

Chitosan and Nanohydroxyapatite Roles in Physical and Chemical Characteristics of Gelatin/Chitosan/Nanohydroxyapatite Microspheres

S. Bagheri-Khoulenjani¹, H. Mirzadeh*^{2,3}, M. Etrati-Khosroshahi¹

1. Department of Biomedical Engineering, Amirkabir University of Technology, P.O. Box: 15875-4413, Tehran, Iran

2. Iran Polymer and Petrochemical Institute, P.O. Box: 14965-115, Tehran, Iran

3. Department of Polymer and Color Engineering, Amirkabir University of Technology, P.O. Box: 15875-4413, Tehran, Iran

Received 30 August 2010, accepted 3 April 2011

ABSTRACT

The effects of chitosan/biopolymer (C/P) and nanohydroxyapatite/ biopolymer (nHA/P) weight ratios on particle size and its uniformity, cross-linking density and NH_2 content of nano-hydroxyapatite/chitosan/gelatin (nHA/C/G) microspheres were investigated. Microspheres were fabricated using water-in-oil emulsion. Cross-linking of microspheres was performed using water soluble carbodiimide. Particle size and its uniformity were evaluated using an optical microscope. The morphology of microspheres was studied by scanning electron microscopy. The obtained data from particle size measurements revealed that increments in C/P ratio increased the particle size while reducing its uniformity, and increased the NH_2 content and cross linking density of the microspheres. It was shown that incremental increase in nHA/P ratio increased the particle size and its uniformity and reduced the NH_2 content and cross-linking density of the microspheres. Morphological studies showed that the fabricated microspheres had spherical shape in medium level of C/P ratio and nHA/P ratio. However, increasing in chitosan/biopolymer ratio induced some micro-cracks into the structure of microspheres.

Key Words:

microsphere,
nanocomposite,
chitosan/gelatin/ nanohydroxyapatite,
particle size, cross-linking density.

(*)To whom correspondence should be addressed.

E-mail: mirzadeh@aut.ac.ir

بررسی اثر کیتوسان و نانوهیدروکسی آپاتیت بر خواص فیزیکی و شیمیایی ریزگویی های نانوکامپوزیتی بر پایه ژلاتین - کیتوسان - نانوهیدروکسی آپاتیت

شاداب باقری خولنجانی^۱، حمید میرزاده^{۲*}، محمد عترتی خسروشاهی^۱

۱- تهران، دانشگاه صنعتی امیرکبیر، دانشکده مهندسی پزشکی، صندوق پستی ۴۴۱۳-۱۵۸۱۷۵

۲- تهران، پژوهشگاه پلیمر و پتروشیمی ایران، صندوق پستی ۱۱۵-۱۴۹۶۵

۳- تهران، دانشگاه صنعتی امیرکبیر، دانشکده مهندسی پلیمر، صندوق پستی ۴۴۱۳-۱۵۸۱۷۵

دریافت: ۸۹/۶/۸، پذیرش: ۹۰/۷/۱۵

چکیده

در این پژوهش، اثر نسبت وزنی کیتوسان - زیست پلیمر و نانوهیدروکسی آپاتیت - زیست پلیمر روی اندازه و توزیع اندازه، مقدار گروه های NH_2 و چگالی پیوندهای عرضی ریزگویی های ساخته شده از نانوکامپوزیت بر پایه ژلاتین - کیتوسان - نانوهیدروکسی آپاتیت بررسی شده است. برای ساخت ریزگویی ها روش امولسیون آب - روغن به کار برده شد. واکنش ایجاد پیوندهای عرضی در ساختار ریزگویی ها با استفاده از کربودی ایمید انجام شده است. اندازه ذرات با استفاده از میکروسکوپ نوری و شکل شناسی ریزگویی ها با استفاده از میکروسکوپ الکترونی پویشی مطالعه شد. مقدار گروه های NH_2 و چگالی پیوندهای عرضی با استفاده از روش رنگ سنجی با TNBS (2,4,6-Trinitrobenzenesulfonic acid) بررسی شد. نتایج نشان می دهد، افزایش نسبت وزنی کیتوسان - زیست پلیمر باعث افزایش اندازه ذرات و کاهش یکنواختی آن و نیز افزایش گروه های NH_2 و چگالی پیوندهای عرضی در ساختار ریزگویی ها می شود. همچنین، افزایش نسبت وزنی نانوهیدروکسی آپاتیت - زیست پلیمر باعث افزایش اندازه ذرات و افزایش یکنواختی آن، کاهش گروه های NH_2 و کاهش چگالی پیوندهای عرضی در ساختار ریزگویی می شود. مطالعات SEM نشان می دهد، در نسبت های وزنی متوسط کیتوسان - زیست پلیمر و نانوهیدروکسی آپاتیت - زیست پلیمر ریزگویی ها دارای ساختاری کاملاً یکنواخت اند. در نسبت های بیشتر کیتوسان - زیست پلیمر ریزگویی ها دارای شکل شناسی کاملاً ناهمگن و ترک دار می شوند.

واژه های کلیدی

ریزگویی،
نانوکامپوزیت،
کیتوسان - ژلاتین -
نانوهیدروکسی آپاتیت،
اندازه ذرات،
چگالی پیوندهای عرضی

* مسئول مکاتبات، پیام نگار:

مقدمه

کیتوسان از مشتقات دی استیل شده کیتین، پلیمری طبیعی است که در پوست خرچنگ و دیواره قارچ ها یافت می شود [۱]. به دلیل خواص منحصر به فردی چون زیست تخریب پذیری [۲]، غیر سمی بودن [۳،۴]، آثار ضدباکتریایی [۴]، زیست سازگاری [۵]، مخاط چسبندگی [۶]، هدایت استخوان سازی و داشتن پتانسیل لازم برای تشویق رشد و تمایز سلول های پیشرو استخوانی (osteoprogenators) و آسان سازی تشکیل استخوان [۷-۱۰] و نیز قیمت کم آن [۱۱]، کیتوسان به عنوان یک زیست ماده برای کاربردهایی مانند مهندسی بافت استخوان و دارورسانی [۱۲،۱۳] مورد استفاده قرار گرفته است. هر چند، استحکام مکانیکی ضعیف و از دست دادن یکنواختی ساختاری در شرایط تر، کاربرد کیتوسان را در مهندسی بافت استخوان محدود می کند.

بنابراین، به منظور از بین بردن این موانع، کیتوسان به شکل کامپوزیت یا آمیخته با مواد مختلف مانند پلی لاکتید-گلیکولید (PLGA) [۴،۹،۱۴،۱۵]، آلژینات [۱۰،۱۶]، ژلاتین [۹،۱۷-۲۱]، کلاژن [۲۲،۲۳]، هیدروکسی آپاتیت و کلسیم فسفات ها [۲۴،۲۵] و شیشه های زیستی [۲۰،۲۶] بررسی شده است. پژوهش های اخیر نشان داده اند، سامانه های کامپوزیتی پاسخ های سلولی استئوبلاست ها و قابلیت تشکیل استخوان را به شکل درون بدنی افزایش داده اند [۲۷،۲۸]. در مقایسه با کامپوزیت های میکرو، نانوکامپوزیت ها خواص مکانیکی و زیستی بهتری نشان داده اند [۲۷،۲۹]. به تازگی نانوکامپوزیت کیتوسان - ژلاتین - نانوهیدروکسی آپاتیت به دلیل خواص زیستی و مکانیکی مناسب در ساخت داربست برای کاربرد در مهندسی بافت استخوان مورد استفاده قرار گرفته اند.

