

Research Paper

Structural and Biological properties of Hydroxyapatite scaffold coated with poly (Lactic-co-glycolic) containing Ag doped CuO

Hossein Abbastabar Ahangar^{1*}

1.Department of Chemistry, Najafabad Branch, Islamic Azad University, Najafabad , Iran

Received: 2021.6.1

Revised: 2021.7.4

Accepted: 2021.7.20

Keywords:

Bone tissue, Hydroxyapatite, CuO, antibacterial

Abstract In this paper, prepared hydroxyapatite scaffolds were coated using poly lactic co-glycolic acid and Ag doped CuO to improve their mechanical strength and biological properties.

Introduction: In bone tissue engineering, bone infections due to trauma, congenital malformations, bone tumors, and accidental crushing can be repaired to restore damaged tissue and restore normal function of lost or damaged tissue. Therefore, the use of antibacterial coatings in porous scaffold for use in implants has been developed in recent years. Hydroxyapatite with suitable biological properties can be one of the suitable materials for making porous bodies.

Materials and Methods: In this paper, the effect of Ag doped CuO nanoparticles on antibacterial behavior of hydroxyapatite- Poly lactic-co-glycolic acid scaffold was studied. The synthesized composite was characterized by X-ray diffraction, scanning electron microscopy and Fourier transform infrared spectra. A gram-positive and a gram-negative bacteria are used to assess the disk's antibacterial activity and the disk exhibits acceptable activity against both of them.

Findings: The obtained results showed that Poly lactic-co-glycolic acid-Hydroxyapatite scaffold did not make inhibition zone in culture medium but the modification of Hydroxyapatite- Poly lactic-co-glycolic acid scaffold's surface by Ag doped CuO led to the higher antibacterial inhibition zone of 19 and 29 mm for Escherichia coli and Staphylococcus aureus, respectively.

Conclusion: The highest antibacterial properties were observed by scaffolds modified with Ag doped CuO. These modified scaffolds have good potential for use in bone tissue engineering, including anti-infective applications.

Citation: Hossein abbastabar Ahangar. Structural and Biological properties of Hydroxyapatite scaffold coated with poly (Lactic-co-glycolic) containing Ag doped CuO. Journal of Nanochemistry & Electrochemistry, 2021; **1 (1):** 26- 36.

***Corresponding author:** Hossein Abbastabar Ahangar

Address: Department of Chemistry, Najafabad Branch, Islamic Azad university, Najafabad, Iran

Tell: 09114773786

Email: abbastabar@pmt.iaun.ac.ir

Extended Abstract

Introduction

In bone tissue engineering, bone infections due to trauma, congenital malformations, bone tumors, and accidental crushing can be repaired to restore damaged tissue and restore normal function of lost or damaged tissue. Therefore, the use of antibacterial coatings in porous scaffold for use in implants has been developed in recent years. This has led to the formation of a new field of research called bio-mimicry in a more serious way. Hydroxyapatite with the chemical formula $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6\text{OH}_2$ was first introduced in 1892. Hydroxyapatite was used as a source for phosphate production until its medical use was discovered, but the discovery of its biocompatibility and bioactivity was a breakthrough in biomaterial science. In this study, hydroxyapatite was prepared from calf bone by sponge foam method. The obtained hydroxyapatite scaffold was coated by PLGA polymer and Ag doped CuO at 5 and 10 wt% and finally evaluated in terms of structure and antibacterial properties.

Materials and Methods

The chemical materials were supplied from Merck Chemical Company. The hydroxyapatite scaffold was fabricated by sponge foam method using Polyurethane sponge, carboxymethylcellulose, and sodium triphosphate. Then, the obtained scaffolds coated by Poly lactic-co-glycolic acid to enhance their mechanical strength under vacuum. The PLGA-coated hydroxyapatite scaffold was then immersed in the solution of Ag doped CuO after that placed in a vacuum oven at 50 ° C for 24 hours. An antibiogram, or allergy test, is a method used to determine the susceptibility of microorganisms to antimicrobial agents, chemotherapy, and antibiotics. In order to ensure the non-drug resistance of the bacteria used to perform the antibacterial test, an antibiogram test was used before transferring the coated scaffolds to the bacterial culture medium. For this purpose,

an anti-biogram paper disk containing autoclaved sterilized penicillin antibiotic was placed in sterile conditions with a pair of sterilized forceps on a Mollerhinton agar petri dish containing *Staphylococcus aureus*, then this petri dish was incubated at 37 ° C for 18 The clock was set. The formation of a growth inhibition zone indicates the effect of antibiotics on the bacteria and the lack of drug resistance of the bacteria.

Results & Discussion

Scanning electron microscopy image of the hydroxyapatite PLGA / nanocomposite scaffold has uneven surfaces with high porosity. Also, the porosity was measured using Digi mizer software for 20 samples and averaged 12.99 μm . Scanning electron microscopy image of hydroxyapatite PLGA nanocomposite scaffold / coated with 10% silver-doped copper oxide confirms the presence of nanoparticles coated on the scaffold as crystalline particles on the wall porosity.

In order to investigate the functional groups in PLGA, hydroxyapatite and nanoparticles, as well as how these groups interact with each other, their infrared spectra was used. For this purpose, the infrared spectrum of hydroxyapatite / PLGA composite, hydroxyapatite composite / PLGA and copper oxide as well as hydroxyapatite composite / PLGA and copper oxide doped with 10% silver were taken and compared (Fig. 3). The antibacterial testing of hydroxyapatite and PLGA composite scaffolds coated with copper oxide are shown in Figure 4 and Table 1. It can be seen that the hydroxyapatite and PLGA composite scaffold coated with copper oxide in the culture medium of *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus* has created a growth inhibition halo, which in Figure (4) is a growth inhibition halo in the culture medium of *Escherichia coli* bacteria with a diameter of 15 Mm and in Figure (4-b) in the culture medium of *Staphylococcus aureus* has a diameter of 21 mm.

