Review article

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

Iran. J. Polym. Sci. Technol. (Persian),
Vol. 33, No. 2, 95-113
June-July 2020
ISSN: 1016-3255
Online ISSN: 2008-0883
DOI: 10.22063/JIPST.2020.1727

Synthesis Methods of In Situ Forming Injectable Hydrogels and Their Applications in Tissue Engineering: A Review

Ali Moradian[1], Mojgan Zandi[1*], Morteza Behzadnasab[2], and Mohamad Pezeshki-Modaress[3]

1. Department of Biomaterials, Faculty of Polymer Science, 2. Departments of Colour, Resin and Surface Coatings, Faculty of Polymer Processing; Iran Polymer and Petrochemical Institute, P.O. Box 14975-112 Tehran, Iran
3. Burn Research Center, Iran University of Medical Sciences, P.O. Box 14665-354, Tehran, Iran

Received: 25 December 2019, accepted: 21 April 2020

ABSTRACT

Tissue engineering is a triad involves three components of different types of cells, growth factor, small biomolecules and scaffold for the purpose of tissue restore, repair and regeneration. In tissue engineering, attachment, growth, proliferation and differentiation of cells require careful control of external factors such as the physical properties of the scaffold as extra cellular matrix (ECM), type and amount of biologically active molecules like small biomolecules, peptides and proteins. Therefore, the interaction of the synthetic and natural scaffolds with the cells must reflect the cellular microenvironment in the body. In this study, we describe a variety of in situ forming injectable hydrogels synthesis with the medical application and tissue regeneration that are crosslinked by chemical bonding or physical interactions. These types of hydrogels have attracted a lot of attention in tissue engineering applications because they can easily transfer the cells or delivered the biomolecules to the damaged tissue. Lack of severe toxicity, minimal injury and pain during surgery could be the other advantages of the injectable hydrogels. A wide variety of chemical methods have been used to crosslink the injectable hydrogels such as click chemistry, Michael addition, Schiff-base, enzymatic reaction and, etc. Some hydrogels can also be cross-linked using physical interactions such as ionic interactions, hydrogen bonding, supramolecular interaction, etc., without external factors in the physiological conditions of the body. In this study, in addition to various methods of synthesis, the practical aspects of hydrogels in regenerative medicine and their achievements in tissue engineering are discussed.

Keywords:
tissue engineering,
scaffold,
injectable hydrogel,
chemical bonding,
physical interaction

(*)To whom correspondence should be addressed.
E-mail: m.zandi@ippi.ac.ir

Please cite this article using:
Moradian A., Zandi M., Behzadnasab M., and Pezeshki-Modaress M., Synthesis Methods of In Situ Forming Injectable Hydrogels and Their Applications in Tissue Engineering: A Review, *Iran. J. Polym. Sci. Technol. (Persian)*, **33**, 95-113, 2020.

مقاله مروری

مروری بر روش‌های تهیه هیدروژل‌های تزریق‌پذیر تشکیل‌شونده درجا و کاربردهای آن‌ها در مهندسی بافت

قابل دسترس در نشانی: http://jips.ippi.ac.ir

مجله علوم و تکنولوژی پلیمر،
سال سی‌وسوم، شماره ۲،
صفحه ۱۱۳-۹۵، ۱۳۹۹
ISSN: 1016-3255
Online ISSN: 2008-0883
DOI: 10.22063/JIPST.2020.1727

علی مرادیان[۱]، مژگان زندی[۱*]، مرتضی بهزادنسب[۲]، محمد پزشکی مدرس[۳]

تهران، پژوهشگاه پلیمر و پتروشیمی ایران، صندوق پستی ۱۱۲-۱۴۹۷۵:
۱- پژوهشکده علوم پلیمر، گروه پلیمرهای زیست‌سازگار، ۲- پژوهشکده فرایند پلیمر، گروه رنگ، رزین و پوشش‌های سطح
۳- تهران، دانشگاه علوم پزشکی ایران، مرکز تحقیقات سوختگی، صندوق پستی ۳۵۴-۱۴۶۶۵

دریافت: ۱۳۹۸/۱۰/۴، پذیرش: ۱۳۹۹/۲/۲

چکیده

مهندسی بافت، مثلثی با سه ضلع از انواع مختلف سلول‌ها، زیست‌مولکول‌های کوچک، عامل رشد و داربست با هدف بازیابی، ترمیم و بهبود عملکرد بافت است. در مهندسی بافت، چسبندگی، رشد، تکثیر و تمایز سلول‌ها نیازمند کنترل دقیق عامل‌های بیرونی نظیر خواص فیزیکی داربست به‌عنوان ماتریس برون‌سلولی (ECM)، نوع و مقدار مولکول‌های فعال زیستی مانند زیست‌مولکول‌های کوچک، پپتیدها و پروتئین‌هاست. بنابراین برهم‌کنش داربست‌های سنتزی و طبیعی با سلول‌ها، باید بازتابی از ریزمحیط سلولی در بدن باشد. در این مطالعه، روش‌های مختلف تهیه هیدروژل‌های تزریق‌پذیر تشکیل‌شونده درجا با کاربرد پزشکی و بازسازی بافت شرح داده شده که با پیوندهای شیمیایی یا برهم‌کنش‌های فیزیکی شبکه‌ای می‌شوند. این نوع هیدروژل‌ها در کاربردهای مهندسی بافت بسیار جالب توجه هستند. زیرا به‌آسانی می‌توانند سلول‌ها یا زیست‌مولکول‌ها را به بافت آسیب‌دیده انتقال دهند. نبود سمیت شدید و وجود حداقل جراحت و درد هنگام جراحی در بیمار از برتری‌های هیدروژل‌های تزریق‌شونده است. روش‌های شیمیایی متنوعی مانند شیمی کلیک، افزایش Michael، باز شیف و واکنش آنزیمی برای شبکه‌ای‌کردن هیدروژل‌های تزریق‌پذیر به‌کار گرفته شده است. برخی از هیدروژل‌ها را می‌توان با برهم‌کنش‌های فیزیکی نظیر برهم‌کنش‌های یونی، پیوند هیدروژنی و برهم‌کنش ابرمولکولی بدون وجود عامل‌های بیرونی در شرایط فیزیولوژی بدن تهیه کرد. در این مطالعه، افزون بر روش‌های مختلف تهیه، جنبه‌های کاربردی این هیدروژل‌ها در پزشکی ترمیمی و دستاوردهای حاصل از آن در مهندسی بافت بحث می‌شود.

واژه‌های کلیدی

مهندسی بافت،
داربست،
هیدروژل تزریق‌پذیر،
پیوند شیمیایی،
برهم‌کنش فیزیکی

* مسئول مکاتبات، پیام‌نگار:
m.zandi@ippi.ac.ir

فهرست

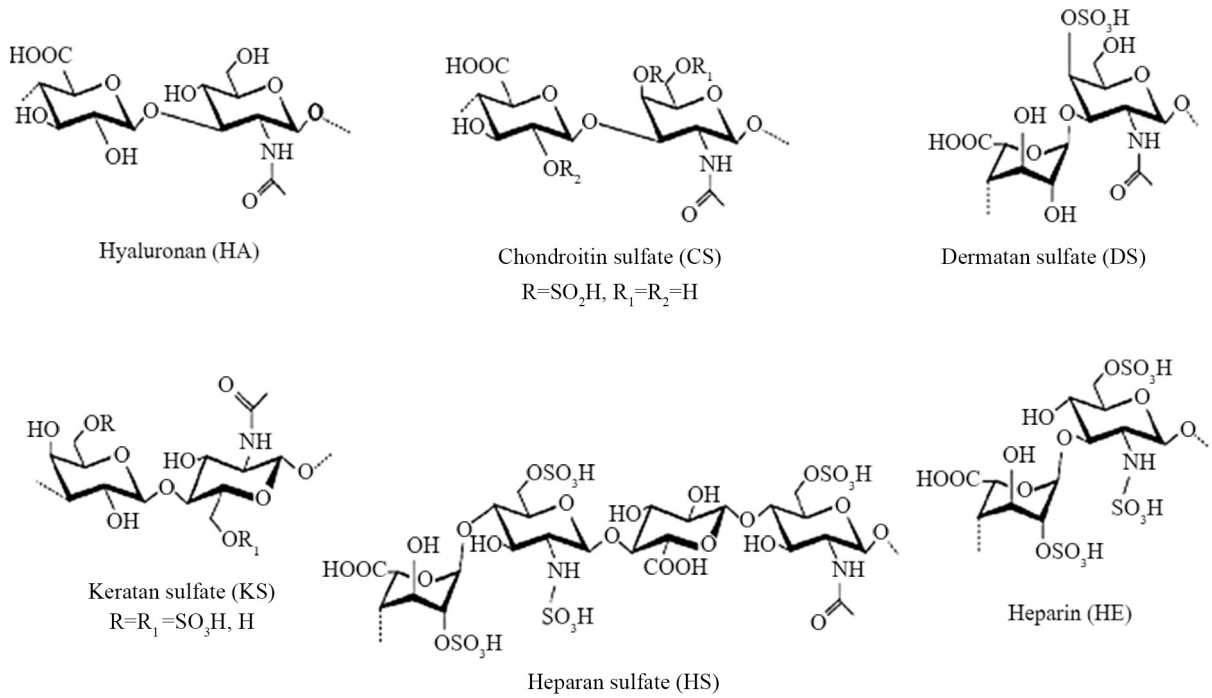
۱- مقدمه ۹۷
۲- هیدروژل‌های تزریق‌پذیر تشکیل‌شونده درجا ۹۹
۲-۱ شبکه‌ای‌شده با اتصال‌های شیمیایی ۹۹
۲-۱-۱ شبکه‌ای‌شده با واکنش افزایشی Michael ۹۹
۲-۱-۲ شبکه‌ای‌شده با واکنش شیمی کلیک ۱۰۰
۲-۱-۳ شبکه‌ای‌شده با شیمی باز شیف ۱۰۰
۲-۱-۴ شبکه‌ای‌شده با آنزیم ۱۰۱
۲-۱-۵ شبکه‌ای‌شده با نور ۱۰۱
۲-۲ هیدروژل‌های تزریق‌پذیر شبکه‌ای‌شده با برهم‌کنش‌های فیزیکی ۱۰۲
۲-۲-۱ شبکه‌ای‌شده با برهم‌کنش‌های یونی ۱۰۲
۲-۲-۱-۱ هیدروژل تزریق‌پذیر بر پایه آلژینات ۱۰۲
۲-۲-۱-۲ هیدروژل تزریق‌پذیر بر پایه کیتوسان ۱۰۳
۲-۲-۲ شبکه‌ای‌شده با دما و pH ۱۰۳
۲-۲-۲-۱ هیدروژل تزریق‌پذیر پاسخگو به دما ۱۰۳
۲-۲-۲-۲ هیدروژل تزریق‌پذیر پاسخگو به دو محرک ۱۰۳
۲-۲-۳ هیدروژل تزریق‌پذیر ابرمولکولی خودگردایشی ۱۰۴
۲-۲-۳-۱ با اتصال‌های مکمل ۱۰۴
۲-۲-۴ هیدروژل‌های تزریق‌پذیر خودگردایشی با برهم‌کنش میزبان-مهمان ۱۰۴
۲-۲-۴-۱ سیکلودکسترین ۱۰۴
۲-۲-۴-۲ کیوکاربیتوریل ۱۰۵
۳- کاربردهای هیدروژل‌های تزریق‌پذیر ۱۰۵
۳-۱ پزشکی ترمیمی ۱۰۵
۳-۲ سلول‌درمانی ۱۰۶
۳-۳ مهندسی بافت ۱۰۷
۴- نتیجه‌گیری ۱۰۸
۵- مراجع ۱۰۸

۱- مقدمه

مهندسی بافت را می‌توان شاخه‌ای از مهندسی پزشکی دانست که با الگوبرداری از ساختارها و برهم‌کنش‌های بین‌سلولی در ریزمحیط سلول، در راستای بهبود، بازگرداندن یا جایگزینی بافت و اندام آسیب‌دیده عمل می‌کند. در این علم میان‌رشته‌ای پژوهشگران می‌کوشند با جایگزینی اندام آسیب‌دیده با اندام‌های مصنوعی یا ترمیم از راه سلول‌درمانی با روش‌هایی همچون تزریق، اتصال یا کاشت سلول در داخل داربست تهیه‌شده برای قرارگیری در محل آسیب، امکان ترمیم و بازسازی بافت یا اندام مدنظر را مهیا کنند. به‌طور کلی، رفتار ترمیمی سلول‌ها تابع برهم‌کنش‌های فیزیکی و شیمیایی میان سه متغیر سلول، عامل رشد و داربست است. بنابراین، با تمرکز روی هر یک از این عامل‌ها و مهندسی روابط موجود می‌توان رفتار مدنظر را به سلول‌ها القا کرد و به نتایج مطلوب دست یافت [۱]. سلول‌ها در ساختارهای طبیعی نیازمند محیطی مناسب برای استقرار، رشد و تکثیر هستند تا افزون بر فراهم‌کردن بستری برای قرارگیری، امکان ارتباط شیمیایی با محیط اطراف در راستای جذب مواد غذایی، واجذب مواد زاید و دریافت و پیام‌رسانی سلولی (cell signaling) را نیز فراهم کنند. در زیست‌شناسی به این ساختارهای طبیعی، ماتریس برون‌سلولی (extra cellular matrix, ECM) گفته می‌شود که در سال‌های اخیر مطالعات زیادی درباره خواص آن به منظور بهینه‌سازی ساختار برای استقرار سلول و ایجاد محیط مناسب برای رشد انجام شده است [۲]. ECM به‌طور طبیعی شامل بستری از پروتئین‌های رشته‌ای و گلیکوزآمینوگلیکان‌ها (GAGs) است که پیرامون سلول‌ها را دربرمی‌گیرد. GAGها پلی‌ساکاریدهای خطی اغلب سولفات‌دار، متشکل از واحدهای دی‌ساکاریدی هستند. این واحدهای دی‌ساکاریدی از هگزوزآمین، مانند N-استیل‌گلوکوزآمین یا گالاکتوزآمین و اورونیک اسید مانند گلوکورونیک اسید یا گالاکتوز تشکیل شده‌اند [۳]. ساختار شیمیایی خانواده GAGها در شکل ۱ نشان داده شده است.

