

## مروری بر سنتز و مشخصات هیدروژل ژلما

کاوه رحیمی ممقانی<sup>۱</sup>، سید مرتضی نقیب<sup>۲\*</sup>، علیرضا زاهدی<sup>۳</sup>

۱- کارشناس ارشد مهندسی مواد، دانشگاه علم و صنعت ایران

۲- استادیار مهندسی مواد، دانشگاه علم و صنعت ایران

۳- استادیار مهندسی انرژی، دانشگاه علم و صنعت ایران

تاریخ دریافت: ۹۵/۱۰/۰۴ تاریخ پذیرش: ۹۶/۰۶/۲۲

پیام‌نگار: [naghib@iust.ac.ir](mailto:naghib@iust.ac.ir)

### چکیده

هیدروژل ژلما یکی از هیدروژل‌های زیست‌سازگار و زیست‌تجزیه پذیر است که اخیراً به طور گسترده در حوزه‌های مختلف مهندسی پزشکی به کار گرفته شده است. درک صحیح اثر پارامترهای سنتز در خواص نهایی ژلما می‌تواند برای طراحی ماده‌ای با خواص زیستی مناسب و خواص فیزیکی متناسب، مفید باشد. به طور کلی، ژلما از واکنش مستقیم ژلاتین و متاکریلیک‌انیدرید سنتز می‌شود. با این حال، نوع و مولاریته بافر، pH اولیه، غلظت ژلاتین و متاکریلیک‌انیدرید، سرعت همزدن، دما و زمان واکنش تأثیر زیادی بر خواص ژلما می‌تواند در معرض تابش پرتو فرابنفش پیوندهای عرضی ایجاد کند و به شکل هیدروژل درآید. هرچند، خواص مکانیکی هیدروژل ژلما می‌تواند تحت تأثیر پارامترهای پرتو فرابنفش، غلظت ژلما و آغازگر قرارگیرد؛ این تغییرات در خواص فیزیکی، مکانیکی و زیستی ژلما، این ماده را کاندیدی مناسبی برای کاربردهای پزشکی همچون مهندسی بافت، سیگنال‌دهی سلولی، حسگرهای زیستی، دارورسانی و انتقال ژن قرار داده است.

**کلیدواژه‌ها:** بسپارهای زیست‌سازگار، ژلاتین، متاکریلات‌انیدرید، پارامترهای سنتز، ژلما، هیدروژل.

### ۱. مقدمه

زمینه‌های کاری و مقالات چاپ‌شده در زمینه ژلما، تا سال ۲۰۱۶ میلادی را مشاهده می‌کنید. بر اساس نتایج، مهندسی مواد و علم شیمی بیشترین نقش را در پژوهش‌های ژلما داشته‌اند. رشد روزافزون چاپ مقالات در این زمینه، بعد از سال ۲۰۱۰، بیانگر جدید بودن و اهمیت موضوع ژلما و کاربردهای آن است. قابل پیش‌بینی است که با توجه به مشارکت رشته‌های مهندسی مواد، پزشکی، شیمی، نانو و سایر علوم، در سال‌های آتی، شاهد افزایش پژوهش‌های علمی در زمینه ژلما خواهیم بود. در ادامه، ابتدا به

سنتز اولیه ماده بسپاری با نام ژلما<sup>۱</sup> در سال ۲۰۰۰ میلادی [۱] با واکنش مستقیم ژلاتین و متاکریلیک‌انیدرید<sup>۲</sup> صورت گرفت. در سال‌های اخیر، هیدروژل‌های ژلما با توجه به خواص فیزیکی و زیست‌شیمیایی مطلوب در حوزه‌های مختلفی چون مهندسی بافت، دارورسانی و ژن‌درمانی مطالعه شده است. در شکل (۱) نمودار

\* تهران، نارمک، دانشگاه علم و صنعت ایران، دانشکده فناوری‌های نوین، بخش نانو زیست مواد

1. GELMA
2. Methacrylic Anhydride (MA)

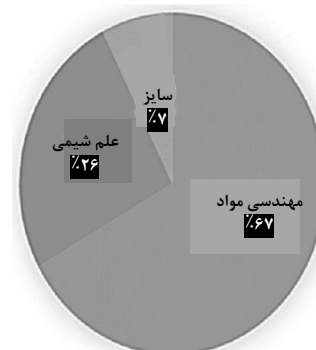
پایدار شده است. ژلاتین که از هیدرولیز کلاژن طبیعی موجود در پوست و بدن پستانداران، آبزبان و حشرات تولید می‌شود، دارای فرمول شیمیایی مستقلی نیست و شامل ۵۰/۵ درصد کربن، ۶/۸ درصد هیدروژن، ۱۷ درصد نیتروژن، ۲۵/۲ درصد اکسیژن با رطوبت ۱۳ درصد، و چگالی معادل ۱/۳ تا ۱/۴ گرم بر سانتی‌مترمکعب است. ژلاتین شامل ۱۸ نوع اسیدآمین است و نخستین بار از جوشاندن پوست و استخوان گاو تهیه شد. کلاژن موجود در بافت حیوانات از طریق دو کنش بازی و اسیدی استخراج می‌شود و بسته به نحوه تهیه، به دو گروه ژلاتین A و B تقسیم می‌شود. ژلاتین براساس گرانی برحسب یکایی به نام بولوم<sup>۲</sup> درجه‌بندی می‌شود. هر چه عدد بولوم ژلاتین بالاتر باشد، درجه آن بالاتر و بهایش بیشتر خواهد بود. ژلاتین به عنوان یک بسیار آبدوست در آب متورم و ساختارش با افزایش دما از هم گسیخته و درون آب حل می‌شود. برای سنجش انحلال‌پذیری این بسیار باید انحلال‌پذیری آن را در دمای محیط آزمایشگاه بررسی کرد؛ زیرا با افزایش دما انحلال‌پذیری این بسیار تحت تأثیر قرار می‌گیرد و افزایش می‌یابد. علاوه بر دما، pH از عوامل موثر در انحلال‌پذیری ژلاتین به‌شمار می‌رود و در خواص شیمیایی و بار سطحی آن تفاوت چشمگیری پدید می‌آورد، زیرا این بسیار، با وجود انحلال‌پذیری به صورت ایزوالکتریک در محیط خنثی، انحلال آن در حالت بازی یا اسیدی به ایجاد بارهای سطحی منجر می‌شود و با تبدیل ژلاتین به یک بسیار چندالکترولیتی به انحلال سریع‌تر و نفوذ عمیق‌تر حلال می‌انجامد. ژلاتین در محیط‌های اسیدی بار مثبت، و در محیط‌های قلیایی بار منفی می‌گیرد. به‌علاوه، بار مثبت موجود در سطح این بسیار در مهندسی بافت می‌تواند به بهبود چسبندگی و رشد سلول انجامد [۲].

