

تهیه و شناسایی نانوکامپوزیت حاوی هیدروکسی آپاتیت به روش تقلید زیستی برای کاربرد در مهندسی بافت استخوان

مهشید اصلانی^۱، معصومه مسکین فام^۲، حمیدرضا آقابزرگ^{۳*}، هدی پاسدار^۴ و فرشته مطیعی^۵

۱- دکترای شیمی معدنی، دانشکده شیمی، واحد تهران شمال، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران

۲- استادیار شیمی معدنی، دانشکده شیمی، واحد لاهیجان، دانشگاه آزاد اسلامی، لاهیجان، ایران

۳- استاد شیمی معدنی، پژوهشگاه صنعت نفت، تهران، ایران

۴- دانشیار شیمی معدنی، دانشکده شیمی، واحد تهران شمال، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران

۵- استادیار شیمی کاربردی، دانشکده شیمی، واحد تهران شمال، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران

دریافت: مرداد ۱۳۹۵، بازنگری: شهریور ۱۳۹۵، پذیرش: شهریور ۱۳۹۵

چکیده: در سال‌های اخیر پژوهشگران از مواد زیستی برای ساخت کامپوزیت‌ها در راستای بهبود مهندسی بافت و ترمیم بافت‌های آسیب‌دیده استفاده کرده‌اند. در این پژوهش، سنتز و شناسایی نانوکامپوزیت ژلاتین - نانولوله کربن - هیدروکسی آپاتیت با روش سنتز درجا، صورت گرفت و اثر تغییر غلظت زیست بسیار بررسی شد. نانوکامپوزیت‌ها با استفاده از روش‌های طیف‌سنجی فروسرخ تبدیل فوریه (FT-IR)، پراکنش انرژی پرتو X (EDAX)، پراش پرتو X (XRD) و میکروسکوپی الکترونی روبشی (SEM) شناسایی شدند. همچنین، بررسی زیست‌فعال آن‌ها در محیط آزمایشگاه به وسیله غوطه‌وری در مایع شبیه‌سازی‌شده بدن (SBF) صورت گرفت. بر اساس نتیجه‌های به‌دست آمده تشکیل و توزیع نانوذرات هیدروکسی آپاتیت به‌عنوان فاز معدنی در بستر زیست‌بسیار تأیید شد. بررسی زیست‌فعال نیز نشان داد که ژلاتین بستر مناسبی برای رشد و هسته‌زایی نانوبلورهای هیدروکسی آپاتیت است و افزایش غلظت ژلاتین تأثیر مطلوبی بر ریخت و توزیع نانوذرات داشتند.

واژه‌های کلیدی: مهندسی بافت استخوان، زیست نانوکامپوزیت، تقلید زیستی، هیدروکسی آپاتیت

مقدمه

جاسازی شده‌اند. بنابراین، استفاده از کامپوزیت‌ها در درمان بازسازی بافت استخوان یک روش تقلیدی مناسب از بستر خارج سلولی^۱ (ECM) است [۲]. ترکیب اصلی بستر خارج سلولی شامل هر دو فاز آلی- معدنی است. فاز معدنی شامل نانوذرات بلوری هیدروکسی آپاتیت به فرمول $Ca_{10}(PO_4)_6(OH)_2$ و فاز آلی از کلاژن نوع I و مقدار کمی از گلیکوز آمینوگلیکان‌ها، پروتئوگلیکان و گلیکوپروتئین تشکیل شده است [۳ تا ۵]. از آنجایی که قسمت

مهندسی بافت تلفیقی از علوم متفاوت مانند پزشکی، مهندسی مواد و علوم زیستی است که با هدف ایجاد و توسعه جایگزین‌های زیستی مشابه بافت انسان، به ترمیم و بازسازی بافت‌های آسیب‌دیده می‌پردازد [۱].

استخوان طبیعی نانوکامپوزیتی تشکیل شده از فیبرهای پروتئین کلاژن است که نانوبلورهای آپاتیت در مولکول‌های پروتئین

1. Extra Cellular Matrix

آن پتانسیل لازم برای کاربرد به‌عنوان داربست را فراهم کرده است [۱۶ تا ۱۸].

از میان مواد مطالعه شده برای تقویت کامپوزیت‌ها به نانولوله‌های کربنی به دلیل استحکام بالا و چقرمگی توجه زیادی شده است. همچنین گزارش‌ها حاکی از این است که این مواد قابلیت لازم برای کاربرد به‌عنوان زیست مواد برای ترمیم استخوان را دارند. از طرفی نانولوله‌های عامل دار شده انحلال‌پذیری، زیست سازگاری و برهم‌کنش سلولی بیشتری دارند و سمی بودن آن‌ها کاهش می‌یابد. گزارش‌ها در مورد نانولوله‌های عامل دار شده با گروه‌های کربوکسیل حداقل سمی بودن سلولی را روی زیست سازگاری، تکثیر و تمایز سلولی نشان دادند. این ویژگی‌ها، نانولوله‌ها را به‌عنوان کاندیدای مناسب در ساخت داربست‌های مهندسی بافت کرده است [۱۹ تا ۲۱].

