تهیه هیدروژل درجا تشکیل شونده آنزیمی از کتیرای اصلاح شده شیمیایی برای مهندسی بافت غضروف

مسلم توکل[۱]، ابراهیم واشقانی فراهانی[۲*]، مسعود سلیمانی[۳،۴]، سمیره هاشمی نجف آبادی[۲] و آتنا حجاری‌زاده[۵]

[۱] ایران، یزد، مجتمع پژوهشی ایران مرکزی، پژوهشگاه علوم و فنون هسته‌ای

[۲] ایران، تهران، دانشگاه تربیت مدرس، دانشکده مهندسی شیمی، گروه زیست‌پزشکی

[۳] ایران، تهران، دانشگاه تربیت مدرس، دانشکده پزشکی، گروه خون‌شناسی

[۴] ایران، تهران، مرکز تحقیقات فناوری بن‌یاخته، گروه نانوتکنولوژی و مهندسی بافت

[۵] ایران، تهران، مرکز تحقیقات فناوری بن‌یاخته، گروه بیولوژی مولکولی و مهندسی ژنتیک

تاریخ دریافت: ۹۶/۸/۲۷ تاریخ پذیرش: ۹۶/۱۱/۱۶

چکیده

در مطالعه حاضر، یک سامانه درجا تشکیل شونده آنزیمی از کتیرای اصلاح شده شیمیایی تهیه و برای استفاده در مهندسی بافت غضروف ارزیابی شده است. برای این کار ابتدا گروههای تیرامینی با روش آمینولیزیز در محیط غیرهمگن به گروههای متیل استری کتیرا پیوند زده شد. سپس برای تهیه هیدروژل، آنزیم هرس رادیش پراکسیداز و هیدروژن پراکسید با محلول پلیمری، با استفاده از سرنگ‌دوتایی مجهز به مخلوط کن، مخلوط شدند. در ادامه، ضمن بررسی برخی خواص فیزیکوشیمیایی هیدروژل، آزمونهای برون‌تنی توانایی زنده ماندن و تمایز سلولهای بنیادی مزانشیمی انسانی کپسول شده در داربست به سلولهای غضروف‌ساز انجام شد. با مخلوط شدن عوامل تشکیل ژل، ایجاد گروههای رادیکالی هیدروکسی فنولی در اثر واکنش آنزیمی، موجب ایجاد پیوند کوالانسی بین گروههای تیرامینی و تشکیل هیدروژل گردید. زمان ژل شدن هیدروژلها، قابل تنظیم در بازه کمتر از ۲ دقیقه بود. بیش از ۹۵ درصد سلولهای مزانشیمی انسانی در حین فرآیند کپسوله شدن زنده ماندند و در مدت زمان ۲۱ روز گرماگذاری، بیش از ۷۵ درصد از سلولها توانایی زنده ماندن خود را حفظ کردند. همچنین نتیجه آزمونهای بیان ژن، هیستولوژی و ترشح گلوکزآمینوگلیکان، نشان داد تمایز سلولهای مزانشیمی کپسول شده در هیدروژل به سلولهای غضروف‌ساز در مجاورت محیط تحریک کننده تمایز، در طول دوره تمایز برون‌تنی، رخ داده است.

واژه های کلیدی: هیدروژل درجا تشکیل شونده آنزیمی، کتیرا، تیرامین، مهندسی بافت غضروف، تمایز سلولی

* نویسنده مسئول، تلفن: ۸۲۸۸۳۳۳۸-۰۲۱، پست الکترونیک: evf@modares.ac.ir

مقدمه

پلیمرهای طبیعی با توجه به خواص مطلوبشان، جایگزینی مناسب برای پلیمرهای سنتزی در مصارف زیست‌پزشکی مانند مهندسی بافت محسوب می‌شوند (۱, ۲۸). کتیرا پلی‌ساکاریدی طبیعی است که از دسته‌ای از گونهای رویینده در محدوده ترکیه تا افغانستان تراویده می‌شود. این صمغ از یک بخش محلول و یک بخش نامحلول متورم شونده در آب تشکیل شده است. بخش نامحلول تورم پذیر، باسورین و بخش محلول، تراگاکانتین یا تراگانتیک اسید نام داده شده است. واحدهای مونوساکاریدی تشکیل دهنده کتیرا، شامل دی-گالاکترونیک اسید، دی-گالاکترونیک اسید متیل استر، ال-آرابینوز، دی-زایلوز، دی-گالاکتوز و ال-فوکوز هستند. بدنه اصلی تراگانتیک اسید از مونومرهای

گالاکترونیک اسید تشکیل شده که در برخی از آنها یک یا چند شاخه جانبی شامل دو یا سه مونوساکارید، جایگزین هیدروژن گروه هیدروکسیل شده است (۱۷ و ۳۱). ترکیب درصد مونوساکاریدها، درجه متیل استری شدن گروههای اسیدی و درجه استیلی شدن در صمغ تراویده از گونه‌های مختلف گیاه کتیرا متفاوت هست. این صمغ از دیرباز کاربرد زیادی در صنایع غذایی، داروسازی و طب سنتی داشته است. با توجه به خواص مطلوب شیمیایی و بیوشیمیایی کتیرا، پژوهشها در زمینه گسترش کاربردهای این صمغ در زیست پزشکی و صنایع غذایی در سالهای اخیر رشد زیادی داشته است (۲۶). از مطالعات انجام شده می‌توان به تهیه هیدروژل حساس به pH از کوپلیمر پیوندی کتیرا–پلی‌آکریلیک اسید (۲۴) برای رهایش دارو، تهیه نانوالیاف از آمیزه فیزیکی کتیرا و پلی وینیل‌الکل (۲۳) برای درمان زخم و تهیه نانوذرات کامپوزیتی کتیرا–الیگو کیتوسان (۹) برای رهایش ژن اشاره کرد. مطالعات برون‌تنی پژوهشگران نشان داده که سمیت کتیرا بر روی سلولهای بنیادی انسانی در محیط برون‌تنی نسبت به پلیمرهای زیستی مانند کیتوزان و زایلوگلوکان کمتر است (۸ و ۲۸).

نتایج مطالعه فتاحی و همکاران (۸) نشان داد که چسبندگی سلولهای L929 انسانی به کتیرای گونه اصفهان شبکه‌ای شده یونی نسبت به آلژینات شبکه‌ای شده یونی، بهتر است. دلیل این امر به برهمکنش مناسب سلولها با مونوساکاریدهای موجود در شاخه‌های جانبی کتیرا، مانند فوکوز، نسبت داده شده است (۸).

حائری و همکاران (۱۰) تمایز استئوژنیک سلولهای مزانشیمی انسانی کشت داده شده بر روی داربست هیدروژلی تهیه شده از کتیرای ژل شده یونی را بررسی کردند. مطالعه آنها نشان دهنده نقش مثبت کتیرا در فرآیند تمایز استئوژنیک سلولهای بنیادی مزانشیمی انسانی بود به گونه‌ای که در طول فرآیند تمایز، فعالیت آلکالین فسفاتاز و محتوای کلسیم و همچنین میزان بیان ژنهای Runx2، Osteonectin و Osteocalcin در مقایسه با کشت بر روی کلاژن بیشتر بوده است.

پیشتر، تیم پژوهشی حاضر پس از پیوندزنی تیرامین به ساختار کتیرا، تهیه هیدروژلهای شبکه‌ای شده شیمیایی تشکیل شونده در محل (*In-situ* forming hydrogel) با استفاده از واکنش آنزیمی را بررسی کردند (۶، ۲۷ و ۲۸). برای تهیه هیدروژل، هیدروژن پراکسید و آنزیم هرس‌رادیش پراکسیداز با محلول پلیمر عامل دار مخلوط شدند. هرس‌رادیش پراکسیداز موجب تجزیه پراکسید هیدروژن به رادیکالهای پراکسید می‌گردد و این رادیکالها با حمله به اتم هیدروژن هیدروکسیل فنولی، موجب تشکیل جایگاه واکنش‌پذیر رادیکال آزاد بر روی گروههای تیرامینی می‌شود. در نتیجه واکنش دیمریزه شدن بین ساختارهای رادیکالی یاد شده، با تشکیل چندین پیوند کوالانسی دی‌تیرامینی بین زنجیره‌های پلیمر عامل دار، شبکه سه بعدی هیدروژل شکل می‌گیرد.

