

ساخت و بررسی خصوصیات نانوکامپوزیت rGO/HAp-Sr حاوی گرافن اکسید احیا شده/نانو هیدروکسی آپاتیت/استرانسیوم و تعیین پتانسیل القای تمایز استخوانی نانوکامپوزیت

شبیم عابدین درگوش¹، شیوا ایرانی²، علیرضا نادری سهی³، مسعود سلیمانی⁴، هنا حنایی اهواز^{5*}

1- گروه زیست شناسی، دانشکده علوم پایه، واحد علوم و تحقیقات، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران

2- دانشیار، گروه زیست شناسی، دانشکده علوم پایه، واحد علوم و تحقیقات، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران

3- استادیار، مرکز تحقیقات فناوری سلول های بنیادی، تهران، ایران

4- دانشیار، گروه هماتولوژی، دانشکده علوم پزشکی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران

5- استادیار، مرکز تحقیقات فناوری سلول های بنیادی، تهران، ایران

تلفن: 021-22082120

کد پستی: 199775555

ایمیل: hanafbt@gmail.com

تاریخ پذیرش: 1399/10/17

تاریخ دریافت: 1399/8/6

چکیده:

نانومواد مبتنی بر گرافن به دلیل زیست سازگاری و زیست فعال بودن، همچنین توانایی آنها در بهبود تمایز استخوانی در حوزه کاربردهای زیست پزشکی مورد بررسی قرار می گیرند. در این مطالعه تحقیقاتی، ورق های کاهش یافته اکسید گرافن (rGO) به عنوان ماده پایه که با هیدروکسی آپاتیت و استرانسیوم بارگذاری شده (rGO/HAp-Sr)، جهت القا تمایز استخوان در سلول های بنیادی مزانشیم چربی مورد استفاده قرار گرفت. برای تعیین خواص این نانوکامپوزیت از تکنیک های آنالیز پراش اشعه ایکس XRD و میکروسکوپ الکترونی عبوری TEM (جهت ارزیابی اندازه و مورفولوژی HAp-Sr بر روی صفحات rGO)، مادون قرمز FT-IR (تجزیه و تحلیل گروه های عملکردی نانوکامپوزیت)، طیف سنجی رامان (برای بررسی اختلالات احتمالی در ساختار نانوکامپوزیت و تعداد لایه ها)، طیف سنجی نوری پلاسمای القایی دوتایی ICP-OES (برای ارزیابی غلظت اتمی عناصر Ca و Sr)، پتانسیل زتا (بارالکتریکی نانوکامپوزیت) و MTT (ارزیابی زیست سازگاری نانوکامپوزیت) استفاده شد. پتانسیل استخوان زایی نانوکامپوزیت سنتز شده با استفاده از آزمون بررسی رسوب کلسیم در سلول های بنیادی مزانشیمی مشتق از چربی بررسی و تأیید شد. با توجه به نتایج به دست آمده القا تمایز استخوان با استفاده از نانوکامپوزیت سنتز شده بدون نیاز به القاگرهای شیمیایی میسر می شود.

کلیدواژگان: گرافن اکسید احیا شده، هیدروکسی آپاتیت، استرانسیوم، سلول های بنیادی مزانشیمی

مشتق از چربی، تمایز استخوان سازی

1- مقدمه

مهندسی بافت و پزشکی بازساختی، زمینه‌های تحقیقاتی هستند که نحوه بازسازی اندام‌ها و بافت‌ها را از طریق مسیرهای سیگنالینگ طبیعی و اجزای سازنده ارگانیسم، مانند سلول‌های بنیادی و فاکتورهای رشد ارزیابی می‌کنند [1]. دلایل بالینی متعددی برای انتخاب گزینه مهندسی بافت استخوان وجود دارد، از جمله نیاز به مواد پرکننده بهتر که می‌توانند در بازسازی نقایص ارتوپدی مورد استفاده قرار گیرند و همچنین نیاز به ایمپلنت‌های ارتوپدی که از نظر مکانیکی برای محیط بیولوژیکی مناسب‌تر است. مهندسی بافت استخوان ممکن است به طور بالقوه راه‌حل‌های جایگزینی را ارائه دهد که دارای خواص مکانیکی بهتری از آنچه در حال حاضر استفاده می‌شود، باشد. افزایش جهانی در وقوع شکستگی‌های پاتولوژیک همراه با ریسک‌های جراحی بر اهمیت مهندسی بافت استخوان (BTE) تأکید می‌کند.

سه نکته اصلی در مهندسی بافت شامل: داربست‌ها، سلول‌های بنیادی و فاکتورهای رشد هستند [2]. داربست‌ها برای کشت سلول‌های بنیادی و حمایت از رشد سلول‌ها جهت ساخت بافتی جدید با کمک عوامل رشد طراحی شده‌اند [3].

با استفاده از تکنیک‌های فناوری نانو، ساختارها می‌توانند به همان اندازه شکل طبیعی ساخته شوند. نانوذرات (NPs) به منظور اصلاح داربست‌ها برای دستیابی به خصوصیات بهتر مانند استخواندکشن، استئوکاندکشن و تجمع استخوان‌سازی طراحی شده‌اند [4].

هیدروکسی آپاتیت (HAP) و تری کلسیم فسفات به عنوان نانوذرات بیوسرامیک شناخته می‌شوند که زیست سازگار هستند و در مصارف زیست پزشکی مورد استفاده قرار گرفته‌اند [5]. هیدروکسی آپاتیت $(Ca_{10}(PO_4)_6(OH)_2)$ یکی از اجزای غیرآلی استخوان است که به دلیل زیست فعال بودن زیاد، زیست سازگاری

و نزدیک بودن آن به استخوان طبیعی، می‌تواند به بازسازی استخوان کمک کند و در تثبیت و پر کردن مواد در نقایص استخوانی در کاربردهای پزشکی استفاده شود [6-8]. سرامیک‌های فسفات کلسیم مانند هیدروکسی آپاتیت (HAP) به دلیل شباهت به فاز معدنی استخوان، در پیوند استخوان بسیار مورد استفاده قرار می‌گیرد. علاوه بر این، به نظر می‌رسد، آنها می‌توانند تشکیل یک لایه آپاتیت بیولوژیکی را القا کنند و از این رو به عنوان مواد زیست فعال در نظر گرفته می‌شوند. آپاتیت بیولوژیکی یک آپاتیت بدون کلسیم است که دارای چندین تعویض در شبکه کریستالی آن مانند Fe^{2+} , K^+ , Na^+ , Cl^- , F^- ، Zn^{2+} ، Mg^{2+} و CO_3^{2-} می‌باشد [9].

استرانسیوم (Sr) یک عنصر ردیابی استخوانی است و 98٪ از کل محتوای آن در اسکلت بدن موجود می‌باشد. گزارش شده است که دوزهای پایین می‌تواند تشکیل استخوان را بهبود بخشد، در حالی که دوزهای زیاد باعث نقص در مینرالیزه شدن استخوان می‌شود استرانسیوم در بافت استخوان تجمع یافته و بنابراین می‌تواند به عنوان یک مارکر برای ردیابی استخوان استفاده شود [10، 11]. جایگزینی Sr در HAP ساختار شیمیایی آن را نزدیک‌تر به استخوان طبیعی می‌کند و خواص بیولوژیکی، مکانیکی و ضد باکتریایی آن را افزایش می‌دهد [12، 13]. برای مثال، این جایگزینی بر افزایش بازسازی استخوان، کاهش تحلیل استخوان و پتانسیل آن در درمان پوکی استخوان تأثیر می‌گذارد [9]. از طرف دیگر، در مطالعه‌ای نشان داده شده که افزودن استرانسیوم می‌تواند خطر شکستگی‌های غیر مهره‌ای در زنان یائسه مبتلا به پوکی استخوان را کاهش دهد [14].

گرافن یکی از آلوتروپ‌های کربن فعال است، مکانی که هر اتم کربن در کریستال دو بعدی به سه اتم کربن مجاور دیگر پیوند می‌خورد و یک ساختار آروماتیک شش ضلعی ایجاد می‌کند [7]. کامپوزیت‌های مبتنی بر گرافن به

گلیسرول فسفات، اسید اسکوریک بیس فسفات (Sigma) و همچنین بافت چربی شکم در قسمت سلولی استفاده شد.

