Research article

Available in: http://jips.ippi.ac.ir

Iran. J. Polym. Sci. Technol. (Persian),
Vol. 36, No. 6, 647-667
February- March 2024
ISSN: 1016-3255
Online ISSN: 2008-0883
DOI: 10.22063/JIPST.2024.3550.2288

Physicochemical Properties and Biocompatibility of Hydrogels Based on Laponite and Modified Chitosan through the Substitution of Its Amino Group

Maryam Nezadi[1], Hamid Keshvari[1*], Fatemeh Shokrolahi[2*], Parvin Shokrollahi [2]

1. Biomaterial and Tissue Engineering Group, Faculty of Biomedical Engineering, Amirkabir University of Technology, P.O. Box: 15875-4413, Tehran, Iran
2. Department of Biomaterial, Faculty of Polymer Science, Iran Polymer and Petrochemical Institute, P.O. Box: 14975-112, Tehran, Iran

Received: 3 December 2023, accepted: 13 July 2024

ABSTRACT

Hypothesis: This study was conducted with the aim of synthesizing and identifying an injectable hydrogel based on chitosan/laponite. First, water-soluble chitosan was obtained from the reaction of chitosan/glycidyl trimethylammonium chloride (GTMAC). Then, an injectable hydrogel was prepared from its combination with laponite nanoparticles.

Methods: Chitosan was reacted with GTMAC in ratios of 1:1, 3:1 and 6:1. Using FTIR and ^{1}H-NMR, the successful synthesis of water-soluble chitosan was confirmed. Besides, thermal stability, solubility in water, ability to absorb and retain moisture, zeta potential, biocompatibility and antibacterial activity of modified samples were investigated and compared with those of pure chitosan. Then, the optimal sample of modified chitosan was combined with laponite at a ratio of 1:1, and the physicochemical, injectability, self-healing, rheological, and biocompatibility properties of this hydrogel were investigated.

Findings: The substitution percentage of QCS1, QCS3 and QCS6 samples was above 25%, 50% and 74%, respectively. QCS3 and QCS6 samples showed better water solubility at different pHs. By increasing the percentage of substitution, the surface charge became more positive and the antibacterial activity improved. However, the higher percentage of cell viability in the QCS3 sample makes it more suitable for biological applications. After hydrogel formation, ionic and hydrogen interactions of QCS/LAP in the hydrogel was confirmed by FTIR. Elemental analysis confirmed the uniform distribution of laponite in the hydrogel. SEM images showed a reduction in pore size after incorporating laponite in the hydrogel. Rheological studies showed a 5-fold increase in the mixed shear modulus after the addition of laponite. Also, the gelation time of the hydrogel was calculated to be about 5 min. The percentage of cell viability obtained by the MTT test after 72 h was 93%. Consequently, the introduced hybrid hydrogel can be a good choice for tissue engineering and drug delivery applications.

Keywords:

injectable hydrogel,
quaternized chitosan,
glycidyl trimethylammonium chloride (GTMAC),
laponiten,
biocompatibility

(*)To whom correspondence should be addressed.
E-mail: Keshvari@aut.ac.ir
f.shokrolahi@ippi.ac.ir

Please cite this article using:
Nezadi M., Keshvari H., Shokrolahi F., Shokrollahi P., Physicochemical Properties and Biocompatibility of Hydrogels Based on Laponite and Modified Chitosan through the Substitution of Its Amino Group, *Iran. J. Polym. Sci. Technol. (Persian)*, **36**, 647-667, 2024.

مقاله پژوهشی

خواص فیزیکی-شیمیایی و زیست‌سازگاری هیدروژل‌های بر پایه لاپونیت و کیتوسان اصلاح‌شده با تغییر جانشینی گروه آمینی

دسترس‌پذیر در نشانی: http://jips.ippi.ac.ir

مجله علوم و تکنولوژی پلیمر،
سال سی وششم، شماره ۶،
صفحه ۶۶۷-۶۴۷، ۱۴۰۲
ISSN: 1016-3255
Online ISSN: 2008-0883
DOI: 10.22063/JIPST.2024.3550.2288

مریم نزادی[۱]، حمید کشوری[۱*]، فاطمه شکرالهی[۲*]، پروین شکرالهی[۲]

۱- تهران، دانشگاه صنعتی امیرکبیر، دانشکده مهندسی پزشکی، گروه پلیمرهای زیست‌سازگار و مهندسی بافت، صندوق پستی ۴۴۱۳-۱۵۸۷۵

۲- تهران، پژوهشگاه پلیمر و پتروشیمی ایران، پژوهشکده علوم پلیمر، گروه پلیمرهای زیست‌سازگار، صندوق پستی ۱۱۲-۱۴۹۷۵

دریافت: ۱۴۰۲/۹/۱۲، پذیرش: ۱۴۰۳/۴/۲۳

چکیده

فرضیه: مطالعه حاضر با هدف سنتز و شناسایی هیدروژل تزریق‌پذیر بر پایه کیتوسان-لاپونیت انجام شد. ابتدا، از واکنش کیتوسان با گلیسیدیل تری‌متیل آمونیوم کلرید (GTMAC)، کیتوسان محلول در آب سنتز شد و سپس از ترکیب آن با نانوذرات لاپونیت، هیدروژل تزریق‌پذیر تهیه شد.

روش‌ها: کیتوسان با نسبت‌های ۱:۱، ۳:۱ و ۶:۱ با GTMAC واکنش داده شد. با آزمون‌های طیف‌سنجی زیرقرمز تبدیل فوریه و رزونانس مغناطیسی هسته، سنتز موفقیت‌آمیز کیتوسان محلول در آب تأیید شد. افزون بر آن؛ پایداری گرمایی، حل‌پذیری در آب، قابلیت جذب و حفظ رطوبت، پتانسیل زتا، زیست‌سازگاری و فعالیت ضدباکتری نمونه‌های اصلاح‌شده (QCS) بررسی و با کیتوسان خالص مقایسه شد. سپس، نمونه بهینه کیتوسان اصلاح‌شده با نسبت ۱:۱ با لاپونیت (LAP) ترکیب شد و خواص فیزیکی-شیمیایی، تزریق‌پذیری، خودترمیمی، رئولوژیکی و زیست‌سازگاری این هیدروژل بررسی شد.

یافته‌ها: درصد جانشینی نمونه‌های QCS1، QCS3 و QCS6 به‌ترتیب بیش از ۲۵، ۵۰ و ٪۷۴ محاسبه شد. دو نمونه QCS3 و QCS6 حل‌پذیری بهتری در pHهای مختلف آب نشان دادند. با افزایش درصد جانشینی، بار سطحی مثبت‌تر شد و فعالیت ضدباکتری ارتقا یافت. با وجود این، بیشتربودن درصد زنده‌مانی یاخته‌ها در QCS3، این نمونه را برای کاربردهای زیستی مناسب‌تر می‌کند. پس از انتخاب نمونه بهینه و تشکیل هیدروژل، برهم‌کنش‌های یونی و هیدروژنی بین QCS/LAP در هیدروژل با FTIR تأیید شد. تجزیه عنصری، توزیع یکنواخت لاپونیت در هیدروژل را نشان داد. تصاویر میکروسکوپ الکترونی کاهش اندازه منافذ هیدروژل را پس از افزودن لاپونیت نشان داد. بررسی‌های رئولوژیکی بیانگر افزایش پنج برابری مدول مختلط برشی پس از افزودن لاپونیت بود. همچنین، زمان ژل‌شدن هیدروژل حدود ۵ min محاسبه شد. درصد زنده‌مانی یاخته‌ای حاصل از آزمون MTT پس از زمان ۷۲ h، ٪۹۳ بود. از این‌رو، هیدروژل ترکیبی معرفی‌شده، می‌تواند انتخاب مناسبی در کاربردهای مهندسی بافت و دارورسانی باشد.

واژه‌های کلیدی

هیدروژل تزریقی،
کیتوسان چهارتایی دارشده،
گلیسیدیل تری‌متیل آمونیوم کلرید،
لاپونیت،
زیست‌سازگاری

* مسئولان مکاتبات، پیام‌نگار:
Keshvari@aut.ac.ir
f.shokrolahi@ippi.ac.ir

مقدمه

هیدروژل‌های تزریقی، به‌طور گسترده در زمینه‌های متنوع پزشکی-دارویی از جمله مهندسی بافت و سامانه‌های دارورسانی استفاده می‌شوند. طی دهه گذشته، هیدروژل‌های تزریق‌پذیر به‌دلیل توجه به ویژگی‌هایی نظیر انتقال فاز از حالت محلول به ژل در پاسخ به محرک خارجی، قابلیت شبیه‌سازی محیط ماتریس برون‌یاخته‌ای و به‌لحاظ خواص فیزیکی-شیمیایی و زیستی، وجود مقادیر زیاد آب در ساختار، ایجاد بستری متخلخل برای کاشت و تکثیر یاخته‌ها و انطباق‌پذیری مناسب با نقص‌های نامنظم به‌عنوان روش درمان کم‌تهاجمی، توجه زیادی را جلب کرده‌اند [۱،۲]. در ساخت این هیدروژل‌ها می‌توان از انواع پلیمرهای طبیعی و زیست‌سازگار مانند کیتوسان بهره برد [۲]. کیتوسان پلی‌ساکاریدی کاتیونی، خطی و متشکل از گلوکوزآمین و N-استیل گلوکوزآمین است [۳]. این پلیمر از استیل‌زدایی کیتین به‌دست می‌آید. کیتین، پلی‌ساکاریدی بدون شاخه بر پایه گلوکوز است که به‌طور گسترده در اجزای اصلی سخت‌پوستان، اسکلت خارجی حشرات و نیر برخی از دیواره‌های یاخته‌های باکتریایی و قارچی یافت می‌شود. کیفیت کیتوسان به منبع کیتین و جداسازی آن و مقدار استیل‌زدایی کیتین بستگی دارد. این ماده به‌دلیل سازگاری با محیط‌زیست و مقرون به‌صرفه‌بودن از نظر اقتصادی اهمیت ویژه‌ای در کاربردهای مهندسی پزشکی یافته است [۴،۵].

شباهت ساختاری کیتوسان با گلیکوزآمینوگلیکان‌ها، ماهیت آب‌دوستی و خواص زیستی عالی، این ماده را به انتخاب بسیار جذابی برای کاربردهای مختلف در مهندسی بافت تبدیل کرده است [۱،۶]. از ویژگی‌های اصلی دیگر کیتوسان این است که التهاب شدید ایجاد نکرده و پاسخ سامانه ایمنی بدن را تحریک نمی‌کند [۷]. همچنین به‌دلیل داشتن بار الکتریکی مثبت، محلول‌های کیتوسان، خاصیت ضدباکتری دارند. کیتوسان به‌دلیل داشتن بار مثبت در زنجیر پلیمری، به سطوح باکتریایی چسبیده و باعث تغییر در نفوذپذیری دیواره غشایی می‌شود و بدن ترتیب از رشد آن‌ها جلوگیری می‌کند [۱۰-۸].

قابلیت کیتوسان در چسبیدن به سطوح نیز یکی دیگر از ویژگی‌های مهم آن است. این ویژگی نه تنها رویکردهای جدیدی را برای انتقال مولکول‌های مفید (به‌ویژه داروها) از راه مسیرهای مخاط ایجاد می‌کند، بلکه به جذب مولکول‌هایی کمک می‌کند که هیچ‌گونه تمایلی برای اتصال به مخاط نیز ندارند [۱۱،۱۲]. به‌عنوان ماده‌ای در زخم‌پوش، کیتوسان دارای چند ویژگی، از جمله جذب مواد شیمیایی، فعال‌سازی درشت‌خوارها و گویچه‌های سفید (neutrophils)، تسریع در تشکیل بافت دانه‌ای (granular) و تشکیل دوباره بافت پوششی (epithelialization)، تشکیل محدود بافت جوشگاه (scar)، خاصیت ضددرد، خون‌ایستی (hemostasis) و خاصیت ضدباکتری ذاتی است [۳]. در حقیقت، کیتوسان می‌تواند با برهم‌کنش میان گروه‌های آمینی و پلاکت‌ها، خونریزی را متوقف کند و سرعت ترمیم زخم را بهبود بخشد [۱۳]. افزون بر این، مطالعات بیانگر فعالیت ضداکسیدانی کیتوسان از راه تثبیت رادیکال‌های آزاد به‌کمک گروه‌های آمینی و کربوکسیل است [۱۴]. همچنین آنزیم‌های بدن موجودات زنده قابلیت تجزیه کیتوسان را دارند، محصولات تخریب‌شده آن، N-استیل گلوکوز و گلوکوزآمین بوده که برای بدن انسان غیرسمی هستند. واسطه‌های تخریب در بدن جمع نمی‌شوند و سامانه ایمنی را تحریک نمی‌کنند [۳].

با وجود ویژگی‌های منحصر به‌فرد کیتوسان، این پلیمر در pH فیزیولوژیکی محلول نیست (pH=۷/۴). اما، در pH کمتر به‌دلیل پروتون‌دارشدن گروه‌های آمین آن (pKa =۶/۵)، حل‌پذیری کمی دارد [۱۵،۱۶]. بدین ترتیب حل‌پذیری کم آن در آب در عمل محدودیت مهمی است و باید از محلولی اسیدی در سنتز سامانه‌های دارورسانی یا هیدروژل‌های بر پایه کیتوسان استفاده کرد. معمولاً محلول ٪۱ (حجمی/حجمی) استیک اسید، لاکتیک اسید یا هیدروکلریک اسید برای حل‌کردن کیتوسان به‌کار گرفته می‌شود [۱۷،۱۸]. البته حذف این اسیدها در مرحله بعدی نیازمند شست‌وشوی طولانی بوده که ممکن است، برای کاربردهای پزشکی ناکارآمد باشد. زیرا امکان دارد، اثری از اسید در فرمول‌بندی دارویی یا هیدروژل طراحی‌شده باقی بماند و به نوبه خود زیست‌سازگاری یا سمی‌نبودن سامانه را کاهش دهد یا همچنین تجزیه برخی داروها را سرعت بخشد [۱۵]. برای غلبه بر این مشکل، استفاده از مشتقات کیتوسان محلول در آب پیشنهاد شده‌اند. کیتوسان دارای گروه‌های فعال هیدروکسیل و آمین است که می‌توانند تحت تأثیر واکنش‌های شیمیایی مختلفی از جمله هیدروکسیل‌دارکردن، کربوکسیل‌دارکردن، آلکیل‌دارکردن، آسیل‌دارکردن و استری‌شدن قرار گیرند [۲۲-۱۸]. این واکنش‌ها با ورود گروه‌هایی به کیتوسان، بلورینگی آن را به‌هم می‌زنند و در نتیجه باعث افزایش حل‌پذیری کیتوسان اصلاح‌شده در آب می‌شوند. مشتقات کیتوسان با خواص فیزیولوژیکی و زیست‌سازگاری بهبودیافته برای کاربردهای مهندسی پزشکی مناسب‌تر هستند [۲۳].

به‌عنوان مثال، گلیکول کیتوسان، به‌عنوان نوعی از کیتوسان اصلاح‌شده از نظر تجاری در دسترس است [۲۴]. Yang و Li نیز از گلیکول کیتوسان استفاده کرده و نشان داده‌اند، این ماده در مقایسه با کیتوسان از حل‌پذیری بیشتری در آب برخوردار است [۲۵،۲۶]. با توجه به آنچه گفته شد، در مطالعه حاضر هدف سنتز کیتوسان محلول در آب بود که بدین منظور واکنش چهارتایی‌شدن (quaternization) کیتوسان انتخاب شده است،

مشتقات کیتوسان با آمین نوع چهارم (quaternized chitosan, QCS) را می‌توان با آب‌گریزی-آب‌دوستی مختلف از راه زنجیرهای آلکیل روی اپوکسیدهای نوع چهارم تهیه کرد. انتظار می‌رود، این واکنش‌ها که با دو گروه NH_2– و OH– می‌تواند انجام شود، به‌دلیل ایجاد بار مثبت و افزایش ممانعت فضایی در مولکول، فعالیت ضدباکتری مؤثرتر و حل‌پذیری بیشتری در آب از خود نشان دهند [۲۷،۲۸]. اما از آنجا که درجه چهارتایی‌شدن به‌طور مستقیم بر خواص فیزیکی-شیمیایی و زیستی کیتوسان مؤثر بوده و ممکن است، سایر خواص آن را نیز دستخوش تغییر قرار دهد، بنابراین ضروری است، عامل‌های این سنتز بهینه‌سازی شود، تا افزون بر حل‌پذیری مناسب و خواص ضدمیکروبی، اثر سوئی بر پایداری گرمایی و زیست‌سازگاری پلیمر نداشته باشد. در پژوهش فعلی، با فراهم‌کردن محیطی اسیدی و به‌کارگیری نسبت‌های مختلف میان واکنش‌دهنده‌ها، سنتز QCS از راه جایگزینی و اصلاح روی گروه‌های NH_2 انجام شد. با وجود خواص فیزیکی، شیمیایی و زیستی جالب کیتوسان در کاربردهای مهندسی بافت، این پلیمر خواص مکانیکی بهتری ندارد، به‌منظور ارتقای این خواص می‌توان نانوذراتی مانند نانورس یا سیلیکات سنتزی را به آن اضافه کرد [۲،۲۹].