سامانه های کامپوزیتی به شکل های مختلف مانند ساختارهای متراکم و داربست های متخلخل و ریزگویی ساخته شده اند. ریزگویی ها را می توان به عنوان پرکننده، به تنهایی یا در ترکیب با یک ماتریس پلیمری دیگر، در کاربردهای مهندسی بافت استخوان استفاده کرد [۲۸]. افزون بر این، ریزگویی ها قابلیت بارگذاری مواد زیستی و زیست فعال را داشته و می توانند در رهایش کنترل شده این مواد طی فرایند بازسازی استخوان مورد استفاده قرار گیرند [۳۰،۳۱].

در این پژوهش، ریزگویی هایی از جنس نانوکامپوزیت بر پایه کیتوسان - ژلاتین - نانوهیدروکسی آپاتیت ساخته شد. از آن جا که خواص فیزیکی و شیمیایی ریزگویی ها مانند اندازه ذرات، توزیع اندازه ذرات و هم چنین تعداد پیوندهای عرضی روی رهایش مواد زیست فعال و نیز رشد سلول ها روی آنها اثر زیادی دارد، اثر نسبت کیتوسان - زیست پلیمر و نانوهیدروکسی آپاتیت - زیست پلیمر روی اندازه ذرات، توزیع اندازه

ذرات، تعداد گروه های NH_2 و چگالی پیوندهای عرضی بررسی شد. بر اساس اطلاعات مؤلفان، تاکنون ریزگویی هایی با این ترکیب ساخته و مطالعه نشده است.

تجربی

مواد

کیتوسان با وزن مولکولی کم از شرکت Fluka، نانوذرات هیدروکسی آپاتیت (با اندازه ذرات ۹۵٪، > 200 nm)، محلول TNBS (2,4,6-Trinitrobenzenesulfonic acid) و روغن زیتون از شرکت Sigma، کربودی ایمید (EDC, N-ethyl-N'(3-dimethylaminopropyl) carbodiimide-hydrochloride، ژلاتین، سدیم کلرید (NaCl)، سدیم هیدروژن کربنات ($NaHCO_3$)، دی سدیم هیدروژن فسفات (Na_2HPO_4)، استیک اسید و استون از شرکت Merck خریداری شد.

دستگاه ها

هم زن مکانیکی ساخت شرکت IKA آلمان، هم زن فراصوت (prop) ساخت آلمان، هم زن، طیف سنج زیرقرمز تبدیل فوریه Bruker (FTIR) مدل FRA160/5 ساخت آلمان برای تعیین درجه استیل زدایی (DD)، طیف سنج فرابنفش ساخت Shimadzu ژاپن، میکروسکوپ الکترونی پویشی II XMU Tescan ساخت جمهوری چک و میکروسکوپ نوری ساخت شرکت Nikon و دوربین رقمی (CCD) متصل به آن ساخت Sony در انجام این طرح به کار گرفته شده است.

روش ها

ساخت ریزگویی ها

برای ساخت ریزگویی ها ابتدا مقدار مشخصی نانوهیدروکسی آپاتیت در ۱۰ mL محلول استیک اسید ۲٪ در آب مخلوط شد. به منظور پراکنش یکنواخت نانوذرات در داخل فاز زیست پلیمر، از امواج فراصوت به مدت ۳۰ s در توان ۵۰ W و بسامد ۰/۶ Hz استفاده شد. سپس، مقدار مشخصی از ژلاتین و کیتوسان (با نسبت های متفاوت) به مخلوط استیک اسید و نانوهیدروکسی آپاتیت اضافه شد تا غلظت فاز زیست پلیمری (ژلاتین و کیتوسان) به ۱۰ درصد وزنی برسد. آن گاه، مواد در دمای $60^{\circ}C$ مخلوط شدند. پس از آن، ۱۰ mL محلول نانوهیدروکسی آپاتیت - ژلاتین - کیتوسان قطره قطره در ۳۰ mL روغن زیتون ریخته شده و برای ۳۰ min با سرعت ۱۲۰۰ rpm مخلوط شدند.

$$S_v = (D_{84} - D_{16}) \times 100 / (2 \times D_{50}) \quad (1)$$

D_{16} اندازه ای است که اندازه ۱۶ درصد ذرات از آن کمتر است و D_{84} اندازه ای است که اندازه ۸۴ درصد ذرات از آن کمتر است. هر چه مقدر S_v کوچک تر باشد، مقدار یکنواختی اندازه ریزگویی ها بیشتر است [۳۳].

بررسی چگالی اتصالات عرضی و گروه های NH_2

از آن جا که واکنش ایجاد اتصالات عرضی با استفاده از EDC در ساختار ریزگویی ها از واکنش یک گروه عاملی آمین (NH_2) و یک گروه کربوکسیلیک اسید ($COOH$) و تشکیل یک گروه آمیدی ($NHCO$) انجام می شود، چگالی پیوندهای عرضی به طور مستقیم با تعداد گروه های آمین مصرف شده در ارتباط است.

مقدار گروه های آمین مصرف شده ریزگویی ها پس از واکنش ایجاد پیوندهای عرضی با استفاده از روش TNBS معرفی شده توسط Bubnis و Ofner [۳۴، ۳۵] با اندکی تغییرات اندازه گیری شد. به طور خلاصه، مقدار دقیقی از ریزگویی ها (۱۰ mg) برای مدت زمان ۴ h در دمای $40^\circ C$ در ۱ mL محلول آبی $NaHCO_3$ (۴٪ w/v) و ۱ mL محلول TNBS (w/v) ۰/۵٪ قرار داده شد.

سپس، ۳ mL HCl از ۳ mL محلول آب کافت ریزگویی ها به محیط اضافه و برای مدت ۲ h در دمای $60^\circ C$ قرار داده شد. پس از آب کافت محلول به منظور سرد شدن در دمای محیط گذاشته شده و ۵ mL آب یون زدوده به محلول اضافه شد. نیمی از ۵ mL محلول با افزودن ۱۵ mL آب رقیق و جذب آن در ۳۴۵ nm با استفاده طیف نورسنج فرابنفش بر حسب محلول شاهد اندازه گیری شد. محلول شاهد دقیقاً با همین فرایند آماده شد، با این تفاوت که محلول HCl پیش از TNBS به محیط اضافه شد. از آن جا که واکنش TNBS با گروه های آمین آزاد تنها در pH های قلیایی انجام پذیر است، افزودن اسید باعث جلوگیری از واکنش این دو

محلول ژلاتین و روغن زیتون، هر دو تا دمای $60^\circ C$ پیش گرم شده بودند. پس از آن، مخلوط به سرعت تا دمای $5^\circ C$ سرد و به مدت ۳۰ min هم زده شد. در ادامه با افزودن ۱۵۰ mL استون در دمای $5^\circ C$ به مدت ۳۰ min عمل هم زدن ادامه یافت. در نهایت، ریزگویی ها به روش صاف کردن جمع آوری و با استون چند مرتبه شسته شد تا باقی مانده روغن حذف شود [۳۲]. مشخصات نمونه های ساخته شده در جدول ۱ آمده است.

ایجاد اتصالات عرضی در ساختار ریزگویی ها

به منظور ایجاد اتصالات عرضی، ۱۰۰ mg از ریزگویی ها در محلول EDC در استون و آب (با نسبت ۲:۸) با غلظت ۶۰ mM به حالت تعلیق شده و روی هم زن به مدت ۶ h در دمای $5^\circ C$ قرار داده شد. به منظور متوقف کردن واکنش ایجاد اتصالات عرضی، ریزگویی ها در محلول $0.1M Na_2HPO_4$ و $2M NaCl$ برای مدت ۱ h با هم زدن یکنواخت و پیوسته قرار داده شد. سپس، ریزگویی ها به مدت ۲۰ min در آب یون زدوده و پس از آن در محلول ۵۰ درصد استون و آب قرار داده شدند. در نهایت، ریزگویی ها با استون خالص شسته و در گرم خانه خلاء در دمای محیط و به مدت ۲۴ h خشک شدند [۳۲].

