

## داربست‌های مهندسی بافت: تاریخچه، انواع و روش ساخت

زهرا السادات هاشمی <sup>M.Sc.\*</sup>، مسعود سلیمانی <sup>Ph.D.\*\*</sup>

\* 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 به طوری که مهندسی بافت توانایی بالقوه برای ساخت عضو و بافت را به صورت *de novo* دارد. به منظور 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 به کار 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

حفظ حالت پایدار بافت یا بهتر کردن عملکرد بافت هدف یا جایگزین کردن عملکرد زیستی بافت است [۱-۲]. به همین دلیل در بحث طب ترمیمی و مهندسی بافت استفاده از سلول‌های بنیادی مشاهده می‌شود. اصطلاح مهندسی بافت به شکل امروزی اولین بار در ۱۹۸۵ توسط فونگ (Fung) مطرح

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

آدرس مکاتبه: تهران، دانشگاه تربیت مدرس، دانشکده علوم پزشکی، گروه هماتولوژی و بانک خون، صندوق پستی: ۱۱۱-۱۴۱۱۵

Email: soleim\_m@modares.ac.ir

کار طراحی داربست است که در این طراحی اندازه حفرات، شدت تخلخل و درجه تخریب پذیری تعیین می‌شود، به طوری که تا رسیدن به زمان تخریب مقاوم به تنش‌های ناحیه‌ای بوده و این فشارها را در کل ناحیه لانه گزینی به صورت همگون و مساوی پخش کند [۵].

### تاریخچه

از دهه ۶۰ میلادی پلیمرهای قابل جذب و تخریب پذیر در اندازه و شکل‌های مختلف برای انتقال دارو و هورمون به کار می‌رفت [۶]. برای مثال پلی آنهیدرید در ابتدا به صورت میکروسفر (Microsphere) یا ریزکره به عنوان حامل به کار برده می‌شد [۷]. پس از آن در دهه ۷۰ به عنوان کاشت (Implant) برای کنترل رهاسازی هورمون، به ویژه هورمون‌های پیشگیری از بارداری به کار برده شدند [۸]. امروزه نیز از داربست‌ها به عنوان 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 به طوری که به صورت کنترل شده داروهای مؤثر در بیهوشی موضعی از آن رها شده و در ناحیه مورد نظر اثر می‌گذاشتند [۱۱]. پس از آن هلر (Heller) برای نیل به هدف انتقال دارو و هورمون از پلی اورتواسترها (Poly (ortho esters) استفاده کرد [۱۲]. آلیفاتیک پلی استرها مانند پلی لاکتیک اسید (شکل ۱) و پلی گلیکولیک اسید برای چندین دهه برای کاشت‌های زیستی و ترمیم بافت به کار می‌رفت [۱۳]. امروزه نیز این پلیمرها به صورت جدا یا در حالت کopolymerی از این

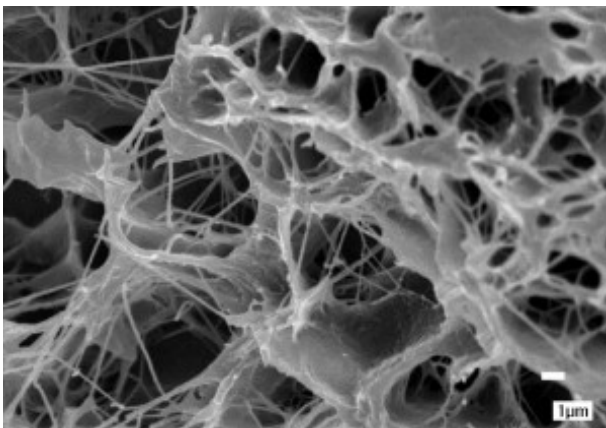
گشت و از سال ۱۹۸۷ یعنی پس از جلسه بنیاد ملی علوم (NSF: National Science Foundation) سرمایه‌گذاری‌ها روی مهندسی بافت آغاز شد. پیشرفت‌های اخیر در زمینه مهندسی بافت به منظور غلبه بر محدودیت‌های روش‌های مرسوم پیوند عضو و پیوند مواد است [۳]. در این زمینه توانایی بالقوه برای ساخت عضو و بافت‌های مصنوعی وجود دارد به طوری که بافت و عضو پیوند زده شده پس از پیوند، همراه با فرد گیرنده رشد کند. با این روش راه حل دائمی برای درمان بافت‌های آسیب دیده وجود دارد، به طوری که نیازی به درمان‌های مکمل نبوده و در نتیجه هزینه درمان بسیار کاهش می‌یابد [۴]. تاکنون مهندسی بافت برای ترمیم بسیاری از بافت‌ها مانند استخوان، غضروف، رگ خونی و پوست به کار رفته است. بنابراین یک بافت برای انجام عمل خود یک سری ویژگی‌های ساختمانی و مکانیکی دارد. بدین منظور برای به دست 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 به صورت *in vivo* و هم *ex vivo* به کار برده می‌شود. در هر دو حالت، داربست تقلیدی از بافت زنده در داخل بدن است که در این حالت به سلول‌های کاشت شده اجازه داده می‌شود روی میکرومحیط اطراف خود تاثیر بگذارند. داربست‌های زیستی با استفاده از مواد زیست سازگار و تخریب پذیر به دست 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 به صورت 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

