

تولید و بررسی خواص داربست نانولیفی کیتوسان حاوی نانوکامپوزیت هیدروکسی آپاتیت/چارچوب فلز-آلی (HAp@MOF) برای کاربردهای مهندسی بافت استخوان

امیرحسین گلستانی^۱، سعید فتاحی^۲، مهدی حسنزاده^{۲*}

^۱ کارشناسی ارشد، دانشکده مهندسی نساجی، دانشگاه یزد، یزد، ایران

^۲ استادیار، دانشکده مهندسی نساجی، دانشگاه یزد، یزد، ایران

m.hasanzadeh@yazd.ac.ir

تاریخ دریافت: ۱۴۰۲/۱۰/۲۶ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۲/۱۲/۲۱

چکیده

در این پژوهش، داربست نانولیفی مبتنی بر کیتوسان حاوی نانوکامپوزیت هیدروکسی آپاتیت/چارچوب فلز-آلی (HAp@MOF) به منظور استفاده در مهندسی بافت تهیه شد. برای این منظور ابتدا نانوکامپوزیت HAp@MOF به روش سنتز درجا چارچوب فلز-آلی تولید و مشخصه‌یابی شد و سپس داربست نانولیفی کیتوسان به کمک روش الکتروسیسی تولید شد. مورفولوژی، ساختار کریستالی، رفتار آبدوستی و همچنین فعالیت ضدباکتری داربست نانولیفی کامپوزیتی CS/PVA-HAp@MOF مورد مطالعه و ارزیابی قرار گرفت. برای این منظور از میکروسکوپ الکترونی روبشی، طیف سنجی مادون قرمز تبدیل فوریه، پراش اشعه ایکس، زاویه تماس آب و آزمون انتشار دیسک استفاده شد. بررسی مورفولوژی داربست نانولیفی کامپوزیتی نشان‌دهنده تولید نانوالیاف یکنواخت و عاری از نقص‌های ساختاری و دانه‌تسبیجی با متوسط قطر ۱۱۳ نانومتر بوده است. همچنین افزودن نانوکامپوزیت HAp@MOF سبب افزایش قطر الیاف تولیدی و افزایش خاصیت آبدوستی با زاویه تماس ۵۷ درجه گردیده است. همچنین بررسی‌های بعمل آمده به منظور بررسی فعالیت ضدباکتری داربست‌های نانولیفی، حاکی از عملکرد مناسب داربست حاوی نانوکامپوزیت HAp@MOF در برابر باکتری گرم مثبت /استافیلوکوکوس اورئوس و باکتری گرم منفی /شرشیاکلی بوده است. نتایج بدست آمده از این تحقیق نشان داد که داربست نانولیفی کامپوزیتی CS/PVA-HAp@MOF می‌تواند بعنوان گزینه مناسب در کاربردهای مهندسی بافت استفاده کرد.

واژه‌های کلیدی: کیتوسان، چارچوب فلز-آلی، نانوالیاف، هیدروکسی آپاتیت، مهندسی بافت استخوان.

Fabrication and characterization of chitosan nanofibrous scaffold containing hydroxyapatite/metal-organic framework (HAp@MOF) nanocomposite for bone tissue engineering applications

Amirhossein Golestani¹, Saeed Fattahi², Mahdi Hasanzadeh^{2*}

¹Master's degree, Faculty of Textile Engineering, Yazd University, Yazd, Iran

²Department of Textile Engineering, Yazd University, P.O. Box 89195-741, Yazd, Iran

m.hasanzadeh@yazd.ac.ir

Abstract

In this study, chitosan-based nanofibrous scaffold containing hydroxyapatite/metal-organic framework (HAp@MOF) nanocomposite was prepared for potential application in tissue engineering. First, HAp@MOF nanocomposite was produced and characterized by *in-situ* synthesis of metal-organic framework, and then chitosan nanofibrous scaffold was produced using electrospinning method. Morphology, crystal structure, hydrophilic behavior and antibacterial activity of CS/PVA-HAp@MOF composite nanofibrous scaffold were studied and evaluated. For this purpose, scanning electron microscope, Fourier transform infrared spectroscopy, X-ray diffraction, water contact angle and disk diffusion test were used. The investigation of the morphology of the composite nanofibrous scaffold showed the production of uniform and bead-free nanofibers with an average diameter of 113 nm. Also, the addition of HAp@MOF nanocomposite has increased the diameter of the fabricated fibers and increased the hydrophilic property with a contact angle of 57 degrees. Moreover, the investigations of antibacterial activity of nanofibrous scaffolds have indicated the appropriate performance of the nanofibrous scaffold containing HAp@MOF nanocomposite against the gram-positive bacteria *Staphylococcus aureus* and the gram-negative bacteria *Escherichia coli*. The obtained results showed that CS/PVA-HAp@MOF composite nanofibrous scaffold can be used as a good candidate for potential tissue engineering applications.

Keywords: Chitosan, metal-organic framework, nanofibers, hydroxyapatite, bone tissue engineering.

۱- مقدمه

مهندسی بافت یک حوزه به سرعت در حال پیشرفت از پزشکی بازساختی است با به کارگیری روش‌های نوین به ارائه یک جایگزین یا بازسازی بافت آسیب دیده با ایجاد موادی با خواص فیزیکی و شیمیایی خاص می‌پردازد [۱]. مهندسی بافت استخوان یکی از نیازهای رایج جراحی ترمیمی و بازسازی بافت به شمار می‌رود که تا کنون تحقیقات گسترده‌ای نیز در این زمینه انجام شده است. پیشرفت‌های اخیر در تحقیقات سلول‌های بنیادی، کاربرد فاکتورهای رشدی و توسعه زیست‌مواد، مهندسی بافت را به شدت تحت تاثیر قرار داده است و راه جدیدی را برای دستیابی به عرضه نامحدود سلول باز کرده است [۲]. مهندسی بافت از طریق کاشت سلول‌های بنیادی در یک محیط سه‌بعدی شرایط رشد آنها را فراهم می‌کند [۳]. فاکتورهای رشدی، پروتئین‌های طبیعی محلول هستند که در فرآیندهای سلولی مختلف مانند رشد، تکثیر، تمایز و مهاجرت نقش دارند. آن‌ها از انواع مختلفی از سلول‌ها مانند ماکروفاژها، فیبروبلاست‌ها و غیره مشتق می‌شوند و از طریق اتصال به گیرنده‌های روی سطح غشای سلولی عملکرد خود را انجام می‌دهند. کاربرد اصلی آن‌ها در بهبود زخم، مهندسی بافت پوست، مهندسی بافت غضروفی و مهندسی بافت استخوان است [۴].

