DOI: 10.22041/ijbme.2010.13349

Investigation and Characterization of Agarose-Gelatin Blend Hydrogel, as a Cellular Carrier Substrate for Cell Therapy Application

R. Imani[1], P. Rahnama Moshtaq[2], S.H. Emami[3], S. Jalili[4], A.M. Sharifi [5*]

[1] PhD Student, Biomaterial Group, Laboratory of Tissue Engineering, School of BioMedical Engineering, Amir Kabir University of Technology, Tehran, Iran, rimani_bmi@yahoo.com

[2] M.Sc Student, Biomaterial Group, Laboratory of Tissue Engineering, School of BioMedical Engineering, Amir Kabir University of Technology, Tehran, Iran, parisa_moshtagh@yahoo.com

[3] Assistant Professor, Biomaterial Group, School of BioMedical Engineering, Amir Kabir University of Technology, Tehran, Iran, Shahriar16@yahoo.com

[4] M.Sc Student, Biomaterial Group, Laboratory of Tissue Engineering, School of BioMedical Engineering, Amir Kabir University of Technology, Tehran, Iran, sasanjalili@gmail.com

[5] Professor, Razi Institute for Drug Research and Department of Pharmacology, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, Iran

Abstract

Cell therapy based on cell encapsulation technology holds out the promise of the treatment of many diseases. The technology of cell encapsulation represents a strategy in which cells that secrete therapeutic products are immobilized and immunoprotected within polymeric and biocompatible carriers. Hydrogels - highly hydrated polymer networks- have ideal characteristics for this application because of good biocompatibility and mimicking natural ECM properties. They can homogeneously incorporate and suspend cells, growth factors, and other bioactive compounds. Temperature-sensitive hydrogels, which can form implants in situ in response to temperature change, from ambient to body temperature, have been extensively used in various cell encapsulation, and tissue repair.

The objective of this study was preparation, Characterization and selection the optimum composition of agarose-gelatin blend hydrogel, for cell encapsulation application. In order to obtain hydrogel with appropriate properties, rheological, mechanical, and structural characteristics of obtained hydrogels were examined. Furthermore, the stability of samples was characterized by degradation and gelatin release measurements under physiological condition. Cell attachment and cytotoxicity analysis were also performed.

Based on the results, hydrogel containing a 1:1 mixture of gelatin and agarose exhibited sol-to-gel transition near body temperature. Samples contain 50% agarose and more, exhibited mechanical integrity under physiological condition. Indentation test of the mechanical properties demonstrated viscoelastic behavior of the blend gelatin-agarose hydrogels under static load; however by increasing the agarose portion, hydrogel behaved more elastically. In vitro biocompatibility experiments showed undetectable cytotoxicity of the hydrogels. Also adding gelatin to agarose modified cell attachment behavior. The results of this study indicate the possibility of the potential use of prepared thermo-responsive agarose/gelatin conjugate with nearly same portion of two components as cell encapsulation carrier.

Key words: **Cell therapy, Encapsulasion, Temperature-sensitive hydrogel, Agarose, Gelatin.**

[*] **Corresponding author**

Address: *Ali Mohammad Sharifi, Razi Institute for Drug Research, Department of Pharmacology, Tehran University of Medical Sciences, Hemat Highway, Tehran, Iran.*
Tel: *+98 21-88622696*
Fax: *+98 21-88622572*
E-mail: *amsharifi@TUMS.ac.ir*

© Copyright 2011 ISBME, http://www.ijbme.org

DOI: 10.22041/ijbme.2010.13349

مطالعه و ارزیابی هیدروژل ترکیبی آگاروز-ژلاتین به عنوان بستر حامل سلول برای به‌کارگیری در سلول‌درمانی

رعنا ایمانی[۱]، پریسا رهنمای‌مشتاق[۲]، شهریار حجتی امامی[۳]، ساسان جلیلی[۴]، علی‌محمد شریفی[۵*]

[۱] دانشجوی دکترا، گروه بیومواد، آزمایشگاه مهندسی بافت، دانشکده مهندسی پزشکی، دانشگاه صنعتی امیرکبیر، تهران
rimani_bmi@yahoo.com

[۲] دانشجوی کارشناسی ارشد، گروه بیومواد، آزمایشگاه مهندسی بافت، دانشکده مهندسی پزشکی، دانشگاه صنعتی امیرکبیر، تهران
parisa_moshtagh@yahoo.com

[۳] استادیار، گروه بیومواد، دانشکده مهندسی پزشکی، دانشگاه صنعتی امیرکبیر، تهران shahriar16@yahoo.com

[۴] دانشجوی کارشناسی ارشد، گروه بیومواد، آزمایشگاه مهندسی بافت، دانشکده مهندسی پزشکی، دانشگاه صنعتی امیرکبیر، تهران
sasanjalili@gmail.com

[۵] استاد، مرکز تحقیقات علوم داروئی رازی و گروه فارماکولوژی، مرکز تحقیقات سلولی ملکولی، دانشگاه علوم پزشکی تهران

چکیده

امروزه "سلول‌درمانی" بر پایه انکپسولاسیون سلول‌ها، نویدی امیدبخش برای درمان بسیاری از بیماری‌ها به‌شمار می‌رود. فناوری انکپسولاسیون سلولی روشی است که در آن سلول‌های ترشح کننده عوامل درمانی درون حامل‌های پلیمری زیست‌سازگار تثبیت شده و دور از دسترس سیستم ایمنی، به بدن منتقل می‌شوند. هیدروژل‌ها دسته‌ای از مواد پلیمری آب‌دوست با ساختار شبکه‌ای هستند که حاوی مقادیر بالایی آب بوده و به دلیل زیست‌سازگاری مطلوب و تقلید ویژگی‌های طبیعی ماده زمینه خارج سلولی، دارای شاخص‌های ایدئال برای کاربرد در این زمینه‌اند. این دسته از مواد امکان اختلاط یکنواخت سلول‌ها، عوامل درمانی، فاکتورهای رشد را فراهم می‌کنند. هیدروژل‌های حساس به دما قادر به ایجاد حامل‌های سلولی پایدار در پاسخ به تغییرات دمایی هستند؛ از این رو به‌طور گسترده در کاربردهای انکپسولاسیون سلولی و مهندسی بافت به کار گرفته شده‌اند.

هدف از این مطالعه، سنتز؛ ارزیابی و انتخاب ترکیبی بهینه از آگاروز و ژلاتین- دو بیوپلیمر ژل‌ساز حساس به دما- برای به‌کارگیری در انکپسولاسیون سلول‌هاست. علاوه بر تعیین نقطه ژلینگی، استحکام و پایداری نمونه‌ها تحت شرایط فیزیولوژیک از طریق بررسی تخریب‌پذیری و رهایش ژلاتین مورد ارزیابی قرار گرفت و چسبندگی سلولی و آزمون سمّیت سلولی نیز بررسی شد. بر مبنای نتایج، هیدروژل با نسبت مشابه دو جزء (۱:۱)، دمای تبدیل ژل در حدود دمای بدن را نشان می‌دهد. نمونه‌های حاوی ۵۰٪ یا بیشتر آگاروز پایداری مناسبی را در شرایط فیزیولوژیک فراهم نمودند. ارزیابی مکانیکی مؤید رفتار ویسکوالاستیک نمونه‌ها بوده هرچند با افزایش میزان ژلاتین، نمونه‌ها الاستیک‌تر رفتار می‌کنند. در بررسی زیست‌سازگاری، هیچ گونه سمّیت سلولی مشاهده نشد؛ همچنین افزودن ژلاتین به آگاروز، خواص چسبندگی سلولی و زیست‌سازگاری را بهبود بخشیده است. هیدروژل ترکیبی ژلاتین- آگاروز با نسبت مشابه اجزا قابلیت کاربرد به عنوان حامل سلولی در انکپسولاسیون سلولی را داراست.

