

بررسی نقش متیل سلولز در ساختار هیدروژل حساس به گرما به عنوان سامانه قابل تزریق برای کاربرد در مهندسی بافت نرم: ساخت و شناسایی

سوگل مطلبی طلا تپه^۱، مازیار شریفزاده بانی^{۲*} و سعید حیدری کشل^۳

۱. دانشجوی دکتری، گروه مهندسی شیمی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد آیت ... املی، آمل، ایران
۲. دانشیار گروه مهندسی شیمی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد آیت ... املی، آمل، ایران
۳. استادیار گروه مهندسی بافت و علوم سلولی کاربردی، دانشگاه علوم و پزشکی شهید بهشتی، تهران، ایران

دریافت: بهمن ۱۳۹۷، بازنگری: مرداد ۱۳۹۸، پذیرش: شهریور ۱۳۹۸

چکیده: یکی از چالش‌های پایه‌ای در مهندسی بافت، انتخاب نوع سپار و طراحی ساختار مناسب برای هیدروژل‌ها است. در این بررسی، برای ساخت بسترهای هیدروژلی با قابلیت تزریق، حساس به گرما، ویژگی فیزیکی و مکانیکی مشابه با بافت‌های نرم بدن، هیدروژل ان-ایزوپروپیل آکریل آمید / آکرلیک اسید / ان-آکریلوسوکسینامید/۲-هیدروکسی اتیل متاکریلات پلی لاکتید (NIPAAm/AAC/NAS/HEMA PLA) با روش اسپارش حلقه باز در نسبت‌های مولی متفاوت ساخته شد. هیدروژل گروه ۱ با نسبت مولی ۸۰/۵/۵/۱۰ به عنوان گروه ایده‌ال در نظر گرفته شد. برای بهبود ویژگی هیدروژل، متیل سلولز به گروه گفته شده، افزوده شد (گروه ۴). ویژگی فیزیکی و مکانیکی و زیستی هیدروژل‌ها نیز مورد بررسی قرار گرفت. نتایج نشان داد، نسبت مولی سپارها در افزایش آبدوستی، تخلخل، کشسانی مشابه با بافت نرم و بهبود تکثیر سلولی، نقش مهمی را ایفا می‌کند. حضور متیل سلولز نیز منجر به بهبود ویژگی‌های یاد شده می‌شود. هیدروژل‌های گروه‌های ۱ و ۴ در مقایسه با گروه‌های دیگر، به دلیل آبدوستی بالای ۵۱٪ و مدول کشسانی مشابه با بافت قلب (به ترتیب ۷۹،۲۲٪ و ۶۸،۱ کیلو پاسگال) و سازگاری زیستی بالای ۹۴٪، محیط ایده‌آلی را برای بهبود فعالیت‌های سلولی ایجاد می‌کنند. به نظر می‌رسد هیدروژل‌های یاد شده (گروه‌های ۱ و ۴) توانایی پیروی از بافت‌های نرم مانند قلب را دارند و در روند ترمیم و بازسازی مؤثر خواهند بود. از سوی دیگر، این هیدروژل‌های قابل تزریق و حساس به گرما امکان مخلوط شدن یکنواخت سلول‌ها و عامل‌های رشد را فراهم می‌کنند و می‌توانند در سلول درمانی بافت‌های نرم نیز کاربردی باشند.

واژه‌های کلیدی: مهندسی بافت نرم، هیدروژل حساس به گرما، متیل سلولز، سازگاری زیستی

مقدمه

جذب آب بالا و تقلید ویژگی‌های طبیعی ماده زمینه خارج سلولی، شاخص‌های ایده‌آل برای کاربرد در زمینه پزشکی دارند [۱، ۲] و [۳]. ماهیت نرم و کشسان برخی از هیدروژل‌ها، اصطکاک سطحی

امروزه هیدروژل‌ها به عنوان نوعی از بسترهای سپاری، با داشتن ساختاری شبکه‌ای و سه بعدی، زیست‌سازگاری مطلوب،

اکریلیک اسید^۲ [۵]، ۲-هیدروکسی اتیل متاکریلات^۴ [۵] و ... استفاده می‌شود. در دو دهه گذشته، هیدروژل‌های سنتزی به دلیل عمر کاربری طولانی، ظرفیت زیاد جذب آب و استحکام زیاد ژل به تدریج جایگزین هیدروژل‌های طبیعی شده‌اند. بسپارهای سنتزی ساختار شناخته شده‌ای دارند که می‌توانند برای عامل دار شدن و بهبود ویژگی‌های فیزیکی و شیمیایی اصلاح شوند. از سویی دیگر، استفاده از بسپارهای طبیعی به دلیل تنوع، فراوانی، ارزانی، تجدیدپذیری، عدم سمیت، زیست‌تخریب‌پذیری و زیست‌سازگاری بسیار جالب توجه است [۲۲].

امروزه، پژوهش‌های گسترده‌ای در ارتباط با هیدروژل‌های حساس به گرما و قابل تزریق برای انتقال داروها و یا سلول‌ها در ترمیم بسیاری از بافت‌ها مانند قلب، استخوان، عصب و ... صورت گرفته است [۴، ۲۲ و ۲۳]. از میان هیدروژل‌های حساس به گرما مانند کیتوسان، متیل سلولز و ... [۲۲]، آن-ایزوپروپیل آکریل آمید (NIPAAm) با ویژگی تبدیل فاز سریع به عنوان یکی از شناخته شده‌ترین و کاربردی‌ترین هیدروژل‌های حساس به گرما است و به دلیل پایداری گرمایی، زیست‌سازگاری، آبدوستی و رفتار تورمی بالا، انتقال فاز بسپارها در محلول آبی از حالت آبدوست به حالت آبریز و شباهت آن‌ها به شبکه‌ها و نسوج بدن، در رده بسپارهای زیست‌سازگار هوشمند قرار گرفته‌اند. این بسپار دمای انحلال بحرانی کمتر از ۳۲ °C را دارد که این ویژگی در سلول درمانی می‌تواند مفید و تاثیرگذار باشد، زیرا سلول‌ها بدون روش هضم آنزیمی به راحتی می‌توانند از سطح جدا شوند و به بافت هدف انتقال یابند [۲۴ تا ۲۶]. در این دما یک انتقال فاز از حالت آبدوست به آب‌گریز وجود دارد که می‌توان با نمک‌ها و مواد سطح‌فعال این دما را به نزدیک دمای بدن رساند. در زیر دمای بحرانی، بخش آنتالپی که در ارتباط با پیونددهی هیدروژنی میان بسپار و مولکول‌های آب است، مسئول حل شدن است. وقتی دما به دمایی بالاتر از دمای بحرانی برسد، بخش آنتروپی (برهمکنش‌های آب‌گریز) منجر به رسوبدهی بسپار می‌شود [۲۶ و ۲۷]. از سویی دیگر بسپار ۲-هیدروکسی اتیل متاکریلات

آن‌ها را با بافت‌های اطراف کم می‌کند. کاهش اصطکاک سطحی موجب می‌شود که آسیب کمتری به سطوح داخلی عروق برسد [۴، ۵ و ۶]. برخی از اعضای بدن انسان، مانند روده، مایع زجاجیه چشم و شش، از ژل‌های زیستی ساخته شده‌اند. ماهیچه‌های بدن نیز از الیاف غوطه‌ور در مایع خون یا پلاسما تشکیل شده است که مواد غذایی و معدنی را برای ادامه کار آن‌ها فراهم می‌کند [۷ و ۸]. شباهت بین ماهیچه طبیعی و ژل بسپاری، قابلیت کاربرد ژل‌ها را به عنوان ماهیچه‌های مصنوعی آشکار می‌کند [۹، ۱۰]. این ترکیب‌ها رفتار اعضای بدن انسان را در پاسخ به تغییر شرایط محیطی مانند دما، pH، آنزیم و میدان الکتریکی پیروی می‌کنند که موجب به کارگیری آن‌ها در بدن به عنوان اندام‌های مصنوعی، حامل‌های دارویی و سلولی شده است [۱۱]. امروزه، هیدروژل‌ها با قابلیت تزریق و حساس به گرما جایگاه ویژه‌ای را در زمینه‌های زیست‌پزشکی، زیست‌مهندسی مانند زیست‌حسگرها، مهندسی بافت نرم، پزشکی ترمیمی و دارویی نشان می‌دهند [۱۲ و ۱۳]. هیدروژل‌های حساس به گرما قادر به ایجاد حامل‌های سلولی پایدار در پاسخ به تغییر دما هستند و قابلیت اختلاط یکنواخت با سلول‌ها و عوامل رشد را دارند [۱۴، ۱۵، ۱۶].

پژوهش‌ها نشان داد که داربست‌ها با داشتن ساختارهای سه بعدی تنها قادرند یک سطح دو بعدی را برای چسبندگی سلولی فراهم کنند، در صورتی که هیدروژل‌ها می‌توانند یک محیط سه بعدی برای سلول‌ها ایجاد کنند [۱۷ تا ۱۹]. یکی از موثرترین عامل‌ها در ویژگی‌های تورمی و استحکام هیدروژل‌ها، پیوندهای عرضی آن به عنوان عامل شبکه‌ای شدن هیدروژل‌ها است. قابلیت جذب آب هیدروژل‌ها از گروه‌های عاملی آبدوست در زنجیرهای بسپاری ناشی از گروه‌های آمینی (NH_2)، هیدروکسیل (OH)، کربوکسیلی (COOH)، سولفونی (SO_3H) و آمیدی (CONH_2) است، در حالی که مقاومت آن‌ها در برابر حل شدن به پیوندهای عرضی بین زنجیرهای شبکه مربوط است [۱۶]. در ساخت هیدروژل‌ها برای کاربردهای پزشکی، از تکپارهای قطبی مانند N-ایزوپروپیل آکریل آمید^۱ [۲۰]، اتیلن گلیکول^۲ [۲۱]،

1. N-isopropylacrylamide(NIPAAm) 2. Ethylene glycol 3. Acrylic acid 4. 2-Hydroxyethyl Methacrylate

چسبندگی سلول‌ها در سطح هیدروژل نیز از طریق آزمون MTT و تصاویر میکروسکوپ الکترونی روبشی مطالعه شد.

بخش تجربی

مواد

دی-ال‌لاکتید^۱ با وزن مولکولی ۱۴۴,۳ (گرم/مول) و N-ایزوپروپیل‌آکریل‌امید (NIPAAm) از شرکت سیگما-آلدريج خریداری و پیش از استفاده با روش تبلور دوباره با حلال‌های اتیل استات و هگزان خالص‌سازی شدند. تکپار اکریلیک اسید (سیگما-آلدريج) نیز به روش تقطیر در خلأ خالص‌سازی شد. ترکیب‌های دیگر شامل N-اکریلوسوکسینامید (NAS)، ۲-هیدروکسی‌اتیل متاکریلات (HEMA)، اکریلیک اسید (AAC)، متیل سلولز (Mw= ۱۴ kDa)، بنزوئیل پراکسید (BPO) و استانوس-۲-اتیل هگزانات^۲ Sn(Oct)₂ به‌عنوان کاتالیست در واکنش نیز از شرکت سیگما-آلدريج خریداری و بدون نیاز به خالص‌سازی استفاده شدند. مواد مورد نیاز کشت سلولی شامل محیط کشت DMEM low glucose از شرکت Gibco, USA و پودر MTT (3-(4, 5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide) برای بررسی سمیت سلولی و آنزیم پروتئاز XIV برای آزمون زیست‌تخریب‌پذیری از شرکت سیگما-آلدريج خریداری شد. همچنین، همه حلال‌های مورد استفاده نیز از شرکت مرک خریداری شدند.

دستگاه‌ها

برای بررسی ساختار شیمیایی نمونه‌ها از دستگاه طیف‌سنج فروسرخ تبدیل فوریه (FTIR) مدل Germany، ALPHA Bruker، به‌منظور ریخت‌شناسی و تعیین اندازه حفره‌ها در سطح هیدروژل از میکروسکوپ الکترونی روبشی مدل (XL30 ESEM, PHILIPS, Germany) برای تعیین ویژگی کشسانی هیدروژل‌ها، از دستگاه Zwick/Roll, 1446 در دمای ۳۷ °C، به‌منظور تعیین و بررسی زاویه تماس از دستگاه سنجش

(HEMA) با ویژگی ترشوندگی بسیار بالا، رفتار کشسانی و زیست‌سازگاری مناسب کاربردهای پزشکی بالایی داشته و شباهت خوبی با بافت‌های طبیعی بدن از خود نشان می‌دهد. یکی از مشکلات پایه‌ای به‌کارگیری این بسپارها مقاومت آن‌ها در برابر تخریب است [۴]. برای غلبه بر این مشکل و کنترل تخریب می‌توان از تکپارهای زیست‌تخریب‌پذیر مانند بتا-بوتیرولاکتون^۱ [۴ و ۲۰]، پلی‌(ال-لاکتید)^۲ [۱۵] و تری‌متیلن‌کربنات^۳ [۲۰] و [۲۸] در ساختار ۲-هیدروکسی‌اتیل متاکریلات استفاده کرد. از سوی دیگر، مطالعات پیشین نشان دادند که حضور برخی از زیست‌مواد مانند کلاژن [۵ و ۲۹]، الاستین [۱۴]، فیبروین ابریشم [۳۰]، [۳۱] و متیل سلولز [۳۲ و ۳۳] در ساختار هیدروژل‌ها نقش مهمی را می‌تواند در بهبود ویژگی‌های فیزیکی و افزایش فعالیت‌های سلولی ایفا کنند. افزون بر اهمیت ایجاد ساختار مناسب و مشابه با بستر خارج سلولی، زیست‌بسپار مذکور به دلیل ویژگی‌های زیستی مناسب همچون، زیست‌سازگاری، چسبندگی، تکثیر و تمایز سلولی مورد توجه پژوهشگران قرار گرفته است [۳۲].