داربست‌های مورد استفاده در مهندسی بافت، نقش اساسی را در رشد سلول‌ها و هدایت ماتریس خارج سلولی (ECM) و مولکول‌های بیولوژیکی و همچنین تشکیل بافت جدید دارد.

این داربست‌ها باید خصوصیات نظیر زیست‌سازگاری، زیست تخریب‌پذیری، ساختار متخلخل، قابلیت چسبندگی و تکثیر سلولی، توانایی القای استخوانی و خواص مکانیکی مشابه بافت استخوان را داشته باشد. در این میان، فرایند الکتروریسی یکی از رایج‌ترین و مناسب‌ترین روش‌ها برای تولید داربست‌های نانولیفی با درصد تخلخل بالا، قطر کم، نسبت سطح به حجم بالا، انعطاف‌پذیری، خواص مکانیکی مطلوب و مناسب برای بسیاری از پلیمرهای زیست‌سازگار و زیست‌تخریب‌پذیر است. مواد مورد استفاده برای تولید داربست‌های نانولیفی مهندسی بافت، مشخصه‌های عملکردی آن را تعیین می‌کند. هنگام انتخاب مواد برای ساخت و طراحی داربست‌های نانولیفی، عواملی مانند شکل، ساختار، وزن مولکولی، شیمی مواد، انرژی سطح، حلالیت، آب‌دوستی، ظرفیت جذب آب، مکانسیم زیست‌تخریب‌پذیری و کاربرد نهایی باید در نظر گرفته شود. تاکنون زیست‌مواد گوناگونی به منظور استفاده در داربست‌های بافت استخوان توسط محققان استفاده شده است که از آن جمله می‌توان به پلیمرهای زیست‌تخریب‌پذیر و زیست‌سازگار، سرامیک‌ها، فلزات، آلیاژها و کامپوزیت‌های آن‌ها اشاره کرد [۵].

هیدروکسی‌آپاتیت (HAp)، نوعی فسفات کلسیم با فرمول شیمیایی $Ca_{10}(PO_4)_6(OH)_2$ است که به دلیل ویژگی‌هایی نظیر غیرسمی بودن، زیست‌فعالی، زیست‌سازگاری عالی، خواص غیرالتهابی، زیست‌تخریب‌پذیری، رسانایی استخوانی و پایداری برای تولید و طراحی داربست‌های مهندسی بافت

استخوان مورد توجه قرار گرفته است [۶]. پایدارترین کلسیم فسفات به شکل کریستالی را می‌توان به دلیل شرایط فیزیولوژیکی هیدروکسی‌آپاتیت به آن نسبت داد. نانوذرات HAp به دلیل میل ترکیبی بالایی که دارند به‌عنوان یکی از امیدوارکننده‌ترین مواد انتقال مولکول‌های زیستی مختلف مانند پروتئین‌ها، هورمون‌ها و انتقال ژن مورد بررسی قرار گرفته‌اند. تاکنون نانوساختار HAp با اشکال مختلف برای برآوردن نیازهای اهداف زیست‌پزشکی از جمله سیستم دارورسانی و ترمیم بافت استخوان طراحی و ساخته شده است [۷]. در این راستا، ساتپاتی^۱ و همکارانش [۸] با هدف تهیه داربست‌هایی برای کاربرد به‌عنوان ماده بازسازی بافت استخوان، نانوذرات هیدروکسی‌آپاتیت (HAp) را بر روی نانوالیاف الکترورسی شده پلی‌وینیل‌الکل و کیتوسان (PVA/CS) تزریق کردند. نتایج بدست آمده توسط این محققان نشان داد که ادغام نانوذرات HAp زیست‌سازگاری و همچنین زیست‌فعالی داربست‌های کامپوزیتی CS/PVA را بهبود می‌بخشد و می‌تواند به‌عنوان گزینه‌ای مناسب برای مهندسی بافت استخوان استفاده شود. ما^۲ و همکارانش [۹] نیز با هدف ایجاد یک داربست کامپوزیتی متخلخل، با استفاده از پلیمرهای طبیعی و مصنوعی و نانوهیدروکسی‌آپاتیت به تقلید از اجزا و ریزساختار استخوان طبیعی پرداختند. این محققان دریافتند که حضور نانوذرات HAp در داربست‌های

کامپوزیتی باعث بهبود مقاومت در برابر فشار، زیست‌فعالی و زیست‌سازگاری می‌شود. در طول دو دهه اخیر، دسته جدیدی از مواد به نام چارچوب فلز-آلی (MOF)، بدلیل برخورداری از تخلخل و سطح مخصوص بالا، دانسیته پایین، تنوع ساختاری زیاد، اندازه حفره نانومتری و حجم حفره بزرگ، مورد توجه محققان قرار گرفته است. این ترکیبات که دسته جدیدی از مواد بلوری و متخلخل هستند، از یون‌های فلزی و لیگاندهای آلی تشکیل شده است و ویژگی‌های هر دو ماده آلی و معدنی را باهم ترکیب می‌کنند. براین اساس، این دسته از نانوساختارهای متخلخل، دارای مزایای فراوانی برای کاربرد در حوزه‌های مختلف از جمله ذخیره‌سازی گاز، کاتالیستی، حسگری، دارورسانی و مهندسی بافت هستند [۱۰-۱۱]. در بین انواع MOFها، چارچوب‌های ایمیدازولات زئولیتی مبتنی بر روی (ZIF-8)، دارای خواص از جمله ذرات با اندازه کوچک، سطح ویژه بالا و عملکرد رهايش پایدار است [۱۲]. در همین لیو^۳ و همکارانش [۱۳]، به بررسی امکان استفاده از ZIF-8 در بهبود مهار باکتری‌های گرم مثبت و منفی با استفاده از ترکیب ZIF-8 با نانوالیاف پلی‌کاپرولاکتون و لیگنین از طریق فرآیند الکترورسی پرداختند. این محققان دریافتند این داربست‌ها برای استفاده در مهندسی بافت استخوان به منظور ترمیم و بازسازی گزینه بسیار مناسبی هستند. به طور مشابه وانگ و همکارانش [۱۴]

¹ Satpathy² Ma³Liu

نیز از طریق تهیه داربست‌های نانولیفی با استفاده از پلی‌کاپرولاکتون و ZIF-8 آنها را جهت استفاده در مهندسی بافت استخوان مورد بررسی قرار دادند. نتایج آزمون‌های سلولی نشان داد که این داربست‌ها زیست‌سازگاری بالایی برای استفاده جهت بازسازی بافت استخوان دارند.

