

سنتر و ارزیابی سمیت سلولی هیدروژل هیبریدی مبتنی بر کیتوزان و نانوکامپوزیت Ph.ZnO@HAP

حمید اویسی^{۱*}، آزاده مشکینی^۲

۱- سبزوار، دانشگاه حکیم سبزواری، دانشکده فنی و مهندسی، گروه مهندسی مواد و پلیمر، کدپستی ۹۶۱۷۹۷۶۴۸۷

۲- مشهد، دانشگاه فردوسی مشهد، دانشکده علوم، گروه شیمی، کدپستی ۹۱۷۷۹۴۸۹۷۴

چکیده

در این مطالعه، به منظور بهبود خواص فیزیکی-شیمیایی و کاربرد زیستی هیدروژل کیتوزان، از نانوکامپوزیت ZnO@HAP پوشش یافته با ترکیبات فنولی (Ph.ZnO@HAP) استفاده شد. نخست، ترکیبات فنولی از غلاف سبز گردو استخراج شده، سپس سنتر نانوکامپوزیت Ph.ZnO@HAP با کمک عصاره فنولی، با استفاده از روش هیدروترمال انجام شد. همچنین هیدروژل کیتوزان با استفاده از NaHCO₃ در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد تهیه شد. هیدروژل‌های هیبریدی مبتنی بر کیتوزان و نانوکامپوزیت Ph.ZnO@HAP به روش مشابه تهیه شده و با استفاده از آنالیز طیف سنج مادون قرمز تبدیل فوریه (FTIR) و میکروسکوپ الکترونی روبشی گسیل میدانی (FE-SEM) مشخصه‌یابی شدند. خواص آنتی‌اکسیدانی، سمیت سلولی و قدرت القاء تمایز استخوانی هیدروژل‌های هیبریدی به ترتیب با استفاده از آزمون‌های DPPH، MTT و سنجش آنزیم آلکالین فسفاتاز سنجیده شد. بر اساس نتایج طیف‌های FTIR، تصاویر FESEM، طیف‌سنجی انرژی پرتوایکس (EDX) و پتانسیل زتا، نانوکامپوزیت‌های Ph.ZnO@HAP دارای مورفولوژی میله‌ای با پوششی از ترکیبات فنولی بر سطح و بار سطحی منفی می‌باشند. علاوه بر این، نتایج آزمون DPPH نشان داد که خواص آنتی‌اکسیدانی نانوکامپوزیت در یک روند وابسته به غلظت افزایش می‌یابد. در تصاویر FESEM از هیدروژل‌های هیبریدی کیتوزان با غلظت‌های مختلف Ph.ZnO@HAP مشاهده شد که هیدروژل‌های هیبریدی دارای ساختار شبکه‌ای منظم‌تری نسبت به هیدروژل کیتوزان می‌باشند. همچنین هیدروژل‌های هیبریدی دارای خاصیت آنتی‌اکسیدانی بوده و با افزایش غلظت نانوکامپوزیت در ساختار هیدروژل، خاصیت آنتی‌اکسیدانی افزایش می‌یابد. مطالعات زیستی نشان داد که سمیت سلولی هیدروژل‌های هیبریدی بر سلول‌های شبه-استئوبلاست (Saos-2) کمتر از هیدروژل کیتوزان می‌باشد و پتانسیل بالاتری در القاء استئوژنز (استخوان‌سازی) نسبت به هیدروژل کیتوزان خالص دارند.

پژوهش‌های کاربردی
مهندسی شیمی - پلیمر

فصلنامه علمی - پژوهشی بین‌رشته‌ای

سال دوم، شماره ۴، نسخه ۱،

زمستان ۱۳۹۷، صفحه ۳۱-۱۹

واژه‌های کلیدی

هیدروژل
کیتوزان
هیدروکسی آپاتیت
گردو
سمیت سلولی

*مسئول مکاتبات:

hamid.oveisi@hsu.ac.ir

مقدمه

هیدروژل‌ها، ساختارهای جامد حاوی درصد بالای میکرومنافذ هستند که این منافذ با آب و یا سیالات زیستی پر شده است. این مواد به دلیل داشتن ساختار متخلخل و شباهت به ماتریکس خارج سلولی و همچنین قابلیت کنترل خواص فیزیکی، شیمیایی و زیستی، کاربرد زیادی در زمینه‌های مختلف بویژه در صنعت دارویی و پزشکی دارند. در میان پلیمرهای مختلف، تا کنون از کیتوزان برای تهیه سامانه‌های هیدروژلی به طور گسترده استفاده شده است (۱). کیتوزان یک پلیمر زیستی کاتیونی است که از واحدهای قندی N-استیل-D-گلوکز آمین و D-گلوکز آمین تشکیل شده است و به دنبال استیل زدایی کیتین حاصل می‌شود (۲). کیتوزان که در دیواره سلولی قارچ‌ها، پوسته انواع سخت پوستان و اسکلت خارجی بندپایان و حشرات یافت می‌شود، دارای خواص زیستی قابل ملاحظه‌ای است و باعث کاربرد فراوان این پلیمر زیستی در علوم پزشکی، صنایع غذایی و دارویی شده است. از جمله خواص زیستی این ترکیب می‌توان به سازگاری زیستی بالا، زیست تخریب پذیری، غیر سمی بودن و خاصیت ایمنولوژیکی کم آن اشاره کرد. همچنین به دلیل حساسیت بالای کیتوزان به pH، عدم انحلال آن در آب و خاصیت ضد باکتریایی، در صنایع دارویی و طراحی سیستم‌های دارورسانی کاربرد بسیار زیادی داشته است (۳). علاوه بر این، از کیتوزان بصورت هیدروژل در مهندسی بافت به منظور بازسازی، حفظ و یا بهبود بافت آسیب دیده نیز استفاده شده است (۴). تا کنون از روش‌های مختلفی جهت ساخت هیدروژل کیتوزان استفاده شده است. به عنوان مثال، استفاده از عوامل شبکه کننده شیمیایی مانند گلوترآلدئید (۵)، فرم آلدئید (۶)، اتیلن گلیکول-دی گلیسیدیل اتر (EGDE) (۷) و جنیپین (۸) در تهیه هیدروژل کیتوزان بسیار رایج می‌باشد. همچنین تهیه هیدروژل بر پایه تعاملات فیزیکی مانند نیروهای الکتروستاتیکی و یا تعاملات آبگریزی، یکی دیگر از روش‌های تهیه هیدروژل است که بدلیل عدم استفاده از عوامل شبکه کننده که در