هدف اصلی از کار حاضر آماده‌سازی و بررسی ویژگی‌های فیزیکوشیمیایی هیدروژل‌های ترکیبی با قابلیت تزریق و حساس به گرما بود که توانایی استفاده در بافت‌های نرم بدن را داشته باشد. از این‌رو، در این پژوهش ابتدا هیدروژل برپایه ان-ایزوپروپیل‌آکریل‌امید به همراه تکپارهای اکریلیک اسید، ان‌اکریلوسوکسینامید^۴ (این ترکیب به‌عنوان پیونددهنده در ساختار است و هیدروژل را نیز قادر به پیوند بهتر با زیست‌مواد می‌کند [۱۴]) و ۲-هیدروکسی‌اتیل متاکریلات‌پلی‌لاکتید (HEMA-PLA)^۵ با روش بسپارش حلقه باز^۶ سنتز شدند. در مرحله بعد، با انتخاب بهترین نسبت از تکپارهای به‌کاررفته در ساختار، با افزایش متیل سلولز، تاثیر حضور آن در ساختار هیدروژل مذکور بررسی شد. پس از ساخت، حضور تکپارها با طیف‌سنجی فروسرخ تایید و برخی ویژگی‌های فیزیکی و مکانیکی همچون جذب آب، زاویه تماس، نرخ تخریب، ریخت‌سطح، مدول کشسانی^۷ و استحکام کششی هیدروژل‌ها بررسی و زیست‌سازگاری، تکثیر و

1. β -butyrolactone 2. Poly(L-lactide) (PLA) 3. Trimethylene carbonate (TMC) 4. N-Acryloxysuccinimide (NAS)
5. 2-hydroxyethyl methacrylate-poly lactide 6. Ring-opening polymerization 7. Elasticity modulus 8. D,L-lactide
9. Stannous 2-ethylhexanoate

پس از ۱۰ دقیقه رسوب زرد رنگی به دست آمد. برای حذف آب، رسوب یک شبانه روز در گرمخانه تحت خلأ قرار داده شد. برای خالص سازی، نمونه‌ها در تتراهیدرافوران حل و با افزودن دی‌اتیل اتر رسوب‌گیری انجام شد. به منظور افزایش کیفیت فراورده، خالص سازی دوبار انجام شد. فراورده (رسوب سفید رنگ) به دست آمده در گرمخانه 55°C تحت خلأ، در طی ۴۸ ساعت خشک شد (شکل ۱-ب).

تهیه هیدروژل چندسازم (NIPAAm-AAC-NAS-HEMAPLA-Methylcellulose) هم‌بسیار به دست آمده از مرحله پیش (با نسبت مولی ۸۰/۵/۱۰) در بافر فسفات (PBS) با pH برابر ۷٫۴ و غلظت ۲۰ درصد (وزنی/حجمی) در دمای 4°C حل شد. سپس، متیل سلولز در PBS (با غلظت ۳ درصد وزنی/حجمی) حل و به محلول به دست آمده (به مقدار ۱۵٪ حجم کل محلول هم‌بسیار) افزوده (جدول ۱) و ۱۲ ساعت در دمای 4°C قرار داده شد. نتایج هر سه مرحله با طیف‌سنجی FTIR بررسی شد (شکل ۱-ج).

شناسایی نمونه‌ها

طیف‌سنجی فرسرخ تبدیل فوریه (FTIR)

از طیف‌سنجی فرسرخ تبدیل فوریه برای شناسایی گروه‌های عاملی موجود در ساختار شیمیایی هیدروژل‌ها استفاده شد. روش نمونه‌سازی بدین ترتیب بود که نمونه‌ها در کلروفرم حل و بی‌درنگ به پودر برومید پتاسیم (KBr) افزوده و به صورت قرصی نازک شکل‌دهی شد. سپس، نمونه‌ها در دمای 40°C برای تبخیر کلروفرم خشک و در نهایت، قرص به دست آمده برای طیف‌سنجی در دستگاه FTIR قرار گرفت. طیف‌ها در گستره 4000 cm^{-1} ثبت شدند.

تعیین گستره دمای سل - ژل

برای تعیین دمای سل-ژل محلول‌های هیدروژل از دستگاه گرماسنج پویشی تفاضلی استفاده شد. در ابتدا، نمونه‌ها با غلظت ۲۰ درصد (وزنی/حجمی) در محلول بافر فسفات (با pH برابر

زاویه تماس مدل OCA 15 plus (شرکت kruss آلمان) و برای تعیین دمای سل-ژل نیز از دستگاه آزمون گرماسنجی پویشی تفاضلی^۱ مدل (Shimadzu, Japan) استفاده شد.

تهیه و آماده‌سازی HEMA-PLA

تکپارهای ۲-هیدروکسی اتیل متاکریلات و دی-ال لاکتید (با نسبت مولی ۲ به ۱) در ۲۷۰ میلی‌لیتر تولوئن حل و پس از ۱۵ دقیقه، $\text{Sn}(\text{Oct})_2$ (۱ مول درصد نسبت به HEMA) به عنوان کاتالیست در ۱ میلی‌لیتر تولوئن حل و به مخلوط افزوده شد. برای برهم‌کنش بین تکپارهای یادشده، این مخلوط در دمای 120°C به مدت ۲ ساعت تحت جریان گاز نیتروژن قرار داده شد تا گاز اکسیژن که می‌تواند در پیشبرد واکنش بسیار مزاحمت ایجاد کند، خارج شود. سپس، ترکیب به دست آمده در تتراهیدرافوران (THF) حل و به منظور رسوب‌گیری در مخلوط آب و یخ قرار داده شد. در مرحله بعدی، رسوب روغنی به دست آمده در اتیل استات حل و به منظور حذف آب، با نمک منیزیم سولفات (MgSO_4) در دمای اتاق به مدت ۲۴ ساعت مخلوط شد. در مرحله نهایی، نمونه در دمای 45°C به مدت یک شبانه روز در گرمخانه تحت خلأ قرار داده شد تا خشک شود (شکل ۱-الف).

تهیه هیدروژل‌ها (NIPAAm-AAC-NAS-HEMAPLA)

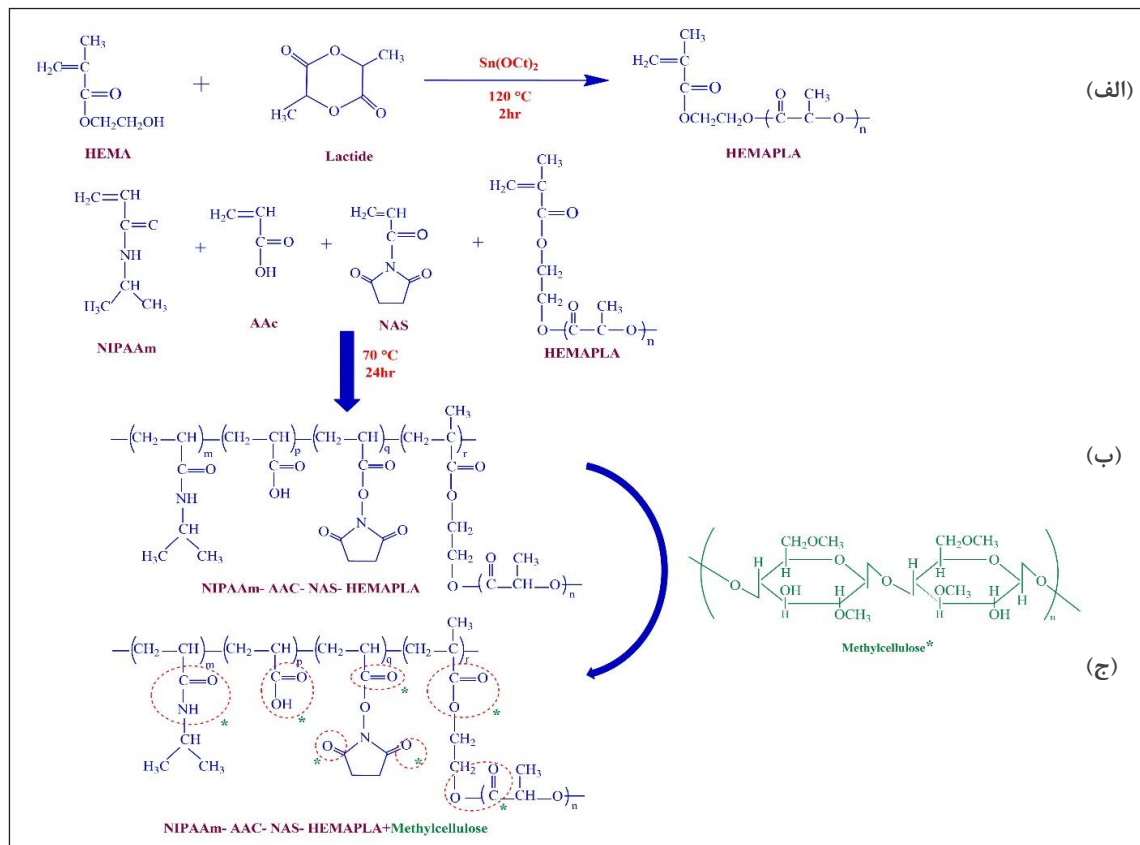
تکپارهای ان-ایزوپروپیل آکریل آمید (NIPAAm)، آکرلیک اسید (AAC) و ان-اکریلوسوکسینامید (NAS) با ماکروم ۲-هیدروکسی اتیل متاکریلات پلی لاکتید (HEMA-PLA) در سه نسبت متفاوت (جدول ۱) در حلال ۴،۱ دی‌اکسان حل و به مدت ۱۵ دقیقه تحت جریان گاز نیتروژن قرار داده شدند. در مرحله بعدی، بنزوئیل پراکسید به عنوان عامل شبکه‌ای‌کننده ($10^{-3} \times 7,2$ مول/مول تکپار) در حلال ۴،۱ دی‌اکسان حل و به مخلوط به دست آمده افزوده شد. این مخلوط برای بسپارش، ۲۴ ساعت در دمای 70°C قرار داده شد. پس از خنک شدن مخلوط بسپاری در دمای اتاق، به آرامی حلال هگزان به آن افزوده شد.

1. Differential scanning calorimetry (DSC) 2. N-acrylosuccinimide

شد. گستره گرمای مورد استفاده برای هر نمونه صفر تا ۶۰°C با سرعت ۵°C در دقیقه تحت جریان ثابت اتمسفر نیتروژن بود [۴]. این آزمون ۳ بار تکرار شد.

در یک حمام یخ با دمای ۴۰°C آماده و با یک وزن مشخص درون محفظه ویژه دستگاه قرار گرفت. با توجه به گرما اعمال شده به نمونه، دمای سل ژل برپایه نمودار خروجی از دستگاه تعیین

شکل ۱ مراحل ساخت ماکرومر HEMA-PLA (الف)، هیدروژل NIPAAm-AAC-NAS-HEMAPLA (ب) و چندسازه هیدروژلی NIPAAm-AAC-NAS-HEMAPLA-Methylcellulose (ج)



جدول ۱ نسبت‌های مولی هیدروژل‌های NIPAAm-AAC-NAS-HEMAPLA و شماره‌گذاری نمونه‌ها

شماره نمونه	AAC	NIPAAm	HEMA-PLA	NAS	Methylcellulose
۱	۵	۸۰	۱۰	۵	-
۲	۵	۷۰	۲۰	۵	-
۳	۵	۶۰	۳۰	۵	۱
۴	۵	۸۰	۱۰	۵	٪ ۱۵ از حجم کل بسپار

آزمون جذب آب

در ساختار، زاویه تماس در دمای بالاتر و پایین تر از سل-ژل اندازه گیری شد. این آزمون ۳ بار تکرار و نتایج مربوط به صورت مقادیر میانگین گزارش شد.

