

# Effect of Salt on Gelation Behavior of Injectable Nanocomposite Scaffold Based on Hydroxypropyl Methylcellulose and Hydroxyapatite/Tricalcium Phosphate Nanoparticles

Roghayyeh Marefat Seyedlar, Mohammad Atai\*, Azizollah Nodehi, and Mohammad Imani

Faculty of Science, Iran Polymer and Petrochemical Institute, P.O. Box: 14975-112, Tehran, Iran

Received 1 June 2013, accepted 18 January 2014

## ABSTRACT

Biocompatible cellulosic polymer hydrogels are used in in-situ forming injectable scaffolds for bone regeneration. The hydrogels, however, generally suffer from their inherent weak mechanical properties. Calcium phosphate particles are used to enhance the mechanical strength and to improve the bone tissue regeneration capability of the scaffolds. In this study, hydroxypropyl methylcellulose (HPMC) was utilized as a polymeric matrix and  $\beta$ -tricalcium phosphate ( $\beta$ -TCP) and hydroxyapatite (HAp) nanoparticles were used to improve the mechanical properties.  $\beta$ -TCP Nanoparticles with plate-like morphology was synthesized through a wet chemical precipitation method. The morphology of the particles was confirmed using scanning electron microscope (SEM). Because the gelation temperature of the HPMC solution was above the temperature of normal human body, different concentrations of sodium sulphate ( $\text{Na}_2\text{SO}_4$ ) were incorporated into the HPMC solutions to examine and adjust the gelation temperature. The cloud point and gelation temperature of the hydrogels were measured using UV/Vis spectroscopy and oscillatory rheometry, respectively. The injectability of the hydrogels, with different inorganic contents, was also measured using a universal testing machine. The results indicated that the cloud point and the gelation temperature of the hydrogels dropped with increase in the sodium sulphate concentration due to Hofmeister effect. The rheology measurements also revealed that  $\beta$ -tricalcium phosphate was more effective than hydroxyapatite in reducing the gelation temperature and enhancement of the modulus and viscosity of the hydrogels. The HPMC hydrogels containing  $\beta$ -tricalcium phosphate and hydroxyapatite nanoparticles were injectable at room temperature. The hydrogels based on HPMC matrix and the calcium phosphate nanoparticles provided promising hydrogels applicable as in-situ forming injectable scaffolds.

### Keywords:

calcium phosphate  
nanoparticles,  
injectable scaffold,  
gelation,  
cloud point,  
hydroxypropyl  
methylcellulose

(\*)To whom correspondence should be addressed.

E-mail: [m.atai@ippi.ac.ir](mailto:m.atai@ippi.ac.ir)

# اثر نمک بر رفتار ژل شدن داربست نانوکامپوزیتی تزریق پذیر بر پایه هیدروکسی پروپیل متیل سلولوز و نانوذرات هیدروکسی آپاتیت - تری کلسیم فسفات

مجله علوم و تکنولوژی پلیمر،  
سال بیست و هفتم، شماره ۲،  
صفحه ۱۰۹-۹۹، ۱۳۹۳  
ISSN: 1016-3255  
Online ISSN: 2008-0883

رقیه معرفت سیدلر، محمد عطایی\*، عزیزاله نودهی، محمد ایمانی

تهران، پژوهشگاه پلیمر و پتروشیمی ایران، پژوهشکده علوم، صندوق پستی ۱۱۲-۱۴۹۷۵

دریافت: ۹۲/۳/۱۱، پذیرش: ۹۲/۱۰/۲۸

## چکیده

ترکیبات سلولوزی پلیمرهای زیست سازگارند که در تهیه ژل های تزریق پذیر برای ترمیم بافت استخوان استفاده می شوند. هیدروژل های تهیه شده از این پلیمرها به طور عمومی استحکام کافی را برای کاربرد در مهندسی بافت نیز دارند. برای افزایش استحکام و نیز بهبود استخوان زایی این داربست ها از ترکیبات کلسیم فسفات استفاده می شود. در این مطالعه، از هیدروژل هیدروکسی پروپیل متیل سلولوز به عنوان ماتریس پلیمری و مواد معدنی کلسیم فسفاتی شامل  $\beta$ -تری کلسیم فسفات و هیدروکسی آپاتیت برای بهبود خواص هیدروژل استفاده شد.  $\beta$ -تری کلسیم فسفات با شکل شناسی صفحه ای به روش رسوب گیری شیمیایی سنتز و با میکروسکوپی الکترونی پویشی تأیید شد. به علت بیشتر بودن دمای تشکیل ژل هیدروکسی پروپیل متیل سلولوز نسبت به دمای بدن، از نمک سدیم سولفات در غلظت های مختلف برای تنظیم دمای تشکیل ژل استفاده شد. دمای ابری شدن نمونه ها با استفاده از طیف بینی UV-Vis و دمای ژل شدن آنها به روش رئومتر معین شد. تزریق پذیری نمونه های حاوی مقادیر مختلف از فاز معدنی نیز با استفاده از دستگاه آزمون عمومی اندازه گیری شد. نتایج نشان داد، به دلیل اثر هوفمیستر دمای ابری و ژل شدن نمونه ها با افزایش غلظت نمک کاهش می یابد. همچنین نتایج رئومتری نشان داد،  $\beta$ -تری کلسیم فسفات نسبت به هیدروکسی آپاتیت دمای تشکیل ژل را به طور مؤثرتری کاهش و نیز مدول و گرانیوی را افزایش می دهد. هیدروژل های هیدروکسی پروپیل متیل سلولوز شامل نانوذرات تری کلسیم فسفات و هیدروکسی آپاتیت در دمای محیط تزریق پذیرند. با توجه به نتایج به دست آمده، هیدروژل های تهیه شده از ماتریس پلیمری هیدروکسی پروپیل متیل سلولوز و نانوذرات  $\beta$ -تری کلسیم فسفات و هیدروکسی آپاتیت می توانند انتخاب مناسبی برای داربست های تزریق پذیر به بدن باشند.

## واژه های کلیدی

نانوذرات کلسیم فسفات،  
داربست تزریق پذیر،  
ژل شدن،  
دمای ابری شدن،  
هیدروکسی پروپیل متیل سلولوز

\* مسئول مکاتبات، پیام نگار:

[m.atai@ippi.ac.ir](mailto:m.atai@ippi.ac.ir)

## مقدمه

امروزه یکی از رایج‌ترین راه‌های رفع نقایص بافت، پیوند بافت است که در آن از افراد دهنده‌ای استفاده می‌شود که توانایی اهدای بافت را داشته باشند. در این روش، افزون بر هزینه بسیار زیاد، مشکلات دیگری نظیر احتمال ایجاد آلودگی‌های میکروبی، واکنش‌های ایمنی و پس‌زدن پیوند نیز مطرح است. همچنین، این روش‌ها به علت مشکلاتی مانند دسترسی محدود به بافت پیوندی با شکل و اندازه مناسب و دردهای مربوط به محل دهنده پیوند محدودیت دارند. روش ترمیمی دیگر، استفاده از فنون جراحی و پروتزهای مصنوعی برای جبران نقص بافت است [۱].