اغلب موارد سمی هستند، این روش کاربرد بیشتری در تهیه هیدروژل‌های مورد استفاده در پزشکی دارد. به عنوان مثال Montebault و همکارانش در سال ۲۰۰۵ موفق به ساخت هیدروژل کیتوزان در حضور گاز آمونیوم بر پایه تعاملات آبگریزی و هیدروژنی شدند (۹). علاوه بر این، Liu و همکارانش در سال ۲۰۱۱، از بیکرینات سدیم برای ساخت هیدروژل کیتوزان استفاده کردند (۱۰). در این روش، بی کرینات سدیم با تولید گاز CO₂ باعث پروتون زدایی گروه‌های آمین کیتوزان شده که این خود باعث افزایش تعاملات فیزیکی و تشکیل هیدروژل کیتوزان می‌شود. اگرچه هیدروژل‌هایی که بر پایه تعاملات فیزیکی ساخته می‌شوند بدلیل عدم استفاده از عوامل شبکه کننده، غیر سمی هستند، اما در برخی موارد، ناپایدار بوده و حالت ژله‌ای خود را از دست می‌دهند. همچنین قدرت مکانیکی پایین و عدم کنترل اندازه منافذ در این نوع از هیدروژل‌ها، کاربرد آنها را محدود کرده است (۱۱). در این راستا استفاده از نانوذرات یا نانوساختارها در ساختار شبکه‌ای این نوع از هیدروژل‌ها کمک شایانی در جهت بهبود خواص فیزیکی، شیمیایی و زیستی آنها خواهد کرد (۱۲، ۱۳). در این نوع از هیدروژل‌ها که هیدروژل‌های هیبریدی یا نانوکامپوزیت‌های هیدروژلی نامیده می‌شوند، تعاملات فیزیکی و شیمیایی که بین نانوذره و شبکه پلیمری ایجاد می‌شود، باعث ایجاد خواص منحصر به فردی در هیدروژل پلیمری می‌شود. با الهام از نانومواد زیست فعال یافت شده در بافت‌های زیستی، نانوذرات هیدروکسی آپاتیت (HAP) با فرمول Ca₁₀(PO₄)₆(OH)₂ می‌تواند به عنوان یک گزینه مناسب برای تهیه هیدروژل‌های هیبریدی باشد. هیدروکسی آپاتیت سرامیک زیستی است که فاز معدنی استخوان را تشکیل می‌دهد و بدلیل زیست سازگاری، غیر سمی بودن، عدم تحریک سیستم ایمنی بطور وسیعی در زمینه‌های مختلف زیستی و پزشکی مورد استفاده قرار گرفته است (۱۴). همچنین، این نانوذرات بدلیل داشتن خاصیت القاء رشد سلول‌های استخوانی Osteoconductive به

سلول‌های استخوانی (Saos-2) مورد بررسی قرار گرفت.

مواد و روش‌ها

مواد

فسفات پتاسیم، کلرید کلسیم، استات روی، کربنات سدیم، استیک اسید و کیتوزان از شرکت Merck خریداری شده است و مورد استفاده قرار گرفت. ۲-۲-دی فنیل ۱-پیکریل هیدرازیل (DPPH)، تریپان بلو، ۲-۳-۵-دی فنیل تترازولیوم برومید (MTT) از شرکت سیگما خریداری شده است. محیط کشت سلولی (RPMI-1640) و سرم جنین گاوی (FBS) از شرکت Gibco تهیه شده است. آنتی بیوتیک پنی سیلین-استرپتوماپسین و تریپسین-EDTA از شرکت Biosera تهیه شده است.

دستگاه‌ها

برای شناسایی گروه‌های عاملی ترکیبات از طیف سنجی فروسرخ تبدیل فوریه (FTIR) مدل Nicolet Avatar 370 استفاده شد. جهت بررسی ریخت شناسی نمونه‌های سنتز شده از میکروسکوپ الکترونی روبشی گسیل میدانی (FE-SEM) مدل MIRA3TESCAN-XMU با ولتاژ ۲۰ kv ساخت کشور چک استفاده شد. جهت تعیین عناصر تشکیل دهنده نانوذرات از طیف سنجی انرژی پرتو ایکس (EDX) استفاده شد. بار سطحی نانوذرات با استفاده از دستگاه پتانسیل زتا (مدل Z8000، فرانسه) بررسی شد.

روش تهیه عصاره فنولی از غلاف سبز گردو

عصاره فنولی غلاف سبز گردو بر اساس روشی که قبلاً گزارش شده است، تهیه شد (۲۲). غلاف سبز گردو از بقیه اجزاء آن جدا شد و در دمای اتاق و در تاریکی خشک شد. سپس با استفاده از آسیاب برقی غلاف سبز خشک شده، پودر شد. جهت عصاره‌گیری از نمونه، به ۱۰ گرم از پودر نرم غلاف، ۱۰۰ میلی‌لیتر محلول آب-استون (۳۰:۷۰ درصد حجمی-حجمی) اضافه شد و به مدت ۲ ساعت تحت شرایط رفلکس بر روی همزن مغناطیسی قرار گرفت. عصاره بدست آمده با

تنهایی و یا بصورت پوشش بر سطح ایمپلنت‌ها، در ترمیم بافت استخوان‌های آسیب دیده استفاده می‌شوند (۱۵). بنابراین استفاده از این نانوذرات در هیدروژل‌های هیبریدی می‌تواند کاربرد گسترده‌ای در مهندسی بافت استخوان، بازسازی و جایگزینی غضروف داشته باشد (۱۶). در همین راستا، محققان هیدروژل‌های ترکیبی از نانوذرات هیدروکسی آپاتیت و پلیمرهای زیستی مانند دکستران، کیتین و کلاژن، به منظور استفاده از آنها در مهندسی بافت استخوان تهیه کرده‌اند. نتایج آنها نشان داد که در تمام نمونه‌ها علاوه بر بهبود خواص فیزیکی و شیمیایی، خصوصیات استئوژنیک نیز در آنها افزایش یافته است (۱۷، ۱۸).

در این مطالعه، جهت تهیه هیدروژل هیبریدی کیتوزان بر پایه تعاملات فیزیکی، از نانوکامپوزیت هیدروکسی آپاتیت پوشش یافته با نانوذرات اکسید روی (ZnO) و عصاره فنولی غلاف سبز گردو استفاده شده است. براساس گزارشات ارائه شده، پوشش ZnO بر سطح هیدروکسی آپاتیت باعث بهبود خواص فیزیکی و شیمیایی این نانوذرات می‌شود (۱۹). جهت تهیه پوششی از ZnO بر سطح نانوذرات هیدروکسی آپاتیت از عصاره فنولی غلاف سبز گردو استفاده شد. غلاف سبز گردو که سالیانه میلیون‌ها تن از آن در صنعت کشاورزی به عنوان ماده زائد تولید می‌شود، غنی از ترکیبات فنولی و فلاونوئیدی مانند هموانیلیدک اسید، کوئرستین و کاتچین می‌باشد (۲۰). احتمالاً این ترکیبات علاوه بر اینکه باعث تسهیل تشکیل ZnO بر سطح نانوذرات HAP می‌شوند (۲۱)، پوششی از این ترکیبات بر سطح نانوذره قرار گرفته و باعث خواهد شد که نانوذرات سنتز شده خاصیت آنتی‌اکسیدانی نیز داشته باشند. بنابراین، هدف از انجام این مطالعه ساخت هیدروژل ترکیبی از کیتوزان و نانوکامپوزیت ZnO@HAP پوشش یافته با ترکیبات فنولی استخراج شده از غلاف سبز گردو (Ph. ZnO@HAP)، به منظور استفاده از آن در مهندسی بافت، بویژه ترمیم استخوان‌های آسیب دیده می‌باشد. خواص فیزیکی و شیمیایی، خاصیت آنتی‌اکسیدانی نانوکامپوزیت و هیدروژل‌های سنتز شده و نیز سمیت سلولی آنها بر روی

درصد) به اسید استیک ۱ درصد اضافه شد و مخلوط حاصل به مدت ۲۴ ساعت بر روی همزن مغناطیسی قرار گرفت. سپس محلول کیتوزان در داخل حمام یخ قرار گرفت و محلول بی کربنات سدیم (۰/۱۲ مولار) به آن اضافه شد. جهت انجام فرایند ژله‌ای شدن، مخلوط حاصل به دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد منتقل شد. جهت تولید هیدروژل کیتوزان-نانوکامپوزیت از روش مشابه استفاده شد، فقط به مخلوط کیتوزان غلظت‌های مختلف نانوکامپوزیت Ph.ZnO@HAP، ۰/۲۵، ۰/۵ و ۱ درصد (وزنی-وزنی نسبت به کیتوزان) اضافه شد و محلول بی کربنات با غلظت ۰/۰۶ مولار استفاده شد. هیدروژل حاصل Cs&Ph.ZnO@HAP نامیده شد.

