ساخت و بررسی ظرف کشت سلول حساس به دما تولید شده به روش پلیمریزاسیون پیوندی با استفاده از پرتو گاما

زهرا آب باریکی[۱]، نسرین شیخ[۲]*، آزاده آصف نژاد[۱]، هادی بهاری فر[۱]
۱. گروه مهندسی پزشکی، واحد علوم و تحقیقات، دانشگاه آزاد اسلامی، ۱۴۷۷۸۹۳۸۵۵، تهران، ایران
۲. پژوهشگاه علوم و فنون هسته ای،پژوهشکده کاربرد پرتوها، ۱۱۳۶۵-۳۴۸۶، تهران، ایران

چکیده:
به منظور ساخت ظرف کشت سلولی حساس به دما، لایه ی نازکی از کوپلیمر(PNIPAAm/PNVCL) با دو نسبت ۲۰/۸۰ (نمونه اول) و ۵۰/ ۵۰ (نمونه دوم) با استفاده از پلیمریزاسیون پرتویی بر روی ظروف کشت سلول پلی استایرنی پیوند زده شد. برای اطمینان از پیوند زنی و بررسی لایه پیوند زده شده آزمونهای FTIR، AFM و زاویه تماس انجام شد. برای نمونه اول و دوم به ترتیب مقدار ضخامت لایه پیوند زده ۲۳/۸۸ nm و ۲۵/۷۸ nm و مقدار چگالی گرافت آنها ۲.۲۷ $\mu gr/cm^2$ و۲.۳۳ $\mu gr/cm^2$ به دست آمد. نتایج آزمون زاویه تماس، آبدوستی و آبگریزی سطح نمونه اول و دوم را در دو دمای ۱۰˚C و ۴۰˚C نشان داد. چسبندگی و جدا شدن سلول های فیبروبلاست در دو دمای ۳۷˚C و ۴˚C انجام شد. مشاهده شد که پس از کشت و رشد سلولها در ۳۷˚C ، با تغییر دما از ۳۷˚C به ۴˚C سلولها براحتی و بصورت صفحات سلولی از سطوح جداشدند.

کلیدواژه‌ها : ظرف کشت سلولی حساس به دما ، کوپلیمر (PNIPAAm/PNVCL)، صفحات سلولی، پرتو گاما

Synthesis and Evaluation of Smart Cell Culture Dish Produced by Graft Polymerization using Gamma-ray

Zahra Abbariki[1], Nasrin Sheikh[2*], Azadeh Asef nejad[1], Hadi Baharifar[1]
1. Radiation Applications Research School, Nuclear Science and Technology Research Institute, 113653486 Tehran, Iran.
2. Department of Biomedical Engineering, Science and Research Branch, Islamic Azad University, 1477893855, Tehran, Iran.

Abstract
To synthesis a thermoresponsive cell culture dish, a thin layer of copolymer (PNVCL / PNIPAAm) with two ratios 20:80 (first sample) and 50:50 (second sample) was grafted onto polystyrene cell culture dishes by radiation polymerization. To insure grafting, and evaluation of the grafted layer, FTIR, AFM, and contact angle experiments were performed. For first and second samples, thickness of the grafted layer was 23.88 nm and 25.78 nm, and their graft density was 2.27 µgr/cm2 and 2.33 µgr/cm2, respectively. The results of contact angle test showed hydrophilicity and hydrophobicity of the surface's the first and second samples at 10° C and 40° C. Attachment and detachment of fibroblast cells were performed at 37° C and 4° C. It was observed that after cell culturing and growing, by changing the temperature from 37° C to 4° C, the cells easily detached from the surfaces as cell sheets

Keywords: Thermoresponsive cell culture dish, Copolymer (PNVCL / PNIPAAm), Cell sheets, and Gamma ray.

