بسم الله الرحمن الرحيم

دانشگاه صنعتی اصفهان
دانشکده مهندسی مواد

دانشگاه علوم پزشکی اصفهان
دانشکده پزشکی

طراحی و ساخت داربست نانوکامپوزیتی PLGA/کیتوزان و ارزیابی تمایز سلول‌های بنیادی مزانشیمی بر روی آن جهت مهندسی بافت عصب

رساله دکتری مهندسی بیومواد

صدیقه واعظی‌فر

اساتید راهنما
دکتر شهناز رضوی
دکتر محمدعلی گلعذار

۱۳۹۲

دانشگاه صنعتی اصفهان
دانشکده مهندسی مواد

دانشگاه علوم پزشکی اصفهان
دانشکده پزشکی

رساله‌ی دکتری رشته‌ی مهندسی بیومواد خانم صدیقه واعظی‌فر

تحت عنوان

طراحی و ساخت داربست نانوکامپوزیتی PLGA/کیتوزان و ارزیابی تمایز سلول‌های بنیادی مزانشیمی بر روی آن جهت مهندسی بافت عصب

در تاریخ توسط کمیته تخصصی زیر مورد بررسی و تصویب نهایی قرارگرفت.

۱- استاد راهنمای پایان‌نامه	دکتر شهناز رضوی
۲- استاد راهنمای پایان‌نامه	دکتر محمدعلی گلعذار
۳- استاد مشاور پایان‌نامه	دکتر محمد مرشد
۴- استاد مشاور پایان‌نامه	دکتر سعید کرباسی
۵- استاد داور	دکتر علی صمدی کوچکسرائی
۶- استاد داور	دکتر سعید نوری خراسانی
۷- استاد داور	دکتر رحمت‌اله عمادی
سرپرست تحصیلات تکمیلی دانشکده	دکتر کیوان رئیسی

تشکر و قدردانی:

به درگاه یگانه معبودم ابراز بندگی و تسلیم می‌کنم و او را به‌خاطر تک تک نعمت‌هائی که به من ارزانی داشت، عاجزانه می‌ستایم.

بر خود لازم می‌دانم که از زحمات استادان راهنمای خود، جناب **آقای دکتر محمدعلی گلعذار** و سرکار خانم دکتر شهناز رضوی به‌خاطر راهنمایی‌های ارزشمندشان و استادان مشاور جناب **آقای دکتر محمد مرشد** و جناب آقای دکتر سعید کرباسی سپاسگزاری کنم.

از جناب آقای **دکتر علی صمدی‌کوچکسرایی**، جناب آقای **دکتر سعید نوری خراسانی** و جناب آقای **دکتر رحمت‌الله عمادی**، استادان محترم داوران، جهت قبول زحمت مطالعه‌ی رساله قدردانی می‌نمایم.

هرگز فراموش نخواهم کرد نگاه‌های مهربان و پر از امید همسر عزیزم آقای **دکتر مهدی کمالی** و فرزند دلبندم **محمد متین** را که نخستین گام‌های این مرحله را با تکیه بر حمایت‌های بی‌دریغشان برداشتم. از **مادر عزیزم** این تنها پشتوانه بی‌بدیل زندگیم صمیمانه سپاسگزارم. از کلیه‌ی اعضاء خانواده‌ام که در طول این مدت همراهیشان مایه‌ی دلگرمیم بود متشکرم. از دوستان و عزیزانم در **مجتمع فناوریهای نوین فدک** به‌خاطر همراهی صمیمانه‌شان سپاسگزارم که لطف و حمایتشان مسیر را برایم هموارتر نمود.

از زحمات بی‌دریغ استادان محترم دانشکده‌ی مواد دانشگاه صنعتی اصفهان به‌ویژه جناب آقای **دکتر کیوان رئیسی** سرپرست محترم تحصیلات تکمیلی دانشکده و کلیه‌ی بزرگوارانی که در طول مدت تحصیل خود از ایشان بهره‌مند شدم، سپاسگزارم.

بر خود لازم می‌دانم از کلیه‌ی کارکنان دانشکده‌ی مواد دانشگاه صنعتی اصفهان قدردانی نمایم.

هزینه‌های (مصرفی و غیرمصرفی) این طرح از بودجه تحقیقاتی دانشگاه صنعتی اصفهان، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان و ستاد توسعه سلول‌های بنیادی معاونت علمی و فناوری ریاست جمهوری مطابق ابلاغیه شماره ۱۹۰۰۴۴ به دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، تامین گردیده است و کلیه حقوق مادی مترتب بر نتایج مطالعات، ابتکارات و نوآوری‌های ناشی از تحقیق موضوع این رساله به نهادهای مذکور تعلق دارد.

تقدیم به

موعود مهربانی که ظهورش را منتظریم

همسر مهربان، پسر عزیز و نازنینم

مادر صبور و بزرگوارم

و روح ملکوتی پدر بزرگوار و برادر عزیزم

فهرست مطالب

عنوان	صفحه
فهرست مطالب	هشت
چکیده	۱
فصل اول (مقدمه)	
۱-۱- مقدمه‌ای بر مهندسی بافت	۲
۱-۱-۱- ویژگی‌های داربست‌های سلولی مورد استفاده در مهندسی بافت	۳
۱-۱-۲- مواد مورد استفاده در ساخت داربست‌های سلولی	۴
۱-۱-۳- روش‌های ساخت داربست‌های سلولی	۱۱
۱-۱-۴- بهبود خواص داربست‌های سلولی	۱۴
۱-۱-۵- استفاده از سلول‌های بنیادی در مهندسی بافت	۲۷
۱-۲- مقدمه‌ای بر بافت عصبی	۳۰
۱-۲-۱- سیستم عصبی	۳۱
۱-۲-۲- تخریب و ترمیم بافت عصبی	۳۳
۱-۲-۳- درمان‌های کلینیکی به‌کارگرفته‌شده جهت درمان آسیب‌های عصبی	۳۵
۱-۲-۴- کاربرد مهندسی بافت در بازسازی سیستم اعصاب مرکزی	۴۰
۱-۲-۵- فاکتورهای نوروتروفیک جهت بهبود بازسازی عصب	۴۱
۱-۳- طراحی آزمون آماری	۴۳
۱-۳-۱- آزمایش‌هایی با سه عامل	۴۵
۱-۳-۲- مراحل تجزیه و تحلیل اثرات	۴۵
۱-۳-۳- تجزیه و تحلیل آزمایش‌های بدون تکرار	۴۵
۱-۴- ضرورت انجام و اهداف	۴۶
۱-۴-۱- ضرورت انجام پروژه	۴۶
۱-۴-۲- انتخاب جنس داربست	۴۷
۱-۴-۳- اهداف پروژه	۴۸
فصل دوم (مواد و روش‌ها)	
۲-۱- مقدمه	۵۰
۲-۲- دستگاه‌ها، نرم‌افزارها و مواد مورد استفاده	۵۰
۲-۲-۱- دستگاه‌های مورد استفاده	۵۰
۲-۲-۲- نرم‌افزارهای مورد استفاده	۵۱
۲-۲-۳- مواد مورد استفاده	۵۲
۲-۳- روش انجام آزمایش‌ها در بخش ساخت و مشخصه‌یابی داربست‌ها	۵۳
۲-۳-۱- تهیه‌ی نانوذرات کیتوزان به‌روش ژل‌شدن یونی	۵۳
۲-۳-۲- تهیه‌ی نانوذرات کیتوزان به‌روش الکترواسپری	۵۵

