

## طراحی هیدروژل هوشمند PNIPAm / کیتوسان تحت تابش دهی گاما به منظور کاربردهای بیولوژیک

سعید حیدری کشل<sup>۱</sup>، اسماعیل بی آزار<sup>۲\*</sup>، آفرین کریمی<sup>۳</sup>، آزاده آصف نژاد<sup>۳</sup>، اشکان امیرخانی<sup>۴</sup>، مهدی شهریاری نور<sup>۶</sup>، فاروق کاظم بیگی<sup>۷</sup>

(۱) مرکز تحقیقات پروتئومیکس، دانشکده پیراپزشکی، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی تهران

(۲) گروه مهندسی بافت و سلول درمانی، دانشکده فن آوری های نوین پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی تهران

(۳) گروه فنی و مهندسی، واحد تکنابن، دانشگاه آزاد اسلامی تنکابن

(۴) گروه بیومواد، دانشکده مهندسی پزشکی، واحد علوم و تحقیقات، دانشگاه آزاد اسلامی تهران

(۵) گروه فنی و مهندسی، دانشکده فنی، واحد علوم و تحقیقات، دانشگاه آزاد اسلامی اراک

(۶) گروه میکروبیولوژی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد علوم و تحقیقات گیلان

(۷) گروه بهداشت محیط، دانشکده بهداشت، دانشگاه علوم پزشکی ایلام

تاریخ دریافت: ۹۱/۱۰/۹

تاریخ پذیرش: ۹۱/۱۲/۴

### چکیده

**مقدمه:** پلیمرهای حساس به دما که در پایین تر از دمای بحرانی شان آبدوست و در بالای آن آبریز می شوند می توانند در مهندسی سلولی بکار روند.

**مواد و روش ها:** در این مطالعه هیدروژل هوشمند حساس به دمای کیتوسان / پلی-N-ایزوپروپیل اکریل آمید به روش تابش دهی گاما به منظور طراحی بستری مناسب برای کشت سلول طراحی نمودیم. هیدروژل‌های تهیه شده پیوند خورده توسط پرتو گاما توسط آنالیز DSC، مقدار تورم و آنالیز سلولی مورد بررسی قرار گرفتند.

**یافته های پژوهش:** نتایج این بررسی ها نشان داد که با این روش بدون افزودنی، کopolymerizاسیون با پیوند گاما با موفقیت انجام شده است. در آزمون تورم، اثر تورم و همچنین تغییر فاز از حالت دو فازی به تک فازی با توجه به داده های حاصله از این بررسی در دو دمای ۴۰ و ۱۰ درجه سانتیگراد به ترتیب نشان دهنده ی آبریزی و آبدوستی سطوح پیوند زده شده می باشد. آنالیز DSC نمونه ها نیز چنین تغییر فازی را در دمای LCST نشان می دهد که نشان دهنده وجود و پلیمریزه شدن N-ایزوپروپیل اکریل آمید به پلی-N-ایزوپروپیل اکریل آمید می باشد. آنالیز سلولی نیز در دماهای مختلف چسبندگی سلولی مناسب و همچنین ویژگی جدایش سلولها را از سطح پلیمر هوشمند نشان می دهد.

**بحث و نتیجه گیری:** سطوح کopolymer هوشمند نشان می دهد که در دمای فیزیولوژیکی (۳۷ درجه سانتیگراد) سلولها به خوبی روی سطح بستر پیوندزنی شده کشت می یابند و در دمای ۴ درجه سانتیگراد سوسپانسیون سلولی به دلیل ویژگی آب گریزی سطح، ایجاد و از سطح جدا می شوند از این کopolymerها می توان برای جدایش سلولی بدون بهره گیری از روش های متداول جدایش سلولی همانند روش مکانیکی یا آنزیماتیکی بهره برد.