از جمله GAGهای متداول در ECM می‌توان به هپاران سولفات، کندرویتین سولفات و کراتان سولفات‌ها اشاره کرد که معمولاً به پروتئین‌های ECM متصل می‌شوند و ترکیبات پروتئوگلیکان‌ها را ایجاد می‌کنند. هیالورونیک اسید نمونه GAG بدون سولفات است که به پروتئین در ECM اتصال ندارد [۵]. همان‌طور که گفته شد، تکثیر و تمایز هر سلول به برهم‌کنش سلول-سلول، خواص فیزیکی ECM و عامل‌های رشد وابسته است [۶]. به‌طور کلی تکامل سلول در بافت حیوانی به ECM وابسته است. بنابراین، در روش‌های نوین مهندسی بافت با الگوبرداری از رفتارهای طبیعی سلول، ساختار مناسب ECM تقلید و شبیه‌سازی می‌شود. با توجه به نقش مهم ECM در پیشبرد روند ترمیم، ساخت داربست‌هایی از جنس ترکیبات ECM می‌تواند با شبیه‌سازی ساختار فیزیکی و شیمیایی ECM طبیعی، بستر مناسبی را برای رشد سلول‌ها فراهم کند. از این‌رو، آشنایی با نقش ترکیبات ماتریس برون‌سلولی در روند ترمیم بافت از ضروریات لازم برای پژوهشگران حوزه ترمیم و مهندسی بافت است [۷].

داربست‌های زیستی را می‌توان با سلول‌زدایی بافت طبیعی و باقی‌گذاشتن ساختار غنی از پروتئین و بدون سلول تهیه کرد [۸]. داربست‌های سنتزی را نیز می‌توان با استفاده از روش‌های مهندسی مواد (به‌ویژه مهندسی پلیمر) به شکل‌های مختلف تهیه کرد. در



شکل ۱- انواع گلیکوزآمینوگلیکان‌ها [۴].

Fig. 1. Types of glycosaminoglycans [4].

ساخت داربست سنتزی، ویژگی‌های ECM مانند زیست‌سازگاری زیاد، زیست‌تخریب‌پذیری و امکان بازسازی سریع آن داخل بدن همیشه در میان پژوهشگران حائز اهمیت بوده است. در ساخت ECM سنتزی به‌طور عمده از پروتئین‌ها از جمله کلاژن، ژلاتین، الاستین و پلی‌ساکاریدهایی مانند آلژینات، هیالورونیک اسید، سلولوز و کیتوسان استفاده می‌شود. بیشتر این پلیمرها به‌دلیل خواص شیمیایی و فیزیکی مشابه با ECM طبیعی انتخاب می‌شوند [۹].

همچنین داربست سنتزی، باید خواص مکانیکی مناسب و ساختاری متخلخل داشته باشد تا متناسب با رشد سلول اجازه انتشار مواد مغذی و نیز دفع ضایعات سلول را بدهد و محیط مناسب و کنترل‌شده را برای رشد سلول‌های بارگذاری‌شده فراهم کند [۱۰]. این داربست‌ها به‌دلیل میزبانی از سلول‌های زنده و حساسیت بسیار زیاد سلول به شرایط محیطی باید به نحوی طراحی شوند که حین فرایند ساخت کمترین آسیب را به سلول‌ها وارد کنند و حداقل مقدار محصولات جانبی سمی و مضر را در خود نگه دارند. داربست‌های سنتزی مهندسی بافت، شکل‌های مختلفی از جمله هیدروژل‌ها [۱۱]، ساختارهای متخلخل [۱۲] و نانوالیاف دارند [۱۳] که در این مطالعه هیدروژل‌های تزریق‌پذیر تشکیل‌شونده درجا به‌عنوان داربست بررسی شدند.

هیدروژل‌ها، شبکه‌های پلیمری سه‌بعدی آب‌دوست با ظرفیت جذب بسیار زیاد آب هستند. از آنجا که به‌طور متوسط ٪۶۰ بدن انسان از آب تشکیل شده است و این مقدار در برخی از اندام‌ها همچون شش تا ٪۸۳ افزایش می‌یابد، هیدروژل‌ها برای اهداف زیست‌پزشکی قابلیت بسیار زیادی داشته و از لحاظ خواص فیزیکی و مکانیکی شباهت خوبی به بافت‌های زنده دارند [۱۴]. بنابراین، مطالعات بسیاری برای استفاده از هیدروژل به‌عنوان ECM سنتزی در کاربردهای مهندسی بافت در محیط درون‌تنی (in vivo) و برون‌تنی (in vitro) (داخل بدن موجود زنده از قبیل حیوانات آزمایشگاهی مانند موش) انجام شده که نتایج امیدوارکننده‌ای را در بر داشته است [۱۵].

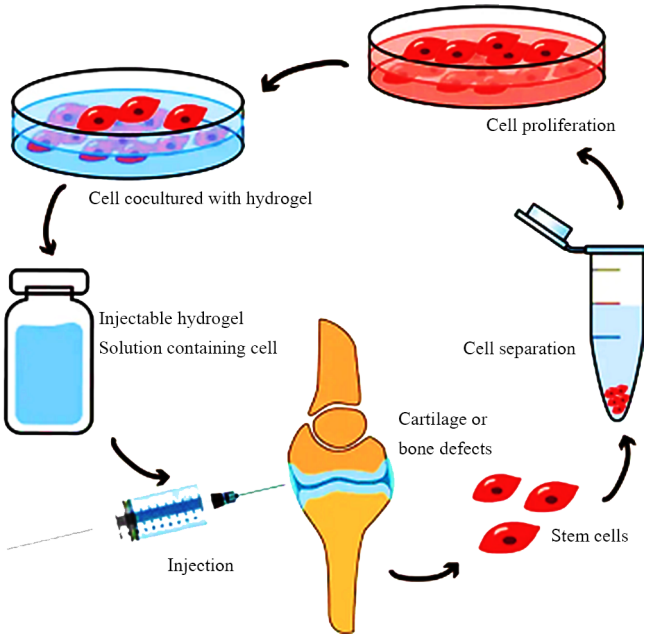
هیدروژل‌ها بر اساس منشأ پلیمر به دو گروه هیدروژل‌های طبیعی همچون کلاژن و آلژینات و سنتزی مانند پلی‌آکریل‌آمید و پلی‌اتیلن گلیکول دسته‌بندی می‌شوند. هیدروژل‌ها را بر اساس ساختار شبکه نیز می‌توان در دو دسته قرار داد. اگر شبکه شامل پیوندهای کووالانسی باشد، مانند پلی‌هیدروکسی‌اتیل‌متاکریلات، هیدروژل را شیمیایی می‌نامند و اگر شبکه نتیجه برهم‌کنش فیزیکی مانند پیوندهای واندروالسی، یونی یا هیدروژنی باشد، نظیر هیدروژل پلی‌وینیل الکل-گلیسین، هیدروژل فیزیکی نامیده می‌شود [۱۶].

با وجود این، قراردادن هیدروژل‌های آماده به‌عنوان داربست در محل آسیب‌دیده همواره به جراحی و ایجاد جراحت نیاز دارد که با درد، صرف هزینه و زمان همراه است، این موضوع موجب محدودشدن

کاربردهای بالینی هیدروژل‌ها شده است. هیدروژل تزریق‌پذیر راه‌حل مهندسان بافت برای رفع این مشکلات در کاربردهای بالینی است. در این روش، پیش‌پلیمرهای عامل‌دارشده پس از تزریق در محیط درون‌تنی و در شرایط فیزیولوژی بدن در محل تزریق، ژل تشکیل می‌دهند و نیاز به جراحی را به حداقل می‌رسانند [۱۷].

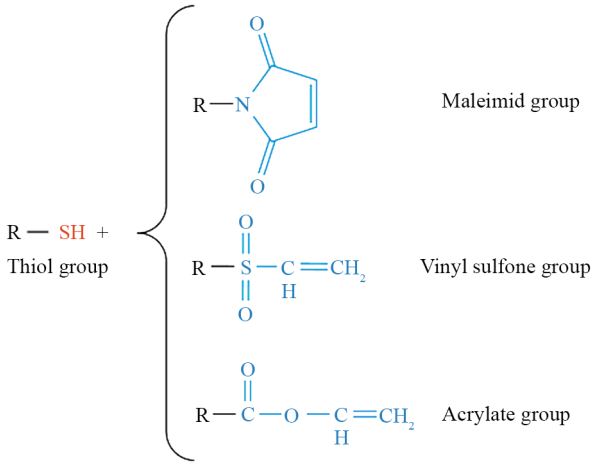
هیدروژل‌های تزریق‌پذیر تشکیل‌شونده درجا را می‌توان با استفاده از اتصال‌های شیمیایی غیرسمی، آنزیم‌های شبکه‌ای‌کننده زیستی، برهم‌کنش‌های فیزیکی مانند برهم‌کنش میان مولکول‌های آب‌گریز، برهم‌کنش یونی و شیمی ابرمولکولی تهیه کرد. از برتری‌های این نوع هیدروژل می‌توان آسانی استفاده به‌عنوان داربست، بارگذاری ساده سلول، درمان با حداقل جراحت واردشده از جراحی و موارد احتمالی مانند سازگاری بهتر با بیمار را بیان کرد [۱۸].

هیدروژل‌های تزریق‌پذیر می‌توانند مواضع آسیب‌دیده با پیچیدگی فضایی زیاد را به‌آسانی پر کنند و حین تشکیل هیدروژل به بافت‌های اطراف خود بچسبند. سازوکار تشکیل هیدروژل تزریق‌پذیر برخلاف هیدروژل‌های معمول که با روش‌های مختلف شیمیایی شبکه‌ای می‌شوند، کاملاً زیست‌سازگار است و عوامل محرک فیزیولوژی برای ایجاد اتصال‌های شیمیایی یا فیزیکی را مهیا می‌کنند، هر چند تعداد محدودی تاکنون برای بارگذاری بلندمدت سلول تأیید بالینی شده‌اند [۱۹]. همچنین، فراهم‌کردن مقدار کافی عامل رشد برای تکثیر و تمایز سلول‌هایی که در هیدروژل بارگذاری شده‌اند، آسان نیست و برای دستیابی به این هدف، عامل‌های رشد باید با روش کنترل‌شده و دقیق



شکل ۲- هیدروژل تزریق‌پذیر تشکیل‌شونده درجا [۲۰].

Fig. 2. In-situ forming injectable hydrogel [20].



شکل ۳- انواع واکنش‌های افزایشی Michael.

Fig. 3. Types of Michael addition reactions.

به هیدروژل وارد شوند.

در این مطالعه سعی شده است تا انواع هیدروژل‌های تزریق‌پذیر (شکل ۲) مصرفی در پزشکی ترمیمی، سلول‌درمانی و بازسازی بافت به‌طور خلاصه شرح داده شوند. ابتدا، هیدروژل‌های تزریق‌پذیر با قابلیت شبکه‌ای‌شدن به‌وسیله پیوند شیمیایی با واکنش افزایشی Michael میان گروه‌های تیول و وینیل، واکنش کلیک میان مولکول‌های بیس‌آلکین و گروه‌های آزیدی و واکنش باز شیف بین گروه‌های آلدهیدی و آمینی بررسی شدند. در مرحله بعد، هیدروژل‌های تزریقی با آنزیم‌های متصل‌کننده زیستی از قبیل هیدروژن پراکسیداز بررسی شدند که برای شبکه‌ای‌کردن هیالورونیک اسید و تیرامین به‌کار گرفته می‌شوند. سومین گروه مطالعه‌شده هیدروژل‌های تزریق‌پذیر با شبکه‌های فیزیکی نظیر برهم‌کنش‌های آب‌گریزی، یونی و نیز هیدروژل‌های پاسخگو به محرک خارجی بوده که شکل‌گیری آن به‌دلیل تغییرات دما یا pH است. در گروه چهارم، هیدروژل‌های ابرمولکولی با استفاده از شیمی میزبان-مهمان بررسی شدند که شامل سیکلودکسترین و کیوکاربیتوریل (cucurbituril) هستند. در نهایت، چند مثال از هیدروژل‌های تزریق‌پذیر برای سلول‌درمانی و بازسازی بافت معرفی شدند که از لحاظ بالینی نسبتاً موفق عمل کردند.

۲- هیدروژل‌های تزریق‌پذیر تشکیل‌شونده درجا

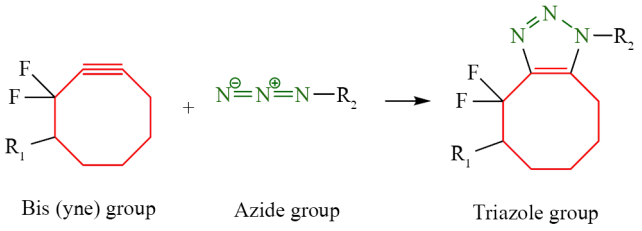
۲-۱ شبکه‌ای‌شده با اتصال‌های شیمیایی

۲-۱-۱ شبکه‌ای‌شده با واکنش افزایشی Michael

واکنش افزایشی Michael، نوعی واکنش افزایشی هسته‌دوستی است

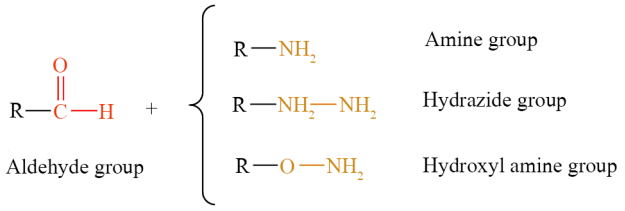
که طی آن گروه کربانیون (تیول یا آمین) به‌عنوان هسته‌دوست، با ترکیب کربونیل آلفا-بتای غیراشباع واکنش می‌دهد [۲۱]. این واکنش در شرایط فیزیولوژی بدن بسیار گزینش‌پذیر، سریع، بدون تولید محصولات جانبی یا واکنش‌های سمی رخ می‌دهد. بر این اساس، از این واکنش به‌طور گسترده برای تهیه هیدروژل‌های تزریق‌پذیر با قابلیت بارگذاری سلول و رهایش کنترل‌شده دارو استفاده می‌شود [۲۲]. به‌عنوان مثال، واکنش افزایشی Michael می‌تواند میان گروه تیول پلیمر با گروه‌های دارای پیوند دوگانه فعال مانند مالئیمید، وینیل سولفون یا آکریلات رخ دهد (شکل ۳) [۲۳].