عنوان	صفحه
۲-۳-۳- تهیه‌ی نانوالیاف PLGA خالص به‌روش الکتروریسی	۵۶
۲-۳-۴- تهیه‌ی نانوبیوکامپوزیت PLGA/CS به‌روش الکتروریسی تک سرنگ	۵۸
۲-۳-۵- تهیه‌ی نانوبیوکامپوزیت PLGA/CS به‌روش الکتروریسی و الکترواسپری همزمان با دو سرنگ	۵۸
۲-۳-۶- تهیه‌ی تصاویر از وب نانوالیاف با استفاده از میکروسکوپ الکترونی روبشی (SEM)	۵۹
۲-۳-۷- تعیین ضخامت وب نانوالیاف	۵۹
۲-۳-۸- تهیه‌ی تصاویر از وب نانوالیاف با استفاده از میکروسکوپ الکترونی عبوری (TEM)	۵۹
۲-۳-۹- تعیین میزان جذب PBS (درصد تورم)	۶۰
۲-۳-۱۰- تعیین زاویه‌ی تماس آب با سطح داربست (WCA)	۶۰
۲-۳-۱۱- اندازه‌گیری خواص مکانیکی وب نانو الیاف	۶۰
۲-۳-۱۲- تخریب‌پذیری داربست‌های نانو الیاف در محیط‌های بیولوژیکی در خارج از بدن	۶۰
۲-۳-۱۳- تعیین اندازه نانوذرات به‌روش پراکندگی نور پویا	۶۱
۲-۳-۱۴- تهیه‌ی طیف ماوراء بنفش-مرئی (UV-Vis)	۶۱
۲-۳-۱۵- تهیه‌ی طیف تبدیل فوریه مادون قرمز (FT-IR)	۶۱
۲-۳-۱۶- تهیه‌ی طیف پراش اشعه ایکس (XRD)	۶۱
۲-۳-۱۷- تجزیه‌ی وزن‌سنجی حرارتی (TGA)	۶۱
۲-۳-۱۸- رزونانس مغناطیسی هسته (NMR)	۶۲
۲-۳-۱۹- طیف‌سنجی فوتوالکترونی اشعه‌ایکس (XPS)	۶۲
۲-۴- روش انجام آزمایش‌ها در بخش کشت سلولی	۶۲
۲-۴-۱- استخراج سلول‌های بنیادی از بافت چربی	۶۲
۲-۴-۲- آماده‌سازی داربست نانوالیاف جهت آزمایش‌های کشت سلولی	۶۲
۲-۴-۳- کشت سلول بر داربست‌های نانوبیوکامپوزیتی PLGA/CS	۶۲
۲-۴-۴- بررسی میزان رشد و تکثیر سلولی (MTT assay)	۶۳
۲-۴-۵- بررسی میزان چسبندگی سلولی	۶۳
۲-۴-۶- مشاهده‌ی مورفولوژی سلول بر روی داربست با استفاده از میکروسکوپ الکترونی روبشی	۶۳
۲-۴-۷- تمایز سلول‌های بنیادی به سلول‌های شوان (مرحله‌ی پیش‌القاء- تشکیل نروسفر)	۶۴
۲-۴-۸- مرحله‌ی القاء نهایی به سلول‌های شوان	۶۴
۲-۴-۹- ارزیابی سلول‌های تمایزیافته (ایمونوسایتوشیمی)	۶۵
۲-۵- تجزیه و تحلیل‌های آماری	۶۵
فصل سوم (نتایج و بحث)	
۳-۱- مقدمه	۶۶
۳-۲- بررسی خواص نانوذرات کیتوزان تولیدشده به‌روش ژل شدن یونی	۶۶
۳-۲-۱- تعیین اندازه‌ی ذرات کیتوزان مصرفی به‌عنوان ماده‌ی اولیه	۶۶
۳-۲-۲- تعیین اندازه‌ی نانوذرات کیتوزان به‌روش پراکندگی نور پویا (DLS)	۶۷

عنوان	صفحه
۳-۲-۳- تعیین مورفولوژی ذرات به‌روش میکروسکوپ الکترونی روبشی و میکروسکوپ الکترونی عبوری	۶۹
۳-۲-۴- طیف ماوراء بنفش-مرئی (UV-Vis)	۷۰
۳-۲-۵- طیف مادون قرمز (FT-IR)	۷۰
۳-۲-۶- طیف پراش اشعه ایکس (XRD)	۷۱
۳-۲-۷- تجزیه‌ی وزن‌سنجی حرارتی (TGA)	۷۱
۳-۲-۸- طیف رزونانس مغناطیسی هسته (NMR)	۷۲
۳-۳- بررسی خواص نانوذرات کیتوزان تولیدشده به‌روش الکترواسپری	۷۲
۳-۳-۱- تعیین مورفولوژی و توزیع اندازه ذرات الکترواسپری شده	۷۲
۳-۴- بررسی مورفولوژی و تعیین میانگین قطر الیاف PLGA خالص	۷۶
۳-۵- بررسی مورفولوژی و تعیین میانگین قطر الیاف نانوبیوکامپوزیت PLGA/CS به‌روش الکتروریسی تک سرنگ	۸۶
۳-۶- بررسی مورفولوژی و تعیین میانگین قطر الیاف نانوبیوکامپوزیت PLGA/CS به‌روش الکتروریسی و الکترواسپری همزمان با دو سرنگ	۸۹
۳-۷- تعیین خواص داربست‌های ساخته‌شده	۹۲
۳-۷-۱- تعیین ضخامت وب نانوالیاف	۹۲
۳-۷-۲- تعیین پراکندگی یکنواخت نانوذرات کیتوزان در بستر الیاف پلیمری به روش TEM	۹۳
۳-۷-۳- تعیین میزان جذب PBS داربست‌ها (درصد تورم)	۹۴
۳-۷-۴- تعیین زاویه‌ی تماس آب با سطح داربست (WCA)	۹۶
۳-۷-۵- اندازه‌گیری خواص مکانیکی وب نانو الیاف	۹۷
۳-۷-۶- طیف‌سنجی مادون قرمز (FTIR)	۱۰۰
۳-۷-۷- طیف‌سنجی فوتوالکترونی اشعه‌ایکس (XPS)	۱۰۱
۳-۷-۸- طیف‌سنجی ماورای بنفش-مرئی (UV-Vis)	۱۰۲
۳-۷-۹- تجزیه‌ی وزن‌سنجی حرارتی (TGA)	۱۰۲
۳-۷-۱۰- تخریب‌پذیری داربست‌های نانو الیاف در محیط‌های بیولوژیکی در خارج از بدن	۱۰۴
۳-۷-۱۱- اطمینان از استریل‌شدن کامل و عدم تخریب داربست‌ها طی زمان استریل‌شدن	۱۰۶
۳-۸- نتایج آزمون‌های بخش کشت سلولی	۱۰۸
۳-۸-۱- مورفولوژی سلول‌های بنیادی مستخرج از بافت چربی	۱۰۸
۳-۸-۲- بررسی میزان رشد و تکثیر سلول‌های بنیادی بر روی داربست‌های مختلف	۱۰۹
۳-۸-۳- بررسی میزان چسبندگی سلول‌های بنیادی بر روی داربست‌های مختلف	۱۱۱
۳-۸-۴- بررسی مورفولوژی سلول‌های بنیادی بر روی داربست‌های مختلف با استفاده از میکروسکوپ الکترونی روبشی	۱۱۳
۳-۸-۵- تشکیل نروسفر در مرحله‌ی پیش‌القاء	۱۱۵

