



Investigation of the Effects of Hydroxyapatite Particles and Carbon Nanotubes on the Mechanical and Biological Properties of Chitosan/Gelatin Composites

Samaneh Nikpar ¹, Alireza Khavandi ^{2*}, Jafar Javdpour ², Hamidreza Rezaie ²

¹ MSc Student, School of Materials and Metallurgical Engineering, Iran University of Science and Technology, Tehran, Iran.

² Professor, School of Materials and Metallurgical Engineering, Iran University of Science and Technology, Tehran, Iran.

*Corresponding Author's Email: khavandi@just.ac.ir

Paper History:

Received: 2025-01-21

Revised: 2025-03-09

Accepted: 2025-04-22

Keywords:

Chitosan/Gelatin Hydrogel,
Hydroxyapatite,
Carbon Nanotubes

Abstract In this study, gelatin/chitosan hydrogels were synthesized using polymer casting and freeze-drying techniques. The effects of varying concentrations of hydroxyapatite (HA) particles and carbon nanotubes (CNTs) on the mechanical and biological properties of the scaffolds were investigated. Scanning Electron Microscopy (SEM) images showed that increasing the concentrations of HA and CNTs resulted in a reduction of the average pore size from $221 \pm 5.53 \mu\text{m}$ to $80 \pm 2 \mu\text{m}$ and $144 \pm 3.61 \mu\text{m}$, respectively. Water absorption capacity decreased from 2516% to 1367% and 1509% upon increasing HA and CNT content, respectively. Furthermore, the degradation rate of the scaffolds under in vitro conditions was reduced followed by the addition of nanoparticles. Compressive strength tests revealed that the Young's modulus increased from $1.09 \pm 0.05 \text{ MPa}$ up to $4.92 \pm 0.22 \text{ MPa}$ and $2.90 \pm 0.13 \text{ MPa}$ as the HA and CNT concentrations increased, respectively. These findings suggest that gelatin/chitosan hydrogels containing HA particles and CNTs exhibit desirable microstructural properties, including uniform distribution of interconnected pores, enhanced swelling capacity, and improved mechanical performance, making them promising candidates for tissue engineering applications.



<https://doi.org/10.30501/jamt.2025.500143.1317>

URL: https://www.jamt.ir/article_219684.html

1. INTRODUCTION

Hydrogels have garnered significant attention as scaffolds for tissue engineering due to their structural similarity to the extracellular matrix, biodegradability, good stability, hydrophilicity, high porosity, interconnected pores, high swelling capacity, and ability to retain large amounts of water (Hafezi et al., 2021; Tran et al., 2020). Among natural polymers, gelatin and chitosan are widely employed in tissue engineering owing to their biocompatibility and biodegradability. The mechanical properties and stability of chitosan/gelatin scaffolds can be enhanced by introducing crosslinked networks or incorporating inorganic particles such as hydroxyapatite and carbon-based reinforcements (Moshayedi et al., 2021). In this study, the effects of adding varying amounts of hydroxyapatite particles and Multi-Walled Carbon Nanotubes (MWCNTs) on the mechanical and biological properties of gelatin/chitosan polymer blends were investigated.

2. MATERIALS AND METHODS

Hydroxyapatite (HA) powder was synthesized using calcium nitrate tetrahydrate, di-ammonium hydrogen phosphate, and ammonia (Merck, Germany). Porcine skin gelatin (Gel) (Bloom: 90–130) and medium molecular weight chitosan (Cs) (75–85 % deacetylation, Sigma-Aldrich, Germany) were used, with acetic acid as the solvent. Glutaraldehyde (GA) (MW:100.12 g/mol, Merck, Germany) served as a crosslinker. Multi-walled carbon nanotubes (MWCNTs) (20–30 nm, Tamad Kala,

Iran) and Phosphate-Buffered Saline (PBS) tablets (Tamad Kala, Iran) were also utilized.

2.1. Hydroxyapatite Synthesis

To produce approximately $5/5 \pm 0/5 \text{ g}$ of HA, calcium nitrate tetrahydrate (12 g) was dissolved in 175 mL of deionized water, while di-ammonium hydrogen phosphate (4 g) was dissolved in 125 mL of deionized water under stirring (VS-130SH, Vison Scientific, Korea) at an optimal speed of 500 rpm. The phosphate solution was gradually added dropwise to the calcium solution. The pH was initially ~6 and was adjusted to 10–11 using ammonia. The precipitate was dried at 75°C for 90 minutes, washed thoroughly using a vacuum pump (JP-40V, Kawaki, Taiwan) to remove residual ammonia, and dried again at 75°C for 24 hours. The dried precipitate was ground using an agate mortar and calcined at 600°C (heating rate: $5^\circ\text{C}/\text{min}$) in a furnace (F11L, AZAR, Iran) to obtain the final HA powder.

2.2. Functionalization of Multi-Walled Carbon Nanotubes (f-MWCNTs)

MWCNTs were functionalized using a 1:3 mixture of 65 % nitric acid and 94 % sulfuric acid. One gram of MWCNTs was stirred at 600 rpm (VS-130SH, Vison Scientific, Korea) at $40\text{--}60^\circ\text{C}$ for 24 hours, and then ultrasonicated (3200, BENDELIN, Germany) for 2 hours to prevent agglomeration. After filtration and washing to neutral pH, the nanotubes were dried at 60°C for 24 hours (Shimaz, Iran). Functionalization enhanced oxidation, interfacial bonding, and dispersion. Followed

Please cite this article as: Nikpar, S., Khavandi, A., Javdpour, J. & Rezaie, H. (2025). Investigation of the Effects of Hydroxyapatite Particles and Carbon Nanotubes on the Mechanical and Biological Properties of Chitosan/Gelatin Composites. *Journal of Advanced Materials and Technologies*, Vol. 13, No. 4, 73-85. [In Persian]. <https://doi.org/10.30501/jamt.2025.500143.1317>.

2783-0829/© 2025 The Author(s). Published by MERC.

This is an open access article under the CC BY license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/legalcode>)



by washing to neutral pH, the nanotubes were dried at 60 °C for 24 hours (Shimaz, Iran).

2.3. HA and f-MWCNT Dispersion

HA powder was dispersed in deionized water at concentrations of 1 %, 2 %, and 3 % by weight, stirred at 500 rpm (VS-130SH, Vison Scientific, Korea) for 60 minutes and sonicated for 30 minutes (Model 3200, BENDELIN, Germany). f-MWCNTs were dispersed in deionized water at 0.2 %, 0.3 %, and 0.4 % by weight, stirred at 600 rpm for 4 hours and then sonicated for 2 hours.

2.4. Fabrication of gelatin/chitosan Composite Hydrogels

Chitosan and gelatin were dissolved in 1 % acetic acid and mixed in a 1:4 ratio. HA suspension (1 %, 2 %, 3 %) and f-MWCNT suspension (0.2 %, 0.3 %, 0.4 %) were added. The mixture was dispersed by magnetic stirring at 500 rpm (VS-130SH, Vison Scientific, Korea) and sonication for 30 minutes. Glutaraldehyde (25 %) was diluted to 0.25 % and added at 3 % by volume based on total weight. The mixture was cast into molds, refrigerated, frozen, and freeze-dried (Model 10, Pishtaz Equipment Sazan Co., Iran) for 34 hours. Table 1 presents the naming convention for the hydrogels.

Table 1. Sample codes and weight percentages* of components.

Sample code	Cs:Gel	HA (wt %)	CNTs (wt %)	GA (wt %)
CG	1:4	1	0/2	3
CG-HA2	1:4	2	0/2	3
CG-HA3	1:4	3	0/2	3
CG-CNT0/3	1:4	1	0/3	3
CG-CNT0/4	1:4	1	0/4	3

* The weight percentages were determined by dissolving the specified amount of each component in a solvent, calculated based on the weight of the component relative to the total weight of the mixture

2.5. Characterization of hydrogels

The microstructure of the samples was analyzed using SEM (VEGA-II, TESCAN, Czech Republic). Compressive mechanical properties, swelling behavior, biodegradation, and cytotoxicity were also assessed in this study. Compressive strength was then determined using a uniaxial compressive testing machine (DBBP-50, Bong Shin, Korea).

3. RESULTS AND DISCUSSION

In terms of mechanical properties, the results indicated that increasing the amounts of hydroxyapatite and MWCNTs significantly enhanced the Young's modulus, thereby improving the compressive mechanical properties of the composite hydrogels (Figure 1).

The SEM images and pore size distribution of hydrogels with varying HA and f-MWCNTs concentrations are presented in Figure 2. The average pore sizes of the scaffolds decreased upon increasing HA concentrations, from $221 \pm 5.53 \mu\text{m}$ (CG) to $117 \pm 2.93 \mu\text{m}$ (CG-HA2) and $80 \pm 2 \mu\text{m}$ (CG-HA3), indicating a denser and more stable network. The precipitation of HA particles and electrostatic interactions contributed to reduced porosity, while f-MWCNTs caused a slight reduction in porosity without significantly altering the pore size (Figure 3). Hydrogels with proper dispersion of HA and f-MWCNTs exhibited a uniformly distributed,

interconnected porous structure, favorable for cell attachment and nutrient exchange.