Email: nasheikh@aeoi.org.ir

۱. مقدمه

سلول های جـدا شده از بافت ها و اعضای بدن می توانند در دمای مناسـب در یـک محـیط حـاوی مـواد غذایی و عوامل رشد درون ظروف کشت با سطوح هیدروفوب رشد کنند. سلولها خاصیت چسبندگی به سطوح هیدروفوب را دارند و برعکس از سطوح هیدروفیل جدا می شوند. در روش های معمول برای جدا شدن سلول های کشت شده از بستر کشت نیاز به یک درمان آنزیمی هست، که معمولا از آنزیم تریپسین[1] استفاده می شود، با اینکه این آنزیم ها به جدا شدن سلول ها از سطح و برداشت آن ها کمک می کند، ولی از طرف دیگر باعث هیدرولیز[2] شدن پروتئین های غشاء سلولی و از بین رفتن ماتریکس خارج سلولی [3] می شود. به همین دلیل تکنیک های جدیدی برای کشت سلول های حساس به آنزیم و یا برداشت سلول ها به شکل یک صفحه سلولی بدون استفاده از آنزیم و بر پایه استفاده از خصوصیت هیدروفوبیسیتی / هیدروفیلیسیتی سطوح کشت انجام شده است[۱]. در پژوهشی یامادا[4] و همکارانش موفق به پیوند زنی یک لایه نازک از پلیمر پلی ان ایزوپروپیل آکریل آمید PNIPAAm [5] بر روی سطح ظروف کشت سلول پلی استایرنی شدند، سطح این ظروف به تغییرات دما حساسیت نشان می داد. ظرف های پیوند زده شده در دمای $۳۷\ ^{\circ}C$ دارای سطحی هیدروفوب بودند و سلول ها می توانستند به بستر ظرف بچسبند و تکثیر یابند. در حالی که در دمای $۱۰\ ^{\circ}C$ تغییر خاصیت داده و سطح آن هیدروفیل می شد، بنابراین سلول های کشت شده بدون استفاده از آنزیم تریپسین به صورت صفحات سلولی از بستر کشت جدا می شدند[۲]. از مزایای ظروف کشت سلولی حساس به دما استفاده نکردن از آنزیم در فرآیند برداشت سلول ها از سطح است، که باعث می شود کانال های یونی ،رسپتورهای فاکتور رشد و اتصال های سلول به سلول سالم ودست نخورده باقی بماند، علاوه بر این می توان سلول های کشت شده را تنها با سردکردن به شکل یک صفحه سلولی[6] از سطح برداشت کرد [۱]. در این پژوهش از کوپلیمر PNVCL / PNIPAAm استفاده شده است در این رابطه پلیمر PNIPAAm شامل یک گروه ایزوپروپیل آب گریز و یک گروه آمید آب دوست می باشد، نیروهای درون مولکولی هر دو گروه باعث کنار هم قرار گرفتن این دو گروه و تشکیل ساختار PNIPAAm می شود، گروه آمیدی می تواند در محلول های آبی با مولکول های آب ارتباط برقرار کند، که موجب دو نوع فعل و انفعالات بین پلیمر و آب، همچنین داخل مولکولی (بین گروههای تشکیل دهنده پلیمر) شود، با توجه به این فعل انفعالات این پلیمر قادر است جهت گیری گروههای خود را با توجه به دما تغییر دهد، یعنی یک فاز انتقالی آب گریز به آب دوست و یا بالعکس داشته باشد. که از همین طریق باعث هوشمندی سطح ظروف کشت سلولی می شود و روند چسبندگی و جدایی سلول ها از بستر کشت را کنترل می کند[۳]. پلیمر دیگری که دارای حساسیت دمایی است و در این پژوهش بکار گرفته شده پلی N- وینیل کاپرولاکتام (PNVCL)[7] است که در مقایسه با PNIPAAm، دارای یک گروه کربوکسیلیکی آبدوست و یک آمید حلقوی یک گروه وینیلی آب گریز می باشد. هر دو پلیمر محلول در آب و غیر یونی هستند. در حالی که PNVCL زیست سازگارتر از PNIPAAm می باشد. شکل ظاهری مونومر این دو پلیمر به صورت بلورهای ریز سفید رنگ و غیر چسبناک است [۴-۶]. جهت پیوند زدن پلیمرهای حساس به دما بر سطح ظرف کشت سلول پلی استایرن از روش های مختلفی استفاده می شود، که پلیمریزاسیون پیوندی مونومر آنها بوسیله پرتو یکی از کاربردی ترین روش ها برای اصلاح خواص سطح این ظروف می باشد. با توجه به اینکه پژوهشگران بر روی پلیمر PNIPAAm تحقیقات بسیاری در زمینه مهندسی صفحات سلولی انجام داده اند، ولی استفاده از پرتو گاما جهت انجام پلیمریزاسیون کوپلیمر(PNIPAAm/PNVCL) بر سطح