آزمون زیست تخریب پذیری در محیط آنزیمی

تخریب هیدروژل ها در یک محیط آنزیمی در دمای °C ۳۷ در مدت ۲۱ روز انجام شد. ابتدا، وزن اولیه نمونه ها با ترازوی دیجیتال (Sartorius مدل CP324S با دقت ۰٫۰۰۰۱ گرم) اندازه گیری شد (w₁) و سپس، نمونه ها با غلظت ۲۰٪ (وزنی/حجمی) تهیه و در حمام °C ۳۷ برای تشکیل ژل جامد قرار داده شد. سپس، ژل های به دست آمده در محیط آنزیمی (حاوی PBS با pH برابر ۷٫۴ و غلظت ۰٫۰۱ مولار به همراه ۲۰ U/ml آنزیم پروتاز XIV) در گرم خانه قرار گرفتند و در یک گستره زمانی تعیین شده (هر دو روز یکبار) نمونه ها از محیط خارج و سه بار با آب مقطر نیم گرم شسته شده و در دمای °C ۵۰ در گرم خانه خشک و وزن آن ها اندازه گیری می شد (w₂). لازم به یادآوری است که محلول رویی ژل ها هر دو روز یکبار با محلول تازه حاوی آنزیم جایگزین و دوباره در گرم خانه با دمای °C ۳۷ قرار می گرفت [۲۰ و ۳۶]. در نهایت، مقدار تخریب هیدروژل ها با معادله ۳ محاسبه شد. نتایج این آزمون با سه بار تکرار در نظر گرفته شد.

$$\text{درصد سرعت تخریب} = ((w_1 - w_2) / w_1) \times 100 \quad (3)$$

اندازه گیری ویژگی مکانیکی هیدروژل ها

ویژگی مکانیکی داربست های هیدروژلی با دستگاه سنجش ویژگی مکانیکی (مجهز به حمام آب °C ۳۷) با نیرویی برابر با ۱۰ پوند و با سرعت ۱۰ میلی متر در دقیقه اندازه گیری شد. پیش از شروع آزمون، برای ایجاد حالت ژل جامد، ۱۰ میلی لیتر از محلول های بسپاری (با غلظت ۲۰ درصد وزنی/حجمی) به مدت ۶ ساعت در گرم خانه با دمای °C ۳۷ قرار داده شدند. سپس، نمونه ها به شکل مستطیل هایی با عرض ۴ و طول ۲۵ میلی متر برش داده شده و

هدف از انجام این آزمون بررسی درصد آب جذب شده با هیدروژل ها است. ابتدا، نمونه ها در بافر فسفات (با pH برابر ۷٫۴ و غلظت ۲۰ درصد) در دمای °C ۴ درجه آماده و سپس، به منظور تشکیل ژل به حمام °C ۳۷ منتقل شدند. نمونه ها به مدت ۳ ساعت داخل گرم خانه قرار داده شد و در گستره زمانی مشخص آب سطح نمونه ها با دستمال گرفته و وزن آن با ترازو اندازه گیری شد. در نهایت، برپایه معادله های ۱ و ۲ به ترتیب درصد آب جذب شده و کاهش آب در هیدروژل محاسبه شد [۲۹ و ۳۵]. (برای هر گروه، آزمون سه بار تکرار و نتایج نیز با مقادیر میانگین تعیین شد.)

$$\text{درصد جذب آب} = ((w_2 - w_1) / w_1) \times 100 \quad (1)$$

$$\text{درصد کاهش آب} = (w_5 - (w_3 - w_4)) / w_5 \times 100 \quad (2)$$

در معادله ۱، w₁ و w₂ به ترتیب وزن اولیه و وزن تر نمونه ها و در معادله ۲، w₃، w₄، w₅ به ترتیب وزن خشک نمونه ها در زمان مورد نظر، وزن تر اولیه هیدروژل ها و وزن بافر فسفات (PBS) مورد استفاده در آزمون است.

آزمون تعیین زاویه تماس^۱

پیش از شروع آزمون، صفحه شیشه ای دستگاه (محل قرار گرفتن نمونه ها) با استون و آب مقطر شسته و خشک شد. محلول آبی بسپاری با غلظت ۲۰ درصد (وزنی/حجمی) آماده و از صافی های غشایی (با قطر ۲mm) عبور داده شد. برای ایجاد یک سطح مسطح و یکنواخت، صفحه شیشه ای دستگاه در محلول بسپاری فرو برده و بی درنگ خارج شد. سپس، ۲ میکرو لیتر آب مقطر از طریق سرنگ، عمود بر سطح چکانده شد و بی درنگ شکل قطره بر سطح با دوربین دیجیتال پس از ۱ ثانیه از قرار گرفتن قطره بر سطح، ثبت و زاویه تماس قطره با سطح اندازه گیری شد. با توجه به حساسیت این گروه از بسپارها به گرما (به دلیل حضور NIPAAm

1. Contact angle

شد. نمونه‌ها در دمای 37°C در گرم‌خانه (با ۹۵٪ رطوبت و ۵٪ کربن دی‌اکسید) به مدت ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت نگهداری شدند. پس از این مدت، ۲۰ میکرولیتر از MTT (با غلظت ۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر) به هر چاهک افزوده و به مدت ۴ ساعت در دمای 37°C قرار داده شدند. پس از خارج کردن محیط کشت، ۱۰۰ میکرولیتر دی‌متیل سولفوکسید (DMSO) به هر چاهک افزوده و جذب در ۵۷۲ نانومتر خوانده شد. در نهایت، درصد زنده ماندن سلولی با معادله ۴ محاسبه شد [۳۷]. شایان ذکر است که این آزمون برای هر نمونه سه بار تکرار و نتایج به صورت مقادیر میانگین گزارش شد.

$$(۴) \times 100 (\text{کنترل OD} / \text{نمونه OD}) = \text{درصد زنده ماندن سلول}$$

ریخت‌شناسی سلول‌ها در هیدروژل با میکروسکوپ الکترونی روبشی (SEM)

برای ریخت‌شناسی سلول‌های کشت داده شده در سطح و داخل تخلخل هیدروژل، از دستگاه میکروسکوپ الکترونی روبشی استفاده شد. پیش از مشاهده سلول‌ها در هیدروژل ابتدا آماده‌سازی آن‌ها انجام شد. پس از ۷۲ ساعت کشت سلول‌های فیبروبلاست در سطح هیدروژل، نمونه‌ها ۳ بار با PBS شسته و در گلو تارالیدئید (۲٫۵٪) برای تثبیت سلول‌ها در دمای 4°C به مدت ۲ ساعت غوطه‌ور شدند. سپس، با اتانول (۲۰٪ (۵ دقیقه)، ۴۰٪ (۵ دقیقه)، ۶۰٪ (۵ دقیقه)، ۸۰٪ (۵ دقیقه) و ۱۰۰٪ (۳۰ ثانیه)) آب‌گیری و برای تثبیت ثانویه به مدت ۲ ساعت در دمای 4°C در اسمیم تراکسید نگهداری و به منظور خشک شدن به گرم‌خانه تحت خلأ انتقال یافتند. در نهایت، سطح با لایه نازکی از طلا پوشیده و آماده برای عکس‌برداری شد.

تجزیه و تحلیل آماری

تجزیه و تحلیل تفاوت آماری با نرم‌افزار SPSS 20.0 گزارش شده است. در صورت وجود تفاوت معنی‌دار، مقایسه و گروه‌بندی

دو انتهای این ژل‌های جامد در فک‌های دستگاه قرار گرفت و با حرکت فک بالایی، اطلاعات مربوط به ویژگی مکانیکی هر نمونه ثبت شد. سپس، مقدار میانگین استحکام کششی و ازدیاد طول برای هر نمونه تعیین و از شیب خط نمودار تنش- کرنش نیز مدول کشسانی محاسبه شد (این آزمون ۳ بار تکرار نتایج به صورت میانگین گزارش شد).

ریخت‌شناسی سطح با میکروسکوپ الکترونی روبشی (SEM)

بررسی ریز ساختارها، ریخت‌شناسی و مقدار تخلخل سطح نمونه‌ها با دستگاه میکروسکوپ الکترونی روبشی (SEM) انجام شد. برای آماده‌سازی، نمونه‌ها با غلظت ۲۰ درصد وزنی / حجمی در حمام آب 37°C طی ۱۲ ساعت به شکل ژل جامد در آمدند. نمونه‌ها پس از خشک شدن با لایه نازک طلا پوشش داده شدند و سطح آن‌ها مورد تصویربرداری قرار گرفت. اندازه حفره‌ها بر سطح هیدروژل با نرم‌افزار Clemex Vision اندازه‌گیری شد.

کشت و سنجش سمیت سلولی با استفاده از آزمون MTT

آزمون MTT برای بررسی قابلیت زنده ماندن سلول‌ها بر هیدروژل‌ها و تایید زیست‌سازگاری این گروه‌ها انجام شد. به این منظور، ابتدا هیدروژل‌ها (با غلظت ۲۰ درصد وزنی / حجمی در PBS) آماده و برای سترون‌سازی و حذف هرگونه آلودگی تحت پرتو UV به مدت ۳۰ دقیقه قرار گرفتند. سلول‌های فیبروبلاست پوستی انسانی^۱ خریداری شده از بانک سلولی انستیتو پاستور ایران با کد C646 به مقدار ۰٫۲۵ میلی‌لیتر با ۱ میلی‌لیتر از محلول هیدروژل در پلیت‌های ۲۴ خانه مخلوط شدند تا به غلظت نهایی 1×10^6 سلول در هر خانه برسند. سپس، پلیت‌ها به مدت ۱۵ دقیقه برای کپسوله شدن سلول‌ها در هیدروژل، در گرم‌خانه قرار داده شدند. پس از خارج کردن نمونه‌ها از گرم‌خانه، مقدار آب پس‌داده شده هیدروژل از سطح پلیت‌ها خارج و محیط کشت DMEM low-glucose حاوی ۱۰٪ از ۱۰۰ U/ml FBS، از پنی‌سیلین، ۱۰۰ $\mu\text{g/ml}$ از استرپتومایسین و ۲ mM از ال‌گلوتامین، افزوده

1. Human Dermal Fibroblasts (HDF)

$1172,11 \text{ cm}^{-1}$ ، $1279,25 \text{ cm}^{-1}$ و $1130,41 \text{ cm}^{-1}$ ، ارتعاش‌های کششی C=C در $1550,97 \text{ cm}^{-1}$ ، ارتعاش‌های خمشی C-H در $1461,13 \text{ cm}^{-1}$ و $1371,13 \text{ cm}^{-1}$ ، ارتعاش‌های کششی گروه‌های کربونیل مربوط به ساختار PLA در $1727,61 \text{ cm}^{-1}$ و ارتعاش‌های کششی کربونیل موجود در ساختار HEMA به دلیل همگامی پیوند^۱ دو گانه در $1650,68 \text{ cm}^{-1}$ ظاهر شده‌اند.

شکل ۳-الف، طیف هم‌بسیار NIPAAm-AAC-NAS-HEMAPLA (گروه ۱) را نشان می‌دهد. نوار پهن ظاهر شده در $3432,7 \text{ cm}^{-1}$ مربوط به ارتعاش‌های کششی گروه هیدروکسیل (OH)، نوارهای موجود در $2881,1 \text{ cm}^{-1}$ و $2931,3 \text{ cm}^{-1}$ و $2977,6 \text{ cm}^{-1}$ مربوط به ارتعاش‌های کششی متقارن و نامتقارن C-H، ارتعاش‌های کششی گروه‌های آمیدی و استری در $1739,5 \text{ cm}^{-1}$ و $1643,1 \text{ cm}^{-1}$ ، ارتعاش‌های خمشی گروه N-H در $1558,2 \text{ cm}^{-1}$ ، ارتعاش‌های خمشی گروه‌های C-H در $1450,2 \text{ cm}^{-1}$ و $1361,5 \text{ cm}^{-1}$ و ارتعاش‌های کششی گروه‌های C-O در $1072,2 \text{ cm}^{-1}$ ، $1160,9 \text{ cm}^{-1}$ و $1265,1 \text{ cm}^{-1}$ هستند.

در طیف FTIR متیل سلولز خالص (شکل ۳-ب)، ارتعاش‌های کششی گروه‌های هیدروکسیل (OH) در $3456,16 \text{ cm}^{-1}$ ، ارتعاش‌های نامتقارن و متقارن گروه‌های C-H به ترتیب در $2931,80 \text{ cm}^{-1}$ و $2838,38 \text{ cm}^{-1}$ ، ارتعاش‌های خمشی گروه‌های متیل و متیلن در $1460,73 \text{ cm}^{-1}$ و $1411,62 \text{ cm}^{-1}$ ، ارتعاش‌های خمشی C-O-C در $1288,92 \text{ cm}^{-1}$ و $1268,70 \text{ cm}^{-1}$ ، ارتعاش‌های کششی C-O-H در $1123,18 \text{ cm}^{-1}$ و $1071,41 \text{ cm}^{-1}$ و همچنین، ارتعاش‌های خمشی خارج از صفحه C-H در $945,45 \text{ cm}^{-1}$ ، $741,82 \text{ cm}^{-1}$ ، $662,94 \text{ cm}^{-1}$ ، $611,74 \text{ cm}^{-1}$ و $576,06 \text{ cm}^{-1}$ ظاهر شده‌اند.

