



امکان استفاده از داربست‌های هوشمند متشکل از موسیلاژ دانه به و کاپاکاراگینان به عنوان داربست سلولی در شرایط

نرمال فیزیولوژیکی و تغییر pH

ندا فرهادی^۱، نفیسه سلطانی زاده^{۲*}، الهه مسائلی^۳، محسن ربانی

۱- دانشجوی دکتری، دانشکده مهندسی کشاورزی، گروه علوم و مهندسی صنایع غذایی، دانشگاه صنعتی اصفهان، اصفهان، ایران

۲- دانشیار، دانشکده مهندسی کشاورزی، گروه علوم و مهندسی صنایع غذایی، دانشگاه صنعتی اصفهان، اصفهان، ایران

۳- استادیار، پژوهشگاه علوم سلولی، موسسه علمی-پژوهش رویان، اصفهان، ایران

۴- استادیار، دانشکده فنی و مهندسی، دانشگاه اصفهان، اصفهان، ایران

اطلاعات مقاله	چکیده
تاریخ های مقاله :	هدف از پژوهش حاضر بررسی قابلیت رشد سلولی بر روی داربست های هوشمند کاراگینان (Carr) و ترکیب کاراگینان و موسیلاژ دانه به (Carr:Quc) به منظور تولید گوشت آزمایشگاهی می باشد. در این پژوهش، دو هیدروژل کاپاکاراگینان با غلظت ۱/۵٪ و کاپاکاراگینان و موسیلاژ دانه به با نسبت ۱:۱ و غلظت نهایی ۱/۵٪ با کمک محلول کلرید پتاسیم ۵٪ تشکیل شدند. سپس توانایی پاسخ‌دهی این دو داربست به تغییر pH محیط مورد ارزیابی قرار گرفت و زنده‌مانی رده سلولی C2C12 در pH ۷/۴ و در هنگام تغییر pH از ۷/۴ به ۵/۵ بررسی شد. بررسی تغییر تورم با تغییر pH محیط (pH ۷-۱) نشان داد که برای داربست Carr بیشترین میزان تورم در pH ۵ و برابر با ۱۴۵٪ به دست آمد که با میزان تورم در سایر pH ها تفاوت معنی داری نشان داد ($P < 0/05$). بیشترین میزان تورم برای داربست Carr:Quc نیز در pH ۵ و به میزان ۴۲۸٪ مشاهده شد که با میزان تورم در سایر pH ها تفاوت معنی داری نشان داد ($P < 0/05$). همچنین تغییر تورم داربست‌ها با تغییر pH از ۷/۴ به ۵/۵ ارزیابی شد. داربست Carr هیچ تغییر توری در زمان‌های مورد مطالعه نشان نداد در حالی که تغییر تورم داربست Carr:Quc بعد از قرار گرفتن در pH ۵/۵ به مدت ۳۰، ۴۵، ۶۰، ۱۸۰ و ۳۶۰ دقیقه نسبت به pH ۷/۴ تفاوت معنی داری داشت ($P < 0/05$). ارزیابی زنده‌مانی سلول‌های C2C12 نیز بر روی داربست Carr:Quc در شرایط نرمال و تغییر pH از ۷/۴ به ۵/۵ نشان داد که زنده‌مانی سلول‌ها در شرایط نرمال بیشتر بود. بررسی زنده‌مانی و رشد سلول‌ها در داربست Carr:Quc به مدت ۱۵ روز نشان داد که داربست مورد نظر سمیتی اعمال نکرد و سلول‌ها زنده‌مانی خود را در طول کشت حفظ کرده و در روزهای ۱۴ و ۱۵ کشت، تمایل تشکیل به توده‌های سلولی سه‌بعدی (اسفروئید) نشان دادند. یافته‌های این تحقیق می‌تواند راه‌گشای طراحی داربست‌های متشکل از بیوپلیمرهای خوراکی برای تسهیل مهندسی بافت گوشت آزمایشگاهی باشد.
تاریخ دریافت: ۱۴۰۳/۶/۱۳	
تاریخ پذیرش: ۱۴۰۳/۱۰/۲	
کلمات کلیدی:	
داربست هوشمند،	
کاپاکاراگینان،	
موسیلاژ دانه به،	
تغییر pH	
زنده‌مانی	
DOI:10.22034/FSCT.22.159.301.	
* مسئول مکاتبات:	

۱- مقدمه

در دنیای به سرعت در حال تکامل امروزی، یکی از چالش‌های مهمی که با آن روبرو هستیم، نیاز فوری به یک منبع پروتئین سالم است که عوارض زیست محیطی تولید آن نسبت به تولید گوشت سنتی به شدت کاهش یابد. با رشد روزافزون جمعیت و تشدید نگرانی‌های زیست‌محیطی، روش‌های سنتی تولید پروتئین، از جمله کشتار حیوانات به طور فزاینده‌ای باعث تخریب محیط زیست می‌شوند. یکی از راه‌حل‌های نوآورانه در این راستا تولید گوشت آزمایشگاهی است که پایداری محیط زیست، سلامت انسان و ملاحظات اخلاقی را در اولویت قرار خواهد داد (۱ و ۲). این روند نیازمند توسعه‌ی تکنولوژی‌های نوین مانند داربست‌های هوشمند است که بتوانند به بهبود کیفیت بافت‌های تولیدی کمک کرده و در عین حال پاسخگوی تغییرات محیطی باشند. داربست‌های هوشمند با ویژگی‌های خاص خود، می‌توانند نقش مهمی در رشد و تکثیر سلول‌ها ایفا کنند و به بهینه‌سازی بافت‌های تولیدی کمک کنند (۳ و ۴). از آن جایی که سلول‌های بنیادی، میوبلاست‌ها و یا سایر سلول‌های پیش‌ساز گوشت، متکی به لنگرگاه هستند، می‌بایست داربست یا بستری جهت وقوع تکثیر و تمایز این سلول‌ها در نظر گرفت. چنین بستری باید دارای خصوصیات مناسبی باشد تا فرایند رشد سلولی به درستی هدایت شود. داربست‌ها در شکل، ترکیبات تشکیل‌دهنده و سایر خصوصیات فیزیکی و مکانیکی با یکدیگر متفاوت هستند؛ به این ترتیب می‌توان داربستی را انتخاب کرد که توسط آن بتوان مورفولوژی بافت و یا سلول عضلانی را بهینه نمود. داربست‌های متخلخل خوراکی و هوشمند که به تغییر شرایط محیطی حساس می‌باشند، همراه با تغییر pH و یا دما، حداقل ۱۰٪ تغییر در ناحیه سطحی آن‌ها رخ می‌دهد که این موضوع باعث بهبود چسبندگی، تکثیر و تمایز سلول‌ها خواهد شد. به طور کلی مکانیسم این عمل به درستی مشخص نیست اما تغییرات سطحی و به تبع آن تحریکات مکانیکی که ایجاد می‌شوند باعث بهبود رشد سلول‌ها خواهند شد (۳). در واقع، کشش مکانیکی که به صورت

دوره‌ای در این هیدروژل‌ها ایجاد می‌شود علاوه بر تأثیر در روند فرآیند رشد و تکثیر سلولی، بیان پروتئین‌هایی مانند الاستین و کلاژن نیز تحت تأثیر قرار خواهد گرفت. هم‌چنین در برخی مواقع فسفریلاسیون کیناز خارج سلولی تسریع شده که این موضوع به خودی خود بر روند تکثیر سلولی اثر قابل‌توجهی دارد (۵، ۶ و ۷). بیوپلیمرهای هوشمند، در زمینه‌هایی مانند مهندسی بافت و پزشکی ترمیمی توجه زیادی را به خود جلب کرده‌اند. ویژگی پاسخ‌دهی به آن‌ها به شرایط محیطی، اجازه می‌دهد که به طور مؤثر با سیستم‌های بیولوژیکی تعامل داشته باشند که این موضوع برای کاربردهای پزشکی و کشت سلولی بسیار حیاتی است. در واقع، این بیوپلیمرها قادرند که ماتریس خارج سلولی (ECM) را شبیه‌سازی کنند و محیطی حمایتی برای چسبیدن و رشد سلول‌ها ایجاد کنند که این فرایند روندی تسهیلی در جهت تجدید بافت‌ها محسوب می‌شود (۸). در زمینه تولید گوشت آزمایشگاهی نیز، ویژگی پاسخ‌دهی این بیوپلیمرها می‌تواند در پیشگیری از آتروفی در کشت سلولی مؤثر باشد. در تولید گوشت آزمایشگاهی، جلوگیری از آتروفی و حفظ سلامت و رشد سلول‌ها از جمله چالش‌های اساسی در فرآیند کشت سلولی است که استفاده از بیوپلیمرهای حساس به تغییرات محیطی، می‌تواند نقش مهمی در بهینه‌سازی این فرآیند ایفا کند. در واقع، انقباض در محیط کشت سلولی به دلیل توانایی پاسخ‌دهی، می‌تواند به تولید میوفیبرهای سالم کمک کرده و از آتروفی جلوگیری کند. این انقباضات مکانیکی در محیط کشت سلولی موجب تحریک و تقویت رشد سلول‌های عضلانی می‌شود که در نهایت به بهبود کیفیت و کارایی تولید گوشت کشت‌شده می‌انجامد (۳).

