



بررسی ویژگی ساختاری و زیستی چندسازه

کیتوسان/نانوفلوئور هیدروکسی آپاتیت

زهرا انصاری^۱ | مهدی کلانتر^{۲*} | مهشید خرازیهای اصفهانی^۳

۱ گروه مهندسی مواد، دانشکده مهندسی معدن و متالورژی، دانشگاه یزد، یزد

۲ گروه مهندسی مواد، دانشکده مهندسی معدن و متالورژی، دانشگاه یزد، یزد

۳ دانشکده مهندسی مواد، دانشگاه صنعتی اصفهان، اصفهان

چکیده: در این پژوهش، چندسازه کیتوسان/نانوفلوئور هیدروکسی آپاتیت با ۱۰ و ۵۰ و ۶۰ درصد وزنی فلئور هیدروکسی آپاتیت به روش سل ژل سنتز شد. این نانوجندسازه قابلیت استفاده در مهندسی بافت استخوان را دارد. برای دستیابی به مقدار استوکیومتری $Ca/P=1/67$ و $P/F=6$ محلول فسفر/فلئور به صورت قطره قطره به محلول کلسیم افزوده شد. آنالیز فازی، ریخت‌شناسی پودر، نوع پیوندها، گروه‌های عاملی، رفتار حرارتی و بررسی زیستی نمونه‌های سنتز شده به ترتیب با پراش پرتو ایکس (XRD)، میکروسکوپ الکترونی روبشی (SEM)، طیف‌سنجی فرسرخ تبدیل فوریه (FTIR)، آزمون حرارتی (TG-DTA) و آزمایش کشت سلولی مورد مطالعه قرار گرفت. نتایج پراش پرتو ایکس و میکروسکوپ الکترونی روبشی نشان می‌دهد که اندازه متوسط نانوبلورک FHA با افزایش مقدار کیتوسان در چندسازه کاهش می‌یابد. نتایج طیف‌سنجی فرسرخ تبدیل فوریه نشان دهنده ایجاد فاز فلئور هیدروکسی آپاتیت بود. براساس نتایج کشت سلولی نیز افزودن فلئور هیدروکسی آپاتیت به مقدار ۱۰ درصد وزنی اثر مثبتی در تکثیر سلول‌ها داشته است.

واژه‌های کلیدی: سل ژل، نانوجندسازه، کیتوسان/نانوفلوئور هیدروکسی آپاتیت، بررسی زیستی.

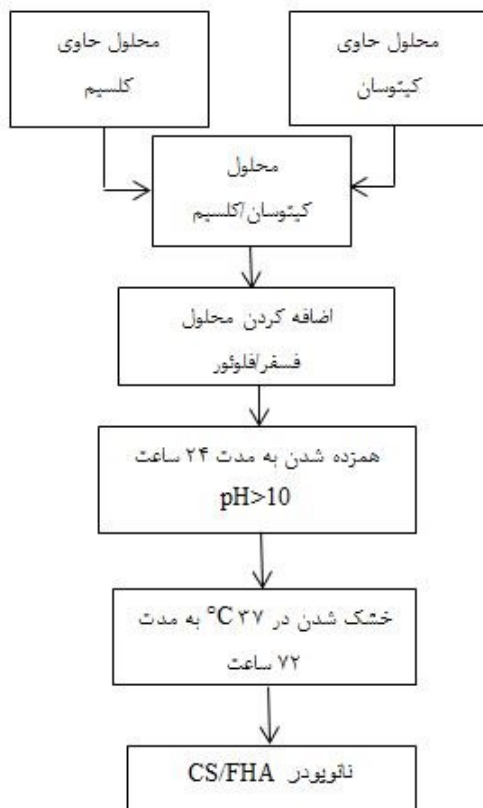
mkalantar@yazd.ac.ir

استخوان پیوند مستقیم برقرار کند [۳ و ۵]. از این رو، چندسازه-های CS/HA مانند CS/HA به علت زیست سازگاری بالا، تجزیه زیستی و استحکام مکانیکی خوب به‌عنوان جایگزین استخوان، داربست مهندسی بافت و یا سیمان استخوانی به طور گسترده‌ای مورد بررسی قرار گرفته‌اند [۶ و ۷]. یکی از بیوسرامیک‌های بر پایه کلسیم فسفات، فلئور هیدروکسی آپاتیت ($FHA; Ca_{10}(PO_4)_6(OH)_2$) است. جایگزینی یون فلئور به جای هیدروکسیل در ساختار هیدروکسی آپاتیت ($HA; Ca_{10}(PO_4)_6(OH)_2$) منجر به تشکیل فلئور هیدروکسی آپاتیت خواهد شد که از شبکه کریستالی فشرده‌تر، حالیت کمتر و زیست فعالی بهتری نسبت به هیدروکسی آپاتیت برخوردار است. بنابراین، اگر به‌عنوان پوشش بر ایمپلنت دندان

۱- مقدمه

کیتوسان یکی از معروفترین بسپارهای زیستی مورد استفاده در مهندسی بافت و ارتوپدی است که به علت شباهت شیمیایی با مولکول‌های زیستی، زیست‌سازگاری [۱]، ویژگی آنتی‌باکتری و توانایی تعامل با بیوسرامیک‌های کلسیم فسفات ($Ca-P$) در چند سال اخیر مورد توجه قرار گرفته است [۲ و ۳]. مولکول‌های آلی و گروه‌های عاملی موجود در بسپارها می‌تواند تشکیل کریستال‌های طبیعی آپاتیت را در فرایند جوانه‌زنی و رشد استخوان کنترل کند، بنابراین، افزودن جزء بسپاری به بیوسرامیک‌های کلسیم فسفات باعث بهبود ویژگی مکانیکی و زیستی می‌شود [۴]. بیوسرامیک کلسیم فسفات ($Ca-P$) یکی از انواع مواد زیست فعال مورد استفاده در زمینه پزشکی و دندان‌پزشکی است که می‌تواند با