بررسی اندازه ریزگویی های ژلاتین - نانوهیدروکسی آپاتیت

برای تعیین اندازه ذرات، از میکروسکوپ نوری استفاده شد. از هر نمونه چند اسلاید تهیه و از هر اسلاید بین ۱۰ تا ۳۰ تصویر گرفته شد. تصاویر حاصل با استفاده از نرم افزار Image Pro Plus بررسی شد. به طور متوسط از هر نمونه، اندازه ۱۰۰۰ ذره بررسی و سپس نمودار توزیع نرمال اندازه ذرات رسم شد. میانه اندازه ذرات (D_{50}) به عنوان اندازه ذرات گزارش شد. به منظور تشریح توزیع اندازه ذرات، از ضریب گستره پراکندگی اندازه ذرات (S_v) استفاده شد. S_v به ترتیب زیر محاسبه می شود:

جدول ۱ - مشخصات نمونه های ساخته شده و D_{50} ، D_{16} و D_{84} نمونه های مربوط (سرعت هم زن ۱۲۰۰ rpm است).

S_v	اندازه ذرات D_{50}	D_{84}	D_{16}	نسبت وزنی		کد نمونه
				کیتوسان - ژلاتین	نانوهیدروکسی آپاتیت - پلیمر	
۴۳/۲	۱۹/۹	۲۹	۱۷/۸	۰	۰/۳۷۵	C0H1
۷۵/۶	۲۲/۹	۳۸/۸	۴/۷	۰/۸	۰	C1H0
۵۷/۳	۳۰/۵	۴۷	۱۷/۸	۰/۸	۰/۳۷۵	C1H1
۴۷/۴	۴۰/۴	۵۷/۷	۱۹/۲	۰/۸	۰/۷۵	C1H2
۵۹/۲	۳۴	۵۴/۴	۱۴/۳	۰/۲	۰/۳۷۵	C2H1

که در آن N_c برابر با مقدار مولی گلوکوزآمین (GlcNAc) در گرم کیتوسان است که در حقیقت بیانگر مقدار گروه های NH_2 موجود در کیتوسان (mole NH_2/g chitosan) است [37]. W وزن نمونه کیتوسان است. با قرار دادن وزن کیتوسان برابر با $1g$ و نوشتن معادله بر حسب N_c به دست می آید:

$$N_c \left(\frac{\text{mole of } NH_2}{g \text{ of chitosan}} \right) = \frac{DD}{240 - \frac{43 \times DD}{161}} \quad (6)$$

تعیین درجه استیل زدایی (DD) کیتوسان

درجه استیل زدایی پلیمر به روش طیف سنجی زیرقرمز (IR) اندازه گیری شد. طیف زیرقرمز تمام نمونه ها از روش قرص KBr با نسبت ۱ به ۱۰۰ (پلیمر: KBr) و در محدوده بسامد $4000-400 \text{ cm}^{-1}$ به دست آمد. درجه استیل زدایی (DD) به کمک معادله (۷) محاسبه شد:

$$DD = 1 - \frac{1.33 \times A_{1655}}{A_{3450}} \quad (7)$$

A_{1655} پیک جذبی آمید نوع اول، در 1655 cm^{-1} به عنوان مقدار گروه های N -استیل و A_{3450} جذب گروه هیدروکسیل در 3450 cm^{-1} ، به عنوان استاندارد داخلی برای تصحیح اختلاف در غلظت پودر کیتوسان در قرص های مختلف، است [2].

بررسی شکل شناسی ریزگویی های ژلاتین- نانوهیدروکسی آپاتیت

شکل شناسی ریزگویی های ساخته شده با استفاده از میکروسکوپ الکترونی پویشی بررسی شد. سطح پیش از تصویربرداری با طلا پوشش دهی شد.

نتایج و بحث

در شکل ۱، نمودار توزیع نرمال اندازه ذرات ارائه شده است. به منظور بررسی دقیق تر روند تغییرات اندازه ذرات و توزیع آن بر حسب تغییرات نسبت کیتوسان- پلیمر و نیز نانوهیدروکسی آپاتیت- پلیمر، در شکل ۲- الف و ب نشان داده شده است.

افزایش نسبت کیتوسان- ژلاتین باعث افزایش اندازه ریزگویی ها شده است (شکل ۲- الف). این مسئله می تواند به دلیل افزایش گرانیوی فاز آبی در اثر افزایش غلظت کیتوسان باشد. گرانیوی کیتوسان به مراتب بیشتر از گرانیوی ژلاتین (در دماهای بیش از $30^\circ C$) است و افزایش

می شود. چگالی پیوندهای عرضی (CD) به کمک معادله (۲) محاسبه شد [36]:

$$CD = 1 - \frac{A_{\text{non-crosslinked}}}{A_{\text{crosslinked}}} \quad (2)$$

که در آن $A_{\text{crosslinked}}$ و $A_{\text{non-crosslinked}}$ به ترتیب جذب نمونه ها پیش از واکنش ایجاد پیوندهای عرضی و پس از آن است.

به منظور تعیین مقدار مول گروه های NH_2 از روش TNBS استفاده شد که پیشتر تشریح شده است. در ساختار ژلاتین، مقدار مول گروه های NH_2 (N) از معادله (۳) محاسبه شد [34, 35]:

$$N \left(\frac{M \text{ of } NH_2}{g \text{ of gelatin}} \right) = \frac{2(A)(0.02)}{1.46 \times 10^4 (b \times x)} \quad (3)$$

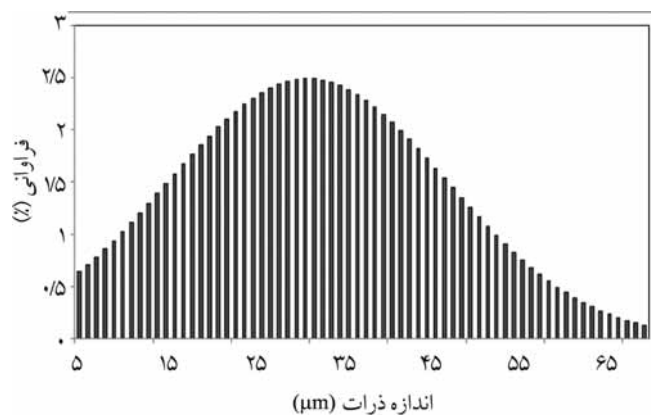
که در آن A جذب نمونه در طول موج 345 nm ، b وزن نمونه ژلاتین و x طول سلول UV است. ضریب $10^4 \times 746$ در معادله (۳) جذب مولی TNBS واکنش داده با گروه های NH_2 موجود در پروتئین هاست. از آن جا که این ضریب جذب مولی تنها برای پپتیدها و پروتئین ها قابل استفاده است و تاکنون این ضریب برای کربوهیدرات ها و به ویژه کیتوسان گزارش نشده است، تعداد گروه های NH_2 موجود در نانوکامپوزیت ساخته شده در این طرح به طور غیرمستقیم و با استفاده از قانون مخلوط ها به کمک معادله (۴) محاسبه شد:

$$N \left(\frac{\text{mole of } NH_2}{g \text{ of microspheres}} \right) = (1 - CD)(N_{\text{non-crosslinked}}) \quad (4)$$

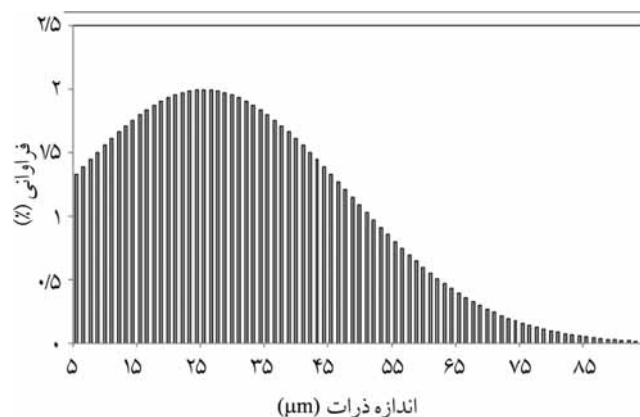
$$N_{\text{non-crosslinked}} = (N_g \times m_g + N_c \times m_c)$$