در این میان پلیمرهایی که به تغییرات pH حساس هستند، می‌توانند به طور خاص در بهبود ساختار داربست‌ها و رشد سلول‌های عضلانی مؤثر باشند. این بیوپلیمرها متشکل از گروه‌های عاملی قابل یونیزاسیون می‌باشند. در واقع این دسته از بیوپلیمرها دهنده و یا گیرنده هیدروژن هستند. به عنوان

pH حساس می‌باشد. گزارش شده است که صمغ دانه به در pH = ۷/۴ کمترین میزان تورم را نشان می‌دهد اما در pH ۷/۴ = بیشترین میزان تورم را دارد (۱۶ و ۱۷). ترکیب کاپاکاراگینان و موسیلاژ دانه به نیز هیدروژلی را ایجاد می‌کند که دربرگیرنده گروه‌های سولفات و کربوکسیلیک اسید بوده و بنابراین خصوصیت پاسخ به تغییر pH محیط را دارا می‌باشد. در مطالعات مختلفی به این نکته اشاره شده است که داربست‌های متشکل از آلژینات، کیتوزان و سلولز و یا کلاژن که با تغییر کمی در دما و یا pH حداقل ۱۰٪ تغییر در اندازه سطح آن‌ها ایجاد می‌شود، استرس مکانیکی را در محیط کشت سلولی ایجاد می‌کنند که اگر این استرس به صورت دوره‌ای اعمال شود، باعث بهبود چسبندگی و تکثیر سلول‌ها می‌شود (۳).

بنابراین، هدف این مطالعه بررسی اثر تغییر pH بر تغییر تورم (کشش مکانیکی) داربست هوشمند کاپاکاراگینان (Carr) و داربست هوشمند ترکیبی موسیلاژ دانه به و کاپاکاراگینان (Carr:Quc) است. سپس زنده‌مانی میوبلاست‌های موشی (C2C12) بر روی داربست‌ها در شرایط نرمال (۷/۴) و سپس در محدوده تغییر فیزیولوژیک (۷/۴-۵/۵) مورد ارزیابی قرار می‌گیرد تا اثر این داربست‌های هوشمند بر تکثیر سلول‌ها مشخص شود. هم‌چنین زنده‌مانی و رشد سلول‌ها در داربست Carr:Quc به مدت ۱۵ روز بررسی می‌شود تا قابلیت داربست Carr:Quc به عنوان یک داربست جدید در جهت تولید گوشت آزمایشگاهی آشکار گردد.

۲- مواد و روش‌ها

۲-۱- مواد

دانه به از یک داروخانه گیاهی در اصفهان تهیه شد. پودر کاپاکاراگینان با برند BLG، کره جنوبی مورد استفاده قرار گرفت. کلرید پتاسیم، بافر فسفات سدیم و اسید کلریدریک از شرکت مرک آلمان خریداری شدند. رده سلولی C2C12 از ACCT، آمریکا تهیه شد. مواد مورد نیاز در کشت سلول شامل محیط کشت پایه (DMEM)، سرم جنین گاوی، محلول فسفات بافر، آنزیم تریپسین، آنتی‌بیوتیک پنی‌سیلین و استرپتومایسین از شرکت Gibco، آمریکا به دست آمد. مواد

مثال پلیمرهای آنیونی که دارای گروه‌های اسیدی مانند کربوکسیلیک (COOH) و یا سولفات (SO_3^-) هستند، در pH پائین هیدروژن دریافت می‌کنند و در pH بالا هیدروژن از دست می‌دهند؛ بنابراین با افزایش pH متورم می‌شوند (۹ و ۱۰). در واقع با افزایش pH، یونیزاسیون گروه‌های کربوکسیلیک اسید، باعث ایجاد دافعه الکتروستاتیک در بین زنجیره‌های پلیمری شده و بدین ترتیب پیوندهای هیدروژنی شکسته می‌شوند؛ در نهایت ساختار باز شده و نفوذ آب بیشتر می‌شود (۱۱).

در این رابطه، پلی‌ساکاریدهای طبیعی هوشمند بسیار مورد توجه هستند. به خصوص پلی‌ساکاریدهایی که از منابع دریایی استخراج می‌شوند به دلیل سمیت کم و سازگاری زیستی به طور گسترده‌ای در صنایع غذایی، دارویی و بیوپزشکی استفاده می‌شوند. به عنوان مثال، کاراگینان که از نوعی جلبک قرمز استخراج می‌شود و متعلق به خانواده‌ی رودوفیسا می‌باشد، پلی‌ساکاریدی با ساختار و عملکرد قابل ملاحظه به شمار می‌آید. در بین انواع کاراگینان، کاپاکاراگینان مصرف گسترده‌ای در صنعت غذا و دارو به خود اختصاص داده است. کاپاکاراگینان (یک گالاکتان سولفات)، به طور گسترده در صنایع غذایی به عنوان یک عامل ژله کننده استفاده می‌شود. تشکیل یک ژل برگشت‌پذیر حرارتی در هنگام خنک شدن محلول کاپاکاراگینان، مربوط به تبدیل حالت کویل به ماریپیج می‌باشد. دما و محتوای یونی، این تغییر ساختاری و در نتیجه تشکیل ژل پایدار را کنترل می‌باشد (۱۱، ۱۲ و ۱۳).

به همین ترتیب پلی‌ساکاریدهای حاصل از دانه‌های گیاهی به دلیل زیست‌سازگاری بالایی که دارند در حوزه‌های مختلف مهندسی بافت و کپسوله‌سازی سلولی مورد استفاده قرار گرفته‌اند (۱۴ و ۱۵). در این خصوص، موسیلاژ دانه به، به دلیل خصوصیتی همچون زیست تخریب‌پذیری، زیست سازگاری، غیر سمی بودن و دسترسی زیستی مورد توجه علوم پزشکی قرار گرفته است. به دلیل حضور میزان قابل توجهی اورونیک اسید در ساختار موسیلاژ دانه به، این صمغ یک بیوپلیمر هوشمند تلقی شده که نسبت به تغییرات

قرار داده شدند. هیدروژل‌های حاصله در آن خلا تحت در دمای ۵۰ درجه سلسیوس خشک شده و جهت ارزیابی‌های بعدی مورد استفاده قرار گرفتند (۱۹).

۲-۴- بررسی تغییر تورم داربست‌ها با تغییر pH

تغییر تورم داربست‌ها در pH های ۱، ۲، ۳، ۴، ۵، ۶ و ۷ اندازه‌گیری شد. هیدروژل‌ها پس از تهیه، تحت خلا خشک شدند و سپس در بافرهایی با pH مورد نظر به مدت ۲۴ ساعت و در دمای ۳۷ درجه سلسیوس قرار داده شدند. پس از توزین (w1)، مجدداً به مدت ۲۴ ساعت در آن تحت دمای ۵۰ درجه سلسیوس خشک شده و وزن آن‌ها ثبت شد (w2). میزان تورم هیدروژل‌ها توسط رابطه ۱ اندازه‌گیری شد (۱۳).

$$\text{رابطه (۱)} \quad \text{تورم (\%)} = \frac{w1-w2}{w2}$$

۲-۵- بررسی تغییر تورم داربست‌ها با تغییر pH ۵/۵ و ۷/۴

بدین منظور، هیدروژل‌های Carr و Carr:Quc تهیه شده و تحت خلا خشک شدند. سپس هیدروژل‌ها (۸ گروه متفاوت از هر دو هیدروژل) به مدت ۲۴ ساعت در بافر فسفات سدیم در pH ۷/۴ و دمای ۳۷ درجه سلسیوس قرار داده شدند. پس از ۲۴ ساعت، هیدروژل‌ها خارج شده و توزین شدند. بعد از آن بلافاصله در مدت زمان‌های متفاوت شامل ۵، ۱۵، ۳۰، ۴۵، ۶۰، ۱۸۰، ۳۶۰ و ۴۸۰ دقیقه در بافر فسفات سدیم با pH ۵/۵ و دمای ۳۷ درجه سلسیوس قرار داده شدند. سپس در فواصل زمانی ذکر شده خارج شده و مجدداً توزین شدند تا مشخص شود در کدام گروه میزان تورم، افزایش داشته است. جدول ۱ بیانگر شرایط ۸ تیمار متفاوت برای هر دو هیدروژل است.

جدول ۱- شرایط تغییر pH برای تیمارهای مختلف

Treatment	Conditions
TRT1	24 h in pH 7.4 and 5 min in pH 5.5
TRT2	24 h in pH 7.4 and 15 min in pH 5.5
TRT3	24 h in pH 7.4 and 30 min in pH 5.5
TRT4	24 h in pH 7.4 and 45 min in pH 5.5
TRT5	24 h in pH 7.4 and 60 min in pH 5.5
TRT6	24 h in pH 7.4 and 180 min in pH 5.5
TRT7	24 h in pH 7.4 and 360 min in pH 5.5

مورد نیاز در رنگ آمیزی سلول‌ها شامل کلسین ای ام، ایتیدیوم بروماید، پارافورمالدئید، تریتون ایکس ۱۰۰، دیپی، فالوئیدین و هوکست با برند Thermo Fisher Scientific، آمریکا استفاده شدند.