اولیگومر و پلیمرهای استفاده‌شده در این روش می‌توانند منشأ سنتزی، همچون پلی‌اتیلن گلیکول (PEG) یا طبیعی مانند ژلاتین و هیالورونیک اسید داشته باشند [۲۴،۲۵]. از برتری‌های استفاده از هیدروژل تزریق‌پذیر، آسانی بارگذاری سلول یا دارو است که با مخلوط‌کردن ساده سلول‌ها و دارو با یکی از اجزا انجام می‌شود. به‌طور مثال، هیدروژل تجاری با نام Extracel TM یکی از هیدروژل‌های تزریق‌پذیراست که با واکنش افزایشی Michael تهیه می‌شود. اجزای این هیدروژل هیالورونیک اسید اصلاح‌شده با گروه‌های تیولی و ژلاتین اصلاح‌شده با پلی‌اتیلن گلیکول-دی‌آکریلات [۲۶،۲۷] است. زمان ژل‌شدن هیدروژل را می‌توان با تغییر غلظت و pH محلول پلیمری کنترل کرد. هیدروژل Extracel TM برای دارورسانی [۲۶]، مش‌ها و توری‌های موانع چسبندگی بافت‌های داخلی شکمی پس از جراحی [۲۷] و مهندسی بافت استفاده شده است. Wiley و همکاران [۲۸] نیز سلول‌های بنیادی مزانشیمی انسان به همراه آنتی‌بیوتیک‌های مختلف را در محلول پلیمری پلی‌اتیلن گلیکول-دی‌تیول همراه با پلی‌اتیلن گلیکول-نوربورنن (norbornene) هشت‌بازو بارگذاری کردند. این مطالعه نشان داد، چگونه می‌توان مقدار نورپلیمرشدن و در نتیجه خواص هیدروژل‌های سنتزی را با تغییر طول موج، شدت و زمان پرتودهی تنظیم کرد و در کاربردهای مختلف از روکش‌ها گرفته تا زیست‌مواد برای کشت سلولی کنترل‌شده و پزشکی ترمیمی استفاده کرد.



شکل ۴- واکنش‌های شیمی کلیک بدون مس.

Fig. 4. Click chemistry copper-free reactions.



شکل ۵- انواع واکنش‌های باز شیف.

Fig. 5. Types of Schiff Base reaction.

۲-۱-۲ شبکه‌ای‌شده با واکنش شیمی کلیک

شیمی کلیک واکنش کاتالیزشده با کاتیون مس (Cu(I)) میان گروه‌های استیلن و آزید بوده که پیوند نهایی ۱،۲،۳-تری‌آزول است. همچنین، این فرایند به‌عنوان واکنش حلقه‌زایی آلکین آزید کاتالیزشده با مس شناخته شده است که با ایجاد ترکیبات حلقوی قابلیت طراحی ساختارهای مختلف مولکولی را فراهم می‌کند [۲۹]. اغلب به همراه کاتالیزور نمک مس سولفات از ترکیب تریس(بنزیل‌تری‌آزول‌متیل) آمین (TBTA) استفاده می‌شود. واکنش شیمی کلیک به pH حساس نبوده و برخلاف واکنش استر-N-هیدروکسی‌سوکینیمید (استر-NHS) با آمین‌ها، به کنترل pH در مخلوط واکنش نیازی نیست. به‌طور کلی، به اضافه‌کردن هیچ نوع بافر ویژه، اسید یا باز نیازی نیست و شیمی کلیک به‌خوبی در محدوده pH ، ۴ تا ۱۲ کار می‌کند [۳۰]. البته شایان ذکر است، سمیت فلز مس موجود در واکنش، کاربردهای آن را در سامانه‌های دارای سلول زنده محدود کرده است [۳۱].

به‌تازگی، شیمی کلیک بدون کاتالیزگر مس با استفاده از ترکیبات حلقوی آلکینی دارای فلوئور، سیکلوستین دی‌فلوئوردار (difluorinated cyclooctyne, DIFO3) و گروه‌های آزیدی برای تشکیل هیدروژل تزریق‌پذیر تشکیل‌شونده درجا (شکل ۴) توسعه‌یافته است. Takahashi و همکاران [۳۲] هیدروژل تزریق‌پذیر بر پایه هیالورونیک اسید را با گروه‌های آزیدی و سیکلوآلکین اصلاح کرده و در غلظت و نسبت‌های متفاوت، زمان ژل‌شدن ۵ min تا ۱۰۰ min را گزارش کردند. این واکنش به‌دلیل عملکرد، شیمی فضایی ویژه، نداشتن سمیت و سریع‌بودن واکنش در شرایط فیزیولوژی بدن به‌طور گسترده برای کاربردهای زیست‌پزشکی استفاده می‌شود. براساس شیمی کلیک، هیدروژل‌های مختلفی برای رهایش مهندسی‌شده دارو و کاربردهای مهندسی بافت ساخته شده‌اند [۳۳].

۲-۱-۳ شبکه‌ای‌شده با شیمی باز شیف

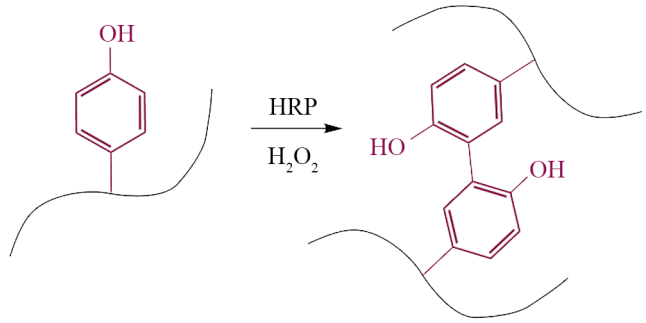
دسته دیگری از هیدروژل‌های تزریق‌پذیر از واکنش باز شیف میان گروه‌های آمینی و آلدهیدی بدون هیچ گونه واکنش جانبی تشکیل می‌شوند. در این واکنش، آمین به‌عنوان گروه هسته‌دوست به اتم کربن

آلدهیدی یا کتونی اضافه می‌شود [۳۴]. اگر به‌جای آمین از گروه‌های هیدروکسیل آمین استفاده شود، پیوند تشکیل‌شده را اُکسیم می‌نامند (شکل ۵).

از برتری‌های این پیوند می‌توان به بازده و سرعت تشکیل بیشتر و نیز مقاومت در برابر آبکافت اشاره کرد [۳۵]. گروه‌های فعال آمینی یا آلدهیدی باقی‌مانده داخل هیدروژل نیز می‌توانند برای ترکیب با زیست‌مولکول و زیست‌داروها استفاده شوند. هیالورونیک اسید، کیتوسان و کندرویتین سولفات برای تهیه هیدروژل‌های تزریقی از واکنش باز شیف استفاده شده‌اند [۳۶،۳۷]. زندی و همکاران [۳۸] با اکسایش گروه‌های هیدروکسیل در آلژینات در مجاورت سدیم پریدات ($NaIO_4$) و تبدیل آن‌ها به گروه‌های آلدهیدی و سپس ترکیب آن با ژلاتین، هیدروژل تزریق‌پذیر بر پایه واکنش باز شیف را برای کاربردهای استخوانی تهیه کردند. همچنین Hozumi و همکاران [۳۹] هیدروژل تزریق‌پذیر تشکیل‌شده با غلظت‌های مختلف از ژلاتین-هیدرازید و هیالورونیک اسید-آلدهید با سرعت تخریب آهسته را به‌عنوان داربست عروقی داخل بدن موش قرار دادند و نتایج امیدوارکننده‌ای گزارش کردند. زمان لازم برای ژل‌شدن و خواص فیزیکی-مکانیکی این هیدروژل‌ها به نسبت آمین به آلدهید وابسته است.

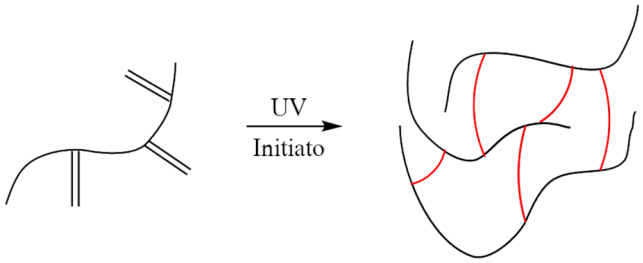
۲-۱-۴ شبکه‌ای‌شده با آنزیم

دسته دیگری از هیدروژل‌های تزریق‌پذیر با فعالیت آنزیم‌هایی از قبیل پراکسیداز ترب کوهی (horseradish peroxidase, HRP) تشکیل می‌شوند. این آنزیم از ریشه گیاه ترب کوهی با نام علمی Armoracia rusticana به‌دست می‌آید و واکنش شبکه‌ای‌شدن ترکیبات پلیمری دارای فنول را در مجاورت هیدروژن پراکسید کاتالیز می‌کند. در این نوع هیدروژل‌ها قابلیت کنترل زمان تشکیل ژل و چگالی اتصال‌های عرضی امکان‌پذیر است [۴۰]. هیدروژل‌های شبکه‌ای‌شده با واسطه آنزیم با توجه به غلظت پلیمر و نسبت آنزیم به تیرامین می‌توانند



شکل ۶- واکنش شبکه‌ای‌شدن آنزیمی.

Fig. 6. Enzymatic crosslinking reaction.



شکل ۷- واکنش نورشبکه‌ای‌شدن.

Fig. 7. Photocrosslinking reaction.

طی چند دقیقه آماده شوند. این هیدروژل‌ها با توجه به خواص کشسانی زیاد نظیر انعطاف‌پذیری مناسب برای بافت‌های نرم مانند ماهیچه‌های میان استخوانی و عضلات قلب و به‌عنوان سامانه‌های دارورسانی [۴۱] و داربست‌های مهندسی بافت [۴۲] استفاده شده‌اند. ترکیبات پلیمری اصلاح‌شده با تیرامین یا هیدروکسی فنیل پروپیونیک اسید مانند هیالورونیک اسید، ژلاتین، دکستران، آلژینات و کیتوسان [۴۳] برای تهیه هیدروژل‌های تزریق‌پذیر تشکیل‌شونده درجا در مجاورت هیدروژن پراکسید و آنزیم پراکسیداز (HRP) (شکل ۶) به‌کار گرفته شدند.

۲-۱-۵ شبکه‌ای‌شده با نور

از پلیمرهای متاکریلاتی و آکریلاتی برای تهیه هیدروژل‌های تزریقی درجا به‌کمک پخت نوری با آغازگرهای حساس به نور (شکل ۷) [۴۴،۴۵] استفاده می‌شود. هر چند واکنش میان گروه‌های آکریلات و تشکیل پیوند کربن-کربن سریع‌تر از متاکریلات رخ می‌دهد. اما، در مقایسه‌ای که میان ترکیبات دارای دو گروه انجام شد، تمام ترکیبات آکریلاتی سمی‌تر از متاکریلات بودند. به همین دلیل امروزه هیدروژل‌های متاکریلاتی در کاربردهای پزشکی بیشتر به‌کار گرفته می‌شوند [۴۶]. محلول پلیمری به بدن تزریق می‌شود و سپس در معرض نور مرئی یا پرتو فرابنفش (UV) قرار می‌گیرد. شبکه‌ای‌شدن با این روش می‌تواند برای بهبود خواص فیزیکی-مکانیکی و پایداری هیدروژل‌های فیزیکی به‌کار گرفته شود [۴۷]. به‌عنوان مثال، متاکریلیک اسید با برهم‌کنش الکتروستاتیکی به پلیمرهای حساس به دما یا شبکه‌های پلیمری متصل شده و بدین ترتیب با افزایش گروه متاکریلاتی به زنجیر پلیمری، امکان ایجاد پیوند عرضی شیمیایی فراهم می‌شود. این نوع هیدروژل‌های ترکیبی خواص مکانیکی خوبی را نشان داده‌اند. با وجود این، هیدروژل‌های تشکیل‌شده با این روش با توجه به سمیت آغازگرهای نوری استفاده‌شده در آن‌ها، نیاز به قرارگیری در معرض نور با طول موج کوتاه که برای بافت سلولی می‌تواند مضر باشد و

نیز محدودیت در عمق نفوذ منابع نوری که استفاده از منابع قوی‌تر و در نتیجه مضرتر را می‌طلبد، در حال حاضر کاربردهای بالینی نسبتاً محدودی دارند [۴۸].

از شاخص‌ترین مواد استفاده‌شده در این روش می‌توان به ژلاتین متاکریلات یا ژلما (GelMA) اشاره کرد که با اصلاح ژلاتین به‌وسیله متاکریلات انیدرید تهیه می‌شود [۴۹]. همچنین، در تهیه هیدروژل ژلما از آغازگرهای UV محلول در آب مانند Irgacure 2959 یا حساس به نور مرئی مانند لیتیم فنیل-۲،۴،۶-تری‌متیل‌بنزوئیل فسفینات (LAP) استفاده می‌شود. از برتری‌های این آغازگرها، حل‌پذیری مناسب در آب و حداقل آسیب‌رسانی به سلول هنگام ایجاد رادیکال است [۵۰].

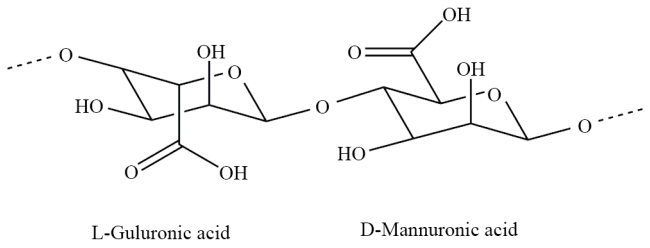
۲-۲ هیدروژل‌های تزریق‌پذیر شبکه‌ای‌شده با برهم‌کنش‌های فیزیکی

۲-۲-۱ شبکه‌ای‌شده با برهم‌کنش‌های یونی

دسته دیگری از هیدروژل‌های تزریق‌پذیر، هیدروژل‌های فیزیکی هستند که با شبکه‌ای‌شدن از برهم‌کنش غیرکووالانسی مانند پیوند یونی، نیروهای آب‌گریزی و پیوند هیدروژنی ایجاد می‌شوند. هیدروژل‌های یونی معمولاً هنگامی تشکیل می‌شوند که پلیمر باردار با پلیمر یا ذرات با بار مخالف آن مخلوط می‌شود [۵۱]. در ادامه، دو نمونه از پرکاربردترین این نوع پلیمرها شرح داده شدند.