۶۰ درصد وزنی فلوئور هیدروکسی آپاتیت به روش سل ژل، ابتدا مقدار مشخصی کیتوسان در ۱۵۰ میلی لیتر استیک اسید ۱٪ حل شد. سپس، در دو ظرف جداگانه، مقادیر مشخصی کلسیم نیترات و دی آمونیم فسفات در آب دیونیزه حل شدند. سپس، محلول حاوی کلسیم با نسبت وزنی مشخص به محلول کیتوسان افزوده شد. محلول در دمای محیط و به مدت ۴ ساعت با همزن مغناطیسی هم زده شد. مقدار مشخصی از آمونیم فلوراید در محلول دی آمونیم فسفات به نسبت استوکیومتری $P/F = 6$ حل و سپس، محلول حاوی فسفر/فلوئور قطره قطره به محلول کلسیم/کیتوسان افزوده و به مدت ۲۴ ساعت با همزن هم زده شد تا محلول به ژل با گرانیوی مناسب تبدیل شد. pH محلول نیز با استفاده از سدیم هیدروکسید یک مولار به مقدار ۱۰ رسید. ژل بدست آمده در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد در آن به مدت ۷۲ ساعت خشک شد تا توده جامدی به دست آید. ژل خشک شده به صورت دستی در هاون خرد و به صورت پودر درآمد.



شکل ۱: نمودار سنتز پودر کیتوسان/نانوفلوئور هیدروکسی آپاتیت (CS/FHA)

استفاده شود، تثبیت و طول عمر بیشتری از آن قابل انتظار است [۵]. افزون بر این، یون فلوئور منجر به ترویج کریستال شدن آپاتیت طبیعی در فرایند تشکیل استخوان می شود [۸] و از پوسیدگی دندان در محیط اسیدی حاوی باکتری جلوگیری کرده است. پس، در مباحث بازسازی دندان به طور گسترده مورد بررسی قرار گرفته است [۹]. با توجه به این ویژگی ها برای بدست آوردن داربستی مطلوب در مهندسی بافت دندان، پژوهشگران تشویق به سنتز چندسازه هایی بر مبنای کیتوسان/فلوئور هیدروکسی آپاتیت (CS/FHA) شدند [۱۰]. از روش های سنتز چندسازه کیتوسان/فلوئور هیدروکسی آپاتیت (CS/FHA) می توان به روش سل ژل اشاره کرد که کنترل دقیق ترکیب (کنترل دقیق مقدار یون فلوئور)، همگنی بهتر، دمای کم و درصد خلوص بالا از ویژگی های مطلوب این روش است [۱۱]. در این پژوهش، چندسازه کیتوسان/نانوفلوئور هیدروکسی آپاتیت (CS/FHA) با بکارگیری مقادیر ۱۰، ۵۰ و ۶۰ درصد وزنی فلوئور هیدروکسی آپاتیت سنتز و تغییرات ساختاری، ریخت شناسی، آنالیز فازی، تحولات فازی و همچنین، رفتار In vitro چندسازه به وسیله طیف سنجی فروسرخ تبدیل فوریه (FTIR)، میکروسکوپ الکترونی روبشی (SEM)، آنالیز پراش پرتو ایکس (XRD)، آنالیز حرارتی (TG/DTA) و آزمایش کشت سلولی مورد بررسی قرار گرفتند.

۲- بخش تجربی

چندسازه کیتوسان/نانوفلوئور هیدروکسی آپاتیت (CS/FHA) با ۱۰ و ۵۰ و ۶۰ درصد وزنی فلوئور هیدروکسی آپاتیت به روش سل ژل و با استفاده از مواد اولیه پیش ساز شامل کیتوسان، اسید استیک (CH_3COOH , Merck)، دی آمونیم فسفات ($(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$, Merck)، کلسیم نیترات تتراهیدرات ($\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, Merck)، آمونیم فلوراید (NH_4F , Merck)، آب دینیزه به عنوان حلال و محلول هیدروکسید سدیم ۱ مولار برای تنظیم pH تهیه شد.

۲-۱- سنتز چندسازه کیتوسان/نانوفلوئور هیدروکسی آپاتیت (CS/FHA)

مطابق با شکل ۱ برای تهیه چندسازه کیتوسان/نانوفلوئور هیدروکسی آپاتیت (CS/FHA) با ۱۰ و ۵۰ و

۲-۲- شناسایی چندسازه کیتوسان/فلوئورهیدروکسی آپاتیت (CS/FHA) با ۱۰ و ۵۰ و ۶۰ درصد وزنی فلوئور هیدروکسی آپاتیت