در این پژوهش، با هدف تهیه نانوکامپوزیتی با افزایش قابلیت زیستی در بدن، از ژلاتین به‌عنوان ماده مطرح زیستی مشابه ترکیب استخوان و روش تقلید زیستی به‌صورت سنتز درجا^۱ استفاده و اثر تغییر غلظت زیست پلیمر بررسی شد.

بخش تجربی

مواد و روش‌ها

برای سنتز نمونه‌ها، ژلاتین (تهیه شده از پوست گاو) ساخت شرکت سیگما-آلدریج، نانولوله‌های کربنی چند دیواره کربوکسیله با قطر خارجی (۸ تا ۱۰ نانومتر) ساخت شرکت نئوتک و کلسیم نترات چهار آب و دی آمونیم هیدروژن فسفات، از شرکت مرک تهیه شدند. برای آزمون زیست فعالی نمک‌های سدیم کلرید، سدیم هیدروژن کربنات، پتاسیم کلرید، دی پتاسیم هیدروژن فسفات سه آب، منیزیم کلرید شش آب، تریس هیدروکسی متیل آمینومتان و محلول هیدروکلریک اسید از شرکت مرک تهیه شدند.

سنتز درجا نانوکامپوزیت‌ها

سنتز درجا نانوکامپوزیت‌ها با روش تقلید زیستی^۲ انجام شد.

اعظم استخوان از هیدروکسی آپاتیت تشکیل شده است، ترکیب آن در کامپوزیت‌ها می‌تواند قابلیت هدایت استخوانی را تا حد زیادی افزایش دهد. همچنین، نانو ذرات هیدروکسی آپاتیت به دلیل افزایش مساحت سطح و به دنبال آن واکنش‌پذیری بیشتر، موجب تکثیر و افزایش چسبندگی سلول‌های بنیادی مزانشیمی، فعالیت آلکالین فسفاتاز و رسوب یون‌های کلسیم می‌شوند [۶]، اما شکنندگی این ماده کاربرد آن را محدود کرده است. یکی از بهترین روش‌ها برای حل این مشکل ترکیب آن با مواد بسیاری زیست‌تخریب‌پذیر مانند کلاژن، ژلاتین، کیتوسان و نشاسته به‌صورت کامپوزیت است. از این‌رو، در دهه‌های اخیر توجه پژوهشگران بر روی نانوذرات معدنی جایگزین شده در بستر پلیمرها جلب شده است [۷ تا ۹].

در سال‌های اخیر، تلاش بر توسعه مواد با ویژگی‌های زیستی و مکانیکی مناسب برای جایگزینی استخوان طبیعی متمرکز شده است. یکی از این تلاش‌ها سنتز کامپوزیت‌ها با رویکرد تقلید زیستی به‌عنوان استخوان مصنوعی است. اساس این روش برهم‌کنش بین بستر آلی و پرکننده‌های معدنی است، که موجب هسته‌زایی و رشد بلورهای معدنی یا جهت‌گیری مناسب اجزای آلی برای رشد منظم‌تر ساختار سلسله مراتبی استخوان می‌شود [۱۰ و ۱۱]. پژوهش‌هایی با این رویکرد روی سنتز نانوکامپوزیت‌ها با استفاده از روش معدنی کردن درجا^۱، با بسپارهای پلی وینیل الکل، پلی لاکتیک اسید، پلی کاپرولاکتون، کلاژن و کیتوسان انجام شده و نانوکامپوزیت‌های تهیه شده ویژگی‌های برتری از خود نشان داده‌اند [۱۲ تا ۱۵].

زیست بسپارها، پلیمرهای قطبی هستند که به دلیل شباهت آن‌ها با بافت موجود زنده، زیست سازگار و غیرسمی هستند. یکی از زیست‌بسپارها با کاربرد پزشکی ژلاتین است. ژلاتین فرم تغییر شکل یافته کلاژن است و کاربرد آن در بافت‌های سخت سودمند است. از مزایای این بسپار می‌توان به زیست‌سازگاری، زیست‌تخریب‌پذیری، تکثیر و چسبندگی مناسب به سلول‌ها اشاره کرد. همچنین، وجود گروه‌های عاملی زیستی در ساختار

1. In situ mineralization

2. In situ synthesis

3. Biomimetic

دی پتاسیم هیدروژن فسفات سه آبه، منیزیم کلرید شش آبه بر اساس جدول ۱ در آب یونزدایی شده حل و با محلول تریس هیدروکسی متیل آمینومتان و هیدروکلریک اسید تا pH برابر با ۷ تثبیت شد.

