Review Article

Polymerization
Quarterly, 2024
Volume 14, Number 3
Pages 15-24
ISSN: 2252-0449

A Review of the Application of Chitosan in Tissue Engineering

Milad Ghezelsofloo*, Abdulhamid Dehghani, Mehdi Sadat-Shojai, and Soheila Ghasemi

Department of Chemistry, Faculty of Sciences, Shiraz University, P.O. Box 7194684795, Shiraz, Iran

Received: 6 September 2023, Accepted: 9 January 2024

Abstract

In recent years, there have been rapid advances in the use of bioactive materials in tissue engineering applications. Therefore, there is an increasing demand for materials with suitable physical, biological and mechanical properties as well as predictable degradation behavior. These materials show outstanding properties such as being antibacterial, malleable in different structures and can be made with a wide range of bioactive materials. For this reason, materials based on chitosan polysaccharide are non-toxic and in addition to biocompatibility and biodegradability, they are also ideal bioactive material. The properties of chitosan, such as poor solubility in water or organic solvents, can limit its use for a specific application. An excellent way to improve or create new properties of chitosan is chemical chain modification generally by linking functional groups, without changing the primary skeleton in order to preserve the original properties. Chitosan is a natural polymer from renewable resources that is obtained from crustaceans such as shrimp. The natural abundance and cost-effectiveness of chitosan has attracted the attention of many researchers due to its use as an alternative for making scaffolds in tissue engineering. The purpose of this article is to provide an overview of chitosan and chitosan derivatives that are used in tissue engineering.

Key Words

**chitosan,
chitosan derivatives,
scaffold,
tissue engineering,
biocompatible**

(*) To whom correspondence should be addressed.
E-mail: milad.ghezelsofloo.chem@gmail.com

مقاله مروری

بسپارش
فصلنامه علمی
سال چهاردهم، شماره ۳،
صفحه ۲۴-۱۵، ۱۴۰۳
ISSN: 2252-0449

مروری بر کاربرد کیتوسان در مهندسی بافت

میلاد قزلسفلو*، عبدالحمید دهقانی، مهدی سادات شجاعی، سهیلا قاسمی
شیراز، دانشگاه شیراز، دانشکده علوم، بخش شیمی، صندوق پستی ۷۱۹۴۶۸۵۷۹۱

دریافت: ۱۴۰۲/۶/۱۵، پذیرش: ۱۴۰۲/۱۰/۱۹

چکیده

در سال‌های اخیر، پیشرفت‌های فزاینده و پرشتابی در استفاده از مواد زیست‌فعال در کاربردهای مهندسی بافت رخ داده است. از این رو، تقاضای روزافزون برای تهیه موادی با خواص فیزیکی، زیستی و مکانیکی مناسب و نیز رفتار تخریب قابل پیش‌بینی به‌وجود آمده است. مواد برپایه کیتوسان که از کیتین مشتق می‌شوند، زیست‌پلیمرهای منحصربه‌فردی هستند. این مواد خواص برجسته‌ای مانند ضدباکتری بودن، شکل‌پذیری در ساختارهای مختلف و قابلیت ساخت با طیف گسترده‌ای از مواد زیست‌فعال را نشان می‌دهند. بدین دلیل، مواد برپایه کیتوسان پلی‌ساکارید غیرسمی بوده و افزون بر زیست‌سازگاری و زیست‌تخریب‌پذیری، زیست‌فعال ایده‌آلی نیز هستند. خواص کیتوسان، مانند حلالیت ضعیف در آب یا حلال‌های آلی، می‌تواند موجب محدودیت استفاده از آن برای کاربردهای خاص شود. اصلاح شیمیایی زنجیر عموماً با پیوند دادن گروه‌های عاملی بدون تغییر پیکره اولیه به‌منظور حفظ خواص اصلی، راهی عالی برای بهبود خواص یا ایجاد خواص جدید در کیتوسان است. کیتوسان پلیمری طبیعی از منابع تجدیدپذیر است که از سخت‌پوستانی مانند میگو و صنایع غذایی دریایی به‌دست می‌آید. فراوانی طبیعی و مقرون‌به‌صرفه بودن کیتوسان توجه بسیاری از پژوهشگران را به‌دلیل استفاده از آن به‌عنوان جایگزینی برای ساخت داربست در مهندسی بافت جلب کرده است. هدف از این بررسی، ارائه نمایی کلی از کیتوسان و مشتق‌های آن بوده که در مهندسی بافت استفاده می‌شود.

میلاد قزلسفلو

عبدالحمید دهقانی

مهدی سادات شجاعی

سهیلا قاسمی

واژگان کلیدی

کیتوسان،
مشتق‌های کیتوسان،
داربست،
مهندسی بافت،
زیست‌سازگار

* مسئول مکاتبات، پیام‌نگار:
milad.ghezelsofloo.chem@gmail.com

مقدمه

در سال‌های اخیر، استفاده از مواد طبیعی زیست‌فعال در مهندسی بافت، به‌دلیل ویژگی‌های منحصربه‌فرد آن‌ها، به‌ویژه شباهت فیزیکی و شیمیایی با بافت‌های انسانی، مورد توجه قرار گرفته است [۱]. پلیمرهای طبیعی، زیست‌سازگارتر از اکثر پلیمرهای سنتزی هستند، بدین سبب، تقاضا برای این پلیمرها در دو دهه گذشته افزایش یافته است. در حال حاضر، ترمیم و بازسازی بافت آسیب‌دیده، چالش بزرگی در تنظیمات بالینی است. سنتز زیست‌مواد جدیدتر و قوی‌تر برای پیشرفت سریع مهندسی بافت ضروری است. تعدادی از مواد طبیعی و سنتزی شامل کیتوسان، کلاژن، ژلاتین، آلژینات، فیبروئین ابریشم، هیدروکسی آپاتیت (HAp)، هیالورونیک اسید هستند. کیتوسان در میان زیست‌پلیمرها به‌دلیل خواص منحصربه‌فرد و دسترس‌پذیری، به‌طور گسترده به‌عنوان نوعی ماده زیست‌فعال بالقوه مطالعه شده است [۲،۳]. در سال‌های اخیر، کیتوسان ماده زیست‌فعال امیدوارکننده‌ای برای مهندسی بافت استخوان، پوست، غضروف، دیسک بین‌مهره‌ای، عروق خونی و غیره به‌شمار می‌رود که می‌تواند به‌طور گسترده در ترمیم بافت‌های بیمار و آسیب‌دیده استفاده شود.