### ۳. هیدروژل

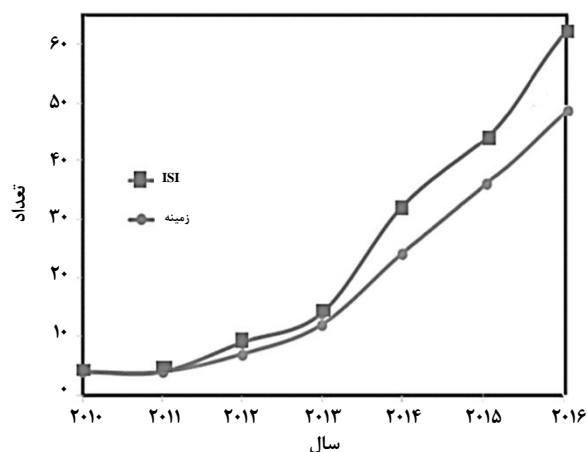
هیدروژل‌ها بسپارهای شبکه‌ای، آبدوست و دارای پیوندهای عرضی اند که توانایی متورم‌شدن در آب و افزایش وزن اصلی خود به میزان چندین برابر را دارند. خواص فیزیکی و زیست‌شیمیایی هیدروژل‌ها عمدتاً به ترکیب، روش‌های به‌کارگرفته شده در بسپارش آن‌ها و چگالی پیوندهای عرضی وابسته است. هیدروژل‌ها چارچوب چندمنظوره‌ای را، شامل خواص ترکیبات موردنظر برای برنامه‌های

۲. Bloom. یکی از مشخصه‌های ژلاتین که این واحد در ارتباط مستقیم با میزان چسبندگی و استحکام آن است.

آشنایی با ژلاتین و هیدروژل پرداخته شده و سپس به بررسی و مشخصه‌یابی سنتز ژلما اشاره می‌شود.



(الف) زمینه کاری مقالات ISI در ژلما



(ب) تعداد مقالات چاپ شده در زمینه ژلما تا سال ۲۰۱۶

شکل ۱. نمودار زمینه‌های کاری و مقالات چاپ شده در زمینه ژلما تا سال ۲۰۱۶ در سایت اسکوپوس.

### ۲. ژلاتین

ژلاتین ماده‌ای پروتئینی کلونیدی زردرنگ و تقریباً بی‌بو و بی‌طعم است، که از هیدرولیز کلاژن طبیعی موجود در پوست و بدن برخی آبزبان و پستانداران و حتی حشرات تولید می‌شود. ماهیت غیرسمی و قابلیت انحلال این بسیار در آب سبب جذابیت و کاربرد گسترده آن در صنایع غذایی، دارویی، پزشکی و نظامی شده است. ژلاتین به عنوان یک ناجوربسپار<sup>۱</sup> پروتئینی آبدوست، از توالی اسیدآمین‌هایی تشکیل شده که پیوندهای پپیدی آنها را به یکدیگر متصل کرده و

۱. Heteopolimer: بسیاری که فقط از یک نوع تکپار ساخته شده باشد، جوربسپار و بسیاری که از چند نوع تکپار ساخته شده باشد، ناجوربسپار نامیده می‌شود.

حضور آغازگر نوری) بسپارش رادیکالی شده و هیدروژلی با پیوندهای عرضی (شبکه‌ای) کووالانسی می‌دهد. به عنوان محصول هیدرولیز کلاژن، ترکیب اصلی محیط خارج سلولی در اکثر بافت‌ها، ژلاتین شامل بسیاری از توالیهای آرژنین-گلیسین-آسپارتیک اسید<sup>۸</sup> است، که پیوندهای سلولی را تعمیم می‌دهد [۲۰]. همچنین، توالی هدف ماتریس متالوپروتئاز<sup>۹</sup> است که برای بازسازی سلولی مناسب به‌شمار می‌آید [۲۱]. در حالی که در مقایسه با کلاژن مزایای ژلاتین شامل حلالیت بهتر و پاد ژنی کمتر است [۲۲ و ۲۳]. فرایند هیدرولیز ساختار سوم کلاژن را تغییر می‌دهد، کاهش تغییرات ساختاری بر اساس منابع، مختلف است. یک محلول ژلاتین خود خاصیت منحصر بفرد تشکیل فیزیکی هیدروژل شبکه‌ای در دماهای پایین را دارد [۱ و ۲]. همچنین، چندین واکنش شیمیایی به ژلاتین دارای پیوندهای عرضی کووالانسی اعمال شده است [۲۴-۲۷].

مشخص است که وجود گروه‌های جایگزین متاکریویل به ژلاتین خاصیت برقراری پیوندهای عرضی با نور<sup>۱۰</sup> در حضور آغازگر نوری و اعمال نور را می‌دهد، که بر اساس بسپارش نوری جایگزین‌های متاکریویل است [۱]. این بسپارش می‌تواند در شرایط معمولی اتفاق افتد (دمای اتاق، محیط خنثی، در محیط‌های آبی و غیره) که امکان کنترل زمانی و مکانی را برای واکنش فراهم می‌آورد [۸]. این شرایط هیدروژل‌های ریزساخت را قادر می‌کند تا در الگوها، ریخت‌شناسی و ساختارهای سه‌بعدی منحصر بفرد که چارچوب‌های آرمانی برای کنترل رفتارهای سلولی به منظور مطالعه برهم‌کنش سلول با مواد زیستی و مهندسی بافت دارند، به‌کار گرفته شوند [۲۸، ۸].

باید گفت که تغییرات شیمیایی در ژلاتین به کمک متاکریلیک‌آنیدرید، به طور کلی تنها کمتر از پنج درصد از باقی‌مانده اسید آمینه در نسبت مولی را درگیر می‌کند [۱]. این امر اشاره به عدم تأثیرپذیری آنچنانی بر بیشتر موتیف‌های اسیدهای آمینه کاربردی (مثل موتیف‌های آرژنین-گلیسین-آسپارتیک اسید، موتیف‌های تخریب‌پذیر ماتریس متالوپروتئاز) دارد. بخصوص موتیف‌های آرژنین-گلیسین-آسپارتیک اسید، شامل گروه‌هایی نیست که با متاکریلیک‌آنیدرید واکنش می‌دهد؛ که البته برای اطمینان از نگهداری خاصیت چسبندگی سلولی خوب ژلماست [۲۹، ۲۰ و ۸]. در ضمن، تخریب‌پذیری آنزیمی هیدروژل

کاربردی، فراهم می‌آورد [۳]. هیدروژل‌های فراوانی بر پایه بسپارهای طبیعی و مصنوعی و انواع گوناگونی از شیمی پیوندهای عرضی برای کاربردهای مختلف زیست‌پزشکی چون پزشکی احیاء، دارورسانی، و چسبندگی بافت توسعه یافته‌اند [۴]. بخصوص، هیدروژل‌ها برای کاربردهای پزشکی شبیه خواص ماتریس خارج سلولی<sup>۱</sup> طراحی شده‌اند تا بتوانند پشتیبانی سه‌بعدی برای رشد سلولی و شکل‌گیری بافت را تأمین کنند [۵]. هیدروژل‌ها به طور گسترده‌ای در کشت سه‌بعدی به منظور مطالعه ماتریس سلول و تعاملات سلول-سلول، تکثیر و مهاجرت [۶] و تمایز کنترل‌شده [۷] نیز به‌کار گرفته شده‌اند. در این زمینه، هیدروژل‌های پایه طبیعی از جمله بسپارهای زیستی نسبت به بسپارهای مصنوعی از مزایای زیادی چون زیست‌سازگاری عالی، پاسخ سیستم ایمنی پایین و امکان فعالیت زیستی موتیف‌های<sup>۲</sup> کدگذاری شده در ساختار شیمیایی برخوردارند.