برای بررسی زیست فعالی، نمونه‌ها در مقدار مشخصی محلول SBF طی زمان‌های ذکر شده قرار گرفتند و پس از پایان دوره زمانی معین، با آب یونزدایی شده شست‌وشو و خشک شدند. نمونه‌ها پیش و پس از غوطه‌وری با روش‌های شناسایی به‌وسیله طیف‌سنجی فروسخ تبدیل فوریه (با دستگاه PerkinElmer 400, USA)، پراش پرتو X (با دستگاه Philips China PW1800)، میکروسکوپ الکترونی روبشی (با میکروسکوپ EM 3200 China) و تجزیه عنصری با روش پراکنش انرژی پرتو X-EDAX^۴ (با دستگاه Philips, China) بررسی شدند.

جدول ۱ غلظت یون‌ها در پلاسمای خون انسان و محلول SBF [۲۲].

یون‌ها	SBF محلول	پلاسمای خون
SO ₄ ²⁻	۰٫۵	۰٫۵
HPO ₄ ²⁻	۱٫۰	۱٫۰
HCO ₃ ⁻	۴٫۲	۲۷٫۰
Cl ⁻	۱۴۷٫۸	۱۰۳٫۰
Ca ²⁺	۲٫۵	۲٫۵
Mg ²⁺	۱٫۵	۱٫۵
K ⁺	۵٫۰	۵٫۰
Na ⁺	۱۴۲٫۰	۱۴۲٫۰

نتیجه‌ها و بحث

شکل ۱-a الگوی پراش پرتو ایکس نمونه‌های S-1، S-2 و S-3 را پیش از غوطه‌وری در محلول SBF نشان می‌دهد. همان‌گونه که مشاهده می‌شود سه پیک شاخص (۰٫۰۲)، (۲۱۱)، (۲۱۳) در گستره ۲θ برابر با ۲۶ تا ۴۹° ظاهر شده‌اند که با توجه به الگوی استاندارد هیدروکسی آپاتیت (JCPDS NO = ۰۹-۴۳۲)

نخست مقادیر ۰٫۲۵، ۰٫۳۶ و ۰٫۴۸ گرم ژلاتین به‌طور جداگانه در ۵۰ میلی‌لیتر آب در دمای ۵۰ درجه سانتی‌گراد تحت شرایط هم‌زدن حل شدند تا محلول‌های با درصد وزنی متفاوت ژلاتین تشکیل شوند. هم‌زمان مخلوط‌های ۴٪ وزنی نانولوله کربنی در اتانول تهیه و به مدت ده دقیقه در حمام فراصوت قرار داده شدند. سپس این مخلوط‌های حاوی ۴٪ وزنی نانولوله‌های کربنی به محلول‌های ژلاتین با درصد وزنی متفاوت افزوده شدند و یک ساعت و نیم در حمام فراصوت قرار داده شدند. پس از آن ۱٫۶۵ گرم نمک کلسیم نیترات چهار آبه و ۰٫۵۵ گرم نمک دی‌آمونیم هیدروژن فسفات به ترتیب به مخلوط‌های ژلاتین-نانولوله کربن تحت شرایط هم‌زدن در دمای ۵۰ درجه سانتی‌گراد افزوده شدند. با هم‌زدن مخلوط‌های به‌دست آمده، نمک‌ها به‌طور کامل حل شدند. سپس با افزودن محلول آمونیاک، pH به ۱۰٫۲ رسانده شد. پس از آن محلول‌ها ۲۴ ساعت در دمای اتاق نگهداری شدند. رسوب‌های تشکیل شده صاف و با آب یونزدایی شده، pH به ۷ رسانده شد. رسوب‌ها به مدت ۱۲ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد در آون قرار داده شدند تا خشک شوند. نمونه‌های تهیه شده برحسب مقدار ژلاتین ۰٫۲۴، ۰٫۳۶ و ۰٫۴۸ گرم به ترتیب با S-1، S-2 و S-3 نام‌گذاری شدند.

آزمون زیست فعالی

زیست فعالی نانوکامپوزیت‌ها در محیط آزمایشگاه (برون تنی)^۱ با غوطه‌وری نمونه‌ها در محلول شبیه‌سازی شده بدن (SBF)^۲ در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد برای دوره‌های زمانی ۷، ۱۴ و ۲۱ روز در شرایط ثابت انجام شد. نخستین بار ترکیب این محلول توسط کوکوبو^۳ پیشنهاد شد که خیلی شبیه به ترکیب پلاسمای خون انسان است [۲۲].