مطالعه رفتار حرارتی و تحولات فازی نمونه‌ها حین زینترینگ، با استفاده از دستگاه آنالیز حرارتی مدل Bahr-Thermoanalyse GmbH-STA504 انجام شد. این دستگاه به طور همزمان آنالیزهای حرارتی و تغییرات وزنی را برای تعیین دمای تحول فازها نشان می‌دهد. پس از تهیه ژل‌ها، آن‌ها را خشک و به پودر تبدیل کرده است. سپس، با مقدار گرمایش ۱۰ درجه بر دقیقه از دمای محیط تا دمای ۶۰۰ درجه سانتیگراد در اتمسفر هوا تحت آنالیز حرارتی قرار گرفتند. به منظور بررسی تغییرات ساختار و مطالعه فازی چندسازه کیتوسان/فلوئورهیدروکسی آپاتیت (CS/FHA)، از روش پراش پرتو ایکس مدل Asenware بهره گرفته شد. اندازه متوسط بلورک‌های فلوئور هیدروکسی آپاتیت در نانوپودر چندسازه کیتوسان/فلوئورهیدروکسی آپاتیت (CS/FHA) با توجه به اطلاعات مربوط به پراش پرتو ایکس از رابطه شرر محاسبه شد (رابطه ۱) [۱۲].

$$L = 0.89\lambda / (\beta \cos\theta) \quad (1)$$

در این رابطه، L اندازه بلورک کریستال، λ طول موج اشعه ایکس (برای تیوب مس برابر با ۰/۱۵۴ نانومتر)، β پهنای پیک بیشینه در نصف ارتفاع (رادیان) و θ زاویه بر حسب درجه است. همچنین، درجه بلورینگی پودرهای سنتز شده نیز بر اساس نتایج پراش پرتو ایکس و با استفاده از معادله (۲) به دست آمد [۱۳].

$$X_C = 1 - \left(\frac{V_{112/300}}{I_{300}} \right) \quad (2)$$

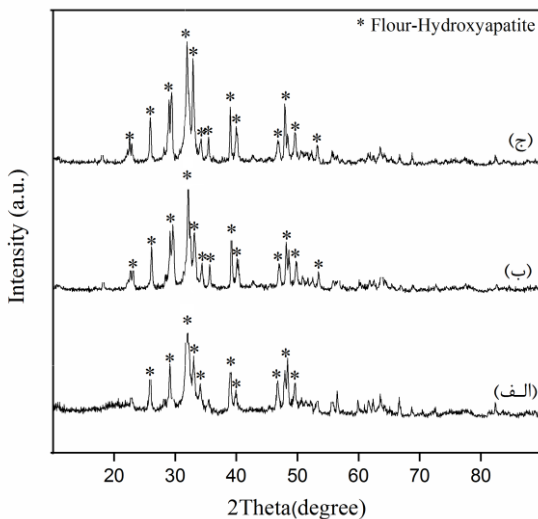
در این رابطه X_C درجه بلورینگی، $V_{112/300}$ شدت عمق بین قله‌های پراش (۲ ۱ ۱) و (۳ ۰ ۰) و I_{300} شدت قله (۳ ۰ ۰) است. برای بررسی گروه‌های عاملی از تبدیل فوریه فرسوخ (Thermo Nicolet Avatar) در گستره طیف ۵۰۰ تا ۴۰۰۰ (cm^{-1}) استفاده شد. از میکروسکوپ الکترونی روشی به منظور بررسی مشخصات ظاهری نانو ذرات سنتز شده بهره گرفته شد. در این پژوهش، با استفاده از سلول‌های بنیادی مزانشیمی انسانی (human Mesenchymal Stem cells(hMSC))

کشت سلولی بر نمونه‌های سنتز شده انجام شد. سپس، مقدار تکثیر و بقای سلول‌ها با استفاده از تست آلامار بلو در ۱، ۳ و ۷ روز پس از کشت سلولی بررسی شد.

۳- نتایج و بحث

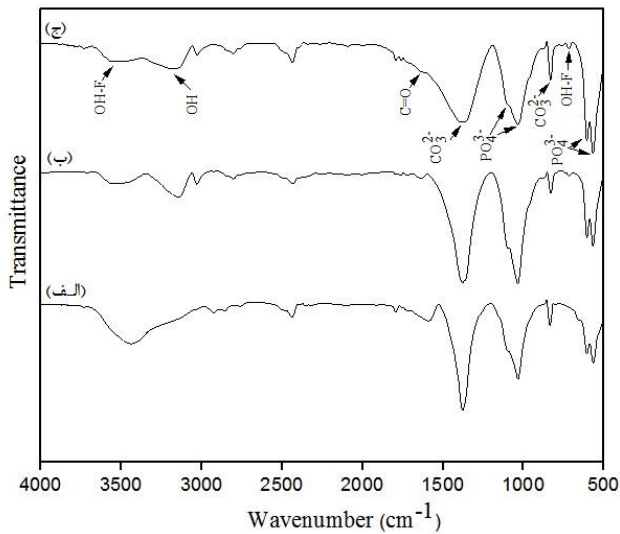
۳-۱- مطالعه ساختار فازی به کمک پراش پرتو ایکس

نتیجه آزمون پراش پرتو ایکس بر ذرات چندسازه کیتوسان/فلوئورهیدروکسی آپاتیت (CS/FHA) با ۱۰ و ۵۰ و ۶۰ درصد وزنی فلوئور هیدروکسی آپاتیت در شکل ۲ نشان داده شده است.