[1] Trypsin
[2] Hydrolysis
[3] Extra cellular matrix
[4] Yamada
[5] Poly(N-isopropylacrylamide)
[6] Cell sheet
[7] Poly(N-vinylcaprolactam)

ظروف کشت سلولی از جنبه های نوآوری در این پژوهش در داخل و خارج از کشور است . خواصی مانند مقرون به صرفه بودن پلیمر PNVCL نسبت به PNIPAAm و زیست سازگاری بالای این پلیمر و همچنین داشتن خواص حرارتی مشابه با PNIPAAm علت ساخت ظروف کشت سلول حساس به دما با کوپلیمر (PNIPAAm/PNVCL) می باشد. بعلاوه در این پژوهش محاسبه چگالی گرافت لایه پیوند زده شده بر روی ظروف کشت سلولی انجام شده که قبلا در کشور انجام نشده است.

۲. روش کار

در این پژوهش مونومرNVCL ۹۸٪ از شرکت Sigma Aldrich، مونومر NIPAAm ۹۷٪ از شرکت Alfa Aesar، n-هگزان ۹۵٪ از شرکت مرک آلمان، ۲-پروپانول ۹۹.۸٪ از شرکت Fluka، ظروف کشت پلی استایرنی با قطر ۷ میلی متر و آب مقطر با استفاده از دستگاه دیونایزر تهیه شد. قبل از استفاده از مونومر های NIPAAm و NVCL به منظور تخلیص آنها هر دو مونومربا روش تبلور مجدد[8] با استفاده ازn -هگزان خالص سازی شدند. سپس محلول مونومری (NIPAAm / NVCL) با غلظت ۴۰٪ وزنی حجمی در دو نسبت (۵۰/۵۰ و ۸۰/۲۰) با استفاده از ۲-پروپانول تهیه شد. پس از آماده سازی محلول مونومری، میزان مشخصی از آن را به طور یکنواخت روی ظروف کشت سلول پلی استایرنی پخش شد و پس از عبوردهی گاز نیتروژن، پرتو دهی در گاما سل۲۲۰ آزمایشگاهی با نرخ دوزGy/S ۱/۲۳، با دوز مشخص kGy ۳۰ انجام شد.لازم به ذکر است که غلظت بهینه با توجه به منابع ۴۰ درصد انتخاب گردید، جهت یافتن دز بهینه پرتودهی واطمینان از غلظت ۴۰ درصد بعنوان غلظتی مناسب کلیه ی محلول ها ی مونومری در چند دز kGy ۱۰، kGy ۳۰ و kGy۵۰ پرتودهی شدند که با توجه به نتایج به دست آمده ازآزمون زاویه تماس وFTIR برای هر نمونه غلظت ۴۰ درصد تایید و دز بهینه kGy۳۰انتخاب شد. به این ترتیب مونومر ها بر سطح ظروف پیوند زده شدند. پس از پرتودهی برای خارج کردن مونومرهای عمل نکرده ظروف را به مدت ۷۲ ساعت در آب مقطر غوطه ور ساخته و سپس به خوبی شستشو داده شدند و در دمای اتاق خشک شدند [۷, ۸].