تهیه محلول SBF

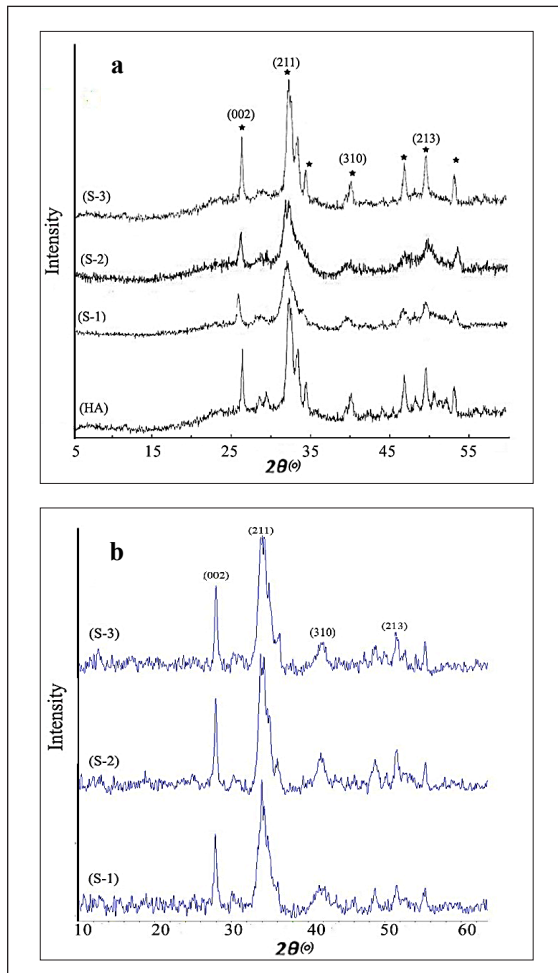
برای تهیه محلول SBF نخست مقادیر محاسبه شده از نمک‌های سدیم کلرید، سدیم هیدروژن کربنات، پتاسیم کلرید،

1. In vitro

2. Simulated body fluid

3. Kokubo

4. Energy dispersive analysis by X-ray (EDAX)



شکل ۱ الگوهای پراش پرتو x نمونه‌ها پیش (a) و پس از غوطه‌وری در محلول SBF (b) در

طیف‌های FT-IR نانولوله‌های کربنی، ژلاتین و هیدروکسی آپاتیت و نمونه‌های سنتز شده S-1، S-2 و S-3 پیش از غوطه‌وری در محلول SBF در شکل ۲-a نشان داده شده است. پیک‌های ناحیه 1120 cm^{-1} و 1720 cm^{-1} مربوط به ارتعاش‌های C=O و گروه کربوکسیل نانولوله‌های کربنی عامل دار شده است. پیک ناحیه 1640 cm^{-1} مربوط به ارتعاش کششی C-H، پیک 2922 cm^{-1} مربوط به ارتعاش کششی پیوند C=O گروه آمید (و پیک‌های ناحیه 1490 cm^{-1} و 1520 cm^{-1} مربوط به ارتعاش کششی پیوند N-H گروه آمید) ژلاتین است.

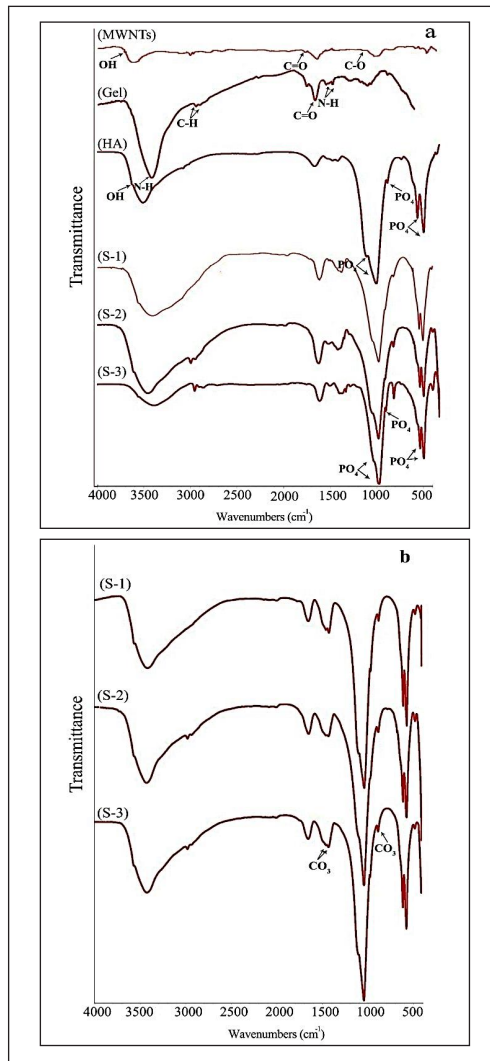
بیانگر وجود این ترکیب در نمونه‌هاست. سه پیک مشاهده شده پهن‌تر از پیک‌های هیدروکسی آپاتیت (HA) خالص سنتز شده هستند که نشان‌دهنده بلورینگی پایین هیدروکسی آپاتیت در کامپوزیت‌های تهیه شده است. به نظر می‌رسد با تغییر غلظت ژلاتین در الگوهای پراش نمونه‌ها، تغییر چشمگیری ایجاد نشده و در تمام الگوها پیک‌های پهن ظاهر شده، نشان‌دهنده بلورینگی پایین ذرات هیدروکسی آپاتیت است که با ساختار استخوان طبیعی هم‌خوانی دارد.

