

مقاله پژوهشی

سنتز ماده نانو کامپوزیت گرافن اکساید احیاشده/نانوهیدروکسی آپاتیت-بیسموت rGo/nHA-Bi و بررسی خاصیت بیولوژیکی آن

سیده مهسا خاتمی^۱، کاظم پریور^۱، علیرضا نادری سهی^۲، مسعود سلیمانی^۳ و هانا حنایی اهواز^{۲*}

۱- دانشگاه آزاد اسلامی، واحد علوم و تحقیقات، گروه زیست‌شناسی، تهران، ایران

۲- مرکز تحقیقات فن آوری بن‌یافته، گروه سلول‌های بنیادی، تهران، ایران

۳- گروه خون‌شناسی، دانشکده پزشکی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران

تاریخ ثبت اولیه: ۱۴۰۱/۰۵/۰۶، تاریخ دریافت نسخه اصلاح شده: ۱۴۰۱/۰۸/۰۸، تاریخ پذیرش قطعی: ۱۴۰۱/۰۸/۲۷

چکیده

در این پژوهش، نانومیله‌های هیدروکسی آپاتیت داپینگ شده با بیسموت (Bi-nHA) روی ورق‌های اکسید گرافن (rGO) احیاشده به روش هیدروترمال قرار گرفتند. شکل‌گیری و ویژگی‌های ساختاری نانو کامپوزیت (rGO/Bi-nHA) با استفاده از FTIR، XRD، TEM، طیف‌سنجی رامان و پتانسیل زتا مشخص شد. همچنین، زنده‌مانی سلول‌ها در حضور ماده rGO/Bi-nHA با استفاده از روش MTT مورد مطالعه قرار گرفت و با استفاده از کیت سنجش میزان رسوب کلسیم در دو محیط معمولی (M) و استئوژنیک (OM) بررسی گردید. نتایج مشخصه‌یابی نشان داد که گرافن اکساید به دلیل حذف پیک شاخص GO که باید در 2θ~11 ظاهر شود، احیا شده است. نتایج FTIR نشان دهنده داپینگ بیسموت روی نانوهیدروکسی بود و داده‌های رامان بیان‌کننده چند لایه بودن نانو کامپوزیت بود. پتانسیل زتا در صفحات نانو کامپوزیت ۲۳/۱-۲۳ mV اندازه‌گیری شد که در مقایسه با گرافن اکساید مثبت‌تر می‌باشد. نتایج بخش سلولی نشان داد، نانو کامپوزیت‌ها اثر منفی در زنده‌مانی سلول‌های مشتق شده از بافت چربی انسانی ندارند و در غلظت‌های پایین ۵-۱ μg/ml باعث تکثیر سلول‌ها می‌شوند. رسوب Ca در تمام غلظت‌ها به همراه محیط کشت معمولی و استئوژنیک مشاهده شد و بیشترین میزان رسوب کلسیم در ۱۰ μg/ml به همراه محیط استئوژنیک تشخیص داده شد. بنابراین به نظر می‌رسد نانو کامپوزیت rGO/Bi-nHA توانایی osteoconductive داشته و باعث القا تمایز استئوژنیک در سلول‌های بنیادی مزانشیمی بافت چربی می‌شود. بر اساس نتایج حاصل از این مطالعه، نانو کامپوزیت سنتز شده به همراه محیط استئوژنیک تمایز استخوان را تقویت می‌کند و برای کاربردهای بیولوژیکی و ساخت داربست برای مهندسی بافت استخوان مناسب است.

واژه‌های کلیدی: نانو کامپوزیت، گرافن اکساید، بیسموت، نانوهیدروکسی آپاتیت.

۱- مقدمه

شده‌اند. این مواد ویژگی‌های مختلفی دارند که از جمله آن‌ها می‌توان به ایجاد نسبت سطح به حجم بالا، انعطاف‌پذیری بدون کاهش مقاومت آن و توزیع در حلال‌های مختلف اشاره نمود [۱،۲]. مواد نانو کربن به دلیل خواص مکانیکی

نانو کامپوزیت‌ها گروهی از مواد هیبریدی هستند که از مواد پلیمری مصنوعی یا طبیعی تجزیه‌پذیر، آلی و غیرآلی ساخته