Conclusion

Hydroxyapatite scaffolds can be prepared by calcination and pyrolysis of animal sources such as bovine bone. The formation of hydroxyapatite with a particle size below 100 nm is confirmed by XRD, FTIR spectra, and SEM. Additives that have antibacterial properties can be fixed on the surface of hydroxyapatite scaffolds. The higher inhibition zone was observed for *Staphylococcus aureus* due to different cell wall structure. These scaffolds modified with copper oxide nanoparticles and silver-doped copper oxide have good potential for use in bone tissue engineering, including anti-infective applications.

Ethical Considerations

Compliance with ethical guidelines

All subjects fulfill the informed consent.

Acknowledgments

We gratefully acknowledge the financial support of this work by Najafabad Islamic Azad University research council

Authors' contributions

Design and conceptualization, methodology, data analysis and final writing: Hossein Abbastabar Ahangar

Conflicts of interest

The author declared no conflict of interest.

مقاله پژوهشی

Structural and Biological properties of Hydroxyapatite scaffold coated with poly (Lactic-co-glycolic) containing Ag doped CuO

نام و نام خانوادگی نویسنده حسین عباس تبار آهنگر
۱. استادیار گروه شیمی، واحد نجف آباد، دانشگاه آزاد اسلامی، نجف آباد ایران

تاریخ دریافت: ۱۴۰۰/۳/۱۱
تاریخ داوری: ۱۴۰۰/۴/۱۳
تاریخ پذیرش: ۱۳۹۹/۴/۲۰

واژه‌های کلیدی:

بافت استخوان، هیدروکسی آپاتیت، اکسید مس، آنتی باکتریال

چ چکیده: داربست‌های مورد استفاده در مهندسی بافت باید علاوه بر عملکرد مناسب، متخلخل، زیست سازگار و زیست تخریب پذیر باشند. در این پژوهش از هیدروکسی آپاتیت حاصل از عملیات شیمیایی و پیرولیز (در دمای ۱۲۰۰ درجه سلسیوس) استخوان ران گوساله ی تازه استفاده شد. ماتریس غیر آلی با ساختار درهم تنیده، منفذدار و هیدروفیلیک تشکیل گردید که بسیار شبیه به استخوان اسفنجی در انسان است. به منظور افزایش استحکام مکانیکی و بهبود خواص بیولوژیکی، داربست‌های هیدروکسی آپاتیت تهیه شده با پلی لاکتیک کوگلایکولیک اسید (۷۵:۲۵) و نانو ذرات اکسید مس داپ شده با نقره ی ۵ و ۱۰ درصد، پوشش دهی شد. داربست‌های پوشش داده شده، در محیط کشت باکتریهای گرم مثبت (استافیلوکوک اورئوس) و گرم منفی (اشرشیاکلی) قرار داده شدند که باعث مهار رشد باکتریها شدند. داربست هیدروکسی آپاتیت پوشش داده شده با PLGA و اکسید مس داپ شده با نقره ۱۰٪ بیشترین تاثیر آنتی باکتریایی را بر مهار رشد باکتری استافیلوکوک اورئوس نسبت به باکتری اشرشیاکلی داشت.

مقدمه و هدف: ساخت داربست های هیدروکسی آپاتیت پوشش داده شده با پلی لاکتیک کوگلایکولیک اسید و اکسید مس داپ شده با نقره

مواد و روش‌ها: مواد مورد استفاده محصول شرکت مرک می باشد و داربست های ساخته شده با استفاده از روش های مختلف طیف سنجی شناسایی شده و خواص آنتی باکتریالی آنها تعیین گردیده است.

یافته‌ها: این داربست ها دارای خواص آنتی باکتریالی و استحکام مکانیکی مناسبی می باشند.

بحث و نتیجه‌گیری: نتایج بدست آمده در این پژوهش پتانسیل مناسب داربست های هیدروکسی آپاتیت پوشش داده شده با پلی لاکتیک کوگلایکولیک اسید و اکسید مس داپ شده با نقره برای استفاده در مهندسی بافت استخوان جهت مقابله با عفونت را دارا می باشد.

مقدمه

های استخوانی جوان و کارآمد به صورت طبیعی در برخی از استخوان های بدن انجام می گیرد (۱). در آسیب ها و له شدگی های شدید استخوانی روند خود نوسازی طبیعی استخوان به تنهایی کارآمد نبوده و معمولاً پیوندهای استخوانی انجام می گیرد. در پیوند استخوان نیز مشکلاتی از قبیل پس زدگی پیوند، التهاب بافت های اطراف، ایجاد واکنش های سمی و از محل خارج شدن استخوان پیوند زده شده به استخوان اصلی وجود دارد (۲). در همین راستا محققان طی دهه اخیر، تصمیم به ساخت داربست‌های نانوکامپوزیتی حاوی نانوهیدروکسی آپاتیت/کلاژن و یا ترکیبات جایگزین این دو جزء اصلی شناخته شده در استخوان طبیعی گرفتند. در چند سال اخیر، رویکرد تحقیقات در کنار

مهندسی بافت یکی از علوم جدید و بین رشته ای است که از اصول علوم زیست شناسی، علم مواد و پزشکی جهت اصلاح بافت زنده آسیب دیده استفاده می نماید تا تجدید، ترمیم و حفظ عملکرد بافت صورت گیرد. در مهندسی بافت، انتخاب نوع و جنس داربست به عنوان یکی از پارامترهای اصلی، مهمترین بخش کار است. داربست شرایط لازم جهت رشد و تکثیر سلولها را فراهم کرده و امکان تشکیل بافت جدید را به وجود می آورد (۱). در بین بافت های بدن، بافت استخوان یکی از بافت هایی است که توانایی بالایی برای تولید مجدد سلول های خود را دارد و در واقع عمل جایگزینی سلول های استخوانی فرسوده با سلول