شکل ۱-b الگوهای پراش پرتو ایکس نمونه‌ها را پس از غوطه‌وری در محلول SBF نشان می‌دهد. الگوهای نمونه‌ها پس از غوطه‌وری و مقایسه با پیش از آن نشان می‌دهد تغییری در ساختار کامپوزیت‌ها ظاهر نشده است. نکته قابل توجه، کاهش عرض پیک‌های هیدروکسی آپاتیت است. این نتیجه به رشد ذرات بلوری آپاتیت روی نمونه‌ها و زیست‌فعالی آن‌ها اشاره دارد. میانگین اندازه نانوبلورهای هیدروکسی آپاتیت در نمونه‌ها پیش و پس از غوطه‌وری در SBF با استفاده از معادله شرر نسبت به صفحات (۰۰۲)، (۳۱۱)، (۳۱۰) و (۲۱۳) محاسبه و در جدول ۲ گزارش شده است.

همان‌طور که مشاهده می‌شود با افزایش غلظت ژلاتین مقادیر میانگین اندازه ذرات بلوری هیدروکسی آپاتیت افزایش یافته است. پس از غوطه‌وری در محلول SBF نیز میانگین اندازه ذرات بلوری نسبت به پیش از غوطه‌وری در این محلول افزایش داشته که این مسأله به زیست‌فعال بودن کامپوزیت‌ها اشاره دارد.

جدول ۲ میانگین اندازه ذرات بلوری نمونه‌ها پیش و پس از غوطه‌وری در محلول SBF

نمونه	میانگین اندازه ذرات بلوری (nm)	
	پیش از غوطه‌وری در محلول (SBF)	پس از غوطه‌وری در محلول (SBF)
S-1	۱۳٫۱	۲۰٫۰
S-2	۱۷٫۴	۲۱٫۲
S-3	۱۴٫۵	۲۲٫۰

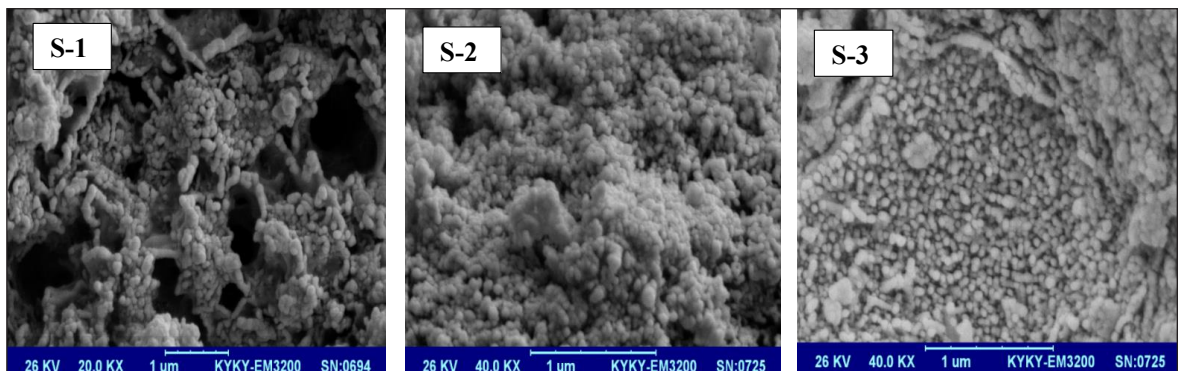


شکل ۲ طیف‌های FT-IR نمونه‌ها پیش (a) و پس از غوطه‌وری (b) در محلول SBF

وجود شیوه‌های ارتعاشی اصلی گروه‌های فسفات در نواحی ۵۴۰، ۶۰۷، ۹۶۰، ۱۰۴۲ و 1059 cm^{-1} و نوار جذبی OH در ناحیه 3569 cm^{-1} نشان‌دهنده تشکیل فاز آپاتیت در نمونه‌هاست. نوار جذبی پهن در گستره 3439 تا 3500 cm^{-1} به وجود مولکول‌های آب نسبت داده می‌شود. همچنین پیک‌های ناحیه 1410 و 1460 cm^{-1} مربوط به ارتعاش کششی گروه کربنات است. در طیف‌های FT-IR سه نمونه S-1، S-2 و S-3 نوارهای جذبی هیدروکسی آپاتیت، ژلاتین و نانولوله‌های کربنی عامل دار شده مشاهده می‌شود.

