

# Electron Beam-Irradiated Crosslinked Hydrogel Scaffold form Natural and Synthetic Polymers: Synthesis and Characterization

Available in: <http://jips.ippi.ac.ir>

Iran. J. Polym. Sci. Technol.  
(Persian),

Vol. 36, No. 1, 47-60

April-May 2023

ISSN: 1016-3255

Online ISSN: 2008-0883

DOI: 10.22063/JIPST.2023.2336.1857

Zeinab Aghelinejad<sup>1</sup>, Moslem Tavakol<sup>2,\*</sup>, Mahboobeh Mahmoodi<sup>1</sup>,  
Maryam Dehghan-Niri<sup>3</sup>

1. Faculty of Biomedical Engineering, Yazd Branch, Islamic Azad University, Postal Code 8915813135, Yazd, Iran
2. Department of Chemical and Polymer Engineering, Yazd University, Postal Code 8915818411, Yazd, Iran
3. Biomedical Engineering Division, Faculty of Chemical Engineering, Tarbiat Modares University, P.O. Box 14115-111, Tehran, Iran

Received: 19 November 2022, accepted: 3 July 2023

## ABSTRACT

**Hypothesis:** Recently, preparation and investigation of hydrogel scaffolds in tissue engineering have gained increasing attentions owing to similarity of their characteristics to extracellular matrix of different tissues. Among different methods for hydrogel preparation, the use of ionizing radiation presents several advantages as it can occur without the need to add chemical agents and the final products can be irradiated to final form in the package, also simultaneously sterilized by irradiation during crosslinking. In this study, chemical modification with glycidylmethacrylate (GMA) as well as physical blending with poly(vinyl alcohol) (PVA) was investigated to prepare hydrogel scaffolds based on polysaccharides, gum tragacanth (GT) and carboxymethyl chitosan (NOCC) using electron beam irradiation. **Methods:** For preparation of the hydrogels, first, GT and NOCC were functionalized with GMA. Afterwards, the blended solutions of these modified polymers and PVA were exposed to electron beam irradiation. Finally, the morphology, gel content, swelling behavior, compressive strength, rheological properties and biocompatibility of the hydrogels were investigated.

**Findings:** GMA-functionalized GT and NOCC in aqueous solution were crosslinked by electron beam irradiation. Blending of PVA with these modified polymers leads to the formation of an interpenetrating polymeric network (IPN) with enhanced compressive strength, storage modulus and swelling degree in comparison with the hydrogels prepared with unblended polymers. The gel content of the hydrogels varies between 65 to 98% as a function of polymer composition and irradiation dose. The hydrogels show viscoelastic behaviors in both compression and rheology analyses as well as excellent elastic recovery in cyclic compression analysis. The stress fracture of IPN hydrogels is found in the range of 1200-1414 kPa. The viability of mesenchymal stem cells (MSCs), exposed to hydrogel extracts is above 85% after 24 and 72 h incubation. According to these results, the IPN hydrogels prepared in this study may be suggested as a promising candidate for further investigation, especially in cartilage tissue engineering.

### Keywords:

poly(vinyl alcohol),  
gum tragacanth,  
carboxymethyl chitosan,  
electron beam irradiation,  
hydrogel scaffold

(\*)To whom correspondence should be addressed.

E-mail: [m.tavakol@yazd.ac.ir](mailto:m.tavakol@yazd.ac.ir)

### Please cite this article using:

Aghelinejad Z., Tavakol M., Mahmoodi M., Dehghan-Niri M., Electron Beam-Irradiated Crosslinked Hydrogel Scaffold form Natural and Synthetic Polymers: Synthesis and Characterization, *Iran. J. Polym. Sci. Technol. (Persian)*, **36**, 47-60, 2023.

# داربست هیدروژلی شبکه‌ای شده با باریکه الکترون از پلیمرهای طبیعی و سنتزی: سنتز و مشخصه‌یابی

زینب عاقلی نژاد<sup>۱</sup>، مسلم توکل<sup>۲\*</sup>، محبوبه محمودی<sup>۱</sup>، مریم دهقان‌نیری<sup>۳</sup>

۱- یزد، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد یزد، گروه مهندسی پزشکی، کد پستی ۸۹۱۵۸۱۳۱۳۵

۲- یزد، دانشگاه یزد، گروه مهندسی شیمی و پلیمر، کد پستی ۸۹۱۵۸۱۸۴۱۱

۳- تهران، دانشگاه تربیت مدرس، دانشکده مهندسی شیمی، گروه مهندسی زیست‌پزشکی، صندوق پستی ۱۱۱-۱۴۱۱۵

دریافت: ۱۴۰۱/۸/۲۸، پذیرش: ۱۴۰۲/۴/۱۲

## چکیده

**فرضیه:** در سال‌های اخیر، به دلیل تشابه مشخصه‌های داربست‌های هیدروژلی با ماتریس برون‌یاخته‌ای بافت‌های مختلف، توجه به تهیه و ارزیابی آن‌ها در مهندسی بافت رشد فزاینده‌ای داشته است. از میان روش‌های مختلف تهیه هیدروژل، استفاده از تابش یوننده (یون‌ساز) دارای چند برتری است، زیرا به واکنش‌گرهای شیمیایی نیاز ندارد و محصول می‌تواند به شکل نهایی تابش‌دهی شده و هم‌زمان با شبکه‌ای شدن با تابش‌دهی سترون شود. در این پژوهش، اصلاح شیمیایی با گلیسیدیل‌متاکریلات و آمیخته‌سازی فیزیکی با پلی(وینیل الکل) برای تهیه داربست‌های هیدروژلی بر پایه پلی‌ساکاریدها، کتیرا و کربوکسی‌متیل کیتوسان به کمک تابش باریکه الکترون، ارزیابی شد. **روش‌ها:** برای تهیه داربست هیدروژلی، ابتدا پلیمرهای طبیعی کتیرا و کربوکسی‌متیل کیتوسان با گلیسیدیل‌متاکریلات عامل‌دار شدند و در ادامه محلول‌های آمیخته‌ای پلیمرهای اصلاح‌شده و پلی(وینیل الکل)، در معرض باریکه الکترون قرار گرفتند. سپس شکل‌شناسی، محتوای ژل، رفتار تورمی، استحکام فشاری، خواص رئولوژیکی و زیست‌سازگاری هیدروژل‌ها بررسی شد. **یافته‌ها:** کتیرای عامل‌دار شده با گلیسیدیل‌متاکریلات و کربوکسی‌متیل کیتوسان در محلول آبی و در معرض باریکه الکترون شبکه‌ای شدند. آمیخته‌سازی پلی(وینیل الکل) با پلیمرهای اصلاح‌شده، موجب تشکیل شبکه پلیمری درهم‌نفوذی با استحکام فشاری، مدول ذخیره و مقدار تورم افزایش‌یافته شد. محتوای ژل هیدروژل‌ها بسته به دُز تابش‌دهی و ترکیب درصد پلیمرها در محدوده ۶۵٪ تا ۹۸٪ متغیر بود. در آزمون‌های استحکام فشاری و رئولوژی، هیدروژل‌ها رفتار گران‌روکشسان و خاصیت بازیابی کشسانی مناسبی نشان دادند. استحکام فشاری هیدروژل‌های تولیدشده از آمیخته فیزیکی پلیمرها در محدوده ۱۴۱۴-۱۲۰۰ kPa بود. زنده‌مانی یاخته‌های مزانشیمی انسانی تماس‌یافته با عصاره هیدروژل، پس از ۲۴ و ۷۲ h گرم‌خانه‌گذاری بیش‌تر از ۸۵٪ بود. با توجه به این نتایج، هیدروژل‌های شبکه پلیمری درهم‌نفوذی تولیدشده در این مطالعه می‌توانند به‌عنوان گزینه کارآمدی برای ارزیابی بیشتر به‌ویژه مهندسی بافت غضروف پیشنهاد شوند.

## واژه‌های کلیدی

پلی(وینیل الکل)،

کتیرا،

کربوکسی‌متیل کیتوسان،

تابش‌دهی باریکه الکترون،

داربست هیدروژلی

\* مسئول مکاتبات، پیام‌نگار:

[m.tavakol@yazd.ac.ir](mailto:m.tavakol@yazd.ac.ir)

## مقدمه

هیدروژل‌های ساخته‌شده از پلیمرهای طبیعی با توجه به زیست‌تخریب‌پذیری، زیست‌سازگاری، قابلیت زیست‌تقلیدی و سایر خواص مطلوب، جایگزین مناسبی برای انواع ساخته‌شده از پلیمرهای صنعتی در کاربردهای زیست‌پزشکی به‌شمار می‌آیند. هیدروژل‌ها می‌توانند با روش‌های مختلف شبکه‌ای‌کردن فیزیکی یا شیمیایی ساخته شوند. شبکه‌های شیمیایی معمولاً دارای استحکام مکانیکی و پایداری بیشتری نسبت به شبکه فیزیکی هستند، اما مشکل مهم آن‌ها باقی‌ماندن واکنشگرهای شیمیایی در محیط و امکان بروز واکنش‌های سمی و التهاب‌زاست. در بین روش‌های شیمیایی، استفاده از پرتوهای یون‌ساز مانند گاما و الکترون دارای برتری‌هایی شامل نیازنداشتن به استفاده از عوامل شیمیایی برای پیشبرد واکنش و در نتیجه نبود نیاز به حذف واکنشگرهای سمی باقی‌مانده، امکان سترون‌سازی سامانه طی فرایند ساخت هیدروژل با استفاده از پرتو و امکان تابش‌دهی و ساخت هیدروژل در قالب و بسته نهایی است [۱-۴].

بافت غضروف مفصلی شامل یاخته‌های کندروسیت توزیع‌شده در شبکه برون‌یاخته‌ای غنی از پروتئوگلیکان و فیبر کلاژنی است. کندروسیت فقط یاخته پاسخگوی ترمیم و نگهداری شبکه برون‌یاخته‌ای یاد شده است. به هر حال، بافت غضروف به‌دلایلی مانند نداشتن رگ و اعصاب، قابلیت محدودی در ترمیم آسیب‌ها دارد. از مهم‌ترین روش‌های درمانی می‌توان به کاشت اندام مصنوعی، کاشت بافت غضروفی ساخته‌شده در محیط برون‌تنی و ترمیم درجای بافت با تزریق یاخته‌ها به‌همراه داربست به محل عارضه اشاره کرد. منابع یاخته‌ای که به‌طور عمده برای مهندسی بافت غضروف استفاده شده‌اند، شامل کندروسیت‌ها و یاخته‌های بنیادی مزانشیمی هستند. استفاده از یاخته‌های کندروسیت برای ترمیم آسیب‌های غضروفی شامل محدودیت‌هایی مانند محدودیت دسترسی و نیاز به استفاده از روش‌های تهاجمی برای استخراج کندروسیت‌های خودی (autologous)، قدرت تکثیر کم و احتمال تمایززدایی کندروسیت‌ها در کشت برون‌تنی است. اما یاخته‌های بنیادی مزانشیمی قدرت رشد و تکثیر زیادی دارند، در صورت قرارگرفتن در شرایط مناسب، می‌توانند به غضروف تمایز یابند و دسترسی به آن‌ها راحت است [۵،۶]. تاکنون داربست‌های متنوع تهیه‌شده از پلیمرهای طبیعی، سنتزی یا ترکیب آن‌ها برای مهندسی بافت غضروف ارزیابی شده است.