#### ۴. ژلما

با بررسی منابع مختلف در مورد سنتز، خواص و کاربردهای زیست‌پزشکی ژلاتین متاکریویل<sup>۳</sup> یا ژلما، مشخص می‌شود که اغلب به نام ژلاتین متاکریلات<sup>۴</sup> [۸-۱۱]، ژلاتین متاکریت‌شده<sup>۵</sup> [۱۲-۱۵]، ژلاتین اصلاح‌شده با متاکریلامید<sup>۶</sup> [۱]، یا ژلاتین متاکریلامید<sup>۷</sup> [۱۶-۱۹] شناخته می‌شود. با توجه به این‌که، ژلما یکی از مشتق‌های ژلاتین است که بیشتر گروه‌های متاکریلامید و کمی گروه‌های متاکریلات را شامل می‌شود، نام ژلاتین متاکریلویل بیشتر مناسب به نظر می‌رسد، که با نام اختصاری ژلما نیز تطابق دارد که بطور گسترده پذیرفته شده است.

ژلما در معرض آغازگر نوری (مثلاً، تحت تابش لامپ فرابنفش در

۱. Extracellular matrix (ECM) یا ماتریس خارج سلول یا بافت برون یاخته‌ای، ماده زمینه‌ای یا شبکه‌ای از گلیکوپروتئین‌ها و یاخته‌هاست که پیرامون یاخته‌ها را دربر گرفته و سلول‌ها را به هم پیوند می‌دهد. این ماده ژله مانند از گلیکوزامینوگلیکان‌ها، گلیکوپروتئین‌ها، مایع بافتی و فیبروبلاست‌های استروما ساخته شده است.

۲. در بسپارهای زیستی مانند پروتئین و یا اسید نوکلئیک، موتیف ساختاری یک فوق ساختار دوم (نظم‌های موضعی که پروتئین در حین تاشدگی به خود می‌گیرند) است که در بسیاری از مولکول‌های دیگر نیز دیده می‌شود. از آنجا که این موتیف‌ها در پروتئین‌ها و آنزیم‌هایی که عملکرد یکسان ندارند ظاهر می‌شوند، نمی‌توان با استفاده از موتیف‌ها عملکردهای زیستی را پیشگویی کرد.

3. Gelatin Methacryloyl (GelMA)

4. Gelatin Methacrylate

5. Methacrylated Gelatin

6. Methacrylamide Modified Gelatin

7. Gelatin Methacrylamide

8. Arginine-Glycine-Aspartic Acid (RGD)  
9. Matrix Metalloproteinase (MMP)  
10. Photocrosslinking

معرفی گروه‌های جانشین متاکریلیک روی گروه‌های آمین فعال و هیدروکسیل در آمینواسیدهای باقی‌مانده می‌پردازد [۱]. در شکل (۲) نمودار تصویری از سنتز و مشخصه‌های ژلما و تهیه هیدروژل با برقراری پیوندهای عرضی در نور را مشاهده می‌کنید. واکنش ژلاتین و متاکریلیک‌آنیدرید برای پیوند با گروه جایگزین است، که در آن اصلاح گروه‌های آمین و هیدروکسیل اولیه رخ می‌دهد. واکنش‌های انتخابی در خلال برقراری پیوندهای عرضی با نور در ژلما، برای ایجاد شبکه‌های هیدروژل که در آن رادیکال‌های آزاد از آغازگر نوری ایجاد شده و نیز بسپارش زنجیره‌ای جایگزینی‌های متاکریلویل آغاز می‌شود. انتشار بین گروه‌های متاکریلویل واقع در همان زنجیره و زنجیره‌های مختلف رخ می‌دهد. پایان یافتن فرایند بین دو زنجیره گسترش یافته و یا بین یک زنجیره انتشار یافته و رادیکال دوم رخ می‌دهد. انتقال زنجیره‌ها و بسیاری دیگر از واکنش‌های جزئی به وضوح نشان داده نشده است.

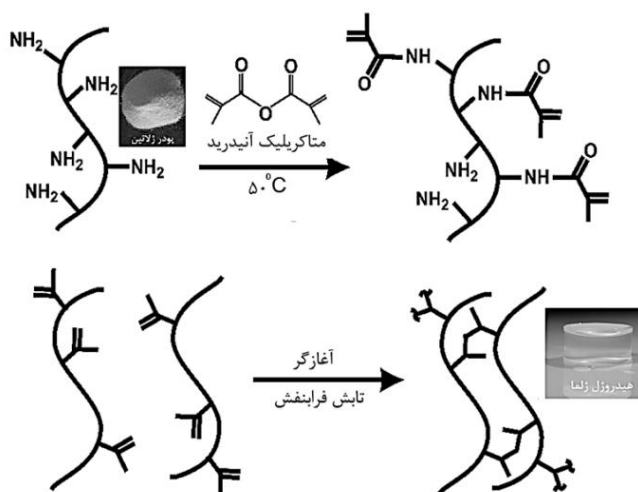
ژلما در محیط آزمایشگاهی توسط کلاژن‌های نوع یک و دو (که به ترتیب با ماتریس متالوپرونتاز-۱ و ماتریس متالوپرونتاز-۸ نامیده می‌شوند) با سرعت زیاد به پیش می‌رود، که حاکی از حضور موتیف‌های حساس به ماتریس متالوپرونتاز در ژلماست [۳۱ و ۳۰]. برای درک اهمیت غلظت ژلما در هیدروژل و بیان محدوده تغییرات خواص هیدروژل ژلما، خلاصه‌ای از خواص این هیدروژل در جدول (۱) درج شده است.

#### ۱-۴ سنتز ژلما

روش‌های متفاوتی برای آماده‌سازی ژلاتین جانشینی شده با متاکریلویل گزارش شده‌اند؛ اما همه آن‌ها اساساً تفاوت‌های کمی با روش کلی و اولیه گزارش شده توسط وان دن بولک<sup>۱</sup> و همکارانش [۱] دارند. ژلما با واکنش مستقیم ژلاتین با متاکریلیک‌آنیدرید در بافر فسفات در دمای ۵۰ درجه سلسیوس سنتز می‌شود. این واکنش به

جدول ۱. خلاصه‌ای از خواص هیدروژل با غلظت‌های مختلف ژلما [۲۸-۳۴].

غلظت ژلما (درصد)	مدول فشاری (کیلوپاسکال)	مدول کششی (کیلوپاسکال)	استحکام کششی (کیلوپاسکال)	تغییر طول شکست (درصد)	میزان تورم (درصد)	میزان تخریب		
						سه روز	یک هفته	یک ماه
۵	۳±۱	۹±۱	۴±۱	۴۰±۶	۱۴۷۶±۲۸	۱۰۰	۱۰۰	۱۰۰
۷٫۵	۱۴±۲	۱۷±۲	۷±۱	۳۹±۵	۱۲۷۲±۲۶	~۸۰	۱۰۰	۱۰۰
۱۰	۲۶±۳	۵۷±۹	۱۸±۱	۳۴±۵	۷۱۹±۲۴	~۳۰	~۶۵	۱۰۰
۱۵	۸۹±۹	۱۵۳±۱۸	۲۴±۲	۲۷±۵	۵۶۷±۱۹	~۲۰	~۳۵	۱۰۰
۲۰	۱۰۸±۸	۱۹۴±۸	۲۹±۳	۲۲±۴	۴۷۰±۹	~۸	~۲۴	~۸۰



شکل ۲. نمودار تصویری سنتز ژلما و تهیه هیدروژل با برقراری پیوندهای عرضی توسط نور [۹].

