

Effect of Zinc Oxide Addition on Antibacterial Behavior of Hydroxyapatite-Poly lactic-co-glycolic acid Scaffold for Bone Tissue Engineering Applications

Narges Abotalebi

M.Sc. Student, Department of Tissue Engineering, Najafabad Branch, Islamic Azad University, Najafabad, Iran, ns.abotalebi@gmail.com

Elahe Poorazizi *

Assistant Professor of Biochemistry, Department of Biochemistry, Najafabad Branch, Islamic Azad University, Najafabad, Iran,

elahpoorazizi@pmd.iaun.ac.ir

Hossein Abbastabar Ahangar

Assistant Professor of Chemistry, Department of Chemistry, Najafabad Branch, Islamic Azad University, Najafabad, Iran, abbastabar@pmt.iaun.ac.ir

Abstract

Introduction: Infection after the surgery is one of the problems of bone scaffolds implants which is normally treated by systemic administration of antibiotics. But due to the poor blood circulation in bone tissue, large antibiotic doses are needed which lead to further drawbacks to renal and hepatic systems.

Materials and methods: In this study, the effect of zinc oxide addition on antibacterial behavior of hydroxyapatite -Poly lactic-co-glycolic acid scaffold was evaluated. The synthesized composite was characterized by X-ray diffraction, scanning electron microscopy equipped with elemental analysis and Fourier transform infrared spectra. In order to determine the antibacterial activity of the fabricated scaffold, *Staphylococcus aureus* (ATTC 25922) and *Escherichia coli* (ATTC 25923) were used as test microorganisms.

Results: The results showed that Hydroxyapatite- Poly lactic-co-glycolic acid scaffold did not make inhibition zone in culture medium but the modification of Hydroxyapatite- Poly lactic-co-glycolic acid scaffold's surface by zinc oxide particles caused Hydroxyapatite- Poly lactic-co-glycolic acid- zinc oxide scaffold to have antibacterial inhibition zone of 12 and 20 mm for *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*, respectively.

Discussion and conclusion: This study revealed that the addition of antibacterial agent to applicable bone tissue engineering scaffolds could be considered as an appropriate way to prevent the growth of infection at the scaffold sites.

Key words: Bone Tissue Engineering, Antibacterial, Zinc Oxide, Hydroxyapatite, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*

* Corresponding author

Received: November 21, 2016 / **Accepted:** April 30, 2017

فصلنامه علمی- پژوهشی زیست‌شناسی میکروارگانیسم‌ها

سال هفتم، شماره ۲۵، بهار ۱۳۹۷، صفحه ۳۳-۴۳

تاریخ دریافت: ۱۳۹۵/۰۹/۰۱ - تاریخ پذیرش: ۱۳۹۶/۰۲/۱۰

اثر افزودن اکسیدروی بر رفتار آنتی‌باکتریال داربست کامپوزیتی هیدروکسی‌آپاتیت- پلی‌لاکتیک کوگلایکولیک اسید برای کاربردهای مهندسی بافت استخوان

نرگس ابوطالبی: دانشجوی کارشناسی ارشد گروه مهندسی بافت، واحد نجف آباد، دانشگاه آزاد اسلامی، نجف آباد، ایران، ns.abotalebi@gmail.com

الهه پورعزیزی*: استادیار بیوشیمی، گروه بیوشیمی، واحد نجف آباد، دانشگاه آزاد اسلامی، نجف آباد، ایران، elahpoorazizi@pmd.iaun.ac.ir

حسین عباس تبار آهنگر: استادیار شیمی، گروه شیمی، واحد نجف آباد، دانشگاه آزاد اسلامی، نجف آباد، ایران، abbastabar@pmt.iaun.ac.ir

چکیده

مقدمه: عفونت پس از عمل جراحی یکی از معضلات کاشت داربست‌های استخوانی است که به‌طور معمول با تجویز آنتی‌بیوتیک‌ها درمان می‌شود. این درمان به‌علت خون‌رسانی ضعیف به بافت استخوان با غلظت‌های زیاد دارو انجام و به مشکلات کبدی و کلیوی منجر می‌شود.

مواد و روش‌ها: در پژوهش حاضر، اثر افزودن اکسیدروی (ZnO) بر رفتار آنتی‌باکتریال داربست کامپوزیتی هیدروکسی‌آپاتیت-پلی‌لاکتیک کوگلایکولیک اسید ارزیابی شد. کامپوزیت تولیدی با پراش اشعه ایکس، میکروسکوپ الکترونی روبشی مجهز به آنالیز عنصری و طیف‌سنجی فروسرخ مشخصه‌یابی شد. دو سویه باکتری گرم مثبت/استافیلوکوکوس اورئوس (ATTC 25922) و گرم منفی/شریشیاکلی (ATTC 25923) برای آزمون آنتی‌باکتریال داربست تولیدی استفاده شدند.

نتایج: نتایج نشان دادند که داربست کامپوزیتی هیدروکسی‌آپاتیت-پلی‌لاکتیک کوگلایکولیک اسید در محیط کشت باکتری‌ها هاله رشدنکردن ایجاد نکرد ولی اصلاح سطح داربست با اکسیدروی باعث ایجاد هاله رشدنکردن ۱۲ و ۲۰ میلی‌متری به ترتیب برای باکتری‌های شریشیاکلی و استافیلوکوکوس اورئوس شد.

بحث و نتیجه‌گیری: این مطالعه نشان داد که افزودن عامل ضدباکتریایی به داربست‌های کاربردی در حوزه مهندسی بافت استخوان می‌تواند راه‌حل مناسبی برای جلوگیری از رشد عفونت در محل کاشت داربست باشد.