کثیراً، پلی‌ساکاریدی طبیعی است که از دسته‌ای از گون‌های روینده در محدوده ترکیه تا افغانستان تراویده می‌شود. این صمغ از بخش نامحلول تورم‌پذیر در آب، باسورین و بخش محلول در آب تراگاکانتین یا تراگاکانتیک اسید تشکیل شده است. بدنه اصلی تراگاکانتیک اسید از مونومرهای گالاکترونیک اسید تشکیل شده است که در برخی

از آن‌ها یک یا چند شاخه جانبی دو یا سه مونوساکاریدی، شامل گالاکتوز، فوکو و مانوز جایگزین هیدروژن گروه هیدروکسیل شده است. کثیراً از دیرباز کاربرد زیادی در صنایع غذایی، داروسازی و طب سنتی داشته است. با توجه به خواص مطلوب تراگاکان (کتیرا)، پژوهش‌ها برای گسترش کاربردهای آن در زیست‌پزشکی و صنایع غذایی در سال‌های اخیر رشد زیادی داشته است [۷،۸].

مطالعات برون‌تنی پژوهشگران نشان داده که سمیت کثیرا روی یاخته‌های بنیادی انسانی نسبت به برخی پلیمرهای زیستی مانند کیتوسان و زایلوگلوکان کمتر است [۹-۱۱]. نتایج مطالعه فتاحی و همکاران [۱۱] نشان داد، چسبندگی یاخته‌های رده L929 انسانی به کثیرای شبکه‌ای‌شده یونی، نسبت به آلژینات شبکه‌ای‌شده یونی، بهتر است. دلیل این موضوع به برهم‌کنش مناسب یاخته‌ها با مونوساکاریدهای موجود در شاخه‌های جانبی کثیرا، مانند فوکوز، نسبت داده شده است. حائری و همکاران [۱۲] تمایز استخوانی یاخته‌های بنیادی مزانشیمی انسانی کشت داده‌شده روی داربست هیدروژلی تهیه‌شده از کثیرای ژل‌شده یونی را بررسی کردند. آن‌ها به این نتیجه رسیدند که طی فرایند تمایز، فعالیت آلکالین فسفاتاز، محتوای کلسیم و مقدار بیان ژن‌های مربوط به تمایز استخوانی (Osteocalcin و Osteonectin, Runx2) در مقایسه با کشت روی کلاژن بیشتر است. در مطالعه دیگری، نشان داده شد، در میکروذرات هیبریدی کثیرا-آلژینات ژل‌شده یونی، خواص تورمی، پایداری و تکثیر و تمایز یاخته‌های استخوان‌ساز کپسول‌شده، نسبت به میکروذرات آلژینات، بهبود یافته است [۱۳].

کربوکسی‌متیل کیتوسان مشتق محلول در آب کیتوسان است که با افزوده‌شدن گروه‌های کربوکسی‌متیل به جایگاه آمین و هیدروکسیل مونوساکاریدهای کیتوسان حاصل می‌شود. پژوهش‌ها نشان داده است، پوشش‌دهی سطح فیلم پلی (L,D-لاکتیک اسید) با کربوکسی‌متیل کیتوسان دارای استخلاف کربوکسیل از موقعیت اکسیژن، موجب بهبود چسبندگی یاخته‌های استخوان‌ساز و غضروفی می‌شود [۱۴].

در مطالعه دیگری نشان داده شد، یاخته‌های مزانشیمی انسانی کشت‌شده روی هیدروژل تهیه‌شده از کربوکسی‌متیل کیتوسان شبکه‌ای‌شده با آسپیرین، زنده‌مانی و تکثیر مناسبی دارند و فرایند استخوان‌سازی در آن‌ها سرعت می‌یابد [۱۵]. هر دو پلیمرهای زیستی نام‌برده، کثیرا و کربوکسی‌متیل کیتوسان، در معرض پرتوهای یون‌ساز چه در فاز جامد و چه محلول، دچار تخریب و کاهش وزن مولکولی می‌شوند. بنابراین، برای ساخت هیدروژل از این پلیمرها با روش تابش‌دهی با باریک‌های الکترون باید از روش‌های خاصی مانند آمیخته‌سازی فیزیکی یا شیمیایی با مونومر-پلیمرهای شبکه‌ای‌شونده

با پرتو بهره برد.

## دستگاه‌ها و روش‌ها

**عامل دار کردن کتیرا و کربوکسی متیل کیتوسان با گلیسیدیل متاکریلات**  
عامل دار کردن کتیرا با گلیسیدیل متاکریلات با روش پیشنهادی Zhao و همکاران [۱۸] انجام شد. ابتدا محلول کتیرا با غلظت ۱٪ وزنی-حجمی تهیه شد. سپس، دمای محیط تا ۶۰°C گرم و تری اتیل آمین (۲/۵٪ وزنی-حجمی) و گلیسیدیل متاکریلات (۲/۵٪ وزنی-حجمی) به محیط اضافه شد. محیط به مدت ۱ h در دمای ۶۰°C و سپس به مدت ۲۳ h در دمای معمولی هم‌زده شد. در ادامه، مخلوط اتانول و استون به محیط اضافه شد و رسوب حاصل چند مرتبه با استون خالص شست‌وشو داده شد. رسوب باقی مانده به مدت ۲۴ h در دمای ۶۰°C خشک و برای انجام آزمایش‌های بعدی در ظروف پلاستیکی نگه‌داری شد. عامل دار کردن کربوکسی متیل کیتوسان با روش مشابه انجام شد با این تفاوت که pH محیط واکنش روی ۷ تنظیم و فقط گلیسیدیل متاکریلات (۲/۵٪ وزنی-حجمی) به محیط اضافه شد و باقی مراحل مانند عامل دار کردن کتیرا ادامه یافت.

## تهیه هیدروژل

پس از تهیه محلول پلی (وینیل الکل) (۸٪-۳٪ وزنی-حجمی)، مقدار معین کربوکسی متیل کیتوسان عامل دار (۲٪-۱٪ وزنی-حجمی) و کتیرای عامل دار (۲٪-۱٪ وزنی-حجمی) به آن اضافه شده و محلول تا یکنواخت شدن کامل، در شرایط محیطی هم‌زده شد. محلول به ظروف پلاستیکی ۵ mL منتقل و درب ظروف بسته شد. محلول‌های یادشده با دستگاه شتاب‌دهنده الکترون مدل T-2200 Rhodotron ساخت شرکت IBA بلژیک با انرژی ۱۰ MeV و حداکثر ولتاژ ۸۰ kV با دُز معین (۱۴-۵۶ kGy) تابش‌دهی شدند. نمونه‌های پرتودیده تا زمان استفاده بعدی در دمای یخچال نگه‌داری شدند. شرایط تولید هیدروژل‌های ساخته‌شده در این پژوهش، در جدول ۱ آمده است.

## مشخصه‌یابی هیدروژل‌ها

### بررسی ساختار شیمیایی

بررسی ساختار شیمیایی و شناسایی گروه‌های عاملی و پیوندهای تشکیل‌شده در نمونه‌ها با طیف‌سنجی زیرقرمز تبدیل فوری انجام شد. نمونه‌ها به منظور آماده‌سازی برای آزمون طیف‌سنجی، پس از خشک شدن، پودر شدند. سپس، با نمک پتاسیم برمید خالص مخلوط و به شکل قرص در آمدند. قرص ساخته‌شده با طیف‌سنج زیرقرمز بررسی شد.

### شکل‌شناسی

برای بررسی ساختار ظاهری میکروسکوپی و تخلخل‌ها هیدروژل از

پلی (وینیل الکل)، نوعی پلیمر زیست‌سازگار و زیست تخریب‌پذیر است که محلول آبی آن در معرض باریکه الکترون، شبکه‌ای و تبدیل به هیدروژل با خواص فیزیکی و مکانیکی شایان توجه می‌شود، اما این هیدروژل نمی‌تواند چسبندگی مناسبی را برای رشد و تکثیر یاخته‌های حیوانی ایجاد کند و تورم محدودی دارد [۱۶].

برای توسعه خواص زیستی و چسبندگی یاخته‌ای این هیدروژل با هدف استفاده از آن به عنوان داربست در مهندسی بافت، تاکنون راهکارهایی مانند عمل‌آوری با پلاسما سرد، پیوندزنی مولکول‌های زیستی بهبوددهنده چسبندگی یاخته‌ای و آمیخته‌سازی با پلیمرهای زیستی و برخی نانوذرات ارزیابی شده است [۱۷، ۱۶].

در پژوهش حاضر، برای اولین بار داربست هیدروژلی بر پایه پلیمرهای طبیعی کتیرا و کربوکسی متیل کیتوسان و پلیمر سنتزی پلی (وینیل الکل) تهیه و با هدف استفاده در مهندسی بافت غضروف مشخصه‌یابی اولیه می‌شود. برای این کار ابتدا گلیسیدیل متاکریلات به ساختار پلیمرهای نام‌برده پیوند زده شد تا در مقابل باریکه الکترون قابلیت شبکه‌ای شدن داشته باشند. سپس، محلول آمیخته فیزیکی پلیمرهای عامل دار و پلی (وینیل الکل)، با دستگاه شتاب‌دهنده الکترون تابش‌دهی شد. در ادامه، خواص داربست هیدروژلی مانند محتوای ژل، رفتار تورمی در بافر فسفات، استحکام مکانیکی، مقدار تخلخل و سمیت یاخته‌ای عصاره استخراجی از هیدروژل با هدف بررسی امکان استفاده از داربست ساخته‌شده در مهندسی بافت غضروف، بررسی شد.

## تجربی

### مواد

کتیرای نواری روشن تراویده از گونه *Astragalus gossypinus* از بازار تهیه شد. کربوکسی متیل کیتوسان (وزن مولکولی ۵۴۳۵۰۰ g/mol) از شرکت Pubchem و پلی (وینیل الکل) (وزن مولکولی ۱۴۵۰۰۰ g/mol) و درجه آب‌کافت بیش از ۹۹٪، گلیسیدیل متاکریلات، تری اتیل آمین و آنزیم پکتیناز (*Aspergillus niger*) از شرکت Sigma-Aldrich خریداری شد. سایر مواد و حلال‌ها از درجه آزمایشگاهی تهیه و بدون خالص‌سازی استفاده شدند. پیش از استفاده از کتیرا، ابتدا ناخالصی‌های قابل مشاهده با چشم، جدا شد. سپس، کتیرا آسیاب‌شده و با الک‌های ویژه میکرومتری ذرات بزرگ آن جدا شد و ذرات کوچک‌تر از ۲۰۰ μm، در این پژوهش، استفاده شدند.