لاپونیت (laponite) از جمله ذرات سیلیکاتی است که معمولاً به‌عنوان عامل ایجاد اتصال عرضی یا ایجاد پیوند کووالانسی در تهیه کامپوزیت‌هایی با خواص مکانیکی مناسب عمل می‌کند. اخیراً این ذرات به‌دلیل خواص فیزیکی و شیمیایی عالی و نیز قابلیت بالقوه در القای استخوان‌زایی مورد توجه قرار گرفته‌اند. مطالعات نشان می‌دهد، ترکیب لاپونیت با پلیمرها می‌تواند خواصی مانند جذب آب، حل‌پذیری و خواص مکانیکی را ارتقا دهد. از سوی دیگر، چسبندگی، تکثیر و قابلیت استخوان‌سازی یاخته‌های کشت‌شده روی این نانوکامپوزیت‌ها با غلظت لاپونیت در ارتباط است [۲،۱۷]. به‌عنوان مثال، پیوند لاپونیت با پلی(اتیلن اکسید) نه تنها موجب بهبود خواص مکانیکی و پایداری شبکه آن می‌شود، بلکه چسبندگی، گسترش و رشد یاخته‌های استخوانی را نیز تقویت می‌کند [۳۰]. در پژوهش حاضر نیز برای بهره‌مندی از خواص لاپونیت از ترکیب آن با QCS استفاده شد. مرور منابع نشان می‌دهد، تاکنون مطالعه‌ای درباره ساختار تقویت‌شده QCS با لاپونیت انجام نشده است. بنابراین پس از انتخاب نمونه بهینه از QCSها با درجه‌های مختلف چهارتایی‌شدن و تشکیل شبکه هیدروژلی به‌کمک لاپونیت، خواص فیزیکی-شیمیایی و زیستی این هیدروژل شامل بررسی پیوندهای شبکه، پراش پرتو X، شکل‌شناسی و تجزیه عنصری، زمان ژل‌شدن، خاصیت تزریق‌پذیری، ترمیم‌شوندگی، گران‌روکشسانی و در نهایت زنده‌مانی یاخته‌ها بررسی شدند.

تجربی

مواد

کیتوسان با وزن مولکولی متوسط (Mn=۱۹۰۰۰۰-۳۱۰۰۰۰ Da و درجه استیل‌زدایی ٪۸۵-۷۵)، گلیسیدیل تری‌متیل آمونیوم کلرید (GTMAC)، سدیم کربنات (Na_2CO_3) و نقره نیترات ($AgNO_3$) از Sigma-Aldrich خریداری شدند. لاپونیت (LPA) با ضخامت ۱ nm و قطر تقریباً ۲۵ nm تا ۳۰ nm از BYK آلمان خریداری شد. استون، اتانول، متانول و استیک اسید از شرکت مواد شیمیایی Merck تهیه شده و بدون خالص‌سازی اضافی استفاده شدند. در این پژوهش از آب دوبار تقطیرشده استفاده شد. برای انجام آزمایش‌های یاخته‌ای از رده یاخته L929 (فیبروبلاست دم موش) و محیط کشت RPMI استفاده شد. معرف‌های زیستی مانند سرم جنین گاوی (FBS)، بافر نمکی فسفاتی (PBS) و پودر MTT از شرکت Merck تهیه شدند.

دستگاه‌ها

در این پژوهش، از طیف‌سنج زیرقرمز تبدیل فوریه EQUINOX 55 (FTIR) و طیف‌سنج رزونانس مغناطیسی هسته (^{1}H-NMR) ۴۰۰ MHz، مدل GAMMA 2-16 LSC ساخت شرکت Christ آلمان، هر دو ساخت Bruker آلمان، گرماوزن‌سنج Netch Instrument ساخت آلمان، دستگاه مرکزگریز مدل Sigma2-16p ساخت آلمان، خشک‌کن انجمادی مدل GAMMA 2-16 LSC ساخت شرکت Christ آلمان، رسانش‌سنج دیجیتال (EC Tester DiST®3-HI98303)، طیف‌سنج پراکندگی نور دینامیکی (DLS)(Brookhaven Instruments, Holtsville, NY)، طیف‌نورسنج UV-Vis مدل UV-1650، ساخت Shimadzu ژاپن، دستگاه UV ساخت شرکت فرایند پردیس سینا، هود جریان آرام نوع II، مدل BSC126، ساخت شرکت ایرانی Beasat و گرم‌خانه (CO_2 (incubator، مدل INC108 ساخت شرکت Memmert آلمان استفاده شد. همچنین، میکروسکوپ نوری معکوس مدل INV-2 ساخت شرکت BEL ایتالیا، خوانشگر ظرف کشت مدل Elx 808، ساخت شرکت BioTek ElISA reader آمریکا، طیف‌نورسنج مدل Elx 808، ساخت شرکت BioTek ElISA reader آمریکا، دستگاه XRD مدل PANalytical (XPert PRo MPD) ساخت هلند، میکروسکوپ الکترونی پویشی Seron Technology AIS-2100 (SEM)، دستگاه مرکزگریز مدل 3-16PK ساخت شرکت Sigma آلمان، پراش‌سنج انرژی پرتو X (EDX 100) Perkin Elmer ساخت شرکت Pyris آمریکا و رئومتر Anton Paar MCR301 ساخت انگلستان به‌کار گرفته شدند.

روش‌ها

سنتز کیتوسان چهارتایی‌دارشده

کیتوسان چهارتایی‌دارشده (QCS) از واکنش کیتوسان با گلیسیدیل تری‌متیل آمونیوم کلرید (GTMAC) مطابق با مراجع [۳۱،۳۲] با تغییرات جزئی سنتز شد. به‌طور خلاصه، ۵ g پودر کیتوسان در ۲۰۰ mL آب مقطر پراکنده شد و سپس ۱ mL استیک اسید (v/v) ٪۰/۵ به‌عنوان کاتالیزگر به بالن دارای کیتوسان اضافه شد. در محیط گاز نیتروژن، GTMAC قطره‌قطره به‌مدت ۳۰ min تحت هم‌زدن مداوم (۳۰۰ rpm) به محلول اضافه شد. نسبت مولی GTMAC به کیتوسان با سه نسبت ۱:۱، ۱:۳ و ۱:۶ انتخاب شد تا کیتوسان‌های محلول در آب با درجه‌های مختلف جانشینی تولید شود. این واکنش به‌مدت ۱۸ h در دمای ۵۵ºC ادامه یافت. پس از تکمیل فرایند، مایع رویی با روش مرکزگریزی با سرعت ۱۰۰۰۰ rpm به‌مدت ۲۰ min در دمای اتاق جمع‌آوری شد. برای خالص‌سازی، محلول به‌کمک قیف بوخنر و در فشار کاهشی صاف شد. برای تشکیل رسوب QCS، مایع حاصل از صافش داخل استون سرد ریخته شد و سپس GTMAC اضافی با شست‌وشو با متانول حذف شد. فرایند تصفیه سه مرتبه تکرار شد و در نهایت خروجی خالص با خشک‌کردن انجمادی به‌مدت ۲۴ h با بازده تقریباً ٪۸۰ به‌دست آمد. نمونه‌های حاصل با توجه به نسبت GTMAC به گروه آمین کیتوسان، با نام‌های (۱:۱) QCS1، (۱:۳)QCS3 و (۱:۶) QCS6 مشخص شدند.

مشخصه‌یابی کیتوسان چهارتایی‌دارشده و انتخاب نمونه بهینه

طیف‌سنجی زیرقرمز تبدیل فوریه

طیف‌سنجی زیرقرمز تبدیل فوریه (FTIR) برای بررسی ترکیب شیمیایی QCS1، QCS3 و QCS6 و هیدروژل در دمای معمولی انجام شد. نمونه‌های پودری همراه با پتاسیم برمید به‌شکل قرص تهیه شده و در محدوده طول موج cm^{-1} ۴۰۰۰–۴۰۰ با قدرت تفکیک cm^{-1} ۴ و ۳۲ پویش بررسی شدند.

طیف‌سنجی رزونانس مغناطیسی هسته

طیف‌سنجی رزونانس مغناطیسی هسته (^{1}H-NMR) با طیف‌سنج ۴۰۰ MHz، در دمای ۲۵ºC، برای تأیید واکنش میان GTMAC و کیتوسان انجام شد. از دوتریم اکسید (D_2O) با مقدار کمی دوتریم کلرید (DCl) به‌عنوان حلال ^{1}H-NMR استفاده شد.

تعیین درجه جانشینی کیتوسان چهارتایی‌دارشده

درجه جانشینی (DS) QSCها با روش تیترکردن یون‌های کلرید تعیین شد و مطابق با معادله (۱) محاسبه شد. این اصطلاح معادل نسبت مولی مول‌های GTMAC متصل‌شده به هر واحد گلوکوزآمین کیتوسان بوده که به درجه استیل‌زدایی کیتوسان نیز وابسته است. در این روش به‌طور خلاصه، ۰/۱ g از انواع QCS سنتزشده در ۱۰۰ mL آب یون‌زدوده (۰/۱ g/dL) حل شد، سپس محلول QSC با افزودن محلول نقره نیترات (۰/۰۱۷ مولار) با استفاده از میکروپیپت (Mediespec-Plus-100) به‌صورت رسانایی تیتر شد. رسانندگی این محلول با استفاده از رسانش‌سنج دیجیتال اندازه‌گیری شد. حجم ۰/۰۱۷ مولار $AgNO_3$ (V^*_{AgNO3})، که به کمترین رسانندگی برای محلول QSC منجر شد، برای محاسبه DS با استفاده از معادله (۱) استفاده شد:

$$DS(\%) = \frac{CV^*_{AgNO_3}}{\dfrac{W_W(g) - (CV^*_{AgNO_3} \times m_{GTMAC})}{(m_G \times DDA) + m_{AG}(1 - DDA)} \times DDA} \times 100 \quad (۱)$$

در این معادله DS، درجه جانشینی؛ CV^*_{AgNO3}، غلظت محلول نقره نیترات؛ W_W، وزن QSC در ۱۰۰ mL آب (۰/۱۰۰۰g) و m_{GTMAC}، وزن مولکولی (۱۵۱ g/mol) GTMAC است. عبارت در مخرج میانگین تعداد مول‌های باقی‌مانده استیل‌زدایی‌شده را در نمونه درنظر می‌گیرد که برای واکنش در دسترس هستند. DDA، درجه استیل‌زدایی؛ m_G، وزن مولکولی گلوکوزآمین (۱۶۱ g/mol) و m_{AG}، وزن مولکولی گلوکوزآمین استیل‌دارشده (۲۰۳ g/mol) است. همچنین، درجه جانشینی (DS)، از طیف ^{1}H-NMR مطابق معادله (۲) به‌دست می‌آید:

$$DS(\%) = \left[\frac{N + (CH_3)_3}{9 \times [H-1]}\right] \times 100 \quad (۲)$$

بدین ترتیب، DS درصد چهارتایی‌شدن یا جانشینی را مشخص می‌کند. $N^+(CH_3)_3$ و H-1 به‌ترتیب سطح زیر منحنی در نواحی ۳/۲ و ۴/۵ ppm است [۳۲].

تخمین مقدار حل‌پذیری در آب

بررسی مقدار حل‌پذیری به‌صورت کمّی با اندازه‌گیری وزن انجام شد. مقدار ۵۰ g از نمونه‌های کیتوسان و کیتوسان اصلاح‌شده (QCS1، QCS3 و QCS6) در ۲ mL آب مقطر در دمای ۲۵ºC به‌مدت ۲۴ h در حمام آب تحت هم‌زدن مداوم قرار گرفتند. سپس، بخش محلول نمونه به روش مرکزگریزی خارج شده و رسوبات خشک و توزین شدند. درصد حل‌پذیری کمّی نمونه‌ها به‌دست آمد. همچنین

وابستگی حل‌پذیری به pH با اندازه‌گیری کدورت ارزیابی شد. در این روش، محلول‌های آبی کیتوسان و کیتوسان‌های اصلاح‌شده تهیه شدند، بدین ترتیب که ۰/۲ g از پودر خشک آن‌ها در ۱۰۰ mL آب یون‌زدوده دارای استیک اسید (۱٪) حل شد. سپس، با افزودن آهسته محلول NaOH (۱ مولار)، عبور نور از نمونه‌ها در pHهای مختلف در λ برابر ۶۰۰ nm با طیف‌نورسنج UV-Vis اندازه‌گیری شد.

گرماوزن‌سنجی

گرماوزن‌سنجی (TGA) برای ارزیابی پایداری گرمایی کیتوسان و کیتوسان‌های اصلاح‌شده انجام شد. نمونه‌ها با سرعت ۲۰°C/min در محدوده ۲۵°C تا ۷۰۰°C در جو نیتروژن در معرض گرمادهی قرار گرفتند.

پتانسیل زتا

بار سطحی نمونه‌ها شامل کیتوسان، QCS3، QCS6 و لاپونیت با سامانه پراکندگی نور دینامیکی (DLS) در آب مقطر و pH خنثی (۷/۴) اندازه‌گیری شد.

ارزیابی جذب رطوبت و ماندگاری آن

مقدار جذب رطوبت مشابه روش Frascareli و همکاران اندازه‌گیری شد [۳۳]. نمونه‌های کیتوسان، QCS3 و QCS6 (۰/۳ g) به‌همراه محلول اشباع سدیم کربنات (Na_2CO_3) (رطوبت نسبی ٪۴۰) درون خشکانه ۲۵°C قرار گرفتند. سپس، در بازه زمانی ۹۶ h (هر ۱۲ h) وزن شدند. جذب رطوبت به‌عنوان مقدار رطوبت جذب‌شده به‌ازای هر گرم از نمونه (گرم/گرم) تعریف شد. در آزمون ماندگاری رطوبت نیز آب (۰/۳ g) به نمونه‌ها (۰/۳ g) اضافه شد و سپس در دمای ۲۵°C درون خشکانه با محلول اشباع سدیم کربنات (رطوبت نسبی ٪۴۰) قرار داده شد، در بازه زمانی ۹۶ h (هر ۱۲ h) وزن شدند و ماندگاری رطوبت به‌صورت مقدار آب باقی‌مانده در نمونه به‌ازای هر گرم آب تزریق‌شده بیان شد [۳۴].

فرایند کشت یاخته‌ای

آماده‌سازی و سترون‌سازی نمونه‌ها

پیش از شروع کشت یاخته‌ای، سترون‌سازی امری ضروری است که به‌منظور سترون‌کردن نمونه کیتوسان، QCS3 و QCS6 و هیدروژل نهایی از دستگاه UV استفاده شد که از روش‌های رایج سترون‌سازی است. مطابق با مقالات درصد استفاده از کیتوسان معمولاً در بازه ٪۰/۵ تا ٪۴/۵ (وزنی/حجمی) قرار دارد [۳۵] بدین ترتیب محلولی از کیتوسان و سایر نمونه‌های سنتزشده با غلظت ٪۲ (وزنی/حجمی) در PBS سترون تهیه شد. سپس، نمونه‌ها با عمق کمتر از ۲ mL به‌مدت ۱ h در معرض پرتو UV قرار گرفتند. از نمونه هیدروژلی نیز محلولی با نسبت ۱:۱ از QCS بهینه و لاپونیت تهیه شد. سپس، به‌مدت ۲۴ h درون خشک‌کن انجمادی قرار گرفت و ساختاری با ابعاد ۵ mm^2 و ضخامت ۰/۵ mm تهیه شد و به‌مدت ۱ h در معرض پرتو فرابنفش قرار گرفت.