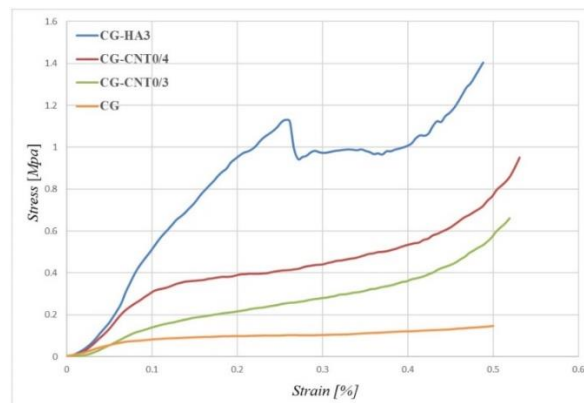


Figure 1. The stress-strain curve of the synthesized composite hydrogels measured under compressive stress in the dry state.

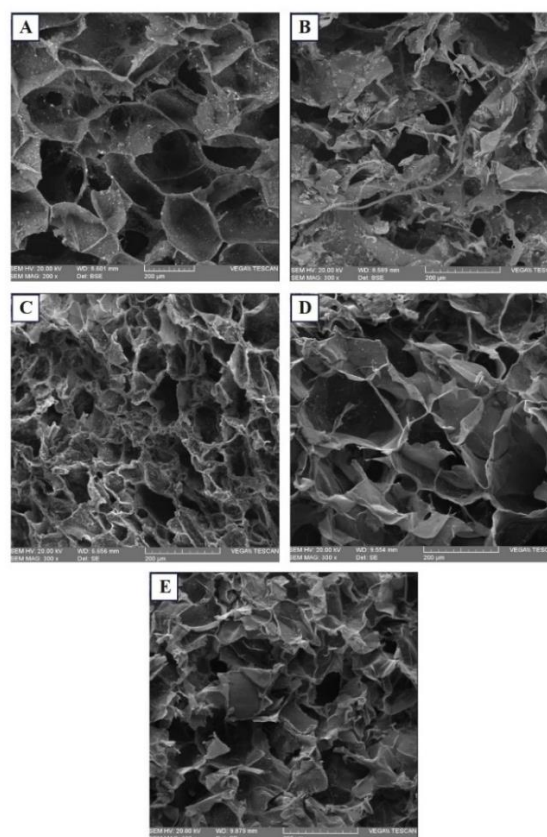


Figure 2. SEM micrograph and pore size distribution of hydrogels A: CG, B: CG-HA2, C: CG-HA3, D: CG-CNT0/3 E: CG-CNT0/4.

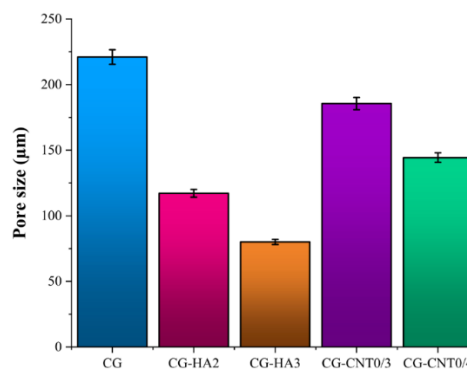


Figure 3. The effect of adding HA and f-MWCNTs on the average porosity of chitosan/gelatin hydrogels.

The results showed that increasing the HA content reduced water absorption and swelling due to the formation of a denser network, whereas f-MWCNTs had a minor effect on swelling (Figure 4). The biodegradation rate decreased with higher concentrations of HA and f-MWCNT, indicating enhanced structural stability (Figure 5). Cytotoxicity testing using the MTT assay demonstrated high cell viability (>70 %) for CG and CG-CNT0/3 hydrogels, confirming their biocompatibility and potential for tissue engineering applications (Figure 6).

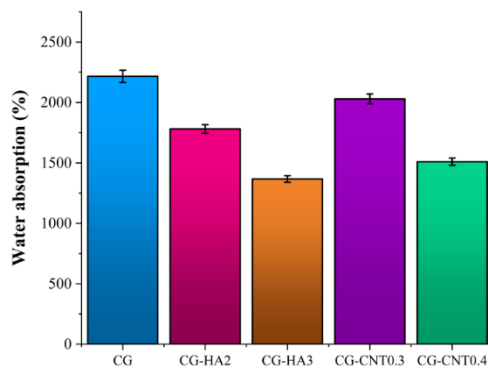


Figure 4. Water absorption capacity of gelatin/chitosan hydrogels containing various amounts of HA and f-MWCNTs in PBS (pH = 7.4) at 37 °C over time.

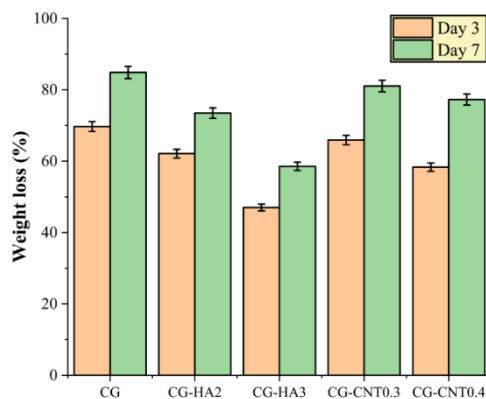


Figure 5. The degradation rate graph of the samples in PBS (pH = 7.4) at 37 °C on days 3 and 7.

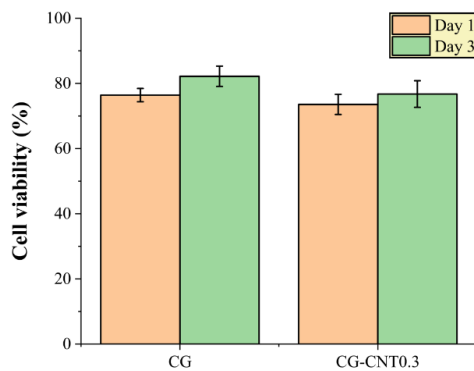


Figure 6. Cellular cytotoxicity test results of CG and CG-CNT0.3 composite hydrogels.

4. CONCLUSION

In conclusion, gelatin/chitosan hydrogels reinforced with hydroxyapatite (HA) and functionalized multi-walled carbon nanotubes (f-MWCNTs) exhibited

improved mechanical and biological properties. Incorporation of HA and f-MWCNTs reduced pore size, water absorption, and degradation rate while enhancing compressive strength and Young's modulus. These modifications resulted in a more stable and dense network structure, making the hydrogels suitable for tissue engineering. Among all samples, CG and CG-CNT0/3 hydrogels exhibited the best overall performance, with optimal mechanical strength, swelling behavior, and biocompatibility. Therefore, CG and CG-CNT0/3 are recommended as the most promising candidates for tissue engineering applications.

REFERENCES

1. Hafezi, M., Khorasani, S. N., Zare, M., Neisiany, R. E., & Davoodi, P. (2021). Advanced hydrogels for cartilage tissue engineering: Recent progress and future directions. In *Polymers* (Vol. 13, Issue 23). MDPI. <https://doi.org/10.3390/polym13234199>
2. Tran, H. D. N., Park, K. D., Ching, Y. C., Huynh, C., & Nguyen, D. H. (2020). A comprehensive review on polymeric hydrogel and its composite: Matrices of choice for bone and cartilage tissue engineering. In *Journal of Industrial and Engineering Chemistry* (Vol. 89, pp. 58–82). Korean Society of Industrial Engineering Chemistry. <https://doi.org/10.1016/j.jiec.2020.06.017>
3. Moshayedi, S., Sarpoolaky, H., & Khavandi, A. (2021). Fabrication, swelling behavior, and water absorption kinetics of genipin-crosslinked gelatin–chitosan hydrogels. *Polymer Engineering and Science*, 61(12), 3094–3103. <https://doi.org/10.1002/pen.25821>



مقاله‌ی کامل پژوهشی

بررسی اثر افزودن ذرات هیدروکسی آپاتیت و نانولوله‌های کربنی بر خواص مکانیکی و زیستی کامپوزیت کیتوسان / ژلاتین

سمانه نیک‌پر^۱، علیرضا خاوندی^{۲*}، جعفر جوادپور^۲، حمیدرضا رضایی^۲

^۱ دانشجوی کارشناسی ارشد، دانشکده‌ی مواد و متالورژی، دانشگاه علم و صنعت ایران، تهران، ایران

^۲ استاد، دانشکده‌ی مواد و متالورژی، دانشگاه علم و صنعت ایران، تهران، ایران

چکیده در این پژوهش، هیدروژل‌های کامپوزیتی ژلاتین/ کیتوسان با استفاده از روش خشک کردن انجمادی تهیه شدند و تأثیر افزودن مقادیر مختلف وزنی هیدروکسی آپاتیت (۱، ۲ و ۳ درصد وزنی) و نانولوله‌های کربنی چندجداره‌ی عامل‌دار شده (۰/۲، ۰/۳ و ۰/۴ درصد وزنی) بر ریزساختار، خواص مکانیکی و زیستی هیدروژل‌ها بررسی شد. نتایج میکروسکوپ الکترونی روبشی (SEM) نشان داد که با افزایش غلظت هیدروکسی آپاتیت، اندازه‌ی منافذ کاهش چشمگیری یافت، به طوری که اندازه‌ی منافذ از $5/53 \pm 221$ میکرومتر در غلظت ۱ درصد وزنی به $2/93 \pm 117$ و 2 ± 80 میکرومتر در غلظت‌های ۲ و ۳ درصد وزنی کاهش یافت. با افزایش غلظت نانولوله‌های کربنی در غلظت‌های ۰/۳ و ۰/۴ درصد وزنی، اندازه‌ی منافذ از $5/53 \pm 221$ میکرومتر به $4/64 \pm 185$ و $3/61 \pm 144$ میکرومتر کاهش یافت. نتایج آزمون‌های مکانیکی نشان داد که با افزایش مقادیر هیدروکسی آپاتیت و نانولوله‌های کربنی، مدول یانگ به طور معناداری افزایش یافت، به طوری که از $1/09 \pm 0/05$ مگاپاسکال به $4/92 \pm 0/22$ و $2/90 \pm 0/13$ مگاپاسکال رسید. همچنین، ظرفیت تورم و نرخ تخریب با افزایش غلظت ذرات کاهش یافت. نتایج آزمون‌های سمیت سلولی نشان داد که هیدروژل‌های انتخاب‌شده هیچ‌گونه سمیت سلولی ندارند و می‌توانند از رشد و تکثیر سلول‌ها حمایت کنند.