گروههای عاملی موجود در سطح نمونه ها و مقایسه کیفی آن ها با استفاده از دستگاه طیف سنج مادون قرمز تبدیل فوریه (FTIR) مدل TENSor27 ازشرکتBruker ساخت کشورآلمان انجام پذیرفت. ظرف شاهد پلی استایرنی باند جذبی قوی به علت گروه های آروماتیکی درcm^{-1} ۱۶۰۰ و نیز باندی در cm^{-1} ۳۳۰۰ دارد، که بیانگر حضور پیوند های هیدروکسیل (OH) بر روی سطح ظروف کشت سلولی می باشد، و در تمام نمونه های شاهد و پیوند زده شده مشاهده شد، زمانی که کوپلیمر NVCL/ NIPAAm روی سطح ظروف کشت سلولی پلی استایرنی پیوند زده شود یک باند جذبی آمیدی درنزدیکی محدوده cm^{-1} ۱۶۵۰ دیده می شود. که در شکل ۱ نشان داده شده است ، این پیک فقط در ظرف های دارای لایه پیوند زده شده دیده می شود. که بیانگر حضور لایه ای از کوپلیمر (PNIPAAm/PNVCL) بر سطح نمونه های ساخته شده است[۹]. لازم به ذکر است کوپلیمر(PNIPAAm/PNVCL) با نسبت ۲۰/۸۰ (نمونه اول) و کوپلیمر(PNIPAAm/PNVCL) ۵۰/ ۵۰ (نمونه دوم) می باشد.

مقدار چگالی گرافت با تهیه محلول استاندارد از دو کوپلیمر خطی (PNIPAAm/PNVCL) با نسبت ۸۰/۲۰ و ۵۰/۵۰ و ترکیبی از نتایج آزمون FTIR برای هر نمونه و حصول مقدار پیک درنسبت I۱۶۵۰/I۱۶۰۰ و رسم منحنی کالیبراسیون

[8] Recrystallization

به ترتیب $\mu gr/cm^2$ ۲.۲۷ و$\mu gr/cm^2$ ۲.۳۳ به دست آمد، که نشان دهنده وجود لایه کوپلیمری با مقیاس میکروگرم بر سطح است.

یکی از روش های ارزیابی تغییرات آبدوستی، آبگریزی سطح محاسبه درجه تر شوندگی سطح است، میزان تر شوندگی سطح ظروف کشت سلولی پیوند زده شده، با اندازه گیری زاویه تماس قطره آب با سطح ظرف تعیین می گردد. در این پژوهش جهت اندازه گیری زاویه تماس سطحی از دستگاه اندازه گیری زاویه تماس مدل CA-500A ساخت کشور ایران استفاده شد. در دمای ۴۰ $^\circ C$ در نمونه اول و دوم تغییرات زاویه تماس با کاهش دما از ۴۰ $^\circ C$ به ۱۰ $^\circ C$ به ترتیب از ۷۱.۴۵ به ۵۱.۹۶ و از ۷۰.۲۳ به ۶۰.۴۳ تغییر کرده است. برای هرگزارش، از میانگین سه اندازه گیری استفاده شده است. در ۱۰ $^\circ C$، دمای پایین تر از LCST کوپلیمرهای پیوند زده شده بر سطح ظروف، زاویه تماس کاهش و در دمای ۴۰ $^\circ C$، دمای بالاتر از LCST کوپلیمرها ی پیوندی، زاویه تماس افزایش یافته است،که این تغییرات به معنای آبدوست شدن سطح ظروف پیوند زده شده با کاهش دما می باشد.