سنتز گرافن اکساید

اکسید گرافن (GO) با استفاده از پودر گرافیت، با استفاده از روش اصلاح شده هامر [30] تهیه شد. در این روش، 0/5 گرم پودر گرافیت و 0/5 گرم نیترات سدیم (NaNO_3) در 23 میلی لیتر اسید سولفوریک در دمای صفر درجه سانتی گراد حل شد. سپس 3 گرم KMnO_4 به تدریج به مخلوط اضافه شد و به دنبال آن حرارت تا 35 درجه سانتی گراد افزایش پیدا کرد. در این مرحله دما ثابت مانده است و مخلوط به مدت 4 ساعت هم زده شد. پس از اتمام واکنش، 40 میلی لیتر آب به صورت قطره ای به محلول اضافه شد. سپس برای تکمیل فرایند 100 میلی لیتر آب و 3 میلی لیتر H_2O_2 به محلول اضافه شد. با تشکیل GO، رنگ مخلوط به زرد روشن تبدیل می شود. سوسپانسیون فیلتر شده و با HCl و آب دیونیزه دو بار شسته شد و به دنبال آن یک بار دیگر توسط آب دیونیزه شستشو داده تا pH به 5 نزدیک شود. سرانجام، محلول آبی اکسید گرافیت چندین بار سونیکیت شد تا اکسید گرافن حاصل شود. اکسید گرافن معمولاً با استفاده از روش های شیمیایی، عوامل احیا کننده مانند هیدرازین و تیمارهای حرارتی به منظور حذف گروه های عملکردی حاوی اکسیژن احیا می شود.

بارگذاری استرانسیوم روی نانو هیدروکسی آپاتیت (HAp-Sr)

0/7 گرم دی آمونیوم هیدروژن فسفات $\text{NaH}_2(\text{PO}_4)_2$ ، 1/18 گرم کلسیم نیترات $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ و 0/5 گرم نیترات سدیم (NaNO_3) به ترتیب در 10 میلی لیتر، 5 میلی لیتر و 5 میلی لیتر آب مقطر حل شد. محلول استرانسیوم به

عنوان یک داربست فعال می تواند تمایز سلول های بنیادی مختلف را به سمت بافت های خاص افزایش دهد [15]. ترکیب صفحات اکسید گرافن احیا شده (rGO) با HAP می تواند تمایز استخوانی سلول های بنیادی مزانشیم چربی را افزایش دهد بدون اینکه از تکثیر آنها جلوگیری کند [16، 17]. این افزایش استخوان سازی در مراحل اولیه تمایز توسط نشانگرهایی مانند تعیین فعالیت آلکالین فسفاتاز و در مراحل آخر از طریق اندازه گیری رسوب کلسیم مورد بررسی قرار می گیرد [17]. علاوه بر این، از گرافت rGO / HAP در نقایص استخوانی کلورایال به منظور تقویت بازسازی استخوان جدید بدون هیچگونه پاسخ التهابی استفاده شده است [15]. بنابراین، پیشنهاد شده که rGO / HAP توانایی ارتقا استخوان سازی را داشته و در نتیجه می تواند بازسازی استخوان را تسریع کند.

هدف از این مطالعه سنتز نانوکامپوزیت مبتنی بر گرافن اکسید احیا شده، هیدروکسی آپاتیت و استرانسیوم و بررسی اثر سینرژیک این سه ترکیب به صورت همزمان در القای استخوان زایی بدون استفاده از القا کننده های شیمیایی در سلول های مزانشیم بافت چربی بوده است. بنابراین در این مطالعه نانوکامپوزیت rGO/HAp-Sr با استفاده از روش هیدروترمال ساخته شد زیست سازگاری و پتانسیل نانوکامپوزیت ها در تمایز استئوژنیک سلول های مزانشیم چربی مورد بررسی قرار گرفت.

2- مواد و روش

پودر گرافیت (مش ≥ 200 میکرومتر)، پرمگنات پتاسیم (KMnO_4)، اسید سولفوریک (H_2SO_4)، نیترات سدیم (NaNO_3)، پراکسید هیدروژن (H_2O_2)، نیترات کلسیم ($\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$)، نیترات استرانسیوم ($\text{Sr}(\text{NO}_3)_2$)، دی آمونیوم هیدروژن فسفات $\text{NaH}_2(\text{PO}_4)_2$ از کمپانی Merck در فرایند ساخت شیمیایی مورد استفاده قرار گرفته است. از DMEM، FBS، دگزامتازون، β -

PANalytical company (کشور سازنده: هلند) انجام شد.

آزمون FT-IR جهت بررسی گروه‌های عاملی سطح نمونه در دانشگاه صنعتی امیرکبیر با دستگاه BOMEM/ SRG 1100G انجام شده است.

طیف سنجی رامان با استفاده از Nd-YAG laser در دمای اتاق و طول موج 532 نانومتر انجام شد. طیف سنجی رامان توسط دستگاه طیف‌سنجی رامان Almega Thermo Nicolet Dispersive Raman spectrometer انجام شد.

نمونه‌ها در PBS ریخته شد و برای پتانسیل زتا از Malvern Instrument Ltd-UK استفاده شد.

در طیف سنجی پلاسمای جفت شده القایی (ICP-OES) میزان بارگذاری استرانسیوم و نانو هیدروکسی آپاتیت در نمونه به وسیله Inductivity Coupled Plasma Optical Emission Spectrometry انجام شد. طیف‌سنجی ICP در دانشگاه تربیت مدرس و توسط دستگاه ICP-OES مدل VISTA-PRO (سازنده: Varian-Inc) یاالات متحده) انجام شد.

جداسازی سلول های بنیادی مزانشیم چربی

بافت چربی شکم پس از اخذ رضایت‌نامه کتبی بیمار بر اساس اخلاق دانشگاه علوم پزشکی تهران از بیماران گرفته شد. جداسازی سلول طبق [3] انجام شد. به‌طور خلاصه، بافت با PBS حاوی پنی سیلین / استرپتومایسین شسته شد و سپس با 150 میکروگرم در میلی لیتر کلاژناز نوع I (سیگما) به مدت 40 دقیقه (5٪ CO₂ در دمای 37 درجه سانتی گراد) هضم شد. پس از ختنی سازی و حذف گلبول‌های قرمز با بافر لیز کننده¹، سلول ها سانتریفیوژ شدند و در دمای 37 درجه سانتی گراد و 5٪ CO₂ انکوبه شدند. محیط کشت حاوی 10٪ FBS، پنی سیلین (100 U / میلی لیتر) /

صورت قطره‌ای به محلول نیترات کلسیم اضافه شد تا PH به 11 برسد. سپس، دی آمونیوم هیدروژن فسفات به مخلوط اضافه شد و واکنش با هم زدن محلول به مدت 5 ساعت در دمای اتاق تکمیل شد. سپس محصول حاصل با آب مقطر شسته شد (سانتریفیوژ با دور 3000 g و مدت زمان 10 دقیقه) تا pH به 7 رسیده و در ادامه برای خشک شدن زیر هود قرار داده شد.

سنتز ماده نانوکامپوزیت حاوی گرافن اکساید احیا شده / هیدروکسی آپاتیت - استرانسیوم (rGO/HAp-Sr)

0/1 گرم آپاتیت - استرانسیوم (HAp-Sr) و 0/1 گرم گرافن اکساید (GO) در 40 میلی لیتر آب مقطر در در بشر جداگانه حل شد. سپس، محلول HAp-Sr به آرامی در محلول آبی GO ریخته و مخلوط حاصل به مدت 15 دقیقه هم زده شد. PH مخلوط با استفاده از محلول آمونیاک به حدود 11 رسید. سرانجام، محلول به اتوکلاو تفلون منتقل شده و به مدت 5 ساعت در آون قرار گرفت. سپس نمونه سانتریفیوژ شده و با آب مقطر شسته شد. در هر مرحله شستشو، مواد اضافی دور ریخته می شد تا PH به 7 برسد. محلول حاصل به مدت 24 ساعت در آون در دمای 50 درجه سانتی گراد خشک شد.