واژه‌های کلیدی: مهندسی بافت استخوان، آنتی‌باکتریال، اکسیدروی، هیدروکسی‌آپاتیت، شریشیاکلی، استافیلوکوکوس اورئوس

* نویسنده مسئول مکاتبات

مقدمه

با توجه به افزایش جمعیت کشورهای مختلف در دهه‌های اخیر، بیماری‌های استخوانی بیش از گذشته در جمعیت میانسال و کهنسال دیده می‌شوند. استفاده از پیوند اتوژنیک و آلوژنیک برای درمان نقص‌های ساختمانی تاریخچه طولانی دارد؛ اگرچه پیوند اتوژنیک عملکرد بهتری درباره زیست‌سازگاری و سایر عامل‌ها دارد، به عمل جراحی دوم برای دریافت بافت اهداکننده نیاز است. در پیوند آلوژنیک نیز خطر عفونت و پس‌زدن وجود دارد و حتی ممکن است باعث انتقال بیماری شود و بر کیفیت زندگی تأثیر گذارد. پیوند استخوان با داربست‌هایی که از زیست‌مواد طبیعی و مصنوعی ساخته می‌شوند مانند فلزات، سرامیک‌ها، پلیمرها و کامپوزیت‌ها روشی تأییدشده برای غلبه کردن بر این مشکلات است. از آنجا که بافت استخوان به شکل طبیعی شامل نانو کامپوزیت سرامیکی (کلسیم فسفات) - پلیمری (کلاژن) است، استفاده از کامپوزیت‌ها برای تولید داربست استخوانی با ویژگی‌های مکانیکی مناسب ضروری است (۱ و ۲).

هیدروکسی-آپاتیت (HAp)^۱ با فرمول شیمیایی $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ درجه زیادی از پایداری شیمیایی و زیست‌سازگاری در محیط فیزیولوژیک بدن دارد و به طور گسترده به عنوان پرکننده نقص‌های استخوانی استفاده می‌شود. با وجود این، استفاده از این ماده در داربست‌های مهندسی بافت استخوان به شکل مستقل محدود شده است زیرا این زیست سرامیک استحکام کششی ضعیفی دارد (۳). در برابر زیست سرامیک‌ها، زیست پلیمرها مطرح می‌شوند که انواع زیست‌سازگار آنها انعطاف پذیر هستند و به آسانی تغییر شکل می‌دهند. از معروف‌ترین و پرکاربردترین پلیمرهای

زیست تخریب و زیست‌سازگار در مهندسی بافت و سیستم‌های رهایش دارو ترکیب دو پلیمر لاکتیک اسید (PLA)^۲ و گلایکولیک اسید (PGA)^۳ یعنی کوپلیمر پلی لاکتیک کو گلایکولیک اسید^۴ (PLGA) است؛ این کوپلیمر با نسبت‌های مختلفی از PLA و PGA و با وزن‌های مولکولی مختلف در دسترس و تأییدشده سازمان غذا و داروی آمریکا (FDA) است. به علت ویژگی‌های منحصر به فرد از جمله زیست‌سازگاری، ویژگی‌های فیزیکی و مکانیکی خوب و زیست تخریب پذیری، این زیست ماده برای مهندسان بافت و پژوهشگران درخور توجه ویژه است (۴). یکی از مشکلات کاشت داربست‌های استخوانی، عفونت پس از عمل جراحی است و چنانچه این عفونت‌ها به شکل مناسب درمان نشوند، به مشکلی جدی تبدیل شده و عمل جراحی دوم را در پی خواهند داشت. به طور معمول، پزشکان پس از کاشت داربست استخوانی، داروهای آنتی بیوتیک تجویز می‌کنند ولی چون خون‌رسانی به بافت استخوان ضعیف است، غلظت‌های زیادی از دارو نیاز است که باعث مسمومیت دارویی و مشکلات کبدی-کلیوی می‌شود (۵). یکی از راهکارهای مؤثر جایگزین که توجه پژوهشگران را جلب کرده، استفاده از عوامل آنتی باکتریال معدنی در داربست‌های استخوانی است؛ این عوامل قادرند از رشد باکتری به شکل موضعی در محل کاشتنی جلوگیری کنند (۶).

در سال‌های اخیر، اثر افزودن یون‌های نقره، مس و روی بر رفتار آنتی باکتریال HAp بررسی شده است. همچنین، ماتسوموتو^۵ و همکاران اثر افزودن یون‌های مس (Cu)، نقره (Ag) و روی (Zn) به ترکیب بتاتری کلسیم فسفات (TCP) و رفتار آنتی باکتریال آن را

منبع زیستی استخوان ران گوساله تهیه شد. ابتدا قسمت های اسفنجی استخوان، مغز استخوان و تکه های گوشت و چربی از قسمت متراکم استخوان جدا و سپس، با مشعل به قسمت متراکم استخوان حرارت مستقیم داده شد تا ترکیبات آلی سوخته و از آن خارج شوند. ماده حاصل به علت داشتن کربن ناشی از سوختن، سیاه شد؛ برای خارج کردن این کربن سیاه، استخوان به مدت ۲ ساعت درون کوره الکتریکی با دمای ۱۲۰۰ درجه سانتی گراد در مجاورت هوا حرارت داده شد و سپس، استخوان سیاه رنگ به استخوان سفید رنگ و طی فرایند بال میل، پودر سفید رنگ تبدیل شد (۱۰).

ساخت داربست PLGA: برای ساخت داربست HAp-PLGA از اسفنج پلی یورتان (PU)، پودر تهیه شده HAp، کربوکسی متیل سلولز و سدیم تری فسفات استفاده شد. ابتدا، اسفنج های پلی یورتان در ابعاد ۱×۱×۱ سانتی متر بریده شدند. برای ساخت هر داربست، ۰/۱ گرم سدیم تری پلی فسفات در ۱۰ میلی لیتر آب جوش حل و سپس روی آن نایلون کشیده و کنار گذاشته شد. ۱۰ میلی لیتر آب مقطر به مدت ۵ دقیقه با همزن مغناطیسی گرم و سپس به آرامی ۱ گرم پودر HAp تهیه شده به آن اضافه شد. پس از گذشت ۳۰ دقیقه، ۰/۳ گرم کربوکسی متیل سلولز کم کم به این محلول اضافه شد و مواد ۲۰ دقیقه با هم مخلوط شدند؛ به این محلول از سدیم تری پلی فسفات حل شده در آب به اندازه ای اضافه شد که محلول قوام مناسبی داشته باشد. سپس، ۱ قطعه اسفنج پلی یورتان درون محلول حاصل غوطه ور و ۲۴ ساعت درون آن با دمای ۸۰ درجه سانتی گراد قرار داده شد تا خشک شود. قطعه اسفنج پلی یورتان خشک شده به مدت ۲ ساعت و با نرخ سرعت گرم شدن ۲ درجه بر دقیقه در دمای ۶۰۰ درجه