کلید واژگان: سلول‌درمانی، انکپسولاسیون، هیدروژل حساس به دما، آگاروز، ژلاتین.

* عهده‌دار مکاتبات

نشانی: تهران، بزرگراه شهید همت، جنب بیمارستان میلاد، دانشگاه علوم پزشکی تهران، دانشکده پزشکی،بخش فارماکولوژی و مرکز تحقیقات علوم داروئی رازی

تلفن: ۸۸۶۲۲۶۹۶، **دورنگار:** ۸۸۶۲۲۵۷۲، **پیام نگار:** amsharifi@TUMS.ac.ir

© Copyright 2011 ISBME, http://www.ijbme.org

۱- مقدمه

بسیاری از بیماری‌ها ناشی از دست‌رفتن سلول‌های خاصی از بدن و یا از دست‌رفتن عملکرد آنها هستند. در کنار بسیاری از روش‌های درمانی مانند درمان دارویی و جراحی، استفاده مستقیم از سلول‌ها و یا بافت‌ها به عنوان عامل درمانی تحت عنوان "سلول‌درمانی" مطرح می‌شود. از انواع سلول‌هایی که برای درمان بیماری‌های مختلف به‌وسیله این روش مورد استفاده قرار گرفته‌اند می‌توان به سلول‌های لانگرهانس[1] به عنوان جایگزین درمان‌های انسولینی، نرون‌های ترشح کننده دوپامین[2] و هپاتوسیت[3]ها برای درمان نارسایی‌های کبدی اشاره کرد [۱]. ممانعت از پس‌زدگی سلول‌های پیوند شده از سوی سیستم ایمنی میزبان چالشی عمده در کاربرد سلول‌درمانی است [۲]. حفاظت ایمنی سلول‌های پیوندی با استفاده از روش‌های انکپسولاسیون[4]، راهکاری برای انتقال این سلول‌ها بدون نیاز به استفاده از داروهای سرکوب‌کننده ایمنیست. با استفاده از روش‌های انکپسولاسیون سلولی، سلول‌ها و بافت‌ها به‌طور فیزیکی با استفاده از یک غشای نیمه‌تراوا یا بستری حامل، از سیستم ایمنی میزبان جدا می‌شوند [۳].

انتخاب و طراحی مواد مناسب به‌عنوان بسترهای حامل و یا غشاهای ایزوله کننده؛ از جنبه‌های مهم مربوط به سیستم‌های انکپسولاسیون سلولی، است. هیدروژل[5]ها به عنوان دسته‌ای از زیست‌مواد جایگاه ویژه‌ای را در کاربردهای انکپسولاسیون به خود اختصاص داده‌اند [۴]. هیدروژل‌ها پلیمرهای آب‌دوست شبکه‌ای شده، حاوی مقادیر بالایی آب هستند. از جمله مهم‌ترین خصوصیات این دسته از مواد نسبت به سایر مواد زیستی می‌توان به زیست‌سازگاری خوب، خواص مکانیکی مشابه بافت‌های بدن و ماده زمینه خارج سلولی، ایجاد محیط مرطوب به واسطه گیر انداختن آب درون ساختار و کم بودن مقدار ماده جامد درون ساختار -که اجازه حرکت مواد و سلول‌ها را فراهم می‌کند- امکان ترکیب شدن با مواد مختلف از جمله سلول و فاکتورهای رشد در فاز مایع و امکان حبس سلول‌ها در فاز ژل با تغییر به موقع فاز از مایع ویسکوز به ژل تحت شرایط فیزیولوژیک اشاره کرد [۵]. هیدروژل‌های فیزیکی به‌رغم استحکام مکانیکی کمتر به‌دلیل سازگاری بیشتر با روش‌های انکپسولاسیون موجود و نیاز نداشتن به مواد شیمیایی برای شبکه‌ای شدن که معمولاً خطر سمّی شدن را به دنبال دارند بیشتر به عنوان بسترهای حامل سلول مورد استفاده هستند. در میان طیف وسیع هیدروژل‌ها تنها تعداد محدودی تاکنون با موفقیت برای اهداف انکپسولاسیون استفاده شده‌اند. مطالعات اخیر به سمت اصلاح هیدروژل‌های موجود و یا توسعه هیدروژل‌های نوین پیش رفته است [۲]. روش اختلاط، روشی ساده برای بهره بردن از مزایای پلیمرهای مختلف است. پلیمر به‌دست آمده می‌تواند خواص هر دو جزء سازنده را بروز دهد. در این راستا، توجه بیشتری بر ترکیب پلیمرهای طبیعی مانند پروتئین‌ها و پلی‌ساکاریدها معطوف شده است [۶].

آگاروز[6] از بیوپلیمرهای پلی‌ساکاریدی است که در کشت سلول‌های حیوانی، باکتری‌ها و انکپسولاسیون سلول‌هایی مانند طحال و غضروف مورد استفاده قرار گرفته است [۷]. علاوه بر خواص ژل‌شوندگی بسیار خوب و استحکام قابل توجه، این پلیمر فاقد گروه‌های عامل شاخصی برای چسبندگی سلول‌ها است. ژلاتین پروتئینی مشتق شده از کلاژن است که کاربردهای وسیعی در پزشکی دارد. در کنار مزایای متعدد این بیوپلیمر مانند چسبندگی و رشد خوب سلول‌ها در برهمکنش با آن، خواص مکانیکی ضعیف و عدم پایداری کافی در شرایط بیولوژیک، کاربرد این ماده را در صورت استفاده نکردن از شبکه‌ای‌کننده‌های شیمیایی محدود کرده است [۸]. در مطالعات اخیر به اختلاط آگاروز و ژلاتین از برخی جنبه‌ها توجه شده است [۶، ۹، ۱۰].

هدف از این مطالعه تهیه هیدروژل ترکیبی حساس به دما بر پایه ژلاتین-آگاروز با نسبت‌های متفاوت اجزاء و با هدف به‌کارگیری در انکپسولاسیون سلول‌ها بوده است. خصوصیات بیولوژیکی، فیزیکی، مکانیکی هیدروژل ترکیبی تهیه شده به‌منظور تعیین ترکیب بهینه برای این کاربرد، از طریق روش‌های مختلف مورد بررسی قرار گرفت.