جدول ۱- مشخصات هیدروژل‌های تهیه شده.

Table 1. characteristics of prepared hydrogels.

Sample	Functionalized tragacanth (w/v%)	Carboxymethyl chitosan (w/v%)	PVA (w/v%)	Irradiation dose (kGy)
P3T2	2.0	0	3.0	28
P8T2-1	2.0	0	8.0	28
P8T1N1	1.0	1.0	8.0	28
P8N2	0	2.0	8.0	28
P10	0	0	10.0	28
T2	2.0	0	0	28
P8T2-2	2.0	0	8.0	14
P8T2-3	2.0	0	8.0	56

$$Sw(t) = \frac{w_t}{w_0} \quad (2)$$

برای بررسی تخریب زیستی هیدروژل‌ها، آزمون تورم شرح داده شده به جای محلول بافر فسفات، در محلول آنزیم پکتیناز با غلظت ۱۰۰ واحد بر میلی لیتر انجام شد.

#### استحکام فشاری

برای اندازه‌گیری استحکام فشاری هیدروژل‌ها بر مبنای استاندارد ASTM F2150-07، نمونه‌های هیدروژل به شکل استوانه‌ای با ارتفاع ۱۳ mm و قطر ۱۵ mm تولید و با دستگاه اندازه‌گیری استحکام فشاری مدل STM-150 ساخت شرکت ایرانی سنتام بررسی شدند. آزمون فشاری با مقدار فشار ثابت ۵ mm/min و تا ۹۰٪ کاهش ارتفاع نمونه، انجام شد. استحکام فشاری (compressive strength, CS) به عنوان حداکثر مقدار بار وارد شده به نمونه (تنش نقطه شکست هیدروژل) با استفاده از معادله (۳) محاسبه شد که در آن، F نیروی وارد شده بر نمونه بر حسب نیوتن و A سطحی از نمونه بر حسب متر مربع بوده که در معرض این نیرو قرار گرفته است. همچنین، کرنش از معادله (۴) محاسبه شد [۲۰]:

$$CS = \frac{F}{A} \quad (3)$$

$$\varepsilon = \frac{\Delta h}{h} \quad (4)$$

در این معادله، h ارتفاع اولیه نمونه و  $\Delta h$  تغییرات ایجاد شده در ارتفاع نمونه است. با توجه به رابطه غیرخطی هیدروژل در آزمون تنش-کرنش، برای محاسبه مدول فشاری (سختی) از روش چندجمله‌ای

میکروسکوپ الکترونی پویشی (SEM) و گسیل میدانی (FE-SEM) مدل MIRA3 ساخت شرکت TESCAN جمهوری چک استفاده شد. برای تهیه نمونه در آزمون میکروسکوپ الکترونی، هیدروژل‌ها با خشک‌کن انجمادی در دمای  $-45^{\circ}\text{C}$  و خلأ خشک شدند. سپس، از نمونه‌ها برش مقطعی تهیه و سطح مقطع در شرایط خلأ با لایه نازکی از طلا پوشانده شد. در بررسی شکل شناسی با FE-SEM به خشک کردن نمونه‌ها نیازی نبود و آزمون با هیدروژل مرطوب انجام شد.

#### محتوای ژل

برای اندازه‌گیری محتوای ژل، نمونه‌های ۲ mm هیدروژل به مدت ۲۴ h در دمای  $60^{\circ}\text{C}$  درون آون خلأ خشک و وزن شدند ( $w_{d0}$ ). در ادامه، ژل‌های خشک به مدت ۱۶ h در آب جوش تحت بازروانی قرار گرفتند. سپس، نمونه‌ها درون آون خلأ به مدت ۲۴ h در دمای  $60^{\circ}\text{C}$  خشک و سپس وزن شدند ( $w_{dt}$ ). محتوای ژل (gel content, GC) مطابق معادله (۱) محاسبه شد [۱۹]:

$$GC\% = \frac{w_{dt}}{w_{d0}} \times 100 \quad (1)$$

#### رفتار تورمی

برای انجام آزمون، نمونه‌های ۲ mm هیدروژل با دقت وزن شدند ( $w_0$ ) و در ۳۰ mL بافر سدیم فسفات ۰/۱ مولار با pH برابر ۷/۴ قرار گرفتند. آزمون رفتار تورمی در محلول با دمای  $37^{\circ}\text{C}$  انجام شد. در زمان‌های معین، نمونه‌ها از محیط خارج و پس از خارج کردن آب سطحی با کاغذ صافی، وزن شدند ( $w_t$ ). مقدار تورم (Sw) در زمان‌های یاد شده با تقسیم وزن هیدروژل متورم بر وزن اولیه هیدروژل، مطابق معادله (۲) تعیین شد [۱،۳]:

کشت پیشین شد. سپس، نمونه‌ها به مدت ۲۴ و ۷۲ h درون گرم‌خانه کربن دی‌اکسید با دمای ۳۷°C قرار گرفتند. پس از گذشت زمان مزبور، نمونه‌ها دو بار با محلول بافر فسفات شسته شدند و در ادامه در محیطی تاریک، محلول رنگی MTT در بافر محیط کشت یاخته‌ای جایگزین شد. سپس، سطح صفحه با ورقه آلومینیومی پوشانده شده و ۳ h گرم‌خانه‌گذاری انجام شد. پس از این زمان، محلول رنگی خارج و ۲۰۰ μL دی‌متیل سولفوکسید به محیط اضافه شد. به منظور حل شدن تمام بلورهای فرمازان (formazan) سه مرتبه محلول با پیپت خارج و بازگردانده شد. سپس، مقدار جذب در طول موج ۵۷۰ nm خوانده و با مقدار جذب محلول شاهد مقایسه شد. هر یک از آزمایش‌ها سه مرتبه تکرار و درصد زنده‌مانی یاخته‌ای با تقسیم مقدار جذب نمونه‌های مطالعه‌شده بر مقدار جذب نمونه شاهد، محاسبه شد [۲۲]:

$$\text{Cell viability (\%)} = \frac{\text{OD}_{\text{Sample}}}{\text{OD}_{\text{Blank}}} \times 100 \quad (7)$$

در این معادله، مقدار جذب فرابنفش محلول MTT مربوط به نمونه قرارگرفته در معرض عصاره هیدروژل و مقدار جذب فرابنفش مربوط به نمونه شاهد کنترل منفی (یاخته‌های کشت داده‌شده در مجاورت محیط کشت عاری از عصاره هیدروژل) است.

#### تحلیل آماری داده‌ها

تحلیل آماری پاسخ‌ها با روش تحلیل پراکندگی ANOVA با نرم‌افزار Minitab انجام و سطح معنی‌داری تفاوت، ۵٪ در نظر گرفته شد. آزمون‌های کمی با سه مرتبه تکرار انجام و داده‌های به‌دست‌آمده به صورت میانگین تکرارها گزارش شدند.

#### نتایج و بحث

##### عامل دار کردن کتیرا با گلیسیدیل متاکریلات

در شکل ۱، طیف FTIR پلیمرهای خام و عامل‌دار نشان داده شده است. در طیف کتیرا (شکل ۱ (a))، پیک در ناحیه ۱۱۵۴ cm<sup>-1</sup> به ارتعاش کششی C-O، پیک در ۱۶۲۰ cm<sup>-1</sup> به نمک کربوکسیلات، برآمدگی پهن در ناحیه ۳۷۰۰-۳۰۰۰ cm<sup>-1</sup> به گروه‌های هیدروکسیل (OH) و پیک در ۱۷۴۸ cm<sup>-1</sup> به ارتعاش کششی پیوند C=O گروه‌های کربوکسیل و کربوکسیلیک اسید متیل استر مربوط است. در طیف کتیرا عامل‌دار (شکل ۱ (b))، پیک جدیدی در حدود ۱۷۲۰ cm<sup>-1</sup> ظاهر شده که به ارتعاش کششی گروه‌های C=O

پیشنهادی Karvinen و همکاران [۲۱]، استفاده شد. بر این اساس، برازش با استفاده از معادله (۵) انجام و شیب به‌دست‌آمده به عنوان مدول فشاری در نظر گرفته شد:

$$\sigma = A\varepsilon + B \exp(C\varepsilon) \quad (5)$$

برای ارزیابی بازیابی کشسانی، آزمایش استحکام فشاری هیدروژل‌ها در محیط آبی با فشرده‌سازی به صورت رفت و برگشتی در ۸ چرخه و تا کرنش ۸۰٪ انجام شد. اختلاف سطح زیر منحنی تنش-کرنش در حالت اعمال بار و برداشتن بار اعمال‌شده در هر چرخه به عنوان مقدار اتلاف انرژی (ΔE) در آن چرخه محاسبه شد [۲۰]:

$$\Delta E = \text{AUC}_i - \text{AUC}_r \quad (6)$$

در این معادله، AUC<sub>i</sub> سطح زیر منحنی در مسیر اعمال فشار (رفت) و AUC<sub>r</sub> سطح زیر منحنی در مسیر برداشتن فشار (برگشت) است. برای محاسبه سطح زیر منحنی از روش انتگرال‌گیری دوزنقه‌ای استفاده شد.

#### رنولوژی

رفتار رنولوژیکی هیدروژل‌ها با استفاده از رئومتر ساخت شرکت Anton Paar اتریش، مجهز به رئومتر دارای صفحه‌های موازی با قطر دیسک ۲/۵ cm انجام شد. آزمون روبش بسامد در دمای ۳۷°C صفحه رئومتر و در ناحیه گران‌روکشسانی خطی با کرنش ثابت ۰/۱٪ و در بسامد ۰/۱ rad/s تا ۱۰۰ rad/s انجام شد.