### 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.

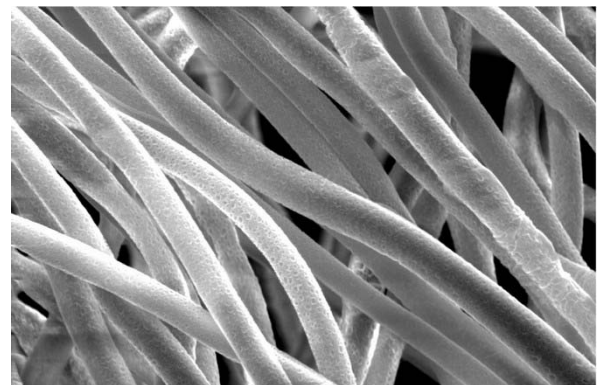
### ویژگی‌های ساختاری داربست

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 [۲۴] است که بر مبنای این مواد داربست‌های بسیاری ساخته شد. داربست‌ها دارای ویژگی‌های اصلی و فرعی است:



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

دو پلیمر، به‌کار برده می‌شود [۱۴]. به‌طور کلی پلی استرهای که در پزشکی کاربرد داشتند شامل پلی کولید، پلی لاکتید، پلی لاکتید به همراه گلیکولید، پلی دی‌وگزانون، پلی کاپرولاکتون و پلی تری متیلن کربونات بود. داربست هیبریدی از پلی کاپرولاکتون، پلی وینیل الکل به همراه چیتوزان در مهندسی بافت [۱۵] و نیز برای کاشت‌های زیستی مطرح شده است [۱۶]. 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 پلی گلیکولیک اسید بود؛ بدین ترتیب 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 پلی لاکتید [۲۰]

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. به طوری 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. به طوری 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 گلیکول (PEG) ساخته می‌شوند. این داربست‌ها محیط و شرایط ملایم‌تر و قابل کنترل 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

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 به طوری 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

به راحتی کنترل کرد تا در نهایت جایگزین بافت هدف شود. (۳) دارای بار، قطبیت و خواص شیمیایی مناسب در سطح خود باشد به طوری که برای اتصال، تکثیر و تمایز سلول‌ها مناسب باشد.

(۴) دارای خواص مکانیکی مناسب باشد. شدت مقاومت مکانیکی در داربست‌ها باید متناسب با بافت هدف یا همان محل لانه‌گزینی باشد. مقاومت مکانیکی داربست باید به گونه‌ای محاسبه شود که در هنگام کار یا نقل و انتقال صدمه‌ای به آن وارد نشود.

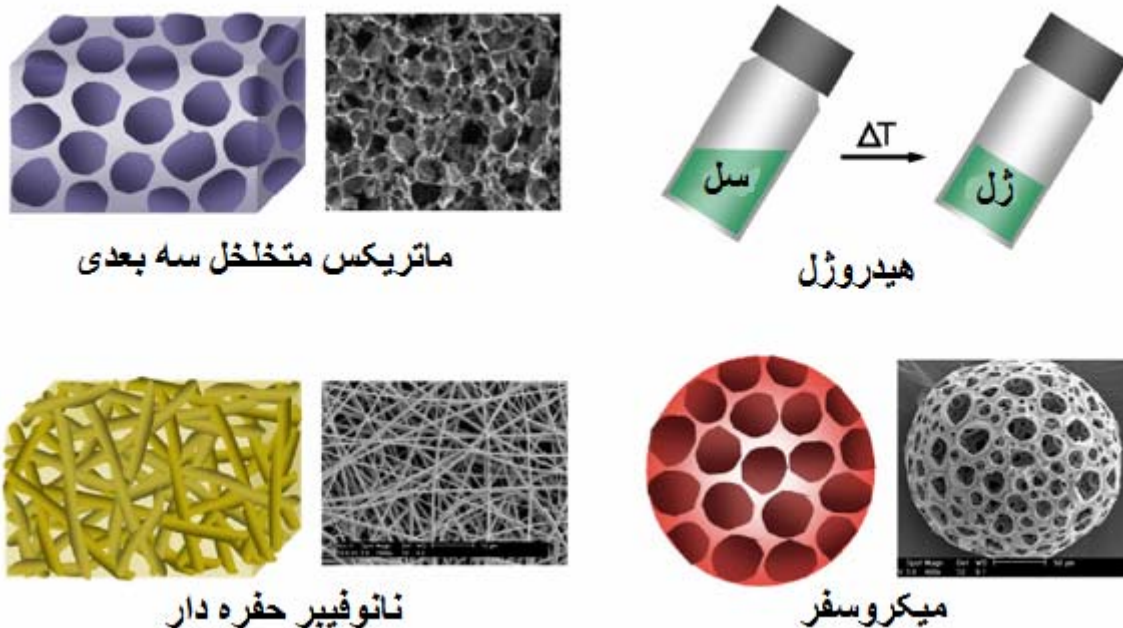
(۵) نباید سیستم ایمنی را تحریک و منجر به پاسخ ایمنی شود.