که در آن $N_{\text{non-crosslinked}}$ و N به ترتیب مقدار گروه های NH_2 موجود در نانوکامپوزیت (mole NH_2/g) پیش از ایجاد پیوندهای عرضی و پس از آن، CD چگالی پیوندهای عرضی و N_g و N_c به ترتیب مقدار گروه های NH_2 موجود در ژلاتین و کیتوسان بر حسب (mole NH_2/g) است. m_g و m_c نیز به ترتیب کسر وزنی ژلاتین و کیتوسان موجود در نانوکامپوزیت است. برای تعیین مقدار گروه های NH_2 موجود در کیتوسان (N_c) از رابطه بین درجه استیل زدایی (DD) کیتوسان و مقدار گروه های NH_2 موجود در آن استفاده شد [37]:

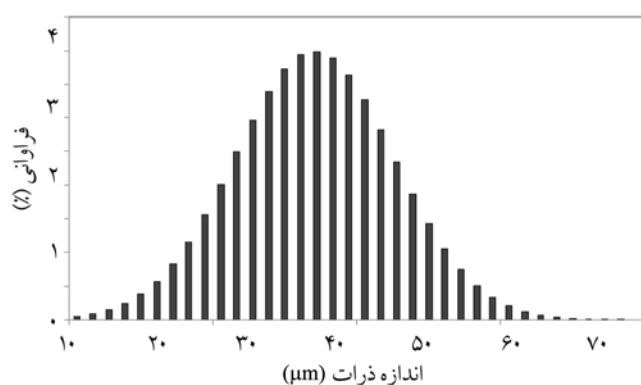
$$DD = \frac{N_c}{\frac{W - 161 \times N_c}{204} + N_c} \quad (5)$$



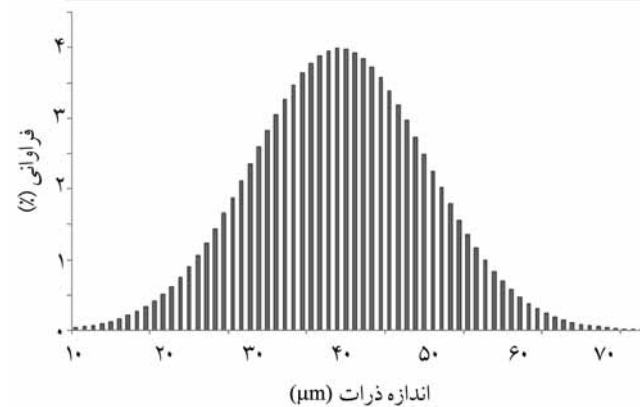
(ب)



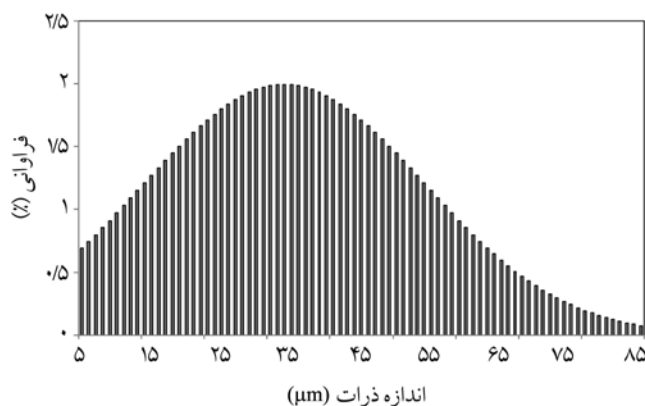
(الف)



(د)



(ج)

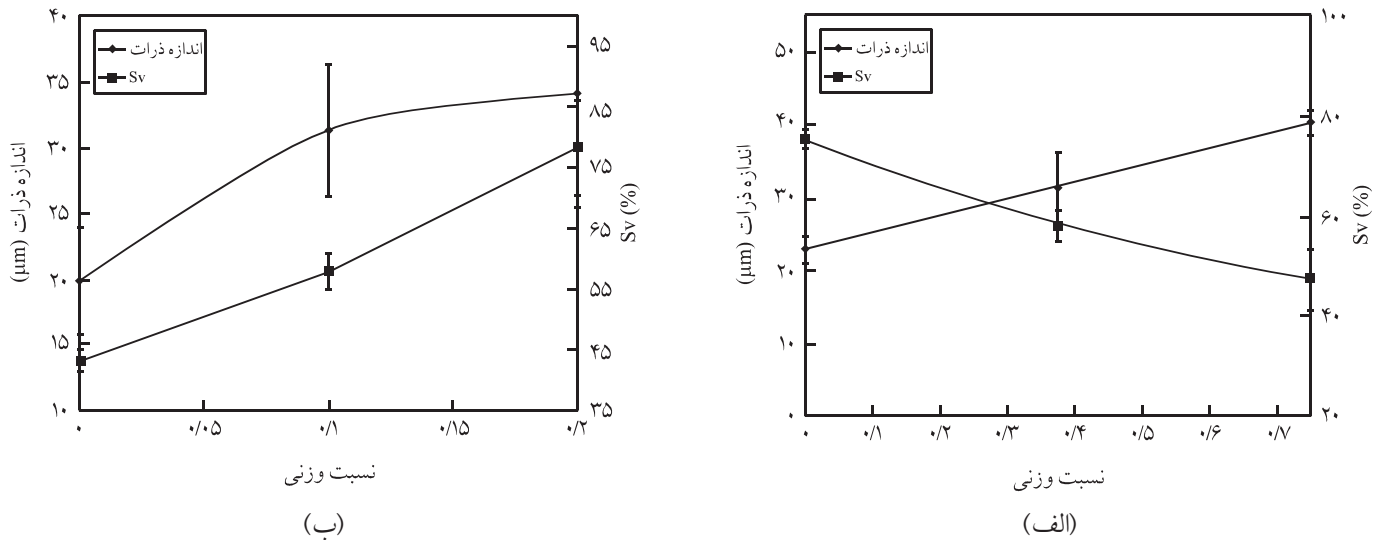


(ه)

شکل ۱- توزیع نرمال اندازه ریزگوی های ساخته شده با نسبت های مختلف نانوهیدروکسی آپاتیت - زیست پلیمر و کیتوسان - زیست پلیمر: (الف) ۰ و ۱، (ب) ۰/۳۷۵ و ۱، (ج) ۰/۷۵ و ۱، (د) ۰/۳۷۵ و ۰ و (ه) ۰/۳۷۵ و ۰/۲.

