Review Article

Tissue Engineering Scaffolds: History, Types and Construction Methods

Hashemi Z.S., M.Sc., Soleimani M., Ph.D.*

**P.O.Box:14115-111, Hematology Department, Medical Sciences Faculty, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran*

Received: Feb 2011 Accepted: Jul 2011

Abstract

Tissue engineering is a rapidly growing research field, potentially capable of de novo tissue and organ construction. This approach is used to improve efficiency both in the tissue and cell culture. This method is required to provide bodies in vivo three-dimensional conditions outside of the body (ex vivo). To achieve this goal, given tissue cells are cultured on the tissue engineering scaffolds. These are structures with on extracellular matrix materials on which different treatments are performed. Initially, they were only used to deliver drugs and hormones, but further investigations revealed their ability to preserve, protect and even transfer cells into the body. Now widespread employment of scaffolds for organ transplantation is in a rapid progress. To improve the organ transplantation materials and structures similar to the target tissues areused. Applying scaffolds for cell reproduction is an ongoing research aimed to increase the efficiency of three-dimensional culture. This goal necessitates the simulation of bodies internal environment which is provided by simultaneous culture of target cells with stromal cells. Present review is a comprehensive study of available information in connection with main aspects of scaffolding. It primarily includes their history, materials and types, scaffolding construction methods and their applications in medicine as well as tissue engineering.

Key words: Scaffold, Tissue engineering, Three-dimensional culture

مقاله مروری

داربست‌های مهندسی بافت: تاریخچه، انواع و روش ساخت

زهراالسادات هاشمی .M.Sc*، ✍ مسعود سلیمانی .Ph.D**

* گروه بیوتکنولوژی پزشکی دانشکده علوم پزشکی دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران و
کمیته تحقیقات دانشجویی/انجمن علمی دانشکده علوم پزشکی دانشگاه تربیت مدرس

** گروه هماتولوژی و بانک خون، دانشکده علوم پزشکی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران

تاریخ دریافت: اسفند ماه ۸۹، تاریخ پذیرش: مرداد ماه ۹۰

چکیده

امروزه تحقیقات در زمینه مهندسی بافت در سطح وسیعی رو به گسترش است به‌طوری که مهندسی بافت توانایی بالقوه برای ساخت عضو و بافت را به‌صورت *de novo* دارد. به‌منظور بهتر شدن کارایی کشت سلول و بافت در مهندسی بافت، نیاز به خلق شرایط سه بعدی بدن (*in vivo*) در حالت خارج بدن (*ex vivo*) است. برای نیل به این هدف، سلول‌های بافت مورد نظر روی داربست‌ها کشت داده می‌شوند. داربست‌ها ساختارهایی مبتنی بر مواد موجود در ماتریکس خارج سلولی است که تیمارهای مختلفی روی آن‌ها انجام شده است. در ابتدا این مواد تنها برای انتقال دارو و هورمون به بدن به‌کار می‌رفت ولی تحقیقات بعدی نشان داد که این مواد توانایی حفظ ، نگهداری و حتی انتقال سلول‌ها به بدن را دارد. روند پیشرفت در زمینه استفاده از داربست‌ها در پیوند عضو به سرعت رو به افزایش است و برای بهبود آن از مواد و ساختارهایی شبیه به بافت هدف استفاده می‌کنند. برای تکثیر سلول‌ها روی داربست‌ها تحقیقات همچنان ادامه دارد تا بدین وسیله کارایی کشت سه بعدی افزایش یابد. برای این منظور نیاز به شبیه‌سازی محیط داخل بدن است که از کشت هم‌زمان سلول‌های هدف و سلول‌های استرومایی استفاده شده است. در نوشته حاضر اطلاعات موجود در ارتباط با جنبه‌های مختلف داربست‌ها شامل تاریخچه، جنس و انواع آن‌ها، روش‌های ساخت داربست‌ها و کاربردهای آن‌ها در پزشکی و مهندسی بافت مرور شده است.

کلید واژه‌ها: داربست، مهندسی بافت، کشت سه‌بعدی

مقدمه

مهندسی بافت حیطه‌ای چند رشته‌ای از اصول و کاربرد روش‌های مهندسی و علوم زیستی، به منظور شناخت بنیادی رابطه بین ساختار و عملکرد در بافت‌های طبیعی و بیمار است. این حیطه ترکیبی از سلول‌ها، مهندسی، مواد و فاکتورهای فیزیکی و شیمیایی مناسب است که هدف آن حفظ حالت پایدار بافت یا بهتر کردن عملکرد بافت هدف یا جایگزین کردن عملکرد زیستی بافت است [۲-۱]. به همین دلیل در بحث طب ترمیمی و مهندسی بافت استفاده از سلول‌های بنیادی مشاهده می‌شود. اصطلاح مهندسی بافت به شکل امروزی اولین بار در۱۹۸۵ توسط فونگ (Fung) مطرح

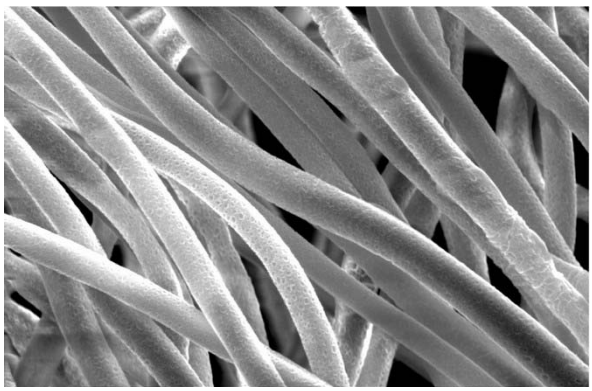
✍ **آدرس مکاتبه:** ایران، تهران، دانشگاه تربیت مدرس، دانشکده علوم پزشکی، گروه هماتولوژی و بانک خون، صندوق پستی: ۱۱۱-۱۴۱۱۵
Email: soleim_m@modares.ac.ir

گشت و از سال ۱۹۸۷ یعنی پس از جلسه بنیاد ملی علوم (NSF: National Science Foundation-) سرمایه‌گذاری‌ها روی مهندسی بافت آغاز شد. پیشرفت‌های اخیر در زمینه مهندسی بافت به منظور غلبه بر محدودیت‌های روش‌های مرسوم پیوند عضو و پیوند مواد است [۳]. در این زمینه توانایی بالقوه برای ساخت عضو و بافت‌های مصنوعی وجود دارد به‌طوری که بافت و عضو پیوند زده شده پس از پیوند، همراه با فرد گیرنده رشد کند. با این روش راه حل دایمی برای درمان بافت‌های آسیب دیده وجود دارد، به‌طوری که نیازی به درمان‌های مکمل نبوده و در نتیجه هزینه درمان بسیار کاهش می‌یابد [٤]. تاکنون مهندسی بافت برای ترمیم بسیاری از بافت‌ها مانند استخوان، غضروف، رگ خونی و پوست به‌کار رفته است. بنابراین یک بافت برای انجام عمل خود یک‌سری ویژگی‌های ساختمانی و مکانیکی دارد. بدین منظور برای به‌دست آوردن این شرایط در مهندسی بافت، از سلول‌هایی که در داخل یک سیستم پشتیبانی مصنوعی قرار دارند، استفاده می‌کنند. سلول‌ها اغلب در داخل ساختارهای مصنوعی کاشت یا جای داده می‌شوند که این ساختارها قادر به تقلید و حمایت از ساختار بافت سه بعدی است. این ساختار داربست نامیده می‌شود که هم به‌صورت *in vivo* و هم *ex vivo* به‌کار برده می‌شود. در هر دو حالت، داربست تقلیدی از بافت زنده در داخل بدن است که در این حالت به سلول های کاشت شده اجازه داده می شود روی میکرومحیط اطراف خود تاثیر بگذارند. داربست های زیستی با استفاده از مواد زیست سازگار و تخریب پذیر به‌دست می‌آید. ساختار این داربست‌ها باید تا حد امکان به بافت منطقه کاشت شبیه باشد. بدین ترتیب بازسازی و بهبود بافت صدمه دیده از لحاظ کیفی و کمی افزایش می‌یابد. ساختمان داربست به‌صورت ماتریکس متخلخلی است که این تخلخل به چسبندگی و جای‌گیری بهتر سلول‌ها کمک می‌کند. اندازه و شدت تخلخل قابل کنترل است. باید گفت اصلی‌ترین بخش کار طراحی داربست است که در این طراحی اندازه حفرات، شدت تخلخل و درجه تخریب پذیری تعیین می‌شود، به‌طوری که تا رسیدن به زمان تخریب مقاوم به تنش‌های ناحیه‌ای بوده و این فشارها را در کل ناحیه لانه گزینی به‌صورت همگون و مساوی پخش کند[۵].

تاریخچه

از دهه ٦٠ میلادی پلیمرهای قابل جذب و تخریب‌پذیر در اندازه و شکل‌های مختلف برای انتقال دارو و هورمون به‌کار می‌رفت [٦]. برای مثال پلی آنهیدرید در ابتدا به صورت میکروسفر (Microsphere) یا ریزکره به عنوان حامل به‌کار برده می‌شد[۷]. پس از آن در دهه ۷۰ به عنوان کاشت (Implant) برای کنترل رهاسازی هورمون، به‌ویژه هورمون‌های پیشگیری از بارداری به‌کار برده شدند [۸]. امروزه نیز از داربست‌ها به‌عنوان وسیله‌ای برای رساندن دارو به مقصد (Drug Delivery Vehicle) استفاده می‌شود [۹]. پس از آن لوکاس (Lucas) و همکارانش برای القای غضروف و استخوان‌سازی، از پروتئین‌های محلول در آب موجود در استخوان گاو استفاده کردند که در این راستا برای رساندن این پروتئین‌ها به مقصد مورد نظر از پلی آنهیدرید استفاده شد [۱۰]. مستر (Masters) و همکارانش در تحقیق خود برای انسداد طولانی مدت ولی محدود به ناحیه‌ای مشخص، از ماتریکس پلی مری ولی قابل تخریب پلی آنهیدرید استفاده کردند به‌طوری که به‌صورت کنترل شده داروهای مؤثر در بیهوشی موضعی از آن رها شده و در ناحیه مورد نظر اثرمی‌گذاشتند [۱۱]. پس ازآن هلر (Heller) برای نیل به هدف انتقال دارو و هورمون از پلی اورتواسترها (Poly (ortho esters استفاده کرد [۱۲]. آلیفاتیک پلی‌استرها مانند پلی‌لاکتیک اسید (شکل ۱) و پلی گلیکولیک اسید برای چندین دهه برای کاشت‌های زیستی و ترمیم بافت به‌کار می‌رفت [۱۳]. امروزه نیز این پلیمرها به‌صورت جدا یا در حالت کوپلیمری از این

دو پلیمر، به‌کار برده می‌شود[۱٤]. به‌طورکلی پلی استرهایی که در پزشکی کاربرد داشتند شامل پلی‌کولید، پلی‌لاکتید، پلی‌لاکتید به همراه گلیکولید، پلی دیئوگزانون، پلی‌کاپرولاکتون و پلی‌تری متیلن کربونات بود. داربست هیبریدی از پلی‌کاپرولاکتون، پلی‌وینیل الکل به همراه چیتوزان در مهندسی بافت [۱۵] و نیز برای کاشت‌های زیستی مطرح شده است[۱٦]. اما استفاده از داربست‌ها برای کاشت سلول‌ها در سال ۱۹۹۰ توسط ناتون (Naughton) و همکارانش انجام شد. این عمل که برای او حق انحصاری (Patent) محسوب شد [۱۷] شامل کاشت خارج بدنی سلول‌ها روی پلیمر پلی‌گلیکولیک اسید بود؛ بدین‌ترتیب سلول‌های پوست، کبد، پانکراس، مغز استخوان، استئوبلاست و کندروبلاست برای کشت سه‌بعدی در این سیستم به‌کار برده شد. در اینجا پیشنهادی از ناتون مطرح شد که این سلول‌های کاشت شده به همراه داربست به محیط زنده یا همان بدن فرد بیمار پیوند زده شوند. در سال ۱۹۹۲ ناتون و همکارانش روی پروتز مفصل ران تحقیقی انجام دادند [۱۸]. بدین ترتیب که آن را با پوششی از سلول‌های غضروف به صورت کشت سه‌بعدی به‌کار بردند و سپس این پروتز را در بدن فرد بیمار جایگزین کردند. پس از آن، کار روی داربست‌ها و ساخت بافت‌های مصنوعی مانند پوست، مغز استخوان، دستگاه تنفسی [۱۹]، پانکراس، مثانه به سرعت افزایش یافت که بنیاد ملی علوم در این زمینه پیش قدم بوده است.