* نویسنده مسئول: حسین عباس تبار آهنگر

نشانی: استادیار گروه شیمی، واحد نجف آباد، دانشگاه آزاد اسلامی، نجف آباد، ایران

تلفن: ۰۹۱۱۴۷۷۳۷۸۶

پست الکترونیکی: abbastabar@pmt.iaun.ac.ir

زیست سازگاری و خواص فیزیکی، مکانیکی خوب و زیست تخریب پذیری این زیست ماده را مورد توجه ویژه مهندسان بافت و پژوهشگران قرار داده است (۴). نانواکسید مس به دلیل برخورداری از ذرات بسیار ریز و در نتیجه سطح ویژه زیاد کیفیت و کارایی بسیار بالاتری نسبت به اکسید مس معمولی دارد. اکسید مس به عنوان یکی عامل ضد میکروبی بر روی گونه‌های مختلف باکتریایی مورد استفاده قرار گرفته است. اگرچه تنها مطالعات اندکی درباره خواص ضد میکروبی اکسید مس (CuO) گزارش شده با این حال، این گزارش‌ها نشان داده‌اند که نانو ذرات اکسید مس توانایی بالقوه‌ای به عنوان یک عامل ضد باکتریایی دارند (۵). با توجه به پژوهش‌های انجام شده در حال حاضر و مروری بر بررسی‌های قبلی، داربست هیدروکسی آپاتیت پوشش داده شده با PLGA همراه با اکسید مس و نقره داپ شده بر روی آن وجود ندارد. در این پژوهش هیدروکسی آپاتیت از استخوان ران گوساله تهیه شد سپس داربست هیدروکسی آپاتیت به روش اسفنج پلیمری ساخته شد سپس با پلیمر PLGA پوشش داده شد و در آن خلأ خشک گردید. این داربست‌ها با نانو ذرات اکسید مس و اکسید مس داپ شده با نقره در درصد‌های وزنی ۵ و ۱۰ درصد وزنی پوشش داده شد و در نهایت از لحاظ ساختاری و خصوصیات آنتی باکتریال مورد بررسی و ارزیابی قرار داده شد.

گذاشته شد. ۱۰ میلی لیتر آب مقطر روی همزن مغناطیسی به مدت ۵ دقیقه قرار داده شد تا آب گرم شود سپس ۱۰ گرم پودر هیدروکسی آپاتیت سنتز شده کم کم به آب مقطر اضافه شد. پس از مدت زمان ۳۰ دقیقه، ۰/۳ گرم کربوکسی متیل سلولز کم کم به محلول اضافه شد. پس از مخلوط شدن این مواد به مدت زمان ۲۰ دقیقه، سدیم تری پلی فسفات حل شده در آب آرام آرام به محلول فوق در حدی اضافه شد که محلول قوام مناسبی داشته باشد. پس از این فرآیند به تدریج ۱۰ قطعه اسفنج پلی اورتان درون این محلول غوطه ور شد و درون آن به مدت زمان ۲۴ ساعت در دمای ۸۰ درجه سانتی گراد قرار داده شد تا خشک شود. سپس به درون کوره الکتریکی منتقل شد تا با نرخ سرعت گرم شدن ۵ درجه بر دقیقه طی مدت زمان ۲ ساعت به ۶۰۰ درجه سانتی گراد رسید، یک ساعت در این دما نگه داشته شد، دوباره با همان نرخ سرعت گرم شدن به ۱۲۰۰ درجه سانتی گراد رسید و یک ساعت نیز در این دما نگه داشته شد و سپس به دمای محیط رسید (۶). سنتز نانو ذرات اکسید مس

به منظور سنتز نانو ذرات اکسید مس دو محلول A و B تهیه شد: محلول A: ۲/۶۴ گرم نیترات مس سه آبه در ۳۰ میلی لیتر آب مقطر حل شد و سپس به منظور کنترل اندازه ذرات ۲ گرم اسید سیتریک اسید به آن اضافه شد و به مدت زمان ۵ دقیقه روی همزن مغناطیسی قرار داده شد.

استفاده از ترکیبات مشابه بافت های بدن، در جهت بکارگیری فرآیندهای مشابه مکانیزم های بیولوژیکی برای سنتز فامعدنی استخوان معطوف شده است. این موضوع منجر به شکل گیری حوزه جدیدی از پژوهش با عنوان زیست تقلیدی^۱ به شکل جدی تری شده است. هیدروکسی آپاتیت با فرمول شیمیایی $Ca_{10}(PO_4)_6OH_2$ اولین بار در سال ۱۸۹۲ معرفی شد. تا هنگامی که کاربرد پزشکی هیدروکسی آپاتیت کشف نشده بود از آن به عنوان منبعی برای تهیه فسفات استفاده می شد، اما کشف خواص زیست سازگاری و بیواکتیویته آن، انقلابی در علم بیومتریال بود (۳). سرامیک های زیست فعال ترکیب شیمیایی مشابه استخوان دارند لیکن ذاتاً ترد و شکننده اند و به علاوه آهنگ تخریب کم آنها، کاربرد کلینیکی آنها را محدود می کند. از طرف دیگر خواص مکانیکی و آهنگ تخریب بیوپلیمرها را می توان برای کاربردهای مختلف اصلاح کرد. از جمله معروف ترین و پرکاربردترین پلیمرهای زیست تخریب و زیست سازگار در مهندسی بافت و سیستم های رهایش دارو ترکیب دو پلیمر PGA^۲ و PLA^۳ یعنی کوپلیمر پلی لاکتیک کوگلایکولیک اسید^۴ (PLGA) می باشد. این کوپلیمر با نسبت های مختلف از PGA، PLA و با وزن های مولکولی مختلف در دسترس می باشد و مورد تایید سازمان غذا و دارو آمریکا (FDA) است. ویژگی های منحصر به فرد این کوپلیمر از جمله

مواد و روش ها

سنتز پودر هیدروکسی آپاتیت

در این پژوهش از استخوان ران گوساله به عنوان منبع بیولوژیکی تهیه ی هیدروکسی آپاتیت طبیعی استفاده شده است. ابتدا قسمت های اسفنجی استخوان، مغز استخوان و همچنین تکه های گوشت و چربی از قسمت متراکم استخوان جدا شدند. سپس به وسیله ی مشعل قسمت متراکم استخوان حرارت مستقیم داده شد تا ترکیبات آلی آن سوخته و از آن خارج شوند. ماده حاصل به علت دارا بودن کربن ناشی از سوختن، سیاه رنگ گردید. برای خارج کردن این کربن سیاه رنگ استخوان در دمای ۱۲۰۰ °C در کوره الکتریکی به مدت دو ساعت در مجاورت هوا حرارت داده شد. بعد از این فرآیند، استخوان سیاه رنگ به استخوان سفید رنگ تبدیل شد و در نهایت با بالمیل شدن، این استخوان رنگ به پودر سفید رنگ تبدیل گردیده است.

