

A Brief Review on Fabrication Methods of Three-dimensional Porous Scaffolds by Electrospinning-Part II: Chemical Methods

Zahra Pedram Rad, Javad Mokhtari*, Zeynab Eskafi

Department of Textile Engineering, Faculty of Engineering, University of Guilan,
P.O. Box: 41635-3756, Rasht, Iran

Received: 6 December 2015, Accepted: 25 June 2016

Abstract

One of the major components of tissue engineering is the scaffold. The main role of the scaffold is to provide a suitable environment that defines the shape of the tissue. In fact, scaffold can support cell adhesion and proliferation. In tissue engineering, three-dimensional (3D) nanofibrous structures are preferred owing to their structural similarity to human body tissues. 3D porous scaffolds serve not only as structural molds for tissue production but also provide signaling cues to cells and facilitate oxygen and therapeutic agent delivery. The fabrication of 3D scaffolds cannot be achieved using conventional processes, so cultured cells could only develop into flat shapes. Therefore, to improve the thickness of scaffolds, several approaches have been suggested to fabricate 3D porous scaffolds. This article summarizes chemical methods of producing 3D porous scaffolds including particulate leaching, phase separation and gas foaming. This review will cover the production methods of 3D scaffolds using electrospinning by focusing on solution electrospinning. Furthermore, the role of various factors like charge density and humidity in electrospun scaffolds is discussed.

Key Words

3D scaffolds,
electrospinning,
particulate leaching,
phase separation,
gas foaming

(*) To whom correspondence should be addressed.
E-mail: j.mokhtari@guilan.ac.ir

مروری کوتاه بر روش‌های تهیه داربست‌های متخلخل سه‌بعدی از راه الکتروریسی - قسمت دوم: روش‌های شیمیایی

بسیار ش
فصلنامه علمی - ترویجی
سال ششم، شماره ۴،
صفحه ۵۱-۳۶، ۱۳۹۵
ISSN: 2252-0449

زهرا پدram راد، جواد مختاری*، زینب اسکافی

رشت، دانشگاه گیلان، دانشکده فنی، گروه مهندسی نساجی، صندوق پستی ۳۷۵۶-۴۱۶۳۵

دریافت: ۱۳۹۴/۹/۱۵، پذیرش: ۱۳۹۵/۴/۵

داربست از اجزای اصلی مهندسی بافت است که نقش عمده آن، آماده‌سازی محیطی مناسب برای تعیین شکل بافت است. در حقیقت، داربست قابلیت پشتیبانی از چسبندگی و تکثیر سلول را دارد. در مهندسی بافت، ساختارهای نانوالیافی سه‌بعدی، به دلیل شباهت به بافت‌های بدن انسان ترجیح داده می‌شوند. داربست‌های متخلخل سه‌بعدی به‌عنوان قالب ساختاری در تولید بافت به‌کار می‌روند، ردیف‌های علامت‌دهی را برای سلول‌ها فراهم می‌کنند و انتقال اکسیژن و عوامل درمانی را آسان می‌سازند. تولید داربست سه‌بعدی با کمک فرایندهای معمولی امکان‌پذیر نیست. بنابراین، سلول‌های کشت شده تنها می‌توانند به‌شکل مسطح رشد کنند. روش‌های مختلفی برای بهبود ضخامت داربست، در تولید داربست‌های متخلخل سه‌بعدی پیشنهاد شده است. در مقاله پیش رو، خلاصه‌ای از روش‌های شیمیایی تولید داربست‌های متخلخل سه‌بعدی، از جمله حلال‌شویی ذرات، جدایی فاز و اسفنج‌شدن گازی ارائه می‌شود. در ادامه، روش‌های تولید داربست‌های سه‌بعدی با روش الکتروریسی، به‌ویژه محلول الکتروریسی مرور می‌شود. افزون بر این، نقش عوامل مختلف، مانند چگالی بار و رطوبت در داربست‌های الکتروریسی شده نیز بررسی می‌شود.

چکیده



زهرا پدram راد



جواد مختاری



زینب اسکافی

واژگان کلیدی

داربست‌های سه‌بعدی،
الکتروریسی،
حلال‌شویی ذرات،
جدایی فاز،
اسفنج‌شدن گازی

مقدمه

در مقاله حاضر، به بررسی روش‌های شیمیایی تولید داربست‌های سه‌بعدی و متخلخل، نظیر الکتروریسی، حلال‌شویی ذرات، جدایی فاز و اسفنج‌شدن گازی پرداخته می‌شود. همچنین، نقش عواملی مانند چگالی بار و رطوبت در الکتروریسی بررسی می‌شود.