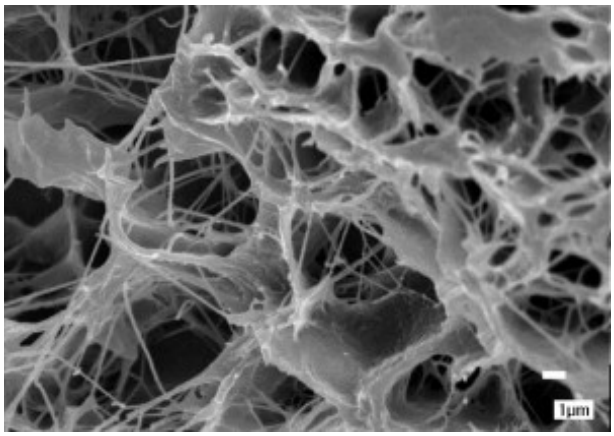
شکل ۱. ساختمان پلی‌لاکتید [۲۰]

ویژگی‌های عملکردی داربست

با توجه به تاریخچه داربست‌ها، باید گفت امروزه هدف اصلی استفاده از داربست‌ها بازسازی مجدد بافت‌های بدن است. هر بافت ویژگی‌های بیولوژیکی و نیز فیزیکی مانند اندازه و شکل خاص خود را دارد. بنابراین هر داربست درعمل باید توانایی وارد کردن آثار بیولوژیکی و مکانیکی خاص را به‌منظور بهبود و تغییر رفتار سلولی دارا باشد. بدین منظور هر داربست براساس خواص بافت هدفش طراحی می‌شود. انتخاب نوع و جنس داربست مهمترین بخش کار است به‌طوری که در نهایت جایگزین بافت آسیب دیده می‌شود. داربست نه تنها اجازه اتصال سلول‌ها را به خود می‌دهد، بلکه باعث مهاجرت سلول‌ها، نقل و انتقال فاکتورهای بیوشیمیایی، انتشار مواد غذایی، مواد زاید و نیز مواد تولیدی سلول‌ها می‌شود. برای رسیدن به این هدف، داربست باید دارای یک‌سری ویژگی‌های ساختاری باشد.

ویژگی‌های ساختاری داربست

ویژگی‌های داربست‌ها شبیه به ماتریکس خارج سلولی (ECM: Extra-Cellular Matrix) است که نقش مهم در سیگنال‌های فیزیکی و شیمیایی تکثیر دارند [۹]. این ماده زمینه یا ماتریکس خارج سلولی دارای پروتئین‌هایی مثل فیبرونکتین [۲۱]، کلاژن [۲۲-۲۳] (شکل ۲) و ژلاتین [۲٤] است که برمبنای این مواد داربست‌های بسیاری ساخته شد. داربست‌ها دارای ویژگی‌های اصلی و فرعی است:



شکل ۲. تصویری از سطح کلاژن با میکروسکوپ الکترونی [۲۵].

۱) تخلخل بالا و تا حد امکان اندازه منافذ در کل داربست مساوی و به یک اندازه باشد. این ویژگی به لانه‌گزینی بهتر، سریعتر و راحت تر سلول‌ها کمک کرده و همچنین انتشار مواد غذایی و مهاجرت سلول‌ها را در کل ساختمان داربست تسهیل می‌کند.

۲) تخریب‌پذیری داربست به‌عنوان یکی دیگر از فاکتورهای ضروری محسوب می‌شود به‌طوری که داربست توسط بافت‌های اطراف جذب شده و دیگر نیازی به عمل جراحی برای حذف داربست نباشد.

در اینجا یک مؤلفه دیگر تحت عنوان نرخ تخریب‌پذیری برای داربست‌ها مطرح می‌شود. در این موارد شدت از بین رفتن داربست طوری تنظیم می‌شود که همزمان با شکل گرفتن بافت جدید و تازه باشد. زمانی که سلول‌های روی داربست توانایی حفظ خود را بدون نیاز به داربست به‌دست آورده و ساختار ماتریکس طبیعی در اطراف خود را بسازند، در این زمان تجزیه داربست شروع می‌شود. در نهایت، مواد حاصل از تخریب داربست توسط بدن فرد گیرنده جذب می‌شود. اگر این درجه و شدت تخریب‌پذیری در داربست بالا باشد، سلول‌ها فرصت کافی برای ساخت ماتریکس خارج سلولی را ندارند و در نتیجه با حذف کامل داربست قدرت زنده ماندن به‌طور مستقل را نداشته و از بین می‌روند. بنابراین عمل کاشت، کارایی خود را نخواهد داشت. از طرف دیگر اگر شدت این مؤلفه پایین باشد یعنی زمان زیاد برای تخریب داربست نیاز باشد سلول‌های پوشش داده شده روی داربست به همراه حجم زیادی از پروتئین‌ها و مواد ماتریکس سلولی باعث ایجاد بار اضافی روی داربست می‌شوند که به اصطلاح داربست قدرت حمل آن را ندارد. بنابراین تخریب ابتدایی و ذره ذره در داربست وجود نداشته و این تخریب یکباره و کلی با از هم گسستن و پاره شدن داربست انجام می‌شود که این حالت برای بدن سمی بوده و پاسخ ایمنی را به همراه دارد و حتی در شرایط حاد منجر به رد پیوند از طرف بیمار می‌شود. در طول فرآیند ترمیم، به‌منظور ارایه پشتیبانی مداوم از سلول‌ها نرخ تخریب داربست طوری تنظیم می‌شود که مطابق با نرخ تکثیر سلول، نرخ تمایز سلول و نرخ رسوب ماتریکس خارج سلولی در ناحیه لانه‌گزینی باشد. بدین ترتیب مواد استفاده شده برای ساخت داربست باید به‌طور مناسب انتخاب شود که با حداقل واکنش و عوارض جانبی، منجر به افزایش چسبندگی، تکثیر و تمایز سلول‌ها شود [۵].

۳) قابل تزریق بودن داربست؛ این ویژگی به دو صورت بیان می‌شود: الف) قابلیت تزریق سلول‌ها به آن وجود دارد. به‌طوری که در این حالت سلول‌ها پس از ورود به فضای داخل داربست روی سطح داربست جایگزین شده و پوششی از سلول‌ها روی سطح داربست است که در این حالت دیگر نیازی به پوشش دادن سلول‌ها با استفاده از مواد شیمیایی مثل تیتانیوم نیست [۲۶]. ب) قابلیت تزریق داربست به همراه سلول‌های موجود در آن، بدون نیاز به عمل جراحی، به محل مورد نظر در بدن، وجود دارد. به‌طوری که کاشت داربست در همان محل صورت می‌گیرد. این حالت بیشتر برای داربست‌های خونی مطرح است. با توجه به این موضوع داربست‌های قابل تزریق به دو دسته هیدروژل و میکروسفر یا ریزکره تقسیم می‌شود (شکل ۳). داربست‌های هیدروژل مشتق شده از آلژینات، ژلاتین و فیبرین است [۲۷-۲۸]. داربست‌های قابل تخریب هیدروژل از پلیمرهای آب‌دوست مانند پلی‌اتیلن گلایکول (PEG) ساخته می‌شوند. این داربست‌ها محیط و شرایط ملایم‌تر و قابل کنترلی را برای رشد و تمایز سلول‌ها ایجاد می‌کند ولی این داربست‌ها کارایی بالا نداشته و دو مشکل عمده پدیدار می‌شود: الف) به دلیل ساختار حساس و ملایم آن‌ها، محدودیت برای انتقال دارد. ب) به دلیل آب‌دوست بودن این پلیمرها، سطح داربست غیرچسبنده بوده و خاصیت اتصالی مناسب داربست را ندارد. پلیمرهای آبگریز به دو صورت نانوفیبر و به فرم میکروسفر (داربست‌های ماتریکسی و قابل تزریق) ساخته

می‌شود؛ اگرچه این پلیمرها بـه محـصولات جـانبی اسـیدی تجزیه می‌شود و این حالت اسیدی مـی‌توانـد روی رشـد و چسبندگی سلول اثر منفی داشته باشـد [۲۹]. میکروسـفرهـا بیشتر از جنس پلی‌لاکتیک/گلایکولیک اسید (PLGA) اسـت که برای تکثیر *in vitro* سلول‌ها به‌کار برده مـی‌شـود [۳۰] و همچنین برای ترمیم بافت غضروفی به محل آسـیب دیـدگی تزریق می‌شود [۳۱-۳۳]. در انتخاب داربـست بایـد عوامـل جانبی و فرعی را نیز در نظر گرفت [۳٤]:

۱) حفرات موجود در داربست با یکدیگر در ارتباط بـوده و به‌صورت به‌هم پیوسته باشد به‌طوری که مثل سیستم گردش خون و رگ در بدن عمل کند.

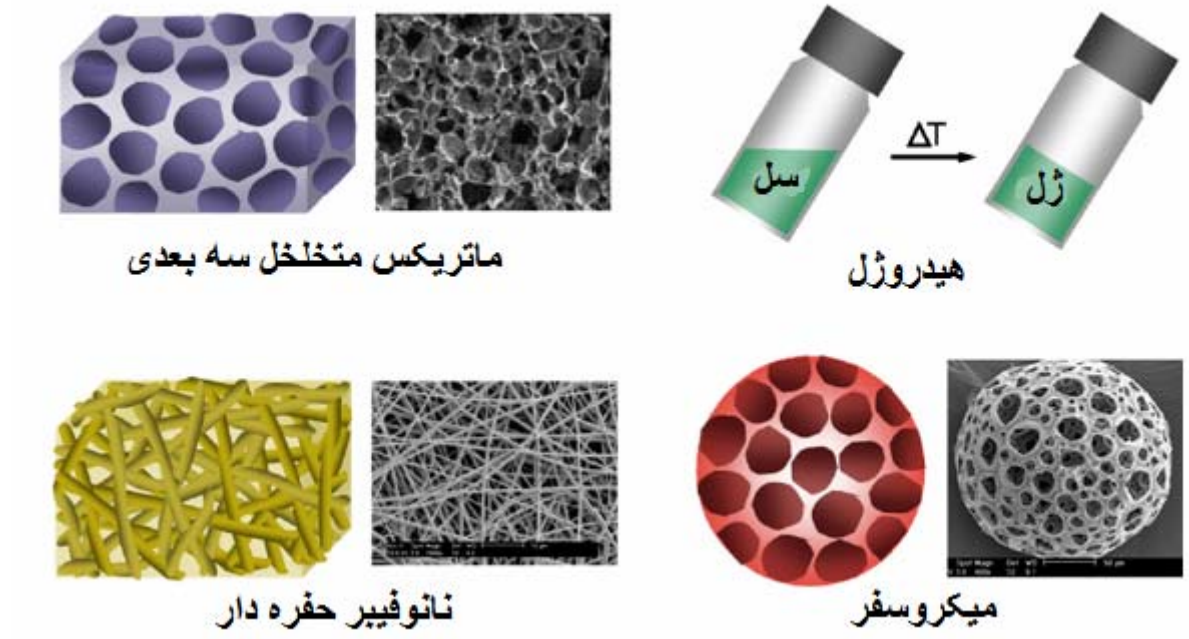
۲) از موادی تهیه شود که بتوان توان تخریب و تجزیـه آن را به راحتی کنترل کرد تا در نهایت جایگزین بافت هدف شود.

۳) دارای بار، قطبیت و خواص شیمیایی مناسب در سـطح خود باشد به‌طوری که برای اتصال، تکثیر و تمـایز سـلول‌هـا مناسب باشد.

٤) دارای خواص مکانیکی مناسب باشد. شـدت مقاومـت مکانیکی در داربست‌ها باید متناسب با بافت هـدف یـا همـان محل لانه‌گزینی باشـد. مقاومـت مکـانیکی داربـست بایـد بـه گونه‌ای محاسـبه شـود کـه در هنگـام کـار یـا نقـل و انتقـال صدمه‌ای به آن وارد نشود.

۵) نباید سیستم ایمنی را تحریک و منجر به پاسـخ ایمنـی شود.

٦) به‌راحتی به اشکال و اندازه‌های مختلف تبدیل شود.



شکل ۳. اشکال مختلف داربست‌های پلیمری در مهندسی بافت [۳۵]

انواع داربست‌ها

تقسیم‌بندی کلی برای داربست‌ها به سه صورت است:

۱. قابلیت تزریق سلول‌ها به آن:

۱,۱. قابل تزریق

۱,۲. غیرقابل تزریق

وجود یا عدم وجود این قابلیت در ویژگی‌های ساختاری داربست‌های زیستی توضیح داده شد. اشاره شد که این ویژگی از اهمیت به‌سزایی برخوردار است. حالتی که پلیمر به‌کار رفته از نظر کلیه موارد مناسب بافت هدف باشد ولی مثل داربست‌های خونی قابل تزریق نباشد، محققین خطر عمل جراحی را در نظر گرفته و از این داربست که قابل تزریق به محل لانه‌گزینی نیست، استفاده می‌کنند.