پیوندهای استخوان مصنوعی روشی است که برای غلبه بر این مشکلات پیشنهاد شده است [۵-۲]. داربست مطلوب برای ترمیم استخوان، باید معدنی‌شدن (یعنی رسوب ماده معدنی در شرایط درون‌تنی) و تشکیل بافت استخوانی جدید را (تشکیل کامپوزیتی از کلاژن و مواد معدنی که در آن مواد معدنی با اندازه، نظم و جهت خاصی در موازات رشته‌های کلاژن قرار گرفته‌اند) به سرعت افزایش دهد و هم‌زمان با تشکیل بافت استخوانی جدید، تخریب و با استخوان جدید جایگزین شود. داربست‌های زیست‌فعال و تزریق‌پذیر را می‌توان از ترکیب دو فاز محلول پلیمری و ترکیب معدنی تهیه کرد [۷، ۶، ۲]. زیست‌فعالی این مواد به قابلیت اتصال آنها به بافت استخوان میزبان با برهم‌کنش‌های فیزیکی - شیمیایی نسبت داده می‌شود که شامل قابلیت تشکیل آپاتیت، القای تمایز سلول‌های استخوان‌ساز و تشکیل ماتریس استخوانی است [۹، ۸].

سرامیک‌هایی مثل کلسیم فسفات‌ها، کلسیم سولفات‌ها، کلسیم کربنات‌ها و شیشه‌های زیست‌فعال به‌عنوان فاز معدنی در بازسازی استخوان استفاده می‌شوند. این سرامیک‌های زیستی، به‌ویژه کلسیم فسفات‌ها، گزینه‌های ایده‌آلی به‌عنوان پرکننده در مهندسی بافت استخوان هستند، زیرا ترکیبات معدنی طبیعی استخوان از کلسیم فسفات تشکیل شده‌اند. مواد کلسیم فسفاتی سمی نیستند و به علت شباهت زیاد به آپاتیت‌های زیستی موجود در استخوان، زیست‌سازگاری و زیست‌فعالی برای مهندسی بافت استخوان مناسب هستند. از این میان، هیدروکسی‌آپاتیت (HAp) و  $\beta$ -تری‌کلسیم فسفات ( $\beta$ -TCP) بیشترین کاربرد را دارند [۱۰، ۷، ۲].

HAp به علت پایداری در شرایط فیزیولوژیک و قابلیت جذب کم به وسیله استئوبلاست‌ها یا ماکروفاژها، به‌عنوان ماده‌ای جذب‌نشده در نظر گرفته می‌شود [۱۲، ۱۱]. همچنین، HAp در مقایسه با سایر انواع کلسیم فسفات‌ها خواص مکانیکی بسیار بهتری دارد [۱۲]. در مقابل، تری‌کلسیم فسفات بیشتر به بخش بی‌شکل استخوان شباهت

دارد [۱۴، ۱۳، ۱۰].  $\beta$ -TCP، به علت انحلال‌پذیری زیاد اغلب در ترکیب با هیدروکسی‌آپاتیت استفاده می‌شود تا طی انحلال و ترسیب دوباره در شرایط درون‌تنی، خواص انحلال‌پذیری آن متعادل شود [۱۵، ۱۲]. به علت شکنندگی و شکل‌دهی سخت سرامیک‌های کلسیم فسفاتی، کاربرد شکل خالص آن برای ترمیم نقص‌های استخوانی سخت است [۱۶، ۵]. بنابراین، مواد مزبور معمولاً به شکل کامپوزیت در ماتریسی از زیست‌پلیمرها استفاده می‌شوند. این ماتریس‌های پلیمری، از لحاظ آبدوستی و قابلیت حفظ آب، مانند ماتریس خارج سلولی احاطه‌کننده سلول‌های تشکیل‌دهنده بافت‌های طبیعی بدن انسان عمل می‌کنند [۱۷، ۷، ۵].

هیدروکسی پروپیل متیل سلولوز (HPMC) پلیمر نیمه‌ستتزی از مشتقات سلولوز است که به‌عنوان داربست تزریق‌پذیر برای رهایش دارو استفاده می‌شود. این ماده سمی نیست، اما خواص مکانیکی هیدروژل‌های بر پایه آن (در حالت خالص و بدون افزودن عوامل تقویت‌کننده) برای کاربردهای ترمیم استخوان ناکافی است [۲۱-۱۸]. به همین دلیل، تهیه نانوکامپوزیتی از آن با سرامیک‌های تقویت‌شده بر پایه کلسیم فسفات، هدف این پژوهش بوده است. محلول آبی HPMC از برهم‌کنش‌های آبگریز، ژل برگشت‌پذیر تشکیل می‌دهد و کمترین دمای انحلال بحرانی آن بسته به استخلاف‌های هیدروکسی پروپیل و متیل متصل به آن حدود  $90-75^{\circ}\text{C}$  است [۲۲، ۲۱، ۶]. مزیت اصلی داربست‌های تزریق‌پذیر مهندسی بافت، عدم نیاز به جراحی [۲۳، ۲۲]، کاهش مدت زمان ترمیم [۲۳، ۲۲]، توزیع همگن سلول‌ها و سایر افزودنی‌ها در داربست [۲۴، ۲۲] و امکان تزریق مستقیم آنها به حفره‌ها با شکل‌ها و اندازه‌های مختلف (حتی حفره‌های با دسترس‌پذیری کم) است [۲۴، ۶]. نویسندگان در مطالعه‌ای دیگر [۲۵] نشان دادند، با افزودن نانوذرات  $\beta$ -TCP و HAp به ماتریس پلیمری HPMC می‌توان رفتار جریان و خواص هیدروژل‌های حاصل را کنترل و برای کاربرد به‌عنوان ژل تزریق‌پذیر بهینه کرد.

در این پژوهش، اثر افزودن نمک سدیم سولفات ( $\text{Na}_2\text{SO}_4$ ) بر خواص رئولوژی، دمای ابری‌شدن و ژل‌شدن هیدروژل HPMC بررسی شد. همچنین، اثر هم‌افزایی نانوذرات HAp و  $\beta$ -TCP در مجاورت نمک، بر همین خواص بررسی شد.

## تجربی

## مواد

از HPMC نوع 90SH-15000 (با گرانش پویای در حد  $15000 \text{ mPa}\cdot\text{s}$ )،  $M_n = 38150 \text{ g/mol}$ ،  $M_w = 56490 \text{ g/mol}$  و  $\text{PDI} = 1/48$ ) به‌عنوان

حجم نهایی حلال (آب) مصرفی به بشری منتقل و دمای آن به حدود  $85^{\circ}\text{C}$  رسانده شد. سپس، HPMC به شکل پودر حین همزدن با همزن مغناطیسی به آب اضافه شد. پس از این مرحله، گرمادهی قطع و بقیه آب مورد نیاز در دمای کمتر به محلول اضافه شد، اما همزدن تا زمانی که پودر کاملاً حل شود و محلول شفافی به دست آید (به مدت حدود 24 h)، ادامه یافت.

برای تهیه نانوکامپوزیت از HPMC و فازهای معدنی، با توجه به کسر وزنی مورد نیاز در تهیه هر فرمول‌بندی، مقدار مشخصی از این مواد توزین و با هم مخلوط شدند. برای اختلاط همگن، از همگن‌ساز مدل DIAX900، ساخت آلمان به مدت 2 min استفاده شد. فرمول‌بندی نانوکامپوزیت‌های تهیه شده در جدول ۱ آمده است.

### مطالعات رئولوژی

تعیین ناحیه گرانروکشنان خطی: اندازه‌گیری‌های رئولوژی در محدوده گرانروکشنان خطی (LVR) در دمای محیط انجام شد. برای تعیین محدوده گرانروکشنان خطی، ابتدا نمودار مدول ذخیره ( $G'$ ) و مدول اتلاف ( $G''$ )، برحسب کرنش در بسامد ثابت 1 Hz رسم و نقطه انتهایی منحنی که از حالت خطی خارج می‌شود، به عنوان کرنش بحرانی انتخاب شد.

در کرنش‌های کمتر از کرنش بحرانی، رفتار گرانروکشنان نمونه‌ها خطی است. نمونه‌های مورد آزمون در مطالعه حاضر، زیر کرنش بحرانی (0/1٪) و در محدوده LVR بررسی شدند.