مشخصه یابی نانوکامپوزیت rGO/HAp-Sr

برای بررسی مورفولوژی ماده نانوکامپوزیت، محلول آبی rGO/HAp-Sr روی گریدهای مسی پوشیده شده با کربن ریخته شد. سپس به وسیله میکروسکوپ الکترونی TEM مدل Carl Zeiss EM 10 CA در دانشگاه صنعتی خواجه نصیر طوسی بررسی شد.

ساختار بلوری نانوذرات توسط آنالیز XRD با پرتو دهی Cu K α معین شد. این آزمون در دانشگاه شریف و دستگاه XRD مدل X'Pert PRO MPD

های مزانشیم چربی 2×10^4 در سانتی متر مربع در هر چاهک می باشد.

آزمایش رسوب کلسیم جهت اندازه گیری میزان کلسیم انجام شد. از آنجایی که بافت استخوان دارای درصد بالایی از ترکیبات معدنی حاوی کلسیم و فسفات می باشد، یکی از شاخص های دیگری که می تواند نشانگر میزان تمایز استخوانی باشد، میزان رسوب کلسیم خارج سلولی می باشد. بنابراین، ابتدا کل رسوبات معدنی خارج سلولی توسط اسید کلریدریک (HCL) حل می شود و سپس میزان رسوب کلسیم توسط کیت سنجش کلسیم مورد ارزیابی قرار می گیرد. در این آزمایش سلول ها در اسید کلریدریک 0.6 N (Merck) همگن شدند و با دور موتور 1200 در دقیقه و به مدت 5 دقیقه سانتریفیوژ شدند. کلسیم آزاد شده با استفاده از کیت سنجش کلسیم (پارس آزمون) تعیین شد. چگالی نوری در 570 نانومتر خوانده شد (بزارهای BioTek، ایالات متحده آمریکا). با توجه به وجود هیدروکسی آپاتیت در نانوکامپوزیت و احتمال اتصال غیراختصاصی به چاهک ها، سیگنال سنجش شده از چاهک های حاوی محیط نانوکامپوزیت عاری از سلول از تمام نمونه ها کم شد. سرانجام، داده ها در برابر پروتئین کل برای کل گروه ها نرمال شد. اندازه گیری کل پروتئین با استفاده از کیت BCA (Life Technologies) طبق دستورالعمل سازنده انجام شد.

تحلیل آماری

تجزیه و تحلیل آماری با استفاده از نرم افزار prism 5 و GraphPad و تحلیل واریانس یک طرفه (One way Anova) برای مقایسه نتایج انجام شد و سطح معناداری $p < 0.05$ انتخاب شد. هر آزمون حداقل سه بار تکرار شده است.

استرپتومایسین (100 میکروگرم / میلی لیتر) بود. در تمام آزمایش ها از سلول های پاساژ 3 استفاده شد.

زنده مانی سلول ها در حضور ماده نانوکامپوزیت

برای تعیین و بررسی زیست سازگاری نانوکامپوزیت rGO/HAp-Sr از روش MTT استفاده شد. تعداد 3×10^3 سلول بنیادی مزانشیمی در هر یک از چاهک های پلیت 96 خانه به همراه ترکیب 200 میکرولیتر 10% DMEM و 1% FBS پنی سیلین کشت داده شدند. علاوه بر این، غلظت های مختلف های نانوکامپوزیت 1، 3، 5، 7 و 10 میکروگرم در میلی لیتر به هر چاهک اضافه شد تا زیست سازگاری ترکیب و زنده مانی سلول ها در 3 نقطه زمانی روز 1، روز 3 و 7 سنجیده شود. پس از 3 ساعت انکوباسیون در محلول MTT، دی متیل سولفوکسید به هر یک از چاهک ها اضافه شد و چگالی نوری در 570 نانومتر خوانده شد (بزارهای BioTek، ایالات متحده آمریکا).

بررسی میزان رسوب کلسیم در سلول های بنیادی

مزانشیم چربی به همراه ماده نانوکامپوزیت

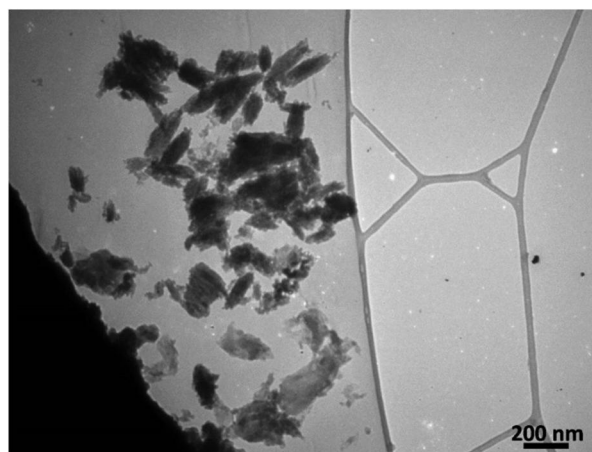
برای مشخص شدن اثر القایی نانوکامپوزیت سه گروه تعریف شد. گروه اول، گروه کنترل مثبت (OM = Osteogenic Medium) می باشد که سلول ها محیط استاندارد تمایز استخوانی (10% DMEM، 7% FBS، 10 میلی گرم دگزامتازون، 10 میلی مولار فسفات b-گلیسرول، 50 میکروگرم / میلی لیتر بیس فسفات اسید اسکوریک) دریافت کردند. در گروه دوم که گروه کنترل نام گذاری شده است (CTL = Control)، سلول ها در محیط پایه DMEM کشت داده شدند و گروه سوم گروه تست می باشد که سلول ها به همراه نانوکامپوزیت ها با غلظت تعیین شده (10-1 میکروگرم در میلی لیتر) به مدت 14 روز تیمار شدند. در این آزمایش تعداد سلول

3- نتایج

میکروسکوپ الکترونی TEM

تصاویر TEM به دست آمده از نانو کامپوزیت rGO/nHAp-Sr در شکل 1 نشان داده شده است. ورق های rGO دارای اندازه تقریبی 2-3 میکرومتر و

کامپوزیت های nHAp-Sr سطوح rGO را تزئین می کنند. همانطور که در شکل مشاهده می شود، نانوکامپوزیت های nHAp-Sr دارای شکل های میله ای با قطر داخلی 100 نانومتر با طول تقریبی 200 نانومتر است. ورق های rGO بیشتر به نظر می رسد که یک لایه هستند.

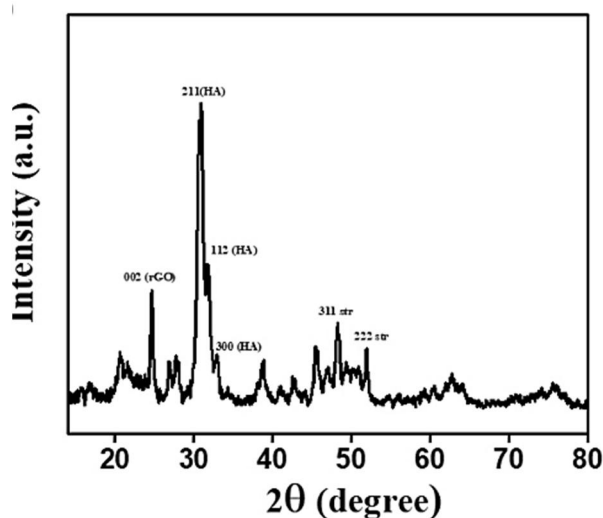


شکل 1- تصویر TEM ماده نانوکامپوزیت، نشان دهنده نانوکامپوزیت های میله ای شکل nHAp-Sr با طول تقریبی 200 نانومتر بر روی ورق های rGO به اندازه تقریبی 2-3 میکرومتر می باشد.