از مهم‌ترین مواد طبیعی زیست‌فعال، کیتوسان است که از اسکلت بیرونی سخت‌پوستان به‌دست می‌آید. با توجه به خواص منحصربه‌فرد کیتوسان از جمله زیست‌تخریب‌پذیری، زیست‌سازگاری، غیرسمی بودن، آب‌دوستی، خواص ضدباکتری و ضدقارچ و آثار ترمیم زخم، این ماده جایگاه متمایزی در میان سایر زیست‌مواد دارد. افزون‌بر این، کیتوسان به‌راحتی با واکنش‌های شیمیایی اصلاح می‌شود. تجزیه کیتوسان موجب تولید قندهای آمینه بی‌ضرر می‌شود که می‌توانند به‌طور کامل توسط بدن انسان جذب شوند [۴،۵]. بنابراین، همه این معیارها کیتوسان را به نامزد مناسبی برای طیف گسترده‌ای از کاربردهای زیست‌پزشکی مانند مهندسی بافت تبدیل می‌کند. در چند دهه اخیر مواد زیست‌فعال برپایه کیتوسان، به‌طور گسترده در مهندسی بافت استفاده شده‌اند. زمینه‌های برجسته مهندسی بافت با استفاده از کیتوسان برای ساخت زیست‌مواد شامل مهندسی‌های بافت غضروف، استخوان، دیسک بین‌مهره‌ای، عروق خونی، پوست، تثبیت بافت و پیراندانی (peri-odontal) و بازسازی قرنیه است. مطالعات گسترده‌ای با استفاده از کیتوسان در ترکیب با مواد طبیعی و سنتزی برای تولید داربست در کاربردهای مهندسی بافت گزارش شده است. در این مقاله تلاش شده است تا مطالعه جامعی از مواد زیست‌فعال برپایه کیتوسان در دهه گذشته در مهندسی بافت انجام شود [۶].

شکل ۱- ساختار کیتین و کیتوسان [۷].

منبع کیتوسان و استخراج آن

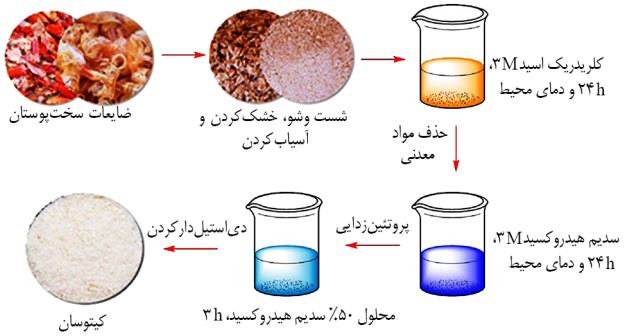
کیتوسان از کیتین، دومین پلی‌ساکارید بزرگ طبیعی مشتق می‌شود که در پوسته موجودات زنده مانند خرچنگ، لاک‌پشت، میگو و حشرات یافت می‌شود. کیتوسان ازطریق استیل‌زدایی جزئی کیتین با روش‌های شیمیایی یا زیستی یا ترکیبی از هر دو به‌دست می‌آید (شکل ۱) [۷].

کیتین، پلیمری طبیعی با خواص منحصربه‌فرد است که از اسکلت بیرونی سخت‌پوستان، حشرات و قارچ‌ها به‌دست می‌آید. کیتوسان با درجه استیل‌زدایی (DD) ۷۰٪ یا بیشتر به‌عنوان کیتوسان درنظر گرفته می‌شود. درجه استیل‌زدایی نشانگر درصد گروه‌های استیل در زنجیر پلیمری کیتین است. هرچه درجه استیل‌زدایی کمتر باشد، وزن مولکولی کیتوسان بیشتر است و خواص فیزیکی و شیمیایی آن نیز متفاوت می‌شود [۸]. برای استخراج کیتوسان از کیتین، ابتدا باید کیتین از منبع آن جدا شود. این کار معمولاً با استفاده از روش‌های فیزیکی مانند شست‌وشو با آب یا حلال‌ها انجام می‌شود. پس از جداسازی کیتین باید استیل‌زدایی انجام شود که معمولاً با استفاده از محلول‌های قلیایی غلیظ مانند سدیم هیدروکسید انجام می‌شود. زمان و دمای استیل‌زدایی بر درجه استیل‌زدایی کیتوسان نهایی اثر می‌گذارد. دو روش اصلی برای استخراج کیتوسان از کیتین وجود دارد:

– استیل‌زدایی ناهمگن: در این روش، کیتین جامد در محلول قلیایی غلیظ قرار می‌گیرد. استیل‌زدایی در سطح کیتین انجام می‌شود و زمان فراوری معمولا طولانی است (تا ۸۰ h).

– استیل‌زدایی همگن: در این روش، کیتین از پیش متورم‌شده در محلول قلیایی غلیظ تحت خلأ قرار می‌گیرد. استیل‌زدایی در تمام قسمت‌های کیتین انجام می‌شود و زمان فراوری معمولا کوتاه‌تر است (۱ h تا ۲ h).

شکل ۲، فرایند مرسوم استخراج کیتوسان از اسکلت بیرونی سخت‌پوستان را نشان می‌دهد. در این فرایند، ابتدا اسکلت بیرونی سخت‌پوستان با آب شست‌وشو داده می‌شود تا آلودگی‌ها و مواد حل‌ناپذیر از آن جدا شود. سپس، اسکلت بیرونی خرد می‌شود و در محلول قلیایی غلیظ قرار می‌گیرد. استیل‌زدایی در دمای ۱۰۰ °C به‌مدت ۲۴ h انجام می‌شود. پس از استیل‌زدایی، کیتوسان به‌وسیلهٔ



شکل ۲- فرایند مرسوم استخراج کیتوسان از اسکلت بیرونی سخت‌پوستان [۸].

شست‌وشو با آب از محلول جدا می‌شود [۸].

پروتئین‌زدایی

ابتدا پوسته‌های خشک‌شده سخت‌پوستان با محلول قلیایی مانند سدیم هیدروکسید و پتاسیم هیدروکسید وارد واکنش می‌شوند تا به حذف پروتئین منجر شود. سپس برای جداسازی، کسر نامحلول قلیایی گریز از مرکز شده و در ادامه به‌طور مکرر با آب مقطر شست‌وشو داده می‌شود تا pH خنثی شود [۸].

کانی‌زدایی

پوسته‌های پروتئین‌زدایی‌شده با محلول رقیق یک اسید معدنی به‌عنوان مثال کلریدریک اسید برای حذف مواد معدنی اصلاح می‌شوند. پس از آن، کسر نامحلول در اسید با استفاده از دستگاه گریز از مرکز جدا می‌شود. بخش جداشده با آب مقطر شسته می‌شود تا از اسید خارج شود. سپس، آن را به‌مدت یک شبانه‌روز خشک می‌کنند تا کیتین با رنگ کمی صورتی به‌دست آید [۹].

رنگ‌زدایی

کیتین به‌دست‌آمده با اکسنده‌هایی مانند پرمنگنات پتاسیم، پراکسید هیدروژن و غیره رنگ‌زدایی شده و سپس با محلول اکسالیک اسید شست‌وشو داده می‌شود. محصول به‌دست‌آمده به‌عنوان کیتین خالص در نظر گرفته می‌شود [۹].