* **عهده‌دار مکاتبات:** هانا حنایی اهواز

نشانی: مرکز تحقیقات فن آوری بن‌یافته، گروه سلول‌های بنیادی، تهران، ایران

تلفن: ۰۲۱-۲۲۰۸۲۱۲۰، دورنگار: ۰۲۱-۲۲۳۵۱۴۶۰، پست الکترونیکی: hanafbt@gmail.com

یکی از مهمترین بیوسرامیک‌ها به دلیل خواص زیستی منحصر بفرد و شباهت ساختاری زیاد به بافت سخت استخوان، در سال‌های اخیر در زمینه‌های مهندسی بافت مورد توجه واقع شده است [۱۴]. به دلیل تشابه ترکیب شیمیایی هیدروکسی آپاتیت با استخوان علاوه بر جنبه‌های زیست‌فعالی و تأثیرات درمانی آن، می‌توان به قابلیت تحریک رشد استخوان، ایجاد پیوند مستقیم با استخوان و چسبندگی مطلوب با بافت استخوان اشاره کرد [۱۵، ۱۶]. سطح هیدروکسی آپاتیت اجازه رشد سلول‌های استخوانی نظیر استخوان‌سازها و استخوان‌خوارها را می‌دهد و به دلیل شباهت شیمی سطح هیدروکسی آپاتیت و استخوان، سلول‌ها تفاوتی بین این دو قائل نمی‌شوند [۱۷]. ساختار هیدروکسی آپاتیت امکان جایگزینی طیف گسترده‌ای از یون‌های مختلف را در خود امکان پذیر می‌کند. بسیاری از کاتیون‌های یک، دو، سه، چهار و حتی شش ظرفیتی می‌توانند در ساختار نانو هیدروکسی آپاتیت جایگزین شوند. چنین جایگزینی‌های یونی بر ویژگی‌هایی مثل مورفولوژی، پارامترهای شبکه، ویژگی سطح، حلالیت، خصوصیات مکانیکی و بیولوژیکی تأثیر می‌گذارد [۱۸]. بنابراین با داپینگ نانو هیدروکسی آپاتیت با فلزاتی مانند نقره، آهن و بیسموت ویژگی‌های جدیدی از جمله فعالیت مغناطیسی و ضد میکروبی در آن ایجاد می‌شود [۱۱]. بیسموت یک عنصر شیمیایی است که در بسیاری از داروها به عنوان یک ماده ضد اسهال و ضد باکتری استفاده شده است [۱۹، ۲۰]. در پژوهش‌های مختلفی هیدروکسی آپاتیت داپینگ شده با کاتیون فلزات مختلف مانند Mg^{2+} ، Zn^{2+} و Bi^{3+} برای افزایش خواص HA مربوط به کاربردهای ارتوپدی و دندانپزشکی ساخته شد. نتایج آن‌ها نشان داد که Bi^{3+} استئوبلاست‌ها را برای رسوب طولانی مدت کلسیم القا می‌کند [۱۸، ۲۱]. سلواکومار و همکارانش بیسموت را روی نانو هیدروکسی آپاتیت جاگذاری کرده و در ادامه Bi-nHA را به همراه SPU الکتروریسی کردند. طبق نتایج آن‌ها ماده نانو کامپوزیت سنتز شده روند استخوان‌سازی را بهبود بخشیده بود [۲۲]. همچنین ژائو و همکارانش

عالی، از جمله، مدول یانگ (حداکثر ۱ TPa) و قدرت ذاتی (تقریباً ۱۳۰ GPa) به عنوان پرکننده در ماتریکس‌های سرامیکی برای ساخت کامپوزیت استفاده می‌شود [۳]. گرافن یک لایه منفرد از اتم‌های کربن آروماتیک با اتم‌های کربن پیوند شده sp^2 است که در یک شبکه دو بعدی مرتب شده‌اند [۴]. تحقیق در مورد گرافن و مشتقات آن به دلیل خصوصیات بیومکانیکی، محبوبیت زیادی در زمینه‌های علمی کسب کرده است. ورقه‌های گرافن دارای هدایت الکتریکی، دمایی [۵] و مقاومت مکانیکی [۶] بالایی هستند. گرافن و مشتقات آن به دلیل زیست‌سازگاری نتایج امیدوار کننده‌ای در تنظیم رفتار سلولی نشان داده‌اند. علاوه بر این، اعتقاد بر این است که آن‌ها در تمایز سلولی نیز از طریق تغییر سطح مواد داربست کمک می‌کنند. گرافن چسبندگی، رشد، تکثیر و تمایز استئوبلاست را بهبود می‌بخشد [۷]. آن‌ها همچنین دارای خواص فیزیکی و شیمیایی و مکانیکی منحصر بفردی هستند، که باعث می‌شود از آن‌ها در قالب داربست برای تقویت تکثیر سلول‌های بنیادی برای بازسازی استخوان استفاده نمایند [۸]. مشتقات گرافن شامل گرافن اکساید و گرافن اکساید احیا شده می‌باشد. گرافن اکساید می‌تواند از طریق واکنش احیا شدن به فرم گرافن اکساید احیا شده تبدیل گردد [۹]. سوسپانسیون یکنواخت و پایدار گرافن اکساید به فیلتراسیون داربست‌های متخلخل کمک می‌کند. این ویژگی منحصر بفرد باعث می‌شود که به عنوان یک ماده مطلوب در مهندسی بافت استخوان در نظر گرفته شود. گرافن اکساید دارای گروه‌های اکسیژن به عنوان گروه‌های عملکردی در سطح خود می‌باشد که برهمکنش با سلول‌ها و مولکول‌های زیستی را تسهیل می‌کند. ورقه‌های گرافن به صورت تک لایه یا چند لایه [۱۰] یا اصلاح شده به لحاظ شیمیایی [۱۱] در دسترس هستند. همانند گرافن اکساید، گرافن اکساید احیا شده نیز حاوی گروه‌های عملکردی در سطح خود است [۱۲]. مواد مبتنی بر گرافن ثابت کرده‌اند که رشد سلول، تمایز سلولی و تکثیر سلولی را تقویت می‌کنند [۱۳]. هیدروکسی آپاتیت با ترکیب شیمیایی $Ca_{10}(PO_4)_6(OH)_2$

با HCl و آب دیونیزه شستشو می‌شود و پس از آن با آب دیونیزه شسته می‌شود تا pH در ۵ تنظیم شود. محلول اکسید گرافیت به مدت ۱ h در اولتراسونیک (۱۰۰ V، ۲۰ kHz) قرار می‌گیرد تا به ورقه‌های GO تبدیل شود.