۲. از لحاظ ساختمان:

۲,۱. ساده (Simple)

۲,۲. پیچیده (Complex)

در داربست‌هایی با ساختمان ساده تنها یک نوع پلیمر وجود دارد، ولی در داربست‌های پیچیده از چندین پلیمر استفاده می‌شود. حالتی از این داربست می‌تواند به‌صورت مخلوطی از چند پلیمر محلول باشد که به فرم مورد نظر قالب‌گیری شده‌اند. در حالت دیگر دو یا تعداد بیشتری پلیمرهای زیستی به فرم فیبر تهیه شده و سپس این الیاف را به‌صورت بافته شده در کنار یکدیگر قرار می‌دهند. همچنین داربست پیچیده می‌تواند تنها یک پلیمر باشد ولی تیمارهای مختلف با انواع نمک‌ها، مواد آلی و معدنی روی سطح آن انجام شود به‌طوری که داربست از فرم ساده در آمده و پیچیدگی یک بافت و ماتریکس طبیعی را به خود بگیرد.

۳. از لحاظ منشا

۳,۱. زیستی و طبیعی

۳,۲. سنتزی [۳۶]

در پلیمرهای زیستی و طبیعی چسبندگی سلول‌ها کارآمدتر است و در داربست‌های سنتزی می‌توان راحت‌تر ویژگی‌های مکانیکی و شدت تخریب پذیری را کنترل کرد [۳۷]. ویژگی‌های مکانیکی داربست اهمیت به‌سزایی دارد زیرا کشت روی داربست منجر به افزایش و تکثیر سلول‌ها به‌ویژه سلول‌های بنیادی می‌شود [۲۱]. باید گفت عمل تقسیم و تمایز سلول‌های بنیادی روی داربست وابسته به خواص فیزیکی داربست است. به‌طور کلی داربست‌ها را براساس منشا به دو گروه کلی طبیعی و سنتزی دسته‌بندی می‌کنند.

پلیمرهای طبیعی

- پلیمرهایی که از استخراج بافتی به‌دست می‌آید. در این حالت سلول‌های بافت هدف حذف شده و عصاره بافتی حاصل به‌عنوان داربست به‌کار برده می‌شود.
- پلیمرهایی که به‌صورت مستقیم از ماتریکس خارج سلولی جداسازی و مشتق می‌شود.
- داربست‌هایی با ساختار پروتئینی مانند کلاژن [۳۸] و فیبرین [۳۹].
- مواد پلی ساکارید و قندی مانند آلژینات، چیتوزان [۴۲-۴۰] و گلیکوزامینوگلیکان. ازآلژینات برای انتقال به موقع و اختصاصی داروی ملوکسی کام (Meloxicam) استفاده می‌شود [۴۳] که این دارو ضد التهاب و استروییدی است. این مواد پلی ساکاریدی سازگاری لازم را با بدن و بافت زنده داشته ولی گاهی نیز برای بدن خاصیت ایمنی‌زایی به همراه دارد.
- برای افزایش پایداری پلیمرهای پلی‌ساکاریدی از ترکیب گلیکوزامینوگلیکان و هیالورونیک اسید [٤٤] استفاده می‌شود و در این بین از موادی مثل گلوتارالدیید، کربودی‌آمید برای برقراری اتصالات عرضی استفاده می‌شود.

پلیمرهای سنتزی

این پلیمرها سازگار با بدن، قابل تجزیه و قابل جذب است. اداره کل غذا و دارو(FDA: Food And Drug Administration) این مواد را تأیید کرده و حتی آن‌ها را تهیه می‌نماید. این پلیمرها

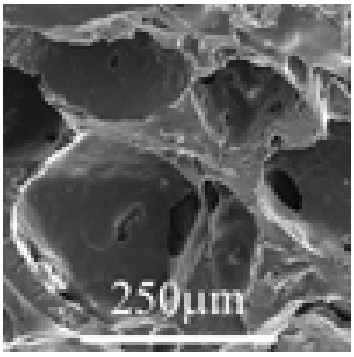
به‌راحتی به ماتریکس‌های سه بعدی با ساختارهای متنوع تبدیل می‌شود. پلیمرهای سنتزی که برای مهندسی بافت به‌کار می‌رود شامل پلی‌آلفا هیدروکسی استرها که پلی‌استرهای آلیفاتیک است، پلی آنهیدرید و پلی اورتواسترها است [٤٥]. پلی آلفا هیدروکسی استرها انواع مختلفی دارد [٤٦]:

۱) پلی گلیکولیک اسید (polyglycolic acid - PGA)

۲) پلی لاکتیک اسید (polylactic acid - PLA)

محصول‌های زیستی از نوع مونومری گلیکولیک اسید و لاکتیک اسید در بدن انسان به‌صورت طبیعی در مسیرهای متابولیک تولید و سپس حذف می‌شود. در حالت داربست همین مواد را به‌صورت پلیمر تهیه می‌کنند. تفاوت این دو در شدت تخریب‌پذیری آن‌هاست به‌طوری که پلی‌گلیکولید سریع‌تر از پلی‌لاکتید تجزیه می‌شود [٤٧].

۳) کوپلیمر لاکتیک اسید و گلیکولیک اسید PLGA(شکل ٤)



شکل ٤. ساختمان متخلخل PLGA [٤٨]

می‌توان رفتار و میزان تخریب‌پذیری کوپلیمر PLGA را کنترل کرد. همچنین می‌توان ویژگی‌های مکانیکی آن را براساس بافت مورد نظر تنظیم نمود. این ویژگی مزیت اصلی این پلیمر و دلیل کاربرد آن در پزشکی است.

٤) پلی کاپرولاکتون PCL [٣٤، ٤٩و٥٠]

از این داربست برای تمایز سلول‌های بنیادی سوماتیک غیر محدود شده Unrestricted Somatic Stem Cells به سلول‌های کبدی استفاده شده است[٥١].

کاربردهای داربست

داربست‌های زیستی کاربردهای متنوع در کشت بافت دارد [٥٢] به‌طور عمده در بازسازی استخوان، غضروف، پوست، ماهیچه و سایر اندام‌های بدن استفاده شده یا با موفقیت در دست تحقیق است. به‌منظور ترمیم مؤثر و سریع در منطقه آسیب دیده، داربست‌ها به همراه بذر سلول‌های مناسب به‌کار می‌رود بدین ترتیب رشد بافت جدید را افزایش می‌دهد. خود این داربست نیز در طول زمان کاشت، تجزیه شده و توسط بافت‌های اطراف جذب می‌شود [٥]. دربحث سلول‌های بنیادی، داربست‌ها بر قدرت چسبندگی، تکثیر و تمایز اثر می‌گذارد و حتی قادر به افزایش سلول‌ها در زیر شرایط ایده آل است [٩]. برای تکثیر سلول‌های بنیادی خون‌ساز و به منظور شبیه‌سازی حالت سه‌بعدی میکرومحیط سلول‌های بنیادی از داربست‌های مشتق شده از مغز استخوان به همراه پوششی از سلول‌های استرومال خون بند ناف استفاده شده است [٥٣]. در این حالت می‌توان فاکتورهای مختلف را روی این محیط اضافه کرده و باعث تمایز یا عدم تمایز سلول‌های بنیادی شد و شبیه‌سازی برای حالت *in vivo* را انجام داد [٥٤]. داربست‌ها برای کاشت سلول‌های حساس به گرما ایده آل است[٥٥]. همچنین به‌عنوان ابزاری برای siRNA delivery[٥٦] و MicroRNA [٥٧] به‌کار می‌رود. دسته ای ازداربست‌ها برای انتقال دارو [٥٨-٥٩] و DNA [٦٠-٦٢] استفاده می‌شود. دسته دیگری از داربست‌ها نیز برای رهاسازی فاکتورهای رشد در محل مورد نظر به‌کار می‌رود. این دسته از داربست‌ها به دلایل مختلفی استفاده می‌شود:

۱) برای آنژیوژنز و رگ زایی: برای این منظور فاکتورهای رشد مانند فاکتور رشد اندوتلیال عروقی (VEGF) توسط میکروسفرهای PLGA دربرگرفته می‌شود[٤٢].

۲) برای ترمیم غضروف و استخوان از فاکتور رشد

TGF_β [٦٣] یا از پروتئین مورفوژنز استخوان (BMP)[٦٤] استفاده می‌کنند.

۳) برای ترمیم زخم، کلاژن به همراه TGF_β و فاکتور رشد فیبروبلاست (FGF) به‌کار برده می‌شود[٦٥-٦٦].

٤) در ترمیم کبد از فاکتورهای رشدی که برای بقا و تکثیر سلول‌های کبدی لازم است (EGF و HGF) استفاده می‌شود [٦٦].

٥) در مهندسی بافت عصبی: برای این منظور از داربست‌های مشتق شده از ماتریکس خارج سلولی استفاده می‌شود. برای مثال داربست فیبرونکتین که فاکتور رشد عصب (NGF) را ترشح می‌کند [٦٧] یا ژل‌های فیبرین که نوروتروفین ۳ (NT_3) را در محیط رها می‌کند[٦٨]. ژل‌های فیبرین هپارین‌دار که به همراه NGF باشد نیز برای ترمیم بافت عصبی به‌کار می‌رود [٦٩]. داربست دیگری که در این گروه جای می‌گیرد از لوله‌های کلاژنی به همراه فاکتور نوروتروفیک مغزی (BDNF) تشکیل شده است[٧٠].

مزایای داربست

یکی از مزیت‌های اصلی مهندسی بافت، کشت سلول‌های وابسته به شرایط سه‌بعدی است به طوری که این حالت سه بعدی تنها در ارگان و بافتی که از آن منشا گرفته اند موجود است بنابراین این سلول‌ها در کشت دو بعدی نمی‌توانند جهت‌گیری مناسب و سه بعدی را به‌دست آورند. در این حالت این سلول‌ها به‌صورت تصادفی مهاجرت کرده و لایه دوبعدی را به وجود می‌آورند. بدین ترتیب این سلول‌ها به سمت مسیرهای نادرستی که برای هدف کشت بافت نامناسب هستند، هدایت می‌شوند. بنابراین برای بهتر شدن اتصال و کلونی زایی سلول‌ها و نیز افزایش کارایی کشت، نیاز به کشت سه‌بعدی است. کشت سه‌بعدی یا همان کشت روی داربست، دارای مزایای دیگری نیز هست:

۱. دراین نوع کشت مورفولوژی سلول‌ها شبیه *in vivo* است.

۲. برهمکنش بین سلولی بهتر انجام می‌شود.

۳. از لحاظ بیولوژی و عملکرد بسیار شبیه به حالت واقعی است درنتیجه می‌توان رفتار سلول‌ها را در این نوع کشت ارزیابی و بررسی کرده و آن را به حالت *in vivo* تعمیم داد.

اهمیت استفاده از داربست‌ها در بهینه سازی، بازسازی و ترمیم بافت هدف است به‌طوری که سلول‌های اولیه کاشته شده روی داربست شروع به تقسیم کرده و ناحیه لانه‌گزینی را پر می‌کنند. فاکتورهای اتصالی که داخل محیط داربست تجمع پیدا می‌کند اتصال و مهاجرت سلول‌ها را افزایش داده و در نتیجه مدت زمان بازسازی و طول دوره را کاهش می‌دهد. کنترل دقیق روی ساختار داربست باعث به حداقل رساندن عوامل جانبی مانند التهاب و تخریب‌های آنزیمی زود هنگام می‌شود. به دلیل خاصیت تخریب‌پذیری این مواد، دیگر نیازی به حذف آن‌ها در بیماران پیوند یافته نیست. این حذف می‌بایست با انجام یک عمل جراحی مجدد در بیمار صورت گیرد که با استفاده از این مواد تخریب پذیر عمل جراحی ثانویه برطرف شده و باعث راحتی بیشتر بیمار و کاهش هزینه می‌شود [٥]. این داربست‌ها برای بدن سمی‌نبوده و منجر به پاسخ ایمنی در بدن فرد پذیرنده نمی‌شود و با بافت زنده سازگار است [٧١].