استیل‌زدایی

کیتین رنگ‌زدایی‌شده با استفاده از محلول قلیایی غلیظ به‌مدت چند ساعت تحت فرایند استیل‌زدایی قرار می‌گیرد تا به کیتوسان تبدیل شود. بخش قلیایی مخلوط با استفاده از دستگاه گریز از مرکز جدا و بخش قلیایی اضافی با شست‌وشوی آب مقطر حذف می‌شود تا pH خنثی شود. درنهایت، کسر کیتوسان به‌دست‌آمده خشک شده و در دمای محیط نگهداری می‌شود. برای به‌دست آوردن خالص‌ترین شکل، کیتوسان خام در استیک اسید آبی ۲٪ وزنی-حجمی حل می‌شود. سپس، مواد نامحلول صاف می‌شود. محلول رویی شفاف است که با محلول سدیم هیدروکسید خنثی می‌شود. درنتیجه نمونه خالصی از کیتوسان به‌عنوان رسوب سفید حاصل می‌شود. کیتوسان به رنگ سفید تا زرد است که می‌تواند به دانه یا پودر تبدیل شود [۹].

ارتباط ساختار با خواص

پیش‌تر گفته شد، کیتوسان پلیمری طبیعی با خواص منحصربه‌فرد است که از اسکلت بیرونی سخت‌پوستان، حشرات و قارچ‌ها به‌دست می‌آید. این پلیمر از واحدهای تکرارشونده D-گلوکوزامین تشکیل شده است که به‌صورت β-(۱-٤) به یکدیگر متصل شده‌اند. با این حال در مواردی، برخی از گروه‌های هیدروکسیل گلوکوزامین با گروه‌های استیل جایگزین می‌شوند. این جایگزینی‌ها درجه استیل‌دار کردن کیتین را تعیین می‌کنند. وجود پیوندهای هیدروژنی در ساختار مولکولی کیتوسان، آن را سفت و سخت می‌کند که به‌راحتی به فیلم‌های با استحکام مکانیکی زیاد تبدیل می‌شود. از طرفی، وجود گروه‌های آمینه در ساختار کیتوسان آن را از کیتین متمایز می‌کند و به کیتوسان خواص استثنایی زیادی می‌بخشد. از مهم‌ترین خواص کیتوسان، حلالیت آن است. کیتوسان خالص در آب نامحلول است. با این حال، در pH اسیدی (کمتر از ٦) حل می‌شود. این امر به‌دلیل پروتون‌دارشدن گروه‌های آمینه در pH اسیدی است. کیتوسان در اسیدهای معدنی مانند هیدروکلریک اسید نیز حل می‌شود [۱۰]. وجود گروه‌های آمینه در ساختار کیتوسان باعث می‌شود که این پلیمر خواص ضدباکتری و ضدقارچ داشته باشد. افزون براین، کیتوسان می‌تواند با یون‌های فلزی ترکیب شده و آن‌ها را از محلول جدا کند. این خاصیت باعث می‌شود تا کیتوسان در تصفیه فاضلاب کاربرد داشته باشد. همچنین، کیتوسان می‌تواند با سایر پلیمرها ترکیب شده و خواص جدیدی را ایجاد کند. به‌عنوان مثال، کیتوسان با پلیمرهای سنتزی با بار منفی ترکیب شده و فیلم‌های چندلایه با خواص مطلوب تولید می‌کند. کیتوسان کاربردهای بالقوه زیادی در زمینه‌های مختلف دارد از جمله مهندسی بافت، تصفیه فاضلاب، پزشکی، صنایع غذایی و کشاورزی [۱۱].

کیتوسان و مشتق‌های آن در مهندسی بافت

مهندسی بافت رشته‌ای نوظهور است که بر تولید بافت‌های جدید

برای جایگزینی بافت‌های آسیب‌دیده یا بیمار تمرکز دارد. این کار با استفاده از یاخته‌های زنده، مولکول‌های زیست‌فعال و داربست‌های متخلخل سه‌بعدی انجام می‌شود که از اتصال، تکثیر و تمایز یاخته‌ای پشتیبانی می‌کند. کیتوسان نامزدی عالی برای کاربردهای مهندسی بافت است. این پلیمر از واحدهای تکرارشونده D-گلوکوزامین تشکیل شده است که به‌صورت β-(۱-٤) به یکدیگر متصل شده‌اند. کیتوسان دارای خواص زیر است:

– زیست‌سازگاری: کیتوسان به‌طور طبیعی در بدن وجود دارد و با سامانه ایمنی بدن به‌عنوان مادهٔ خارجی تشخیص داده نمی‌شود.

– تجزیه‌پذیری زیستی: کیتوسان می‌تواند به محصولات بی‌ضرر تجزیه شود و هیچ‌گونه عوارض جانبی برای بدن ایجاد نمی‌کند.

– غیرسمی بودن: کیتوسان سمی نیست و هیچ‌گونه واکنش‌های التهابی ایجاد نمی‌کند.

– خاصیت ضدباکتری: کیتوسان دارای خاصیت ضدباکتری است و می‌تواند از رشد باکتری‌ها در اطراف داربست جلوگیری کند.

– میل ترکیبی قوی با پروتئین‌ها: کیتوسان می‌تواند به‌راحتی با پروتئین‌های بدن پیوند برقرار کند و این مسئله می‌تواند به چسبندگی یاخته‌ها به داربست کمک کند.

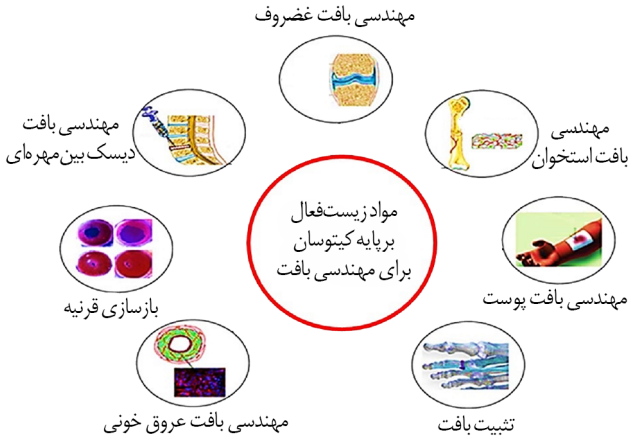
کیتوسان را می‌توان به روش‌های مختلف برای تولید داربست‌های مهندسی بافت استفاده کرد. از روش‌های رایج، استفاده از کیتوسان به‌عنوان پیش‌سازی برای تولید هیدروژل‌هاست. هیدروژل‌ها مواد ژل‌مانندی هستند که از آب و ماده پلیمری تشکیل شده‌اند. هیدروژل‌های کیتوسان می‌توانند خواص مختلف داشته باشند که آن‌ها را برای کاربردهای مختلف مهندسی بافت مناسب می‌کند. به‌عنوان مثال، هیدروژل‌های کیتوسان با استحکام مکانیکی زیاد می‌توانند برای ساخت داربست‌های قوی برای حمایت از رشد بافت‌های عضلانی یا استخوانی استفاده شوند. هیدروژل‌های کیتوسان با خاصیت ضدباکتری زیاد می‌توانند برای ساخت داربست‌هایی استفاده شوند که از رشد باکتری‌ها در اطراف زخم‌ها جلوگیری می‌کنند [۱۲]. در حال حاضر، استفاده از کیتوسان برای کاربردهای مختلف مهندسی بافت در حال بررسی است. برخی از کاربردهای بالقوه کیتوسان در مهندسی بافت عبارتند از:

– تولید داربست‌های غضروفی برای ترمیم آسیب‌های غضروفی؛
– تولید داربست‌های استخوانی برای ترمیم آسیب‌های استخوانی؛
– تولید داربست‌های عضلانی برای ترمیم آسیب‌های عضلانی؛
– تولید داربست‌های عصبی برای ترمیم آسیب‌های عصبی؛
– تولید داربست‌های پوستی برای ترمیم زخم‌های پوستی؛
– تولید داربست‌های دندانی برای ترمیم آسیب‌های دندانی.

