انستیتو پاستور ایران استفاده شد. پس از دفریز کردن سلول‌ها، آن‌ها را به فلاسک دارای محیط کشت RPMI به همراه FBS ۱۰٪ انتقال داده شده‌اند و سپس فلاسک در انکوباتور با دمای  $37^\circ\text{C}$ ، رطوبت ۹۰٪ و غلظت اکسیژن ۵٪ قرار داده شد. لازم به ذکر است که محیط کشت هر سه روز تعویض گردید. به منظور بررسی سمیت نمونه‌ها و تأثیر آن‌ها بر رشد و تکثیر سلول‌ها، فرآیند عصاره‌گیری براساس استاندارد ایزو ۵-۱۰۹۹۳ انجام شد که طی آن به هر ۰/۱ گرم از وزن نمونه مقدار یک میلی‌لیتر محیط کشت اضافه گردید. پس از گذشت ۷ روز محیط کشت از ظرف خارج شده و به سلول‌ها افزوده شد. مقدار مشخصی محیط کشت (RPMI) نیز به عنوان شاهد در نظر گرفته شد. برای بررسی میزان تکثیر سلولی ابتدا  $1 \times 10^4$  سلول به همراه ۱۰۰ میکرولیتر محیط کشت درون هر چاهک در صفحه کشت سلولی ۹۶ چاهکی ریخته شد و سپس به مدت ۲۴ ساعت در انکوباتور  $37^\circ\text{C}$  قرار گرفت تا سلول‌ها به کف صفحه متصل شوند. پس از اطمینان از اتصال سلول‌ها، محیط کشت را از روی سلول‌ها تا حد امکان خارج کرده و ۹۰ میکرولیتر از عصاره نمونه‌ها، به همراه FBS ۱۰ میکرولیتر به هر چاهک کشت افزوده

جدول ۱- پارامتر شبکه، حجم سلول و اندازه ذره نانوکامپوزیت‌های تهیه شده

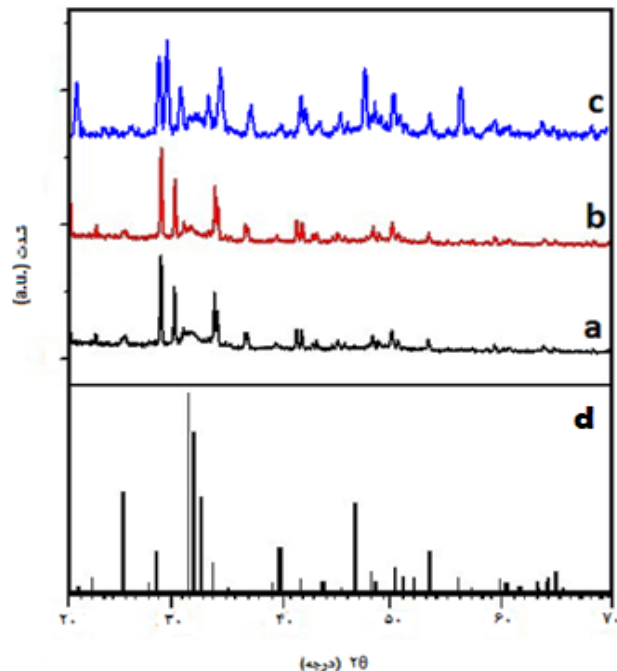
اندازه ذره (nm)	حجم سلول	پارامتر شبکه c (Å)	پارامتر شبکه a (Å)	نمونه
۹	۱۵۸۱	۶/۸۴	۹/۴۵	nHA/ZnO/CS
۸	۱۵۹۲	۶/۸۶	۹/۴۷	nHA/MgO/CS
۲۰	۱۵۵۰	۷/۲۳	۹/۱۰	nHA/CeO <sub>2</sub> /CS