ریخته‌گری حلال و حلال‌شویی ذرات (SCPL)

این روش، راحت‌ترین شیوه تهیه داربست‌های متخلخل است. داربست‌های بسیار متخلخل با تخلخل بیش از ۹۳٪ و قطر منافذ تا $500 \mu\text{m}$ را می‌توان با استفاده از این روش تولید کرد. در روش SCPL، پس از انحلال پلیمر در حلال آلی مناسب، ذرات منفذساز (porogen) در محلول پلیمری پراکنده می‌شوند. محلول به دست آمده در قالب ریخته می‌شود تا پس از مدتی حلال آلی تبخیر شود. سپس، پلیمر را از قالب خارج کرده و در حلال دیگری غوطه‌ور می‌کنند. این حلال بسته به نوع ذره منفذساز به‌کار رفته متفاوت است. بدین ترتیب، ذرات منفذساز شسته می‌شوند و داربست متخلخل به دست می‌آید. ذرات منفذساز را مواد مختلف از جمله نمک، شکر و پارافین می‌توانند تشکیل دهند.

مزیت اصلی روش SCPL ایجاد تخلخل فراوان، منافذ دارای ساختار یکنواخت، سادگی، تطبیق‌پذیری و کنترل آسان اندازه و هندسه منافذ است. به‌طور کلی، تخلخل داربست را می‌توان با مقدار، اندازه و شکل ذرات افزوده شده کنترل کرد. از آنجاکه در مرحله نمک‌شویی، پلیمرهای محلول در آب نیز به‌طور کامل حل می‌شوند، روش ریخته‌گری حلال و حلال‌شویی ذرات به‌طور معمول برای ساخت داربست از پلیمرهای نامحلول در آب مانند پلی‌پورتان-اوره، پلی‌لاکتیک اسید، دی‌بوتیریل کیتین، پلی‌لاکتیک گلیکولیک اسید و پلی‌کاپرولاکتون به‌کار می‌رود. در روش SCPL امکان باقی‌ماندن مقداری حلال در پلیمر وجود دارد که این موضوع بر سلول و عوامل رشد اثرگذار است. از سوی دیگر، باقی‌ماندن ذرات منفذساز نیز، برای کشت سلول نامناسب است. باتوجه به نکات گفته شده، تبخیر حلال باقی‌مانده پس از خشک‌کردن با خلأ و شستن ذرات منفذساز باید به‌طور کامل انجام شود. در نتیجه، زمان آماده‌سازی داربست افزایش درخور توجهی می‌یابد. از دیگر معایب روش SCPL، نفوذ نایکنواخت ناشی از پراکندگی ضعیف ذرات منفذساز است که موجب کاهش خواص مکانیکی ساختار متخلخل می‌شود. افزون بر این، طراحی منافذ به‌هم متصل با این روش مشکل است [۲۶-۲۰]. روش SCPL می‌تواند در مهندسی بافت استخوان، غضروف [۲۷] و پوست [۲۶] به‌کار رود. شکل ۱ نمایی از مراحل تولید داربست را با استفاده از این روش نشان

مهندسی بافت به‌عنوان روشی امیدبخش در ترمیم یا تعویض بافت آسیب‌دیده شناخته شده است. امروزه، این فناوری در ترمیم و بازسازی بافت‌ها و اندام‌هایی مانند پوست [۳-۱]، استخوان [۴]، غضروف [۵،۶]، رباط [۷]، کبد [۸]، قلب [۹] و اعصاب [۱۰،۱۱] استفاده می‌شود [۱۲]. داربست، سلول و عوامل رشد سه رکن اصلی مهندسی بافت را تشکیل می‌دهند [۱۳]. داربست‌های نانوالیافی در مقایسه با سایر داربست‌های رایج، گزینه‌های مناسبی برای اتصال، تکثیر (proliferation) و عملکرد سلول‌ها هستند. نانوالیاف تهیه شده با شبیه‌سازی ابعادی به ماتریس برون‌سلولی طبیعی (extracellular matrix, ECM)، تعامل مطلوب با سلول‌ها را امکان‌پذیر می‌کند. همچنین تخلخل داربست، امکان انتقال مواد مغذی به سلول‌ها و دفع ضایعات سلولی را فراهم می‌سازد. این نکات، عوامل کلیدی موفقیت فناوری مهندسی بافت در بازسازی بافت‌های آسیب‌دیده به‌شمار می‌روند [۱۴].