#### زنده‌مانی یاخته‌ای در مجاورت عصاره هیدروژل

به منظور بررسی سمیت نمونه‌های هیدروژل در یاخته‌های مزانشیمی از آزمون MTT استفاده شد. ابتدا، نمونه هیدروژل در شرایط سترون از ظرف خارج و در ۱۰ mL محلول بافر محیط کشت یاخته‌ای به مدت ۲۴ h درون گرم‌خانه (incubator) نگهداری شد. سپس، محلول به مدت ۱۰ min با سرعت ۵۰۰۰ rpm در دستگاه مرکزگریز قرار گرفت و مایع رویی آن برداشت شد. در ادامه، محلول سرم آلبومین گاوی به مقداری اضافه شد تا محلول ۱۰٪ سرم آلبومین گاوی تهیه شود. در این مدت به صورت جداگانه یاخته‌های مزانشیمی با چگالی ۷۰۰۰ یاخته در هر چاهک در صفحه ۹۶-خانه‌ای کشت داده شد. پس از ۲۴ h و اطمینان از چسبیدن و وضعیت مناسب رشد یاخته‌ای در چاهک‌ها، محیط کشت دارای عصاره هیدروژل جایگزین محیط

به ارتعاش کششی گروه‌های اپوکسی مربوط است. وجود پیک‌های یادشده می‌تواند به‌عنوان نشانه عامل دار کردن موفق در نظر گرفته شود [۱۸].

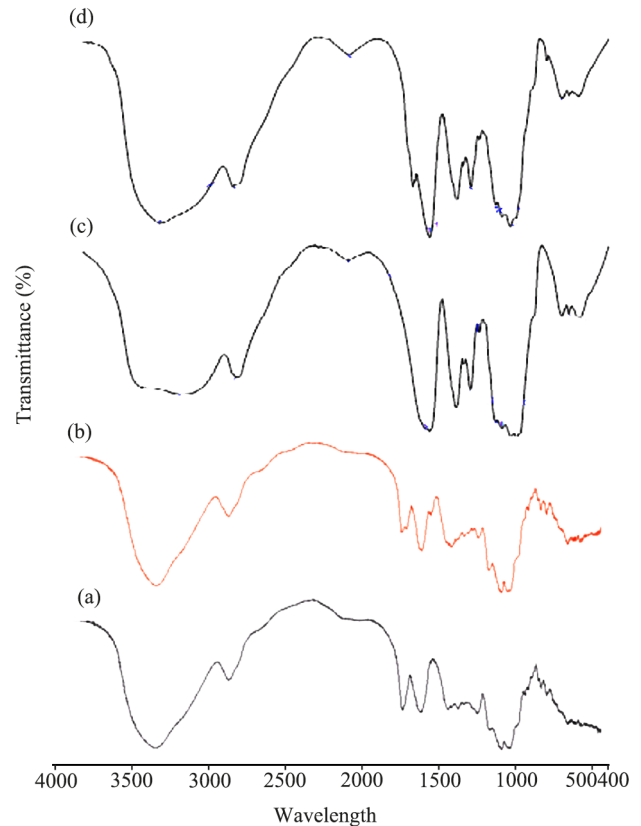
### ساخت هیدروژل و محتوای ژل

تابش دهی پلی‌ساکاریدها در فاز محلول یا پودر خشک، به‌طورعمومی به واکنش شکست زنجیر و کاهش وزن مولکولی آن‌ها منجر می‌شود. از این فرایند برای تهیه مشتقات کیتوسانی با وزن مولکولی کم برای افزایش خواص ضد میکروبی و قدرت اتصال به چربی استفاده شده است [۲۴]. همچنین، بر اساس مطالعات انجام‌شده تابش دهی کتیرا در فاز محلول یا پودر موجب کاهش وزن مولکولی و تشکیل محلولی با گرانروی کمتر نسبت به محلول اولیه شده است [۳، ۲۵، ۲۶]. تاکنون از روش‌های مختلفی مانند آمیخته‌سازی با مونومرها یا پلیمرهای دارای قابلیت شبکه‌ای شدن با پرتو، پیوندزنی شیمیایی با پلیمرها-مونومرهای یادشده، تابش دهی در حالت خمیری و تابش دهی در مجاورت گازهای اشباع‌نشده برای شبکه‌ای کردن پلی‌ساکاریدها با پرتو استفاده شده است [۸].

در این پژوهش، برای ایجاد موقعیت فعال به‌منظور شبکه‌ای شدن با پرتو، گلیسیدیل متاکریلات به ساختار پلی‌ساکاریدی پیوند زده شد. پیوندهای اشباع‌نشده دوگانه موجود در ساختار گلیسیدیل متاکریلات، مستعد واکنش پلیمر شدن و شبکه‌ای شدن رادیکال آزاد در مواجهه با پرتو هستند. شکل ۲، طرح کلی واکنش شبکه‌ای شدن پلی‌ساکارید عامل دار و تشکیل هیدروژل در اثر تابش دهی را نشان می‌دهد.

در اثر تابش دهی محلول پلیمر عامل دار، افزون بر ایجاد رادیکال آزاد روی زنجیر پلیمری، رادیکال‌های آزاد هیدروکسیل در محیط آبی شکل می‌گیرند. رادیکال‌های هیدروکسیل شکل گرفته به زنجیر پلیمری حمله می‌کنند و موجب تشکیل درشت‌رادیکال‌های پلیمری می‌شوند. در ادامه، درشت‌رادیکال‌های ایجادشده می‌توانند به سایر زنجیرهای پلیمری حمله و درشت‌رادیکال‌های بزرگ‌تری را تشکیل دهند (واکنش‌های رشد). همچنین واکنش بین درشت‌رادیکال‌های ایجادشده، موجب شبکه‌ای شدن پلیمر و تشکیل شبکه سه‌بعدی هیدروژل می‌شود (واکنش‌های پایان). پیش‌تر پژوهشگران گزارش کردند، پلی‌آسپارتامید عامل دارشده با گروه گلیسیدیل متاکریلات در دُزهای بسیار کم در محدوده ۱-۲ kGy با محتوای ژل بیش از ۶۰٪ شبکه‌ای می‌شود [۲۷].

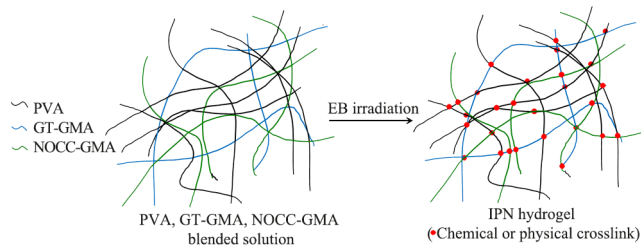
سازوکار پیشنهادی تشکیل هیدروژل درهم‌نفودی در اثر تابش دهی محلول آمیخته فیزیکی پلی(وینیل الکل)، کتیرای عامل دار و کربوکسی متیل کیتوسان عامل دار (برگرفته از سازوکار پیشنهادی Singh و همکاران [۲۸]) در ادامه آورده شده است.



شکل ۱- طیف FTIR: (a) کتیرا، (b) کتیرای عامل دارشده با گلیسیدیل متاکریلات، (c) کربوکسی متیل کیتوسان و (d) کربوکسی متیل کیتوسان عامل دارشده با گلیسیدیل متاکریلات.

Fig. 1. FTIR spectra of: (a) tragacanth, (b) glycidylmethacrylate functionalized tragacanth, (c) carboxymethyl chitosan, and (d) glycidylmethacrylate functionalized carboxymethyl chitosan.

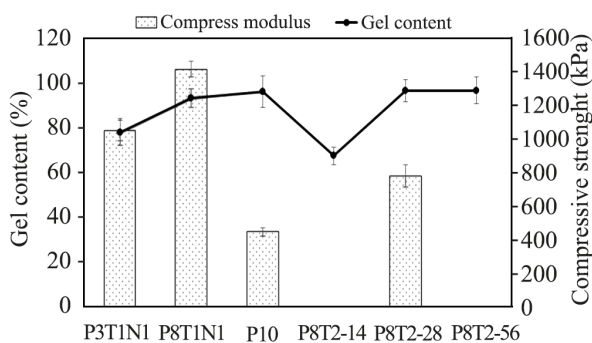
گروه‌های استری پیوندخورده مربوط است. همچنین برآمدگی کوچک ظاهرشده در محدوده  $1560 \text{ cm}^{-1}$  می‌تواند به ارتعاش کششی پیوند دوگانه کربن-کربن ( $C=C$ ) گروه‌های متاکریلات نسبت داده شود. وجود این دو مشخصه جدید، می‌تواند مؤید انجام واکنش عامل دار شدن باشد [۲۳]. در طیف کربوکسی متیل کیتوسان (شکل ۱ (c))، پیک موجود در ناحیه  $1600 \text{ cm}^{-1}$  و  $1420 \text{ cm}^{-1}$  به ارتعاش‌های کششی متقارن و نامتقارن نمک کربوکسیلات، پیک موجود در  $1320 \text{ cm}^{-1}$  به گروه آمینی کربوکسی متیل کیتوسان و برآمدگی پهن در ناحیه  $3700-3000 \text{ cm}^{-1}$  به گروه‌های هیدروکسیل (OH) مربوط است. در پیک کربوکسی متیل کیتوسان عامل دار (شکل ۱ (d))، پیک جدید ظاهرشده در حدود  $1720 \text{ cm}^{-1}$  به ارتعاش کششی گروه‌های  $C=O$  در گروه‌های استری پیوندخورده و برآمدگی کوچک ظاهرشده در محدوده  $840 \text{ cm}^{-1}$



شکل ۳- تشکیل شبکه پلیمری درهم‌نفوذی با تابش‌دهی باریکه الکترون در محلول آمیخته‌ای پلیمر.

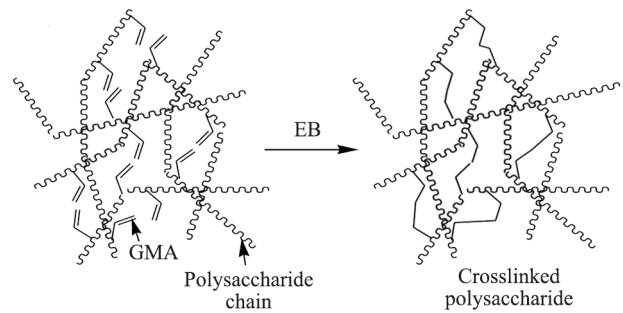
Fig. 3. IPN formation via electron beam irradiation of blended polymer solution.

پیوندهای هیدروژنی میان گروه‌های هیدروکسیل، کربوکسیل و آمین موجود در زنجیرهای پلیمری، برهم‌کنش الکتروستاتیک بین گروه‌های آمین و کربوکسیل باردار و نیز حبس فیزیکی زنجیرها بین هم وجود دارد. نمایی از این شبکه در شکل ۳ نشان داده شده است. در شکل ۴، محتوای ژل هیدروژل‌های تهیه‌شده آمده است. در محدوده مطالعه‌شده در طرح حاضر، واکنش شبکه‌ای شدن بر واکنش کاهش وزن مولکولی غلبه کرده و در نتیجه هیدروژل تشکیل شده است. در حالی که افزایش دُز تابش‌دهی از ۱۴ kGy به ۲۸ kGy موجب افزایش افزایش محتوای ژل شد، افزایش تابش‌دهی از ۲۸ kGy به ۵۶ kGy موجب تغییر معنی‌دار در محتوای ژل نشد. همچنین، در شرایط غلظت کل محلول پلیمری و دُز تابش‌دهی ثابت، ترکیب درصد پلیمرها اثر معنی‌داری بر محتوای ژل نداشت. افزایش محتوای ژل با افزایش دُز تابش‌دهی تا مقدار معین و ثابت ماندن یا رفتار کاهش‌ی پس از آن برای محلول بسیاری از پلیمرها گزارش شده است [۳، ۲۹، ۳۰]. پیش‌تر، دهقان‌نیری و همکاران [۲۹] با تابش‌دهی محلول آمیخته



شکل ۴- محتوای ژل و استحکام فشاری هیدروژل‌های تهیه‌شده با آمیخته‌های پلیمری.