علیرغم تحقیقات فراوان صورت گرفته بر روی استفاده از چارچوب‌های فلز-آلی و هیدروکسی آپاتیت در حوزه مهندسی بافت، تاکنون مطالعه‌ای بر روی نانوکامپوزیت هیدروکسی آپاتیت/چارچوب فلز-آلی (HAp@MOF) و نانوالیاف کامپوزیتی حاوی HAp@MOF در صورت نگرفته است. از اینرو هدف این پژوهش، طراحی و ساخت داربست نانولیفی زیست‌سازگار حاوی نانوکامپوزیت HAp@MOF به‌منظور ترمیم و بازسازی بافت استخوان است. برای این منظور از کیتوسان بعنوان یک پلیمر طبیعی دارای خواص برجسته‌ای از جمله زیست‌سازگاری، زیست‌تخریب‌پذیری و عدم سمیت برای تولید داربست نانولیفی استفاده شد. به منظور افزایش خاصیت ضدباکتری و خواص عملکردی آن برای ترمیم بافت استخوان، از نانوکامپوزیت

HAp@MOF استفاده شد. براین اساس ابتدا چارچوب فلز-آلی ZIF-8 بر روی هیدروکسی آپاتیت به صورت درجا سنتز شد. در ادامه ضمن بررسی ساختار و مورفولوژی نانوکامپوزیت HAp@MOF، داربست نانولیفی کیتوسان حاوی نانوکامپوزیت HAp@MOF سنتز شده به روش الکترورسی تولید گردید. در پایان نیز به مشخصه‌یابی و بررسی خواص

ضدباکتری داربست‌های تولید شده پرداخته شد.

۲- تجربیات

۲-۱- مواد

در این پژوهش هیدروکسی آپاتیت (HAp) سوزنی شکل با قطر ۳۰-۱۰ نانومتر و طول ۲۰۰ نانومتر از شرکت آرمینا ایران تهیه شد. همچنین از نیترات روی ۶ آبه $(\text{Ni}(\text{NO}_3)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O})$ ، بعنوان نمک فلزی و ۲- متیل ایمیدازول (2-MIM) بعنوان لیگاند آلی برای سنتز چارچوب فلز-آلی برپایه روی استفاده شد. به منظور تهیه داربست نانولیفی نیز از پودر کیتوسان (CS) با وزن مولکولی متوسط و پلی‌وینیل‌الکل (PVA) با وزن مولکولی ۶۰۰۰۰ دالتون استفاده شد. متانول و اسید استیک ۹۹٪ نیز بعنوان حلال‌های شیمیایی مورد نیاز در این پژوهش (تهیه شده از شرکت مرک آلمان) مورد استفاده قرار گرفتند.

۲-۲- سنتز نانوکامپوزیت HAp@MOF

برای سنتز چارچوب فلز-آلی ایمیدازولات زئولیتی (ZIF-8)، ۰/۷۵ گرم نیترات روی شش آبه، ۲/۰۷۵ گرم 2-MIM و ۰/۹۲۵ گرم HAp بصورت جداگانه در ۳۰ میلی‌لیتر متانول حل شده و به مدت ۳ ساعت در دمای ۷۰ درجه سلسیوس قرار گرفتند. پس از انحلال کامل، محلول نیترات روی به 2-MIM اضافه گردید و به مدت ۳۰ دقیقه در حمام اولتراسونیک قرار داده شد. سپس محلول HAp به آرامی به محلول ZIF-8 اضافه و به مدت ۳ ساعت بر روی همزن حرارتی قرار داده شد. سپس پودر نانوکامپوزیت HAp@MOF، از طریق سانتریفیوژ با سرعت ۴۰۰۰ دور بر دقیقه و به مدت ۱۵ دقیقه از محلول

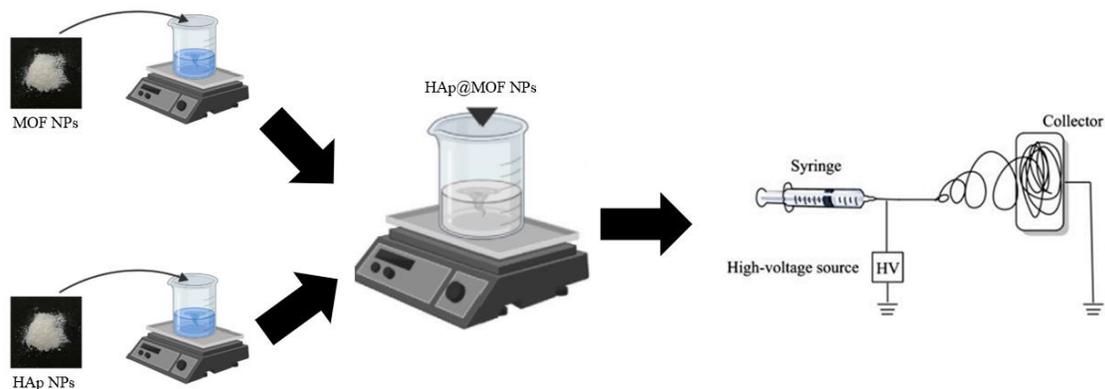
مخلوط شدند. به طور مشابه محلول PVA/CS حاوی ۱٪ نانوکامپوزیت HAp@MOF نیز تهیه و توسط دستگاه الکترورسی (شرکت نانواژما Full Option Lab ES) تولید شدند. فرایند الکترورسی محلول‌های فوق در شرایط ولتاژ ۲۷ کیلوولت، نرخ تغذیه ۰/۱ میلی‌لیتر بر ساعت، فاصله ریسندگی ۱۶ سانتی‌متر و سرعت چرخش ۵۰۰ دور بر دقیقه درام جمع‌کننده صورت گرفت. شکل ۱ شماتیک فرایند تولید داربست‌های نانولیفی CS/PVA-HAp@MOF را نشان می‌دهد.

