

A Review on Different Approaches for Improving Cell Infiltration in Electrospun Nanofibrous Scaffolds

Sajedeh Khorshidi¹, Atefeh Solouk², Saideh Mazinani³, Hamid Mirzadeh^{4*}

- 1- M.Sc. Student, Department of Biomaterials and Tissue Engineering, Faculty of Biomedical Engineering, Amirkabir University of Technology, Tehran, Iran
- 2- Assistant Professor, Department of Biomaterials and Tissue Engineering, Faculty of Biomedical Engineering, Amirkabir University Technology, Tehran, Iran
- 3- Assistant Professor, Amirkabir Nanotechnology Research Institute, Amirkabir University Technology, Tehran, Iran
- 4- Professor, Faculty of Polymer Engineering, Amirkabir University Technology, Tehran, Iran

**Corresponding Address: P.O.Box: 15875-4413, Hafez Ave, Amirkabir University of Technology, Faculty of Polymer Engineering, Tehran, Iran
Email: Mirzadeh@aut.ac.ir*

Received: 06/May/2015, Accepted: 05/Jan/2016

Abstract

In recent years, electrospinning that has the capability to form polymeric nano-/microfibers has gained substantial attention for fabrication of tissue engineering scaffolds. The morphological resemblance to native extracellular matrix (ECM), high surface to volume ratio, high porosity, and pore interconnectivity are amongst the brilliant features of electrospun structures. The high surface area to volume ratio and interconnected pores of these fibrous meshes confer desirable cell attachment and growth. However, due to small pore sizes and high packing density of electrospun nanofibers, cell penetration into a conventional electrospun mat is completely restrained. Scarce cell infiltration in turn prohibit cell migration into internal parts of the scaffold, cause inhomogeneous cell distribution throughout the structure, limit vascularization, and impede tissue ingrowth. In fact, traditional electrospun nanofibrous scaffolds in practice act as two-dimensional (2D) surfaces rather than three-dimensional (3D) microenvironments. Thus far, a number of approaches have been employed to solve this problem, which range from simple variations in electrospinning parameters to intricate post-processing modifications. Some efforts directly manipulate the electrospun mat characteristics to enhance cell penetration, while others combine cells with scaffolds or encourage cells to migrate into internal parts with different stimuli. In the present study, we have attempted to provide an overview of different approaches offered for improving cell infiltration in electrospun scaffolds.

Keywords: Electrospinning, Tissue engineering, Scaffold, Cell infiltration

Pathobiology Research, Vol. 18 (2015-2016), No.4, Pages: 1-22

مروری بر روش‌های به‌کار رفته برای بهبود نفوذ سلولی در داربست‌های نانولیفی الکتروریسی شده

ساجده خورشیدی^۱، عاطفه سلوک^۲، سعیده مزینانی^۳، حمید میرزاده^{۴*}

- ۱- دانشجوی کارشناسی ارشد، گروه بیومتریال و مهندسی بافت، دانشکده مهندسی پزشکی، دانشگاه صنعتی امیر کبیر، تهران، ایران
 ۲- استادیار، گروه بیومتریال و مهندسی بافت، دانشکده مهندسی پزشکی، دانشگاه صنعتی امیر کبیر، تهران، ایران
 ۳- استادیار، پژوهشکده نانوفناوری امیر کبیر، دانشگاه صنعتی امیر کبیر، تهران، ایران
 ۴- استاد، دانشکده مهندسی پلیمر، دانشگاه صنعتی امیر کبیر، تهران، ایران

*آدرس نویسنده مسئول: ایران، تهران، کدپستی ۱۵۸۷۵-۴۴۱۳، خیابان حافظ، دانشگاه صنعتی امیر کبیر، دانشکده مهندسی پلیمر
 Email: Mirzadeh@aut.ac.ir

پذیرش مقاله: ۹۴/۱۰/۱۶

دریافت مقاله: ۹۴/۰۲/۱۷

چکیده

در سال‌های اخیر الکتروریسی با قابلیت ایجاد میکرو-نانوالیاف پلیمری مشابه ساختار لیفی ماتریس خارج سلولی توجه بسیاری را در تولید داربست‌های مهندسی بافت به خود معطوف ساخته است. شبیه‌سازی آرایش لیفی ماتریس خارج سلولی در بدن، نسبت سطح به حجم بالا، میزان تخلخل قابل توجه و پیوستگی کامل خلل و فرج‌ها از مهم‌ترین مزایای ساختارهای الکتروریسی شده است. درصد تخلخل بالا و پیوستگی خلل و فرج در این داربست‌ها، چسبندگی و رشد مناسب سلولی را به دنبال خواهد داشت. اما به سبب کوچکی اندازه حفرات و تراکم بالای الیاف، نفوذ سلولی در داربست‌های الکتروریسی شده محدود است. نفوذ سلولی اندک در داربست‌های الکتروریسی کاهش مهاجرت سلولی به بخش‌های داخلی ساختار، توزیع غیر یکنواخت جمعیت سلولی در کل داربست، رگ‌زایی کم و نفوذ اندک بافت را به دنبال دارد. در واقع داربست الکتروریسی شده بیش از آن‌که یک محیط سه‌بعدی برای اسکان و فعالیت‌های سلولی فراهم آورد یک بستر دوبعدی محسوب می‌شود. تا کنون روش‌های اصلاح شده الکتروریسی یا اصلاحات پس از فرآیند بسیاری برای حل این مشکل پیشنهاد شده است که تغییرات کوچک در پارامترهای الکتروریسی تا روش‌های پیچیده با نیازمندی‌های خاص را مورد توجه قرار داده است. در بسیاری از این تلاش‌ها مستقیماً با دستکاری مشخصات نمونه الکتروریسی شده نفوذ سلولی بهبود یافته است. حال آن‌که در برخی دیگر تشویق مهاجرت سلولی بدون تغییر ویژگی‌های نمونه الکتروریسی شده مورد توجه قرار گرفته است. در این مقاله مروری سعی بر این است تلاش‌های انجام شده در زمینه بهبود نفوذ سلولی در نانوالیاف الکتروریسی شده به تفصیل ارایه شود.

کلیدواژگان: الکتروریسی، مهندسی بافت، داربست، نفوذ سلولی

پژوهش‌های آسیب شناسی زیستی، دوره ۱۸، شماره ۴، زمستان ۱۳۹۴، صفحات: ۲۲-۱

مقدمه

یک سیستم الکتروریسی به‌طور کلی شامل منبع تغذیه، بخش تزریق و جمع‌کننده است [۱]. پمپ تزریق محلول یا مذاب پلیمری را به سوی سر سوزن می‌راند، ولتاژ الکتریکی بالا به

در سال‌های اخیر الکتروریسی (Electrospinning) با قابلیت ایجاد ساختارهای لیفی نفاخته شده توجه بسیاری را در تولید داربست‌های مهندسی بافت به خود معطوف ساخته است.

بهبود نفوذ سلولی در داربست‌های الکتروریسی شده

محیط زیستی سلول‌ها در یک محیط سه‌بعدی استقرار دارند که بر تمام رفتارهای آن‌ها اثرگذار است. بنابراین ایجاد محیط سه‌بعدی در داربست‌های الکتروریسی شده ضروری است. برای حل مشکل مذکور روش‌های اصلاح شده الکتروریسی یا اصلاحات پس از فرآیند بسیاری پیشنهاد شده است که تغییرات کوچک در پارامترهای الکتروریسی تا روش‌های پیچیده با نیازمندی‌های خاص را مورد توجه قرار داده است. برای بهبود نفوذ سلولی در داربست‌های الکتروریسی تلاش‌های بسیاری انجام شده است. در بسیاری از این تلاش‌ها مستقیماً با دست‌کاری مشخصات نمونه الکتروریسی شده، به عبارت دیگر؛ با افزایش اندازه خلل و فرج یا کاهش چگالی توده الیاف نفوذ سلولی بهبود یافته است. حال آن‌که برخی دیگر تشویق مهاجرت سلولی بدون تغییر ویژگی‌های نمونه الکتروریسی شده را مورد توجه قرار داده‌اند [۸]. روش‌های به کاررفته در چند گروه اصلی جای می‌گیرد که عبارتست از: (آ) افزایش اندازه حفرات و کاهش تراکم الیاف، (ب) همراهی عوامل زیستی مختلف با داربست، (پ) اسپری کردن یا لایه گذاری سلول‌ها میان الیاف، (ت) استفاده از کشت پویا و (ث) ترکیب الکتروریسی با دیگر روش‌های ساخت داربست. در این مقاله تلاش بر آن است تا مجموعه رویکردهای مورد استفاده برای بهبود نفوذ سلولی در داربست‌های الکتروریسی شده به تفصیل بیان شود. برای دریافت اطلاعات جامع درباره تمامی مشکلات مطرح در فرآیند الکتروریسی و راه‌حل‌های ارائه شده برای آن‌ها به مقاله مروری دیگری که توسط نویسندگان مقاله حاضر به چاپ رسیده است مراجعه شود [۸].

معرفی فرآیند الکتروریسی

در سال‌های اخیر الکتروریسی به روشی مورد توجه برای ساخت داربست‌های مهندسی بافت تبدیل شده است. فرآیند الکتروریسی به عملیاتی گفته می‌شود که در آن محلول یا مذاب پلیمری به الیافی در حد نانو یا میکرومتر تبدیل می‌شود [۹]. اجزای اصلی در یک سیستم الکتروریسی شامل منبع ولتاژ،

قطره مایع شکل گرفته در سر سوزن اعمال شده و بدنه قطره دارای بار می‌شود. قطره سیال تغییر شکل می‌دهد و شکل مخروطی موسوم به مخروط تیلور (Taylor cone) را ایجاد می‌کند. پس از غلبه نیروی الکتروستاتیک بر کشش سطحی مایع پرتاب جریان مایع از نوک مخروط، حرکت جریان باردار به سوی جمع‌کننده و در نهایت رسوب الیاف پلیمری بر سطح جمع‌کننده را خواهیم داشت [۲].

پارامترهای بسیاری فرآیند الکتروریسی و ویژگی‌های ریخت‌شناسی (Morphology) الیاف حاصل از آن را تحت تأثیر قرار می‌دهد. از آن جمله می‌توان به وزن مولکولی پلیمر، غلظت، کشش سطحی، گرانیروی و هدایت محلول پلیمری، ولتاژ، نرخ تزریق، فاصله ریسند جمع‌کننده، نوع جمع‌کننده و شرایط محیطی اشاره کرد [۲-۴].

الکتروریسی قابلیت تولید الیافی در محدوده چند نانومتر تا چند میکرومتر را دارا است. از مهم‌ترین مزایای نانوالیاف الکتروریسی شده می‌توان به تقلید ساختار لیفی ماتریس خارج سلولی، نسبت سطح به حجم بالا، درصد تخلخل بالا و پیوستگی کامل خلل و فرج‌ها اشاره کرد. مزایای مذکور به همراه امکان فرآیند گسترده وسیعی از پلیمرهای طبیعی و سنتزی و سادگی فرآیند، الکتروریسی را به روشی مورد توجه برای تولید نانوالیاف برای کاربردهای مهندسی بافت مبدل ساخته است.

برخلاف مزایای مذکور، الیاف الکتروریسی شده محدودیت‌هایی را نیز دارند. از مهم‌ترین این محدودیت‌ها می‌توان به نفوذ سلولی اندک در نمونه‌های نانولیفی اشاره کرد. این نفوذ سلولی اندک به کوچکی حفرات و تراکم بالای الیاف در نمونه‌های نانولیفی نسبت داده شده است [۵].