1. Van Den Bulcke

بازی (به میزان نه) و استفاده از محلول اولیه حاوی ۱۰ الی ۲۰ درصد وزنی ژلاتین با دمای ۵۰ درجه سلسیوس، با افزودن یکباره متاکریلات آنیدرید (به میزان ۰/۱ میلی لیتر برای هر گرم ژلاتین)، بعد از یک ساعت هم‌زدن موفق به سنتز ژلما با ۹۶ درصد جانشینی شدند [۳۵].

#### ۴-۲ سنتز هیدروژل ژلما

برقراری پیوندهای عرضی با نور در بسپار ژلما، می‌تواند با یک آغازگر قابل حل در آب و تابش نور فرابنفش صورت گیرد. نمودار تصویری مراحل آماده‌سازی هیدروژل ژلما در شکل (۳) مشاهده می‌کنید. انتخاب مرسوم برای آغازگرهای نوری قابل حل در آب شامل ۲- هیدروکسی-۱- (۴- (۲- هیدروکسیاتوکسی) فنیل)-۲- متیل-۱- پروپانول<sup>۲</sup> [۲۹ و ۸] و نمک لیتیم آسپیل فسفینات<sup>۳</sup> [۳۶] است. ۲- هیدروکسی-۱- (۴- (۲- هیدروکسیاتوکسی) فنیل)-۲- متیل-۱- پروپانول یک آغازگر نوری مرسوم قابل دسترسی است که قابلیت حل در آب به میزان حداقل پنج میلی گرم بر میلی لیتر را دارد [۳۷]. این میزان حلالیت، مقدار چشمگیری برای یک بسپارش نوری در محیط‌های آبی است. نمک لیتیم آسپیل فسفینات یک آغازگر نوری جایگزین با قابلیت انحلال در آب است که اخیراً به کار گرفته شده است. این ماده حلالیت بالاتری در آب (بیش از ۸/۵ درصد وزنی) و ضریب تضعیف مولار بیشتری در طول موج ۳۶۵ نانومتر نسبت به ۲- هیدروکسی-۱- (۴- (۲- هیدروکسیاتوکسی) فنیل)-۲- متیل-۱- پروپانول دارد [۳۶]. میزان جانشینی، غلظت ژلما، غلظت آغازگر و زمان تاباندن نور فرابنفش پارامترهای اصلی‌اند که امکان تنظیم خواص فیزیکی و ریزساختار هیدروژل ژلمای حاصل شده را فراهم می‌کنند [۱].

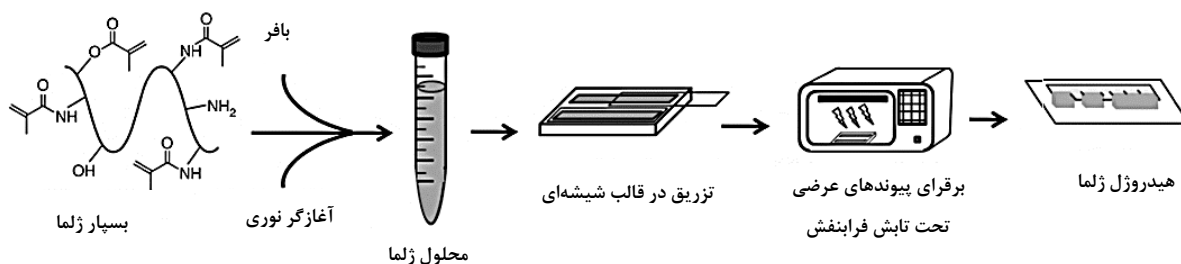
#### ۴-۳ مشخصات هیدروژل ژلما

مشخصه‌های خواص فیزیکی (همچون تخلخل، مدول فشاری و تورم در آب) و پارامترهای واکنش سلولی (همچون زیست‌پذیری سلول، تولید مثل و گسترش سلولی) در هیدروژل‌های ژلما پارامترهای کلیدی برای سنجش مناسب بودن این بسپارها در کاربردهای متفاوت مهندسی بافت است. عوامل موثر بر خواص فیزیکی هیدروژل ژلما را به‌طور خلاصه در شکل (۴) مشاهده می‌کنید.

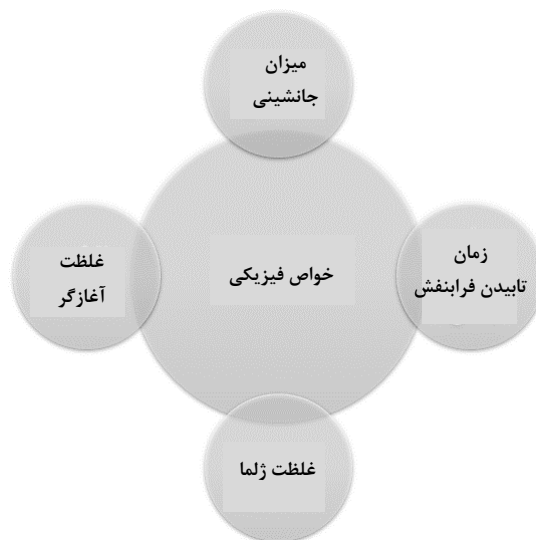
معمولاً ژلما با واکنش مستقیم ژلاتین و متاکریلیک آنیدرید در بافر فسفات در  $pH=7/4$  در دمای ۵۰ درجه سلسیوس سنتز می‌شود. درجه‌های متفاوت جانشینی متاکریلوپیل در ژلما را می‌توان با تنظیم میزان افزایش متاکریلیک آنیدرید به هم‌زن واکنش به‌دست آورد که به دلیل تأثیر در تراکم پیوندهای عرضی ژلما با خواص مکانیکی متفاوت ایجاد می‌کند. نگهداشتن  $pH$  در محدوده بالا (قلیایی) در طول واکنش شیمیایی، واکنش‌پذیری آمین‌ها و گروه‌های هیدروکسیل را افزایش می‌دهد که به درجه جانشینی بالاتر می‌انجامد [۳۲]. بعد از توقف واکنش جانشینی، با افزودن فسفات بافر (معمولاً تا پنج برابر) محلول رقیق می‌شود. گزارش شده است که با سانتیفریوژ کردن با سرعت ۵۸۰۰ دور در دقیقه به مدت سه دقیقه نیز می‌توان به حذف ناخالصی‌ها کمک کرد [۳۳]. در ادامه، برای جداسازی کامل، محلول به‌دست آمده باید در آب یونیده (آب مقطر) توسط کیسه دیالیز (با وزن مولکولی جداکننده ۱۲ تا ۱۴ کیلودالتون) به مدت ۵ تا ۷ روز دیالیز شود تا امکان خروج و حذف کامل ناخالصی‌ها با وزن مولکولی کمتر، شامل متاکریلیک آنیدرید واکنش نداده و محصولات جانبی اسیدمتاکریلیک و غیره با پتانسیل سمیت، را به طور کامل فراهم آورد. برای نتیجه بهتر توصیه شده است که آب یونیده حداقل روزی دوبار تعویض شود. در نهایت، محلول یونیده منجمد و خشک و برای استفاده‌های بعدی در یخچال نگهداری می‌شود. نکته قابل ذکر این است که واکنش ژلاتین و متاکریلیک یک واکنش دوفازی است که در آن یک ترکیب آلی در داخل یک فاز آبی افزوده و پراکنده می‌شود. در نتیجه، میزان افزودن متاکریلیک آنیدرید و وضعیت هم‌زدن، ممکن است آثار خاصی در کیفیت پراکندگی و در نهایت میزان جانشینی متاکریلوپیل محصول نهایی داشته باشد. البته، آثار وضعیت هم‌زدن‌های متفاوت بر خواص ژلما هنوز با جزئیات کامل مطالعه و بررسی نشده است. اخیراً گزارش شده است که با تنظیم اولیه  $pH$  در محدوده بازی می‌توان میزان متاکریلیک آنیدرید افزوده شده برای سنتز ژلما را کاهش داد [۳۴]. شیراهاما<sup>۱</sup> و همکارانش در سال ۲۰۱۶ با بررسی مولاریته بافر، تنظیم  $pH$  اولیه، غلظت ژلاتین، غلظت متاکریلیک آنیدرید، دما و زمان واکنش، نشان دادند که می‌توان برای سنتز آسان و سریع ژلما، متاکریلیک آنیدرید را یکباره در محلول ژلاتین وارد کرد. آنان با استفاده از محلول بافر سدیم کربنات- بی کربنات ۰/۲۵ مولار، تنظیم  $pH$  محیطی در محدوده