در ۵ mL آب مقطر دیونیزه حل شد. سپس $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ و $\text{Bi}(\text{NO}_3)_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ در محیط آبی و به روش اولتراسونیک حل گردید. سپس محلول آبی $\text{Bi}(\text{NO}_3)_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ به صورت قطره‌قطره به محلول $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ اضافه گردید. مخلوط به مدت یک ساعت در دمای 40°C همزده شد. در نهایت، محلول $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ به صورت قطره‌قطره به مخلوط اضافه می‌گردد. pH محلول به کمک محلول آمونیوم به ۱۰ رسانده می‌شود. این مخلوط به مدت ۴ ساعت در دمای 40°C هم زده شد. مواد حاصل از آن در محیط‌های آبی تا زمانی که pH ۷ حاصل شود سانتیفریوژ شد (۱۰ دقیقه، ۲۵۰۰ دور در دقیقه) و رسوب در دمای اتاق خشک شد [۲۲].

برای تهیه نانو کامپوزیت‌ها، ۰/۱ گرم GO در ۴۰ میلی‌لیتر آب مقطر حل شد. علاوه بر این، ۰/۱ g Bi-nHA به محلول GO اضافه شد و pH با استفاده از محلول آمونیاک به ۱۱ تنظیم شد. مخلوط rGO/Bi-nHA در اتوکلاو از جنس فولاد ضدزنگ ریخته شد و در دمای 140°C به مدت ۵ h انکوبه شد. پس از گذشت زمان، مخلوط سانتیفریوژ شد (۱۵ دقیقه، ۳۰۰۰ دور در دقیقه) تا اینکه pH به ۷ تبدیل شد. رسوب به مدت ۴۸ ساعت در دمای 50°C در اون خشک گردید.

آنالیز الگوی پراش اشعه X (XRD) با استفاده از سیستم از Philips X'Pert Pro MRD $\lambda = 1.54 \text{ \AA}$ و FTIR با استفاده از Bruker، Equinox 55 بدست آمد. طیف‌سنجی رامان با استفاده از HR-800 Jobin-Yvon با منبع لیزر Nd-YAG که در طول موج ۵۳۲ nm در دمای اتاق انجام شد.

جداسازی سلول‌های مزانشیمی بافت چربی به روش آنزیمی انجام گردید [۲۷]. نمونه لیپوساکشن چندین بار با نرمال سالین شسته شد. در مرحله بعدی، کلاژناز IV اضافه شد و نمونه به مدت ۴۵ دقیقه در دمای 37°C در حالی که روی

داربستی هیبرید از هیدروکسی آپاتیت و گرافن اکساید احیاشده تهیه کردند که این داربست سرعت ترمیم استخوان را افزایش می‌داد [۲۳]. نای و همکارانش یک کامپوزیت متخلخل از اکسید گرافن احیا شده و نانو هیدروکسی آپاتیت به روش خود تجمعی تهیه کردند. طبق گزارش آن‌ها داربست تهیه شده بطور قابل توجهی تکثیر سلول‌های بنیادی مزانشیمی مغز استخوان رت را افزایش می‌داد [۲۴]. دالگیج و همکارانش سیلیکات را روی نانو هیدروکسی آپاتیت داپینگ کرده و ماده نانو کامپوزیتی به همراه گرافن اکساید سنتز نمودند و آن را به همراه پلی کاپرولاکتون الکتروریسی کردند. داربست‌های حاوی ماده نانو کامپوزیت چسبندگی، گسترش، تکثیر سلولی بهتری را در مقایسه با کنترل نشان می‌دادند [۲۵]. در پژوهش‌های مختلفی تاثیر مشتقات مختلف گرافن و نانو هیدروکسی آپاتیت داپینگ شده با کاتیون‌های مختلف از جمله بیسموت بطور جداگانه بر روی فعالیت‌های بیولوژیکی سلول‌های مختلف بررسی شده است. مطالعه حاضر با هدف بررسی اثر همزمان و بهره‌مندی از اثرات سینرژیستیکی سه ماده ذکر شده، ماده rGO/Bi-nHA به روش هیدروترمال سنتز شد و ویژگی‌های بیولوژیکی آن در حضور سلول‌های بنیادی مزانشیمی مشتق از بافت چربی انسانی مورد بررسی قرار گرفته است.

۲- فعالیت‌های تجربی

اکسید گرافن (GO) با استفاده از روش اصلاح شده هامر [۲۶] تهیه شد. پودر گرافیت (۰/۵ g) و نترات سدیم (۰/۵ g) در حمام یخی در ۲۳ mL اسید سولفوریک حل گردید. سپس، KMnO_4 (۳ g) به مخلوط اضافه شد و دما به 35°C افزایش یافت. مخلوط به مدت ۴ h در همان درجه حرارت هم زده شد. پس از اتمام واکنش، آب دیونیزه (۴۰ mL) به صورت تدریجی اضافه گردید. سرانجام، در پایان فرآیند، آب دیونیزه (۱۰۰ mL) و H_2O_2 (۳ mL) به محلول اضافه شد. با تشکیل اکسید گرافیت، رنگ مخلوط به رنگ زرد روشن تغییر می‌کند. سوسپانسیون اکسید گرافیت فیلتر شده و

داده‌ها بطور متوسط \pm انحراف معیار ارائه شد. داده‌ها در صورت معنی‌دار بودن $P < 0/05$ گزارش شدند.