شکل ۳ برخی از این کاربردها را نشان می‌دهد. پژوهش‌ها درباره کاربردهای کیتوسان در مهندسی بافت همچنان ادامه دارد و انتظار می‌رود که در آینده کاربردهای بیشتری برای این پلیمر ارائه شود [۹].

مهندسی بافت غضروف

کیتوسان به‌دلیل امکان استفاده در اشکال مختلف مانند الیاف، اسفنج و هیدروژل در کاربردهای مهندسی بافت غضروف استفاده می شود. از آنجا که کیتوسان دارای ویژگی‌هایی برای کمک یا تحریک سنتز آنیونی گلیکوزآمینوگلیکان‌های ویژه غضروف است، داربست‌های کامپوزیتی برپایه کیتوسان برای ترمیم غضروف مفصلی مورد توجه واقع شده‌اند [٦]. کلاژن جزء مهمی از ماتریس برون‌یاخته‌ای (ECM) است که در ساخت داربست‌های جاذب آب استفاده می‌شود. افزون‌بر این، ساختارهای بسیار متخلخل به رشد یاخته‌ها و حمل‌ونقل مواد مغذی کمک می‌کنند که موجب می‌شود هیدروژل قابلیت چسبندگی و تکثیر فوق‌العاده یاخته‌های غضروف تیروئید انسان را نشان دهد. این هیدروژل طی ۷۰ روز به مقدار ٦۵/۹٪ تخریب می‌شود که نشانگر تطابق خوب آن با سرعت بازسازی غضروف است و آن‌ها را به نامزد بالقوه برای مهندسی بافت غضروف تبدیل می‌کند [۱۳]. انواع مشابهی از هیدروژل‌های برپایه پروتئین از کیتوسان و کلاژن برای کاربردهای مهندسی بافت غضروف تهیه شده‌اند. ترکیب کلاژن با کیتوسان موجب بهبود خواص مکانیکی، کاهش سرعت زیست‌تخریب و افزایش، اتصال و تکثیر یاخته‌ای شده است. هیدروژل حاصل دارای منافذ متمایز به‌هم پیوسته (۳۰-۷۵ μm) و ریزمنافذ (کمتر از ۲ μm) بود که امکان انتقال همرفتی مایعات زیستی را فراهم می‌کرد. بااین‌حال، هیدروژل خواص مکانیکی رضایت‌بخشی را ارائه نکرد [١٤]. کیتوسان به‌طور



شکل ۳- نمایی از کاربردهای مواد زیست‌فعال برپایه کیتوسان [۹].

گسترده با فیبروئین ابریشم، یکی دیگر از زیست‌پلیمرهای برپایه پروتئین، ترکیب شده است. فیبروئین ابریشم، که معمولاً از پیله‌های پروانه ابریشم خانگی (Bombyx mori) استخراج می‌شود، به‌علت زیست‌سازگاری، خواص مکانیکی عالی، تخریب آهسته، چسبندگی و تکثیر یاخته‌ای برای مهندسی بافت غضروف مورد توجه قرار گرفته است. برخی از پژوهشگران از مشتق‌های کیتوسان در ترکیب با فیبروئین ابریشم برای تولید هیدروژل در کاربرد بافت غضروف استفاده کرده‌اند [۱۵].

مهندسی بافت استخوان

مهندسی بافت استخوان، علمی میان‌رشته‌ای بوده که شامل ترکیبی از شیمی، مهندسی و علوم زیستی برای طراحی، ساخت و توسعه داربست‌های سه‌بعدی با ساختار متخلخل بسیار به‌هم پیوسته است. مهم‌ترین نیاز این داربست‌ها، مطابقت با خواص بافتی است که جایگزین می‌شود. افزون‌بر این، داربست‌ها باید دارای سازگاری زیستی، رسانایی استخوانی و استحکام مکانیکی برای بازیابی استخوان‌های ازدست‌رفته یا آسیب‌دیده باشند. پژوهش‌های گسترده‌ای با استفاده از مواد طبیعی و سنتزی برای تولید داربست در مهندسی بافت استخوان انجام شده است. کیتوسان در زمینه ساخت داربست اهمیت زیادی یافته است. با این حال، خواص مکانیکی داربست‌های کیتوسان از خواص استخوان طبیعی کمتر است. به گفته بسیاری از پژوهشگران، HAp [$Ca_{10}(PO_4)_6(OH)_2$] می‌تواند خواص مکانیکی و رسانایی استخوانی کاشتینه‌ها را بهبود بخشد [۱۶]. این ترکیب یکی از پایدارترین اشکال فسفات کلسیم است و به‌عنوان جزء اصلی در استخوان وجود دارد. همچنین، HAp به تشکیل استخوان جدید بدون جذب و برهم‌کنش با سامانه زنده کمک می‌کند. افزون‌بر این، HAp سطح بالایی از نانوساختاری و زیست‌فعالی بهتری را نشان می‌دهد. درنتیجه، کامپوزیت‌های ساخته‌شده از کیتوسان و HAp به تشکیل استخوان جدید بدون جذب و برهم‌کنش با سامانه زنده کمک می‌کند.

نوعی داربست سه‌بعدی متخلخل از ترکیب کلاژن-کیتوسان-پلی‌اتیلن گلیکول (PEG)-هیدروکسی آپاتیت با خشک کردن انجمادی با استفاده از روش‌های اتصال عرضی عمل‌آوری گرمایی تهیه شد. این کار، اثر HAp را در مواد برپایه کیتوسان بررسی کرد. خواص مکانیکی داربست‌های کیتوسان-کلاژن پس از افزودن HAp و PEG به کامپوزیت‌ها بهبود یافت. این بدان معناست که مقاومت فشاری و سرعت تغییرشکل بهبود یافته است. با این حال به‌دلیل افزایش شکنندگی، کامپوزیت‌های تهیه‌شده از HAp و کیتوسان استحکام مکانیکی ضعیفی را نشان می‌دهند. برای غلبه بر این مشکل، کانی‌های رسی به کامپوزیت کیتوسان-HAp افزوده شدند.