(۶) به راحتی به اشکال و اندازه‌های مختلف تبدیل شود.

می‌شود؛ اگرچه این پلیمرها به محصولات جانبی اسیدی تجزیه می‌شود و این حالت اسیدی می‌تواند روی رشد و چسبندگی سلول اثر منفی داشته باشد [۲۹]. میکروسفرها بیشتر از جنس پلی‌لاکتیک/گلیکولیک اسید (PLGA) است که برای تکثیر *in vitro* سلول‌ها به کار برده می‌شود [۳۰] و همچنین برای ترمیم بافت غضروفی به محل آسیب دیدگی تزریق می‌شود [۳۱-۳۳]. در انتخاب داربست باید عوامل جانبی و فرعی را نیز در نظر گرفت [۳۴]:

(۱) حفرات موجود در داربست با یکدیگر در ارتباط بوده و به صورت بهم پیوسته باشد به طوری که مثل سیستم گردش خون و رگ در بدن عمل کند.

(۲) از موادی تهیه شود که بتوان توان تخریب و تجزیه آن را



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

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 [۴۰-۴۲] و گلیکوزامینوگلیکان. از آلژینات برای انتقال به موقع و اختصاصی داروی ملوکسی کام (Meloxicam) استفاده می‌شود [۴۳] که این دارو ضد التهاب و استروئیدی 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 پلی ساکاریدی از ترکیب گلیکوزامینوگلیکان و هیالورونیک اسید [۴۴] استفاده می‌شود و در این بین از موادی مثل گلو تارالدید، 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

### 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

کبدی استفاده شده است [۵۱].

### کاربردهای داربست

داربست‌های زیستی کاربردهای متنوع در کشت بافت دارد [۵۲] 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 [۵]. در بحث سلول‌های بنیادی، داربست‌ها بر قدرت چسبندگی، تکثیر و تمایز اثر می‌گذارد و حتی قادر به افزایش سلول‌ها در زیر شرایط ایده آل است [۹]. 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 [۵۳]. 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 [۵۴]. داربست‌ها برای کاشت سلول‌های حساس به گرما ایده آل است [۵۵]. همچنین به‌عنوان ابزاری برای siRNA delivery [۵۶] و MicroRNA [۵۷] به‌کار می‌رود. دسته‌ای از داربست‌ها برای انتقال دارو [۵۸-۵۹] و DNA [۶۰-۶۲] 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 [۴۲].
- (۲) برای ترمیم غضروف و استخوان از فاکتور رشد

به‌راحتی به ماتریکس‌های سه‌بعدی با ساختارهای متنوع تبدیل می‌شود. پلیمرهای سنتزی که برای مهندسی بافت به‌کار می‌رود شامل پلی‌آلفا هیدروکسی استرها که پلی‌استرهای آلیفاتیک است، پلی‌آنهیدرید و پلی‌اورتواسترها است [۴۵]. پلی‌آلفا هیدروکسی استرها انواع مختلفی دارد [۴۶]:

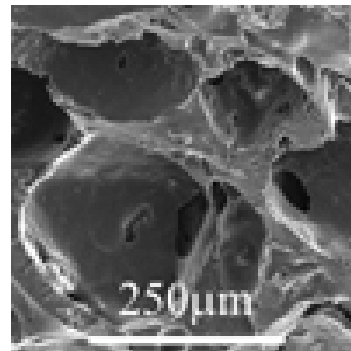
(۱) پلی‌گلیکولیک اسید (polyglycolic acid - PGA)

(۲) پلی‌لاکتیک 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 به‌طوری‌که پلی‌گلیکولید سریع‌تر از پلی‌لاکتید تجزیه می‌شود [۴۷].

(۳) کو پلیمر لاکتیک اسید و گلیکولیک اسید

PLGA (شکل ۴)



شکل ۴. ساختمان متخلخل PLGA [۴۸]

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.

(۴) پلی‌کاپرولاکتون PCL [۳۴، ۴۹ و ۵۰]

از این داربست برای تمایز سلول‌های بنیادی سوماتیک غیر محدود شده Unrestricted Somatic Stem Cells به سلول‌های

*in vivo* است.

