

## Study of Biocompatibility and Antibacterial Properties of Titanium Substrates Coated With Chitosan Reinforced With Graphene Oxide

Mahsa Gheysoor, Shahab Faghihi

Department of Stem Cells and Regenerative Medicine, National Institute of Genetic Engineering and Biotechnology, Tehran, Iran

### Article Information

#### Article history:

Received: 2018/02/03

Accepted: 2018/06/25

Available online: 2018/06/30

#### Article Subject:

Nanobiotechnology

IJMM 2018; 12(2): 107-115

#### Corresponding author:

Shahab Faghihi

Department of Stem Cells and  
Regenerative Medicine,

National Institute of Genetic  
Engineering and

Biotechnology,

Tehran, Iran

Tel: 021-44787386

Email:

[sfaghihi@nigeb.ac.ir](mailto:sfaghihi@nigeb.ac.ir)

Use your device to scan  
and read the article online



### Abstract

**Background and Aims:** In this study graphene oxide based coatings are applied on the titanium substrates in order to improve their biocompatibility and antibacterial properties of titanium substrate.

**Materials and Methods:** Chitosan, graphene oxide and their composites separately are coated on the substrates and their hydrophilicity and roughness are measured using contact angle measurement and atomic force microscopy. The coated substrates are then exposed to MG63 osteoblasts and *Staphylococcus aureus* in order to evaluate the interactions.

**Results:** The results show that titanium samples that are coated with chitosan and composites have better surface hydrophilicity and higher roughness compared to other samples and uncoated titanium. Cell adhesion is also improved on the coated substrates. Regarding the antibacterial property the composite coating show the best results.

**Conclusions:** It is concluded that the titanium substrate which is coated with nanocomposite of graphene oxide and chitosan has higher hydrophilicity and roughness that resulted to enhance biocompatibility and antibacterial property. This may lead to a higher success rate in the application of these substrates in maxillofacial implant surgeries.

**Keywords:** Titanium, Graphene Oxide, Chitosan, Biocompatibility, Antibacterial

Copyright © 2018 Iranian Journal of Medical Microbiology. All rights reserved.

### How to cite this article:

Gheysoor M, Faghihi S. Study of Biocompatibility and Antibacterial Properties of Titanium Substrates Coated With Chitosan Reinforced With Graphene Oxide. Iran J Med Microbiol. 2018; 12 (2): 107-115



## مطالعه خواص زیستی و آنتی باکتریال نمونه‌های تیتانیومی پوشش داده شده با کیتوزان تقویت شده با گرافن اکساید

مهسا قیصور، شهاب فقیهی

گروه سلول‌های بنیادی و پزشکی بازساختی، پژوهشگاه ملی مهندسی ژنتیک و زیست فناوری، تهران، ایران

### چکیده

### اطلاعات مقاله

**زمینه و هدف:** در این تحقیق، برای بهبود خواص زیستی و آنتی باکتریال نمونه‌های تیتانیومی، پوشش‌هایی بر پایه گرافن اکساید، پلی ساکارید کیتوزان و کامپوزیت کیتوزان و گرافن اکساید به صورت مستقل روی نمونه‌ها داده شده است.

**مواد و روش کار:** میزان آبدوستی و زبری پوشش‌ها از طریق زاویه تماس آب و میکروسکوپ نیروی اتمی و میکروسکوپ الکترونی ارزیابی و اندازه‌گیری شد. سپس نمونه‌ها در معرض سلول‌های استخوانی شبه استئوبلاستی و همچنین باکتری *استافیلوکوکوس ارتوس* قرار داده شد تا تقابل مشترک سطوح پوشش داده شده ارزیابی شود.

**یافته‌ها:** نتایج نشان داد که میزان آبدوستی و زبری سطوح در پوشش‌های کامپوزیتی و کیتوسانی به طور چشمگیری بهبود یافته است. چسبندگی و زنده‌مانی سلول‌ها بر این پوشش‌ها در مقایسه با تیتانیوم بدون پوشش افزایش چشمگیری را نشان می‌دهد. همچنین نتایج نشان می‌دهد که تیتانیوم پوشش داده شده با کامپوزیت کیتوزان/گرافن اکساید از نظر زیستی و مقاومت در برابر رشد باکتریایی می‌تواند پوششی مناسب برای نمونه‌های تیتانیومی با قابلیت کاشت در جراحی‌های دهان و دندان باشد.

**نتیجه‌گیری:** با توجه به نتایج حاصل می‌توان ادعا کرد که کامپوزیت کیتوزان/گرافن اکساید با داشتن زیست سازگاری بالا، آبدوستی مناسب، خواص آنتی باکتریال مطلوب دارد و می‌تواند گزینه مناسبی برای پوشش مواد کاشتی کاربردی در جراحی‌های دهان و دندان باشد.

**کلمات کلیدی:** تیتانیوم، گرافن اکساید، کیتوزان، زیست سازگاری، آنتی باکتریال

کپی رایت ©: حق چاپ، نشر و استفاده علمی از این مقاله برای مجله میکروبی شناسی پزشکی ایران محفوظ است.

### تاریخچه مقاله

دریافت: ۱۳۹۶/۱۱/۱۴

پذیرش: ۱۳۹۷/۰۴/۰۴

انتشار آنلاین: ۱۳۹۷/۰۴/۰۹

موضوع: نانو بیوتکنولوژی

IJMM1397;12(2): 107-115

نویسنده مسئول:

شهاب فقیهی

گروه سلول‌های بنیادی و پزشکی بازساختی، پژوهشگاه ملی مهندسی ژنتیک و زیست فناوری، تهران، ایران

تلفن: ۰۲۱-۴۴۷۸۷۳۸۶

پست الکترونیک:

[sfaghihi@nigeb.ac.ir](mailto:sfaghihi@nigeb.ac.ir)