تاریخچه‌ی مقاله:

ثبت اولیه: ۱۴۰۳/۱۱/۰۲

بازنگری: ۱۴۰۳/۱۲/۱۹

پذیرش قطعی: ۱۴۰۴/۰۱/۱۹

کلیدواژه‌ها:

هیدروژل کیتوسان/ ژلاتین،

هیدروکسی آپاتیت،

نانولوله‌های کربنی



<https://doi.org/10.30501/jamt.2025.500143.1317>

URL: https://www.jamt.ir/article_219684.html

۱- مقدمه

می‌تواند چسبندگی، مهاجرت، تکثیر و تمایز سلول‌ها را برای ترمیم بافت تسهیل کند (Tran et al., 2020). هیدروکسی آپاتیت دارای زیست‌سازگاری است و به دلیل ساختار و ترکیبات شیمیایی برای اتصال، تکثیر و تمایز سلول‌های بنیادی مزانشیمی (MSCs) مناسب است (Huang et al., 2018). از طرفی، ترکیب نانولوله‌های کربنی در داربستی هیدروژلی باعث بهبود استحکام، انعطاف‌پذیری، القای رگ‌زایی، کاهش ترومبوز و دستکاری بیان ژن برای ترمیم بافت می‌شود (Huang, 2020). در پژوهش حاضر، با بررسی تأثیر افزودن مقادیر مختلفی از ذرات هیدروکسی آپاتیت (۱، ۲ و ۳ درصد وزنی) و نانولوله‌های کربنی

هیدروژل‌ها دسته‌ای از داربست‌ها هستند که به دلیل زیست‌سازگاری عالی و جذب مقادیر آب فراوان (معمولاً ۷۰ تا ۹۹ درصد) به عنوان داربست‌هایی برای مهندسی بافت به شدت به آن‌ها توجه شده است (Hafezi et al., 2021; Tran et al., 2020). ژلاتین و کیتوسان به دلیل زیست‌سازگاری و زیست‌تخریب‌پذیری به طور گسترده در مهندسی بافت به کار می‌روند (Moshayedi et al., 2021). افزودن ذرات تقویت‌کننده‌ی کربنی یا معدنی در داربست‌های کیتوسان/ژلاتین

*عهده‌دار مکاتبات: علیرضا خاوندی

نشانی: تهران، تهران، دانشگاه علم و صنعت ایران، دانشکده‌ی مهندسی مواد و متالورژی، تلفن: ۰۲۱-۷۳۲۲۸۸۸۸، دورنگار: ۰۲۱-۷۷۲۴۰۴۸۰

پیام‌نگار: khavandi@just.ac.ir

خشک شدند. سپس، با استفاده از پمپ خلأ (Kawaki, JP-40V)، تایوان) شست‌وشو داده شدند تا آمونیاک باقی‌مانده حذف شود و دوباره به مدت ۲۴ ساعت در ۷۵ درجه سلسیوس خشک شدند. پس از خشک شدن، رسوب با استفاده از هاون عقیق پودر شد و در دمای ۶۰۰ درجه‌ی سلسیوس (نرخ گرم شدن: ۵ درجه سلسیوس / دقیقه) در کوره (AZAR, F11L، ایران) کلسینه شد تا پودر نهایی هیدروکسی آپاتیت حاصل شود.

۲-۳- عامل‌دار کردن نانولوله‌های کربنی چندجداره

نانولوله‌های کربنی چندجداره (MWCNTs) با استفاده از ترکیب اسید نیتریک ۶۵ درصد و اسید سولفوریک ۹۴ درصد (با نسبت ۱ به ۳) عامل‌دار شدند. یک گرم MWCNTs به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۶۰-۴۰ درجه‌ی سلسیوس با سرعت ۶۰۰ دور در دقیقه هم زده شد (Vison Scientific, VS-130SH، کره)، سپس به مدت ۲ ساعت با دستگاه اولتراسونیک (۳۲۰۰، BENDELIN، آلمان) اولتراسونیک شد تا از تجمع ذرات جلوگیری شود. پس از فیلتر کردن و شست‌وشو تا pH خنثی، نانولوله‌ها به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۶۰ درجه‌ی سلسیوس خشک شدند (Shimaz، ایران) و در نهایت نانولوله‌های کربنی چندجداره‌ی عامل‌دار شده (f-MWCNTs) به دست آمد. عامل‌دار کردن باعث بهبود پراکندگی شد.

۲-۴- پراکنده‌سازی هیدروکسی آپاتیت و f-MWCNT

پودر هیدروکسی آپاتیت در آب دیونیزه در غلظت‌های ۱، ۲ و ۳ درصد وزنی حل شد، به مدت ۶۰ دقیقه با سرعت ۵۰۰ دور در دقیقه هم زده شد (Vison Scientific, VS-130SH، کره) و به مدت ۳۰ دقیقه اولتراسونیک شد (مدل ۳۲۰۰، BENDELIN، آلمان). f-MWCNTs در آب دیونیزه در غلظت‌های ۰/۲، ۰/۳ و ۰/۴ درصد وزنی حل شدند، به مدت ۴ ساعت با سرعت ۶۰۰ دور در دقیقه هم زده و به مدت ۲ ساعت اولتراسونیک شدند. در نهایت، پس از انجام این مراحل، سوسپانسیون‌های هیدروکسی آپاتیت و نانولوله‌های کربنی به دست آمد.

۲-۵- آماده‌سازی هیدروژل‌های کامپوزیتی کیتوسان/ ژلاتین

کیتوسان و ژلاتین در اسید استیک ۱ درصد حل و در نسبت ۱:۴ مخلوط شدند. سوسپانسیون هیدروکسی آپاتیت (۱، ۲ و ۳ درصد وزنی) و سوسپانسیون f-MWCNT (۰/۲، ۰/۳، ۰/۴

چندجداره (۰/۲، ۰/۳ و ۰/۴ درصد وزنی) به مخلوط پلیمری ژلاتین/ کیتوسان، تلاش شده است تا ترکیبی بهینه با تعادل مطلوب میان خواص مکانیکی و زیستی ارائه شود. استفاده‌ی هم‌زمان از این دو تقویت‌کننده در ساختار هیدروژل و به‌کارگیری روش‌های مناسب برای پراکندگی یکنواخت این ذرات در ماتریس پلیمری از چالش‌های موجود در تحقیقات پیشین بوده است. در این مطالعه، هیدروژل‌ها با فرایند خشک کردن انجمادی تهیه شدند و با استفاده از آنالیز طیف‌سنجی تبدیل فوریه‌ی مادون قرمز (FTIR)، میکروسکوپ الکترونی روبشی (SEM) و آزمون مکانیکی فشاری ارزیابی شدند. همچنین، رفتار تورم و زیست‌تخریب‌پذیری داربست‌ها مطالعه شد. نتایج این پژوهش می‌تواند در توسعه‌ی داربست‌های زیستی با ساختاری پایدار و زیست‌سازگاری مطلوب برای کاربردهای مهندسی بافت مؤثر باشد.

۲- مواد و روش تحقیق

۲-۱- مواد

پودر هیدروکسی آپاتیت (HA) با استفاده از نیترات کلسیم چهارآبه، دی‌آمونیم هیدروژن فسفات و آمونیاک (مرک، آلمان) سنتز شد. ژلاتین (Gel) پوست خوک (عدد بلوم: ۹۰-۱۳۰) و کیتوسان (Cs) با وزن مولکولی متوسط (۷۵-۸۵ درصد استیل‌زدایی، سیگما-آلد ریچ، آلمان) به همراه اسید استیک به‌عنوان حلال استفاده شدند. گلو تار آلدهید (GA) (MW: 100.12 g/mol، مرک، آلمان) به‌عنوان عامل اتصال عرضی به کار رفت. نانولوله‌های کربنی چندجداره (MWCNTs) (با قطر ۲۰-۳۰ نانومتر، تماد کالا، ایران) و قرص‌های سالین بافر فسفات (PBS) (تماد کالا، ایران) نیز در این تحقیق استفاده شدند.