ساخت داربست هیدروکسی آپاتیت

برای ساخت این داربست از اسفنج پلی اورتان، پودر سنتز شده هیدروکسی آپاتیت، کربوکسی متیل سلولز^۷ و سدیم تری پلی فسفات^۸ استفاده گردید. ابتدا اسفنج های پلی اورتان به ابعاد ۱×۱×۱ cm برش داده شد. برای ساخت ۱۰ داربست، ۰/۱ گرم سدیم تری پلی فسفات در ۱۰ گرم آب جوش حل شد، روی آن نایلون کشیده و کنار

5 -Food And Drug Administration of American

6 -Polymer Foam

7 -Carbony Methyl Cellulose

8 -Sodium Tripoly phosphate

1 -Biomimetic

2 -Poly Glycolic Acid

3 -Poly Lactic Acid

4 -Poly Lactic co Glycolic Acid

محلول B: ۳/۶ گرم سود در ۵۰ میلی لیتر آب مقطر حل شد. محلول B به وسیله بورت و به صورت قطره قطره به محلول A افزوده شد. سپس به وسیله سانتریفیوژ نانو ذرات اکسید مس جداسازی شد. اکسید مس بدست آمده با آب مقطر شستشو داده شد و سپس به مدت زمان ۲۴ ساعت در دمای ۸۰-۷۰ درجه سانتی گراد در آن خشک گردید و در نهایت به منظور حذف کامل اسید سیتریک به مدت زمان ۴ ساعت درون کوره الکتریکی در دمای ۵۰۰ درجه سانتی گراد قرار داده شد (۷۸).

آزمایش آنتی بیوگرام

آنتی بیوگرام یا تست حساسیت، روشی است که برای تعیین حساسیت میکرو ارگانیسم ها به عوامل و داروهای ضد میکروبی و شیمی درمانی و آنتی بیوتیک ها بکار می رود. به منظور حصول اطمینان مبنی بر عدم مقاومت دارویی باکتری هایی استفاده شده جهت انجام آزمایش آنتی باکتریال، پیش از انتقال داربست‌های پوشش داده شده به محیط کشت باکتری از تست آنتی بیوگرام استفاده شد. به این منظور دیسک کاغذی آنتی بیوگرام حاوی آنتی بیوتیک پنی سیلین استریل شده توسط اتوکلاو در شرایط سترون توسط پنس استریل شده بر روی پتری دیش کشت مولر هینتون آگار حاوی باکتری استافیلوکوک اورئوس قرار گرفت، سپس این پتری دیش درون انکوبار ۳۷ درجه سانتی گراد به مدت ۱۸ ساعت قرار داده شد. تشکیل هاله عدم رشد نشان از تاثیر آنتی بیوتیک بر روی باکتری و عدم مقاومت دارویی باکتری است (۹).

نتایج و بحث:

بررسی الگوی پراش پرتو اشعه ایکس (XRD)

پراش اشعه‌ی X برای مطالعه‌ی ساختار مواد بلوری استفاده می‌شود. ناحیه‌ی پرتو X در طیف الکترومغناطیس در محدوده‌ی بین پرتو گاما و فرابنفش قرار دارد. با استفاده از این ناحیه‌ی طیفی می‌توان اطلاعاتی در خصوص ساختار، جنس ماده و نیز تعیین مقادیر عناصر بدست آورد. برای یک ماده خالص، الگوی پراش پرتو X، همانند اثر انگشت برای آن ماده است. گسترده‌ترین استفاده XRD در شناسایی ترکیبات کریستالین بر اساس طرح پراش آنهاست. الگوی پراش پرتو X مربوط به نانو ذرات اکسید مس (CuO) و اکسید مس داپ شده با نقره ۱۰ درصد (CuOAg₁₀) در شکل ۱ آورده شده است. نتایج XRD نشان می‌دهد پیک‌های شاخص پراش برای نانوذره اکسید مس در ۳۲/۵°، ۳۵/۳°، ۳۸/۶°، ۴۸/۶° ظاهر شده‌اند و این پیک‌ها با استاندارد اطلاعات پراش CuO (JCPDS file No.45-0937) منطبق می‌باشند. هیچ پیک شاخص دیگری در این طیف از ناخالصی مشاهده نمی‌گردد که تعیین‌کننده‌ی کیفیت و خلوص بالای نانو ذرات اکسید مس تهیه‌شده می‌باشد. از طرف دیگر در ترکیب نانوذره اکسید مس داپ شده با نقره ۱۰ درصد (CuOAg₁₀) پیک مشاهده شده در ۳۸°، ۴۴° و ۷۷/۳° و انطباق آنها با استاندارد اطلاعات پراش Ag (تعیین کننده‌ی حضور Ag در نانو ذره‌ی سنتز شده می‌باشد) (۹).

محلول B: ۳/۶ گرم سود در ۵۰ میلی لیتر آب مقطر حل شد. محلول B به وسیله بورت و به صورت قطره قطره به محلول A افزوده شد. سپس به وسیله سانتریفیوژ نانو ذرات اکسید مس جداسازی شد. اکسید مس بدست آمده با آب مقطر شستشو داده شد و سپس به مدت زمان ۲۴ ساعت در دمای ۸۰-۷۰ درجه سانتی گراد در آن خشک گردید و در نهایت به منظور حذف کامل اسید سیتریک به مدت زمان ۴ ساعت درون کوره الکتریکی در دمای ۵۰۰ درجه سانتی گراد قرار داده شد (۷۸).