شکل ۲: الگوی پراش پرتو ایکس (الف) CS/10%FHA، (ب) CS/50%FHA و (ج) CS/60%FHA

نتایج پراش پرتو ایکس نشان می‌دهد که در همه نمونه‌ها قله‌های اصلی مربوط به فلوئورهیدروکسی آپاتیت به وضوح دیده می‌شود و به جز فاز فلوئور هیدروکسی آپاتیت سایر فازهای ناخواسته در ترکیب حضور ندارند. همچنین، با افزایش مقدار فلوئورهیدروکسی آپاتیت در چندسازه شدت پیک‌ها افزایش پیدا کرده است. نتایج محاسبات مربوط به اندازه متوسط بلورک و درصد بلورینگی چندسازه کیتوسان/فلوئورهیدروکسی آپاتیت (CS/FHA) با ۱۰ و ۵۰ درصد وزنی فلوئور هیدروکسی آپاتیت در جدول (۱) آمده است.



شکل ۳: طیف سنجی فروسرخ با تبدیل فوریه (الف) CS/10%FHA، (ب) CS/50%FHA و (ج) CS/60%FHA

سه نوار مرتبط با ارتعاش‌های ν_1 ، ν_3 و ν_4 از گروه فسفاتی (PO_4^{3-}) به ترتیب در عدد موجی (cm^{-1}) ۹۶۰ برای نوار ارتعاشی ν_1 ، در عدد موجی‌های (cm^{-1}) ۱۰۴۰ و ۱۱۰۰ برای نوار ارتعاشی ν_3 و در عدد موجی‌های (cm^{-1}) ۵۷۰، ۶۱۰ برای نوار ارتعاشی ν_4 در ترکیب آپاتیت قابل تشخیص هستند. نوار موجود در ۱۶۳۵ (cm^{-1}) و پیک پهن از ۳۰۰۰ تا ۳۵۰۰ (cm^{-1}) به ترتیب مربوط به پیوند $\text{C}=\text{O}$ (amide I) و گروه هیدروکسیل است، یک نوار کوچک در ۳۵۵۰ (cm^{-1}) نیز مربوط به پیوند بین OH و F است که نشان دهنده نفوذ یون فلوئور به داخل شبکه آپاتیت است. بی‌آزار و همکارانش [۱۳] نشان دادند آنچه ساختار هیدروکسی آپاتیت را از ساختار فلوئورهیدروکسی آپاتیت متمایز می‌سازد باندهای مرتبط با گروه‌های هیدروکسیل شبکه‌ای است. مطابق با شکل ۳ نوار مربوط به گروه هیدروکسیل (در عدد موجی ۶۳۰ (cm^{-1})) در هیچکدام از نمودارهای مربوط به چندسازه کیتوسان/فلوئورهیدروکسی آپاتیت ظاهر نشده است. همچنین، حضور نوار در ۷۳۵ (cm^{-1}) نشان‌دهنده پیوند (OH-F) و جایگزینی گروه‌های فلوئور با گروه‌های هیدروکسیل در ساختار آپاتیت است. کوستسکو و همکارانش [۱۶] نشان دادند که نوار ۸۴۰ (cm^{-1}) و نوار پهن در ۱۴۰۰ (cm^{-1}) نشان‌دهنده گروه‌های کربناتی است.

جدول ۱: مقادیر مربوط به چندسازه کیتوسان/فلوئورهیدروکسی آپاتیت (CS/FHA) با ۱۰ و ۵۰ و ۶۰ درصد وزنی فلوئور هیدروکسی آپاتیت

درصد بلورینگی	اندازه متوسط بلورک FHA (nm)	نمونه
۴۱٪	۲۶	CS/10%FHA
۴۸٪	۳۳	CS/50%FHA
۵۸٪	۴۰	CS/60%FHA

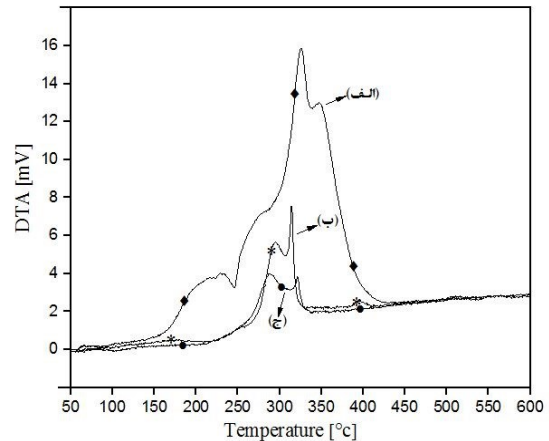
نتایج بدست آمده به خوبی نشان می‌دهد که با کاهش مقدار فلوئور هیدروکسی آپاتیت در چندسازه اندازه متوسط بلورک و درصد بلورینگی کاهش یافته است. بنابراین، در چندسازه CS/10%FHA کمترین اندازه متوسط بلورک و درصد بلورینگی را داریم که مربوط به حضور استیک اسید در محلول کیتوسان حین آماده سازی محلول CS/FHA است [۱۴]. در حقیقت استیک اسید تا حدی بلورهای FHA را حل کرده و اندازه کریستال‌های FHA کاهش می‌دهد. مقادیر بالاتر کیتوسان در محلول سل نهایی مقادیر بالاتر استیک اسید را به همراه داشته است. بنابراین، مقدار انحلال بلورک‌های فلوئورهیدروکسی آپاتیت شکل گرفته در ضمن فرایند سل‌ژل افزایش می‌یابد. در پژوهشی نیز که توسط زانمیائو و همکارانش [۱۵] انجام شد، اندازه متوسط بلورک‌های HA در داربست چندسازه CS/HA در مقایسه با داربست HA خالص کاهش یافته است.