عنوان	صفحه
۳-۸-۶- مرحله‌ی القاء نهایی به سلول‌های شوان	۱۱۵
۳-۸-۷- بررسی میزان تکثیر سلول‌های شوان بر روی داربست‌ها	۱۱۶
۳-۸-۸- ایمونوسایتوشیمی	۱۱۷
۳-۸-۹- مورفولوژی سلول‌ها در گروه‌های مختلف	۱۲۷
فصل چهارم (نتیجه‌گیری و پیشنهادها)	
۴-۱- نتیجه‌گیری	۱۳۰
۴-۲- پیشنهادها	۱۳۲
مراجع	**۱۳۳**

چکیده

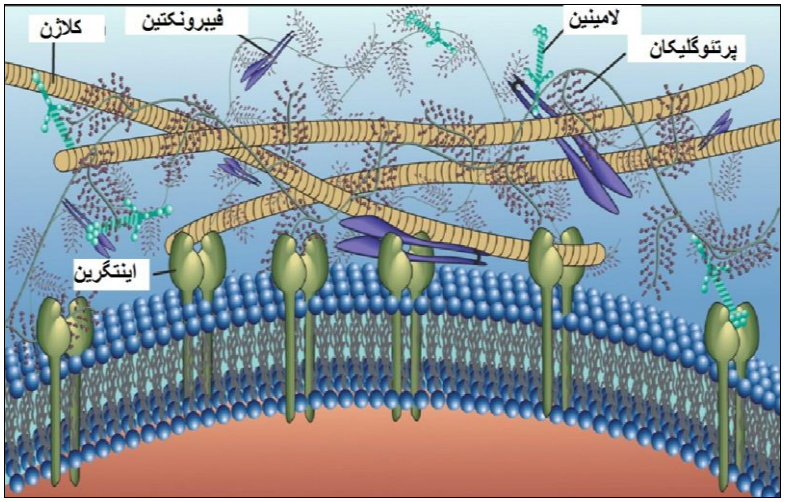
در سال‌های اخیر با گسترش علم بین رشته‌ای مهندسی بافت که تلفیقی از به‌کارگیری روش‌های سلولی، مهندسی و علم مواد در ساخت بافت‌های زنده است، روزنه‌ی امیدی برای درمان و ترمیم ضایعات بافتی و نقص عضو پدید آمده است. با استفاده از این فناوری، سلول‌های ناحیه‌ای از بدن یا سلول‌های بنیادی را در محیط خارج بدن کشت داده و سپس مجتمع سلولی رشد کرده و یا تمایزیافته را وارد بدن فرد بیمار می‌کنند. در بیشتر مواقع، تکثیر و تمایز سلول‌ها بر روی بسترهایی صورت می‌گیرد که تقلیدی از ماتریکس خارج سلولی سلول‌های حیوانی است. این بسترهای مهندسی بافت از جنس پلیمرهای مصنوعی و طبیعی می‌باشند. پلی‌لاکتیک‌گلیکولیک‌اسید (PLGA) و کیتوزان به‌ترتیب از دسته‌ی پلیمرهای مصنوعی و طبیعی متداول برای کاربردهای مهندسی بافت هستند. در این پژوهش با استفاده از دو روش، داربست مهندسی بافت نانوبیوکامپوزیتی PLGA/CS تهیه شد. در روش اول نانوذرات کیتوزان تهیه‌شده به روش ژل‌شدن یونی در محلول پلیمری PLGA به‌صورت یکنواخت توزیع شده و به‌روش الکتروریسی تک مرحله‌ای با استفاده از یک سرنگ ریسیده شد. در روش دوم تهیه‌ی نانوذرات کیتوزان از محلول کیتوزان به‌روش الکترواسپری بهینه‌سازی شد و با استفاده از دو سرنگ به‌طور همزمان این نانوبیوکامپوزیت تهیه شد. در این روش، الکترواسپری نانوذرات کیتوزان بر روی نانوالیاف PLGA در حال جمع‌آوری بر روی درام به‌طور همزمان، نانوبیوکامپوزیتی یکنواخت حاصل شد. این داربست‌ها با سه نسبت مختلف PLGA/CS ۷۰/۳۰، ۸۰/۲۰ و ۹۰/۱۰ به هر دو روش با موفقیت ساخته شد. در همه نسبت‌های ذکرشده و به هر دو روش، الیافی با آرایش تصادفی و هم‌راستا تهیه شد و مشخصه‌های فیزیکی- شیمیایی داربست‌های تهیه‌شده به روش‌های مختلف ارزیابی شد. روش‌های مورد استفاده در مشخصه‌یابی داربست عبارت‌اند از: مشاهده مورفولوژی الیاف توسط میکروسکوپ الکترونی روبشی (SEM) و همچنین میکروسکوپ الکترونی عبوری (TEM)، تعیین میزان جذب بافر فسفات (PBS) تحت عنوان نسبت تورم، تعیین زاویه‌ی تماس آب با سطح داربست، اندازه‌گیری خواص مکانیکی، زیست تخریب‌پذیری داربست در محیط بیولوژیکی خارج از بدن، طیف‌سنجی مادون قرمز (FTIR)، اسپکتروسکوپی فوتوالکترونی اشعه ایکس (XPS) و مطالعه‌ی خواص حرارتی داربست. نتایج حاصل شده در این بخش نشان داد در حالت بهینه، کمترین میانگین قطر الیاف در روش تک سرنگی و در داربست PLGA/CS با نسبت ۷۰/۳۰، معادل ۲۸۶ nm در الیاف با آرایش هم‌راستا به‌دست آمد. درصد تورم این داربست به‌عنوان معیاری از آبدوستی برابر ۱۱/۱۰ ± ۳۰۵/۵۷ درصد و میزان تخریب نمونه در محیط بیولوژیک خارج از بدن در مدت یک ماه ۳۵-۳۰ درصد حاصل شد. استحکام کششی، مدول یانگ و درصد ازدیاد طول به‌ترتیب برابر ۱/۱۹ ± ۱۳/۴۰ و ۰/۲۹ ± ۳/۰۰ مگاپاسکال و ۱/۸ ± ۳۶/۰ درصد برای این داربست به‌دست آمد. در بخش سلولی، پس از استخراج سلول‌های بنیادی از بافت چربی، این سلول‌ها جهت ارزیابی تمایزشان به سلول شوان استفاده شد. پس از ارزیابی سازگاری زیستی این سلول‌ها با داربست‌های تهیه‌شده، در ادامه تمایز سلول‌های بنیادی مزانشیمی به سلول‌های شوان بر روی داربست‌ها با خواص بهینه مطالعه شد. سپس اثر پارامترهای مختلف بر رشد و تکثیر و تمایز سلول‌های بنیادی مزانشیمی بررسی شد. پس از بهینه‌سازی نهایی خواص داربست و رشد و تکثیر و تمایز سلول‌ها بر روی آن، تمایز سلول‌های بنیادی به سلول‌های شوان از نظر ایمونوسایتوشیمی اثبات شد و این محصول به‌عنوان فرآورده‌ی مهندسی بافت بهینه جهت ترمیم ضایعات اعصاب محیطی معرفی شد. روش‌های مورد استفاده در این بخش شامل بررسی میزان چسبندگی سلول‌ها به داربست، ارزیابی میزان بقاء سلول‌ها و تکثیر سلولی از طریق روش MTT و ارزیابی میزان سلول‌های تمایزیافته است. جهت بررسی درصد سلول‌های تمایزیافته به سلول‌های شوان از روش رنگ‌آمیزی ایمونوفلورسنت مارکرهای GFAP، MBP، S100 استفاده شد و نتایج نشان داد بیشترین درصد بیان مارکرهای اختصاصی ذکرشده در داربست PLGA/CS تهیه‌شده به روش تک سرنگی با نسبت ۷۰/۳۰ با آرایش الیاف هم‌راستا به‌ترتیب برابر ۸۹/۵، ۸۵/۷ و ۹۶/۱ درصد حاصل شد. هر مرحله از آزمایش‌ها سه بار تکرار شد و آنالیز آماری داده‌ها با استفاده از نرم‌افزار SPSS-17 و تجزیه و تحلیل یافته‌ها با استفاده از روش One Way ANOVA انجام شد. این نتایج نشان داد که داربست‌های PLGA/CS با آرایش الیاف هم‌راستا قابلیت کاربرد وسیع جهت ترمیم و بازسازی اعصاب محیطی دارند.

