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

سعید حیدری کشل[۱] ، اسماعیل بی آزار[۲*] ، آفرین کریمی[۳] ، آزاده آصف نژاد [۳] ، اشکان امیرخانی[۵] ، مهدی شهریاری نور[۶] ، فاروق کاظم بیگی[۷]

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 تنکابن ، دانشگاه آزاد اسلامی تنکابن

۴)گروه بیومواد ، دانشکده مهندسی پزشکی ، واحدعلوم 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: ۹۱/۱۲/٤**

چکیده

مقدمه: پلیمرهای حساس به دما که در پایین تر از دمای بحرانی شان آبدوست و در بالای آن آبگریز 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، کوپلیمریزاسیون 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 و۱۰ درجه سانتیگراد به ترتیب نشان دهنده ی آبگریزی 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 کوپلیمر 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 کوپلیمرها 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

[Downloaded from sjimu.medilam.ac.ir on 2026-11-11]

مقدمه

در طول چند دهه اخیر مواد بسیار زیادی برای کاربردهای پزشکی و همچنین ابزار پزشکی تولید شده اند. هرکدام از این مواد واکنش های معمولا 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 دمایC° ۳۷ اجازه چسبیدن و تکثیر را می دهند. سلول ها بصورت خودبخودی، هنگامی که دما به کمتر از $^{\circ}C$ ۳۲ کاهش یابد، بدون نیاز به آنزیم 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. PNIPAAm و پلی اکریلیک اسید بر روی بستر های 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 N2 غوطه ور می شوند که تحت این شرایط کوپلیمریزاسیون پیوندی اتفاق می افتد [۶-۱۴]. مطالعات زیادی در تهیه هیدروژلهای 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 آمید 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 آمید و با بهره گیری از روش پلیمریزاسیون رادیکالی همراه با پرتودهی گاما ، هیدروژلهای 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 عمدتا ماده پایدار کننده ترکیبات آمیدی را خارج می کند. سپس این محلول را به مدت ۱۶ ساعت درون یخچال قرار دادیم تا اینکه NIPAAmتبلور 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 N2 در پریود زمانی خاص، غوطه ورمی شوند. و سپس تحت دوزKGy ۱۰ 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 آون خلا خشک می شود برای بررسی حضور پلیمر هوشمند روی سطوح با شرایط بهینه ، از آنالیز حرارتی DSC (Netzschdsc200F3)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 درمدت 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 ان از دما نمونه ها در دماهای مختلف ۱۰ تا ۴۰ درجه سانتیگراد قرار و مجددا مورد ارزیابی وزنی قرار گرفتند. برای بررسی سلولی تعداد ۲×۱۰۵ سلول فیبروبلاستی (L929) را بر روی بستر ها، که در ابعاد ۱*۱ 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 گر فته شدند. پس از گذشت ۷۲ ساعت سلول های کشت یافته ایجاد کلون های را بر روی بستر می نمایند. در این مرحله از

[Downloaded from sjimu.medilam.ac.ir on 2026-11-11]

رشد، پس از تهیه تصاویر میکروسکوپی نوری اینورت ، از کشت سلولها بر روی بستر ، بستر ها 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

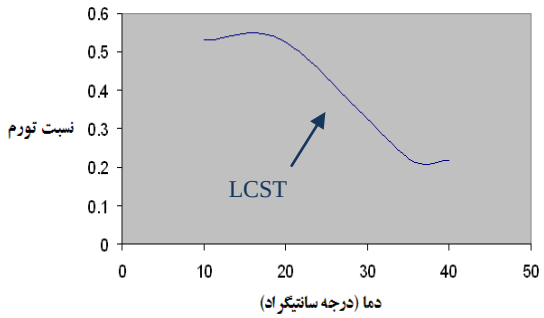
بررسی مقدار تورم

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

(نتایج بر مبنای میانگین داده ها SD ± و $p < 0.05$).