هیدروژلهای تشکیل شونده در محل، به شکل مایع به بدن تزریق می‌شوند و در شرایط بدن به شکل جامد/ شبه جامد در می‌آیند. تشکیل این هیدروژلها به کمک روشهای مختلف شیمیایی و فیزیکی انجام می‌شود (۲ و ۱۸). در دهه اخیر استفاده از واکنش آنزیمی برای تهیه این هیدروژلها مورد توجه قرار گرفته، زیرا واکنشهای آنزیمی در شرایط متعارف بدن رخ می‌دهد، احتمال واکنشهای جانبی کم است و سرعت آنها غالباً بالاتر از دیگر واکنشهای شیمیایی است (۱۸).

بافت غضروف مفصلی شامل سلولهای کندروسیت توزیع شده در شبکه برون سلولی غنی از پروتئوگلیکان‌ها و فیبر کلاژنی است. سلولهای غضروف‌ساز (کندروسیت) تنها سلولهای پاسخ‌گوی ترمیم و نگهداری شبکه برون سلولی یاد شده هستند. سالانه انسانهای زیادی در اثر صدمات فیزیکی، پیری و ... دچار ضایعه‌های غضروفی می‌شوند. از

طرفی بافت غضروف به دلایلی مانند نداشتن رگ و اعصاب، توانایی محدودی در ترمیم آسیبها دارد. بنابراین روشهای مختلفی برای درمان آسیبهای مفصلی پیشنهاد شده است. از مهم‌ترین روشهای درمانی می‌توان به کاشت اندام مصنوعی، کاشت بافت غضروفی ساخته شده در محیط برون‌تنی و ترمیم درجای بافت با تزریق سلولها به محل عارضه اشاره کرد (۴ و ۱۲). روشهای درمانی که نیاز به جراحی برای جاگذاری بافت پیش‌ساخته یا اندام مصنوعی دارند، موجب ایجاد زخم و نارضایتی در بیماران می‌شوند. همچنین تولید بافت غضروف در محیط برون‌تنی با اندازه و ویژگیهای ناحیه آسیب دیده بافت دشوار است. از طرفی تزریق سلولها به صورت فشرده (قرص فشرده سلولی (Cell pellet) و یا توده سلولی(Micromass)) به محل عارضه به دلیل محدودیت حجمی و چسبندگی سلولها به محل عارضه و تزریق تعلیق سلولی (Cell suspension) به دلیل مشکل نگهداشت سلولهای آسیب دیده در محل تزریق، در مرحله بالینی مفید به نظر نمی‌رسد. بنابراین، در سالهای اخیر توجه بسیاری از پژوهشگران بر استفاده از سامانه‌های تشکیل شونده در محل به عنوان داربست تزریقی سه‌بعدی برای حمل و کپسول کردن سلولها متمرکز شده است. در این فرآیند، با تزریق تعلیق سلول در محلول پلیمر و عوامل فعال زیستی به بدن، داربست سلولی سه بعدی شکل می‌گیرد که فضای خالی محل تزریق را پر می‌کند و نقش ماتریس برون سلولی را برای سلولهای کپسول شده ایفاء می‌کند. در طول زمان درمان، به تدریج سلولها ماتریس برون سلولی مورد نیاز خود را ترشح می‌کنند و داربست در صورت زیست‌تخریب‌پذیر بودن، مصرف شده یا از بدن دفع می‌شود (۲، ۳، ۱۲ و ۲۵). منابع سلولی که عمدتاً برای مهندسی بافت غضروف استفاده شده‌اند، شامل کندروسیتها و سلولهای بنیادی مزانشیمی هستند. هر چند استفاده از سلولهای کندروسیت، یک روش ارزنده برای ترمیم آسیبهای غضروفی است، محدودیتهایی برای این روش وجود دارد. برای مثال، برای استخراج کندروسیتهای اتولوگ نیاز به روشهای تهاجمی و برداشتن قسمتی از بافت مفصل است، دسترسی به این سلولها محدود است و با این روش تعداد کمی سلول به دست می‌آید، این سلولها (سلولهای کاملاً تمایز یافته) دارای قدرت تکثیر پایینی هستند و همچنین تکثیر سلولهای کندروسیت در آزمایشگاه ممکن است موجب تمایز زدایی آنها شود. در این بین، سلولهای بنیادی مزانشیمی همواره مورد توجه بوده‌اند، زیرا این سلولها دارای قدرت رشد و تکثیر بالایی هستند، در صورت قرار گرفتن در شرایط مناسب، می‌توانند به غضروف تمایز یابند و دسترسی به آنها راحت است (۱۳). در سالهای اخیر چندین مطالعه در مورد تمایز برون‌تنی سلولهای مزانشیمی کپسول شده در داربستهای سه بعدی تزریقی به سلولهای کندروسیت انجام شده است (۵، ۷، ۱۶، ۲۰ و ۲۱).

در پژوهش حاضر، پس از تهیه هیدروژل درجا تشکیل شونده آنزیمی، بررسی برخی خصوصیات فیزیکوشیمیایی آن انجام شده و در ادامه میزان زنده‌ماندن سلولهای مزانشیمی کپسول شده در هیدروژل در مدت زمان ۲۱ روز گرماگذاری و همچنین تمایز برون‌تنی سلولهای کپسول شده در هیدروژل به سلولهای کندروسیت در حضور عوامل تمایز دهنده ارزیابی شده است.

مواد و روشها

مواد: کتیرای خام ایرانی تراویده از گونه اصفهان (*Astragalus gossypinus*) از بازار تهیه و پس از جداسازی ناخالصیها، آسیاب و ذخیره شد. هرس‌رادیش پراکسیداز، هیدروکسی‌فنیل‌اتیل‌آمین (تیرامین)(2-(4-hydroxyphenyl) ethylamine (tyramine)) ، آکریدین نارنجی(Acridine orange (AO))، پروپیدیوم یدید (Propidium iodide (PI))، دگزامتازون، انسولین-ترانسفورمین-سلنیوم (Insulin-transfermin-selenium (ITS)) و آسکوربیک بی‌فسفات (Ascorbic acid bi-phosphate) از شرکت سیگما-آلدریچ، هیدروژن پراکسید از شرکت مرک، فاکتور رشد نوترکیب

انسانی (TGF-β_1= Recombinant human transforming growth factor-beta 1) از شرکت پیروتک و محیط کشت سلولی ((Dulbecco's modified eagle's medium (DMEM)) از شرکت اینویتروژن تهیه شدند. دیگر مواد آزمایشگاهی و حلالها، همگی از درجه آزمایشگاهی تهیه و بدون خالص‌سازی استفاده شدند. پیوندزنی تیرامین به کتیرا، با استفاده از روش آمینولیزیز غیرهمگن در متانول مطابق روش شرح داده شده در مقالات پیشین (۲۷) انجام شد و میزان عامل داروسازی با اسپکتروفوتومتری فرابنفش با استفاده از روش پیشنهادی ساکای و همکاران (۱۹) محاسبه شد.

تهیه هیدروژل و زمان ژل شدن: برای تهیه هیدروژل، ابتدا محلول آنزیم با غلظت مشخص به محلول کتیرای عامل دار افزوده شده و سپس این محلول با استفاده از سرنگ دوتایی جفت با محلول هیدروژن پراکسید مخلوط شد. برای تعیین زمان ژل شدن از روش وارونه کردن لوله آزمایش استفاده شد (۱۴). مشاهده نشدن تغییر شکل پس از یک دقیقه وارونه کردن میکروتیوب ۵ میلی‌لیتری، نشانه تشکیل ژل در نظر گرفته شد.