شکل ۳-ج، طیف FTIR مربوط به چندسازه هیدروژلی NIPAAm-AAC-NAS-HEMAPLA Methylcellulose را نشان می‌دهد. با توجه به ساختار متیل سلولز، محتمل‌ترین برهم‌کنشی که می‌توان فرض کرد اتفاق افتد، پیوندهای هیدروژنی

میانگین‌ها با آزمون دانکن و LSD انجام و همه نتایج به صورت میانگین \pm انحراف معیار آورده شد. سطح معنی‌دار بودن تفاوت‌ها با $p < 0,001$ و $p < 0,0001$ محاسبه شد.

نتیجه‌ها و بحث

طیف FTIR هیدروژل‌ها

هدف از انجام این آزمون بررسی ساختارهای شیمیایی و برهم‌کنش بین تکپارها در ساختار هیدروژل است. همان‌طور که در طیف FTIR بسیار HEMA در شکل ۲-الف مشاهده می‌شود، ارتعاش‌های کششی گروه هیدروکسیل (OH) در 3425 cm^{-1} ، ارتعاش‌های کششی نامتقارن و متقارن C-H در $2928,24 \text{ cm}^{-1}$ و $2960,95 \text{ cm}^{-1}$ ، ارتعاش کششی گروه‌های استری در $1725,62 \text{ cm}^{-1}$ ، ارتعاش کششی گروه الکن در $1634,80 \text{ cm}^{-1}$ ، ارتعاش خمشی گروه‌های C-H در $1460,98 \text{ cm}^{-1}$ و ارتعاش‌های کششی C-O در $1069,54 \text{ cm}^{-1}$ ظاهر شده‌اند.

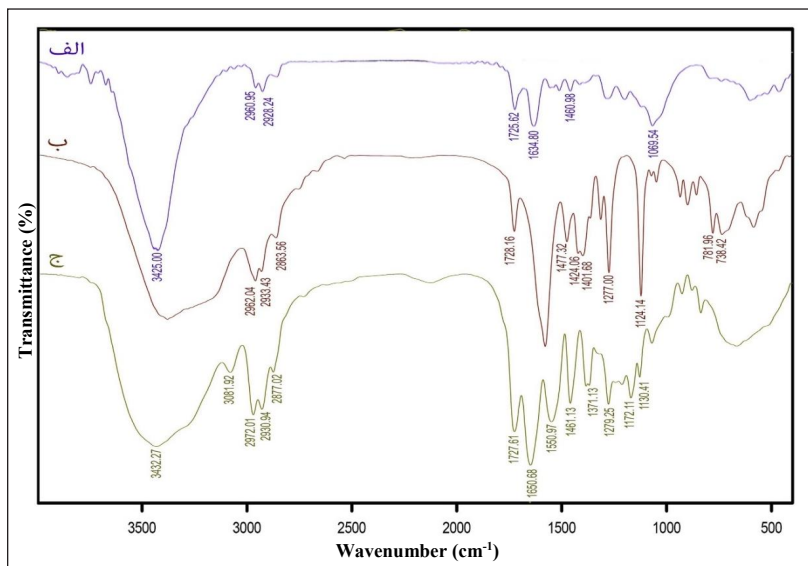
در طیف FTIR گروه‌های PLA خالص (شکل ۲-ب)، نوارهای موجود در نواحی $2962,04 \text{ cm}^{-1}$ و $2933,43 \text{ cm}^{-1}$ مربوط به ارتعاش‌های کششی نامتقارن گروه‌های C-H، نوار $2863,56 \text{ cm}^{-1}$ مربوط به ارتعاش‌های متقارن C-H، نوار $1728,16 \text{ cm}^{-1}$ مربوط به ارتعاش‌های کششی گروه کربونیل، نوارهای $1477,32 \text{ cm}^{-1}$ ، $1424,06 \text{ cm}^{-1}$ و $1401,68 \text{ cm}^{-1}$ مربوط به ارتعاش‌های خمشی C-H، نوارهای 1277 cm^{-1} و $1124,14 \text{ cm}^{-1}$ مربوط به ارتعاش‌های کششی C-O و نوارهای $781,96 \text{ cm}^{-1}$ و $738,42 \text{ cm}^{-1}$ مربوط به ارتعاش‌های خمشی خارج از صفحه C-H است.

نوارهای موجود در شکل ۲-ج برهم‌کنش بین گروه‌های HEMA و PLA را نشان می‌دهد. ارتعاش‌های کششی گروه‌های هیدروکسیل (OH) در $3432,27 \text{ cm}^{-1}$ ، ارتعاش‌های کششی نامتقارن و متقارن C-H در $2972,01 \text{ cm}^{-1}$ ، $2977,02 \text{ cm}^{-1}$ و $2930,94 \text{ cm}^{-1}$ و همچنین، ارتعاش‌های کششی گروه‌های C-H الکن (C=CH₂) در $3081,92 \text{ cm}^{-1}$ ، ارتعاش‌های کششی O-C در

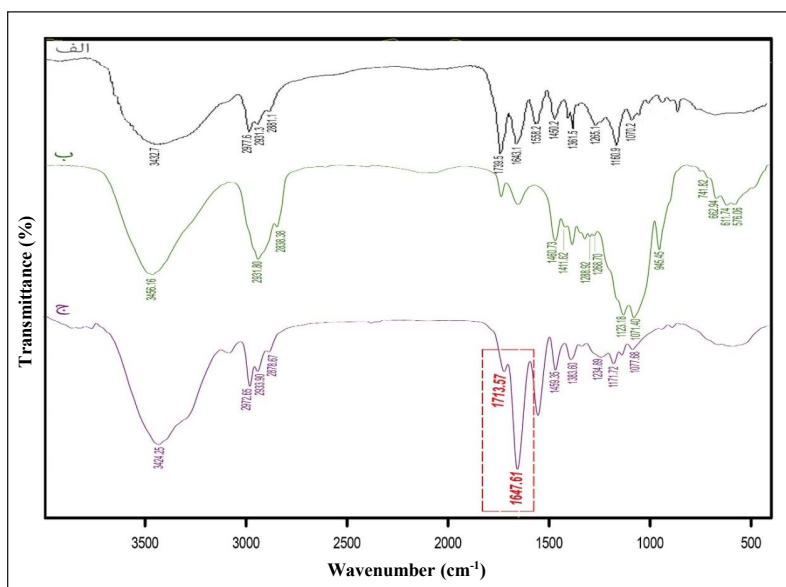
1. Resonance

بین گروه‌های هیدروکسیل سلولز با گروه‌های C=O، N-H و OH هم‌بسیار است. از سوی دیگر، گروه‌های هیدروکسیل (OH) هم‌بسیار نیز می‌تواند با اکسیژن گروه‌های $\text{CH}_2\text{-O-CH}_3$ در متیل سلولز پیوند هیدروژنی دهد. تغییر نوار امید از 1739.5 cm^{-1} به 1643.1 cm^{-1} و نوار گروه‌های استری از 1713.57 cm^{-1}

می‌توان ناشی از تاثیر برهم‌کنش‌های هیدروژنی دانست. شکل ۲-ج، بیانگر برهم‌کنش‌های احتمالی بین گروه هیدروکسیل (OH) و $\text{CH}_2\text{-O-CH}_3$ متیل سلولز با گروه‌های هم‌بسیار است.



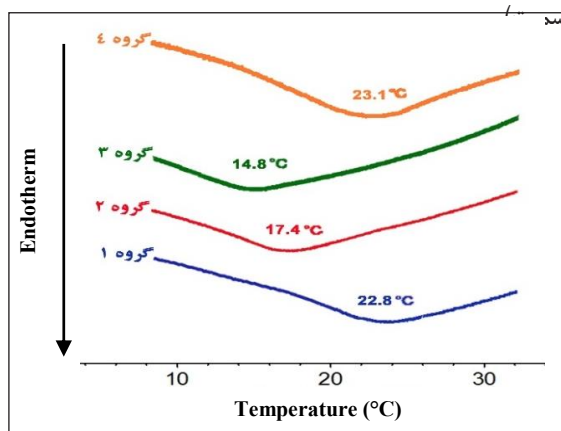
شکل ۲ طیف‌های FTIR مربوط به ساختارهای ۲- هیدروکسی اتیل متاکریلات خالص HEMA (الف)، دی-ال لاکتید خالص (PLA) (ب) و HEMA-PLA (ج)



شکل ۳ طیف‌های FTIR مربوط به ساختارهای NIPAAm-AAC-NAS-HEMA PLA (گروه ۱) (الف)، متیل سلولز خالص (Methylcellulose) (ب) و NIPAAm-AAC-NAS-HEMA PLA- Methylcellulose (ج)

بین دمای سل-ژل

مناسبی به عنوان حامل سلولز یا دارو برای تزریق در برخی بافت‌ها در بدن مانند غضروف، ماهیچه و یا قلب باشند (در صورت عدم



شکل ۴ دمای سل-ژل نمونه‌های تهیه شده

جذب آب

در ابتدا، به بررسی درصد کاهش آب هیدروژل‌ها در طول ۳ ساعت پرداخته شد. برپایه شکل ۵، مقدار جذب همه نمونه‌ها در طول ۶۰ دقیقه ابتدایی روند افزایشی دارد. پس از آن، مقدار جذب ثابت است. پس از پایان ۴ ساعت، مقدار جذب آب از ۳۵/۱۵٪ (گروه ۳) به ۶۱/۵۰٪ (گروه ۴) و متناسب با آن مقدار کاهش آب از ۳۸/۳۱٪ (گروه ۳) به ۶۳/۷۸٪ (گروه ۴) تغییر یافت. همچنین، نتایج به دست آمده از تجزیه و تحلیل ANOVA، تفاوت آماری معنی‌داری را بین گروه‌ها نشان داد ($P < 0.001$). نکته قابل توجه این است که در همه گروه‌ها درصد کاهش آب نسبت به درصد جذب آب با مقدار بیشتر گزارش شده است. زیرا هیدروژل با یک ظرفیت تعیین شده‌ای می‌تواند قابلیت نگهداری آب را داشته باشد ولی پس از جذب آب به دلیل تخریب برخی گروه‌های آب‌دوست در سطح هیدروژل، درصد کاهش آب به نسبت، کمی افزایش می‌یابد. همان‌طور که انتظار می‌رفت، افزایش جذب آب به شدت وابسته به نسبت NIPAAm/HEMA و حضور گروه متیل سلولز است. از آنجاکه متیل سلولز به عنوان یک بسیار طبیعی و آب‌دوست شناخته