۲-۲- استخراج موسیلاژ دانه به

استخراج موسیلاژ دانه به توسط آب گرم دیونیزه انجام شد. دانه‌ها به مدت ۳۰ دقیقه در معرض آب گرم با دمای ۵۰ درجه سلسیوس قرار گرفته و همزده شدند تا موسیلاژ خارج شود و سپس موسیلاژ به توسط اکستراکتور آزمایشگاهی از دانه جدا شد. موسیلاژ حاصله توسط خشک‌کن انجمادی خشک (دنا و کیوم، ایران) و سپس آسیاب شد (۱۸).

۲-۳- تهیه هیدروژل کاپاکاراگینان (Carr) و هیدروژل متشکل از کاپاکاراگینان و موسیلاژ دانه به (Carr:Quc)

جهت تهیه هیدروژل کاپاکاراگینان، مقدار معینی از پودر کاپاکاراگینان در آب دیونیزه حل شد تا محلول ۱/۵ درصد وزنی-حجمی (w/v) حاصل شود. برای تهیه هیدروژل Carr:Quc، پودر کاپاکاراگینان و موسیلاژ به، به نسبت ۱:۱ با غلظت نهایی ۱/۵ درصد وزنی-حجمی با یکدیگر ترکیب شده و در آب دیونیزه حل شدند تا یک محلول کلئیدی ایجاد شود. سپس محلول‌های حاصله در دمای ۶۰ درجه سلسیوس به مدت ۳۰ دقیقه همزده شد تا توزیع یکنواختی از ذرات به دست آید. محلول‌های داغ Carr و Carr:Quc به صورت جداگانه در قالب‌های دایره‌ای شکل با قطر ۱۷ میلی-متر از جنس پلی‌متیل متاکریلات ریخته شدند و به مدت ۱۵ دقیقه در دمای محیط سرد شد. سپس جهت تشکیل ژل، هیدروژل‌های کاپاکاراگینان در حمام کلرید پتاسیم (KCl) ۵ درصد وزنی-حجمی به مدت یک ساعت و در دمای محیط

۲-۶- بررسی زنده‌مانی سلول‌ها بر روی داربست‌ها با

تغییر pH

بدین منظور سلول‌ها به تعداد ۱۰۰۰۰۰۰، بر روی هیدروژل Carr:Quc کشت داده شدند و به مدت ۲۴ ساعت در شرایط تکثیر با pH ۷/۴ قرار گرفتند. سپس محیط کشت تعویض شد و محیط رشد با pH ۵/۵ به مدت ۱۵ دقیقه اضافه شد. جهت کاهش pH محیط کشت از اسیدکلریدریک ۱ نرمال استفاده شد. پس از ۱۵ دقیقه، محیط کشت خارج شد و داربست‌ها با نمک فسفات بافر شستشو داده شدند و سپس محیط رشد معمولی با pH ۷/۴ اضافه شد و داربست‌ها به مدت ۲۴ ساعت دیگر در شرایط نرمال تکثیر قرار گرفتند. هیدروژل‌های Carr:Quc شاهد نیز به مدت ۴۸ ساعت در شرایط نرمال تکثیر قرار گرفتند. در نهایت، برای بررسی زنده‌مانی سلول‌ها از رنگ‌آمیزی کلکسین ای ام و ایتیدیوم بروماید استفاده شد و سپس از میکروسکوپ فلورسانس (Echo revolution آمریکا) جهت تصویربرداری استفاده شد (۲۰).

۲-۷- بررسی زنده‌مانی سلول‌ها بر روی داربست

Carr:Quc در شرایط نرمال

بدین منظور جهت بررسی چسبندگی سلول‌ها، هسته سلول و پروتئین اکتین رشته‌ای به ترتیب با دبی و فالوئیدین رنگ‌آمیزی شدند. بدین ترتیب که تعداد ۱۰۰۰۰۰۰ سلول بروی داربست‌ها کشت داده شد و ۱ روز پس از کشت سلولی، سلول‌ها توسط پارافورمالدهید ۴ درصد به مدت ۱۵ دقیقه تثبیت شدند. بعد از آن داربست‌ها با فسفات بافر (PBS) شستشو شده و به منظور نفوذپذیر کردن غشای سلولی، محلول ۱/۱ درصد تریتون ایکس ۱۰۰ اضافه شد. مجدداً پس از شستشو با PBS رنگ فالوئیدین به مدت یک ساعت افزوده شد و داربست‌ها با PBS شستشو داده شدند. سپس رنگ دبی اضافه شد و بعد از ده دقیقه داربست‌ها با PBS شسته شده و جهت تصویربرداری سلول‌ها از میکروسکوپ کانفوکال (ZEISS، آمریکا) استفاده شد. بعلاوه، جهت بررسی زنده‌مانی سلول‌ها طی ۱۵ روز، از رنگ آمیزی کلکسین ای ام و ایتیدیوم بروماید استفاده شد و سپس از میکروسکوپ فلورسانس جهت تصویربرداری استفاده شد. هم‌چنین رنگ‌آمیزی کلکسین ای ام و هوکست در روزهای ۱ و ۱۴ کشت سلول انجام شد. بدین ترتیب که محلول ۱ میلی مولار

کلکسین ای ام و ۲۰ میلی مولار هوکست به نسبت ۱:۱۰۰۰ با محیط کشت کامل رقیق شده و به محیط رشد سلول اضافه شدند. سپس به مدت ۱۵ دقیقه در دمای ۳۷ درجه سلسیوس و غلظت ۵٪ CO₂ انکوبه شدند. سلول‌ها با استفاده از میکروسکوپ کانفوکال تصویربرداری شدند. جهت بررسی مورفولوژی سلول توسط میکروسکوپ SEM (ZEISS، آلمان) ۱۴ روز پس از کشت، داربست مورد نظر از محیط کشت خارج شده و با PBS شسته و قبل از تصویربرداری توسط خشک‌کن انجمادی خشک شد و سپس تصویر نمونه مورد نظر در بزرگنمایی ۱۰ میکرومتر گرفته شد (۲۱).

۲-۸- آنالیز آماری

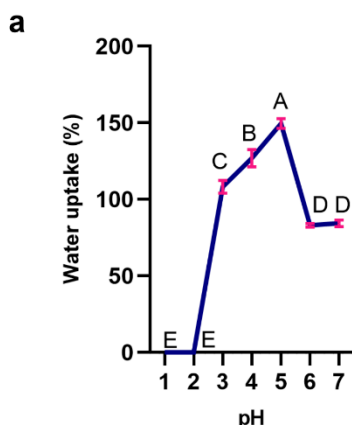
تجزیه و تحلیل آماری با استفاده از نرم افزار SAS صورت گرفت. با توجه به نوع آزمایش، برای ارزیابی تغییرات تورم در pH‌های مختلف از آزمون t-Student و در آزمایش بررسی تورم داربست از آنالیز واریانس یک طرفه (one-way ANOVA) بر مبنای حداقل تفاوت معنی‌دار استفاده شد. جهت رسم نمودارها از نرم‌افزار GraphPad Prism استفاده شد. نمودارها به صورت گراف‌های میله‌ای و بر اساس انحراف معیار (s.d.) حداقل ۳ تکرار ترسیم شدند. معنی‌داری نمونه‌ها در سطح احتمال ۰/۰۵ به دست آمد.

۳- نتایج و بحث

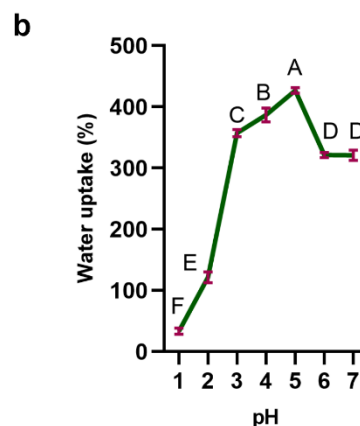
۳-۱- بررسی اثر تغییر pH بر تغییر تورم داربست‌ها

شکل ۱-ا روند تغییر تورم هیدروژل Carr را نسبت به تغییر pH نشان می‌دهد. هیدروژل‌ها به مدت ۲۴ ساعت و در دمای ۳۷ درجه سلسیوس در pH‌های مورد نظر قرار گرفتند. همان‌طور که مشاهده می‌شود در pH ۱ و ۲، افزایش تورمی دیده نمی‌شود و این هیدروژل توانست آب جذب کند. اما با افزایش pH، روند افزایشی در جذب آب دیده شد. میزان تورم در pH=۳ به میزان ۱۰۸٪، در pH=۴ برابر با ۱۲۶٪ و در pH=۵ به صورت میانگین ۱۴۵٪ بود. اما با افزایش pH، روند کاهشی مشاهده شد و در pH=۷ میزان تورم به حدود ۹۰٪ رسید. به همین ترتیب شکل ۱-ب روند افزایش تورم هیدروژل Carr:Quc را با تغییر pH نشان می‌دهد. در مورد هیدروژل Carr:Quc نیز روند مشابه تقریباً مشاهده شد. با این تفاوت که این هیدروژل در pH=۱ به تورمی

pH رسید. اما با افزایش pH، تورم کاهش یافت تا به تورمی در حدود ۳۲٪ در pH=۷ رسید.



در حدود ۳۵٪ و در pH=۲ به تورمی در حدود ۱۲۵٪ رسید. روند تورم، تا pH=۵ افزایشی بود تا به تورمی در حدود ۴۲۸٪ در این



شکل ۱- تغییر تورم داربست (a) Carr و داربست Carr:Quc (b) با تغییر pH. حروف متفاوت بیانگر تفاوت معنی دار بین تیمارها است ($p < 0.05$).