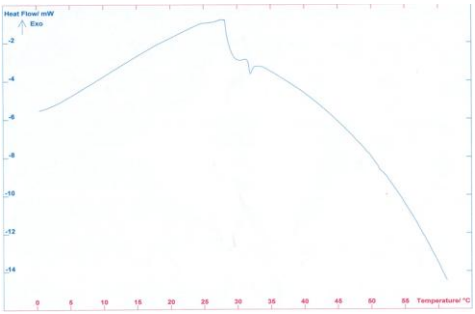
شکل ۱. مقدار تورم هیدروژل کیتوسان / NIPAAm با نسبت ۱ /۱ در دوز ۲۰ کیلوگری بر مبنای دما.

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 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

[Downloaded from sjimu.medilam.ac.ir on 2026-11-11]

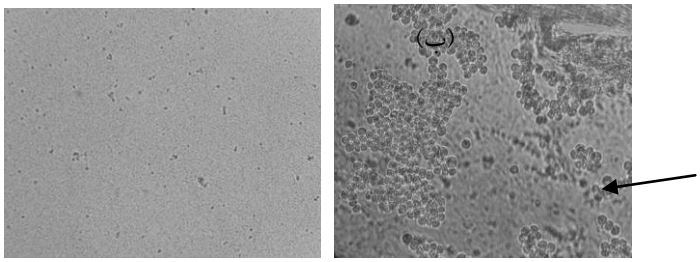
دمایی حاکی از ایجاد تغییر فاز ناشی از حضور این پلیمر حساس به دما می باشد که در دمای زیر $^{\circ}C$ ۳۲ ویژگی آبدوستی و در دمای بالای $^{\circ}C$ ۳۲ (یعنی دمای $^{\circ}C$ ۳۷) ویژگی آبگریزی سطح را نشان میدهد.



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

نتایج آنالیز سلولی

سوسپانسیون سلولی سلول های فیبروبلاست (l929) دم موش بر مبنای روش استاندارد ISO10993 تهیه گردید و در دماهای مختلف ۳۷ و ۴ درجه سانتیگراد با توجه به توضیحات در بخش روش کار توسط میکروسکوپ نوری Nikon Eclipse Ts-100 با بزگنمایی ۱۰۰ مورد بررسی قرار می گیرند. شکل ۳ الف کشت سلولها روی سطح کوپلیمر هوشمند را در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد نشان می دهد سلولها بخوبی در این دما روی سطح کوپلیمر چسبیده اند تصویر ۳ ب تاثیر کاهش دما تا ۴ درجه سانتیگراد را در روی سطح کوپلیمر نشان می دهد سلولهای جدا شده از سطح نمونه در دمای ۴ درجه سانتیگراد بخوبی در این تصویر مشخص است.



شکل ۳. کشت سلولها در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد و جدایش سلولی در ٤ درجه سانتیگراد از روی سطح کوپلیمر هوشمند . سلولهای جدا شده از سطح کوپلیمر با پیکان نشان داده شده است.

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 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

[Downloaded from sjimu.medilam.ac.ir on 2026-11-11]

کشت سلولهای فیبروبلاست روی سطوح کوپلیمر 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 کوپلیمرها می توان برای جدایش سلولی بدون بهره گیری از روش های متداول جدایش سلولی همانند روش مکانیکی یا آنزیماتیکی بهره برد.

سپاسگزاری

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

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. ASAIO J 1996;42: 876-81.

2-Kikuchi A, OkanoT. 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 SilvaJoao F, Manoand Rui L. Smart thermoresponsive coatings and surfaces for tissue engineering: switching cell-material boundaries. Trends Biotechnol 2007;25:

4-AkiyamaY, 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, FukaiTO. 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 photograftedon 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 cellreleasing 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 copolymerrization 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. Carbohyd 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.

[Downloaded from sjimu.medilam.ac.ir on 2026-11-11]

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.

[Downloaded from sjimu.medilam.ac.ir on 2026-11-11]

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

Heidari keshel S[1, 2], Biazar E[3], karimi A[4], Asefnejad A[4], Amirkhani A[5], Shahriarinoor M[6] , Kazem beigi F[7]*

(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, intelegent 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)*

[Downloaded from sjimu.medilam.ac.ir on 2026-11-11]