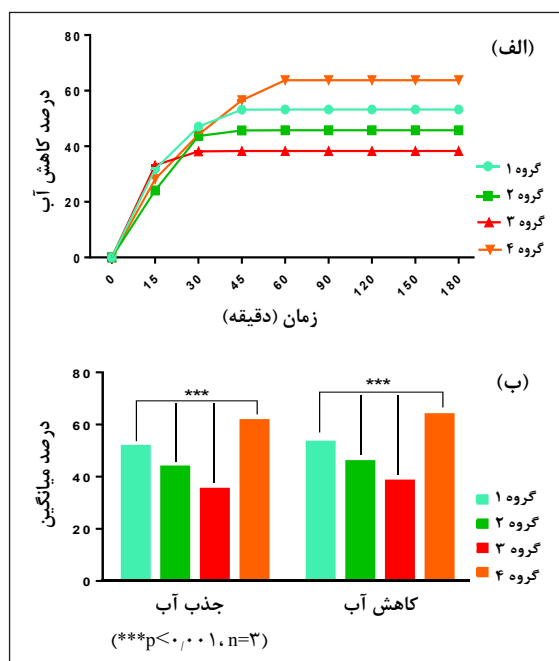
کنترل دمای سل-ژل در برنامه‌های کاربردی پزشکی یکی از عامل‌های مهم و پایه‌ای بشمار می‌آید. زیرا دمای فرمولاسیون را تعیین می‌کند [۳۸]. ترکیب‌های دارویی، پروتئین و یا سلول‌ها باید در حالت سل مخلوط و به بدن تزریق شوند و پس از تزریق در بدن به شکل ژل درآیند. هیدروژل‌های حساس به گرما برپایه NIPAAm با داشتن دمای سل-ژل کمتر از ۳۲ °C می‌توانند جایگزین‌های مناسبی در بدن محسوب شوند. نتایج این آزمون در جدول ۲ و شکل ۴ نشان داده شده است. مقایسه داده‌های سه گروه ۱، ۲ و ۳ نشان داد که با افزایش نسبت NIPAAm به HEMA دمای سل-ژل از ۱۴/۸ °C به ۲۲/۸ °C افزایش یافت. زیرا، انحلال‌پذیری بالای NIPAAm، بین واحدهای این تکپار و مولکول‌های آب پیوندهای هیدروژنی برقرار می‌کند. بنابراین، با افزایش نسبت NIPAAm در ساختار هیدروژل، به دمای بالاتری برای شکستن پیوندهای هیدروژنی نیاز است. همچنین، مقایسه دمای سل-ژل دو گروه ۱ و ۴ نیز نشان داد که با افزایش متیل سلولز دمای سل-ژل با تفاوت کمی از ۲۲/۸ °C به ۲۳/۱ °C افزایش یافت که می‌تواند به دلیل پیوندهای هیدروژنی ایجاد شده بین گروه‌های هیدروکسیل متیل سلولز با هم‌پسپار باشد. بررسی‌های پیشین نشان می‌دهد که با کاهش محتوای AAC در ساختار بسیار، هیدروژل‌های چندسازه بسیار آب‌گریز خواهند بود و حتی پس از حذف PLA، در دمای سل-ژل کمتر از ۳۷ °C باقی خواهند ماند و هیدروژل قابلیت شکل‌گیری نخواهد داشت. از سوی دیگر، اگر محتوای AAC در ترکیب‌های هیدروژل بسیار بالا باشد، هم‌پسپار بسیار آب‌دوست خواهد بود و قادر به تشکیل ژل در دمای ۳۷ °C نخواهد بود. همچنین، باید توجه داشت که افزایش AAC نیز موجب اسیدی شدن محیط کشت سلولی خواهد شد که نمی‌تواند برای بقای سلول مفید باشد. به همین دلیل، مقدار AAC در هر چهار گروه با یک نسبت ثابت و تعیین شده، انجام شد [۵ و ۳۹]. به نظر می‌رسد که هر چهار گروه با داشتن دمای سل-ژل پایین‌تر از ۲۴ °C و قابلیت تزریق می‌توانند انتخاب

1. Analysis of variance (ANOVA)

موثر سلول‌ها به یک سطح را بین ۴۰ تا ۷۰ درجه گزارش کرده‌اند. برای بررسی رفتار ترشوندگی و انرژي سطح، سامانه اندازه‌گیری زاویه تماس به‌عنوان روشی کاربردی شناخته می‌شود. در یک سطح جامد، هر چه انرژي آزاد سطحی یا همان کشش سطحی بالاتر باشد ترشوندگی سریع‌تر اتفاق می‌افتد و زاویه تماس نیز در اثر برآیند انرژي‌های سطحی بین صفر تا ۱۸۰ درجه تغییر می‌کند. به طور معمول، سطوح با آب‌دوستی بالا زاویه تماس بین صفر تا ۳۰ درجه و سطوح با آب‌دوستی کم، زاویه تماس تا ۹۰ درجه و سطوح آب‌گریز زاویه تماس بالای ۹۰ درجه را نشان می‌دهند [۴۲ تا ۴۵].

شکل ۶ چگونگی قرارگیری قطره آب را پس از ۱ ثانیه در سطوح نشان می‌دهد. در واقع، هر چه سطوح بسترهای طراحی شده آب‌دوست‌تر باشند، زاویه تماس قطره آب کوچکتر و چسبندگی سلولی بهتری را نشان می‌دهد. نتایج به‌دست آمده از این آزمون در جدول ۲ نشان داده شده است. با توجه به این که هیدروژل‌های یاد شده حساس به گرما هستند و برای هر گروه دمایی سل-ژل معینی تعیین شده، رفتار ترشوندگی در دماهای بالاتر و پایین‌تر از سل-ژل هر نمونه بررسی شد. برپایه شکل ۶ در همه گروه‌ها، افزایش زاویه آب در دمای بالاتر از سل-ژل نسبت به دمای کمتر از سل-ژل مشاهده می‌شود. زیرا افزایش دما موجب شکسته شدن پیوندهای هیدروژنی بین مولکول‌های آب و گروه‌های آب‌دوست موجود در ساختار هیدروژل-ها شده و در نتیجه گروه‌های آب‌گریز مانند ایزوپروپیل‌ها در سطوح جایگزین می‌شوند و زاویه تماس افزایش و رفتار ترشوندگی بسترها کاهش می‌یابد. همان‌طور که در شکل ۶ مشاهده می‌شود، مقایسه گروه‌های ۱، ۲ و ۳ نشان داد که با کاهش نسبت NIPAAm در دمای پایین‌تر از سل-ژل میانگین زاویه تماس از 49.04° به 87.13° و در دمای بالاتر از سل-ژل میانگین زاویه تماس از 66.05° به 104.11° افزایش یافت که متناسب با آن رفتار ترشوندگی کاهش می‌یابد. در واقع عامل اصلی این پدیده را می‌توان کاهش گروه‌های آب‌دوست در سطوح دانست. همچنین، با کاهش آب‌دوستی شبکه در محیط‌های زیستی آبی حفظ و ویژگی مکانیکی نیز افزایش

می‌شود [۳۳ و ۳۴]، افزودن آن به ساختار گروه ۱ (با بیشترین نسبت NIPAAm) نقش موثری را در افزایش آب‌دوستی و مقدار جذب آب هیدروژل‌ها در مقایسه با پژوهشی که گوان و همکارانش بر هیدروژل‌های مشابه با این پژوهش انجام داده بودند، نشان داد [۲۰]. بنابراین، به نظر می‌رسد که هیدروژل‌های گروه‌های ۱ و ۴ به دلیل حضور گروه‌های آب‌دوست (OH) و پیوندهای هیدروژنی تشکیل‌شده، در افزایش سرعت آب‌دوستی نقش پایه‌ای ایفا می‌کنند و قادر به بهبود پایداری زیستی و تکثیر سلولی خواهند شد. از سوی دیگر، افزایش پیوندهای هیدروژنی در گروه ۴ سبب ایجاد ساختاری متخلخل شده که می‌تواند در افزایش جذب آب موثر واقع شود. پس از کارگذاری هیدروژل‌ها در بافت مورد نظر، جذب آب بالای این ترکیب‌ها سبب تبادل‌های بهتر سلولی مانند جذب مواد غذایی و دفع مواد زاید خواهد شد [۴۰ و ۴۱].



شکل ۵ فرایند کاهش آب برای هیدروژل‌های مورد بررسی در طول ۳ ساعت (الف) و درصد میانگین جذب و کاهش آب پس از ۳ ساعت (ب)

بررسی رفتار ترشوندگی با آزمون زاویه تماس

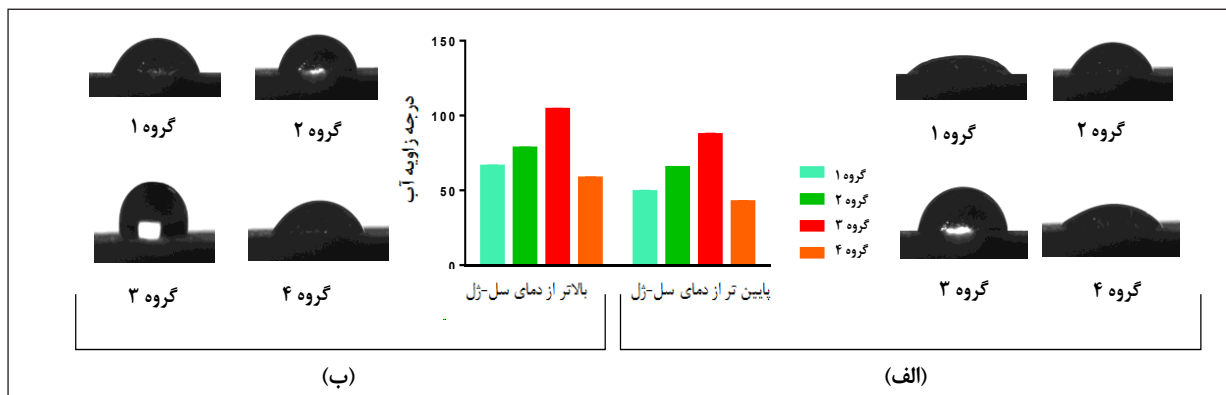
پژوهش‌ها مقدار بهینه زاویه تماس قطره آب برای چسبندگی

هیدروژل‌ها در بازه زمانی ۲۱ روز کاهش جرم چشم‌گیری را برای همه گروه‌ها نشان داد (شکل ۷). با توجه به نتایج این آزمون پس از ۲۱ روز، تفاوت آماری معنی‌داری بین سه گروه ۱، ۲ و ۳ مشاهده شد ($p < 0.001$). همان‌طوری که انتظار می‌رفت، با افزایش نسبت NIPAAm، مقدار تخریب افزایش یافت. زیرا افزایش NIPAAm تا حدود ۱۶٪ سبب افزایش جذب آب شده که به همان نسبت نیز موجب افزایش مقدار تخریب می‌شود. از سوی دیگر، با توجه به تصاویر SEM (شکل ۹)، گروه ۱ سطح ناهموارتری نسبت به دو گروه دیگر (۲ و ۳) نشان داده است که همین ویژگی نیز در تخریب زود هنگام این گروه دخالت دارد. در مرحله بعد، نقش متیل سلولز در ساختار گروه ۴ بررسی شد. همان‌طور که انتظار می‌رفت، به دلیل نسبت بالای NIPAAm و حضور گروه‌های متیل سلولز در ساختار، بیشترین درصد تخریب در این گروه مشاهده شد (شکل ۷). (لازم به ذکر است که بین گروه‌های ۱ و ۴ در $P > 0.001$ تفاوت معنی‌داری یافت نشد). نتایج پژوهش‌های پیشین نیز گویای چنین نکته‌ای است که حضور متیل سلولز در ساختار به افزایش جذب آب و افزایش مقدار تخریب کمک می‌کند [۳۴]، زیرا با افزودن متیل سلولز سطح غیریکنواخت و متخلخلی تشکیل شده است که موجب کاهش پایداری محلول بسپاری و افزایش سرعت تخریب می‌شود [۴۱].

می‌یابد (برپایه نتایج بخش آزمون مکانیکی). از سوی دیگر، گروه ۴ (حاوی متیل سلولز) با داشتن گروه‌های آب‌دوست بیشتر (مانند هیدروکسیل) در سطح، زاویای تماس 42.25° (در دمای کمتر از سل-ژل) و 58.20° (در دمای بالاتر از سل-ژل) را نشان می‌دهند (شکل ۶)، زیرا با افزودن متیل سلولز پیوندهای هیدروژنی بیشتری با هم‌بسپار تشکیل شده که می‌تواند موجب افزایش تخلخل ساختار، کاهش اندازه زاویه تماس و افزایش رفتار ترشوندگی شود. از سوی دیگر، پژوهش‌های پیشین نشان دادند که رفتار ترشوندگی نه تنها وابسته به گروه‌های آب‌گریز و آب‌دوست موجود در سطح است بلکه به جهت‌گیری گروه‌ها، ناهمواری و حضور حفره‌ها در سطح نیز بستگی خواهد داشت [۴۶ و ۴۷]. فرضیه‌های یاد شده، برپایه نتایج به‌دست آمده از این آزمون است به گونه‌ای که گروه‌های ۱ و ۴ (به‌ویژه گروه ۴ به دلیل حضور متیل سلولز در ساختار) کمترین زاویه تماس و بیشترین رفتار ترشوندگی را با بالاترین مقدار تخلخل و ناهمواری در سطح (شکل ۹) از خود نشان می‌دهند.