تورم تعادلی: برای اندازه‌گیری تورم تعادلی، یک میلی‌لیتر هیدروژل خشک شده با روش انجمادی، وزن شد (M_0) و سپس به محلول بافر فسفات ۰/۱ مولار (pH=۷/۴) منتقل و در گرمخانه با شدت لرزش ۱۵۰ دور بر دقیقه و دمای ۳۷ درجه سلسیوس گرماگذاری شد. پس از ۴۸ ساعت، هیدروژل بیرون آورده شده و پس از خشک کردن آب سطحی توسط کاغذ صافی، وزن گردید (M_t). میزان تورم تعادلی با تقسیم اختلاف وزن هیدروژل در هر زمان و وزن اولیه هیدروژل خشک بر وزن اولیه هیدروژل خشک مطابق رابطه ۲ به دست آمد.

رابطه (۲)

$$\textit{Equilibrium}\ \text{swelling degree} = \frac{M_t - M_0}{M_0}$$

تورم/تخریب برون تنی: برای بررسی رفتار تورم/تخریب هیدروژل در محیط برون‌تنی، پس از تهیه هیدروژل به حجم ۱ میلی‌لیتر (با وزن W_0) در میکروتیوب ۵ میلی‌لیتری، ۲ میلی‌لیتر بافر فسفات به هیدروژل اضافه و محیط در گرمخانه لرزان با شدت لرزش ۱۵۰ دور بر دقیقه در دمای ۳۷ درجه سلسیوس گرماگذاری شد. در بازه‌های زمانی معین، پس از خارج کردن محیط رویی، هیدروژل وزن شد (W_t). نسبت وزنی هیدروژل با تقسیم وزن هیدروژل در هر زمان بر وزن اولیه هیدروژل مطابق رابطه ۱ محاسبه گردید.

$$\textit{Weight}\ \text{ratio} = \frac{W_t}{W_0} \qquad \text{رابطه (۱)}$$

کپسول کردن سلولها در هیدروژل: برای کپسوله کردن سلولها در هیدروژل، سلولهای مزانشیمی کشت داده شده در فلاسک، توسط تریپسین جدا و پس از شمارش سانتریفیوژ شد. سپس مقدار مشخص محلول پلیمر عامل دار افزوده و تعلیق سلولی برای یکنواخت شدن چندین بار خیلی آرام پیپتاژ شد. سپس مواد مورد نیاز، در شرایط سترون با استفاده از سرنگ دوتایی مخلوط و به چاهکهای صفحه ۲۴ خانه‌ای منتقل و در گرمخانه گذاشته شدند. پس از گذشت ۱۰ دقیقه، یک میلی‌لیتر محیط کشت به هیدروژل افزوده شده و صفحه‌ها دوباره به گرمخانه منتقل شدند. در طول فرآیند کشت یا تمایز، هر دو یا سه روز یک بار ۸۰ درصد حجمی از محیط کشت رویی با محیط کشت مناسب جایگزین شد.

توانایی زنده ماندن سلولهای کپسول شده در هیدروژل: برای بررسی توانایی زنده ماندن سلولهای کپسوله شده در هیدروژل، از روش رنگ‌آمیزی مرده-زنده با آکریدین نارنجی و پریمیدیوم یداید مطابق دستورالعمل شرح داده شده توسط لی و همکاران (۱۵) استفاده شد. پس از دو بار شستشوی هیدروژل با بافر فسفات، ۳۰۰ میکرولیتر محلول آکریدین نارنجی و پریمیدیوم یداید در بافر فسفات با

غلظت ۳۰ و ۲۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر به هیدروژل، در شرایط تاریک، اضافه شد. پس از ۵ دقیقه، هیدروژل سه بار با بافر فسفات شستشو یافت و ۵۰۰ میکرولیتر بافر بر روی هیدروژل اضافه شد. سپس، سریعاً از ۱۰ مقطع هیدروژل، به صورت تصادفی توسط میکروسکوپ فلورسانس مجهز به فیلترهای سبز و قرمز تصویربرداری شد. برای تعیین تعداد سلولهای زنده یا مرده، از تعداد کل سلولهای زنده و مرده شمارش شده از ۱۰ مقطع رنگ‌آمیزی شده میانگین گرفته شد. زنده مانی سلولی از تقسیم تعداد کل سلولهای زنده تقسیم بر مجموع تعداد سلولهای زنده و مرده محاسبه شد. تصاویر با تلفیق فیلتر سبز و قرمز تهیه شدند.

تمایز غضروفی: برای بررسی تمایز سلولهای مزانشیمی انسانی استخراج شده از مغز استخوان به سلولهای غضروف‌ساز (کندروسیت)، پس از کپسوله کردن این سلولها (در پاساژ سوم) با غلظت 10^{6} سلول بر میلی‌لیتر در هیدروژل، محیط عاری از سرم جنین گاوی اضافه و پس از ۲۴ ساعت گرماگذاری، سلولها با محیط تمایزی دارای ۱۰ نانوگرم فاکتور رشد نوترکیب انسانی تی‌جی‌اف بتا یک، ۵۰ میکروگرم آسکوربیک اسید بی فسفات، 10^{-7} مول دگزامتازون و ۱۰ نانوگرم فاکتور رشد انسانی بی‌اف‌جی‌اف در میلی‌لیتر تغذیه شد. در مدت زمان آزمون (۲۱ روز) هر ۳ روز یک بار محیط کشت با محیط تمایزی جدید جایگزین گردید. همچنین برای مقایسه، تمایز برون‌تنی قرص فشرده سلولی بررسی شد. برای این کار، پس از جدا کردن سلولهای مزانشیمی (پاساژ سوم) از سطح فلاسک، فالکون ۱۵ میلی‌لیتری حاوی تعلیق سلولی به تعداد حدود ۲۰۰–۳۰۰ هزار سلول، با شدت ۱۳۰۰۰ دور بر دقیقه (۴۰۰ g) به مدت ۶ دقیقه سانتریفیوژ شد. سپس، برای شکل گرفتن قرص سلولی، محیط به مدت یک شب به همان صورت گرماگذاری گردید. در ادامه، محیط رویی خارج و با ۷۰۰ میکرولیتر محیط تمایزی جایگزین شد. در طول فرآیند تمایز، هر ۳ روز یک بار ۵۰۰ میکرولیتر از محیط رویی با محیط تمایزی جدید جایگزین شد.

بیان ژنهای مرتبط با تمایز: سلولهای کپسوله شده پس پایان دوره معین تمایز، برای بررسی بیان ژنهای مرتبط از گرمخانه خارج شدند. استخراج ریبونوکلئیک اسید با استفاده از کیت استخراج ریبونوکلئیک اسید شرکت کیاژن انجام شد. برای این‌کار، پس از شستشوی هیدروژل با بافر فسفات، هیدروژل توسط اسکراپر سترون قطعه قطعه شد. سپس ۲ مرتبه، ۲ میلی‌لیتر بافر فسفات اضافه و پس از چندین بار پیپتاژ، محیط به مدت ۸ دقیقه با شدت ۲۵۰۰۰ دور بر دقیقه سانتریفیوژ و محلول رویی خارج شد. در ادامه، یک میلی‌لیتر بافر لیز کننده به نمونه اضافه و محیط به مدت ۵ دقیقه توسط دستگاه لیز کننده بافت شدیداً همزده شد. سپس با استفاده از کلروفرم، ایزوپروپانل، اتانول ۷۵ درصد و آب دی‌یونیزه و مطابق با راهنمای کیت، استخراج محتوای ریبونوکلئیک اسید سلولها انجام گرفت و غلظت آن با استفاده از اسپکتروفوتومتر فرابنفش مشخص شد. تهیه کتابخانه ژنی (cDNA) با استفاده از کیت سنتز کتابخانه ژنی (ترانس‌کریپتاز وارون) شرکت اینویتروژن و مطابق دستورالعمل کیت انجام شد. در این مرحله از پرایمر رندوم هگزامر، بافر مربوط، dNTP و آنزیم ترانسکریپتاز وارون (Reverse transcriptase enzyme) استفاده شد. پس از اتمام مراحل، محلول کتابخانه ژنی ساخته شده در دمای ۲۰- درجه سلسیوس نگهداری شد. در مرحله بعدی، از مسترمیکس ساخت شرکت اینویتروژن، آنزیم برچسب زده شده و محلول پرایمر مرتبط برای انجام واکنش زنجیره‌ای پلیمراز با استفاده از دستگاه ترموسایکلر (PCR thermo cycler) بمنظور تکثیر ژنهای مرتبط با فرآیند تمایز (کلاژن I، کلاژن II، ساکس ۹ و اگرکان)(Collagen I, collagen II, SOX9 and aggrecan.) استفاده شد. سپس برای ارزیابی بیان ژنهای مرتبط، فرآیند الکتروفورز با استفاده از ژل ۲ درصد وزنی آگارز انجام و تصویربرداری از ژل با استفاده از دستگاه UVIDoc انجام شد.