**واژه های کلیدی:** مهندسی سلولی، پلیمر هوشمند حساس به دما، کیتوسان، پلی-N-ایزوپروپیل اکریل آمید

\*نویسنده مسئول: گروه مهندسی بافت و سلول درمانی، دانشکده فن آوری های نوین پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی تهران

Email: [kia\\_esm@yahoo.com](mailto:kia_esm@yahoo.com)

## مقدمه

در طول چند دهه اخیر مواد بسیار زیادی برای کاربردهای پزشکی و همچنین ابزار پزشکی تولید شده اند. هر کدام از این مواد واکنش های معمولاً کنترل نشده ی بسیار زیادی با پروتئین ها و سلول ها هم بصورت *In vitro* و هم بصورت *In vivo* می دهند که منجر به نتایج و تصمیم گیری های مختلفی در خصوص زیست سازگاری مواد می شود. در حقیقت مهندسی جدایش سلولی به منظور اجتناب از محدودیت های ابزارها و روشهای شیمیایی همانند توسعه یافته است [۱-۴]. پلیمرهای حساس به دما بصورت کووالانسی به ظروف پیوند زده شده اند که به بسیاری از انواع سلول ها در دمای  $37^{\circ}\text{C}$  اجازه چسبیدن و تکثیر را می دهند. سلول ها بصورت خودبخودی، هنگامی که دما به کمتر از  $32^{\circ}\text{C}$  کاهش یابد، بدون نیاز به آزیم های پروتئولیتیک جدا میشوند. نفوذ پرتو گاما در ماده باعث تولید الکترون های ثانویه شده که باعث یونیزه کردن مولکول های آن ماده می شود. نفوذ پرتو گاما باعث تولید الکترون های ثانویه شده و سبب یونیزه کردن مولکول های ماده می شود. PNIPAm و پلی اکریلیک اسید بر روی بسترهای مختلفی مثل PTFE و PVDF بطور موفقیت آمیزی توسط تابش اشعه گاما پیوند زده شده اند. در سطح بستری که تحت اشعه گاما قرار می گیرد، رادیکال های آزاد و گروه های پراکسید ایجاد می گردد. بسترهای از قبل تابش یافته در محلول مونومر در دمای مناسب و در محیط  $\text{N}_2$  غوطه ور می شوند که تحت این شرایط کوپلیمریزاسیون پیوندی اتفاق می افتد [۶-۱۴].

مطالعات زیادی در تهیه هیدروژل های هوشمند همراه با مواد زیست سازگار و چسبنده سلولی همانند کیتوسان انجام شده است که می تواند همراه با پلیمر هوشمند آب گریز و نامناسب برای کشت سلولها پلی-N- ایزوپروپیل اکریل امید تحت روشهای کوپلیمریزاسیون مختلف، ویژگی چسبندگی سلولی آن را افزایش دهد [۱۵-۲۳]. در این مطالعه نیز با بهره گیری از ماده چسبنده سلولی کیتوسان و مونومر N- ایزوپروپیل اکریل امید و با بهره گیری از روش پلیمریزاسیون

رادیکالی همراه با پرتو دهی گاما، هیدروژل های متورم هوشمند را طراحی و مورد ارزیابی قرار می دهیم.

## مواد و روش ها

۱۰/۳۳ گرم NIPAAm (sigma-aldrich) را در ۱۲۵ میلی لیتر n-هگزان حل شدند. هدف از این کار اطمینان از خارج شدن پایدارکننده های ماده بود. لازم به ذکر است که n-هگزان عمدتاً ماده پایدارکننده ترکیبات آمیدی را خارج می کند. سپس این محلول را به مدت ۱۶ ساعت درون یخچال قرار دادیم تا اینکه NIPAAm تبلور مجدد تشکیل گردد. محلولهای کیتوسان حل شده در اسید استیک و NIPAAm با نسبتهای حل شده در محلول ۱/۱ و ۳/۱ در دمای مناسب با جوشاندن  $\text{N}_2$  در پرپود زمانی خاص، غوطه ور می شوند. و سپس تحت دوز  $10\text{ KGy}$  و ۲۰ قرار می گیرند. بعد از تابش، نمونه ها به مدت ۴۸ ساعت در متانول سوکسله می گردند تا مونومرهای پلیمریزه نشده خارج شوند. هیدروژل در آن خلا خشک می شود برای بررسی حضور پلیمر هوشمند روی سطوح با شرایط بهینه، از آنالیز حرارتی DSC (Netzsch 200F3) با سرعت گرمایش ۵ درجه سانتیگراد از ۰ تا ۶۰ درجه سانتیگراد در محیط اتمسفر نیتروژن استفاده گردید. برای بررسی تورم هیدروژل ها از روش گراویمتری یا وزن سنجی استفاده گردید نمونه ها همراه با دو غلظت مختلف همراه با دوز های مختلف تابش در مدت زمان ۱ ساعت و ۱ هفته در آب غوطه ور می شوند و مقدار آب باقیمانده با فیلتر گرفته شده و مورد سنجش قرار می گیرد. نسبت تورم برابر است با  $Ws/Wd$  (وزن ماده متورم شده به وزن خشک هیدروژل). برای بررسی مقدار تورم و تاثیر آن از دما نمونه ها در دماهای مختلف ۱۰ تا ۴۰ درجه سانتیگراد قرار و مجدداً مورد ارزیابی وزنی قرار گرفتند. برای بررسی سلولی تعداد  $2 \times 10^5$  سلول فیبروبلاستی (L929) را بر روی بسترها، که در ابعاد  $1 \times 1$  سانتیمتری بریده شده اند و درون چاهک پلیت ۶ خانه قرار داده شده اند کشت می نماییم. برای هر نمونه بستر هوشمند تعداد ۳ تکرار را در نظر گرفته شدند. پس از گذشت ۷۲ ساعت سلول های کشت یافته ایجاد کلون های را بر روی بستر می نمایند. در این مرحله از

