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

Iran. J. Polym. Sci. Technol.
(Persian),
Vol. 29, No. 6, 521-531
February- March 2017
ISSN: 1016-3255
Online ISSN: 2008-0883

Effects of Crosslinking and Neutralization Agents on the Morphology of Chitosan Electrospun Scaffolds

Maryam Mashayekhi, Hamid Mirzadeh*, and Shadab Bagheri-Khoulenjani

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

Received: 2 November 2015, accepted: 7 October 2016

ABSTRACT

Chitosan, a natural polymer derived from chitin by deacetylation process of chitin, has gained an enormous interest in tissue engineering due to its unique features such as antibacterial activity and wound healing properties. Electrospinning of acidified chitosan solution is one of the most widely-used approaches in fabrication of 3D scaffolds. Although there are some reports addressing morphology tailoring of the chitosan nanofibers through solution electrospinning, there is no comparative report concerning the neutralization and stabilization conditions of chitosan electrospun fibers. Therefore, this article compares the effects of different neutralizing agents such as aqueous solutions of sodium carbonate (Na_2CO_3) and potassium carbonate (K_2CO_3), and crosslinking reagents including glutaraldehyde (GA) and genipin on morphology of electrospun chitosan fibers. After neutralization and stabilization processes, Fourier transform infrared spectroscopy (FTIR) was employed to investigate the morphology of fibers. Furthermore, the influence of the aforementioned parameters on stability of fibers was probed using scanning electron microscopy. SEM images illustrated that the scaffold resulting from electrospinning of 4 wt% chitosan solution in a mixture of trifluoroacetic acid (TFA) and dichloromethane (DCM) possessed a well-formed nanofibrous structure. Afterwards, different methods for neutralization and stabilization of the electrospun chitosan nanofiber mats were performed. In this respect, aqueous solutions of both Na_2CO_3 and K_2CO_3 salts (1M) were employed as neutralization agents and GA and genipin were used as two different crosslinking agents. Based on SEM analysis, the chitosan fibers, crosslinked with genipin, showed better morphology than a scaffold which was crosslinked with glutaraldehyde.

Keywords:
chitosan,
electrospinning,
neutralization,
crosslinking agent,
nanofibers

(*)To whom correspondence should be addressed.
E-mail: mirzadeh@aut.ac.ir

Please cite this article using:
Mashayekhi M., Mirzadeh H., and Bagheri-Khoulenjani Sh., Effects of Crosslinking and Neutralization Agents on the Morphology of Chitosan Electrospun Scaffolds., *Iran. J. Polym. Sci. Technol. (Persian)*, **29**, 521-531, 2017.

قابل دسترس در نشانی: http://jips.ippi.ac.ir

اثر عوامل شبکه‌ای‌کننده و خنثی‌کننده بر شکل‌شناسی داربست‌های الکتروریسی‌شده کیتوسان

مجله علوم و تکنولوژی پلیمر،
سال بیست و نهم، شماره ۶،
صفحه ۵۳۱-۵۲۱، ۱۳۹۵
ISSN: 1016-3255
Online ISSN: 2008-0883

مریم مشایخی، حمید میرزاده*، شاداب باقری خولنجانی

تهران، دانشگاه صنعتی امیرکبیر، دانشکده مهندسی پلیمر و رنگ، صندوق پستی ۴۴۱۳-۱۵۸۷۵

دریافت: ۱۳۹۴/۸/۱۱، پذیرش: ۱۳۹۵/۷/۱۶

چکیده

کیتوسان پلیمری طبیعی است که از واکنش استیل‌زدایی کیتین تهیه می‌شود و به دلیل داشتن خواص ضدباکتری و قابلیت بهبود زخم، به‌وفور در مهندسی بافت مورد توجه قرار گرفته است. ریسندگی محلول اسیدی کیتوسان با روش الکتروریسی، از متداول‌ترین روش‌های ساخت داربست‌های سه‌بعدی از این پلیمر است. با وجود مطالعات فراوان درباره بررسی شکل‌شناسی الیاف حاصل از الکتروریسی محلول کیتوسان، اثر عوامل مختلف بر چگونگی خنثی‌سازی و پایدارسازی این الیاف به‌خوبی بررسی نشده است. از این‌رو در پژوهش حاضر، برای بررسی اثر ترکیب‌های خنثی‌کننده و شبکه‌ای‌کننده بر شکل‌شناسی الیاف حاصل از الکتروریسی، به ترتیب از محلول آبی نمک‌های سدیم کربنات و پتاسیم کربنات و عوامل شبکه‌ای‌کننده گلوتارآلدهید و جنیپین استفاده شد. برای بررسی ساختار شیمیایی الیاف کیتوسان پس از فرایندهای خنثی‌سازی و پایدارسازی از روش طیف‌سنجی زیرقرمز تبدیل فوریه (FTIR) استفاده شد. روش میکروسکوپی الکترونی پویشی (SEM) نیز برای بررسی اثر هر یک از عوامل یاد شده بر شکل‌شناسی داربست‌ها به‌کار گرفته شد. طبق تصاویر میکروسکوپی، الیاف به‌دست آمده از الکتروریسی محلول کیتوسان با غلظت ٪۴ وزنی در مخلوط حلال‌های تری‌فلوئورواستیک اسید (TFA) و دی‌کلرومتان (DCM) شکل‌شناسی خوبی نشان می‌دهند. پس از این مرحله، روش‌های مختلف خنثی‌سازی و پایدارسازی الیاف تهیه شده بررسی شد. بدین منظور، از محلول‌های آبی با غلظت ۱ مولار سدیم کربنات (Na_2CO_3) و پتاسیم کربنات (K_2CO_3) به‌عنوان عامل خنثی‌کننده و از دو ترکیب گلوتارآلدهید و جنیپین به‌عنوان عامل شبکه‌ای‌کننده استفاده شد. نتایج SEM نشان داد، الیاف شبکه‌ای‌شده با استفاده از ترکیب جنیپین، شکل‌شناسی همگن‌تر و منظم‌تری دارند.

واژه‌های کلیدی

کیتوسان،
الکتروریسی،
خنثی‌سازی،
عامل شبکه‌ساز،
نانوالیاف

* مسئول مکاتبات، پیام‌نگار:
mirzadeh@aut.ac.ir

مقدمه

امروزه، پلیمرهای طبیعی به علت شباهت زیستی و شیمیایی به بافت‌های بدن به‌طور گسترده در کاربردهای مهندسی بافت مورد توجه قرار گرفته‌اند. کیتوسان پلیمری طبیعی، غیرسمی و زیست‌تخریب‌پذیر و دارای اتصالات (۴-۱)-β است که واحدهای ۲-آمینو-۲-دئوکسی-D-گلوکوز و N-استیل-۲-آمینو۲-دئوکسی-D- را به‌هم متصل می‌کند [۵-۱]. گروه آمینی موجود در کیتوسان، گروهی فعال است که خواص ویژه‌ای به آن می‌بخشد. بار مثبت موجود در ساختار کیتوسان و نیز خواص زیست‌چسبندگی آن باعث استفاده گسترده از این پلیمر در صنایع داروسازی، غذایی و آرایشی بهداشتی شده است [۶،۷].

از سوی دیگر در سال‌های اخیر روش الکتروریسی به علت سادگی، تطبیق‌پذیری، قابلیت کنترل قطر و شکل‌شناسی، ارتباط بین تخلخل‌ها و شباهت ساختاری الیاف به‌دست آمده با ماتریس فراسلولی، مورد توجه قرار گرفته است [۸،۹]. زیادبودن نسبت سطح به حجم و مقدار تخلخل‌ها در داربست‌های الکتروریسی شده امکان انتقال بین‌سطحی و برهم‌کنش سطحی را فراهم می‌کند که می‌تواند در مهندسی بافت مفید واقع شود [۱۱-۷].