سنجش میزان ترکیبات فنولی بر سطح

نانوکامپوزیت ZnO@HAP

جهت تعیین میزان فنول پوشش‌یافته بر سطح نانوکامپوزیت ZnO@HAP از آزمون Folin Ciocalteu استفاده شد. برای این منظور، ۲ میلی‌لیتر فولین رقیق شده (۱:۱۰ آب:فولین) و ۲ میلی‌لیتر کربنات سدیم (۷/۵ درصد) به ۰/۵ میلی‌لیتر از محلول نانوکامپوزیت با غلظت‌های مختلف ۰/۲ تا ۱ میلی‌گرم/میلی‌لیتر اضافه شد. پس از ۹۰ دقیقه نگهداری نمونه‌ها در دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد، محلول آبی رنگی حاصل شد که جذب آن در طول موج ۷۶۵ نانومتر با استفاده از دستگاه طیف‌سنجی مرئی-فرابنفش خوانده شد. جهت تعیین غلظت فنول در نمونه‌های مذکور، منحنی استاندارد با استفاده از اسید گالیک، به عنوان یک ترکیب استاندارد فنولی تهیه شد. میزان فنول پوشش‌یافته بر سطح نانوکامپوزیت‌ها بر حسب میلی‌گرم گالیک اسید/میلی‌لیتر محاسبه شد.

سنجش میزان ترکیبات فلاونوئیدی بر سطح

نانوکامپوزیت ZnO@HAP

ابتدا به ۲۵۰ ماکرولیتر از محلول حاوی غلظت‌های مختلف نانوکامپوزیت، ۱/۲۵ میلی‌لیتر آب و ۷۵ ماکرولیتر از نیترات سدیم ۵ درصد اضافه شد و به مدت ۵

استفاده از کاغذ واتمن فیلتر شد. پس از حذف حلال آلی از عصاره، حجم نهایی عصاره به ۳۰ میلی‌لیتر رسانده شد و در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد نگهداری شد.

سنتز نانوذرات ZnO@HAP و Ph.ZnO@HAP

ابتدا محلول فسفات پتاسیم با غلظت ۰/۰۱۵ مولار در ۱۰۰ میلی‌لیتر آب دیونیزه تهیه شد. سپس کلرید کلسیم با غلظت ۰/۰۲۴ مولار به صورت قطره قطره به آن اضافه شد. پس از تنظیم pH بر روی ۱۱، مخلوط واکنش بدون ظرف هیدروترمال منتقل شد و به مدت ۱۸ ساعت در دمای ۱۵۰ درجه سانتی‌گراد قرار گرفت. پس از گذشت مدت زمان مذکور و سرد شدن نمونه، نانوذرات هیدروکسی‌آپاتیت چندین بار با اتانول و سپس آب شستشو داده شدند. سپس نانوذرات در آون خلاء، دمای ۵۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲۴ ساعت جهت خشک شدن قرار گرفتند. جهت سنتز نانوکامپوزیت ZnO@HAP پوشش‌یافته با عصاره فنولی غلاف سبز گردو (Ph.ZnO@HAP)، نانوذرات HAP در آب دیونیزه با غلظت ۱/۰۶ میلی‌گرم/میلی‌لیتر پراکنده شدند. سپس ۵۰ میلی‌لیتر استات روی با غلظت ۰/۰۴ مولار به آن اضافه شد و به مدت ۳۰ دقیقه بر روی همزن مغناطیسی قرار گرفت. پس از گذشت مدت زمان مذکور، دمای واکنش را به ۴۰ درجه سانتی‌گراد رسانده و ۲۰ میلی‌لیتر از محلول عصاره فنولی غلاف سبز گردو (۱۶:۴ عصاره-آب (درصدحجمی حجمی)) به آن اضافه شد و pH مخلوط واکنش بر روی ۱۱ تنظیم شد. پس از گذشت یک ساعت، مخلوط به داخل ظرف هیدروترمال منتقل شد و به مدت ۳ ساعت در دمای ۱۲۰ درجه سانتی‌گراد قرار گرفت. نانوذرات سنتز شده با استفاده از سانتریفیوژ از مخلوط واکنش جدا شدند و چندین مرتبه با آب شستشو داده شدند. نانوذرات در آون خلاء، دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲۴ ساعت جهت خشک شدن قرار گرفتند.

تهیه هیدروژل کیتوزان و هیدروژل کیتوزان-نانوکامپوزیت

به منظور تهیه هیدروژل کیتوزان، ابتدا کیتوزان (۲

در این فرمول $A_{control}$ جذب شاهد، A_{sample} جذب نمونه می باشد.

ارزیابی میزان تورم هیدروژل ها

جهت ارزیابی قدرت جذب آب توسط هیدروژل های تهیه شده، ابتدا مقدار مشخصی از هیدروژل (وزن خشک، W_d) را در مقدار مشخصی بافر فسفات (pH 7) غوطه ور کرده و پس از گذشت مدت زمان مشخص و گرفته شدن آب اضافه از هیدروژل، وزن آن (وزن مرطوب، W_w) سنجیده شد. سپس میزان تورم هیدروژل با استفاده از فرمول (2) محاسبه شد.

$$\text{Swelling ratio (\%)} = \frac{W_w - W_d}{W_d} \times 100 \quad (2)$$

بررسی سمیت هیدروژل ها بر سلول های استخوانی

به منظور بررسی سمیت هیدروژل های ساخته شده، از سلول های شبه استئوبلاست، Saos-2، به عنوان مدل استفاده شد. برای این منظور 1×10^4 سلول در معرض غلظت های مختلف از نمونه های سنتز شده قرار گرفتند و در داخل انکوباتور، دمای 37 درجه سانتی گراد و CO_2 5 درصد به مدت 3 روز نگهداری شدند. پس از گذشت مدت زمان مذکور، میزان حیات سلول ها با استفاده از ترکیب MTT مورد بررسی قرار گرفت. برای این منظور، 10 ماکرولیتر MTT (5 میلی گرم/میلی لیتر) به سلول ها اضافه شد و پس از گذشت 4 ساعت، رسوب فورمازان تشکیل شده، در DMSO حل شد. سپس جذب نمونه ها در 570 نانومتر با استفاده از دستگاه خوانشگر الیزا خوانش شد. میزان حیات سلولی با استفاده از فرمول (3) محاسبه شد. در این فرمول، A_{sample} جذب نمونه های تیمار شده و $A_{control}$ جذب نمونه تیمار نشده است.