مورد بیوپلیمرهای هوشمند و حساس به تغییر pH و کاربرد آنها به خصوص در سیستم‌های تحویل دارویی وجود دارد. به عنوان مثال لوهانی و همکاران (۲۰۱۶)، از ترکیب کاپاکاراگینان و سدیم کربوکسی متیل سلولز، شبکه هیدروژل حساس به pH ساختند. آن‌ها رهایش داروی ایبوبروفن را از این شبکه در دو ۷/۴ و ۱/۲ pH بررسی نمودند. نتایج نشان دادند که این هیدروژل در pH=۷/۴ حدود ۷۰۰ درصد اما در pH=۱/۲ حدود ۲۰۰ درصد تورم داشت. در pH=۷/۴ به دلیل یونیزاسیون گروه‌های کربوکسیلیک اسید و نفوذ بیشتر آب به داخل ساختار و باز شدن شبکه، رهایش به طور کامل صورت گرفت اما در pH=۲ رهایش کمتر بود (۲۲). همچنین در مطالعه دیگری از شبکه هیدروژل کاپاکاراگینان و کربوکسی متیل سلولز جهت تولید سیستم تحویل دارویی پروبیوتیک استفاده شد. در این مطالعه هدف، تحویل باکتری پروبیوتیک لاکتوباسیلوس پلاتناروم در محل کلون بود. میزان تورم شبکه و رهایش دارو در دو ۷/۴ و ۱/۲ pH بررسی شد. نتایج نشان دادند که تورم در pH=۷/۴ و به تبع آن رهایش دارو در این pH به طور قابل ملاحظه‌ای بیشتر بود و به ۶۰۰ CFU/g رسید در حالی که در pH=۱/۲ به علت بسته شدن شبکه رهایش دارو ۱۸۰ CFU/g گزارش شد (۱۲).

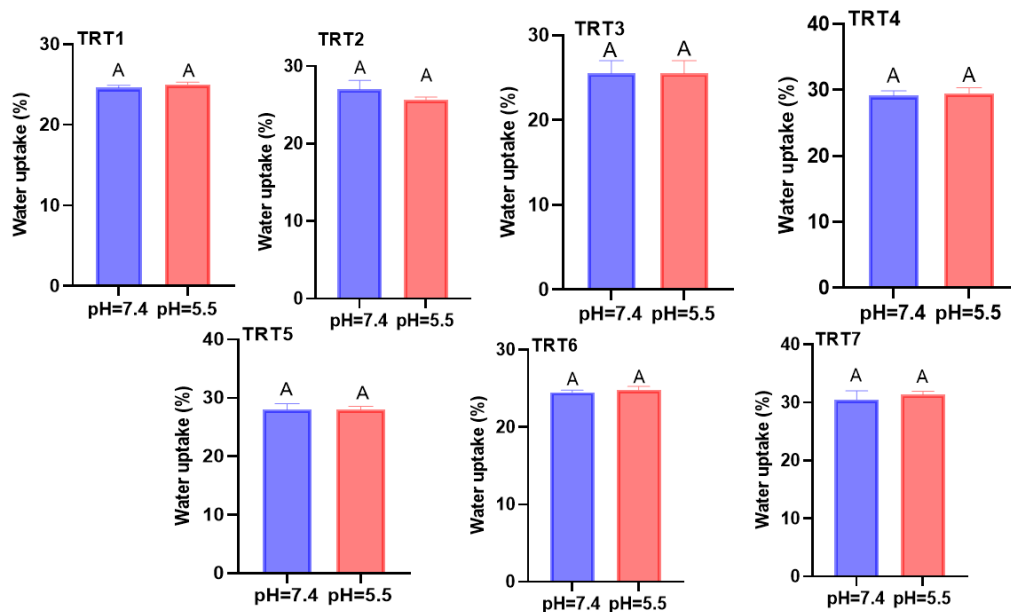
۳-۲- بررسی تغییر تورم داربست‌ها در اثر تغییر pH از ۷/۴ به ۵/۵

روند تغییر تورم و یا درصد جذب آب داربست‌های Carr و Carr:Quc، مطابق با مکانیسمی است که در مطالعات مختلف به آن اشاره شده است. هر دو هیدروژل دربرگیرنده پلیمرهای آنیونی هستند. بنابراین در ساختار خود گروه‌های عاملی اسیدی مانند کربوکسیلیک اسید و یا سولفات دارند. این گروه‌ها در pH های اسیدی، هیدروژن را در ساختار خود حفظ می‌کنند و به شکل COOH و OSO_3H هستند و بالعکس در pH بالاتر شروع به از دست دادن الکترون کرده و به COO^- و OSO_3^- تبدیل می‌شوند. با افزایش یونیزاسیون گروه‌های کربوکسیلیک اسید و سولفات، دافعه الکتروستاتیک در بین زنجیره‌های پلیمری بیشتر شده و بدین ترتیب پیوندهای هیدروژنی شکسته می‌شوند، در نهایت ساختار باز شده و نفوذ آب بیشتر می‌شود (۱۲).

روند جذب آب در pH=۱-۷ نشان داد که هر دو داربست Carr و Carr:Quc در pH=۵ میزان جذب آب بیشتری نسبت به pH=۷ داشتند. با توجه به اینکه در بیوپلیمرهای حساس به pH، یونیزاسیون گروه‌های اسیدی و یا بازی موجود در ساختار هیدروژل‌ها تعیین کننده میزان جذب آب آن بیوپلیمر است، انتظار می‌رود که در مورد هیدروژل‌های Carr و Carr:Quc، یونیزاسیون گروه‌های عاملی اسیدی و به تبع آن دافعه الکتروستاتیک در pH=۵ بیشتر از pH=۷ صورت گرفته باشد. بنابراین برقراری پیوندهای آبدوست بین COO^- و SOO_3^- با مولکول‌های آب منجر به جذب میزان زیاد آب شده است. گزارشات متعددی در

به مدت ۵، ۱۵، ۳۰، ۴۵، ۶۰، ۱۸۰، و یا ۳۶۰ دقیقه در $pH=5/5$ و دمای ۳۷ درجه سلسیوس قرار داده شدند و سپس تورم اندازه گیری شد. همانطور که ملاحظه می شود، افزایش تورم معنی داری برای هیچ کدام از تیمارها مشاهده نشد. شکل ۳ نیز به همین صورت تغییر تورم را برای داربست Carr:Quc نشان می دهد. همانطور که ملاحظه می شود در همه تیمارها به غیر از ۵ دقیقه در $pH=5/5$ (TRT1)، افزایش تورم معنی - داری از $pH=7/4$ به $pH=5/5$ مشاهده شد. طبق نتایج به دست آمده در این بخش، جهت بررسی زنده ماننی سلولها در شرایط تغییر pH از $7/4$ به $5/5$ ، فقط داربست Carr:Quc مورد ارزیابی قرار گرفت. به دلیل این که در تغییر pH از $7/4$ به $5/5$ در مورد Carr تفاوت معنی داری مشاهده نشد.

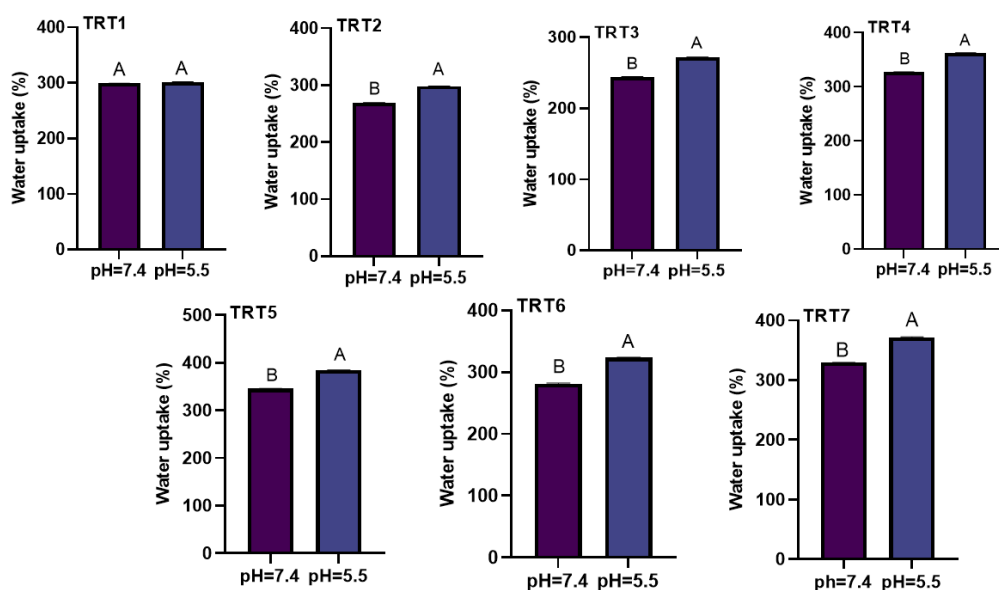
با توجه به نتایج بخش قبل، دو $pH=7/4$ و $pH=5/5$ به عنوان نقاطی برای تغییر pH در نظر گرفته شد. $pH=7/4$ تا $pH=5/5$ بازه pH فیزیولوژیک در نظر گرفته می شود. $pH=7/4$ شرایط نرمال فیزیولوژیک و بهینه کشت سلولی است در حالی که در شرایط غیرنرمال فیزیولوژیکی مانند پاسخ های تورمی و ایجاد زخم، pH ناحیه مورد نظر ممکن است تا $5/5$ کاهش یابد. بنابراین با توجه به نتایج مرحله قبل که بیشترین تورم در $pH=5$ حاصل شد و همچنین با توجه به بازه pH فیزیولوژیک، دو $7/4$ و $5/5$ pH به عنوان نقاط تغییر pH در نظر گرفته شد. شکل ۲، تغییر تورم از $pH=7/4$ به $5/5$ را برای داربست Carr در شرایط زمانی متفاوت نشان می دهد. همگی تیمارها ۲۴ ساعت در $pH=7/4$ و دمای ۳۷ درجه سلسیوس قرار گرفتند و بعد از آن



شکل ۲- تغییر تورم از $pH=7/4$ به $pH=5/5$ برای داربست Carr. حروف مشابه بیانگر عدم تفاوت معنی دار بین تیمارها است ($p < 0/05$).