الکتروریسی کیتوسان خالص را اولین بار Min و همکاران در فرایند دومرحله‌ای انجام دادند [۱۲]. این پلیمر به علت داشتن واحد تکراری سخت D- گلوکوزآمین، بلورینگی زیاد و قابلیت ایجاد پیوند هیدروژنی، انحلال‌پذیری کمی در حلال‌های آلی متداول دارد [۳،۱۳]. سامانه حلالی استفاده شده در الکتروریسی کیتوسان، نقش زیادی در شکل‌شناسی و ویژگی‌های الیاف نهایی دارد. Ohkawa حلال‌های مختلف از جمله استیک اسید، دی‌متیل‌فرمامید، تری‌فلوئورواستیک اسید (TFA) و دی‌کلرومتان (DCM) را برای الکتروریسی کیتوسان مورد آزمون قرار داد که از این میان فقط TFA موجب تولید جت فرایند الکتروریسی شد [۱۶-۱۴]. ترکیب TFA با گروه‌های آمینی کیتوسان تشکیل نمک می‌دهد و این نمک ساختار قوی بین‌مولکولی زنجیرهای کیتوسان را در محلول اسیدی از بین می‌برد. همچنین، فراریت زیاد TFA امکان جامدسازی سریع جت الکتروریسی شده کیتوسان TFA را فراهم می‌کند [۱۴،۱۷]. اما شکل‌شناسی الیاف الکتروریسی شده کیتوسان با حلال TFA شامل دانه‌های کوچک و الیاف به‌هم متصل است [۱۵،۱۸].

برای رفع این مشکل Ohkawa با افزودن حلال آلی و فرار DCM به محلول کیتوسان در TFA شکل‌شناسی الیاف حاصل را بهبود بخشید. اختلاط TFA با حلال آلی فرارتر، تبخیر سریع‌تر حلال حین کشش جت پلیمری را در فرایند الکتروریسی به همراه دارد. افزایش سرعت جامدسازی لیف در این مرحله می‌تواند اعمال نیروی کشش روی الیاف را بیشتر کند و از اثر ناهمگنی چگالی بار در سطح و طول لیف و در پی آن ناهمگنی نیروی الکتروستاتیک بکاهد که باعث کاهش قطر الیاف و کاهش شکل‌شناسی دانه‌ای شود. همچنین، جامدسازی سریع‌تر الیاف از جوش‌خوردن آن‌ها و تشکیل الیاف به‌هم پیوسته نیز جلوگیری می‌کند [۱۴].

افزودن DCM به محلول کیتوسان-TFA باعث کاهش گرانروی محلول پلیمری می‌شود. این موضوع، امکان الکتروریسی محلول‌هایی با غلظت پلیمر زیاد را در سامانه TFA/DCM فراهم می‌کند. از طرفی، اگر نسبت DCM به TFA در سامانه حلالی زیاد باشد، انحلال کیتوسان به دلیل کمبود TFA دچار مشکل می‌شود. افزون بر این، به علت کاهش بیش از حد گرانروی محلول پلیمری، طی فرایند الکتروریسی پرتاب قطره از نازل به سمت داربست مشاهده می‌شود. این قطره‌ها به‌طور کامل الیاف را در خود حل می‌کنند و باعث از بین رفتن یکنواختی داربست تهیه شده می‌شود. در نتیجه، یافتن نسبت بهینه TFA/DCM برای داشتن الیاف بدون نقص حائز اهمیت است. در مطالعات متعددی نسبت ۷۰/۳۰ به‌عنوان نسبت بهینه TFA/DCM گزارش شده و پژوهشگران بسیاری آن را مبنای انجام آزمون‌های خود قرار داده‌اند [۲۲-۱۹]. در این پژوهش، نیز برای الکتروریسی کیتوسان از این سامانه حلالی با نسبت ۷۰/۳۰ استفاده شد.

فرایند انحلال کیتوسان در TFA با تشکیل نمک تری فلوئورواستات گروه آمینی روی کربن C2 گلوکوزآمین همراه است. پس از تهیه داربست، با تبخیر حلال و طی فرایند خشک‌شدن، نمک TFA در فیلم کیتوسان باقی می‌ماند [۲۳] که موجب تغییر pH داربست و مرگ سلولی می‌شود [۱۹،۲۴،۲۵]. Zhang و همکاران وجود ذره‌های کوچک روی الیاف الکتروریسی‌شده را به وجود نمک در سطح الیاف نسبت دادند. بنابراین، داربست‌ها پس از الکتروریسی باید خنثی شوند تا pH آن‌ها به مقدار ۷/۴، برابر با pH بدن، برسد. از بازهای مختلف می‌توان برای خنثی‌کردن داربست‌های کیتوسان حاوی نمک اسیدی استفاده کرد [۲۴].

از طرفی، الیاف الکتروریسی‌شده کیتوسان حتی پس از خنثی‌شدن نیز در محیط آبی حل یا متورم می‌شوند، در نتیجه استفاده از داربست حاصل به همان شکل اولیه برای مهندسی بافت مناسب نیست [۲۶،۲۷]. به بیان دیگر، داربست‌های حاصل از پلیمر طبیعی کیتوسان، استحکام کافی ندارند و وقتی که در محیط آبی یا بافر نمکی فسفاتی (PBS) قرار می‌گیرند، ساختار خود را از دست می‌دهند. به همین دلیل داربست پس از الکتروریسی و خنثی‌شدن، باید شبکه‌ای شود. از این‌رو، پایدارسازی الیاف پس از الکتروریسی موضوعی ضروری است [۴،۲۶،۲۸،۲۹].

روش‌های مختلف شیمیایی و فیزیکی برای شبکه‌ای‌کردن

داربست‌های کیتوسان وجود دارد که استفاده از آلدهیدها، یکی از این روش‌هاست [۲۸،۲۹]. در واکنش شبکه‌ای‌شدن به‌وسیله آلدهیدها، گروه کربونیل (C=O) آلدهیدی با گروه آمین پلی‌ساکاریدها واکنش می‌دهد [۳۱-۲۹]. گلوتارآلدهید از رایج‌ترین آلدهیدهای استفاده شده برای شبکه‌ای‌کردن کیتوسان است. این آلدهید پنج‌کربنی به علت ارزانی و قابلیت حفظ شکل‌شناسی الیاف توجه زیادی را به خود جلب کرده است. [۳۲،۳۳]. در سال‌های اخیر افزون بر آلدهیدها استفاده از جنیپین (genipin) به‌عنوان عامل شبکه‌ای‌کننده برای پروتئین‌ها، کلاژن و کیتوسان افزایش یافته است [۲۶،۳۴] که سمیت بسیار کمتر و زیست‌سازگاری بیشتری در مقایسه با GA دارد [۶،۲۷،۳۵] و همانند گلوتارآلدهید با گروه آمین نوع دوم موجود در ساختار کیتوسان واکنش می‌دهد [۶،۲۷]. در مطالعات مختلف، جنیپین به محلول کیتوسان پیش از الکتروریسی اضافه شده یا پس از الکتروریسی، داربست حاصل در جنیپین قرار داده شده است [۲۷،۳۶].

با وجود مطالعات فراوان درباره بررسی شکل‌شناسی الیاف حاصل از الکتروریسی محلول کیتوسان، اثر عوامل مختلف بر چگونگی خنثی‌سازی و پایدارسازی این الیاف به‌خوبی بررسی نشده است. از این‌رو، در پژوهش حاضر روش‌های مختلف خنثی‌سازی و شبکه‌ای‌کردن داربست الکتروریسی‌شده کیتوسان بررسی شد. پس از بررسی شکل‌شناسی الیاف به‌دست آمده از هر روش و قابلیت بازهای استفاده شده در خنثی‌کردن داربست، بهترین شرایط برای پایدارسازی داربست کیتوسان گزارش شده است.