رشد، پس از تهیه تصاویر میکروسکوپی نوری اینورت، از کشت سلولها بر روی بستر، بسترها را به پلیت های جدید منتقل می نماییم زیرا سلولهای کشت یافته بر کف پلیت می توانند در بررسی تداخل ایجاد نمایند. پلیت جدید را به مدت ۲۰ دقیقه در دمای ۴ درجه سانتی گراد قرار داده، سپس میزان جدایش سلولها را با میکروسکوپ بررسی نمودیم.

### یافته های پژوهش

بررسی مقدار تورم

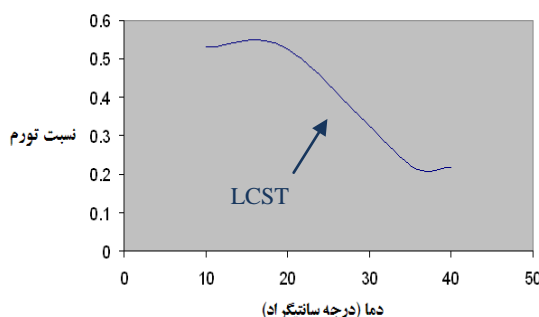
مقدار تورم را بر حسب فرمول وزن نمونه متورم بر وزن نمونه خشک محاسبه می نماییم که برای نمونه های با نسبت ۳/۱ و ۱/۱ در دوزهای جذبی ۱۰ Kgy و

۲۰ در جدول زیر آورده شده است. همانطور که مشاهده می شود با افزایش مقدار کیتوسان یا کاهش مونومر از یک به سه، مقدار تورم افزایش می یابد. از طرفی نتایج جدول ۱ نشان می دهد که با افزایش دوز تابشی تاثیر چندانی در مقدار تورم ایجاد نمی شود اما به مرور زمان مقدار تورم افزایش دو برابری را نشان می دهد. شکل ۱ نیز مقدار تورم را برای نمونه هیدروژل بر حسب دما نشان می دهد که با افزایش دما مقدار تورم کاهش می یابد دمای بحرانی پلیمر از نمودار قابل محاسبه می باشد که این دلیلی بر پلیمریزاسیون موفق همراه با پرتودهی گاما می باشد.

جدول ۱. مقدار تورم برای نمونه هیدروژلهای همراه با نسبت کیتوسان و NIPAAm ۱/۱ و ۳/۱ در دوزهای ۱۰ و ۲۰ کیلوگری در زمانهای مختلف.

نمونه	۳/۱۰	۳/۲۰	۱/۱۰	۱/۲۰
۱ ساعت در ۲۵ درجه	۰.۳ ± ۵/۵	۰.۱ ± ۵/۴	۰.۴ ± ۷/۶	± ۷/۱
۱ هفته در ۲۵ درجه	± ۱۱/۱	± ۱۰/۸	± ۱۴/۱	± ۱۴/۱
	۰.۶	۰.۲	۰.۵	۰.۱

(نتایج بر مبنای میانگین داده ها SD و  $P < 0.05$ )



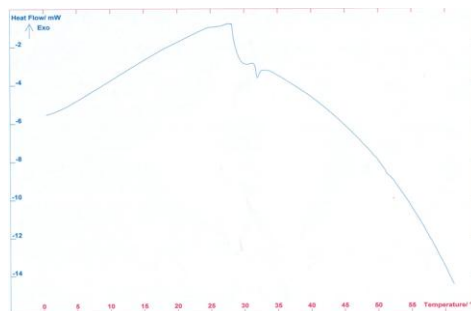
شکل ۱. مقدار تورم هیدروژل کیتوسان / NIPAAm با نسبت ۱/۱ در دوز ۲۰ کیلوگری بر مبنای دما.