۳-۲- بررسی ترکیب به کمک طیف‌سنجی فروسرخ تبدیل فوریه (FTIR)

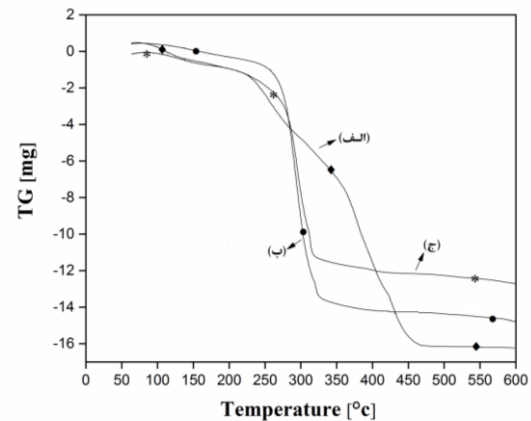
نتیجه بررسی ساختاری طیف سنجی تبدیل فوریه فروسرخ چندسازه کیتوسان/فلوئورهیدروکسی آپاتیت (CS/FHA) با ۱۰ و ۵۰ و ۶۰ درصد وزنی فلوئور هیدروکسی آپاتیت در شکل ۳ ارائه شده است.

۳-۳- آنالیز حرارتی و تغییرات وزنی

شکل‌های (۴) و (۵) تغییرات فیزیکوشیمیایی و تغییرات وزنی چندسازه‌های کیتوسان/فلوئورهیدروکسی آپاتیت (CS/FHA) با ۱۰ و ۵۰ و ۶۰ درصد وزنی فلوئورهیدروکسی آپاتیت را نسبت به دما در یک فرایند حرارت دهی در اتمسفر هوا تا دمای ۶۰۰ درجه سانتی‌گراد را نشان می‌دهند.



شکل ۴: نتایج حاصل از آزمون آنالیز حرارتی (الف) CS/10%FHA، (ب) CS/50%FHA و (ج) CS/60%FHA



شکل ۵: نتایج حاصل از آزمون آنالیز حرارتی (الف) CS/10%FHA، (ب) CS/50%FHA و (ج) CS/60%FHA

با توجه به شکل ۴ (الف، ب و ج) یک پیک گرماگیر پهن و ملایم بین ۵۰ تا ۱۲۰ درجه سانتیگراد وجود دارد که نشان دهنده تبخیر رطوبت سطحی است که با کاهش وزنی ۴، ۲ و ۱/۵ درصدی در منحنی تغییرات وزنی شکل ۵ به ترتیب برای چندسازه کیتوسان/فلوئورهیدروکسی آپاتیت (CS/FHA) با ۱۰ و ۵۰ و ۶۰ درصد وزنی فلوئورهیدروکسی آپاتیت همراه است. پیک گرماگیر

بعدی که به طور واضح در چندسازه کیتوسان/فلوئورهیدروکسی آپاتیت (CS/FHA) با ۱۰ درصد وزنی فلوئورهیدروکسی آپاتیت قابل مشاهده است، در دمای ۲۵۰ درجه سانتیگراد مربوط به حذف آب جذب شده ساختاری است به طوری که منحنی تغییرات وزنی (شکل ۵) کاهش وزن ۷، ۴ و ۳ درصد به ترتیب برای چندسازه کیتوسان/فلوئورهیدروکسی آپاتیت (CS/FHA) با ۱۰ و ۵۰ و ۶۰ درصد وزنی فلوئورهیدروکسی آپاتیت نشان می‌دهد. پیک گرمازا در گستره ۲۵۰ تا ۴۵۰ درجه سانتیگراد در چندسازه CS/10%FHA (شکل ۴ الف)) و در گستره ۲۵۰ تا ۳۳۰ درجه سانتیگراد (شکل ۴ ب، ج)) برای چندسازه‌های CS/50%FHA و CS/60%FHA مربوط به تجزیه حرارتی کیتوسان است که در نمودار تغییرات وزنی با کاهش شدید ۵۶ درصد وزنی برای چندسازه CS/10%FHA و با کاهش ۴۲ و ۳۶ درصد وزنی برای CS/50%FHA و CS/60%FHA همراه است، تا دمای ۶۰۰ درجه سانتیگراد دیگر کاهش وزن واضحی مشاهده نمی‌شود و منحنی‌ها تقریباً در این گستره دمایی پایدار هستند. به طور کلی می‌توان نتیجه گرفت چندسازه‌های CS/FHA دارای پایداری حرارتی قابل قبول در دمای بیش از ۲۵۰ درجه سانتیگراد هستند که پایداری حرارتی آن‌ها در مقایسه با فلوئورهیدروکسی آپاتیت خالص (با مقاومت حرارتی بالاتر از ۵۰۰ درجه سانتیگراد) کاهش یافته است [۱۷].

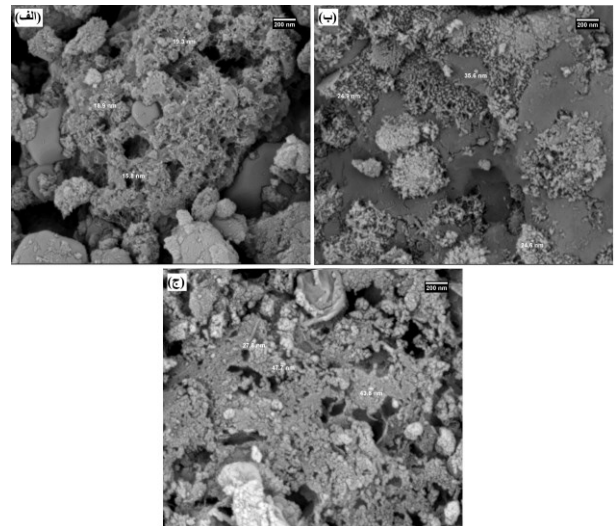
۳-۴- بررسی شکل و اندازه ذرات به کمک میکروسکوپ الکترونی روبشی