مطالعه ساختار نانوکامپوزیت rGO/HAp-Sr

شکل 2 نشانگر الگوهای XRD در نانوکامپوزیت rGO/HAp-Sr می باشد. همانطور که مشاهده می شود پیک های شاخص XRD مربوط به HAp در 25/9 درجه و 31/9 درجه نشان داده شده که به ترتیب مربوط به صفحات (002) و (211) است. همچنین، پیک های شاخص که در 32/3، 33/0 درجه مشاهده شده اند به ترتیب با صفحات (112)، (300) HAp مربوط هستند. پیک پراش HAp به خوبی با الگوی استاندارد آن (کارت JCPDS با شماره 09-0432) و هیدروکسی آپاتیت

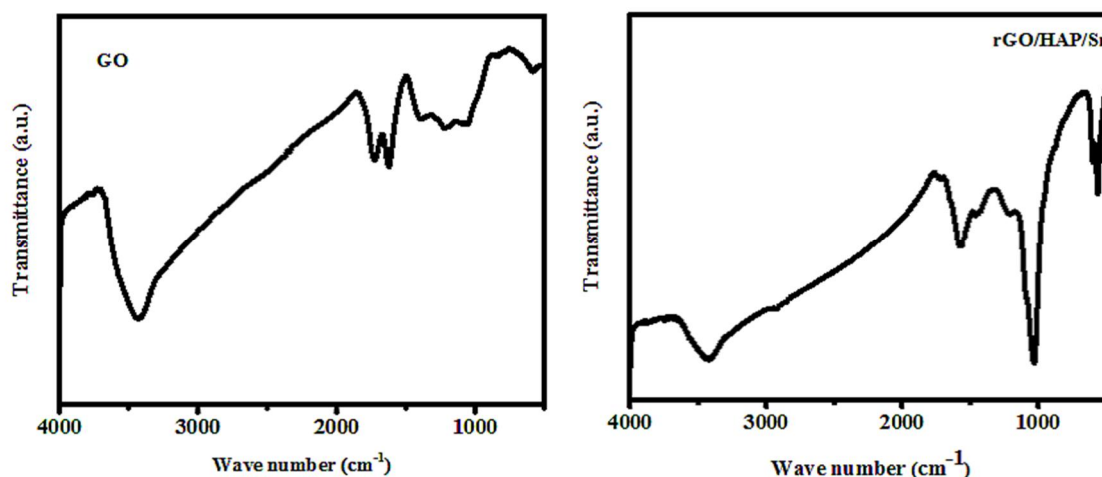
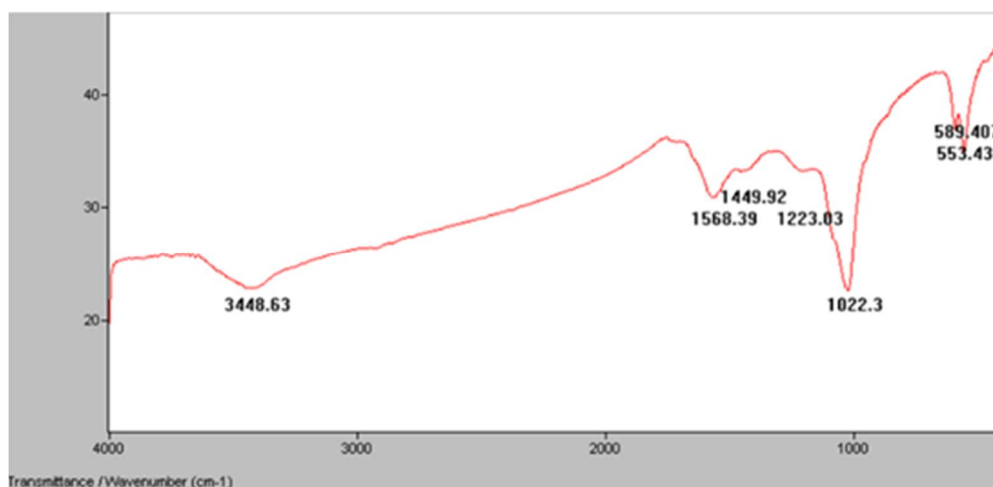
استرانسیم (JCPDS شماره 33-1348) هماهنگ است و نشان می دهد که نانوذرات HAp دارای یک ساختار کریستالی شش ضلعی با خلوص بالا هستند. پیک های شاخص در 48/2 درجه و 52/5 درجه به صفحه های کریستالی (311) و (222) ساختار مکعب شکل استرانسیم (JCPDS 89-4045) اختصاص پیدا می کند. پیک شاخص rGO در 24 درجه قرار داده شده است که نشان دهنده کاهش ورق های GO در 11°~20 است. فضای بین لایه های rGO 0/36 نانومتر محاسبه می شود که مربوط به کریستالی شدن (002) می باشد.



شکل 2- نمودار حاصل از طیف سنجی XRD. با توجه به نتایج بدست آمده از الگوهای XRD نانوکامپوزیت rGO/HAp-Sr مشاهده می شود که پیک های شاخص XRD مربوط به HAp به خوبی با الگوی استاندارد آن هماهنگ بوده و نشان می دهد که نانوذرات HAp دارای یک ساختار کریستالی شش ضلعی با خلوص بالا هستند. پیک های شاخص استرانسیوم به ساختار مکعب شکل آن اختصاص می یابد. پیک شاخص rGO نشان دهنده احیا شدن GO در $11^\circ \sim 2\theta$ است.

nHAp تعلق دارد، از طرف دیگر در نمودار FTIR حاصل از گرافن اکساید (سمت چپ)، دو پیک کنار هم (دو شاخه) ملاحظه می شود که در حدود cm^{-1} $1568/39^1$ و 1700cm^{-1} هستند که به ترتیب متعلق به باند دوگانه کربن ($\text{C}=\text{C}$) و باند کربونیل ($\text{C}=\text{O}$) می باشند. همانطور که ملاحظه می شود، با احیا شدن گرافن اکساید، باند مربوط به گروه کربونیل (cm^{-1} 1700^1) از بین رفته که نشان دهنده احیا شدن گرافن اکساید می باشد و تنها باند مربوط به $1568/39\text{cm}^{-1}$ باقی مانده است [20].

طیف FT-IR نانوکامپوزیت سنتز شده در شکل 3 نشان داده شده است. باندهایی که در $1022/3\text{cm}^{-1}$ ، $1223/03\text{cm}^{-1}$ ، $1449/92\text{cm}^{-1}$ ، $549/407\text{cm}^{-1}$ و $553/438^1$ قرار می گیرند به PO_4^{3-} -HAP نسبت داده می شوند [18]. پیوندهای موجود در $3448/63$ و $1568/39$ سانتی متر در متر مربع مربوط به جذب شدیدی از H_2O است [19]. نوارهای معمول هیدروکسیل در $3448/63$ سانتی متر در متر مربع ظاهر می شوند [20]. همانطور که در نمودار FTIR گزارش شده از نانوکامپوزیت rGO/HAp-Sr مشاهده می شود، باند واضح و شارپ $1022/3\text{cm}^{-1}$ به گروه PO_4^{3-} در



شکل 3 - نمودار حاصل از FTIR. باندهایی که در $553/438 \text{ cm}^{-1}$ ، $549/407 \text{ cm}^{-1}$ ، $1449/92 \text{ cm}^{-1}$ ، $1223/03 \text{ cm}^{-1}$ ، $1022/3 \text{ cm}^{-1}$ مشاهده شده‌اند، به گروه PO_4^{3-} در nHAp تعلق می‌گیرد. دو باند جذبی $3448/63 \text{ cm}^{-1}$ و $1568/39 \text{ cm}^{-1}$ مربوط به شدت جذب H_2O می‌باشد. باندهای هیدروکسیل ($-\text{OH}$) نیز در $3448/63 \text{ cm}^{-1}$ ظاهر می‌شوند. در نمودار FTIR حاصل از گرافن اکساید (سمت چپ)، دو پیک کنار هم (دو شاخه) ملاحظه می‌شود که در حدود $1568/39 \text{ cm}^{-1}$ و 1700 cm^{-1} هستند که به ترتیب متعلق به باند دوگانه کربن ($\text{C}=\text{C}$) و باند کربونیل ($\text{C}=\text{O}$) می‌باشند. همانطور که ملاحظه می‌شود، با احیا شدن گرافن اکساید، باند مربوط به گروه کربونیل (1700 cm^{-1}) از بین رفته که نشان‌دهنده احیا شدن گرافن اکساید می‌باشد و تنها باند مربوط به $1568/39 \text{ cm}^{-1}$ باقی مانده است.