### مقدمه

در صنعت هوافضا، ناپیری و تحقیقات زیست پزشکی استفاده شده است (۴، ۳). یکی از کاربردهای اصلی تیتانیوم در پزشکی به عنوان قطعات ثابت در داخل بدن، کاشتنی و در نقش قسمتی از مفصل زانو، ران و یا ریشه دندان است. بنا به کاربردهای وسیع و متنوع این فلز به عنوان کاشتنی، برطرف کردن نقایص آن از جمله مانع از شکست ایمپلنت، افزایش احتمال یکپارچگی با بافت استخوان (استئواینترگریشن)، و کاهش عفونت‌های باکتریایی ناشی از ایمپلنت در داخل بدن بسیار حائز اهمیت است. مشخص شده

تحقیقات گسترده‌ای در زمینه اصلاح سطح تیتانیوم برای بهبود کارایی آن در کاربردهای پزشکی صورت گرفته است. در این راستا بررسی‌ها در دهه اخیر بر روش‌های اصلاح سطح شیمیایی متمرکز شده است. بررسی‌های انجام شده نشانگر آن است که اهداف اصلی در راستای افزایش قابلیت زیست فعال شدن و بهبود چسبندگی استخوان به سطح ایمپلنت تیتانیوم متمرکز شده است (۲، ۱). تیتانیوم به دلایل گسترده‌ای از جمله استحکام ویژه بالا، مقاومت نسبت به خوردگی، زیست سازگاری و انعطاف پذیری بالا

ارزیابی شدند. آزمایشات با استفاده از سلول‌های استئوپلاستی انسان (MG۶۳) انجام گرفت و چسبندگی، تکثیر، مورفولوژی این سلول‌ها بر سطوح پوشش‌دار بررسی و با نمونه‌های بدون پوشش مقایسه شد. همچنین خواص ضدباکتریایی پوشش‌های ایجادشده بر سطوح تیتانیومی از طریق *استافیلوکوکوس/رئوس*، متداول‌ترین سویهٔ باکتری در عفونت‌های باکتریایی ارتوپدی ارزیابی شد.

### مواد و روش‌ها

#### مواد

دیسک‌های تیتانیومی (Ti-6Al-4V) با قطر ۱۳ میلی‌متر و ضخامت ۲ میلی‌متر تهیه شد.  $H_2SO_4$ ،  $HNO_3$ ،  $K_2MnO_4$ ،  $H_2O_2$  و HCl از شرکت مرک و محیط کشت DMEM و تریپسین از شرکت گیبکو خریداری شدند. گرافن اکساید، MTT (۳-۵،۴-دی متیل تیاژول)-۵،۲ دی فیل تترازولیوم برمید) و FBS و استرپتومایسین و پنی‌سلین از شرکت سیگما تهیه شد.

#### سنتز گرافن اکساید

در ساخت نانو صفحات گرافن اکساید روش اصلاح‌شدهٔ هامر به کار رفت؛ لذا برای ساخت گرافن اکساید ۱ گرم گرافیت به ۱۲۰ میلی‌لیتر محلول اسید سولفوریک ۹۸٪ اضافه و مخلوط حاصل در حمام یخ قرار داده شد. سپس ۵۰۰ میلی‌گرم سدیم نیترات به مخلوط اضافه و به مدت یک ساعت روی مگنت استیرر با سرعت ۲۰۰ دور در دقیقه قرار داده شد. مخلوط به دست آمده در حمام یخ قرار داده شد و ۶ گرم پرمنگنات به آهستگی به آن اضافه شد. پس از اضافه شدن ۴۰۰ میلی‌لیتر آب دو بار تقطیر به مخلوط، به مدت یک ساعت روی مگنت استیرر در دمای  $70^{\circ}C$  قرار داده شد. در مرحلهٔ بعدی ۱۰ میلی‌لیتر آب اکسیژنه ۳۰٪ به مخلوط اضافه و پس از گذشت ۴۸ ساعت محلول روی دور ریخته شد و رسوب قهوه‌ای‌رنگ به ترتیب با اسید کلریدریک ۰/۵ مولار و آب دیونیزه شست‌وشو داده شد. محلول آب دیونیزه و رسوب به مدت یک ساعت در دستگاه اولتراسونیک پروب‌دار قرار داده شد و در نهایت پس از قرار دادن محلول در دستگاه فریز درایر پودر گرافن اکساید به دست آمد.

#### سنتز محلول نانو کامپوزیتی

ابتدا محلول ۱٪ وزنی کیتوسان با اضافه کردن پودر کیتوسان به محلول اسید استیک ۱٪ حجمی تهیه شد و مخلوط حاصله به مدت ۲۴ ساعت روی مگنت استیرر با سرعت متوسط قرار گرفت. مخلوط ۱٪ وزنی پودر گرافن اکساید با آب دیونیزه تهیه و به مدت یک ساعت روی مگنت استیرر قرار داده شد. محلول کیتوسان و گرافن اکساید حاصله با نسبت حجمی مساوی

است که پاسخ یک مادهٔ بیولوژیکی به بافت انسان به خواص سطحی و زیست‌سازگاری آن بستگی دارد. مروری بر تحقیقات انجام‌شده در این زمینه نشان می‌دهد که محققان برای بهینه‌کردن روش‌های اصلاح سطح تلاش کرده‌اند و در این راستا به اصلاح سطح به صورت مکانیکی، شیمیایی، الکتروشیمیایی و فیزیکی به منظور افزایش زیست‌سازگاری، زبری سطح، افزایش آبدوستی سطح و بهبود مقاومت به خوردگی و نیز عوامل میکروبی توجه شده است (۵، ۶). یکی از روش‌های اصلاح سطح و اعمال پوشش‌های زیست‌سازگار، استفاده از روش اسپین کوتینگ به منظور اصلاح سطح شیمیایی است. از مزایای این روش ضخامت کم پوشش ایجادشده بر سطح (۱۰۰ نانومتر تا ۱۰ میکرومتر)، سهولت و سرعت انجام پوشش‌دهی است (۷). از جمله موادی که با استفاده از این روش روی سطح استفاده شده‌اند، می‌توان به پوشش‌های سرامیکی، پلیمرها، هیدروکسی آپاتیت و فسفات کلسیم اشاره کرد. با بررسی و کنکاش در نتایج تحقیقات انجام‌شده مشخص شد که مواد بر پایهٔ کربن و پلیمرهای زیست فعال از جمله کیتوزان، پتانسیل عملکردی امیدوارکننده‌ای را نشان داده‌اند. کیتوسان خواص ضدباکتریایی، زیست‌سازگاری و زیست تخریب‌پذیری مطلوب دارد. Pavitra و همکاران، پوششی از کیتوسان را بر بستر تیتانیومی استفاده کردند و نتایج حاکی از آن بود که پوشش کیتوسان سبب افزایش زیست‌سازگاری سطح بستر و کاهش تهاجم باکتریایی می‌شود (۸). در سال‌های اخیر گرافن و مشتقات آن به عنوان مواد نانو ساختاری که پتانسیل بالایی به منظور مصارف در زمینه‌های زیست پزشکی دارند، پیشنهاد شده‌اند. گرافن اکساید (GO) مشتق گرافن است که از طریق اکسیداسیون گرافن تهیه می‌شود و سازگاری زیستی مناسب و خواص مکانیکی و الکتریکی بسیار مطلوبی دارد؛ بنابراین به عنوان ماده‌ای منتخب در پوشش‌دهی سطوح زیست مواد، استفاده شده است (۹، ۱۰). علاوه بر این، برخی از مطالعات خواص ضدباکتریایی را در خصوص پوشش‌های حاوی GO گزارش کرده‌اند (۱۱).