سنجش فعالیت آنزیم آلکالین فسفاتاز

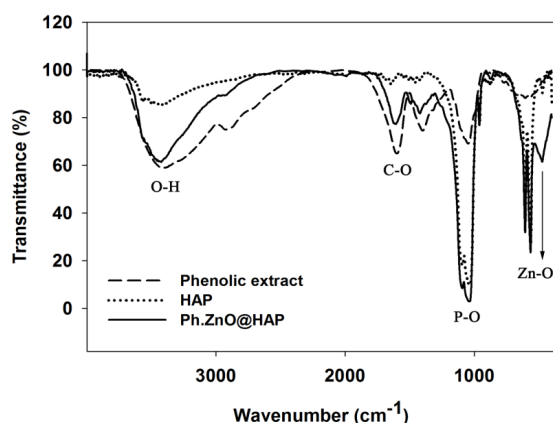
به منظور سنجش فعالیت آنزیم آلکالین فسفاتاز از کیت

دقیقه در تاریکی قرار گرفت. سپس به هر نمونه 150 ماکرولیتر از کلرید آلومینیوم 10 درصد اضافه شد و پس از 6 دقیقه قرار گرفتن نمونه ها در تاریکی، 500 ماکرولیتر سود یک مولار اضافه شد. پس از اضافه شدن 275 ماکرولیتر آب به هر کدام از نمونه ها، جذب نمونه ها در طول موج 510 نانومتر با استفاده از دستگاه طیف سنجی مرئی-فرابنفش خوانده شد. جهت تعیین غلظت فلاونوئید بر سطح نانوکامپوزیت، منحنی استاندارد با استفاده از کانتچین، به عنوان یک ترکیب استاندارد فلاونوئیدی تهیه شد و سپس میزان فلاونوئید پوشش یافته بر سطح نانوکامپوزیت بر حسب میلی گرم کانتچین/ میلی لیتر محاسبه شد.

بررسی خواص آنتی اکسیدانی

جهت بررسی خواص آنتی اکسیدانی نانوکامپوزیت Ph.ZnO@HAP و هیدروژل Cs.Ph.ZnO@HAP، از آزمون DPPH استفاده شد. این روش مبتنی بر به دام اندازی رادیکال های آزاد تولید شده توسط DPPH با استفاده از ترکیبات آنتی اکسیدانی است. برای این منظور، یک میلی لیتر محلول DPPH (2 میلی مولار) به یک میلی لیتر محلول حاوی غلظت های مختلف نانوکامپوزیت Ph.ZnO@HAP و یا HAP اضافه شد و به مدت 30 دقیقه در تاریکی در دمای اتاق نگهداری شد. سپس جذب محلول در طول موج 517 نانومتر خوانده شد. در این آزمون محلول DPPH به تنهایی به عنوان نمونه شاهد در نظر گرفته شد. همچنین از ویتامین C به عنوان کنترل مثبت استفاده شد. جهت ارزیابی خاصیت آنتی اکسیدانی هیدروژل سنتز شده، غلظت های مشخصی از هیدروژل به محلول DPPH اضافه شد و پس از 30 دقیقه، جذب آن در طول موج 517 نانومتر خوانده شد. جهت محاسبه ظرفیت خنثی نمودن رادیکال های آزاد (Radical Scavenging Capacity, RSC) از فرمول (1) استفاده شد.

$$RSC = \frac{A_{control} - A_{sample}}{A_{control}} \times 100 \quad (1)$$



شکل ۱ طیف FTIR عصاره فنولی، نانوذرات HAP و نانوکامپوزیت Ph.ZnO@HAP

پارس آزمون استفاده شد و بر اساس دستورالعمل ذکر شده در کیت میزان فعالیت این آنزیم سنجیده شد. برای این منظور، ابتدا پروتئین های سلول با استفاده از بافر لیز (NaCl ۱۵۰ میلی مولار، Tris-HCl ۵۰ میلی مولار و ترایتون X-100 یک درصد) استخراج شد و غلظت آن با استفاده از روش برادفورد (۲۳) سنجیده شد. ۲۰ ماکرولیتر از پروتئین استخراج شده از سلول را به یک میلی لیتر از محلول کیت اضافه نموده و بلافاصله فعالیت آنزیم در بازه زمانی ۴ دقیقه با استفاده از دستگاه طیف سنج در طول موج ۴۰۵ نانومتر سنجیده شد. سپس فعالیت آنزیم U/mg گزارش شد.

نتایج و بحث

مشخصه بانی نانوذرات Ph.ZnO @HAP

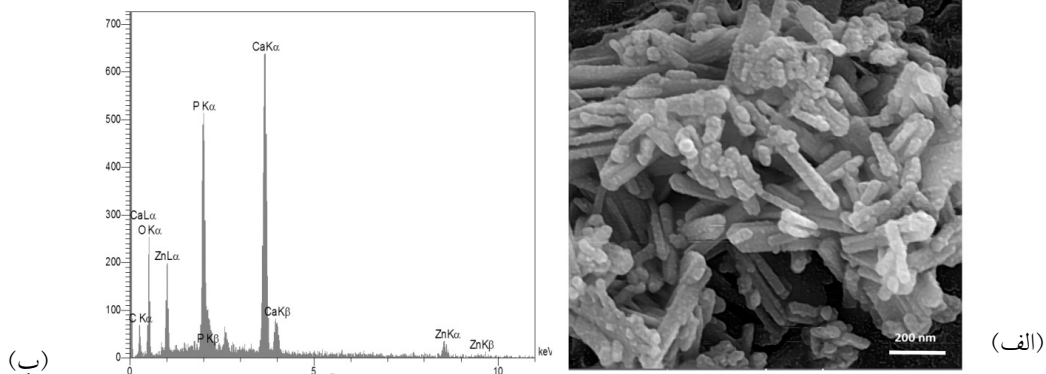
بررسی طیف FTIR همانطور که در شکل ۱ مشاهده می شود، در طیف عصاره فنولی غلاف سبز گردو باند مشخص و پهنی در ناحیه 3399 cm^{-1} مشاهده می شود که مربوط به ارتعاشات کششی گروه OH می باشد. باند ظاهر شده در ناحیه 2924 cm^{-1} مربوط به ارتعاشات کششی C-H آلیفاتیک می باشد. باندهای 1599 cm^{-1} و 1398 cm^{-1} مربوط به ارتعاشات کششی متقارن و نامتقارن C=O گروه کربوکسیل به شکل کربوکسیلیک اسید یا استرهای آن می باشد. باند 1047 cm^{-1} مربوط به ارتعاشات کششی C-OH گروه های الکلی و یا کربوکسیلیک اسید است (۲۴). در طیف مربوط به Ph.ZnO@HAP باندهای ظاهر شده در عدد موج 1098 cm^{-1} و 959 cm^{-1} مربوط به گروه فسفات هیدروکسی آپاتیت می باشد که در طیف HAP نیز ظاهر شده است. علاوه بر این، در این طیف، باند جذبی Zn-O در 469 cm^{-1} نیز دیده می شود که تاییدی بر سنتز ZnO بر سطح نانوذرات هیدروکسی آپاتیت است (۲۵). همچنین، ظاهر شدن دو باند در عدد موج 1617 cm^{-1} و 3423 cm^{-1} به ترتیب مربوط به گروه C=O و گروه O-H است که نشان دهنده حضور ترکیبات فنولی بر سطح نانوذرات می باشد.

بررسی مورفولوژی. همانطور که در تصاویر FESEM مشاهده می شود نانوکامپوزیت های سنتز شده میله ای شکل هستند (شکل ۲ الف). قطر نانوکامپوزیت ها

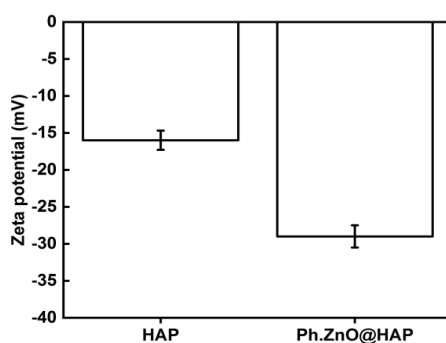
32 ± 8 نانومتر و طول آنها 154 ± 45 نانومتر محاسبه شد. براساس نتایج حاصل از طیف سنجی انرژی پرتو ایکس (EDS) نانوکامپوزیت، حضور عناصر کلسیم، فسفر مربوط به نانوذرات HAP، عنصر روی مربوط به نانوذرات ZnO، و کربن مربوط به ترکیبات فنولی در سطح نانوکامپوزیت تایید شد (شکل ۲ ب).