2. 2- Hydroxy-1- [4- (2-Hydroxyethoxy) Phenyl]- 2-Methyl-1-Propanone (Irgacure 2959)  
3. Lithium Acylphosphinate Salt (LAP)

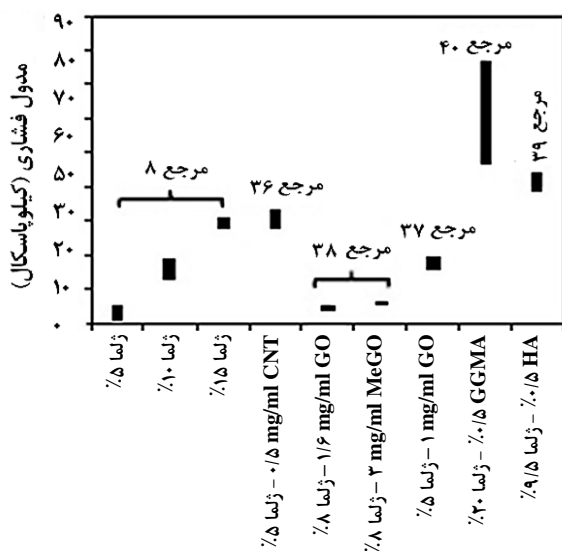
1. Hitomi Shirahama



شکل ۳. مراحل تولید هیدروژل ژلما [۳۳].

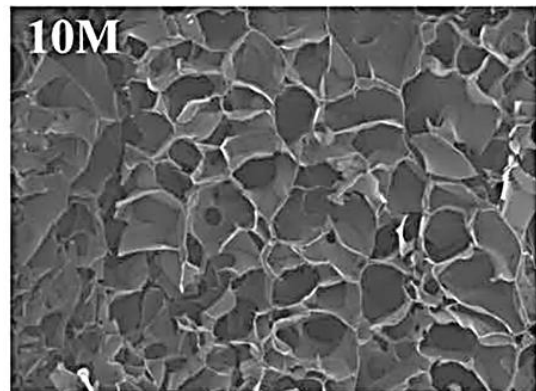
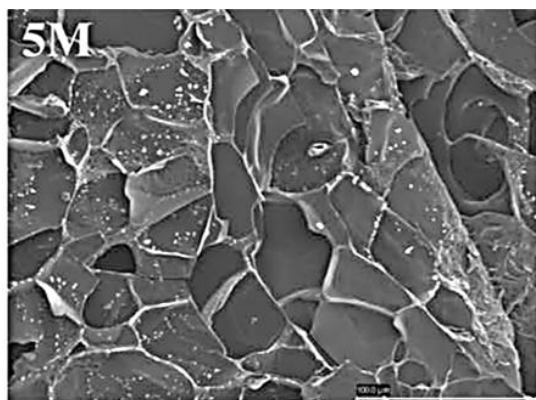
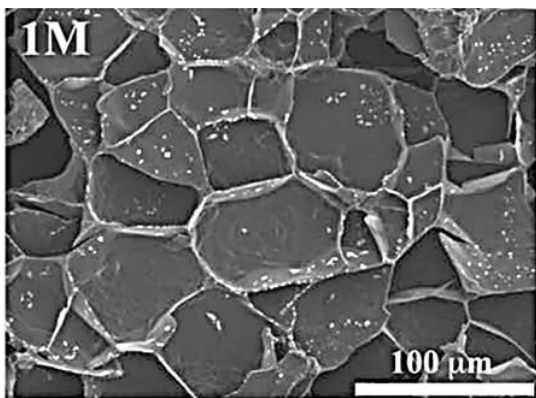


شکل ۴. عوامل نسبتاً مستقل دخیل در خواص فیزیکی هیدروژل ژلما [۸].



شکل ۵. مدول‌های فشاری گزارش شده برای هیدروژل ژلما در مطالعات مختلف [۸، ۳۶، ۳۷، ۳۸، ۳۹، ۴۰].

ژلما، با توجه به قابلیت تنظیم خواصش از طریق دستکاری در فرایند سنتز (چون وضعیت برقراری پیوندهای عرضی)، تطبیق‌پذیری پدیده‌های بروز می‌دهد. مثلاً، مدول فشاری ژلما می‌تواند با تغییر در میزان جانشینی متاکریلایل یا با افزودن ترکیبات آلی و غیرآلی به ژلما تغییر کند، که در شکل (۵) مشاهده می‌کنید. این گستره وسیع خواص، ژلما را برای استفاده گسترده در کاربردهای مهندسی پزشکی و دارو زیستی به ماده مناسبی تبدیل می‌کند. هیدروژل‌های ژلما می‌توانند در معرض عملیات‌های برودتی (همچون منجمد و خشک کردن) نیز قرار بگیرند تا بتوانند داربست‌های متخلخلی با اندازه تخلخل‌های کنترل شده پدید آورند [۳۸-۴۳].



شکل ۶. تصاویر میکروسکوپی الکترونی روبشی از هیدروژل ژلما برای نشان دادن اثر میزان جانشینی متاکریلویل در ابعاد منافذ هیدروژل ژلما [۱۱].

(مقادیر ۳۰، ۱۶ و ۳/۳ کیلوپاسکال) [۸]. نیکول پی برد که نسبت تورم با افزایش میزان جانشینی متاکریلویل و کسر جرمی ژلما کاهش می‌یابد [۸]. به همین ترتیب، میزان تکثیر سلولی نسبت عکس با کسر جرمی ژلما در داخل هیدروژل دارد [۸]. این موارد را به‌طور خلاصه در شکل (۷) مشاهده می‌کنید.