محدودیت‌های داربست

محدودیت‌های داربست به چند حالت دسته‌بندی می‌شود:

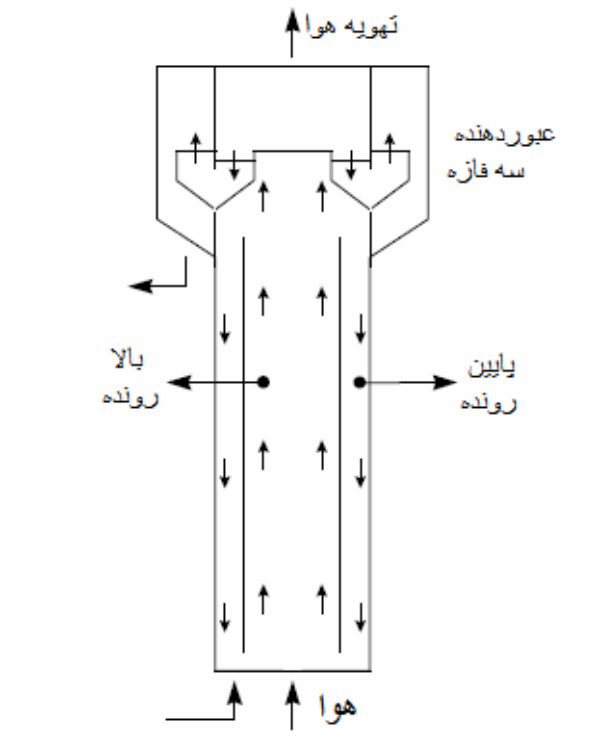
بخش اعظم محدودیت‌های داربست‌های زیستی وابسته به خواص مواد تشکیل دهنده آن‌ها است. مواد مختلف در استحکام، سرعت تخریب‌پذیری و سایر عوامل متفاوت است، بنابراین با توجه به هدف، باید جنس داربست به درستی انتخاب شود. برای مثال اگر داربستی از لحاظ پارامتر استحکام در ترمیم استحوان مناسب باشد ولی دوره تجزیه آن بیش از زمان مورد نظر ما به طول انجامد، داربست نامناسبی است.

بنابراین پارامترها باید بهینه‌سازی شود تا بهترین کارایی برای ترمیم بافتی را داشته باشد [۵]. به‌منظور ترمیم استخوان و دندان روی داربست‌های معدنی از بافت مغز استخوان به همراه سولفات کلسیم کار شده است [۷۲].

محدودیت در اندازه برای داربست‌ها به دو صورت بیان می‌شود: الف) محدودیت در اندازه کلی داربست: به‌طوری که در محل لانه‌گزینی خود در بافت هدف، جایگزین شده و بیش از حد بزرگ یا کوچک نباشد. ب) محدودیت در اندازه حفرات و منافذ داربست: به‌طوری که سلول‌ها قادر به مهاجرت بوده و سیستم تغذیه و اکسیژن رسانی برقرار باشد.

اکسیژن‌رسانی و تغذیه سلول‌ها در مراحل اولیه با رعایت محدودیت در اندازه رفع می‌شود اما پس از مدتی مسئله دیگری تحت عنوان عمق نفوذ سلولی (Dp: Penetration Depth) مطرح می‌شود. سلول‌های اولیه پس از کاشت روی داربست، شروع به تکثیر و مهاجرت روی داربست می‌کند ولی پس از مدتی کلونی‌زایی و ترشح ماتریکس خارج سلولی به وسیله این سلول‌ها آغاز می‌شود. در این مدت سلول‌ها نیاز به اکسیژن و مواد غذایی دارند و زمانی که در سطح قرار گیرند این نیاز به‌راحتی برآورده می‌شود. ولی پس از مدتی که سلول‌ها به داخل داربست مهاجرت کرده و وارد نواحی عمیق‌تر می‌شوند، دچار کمبود مواد غذایی و اکسیژن می‌شوند. سلول‌ها تنها قادرند ۵۰۰ میکرومتر از سطح فاصله بگیرند [۴۹, ۷۳]. نفوذ بیشتر سلول‌ها به داخل داربست منجر به مرگ آنان می‌شود [۷٤] .به‌دلیل پوشیده شدن سطح داربست با لایه‌ای از سلول های اولیه، نفوذ اکسیژن و مواد غذایی به عمق داربست تنها با کمک انتشار صورت می گیرد. عمق نفوذ سلولی، عمقی است که تا آن عمق سلول‌ها توانسته‌اند تنها با انتشار، مواد مورد نیاز خود را به‌دست آورده و زنده بمانند، بنابراین از این عمیق‌تر قادر به رشد نیستند. در داربست‌هایی که با کمک سیستم‌های مرسوم ساخته شده‌است این محدودیت وجود دارد زیرا قطر این داربست ها بسیار زیاد بوده و سلول های داخلی تر از بین می رود. بنابراین برای کار با داربست نیاز به سیستم عروقی مصنوعی است که این سیستم باید قادر به رساندن اکسیژن و مواد غذایی به سلول و نیز حذف مواد مصرفی باشد. البته باید اشاره کرد که در این سیستم نسل جدید داربست های CAD و SFF وجود دارد.

به‌طور کلی داربست‌های مهندسی بافت برای کشت سه‌بعدی در مقیاس کم به‌کار برده می‌شود و این محدودیت برای آن‌ها وجود دارد. حال آنکه برای مقیاس بزرگ (Large Scale) از بیوراکتورها (Bireactor) استفاده می‌شود که نیاز به کشت سه بعدی در حجم بالا و در *in vitro* را برطرف می‌کند.

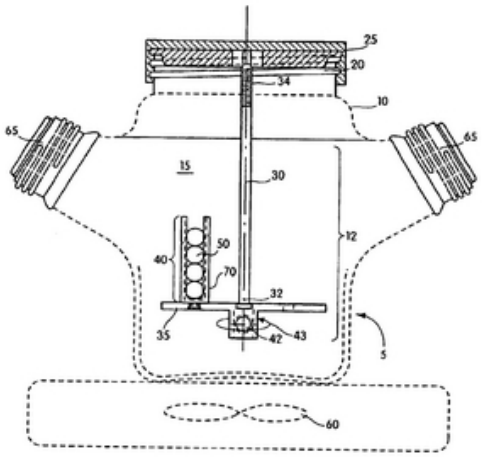


شکل ۵. تصویر کلی از Air lift Bioreactor [۷۵]

بیوراکتورها در کشت سه‌بعدی

زمانی که نیاز به حجم انبوهی از یک محصول باشد

فرمانتور و بیوراکتورها مطرح می‌شوند. در تولید پروتئین و به‌ویژه آنتی‌بادی نیاز به چند کیلوگرم از محصول خالص است که فرمانتورهای دو هزار لیتری (Air-lift Bioreactor) برای شرکت‌های تجاری تهیه شده است (شکل ۵) که بذر اولیه برای این فرمانتورها در حدود یک کیلوگرم و محصول نهایی طی روند ۱۵ روزه ٤ کیلوگرم است. باید گفت برای به‌دست آوردن محصولی مانند آنتی‌بادی در روش *in vivo* از میزبان حیوانی (موش) استفاده می‌شود ولی مسایل اخلاقی در این بخش مطرح است و راه را به سمت استفاده بیشتر از کشت سه‌بعدی در بیوراکتورها باز کرده است. در این حالت جدا از حذف مسایل اخلاقی، نیاز به نگهداری از حیوان و صرف هزینه انسانی نیست و محصول در مرحله پایین دست (Down Stream) به‌طور خالص به‌دست می‌آید و هزینه برای این مراحل در بخش صنعت حذف می‌شود. در راکتورهای زیستی نوع سلول دست‌ورزی شده مهم است. اگر سلول معلق باشد شرایط کشت آن ساده است و همواره سلول‌ها در حالت سه‌بعدی هستند. سیستم تغذیه و اکسیژن رسانی به‌طور الکترونیکی در هر لحظه بررسی شده و کنترل می‌شود. سلول‌های چسبنده باید روی سطحی تثبیت شوند به‌طوری که این سطح اثر مکانیکی چرخش مواد در راکتور را کاهش داده و باعث افزایش نسبت سطح به حجم شود. این سطوح به‌صورت دیسک‌های سلولزی متخلخل و حالتی از داربست‌های قابل تجزیه است. این دیسک‌ها به‌عنوان حامل عمل می‌کنند و سلول‌ها در آن‌ها به دام می‌افتند. با گردش مواد در اطراف، این دیسک‌ها نیز در محیط راکتور به چرخش در می‌آید و بدین طریق مواد غذایی در اطراف آن‌ها بهتر در گردش بوده و سیستم گردش سه‌بعدی برقرار می‌شود. حالت دیگر استفاده از فیبرهای بلند سلولزی است که سلول‌ها در داخل آن‌ها کشت داده می‌شوند. چندین عدد از این فیبرها در کنار هم قرار گرفته و یک هولوفیبر (Hollow Fiber) را ایجاد می‌کند. در این حالت مواد غذایی از یک سمت این محفظه فیبری وارد و از سمت دیگر خارج می‌شود. برای عدم ادغام مواد تولیدی و زاید در راکتورها، از غشاهای نیمه تراوا (Membrane Base Reactor) استفاده می‌کنند؛ بدین ترتیب که در مرحله بالایی (Up Stream) مواد خام وارد راکتور شده، در مرحله میانی (Middle Stream) پردازش شده و در مرحله پایین دست محصول خالص به‌دست می‌آید. برای گردش مواد در اطراف سلول می‌توان از همزن استفاده کرد مانند spinner flasks (شکل ٦) یا مانند roller bottles (شکل ۷) از چرخش خود محفظه اصلی استفاده کرد. البته شرایط در راکتور می‌تواند ثابت (Static Culture) باشد؛ به‌طوری که در طول فرآیند مواد غذایی و زاید، وارد و خارج نشود. بدین ترتیب سیستم به‌صورت بسته است (Batch System) یا راکتور می‌تواند در حالت پویا و دینامیک (Dynamic Culture) باشد. این سیستم پویا با ورود مواد به داخل راکتور و نیز خروج مواد از راکتور در ارتباط است.



شکل ٦. تصویری از spinner flasks [۷٦].

شکل ۷. تصویری از roller bottles [۷۷]

بهینه‌سازی استفاده از داربست‌ها

برای افزایش کارایی و بهینه‌سازی عملکرد داربست روی سطح آن تیمارهایی انجام می‌شود. با کمک این تغییرات امکان تکثیر و نفوذ سلول ها بیشتر می‌شود. خواص سطحی داربست یعنی آب‌گریز یا آب‌دوست بودن آن، ناشی از ترکیب شیمیایی موجود در داربست است. این خواص ممکن است برای القای قدرت چسبندگی سلول به صورت انتخابی و نیز برای مهاجرت و تکثیر سلول ها یا حتی رهاسازی فاکتورهای رشد از داربست مناسب نباشد [۷۸]. فعال شدن سطح داربست با جذب فیزیکی یا تغییرات شیمیایی همراه است. گاهی برای افزایش اتصال سلول‌ها به سطح داربست موادی مانند پلی-ال- لیزین، کلاژن، پروتئین‌های چسبنده سطح سلول (فیبرونکتین، لامینین، ویترونکتین) را به سطح ماتریکس پلیمری متصل می کند[۷۹-۸۰]. از پلی- ال- لیزین برای کشت سلول های غضروفی استفاده شده است[۸۱]. به‌منظور متعادل نمودن برهم‌کنش سلول و ماتریکس و نیز پایدار نگه داشتن لایه سلولی روی داربست از مولکول های زیستی فعال استفاده می‌شود. این مولکول‌ها را می‌توان با پیوند کوالانسی به سطح داربست متصل کرد و سپس سلول‌ها با گیرنده‌های سطحی خود این مولکول‌ها را شناسایی و با کمک آن‌ها روی داربست جایگیری کنند. این مولکول‌ها می‌توانند ماکرومولکول های مشتق از مواد طبیعی مانند کلاژن، ژلاتین، هپارین، هیالورونیک اسید یا پپتید های کوچک حاصل از

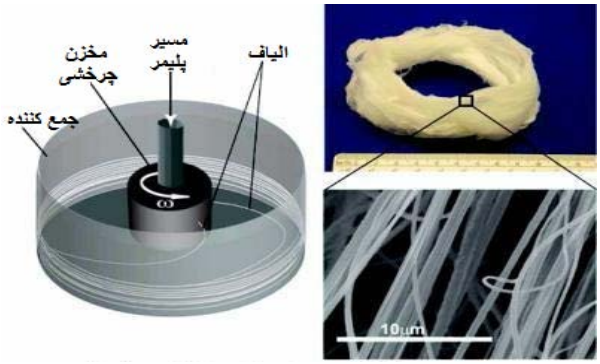
پروتئین‌های اتصالی سلول مانند تری پپتید آرژینین- گلایسین- آسپارتیک اسید یا حتی مواد قندی مانند گالاکتوز و لاکتوز باشند [۷۸, ۸۲].