۲-۲- سنتز هیدروکسی آپاتیت

برای تولید حدود ۵/۵ ± ۵/۰ گرم هیدروکسی آپاتیت (HA)، ۱۲ گرم نیترات کلسیم چهارآبه در ۱۷۵ میلی‌لیتر آب دیونیزه و ۴ گرم دی‌آمونیم هیدروژن فسفات در ۱۲۵ میلی‌لیتر آب دیونیزه تحت هم زدن توسط همزن مغناطیسی (Vison, VS-130SH، Scientific، کره) با سرعت ۵۰۰ دور در دقیقه حل شد. محلول فسفات تدریجاً به محلول کلسیم اضافه شد. pH اولیه حدود ۶ بود و با افزودن آمونیاک روی ۱۰ تنظیم شد. رسوبات به‌دست‌آمده به مدت ۹۰ دقیقه در دمای ۷۵ درجه‌ی سلسیوس

۲-۶-۲- مطالعه‌ی ریزساختار

ریزساختار و اندازه‌ی حفرات هیدروژل‌های تهیه‌شده با استفاده از دستگاه میکروسکوپ الکترونی روبشی^۱ (مدل VEGA-II، شرکت TESCAN، جمهوری چک) تحت ولتاژ شتاب‌دهنده‌ی ۱۰ یا ۲۰ کیلوولت بررسی شد. بر این اساس، نمونه‌ها در راستای افقی شکسته شدند و برای جلوگیری از تجمع الکترون‌ها در سطح، با لایه‌ی نازکی از نقره یا طلا پوشش داده و با میکروسکوپ الکترونی مطالعه شدند. در ادامه، متوسط اندازه‌ی حفرات هیدروژل‌ها به کمک نرم‌افزار ImageJ (نسخه‌ی ۱/۵۳e) و با انجام حداقل ۱۰۰ اندازه‌گیری در هر گروه از نمونه‌ها محاسبه شد.

۲-۶-۳- ارزیابی رفتار تورم

به منظور بررسی توانایی جذب آب هیدروژل‌ها، نمونه‌های خشک‌شده به مدت ۲۴ ساعت در محلول نمک فسفات با خاصیت بافری (pH= ۷/۴) در دمای 1 ± 37 درجه‌ی سلسیوس غوطه‌ور شدند. سپس، نمونه‌های متورم در فواصل زمانی مشخص از محلول خارج شدند و آب سطحی آن‌ها به آرامی با دستمال کاغذی گرفته شد و وزن نمونه‌های متورم توسط ترازوی آزمایشگاهی (مدل S123، BEL Engineering، ایتالیا) با دقت 0.001 گرم ثبت شد. قابلیت جذب آب هیدروژل‌ها در طول آزمون تورم از طریق رابطه‌ی (۱) محاسبه شد (Moshayedi et al., 2022):

$$\text{Water uptake [\%]} = \frac{W_t - W_0}{W_0} \times 100 \quad (1)$$

در رابطه‌ی فوق، W_t و W_0 به ترتیب نشان‌دهنده‌ی وزن تر هیدروژل‌ها در زمان t و وزن خشک اولیه‌ی آن‌ها است.

جدول ۱. نام‌گذاری هیدروژل‌های کیتوسان/ژلاتین حاوی ذرات هیدروکسی آپاتیت و نانولوله‌های کربنی چندجداره

ردیف	کد نمونه‌ها	کیتوسان: ژلاتین	هیدروکسی آپاتیت (درصد وزنی)	نانولوله کربنی (درصد وزنی)	گلوکار آلدهید (درصد حجمی)
۱	CG	۴:۱	۱	۰/۲	۳
۲	CG-HA2	۴:۱	۲	۰/۲	۳
۳	CG-HA3	۴:۱	۳	۰/۲	۳
۴	CG-CNT0/3	۴:۱	۱	۰/۳	۳
۵	CG-CNT0/4	۴:۱	۱	۰/۴	۳

درصد وزنی) به مخلوط اضافه شدند. مخلوط به دست آمده در ابتدا با هم زدن مغناطیسی در سرعت ۵۰۰ دور در دقیقه (VS-130SH، Vison Scientific، کره) به مدت ۶۰ دقیقه هم زده شد و سپس به مدت ۳۰ دقیقه، به منظور پراکنده‌سازی بهتر ذرات هیدروکسی آپاتیت و نانولوله‌های کربنی، در حمام اولتراسونیک قرار داده شد. در ادامه، گلوکار آلدهید رقیق شده (۲۵/۰ درصد) به مقدار ۳ درصد حجمی، بر اساس وزن کل، به مخلوط اضافه شد. مخلوط در قالب‌ها ریخته شد، در یخچال نگهداری و سپس به مدت ۴۸ ساعت فریز شد و در آخر به مدت ۳۴ ساعت در خشک‌کن انجمادی (مدل ۱۰، شرکت تجهیزات صنعت پیش‌تاز، ایران) خشک شد. جدول ۱ نحوه‌ی نام‌گذاری هیدروژل‌ها را ارائه می‌دهد.

۲-۶-۴- مشخصه‌یابی

۲-۶-۴-۱- بررسی ساختار مولکولی

پیوندهای مشخصه در کامپوزیت‌های حاوی هیدروکسی آپاتیت و نانولوله‌های کربنی چندجداره به کمک آنالیز طیف‌سنجی تبدیل فوریه‌ی مادون قرمز مطالعه شد. برای این منظور، ابتدا هیدروژل‌های سنتز شده به شکل پودر درآمدند و سپس جذب مادون قرمز پودرها در محدوده‌ی عدد موج 4400 تا 440 $[\text{cm}^{-1}]$ با دستگاه طیف‌سنج مادون قرمز Perkin Elmer (مدل Spectrum RX1، ماساچوست، آمریکا) و با قدرت تفکیک 2 $[\text{cm}^{-1}]$ بررسی شد.

۲-۶-۴- ارزیابی رفتار تخریب برون‌تنی

نرخ تخریب هیدروژل‌ها از میزان کاهش وزن^۱ نمونه‌ها در PBS (pH= ۷/۴) در دمای ۳۷ درجه سلسیوس محاسبه شد. وزن خشک هیدروژل‌های تخریب‌شده در فواصل زمانی معین ثبت و درصد کاهش وزن هیدروژل‌ها از طریق رابطه (۲) محاسبه شد. در این رابطه، W_D و W_0 به ترتیب نشان‌دهنده‌ی وزن خشک هیدروژل‌های تخریب‌شده در فواصل زمانی معین t و وزن خشک اولیه نمونه‌ها است (Moshayedi et al., 2022).

$$\text{Water loss [\%]} = \frac{W_0 - W_D}{W_0} \times 100 \quad (2)$$

۲-۶-۵- ارزیابی خواص مکانیکی فشاری

خواص مکانیکی فشاری به کمک دستگاه آزمون استحکام فشاری تک‌محوره (مدل Bong Shin, DBBP-50، کره) بررسی شد. بدین منظور، نمونه‌های استوانه‌ای به ترتیب، به قطر و ارتفاع تقریباً $8/0 \pm 0/2$ میلی‌متر، با لود سل ۵۰ [Kgf] و سرعت ۱ [mm/min] فشرده و مدول الاستیسیته‌ی فشاری هیدروژل‌ها از شیب ناحیه‌ی خطی نمودارهای تنش-کرنش محاسبه شد.

۲-۶-۶- آزمون سمیت سلولی

زنده‌مانی تکثیر سلول‌های MC3T3-E1 روی هیدروژل‌های ساخته‌شده با نانولوله‌های کربنی چندجداره به کمک آزمون MTT بررسی شد. ابتدا نمونه‌ها به ضخامت تقریبی ۲ میلی‌متر بریده و دو بار با PBS شست‌وشو داده شدند. در ادامه، در فواصل زمان ۱ و ۳ روز، ۷۰ میکرولیتر محلول MTT (5ug/ml) افزوده شد و پلیت کشت به مدت ۴ ساعت انکوبه شد. میزان جذب نور محلول‌های بنفش‌رنگ در طول موج ۵۷۰ نانومتر به کمک دستگاه Eliza Plate Reader (Bio Tek Instruments، ورمونت، امریکا) اندازه‌گیری شد.

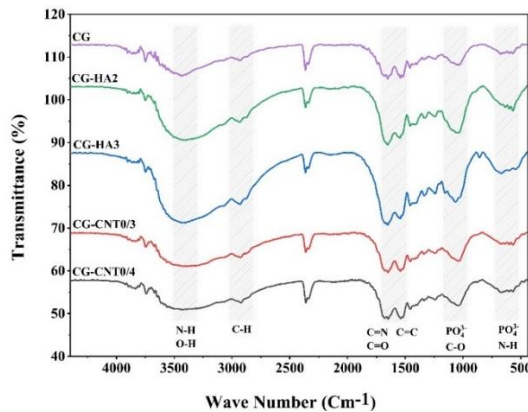
۲-۶-۷- آنالیز آماری

داده‌های کمی این پژوهش، که حاصل حداقل سه اندازه‌گیری تصادفی است، به صورت میانگین \pm انحراف معیار گزارش شد. اختلاف میانگین گروه‌ها با استفاده از آنالیز واریانس در سطح معناداری ۹۵ درصد بررسی (ANOVA) یک‌طرفه شد.