در مهندسی بافت، حجم مخصوص زیاد داربست دارای اهمیت است و فعالیت سلول در داربست‌های سه‌بعدی بهتر از داربست‌های دوبعدی هدایت می‌شود. داربست‌های دوبعدی، ساختار فشرده دارند و الیاف تنها در جهت افقی، جهت‌گیری می‌کنند. در نتیجه، نفوذ سلول محدود است و سلول در سطح نانوالیاف و به‌حالت دوبعدی رشد می‌کند [۱۷-۳،۱۵]. ساختار الیاف دارای آرایش سه‌بعدی و توزیع تصادفی در ECM طبیعی پوست، پستان، کبد، مثانه، ریه و بسیاری دیگر از اندام‌ها و بافت‌ها یافت می‌شود. از این‌رو، استفاده از داربست لیفی دوبعدی در ترمیم بافت‌ها یا اندام‌هایی با ضخامت خاص محدودیت دارد. از طرفی، عملکرد و تمایز سلول‌های دوبعدی مانند سلول‌های سه‌بعدی طبیعی نیست. بنابراین، تولید ساختارهای سه‌بعدی پیشرفت درخور توجهی در فناوری مهندسی بافت ایجاد کرده است. در این داربست‌ها، سلول به‌طور گسترده در تمام سطح داربست به‌شکل سه‌بعدی رشد می‌کند. از این‌رو، عملکرد سلول‌ها مانند سلول‌های سه‌بعدی طبیعی بدن می‌شود [۱۸].

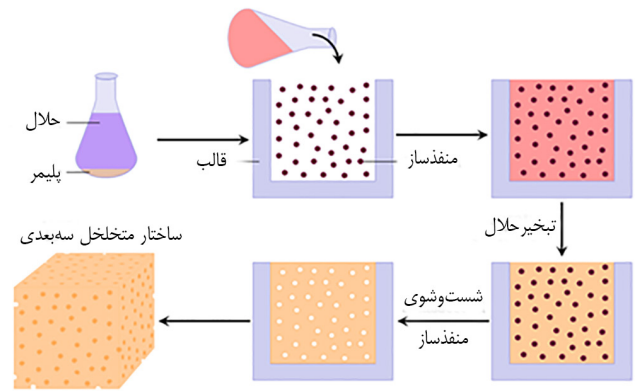
تعدادی از روش‌های تولید داربست متخلخل سه‌بعدی که از دهه‌های گذشته مورد توجه قرار گرفته‌اند حلال‌شویی ذرات (particulate leaching)، جدایی فاز و اسفنج‌شدن گازی (gas foaming) هستند [۱۹]. همچنین، با انجام تغییرات ساده در محلول الکتروریسی، همچون افزایش رسانایی محلول، استفاده از پلیمرهای رسانا و استفاده از حلال‌هایی که باعث خودگردایش الیاف می‌شوند، می‌توان لایه‌های نانولیفی با تخلخل و ضخامت زیاد تولید کرد.

تولید شده از روش TIPS منافذ بیشتری دارند. همچنین، نتایج کشت سلول نشان داد، داربست تهیه شده با روش SLL از ظرفیت بسیار مناسبی برای کاربرد در مهندسی بافت پوست برخوردار است [۲۶].

گروهی از پژوهشگران داربست‌های کامپوزیتی پلی‌کاپرولاکتون-زیست‌شیشه (bioglass-®45S5) را با استفاده از روش نمک‌شویی تولید کردند. در این پژوهش، از نمک‌های NaCl ، NaHCO_3 و مخلوط آن‌ها، با هدف بهینه‌سازی تخلخل داربست‌ها استفاده شد. نتایج ارزیابی‌ها نشان داد، در نمونه‌های دارای حداقل ۵۰٪ زیست‌شیشه کلسیم کربنات زیادی روی داربست‌ها تشکیل شده است. اما نمونه دارای مقدار کمی (۱۰٪) از این ماده، کلسیم کربنات اندکی ایجاد می‌کند. در حقیقت، تشکیل کلسیم کربنات به مقدار زیست‌شیشه بستگی دارد، زیرا این ماده در محیط آبی به‌شدت واکنش‌پذیر بوده که این موضوع شرط مهم زیست‌فعال بودن زیست‌شیشه است. ماده مزبور می‌تواند با یون‌های کربنات موجود در رطوبت محیط و مهم‌تر از همه در آب استفاده شده برای نمک‌شویی، واکنش دهد. واکنش زیست‌شیشه با آب، نقطه ضعف روش نمک‌شویی است که موجب تغییر خواص این ماده می‌شود. بدین ترتیب، حتی اگر داربست‌ها شبکه‌ای متخلخل و میکروساختاری باشند، تولید آن‌ها با روش نمک‌شویی به بهینه‌سازی نیاز دارد تا از واکنش زیست‌شیشه با آب و در ادامه، رسوب و تجمع آن جلوگیری شود [۲۸].