بررسی بار سطحی نانوکامپوزیت. بررسی پتاسیل زتا نشان داد که بار سطحی نانوذرات HAP، -16 میلی ولت است در حالی که با اضافه شدن لایه ZnO و ترکیبات فنولی، بار سطحی منفی تر (-29 میلی ولت) شده است که این خود شرایط مطلوب تری برای ایجاد تعاملات الکتروستاتیک بین نانوکامپوزیت با کیتوزان در فرایند تهیه هیدروژل فراهم می کند (شکل ۳).

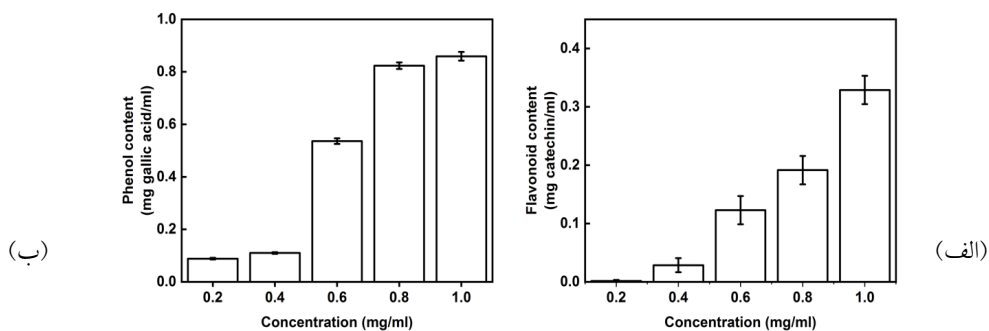
بررسی خواص آنتی اکسیدانی نانوکامپوزیت Ph.ZnO@HAP. میزان ترکیبات فنولی و فلاونوئیدی موجود در سطح نانوکامپوزیت به ترتیب با استفاده از روش رنگ سنجی فولین سیکالتو و معرف کلرید آلومینیوم سنجیده شد. همانطور که در شکل ۴ (الف) و (ب) مشاهده می شود، میزان فولین و فلاونوئید پوشش یافته بر سطح نانوکامپوزیت در یک روند وابسته به غلظت افزایش داشت. در غلظت یک میلی گرم/میلی لیتر، میزان فولین در سطح نانوکامپوزیت 0.85 ± 0.01 میلی گرم گالیک اسید/میلی لیتر و میزان فلاونوئید 0.32 ± 0.02



شکل ۲ تصویر FESEM نانوکامپوزیت Ph.ZnO@HAP (الف). طیف انرژی پرتو ایکس نانوکامپوزیت Ph.ZnO@HAP (ب).

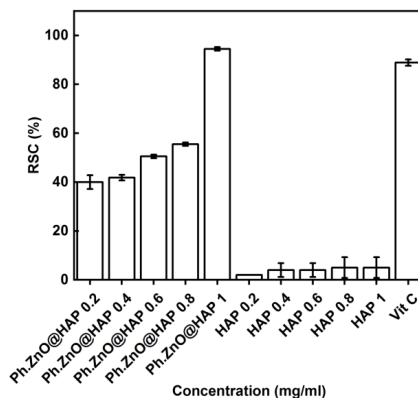


شکل ۳ بررسی بار سطحی نانوذرات HAP و نانوکامپوزیت Ph.ZnO@HAP



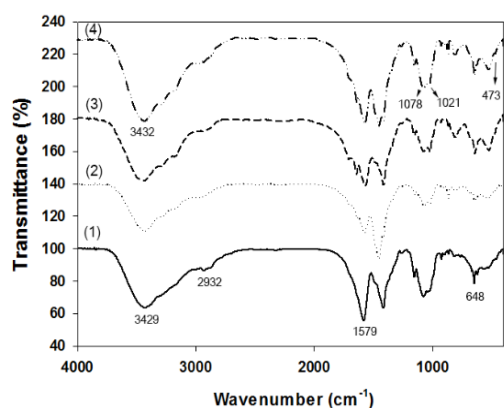
(ب)

(الف)



(ج)

شکل ۴ سنجش میزان ترکیبات فنولی (الف)، فلاونوئیدی (ب) و میزان خاصیت آنتی اکسیدانی نانوکامپوزیت Ph.ZnO@HAP (ج).



شکل ۵ طیف FTIR مربوط به هیدروژل کیتوزان (Cs) (۱)، Cs&Ph.ZnO@HAP (۲۵٪) (۲)، Cs&Ph.ZnO@HAP (۵٪) (۳) و Cs&Ph.ZnO@HAP (۱٪) (۴).

ساختار هیدروژل می باشد (شکل ۵ (۲)).

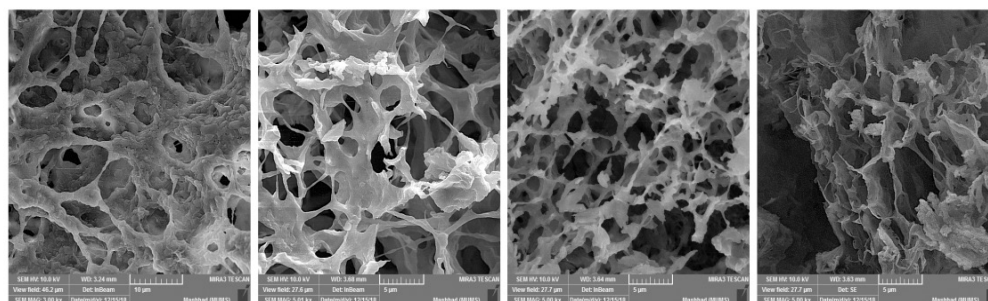
بررسی مورفولوژی. همانطور که در تصاویر FESEM مشاهده می شود (شکل ۶)، هیدروژل ها دارای ساختار ماکرومتخلخل هستند و میزان تخلخل در نمونه های ۰/۲۵ و ۰/۵ درصد Cs&Ph.ZnO@HAP بیشتر از هیدروژل کیتوزان است و ساختار شبکه ای یکنواخت و مشخصی دارند. در نمونه ۱ درصد Cs&Ph.ZnO@HAP ساختار شبکه ای مشخصی به چشم نمی خورد که احتمالاً به دلیل افزایش غلظت نانوکامپوزیت ها و تداخل آنها در ایجاد شبکه می باشد.

بررسی خواص آنتی اکسیدانی. مطالعات قبلی نشان داده است که کیتوزان دارای فعالیت آنتی اکسیدانی می باشد

میلی گرم کاتچین/میلی لیتر می باشد. به منظور سنجش ظرفیت آنتی اکسیدانی نانوکامپوزیت Ph.ZnO@HAP از آزمون DPPH استفاده شد (شکل ۴ (ج)). میزان فعالیت آنتی اکسیدانی نانوکامپوزیت Ph.ZnO@HAP نیز با افزایش غلظت روند صعودی داشت، بطوری که در غلظت یک میلی گرم/میلی لیتر ظرفیت آنتی اکسیدانی نانوکامپوزیت $94/5 \pm 0/7$ درصد می باشد. لازم به ذکر است که در غلظت یکسان، نانوذرات HAP هیچ گونه خاصیت آنتی اکسیدانی نداشتند.