خاک رس دارای ساختار سیلیکات لایه‌ای است. از این رو، وارد کردن خاک رس از نوع مونت‌موریلونیت (MMT) در یک کامپوزیت می‌تواند خواص مکانیکی را افزایش دهد. خاک رس MMT را با نمک‌های آلکیل آمونیوم اصلاح کردند تا امتزاج‌پذیری ماتریس پلیمری را بهبود بخشند. این کامپوزیت خواص مکانیکی و زیست‌فعالی بهبودیافته و همچنین غیرسمی بودن را برای رده‌های یاخته‌ای استخوان‌ساز MG ۶۳ نشان داد. اگرچه زنده‌مانی یاخته‌ها کمتر بود، اما در محدوده قابل قبولی باقی ماند. با این حال، کامپوزیت استحکام کششی ۵۶ MPa را در مقایسه با استخوان انسان (۵۰ MPa) نشان داد. این کامپوزیت، قابلیت بالقوه استفاده در کاربردهای مهندسی بافت استخوان غیرباربر را دارد. افزودن یون‌های فلزی، راهبرد جذابی برای تقلید از استحکام مکانیکی استخوان است، زیرا مشخص شده است، عملکرد مکانیکی و زیستی کامپوزیت‌ها را افزایش می‌دهد. روی، یکی از فلزاتی است که می‌تواند تراکم استخوان را افزایش دهد و از تحلیل آن جلوگیری کند [۱۷].

تثبیت بافت استخوان

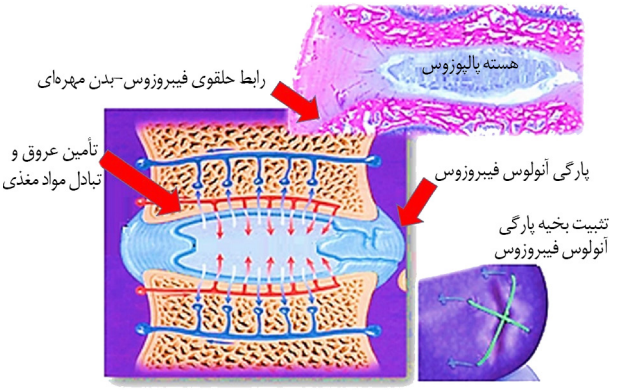
هر سال افراد زیادی از بیماری‌های مختلف مرتبط با استخوان و شکستگی آن رنج می‌برند. دانشمندان در تلاشند تا فرایندهایی را برای تثبیت بافت استخوانی ایجاد کنند که برای بیمار و پزشک راحت باشد. با این حال، ساختار پیچیده استخوان وضعیت را بغرنج می‌کند. در طول چند دهه گذشته، پژوهشگران درباره زیست‌پلیمرهایی مانند کیتوسان و مشتق‌های آن‌ها برای حل مسئله شکستگی و ترمیم استخوان تمرکز کرده‌اند. دلایل اصلی انتخاب کیتوسان زیست‌تخریب‌پذیری، زیست‌سازگاری و غیرسمی بودن آن است [۱۸]. افزون‌بر این، سهولت ساخت و اصلاح شیمیایی و سازگاری با سایر زیست‌مواد، کیتوسان را به انتخاب برتر پژوهشی تبدیل کرده است. یک میله زیست‌سازگار از کیتوسان با استفاده از گلوتارآلدهید به‌عنوان اتصال‌دهنده برای رفع شکستگی استخوان ساخته شد.

کامپوزیت برپایه کیتوسان با ترکیب الیاف کیتین ساخته شد که بلورینگی استخوان‌مانند و پایداری گرمایی را نشان داد. خواص مکانیکی ضعیف، کاربردها را در زمینه زیست‌پزشکی محدود می‌کند. پژوهشگران دریافته‌اند، استفاده از HAp می‌تواند زیست‌فعالی مواد ترمیم‌کننده استخوان را بهبود بخشد و باعث ایجاد استخوان جدید شود. در اینجا، مواد خام با روش لایه‌به‌لایه اتصال عرضی

کووالانسی یافته و تقویت شدند. آن‌ها کامپوزیت غیرشبکه‌ای را با استفاده از اجزای مشابه در نسبت مساوی برای مقایسه با کامپوزیت شبکه‌ای ساختند و مقادیر بیشتری برای مقاومت خمشی نمونه‌های شبکه‌ای‌شده گزارش کردند [۱۹]. اخیرا در گزارشی ادعا شده است، کیتوسانی که به تنهایی یا در ترکیب با سایر مواد استفاده می‌شود، در مقایسه با همتای غیرشبکه‌ای آن، عملکرد بهتری دارد در هر زمان که پیوند متقابل داشته باشد. کامپوزیت زیست‌سازگار با روش لایه‌به‌لایه مشابه براساس کیتوسان و HAp، به‌عنوان ماده‌ای درون‌کاشت، ساخته شد. این کامپوزیت، خواص مکانیکی و سازگاری یاخته‌ای قابل مقایسه‌ای را نشان داد. کیتوسان به‌عنوان ماده‌ای تثبیت‌کننده شکستگی استخوان، می‌تواند با سایر مواد کامپوزیتی ترکیب شود. کیتوسان می‌تواند برای تثبیت مواد الیافی به استخوان ازطریق رشد استخوان در فضاهای بین الیاف استفاده شود. بافت‌های استخوانی برای دوره‌های طولانی زنده ماندند و یکپارچگی طولانی‌مدت تثبیت پیوند استخوان را تضمین کردند [۲۰].

مهندسی بافت دیسک بین‌مهره‌ای

دیسک بین‌مهره‌ای (intervertebral disk, IVD) بزرگ‌ترین بافت بدون عروق بدن انسان، بخشی از مجموعه سه‌مفصلی بوده که از غضروف الیافی ساخته شده است. این مفاصل از آناتومی عصبی کل ستون فقرات محافظت کرده و به حرکت، تحمل وزن و انعطاف‌پذیری کمک می‌کنند. IVD عمدتاً حاوی هیدروژل‌های پر از الیاف است و به سه ناحیه بافتی تقسیم می‌شود. نواحی عبارت از هسته پالپوزوس، حلقه فیبروزوس و صفحه‌های انتهایی مهره‌هاست. هیدروژل‌های پروتئوگلیکان تقویت‌شده با الیاف کلاژن ۹۵٪ وزنی IVD را تشکیل می‌دهند [۲۱]. علت ابتلا به IVD، فرایند تباهی است که به ازدست دادن پروتئوگلیکان‌ها، به‌هم ریختگی ساختار ماتریس برون‌یاخته‌ای، پارگی در IVD و ازدست دادن ارتفاع دیسک منجر می‌شود. از آنجا که IVD ماهیت بدون عروق دارد، خودترمیم آن درخور توجه نیست. بافت‌های حلقه فیبروزوس به‌طور ویژه ظرفیت بسیار محدودی برای خودترمیم در صورت آسیب یا پارگی دارند (شکل ٤). امروزه محبوب‌ترین درمان، برداشتن دیسک و فیوژن بدن‌های مهره‌های مجاور (VBs) است. اما این به تباهی بیشتر به‌دلیل تغییر حرکت قطعه‌ای منجر می‌شود. درنتیجه، درمان‌های انجام‌شده برای مقابله با مشکلات IVD رضایت‌بخش نبوده است [۲۲]. مواد برپایه کیتوسان به‌دلیل زیست‌تخریب‌پذیری، غیرسمی بودن، سازگاری یاخته‌ای و فعالیت هم‌ایستایی می‌توانند راه‌حل امیدوارکننده‌ای برای درمان مشکلات IVD باشند. قرار



شکل ٤- نمایی از بخش دیسک بین‌مهره‌ای که نشانگر ورود حلقه فیبروزوس به بدنه مهره‌ها و مسیرهای انتقال مواد مغذی و تبادل گاز است [۲۲].