کلمات کلیدی: مهندسی بافت عصب، داربست نانوالیاف، پلی‌لاکتیک‌گلیکولیک‌اسید، کیتوزان، سلول‌های شوان

فصل اول
مقدمه

۱-۱- مقدمه‌ای بر مهندسی بافت

یکی از مشکلاتی که علم پزشکی همواره با آن روبرو بوده است، ارائه‌ی درمان قطعی برای بافت‌ها و اندام‌های آسیب‌دیده و از بین رفته است. روش معمول برای درمان این نوع ضایعات، روش‌های پیوند عضو و یا بافت است که خود، مشکلات عدیده‌ای از جمله کمبود عضو اهدایی، هزینه‌ی بالای پیوند و عوارض ثانویه ناشی از ورود بافت و عضو جدید درون بدن گیرنده را دارد [۱ و ۲]. در سال‌های اخیر با گسترش علم بین رشته‌ای مهندسی بافت[1] که تلفیقی از به‌کارگیری روش‌های سلولی، مهندسی و علم مواد در ساخت بافت‌های زنده است، روزنه‌ی امیدی برای درمان و ترمیم ضایعات بافتی و نقص عضو پدید آمده است. با استفاده از این فناوری، سلول‌های ناحیه‌ای از بدن یا سلول‌های بنیادی را در محیط خارج بدن کشت داده و سپس مجتمع سلولی رشد کرده و یا تمایزیافته را وارد بدن فرد بیمار می‌کنند. در بیشتر مواقع، تکثیر و تمایز سلول‌ها بر روی بسترهایی صورت می‌گیرد که تقلیدی از ماتریکس خارج سلولی[2] سلول‌های حیوانی است (شکل (۱-۱)) [۳].



شکل (۱-۱) ساختمان ماتریکس خارج سلولی سلول‌های حیوانی [۳]

[1] Tissue Engineering
[2] Extracellular Matrix

۱-۱-۱- ویژگی‌های داربست‌های سلولی مورد استفاده در مهندسی بافت

بافت‌های بدن از سلول‌هایی تشکیل شده‌اند که بر روی چارچوب یا داربستی که ماتریکس خارج سلولی نامیده می‌شود قرارگرفته‌اند. ماتریکس خارج سلولی شبکه‌ای از الیاف کلاژن، الاستین، فیبروئین و تعدادی دیگر از پروتئین‌ها است که حفاظت مکانیکی برای سلول‌ها ایجاد کرده و مسیری برای انتقال مواد غذایی و دفع مواد زاید نیز فراهم می‌آورد. در ضمن مولکول‌هایی نیز در ساختار این داربست وجود دارد که به‌وسیله‌ی گیرنده‌های سطحی سلول‌ها شناسایی شده و به آن‌ها متصل می‌گردند. لازم به‌ذکر است که ماتریکس خارج سلولی در بافت‌های مختلف متفاوت است، به همین علت در ساخت داربست‌های سلولی مبنا را بافت هدف قرار داده و داربست را براساس خصوصیات فیزیولوژیکی بافت هدف طراحی می‌کنند. داربست‌های تولیدشده در مهندسی بافت باید از نظر ساختاری مشابه ماتریکس خارج سلولی باشند و تا حد ممکن ساختار شیمیایی مشابهی نیز داشته باشند تا چسبیدن، رشد وتمایز سلول‌ها بر روی آن‌ها به‌خوبی صورت گیرد [٤]. انواع گوناگونی از داربست‌های سلولی در مهندسی بافت استفاده می‌شوند. همانطورکه در بالا اشاره شد این داربست‌ها همگی تقلیدی از ماتریکس خارج سلولی می‌باشند و لذا باید ویژگی‌هایی را دارا باشند. این ویژگی‌ها به‌طور مختصر در ادامه بیان شده است:

- متخلخل‌بودن (همانند ماتریکس خارج سلولی)

اولین موردی که در رابطه با داربست‌های سلولی باید مد نظر قرار داد، تخلخل داربست است، چرا که نفوذ و رشد سلول‌ها درون داربست به تخلخل آن وابسته است. اندازه‌ی خلل و فرج داربست‌های سلولی باید در حدود اندازه‌ی سلول‌ها باشد. زیرا اگر اندازه‌ی حفرات بزرگ باشد سلول توان چسبیدن به آن را نداشته و اگر هم اندازه‌ی حفرات کوچک باشد، نفوذ به درون داربست به‌سختی امکان‌پذیر است. در داربست‌های متخلخل عبور مواد مغذی به درون داربست به‌راحتی صورت می‌گیرد. همچنین متخلخل‌بودن داربست باعث می‌شود چگالی بالایی از سلول‌ها بر روی آن قرار گیرد [۲].

- زیست‌سازگاری[1]

زیست‌سازگاری داربست‌های سلولی یکی از مباحث بسیار مهم در طراحی و ساخت داربست‌ها است. چرا که رفتار ثانویه‌ی سلول و اینکه آیا پاسخ آلرژیک در بافت ایجاد می‌کند یا نه، به‌طور مستقیم با زیست‌سازگاری داربست ارتباط دارد [۳].

- زیست تخریب‌پذیری[2]

زیست تخریب‌پذیری نیز یکی دیگر از خصوصیات ضروری داربست‌های سلولی است. مواد مورد استفاده در تهیه‌ی داربست‌های سلولی باید به‌دلایل زیر زیست تخریب‌پذیر باشند:

---

[1] Biocompatibility
[2] Biodegradability

- نیاز به خارج‌کردن داربست از داخل بدن توسط عمل جراحی ثانویه نباشد.
- داربست مورد استفاده، تخریب و به‌تدریج به‌جای آن بافت طبیعی جایگزین شود.
- تخریب داربست به مرور زمان، باعث کاهش پاسخ‌های مزمن بدن به داربست به‌عنوان یک جسم بیگانه می‌شود [۵].

پارامترهای موثر در تخریب داربست‌های سلولی را می‌توان در جدول (۱-۱) مشاهده نمود.

جدول (۱-۱) پارامترهای موثر در تخریب داربست‌های سلولی [٦]

مواد	داربست	محیط خارج	محیط داخل
ترکیب	اندازه	محیط	مکان‌های تماس با سلول
ساختار	جرم	pH	نوع سلول
وزن مولکولی	تخلخل	شدت جریان سیال	ایمونولوژی
اتصالات عرضی	نسبت سطح به حجم	دما	آنزیم‌ها
	شکل هندسی	تعداد سلول‌ها	سیستم عروقی بافت هدف
	توپوگرافی سطح	فعالیت سلول‌ها	
	شیمی سطح	قدرت یونی	

۱-۱-۲- مواد مورد استفاده در ساخت داربست‌های سلولی

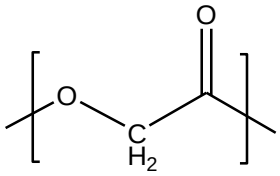
در ساخت داربست‌های سلولی نکات زیادی را باید مد نظر قرار داد. پارامترهای مورد بحث که ویژگی‌های داربست را تعیین می‌کنند، به‌طور عمده به مواد مورد استفاده در ساختمان داربست برمی‌گردد. اغلب برای ساخت داربست‌های سلولی از ٤ نوع ماده استفاده می‌شود که در زیر به آن‌ها اشاره می‌شود و خواص هر کدام نیز بحث می‌شوند.

- مواد آلی سنتزی

بیشتر پلیمرهای سنتزی که در مهندسی بافت و سامانه‌های رهایش دارو استفاده می‌شوند جزء خانواده‌ی پلی‌استرهای آلیفاتیک خطی می‌باشند. این پلیمرها شامل پلی‌لاکتیک اسید (PLA)، پلی‌گلایکولیک اسید (PGA)، پلی‌کاپرولاکتون (PCL)، پلی‌هیدروکسی آلکانوآت‌ها (PHA) و کوپلیمرهای متشکل از این پلیمرها مانند پلی‌لاکتیک‌گلایکولیک‌اسید (PLGA) می‌باشند. این پلیمرها همگی زیست‌سازگار و زیست تخریب‌پذیر هستند که توسط سازمان غذا و دارو آمریکا[1] (FDA) تایید شده است. پلی‌لاکتیک‌اسید، پلی‌گلایکولیک اسید و کوپلیمر متشکل از این دو پلیمر، از پلیمرهای سنتزی می‌باشند و کاربرد بسیاری در زمینه‌ی مهندسی بافت و رهایش دارو

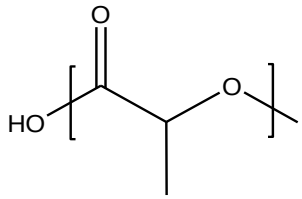
[1] Food & Drug Administration

دارند. پلی‌گلایکولیک اسید (PGA) پلی‌استری خطی است که آبدوست بوده و به‌راحتی هیدرولیز می‌شود و محصول هیدرولیز آن، گلایکولیک‌اسید است که یکی از متابولیت‌های سلولی است. تاکنون استفاده‌های زیادی از پلی‌گلایکولیک‌اسید در پژوهش‌های مهندسی بافت شده است. در شکل (۱-۲) ساختار (PGA) نشان‌داده شده است. به‌علت آبدوستی این پلیمر، داربست‌های تولیدی از آن خواص مکانیکی مطلوبی نداشته و بسته به نوع داربست تولیدی از این پلیمر، زمان تخریبی بین ۲ تا ۲٤ هفته دارند [۷ و ۸].