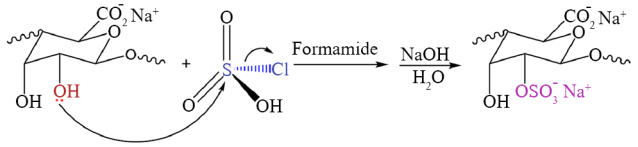
۲-۲-۱-۱ هیدروژل تزریق‌پذیر بر پایه آلژینات

آلژینات، پلی‌ساکارید خطی آنیونی به‌دست‌آمده از جلبک‌های قهوه‌ای با واحدهای ساختاری D-مانورونیک اسید و L-گلورونیک اسید است (شکل ۸). این پلیمر طبیعی به جزء مهمی در صنعت غذایی، داروسازی، محصولات آرایشی و بهداشتی تبدیل شده است. آلژینات‌هایی که دارای مقادیر زیادی گلورونیک اسید هستند، در مقایسه با آلژینات‌های سرشار از مانورونات، ژل‌هایی با استحکام شایان توجه ایجاد می‌کنند [۵۲]. هیدروژل‌های تزریقی بر پایه آلژینات از مخلوط‌کردن ساده محلول‌های دارای آلژینات با کاتیون‌های دوظرفیتی مانند Ca^{2+}، Mg^{2+} و Ba^{2+} تشکیل می‌شوند. این هیدروژل‌ها به‌طور گسترده



شکل ۸- واحد ساختاری آلژینات.

Fig. 8. Structural unit of alginate.



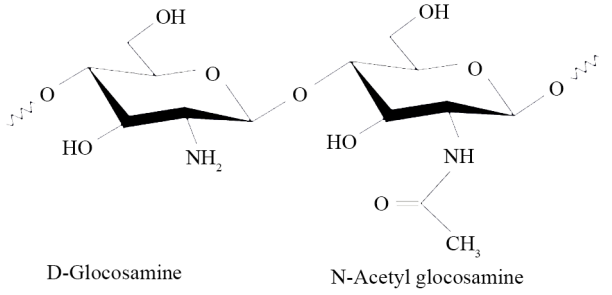
شکل ۹- سولفات‌دارشدن آلژینات [۵۸].

Fig. 9. Sulfation of alginate [58].

برای دارورسانی [۵۳]، سلول‌درمانی [۵۴] و مهندسی بافت [۵۵] استفاده می‌شوند.

سرعت تشکیل و استحکام فیزیکی-مکانیکی هیدروژل‌های آلژینات را می‌توان با تغییر غلظت آلژینات، وزن مولکولی و مقدار گلوکورونیک اسید موجود در واحد ساختاری آلژینات و نوع و مقدار کاتیون اضافه‌شده کنترل کرد. Kuo و همکاران [۵۶] نشان دادند، سرعت تشکیل هیدروژل آلژینات با افزایش مقدار نمک دارای کلسیم در سامانه‌های $GDL/CaCO_3$ و $CaSO_4/CaCO_3/GDL$ افزایش می‌یابد [۵۶،۵۷]. گلوکونو-دلتا-لاکتون (glucono delta-lactone, GDL) از مشتقات گلوکوز و مولکولی حلقوی‌شکل است که در اثر آبکافت به گلوکونیک اسید تبدیل می‌شود. با وجود این، هیدروژل دارای آلژینات شبکه‌ای‌شده یونی در بدن در مقایسه با هیدروژل‌های شیمیایی پایداری فیزیکی کمتری دارد. زیرا، ذرات یون از هیدروژل به داخل مایعات بدن مهاجرت می‌کنند. Lee و همکاران [۵۹] توانستند با افزایش pH محیط و درصد نمک کلسیم، پایداری ذرات هیدروژل آلژینات را نشان دهند. افزون بر این، کنترل تشکیل هیدروژل آلژینات مشکل است و هیدروژل چسبندگی سلولی ضعیفی دارد [۵۳] که می‌توان آلژینات را با گروه‌های سولفات‌دار اصلاح کرد (شکل ۹). همچنین برای بهبود و ثبات خواص مکانیکی این نوع هیدروژل، آلژینات با پیوندهای کووالانسی شبکه‌ای می‌شود.

Chou و همکاران [۶۰] گزارش کردند، هیدروژل آلژینات متاکریلات که با پرتودهی UV شبکه‌ای‌شده بود، در مقایسه با



شکل ۱۰- واحد ساختاری کیتوسان.

Fig. 10. Structural unit of chitosan.

هیدروژل شبکه‌ای‌شده یونی در آلژینات زنده‌مانی مورد قبولی از سلول‌ها را طی چهار هفته در موش نشان داده است. هر چند این هیدروژل‌ها با درنظرگرفتن نکات زیستی حین ساخت، عملکرد بالینی نسبتاً قابل قبولی دارند. اما، از آنجا که آلژینات استفاده‌شده در این هیدروژل‌ها از منابع طبیعی استخراج می‌شود، باید فرایند خالص‌سازی کامل انجام شود تا آلاینده‌های موجود در آن به التهاب یا پاسخ ایمنی در بدن منجر نشود [۶۱].

۲-۲-۱-۲ هیدروژل تزریق‌پذیر بر پایه کیتوسان

کیتوسان پلی‌ساکارید زیست‌سازگار، زیست‌تخریب‌پذیر و خطی کاتیونی با واحدهای ساختاری متناوب گلوکوزآمین و استیل گلوکوزآمین است که از استیل‌زدایی کیتین به‌دست می‌آید (شکل ۱۰) [۶۲]. کیتوسان می‌تواند شبکه هیدروژلی با نمک‌های پلی‌آنیونی و نانوذرات فلزی را طی برهم‌کنش‌های الکتروستاتیک تشکیل دهد [۶۳،۶۴]. همچنین، هیدروژل‌های هوشمند حساس به دما و تغییرات pH را می‌توان با استفاده از کیتوسان و نمک پلی‌ال‌های آنیونی از قبیل گلیسرول، سوربیتول، فروکتوز یا گلوکوز فسفات تهیه کرد [۶۴،۶۵]. عامل تشکیل هیدروژل می‌تواند پیوند هیدروژنی، برهم‌کنش الکتروستاتیک و برهم‌کنش آب‌گریزی میان نمک‌های کیتوسان و پلی‌ال فسفات باشد. محلول کیتوسان در pH فیزیولوژی و دمای بدن تبدیل به هیدروژل می‌شود و می‌توان دارو و سلول را به‌آسانی در هیدروژل بارگذاری کرد.

۲-۲-۲ شبکه‌ای‌شده با دما و pH

۲-۲-۲-۱ هیدروژل تزریق‌پذیر پاسخگو به دما

برخی از پلیمرها بر اثر تغییرات دما به‌عنوان محرک بیرونی، متحمل تغییر خواص از جمله حل‌پذیری و انتقال فاز [۶۸-۶۶] در سامانه می‌شوند. این آستانه تغییرات به‌عنوان دمای بحرانی کمتر حل‌پذیری (lower critical solution temperature, LCST) یا دمای بحرانی بیشتر حل‌پذیری (upper critical solution temperature, UCST)، دمای بحرانی محلول [۶۹] نامیده می‌شود.

انتقال فاز پلی(N-ایزوپروپیل آکریل‌آمید)، PNIPAAm، از حالت محلول به ژل در بیش از دمای ۳۲°C در محلول آبی، اتفاق می‌افتد. از آنجا که دمای بحرانی PNIPAAm به‌کمک کوپلیمرشدن با پلیمر آب‌دوست افزایش می‌یابد، می‌توان دمای ژل‌شدن درجا را با دمای بدن و افزایش مقدار پلیمر آب‌دوست در زنجیر تنظیم کرد [۷۰،۷۱]. همچنین، محلول پلیمرهای طبیعی کیتوسان و هیالورونیک اسید به همراه نمک سدیم گلیسرول فسفات در شرایط فیزیولوژی بدن قابلیت تزریق‌پذیری دارد و در محدوده دمای ۳۱/۲°C تا ۳۷/۲°C با توجه به مقدار نمک گلیسرول فسفات و درصد پلیمر، ژل تشکیل می‌دهد. همچنین، این هیدروژل با بارگذاری داروی دوکسورابیسین (doxorubicin) برای درمان سلول‌های سرطانی مطالعه شده است [۷۲].

قطعه‌های کوپلیمری خطی و ستاره‌ای تشکیل‌شده از پلیمرهای آب‌دوست نظیر پلی‌اتیلن اکسید (PEO) به‌عنوان هسته آب‌دوست و گروه‌های انتهایی PNIPAAm، با توجه به مقدار کوپلیمرشدن گروه‌های آب‌دوست در محدوده دمای ۲۷°C تا ۴۳°C رفتار مناسبی در برابر تحریک‌های دمایی دارند و هیدروژل آن پایداری خواص مکانیکی خوبی را نشان می‌دهد [۶۹]. هیدروژل‌های زیست‌تخریب‌پذیر نیز با این روش از ترکیب پلیمرهای تخریب‌ناپذیر مانند PNIPAAm و پلیمرهای طبیعی توسعه یافته‌اند. محلول هیالورونیک اسید پیوندشده بر پلیمر PNIPAAm می‌تواند شبکه هیدروژل حساس به تغییرات دما را تشکیل دهد [۷۳]. سرعت تخریب، نسبت تورم و زیست‌سازگاری این هیدروژل را می‌توان با تغییر نسبت PNIPAAm به هیالورونیک اسید برای کاربردهای مختلف مهندسی بافت تنظیم کرد.

کوپلیمر سه‌جزئی پلی(اتیلن اکسید)-پلی(پروپیلن اکسید)-پلی(اتیلن اکسید)، PEO-PPO-PEO، با نام تجاری پلورونیک، از متداول‌ترین هیدروژل‌های حساس به دما برای کاربردهای زیست‌پزشکی است. تشکیل این هیدروژل به غلظت و دمای محلول پلیمری بستگی دارد و محدوده دمایی آن ۱۰°C تا ۱۰۰°C است. پلورونیک با درصد ترکیب و وزن مولکولی متفاوت اجزای کوپلیمر در دارورسانی، ژن‌رسانی، پیشگیری از چسبندگی بافت و مهندسی بافت استفاده می‌شود [۷۴]. با وجود این، پلورونیک معایبی از جمله استحکام مکانیکی ضعیف و تخریب‌ناپذیری دارد. کوپلیمر پلی(اتیلن گلیکول-*b*-(DL-لاکتیک اسید-*co*-گلیکولیک اسید)-*b*-اتیلن گلیکول)، PEG-PLGA-PEG، نیز هیدروژل حساس به دما با دمای ژل‌شدن ۳۱°C شبیه به کوپلیمر PEO-PPO-PEO اما با خاصیت زیست‌تخریب‌پذیری است [۷۵]. با وجود کاربردهای پزشکی PLGA به‌عنوان داربست [۷۶] در مهندسی بافت که دارای تأییدیه FDA نیز است، برخی از آن‌ها پس از تخریب، مونومرهای اسیدی آزاد می‌کنند که موجب عوارض جانبی و آسیب‌رساندن به زیست‌مولکول‌ها، سلول‌ها و بافت‌ها می‌شود [۷۷].

۲-۲-۲-۲ هیدروژل تزریق‌پذیر پاسخگو به دو محرک

مشکل اصلی هیدروژل‌های فیزیکی حساس به دما، پایداری و خواص مکانیکی ضعیف آن‌ها در بدن است. بر این اساس، هیدروژل‌های حساس به دما و pH برای کاهش این مشکلات توسعه یافتند. یکی

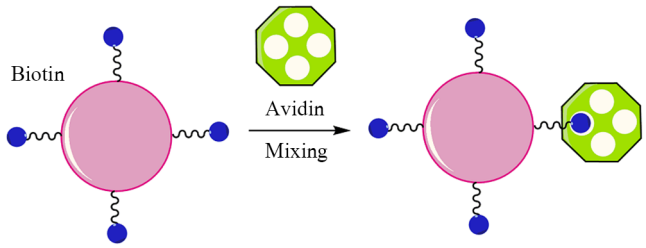
از مثال‌های مناسب برای این نوع هیدروژل‌ها، کوپلیمرهای بر پایه PNIPAAm هستند. بدین منظور، پلیمر PNIPAAm با زنجیرهای حساس به pH مانند پلی(پروپیل آکریلیک اسید) (PPAA)، پلی‌ایزوپروپیل مالئیمیک اسید (PNIPMAA) و پلی(متاکریلیک اسید) (PMAA) کوپلیمر می‌شود [۷۸]. این پلیمرهای سنتزی نه فقط حساس به دما بوده بلکه به‌طور شایان توجهی به‌دلیل وجود گروه‌های کربوکسیل در ساختار آن‌ها به تغییرات pH نیز حساس هستند. افزون بر این، هیدروژل‌های حساس به دما و pH با کوپلیمرهای چندجزئی [۷۹] نیز تهیه شده‌اند. Khan و همکاران [۸۰] هیدروژل تزریق‌پذیر زیست‌سازگار بر پایه PNIPAAm و کربوکسی متیل کیتوسان با انتقال فاز سل–ژل را در شرایط فیزیولوژی بدن یعنی دمای ۳۷°C و pH برابر ۷/۴ با کاربرد دارورسانی تشکیل‌شونده درجا تهیه کردند.

به‌تازگی کوپلیمر سنتزی و زیست‌تخریب‌پذیر بر پایه مونومرهای کاپرولاکتون و لاکتیک اسید با نام پلی(ε–کاپرولاکتون–*co*–لاکتید)، PCLA، برای کاربردهای پزشکی گسترش یافته است. اولیگومرهای سولفامتازین (sulfamethazine, SMO) حساس به pH به دو انتهای کوپلیمر قطعه‌ای PCLA–PEG–PCLA متصل می‌شوند. محلول کوپلیمر چندقطعه‌ای SMO-PCLA-PEG-PCLA-SMO نشان می‌دهد، تغییر فاز از حالت سل به ژل در pH برابر ۷/۲ و دمای بدن امکان‌پذیر است. سازوکار تشکیل هیدروژل، نتیجه برهم‌کنش آب‌گریزی میان قطعه‌های SMO و PCLA است. این هیدروژل‌های حساس به دما و pH، استحکام مکانیکی را افزایش می‌دهند و مانع از ژل‌شدن محلول پلیمری در نوک سوزن هنگام تزریق به بدن می‌شوند. برای افزایش خواص مکانیکی هیدروژل‌های فیزیکی می‌توان آن‌ها را با ترکیبات حساس به نور و دما توسعه داد [۸۱].