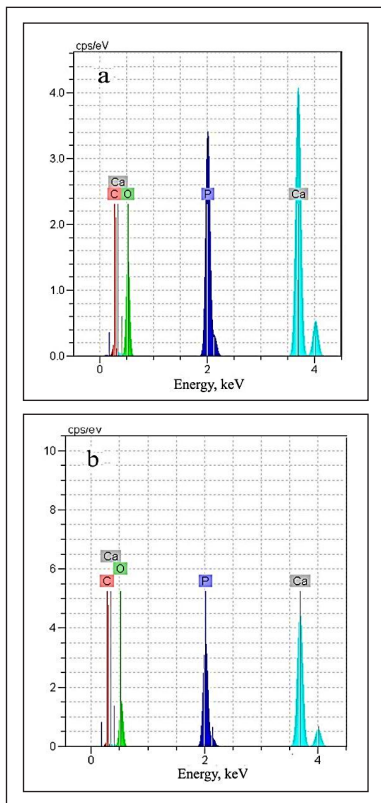
شکل ۲-b طیف FT-IR نمونه‌ها پس از غوطه‌وری در محلول SBF است. با مقایسه طیف‌ها نسبت به پیش از غوطه‌وری، پیک‌های گروه‌های عاملی فسفات، هیدروکسیل، کربنات و آب همگی مشاهده شده‌اند. افزایش شدت پیک‌ها در 1410 و 1460 cm^{-1} مربوط به گروه کربنات، تشکیل کربنات آپاتیت و زیست‌فعالی کامپوزیت‌ها را تأیید می‌کند.

شکل ۳ تصویرهای میکروسکوپ الکترونی نمونه‌های سنتز شده پیش از غوطه‌وری در محلول SBF را نشان می‌دهد. همان‌طور که مشاهده می‌شود نانوذرات کروی هیدروکسی آپاتیت به‌طور یکنواخت در بستر ژلاتین و بر روی نانولوله‌های کربنی توزیع شده‌اند. در هر سه تصویر هیچ‌گونه جدایی و مرز مشخص بین فازهای آلی و معدنی مشاهده نمی‌شود. به نظر می‌رسد با افزایش غلظت ژلاتین، توزیع نانو ذرات کروی، یکنواخت‌تر هستند (شکل ۳-(S-3)).



شکل ۳ تصویرهای میکروسکوپ الکترونی نمونه‌های S-1، S-2 و S-3 پیش از غوطه‌وری در محلول SBF

در هیدروکسی آپاتیت ۱/۷ است و در نمونه موردنظر با افزایش زمان غوطه‌وری از ۱/۷ به ۲/۳ افزایش داشته است. این مسأله را می‌توان به افزایش هسته‌زایی و رشد تشکیل فاز معدنی در نانوکامپوزیت با افزایش زمان غوطه‌وری نسبت داد.

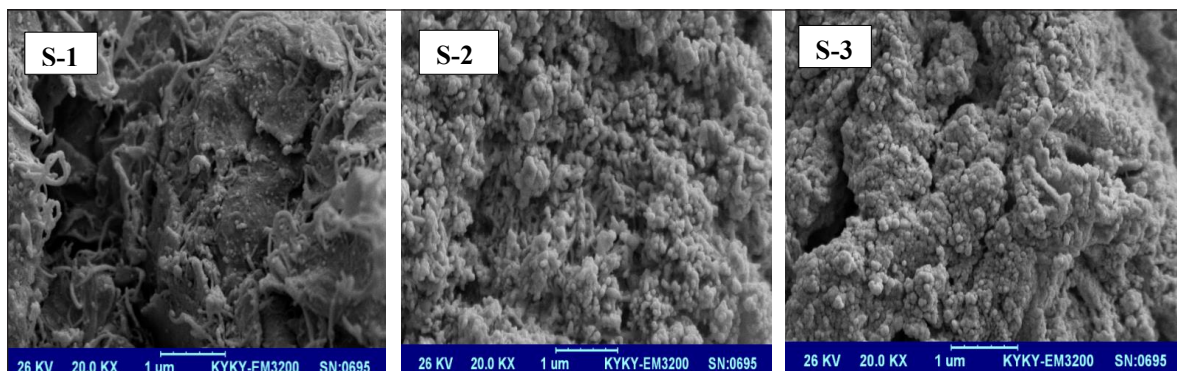


شکل ۵ طیف‌های EDAX نمونه S-2 پیش (a) و پس از غوطه‌وری (b) در محلول SBF

شکل ۴ تصویرهای میکروسکوپ الکترونی نمونه‌ها پس از غوطه‌وری در محلول SBF است. همان‌طور که مشاهده می‌شود میزان رشد نانو ذرات هیدروکسی آپاتیت در سطح نمونه‌ها با افزایش غلظت ژلاتین افزایش یافته است. تشکیل هیدروکسی آپاتیت برای تولید استخوان در بدن مهم است. بنابراین، کامپوزیت‌هایی که بستر خوبی برای رشد هیدروکسی آپاتیت فراهم کنند، پیشنهاد خوبی برای تشکیل استخوان هستند. این نتیجه‌ها بر زیست فعال بودن نمونه‌ها اشاره دارد.