در این تحقیق به منظور دستیابی به خواص بیولوژیکی و فیزیکی مطلوب سطوح نمونه‌های تیتانیومی (Ti)، از کیتوزان (Cs) و گرافن اکساید (Go) و ترکیب این دو ماده (Cs/Go) به منظور پوشش تیتانیوم استفاده شد. به این منظور روش اسپین کوتینگ (Spin Coating) برای پوشش‌دهی نمونه‌های تیتانیومی به کار رفت و پس از مشخصه‌یابی سطح با استفاده از میکروسکوپ نیروی اتمی (AFM)، میکروسکوپ الکترونی و اندازه‌گیری زاویهٔ تماس، تعاملات سلولی و ضدمیکروبی نمونه‌های پوشش‌دار و بدون پوشش

افزار GPES متصل به دستگاه نمودارهای مربوط به هر نمونه را ترسیم کرد.

### بررسی چسبندگی و تکثیر سلولی

به منظور بررسی چسبندگی و تکثیر سلولی از آزمون MTT با به کارگیری کیت تکثیر سلولی Roche استفاده شد. ابتدا سلول‌های شبه استئوبلاستی (MG-63) در محیط DMEM با غلظت ۱۰۰ واحد در میلی لیتر از آنتی بیوتیک پنی سیلین (Invitrogen, USA) و غلظت ۱۰۰ میکروگرم در میلی لیتر آنتی بیوتیک استرپتومایسین (Invitrogen, USA) و ۱۰٪ FBS در انکوباتور با ۵٪ CO<sub>2</sub> کشت داده شد. دیسک‌های تیتانیومی استریل درون چاهک‌های پلیت ۲۴ خانه‌ای قرار داده شد و تعداد ۵×۱۰<sup>۴</sup> سلول (برای بررسی چسبندگی) و ۱۰×۱۰<sup>۴</sup> سلول (برای بررسی تکثیر سلولی) روی هر یک از نمونه‌های تیتانیومی اضافه شده و در انکوباتور تحت دمای ۳۷°C قرار داده شد. در این تحقیق تیتانیوم بدون پوشش به عنوان کنترل در نظر گرفته شده است. پس از گذشت زمان‌های مربوطه، دیسک‌های تیتانیومی ابتدا با بافر شستشو داده شده و سپس به چاهک جدید منتقل شدند. سپس محلول MTT با غلظت ۵ mg/ml به هر چاهک اضافه شده و پس از گذشت زمان ۴ ساعت با اضافه کردن DMSO و تشکیل رنگ بنفش، میزان جذب رنگ تولیدشده در طول موج ۵۸۰ نانومتر با دستگاه الیزا ریدر (ELISA reader) بررسی شد.

### بررسی مورفولوژی سلول‌ها

مورفولوژی سلول‌های MG63 پس از گذشت ۳ روز از کشت سلول‌ها روی نمونه‌های تیتانیوم پوشش‌دار و شاهد بررسی شد. در ابتدا تعداد ۱۵۰۰۰ سلول در هر میلی لیتر محیط کشت بر نمونه‌های پوشش‌داده شده در پلیت کشت ۲۴ خانه‌ای اضافه و تحت دمای ۳۷°C در انکوباتور قرار داده شدند. پس از گذشت ۳ روز سطح نمونه‌ها به وسیله بافر PBS شسته شدند و در گلوآرآلدئید ۲/۵ درصد در دمای ۴°C به مدت ۲۴ ساعت قرار گرفتند. سپس نمونه‌ها با استفاده از غلظت‌های مختلف اتانول (۳۰٪، ۴۰٪، ۵۰٪، ۷۰٪، ۸۰٪، ۹۰٪ تا ۱۰۰٪) آبگیری شدند. سطح نمونه‌های آب‌گیری شده با لایه‌ای از طلا پوشانده شد و در نهایت مورفولوژی سلولی با میکروسکوپ الکترونی روبشی مدل EM3200 مطالعه شد.

### تست ضدباکتریایی پوشش‌ها

برای بررسی خواص ضدباکتریایی نمونه‌های تیتانیومی پوشش‌داده شده از استافیلوکوکوس ائوس استفاده شد. سوسپانسیون استافیلوکوکوس ائوس در دمای ۳۷°C و ۱۸۰ دور

تهیه شد و به مدت یک ساعت در دستگاه اولترا سونیکاتور با بسامد ۴۰ هرتز و دور ۰/۵ قرار گرفت.