۲. برهمکنش بین سلولی بهتر انجام می‌شود.

۳. از لحاظ بیولوژی و عملکرد بسیار شبیه به حالت واقعی است در نتیجه 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 به طوری 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 تخریب‌پذیر عمل جراحی ثانویه برطرف شده و باعث راحتی بیشتر بیمار و کاهش هزینه می‌شود [۵]. این داربست‌ها برای بدن سمی نبوده و منجر به پاسخ ایمنی در بدن فرد پذیرنده نمی‌شود و با بافت زنده سازگار است [۷۱].

### 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 استخوان مناسب باشد ولی دوره تجزیه آن بیش از زمان مورد نظر ما به طول انجامد، داربست نامناسبی است.

TGF\_β [۶۳] یا از پروتئین مورفوژن استخوان (BMP) [۶۴] استفاده می‌کنند.

۳) برای ترمیم زخم، کلاژن به همراه TGF\_β و فاکتور رشد فیروبلست (FGF) به کار برده می‌شود [۶۵-۶۶].

۴) در ترمیم کبد از فاکتورهای رشدی که برای بقا و تکثیر سلول‌های کبدی لازم است (EGF و HGF) استفاده می‌شود [۶۶].

۵) در مهندسی بافت عصبی: برای این منظور از داربست‌های مشتق شده از ماتریکس خارج سلولی استفاده می‌شود. برای مثال داربست فیرونکتین که فاکتور رشد عصب (NGF) را ترشح می‌کند [۶۷] یا ژل‌های فیبرین که نوروتروفین ۳ (NT\_3) را در محیط رها می‌کند [۶۸]. ژل‌های فیبرین هپارین‌دار که به همراه NGF باشد نیز برای ترمیم بافت عصبی به کار می‌رود [۶۹]. داربست دیگری که در این گروه جای می‌گیرد از لوله‌های کلاژنی به همراه فاکتور نوروتروفیک مغزی (BDNF) تشکیل شده است [۷۰].

### مزایای داربست

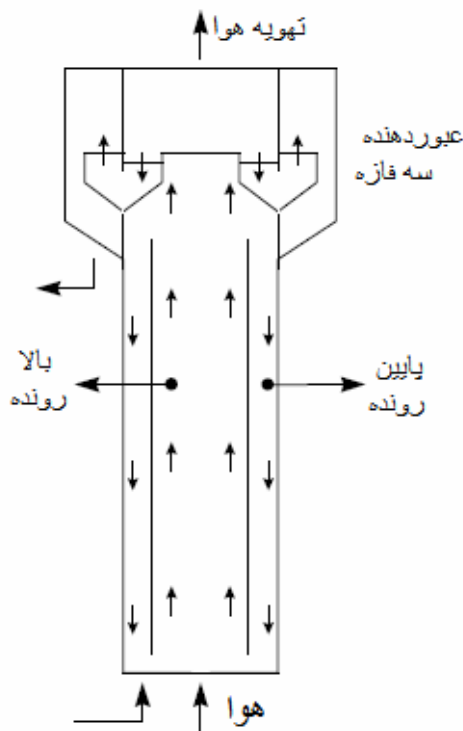
یکی از مزیت‌های اصلی مهندسی بافت، کشت سلول‌های وابسته به شرایط سه‌بعدی است به طوری که این حالت سه‌بعدی تنها در ارگان و بافتی که از آن منشأ گرفته اند موجود است بنابراین این سلول‌ها در کشت دو بعدی نمی‌توانند جهت‌گیری مناسب و سه‌بعدی را به دست آورند. در این حالت این سلول‌ها به صورت تصادفی مهاجرت کرده و لایه دو بعدی 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. در این نوع کشت مورفولوژی سلول‌ها شبیه



این داربست‌ها بسیار زیاد بوده و سلول‌های داخلی تر از بین می‌رود. 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 داربست‌های 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 سه‌بعدی 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

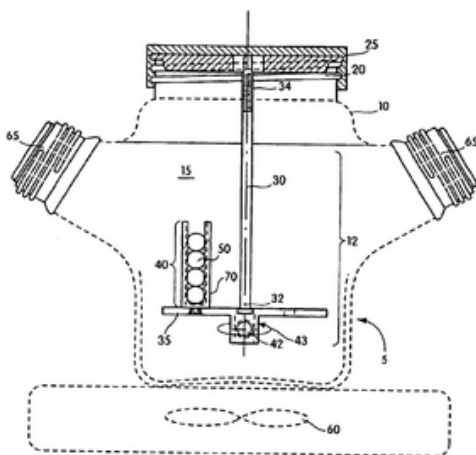
بنابراین پارامترها باید بهینه‌سازی شود تا بهترین کارایی برای ترمیم بافتی را داشته باشد [۵]. به‌منظور ترمیم استخوان و دندان روی داربست‌های معدنی از بافت مغز استخوان به همراه سولفات کلسیم کار شده است [۷۲].