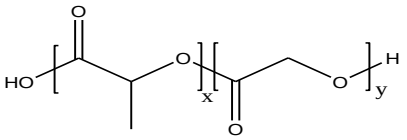
شکل (۱-۲) پلی‌گلایکولیک‌اسید (PGA) [۷]

پلی‌لاکتیک‌اسید نیز یکی از پلی‌استرهای آلیفاتیک خطی است که کاربردهای مختلفی در پزشکی و مهندسی بافت دارد. شکل (۱-۳)، ساختار شیمیایی پلی‌لاکتیک‌اسید را نشان می‌دهد. اگر چه از نظر ساختاری، پلی‌لاکتیک‌اسید بسیار شبیه به پلی‌گلیکولیک‌اسید می‌باشد، ولی خواص شیمیایی، فیزیکی و مکانیکی این دو پلیمر به‌دلیل حضور گروه جانبی متیل موجود در پلی‌لاکتیک‌اسید، بسیار متفاوت هستند.



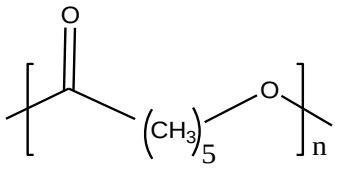
شکل (۱-۳) پلی‌لاکتیک‌اسید (PLA) [۷]

به‌دلیل وجود گروه جانبی متیل در ساختار آن، این پلیمر می‌تواند به‌صورت ایزومرهای L، D و مخلوطی از این ایزومرها (LD) باشد. این ایزومرها نیز تفاوت‌هایی با یکدیگر دارند. به‌عنوان مثال ایزومر LD آمورف و ایزومر L بلورین است. در نتیجه، نرخ تخریب ایزومر LD نسبت به ایزومرL سریع‌تر است. وجود گروه‌های متیل در ساختار پلی‌لاکتیک‌اسید، آن را تبدیل به پلیمری آب‌گریز کرده و این امر باعث کاهش نرخ تخریب‌پذیری آن نسبت به پلی‌گلیکولیک‌اسید شده است [۵، ۹ و ۱۰]. به‌منظور دست‌یابی به تخریب‌پذیری مناسب، نسبت‌های مختلف پلی‌لاکتیک‌اسید و پلی‌گلیکولیک‌اسید (بسته به نوع کاربرد و نرخ تخریب مورد نیاز) به‌صورت کوپلیمر، استفاده می‌شود. به‌طوری که هر چقدر درصد پلی‌لاکتیک‌اسید بیشتر باشد، سرعت تخریب داربست کمتر است. انتخاب درصد این دو پلیمر در کوپلیمر مربوطه اغلب به نوع سلول‌هایی که بر روی داربست کشت داده می‌شوند، بستگی دارد [۸ و ۹]. در شکل (۱-٤) ساختار شیمیایی این پلیمر نشان داده شده است.



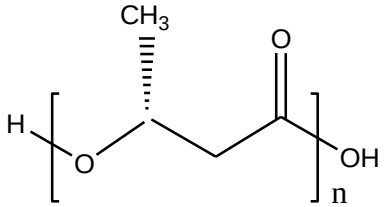
شکل (۱-٤) پلی‌لاکتیک گلایکولیک اسید(PLGA) x: PLA, y: PGA [۷]

پلی‌کاپرولاکتون نیز یکی دیگر از پلی‌استرهای آلیفاتیک خطی است که در تحقیقات مهندسی بافت به‌کار می‌رود. ساختمان شیمیایی پلی‌کاپرولاکتون در شکل (۱-۵)، آمده است. این پلیمر نیمه بلوری بوده و تخریب آن به کندی در داخل بدن صورت می‌گیرد. پلی‌کاپرولاکتون نسبت به PGA، PLA و کوپلیمرهای آن‌ها با سرعت آهسته‌تری تخریب می‌شود و به همین دلیل این پلیمر، در مواردی که نیاز به سرعت تخریب آهسته باشد و همچنین در کاربردهای رهاسازی کنترل شده دارو، استفاده می‌شود. جهت دستیابی به نرخ تخریب سریع‌تر این پلیمر، کوپلیمر و یا مخلوط آن با پلیمرهایی که نرخ تخریب سریع‌تر دارند، استفاده می‌شوند. به‌عنوان مثال استفاده از کوپلیمر پلی‌کاپرولاکتون با پلیمرهایی که نرخ تخریب سریع‌تر دارند، منجر به افزایش نرخ تخریب پلی‌کاپرولاکتون خواهد شد [۵ و ۱۱].



شکل (۱-۵) پلی‌کاپرولاکتون (PCL) [۵]

پلی هیدروکسی‌آلکانوآت‌ها (PHA) نیز گروهی دیگر از پلی‌استرهای تخریب‌پذیراند که به‌صورت سنتزی و نیز توسط میکروارگانیزم‌ها تولید می‌شوند. این دسته شامل پلی‌هیدروکسی‌بوتیرات (PHB)، پلی‌هیدروکسی‌والرات (PHV)، پلی‌هیدروکسی‌اکتانوآت (PHO) و کوپلیمرهای متشکل از آن‌ها هستند. به‌دلیل طبیعت آب‌گریز این پلیمرها، سرعت تخریب آن‌ها در داخل بدن بسیار آهسته است و به همین دلیل نسبت به پلی‌استرهای دیگر به میزان کمتری در مهندسی بافت به‌کار می‌روند [۱۲]. ساختمان شیمیایی پلی‌هیدروکسی‌بوتیرات (PHB) در شکل (۱-۶)، آمده است.



شکل (۱-۶) پلی‌هیدروکسی‌بوتیرات (PHB) [۵]

پلیمرهایی مانند پلی‌فسفراسترها، پلی‌فسفازین‌ها، پلی‌ارتواسترها، پلی‌انیدریدها، پلی‌آمینواسیدها، پلی‌یورتان‌های تخریب‌پذیر، پلی‌پروپیلن‌فومارات، پلیمرهای مشتق‌شده از تیروزین و پلی‌دی‌اکسان‌ها و ... نیز در تحقیقات مهندسی بافت استفاده شده‌اند [۱۳].

ژانگ[1] و همکارانش در تحقیقات خود مقایسه‌ای بین خصوصیات داربست‌های نانوالیاف تهیه‌شده از ٦ نوع پلی‌استر پلی‌گلیکولیک‌اسید، پلی‌لاکتیک‌کوگلیکولیک‌اسید (۵۰:۵۰)، پلی‌لاکتیک‌کوگلیکولیک‌اسید (G:L=۱۵:۸۵)، پلی‌ال‌لاکتیک‌اسید، پلی‌ال‌دی‌لاکتیک‌اسید و پلی‌کاپرولاکتون انجام داده‌اند [۱٤]. در اثر قرارگرفتن

[1] Zhang

پلی‌گلیکولیک‌اسید در محیط‌های بیولوژیکی، الیاف تخریب شده و طول آن‌ها کوتاه و به مرور زمان پودر می‌شوند. در مورد پلی‌ال‌دی‌لاکتیک‌اسید و پلی‌لاکتیک‌کوگلیکولیک‌اسید) با نسبت‌های (۵۰:۵۰) و (۸۵:۱۵)، الیاف متورم شده و سپس ساختار متخلخل داربست تخریب می‌شود.