### آماده‌سازی نمونه‌های تیتانیومی

دیسک‌های تیتانیومی خالص تجاری در ابعاد 1cm × 1cm تهیه شد. این قطعات به صورت مکانیکی با دستگاه Grinder/Polisher مدل MP-28 و ورقه‌های سمباده P 1500 پولیش داده شد. دیسک‌های تیتانیومی به ترتیب در اتانول و آب دیونیزه قرار داده شد تا ضایعات حاصل از پولیش نمونه‌ها جدا شود. سپس دیسک‌های تیتانیومی در آون با دمای ۷۰°C قرار داده شد. پوشش‌دهی دیسک‌های تیتانیومی با دستگاه اسپین کوتینگ (M.T.D.92) انجام گرفت. قطرات محلول با فاصله ۱ سانتی‌متر از سطح دیسک‌های تیتانیومی در حالت دینامیک به تیتانیوم‌ها افزوده شد تا لایه‌ای نازک از محلول‌ها روی سطح قرار گیرد. تیتانیوم‌های پوشش‌داده شده به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۵۰°C قرار داده شدند. سطح پوشش‌دهی دیسک‌های تیتانیومی در شرایط دستگاهی ۲۵۰۰ دور در دقیقه و زمان ۶۰ ثانیه انجام شد. برای انجام آزمایش‌های بیشتر نمونه‌های تیتانیومی با آب دو بار تقطیر و محلول فسفات بافر شستشو داده شدند.

### مشخصه یابی پوشش‌ها

مورفولوژی سطحی Ti-6Al-4V به عنوان نمونه شاهد و نمونه‌های پوشش‌داده شده با میکروسکوپ الکترونی روبشی (SEM, AMRY 1-1910FE) مطالعه شد. زاویه تماس قطره آب مقطر بر نمونه شاهد و نمونه‌های پوشش‌داده شده، حداقل در سه نقطه از سطح اندازه‌گیری و میانگین زاویه تماس روی هر نمونه اندازه‌گیری شد. زبری سطح نمونه شاهد و نمونه‌های پوشش‌داده شده در دو نقطه متفاوت و در سه مقیاس ۰/۵، ۱، ۳ میکرومتر با تعداد ۲۵۶ پیکسل عکس برداری شدند. تصویربرداری از سطوح از سوی یک پین با نوک بسیار تیز در حالت تماسی با دستگاه میکروسکوپ اتمی Auto Probe ساخت کمپانی Veeco صورت پذیرفت. شرایط محیطی برای انجام آزمایش در دمای ۲۵°C و رطوبت ۴۰٪ تنظیم شد. به منظور بررسی مقاومت به خوردگی، نمونه شاهد و نمونه‌های پوشش‌داده شده از دستگاه Auto Lab مدل PG State 30 استفاده شد. اطراف نمونه‌های تیتانیومی پوشش‌دار و بدون پوشش با چسب عایق‌بندی شد؛ به طوری که فقط مساحت ۳/۳×۰/۳ سانتی‌متر از سطح نمونه‌ها در تماس با محلول رسانای الکترولیت PBS قرار گیرند. الکتروده مرجع در این آزمون از نوع کالومل و الکتروده کمکی از جنس گرافیت انتخاب شد. برای هر نمونه این آزمون سه بار تکرار شد و در نهایت نرم

یکنواخت، بدون روزنه و برآمدگی را نشان می‌دهند. سطح نمونه تیتانیومی پوشش‌داده‌شده با گرافن اکساید نشانگر لبه‌های صفحات گرافن است که در برخی نقاط این صفحات روی یکدیگر افتاده‌اند و شکل چندلایه‌ای به خود گرفته‌اند. در خصوص نمونه‌های پوشش‌داده‌شده نانو کامپوزیت مشخص شد که سطح یکنواختی نمونه‌های دیگر را نداشته و به‌وضوح می‌توان برآمدگی‌ها و فرورفتگی‌هایی را بر سطح مشاهده کرد.

#### بررسی زاویه تماس

با توجه به میانگین زاویه تماس نمونه‌ها در جدول ۱، نمونه پوشش‌داده‌شده به‌وسیله کیتوسان با اختلاف معناداری نسبت به نمونه شاهد آب‌دوستی بیشتری را نشان می‌دهد. با توجه به تصاویر و زاویه‌های به‌دست‌آمده، مشخص شد که نمونه کامپوزیتی پس از نمونه کیتوسانی بیشترین خاصیت آب‌دوستی را دارد. این در حالی است که نمونه گرافن اکساید بیشترین زاویه تماس را دارد و این به‌معنای داشتن کمترین میزان آب‌دوستی بر سطح این نمونه است.

در دقیقه در انکوباتور قرار داده شد. سپس سوسپانسیون باکتری *استافیلوکوکوس ارئوس* با جذب نوری ۰/۵ تهیه شد. تیتانیوم‌های پوشش‌داده‌شده و بدون پوشش به سوسپانسیون باکتری منتقل و در زمان‌های مشخص میزان جذب نوری محیط‌های حاوی نمونه در طول موج ۶۰۰ نانومتر اندازه‌گیری شد.