شکل ۶ تصاویر تهیه شده به کمک میکروسکوپ الکترونی روبشی از ذرات چندسازه کیتوسان/فلوئورهیدروکسی آپاتیت (CS/FHA) با ۱۰ و ۵۰ و ۶۰ درصد وزنی فلوئورهیدروکسی آپاتیت را نشان می‌دهد. تصاویر SEM نشان می‌دهد که ذرات FHA کروی و شبه کروی بوده و در برخی نقاط به شکل توده‌ای و کلوخه‌ای درآمده‌اند و بلورهای FHA با قطر متوسط کمتر از ۵۰ نانومتر به وضوح مشاهده می‌شود. اندازه و شکل کریستالیت‌های FHA و سرعت رشد آن‌ها به مقدار غلظت یون‌های $[Ca^{2+}]$ و $[PO_4^{3-}]$ بستگی دارد. در چندسازه‌های کیتوسان/فلوئورهیدروکسی آپاتیت (CS/FHA) با ۵۰ و ۶۰ درصد وزنی فلوئورهیدروکسی آپاتیت به دلیل دارا بودن مقادیر

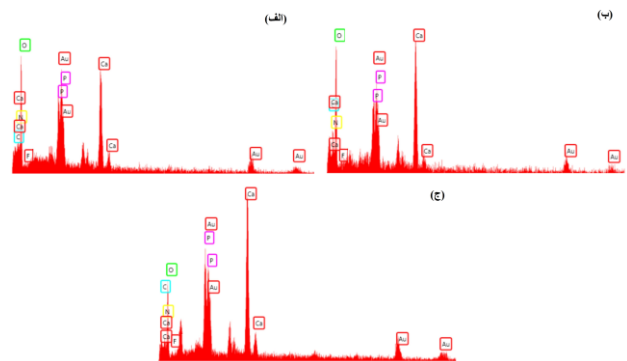
۳-۵- رفتار زیستی

به منظور بررسی رفتار زیستی چندسازه کیتوسان/فلوئورهیدروکسی آپاتیت (CS/FHA) با ۱۰ و ۵۰ و ۶۰ درصد وزنی فلوئورهیدروکسی آپاتیت آزمون کشت سلولی انجام شد. سلول‌های بنیادی مزانشیمی انسانی به مدت ۱، ۳ و ۷ روز بر پودرها کشت داده شدند. سپس، برای بررسی رشد و تکثیر سلول‌ها از روش رنگ سنجی آلامار بلو استفاده شد. شایان ذکر است پیش از انجام کشت سلولی، نمونه‌ها چندین بار متوالی با آب دیونیزه شستشو داده شدند. سپس، به مدت یک ساعت در اتوکلاو استریل شدند و سپس، مورد کشت سلولی قرار گرفتند. به منظور تهیه نمونه شاهد (کنترل) نیز از کشت سلول‌ها در محیط بدون حضور چندسازه استفاده شد. نمودار ۸ نشان می‌دهد که سلول‌های بنیادی مزانشیمی بر نمونه‌های پودری چندسازه کیتوسان/فلوئورهیدروکسی آپاتیت (CS/FHA) و کیتوسان نسبت به نمونه شاهد تکثیر سلولی بهتری داشته‌اند که نشان دهنده غیرسمی بودن آنها است. در روزهای نخست و سوم نمونه CS/10%FHA تکثیر سلولی بیشتری نسبت به سایر نمونه‌ها از خود نشان داده است. افزایش مقادیر کاهش درصد آلامار بلو در طول دوره کشت سلولی نشان دهنده افزایش تکثیر سلول‌های بنیادی مزانشیمی انسانی است. این امر بیانگر اثر مثبت آبدوستی کیتوسان و مقدار بهینه فلوئورهیدروکسی آپاتیت به مقدار ۱۰ درصد وزنی بر تکثیر و زنده ماندن سلول‌های مزانشیمی و افزایش زیست سازگاری چندسازه است. در پژوهشی جولین یانگ و همکارانش [۱۹] با افزوده کردن کیتوسان به پوشش هیدروکسی آپاتیت ویژگی آبدوستی چندسازه CS/HA را نسبت به پوشش خالص HA افزایش داده که در نتیجه باعث تقویت تکثیر سلولی و نهایتاً تسریع چسبندگی و تکثیر سلولی شدند. در پژوهش مشابهی نیز نشان داده شد که چندسازه بر پایه کیتوسان/کلسیم فسفات غیرسمی بوده و تکثیر سلولی مناسب و ویژگی زیست-سازگاری مطلوبی نسبت به هیدروکسی آپاتیت خالص داشته است [۱۵].

بیشتر یون کلسیم و فسفر سرعت رشد کریستالی FHA و کلوخه شدن افزایش می‌یابد که در واقع نتایج بدست آمده از تصاویر میکروسکوپ الکترونی روبشی نیز نتایج روش شرر را تایید می‌کند. نتایج EDAX شکل ۷ نیز نشان داد که در گستره فازی فلوئورهیدروکسی آپاتیت در تمامی چندسازه‌های CS/FHA نسبت مولی Ca / P حدوداً ۱/۶۹ است. از طرفی، پژوهش انجام شده نشان می‌دهد با افزودن یون فلوئور و به دنبال تشکیل فلوئورهیدروکسی آپاتیت، اندازه بلورک‌ها و درجه بلورینگی نسبت به هیدروکسی آپاتیت افزایش می‌یابد. یون فلوئور نیروی محرکه برای رشد کریستال آپاتیت را افزایش می‌دهد و همچنین تمایل به کاهش کرنش بر شبکه آپاتیت را دارد و در نتیجه، ثبات ساختار آپاتیت را افزایش می‌دهد [۱۸].