کشت یاخته‌های فیبروبلاست دم موش L929

از فیبروبلاست‌های دم موش رده L929 برای بررسی زیست‌سازگاری نمونه‌ها استفاده شد. این یاخته‌ها درون فلاسک‌های ۲۵ cm^2 مخصوص کشت بافت، همراه با محیط کشت RPMI مغذی‌شده با ٪۱۰ از FBS و ٪۱ آنتی‌بیوتیک پنی‌سیلین/استرپتومایسین (Pen/Strep) کشت داده شدند (هود جریان آرام نوع II). فلاسک‌ها در دمای ۳۷°C و ٪۵ از CO_2 گرم‌خانه‌گذاری شدند و روزانه به‌لحاظ تعویض محیط کشت و آلودگی احتمالی مایکوپلاسما (mycoplasma) بررسی شده و پس از رسیدن فلاسک به تراکم یاخته‌ای ٪۸۰ (فاز لگاریتمی رشد یاخته‌ای) پاساژ (cell passage) داده شدند، بدین ترتیب که پس از حذف محیط کشت قبلی، ابتدا یک بار فلاسک با PBS شست‌وشو داده شد. سپس، ۷۰۰ µL آنزیم تریپسین به فلاسک اضافه شد و پس از ۳ min، یاخته‌ها از کف فلاسک جدا شدند و به حالت تعلیق تک‌یاخته‌ای داخل فالکون (falcon) ریخته شدند. برای خنثی‌کردن تریپسین، محیط کشت جدید اضافه شد و سپس تعلیق یاخته‌ای با دور ۱۳۰۰ rpm طی مدت ۵ min درون دستگاه مرکزگریز قرار داده شد. سپس با حذف روماند (supernatant)، مجموعه یاخته‌ای تشکیل در انتهای فالکون به‌همراه محیط کشت تازه، به فلاسک‌های جدید انتقال داده شد. از این فلاسک‌ها به‌منظور انجام آزمون MTT و بررسی مقدار سمیت نمونه‌ها استفاده شد.

بررسی سمیت یاخته‌ای نمونه‌ها با MTT

برای انجام آزمون سمیت یاخته‌ای، ابتدا تعلیقه‌ای از یاخته‌های L929 در محیط کشت کامل (RPMI+FBS 10%+Pen/Strep 1%) تهیه شد، شمارش یاخته‌ای با لام Neubaur و رنگ‌آمیزی آبی متیلن انجام شد. سپس، در هر چاهک از ظرف کشت یاخته‌ای ۹۶خانه‌ای، حدود ۱۰۰۰۰ یاخته اضافه شد. در ادامه، ۲۰۰ µL محیط کشت به چاهک‌ها اضافه شد و برای رسیدن به تراکم ٪۸۰ یاخته‌ای، ظرف کشت در دمای ۳۷°C با ٪۵ از CO_2 و ٪۹۵ رطوبت گرم‌خانه‌گذاری شد. پس از پوشش‌دهی ٪۸۰ از کف چاهک‌ها با یاخته، محیط کشت خارج شده و سطح یاخته‌ها با بافر PBS شست‌وشو داده شد. دوباره در تمام چاهک‌ها محیط کشت با دو برابر غلظت استاندارد و به‌مقدار ۱۰۰ µL

اضافه شد. سپس، به چاهک‌ها مقدار ۱۰۰ μL از نمونه‌های محلول کیتوسان در PBS افزوده شد، یکی از خانه‌ها به‌عنوان نمونه کنترل درنظر گرفته شد. دوباره ظرف کشت گرم‌خانه‌گذاری شد. نمونه‌های هیدروژل خشک نیز درون چاهک‌های یک ظرف کشت ۲۴خانه‌ای به‌همراه محیط کشت RPMI به‌مدت یک‌شب قرار گرفت. سپس، حجم ۲۰۰ μL از تعلیقه یاخته‌ای در محیط کشت کامل دارای 5×10^3 یاخته روی هیدروژل‌ها قرار گرفت. یکی از خانه‌ها به‌عنوان کنترل انتخاب شد و این ظرف کشت نیز به درون گرم‌خانه منتقل شد. زمان گرم‌خانه‌گذاری برای آزمون سمیت MTT، ۲۴، ۴۸ و ۷۲ h درنظر گرفته شد. طی زمان‌های تعیین‌شده، برای بررسی مقدار زنده‌مانی یاخته‌ای از دی‌متیل تیازل دی‌فنیل تترازولیوم برمید (MTT) استفاده شد. بدین ترتیب که ۱۰۰ μL از محلول MTT با غلظت ۰/۵ g/mL به چاهک‌های دارای نمونه‌های کیتوسان وارد شد. در نمونه‌های هیدروژلی نیز ابتدا محیط کشت به‌دقت خارج شد. نمونه‌ها با PBS شست‌وشو داده شدند و سپس با محلول MTT با غلظت ۰/۵ g/mL به‌همراه محیط کشت RPMI (نسبت ۱:۹) گرم‌خانه‌گذاری شدند. طی زمان گرم‌خانه‌گذاری MTT به‌کمک سوکسینات دهیدروژناز که یکی از آنزیم‌های چرخه تنفسی میتوکندری‌ها کاهش می‌یابد. کاهش و شکسته‌شدن این حلقه موجب تولید بلورهای بنفش‌رنگ فورمازان می‌شود که در زیر میکروسکوپ نوری معکوس قابل تشخیص است. مقدار رنگ تولیدشده با تعداد یاخته‌هایی که از نظر متابولیکی فعال هستند (یاخته‌های زنده)، رابطه مستقیم دارد. بلورهای فورمازان در آب نامحلول بوده و باید پیش از رنگ‌سنجی با ماده حلال آلی به حالت محلول درآیند. به همین علت، پس از گذشت ۴ h محلول روی یاخته‌ها خارج شده و ایزوپروپانول به آن‌ها اضافه می‌شود تا بلورهای بنفش‌رنگ ایجادشده حل شود. سپس، جذب نوری آن در طول موج ۵۷۰ nm با استفاده از خوانشگر ظرف کشت خوانده شد. چاهک‌های دارای یاخته‌های زنده زیادتر، چگالی نوری (OD) بیشتری نسبت به حفره‌های با تعداد یاخته زنده کمتر نشان خواهد داد. بدین ترتیب مقدار زنده‌مانی یاخته‌ها با نمونه کنترل مقایسه شد [۳۶]. همچنین، به‌منظور بررسی تغییرات شکل‌شناسی، تصاویر یاخته‌ها به‌کمک میکروسکوپ نوری معکوس تهیه شد.

بررسی خواص ضدباکتری

برای ارزیابی فعالیت ضدباکتریایی نمونه‌ها، آزمون کشت باکتری با دو دسته باکتری گرم مثبت (ATCC 29737) *Staphylococcus aureus* و باکتری گرم منفی (ATCC 10536) *Escherichia coli* با روش انتشار چاهک انجام شد. در این روش، با استفاده از کلنی ۲۴ساعتی هر یک از باکتری‌های کشت شده و ۵ mL سرم فیزیولوژی سترون، تعلیقه یکنواختی از باکتری‌ها با غلظت معادل ۰/۵ مک‌فارلند تهیه شد. سپس، باکتری‌ها به‌کمک سواب آزمایشگاهی روی محیط Mueller Hinton Broth به‌صورت چمنی کشت داده شدند [۳۷]. سه چاهک هر یک با قطر ۳ mm با استفاده از پیپت پاستور سترون و در مرکز ظرف کشت ایجاد شد. ۵۰ μL از محلول ٪۵ نمونه‌ها تهیه شد (کیتوسان خالص در آب و استیک اسید ٪۱ و نمونه‌های QCS3 و QCS6 در آب یون‌زدوده حل شدند) و به درون این چاهک‌ها چکانده شد. سپس، نمونه‌ها به‌مدت ۱۸ h در دمای ۳۷°C گرم‌خانه‌گذاری شدند. اندازه‌گیری قطر هاله مهار رشد با میکروسنج انجام شد. برای اطمینان از نتیجه، این آزمایش برای هر سویه باکتری سه مرتبه تکرار شد و در نهایت میانگین قطر هاله مهار رشد به‌عنوان قطر نهایی گزارش شد.

برای سنجش حداقل غلظت بازدارندگی رشد باکتری (MIC، حداقل غلظتی از نمونه که می‌تواند بیش از ٪۹۰ باکتری‌ها را مهار کند)، از روش رقت دو برابری استفاده شد.

ابتدا، محلول مادر از نمونه‌ها تهیه شد. از این محلول، نمونه‌هایی با رقت دو برابر در محیط Mueller Hinton Broth تهیه شد (برای هر نمونه رقت‌های بین ۲۵ μg/mL تا ۶۴۰۰ μg/mL درنظر گرفته شد). سپس، ۲ mL از هر یک از محلول‌های رقیق تهیه‌شده به‌طور جداگانه به ۱۸ mL محیط Mueller Hinton Broth سترون اضافه شد و در پلیت‌هایی با قطر ۸ cm ریخته شد. سپس تعلیقه‌ای با کدورت ۰/۵ لوله مک‌فارلند از باکتری تهیه شد ($1/5\times10^5$) و مقدار ۱۰۰ μL از آن به‌صورت نقطه‌ای بر سطح محیط کشتی تلقیح شد که محتوی غلظت‌های مختلف از نمونه بود. نمونه‌ها به‌مدت ۱۸ h درون گرم‌خانه در دمای ۳۷°C نگه‌داری شدند و جذب نوری نمونه‌ها در ۶۳۰°C با طیف‌نورسنج خوانده شد. اولین ظرف کشت دارای رقتی از نمونه که در آن رشد باکتری دیده نشد (کدورتی دیده نشد)، به‌عنوان MIC درنظر گرفته شد. برای کنترل منفی از ظرف کشت دارای محیط Mueller Hinton Broth، بدون باکتری و برای کنترل مثبت همین محیط با باکتری استفاده شد [۲۷].

تهیه هیدروژل کیتوسان چهارتایی‌دارشده-لاپونیت (QCS/LAP)

ابتدا تعلیقه لاپونیت ٪۲ (۲۰ mg لاپونیت در ۱۰ mL دو بار تقطیر) تهیه شد و با همزن مغناطیسی به‌مدت ۶۰ min در دمای معمولی به‌طور همگن مخلوط شد [۳۸]. محلول ٪۲ از QCS3 (نمونه بهینه) نیز در آب دو بار تقطیرشده (۲۰ mg در ۱۰ mL آب) در دمای محیط به‌دست آمد. نانوکامپوزیت هیدروژلی حاصل با ترکیب نسبت ۱:۱ تحت همزدن مغناطیسی دو محلول به‌دست آمد و QCS/LAP

نام‌گذاری شد. از نتایج آزمون پتانسیل زتا در کنترل قدرت یونی محیط استفاده شد.

زمان ژل‌شدن

برای بررسی زمان ژل‌شدن هیدروژل، محلول در دمای ۳۷°C در یک ظرف شیشه‌ای گرم‌خانه‌گذاری شد و زمان ژل‌شدن با استفاده از آزمایش لوله معکوس تعیین شد [۲].

مشخصه‌یابی ساختاری هیدروژل کیتوسان چهارتایی‌دارشده-لاپونیت

ابتدا هیدروژل سنتزشده در خشک‌کن انجمادی قرار گرفت و همراه با پتاسیم برمید مشابه با نمونه‌های QCS که در پیش‌تر اشاره شد، با آزمون FTIR مشخصه‌یابی شد. سپس، الگوهای پراش پرتو X (XRD) به‌کمک پراش‌سنج با تابش CuKα (۰/۱۵۴۱۸ nm) در ۴۰ kV و ۴۰ mA به‌دست آمد. نمونه‌ها در محدوده 2θ از ° ۴ تا ° ۷۰ برای ارزیابی ساختار بلوری و بی‌شکل بررسی شدند. افزون بر این، فاصله میان صفحه‌های نانوذرات لاپونیت به‌صورت خالص و در هیدروژل با الگوهای XRD و معادله Bragg بررسی شد:

$$d = \frac{\lambda}{2\mathrm{Sin}\theta} \qquad (۳)$$

در این معادله λ، طول موج منبع آند مس (۰/۱۵۴۱۸ nm)، d، نشانگر فاصله صفحه‌های لاپونیت و θ، زاویه پراش است [۳۹].

برای مقایسه شکل‌شناسی، هیدروژل‌ها ابتدا به‌مدت ۲۴ h درون خشک‌کن انجمادی قرار گرفتند. ساختار حاصل پس از خشک‌شدن درون نیتروژن مایع قرار گرفت و سطح مقطع آن شکسته شد تا مقطع عرضی دیده شود [۴۰،۴۱]. نمونه‌ها پیش از تصویربرداری به‌مدت ۸۰ s در ولتاژ ۸۰ kV با طلا پوشش‌دهی شدند. در نهایت، تصاویر SEM به‌کمک میکروسکوپ الکترونی پویشی تهیه شد. همچنین تجزیه عنصری عناصر موجود در لاپونیت (Mg، Si و Na) برای بررسی چگونگی توزیع لاپونیت در هیدروژل به‌کمک طیف‌سنجی پراش انرژی پرتو X (EDX) در ولتاژ ۲۰ kV و بزرگ‌نمایی ۵۱۰ x انجام شد.

تزریق‌پذیری و خودترمیمی

محلول آبی لاپونیت و QCS به‌همراه رنگ خوراکی، در یک سرنگ (سر سوزن با اندازه ۲۱) بارگذاری و پس از ۵ min و تشکیل هیدروژل، روی صفحه شیشه‌ای اکسترود شد. بدین ترتیب قابلیت تزریق‌پذیری هیدروژل مشخص شد. برای بررسی خاصیت خودترمیمی هیدروژل در دو رنگ متفاوت تهیه شد. سپس هیدروژل‌ها برش داده شدند و حدود زمان ۱۵ min در محلی که تازه برش خورده بود، در کنار هم قرار گرفتند. سپس، با استفاده از انبرک مقاومت آن‌ها به‌صورت ظاهری در برابر کشش بررسی شد.

رفتار رئولوژیکی

خواص گران‌روکشسانی هیدروژل QCS/LAP در مقایسه با QCS به‌کمک رئومتر با هندسه صفحه موازی نوسانی (قطر ۵۰ mm) و کرنش ثابت ٪۰/۵ در بسامد ۱ Hz تعیین شد. دما از ۲۲°C (دمای محیط) به ۴۰°C با سرعت ۲ °C/min افزایش یافت. ژل‌شدن با اندازه‌گیری مدول مختلط برشی |G*|، ثبت شد که پارامتر رایجی برای تعیین استحکام مواد گران‌روکشسان مانند هیدروژل است. مدول برشی مختلط، |G*|، با مدول ذخیره (G') و اتلاف (G") مطابق با معادله (۴) مرتبط است. مدول ذخیره معیاری از انرژی تغییرشکل ذخیره‌شده در نمونه طی فرایند برشی (رفتار کشسانی) بوده، در حالی که مدول اتلاف اندازه‌گیری انرژی استهلاک‌شده در نمونه طی فرایند برشی (رفتار گران‌رو) است و از دست می‌رود [۴۲].

$$\left|G^*\right| = \sqrt{(G')^2 + (G'')^2} \qquad (۴)$$

برای محاسبه زمان دقیق ژل‌شدن، آزمایش جاروب زمانی هیدروژل QCS/LAP انجام شد. در بسامد ثابت ۱ rad/s، مدول ذخیره (G') و اتلاف (G") طی فرایند ژل‌شدن در دمای ۳۷°C اندازه‌گیری شده و تلاقی این دو منحنی به‌عنوان نقطه ژل‌شدن معرفی شد.

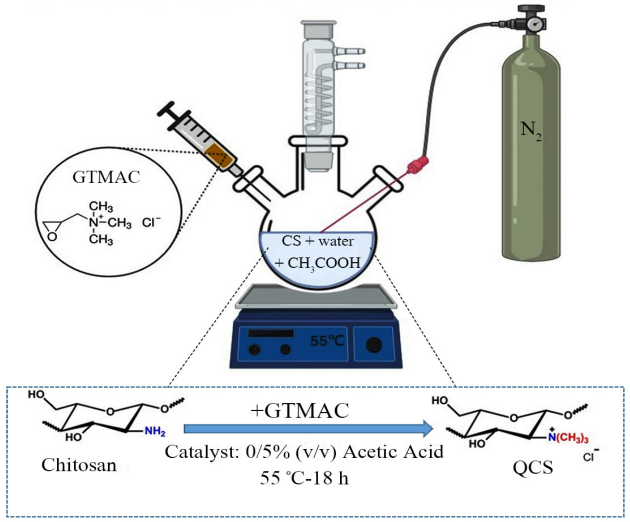
تحلیل‌های آماری

داده‌های حداقل سه مرتبه تکرار جمع‌آوری شده و نتایج به‌صورت میانگین ± انحراف معیار گزارش شدند. مقایسه آماری بین نتایج گروه‌ها با روش t-test و ANOVA انجام شد. مقادیر P < ۰/۰۵ به‌عنوان تفاوت معنادار درنظر گرفته شد.