فوق در طی دو مرحله شستشو با متانول به دست آمد و در دمای ۷۰ درجه سلسیوس داخل به مدت ۳۰ ساعت در آون قرار داده شد.

۲-۲- تولید داربست نانولیفی CS/PVA-

HAp@MOF

به منظور الکترورسی داربست‌های نانولیفی، ابتدا محلول‌های PVA (۱۲wt.%) در آب دیونیزه و CS (۳wt.%) در اسید استیک ۰.۷٪ طور جداگانه تهیه گردید. سپس محلول‌های فوق با نسبت ۵۰:۵۰ کیتوسان (PVA/CS) با هم ترکیب شده و به مدت ۱۰ ساعت در دمای اتاق بر روی همزن مغناطیسی



شکل ۱. شماتیک فرایند تولید داربست‌های نانولیفی CS/PVA-HAp@MOF.

۲-۳- مشخصه‌یابی

در این پژوهش، جهت بررسی مورفولوژی و اندازه ذرات نانوکامپوزیت HAp@MOF و قطر داربست‌های نانولیفی CS/PVA-HAp@MOF تهیه‌شده از میکروسکوپ الکترونی روبشی MITRAIII محصول شرکت TESCAN جمهوری چک استفاده شد. به منظور ممانعت از تجمع الکترون‌ها و ایجاد رسانایی در نمونه‌های مورد بررسی، نانوکامپوزیت و داربست‌های نانولیفی با استفاده از دستگاه پوشش‌دهی کاتانداز (Sputter coater) با اتم‌های طلا پوشانیده شدند. همچنین جهت تایید و تشخیص حضور عناصر موجود در داربست‌های لیفی توسط طیف‌سنجی پراش انرژی پرتو ایکس (EDS) مورد بررسی قرار گرفت. در این پژوهش، برای شناسایی ترکیبات و پیوندهای موجود در داربست‌های نانولیفی CS/PVA-HAp@MOF از آزمون طیف‌سنجی مادون قرمز تبدیل فوری (FTIR) و دستگاه TENSOR 27 محصول شرکت Bruker آمریکا استفاده شد. بررسی ساختار کریستالی نمونه‌های مورد بررسی نیز توسط دستگاه پراش سنج اشعه ایکس (XRD) ساخت شرکت Philips کشور هلند، تحت تابش $Cu K\alpha$ صورت گرفت.

به منظور بررسی رفتار آبگریزی و آبدوستی داربست‌های نانولیفی CS/PVA-HAp@MOF از آزمون زاویه تماس آب (WCA) استفاده شده است. برای این منظور داربست‌های نانولیفی تهیه شده در ابعاد $2 \times 2 \text{ cm}^2$ بریده شده و یک قطره آب مقطر توسط میکروپیت بصورت عمودی در ۵ نقطه از

سطح داربست‌های نانولیفی قرار داده شد. پس از گذشت ۲۰ ثانیه، تصویر قطره توسط دوربین ثبت و زاویه تماس قطره با سطح، اندازه‌گیری شد. در پایان میانگین زاویه تماس آب بر اساس میزان متوسط پنج اندازه‌گیری در نقاط هر داربست گزارش شد.

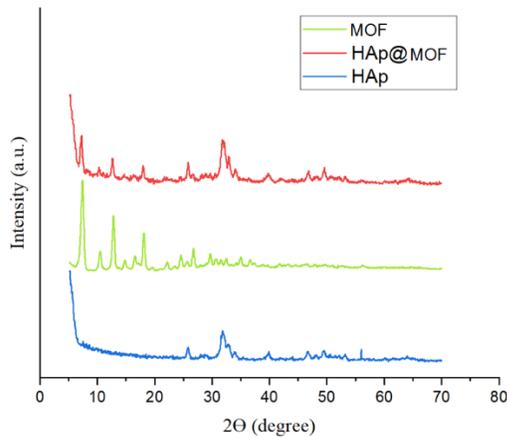
۲-۴- ارزیابی فعالیت ضدباکتری

فعالیت ضدباکتریایی داربست‌های نانولیفی CS/PVA و CS/PVA-HAp@MOF در برابر باکتری‌های استافیلوکوکوس آرنوس (*S. aureus*) و اشرشیاکولی (*E. coli*) به روش انتشار دیسک براساس دو استاندارد CLSI M02- A10 و CLSI M100-S21 مورد ارزیابی قرار گرفت. بدین منظور از سویه‌های باکتری‌های گرم منفی اشرشیاکولی (ATCC 25922) و گرم مثبت استافیلوکوکوس آرنوس (ATCC 25923) استفاده شد. این باکتری‌ها در یک محیط کشت مولر هینتون آگار با غلظتی معادل استاندارد نیم مک‌فارلند ($1.5 \times 10^8 \text{ CFU mL}^{-1}$) و به کمک سواب استریل بر روی پلیت کشت داده شدند. همچنین محلول نمونه‌ها قبل از استفاده در شرایط استریل قرار داده شد. سپس داربست‌های نانولیفی پانچ شده با قطر ۰/۵ میلی‌متر به‌منظور استریل کردن به مدت ۲۰ دقیقه تحت تابش نور UV قرار گرفتند و در نهایت به پلیت حاوی کشت جهت بررسی خاصیت ضدباکتریایی اضافه شدند [۱۵].

۳- نتایج و بحث

HAp@MOF نیز بیانگر وجود صفحات مشترک است که

موید سنتز موفق آن است.