بررسی کردند؛ نتایج، نشان دادند که از نظر آنتی باکتریالی کامپوزیت های AgCu-TCP و AgZn-TCP فعال تر از کامپوزیت Ag-TCP هستند (۷). دلیماً و همکاران نیز اثر افزودن یون های دو ظرفیتی Co^{2+} ، Mg^{2+} ، Cu^{2+} ، Pb^{2+} و Zn^{2+} را بر رفتار زیستی HAp بررسی کردند (۸). ژائو^۷ و همکاران در سال ۲۰۱۱، فعالیت آنتی باکتریال نانو کامپوزیت مس جایگزین شده در HAp پلی یورتان را در برابر باکتری های /شریشیاکلی^۸ و /استافیلوکوکوس /اورئوس^۹ بررسی کردند؛ نتایج نشان دادند که فعالیت آنتی باکتریال نانو کامپوزیت یاد شده در حضور یون مس بهبود یافت (۹). هدف پژوهش حاضر، ساخت داربست کامپوزیتی HAp-PLGA لایه نشانی شده با اکسیدروی (ZnO) و بررسی رفتار آنتی باکتریال ZnO روی این داربست برای کاربرد در مهندسی بافت استخوان است. نوآوری این پژوهش، پوشش دهی کامپوزیت HAp-PLGA با ZnO و بررسی ویژگی های آنتی باکتریال آن در برابر دو سویه باکتری /شریشیاکلی و /استافیلوکوکوس /اورئوس برای نخستین بار است.

مواد و روش ها

مواد: HAp طبیعی از استخوان ران گوساله تهیه شد. نیترات روی شش آب به $(\text{Zn}(\text{NO}_3)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O})$ ، کربوکسی متیل سلولز و پلی لاکتیک کو گلایکولیک اسید از کمپانی سیگما-آلد ریچ (آمریکا) و سدیم تری پلی فسفات $(\text{Na}_5\text{P}_3\text{O}_{10})$ با درصد خلوص بیش از ۹۴ درصد، سدیم هیدروکسید با خلوص ۸۵ درصد، سیتریک اسید و دی کلرومتان از کمپانی مرک (آلمان) خریداری شدند.

تهیه داربست PLGA-HAp-ZnO:

تهیه پودر HAp: در پژوهش حاضر، HAp طبیعی از

شرایط استریل و زیرهود لمینار انجام شد. برای هر داربست، ۰/۱ گرم پودر ZnO در ۵ میلی‌لیتر آب مقطر درون لوله آزمایش غوطه‌ور شد و سپس، داربست HAp پوشش داده شده با PLGA درون محلول قرار گرفت. سپس، لوله‌ها با پنبه مسدود شدند و ۲۴ ساعت درون آون با دمای ۵۰ درجه سانتی‌گراد قرار گرفتند.

آماده‌سازی محیط‌کشت باکتری‌ها و آزمون آنتی‌باکتریال: از سویه‌های باکتری‌های گرم منفی *اشریشیا کلی* (ATCC 25923) و گرم مثبت *استافیلوکوکوس اورئوس* (ATCC 25922) برای بررسی ویژگی‌های آنتی‌باکتریال داربست تولیدی استفاده شد. این باکتری‌ها پیش از استفاده در شرایط هوازای و در محیط مولر هینتون برات^{۱۱}، ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد گرماگذاری شدند. پس از کشت ۲۴ ساعته باکتری‌ها، غلظتی معادل استاندارد نیم مک‌فارلند تهیه و به کمک سواب استریل روی پلیت حاوی محیط‌کشت مولر هینتون آگار کشت خطی یکنواخت داده شد. برای خروج رطوبت، داربست‌های HAp-PLGA حاوی و فاقد ZnO زیر هود لمینار قرار گرفتند و با پنس استریل به درون پتری‌دیش‌های کشت مولر هینتون آگار (پتری‌دیش حاوی کشت باکتری *اشریشیا کلی* و پتری‌دیش حاوی کشت باکتری *استافیلوکوکوس اورئوس*) منتقل شدند. پس از انتقال، اندکی با پنس به داربست‌ها فشار وارد شد تا ا درون محیط کشت مولر هینتون آگار ثابت شوند. در پایان، پتری‌دیش‌های کشت مولر هینتون آگار و داربست‌های ثابت شده درون آنها ۱۸ ساعت درون انکوباتور با دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد قرار گرفتند.

ریخت‌شناسی داربست‌ها: ریخت‌شناسی و ساختار

داربست‌های کامپوزیتی HAp-PLGA-ZnO و HAp-

سانتی‌گراد درون کوره الکتریکی قرار گرفت و ۱ ساعت در این دما نگه داشته شد، دوباره با همان نرخ سرعت گرم‌شدن به دمای ۱۲۰۰ درجه سانتی‌گراد رسید و ۱ ساعت در این دما نگه داشته شد و سپس به دمای محیط رسید. داربست تولیدی به محلول PLGA (۱ گرم PLGA در ۱۵ میلی‌لیتر دی‌کلرومتان) اضافه و ۱ دقیقه درون محلول غوطه‌ور شد. پس از آن، نمونه به کمک قیف بوخنر و در خلأ صاف شد تا ذرات PLGA داخل منافذ داربست وارد شوند. دوباره داربست ۳۰ ثانیه در محلول PLGA قرار گرفت تا پوشش دهی کامل شود. داربست پوشش داده شده ۲ ساعت درون آون و در دمای ۸۰ درجه سانتی‌گراد قرار گرفت تا خشک شود. گفتنی است که برای استریل کردن داربست تهیه‌شده، ابتدا داربست درون پتری‌دیش استریل شده قرار داده شد و سپس شش وجه داربست، ۲۰ دقیقه زیر هود لمینار با اشعه UV استریل شدند (۱۰).