نفوذ سلولی اندک، مهاجرت سلولی کم به بخش‌های داخلی ساختار، توزیع ناهمگن جمعیت سلولی در کل ساختار، کاهش رگ‌زایی و رشد بافت به داخل ساختار را به دنبال خواهد داشت [۶، ۷]. در واقع داربست الکتروریسی شده بیش از آن‌که یک محیط سه‌بعدی برای اسکان و فعالیت‌های سلولی فراهم آورد یک بستر دوبعدی محسوب می‌شود. حال آن‌که در

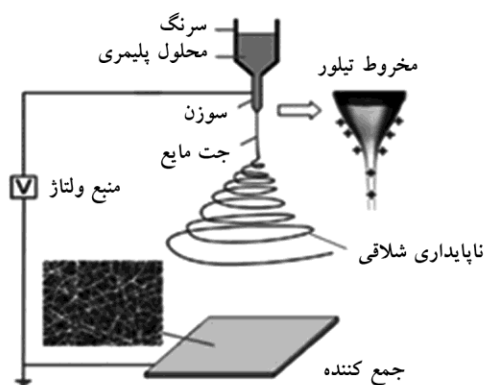
اعمالی از خارج. این قطره با افزایش شدت میدان الکتریکی در جهت میدان رفته رفته کشیده می شود و کشیدگی آن با توازن نیروهای الکتریکی و سطحی تعیین می شود. با افزایش شدت میدان به یک میزان بحرانی (E^*)، قطره به شکل مخروطی با نیم زاویه مشخصه ۳۰ درجه و بالاتر در می آید که با نام مخروط تیلور شناخته می شود. افزایش بیشتر در شدت میدان، ناپایداری قطره و پرتاب جت سیال از نوک قطره را سبب می شود. در مرحله اول، ولتاژ بحرانی لازم برای ایجاد جریان از مخروط تیلور با رابطه ۱ قابل محاسبه است [۱۲، ۱۳].

رابطه ۱:

$$V_c^2 = 4 \frac{H^2}{h^2} \left(\ln \left(\frac{2h}{R} \right) - 1.5 \right) (1.3\pi R \gamma) (0.09)$$

که در آن H فاصله سوزن جمع کننده، h طول ستون مایع، R شعاع خارجی سوزن، V_c ولتاژ بحرانی و γ کشش سطحی است. قطر جت سیال با افزایش فاصله از سوزن کاهش یافته و زمان لازم برای باز توزیع بار اضافه در امتداد طول جت افزایش می یابد که تغییر مکان بارهای الکتریکی و ناپایداری جت را به دنبال دارد. به عبارت دیگر؛ پس از مسیر مستقیم، جت دچار تغییر شکل خمشی می شود، به اطراف متمایل شده و حرکات حلقه ای مارپیچی را انجام می دهد. در هر حلقه قطر جت کاهش یافته، درحالی که قطر حلقه افزایش می یابد. ناپایداری مذکور، ناپایداری خمشی یا شلاقی نامیده می شود. ناپایداری مذکور سبب افزایش زمان حرکت جت سیال، افزایش طول مسیر طی شده توسط آن، تشدید تبخیر حلال و کاهش قطر الیاف می شود [۱، ۱۳]. پس از طی مسیر، قطر ناپایداری خمشی رفته رفته کاهش می یابد. در فرآیند امتدادیابی جت، حلال موجود تبخیر می شود و الیاف پلیمری باردار بر جای می ماند. ویژگی های ریخت شناسی و ساختار الیاف جمع شده وابستگی شدیدی به نحوه جمع آوری دارد. صفحات جمع کننده ساکن، جمع کننده های چرخان، قابی، حمام حلال و میدان های الکتریکی و مغناطیسی کمکی می تواند به عنوان جمع کننده استفاده شود و ایجاد ساختارهایی با جهت گیری ویژه، ساختارهای حلقه ای، لوله ای و غیره را امکان پذیر سازد [۱۱، ۱۳].

ریسنده، پمپ تزریق و جمع کننده الیاف است. در فرآیند الکترورسی، قطره محلول یا مذاب پلیمری تحت میدان الکتریکی با شدت بالا واقع می شود. نیروی الکترواستاتیک اعمالی از سوی میدان سبب تغییر شکل قطره می شود. هنگامی که دافعه الکترواستاتیک بر کشش سطحی قطره غلبه کند، کشیدگی قطره و پرتاب جریان مایع از سطح آن رخ می دهد. جت سیال ایجاد شده به سمت صفحه جمع کننده حرکت می کند، در این مسیر تبخیر حلال، خمش و کشیدگی الیاف پلیمری رخ می دهد و در نهایت الیاف پلیمری باردار در صفحه جمع کننده واقع می شود (شکل ۱) [۱۰]. فرآیند الکترورسی به سه مرحله تقسیم می شود. شکل گیری جت و امتداد یابی آن در یک خط راست، رشد ناپایداری خمشی الکتریکی و امتداد یابی بیشتر و در نهایت جامد شدن جت سیال و رسوب الیاف در سطح جمع کننده [۱۱].



شکل ۱ نمایش فرآیند الکترورسی [۱۲]

اولین گام در فرآیند الکترورسی شکل گیری قطره باردار در سر الکتروود اولیه است. زمانی که ولتاژ بالا به نازل اعمال می شود، سطح قطره که در نوک نازل توسط کشش سطحی سیال ثابت نگه داشته شده است به شکل الکتریکی باردار شده و تحت تأثیر دو نیروی الکترواستاتیک قرار می گیرد: دافعه الکترواستاتیک بین بارهای هم نام موجود در سطح و نیروی کولنی (Coulomb force) اعمال شده توسط میدان الکتریکی

داربست باید چسبندگی سلولی، انتقال اکسیژن، مواد غذایی و مواد زاید را فراهم آورد. بنابراین مساحت سطحی بالا و ساختار سه‌بعدی متخلخل با خلل و فرج باز و به هم پیوسته مورد نیاز است. معماری، درصد تخلخل و اندازه خلل و فرج داربست از عوامل تعیین‌کننده در این زمینه هستند [۱۹، ۲۰]. این عوامل میزان نفوذ سلول و بافت به داخل داربست مهندسی شده را تعیین می‌کند. به علاوه؛ بر فرآیندهای سلولی دیگر چون چسبندگی، مهاجرت، تکثیر، ویژگی‌های ریخت‌شناسی، بیان فنوتیپ، سنتز DNA و تشکیل ECM نیز مؤثر است. از سویی؛ تبادل مواد غذایی، متابولیت‌ها و مواد دفعی داربست با محیط پیرامون را تحت تأثیر قرار می‌دهد. چنین انتقالاتی در محیط آزمایشگاه و بلافاصله پس از کاشت در بدن پیش از رگ‌زایی ضروری است. در زیر نقش این پارامترها بر برخی از رفتارهای سلولی به تفصیل شرح داده شده است:

رابطه میان پارامترهای سیستم متخلخل و چسبندگی و نفوذ سلولی

با کاهش اندازه خلل و فرج‌ها فضای در دسترس برای چسبندگی سلولی افزایش می‌یابد. در واقع با کاهش اندازه خلل و فرج، جذب پروتئین‌های واکنشی از سرم افزایش یافته و نواحی اتصالی بیشتری برای چسبندگی سلولی فراهم می‌آید. اما باید توجه داشت در صورتی که اندازه خلل و فرج از قطر سلول‌ها کوچک‌تر شود نفوذ سلولی به بخش‌های داخلی ساختار دشوار می‌شود [۲۰].

رابطه میان پارامترهای سیستم متخلخل و تکثیر سلولی

علاوه بر چسبندگی و مهاجرت سلولی، پارامترهای یک سیستم متخلخل روی تکثیر سلولی اثرگذار است. در داربست‌هایی با اندازه خلل و فرج بسیار کوچک (کوچک‌تر از قطر سلول) نمونه مانند یک ساختار دوعدی عمل می‌کند. سلول‌ها تنها در سطح چسبیده و پس از مدتی غشاهای سلولی

مزایای الکتروریسی

از مهم‌ترین ویژگی‌های الیاف الکتروریسی شده تقلید ساختار لیفی ماتریس خارج سلولی است. ماتریس خارج سلولی در بدن پیچیده، پویا و دارای ویژگی‌های متفاوت برای هر بافت است. اما به طور کلی از زمینه پلی ساکاریدی و الیاف پروتئینی تشکیل شده است. این الیاف علاوه بر تأمین حمایت ساختاری و پیوستگی مکانی برای بافت، مکانی برای اتصال و تنظیم رفتارهای سلولی به‌شمار می‌رود. قطر الیاف ماتریس خارج سلولی (Extra Cellular Matrix: ECM) در محدوده ۵۰-۵۰۰ نانومتر گزارش شده، محدوده‌ای که قابل پوشش توسط الیاف الکتروریسی شده است. نسبت سطح به حجم بالا، درصد تخلخل بالا، سهولت عملکردی ساختن برای اهداف گوناگون و خواص مکانیکی قابل کنترل از مزایای دیگر نمونه‌های الکتروریسی شده است. امروزه امکان الکتروریسی پلیمرهای زیست‌سازگار و زیست‌تخریب‌پذیر طبیعی و سنتزی بسیاری وجود دارد. مزایای مذکور به همراه امکان تولید انبوه و سادگی فرآیند، الکتروریسی را به روشی فراگیر و مورد توجه برای تولید الیاف مبدل ساخته است [۱۴-۱۶].

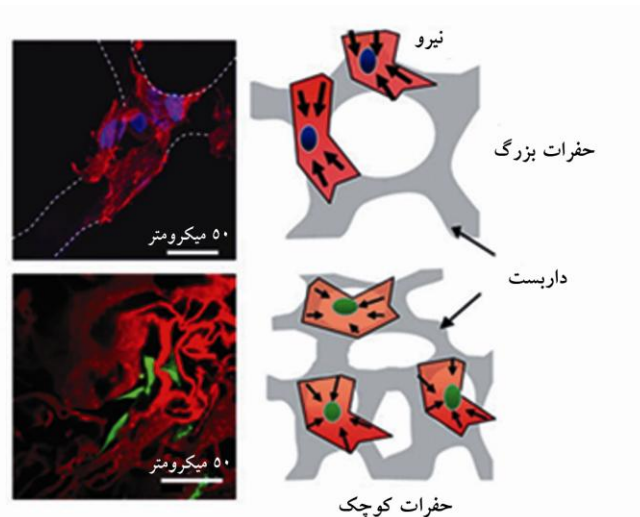
اهمیت تخلخل در داربست‌های مهندسی بافت

داربست‌های مهندسی بافت در نقش جایگزین در مواردی که ECM بافت طبیعی به سبب بیماری، آسیب یا مشکلات مادرزادی از بین رفته است، حمایت موقت برای سلول‌ها را فراهم می‌آورد. در بدن این ماتریس، بافت‌های مختلف را از یکدیگر جدا کرده، ساختار حمایتی برای سلول‌ها ایجاد کرده و محرک‌های فیزیکی و شیمیایی مختلف را برای رفتارهای سلولی فراهم می‌آورد [۱۷]. بنابراین تعریف ویژگی‌هایی برای ساختار جایگزین آن ضروری است. زیست‌سازگاری، زیست‌تخریب‌پذیری با نرخ تخریب مناسب، قابلیت سترون شدن، هم‌خوانی با خواص مکانیکی بافت طبیعی و امکان ایجاد چسبندگی و سایر رفتارهای سلولی از جمله ویژگی‌های لازم برای یک داربست است [۱۸]. علاوه بر آن چه گفته شد

رابطه میان پارامترهای سیستم متخلخل و تمایز سلولی

در صورت استفاده از سلول‌های بنیادی یا سلول‌های پیش‌ساز (Progenitor cells) همراه با داربست مهندسی شده، پارامترهای سیستم متخلخل بر تمایز به رده هدف موثر خواهد بود. سلول‌ها قادر به حس نیروهای مکانیکی موجود در محیط پیرامون خود هستند. در نمونه‌هایی با اندازه خلل و فرج بزرگ‌تر از قطر سلول، سلول نمونه را به صورت یک ساختار مسطح یا حداکثر سطح منحنی شکل دریافت می‌کند و ساز و کار انتقال پیام مکانیکی از محیط به سلول مانند بستر دویعدی است. با کاهش اندازه خلل و فرج‌ها، سلول از حالت کاملاً پخش شده و تحت نیروی کششی بالا به حالت فشرده که با تمام ابعاد در تماس است تغییر می‌یابد. با تغییر نیروهای اعمالی به سلول، مسیرهای تمایزی ویژه فعال خواهد شد (شکل ۲) [۲۳].