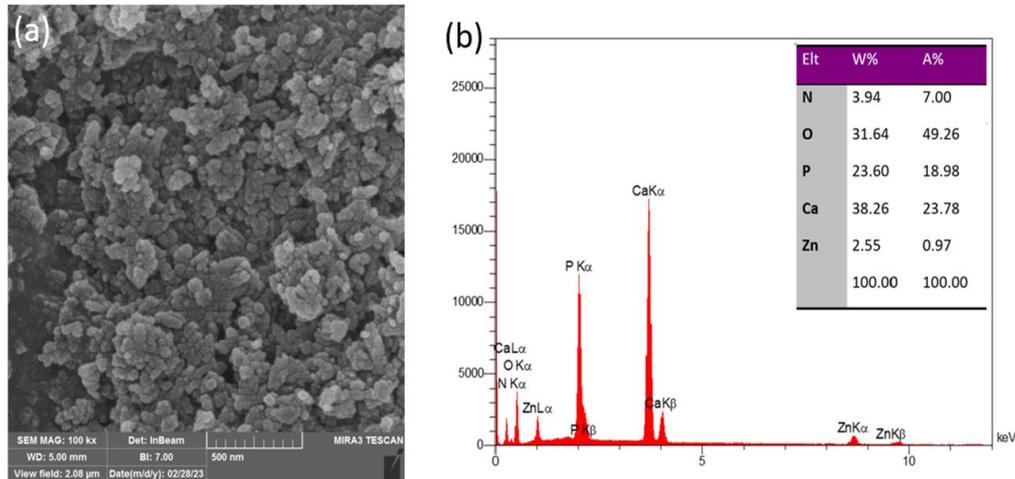


شکل ۲. الگوی پراش پرتو ایکس (XRD) MOF, HAp و نانوکامپوزیت HAp@MOF.

شکل ۳ تصاویر FESEM نانوکامپوزیت HAp@MOF را در بزرگنمایی‌های مختلف نشان داده است. همانطور که مشاهده می‌شود، چارچوب فلز-آلی ZIF-8 بصورت یکپارچه با توزیع اندازه ذرات یکنواخت بر روی هیدروکسی‌آپاتیت سنتز شده است. متوسط اندازه ذرات نانوکامپوزیت HAp@MOF حدود ۵۰ نانومتر است. همچنین طیف EDS بدست آمده از نانوکامپوزیت HAp@MOF (شکل ۳b) نشان‌دهنده وجود عناصر نیتروژن، اکسیژن، فسفر، کلسیم و روی (ZIF-8) دارد.

۱-۳- ارزیابی نانوکامپوزیت HAp@MOF

الگوهای پراش پرتو ایکس چارچوب فلز-آلی ZIF-8، هیدروکسی‌آپاتیت (HAp) و نانوکامپوزیت HAp@MOF در شکل ۲ نشان داده شده است. بررسی‌ها نشان از ساختار کریستالی ترکیبات سنتز شده دارد. پیک‌های مشخصه ZIF-8 در زوایای (2θ) ۷/۳، ۱۰/۳، ۱۲/۸، ۱۴/۸، ۱۶/۵، ۱۸/۱، ۱۹/۷، ۲۲/۲، ۲۴/۶، ۲۵/۷، ۲۶/۸، ۲۸/۹، ۲۹/۸ درجه نشان داده شده است که به ترتیب مربوط به صفحات (۰۱۱)، (۰۰۲)، (۱۱۲)، (۰۲۲)، (۰۱۳)، (۲۲۲)، (۱۲۳)، (۱۱۴)، (۲۳۳)، (۲۲۴)، (۱۳۴)، (۱۲۵) و (۰۴۴) است. بررسی‌های بعمل آمده نشان‌دهنده مطابقت خوب پیک‌های مشاهده شده با مطالعات پیشین است [۱۶]. همچنین الگوهای پراش پرتو ایکس هیدروکسی‌آپاتیت مورد استفاده در این پژوهش نشان می‌دهد که HAp دارای پیک‌های اصلی شامل زوایای (۲) ۲۵/۸، ۲۸/۹، ۳۱/۸، ۳۲/۸، ۳۴/۰، ۳۹/۸، ۴۶/۷، ۴۹/۵، ۵۳/۲ است که به ترتیب به صفحات (۰۰۲)، (۲۱۰)، (۲۱۱)، (۱۱۲)، (۳۰۰)، (۲۰۲)، (۲۲۲)، (۲۱۳) و (۰۴۴) مربوط می‌شوند [۸]. بررسی الگوی پراش پرتو ایکس نانوکامپوزیت



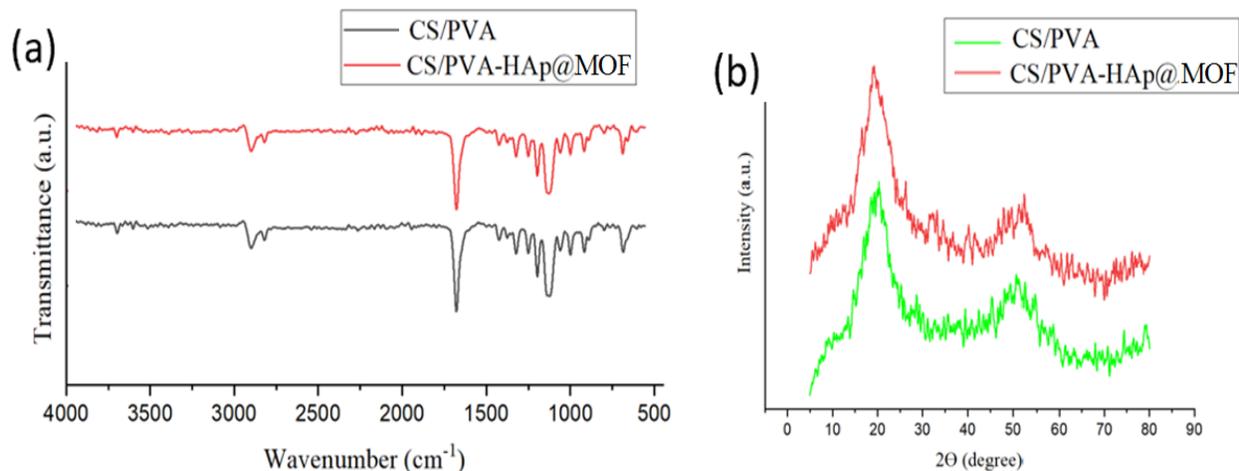
شکل ۳. (a) تصویر میکروسکوپ الکترونی روبشی (FESEM) و (b) طیف پراش انرژی پرتو ایکس (EDS) نانوکامپوزیت HAp@MOF.