بافت شناسی (هیستولوژی) و بررسی ترشح گلوکز

آمینوگلیکان: برای بافت‌شناسی و بررسی کیفی میزان ترشح گلوکزآمینوگلیکان، نمونه‌های مورد نظر پس از شستشو با بافر فسفات، در فرمالین ۱۰ درصد تثبیت شدند. سپس به صورت مرحله‌ای با غلظتهای مختلف اتانول آبگیری و برای مراحل بعدی در پارافین نگهداری شدند. در مرحله بعد، برش مقطعی از نمونه‌ها تهیه و آنها با هماتوکسیلین و ائوسین (Hematoxylin and eosin stain) برای بافت شناسی و سافرانین-او (Safranin-O) برای بررسی کیفی میزان ترشح گلوکز آمین رنگ‌آمیزی شدند. سطح مقطع رنگ‌آمیزی شده برای ارزیابی کیفی توسط میکروسکوپ نوری بررسی و تصویربرداری شد.

نتایج و بحث

در فرآیند کپسول کردن سلولها در داربست هیدروژلی شکل گیرنده در محل آنزیمی، تعلیق سلولی در محلول پلیمر و عوامل تشکیل ژل در محل مورد نظر تزریق می‌گردد و در آن جا داربست سلولی سه بعدی شکل می‌گیرد که فضای خالی محل تزریق را پر می‌کند. داربست یاد شده توانایی نگهداری و همراهی سلولها را در طول زمان درمان دارد و در صورت زیست‌تخریب‌پذیر بودن با گذشت زمان، در حالی که سلولها ضمن تکثیر و تمایز ماتریس برون سلولی مورد نیاز خود را ترشح می‌کنند، تجزیه می‌گردد. یک داربست مطلوب باید در زمان مناسب شکل بگیرد، دارای محتوای آب و تخلخل مناسب برای تبادل مواد مورد نیاز و مهاجرت سلولها باشد، چسبندگی لازم برای اتصال به بافت اطراف را داشته باشد، دارای گروههای فعال مورد نیاز برای اتصال سلولها باشد، زیست‌تخریب‌پذیر و زیست‌سازگار باشد و از نظر استحکام مکانیکی و فعالیت زیستی قادر بهمراهی سلولها در حین فرآیند رشد و ترشح ماتریس برون‌سلولی باشد.

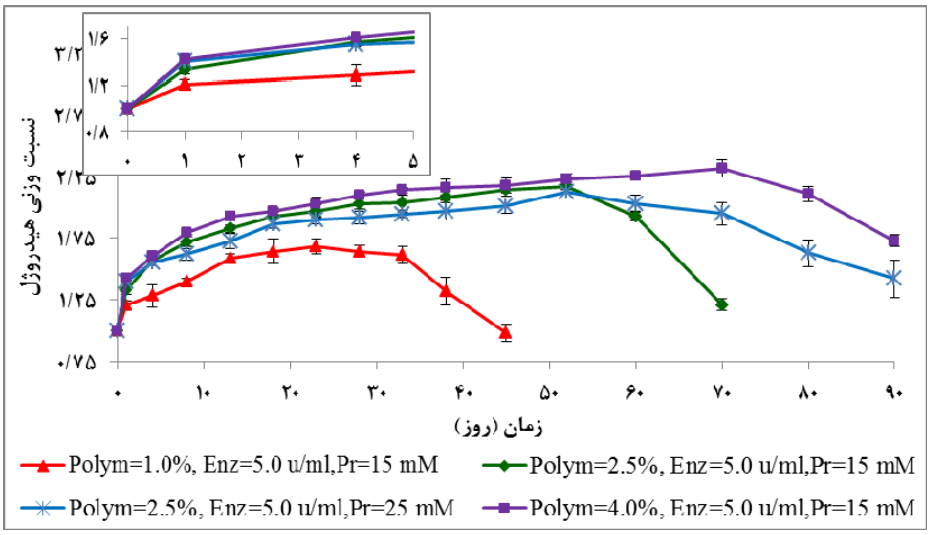
تهیه هیدروژل و زمان ژل شدن: مطابق نتایج طیف‌سنجی فرابنفش، میزان عامل دارسازی تیرامین روی کتیرا ۳/۹ درصد وزنی بود. در فرآیند تهیه هیدروژل، هرس‌رادیش پراکسیداز موجب تجزیه پراکسید هیدروژن به رادیکالهای پراکسید می‌گردد و با حمله این رادیکالها به گروه فنولی کتیرای عامل دار، رادیکالهای آزاد فنوکسی شکل می‌گیرند. در نتیجه واکنش بین ساختارهای رادیکالی یاد شده، چندین پیوند کوالانسی بین زنجیرهای پلیمری ایجاد شده و شبکه سه بعدی هیدروژل تشکیل می‌گردد. زمان ژل شدن نمونه‌ها با تنظیم غلظت پلیمر، آنزیم و هیدروژن پراکسید، قابل تنظیم در محدوده کمتر از ۲ دقیقه بود. این زمان برای استفاده سامانه تشکیل شونده در محل برای کاربردهای بالینی مطلوب است. داربستهای هیدروژلی تشکیل شونده در محل باید در زمان مناسب شکل بگیرند تا از پخش محلول در بافت اطراف جلوگیری شده و سلولها فرصت رسوب پیدا نکرده و به صورت یکنواخت در شبکه هیدروژل قرار بگیرند (۲۷).

تورم تعادلی: درجه تورم تعادلی هیدروژلهای تهیه شده از کتیرای عامل دار در بازه مورد مطالعه بسته به غلظت پلیمر، آنزیم و هیدروژن پراکسید در محدوده ۱۶-۲۲ متغیر بود. با افزایش غلظت هیدروژن‌پراکسید و آنزیم، به دلیل افزایش دانسیته شبکه‌ای شدن، درجه تورم تعادلی هیدروژل کاهش یافت. همچنین، با افزایش غلظت پلیمر به دلیل افزایش فشار تورمی ناشی از افزایش تعداد گروههای کربوکسیلی آزاد، درجه تورم تعادلی افزایش یافت.

تورم/ تخریب پذیری برون تنی: رفتار هیدروژل از نظر سرعت و میزان جذب آب و همچنین تخریب‌پذیری از ویژگیهای تأثیرگذار در انتخاب آن برای استفاده در زیست‌پزشکی است. نمودار رفتار جذب آب/ تخریب هیدروژل در بافر فسفات سدیم (pH=7.4) در شکل ۱ نشان داده شده است.

در چند ساعت ابتدایی به دلیل نفوذ آب برای آب‌پوشی کامل زنجیره‌های پلیمری، هیدروژل با جذب آب متورم شده و نسبت وزنی هیدروژل افزایش می‌یابد. در ادامه، به دلیل تخریب برخی نقاط اتصال شیمیایی و کاهش چگالی

شبکه، حجم شبکه هیدروژل و در نتیجه نسبت وزنی هیدروژل افزایش پیدا می‌کند. از طرف دیگر به تدریج تخریب بیشتر شبکه و همچنین تجزیه و حل شدن زنجیره‌های پلیمری، موجب فروپاشی تدریجی شبکه سه بعدی در قسمتهایی از هیدروژل گشته و نهایتاً روند کاهش نسبت وزنی هیدروژل شروع می‌گردد.