معادله شرر ۳ هم برای محاسبه اندازه تقریبی نانوذره‌ها مورد استفاده قرار گرفت، معادله شرر عبارت‌اند از:

$$L = K\lambda / (\beta \cos\theta) \quad (۳)$$

در آنالیز EDX امکان شناسایی عنصرهای تشکیل دهنده نمونه به شکل نیمه کمی وجود خواهد داشت. در شکل ۳ طیف EDX: nHA/CeO<sub>2</sub>/CS (ج) nHA/MgO/CS (ب) nHA/ZnO/CS (ا) nHA (د) کیتوسان نشان داده شده است. در طیف EDX ترکیب nHA (شکل ۳-د) به خوبی وجود عنصرهای کلسیم، فسفر و اکسیژن نشان داده شده است. طیف EDX نمونه کیتوسان (شکل ۳-ه) حضور عنصرهای اکسیژن، نیتروژن و کربن را نشان داده است. حضور کلسیم، فسفر، نیتروژن، روی و اکسیژن در نمونه nHA/ZnO/CS (شکل ۳-ا) با استفاده از طیف EDX آن ارایه داده شده است. علاوه بر کلسیم، فسفر، نیتروژن و اکسیژن وجود سریم و منیزیم در طیف EDX نانوکامپوزیت nHA/MgO/CS و nHA/CeO<sub>2</sub>/CS (شکل ۳-ب و ۳-ج) نشان داده شده است که نشان دهنده تشکیل این نانوکامپوزیت‌ها می‌باشد.

تصویربرداری میکروسکوپ الکترونی روبشی (SEM) امکان بررسی سطح و ریخت شناسی نانو ساختارها فراهم آورده است. تصویرهای SEM نمونه‌های (ا) nHA (ب) کیتوسان، (ج) nHA/ZnO/CS و (د) nHA/MgO/CS در شکل ۴ نشان داده شده است. در تصویر SEM هیدروکسی آپاتیت (شکل ۴-ا) انباشته‌های به نسبت فشرده مشاهده شد که در نتیجه به هم پیوستن ذره‌هایی با اندازه نانومتری به یکدیگر هستند. همان‌گونه که در تصویر میکروسکوپ الکترونی نانوذره‌های کیتوسان (شکل ۴-ب) مشخص است، ذره‌ها بصورت یکنواخت و کروی نامتناجس همراه با کلوخگی و تجمع را نشان می‌دهند. اندازه ذره‌های نانوذره‌های کیتوسان در بازه ۱۵۰-۲۱۰ نانومتر مشاهده شد. تصویر میکروسکوپ الکترونی نانوذره‌های nHA/ZnO/CS و nHA/MgO/CS (شکل ۴-ج و ۴-د) نشان می‌دهد که ساختار منافذ باز و سطح بسیار بالایی دارند. منافذ کانال‌های به هم پیوسته‌ای را ایجاد می‌کنند که نفوذپذیری آب و