ساخت داربست بر اساس روش‌های مرسوم

با استفاده از روش‌های مرسوم ساخت داربست (Conventional Scaffold Fabrication Techniques)، ساختارهای متخلخل پیوسته به‌دست می‌آید. این روش‌ها به‌طور کلی در هشت گروه جای می‌گیرند و هر یک دارای مزایا و معایبی هستند که به آن‌ها اشاره خواهد شد:

۱- روش خود تجمعی (Self-Assembly Method)

خود تجمعی مولکولی یکی از روش‌هایی است که برای ساخت داربست‌های زیستی به‌کار می‌رود. در این روش از ذراتی استفاده می‌شود که تمامی آن‌ها از لحاظ ویژگی‌های فیزیکی مانند اندازه و نیز ویژگی‌های شیمیایی مشابه‌اند. برای این روش نانوذرات کاندیدای مناسبی است. در مهندسی معکوس و با حرکت از جزء به کل، شاهد کنار هم قرار گرفتن این ذرات هستیم. با این تجمع، ساختارهای متخلخل به‌دست می‌آید. در اینجا نیز ساختارها برمبنای ماتریکس خارج سلولی است. برای تجمع نانوفیبرها حتی می‌توان از ماشین چرخنده (روتور) استفاده نمود (شکل ۸). در این حالت با حرکت دورانی و سریع محفظه، الیاف روی هم فشرده و جمع می‌شوند. باید گفت داربست‌های نانو الیاف زیست سازگار است ولی برای مثال نانوتیوب‌های کربنی تخریب ناپذیر است و بدین ترتیب تجزیه نمی‌شود و حتی در شرایطی سمیت زاست. با این وجود در مهندسی بافت از این نوع داربست‌ها بسیار استفاده می‌شود زیرا که استفاده از آنان بسیار راحت بوده، به اندازه و شکل‌های مختلف قابل تبدیل است، تهیه این داربست‌ها آسان و کم هزینه است و در کل بسیار پر کاربرد است[٤٧].



شکل ۸. استفاده از روتور برای تجمع نانوالیاف [۸۳]

۲- اتصال رشته‌ای (Fiber Bonding)

در حالت اتصال رشته‌ای، ساختمان متخلخل داربست با اتصال الیاف به یکدیگر به‌وجود می‌آید به طوری که در نقطه تقاطعی الیاف، حفرات داربست شکل می‌گیرند. این روش ساخت نوعی ازتکنولوژی نساجی است که مواد اولیه آن شبکه‌ای غیر بافته شده از پلیمرهای تخریب پذیر است. از پلیمرهای PGA و PLA در این روش استفاده شده است [۸٤]. پایداری داربست در این نوع روش کم است بنابراین با کاشت سلول‌ها روی آن تغییر شکل داربست مشاهده می‌شود. به همین دلیل برای افزایش ویژگی‌های مکانیکی داربست تیمارهایی روی داربست‌ها انجام داده‌اند [۸۵]. در این حالت پلیمر PLA را در کلرید متیلن حل کرده و سپس به محلول حاصل الیاف PGA را اضافه کردند. سپس دمای محلول را کاهش داده و فرم منجمد از این دو پلیمر حاصل شد. پس از آن PLA را با حل مجدد در کلرید متیلن از محیط حذف می‌نمایند. در نهایت شبکه PGA به‌صورت داربستی از الیاف به هم بافته شده حاصل می‌شود [۸٦].

۳- فروشویی ذره‌ای و قالب‌گیری حلال Solvent Casting & Particulate Leaching (SCPL)

این روش راحت‌ترین روش برای تهیه داربست‌های متخلخل است [۸۷]. در این حالت پلیمر در حلال آلی مناسب حل می‌شود (PLA در دی کلرومتان) سپس محلول حاصل در قالب‌هایی ریخته می‌شود که این قالب‌ها با ذرات پروژن (Porogen Particles) پر شده‌اند [٤۷].

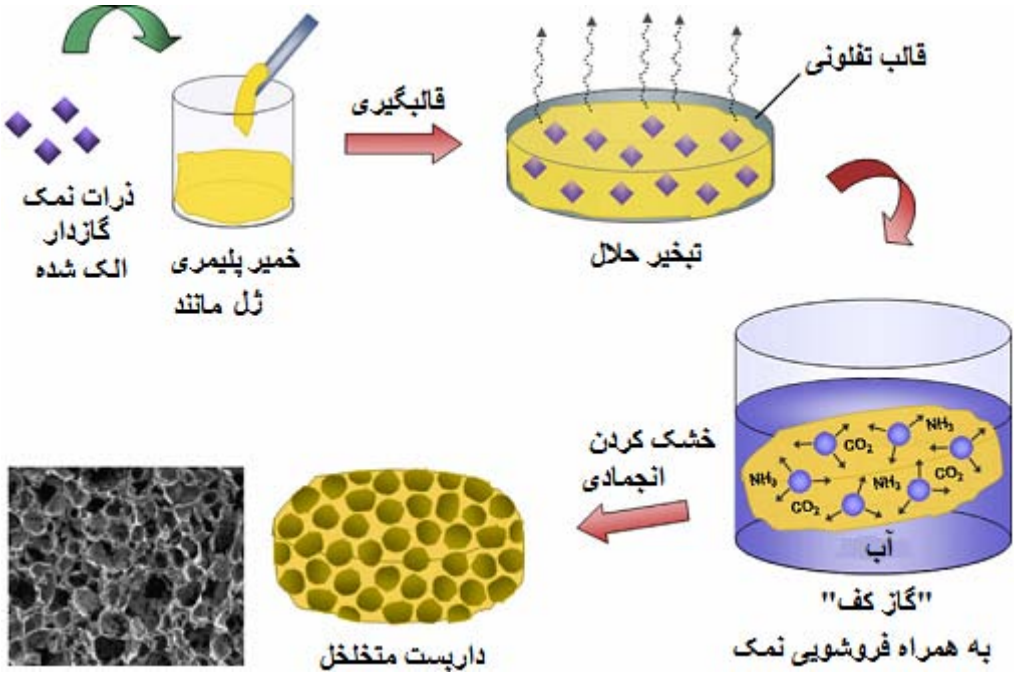
ذرات پروژن می‌تواند مواد متفاوتی از جمله نمک غیر آلی مانند سدیم کلرید، کریستال‌های ساکارز و یا ذرات ژلاتین و پارافین باشد. اندازه این ذرات پروژن، اندازه حفرات داربست‌ها را تعیین می‌کند. نسبت مخلوط کردن ذرات پروژن با مقدار پلیمر میزان تخلخل در داربست را نشان می‌دهد به‌طوری که در یک حجم مشخص از پلیمر هر چه تعداد این ذرات بیشتر باشد تخلخل آن داربست بیشتر است [۸۷-۸۸].

در مرحله بعد به پلیمر درون قالب زمان داده می‌شود تا حلال آلی تبخیر شود سپس پلیمر که شکل قالب را به خود گرفته است از قالب خارج کرده و در حلال دیگری غوطه‌ور می‌کنند. این حلال بسته به نوع ذره پروژن به‌کار رفته متفاوت است؛ برای مثال آب برای سدیم کلرید و ساکارز کریستاله، و نیز ژلاتین و هگزان برای پارافین استفاده می‌شود. با کمک این حلال ذرات پروژن نیز شسته شده و تنها داربست متخلخل باقی می‌ماند. مشکل این روش این است که حلال آلی باید به‌طور کامل تبخیر شود و همچنین ذرات پروژن نیز باید به طور کامل شسته شود. باقی ماندن این ذرات نمک و پروژن برای کاشت سلول‌ها نامناسب است و حذف آنان الزامی است [۸۹].

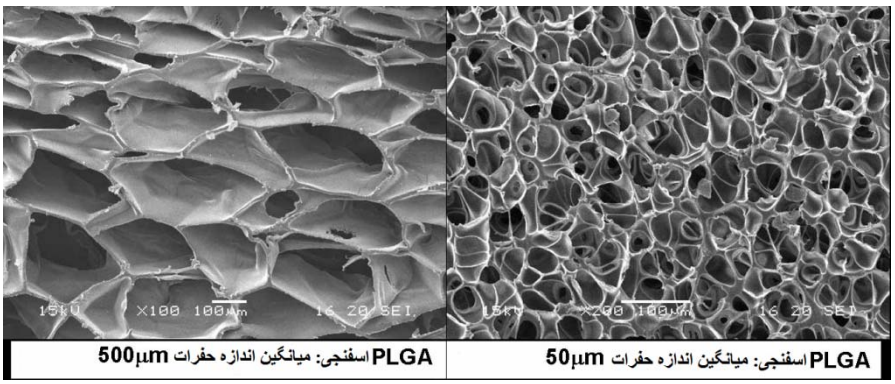
۴- گازکف (Gas Foaming)

دراین روش از گاز دی‌اکسید کربن با فشار بالا برای ایجاد حفره در داربست استفاده می‌شود. به‌طوری که پلیمر را روی صفحات مشبکی قرار داده و برای چند روز در معرض گاز دی‌اکسید کربن (CO_2) با فشار بالا قرار می‌دهند. در این حالت پلیمر با این گاز اشباع می‌شود. سپس فشار روی داربست را کم می‌کنند و به سطح فشار اتمسفر می‌رسانند. به این ترتیب حلالیت گاز در پلیمر کاهش یافته و گاز از پلیمر خارج می‌شود. با خروج گاز حفرات در داربست شکل

می‌گیرد (شکل ۹). در این روش نیازی به حلال آلی نیست و نیز فرایند گرمادهی وجود ندارد؛ بنابراین برای موادی که به حرارت حساس‌اند از این روش استفاده می‌شود [۹۰]. برای کارآمدتر کردن این روش از ذرات نمک استفاده کردند؛ به خمیر یا ژل پلیمر، ذرات نمک بیکربنات آمونیم اضافه می‌کنند که با غوطه‌ور کردن پلیمر حاصل در آب، این نمک به آمونیاک و گاز دی‌اکسید کربن تبدیل می‌شود. گاز دی اکسید کربن خارج شده و آمونیاک نیز شسته می‌شود و در نهایت پلیمر متخلخل به‌دست می‌آید [۹۱].



شکل ۹. روند ساخت داربست متخلخل براساس روش گاز کف[۳۵]



شکل ۱۰. PLGA ساخته شده بر اساس روش گاز کف[۹۲]

۵- امولسیون یخ خشک (Emulsification Freeze-Drying)

دراین روش ابتدا پلیمرهای تخریب‌پذیر در حلال مناسب حل می‌شودد. برای مثال PLA یا PGA به‌ترتیب در حلال‌های آلی مناسب یعنی دی‌کلرومتان وکلرید متیلن و کلاژن در حلال اسیدی یعنی استیک اسید یا هیدروکلریک اسید حل و سپس به محلول حاصل آب اضافه می‌شود. در این حالت امولسیونی از آب و روغن به‌دست می‌آید که این مخلوط را به‌هم زده و در قالب می‌ریزند و بدین ترتیب اجازه جداشدن دو فاز را نمی‌دهند

و ذرات آب در داخل مخلوط پراکنده و فاز آلی به صورت پیوسته است. قالب را در نیتروژن مایع می‌گذارند تا منجمد شود و سپس با روش خشک کردن یخ (Freeze-Dried)، آب و حلال آلی از محیط حذف می‌شود. با خروج این مواد در داخل پلیمر حفرات ایجاد می‌شود. با این روش داربست‌هایی با تخلخل بالای ۹۵ درصد و اندازه حفرات ۲۰۰ میکرومتر به‌دست آمده است [۹۳]. در روش ژل شدن انجمادی (Freeze-Gelation) پلیمرها در حلال مورد نظر حل می‌شود و پس از آن وزن‌های معینی از ژلاتین در دمای ۵۰ درجه با کمک هم زن مغناطیسی به محلول اضافه می‌شود. این محلول را در دمای ۲۰- درجه منجمد می‌کنند. در اثر کاهش دما محلول‌ها دچار جدایش فازی شده و شکل‌گیری صورت می‌گیرد. در نهایت محلول‌های منجمد را در هیدروکسید سدیم و اتانول قرار می‌دهند تا فرایند ژل شدن محلول‌ها انجام شود. در آخر نیز با انتقال این ژل‌ها به دستگاه دسیکاتور و خشک کردن آن‌ها در دمای محیط داربست مورد نظر به‌دست می‌آید. با این روش داربست جدید و متخلخل چیتوزان- ژلاتین- تری فسفات کلسیم برای کشت سلول‌های کندروسیت ساخته شده است [۹٤].