سنتز نانو ذرات اکسید مس داپ شده با نقره (۱۰٪)

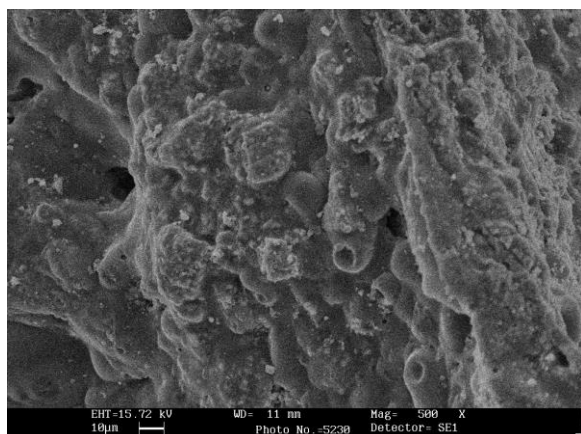
به منظور سنتز نانو ذرات اکسید مس داپ شده با نقره و ۵ درصد دو محلول A و B تهیه شد. محلول A: ۳/۵۹ گرم نیترات مس سه آبه به همراه ۰/۰۷۹ گرم نقره در ۳۰ میلی لیتر آب مقطر حل شد و سپس به منظور کنترل اندازه ذرات ۲ گرم اسید سیتریک به آن اضافه شد و به مدت زمان ۵ دقیقه روی همزن مغناطیسی قرار داده شد. محلول B: ۳/۶ گرم سود در ۵۰ میلی لیتر آب مقطر حل شد. محلول B به وسیله بورت و به صورت قطره قطره به محلول A افزوده شد. سپس به وسیله ی سانتریفیوژ نانو ذرات اکسید مس داپ شده با نقره جداسازی و با آب مقطر شستشو داده شد و سپس به مدت زمان ۲۴ ساعت در دمای ۸۰-۷۰ درجه سانتی گراد در آن خشک گردید و در نهایت به منظور حذف کامل اسید سیتریک به مدت زمان ۴ ساعت در کوره الکتریکی در دمای ۵۰۰ درجه سانتی گراد قرار داده شد. برای سنتز نانو ذرات اکسید مس داپ شده با نقره ۱۰٪ تمام موارد بالا انجام شده و تنها محلول A مقدرًا نمک نقره دو برابر می‌گردد.

پوشش داربست‌های هیدروکسی آپاتیت توسط PLGA

جهت پوشش دهی ۱۰ داربست هیدروکسی آپاتیت، مقدار ۱ گرم PLGA در ۱۵ میلی لیتر دی کلرومتان حل شد. داربست ها یکی یکی به محلول اضافه شد و هر کدام به مدت زمان ۱ دقیقه درون محلول غوطه ور شد. سپس نمونه ها توسط قیف بوختر تحت خلا برای چند ثانیه صاف شدند تا ذرات PLGA داخل منافذ داربست ها وارد شوند. دوباره نمونه ها به مدت ۳۰ ثانیه در محلول PLGA قرار گرفتند تا پوشش دهی کامل شود. داربست‌های پوشش داده شده به مدت زمان ۲ ساعت درون آن خشک در دمای ۸۰ درجه سانتی گراد قرار داده شدند تا کاملاً خشک شوند.

اصلاح داربست‌های هیدروکسی آپاتیت پوشش داده شده توسط PLGA با نانو ذرات اکسید مس داپ شده با نقره

آماده سازی داربست‌های اصلاح شده با نانو ذرات اکسید مس در شرایط استریل و زیرهود لمینار انجام شد. برای آماده سازی ۲ عدد داربست، ۱۰ میلی لیتر آب مقطر و ۲ عدد لوله آزمایش دهانه گشاد از قبل با اتوکلاو استریل شدند. برای هر داربست ۰/۱ گرم نانو ذره اکسید مس داپ شده با نقره در ۵ میلی لیتر آب مقطر درون لوله آزمایش حل شد، سپس داربست هیدروکسی آپاتیت پوشش داده شده با PLGA

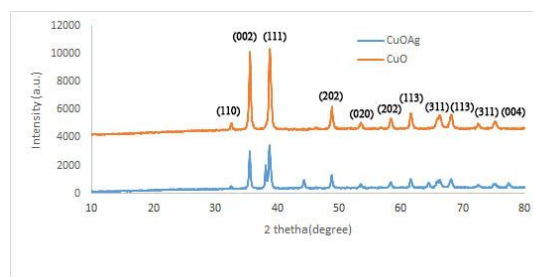


ب

شکل ۲. تصویر میکروسکوپ الکترونی روبشی الف. سطح داربست نانوکامپوزیتی هیدروکسی آپاتیت/PLGA ب. سطح داربست نانوکامپوزیتی هیدروکسی آپاتیت/PLGA پوشش داده شده با اکسید مس داپ شده با نقره ۱۰ درصد