مشخصه یابی هیدروژل Ph&Cs.ZnO@HAP

بررسی طیف FTIR. در طیف مربوط به هیدروژل کیتوزان (شکل ۵ (۱)) باند جذبی در ناحیه 3429 cm^{-1} مربوط به ارتعاشات کششی O-H و یا N-H بوده و باند ظاهر شده در ناحیه 2932 cm^{-1} متعلق به C-H آلیفاتیک می باشد. باند جذبی در عدد موج 1579 cm^{-1} مربوط به گروه C=O می باشد. باندهای ظاهر شده در محدوده 900 تا 1200 cm^{-1} مربوط به ساختار پیرانوز قند بوده و عدد موج 600 مربوط به گروه O=C-N می باشد (۲۶). در طیف های مربوط به هیدروژل های هیبریدی Cs&Ph.ZnO@HAP، علاوه بر باندهای جذبی مربوط به کیتوزان، باندهای جذبی مربوط به نانوکامپوزیت نیز مشاهده می شود (شکل ۵ (۲-۴)). به عنوان مثال، در طیف مربوط به نمونه ۱۰ درصد Cs&Ph.ZnO@HAP، باند جذبی در عدد موج 1078 و 473 به ترتیب مربوط به Zn-O و گروه فسفات نانوکامپوزیت است، که نشان دهنده حضور نانوذرات در



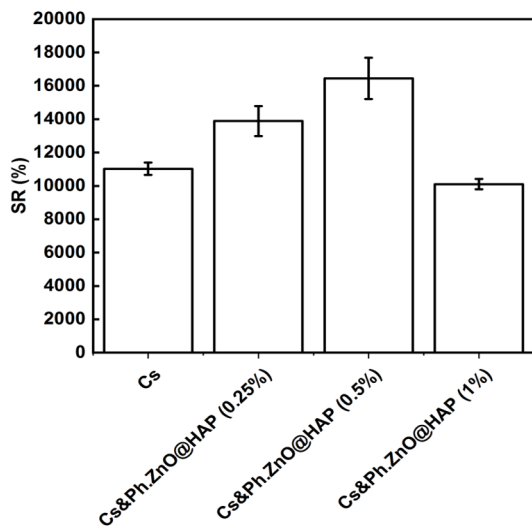
شکل ۶ تصاویر FESEM از هیدروژل کیتوزان (الف)، هیدروژل هیبریدی Cs&Ph.ZnO@HAP (۲۵٪) (ب) و Cs&Ph.ZnO@HAP (۵٪) (ج) و Cs&Ph.ZnO@HAP (۱٪) (د).

شکل ۸ نشان می‌دهد که میزان تورم با افزایش غلظت نانوکامپوزیت در ساختار هیدروژل‌های هیبریدی افزایش یافته، هرچند که در نمونه ۱ درصد Cs&Ph.ZnO@HAP میزان تورم نسبت به سایر هیدروژل‌های هیبریدی و نیز هیدروژل کیتوزان کاهش یافته است. این کاهش در میزان تورم می‌تواند بدلیل ضعف در ساختار شبکه‌ای هیدروژل باشد.

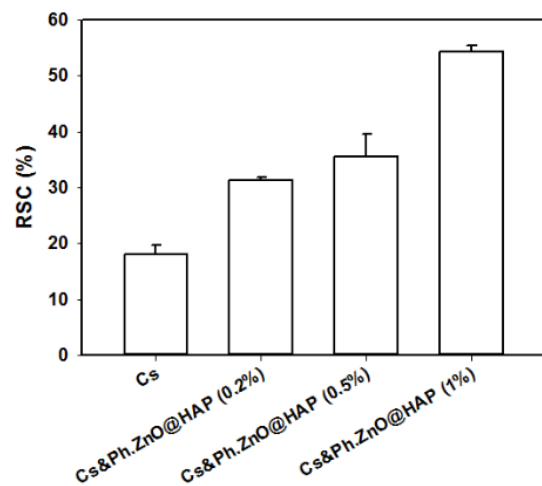
بررسی خواص Osteoinductive. نتایج آزمون MTT نشان داد که میزان سمیت کیتوزان در سلول‌های Saos-2، با افزایش غلظت نمونه در محیط کشت سلول، افزایش می‌یابد (شکل ۹). علاوه بر این، در هیدروژل ۰/۲۵ و ۰/۵ درصد Cs&Ph.ZnO@HAP میزان سمیت در تمام غلظت‌ها، بطور قابل توجهی نسبت به هیدروژل کیتوزان کاهش یافته، در حالی که در هیدروژل ۱ درصد Cs&Ph.ZnO@HAP میزان سمیت سلولی نسبت به دیگر هیدروژل‌های هیبریدی کیتوزان افزایش یافته است. کاهش سمیت هیدروژل‌های هیبریدی کیتوزان (۰/۲۵ و ۰/۵ درصد)، احتمالاً به دلیل خاصیت آنتی‌اکسیدانی ترکیبات فنولی پوشش یافته بر سطح نانوذرات می‌باشد. در این راستا نتایج قبلی نشان داده‌اند که ترکیبات آنتی

(۲۷، ۲۸) و به همین دلیل در صنایع غذایی و دارویی از آن استفاده می‌شود. به منظور بررسی خواص آنتی‌اکسیدانی هیدروژل کیتوزان و هیدروژل‌های هیبریدی سنتز شده، از آزمون DPPH استفاده شد. بررسی نتایج نشان داد که با افزایش غلظت نانوکامپوزیت در ساختار هیدروژل، ظرفیت آنتی‌اکسیدانی هیدروژل افزایش می‌یابد (شکل ۷). به عنوان مثال، در غلظت ۲۰۰ ماکروگرم/میلی‌لیتر، ظرفیت آنتی‌اکسیدانی هیدروژل Cs و نمونه‌های ۰/۲، ۰/۵ و ۱ درصد Cs&Ph.ZnO@HAP به ترتیب $18 \pm 1/7$ ، $31 \pm 0/5$ ، $4 \pm 0/4$ و $5 \pm 1/5$ درصد محاسبه شد.

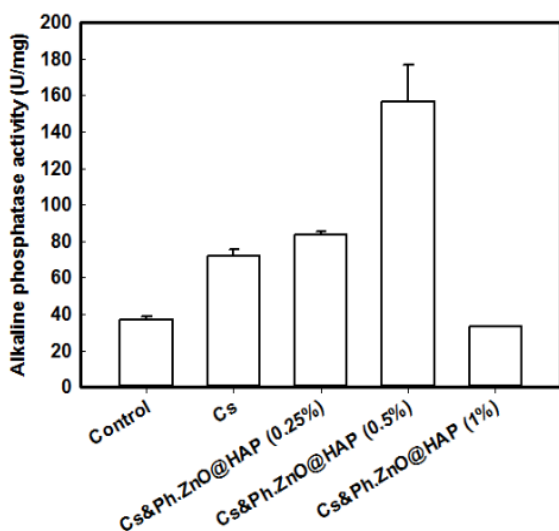
بررسی تورم. میزان جذب آب در زیست‌موادها از این جهت حائز اهمیت است که با جذب سیالات زیستی که حاوی اکسیژن، مواد غذایی و ملکول‌های پیام‌رسان هستند باعث حفظ حیات سلول‌هایی می‌شوند که در ارتباط با این مواد هستند. علاوه بر خصلت آبگریزی و سختی، ساختار متخلخل، یکی از عواملی است که در توانایی ماده در جذب آب موثر است. کیتوزان به دلیل داشتن ماهیت هیدروفیل قدرت جذب آب بالایی دارد و ساختار شبکه‌ای هیدروژل کیتوزان قدرت جذب آب را نیز در این پلیمر افزایش می‌دهد. نتایج ارائه شده در