۶- روش حرارتی ناشی از جداسازی فاز
Thermally Induced Phase Separation (TIPS)

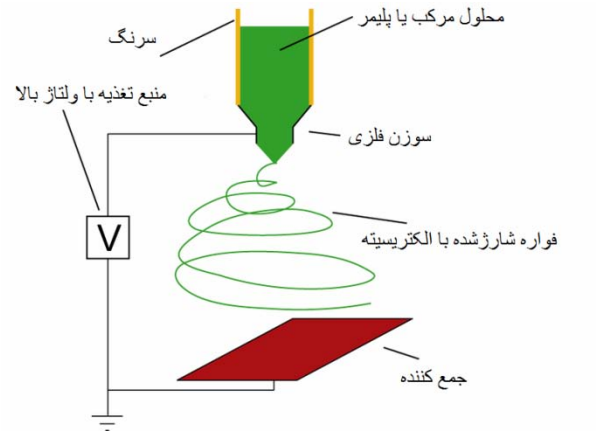
این روش نیز مانند روش قبل براساس جداسازی دو فاز است. در این فرآیند به حلال با نقطه ذوب پایین نیاز است [۹۵-۹٦] تا این حلال به سرعت تصعید شود. برای مثال پلیمر PLA درحلال دی اگزان حل می‌شود، سپس برای ایجاد دو فاز به این محلول مقداری آب اضافه می‌کنند. در این حالت دو فاز تشکیل می‌شود، در یک فاز پلیمر به مقدار زیاد و در یک فاز پلیمر به مقدار کمتری وجود دارد. پس از آن دمای این مخلوط را به زیر دمای ذوب حلال می‌رسانند که منجر به تشکیل دو فاز جامد می‌شود. بعد از چند روز با خشک کردن در خلأ، حلال تصعید شده و در نهایت داربست متخلخل حاصل می‌شود. این تکنیک مبنی بر جداسازی و مخلوط نشدن فازها با کمک خواص ترمودینامیکی است. در این روش منافذ ۱ تا ۱۰ میکرومتر بوده و در ارتباط با یکدیگر نیستند [۹۷]. باید گفت داربستی که از این روش به‌دست می‌آید دارای تخلخل بالای ۹۰درصد است و برای افزایش مورفولوژی اسفنجی شکل می‌توان به محلول پلیمری سورفکتانت یا مولکول‌های فعال از لحاظ بیولوژیکی مانند آلکالین فسفاتاز اضافه کرد [۹۸].

۷- قالب‌گیری گداز (Melt Moulding)

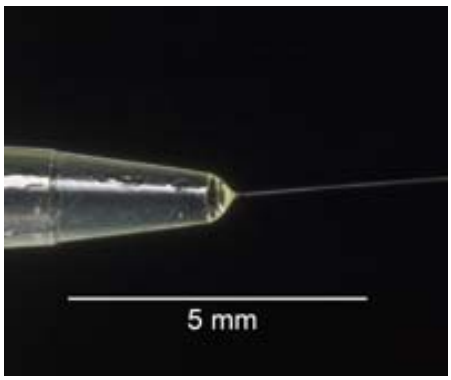
در این پروسه قالب تفلون را با پودر PLGA و میکروسفرهای ژلاتین پر می‌کنند. این میکروسفرها در اندازه‌های مشخص ساخته شده و بسته به کاربرد داربست هدف استفاده می‌شود. اندازه این میکروسفرها اندازه خلل و فرج داربست را تعیین می‌کند. پس از پر کردن قالب، دمای آن را افزایش می‌دهند در حالی که روی مخلوط فشار زیادی را إعمال می‌کنند [۹۹]. با این روش ذرات PLGA در هم فرو رفته و به یکدیگر متصل می‌شود. پس ازآن، قالب تفلون را برداشته و داربست حاصل را در آب غوطه ور می‌کنند و با این کار ذرات ژلاتین شسته شده و از داربست حذف می‌شود. در نهایت ساختار متخلخل PLGA به‌دست می‌آید که این داربست شکل قالب را به خود می‌گیرد و می‌توان در اندازه‌های مختلف آن را به‌دست آورد [۱۰۰].

۸- الکتروریسی (Electrospinning)

روش ریسندگی الکتریکی (شکل ۱۱) پرکاربردترین روش ساخت داربست‌ها است. این روش بسیار ساده بوده و در سطح آزمایشگاه نیز می‌توان آن را انجام داد. در این روش از یک سرنگ، یک صفحه جمع‌کننده به همراه ولتاژ ۱۰تا۲۰ کیلوولت استفاده می‌شود. در این روش پلیمر به صورت محلول یا مذاب داخل سرنگ ریخته می‌شود. باید گفت در ریسندگی الکتریکی محدودیت برای نوع پلیمر وجود ندارد و برای انواع پلیمرها به‌کار برده می‌شود و بدین ترتیب بسیار متنوع است. این تنوع به محققین کمک می‌کند تا بر اساس هدف مورد نظر خود بستر مناسب را به‌کار برند؛ برای مثال روی نانو الیاف پلی‌اتر سولفون که با این روش تهیه شده‌است در زمینه سلول‌های بنیادی کارشده است [۱۰۱].



شکل ۱۱. تصویر شماتیک از الکتروریسی [۱۰۲]



شکل ۱۲. تصویری از سرنگ الکتروریسی در حالی که پلیمر از آن خارج می‌شود [۱۰۳]

با استفاده از نیروی گرانش، فشار مکانیکی سرنگ (شکل۱۲) و میدان الکتریکی با ولتاژ بالا پلیمر از سرنگ خارج می‌شود. سطح هر پلیمر به‌طور طبیعی دارای بار است در نتیجه قطب‌های این میدان الکتریکی در هر لحظه به سطح پلیمر مورد نظر دافعه یا جاذبه دارد. نیروی الکتریکی ایجاد شده بر کشش سطحی قطره محلول پلیمری غلبه کرده و پلیمر به حالت فواره نازکی از نوک سرنگ و نازل، خارج می‌شود. همزمان حلال نیز تبخیر شده و تنها پلیمر که به‌صورت نانوفیبر جامدی است از نازل به‌طور پیوسته خارج می‌شود. برای مثال پلیمری را تصور کنید که دارای بار مثبت است. در هر لحظه قطب مخالف، پلیمر را جذب و قطب هم‌نام آن را دفع می‌کند پس در این حالت پلیمر به سمت قطب منفی رفته و روی صفحه جمع کننده قرار می‌گیرد و با

جابه‌جایی قطب‌ها با کمک ولتاژ به‌کار رفته این بار جای قطب منفی در سمت دیگر صفحه جمع کننده است. بنابراین ادامه نانو رشته پلیمری به سمت دیگر حرکت کرده و ردیف دوم را روی صفحه جمع کننده به وجود می‌آورد. بنابراین پلیمر روی صفحه جمع کننده درحال جابجایی بین دو قطب است. در این مسیر رفت و برگشت الیاف روی هم تنیده می‌شوند. باید گفت این تنیدگی از نوع بافت پارچه نیست و یک فیبر بلند و پیوسته روی خود فشرده شده است. در نهایت داربستی متخلخل بدست می‌آید. محققین با انجام تغییرات در شدت جریان خروج محلول از سورنگ، فاصله صفحه جمع کننده تا سورنگ و یا مقدار ولتاژ(حتی تا ۳۰ کیلوولت) توانستند اندازه حفرات در این نوع داربست‌ها را تغییر دهند[۴۷, ۱۰۴]. در این زمینه داربست جدیدی از نانوالیاف پلی کاپرولاکتون و پلی اترسولفون به همراه کلاژن برای تکثیر سلول‌های خونی ساخته شده است[۱۰۵].

معایب داربست‌های مهندسی بافت

داربست‌های مهندسی بافت بسیار پر کاربرد هستند ولی مشکل استفاده از آن‌ها مربوط به تغییر pH در ناحیه لانه‌گزینی است. به‌طوری که پس از کاشت سلول‌ها روی داربست، در چند هفته اول pH در میکرومحیط داربست کمی تغییر می‌کند و از ۷/۵ به ۶/۸ می‌رسد. زیرا محصول فرعی که از تجزیه داربست حاصل می شود محیط را به سمت اسیدی شدن و کاهش pH سوق می‌دهد. این حالت برای رشد سلول‌ها نامناسب بوده و خود عامل تخریب بافت می‌شود [۱۰۶]. برای مثال پلی‌لاکتیک اسید به لاکتیک اسید تجزیه می‌شود[۱۰۷]. این محیط اسیدی عملکرد سلولی را تحت تأثیر قرار می‌دهد [۱۰۶].

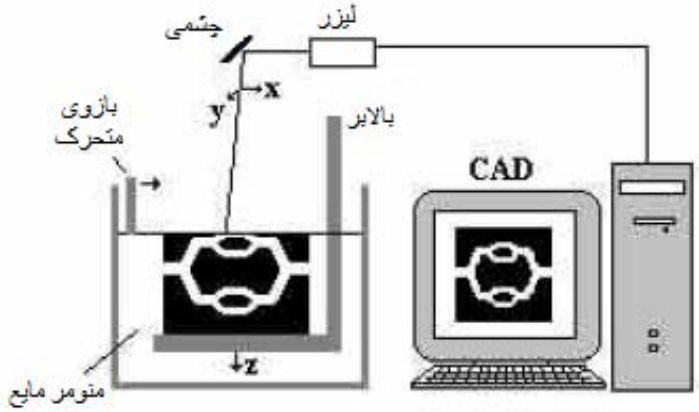
مشکل دیگر مربوط به ذراتی است که از تجزیه داربست حاصل می‌شود که گاهی این ذرات می‌تواند منجر به ایجاد پاسخ ایمنی شود. نه تنها این ذرات بلکه سطح بسیاری از داربست ها

برای سلول ها ناآشنا بوده و حتی ممکن است منجر بـه تحریـک سیستم ایمنی شود[۱۰۸].

سـاخت داربـست بـر اسـاس تکنولـوژیSFF (Solid Freeform Fabrication)

تکنولوژی جدیدی که برای ساخت و طراحـی داربـست‌هـا به‌کار می‌رود استفاده ازتکنولـوژی SFF اسـت (شـکل۱۳). ایـن روش با کمک نرم افـزار و برنامـه‌هـای کـامپیوتری CAD/CAM (Computer Assisted Design And Manufacturing) انجام می‌شـود. این روش به ما این اجازه را می‌دهد تا هر نوع داربست را به هـر شکل و اندازه درآوریم به‌طوری که این داربست تنها برای محل جایگیری (محل لانه‌گزینی در بافـت هـدف) خـود اختـصاصی باشد. در این روش به‌طور دقیق، اختصاصی و حـساس سـاختار متخلخل داربست تهیه می‌شود. طراحی اولیه در نرم افـزار انجـام شده و سپس این طرح به دستگاهSFF داده می‌شـود تـا داربـست به‌صورت لایه به لایه با کنترل دقیق ویژگی‌های ریخـت‌شناسـی، ترکیب شیمیایی و نیز ویژگـی‌هـای مکـانیکی در مـدل فیزیکـی ساخته شود [۱۰۹]. اندازه منافذ، میزان تخلخل، توزیع این میـزان تخلخل، عمق داربست، فاصله لایه‌هـا از یکـدیگر، میـزان نفـوذ اکسیژن و مواد غذایی به هر لایه و نیز سرعت انتـشار مـواد بـین لایه‌ها در این برنامه تعیین شده و سپس به اجرا در می‌آید تـا در نهایت سیستم عروقی مصنوعی در داخل داربست برقـرار شـود.

با کمک میکروکنترل‌ها در هر لایه می‌توان میـزان نفـوذ و انتـشار مواد را در زمان‌های مختلف کشت بررسی کرد. دستگاه در ابتـدا لایه‌های پایین و داخلی تر را ساخته و سـپس بـه سـمت سـطح داربست برای ساخت لایه‌های سـطحی نزدیـک مـی‌شـود [٤٧]. دستگاهSFF انواع مختلفی دارد ولی اساس تمام آن‌ها یکسان است و تنها تفاوت در روش طرح زدن روی داربست است. برای مثال در حالت چاپگر سـه بعـدی (Three Dimensional Printing (3DP، میکروقطرات از نوک چاپگر خارج شـده و روی پـودر پلیمـری داربست طرح می‌زند[۱۱۰]. می‌توان برای عمل چاپگر از حرارت نیز کمک گرفت (Phase-Change Jet Printing) [۱۱۱]. حالت دیگر می‌توان از روش حکاکی Stereolithography (SLA) اسـتفاده کـرد به طوری که در این روش با کمک لیزر، قالب پلیمـری داربـست لایه به لایه تراشیده می‌شـود [۱۱۲]. در روش Fused Deposition Modelling (FDM) نیـز حـرارت بـه‌کـار مـی‌رود. ایـن حـرارت می تواند به میله قابل ارتجاعی منتقل شود (در این حالت پلیمر به مانند ورقه‌های روی هم فشرده است) به‌طوری که این میله طرح مورد نظر را روی هر لایه می زنـد؛ بنـابراین روی هـر ورقـه، طـرح داربست رسوب می‌کند به‌طوری که گویی این ورقه‌ها دارای نوشـته می‌شود و با ترکیب این ورقه‌ها روی هم داربـست شـکل مـی‌گیـرد [۱۱۳]. در پلاتـر سـه بعـدی (3D Plotter) نیـز از حـرارت اسـتفاده می‌شود که نقش، لایه به لایه روی داربست زده می‌شود [۱۱٤].