دست آمده در این بخش، جهت بررسی زنده ماننی سلولها در شرایط تغییر pH از $7/4$ به $5/5$ ، فقط داربست Carr:Quc مورد ارزیابی قرار گرفت. به دلیل این که در تغییر pH از $7/4$ به $5/5$ در مورد Carr تفاوت معنی داری مشاهده نشد.

شکل ۳ نیز به همین صورت تغییر تورم را برای داربست Carr:Quc نشان می دهد. همانطور که ملاحظه می شود در همه تیمارها به غیر از ۵ دقیقه در $pH=5/5$ (TRT1)، افزایش تورم معنی داری از $pH=7/4$ به $5/5$ مشاهده شد. طبق نتایج به



شکل ۳- تغییر تورم از $pH=7.4$ به $pH=5.5$ برای داربست Carr:Quc. حروف متفاوت بیانگر تفاوت معنی‌دار بین تیمارها است ($p < 0.05$).

۳-۳- بررسی زنده‌مانی سلول‌ها بر روی داربست

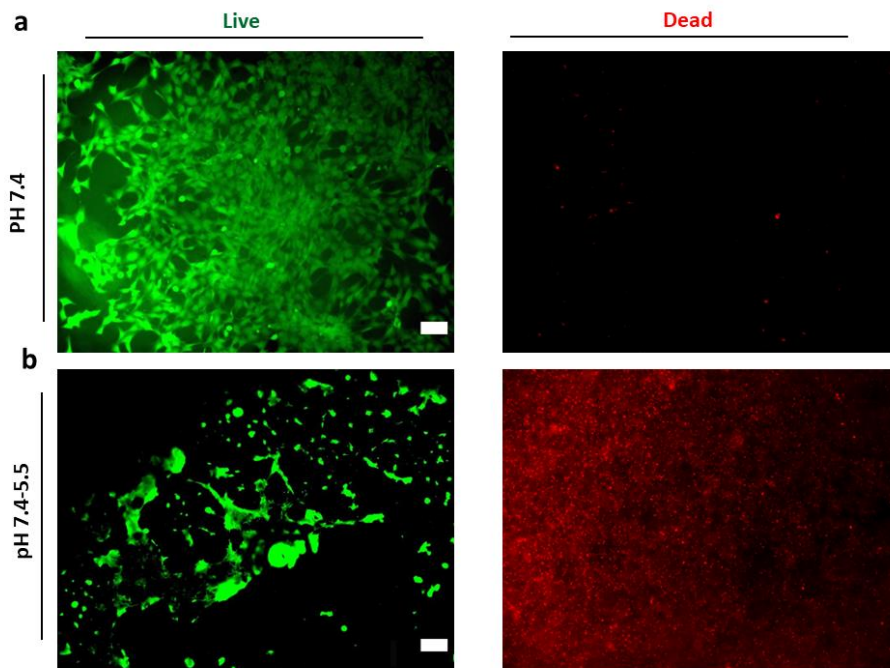
Carr:Quc در شرایط نرمال و تغییر pH از 7.4 به 5.5 شکل ۴-ا و b سلول‌های زنده (سبز) و مرده (قرمز) را ۴۸ ساعت پس از کشت در $pH=7.4$ و تغییر pH از 7.4 به 5.5 نشان می‌دهد. همان‌طور که ملاحظه می‌شود، سلول‌ها در شرایط نرمال (شکل ۴-ا)، به خوبی رشد کردند و تعداد کمی از سلول‌ها مردند. اما وقتی تغییر pH در محیط کشت انجام شد (شکل ۴-ب) و سلول‌ها تنها به مدت ۱۵ دقیقه در شرایط اسیدی و در $pH=5.5$ قرار گرفتند، بخش بیشتری از سلول‌ها مردند و زنده‌مانی سلول‌ها به طور قابل ملاحظه‌ای کاهش یافت.

در مطالعات متعددی گزارش شده است که تغییر pH محیط در مورد داربست‌های حساس به تغییر pH ، می‌تواند موجب بهبود فرایند تکثیر، جهت‌گیری و تمایز سلول‌ها شود. به عنوان مثال در مطالعه‌ای هیدروژل سنتزی حساس به تغییر pH ، متشکل از دی متیل آمینواتیل متاکریلات (DMAEMA)-۲-هیدروکسی اتیل متاکریلات به نسبت‌های ۷۰/۳۰، ۸۰/۲۰ و ۹۰/۱۰ ساخته شد و زنده‌مانی و تکثیر سلول‌های فیبروبلاست موشی (NIH/3T3) در شرایط

اسیدی مورد ارزیابی قرار گرفت. نتایج نشان دادند وقتی pH محیط رشد سلول در طول ۳ روز کاهش یافت و به حدود 5.5 یا 6 رسید، سلول‌ها تکثیر بیشتری نسبت به pH نرمال داشتند. به دلیل این‌که داربست‌های هوشمند به تغییرات pH پاسخ داده و متورم شدند؛ در نتیجه، انتقال اکسیژن و مواد مغذی به مرکز داربست افزایش یافته و این موضوع باعث افزایش تکثیر سلول‌ها شده بود. مخصوصاً نسبت $70/30$ پاسخ بهتری به تغییرات pH نشان داد (۲۳). اما در مطالعه پیش رو، در مورد هیدروژل Carr:Quc این مورد مشاهده نشد و بالعکس با تغییر شرایط بهینه رشد سلولی، تعداد زیادی از سلول‌ها مردند. وقتی سلول‌ها به دلیل تغییرات pH در محیط کشت سلولی می‌میرند، نشان می‌دهد که داربست‌های پاسخ‌دهنده به pH به طور بهینه عمل نمی‌کنند یا محدوده pH خارج از تحمل سلول‌هاست که عوامل متعددی در این مورد دخالت دارند. به عنوان مثال اگر تغییرات pH بیش از حد شدید باشد، می‌تواند منجر به مرگ سلول شود. بیشتر سلول‌ها در محدوده pH 7.2 تا 7.4 رشد می‌کنند. انحراف از این محدوده می‌تواند باعث استرس سلولی شود و به آپوپتوز یا نکروز منجر شود. بعلاوه نوسان

مشاهده شد، در بخش کشت سلول، سلول‌ها قادر به تحمل pH خارج از بازه نرمال فیزیولوژیک نبوده و این موضوع منجر به آپوپتوز سلول‌ها شد. اما با توجه به نتایج حاصله و در نظر گرفتن این نکته که داربست‌ها در pH=۱ تقریباً شبیه بسته خود را حفظ می‌کنند و در pH=۷ تورم آن‌ها چندین برابر شده و کاملاً باز می‌شوند، می‌توانند به صورت میکرو حامل‌هایی برای استفاده در سیستم‌های تحویل دارویی خوراکی مورد استفاده قرار گیرند.

pH می‌تواند باعث ایجاد یک محیط ناپایدار شود در حالی که سلول‌ها به یک محیط پایدار برای رشد و تکثیر نیاز دارند. همچنین تورم و یا انقباض سریع داربست‌ها می‌تواند استرس اسمزی ایجاد کند و به غشای سلولی آسیب برساند. به علاوه، اگر داربست‌ها به درستی انتشار مواد مغذی و اکسیژن را تسهیل نکنند، سلول‌های مرکزی ممکن است به اندازه کافی مواد مغذی و اکسیژن دریافت نکنند که منجر به مرگ سلول می‌شود. بنابر آنچه گفته شد، اگرچه که داربست Carr:Quc به تغییر pH به خوبی پاسخ داد و تغییر تورم در اثر تغییر pH



شکل ۴- تصاویر فلورسانس از سلول‌های زنده (سبز) و مرده (قرمز) بر روی داربست Carr:Quc (a) در pH ۷/۴ و (b) تغییر از ۷/۴ به ۵/۵. نوار مقیاس ۱۰۰ میکرومتر.