تهیه ZnO و اصلاح داربست با آن: برای تولید ZnO،

دو محلول A و B تهیه شدند: محلول A: ۲/۴ گرم نیترات روی شش‌آبه در ۳۰ میلی‌لیتر آب مقطر حل و سپس برای کنترل اندازه ذرات، ۲ گرم سیتریک‌اسید به آن اضافه و ۵ دقیقه روی همزن مغناطیسی قرار داده شد. محلول B: ۳/۶ گرم سود در ۵۰ میلی‌لیتر آب مقطر حل و به وسیله بورت قطره‌قطره به محلول A افزوده شد. سپس، ذرات ZnO با سانتریفیوژ جداسازی شدند. ZnO حاصل با آب مقطر شستشو و ۲۴ ساعت در دمای ۷۰ تا ۸۰ درجه سانتی‌گراد درون آون خشک شد. برای حذف کامل سیتریک‌اسید، به مدت ۴ ساعت درون کوره الکتریکی و دمای ۵۰۰ درجه سانتی‌گراد قرار گرفت (۱۱ و ۱۲).

آماده‌سازی داربست اصلاح‌شده با ذرات ZnO در

عنصر Zn در تصویر آنالیز عنصری داربست HAp-PLGA-ZnO (شکل ۱-ب) به وضوح دیده می شود. از تصاویر SEM همراه با آنالیز عنصری (EDS) داربست های کامپوزیتی HAp-PLGA و HAp-ZnO می توان نتیجه گرفت که ZnO با موفقیت سطح داربست HAp-PLGA را اصلاح کرده است.

بررسی الگوی پراش اشعه ایکس (XRD): پراش اشعه X نمونه های HAp، ZnO و HAp-PLGA-ZnO به ترتیب در شکل ۲-الف، ب و ج ارائه شده است. HAp بسیار بلوری است و قله هایی با شدت ۲θ مساوی ۲۶°، ۳۲°، ۴۰°، ۴۶° و ۴۹° نشان داده است که این قله ها با کارت JCPDS به شماره ۰۴۳۲-۰۰۹ مربوط به الگوی پراش اشعه ایکس HAp مطابقت دارند. همان طور که در شکل ۲-ب دیده می شود، ZnO قله های تیزی در موقعیت های ۲θ مساوی ۳۱°، ۳۴°، ۳۶°، ۴۷°، ۵۶° و ۶۲° و ۶۷° دارد که ماهیت بلوری ZnO را نشان می دهد (۱۳). داربست کامپوزیتی HAp-PLGA-ZnO تمام قله های ویژه ZnO و HAp را نشان می دهد (شکل ۲-ج) که ماهیت بلوری این داربست کامپوزیتی را تأیید می کند. همچنین دو قله موجود در داربست کامپوزیتی HAp-PLGA-ZnO واقع در موقعیت های ۲θ مساوی ۳۶° و ۴۷° به ترتیب نماینده صفحات بلورینه (۱۰۱) و (۱۰۲) مربوط به ZnO هستند و با کارت JCPDS شماره ۰۰۳-۰۸۸۸ مربوط به الگوی پراش اشعه ایکس ZnO تطابق دارند. کاهش شدت قله های داربست کامپوزیتی HAp-PLGA-ZnO نسبت به قله های ZnO و HAp خالص، کاهش درجه تبلور این داربست کامپوزیتی را با توجه به ترکیب PLGA آمورف نشان می دهد.

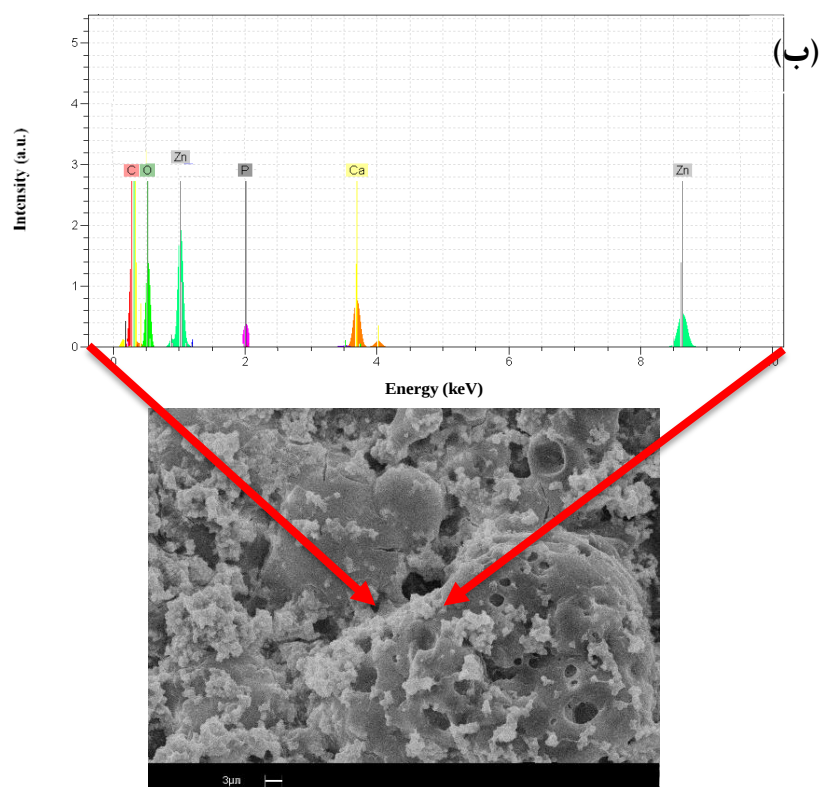
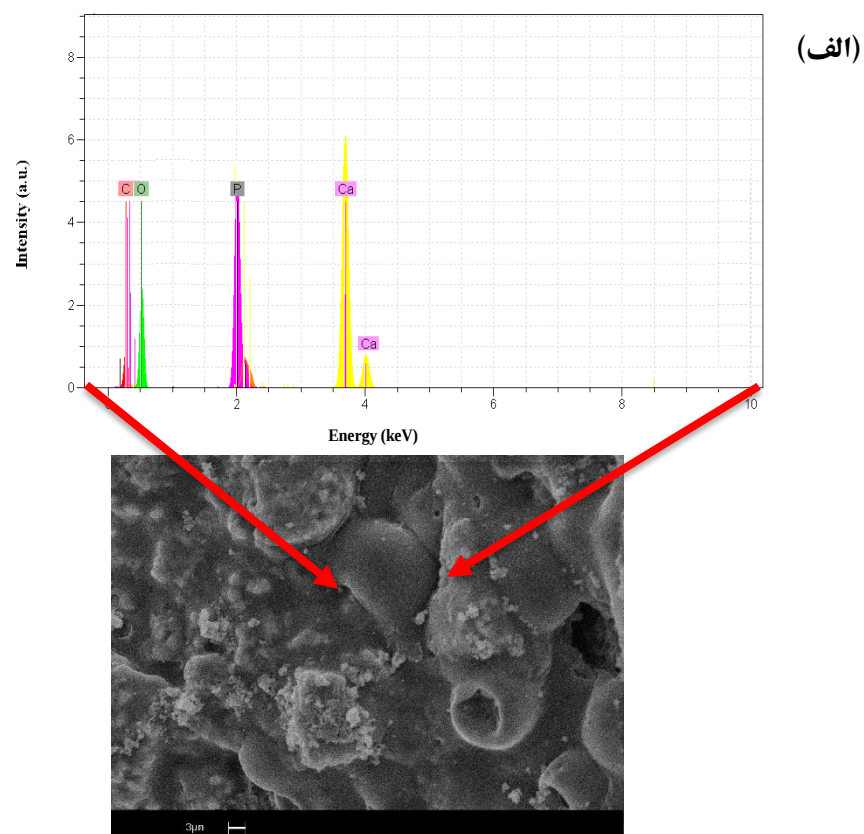
PLGA با میکروسکوپ الکترونی روبشی (SEM, Philips ESEM XL30) مجهز به آنالیز عنصری (EDS) بررسی شد. همچنین، اندازه تخلخل داربست های تهیه شده با نرم افزار Digi mizer اندازه گیری شد.