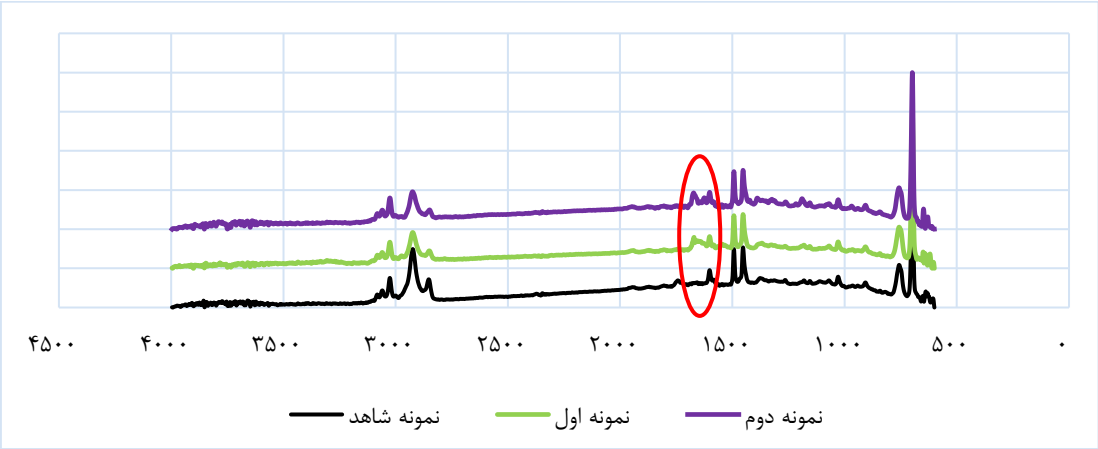
همچنین در این پژوهش به منظور بررسی توپوگرافی، مورفولوژی و زبری سطح نمونه ها و اندازه گیری ضخامت تقریبی لایه پیوند زده شده از میکروسکوپ نیروی اتمی AFM مدل Park Scientific Instrument -CP outo prob استفاده شده است. که تصاویر دو بعدی و ۳ بعدی از سطح نمونه اول و دوم در شکل ۲ و ۳ نشان داده شده است. فاکتور زبری RMS [۹] که ریشه متوسط مربع در ریاضیات آماری است به ما کمک می کند تا ارزیابی مناسبی از میزان ضخامت لایه پیوندی و تغییرات ایجاد شده در سطح داشته باشیم. که در این تحقیق مقدار فاکتوری زبری درنمونه اول و دوم به ترتیب ۲/۱۳ و ۲/۵۸ و مقدار ضخامت لایه پیوند زده nm ۲۳/۸۸ و ۲۳/۷۸ به دست آمد. به دلیل تاثیر مستقیم ضخامت لایه پیوند زده شده بر روند چسبندگی و کشت سلول ها، همچنین برداشت و جدا شدن آن ها از بستر کشت محاسبه ی ضخامت این لایه بسیار حائز اهمیت است،در صورت کم بودن ضخامت لایه پیوند زده شده با کاهش دما آبدوستی سطح به اندازه ایی نیست، که موجب جدا شدن سلول ها از بستر کشت شود. و در مقابل تشکیل یک لایه ضخیم از پلیمر پیوند زده شده بر سطح ظرف های کشت سلولی، مانع از چسبیدن سلول ها بر سطح ظرف کشت می شود، چنین سطحی دافع سلولی است[۱۰].

سلول های فیبروبلاست در دمای ۳۷ درجه بر روی ظروفی که با کوپلیمر (PNIPAAm/PNVCL) در دو نسبت ۵۰/۵۰ و ۸۰/۲۰ پیوند زده شده بود کشت شدند، در هر دو نمونه سلول ها به خوبی به بستر کشت چسبیده و تکثیر یافتند و جهت برداشت سلول ها ظروف کشت به مدت ۵۰ دقیقه در دمای ۴ $^\circ C$ نگهداری شدند، کلیه ی سلول ها بدون استفاده از آنزیم و تنها با کاهش دما از بستر کشت جدا شدند. در شکل ۴ رفتار سلول ها در ظرف کنترل و فاقد لایه ی کو پلیمری در دو دمای۳۷ $^\circ C$ و۴ $^\circ C$ نشان می دهد که با تغییر دما هیچگونه تغییری حاصل نمی شود و برای اطمینان از چسبیدن سلول ها به بستر کشت تمام محیط کشت را خارج کرده و از منطقه ی باقی مانده عکس گرفته شد، همانطور که مشاهده می شود تمامی سلول ها به کف ظرف چسبیده اند، اما در ظروفی که با کوپلیمر (PNIPAAm/PNVCL) پیوند زده شده اند سلول ها پس از سرد شدن تا دمای ۴ $^\circ C$ از بستر کشت جدا شده و پس از خالی کردن محیط کشت سلول ها به همراه محیط کشت از ظرف خارج شده به نحوی که در منطقه باقی مانده هیچ سلولی در کف ظرف ها