وان ولیربرگ<sup>۱</sup> و همکارانش دستیابی به هیدروژل‌های ژلمای متخلخل با برقرار کردن شرایط برودتی در هیدروژل‌هایی را که به‌صورت شیمیایی پیوندهای عرضی برقرار کرده بودند، گزارش دادند [۴۴]. آنان تأیید کردند که ابعاد متوسط تخلخل‌ها با غلظت ژلما و سرعت سردکردن رابطه معکوس دارد. همچنین موفق شدند برای هیدروژل ژلما شیب اندازه تخلخل را بر اساس تغییرات سردکردن به‌دست آورند [۴۴ و ۴۵]. در شکل (۶) مشاهده می‌کنید که ابعاد تخلخل در هیدروژل ژلما می‌تواند با تغییر در میزان جانشینی متاکریلویل تنظیم شود [۴۶ و ۱۱]. گزارش شده است که در سنتز ژلما استفاده از ژلاتین نوع B در مقایسه با نوع A، به مقداری جزئی می‌تواند میزان جانشینی ژلما را افزایش دهد [۴۷]. مثلاً، چن<sup>۲</sup> و همکارانش [۱۱] هیدروژل ژلما با میزان جانشینی‌های مختلف (۴۹/۸، ۶۳/۸ و ۷۳/۲ درصد) را با بهره‌گیری از، به ترتیب، ۱، ۵ و ۱۰ مولار محلول متاکریلیک‌انیدرید سنتز کردند. در کار آزمایشگاهی، میزان جانشینی که از طریق طیف‌سنجی تشدید مغناطیسی هسته‌ای<sup>۳</sup> اندازه‌گیری می‌شود، به نسبت بین گروه‌های عامل‌دار شده به گروه‌های آمین اصلی در دسترس، اطلاق می‌شود. اندازه تخلخل متوسط در هیدروژل‌های ژلما که با میکروسکوپ الکترونی روبشی<sup>۴</sup> بعد از منجمد و خشک‌کردن مشخص شد؛ (۴۹/۸ درصد) ۵۰، (۶۳/۸ درصد) ۳۰ و (۷۳/۲ درصد) ۲۰ میکرومتر بود.

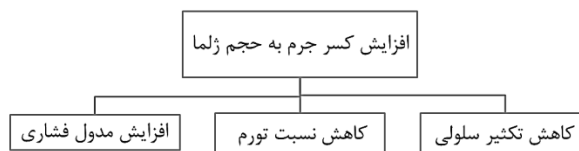
روابط دیگری بین سایر پارامترها (همچون برهم‌کنش‌های شیمیایی، فیزیکی و زیستی) برای هیدروژل‌های ژلما گزارش شده است. چن و همکارانش مشاهده کردند که مدول فشاری هیدروژل ژلما با میزان جانشینی متاکریلویل رابطه مستقیم دارد. مدول‌های فشاری به‌دست آمده (۴۹/۸ درصد)  $210 \pm 0.18$  کیلوپاسکال، (۶۳/۸ درصد)  $372 \pm 0.18$  کیلوپاسکال و (۷۳/۲ درصد)  $45 \pm 0.33$  کیلوپاسکال بود [۱۱]. مدول فشاری با کسر جرم به حجم ژلما نیز رابطه مستقیم دارد. مثلاً، نیکول<sup>۵</sup> و همکارانش برای هیدروژل‌های ژلمایی با ۷۳/۲ درصد جانشینی، مدول‌های فشاری ۲۲، ۱۰ و ۲ کیلوپاسکال را، به ترتیب، برای هیدروژل‌ها با میزان ژلما ۱۵، ۱۰ و ۵ درصد وزنی به حجم را پیش‌بینی کردند. مقادیر یادشده برای هیدروژل ژلمایی با میزان جانشینی بالاتر (۸۱/۴ درصد) افزایش داشتند

1. Van Vlierbergh
2. Chen
3. Hydrogen Nuclear Magnetic Resonance (H-NMR)
4. Scanning Electron Microscope (SEM)
5. Nichol

دارند، که ناشی از وجود موتیف‌های چسبندگی سلول آرژنین-گلیسین-آسپارتیک اسید و زنجیره آمینواسیدهای تخریب پذیر ماتریس متالوپرونتاز است. همچنین، این مواد زیستی با قابلیت برقراری پیوندهای عرضی با نور، امکان ساخت ریزساختارهای پرسلول مهندسی شده با معماری سه‌بعدی تعریف‌شده و توپولوژی با یک چارچوب را فراهم می‌آورند. ساختارهای سه‌بعدی پرسلولی بر اساس هیدروژل ژلما می‌تواند برای تقلید ساختار بافت‌های طبیعی و سامانه‌های دارورسانی طراحی شوند که امکان کاربری آن‌ها در مهندسی بافت و بازتولید دارو را فراهم می‌آورد.

### مراجع

- [1] Van Den Bulcke, A. I., Bogdanov, B., De Rooze, N., Schacht, E. H., Cornelissen, M., Berghmans, H., "Structural and Rheological Properties of Methacrylamide Modified Gelatin Hydrogels", *Biomacromolecules*, Vol. 1, pp. 31-38, (2000).
- [2] Yue, K., Li, X., Schrobback, K., Sheikhi, A., Annabi, N., Leijten, J., Zhang, W., Zhang, Y. S., Hutmacher, D. W., Klein, T. J., Khademhosseini, A., "Structural analysis of photocrosslinkable methacryloyl-modified protein derivatives", *Biomaterials*. Vol. 139, pp. 163-171, (2017).
- [3] Annabi, N., Tamayol, A., Uquillas, J. A., Akbari, M., Bertassoni, L. E., Cha, C., Camci- Unal, G., Dokmeci, M. R., Peppas, N. A., Khademhosseini, "25th Anniversary Article: Rational Design and Applications of Hydrogels in Regenerative Medicine", *Advanced Materials*, Vol. 26, pp. 85-124, (2014).
- [4] Thiele, J., Ma, Y., Bruekers, S. M. C., Ma, S., Huck, W. T. S., "25th Anniversary Article: Designer Hydrogels for Cell Cultures: A Materials Selection Guide", *Advanced Materials*, Vol. 26, pp. 125-148, (2014).
- [5] Alge, D. L., Anseth, K. S., "Bioactive hydrogels: Lighting the way", *Nature Materials*, Vol. 12, pp. 950-952, (2013).
- [6] Parthiban, S. P., Rana, D., Jabbari, E., Benkirane-Jessel, N., Ramalingam, M., "Covalently immobilized VEGF-mimicking peptide with gelatin methacrylate enhances microvascularization of endothelial cells", *Acta biomaterialia*, Vol. 51, pp. 330-340, (2017).
- [7] West, J. L., "Protein-patterned hydrogels: Customized cell microenvironments, " *Nature Materials*. Vol. 10, pp. 727-729, (2011).
- [8] Nichol, J. W., Koshy, S. T., Bae, H., Hwang, C. M., Yamanlar, S., Khademhosseini, A., "Cell-laden microengineered gelatin methacrylate hydrogels", *Biomaterials*, Vol. 31, 5536-5544, (2010).
- [9] Hutson, C. B., Nichol, J. W., Aubin, H., Bae, H., Yamanlar, S., Al-Haque, S., Koshy, S. T., Khademhosseini, A., "Synthesis and Characterization of Tunable Poly (Ethylene Glycol): Gelatin Methacrylate Composite Hydrogels", *Tissue Engineering Part A*, Vol. 17, pp. 1713-1723, (2011).



شکل ۷. تأثیر افزایش کسر جرم به حجم ژلما در خواص فیزیکی و مکانیکی و سلولی [۸].