تجربی

مواد

کیتوسان با وزن مولکولی متوسط ۲۹۰۰۰۰ g/mol از شرکت Sigma-Aldrich خریداری شد. TFA، DCM و GA از شرکت Merck و جنیپین از شرکت Challenge Bioproducts تهیه شدند.

دستگاه‌ها و روش‌ها

الکتروریسی

برای تهیه محلول ٪۴ کیتوسان، ۰/۲ g از این پلیمر در ۵ mL از سامانه حلالی TFA/DCM با نسبت ۷۰/۳۰ حل شد. همچنین، برای پیش‌شبکه‌ای‌کردن تعدادی از نمونه‌ها، ۰/۰۰۵ g جنیپین به همراه ۰/۲ g کیتوسان در سامانه حلالی TFA/DCM با نسبت ۷۰/۳۰ نیز حل شد. گفتنی است، غلظت جنیپین محلول ٪۵.w/v و فرایند شبکه‌ای‌شدن در دمای محیط انجام شد.

دستگاه الکتروریسی ساخت شرکت نانوآزما با منبع ولتاژ مثبت و منفی برای الکتروریسی استفاده شد. الکترود مثبت با ولتاژ ۱۶ kV به سرنگ حاوی محلول پلیمری و الکترود منفی با ولتاژ ۷ kV به جمع‌کننده دستگاه متصل شد. سرعت تزریق محلول کیتوسان از سرنگ ۵ mL/h (سر سرنگ spinal با اندازه ۱۹ gauge) ۰/۵ mL و فاصله نازل تا جمع‌کننده ۲۰ cm درنظر گرفته شد.

خنثی‌سازی

برای خنثی‌کردن داربست کیتوسان پس از الکتروریسی، داربست‌ها در اندازه مساوی بریده شدند و به‌مدت ۲ h در محلول ۱ M سدیم‌کربنات یا محلول ۱ M پتاسیم‌کربنات قرار گرفتند. پس از آن، داربست‌ها چند بار با آب شسته شدند تا pH آن‌ها به pH خنثی برسد و به‌مدت یک روز در مجاورت هوا قرار داده شدند تا خشک شوند.

شبکه‌ای‌کردن

برای شبکه‌ای‌کردن داربست الکتروریسی‌شده کیتوسان، پس از خنثی‌سازی و خشک‌شدن، داربست‌ها به‌مدت ۲۴ h درون خشکانه تحت بخار گلوتارآلدهید ٪۲۵ وزنی قرار داده شدند. همچنین، داربست‌هایی که جنیپین در محلول آن‌ها وجود داشت، برای اتمام فرایند شبکه‌ای‌شدن، به‌مدت ۲ h در جنیپین قرار گرفتند.

طیف‌سنجی زیرقرمز تبدیل فوریه

برای بررسی اثر عوامل خنثی‌کننده و شبکه‌ای‌کننده بر داربست‌ها، از طیف‌سنج زیرقرمز مدل 8400S ساخت شرکت SHIMADZU استفاده شد.

شناسایی داربست‌های الکتروریسی‌شده

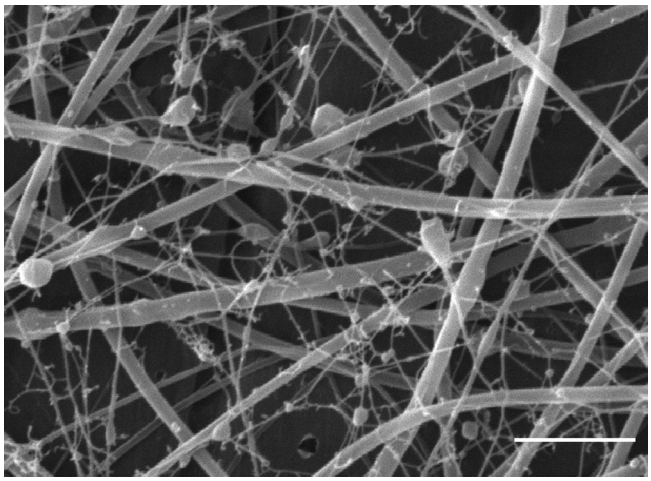
پس از انجام فرایند الکتروریسی، برای بررسی شکل‌شناسی، تصاویر الکترونی از نمونه‌ها با استفاده از میکروسکوپ الکترونی پویشی (SEM) مدل AIS2100 ساخت شرکت Seron Technology کره تهیه شد. نمونه‌ها پیش از تصویربرداری با دستگاه EMITECH انگلستان با طلا پوشش‌دهی شدند.

برای اندازه‌گیری قطر الیاف و ابعاد تخلخل‌ها به‌کمک تصاویر حاصل از میکروسکوپی الکترونی پویشی، از نرم‌افزار imageJ استفاده شد. برای اندازه‌گیری قطر الیاف، از پنج داربست با ویژگی یکسان، تصویر SEM گرفته شد. در هر یک از این پنج تصویر، قطر ۹۰ رشته لیف مختلف اندازه‌گیری و میانگین قطر گزارش شد.

نتایج و بحث

الکتروریسی کیتوسان

تصاویر حاصل از میکروسکوپی الکترونی داربست‌های الکتروریسی شده کیتوسان نشان داد، الیاف پس از الکتروریسی نقص دانه‌ای ندارند. اما، همان‌طور که پیش از این Zhang و همکاران نیز بیان کردند، نمک کیتوسان تری‌فلوئورواستات در آن‌ها وجود دارد. شکل ۱ الیاف حاصل از الکتروریسی کیتوسان در محلول TFA/DCM را نشان می‌دهد.



شکل ۱- تصویر SEM الیاف الکتروریسی شده کیتوسان.

خنثی‌کردن

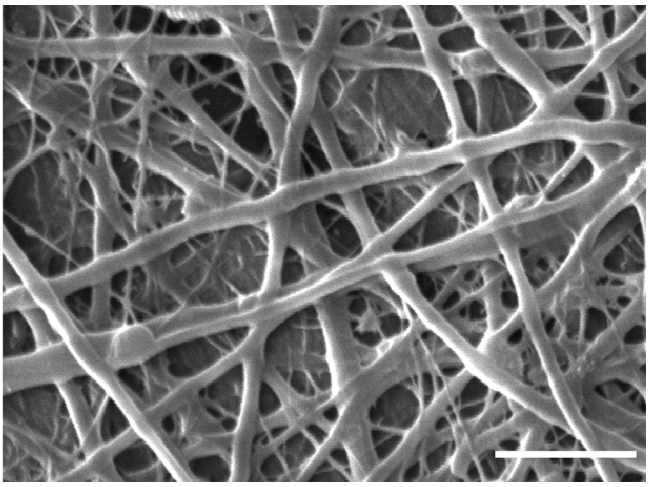
برای خنثی‌کردن نمک‌های موجود در داربست‌ها از محلول M ۱ سدیم کربنات و محلول M ۱ پتاسیم کربنات استفاده شد. شکل ۲-الف و ۲-ب به ترتیب مربوط به نمونه‌های CH-Na و CH-K (جدول ۱) است.