- مواد معدنی سنتزی

مواد معدنی سنتزی به‌علت ساختار محکم و شکننده‌ی خود بیشتر به‌عنوان داربست سلولی برای بافت‌های سخت مانند استخوان در نظر گرفته می‌شوند. از جمله این مواد می‌توان به گروه‌های شیشه‌های زیست فعال[1] متخلخل و کلسیم فسفات‌ها اشاره کرد که دارای خواص زیست‌سازگاری و زیست فعالی هستند. در میان کلسیم فسفات‌ها، β-تری‌کلسیم‌فسفات (β - TCP)، هیدروکسی‌آپاتیت (HAP) و مشتقات آن به میزان فراوانی در مهندسی بافت‌های سخت، به‌ویژه استخوان استفاده می‌شوند [۲]. خواص سطحی داربست‌های تهیه‌شده از این مواد باید به‌گونه‌ای باشند که چسبندگی سلول‌های استئوبلاست و رشد و تکثیر آن‌ها بر روی این مواد به‌خوبی صورت گیرد. یکی از مشکلات مواد معدنی در تهیه‌ی داربست‌ها این است که به سختی می‌توان با آن‌ها ساختار متخلخل ایجاد کرد و از نظر مکانیکی شکننده هستند. به‌منظور غلبه بر این مشکلات، این مواد به‌صورت کامپوزیت با پلیمرهای طبیعی یا مصنوعی برای مهندسی بافت استخوان به‌کار می‌روند. با استفاده از این کامپوزیت‌ها، داربست بسیار متخلخل با خواص مکانیکی مناسب تهیه می‌شود. کامپوزیت پلیمر/ ماده معدنی برای کاربرد در بافت‌هایی که ساختمان معدنی دارند استفاده می‌شوند [۸]. برای تقلید اندازه بلورهای معدنی که در استخوان یا سایر بافت‌های معدنی وجود دارد، نانو هیدروکسی‌آپاتیت‌ها با پلیمرهای مصنوعی یا طبیعی ترکیب و در مهندسی بافت به‌کار گرفته شده‌اند. کاربرد پلیمر به‌صورت کامپوزیت نه تنها خواص مکانیکی پلیمر را بهبود می‌بخشد، بلکه باعث افزایش جذب پروتئین و در نتیجه باعث بهبود چسبندگی سلول‌ها می‌شود [۵ و ۱۵].

- مواد آلی طبیعی

این مواد شامل پلیمرهای زیستی هستند، که زیست تخریب‌پذیر بوده و تخریب آن‌ها به‌واسطه‌ی واکنش‌های آنزیمی صورت می‌گیرد. مزیت اصلی در استفاده از پلیمرهای زیستی، زیست فعال‌بودن آن‌ها است که همین ویژگی باعث افزایش آبدوستی سطح داربست‌ها و همچنین چسبیدن سلول به سطح داربست‌های حاصل از این مواد می‌شود. این پلیمرها معایبی نیز دارند که از آن جمله می‌توان به پایین‌بودن خواص مکانیکی و تخریب سریع آن‌ها اشاره کرد. زیست پلیمرهایی که در مهندسی بافت و سامانه‌های رهایش دارو استفاده می‌شوند به دو دسته‌ی پلی‌ساکاریدها و پلی‌پپتیدها تقسیم می‌شوند [۲].

[1] Bioactive

الف) پلی‌پپتیدها

- کلاژن

کلاژن جزء اصلی بافت‌های ساختاری پستانداران است. در حال حاضر ۱۹ نوع مختلف کلاژن وجود دارد که فراوان‌ترین آن کلاژن نوع I است. کلاژن از ۳ زنجیره‌ی پلی‌پپتیدی تشکیل شده است که به‌هم پیچیده شده‌اند و یک مارپیچ سه تایی تشکیل می‌دهند. زنجیره‌های پلی‌پپتیدی موجود از سکانس‌های تکراری Glycine-X-Y تشکیل شده‌اند که X و Y در بیشتر مواقع به‌ترتیب پرولین و هیدروکسی‌پرولین هستند. وجود ریشه‌های چسبنده در ساختار کلاژن باعث می‌شود که سطحی جاذب و چسبنده برای اتصال سلول‌ها داشته باشد [۱٦]. کلاژن به آسانی هیدرولیز شده و خصوصیات مکانیکی مناسبی هم ندارد و در بیشتر موارد برای استحکام‌دادن به آن، با گلوتارآلدهید در ساختار آن، پیوندهای عرضی ایجاد می‌شود [۱۷]. از کلاژن به‌علت داشتن مکان‌های اتصال پروتئین‌های اینتگرین در پژوهش‌های مهندسی بافت استفاده‌های فراوانی شده است. کلاژن نوع II برای اتصال کندروسیت‌ها و رشد و تمایز آن‌ها مناسب‌اند [۱۸].

- ژلاتین

ژلاتین از نظر ساختار شیمیایی مشابه کلاژن است ولی برخلاف کلاژن دارای خصوصیات مکانیکی بسیار ضعیفی است. ژلاتین از دناتوره‌کردن مارپیچ ۳تایی کلاژن به یک مولکول تک رشته‌ای حاصل می‌شود. در آب حل‌شده و با تغییر دما به حالت ژل درمی‌آید. به‌راحتی هیدرولیزشده و برای استحکام‌بخشیدن به آن، با گلوتارآلدهید در ساختار آن، پیوندهای عرضی ایجاد می‌کنند [۱۹]. ژلاتین نیز دارای مکان‌های اتصال پروتئین‌های اینتگرین است و باعث چسبیدن سلول‌ها به داربست‌هایی می‌شود که درون ساختار خود این ماده را دارند. ژلاتین استحکام مکانیکی مناسبی نداشته، به همین دلیل اغلب آن را با یک جزء که از لحاظ مکانیکی استحکام بیشتری دارد در ساختار داربست‌های سلولی به‌کار می‌برند. برای مثال می‌توان به کشت سلول‌های عصبی بر روی داربست‌های نانوالیاف حاصل از پلی‌کاپرولاکتون و ژلاتین اشاره کرد [۱۱، ۱۶ و ۲۰].

- ابریشم

ابریشم الیافی است که اساس پروتئینی دارد. ساختار اولیه‌ی ابریشم واحدهای تکراری پروتئین غنی از گلیسین است. ساختار دوم ابریشم، صفحه‌ی β است که در واقع استحکام مکانیکی فوق‌العاده بالای ابریشم نیز به‌خاطر همین ساختار است. اتصال و رشد مثبت سلول‌های فیبروبلاست در داربست‌های حاوی ابریشم مشاهده شده است. اخیراً سلول‌های استئوبلاست رشد داده شده بر روی داربست حاصل از فیبروئین ابریشم خصوصیات سلول‌های استخوانی را نشان داده‌اند [۲۱].