جدایی فاز

در روش جدایی فاز، سامانه چندجزئی همگن، در شرایط ویژه، به‌سبب ناپایداری شدن به‌شکل ترمودینامیکی و به‌علت کاهش انرژی آزاد سامانه، به بیش از یک جزء تبدیل می‌شود. دو نوع جدایی فاز مایع-مایع و جامد-مایع وجود دارد. جدایی فاز جامد-مایع در محلول پلیمر، با کاهش دما تا زمان تبلور حلال اتفاق می‌افتد. در این فرایند دمای تبلور حلال در محلول پلیمری بیشتر از دمای جدایی فاز است. اما هنگامی که دمای تبلور حلال بسیار کمتر از دمای جدایی فاز باشد، با کاهش دمای محلول پلیمری، جدایی فاز مایع-مایع اتفاق می‌افتد. تفاوت اصلی میان این دو فرایند امتزاج‌پذیری سامانه است. واکنش قوی پلیمر و حلال به جدایی فاز جامد-مایع و واکنش ضعیف پلیمر و حلال به جدایی فاز مایع-مایع منجر می‌شود. در شرایط مختلف، مانند تنوع پلیمر و حلال، غلظت پلیمر، نسبت حلال - ضدحلال و روش‌های مختلف گرمادهی و خنک‌کردن، می‌توان ساختارهای متخلخل مختلفی را



شکل ۱- نمایشی از مراحل تولید داربست با روش حلال‌شویی ذرات [۲۴].

می‌دهد.

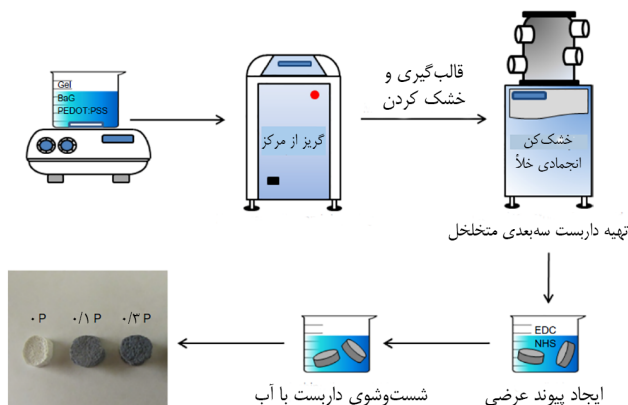
مدرس و همکاران داربست نانوالیافی ژلاتین-کیتوسان را با کمک فرایند نمک‌شویی-خشک‌کن انجمادی خلأ (SLL) تولید کرده و ویژگی‌های داربست تولیدی را با داربست تهیه شده با روش جدایی فاز گرماالقایی (thermally induced phase separation, TIPS) مقایسه کردند. به‌منظور آماده‌سازی داربست، پس از انحلال کیتوسان و ژلاتین در استیک اسید، نمک به محلول افزوده شد. محلول به‌دست آمده در قالب پلی‌اتیلنی ریخته شده و در گرم‌خانه خلأ در دمای 45°C به مدت ۲۴ h خشک شد. فیلم خشک شده پس از شبکه‌ای شدن به مدت ۷ روز هر ۱۲ h شست‌وشو داده شد تا ذرات نمک از داربست خارج شود. در نهایت، داربست با کمک خشک‌کن انجمادی خلأ خشک شد. نتایج این پژوهش نشان داد، با تغییر نسبت نمک-پلیمر می‌توان تخلخل داربست را تنظیم کرد. در حجم ثابت از پلیمر و نمک، با کاهش مقدار نمک، مقدار پلیمر افزایش می‌یابد. از این رو، مقدار تورم و جذب مولکول‌های آب در مرحله نمک‌شویی بیشتر می‌شود. این موضوع موجب تشکیل دیواره‌های ضخیم‌تر و اثرگذاری بیشتر سازوکار خشک‌کن انجمادی بر تخلخل می‌شود. همچنین، داربست‌های تهیه شده با روش SLL از سطح بسیار متخلخل و لایه‌های داخلی نامتراکم برخوردارند. در مقابل، داربست‌های تهیه شده با روش TIPS از ساختار متراکم، به‌ویژه در غلظت‌های زیاد پلیمر روی سطح خود برخوردارند.