مطابق تصاویر میکروسکوپ الکترونی، پس از استفاده از محلول‌های بازی برای خنثی‌کردن، دانه‌هایی که در داربست وجود داشتند، ناپدید شدند که با مشاهدات سایر پژوهشگران مبنی بر نمک‌بودن دانه‌ها و نبود نقص دانه‌ای مطابقت دارد. با توجه به این نکته که pH محلول ۰/۱ نرمال پتاسیم‌کربنات ۱۱/۵ و pH محلول ۰/۱ نرمال سدیم‌کربنات ۱۱/۶ است، تفاوت قابلیت خنثی‌کردن این دو محلول زیاد نیست. تصاویر حاصل از میکروسکوپ الکترونی نیز تفاوت چندانی در شکل‌شناسی الیاف خنثی‌شده با این دو محلول را نشان نمی‌دهد (شکل ۲).

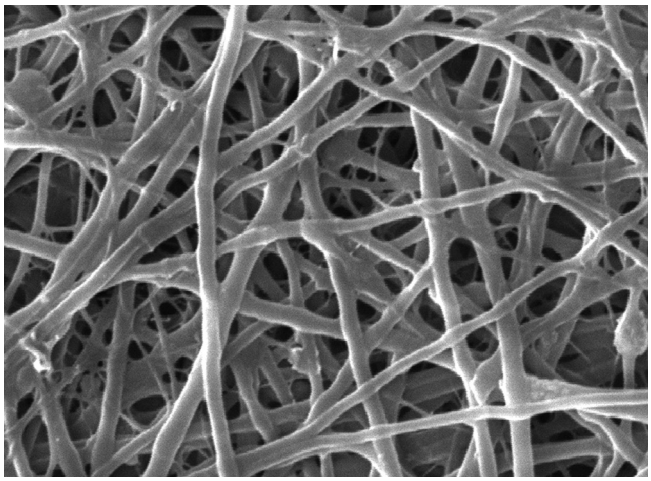
سازوکار خنثی‌شدن به‌وسیله سدیم کربنات و پتاسیم کربنات مشابه است. به محض تماس نانوالیاف با محلول آبی سدیم‌کربنات و پتاسیم‌کربنات، نمک‌های TFA باقی‌مانده حل می‌شود و گروه‌های $-NH_3^+$ روی زنجیر کیتوسان آزاد می‌شود. به دنبال آن، واکنش پروتون‌زدایی گروه‌های $-NH_3^+$ به‌سرعت آغاز می‌شود و پروتون‌های جدا شده با یون‌های CO_3^{2-} واکنش می‌دهند و به HCO_3^- تبدیل می‌شوند. همچنین، پروتون‌های جدا شده می‌توانند با HCO_3^- واکنش دهند تا در نهایت کربونیک اسید (H_2CO_3) حاصل شود. به دلیل وجود مقدار اضافی محلول بازی در سامانه، فرایند خنثی‌سازی تا آنجا پیش می‌رود که هیچ نمک TFA باقی نماند [۱۹،۲۴].

با این فرض که تمام گروه‌های کاتیونی $-NH_3^+$ کیتوسان طی فرایند خنثی‌سازی پروتون‌زدایی شود، محلول‌های سدیم‌کربنات و پتاسیم‌کربنات قابلیت نسبی حفظ شکل‌شناسی الیاف در محیط خنثی مانند محلول PBS را دارند [۱۹،۲۴].

برای اطمینان از خنثی‌شدن نمک‌های داربست الکتروریسی شده،



(الف)



(ب)

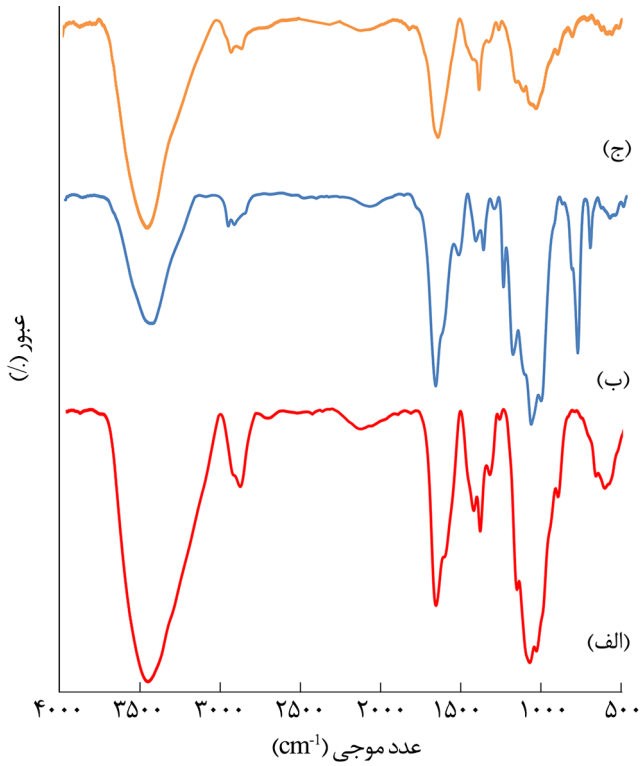
شکل ۲- تصاویر SEM الیاف کیتوسان در سامانه حلالی TFA/DCM خنثی‌شده با: (الف) سدیم کربنات و (ب) پتاسیم کربنات.

جدول ۱– نام‌گذاری نمونه‌های الکتروریسی شده، خنثی و شبکه‌ای شده.

نمونه	شبکه‌ای شده	خنثی شده	الکتروریسی شده
۱	CH-Na-GA	CH-Na	CH/TFA-DCM
۲	CH-K-GA	CH-K	CH/TFA-DCM
۳	CH-Na-g	CH/g-Na	CH/TFA-DCM/genipin
۴	CH-Na-g	CH/g-K	CH/TFA-DCM/genipin

از داربست پیش و پس از خنثی‌سازی آزمون طیف‌سنجی زیرقرمز گرفته شد و با طیف حاصل از پودر کیتوسان خالص مقایسه شد. پودر کیتوسان اولیه نوارهای جذبی قوی در ۳۳۰۰ و $3400\,cm^{-1}$ نشان می‌دهد که مربوط به کشش گروه‌های $-NH_2$ است [۱۹]. پیک جذبی شاخص در $1538\,cm^{-1}$ در داربست نانوالیاف کیتوسان پس از الکتروریسی به نوار کششی گروه‌های آمینی پروتون‌دار شده یا همان گروه‌های $-NH_3^+$ مربوط می‌شود. همچنین، سه نوار جذبی در ۷۲۰، ۷۹۶ و $840\,cm^{-1}$ نشانگر وجود نمک TFA در داربست نانوالیاف کیتوسان پس از الکتروریسی است.

با توجه به یکی‌بودن سازوکار خنثی‌شدن به‌وسیله پتاسیم کربنات و سدیم کربنات انتظار می‌رود، طیف‌سنجی زیرقرمز نمونه‌های خنثی



شکل۳– طیف زیرقرمز داربست کیتوسان: (الف) پس از و (ب) پیش از فرایند خنثی‌سازی و (ج) پودر کیتوسان اولیه.

شده با هر دو روش، مشابه یکدیگر باشد. داربست‌های خنثی‌شده با سدیم کربنات نیز همانند پودر کیتوسان اولیه که در شکل ۳ نشان داده شده است، نوار جذبی قوی در ۳۳۰۰ و $3400\,cm^{-1}$ نشان می‌دهد که مربوط به کشش گروه‌های $-NH_2$ بوده و نوار $1630\,cm^{-1}$ مربوط به گروه آمین است. سه نوار ۷۲۰، ۷۹۶ و $840\,cm^{-1}$ و نوار $1538\,cm^{-1}$ مربوط به آمونیوم نیز در آن مشاهده نمی‌شود، یعنی خروج حلال و نمک TFA از داربست کیتوسان با انجام فرایند خنثی‌سازی رخ داده است [۲۴]. برای نمونه‌های خنثی شده با پتاسیم کربنات نیز نتایج مشابهی مشاهده شد.