به یکدیگر رسیده و به سبب پدیده مانع تماسی (Contact inhibition) به یکدیگر پیام‌های مرگ ارسال می‌کنند. اگرچه ممکن است در روزهای نخست کشت تعداد سلول‌ها در نمونه با اندازه خلل و فرج کوچک‌تر بیشتر از تعداد سلول‌ها در نمونه با اندازه خلل و فرج بزرگ‌تر باشد. زیرا چنین نمونه‌ای سطح تماس بیشتری را برای چسبندگی سلولی فراهم می‌آورد، اما پس از مدتی مرگ سلولی بر تکثیر سلولی پیشی می‌گیرد. این درحالی است که در نمونه‌ای با قطر خلل و فرج بزرگ‌تر سلول‌ها به بخش‌های داخلی ساختار نفوذ کرده و توزیع همگنی از سلول‌ها در ساختار ایجاد می‌شود. از سوی دیگر، کوچکی خلل و فرج‌ها کاهش انتقال مواد حیاتی، ایجاد نواحی فقیر از اکسیژن و مواد غذایی در ساختار و مرگ سلولی را به دنبال دارد. به علاوه سلول‌هایی که به هر دلیل دچار مرگ شده در ساختار باقی مانده و ممکن است بر سلامت سلول‌های مجاور اثر نامطلوب بگذارد [۲۱، ۲۲].



شکل ۲ نیروی مکانیکی دریافتی توسط سلول‌ها در ساختارهایی با اندازه خلل و فرج متفاوت [۲۳]

افزایش دهد. گزارش‌های متعددی نشانگر آن است که داربست‌های متخلخل نسبت به نمونه‌های غیرمتخلخل پاسخ جسم خارجی کمتر و فیروز کمتری ایجاد می‌کند. البته اندازه و

رابطه میان پارامترهای سیستم متخلخل و پاسخ ایمنی

داربست‌های مهندسی بافت می‌توانند با افزایش رگ‌زایی و کاهش تشکیل کپسول فیروز حیات و پیوستگی خود را

بهبود نفوذ سلولی در داربست‌های الکتروریسی شده

داربست توانایی آن در ایجاد سیستم رگی مناسب است. برای ایجاد چنین سیستمی، فعالیت دو گروه از سلول‌ها یعنی سلول‌های اندوتلیال و سلول‌های ایمنی اثرگذار است. در مرحله اول، ساختار باید فراخوانی و مهاجرت سلول‌های ایمنی را در حد مطلوب (و نه بیش از حد) فراهم آورد و در مرحله بعد مهاجرت سلول‌های اندوتلیال به بخش‌های داخلی را امکان‌پذیر سازد. مهاجرت بهینه سلول‌های اندوتلیال برای خلل و فرج‌هایی در محدوده ۳۰-۳۵ میکرومتر فراهم است [۲۵].

تخلخل و اندازه خلل و فرج داربست‌های الکتروریسی شده

ویژگی خلل و فرج از خصوصیات ساختاری مهم برای هر شبکه بافته نشده است. اندازه و شکل خلل و فرج‌ها نقش مهمی در نفوذپذیری، تصفیه و خصوصیات مکانیکی ساختار ایفا می‌کند. به‌علاوه؛ اندازه ویژه خلل و فرج‌ها رشد و سنتز ECM را به‌دنبال خواهد داشت. از ویژگی‌های قابل توجه در داربست‌های الکتروریسی درصد تخلخل بالا و پیوستگی کامل خلل و فرج‌ها است. درصد تخلخل بالا، پیوستگی خلل و فرج و نسبت سطح به حجم بالا در این داربست‌ها، چسبندگی و رشد مناسب سلولی را به‌دنبال خواهد داشت. اما خلل و فرج‌های کوچک نمونه‌های نانولیفی مهاجرت سلولی به داخل ساختار و رشد غیرکافی بافت را سبب می‌شود [۲۷].

دشواری نفوذ سلولی در داربست‌های الکتروریسی و علل آن

اگرچه داربست‌های الکتروریسی شده ابزاری مؤثر در چسبندگی و رشد سلولی محسوب می‌شوند اما نفوذ سلولی به داخل ساختار به‌عنوان یک چالش مطرح است (شکل ۳). این امر به اندازه کوچک خلل و فرج و تراکم بالای الیاف در ساختار الکتروریسی شده نسبت داده شده است. نفوذ سلولی اندک به داربست‌های الکتروریسی کاهش مهاجرت سلولی به

شکل خلل و فرج‌ها در این زمینه پارامترهایی تعیین‌کننده است [۲۴]. بررسی‌ها نشان می‌دهد داربست‌های متخلخل با خلل و فرج‌های کروی و اندازه خلل و فرج در محدوده ۳۰-۴۰ میکرومتر کمترین میزان فیبروز و بیشترین میزان رگ‌زایی را سبب می‌شود. این درحالی است که نمونه‌های متخلخل با اندازه خلل و فرج بیش از ۹۰ میکرومتر کاهش رگ‌زایی و افزایش ضخامت کپسول فیروز را به دنبال دارد [۲۵].

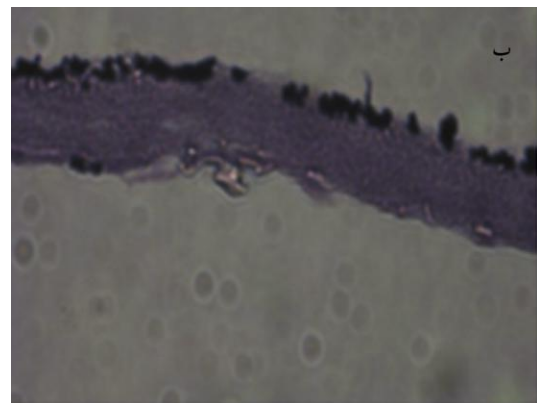
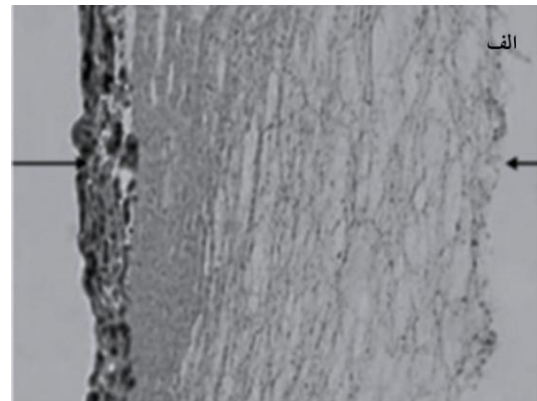
در محدوده ۱۰-۴۵ میکرومتر خلل و فرج‌ها غالباً با بافت فیروهِستِیوسیتیک (Fibrohistiocytic tissue) اشغال می‌شود. این بافت شامل اجزای بافت فیروزی و ماکروفاژهای بافتی است. ماکروفاژهای بافتی در تغییر بافت به سمت بافت طبیعی و کاهش تشکیل بافت فیروزی اثرگذار است. در مورد خلل و فرج‌های بالای ۴۵ میکرومتر ساختار غالباً با بافت فیروزی منظم و دارای عروق خونی بسیار پر می‌شود. در اندازه خلل و فرج‌های بسیار بزرگ (بزرگ‌تر از ۲۰۰ میکرومتر) نیز نمونه با بافت فیروزی شل و فاقد سلول اشغال می‌شود [۲۴].

پارامتر مهم دیگر در تعیین زیست‌سازگاری فعالیت ماکروفاژها است. ماکروفاژها براساس محرک‌های محیطی، فنوتیپ‌های متفاوتی ارایه می‌دهند که از مطرح‌ترین آن‌ها می‌توان به M_1 و M_2 اشاره کرد. هر یک از فنوتیپ‌های ماکروفاژی عملکرد متفاوتی ارایه می‌دهد. فنوتیپ M_1 به‌عنوان کشنده عوامل میکروبی و عامل پیش‌التهابی محسوب می‌شود. درحالی که فنوتیپ M_2 به‌عنوان عامل ضد التهاب، تنظیم‌کننده سیستم ایمنی، فعال در رگ‌زایی، ترمیم و تغییر بافتی عمل می‌کند. معماری داخلی داربست بر میزان و فنوتیپ ماکروفاژهای فعال شده اثرگذار است. به‌نظر می‌رسد اندازه خلل و فرج ویژه داربست سبب می‌شود تا خلل و فرج‌ها به‌صورت گسترده توسط نسبت بالای از ماکروفاژهای M_2 به M_1 تحت حمله قرار گرفته و ترمیم بافتی به التهاب بیش از اندازه پیشی گیرد [۲۶].

رابطه میان پارامترهای سیستم متخلخل و رگ‌زایی

عامل تعیین‌کننده دیگر در تعیین زیست‌سازگاری یک

بخش‌های داخلی ساختار، توزیع غیر یکنواخت جمعیت سلولی در کل داربست، رگ‌زایی اندک و نفوذ اندک بافت به داخل ساختار را به دنبال دارد [۸].



شکل ۳ نمایش دشواری نفوذ سلولی در داربست الکتروریسی شده (الف) تصویر میکروسکوپ نوری (ب) تصویر رنگ‌آمیزی هماتوکسیلین و انوزین (H&E: Hematoxylin and eosin) از سطح مقطع نمونه پس از ۷ روز کشت [۲۰]

فرج کوچک‌تر محدود می‌شود [۲۸]. علت دیگر برای نفوذ سلولی محدود در داربست‌های الکتروریسی شده، تراکم بالای الیاف موجود در ساختار است. در یک جمع‌کننده متداول، بار به صورت همگن روی سطح فلزی توزیع می‌شود و گروهی از الیاف در کنار یکدیگر در یک لایه واقع می‌شوند. لایه‌های بعدی نیز بر سطح لایه‌های موجود شکل می‌گیرند. اما هر لایه تمایل بالایی به سطح جمع‌کننده را دارا است که نهایتاً ساختاری با تراکم بالای الیاف را ایجاد می‌کند [۲۹، ۳۰].

روش‌های بهبود نفوذ سلولی در داربست‌های الکتروریسی شده

برای بهبود نفوذ سلولی در داربست‌های الکتروریسی، غالباً افزایش اندازه خلل و فرج ضمن حفظ ویژگی‌های ریخت‌شناسی و پیوستگی تخلخل داربست مورد توجه واقع شده است. خصوصیات فیزیکی داربست‌های الکتروریسی شده مانند ویژگی‌های ریخت‌شناسی، قطرالیاف، میزان تخلخل، اندازه خلل و فرج و خصوصیات مکانیکی به پارامترهای الکتروریسی و اصلاحات پس از فرآیند وابسته است.

از این رو روش‌های اصلاح شده الکتروریسی یا اصلاحات پس از فرآیند بسیاری برای حل این مشکل پیشنهاد شده است که تغییرات کوچک در پارامترهای الکتروریسی تا روش‌های پیچیده با نیازمندی‌های خاص را مورد توجه قرار داده است.