۳- نتایج و بحث

۳-۱- آنالیز تبدیل فوریه‌ی مادون قرمز

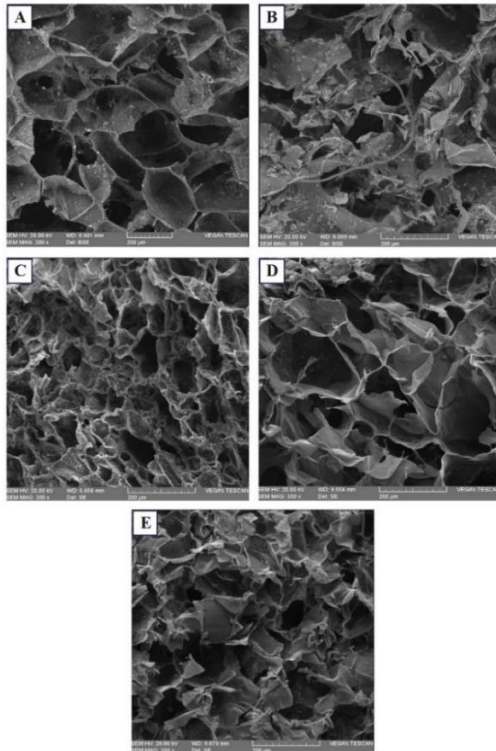
شکل ۱ طیف FTIR داربست‌های هیدروژلی سنتز شده (CG، CG-HA2، CG-HA3، CG-CNT0/3 و CG-CNT0/4) را در محدوده‌ی عدد موج ۴۴۰۰ تا ۴۴۰ $[\text{cm}^{-1}]$ نشان می‌دهد.



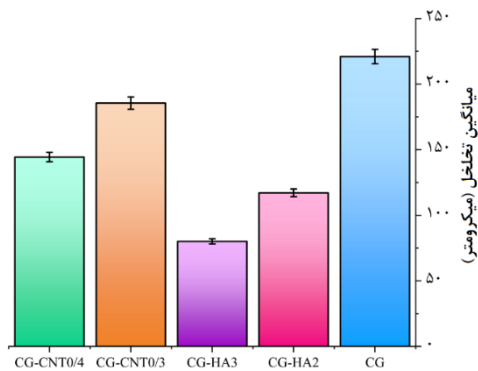
شکل ۱. نتایج حاصل از آنالیز FTIR هیدروژل‌های کامپوزیتی سنتز شده

پیک جذبی در محدوده‌ی عدد موج 3410 cm^{-1} تا 3400 cm^{-1} مربوط به ارتعاشات کششی پیوند N-H است که با نوسانات کششی پیوند O-H نیز هم‌پوشانی دارد (Isikli et al., 2012). همچنین، این پیک نشان می‌دهد که نانولوله‌های چندجداره با گروه‌های کربوکسیلیک اسید (COOH)، که می‌توانند ویژگی‌های هیدروکسیل (OH) را معرفی کنند، عامل‌دار شده‌اند (Rahman, 2018). پیک جذبی ظاهر شده در اعداد موج ۲۹۲۰ تا ۲۹۴۰ مربوط به نوسانات کششی متقارن و نامتقارن پیوند آلیفاتیک C-H است (Mesgar et al., 2018). پیک مشاهده‌شده در محدوده‌ی ۱۶۵۰ تا ۱۶۷۰ به ارتعاشات کششی پیوند C=O مربوط به گروه‌های COOH نانولوله‌های کربنی چندجداره‌ی عامل‌دار شده نسبت داده می‌شود (Rahman, 2018; Zadehnajar et al., 2020). همچنین، این پیک با پیوندهای ایمینی (C=N) ناشی از واکنش بین گروه‌های آمینی NH_2 در کیتوسان و ژلاتین و گروه‌های آلدهیدی -CHO در گلو تار آلدهید دارای هم‌پوشانی است (Harijanto et al., 2022). پیک در محدوده‌ی عدد موج ۱۵۳۰ تا ۱۵۵۰ نشان‌دهنده‌ی ارتعاشات کششی پیوند کربن-کربن در نتیجه‌ی افزودن نانولوله‌های کربنی چندجداره به ماتریس پلیمری کیتوسان/ ژلاتین است.

تأثیر منفی بر تخلخل دارد و ممکن است باعث ایجاد تغییرات غیرعادی در اندازه‌ی منافذ در مقایسه با زمانی شود که هیدروکسی آپاتیت به‌طور یکنواخت پراکنده باشد ([Harijanto et al., 2022](#)).



شکل ۲. تصاویر SEM و توزیع اندازه‌ی منافذ هیدروژل‌های CG: A: CG-CNT0/4، B: CG-HA2، C: CG-HA3، D: CG-CNT0/3، E: CG-CNT0/4



شکل ۳. اثر افزودن هیدروکسی آپاتیت و نانولوله‌های کربنی بر میانگین تخلخل هیدروژل‌های کیتوسان/ ژلاتین

همچنین، افزودن f-MWCNTs در مقادیر بیشتر (۰/۳ و ۰/۴ درصد وزنی) به کاهش جزئی میانگین تخلخل ساختارهای کامپوزیتی منجر شد. نانولوله‌های کربنی با اندازه‌ی نانومتری خود می‌توانند درون ساختار شبکه‌ای پلیمر پخش شوند و برخی از فضاهای خالی کوچک را پر کنند. با این حال، از آنجاکه نانولوله‌های کربنی معمولاً دارای ریخت‌شناسی خطی و طول

پیک مشاهده‌شده ([Rahman, 2018; Zadehnajar et al., 2020](#)). پیک مشاهده‌شده در محدوده‌ی اعداد موج ۱۰۳۰ تا ۱۰۶۰ با پیک‌های مشخصه‌ی نوسانات کششی پیوند C-O مربوط به گروه‌های COOH موجود در نانولوله‌های کربنی چندجداره ([Ferreira et al., 2018](#)) و ارتعاشات کششی نامتقارن گروه‌های فسفات ($v^3PO_4^{3-}$) موجود در ساختار هیدروکسی آپاتیت مطابقت دارد. همچنین، این پیک با ارتعاشات کششی پیوندهای C-N دارای هم‌پوشانی است ([Sathiyavimal et al., 2019](#)). پیک در محدوده‌ی عدد موج ۶۰۰ تا ۶۲۰ مربوط به ارتعاشات خمشی نامتقارن گروه‌های فسفات ($v^4PO_4^{3-}$) موجود در هیدروکسی آپاتیت است ([Maji & Dasgupta, 2014](#)).

۳-۲- ریزساختار

اندازه‌ی متوسط منافذ یکی از پارامترهای تعیین‌کننده در طراحی داربست‌های مهندسی بافت است. منافذ دارای اندازه‌ی بسیار کوچک مهاجرت سلول‌ها از طریق داربست را محدود و تبادل مواد مغذی و دفع مواد زائد را دشوار می‌کنند، درحالی‌که منافذ، با اندازه‌ی بسیار بزرگ، سطح در دسترس برای چسبندگی سلول‌ها را کاهش می‌دهند ([Dan et al., 2016; Shamekhi et al., 2019](#)). متوسط اندازه‌ی حفرات هیدروژل‌ها، که به کمک نرم‌افزار Image J محاسبه شد. میانگین تخلخل داربست‌های CG، CG-HA2، CG-HA3، CG-CNT0/3 و CG-CNT0/4 به ترتیب $185 \pm 4/64$ ، 80 ± 2 ، $117 \pm 2/93$ ، $221 \pm 5/53$ و $144 \pm 3/61$ میکرومتر بود (شکل ۲ و ۳). افزودن مقادیر بالاتر هیدروکسی آپاتیت به ماتریس هیدروژل کیتوسان/ ژلاتین موجب تشکیل شبکه‌ای متراکم‌تر و پایدارتر می‌شود که فضای خالی را کاهش می‌دهد و در نتیجه موجب کاهش اندازه‌ی منافذ و تخلخل می‌شود ([Harijanto et al., 2022](#)). کاهش تخلخل بر اثر افزایش مقدار هیدروکسی آپاتیت به دلیل رسوب هیدروکسی آپاتیت و مسدود شدن منافذ در داربست توسط آگلومره‌های اضافی هیدروکسی آپاتیت (به جای رفتن به دیواره‌ی منافذ تشکیل‌شده توسط ژلاتین و کیتوسان) و همچنین برهم‌کنش‌های الکترواستاتیکی بین گروه‌های NH_3^+ موجود در ژلاتین و یون‌های Ca^{2+} و PO_4^{3-} و گروه OH موجود در هیدروکسی آپاتیت نسبت داده شود ([Harijanto et al., 2022; Maji et al., 2015](#)). علاوه بر این، تجمع ذرات هیدروکسی آپاتیت می‌تواند فضای خالی کمتری ایجاد کند که این وضعیت

می‌کنند. این امر باعث کاهش فاصله‌ی بین زنجیره‌ها و ایجاد شبکه‌ای متراکم‌تر می‌شود. در نتیجه، فضای کافی برای نفوذ و نگهداری مولکول‌های آب در شبکه‌ی سه‌بعدی هیدروژل کاهش می‌یابد (Azhar et al., 2014). همچنین، یون‌های کلسیم و فسفات موجود در هیدروکسی آپاتیت می‌توانند با گروه‌های کربوکسیلات ژلاتین یا گروه‌های آمینی کیتوسان، پیوندهای یونی قوی تشکیل دهند. بنابراین، حضور هیدروکسی آپاتیت در ماتریس هیدروژل باعث درگیر شدن برخی گروه‌های آب‌دوست موجود در کیتوسان و ژلاتین می‌شود که این گروه‌ها نقش مهمی در جذب مولکول‌های آب و تشکیل پیوندهای هیدروژنی دارند (Harijanto et al., 2022; Mohamed et al., 2014). ذرات هیدروکسی آپاتیت به‌عنوان یک فاز سخت در هیدروژل عمل می‌کنند و افزایش سختی هیدروژل توانایی زنجیره‌ها برای تغییرشکل و ایجاد فضای مناسب برای جذب آب را محدود می‌کند (Sharma et al., 2016; Thunsiri et al., 2018).