آزمون رویش دما: پس از آزمون تعیین ناحیه گرانروکشنان خطی، شرایط برای آزمون رویش دما با اطمینان از اینکه آزمون در محدوده (LVR) انجام می‌شود، بررسی شد. آزمون‌ها در محدوده دمایی

جدول ۱- نمونه‌های تهیه شده برای بررسی خواص داربست‌های تزریق‌پذیر.

HPMC (wt%)	$\text{Na}_2\text{SO}_4$ (M)	HAp (w/w%)	$\beta$ -TCP (w/w%)	فرمول‌بندی
۲	۰/۱	-	-	۱
۲	۰/۲	-	-	۲
۲	۰/۳	-	-	۳
۲	۰/۲	۱۰	۱۰	۴
۲	۰/۲	۲۰	۱۰	۵
۲	۰/۲	۱۰	۲۰	۶
۲	۰/۲	۲۰	۲۰	۷

ماتریس پلیمری در ساخت داربست‌های تزریق‌پذیر استفاده شد. این پلیمر از مشتقات سلولوز و محصول شرکت ShinEtsu ژاپن است. ذرات HAp استفاده شده با شکل شناسی میله‌ای (قطر  $> 100 \text{ nm}$  و طول  $> 200 \text{ nm}$ ) از شرکت Nanoshel هند خریداری شد.  $\beta$ -TCP با شکل شناسی صفحه‌ای (ضخامت حدود  $60 \text{ nm}$  تا  $90 \text{ nm}$  و طول صفحه حدود  $2 \mu\text{m}$  تا  $3 \mu\text{m}$ ) با استفاده از روش شیمی تر سنتز شد [25]. شکل ۱ تصویر میکروسکوپ الکترونی این ذرات را نشان می‌دهد.

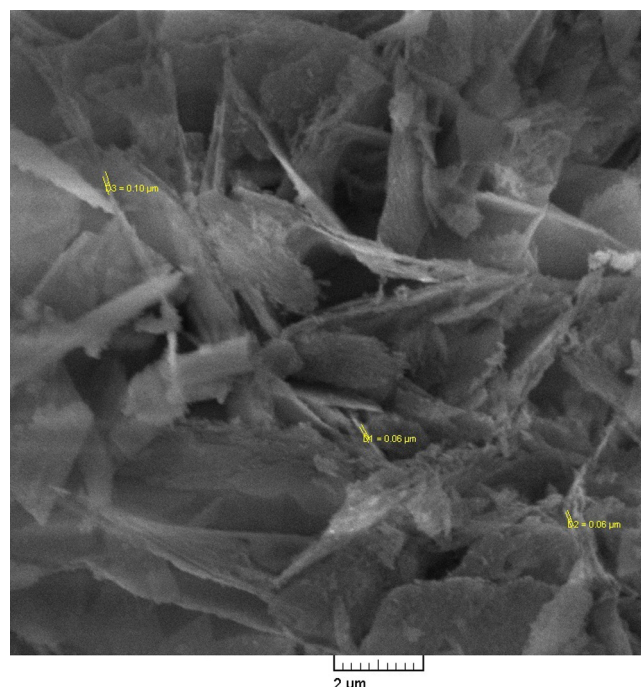
### دستگاه‌ها

دستگاه رئومتر مدل MCR300، ساخت شرکت Anton Paar اتریش، رنگ‌نگار ژل تراوای (GPC) GFC-Shimadzu 6A (GPC) ساخت ژاپن با استاندارد دکستران برای اندازه‌گیری وزن مولکولی، طیف نورسنج فرابنفش - مرئی (UV-Vis) مدل UV-1650PC ساخت شرکت Shimadzu ژاپن برای اندازه‌گیری دمای ابری شدن و برای آزمون تزریق‌پذیری دستگاه آزمون عمومی UTM مدل STM-20، ساخت شرکت SANTAM، ایران به کار گرفته شد. برای تهیه نمونه‌های نانوکامپوزیتی از همگن‌ساز Heidolph مدل DIAX900، ساخت آلمان استفاده شد.

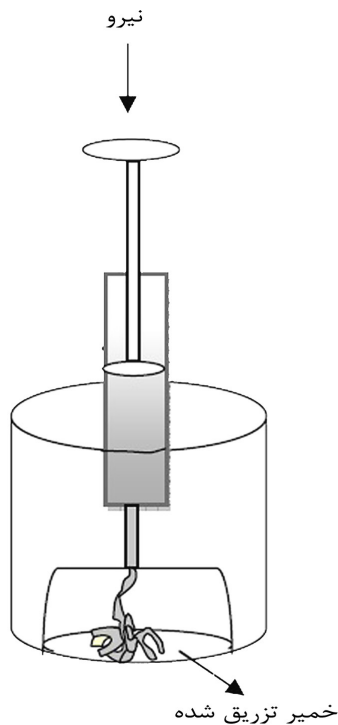
### روش‌ها

#### تهیه نمونه‌ها

برای تهیه محلول HPMC با غلظت معین، ابتدا حدود یک سوم از



شکل ۱- تصویر SEM نانوذرات  $\beta$ -TCP با ساختار صفحه‌ای.



شکل ۲- تصویر کلی از شیوه اندازه گیری تزریق پذیری نمونه های تهیه شده.

## نتایج و بحث

### رئولوژی

دمای ژل شدن و خواص رئولوژی محلول های هیدروکسی پروپیل متیل سلولوز مطالعه شد. نتایج رئولوژی در نمودارهای شکل ۳ مشاهده می شود. نمودارهای شکل ۳ - الف نشان می دهد، گرانروی نمونه HPMC استفاده شده در حدود  $11000 - 10000$  mPa.s بوده که با مقادیر ارائه شده توسط شرکت سازنده (گرانروی محلول ۲٪ وزنی در  $20^{\circ}\text{C}$ ،  $21000 - 11000$  mPa.s) در توافق است.

افزایش گرانروی، روشی دقیق برای تعیین دمای ژل شدن است، بدین معنی که دمای افزایش سریع و ناگهانی در گرانروی، به عنوان دمای ژل شدن معرفی می شود [۲۱]. در این مطالعه، با تعیین معادله خطوط در سه بخش از منحنی و به دست آوردن نقاط تقاطع آنها دمای (نقطه) شروع ( $T_g$ ) و پایان ژل ( $T_p$ ) شدن معین شد. برای تعیین نقطه میانی (یا دمای ژل) ( $T_i$ ) مشتق گرانروی (شکل ۳ - الف) برحسب دما رسم و دمای مربوط به پیک، به عنوان دمای ژل شدن معرفی شد. همچنین برای مقایسه، نقطه ژل از منحنی های مدول ذخیره و اتلاف (شکل ۳- ب) نیز اندازه گیری شد. نتایج در جدول ۲ آمده است.

$25-90^{\circ}\text{C}$  و  $10-60^{\circ}\text{C}$  با سرعت افزایش دمای  $2^{\circ}\text{C}/\text{min}$  انجام شد. محلول ۲٪ وزنی HPMC به عنوان ماتریس برای تهیه ماتریس و ادامه بررسی ها استفاده شد. برای بررسی اثر غلظت نمک  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ ، HAP و  $\beta$ -TCP بر خواص رئولوژی نمونه ها، نمونه هایی با ترکیب درصد های متفاوت (مطابق جدول ۱) از اجزا ساخته و بررسی شدند.