نخستین تلاش انجام گرفته در این زمینه به سال ۲۰۰۵ باز می‌گردد. برای نخستین بار در بررسی انجام شده توسط ژانگ (Zhang) و همکاران مهاجرت سلول‌های بنیادی مزانشیمی در داربست‌های الکتروریسی پلی‌کاپرولاکتون (Polycaprolactone) و آمیزه پلی‌کاپرولاکتون-ژلاتین مورد مقایسه واقع شده و مهاجرت دو برابری در نمونه آمیزه نسبت به نمونه خالص گزارش شده است که امروزه به نقش ژلاتین در هدایت رفتارهای سلولی و انحلال تدریجی آن در محیط کشت و بزرگ‌تر شدن خلل و فرج‌ها نسبت داده شده است [۳۱]. تلاش‌های بعدی انجام شده برای بهبود نفوذ سلولی در داربست‌های الکتروریسی را می‌توان در چند

قطر خلل و فرج و قطرالیاف الکتروریسی دو پارامتر مرتبط است. بنابراین حصول داربستی با الیاف میکرو یا نانومتر و اندازه خلل و فرج ماکرومتر با فرآیند الکتروریسی به شیوه متداول امکان‌پذیر نیست. اندازه خلل و فرج مورد نیاز برای نفوذ سلول‌های مختلف متفاوت است. به هر حال اندازه خلل و فرج بهینه برای بسیاری از سلول‌ها در محدوده ۱۰۰-۵۰۰ میکرومتر است و نفوذ سلولی به داربست در صورت خلل و

بهبود نفوذ سلولی در داربست‌های الکتروریسی شده

سال ۲۰۱۱ با افزایش نرخ تزریق محلول الکتروریسی، درصد تخلخل، اندازه خلل و فرج و ضخامت ساختار تهیه شده از الاستین را افزایش داده‌اند که در نهایت بهبود مهاجرت فیروبلاست‌های پوستی در شرایط درون تنی و برون‌تنی و مشاهده مراحل اولیه رگ‌زایی را به دنبال داشته است [۳۵].

زندر (Zander) و همکاران در سال ۲۰۱۳ با افزایش غلظت محلول الکتروریسی پلی‌کاپرولاکتون، اندازه خلل و فرج داربست تهیه شده و نفوذ سلولی به بخش‌های داخلی آن را بهبود داده‌اند [۳۷].

اگرچه افزایش قطر الیاف، افزایش اندازه خلل و فرج و بهبود نفوذ سلولی را به دنبال خواهد داشت اما در این حالت سطح در دسترس برای چسبندگی سلولی کاهش می‌یابد. به علاوه؛ با افزایش قطر الیاف فنوتیپ مناسب سلولی در شرایط درون تنی حاصل نخواهد شد. یک داربست ایده‌آل باید توازن میان چسبندگی و نفوذ سلولی فراهم آورد، از یک سو سطح مناسب و قابل توجهی برای چسبندگی سلولی فراهم آورد و از سوی دیگر مهاجرت سلولی به بخش‌های داخلی ساختار را ممکن سازد. بنابراین ایجاد توازن میان قطر الیاف و حفرات ضروری است. به نظر می‌رسد اندازه خلل و فرج چنین داربستی باید با توجه به قطر سلول هدف انتخاب شود. قطر سلولی در بافت‌های مختلف در محدوده چند تا چند صد میکرومتر است. در واقع کمینه اندازه خلل و فرج داربست الکتروریسی باید از قطر سلول هدف بزرگ‌تر باشد. ترکیبی از نانو و میکروالیاف می‌تواند روشی مناسب برای حصول چسبندگی و نفوذ مناسب سلولی به صورت همزمان باشد. الیاف نانو چسبندگی مناسب و الیاف میکرو نفوذ کافی سلولی را تضمین می‌کنند.

علاوه بر پارامترهای مذکور، تغییر شرایط دیگر مانند شرایط محیطی نیز می‌تواند بر بهبود نفوذ سلولی اثر گذار باشد. به عنوان مثال افزایش دمای کنترل شده در طول فرآیند، افزایش نرخ تبخیر حلال و کاهش ادغام الیاف را به دنبال خواهد داشت. در بررسی انجام شده توسط شعبانی و همکاران، تمرکز حرارت در محدوده انتهایی حرکت جت به سمت جمع‌کننده توسط آرایه‌ای از

گروه به شرح زیر جای داد:

تغییر پارامترهای الکتروریسی

ساده‌ترین راه برای افزایش اندازه خلل و فرج داربست‌های الکتروریسی تغییر پارامترهای سیستم یا فرآیند در عملیات است. به طور کلی خلل و فرج بزرگ‌تر با افزایش قطر الیاف قابل حصول است. در مقالات ارائه شده توسط پزشکی و همکاران اثر تغییر پارامترهای الکتروریسی بر قطر الیاف با ارزیابی‌های تجربی و مدل‌سازی‌های ریاضی به تفصیل بررسی شده است [۳، ۱۵]. در پژوهش انجام شده توسط کوشا و همکاران نیز اثر این عوامل بر قطر نانوالیاف مطالعه شده است [۹، ۱۴]. رابطه میان قطر الیاف و اندازه خلل و فرج با بررسی‌های تجربی و مدل‌سازی‌های آماری ثابت شده است [۳۲]. این امر در داربست‌های تهیه شده از پلی‌کاپرولاکتون [۳۳]، ژلاتین [۳۴] و تروپوالاستین (Tropoelasin) [۳۵] بررسی شده است.

به عنوان مثال افزایش ۲/۵ برابری در قطر الیاف داربست تهیه شده از پلی‌کاپرولاکتون افزایش ۲/۲۵ برابری در قطر متوسط خلل و فرج را در پی داشته است [۳۶]. الیاف با قطر بزرگ‌تر معمولاً با افزایش غلظت یا نرخ جریان محلول پلیمری در فرآیند الکتروریسی حاصل می‌آید. این رویکرد به صورت موفقیت‌آمیز مهاجرت سلول‌های بنیادی مزانشیمی [۳۶]، مایوفیبروبلاست‌ها (Myofibroblasts) [۳۳] و استئوبلاست‌ها (Osteoblasts) [۳۴] در داربست‌های الکتروریسی با مواد پایه مختلف را سبب شده است.

بالگوئید (Balguid) و همکاران در سال ۲۰۰۹ با تغییر برخی از پارامترها (غلظت محلول، نرخ تزریق و ولتاژ اعمالی) نمونه‌های الکتروریسی با بازه‌ای از قطر الیاف را تهیه کرده‌اند. با افزایش قطر الیاف مهاجرت سلولی به بخش‌های داخلی داربست بهبود یافته و نفوذ کامل در نمونه‌ای با قطر خلل و فرج در محدوده قطر سلولی مورد استفاده به دست آمده است [۳۳].

رن جاک کواسینا (Rnjak-Kovacina) و همکاران در

لامپ‌های هالوژنی، کاهش تراکم توده ساختار، افزایش ضخامت و بهبود نفوذ سلولی را به دنبال داشته است [۵].

افزایش اندازه خلل و فرج در داربست‌های الکتروریسی با تغییر شکل جمع‌کننده الیاف نیز حاصل می‌آید. استفاده از جمع‌کننده‌هایی با الگوی ویژه در بخش‌های فلزی و ایجاد بخش‌های نارسانا در کل ساختار [۳۸]، کاربرد جمع‌کننده‌های عایق با بخش‌های انتخابی فلزی [۳۰] و استفاده از محفظه فلزی حاوی مایع برای جمع کردن الیاف نمونه‌هایی از این مورد است [۳۹].

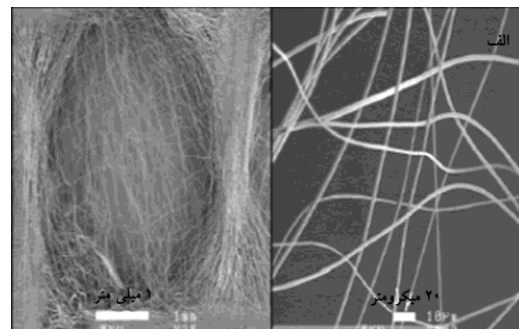
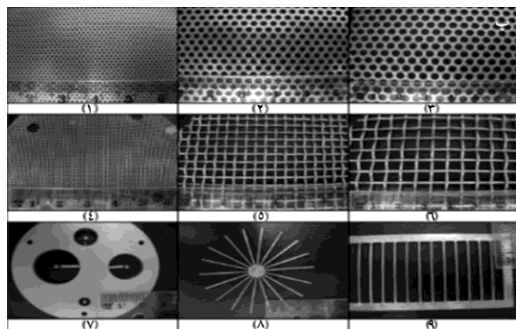
در سیستم‌های الکتروریسی متداول، استفاده از جمع‌کننده‌های رسانا سبب پخش بار به صورت یکنواخت در سطح وسیعی می‌شود. بنابراین گروهی از الیاف در کنار یکدیگر در یک لایه رسوب کرده و لایه بعدی روی لایه حاضر شکل می‌گیرد. اما لایه‌های فوقانی نیز کشش قوی نسبت به جمع‌کننده را دارند. که شکل‌گیری ساختاری با تراکم بالای الیاف را سبب می‌شود. بنابراین به نظر می‌رسد تغییر ساختار جمع‌کننده و ایجاد بخش‌های نارسانا در آن بتواند سبب تغییر شکل میدان الکترواستاتیک خارجی و

کاهش چگالی توده الیاف شود [۳۰].

در سال ۲۰۱۱ بلکنی (Blakeney) و همکاران آرایش ویژه از جمع‌کننده از یک فوم کروی با پوشش پستی فلزی و سوزن‌های فولادی تهیه کرده و شکل‌گیری ساختار لیفی سه بعدی با تراکم کمتر الیاف و نفوذ سلولی بهتر را گزارش کرده‌اند [۳۰].

در سال ۲۰۱۲ نیز تلاش مشابه‌ای توسط فیس (Phipps) و همکاران برای بهبود نفوذ سلولی در داربست تهیه شده از پلی‌کاپرولاکتون-کلاژن-هیدروکسی آپاتیت (Polycaprolactone-collagen-hydroxyapatite) انجام شده است. با این حال تنها تهیه داربست با این روش از نمونه پلی‌کاپرولاکتون خالص موفق‌آمیز بوده است [۶].

در بررسی انجام شده توسط وکت (Vaquette) و کوپروایت (Cooper-White) جمع‌کننده‌های رسانا با اشکال و الگوهای متفاوتی از بخش‌های رسانا طراحی و مورد استفاده واقع شده و بهبود نفوذ سلولی در نمونه‌های تشکیل شده روی سطوح دارای الگو نسبت به سطوح صاف گزارش شده است (شکل ۴) [۳۸].



شکل ۴ الف) استفاده از جمع‌کننده‌هایی با الگوی ویژه برای افزایش اندازه خلل و فرج در داربست‌های الکتروریسی ب) تصویر میکروسکوپ الکترونی روبشی از داربست تهیه شده با استفاده از جمع‌کننده با الگوی ویژه و نمایش بزرگ شدن خلل و فرج [۳۸]

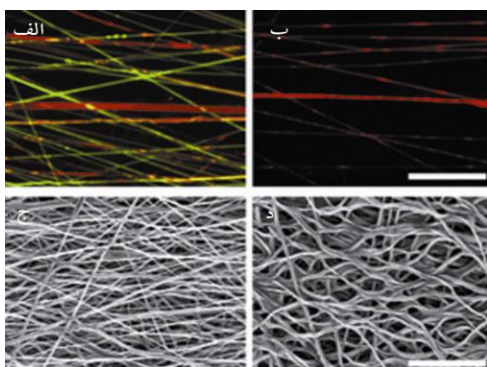
علاوه بر جمع‌کننده‌هایی با بخش‌های انتخابی هادی، محفظه فلزی حاوی مایع نیز می‌تواند به عنوان جمع‌کننده الیاف استفاده شود. استفاده از محفظه فلزی حاوی مایع به الکتروریسی تر (Wet electrospinning) اشاره دارد. الکتروریسی تر از یک محفظه فلزی با یک مایع مناسب به عنوان جمع‌کننده استفاده می‌کند. سپس نمونه حاصل توسط خشک‌کشی انجمادی یا

اگرچه تغییر ساختار جمع‌کننده سبب تولید نانوالیافی با تراکم کمتر می‌شود، اما طراحی، ساخت و کاربرد این جمع‌کننده‌ها پیچیده و دشوار است. مشکل دیگر در کاربرد جمع‌کننده‌های مذکور از دست رفتن الگوی اولیه ایجاد شده با افزایش ضخامت نمونه است؛ بنابراین این روش برای ساخت داربست‌های نانولیفی با ضخامت زیاد قابل استفاده نیست.