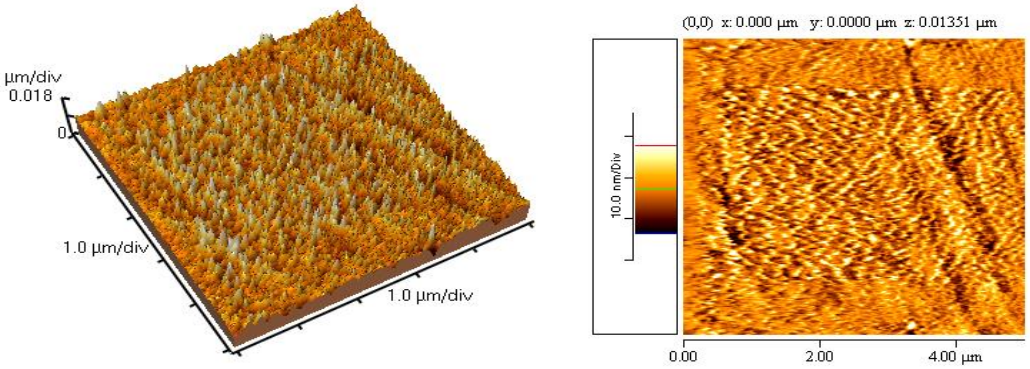
[9] Root mean square

مشاهده نمی شود(شکل۵و۶). البته ظروفی که با کوپلیمر (PNIPAAm/PNVCL) نسبت ۸۰/۲۰ پیوند زده شده بودند سلول ها به شکل یک صفحه سلولی از سطح جدا شدند که در شکل ۵ نشان داده شده است. جدا شدن سلول ها با کاهش دما در ظروف پیوند زده شده به دلیل ضخامت و زاویه تر شوندگی مناسب، داشتن نقطه LCST کمتر از ۳۷ درجه سانتی گراد، حساسیت به دما و توزیع یکنواخت لایه پیوند زده شده بر سطح می باشد. زیرا سلول ها در ظروف کشت معمولی به تغییرات دما هیچ پاسخی نمی دهند و حتی در برداشت با آنزیم تریپسین به صورت دانه دانه جدا می شوند که همین موضوع سبب آسیب دیدن ماتریکس خارج سلولی نیز می شود، در حالی که در شکل ۵ سلول هایی بهم پیوسته مشاهده می شودکه همان صفحه سلولی است، که تنها با سرد کردن از بستر کشت جدا شده است.

۳. شکل ها

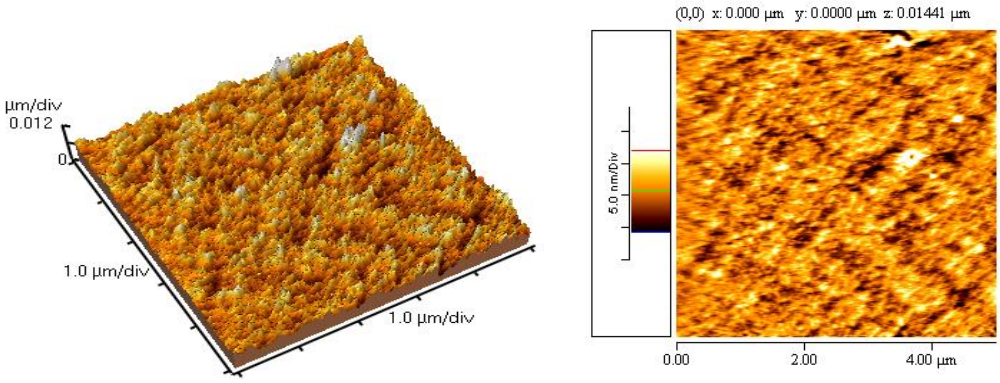


شکل۱. مقایسه طیف ATR نمونه ی شاهد و نمونه های پیوند زده شده با کوپلیمر (PNIPAAm /PNVCL)