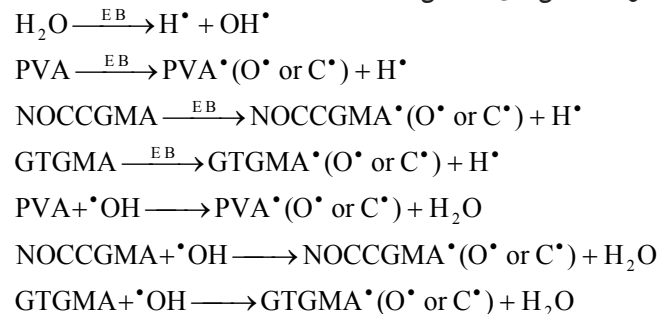
Fig. 4. Gel content and compressive strength of hydrogels prepared with polymer blends.



شکل ۲- طرح کلی واکنش شبکه‌ای شدن پلی‌ساکارید عامل‌دار شده با تابش‌دهی.

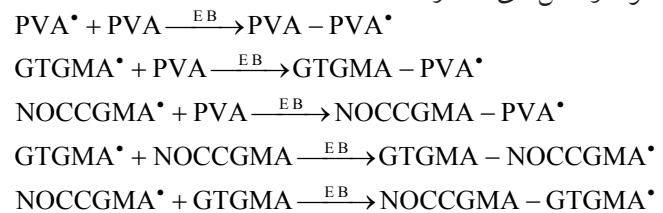
Fig. 2. The scheme of crosslinking reaction of functionalized polysaccharide by irradiation.

نمونه واکنش‌های آغازش:

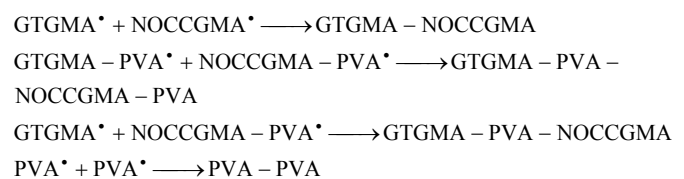


در واکنش‌های بالا PVA، پلی(وینیل الکل)؛ GT، کتیرا؛ NOCC، کربوکسی‌متیل کیتوسان؛ GTGMA، کتیرای عامل‌دار شده؛ NOCCGMA، کربوکسی‌متیل کیتوسان عامل‌دار و منظور از EB، باریکه الکترون است.

نمونه واکنش‌های انتشار:



نمونه واکنش‌های پایانش:



در نتیجه واکنش‌های بالا شبکه پلیمری درهم‌نفوذی شامل نقاط اتصال عرضی شیمیایی بین زنجیرهای مختلف پلیمری مختلف شکل می‌گیرد. در شبکه یادشده، نقاط اتصال عرضی فیزیکی به دلیل



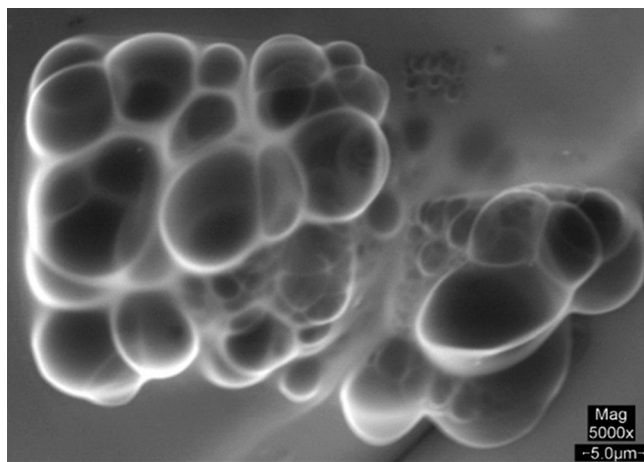
اکسیژن و نیز مهاجرت یاخته‌ای می‌تواند مؤثر باشد. در شکل ۵، تصویر FE-SEM از نمونه هیدروژل‌های ساخته‌شده از آمیخته فیزیکی پلیمرها نشان داده شده است. در حالی که در هیدروژل پلی(وینیل الکل) حباب‌هایی با قطر بیش از  $5 \mu\text{m}$  به صورت ناپیوسته و نایکناخت در هیدروژل شکل گرفته‌اند، در نمونه تولیدشده از تابش‌دهی آمیخته فیزیکی پلیمرها، حباب‌هایی با اندازه کوچک‌تر اما تعداد بیشتر به‌طور نسبتاً یکنواخت شکل گرفته‌اند. تشکیل حباب‌ها می‌تواند به تولید گاز هیدروژن در اثر تابش‌دهی محلول و تبخیر آب در اثر گرم‌شدن محلول در اثر تابش‌دهی نسبت داده شود.

مطابق تصویر میکروسکوپ الکترونی، در هیدروژل تهیه‌شده از آمیخته فیزیکی پلیمرها در غلظت کل ۵٪ وزنی-حجمی (نمونه P3T1N1) اندازه تخلخل‌ها،  $110 \pm 18 \mu\text{m}$  بود و تخلخل‌ها

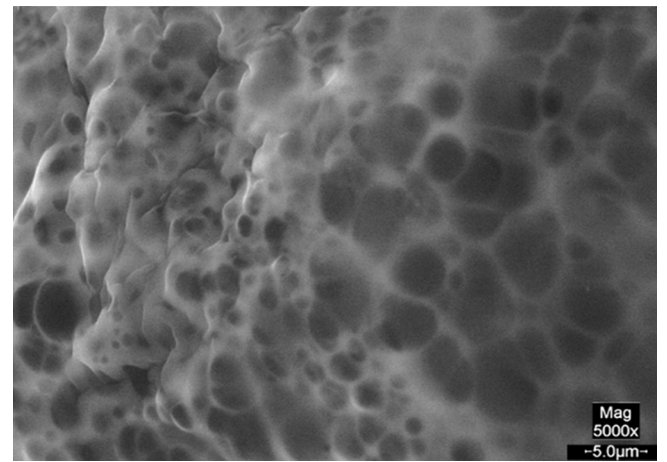
فیزیکی پلی(وینیل الکل و کتیرای) عامل‌دارشده با گروه تیرامینی، به این نتیجه رسیدند که محتوای ژل با افزایش دُز تابش‌دهی تا  $28 \text{ kGy}$  افزایش و پس از آن به تدریج کاهش می‌یابد. Zhao و همکاران [۱۸] گزارش دادند، در اثر تابش‌دهی محلول آمیخته فیزیکی کندروتین سولفات و هیالورونیک اسید عامل‌دارشده با گلیسیدیل متاکریلات و پلی(وینیل الکل)، با افزایش دُز تابش‌دهی از  $5 \text{ kGy}$  تا  $15 \text{ kGy}$ ، محتوای ژل هیدروژل افزایش و پس از آن کاهش یافته است. این پژوهشگران پدیده یادشده را به تخریب زنجیر پلی‌ساکاریدهای موجود در آمیخته با افزایش دُز تابش‌دهی نسبت دادند [۱۸].

### شکل‌شناسی هیدروژل

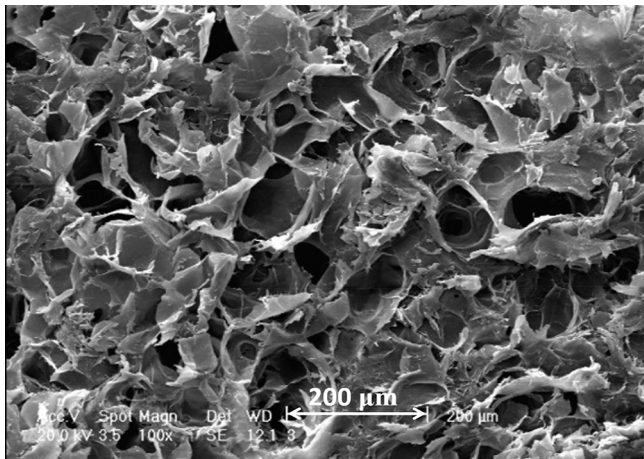
اندازه و شکل تخلخل‌های هیدروژل در فرایند انتقال مواد غذایی،



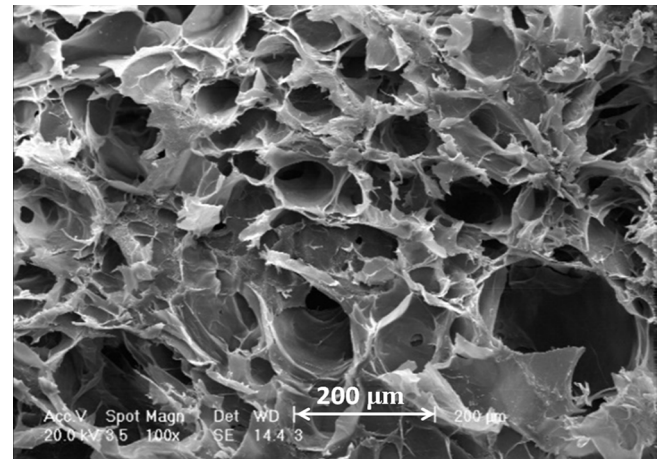
(a)



(b)



(c)



(d)

شکل ۵- تصاویر FE-SEM از نمونه‌های هیدروژل: P10 (a) و P8T1N1 (بزرگ‌نمایی ۵۰۰۰) و تصاویر SEM نمونه‌های هیدروژل P8T1N1 (c) و P3T1N1 (بزرگ‌نمایی ۱۰۰).

Fig. 5. FE-SEM images of hydrogel samples: (a) P10 and (b) P8T1N1 (magnification 5000) and SEM images of hydrogel samples (c) P8T1N1 and (d) P3T1N1 (magnification 50).