### طیف نورسنجی فرابنفش - مرئی

این آزمون در طول موج  $800$  nm به روش طیف نورسنجی فرابنفش - مرئی برای تعیین دمای ابری شدن انجام شد. در این طول موج در دماهای کم نمونه فاقد هر نوع جذب است و عبور ۱۰۰٪ دیده می شود، ولی با نزدیک شدن به دمای ژل مقدار عبور کاهش می یابد. دمایی را که عبور به ۵۰٪ مقدار اولیه می رسد، به عنوان دمای ابری شدن گزارش می کنند [۲۷، ۲۶، ۲۱]. نمونه های استفاده شده برای انجام این آزمون مطابق جدول ۱ تهیه شدند.

### آزمون رنگ نگاری ژل تراوایی

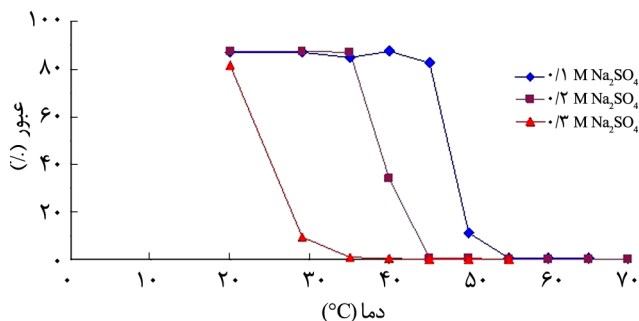
آزمون رنگ نگاری ژل تراوایی با استفاده از آشکارساز ضریب شکست برای تعیین وزن مولکولی متوسط نمونه های هیدروکسی پروپیل متیل سلولوز انجام شد. این سامانه بر پایه حلال آب بود و آزمون در دمای  $25^{\circ}\text{C}$  و با استاندارد دکستران انجام شد. حجم تزریق برابر  $20$   $\mu\text{L}$  بود که با سرعت  $1$  mL/min جریان یافت. از ستون Waters Ultrahydrogel 250 ساخت آمریکا استفاده شد.

### آزمون تزریق پذیری

آزمون تزریق پذیری ژل های تزریق پذیر با استفاده از سرنگ های تجاری معمول انجام می شود. تزریق پذیری به شکل درصد وزنی خمیر خروجی از سرنگ تعریف می شود. در این مطالعه، از سرنگ با ظرفیت  $5$  mL، قطر داخلی  $13$  mm و قطر مجرای خروجی  $1/2$  mm استفاده شد. بدین منظور، مجموعه ای مطابق شکل ۲ استفاده شد که در آن محتوای سرنگ با اعمال نیرو به محفظه تزریق شد. نیرو با سرعت ثابت  $15$  mm/min و با استفاده از دستگاه آزمون عمومی به پیستون سرنگ اعمال شد. نمونه ها پس از  $2$  min اختلاط با همگن ساز برای آزمون تزریق پذیری استفاده شدند.

### تحلیل های آماری

هر آزمون سه مرتبه تکرار و تحلیل آماری با استفاده از آزمون ANOVA و آزمون تکمیلی Tukey انجام شد. برای مقادیر  $p$  کمتر از  $0.05$  اختلاف ها معنی دار در نظر گرفته شد.



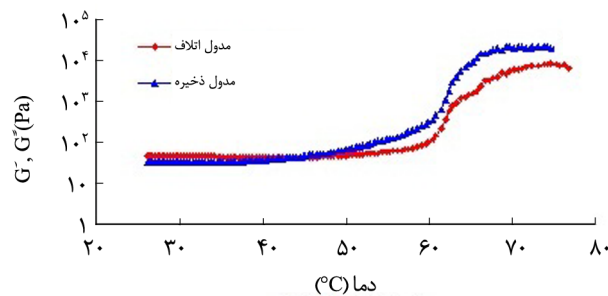
شکل ۴- دمای ابری شدن محلول‌های HPMC با غلظت‌های مختلف  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  (نمودارهای نمونه‌های ۱ تا ۳ مطابق جدول ۱ است).

رتولوزی، ابتدا دمای ابری شدن محلول‌های آبی HPMC محتوی ۰/۱، ۰/۲ و ۰/۳ مولار  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  با استفاده از دستگاه UV-Vis معین شد (شکل ۴ و جدول ۳). دمای ابری شدن نمونه حاوی ۰/۱ M نمک حدود  $53^\circ\text{C}$  است که نشان می‌دهد، دمای ژل شدن این نمونه بیشتر از این دما و در نتیجه بیشتر از دمای بدن است. بنابراین، برای کاربردهای زیستی مناسب نیست. نمونه حاوی ۰/۳ M نمک، دمای ابری شدن  $26^\circ\text{C}$  را نشان می‌دهد، یعنی می‌توان گفت، نمونه پیش از دمای فیزیولوژی ژل می‌شود، اما دمای ژل شدن آن بسیار نزدیک به دمای محیط است. بنابراین، نمونه مزبور برای ادامه بررسی‌ها در این پژوهش انتخاب نشد. دمای ابری شدن نمونه حاوی ۰/۲ M نمک حدود  $40^\circ\text{C}$  است که در مقایسه با نمونه‌های پیشین کمی بیشتر از دمای بدن است. از آنجا که در فرمول‌بندی‌های نهایی، ذرات فاز معدنی نیز دمای ژل شدن را کاهش می‌دهند، این نمونه برای ادامه بررسی‌ها انتخاب شد. آزمون رتولوزی روبش دما برای نمونه حاوی ۰/۲ مولار  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  انجام شد (شکل ۵).

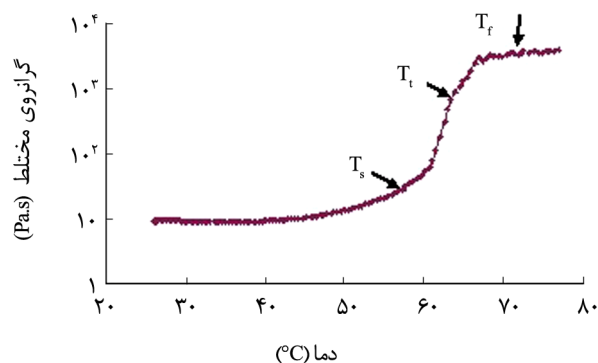
نتایجی که توسط Weng, Zhang, و Ruan ارائه شده است، نشان می‌دهد، مولکول‌های کوچک به‌عنوان احاطه‌کننده زنجیرهای سلولوزی عمل می‌کنند. در این شرایط، در دماهای کم مولکول‌های کوچک به‌عنوان پوسته‌ای برای گروه‌های هیدروکسی پروپیل عمل کرده و از تشکیل پیوندهای هیدروژنی بین زنجیرها جلوگیری می‌کنند. این موضوع مشابه تشکیل قفس آب احاطه‌کننده انبوه‌های آبگریز در مراحل اولیه است. با افزایش دما، پوسته‌ها از هم گسسته می‌شوند

جدول ۳- مقادیر دمای ابری شدن در مجاورت غلظت‌های مختلف  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ .

فرمول‌بندی	۱	۲	۳
دمای ابری شدن ( $^\circ\text{C}$ )	۵۳	۴۰	۲۶



(الف)



(ب)

شکل ۳- تغییرات: (الف) مدول‌های کشسانی ( $G'$ ) و اتلاف ( $G''$ ) و (ب) گرانیوی بر حسب دما، برای هیدروژل شامل ۲٪ وزنی HPMC.

با توجه به اینکه هدف این مطالعه تهیه هیدروژل‌هایی با قابلیت ژل شدن در دمای بدن است، دمای ژل شدن HPMC به کمک افزودنی‌ها کاهش یافت.