چسبندگی و تولیدمثل سلول‌های مختلف در هیدروژل ژلما را به نحو پدیده‌ای بررسی و شاخص‌بندی کرده‌اند. مطالعات پیشگام نشان می‌دهد که هیدروژل‌های ژلما می‌توانند به عنوان یک ماده غالب در دو یا سه‌بعد برای کشت سلول‌های فعال به کار گرفته شوند که از خواص ترکیبی زیست‌سازگاری، خواص مکانیکی و برخورداری از رشته‌های پپتیدی زیست‌فعال‌ش ناشی می‌شود [۴۸]. مثلاً، سلول‌ها می‌توانند در محلول‌های اولیه بسیار ژلما معلق شده، سپس در حضور نور فرابنفش پیوندهای عرضی برقرار کنند و هیدروژل پرسلول<sup>۱</sup> سه‌بعدی را تشکیل بدهند. عموماً در هیدروژل‌های پرسلول با پیوندهای عرضی برقرار شده، زیست‌پذیری سلول‌ها، چشمگیر (بیش از ۸۰ درصد) مشاهده می‌شود. برعکس محیط‌های کشت سلولی دوبعدی، سلول‌های حبس‌شده در هیدروژل‌ها باید بتوانند محیط‌های اطراف خود را برای گسترش و مهاجرت مدل‌سازی نمایند [۲۹].

### ۵. نتیجه‌گیری کلی

ژلما از یک بسیار طبیعی به نام ژلاتین با یک مرحله اصلاح شیمیایی تشکیل شده است. معرفی گروه‌های جانبی متاکریلویل با قابلیت برقراری پیوندهای عرضی با نور، امکان بسپارش آسان و سریع ژلاتین در معرض نور با حضور آغازگر را فراهم می‌آورند. بسپاری از پارامترهای فیزیکی هیدروژل‌های ژلما همچون خواص مکانیکی، ابعاد تخلخل‌ها، سرعت تخریب‌پذیری و نسبت تورم می‌تواند به دلخواه با تغییر میزان جانبی متاکریلویل، غلظت بسپار اولیه، غلظت آغازگر و زمان تابش نور فرابنفش تغییر کند. علاوه بر این، هیدروژل‌های ژلمای حاصل، زیست‌سازگاری عالی و زیست‌فعالی ژلاتین چون چسبندگی، گسترش و تکثیر مناسب در خطوط سلولی مختلف را

1. Cell-Laden

- [10] Nikkiah, M., Eshak, N., Zorlutuna, P., Annabi, N., Castello, M., Kim, K., Dolatshahi-Pirouz, A., Edalat, F., Bae, H., Yang, Y., Khademhosseini, A., "Directed endothelial cell morphogenesis in micropatterned gelatin methacrylate hydrogels", *Biomaterial*, Vol. 33, pp. 9009-9018, (2012).
- [11] Chen, Y-C., Lin, R-Z., Qi, H., Yang, Y., Bae, H., Melero-Martin, J. M., Khademhosseini, A., "Functional Human Vascular Network Generated in Photocrosslinkable Gelatin Methacrylate Hydrogels", *Advanced Functional Materials*, Vol. 22, pp. 2027-2039, (2012).
- [12] Hosseini, V., Ahadian, S., Ostrovidov, S., Camci-Unal, G., Chen, S., Kaji, H., Ramalingam, M., Khademhosseini, A., "Engineered Contractile Skeletal Muscle Tissue on a Microgrooved Methacrylated Gelatin Substrate", *Tissue Engineering Part A*, Vol. 18, pp. 2453-2465, (2012).
- [13] Chen, M. B., Srigunapalan, S., Wheeler, A. R., Simmons, C. A., "A 3D microfluidic platform incorporating methacrylated gelatin hydrogels to study physiological cardiovascular cell-cell interactions", *Lab on a Chip*, Vol. 13, pp. 2591-2598, (2013).
- [14] Bertassoni, L. E., Cardoso, J. C., Manoharan, V., Cristino, A. L., Bhise, N. S., Araujo, W. A., Zorlutuna, P., Vrana, N. E., Ghaemmaghami, A. M., Dokmeci, M. R., Khademhosseini, A., "Direct-write bioprinting of cell-laden methacrylated gelatin hydrogels", *Biofabrication*, Vol. 6, pp. 024105, (2014).
- [15] Lin, R-Z., Chen, Y-C., Moreno-Luna, R., Khademhosseini, A., Melero-Martin, J. M., "Transdermal regulation of vascular network bioengineering using a photopolymerizable methacrylated gelatin hydrogel", *Biomaterials*, Vol. 34, pp. 6785-6796, (2013).
- [16] Schuurman, W., Levett, P. A., Pot, M. W., van Weeren, P. R., Dhert, W. J. A., Hutmacher, D. W., Melchels, F. P., Klein, T. J., Malda, J., "Gelatin-Methacrylamide Hydrogels as Potential Biomaterials for Fabrication of Tissue-Engineered Cartilage Constructs", *Macromolecular Bioscience*, Vol. 13, pp. 551-561, (2013).
- [17] Kaemmerer, E., Melchels, F. P. W., Holzapfel, B. M., Meckel, T., Hutmacher, D. W., Loessner, D., "Gelatin methacrylamide-based hydrogels: An alternative three-dimensional cancer cell culture system", *Acta Biomaterialia*, Vol. 10, pp. 2551-2562, (2014).
- [18] Serafim, A., Tucureanu, C., Petre, D-G., Dragusin, D-M., Salageanu, A., Van Vlierberghe, S., Dubruel, P., Stancu, I. C., "One-pot synthesis of superabsorbent hybrid hydrogels based on methacrylamide gelatin and polyacrylamide. Effortless control of hydrogel properties through composition design", *New Journal of Chemistry*, Vol. 38, pp. 3112-3126, (2014).
- [19] Billiet, T., Gevaert, E., De Schryver, T., Cornelissen, M., Dubruel, P., "The 3D printing of gelatin methacrylamide cell-laden tissue-engineered constructs with high cell viability", *Biomaterials*, Vol. 35, pp. 49-62, (2014).
- [20] Liu, Y., Chan-Park, M. B., "A biomimetic hydrogel based on methacrylated dextran-graft-lysine and gelatin for 3D smooth muscle cell culture", *Biomaterials*, Vol. 31, pp. 1158-1170, (2010).
- [21] Van den Steen, P. E., Dubois, B., Nelissen, I., Rudd, P. M., Dwek, R. A., "Opdenakker G. Biochemistry and Molecular Biology of Gelatinase B or Matrix Metalloproteinase-9 (MMP-9)", *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology*, Vol. 37, pp. 375-536, (2002).
- [22] Rizwan, M., Peh, G. S. L., Ang, H. P., Lwin, N. C., Adnan, K., Mehta, J. S., Tan, W. S., Yim, E. K. F., "Sequentially-crosslinked bioactive hydrogels as nano-patterned substrates with customizable stiffness and degradation for corneal tissue engineering applications", *Biomaterials*, Vol. 120, pp. 139-154, (2017).
- [23] Gorgieva, S., Kokol, V., "Collagen-vs. gelatine-based biomaterials and their biocompatibility: review and perspectives", *InTech*, (2011).
- [24] Jayakrishnan, A., Jameela, S. R., "Glutaraldehyde as a fixative in bioprotheses and drug delivery matrices", *Biomaterials*, Vol. 17, pp. 471-484, (1996).
- [25] Olde Damink, L. H. H., Dijkstra, P. J., Van Luyn, M. J. A., Van Wachem, P. B., Nieuwenhuis, P., Feijen, J., "Crosslinking of dermal sheep collagen using hexamethylene diisocyanate", *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, Vol. 6, pp. 429-434, (1995).
- [26] Sung, H-W., Hsu, H-L., Shih, C-C., Lin, D-S., "Cross-linking characteristics of biological tissues fixed with monofunctional or multifunctional epoxy compounds", *Biomaterials*, Vol. 17, pp. 1405-1410, (1996).
- [27] Han, M. E., Kang, B. J., Kim, S. H., Kim, H. D., Hwang, N. S., "Gelatin-based extracellular matrix cryogels for cartilage tissue engineering", *Journal of Industrial and Engineering Chemistry*, Vol. 45, pp. 421-429, (2017).
- [28] Aubin, H., Nichol, J. W., Hutson, C. B., Bae, H., Sieminski, A. L., Crokek, D. M., Akhyari, P., Khademhosseini, A., "Directed 3D cell alignment and elongation in microengineered hydrogels", *Biomaterials*, Vol. 31, pp. 6941-6951, (2010).
- [29] Benton, J. A., DeForest, C. A., Vivekanandan, V., Anseth, K. S., "Photocrosslinking of Gelatin Macromers to Synthesize Porous Hydrogels That Promote Valvular Interstitial Cell Function", *Tissue Engineering Part A*, Vol. 15, pp. 3221-30, (2009).
- [30] Xu, F., Inci, F., Mullick, O., Gurkan, U. A., Sung, Y., Kavaz, D., Xu, F., Inci, F., Mullick, O., Gurkan, U. A., Sung, Y., Kavaz, D., Li, B., Denkbaz, E. B., Demirci, U., "Release of Magnetic Nanoparticles from Cell-Encapsulating Biodegradable Nanobiomaterials", *ACS Nano*, Vol. 6, pp. 6640-6649, (2012).
- [31] Xiao, W., He, J., Nichol, J. W., Wang, L., Hutson, C. B., Wang, B., Du, Y., Fan, H., Khademhosseini, A., "Synthesis and characterization of photocrosslinkable gelatin and silk fibroin interpenetrating polymer network hydrogels", *Acta Biomaterialia*, Vol. 7, pp. 2384-2393, (2011).