دو سازوکار حلال‌شویی بلورهای نمک و جدایی فاز در دیواره منافذ در طول فرایند خشک‌کن انجمادی خلأ که به ایجاد تخلخل در دیواره منافذ منجر می‌شود، موجب تولید ساختار متخلخل ژلاتین-کیتوسان با استفاده از روش SLL می‌شوند. این دو سازوکار، ساختار خاصی از منافذ را ایجاد می‌کنند که برای کشت سلول مناسب است. زیرا اتصالات، در مقایسه با داربست‌های

کمتر از دمای بحرانی اتفاق می‌افتد. در دماهای کمتر از این مقدار، جدایی فاز با روش تجزیه اسپینودال رخ می‌دهد. ساختار پلیمر نهایی که با توجه به سامانه پلیمر و حلال و شرایط جدایی فاز متفاوت است، به‌طور کلی در سه شکل پودر، اسفنج سلول‌باز و سلول‌بسته ایجاد می‌شود. در مهندسی بافت تنها اسفنج سلول‌باز استفاده می‌شود. پارامترهای تعیین اندازه سلول شامل نوع پلیمر و حلال، غلظت محلول پلیمری و دما هستند. این روش معمولاً داربستی با اندازه سلول در محدوده $10-100 \mu\text{m}$ تولید می‌کند. مزایای این روش شامل امکان تولید داربست با خواص مکانیکی مناسب و قابلیت ترکیب با سایر روش‌ها، مانند حلال‌شویی ذرات و الگوبرداری سریع است. با وجود این، روش جدایی فاز گرماالقایی شامل معایبی از جمله کنترل کم بر جهت‌گیری و قطر الیاف و طولانی‌بودن زمان تولید است.

از آنجاکه جدایی فاز در همه حلال‌ها رخ نمی‌دهد، انتخاب حلال و دما در تهیه نانوالیاف بسیار مهم است. با این روش، در شرایط مطلوب می‌توان ساختار سه‌بعدی لیفی را با ابعاد نانو و معماری شبیه کلاژن نوع I، به‌منظور استفاده در کاربردهای مختلف پزشکی تولید کرد [۲۰، ۲۱، ۲۳، ۳۲، ۳۵].

شاهینی و همکاران داربست نانوکامپوزیتی رسانای سه‌بعدی را برای مهندسی بافت استخوان تولید کردند. بدین منظور، ژل و شیشه زیست‌فعال (bioactive glass, BaG) در آب حل شد. سپس پلی‌اتیلن‌دی‌اکسی‌تیوفن (PEDOT) و پلی‌استیرن سولفونات (PSS) به آن اضافه شد. محلول در مرکزگریز قرار گرفت و فاز جدا شده با کمک خشک‌کن انجامادی خلأ خشک، در نهایت شبکه‌ای شد (شکل ۲). نتایج نشان داد، داربست تولید شده با خواص مکانیکی و پایداری تخریب مناسب، سرعت تخریب مناسب را برای ترمیم استخوان ایجاد می‌کند. براساس نتایج کشت سلول مشخص شد،



شکل ۲- نمای از مراحل تولید داربست متخلخل سه‌بعدی با روش خشک‌کردن انجاماد امولسیون [۴].

به‌دست آورد [۳۲-۲۹]. این ساختارها قابلیت استفاده در ترمیم بافت‌های بدن مانند غضروف [۲۹]، استخوان [۳۳]، رگ [۳۴] و غیره را دارند.

جدایی فاز - خشک کردن انجامادی امولسیون

در این روش، ابتدا با همگن‌کردن محلول پلیمری در حلال آلی، امولسیون ایجاد می‌شود. سپس، به محلول به‌دست آمده ضدحلالی مانند آب اضافه می‌شود تا جدایی فاز اتفاق افتد. بدین ترتیب، امولسیون از آب و حلال ایجاد می‌شود. این مخلوط به‌هم‌زده شده و در قالب ریخته می‌شود. در نهایت، پس از سرد شدن سریع امولسیون، به‌منظور حذف حلال و آب از خشک‌کن انجامادی خلأ استفاده می‌شود. با این روش، می‌توان داربستی با تخلخل بیش از ۹۰٪ و اندازه منافذ در محدوده $20-200 \mu\text{m}$ تهیه کرد. پارامترهای خشک‌کننده نقش مهمی در تعیین ساختار داربست دارند. اندازه منافذ را نیز می‌توان با سرعت انجاماد و pH کنترل کرد. بنابراین، انجاماد سریع منافذ کوچک‌تری تولید می‌کند. درحالی‌که، انجاماد کنترل شده در یک جهت، برای ایجاد ساختار سه‌بعدی متخلخل همگن استفاده می‌شود. این روش، به دمای زیاد و مرحله شست‌وشوی جداگانه نیاز ندارد. نقطه ضعف این روش، اندازه منافذ کوچک و زمان طولانی فرایند است [۲۰، ۲۱، ۲۳].