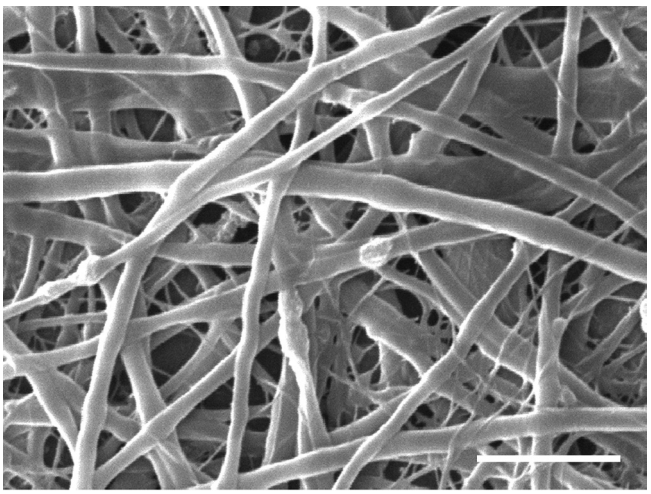
شبکه‌ای کردن

داربست‌ها پس از خنثی‌شدن با باز و خشک‌شدن در هوای آزاد، به‌مدت ۲۴ h در معرض بخار گلوتارآلدهید قرار گرفتند. شکل ۴ تصاویر SEM مربوط به الیاف حاصل از الکتروریسی کیتوسان در سامانه حلالی TFA/DCM پس از شبکه‌ای‌شدن است. در هر دو نمونه نفوذ الیاف در هم مشاهده می‌شود.

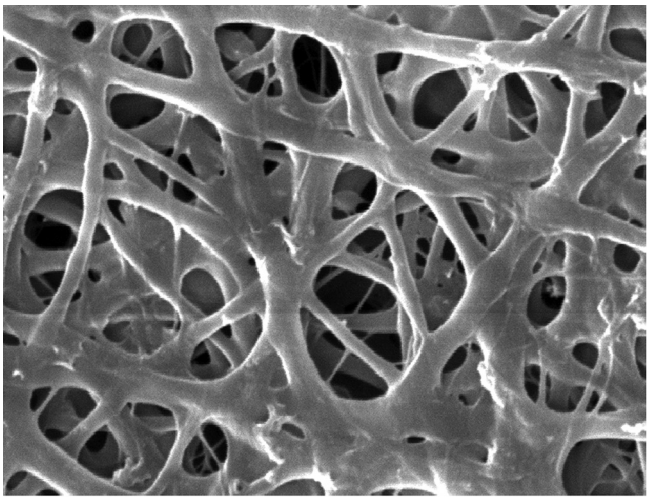
اتصالات عرضی حاصل از واکنش گلوتارآلدهید با کیتوسان مربوط به تشکیل گروه ایمین است که در طرح ۱ نشان داده شده است. در این واکنش ابتدا گروه آلدهیدی با گروه آمین کیتوسان واکنش می‌دهد. پس از آن، گروه آلدهید موجود در انتهای دیگر گلوتارآلدهید با گروه آمین دیگری از زنجیر کیتوسان، واکنش می‌دهد. در نهایت، گروه‌های آلدهیدی باعث ایجاد اتصال عرضی بین زنجیرهای کیتوسان می‌شوند.

شکل ۵، طیف زیرقرمز حاصل از داربست خنثی‌شده با سدیم‌کربنات، پس از ۲۴ h قرارگرفتن در معرض گلوتارآلدهید را در مقایسه با طیف زیرقرمز پودر کیتوسان خالص نشان می‌دهد. پیدایش نوار جذبی در $1562\,cm^{-1}$ به تشکیل گروه ایمین (C=N-) در اثر واکنش گلوتارآلدهید با گروه‌های آمین داربست نسبت داده شد. همچنین پس از شبکه‌ای‌شدن داربست با گلوتارآلدهید، گروه C-N به‌وجود می‌آید. اما، از آنجا که این گروه در کیتوسان نیز وجود دارد، در طیف FTIR هم‌پوشانی اتفاق می‌افتد و تغییری در این ناحیه دیده نمی‌شود [۲۶].

همان‌طور که پیش از این بیان شد، برای شبکه‌ای‌کردن افزون بر گلوتارآلدهید امکان استفاده از جنیپین نیز وجود دارد که سمیت کمتری نسبت به گلوتارآلدهید دارد. از آنجا که استفاده از جنیپین پس از الکتروریسی کارآمد نیست، بنابراین ۰/۰۰۵ g جنیپین به محلول ٪۴ کیتوسان در سامانه حلالی TFA/DCM اضافه شد. این داربست‌ها نیز پس از الکتروریسی در محلول ۱ M سدیم‌کربنات و پتاسیم‌کربنات خنثی شدند. پس از خنثی‌شدن و خشک‌شدن در معرض هوا، برای اتمام فرایند شبکه‌ای‌شدن داربست‌ها در جنیپین قرار گرفتند. شکل ۶



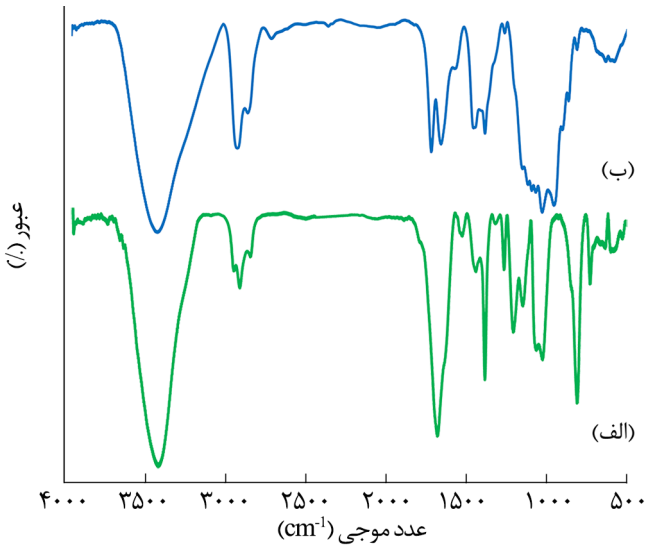
(الف)



(ب)

شکل ۴- تصاویر SEM الیاف کیتوسان در سامانه حلالی TFA/DCM خنثی‌شده با: (الف) سدیم کربنات و (ب) پتاسیم‌کربنات (شبکه‌ای شده با گلوتارآلدهید).

تصاویر مربوط به خنثی‌شدن این داربست‌ها را با محلول‌های بازی و شکل ۷ تصاویر این داربست‌ها را پس از اتمام فرایند شبکه‌ای‌شدن

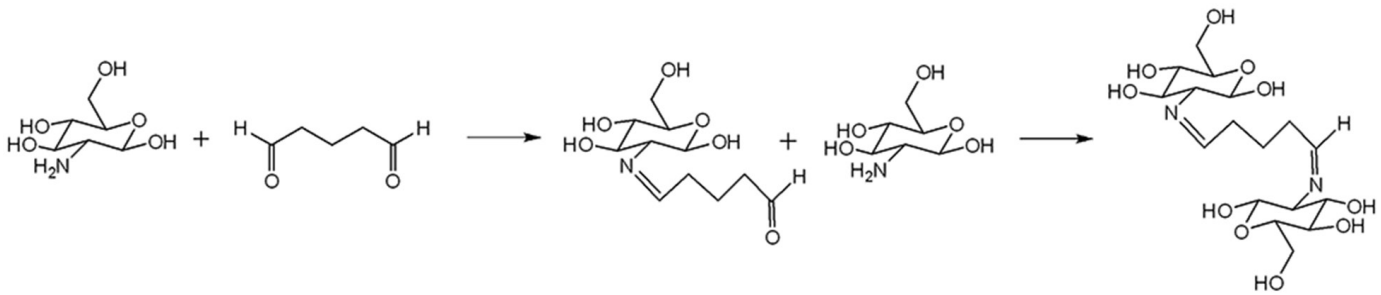


شکل ۵- طیف‌های FTIR: (الف) کیتوسان پودری و (ب) داربست کیتوسان الکتروریسی‌شده که فرایند خنثی‌سازی با سدیم کربنات و شبکه‌ای‌شدن با بخار گلوتارآلدهید روی آن انجام شده است.