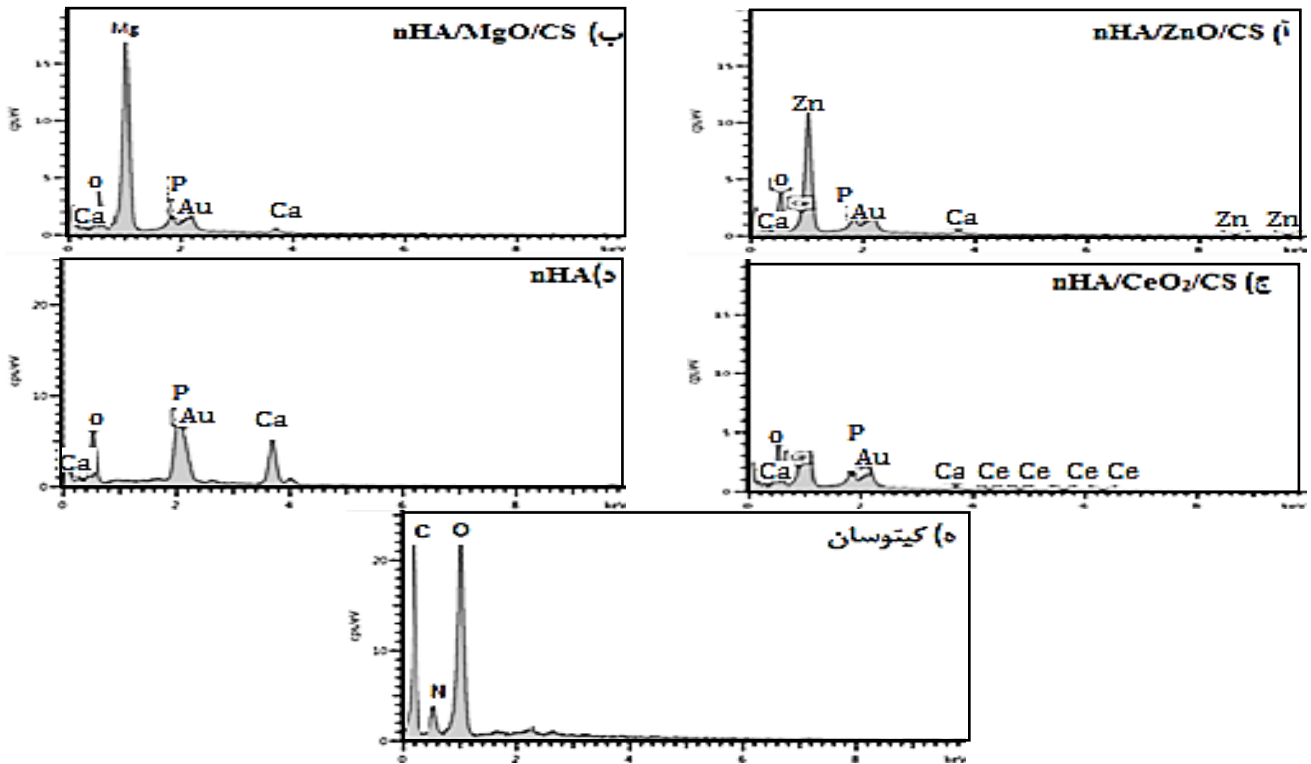
شکل ۲- طیف XRD نانوکامپوزیت‌های تهیه شده: (a) nHA/ZnO/CS، (b) nHA/MgO/CS، (c) nHA/CeO<sub>2</sub>/CS، (d) nHA

#### نتیجه‌های مطالعه XRD

الگوی XRD مربوط به نمونه‌های تهیه شده در شکل ۲ نشان داده شده است که پیک‌های شناسایی در  $2\theta$  برابر  $21^\circ$ ،  $26^\circ$ ،  $29^\circ$ ،  $30^\circ$ ،  $32^\circ$ ،  $34^\circ$ ،  $43^\circ$  و  $57^\circ$  ظاهر شده است. طبق شماره استاندارد ۲۲۲۰-۹۰۰-۹۶ کارت JCPDS الگوی ظاهر شده مربوط به هیدروکسی آپاتیت است. با استفاده از معادله ۲ و نرم افزار Xpert High Score پارامتر شبکه a و c تخمین زده شد [۱۵].

$$1/d^2 = 4(h^2 + hk + k^2)/3a^2 + l^2/c^2 \quad (۲)$$

هیدروکسی آپاتیت خالص دارای ساختار کریستالی هگزاگونال با گروه نقطه‌ای P6<sub>3</sub>/m است و پارامترهای شبکه آن برابر  $a = b = 9/41 \text{ \AA}$  و  $c = 6/84 \text{ \AA}$  است [۱۶]. همان‌گونه که در جدول ۱ قابل مشاهده است پارامترهای شبکه a و c نانوکامپوزیت‌های تهیه شده در تطابق خوبی با مقدارهای آن در هیدروکسی آپاتیت خالص است. تغییر جزئی در پارامتر شبکه نمونه‌های تهیه شده تایید کننده دوپ شدن اکسیدهای فلزی به ساختار هیدروکسی آپاتیت هستند. در الگوی XRD نانوکامپوزیت nHA/CeO<sub>2</sub>/CS (شکل ۲-ج) پیک‌های ساختار کیتوسان، CeO<sub>2</sub> و HA یافت می‌شوند. علاوه بر این، پیک پراش در زاویه  $29/35^\circ$  مربوط به صفحه (۱۱۱) بلور سریم اکسید منطبق با شماره کارت استاندارد ۰۷۹۲-۸۱ را نشان می‌دهد.