تخریب آنزیمی

انتظار می‌رود که پس از کارگذاری هیدروژل‌ها در بافت موردنظر به علت فعالیت‌های آنزیمی مقدار تخریب با سرعت بیشتری اتفاق افتد. نتایج زیست‌تخریب‌پذیری آنزیمی

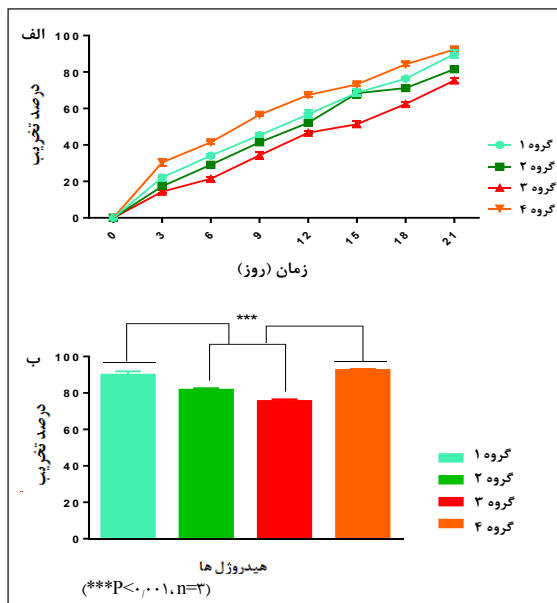


شکل ۷ بررسی فرایند تخریب آنزیمی هیدروژل‌ها در طی ۲۱ روز در محیط آنزیمی (الف) و درصد تخریب هیدروژل‌ها پس از ۲۱ روز (ب)

ANOVA تفاوت قابل توجه‌ای را برای مدول کشسانی، استحکام کششی و ازدیاد طول نمونه‌ها نشان داد ($P < 0.001$). مقایسه سه گروه ۱، ۲ و ۳ نشان داد که با کاهش نسبت NIPAAm، به دلیل شکست بیشتر پیوندهای هیدروژنی، مدول کشسانی از ۶۸٫۱۰ (گروه ۱) به ۱۱۸٫۱۹ (گروه ۲) و ۱۴۶٫۵۸ (گروه ۳) کیلو پاسکال افزایش می‌یابد و به دنبال آن نیز ازدیاد طول از ۷۵٫۳٪ (گروه ۱) به ۱۱۰٫۲۷۵٪ (گروه ۲) و ۱۵۶٫۷۵٪ (گروه ۳) و استحکام کششی نیز از ۴٫۹۱ (گروه ۱) به ۵٫۳۹ (گروه ۲) و ۶٫۲۱ (گروه ۳) کیلو پاسکال افزایش یافت. در مرحله بعدی، تاثیر افزودن متیل سلولز به ساختار هیدروژل گروه ۱ بررسی شد. جالب توجه است که با افزایش متیل سلولز مدول کشسانی از ۶۸٫۱۰ به ۷۹٫۲۲ کیلو پاسکال افزایش یافت ولی به علت افزایش محتوای آب بیشتر در سطح بسیار و کاهش ارتباط بین زنجیره‌های هم-بسیار، استحکام کششی از ۴٫۹۱ به ۴٫۶۵ کیلو پاسکال و ازدیاد طول نیز از ۷۵٫۳٪ به ۲۷۱٫۷۵٪ کاهش یافته که در نتیجه سبب پارگی سریع‌تر در بسیار می‌شود. مطابق با نتایج به دست آمده به نظر می‌رسد که گروه‌های ۱ و ۴ با داشتن مدول کشسانی نزدیک به بافت طبیعی قلب (بین ۱ تا ۱۴۰ کیلو پاسکال برای قلب موش و بین ۲۰ تا ۵۰۰ کیلو پاسکال برای قلب انسان)، می‌توان گروه‌های مناسبی برای این بافت در نظر گرفت [۵۰ و ۵۱].

ریخت‌شناسی سطح

داشتن مساحت سطحی بالا و تخلخل به هم پیوسته به عنوان عوامل موثر در فعالیت‌های سلولی مانند چسبندگی، تکثیر و تمایز سلولی، رخ نمود، تهیه DNA و مقدار نفوذ سلول و بافت به داخل ماتریکس‌های سه بعدی در نظر گرفته می‌شود [۵۲ و ۵۳]. با توجه به شکل ۹، گروه ۱ (با نسبت بیشتر NIPAAm) در مقایسه با دو گروه ۲ و ۳ (با نسبت کمتر NIPAAm) سطحی ناهموارتر و همراه با تخلخل (در گستره ۲۸٫۳۴۳ تا ۹۸٫۰۳۷ میکرومتر) را نشان می‌دهد. همان‌طور که انتظار می‌رفت، افزایش گروه‌های آبدوست سبب افزایش ناهمواری و تخلخل در سطح می‌شود.



شکل ۶ تصاویر قطره آب در تماس با سطح هیدروژل‌ها و تعیین زاویه تماس آن‌ها در دمای کمتر از سل-ژل (الف) و در دمای بالاتر از سل-ژل (ب)

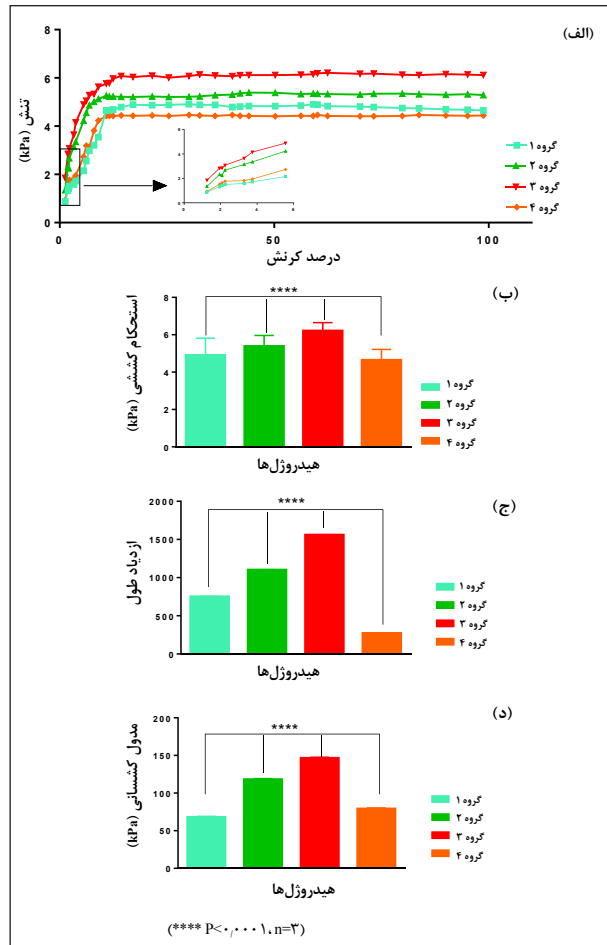
بررسی ویژگی مکانیکی نمونه‌های هیدروژلی

در صورت ضعف مکانیکی ساختارهای سه بعدی طراحی شده، می‌توان با ایجاد تغییرات در ساختار هیدروژل شرایط مکانیکی را برای حفظ و رشد سلول‌ها بهبود بخشید [۴۸ و ۴۹]. به منظور بررسی تاثیر نسبت تکپارها در ساختار هم-بسیارها و حضور متیل سلولز در ساختار گروه ۴، ویژگی‌های مکانیکی هیدروژل‌های تولیدی با آزمون کشش (Tensile Test) بررسی شد. در شکل ۸-الف، نمودارهای تنش-کرنش مربوط به هیدروژل‌ها نشان داده شده است. این نمودار، برای همه نمونه‌ها در مراحل اولیه به صورت خطی افزایش می‌یابد و پس از رسیدن به نقطه بیشینه تنش، در تنشی ثابت تا رسیدن به نقطه شکست به موازات محور کرنش ادامه می‌یابد. یکی از مهم‌ترین مشخصه‌های هیدروژل‌ها مدول کششی است که برابر شیب اولیه نمودار تنش-کرنش است. جدول ۲ و شکل ۸ اطلاعات مربوط به ویژگی مکانیکی هیدروژل‌ها را نشان می‌دهد. نتایج برپایه تجزیه و تحلیل آماری

هم‌بسیار، حفره‌های بیشتری (در گستره ۲۹,۱۰۵ تا ۱۰۵,۵۴۰ میکرومتر) نسبت به گروه ۱ در سطح پدیدار می‌شود که به صورت به‌هم‌پیوسته و غیریکنواخت هستند (شکل ۹-د). این تصویر به خوبی به هم پیوستگی بین تخلخل موجود در سطح را نشان می‌دهد. حضور منافذ نقش مهمی را در رساندن مواد مغذی به سلول‌ها و دفع مواد زائد ایفا می‌کند. بررسی‌های زیادی نشان داده است که ساختارهای متخلخل نسبت به غیرمتخلخل چندتارشیوی کمتری ایجاد کرده و متناسب با اندازه تخلخل نیز می‌توانند موجب افزایش رگ‌زایی شوند [۵۴]. نکته جالب توجه در گروه ۱ و به ویژه گروه ۴، وجود حفره‌ها در اندازه‌های متفاوت است (شکل‌های ۹-الف و د). در روزهای ابتدایی کشت سلولی، تکثیر سلول‌ها در بخشی‌هایی از سطح که اندازه تخلخل آن کوچک است، بیشتر خواهد بود. زیرا سطح تماس بیشتری برای چسبندگی سلولی فراهم می‌شود، اما از آنجایی که تخلخل کوچک سبب کاهش انتقال مواد مغذی و اکسیژن می‌شود، انتظار می‌رود که پس از مدتی مرگ سلول‌ها نسبت به تکثیر سلولی افزایش یابد. وجود این سلول‌های مرده در سطح می‌تواند بر سلامت سلول‌های زنده نیز تاثیر نامطلوب بگذارد. از سوی دیگر، در بخشی از سطح با حفره‌های بزرگتر، سلول‌ها قادر به نفوذ در بخش‌های داخلی خواهند بود و توزیع همگنی از سلول‌ها ایجاد خواهد شد که در واقع می‌توان گفت در این حالت به اصطلاح سلول‌ها در داخل هیدروژل‌ها پوشینه‌دار^۲ می‌شوند. این ویژگی موجب می‌شود در بافت‌هایی که امکان کاشت وجود نداشته باشد، هیدروژل‌ها به‌عنوان حامل مناسب سلولی به کار روند و سلول‌ها به راحتی در ساختار داخلی و تخلخل آن‌ها جای گرفته و به بافت هدف انتقال یابند. این گروه از هیدروژل‌ها با داشتن ساختاری مشابه با بافت طبیعی موردنظر می‌توانند به ترمیم زود هنگام بخش آسیب دیده نیز کمک شایانی کنند [۵].

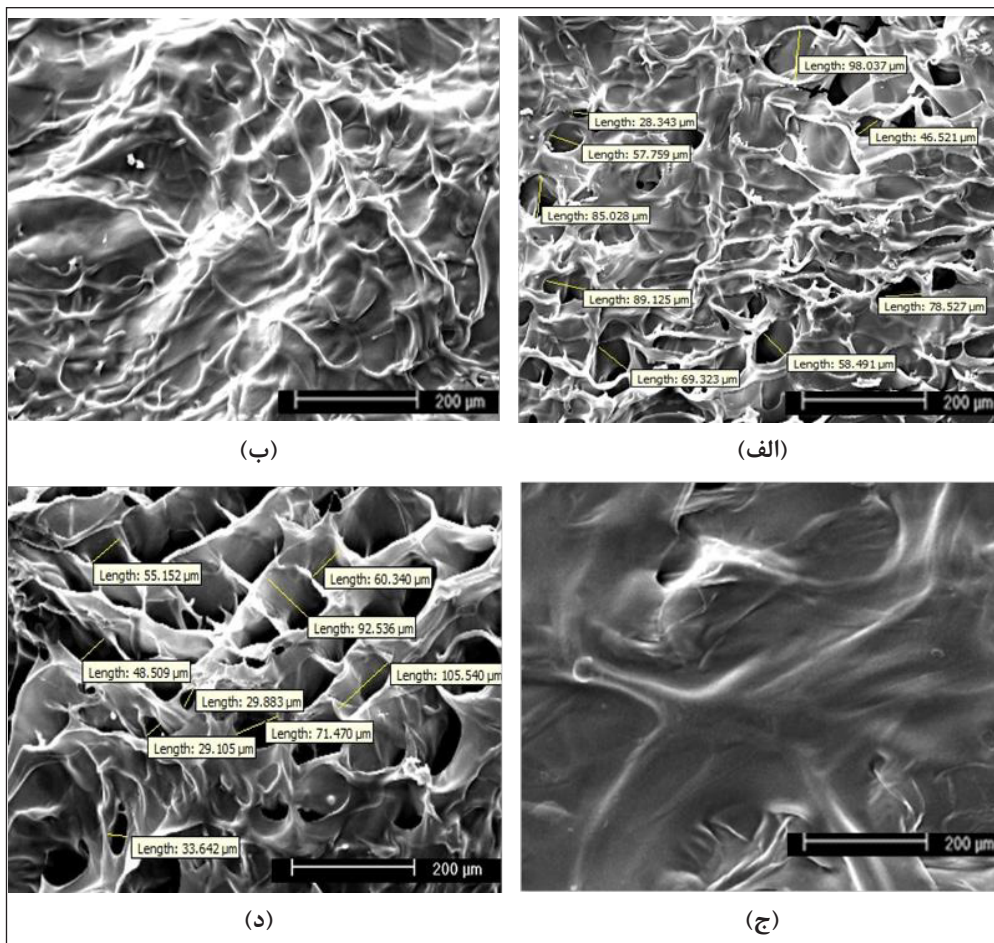
بررسی مقدار بقا سلولی با آزمون MTT

برای بررسی تاثیر هیدروژل‌های یادشده بر مقدار حیات سلولی،



شکل ۸ ویژگی مکانیکی هیدروژل‌های تهیه شده در دمای ۳۷ °C نمودار تنش-کرنش (الف)، استحکام کششی (ب)، درصد ازدیاد طول (ج) و مدول کشسانی (د)