کیتوسان - ژلاتین باعث افزایش S_v شده است. این امر نشان دهنده کاهش مقدار یکنواختی ریزگوی هاست. این مسئله نیز می تواند به دلیل افزایش گرانی فاز آبی در اثر افزایش غلظت کیتوسان [۳۸] باشد. به

نسبت کیتوسان - ژلاتین باعث افزایش گرانی فاز آبی می شود [۳۸]. دیناروند و همکاران نشان داده اند، افزایش گرانی فاز آبی باعث افزایش اندازه ریزگوی ها می شود [۳۹]. هم چنین، افزایش نسبت



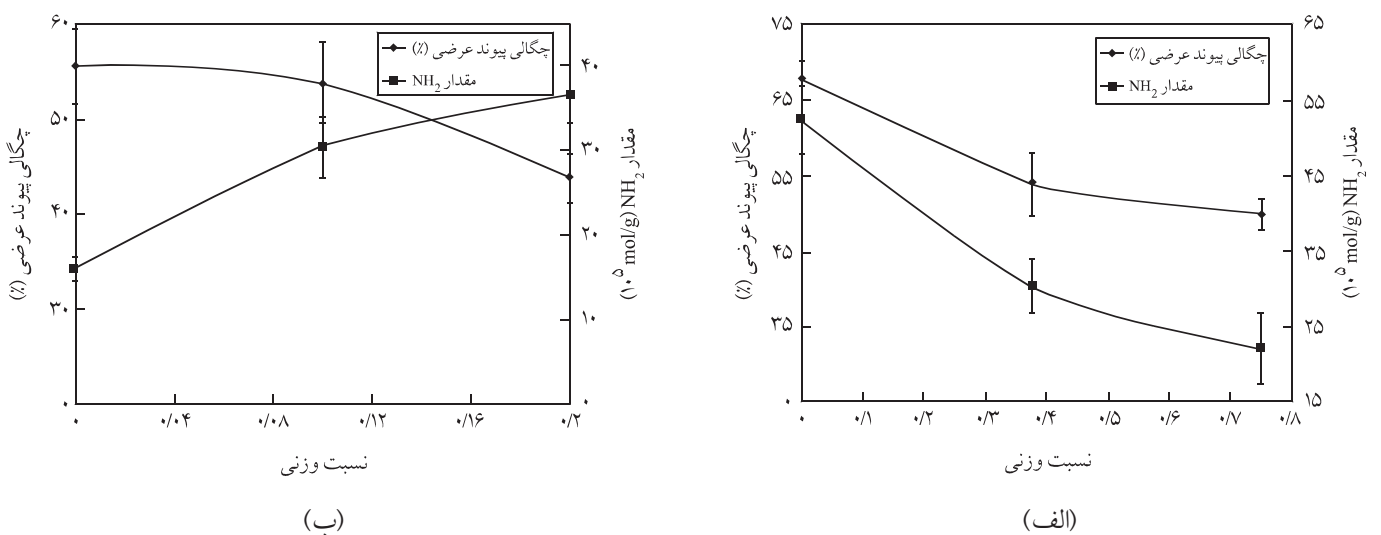
شکل ۲- تغییرات اندازه ذرات و توزیع اندازه ذرات بر حسب: (الف) نسبت کیتوسان - زیست پلیمر و (ب) نسبت نانوهیدروکسی آپاتیت - زیست پلیمر.

گرانروی فاز آبی باشد. از آن جا که غلظت پلیمر ثابت در نظر گرفته شده است، افزایش نانوذرات هیدروکسی آپاتیت باعث افزایش غلظت نهایی فاز آبی می شود. این افزایش غلظت نیز باعث افزایش گرانروی فاز آبی می شود.

افزایش نسبت نانوهیدروکسی آپاتیت - پلیمر باعث کاهش S_v شده است. به نظر می رسد، با افزودن نانوذرات هیدروکسی آپاتیت به فاز آبی تنش در داخل فاز آبی به طور یکنواخت تری توزیع می شود [۴۰، ۴۱].

نظر می رسد، با افزایش گرانروی فاز آبی مقدار توزیع تنش در داخل فاز آبی با یکنواختی کمتری انجام شود. عدم توزیع یکنواخت تنش در داخل فاز آبی منجر به تولید ریزقطره های غیریکنواخت از فاز آبی در داخل فاز آلی شده که خود باعث تشکیل ریزگویی هایی با اندازه های متفاوت می شود و یکنواختی اندازه ریزگویی ها کاهش می یابد.

افزایش نسبت نانوهیدروکسی آپاتیت - پلیمر باعث افزایش اندازه ریزگویی ها شده است (شکل ۲ - ب). این امر می تواند به دلیل افزایش



شکل ۳- تغییرات چگالی پیوندهای عرضی و مقدار گروه های NH_2 بر حسب: (الف) نسبت کیتوسان - زیست پلیمر و (ب) نسبت نانوهیدروکسی آپاتیت - زیست پلیمر.

جدول ۲ - مقدار گروه های NH₂ پیش و پس از واکنش شبکه ای شدن.

گروه های NH ₂ (μmole/g)			DD	کد نمونه
مصرف شده طی واکنش	پس از شبکه ای شدن	اولیه		
-	-	۳۹۰	-	ژلاتین
-	-	۳۶۸۰	۰/۸۵	کیتوسان
۱۶۱	۱۲۹	۲۸۹	-	C0H1
۵۲۴	۲۵۱	۷۷۵	-	C1H0
۳۰۴	۲۶۰	۵۶۴	-	C1H1
۲۲۱	۲۲۲	۴۴۳	-	C1H2
۳۶۷	۴۷۱	۸۳۸	-	C2H1

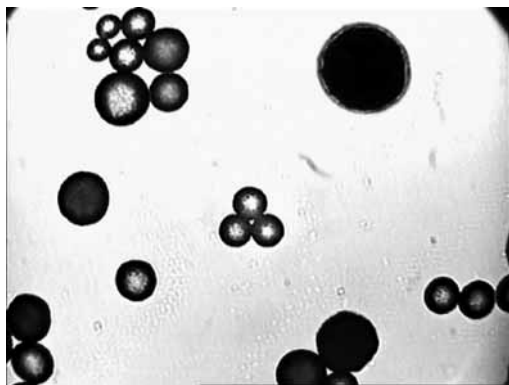
نسبت کیتوسان به ژلاتین باعث افزایش چگالی گروه های NH₂ می شود. همان طور که در **شکل ۳** مشاهده می شود، افزایش کیتوسان باعث کاهش چگالی پیوندهای عرضی می شود. در نتیجه، افزایش کیتوسان در نهایت باعث افزایش گروه های NH₂ می شود.

افزودن نانوذرات هیدروکسی آپاتیت به ریزگویی ها باعث کاهش چگالی پیوندهای عرضی شده است (**شکل ۳-ب**). این مسئله می تواند به دلیل درگیر شدن گروه های کربوکسیلیک و NH₂ آزاد با یون های Ca⁺⁺ و PO₄³⁻ موجود در ترکیب نانوهیدروکسی آپاتیت باشد. زندی و همکاران [۲۹] نشان داده اند، نانوهیدروکسی آپاتیت می تواند به شکل یونی با اسید آمینه های موجود در ژلاتین (مخصوصاً لایسین و آرژینین) وارد تعامل شود. در نتیجه این تعامل، گروه های NH₂ و کربوکسیلیک در دسترس برای انجام واکنش ایجاد پیوندهای عرضی کاهش یافته و در نتیجه چگالی پیوندهای عرضی کاهش می یابد.

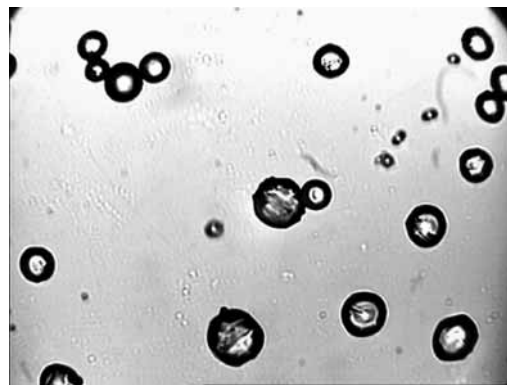
اگرچه افزایش نانوذرات هیدروکسی آپاتیت باعث کاهش چگالی پیوندهای عرضی شده است که به نوبه خود می تواند باعث افزایش گروه های NH₂ شود، افزایش نانوذرات هیدروکسی آپاتیت باعث کاهش مقدار گروه های NH₂ در ریزگویی ها پیوند عرضی داده شده است (**شکل ۳-ب**). افزایش نانوذرات هیدروکسی آپاتیت به دلیل عدم وجود گروه های NH₂ در ساختار آن، باعث کاهش گروه های NH₂ اولیه می شود. به نظر می رسد، این کاهش در مقدار گروه های NH₂ اولیه بیشتر از آن است که کاهش چگالی پیوندهای عرضی بتواند آن را جبران کند و در نهایت افزایش نسبت وزنی نانوذرات هیدروکسی آپاتیت - زیست پلیمر باعث کاهش تعداد NH₂ در ریزگویی ها شده است.