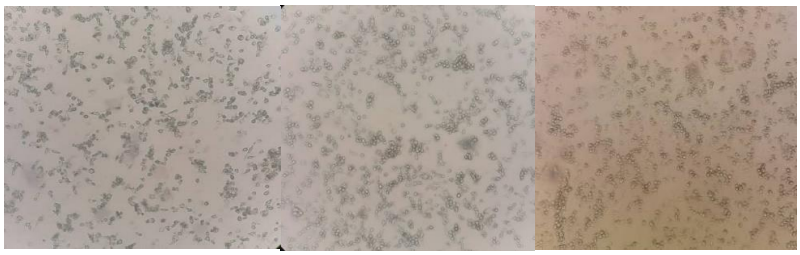
(ب) (الف)

شکل۲. تصویرAFM ازسطح نمونه ی اول (الف). تصویر دوبعدی (ب). تصویر سه بعدی



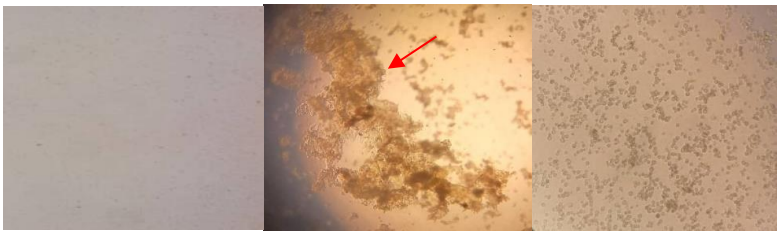
(ب) (الف)

شکل۳. تصویرAFM ازسطح نمونه ی دوم (الف). تصویر دوبعدی (ب). تصویر سه بعدی



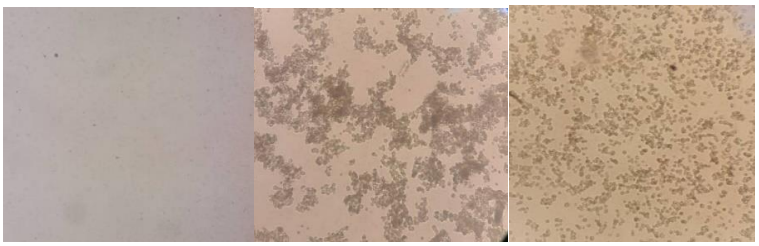
ج (منطقه باقی مانده) ب (دمای ۴ ˚C) الف (دمای ۳۷ ˚C)

شکل ۴. کشت سلول بر روی ظرف کنترل فاقد لایه پیوند زده شده



ج (منطقه باقی مانده) ب (دمای ۴ ˚C) الف (دمای ۳۷ ˚C)

شکل۵. کشت سلول بر روی ظرف پیوند زده شده با کوپلیمر(PNVC / PNIPAAm) با نسبت۸۰/۲۰
(پیکان صفحه سلولی را نشان می دهد)



ج (منطقه باقی مانده) ب (دمای ۴ ˚C) الف (دمای ۳۷ ˚C)

شکل۶. کشت سلول بر روی ظرف پیوند زده شده با کوپلیمر(PNVC / PNIPAAm) با نسبت۵۰/۵۰
(لازم به ذکر است که تمامی تصاویرکشت سلول با بزرگ نمایی ۱۰۰۰ برابر و به صورت تصادفی گرفته شده است).