۳- نتایج و بحث

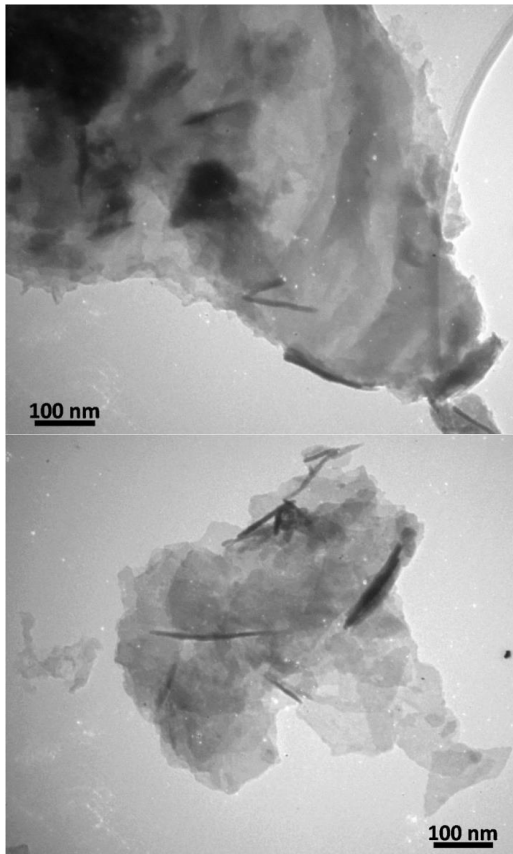
در این مطالعه Bi-nHA به همراه گرافن اکساید به روش هیدروترمال برای ساخت نانو کامپوزیت Bi-nHA/rGO مورد استفاده قرار گرفت. گرافن مشتقات مختلفی دارد که از جمله آن می‌توان به گرافن اکساید و گرافن اکساید احیاء شده اشاره نمود. GO از اکسیداسیون دانه‌های گرافیتی بدست می‌آید. متداول‌ترین تکنیک سنتز گرافن اکساید، روش Hummers است که در این پژوهش نیز از این روش استفاده گردید [۲۶]. ساختار هیدروکسی آپاتیت به گونه‌ای می‌باشد که امکان جاگذاری کاتیون‌های تک، دو، سه، چهار و حتی شش ظرفیتی را بر روی خود دارد [۱۵]. بیسموت یک کاتیون سه ظرفیتی با خواص دارویی می‌باشد که امکان جاگذاری آن بر روی نانو هیدروکسی آپاتیت وجود دارد [۲۱]. شکل ۱ تصاویر TEM از نانو کامپوزیت‌های rGO/Bi-nHA را نشان می‌دهد. همانطور که در شکل دیده می‌شود، میله‌های نانو Bi-nHA بر روی سطوح rGO متصل شده‌اند و ورقه‌های rGO برای ایجاد دو و سه لایه به یکدیگر چسبیده‌اند. اندازه متوسط ورقه‌های گرافن حدود $2 \mu\text{m}$ و طول نانوسیم‌ها Bi-nHA 200 nm با قطر حدود 50 nm تخمین زده می‌شود. GO دارای گروه‌های عملکردی اکسیژن‌دار مثل $-\text{COOH}$ ، $-\text{OH}$ و اپوکسی در صفحه پایه و لبه صفحات گرافیتی است. وجود گروه‌های کربوکسیل و هیدروکسیل در GO باعث می‌شود تا کلسیم هیدروکسی آپاتیت از طریق برهمکنش‌های الکترواستاتیک به سطح صفحات GO جذب گردد [۲۴]. Baradaran و همکارانش کامپوزیت هیدروکسی آپاتیت و گرافن اکساید احیاء شده را بدون استفاده از عوامل کاهنده و به روش هیدروترمال تهیه کردند. آن‌ها کامپوزیت سنتز شده را با روش‌های مختلف مشخصه‌یابی کردند و گزارش کردند که بطور ویژه، عملکرد مکانیکی و زیست‌سازگاری هیدروکسی آپاتیت با اکسید