بهبود نفوذ سلولی در داربست‌های الکتروریسی شده

رسوب می‌کند. در مرحله بعد نمونه تهیه شده در آب یون زدوده واقع شده و بلورهای نمک خارج می‌شود و جای خالی باقی مانده از خروج آن‌ها، ایجاد خلل و فرج بزرگ‌تر را سبب می‌شود [۲۸، ۴۱]. توزیع یکنواخت ذرات نمک میان الیاف از چالش‌های مطرح در این روش است. به نظر می‌رسد حذف ذرات نمک بیش از آن‌که سبب افزایش فضاهای خالی میان الیاف شود، حفرات میان لایه‌ای ایجاد می‌کند. ایجاد حفرات میان لایه‌ای سبب ویژگی‌های ریخت‌شناسی غیر یکنواخت و پایداری پایین نمونه نهایی می‌شود.

روش دیگر استفاده از فاز پلیمری قابل انحلال به جای ذرات بلوری است. در این رویکرد یک پلیمر انحلال‌پذیر با ماده اصلی الکتروریسی همراه شده و مجموع تحت فرآیند واقع می‌شود یا جزء انحلال‌پذیر در فرآیند الکتروریسی روی جمع‌کننده هدف میان الیاف توزیع می‌شود. به عبارت دیگر؛ جزء انحلال‌پذیر توسط هم الکتروریسی یا الکتروریسی دوگانه با ماده اصلی همراه می‌شود و پس از تهیه در حلال مناسب برای حذف جزء انحلال‌پذیر واقع می‌شود. حذف این جزء افزایش میزان تخلخل و اندازه خلل و فرج را در پی خواهد داشت (شکل ۵). با استفاده از این روش پلیمرهای انحلال‌پذیری چون پلی اتیلن اکساید یا ژلاتین با اجزای انحلال‌پذیری چون پلی کاپرولاکتون و پلی لاکتیک کوگلایکولیک اسید همراه شده است و افزایش میزان تخلخل و اندازه خلل و فرج را در پی داشته است [۳۱، ۴۲، ۴۳].



شکل ۵ الف) نمایش سیستم مورد استفاده برای الکتروریسی هم‌زمان یک پلیمر انحلال‌پذیر با الیاف اصلی در حال الکتروریسی ب) تصویر فلورسنت و میکروسکوپ الکترونی روبشی از داربست تهیه شده پیش و پس از حذف جزء انحلال‌پذیر [۴۲]

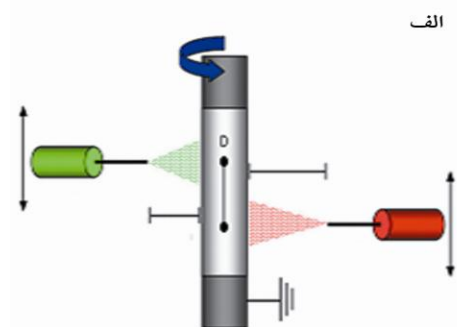
خشک‌کایش متداول مایع جمع‌کننده خود را از دست می‌دهد. این فرآیند قادر به افزایش درصد تخلخل، اندازه خلل و فرج و کاهش تراکم الیاف در توده داربست الکتروریسی است. این روش به صورت موفقیت‌آمیز میزان تخلخل و اندازه خلل و فرج در داربست‌های الکتروریسی تهیه شده از پلی لاکتیک اسید و فیبروی (Fibroin) ابریشم را افزایش داده است [۳۹، ۴۰].

اگرچه الکتروریسی تر روشی کاملاً کارآمد برای ایجاد داربست‌های نانولیفی سه بعدی است، اما سازگاری ماده تحت الکتروریسی با مایع جمع‌کننده باید مورد توجه قرار گیرد. مایع جمع‌کننده باید صرفاً یک عامل ترکنده برای ماده تحت الکتروریسی عمل کند. این مایع نباید با الیاف واکنش داده یا آن‌ها را حل کند. این امر به ویژه برای پلیمرهای طبیعی دارای اهمیت است، زیرا این پلیمرها پیش از شبکه‌ای شدن تمایل بالایی به انحلال‌پذیری در مایع جمع‌کننده دارند.

همراهی اجزای فداشونده با نمونه الکتروریسی

روش دیگر برای افزایش اندازه خلل و فرج، ترکیب ماده الکتروریسی با اجزای قابل حذف است. بدین منظور می‌توان از مواد مختلف مانند ذرات نمک، پلیمرهای انحلال‌پذیر و بلورهای یخ استفاده کرد.

به عنوان مثال ذرات نمک با ابعاد کنترل شده به صورت هم‌زمان با فرآیند الکتروریسی روی حسیب لیفی در حال تشکیل



استفاده از الیاف فدا شونده همراه زمینه اصلی غالباً سبب بهبود قابل توجهی در میزان نفوذ سلولی می‌شود، اما باید توجه داشت پس از حذف جزء ثانویه، اعوجاج، تغییرات ساختاری و ابعادی نمونه اصلی اجتناب ناپذیر است. به علاوه در این روش محدودیت انتخاب پلیمر الکترورسی مطرح است. این روش تنها هنگامی امکان پذیر است که حلال جزء فدا شونده اثر تخریبی بر پلیمر اصلی نداشته باشد. در صورتی که جزء فدا شونده در محیط آبی حذف شود، این روش برای داربست‌های که پلیمر اصلی آن در محیط آبی انحلال پذیر است، قابل استفاده نیست. مگر این که داربست پس از شبکه‌ای شدن جزء اصلی در محیط حذف کننده جزء فدا شونده واقع شود و فرآیند شبکه‌ای کردن جزء اصلی اثر تثبیتی بر جزء فدا شونده نداشته باشد.

روش دیگر، همراهی بلورهای یخ با الیاف الکترورسی و خروج بلورهای ایجاد شده است که شکل گیری خلل و فرج با قطر بزرگتر را سبب می‌شود. این فرآیند، الکترورسی در دمای پایین (Cryogenic electrospinning) نامیده می‌شود که در آن به سبب رطوبت موجود در محفظه الکترورسی و سرد بودن جمع کننده فلزی هم گام با تشکیل الیاف پلیمری، بلورهای یخ نیز میان الیاف تشکیل می‌شود. پس از تشکیل، نمونه در خشک کن انجمادی یا خشک کن معمولی واقع شده و ذرات یخ از طریق تصعید خارج می‌شود [۴۴، ۴۵].

مهم ترین جنبه فرآیند الکترورسی در دمای پایین، هم زمانی نرخ تشکیل بلورهای یخ و نشستن الیاف بر سطح جمع کننده است. در صورتی که تشکیل الیاف سریع تر از شکل گیری بلورهای یخ باشد، ساختار لیفی متراکم حاصل می‌آید. در حالت عکس، داربست لیفی شکننده حاصل خواهد آمد. به علاوه؛ روش حذف بلورهای یخ در تعیین ساختار متخلخل داربست تأثیرگذار است. خشکایش انجمادی نسبت به خشک کردن معمولی ساختاری با حفرات بی نقص بهتری را حاصل می‌کند.

اصلاحات پس از انجام الکترورسی

روش دیگر برای بهبود نفوذ سلولی افزایش فاصله میان

الیاف پس از فرآیند الکترورسی است. بدین منظور می‌توان از منابع انرژی متفاوتی استفاده کرد. در بررسی انجام شده توسط لی (Lee) و همکاران در سال ۲۰۱۲ انرژی فراصوت بدین منظور استفاده شده است. با اعمال انرژی فراصوت در محیط آبی به الیاف، آب میان الیاف نفوذ کرده و به صورت مکانیکی جدایش الیاف را فراهم آورده است [۴۶].

البته باید توجه داشت استفاده از امواج فراصوت احتمال آسیب به الیاف را ایجاد می‌کند. بسیاری از لیف‌های پلیمری تحت امواج فراصوت شکسته شده و قطعات لیفی از آن‌ها حاصل می‌آید. به علاوه ساختار لیفی پس از سونیکاسیون (Sonication) خواص مکانیکی ضعیفی از خود نشان می‌دهد. لیزر با توانایی حذف و ایجاد کندگی‌های دقیق در ماده ابزار مؤثر برای ایجاد اصلاحات پس از فرآیند الکترورسی محسوب می‌شود. برای نخستین بار چپو (Chio) و همکاران به صورت موفقیت آمیزی کندگی‌های موضعی در داربست نانولیفی پلی کاپرولاکتون ایجاد کردند [۲۶]. لیزرهایی با شدت بالا و تابش بسیار سریع برای فرآیند داربست‌های الکترورسی گزینه بسیار مناسبی است. گرم کردن بسیار سریع، ذوب و تبخیر الیاف ناشی از انرژی بالای لیزر قادر به ایجاد فضاهای خالی در ساختار خواهد بود. کنترل پارامترهای فرآیند مانند توان، پالس، نرخ اسکن و جهت گیری لیزر امکان ایجاد الگوهای ویژه را امکان پذیر می‌سازد [۲۷]. با این وجود در اصلاحات انجام شده توسط لیزر امکان ذوب یا تف‌جوشی ناخواسته، فقدان به هم پیوستگی تخلخل‌ها و تغییرات خواص مکانیکی یا ساختاری وجود دارد.

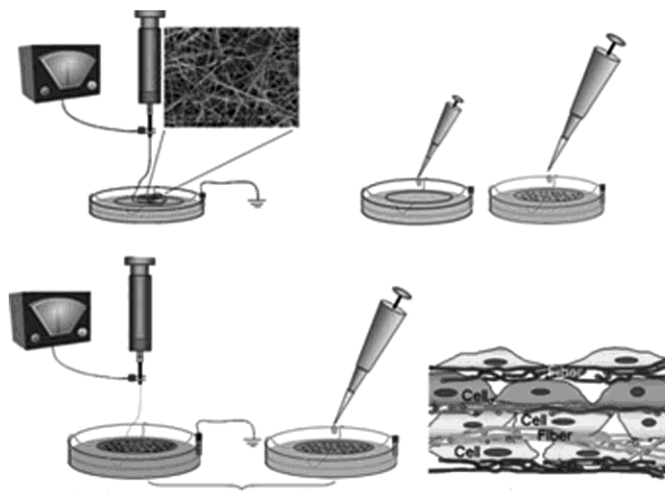
قرارگیری هم‌زمان سلول‌ها با نمونه در حال تشکیل

روش دیگر برای بهبود نفوذ سلولی در داربست الکترورسی، قرار گیری سلول‌ها در نمونه در حال تشکیل است. در این زمینه الکترورسی هم‌زمان پلیمر با الکترواسپری (Electrospray) سلول‌ها و لایه گذاری سلول‌ها میان صفحات الکترورسی شده مطرح است [۴۷-۴۹]. روش نخست سلول‌ها

بهبود نفوذ سلولی در داربست‌های الکتروریسی شده

الیاف به سبب عبور سلول‌ها از نازل الکترواسپری، سلول‌ها در معرض تنش برشی واقع شده و آسیب آن‌ها بسیار محتمل است. لایه گذاری سلول‌ها میان صفحات الکتروریسی شده امکان ایجاد ساختارهای بسیار متنوعی را فراهم می‌آورد. زیرا در این روش امکان تغییر ترکیب، قطر الیاف، تراکم الیاف، جهت گیری لیف‌ها، نوع سلول‌ها و تراکم آن‌ها در هر لایه وجود دارد.