HAp@MOF دارد. ارتعاش کششی متقارن و نامتقارن گروه‌های متیلن نیز به ترتیب در 2851 cm^{-1} و 2921 cm^{-1} رخ داده است. برخی از پیک‌های جذبی مربوط به نانوکامپوزیت HAp@MOF با جذب مربوط به گروه‌های عاملی پلیمرهای کیتوسان و PVA همپوشانی داشته است. الگوهای XRD داربست‌های نانولیفی CS/PVA- و CS/PVA- HAp@MOF به منظور بررسی ساختار کریستالی آن‌ها به دست آمد که در شکل ۴b قابل مشاهده است. همانطور که مشاهده می‌شود، ساختار کریستالی داربست‌های نانولیفی کیتوسان پس از نانوکامپوزیت HAp@MOF تغییر چندانی نداشته است که دلیل این امر را می‌توان درصد کم نانوکامپوزیت در نانوالیاف کیتوسان و همچنین برقراری پیوند هیدروژنی بین HAp@MOF و کیتوسان دانست.

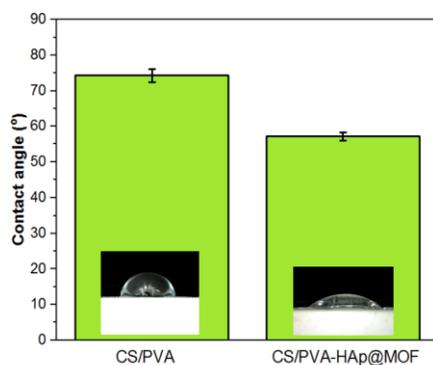
۲-۳- ارزیابی داربست نانولیفی CS/PVA-

HAp@MOF

در شکل ۴a ساختار و پیوندهای شیمیایی داربست‌های نانولیفی CS/PVA و CS/PVA-HAp@MOF به کمک طیف FTIR در محدوده عدد موجی 500 تا 4000 cm^{-1} مورد بررسی و تحلیل قرار گرفته است. پیک قابل مشاهده در 1654 cm^{-1} وجود پیوند شیمیایی C=O را که از ساختار کیتوسان حاصل می‌شود را تایید می‌کند. پیک قابل مشاهده در 1087 cm^{-1} نشان‌دهنده ارتعاش کششی P-O در PO_4^{3-} است [۱۶]. پیک‌های مشاهده شده در ناحیه 1728 cm^{-1} و 1072 cm^{-1} به ترتیب مربوط به ارتعاشات گروه‌های C=O و C-O-C است [۱۷-۱۸]. طیف FTIR داربست نانولیفی CS/PVA- HAp@MOF نشان از وجود گروه‌های کیتوسان و PVA و همچنین گروه‌های عاملی جدید منسوب به نانوکامپوزیت



شکل ۴. (a) طیف مادون قرمز تبدیل فوریه و (b) الگوی پراش پرتو ایکس داربست‌های نانولیفی CS/PVA- و CS/PVA-HAp@MOF



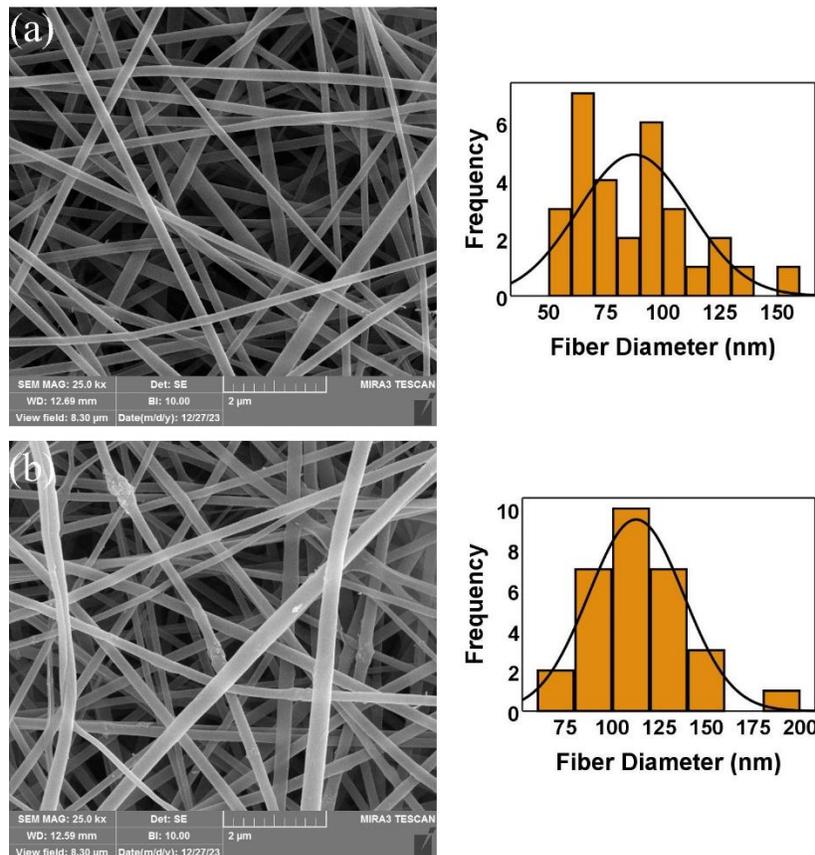
شکل ۵. زاویه تماس قطره آب داربست‌های نانولیفی CS/PVA-HAp@MOF و CS/PVA

شکل ۶ تصویر FESEM داربست‌های نانولیفی و توزیع قطر آن‌ها را نشان می‌دهد. همانطور که مشاهده می‌شود، داربست‌های نانولیفی تهیه شده، دارای ساختار نسبتاً یکنواخت و بدون دانه‌تسبیحی هستند و حضور نانوکامپوزیت HAp@MOF در بین الیاف بخوبی قابل مشاهده است. بررسی توزیع قطر نانوالیاف نیز بیانگر افزایش قطر نانوالیاف با افزودن

نتایج حاصل از آزمون زاویه تماس آب داربست‌های نانولیفی CS/PVA و CS/PVA-HAp@MOF نیز در شکل ۵ نشان داده شده است. همانطور که مشاهده می‌شود، داربست نانولیفی CS دارای زاویه تماس ۷۴/۳ درجه است. این درحالیست که زاویه تماس داربست نانولیفی CS/PVA- HAp@MOF بدلیل افزایش زبری سطح ناشی از حضور نانوکامپوزیت HAp@MOF، به ۵۷/۱ درجه کاهش یافته است. بر این اساس می‌توان نتیجه گرفت که حضور نانوکامپوزیت HAp@MOF در نانوالیاف کیتوسان سبب افزایش آبدوستی می‌شود. در این مطالعه، مورفولوژی داربست‌های نانولیفی CS/PVA و CS/PVA-HAp@MOF با استفاده از میکروسکوپ الکترونی روبشی مورد مطالعه و ارزیابی قرار گرفت.