شیکر در دور ۲۵۰ دور بود، انکوبه شد. کلاژناز با سانتی‌فیوژ در ۱۲۰۰ دور در دقیقه و به مدت ۱۰ دقیقه جداسازی شد. سپس رسوبات با بافر لیزکننده RBC انکوبه شدند تا سلول‌های خونی از بین بروند. سلول‌ها در DMEM غنی شده با $10\% \text{ FBS}$ ، $1\% \text{ پن/استرپ}$ و $1\% \text{ آمفوتریسین}$ (همگی از سیگما) در انکوباتور ($5\% \text{ CO}_2$ در 37°C) کشت داده شدند. برای ارزیابی سایتوتوکسیک بودن نانو کامپوزیت سلول‌های ADSCs به تعداد 3×10^3 سلول در محیط DMEM F12 غنی شده با $10\% \text{ FBS}$ ، $1\% \text{ پن استرپ}$ در 37°C و $5\% \text{ CO}_2$ کشت داده شدند. سلول‌های ADSCs با غلظت‌های ۱، ۳، ۵، ۷ و $10 \mu\text{g/mL}$ از ماده نانو کامپوزیت rGO/Bi-nHA تیمار گردیدند. محیط کشت بعد از ۱، ۳، ۵ و ۷ روز کشت دور ریخته شده و زنده‌مانی سلول‌ها با استفاده از آزمون MTT ارزیابی گردید. جذب نوری (OD) در 570 nm با استفاده از دستگاه Bio-Tek ELX8000 microplate reader بررسی گردید.

برای شناسایی مواد معدنی و رسوب کلسیم سلول‌های ADSCها (2×10^4 سلول)، در DMEM F12، حاوی $10\% \text{ FBS}$ و $1\% \text{ پن استرپ}$ کشت داده شدند. سلول‌ها با نانو کامپوزیت‌های rGO/Bi-nHA در ۱، ۳، ۵، ۷ و $10 \mu\text{g/ml}$ در محیط معمولی (M) و استئوژنیک (OM) به مدت ۱۴ روز تحت تیمار قرار گرفتند. محیط تمایز استئوژنیک استاندارد از اسید اسکوربیک، دگزمتازون (10^{-7} mL) و β -گلیسرو فسفات (10^{-2} ml) و DMEM F12 تشکیل شده است. پس از ۱۴ روز، هر دو نوع محیط معمولی و استئوژنیک حذف و سلول‌ها با PBS شسته شدند. مقدار کلسیم استخراج شده توسط HCl و با استفاده از کیت تشخیص کلسیم (پارس آزمون، ایران) طبق دستورالعمل سازنده اندازه‌گیری می‌شود. سرانجام، جذب نوری در 570 nm با استفاده از ریزخوان Bio-Tek ELX8000 اندازه‌گیری شد. در محاسبات مقدار کلسیم موجود در هیدروکسی آپاتیت کم شده است.

هر آزمایش سه بار تکرار شد. تجزیه و تحلیل یک طرفه از برای مقایسه نتایج از واریانس (ANOVA) استفاده شد.

می باشد. نتایج نشان می دهد که کامپوزیت rGO/Bi-nHA چند لایه است. نتایج بدست آمده برای مشخصه یابی نانو کامپوزیت سنتر شده در راستای مطالعه برادران می باشد [۲۸]. پتانسیل زتا در نانو کامپوزیت rGO/Bi-nHA برابر با $23/1 \text{ mV}$ - است. بار نانو کامپوزیت به دلیل قرار گرفتن Bi-nHA بر روی rGO در مقایسه با GO که 40 mV - است، افزایش یافته است. از آنجایی که غشای سلول ها دارای بار منفی می باشد، بار الکتریکی نانو کامپوزیت طراحی شده دارای اهمیت است و می تواند در برهمکنش سلول با ماده نانو کامپوزیت تاثیرگذار باشد. مثبت تر شدن گرافن اکساید بدلیل قرارگیری Bi-nHA بر روی سطح آن است [۲۹].

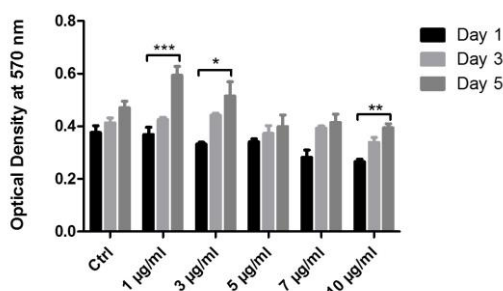


شکل ۱: تصاویر TEM از نانو کامپوزیت های rGO/Bi-nHA

گرافن احیا شده بطور قابل توجهی بهبود می یابد [۲۸]. در این پژوهش، تکنیک XRD برای تأیید ساختار نانو کامپوزیت rGO/Bi-nHA انجام شد (شکل الف ۲). پیک های شاخص nHA در $2\theta \sim 20, 24/97, 30/84$ قرار گرفته است که به ترتیب مربوطه صفحات (۰۰۲)، (۲۱۱) می باشد. پیک مربوط به بیسموت در $2\theta \sim 27.26, 40, 48$ قرار گرفته است که با صفحات (012)، (110)، (202) معادل می باشد. پیک شاخص GO که باید در $2\theta \sim 11$ ظاهر شود، دیده نشد، این بدان معنی است که GO طی سنتر شده احیا شده است. احیا گرافن اکساید و داپینگ بیسموت با nHA با تکنیک FTIR نیز بررسی گردید (شکل ب ۲). باندهای جذب در 3428 cm^{-1} مربوط به پیوند کششی گروه هیدروکسیل (OH^-) می باشد. باندهای 1655 و 1573 cm^{-1} مربوط به $\text{C}=\text{C}$ در rGO بوده و باندهای 1109 ، 1022 و $558/468 \text{ cm}^{-1}$ مشاهده گردید. باندهای 795 cm^{-1} قرار دارد. در نهایت، باندهای $594/69 \text{ cm}^{-1}$ نشانگر داپینگ Bi-O در nHA است. شکل ج ۲، طیف Raman نانو کامپوزیت های rGO/Bi-nHA را نشان می دهد. Zhou و همکارانش نشان دادند طیف رامان پیک های D و G برای GO و rGO در حدود 1588 و 1345 cm^{-1} می باشد [۲۳]. همانطور که در شکل ۳ مشاهده می شود، قله پیوندهای D و G مواد گرافیتی به ترتیب در 1349 ، 1592 cm^{-1} قرار می گیرند. موقعیت قله G به طول موج بالاتر منتقل شده است که می تواند مربوط به ناخالصی های ناشی از داپینگ موجود در گرافن باشد. $I_D/I_G = 1/78$ محاسبه گردید که در مقایسه با $I_D/I_G = 1/16$ GO افزایش یافته است. این موضوع نشان دهنده حذف گروه های اکسیژن و احیا شبکه sp^2 در حین کاهش را نشان می دهد که گروه های عاملی اکسیژن احیا شده و GO به rGO تبدیل شده است. علاوه بر این، نسبت $I_{2D}/I_G = 0/28$