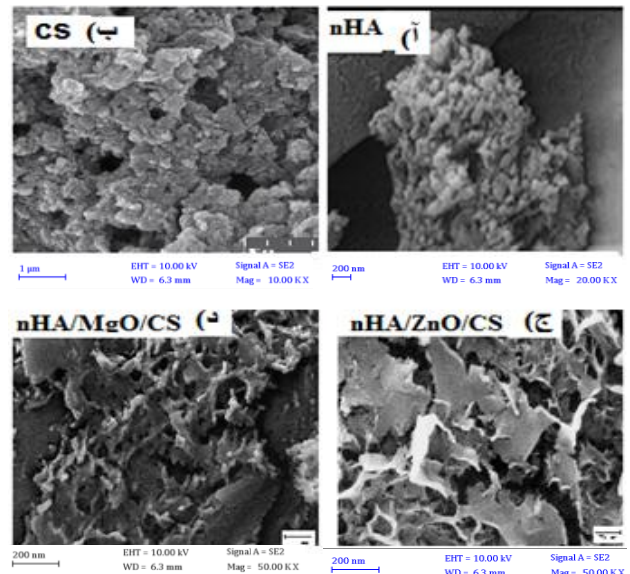
شکل ۳- طیف EDX برای ترکیب‌های (ا) nHA/ZnO/CS (ب) nHA/MgO/CS (ج) nHA/CeO<sub>2</sub>/CS (د) nHA (ه) کیتوسان

و اندازه متوسط آن‌ها ۱۰۰ تا ۱۵۰ میکرومتر است.

### نتیجه‌های آزمون سمیت سلولی

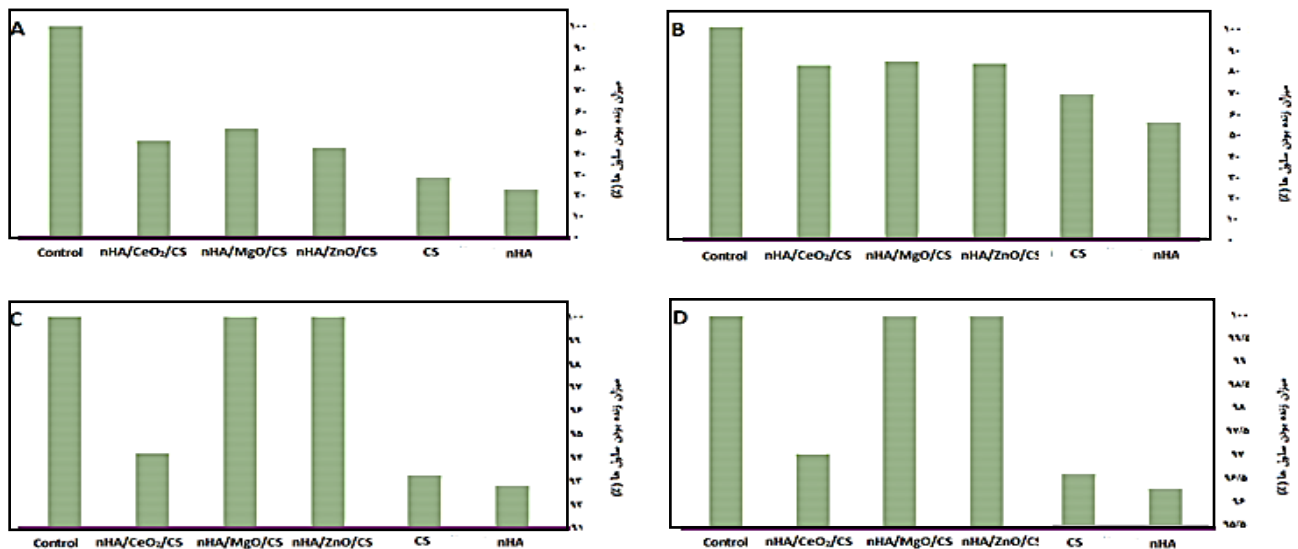
طبق روش ذکر شده نمونه‌های کیتوسان، هیدروکسی آپاتیت، nHA/ZnO/CS، nHA/MgO/CS و nHA/CeO<sub>2</sub>/CS به وسیله آزمون ارزیابی MTT مورد بررسی قرار گرفتند. برای بررسی اثر غلظت نانوکامپوزیت‌ها در سمیت سلولی، چهار غلظت گوناگون از هر یک از نانوکامپوزیت‌ها در آزمون ارزیابی MTT استفاده شد که مقدارهای آن عبارت‌اند از: ۰/۱، ۰/۲، ۰/۴ و ۰/۸ میلی گرم بر میلی لیتر.