گروه‌های ۲ و ۳ با سطوحی یکنواخت‌تر و بدون تخلخل ظاهر شده‌اند. به نظر می‌رسد که نسبت تکپاره‌های به کار رفته در این گروه‌ها فضای مناسبی را برای رشد و تکثیر سلولی ایجاد نکرده باشند. زیرا در این حالت سلول‌ها فقط در سطح چسبیده و پس از مدتی غشاهای سلولی به هم رسیده و با ایجاد ممانعت فضایی به یکدیگر پیام مرگ ارسال می‌کنند. نتایج SEM نیز نشان داد که در گروه ۴ با افزایش متیل سلولز، به دلیل پیوندهای هیدروژنی انجام شده بین گروه‌های هیدروکسیل متیل سلولز و گروه‌های



شکل ۹ تصاویر میکروسکوپ الکترونی روبشی هیدروژل‌های تهیه شده گروه ۱ (الف)، گروه ۲ (ب)، گروه ۳ (ج) و گروه ۴ (د) پیش از کشت سلول

تفاوت معنی‌داری بین این دو گروه با گروه کنترل نیز مشاهده نشد ($P > 0.001$). این نتیجه عدم سمیت سلولی این دو گروه را تایید می‌کند. (لازم به یادآوری است که حضور متیل سلولز در ساختار گروه ۴، حدود ۴٪ رشد و تکثیر سلولی را نسبت به گروه ۱ افزایش داده است.) هیدروژل‌های گروه ۲ و ۳، به دلیل عدم فضای مناسب (ساختاری مسطح و بدون تخلخل) و کاهش مواد مغذی و اکسیژن در سطح، تکثیر سلولی کمتری را در مقایسه با گروه کنترل نشان دادند ($P < 0.001$). با توجه به رشد چشمگیر سلول‌ها در سطح دو گروه ۱ و ۴، به نظر می‌رسد که هیدروژل‌های یادشده (به‌ویژه

آزمون MTT در شرایط آزمایشگاهی انجام شد. در این آزمون، نمک تترازولیم با سلول‌های زنده جذب و بلورهای بنفش رنگ نامحلول فرمازان تشکیل و سپس، با افزودن شوینده حل می‌شود. در این آزمون، برای هر نوع سلول، یک رابطی خطی بین تعداد سلول‌ها و مقدار جذب مشخص می‌شود که امکان تعیین هر گونه تغییرات در مقدار تکثیر سلول‌ها را فراهم می‌کند. همان‌طور که در شکل ۱۰ نشان داده می‌شود، با گذشت ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت از کشت سلولی، نتایج این آزمون برای دو گروه ۱ و ۴ مشابه با گروه کنترل گزارش شده و برپایه تحلیل آماری ANOVA،

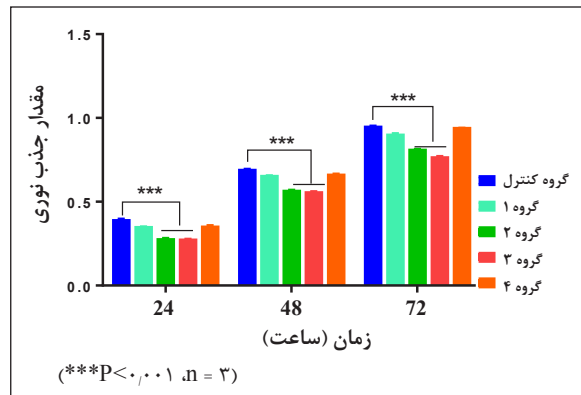
جدول ۲ نتایج به دست آمده از ویژگی فیزیکی و مکانیکی هیدروژل‌های بررسی شده

عامل‌های مورد بررسی	گروه ۱	گروه ۲	گروه ۳	گروه ۴
دمای سل-ژل (°C)	۲۲٫۸	۱۷٫۴	۱۴٫۸	۲۳٫۱
قابلیت تزریق	+	+	+	+
جذب آب (%)	۵۱٫۶۳±۰٫۱۰	۴۳٫۷۰±۰٫۲۳	۳۵٫۱۵±۰٫۱۹	۶۱٫۵۰±۰٫۰۶
کاهش آب (%)	۵۳٫۲۳±۰٫۱۰	۴۵٫۷۶±۰٫۱۵	۳۸٫۳۱±۰٫۱۹	۶۳٫۷۸±۰٫۰۵
زاویه تماس (درجه) (پیش از دمای سل-ژل)	۴۹٫۰۴±۰٫۶۱	۶۵٫۱۵±۰٫۳۴	۸۷٫۱۳±۰٫۶۱	۴۲٫۲۵±۰٫۵۱
زاویه تماس (درجه) (پس از دمای سل-ژل)	۶۶٫۰۵±۰٫۵۵	۷۸٫۱۴±۰٫۴۳	۱۰۴٫۱۱±۰٫۳۲	۵۸٫۲۰±۰٫۳۳
مقدار تخریب آنزیمی (%)	۸۹٫۴۲±۲٫۱۱	۸۱٫۵۴±۱٫۰۸	۷۵٫۳۴±۱٫۱۹	۹۲٫۳۵±۰٫۸۳
مدول کشسانی (kPa)	۶۸٫۱±۰٫۹۰	۱۱۸٫۱۹±۱٫۰۱	۱۴۶٫۵۹±۰٫۹۴	۷۹٫۲۲±۰٫۹۹
استحکام کششی (kPa)		۴٫۶۵±۰٫۵۶	۶٫۲۱±۰٫۴۳	
ازدیاد طول (%)		۲۷۱٫۷۵±۱٫۱۷	۱۵۶۰٫۷۵±۱٫۰۵	

هیدروژل گروه ۴) شرایط مشابه ماتریکس خارج سلولی^۱ موجود در بافت طبیعی بدن را فراهم کرده و از تکثیر سلول‌ها حمایت می‌کنند.

سلول‌ها بر سطح هیدروژل‌ها شناخته می‌شود. توانایی تکثیر و چسبندگی سلولی در درجه نخست به ویژگی فیزیکی و شیمیایی ترکیب بسترهای سلولی (هیدروژل) بستگی دارد [۵۵]. با توجه به نتایج آزمون MTT پس از ۷۲ ساعت، گروه ۴ شباهت زیادی را با گروه کنترل داشته و به‌عنوان بهترین گروه به دلیل زنده ماندن سلولی در نظر گرفته شد. به همین دلیل، برای بررسی و مشاهده سلول‌ها در سطح و داخل تخریل هیدروژل یادشده، تصویربرداری میکروسکوپ الکترونی روبشی بر نمونه انجام شد. از عامل‌های پایه‌ای در چسبندگی سلولی می‌توان به ویژگی آبدوستی و ویژگی‌های ساختاری سطح بستر اشاره داشت [۴۲]. تصویر ۱۲-الف، چسبندگی و حضور سلول‌ها را به‌طور روشن در سطح نشان می‌دهد. همان‌گونه که در بخش "جذب آب" نیز اشاره شد، گروه ۴ به دلیل حضور متیل سلولز در ساختار، سطوح با آبدوستی بیشتری را ایجاد می‌کند که موجب چسبندگی بیشتر سلول‌ها در سطح می‌شود. از سوی دیگر، ریخت سطح هیدروژل یاد شده (شکل ۹-د)، حضور حفره‌های ریز و درشت (در

هیدروژل گروه ۴) شرایط مشابه ماتریکس خارج سلولی^۱ موجود در بافت طبیعی بدن را فراهم کرده و از تکثیر سلول‌ها حمایت می‌کنند.

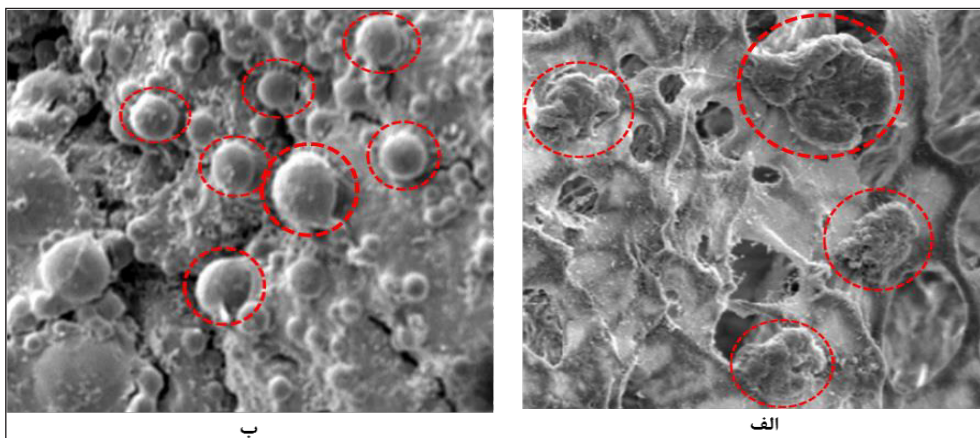


شکل ۱۰ مقدار جذب نوری سلول‌های فیبروبلاست بر سطح هیدروژل‌ها پس از ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت کشت

ریخت شناسی سلول‌ها با میکروسکوپ الکترونی روبشی چسبندگی سلول‌ها به عنوان نخستین رویداد پس از انتقال

1. Extra Cellular Matrix (ECM)

نیز موجب به دام افتادن سلول‌ها می‌شود که می‌تواند در حفظ و بقا بیشتر سلول‌ها در حین تزریق به بافت نیز موثر واقع شود. شکل ۱۱-ب، سلول‌های به دام افتاده از برش عمودی سطح هیدروژل یادشده را نشان می‌دهد.



شکل ۱۱ تصاویر SEM از چسبندگی سلول‌های فیبروبلاست در سطح (الف) و برش عرضی در سطح هیدروژل (ب) گروه ۴

۱ و ۴ با کمترین تفاوت با گروه کنترل را نشان داد. همچنین، تصاویر میکروسکوپ الکترونی روبشی از سلول‌های تکثیر یافته در سطح هیدروژل گروه ۴ نیز تاثیر متیل سلولز را در چسبندگی سلولی نشان داد. می‌توان گفت که این گروه محیط ایده‌آلی را برای رشد و تکثیر سلول‌ها فراهم می‌کنند. جمع‌بندی نتایج این بررسی نشان می‌دهد که در پژوهش‌های آتی، هیدروژل‌های گروه‌های ۱ و ۴ با قابلیت تزریق (با داشتن دمای سل-ژل کمتر از ۲۵) و آب‌دوستی بالای ۵۱٪، داشتن مدول کشسانی در گستره بافت طبیعی قلب (برای انسان بین ۲۰ تا ۵۰۰ کیلوپاسگال و برای موش بین ۱ تا ۱۴۰ کیلوپاسگال) و زیست‌سازگاری بالای سلولی می‌توانند به‌عنوان بستر و حامل سلول‌ها در سلول درمانی برخی از بیماری‌های قلبی موثر واقع شوند.

سپاسگزاری

بدین وسیله از پروفیسور عظیم اکبرزاده خیاوی که ما را در ارتقاء کیفی این پژوهش یاری کردند، صمیمانه تشکر می‌شود.