همچنین، افزایش غلظت f-MWCNTs ممکن است به تجمع ذرات و انسداد منافذ و کاهش فضای مؤثر برای نفوذ آب به داخل هیدروژل منجر شود؛ زیرا می‌تواند باعث شود که برخی از گروه‌های کربوکسیلی در دسترس مولکول‌های آب قرار نگیرند و این کاهش دسترسی به گروه‌های آب‌دوست ظرفیت جذب آب را کاهش می‌دهد (Shamekhi et al., 2019). همچنین، حضور بیشتر نانولوله‌های کربنی عامل‌دار باعث افزایش قابل‌توجه استحکام مکانیکی و مدول یانگ هیدروژل می‌شود که این افزایش استحکام از گسترش و تورم آزادانه‌ی شبکه جلوگیری می‌کند (Zadehnajar et al., 2020).

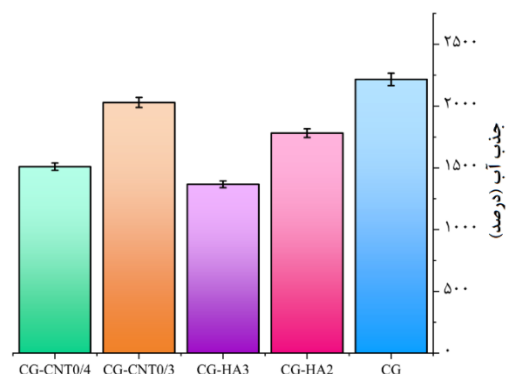
۳-۴- تخریب برون‌تنی

دو پارامتر اندازه‌ی تخلخل و نفوذپذیری داربست‌ها بر میزان تخریب تأثیر دارند (Shamekhi et al., 2019). نرخ تخریب نمونه‌های CG، CG-HA2، CG-HA3، CG-CNT0/3 و CG-CNT0/4 در روز سوم به‌ترتیب برابر با $1/39 \pm 69/70$ ، $1/24 \pm 62/12$ ، $0/94 \pm 47/02$ ، $1/32 \pm 65/91$ و $1/17 \pm 58/33$ درصد و در روز هفتم به‌ترتیب برابر با $1/70 \pm 84/85$ ، $1/47 \pm 73/48$ ، $1/17 \pm 58/55$ ، $1/62 \pm 81/06$ و $1/55 \pm 77/27$ درصد بود (شکل ۵). نمونه‌ی CG بیشترین نرخ تخریب را در مقایسه با سایر نمونه‌ها دارد که می‌تواند به‌دلیل حفرات بزرگ‌تر و جذب آب بیشتر این نمونه باشد.

نسبتاً بالایی هستند، به‌جای تجمع درون حفرات بزرگ، ممکن است در امتداد دیواره‌های حفرات قرار بگیرند و اندازه‌ی برخی از تخلخل‌های کوچک‌تر را کاهش دهند. این پدیده می‌تواند به کاهش جزئی اندازه‌ی میانگین تخلخل منجر شود. از سوی دیگر، افزودن نانولوله‌های کربنی می‌تواند بر میزان برهم‌کنش‌های بین زنجیره‌های پلیمری کیتوسان و ژلاتین تأثیر بگذارد. به‌دلیل خاصیت تقویت‌کنندگی نانولوله‌های کربنی و تعاملات فیزیکی و شیمیایی آن‌ها با پلیمرها، شبکه‌ی هیدروژلی ممکن است کمی متراکم‌تر شود که این مسئله به کاهش اندازه‌ی میانگین تخلخل منجر می‌شود (Mesgar et al., 2018).

۳-۳- رفتار تورم

قابلیت تورم داربست‌های کامپوزیتی برای جذب مایعات بدن، انتقال مواد مغذی و متابولیت‌های سلولی شاخص مهمی برای کاربرد آن‌ها در مهندسی بافت است و نفوذ سلول‌ها به داربست را در طی کشت سلولی تسهیل می‌کند (Azhar et al., 2014). ماهیت آب‌دوست هیدروژل‌های کیتوسان/ژلاتین ناشی از حضور گروه‌های عاملی آب‌دوست نظیر OH ، NH_2 و COOH در زنجیره‌ی مولکولی این بسپارها است (Moshayedi et al., 2021). بررسی‌های انجام‌شده پس از ۲۴ ساعت غوطه‌وری نشان داد که حداکثر جذب آب در نمونه‌های CG، CG-HA2، CG-CG- $\pm 50/33$ ، HA3، CG-CNT0/3 و CG-CNT0/4 به‌ترتیب به $2516/54 \pm 35/63$ ، $1781/38 \pm 27/34$ ، $1367/23 \pm 40/59$ و $2029/27 \pm 30/19$ درصد می‌رسد (شکل ۴).

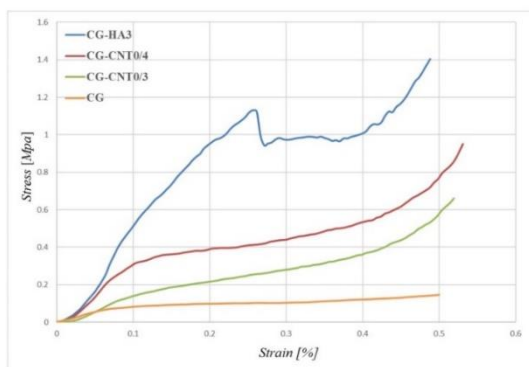


شکل ۴. میزان جذب آب هیدروژل‌های ژلاتین/کیتوسان حاوی مقادیر مختلفی از HA و f-MWCNTs پس از ۲۴ ساعت غوطه‌وری در PBS و دمای ۳۷ درجه‌ی سلسیوس بر حسب زمان ذرات هیدروکسی آپاتیت به‌عنوان عامل پرکننده عمل می‌کنند و فضای خالی میان زنجیره‌های کیتوسان و ژلاتین را پر

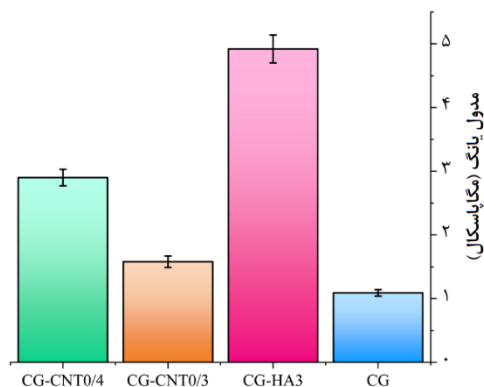
برابر تخریب‌های شیمیایی و مکانیکی منجر می‌شود (Sharmeen et al., 2018; Zadehnajar et al., 2020). همچنین، نانولوله‌های کربنی به دلیل مدول یانگ بالا و استحکام کششی زیاد باعث افزایش استحکام مکانیکی هیدروژل می‌شوند (Zadehnajar et al., 2020).

۳-۵- خواص مکانیکی فشاری

مدول یانگ نمونه‌های CG، CG-HA3، CG-CNT0/3 و CG-CNT0/4 به ترتیب در محدوده 0.05 ± 0.01 ، 0.09 ± 0.01 ، 0.22 ± 0.01 و 0.92 ± 0.07 ، 0.58 ± 0.13 و 0.90 ± 0.13 مگاپاسکال به دست آمد (شکل ۶ و ۷).

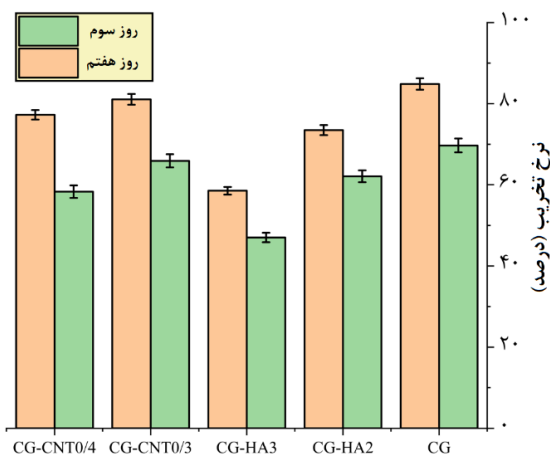


شکل ۶. منحنی تنش-کرنش هیدروژل‌های کامپوزیتی سنتز شده که تحت تنش فشاری و در حالت خشک اندازه‌گیری شده است



شکل ۷. نمودار مقایسه مدول یانگ هیدروژل‌های کامپوزیتی کیتوسان/ژلاتین سنتز شده (CG، CG-HA3، CG-CNT0/3 و CG-CNT0/4)

داربست‌های تهیه‌شده با غلظت هیدروکسی آپاتیت بالاتر به دلیل افزایش تعامل گروه‌های عاملی موجود در بسپارهای کیتوسان (گروه‌های آمینی) و ژلاتین (گروه‌های آمیدی و هیدروکسیلی) با گروه‌های کربوکسیل موجود در سطح هیدروکسی آپاتیت از طریق برهم‌کنش‌های پیوندهای یونی یا هیدروژنی باعث پر شدن فضاهای خالی در شبکه‌ی پلیمری و



شکل ۸. نمودار نرخ تخریب نمونه‌ها در PBS و دمای ۳۷ درجه‌ی سلسیوس در روزهای سوم و هفتم