ب) پلی‌ساکاریدها

- آگاروز

پلی‌ساکاریدی است که از جلبک‌ها استخراج شده و به‌علت گروه‌های هیدروکسیل که در ساختار خود دارد، در آب حل شده و به‌وسیله‌ی واکنش‌های آنزیمی به‌راحتی تخریب می‌شود. در تحقیقات مهندسی بافت برای کشت سلول‌های غضروف و سلول‌های عصبی استفاده شده است [۲۲ و ۲۳].

- آلژینات

پلی‌ساکاریدی آنیونی است که همانند آگاروز از جلبک‌ها به‌دست می‌آید. محلول در آب بوده و به‌عنوان داربست‌های سلولی برای کشت سلول‌های فیبروبلاست استفاده شده است [۱۶].

- هیالورونیک اسید

هیالورونیک اسید، گلیکوزآمینوگلیکان عمده در ماتریکس خارج سلولی است. این زیست پلیمر، پاسخ‌های ایمنی ایجاد نکرده و چسبندگی نیز ندارد. به‌راحتی در آب حل شده و به سرعت تحت واکنش‌های آنزیمی تخریب می‌شود [۱۶].

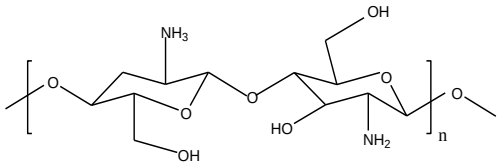
- کیتوزان

اولین کیتوزان[1] کشف شده در سال ۱۸۵۹ توسط روگت[2] وقتی که کیتین را در یک محلول هیدروکسیدپتاسیم می‌جوشاند به‌دست آمد. کیتوزان یک پلی‌ساکارید به‌دست آمده به‌وسیله‌ی استیل‌زدایی[3] کیتین[4] است. کیتین جزء اصلی از پوشش خارجی بدن (مو، استخوان یا پوست) سخت‌پوستان (خرچنگ) بوده و یک نوع پلیمر زیستی[5] است. جداسازی کیتین از ۳ منبع صورت مي‌گیرد که عبارتند از: ۱- سنگواره سخت‌پوستان ۲- حشرات ۳- قارچ‌ها

کیتوزان، پلیمری خطی با ساختاری ساکاریدی است که از استیل‌زدایی پلیمر طبیعی کیتین به‌دست می‌آید. به‌دلیل وجود گروه‌های آمینی در کیتوزان، این پلیمر دارای خصوصیات منحصر به فردی است که از آن جمله می‌توان به قابلیت زیستی، غیرسمی بودن و سازگاری با سلول‌ها و بافت‌ها اشاره نمود [۲٤].کیتوزان محصول استیل‌زدایی‌شده زیست پلیمر کیتین است. این پلیمر دارای ساختمان گلوکز آمینی بوده که پلی‌ساکاریدی خطی است که از پیوندهای(۱-۴)β D–گلوکزآمین و گروه‌های N–استیل تشکیل شده است (شکل (۱-۷)). کیتوزان زیست پلیمری کاتیونی است و در محلول‌های آبی با pH بیشتر از ۷ حل نمی‌شود. به‌علت داشتن گروه‌های آمین در ساختار خود،

[1] Chitosan
[2] Rouget
[3] Deacetylation
[4] Chitin
[5] Biopolymer

باعث افزایش آبدوستی سطح داربست‌ها شده و در نتیجه باعث چسبندگی سلول‌ها به سطح داربست می‌شود و در مواردی نیز باعث بیان پروتئین‌های ماتریکس خارج سلولی می‌شود [۲۲ و ۲۵].



شکل (۱-۷) ساختمان شیمیایی کیتوزان [۲۲]

از کاربردهای کیتوزان می‌توان به‌اختصار به موارد زیر اشاره کرد [۲۶]:

- تیمار آب‌های زائد (رفع یون‌های فلزی)
- انعقاد (پروتئین- رنگ و آمینواسیدها)
- تثبیت آنزیمی
- فیلم‌ها و پوشش‌های خوراکی
- ضدکلسترول
- دفع ضایعات رادیواکتیو
- آرایشی
- التیام جراحات
- سیستم توزیع و آزادسازی دارو
- کاربردهای پزشکی زیستی
- درمان (ضدسرطان)
- صاف‌کردن نوشیدنی‌ها
- کاربرد در صنایع غذایی
- کروماتوگرافی

با توجه به موارد بیان شده ملاحظه می‌شود یکی از کاربردهای ویژه کیتوزان کاربردهای پزشکی زیستی آن می‌باشد. استفاده از کیتوزان در ساخت داربست‌های مهندسی بافت اغلب به‌صورت محلول و در ترکیب با سایر محلول‌های پلیمری رایج است. در این کاربرد و سایر موارد کاربرد، استفاده از کیتوزان به‌شکل نانوذره تاثیر چشمگیرتری داشته و موثرتر عمل می‌کند. استفاده از کیتوزان به‌صورت نانوذره منجر به افزایش مساحت سطح کیتوزان شده و سطح تماس موثر را افزایش می‌دهد. روش‌های مختلفی برای تهیه نانوذرات کیتوزان وجود دارد که از آن جمله می‌توان به‌روش آسیاب‌کاری[1] [۲۷]، روش امولسیون معکوس[2] [۲۸] و روش ژل‌شدن یونی[3] [۲۹- ۳۱] اشاره کرد.

یکی از روش‌های رایج سنتز نانوذرات کیتوزان، روش ژل‌شدن یونی است. در این روش تولید نانوذرات براساس کنترل پلیمریزاسیون پلیمر طبیعی کیتوزان با استفاده از واکنشگرهای جانبی انجام می‌شود. واکنشگر اصلی مورد استفاده در این روش سدیم‌تری‌پلی‌فسفات است. آنیون‌های تری‌پلی‌فسفات با بار الکتریکی منفی با حضور در کنار محلول پلیمری کیتوزان منجر به خودداری از پلیمریزاسیون کنترل‌نشده و بی‌رویه‌ی کیتوزان می‌شوند و با کنترل پارامترهای مختلفی نظیر غلظت محلول پلیمری کیتوزان، غلظت آنیون‌هایی با بار منفی تری‌پلی‌فسفات، مدت زمان واکنش و دمای واکنش، نانوذرات کیتوزان در محلول شروع به تشکیل می‌کنند. با نظارت کامل بر پارامترهای موثر

[1] Ultrafine milling
[2] Reverse emulsion
[3] Ionotropic gelation