همان‌طور که در نمودارهای شکل ۳ مشاهده می‌شود، دمای ژل شدن HPMC بیشتر از دمای فیزیولوژیک بدن انسان است. بنابراین، برای کاهش دمای ژل شدن از نمک  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  استفاده شد. برای تعیین غلظت مورد نیاز  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  در انجام بررسی‌های

جدول ۲- مقادیر دمای شروع، میانی و پایان ژل شدن و مدول‌های کشسانی ( $G'$ ) و اتلاف ( $G''$ ) و گرانیوی مختلط ( $\eta$ ) در این دماها برای هیدروژل HPMC.

$T_f$ ( $^\circ\text{C}$ )	$T_t$ ( $^\circ\text{C}$ )	$T_s$ ( $^\circ\text{C}$ )	مشخصه
۷۳	۶۶	۶۱	
۲۱۹۰۰	۱۱۵۰۰	۴۶۰	$G'$ (Pa)
۷۵۹۰	۱۹۲۰	۱۵۰	$G''$ (Pa)
۳۶۹۰	۱۸۶۰	۷۷	$\eta_{\text{complex}}$ (Pa.s)

HPMC را با گرم و سرد کردن به وسیله DSC و پراش پرتو X در زاویه کوچک بررسی کردند. نتایج گرماسنجی پویایی تفاضلی نشان داد، فرایند ژل شدن دو مرحله‌ای است و منظم و نامنظم شدن آب در طول زنجیرهای پلی ساکاریدی مسئول رفتار گرمایی مشاهده شده است. مشاهدات نیم رخ پراش پرتو X با زاویه کوچک، افزایش ناهمگنی از ۴-۵ nm تا چند ۱۰ nm را در محلول طی تشکیل ژل نشان می‌دهد. حدس زده می‌شود، ژل شدن با تشکیل میسل با توزیع اندازه بزرگ و در نهایت جدایی فاز انجام می‌شود [۲۹].

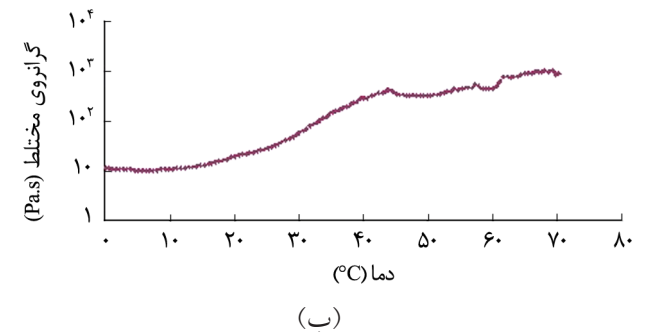
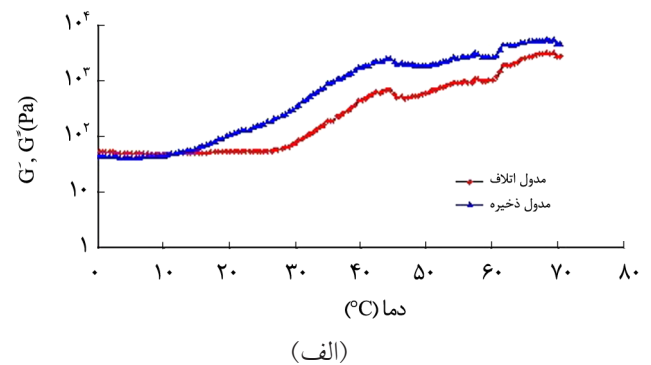
از مقایسه شکل‌های ۳ و ۵ می‌توان نتیجه گرفت، با افزودن نمک  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  دمای ژل شدن کاهش می‌یابد و دمای شروع ژل شدن از حدود  $60^\circ\text{C}$  به  $20^\circ\text{C}$  منتقل می‌شود. علت این رفتار پیروی از سری هوفمیستر است. اگرچه آثار نمک‌ها بر تعدادی از سامانه‌های ژلی مثل متیل سلولوز بررسی شده است [۳۱-۳۳]، اما گزارش‌های کمی درباره اثر نمک‌ها بر ژل شدن HPMC که کاربرد زیستی و دارویی فراوانی دارد، ارائه شده است. Mitchell و همکاران نشان دادند، نمک‌های مختلف که دمای ابری شدن HPMC را کاهش می‌دهند، از سری هوفمیستر پیروی می‌کنند [۳۴،۳۵]. Hribar پیشنهاد کرده است، ساختار آب با تعادل بین پیوندهای هیدروژنی و الکتروستاتیک معین می‌شود. آنیون‌های چند ظرفیتی و کوچک‌تر مثل  $\text{F}^-$  و  $\text{Cl}^-$  باعث جهت‌یابی الکتروستاتیک شدید مولکول‌های آب نسبت به آنیون‌ها می‌شوند که ساختار آب را بسیار منظم‌تر می‌کند. بنابراین، مولکول‌های آب کمتری برای آبیوشانی HPMC در دسترس هستند. این اثر، تراکم استخلاف‌های آبگریز را تسریع و آسان می‌کند که منجر به کاهش دمای ژل محلول‌های HPMC می‌شود. وی معتقد است، اثر نمک بر درجه ساختاردهی آب اساساً به وسیله آنتروپی محلول یونی و تغییرات گرانیوی معین می‌شود. آنیون‌ها با مقادیر آنتروپی منفی‌تر در نظم‌دهی مولکول‌های آب بسیار مؤثرتر عمل می‌کنند [۳۶].

یون‌های  $\text{SO}_4^{2-}$  به دلیل برهم‌کنش با مولکول‌های آبیوش‌کننده زنجیرهای پلیمر، انرژی لازم را برای کاهش برهم‌کنش آب - پلیمر کاهش می‌دهند، در نتیجه، این یون‌ها ایجاد برهم‌کنش‌های آبگریز را بین زنجیرهای پلیمر آسان می‌کنند. بنابراین، دمای تشکیل ژل کاهش می‌یابد (شکل ۵). اما، مدول در دمای زیاد نسبت به HPMC خالص کاهش می‌یابد. این رفتار را می‌توان به ایجاد برهم‌کنش بین یون‌های موجود در محیط و بخش‌های آبدوست پلیمر ارتباط داد که از ایجاد برهم‌کنش‌های هیدروژنی بین بخش‌های آبدوست جلوگیری کرده و وجود برهم‌کنش‌های هیدروژنی را به‌عنوان عامل دوم تشکیل ژل تأیید می‌کند.

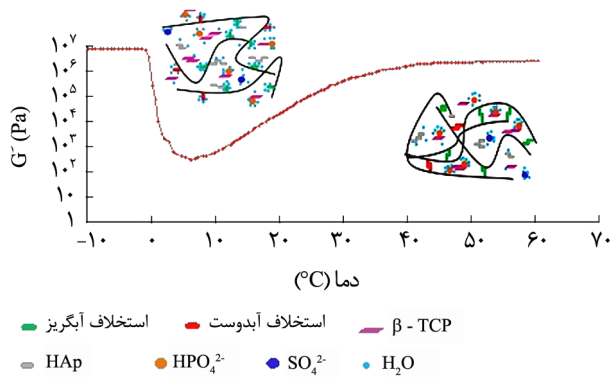
تا گروه‌های هیدروکسی را در معرض دمای زیاد قرار دهند که منجر به تشکیل پیوند هیدروژنی بین زنجیرها می‌شود [۲۸]. بنابراین پیشنهاد شده است، که در تشکیل پیوند هیدروژنی بین زنجیرها و برهم‌کنش‌های آبگریز در ژل شدن HPMC دخالت دارد. با این حال، برهم‌کنش‌های آبگریز نقش اصلی را طی ژل شدن دارند و هنوز اثبات وجود نقش برهم‌کنش‌های هیدروژنی جای بحث دارد [۲۷].