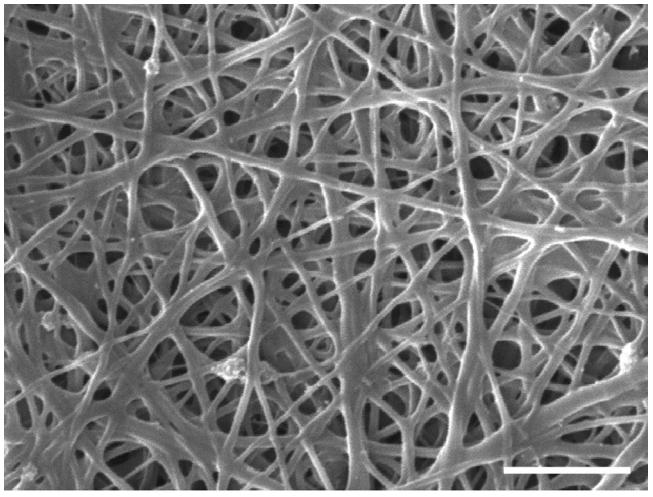
نشان می‌دهد.

نتایج مربوط به طیف‌سنجی زیرقرمز نمونه حاصل از الکتروریسی کیتوسان به همراه جنیپین، خنثی‌شدن این داربست با سدیم‌کربنات و شبکه‌ای‌شدن مجدد با جنیپین در شکل ۸ نشان داده شده است. همان‌طور که در شکل ۳ مشاهده شد، پودر کیتوسان در $1630\ cm^{-1}$ پیک نشان می‌دهد که مربوط به C=O است. پس از الکتروریسی محلول کیتوسان-جنیپین این پیک پهن‌تر می‌شود که به علت هم‌پوشانی با C=C ساختار حلقوی جنیپین است. پس از الکتروریسی، در عدد موجی $1430\ cm^{-1}$ به علت کشش ناجورحلقه آمین نوار جدیدی تشکیل می‌شود که در پودر کیتوسان خالص وجود نداشت [۲۷،۳۷]. از طرفی، به علت وجود جنیپین در هر سه مرحله و شبکه‌ای‌شدن اندک داربست، تفاوت ساختاری زیادی مشاهده نمی‌شود.

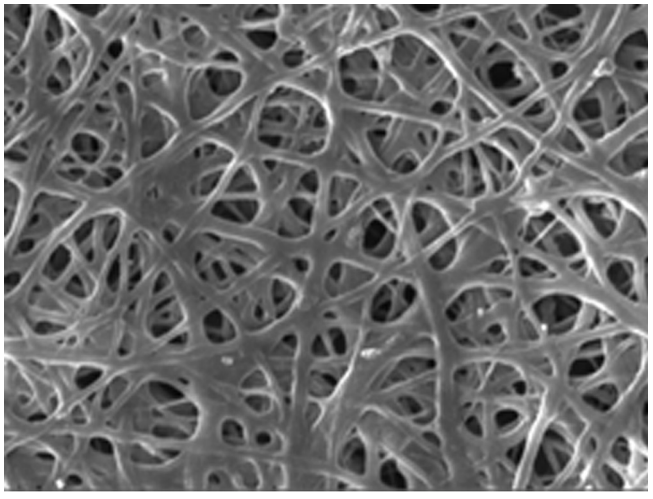
از مقایسه خنثی‌شدن نمونه‌های ۱ و ۲ جدول ۱ (شکل ۲) با نمونه‌های ۳ و ۴ (شکل ۶)، چنین به نظر می‌رسد که شکل‌شناسی



طرح ۱- واکنش گروه‌های آلدهیدی با واحدهای تکرارشونده کیتوسان و ایجاد اتصالات عرضی میان زنجیرهای پلیمری.

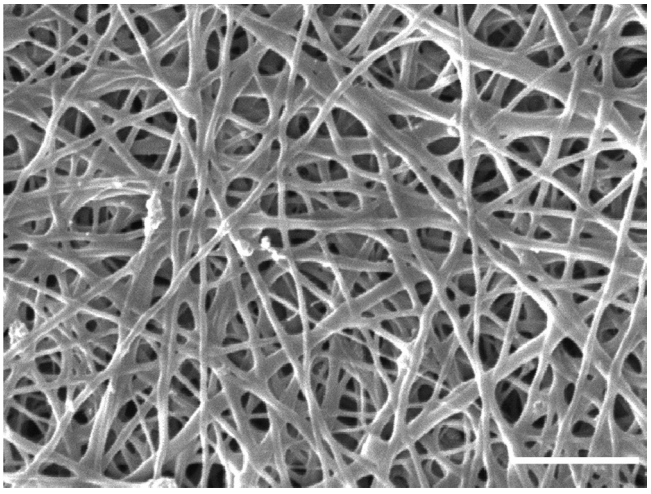


(الف)

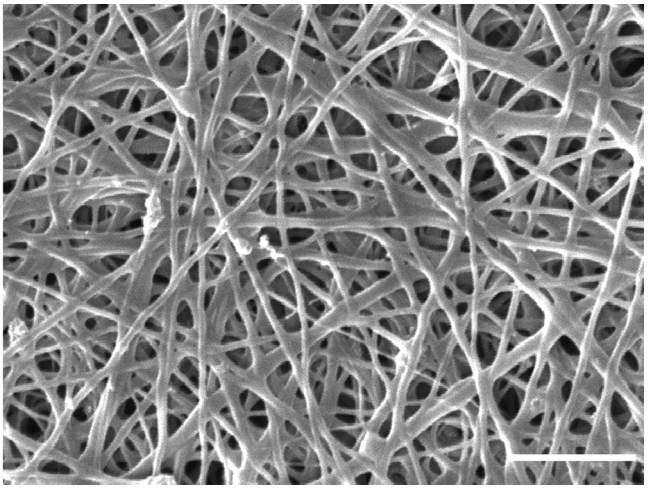


(ب)

شکل ۶- تصاویر SEM الیاف کیتوسان-جنیپین در سامانه حلالی TFA/DCM خنثی‌شده با: (الف) سدیم کربنات و (ب) پتاسیم کربنات.



(الف)



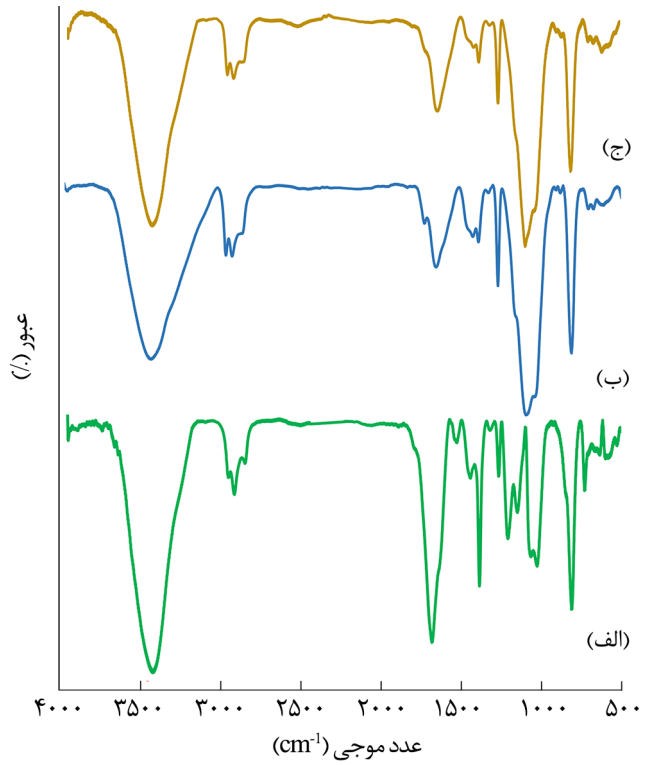
(ب)

شکل ۷- تصاویر SEM الیاف کیتوسان-جنیپین در سامانه حلالی TFA/DCM شبکه‌ای‌شده با جنیپین خنثی‌شده با: (الف) سدیم کربنات و (ب) پتاسیم کربنات.