را میان الیاف الکتروریسی محاط می‌کند در حالی که در روش دوم پس از تشکیل هر حصیر الکتروریسی، سلول‌ها روی آن لایه واقع شده و با تکرار این عمل ساختارهایی با چگالی بالای سلولی حاصل می‌آید (شکل ۶). در این روش‌ها حفظ حیات و شرایط سترون برای سلول‌ها دشوار به نظر می‌رسد. به‌علاوه سمیت حلال باقی مانده در نمونه برای سلول‌ها چالش برانگیز است [۵۰، ۵۱]. در روش الکترواسپری سلول‌ها و الکتروریسی



شکل ۶ نمایش سیستم مورد استفاده برای لایه‌گذاری سلول‌ها میان الیاف الکتروریسی و ساختار نهایی حاوی نانوالیاف/سلول [۴۹]

کرده‌اند. در این بررسی هپارین به‌عنوان واسطه برای اتصال عامل رشد مذکور استفاده شده است. گروه‌های سولفات هپارین با برهم کنش‌های الکتروستاتیک، اتصال و رهایش کنترل شده این عامل را فراهم آورده‌اند [۵۲].

سل (Sell) و همکاران در سال ۲۰۱۱ پلاکت غنی شده از پلازما (Platelet Rich Plasma: PRP) را با داربست الکتروریسی همراه کرده‌اند. پلاکت غنی از پلازما پس از طی مراحل به‌صورت پودر درآمده و با ماده الکتروریسی تحت فرآیند واقع شده است. در پاسخ مهاجرت بهتر سلولی به بخش‌های داخلی ساختار گزارش شده است که به حضور عوامل کموتاکسی در پودر پلاکتی و نیز اثر آن بر افزایش انعطاف‌پذیری ساختار لیفی نسبت داده شده است [۵۳].

تشویق مهاجرت سلولی به بخش‌های داخلی ساختار

روش دیگر برای بهبود نفوذ سلولی به بخش‌های داخلی داربست الکتروریسی شده تشویق مهاجرت سلولی به کمک عوامل زیستی است. کموتاکسی (Chemotaxis) که به‌صورت مهاجرت سلولی در پاسخ به شیب غلظتی ماده محلول تعریف می‌شود در این زمینه می‌تواند بسیار کارآمد باشد. همراهی عوامل رشد مختلف با اثر کموتاکسی با الیاف الکتروریسی می‌تواند مهاجرت سلولی به داخل ساختار را بهبود بخشد.

لی (Lee) و همکاران در سال ۲۰۱۲ عامل رشد PDGF-BB (Platelet-derived growth factor BB) را با داربست الکتروریسی تهیه شده از پلی‌کاپرولاکتون-ژلاتین همراه

ادغام الکتروریسی با روش‌های دیگر ساخت داربست

ترکیب الکتروریسی با روش‌های دیگر ساخت داربست می‌تواند راه‌کاری برای جبران نقاط ضعف داربست‌های الکتروریسی شده باشد. از آن جمله می‌توان به ترکیب نانو الیاف الکتروریسی با میکرو- و ماکروالیاف تولیدی از روش‌های چون پرینت سه بعدی (3D printing) و رسوب مذاب پلیمری (Polymer melt deposition) اشاره کرد.

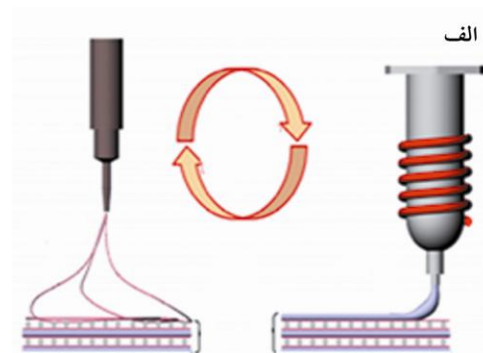
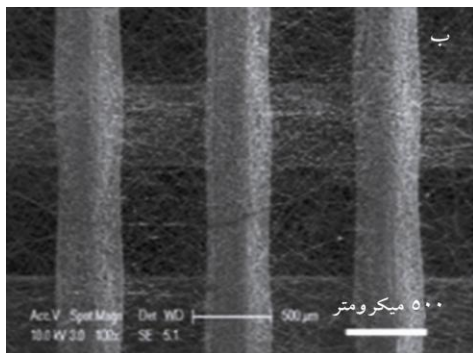
در روش رسوب مذاب پلیمری در اثر برخورد هوای فشرده، میکروالیاف از مذاب پلیمری خروجی از یک نازل شکل می‌گیرد. حرکت سه بعدی نازل ایجاد ساختار سه بعدی از میکروالیاف را امکان‌پذیر می‌سازد. ترکیب الیاف تولیدی از این روش در سال ۲۰۰۸ توسط پارک (Park) و همکاران گزارش شده است (شکل ۷) [۵۵]. به علاوه؛ امکان ترکیب الیاف الکتروریسی شده با الیاف حاصل از پرینت سه بعدی نیز فراهم است. الیاف حاصل از پرینت سه بعدی برخلاف نمونه‌های الکتروریسی شده اندازه خلل و فرج بزرگ‌تر را دارا است که ممکن است سبب از دست رفتن سلول‌های کشت شده در ساختار شود. بنابراین ترکیب الیاف هر دو روش می‌تواند میزان بهینه‌ای از نفوذ سلولی را به دست دهد [۵۶]. در روش‌هایی که نیاز به استفاده از مذاب پلیمری وجود دارد، محدودیت انتخاب ماده تحت فرآیند مطرح است. این روش‌ها برای بسیاری از پلیمرهای طبیعی حساس به حرارت و پلیمرهای سنتزی ترموست امکان‌پذیر نیست.

اگرچه همراهی عوامل زیستی با نمونه‌های الکتروریسی می‌تواند راه حل مؤثری برای بهبود نفوذ سلولی باشد اما با مشکلاتی چون امکان توزیع غیر یکنواخت این عوامل، تخریب یا از دست رفتن فعالیت زیستی و رهايش انفجاری آن‌ها مطرح است.

کشت پویا

روش دیگر برای بهبود نفوذ سلولی در داربست الکتروریسی استفاده از شرایط کشت پویا (Dynamic cell culture) است. نقل و انتقالات وابسته به نفوذ تنها تا فاصله ۱۰۰ میکرومتر امکان‌پذیر است. بنابراین برای ساختارهای با ضخامت بیشتر انتقال مواد غذایی، اکسیژن، متابولیت‌ها و مواد دفعی باید از طریق جریان همرفت انجام گیرد که توسط سیستم کشت پویا فراهم می‌شود. به علاوه تنش برشی اعمالی به سلول‌ها در چنین محیطی می‌تواند عاملی مؤثر برای راندن سلول‌ها به بخش‌های داخلی ساختار باشد. بدین منظور داربست‌های الکتروریسی دارای سلول در راکتورهای زیستی (Bioreactors) نفوذی و انکوباتورهای لرزان واقع شده و نتایج امیدوارکننده‌ای از بهبود نفوذ سلولی حاصل آمده است [۴۷، ۵۴].

نیروهای اعمالی به سلول‌ها در راکتورهای زیستی بر رفتارهای مختلف سلولی و سنتز ماتریس خارج سلولی توسط سلول‌ها اثر گذار است و ممکن است آسیب‌های ناخواسته بر سلول‌ها وارد نماید.



شکل ۷ الف) نمایش سیستم ترکیبی الکتروریسی و رسوب مذاب پلیمری برای ایجاد ساختار حاوی میکرو/نانوالیاف ب) تصویر میکروسکوپ الکترونی روشی ساختار حاصل [۵۵]

بهبود نفوذ سلولی در داربست‌های الکتروریسی شده

کپسوله کردن، استفاده از سیستم‌های تزریق‌پذیر و تلفیقی از الکتروریسی الیاف و الکترواسپری ژل اشاره کرد [۵۷-۶۰]. مجموعه رویکردهای به کار رفته برای بهبود نفوذ سلولی در نانوالیاف الکتروریسی شده در جدول ۱ ارائه شده است.

روش دیگر برای بهبود نفوذ سلولی در داربست‌های الکتروریسی همراهی الیاف با یک ژل است. چنین ترکیبی تقلید بسیار مناسب از ساختار ECM خواهد بود. برای تهیه چنین ترکیباتی روش‌های متعددی مطرح است از آن جمله می‌توان به لایه گذاری،

جدول ۱ خلاصه‌ای از روش‌های به کار رفته برای بهبود نفوذ سلولی در داربست‌های الکتروریسی شده

رویکرد	روش مورد استفاده	ماده	نتایج	مراجع
	افزایش نرخ تزریق	الاستین	افزایش اندازه خلل و فرج، بهبود نفوذ سلولی در شرایط درون‌تنی و برون‌تنی، مشاهده مراحل اولیه رگ‌زایی	[۳۵]
	تغییر پارامترهای سیستم و فرآیند	پلی‌کاپرولاکتون	افزایش اندازه خلل و فرج، بهبود نفوذ سلولی برای سلول هدف	[۳۳]
تغییر پارامترهای الکتروریسی	افزایش غلظت محلول	پلی‌کاپرولاکتون	افزایش اندازه خلل و فرج، بهبود نفوذ سلولی برای سلول هدف	[۳۷]
	ترکیب نانو و میکروالیاف	پلی‌کاپرولاکتون-کلاژن	چسبندگی و مهاجرت مطلوب دو جمعیت سلولی مورد استفاده	[۶۱]
	افزایش نرخ تبخیر حلال	پلی‌لاکتیک اسید	افزایش اندازه خلل و فرج و تخلخل، افزایش قابل توجه ضخامت داربست و بهبود نفوذ سلولی	[۸]
	استفاده از پلی‌اتیلن اکسید به‌عنوان جزء انحلال‌پذیر	پلی‌کاپرولاکتون-کلاژن	افزایش اندازه خلل و فرج و بهبود نفوذ سلولی	[۶]
	کاربرد ژلاتین به‌عنوان جزء انحلال‌پذیر و محرک مهاجرت سلولی	پلی‌کاپرولاکتون	بهبود نفوذ و عملکرد سلولی	[۴۲]
استفاده از اجزای فداشونده	استفاده از نمک به‌عنوان عامل تخلخل‌زا	هیالورونیک اسید-کلاژن	افزایش اندازه خلل و فرج، افزایش ضخامت داربست و بهبود نفوذ سلولی	[۳۱]
	استفاده از یخ به‌عنوان عامل تخلخل‌زا	پلی‌لاکتیک اسید	بهبود نفوذ سلولی	[۴۱]
		پلی‌لاکتیک کوگلایکولیک	افزایش اندازه خلل و فرج، افزایش ضخامت داربست و بهبود نفوذ سلولی	[۲۸]
		اسید-پلی‌پورتان	بهبود نفوذ سلولی در شرایط درون تنی و برون تنی و آغاز رگ‌زایی	[۴۴]
		پلی‌لاکتیک اسید	بهبود نفوذ سلولی	[۴۵]
تغییر ساختار جمع‌کننده	استفاده از جمع‌کننده با بخش‌های انتخابی فلزی	پلی‌کاپرولاکتون-پلی‌کاپرولاکتون	افزایش اندازه خلل و فرج و بهبود نفوذ سلولی	[۳۰]
		پلی‌گلایکولیک اسید	افزایش ضخامت و بهبود نفوذ سلولی	[۳۸]
الکتروریسی تر	استفاده از مایع به‌عنوان محیط جمع‌کننده الیاف	پلی‌لاکتیک کوگلایکولیک	افزایش ضخامت و بهبود نفوذ سلولی	[۳۹]
		اسید-پلی‌کاپرولاکتون	افزایش ضخامت و بهبود نفوذ سلولی	[۴۰]
سونیکاسیون	استفاده از سونیکاتور برای جدایش الیاف و نفوذ آب میان آن‌ها	پلی‌لاکتیک اسید	افزایش ضخامت و بهبود نفوذ سلولی	[۴۶]
کاربرد لیزر	کاربرد لیزر برای کندگی و ذوب کنترل شده الیاف	پلی‌کاپرولاکتون	بهبود نفوذ سلولی و آغاز رگ‌زایی	[۶۲]
	PDGF-BB همراهی با داربست به‌عنوان عامل ایجادکننده مهاجرت سلولی	پلی‌کاپرولاکتون-ژلاتین	بهبود نفوذ سلولی	[۵۲]
همراهی عوامل زیستی با داربست	استفاده از هیپارین به‌عنوان عامل ضد انعقاد و منبع اتصال عامل‌های رشد	پلی‌لاکتیک اسید	بهبود نفوذ سلولی در شرایط درون تنی	[۶۳]
	همراهی PRP با داربست به‌عنوان منبع عوامل رشد	ابریشم-پلی‌گلایکولیک	بهبود نفوذ سلولی	[۵۳]
	همراهی هیالورونان با ماده اصلی داربست برای فعال‌سازی مسیرهای مهاجرت سلولی	اسید-پلی‌کاپرولاکتون	افزایش اندازه خلل و فرج، افزایش ضخامت داربست و بهبود نفوذ سلولی	[۶۴]