شکل ۱- رفتار تورمی هیدروژل کتیرا-تیرامین در بافر فسفات با pH برابر ۷/۴؛ Polym: پلیمر (درصد وزنی)، Enz: آنزیم (واحد بر میلی‌لیتر)، Pr: هیدروژن پراکسید (میلی‌مولار)

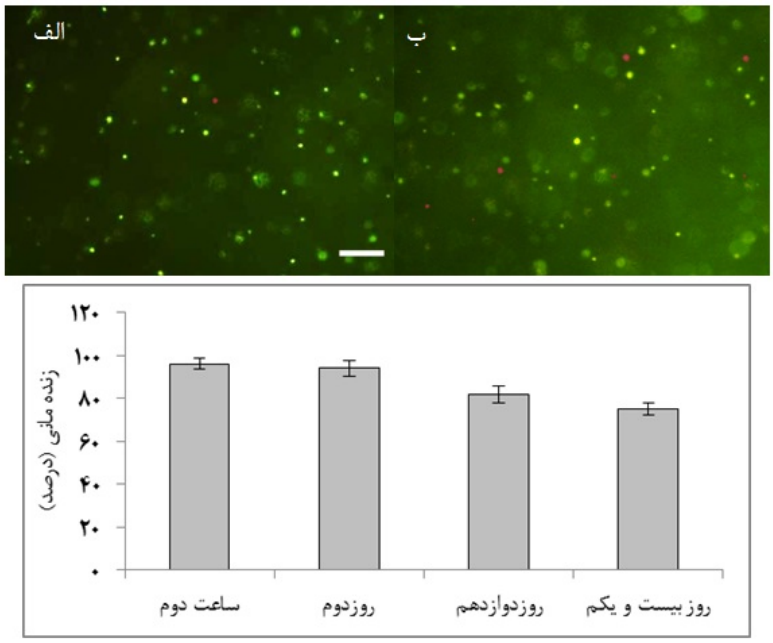
این روند تا تخریب و حل شدن کامل شبکه ادامه پیدا می‌کند. همان طور که در شکل ۱ مشاهده می‌گردد، سرعت جذب آب و در ادامه سرعت تخریب هیدروژل با افزایش غلظت هیدروژن پراکسید کاهش یافت. این مسئله می‌تواند به افزایش چگالی شبکه‌ای شدن نسبت داده شود. از طرف دیگر، هیدروژلهای تهیه شده در غلظتهای بالاتر پلیمر با سرعت بیشتری متورم شده و پایداری بالاتری در مقابل تخریب از خود نشان دادند. افزایش سرعت جذب آب در غلظتهای بالاتر کتیرای عامل دار می‌تواند به افزایش فشار تورمی ناشی از گروههای کربوکسیلی یونیزه شده روی زنجیره‌های پلیمری نسبت داده شود (۲۹).

توانایی زنده ماندن سلولهای کپسول شده در هیدروژل: تصاویر حاصل از رنگ‌آمیزی سلولهای کپسول شده در هیدروژل تهیه شده با غلظت ۲/۵ درصد وزنی کتیرای عامل دار، ۵ واحد بر میلی‌لیتر هرس‌رادیش پراکسیداز و ۱۵ میلی‌مولار هیدروژن پراکسید در طول دوره تمایز در شکل ۲ نشان داده شده است.

در حالی که زنده مانی سلولها پس از گذشت ۲ ساعت از بارگذاری به صورت میانگین ۹۶ درصد اندازه‌گیری شد، این عدد پس از ۲، ۱۲ و ۲۱ روز گرماگذاری به ترتیب به ۹۴ درصد، ۸۲ درصد و ۷۵ درصد درصد کاهش یافت. مطابق نتایج مطالعه انجام شده توسط پارک و همکاران (۲۲)، تقریباً تمامی سلولهای کپسول شده در هیدروژل تهیه شده از آمیزه شیمیایی تترونیک-سوکسینیک انهیدرید-تیرامین (Tetronic-succinic anhydride-tyramine) در شرایط استفاده از غلظت کمتر از ۱۸/۵ میلی‌مولار هیدروژن پراکسید، پس از ۲ ساعت گرماگذاری زنده ماندند. همچنین ژو و همکاران گزارش کردند که ۷۶/۹ درصد از سلولهای مزانشیمی کپسول شده در ژل فیزیکی آلژینات، در روز بیست و یکم تمایز زنده ماندند (۳۰). این نتایج نشان دهنده زیست‌سازگاری مناسب هیدروژل تهیه شده از کتیرا است.

تمایز غضروفی: در این مطالعه تمایز سلولهای مزانشیمی کپسول شده در هیدروژل در محیط درون‌تنی با تمایز این

سلولها در شکل قرص فشرده سلولی مقایسه شده است.



شکل۲- تصویر سلولهای کپسول شده در هیدروژل پس از (الف) ۲ و (ب) ۱۲ روز گرماگذاری (اندازه مقیاس: ۲۰۰ میکرومتر) و نمودار زنده‌مانی سلولهای کپسول شده در هیدروژل در طول دوره تمایز برون‌تنی. نقاط سبز نشان دهنده سلولهای زنده و نقاط قرمز نشان دهنده سلولهای مرده هستند.

سامانه کشت قرص فشرده سلولی برای تمایز غضروف بر اساس فرآیند ایجاد غضروف در دوران جنینی طراحی شده است. در دوران جنینی اساس تمایز غضروفی، تراکم سلولی در سلولهای مزانشیمی محل تشکیل غضروف و در نتیجه افزایش تعامل سلولی است. در فرآیند تهیه قرص فشرده سلولی، تراکم سلولی با سانتریفیوژ کردن سوسپانسیون سلولها افزایش می‌یابد. این سیستم و سیستمهای مشابه مانند کشت توده سلولی (میکرومس) به دلیل محدودیت جرم و حجم، نمی‌توانند به صورت مستقیم در بسیاری از درمانهای بالینی استفاده شوند (۷). داربستهای هیدروژلی با داشتن ساختار مشابه ماتریس خارج سلولی، به عنوان یک راه‌کار مناسب برای ایجاد محیط سه بعدی مورد نیاز سلولها در مهندسی بافت غضروف مطرح شده‌اند. هیدروژلهای تشکیل شونده در محل، به صورت محلول، با سهولت نسبی می‌توانند در محل عارضه تزریق شوند و در فرآیند تشکیل ژل ضمن کپسول کردن سلولهای معلق شده در محلول، فضای خالی محل تزریق را پر کنند. با توجه به خواص مطلوب فیزیکومکانیکی و بیولوژیکی داربستهای هیدروژلی به عنوان یک محیط سه بعدی مساعد برای رشد، تکثیر و تمایز سلولی، تاکنون چندین مطالعه در خصوص تمایز برون‌تنی سلولهای مزانشیمی کپسول شده در هیدروژلهای تشکیل شونده در محل در حضور عوامل تحریک کننده تمایز انجام شده است. با توجه به نتایج این مطالعات، سلولهای مزانشیمی کپسول شده در محیط سه بعدی هیدروژل، در حضور عوامل تحریک کننده تمایز، در طول زمان تمایز نشانه‌های تمایز غضروفی مانند بیان ژنهای مرتبط با فرآیند تمایز غضروفی و ترشح گلوکزآمینوگلیکان را نشان داده‌اند (۷، ۱۱ و ۲۱). در مطالعه حاضر، تمایز سلولهای مزانشیمی در حالت قرص فشرده سلولی و حالت کپسول شده در هیدروژل تشکیل شونده در محل تهیه شده از کتیرای اصلاح شده شیمیایی، به صورت کیفی مقایسه شده است. برای اثبات انجام تمایز غضروفی، روشهای متنوعی استفاده می‌شود که از این موارد می‌توان به بررسی