الیاف نمونه‌های ۳ و ۴ در مدت زمانی که در محلول بازی قرار داشتند، به علت وجود جنیپین در ساختار و پیش‌شبکه‌ای‌شدن، بهتر حفظ شده و مقدار تورم الیاف کمتر است. اما، بعضی از دانه‌های نمک به‌دام افتاده و خنثی نشده‌اند (شکل ۷-الف و ب). اضافه‌کردن جنیپین در مرحله اول به منظور کاهش مقدار تورم الیاف و الکتروریسی پیش‌ژل کیتوسان است. در واقع، وجود جنیپین در محلول هنگام الکتروریسی موجب شبکه‌ای‌شدن تعداد محدودی از دسته الیاف می‌شود. این پیش‌شبکه‌ای‌شدن هنگام خنثی‌سازی کمک می‌کند که مقدار تورم الیاف در مقایسه با الیاف الکتروریسی‌شده‌ای که در محلول آن‌ها جنیپین وجود نداشته است، کمتر باشد.

برای مقایسه شبکه‌ای‌شدن داربست‌ها با دو عامل شبکه‌ای‌کننده مختلف گلوتارآلدهید و جنیپین، با توجه به گزارش‌های پژوهشگران مبنی بر قابلیت گلوتارآلدهید در حفظ بهتر شکل‌شناسی نسبت به جنیپین، انتظار می‌رفت که الیاف شبکه‌ای شده با گلوتارآلدهید شکل‌شناسی بهتری داشته باشند. اما از آنجا که پیش از شبکه‌ای‌کردن، الیاف کیتوسان باید خنثی شوند و این موضوع موجب تورم الیاف می‌شود، نمونه‌های دارای جنیپین (شکل ۷)، تورم کمتر و در نتیجه شکل‌شناسی بهتری را در مقایسه با الیاف شبکه‌ای شده با بخار گلوتارآلدهید (شکل ۴) نشان دادند.

قطر الیاف داربست‌های حاصل از مراحل الکتروریسی، خنثی‌سازی و شبکه‌ای‌کردن با استفاده از نرم‌افزار ImageJ اندازه‌گیری شد و قطر متوسط الیاف در جدول ۲ آمده است. در اندازه‌گیری قطر الیاف،



شکل ۸- طیف‌های FTIR: (الف) نمونه حاصل از الکتروریسی کیتوسان به همراه جنیپین، (ب) نمونه خنثی‌شده با سدیم کربنات و (ج) نمونه شبکه‌ای شده با جنیپین.

زیرشاخه‌هایی که از ساختار کیتوسان خارج می‌شوند، درنظر گرفته نشده است.

الیاف کیتوسان خنثی‌شده با محلول سدیم‌کربنات و پتاسیم‌کربنات پس از خنثی‌شدن، افزایش قطر حدود ٪۱۷را نسبت به الیاف پس از الکتروریسی نشان دادند. اما برای الیافی که در ساختار خود جنیپین دارند، این افزایش قطر ٪۱۰ بود که این به علت وجود جنیپین در ساختار داربست است. جنیپین باعث حفظ شکل‌شناسی الیاف می‌شود. پس از شبکه‌ای‌کردن، قطر الیاف در مقایسه با حالت خنثی شده کاهش پیدا کرد که این کاهش قطر برای تمام نمونه‌ها حدود ٪۶ تا ٪۷ نسبت به الیاف خنثی شده بود.

جدول ۲- قطر الیاف پس از الکتروریسی، خنثی‌سازی و شبکه‌ای‌کردن.

نمونه	قطر الیاف (nm)
CH	۲۶۹±۱۷
CH-Na	۳۲۶±۳۱
CH-Na-GA	۳۰۲±۱۱
CH-K	۳۲۷±۲۳
CH-K-GA	۳۰۸±۹
CH/g	۲۵۴±۲۹
CH/g-Na	۲۸۲±۲۲
CH/g-Na-g	۲۶۲±۱۶
CH/g-K	۲۸۸±۲۴
CH/g-K-g	۲۶۷±۱۹

نتیجه‌گیری

با توجه به نیاز به تثبیت ساختار داربست‌های الکتروریسی شده کیتوسان پس از الکتروریسی، در این پژوهش روش‌های مختلف خنثی‌سازی و شبکه‌ای‌کردن داربست‌ها بررسی شد. با توجه به نتایج به‌دست آمده، محلول‌های آبی سدیم کربنات و پتاسیم کربنات هر دو عامل مناسبی برای خنثی‌کردن نمک‌های موجود در داربست کیتوسان هستند. همچنین، بررسی تصاویر میکروسکوپی الکترونی پویشی و نتایج طیف‌سنجی زیرقرمز نشان داد، از میان دو عامل شبکه‌ای‌کننده گلوتارآلدهید و جنیپین، جنیپین به دلیل وجود در محلول حین الکتروریسی بهتر عمل کرده و تورم کمتری در الیاف مشاهده می‌شود.

مراجع

1. Reis T.C., Correia I.J., and Aguiar-Ricardo A., Electrodynamic Tailoring of Self-Assembled Three-Dimensional Electrospun Constructs, *Nanoscale*, **5**, 7528-7536, 2013.
2. Trifković K., Milašinović N., Djordjević V., Zdunić G., Krušić M.K., Knežević-Jugović Z., Šavikin K., Nedović V., and Bugarski B., Chitosan Crosslinked Microparticles with Encapsulated Polyphenols: Water Sorption and Release Properties, *J. Biomater. Appl.*, **30**, 618-31, 2015.
3. Dutta P.K., Dutta J., and Tripathi V., Chitin and Chitosan: Chemistry, Properties and Applications, *J. Sci. Ind. Res.*, **63**, 20-31, 2004.
4. Lee H. and Kim G., Cryogenically Fabricated Three-Dimensional Chitosan Scaffolds with Pore Size-Controlled Structures for Biomedical Applications, *Carbohydr. Polym.*, **85**,

817-823, 2011.