[1] Langerhanse
[2] Dopaminergic
[3] Hepatocyte
[4] Encapsulation
[5] Hydrogel
[6] Agarose

© Copyright 2011 ISBME, http://www.ijbme.org

۲- روش

۲-۱- تهیه هیدروژل ترکیبی

برای تهیه هیدروژل ترکیبی با غلظت نهایی ۳٪ (۰/۳g مخلوط دو پودر به ازای ۱۰mlit حجم نهائی نمونه) و نسبت‌های متفاوت آگاروز به ژلاتین پس از توزین، پودر آگاروز (محصول شرکت سیگما[7]) در آب دو بار تقطیر در دمای ۹۰°C به مدت ۳۰ دقیقه حل شد. دمای محلول تا حدود ۶۰°C پائین آورده شده و پودر ژلاتین (محصول شرکت سیگما) به محلول آگاروز اضافه شد و تحت دور مناسب، ژلاتین در محلول آگاروز به‌خوبی حل شده و توزیع شد و محلولی یکنواخت به‌دست آمد. نمونه‌ها تا تشکیل ژل در دمای اتاق قرار گرفته و سپس در دمای ۴°C نگهداری شدند. نمونه‌ها بر حسب درصد آگاروز موجود در وزن خشک نمونه به ترتیب AG۱۰۰، AG۷۵، AG۵۰، AG۲۵ نام‌گذاری شدند (جدول ۱). حجم و شکل نمونه‌ها بر حسب نوع آزمون مورد استفاده در مراحل تعیین مشخصات متفاوت بوده است.

۲-۲- تعیین نقطه ژلینگی

از آزمون رئومتری نوسانی دو صفحه موازی[8] (MCR300) برای تعیین نقطه ژلینگی بر مبنای تغییرات گرانروی[9] و ضریب ذخیره[10] محلول ترکیبی آگاروز-ژلاتین تحت کاهش دما طی فرایند تبدیل سُل- ژل استفاده شد. ۱mlit از محلول ترکیبی تهیه شده در فاصله دو صفحه موازی با فرکانس ۱Hz و دامنه کرنش ۱٪ با نرخ ۱°C بر دقیقه از دمای ۹۰°C-۲۵ خنک شد. تغییرات گرانروی و ضریب ذخیره با دما به‌منظور تعیین نقطه ژلینگی برمبنای این داده‌ها برای ترکیب درصدهای مختلف ثبت شد.

جدول ۱- در صد دو جزء در حجم نهائی نمونه ژل ترکیبی ۳٪

کد نمونه	درصد آگازور	درصد ژلاتین
AG۱۰۰	٪۱۰۰	۰
AG۷۵	٪۷۵	٪۲۵
AG۵۰	٪۵۰	٪۵۰
AG۲۵	٪۲۵	٪۷۵

۲-۳- بررسی رفتار جذب آب و تخریب‌پذیری

از آنجا که بسترهای حاوی سلول درون بدن، عموماً در تماس با مایعات بدن قرار می‌گیرند؛ بررسی رفتار جذب آب آنها در محیط‌های مشابه محیط بدن ضروری است. نمونه‌های هیدروژلی به شکل صفحه‌هایی استوانه‌ای با قطر ۱cm و ضخامت ۰/۵cm تهیه شدند. پس از تعیین وزن اولیه، نمونه‌ها به مدت ۷روز در دمای ۳۷°C در ۵mlit بافر فسفات[11] غوطه‌ور شدند. میزان افزایش وزنی نمونه‌ها در حالت تر نسبت به وزن اولیه در طول زمان آزمون به عنوان معیار جذب آب محاسبه شد [۷].

از آنجا که بیوپلیمرها عمدتاً زیست تخریب‌پذیرند، میزان تخریب‌پذیری نمونه‌های هیدروژلی بر مبنای تغییر وزن خشک نمونه‌ها، در طول مدت آزمون محاسبه شد. آزمون یاد شده در بازه زمانی ۷ روز با تعویض روزانه بافر فسفات تکرار شد و نمونه‌ها پس از خروج از محیط تحت انجماد و سپس ۲۴ ساعت خشکایش انجمادی[12] قرار گرفتند. وزن خشک نمونه‌ها تعیین شد و درصد تخریب نمونه‌ها بر مبنای کاهش وزن خشک طبق رابطه (۱) محاسبه گردید:

$$\%M_d = \frac{(W_0 \times 0.03 - W_1)}{(W_0 \times 0.03)} \qquad (۱)$$

که در این رابطه W_0 وزن اولیه نمونه‌ها در حالت مرطوب و W_1 وزن ثانویه نمونه‌ها پس از خشکایش است.

۲-۴- بررسی پیوستگی ساختاری

برای تعیین پیوستگی و استحکام ساختاری هیدروژل فیزیکی ترکیبی، میزان رهایش ژلاتین به عنوان جزء ناپایدارتر تحت شرایط فیزیولوژیک به‌وسیله روش بردفورد[13] اندازه‌گیری شد [۱۰]. ابتدا نمودار استاندارد غلظت ژلاتین برحسب میزان جذب رنگ تحت ۵۷۰nm، تهیه شد. نمونه‌های هیدروژل تهیه شده به صورت صفحات استوانه‌ای به قطر ۱cm و عرض ۰/۵cm پس از توزین اولیه به مدت ۲۴ ساعت در ۵mlit بافر فسفات در دمای ۳۷°C نگهداری شدند. پس از خروج نمونه‌ها، با نمونه‌گیری از محیط رهایش، جذب نهایی توسط دستگاه الایزاریدر[14] تعیین شد. با مقایسه مقادیر

[7] Sigma
[8] Parallel plate oscillation rheometer
[9] Viscosity
[10] Storage modulus
[11] Phosphate bafer
[12] Freez drying
[13] Brad Ford
[14] ELIZA reader

© Copyright 2011 ISBME, http://www.ijbme.org

به‌دست آمده با نمودار استاندارد میزان غلظت ژلاتین در چاهک‌ها تعیین و میزان رهایش ژلاتین از ساختار ژل طبق رابطه (۲) تعیین شد:

$$\%\,\mathrm{Re}lease = \frac{100\times C}{W_g \times 0.02} \qquad (۲)$$

که در این رابطه C غلظت به دست آمده از نمودار استاندارد و W_g وزن ژلاتین موجود در نمونه اولیه با توجه به درصد ترکیبات آن است.

۵-۲- بررسی خواص مکانیکی

برای بررسی خواص مکانیکی هیدروژل های ترکیبی تحت بار ثابت از روش ایندنتیشن[۱۵]، با فشارنده گوی شکل استفاده شد [۱۱]. نمونه‌ها به شکل صفحات نازک دایره‌ای شکل به قطر ۳cm و عرض ۱cm تهیه شد. گوی فلزی از جنس فولاد با قطر ۲۰mm بر روی سطح ژل در مرکزیت دیسک قرار گرفته و در زمان‌های متوالی میزان فرورفتگی گوی در ژل به‌وسیله ریزسنج با دقت اندازه‌گیری شد. ضریب یانگ برای نمونه‌ها از رابطه (۳) محاسبه شد:

$$E = \frac{3\times(1-\gamma^2)\times F}{4\times h^{1.5}\times r^{0.5}} \qquad (۳)$$

که در آن γ ضریب پوآسون، F نیروی وزن گوی برحسب dyne، h عمق فرورفتگی گوی درون ژل فیزیکی برحسب cm و r شعاع گوی برحسب cm است. برای بررسی بیشتر میزان پایداری مکانیکی تحت شرایط فیزیولوژیک نمونه‌ها با مشخصات ذکر شده به مدت ۲۴ ساعت در بافر فسفات در دمای ۳۷°C غوطه‌ور شدند و پس از رسیدن به حالت تعادل مراحل فوق مجدد تکرار شده و ضریب یانگ محاسبه شد و میزان افت ضریب‌ها با مقایسه شدند و نتایج به دست آمد.