نیتروژن قرار گرفتند. شکل ۲ آنالیز حرارتی نمونه پیوند زنی شده با پرتو گاما را نشان می دهد. دمای ۳۰ درجه سانتیگراد، دمای بحرانی پلیمر هوشمند و نشانگر حضور پلیمر PNIPAAm و انجام موفق فرایند پلیمریزاسیون است پیک ایجاد شده در این محدوده

نتایج آنالیز DSC

برای بررسی حضور پلیمر هوشمند، نمونه ها مورد بررسی آنالیز حرارتی DSC (NETZSCHDSC200F3) با رنج دمایی ۵ درجه در هر دقیقه از ۰ تا ۶۰ درجه سانتیگراد در اتمسفر گاز

دمایی حاکی از ایجاد تغییر فاز ناشی از حضور این پلیمر حساس به دما می باشد که در دمای زیر  $32^{\circ}\text{C}$  ویژگی آبدوستی و در دمای بالای  $32^{\circ}\text{C}$  (یعنی دمای  $37^{\circ}\text{C}$ ) ویژگی آبگریزی سطح را نشان میدهد.

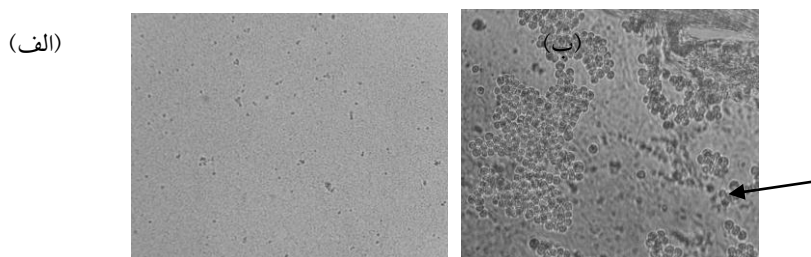


شکل ۲. آنالیز حرارتی DSC نمونه هیدروژل پیوندزنی شده با پرتو گاما.

شکل ۳ الف کشت سلولها روی سطح کوپلیمر هوشمند را در دمای  $37^{\circ}\text{C}$  درجه سانتیگراد نشان می دهد سلولها بخوبی در این دما روی سطح کوپلیمر چسبیده اند تصویر ۳ ب تاثیر کاهش دما تا  $4^{\circ}\text{C}$  درجه سانتیگراد را در روی سطح کوپلیمر نشان می دهد سلولهای جدا شده از سطح نمونه در دمای  $4^{\circ}\text{C}$  درجه سانتیگراد بخوبی در این تصویر مشخص است.

نتایج آنالیز سلولی

سوسپانسیون سلولی سلول های فیبروبلاست (1929) دم موش بر مبنای روش استاندارد ISO10993 تهیه گردید و در دماهای مختلف  $37^{\circ}\text{C}$  و  $4^{\circ}\text{C}$  درجه سانتیگراد با توجه به توضیحات در بخش روش کار توسط میکروسکوپ نوری Nikon Eclipse Ts-100 با بزرگنمایی ۱۰۰ مورد بررسی قرار می گیرند.



شکل ۳. کشت سلولها در دمای  $37^{\circ}\text{C}$  درجه سانتیگراد و جدایش سلولی در  $4^{\circ}\text{C}$  درجه سانتیگراد از روی سطح کوپلیمر هوشمند . سلولهای جدا شده از سطح کوپلیمر با پیکان نشان داده شده است.

تابشی با پرتوهای گاما استفاده شد و مورد ارزیابی آنالیز DSC ، مقدار تورم و آنالیز سلولی مورد بررسی قرار گرفت آنالیز DSC ، فرایند پلیمریزاسیون و حضور پلیمر هوشمند به دلیل تغییر فاز از مایع به جامد را اثبات می نماید. مقدار تورم بر مبنای دما و غلظت های مواد نشان دهنده تورم مناسب و همچنین پلیمریزاسیون موفق بود بررسی های سلولی همراه با

### بحث و نتیجه گیری

در این مطالعه هیدروژل هوشمند حساس به دمای زیست سازگار دمای کیتوسان / پلی -N- ایزوپروپیل اکریل آمید به روش تابش دهی گاما به منظور طراحی بستری مناسب برای کشت سلول طراحی شد. این مواد از لحاظ زیست سازگاری دارای ویژگیهای مناسبی برای سلولها می باشد همچنین از فرایند کوپلیمریزاسیون

گیری از روش های متداول جدایش سلولی همانند روش مکانیکی یا آنزیماتیکی بهره برد.