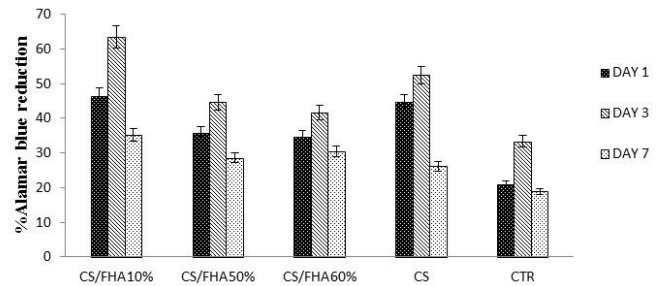
شکل ۶: تصاویر میکروسکوپ الکترونی روبشی (الف) چندسازه CS/10%FHA (ب) چندسازه CS/50%FHA (ج) چندسازه CS/60%FHA



شکل ۷: تصاویر آنالیز EDAX (الف) چندسازه CS/10%FHA (ب) چندسازه CS/50%FHA (ج) چندسازه CS/60%FHA

مراجع

- [1] Lewandowska, K., Furtos, G., "Study of apatite layer formation on SBF-treated chitosan composite thin films", *Polymer Testing*, 71, 173–181, 2018.
- [2] Lu, X., Wang, Y. bo, Liu, Y. rong, Wang, J. xin, Qu, S. xin, Feng, B., Weng, J., "Preparation of HA/chitosan composite coatings on alkali treated titanium surfaces through sol-gel techniques", *Materials Letters*, 61, 3970–3973, 2007.
- [3] Gomez Sanchez, A., Prokhorov, E., Luna-Barcenas, G., Mora-García, A.G., Kovalenko, Y., Rivera-Muñoz, E.M., Grazia Raucchi, M., Buonocore, G., "Chitosan-hydroxyapatite nanocomposites: Effect of interfacial layer on mechanical and dielectric properties", *Materials Chemistry and Physics*, 217, 151–159, 2018.
- [4] Jegatheeswaran, S., Selvam, S., Sri Ramkumar, V., Sundrarajan, M., "Novel strategy for f-HAp/PVP/Ag nanocomposite synthesis from fluoro based ionic liquid assistance: Systematic investigations on its antibacterial and cytotoxicity behaviors", *Materials Science and Engineering C*, 67, 8–19, 2016.
- [5] Cheng, K., Weng, W., Qu, H., Du, P., Shen, G., Han, G., Yang, J., Ferreira, J.M.F., "Sol-Gel Preparation and In Vitro Test of Fluorapatite / Hydroxyapatite Films", 43, 33–37, 2003.
- [6] Escobar-sierra, D.M., Martins, J., Ossa, C.P., "Chitosan / hydroxyapatite scaffolds for tissue engineering manufacturing method effect comparison Comparación del efecto del método de fabricación en plataformas de quitosano / hidroxiapatita para ingeniería de tejidos", 13, 24–35, 2015.
- [7] Davidenko, N., Carrodegua, R.G., Peniche, C., Solís, Y., Cameron, R.E., "Chitosan/apatite composite beads prepared by in situ generation of apatite or Si-apatite nanocrystals", *Acta Biomaterialia*, 6, 466–476, 2010.
- [8] Kim, H.W., Kong, Y.M., Bae, C.J., Noh, Y.J., Kim, H.E., "Sol-gel derived fluor-



شکل ۸: بررسی تست آلاماربلو بعد از ۱، ۳ و ۷ روز کشت سلولی بر نمونه‌های کیتوسان و چندسازه کیتوسان/فلوئورهیدروکسی آپاتیت (CS/FHA)

۴- نتیجه‌گیری

در این پژوهش، با استفاده از روش سل ژل چندسازه کیتوسان/نانوفلوئورهیدروکسی آپاتیت با ۱۰ و ۵۰ و ۶۰ درصد وزنی فلوئور هیدروکسی آپاتیت سنتز شد. شناسایی نمونه‌ها با استفاده از آنالیزهای پراش پرتو اشعه ایکس و طیف سنجی تبدیل فوریه فرسرخ فلوئورهیدروکسی آپاتیت با ترکیب و ساختار مطلوب را تایید کرد. جانمایی یون فلوئور با هیدروکسیل با نتایج طیف‌سنجی فرسرخ تبدیل فوریه به اثبات رسید. بررسی و مشاهده ذرات چندسازه کیتوسان/فلوئورهیدروکسی آپاتیت سنتز شده با میکروسکوب الکترونی روبشی و همچنین، محاسبه اندازه متوسط بلورک‌ها به کمک روش شرر نیز نشان داد که ذرات کروی و شبه کروی در تمامی نمونه‌ها ابعاد کمتر از ۵۰ نانومتر دارند همچنین، با افزایش مقدار کیتوسان، اندازه کریستال‌های FHA کاهش یافت. نتایج آنالیز حرارتی نیز نشان داد که چندسازه‌های CS/FHA پایداری حرارتی در دمای بیش از ۲۵۰ درجه سانتیگراد را دارا هستند. در نهایت، بر اساس نتایج آزمایش کشت سلولی و آلامار بلو، با افزوده کردن ۱۰ درصد وزنی فلوئورهیدروکسی آپاتیت و تشکیل چندسازه آبدوست CS/10%FHA، بهترین تکثیر و زنده ماندن سلول‌های مزانشیمی و افزایش زیست سازگاری بدست آمد.