بسیاری از این پژوهشگران بر این باورند، ابتدا برهم‌کنش‌های آبگریز ساختارهای میسل ماندی تشکیل می‌دهند و سپس بین بخش‌های آبدوست، برهم‌کنش‌های هیدروژنی اتفاق می‌افتد [۲۹]. همچنین آنها پیشنهاد دادند، نواحی اتصال شامل دو بخش تراکم گروه‌های هیدروکسی و انبوه‌های آبگریز است. در مطالعات رئولوژی، دلیل افزایش سریع مدول ذخیره در دماهای بیشتر از  $T_{\text{onset}}$  سینتیک انتقالات سل - ژل است که گرمای داده شده ابتدا جذب می‌شود تا قفس آب و پوسته‌های اطراف انبوه‌های آبگریز و گروه‌های هیدروکسی را بشکند. این مرحله، با تشکیل انبوه‌های آبگریز و گروه‌های هیدروکسی دنبال می‌شود. افزایش سریع در مدول ذخیره ژل HPMC با تشکیل نواحی اتصال انبوه‌های آبگریز و گروه‌های هیدروکسی ایجاد می‌شود [۱۸،۲۷،۳۰].

Yuguchi و همکاران رفتار ژل شدن برگشت پذیر محلول‌های آبی

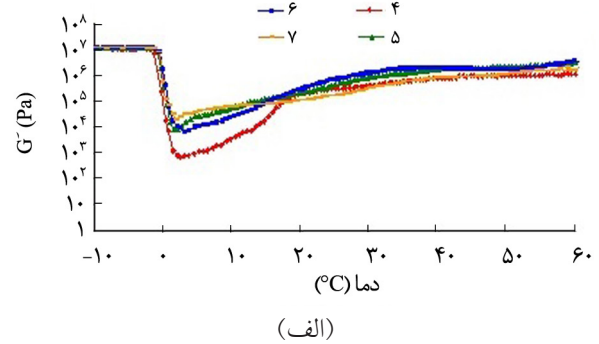


شکل ۵- تغییرات: (الف) مدول‌های کشسانی ( $G'$ ) و اتلاف ( $G''$ ) و (ب) گرانیوی بر حسب دما برای محلول ۲ w/w/ هیدروکسی پروپیل متیل سلولوز حاوی ۰/۲ مولار  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  (فرمول بندی ۲ مطابق جدول ۱).

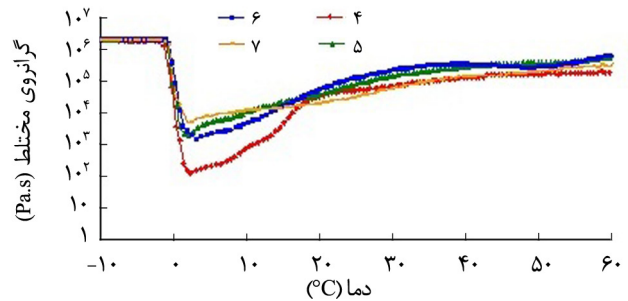


شکل ۷- برهم‌کنش نانوذرات معدنی HAp و  $\beta$ -TCP و یون‌های آزاد شده از آنها و نمک  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  با HPMC.

نمک‌ها بر دمای انتقال فاز محلول‌های آبی پلیمرهای حساس به دما مثل متیل سلولوز، هیدروکسی پروپیل متیل سلولوز و کوپلیمرهای N-ایزوپروپیل آکریل‌آمید مؤثرند. Kim و همکاران اثر نمک بر رفتار ژل شدن دمایی کوپلیمرهای سه‌قطعه‌ای پلی (اتیلن گلیکول) و پلی (L-D-لاکتید-co-گلیکولید) (PEG-PLGA-PEG) را بررسی کردند. آنها نشان دادند، نمک‌های با اثر نمک‌زدایی مثل سدیم کلرید با تشکیل ساختار آب، دمای ژل شدن را کاهش می‌دهند. از طرف دیگر، نمک‌های با اثر نمک‌فرونی مثل سدیم تیوسیانات با شکستن ساختار آب دمای ژل شدن را افزایش می‌دهند. اثر یون‌ها از سری‌های هوفمیستر پیروی می‌کند که از قابلیت یون‌ها برای رسوب پروتئین‌ها ناشی می‌شود و آنیون‌ها به ترتیب  $\text{SO}_4^{2-} > \text{S}_2\text{O}_3^{2-} > \text{H}_2\text{PO}_4^- > \text{F}^- > \text{Cl}^- > \text{Br}^- \approx \text{NO}_3^- > \text{I}^- > \text{ClO}_4^- > \text{SCN}^-$  و کاتیون‌ها به ترتیب  $\text{Li}^+ > \text{Na}^+ > \text{K}^+ > \text{Mg}^{2+} > \text{Ca}^{2+} > \text{Ba}^{2+}$  اثر کاتیون‌ها بسیار کمتر از آنیون‌هاست. سازوکارهای مختلفی برای توضیح اثر سری‌های هوفمیستر پیشنهاد شده و اکثر نظریه‌ها بر پایه قابلیت یون‌ها برای شکستن ساختار آب است [۳۴، ۳۹]. Collin پیشنهاد داد، اثر یونی به ساختار آب برای رقابت بین برهم‌کنش‌های آب - یون مربوط می‌شود [۴۰]. درنهایت، نمونه حاوی ۰/۲ مولار  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  (فرمول‌بندی ۲) انتخاب شد، به دلیل اینکه نسبت به نمونه‌های ۱ و ۳ دمای ابری شدن و در نتیجه دمای ژل نزدیک به دمای



(الف)



(ب)

شکل ۶- تغییرات: (الف) مدول ذخیره ( $G'$ ) و (ب) گرانروی بر حسب دما برای نمونه‌های حاوی نمک  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  (نمودارهای ۴ تا ۷ مطابق جدول ۱ هستند).

### بررسی دمای ابری شدن

برای تعیین دمای ابری شدن پلیمرهای حساس به دما از کدورت‌سنجی [۳۷]، رنگ‌سنجی [۲۱] یا فنون مبتنی بر طیف‌بینی UV-Vis [۲۱] استفاده می‌شود که مقدار نور عبوری از نمونه را نشان می‌دهند. در نقطه ابری شدن، برهم‌کنش پلیمر با حلال کم می‌شود و در واقع پلیمر در حلال رسوب می‌کند. این پدیده منجر به ایجاد کدورت در سامانه می‌شود. معمولاً نقطه‌ای را که مقدار نور عبوری به ۵۰٪ مقدار اولیه می‌رسد، نقطه ابری شدن می‌نامند [۲۱، ۲۷، ۳۸].

همان‌طور که در شکل ۴ مشاهده می‌شود، با افزایش غلظت نمک  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ ، دمای ابری شدن کاهش می‌یابد. این رفتار به دلیل پیروی نمک‌ها از سری هوفمیستر و اثر آن بر برهم‌کنش یون‌های حاصل با آبیوش‌کننده‌های پلیمر است. همچنین، مقدار کاهش دمای ابری شدن با غلظت نمک  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  رابطه مستقیم دارد.

جدول ۴- مقدار بیشینه نیروی تزریق برای نمونه‌های ارائه شده در جدول ۱.

فرمول‌بندی	۴	۵	۶	۷
میانگین بیشینه نیرو (N)	۳/۵۵ (۱/۲۵)	۳/۴۸ (۱/۱۶)	۲/۹ (۰/۱۵)	۴/۲۵ (۱/۱۶)

میانگین سه اندازه‌گیری گزارش شده و اعداد داخل پرانتز انحراف معیار داده‌هاست.