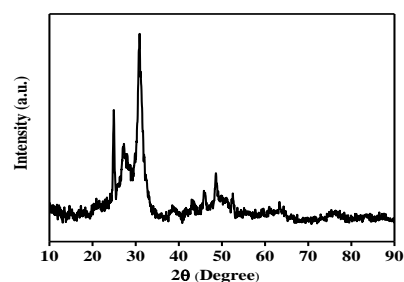
زیست‌سازگاری آن‌ها را نشان داده است [۲۱، ۳۱]. شکل ۳ نشان دهنده زنده‌مانی سلول‌ها است که با غلظت‌های مختلف rGO/Bi-nHA به مدت ۱، ۳ و ۵ روز تیمار شده‌اند. ADSC‌های انسانی وقتی در معرض مدت زمان تیمار با غلظت‌های مختلف نانو کامپوزیت‌های rGO/Bi-nHA قرار می‌گیرند، پاسخ‌های بیولوژیکی متفاوتی نشان می‌دهند. در همه غلظت‌ها، روند افزایشی از روزهای ۱ تا ۵ وجود دارد. در غلظت‌های پایین نانو کامپوزیت (۱، ۳ و ۵ $\mu\text{g/ml}$) سرعت تکثیر سلول‌ها مشابه گروه کنترل می‌باشد. تیمار با غلظت بالاتر نانو کامپوزیت‌ها منجر به کاهش میزان تکثیر سلول‌ها شد. با این حال، می‌توان نتیجه گرفت که در غلظت‌های ۷ و ۱۰ $\mu\text{g/ml}$ سلول‌ها بیش از ۵۰ درصد زنده مانده‌اند. بنابراین، ماده نانو کامپوزیت سنتز شده سمیتی برای سلول‌های مزانشیمی بافت چربی نداشته و زیست‌سازگار است.

MTT Assay

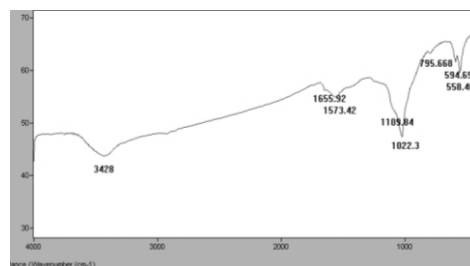


شکل ۳: نتایج MTT پس از ۱، ۳ و ۵ روز نشان دهنده میزان زنده ماندن ADSC‌ها در حضور نانو کامپوزیت Bi-nHA/rGO می‌باشد ($P < 0.05$), ($P < 0.01$), ($P < 0.001$).

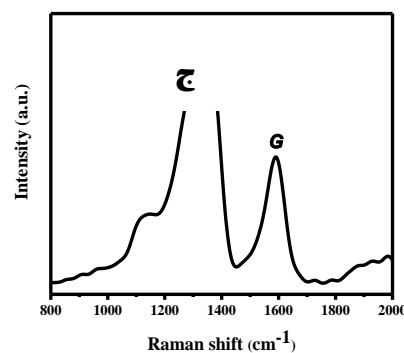
سنجش میزان رسوب کلسیم توسط ADSC‌ها می‌تواند به عنوان نشانگر تمایز استئوژنیک در نظر گرفته شود. سلول‌های بنیادی مزانشیمی بافت چربی انسانی در غلظت‌های ۱، ۳، ۵، ۷ و ۱۰ $\mu\text{g/ml}$ از ماده نانو کامپوزیت به همراه محیط تمایزی استئوژنیک (OM) و محیط معمولی (M) به مدت چهارده روز تیمار گردید. شکل ۴ نشان دهنده میزان رسوب کلسیم در گروه‌های مورد مطالعه است. در گروه سلول‌های تیمار شده با ماده NC و محیط کشت معمولی (M) روند افزایش رسوب کلسیم مشاهده می‌شود. غلظت ۱۰ $\mu\text{g/ml}$ تفاوت



(الف)



(ب)



(ج)

شکل ۲: نتایج مشخصه‌یابی ماده نانو کامپوزیت، نمودار (الف) حاصل از طیف‌سنجی XRD، نمودار (ب) حاصل از FTIR و نمودار (ج) طیف‌سنجی رامان مربوط به ماده نانو کامپوزیت Bi-nHA/rGO. پیک‌های D و G روی شکل مشخص شده است.