در **شکل ۴**، تصاویر میکروسکوپ نوری از ریزگویی های ساخته شده در شرایط متفاوت ارائه شده است. همان طور که در تصویر مشاهده می شود، تمام ذرات کاملاً کروی بوده و چسبندگی بین ذرات مشاهده

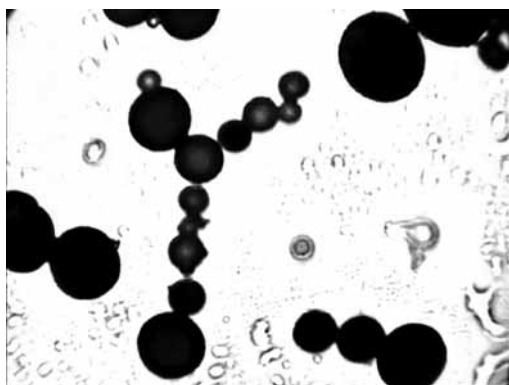
نانوذرات هیدروکسی آپاتیت که کروی شکل هستند، در بین زنجیرهای پلیمری مانند یک روان کننده عمل کرده و در نتیجه باعث توزیع یکنواخت تر تنش در بین زنجیرهای پلیمری می شوند. توزیع یکنواخت تنش در فاز آبی باعث تشکیل ریزگویی هایی با اندازه یکنواخت تر می شود. اگرچه، افزایش کیتوسان باعث کاهش چگالی پیوندهای عرضی ریزگویی ها شده است (**شکل ۳-الف**)، اما تعداد پیوندهای عرضی ایجاد شده افزایش یافته است (**جدول ۲**). افزایش تعداد پیوندهای عرضی در حقیقت به سبب افزایش گروه های NH₂ اولیه و در نتیجه افزایش احتمال تماس گروه های آمین و کربوکسیلیک اسید است. از آن جا که چگالی پیوندهای عرضی در حقیقت نسبت پیوندهای آمین مصرف شده به گروه های آمین اولیه است، افزایش گروه های آمین اولیه باعث کاهش چگالی پیوندهای عرضی محاسبه شده می شود و به نظر می رسد، افزایش تعداد پیوندهای جدید نتوانسته است این کاهش را جبران کند. همان طور که در **شکل ۳-الف** مشاهده می شود، افزایش کیتوسان به ریزگویی ها به طور قابل ملاحظه ای باعث افزایش چگالی گروه های آمین آزاد در ریزگویی ها شده است. تعداد گروه های آمین آزاد در ریزگویی ها بستگی به دو عامل تعداد گروه های آمین آزاد موجود در ریزگویی ها پیش از ایجاد پیوند عرضی و چگالی پیوندهای عرضی دارد. هر چه مقدار گروه های آمین آزاد موجود در ریزگویی ها پیش از ایجاد پیوند عرضی بیشتر باشد، تعداد گروه های آمین آزاد در انتها بیشتر می شود. هر چه چگالی پیوندهای عرضی بیشتر باشد، به علت درگیر شدن گروه های آمین آزاد در واکنش ایجاد پیوندهای عرضی و تشکیل پیوندهای آمیدی، در انتها چگالی گروه های آمین آزاد کمتر می شود. افزایش کیتوسان به ترکیب ریزگویی ها اثر متفاوتی بر مقدار گروه های آمین اولیه و چگالی پیوندهای عرضی دارد. از آن جا که تعداد گروه های NH₂ در کیتوسان به مراتب بیشتر از ژلاتین است (**جدول ۲**)، افزایش



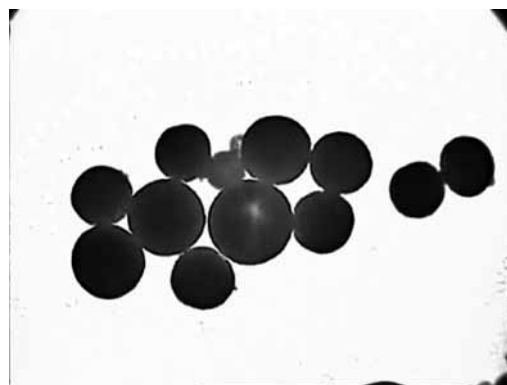
(ب)



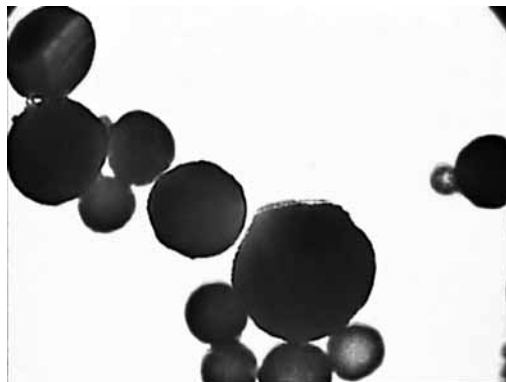
(الف)



(د)



(ج)



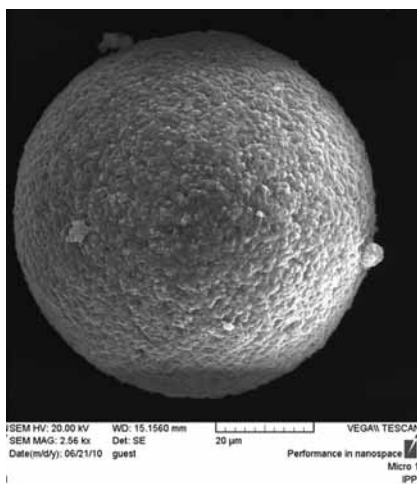
(ه)

شکل ۴ - تصاویر میکروسکوپ نوری از ریزگویی های ساخته شده با نسبت های مختلف نانوهیدروکسی آپاتیت - زیست پلیمر و کیتوسان - زیست - پلیمر: (الف) ۰ و ۰/۱، (ب) ۰/۳۷۵ و ۰/۱، (ج) ۰/۷۵ و ۰/۱، (د) ۰/۳۷۵ و ۰ با بزرگ نمایی ۲۰۰ و (ه) ۰/۳۷۵ و ۰/۲ با بزرگ نمایی ۴۰۰.

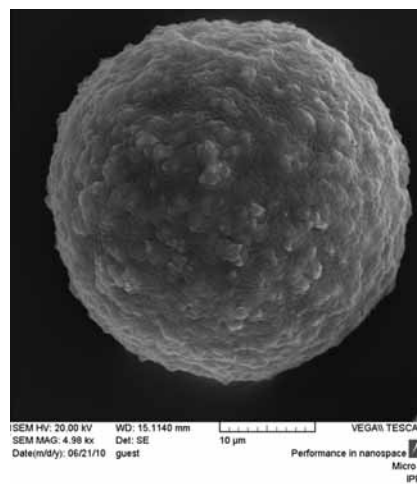
پلیمر برابر با ۰/۳۷۵ و ۰/۷۵ و کیتوسان - زیست پلیمر برابر با ۰/۱، ریزگویی های ساخته شده کاملاً کروی بوده و هیچ ترکی در ساختار آن دیده نمی شود. هر چند به نظر می رسد، به دلیل وجود ذرات نانوهیدروکسی آپاتیت، نایکنواختی سطحی روی سطح ریزگویی ها وجود دارد.