همان‌گونه که در شکل ۵ نشان داده شده است در غلظت اولیه که معادل ۰/۱ میلی گرم بر میلی لیتر از نانوکامپوزیت‌ها است، میانگین میزان زنده بودن سلول‌ها به ۵۰٪ در نانوکامپوزیت nHA/MgO/CS رسیده است و این میزان در دو نانوکامپوزیت دیگر به ۴۰٪ کاهش یافته است. با افزایش غلظت به ۰/۲ میلی گرم به میلی لیتر میانگین میزان زنده بودن سلول‌ها در هر سه نمونه به حدود ۸۰٪ رسید که تایید کننده این مطلب است که با افزایش غلظت نانوکامپوزیت‌ها میزان سمیت سلولی کاهش چشمگیری داشته است. از این رو افزایش غلظت تا ۰/۴ و ۰/۸ میلی گرم به میلی لیتر نیز مورد



شکل ۴- طیف SEM نانوکامپوزیت‌های تهیه شده: (ا) nHA/، (ب) کیتوسان، (ج) nHA/ZnO/CS، (د) nHA/MgO/CS

همچنین امکان مهاجرت مولکول‌های زیستی را ممکن می‌سازد. چنین شبکه سه‌بعدی گسترده‌ای امکان جذب محلول‌های گوناگون را فراهم می‌کند. لبه‌های منافذ ملایم و به شکل گلبرگ هستند



شکل ۵- نتیجه‌های تست سمیت سلولی نانوکامپوزیت‌های تهیه شده در غلظت‌های: (a) ۰/۱، (b) ۰/۲، (c) ۰/۴، (d) ۰/۸ (mg/ml)

دوپ شده با  $ZnO$ ،  $MgO$  و  $CeO_2$  به وسیله روش هم‌رسوبی تهیه شدند. نتیجه‌های به دست آمده از آنالیزهای FT-IR و XRD تایید کننده تشکیل ساختار هیدروکسی آپاتیت در نانوکامپوزیت‌ها بوده است. همچنین اثر غلظت و نوع دوپ‌شونده در آزمون سمیت سلولی در برابر سلول MG-63 مورد بررسی قرار گرفت. نتیجه‌ها نشان داد که هر سه اکسید فلزی اثر زیستی مثبتی در عملکرد نانوکامپوزیت دارند، بدین صورت که در غلظت‌های بالای ۰/۱ میلی گرم بر میلی لیتر از نانوکامپوزیت، هر سه نمونه تهیه شده درجه سمیت قابل قبولی داشته‌اند. علاوه بر آن در دو غلظت ۰/۴ و ۰/۸ میلی گرم بر میلی لیتر نانوکامپوزیت‌های nHA/MgO/CS و nHA/ZnO/CS هیچ‌گونه سمیتی از خود بروز ندادند. همچنین نتیجه‌ها نشان داده است که استفاده از اکسیدهای فلزی به واسطه دارا بودن ویژگی زیست فعالی منجر به افزایش کارایی هیدروکسی آپاتیت می‌شود.