آزمون MTT برای بررسی فعالیت آنزیم‌های ردوکتاز به عنوان معیاری برای زنده ماندن و تکثیر سلول انجام گردید. مطالعات مختلفی برای بررسی زنده ماندن سلول‌های مختلف مانند استئوبلاست‌ها [۳۰] و سلول‌های شبه استئوبلاست [۲۲] بر روی مشتقات گرافن و هیدروکسی آپاتیت [۱۳] انجام شده است. مطالعات نشان داد که مشتقات گرافن، گرافن/هیدروکسی آپاتیت به لحاظ بیولوژیکی زیست‌سازگار هستند. مطالعات در مورد انواع یون‌های داپینگ شده روی هیدروکسی آپاتیت و گرافن اکسید نیز

دارای خاصیت استوژنیک بوده و برای استفاده در ساخت داربست برای مهندسی بافت استخوان مناسب می‌باشد. نانو کامپوزیت ساخته شده در ساخت داربست‌های استخوانی علاوه بر نقش هدایت‌گری تمایز استخوانی می‌تواند باعث بهبود مقاومت مکانیکی داربست‌ها نیز گردد.

۴- نتیجه‌گیری

در مطالعه حاضر، نانو کامپوزیت‌های rGO/Bi-nHA با استفاده از روش هیدروترمال سنتز شدند. در مقایسه با nHA و GO، کامپوزیت‌ها از نظر خصوصیات بیولوژیکی و مکانیکی بهبود یافته‌اند. کشت سلول و نتایج زنده ماندن نشان داد که افزودن نانو کامپوزیت‌ها باعث تکثیر سلول‌ها به ویژه در غلظت‌های کمتر (۱ تا ۵ $\mu\text{g/ml}$) می‌شود. همچنین ماده NC باعث افزایش رسوب کلسیم در غلظت‌های بالاتر می‌شود و اثر محیط استوژنیک (OM) را نیز تقویت می‌کند. در نهایت، می‌توان نتیجه گرفت که rGO/Bi-nHA می‌تواند در ساخت داربست به روش‌های مختلف و به همراه پلیمرهای سنتتیک مختلف برای مهندسی بافت استخوان استفاده شود.

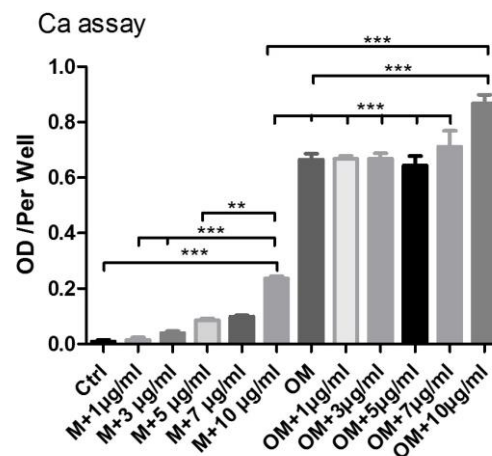
سپاسگزاری

نویسندگان از مرکز تحقیقات بن‌یافته تشکر و قدردانی می‌کند.

مراجع

- [1] Y. Shen, X. Zhang, M. Li, Y. Lin, *National Science Review*, **4**, 2017, 23.
- [2] S. Rafieian, H. Mirzadeh, H. Mahdavi, M.E. Masoumi, *Science and Engineering of Composite Materials*, **26**, 2019, 154.
- [3] G. Yang, L. Li, W.B. Lee, M.C. Ng, *Science and Technology of Advanced Materials*, **19**, 2018, 613.
- [4] S. Song, H. Shen, Y. Wang, X. Chu, J. Xie, N. Zhou, *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, **185**, 2020, 110596.
- [5] A. Li, C. Zhang, Y.F. Zhang, *Polymers*, **9**, 2017, 437.
- [6] D.G. Papageorgiou, I.A. Kinloch, R.J. Young, *Progress in Materials Science*, **90**, 2017, 75.
- [7] A. Marrella, G. Tedeschi, P. Giannoni, A. Lagazzo, F. Sbrana, F. Barberis, *Materials Science and Engineering: C*, **93**, 2018, 1044.
- [8] S. Prasad, S. Suresh, R. Wong, *Materials (Basel)*, **11**, 2018, 1430.