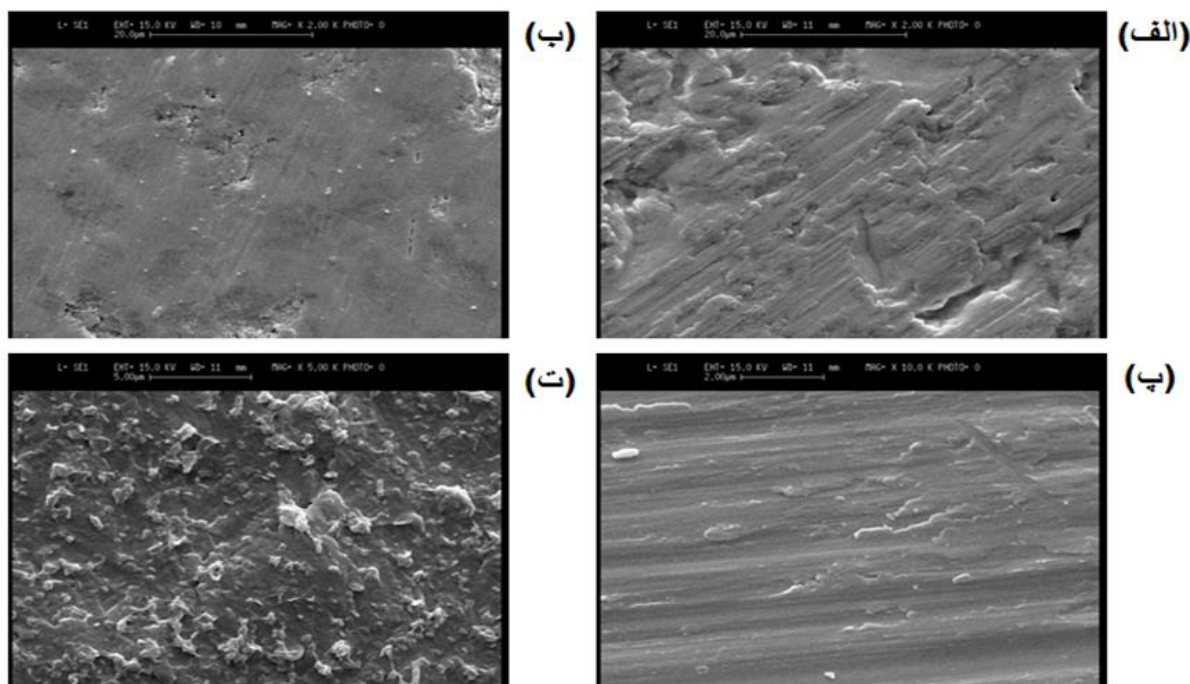
#### بررسی‌های آماری

کلیه آزمایشات با حداقل تکرار ۳ بار انجام گرفت و تعداد نمونه‌ها در هر آزمایش ۳ بوده است. برای همه مقادیر، محاسبات آماری شامل میانگین، واریانس و آزمون تی صورت گرفته و به نتایج با سطح معنی‌دار کمتر از ۰/۰۵ به لحاظ آماری توجه شده است. به این منظور از نرم‌افزار SPSS نسخه ۲۲ استفاده شد.

#### یافته‌ها

#### مشخصه‌یابی سطح نمونه‌های تیتانیومی

تصاویر میکروسکوپ الکترونی مربوط به سطح نمونه‌های تیتانیومی پوشش‌داده‌شده و نمونه شاهد در شکل ۱ نشان داده شده است. همان‌گونه که در شکل مشاهده می‌شود، تیتانیوم‌های پوشش‌داده‌شده با کیتوسان در مقایسه با نمونه‌های دیگر سطح



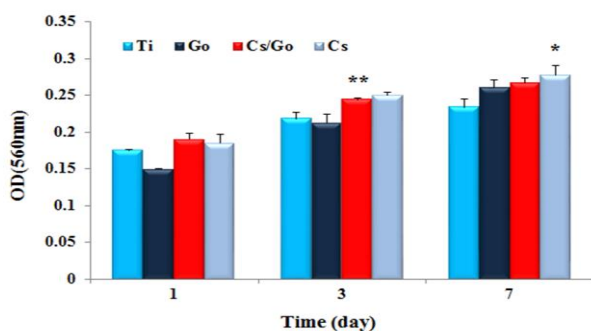
شکل ۱. میکروسکوپ الکترونی روبشی از سطح نمونه‌های پوشش‌داده‌شده با الف) گرافن اکساید ب) کیتوسان پ) کامپوزیت گرافن اکساید و کیتوسان ت) نمونه تیتانیوم خالص

جدول ۱. بررسی میزان آب‌دوستی و زبری سطح تیتانیوم (Ti)، پوشش کیتوسان (Cs)، گرافن اکساید (Go) و کامپوزیت کیتوسان/گرافن اکساید (Cs/Go).

نمونه‌ها	میانگین زبری سطح (nm)	میانگین آب‌دوستی سطح
Ti	27/45 ± 1/56	109/4 ± 1/27
Cs	14/1 ± 2/08	60/5 ± 0/33
Go	4/82 ± 2/55	95 ± 0/81
Cs/Go	33/58 ± 2/09	82/65 ± 0/46

### بررسی زنده‌مانی سلول‌ها

سلول‌های کشت‌داده‌شده روی سطح نمونه‌های تیتانیومی پوشش‌داده‌شده پس از گذشت یک روز در مقایسه با نمونه شاهد تفاوت چندانی نشان نمی‌دهند؛ اما با گذشت ۳ روز سلول‌های بیشتری روی نمونه‌های کیتوسانی نسبت به سایر نمونه‌ها مشاهده شد. در روز هفتم بیشترین تعداد سلول‌ها به ترتیب روی سطح نمونه کیتوسان و نمونه کامپوزیت دیده شدند (شکل ۳).



شکل ۳. میزان زنده‌مانی سلول‌ها بر نمونه‌های پوشش‌داده‌شده تیتانیومی.  $P < 0/05$ \* مقایسه پوشش کیتوسان با تیتانیوم،  $P < 0/05$ \*\* در مقایسه پوشش کامپوزیتی و تیتانیوم

### بررسی مورفولوژی سلولی

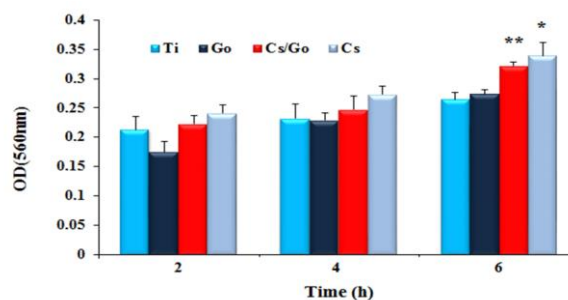
تصاویر به‌دست‌آمده از میکروسکوپ الکترونی روبشی نشان داد سلول‌های MG63 که به مدت ۳ روز روی نمونه‌ها کشت داده شده بودند، گسترش و تراکم نسبتاً خوبی بر سطح نمونه‌ها داشتند. این در حالی است که در نمونه کیتوسان و کامپوزیت سلول‌ها در تمامی جهات گسترش پیدا کرده‌اند. در دو نمونه تیتانیوم خالص و گرافن اکساید سلول‌ها در یک جهت خاص آرایش یافته‌اند؛ اما در دو نمونه‌های کیتوسان و کامپوزیت که از زبری سطح بیشتری نیز برخوردارند، سلول‌ها در تمامی جهات گسترش یافته و خود را روی بستر پهن کرده‌اند (شکل ۴).