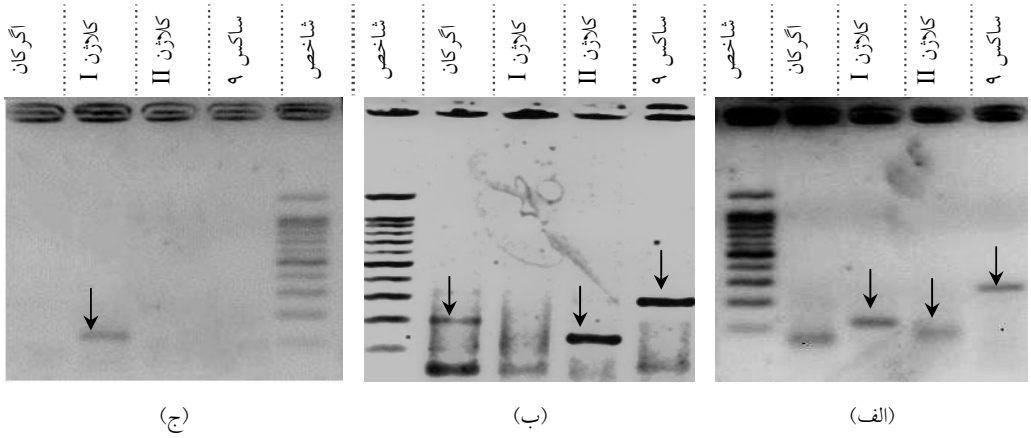
بیان ژنهای مرتبط با تمایز غضروفی (کلاژن II، اگرکان و ساکس ۹)، بررسی ترشح گلوکزآمینوگلیکان و کلاژن نوع II و آنالیز هیستولوژی اشاره کرد.

بیان ژنهای مرتبط با تمایز غضروفی: تصویر ژل الکتروفورز مربوط به بیان ژنهای کلاژن I، کلاژن II، اگرکان و ساکس ۹ در سلولهای مزانشیمی، قرص سلولی فشرده و سلولهای کپسول شده در هیدروژل پس از ۲۱ روز گرماگذاری برون‌تنی در حضور عوامل تمایز در شکل ۳ نشان داده شده است.

اندازه قطعه محصول تکثیر شده توسط پرایمرهای اگرکان، کلاژن I، کلاژن II و ساکس ۹ به ترتیب ۱۹۰، ۸۵، ۱۲۱ و ۲۶۳ جفت باز و اندازه شاخص ۱۰۰۰ جفت‌بازی است. در سلولهای مزانشیمی بیان کلاژن I به خوبی مشاهده شد و نشانه‌ای از کلاژن II، اگرکان و ساکس ۹ مشاهده نشد. پس از ۲۱ روز گرماگذاری قرص فشرده سلولی در حضور محیط تمایزی، ژنهای کلاژن II و ساکس ۹ به خوبی بیان شد، اگرکان بیان ضعیف‌تری نشان داد و کلاژن I بیان نشد. در شرایط یکسان پس از ۲۱ روز گرماگذاری سلولهای کپسول شده در هیدروژل، ژنهای کلاژن II و ساکس ۹ بیان شدند ولی اگرکان بیان مناسبی نداشت. پیشتر پژوهشگران گزارش کردند که سلولهای مزانشیمی کپسول شده در هیدروژل تشکیل شونده در محل تهیه شده از صمغ ژلان، تنها در صورت مواجهه با عوامل تمایزی، ژنهای مربوط به تمایز غضروفی را بیان می‌کنند (۷).

جدول ۱- اثر عوامل مختلف بر درجه تورم تعادلی هیدروژل

پلیمر (درصد وزنی)	آنزیم (واحد بر میلی‌لیتر)	هیدروژن پراکسید (میلی‌مولار)	تورم تعادلی	پلیمر (درصد وزنی)	آنزیم (واحد بر میلی‌لیتر)	هیدروژن پراکسید (میلی‌مولار)	تورم تعادلی
۱/۰	۷/۵	۱۵/۰	۱۹/۵	۲/۰	۷/۵	۷/۵	۱۸/۳
۱/۵	۷/۵	۱۵/۰	۱۶/۸	۲/۰	۷/۵	۲۲/۵	۱۶/۶
۲/۰	۷/۵	۱۵/۰	۱۸/۹	۲/۰	۵/۰	۱۵/۰	۱۹/۳
۲/۵	۷/۵	۱۵/۰	۲۰/۳	۲/۰	۲/۵	۱۵/۰	۲۲/۰
۴/۰	۵/۰	۱۵/۰	۱۸/۱	۲/۵	۵/۰	۱۵/۰	۲۰/۸



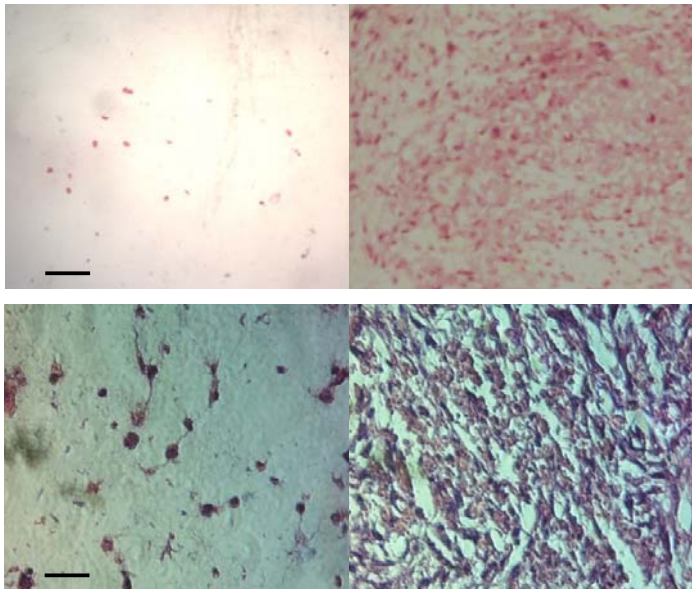
شکل ۳- تصویر ژل الکتروفورز آگارز مربوط به بیان ژنهای تمایزی کندروسیت: سلولهای مزانشیمی کپسول شده در هیدروژل (الف)، قرص فشرده سلولی (ب) و سلولهای مزانشیمی (ج)

هیستولوژی: در این مطالعه از رنگ‌آمیزی هماتوکسیلین-ائوسین برای بررسی هیستولوژی و مشاهده مورفولوژی سلولها استفاده شد (شکل ۴).

همان‌گونه که در شکل ۴ مشاهده می‌شود، در قرص فشرده سلولی چگالی سلولها بیشتر است و در هر دو نمونه سلولها تقریباً به صورت یکنواخت در سطح مقطع پخش شده‌اند. همچنین در هر دو نمونه سلولها تقریباً دارای مورفولوژی کروی هستند. تغییر مورفولوژی از حالت نسبتاً کشیده به کروی و بزرگ‌تر شدن اندازه سلولها به عنوان نشانه‌ای از انجام فرآیند تمایز بیان شده است (۱۱ و ۳۰).

ترشح گلوکز آمینوگلیکان: در شکل ۵ رنگ‌آمیزی گلوکزآمینوگلیکان مقطع گرفته شده از نمونه‌های قرص فشرده سلولی و هیدروژل حاوی سلول در طول دوره تمایز نشان داده شده است.