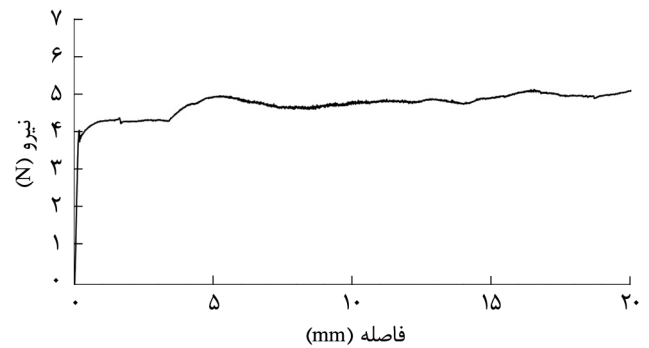


عمومی ارزیابی شد. تزریق پذیری را بر حسب مقدار وزن ماده تزریق شده نسبت به وزن اولیه پیش از تزریق بیان می کنند. در این مطالعه، تمام نمونه ها تزریق پذیر کامل بودند. بنابراین، نتیجه گزارش شده بیشینه نیروی تزریق است. شماره و شرایط نمونه های بررسی شده در این آزمون، در جدول ۱ و نتایج این آزمون در جدول ۴ آمده است. شکل ۸ نمونه ای از منحنی نتایج آزمون تزریق پذیری را نشان می دهد. تحلیل آماری ANOVA انجام شده روی نتایج نشان داد، تفاوت آماری معنی داری بین مقادیر نیروی تزریق پذیری نمونه های مختلف وجود ندارد ( $p < 0.05$ ). هنگامی که غلظت پرکننده افزایش می یابد، پدیده های مختلفی اتفاق می افتد:

- با توجه به افزایش تعداد ذرات بر واحد حجم، بسامد برخورد ذرات طی جریان افزایش می یابد.
- جاذبه ها و دافعه های بین ذرات به دلیل بارهای الکتروستاتیک بیشتر می شود.
- چرخش ذرات طی جریان یافتن، آثار اتلاف اضافی ایجاد می کند که منجر به افزایش گرانی می شود.
- اما در نمونه های مورد آزمون به نظر می رسد، مقدار پرکننده به اندازه ای نیست که برهم کنش های مؤثری بین ذرات ایجاد شود. بنابراین، تفاوت معنی داری بین مقادیر نیروی تزریق پذیری نمونه های مختلف مشاهده نشد.

### نتیجه گیری

در این مطالعه، داربست های کامپوزیتی حاوی نانوذرات کلسیم فسفات دوفازی حساس به دما، تزریق پذیر و تشکیل شونده در محل با استفاده از نانوذرات HAp و  $\beta$ -TCP به عنوان فاز معدنی و HPMC به عنوان ماتریس تهیه شد. برای کاهش دمای ژل شدن از نمک  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  استفاده شد که برای تأیید کاهش دمای ابری شدن از طیف سنجی UV-Vis و بررسی رفتار ژل ها از رئولوژی استفاده شد. نتایج رئومتری نشان داد، ترکیب این نانوذرات در محلول آبی HPMC منجر به افزایش گرانی، مدول های ذخیره و اتلاف و کاهش دمای ژل شدن می شود. نمونه حاوی فاز معدنی زیاد، حساسیت دمایی کمتری نسبت به نمونه حاوی فاز معدنی کم دارد. همه این فرمول بندی ها تزریق پذیری قابل قبولی دارند.



شکل ۸- نمودار تزریق پذیری نمونه ۴ (حاوی ۲۰٪ فاز معدنی، ۱۰٪ HAP و ۱۰٪ TCP).

بدن نشان می دهد. اگرچه دمای ژل شدن این نمونه بیشتر از دمای بدن است، اما انتظار می رود، وجود فاز معدنی در فرمول بندی های نهایی این دما را کاهش دهد.

### اثر نمک بر رفتار نمونه های حاوی مخلوط فاز معدنی

در شکل ۶ مشاهده می شود، نمونه های حاوی  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  در دمای محیط به استحکام نهایی رسیده اند و بنابراین رفتار ژل شدن در محل (در دمای حدود  $37^\circ\text{C}$ ) را نشان نمی دهند. با توجه به نمودارهای این شکل می توان نتیجه گرفت، نمونه حاوی ۲۰٪ فاز معدنی با تغییر دما بیشترین تغییرات گرانی و مدول های ذخیره و اتلاف را نشان می دهد. زیرا، این نمونه دارای مقدار فاز معدنی کمتری است و پلیمر سهم بیشتری از ژل را اشغال می کند. بنابراین، با تغییرات دما به دلیل غالب بودن اثر پلیمر، بیشترین تغییرات را در مدول و گرانی نشان می دهد. همچنین، یون آزاد شده از فاز معدنی (به ویژه  $\beta$ -TCP)، منجر به کاهش دمای ژل نمونه تا دماهای کم شده است، به طوری که در دمای  $25^\circ\text{C}$  بخش بیشتری از پلیمر ژل شده است [۲، ۴۱، ۴۲]. اثر یون بر کاهش دمای ژل شدن HPMC، با افزودن نمک به آن با استفاده از رئولوژی و UV-Vis تأیید شد. این برهم کنش ها طرح وار در شکل ۷ نشان داده شده است. در غلظت های ۳۰ و ۴۰٪ فاز معدنی، غلظت فاز معدنی تا حدی زیاد شده است که رفتار ژل شدن پلیمر خیلی کمتر دیده می شود.