۴. نتیجه‌گیری

هدف از انجام این پروژه ساخت ظروف کشت سلولی حساس به دما به منظور تولید صفحات سلولی جهت کاربرد در مهندسی بافت بوده است، نمونه هایی با نسبت مشخص از دو منومرNIPAAm و NVCL تهیه وبروش پلیمریزاسیون پیوندی با دزهای مختلف پرتو گاما تهیه شدند. نتایج آزمون FTIR و مشاهده کیفیت مطلوب پیک در منطقه ۱۶۵۰ و همچنین براساس نتایج آزمون زاویه تماس و تغییرات چشمگیر زاویه تماس با کاهش دما، ۳۰ kGy دز بهینه جهت پلیمرزاسیون پرتویی تعیین شد. نتایج آزمون FTIR در تمامی نمونه ها وجود لایه کوپلیمری (PNIPAAm/PNVCL) بر سطح ظروف کشت سلول پلی استایرنی را تایید کرد و چگالی پیوند با استفاده از منحنی کالیبراسیون به دست آمد، که نشان دهنده وجود یک لایه پلیمری با مقیاس میکروگرم بر سطح است. علاوه بر این تغییرات آبدوستی به آب گریزی برای سطح و بالعکس با توجه به تغییرات دما ، حساسیت دمایی لایه کوپلیمری پیوند زده شده را ثابت می کند. نتایج بررسی با میکروسکوپ AFM نشان داد که لایه پلیمری در تمامی نمونه ها با موفقیت پیوند زده شده و دارای ضخامتی در اندازه نانو می باشد. لذا بر این اساس مشاهده شد که سلول ها در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد بر روی ظرف های کشت سلولی پیوند زده تکثیر و رشد یافتند کشت سلول ها در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد نشان می دهد که نقطه LCST لایه پیوند زده شده کمتر از ۳۷ درجه سانتی گراد می باشد. متعاقبا با کاهش دما سطح ظرف هیدروفیل شده و سلول ها بدون هیچ گونه درمان آنزیمی به شکل صفحات سلولی از سطح جدا شدند.

۵. مراجع

۱. Nagase, K., et al., Poly (N-isopropylacrylamide)-based thermoresponsive surfaces provide new types of biomedical applications. Biomaterials, 2018. 153: p. 27-48.

۲. Yamada, N., et al., Thermo - responsive polymeric surfaces; control of attachment and detachment of cultured cells. Die Makromolekulare Chemie, Rapid Communications, 1990. 11(11): p. 571-576.

۳. Klouda, L. and A.G. Mikos, Thermoresponsive hydrogels in biomedical applications. European journal of pharmaceutics and biopharmaceutics, 2008. 68 :(۱)p. 34-45.

۴. Kozanoğlu, S., T. Özdemir, and A. Usanmaz, Polymerization of N-vinylcaprolactam and characterization of poly (N-vinylcaprolactam). Journal of Macromolecular Science, Part A, 2011. 48(6): p. 467-477.

۵. Rao, K.M., K.S.V.K. Rao, and C.-S. Ha ,Stimuli responsive poly (vinyl caprolactam) gels for biomedical applications. Gels, 2016. 2(1): p. 6.

۶. Shi, K., et al., Novel biocompatible thermoresponsive poly (n-vinyl caprolactam)/clay nanocomposite hydrogels with macroporous structure and improved mechanical characteristics. ACS applied materials & interfaces, 2017. 9(26): p. 21979-21990.

۷. Arenas, E., et al., Radiation Grafting of N-Isopropylacrylamide onto Poly (vinyl chloride) tubes by Gamma Irradiation. Polymer Bulletin, 2007. 58(2): p. 401-4.۰۹

۸. Biazar, E., M. Khorasani, and M. Daliri, Cell sheet engineering: solvent effect on nanometric grafting of poly-N-isopropylacrylamide onto polystyrene substrate under ultraviolet radiation. International journal of nanomedicine, 2011. 6: p. 295.

۹. Mokhtarinia, K., et al., Switchable phase transition behavior of thermoresponsive substrates for cell sheet engineering. Journal of Polymer Science Part B: Polymer Physics, 2018. 56(23): p. 1567-1576.

۱۰. Fukumori, K., et al., Temperature-responsive glass coverslips with an ultrathin poly (N-isopropylacrylamide) layer. Acta Biomaterialia, 2009. 5(1): p. 470-476.