پراش پرتو ایکس: ترکیب فازی داربست HAp-PLGA-ZnO با پراش اشعه ایکس (XRD) مدل Philips TW3710 بررسی شد.

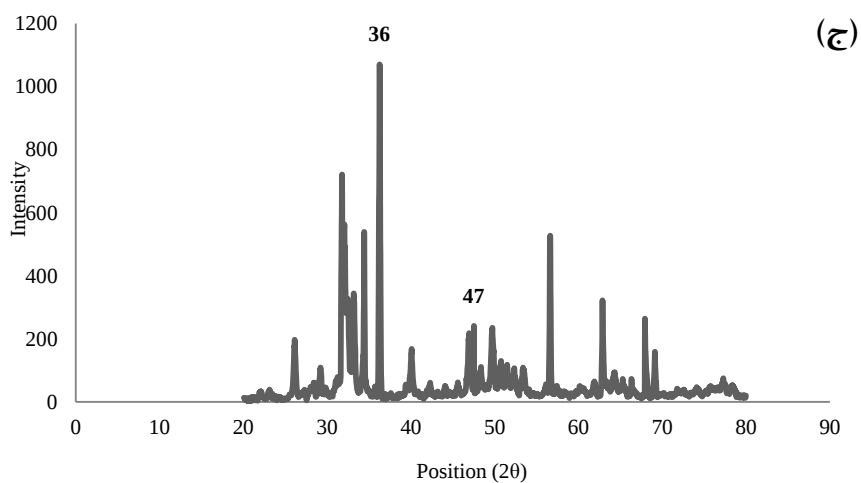
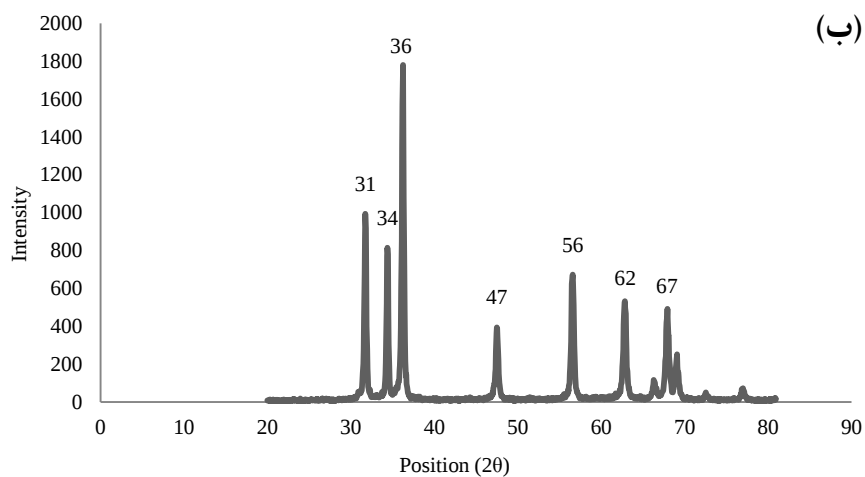
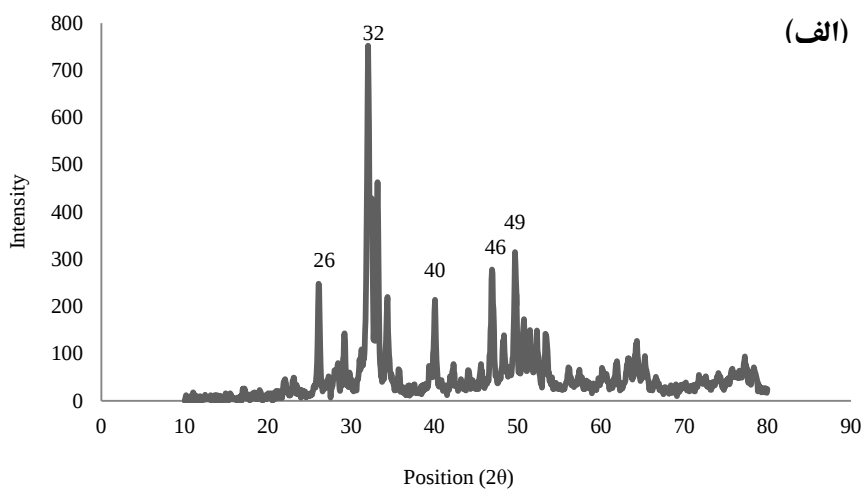
طیف سنجی FTIR: طیف سنجی فروسرخ تبدیل فوریه مدل JASCO 6300 برای شناسایی و تعیین گروه های عاملی و پیوندهای داربست های تهیه شده استفاده شد.