۲-۲-۳ هیدروژل‌های تزریق‌پذیر ابرمولکولی خودگردایشی

۲-۲-۳-۱ *با اتصال‌های مکمل*

هیدروژل‌های خودگردایشی (self-assembling) با اتصال‌های مکمل (complementary binding) مانند زوج گیرنده و لیگاند [۸۲]، زوج



شکل ۱۱– برهم‌کنش گیرنده–لیگاند.

Fig. 11. Ligand–receptor interaction.

پادگن–پادتن (antigen–antibody) [۸۳] و جفت‌شدن بازی [۸۴] توسعه یافته‌اند. از آنجا که پیوند میان زوج گیرنده و لیگاند بسیار گزینشی بوده گزینه مناسبی برای ایجاد هیدروژل‌های تزریق‌پذیر درجاست. به‌عنوان مثال، از ترکیب استرپتاویدین (streptavidin)–بیوتین (biotin) به‌عنوان هیدروژل تزریقی استفاده شده است (شکل ۱۱) [۸۵]. همچنین میکروذرات متخلخل PLA-PEG عامل‌دارشده با بیوتین و شبکه‌ای‌شده با آویدین (avidin) نیز به‌عنوان هیدروژل تزریقی درجا توسعه یافته‌اند. اصلاح آلژینات با آویدین و ترکیب آن با اینتگرین‌های (integrin) مختلف به‌عنوان گیرنده از جمله اینتگرین α3β1 که متشکل از پروتئین‌های لامینین (laminin) و ترومبوسپوندین (thrombospondin) است، به‌عنوان هیدروژل‌های خودگردایشی به‌شمار می‌آیند [۸۶]. افزون بر این، پپتیدهای غنی از تریپتوفان (tryptophan) و پیرولین (pyrroline) برای تشکیل هیدروژل استفاده شده‌اند [۸۲]. مقدار پروتئین شبکه‌ای‌شده بر سرعت تشکیل هیدروژل و نیز استحکام فیزیکی آن اثرگذار است. افزون بر این، عامل‌های رشد را می‌توان به محلول پلیمری برای بهبود عملکرد سلولی اضافه کرد [۸۳].

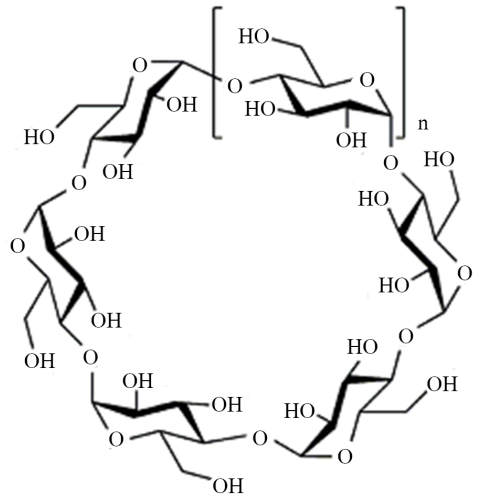
همان‌طور که بیان شد، برهم‌کنش پادگن–پادتن نیز برای تشکیل هیدروژل‌های تزریق‌پذیر استفاده شده است. مخلوط‌کردن ساده پلیمرهای دارای پادگن و پادتن می‌تواند به تشکیل هیدروژل منجر شود. وجود پادگن یا پادتن آزاد نیز بر خواص فیزیکی این هیدروژل‌ها اثرگذار است. Xing و همکاران [۸۴] هیدروژل‌های خودگردایشی را با استفاده از زنجیرهای DNA تهیه کردند. با وجود این، مشکلات نسبی تولید انبوه و اصلاح شیمیایی زیست‌مولکول‌ها و مسائل مربوط به ایمنی بدن، مواردی است که باید برای توسعه این روش در کاربردهای مهندسی بافت مورد توجه قرار گیرد.

۲-۲-۴ هیدروژل‌های تزریق‌پذیر خودگردایشی با برهم‌کنش میزبان–مهمان

۲-۲-۴-۱ *سیکلودکسترین*

سیکلودکسترین (CD)، از نشاسته با فعالیت آنزیمی گلیکوزیل‌ترانسفراز (glycosyltransferases) به‌دست می‌آید و در صنایع غذایی، دارویی، پزشکی و آرایشی کاربرد دارد [۸۷]. ترکیبات CD مجموعه‌ای از اولیگوساکاریدهای حلقوی طبیعی هستند که از واحدهای شش، هفت یا هشت‌تایی d–گلوکوپیرانوزید (α,β,γ-CD) تشکیل شده‌اند (شکل ۱۲). این ترکیبات حفره داخلی آب‌گریز و سطح قطبی آب‌دوست دارند که با استفاده از آن می‌توان سامانه‌ایی با بارگذاری مولکول‌های مهمان مانند پلی‌اتیلن گلیکول، آدامانتان و کلسترول تولید کرد [۸۸].

هیدروژل‌های تزریق‌پذیر بر پایه CD، تهیه‌شده با استفاده از شیمی



n=1, α-Cyclodextrin
n=2, β-Cyclodextrin
n=3, γ-Cyclodextrin

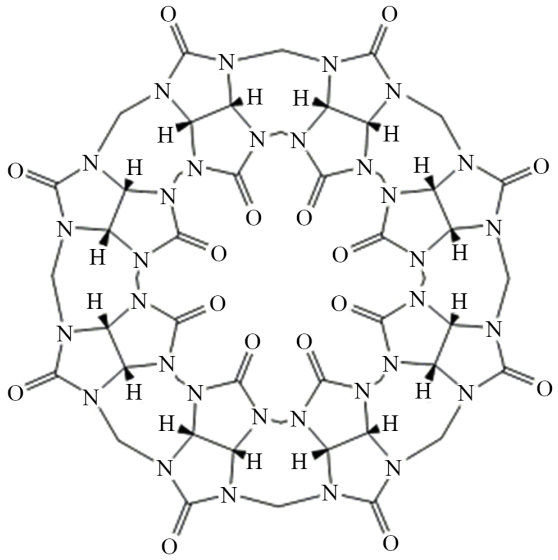
شکل ۱۲- ساختار شیمیایی سیکلودکسترین.

Fig. 12. Chemical structure of cyclodextrin.

میزبان-مهمان، به‌عنوان جایگزینی برای هیدروژل‌های خودگردایشی، دسته دیگری از هیدروژل‌های فیزیکی توسعه یافته‌اند که می‌توانند در کاربردهای مختلف پزشکی استفاده شوند [۸۹]. پلی(اتیلن گلیکول) می‌تواند به داخل حفره α-CD نفوذ کند تا هیدروژل‌های تزریقی متشکل از پلی(اتیلن گلیکول) و α-CD در محلول آبی ایجاد شود [۸۹]. این دسته از هیدروژل‌ها به‌طور شایان توجهی خواص تیکسوتروپی (thixotropic) دارند. از طرفی، پلی(اتیلن گلیکول) با وزن مولکولی زیاد تخریب‌ناپذیر است که موجب می‌شود، برای کاربردهای درون‌تنی ایده‌آل نباشد. افزون بر این، هیدروژل‌های بر پایه CD، به‌دلیل کمبود اتصال با مولکول مهمان و پایداری کم در ثبات خواص مکانیکی محدودیت استفاده در بدن دارند [۹۰]. برای بهبود پایداری هیدروژل α-CD، از کوپلیمر PEO-PPO-PEO برای ایجاد شبکه فیزیکی استفاده می‌شود. از ترکیب β-CD با آدامانتین (adamantine) و β-CD با کلسترول می‌توان به‌عنوان هیدروژل‌های تزریق‌پذیراستفاده کرد [۹۱].

۲-۲-۴-۲ کیوکاربیتوریل

کیوکاربیتوریل ($CB_{(n: 5-8)}$) درشت‌مولکول متقارن است و می‌تواند در محلول آبی با یون آسیل آمونیوم برهم‌کنش میزبان-مهمان بسیار قوی و گزینشی ایجاد کند (شکل ۱۳). برهم‌کنش فیزیکی CB با مولکول مهمان به‌دلیل سمیت سلولی ناچیز می‌تواند برای کاربردهای زیستی استفاده شود [۹۲]. اندازه حلقه $CB_{(n)}$ و طول مولکول مهمان



$CB_{(n=8)}$

شکل ۱۳- ساختار شیمیایی کیوکاربیتوریل هشت‌تایی.

Fig. 13. Chemical structure of cucurbituryl (n=8).

عامل‌های مهمی برای جفت‌شدن مولکول مهمان با CB هستند. به‌عنوان مثال، ترکیب $CB_{(8)}$ با دو مولکول مهمان شامل ویولوژن (viologen) با کمبود الکترون و ۲-نفتول غنی از الکترون را می‌توان بیان کرد [۹۳]. $CB_{(6)}$ با دی‌آمینوهگزان (DAH) و اسپرمین (spermine, SPM) زوج بسیار پایداری تشکیل می‌دهد که تقریباً قابل مقایسه با استرپتاویدین و بیوتین است. همچنین با اصلاح $B_{(6)}$ با استفاده از گروه‌های مختلف، می‌توان تکثیر و شکل‌شناسی سلول‌های بارگذاری‌شده را کنترل کرد [۹۴]. هیدروژل‌های ابرمولکولی هیالورونیک اسید (HA) اصلاح‌شده را می‌توان به‌مدت ۲ min با مخلوط‌کردن $CB–HA_{(6)}$ و DAH-HA در مجاورت سلول به‌آسانی تهیه کرد. هیدروژل‌های $DAH–HA/CB_{(6)}$ پایداری مکانیکی خوب، تجزیه‌پذیری آنزیمی و سمیت ناچیزی دارند که برای سلول‌درمانی و بازسازی بافت قابل استفاده هستند. برای کاربردهای درون‌تنی، ایمنی بلندمدت هیدروژل‌های $DAH–HA/CB_{(6)}$ باید با دقت بررسی شود [۹۴].

۳- کاربرد هیدروژل‌های تزریق‌پذیر

۳-۱ پزشکی ترمیمی

پزشکی ترمیمی در زمینه کاربرد مهندسی بافت برای بازسازی بافت آسیب‌دیده و سلول‌درمانی شامل رساندن سلول‌ها به بافت آسیب‌دیده برای ترمیم است. سلول‌درمانی خودی (autologous) با سلول‌های

خود بیمار انجام می‌شود، در حالی که در سلول‌درمانی دگرزا (allogeneic) سلول‌ها را از فرد اهداکننده می‌گیرند. فرد اهداکننده باید سازگاری بافتی نزدیک با بدن بیمار داشته باشد [۹۵]. بازسازی یا مهندسی بافت آسیب‌دیده با استفاده از سلول، مولکول‌های پیام‌رسان و داربست انجام می‌شود. افزون بر علامت‌های خارجی که از محیط میکروسکوپی حاصل می‌شود، برهم‌کنش سلول–سلول از راه پروتئین‌های غشای سلول نیز برای شتاب‌دهی رشد و عملکرد سلولی مهم است [۹۶].

برهم‌کنش سلول–سلول به برهم‌کنش مستقیم بین سطوح سلولی مربوط است که نقش مهمی در رشد و عملکرد آن‌ها دارد. این برهم‌کنش به سلول‌ها اجازه می‌دهد تا در واکنش به تغییر در ریزمحیط خود با یکدیگر ارتباط برقرار کنند. این سطوح از پروتئین‌های غشایی تشکیل شده‌اند و فرایندهای غشایی به‌عنوان دروازه عمل می‌کنند تا انتقال مواد ویژه به داخل غشا امکان‌پذیر باشد [۹۷]. هیدروژل‌ها به‌طور گسترده به‌عنوان حامل سلول و ECM سنتزی، برای کنترل رشد و عملکرد سلول با استفاده از عامل‌های رشد بررسی شدند. در ادامه سعی شده است، شرحی از هیدروژل‌های تزریق‌پذیر برای استفاده در سلول‌درمانی و بازسازی بافت بیان شود.

۳-۲ سلول‌درمانی

انتقال پلاسما و پیوند مغز استخوان نمونه‌هایی از درمان با سلول است. در این روش، از جمعیت چند میلیون تا صدها میلیون سلول برای تزریق مؤثر استفاده می‌شود [۹۸]. سلول‌رسانی به مقدار کافی می‌تواند کیفیت درمان را افزایش دهد و این موضوع برتری بزرگی برای بیماران مبتلا به بیماری‌های مزمن مانند دیابت به‌شمار می‌آید. به‌طور مثال، پیوند جزایر لانگرهانس (بخشی از لوزالمعده) درمانی امیدوارکننده برای درمان دیابت است. از دست‌دادن و ضعیف‌شدن سلول جزایر لوزالمعده (pancreatic islets) مانع عمده‌ای برای درمان دیابت با روش پیوند است. هیدروژل‌ها می‌توانند با محافظت از سلول‌ها و ایجاد محیط مناسب، عمر مفید آن‌ها را افزایش دهند. به‌طور مثال، کوپلیمرشدن پلی‌آکریل‌آمید با پلی‌آکریلیک اسید که پلیمر قطبی و آب‌دوست است و در تهیه ژل برای صنایع غذایی و پزشکی کاربرد دارد [۹۹] به کوپلیمر P(NIPAAm-*co*-AA) منجر می‌شود. این کوپلیمر به‌عنوان داربست سلولی تزریق‌پذیر برای بارگذاری سلول جزایر لانگرهانس بررسی و دیده شد، زنده‌ماندن این نوع سلول در هیدروژل P(NIPAAm-*co*-AA) و مقدار ترشح انسولین آن به‌طور شایان توجهی در مقایسه با سلول‌های آزاد افزایش یافته است [۱۰۰].