پایداری شیمیایی هیدروکسی آپاتیت به مقدار زیادی وابسته به نسبت مولی کلسیم به فسفر است. ثابت شده که هیدروکسی آپاتیت استوکیومتری پایدارتر از غیر استوکیومتری است. نسبت مولی کلسیم به فسفر در هیدروکسی آپاتیت زیستی بین ۱/۶۲ تا ۱/۶۴ است که در استخوان با گذشت زمان این نسبت افزایش می‌یابد [۲۳]. یکی از متداول‌ترین روش‌ها برای شناسایی عنصرهای کلسیم و فسفر و تعیین نسبت آن‌ها با روش EDAX است. در این پژوهش، نمونه S-2 برای این آزمون انتخاب شده است. برای اثبات زیست فعالی این نمونه، ۱، ۲ و ۳ هفته در محلول SBF قرار داده شد.

شکل ۵ طیف‌های EDAX نمونه S-2 پیش و پس از ۳ هفته غوطه‌وری در محلول SBF را نشان می‌دهد. همان‌طور که در شکل مشاهده می‌شود پیک‌های مربوط به کلسیم و فسفر در این طیف‌ها، دلیل بر وجود آن‌ها در نمونه است. در جدول ۳ نسبت مولی محاسبه شده کلسیم به فسفر در هیدروکسی آپاتیت تشکیل شده در کامپوزیت آورده شده است. نسبت مولی کلسیم به فسفر



شکل ۴ تصویرهای میکروسکوپ الکترونی نمونه‌های S-1، S-2 و S-3 پس از غوطه‌وری در محلول SBF

و الگوهای پراش پرتو X، تشکیل فاز معدنی در بستر آلی را تأیید کردند. تصویرهای میکروسکوپ الکترونی و تجزیه عنصری تشکیل و توزیع ذرات نانو هیدروکسی آپاتیت را در بستر زیست‌بسپار تحت روش سنتز در مکان نشان دادند. همچنین، نتیجه‌های به‌دست آمده نشان دادند که ژلاتین بستر مناسبی برای رشد و هسته‌زایی نانوبلورهای هیدروکسی آپاتیت است و افزایش غلظت ژلاتین روی ریخت و اندازه ذرات بلوری هیدروکسی آپاتیت تأثیر مطلوبی داشتند. آزمون زیست‌فعالی نانو کامپوزیت‌ها در محیط آزمایشگاه، رشد نانوبلورها را در محلول SBF تأیید کرد.

جدول ۳ نسبت مولی کلسیم / فسفر در نمونه S-2 پیش و پس از غوطه‌وری در محلول SBF در زمان‌های متفاوت

نسبت مولی کلسیم / فسفر	زمان (هفته)
۱٫۷	۰
۲٫۰	۱
۲٫۲	۲
۲٫۳	۳

نتیجه‌گیری

سنتز درجا نانوکامپوزیت‌ها را می‌توان با روش تقلید زیستی در بستر ژلاتین انجام داد. نوارهای جذبی طیف‌سنجی فرورسرخ

مراجع

- [1] Wang, X.; Nyman, J.S.; Dong, X.; Leng, H.; Reyes, M.; "Fundamental Biomechanics in BoneTissue Engineering", Morgan & Claypool, USA, 2010.
- [2] Zhou, H.; Lee, J.; Acta Biomaterialia, 7, 2769-2781, 2011.
- [3] Chen, L.; Jingxiao, H.; Jiabing, R.; Xinyu, S.; Hua, T.; J. polymer composites, 37, 81-90, 2016.
- [4] Anderson, J.M.; Patterson, J.L.; Vines, J.B.; Javed, A.; Gilbert, S.R.; Jun, H.W.; ACS Nano, 5, 9463-9479, 2011.
- [5] Sundaram, J.; Durance, T.D.; Wang, R.; J. Acta Biomaterialia, 4, 932-942, 2008.
- [6] Aydin, E.; Planell, J.A.; Hasirci, V.; J. Mater. Sci: Mater. Med, 22, 2413-2427, 2011.
- [7] Yousefi, A.M.; James, P. F.; Akbarzadeh, R.; Subramanian, A.; Flavin, C.; Oudadesse, H.; J. Stem. Cells Internationa, 2016, 1-13, 2016.
- [8] Biswas, A.; Bayer, I.S.; Zhao, H.; Wang, T.; Watanabe, F.; Biris, A.S.; J. Biomacromol-ecules, 11, 2545-2549, 2010.
- [9] BQ, L.; QL, H.; XZ, Q.; ZP, F.; JC, S.; J. Acta. Polym. Sin, 6, 828-833, 2002.
- [10] Katti, K.; and Gujjula, P.; "Control of mechanical responses in in-situ polymer/hydroxyapatite composite for bone replacement", Proceedings of the 15th ASCE Engineering Mechanism Conference, Columbia University, New York, 2002.
- [11] Sadjadi, M.S.; Meskinfam, M.; Sadeghi, B.; Jazdarreh, H.; Zare, K.; J. Materials Chemistry and Physics, 124, 217-222, 2010.
- [12] Mollazadeh, S.; Javadpour, J.; Khavandi, A. J.; J. Ceramics International, 33, 1579-1583, 2007.
- [13] Rezaei, A.; Mohammadi, M.R.; J. Mater Sci & Eng C, 33, 390-396, 2013.
- [14] Venkatesan, J.; Kim, S.K.; J. Mar. Drugs, 8, 2252-2266, 2010.
- [15] Liu, L.; Zhang, L.; Ren, B.; Wang, F.; Zhang Q.; J. Artif Cells Blood Substit Immobil Bio-