جدایی فاز گرماالقایی

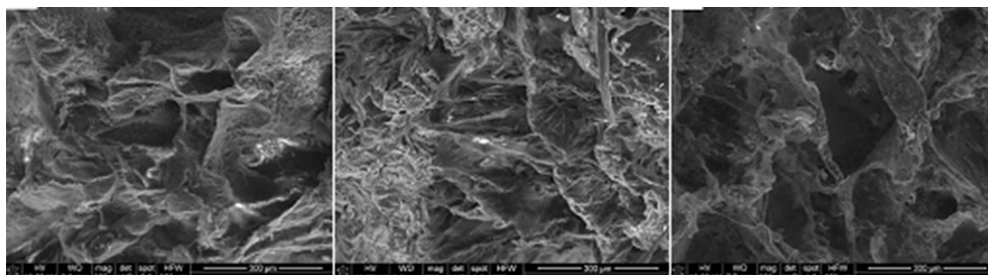
برای طراحی داربست بدین روش، تغییر دما لازم است تا محلول پلیمری به دو فاز جدا شود. فرایند شامل پنج مرحله محلول پلیمر، جدایی فاز و ژل شدن، استخراج حلال، جامد کردن و خشک کردن انجامادی است. ابتدا پلیمر در حلالی با دمای زیاد حل می‌شود. با کاهش دمای محلول تا زیر دمای انجاماد حلال، جدایی فاز رخ می‌دهد و پس از آن، خشک کردن انجامادی انجام می‌شود. در حقیقت، در شرایط خاص محلول ترمودینامیکی ناپایدار شده و به دو فاز غنی از پلیمر و کم‌پلیمر تفکیک می‌شود. در نهایت، حلال با تبخیر یا تصعید حذف شده و با استخراج حلال، فاز کم‌پلیمر حذف و فاز غنی از پلیمر جامد می‌شود. بدین ترتیب، داربست پلیمری متخلخل سه‌بعدی تولید می‌شود. درحقیقت، پلیمر موجود در فاز غنی از پلیمر، به‌شکل اسکلت سخت می‌شود و فضاهای اشغال شده با حلال در فاز بدون پلیمر به‌شکل خلل و فرج اسفنجی در پلیمر درمی‌آیند. جدایی فاز معمولاً به یکی از دو روش کلی هسته‌زایی و رشد یا تجزیه اسپینودال (spinodal) اتفاق می‌افتد. شایان توجه آن که جدایی فاز با کمک سازوکار هسته‌زایی و رشد دقیقاً دمای

ساختار داربست‌های تهیه شده بررسی کردند. بدین منظور، PCL را در مخلوط حلال دی‌اکسان-آب در دمای 40°C حل کردند. محلول با سرعت $30^{\circ}\text{C}/\text{min}$ سرد شد. نقطه ابری شدن محلول (دمایی که محلول شروع به کدر شدن می‌کند) و دمای ژل شدن (دمایی که محلول نمی‌تواند جریان یابد) تعیین شد. سپس، محلول تا دمای 40°C به مدت ۲ h سرد شده و کاملاً منجمد شد. در نهایت، نمونه در دمای 54°C و فشار 0.946 mbar به مدت سه روز خشک شد. در این پژوهش، به منظور تولید داربست‌های درشت‌متخلخل از ترکیب روش‌های جدایی فاز و شکرشویی (sugar leaching) در سامانه سه‌جزئی پلی‌کاپرولاکتون-دی‌اکسان-آب استفاده شد. در این مطالعه، تصاویر SEM داربست‌های پلی‌کاپرولاکتون، ساختار کروی نشان می‌دهند که ممکن است در اثر رشد منافذ پلی‌کاپرولاکتون، در مدت جدایی فاز محلول پلیمر تشکیل شده باشند. از آنجا که در اینجا حلال و ضدحلال به‌عنوان ناخالصی عمل می‌کنند، گرانیوی زیاد و وجود مقدار مشخصی ناخالصی در تشکیل منافذ مؤثرند. درحقیقت، زمانی که مقدار ناخالصی‌ها زیاد باشد، به دلیل گرانیوی زیاد پلیمر، ناخالصی‌ها در مرکز باقی می‌مانند. در نتیجه، بلورهای شاخه‌ای با حفظ شکل کروی در همه جهت‌ها رشد می‌کنند. همان‌طور که در شکل‌های ۴ و ۵ نشان داده شده است، میکروکره‌ها از منافذ کروی تشکیل شده‌اند که در اثر تجمع مولکول‌های حلال (به دلیل حذف ناخالصی‌ها در مدت فرایند خشک‌کن انجمادی) ایجاد شده‌اند. ساختارهای نانولیفی موجود در میکروکره‌ها نیز از راه رشد صفحه‌های بلوری ایجاد می‌شوند. نتایج این پژوهش نشان داد، ژل شدن سامانه نقش بسیار مهمی در تشکیل ساختارهای نانولیفی دارد. همان‌طور که در شکل ۴ مشخص است، زمانی که دما به سرعت از 8°C تا 40°C کاهش می‌یابد، ساختارهای میکرومتخلخل باز، با منافذ یکپارچه در اندازه $20\text{--}50\ \mu\text{m}$ تشکیل می‌شوند (شکل ۴-ب). اما در حالتی که دما در مدت زمان ۲ h از 8°C به 40°C کاهش می‌یابد، پیش از رسیدن به دمای 40°C

داربست نانوکامپوزیتی زیست‌سازگار است و می‌تواند به رشد سلول کمک کند [۴].