افزون بر این، با افزودن هورمون گلوکاگون مانند پپتید GLP-1 به هیدروژل، ترشح انسولین افزایش می‌یابد [۱۰۱]. یکی دیگر از هیدروژل‌های تزریق‌پذیر استفاده‌شده به همراه بارگذاری سلول جزایر پانکراس از واکنش افزایشی Michael مانند PEG–مالئیمید چهاربازو و پپتیدهای دی‌تیول است. همچنین، هیدروژل با پپتیدی مانند آرژینیل گلیسیل‌اسپارتیک اسید (RGD) که مسئول چسبندگی سلول به ECM بوده [۱۰۲] یا عامل رشد اندوتلیال عروقی (vascular endothelial, VEGF) که در رگ‌زایی (angiogenesis) و بهبود زنده‌مانی سلول‌ها مؤثر است، ترکیب می‌شود [۱۰۳]. پیوند جزایر لوزالمعده با استفاده از هیدروژل‌های پلی(اتیلن گلیکول) حامل عامل رشد VEGF به برگشت از افزایش قند خون (hyperglycemia) در موش‌های مبتلا به دیابت منجر شد. همچنین آزمون تحمل گلوکوز، مقدار عادی قند خون (normoglycemia) (غلظت طبیعی قند در خون) را در موش‌های دیابتی تأیید کرد. هیدروژل آلژینات دارای شیشه زیست‌فعال و سلول فیبروبلاست (fibroblasts) با رهایش VEGF برای درمان بلندمدت کم خونی موضعی (ischemia) مطالعه شده است [۱۰۴]. شیشه‌های زیست‌فعال، تکثیر سلول‌های اندوتلیال و ترشح VEGF را از سلول فیبروبلاست در ذرات آلژینات افزایش دادند.

سلول‌ها به‌طور ژنتیکی برای تولید و ترشح زیست‌مولکول‌هایی مانند سیتوکین‌ها (cytokines)، هورمون‌ها و پروتئین‌ها اصلاح می‌شوند. ذرات آلژینات با پپتید RGD به همراه بارگذاری سلول ماهیچه‌ای (myoblasts, C2C12) مهندسی‌شده برای ترشح اریتروپوئیتین (erythropoietin, EPO) موش [۱۰۵] استفاده شده است. دیده شد، ترشح EPO در آزمایش برون‌تنی از سلول‌های موجود در میکروکپسول‌های دارای آلژینات همراه RGD بیشتر از گروه کنترل بود. افزون بر این، تزریق زیرجلدی هیدروژل‌های دارای سلول به انتشار نسبتاً زیاد EPO، حفظ سطح زیاد خون‌بهر یا درصد سلول‌های قرمز در خون (hematocrit)، با حداقل واکنش التهابی منجر شد. همچنین، هیدروژل پلی(اتیلن گلیکول) همراه با بارگذاری سلول فیبروبلاست مهندسی‌شده برای بازسازی استخوان در حیوانات توسعه یافتند [۱۰۶].

Choi و همکاران نشان دادند، هیدروژل PEG–دی‌آکریلات دارای سلول می‌تواند برای درمان دیابت به‌عنوان سامانه تشخیص و درمان استفاده شود [۱۰۷،۱۰۸]. هیدروژل‌های شبکه‌ای‌شده با نور (مرئی یا UV) که دارای ترکیبات سیستئین (cysteine) با گروه سولفوهیدریل باشند، برای هدایت رشد سلول و مهاجرت آن با هدف سلول‌درمانی استفاده می‌شوند. به‌طور شایان توجهی، بیان ژن (استفاده از ژن برای تولید ریبونوکلئیک اسید، RNA، یا پروتئین) در سلول‌های بنیادی

مزانشیمی (MSCs) بیشتر از سایر سلول‌هاست [۱۰۹]. سلول‌های مزانشیمی دگرزا یا ناهمسرشت (xenogenic) پیوندشده، در بقای بلندمدت و حتی جذب در بافت‌های مختلف میزبان، نشانه‌ای از پاسخی ایمنی نمی‌دهد [۱۱۰].

برای کاربردهای مهندسی بافت، هیدروژل‌های ابرمولکولی $CB_{(6)}$/DHA–HA با پپتید RGDyK حلقوی اصلاح شد. پس از دو هفته، تعداد سلول‌های فیبروبلاست انسانی در هیدروژل پنج برابر افزایش یافت که مطابق با خواص و رفتار تکثیر سلولی در محیط دارای RGD است. Park و همکاران [۹۴] با تزریق هیدروژل‌هایی از قبیل $CB_{(6)}$-HA و FITC–$CB_{(6)}$(fluorescein isothiocyanate) زیر پوست موش نشان دادند هیدروژل‌های ابرمولکولی به‌عنوان ECM سنتزی سه‌بعدی با بارگذاری سلول‌های بنیادی اصلاح‌شده ژنتیکی برای درمان‌های مختلف کاربرد دارند.

۳-۳ مهندسی بافت

اهمیت بازسازی بافت به‌طور چشمگیری با امید به زندگی بلندمدت افزایش یافته است [۱۱۱]. پوست، غضروف و استخوان بازسازی‌شده در حال حاضر از نظر بالینی عملی شده است و پیشرفت قابل قبولی برای بازسازی بافت مثانه، کبد و قلب و نیز اعصاب نخاعی به‌دست آمده است [۱۱۲]. هیدروژل‌های تزریق‌پذیر به‌طور گسترده به‌عنوان داربست مصنوعی برای پزشکی ترمیمی بررسی شده‌اند. هیدروژل تزریقی هیالورونیک اسید با واکنش افزایشی Michael از ترکیب گروه تیول در هیالورونیک اسید و پلی(اتیلن گلیکول) اصلاح‌شده با وینیل سولفون (PEG–VS) برای ترمیم بافت غضروف توسعه یافته است [۲۴]. سلول‌های بافت غضروفی (chondrocyte) با محلول‌های پلیمری به‌طور همگن مخلوط شدند. پس از تشکیل هیدروژل نتایج نشان داد، سلول‌ها به‌مدت سه هفته زنده ماندند و تکثیر شدند.

سایر هیدروژل‌های تزریق‌پذیر که با واکنش افزایشی Michael تهیه شدند، با استفاده از هپارین تیول و پلی(اتیلن گلیکول)–دی‌آکریلات برای کشت سلول‌های بافت کبدی (hepatocyte) [۱۱۳] توسعه یافتند. سلول‌های بافت کبدی بارگذاری‌شده عملکرد کبدی را در موش صحرایی افزایش دادند. مقدار آلبومین، اوره و سایر تولیدهای کبد به‌مدت سه هفته پس از بارگذاری سلول در سطح زیادی حفظ شد. همچنین، در هیدروژل دارای عامل‌های رشد، سلول‌های بافت کبدی سطوح بیشتری از تولید آلبومین و اوره را نسبت به سلول‌های واردشده در داخل هیدروژل تنها نشان دادند.

افزون بر این، ایجاد شبکه شیمیایی میان ترکیبات دکستران–تیرامین و هپارین–تیرامین در غضروف‌سازی [۴۱] به‌کار گرفته شده است. هپارین با اجزای ECM سلول برهم‌کنش دارد و پیام‌رسانی سلول را در برهم‌کنش سلول–ماتریس بهبود می‌بخشد. هپارین می‌تواند چسبندگی، تکثیر و تمایز سلول را ارتقا دهد.

هیدروژل‌های بر پایه پپتید نیز با استفاده از شیمی کلیک برای سلول‌رسانی توسعه یافتند. هیدروژل تزریقی پپتید RGD با گروه آزیدی و پلی(اتیلن گلیکول) چهار بازو اصلاح‌شده با استیلن در واکنش شیمی کلیک توسعه یافته است. در ادامه، فیبروبلاست‌های پوست انسانی داخل این هیدروژل بارگذاری شدند تا امکان استفاده از این نوع هیدروژل برای بهبود زخم بررسی شود. نتایج نشان داد، چسبندگی و تکثیر سلول‌های بارگذاری‌شده به‌طور شایان توجهی با افزایش مقدار پپتید RGD در هیدروژل بهبود یافته است [۱۱۴]. هیدروژل‌های حساس به pH و دما مشکل تشکیل هیدروژل هنگام تزریق به داخل بدن را از بین می برند، زیرا تا پیش از ورود به محیط بدن مایع هستند و فقط با قرارگیری در شرایط فیزیولوژی بدن شکل می‌گیرند. دیده شده است، محلول کوپلیمر چندجزئی SMO-PCLA-PEG-PCLA-SMO شرایط تغییر فاز سل به ژل را در pH برابر ۷/۲ و دمای بدن [۷۹] دارد و به‌آسانی در تماس با بافت بدن هیدروژل مدنظر تهیه می‌شود. سلول MSC انسانی و پروتئین نوترکیب BMP-2 به‌راحتی در این هیدروژل بارگذاری شدند. دیده شد، تزریق زیرجلدی محلول پلیمر دارای سلول MSC انسان و BMP-2 و مولکول‌های زیست‌فعال در پشت موش به تشکیل هیدروژل طی ۱۰ min منجر شد. نتایج نشان داد، هیدروژل شکل خود را حفظ کرد و سلول‌های مزانشیمی تا هفت هفته زنده ماندند و تکثیر شدند.

هیدروژل تزریقی پلی‌یورتان–آکریلات نیز با ترکیب پلی(پروپیلن گلیکول)، پلی(کاپرولاکتون دی‌ال)، هیدروکسی اتیل متاکریلات و ایزوفورون دی‌ایزوسیانات (IPDI) برای کاربردهای زیست‌پزشکی استفاده می‌شوند. خواص مکانیکی پلیمرهای شبکه‌ای‌شده مشابه بافت‌های نرم است. همچنین، پس از گذشت چهار هفته زیست‌سازگاری خوبی در پشت موش صحرایی نشان دادند. افزون بر این، هیدروژل‌های شبکه‌ای‌شده فیزیکی بر پایه پروتئین با بارگذاری سلول‌های مختلف مانند سلول‌های بنیادی مزانشیمی نیز تهیه شدند [۴۷]. زنجیرهای پپتیدی غنی از تریپتوفان و پرولین از اجزای تشکیل هیدروژل بودند. سلول‌های بنیادی عصبی بارگذاری‌شده در این هیدروژل تمایز و تکثیر یافته و شبکه‌های پایداری را تشکیل دادند [۸۲].

هیدروژل‌های ابرمولکولی سیکلودکسترین (CD) با استفاده از برهم‌کنش میزبان–مهمان نیز برای بارگذاری سلول‌های بنیادی توسعه یافتند. کوپلیمر سه‌جزئی MPEG-PCL-MPEG متوکسی پلی(اتیلن

گلیکول)-*b*-پلی(ε-کاپرولاکتون) به همراه α-CD با تشکیل شبکه فیزیکی برای اهداف مهندسی بافت استفاده شده است. سلول‌های ECV304 و MSC حاصل از مغز استخوان به‌آسانی در هیدروژل بارگذاری شده و نگه داشته می‌شوند که نشانگر امکان استفاده از این هیدروژل در کاربردهای مهندسی بافت است [۱۱۴].

۴- نتیجه‌گیری

در این مقاله، محدوده گسترده‌ای از هیدروژل‌های تزریق‌پذیر برای پزشکی ترمیمی از جمله سلول‌درمانی و بازسازی بافت‌ها شرح داده شدند. هر نوع از هیدروژل‌های تزریق‌پذیر برتری‌ها و عیب‌های ویژه‌ای از دیدگاه پزشکی دارند. هیدروژل‌های تزریق‌پذیر شبکه‌ای‌شده با پیوند شیمیایی خواص مکانیکی خوبی دارند، اما در کاربردهای درون‌تنی به‌دلیل سمیت سلولی محدود شده‌اند. در مقابل، هیدروژل‌های تزریق‌پذیر که با برهم‌کنش فیزیکی شبکه‌ای می‌شوند، می‌توانند به‌آسانی بدون واکنش‌های شیمیایی تهیه شوند، اما این هیدروژل‌ها خواص مکانیکی ضعیف و پایداری کمی در بدن دارند. جدی‌ترین چالش برای استفاده از هیدروژل‌های تزریق‌پذیر تشکیل‌شونده درجا در پزشکی دستیابی به ساختار ریزمحیط سلول به‌عنوان ECM است. موضوع‌های دیگر بحث‌شده در استفاده از این نوع هیدروژل‌ها، زیست‌سازگاری، زیست‌تخریب‌پذیری، داشتن منافذ متصل به‌هم برای عبور و خروج مواد و کنترل رشد سلول‌هاست. مهندسی بافت به درک عمیقی از زیست‌شناسی سلول‌های بنیادی، برهم‌کنش سلول-سلول، دینامیک بافت، زیست‌مواد، فرایندهای فیزیکی و شیمیایی و طرح‌های زیست‌مهندسی نیاز دارد. دستیابی به تمام این نیازها و ادغام آن‌ها در طرح‌های جدید، وظیفه اصلی مهندسان بافت بوده و امید است، این زمینه نوظهور راه‌حلی برای چالش‌ها و مشکلات موجود در پزشکی ترمیمی و مهندسی بافت باشد.