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 [۷۴].

به‌دلیل پوشیده شدن سطح داربست با لایه‌ای از سلول‌های اولیه، نفوذ اکسیژن و مواد غذایی به عمق داربست تنها با کمک انتشار صورت می‌گیرد. 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

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 به دست می‌آید. برای گردش مواد در اطراف سلول می‌توان از همزن استفاده کرد مانند spinner flasks (شکل ۶) یا مانند roller bottles (شکل ۷) از چرخش خود محفظه اصلی استفاده کرد. البته شرایط در راکتور می‌تواند ثابت (Static Culture) باشد؛ به طوری که در طول فرآیند مواد غذایی و زاید، وارد و خارج نشود. بدین ترتیب سیستم به صورت 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 ۶. تصویری از spinner flasks [۷۶].

فرماتور و بیوراکتورها مطرح می‌شوند. در تولید پروتئین و به ویژه آنتی‌بادی نیاز به چند کیلوگرم از محصول خالص است که فرماتورهای دو هزار لیتری (Air-lift Bioreactor) برای شرکت‌های تجاری تهیه شده است (شکل ۵) که بذر اولیه برای این فرماتورها در حدود یک کیلوگرم و محصول نهایی طی روند ۱۵ روزه ۴ کیلوگرم است. باید گفت برای به دست 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) به طور خالص به دست 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 به طور الکترونیکی در هر لحظه بررسی شده و کنترل می‌شود. سلول‌های چسبنده باید روی سطحی تثبیت شوند به طوری که این سطح اثر مکانیکی چرخش مواد در راکتور را کاهش داده و باعث افزایش نسبت سطح به حجم شود. این سطوح به صورت دیسک‌های سلولزی متخلخل و حالتی از داریست‌های قابل تجزیه است. این دیسک‌ها به عنوان 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

پروتئین‌های اتصال سلول مانند تری پتید آرژینین - گلیسین - 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 به دست 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 به کار 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 به دست می‌آید. در اینجا نیز ساختارها بر مبنای 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 تخریب‌ناپذیر 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 [۴۷].



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 سلول‌ها 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 سلول‌ها 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 می‌کنند [۷۹-۸۰]. از پلی-ال-لیزین برای کشت سلول‌های غضروفی استفاده شده است [۸۱]. به منظور متعادل نمودن برهم‌کنش سلول و ماتریکس و نیز پایدار نگه داشتن لایه سلولی روی داربست از مولکول‌های 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 ماکرومولکول‌های مشتق از مواد طبیعی مانند کلاژن، ژلاتین، هپارین، هیالورونیک اسید یا پپتیدهای کوچک حاصل از

داربست‌های مهندسی بافت: تاریخچه، انواع و روش ساخت ۱۵۷

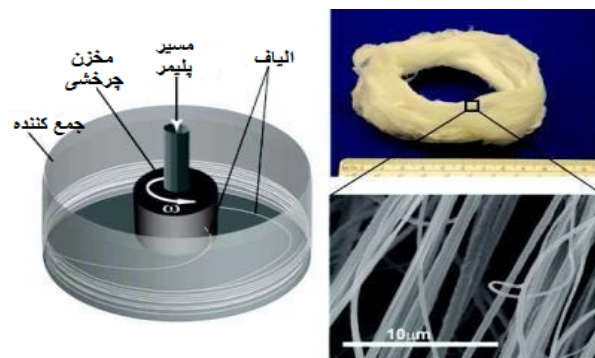
قالب‌هایی ریخته می‌شود که این قالب‌ها با ذرات پروژن (Porogen Particles) پر شده‌اند [۴۷].

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 به طوری 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 به کار 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 به طور 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)

در این روش از گاز دی‌اکسید کربن با فشار بالا برای ایجاد حفره در داربست استفاده می‌شود. به طوری که پلیمر را روی صفحات مشبکی قرار داده و برای چند روز در معرض گاز دی‌اکسید کربن (CO<sub>2</sub>) 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



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 به وجود می‌آید به طوری که در نقطه تقاطعی الیاف، حفرات داربست شکل می‌گیرند. این روش ساخت نوعی از تکنولوژی نساجی است که مواد اولیه آن شبکه‌ای غیر بافته شده از پلیمرهای تخریب پذیر است. از پلیمرهای PLA و PGA در این روش استفاده شده است [۸۴]. 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 به صورت داربستی از الیاف به هم بافته شده حاصل می‌شود [۸۶].