- technol, 31, 435-438, 2003.
- [16] Aroguz, A.Z.; Baysal, K.; Adiguzel, Z.; Baysal, B.M.; J. Appl Biochem. Biotechnol, 173, 433- 448, 2014.
- [17] Patel, Z.S.; Yamamoto, M.; Ueda, H.; Tabata, Y; Mikos, A.G.; J. Acta Biomater, 4, 1126-1138, 2008.
- [18] W. Xia, W. Liu, L. Cui, Y. Liu, W. Zhong, D. Liu, J. Wu, K. Chua, Y. Cao.; J. Biomed Mater Res B Appl Bio Mater, 71, 373-380, 2004.
- [19] Salam, M.A.; Makki, MS. I; Abdelaal, MY A.; J. Alloys & Compounds 509, 2582- 2587, 2011.
- [20] Chen, L.; Jingxiao, H.; Xinyu, S.; Hua, T.; J. Mater Sci: Mater Med 24:1843-1851, 2013.
- [21] Vardharajula, S.; Ali, S.Z.; Tiwari, P.M.; Eroclu, E.; Vig, K.; Dennis, V.A.; Singh, S.R.; J. Nanomedicine 7, 5361-5374, 2012.
- [22] Kokubo, T.; Kushitani, H.; Sakka, S.; Kitsugi, T.; Yamamuro, T.; J. Biomed Mater Res, 24, 721-734, 1990.
- [23] Brown, B.W.; Brown, P.W.; Constantz, B.; Hydroxyapatite and Related Materials, CRC Press, 1994.

Preparation and characterization of nanocomposite containing hydroxyapatite via biomimetic method in order to use in bone tissue engineering

M. Aslani¹, M. Meskinfam², H.R. Aghabozorg^{3,*}, H. Passdar⁴ and F. Motiee⁵

1. PhD of Inorganic Chemistry, Department of Chemistry, Faculty of Chemistry, North Tehran Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran
2. Assistant Prof. of Inorganic Chemistry, Department of Chemistry, Faculty of Chemistry, Lahijan Branch, Islamic Azad University, Lahijan, Iran
3. Prof. of Inorganic Chemistry, Research Institute of Petroleum Industry, Tehran, Iran
4. Associate Prof. of Inorganic Chemistry, Department of Chemistry, Faculty of Chemistry, North Tehran Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran
5. Assistant Prof. of Applied Chemistry, Department of Chemistry, Faculty of Chemistry, North Tehran Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran

Received: August 2016, Revised: September 2016, Accepted: September 2016

Abstract: In recent years, researchers have used biomaterials for synthesis of composites in order to improve tissue engineering and repair of damaged tissues. In this study, synthesis and characterization of gelatin-carbon nanotube-hydroxyapatite nanocomposite with in situ synthesis method were carried out and the effect of biopolymer concentration was evaluated. Nanocomposites were characterized using infrared spectroscopy (FT-IR), energy dispersive of X- ray (EDAX), X- ray diffraction (XRD), and scanning electron microscopy (SEM) methods. Also, in vitro bioactivity took place by immersion in SBF solution. Based on the results, formation and distribution of nano hydroxyapatite particles as a mineral phase in biopolymer matrix was confirmed. Bioactivity study showed that the gelatin was a suitable matrix for nucleation and growth of the hydroxyapatite nanocrystals, and increasing the concentration of gelatin had an optimum effect on morphology and distribution of nanoparticles.

Keywords: Bone tissue engineering, Bionanocomposite, Biomimetic, Hydroxyapatite