نتایج

بررسی ریخت شناسی داربست ها: شکل ۱-الف و ب به ترتیب تصاویر SEM همراه با آنالیز عنصری (EDS) داربست های کامپوزیتی HAp-PLGA و HAp-ZnO را نشان می دهد. در شکل ۱-الف، داربست کامپوزیتی HAp-PLGA دارای سطوح ناهموار همراه با تخلخل است. پس از فرایند لایه نشانی کامپوزیت HAp-PLGA با ZnO، این ذرات به شکل ذرات بلوری روی سطح کامپوزیت HAp-PLGA مشاهده می شوند (شکل ۱-ب). نتایج نشان دادند که میانگین اندازه منافذ برای داربست های HAp-PLGA و HAp-PLGA-ZnO به ترتیب برابر ۳۶۵ و ۳۳۲ میکرومتر است. نتایج آنالیز عنصری داربست HAp-PLGA در شکل ۱-الف، حضور عناصر کلسیم، فسفر و کربن را در این داربست تأیید می کند و این عناصر به ترتیب به ساختارهای HAp و PLGA نسبت داده می شوند. با مقایسه تصاویر آنالیز عنصری داربست HAp-PLGA و HAp-PLGA-ZnO، حضور قله های



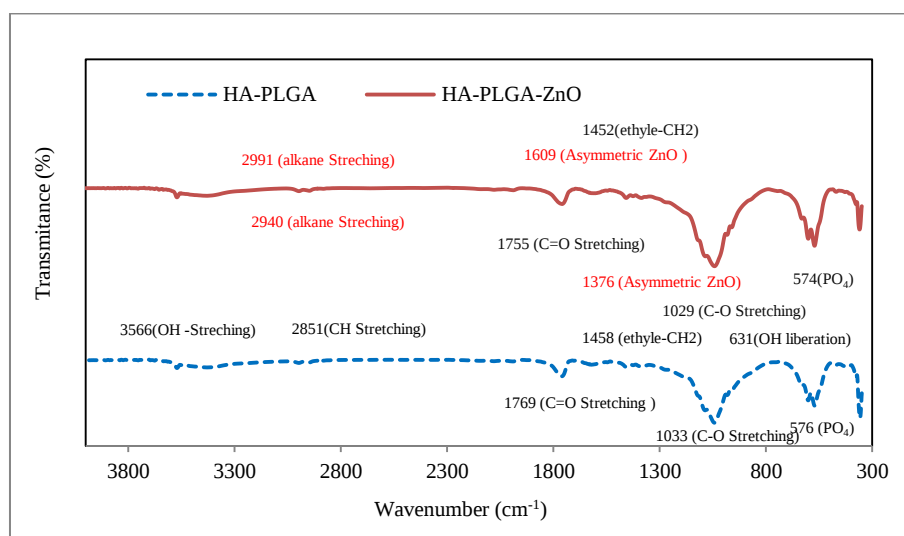
شکل ۱- تصاویر SEM داربست‌های الف. HAp-PLGA، ب. HAp-PLGA-ZnO



شکل ۲- الگوی پراش اشعه ایکس الف. HAp، ب. ZnO، ج HAp-PLGA-ZnO

OH به ترتیب در حالت کششی و آزاد متعلق هستند. علاوه بر این، گروه‌های 1033 cm^{-1} ، 1033 cm^{-1} و 601 cm^{-1} 576 cm^{-1} ناشی از گروه‌های فسفات هم دیده می‌شوند. در طیف FTIR داربست کامپوزیتی HAp-PLGA-ZnO، تمام باندهای ویژه HAp-PLGA مشاهده شدند (۱۵). تنها تفاوت بین طیف FTIR داربست HAp-PLGA و ZnO 2940 cm^{-1} و 2991 cm^{-1} متعلق به گروه‌های آلکان CH کششی و قله‌های 1609 cm^{-1} و 1376 cm^{-1} به ترتیب مربوط به باند کششی نامتقارن و متقارن ZnO است. حضور این گروه‌ها در طیف FTIR مربوط به داربست HAp-PLGA-ZnO، وجود اکسیدروی را در داربست HAp-PLGA تأیید می‌کند.

بررسی طیف سنجی فروسرخ (FTIR): طیف سنجی FTIR برای توصیف گروه‌های عاملی HAp-PLGA و HAp-PLGA-ZnO انجام شد (شکل ۳). به طور معمول، FTIR برای ارزیابی بیشتر شیمی سطح و ویژگی‌های مواد استفاده می‌شود (۱۴). در طیف FTIR مربوط به HAp-PLGA، چند باند ویژه PLGA در 1033 cm^{-1} و 1769 cm^{-1} (C=O کششی)، 1458 cm^{-1} (اتیل-CH₂)، 1029 cm^{-1} (کربونیل کششی)، 1033 cm^{-1} (CH- کششی) و 576 cm^{-1} (OH- کششی) به وضوح دیده می‌شوند. همچنین، HAp پنج باند مادون قرمز مهم واقع در 1033 cm^{-1} ، 576 cm^{-1} ، 601 cm^{-1} ، 631 cm^{-1} و 3566 cm^{-1} را نشان می‌دهد. در میان این باندها، دو باند در 3566 cm^{-1} و 631 cm^{-1} مشاهده می‌شوند که به پیوند هیدروژنی یون



شکل ۳- طیف FTIR کامپوزیت‌های HAp-PLGA و HAp-PLGA-ZnO

آنتی‌باکتریال داربست‌ها انتخاب شدند. استافیلوکوکوس اورئوس باکتری گرم مثبت، بی‌هوازی اختیاری و یکی از شایع‌ترین باکتری‌های بیماری‌زاست که با تولید رنگدانه تلایی کاروتنوئیدی به نام استافیلوزانتین، کلنی‌های زردرنگی ایجاد می‌کند.