- [32] Hoch, E., Schuh, C., Hirth, T., Tovar, G. E. M., Borchers, K., "Stiff gelatin hydrogels can be photochemically synthesized from low viscous gelatin solutions using molecularly functionalized gelatin with a high degree of methacrylation", *Journal of Materials Science-Materials in Medicine*, Vol. 23, pp. 2607-2617, (2012).
- [33] Daniela, L., Meinert, Ch., Kaemmerer, E., Martine, L. C., Yue, K., Peter, A., Levett, P. A., Klein, T. J., Melchels, F. P., Khademhosseini, A., Hutmacher, D. W., "Functionalization, preparation and use of cell-laden gelatin methacryloyl-based hydrogels as modular tissue culture platforms", *Nature protocols* 11, Vol 4, pp. 727-746, (2016).
- [34] Hoon, L. B., Shirahama, H., Cho, N. J., Tan, P. L., "Efficient and controllable synthesis of highly substituted gelatin methacrylamide for mechanically stiff hydrogels", *RSC Advances*, Vol. 128, pp. 106094-106097, (2015).
- [35] Hitomi, S., Lee, B. H., Tan L.P., Cho, N. J., "Precise tuning of facile one-pot gelatin methacryloyl (GeLMA) synthesis", *Scientific Reports*, Vol. 6, pp. 31016, (2016)
- [36] Fairbanks, B. D., Schwartz, M. P., Bowman, C. N., Anseth, K. S., "Photoinitiated polymerization of PEG-diacrylate with lithium phenyl-2,4,6-trimethylbenzoylphosphinate: polymerization rate and cytocompatibility", *Biomaterials*, Vol. 30, pp. 6702-6707, (2009).
- [37] Benton, J. A., Fairbanks, B. D., Anseth, K. S., "Characterization of valvular interstitial cell function in three dimensional matrix metalloproteinase degradable PEG hydrogels", *Biomaterials*, Vol. 30, pp. 6593-6603, (2009).
- [38] Koshy, S. T., Ferrante, T. C., Lewin, S. A., Mooney, D. J., "Injectable, porous, and cell-responsive gelatin cryogels", *Biomaterials*, Vol. 35, pp. 2477-2487, (2014).
- [39] Shin, S. R., Bae, H., Cha, J. M., Mun, J. Y., Chen, Y.-C., Tekin, H., Shin, H., Farshchi, S., Dokmeci, M. R., Tang, S., Khademhosseini, A., "Carbon Nanotube Reinforced Hybrid Microgels as Scaffold Materials for Cell Encapsulation", *ACS Nano*, Vol. 6, pp. 362-372, (2012).
- [40] Shin, S. R., Aghaei-Ghareh-Bolagh, B., Dang, T. T., Topkaya, S. N., Gao, X., Yang, S. Y., Jung, S. M., Oh, J. H., Dokmeci, M. R., Tang, X. S., Khademhosseini, A., "Cell-laden Microengineered and Mechanically Tunable Hybrid Hydrogels of Gelatin and Graphene Oxide", *Advanced Materials*, Vol. 25, pp. 6385-6391, (2013).
- [41] Cha, C., Shin, S. R., Gao, X., Annabi, N., Dokmeci, M. R., Tang, X. S., Khademhosseini, A., "Controlling Mechanical Properties of Cell-Laden Hydrogels by Covalent Incorporation of Graphene Oxide.", *Small*, Vol 10., pp. 514-523, (2014).
- [42] Levett, P. A., Melchels, F. P. W., Schrobback, K., Hutmacher, D. W., Malda, J., Klein, T. J., "A biomimetic extracellular matrix for cartilage tissue engineering centered on photocurable gelatin, hyaluronic acid and chondroitin sulfate", *Acta Biomaterialia*, Vol. 10, pp. 214-223, (2014).
- [43] Shin, H., Olsen, B. D., Khademhosseini, A., "The mechanical properties and cytotoxicity of cell-laden double-network hydrogels based on photocrosslinkable gelatin and gellan gum biomacromolecules", *Biomaterials*, Vol. 33, pp. 3143-3152, (2012).
- [44] Van Vlierberghe, S., Cnudde, V., Dubruel, P., Masschaele, B., Cosijns, A., De Paepe, I., Jacobs, P. J., Van Hoorebeke, L., Remon, J. P., Schacht, E., "Porous gelatin hydrogels: 1. Cryogenic formation and structure analysis", *Biomacromolecules*, Vol. 8, pp. 331-337, (2007).
- [45] Van Vlierberghe, S., Dubruel, P., Schacht, E., "Effect of Cryogenic Treatment on the Rheological Properties of Gelatin Hydrogels", *Journal of Bioactive and Compatible Polymers*, Vol. 25, pp. 498-512, (2010)..
- [46] Lee, Y., Lee, J. M., Bae, P.-K., Chung, I. Y., Chung, B. H., Chung, B. G., "Photo-crosslinkable hydrogel-based 3D microfluidic culture device", *Electrophoresis*, Vol. 36, pp. 994-1001, (2015).
- [47] Hoon, L. B., Lum, N., Seow, L. Y., Lim, P. Q., Tan, L. P., "Synthesis and Characterization of Types A and B Gelatin Methacryloyl for Bioink Applications", *Materials* 9, Vol 10, pp. 797, (2016).
- [48] Dubruel, P., Unger, R., Van Vlierberghe, S., Cnudde, V., Jacobs, P. J., Schacht, E., Kirkpatrick, C. J., "Porous gelatin hydrogels: 2. In vitro cell interaction study", *Biomacromolecules*, Vol. 8, pp. 338-344, (2007).