۶-۲- بررسی برهم کنش سلول- هیدروژل

رده سلولی تخمدان موش چینی[۱۶] (CHO) تهیه شده از انیستیتو پاستور ایران درون محیط کشت RPMI۱۶۴۰[۱۷] حاوی ۱۰٪ سرم جنین گاوی و ۱٪ پنسیلین/استرپتومایسین[۱۸] به روش استاندارد کشت داده شد (تمام مواد مورد استفاده از رده تجاری گیبکو[۱۹] هستند). پس از ۲ روز قرارگیری در شرایط انکوباتور حاوی ۵٪ دی اکسید کربن در دمای ۳۷°C سلول‌ها از کف بشقاب جدا شده و پس از شستشو، سوسپانسیون سلولی یکنواخت تهیه شد. شمارش تعداد سلول‌ها در سوسپانسیون با روش هموسایتومتری[۲۰]، به‌وسیله لام نئوبار[۲۱] انجام شد.

برای بررسی میزان برهم‌کنش سلول‌ها با هیدروژل ترکیبی و میزان زیست سازگاری آنها و در نهایت تأثیر ترکیب درصد دو جزء سازنده بر این عامل، از آزمون MTT[۲۲] (نمک تترازولیوم برماید) استفاده شد [۱۲]. در این آزمون به طور خلاصه پس از تهیه سوسپانسیون سلولی به روش فوق، تعداد ۵۰۰۰ سلول در حجم ۲۰۰µl محیط کامل به چاهک‌های بشقاب ۹۶ چاهکی منتقل شده و به مدت ۲۴ ساعت درون انکوباتور قرار گرفتند. پس از اطمینان از چسبیدن سلول‌ها به کف بشقاب و گسترش آنها با ریخت‌شناخت دوکی‌شکل، در این مرحله محیط قبلی با محیط تازه تعویض شده و لایه‌ای نازک از ژل‌های تهیه شده با قطر ۱cm و عرض ۰/۷mm درون چاهک در تماس نزدیک با سلول‌ها قرار گرفتند. چاهک‌های بدون نمونه (پلی استایرن[۲۳]) به عنوان شاهد منفی در نظر گرفته شدند. بشقاب دوباره به شرایط انکوباتور بازگردانده شده و مجدداً ۷۲ساعت در تماس با هیدروژل ترکیبی قرار گرفت. پس از طی این زمان لایه‌های ژل به دقت از چاهک‌ها خارج شده و ۲۰µ l محلول ماده MTT به چاهک‌ها اضافه شده و به مدت ۲ ساعت درون انکوباتور نگهداری شد. با خروج محیط کشت و افزودن ۲۰۰µlit حلّال DMSO[۲۴] و حل شدن بلورهای رنگ ایجاد شده، میزان جذب رنگ در هر چاهک حاوی توده به‌وسیله دستگاه الایزاریدر تحت طول موج ۵۹۰nm خوانده شد. با مقایسه میزان عدد جذب هر نمونه با مقدار عدد جذب نمونه شاهد، درصد نسبی سلول‌های زنده در هر چاهک محاسبه شد.

برای بررسی میزان چسبندگی سلولی هیدروژل‌های ترکیبی، ریخت‌شناخت سلول‌ها کشت یابنده روی سطح هیدروژل به عنوان معیار چسبندگی مورد بررسی قرار گرفت.

[15] Indentation
[16] **C**hinese **H**amster **O**vary
[17] **R**oswell **P**ark **M**emorial **I**nstitute medium
[18] Penicillin/Streptomycin
[19] Gibco
[20] Hemocytometer
[21] Neubauer lam
[22] 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide
[23] Polystyren
[24] **Dim**ethyl **sulfo**cside

© Copyright 2011 ISBME, http://www.ijbme.org

به‌طور خلاصه بشقاب ۶ چاهکی کشت سلولی با ۱mlit محلول ترکیبی تهیه شده پوشش داده شد. یکی از چاهک‌ها به‌عنوان نمونه شاهد منفی بدون پوشش رها شد. سوسپانسیون سلولی طبق روش یاد شده آماده شده و مورد شمارش قرار گرفت. تعداد صدهزار سلول در ۲mlit محیط کامل به هر چاهک منتقل شده و بشقاب به مدت ۲۴ ساعت در انکوباتور نگهداری شد. پس از طی این زمان ریخت‌شناسی سلول‌ها روی سطح هیدروژل‌ها با استفاده از میکروسکوپ نوری معکوس مورد بررسی قرار گرفتند و تصاویر آن ثبت شد. علاوه بر مشاهده کیفی، به‌منظور کمّی‌سازی میزان چسبندگی سلولی، تعداد سلول‌های نچسبیده به سطح هیدروژل با استفاده از خارج‌سازی محیط فوقانی لایه هیدروژل و به روش هموسایتومتری مورد شمارش قررا گرفت. از تقسیم تعداد سلول‌های نچسبیده به سطح هیدروژل بر تعداد اولیه سلول‌های قرار گرفته در هر چاهک، درصد سلوهای نچسبیده تعیین شد (جدول ۲).

۳- نتایج

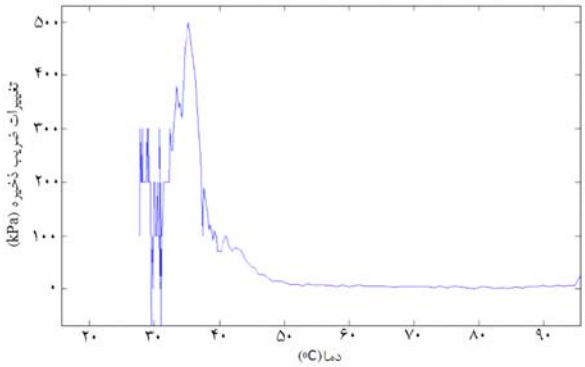
۳-۱- تعیین نقطه ژلینگی

درباره کاربرد هیدروژل‌های حساس به دما در انکپسولاسیون سلول‌ها، دمای ژلینگی (دمای تبدیل سُل- ژل) متغیّری عملکردیست که باید پیش از فرایند انکپسولاسیون تعیین شود. چرا که همراه‌سازی سلول با هیدروژل باید پیش از تشکیل ژل و یا کاهش سیّالیت سُل انجام گیرد و تبدیل سُل-ژل بلافاصله پس از شکل دهی میکروکپسول‌ها اتفاق افتد. از طرف دیگر سلول‌ها قادر به تحمل دمای بالا نیستند و امکان آسیب و حتی مرگ طی مواجهه با دمای بالا وجود دارد. بنابراین دمای ژلینگی باید در محدوده تحمل سلول‌ها باشد و فاصله زمانی اختلاط ژل و سلول تا تشکیل ژل پایدار تا حد امکان حداقل شود. شکل‌گیری شبکه سه‌بعدی پلیمری و تبدیل سُل- ژل سبب افزایش ناگهانی ضریب ذخیره و گرانروی ترکیب است از آنجا که تشکیل شبکه در نتیجه کاهش دماست، این افزایش در یک بازه دمایی قابل تشخیص است. برای تعیین نقطه دقیق‌تر، مشتقات اول گرانروی و ضریب ذخیره برحسب تغییرات دما رسم شده (شکل ۱) و نقطه اوج نمودار به‌عنوان تخمین مناسب‌تری از دمای ژلینگی ارائه شده است.