مشاهده می‌شود. موقعیت معمول پیک G برای مواد کربنی تک لایه گزارش شده است که برای صفحات گرافن تک لایه در 1580 سانتی متر می‌باشد، اما در اینجا به 1585 سانتی متر تغییر یافته است که به معنای بیش از یک لایه بودن گرافن می‌باشد. نسبت ID / IG ورق‌های گرافن می‌تواند برای اندازه دامنه sp^2 در ساخت گرافیت باشد که

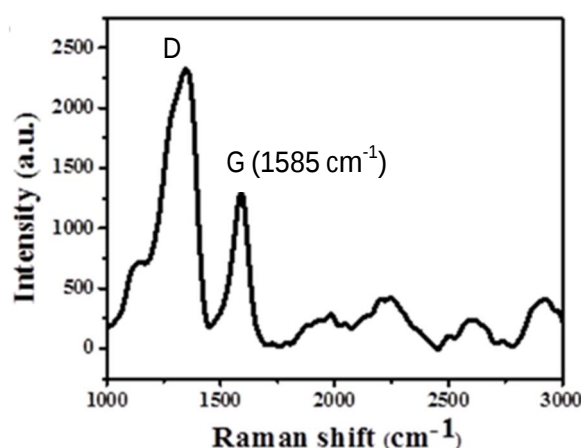
از طیف سنجی رامان برای بررسی بی‌نظمی احتمالی در ساختار گرافن، یافتن تعداد لایه‌های آن [21] و تعیین پیوسته‌های HAp-Sr بر روی سطوح ورق rGO استفاده شد. شکل 4، طیف رامان از مونو هیبریدهای rGO/HAp-Sr را نشان می‌دهد. موقعیت‌های باند دوگانه مربوط به پیوندهای G و D ساختارهای گرافیکی در طیف رامان

شامل پیوندهای sp^2 و sp^3 است. در این مطالعه، نانوکامپوزیت IG / ID در طول موج 532 نانومتر برابر 0/84 سانتی متر برآورد شده است که در مقایسه با اکسید گرافن، کاهش یافته است که نشان دهنده تبدیل اکسید گرافن (GO) به فرم احیا شده (rGO) است. نسبت I_{2D} / I_{IG} تعداد صفحات اکسید گرافن احیا شده را نشان می دهد. برای نانوکامپوزیت rGO/HAp-Sr این نسبت cm^{-1} 0/11 محاسبه شده که بیانگر ساختار چند لایه ای (تقریبی 4 لایه) rGO می باشد.

برای یافتن غلظت اتمی عناصر (Sr و Ca) در نانوکامپوزیت rGO/HAp-Sr از طیف سنجی نوری

پلاسمای القایی دوتایی (ICP-OES) استفاده شد. مقدار Sr و Ca در نانوکامپوزیت ها به ترتیب 7 و 10 درصد وزنی (درصد وزنی) گزارش شده است، به این معنی که حداکثر مقدار آن برای اکسید گرافن کاهش یافته است. این نتایج نشان می دهد که مواد گرافن تقریبی 80 درصد وزنی از نانوکامپوزیت را اشغال کرده است.

پتانسیل Zeta نانوکامپوزیت mV 18/9- محاسبه شده که در مقایسه با GO که دارای پتانسیل زتا mV 40- می باشد، افزایش یافته است. این ویژگی می تواند مربوط به از بین رفتن گروه های عملکردی اکسیژن بر روی سطوح ورق GO و اتصال nHAp-Sr در سطوح rGO باشد.

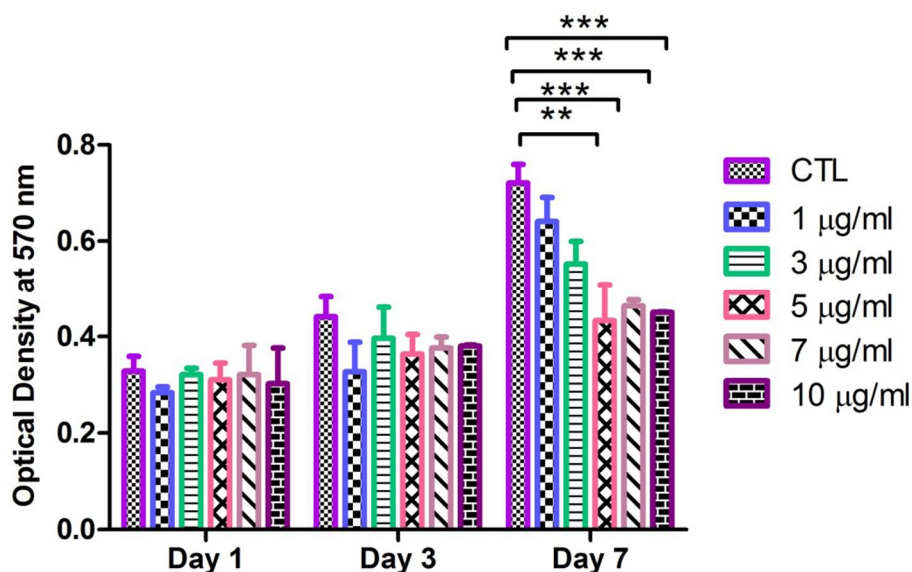


شکل 4- نمودار طیف سنجی رامان. از طیف سنجی رامان برای بررسی اختلالات احتمالی در ساختار گرافن، یافتن تعداد لایه آن و تعیین اتصالات HAp-Sr در سطوح ورقه rGO استفاده شد. موقعیت پیک D و G در رابطه با ماده گرافنی می باشد.

اندازه گیری سمیت سلولی

آزمون MTT برای بررسی زنده ماندن و تکثیر سلول ها در حضور ماده نانوکامپوزیت در طی 7 روز انجام گردید. شکل 5، پاسخ های بیولوژیکی مختلف سلول ها به دوزهای مختلف نانوکامپوزیت را نشان می دهد. به طور کلی می توان مشاهده کرد که هیچ سمیتی در سلول ها در تمام غلظت های مورد مطالعه نانوکامپوزیت در روزهای یکم و سوم وجود ندارد اما در نقاط زمان طولانی تر (روز

7) سمیت سلولی جزئی برای غلظت 3 میکروگرم / میلی لیتر به بعد مشاهده شد. بر این اساس، برای تیمار طولانی مدت سلول ها با این نانوکامپوزیت، غلظت کمتر از 5 میکروگرم در میلی لیتر توصیه می شود. با این حال، کاهش در تکثیر سلولی که برای غلظت های بالاتر نانوکامپوزیت مشاهده می شود، ممکن است به دلیل تمایز نهایی استئوژنیک سلول ها باشد که در محدوده زمانی کوتاه تری رخ داده است.

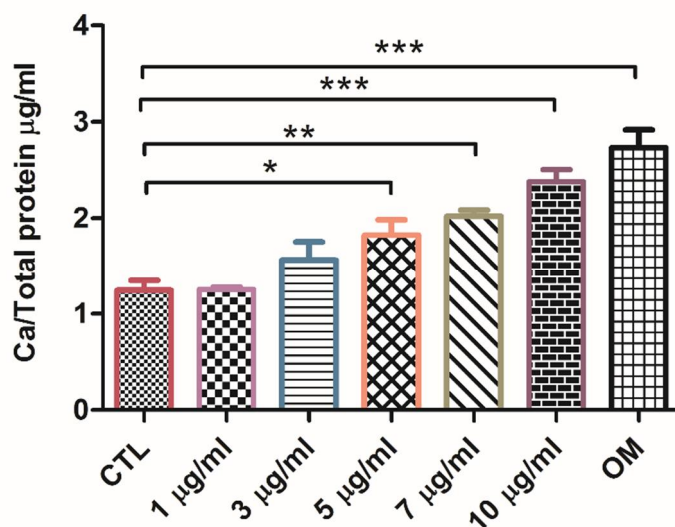


شکل 5- نتایج به دست آمده از تست MTT در روزهای 1، 3 و 7 برای بررسی اثر سمیت نانوکامپوزیت در غلظت های 1، 3، 5، 7، 10 میکروگرم بر میلی لیتر

رسوب کلسیم

بافت استخوان دارای درصد بالایی از ترکیبات معدنی حاوی کلسیم و فسفات می باشد. به همین دلیل یکی از شاخص های نهایی و بالینی که نشانگر میزان تمایز استخوانی باشد، میزان رسوب و ترشح کلسیم توسط سلول می باشد. محتوای کلسیم به عنوان نشانگری جهت توانایی القا استخوان در هر تیمار اندازه گیری شد. همانطور که در شکل 6 ارائه شده است، در مقایسه با گروه کنترل و گروه دارای محیط استئوژنیک (OM)،

نانوکامپوزیت در تمام غلظت ها منجر به رسوب کلسیم و تمایز استخوان سازی می شوند. علاوه بر این، زمانی که سلول ها در معرض غلظت بالاتری از نانوکامپوزیت قرار می گیرند، رسوب کلسیم بیشتری مشاهده می شود. علاوه بر این، بر اساس نتایج به دست آمده، وجود نانوکامپوزیت به تنهایی برای القا تمایز استخوان در سلول کافی است. علاوه بر این، در محدوده 5 تا 10 میکروگرم / میلی لیتر از نانوکامپوزیت، تفاوت معنی داری در میزان کلسیم رسوب شده مشاهده نشد.