### بررسی توپوگرافی سطح

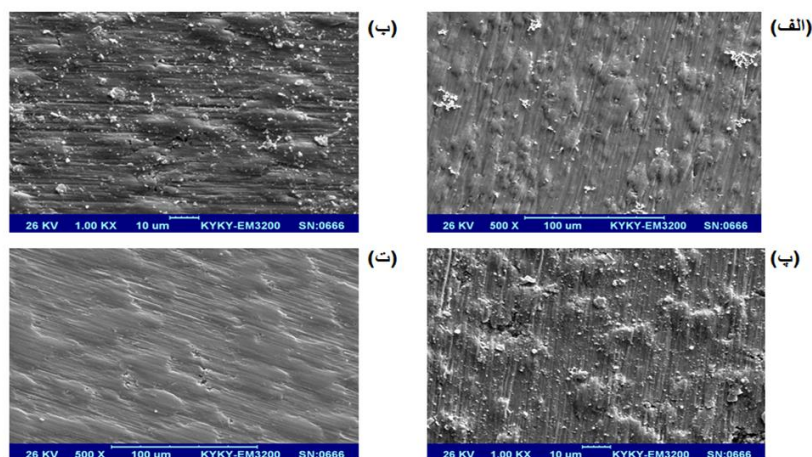
جدول ۱ نتایج به‌دست‌آمده از بررسی ناهمواری و پستی بلندی سطح را نشان می‌دهد. همان‌گونه که ملاحظه می‌شود، نمونه پوشش‌داده‌شده کامپوزیتی با میانگین زبری  $33/58 \pm 2/09$  نانومتر از تمامی نمونه‌ها زبری و ناهمواری بیشتری را نشان می‌دهد. در حالی که نمونه شاهد، کیتوسان، گرافن اکساید به ترتیب با داشتن میانگین زبری  $1/56 \pm 27/45$ ،  $2/08 \pm 14/1$ ،  $2/55 \pm 4/82$  نانومتر پس از نمونه کامپوزیتی قرار می‌گیرند. طبق نتایج به‌دست‌آمده نمونه نانوکامپوزیتی بیشترین زبری را روی سطح نشان می‌دهد.

### بررسی چسبندگی سلول

نتایج حاصل از آزمون چسبندگی سلول نشان می‌دهد که پس از گذشت دو ساعت تعداد سلول‌های متصل‌شده به تیتانیوم و نمونه‌های پوشش‌داده‌شده اختلاف چشمگیری را نشان نمی‌دهند. در حالی که روند چسبندگی سلول‌ها پس از گذشت ۴ ساعت افزایش یافته و نمونه با پوشش کیتوسان بیشترین تعداد سلول‌های متصل‌شده روی سطح را نشان می‌دهد. پس از گذشت ۶ ساعت مشاهده شد که سلول‌های بیشتری به نمونه کیتوسانی و به‌دنبال آن نمونه کامپوزیتی متصل شده‌اند (شکل ۲).



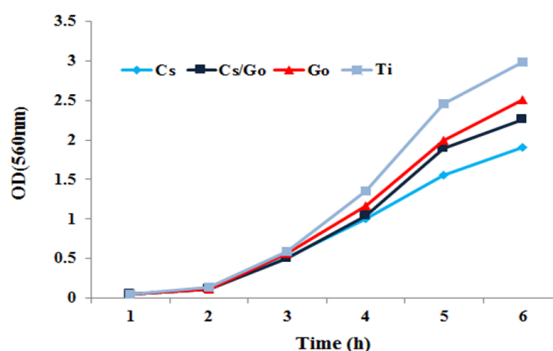
شکل ۲. میزان چسبندگی سلول‌ها روی نمونه‌های پوشش‌داده‌شده تیتانیومی.  $P < 0/05$ \* مقایسه پوشش کیتوسان با تیتانیوم،  $P < 0/05$ \*\* در مقایسه پوشش کامپوزیتی و تیتانیوم



شکل ۴. تصویر میکروسکوپ الکترونی روبشی از سلول‌های MG63 بر سطح نمونه‌های پوشش‌داده شده (الف) کیتوسان، (ب) گرافن اکساید، (پ) کامپوزیت، (ت) تیتانیوم.

#### بررسی خواص ضدباکتریایی پوشش‌ها

نتایج حاصل از بررسی خواص ضدباکتریایی نمونه‌های پوشش‌دار و بدون پوشش در شکل ۵ نشان داده شده است. با توجه به نمودار مشخص شد که پوشش‌های کیتوسان، کامپوزیت کیتوسان و گرافن اکساید در مقایسه با تیتانیوم خالص تا میزان جالب توجهی از رشد باکتری *استافیلوکوکوس اورئوس* جلوگیری کرده‌اند. بهترین نتیجه در نمونه‌های تیتانیومی پوشش‌داده شده با کیتوسان و کامپوزیت کیتوسان - گرافن اکساید به دست آمد؛ به طوری که پس از ۶ ساعت تعداد باکتری‌ها به نصف کاهش یافته است.