با توجه به مقادیر خلاصه شده در جدول ۳، دمای ژلینگی نمونه‌های AG۵۰ و AG۷۵ در محدوده مطلوب کاربرد سلولیست (۲±۳۷°C). با توجه به این که اختلاط و توزیع سلول‌ها در ژل باید در دمایی بالاتر از نقطه ژلینگی (۲°C یا ۳°C) صورت گیرد، نمونه AG۵۰ شرایط بهتری را فراهم می‌سازد. زیرا می‌توان سلول‌ها را در محدوده دمائی نرمال ۳۷°C با ژل مخلوط کرد و با کاهش دما تا حدود ۳۵°C ژل پایدار تشکیل شده و سلول‌ها را در بر بگیرد.

جدول ۲- نتایج آزمون چسبندگی سلولی

کد نمونه	درصد متوسط تعداد سلول‌های نچسبیده به سطح هیدروژل
AG۱۰۰	٪۹۲
AG۷۵	٪۸۸
AG۵۰	٪۴۶/۳
AG۲۵	٪۷۳
نمونه شاهد	٪۰



شکل ۱- تغییرات مشتق اول ضریب ذخیره با دما برای نمونه AG۵۰

جدول ۳- دمای ژلینگی به دست آمده از آزمون رئومتری

کد نمونه	نقطه بیشینه نمودار مشتق ضریب (°C)	نقطه بیشینه نمودار مشتق ضریب (°C)
AG۲۵	۲۷/۳	۲۸
AG۵۰	۳۵	۳۵/۲
AG۷۵	۳۶/۶	۳۷/۱
AG۱۰۰	۳۹/۵	۳۹

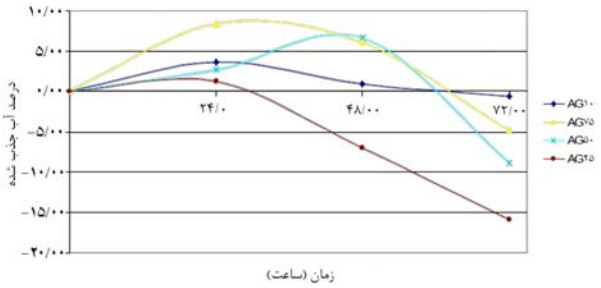
© Copyright 2011 ISBME, http://www.ijbme.org

در حالی‌که در نمونه AG۱۰۰ عمل اختلاط با فاز مایع باید در حدود دمای ۴۲°C-۴۳ صورت گیرد که خود احتمال آسیب رساندن به سلول را به همراه دارد. برای نمونه AG۲۵ اگرچه دمای اختلاط می‌تواند دمای فیزیولوژیک باشد اما برای تشکیل ژل پایدار میزان کاهش دما باید قابل توجه باشد و دمای نهائی پائین که در حدود ۱۰°C کمتر از دمای فیزیولوژیک است، می‌تواند سبب آسیب سلول‌های قرار گرفته درون ژل شود. از این رو دو نمونه AG۵۰ و AG۷۵ در این آزمون نسبت به دو نمونه دیگر ترجیح داده می‌شوند.

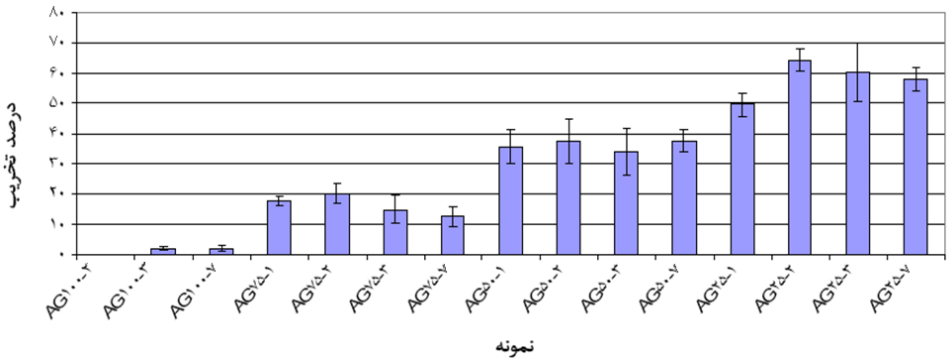
۲-۳- رفتار جذب آب و تخریب

آگاروز و هیدروژل از جمله پلیمرهای آب‌دوست هستند و از قابلیت برهم‌کنش با ملکول‌های آب برخوردارند. ژلاتین به دلیل ساختارش عمدتاً برهم‌کنش شدیدتری با آب نشان می‌دهد و قابلیت جذب آب و تورم بالاتری نسبت به آگاروز دارد. انتظار می‌رود که ترکیب این دو، رفتاری بینابینی را نتیجه دهد. داده‌های به‌دست آمده از بررسی میزان تغییرات وزنی نمونه‌ها در بازه زمانی ۷۲ ساعت در شکل ۲ آمده است. با توجه به نمودار، به جز AG۲۵، سایر نمونه‌ها تا بازه زمانی معینی افزایش وزنی ناشی از جذب آب اضافی را نشان داده‌اند. تغییرات وزنی نمونه‌ها می‌تواند ناشی از تأثیر هم‌زمان دو عامل جذب و تخریب باشد؛ زیرا در فاصله غوطه‌وری نمونه‌ها در محیط مرطوب، تخریب و یا حلّالیت جزئی زنجیره‌هائی که درگیری ضعیفی با شبکه دارند اتفاق می‌افتد، این عامل سبب افزایش قطر تخلخل‌های درونی ساختار می‌شود و در مراحل ابتدائی نفوذ ملکول‌های آب اضافی از محیط را فراهم می‌کند و در نتیجه کاهش وزن ناشی از تخریب با افزایش وزن ناشی از جذب جبران می‌شود. اگر تخریب ادامه یابد میزان آب جایگزین نمی‌تواند کاهش وزن را جبران کند و وزن نهایی افت می‌کند.

از این رو برای بررسی میزان جذب بدون دخالت تخریب، بازه زمانی کوتاه ابتدائی بیشتر مورد توجه قرار گرفته‌است. در ۱۰ ساعت ابتدائی میزان جذب ناچیز و در حدود ۴٪-۳٪ وزن کل نمونه‌ها بوده است و تورم شاخصی نیز مشاهده نشد. از آنجا که نمونه‌های مورد بررسی در حالت تر بودند جذب آب چندانی مورد انتظار نبوده است. متورم نشدن نمونه‌ها نکته مثبتی برای حفظ پایداری ابعادی میکرو کپسول‌های تهیه شونده با ابعاد معین است. داده‌های به‌دست‌آمده در نمودار ارائه شده در شکل ۳ نشان می‌دهد که با افزایش مقدار ژلاتین در زمان‌های یکسان، میزان تخریب‌پذیری افزایش یافته است. نرخ تخریب برای نمونه AG25 در طول ۷ روز سریع‌تر است. با توجه به اینکه برای نمونه‌های AG۷۵ و AG۵۰ در مقایسه روز اول تا هفتم افزایش درصد تخریب ناچیز است، می‌توان نتیجه گرفت که عمده کاهش وزن در بازه زمانی ابتدائی ۲۴ ساعت در اثر حلّالیت زنجیرهای ژلاتین که درگیری کمتری با شبکه داشته‌اند، صورت گرفته است.