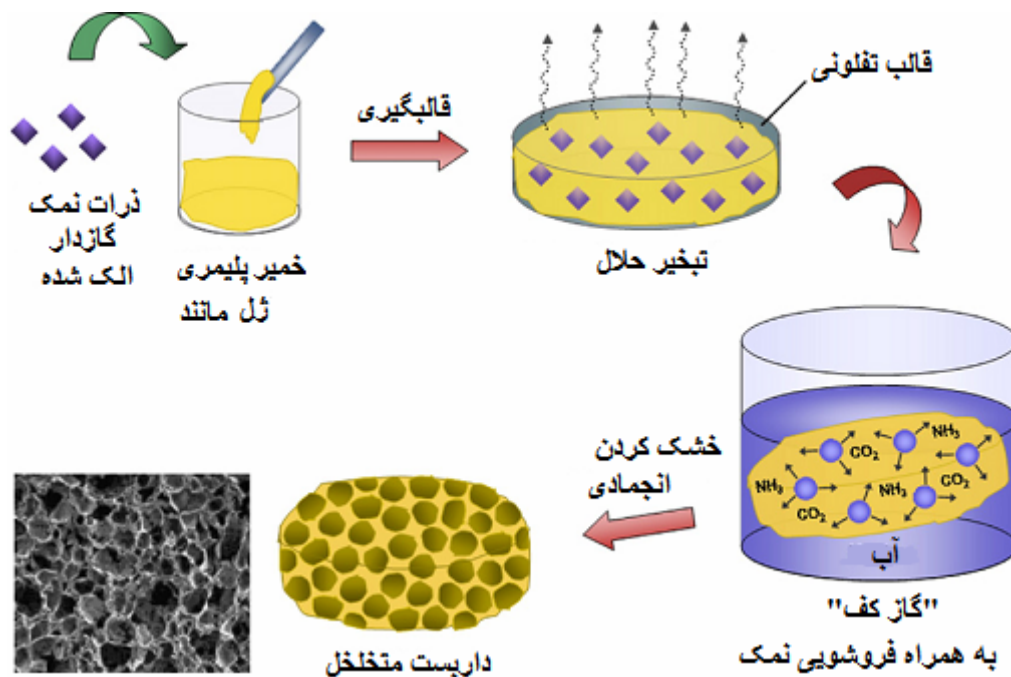
#### ۳- روشی ذره‌ای و قالب‌گیری حلال Solvent

##### Casting & Particulate Leaching (SCPL)

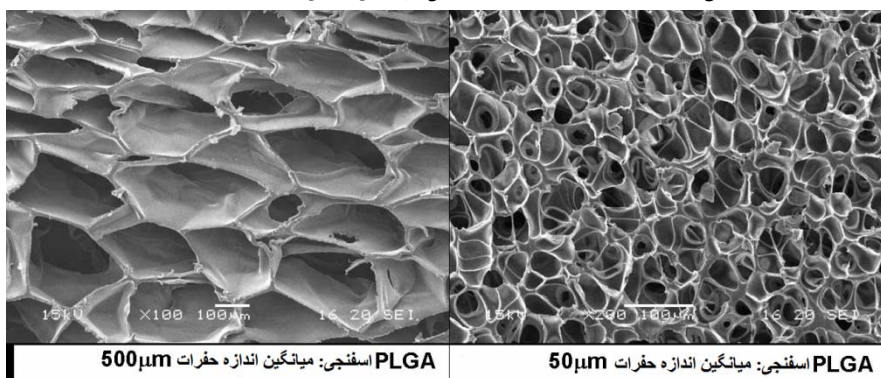
این روش راحت‌ترین روش برای تهیه داربست‌های متخلخل است [۸۷]. در این حالت پلیمر در حلال آلی مناسب حل می‌شود (PLA در دی‌کلرومتان) سپس محلول حاصل در

که با غوطه‌ور کردن پلیمر حاصل در آب، این نمک به آمونیاک و گاز دی‌اکسید کربن تبدیل می‌شود. گاز دی‌اکسید کربن خارج شده و آمونیاک نیز شسته می‌شود و در نهایت پلیمر متخلخل به دست می‌آید [۹۱].

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



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



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

اسیدی یعنی استیک اسید یا هیدروکلریک اسید حل و سپس به محلول حاصل آب اضافه می‌شود. در این حالت امولسیون از آب و روغن به دست می‌آید که این مخلوط را به هم زده و در قالب می‌ریزند و بدین ترتیب اجازه جدا شدن دو فاز را نمی‌دهند

### ۵- امولسیون یخ خشک (Emulsification Freeze-Drying)

در این روش ابتدا پلیمرهای تخریب‌پذیر در حلال مناسب حل می‌شود. برای مثال PLA یا PGA به ترتیب در حلال‌های آلی مناسب یعنی دی‌کلرومتان و کلرید متیلن و کلاژن در حلال

روش منافذ ۱ تا ۱۰ میکرومتر بوده و در ارتباط با یکدیگر نیستند [۹۷]. باید گفت داربستی که از این روش به دست می‌آید دارای تخلخل بالای ۹۰ درصد 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 اعمال می‌کنند [۹۹]. با این روش ذرات PLGA در هم فرو رفته و به یکدیگر متصل می‌شود. پس از آن، 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 به دست می‌آید که این داربست شکل قالب را به خود می‌گیرد و می‌توان در اندازه‌های مختلف آن را به دست 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 ۱۰ تا ۲۰ 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 به کار برده می‌شود و بدین ترتیب بسیار متنوع است. این تنوع به محققین کمک می‌کند تا بر اساس هدف مورد نظر خود بستر مناسب را به کار برند؛ برای مثال روی نانو الیاف پلی اتر سولفون که با این روش تهیه شده است در زمینه سلول‌های بنیادی کار شده است [۱۰۱].