### تزریق پذیری

تزریق پذیری داربست های تزریق پذیر با استفاده از دستگاه آزمون

## مراجع

- Nerem R.M.S.A., Tissue Engineering: from Biology to Biological Substitutes, *Tissu Eng.*, **1**, 3-13, 1995.
- Damien C.J. and Parsons J.R., Bone Graft and Bone Graft Substitutes: A Review of Current Technology and Applications, *J. Appl. Biomater.*, **2**, 187-208, 1991.
- William R. and Segagib M., Synthetic Bone Graft Substitutes, *ANZ J. Surg.*, **71**, 354-361, 2001.
- Boix D., Weiss P., Gauthier O., Guicheux J., Bouler J.M., Pilet P., Daculsi G., and Griman di G., Injectable Bone Substitute to Preserve Alveolar Ridge Resorption after Tooth Extraction: A Study in Dog, *J. Mater. Sci., Mater. Medicine*, **17**, 1145-1152, 2006.
- Mickiewicz R.A., *Polymer-Calcium Phosphate Composites for Use as an Injectable Bone Substitute*, MSc Thesis, University of Toronto, 2001.
- Wu C. and Xiao Y., Evaluation of the In Vitro Bioactivity of Bioceramics, *Bone and Tissue Regeneration Insights*, **2**, 25-29, 2009.
- Jallot E., *Handbook of Nanostructured Biomaterials and their Applications in Nanobiotechnology*, American Scientific, USA, 495-509, 2005.
- Huang Z., Tian J., Yu B., Xu Y., and Feng Q., A Bone-Like Nano-hydroxyapatite/Collagen Loaded Injectable Scaffold, *Biomed. Mater.*, **4**, 055005, 2009.
- Dorozhkin S.V., Nanosized and Nanocrystalline Calcium Orthophosphates, *Acta Biomaterialia*, **6**, 715-734, 2010.
- Link D.P., *Bone Cement: Biological Properties of Biodegradable Polymeric Microparticles*, UB Nijmegen, 2008.
- Kwon S.H., Jun Y.K., and Hong Kim H.E., Synthesis and Dissolution Behavior of  $\beta$ -TCP and HA/ $\beta$ -TCP Composite Powders, *J. Eur. Ceramic Soc.*, **23**, 1039-1045, 2003.
- Dorozhkin S.V., Calcium Orthophosphates as Bioceramics: State of the Art, *J. Funct. Biomater.*, **1**, 22-107, 2010.
- Kim H., *Synthesis and Control of Microstructure, Mechanical Properties, and Bioactivity in Biphasic and Preferentially Oriented Calcium Phosphate Bioceramics*, PhD Thesis, University of Alabama, Birmingham, 2007.
- Cho J.S., Jung D.S., Han J.M., and Kang Y.C., Nano-sized  $\alpha$  and  $\beta$ -TCP Powders Prepared by High Temperature Flame Spray Pyrolysis, *Mater. Sci. Eng., Part C*, **29**, 1288-1292, 2009.
- Castellani C., Zanoni G., Tangl S., Van Griensven M., and Redl H., Biphasic Calcium Phosphate Ceramics in Small Bone Defects: Potential Influence of Carrier Substances and Bone Marrow on Bone Regeneration, *Clin. Oral Implants Res.*, **20**, 1367-1374, 2009.
- Yang Y., Kim K.H., and Ong J.L., A Review on Calcium Phosphate Coatings Produced Using a Sputtering Process-An Alternative to Plasma Spraying, *Biomaterials*, **26**, 327-337, 2005.
- Slaughter B.V., Khurshid S.S., Fisher O.Z., Khademhosseini A., and Peppas N.A., Hydrogels in Regenerative Medicine, *Adv. Mater.*, **21**, 3307-3329, 2009.
- Pérez O.E., Wargon V., and Pilosof A.M.R., Gelation and Structural Characteristics of Incompatible Whey Proteins/Hydroxypropylmethylcellulose Mixtures, *Food Hydrocolloid*, **20**, 966-974, 2006.
- Xu H.H.K., Weir M.D., Burguera E.F., and Fraser A.M., Injectable and Macroporous Calcium Phosphate Cement Scaffold, *Biomaterials*, **27**, 4279-4287, 2006.
- Escudero J.J., Ferrero C., and Jiménez-Castellanos M.R., Compaction Properties, Drug Release Kinetics and Fronts Movement Studies from Matrices Combining Mixtures of Swellable and Inert Polymers. II. Effect of HPMC with Different Degrees of Methoxy/Hydroxypropyl Substitution, *Int. J. Pharm.*, **387**, 56-64, 2010.
- Silva S.M., Pinto F.V., Antunes F.E., Miguel M.G., Sousa J.J., and Pais A.A., Aggregation and Gelation in Hydroxypropylmethyl Cellulose Aqueous Solutions, *J. Colloid Interface Sci.*, **327**, 333-340, 2008.
- Hockin H.K., Xu M.D.W., and Carl G., Aggregation and Gelation in Simon. Injectable and Strong Nano-apatite Scaffolds for Cell/Growth Factor Delivery and Bone Regeneration, *Dental Mater.*, **24**, 1212-1222, 2008.
- Zhao L., Weir MD., and Xu H.H.K., An Injectable Calcium Phosphate-Alginate Hydrogel-Umbilical Cord Mesenchymal Stem Cell Paste for Bone Tissue Engineering, *Biomaterials*, **31**, 6502-6510, 2010.
- Hou Q., De Bank P.A., and Shakesheff K.M., Injectable Scaffolds for Tissue Regeneration, *J. Mater. Chem.*, **14**, 1915-1923, 2004.

25. Marefat Seyedlar R., Nodehi A., Atai M., and Imani M., Gelation Behavior of In Situ Forming Gels Based on HPMC and Biphasic Calcium Phosphate Nanoparticles, *Carbohydr. Polym.*, **99**, 257-263, 2014.
26. Weng L.H., Zhang L.N., Ruan D., Shi L.H., and Xu J., Thermal Gelation of Cellulose in a NaOH/Thiourea Aqueous Solution, *Langmuir*, **20**, 2086-2093, 2004.
27. Liu S.Q., Joshi S.C., Lam Y.C., and Tam K.C., Thermoreversible Gelation of Hydroxypropylmethylcellulose in Simulated Body Fluids, *Carbohydr. Polym.*, **72**, 133-143, 2008.
28. Yuguchi Y., Urakawa H., Kitamura S., Ohno S., and Kajiwara K., Gelation Mechanism of Methylhydroxypropylcellulose in Aqueous Solution, *Food Hydrocolloid.*, **9**, 173-179, 1995.
29. Bodvik R., Dedinaite A., Karlson L., Bergström M., Bäverbäck P., and Pedersen J.S., Aggregation and Network Formation of Aqueous Methylcellulose and Hydroxypropylmethylcellulose Solutions, *Colloid. Surface. A: Physicochem. Eng. Aspect.*, **354**, 162-171, 2010.
30. Kundu P. and Kundu M., Effect of Salts and Surfactant and their Doses on the Gelation of Extremely Dilute Solutions of Methyl Cellulose, *Polymer*, **42**, 2015-2020, 2001.
31. Joshi S.C. and Lam Y.C., Modeling Heat and Degree of Gelation for Methyl Cellulose Hydrogels with NaCl Additives, *J. Appl. Polym. Sci.*, **101**, 1620-1629, 2006.
32. Liang H.F., Hong M.H., Ho R.M., Chung C.K., Lin Y.H., and Chen C.H., Novel Method Using a Temperature-sensitive Polymer (methylcellulose) to Thermally Gel Aqueous Alginate as a pH-Sensitive Hydrogel, *Biomacromolecules*, **5**, 1917-1925, 2004.
33. Liu S.Q., Joshi S.C., and Lam Y.C., Effects of Salts in the Hofmeister Series and Solvent Isotopes on the Gelation Mechanisms for Hydroxypropylmethylcellulose Hydrogels, *J. Appl. Polym. Sci.*, **109**, 363-372, 2008.
34. Mitchell K., Ford J.L., Armstrong D.J., Elliott P.N.C., Rostron C., and Hogan J.E., The Influence of Additives on the Cloud Point, Disintegration and Dissolution of Hydroxypropylmethylcellulose Gels and Matrix Tablets, *Int. J. Pharm.*, **66**, 233-242, 1990.
35. Hribar B., Southall N.T., Vlachy V., and Dill K.A., How Ion Affect the Structure of Water, *J. Am. Chem. Soc.*, **124**, 12302-12311, 2002.
36. Bajwa G.S., Sammon C., Timmins P., and Melia C.D., Molecular and Mechanical Properties of Hydroxypropyl Methylcellulose Solutions during the Sol:Gel Transition, *Polymer*, **50**, 4571-4576, 2009.
37. Lev E. and Bromberg E.S.R., Temperature-responsive Gels and Thermogelling Polymer Matrices for Protein and Peptide Delivery, *Adv. Drug Deliver. Rev.*, **31** 197-221, 1998.
38. Jeong B., Bae Y.H., and Kim. S.W., Thermoreversible Gelation of PEG-PLGA-PEG Triblock Copolymer Aqueous Solutions, *Macromolecules*, **32**, 7064-7069, 1999.
39. Collins K.D., Charge Density-Dependent Strength of Hydration and Biological Structure, *Biophys. J.*, **72**, 65-76, 1997.
40. Cameron H.U., Macnab I., and Pilliar R.M., Evaluation of a Biodegradable Ceramic, *J. Biomed. Mater. Res.*, **11**, 179-186, 1977.
41. Shimazaki K. and Mooney V., Comparative Study of Porous Hydroxyapatite and Tricalcium Phosphate as Bone Substitute, *J. Orthop. Res.*, **3**, 301-310, 1985.
42. Shenoy A.V., *Rheology of Filled Polymer Systems*, **4**, Springer, 144-145, 1999.