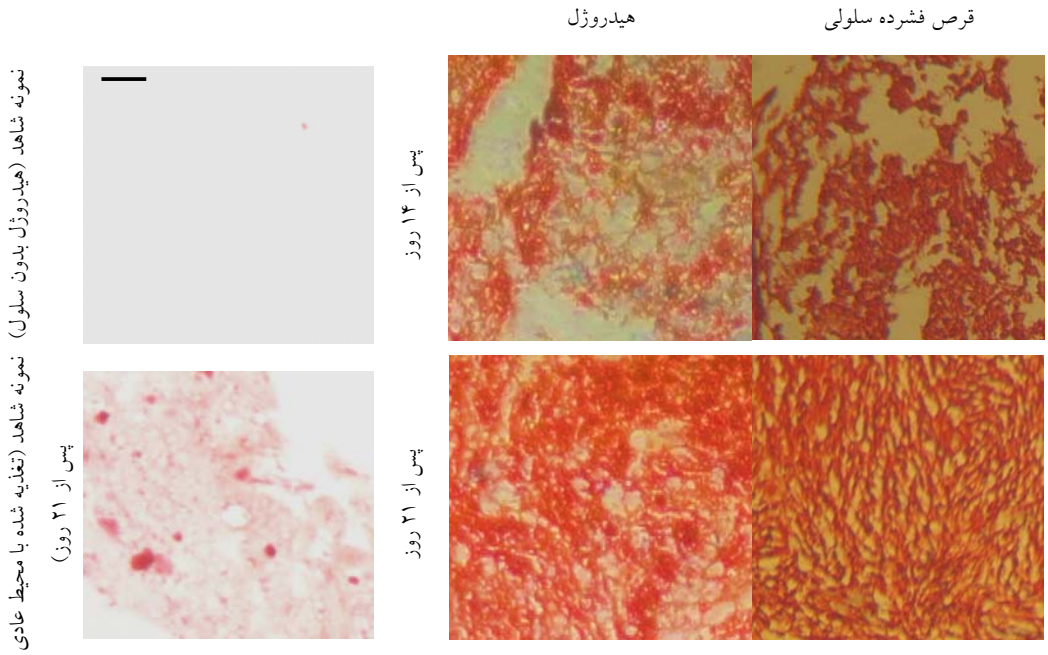
همان‌گونه که مشاهده می‌شود، در نمونه هیدروژل بدون سلول، زمینه رنگ شده مشاهده نمی‌گردد. چگالی ترشح گلوکزآمینوگلیکان با افزایش زمان تمایز در هر دو مورد نمونه قرص فشرده سلولی و نمونه سلولهای کپسول شده در هیدروژل، افزایش یافته است.



(ب) (الف)

شکل ۴- تصویر رنگ آمیزی H&E سلولهای موجود در قرص فشرده سلولی (الف) و کپسول شده در هیدروژل (ب)، پس از ۲۱ روز تمایز (ردیف بالا: اندازه مقیاس ۲۰۰ میکرومتر و بزرگنمایی × ۱۰ و ردیف پایین: اندازه مقیاس ۵۰ میکرومتر و بزرگنمایی × ۴۰).

همچنین، در نمونه سلولهای کپسول شده در هیدروژل که با محیط کشت عاری از عوامل تمایز دهنده تغذیه شده، میزان ترشح گلوکزآمینوگلیکان نسبت به نمونه تغذیه شده با محیط تمایزی بسیار ناچیز است. این مسئله نشان‌دهنده نقش تعیین کننده عوامل بیوشیمیایی تحریک کننده تمایز (فاکتورهای رشد) در فرآیند تمایز غضروفی است. تمایز نیافتن سلولهای کپسول شده در هیدروژل و همچنین قرص فشرده سلولی در صورت تغذیه نشدن با عوامل تمایز دهنده، در مطالعات منتشر شده پیشین نیز گزارش شده است (۷).



شکل ۵- تصویر رنگ‌آمیزی گلوکزآمینوگلیکان نمونه‌ها. اندازه مقیاس: ۲۰۰ میکرومتر و بزرگنمایی برابر × ۲۰

در مجموع می‌توان گفت، تغییر مورفولوژی از حالت نسبتاً کشیده به کروی، بزرگ‌تر شدن اندازه سلولها و افزایش ترشح گلوکزآمینوگلیکان با افزایش زمان گرماگذاری در مجاورت عوامل تمایز سلولی، نشانه‌ای از انجام شدن موفق آمیز فرآیند تمایز غضروفی سلولهای کپسول شده در هیدروژل است. بنابراین این هیدروژل به عنوان یک گزینه امیدوار کننده برای مهندسی بافت غضروف می‌تواند مورد ارزیابی حیوانی قرار گیرد.

نتیجه‌گیری

در این پژوهش با اختلاط کتیرای عامل دار شده با گروه تیرامینی، هیدروژن پراکساید و آنزیم هرس رادیش پراکسیداز، هیدروژل تشکیل شونده در محل آنزیمی با موفقیت تهیه شد. زمان ژل شدن قابل تنظیم در بازه زیر ۲ دقیقه بود و هیدروژل در محیط بافر فسفات به مدت بیش از ۲ ماه پایدار ماند. در شرایط مناسب تشکیل ژل، بیش از ۹۵ درصد سلولها در حین فرآیند کپسوله کردن توانایی زنده ماندن خود را حفظ و در مدت زمان ۲۱ روز گرماگذاری، بیش از ۷۵ درصد از سلولها زنده ماندند. همچنین نتیجه تمایز برون‌تنی سلولهای کپسوله شده در هیدروژل پس از ۲۱ روز گرماگذاری در حضور عوامل شیمیایی تحریک کننده تمایز در محیط برون‌تنی نشان داد، تمایز سلولی به سلولهای غضروف‌ساز (کندروسیت) برای سلولهای مزانشیمی کپسول شده در هیدروژل رخ داده است.

منابع

۱- خادمی خالدی س.، شکرالهی پ.، زندی م.، ایرانی ش.، ۱۳۹۴، پوشش دهی ژلاتین-کیتوسان روی داربست پلی‌کاپرولاکتون سوپرامولکولی و بررسی تأثیر آن بر رفتار سلولهای فیبروبلاست موش. مجله پژوهش‌های سلولی و مولکولی، ۲۸، ۵۰۰-۵۱۲.

۲- روشنی یساقی ا.، تقدیر م.، شکرگزار م.ع.، نادری منش ح.، ۱۳۹۴، طراحی و ساخت نانو هیدروژلهای سه بعدی بر پایه پپتیدهای خود آراینده جهت مهندسی بافت‌های نرم. مجله پژوهش‌های سلولی و مولکولی، ۲۸، ۵۲۴-۵۳۸.

3- Amini A.A., Nair L.S., 2012, Injectable Hydrogels for Bone and Cartilage Repair. *Biomedical Materials*, 7.

4- Chang C.H., Huei L.F., Kou T.-F.,Liu H.-C., 2005, Cartilage Tissue Engineering. *Biomedical Engineering- Applications, Basis & Communications*, 17, 61-71.

5- Cho J.H., Kim S.-H., Park K.D., Jung M.C., Yang W.I., Han S.W., Noh J.Y.,Lee J.W., 2004, Chondrogenic Differentiation of Human Mesenchymal Stem Cells Using a Thermosensitive Poly(N-Isopropylacrylamide) and Water-Soluble Chitosan Copolymer. *Biomaterials*, 25, 5743-5751.

6- Dehghan-Niri M., Tavakol M., Vasheghani-Farahani E.,Ganji F., 2015, Drug Release from Enzyme-Mediated in Situ-Forming Hydrogel Based on Gum Tragacanth–Tyramine Conjugate. *Journal of Biomaterials Applications*, 29, 1343-1350.

7- Fan J., Gong Y., Ren L., Varshney R.R., Cai D.,Wang D.-A., 2010, In Vitro Engineered Cartilage Using Synovium-Derived Mesenchymal Stem Cells with Injectable Gellan Hydrogels. *Acta Biomaterialia*, 6, 1178-1185.

8- Fattahi A., Petrini P., Munarin F., Shokoohinia Y., Golozar M.A., Varshosaz J.,Tanzi M.C., 2013, Polysaccharides Derived from Tragacanth as Biocompatible Polymers and Gels. *Journal of Applied Polymer Science*, 129, 2092-2102.

9- Fattahi A., Sadrjavadi K., Golozar M.A., Varshosaz J., Fathi M.-H.,Mirmohammad-Sadeghi H., 2013, Preparation and Characterization of Oligochitosan–Tragacanth Nanoparticles as a Novel Gene Carrier. *Carbohydrate Polymers*, 97, 277-283.

10- Haeri S.M.J., Sadeghi Y., Salehi M., Farahani R.M.,Mohsen N., 2016, Osteogenic Differentiation of Human Adipose-Derived Mesenchymal Stem Cells on Gum Tragacanth Hydrogel. *Biologicals*, 44, 123-128.