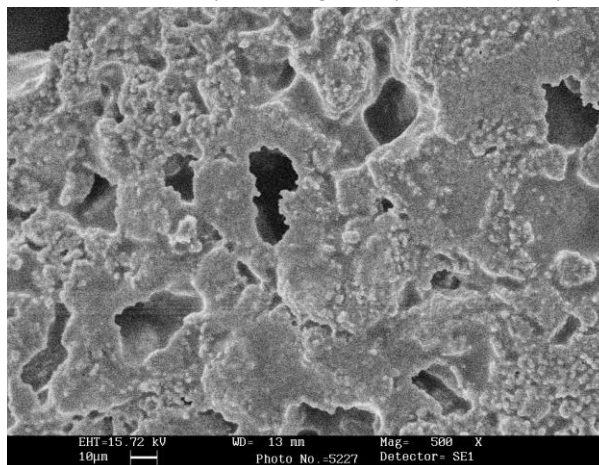
بررسی نتایج طیف فروسرخ FT-IR

به منظور بررسی گروه‌های عاملی موجود در PLGA و هیدروکسی آپاتیت و نانو ذرات و همچنین چگونگی برهم کنش این گروه‌ها با یکدیگر از طیف مادون قرمز آنها استفاده به عمل آمد و به این منظور طیف مادون قرمز کامپوزیت هیدروکسی آپاتیت/PLGA، کامپوزیت هیدروکسی آپاتیت/PLGA و اکسید مس و همچنین کامپوزیت هیدروکسی آپاتیت/PLGA و اکسید مس داپ شده با نقره ۱۰ درصد گرفته شد و در شکل ۳ به صورت مقایسه‌ای با هم ارائه شدند. همانطور که مشاهده می‌شود هر ۳ طیف مادون قرمز، کلیه ی پیک‌های مربوط به فاز آپاتیت نشان داده شده است پیک مشاهده شده در محدوده $629-570 \text{ cm}^{-1}$ مربوط به ارتعاشات چرخشی گروه عاملی PO_4^{3-} و پیک واقع در عدد موجی 1041 cm^{-1} مربوط به ارتعاشات کششی این گروه عاملی است. پیک ظاهر شده در ناحیه 3570 cm^{-1} مربوط به گروه عاملی OH هیدروکسی آپاتیت است. همچنین پیک‌های 1266 cm^{-1} و $1118-1086 \text{ cm}^{-1}$ مربوط به ارتعاشات کششی نامتقارن و ارتعاش کششی متقارن پیوند C-O است. گروه‌های متیل پیک تیزی در 1457 cm^{-1} نشان می‌دهند که ناشی از ارتعاشات کششی این پیوند است. در عدد موجی 1760 cm^{-1} پیک بسیار تیز و واضح مشاهده می‌شود که ناشی از ارتعاش کششی گروه‌های کربونیل است. پیک مربوط به گروه‌های CH موجود در پلیمر در نزدیکی 2999 cm^{-1}

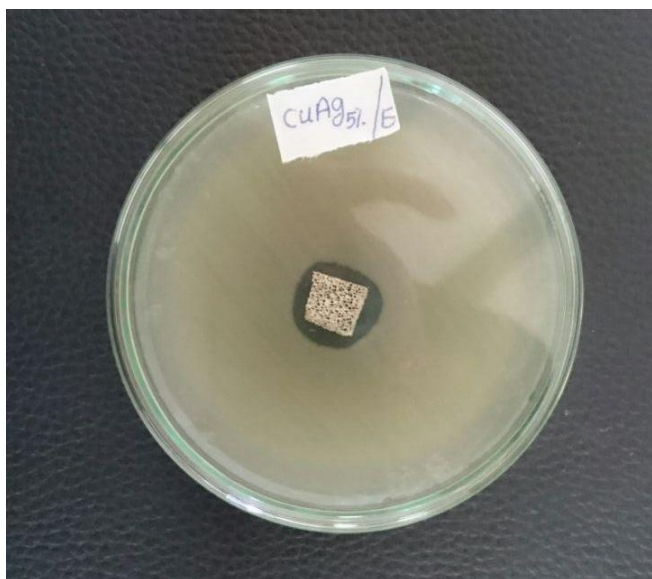


شکل ۱. الگوی پراش پرتو ایکس نانوذرات اکسید مس (CuO) و اکسید مس داپ شده با نقره ۱۰٪ (CuOAg)

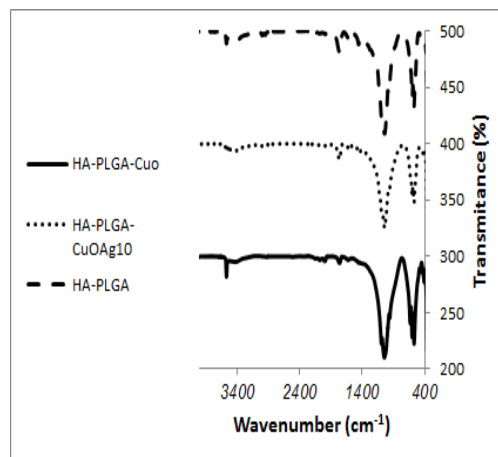
تصویر میکروسکوپ الکترونی روبشی از داربست نانوکامپوزیتی هیدروکسی آپاتیت/PLGA در شکل ۲ آورده شده است. همان‌طور که مشاهده می‌شود داربست نانوکامپوزیتی هیدروکسی آپاتیت/PLGA دارای سطوحی ناهموار همراه با تخلخل می‌باشد. همچنین اندازه‌ی تخلخل‌ها با استفاده از نرم‌افزار Digi mizer برای ۲۰ نمونه اندازه‌گیری و به طور میانگین $12/99$ میکرومتر بدست آمد. تصویر میکروسکوپ الکترونی روبشی از داربست نانوکامپوزیتی هیدروکسی آپاتیت/PLGA پوشش داده شده با اکسید مس داپ شده با نقره‌ی ۱۰ درصد تایید کننده حضور نانو ذرات پوشش داده شده روی داربست به صورت ذرات کریستالی بر دیواره‌ی تخلخل‌ها می‌باشند. اندازه‌ی تخلخل‌ها با استفاده از نرم‌افزار Digi mizer برای ۲۰ نمونه اندازه‌گیری به طور میانگین $9/89$ میکرومتر بدست آمد.



الف



مشهود است. همچنین یک پیک جذبیه پهن با شدت کم در ناحیه $3400-3100 \text{ cm}^{-1}$ متعلق به مد کششی OH موجود در گروه عاملی کربوکسیلیک انتهایی پلیمر PLGA می باشد. از طرف دیگر پیک های جذبی مربوط به نانو ذرات CuO و CuOAg_{10} در ناحیه $630-490 \text{ cm}^{-1}$ نمایان شده اند که با جذب های کششی اکسید های فلزی موجود در هیدروکسی آپاتیت همپوشانی داشته است (۸،۱۰).