5. Tully-Dartez S., Cardenas H.E., and Sit P.F.S., Pore Characteristics of Chitosan Scaffolds Studied by Electrochemical Impedance Spectroscopy, *Tissue Eng., Part C: Methods,* **16**, 339-345, 2009.
6. Luo M., Peng H., Deng Z., Yin Z., Zhao Q., and Xiong H., Preparation and Characterization of Genipin-Crosslinked Chitosan Microspheres for the Sustained Release of Salidroside, *Int. J. Food Eng.,* **11**, 323-333, 2015.
7. Koosha M. and Mirzadeh H., Electrospinning, Mechanical Properties, and Cell Behavior Study of Chitosan/PVA Nanofibers, *J. Biomed. Mater. Res. Part A*, **103**, 3081-3093, 2015.
8. Zhong S., Zhang Y., and Lim C.T., Fabrication of Large Pores in Electrospun Nanofibrous Scaffolds for Cellular Infiltration: A Review, *Tissue Eng. Part B: Rev.,* **18**, 77-87 2011.
9. Ma P.X. and Elisseeff J., *Scaffolding in Tissue Engineering*, CRC, 2006.
10. Boateng J.S., Matthews K.H., Stevens H.N.E., and Eccleston G.M., Wound Healing Dressings and Drug Delivery Systems: A Review, *J. Pharm. Sci.,* **97**, 2892-2923, 2008.
11. Phipps M.C., Clem W.C., Grunda J.M., Clines G.A., and Bellis S.L., Increasing the Pore Sizes of Bone-Mimetic Electrospun Scaffolds Comprised of Polycaprolactone, Collagen I and Hydroxyapatite to Enhance Cell Infiltration, *Biomaterials,* **33**, 524-534, 2012.
12. Min B-M., Lee S.W., Lim J.N., You Y., Lee T.S., Kang P.H., and Park W.H., Chitin and Chitosan Nanofibers: Electrospinning of Chitin and Deacetylation of Chitin Nanofibers, *Polymer,* **45**, 7137-7142, 2004.
13. Elsabee M.Z., Naguib H.F., and Morsi R.E., Chitosan Based Nanofibers, Review, *Mater. Sci. Eng., C,* **32**, 1711-1726, 2012.
14. Ohkawa K., Cha D., Kim H., Nishida A., and Yamamoto H., Electrospinning of Chitosan, *Macromol. Rapid Commun.,* **25**,1600-1605, 2004.
15. Ohkawa K., Minato K.I., Kumagai G., Hayashi Sh., and Yamamoto H., Chitosan Nanofiber, *Biomacromolecules,* **7**, 3291-3294, 2006.
16. De Vrieze S., Westbroek P., Camp T.V., and Langenhove L.V., Electrospinning of Chitosan Nanofibrous Structures: Feasibility Study, *J. Mater. Sci.,* **42**, 8029-8034, 2007.
17. Areias A., Gómez-Tejedor J.A., Sencadas V., Alió J., Ribelles J.L., and Lanceros-Mendez S., Assessment of Parameters Influencing Fiber Characteristics of Chitosan Nanofiber Membrane to Optimize Fiber Mat Production, *Polym. Eng. Sci.,* **52**, 1293-1300, 2012.
18. Schiffman J.D. and Schauer C.L., One-step Electrospinning of Cross-linked Chitosan Fibers, *Biomacromolecules,* **8**, 2665-2667, 2007.
19. Sangsanoh P. and Supaphol P., Stability Improvement of Electrospun Chitosan Nanofibrous Membranes in Neutral or Weak Basic Aqueous Solutions, *Biomacromolecules,* **7**, 2710-2714, 2006.
20. Martínez-Camacho A.P., Cortez-Rocha M.O., Castillo-Ortega M.M., Burgos-Hernández A., Ezquerra-Brauer J.M., and Plascencia-Jatomea M., Antimicrobial Activity of Chitosan Nanofibers Obtained by Electrospinning, *Polym. Int.,* **60**, 1663-1669, 2011.
21. Sencadas V., Correia D.M., Areias A., Botelho G., Fonseca A.M., Neves I.C., Ribelles, J.G., and Mendez S.L., Determination of the Parameters Affecting Electrospun Chitosan Fiber Size Distribution and Morphology, *Carbohydr. Polym.,* **87**, 1295-1301, 2012.
22. Jacobs V., Patanaik A., D Anandjiwala R., and Maaza M., Optimization of Electrospinning Parameters for Chitosan Nanofibres, *Curr. Nanosci.,* **7**, 396-401, 2011.
23. Hasegawa M., Isogai A., Onabe F., and Usuda M., Dissolving States of Cellulose and Chitosan in Trifluoroacetic Acid, *J. Appl. Polym. Sci.,* **45**, 1857-1863, 1992.
24. Haider S. and Park S-.Y., Preparation of the Electrospun Chitosan Nanofibers and Their Applications to the Adsorption of Cu (II) and Pb (II) Ions from an Aqueous Solution, *J. Membr. Sci.,* **328**, 90-96, 2009.
25. Noriega S.E. and Subramanian A., Consequences of Neutralization on the Proliferation and Cytoskeletal Organization of Chondrocytes on Chitosan-based Matrices, *Int. J. Carbohydr. Chem.,* **2011**, 2011.
26. Zhang K., Qian Y., Wang H., Fan L., Huang C., Yin A., and Mo X., Genipin-crosslinked Silk Fibroin/Hydroxybutyl Chitosan Nanofibrous Scaffolds for Tissue-Engineering Application, *J. Biomed. Mater. Res. Part A,* **95**, 870-881, 2010.
27. Mirzaei E., Faridi-Majidi R., Shokrgozar M.A., and Asghari Paskiabi F., Genipin Cross-linked Electrospun Chitosan-based Nanofibrous Mat as Tissue Engineering Scaffold, *Nanomed. J.,* **1**, 137-146, 2014.
28. Chen Q., Liang S., and Thouas G.A., Elastomeric Biomaterials for Tissue Engineering, *Prog. Polym. Sci.,* **38**, 584-671, 2013.
29. Sargin İ. and Arslan G., Effect of Glutaraldehyde Cross-Linking

Degree of Chitosan/Sporopollenin Microcapsules on Removal of Copper (II) from Aqueous Solution, *Desalin. Water Treat.,* **57**, 1-13, 2015.

30. Yu Q., Song Y., Shi X., Xu C., and Bin Y., Preparation and Properties of Chitosan Derivative/Poly(vinyl alcohol) Blend Film Crosslinked with Glutaraldehyde, *Carbohydr. Polym.,* **84**, 465-470, 2011.
31. Jameela S. and Jayakrishnan A., Glutaraldehyde Cross-Linked Chitosan Microspheres as a Long Acting Biodegradable Drug Delivery Vehicle: Studies on the In Vitro Release of Mitoxantrone and In Vivo Degradation of Microspheres in Rat Muscle, *Biomaterials,* **16**, 769-775, 1995.
32. Kiernan J.A., Formaldehyde, Formalin, Paraformaldehyde and Glutaraldehyde: What They are and what They do, *Microscopy Today,* **1**, 2000.
33. Migneault I., Dartiguenave C., Bertrand M.J., and Waldron K.C., Glutaraldehyde: Behavior in Aqueous Solution, Reaction with Proteins, and Application to Enzyme Crosslinking, *Biotechniques,* **37**, 790-806, 2004.
34. Chen H., Ouyang W., Lawuyi B., and Prakash S., Genipin Cross-Linked Alginate-Chitosan Microcapsules: Membrane Characterization and Optimization of Cross-linking Reaction, *Biomacromolecules,* **7**, 2091-2098, 2006.
35. Harris R., Lecumberri E., and Heras A., Chitosan-genipin Microspheres for the Controlled Release of Drugs: Clarithromycin, Tramadol and Heparin, *Marine Drugs,* **8**,1750-1762, 2010.
36. Frohbergh M.E., Katsman A., Botta G.P., Lazarovici P., Schauer C.L., Wegst U.G., and Lelkes P.I., Electrospun Hydroxyapatite-containing Chitosan Nanofibers Crosslinked with Genipin for Bone Tissue Engineering, *Biomaterials,* **33**, 9167-9178, 2012.
37. Butler M.F., Ng Y.F., and Pudney P.D., Mechanism and Kinetics of the Crosslinking Reaction Between Biopolymers Containing Primary Amine Groups and Genipin, *J. Polym. Sci., Part A: Polym. Chem.,* **41**, 3941-3953, 2003.