شکل ۱۳. تصویر شماتیک از دستگاهSFF [۱۱۵]

نتیجه‌گیری

پلیمرهای فعال، تخریب پذیر و سازگار با بدن طی این چند دهه به شدت مورد تحقیق و بررسی قرار گرفت تا منجر به ساخت انواع داربست‌های مهندسی بافت شد. جنس و روش ساخت این داربست‌ها بسته به هدف مورد نظر متفاوت است. داربست‌ها می‌تواند برای تکثیر و تمایز سلول‌ها، بررسی مورفولوژی سلول‌ها، به‌منظور شبیه‌سازی حالت *in vivo* یا به عنوان کاشت‌های زیستی برای ترمیم بافت‌های بدن به‌کار رود. برای اتصال و مهاجرت بهتر سلول‌ها، سطح داربست‌ها را از لحاظ فیزیکی و شیمیایی تیمار می‌کنند. داربست‌هایی که بر مبنای روش‌های ساخت مرسوم بدست می‌آید ساختار متخلخل و اسفنجی دارد که قطر آنان زیاد بوده و نفوذ اکسیژن و مواد غذایی به سطوح داخلی‌تر به سختی انجام می‌شود. در حالی که روش های جدید ساخت داربست با فرم آزاد جامد (SFF) با به‌کار بردن تکنولوژی بیوانفورماتیک و نرم‌افزار، به‌عنوان انقلابی در طراحی و ساخت به شمار می‌رود. در این روش برای هر لایه میکروکنترل‌هایی را تعبیه می‌کنند تا بدین‌ترتیب سیستم گردش مواد شبیه‌سازی شود. به‌طور خلاصه داربست‌ها دارای مزایا و محدودیت‌هایی هستند که روش‌های جدید برای کاهش محدودیت‌ها و افزایش مزایای استفاده از داربست‌هاست. این استفاده به‌طور چشم‌گیری در حال افزایش است به‌طوری که شبیه‌سازی داربست‌ها از محیط داخل بدن باعث تسهیل در طب ترمیمی و مهندسی بافت شده است. در این راستا به پتانسیل داربست‌ها برای ساخت بافت‌های مصنوعی نزدیک شده‌اند.

References

1. **Belle.** Tissue engineering, an overview. In: Belle, editor. Tissue Engineering: Current Perspectives: Birkhauser Verlag AG 1993. 3-15.
2. **Shalak R, Fox C.** Preface. In: Shalak R, Fox C, editors. Tissue Engineering. New York: Alan R Liss, 1998. pp 26-9.
3. **Langer R, Vacanti J.** Tissue engineering. Science 1993; 5110: 920-6.
4. **Patrick CW, Jr, Mikos AG, McIntire LV.** Prospectus of Tissue Engineering. In: Patrick CW, Jr., Mikos AG, McIntire LV, editors. Frontiers in Tissue Engineering. New York, Elsevier Science, 1998, pp 3-11.
5. **Cheung H, Lau K, Lu T, Hui D.** A critical review on polymer-based bio-engineered materials for scaffold development. Composites B: Eng 2007; 3: 291-300.
6. **Langer R.** A New Approach to Drug Delivery. Tech Rev 1981; 83: 26-34.
7. **Mathiowitz E, Saltzman W, Domb A, Dor P, Langer R.** Polyanhydride microspheres as drug carriers. II. Microencapsulation by solvent removal. J Appl Polymer Sci 1988; 3: 755-74.
8. **Beck Lr, Pope Vz.** Controlled-release delivery systems for hormones. A review of their properties and current therapeutic use. Drugs 1984; 6: 528.
9. **Dutta RC, Dutta AK.** Cell-interactive 3D-scaffold; advances and applications. Biotechnol Adv 2009; 4: 334-9.
10. **Lucas P, Laurencin C, Syftestad G, Domb A, Goldberg V, Caplan A, et al.** Ectopic induction of cartilage and bone by water-soluble proteins from bovine bone using a polyanhydride delivery vehicle. J Biom Mat Res 1990; 24: 901-11.
11. **Masters D, Berde C, Dutta S, Griggs C, Hu D, Kupsky W, et al.** Prolonged regional nerve blockade by controlled release of local anesthetic from a biodegradable polymer matrix. Anesthesiology 1993; 79: 340-6.
12. **Heller J.** Development of poly (ortho esters): a historical overview. Biomaterials 1990; 11: 659-65.
13. **Cutright D, Perez B, Beasley J, Larson WJ, Posey WR.** Degradation rates of polymers and

copolymers of polylactic and polyglycolic acids. Oral Surg, Oral Med, Oral Pathol 1974; 37:142-52.

14. **Gilding DK, Reed AM.** Biodegradable polymers for use in surgery--polyglycolic/poly (actic acid) homo-and copolymers: 1. Polymer 1979; 20: 1459-64.
15. **Mohammadi Y, Soleimani M, Fallahi-Sichani M, Gazme A, Haddadi-Asl V, Arefian E, et al.** Nanofibrous poly (epsilon-caprolactone)/poly (vinyl alcohol)/chitosan hybrid scaffolds for bone tissue engineering using mesenchymal stem cells. Int J Art Organ 2007; 3: 204.
16. **Ajili S, Ebrahimi N, Soleimani M**. Polyurethane/polycaprolactane blend with shape memory effect as a proposed material for cardiovascular implants. Acta biomater 2009; 5: 1519-30.
17. **Naughton G, Naughton B.** Three-dimensional cell and tissue culture system. 1990;US Patent: 4963489.
18. **Naughton G, Naughton B.** Three-dimensional cell and tissue culture apparatus. 1992;US Patent: 5160490.
19. **Macchiarini P, Jungebluth P, Go T, Asnaghi M, Rees L, Cogan T, et al.** Clinical transplantation of a tissue-engineered airway. Lancet 2008; 372: 2023-30.
20. web page. FEI Image Gallery. 2011; FEI Company: [Electrospun fibers of polylactide]. Available from: http://www.fei.com/resources/image-gallery/polylactide-2093.aspx.
21. **Feng Q, Chai C, Jiang XS, Leong KW, Mao HQ.** Expansion of engrafting human hematopoietic stem/progenitor cells in three dimensional scaffolds with surface immobilized fibronectin. J Biomed Mater Res A 2006; 4: 781-91.
22. **Pabbruwe M, Esfandiari E, Kafienah W, Tarlton J, Hollander A.** Induction of cartilage integration by a chondrocyte/collagen-scaffold implant. Biomaterials 2009; 30: 4277-86.
23. **Kassem M, Kristiansen M, Abdallah B.** Mesenchymal stem cells: cell biology and potential use in therapy. Basic clin pharmacol toxicol 2004; 95: 209-14.
24. **Guo T, Zhao J, Chang J, Ding Z, Hong H, Chen J, et al.** Porous chitosan-gelatin scaffold containing plasmid DNA encoding transforming growth factor-[beta] 1 for chondrocytes proliferation. Biomaterials 2006; 27: 1095-103.
25. **Writer S.** web page. Increase Collagen and Elastin Production. 2011 [updated 2011]; Available from: http://thegist.dermagist.com/how-to-increase-collagen-and-elastin-production.
26. **Hartman EH, Vehof JW, Spauwen PH, Jansen JA.** Ectopic bone formation in rats: the importance of the carrier. Biomaterials 2005; 26: 1829-35.
27. **Rowley JA, Madlambayan G, Mooney DJ.** Alginate hydrogels as synthetic extracellular matrix materials. Biomaterials 1999; 20: 45-53.
28. **Passaretti D, Silverman RP, Huang W, Kirchhoff CH, Ashiku S, Randolph MA, et al.** Cultured chondrocytes produce injectable tissue-engineered cartilage in hydrogel polymer. Tissue Eng 2001; 7: 805-15.
29. **Williams C, Kim T, Taboas A, Malik A, Manson P, Elisseeff J.** In vitro chondrogenesis of bone marrow-derived mesenchymal stem cells in a photopolymerizing hydrogel. Tissue Engin 2003;9: 679-88.
30. **Chun K, Yoo H, Yoon J, Park T.** Biodegradable PLGA microcarriers for injectable delivery of chondrocytes: effect of surface modification on cell attachment and function. Biotechnology progress 2004; 20: 1797-801.
31. **Mercier N, Costantino H, Tracy M, Bonassar L.** A novel injectable approach for cartilage formation in vivo using PLG microspheres. Annals of biomedical engineering 2004; 32: 418-29.
32. **Kang S, Jeon O, Kim B.** Poly (lactic-co-glycolic acid) microspheres as an injectable scaffold for

cartilage tissue engineering. Tissue Engineering 2005; 11: 438-47.

33. **Thissen H, Chang K, Tebb T, Tsai W, Glattauer V, Ramshaw J, et al.** Synthetic biodegradable microparticles for articular cartilage tissue engineering. J Biomed Mater Res A 2006;77: 590-8.
34. **Hutmacher D.** Scaffold design and fabrication technologies for engineering tissues state of the art and future perspectives. J Biomater Sci Polym Ed 2001; 12: 107-24
35. **Chung HJ, Park TG.** Surface engineered and drug releasing pre-fabricated scaffolds for tissue engineering. Adv Drug Deliv Rev 2007; 59: 249-62.
36. **Koch T, Berg L, Betts D.** Current and future regenerative medicine—Principles, concepts, and therapeutic use of stem cell therapy and tissue engineering in equine medicine. Can Vet J 2009; 50: 155-65.
37. **Dado D, Levenberg S.** Cell-scaffold mechanical interplay within engineered tissue. Elsevier 2009; 6: 656-64.
38. **Pieper J, Hafmans T, Van Wachem P, Van Luyn M, Brouwer L, Veerkamp J, et al.** Loading of collagen heparan sulfate matrices with bFGF promotes angiogenesis and tissue generation in rats. J Biomed Mater Res 2002; 62: 185-94.
39. **Sakiyama-Elbert S, Hubbell J.** Development of fibrin derivatives for controlled release of heparin-binding growth factors. J Control Release 2000; 65: 389-402.
40. **Nettles D, Elder S, Gilbert J.** Potential use of chitosan as a cell scaffold material for cartilage tissue engineering. Tissue Eng 2002; 8: 1009-16-27.
41. **Li Z, Ramay H, Hauch K, Xiao D, Zhang M.** Chitosan-alginate hybrid scaffolds for bone tissue engineering. Biomaterials 2005; 26: 3919-28.
42. **Perets A, Baruch Y, Weisbuch F, Shoshany G, Neufeld G, Cohen S.** Enhancing the vascularization of three-dimensional porous alginate scaffolds by incorporating controlled release basic fibroblast growth factor microspheres. J Biomed Mater Res A 2003; 65: 489-97.
43. **Sharma S, Pawar A.** Low density multiparticulate system for pulsatile release of meloxicam. Int J Pharmac 2006;313: 150-8.
44. **Baier Leach J, Bivens K, Patrick Cw, Jr, Schmidt C.** Photocrosslinked hyaluronic acid hydrogels: natural, biodegradable tissue engineering scaffolds. Biotechnol Bioengin 2003;82:578-89.
45. **Gunatillake P, Adhikari R.** Biodegradable synthetic polymers for tissue engineering. Eur Cell Mater 2003; 5: 1-16.
46. **Shi G, Cai Q, Wang C, Lu N, Wang S, Bei J.** Fabrication and biocompatibility of cell scaffolds of poly (L-lactic acid) and poly (L-lactic-co-glycolic acid). Polymers for advanced technologies 2002; 3-4: 227-32.
47. **Lavik E, Langer R.** Nerve Regeneration, in Scaffolding in Tissue Engineering. Ma P, Elisseeff J (eds). CRC Press, pp 481-499
48. web page. Poly (lactic-co-glycolic acid) (PLGA) porous scaffold for tissue engineering. 2011; Available from: http://www.doitpoms.ac.uk /miclib/systems.php?id=85.
49. **Vunjak-Novakovic G, Freed LE.** Culture of organized cell communities. Adv Drug Deliv Rev 1998; 33: 15-30.
50. **Agrawal MC, Ray RB.** Biodegradable polymeric scaffolds for musculoskeletal tissue engineering. J Biomed Mater Res 2001; 55: 141-50.
51. **Hashemi S, Soleimani M, Zargarian S, Haddadi-Asl V, Ahmadbeigi N, Soudi S, et al.** In vitro differentiation of human cord blood-derived unrestricted somatic stem cells into hepatocyte-like cells on poly(epsilon-caprolactone) nanofiber

scaffolds.. Cells Tissues Organs 2009; 190: 135-49.