نتایج و بحث

مشخصه‌یابی QCS

همان‌طور که در بخش سنتز کیتوسان چهارتایی بیان شد، مجموعه سه‌تایی QCS با به‌کارگیری نسبت‌های مولی مختلفی از GTMAC به گروه آمین کیتوسان، مطابق با طرح ۱ سنتز شد. در این سنتز به‌منظور افزایش سرعت واکنش و اطمینان از اتصال هدفمند گروه اپوکسی



طرح ۱- طرح واکنش مزدوج‌شدن GTMAC با پیکره کیتوسان.

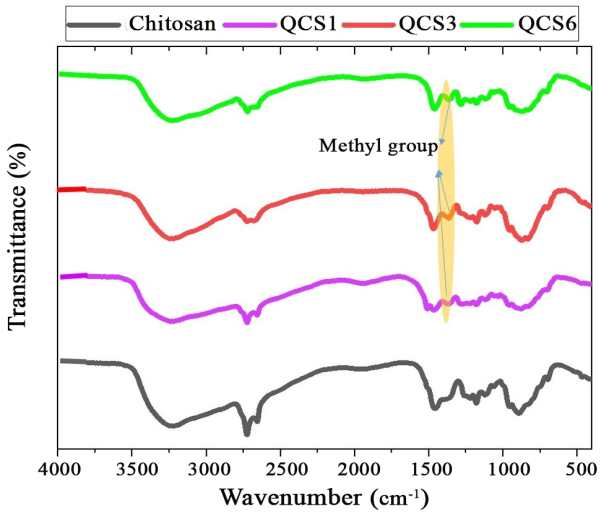
Scheme 1. Reaction Scheme for the conjugation of GTMAC to the chitosan backbone.

GTMAC به گروه آمین کیتوسان از استیک اسید استفاده شد. مطالعات نشان می‌دهد، این گروه اپوکسی ممکن است، در محیط اسیدی راحت‌تر باز شود که به نوبه‌خود به افزایش سرعت واکنش منجر می‌شود. همچنین در محیط اسیدی، گروه اپوکسی GTMAC بیشتر با گروه‌های آمین (NH_2) کیتوسان واکنش می‌دهد، در حالی که در شرایط قلیایی، این اتصال به‌طور عمده روی گروه‌های هیدروکسیل (–OH) کیتوسان رخ می‌دهد [۳۱،۳۴]. درصد جانشینی گروه‌های کیتوسان می‌تواند بسته به شرایط واکنش مانند دما، زمان واکنش و غلظت پلیمر متفاوت باشد [۱۵]. اما در مطالعه حاضر، تنها تغییر نسبت مولی GTMAC به کیتوسان (یعنی ۱:۱، ۱:۳ و ۱:۶ GTMAC/کیتوسان) مطابق با جدول ۱ به‌عنوان متغیر اصلی درنظر گرفته شد. همچنین،

جدول ۱- ترکیب‌بندی مخلوط واکنش در تهیه کیتوسان‌های محلول در آب با نسبت‌های مختلف GTMAC/CS.

Table 1. Composition of reaction mixtures employed for preparation of QCSs with different ratios of GTMAC/CS.

Chemical (GTMAC/CS)	1:1	3:1	6:1
Chitosan (g)	5	5	5
GTMAC (mL)	4.6	13.8	27.6
Water (mL)	194.4	185.2	171.4
Acetic Acid (mL)	1	1	1
Total (mL)	200	200	200



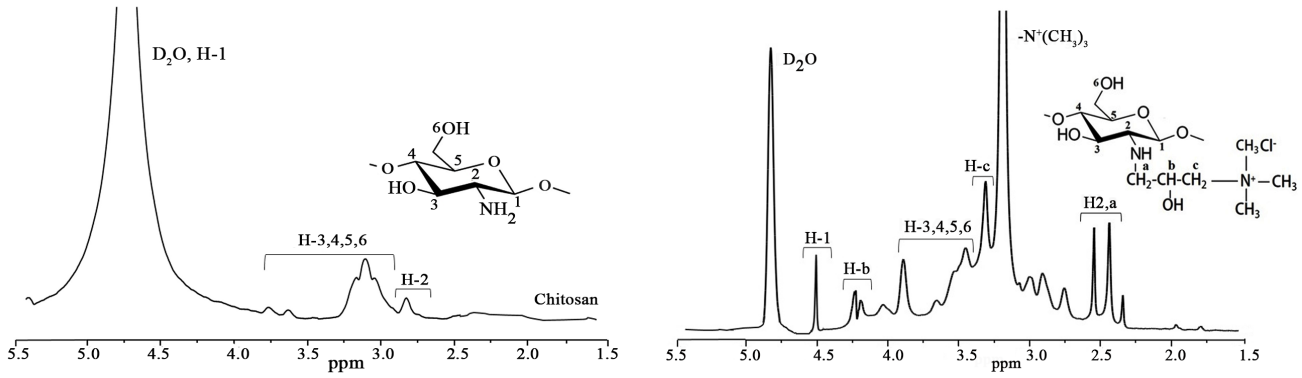
شکل ۱- طیف‌های FTIR کیتوسان‌های محلول در آب با درجه‌های مختلف جانشینی.

Fig. 1. FTIR spectra of water-soluble chitosan (QCSs) with varying degrees of substitution (DS).

استفاده از پمپ سرنگی در این سنتز به‌دلیل ایجاد اختلاط بهتر میان واکنش‌دهنده‌ها به بازدهی مطلوب‌تر و درجه جانشینی بیشتر نسبت به مقالات مشابه منجر شد [۴۳،۴۴].

طیف FTIR نمونه‌های کیتوسان، QCS1، QCS3 و QCS6 در شکل ۱ نشان داده شده است. کیتوسان پیک‌های مشخصه را در ۳۳۰۰ cm^{-1} (ارتعاش کششی OH– و NH_2–)، ۲۷۵۵ cm^{-1} (ارتعاش کششی C-H گروه‌های CH_2 یا CH_3) و ۱۵۰۰ cm^{-1} (ارتعاش خمشی NH_2–) نشان می‌دهد. همچنین یک جذب قوی در حدود ۸۰۴ cm^{-1} (ارتعاش کششی حلقه پیرانوزید) دیده می‌شود [۴۴]. در طیف QCS، یک پیک مشخصه در حدود ۱۴۷۵ cm^{-1} به پیوند متیل GTMAC مربوط است. این پیک که در تمام نمونه‌های اصلاح‌شده دیده می‌شود، نشان‌دهنده پیوند موفقیت‌آمیز GTMAC با گروه آمین کیتوسان است [۴۵].

بررسی و تحلیل ^{1}H-NMR برای تأیید سنتز موفقیت‌آمیز کیتوسان چهارتایی‌دارشده انجام شد. شکل ۲ به‌ترتیب طیف ^{1}H-NMR کیتوسان و QCS3 را در دمای معمولی نشان می‌دهد. در طیف ^{1}H-NMR کیتوسان، رزونانس در ۲/۸ ppm مربوط به پروتون‌های H-2 بود، پیک‌های در حدود ۳/۲ ppm تا ۳/۸ ppm به پروتون‌های H3, 4, 5, 6 نسبت داده شد. پیک در ناحیه ۴/۵ ppm به پروتون‌های H-1 اختصاص دارد (که به‌نظر می‌رسد، به‌دلیل تبادل با هیدروژن فعال در حلال D_2O ناپدید شده است) [۴۶]. در طیف ^{1}H-NMR نمونه QCS3، پیک مشخصه قوی پروتون‌ها در ۳/۱ ppm به گروه $-N^+(CH_3)_3$ نسبت داده شد که به گروه‌های هیدروژنی در زنجیر جانبی QCS3



شکل ۲- طیف‌های ^{1}H-NMR (a) کیتوسان و (b) کیتوسان محلول در آب (QCS3).

Fig. 2. ^{1}H-NMR spectra for (a) chitosan and (b) water-soluble chitosan (QCS3).

اختصاص دارد، دلیل آن جانشینی نمک‌های آمونیوم چهارتایی روی شاخه اصلی کیتوسان بوده که شواهدی برای انجام این واکنش است، این نتایج با سایر مطالعات هم‌خوانی دارد [۲۷،۳۴].

محاسبه درجه جانشینی

DS برای هر نمونه QCS با روش تیترکردن نقره نیترات محاسبه شد (شکل ۳ (a) و (b)). پیش از افزودن $AgNO_3$، رسانندگی اولیه QCS تهیه‌شده با استفاده از نسبت مولی ۶:۱ از GTMAC به کیتوسان، بیشترین مقدار بود. اما، با اضافه $AgNO_3$ به محلول‌های دارای QCS، رسانندگی این محلول‌ها به‌تدریج کاهش یافت. این کاهش رسانندگی را می‌توان با واکنش شیمیایی زیر توضیح داد:

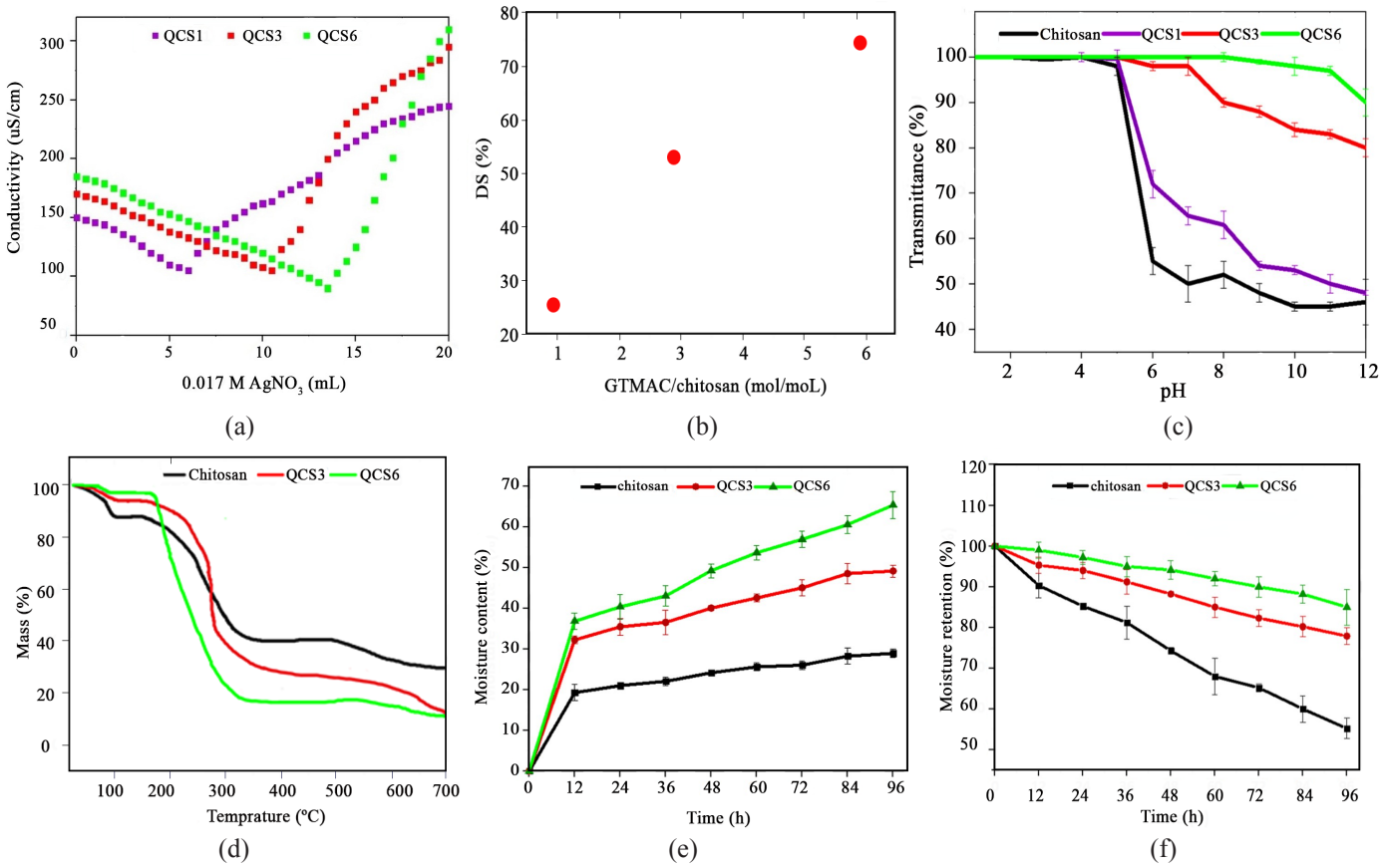
$$QCS\text{-}(CH_3)_3N^+Cl^-(aq)+Ag+NO_3^-(aq) \leftrightarrow QCS\text{-}(CH_3)_3N^+NO_3^-(aq)+AgCl \quad (۵)$$

تفکیک نمک کلرید QCS، مشتقات آمونیوم تری‌متیل‌دارشده با بار مثبت و یون‌های کلر با بار منفی را تولید می‌کند. از سوی دیگر، محلول $AgNO_3$ شامل یون‌های Ag^+ و NO_3^- است. یون‌های Cl^- و Ag^+ با هم ترکیب می‌شوند و جامد نامحلول (AgCl) را تشکیل می‌دهند که رسوب می‌کند و به نوبه‌خود به کاهش رسانایی محلول منجر می‌شود. البته افزودن محلول آبی $AgNO_3$ به QCS رسانایی را تا رسیدن به حداقل مقدار کاهش می‌دهد. پس از آن، افزودن بیشتر $AgNO_3$ به افزایش رسانایی محلول منجر می‌شود. مقادیر DS برای هر یک از QCSها از معادله (۱) با استفاده از حجم بحرانی (V^*_{AgNO3}) محاسبه شد که به‌عنوان حجم $AgNO_3$ لازم برای رسیدن به حداقل مقدار رسانایی تعریف می‌شود (شکل ۳ (a)).

همان‌طور که در شکل ۳ (b) نشان داده شده است، درصد جانشینی محاسبه‌شده با افزایش نسبت GTMAC به کیتوسان که در ابتدا برای سنتز به‌کار رفته بود، افزایش می‌یابد، این مقدار ۲۵/۵۴، ۵۰/۴۴ و ۷۴/۴۶٪ به‌ترتیب برای (۱:۱) QCS1، (۳:۱) QCS3 و (۶:۱) QCS6 به‌دست آمد. همچنین درصد جانشینی با روش ^{1}H-NMR محاسبه شد. این جانشینی ۲۸، ۵۳ و ۷۰٪ به ترتیب برای (۱:۱) QCS1، (۳:۱) QCS3 و (۶:۱) QCS6 به‌دست آمد که با نتایج تیترکردن مطابقت خوبی دارد و سنتز QCS را تأیید می‌کند (P value < ۰/۰۵).

حل‌پذیری در آب

همان‌طور که در جدول ۲ نشان داده شده است، کیتوسان به‌دلیل وجود پیوندهای هیدروژنی بین‌مولکولی قوی خود در آب نامحلول است. اما حل‌پذیری نمونه‌های اصلاح‌شده با افزایش درجه جانشینی تغییرات چشمگیری دارد. نمونه QCS1 مقدار کمی انحلال‌پذیر شده است، اما نمونه‌های QCS3 و QCS6 در pH فیزیولوژی انحلال‌پذیری قابل قبولی داشتند که آن‌ها را به گزینه‌های مناسبی در کاربردهای مهندسی بافت و دارورسانی تبدیل می‌کند. چنین به‌نظر می‌رسد، با انجام واکنش و ورود گروه‌های آمونیوم چهارتایی به کیتوسان، ممانعت فضایی ایجاد شده و تعداد پیوندهای بین‌مولکولی و درون‌مولکولی کیتوسان کاهش می‌یابد و همین مسئله حل‌پذیری را بهبود می‌بخشد. در واقع، پس از چهارتایی‌دارشدن این پلیمر به یک کاتیون محلول در آب تبدیل می‌شود [۴۳]. Freitas و همکاران [۴۷] نیز حل‌پذیری مشتقات کیتوسان اصلاح‌شده در حلال‌های مختلف را بررسی کردند. نتایج مطالعه آن‌ها نشان داد، مشتقات QCS حل‌پذیری مطلوبی در آب و نیز در حلال‌های قطبی نشان می‌دهد. شکل ۳ (c) وابستگی حل‌پذیری نمونه‌ها را به pH محلول نشان می‌دهد. در pH کم (pH < ۵)، مقدار شفافیت نمونه‌ها (کیتوسان و نیز QCS3، QCS1 و QCS6) تقریباً ۱۰۰٪ است. این نشان می‌دهد، مولکول‌های کیتوسان و



شکل ۳- (a) رسانندگی نمونه‌های کیتوسان اصلاح‌شده (QCS1، QCS3 و QCS6)، به‌عنوان تابعی از حجم $AgNO_3$ اضافه‌شده در دمای ۲۵°C، (b) درصد DS تعیین‌شده به‌عنوان تابعی از نسبت مولی GTMAC به کیتوسان [G]/[C]، (c) حل‌پذیری کیتوسان و نمونه‌های اصلاح‌شده در pHهای مختلف در ۲۵°C، (d) منحنی‌های TGA کیتوسان و نمونه‌های QCS3 و QCS6، (e) جذب و (f) ماندگاری رطوبت کیتوسان، QCS3 و QCS6 در رطوبت نسبی ٪۴۰ در ۲۵°C.