شکل ۲- رفتار جذب آب

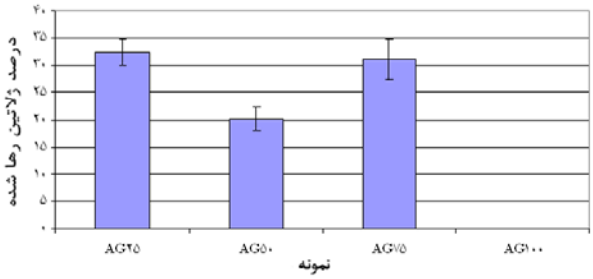


شکل ۳- مقایسه درصد تخریب نمونه‌ها بر حسب ترکیب درصد در روزهای مختلف (۱، ۲، ۳ و ۷ روز)

© Copyright 2011 ISBME, http://www.ijbme.org

۳-۳- پیوستگی ساختاری

اختلاط پلیمرهای شبکه‌ای شونده در شرایط مناسب می‌تواند ساختارهای شبکه‌ای درهم نفوذکننده را ایجاد کند. بدین معنا که ساختار شبکه‌ای یک پلیمر در حضور ساختار شبکه‌ای پلیمر دوم شکل بگیرد و شبکه‌ها با هم درگیری فیزیکی و بر هم کنش‌های فیزیکی و بعضاً شیمیائی داشته باشند. از آنجا که آگاروز و ژلاتین هر دو به تنهایی قادر به ایجاد شبکه سه بعدی فیزیکی در پاسخ به دما هستند، ترکیب آن دو نیز در پاسخ به کاهش دما می‌تواند شبکه سه‌بعدی فیزیکی را نتیجه دهد. امکان تشکیل شبکه‌های پایدار مشروط به وجود مقدار کافی از هر دو پلیمر است. عدم اختلاط مناسب و کاهش غلظت چشم‌گیر یک جزء نسبت به جزء دوم سبب می‌شود که جزء غالب نقش ماده زمینه و جزء کمتر نقش فاز پراکنده را ایفا کند. فاز پراکنده به دلیل کاهش غلظت زنجیرها در حجم مشخصی از ساختار، قادر به تشکیل شبکه ایدئال نیست ازاین رو درهم فرو رفتن شبکه‌ها اتفاق نمی‌افتد و ساختار از حالت دو فاز پیوسته به صورت ماتریس-فاز پراکنده تبدیل می‌شود. مسلماً ساختاری ایدئال است که هر دو فاز را پیوسته داشته باشد و شبکه‌های تشکیل شوند به خوبی با هم درگیر شوند. بر مبنای داده‌های به دست آمده (شکل ۴) مشاهده می‌شود که نمونه حاوی مقدار یکسان از هر دو جزء، رهایش ژلاتین کمتری را داشته است. می‌توان نتیجه گرفت که در ترکیب ۵۰/۵۰ از هردو ساختار، شبکه‌های ایجاد شده منسجم‌تر و کامل‌تر هستند و در واقع ساختار شبیه‌تری به شبکه‌های درهم نفوذ کننده تشکیل شده است. میزان رهایش ژلاتین در نمونه با ۷۵٪ آگاروز بیشتر از نمونه با ۲۵٪ آگاروز است. زیرا در این نمونه فاز پیوسته آگاروز است و ژلاتین قادر به تشکیل شبکه‌ای ایدئال و کامل نیست و از این رو درگیری مناسبی با ساختار نداشته و در محیط آزاد می‌شود. بنابراین نمونه AG۵۰ از نظر پایداری ساختاری شبکه ژل دو جزئی ایجاد شده، نسبت به سایر نمونه‌ها طلوب‌تر است.



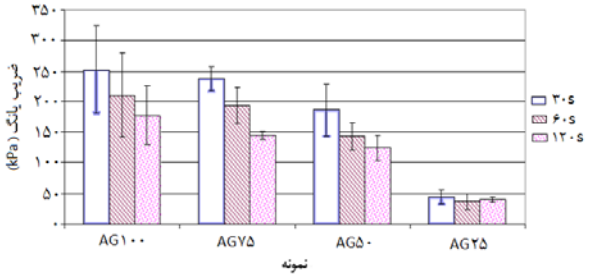
شکل ۴- نمودار رهایش ژلاتین برای ترکیب درصدهای مختلف هیدروژل ترکیبی

۴-۳- خواص و پایداری مکانیکی

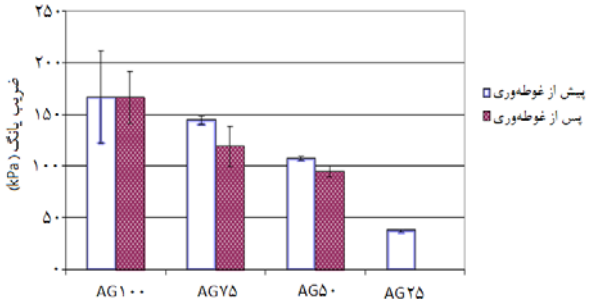
بررسی خواص مکانیکی ژل‌ها عموماً چالش برانگیز بوده است. زیرا هیدروژل‌ها موادی نرم و ضعیف هستند و به راحتی تحت نیرو تغییرشکل می‌دهند. بنابراین نمی‌توان از روش‌های معمول برای تعیین استحکام مکانیکی مانند آزمون کشش برای تعیین ضریب یانگ آنها استفاده کرد. علاوه بر این ماهیت ویسکوالاستیک هیدروژل‌ها، رفتارشان در برابر اعمال نیروها را به زمان وابسته می‌کند. بنابراین ایندنتیشن روش مناسبی برای بررسی خواص مکانیکی هیدروژل‌هاست [۱۳]. با توجه به داده‌های به دست آمده از آزمون در شکل ۵، با افزایش بخش ژلاتین، استحکام کاهش می‌یابد به طوری‌که این کاهش روندی خطی دارد. رفتار نمونه‌های هیدروژلی تحت بار ثابت با زمان، مؤید ماهیت ویسکوالاستیک هیدروژل‌های ترکیبیست. اگرچه نمونه AG۲۵ رفتار الاستیک‌تر از خود بروز داده است. افت مدول با زمان در سایر نمونه‌ها تقریباً با روند مشابهی صورت گرفته است و در ۱۲۰s به حالت تعادل نزدیک شده است. مقایسه مقادیر ضریب در زمان ۱۲۰s برای نمونه‌ها قبل و بعد از غوطه‌وری در بافر فسفات (شکل ۵)، نشان می‌دهد که میزان پایداری خواص مکانیکی نیز با افزایش میزان آگاروز افزایش یافته است. نمونه AG۲۵ پس از غوطه‌وری تحت آزمون دچار پارگی شد. میزان متوسط افت ضریب برای نمونه‌های AG۵۰ و AG۷۵ به ترتیب در حدود ۲۰٪ و ۲۵٪ مقدار اولیه است که با داده‌های میزان تخریب این دو نمونه همسو است. از آنجا که در شرایط مشابه درون بدن، افت ضریب و خواص مکانیکی گریز ناپذیر است؛ ژلی برای کاربردهای در تماس با بدن مطلوب است که کمترین افت را