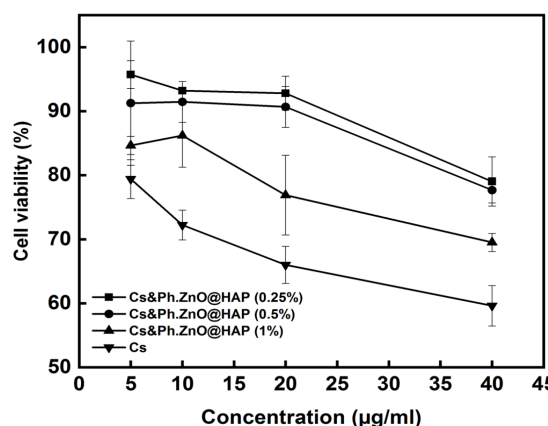
شکل ۸ بررسی میزان تورم هیدروژل کیتوزان و هیدروژل‌های هیبریدی Cs&Ph.ZnO@HAP



شکل ۷ سنجش خاصیت آنتی‌اکسیدانی هیدروژل کیتوزان و هیدروژل‌های هیبریدی Cs&Ph.ZnO@HAP



شکل ۱۰. سنجش فعالیت آنزیم آلکالین فسفاتاز در سلول های Saos-2 تیمار شده با هیدروژل کیتوزان و هیدروژل های هیبریدی



شکل ۹. بررسی سمیت هیدروژل کیتوزان (Cs) و هیدروژل های هیبریدی Cs&Ph.ZnO@HAP بر سلول های Saos-2 پس از گذشت ۴۸ ساعت

این آنزیم در سلول های تیمار شده با هیدروژل ۰/۲۵ و ۰/۵ درصد Cs&Ph.ZnO@HAP بطور معناداری نسبت به هیدروژل کیتوزان (Cs) و هیدروژل یک درصد Cs&Ph.ZnO@HAP بیشتر است. بر اساس این نتایج، هیدروژل کیتوزان و هیدروژل هیبریدی یک درصد Cs&Ph.ZnO@HAP بدلیل اثرات سمی بالایی که دارند باعث مرگ سلول ها می شوند در حالی که هیدروژل ۰/۲۵ و ۰/۵ درصد Cs&Ph.ZnO@HAP باعث حفظ حیات سلول ها و القاء فرایند استئوژنز می شوند. در این راستا مطالعات قبلی نشان داده اند که ترکیبات آنتی اکسیدانی مانند کاتچین و نیز کلسیم فسفات ها باعث افزایش بیان فاکتورهای موثر در فرایند استئوژنز می شوند (۲۹, ۳۲). بر اساس نتایج بدست آمده در این مطالعه، اثر توام این ترکیبات در کنار یکدیگر در قالب هیدروژل های هیبریدی، پتانسیل بالایی در القاء فرایند استئوژنز ایجاد می کند.

نتیجه گیری

در این مطالعه هیدروژل های هیبریدی از کیتوزان و نانوکامپوزیت Ph.ZnO@HAP، به منظور بهبود خواص زیستی هیدروژل کیتوزان سنتز شد. نانوکامپوزیت های

اکسیدانی باعث حفظ حیات سلول های بنیادی مزانشیمال و نیز باعث القاء استئوژنز در آنها می شوند (۲۹, ۳۰). علاوه بر این، در نمونه کیتوزان و هیدروژل هیبریدی Cs. Ph.ZnO@HAP یک درصد، بدلیل ضعف در ساختار شبکه ای، قدرت انتقال آب و مواد مغذی به سلول های کشت شده بر روی این بسترها کمتر بوده، لذا میزان زنده مانده در این سلول ها در مقایسه با سلول های کشت شده بر روی هیدروژل های هیبریدی ۰/۲۵ و ۰/۵ درصد کاهش می یابد. بنابراین براساس نتایج بدست آمده، هیدروژل های هیبریدی ۰/۲۵ و ۰/۵ درصد در مقایسه با هیدروژل کیتوزان، بدلیل اثرات سمی کمی که بر سلول های استخوانی دارند می توانند جایگزین مناسب تری برای این ترکیب در درمان آسیب های استخوانی باشند.

سنجش فعالیت آنزیم آلکالین فسفاتاز. یکی از آنزیم های مهم در فرایند استئوژنز، آنزیم آلکالین فسفاتاز می باشد (۳۱). به منظور بررسی فرایند استئوژنز در سلول های استخوانی تیمار شده با هیدروژل های هیبریدی، میزان فعالیت آنزیم آلکالین فسفاتاز در سلول های تیمار شده مورد بررسی قرار گرفت. نتایج ارائه شده در شکل ۱۰ نشان می دهد که میزان بیان

به هیدروژل کیتوزان بوده و سمیت کمتری نسبت به سلول‌های استخوانی داشتند. همچنین هیدروژل‌های هیبریدی باعث بلوغ سلول‌های تمایز نیافته استخوانی به سلول‌های بالغ و دارای عملکرد (استئوژنز) شدند. بنابراین بر اساس نتایج بدست آمده در این مطالعه، هیدروژل‌های هیبریدی Cs&Ph.ZnO@HAP می‌توانند به عنوان یک گزینه مناسب جهت ترمیم آسیب‌های استخوانی در نظر گرفته شوند، هرچند که مطالعات بیشتری، بویژه مطالعات *in vivo* در این راستا بایستی صورت گیرد.

قدردانی نویسنندگان از حمایت مالی معاونت پژوهشی دانشگاه فردوسی مشهد و دانشگاه حکیم سبزواری جهت انجام این مطالعه در قالب طرح تحقیقاتی با کد ۳۳/۶۵۳۳۳ کمال تشکر و قدردانی را دارند.

Ph.ZnO@HAP در دو مرحله با استفاده از عصاره فنولی غلاف سبز گردو سنتز شدند. در مقایسه با هیدروژل کیتوزان، هیدروژل‌های هیبریدی با غلظت‌های مشخصی از نانوکامپوزیت (۰/۲۵ و ۰/۵ درصد)، دارای ساختمان شبکه‌ای بهتر و منظم‌تری بودند. ساختارهای شبکه‌ای منظم اگرچه استحکام مکانیکی کمتری دارند، اما در کاربردهای زیستی، پاسخ‌های زیستی بهتری را ایجاد می‌کنند. علاوه بر این، وجود ترکیبات فنولی و فلاونوئیدی موجود در سطح نانوکامپوزیت‌های سنتز شده و نیز بار منفی سطح این ترکیبات علاوه بر اینکه باعث تسریع فرایند ژله‌ای شدن کیتوزان شد، بر خواص زیستی هیدروژل کیتوزان نیز تاثیر گذاشت. به عنوان مثال، هیدروژل‌های هیبریدی با درصدهای مشخصی از نانوکامپوزیت، دارای خواص آنتی‌اکسیدانی بیشتری نسبت