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 به دست 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 دیسکاتور و خشک کردن آن‌ها در دمای محیط داربست مورد نظر به دست می‌آید. با این روش داربست جدید و متخلخل چیتوزان-ژلاتین-تری فسفات کلسیم برای کشت سلول‌های کندروسیت ساخته شده است [۹۴].

#### 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 [۹۵-۹۶] تا این حلال به سرعت تصعید شود. برای مثال پلیمر PLA در حلال 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

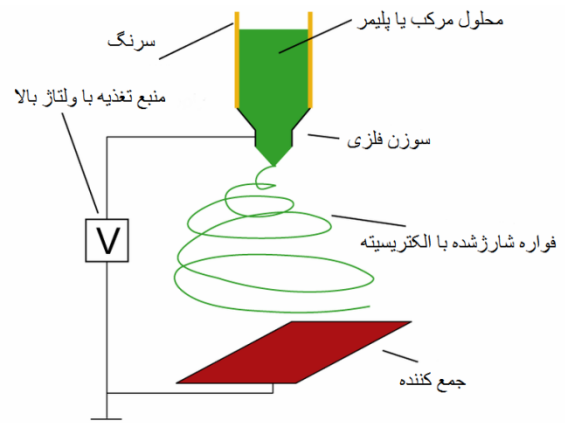


جابه‌جایی قطب‌ها با کمک ولتاژ به کار رفته این بار جای قطب منفی در سمت دیگر صفحه جمع کننده است. بنابراین ادامه نانو رشته پلیمری به سمت دیگر حرکت کرده و ردیف دوم را روی صفحه جمع کننده به وجود می‌آورد. بنابراین پلیمر روی صفحه جمع کننده در حال جابجایی بین دو قطب است. در این مسیر رفت و برگشت الیاف روی هم 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].

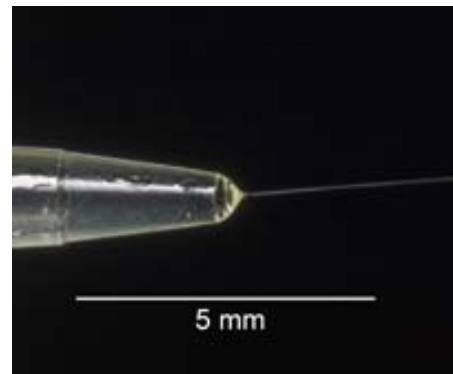
### معایب داربست‌های مهندسی بافت

داربست‌های مهندسی بافت بسیار پر کاربرد هستند ولی مشکل استفاده از آن‌ها مربوط به تغییر pH در ناحیه لانه‌گزینی است. به طوری 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 می‌شود 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 داربست‌ها



شکل ۱۱. تصویر شماتیک از الکترورسی [۱۰۲]



شکل ۱۲. تصویری از سورنگ الکترورسی در حالی که پلیمر از آن خارج می‌شود [۱۰۳]

با استفاده از نیروی گرانش، فشار مکانیکی سورنگ (شکل ۱۲) و میدان الکتریکی با ولتاژ بالا پلیمر از سورنگ خارج می‌شود. سطح هر پلیمر به طور 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 سورنگ و نازل، خارج می‌شود. همزمان حلال نیز تبخیر شده و تنها پلیمر که به صورت نانوفیبر جامدی است از نازل به طور 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