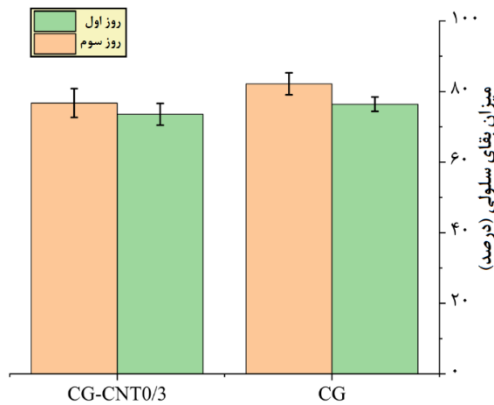
با افزایش درصد وزنی هیدروکسی آپاتیت و نانولوله‌های کربنی چندجداره، نرخ تخریب کاهش یافت. در واقع، افزودن مقادیر بیشتری از هیدروکسی آپاتیت باعث کاهش تخلخل هیدروژل می‌شود که به کاهش نرخ نفوذ آب به داخل هیدروژل منجر می‌شود. کاهش نفوذپذیری واکنش‌های تجزیه‌ای ماتریس هیدروژل را محدود می‌کند و تخریب آن را به تعویق می‌اندازد (Azhar et al., 2014). هیدروکسی آپاتیت می‌تواند با گروه‌های عاملی موجود در کیتوسان و ژلاتین (مانند گروه‌های آمینی و کربوکسیل) برهم‌کنش‌های یونی و شیمیایی برقرار کند. این برهم‌کنش‌ها پایداری ساختار را در محیط‌های آبی و آنزیمی بالا می‌برد که تخریب آن را دشوارتر می‌کند (Harijanto et al., 2014; Mohamed et al., 2022). همچنین، هیدروکسی آپاتیت به طور ذاتی مقاومت بیشتری در برابر تخریب شیمیایی و هیدرولیتیک دارد و این خاصیت را به هیدروژل منتقل می‌کند و سختی و استحکام مکانیکی هیدروژل را افزایش می‌دهد (Sharma et al., 2016; Thunsiri et al., 2018).

نرخ تخریب پایین‌تر بر اثر افزودن نانولوله‌های کربنی می‌تواند به دلیل ایجاد پیوند بین گروه‌های عاملی موجود در پلیمرهای کیتوسان و ژلاتین و گروه‌های کربوکسیل (COOH) مربوط به f-MWCNTs باشد. در واقع، گروه‌های کربوکسیل موجود در سطح نانولوله‌های کربنی با گروه‌های آمینی موجود در کیتوسان و گروه‌های کربوکسیلی و آمیدی موجود در ژلاتین واکنش و به ترتیب پیوندهای کووالانسی یا یونی و پیوندهای هیدروژنی یا الکترواستاتیکی تشکیل می‌دهند. این پیوندهای شیمیایی به تثبیت شبکه‌ی هیدروژل و افزایش مقاومت آن در

بالتر از ۰/۵ درصد وزنی، به دلیل تجمع نانولوله‌ها، کاهش خواص مکانیکی مشاهده شد. این نتایج نشان می‌دهد که مقادیر بهینه‌ی هیدروکسی آپاتیت و نانولوله‌های کربنی می‌توانند استحکام مکانیکی داربست‌های زیستی را بهبود بخشند، درحالی‌که غلظت‌های بیش از حد ممکن است اثر منفی در خواص مکانیکی داشته باشند. بنابراین، مقادیر انتخاب شده در این مطالعه بهینه هستند و به بهبود مدول یانگ و استحکام فشاری هیدروژل‌ها منجر شده‌اند.

۳-۶- آزمون سمیت سلولی

در این پژوهش، ایمنی زیستی و توانایی حمایت از تکثیر سلولی هیدروژل‌های CG و CG-CNT0/3 با آزمون MTT در بازه‌های زمانی ۱ و ۳ روز پس از کشت ارزیابی شد (شکل ۸).



شکل ۸. نتایج آزمون سمیت سلولی هیدروژل‌های کامپوزیتی CG و CG-CNT0/3

این دو نمونه به دلیل عملکرد برتر در آزمون‌های قبلی از نظر ریزساختار، خواص مکانیکی و رفتار تومی انتخاب شدند تا قابلیت زیستی آن‌ها نیز بررسی و به عنوان نمونه‌های بهینه برای مهندسی بافت معرفی شوند. جهت محاسبه درصد بقای سلولی، جذب نوری نمونه‌ها با استفاده از اسپکتروفتومتر اندازه‌گیری و نسبت به گروه کنترل (که در روز اول دارای جذب نوری برابر با ۱/۴ و در روز سوم برابر با ۱/۸۳ ثبت شده بود) ارزیابی گردید. نتایج نشان داد که در روز اول، درصد بقای سلولی هیدروژل‌های CG و CG-CNT0/3 به ترتیب برابر با 76 ± 2 درصد و 73 ± 3 درصد و در روز سوم به ترتیب به 77 ± 1 درصد و 73 ± 3 درصد رسیده است (شکل ۸). با توجه به این که درصد بقای سلولی در هر دو بازه زمانی اندازه‌گیری (۱ و ۳ روز) بالای ۷۰ درصد محسوب می‌شود،

در نتیجه ایجاد ساختاری متراکم‌تر می‌شود. بنابراین، این پیوندهای شیمیایی باعث می‌شوند که ذرات هیدروکسی آپاتیت به طور محکم‌تری در ساختار ماتریس پلیمری گنجانده شوند و انتقال تنش در سراسر هیدروژل یکنواخت‌تر انجام می‌شود. همچنین، کاهش اندازه‌ی منافذ و تخلخل در برابر نیروهای فشاری اهمیت دارد، زیرا ساختاری متراکم‌تر مقاومت بیشتری در برابر تغییر شکل و تخریب مکانیکی دارد (Maji et al., 2015; Mohonta et al., 2021). ذرات هیدروکسی آپاتیت به عنوان نقاط تقویتی و جاذب تنش عمل می‌کنند. زمانی که نیرو به هیدروژل وارد می‌شود، ذرات هیدروکسی آپاتیت از لغزش زنجیره‌های پلیمری جلوگیری و شبکه‌ی پلیمری را پایدارتر می‌کنند (Mohonta et al., 2021). نانولوله‌های کربنی چندجداره به دلیل اندازه‌ی نانویی، نسبت بالای استحکام به وزن و مدول الاستیسیته‌ی بالای خود می‌توانند با زنجیره‌های پلیمری کیتوسان در هیدروژل پیوندهایی برقرار کنند (Shamekhi et al., 2019). نانولوله‌های کربنی چندجداره با توزیع یکنواخت در ماتریس هیدروژل می‌توانند بارهای مکانیکی را مؤثرتر منتقل کنند و پایداری ساختاری را افزایش دهند (Kaur et al., 2021; Mesgar et al., 2018).

نتایج این پژوهش نشان داد که افزودن ذرات هیدروکسی آپاتیت و f-MWCNTs به هیدروژل‌های کیتوسان/ژلاتین باعث افزایش مدول یانگ از 1.09 ± 0.05 تا 1.92 ± 0.22 مگاپاسکال به 2.90 ± 0.13 مگاپاسکال شده است. این نتایج با مطالعات پیشین مطابقت دارد و بهبود خواص مکانیکی را تأیید می‌کند. برای مثال، کومار و همکاران (Mohonta et al., 2021) مدول یانگ داربست‌های کیتوسان/نانوهیدروکسی آپاتیت را 1.62 مگاپاسکال گزارش کردند، درحالی‌که ماجی و همکاران (Maji & Dasgupta, 2014) مدول یانگ و استحکام فشاری داربست‌های کیتوسان/ژلاتین/هیدروکسی آپاتیت را در محدوده‌ی ۳/۳ تا ۵/۳ مگاپاسکال اندازه‌گیری کردند. پنگفی و همکاران (Ma et al., 2021) نیز، با استفاده از ترکیب ژلاتین، کیتوسان، پلی‌وینیل الکل و هیدروکسی آپاتیت، مدول یانگ 2.11 مگاپاسکال را گزارش کردند. همچنین، مسگر و همکاران (Mesgar et al., 2018) نشان دادند که افزودن نانولوله‌های کربنی به داربست‌های کیتوسان/ژلاتین باعث افزایش مدول فشاری از $9/10$ به $18/7$ مگاپاسکال شده است، اما در مقادیر