Fig. 3. (a) Conductivity of QCSs as a function of volume of $AgNO_3$ added at 25°C, (b) the percent of DS determined as a function of the molar ratio of GTMAC to chitosan, [G]/[C]; (c) solubility of chitosan and modified samples (QCS3, QCS1, and QCS6) at different pHs at 25°C, (d) TGA curves of chitosan, QCS3, and QCS6, (e) absorption, and (f) moisture retention of chitosan, QCS3, and QCS6 at 40% relative humidity and temperature at 25°C.

QCS در شرایط اسیدی حل‌پذیری خوبی دارند. هنگامی که pH از ۵ به ۶ افزایش می‌یابد، شفافیت محلول کیتوسان به‌سرعت کاهش می‌یابد و محلول مات می‌شود. در مقابل، این تغییر با شدت کمتری در محلول‌های QCS دیده می‌شود، به‌ویژه زمانی که درجه جانشینی از ٪۲۵/۵۴ به ٪۷۴/۴۶ افزایش می‌یابد. به‌طور کلی این نتایج نیز مشابه با بررسی وزن نمونه‌ها، نشان می‌دهد، QCS3 و QCS6 در شرایط فیزیولوژی حل‌پذیری

جدول ۲- مقایسه درجه جانشینی، حل‌پذیری در آب و پتانسیل زتای کیتوسان، کیتوسان‌های محلول در آب و لاپونیت.

Table 2. Comparison of substitution degree, water solubility, and zeta potential of chitosan, water-soluble chitosan, and laponite.

Chemical	Chitosan	QCS1	QCS3	QCS6	LAP
Substitution degree (%)	-	25.54 ± 0.9	50.44 ± 4.5	74.46 ± 6.7	-
Water solubility (%)	۰	2.0 ± 0.2	21.6 ± 1.1	32.8 ± 1.3	-
Zeta potential (mV)	3.3 ± 0.5	5.4 ± 0.7	11. 98± 1.2	21.69 ± 2.0	-43.19 ± 1.15

بهتری نسبت به کیتوسان اصلاح‌نشده و QCS1 دارند. یافته‌های حاصل مطابقت خوبی با سایر پژوهش‌ها نشان می‌دهد [۱۵،۳۴،۴۶]. در ادامه مطالعات با دو نمونه QCS3 و QCS6 انجام شد که وضعیت بهتری از لحاظ حل‌پذیری داشتند.

پایداری گرمایی

از گرماوزن‌سنجی برای بررسی تخریب گرمایی و بلورش پلیمرها استفاده شد. شکل۳ (d) منحنی‌های TGA کیتوسان، QCS3 و QCS6 را نشان می‌دهد. کیتوسان دو پیک اصلی را در منحنی‌های TG نشان می‌دهد. ناحیه بین ۳۰°C تا ۱۴۰°C، مقدار ۱۴/۶٪ کاهش جرم داشت که ناشی از تبخیر آب موجود در ساختار پلیمر بود. در مرحله دوم، بین ۱۵۰°C تا ۳۵۶°C مقدار ۴۴/۸٪ کاهش جرم دیده شد. این کاهش جرم را می‌توان به تخریب ساختار پلی‌ساکاریدی کیتوسان نسبت داد [۳۲]. رفتار تقریباً مشابهی در منحنی TGA نمونه‌های QCS3 و QCS6 مشاهده شد. QCS3 تقریباً ۶/۴٪ از وزن خود را در محدوده دمایی ۵۳°C تا ۱۴۰°C از دست داد و QCS6 حدود ۳/۳٪ کاهش وزن در این محدوده دمایی داشت که این مقادیر به تبخیر آب موجود در ساختار آن‌ها اشاره دارد. اما در مرحله دوم، کاهش جرم بیشتری نسبت به کیتوسان دیده می‌شود. QCS3 و QCS6 در محدوده دمای ۱۵۰°C تا ۳۵۰°C به‌ترتیب ۶۴/۶ و ۷۸/۷٪ از وزن خود را از دست می‌دهند که این کاهش وزن را می‌توان به شکستن پیوندهای هیدروژنی و گلیکوزیدی در نمونه‌های اصلاح‌شده نسبت داد [۳۲]. مراحل تخریب شناسایی‌شده با مشخصات تجزیه گرمایی گزارش‌شده درباره کیتوسان و مشتقات آن سازگاری دارد. به‌طور کلی مشاهدات بیانگر آن است که با انجام اصلاح شیمیایی و چهارتایی‌دارکردن کیتوسان به‌وضوح پایداری گرمایی آن نسبت به کیتوسان خالص کاهش می‌یابد [۴۸]. Freitas و همکاران [۴۷] نیز در مطالعه‌ای تخریب گرمایی کیتوسان اصلاح‌شده را ارزیابی کردند و دریافتند، هر چقدر درجه جانشینی بیشتر باشد، پایداری گرمایی پلیمر کمتر است. این ممکن است، به‌دلیل این واقعیت باشد که گروه‌های متیل ترکیب‌شده روی اتم‌های نیتروژن، استحکام درون‌زنجیری آن پلیمر را کاهش می‌دهند، به‌ویژه آن‌هایی که از پیوندهای H هستند. افزون بر این، ویژگی آب‌دوستی این نوع از کیتوسان‌ها به محتوای آب بیشتری منجر می‌شود که همین موضوع برهم‌کنش‌های زنجیری را تضعیف می‌کند.

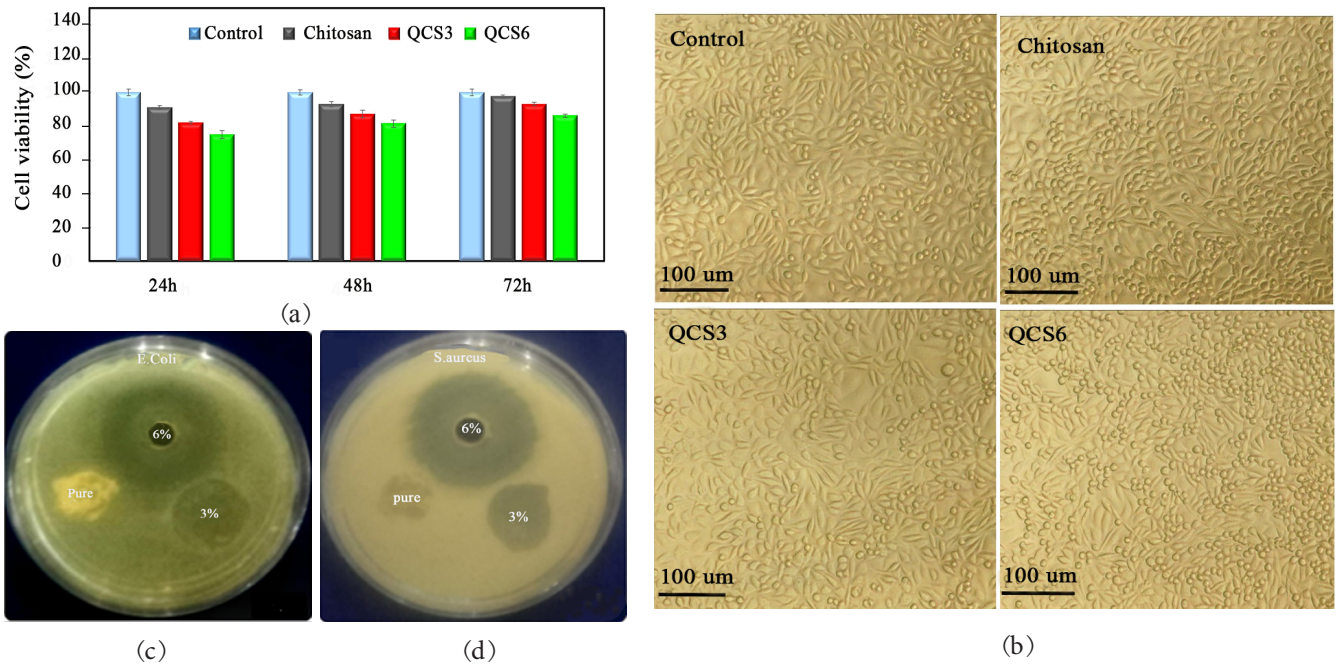
بار سطحی

پتانسیل زتا یک خاصیت فیزیکی است که معمولاً برای پیش‌بینی برهم‌کنش ماده در تماس با سطوح سایر مواد، داده‌های مفید به‌شمار می‌آید. پتانسیل زتای به‌دست‌آمده برای نمونه‌های سنتزی QCS3، QCS1 و QCS6 در جدول ۲ نشان داد، بار سطحی در تمام نمونه‌ها مثبت است و با افزایش نسبت چهارتایی‌شدن، مقادیر پتانسیل زتا نیز افزایش یافت. همچنین بار سطحی لاپونیت نیز اندازه‌گیری و منفی گزارش شد.

رطوبت جذب‌شده و ماندگاری آن

شکل ۳ (e) مقدار جذب رطوبت کیتوسان، QCS3 و QCS6 را در رطوبت نسبی ۴۰٪ نشان می‌دهد. همان‌طور که دیده می‌شود، مقدار رطوبت تمام نمونه‌ها با افزایش زمان افزایش می‌یابد. رطوبت QCS با درجه جانشینی آن مرتبط بوده و مقدار آن از کیتوسان خالص بسیار بیشتر است (P vlaue < ۰/۰۰۱). درصد جذب کیتوسان و نمونه‌های QCS3 و QCS6 در مدت ۹۶ h به‌ترتیب ۲۸/۹، ۴۹/۱ و ۶۵/۳٪ بود. Frascareli و همکاران [۳۳] نشان دادند، ساختار شاخه‌ای کیتوسان اصلاح‌شده، برهم‌کنش‌های قطبی با آب را از راه پیوندهای هیدروژنی تشویق می‌کند و در نتیجه خاصیت جذب رطوبت را بهبود می‌بخشد. گروه‌های عاملی از جمله NH_2 و OH که ارتباط نزدیکی با ویژگی‌های بلورینگی در ساختار چندشکلی QCS دارند، می‌توانند با تشکیل پیوندهای هیدروژنی سبب نفوذ آب در شبکه بلوری آن شوند. اما، با افزایش درجه جانشینی، ساختار منظم کیتوسان به‌شدت تخریب می‌شود و ساختار مولکولی آن شاخه‌ای‌تر و بی‌نظم‌تر می‌شود، بدین ترتیب آب اجازه دسترسی بیشتری به مولکول کیتوسان خواهد داشت.

افزون بر آن، درصد ماندگاری رطوبت نمونه‌های QCS3، QCS6 و کیتوسان در رطوبت نسبی ۴۰٪ در شکل ۳ (f) نشان داده شده است. ماندگاری رطوبت در QCS بسیار بیشتر از کیتوسان بود (P vlaue < ۰/۰۰۱) مقادیر ماندگاری رطوبت کیتوسان، QCS3 و QCS6 به‌ترتیب ۵۵/۹، ۷۷/۹ و ۸۵/۰٪ بود. Kurita و همکاران [۴۹] گزارش کردند، افزایش گروه‌های آب‌دوست آمونیوم چهارتایی به ظرفیت اتصال بیشتر مولکول‌های آب منجر می‌شود و رطوبت بیشتری را حفظ می‌کند. Omer و همکاران [۴۸] نیز دریافتند، تخریب ساختار بلوری به جذب رطوبت بسیار بیشتر و نیز حفظ آب جذب شده کمک می‌کند. این ویژگی می‌تواند در کاربردهای مهندسی بافت نظیر توسعه زخم‌پوش‌ها بسیار مؤثر واقع شود. زخم‌پوش‌ها با این قابلیت قادر هستند، ترشح‌های ناشی از زخم را جذب کنند و از گسترش عفونت‌های باکتریایی جلوگیری کنند. افزون بر این، می‌توانند با ایجاد محیطی مرطوب در اطراف زخم، عبور فیبروبلاست‌ها، سلول اصلی کراتین‌ساز پوست (keratinocyte) و یاخته‌های درون‌رگی (endothelial) را به ناحیه آسیب‌دیده زخم آسان کنند. خاصیت جذب آب در کاربرد هیدروژل‌های جایگزین غضروف نیز از اهمیت ویژه‌ای برخوردار است [۵۰].



شکل ۴- (a) بررسی سمیت و زنده‌مانی یاخته‌های فیبروبلاست (L929) با آزمون MTT، (b) شکل‌شناسی یاخته‌های فیبروبلاست پس از ۲۴ h از زمان کشت و اثرهای مهاری کیتوسان (خالص)، QCS3 و QCS6 بر (c) *S. aureus* و (d) *E. coli*.

Fig. 4. (a) Examination of the toxicity and viability of fibroblast cells (L929) using the MTT test, (b) morphology of fibroblast cells after 24 h of culture and inhibitory effects of chitosan (pure), QCS3, and QCS6 on (c) *S. aureus* and (d) *E. coli*.

زیست‌سازگاری

از نظر زیستی، QCS خواص بسیار مشابه کیتوسان را نشان می‌دهد، مانند سمی‌نبودن، زیست‌تخریب‌پذیری، زیست‌سازگاری، مخاط چسبی و فعالیت ضدمیکروبی [۴۷]. با وجود این، خواص منحصربه‌فردی نیز در اثر اصلاح پلیمر حاصل شده که در ادامه بررسی می‌شود.

سمیت یاخته‌ای

اثر سمیت نمونه‌ها بر یاخته‌های فیبروبلاست L929 موش بررسی شد و درصد زنده‌مانی آن‌ها با آزمون MTT در بازه‌های زمانی ۲۴، ۴۸ و ۷۲ h اندازه‌گیری شد (شکل ۴ (a)). نتایج حاکی از آن بود، نمونه‌های سنتزی سمیت شایان توجهی برای یاخته‌های فیبروبلاست L929 موش ندارند و زنده‌مانی یاخته‌ها پس از ۷۲ h برای همه نمونه‌ها بیش از ٪۸۶ گزارش شد. با گذشت زمان، درصد زنده‌مانی یاخته‌ها در تمام نمونه‌ها افزایش داشت که بیانگر تکثیر یاخته‌هاست. با وجود این، نمونه QCS3 زنده‌مانی بیشتری نسبت به نمونه QCS6 نشان داد (٪۸۲ در مقابل ٪۷۵ برای ۲۴ h، ٪۸۷/۳ در مقابل ٪۸۱/۵ برای ۴۸ h و ٪۹۳ در مقابل ٪۸۶/۳ برای ۷۲ h). همان‌طور که مشخص است، با افزایش درجه جانشینی در کیتوسان مقدار سمیت تا حدودی افزایش می‌یابد؛ از آنجا که زیست‌سازگاری و تکثیر یاخته‌ها عامل مهمی در کاربردهای مهندسی بافت به‌شمار می‌آید؛ به عبارت دیگر، نتایج این آزمون، پیوستگی رشد، مهاجرت، تمایز یاخته‌ها و در نتیجه تشکیل بافت جدید را تحت تأثیر قرار می‌دهد. بنابراین استفاده از کیتوسان با درجه جانشینی کمتر QCS3 می‌تواند در کاربردهای دارورسانی و مهندسی بافت مطمئن‌تر باشد. Wongwanakul و همکاران [۵۱] نیز اثر کیتوسان چهارتایی‌دارشده را بر تکثیر و تمایز یاخته‌های Caco-2 (یاخته‌های پوششی سرطانی جداشده از بافت روده بزرگ) در سامانه دارورسانی خوراکی بررسی کردند. آن‌ها کیتوسان‌های با درجه جانشینی ٪۵۶ تا ٪۱۲۴ سنتز کردند و نتایج نشان داد، کیتوسان با کمترین درجه جانشینی اختلالی در رشد و تمایز یاخته‌های روده‌ای ندارد و می‌تواند پلیمر زیست‌سازگاری در کاربردهای پزشکی باشد. شکل۴ (b) تغییرات شکل‌شناسی یاخته‌ها را در مدت ۲۴ h نشان می‌دهد که با نتایج MTT سازگار است. در نمونه‌هایی که زنده‌مانی کمّی بیشتری گزارش شده است، یاخته‌های فیبروبلاست حالت دوکی‌شکل داشته و چسبندگی مناسب‌تری به کف ظرف کشت داشته‌اند. اما در نمونه QCS6 تعداد یاخته‌های کروی و مرده که روی سطح قرار گرفته‌اند تا حدودی بیشتر شده است.