شکل ۵. منحنی رشد باکتری *استافیلوکوکوس اورئوس* بر نمونه‌های تیتانیومی پوشش‌داده شده

#### بحث

نتایج حاصل از بررسی مورفولوژی سطح به وسیله میکروسکوپ الکترونی روبشی نشان داد که نمونه نانوکامپوزیتی بیشترین میزان پستی و بلندی را روی سطح نشان داده است. این تغییر مورفولوژی در نمونه‌های نانوکامپوزیتی ناشی از تاخوردگی و

خمش صفحات گرافن اکساید هستند. همان‌طور که ذکر شد، کیتوسان و گرافن اکساید قادر به ایجاد برهم‌کنش‌های فیزیکی و الکتروستاتیک هستند که در نتیجه این برهم‌کنش‌ها، صفحات گرافن اکساید را به صورت پراکنده شده در پلیمر کیتوسان می‌توان مشاهده کرد. همچنین میزان آب‌دوستی سطح روی نمونه‌های پوشش‌داده شده که از طریق زاویه تماس اندازه‌گیری شد، نشان داد که نمونه پوشش‌داده شده به وسیله گرافن اکساید بیشترین زاویه تماس را دارد و این به معنای داشتن کمترین میزان آب‌دوستی روی سطح این نمونه است. در این آزمون میزان آب‌دوستی سطح نمونه‌های پوشش‌داده شده و شاهد بررسی شد. بررسی میزان آب‌دوستی سطح امکان پیش‌بینی برهم‌کنش‌های مایعات بدن و پروتئین‌های محلول در آن را با سطح فراهم می‌کند (۱۳، ۱۲). میزان زبری سطح از دیگر عوامل مهم و تأثیرگذار در اتصال سلول‌ها به سطح است. در این روش از یک پروب استفاده می‌شود که با تماس بر سطح و حرکت در نقاط مختلف تصویری سه‌بعدی از سطح را نشان می‌دهد که تعیین‌کننده پستی و بلندی‌های سطح است. نتایج به دست آمده از این اندازه‌گیری نشان داد که نمونه کامپوزیتی بیشترین میزان زبری سطح را نشان می‌دهد که این ویژگی می‌تواند بر اثر تاخوردگی و خم شدن صفحات گرافن اکساید در پلیمر کیتوسان مرتبط باشد. صفحات گرافن اکساید بسیار نازک بوده و در برخی نقاط روی هم می‌افتند که سبب ایجاد برآمدگی و فرورفتگی در سطح نمونه پوشش‌داده شده به وسیله گرافن اکساید می‌شود (۱۴). عوامل مذکور شامل زبری سطح و میزان آب‌دوستی از عوامل تعیین‌کننده تقابلات مشترک سلولی و یا به طور کلی بیولوژیک روی سطوح زیست مواد هستند. بررسی چسبندگی سلول در زمان‌های کوتاه

مختلف پزشکی پیشنهاد شده است. با این حال چگونگی عملکرد خاصیت ضدباکتریایی گرافن اکساید نامشخص است.

### نتیجه‌گیری

در این تحقیق پوشش‌های بر پایه گرافن اکساید، پلی ساکارید کیتوسان و کامپوزیت کیتوسان و گرافن اکساید روی سطح نمونه‌های تیتانیومی اعمال شد. برای بررسی ریخت‌شناسی سطح تیتانیوم از آزمون‌های میکروسکوپ نیروی اتمی و میکروسکوپ الکترونی روبشی استفاده شد. نتایج حاصل از مطالعات میکروسکوپ نیروی اتمی نشان می‌دهد که پوشش‌های کامپوزیتی کیتوسان و گرافن اکساید سبب افزایش زبری سطح نسبت به سایر پوشش‌ها می‌شود. نتایج آزمون زاویه تماس اثبات کرد پوشش کیتوسان روی سطح سبب کاهش زاویه تماس و افزایش آب‌دوستی سطح می‌شود. پس از نمونه کیتوسان، نمونه کامپوزیتی بیشترین میزان آب‌دوستی بین سایر نمونه‌ها را دارد. حضور کیتوسان در کنار گرافن اکساید سبب افزایش آب‌دوستی و زبری و مورفولوژی بهتر پوشش کامپوزیتی روی سطح شده است. همچنین پوشش‌دهی نمونه‌های تیتانیومی منجر به کاهش رشد باکتری *استافیلوکوکوس اورئوس* شد که درخصوص کیتوسان و کامپوزیت کیتوسان - گرافن اکساید قابل‌ملاحظه بود. این باکتری یکی از مهم‌ترین عوامل بروز عفونت در نواحی‌ای است که ایمپلنت جایگذاری می‌شود. با توجه به نتایج حاصل می‌توان ادعا کرد که کامپوزیت کیتوسان/گرافن اکساید با داشتن زیست‌سازگاری بالا، آب‌دوستی مناسب، با خواص آنتی باکتریال مطلوب می‌تواند گزینه مناسبی برای پوشش مواد کاشتی کاربردی در جراحی‌های دهان و دندان باشد.

### سپاسگزاری

نویسندگان مقاله بر خود لازم می‌دانند که از پژوهشگاه ملی مهندسی ژنتیک و زیست فناوری به‌خاطر حمایت مالی طرح انجام‌شده تقدیر و تشکر کنند.

### تعارض منافع

بین نویسندگان تعارض در منافع گزارش نشده است.