سپاسگزاری

این پژوهش با همکاری موسسه پژوهشی ملی ایتالیا (CNR) انجام شد و تست‌های زیستی در آزمایشگاه تخصصی بیومتریال این موسسه تحت نظر دکتر ماریا گرازیا راشی انجام شد.

- SYNTHESIZED BY SOL-GEL", *Journal of Nanomaterials and Biostructures*, 5, 989–1000, 2010.
- [17] Barandehfard, F., Rad, M.K., Hosseinnia, A., Khoshroo, K., Tahriri, M., Jazayeri, H.E., "The Addition of Synthesized Hydroxyapatite and Fluorapatite Nanoparticles to a Glass-Ionomer Cement for Dental Restoration and its Effects on Mechanical Properties", *Ceramics International*, 42, 17866–17875, 2016.
- [18] Rameshbabu, N., Kumar, T.S.S., Rao, K.P., "Synthesis of nanocrystalline fluorinated hydroxyapatite by microwave processing and its in vitro dissolution study", *Mater. Sci*, 29, 611–615, 2006.
- [19] Yang, J., Liu, A., Han, Y., Li, Q., Tian, J., Zhou, C., "Osteodifferentiation of mesenchymal stem cells on chitosan/hydroxyapatite composite films", *Journal of Biomedical Materials Research - Part A*, 102, 1202–1209, 2014.
- hydroxyapatite biocoatings on zirconia substrate", *Biomaterials*, 25, 2919–2926, 2004.
- [9] Kim, H., Kim, H., Knowles, J.C., "Fluor-hydroxyapatite sol – gel coating on titanium substrate for hard tissue implants", *Biomaterials*, 25, 3351–3358, 2004.
- [10] Tondnevis, F., Ketabi, M., Fekrazad, R., Sadeghi, A., Abolhasani, M.M., "Using chitosan besides nano hydroxyapatite and fluorohydroxyapatite boost dental pulp stem cell proliferation", *Journal of Biomimetics, Biomaterials and Biomedical Engineering*, 42, 39–50, 2019.
- [11] Choi, D., Marra, K.G., Kumta, P.N., "Chemical synthesis of hydroxyapatite / poly (e -caprolactone) composites", *Materials Research Bulletin*, 39, 417–432, 2004.
- [12] Sebdani, M.M., Fathi, M.H., "Preparation and characterization of hydroxyapatite – forsterite – bioactive glass nanocomposite coatings for biomedical applications", *Ceramics International*, 38, 1325–1330, 2012.
- [13] Biazar, E., "Synthesis of fluorapatite – hydroxyapatite nanoparticles and toxicity investigations", *International Journal of Nanomedicine*, 6, 197–201, 2011.
- [14] Danilchenko, S.N., Kalinkevich, O.V., Pogorelov, M. V., Kalinkevich, A.N., Sklyar, A.M., Kalinichenko, T.G., Ilyashenko, V.Y., Starikov, V.V., Vakh., "Chitosan – hydroxyapatite composite biomaterials made by a one step co-precipitation method: preparation , characterization and in vivo tests", 9, 119–126, 2009.
- [15] Xianmiao, C., Yubao, L., Yi, Z., Li, Z., Jidong, L., Huanan, W., "Properties and in vitro biological evaluation of nano-hydroxyapatite/chitosan membranes for bone guided regeneration", *Materials Science and Engineering C*, 29, 29–35, 2009.
- [16] Costescu, A., Pasuk, I., Ungureanu, F., Dinischiotu, A., Huneau, F., Galaup, S., Coustumer, P.L.E., Predoi, D., "PHYSICO-CHEMICAL PROPERTIES OF NANO-SIZED HEXAGONAL HYDROXYAPATITE POWDER

Investigation of Structural and biological properties of chitosan/nano-flourhydroxyapatite composite

Z. Ansari¹, M. Kalantar^{1*}, M. KHaraziha²

¹Department of Materials Engineering, Faculty of Mining and materials engineering, Yazd University, Yazd

²Department of Materials Engineering, Isfahan University of Technology, Isfahan

Abstract: In this study CS/nFHA composite at different compositions (90/10-50/50-40/60 w/w) synthesized by sol-gel method. This nanocomposite is used as biocompatible materials for bone tissue engineering. The appropriate amounts of P/F solution was added dropwise to the Ca solution to yield a stoichiometric ratio of Ca/P=1.67 and P/F=6. The Phase analysis, powder morphology, the bonds configuration, functional groups, thermal behaviors and biological assesment of the synthesized samples were studied by X-ray Diffraction (XRD), Scanning Electron Microscopy (SEM), Fourier transform infrared spectroscopy (FTIR), Thermo-gravimetric and Differential Thermal Analysis (TG-DTA) and Cell culture method respectively. The XRD and SEM results showed that increasing chitosan content in the composite decreased the average FHA nanocrystallite size. The results of FTIR showed the presence of flour-hydroxyapatite phase. The result of Cell culture indicates that the addition of 10% (w/w) FHA has a positive effect on the cell proliferation.

Keywords: Sol-gel, Nano Composite, Chitosan/nano-flourhydroxyapatite, Biological assessment