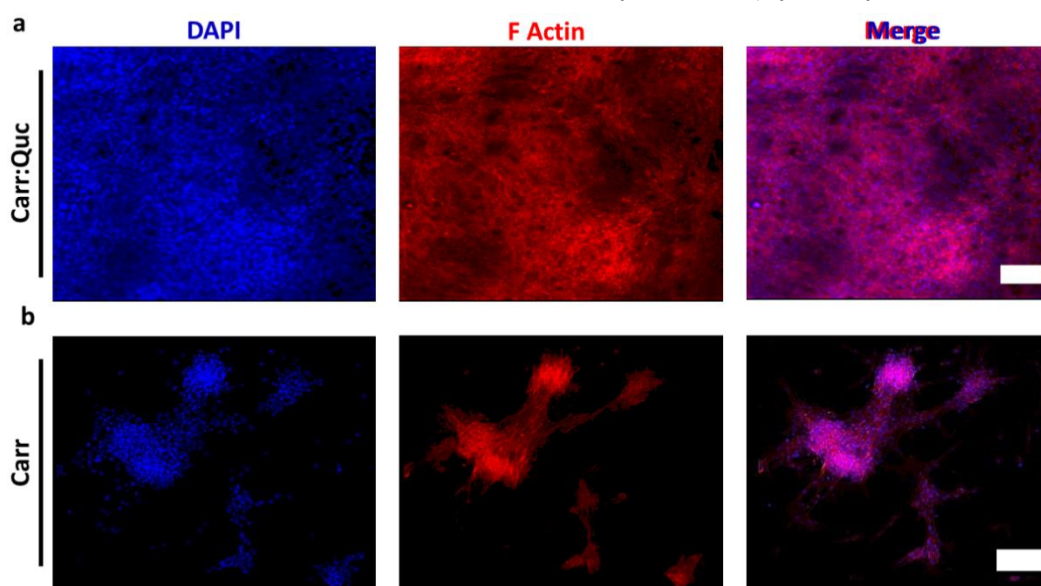
شکل ۵ چسبندگی و توزیع سلول را در هیدروژل Carr:Quc یک روز پس از کشت نشان می‌دهد. شکل ۵-a بیانگر چسبندگی مناسب سلول‌ها به سطح داربست و تشکیل اکتین رشته‌ای می‌باشد. شکل ۵-b نیز لایه‌های مختلف داربست را همراه با سلول در قسمت درونی داربست نشان می‌دهد. در واقع، این شکل حالت‌های مختلف هسته و اکتین رشته‌ای را در هر لایه در طول محور Z نمایش می‌دهد. اکتین رشته‌ای از مهم‌ترین پروتئین‌های اسکلت سلولی محسوب می‌شود و در فرایندهای متفاوت از جمله مهاجرت سلولی، چسبندگی و سیگنال‌دهی نقش مهمی ایفا می‌کند (۲۴). ترکیب و

با توجه به اینکه هدف این مطالعه بررسی قابلیت استفاده از داربست‌های ساخته شده به خصوص داربست جدید Carr:Quc برای تولید گوشت آزمایشگاهی می‌باشد، در ادامه توانایی زنده‌مانی و تکثیر سلول‌ها بر روی داربست Carr:Quc در مدت ۱۵ روز در شرایط نرمال بررسی شد تا قابلیت چسبندگی و رشد سلول‌های عضلانی بر روی داربست مورد نظر مورد ارزیابی قرار گیرد.

۳-۴- بررسی زنده‌مانی سلول‌ها بر روی داربست Carr:Quc در شرایط نرمال

بازسازی سلولی، تشکیل اسکلت سلولی را امکان‌پذیر می‌سازد. بعلاوه، ساختار سه بعدی ماتریس هیدروژل‌ها بر نحوه تعامل سلول‌ها با محیط اطراف خود تأثیر می‌گذارد. یک هیدروژل با ساختار مناسب می‌تواند مهاجرت و ایجاد ساختارهای غنی از اکتین رشته‌ای را تسهیل کند. این مطالب بیانگر این موضوع است که هیدروژل Carr:Quc توانسته است ساختار مناسبی جهت تشکیل اسکلت سلولی، در اختیار سلول‌ها قرار دهد.

خصوصیات هیدروژل‌ها از جمله خواص مکانیکی، سختی و زیست‌سازگاری آن‌ها می‌تواند روند تشکیل اکتین رشته‌ای را تحت تأثیر قرار دهند. در واقع سلول‌ها واکنش‌های متفاوتی به هیدروژل‌های متفاوت نشان می‌دهند و طراحی مناسب هیدروژل‌ها می‌تواند بازآرایی اسکلت سلولی را بهبود بخشد (۱). هم‌چنین سرعت تخریب هیدروژل‌ها عامل بسیار مهم دیگری است. اگر هیدروژل خیلی سریع تجزیه شود، ممکن است ساختار پایدار برای سازماندهی اکتین رشته‌ای را فراهم نکند. اما یک هیدروژل با سرعت تخریب مطابق با ظرفیت



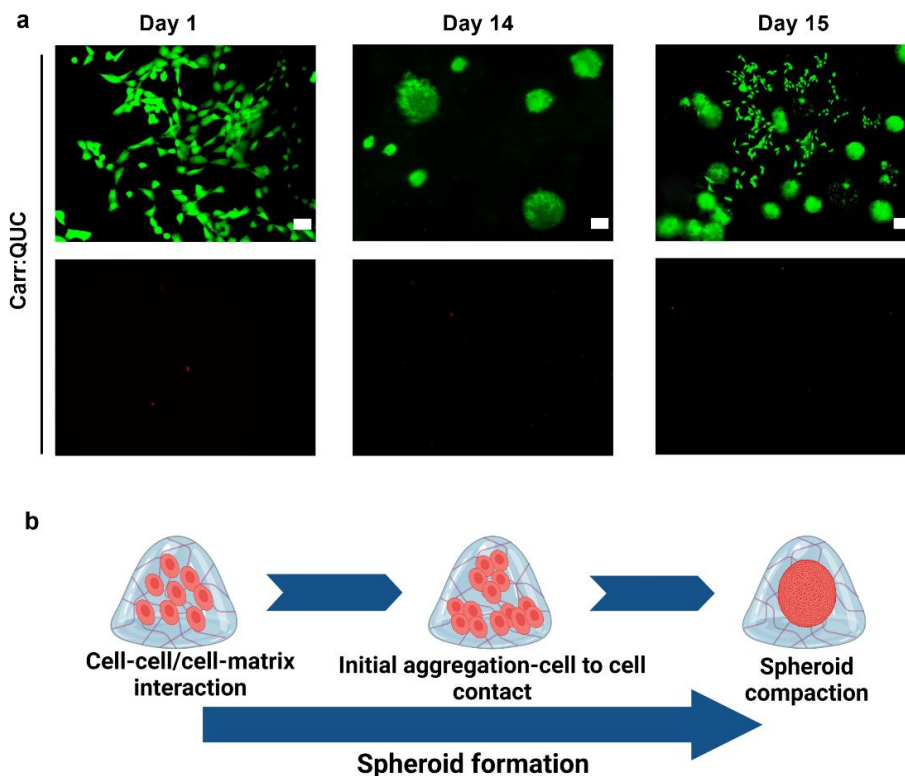
شکل ۵- (a) تصاویر میکروسکوپی کانفوکال از سلول‌ها ۱ روز پس از کشت روی Carr:Quc. (b) هسته و پروتئین اکتین در لایه‌های مختلف داربست. نوار مقیاس: ۱۰۰ میکرومتر.

کنش اینتگرین و ماتریس خارج سلولی منجر به تنظیم بیان کاده‌رین می‌شود. سپس به دلیل تجمع سلولی و برخورد‌های سلولی، تجمع کاده‌رین رخ می‌دهد. در نهایت، ماتریس خارج سلولی ساخته شده و شکل متراکمی از کره‌های سلولی ظاهر می‌شود. در واقع، در یک اسفروئید متراکم، مورفولوژی سلول منفرد قابل تشخیص نمی‌باشد (۲۵ و ۲۶).

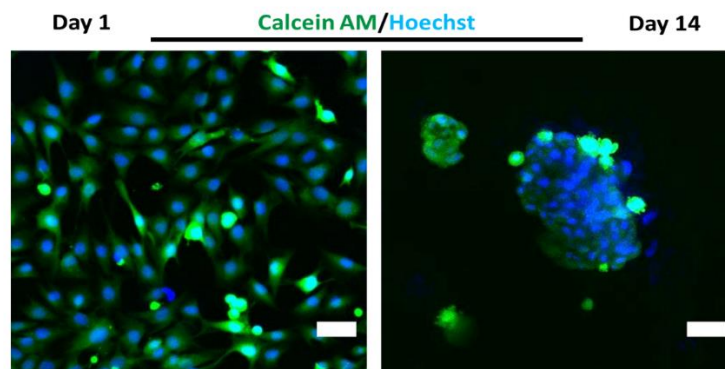
هم‌چنین شکل ۷، تصاویر کانفوکال سلول‌ها را که توسط کلسین ای ام و هوکست رنگ آمیزی شدند، ۱ و ۱۴ روز پس از کشت بر روی هیدروژل Carr:Quc نشان می‌دهد. یک روز پس از کشت سلول‌ها با مورفولوژی کشیده و پهن مشاهده شدند اما بعد از گذشت ۱۴ روز، سلول‌ها تشکیل اسفروئید دادند که این نتایج،

بعلاوه، شکل ۶-a زنده‌مانی و رشد سلول‌ها را به مدت ۱۵ روز بر روی داربست نشان می‌دهد. همان‌طور که مشخص است سلول‌ها زنده‌مانی خود را در طول کشت بر روی داربست مورد مطالعه حفظ کردند و در هفته دوم کشت، تمایل به تشکیل کره‌های سلولی با نام اسفروئید نشان دادند. در روز اول، سلول‌ها با مورفولوژی کشیده و پهن، پراکنده شده و توزیع یافتند. پس از ۱۴ روز، تشکیل کره‌های سلولی مشاهده شد و در نهایت در روز ۱۵، اسفروئیدهای مجزا بدون تشخیص مورفولوژی سلول منفرد تشکیل شدند. مراحل تشکیل اسفروئید در بستر هیدروژل‌های طبیعی در شکل ۶-b به صورت شماتیک نشان داده شده است. برهم-

مشاهدات مربوط به شکل ۷ را تایید می‌کنند. شکل ۸ نیز تصویر SEM از تشکیل اسفروئید فشرده، ۱۴ روز پس از کشت سلول را نشان می‌دهد. همان‌طور که مشاهده می‌شود، در این تصویر نیز مورفولوژی سلولی در قالب سلول منفرد مشخص نیست.