### سیاسگزاری

بدین وسیله مراتب تشکر و قدر دانی خود را از شورا، پژوهشی مرکز تحقیقات پروتئومیکس بیان می دارم.

کشت سلولهای فیروبللاست روی سطوح کولیمیر هوشمند نشان می دهد که در دمای فیزیولوژیکی (۳۷ درجه سانتیگراد) سلولها به خوبی روی سطح بستر پیوندزنی شده کشت می یابند و در دمای ۴ درجه سانتیگراد سوسپانسیون سلولی به دلیل ویژگی آب گریزی سطح، ایجاد و از سطح جدا می شوند از این کولیمرها می توان برای جدایش سلولی بدون بهره

### References

- 1-Park KD, Suzuki K, Lee WK, Lee JE, Kim YH, Sakurai Y, et al. Platelet adhesion and activation on polyethylene glycol modified polyurethane surfaces. *ASAIIO J* 1996;42: 876-81.
- 2-Kikuchi A, Okano T. Nanostructured designs of biomedical materials applications of cell sheet engineering to functional regenerative tissues and organs. *J Control Release* 2005;101: 69-84.
- 3-Ricardo MP, da Silva Joao F, Mano and Rui L. Smart thermoresponsive coatings and surfaces for tissue engineering: switching cell-material boundaries. *Trends Biotechnol* 2007;25:
- 4-Akiyama Y, Kikuchi A, Yamato M, Okano T. Ultra thin poly (N-isopropylacrylamide) grafted layer on poly (styrene) surfaces for cell adhesion/detachment control. *Langmuir* 2004; 22: 5506-11.
- 5-Ozyürek Z. Thermoresponsive glycopolymers via controlled radical polymerization (RAFT) for biomolecular recognition. *Macromol Chem Phys* 2007;208: 1035-49.
- 6-Yamato C, Kohno A, Nishimoto H, Sekine F, Fukai TO. Cell sheet engineering: recreating tissues without biodegradable scaffolds. *Biomaterials* 2005;26: 6415-22.
- 7-Mook LY, Joon PJn, Joon HL, Young ML, Young CN. Cell sheet detachment from poly(Nvinylcaprolactam-co-N-isopropylacrylamide) grafted onto tissue culture polystyrene dishes. *J Ind Eng Chem* 2007; 13: 21-6.
- 8-Priscila SC, Ma'rcia RM, Wanderley V, Eduardo R, Adley FR, Edvani CM. Characterization of PNIPAAm photografted on PET and PS surfaces. *Appl Surf Sci J* 2005;245: 223-33.
- 9-Yamada N, Okano T, Sakai H, Karikusa F, Sawasaki Y, Sakurai Y. Thermo-responsive polymeric surfaces; control of attachment and detachment of cultured cells. *Macromol Chem Rapid Commun* 1990;11: 571-6.
- 10-Yaping Hou, Andrew R, Matthews A, Smitherman M, Allen S. Thermoresponsive nanocomposite hydrogels with cell releasing behavior. *Biomaterials* 2008;29: 3175-84.
- 11-Gil ES, Hudson SM. Stimuli-responsive polymers and their bioconjugates. *Progr Poly Sci* 2004;29: 1173-222.
- 12-Yamato M, Okano T. Cell Sheet Engineering. *Materials Today* 2004;7: 42-7.
- 13-Caner H, Hasipoglu H, Yilmaz O, Yilmaz E. Graft copolymerization of 4-vinylpyridine on to Chitosan-1. *Eur Polym J* 1998;34: 493-7.
- 14-Singh DK, Ray AR. Radiation-induced grafting of N, N0-dimethylaminoethyl methacrylate onto chitosan films. *J Appl Polym Sci* 1997;66: 869-77.
- 15-Mima S, Miya M, Iwamoto R, Yoshikawa S. Highly deacetylated chitosan and its properties. *J Appl Polym Sci* 1983;28: 1909-17.
- 16-Kumbar SG, Aminabhavi TM. Synthesis and characterization of modified chitosan microspheres: effect of the grafting ratio on the controlled release of nifedipine through microspheres. *J Appl Polym Sci* 2003;89: 2940-9.
- 17-Shantha KL, Harding DRK. Synthesis and characterization of chemically modified chitosan microspheres. *Carbohydr Polym* 2002;48: 247-53.
- 18-Wang MZ, Qiang JC, Fang Y. Preparation and properties of chitosan-poly(Nisopropylacrylamide) semi-IPN hydrogels. *J Polym Sci Part A: Polym Chem* 2000;38: 474-81.