شکل 6- رسوب کلسیم، در مقایسه با گروه کنترل (CNT) و OM (محیط اوستوژنیک)، نانوکامپوزیت ها (NC) در تمام غلظت ها منجر به رسوب کلسیم و تمایز استخوان سازی می شوند.

بحث

بازسازی استخوان تعادل فعالیت بین دو گروه مختلف سلول استئوکلاست و استئوبلاست است که به ترتیب در تجزیه و رسوب استخوان نقش دارند [22]. بازسازی بافت استخوان یکی از اصلی ترین چالش ها در زمینه مهندسی بافت می باشد. عوارض آناتومیک استخوان با فشار مکانیکی زیاد که در معرض آن است، آن را به بافتی منحصر به فرد تبدیل کرده است [22]. در سال های گذشته، استفاده از نانوذرات در زمینه مهندسی بافت، بیوتکنولوژی و پزشکی زیستی به میزان قابل توجهی افزایش یافته است.

یکی از دلایل اصلی این است که نانوذرات در مقایسه با طب رایج توانایی ایجاد کاربردهای فناوری جدید را دارند [23]. نانوذرات مختلفی در تحقیقات مهندسی بافت استخوان مورد استفاده قرار می گیرند که شامل گروه آلی (لیپوزوم ها، NP های پلیمری، دندریمرها) و گروه غیر آلی (NP های سیلیکا، NP های طلائی، NP های مغناطیسی، NP های سرمایی، نانولوله های کربنی) می باشد [23]. در

این مطالعه، ورق های اکسید گرافن احیا شده (rGO) به عنوان ماده پایه انتخاب شده که با هیدروکسی آپاتیت و استرانسیوم بارگذاری شده و میزان زیست سازگاری و میزان رسوب کلسیم در اثر تیمار سلول های بنیادی مزانشیم چربی با تیمار نانوکامپوزیت سنتز شده rGO/HAp-Sr مورد بررسی قرار گرفت.

یکی از دلایل استفاده از گرافن ویژگی های منحصر به فرد آن می باشد. پیوندهای σ (پیوندهای C-C) باعث ماهیت به طور کامل مسطح گرافن شده و خصوصیات مکانیکی قوی آن را تعیین می کنند. خصوصیات الکتریکی، مکانیکی و فیزیکی منحصر به فرد گرافن مانند سختی بالاتر از الماس، هدایت حرارتی نزدیک به سیزده برابر مس، مدول الاستیک تا 1 Tpa و شفافیت نوری خوب در حدود 97/7% انتقال باعث ایجاد ترکیب با سایر پلی مرها جهت تقویت ویژگی های آنها می شود [24]. گرافن را می توان با مواد دیگری مانند پلی مرهای مصنوعی یا طبیعی مخلوط کرد تا خواص مکانیکی و الکتریکی آنها تقویت شود. گرافن همچنین می تواند به راحتی از طریق تعامل فیزیکی با ترکیبات فعال زیستی مانند پروتئین ها، آنزیم ها،

داروها، فاکتورهای رشد و DNA قابل عملکرد باشد. برای افزایش خاصیت هدایت الکتریکی GO محلول در آب، rGO می‌تواند با احیا شدن GO از طریق فرایندهای قرار گرفتن در معرض حرارتی، شیمیایی یا UV تولید شود. میزان اکسیژن‌های سطحی در rGO تولید شده کاسته شده و به دلیل این که هیدرازین از بین رفته و تجزیه شده است، خاصیت آگریزی کمتری دارد و برای کاربردهای بیولوژیکی مفید است [25]. زیست سازگازی گرافن به غلظت، اندازه ذرات و زمان در معرض قرار گرفتن بستگی دارد. بسیاری از مطالعات حاکی از آن است که غلظت زیاد گرافن باعث ایجاد سمیت می‌شود [26].

مواد زیستی حاوی استرانسیم به‌طور فزاینده‌ای برای کاربردهای ارتوپدی در حال توسعه است. اعتقاد بر این است که آزاد شدن استرانسیم از سطح بیومتریال در محیط فیزیولوژیکی باعث تکثیر، تمایز سلول و افزایش فعالیت متابولیکی استئوبلاست‌ها می‌شود [27]. مطالعات قبلی نشان داده است که دوزهای کم استرانسیم باعث افزایش کانی استخوان می‌شود و دوزهای بالا اثر منفی دارند [28]. مکانیسم مولکولی به خوبی درک نشده است، اگرچه مطالعات مختلف *in vitro* نشان داده است که داپینگ Sr در HAP باعث ایجاد تمایز و تکثیر استئوبلاست‌ها می‌شود و همچنین از طریق فعال کردن گیرنده سنجش کلسیم می‌تواند باعث تحریک آنژیوژنز و متعاقباً استخوان سازی هم می‌شود [29]. در یک مطالعه در سال 2006 [30]، به بررسی فعالیت زیستی در شرایط *in vitro* هیدروکسی آپاتیت حاوی استرانسیم (Sr-HAP) و تأثیر آن بر چسبندگی سلولی، تکثیر و تمایز پرداخته شد. همچنین به مقایسه اثر Sr-HAP و هیدروکسی آپاتیت (HAP) پرداخته شده و ملاحظه شده که Sr-HAP باعث اتصال بهتر و تکثیر بیشتر سلول‌های پیش‌ساز استخوان شده و هیچ اثر مضر در تشکیل ماتریکس خارج سلولی و مینرالیزه شدن نشان نداد و به‌طور گسترده‌ای در

ارتوپدی و دندانپزشکی استفاده می‌شود. همچنین حضور یون استرانسیم باعث تحریک تمایز سلول‌های پیش‌ساز استخوان و بیان ALP می‌شود. در تحقیق دیگری در سال 2016 [10] به بررسی تأثیر داپینگ استرانسیم (Sr) بر هیدروکسی آپاتیت (HAP) پرداختند و نتیجه تحقیقات نشان داد که استرانسیم باعث تشکیل استخوان و باعث کاهش جذب استخوان می‌شود و می‌توان از آن جهت تحریک استخوان‌سازی استفاده شود. در سال 2015، لی² و همکارانش، به بررسی تأثیر نانوکامپوزیت‌های اکسید گرافن احیا شده و هیدروکسی آپاتیت (rGO/HAP) در تقویت استئوژنز در سلول‌های پیش ساز استئوبلاست MC3T3-E1 و ارتقا تشکیل استخوان جدید پرداختند. هنگامی که با HAP ترکیب شود، rGO به‌طور هم‌افزایی باعث تقویت خود به خودی تمایز استخوان سلول‌های MC3T3-E1 بدون ممانعت از گسترش آنها می‌شود. افزایش استئوژنز از تعیین فعالیت آلکالین فسفاتاز به عنوان نشانگر مرحله اولیه استخوان‌زایی و کانی سازی کلسیم و فسفات به عنوان نشانگر اواخر مرحله تأیید شد. تجزیه و تحلیل ایمونوبلات نشان داد که نانوکامپوزیت‌های rGO/HAP باعث افزایش معنی دار سطح بیان استئوپتین و استئوکلسین می‌شوند. علاوه بر این، rGO/HAP به‌طور قابل توجهی باعث افزایش تشکیل استخوان جدید در نقص کالواریال: نقص استخوان کالواریال در جوندگان اغلب به عنوان مدل غیر ارتوتاپیک برای ارزیابی بازسازی استخوان به کار می‌رود. مدل نقص استخوان کالواریال موش به طور گسترده به عنوان یک طرح تجربی ارتوتاپیک برای ارزیابی ظرفیت بازسازی استخوان DPSCها در کمپلکس مجموعه و صورت به کار گرفته شده است.