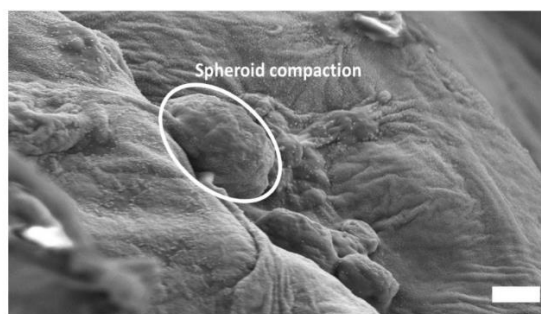
شکل ۶- (a) تصاویر فلورسانس از سلول‌های زنده (سبز) و مرده (قرمز) بر روی داربست Carr:Quc. نوار مقیاس ۱۰۰ میکرومتر. (b) مراحل تشکیل اسفروئید در بستر هیدروژل



شکل ۷- مورفولوژی سلول و روند تشکیل اسفروئید ۱ و ۱۴ روز پس از کشت در داربست Carr:Quc. نوار مقیاس ۱۰۰ میکرومتر.

این نتایج نشان دادند که سلول‌ها در طول دو هفته در بستر هیدروژل قادر به رشد بودند و هیدروژل مورد مطالعه هیچ گونه سمیتی از خود نشان نداد. بعلاوه، سلول‌ها بعد از دو هفته در محیط کشت اسفروئید تشکیل دادند. تشکیل اسفروئید در ساختار هیدروژل‌ها و پلیمرهای طبیعی همچون کلاژن، هیالورونیک اسید، کیتوزان و ماتریژل نیز گزارش

شده است (۲۷، ۲۸ و ۲۹). در واقع عوامل متعددی در روند تشکیل اسفروئید در بستر هیدروژل نقش دارند که عبارتند از (۳۰ و ۳۱):



شکل ۸- تصویر SEM از اسفروئید تشکیل شده ۱۴ روز پس از کشت در داربست Carr:QSM. نوار مقیاس: ۱۰۰ میکرومتر.

۱- برهم‌کنش سلول-سلول: ماتریس هیدروژل برهم‌کنش سلول-سلول را با فراهم آوردن شرایطی برای نزدیک شدن سلول‌ها به یکدیگر، تقویت می‌کند. این امر باعث تجمع سلولی و تشکیل ساختارهای چند سلولی می‌شود.

۲- برهم‌کنش سلول-ماتریس: سلول‌ها از طریق مولکول‌های چسبنده مختلف موجود در ماتریس هیدروژل با ماتریس تعامل می‌کنند. این تعامل، رفتار سلول‌ها را از جمله مهاجرت و تجمع تحت تأثیر قرار می‌دهد و به تشکیل اسفروئید منجر می‌شود.

۳- ساختار ماتریس: ویژگی‌های فیزیکی هیدروژل مانند سفتی، تخلخل و نوع و اندازه تخلخل‌ها، نیز نقش مهمی در این زمینه ایفا می‌کند. یک بستر زیست‌تقلیدپذیر با خواص مکانیکی مناسب، محیطی مناسب برای تجمع سلول‌ها و تشکیل اسفروئید فراهم می‌کند.

۴- گرادیان اکسیژن و مواد مغذی: با افزایش اندازه اسفروئید، گرادیان‌های مواد مغذی و اکسیژن در داخل ماتریس هیدروژل شکل می‌گیرند. این موضوع می‌تواند منجر به ایجاد میکرومحیطی شود که شرایط فیزیولوژیک را به صورت بهتری تقلید کند و نتیجتاً رفتار سلول‌ها و مورفولوژی اسفروئید را تحت تأثیر قرار می‌دهد.

۵- تکثیر سلول و مرگ برنامه‌ریزی شده (آپوپتوز): این موضوع نیز به تشکیل اسفروئید کمک می‌کند. سلول‌ها در ماتریس هیدروژل ممکن است با سرعت‌های مختلف تکثیر کنند و تعادل بین تکثیر و آپوپتوز می‌تواند ساختار اسفروئید را شکل دهد.

۴- نتیجه‌گیری

نتایج حاصل از این مطالعه، نشان دادند که داربست متشکل از کاپاکاراگینان و صمغ دانه به، پتانسیل مناسبی برای استفاده در کشت سلولی و کشاورزی سلولی دارد. به دلیل اینکه سلول‌ها در شرایط نرمال و کشت طولانی مدت قادر به تکثیر بر روی این داربست و تشکیل اسفروئید بودند، این داربست می‌تواند به عنوان گزینه مناسبی برای تولید گوشت آزمایشگاهی در نظر گرفته شود.

۵- تقدیر و تشکر

این اثر تحت حمایت مادی صندوق حمایت از پژوهشگران و فناوران کشور (INSF) برگرفته شده از طرح شماره ۴۰۳۲۹۵ انجام شده است.

۶- منابع

Levenberg, S. (2020). Textured soy protein scaffolds enable the generation of three-

[1] Ben-Arye, T., Shandalov, Y., Ben-Shaul, S., Landau, S., Zagury, Y., Ianovici, I., Lavon, N., &

- dimensional bovine skeletal muscle tissue for cell-based meat. *Nature Food*, 1(4), 210–220. <https://doi.org/10.1038/s43016-020-0046-5>
- [2] Kumar, P., Sharma, N., Sharma, S., Mehta, N., Kumar Verma, A., Chemmalar, S., & Qurni Sazili, A. (2021). *In-vitro* meat: a promising solution for sustainability of meat sector. *Journal of Animal Science and Technology*, 63(4), 693–724. <https://doi.org/10.5187/jast.2021.e85>
- [3] Bhat, Z. F., & Fayaz, H. (2011). Prospectus of cultured meat - Advancing meat alternatives. In *Journal of Food Science and Technology* (Vol. 48, Issue 2, pp. 125–140). <https://doi.org/10.1007/s13197-010-0198-7>
- [4] Zhang, K., Wang, S., Zhou, C., Cheng, L., Goa, X., Xie, X., Sun, J., Wang, H., Weir, M., Reynold, M., & Zhang, N. (2023). Advanced smart biomaterials and constructs for hard tissue engineering and regeneration, *bone research*, 6(31). <https://www.nature.com/articles/s41413-018-0032-9#citeas>
- [5] Ashraf, M. U., Hussain, M. A., Muhammad, G., Haseeb, M. T., Bashir, S., Hussain, S. Z., & Hussain, I. (2017). A superporous and superabsorbent glucuronoxylan hydrogel from quince (*Cydonia oblonga*): Stimuli responsive swelling, on-off switching and drug release. *International Journal of Biological Macromolecules*, 95, 138–144. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2016.11.057>
- [6] Nagai, Y., Yokoi, H., Kaihara, K., & Naruse, K. (2012). The mechanical stimulation of cells in 3D culture within a self-assembling peptide hydrogel. *Biomaterials*, 33(4), 1044–1051. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2011.10.049>
- [7] Tseng, L.-F., Mather, P. T., & Henderson, J. H. (2013). Shape-memory-actuated change in scaffold fiber alignment directs stem cell morphology. *Acta Biomaterialia*, 9(11), 8790–8801. <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2013.06.043>
- [8] Khan, F., & Tanaka, M. (2018). Designing smart biomaterials for tissue engineering. *International Journal of Molecular Sciences*, 19(1). <https://doi.org/10.3390/ijms19010017>
- [9] Hoare, T. R., & Kohane, D. S. (2008). Hydrogels in drug delivery: Progress and challenges. *Polymer*, 49(8), 1993–2007. <https://doi.org/10.1016/j.polymer.2008.01.027>
- [10] Li, X., Liu, X., Yu, Y., Qu, X., Feng, Q., Cui, F., & Watari, F. (2009). Recent patents on polymeric scaffolds for tissue engineering. *Recent Patents on Biomedical Engineering (Discontinued)*, 2(1), 65–72. <http://dx.doi.org/10.2174/1874764710902010065>
- [11] Hezaveh, H., & Muhamad, I. I. (2013). Modification and swelling kinetic study of kappa-carrageenan-based hydrogel for controlled release study. *Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers*, 44(2), 182–191. <https://doi.org/10.1016/j.jtice.2012.10.011>
- [12] Dafe, A., Etemadi, H., Zarredar, H., & Mahdavinia, G. R. (2017). Development of novel carboxymethyl cellulose/k-carrageenan blends as an enteric delivery vehicle for probiotic bacteria. *International Journal of Biological Macromolecules*, 97, 299–307. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2017.01.016>
- [13] Santo, V. E., Frias, A. M., Carida, M., Cancedda, R., Gomes, M. E., Mano, J. F., & Reis, R. L. (2009). Carrageenan-based hydrogels for the controlled delivery of PDGF-BB in bone tissue engineering applications. *Biomacromolecules*, 10(6), 1392–1401. <https://pubs.acs.org/doi/10.1021/bm8014973>
- [14] Demir, D. (2024). Potential use of extracted flax seed mucilage in the construction of macroporous cryo-scaffolds. *Biomedical Materials*, 19(5), 055002. <https://doi.org/10.1088/1748-605x/ad5bad>
- [15] Soukoulis, C., Gaiani, C., & Hoffmann, L. (2018). Plant seed mucilage as emerging biopolymer in food industry applications. *Current Opinion in Food Science*, 22, 28–42. <https://doi.org/10.1016/j.cofs.2018.01.004>
- [16] Ashraf, M. U., Hussain, M. A., Bashir, S., Haseeb, M. T., & Hussain, Z. (2018). Quince seed hydrogel (glucuronoxylan): Evaluation of stimuli responsive sustained release oral drug delivery system and biomedical properties. *Journal of Drug Delivery Science and Technology*, 45, 455–465. <https://doi.org/10.1016/j.jddst.2018.04.008>
- [17] Jouki, M., Mortazavi, S. A., Yazdi, F. T., & Koocheki, A. (2014b). Optimization of extraction, antioxidant activity and functional properties of quince seed mucilage by RSM. *International Journal of Biological Macromolecules*, 66, 113–124. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2014.02.026>
- [18] Jouki, M., Mortazavi, S. A., Yazdi, F. T., & Koocheki, A. (2014a). Characterization of antioxidant–antibacterial quince seed mucilage films containing thyme essential oil. *Carbohydrate Polymers*, 99, 537–546. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2013.08.077>
- [19] Popa, E., Reis, R., & Gomes, M. (2012). Chondrogenic phenotype of different cells encapsulated in κ-carrageenan hydrogels for cartilage regeneration strategies. *Biotechnology and Applied Biochemistry*, 59(2), 132–141. <https://doi.org/10.1002/bab.1007>
- [20] Haghniaz, R., Ankit Gangrade, A., Montazerian, H., Zarei, F., Menekse Ermis, M., Li, Z., Du, Y., Khosravi, S., Barros, N., Mandal, K., Rashad, A., Zehtabi, F., Li, J., Dokmeci, M., Kim, H.,