در شرایط اعمال فشار است. هنگامی که غضروف مفصلی طبیعی زیر تنش قابل ملاحظه‌ای است، به‌عنوان مثال، هنگام دویدن و پریدن، مدول فشاری به‌طور نمایی برای مقاومت در برابر تنش فشاری زیاد و جلوگیری از آسیب غضروف، افزایش می‌یابد. همان‌طور که در شکل ۴ دیده می‌شود، با افزودن کتیرای عامل‌دار به محلول پلی(وینیل الکل)، برای نمونه تولیدشده با دُز تابش‌دهی ۲۸ kGy، مقدار استحکام فشاری از ۴۴۷ kPa به ۷۸۰ kPa افزایش یافت. همچنین با افزودن کربوکسی‌متیل کیتوسان به ساختار یادشده، مقدار استحکام فشاری به ۱۴۱۴ kPa افزایش یافت. این مسئله نشان‌دهنده نقش مثبت تشکیل شبکه پلیمری درهم‌نفوذی با پلیمرهای زیستی بر استحکام فشاری هیدروژل است.

در شکل ۶ (c) نتایج استحکام فشاری در حالت چرخه‌ای برای نمونه P8T1N1 نشان داده شده است. این آزمایش در ۸ چرخه و با مقدار کرنش ۸۰٪ انجام شد. هیدروژل پس از اینکه زیر فشار قرار گرفته است، توانست به‌طور طبیعی به حالت اولیه بازگردد و دوباره در چرخه بعدی زیر فشار قرار گیرد. انطباق نسبی منحنی‌های رفت‌وبرگشتی متوالی، نشانه‌ای از قابلیت بازیابی سریع آسیب هیدروژل به‌صورت طبیعی و به‌عبارتی خاصیت بازیابی کشسان هیدروژل است. اختلاف سطح زیر منحنی در حالت اعمال بار و برداشتن بار اعمال‌شده، به‌عنوان انرژی اتلاف شناخته می‌شود. همان‌طور که در شکل ۶ (d) مشاهده می‌شود، مقدار اتلاف انرژی در چرخه‌های اول حدود ۰/۲۹ kPa و در چرخه‌های بعدی حدود ۰/۱۵ kPa بود. این مسئله نشان می‌دهد، فقط بخشی از پیوندهای فیزیکی به‌طور برگشت‌ناپذیر شکسته و به آسیب پایدار در هیدروژل منجر شده‌اند و مابقی هنگام برداشت فشار ترمیم شده‌اند.

مطابق نتایج آزمون بررسی رفتار رئولوژیکی هیدروژل‌ها (شکل ۶ (d))، در همه محدودده مطالعه‌شده بسامد، مقادیر مدول ذخیره برای هر دو هیدروژل P8T1N1 و P3T1N1 بیش از مدول اتلاف است و رفتار خطی مستقل از بسامد مشاهده می‌شود. مدول ذخیره برای هیدروژل‌های یادشده به‌ترتیب در محدوده ۱۰۰۰ و کمتر از ۱۰۰۰۰ Pa است. همچنین، مقدار فاکتور اتلاف برای هر دو هیدروژل در محدوده بسامد مطالعه‌شده، در بازه ۰/۰۳-۰/۰۴ تغییر کرده است. این مسئله نشان‌دهنده وجود اتصالات‌های عرضی کافی و استحکام مناسب هیدروژل‌های آمیخته‌ای پلی(وینیل الکل)-کتیرا-کربوکسی‌متیل کیتوسان است [۲۹]. مدول کشسانی هیدروژل تولیدشده با تابش‌دهی محلول آمیخته فیزیکی نانوسلولوز-ژلاتین [۳۷] و تابش‌دهی محلول آمیخته فیزیکی نانوذرات کیتوسان اصلاح‌شده با نانورس-پلی(وینیل الکل) [۳۰]، به‌ترتیب حدود ۸۰۰ Pa و کمتر از ۱۰۰۰۰ Pa گزارش شده است.

به‌شکل‌های مختلف در تمام هیدروژل توزیع شده بودند و نشانه‌ای از جدایی فاز در هیچ یک از تصاویر مشاهده نشد. اندازه تخلخل‌ها در نمونه P8T1N1 به  $75 \pm 21 \mu\text{m}$  کاهش یافت. تاکنون نظرهای متناقضی درباره اندازه مناسب تخلخل برای رشد و تمایز غضروفی ارائه شده است. به‌عنوان مثال، در مطالعه‌ای اشاره شده است که اندازه تخلخل در محدوده  $120-25 \mu\text{m}$  در داربست‌های تهیه‌شده از کلاژن و پلی‌یورتان برای غضروف‌زایی مناسب‌تر است، در حالی که در مطالعه دیگری، اندازه بهینه تخلخل برای رشد مناسب و ترشح ماتریس برون‌یاخته‌ای یاخته‌های کندروسیت رشدیافته روی داربست‌های تهیه‌شده از ژلاتین و کیتوسان،  $500-250 \mu\text{m}$  بیان شده است [۳۱-۳۳]. اندازه تخلخل هیدروژل تولیدشده با چرخه ذوب-انجماد از آمیخته فیزیکی محلول ۵٪ وزنی پلی(وینیل الکل) و محلول ۱/۵٪ وزنی آلژینات سدیم،  $62 \pm 16 \mu\text{m}$  گزارش شد. ادعا شده است، این اندازه در محدوده مناسب برای رشد و نفوذ یاخته‌های فیبروپلاست پوستی (محدوده مطلوب  $125-20 \mu\text{m}$ ) قرار دارد [۳۴].

### خواص مکانیکی

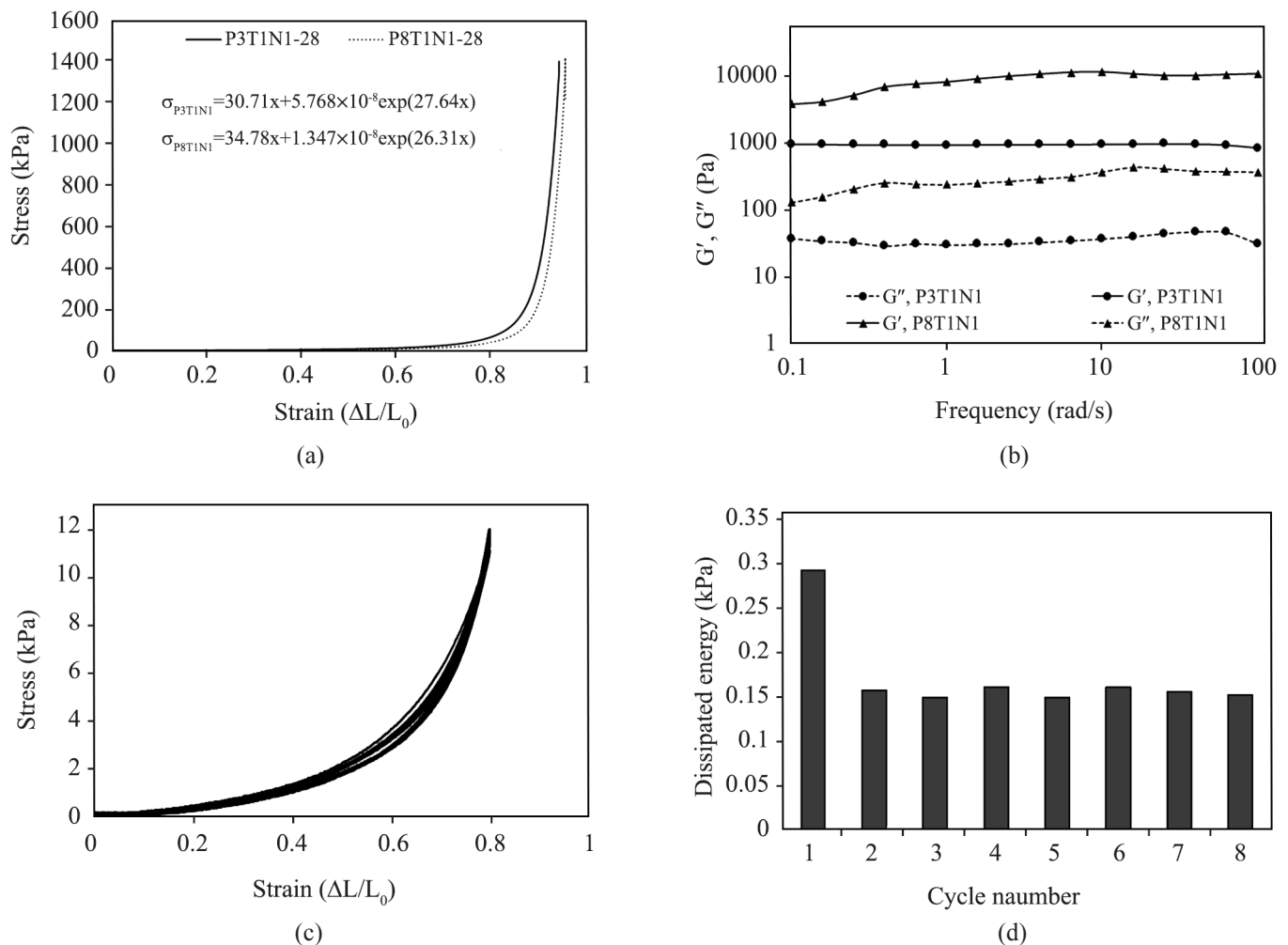
طراحی داربست‌های مهندسی بافت برای ترمیم غضروف باید به‌صورتی باشد که رفتار تحت تنش‌های فشاری، کششی و برشی را برای دستیابی به فعالیت مشابه غضروف طبیعی تقلید کند. داربست‌ها، افزون بر همراهی یاخته‌ها طی فرایند ترمیم بافت، با تقلید ویژگی‌های مکانیکی بافت، بر فعالیت و روند تمایز یاخته‌ها اثرگذارند [۲۰، ۳۵، ۳۶].