نشان داد که روند چسبندگی سلول‌ها پس از گذشت ۴ ساعت افزایش یافته و نمونه با پوشش کیتوسان بیشترین تعداد سلول‌های متصل‌شده روی سطح را نشان می‌دهد. پس از گذشت ۶ ساعت مشاهده شد که سلول‌های بیشتری به نمونه کیتوسانی و به‌دنبال آن نمونه کامپوزیتی متصل شده‌اند. این امر حاکی از چسبندگی بهتر سلول‌ها بر نمونه کیتوسان و کامپوزیت در مقایسه با تیتانیوم خالص و گرافن اکساید است که می‌توان آن را با خاصیت زیست‌سازگاری بالای کیتوزان مرتبط دانست (۱۵). همچنین برای بررسی سمیت احتمالی در پوشش‌های به‌کارگرفته‌شده به‌ویژه پوشش‌های تقویت‌شده با گرافن اکساید میزان زنده‌مانی سلول‌ها روی پوشش‌ها بررسی شد که نتایج حاکی از این واقعیت است که نه‌تنها پوشش‌های ایجادشده اختلالی در زنده‌مانی سلول‌ها ایجاد نکرده‌اند، بلکه با داشتن خواص زیست‌سازگاری مناسب زنده‌مانی سلول‌ها را نیز افزایش داده‌اند. در حالی که گرافن اکساید اختلاف چشمگیری در زنده‌مانی سلول‌ها نسبت به نمونه شاهد نشان نمی‌دهد. با وجود آنکه گرافن اکساید در روند زنده‌مانی سلول‌ها بهبودی ایجاد نکرده است، اما مشابه بودن تعداد سلول‌ها روی سطح نمونه گرافن اکساید و نمونه شاهد نشان‌دهنده عدم سمیت این پوشش برای سلول‌ها است. در روز هفتم بر روند افزایش رشد و زنده‌مانی سلول‌ها روی نمونه‌ها هیچ اختلالی مشاهده نشد و افزایش رشد با گذشت زمان نشان از زیست‌سازگاری پوشش‌ها و به‌ویژه پوشش کیتوزانی می‌دهد. در نهایت در خصوص خواص آنتی‌باکتریال با توجه به این نکته که کیتوزان خواص ثابت‌شده آنتی‌باکتریال دارد، نتایج حاصل از رشد باکتری *استافیلوکوکوس اورئوس* روی نمونه‌های پوشش‌داده‌شده تیتانیومی حاکی از آن بود که کلیه پوشش‌های به‌کارگرفته‌شده در مقایسه با نمونه بدون پوشش ممانعت بیشتری از رشد باکتری روی سطح به‌عمل می‌آورند. از نظر بالینی، تجویز آنتی‌بیوتیک‌ها به‌عنوان یک درمان کمکی در راستای کاهش یا از بین بردن پاتوژن‌ها است؛ اما استفاده طولانی‌مدت از این سیستم امکان‌پذیر نیست. کیتوسان خواص زیست‌سازگاری بسیار مناسبی دارد. از جمله خواص منحصربه‌فرد آن خاصیت آنتی‌باکتریال است که این خاصیت به درجه داستیلاسیون و همچنین وزن مولکولی آن بستگی دارد. گرافن اکساید نیز به‌عنوان یک عامل ضدباکتریایی برای کاربردهای



## References

- Williams JM, Adewunmi A, Schek RM, Flanagan CL, Krebsbach PH, Feinberg SE, et al. Bone tissue engineering using polycaprolactone scaffolds fabricated via selective laser sintering. *Biomaterials*. 2005;26(23):4817-27. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2004.11.057> PMID:15763261
- Long M, Rack H. Titanium alloys in total joint replacement—a materials science perspective. *Biomaterials*. 1998;19(18):1621-39. [https://doi.org/10.1016/S0142-9612\(97\)00146-4](https://doi.org/10.1016/S0142-9612(97)00146-4)
- Muñoz-Moreno R, Pérez-Prado MT, Ruiz-Navas EM, Boehlert CJ. In situ SEM observations of the tensile-creep deformation behavior and fracture mechanisms of a  $\gamma$ -TiAl intermetallic alloy at low and high stresses. *Mater Res Soc Symp Proc*. 2012;15(16):65-70.
- Zhanga F, Chena S, Dongb L, Leia Y, Liua T, Yin Y. Preparation of superhydrophobic films on titanium as effective corrosion barriers. *Appl Surf Sci*. 2011;257(7):2587-91. <https://doi.org/10.1016/j.apsusc.2010.10.027>
- Bouزيد T, Sinitskii A, Lim JY. Graphene platform for neural regenerative medicine. *Neural Regen Res*. 2016;11(6):894-9. <https://doi.org/10.4103/1673-5374.184454>
- Chen Y, Star A, Vidal S. Sweet carbon nanostructures: carbohydrate conjugates with carbon nanotubes and graphene and their applications. *Chem Soc Rev*. 2013;42(11):4532-42. <https://doi.org/10.1039/C2CS35396B> PMID:23247183
- Ramasundaram S, Yoon S, Kim KJ, Lee JS. Direct preparation of nanoscale thin films of poly(vinylidene fluoride) containing  $\beta$ -crystalline phase by heat-controlled spin coating. *Macromol Chem Phys*. 2008;209(24):2516-26. <https://doi.org/10.1002/macp.200800501>
- Pavithra R, Logesh Kumar S, Vijayalakshmi C, Padmapriya P, Nithyakalyani K. Surface modification of titanium with chitosan extraction from crab shell by spin coating. *Int J Circ Thero App*. 2016;9(9):4027-32.
- Kuilla T, Bhadra S, Yao D, Kim NH, Bose S, Lee JH. Recent advances in graphene based polymer composites. *Prog Polym Sci*. 2010;35(11):1350-75. <https://doi.org/10.1016/j.progpolymsci.2010.07.005>
- Liu Y, Wu G, De Groot K. Biomimetic coatings for bone tissue engineering of critical-sized defects. *J R Soc Interface*. 2010;7(S5):631-47. <https://doi.org/10.1098/rsif.2010.0115.focus> PMID:20484228 PMID:PMC2952178
- Liu S, Zeng TH, Hofmann M, Burcombe E, Wei J, Jiang R, et al. Antibacterial activity of graphite, graphite oxide, graphene oxide, and reduced graphene oxide: membrane and oxidative stress. *ACS nano*. 2011;5(9):6971-80. <https://doi.org/10.1021/nn202451x> PMID:21851105
- Gronowicz G, McCarthy M. Response of human osteoblasts to implant materials: Integrin-mediated adhesion. *J Orthop Res*. 1996;14(6):878-87. <https://doi.org/10.1002/jor.1100140606> PMID:8982129
- Faghihi S, Zhilyaev AP, Szpunar JA, Azari V, Vali H, Tabrizian M. Nanostructuring of a titanium material by high-pressure torsion improves pre-osteoblast attachment. *Adv Mater*. 2007;19(8):1069-73. <https://doi.org/10.1002/adma.200602276>
- Marimuthua M, Veerapandian M, Ramasundaram S, Hong SW, Sudhagar P, Nagarajan S, et al. Sodium functionalized graphene oxide coated titanium plates for improved corrosion resistance and cell viability. *Appl Surf Sci*. 2014;293:124-31. <https://doi.org/10.1016/j.apsusc.2013.12.114>
- Croisier F, Jérôme C. Chitosan-based biomaterials for tissue engineering. *Eur Polym J*. 2013;49(4):780-92. <https://doi.org/10.1016/j.eurpolymj.2012.12.009>