- Khademhosseini, A., & Yangzhi, Z. (2023). An All-In-One Transient Theranostic Platform for Intelligent Management of Hemorrhage, *Advanced Science*, *10*, 2301406. <https://doi.org/10.1002/advs.202301406>
- [21] Anowar H. Khan, A., Zhou, S., Moe, M., Ortega Quesada, B., Bajgirani, K., Lassiter, H., & Melvin, A. (2022). Generation of 3D Spheroids Using a Thiol–Acrylate Hydrogel Scaffold to Study Endocrine Response in ER⁺ Breast Cancer, *Biomaterials Science & Engineering*, *8*, 9. <https://pubs.acs.org/doi/10.1021/acsbiomaterials.2c00491>
- [22] Lohani, A., Singh, G., Bhattacharya, S. S., Hegde, R. R., & Verma, A. (2016). Tailored-interpenetrating polymer network beads of κ-carrageenan and sodium carboxymethyl cellulose for controlled drug delivery. *Journal of Drug Delivery Science and Technology*, *31*, 53–64. <https://doi.org/10.1016/j.jddst.2015.11.005>
- [23] You, J.-O., Rafat, M., Almeda, D., Maldonado, N., Guo, P., Nabzdyk, C. S., Chun, M., LoGerfo, F. W., Hutchinson, J. W., & Pradhan-Nabzdyk, L. K. (2015). pH-responsive scaffolds generate a pro-healing response. *Biomaterials*, *57*, 22–32. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2015.04.011>
- [24] Stricker, J., Falzone, T., & Gardel, M. L. (2010). Mechanics of the F-actin cytoskeleton. *Journal of Biomechanics*, *43*(1), 9–14. <https://doi.org/10.1016/j.jbiomech.2009.09.003>
- [25] Ryu, N.-E., Lee, S.-H., & Park, H. (2019). Spheroid culture system methods and applications for mesenchymal stem cells. *Cells*, *8*(12), 1620. <https://doi.org/10.3390/cells8121620>
- [26] Zhang, K., Yan, S., Li, G., Cui, L., & Yin, J. (2015). In-situ birth of MSCs multicellular spheroids in poly (L-glutamic acid)/chitosan scaffold for hyaline-like cartilage regeneration. *Biomaterials*, *71*, 24–34. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2015.08.037>
- [27] Italo Rodrigo Calori, I., Rodrigues Alves, S., Bi, H., & Claudio Tedesco, A. (2022). Type-I Collagen/Collagenase Modulates the 3D Structure and Behavior of Glioblastoma Spheroid Models. *Applied Bio Materials*, *5*, 2. <https://pubs.acs.org/doi/10.1021/acsabm.1c01138>
- [28] Polez, R., Huynh, N., Pridgeon, C., Valle-Delgado, J., Harjumaki, R., & Osterberg, M. (2024). Insights into spheroids formation in cellulose nanofibrils and Matrigel hydrogels using AFM-based techniques, *Materials Today Bio*, *26*, 1010165. <https://doi.org/10.1016/j.mtbio.2024.101065>
- [29] Shim, H., Kim, Y., Park, K., Park H., Moo Hu, K., & Kang, S. (2024). Enhancing cartilage regeneration through spheroid culture and hyaluronic acid microparticles: A promising approach for tissue engineering. *Carbohydrate Polymers*, *323*, 121734. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2023.121734>
- [30] Cui, X., Hartanto, Y., & Zhang, H. (2017). Advances in multicellular spheroids formation. *Journal of the Royal Society Interface*, *14*(127), 20160877. <https://doi.org/10.1098/rsif.2016.0877>
- [31] Su, C., Chuah, Y. J., Ong, H. B., Tay, H. M., Dalan, R., & Hou, H. W. (2021). A facile and scalable hydrogel patterning method for microfluidic 3D cell culture and spheroid-in-gel culture array. *Biosensors*, *11*(12), 509. <https://doi.org/10.3390/bios11120509>



Scientific Research

The potential of smart scaffolds containing quince seed mucilage and kappa-carrageenan for cell culture under normal physiologic conditions and varying pH levels

Neda Farhadi¹, Nafiseh Soltanizadeh*², Elahe Masaali*³, Mohsen Rabbani⁴

- 1- Ph.D. candidate, Department of Food Science and Technology, College of Agriculture, Isfahan University of Technology, Isfahan, Iran
- 2- Associate professor, Department of Food Science and Technology, College of Agriculture, Isfahan University of Technology, Isfahan, Iran
- 3- Assistant Professor, Department of Animal Biotechnology, Cell Science Research Center, Royan Institute for Biotechnology, ACECR, Isfahan, Iran
- 4- Assistant Professor, Department of Biomedical Engineering, Faculty of Engineering, University of Isfahan, Isfahan, Iran

ARTICLE INFO	ABSTRACT
<p>Article History:</p> <p>Received: 2024/9/3</p> <p>Accepted: 2024/12/22</p> <hr/> <p>Keywords:</p> <p>Smart Scaffold, Kappa-carrageenan, Quince seed mucilage, pH change, Cell Viability.</p> <hr/> <p>DOI: 10.22034/FSCT.22.159.301.</p> <p>*Corresponding Author E-</p>	<p>The purpose of this study is to investigate the ability of smart scaffolds of Kappa-carrageenan (Carr) and the combination of Kappa-carrageenan and quince seed mucilage (Carr:Quc) to support C2C12 viability and growth for cultured meat production. Carr and Carr:Quc with a final concentration of 1.5% (v/w) were developed using a 5% potassium chloride solution. The capability of the scaffolds to respond to the pH change of the environment was evaluated, and the viability of C2C12 at normal pH (7.4) and varying pH levels (7.4-5.5) was assessed. The evaluation of swelling changes with varying pH (pH 1-7) showed that for the Carr scaffold, the highest swelling was observed at pH 5, reaching 145%, which showed a significant difference compared to swelling at other pH levels ($p < 0.05$). The highest swelling for the Carr:Quc scaffold was also observed at pH 5, reaching 428%, with a significant difference compared to swelling at other pH levels ($p < 0.05$). Moreover, the change in the swelling behavior of the scaffolds was evaluated by changing the pH from 7.4 to 5.5. Carr did not show any swelling change, while Carr:Quc demonstrated a significant change in swelling after exposure to pH 5.5 for 30, 45, 60, 180, and 360 min. On Carr:Quc, C2C12 showed higher viability in normal conditions compared to varying pH levels from 7.4 to 5.5. Furthermore, after culturing on Carr:Quc, C2C12 maintained their viability throughout the culture period for 15 days at pH 7.4 and showed the potential for spheroid formation. The findings of this study could pave the way for the design of scaffolds made of edible biopolymers to facilitate tissue engineering of cultured meat</p>