مراجع

- 1- Hamed H., Moradi S., Hudson S.M., Tonelli AE. Chitosan Based Hydrogels and Their Applications for Drug Delivery in Wound Dressings: A Review. *Carbohydrate Polymers*. 199, 445-60, 2018.
- 2- El Knidri H., Belaabed R., Addaou A., Laajeb A., Lahsini A. Extraction, Chemical Modification and Characterization of Chitin and Chitosan. *International Journal of Biological Macromolecules*. 120, 1181-9, 2018.
- 3- Pellá M.C.G., Lima-Tenório M.K., Tenório-Neto E.T., Guilherme M.R., Muniz E.C., Rubira A.F. Chitosan-Based Hydrogels: From Preparation to Biomedical Applications. *Carbohydrate Polymers*. 196, 233-45, 2018.
- 4- Ahmed S., Annu, Ali A., Sheikh J. A Review on Chitosan Centred Scaffolds and Their Applications in Tissue Engineering. *International Journal of Biological Macromolecules*. 116, 849-862, 2018.
- 5- Milosavljević N.B., Kljajević L.M., Popović I.G., Filipović J.M., Kalagasidis Krušić M.T. Chitosan, Itaconic Acid and Poly(vinyl alcohol) Hybrid Polymer Networks of High Degree of Swelling and Good Mechanical Strength. *Polymer International*. 59(5), 686-694, 2010.
- 6- Singh A., Narvi S.S., Dutta P.K., Pandey N.D. External Stimuli Response on a Novel Chitosan Hydrogel Crosslinked With Formaldehyde. *Bulletin of Materials Science*. 29(3), 233-8, 2006.
- 7- Liu R., Xu X., Zhuang X., Cheng B. Solution Blowing of Chitosan/PVA Hydrogel Nanofiber Mats. *Carbohydr Polymer*. 101, 1116-21, 2014.
- 8- Muzzarelli R.A.A. Genipin-Crosslinked Chitosan Hydrogels as Biomedical and Pharmaceutical Aids. *Carbohydrate Polymers*. 77(1), 1-9, 2009.
- 9- Montembault A., Viton C., Domard A. Rheometric Study of The Gelation of Chitosan in Aqueous Solution Without Cross-Linking Agent. *Biomacromolecules*. 6(2), 653-62, 2005.
- 10- Liu L., Tang X., Wang Y., Guo S. Smart Gelation of Chitosan Solution in The Presence of NaHCO₃ for Injectable Drug Delivery System. *International journal of pharmaceutics*. 414(1-2), 6-15, 2011.
- 11- Croisier F., Jérôme C. Chitosan-Based Biomaterials for Tissue Engineering. *European Polymer Journal*. 49(4), 780-92, 2013.
- 12- Xu B., Wang L., Liu Y., Zhu H., Wang Q. Preparation of High Strength and Transparent Nanocomposite Hydrogels Using Alumina Nanoparticles as Cross-Linking Agents. *Materials Letters*. 228, 104-7, 2018.
- 13- Xie Y., Liao X., Zhang J., Yang F., Fan Z. Novel Chitosan Hydrogels Reinforced by Silver Nanoparticles With Ultrahigh Mechanical and High Antibacterial Properties for Accelerating Wound Healing. *International Journal of Biological Macromolecules*. 119, 402-12, 2018.
- 14- Szczeń A., Holysz L., Chibowski E. Synthesis of Hydroxyapatite for Biomedical Applications. *Advances in Colloid and Interface Science*. 249, 321-30, 2017.
- 15- Yoshikawa H., Tamai N., Murase T., Myoui A. Interconnected Porous Hydroxyapatite Ceramics for Bone Tissue Engineering. *Journal of the Royal Society, Interface*. 6 Suppl 3(Suppl 3):S341-S8, 2009.
- 16- Nikpour M.R., Rabiee S.M., Jahanshahi M. Synthesis and Characterization of Hydroxyapatite/Chitosan Nanocomposite Materials for Medical Engineering Applications. *Composites Part B: Engineering*. 43(4), 1881-6, 2012.
- 17- Chang C., Peng N., He M., Teramoto Y., Nishio Y., Zhang L. Fabrication and Properties of Chitin/Hydroxyapatite Hybrid Hydrogels as Scaffold Nano-Materials. *Carbohydr Polymer*. 91(1), 7-13, 2013.
- 18- Fricain J.C., Schlaubitz S., Le Visage C., Arnault I., Derkaoui S.M., Siadous R., Catros S., Lalonde C., Barreille R., Fabre T., Cornet S., Durand M., Leonard A., Sahraoui N., Letourneur D., Amedee J. A Nano-Hydroxyapatite--Pullulan/Dextran Polysaccharide Composite Macroporous Material for Bone Tissue Engineering. *Biomaterials*. 34(12), 2947-59, 2013.
- 19- Saxena V., Hasan A., Pandey L.M. Effect of Zn/ZnO Integration With Hydroxyapatite: A Review. *Materials Technology*. 33(2), 79-92, 2018.
- 20- Meshkini A. Modulation of Oxidative Stress in Thrombin-Stimulated Platelets by Almond by-Product. *Waste and Biomass Valorization*. 9(6), 1015-25, 2018.
- 21- Pezeshkpour V., Khosravani S.A., Ghaedi M., Dastan K., Zare F., Sharifi A., Jannesar R., Zoladl M. Ultrasound Assisted Extraction of Phenolic Acids From Broccoli Vegetable and Using Sonochemistry for Prepa-

- ration of MOF-5 Nanocubes: Comparative Study Based on Micro-Dilution Broth and Plate Count Method for Synergism Antibacterial Effect. *Ultrasonics Sonochemistry*. 40,1031-8, 2018.22- Meshkini A. Acetone Extract of Almond Hulls Provides Protection against Oxidative Damage and Membrane Protein Degradation. *Journal of acupuncture and meridian studies*. 9(3), 134-42, 2016.
- 23- Bradford M.M. A Rapid and Sensitive Method for The Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing The Principle of Protein-Dye Binding. *Analytical biochemistry*. 72, 248-54, 1976.
- 24-Hashemian S. A Comparative Study of Cellulose Agricultural Wastes (Almond Shell, Pistachio Shell, Walnut Shell, Tea Waste And Orange Peel) for Adsorption of Violet B Dye from Aqueous Solutions. *Oriental Journal Chemistry*. 30, 4, 2014.
- 25- Zhang N., Gao T., Wang Y., Wang Z., Zhang P., Liu J. Environmental pH-Controlled Loading and Release of Protein on Mesoporous Hydroxyapatite Nanoparticles for Bone Tissue Engineering. *Materials science & engineering C, Materials for biological applications*. 46, 158-65, 2015.
- 26- Contri R.V., Soares R.M.D., Pohlmann A.R., Guterres S.S. Structural Analysis of Chitosan Hydrogels Containing Polymeric Nanocapsules. *Materials Science and Engineering: C*. 42, 234-42, 2014.
- 27- Ngo D.H., Kim S.K. Chapter Two - Antioxidant Effects of Chitin, Chitosan, and Their Derivatives. In: Kim S-K, editor. *Advances in food and nutrition research*. 73: Academic Press;. p. 15-31, 2014.
- 28- Ngo D.H., Kim S.K. Antioxidant Effects of Chitin, Chitosan, and Their Derivatives. *Advances in food and nutrition research*. 73,15-31, 2014.
- 29- Jin P., Wu H., Xu G., Zheng L., Zhao J. Epigallocatechin-3-gallate (EGCG) as a Pro-Osteogenic Agent to Enhance Osteogenic Differentiation of Mesenchymal Stem Cells From Human Bone Marrow: An In Vitro Study. *Cell and tissue research*. 356(2), 381-90, 2014.
- 30- Sistanipour E., Meshkini A., Oveisi H. Catechin-Conjugated Mesoporous Hydroxyapatite Nanoparticle: A Novel Nano-Antioxidant With Enhanced Osteogenic Property. *Colloids and surfaces B, Biointerface*, 169, 329-339, 2018.
- 31- Aubin J.E. Regulation of Osteoblast Formation and Function. *Reviews in endocrine & metabolic disorders*. 2(1), 81-94, 2001.
- 32- Rodriguez-Valencia C., Freixeiro P., Serra J., Ferreira C.M., Gonzalez P., Lopez-Alvarez M. In Vitro Evaluation of The Antibacterial and Osteogenic Activity Promoted by Selenium-Doped Calcium Phosphate Coatings. *Biomedical materials (Bristol, England)*. 12(1), 015028, 2017.