فعالیت ضدباکتری

نتایج فعالیت ضدباکتری نمونه‌ها در شکل ۴ (d) و (c) و جدول ۳ نشان

جدول ۳- فعالیت ضدباکتری نمونه‌های کیتوسان، QCS3 و QCS6.

Table 3. Antibacterial activity of chitosan samples, QCS3 and QCS6.

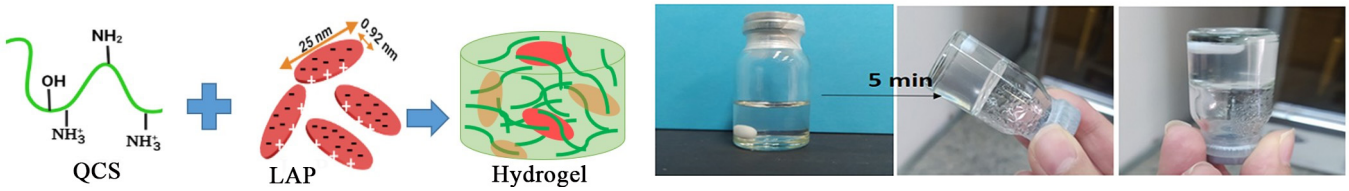
Sanple	Test			
	Diameter of the inhibition halo (mm)		Minimum inhibitory concentration (mg/mL)	
	S. aureus	*E.coli*	*S. aureus*	*E.coli*
Chitosan	7±0.5	6.1±1.4	> 3200	> 3200
QCS3	14.5±1.7	16.3±0.9	100	100
QCS6	28.6±1.3	26.9±2.1	25	25

داده شده است. براساس یافته‌ها در روش انتشار چاهک بیشترین قطر مهار رشد برای باکتری *Escherichia coli* و *Staphylococcus aureus* برای نمونه QCS6 به‌دست آمده که حاکی از آن است، این نمونه در برابر باکتری‌های گرم مثبت و گرم منفی خواص ضدباکتری خوبی نشان می‌دهد. مطابق با جدول ۳ قطر مهار رشد برای نمونه‌ی QCS6 در مقایسه با نمونه QCS3 و نمونه کیتوسان، برتری چشمگیری داشت (P value < ۰/۰۵). افزون بر این، با اندازه‌گیری حداقل غلظت بازدارندگی (MIC) محلول‌های پلیمری نیز نتایج مشابهی به‌دست آمد که بیانگر آن است، نمونه QCS6 می‌تواند در حداقل غلظت خود (۲۵ μg/mL) رشد ٪۹۰ باکتری‌های گرم مثبت و گرم منفی را مهار کند. این مقدار در نمونه QCS3 به ۱۰۰ μg/mL افزایش داشت. اما، هر دو پلیمر اصلاح‌شده در مقایسه با کیتوسان خالص (با MIC بیش از ۳۲۰۰ μg/mL) به‌وضوح خواص ضدباکتری مؤثرتری نشان دادند (P value < ۰/۰۰۱). همچنین این نتایج با اندازه‌گیری پتانسیل زتا نمونه‌ها تطابق داشت. بدین ترتیب که با افزایش درجه جانشینی و در نتیجه بار مثبت سطحی، برهم‌کنش الکتروستاتیک نمونه‌ها با پپتیدوگلیکان‌های منفی روی دیواره یاخته‌ای باکتری، افزایش می‌یابد. در نتیجه، خواص ضدباکتری بهبود پیدا می‌کند [۴۷،۴۸،۵۲]. Sahariah و همکاران [۱۸] در مطالعه‌ای مروری نشان دادند، وجود بار مثبت در زنجیر پلیمری کیتوسان افزون بر حل‌پذیری عامل مهمی برای فعالیت ضدمیکروبی درنظر گرفته می‌شود. اعتقاد بر این است، وجود و چگالی این بار کاتیونی مسئول اتصال کارآمد کیتوسان به اجزای آنیونی موجود در غشای باکتری است. Zho و همکاران [۲۷] نیز سنتز هیدروژل‌های تزریق‌پذیر ضدباکتری بر پایه کیتوسان چهارتایی‌دارشده و دکستران را برای کاربردهای مهندسی بافت بررسی کردند. مطابق با پژوهش آن‌ها نیز کیتوسان‌هایی که درصد جانشینی بیش از ٪۴۰ داشتند، در آزمون MIC خواص ضدباکتری مؤثرتری نشان دادند. براساس آنچه گفته شد، انتخاب QCS6 شاید در کاربردهایی که خواص ضدباکتری اهمیت ویژه‌تری دارد، نظیر تولید زخم‌پوش‌ها پیشنهاد مناسبی تلقی شود. اما، در مجموع براساس یافته‌ها استفاده از QCS3 در کاربردهای زیستی منطقی‌تر است و در نتیجه به‌عنوان نمونه بهینه در مراحل بعدی مطالعه شد.

مشخصه‌یابی QCS/LAP

با اضافه‌شدن محلول لاپونیت به محلول QCS3، هیدروژلی تزریق‌پذیر و خودترمیم‌شونده تشکیل شد (شکل ۵(a)). گروه‌های هیدروکسیل لاپونیت قابلیت برهم‌کنش با گروه‌های عاملی کیتوسان چهارتایی‌دارشده را دارند و پیوندهای هیدروژنی تشکیل می‌دهند. کاربرد ذرات لاپونیت به‌عنوان اتصال‌دهنده عرضی چندمنظوری در شکل‌گیری ساختارهای کامپوزیتی و تقویت ساختارهای پلیمری تأیید شده است [۲]. لاپونیت با داشتن هم‌زمان بار منفی و مثبت (در سطوح و لبه‌ها) قادر است، تا با پلیمرها برهم‌کنش‌های یونی برقرار کرده و خاصیت ژل‌شوندگی ایجاد کند. همچنین، نتایج آزمون پتانسیل زتا برای QCS3 و LAP به‌ترتیب ۱۱/۹۸ و ۴۳/۱۹ mV- بوده که مؤید تشکیل شبکه یونی است. زمان ژل‌شدن عامل مهمی در تشکیل هیدروژل و به‌ویژه هیدروژل‌های تزریق‌پذیر است. برای اندازه‌گیری زمان ژل‌شدن از روش لوله معکوس مطابق با شکل ۵ (b) استفاده شد. پس از ۵ min قرارگیری محلول QCS/LAP درون گرم‌خانه ساختار هیدروژلی مدنظر شکل گرفت.

به‌منظور بررسی ساختار شیمیایی هیدروژل QCS/LAP طیف FTIR تهیه شد (شکل ۶ (a)). پیک‌های مشخصه QCS ژل‌شده را می‌توان در حدود cm^{-1} ۳۳۰۰-۳۵۰۰ مشاهده کرد که به گروه‌های NH و OH مربوط است. همچنین، پیک‌های نواحی ۱۶۴۱ و cm^{-1} ۱۴۷۵ به گروه‌های CO و $(NH_3)^+$ کیتوسان مرتبط هستند [۱۰]. طیف FTIR لاپونیت پیک غالب در ناحیه cm^{-1} ۱۰۰۹ و پیک دیگری در حدود cm^{-1} ۶۸۵ نشان می‌دهد که به‌ترتیب به ارتعاش کششی Si-O و ارتعاش خمشی O-Si-O نسبت داده می‌شوند [۲۹]. در طیف FTIR/ATR هیدروژل، ظهور پیک cm^{-1} ۱۰۰۲ گنجاندن لاپونیت را در ساختار QCS تأیید می‌کند [۲].



(a) (b)

شکل ۵- (a) طرحی از تشکیل هیدروژل QCS/LAP و (b) ارزیابی زمان ژل‌شدن با آزمایش لوله معکوس.

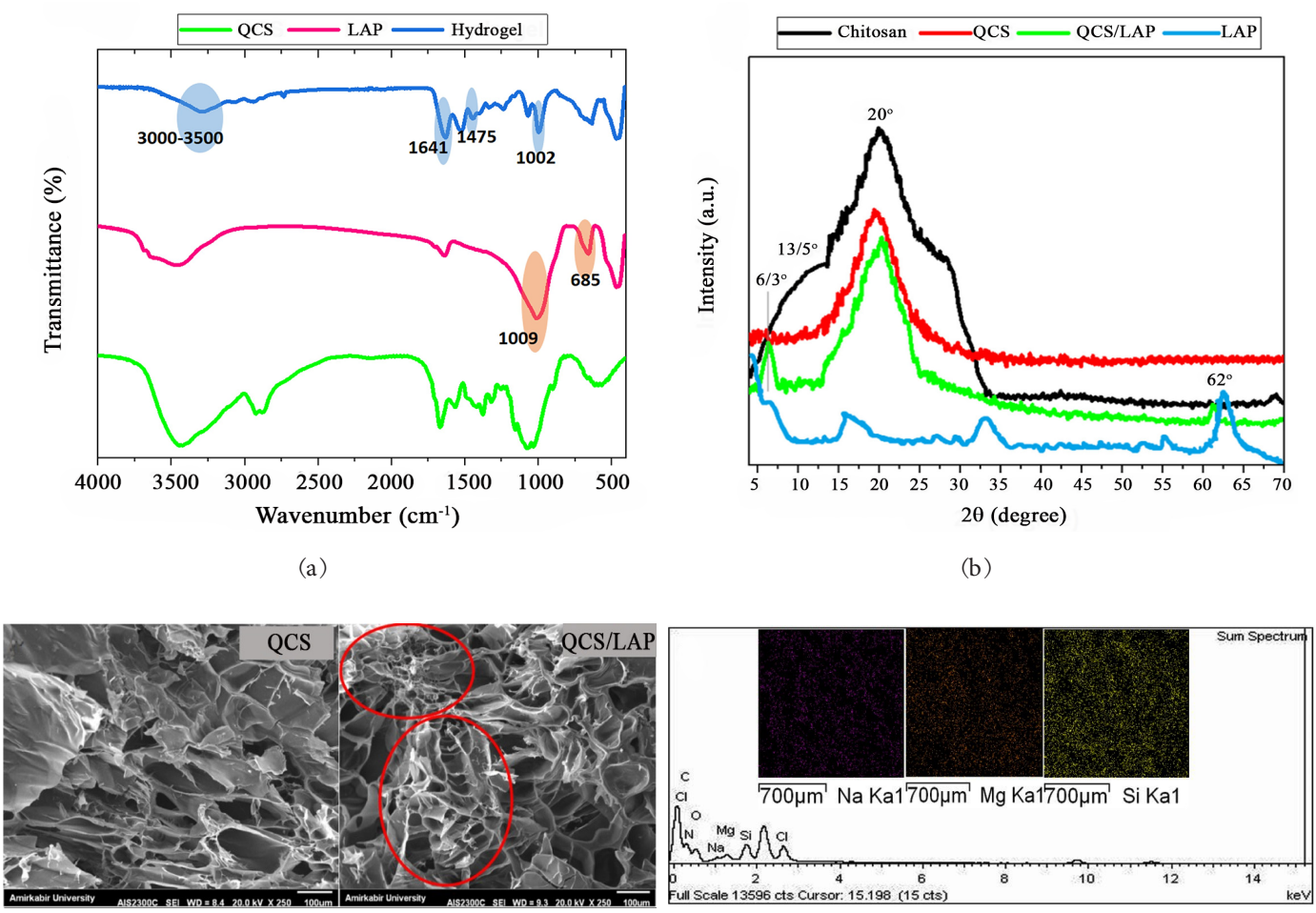
Fig. 5. (a) Schematic formation of QCS/LAP hydrogel and (b) evaluation of gelation time by inverted tube test.

برای مقایسه خواص بلوری نمونه‌های مختلف، الگوهای XRD کیتوسان، QCS، LAP و QCS/LAP (شکل ۶ (b)) تهیه شد. شکل ۶ نشان می‌دهد، پراش کیتوسان اصلاح‌نشده شامل دو قله اصلی است که در حدود ۱۳/۵ و ۲۰° قرار دارند. پیک در حدود ۱۱/۹۵ ° به ساختار بلوری آب‌پوشیده کیتوسان نسبت داده می‌شود که مولکول‌های آب را در خود جای داده است. پیک ثبت‌شده در نزدیکی ۲۰/۲° نشان‌دهنده شبکه بلوری نسبتاً منظم کیتوسان است و درجه زیادی از بلورینگی را نشان می‌دهد. در مقایسه با کیتوسان، الگوی پراش پرتو X نمونه اصلاح‌شده تغییراتی در زوایای پراش و نیز شدت آن نشان می‌دهد. پیک ناحیه ۱۳/۵ ° در نمونه QCS به‌تدریج ناپدید شده و شدت پیک نزدیک به ۲۰ °، بسیار کاهش می‌یابد. تغییرات دیده‌شده در الگوی XRD نشان می‌دهد، ساختار کیتوسان با فرایند چهارتایی‌شدن از بلوری به بی‌شکل تغییر یافته است [۳۴]. به‌عبارت دیگر، این واکنش سبب تضعیف پیوندهای هیدروژنی درون و بین‌مولکولی کیتوسان و در نتیجه تضعیف ساختار بلوری آن می‌شود. لاپونیت خالص نیز دارای دو پیک اصلی در نواحی ۶/۳ و ۶۲ ° است که به‌ترتیب مربوط به صفحه‌های پایه (001) و صفحه‌های جانبی (060) خاک رس است. این نتایج در توافق با یافته‌های JCPDS است (09-0031). همچنین با مشارکت لاپونیت در شبکه هیدروژلی، این قله‌های مشخصه نانوورق‌های لاپونیت در هیدروژل با تغییر درجه مختصری دیده می‌شوند که ناشی از برقراری پیوند هیدروژنی بین لاپونیت و QCS است [۵۳]. افزون بر آن، خاصیت بلوری هیدروژل افزایش می‌یابد. این افزایش احتمالاً با جهت‌گیری دوباره زنجیرهای پلیمری به‌دلیل نیروهای الکتروستاتیک بین نانوذرات لاپونیت و کیتوسان حاصل می‌شود. همچنین به‌کمک الگوی XRD فاصله صفحه‌های لاپونیت پیش و پس از تشکیل شبکه هیدروژلی محاسبه شد و پراکندگی نانوذرات لاپونیت را در ماتریس پلیمری تأیید کرد. فاصله میان‌لایه‌ای ذرات لاپونیت در نمونه خالص و نمونه موجود در هیدروژل در ناحیه ۶/۳° (صفحه ۰۰۱) به‌ترتیب ۱۳/۵ و ۱۵/۷ Å به‌دست آمد که این تغییر فاصله، قرارگیری زنجیرهای پلیمری در میان صفحه‌های LAP را تأیید می‌کند. سایر نویسندگان نیز نتایج مشابهی گزارش کرده‌اند [۲،۳۹].