دادن کاشتینه در محل تزریق به بازیابی خواص گران‌روکشسانی دیسک‌هایی منجر شد که برای بازیابی زیست‌مکانیکی دیسک متصل شده بودند. افزون براین، ترمیم یا افزایش ارتفاع دیسک با اجتناب از فشرده‌سازی ریشه عصبی، کمردرد را سرکوب یا کاهش می‌دهد. نوعی محلول تزریقی شفاف امیدوارکننده برای بازسازی IVD بدون نیاز به جراحی باز توسعه داده شده است. این هیدروژل زیست‌سازگار و غیرسمی برپایه کیتوسان بوده که در دمای ٤ °C مایع است و برای ۳۰ min در دمای ۳۷ °C تنظیم شده است. افزون‌بر این، مدول ذخیره‌سازی ثابتی را در طیف وسیعی از کرنش نشان داد که مانند ساختار IVD ECM است که می‌تواند داربست مناسبی برای یاخته‌های IVD و بازسازی آن‌ها باشد [۲۳].

مهندسی بافت عروق خونی

در مهندسی عروق، پیوندهای سنتزی معمولاً در جایی استفاده می‌شوند که یاخته‌ها توانایی تشکیل بافت بازسازی‌شده عملکردی را داشته باشند. با این حال، کارایی آن اغلب به‌دلیل نفوذ یاخته میزبان، جمع شدن کلسیم در بافت بدن یا بازسازی ضعیف محدود می‌شود. همچنین، پیوندهای عروقی با مشکلاتی مانند عدم تطابق اندازه، کمبود عرضه یا بیماری‌های عروقی مواجه هستند. پیوندها یا تکه‌های زیست‌مواد در تماس با خون قرار می‌گیرند، از این رو باید زیست‌سازگار باشند.

ناسازگاری می‌تواند به التهاب و جمع شدن کلسیم در بافت بدن و درنتیجه شکست پس از جراحی منجر شود. تخریب زیست‌مواد نیاز به کنترل دارد تا نه بسیار سریع و نه بسیار کند تجزیه شود. اگر پیوند خیلی سریع تجزیه شود، مستعد شکست است. اگر خیلی

آهسته تجزیه شود، مانع تکثیر و ادغام یاخته‌ای می‌شود. بنابراین، سنتز پیوندهای زیست‌مواد که می‌توانند از نفوذ و تکثیر یاخته‌ای پشتیبانی کنند و تحت بازسازی سریع قرار گیرند، برای موفقیت در مهندسی بافت رگ‌های خونی بسیار مهم است [۲٤]. کیتوسان، ماده زیست‌تخریب‌پذیر و زیست‌سازگاری است. که می‌توان آن را به‌راحتی تنظیم کرد تا خواص مدنظر را به‌دلیل ویژگی‌های متخلخل و ژل‌ساز آن، نشان دهد. *N*-استیل گلوکوزامین ECM بافت رگ‌های خونی از گلیکوزآمینوگلیکان‌ها ساخته شده است که ساختاری مشابه کیتوسان دارند. در این زمینه، ترکیبی از کیتوسان و سایر پلیمرها، پیشرفت‌های بالقوه‌ای در استحکام مکانیکی، چسبندگی و تکثیر یاخته‌ای نشان داده‌اند. تکه‌های لایه‌به‌لایه عروقی نیز بررسی شده‌اند که در آن‌ها رسوب پلیمری لایه‌ای، اتصال و تکثیر یاخته‌ها را بهبود می‌بخشد. لایه‌ها از آن جهت استفاده می‌شوند که زیست‌مواد چندجزئی اغلب ناپایدارند و به روش سنتز گسترده نیاز دارند [۲۵]. رسوب‌گذاری اجزای مختلف به‌وسیله لایه‌های متناوب اجزای با بار مخالف انجام می‌شود. در مطالعه‌ای، پیوندهای دولایه کیتوسان-ژلاتین با سطح گسترده تهیه شد. لایه داخلی باعث چسبندگی و تکثیر یاخته‌ای خوب می‌شود، در حالی که لایه بیرونی انعطاف ساختاری و نقش محافظت دارد [۲٦].

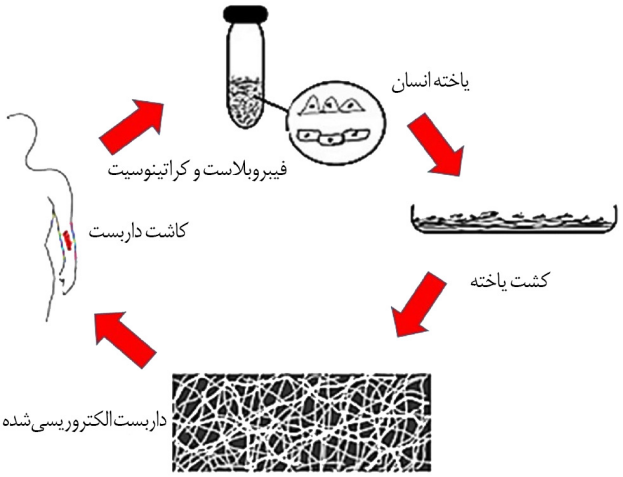
مهندسی بافت پوست

پیوندهای پوستی جسم خارجی باعث تحریک‌پذیری، پادگن و انتقال بیماری می‌شود. محدود بودن محل اهداکننده یکی دیگر از دلایلی است که مانع از جایگزینی پوست می‌شود. ازاین‌رو، آماده‌سازی داربست‌هایی با چسبندگی و تکثیر یاخته‌ای خوب در مهندسی بافت پوست مورد نیاز است. داربست خوب باید مانند ماتریس برون‌یاخته‌ای عمل کند و تمایز و تکثیر یاخته‌ای هدفمندی را هدایت کند. همچنین باید زیست‌سازگاری، زیست‌تخریب‌پذیری کنترل‌پذیر و استحکام مکانیکی لازم را داشته باشد.