۵- مراجع

1. Lanza R., Langer R., and Vacanti J.P., *Principles of Tissue Engineering*, 4 th ed., Elsevier, 237-259, 2013.
2. *The Extracellular Matrix: An Overview*, Mecham R.P. (Ed.), Springer Berlin Heidelberg, 1-39, 2011.
3. Varki A., Cummings R.D., Esko J.D., Freeze H.H., Stanley P., Bertozzi, C.R., Hart G.W., and Etzler M.E., *Essentials of Glycobiology*, Cold Spring Harbor Laboratory, 30-49, 2009.
4. Jurgen Schiller K.L., The Detailed Structural Characterization of Chemically Modified Glycosaminoglycans is Absolutely Essential to Explain Potential Biological Effectsm, *J. Glycomics Lipidomics*, **04**, 1-10, 2014.
5. Bast R.C., Hennessy B., and Mills G.B., The Biology of Ovarian Cancer: New Opportunities for Translation, *Nat. Rev. Cancer*, **9**, 415-428, 2009.
6. Lutolf M.P., Gilbert P.M., and Blau H.M., Designing Materials to Direct Stem-Cell Fate, *Nature*, **462**, 433-441, 2009.
7. Yi S., Ding F., Gong L., and Gu X., Extracellular Matrix Scaffolds for Tissue Engineering and Regenerative Medicine, *Curr. Stem Cell Res. Ther*, **12**, 233-246, 2017.
8. Bakhtiar H., Pezeshki-Modaress M., Kiaipour, Z., Shafiee M., Ellini M. R., Mazidi A., Rajabi S., Zamanlui Benisi S., Ostad S.N., Galler K., Pakshir, P., Azarpazhooh A., and Kishen A., Pulp ECM-derived Macroporous Scaffolds for Stimulation of Dental-Pulp Regeneration Process, *Dent. Mater*, **36**, 76-87, 2020.
9. Eltom A., Zhong G., and Muhammad A., Scaffold Techniques and Designs in Tissue Engineering Functions and Purposes: A Review, *Adv. Mater. Sci. Eng.*, **2019**, 1-13, 2019.
10. Moradian A. and Khademzadeh J., Biodegradable and Biocompatible Synthetic Polymers for Tissue Engineering, *Iran. Polym. Technol. Res. Dev.*, *(Persian)*, **3**, 63-78, 2018.
11. Dash M., Chiellini F., Ottenbrite R.M., and Chiellini E., Chitosan-A Versatile Semi-Synthetic Polymer in Biomedical Applications, *Prog. Polym. Sci.*, **36**, 981-1014, 2011.
12. Puppi D., Chiellini F., Piras A.M., and Chiellini E., Polymeric Materials for Bone and Cartilage Repair, *Prog. Polym. Sci.*, **35**, 403-440, 2010.
13. Sadeghi A., Zandi M., Pezeshki-Modaress M., and Rajabi S., Tough, Hybrid Chondroitin Sulfate Nanofibers as a Promising Scaffold for Skin Tissue Engineering, *Int. J. Biol. Macromol.*, **132**, 63-75, 2019.
14. Chai Q., Jiao Y., and Yu X., Hydrogels for Biomedical

Applications: Their Characteristics and the Mechanisms Behind Them, *Gels*, **3**, 6-15, 2017.

15. Seliktar D., Designing Cell-Compatible Hydrogels for Biomedical Applications, *Science*, **336**, 1124-1138, 2012.
16. Lowman A.M., Dziubla T.D., Bures P., and Peppas N.A., Structural and Dynamic Response of Neutral and Intelligent Networks in Biomedical Environments, *Adv. Chem. Eng.*, **29**, 75-130, 2004.
17. Lee J.H., Injectable Hydrogels Delivering Therapeutic Agents for Disease Treatment and Tissue Engineering, *Biomater. Res.*, **22**, 27-41, 2018.
18. Ko D.Y., Shinde U.P., Yeon B., and Jeong B., Recent Progress of In Situ Formed Gels for Biomedical Applications, *Prog. Polym. Sci.*, **38**, 672-701, 2013.
19. Yu L. and Ding J., Injectable Hydrogels as Unique Biomedical Materials, *Chem. Soc. Rev.*, **37**, 1473-1481, 2008.
20. Liu M., Zeng X., Ma C., Yi H., Ali Z., Mou X., Li S., Deng Y., and He N., Injectable Hydrogels for Cartilage and Bone Tissue Engineering, *Bone Res.*, **5**, 1-20, 2017.
21. Nair D.P., Podgórski M., Chatani S., Gong T., Xi W., Fenoli C.R., and Bowman C.N., The Thiol-Michael Addition Click Reaction: A Powerful and Widely Used Tool in Materials Chemistry, *Chem. Mater.*, **26**, 724-744, 2014.
22. McCall J.D. and Anseth K.S., Thiol-Ene Photopolymerizations Provide a Facile Method to Encapsulate Proteins and Maintain Their Bioactivity, *Biomacromolecules*, **13**, 2410-2417, 2012.
23. Matsumoto M., Udomsinprasert W., Laengee P., Honsawek S., Patarakul K., and Chirachanchai S., A Water-Based Chitosan-Maleimide Precursor for Bioconjugation: An Example of a Rapid Pathway for an In Situ Injectable Adhesive Gel, *Macromol. Rapid Commun.*, **37**, 1618-1622, 2016.
24. Jin R., Moreira Teixeira L.S., Krouwels A., Dijkstra P.J., van Blitterswijk C.A., Karperien M., and Feijen J., Synthesis and Characterization of Hyaluronic Acid–Poly(ethylene glycol) Hydrogels via Michael addition: An Injectable Biomaterial for Cartilage repair, *Acta Biomater.*, **6**, 1968-1977, 2010.
25. Yang J.A., Kim H., Park K., and Hahn S.K., Molecular Design of Hyaluronic Acid Hydrogel Networks for Long-Term Controlled Delivery of Human Growth Hormone, *Soft Matter*, **7**, 868-870, 2011.
26. Cai S., Liu Y., Zheng Shu X., and Prestwich G.D., Injectable Glycosaminoglycan Hydrogels for Controlled Release of Human Basic Fibroblast Growth Factor, *Biomaterials*, **26**, 6054-6067, 2005.
27. Liu Y., Shu X.Z., and Prestwich G.D., Reduced Postoperative Intra-Abdominal Adhesions Using Carbylan-SX, a Semisynthetic Glycosaminoglycan Hydrogel, *Fertil. Steril.*, **87**, 940-948, 2007.
28. Wiley K.L., Ovadia E.M., Calo C.J., Huber R.E., and Kloxin A.M., Rate-based Approach for Controlling the Mechanical Properties of 'Thiol–ene' Hydrogels Formed with Visible Light, *Polym. Chem.*, **10**, 4428-4440, 2019.
29. Worrell B.T., Malik J.A., and Fokin V.V., Direct Evidence of a Dinuclear Copper Intermediate in Cu(I)-Catalyzed Azide-Alkyne Cycloadditions, *Science*, **340**, 457-460, 2013.
30. Schöffler A.L., Makarem A., Rominger F., and Straub B.F., Dinuclear Thiazolylidene Copper Complex as Highly Active Catalyst for Azid-Alkyne Cycloadditions, *Beilstein J. Org. Chem.*, **12**, 1566-1572, 2016.
31. Jewett J.C. and Bertozzi C.R., Cu-free Click Cycloaddition Reactions in Chemical Biology, *Chem. Soc. Rev.*, **39**, 1272-1279, 2010.
32. Takahashi A., Suzuki Y., Suhara T., Omichi K., Shimizu A., Hasegawa, K., Kokudo N., Ohta S., and Ito T., In Situ Cross-Linkable Hydrogel of Hyaluronan Produced via Copper-Free Click Chemistry, *Biomacromolecules*, **14**, 3581-3588, 2013.
33. van Dijk M., van Nostrum C.F., Hennink W.E., Rijkers D.T.S., and Liskamp R.M.J., Synthesis and Characterization of Enzymatically Biodegradable PEG and Peptide-Based Hydrogels Prepared by Click Chemistry, *Biomacromolecules*, **11**, 1608-1614, 2010.
34. Nguyen Q.V., Huynh D.P., Park J.H., and Lee D.S., Injectable Polymeric Hydrogels for the Delivery of Therapeutic Agents: A Review, *Eur. Polym. J.*, **72**, 602-619, 2015.
35. Collins J., Xiao Z., Müllner M., and Connal L.A., The Emergence of Oxime Click Chemistry and Its Utility in Polymer Science, *Polym. Chem.*, **7**, 3812-3826, 2016.
36. Tan H., Chu C.R., Payne K.A., and Marra K.G., Injectable In Situ Forming Biodegradable Chitosan–Hyaluronic Acid Based Hydrogels for Cartilage Tissue Engineering, *Biomaterials*, **30**, 2499-2506, 2009.
37. Wang D.A., Varghese S., Sharma B., Strehin I., Fermanian S., Gorham J., Fairbrother D.H., Cascio B., and Elisseeff J.H., Multifunctional Chondroitin Sulphate for Cartilage Tissue–Biomaterial Integration, *Nat. Mater.*, **6**, 385-392, 2007.
38. Emami Z., Ehsani M., Zandi M., and Foudazi R., Controlling

Alginate Oxidation Conditions for Making Alginate-Gelatin Hydrogels, *Carbohydr. Polym.*, **198**, 509-517, 2018.

39. Hozumi T., Kageyama T., Ohta S., Fukuda J., and Ito T., Injectable Hydrogel with Slow Degradability Composed of Gelatin and Hyaluronic Acid Cross-Linked by Schiff's Base Formation, *Biomacromolecules*, **19**, 288-297, 2018.
40. Lee F., Bae K.H., and Kurisawa M., Injectable Hydrogel Systems Crosslinked by Horseradish Peroxidase, *Biomed. Mater.*, **11**, 1-14, 2015.
41. Kim K.S., Park S.J., Yang J.A., Jeon J.H., Bhang S.H., Kim B.S., and Hahn S.K., Injectable Hyaluronic Acid–Tyramine Hydrogels for the Treatment of Rheumatoid Arthritis, *Acta Biomater.*, **7**, 666-674, 2011.
42. Jin R., Moreira Teixeira L.S., Dijkstra P.J., van Blitterswijk C.A., Karperien M., and Feijen J., Chondrogenesis in Injectable Enzymatically Crosslinked Heparin/Dextran Hydrogels, *J. Control. Release*, **152**, 186-195, 2011.
43. Lee F., Bae K.H., and Kurisawa M., Injectable Hydrogel Systems Crosslinked by Horseradish Peroxidase, *Biomed. Mater.*, **11**, 1-14, 2015.
44. Elisseeff J., Anseth K., Sims D., McIntosh W., Randolph M., and Langer R., Transdermal Photopolymerization for Minimally Invasive Implantation, *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **96**, 3104-3107, 1999.
45. Ghasaban S., Atai M., Imani M., Zandi M., and Shokrgozar M.A., Photo-Crosslinkable Cyanoacrylate Bioadhesive: Shrinkage Kinetics, Dynamic Mechanical Properties, and Biocompatibility of Adhesives Containing TMPTMA and POSS Nanostructures as Crosslinking Agents, *J. Biomed. Mater. Res., Part A*, **99**, 240-248, 2011.
46. Yoshii E., Cytotoxic Effects of Acrylates and Methacrylates: Relationships of Monomer Structures and Cytotoxicity, *J. Biomed. Mater. Res.*, **37**, 517-524, 1997.
47. Pereira I.H.L., Ayres E., Patrício P.S., Góes A.M., Gomide V.S., Junior E.P., and Oréfice R.L., Photopolymerizable and Injectable Polyurethanes for Biomedical Applications: Synthesis and Biocompatibility, *Acta Biomater*, **6**, 3056-3066, 2010.
48. Ovsianikov A., Malinauskas M., Schlie S., Chichkov B., Gittard S., Narayan R., Löbler M., Sternberg K., Schmitz K.P., and Haverich A., Three-dimensional Laser Micro- and Nano-structuring of Acrylated Poly(ethylene glycol) Materials and Evaluation of Their Cytoxicity for Tissue Engineering Applications, *Acta Biomater*, **7**, 967-974, 2011.
49. Nichol J.W., Koshy S.T., Bae H., Hwang C.M., Yamanlar S., and Khademhosseini A., Cell-laden Microengineered Gelatin Methacrylate Hydrogels, *Biomaterials*, **31**, 5536-5544, 2010.
50. Pahoff S., Meinert C., Bas O., Nguyen L., Klein T.J., and Hutmacher D.W., Effect of Gelatin Source and Photoinitiator Type on Chondrocyte Redifferentiation in Gelatin Methacryloyl-based Tissue-Engineered Cartilage Constructs, *J. Mater. Chem. B*, **7**, 1761-1772, 2019.
51. Seo J.Y., Lee B., Kang T.W., Noh J.H., Kim M.J., Ji Y.B., Ju H.J., Min B.H., and Kim M.S., Electrostatically Interactive Injectable Hydrogels for Drug Delivery, *Tissue Eng. Regen. Med.*, **15**, 513-520, 2018.
52. Tønnesen H.H. and Karlsen J., Alginate in Drug Delivery Systems, *Drug Dev. Ind. Pharm.*, **28**, 621-630, 2002.
53. Nair L.S. and Laurencin C.T., Biodegradable Polymers as Biomaterials, *Prog. Polym. Sci.*, **32**, 762-798, 2007.
54. Sun J.Y., Zhao X., Illeperuma W.R.K., Chaudhuri O., Oh K.H., Mooney D.J., Vlassak J.J., and Suo Z., Highly Stretchable and Tough Hydrogels, *Nature*, **489**, 133-136, 2012.
55. Zhao L., Weir M. D., and Xu H.H.K., An Injectable Calcium Phosphate-Alginate Hydrogel-Umbilical Cord Mesenchymal Stem Cell Paste for Bone Tissue Engineering, *Biomaterials*, **31**, 6502-6510, 2010.
56. Kuo C.K. and Ma P.X., Ionically Crosslinked Alginate Hydrogels as Scaffolds for Tissue Engineering: Part 1. Structure, Gelation Rate and Mechanical Properties, *Biomaterials*, **22**, 511-521, 2001.
57. Kuo C.K. and Ma P.X., Maintaining Dimensions and Mechanical Properties of Ionically Crosslinked Alginate Hydrogel Scaffolds In Vitro, *J. Biomed. Mater. Res. A.*, **84**, 899-907, 2008.
58. Daemi H., Mashayekhi M., and Pezeshki Modaress M., Facile Fabrication of Sulfated Alginate Electrospun Nanofibers, *Carbohydr. Polym.*, **198**, 481-485, 2018.
59. Lee K.Y. and Mooney D.J., Alginate: Properties and Biomedical Applications, *Prog. Polym. Sci.*, **37**, 106-126, 2012.
60. Chou A.I., Akintoye S.O., and Nicoll S.B., Photo-crosslinked Alginate Hydrogels Support Enhanced Matrix Accumulation by Nucleus Pulposus Cells In Vivo, *Osteoarthr. Cartil.*, **17**, 1377-1384, 2009.
61. Igarashi T., Iwasaki N., Kawamura D., Tsukuda Y., Kasahara Y., Todoh M., Tadano S., and Minami A., Therapeutic Effects

of Intra-Articular Ultrapurified Low Endotoxin Alginate Administration on Experimental Osteoarthritis in Rabbits, *Cartilage*, **3**, 70-78, 2012.