برای بررسی شکل‌شناسی و تجزیه عنصری، ابتدا از نمونه‌ها ژل تهیه شد و پس از قرارگرفتن در خشک‌کن انجمادی، بررسی شکل‌شناسی روی سطح مقطع ژل خشک‌شده انجام شد. شکل ۶ (c) شکل‌شناسی کیتوسان اصلاح‌شده (QCS3) و هیدروژل ترکیبی (QCS/LAP) را نشان می‌دهد. همان‌طور که مشخص است، هیدروژل QCS/LAP سطح مقطع متراکم‌تر و با تخلخل کمتری نسبت به QCS3 دارد. این نتیجه می‌تواند ناشی برهم‌کنش پیوندهای هیدروژنی بین QCS و لاپونیت باشد. همچنین، جاذبه الکتروستاتیکی بین بارهای مثبت کیتوسان اصلاح‌شده و سطوح منفی لاپونیت سبب ایجاد ساختاری با نمایی متراکم‌تر و با منافذ کوچک‌تر می‌شود [۲]. این ویژگی می‌تواند در کاربردهای دارورسانی اهمیت پیدا کند و با این منافذ رفتار تورم و انتشار دارو کنترل شود. برای بررسی توزیع لاپونیت در هیدروژل، آزمون EDX بررسی شد. نتایج نقشه‌برداری در شکل ۶ (d) وجود Mg، Si و Na را در هیدروژل نانوکامپوزیتی تأیید می‌کند. دیده می‌شود، نانوصفحه‌های لاپونیت در هیدروژل به‌طور یکنواخت توزیع شده‌اند، این توزیع یکنواخت برای حفظ یکپارچگی مواد مهم است.

تزریق‌پذیری و خودترمیمی

قابلیت تزریق از راه خروج از سرنگ برای هیدروژل QCS/LAP آزمایش شد. همان‌طور که در شکل ۷ (a) نشان داده شده است، هیدروژل به‌راحتی از راه سوزن با اندازه ۲۱ با فشار دست خارج شد که به‌وضوح قابلیت تزریق‌پذیری این هیدروژل را نشان می‌دهد. در بررسی رفتار خودترمیمی هیدروژل QCS/LAP به‌صورت دو قطعه با رنگ قرمز و آبی تهیه شد (شکل ۷ (b)). پس از برش قطعات، دو نیم قطعه با رنگ‌های مختلف به‌مدت ۱۵ min از سطوح تازه برش‌خورده به یکدیگر متصل شدند (تا یک قطعه کامل ایجاد شود) و سپس با انبرک کشیده شدند. مطابق شکل ۷ (c)، قطعه دورنگ قابلیت تحمل کشش را دارد که این نشان‌های از ویژگی خودترمیمی هیدروژل است.

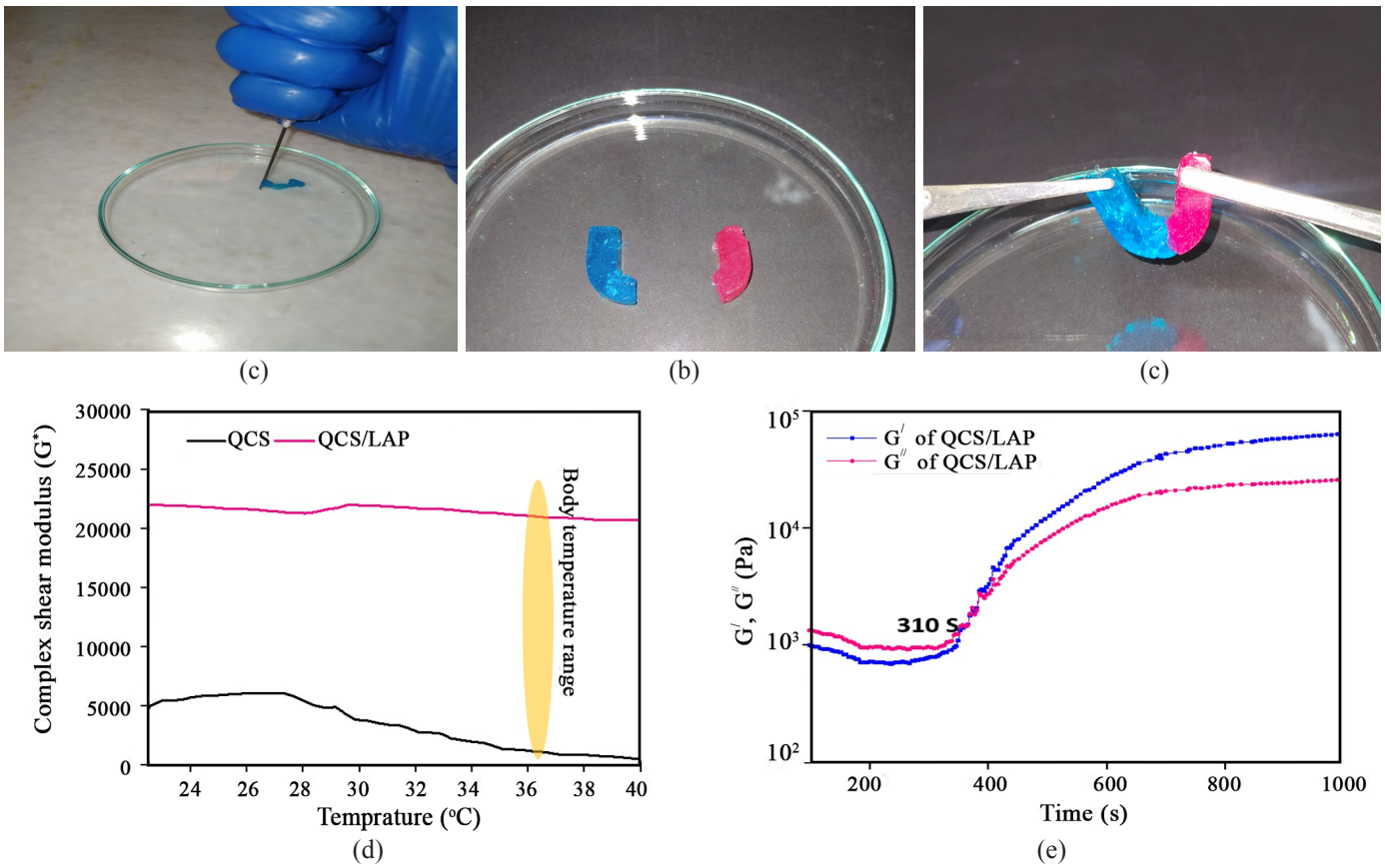


شکل ۶- (a) طیف‌های FTIR نمونه LAP، QCS3 و هیدروژل QCS/LAP، (b) طیف پراش پرتو X کیتوسان، نمونه LAP، QCS3 و هیدروژل، (c) شکل‌شناسی سطح مقطع نمونه QCS3 و هیدروژل و (d) تجزیه عنصری هیدروژل.

Fig. 6. (a) FTIR spectra of QCS3 sample, LAP, and QCS/LAP hydrogel, (b) X-ray diffraction spectrum of chitosan, QCS3 sample, and the hydrogel, (c) surface morphology of the cross section of QCS3 sample and the hydrogel, and (d) elemental analysis of the hydrogel.

رفتار رئولوژیکی

شکل ۷ (d) رفتار رئولوژی هیدروژل QCS/LAP را در مقایسه با QCS نشان می‌دهد. همان‌طور که مشخص است، |G*| هیدروژل QCS/LAP در دمای ۲۲°C تا ۴۰°C از ۲۲/۶ kPa تا ۲۰/۷ kPa تغییر می‌کند. بنابراین، در چنین محدوده دمایی خواص خود را حفظ می‌کند، اما QCS نه تنها مدول کمتری دارد، بلکه با افزایش دما این مدول کاهش می‌یابد و از ۵ kPa در دمای ۲۲°C به ۰/۵ Pa در ۴۰°C کاهش پیدا می‌کند و در محدوده دمای بدن خواص رئولوژیکی لازم برای کاربردهای مهندسی بافت ندارد. گنجاندن لاپونیت با ایجاد پیوند بین گروه‌های هیدروکسیل لاپونیت و آمین در کیتوسان و نیز برهم‌کنش بارهای مثبت و منفی در ساختار سبب کاهش تحرک زنجیرهای پلیمری می‌شود و مدول برشی مختلط افزایش می‌یابد [۲]. افزون بر آن آزمون جاروب زمان برای هیدروژل QCS/LAP، در ابتدا مدول اتلاف (G") بیش از مدول ذخیره (G') قرار دارد که حاکی از غلبه خواص گران‌رو است، از آنجا که سرعت افزایش G' سریع‌تر از G" است، یک نقطه تقاطع در حدود ۵ min برای هیدروژل نانوکامپوزیت ظاهر شد که نشان می‌دهد، ساختار مایع‌مانند به سامانه ژل‌مانند با خواص کشسانی غالب تبدیل شده است (شکل ۷ (e)). برای تزریق کم‌تهاجمی این دسته از هیدروژل‌ها ۵ min زمان مناسبی است. این زمان، فرصت کافی را در اختیار جراح قرار می‌دهد تا پیش



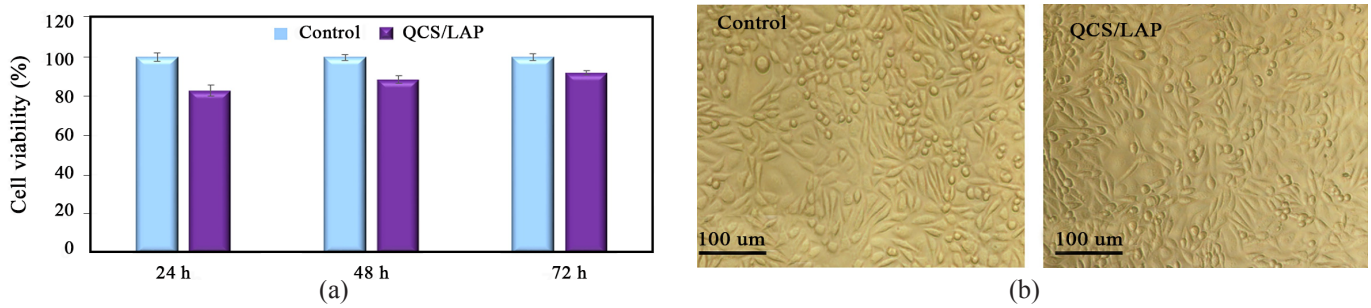
شکل ۷- (a) تزریق‌پذیری هیدروژل QCS/LAP از سرنگ با اندازه ۲۱، (c)، (b) رفتار خودترمیمی هیدروژل با گذشت ۱۵ min، (d) منحنی‌های |G*|-دما QCS و QCS/LAP و (e) آزمون رئولوژیکی جاروب زمان هیدروژل در ۳۷°C.

Fig. 7. (a) Injectability of QCS/LAP hydrogel through a 21-gauge needle, (c), (d) self-healing behavior of the hydrogel after 15 min, (d) |G*|-temperature curves of QCS and QCS/LAP samples, and (e) time sweep rheological test of the hydrogel at 37°C.

از تشکیل شبکه هیدروژلی، تزریق را انجام دهد [۴۲].

زیست‌سازگاری

سمیت هیدروژل QCS/LAP نیز با آزمون MTT روی یاخته‌های فیبروبلاست L929 موش بررسی شد. تصاویر میکروسکوپ نوری در شکل ۸ (a) آمده است. نتایج نشان داد، هیدروژل سنتزی در مقایسه با گروه کنترل سمیت شایان توجهی برای یاخته‌های فیبروبلاست L929 موش ندارند و زنده‌مانی یاخته‌ها پس از ۷۲ h بیش از ٪۹۳ گزارش شد. همچنین، با گذشت زمان درصد زنده‌مانی یاخته‌ها افزایش یافت که نشان از تکثیر یاخته‌های فیبروبلاست دارد. مطالعات زیادی کیتوسان و لاپونیت را برای گستره وسیعی از کاربردهای زیستی پیشنهاد می‌کند [۲،۲۹]. کیتوسان پلی‌ساکارید طبیعی متشکل از واحدهای N-استیل-D-گلوکوزآمین و D-گلوکوزآمین با قابلیت تجزیه زیستی و غیرسمی است. از طرفی دیگر، ترکیب نانوذرات سیلیکات در پلیمرها باعث افزایش اتصال، تکثیر و تمایز یاخته‌ای می‌شود. نانوذراتی مانند لاپونیت به‌دلیل ساختار لایه‌ای و در نتیجه مساحت سطح ویژه زیاد، قابلیت جذب، واکنش‌پذیری سطحی و ظرفیت تبادل کاتیونی را در ماتریس پلیمری افزایش می‌دهند که این ویژگی خواص زیستی بهبودیافته آن‌ها را توضیح می‌دهد. به‌عنوان مثال، افزودن لاپونیت در هیدروژل کیتوسان-پلی‌آنیلین به القای تمایز استخوانی یاخته‌های بنیادی و نیز زنده‌ماندن مناسب فیبروبلاست‌های موش (L929) منجر شد [۵۴]. این نتایج تأیید می‌کند، هیدروژل‌های ساخته‌شده قابلیت ایجاد شرایط زیست‌سازگار و غیرسمی مناسب برای رشد و تکثیر یاخته‌ها را دارند. تغییرات شکل‌شناسی یاخته‌ها را در مدت ۲۴ h نشان می‌دهد که با نتایج MTT سازگار است. برهم‌کنش یاخته-زیست‌ماده روش پیچیده‌ای است که بر زنده‌مانی، تکثیر و تمایز یاخته اثر می‌گذارد. چسبیدن به سطح زیست‌مواد برای یاخته اهمیت حیاتی دارد، زیرا پیش‌درآمد سایر رفتارهای یاخته‌ای نظیر مهاجرت، سیگنال‌دهی رشد و تمایز آن است [۲].



شکل ۸- (a) بررسی سمیت و زنده‌مانی یاخته‌های فیبروبلاست (L929) با آزمون MTT و (b) شکل‌شناسی یاخته‌های فیبروبلاست پس از ۲۴ h از زمان کشت.

Fig. 8. (a) Examination of the toxicity and viability of fibroblast cells (L929) using the MTT test and (b) morphology of fibroblast cells after 24 h of culture.

یاخته‌های فیبروبلاست به‌مدت ۲۴ h روی هیدروژل‌ها کشت داده شدند. شکل ۸ (b) نشان می‌دهد، این یاخته‌ها اتصال خوبی به سطح داشته‌اند و حالت دوکی‌شکل آن‌ها زنده‌مانی را تأیید می‌کند. در نتیجه وجود لاپونیت در ساختار هیدروژل به‌دلیل خواص زیستی مناسب این نانوساختار اتصال یاخته‌ای را به‌طور شایان توجهی بهبود می‌بخشد.

نتیجه‌گیری

به‌منظور تولید هیدروژل تزریق‌پذیر بر پایه کیتوسان و لاپونیت، ابتدا کیتوسان با GTMAC با نسبت‌های مولی مختلف، برای تهیه کیتوسان محلول در آب، واکنش داده شد. انجام سنتز با آزمون‌های FTIR، ^{1}H-NMR و TGA تأیید شد. درصد جانشینی پلیمرهای اصلاح‌شده (QCS1، QCS3 و QCS6) با روش تیترکردن نقره نیترات به‌ترتیب ۰/۹ ± ۲۵/۵۴، ۴/۵ ± ۵۰/۴۴ و ۶/۷ ± ۷۴/۴۶ درصد گزارش شد. مقدار حل‌پذیری نمونه‌ها در pHهای مختلف نشان داد، نمونه‌های QCS3 و QCS6 تقریباً در تمام محیط‌ها قابلیت حل‌پذیری دارند، در حالی که حل‌پذیری کیتوسان و QCS1 به محیط‌های اسیدی (pH < ۶) وابسته است. بررسی جذب رطوبت و ماندگاری آن در دمای ۲۵°C برای نمونه‌های اصلاح‌شده نسبت به کیتوسان افزایش چشمگیری دارد. این قابلیت می‌تواند در ساخت زخم‌پوش‌های مهندسی بافت کارآمد باشد و با جذب ترشح‌های زخم به بهبود روند ترمیم کمک کند. در نهایت، آزمون‌های MTT روی یاخته‌های فیبروبلاست L929 در مجاورت این محلول‌های پلیمری، زیست‌سازگاری آن‌ها را تأیید کرد. درصد زنده‌مانی یاخته‌ها در نمونه QCS3 بیش از QCS6 بود که نشان می‌دهد، این درجه از جانشینی (حدود ٪۵۰) با توجه به حل‌پذیری مناسب در کاربردهای مهندسی پزشکی کفایت می‌کند. بدین ترتیب، این نمونه در ترکیب با لاپونیت در تهیه هیدروژل تزریقی به‌کار گرفته شد. شبکه هیدروژلی QCS/LAP خواص فیزیکی-شیمیایی مناسبی از خود نشان داد. خاصیت تزریق‌پذیری، ترمیم‌شوندگی، رفتار گران‌روکشسان و زیست‌سازگاری زیاد این هیدروژل، قابلیت آن را برای کاربردهای مهندسی بافت نشان می‌دهد.