بررسی قرار گرفت. نتیجه‌ها در هر دو غلظت مشابه هم بوده است و بیانگر این نکته است که سمیت سلولی در دو نمونه nHA/MgO/CS و nHA/ZnO/CS به صفر کاهش یافته است و منجر به ایجاد هیچ‌گونه سمیت نشده است، به عبارت دیگر میانگین میزان زنده بودن سلول‌ها برابر با نمونه کنترل و ۱۰۰٪ بوده است. به همین ترتیب در نمونه nHA/CeO<sub>2</sub>/CS میانگین میزان زنده بودن سلول‌ها در دو غلظت ۰/۴ و ۰/۸ به ترتیب معادل ۹۴٪ و ۹۷٪ بوده است که نشان‌دهنده سمیت بسیار کم آن است. با بررسی آزمون ارزیابی MTT می‌توان به این نتیجه دست یافت که استفاده از نانوکامپوزیت‌ها در غلظت بالاتر منجر به اثرهای زیستی بهتر و با سمیت کمتر خواهد شد. همچنین در میان سه نمونه تهیه شده نانوکامپوزیت‌های nHA/MgO/CS و nHA/ZnO/CS در غلظت‌های بالاتر هیچ‌گونه سمیت سلولی را از خود نشان ندادند.

## نتیجه‌گیری

در این پژوهش نانوکامپوزیت‌های هیدروکسی آپاتیت/کیتوسان

تاریخ دریافت: ۱۴۰۰/۰۶/۲۳؛ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۰/۰۹/۱۵

## مراجع

- [1] Mohamed K.R., Beherei H.H., El Bassyouni G.T., El Mahallawy N., *Fabrication and Mechanical Evaluation of Hydroxyapatite/Oxide Nano-Composite Materials*, *Materials Science & Engineering C*, **33**: 4126–4132 (2013)
- [2] Abidi S.S.A., Murtaza Q., *Synthesis and Characterization of Nano-Hydroxyapatite Powder using Wet Chemical Precipitation Reaction*, *Journal of Materials Science & Technology*, **30**: 307–310 (2014)