داربست‌های برپایه کیتوسان، زیست‌مواد برتری برای مهندسی بافت پوست هستند. زیرا، زیست‌سازگار و زیست‌تخریب‌پذیرند. درنتیجه، می‌توانند به‌راحتی ازطریق اتصال عرضی به سایر پلیمرها متصل شوند. این اتصال عرضی موجب می‌شود تا داربست‌های برپایه کیتوسان خواص جدیدی مانند استحکام مکانیکی برتر بیابند. داربست‌های برپایه کیتوسان، ایمنی‌نازایی خوبی را نشان می‌دهند و حتی با وجود لیزوزوم‌ها به‌کندی تخریب می‌شوند. اگرچه کیتوسان مقرون به صرفه و زیست‌سازگار است، اما کمتر محلول بوده و اغلب استحکام مکانیکی کافی را ندارد [۷،۲۷]. داربست دولایه برای استحکام‌بخشی به داربست‌های کیتوسان استفاده می‌شود. در حالی که لایه‌ای استحکام مکانیکی لازم را ایجاد می‌کند، لایه دیگر بازسازی پوست را آسان می‌کند.

استحکام مکانیکی را می‌توان با پلی‌کاپرولاکتون یا ترکیب آن و زخم‌پوش را می‌توان به‌وسیله لایه دیگر حاوی کیتوسان و ترکیب آن تأمین کرد [۲۸]. مطالعه داربست کیتوسان دولایه تهیه‌شده با استفاده از ریخته‌گری و خشک کردن انجمادی نشان داد، این داربست قابلیت بالقوه خوبی را در حفظ پایداری دارد. داربست نانوالیافی کیتوسان می‌تواند ECM را تقلید کند و چسبندگی و تکثیر یاخته‌ای را افزایش دهد. هنگام استفاده درون‌یاخته‌ای، بازسازی چشمگیر لایه‌های درم و اپیدرم در موش‌ها مشاهده شد. مخلوط پلیمرهای مختلف مانند کلاژن، ژلاتین و فیبرینوژن با کیتوسان اغلب خواص مورد نیاز برای ساخت داربست را در مهندسی بافت فراهم می‌کند. کلاژن، زیست‌سازگار و دارای خاصیت پادگنی کم است. با این حال، داربست‌های کلاژنی عمل‌آوری‌نشده به‌سرعت تخریب می‌شوند و از نظر مکانیکی ضعیف هستند. داربست‌های مخلوط کیتوسان و کلاژن در بازسازی پوست و درمان پوست سوخته استفاده می‌شوند. استفاده از گلوتار آلدهید در ترکیب کیتوسان-کلاژن می‌تواند مدت بقای داربست را افزایش دهد [۲۹].

نتیجه مطالعه‌ای نشان داد، افزودن اندک ٪۰/۲۵ از گلوتار آلدهید در داربست مخلوط کیتوسان-کلاژن، زیست‌تخریب را به‌طور درخور توجهی کاهش داد و نفوذ فیبروبلاست کافی را فراهم کرد. افزودن چسب فیبرین با داربست ساختار ناهمگن، مشکل در رشد یاخته‌ها در قسمت بالایی داربست‌ها را کاهش می‌دهد. داربست‌های نانو یا میکروالیافی کیتوسان-کلاژن ساختار ECM را تقلید کردند. ژلاتین نیز مانندکلاژن، به‌عنوان ماده بالقوه بادوام در مهندسی بافت پوست استفاده می‌شود. ژلاتین چسبندگی و رشد یاخته‌ای خوبی را نشان می‌دهد و از استحکام مکانیکی خوبی برخوردار است. داربست‌های نانوالیافی ژلاتین-کیتوسان الکتروریسی‌شده، قابلیت استفاده در مهندسی بافت را دارند. در شکل ۵، داربست‌های الکتروریسی‌شده دارای شبکه به‌هم پیوسته هستند که انتقال مواد مغذی خوبی را تضمین می‌کنند. نتایج نشان داد، وجود کیتوسان می‌تواند تکثیر یاخته‌ها را افزایش دهد، اگرچه نسبت‌های مختلف مواد نتایج متفاوتی به همراه دارد. افزودن مواد دیگری مانند هیالورونیک اسید می‌تواند انعطاف‌پذیری و حبس آب را تا حد زیادی افزایش دهد. همچنین، کیتوسان و فیبرین می‌توانند برای دستیابی به داربست‌های باکیفیت خوب مخلوط شوند که می‌توانند از رگ‌زایی، ترمیم بافت و افزایش اتصال و رشد یاخته‌ای پشتیبانی کنند [۳۰].



شکل ۵- فرایند ساخت داربست‌های الکتروریسی‌شده برای مهندسی بافت پوست [۳۰].

نتیجه‌گیری

مهندسی بافت با نام پزشکی ترمیمی، به‌عنوان درمان پزشکی ایده‌آل برای بیماری‌هایی درنظر گرفته می‌شود که درمان آن‌ها با روش‌های موجود بسیار دشوار است. مهندسی بافت برای ترمیم قسمت‌های آسیب‌دیده بدن و بازیابی عملکرد آن‌ها با استفاده از بافت‌ها، مواد و کاشتینه‌های سنتزی رشدیافته در آزمایشگاه طراحی شده است. برای بازسازی بافت‌های آسیب‌دیده، مهندسی زیست‌پزشکی از سه ابزار اساسی شامل یاخته زنده، مولکول‌های پیام‌رسان و داربست استفاده می‌کند. کیتوسان یکی از امیدوارکننده‌ترین زیست‌مواد در مهندسی بافت است، زیرا مجموعه‌ای متمایز از خواص فیزیکی، شیمیایی و زیستی سودمند را ارائه می‌کند که آن را برای انواع بازسازی بافت، واجد شرایط می‌کند. در این بررسی، نمونه‌هایی از انواع مشتق‌های کیتوسان اصلاح‌شده برای کاربرد در مهندسی بافت و همچنین راهکارهای استفاده از آن‌ها به‌عنوان داربست در انواع مختلف اندام‌ها مانند پوست، غضروف استخوان، عصب و عروق خونی و غیره ارائه شد. این بررسی، کاربرد کیتوسان را به‌عنوان ماده بالقوه برای بافت‌ها و اندام‌های سنتزی مختلف نشان داده است. بااین‌حال، هنوز هم چالش‌های زیادی مانند بهبود خواص مکانیکی ضعیف آن به‌عنوان جایگزینی سنتزی وجود دارد. راهبرد تحویل مؤثر عامل‌های رشد به داربست برپایه کیتوسان، نشانگر زیست‌سازگاری است که باید در کاربردهای مختلف کاشتینه‌ها به آن توجه شود.