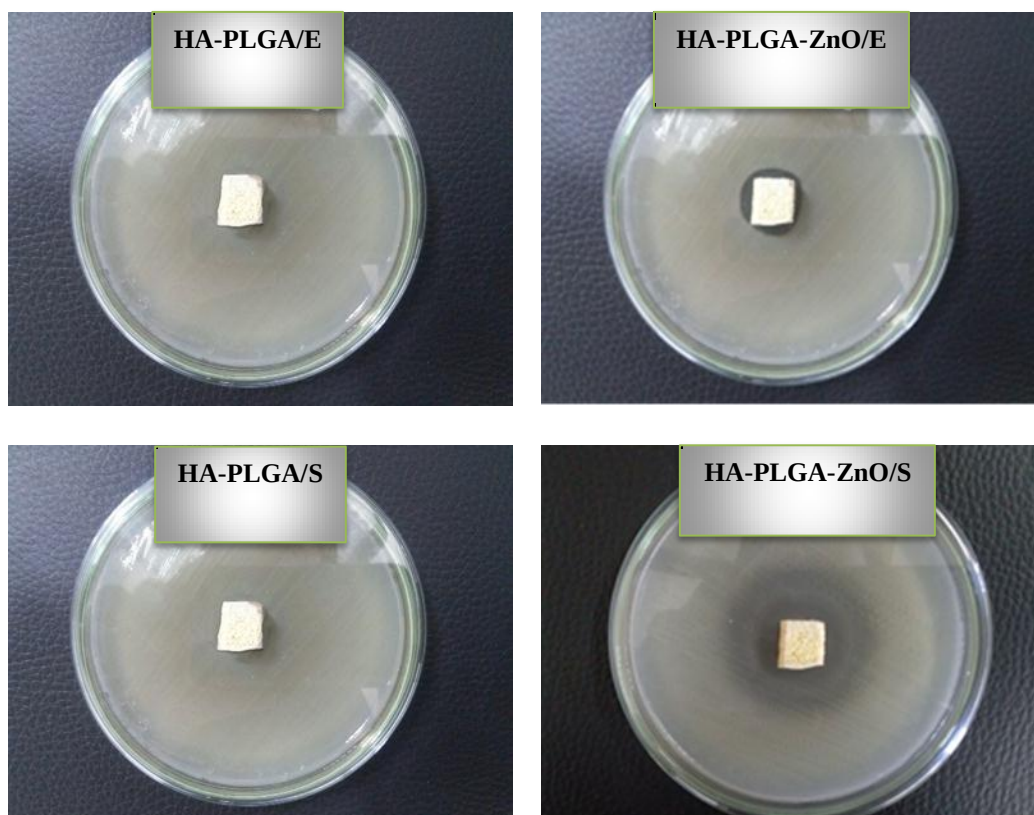
بررسی رفتار آنتی‌باکتریال داربست‌ها: شکل ۴،

نتایج آزمون آنتی‌باکتریال داربست کامپوزیتی HAp-PLGA حاوی و فاقد اکسیدروی را نشان می‌دهد. در این پژوهش، دو سویه باکتری/شریشیاکلی و استافیلوکوکوس اورئوس برای ارزیابی رفتار

است. باکتری/شریشیا کلی، در حالت عادی در دستگاه گوارش انسان زندگی می کند و معمولاً بیماری زا نیست ولی گونه های خاصی از این باکتری در شرایط خاص می توانند بیماری های مختلفی ایجاد کنند (۱۶).

همان طور که در شکل ۴، مشاهده می شود، داربست کامپوزیتی HAp-PLGA در محیط کشت باکتری های/شریشیا کلی و/استافیلوکوکوس اورئوس، هاله رشد نکردن ایجاد نکرده است ولی هاله رشد نکردن در اطراف داربست کامپوزیتی HAp-PLGA-ZnO در محیط کشت باکتری های/شریشیا کلی و/استافیلوکوکوس به وضوح دیده می شود. قطر هاله رشد نکردن در محیط کشت باکتری/شریشیا کلی و/استافیلوکوکوس اورئوس به ترتیب برابر ۱۲ و ۲۰ میلی متر است.

این رنگدانه در بیماری زایی نقش دارد زیرا به عنوان ماده آنتی اکسیدان عمل کرده و موجب در امان ماندن باکتری در برابر رادیکال های آزاد اکسیژنی می شود که سیستم ایمنی (گلبول های سفید) میزبان برای کشتن باکتری ها تولید می کنند. این باکتری، گستره وسیعی از عفونت های ساده پوستی (مانند جوشدانه، کورک، کفگیرک، گل مژه و آبسه) تا بیماری های خطرناک تری (مانند پنومونی، مننژیت، استئومیلیت، اندوکاردیت، سندرم شوک سمی و سپتی سمی) را ایجاد می کند. استافیلوکوکوس اورئوس یکی از پنج عامل شایع ایجاد کننده عفونت های بیمارستانی به ویژه عفونت های زخم پس از جراحی است (۱۴)./شریشیا کلی که به باسیل معروف است، باکتری گرم منفی، متحرک، هوازی بی هوازی اختیاری (با قابلیت رشد در دو محیط)



شکل ۴- تصویر داربست HAp-PLGA و HAp-PLGA-ZnO در حضور باکتری های/شریشیا کلی (E) و استافیلوکوکوس اورئوس (S)

محیط کشت باکتری‌ها، ویژگی آنتی‌باکتریال مشاهده شد و قطر هاله رشد نکردن برای باکتری‌های *استافیلوکوکوس اورئوس* و *اشریشیا کلی* به ترتیب برابر ۲۰ و ۱۲ میلی‌متر اندازه‌گیری شد. با توجه به بیشتر بودن قطر هاله رشد نکردن *استافیلوکوکوس اورئوس* نسبت به *اشریشیا کلی* می‌توان نتیجه گرفت که باکتری *استافیلوکوکوس اورئوس* نسبت به باکتری *اشریشیا کلی* مقاومت کمتری در برابر داربست HAp-PLGA-ZnO دارد. در نهایت، ZnO، لایه‌نشانی داربست HAp-PLGA را با موفقیت انجام داد و تأثیر عامل آنتی‌باکتریال ZnO روی داربست HAp-PLGA تأیید شد.

References

- (1) Vallet-Regi M. *Bio-ceramics with clinical applications*. New York: John Wiley & Sons Inc.; 2014.
- (2) Itokazu M., Yang W., Aoki T., Ohara A., Kato N. Synthesis of antibiotic-loaded interporous hydroxyapatite blocks by vacuum method and *in vitro* drug release testing. *Biomaterials* 1998; 19(7): 817-9.
- (3) Öner M., Yetiz E., Ay E., Uysal U. Ibuprofen release from porous hydroxyapatite tablets. *Ceramics International* 2011; 37(7): 2117-25.
- (4) He D., Dong W., Tang S., Wei J., Liu Z., Gu X., et al. Tissue engineering scaffolds of mesoporous magnesium silicate and poly (ϵ -caprolactone)-poly (ethylene glycol)-poly (ϵ -caprolactone) composite. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine* 2014; 25(6): 1415-24.
- (5) Arcos D., Vallet-Regí M. Bioceramics for drug delivery. *Acta Materialia* 2013; 61(3): 890-911.