- [3] Bhuiyan D., Jablonsky M. J., Kolesov I., Middleton J., Wick T. M., Tannenbaum R., [Novel Synthesis and Characterization of a Collagen-based Biopolymer Initiated by Hydroxyapatite Nanoparticles](#), *Acta Biomaterialia*, **15**: 181–190 (2015)
- [4] Balakrishnan B., Soman D., Payanam U., Laurent A., Labarre D., Jayakrishnan A., [A Novel Injectable Tissue Adhesive based on Oxidized Dextran and Chitosan](#), *Acta Biomaterialia*, **53**: 343–354 (2017)
- [5] Šupová M., [Substituted Hydroxyapatites for Biomedical Applications: A Review](#), *Ceramics International*, **41**: 9203–9231(2015)
- [6] Bertinetti L., Tampieri A., Landi E., Martra G., Coluccia S., [Punctual Investigation of Surface Sites of HA and Magnesium-HA](#), *Journal of the European Ceramic Society*, **26**(6): 987–991 (2006)
- [7] Laurencin D., Almora-Barrios N., de Leeuw N. H., Gervais C., Bonhomme C., Mauri F., Chrzanowski W., Knowles J. C., Newport R. J., Wong A., Gan Z., Smith M. E., [Magnesium Incorporation into Hydroxyapatite](#), *Biomaterials*, **32**: 1826–1837(2011)
- [8] Dizaj S. M., Lotfipour F., Barzegar-Jalali M., Zarrintan M. H., Adibkia K., [Antimicrobial Activity of the Metals and Metal Oxide Nanoparticles](#), *Materials Science & Engineering C*, **44**: 278–84 (2014)
- [9] Gnaneshwar P. V., Sudakaran S. V., Abisegapriyan S., Sherine J., Ramakrishna S., Ab. Rahim M. H., Mohd. Yusoff M., Jose R., Venugopal J. R., [Ramification of Zinc Oxide Doped Hydroxyapatite Biocomposites for the Mineralization of Osteoblasts](#), *Materials Science & Engineering C*, **96**: 337–346 (2019)
- [10] Vormann J., [Magnesium: Nutrition and Metabolism](#), *Molecular Aspects of Medicine*, **24**:27–37(2003)
- [11] Jin T., He Y., [Antibacterial Activities of Magnesium Oxide \(MgO\) Nanoparticles Against Foodborne Pathogens](#). *Journal of Nanoparticle Research*, **13**(12): 6877–6885 (2011)
- [12] Coelho C. C., Araújo R., Quadros P. A., Sousa S. R., Monteiro F. J., [Antibacterial Bone Substitute of Hydroxyapatite and Magnesium Oxide to Prevent Dental and Orthopaedic Infections](#), *Materials Science & Engineering C*, **97**: 529–538 (2019)
- [13] Gopi D., Ramya S., Rajeswari D., Karthikeyan P., Kavitha L., [Strontium, Cerium Co-Substituted Hydroxyapatite Nanoparticles: Synthesis, Characterization, Antibacterial Activity Towards Prokaryotic Strains and in Vitro Studies](#). *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, **451**: 172-180 (2014)
- [14] Li J., Zhu D., Yin J., Liu Y., Yao F., Yao K., [Formation of Nano-Hydroxyapatite Crystal in Situ in Chitosanpectin Polyelectrolyte Complex Network](#). *Materials Science & Engineering C*, **30**: 795–803 (2010)
- [15] Ibrahim D., Mostafa A.A., Korowash S.I., [Chemical Characterization of some Substituted Hydroxyapatites](#), *Chemistry Central Journal*, **5**: 74 (2011)
- [16] Frasnelli M., Cristofaro F., Sglavo V.M., Dirè S., Callone E., Ceccato R., Bruni G., Cornaglia A.I., Visai L., [Synthesis and Characterization of Strontium-Substituted Hydroxyapatite Nanoparticles for Bone Regeneration](#), *Materials Science & Engineering C*, **71**: 653–662 (2017)



- [17] Nguyen, N.K., Leoni, M., Maniglio, D. and Migliaresi, C., [Hydroxyapatite Nanorods: Soft-Template Synthesis, Characterization and Preliminary in Vitro Tests](#). *Journal of biomaterials applications*, **28**: 49-61 (2013)
- [18] Virginia, M., Laksono, A.D., Asih, W.P.K. and Agustiningtyas, D.T., [Study on Biocompatibility of Chitosan/Hydroxyapatite Doped Silicon Composite as Material for Alveolar Socket Preservation](#). *In Journal of Physics: Conference Series*, **1726(1)**: 012007 (2021)
- [19] Sun, F., Koh, K., Ryu, S.C., Han, D.W. and Lee, J., [Biocompatibility of Nanoscale Hydroxyapatite-Embedded Chitosan Films](#). *Bulletin of the Korean Chemical Society*, **33**: 3950-3956. (2012)
- [20] Li, M., Wang, Y., Liu, Q., Li, Q., Cheng, Y., Zheng, Y., Xi, T. and Wei, S., [In Situ Synthesis and Biocompatibility of Nano Hydroxyapatite on Pristine and Chitosan Functionalized Graphene Oxide](#). *Journal of Materials Chemistry B*, **1(4)**: 475-484 (2013)
- [21] Kazimierczak, P., Benko, A., Nocun, M. and Przekora, A., [Novel Chitosan/Agarose/Hydroxyapatite Nanocomposite Scaffold for Bone Tissue Engineering Applications: Comprehensive Evaluation of Biocompatibility and Osteoinductivity with the use of Osteoblasts and Mesenchymal Stem Cells](#). *International journal of nanomedicine*, **14**: 6615. (2019)