اندازه‌های متفاوت) را نشان می‌دهد. در بخش‌هایی از سطح با اندازه حفره‌های کوچکتر، سلول‌ها قابلیت چسبندگی بیشتری را داشته و از طریق ترشح‌های درون سلولی خود به سطح و یکدیگر بچسبند. همچنین، وجود حفره‌ها با اندازه‌های بزرگتر در سطح

نتیجه‌گیری

بررسی‌ها و نتایج نشان داد که هیدروژل گروه ۱ (با نسبت‌های مولی ۸۰/۵/۱۰ از NIPAAm/AAC/NAS/HEMA) در مقایسه با گروه‌های دیگر ویژگی‌های مکانیکی و فیزیکی مناسب‌تری را داشته و از لحاظ ساختاری شرایط بهتری را برای زنده ماندن سلول‌ها ایجاد کرده است. از سوی دیگر، افزودن متیل سلولز به هیدروژل گروه ۱ جذب آب را حدود ۱۰٪ افزایش و متناسب با آن زاویه تماس را ۷ درجه کاهش و مدول کشسانی را نیز از ۶۸،۱ ± ۰،۹۰ به ۷۹،۲۲ ± ۰،۹۹ تغییر داد. تصاویر میکروسکوپ الکترونی روبشی این دو گروه، ساختاری ناهموار و متخلخل را نشان داد که این ویژگی از دید مهندسی بافت به‌عنوان عاملی موثر در تکثیر و چسبندگی سلول‌ها بشمار می‌آید. از سوی دیگر، حضور حفره‌های ریز و درشت در ساختار این گروه از هیدروژل‌ها می‌تواند موجب کپسوله شدن برخی از سلول‌ها شود که به کاهش مرگ و حفظ بهتر سلول‌ها در حین تزریق کمک شایانی می‌کند. نتایج آزمون MTT نیز بیشترین مقدار زیست‌سازگاری برای گروه‌های

مراجع

- [1] Thomas, D; Brien, T.O.; Pandit, A.; Adv. Mater. 30, 1870006-1870016, 2018.
- [2] Waliullah, M. S.; Gan, Y. X.; Chen, A.D.; Gan, R.N.; Materials 2, 6351-6358, 2018.
- [3] Hasan, A.A.; Khattab, M.A. Islam, K.A.; Hweij, J.; Zeitouny, R.; Waters, M.; Sayegh, M.M.; Paul, A.; Adv. Sci. 2, 1500122-1500126, 2015.
- [4] Li, Z.; Fan, Z.Y.; Xu, H.; Niu, X.; Xie, Z.; Guan, J.; ACS Appl. Mater. Interfaces. 8, 15948-15957, 2016.
- [5] Wang, F.Z.; Li, M.; Khan, K.; Tamama, P.; Kuppusamy, W.R.; Wagner, C.K.; Guan, J. Acta Biomater. 6, 1978-1991, 2010.
- [6] French, K.M.; Boopathy, A.V.; DeQuach, J.A.; Chingozha, L.; Lu, H.; Christman, K.L.; Acta Biomater. 8, 4357-4364, 2012.
- [7] Martino, S.F.; Angelo, D.; Armentano, I.J.; Kenny, M.; Orlicchio, A.; Biotechnol. Adv. 30, 338-351, 2012.
- [8] Tang, Y.; Wang, X.; Li, Y.; Lei, M.; Du, Y.; Kennedy, J.F.; Carbohydr. Polym. 82, 833-841, 2010.
- [9] Reynolds, D.B.; Repperger, D.W.; Phillips, C.A.; Ann. Biomed. Eng. 31, 310-317, 2003.
- [10] Taşdelen, B.N.; Kayaman-Apohan, Z.; MISirli, O.; Baysal, B.M.; J. Appl. Polym. Sci. 97, 1115-1124, 2005.
- [11] Ullah, F.M.; Othman, B.H.; Javed, F.Z.; Akil, H.M.; Mater. Sci. Eng. C. 57, 414-433, 2015.
- [12] Baei, P., Jalili-Firoozinezhad, S.S.; Rajabi-Zeleti, M.; Tafazzoli-Shadpour, H.; Aghdami, N.; Mater. Sci. Eng. C. 63, 131-141, 2016..
- [13] Sepantafar, M.R.; Maheronnaghsh, H.; Mohammadi, S.; Rajabi-Zeleti, N.; Annabi, N.; Baharvand, H.; Biotechnol. Adv. 34, 362-379, 2016.
- [14] Fathi, A.; Mithieux, S.M.; Wei, H.; Chrzanowski, W.P.; Valtchev, A.S.; Dehghani, F.; Biomaterials 35, 5425-5435, 2014.
- [15] Yoshizumi, T.; Zhu, Y.; Jiang, H.; D'Amore, A.; Sakaguchi, H.; Wagner, W.R.; Biomaterials 83, 182-193, 2016.
- [16] Morkhande, V.K.; Pentewar, R. S.; Gapat, V.S.; Sayyad, R.; Sandip, K.; Indo Am. J. Pharm. Res. 6, 4678-4689, 2016.
- [17] Deng, C.; Zhu, H.; Li, J.; Feng, C.; Yao, Q.; Wang, L.; Chang, J.; Theranostics 8, 1940-1955, 2018.
- [18] Chen, G.; Kawazoe, N.; Pharmaceutics 8, 171-191, 2018.
- [19] Madry, H.P.; Cucchiari, M.; Cartilage 2, 201-225, 2011.
- [20] Xu, Y.; Li, Z.; Li, X.; Fan, Z.; Liu, Z.; Xie, X.; Guan, J.; Acta Biomater. 26, 23-33, 2015.
- [21] Smith, A.W.; Hoyne, J.D.; Nguyen, P.K.; McCreedy, D.A.; Aly, H.; Efimov, I.R.; Rentschler, S.; Elbert, D.L.; Biomaterials 34, 6559-6571, 2013.
- [22] Kondiah, P.; Choonara, Y.; Kondiah, P.; Marimuthu, T.; Kumar, P.; Pillay, V.; Molecules 21, 1580-1586, 2016.
- [23] Stabenfeldt, S.E.; García, A.J.; LaPlaca, M.C.; J. Biomed. Mater. Res. Part A. 77A, 718-725, 2006.
- [24] Chalanqui, M.J.; Pentlavalli, S.; McCrudden, C.; Chambers, P.; McCarthy, H.O.; Mater. Sci. Eng. C. 95, 409-421, 2017.
- [25] Yang, J.; IOP Conf. Ser. Mater. Sci. Eng.

- 504, 12013-12018, 2019.
- [26] Miao, L.; Hu, J.; Lu, M.; Tu, Y.; Chen, X.; Li, Y.; Lin, S.; Li, F.; *Carbohydr. Polym.* 137, 433–440, 2016.
- [27] Yang, H.R.; van Ee, J.; Timmer, K.E.; Craenmehr, G.M.; Huang, J.H.; Öner, F.C.; Dhert, W.J.; Kragten, H.M.; Willems, N.G.; Papen-Botterhuis, N.E.; Creemers, L.B.; *Acta Biomater.* 23, 214–228, 2015.
- [28] Li, Z.; Fan, Z.; Xu, Y.; Lo, W.; Wang, X.; Niu, H.; Khan, M.; Guan, J.; *ACS Appl. Mater. Interfaces.* 8, 10752–10760, 2016.
- [29] Guan, J.; Hong, Y.; Ma, Z.; Wagner, W.R.; *Biomacromolecules* 9, 1283–1292, 2008.
- [30] Luo, K.; Yang, Y.; Shao, Z.; *Adv. Funct. Mater.* 26, 872–880, 2016.
- [31] Sun, W.; Incitti, T.; Migliaresi, C.; Quattrone, A.; Casarosa, S.; *J. Tissue Eng. Regen. Med.* 11, 1532–1541, 2017.
- [32] Chang, C.; Zhang, L.; *Carbohydr. Polym.* 84, 40–53, 2011.
- [33] Gold, G.T.; Varma, D.M.; Taub, P.J.; Nicoll, S.B.; *Carbohydr. Polym.* 134, 497–507, 2015.
- [34] Rokhade, A.P.; Shelke, N.B.; Patil, S.A.; Aminabhavi, T.M.; *Carbohydr. Polym.* 69, 678–687, 2007.
- [35] Bai, Y.; Chen, B.; Xiang, F.; Zhou, J.; Wang, H.; Suo, Z.; *Appl. Phys. Lett.* 105, 151903-151909, 2014.
- [36] Zhou, J.; Zhang, B.; Liu, X.; Shi, L.; Zhu, J.; Wei, D.; Zhong, J.; Sun, G.; He, D.; *Carbohydr. Polym.* 143, 301–309, 2016.
- [37] Dehghani, S.; Rasoulianboroujeni, M.; Ghasemi, H.; Keshel, S.H.; Nozarian, Z.; Hashemian, M.; Zarei-Ghanavati, N.M.; Latifi, G.; Ghaffari, R.; Cui, Z.; Ye, H.; Tayebi, L.; *Biomaterials* 174, 95–112, 2018.
- [38] Parmar, I.A.; A. Shedje, S.M.; Badiger, V.P.; Wadgaonkar, P.; *RSC Adv.* 7, 5101–5110, 2017.
- [39] Li, X.; Zhou, J.; Liu, Z.; Chen, J.; Lü, S.; Sun, H.; Li, J.; Lin, Q.; Yang, B.; Duan, C.; Xing, M.M.; Wang, C.; *Biomaterials*, 35(22), 5679–5688, 2014.
- [40] Mehra, M.M.; Asadollahi, A.; Ghaedi, K.; Salehi, H.; Arpanaei, A.; *Int. J. Biol. Macromol.* 79, 687–695, 2015.
- [41] Meng, Z.X.; Xu, X.X.; Zheng, W.; Zhou, H.M.; Li, L.; Zheng, Y.F.; *Colloids Surfaces B Biointerfaces* 84, 97–102, 2011.
- [42] Ramier, J.; Boudierlique, T.; Stoilova, O.; Manolova, N.I.; Langlois, V.; Renard, E.; Albanese, P.; Grande, D.; *Mater. Sci. Eng. C.* 38, 161–169, 2014.
- [43] Rosa, V.; Xie, H.; N. Dubey, T.T.; Madanagopal, S.S.; Morin, J.L.; Castro Neto, A.H.; *Dent. Mater.* 32, 1019–1025, 2016.
- [44] Arima, Y.; Iwata, H.; *Biomaterials* 28, 3074–3082, 2007.
- [45] Crawford, R.J.; Ivanova, E.P.; Webb, H.K.; *Superhydrophobic Surfaces* 14, 27–49, 2015.
- [46] Menzies, K.L.; Jones, L.; *Optom. Vis. Sci.* 87, 387–399, 2010.
- [47] Shi, X.; Lu, S.; Xu, W.; *Mater. Chem. Phys.* 134, 657–663, 2012.
- [48] Sengupta, P.; Prasad, B.L.V.; *Regen. Eng. Transl. Med.* 4, 75-91, 2018.
- [49] Laurencin, C.; Nair, L.; "Nanotechnology and Regenerative Engineering", CRC Press, Boca Raton, 2014.
- [50] Li, Z.; Guo, X.; Palmer, A.F.; Das, H.; Guan, J.; *Acta Biomater.* 8, 3586–3595, 2012.
- [51] Chaudhuri, R.; Ramachandran, M.; Mo-

- haril, P.; Harumalani, M.; Jaiswal, A.K.; Mater. Sci. Eng. C. 79, 950–957, 2017.
- [52] Billiet, T.; Vandehaute, M.; Schelfhout, J.; Van Vlierberghe, S.; Dubruel, P.; Biomaterials 33, 6020–6041, 2012.
- [53] Pezeshki Modares, M.; Mirzadeh, H.; Zandi, M.; Iran. Polym. J. 21, 191–200, 2012.
- [54] Madden, L.R.; Mortisen, D.J.; Sussman, E.M.; Dupras, S.K.; Murry, C.E.; Ratner, B.D.; Proc. Natl. Acad. Sci. 107, 15211–15216, 2010.
- [55] Jose, M.; Thomas, V.K.; Johnson, D.; Nyairo, E.; Acta Biomater. 5, 305–315, 2009.

Evaluation of methylcellulose role in thermosensitive hydrogel structure as injectable system for tissue engineering application: fabrication and characterization

Sogol Motalebi Tala Tapeh¹, Mazyar Sharifzadeh Baei^{2*}, Saeed Heydari Keshel³

1. PhD.student in Department of Chemical Engineering, Ayatollah Amoli Branch, Islamic Azad University, Amol, Iran
2. Associate Prof. in Department of Chemical Engineering, Ayatollah Amoli Branch, Islamic Azad University, Amol, Iran
3. Assistant Prof. in Department of Tissue Engineering and Applied Cell Science, Shahid Beheshti University of Medical Sciences, Tehran, Iran

Received: February 2016, Revised: August 2017, Accepted: September 2017

Abstract: One of the challenges in tissue engineering is polymer material selection and design of a suitable structure for hydrogels. In this study, N-isopropylacrylamide/Acrylic acid/N-Acryloxysuccinimide/2-Hydroxyethyl methacrylate-poly lactide hydrogel (NIPAAm/AAC/NAS/HEMAPLA) was prepared with various molar ratio by ring-opening polymerization method to fabricate hydrogel substrate with properties of injectability, thermosensitive, physical and mechanical similar of soft tissues. The hydrogel with the ratio of 80/5/5/10 was selected as ideal groups (group 1). Methylcellulose was also used in the hydrogel structure to improve quality of the hydrogel (group 4). Then, the physicochemical, mechanical and biological properties of the hydrogels were evaluated. The results showed, molar ratio of polymers not only plays an important role in enhancing hydrophilicity, porosity, elastic modulus-like soft tissues, and cell proliferation, but also the presence of methyl cellulose lead to the improvement of the mentioned properties. So that, hydrogels of groups 1 and 4 provide an ideal environment for improving cellular activities due to hydrophilicity of more than 51%, elastic modulus-like cardiac tissues (68.1 kPa and 79.22 kPa, respectively), biocompatibility above 90%, with compared to other groups. It seems that the mentioned hydrogels (1 and 4 groups) can imitate soft tissue properties such as cardiac and be effective to regenerate and repair. In the other hand, these thermosensitive and inject ability hydrogels lead to a uniform mixing of cells and growth factors, as well as can apply to the cell therapy of soft tissue.

Keywords: Soft tissues engineering, Thermosensitive hydrogel, Methylcellulose, Biocompatibility