گروهی از پژوهشگران با استفاده از پلی‌کاپرولاکتون (PCL) و شیشه زیست‌فعال، داربست‌های کامپوزیتی برای کاربردهای مهندسی بافت استخوان تولید کردند. کامپوزیت‌ها به شکل داربست‌های بسیار متخلخل و سه‌بعدی از سه روش حلال‌شویی ذرات و ریخته‌گری حلال (SCPL)، جدایی فاز جامد-مایع (SLPS) و وارونگی فاز (PI) تولید شدند. داربست‌ها از نظر خواص مانند ساختار، تبلور، تخریب آبکافتی، زیست‌فعالی سطح و پاسخ سلولی ارزیابی شدند. تصاویر SEM (شکل ۳) نشان داد، داربست تولید شده با روش SCPL دارای تخلخل زیاد، شبکه به هم پیوسته مناسب و نامنظم و توزیع یکنواخت منافذ در محدوده $10\ \mu\text{m}$ تا حدود $300\ \text{mm}$ است. از سوی دیگر، داربست به دست آمده از روش SLPS دارای منافذ دراز آرایش یافته در حدود $150\text{--}10\ \text{mm}$ است، درحالی‌که داربست تولید شده با روش PI منافذ کمی نایکنواخت در محدوده از چند میکرون تا حدود $250\ \text{mm}$ دارد. تخلخل و اتصالات داخلی داربست‌های تهیه شده با روش‌های SLPS و PI نسبت به داربست به دست آمده از روش SCPL کمتر بوده، اما از مناطق سطحی بیشتری برخوردار است. همچنین، بررسی ساختار سلول‌های استخوانی کشت یافته روی داربست‌ها نشان داد، سلول‌ها قابلیت نفوذ به داخل منافذ و چسبندگی به سطح آن‌ها و نیز گسترش در تمام سطح منافذ را دارند. این سلول‌ها دارای ساختاری مناسب، با شبکه سه‌بعدی سلولی-سلولی هستند. مشاهدات میکروسکوپی توزیع سلول‌ها را در تمام سطوح داربست، بدون تمایل به رشد خوشه‌ای نشان داد [۳۳].

Liu و همکاران داربست‌های سه‌بعدی PCL را با ساختارهای نانولیفی و اسفنجی با استفاده از روش جدایی فاز مایع-مایع گرمایی از سامانه سه‌جزئی پلی‌کاپرولاکتون-دی‌اکسان-آب تولید کردند. همچنین، اثر غلظت پلیمر، دما و نسبت دی‌اکسان و آب را بر

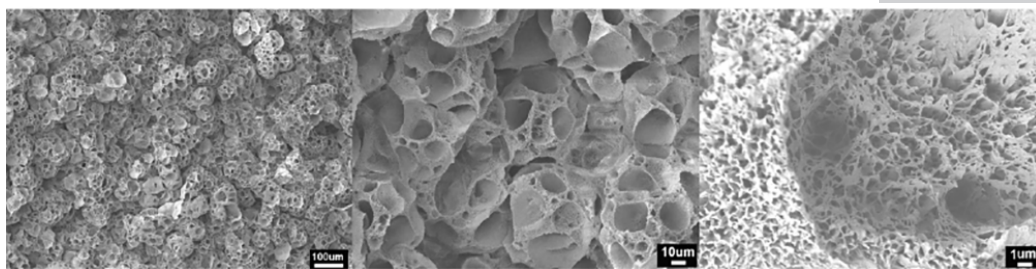


(پ)

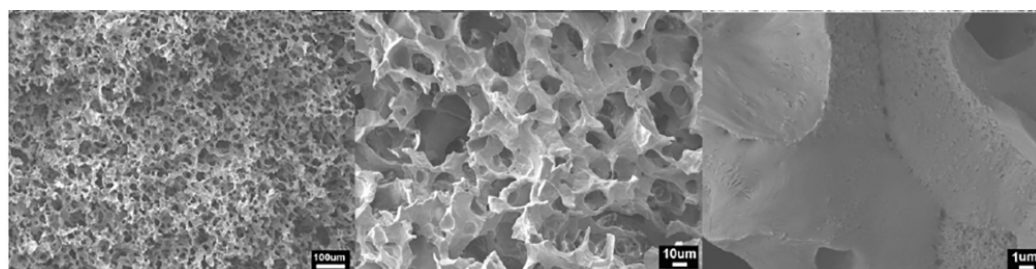
(ب)

(الف)

شکل ۳- تصاویر SEM داربست‌های تولید شده با روش‌های: (الف) SCPL، (ب) SLPS و (پ) PI [۳۳].