11- Hui T.Y., Cheung K.M.C., Cheung W.L., Chan D.,Chan B.P., 2008, In Vitro Chondrogenic Differentiation of Human Mesenchymal Stem Cells in Collagen Microspheres: Influence of Cell Seeding Density and Collagen Concentration. *Biomaterials*, 29, 3201-3212.

12- Hunziker E.B., 2001, Articular Cartilage Repair: Basic Science and Clinical Progress. A Review of the Current Status and Prospects. *Osteoarthritis and Cartilage*, 10, 432-463.

13- Johnstone B., Hering T., Caplan A., Goldberg V.,Yoo J., 1998, In Vitro Chondrogensis of Bone Marrow-Drived Mesenchymal Stem Cells. *Experimental cell Research*, 238, 265-272.

14- Kurisawa M., Chung J.E., Yang Y.Y., Gao S.J.,Uyama H., 2005, Injectable Biodegradable Hydrogels Composed of Hyaluronic Acid–Tyramine Conjugates for Drug Delivery and Tissue Engineering. *Chemical Communications*, 34, 4312-4314.

15- Lee S.-Y.,Tae G., 2007, Formulation and in Vitro Characterization of an in Situ Gelable, Photo-Polymerizable Pluronic Hydrogel Suitable for Injection. *Journal of Controlled Release*, 119, 313-319.

16- Liu S.Q., Tian Q., Hedrick J.L., Po Hui J.H., Rachel Ee P.L.,Yang Y.Y., 2010, Biomimetic Hydrogels for Chondrogenic Differentiation of Human Mesenchymal Stem Cells to Neocartilage. *Biomaterials*, 31, 7298-7307.

17- Mohamadnia Z., Zohuriaan-Mehr M.J., Kabiri K.,Razavi-Nouri M., 2008, Tragacanth Gum-Graft-Polyacrylonitrile: Synthesis, Characterization and Hydrolysis. *Journal of Polymer Research*, 15, 173-180.

18- Moreira Teixeira L.S., Feijen J., van Blitterswijk C.A., Dijkstra P.J.,Karperien M., 2012, Enzyme-Catalyzed Crosslinkable Hydrogels: Emerging Strategies for Tissue Engineering. *Biomaterials*, 33, 1281-1290.

19-Ogushi Y., Sakai S.,Kawakami K., 2007, Synthesis of Enzymatically-Gellable Carboxymethylcellulose for Biomedical Applications. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 104, 30-33.

20- Park H., Temenoff J.S., Tabata Y., Caplan A.I.,Mikos A.G., 2007, Injectable Biodegradable Hydrogel Composites for Rabbit Marrow Mesenchymal Stem Cell and Growth Factor Delivery for Cartilage Tissue Engineering. *Biomaterials*, 28, 3217-3227.

21- Park K.H.,Na K., 2008, Effect of Growth Factors on Chondrogenic Differentiation of Rabbit Mesenchymal Cells Embedded in Injectable Hydrogels. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 106, 74-79.

22- Park K.M., Shin Y.M., Joung Y.K., Shin H.,Park K.D., 2010, In Situ Forming Hydrogels Based on Tyramine Conjugated 4-Arm-Ppo-Peo Via Enzymatic Oxidative Reaction. *Biomacromolecules*, 11, 706-712.

23- Ranjbar-Mohammadi M., Prabhakaran M.P., Bahrami S.H.,Ramakrishna S., 2016, Gum Tragacanth/Poly(L-Lactic Acid) Nanofibrous Scaffolds for Application in Regeneration of

Peripheral Nerve Damage. *Carbohydrate Polymers*, 140, 104-112.

24- Saruchi, Kaith B.S., Jindal R.,Kapur G.S., 2014, Synthesis of Gum Tragacanth and Acrylic Acid Based Hydrogel: Its Evaluation for Controlled Release of Antiulcerative Drug Pantoprazole Sodium. *Journal of the Chinese Advanced Materials Society*, 2, 110-117.

25- Sittinger M., Hutmacher D.W.,Risbud M.V., 2004, Current Strategies for Cell Delivery in Cartilage and Bone Regeneration. *Current Opinion in Biotechnology*, 15, 411-418.

26- Tavakol M.,Mohammadifar M.A., 2017, A Review on Gum Tragacanth and Its Biomedical Applications. *Shimi va Mohandesi Shimi Iran (In Persian)*, 36, 1-20.

27- Tavakol M., Vasheghani-Farahani E., Mohammadifar M.A., Soleimani M.,Hashemi-Najafabadi S., 2016, Synthesis and Characterization of an in Situ Forming Hydrogel Using Tyramine Conjugated High Methoxyl Gum Tragacanth. *Journal of Biomaterials Applications*, 30, 1016-1025.

28- Tavakol M., Vasheghani-Farahani E., Soleimani M., Mohammadifar M.A., Hashemi-Najafabadi S.,Hafizi M., 2013, Synthesis and Characterization of an Enzyme Mediated in Situ Forming Hydrogel Based on Gum Tragacanth for Biomedical Applications. *Iranian Journal of Biotechnology*, 12, 15811.

29- Vasheghani-Farahani E., Vera J.H., Cooper D.G.,Weber M.E., 1990, Swelling of Ionic Gels in Electrolyte Solutions. *Industrial & Engineering Chemistry Research*, 29, 554-560.

30- Xu J W.W., Ludeman M, Cheng K, Hayami T, Lotz JC, Kapila S., 2008, Chondrogenic Differentiation of Human Mesenchymal Stem Cells in Three-Dimensional Alginate Gels. *Tissue Eng Part A*, 14, 667-680.

31- Yokoyama A., Srinivasan K.R.,Fogler H.S., 1988, Stabilization Mechanism of Colloidal Suspensions by Gum Tragacanth: The Influence of Ph on Stability. *Journal of Colloid And Interface Science*, 126, 141-149.

Preparation of an enzyme catalyzed in situ forming hydrogel based on chemically modified tragacanth for cartilage tissue engineering

Tavakol M.[1], Vasheghani Farahani E.[2], Soleimani M.[3,4], Hashemi Najafabadi S.[2] and Hajarizadeh A.[5]

[1] Central Iran Research Complex, Nuclear Science and Technology Research Institute, Yazd, I.R. of Iran

[2] Biomedical Engineering Divisions, Faculty of Chemical Engineering, Tarbiat Modares University, Tehran, I.R. of Iran

[3] Dept. of Hematology, Faculty of Medical Sciences, Tarbiat Modares University, Tehran, I.R. of Iran

[4] Dept. of Nanotechnology and Tissue Engineering, Stem Cell Technology Research Center, Tehran, I.R. of Iran

[5] Dept. of Molecular Cell Biology, Stem Cell Technology Research Center, Tehran, I.R. of Iran

Abstract

In the present study, an enzyme catalyzed in situ forming hydrogel based on chemically modified tragacanth was prepared and then evaluated for use in cartilage tissue engineering. For this purpose, firstly tyramine was conjugated on the galacturonic acid methyl ester units of gum tragacanth (GT) via ammonolysis of methyl ester groups in heterogeneous media. Then, the hydrogel was prepared by mixing of functionalized polymer, horseradish peroxidase (HRP) and hydrogen peroxide using a double syringe equipped with a mixing chamber. Then, cell viability of the encapsulated human mesenchymal stem cells (hMSCs) and *in vitro* chondrocyte differentiation of them, incubated in the presence of differentiation medium, were investigated. After mixing of the gel promoters, hydrogel formation was obtained due to enzyme catalyzed oxidative coupling reaction between phenolic groups of tyramine functional groups. The tunable gelation time of hydrogels was less than 2 minute. Viability of the encapsulated cells was more than 95% and 75% after 2 h and 21 days of incubation. The expression of chondrocytic genes and sulphated glycosaminoglycan indicated that the encapsulated hMSCs differentiated to chondrocyte cells during *in vitro* differentiation time.

Key words: Enzyme mediated in situ forming hydrogel, Tragacanth, Tyramine, Cartilage tissue engineering, Cell differentiation.