قدردانی

نویسندگان مقاله بر خود لازم می‌دانند، از آزمایشگاه زیست‌مواد و پلیمرهای زیست‌سازگار پژوهشگاه پلیمر و پتروشیمی ایران برای فراهم‌آوردن امکانات آزمایشگاهی این پژوهش و نیز زحمات سرکار خانم مهندس ناهید سلیمی، قدردانی کنند.

علائم اختصاری

DLS	Dynamic light scattering
DS	Degree of substitution
EDX	Energy dispersive X-ray
FBS	Fetal bovine serum
FTIR	Fourier transform infrared
GTMAC	Glycidyltrimethylammonium chloride
QCS	Quaternized chitosan
^{1}H-NMR	Nuclear magnetic resonance
LAP	Laponite
MIC	Minimum inhibitory concenteration

MTT 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide
PBS Phosphate-buffered saline
RPMI Roswell park memorial institute
SEM Scanning electron microscopy
TGA Thermogravimetric analysis
XRD X-ray diffraction

مراجع

1. de Lima E.L., Vasconcelos N.F., da Silva Maciel J., Andrade F.K.,Vieira R.S., and Feitosa J.PA., Injectable Hydrogel Based on Dialdehyde Galactomannan and N-succinyl Chitosan: A Suitable Platform for Cell Culture, *J. Mater. Sci., Mater. Med.,* **31**, 5, 2020.
2. Ranjbardamghani F., Eslahi N., and Jahanmardi R., An Injectable Chitosan/Laponite Hydrogel Synthesized via Hybrid Cross-linking System: A Smart Platform for Cartilage Regeneration, *Polym. Adv. Technol.*, **34**, 2298-2311, 2023.
3. Zhao D., Yu S., Sun B., Gao S., Guo S., and Zhao K., Biomedical Applications of Chitosan and Its Derivative Nanoparticles, *Polymer*, **10**, 462, 2018.
4. Hossein P., Barzegarzadeh M., and Sadegh F.A.M., Magnetic Graphene Quantum Dot/Chitosan Bionanocomposite Hydrogel Beads for Drug Delivery System: Synthesis and Application, *Iran. J. Polym. Sci. Technol. (Persian)*, **36**, 409-420, 2023.
5. Andreica B.-I., Cheng X., and Marin L., Quaternary Ammonium Salts of Chitosan. A Critical Overview on the Synthesis and Properties Generated by Quaternization, *Eur. Polym. J.*, **139**, 110016, 2020.
6. Kabirkoohian A., Bakhshi H., Irani S., and Sharifi F., Chemical Immobilization of Carboxymethyl Chitosan on Polycaprolactone Nanofibers as Osteochondral Scaffolds*, Appl. Biochem. Biotechnol.*, **195**, 3888-3899, 2023.
7. Chien R.-C., Yen M.-T., and Mau J.-L., Antimicrobial and Antitumor Activities of Chitosan from Shiitake Stipes, Compared to Commercial Chitosan from Crab Shells, *Carbohyd. Polym.,* **138**, 259-264, 2016.
8. Younes I., Sellimi S., Rinaudo M., Jellouli K., and Nasri M., Influence of Acetylation Degree and Molecular Weight of Homogeneous Chitosans on Antibacterial and Antifungal Activities, *Int. J. Food Microbiol.*, **185**, 57-63, 2014.
9. Kong M., Chen X.G., Xing K., and Park H.J., Antimicrobial Properties of Chitosan and Mode of Action: A State of the Art Review, *Int. J. Food Microbiol.*, **144**, 51-63, 2010.
10. Teotia A., Laurén I., Borandeh S., and Seppälä J., Quaternized Chitosan Derivatives as Viable Antiviral Agents: Structure–Activity Correlations and Mechanisms of Action, *ACS Appl. Mater. Interfaces*, **15**, 18707-18719, 2023.
11. Bugnicourt L. and Ladavière C., Interests of Chitosan Nanoparticles Ionically Cross-Linked with Tripolyphosphate for Biomedical Applications, *Prog. Polym. Sci*., **60**, 1-17, 2016.
12. Andreica B.-I., Anisiei A., Rosca I., Sandu A.-I., Pasca A.S., Tartau L.M., and Marin L., Quaternized Chitosan/Chitosan Nanofibrous Mats: An Approach Toward Bioactive Materials for Tissue Engineering and Regenerative Medicine, *Carbohydr. Polym.*, **302**, 120431, 2023.
13. Feng P., Luo Y., Ke C., Qiu H., Wang W., Zhu Y., Hou R., Xu L., and Wu S., Chitosan-Based Functional Materials for Skin Wound Repair: Mechanisms and Applications, *Front. Bioeng. Biotechnol.*, **9**, 650598, 2021.
14. Younes I. and Rinaudo M., Chitin and Chitosan Preparation from Marine Sources. Structure, Properties and Applications, *Mar. Drugs*, **13**, 1133-1174, 2015.
15. Cho J., Grant J., Piquette-Miller M., and Allen C., Synthesis and Physicochemical and Dynamic Mechanical Properties of a Water-Soluble Chitosan Derivative as a Biomaterial, *Biol. Macromol.*, **7**, 2845-2855, 2006.
16. Yang F., Chen L., Zhao D., Guo T., Yu D., Zhang X., Li P., and Chen J., A Novel Water-Soluble Chitosan Grafted with Nerol: Synthesis, Characterization and Biological Activity, *Int. J. Biol. Macromol.*, **232**, 123498, 2023.
17. Tao L., Zhonglong L., Ming X., Zezheng Y., Zhiyuan L., Xiaojun Z., and Jinwu W., In Vitro and In Vivo Studies of a Gelatin/Carboxymethyl Chitosan/LAPONITE® Composite Scaffold for Bone Tissue Engineering, *RSC Adv*., **7**, 54100-54110, 2017.
18. Sahariah P. and Másson M., Antimicrobial Chitosan and Chitosan Derivatives: A Review of the Structure-Activity Relationship, *Biol. Macromol.*, **18**, 3846-3868, 2017.
19. Sajomsang W., Ruktanonchai U.R., Gonil P., Warin C., Quaternization of N-(3-Pyridylmethyl) Chitosan Derivatives:

Effects of the Degree of Quaternization, Molecular Weight and Ratio of N-Methylpyridinium and N,N,N-Trimethyl Ammonium Moieties on Bactericidal Activity, *Carbohydr. Polym*., **82**, 1143-1152, 2010.

20. Senra T.D., Khoukh A., and Desbrieres J., Interactions between Quaternized Chitosan and Surfactant Studied by Diffusion NMR and Conductivity, *Carbohydr. Polym*., **156**, 182-192, 2017.
21. Shao K., Han B., Gao J., Song F., Yang Y., and Liu W., Synthesis and Characterization of a Hydroxyethyl Derivative of Chitosan and Evaluation of Its Biosafety, *J. Ocean Univ. China*, **14**, 703-709, 2015.
22. Zhou H., Qian J., Wang J., Yao W., Liu C., Chen J., and Cao X., Enhanced Bioactivity of Bone Morphogenetic Protein-2 with Low Dose of 2-N,6-O-Sulfated Chitosan In Vitro and In Vivo, *Biomaterial*, **30**, 1715-1724, 2009.
23. Islam N. and Ferro V., Recent Advances in Chitosan-Based Nanoparticulate Pulmonary Drug Delivery, *Nanoscale*, **8**, 14341-14358, 2016.
24. Kim E.H., Lim S., Kim T.E., Jeon I.O., and Choi Y.S., Preparation of In Situ Injectable Chitosan/Gelatin Hydrogel Using an Acid-Tolerant Tyrosinase, *Biotechnol. Biopro. Eng*., **23**, 500-506, 2018.
25. Yang B., Zhang Y., Zhang X. Tao L., Li S., and Wei Y., Facilely Prepared Inexpensive and Biocompatible Self-Healing Hydrogel: A New Injectable Cell Therapy Carrier, *Polym. Chem*., **3**, 3235-3238, 2012.
26. Li Z., Shim H., Cho M.O., Cho I.S., Lee J.H., Kang S.-W., Kwon B., and Huh K.M., Thermo-Sensitive Injectable Glycol Chitosan-Based Hydrogel for Treatment of Degenerative Disc Disease, *Carbohydr. Polym.*, **184**, 342-353, 2018.
27. Zhao X., Li P., Guo B., and Ma P.X., Antibacterial and Conductive Injectable Hydrogels Based on Quaternized Chitosan-Graft-Polyaniline/Oxidized Dextran for Tissue Engineering, *Acta Biomater*., **26**, 236-248, 2015.
28. Zhao X., Wu H., Guo B., Dong R., Qiu Y., and Ma P.X., Antibacterial Anti-Oxidant Electroactive Injectable Hydrogel as Self-Healing Wound Dressing with Hemostasis and Adhesiveness for Cutaneous Wound Healing, *Biomaterials*, **122**, 34-47, 2017.
29. Heragh B.K., Javanshir S., Mahdavinia G.R., and Jamal M.R.N., Hydroxyapatite Grafted Chitosan/Laponite RD Hydrogel: Evaluation of the Encapsulation Capacity, pH-Responsivity, and Controlled Release Behavior, *Int. J. Biol. Macromol*., **190**, 351-359, 2021.
30. Gaharwar A.K., Schexnailder P.J., Kline B.P., and Schmidt G., Assessment of Using Laponite® Cross-Linked Poly(ethylene oxide) for Controlled Cell Adhesion and Mineralization, *Acta Biomater*., **7**, 568-577, 2011.
31. Zou X., Zhao X., and Ye L., Synthesis of Cationic Chitosan Hydrogel with Long Chain Alkyl and Its Controlled Glucose-Responsive Drug Delivery Behavior, *RSC Adv*., **5**, 96230-96241, 2015.
32. Luan F., Wei L., Zhang J., Tan W., Chen Y., Dong F., Li Q., and Guo Z., Preparation and Characterization of Quaternized Chitosan Derivatives and Assessment of Their Antioxidant Activity, *Molecules*, **23**, 516, 2018.
33. Frascareli E., Silva V., Tonon R., and Hubinger M., Effect of Process Conditions on the Microencapsulation of Coffee Oil by Spray Drying, *Food Bioprod. Process.*, **90**, 413-424, 2012.
34. Huang J., Cheng Z.-H., Xie H.-H., Gong J.-Y., Lou J., Ge Q., Wang Y.-J., Wu Y.-F., Liu S.-W., and Sun P.-L., Effect of Quaternization Degree on Physiochemical and Biological Activities of Chitosan from Squid Pens, *Int. J. Biol. Macromol.*, **70**, 545-550, 2014.
35. Salas C., Thompson Z., and Bhattarai N., Electrospun Chitosan Fibers, In *Electrospun Nanofibers*, Elsevier, 371-398, 2017.
36. Chiono V., Mozetic P., Boffito M., Sartori S., Gioffredi E., Silvestri A., Rainer A., Giannitelli S.M., Trombetta M., and Nurzynska D., Polyurethane-Based Scaffolds for Myocardial Tissue Engineering, *Interface Focus*, **4**, 20130045, 2014.
37. Sharifee F., Asadpour L., Shariati S., and Salehzadeh A., Evaluation of Antibacterial Effect of Aqueous, Hydro-Alcoholic and Alcoholic Extracts of *Morus nigra* on Gram-Positive and Gram-Negative Bacteria, *J. Adv. Env. Health Res.,* **10**, 225-234, 2022.
38. Liu B., Li J., Lei X., Miao S., Zhang S., Cheng P., Song Y., Wu H., Gao Y., and Bi L., Cell-Loaded Injectable Gelatin/Alginate/LAPONITE®Nanocomposite Hydrogel Promotes Bone Healing in a Critical-Size Rat Calvarial Defect Model, *RSC Adv.*, **10**, 25652-25661, 2020.
39. Golafshan N., Rezahasani R., Esfahani M.T., Kharaziha M., and Khorasani S., Nanohybrid Hydrogels of Laponite: PVA-Alginate as a Potential Wound Healing Material, *Carbohydr. Polym.*, **176**, 392-401, 2017.
40. Kim S. and Lee J., Indentation and Temperature Response of

Liquid Metal/Hydrogel Composites, *J. Ind. Eng. Chem.*, **110**, 225-233, 2022.

41. Satani H., Kuwata M., Ishii H., Inoue T., and Shimizu A., Preparation of SEM Hydrogel Samples Using a High Pressure Water Freeze Fracture Method, *High Press. Res.*, **41**, 97-108, 2021.
42. Willems N., Yang H.-Y., Langelaan M.L., Tellegen A.R., Grinwis G.C., Kranenburg H.-J.C., Riemers F.M., Plomp S.G., Craenmehr E.G., and Dhert W.J., Biocompatibility and Intradiscal Application of a Thermoreversible Celecoxib-Loaded Poly-N-Isopropylacrylamide MgFe-Layered Double Hydroxide Hydrogel in a Canine Model, *Arthritis Res. Ther.*, **17**, 1-16, 2015.
43. Peng Z.-X., Wang L., Du L., Guo S.-R., Wang X.-Q., and Tang T.-T., Adjustment of the Antibacterial Activity and Biocompatibility of Hydroxypropyltrimethyl Ammonium Chloride Chitosan by Varying the Degree of Substitution of Quaternary Ammonium, *Carbohydr. Polym*, **81**, 275-283, 2010.
44. Wang F., Zhang Q., Huang K., Li J., Wang K., Zhang K., and Tang X., Preparation and Characterization of Carboxymethyl Cellulose Containing Quaternized Chitosan for Potential Drug Carrier, *Int. J. Biol. Macromol.*, **154**, 1392-1399, 2020.
45. Ren Y., Zhao X., Liang X., Ma P.X., and Guo B., Injectable Hydrogel Based on Quaternized Chitosan, Gelatin and Dopamine as Localized Drug Delivery System to Treat Parkinson's Disease, *Int. J. Biol. Macromol.*, **105**, 1079-1087, 2017.
46. Liang H., Zhou B., He L., An Y., Lin L., Li Y., Liu S., Chen Y., and Li B., Fabrication of Zein/Quaternized Chitosan Nanoparticles for the Encapsulation and Protection of Curcumin, *Rsc Adv.*, **5**, 13891-13900, 2015.
47. Freitas E.D., Moura Jr, C.F., Kerwald J., and Beppu M.M., An Overview of Current Knowledge on the Properties, Synthesis and Applications of Quaternary Chitosan Derivatives, *Polymer*, **12**, 2878, 2020.
48. Omer A.M., Tamer T.M., Khalifa R.E., Eltaweil A.S., Agwa M.M., Sabra S., Abd-Elmonem M.S., Mohy-Eldin M.S., and Ziora Z.M., Formulation and Antibacterial Activity Evaluation of Quaternized Aminochitosan Membrane for Wound Dressing Applications, *Polymer*, **13**, 2428, 2021.
49. Kurita K., Tomita K., Tada T., Ishii S., Nishimura S.I., and Shimoda K., Squid Chitin as a Potential Alternative Chitin Source: Deacetylation Behavior and Characteristic Properties, *J. Polym. Sci., Part A: Polym. Chem*, **31**, 485-491, 1993.
50. Mohsenifard S., Mashayekhan S., and Safari H., A Hybrid Cartilage Extracellular Matrix-Based Hydrogel/Poly(ε-Caprolactone) Scaffold Incorporated with Kartogenin for Cartilage Tissue Engineering, *J. Biomater. Appl.*, **37**, 1243-1258, 2023.
51. Wongwanakul R., Jianmongkol S., and Gonil P., Sajomsang W., Maniratanachote R., and Aueviriyavit S., Biocompatibility Study of Quaternized Chitosan on the Proliferation and Differentiation of Caco-2 Cells as an In Vitro Model of the Intestinal Barrier, *J. Bioact. Compat. Pol.*, **32**, 92-107, 2017.
52. Zou Y., Sun Y., Shi W., Wan B., and Zhang H., Dual-Functional Shikonin-Loaded Quaternized Chitosan/Polycaprolactone Nanofibrous Film with pH-Sensing for Active and Intelligent Food Packaging, *Food Chem.*, **399**, 133962, 2023.
53. Kiaee G., Dimitrakakis N., Sharifzadeh S., Kim H.J., Avery R.K., Moghaddam K.M., Haghniaz R., Yalcintas E.P., Barros N.R., and Karamikamkar S., Laponite-Based Nanomaterials for Drug Delivery, *Adv. Healthc. Mater.,* **11**, 2102054, 2022.
54. Zhang L., He G., Yu Y., Zhang Y., Li X., and Wang S., Design of Biocompatible Chitosan/Polyaniline/Laponite Hydrogel with Photothermal Conversion Capability, *Biomol.*, **12**, 1089, 2022.