بدون ایجاد پاسخ التهابی می‌شود. این نتایج نشان داد که نانوکامپوزیت‌های rGO/HAP می‌توانند جهت تسریع

بازسازی استخوان و پیوند استخوان در حیطه‌های دندانپزشکی و ارتوپدی مورد استفاده قرار گیرند، زیرا این مواد کامپوزیتی مبتنی بر گرافن پتانسیل‌هایی برای تحریک استخوان‌زایی دارند [31]. مطالعه لی در سال 2015، بر تأثیر اکسید گرافن احیا شده (rGO) و هیدروکسی آپاتیت (HAp) بر تمایز استخوانی سلول‌های مزانشیم چربی تأکید دارد. در این مطالعه پیشنهاد شده که کامپوزیت‌های HAp پوشیده از rGO به‌عنوان پرکننده‌های استخوانی دندان و ارتوپدی به‌طور مؤثر مورد استفاده قرار گیرند، زیرا این مواد ذره‌ای مبتنی بر گرافن دارای اثرات قدرتمندی بر تحریک تمایز خود به خودی استخوانی سلول‌های مزانشیم چربی بوده و نشان دهنده فعالیت بیولوژیکی برتر و پتانسیل استئوژنیک است. به‌طور خلاصه، نشان دادند که تمایز استخوانی سلول‌های مزانشیم چربی توسط کامپوزیت‌های HAp پوشش داده شده با rGO افزایش یافته است. علاوه بر این دریافتند که زمانی که سلول‌ها در محیط کشت استخوانی (OM) کشت داده می‌شوند، فعالیت استئوژنیک توسط کامپوزیت‌های HAp-rGO بیشتر می‌شود. در معرض قرار گرفتن اولیه سلول‌ها در برابر پراکندگی کلونیدی کامپوزیت‌های HAp-rGO و در برابر افزایش تماس سلول‌ها با کامپوزیت‌ها، که به نوبه خود تسهیل سیگنالینگ درون سلولی را انجام می‌دهند، هنوز مبهم است و نیاز به مطالعه بیشتر در سطح مولکولی دارد. در هر صورت، این کار حاکی از آن است که کامپوزیت‌های HAp-rGO می‌توانند از عوامل مؤثر در استئوژن سلول‌های استخوان باشد و این چنین کامپوزیت‌های مبتنی بر rGO کاندیداهای بالقوه برای داربست‌های مهندسی بافت، محرک‌های تمایز سلول‌های بنیادی هستند [32]. نانوکامپوزیت‌های ترکیبی، متشکل از مشتقات HAp و گرافن، از جمله GO و rGO، به‌طور گسترده‌ای در زمینه استئوژن در مدلی کشت سلولی آزمایشگاهی مورد آزمایش قرار گرفته است. در همین

خصوص در مطالعه‌ای در سال 2015، [15] به بررسی پتانسیل نانوکامپوزیت‌های rGO/HAp برای تقویت استخوان‌زایی در شرایط *in vivo* و *in vitro* پرداخته شد. نتایج حاصل از مطالعه به این صورت بود که استئوژن سلول‌های MC3T3-E1 به‌طور خودبه‌خود توسط نانوکامپوزیت‌های rGO/HAp بدون عوامل استئواینداکتیو تحریک می‌شود. علاوه بر این، پاسخ‌های استخوان‌زایی با واسطه نانوکامپوزیت‌های rGO/HAp در حضور عوامل استئواینداکتیو بیشتر تحریک می‌شوند. پتانسیل سطحی rGO به دلیل وجود گروه‌های هیدروکسیل و کربوکسیل روی سطح آنها بار منفی دارد، در حالی که هیدروکسی آپاتیت به دلیل وجود کلسیم دارای بار مثبت می‌باشد. علاوه بر این، تعامل پیوند هیدروژنی بین گروه‌های هیدروکسیل HAp و گروه‌های عاملی حاوی اکسیژن rGO مانند گروه‌های کربوکسیلی، هیدروکسیل، کربونیل و اپوکسی ممکن است، چسبندگی خوبی بین HAp و rGO ایجاد کند [15].

با توجه به مطالعات و تحقیقات گزارش شده و نتایج موجود، در این مطالعه به بررسی ویژگی‌های مشترک این سه ترکیب به صورت همزمان در ساختار نانوکامپوزیت پرداخته شد. همچنین، بعد از تأیید زیست سازگاری، میزان القا تمایز استخوانی در سلول‌های بنیادی مزانشیم چربی بدون استفاده از القاکننده‌های شیمیایی مورد بررسی قرار گرفت. در مطالعه ما، می‌توان مشاهده کرد که پس از 3 روز هیچ سمیتی در سلول‌ها در تمامی غلظت‌های مختلف مورد مطالعه نانوکامپوزیت وجود ندارد. با این حال، در زمان طولانی‌تر، اندکی سمیت سلولی وابسته به زمان برای غلظت بالاتر از 5 میکروگرم / میلی لیتر مشاهده شد. بر این اساس، برای تیمار طولانی مدت سلول‌ها با این نانوکامپوزیت، غلظت کمتر از 5 میکروگرم در میلی لیتر توصیه می‌شود.

نتیجه گیری

این مطالعه به بررسی زیست سازگاری نانوکامپوزیت rGO/HAp-Sr و رسوب کلسیم به عنوان یک نشانگر تمایزی استخوان در سلول‌های بنیادی مزانشیم چربی پرداخته است که به طور خود به خود توسط نانوکامپوزیت rGO/HAp-Sr و بدون استفاده از هرگونه عامل شیمیایی استخوان سازی تحریک شده است. رسوب کلسیم در ماتریکس خارج سلولی بیانگر استخوان سازی است و به عنوان مارکری برای بازسازی استخوان در نظر گرفته می شود. مشاهده شد که حضور نانوکامپوزیت به طور جداگانه برای ایجاد تمایز استخوان در سلول کافی بوده است، علاوه بر این، افزایش غلظت نانوکامپوزیت منجر به افزایش رسوب کلسیم در سلول‌ها می شود.

تشکر و قدردانی

نویسندگان از مسئولین مرکز تحقیقات فناوری بن یاخته به دلیل حمایت سخاوتمندانه و فراهم کردن امکانات و نیز از تمام کسانی که در این مطالعه همکاری کردند، کمال تشکر و قدردانی را دارند. این پروژه توسط مرکز تحقیقات فناوری بن یاخته حمایت مالی شد.

تأییدیه اخلاقی

موردی توسط نویسندگان گزارش نشد.