افزایش غلظت کیتوسان باعث ایجاد چروک خوردگی هایی در

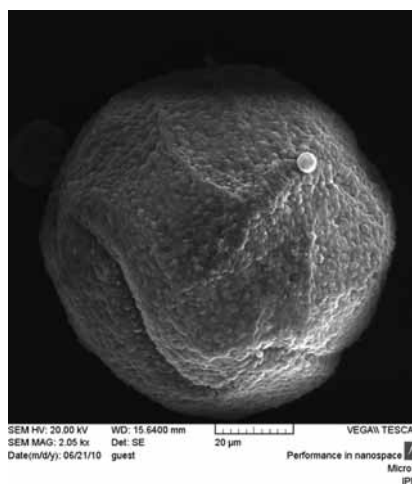
نمی شود. به منظور بررسی دقیق تر شکل شناسی ریزگویی ها و اثر نانوهیدروکسی آپاتیت و کیتوسان بر شکل شناسی ریزگویی های حاصل، تصاویر SEM از ریزگویی های ساخته شده با نسبت نانوهیدروکسی آپاتیت - پلیمر برابر با ۰/۳۷۵ و ۰/۷۵ در شکل ۵-الف و ب و نیز کیتوسان - پلیمر برابر با ۰/۱ و ۰/۲ در شکل ۵-الف و ج ارائه شده است. همان طور که در شکل ۵-الف مشاهده می شود، در نسبت آپاتیت -



(ب)



(الف)



(ج)

شکل ۵- تصاویر SEM از ریزگویی های ساخته شده با نسبت های مختلف نانوهیدروکسی آپاتیت - زیست پلیمر و کیتوسان - زیست پلیمر: (الف) ۰/۳۷۵ و ۰/۱، (ب) ۰/۷۵ و ۰/۱ و (ج) ۰/۳۷۵ و ۰/۲.

زیست پلیمر روی اندازه و توزیع اندازه، مقدار گروه های NH_2 و چگالی پیوندهای عرضی ریزگویی های ساخته شده از نانوکامپوزیت بر پایه ژلاتین - کیتوسان - نانوهیدروکسی آپاتیت بررسی و مشخص شد، افزایش نسبت وزنی کیتوسان - زیست پلیمر و نانوهیدروکسی آپاتیت - زیست پلیمر باعث افزایش اندازه ذرات و کاهش یکنواختی آن، افزایش مقدار گروه های NH_2 و کاهش چگالی پیوندهای عرضی در ساختار ریزگویی ها می شود. هم چنین، افزایش نسبت وزنی نانوهیدروکسی آپاتیت - زیست پلیمر باعث افزایش اندازه ذرات و افزایش یکنواختی آن، کاهش گروه های NH_2 و کاهش چگالی پیوندهای عرضی در ساختار ریزگویی ها می شود. مطالعات SEM نشان داد، در نسبت های وزنی کیتوسان - زیست پلیمر برابر ۰/۱ و

ساختار ریزگویی ها شده است. افزایش نسبت کیتوسان - زیست پلیمر (با توجه به ثابت بودن غلظت زیست پلیمر) باعث کاهش ژلاتین موجود در ریزگویی ها می شود. شکل گیری ریزگویی ها طی فرایند ساخت، در حقیقت به دلیل ژل شدن محلول ژلاتین در اثر کاهش دماست. کاهش غلظت ژلاتین و نیز وجود زنجیرهای کیتوسان در بین زنجیرهای ژلاتین می تواند روی فرایند ژل شدن ژلاتین اثر بگذارد و در نتیجه باعث ایجاد ریزترک هایی در ساختار ریزگویی ها شود.

نتیجه گیری

اثر نسبت وزنی کیتوسان - زیست پلیمر و نانوهیدروکسی آپاتیت -

قدردانی

از قطب علمی پلیمرهای زیست سازگار پژوهشگاه پلیمر و پتروشیمی ایران به دلیل حمایت مالی از این پژوهش قدردانی می شود.

مراجع

1. Akman A.C., Tigli R.S., Gumusderelioglu M., and Nohutcu R.M., Bone Morphogenetic Protein-6-loaded Chitosan Scaffolds Enhance the Osteoblastic Characteristics of MC3T3-E1 Cells, *Artif. Organs*, **34**, 65-74, 2010.
2. Bagheri-Khoulenjani S., Taghizadeh S.M., and Mirzadeh H., An Investigation on The Short-Term Biodegradability of Chitosan with Various Molecular Weights and Degrees of Deacetylation, *Carbohydr. Polym.*, **78**, 773-778, 2009.
3. Jiang L.Y., Li Y.B., Wang X.J., Zhang L., Wen J.Q., and Gong M., Preparation and Properties of Nano-hydroxyapatite/Chitosan/Carboxymethyl Cellulose Composite Scaffold, *Carbohydr. Polym.*, **74**, 680-684, 2008.
4. Cai X., Tong H., Shen X., Chen W., Yan J., and Hu J., Preparation and Characterization of Homogeneous Chitosan-Polylactic Acid/Hydroxyapatite Nanocomposite for Bone Tissue Engineering and Evaluation of Its Mechanical Properties, *Acta Biomaterialia*, **5**, 2693-2703, 2009.
5. Zhang Y., Venugopal J.R., El-Turki A., Ramakrishna S., Su B., and Lim C.T., Electrospun Biomimetic Nanocomposite Nanofibers of Hydroxyapatite/Chitosan for Bone Tissue Engineering, *Biomaterials*, **29**, 4314-4322, 2008.
6. Taghizadeh S.M. and Davari G., Study on Mucoadhesion Properties of Chitosan, *Iran. J. Polym. Sci. Technol. (In Persian)*, **20**, 515-519, 2007.
7. Muzzarelli R.A.A., Chitins and Chitosans for the Repair of Wounded Skin, Nerve, Cartilage and Bone, *Carbohydr. Polym.*, **76**, 167-182, 2009.
8. Tang X.J., Gui L. and Lu X.Y., Hard Tissue Compatibility of Natural Hydroxyapatite/Chitosan Composite, *Biomed. Mater.*, **3**, 2008.
9. Mohammadi Y., Mirzadeh H., Moztarzadeh F., Soleimani M., and Jabbari E., Osteogenic Differentiation of Mesenchymal Stem Cells on Novel Three-Dimensional Poly(L-Lactic Acid)/Chitosan/Gelatin/Beta-Tricalcium Phosphate Hybrid Scaffolds, *Iran. Polym. J.*, **16**, 57-69, 2007.
10. Li Z.S., Ramay H.R., Hauch K.D., Xiao D.M., and Zhang M.Q., Chitosan-Alginate Hybrid Scaffolds for Bone Tissue Engineering, *Biomaterials*, **26**, 3919-3928, 2005.
11. Heinemann C., Heinemann S., Lode A., and Bemhardt A., Worch H., and Hanke T., In Vitro Evaluation of Textile Chitosan Scaffolds for Tissue Engineering Using Human Bone Marrow Stromal Cells, *Biomacromolecules*, **10**, 1305-1310, 2009.
12. Mahdavi H., Taghizadeh S.M., Mivehchi H., and Ahmad Khan Beigi F., The Effect of Chitosan Molecular Weight on the Rate of Drug Release of Prednisolone Sodium Phosphate from Chitosan Microspheres Prepared by Spray Dryer, *Iran. J. Polym. Sci. Technol. (In Persian)*, **19**, 225-232, 2006.
13. Dustgani A., Vasheghani-Farahani E. and Imani M., Determination of the Optimum Conditions for Production of Chitosan Nanoparticles, *Iran. J. Polym. Sci. Technol.*, **20**, 457-464, 2007.
14. Jiang T., Khan Y., Nair L.S., Abdel-Fattah W.I., and Laurencin C.T., Functionalization of Chitosan/Poly(Lactic Acid-Glycolic Acid) Sintered Microsphere Scaffolds via Surface Heparinization for Bone Tissue Engineering, *J. Biomed. Mater. Res. A*, **93A**, 1193-1208, 2010.
15. Jiang T., Nukavarapu S.P., Deng M., Jabbarzadeh E., Kofron M.D., and Doty S.B., Chitosan-Poly(lactide-co-glycolide) Microsphere-Based Scaffolds for Bone Tissue Engineering: In Vitro Degradation and in Vivo Bone Regeneration Studies, *Acta Biomater.*, **6**, 3457-3470, 2010.
16. Wang J.Y., Fu W.L., Zhang D.M., Yu X., Li J., and Wan C., Evaluation of Novel Alginate Dialdehyde Cross-Linked Chitosan/Calcium Polyphosphate Composite Scaffolds for Meniscus Tissue Engineering, *Carbohydr. Polym.*, **79**, 705-710, 2010.
17. Mohamed K.R. and Mostafa A.A., Preparation and Bioactivity Evaluation of Hydroxyapatite-Titania/Chitosan-Gelatin Polymeric Biocomposites, *Mater. Sci. Eng. C, Biomim. Supramol.*, **28**, 1087-1099, 2008.
18. Li J., Dou Y., Yang J., Yin Y., Zhang H., Yao F., Wang H., and Yao K., Surface Characterization and Biocompatibility of Micro- and Nano-Hydroxyapatite/Chitosan-Gelatin Network Films, *Mater. Sci. Eng. C, Biomim. Supramol.*, **29**, 1207-1215, 2009.
19. Liu J.S., Zhang H.L., Wang Q., Yang J., and Chen Z.Q., Release of Plasmid DNA from Nano-Hydroxyapatite/Chitosan-Gelatin