رویکرد	روش مورد استفاده	ماده	نتایج	مراجع
معرفی سلول‌ها در داربست از طریق الکترواسپری یا لایه گذاری	الکترواسپری هم‌زمان سلول‌ها با الکتروریسی الیاف و معرفی سوسپانسیون سلولی میان لایه‌های الکتروریسی شده	پلی‌یورتان پلی‌کاپرولاکتون-کلاژن	حضور سلول‌های زنده میان الیاف یا لایه‌های نانولیفی	[۴۷] [۴۹]
کشت پویا	اعمال تنش برشی به محیط کشت برای راندن سلول‌ها به بخش‌های داخلی داربست	پلی‌کاپرولاکتون	بهبود نفوذ سلولی و اثرگذاری بر ترکیبات ترشحي ECM	[۵۴]
ترکیب الکتروریسی و روش‌های تولید میکرو/ماکروالیاف	ترکیب نانوالیاف الکتروریسی شده با الیاف حاصل از روش‌های چون پرینت سه بعدی	پلی‌کاپرولاکتون پلی‌اتیلن اکسید ترفتالات- پلی بوتیلن ترفتالات	بهبود نفوذ سلولی	[۵۵] [۵۶]
ادغام نانوالیاف الکتروریسی شده و ژل	جای گذاری الیاف به روش‌های مختلف در یک ترکیب هیدروژلی	پلی‌کاپرولاکتون-کلاژن پلی‌یورتان پلی‌لاکتیک اسید	حصول نفوذ سلولی مناسب و شبیه‌سازی ساختار ECM در بافت‌های زیستی	[۵۷-۶۰]

نتیجه گیری

اثبات قابلیت آن‌ها در ایجاد ساختارهای بافتی سه بعدی از نمونه‌های الکتروریسی شده نیازمند بررسی‌های بیشتری است. هر یک از روش‌های مذکور مزایا و معایب ویژه خود را دارند. تغییر پارامترهای الکتروریسی روشی ساده است، اما معمولاً همراه با افزایش اندازه حفرات افزایش اندازه لیف‌ها را نیز سبب می‌شود. افزایش اندازه لیف‌ها مزایای مربوط به ساختارهای نانو را کاهش می‌دهد. همراهی اجزای فدا شونده با نمونه الکتروریسی و حذف آن‌ها اغلب تغییرات ساختاری ناخواسته در نمونه ایجاد می‌کند. به علاوه این روش برای تعداد محدودی از پلیمرها امکان‌پذیر است؛ زیرا حلال مورد استفاده برای حذف جز فدا شونده نباید آثار تخریبی بر جزء اصلی داشته باشد. در روش جای گذاری مستقیم سلول‌ها میان الیاف یا صفحات الکتروریسی شده حفظ شرایط سترون برای سلول‌ها و حفظ حیات سلولی دشوار به نظر می‌رسد. تشویق مهاجرت سلولی به کمک محرک‌های بیوشیمیایی و کشت پویا به تنهایی قادر به ایجاد ساختارهای سه بعدی نانولیفی و بهبود نفوذ سلولی به بخش‌های داخلی ساختار نیست و باید همراه با روش‌های اصلاحی دیگر به کار گرفته شود. ترکیب الکتروریسی با سایر روش‌های ساخت داربست رویکردی جالب برای حل مشکلات نانوالیاف الکتروریسی شده است. به ویژه ادغام این الیاف با ترکیبات هیدروژلی علاوه بر این که مهاجرت سلولی در ساختار را امکان‌پذیر می‌سازد، شبیه‌سازی

در دهه‌های اخیر الکتروریسی به سبب سادگی، فراگیری و امکان ایجاد ساختارهای لیفی مشابه ECM به روشی مورد توجه برای تولید داربست‌های مهندسی بافت مبدل گشته است. با این وجود اندازه کوچک خلل و فرج‌های نانوالیاف الکتروریسی شده، دشواری نفوذ سلولی به بخش‌های داخلی داربست، کاهش رگ‌زایی و عدم رشد بافت به داخل ساختار را به دنبال خواهد داشت که می‌تواند کاربرد آن‌ها برای اهداف ترمیمی مهندسی بافت‌های مختلف را محدود سازد. ساختارهای الکتروریسی شده معمول با نفوذ اندک سلولی تنها برای بازسازی بافت‌های دوبعدی شامل اپی‌تلیوم و اندوتلیوم مناسب هستند؛ از این رو تلاش‌های بسیاری برای بهبود نفوذ سلولی در این ساختارها انجام گرفته است تا آن‌ها را به جایگزینی مناسب برای بافت‌های سه بعدی مبدل سازد. این تلاش‌ها گستره وسیعی را از تغییر پارامترهای الکتروریسی تا همراهی اجزای فدا شونده با نمونه الکتروریسی شده، به کارگیری اصلاحات پس از فرآیند، جای گذاری سلول‌ها میان الیاف یا صفحات الکتروریسی شده، تشویق مهاجرت سلولی به بخش‌های داخلی ساختار به کمک محرک‌های بیوشیمیایی، ایجاد شرایط کشت پویا و ترکیب الکتروریسی با دیگر روش‌های ساخت داربست را در برمی‌گیرد. با این حال روش‌های مذکور تنها در موارد معدودی به کار گرفته شده و

بهبود نفوذ سلولی در داربست‌های الکتروریسی شده

بستر هیدروژلی و ایجاد پیوستگی میان فاز لیفی و ژلی ساختاری با نفوذپذیری و استحکام مکانیکی بالا را تشکیل می‌دهد. به نظر می‌رسد در آینده نزدیک استفاده از انواع روش‌های مختلف برای اصلاح عیوب داربست‌های الکتروریسی شده که ذکر آن‌ها در مقاله انجام شد، بتواند باعث شوند که این داربست‌های لیفی نانو ساختار به جایگزین‌های ایده‌آلی برای بافت‌های سه بعدی آسیب دیده و استفاده از آن‌ها در کلینیک تبدیل شوند.

بسیار مناسبی از ساختار طبیعی ECM که ذاتاً دارای آرایش لیفی-ژلی است ارائه می‌دهد. نانوالیاف آرایش ساختاری و هیدروژل‌ها خاصیت کشسانی (Viscoelastic) و انتقال نفوذی ECM را تقلید می‌کنند. داربست‌های ترکیبی لیفی-ژلی قادر به غلبه بر محدودیت‌های مطرح در ساختارهای منحصراً لیفی و هیدروژلی هستند. نانوالیاف نفوذ سلولی اندک و هیدروژل‌ها استحکام مکانیکی ضعیفی دارند. توزیع مناسب نانوالیاف در یک

منابع

- [1] Sill TJ, von Recum HA. Electrospinning: applications in drug delivery and tissue engineering. *Biomaterials* 2008; 29(13): 1989-2006.
- [2] Gunn J, Zhang M. Polyblend nanofibers for biomedical applications: perspectives and challenges. *Trends Biotechnol* 2010; 28(4): 189-97.
- [3] Pezeshki-Modaress M, Zandi M, Mirzadeh H. Fabrication of gelatin/chitosan nanofibrous scaffold: process optimization and empirical modeling. *Polym Int* 2015; 64: 571-80.
- [4] Beachley V, Wen X. Polymer nanofibrous structures: Fabrication, biofunctionalization, and cell interactions. *Prog Polym Sci* 2010; 35(7): 868-892.
- [5] Shabani I, Haddadi-Asl V, Seyedjafari E, Soleimani M. Cellular infiltration on nanofibrous scaffolds using a modified electrospinning technique. *Biochem Biophys Res Commun* 2012; 423(1): 50-4.
- [6] Phipps MC, Clem WC, Grunda JM, Clines GA, Bellis SL. Increasing the pore sizes of bone-mimetic electrospun scaffolds comprised of polycaprolactone, collagen I and hydroxyapatite to enhance cell infiltration. *Biomaterials* 2012; 33(2): 524-34.
- [7] Greiner A, Wendorff JH. Electrospinning: a fascinating method for the preparation of ultrathin fibers. *Angew Chem Int Ed Engl* 2007; 46(30): 5670-703.
- [8] Khorshidi S, Solouk A, Mirzadeh H, Mazinani S, Lagaron JM, Sharifi S, Ramakrishna S. A review of key challenges of electrospun scaffolds for tissue-engineering applications. *J Tissue Eng Regen Med* 2015. [Epub ahead of print]
- [9] Koosha M, Mirzadeh H, Shokrgozar MA, Farokhi M. Nanoclay-reinforced electrospun chitosan/PVA nanocomposite nanofibers for biomedical applications. *RSC Adv* 2015; 5: 10479-87.
- [10] Agarwal S, Wendorff JH, Greiner A. Use of electrospinning technique for biomedical applications. *Polymer* 2008; 49(26): 5603-21.

- [11] Sun B, Long YZ, Zhang HD, Lia MM, Duvail JL, Jiang XY, Yin HL. Advances in three-dimensional nanofibrous macrostructures via electrospinning. *Progress in Polymer Science* 2014; 39(5): 862-90.
- [12] Garg K, Bowlin GL. Electrospinning jets and nanofibrous structures. *Biomicrofluidics* 2011; 5(1): 13403.
- [13] Agarwal S, Greiner A, Wendorff JH. Functional materials by electrospinning of polymers. *Progress in Polymer Science* 2013; 38(6): 963-91.
- [14] Koosha M, Mirzadeh H. Electrospinning, mechanical properties, and cell behavior study of chitosan/PVA nanofibers. *J Biomed Mater Res A* 2015; 103(9): 3081-93.
- [15] Pezeshki-Modaress M, Mirzadeh H2, Zandi M. Gelatin-GAG electrospun nanofibrous scaffold for skin tissue engineering: fabrication and modeling of process parameters. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl* 2015; 48: 704-12.
- [16] Pezeshki-Modaress M, Rajabi-Zeleti S, Zandi M, Mirzadeh H, Sodeifi N, Nekookar A, Aghdami N. Cell-loaded gelatin/chitosan scaffolds fabricated by salt-leaching/lyophilization for skin tissue engineering: in vitro and in vivo study. *J Biomed Mater Res A* 2014; 102(11): 3908-17.
- [17] Guo B, Sun Y, Finne-Wistrand A, Mustafa K, Albertsson AC. Electroactive porous tubular scaffolds with degradability and non-cytotoxicity for neural tissue regeneration. *Acta Biomater* 2012; 8(1): 144-53.
- [18] Billiet T, Vandenhoute M, Schelfhout J, Van Vlierberghe S, Dubrue P. A review of trends and limitations in hydrogel-rapid prototyping for tissue engineering. *Biomaterials* 2012; 33(26): 6020-41.
- [19] Pezeshki-Modaress M, Mirzadeh H Zandi M. Fabrication of a porous wall and higher interconnectivity scaffold comprising gelatin/chitosan via combination of salt-leaching and lyophilization methods. *Iranian Polymer Journal* 2012; 21(3): 191-200.
- [20] Agarwal S, Wendorff JH, Greiner A. Progress in the field of electrospinning for tissue engineering applications. *Adv Mater* 2009; 21(32-33): 3343-51.
- [21] Szentivanyi A, Chakradeo T, Zernetsch H, Glasmacher B. Electrospun cellular micro-environments: Understanding controlled release and scaffold structure. *Adv Drug Deliv Rev* 2011; 63(4-5): 209-20.
- [22] Pezeshki-Modaress M, Rajabi-Zeleti S, Zandi M, Mirzadeh H, Sodeifi N, Nekookar A, Aghdami N. Cell-loaded gelatin/chitosan scaffolds fabricated by salt-leaching/lyophilization for skin tissue engineering: in vitro and in vivo study. *J Biomed Mater Res A* 2014; 102(11): 3908-17.
- [23] Reilly GC, Engler AJ. Intrinsic extracellular matrix properties regulate stem cell differentiation. *J Biomech* 2010; 43(1): 55-62.