52. **Sundelacruz S, Kaplan DL.** Stem cell-and scaffold-based tissue engineering approaches to osteochondral regenerative medicine. Semin Cell Dev Biol; 2009 ;20:646-55
53. **Vazifeshiran N, Soleimani M, Mortazavi Y, Kaviani S, Aboualghasemi H, Nikogoftar M**. 3D culture of umblical cord blood-drived CD34+ cells on a DBM scaffold coated by cord blood–drived unrestricted somatic stem cells (USSC). Modares J Med Sci; Pathobiol 2010; 13: 63-81. (persian)
54. **Willerth SM, Arendas K, Gottlieb DI, Sakiyama-Elbert S.** Optimization of fibrin scaffolds for differentiation of murine embryonic stem cells into neural lineage cells. Biomaterials 2006; 36: 5990-6003.
55. **Bhattarai N, Gunn J, Zhang M.** Chitosan-based hydrogels for controlled, localized drug delivery. Adv Drug Delivery Rev 2010; 62: 83-99.
56. **Jayakumar R, Chennazhi KP, Muzzarelli RAA, Tamura H, Nair SV, Selvamurugan N.** Chitosan conjugated DNA nanoparticles in gene therapy. Carbohydrate Polymers 2010; 79: 1-8.
57. **Salinas CN, Anseth KS.** Mesenchymal stem cells for craniofacial tissue regeneration: designing hydrogel delivery vehicles. J Dent Res 2009; 88: 681-92.
58. **Chen J, Wang C, Lü S, Wu J, Guo X, Duan C, et al.** In vivo chondrogenesis of adult bone-marrow-derived autologous mesenchymal stem cells. Cell Tissue Res 2005; 319: 429-38.
59. **Yoon JJ, Kim JH, Park TG.** Dexamethasone-releasing biodegradable polymer scaffolds fabricated by a gas-foaming/salt-leaching method. Biomaterials 2003; 24: 2323-9.
60. **David M, Salvay D, Shea LD.** Inductive tissue engineering with protein and DNA-releasing scaffolds. Mol BioSyst 2006; 2: 36-48.
61. **Park TG, Jeong JH, Kim SW.** Current status of polymeric gene delivery systems. Adv Drug Deliv Rev 2006; 58: 467-86.
62. **Shea LD, Smiley E, Bonadio J, Mooney DJ**. DNA delivery from polymer matrices for tissue engineering. Nat Biotechnol 1999:17: 551-4.
63. **Chen RR, Mooney DJ.** Polymeric growth factor delivery strategies for tissue engineering. Pharmaceutical Res 2003; 20: 1103-12.
64. **Wozney JM, Rosen V.** Bone morphogenetic protein and bone protein gene family in bone formation and repair. Clin Orthop Relat Res 1998;346: 26-37.
65. **Pandit A, Ashar R, Feldman D.** The effect of TGF-beta delivered through a collagen scaffold on wound healing. J Invest Surg 1999; 2: 89-100.
66. **Pandit A, Ashar R, Feldman D, Thompson A.** Investigation of acidic fibroblast growth factor delivered through a collagen scaffold for the treatment of full-thickness skin defects in a rabbit model. Plast Reconstr Surg 1998; 101: 766-75.
67. **Whitworth IH, Brown RA, Doré CJ, Anand P, Green CJ, Terenghi G.** Nerve growth factor enhances nerve regeneration through fibronectin grafts. J Hand Surg Br 1996; 21: 514-22.
68. **Taylor SJ, McDonald J.** Controlled release of neurotrophin-3 from fibrin gels for spinal cord injury. J Control Release 2004; 98: 281-94.
69. **Sakiyama-Elbert SE, Hubbell JA.** Controlled release of nerve growth factor from a heparin-containing fibrin-based cell ingrowth matrix. J Control Release 2000; 69: 149-58.
70. **Utley D, Lewin S, Cheng E, Verity A, Sierra D, Terris D.** Brain-derived neurotrophic factor and collagen tubulization enhance functional recovery after peripheral nerve transection and repair. Arch Otolaryngol- Head and Neck Surg 1996;122 : 407.
71. **Liuyun J, Yubao L, Chengdong X.** Preparation and biological properties of a novel composite scaffold of nano-hydroxyapatite/chitosan/carboxymethyl cellulose

for bone tissue engineering. J Biomed Sci 2009;16 : 65.

72. **Behnia H, Khojasteh A, Soleimani M, Tehranchi A, Khoshzaban A, Keshel SH, et al.** Secondary repair of alveolar clefts using human mesenchymal stem cells. Oral Surg, Oral Med, Oral Pathol, Oral Radiol, Endod 2009; 108: e1.
73. **Ishaug-Riley SL, Crane GM, Gurlek A, Miller MJ, Yasko AW, Yaszemski MJ,et al.** Ectopic bone formation by marrow stromal osteoblast transplantation using poly (DL-lactic-co-glycolic acid) foams implanted into the rat mesentery. J Biomed Mater Res 1997; 36: 1-8.
74. **Martin I, Padera RF, Vunjak-Novakovic G, Freed LE.** In vitro differentiation of chick embryo bone marrow stromal cells into cartilaginous and bone like tissues. J Orthop Res 1998; 16: 181-9.
75. web page. Air Lift or Bubble Column Reactors. National Technical University of Athens (NTUA) 2011; Available from: http://www.metal.ntua.gr /~pkousi/e-learning/bioreactors/page_11.htm.
76. Upton TM, Flickinger JT. Cell culture spinner flasks. Google Patents; 2006.
77. Exhibition TVI. web page. Modular laboratory cell culture device. 2011; Available from: http://www.directindustry.com/prod/ibs-integra-biosciences/modular-laboratory-cell-culture-devices-39224-414788.html.
78. **Lutolf M, Hubbell J.** Synthetic biomaterials as instructive extracellular microenvironments for morphogenesis in tissue engineering. Nat Biotechnol 2005; 23: 47-55.
79. **Nuttelman CR, Mortisen DJ, Henry SM, Anseth KS.** Attachment of fibronectin to poly (vinyl alcohol) hydrogels promotes NIH3T3 cell adhesion, proliferation, and migration. J Biomed Mater Res 2001; 57: 217-23.
80. **Bhati RS, Mukherjee DP, McCarthy KJ, Rogers SH, Smith DF, Shalaby SW.** The growth of chondrocytes into a fibronectin coated biodegradable scaffold. J Biomed Mater Res 2001; 56: 74-82.
81. **Atashi A, Nadri S, Hafizi M, Soleimani M.** Role of poly-l-lysine-coated plates and fetal calf serum concentration in sheep chondroprogenitor cell culturing. J Artif Organs 2009; 12: 118-22.
82. **Hersel U, Dahmen C, Kessler H.** RGD modified polymers: biomaterials for stimulated cell adhesion and beyond. Biomaterials 2003; 24: 4385-415.
83. **Badrossamay MR, McIlwee HA, Goss JA, Parker KK.** Nanofiber assembly by rotary jet-spinning. Nano Lett 2010; 10: 2257-61.
84. **Cima LG, Vacanti J, Vacanti C, Ingber D, Mooney D, Langer R.** Tissue engineering by cell transplantation using degradable polymer substrates. J Biomech Eng 1991;113: 143-51.
85. **Mikos AG, Bao Y, Cima LG, Ingber DE, Vacanti JP, Langer R.** Preparation of poly (glycolic acid) bonded fiber structures for cell attachment and transplantation. J Biomed Mater Res 1993; 27: 183-9.
86. **Kim BS, Mooney DJ.** Engineering smooth muscle tissue with a predefined structure. J Biomed Mater Res A 1998; 41: 322-32.
87. **Mikos AG, Thorsen AJ, Czerwonka LA, Bao Y, Langer R, Winslow DN, et al.** Preparation and characterization of poly (L-lactic acid) foams. Polymer 1994; 35: 1068-77.
88. **Mikos A, Sarakinos G, Vacanti J, Langer R, Cima L.** Biocompatible polymer membranes and methods of preparation of three dimensional membrane structures. 1996;US Patent: 5514378.
89. **Mikos AG, Sarakinos G, Vacanti JP, Langer R, Cima LG.** Biocompatible polymer membranes and methods of preparation of three dimensional membrane structures. 1996;US Patent: 5514378.
90. **Mooney DJ, Baldwin DF, Suh NP, Vacanti JP, Langer R.** Novel approach to fabricate porous sponges of poly (D,L-lactic-co-glycolic acid) without the use of organic solvents. Biomaterials

1996; 17: 1417-22.

91. **Nam YS, Yoon JA, Park TG.** A novel fabrication method of macroporous biodegradable polymer scaffolds using gas foaming salt as a porogen additive. J Biomed Mater Res B: Appl Biomater 2000; 25: 1-7.
92. **Yeng LL.** web page. Supercritical gas foaming technique for microporous PLGA foams. 2011; Available from: http://cheed.nus.edu.sg/~chewch/NEW/students_lee.htm.
93. **Whang K, Thomas CH, Healy KE, Nuber G.** A novel method to fabricate bioabsorbable scaffolds. Polymer 1995; 36: 837-42.
94. **Mohamadi Y, Mirzade H, Moztarzade F, Soleimani M, Jabary E.** Design and fabrication of biodegradable porous chitosan/gelatin/tricalcium phosphate hybrid scaffolds for tissue engineering. Ir J Polymer Sci Technol, IJPST 2007; 3: 297-309. (persian)
95. **Nam YS, Park TG.** Porous biodegradable polymeric scaffolds prepared by thermally induced phase separation. J Biomed Mater Res A 1999; 47: 8-17.
96. **Nam YS, Park TG.** Biodegradable polymeric microcellular foams by modified thermally induced phase separation method. Biomaterials 1999; 20: 1783-90.
97. **Schugens C, Maquet V, Grandfils C, Jérôme R, Teyssie P.** Polylactide macroporous biodegradable implants for cell transplantation. II. Preparation of polylactide foams by liquid-liquid phase separation. J Biomed Mater Res A 1996; 30: 449-61.
98. **Lo H, Ponticiello MS, Leong KW.** Fabrication of controlled release biodegradable foams by phase separation. Tissue Eng 1995; 1: 15-28.
99. **Thomson RC, Yaszemski MJ, Powers JM, Mikos AG.** Fabrication of biodegradable polymer scaffolds to engineer trabecular bone. J Biomater Sci, Polym Ed 1996; 7: 23-38.
100. **Thompson R, Yaszembksi M, Powers J, Harrigan T, Mikos A.** Poly(a-hydroxy ester)/short fiber hydroxyapatite composite foams for orthopedic applications. In: Mikos A, Leong K, Yaszemski M, editors. Polymers in Medicine and Pharmacy. Pittsburgh: Materials Research Society Symposium Proceedings; 1995. 25-30.
101. Shabani I, Haddadi-Asl V, Seyedjafari E, Babaeijandaghi F, Soleimani M. Improved infiltration of stem cells on electrospun nanofibers. Biochem Biophys Res Commun 2009; 382: 129-33.
102. Landcuo. web page. Electrospinning setup. Own work, drawn by English Wikipedia user w:User:Landcuo, uploaded on Commons by Italian Wikipedia user Lohe; 2007; Available from: http://en.wikipedia.org/wiki/File:Electrospinning_setup.png.
103. **Sattary L.** web page. Electrospinning makes fibres from liquid. laboratory news; 2009; Available from: http://www.labnews.co.uk/news/electrospinning-makes-fibres-from-liquid/.
104. **Ma Z, Kotaki M, Inai R, Ramakrishna S.** Potential of nanofiber matrix as tissue-engineering scaffolds. Tissue Eng 2005; 11: 101-9.
105. **Kazemnejad S, Allameh A, Soleimani M, Gharehbaghian A, Mohammadi Y, Amirizadeh N, et al.** Development of a novel three-dimensional biocompatible nanofibrous scaffold for the expansion and hepatogenic differentiation of human bone marrow mesenchymal stem cells. Ir J Biotechnol 2007; 5: 201-11.
106. **Kohn D, Sarmadi M, Helman J, Krebsbach P.** Effects of pH on human bone marrow stromal cells in vitro: implications for tissue engineering of bone J Biomed Mater Res 2002; 60: 292-9.
107. **Reed A, Gilding D.** Biodegradable polymers for use in surgery--poly (glycolic)/poly (Iactic acid)

homo and copolymers: 2. In vitro degradation. Polymer 1981; 22: 494-8.

108. **Arem A.** Collagen modifications. Clin Plast Surg 1985; 12: 209.

109. **Yang S, Leong K, Du Z, Chua C.** The design of scaffolds for use in tissue engineering. Part II. rapid prototyping techniques. Tissue Eng 2002; 8: 1-11.

110. **Sachs E, Curodeau A, Fan T, Bredt J, Cima M, Brancazio D.** Three dimensional printing system. 1998;US Patent: 5807437.

111. **Sanders Jr R, Forsyth J, Philbrook K.** 3-D model maker. 1996;US Patent: 5506607.

112. **Hull C.** Method for production of three-dimensional objects by stereolithography. 1990;US Patent: 4929402.

113. **Crump S.** Apparatus and method for creating three-dimensional objects. 1992;US Patent: 5121329.

114. **Landers R, Mülhaupt R.** Desktop manufacturing of complex objects, prototypes and biomedical scaffolds by means of computer-assisted design combined with computer-guided 3D plotting of polymers and reactive oligomers. Macromol Mater Eng 2000; 282: 17-21.

115. **Sachlos E, Czernuszka JT.** Making Tissue Engineering Scaffolds Work. Review on The Application Of Solid Freeform Fabrication Technology To The Production Of Tissue Engineering Scaffolds. Europ Cells Mater 2003; 5: 29-40.