ویسکوزیته محلول پلیمری و افزایش میزان درهم‌تنیدگی زنجیرهای پلیمری کیتوسان می‌باشد و همچنین حضور نانوکامپوزیت HAp@MOF در ساختار نانوالیاف است [۱۹].

نانوکامپوزیت HAp@MOF به داربست نانولیفی کیتوسان بوده است، بطوریکه قطر نانوالیاف کیتوسان از ۸۷ نانومتر به ۱۱۳ نانومتر افزایش یافت. این افزایش قطر بدلیل افزایش



شکل ۶. تصویر میکروسکوپ الکترونی روبشی و توزیع قطر داربست‌های نانولیفی (a) CS/PVA و (b) CS/PVA-HAp@MOF.

اورئوس (*S. aureus*) و باکتری گرم منفی /شرشیاکلی (*E. coli*)، در ظرف‌های حاوی آگار اندازه‌گیری شد که نتایج آن در جدول ۱ خلاصه گردیده است. شکل ۷ نیز تصویر نمونه‌های مورد مطالعه را در دیسک حاوی باکتری نشان داده است.

۳-۳- فعالیت ضدباکتری داربست نانولیفی

CS/PVA-HAp@MOF

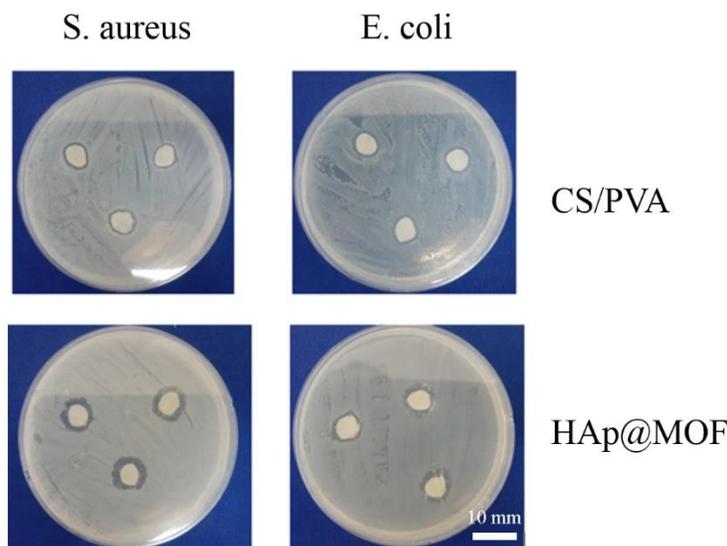
برای بررسی فعالیت ضدباکتریایی داربست‌های الکتروریسی شده CS/PVA و CS/PVA-HAp@MOF، قطر هاله عدم رشد در برابر باکتری گرم مثبت /استافیلوکوکوس

جدول ۱. نتایج آزمون ضدباکتری داربست نانولیفی تهیه شده

میانگین قطر هاله عدم رشد (mm)		نمونه
<i>E. coli</i>	<i>S. aureus</i>	
6.1±0.30	6.4±0.35	CS/PVA
7.8±0.20	8.1±0.35	CS/PVA- HAp@MOF

و در نهایت عملکرد ذاتی آن‌ها را از بین برده و منجر به مرگ باکتری شود [۲۰]. در واقع ماهیت ضدباکتریایی و بهبود خواص نانوساختاری کامپوزیت HAp@MOF، پتانسیل کاربردی این ترکیب را برای توسعه داربست‌های مورد استفاده در مهندسی بافت افزایش داده است. از سوی دیگر بکارگیری آن در شکل نانوالیاف نیز سبب ایجاد خواصی نظیر سطح تماس بالا، تخلخل فراوان و خواص مکانیکی مطلوب گردیده است.

نتایج بدست آمده نشان دهنده فعالیت ضدباکتریایی داربست‌های نانولیفی تولید شده در برابر هر دو نوع باکتری است. علاوه بر این، در مورد داربست‌های نانولیفی کامپوزیتی (CS/PVA-HAp@MOF)، فعالیت بیشتری نسبت به داربست CS/PV مشاهده شد. دلیل این امر وجود کاتیون‌های فلزی (Zn^{2+}) و لیگاند‌های 2-MIM است. فعل و انفعالات الکترواستاتیکی بین یون‌های Zn^{2+} و گروه‌های پروتئینی-SH می‌تواند غشاهای سلولی را به هم ریخته و پراکنده کنند



شکل ۷. تصویر هاله عدم رشد باکتری‌های استافیلوکوکوس اورئوس و اشرشیاکلی داربست‌های نانولیفی.

۴- نتیجه گیری

در این پژوهش، داربست نانولیفی مبتنی بر کیتوسان حاوی نانوکامپوزیت HAp@MOF به روش الکترورسی تهیه شد. برای این منظور ابتدا چارچوب فلز-آلی بر پایه روی (ZIF-8) بصورت درجا بر روی ذرات هیدروکسی آپاتیت سنتز شد و در ادامه در تولید داربست نانولیفی کیتوسان بکار گرفته شد. تأثیر حضور نانوکامپوزیت HAp@MOF بر خواص ساختاری، مورفولوژی و همچنین فعالیت ضدباکتری داربست نانولیفی کیتوسان مورد ارزیابی قرار گرفت. بررسی مورفولوژی داربست نانولیفی کامپوزیتی CS/PVA-HAp@MOF توسط میکروسکوپ الکترونی روبشی نشان دهنده تولید نانوالیاف یکنواخت و عاری از نقص‌های ساختاری و دانه‌تسبیجی بوده است. همچنین بررسی توزیع قطر آنها حاکی از تولید داربست نانولیفی با متوسط قطر الیاف ۱۱۳ نانومتر است. نتایج آزمون زاویه تماس آب نشان دهنده کاهش زاویه تماس و افزایش خاصیت آبدوستی با افزودن نانوکامپوزیت HAp@MOF به