همان‌طور که در شکل ۶ (a) نشان داده شده است، رابطه بین تنش و کرنش در نمونه هیدروژل (P8T1N1 و P3T1N1) ساخته‌شده در این پژوهش، غیرخطی کشسان بوده و با رابطه نمایی قابل برازش است. هیدروژل ساخته‌شده مانند بسیاری دیگری از هیدروژل‌ها در تنش‌های ابتدایی نسبت به تغییر شکل مقاوم است و در ادامه سخت‌تر می‌شود و در نهایت به‌دلیل تغییر شکل دائمی، فرومی‌پاشد. هنگامی که بار اعمال می‌شود، زنجیرهای پلیمری هیدروژل تغییر جهت می‌یابند و آب آزاد از هیدروژل شروع به تخلیه می‌کند. همان‌طور که در شکل ۶ (a) مشاهده می‌شود، در کرنش‌های کم، به‌دلیل ساختار سه‌بعدی متخلخل و آب آزاد موجود در شبکه، هیدروژل دارای مدول فشاری (سختی) کمتری است. در کرنش‌های بیشتر، جهت زنجیرهای پلیمری تمایل به یکنواخت‌شدن دارند، در حالی که اصطکاک ناشی از جریان آب آزاد شروع به ایجاد اثر سخت‌کننده روی هیدروژل می‌کند و باعث افزایش مدول می‌شود. این رفتار به‌عنوان سخت‌شوندگی کرنشی تعریف می‌شود و نشان‌دهنده تغییر شکل غیرخطی هیدروژل‌ها

## رفتار تورمی

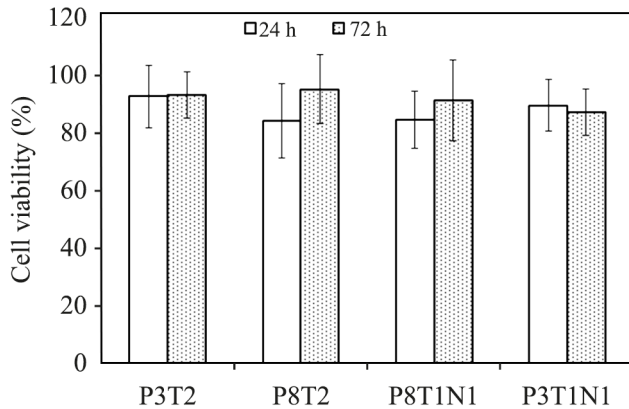
به واسطه تفاوت فشار اسمزی و قدرت یونی دو محیط، به‌طور کلی مولکول‌های آب به سمت داخل هیدروژل حرکت می‌کنند. این فرایند تا زمان رسیدن به تعادل ترمودینامیکی میان نیروهای پیش‌برنده تورم (فشار اسمزی، قدرت یونی، آب‌پوشی زنجیرهای پلیمری) و نیروهای مقاوم به تورم (اتصال‌های عرضی) ادامه می‌یابد. در ادامه تخریب زنجیرهای پلیمری و نقاط اتصال عرضی می‌تواند به بزرگ‌تر شدن فضا برای نفوذ آب و افزایش درجه تورم هیدروژل منجر شود تا جایی که هیدروژل به‌طور کامل فروپاشیده و در محیط حل شود [۳۸]. در شکل ۷، نمودار رفتار تورمی هیدروژل‌های تهیه‌شده از تابش‌دهی آمیخته فیزیکی پلیمرهای پلی(وینیل الکل)-کتیرای عامل‌دار-کربوکسی متیل کیتوسان عامل‌دار در بافر فسفات و

رفتار تورم-تخریب برون‌تنی در محیط آبی به‌عنوان معیاری از قدرت جذب آب و پایداری شیمیایی هیدروژل، یکی از ویژگی‌های مهم هیدروژل‌هاست که در مهندسی بافت معمولاً ارزیابی می‌شود. ظرفیت جذب آب و رفتار تورمی هیدروژل، به عوامل بسیاری از جمله نوع پلیمر و تعداد گروه‌های آب‌دوست روی زنجیر پلیمر، چگالی شبکه، ماهیت حلال، قدرت یونی و چگونگی برهم‌کنش بین پلیمر و حلال بستگی دارد [۳۸]. برخی پژوهشگران فرایند جذب آب در هیدروژل‌ها را شامل سه مرحله نفوذ حلال (آب) در شبکه پلیمری، آسایش زنجیرهای پلیمری و توسعه شبکه پلیمری در توده حلال دانسته‌اند [۳۹]. وقتی هیدروژل در محیط آبی قرار می‌گیرد،



شکل ۶- (a) رفتار تنش-کرنش و (b) رفتار رئولوژیکی نمونه‌های P3T1N1 و P8T1N1 و (c) نمودار تنش-کرنش و (d) مقدار اتلاف انرژی در چرخه‌های رفت‌وبرگشتی برای نمونه P8T1N1.

Fig. 6. (a) Stress-strain behavior and (b) rheological behavior of P3T1N1 and P8T1N1 hydrogels, (c) stress-strain curve, and (d) dissipated energy in repeated compressive cycles for P8T1N1.



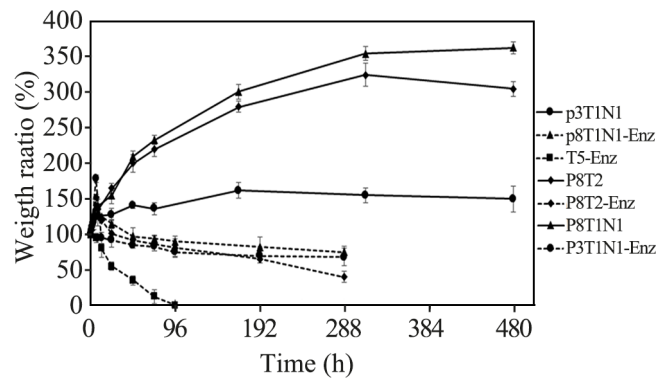
شکل ۸- درصد یاخته‌های زنده‌مانده پس از ۲۴ و ۷۲ h در معرض عصاره هیدروژل.

Fig. 8. The percent of viable cells after 24 and 72 h exposure to hydrogel extract.

که مشاهده می‌شود، برای همه نمونه‌های مطالعه‌شده شامل P3T2، P8T2، P3T1N1 و P8T1N1، بیش از ۸۵٪ یاخته‌های مزانشیمی پس از ۲۴ و ۷۲ h از کشت در مجاورت عصاره هیدروژل، زنده مانده‌اند. تفاوت میانگین زنده‌مانی در موارد مطالعه‌شده از نظر آماری معنی‌دار نیست ( $P < 0.05$ ) و میانگین زنده‌مانی یاخته‌ها بیش از ۸۵٪ بوده است. این نتایج، می‌تواند نشان‌دهنده زیست‌سازگاری هیدروژل‌های تولیدشده در این پژوهش باشد. Zhao و همکاران [۱۸] مقدار زنده‌مانی یاخته‌های کراتونوسیت انسانی کشت داده‌شده در معرض عصاره استخراجی هیدروژل آمیخته‌ای پلی(وینیل الکل)-هیالورونیک اسید-کندروتین سولفات تولیدشده با روش تابش‌دهی گاما را پس از ۴۸ h گرم‌خانه‌گذاری بیش از ۹۲٪ گزارش دادند. دهقان‌نیری و همکاران [۲۹] نیز در مطالعه‌ای نشان دادند، زنده‌مانی یاخته‌های مزانشیمی گرفته‌شده از مغز استخوان خرگوش که در مجاورت عصاره استخراجی از هیدروژل آمیخته‌ای پلی(وینیل الکل)-کتیرای عامل‌دارشده با تیرامین تولیدشده با استفاده از تابش‌دهی الکترونی، قرار گرفته‌اند، پس از ۲۴، ۷۲ و ۱۲۰ روز گرم‌خانه‌گذاری بیش از ۹۰٪ بوده است.

### نتیجه‌گیری

در این مطالعه، با هدف تهیه هیدروژل بر پایه پلیمرهای طبیعی با استفاده از تابش‌دهی، عامل‌دارکردن با گلیسیدیل متاکریلات و آمیخته‌سازی با پلی(وینیل الکل) ارزیابی شد. عامل‌دارکردن با گلیسیدیل متاکریلات،



شکل ۷- رفتار تورمی هیدروژل‌ها در بافر نمکی فسفات‌ی و محلول آنزیم پکتیناز.

Fig. 7. Swelling behavior of hydrogels in phosphate buffered saline (PBS) and pectinase enzyme solutions.

در محلول آنزیم پکتیناز نشان داده شده است. با مقایسه هیدروژل تهیه‌شده در غلظت کل ۵ و ۱۰٪ وزنی-حجمی پلیمرها، مشخص است، هیدروژل تهیه‌شده با غلظت بیشتر محلول پلیمری از همان ساعت‌های ابتدایی درجه تورم زیادتری داشته است. هر چند در حالت غلظت بیشتر پلیمر، کاهش مقدار تخلخل و افزایش چگالی شبکه می‌تواند موجب کاهش سرعت و مقدار تورم شود، افزایش سرعت و مقدار تورم در غلظت‌های بیشتر پلیمر می‌تواند به وجود تعداد بیشتری گروه مستعد جذب آب در هیدروژل در غلظت‌های بیشتر نسبت داده شود. همچنین، افزودن کربوکسی‌متیل کیتوسان به ساختار، موجب افزایش بسیار کمی در مقدار تورم در روزهای ششم به بعد در آزمون تورم شد.

همان‌طور که در نمودارهای زیست‌تخریب هیدروژل‌ها در شکل ۷ دیده می‌شود، در مجاورت آنزیم در زمان کمتر از سه روز، هیدروژل تولیدشده از کتیرا کاملاً تخریب شده است که به عملکرد آنزیم پکتیناز در شکستن پیوندهای بتا بین مونوساکاریدهای کتیرا برمی‌گردد. همچنین، سرعت تخریب سایر نمونه‌ها در مقایسه با تخریب شیمیایی بدون وجود آنزیم بیشتر است. این مسئله می‌تواند نشانه‌ای از زیست‌تخریب‌پذیری هیدروژل‌های ساخته‌شده باشد.

### سمیت عصاره استخراجی هیدروژل روی یاخته‌ها

در این آزمون، برای بررسی سمیت یاخته‌ای هیدروژل در شرایط آزمایشگاهی (برون‌تنی)، مطابق روش پیشنهادی Zhao و همکاران [۱۸]، یاخته‌های مزانشیمی در مجاورت عصاره استخراجی از هیدروژل قرار گرفتند و آزمون MTT برای محاسبه مقدار زنده‌مانی یاخته‌ای انجام شد. نتایج آزمون در شکل ۸ نشان داده شده است. همان‌طور

۹۳٪ و استحکام فشاری ۱۴۱۴ kPa بود. با توجه به نتایج آزمون‌های یاخته‌ای، بیش از ۸۵٪ یاخته‌های مزانشیمی پس از ۲۴ و ۷۲ h از کشت در مجاورت عصاره استخراجی از هیدروژل، زنده ماندند. با توجه به نتایج یادشده، هیدروژل ساخته شده در این پژوهش می‌تواند به‌عنوان گزینه مناسب برای ارزیابی بیشتر در مهندسی بافت استفاده شود.