نتایج آزمون آنتی‌باکتریال نشان می‌دهند که باکتری‌های *استافیلوکوکوس اورئوس* در برابر داربست کامپوزیتی HAp-PLGA دارای ZnO مقاومت کمتری نسبت به باکتری‌های *اشریشیا کلی* دارند. ردی^{۱۲} و همکاران نیز رفتار آنتی‌باکتریال ZnO را در برابر دو رده باکتری‌های گرم مثبت و منفی ارزیابی کردند و نتایج نشان دادند که قطر هاله رشد نکردن باکتری‌های گرم مثبت بیشتر از باکتری‌های گرم منفی است (۱۷). دلیل مقاومت بیشتر باکتری‌های گرم منفی به ذرات ZnO را می‌توان به غشای خارجی، ساختار دیواره سلولی، فیزیولوژی سلول و متابولیسم این باکتری‌ها نسبت داد. اگرچه تاکنون مکانیسم دقیق عملکرد نانوذرات ZnO در برابر باکتری‌ها و روند اساسی اثر ضدباکتریایی این ترکیب روشن نشده است، اختلال در غشای سلول و تنش اکسیداتیو در کمپیلوباکتر مکانیسم‌های رفتار آنتی‌باکتریال این ترکیب گزارش شده‌اند که ناشی از تولید مولکول‌های فعال حاوی اکسیژن مانند H_2O_2 ، OH^- و O_2^{2-} است (۱۸).

بحث و نتیجه‌گیری

در پژوهش حاضر، داربست کامپوزیتی HAp-PLGA حاوی و فاقد اکسیدروی تولید و مشخصه‌یابی شد. همچنین اثر افزودن ZnO بر رفتار آنتی‌باکتریال این داربست بررسی شد. تصاویر SEM، توزیع همگن ذرات ZnO بر سطح داربست HAp-PLGA را پس از فرآیند لایه‌نشانی تأیید کردند. نتایج آزمون آنتی‌باکتریال نشان دادند که داربست HAp-PLGA در محیط کشت باکتری *اشریشیا کلی* و *استافیلوکوکوس اورئوس*، هاله رشد نکردن ایجاد نکرد. پس از لایه‌نشانی ZnO روی داربست HAp-PLGA و قراردادن این داربست در

- (6) Xie Y., He Y., Irwin PL., Jin T., Shi X. Antibacterial activity and mechanism of action of zinc oxide nanoparticles against *Campylobacter jejuni*. *Applied and environmental microbiology* 2011; 77(7): 2325-31.
- (7) Matsumoto N., Sato K., Yoshida K., Hashimoto K., Toda Y. Preparation and characterization of β -tricalcium phosphate co-doped with monovalent and divalent antibacterial metal ions. *Acta biomaterialia* 2009; 5(8): 3157-64.
- (8) de Lima IR., Alves GG., Soriano CA., Campaneli AP., Gasparoto TH., Schnaider Ramos E., et al. Understanding the impact of divalent cation substitution on hydroxyapatite: an *in vitro* multiparametric study on biocompatibility. *Journal of Biomedical Materials Research Part A* 2011; 98(3): 351-8.
- (9) Zhao CX., Zhang WD., Mai AP., Huang XM., Ouyang YS. Synthesis and characterization of waterborne polyurethane/Cu (II)-loaded hydroxyapatite nanocomposites with antibacterial activity. *Journal of nanoscience and nanotechnology* 2011; 11(8): 6779-87.
- (10) Ooi CY., Hamdi M., Ramesh S. Properties of hydroxyapatite produced by annealing of bovine bone. *Ceramics international* 2007; 33(7): 1171-7.
- (11) Chen C., Liu P., Lu C. Synthesis and characterization of nano-sized ZnO powders by direct precipitation method. *Chemical Engineering Journal* 2008; 144(3): 509-13.
- (12) Wahab R., Ansari SG., Kim YS., Dar MA., Shin HS. Synthesis and characterization of hydrozincite and its conversion into zinc oxide nanoparticles. *Journal of Alloys and Compounds* 2008; 461(1): 66-71.
- (13) Khan YM., Katti DS., Laurencin CT. Novel polymer-synthesized ceramic composite-based system for bone repair: An *in vitro* evaluation. *Journal of Biomedical Materials Research Part A* 2004; 69(4): 728-37.
- (14) Manzano M., Aina V., Arian CO., Balas F., Cauda V., Colilla M., et al. Studies on MCM-41 mesoporous silica for drug delivery: effect of particle morphology and amine functionalization. *Chemical Engineering Journal* 2008; 137(1): 30-7.
- (15) Hassanzadeh-Tabrizi SA., Bigham A., Rafienia M. Surfactant-assisted sol-gel synthesis of forsterite nanoparticles as a novel drug delivery system. *Materials Science and Engineering: C*. 2016; 58 (4): 737-41.
- (16) Høiby N., Bjarnsholt T., Givskov M., Molin S., Ciofu O. Antibiotic resistance of bacterial biofilms. *International journal of antimicrobial agents* 2010; 35(4): 322-32.
- (17) Reddy KM., Feris K., Bell J., Wingett DG., Hanley C., Punnoose A. Selective toxicity of zinc oxide nanoparticles to prokaryotic and eukaryotic systems. *Applied physics letters* 2007; 90(21): 213-902.
- (18) Sirelkhatim A., Mahmud S., Seeni A., Kaus NH., Ann LC., Bakhori SK., et al. Review on zinc oxide nanoparticles: antibacterial activity and toxicity mechanism. *Nano-Micro Letters* 2015; 7(3): 219-42.

¹- Hydroxyapatite²- Lactic acid³- Glycolic acid⁴- Poly lactic-co-glycolic acid⁵- Matsumoto⁶- De Lima⁷- Zhao⁸- Escherichia coli⁹- Staphylococcus aureus¹⁰- Polyurethane¹¹- Muller-Hinton Broth¹²- Reddy