62. Pezeshki-Modaress M., Rajabi-Zeleti S., Zandi M., Mirzadeh H., Sodeifi N., Nekookar A., and Aghdami N., Cell-loaded Gelatin/Chitosan Scaffolds Fabricated by Salt-Leaching/ Lyophilization for Skin Tissue Engineering: In Vtro and In Vivo Study, *J. Biomed. Mater. Res., Part A*, **102**, 3908-3917, 2014.
63. Berger J., Reist M., Mayer J., Felt O., and Gurny R., Structure and Interactions in Chitosan Hydrogels Formed by Complexation or Aggregation for Biomedical Applications, *Eur. J. Pharm. Biopharm.*, **57**, 35–52, 2004.
64. Jamali Firouzabadi V. and Kokabi M., Triple Stimuli Responsive Poly(vinyl alcohol)Chitosan/Nanoclay/Nanosilver Nanocomposite Hydrogel, *Iran. J. Polym. Sci. Technol. (Persian)*, **32**, 3-14, 2019.
65. Tan H. and Marra K.G., Injectable, Biodegradable Hydrogels for Tissue Engineering Applications, *Materials (Basel)*, **3**, 1746-1767, 2010.
66. Yan J., Yang L., Wang G., XiaoY., Zhang B., and Qi N., Biocompatibility Evaluation of Chitosan-based Injectable Hydrogels for the Culturing Mice Mesenchymal Stem Cells In Vitro, *J. Biomater. Appl.*, **24**, 625-637, 2010.
67. Klouda L. and Mikos A.G., Thermoresponsive Hydrogels in Biomedical Applications, *Eur. J. Pharm. Biopharm.*, **68**, 34-45, 2008.
68. Zandi M. and Mirzadeh H., Effects of Concentration, Temperature, and pH on Chain Mobility of Gelatin during Early Stages of Gelation, *Iran. Polym. J.*, **16**, 861-870, 2007.
69. Ruel-Gariépy E. and Leroux J.C., In Situ-Forming Hydrogels-Review of Temperature-Sensitive Systems, *Eur. J. Pharm. Biopharm.*, **58**, 409-426, 2004.
70. Alexandridis P., Zhou D., and Khan A., Lyotropic Liquid Crystallinity in Amphiphilic Block Copolymers: Temperature Effects on Phase Behavior and Structure for Poly(ethylene oxide)-*b*-Poly(propylene oxide)-*b*-Poly(ethylene oxide) Copolymers of Different Composition, *Langmuir*, **12**, 2690-2700, 1996.
71. Seyedlar R.M., Imani M., Atai M., and Nodehi A., Temperature-Responsive Hydrogels: Materials, Mechanisms and Biological Applications, *Iran. J. Polym. Sci. Technol. (Persian)*, **31**, 211-237, 2018.
72. Zhang W., Jin X., Li H., Zhang R., and Wu C., Injectable and Body Temperature Sensitive Hydrogels Based on Chitosan and Hyaluronic Acid for pH Sensitive Drug Release, *Carbohydr. Polym.*, **186**, 82-90, 2018.
73. Ha D.I., Lee S.B., Chong M.S., Lee Y.M., Kim S.Y., and Park Y.H., Preparation of Thermo-responsive and Injectable Hydrogels Based on Hyaluronic Acid and Poly(N-isopropylacrylamide) and Their Drug Release Behaviors, *Macromol. Res.*, **14**, 87-93, 2006.
74. Fusco S., Borzacchiello A., and Netti P.A., Perspectives on: PEO-PPO-PEO Triblock Copolymers and Their Biomedical Applications, *J. Bioact. Compat. Polym.*, **21**, 149-164, 2006.
75. Jeong B., Bae Y.H., and Kim S.W., In Situ Gelation of PEG-PLGA-PEG Triblock Copolymer Aqueous Solutions and Degradation Thereof, *J. Biomed. Mater. Res.*, **50**, 171-177, 2000.
76. Massumi M., Abasi M., Babaloo H., Terraf P., Safi M., Saeed M., Barzin J., Zandi M., and Soleimani M., The Effect of Topography on Differentiation Fates of Matrigel-Coated Mouse Embryonic Stem Cells Cultured on PLGA Nanofibrous Scaffolds, *Tissue Eng., Part A*, **18**, 609-620, 2012.
77. Liu H., Slamovich E.B., and Webster T.J., Less Harmful Acidic Degradation of Poly(lactic-*co*-glycolic acid) Bone Tissue Engineering Scaffolds Through Titania Nanoparticle Addition, *Int. J. Nanomed.*, **1**, 541-545, 2006.
78. Xu X.D., Zhang X.Z., Cheng S.X., Zhuo R.X., and Kennedy J.F., A Strategy to Introduce the pH Sensitivity to Temperature Sensitive PNIPAAm Hydrogels without Weakening the Thermosensitivity, *Carbohydr. Polym.*, **68**, 416-423, 2007.
79. Kim H.K., Shim W.S., Kim S.E., Lee K.H., Kang E., Kim J.H., Kim K., Kwon I.C., and Lee D.S., Injectable In Situ–Forming pH/Thermo-Sensitive Hydrogel for Bone Tissue Engineering, *Tissue Eng., Part A*, **15**, 923-933, 2009.
80. Khan S., Akhtar N., Minhas M.U., and Badshah S.F., pH/ Thermo-Dual Responsive Tunable In Situ Cross-Linkable Depot Injectable Hydrogels Based on Poly(N-isopropylacrylamide)/ Carboxymethyl Chitosan with Potential of Controlled Localized and Systemic Drug Delivery, *AAPS PharmSciTech*., **20**, 1-16, 2019.
81. Potta T., Chun C., and Song S.C., Dual Cross-Linking Systems of Functionally Photo-Cross-Linkable and Thermoresponsive Polyphosphazene Hydrogels for Biomedical Applications, *Biomacromolecules*, **11**, 1741-1753, 2010.
82. Wong Po Foo C.T.S., Lee J.S., Mulyasasmita W., Parisi-Amon

A., and Heilshorn S.C., Two-Component Protein-Engineered Physical Hydrogels for Cell Encapsulation, *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **106**, 22067-22072, 2009.

83. Miyata T., Asami N., and Uragami T., Structural Design of Stimuli-Responsive Bioconjugated Hydrogels that Respond to a Target Antigen, *J. Polym. Sci., Part B: Polym. Phys.*, **47**, 2144-2157, 2009.
84. Xing Y., Cheng E., Yang Y., Chen P., Zhang T., Sun Y., Yang Z., and Liu D., Self-Assembled DNA Hydrogels with Designable Thermal and Enzymatic Responsiveness, *Adv. Mater.*, **23**, 1117-1121, 2011.
85. Salem A.K., Rose F.R.A.J., Oreffo R.O.C., Yang X., Davies M.C., Mitchell J.R., Roberts C.J., Stolnik-Trenkic S., Tendler S.J.B., Williams P.M., and Shakesheff K.M., Porous Polymer and Cell Composites that Self-Assemble In Situ, *Adv. Mater.*, **15**, 210-213, 2003.
86. Wen H., Xiao W., Biswas S., Cong Z.Q., Liu X.M., Lam K.S., Liao Y.H., and Deng W., Alginate Hydrogel Modified with a Ligand Interacting with α3β1 Integrin Receptor Promotes the Differentiation of 3D Neural Spheroids toward Oligodendrocytes In Vitro, *ACS Appl. Mater. Interfaces*, **11**, 5821-5833, 2019.
87. Rajput K.N., Patel K.C., and Trivedi U.B., β-Cyclodextrin Production by Cyclodextrin Glucanotransferase from an Alkaliphile *Microbacterium terrae* KNR 9 Using Different Starch Substrates, *Biotechnol. Res. Int.*, **2016**, 1-7, 2016.
88. Davis M.E. and Brewster M.E., Cyclodextrin-based Pharmaceutics: Past, Present and Future, *Nat. Rev. Drug Discov.*, **3**, 1023-1035, 2004.
89. Li J., Self-assembled Supramolecular Hydrogels Based on Polymer-Cyclodextrin Inclusion Complexes for Drug Delivery, *NPG Asia Mater.*, **2**, 112-118, 2010.
90. ehn J.M., *Current Challenges on Large Supramolecular Assemblies*, Springer, Netherlands, 51-66, 1999.
91. van de Manakker F., van der Pot M., Vermonden T., van Nostrum C.F., and Hennink W.E., Self-Assembling Hydrogels Based on β-Cyclodextrin/Cholesterol Inclusion Complexes, *Macromolecules*, **41**, 1766–1773, 2008.
92. Lee J.W., Samal S., Selvapalam N., Kim H.J., and Kim K., Cucurbituril Homologues and Derivatives: New Opportunities in Supramolecular Chemistry, *Acc. Chem. Res.*, **36**, 621-630, 2003.
93. Appel E.A., Biedermann F., Rauwald U., Jones S., Zayed J.M., and Scherman O.A., Supramolecular Cross-Linked Networks via Host-Guest Complexation with Cucurbit[8]uril, *J. Am. Chem. Soc.*, **132**, 14251-14260, 2010.
94. Park K.M., Yang J.A., Jung H., Yeom J., Park J.S., Park K.H., Hoffman A.S., Hahn S.K., and Kim K., In Situ Supramolecular Assembly and Modular Modification of Hyaluronic Acid Hydrogels for 3D Cellular Engineering, *ACS Nano*, **6**, 2960-2968, 2012.
95. Lee S.J., Atala A., and Yoo J.J., *In Situ Tissue Regeneration : Host Cell Recruitment and Biomaterial Design*, Academic, 3-17, 2016.
96. Kirouac D.C., Madlambayan G.J., Yu M., Sykes E.A., Ito C., and Zandstra P.W., Cell-Cell Interaction Networks Regulate Blood Stem and Progenitor Cell Fate, *Mol. Syst. Biol.*, **5**, 293-303, 2009.
97. Alberts B., Johnson A., Lewis J., Raff M., Roberts K., and Walter P., *Molecular Biology of the Cell, Garland Science*, 4th ed., New York, 4-26, 2002.
98. Le Blanc K., Frassoni F., Ball L., Locatelli F., Roelofs H., Lewis I., Lanino E., Sundberg B., Bernardo M.E., Remberger M., Dini G., Egeler R.M., Bacigalupo A., Fibbe W., and Ringdén O., Mesenchymal Stem Cells for Treatment of Steroid-Resistant, Severe, Acute Graft-Versus-Host Disease: A Phase II Study, *Lancet*, **371**, 1579-1586, 2008.
99. Vosoughi S., Hojjati S.M.R., and Kasraian A., Preparation and Study on Properties Superabsorbent Hydrogel Composite of Acrylamide Acrylic Acid and Zeolite in Agricultural Uses, *Iran. J. Polym. Sci. Technol. (Persian),* **30**, 391-404, 2018.
100. Vernon B., Kim S.W., and Bae Y.H., Insulin Release from Islets of Langerhans Entrapped in a Poly(N-isopropylacrylamide-*co*-acrylic acid) Polymer Gel, *J. Biomater. Sci. Polym. Ed.*, **10**, 183-198, 1999.
101. Gappa H., Baudyš M., Koh J.J., Kim S.W., and Bae Y.H., The Effect of Zinc-Crystallized Glucagon-Like Peptide-1 on Insulin Secretion of Macroencapsulated Pancreatic Islets, *Tissue Eng.*, **7**, 35-44, 2001.
102. low E.F., Haas T.A., Zhang L., Loftus J., and Smith J.W., Ligand Binding to Integrins, *J. Biol. Chem.*, **275**, 21785-21788, 2000.
103. Phelps E.A., Headen D.M., Taylor W.R., Thulé P.M., and García A.J., Vasculogenic Bio-synthetic Hydrogel for Enhancement of Pancreatic Islet Engraftment and Function in Type 1 Diabetes, *Biomaterials*, **34**, 4602-4611, 2013.
104. Keshaw H., Forbes A., and Day R.M., Release of Angiogenic

Growth Factors from Cells Encapsulated in Alginate Beads with Bioactive Glass, *Biomaterials*, **26**, 4171-4179, 2005.

105. Orive G., De Castro M., Kong H.J., Hernández R.M., Ponce S., Mooney D.J., and Pedraz J.L., Bioactive Cell-Hydrogel Microcapsules for Cell-Based Drug Delivery, *J. Control. Release*, **135**, 203-210, 2009.
106. Bikram M., Fouletier-Dilling C., Hipp J.A., Gannon F., Davis A.R., Olmsted-Davis E.A., and West J.L., Endochondral Bone Formation from Hydrogel Carriers Loaded with BMP2-Transduced Cells, *Ann. Biomed. Eng.*, **35**, 796-807, 2007.
107. Choi M., Choi J.W., Kim S., Nizamoglu S., Hahn S.K., and Yun S.H., Light-Guiding Hydrogels for Cell-Based Sensing and Optogenetic Synthesis In Vivo, *Nat. Photonics*, **7**, 987-994, 2013.
108. Luo Y. and Shoichet M.S., A Photolabile Hydrogel for Guided Three-Dimensional Cell Growth and Migration, *Nat. Mater.*, **3**, 249-253, 2004.
109. Oh H.J., Park E.J., Lee S.Y., Soh J.W., Kong I.S., Choi S.W., Ra J.C., Kang S.K., and Lee B.C., Comparison of Cell Proliferation and Epigenetic Modification of Gene Expression Patterns in Canine Foetal Fibroblasts and Adipose Tissue-Derived Mesenchymal Stem Cells, *Cell Prolif.*, **45**, 438-444, 2012.
110. Wojciechowski A.B., Englund U., Lundberg C., and Warfvinge K., Survival and Long Distance Migration of Brain-Derived Precursor Cells Transplanted to Adult Rat Retina. *Stem Cells*, **22**, 27-38, 2004.
111. Badylak S.F. and Nerem R.M., Progress in Tissue Engineering and Regenerative Medicine, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **107**, 3285-3286, 2010.
112. Laflamme M.A. and Murry C.E., Heart Regeneration, *Nature*, **473**, 326-335, 2011.
113. Kim M., Lee J.Y., Jones C.N., Revzin A., and Tae G., Heparin-Based Hydrogel as a Matrix for Encapsulation and Cultivation of Primary Hepatocytes, *Biomaterials*, **31**, 3596-3603, 2010.
114. Wu D.Q., Wang T., Lu B., Xu, X.D., Cheng S. X., Jiang X.J., Zhang X.Z., and Zhuo R.X., Fabrication of Supramolecular Hydrogels for Drug Delivery and Stem Cell Encapsulation, *Langmuir*, **24**, 10306-10312, 2008.