داربست نانولیفی کیتوسان بوده است. همچنین طبق نتایج به‌دست آمده از آزمون انتشار دیسک مشخص شد که نانوکامپوزیت HAp@MOF بخوبی توانسته فعالیت ضدباکتریایی داربست نانولیفی کیتوسان را در برابر باکتری گرم مثبت *استافیلوکوکوس اورئوس* و باکتری گرم منفی *اشرشیاکلی* بطور موثری بهبود بخشد. نتایج بدست آمده از این تحقیق نشان داد که داربست نانولیفی کامپوزیتی CS/PVA-HAp@MOF یک داربست امیدوارکننده برای استفاده جهت بازسازی و ترمیم استخوان است، که این مهم نیازمند مطالعات تکمیلی است. از اینرو بررسی سایر خصوصیات داربست‌های تولید شده نظیر زیست سازگاری، عدم سمیت سلولی و تمایز سلولی در دست اجرا می‌باشد.

۵- تشکر و قدردانی

بدینوسیله از آزمایشگاه تحقیقات دانشکده مهندسی نساجی دانشگاه یزد تشکر و قدردانی می‌گردد.

۶- مراجع

- [1] K. Peranidze, T. V. Safronova, and N. R. Kildeeva, "Fibrous polymer-based composites obtained by electrospinning for bone tissue engineering," *Polymers (Basel)*, vol. 14, 2022
- [2] M. E. Gomes and R. L. Reis, "Tissue engineering: Key elements and some trends," *Macromol Biosci*, vol. 4, 2004.
- [3] K. Hoseini Pajooh, M. Kiani rad & lrm;, and Azadeh. Jafarzadeh & lrm;, "Synthesis of silk fibroin-kitosan nanofibers as tissue engineering scaffold for articular cartilage," *Journal of Textile Science and Technology*, vol. 8, 2019.

- [4] N. Guan, Z. Liu, Y. Zhao, Q. Li, and Y. Wang, "Engineered biomaterial strategies for controlling growth factors in tissue engineering," *Drug Deliv*, vol. 27, 2020.
- [5] L. Suamte, A. Tirkey, J. Barman, and P. Jayasekhar Babu, "Various manufacturing methods and ideal properties of scaffolds for tissue engineering applications," *Smart Materials in Manufacturing*, vol. 1, 2023.
- [6] A. Zare Mehrjardi, hamedeh Rahimnezhad, and S. Rahimnezhad, "Investigating the antibacterial and absorbent properties of disposable masks based on the hydroxyapatite," *Journal of Textile Science and Technology*, vol. 12, 2023.

- [7] N. Salahuddin, E. M. Ibrahim, and M. El-Kemary, "Different Methods for Preparation of Hydroxyapatite Nanostructures," *Biointerface Res Appl Chem*, vol. 13, 2023
- [8] A. Satpathy et al., "Bioactive Nano-Hydroxyapatite Doped Electrospun PVA-Chitosan Composite Nanofibers for Bone Tissue Engineering Applications," *J Indian Inst Sci*, vol. 99, no. 3, pp. 289–302, 2019, doi: 10.1007/s41745-019-00118-8.
- [9] P. Ma, W. Wu, Y. Wei, L. Ren, S. Lin, and J. Wu, "Biomimetic gelatin/chitosan/polyvinyl alcohol/nano-hydroxyapatite scaffolds for bone tissue engineering," *Mater Des*, vol. 207, 2021.
- [10] D. Giliopoulos, A. Zamboulis, D. Giannakoudakis, D. Bikiaris, and K. Triantafyllidis, "Polymer/metal organic framework (MOF) nanocomposites for biomedical applications," *Molecules*, vol. 25, 2020.
- [11] K. K. Gangu, S. Maddila, S. B. Mukkamala, and S. B. Jonnalagadda, "A review on contemporary Metal-Organic Framework materials," *Inorganica Chim Acta*, vol. 446, 2016.
- [12] Z. Shu, C. Zhang, L. Yan, H. Lei, C. Peng, and S. Liu, "International Journal of Biological Macromolecules Antibacterial and osteoconductive polycaprolactone / polylactic acid / nano-hydroxyapatite / Cu @ ZIF-8 GBR membrane with asymmetric porous structure," *Int J Biol Macromol*, vol. 224, 2023.
- [13] R. Liu, Y. Pang, T. Xiao, S. Zhang, Y. Liu, and Y. Min, "Multifunctional PCL composite nanofibers reinforced with lignin and ZIF-8 for the treatment of bone defects," *Int J Biol Macromol*, vol. 218, 2022.
- [14] B. Wang et al., "ZIF-8 induced hydroxyapatite-like crystals enabled superior osteogenic ability of MEW printing PCL scaffolds," *J Nanobiotechnology*, vol. 21, 2023.
- [15] P. Zahedi, I. Rezaeian, S. O. Ranaei-Siadat, S. H. Jafari, and P. Supaphol, "A review on wound dressings with an emphasis on electrospun nanofibrous polymeric bandages," *Polymers for Advanced Technologies*, vol. 21, Feb. 2010..
- [16] E. Lamei and M. Hasanzadeh, "Fabrication of chitosan nanofibrous scaffolds based on tannic acid and metal-organic frameworks for hemostatic wound dressing applications," *Int J Biol Macromol*, vol. 208, May 2022.
- [17] A. Abedi, M. Hasanzadeh, and L. Tayebi, "Conductive nanofibrous Chitosan/PEDOT:PSS tissue engineering scaffolds," *Mater Chem Phys*, vol. 237, Nov. 2019.
- [18] A. Abedi, M. Hasanzadeh, and L. Tayebi, "Conductive nanofibrous Chitosan/PEDOT:PSS tissue engineering scaffolds," *Mater Chem Phys*, vol. 237, 2019
- [19] مظفری، ابولفضل، میرجلیلی، محمد و همکاران. تاثیر تانیک اسید بر خواص نانوالیاف ژلاتین الکتروریسی شده، ۲۰۲۰.
- [20] O. Chiara et al., "A systematic review on the use of topical hemostats in trauma and emergency surgery," *BMC Surgery*, vol. 18, Aug. 29, 2018.