- [24] Madden LR, Mortisen DJ, Sussman EM, Dupras SK, Fugate JA, Cuy JL, Hauch KD, Laflamme MA, Murry CE, Ratner BD. Proangiogenic scaffolds as functional templates for cardiac tissue engineering. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2010; 107(34): 15211-6.
- [25] Marshall AJ, Irvin CA, Barker T, Sage EH, Hauch KD, Ratner BD, American Chemical Society. Biomaterials with tightly controlled pore size that promote vascular in-growth. *Polymer Preprints -America* 2004; 45: 100-1.
- [26] Lee BL, Jeon H, Wang A, Yan Z, Yu J, Grigoropoulos C, Li S. Femtosecond laser ablation enhances cell infiltration into three-dimensional electrospun scaffolds. *Acta Biomater* 2012; 8(7): 2648-58.
- [27] Zhong S, Zhang Y, Lim CT. Fabrication of large pores in electrospun nanofibrous scaffolds for cellular infiltration: a review. *Tissue Eng Part B Rev* 2012; 18(2): 77-87.
- [28] Wright LD, Andric T, Freeman JW. Utilizing NaCl to increase the porosity of electrospun materials. *Materials Science and Engineering: C* 2011; 31(1): 30-6.
- [29] Rnjak-Kovacina J, Weiss AS. Increasing the pore size of electrospun scaffolds. *Tissue Eng Part B Rev* 2011; 17(5): 365-72.
- [30] Blakeney BA, Tambralli A, Anderson JM, Andukuri A, Lim DJ, Dean DR, Jun HW. Cell infiltration and growth in a low density, uncompressed three-dimensional electrospun nanofibrous scaffold. *Biomaterials* 2011; 32(6): 1583-90.
- [31] Zhang Y, Ouyang H, Lim CT, Ramakrishna S, Huang ZM. Electrospinning of gelatin fibers and gelatin/PCL composite fibrous scaffolds. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater* 2005; 72(1): 156-65.
- [32] Eichhorn SJ, Sampson WW. Statistical geometry of pores and statistics of porous nanofibrous assemblies. *J R Soc Interface* 2005; 2(4): 309-18.
- [33] Balguid A, Mol A, van Marion MH, Bank RA, Bouten CV, Baaijens FP. Tailoring fiber diameter in electrospun poly(epsilon-caprolactone) scaffolds for optimal cellular infiltration in cardiovascular tissue engineering. *Tissue Eng Part A* 2009; 15(2): 437-44.
- [34] Sisson K, Zhang C, Farach-Carson MC, Chase DB, Rabolt JF. Fiber diameters control osteoblastic cell migration and differentiation in electrospun gelatin. *J Biomed Mater Res A* 2010; 94(4): 1312-20.
- [35] Rnjak-Kovacina J, Wise SG, Li Z, Maitz PK, Young CJ, Wang Y, Weiss AS. Tailoring the porosity and pore size of electrospun synthetic human elastin scaffolds for dermal tissue engineering. *Biomaterials* 2011; 32(28): 6729-36.
- [36] Pham QP, Sharma U, Mikos AG. Electrospun poly(epsilon-caprolactone) microfiber and multilayer nanofiber/

- microfiber scaffolds: characterization of scaffolds and measurement of cellular infiltration. *Biomacromolecules* 2006; 7(10): 2796-805.
- [37] Zander NE, Orlicki JA, Rawlett AM, Beebe TP Jr. Electrospun polycaprolactone scaffolds with tailored porosity using two approaches for enhanced cellular infiltration. *J Mater Sci Mater Med* 2013; 24(1): 179-87.
- [38] Vaquette C, Cooper-White JJ. Increasing electrospun scaffold pore size with tailored collectors for improved cell penetration. *Acta Biomater* 2011; 7(6): 2544-57.
- [39] Yokoyama Y, Hattori S, Yoshikawa C, Yasuda Y, Koyama H, Takato T, Kobayashi H. Novel wet electrospinning system for fabrication of spongiform nanofiber 3-dimensional fabric. *Materials Letters* 2009; 63(9-10): 754-6.
- [40] Yang W, Yang F, Wang Y, Both SK, Jansen JA. In vivo bone generation via the endochondral pathway on three-dimensional electrospun fibers. *Acta Biomater* 2013; 9(1): 4505-12.
- [41] Kim TG, Chung HJ, Park TG. Macroporous and nanofibrous hyaluronic acid/collagen hybrid scaffold fabricated by concurrent electrospinning and deposition/leaching of salt particles. *Acta Biomater* 2008; 4(6): 1611-9.
- [42] Baker BM, Gee AO, Metter RB, Nathan AS, Marklein RA, Burdick JA, Mauck RL. The potential to improve cell infiltration in composite fiber-aligned electrospun scaffolds by the selective removal of sacrificial fibers. *Biomaterials* 2008; 29(15): 2348-58.
- [43] Whited BM, Whitney JR, Hofmann MC, Xu Y, Rylander MN. Pre-osteoblast infiltration and differentiation in highly porous apatite-coated PLLA electrospun scaffolds. *Biomaterials* 2011; 32(9): 2294-304.
- [44] Simonet M, Schneider OD, Neuenschwander P, Stark WJ. Ultraporous 3D polymer meshes by low-temperature electrospinning: use of ice crystals as a removable void template. *Polymer Engineering & Science* 2007; 47(12): 2020-6.
- [45] Leong MF, Rasheed MZ, Lim TC, Chian KS. In vitro cell infiltration and in vivo cell infiltration and vascularization in a fibrous, highly porous poly(D,L-lactide) scaffold fabricated by cryogenic electrospinning technique. *J Biomed Mater Res A* 2009; 91(1): 231-40.
- [46] Lee JB, Jeong SI, Bae MS, Yang DH, Heo DN, Kim CH, Alsberg E, Kwon IK. Highly porous electrospun nanofibers enhanced by ultrasonication for improved cellular infiltration. *Tissue Eng Part A* 2011; 17(21-22): 2695-702.
- [47] Stankus JJ, Guan J, Fujimoto K, Wagner WR. Microintegrating smooth muscle cells into a biodegradable, elastomeric fiber matrix. *Biomaterials* 2006; 27(5): 735-44.

- [48] Stankus JJ, Soletti L, Fujimoto K, Hong Y, Vorp DA, Wagner WR. Fabrication of cell microintegrated blood vessel constructs through electrohydrodynamic atomization. *Biomaterials* 2007; 28(17): 2738-46.
- [49] Yang X, Shah JD, Wang H. Nanofiber enabled layer-by-layer approach toward three-dimensional tissue formation. *Tissue Eng Part A* 2009; 15(4): 945-56.
- [50] Canbolat MF, Tang C, Bernacki SH, Pourdeyhimi B, Khan S. Mammalian cell viability in electrospun composite nanofiber structures. *Macromol Biosci* 2011; 11(10): 1346-56.
- [51] Seil JT, Webster TJ. Spray deposition of live cells throughout the electrospinning process produces nanofibrous three-dimensional tissue scaffolds. *Int J Nanomedicine* 2011; 6: 1095-9.
- [52] Lee J, Yoo JJ, Atala A, Lee SJ. The effect of controlled release of PDGF-BB from heparin-conjugated electrospun PCL/gelatin scaffolds on cellular bioactivity and infiltration. *Biomaterials* 2012; 33(28): 6709-20.
- [53] Sell SA, Wolfe PS, Ericksen JJ, Simpson DG, Bowlin GL. Incorporating platelet-rich plasma into electrospun scaffolds for tissue engineering applications. *Tissue Eng Part A* 2011; 17(21-22): 2723-37.
- [54] Nerurkar NL, Sen S, Baker BM, Elliott DM, Mauck RL. Dynamic culture enhances stem cell infiltration and modulates extracellular matrix production on aligned electrospun nanofibrous scaffolds. *Acta Biomater* 2011; 7(2): 485-91.
- [55] Park SH, Kim TG, Kim HC, Yang DY, Park TG. Development of dual scale scaffolds via direct polymer melt deposition and electrospinning for applications in tissue regeneration. *Acta Biomater* 2008; 4(5): 1198-207.
- [56] Moroni L, Schotel R, Hamann D, de Wijn JR, van Blitterswijk CA. 3D Fiber-Deposited Electrospun Integrated Scaffolds Enhance Cartilage Tissue Formation. *Advanced Functional Materials* 2008; 18(1): 53-60.
- [57] Ekaputra AK, Prestwich GD, Cool SM, Hutmacher DW. Combining electrospun scaffolds with electrosprayed hydrogels leads to three-dimensional cellularization of hybrid constructs. *Biomacromolecules* 2008; 9(8): 2097-103.
- [58] Hsieh A, Zahir T, Lapitsky Y, Amsden B, Wan W, Shoichet MS. Hydrogel/electrospun fiber composites influence neural stem/progenitor cell fate. *Soft Matter* 2010; 6(10): 2227-37.
- [59] McMahon RE, Qu X, Jimenez-Vergara AC, Bashur CA, Guelcher SA, Goldstein AS, Hahn MS. Hydrogel-electrospun mesh composites for coronary artery bypass grafts. *Tissue Eng Part C Methods* 2011; 17(4): 451-61.

- [60] Yang Y, Wimpenny I, Ahearne M. Portable nanofiber meshes dictate cell orientation throughout three-dimensional hydrogels. *Nanomedicine* 2011; 7(2): 131-6.
- [61] Ju YM, Choi JS, Atala A, Yoo JJ, Lee SJ. Bilayered scaffold for engineering cellularized blood vessels. *Biomaterials* 2010; 31(15): 4313-21.
- [62] Joshi VS, Lei NY, Walthers CM, Wu B, Dunn JC. Macroporosity enhances vascularization of electrospun scaffolds. *J Surg Res* 2013; 183(1): 18-26.
- [63] Kurpinski KT, Stephenson JT, Janairo RR, Lee H, Li S. The effect of fiber alignment and heparin coating on cell infiltration into nanofibrous PLLA scaffolds. *Biomaterials* 2010; 31(13): 3536-42.
- [64] Li L, Qian Y, Jiang C, Lv Y, Liu W, Zhong L, Cai K, Li S, Yang L. The use of hyaluronan to regulate protein adsorption and cell infiltration in nanofibrous scaffolds. *Biomaterials* 2012; 33(12): 3428-45.