شکل ۳. طیف مادون قرمز کامپوزیت هیدروکسی آپاتیت/PLGA کامپوزیت هیدروکسی آپاتیت/PLGA پوشش داده شده با اکسید مس و کامپوزیت هیدروکسی آپاتیت/PLGA پوشش داده شده با اکسید مس داپ شده با نقره ۱۰ درصد.

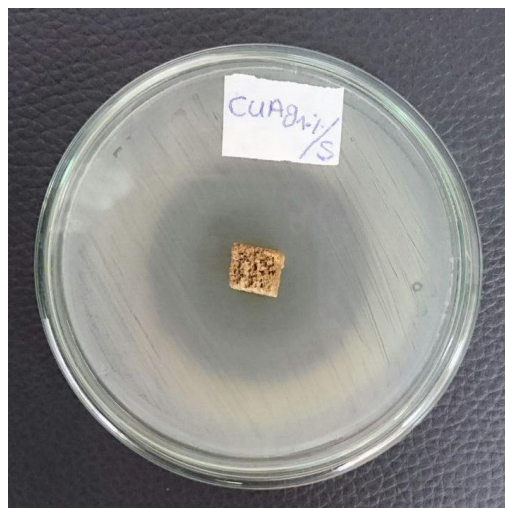
بررسی تاثیرات آنتی باکتریالی داربست های کامپوزیتی

نتایج حاصل از تست آنتی باکتریال داربست های کامپوزیتی هیدروکسی آپاتیت و PLGA پوشش داده شده با اکسید مس در شکل ۴ و جدول ۱ نشان داده شده است. مشاهده می گردد که داربست کامپوزیتی هیدروکسی آپاتیت و PLGA پوشش داده شده با اکسید مس در محیط کشت باکتری های اشرشیاکلی و استافیلوکوک اورئوس هاله ی عدم رشد ایجاد کرده است که در شکل (۴) هاله ی عدم رشد در محیط کشت باکتری اشرشیاکلی قطری برابر ۱۵ میلی متر و در شکل (۴-ب) در محیط کشت باکتری استافیلوکوک اورئوس قطری برابر با ۲۱ میلی متر ایجاد نموده است.

با توجه به نتایج حاصل از بررسی آنتی باکتریال بر روی داربست‌های می توان بیان کرد داربست نانوکامپوزیتی هیدروکسی آپاتیت/PLGA پوشش داده شده با اکسید مس و نقره داپ شده ۱۰٪ بهترین نتیجه خاصیت آنتی باکتریالی را بر محیط کشت باکتری های اشرشیاکلی و استافیلوکوک اورئوس و به خصوص برای باکتری استافیلوکوک اورئوس دارد. این اختلاف به دلیل ساختار متفاوت دیواره سلولی باکتری ها است. ساختار دیواره سلولی باکتریهای گرم منفی (*E. coli*) پیچیده تر از باکتریهای گرم مثبت (*S. aureus*) است. باکتری های گرم مثبت دارای دیواره های سلولی متشکل از پپتیدو گلیکان هستند در حالی که باکتری های گرم منفی دارای دیواره های سلولی تنها با یک لایه نازک از پپتیدو گلیکان و یک غشای خارجی با لیپوپلی ساکارید هستند مولکول های لیپوپلی ساکارید (LPS) از باکتری ها در برابر مواد آنتی باکتریال محافظت می کنند (۱۱-۱۴).

جدول ۱. فعالیت آنتی باکتریال و هاله عدم رشد داربست های کامپوزیتی در برابر باکتری اشرشیاکلی و باکتری استافیلوکوک اورئوس

داربست	قطر هاله عدم رشد باکتری اشرشیاکلی (mm)	قطر هاله عدم رشد باکتری استافیلوکوک اورئوس (mm)
داربست هیدروکسی آپاتیت و PLGA پوشش داده شده با اکسید مس	۱۵	۲۵
هیدروکسی آپاتیت و PLGA پوشش داده شده با اکسید مس و نقره داپ شده ۵٪	۱۹	۲۶
هیدروکسی آپاتیت و PLGA پوشش داده شده با اکسید مس و نقره داپ شده ۱۰٪	۱۸	۲۹



شکل ۴. تصاویر داربست های کامپوزیتی هیدروکسی آپاتیت اصلاح شده با نانوذرات CuO و Ag doped بر روی محیط کشت باکتری اشرشیاکلی و استافیلوکوک اورئوس

مشاهده می گردد که داربست کامپوزیتی هیدروکسی آپاتیت و PLGA پوشش داده شده با اکسید مس داپ شده با نقره ۵ درصد در محیط کشت باکتری های اشرشیاکلی و استافیلوکوک اورئوس هاله عدم رشد ایجاد کرده است، هاله ی عدم رشد در محیط کشت باکتری اشرشیاکلی قطری برابر ۱۹ میلی متر و در محیط کشت باکتری استافیلوکوک اورئوس قطری برابر با ۲۶ میلی متر ایجاد نموده است. مشاهده می گردد که داربست کامپوزیتی هیدروکسی آپاتیت و PLGA پوشش داده شده با اکسید مس و نقره داپ شده ۱۰٪ در محیط کشت باکتری های اشرشیاکلی و استافیلوکوک اورئوس، هاله ی عدم رشد ایجاد کرده است. هاله عدم رشد در محیط کشت باکتری اشرشیاکلی قطری برابر با ۱۸ میلی متر و در محیط کشت باکتری استافیلوکوک اورئوس قطری برابر با ۲۹ میلی متر ایجاد نموده است.