موجب شبکه‌ای شدن محلول پلیمرهای عامل‌دار در مواجهه با بارکده الکترون شد. با تابش‌دهی آمیخته فیزیکی پلیمرها، هیدروژلی با محتوای ژل، رفتار تورمی و استحکام مکانیکی مناسب به‌دست آمد. هیدروژل ساخته شده با غلظت ۸٪ پلی(وینیل الکل)، ۱٪ کتیرای عامل‌دار و ۱٪ کربوکسی‌متیل کیتوسان عامل‌دار، دارای محتوای ژل

## مراجع

- Soler D.M., Rodríguez Y., Correa H., Moreno A., and Carrizales L., Pilot Scale-up and Shelf Stability of Hydrogel Wound Dressings Obtained by Gamma Radiation, *Rad. Phys. Chem.*, **81**, 1249-1253, 2012.
- Choi J., Pant B., Lee C., Park M., Park S.-J., and Kim H.-Y., Preparation and Characterization of Eggshell Membrane/PVA Hydrogel via Electron Beam Irradiation Technique, *J. Ind. Eng. Chem.*, **47**, 41-45, 2016.
- Tavakol M., Dehshiri S., and Vasheghani-Farahani E., Electron Beam Irradiation Crosslinked Hydrogels Based on Tyramine Conjugated Gum Tragacanth, *Carbohydr. Polym.*, **152**, 504-509, 2016.
- Ajji Z., Mirjalili G., Alkhatib A., and Dada H., Use of Electron Beam for the Production of Hydrogel Dressings, *Rad. Phys. Chem.*, **77**, 200-202, 2008.
- Sahraei S.S., Kalthor N., and Sheykhasan M., Application of Scaffolds in Cartilage Tissue Engineering: A Review Paper, *Razi J. Med. Sci.*, **26**, 42-55, 2019.
- Tavakol M., Vasheghani-Farahani E., Soleimani M., Hashemi-Najafabadi S., and Hajizadeh A., Preparation of an Enzyme Catalyzed In-Situ Forming Hydrogel Based on Chemically Modified Tragacanth for Cartilage Tissue Engineering, *Cell. Molecul. Res.*, **32**, 297-310, 2019.
- Dehghan-Niri M., Vasheghani-Farahani E., Eslaminejad M.B., Tavakol M., and Bagheri F., Preparation of Gum Tragacanth/Poly(vinyl alcohol)/Halloysite Hydrogel Using Electron Beam Irradiation with Potential for Bone Tissue Engineering, *Carbohydr. Polym.*, **305**, 120548, 2023.
- Tavakol M. and Mohammadifar M.A., A Review on Gum Tragacanth and Its Biomedical Applications, *Iran. J. Chem. Chem. Eng. (Persian)*, **36**, 1-20, 2017.
- Tavakol M., Vasheghani-Farahani E., Soleimani M., Mohammadifar M.A., Hashemi-Najafabadi S., and Hafizi M., Synthesis and Characterization of an Enzyme Mediated In-Situ Forming Hydrogel Based on Gum Tragacanth for Biomedical Applications, *Iran. J. Biotech.*, **12**, 15811, 2013.
- Tavakol M., Vasheghani-Farahani E., Mohammadifar M.A., Soleimani M., and Hashemi-Najafabadi S., Synthesis and Characterization of an In-Situ Forming Hydrogel Using Tyramine Conjugated High Methoxyl Gum Tragacanth, *J. Biomater. Appl.*, **30**, 1016-1025, 2016.
- Fattahi A., Petrini P., Munarin F., Shokoohinia Y., Golozar M.A., Varshosaz J., and Tanzi M.C., Polysaccharides Derived from Tragacanth as Biocompatible Polymers and Gels, *J. Appl. Polym. Sci.*, **129**, 2092-2102, 2013.
- Haeri S.M.J., Sadeghi Y., Salehi M., Farahani R.M., and Mohsen N., Osteogenic Differentiation of Human Adipose-Derived Mesenchymal Stem Cells on Gum Tragacanth Hydrogel, *Biologicals*, **44**, 123-128, 2016.
- Fayazzadeh E., Rahimpour S., Ahmadi S.M., Farzampour S., Anvari M.S., Boroumand M.A., and Ahmadi S.H., Acceleration of Skin Wound Healing with Tragacanth (Astragalus) Preparation: An Experimental Pilot Study in Rats, *Acta Med. Iran.*, **52**, 3-8, 2014.
- Cai K., Yao K., Li Z., Yang Z., and Li X., Rat Osteoblast Functions on the O-Carboxymethyl Chitosan-Modified Poly(D,L-lactic acid) Surface, *J. Biomat. Sci. Polym. Ed.*, **12**, 1303-1315, 2001.
- Fattahi R., Soleimani M., Khani M.-M., Rasouli M., and Hosseinzadeh S., A Three-Dimensional Structure with Osteoconductive Function Made of O-Carboxymethyl Chitosan Using Aspirin as a Cross-Linker, *Int. J. Polym. Mater. Polym. Biomater.*, **73**, 1-17, 2023.
- Firoozi M., Entezam M., Masaeli E., Ejeian F., and Nasr-Esfahani M.H., Physical Modification Approaches to Enhance Cell Supporting Potential of Poly(vinyl alcohol)-Based Hydrogels, *J. Appl. Polym. Sci.*, **139**, 51485, 2022.
- Fang J., Li P., Lu X., Fang L., Lv X., and Ren F., A Strong,

- Tough, and Osteoconductive Hydroxyapatite Mineralized Polyacrylamide/Dextran Hydrogel for Bone Tissue Regeneration, *Acta Biomater.*, **88**, 503-513, 2019.
18. Zhao L., Gwon H.-J., Lim Y.-M., Nho Y.-C., and Kim S.Y., Hyaluronic Acid/Chondroitin Sulfate-Based Hydrogel Prepared by Gamma Irradiation Technique, *Carbohydr. Polym.*, **102**, 598-605, 2014.
  19. Yoshii F., Zhao L., Wach R.A., Nagasawa N., Mitomo H., and Kume T., Hydrogels of Polysaccharide Derivatives Crosslinked with Irradiation at Paste-Like Condition, *Nucl. Instrum. Meth. B.*, **208**, 320-324, 2003.
  20. Stammen J.A., Williams S., Ku D.N., and Guldberg R.E., Mechanical Properties of a Novel PVA Hydrogel in Shear and Unconfined Compression, *Biomaterials*, **22**, 799-806, 2001.
  21. Karvinen J., Koivisto J., Jönkkäri I., and Kellomäki M., The Production of Injectable Hydrazone Crosslinked Gellan Gum-Hyaluronan-Hydrogels with Tunable Mechanical and Physical Properties, *J. Mech. Behav. Biomed. Mater.*, **71**, 383-391, 2017.
  22. Kamiloglu S., Sari G., Ozdal T., and Capanoglu E., Guidelines for Cell Viability Assays, *Food Frontiers*, **1**, 332-349, 2020.
  23. Reis A.V., Cavalcanti O.A., Rubira A.F., and Muniz E.C., Synthesis and Characterization of Hydrogels Formed from a Glycidyl Methacrylate Derivative of Galactomannan, *Int. J. Pharm.*, **267**, 13-25, 2003.
  24. Rashid T.U., Shamsuddin S.M., Khan M.A., and Rahman M.M., Evaluation of Fat Binding Capacity of Gamma Irradiated Chitosan Extracted from Prawn Shell, *Soft Mater.*, **12**, 262-267, 2014.
  25. Khoylou F. and Naimian F., Radiation Synthesis of Superabsorbent Polyethylene Oxide/Tragacanth Hydrogel, *Rad. Phys. Chem.*, **78**, 195-198, 2009.
  26. Teimouri S., Abbasi S., and Sheikh N., Effects of Gamma Irradiation on Some Physicochemical and Rheological Properties of Persian Gum and Gum Tragacanth, *Food Hydrocoll.*, **59**, 9-16, 2016.
  27. Giammona G., Pitarresi G., Cavallaro G., and Spadaro G., New Biodegradable Hydrogels Based on an Acryloylated Polyaspartamide Cross-Linked by Gamma Irradiation, *J. Biomater. Sci. Polym. Ed.*, **10**, 969-987, 1999.
  28. Singh B., Varshney L., Francis S., and Rajneesh, Designing Tragacanth Gum Based Sterile Hydrogel by Radiation Method for Use in Drug Delivery and Wound Dressing Applications, *Int. J. Biol. Macromol.*, **88**, 586-602, 2016.
  29. Dehghan-Niri M., Vasheghani-Farahani E., Eslaminejad M., Tavakol M., and Bagheri F., Physicomechanical, Rheological and In-Vitro Cytocompatibility Properties of the Electron Beam Irradiated Blend Hydrogels of Tyramine Conjugated Gum Tragacanth and Poly(vinyl alcohol), *Mater. Sci. Eng. C*, **114**, 111073, 2020.
  30. Entezam M., Ehghaghiyan A., Sedeh N.N., Jafari S.H., and Khonakdar H.A., Physicomechanical and Antimicrobial Characteristics of Hydrogel Based on Poly(vinyl alcohol): Performance Improvement via Inclusion of Chitosan-Modified Nanoclay, *J. Appl. Polym. Sci.*, **136**, 47444, 2019.
  31. Stenhamre H., Nannmark U., Lindahl A., Gatenholm P., and Brittberg M., Influence of Pore Size on the Redifferentiation Potential of Human Articular Chondrocytes in Poly(urethane urea) Scaffolds, *J. Tissue Eng. Regen. Med.*, **5**, 578-88, 2011.
  32. Lien S.-M., Ko L.-Y., and Huang T.-J., Effect of Pore Size on ECM Secretion and Cell Growth in Gelatin Scaffold for Articular Cartilage Tissue Engineering, *Acta Biomater.*, **5**, 670-679, 2008.
  33. Matsiko A., Gleeson J., and O'Brien F., Scaffold Mean Pore Size Influences Mesenchymal Stem Cell Chondrogenic Differentiation and Matrix Deposition, *Tissue Eng. A*, **21**, 3-14, 2014.
  34. Bahadoran M., Shamloo A., and Nokooran Y.D., Development of a Polyvinyl Alcohol/Sodium Alginate Hydrogel-Based Scaffold Incorporating bFGF-Encapsulated Microspheres for Accelerated Wound Healing, *Sci. Rep.*, **10**, 7342, 2020.
  35. Lee K.Y. and Mooney D.J., Hydrogels for Tissue Engineering. *Chem. Rev.*, **101**, 1869-1880, 2001.
  36. Kumar A. and Han S.S., PVA-Based Hydrogels for Tissue Engineering: A Review, *Int. J. Polym. Mater. Polym. Biomater.*, **66**, 159-182, 2017.
  37. Wan Ishak W.H., Rosli N.A., Ahmad I., Ramli S., and Mohd Amin M.C.I., Drug Delivery and In-Vitro Biocompatibility Studies of Gelatin-Nanocellulose Smart Hydrogels Cross-Linked with Gamma Radiation, *J. Mater. Res. Technol.*, **15**, 7145-7157, 2021.
  38. Vasheghani-Farahani E., Vera J.H., Cooper D.G., and Weber M.E., Swelling of Ionic Gels in Electrolyte Solutions, *Ind. Eng. Chem. Res.*, **29**, 554-560, 1990.
  39. Yoshida R., Okuyama Y., Sakai K., Okano T., and Sakurai Y., Sigmoidal Swelling Profiles for Temperature-Responsive Poly(N-isopropylacrylamide-co-butyl methacrylate) Hydrogels, *J. Membr. Sci.*, **89**, 267-277, 1994.