معناداری را در مقایسه با غلظت‌های پائین‌تر نشان می‌دهد. همچنین بررسی نمودار تیمار سلول‌ها با ماده NC به همراه محیط کشت استوژنیک نیز روند افزایشی رسوب کلسیم را نشان می‌دهد و بیشترین میزان رسوب کلسیم در غلظت ۱۰ $\mu\text{g/ml}$ در مقایسه با گروه‌های با غلظت پائین‌تر نشان می‌دهد. بنابراین رسوب کلسیم در گروه‌های دارای محیط کشت معمولی و محیط استوژنیک روند افزایشی نشان می‌دهد و در غلظت ۱۰ $\mu\text{g/ml}$ به بالاترین میزان خود می‌رسد. در گروه‌های دارای محیط OM غلظت‌های ۱-۷ $\mu\text{g/ml}$ رسوب کلسیم مشابهی با محیط استوژنیک را نشان می‌دهند، در حالی که غلظت ۱۰ $\mu\text{g/ml}$ افزایش قابل توجهی در رسوب کلسیم در مقایسه با غلظت‌های پایین‌تر نشان داد. مواد هیبریدی ساخته شده با مشتقات گرافن و نانوهیدروکسی آپاتیت خاصیت استوژنیک دارند و باعث تمایز سلول‌های بنیادی و رسوب مواد معدنی می‌شوند [۲۲، ۳۱، ۳۲]. با توجه به نتایج بدست آمده به نظر می‌رسد که ماده نانو کامپوزیت بدون حضور محیط کشت استوژنیک و در غلظت‌های بالاتر باعث رسوب کلسیم می‌گردد.



شکل ۴: ارزیابی رسوب Ca در حضور نانو کامپوزیت rGO/Bi-nHA در روز ۱۴. (** P < 0.01) (* P < 0.05), (***) P < 0.001.

همچنین ماده NC اثر هم‌افزایی به همراه محیط کشت استوژنیک (OM) داشته و به دلیل خصوصیات شیمیایی باعث پیشرفت تمایز می‌گردد. بنابراین ماده NC سنتز شده

- [22] M. Selvakumar, P. Srivastava, H.S. Pawar, N.K. Francis, B. Das, G. Sathishkumar, *ACS Appl Mater Interfaces*, **8**, 2016, 4086.
- [23] K. Zhou, P. Yu, X. Shi, T. Ling, W. Zeng, A. Chen, *ACS nano*, **13**, 2019, 9595.
- [24] W. Nie, C. Peng, X. Zhou, L. Chen, W. Wang, Y. Zhang, *Carbon*, **116**, 2017, 325.
- [25] A.D. Dalgic, A.Z. Alshemary, A. Tezcaner, D. Keskin, Z. Evis, *Journal of Biomaterials Applications*, **32**, 2018, 1392.
- [26] W.S. Hummers Jr, R.E. Offeman, *Journal of the American Chemical Society*, **80**, 1958, 1339.
- [27] S.M. Khatami, K. Parivar, A.N. Sohi, M. Soleimani, H. Hanaee-Ahvaz, *Tissue and Cell*, **65**, 2020, 101363.
- [28] S. Baradaran, E. Moghaddam, W.J. Basirun, M. Mehrali, M. Sookhakian, M. Hamdi, *Carbon*, **69**, 2014, 32.
- [29] O. Rosskopfova, M. Galambos, P. Rajec, *Journal of Radioanalytical and Nuclear Chemistry*, **287**, 2011, 715.
- [30] P.M. Ajayan, L.S. Schadler, P.V. Braun, *Nanocomposite Science and Technology*. John Wiley & Sonz, 2006.
- [31] A.E. Pazarcviren, A. Tahmasebifar, A. Tezcaner, D. Keskin, Z. Evis, *Ceramics International*, **44**, 2018, 3791.
- [32] S. Abedin Dargoush, S. Hatamie, S. Irani, M. Soliemani, H. Hanaee-Ahvaz, A. Naderi Sohi, *Asian Journal of Nanosciences and Materials*, **3**, 2020, 226.
- [9] V. Agarwal, P.B. Zetterlund, *Chemical Engineering Journal*, **115**, 2020, 127018.
- [10] R. Muzyka, S. Drewniak, T. Pustelny, M. Chrubasik, G. Gryglewicz, *Materials*, **11**, 2018, 1050.
- [11] N. Dubey, R. Bentini, I. Islam, T. Cao, A.H. Castro Neto, V. Rosa, *Stem Cells Int*, **2015**, 2015, 804213.
- [12] T.A. Tabish, H. Hayat, A.A. Rahat, T.M. Abdullah, J.L. Whatmore, *Nanotechnology*, **28**, 2017, 504001.
- [13] O. Akhavan, E. Ghaderi, *Carbon*, **59**, 2013, 200.
- [14] M. Nabavinia, A.B. Khoshfetrat, H. Naderi-Meshkin, *Materials Science and Engineering: C*, **97**, 2019, 67.
- [15] G. Ciobanu, A.M. Bargan, C. Luca, *JOM*, **67**, 2015, 2534.
- [16] N. Ramesh, S.C. Moratti, *Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials*, **106**, 2018, 2046.
- [17] J. Venkatesan, S.K. Kim, *Journal of Biomedical Nanotechnology*, **10**, 2014, 3124.
- [18] Z. Chen, Y. Liu, L. Mao, L. Gong, W. Sun, L. Feng, *Ceramics International*, **44**, 2018, 6002.
- [19] E.Y. Buslaeva, S. Kraevskii, S. Tkachev, S. Gubin, *Russian Journal of Inorganic Chemistry*, **65**, 2020, 5.
- [20] M. Kowalik, J. Masternak, B. Barszcz, *Current medicinal Chemistry*, **26**, 2019, 729.
- [21] T.J. Webster, E.A. Massa-Schlueter, J.L. Smith, E.B. Slamovich, *Biomaterials*, **25**, 2004, 2111.