© Copyright 2011 ISBME, http://www.ijbme.org

داشته باشد و یا نرخ کاهش خواص آن کندتر باشد. نتایج به‌دست آمده در این بخش نشان می‌دهد که شبکه آگاروز از نظر مکانیکی پایدار است و در مقابل شبکه ژلاتین افت خواص چشم‌گیری دارد به طوری که نمونه AG۵۰ کمترین ضریب و افت ۱۰۰٪ خواص را در شرایط مشابه فیزیولوژیک داشته است. در مقایسه دو نمونه AG۵۰ و AG۷۵ از آنجا که درصد افت ضریب تفاوت شاخصی ندارد؛ بر حسب کاربرد نهائی و خواص مکانیکی بافت هدف که سلول‌ها به همراه بستر هیدروژلی به آن منتقل خواهند شد می‌توان نمونه مناسب‌تر را انتخاب کرد.



الف



ب

شکل ۵- الف) روند تغییر مدول با زمان آزمون برای نمونه‌ها پیش از غوطه‌وری در محیط بافر؛ ب) مقایسه میزان افت ضریب پیش و پس از غوطه‌وری (ستون هاشورخورده) در بافر تحت شرایط فیزیولوژیک

۵-۳- برهمکنش سلول- هیدروژل

همان‌طور که پیشتر اشاره شد، خصوصیات بیولوژیک موادی که در کاربردهای سلولی به‌کار می‌روند از مهم‌ترین پارامترهائیست که باید به خوبی مورد بررسی قرار گیرد. زیست‌سازگاری به‌عنوان متغیّری که نشان‌دهنده رفتار بیولوژیک بیومواد است در مطالعات مربوط به انکپسولاسیون سلول‌ها مورد توجه قرار گرفته است. میزان زیست‌سازگاری ماده پلیمری سازنده ژل و امکان برهم‌کنش مؤثر بین سلول و پلیمر می‌تواند رشد، رفتار و عملکرد سلول‌ها را تحت تأثیر قرار دهد. وجود گروه‌های عاملی برهم‌کنش کننده با سلول در ساختار پلیمر می‌تواند، شرایط مطلوب‌تری را ایجاد کند. آگاروز و ژلاتین هر دو بیوپلیمرهایی طبیعی هستند که زیست‌سازگاری آنها در مطالعات مختلف به اثبات رسیده است. داده‌های به‌دست آمده از آزمون MTT مؤید این است که حضور هیدروژل نه‌تنها سبب کاهش زیست‌پذیری[۲۵] نشده است، بلکه میزان رشد و زنده بوده سلول‌ها در اکثر نمونه‌ها به جز AG۲۵ بیشتر از نمونه شاهد بوده است به خصوص در نمونه AG۵۰ این میزان بسیار چشم‌گیر است. به نظر می‌رسد که به دلیل حلّالیت و تخریب بالای نمونه AG۲۵ و معلق بودن ذرات ناشی از آن شرایط رشد سلول‌ها و میزان زیست پذیری را تحت تأثیر قرار داده است.

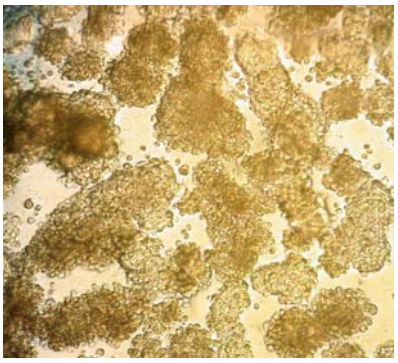
آگاروز در مطالعات بسیاری برای انکپسولاسیون برخی از سلول‌ها مورد استفاده قرار گرفته است. از آنجا که این بیوپلیمر خواص چسبندگی از خود بروز نمی‌دهد؛ غالب سلول‌هایی که توسط ماده انکپسوله شده‌اند؛ وابسته به تکیه‌گاه نیستند (مانند کندروسیت[۲۶] و یا هپاتوسیت[۲۷]) و در محیط‌های نچسب عملکرد بهتری را از خود بروز می‌دهند [۱۴]. برای کاربردهایی که نیازمند چسبندگی سلولیست، آگاروز با پپتیدهایی مانند RGD[۲۸] برای افزایش میزان چسبندگی اصلاح شده است. چسبندگی سلول‌ها روی بستر کشت سبب تغییر ریخت‌شناخت آنها می‌گردد. در رقابت بین برهمکنش سلول-سلول و سلول- سطح، وابسته به خواص بستر چسبندگی کمتر سبب چسبیدن بیشتر سلول‌ها به یکدیگر می‌شود و ریخت‌شناخت سلولی به سمت تشکیل تجمعات سلولی توده‌مانند پیش می‌رود. هرچه چسبندگی به سطح کمتر باشد، سرعت و میزان تشکیل توده‌های سلولی افزایش می‌یابد. تصاویر نمایش داده شده در شکل ۶ نشان می‌دهد که با افزایش میزان آگاروز، چسبیدن سلول بر سطح کاهش می‌یابد و در پی آن تشکیل توده سریع‌تر اتفاق می‌افتد. همچنین افزایش چشم‌گیری در ابعاد توده‌های

[25] Viability [26] Chondrocyte [27] Hepatocyte [28] Arginine-Glycine-Aspartic acid

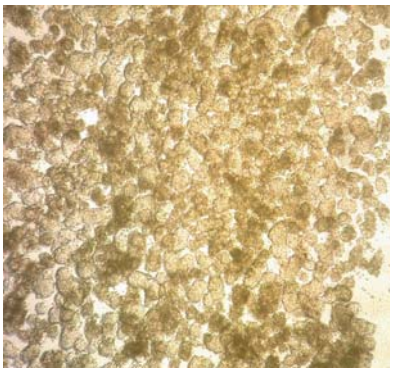
© Copyright 2011 ISBME, http://www.ijbme.org

تشکیل شده مشاهده می‌شود. در نمونه AG۵۰ چسبندگی نسبی اتفاق افتاده و توده‌های مجزائی شکل نگرفته است. به دلیل عدم شفافیت محیط نمونه AG۲۵ که ناشی از حلّالیت و رهایش مقادیر بالای ژلاتین و آگاروز در محیط است، تصویر این نمونه قابل ارزیابی نبود. سلول‌ها قادرند به ملکول‌هایی ژلاتینی که درگیر ساختار هستند، بچسبند. اگر ملکول ژلاتین در محیط رها شود و یا به صورت زنجیر آزاد در ساختار باقی بماند چسبندگی مناسبی اتفاق نخواهد افتاد. از این رو نمونه با نسبت ۵۰/۵۰ که بهترین شبکه را نتیجه می‌دهد، از نظر چسبندگی سلولی بهتر از سایر نمونه‌ها حتی AG۲۵ عمل می‌کند.