19-Kim SY, Cho SM, Lee YM, Kim SJ. Thermoand pH-responsive behaviors of graft copolymer and blendbased on chitosan and N-isopropylacrylamide. *J Appl Polym Sci* 2000;78: 1381-91.

20-Li Y, Yu H, Liang B, Fang Y. Study of radiationinduced graft copolymerization of butyl acrylate onto chitosan in acetic acid aqueous solution. *J Appl Polym Sci* 2003;90:2855-60.

21-Zhai ML, Liu N, Li J, Yi M, Li JQ, Ha HF. Radiation preparation of PVA-g-

NIPAAm in a homogeneous system and its application in controlled release. *Radiat Phys Chem J* 2000;57: 481-4.

22-Liu PF, Zhai ML, Wu JL. Study on radiationinduced grafting of styrene onto chitin and chitosan. *Radiat Phys Chem J* 2001;61: 149-53.

23-Yoksan R, Akashi M, Biramontri S, Chirachanchai S. Hydrophobic chain conjugation at hydroxyl group onto g-ray irradiated chitosan. *Biomacromolecules* 2001;2:1038-44.

## Smart Hydrogel designed PNIPAm / chitosan by Gamma Irradiation of Biological applications

Heidari keshel S<sup>1, 2</sup>, Biazar E<sup>3\*</sup>, karimi A<sup>4</sup>, Asefnejad A<sup>4</sup>, Amirkhani A<sup>5</sup>,  
Shahriarinoor M<sup>6</sup>, Kazem beigi F<sup>7</sup>

(Received: 29 Dec. 2012

Accepted: 22 Feb. 2013)

### Abstract

**Introduction:** The Thermo-sensitive polymers that are hydrophilic and hydrophobic at lower and higher than their transition temperature, respectively, may be used in cellular engineering.

**Methods & Materials:** Thermo-sensitive hydrogels were prepared by graft copolymerization of chitosan and N-Isopropylacrylamide via gamma radiation. Characterization of hydrogels such as DSC analysis and swelling test and cell assessments for harvesting living cell sheet were investigated. DSC analysis showed chitosan and N-Isopropylacrylamide monomer were grafted via gamma radiation successfully.

**Findings:** Swelling ratio and curves corroborated the hydrophilicity / hydrophobicity of hydrogel and the property is due to presence of N-Isopropylacrylamide in different

temperatures. The hydrogel was tested for harvesting epithelial cells after carrying out cell culture at 37 °C and incubating the confluent cells at 4°C for spontaneous detachment of cell sheet from hydrogel surface without enzyme treatment. The analyses revealed the procedure was successful.

**Discussion & Conclusion:** Cell viability assay results and microscopic observations demonstrated that cells could attach to the hydrogel surface and maintain high viability and proliferation ability. Cell detachment efficiency from the hydrogel was high. These unique properties of the hydrogel would make it a promising support for epithelial cell grafting especially cornea regeneration.

**Key words:** Tissue engineering, intelgent polymer temperature response, chitosan, poly N-Isopropylacrylamide

1. Proteomics research center, Faculty of paramedical sciences, shahidbeheshti university of medical science, Tehran, Iran
  2. Tissue engineering department, school of advanced technologies in medicine, Tehran university of medical science, Tehran, Iran
  3. Dept of biomaterial engineering, Tonekabon branch, Islamic azad university, Tonekabon, Iran
  4. Dept of Biomedical engineering, science and research Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran
  5. Dept of Technology and Engineering, Faculty of Technology, Sciences and Research Branch, Islam Azad university of Arak, Arak, Iran
  6. Dept of Microbiology Science and Research Branch, Islamic Azad University, Gilan, Iran
  7. Dept of Environmental Health, Faculty of Health, Ilam university of medical science, Ilam, Iran
- \*(corresponding author)