مراجع

1. Hooshmand-Ardakani A., Talaei-Khozani T., Sadat-Shojai M., Bahmanpour S., and Zarei-fard N., In Vitro Characterization of Multilamellar Fibers with Uniaxially Oriented Electrospun Type I Collagen Scaffolds, *Adv. Mater. Sci. Eng.*, **2020**, 4084317, 2020.
2. Delshad Y., Dehghani A., Ghezelsofloo M., and Ghasemi S., Efficient Synthesis of Benzimidazoles in Solvent-Free Conditions Using Chitosan-Copper (II) Complex Extracted from Persian Gulf Shrimp Shell, *Chem. Res. Nanomater. (Persian)*, **1**, 25-34, 2022.
3. Ghezelsofloo M., Dehghani A., and Ghasemi S., Application of Chitosan Polymeric Carriers as Controlled Drug Delivery Systems, *Chem. Res. Nanomater. (Persian)*, **1**, 54-68, 2022.
4. Karami M., Abdouss M., Kalaee M., and Moradi O., Investigating the Antibacterial Properties of Chitosan Nanocomposites Containing Metal Nanoparticles for Using in Wound Healings: A Review Study, *Polymerization (Persian)*, **13**, 42-53, 2024.
5. Koosha M., Modern Commercial Wound Dressings and Introducing New Wound Dressings for Wound Healing: A Review, *Polymerization (Persian)*, **6**, 65-80, 2017.
6. Sadat-Shojai M. and Moghaddas H., Modulated Composite Nanofibers with Enhanced Structural Stability for Promotion of Hard Tissue Healing, *Iran. J. Sci. Technol. Trans. A: Sci.*, **45**, 529-537, 2021.
7. Madni A., Kousar R., Naeem N., and Wahid F., Recent Advancements in Applications of Chitosan-Based Biomaterials for Skin Tissue Engineering, *J. Bioresour. Bioprod.*, **6**, 11-25, 2021.
8. Mohebbi S., Nezhad M.N., Zarrintaj P., Jafari S.H., Gholizadeh S.S., Saeb M.R., and Mozafari M., Chitosan in Biomedical Engineering: A Critical Review, *Curr. Stem. Cell. Res. Ther.*, **14**, 93-116, 2019.
9. Riva R., Ragelle H., des Rieux A., Duhem N., Jérôme C., and Préat V., Chitosan and Chitosan Derivatives in Drug Delivery and Tissue Engineering, in *Chitosan for Biomaterials II*, Springer, 19-44, 2011.
10. Shariatinia Z., Pharmaceutical Applications of Chitosan, *Adv. Colloid. Interface. Sci.*, **263**, 131-194, 2019.
11. Rodríguez-Vázquez M., Vega-Ruiz B., Ramos-Zúñiga R., Saldaña-Koppel D.A., and Quiñones-Olvera L.F., Chitosan and Its Potential Use as a Scaffold for Tissue Engineering in Regenerative Medicine, *Biomed Res. Int.*, **2015**, 2015. https://

doi.org/10.1155/2015/821279

12. Sadat-Shojai M. and Ghadiri-Ghalenazeri S., A Modular Strategy for Fabrication of Responsive Nanocomposites Using Functionalized Oligocaprolactones and Hydroxyapatite Nanoparticles, *New. J. Chem.*, **46**, 20155-20166, 2020.
13. Zeng C., Cai D., and Quan D., Application of Chitosan in Cartilage Tissue Engineering, *Chinese J. Intern. Med*., **19**, 831-834, 2005.
14. Li H., Hu C., Yu H., and Chen C., Chitosan Composite Scaffolds for Articular Cartilage Defect Repair: A Review, *RSC Adv*., **8**, 3736-3749, 2018.
15. Nettles D.L., Elder S.H., and Gilbert J.A., Potential Use of Chitosan as a Cell Scaffold Material for Cartilage Tissue Engineering, *Tissue Eng*., **8**, 1009-1016, 2002.
16. Sadat-Shojai M., Asadnia M., Zarei-fard N., and Arvaneh A.R., Electrospinning of Liquefied Banana Stem Residue in Conjugation with Hydroxyapatite Nanocrystals: Towards New Scaffolds for Bone Tissue Engineering, *Cellulose*, **29**, 4039-4056, 2022.
17. Alonzo M., Primo F.A., Kumar S.A., Mudloff J.A., Dominguez E., Fregoso G., Ortiz N., Weiss W.M., and Joddar B., Bone Tissue Engineering Techniques, Advances, and Scaffolds for Treatment of Bone Defects, *Curr. Opin. Biomed. Eng*., **17**, 100-248, 2021.
18. Venkatesan J. and Kim S.K., Chitosan Composites for Bone Tissue Engineering—An Overview, *Mar. Drugs*, **8**, 2252-2266, 2010.
19. LogithKumar R., KeshavNarayan A., Dhivya S., Chawla A., Saravanan S., and Selvamurugan N., A Review of Chitosan and Its Derivatives in Bone Tissue Engineering, *Carbohydr. Polym*., **151**, 172-188, 2016.
20. Balagangadharan K., Dhivya S., and Selvamurugan N., Chitosan Based Nanofibers in Bone Tissue Engineering, *Int. J. Biol. Macromol*., **104**, 1372-1382, 2017.
21. Di Martino A., Sittinger M., and Risbud M.V., Chitosan: A Versatile Biopolymer for Orthopaedic Tissue-Engineering, *Biomaterials*, **26**, 5983-5990, 2005.
22. Islam M.M., Shahruzzaman M., Biswas S., Sakib M.N., and Rashid T.U., Chitosan Based Bioactive Materials in Tissue Engineering Applications-A Review, *Bioact. Mater*., **5**, 164-183, 2020.
23. Jiang T., James R., Kumbar S.G., and Laurencin C.T., Chitosan as a Biomaterial: Structure, Properties, and Applications in Tissue Engineering and Drug Delivery, *Natural Syn. Biomed. Polym.*, 91-113, 2014.
24. Deng C., Li F., Griffith M., Ruel M., and Suuronen E.J., Application of Chitosan-Based Biomaterials for Blood Vessel Regeneration, *Macromol. Symp*., **297**, 138-146, 2010.
25. Nemeno-Guanzon J.G., Lee S., Berg J.R., Jo Y.H., Yeo J.E., Nam B.M., and Lee J.I., Trends in Tissue Engineering for Blood Vessels, *J. Biotechnol. Biomed*., **2012**, 2012.
26. Pankajakshan D. and Agrawal D.K., Scaffolds in Tissue Engineering of Blood Vessels, *Can. J. Physiol. Pharmacol*., **88**, 855-873, 2010.
27. Pandey A.R., Singh U.S., Momin M., and Bhavsar C., Chitosan: Application in Tissue Engineering and Skin Grafting, *J. Polym. Res*., **24**, 1-22, 2017.
28. Romanova O.A., Grigor'ev T.E., Goncharov M.E., Rudyak S.G., Solov'yova E.V., Krasheninnikov S.T. et al., Chitosan as a Modifying Component of Artificial Scaffold for Human Skin Tissue Engineering, *Bull. Exp. Biol. Med*., **159**, 557-566, 2015.
29. Ma L., Gao C., Mao Z., Zhou J., Shen J., Hu X., and Han C., Collagen/Chitosan Porous Scaffolds with Improved Biostability for Skin Tissue Engineering, *Biomaterials*, **24**, 4833-4841, 2003.
30. Luangbudnark W., Viyoch J., Laupattarakasem W., Surakunprapha P., and Laupattarakasem P., Properties and Biocompatibility of Chitosan and Silk Fibroin Blend Films for Application in Skin Tissue Engineering, *Sci. World J*., **2012**, 2012.