- Composite Scaffolds, *Rare Metal. Mat. Eng.*, **38**, 850-853, 2009.
20. Peter M., Binulal N.S., Nair S.V., Selvamurugan, Tamura H., and Jayakumar R., Novel Biodegradable Chitosan-Gelatin/Nano-Bioactive Glass Ceramic Composite Scaffolds for Alveolar Bone Tissue Engineering, *Chem. Eng. J.*, **158**, 353-361, 2010.
 21. Mohammadi Y., Mirzadeh H., Moztarzadeh F., Soleymani M., and Jabari E., Design and Fabrication of Biodegradable Porous Chitosan/Gelatin/Tricalcium Phosphate Hybrid Scaffolds for Tissue Engineering, *Iran. J. Polym. Sci. Technol. (In Persian)*, **20**, 297-308, 2007.
 22. Niu X., Feng Q., Wang M., Guo X., and Zheng Q., Porous Nano-HA/Collagen/PLLA Scaffold Containing Chitosan Microspheres for Controlled Delivery of Synthetic Peptide Derived from BMP-2, *J. Control. Rel.*, **134**, 111-117, 2009.
 23. Shi S., Cheng X., Wang J., Zhang W., Peng L., and Zhang Y., Rbtmp-2 Microspheres-Loaded Chitosan/Collagen Scaffold Enhanced Osseointegration: An Experiment in Dog, *J. Biomater. Appl.*, **23**, 331-46, 2009.
 24. Fan C., Liu D. and Ren Y., Preparation Of Chitosan-Encapsulated Porous Calcium Polyphosphate Bioceramic, *Chin. J. Reprative Reconstructive Surg.*, **21**, 1355-1358, 2007.
 25. Sendemir-Urkmez A. and Jamison R.D., The Addition of Biphasic Calcium Phosphate to Porous Chitosan Scaffolds Enhances Bone Tissue Development In Vitro, *J. Biomed. Mater. Res. A*, **81A**, 624-633, 2007.
 26. Peter M., Binulal N.S., Soumya S., Nair S.V., Furuik T., Tamura H., and Jayakumar R., Nanocomposite Scaffolds of Bioactive Glass Ceramic Nanoparticles Disseminated Chitosan Matrix for Tissue Engineering Applications, *Carbohydr. Polym.*, **79**, 284-289, 2010.
 27. Zandi M., Mirzadeh H., Mayer C., Urch H., Eslaminejad M.B., Bagheri F., and Mivehchi H., Biocompatibility Evaluation of Nano-Rod Hydroxyapatite/Gelatin Coated with Nano-Hap as a Novel Scaffold Using Mesenchymal Stem Cells, *J. Biomed. Mater. Res. A.*, **92A**, 1244-1255, 2010.
 28. Kim H.W., Yoon B.H. and Kim H.E., Microsphere of Apatite-Gelatin Nanocomposite as Bone Regenerative Filler, *J. Mater. Sci. Mater. Medicine.*, **16**, 1105-1109, 2005.
 29. Mirzadeh H., Zandi M., and Eslaminejad M.B., Evaluation of Wistar Rats Mesenchymal Stem Cells Response to Novel Gelatin Scaffold Coated with Nano Rod Hap, *Int. J. Artif. Organs.*, **32**, 416-416, 2009.
 30. Sivakumar M., Manjubala I., and Rao K.P., Preparation, Characterization and In-Vitro Release of Gentamicin from Coralline Hydroxyapatite-Chitosan Composite Microspheres, *Carbohydr. Polym.*, **49**, 281-288, 2002.
 31. Wang Y.J., Lin F.H., Sun J.S., Huang Y.C., Chueh S.C., and Hsu F.Y., Collagen-Hydroxyapatite Microspheres as Carriers for Bone Morphogenic Protein-4, *Artif. Organs.*, **27**, 162-168, 2003.
 32. Adhirajan N., Shanmugasundaram N., and Babu M., Gelatin Microspheres Cross-linked with EDC as a Drug Delivery System for Doxycycline: Development and Characterization, *J. Microencapsul.*, **24**, 659-671, 2007.
 33. Allaire S.E. and Parent L.E., Size Guide Number and Rosin-Rammler Approaches to Describe Particle Size Distribution of Granular Organic-Based Fertilisers, *Biosyst. Eng.*, **86**, 503-509, 2003.
 34. Ofner C.M. and Bubnis W.A., Chemical and Swelling Evaluations of Amino Group Crosslinking in Gelatin and Modified Gelatin Matrices, *Pharm. Res.*, **13**, 1821-1827, 1996.
 35. Bubnis W.A. and Ofner C.M., The Determination of Epsilon-Amino Groups in Soluble and Poorly Soluble Proteinaceous Materials by a Spectrophotometric Method Using Trinitrobenzenesulfonic Acid, *Anal. Biochem.*, **207**, 129-133, 1992.
 36. Balakrishnan B. and Jayakrishnan A., Self-cross-linking Biopolymers as Injectable in Situ Forming Biodegradable Scaffolds, *Biomaterials*, **26**, 3941-3951, 2005.
 37. Tan S.C., Khor E., Tan T.K., and Wong S.M., The Degree of Deacetylation of Chitosan: Advocating the First Derivative UV-Spectrophotometry Method of Determination, *Talanta*, **45**, 713-719, 1998.
 38. Wang Y., Qiu D., Cosgrove T., and Denbow M.L., A Small-Angle Neutron Scattering and Rheology Study of The Composite of Chitosan and Gelatin, *Colloid. Surf. B Biointerfaces*, **70**, 254-8, 2009.
 39. Dinarvand R., Mahmoodi S., and Farboud E., Effect of Process Variables on Particle Size of Gelatin Microspheres Containing Lactic Acid, *Pharm. Dev. Technol.*, **9**, 291-299, 2004.
 40. Tuteja A., Duxbury P.M., and Mackay M.E., Multifunctional Nanocomposites with Reduced Viscosity, *Macromolecules*, **40**, 9427-9434, 2007.
 41. Tuteja A., Mackay M.E., Hawker C.J., and Horn B.V., Effect of Ideal, Organic Nanoparticles on the Flow Properties of Linear Polymers: Non-Einstein-Like Behavior, *Macromolecules*, **38**, 8000-8011, 2005.