- Engineering Applications. *Nanoscale Research Letters*, 11(1). <https://doi.org/10.1186/s11671-016-1669-1>
- Ferreira, F. V., Franceschi, W., Menezes, B. R. C., Biagioni, A. F., Coutinho, A. R., & Cividanes, L. S. (2018). Synthesis, characterization, and applications of carbon nanotubes. In *Carbon-Based Nanofillers and Their Rubber Nanocomposites: Carbon Nano-Objects* (pp. 1-45). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-813248-7.00001-8>
 - Hafezi, M., Khorasani, S. N., Zare, M., Neisiany, R. E., & Davoodi, P. (2021). Advanced hydrogels for cartilage tissue engineering: Recent progress and future directions. In *Polymers* (Vol. 13, Issue 23). MDPI. <https://doi.org/10.3390/polym13234199>
 - Harijanto, E., Yuliati, A., & Widiyanti, P. (2022). Compressive Strength and Porosity Size of Bovine-Gelatin-Chitosan Hydroxyapatite Scaffold. *Journal of International Dental and Medical Research*, 15(3), 990-994. <https://doi.org/10.20473/j.djmk.v49.i3.p153-157>
 - Huang, B. (2020). Carbon nanotubes and their polymeric composites: the applications in tissue engineering. *Biomaterials Reviews*, 5(1). <https://doi.org/10.1007/s40898-020-00009-x>
 - Huang, J., Liang, Y., Jia, Z., Chen, J., Duan, L., Liu, W., Zhu, F., Liang, Q., Zhu, W., You, W., Xiong, J., & Wang, D. (2018). Development of Magnetic Nanocomposite Hydrogel with Potential Cartilage Tissue Engineering. *ACS Omega*, 3(6), 6182-6189. <https://doi.org/10.1021/acsomega.8b00291>
 - Isikli, C., Hasirci, V., & Hasirci, N. (2012). Development of porous chitosan-gelatin/hydroxyapatite composite scaffolds for hard tissue-engineering applications. *Journal of Tissue Engineering and Regenerative Medicine*, 6(2), 135-143. <https://doi.org/10.1002/term.406>
 - Kaur, K., Paiva, S. S., Caffrey, D., Cavanagh, B. L., & Murphy, C. M. (2021). Injectable chitosan/collagen hydrogels nano-engineered with functionalized single wall carbon nanotubes for minimally invasive applications in bone. *Materials Science and Engineering C*, 128. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2021.112340>
 - Maji, K., & Dasgupta, S. (2014). Hydroxyapatite-Chitosan and Gelatin Based Scaffold for Bone Tissue Engineering. *Transactions of the Indian Ceramic Society*, 73(2), 110-114. <https://doi.org/10.1080/0371750X.2014.922424>
 - Maji, K., Dasgupta, S., Kundu, B., & Bissoyi, A. (2015). Development of gelatin-chitosan-hydroxyapatite based bioactive bone scaffold with controlled pore size and mechanical strength. *Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition*, 26(16), 1190-1209. <https://doi.org/10.1080/09205063.2015.1082809>
 - Mesgar, A. S., Mohammadi, Z., & Khosrovan, S. (2018). Improvement of mechanical properties and in vitro bioactivity of freeze-dried gelatin/chitosan scaffolds by functionalized carbon nanotubes. *International Journal of Polymeric Materials and Polymeric Biomaterials*, 67(5), 267-276. <https://doi.org/10.1080/00914037.2017.1320663>
 - Mohamed, K. R., Beherei, H. H., & El-Rashidy, Z. M. (2014). In vitro study of nano-hydroxyapatite/chitosan-gelatin composites for bio-applications. *Journal of Advanced Research*, 5(2), 201-208. <https://doi.org/10.1016/j.jare.2013.02.004>
 - Mohonta, S. K., Maria, K. H., Rahman, S., Das, H., & Hoque, S. M. (2021). Synthesis of hydroxyapatite nanoparticle and role of its size in hydroxyapatite/chitosan-gelatin biocomposite for bone grafting. *International Nano Letters*, 11(4), 381-393. <https://doi.org/10.1007/s40089-021-00347-9>
 - Moshayedi, S., Sarpoolaky, H., & Khavandi, A. (2021). Fabrication, swelling behavior, and water absorption kinetics of genipin-crosslinked gelatin-chitosan hydrogels. *Polymer Engineering and Science*, 61(12), 3094-3103. <https://doi.org/10.1002/pen.25821>
 - Moshayedi, S., Sarpoolaky, H., & Khavandi, A. (2022). Fabrication and characterization of gelatin/chitosan/zinc oxide nanocomposite hydrogels intended for biomedical applications. *Journal of Advanced Materials and Technologies (JAMT)*, 11(2), 57-69. [in Persian]. <https://doi.org/10.30501/jamt.2022.327545.1213>
 - Rahman, M. M. (2018). Preparation of Carbon Nanotube Reinforced Gelatin-Chitosan-Hydroxyapatite Biocomposite for Bone Tissue Engineering. *Open Access Journal of Biomedical Engineering and Biosciences*, 1(3). <https://doi.org/10.32474/OAJBEB.2018.01.000113>

می‌توان استدلال کرد که در غلظت‌های ۰/۲ و ۰/۳ درصد وزنی نانولوله‌های کربنی، هیچ افزایش قابل توجهی در سمیت سلولی بروز نکرده است. علاوه بر این، توزیع یکنواخت و پراکندگی نانولوله‌ها در ساختار هیدروژل منجر به کاهش سطح فعال این نانوذرات و در نتیجه کاهش احتمال تولید رادیکال‌های آزاد (ROS) گردیده است

۴- نتیجه‌گیری

در این پژوهش، هیدروژل‌های ژلاتین/ کیتوسان با استفاده از روش ریخته‌گری محلول پلیمری و فرایند خشک کردن انجمادی تولید شدند و تأثیر افزودن ذرات هیدروکسی آپاتیت و نانولوله‌های کربنی چندجداره‌ی عامل‌دار شده بر ویژگی‌های ریزساختاری، خواص مکانیکی و زیستی این داربست‌های پلیمری بررسی شد. نتایج نشان داد که با افزایش مقادیر ذرات هیدروکسی آپاتیت و نانولوله‌های کربنی، میزان تخلخل، ظرفیت جذب آب و سرعت تخریب برون‌تنی به‌طور قابل توجهی کاهش یافت، درحالی‌که استحکام فشاری هیدروژل‌ها بهبود یافت. با توجه به این یافته‌ها، هیدروژل‌های CG و CG-CNT0/3، به دلیل تعادل مطلوب در خواص مکانیکی و زیستی، گزینه‌ای مناسب برای استفاده در مهندسی بافت هستند. این داربست‌ها از نظر ریزساختار، استحکام مکانیکی، زیست‌تخریب‌پذیری و زیست‌سازگاری عملکرد برتری داشتند و آزمون MTT نیز زیست‌سازگاری مطلوب آن‌ها را تأیید کرد.

۵- سپاسگزاری

نویسندگان این مقاله بر خود لازم می‌دانند از همکاری آزمایشگاه‌های دانشگاه علم و صنعت ایران، که با فراهم کردن تجهیزات و حمایت‌های موردنیاز ما را در انجام این پژوهش یاری رساندند، سپاسگزاری کنند.

مراجع

- Azhar, F. F., Olad, A., & Salehi, R. (2014). Fabrication and characterization of chitosan-gelatin/nanohydroxyapatite-polyaniline composite with potential application in tissue engineering scaffolds. *Designed Monomers and Polymers*, 17(7), 654-667. <https://doi.org/10.1080/15685551.2014.907621>
- Dan, Y., Liu, O., Liu, Y., Zhang, Y. Y., Li, S., Feng, X. B., Shao, Z. W., Yang, C., Yang, S. H., & Hong, J. b. (2016). Development of Novel Biocomposite Scaffold of Chitosan-Gelatin/Nanohydroxyapatite for Potential Bone Tissue

18. Sathiyavimal, S., Vasantharaj, S., LewisOscar, F., Pugazhendhi, A., & Subashkumar, R. (2019). Biosynthesis and characterization of hydroxyapatite and its composite (hydroxyapatite-gelatin-chitosan-fibrin-bone ash) for bone tissue engineering applications. *International Journal of Biological Macromolecules*, 129, 844-852. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2019.02.058>
19. Shamekhi, M. A., Mirzadeh, H., Mahdavi, H., Rabiee, A., Mohebbi-Kalhari, D., & Baghaban Eslaminejad, M. (2019). Graphene oxide containing chitosan scaffolds for cartilage tissue engineering. *International Journal of Biological Macromolecules*, 127, 396-405. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2019.01.020>
20. Sharma, C., Dinda, A. K., Potdar, P. D., Chou, C. F., & Mishra, N. C. (2016). Fabrication and characterization of novel nanobiocomposite scaffold of chitosan-gelatin-alginate-hydroxyapatite for bone tissue engineering. *Materials Science and Engineering C*, 64, 416-427. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2016.03.060>
21. Sharmeen, S., Rahman, A. F. M. M., Lubna, M. M., Salem, K. S., Islam, R., & Khan, M. A. (2018). Polyethylene glycol functionalized carbon nanotubes/gelatin-chitosan nanocomposite: An approach for significant drug release. *Bioactive Materials*, 3(3), 236-244. <https://doi.org/10.1016/j.bioactmat.2018.03.001>
22. Thunsiri, K., Oonjai, A., & Wattanutchariya, W. (2018). Characterization of hydroxyapatite/silk fibroin/chitosan scaffold for cartilage tissue engineering. *Key Engineering Materials*, 775 KEM, 120-126. <https://doi.org/10.4028/www.scientific.net/KEM.775.120>
23. Tran, H. D. N., Park, K. D., Ching, Y. C., Huynh, C., & Nguyen, D. H. (2020). A comprehensive review on polymeric hydrogel and its composite: Matrices of choice for bone and cartilage tissue engineering. In *Journal of Industrial and Engineering Chemistry* (Vol. 89, pp. 58-82). Korean Society of Industrial Engineering Chemistry. <https://doi.org/10.1016/j.jiec.2020.06.017>
24. Zadehnajar, P., Akbari, B., Karbasi, S., & Mirmusavi, M. H. (2020). Preparation and characterization of poly ϵ -caprolactone-gelatin/multi-walled carbon nanotubes electrospun scaffolds for cartilage tissue engineering applications. *International Journal of Polymeric Materials and Polymeric Biomaterials*, 69(5), 326-337. <https://doi.org/10.1080/00914037.2018.1563088>