نتیجه گیری

داربست‌های هیدروکسی آپاتیت را می‌توان با کلسینه و پیرولیز کردن منابع حیوانی مانند استخوان گاو تهیه کرد. با توجه به نتایج طیف XRD و FTIR و تصاویر SEM از نانو پودرهای سنتز شده، تشکیل هیدروکسی آپاتیت با اندازه ذرات زیر ۱۰۰ نانومتر تایید می‌شود. افزودنی‌هایی که خاصیت آنتی باکتریال دارند می‌توانند روی سطح داربست‌های هیدروکسی آپاتیت تثبیت شوند. قطر هاله‌ی عدم رشد ایجاد شده توسط داربست‌های اصلاح شده با اکسید مس داپ شده با نقره‌ی ۵ و ۱۰٪ نسبت به داربست‌های هیدروکسی آپاتیت خالص و هیدروکسی آپاتیت اصلاح شده با اکسید مس، در محیط‌های کشت باکتری‌ها بیشتر بوده، بنابراین می‌توان نتیجه گرفت که بیشترین خاصیت آنتی باکتریال توسط داربست‌های اصلاح شده با اکسید مس داپ شده با نقره ۵٪ و ۱۰٪ ایجاد شد. این داربست‌های اصلاح شده با نانو ذرات اکسید مس و اکسید مس داپ شده با نقره پتانسیل خوبی برای استفاده در مهندسی بافت استخوان شامل برنامه‌های کاربردی مقابله با عفونت دارا می‌باشد.

مشارکت نویسندگان

طراحی و ایده پردازی، روش شناسی و تحلیل داده‌ها: و نگارش نهایی: حسین عباس تبار آهنگر

تعارض منافع

بنابر اظهار نویسندگان مقاله حاضر فاقد هرگونه تعارض منافع بوده است.

ملاحظات اخلاقی

پیروی از اصول اخلاق پژوهش

ر مطالعه حاضر، فرم‌های رضایت نامه آگاهانه توسط تمامی آزمودنی‌ها تکمیل شد.

تشکر و قدردانی

نویسنده از معاونت پژوهشی دانشگاه نجف آباد به خاطر حمایت در انجام کار تحقیقاتی حاضر تشکر و قدردانی می‌کند.

References

- Hutmacher D.W. [Scaffolds in tissue engineering bone and cartilage](#). *Biomaterials*. 2000; 21, 2529-2543. doi.org/10.1016/S0142-612(00)00121-6.
- Cassidy J.W. [Nanotechnology in the regeneration of complex tissues](#). *Bone and tissue regeneration insights*. 2014; 25-35. doi: 10.4137/BTRIS12331
- Liu C. Xia Z. Czernuszka J.T. [Design and Development of Three-Dimensional Scaffolds for Tissue Engineering](#). *Chemical Engineering Research and Design*. 2007; 85, 1051-1064. doi.org/10.1205/cherd06196.
- Danhier F. Ansorena E. Silva J.M. Coco R. Le Breton A. Pr at V. [PLGA-based nanoparticles: an overview of biomedical applications](#). *Journal of Controlled Release*. 2012; 161, 505-522. doi.org/10.1016/j.jconrel.2012.01.043
- Das D. Nath B. Phukon P. Dolui S. [Synthesis and evaluation of antioxidant and antibacterial behavior of CuO nanoparticles](#). *Colloids Surfaces B* 2012; 101, 430-433. doi.org/10.1016/j.colsurfb.2012.07.002
- Duhamel C. Bonnetien J.L. Champion Y. [Synthesis and characterization of Ag doped Cu nanoparticles](#). *Journal of Alloys and Compounds*. 2008; 460, 191-195. doi.org/10.1016/j.jallcom.2007.05.064
- Mondal S. Pal U. Dey A. [Natural origin hydroxyapatite scaffold as potential bone tissue engineering substitute](#). *Ceramics International*. 2016; 42, 18338-18346. DOI: 10.1016/j.ceramint.2016.08.165
- Ryu J. Kwon J. Kim K.M. Hong H.J. Koh W.G. Lee J. [Synergistic Effect of Porous Hydroxyapatite Scaffolds Combined with Bioactive Glass/Poly\(lactic-co-glycolic acid\) Composite Fibers Promotes Osteogenic Activity and Bioactivity](#). *ACS Omega*. 2019; 4, 2302-2310. doi.org/10.1021/acsomega.8b02898
- حنیفی آ، فتحی م، ح، روحانی اصفهانی ا. ساخت، مشخصه یابی و ارزیابی مقایسه های زیست فعالی هیدروکسی آپاتیت نانو ساختار، گروه پژوهشی بیومواد، دانشکده مهندسی مواد، دانشگاه صنعتی پیشرفته اصفهان. مواد
- Khan M.Y. Katti D.S. Katti L. Laurencin CT. [Novel polymer-synthesized ceramic composite-based system for bone repair: an in vitro evaluation](#). *J Biomed Mater Res*. 2013; 69A, 728-737.
- Manzano M. Aina V. Arean C.O. Balas F. Cauda V. Colilla M. Delgado M.R. Vallet-Regi M. [Studies on MCM-41 mesoporous silica for drug delivery: Effect of particle morphology and amine functionalization](#). *Chemical Engineering Journal*. 2008; 137, 30-37. doi.org/10.1016/j.cej.2007.07.078
- Fekri M.H. Tousi F. Heydari R. Razavi Mehr M. M. Rashidipour, 2021. [Synthesis of Magnetic Novel Hybrid Nanocomposite \(Fe₃O₄@SiO₂/Activated carbon \(by a Green method and Evaluation of Its Antibacterial Potential](#), *Iranian Journal of Chemistry and Chemical Engineering*. (IN Press). DOI: 10.30492/ijcce.2021.128507.4164.
- رسوی ششده س.ع. رضایی رارچی س. طالبی ر.ع. یآوری م. تاثیر دوزهای مختلف نانو ذرات نقره بر پارامترها، ساختار اسپرم موش. مجله سلول و کروماتین یافت ۱۳۹۴، ۶، ۱۸۵-۱۷۷
- مهدوی راد م، نجف زاده ن، نیاپور ع، جعفری ع، ر. اثرات نقره با ضد سرطانی نانوکامپوزیت اکسید روی و ترکیب نانویی اکسید روی بر سلول های رده سرطانی بدخیم ملانوما. مجله علمی پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی اراک. شماره ۶، شمشه‌ریور، ۱۳۹۳.