منابع

- Polymers for Advanced Technologies, 2020. n/a(n/a).
- Valenti, M., L. Dalle Carbonare, and M. Mottes, *Osteogenic Differentiation in Healthy and Pathological Conditions*. International Journal of Molecular Sciences, 2016. **18**(1): p. 41.
- Gaharwar, A.K., et al., *Highly Extensible, Tough, and Elastomeric Nanocomposite Hydrogels from Poly(ethylene glycol) and Hydroxyapatite Nanoparticles*. Biomacromolecules, 2011. **12**(5): p. 1641-1650.
- Boanini, E., M. Gazzano, and A. Bigi, *Ionic substitutions in calcium phosphates synthesized at low temperature*. Acta Biomaterialia, 2010. **6**(6): p. 1882-1894.
- Shin, S.R., et al., *Graphene-based materials for tissue engineering*. Advanced Drug Delivery Reviews, 2016. **105**: p. 255-274.
- Landi, E., et al., *Carbonated hydroxyapatite as bone substitute*. Journal of the European Ceramic Society, 2003. **23**(15): p. 2931-2937.
- Ravi, N.D., et al., *Strontium-Substituted Calcium Deficient Hydroxyapatite Nanoparticles: Synthesis, Characterization, and Antibacterial Properties*. Journal of the American Ceramic Society, 2012. **95**(9): p. 27.
- Özbek, Y.Y., F.E. Baştan, and F. Üstel, *Synthesis and characterization of strontium-doped hydroxyapatite for biomedical applications*. Journal of Thermal Analysis and Calorimetry, 2016. **125**(2): p. 745-750.
- Guo, D., et al., *Development of a strontium-containing hydroxyapatite bone cement*. Biomaterials, 2005. **26**(19): p. 4073-4083.
- Capuccini, C., et al., *Interaction of Sr-doped hydroxyapatite nanocrystals with osteoclast and osteoblast-like cells*. Journal of Biomedical Materials Research Part A, 2009. **89A**(3): p. 594-600.
- Ahmed, M.K., S. Mansour, and R. Al-Wafi, *Nanofibrous scaffolds of ε-polycaprolactone containing Sr/Se-hydroxyapatite/graphene oxide for tissue engineering applications*. Biomedical Materials, 2020.
- J. Y. Reginster, E.S., M. C. De Vernejoul, S. Adami, J. Compston, C. Phenekos, J. P. Devogelaer, and A.S. M. Diaz Curiel, S. Goemaere, O. H. Sorensen, D. Felsenberg, and P. J. Meunier, *Strontium Ranelate Reduces the Risk of Nonvertebral Fractures in Postmenopausal Women with Osteoporosis*:

- Vieira, S., et al., *Nanoparticles for bone tissue engineering*. Biotechnology Progress, 2017. **33**(3): p. 590-611.
- Roohani-Esfahani, S.I., et al., *Effects of bioactive glass nanoparticles on the mechanical and biological behavior of composite coated scaffolds*. Acta Biomaterialia, 2011. **7**(3): p. 1307-1318.
- Abedin Dargoush, S., et al., *Chondroinductive impact of polyethersulfone/benzyl hyaluronate nanofibrous scaffold on human mesenchymal stem cells*.

- bone. International Journal of Nanomedicine, 2012: p. 4545.
24. Liu, Z., et al., *Fluorescent sensors using DNA-functionalized graphene oxide*. Analytical and Bioanalytical Chemistry, 2014. **406**(27): p. 6885-6902.
 25. Liu, L., et al., *Mechanical properties of graphene oxides*. Nanoscale, 2012. **4**(19): p. 5910.
 26. Chang, Y., et al., *In vitro toxicity evaluation of graphene oxide on A549 cells*. Toxicology Letters, 2011. **200**(3): p. 201-210.
 27. Kumar, S. and K. Chatterjee, *Strontium eluting graphene hybrid nanoparticles augment osteogenesis in a 3D tissue scaffold*. Nanoscale, 2015. **7**(5): p. 2023-2033.
 28. Egles, C., et al., *Strontium-doped hydroxyapatite polysaccharide materials effect on ectopic bone formation*. Plos One, 2017. **12**(9): (p. e0184663).
 29. Frasnelli, M., et al., *Synthesis and characterization of strontium-substituted hydroxyapatite nanoparticles for bone regeneration*. Materials Science and Engineering: C, 2017. **71**: p. 653-662.
 30. Xue, W., et al., *Osteoprecursor cell response to strontium-containing hydroxyapatite ceramics*. Journal of Biomedical Materials Research Part A, 2006. **79A**(4): p. 804-814.
 31. Lee, J.H., et al., *Enhanced Osteogenesis by Reduced Graphene Oxide/Hydroxyapatite Nanocomposites*. Scientific Reports, 2015 :^(۱)۵ .p. 18833.
 32. Liu, Y., et al., *Hydroxyapatite/graphene-nanosheet composite coatings deposited by vacuum cold spraying for biomedical applications: Inherited nanostructures and enhanced properties*. Carbon, 2014. **67**: p. 250-259.
 - Treatment of Peripheral Osteoporosis (TROPOS) Study*. 2005.
 15. Lee, J.H., et al., *Reduced graphene oxide-coated hydroxyapatite composites stimulate spontaneous osteogenic differentiation of human mesenchymal stem cells*. Nanoscale, 2015 :^(۲۷)۷ . p. 11642-11651.
 16. Zhou, K., et al., *Hierarchically porous hydroxyapatite hybrid scaffold incorporated with reduced graphene oxide for rapid bone ingrowth and repair*. ACS nano, 2019. **13**(8): p. 9595-9606.
 17. Prakash, J., et al., *Nanocomposite chitosan film containing graphene oxide/hydroxyapatite/gold for bone tissue engineering*. International Journal of Biological Macromolecules, 2020.
 18. Ning, Z., et al., *Solvothermal Synthesis and Optical Performance of One-dimensional Strontium Hydroxyapatite Nanorod*. Chinese Journal of Chemical Engineering, 2012. **20**(1): p. 89-94.
 19. Suganthi, R.V., et al., *Fibrous growth of strontium substituted hydroxyapatite and its drug release*. Materials Science and Engineering: C, 2011. **31**(3): p. 593-599.
 20. Prekajski, M., et al., *Ouzo effect—New simple nanoemulsion method for synthesis of strontium hydroxyapatite nanospheres*. Journal of the European Ceramic Society, 2016. **36**(5): p. 1293-1298.
 21. Dresselhaus, M.S., et al., *Perspectives on Carbon Nanotubes and Graphene Raman Spectroscopy*. Nano Letters, 2010. **10**(3): p. 751-758.
 22. Cancedda, R., et al., *Tissue engineering and cell therapy of cartilage and bone*. Matrix Biology, 2003. **22**(1): p. 81-91.
 23. Tautzenberger, A., Kovtun, and Ignatius, *Nanoparticles and their potential for application in*

Fabrication and characterization of rGO / HAp-Sr nanocomposite containing reduced graphene oxide / nano-hydroxyapatite / strontium and determination of osteoinductive potential of nanocomposite

Shabnam Abedin Dargoush¹PhD, Shiva Irani²PhD, Alireza Naderi Sohi³PhD, Masoud Soleimani⁴PhD, Hana Hanaee-Ahvaz^{5*}PhD

1- PhD, Department of Biology, Science and Research Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran

2- PhD, Associate Professor, Department of Biology, Science and Research Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran

3- PhD, Assistant Professor, Stem Cell Technology Research Center, Tehran, Iran

4- PhD, Associate Professor, Hematology Department, Faculty of Medical Sciences, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran.

5- PhD, Assistant Professor, Stem Cell Technology Research Center, Tehran, Iran

*Corresponding author:

Address: Stem Cell Technology Research Center, Tehran, Iran

Phone: +98 (21) 22082120

zip code: 1997775555

Email: hanafbt@gmail.com

Received: 2020/10/27

Accepted: 2021/1/6

Abstract

Graphene-based nanomaterials are being investigated for their biocompatibility and bioactivity, as well as their ability to improve osteogenic differentiation. In this research, the base material, reduced graphene oxide (rGO) sheets, were decorated with hydroxyapatite and strontium (rGO / HAp-Sr) to induce osteogenic differentiation in adipose-derived mesenchymal stem cells. Different techniques were used to determine the properties of the nanocomposite such as diffraction analysis techniques (XRD) and transmission electron microscopy (to evaluate the size and morphology of HAp-Sr on rGO plates), FT-IR (to analyze the nanocomposite functional group), Raman spectroscopy (to investigate possible disorders in nanocomposite structure and number of layers), induced dual plasma emission spectroscopy (to assess atomic concentration of Ca and Sr), zeta potential (electrical potential of the nanocomposite) and MTT (nanocomposite cytotoxicity assessment) were used. The ossification potential of the synthesized nanocomposite was investigated and confirmed using the calcium deposition test in dipose-derived mesenchymal stem cells. According to the obtained results, osteogenic differentiation induction is possible using synthesized nanocomposites without the need for chemical inducers.

Keywords: Reduced graphene oxide, Hydroxyapatite, Strontium, Adipose-derived mesenchymal stem cells, Osteogenic differentiation