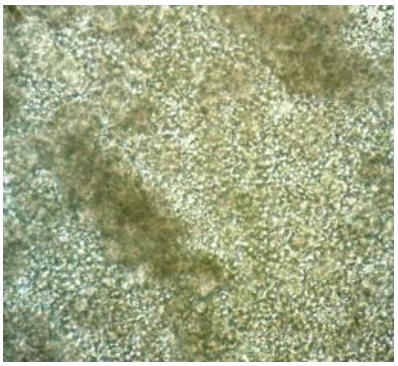
داده‌های به‌دست آمده از آزمون شمارش سلول‌های نچسبیده به سطح (جدول ۳) نیز مؤید این مطلب است. با مقایسه این داده‌ها می‌توان نتیجه گرفت که نمونه AG۵۰ بیشترین چسبندگی سلول به سطح را نشان داده است. در مقایسه نمونه‌های AG۷۵ و AG۱۰۰ تأثیر چندانی در افزایش تعداد سلول‌های چسبیده مشاهده نشده است، البته ریخت‌شناخت سلولی متفاوتی را نشان داده‌اند. انتظار می‌رود که با افزایش ژلاتین درون ساختار، اتصال سلولی به دلیل وجود پپتیدهای RGD افزایش یابد اما در مقایسه بین نمونه‌ها این تأثیر به صورت قابل انتظار نبوده است. توجه به میزان چسبندگی سلولیAG25 نشان می‌دهد که صرفاً افزایش جزء چسباننده کافی نیست بلکه باید این جزء در ساختار تثبیت شود. حل شدن زنجیرهای ژلاتین و خروج آهسته آنها از ساختار در محیط؛ علاوه بر کدر کردن محیط، بستری پایدار برای چسبندگی فراهم نساخته است و انتظار می‌رود که سلول‌های چسبیده به سطح نیز با روند حلّالیت و تخریب ژل از سطح جدا شوند. به همین دلیل، AG۵۰ با محتوای ژلاتین کمتر نسبت به AG۲۵ چسبندگی بیشتری را به دنبال داشته است. آگاروز نه تنها چسبندگی سلولی را ترغیب نمی‌کند بلکه با توجه به بار غالب منفی ساختار آگاروز، سطحی دافع را در مقابل سلول قرار می‌دهد که سلول‌ها در برهمکنش با آن به سرعت به چسبیدن و تشکیل توده‌هایی سه‌بعدی متمایل می‌شوند. این تأثیر در نمونه خالص آگاروز بسیار بارز بود.



AG۱۰۰



AG۷۵



AG۵۰

شاهد

شکل ۶- ریخت‌شناخت متفاوت سلول رشد یافته روی سطح هیدروژل با ترکیب درصدهای مختلف

© Copyright 2011 ISBME, http://www.ijbme.org

۴- نتیجه‌گیری

در این مطالعه با تهیه هیدروژل ترکیبی ژلاتین-آگاروز با هدف بهره‌گیری از مزایا هر دو بیوپلیمر به‌منظور ایجاد بستر مناسبی برای حمل سلول‌ها در فناوری انکپسولاسیون سلولی و سلول‌درمانی، اثر نسبت مختلف اجزاء بر خواص نهایی بیولوژیکی، فیزیکی و مکانیکی مورد ارزیابی قرار گرفت. بر مبنای داده‌های به‌دست آمده، نمونه‌ها با نسبت اجزاء مشابه خواص نهایی مطلوب‌تری را به‌دلیل پایداری بیشتر ساختاری نتیجه دادند. دمای ژلینگی در حدود دمای بدن برای نمونه AG۵۰ و AG۷۵ امکان استفاده مناسب آنها را در اکثر روش‌های انکپسولاسیون بر پایه تغییر دما فراهم می‌سازد. افزودن ژلاتین به آگاروز تا حدودی توانسته چسبندگی سلولی را بهبود بخشد و بر زیست‌سازگاری تأثیر شاخصی داشته است. در نهایت به‌نظر می‌رسد استفاده از هیدروژل‌های ترکیبی به پتانسیل مناسبی در بهره‌گیری از مزایای هر دو جزء، اصلاح و کنترل مطلوب خواص منجر می‌شود. ترکیب ژلاتین و آگاروز با نسبت اجزاء مشابه می‌تواند به خوبی برای کاربرد انکپسولاسیون سلولی مورد استفاده قرار گیرد.

مراجع

[1] Ainhoa M., Aitziber P., Gorka O., Rosa M H., de María C., Luis P. J., Review: Cell micro encapsulation technology: Towards clinical application, Journal of Controlled Release, 2008; 132:. 76–83.

[2] Babensee J., Anderson J. M., McIntire L., Mikos A.G., Host response to tissue engineered devices, Advanced Drug Delivery Reviews, 1998; 33: 111–139.

[3] Wilson J., Chaikof E., Challenges and emerging technologies in the immunoisolation of cells and tissues, Advanced Drug Delivery Reviews, 2008; 60: 124–145.

[4] Zimmermann H., Ehrhart F., Zimmermann D., Müller K., Katsen-Globa A., Behringer M., Feilen P. J., Gessner P., Zimmermann G., Shirley S. G., Weber M.M., Metze J., Zimmermann U., Hydrogel – based encapsulation of biological, functional tissue: fundamentals, technologies and applications, Apply Physics, 2007; 89: 909–922.

[5] Baroli B., Hydrogels for Tissue Engineering and Delivery of Tissue-Inducing Substances, Journal of Pharmacutical Sciences, 2007; 96: 2197-2223.

[6] Liu J., Lin Sh., Li L., Liu E., Release of theophylline from polymer blend hydrogels, International Journal of Pharmaceutics, 2005; 298: 117–125.

[7] Li R.H., Altreuter D.H., Gentile F.T., Transport Characterization of Hydrogel Matrices for Cell Encapsulation, Biotechnology and Bioengineering, 1996; 50: 365-373.

[8] Martínez-Díaz G.J., Nelson D., Crone W.C., Kao W.J., Mechanical and Chemical Analysis of Gelatin-Based Hydrogel Degradation, Macromolecular Chemistry and Physics, 2003; 204: 1898 –1908.

[9] Sakai Sh., Hashimoto I., Kawakami K., Agarose – gelatin conjugate for adherent cell-enclosing capsules, Biotechnology Letters, 2007; 29: 731–735.

[10] Verma V., Verma P., Kar S. K., Ray P. and Ray A R., Fabrication of Agar-Gelatin Hybrid Scaffolds Using a Novel Entrapment Method for In Vitro Tissue Engineering Applications, Biotechnology and Bioengineering, 2007; 96: 392-400.

[11] Emami Sh., Crosslinked poly(ethylene oxide) hydrogels, Journal of Applied Polymer Science, 2003; 88; 1451 – 55.

[12] Lu H. F., Targonsky E. D., Wheeler M., B. Cheng Y. L., Thermally Induced Gelable Polymer Networks for Living Cell Encapsulation, Biotechnology and Bioengineering, 2007; 96: 146-155.

[13] Anseth K.S., Bowman C.N. and BrannonPeppas L., Review: Mechanical properties of hydrogels and their experimental determination, Biomaterials, 1996; 17: 1647-57.

© Copyright 2011 ISBME, http://www.ijbme.org