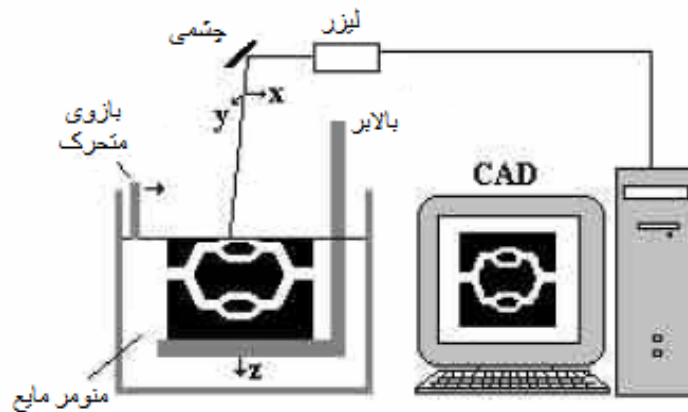
با کمک میکروکنترلرها در هر لایه می‌توان میزان نفوذ و انتشار مواد را در زمان‌های مختلف کشت بررسی کرد. دستگاه در ابتدا لایه‌های پایین و داخلی تر را ساخته و سپس به سمت سطح داریست برای ساخت لایه‌های سطحی نزدیک می‌شود [۴۷]. دستگاه SFF انواع مختلفی دارد ولی اساس تمام آن‌ها یکسان است و تنها تفاوت در روش طرح زدن روی داریست است. برای مثال در حالت چاپگر سه بعدی (Three Dimensional Printing (3DP)، میکروقطرات از نوک چاپگر خارج شده و روی پودر پلیمری داریست 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) استفاده کرد به طوری که در این روش با کمک لیزر، قالب پلیمری داریست لایه به لایه تراشیده می‌شود [۱۱۲]. در روش Fused Deposition Modelling (FDM) نیز حرارت به‌کار می‌رود. این حرارت می‌تواند به میله قابل ارتجاعی منتقل شود (در این حالت پلیمر به مانند ورقه‌های روی هم فشرده است) به طوری که این میله طرح مورد نظر را روی هر لایه می‌زند؛ بنابراین روی هر ورقه، طرح داریست رسوب می‌کند به طوری که گویی این ورقه‌ها دارای نوشته می‌شود و با ترکیب این ورقه‌ها روی هم داریست شکل می‌گیرد [۱۱۳]. در پلاتر سه بعدی (3D Plotter) نیز از حرارت استفاده می‌شود که نقش، لایه به لایه روی داریست زده می‌شود [۱۱۴].

برای سلول‌ها ناآشنا بوده و حتی ممکن است منجر به تحریک سیستم ایمنی شود [۱۰۸].

### ساخت داریست بر اساس تکنولوژی SFF

(Solid Freeform Fabrication)

تکنولوژی جدیدی که برای ساخت و طراحی داریست‌ها به‌کار می‌رود استفاده از تکنولوژی SFF است (شکل ۱۳). این روش با کمک نرم افزار و برنامه‌های کامپیوتری CAD/CAM (Computer Assisted Design And Manufacturing) انجام می‌شود. این روش به ما این اجازه را می‌دهد تا هر نوع داریست را به هر شکل و اندازه درآوریم به طوری که این داریست تنها برای محل جایگیری (محل لانه‌گزینی در بافت هدف) خود اختصاصی باشد. در این روش به‌طور دقیق، اختصاصی و حساس ساختار متخلخل داریست تهیه می‌شود. طراحی اولیه در نرم افزار انجام شده و سپس این طرح به دستگاه SFF داده می‌شود تا داریست به‌صورت لایه به لایه با کنترل دقیق ویژگی‌های ریخت‌شناسی، ترکیب شیمیایی و نیز ویژگی‌های مکانیکی در مدل فیزیکی ساخته شود [۱۰۹]. اندازه منافذ، میزان تخلخل، توزیع این میزان تخلخل، عمق داریست، فاصله لایه‌ها از یکدیگر، میزان نفوذ اکسیژن و مواد غذایی به هر لایه و نیز سرعت انتشار مواد بین لایه‌ها در این برنامه تعیین شده و سپس به اجرا در می‌آید تا در نهایت سیستم عروقی مصنوعی در داخل داریست برقرار شود.



شکل ۱۳. تصویر شماتیک از دستگاه SFF [۱۱۵]



غذایی به سطوح داخلی تر به سختی انجام می‌شود. در حالی که روش های جدید ساخت داربست با فرم آزاد جامد (SFF) با به کار بردن تکنولوژی بیوانفورماتیک و نرم افزار، به عنوان انقلابی در طراحی و ساخت به شمار می‌رود. در این روش برای هر لایه میکروکنترل‌هایی را تعبیه می‌کنند تا بدین ترتیب سیستم گردش مواد شبیه‌سازی شود. به طور خلاصه داربست‌ها دارای مزایا و محدودیت‌هایی هستند که روش های جدید برای کاهش محدودیت‌ها و افزایش مزایای استفاده از داربست‌هاست. این استفاده به طور چشم‌گیری در حال افزایش است به طوری 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

## 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، به منظور شبیه‌سازی حالت *in vivo* یا به عنوان کاشت‌های زیستی برای ترمیم بافت‌های بدن به کار 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

- 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, Asnagli 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, Elisseff 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 umbilical cord blood-driven CD34+ cells on a DBM scaffold coated by cord blood-driven 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](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-integrabiosciences/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\\_le\\_e.htm](http://cheed.nus.edu.sg/~chewch/NEW/students_le_e.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, Ponticello 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](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, Amirzadeh 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 (lactic 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.