(الف)

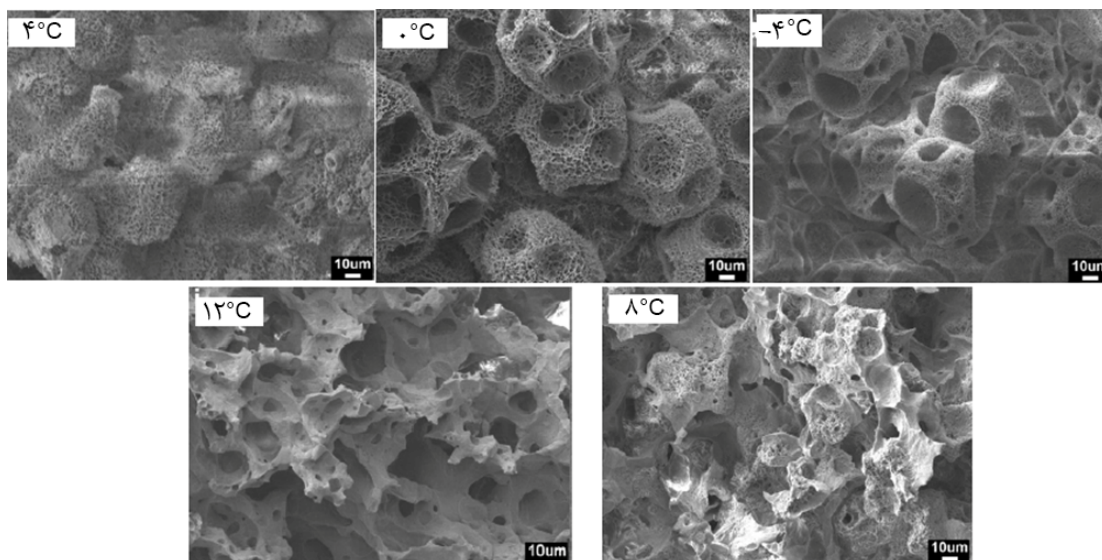


(ب)

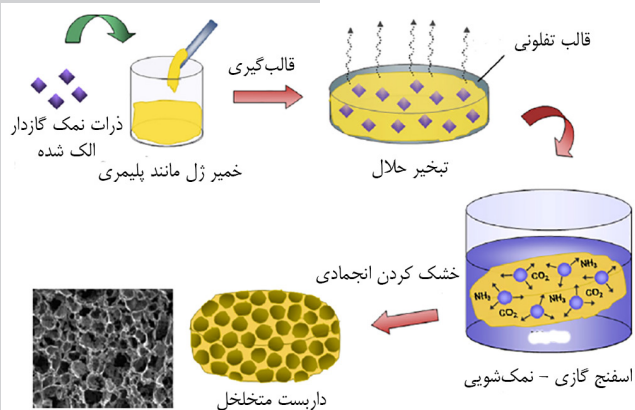
شکل ۴- تصاویر SEM داربست‌های تولیدی با بزرگ‌نمایی‌های مختلف در اثر انجماد PCL با کاهش دما از -8°C به -40°C : (الف) در مدت ۲ h و (ب) به سرعت در دی‌اکسان-آب با نسبت ۱۰:۹۰ [۳۶].

در حقیقت، با افزایش حجم ضدحلال، انحلال‌پذیری پلیمر کاهش می‌یابد. از این رو، باتوجه به تعامل ضعیف میان پلیمر و رقیق‌کننده و گرانی کمی در سامانه شبه‌حلال، تشکیل فاز کم‌پلیمر با استفاده از باقی‌مانده قطره‌های بزرگ‌تر امکان‌پذیر است. از طرفی، باتوجه به تصاویر مشخص شد، غلظت پلیمر اثر اندکی بر قطر الیاف دارد، اما اثر درخور توجهی بر تشکیل ساختارهای نانولیفی ندارد. زمانی که غلظت پلیمر از ۵٪ به ۱۵٪ افزایش می‌یابد، میکروکره‌ها به یکدیگر متصل می‌شوند. همچنین تصاویر SEM نشان داد، داربست‌های

ساختاری خاص با میکروکره‌های متصل و متخلخل نانولیفی دارای میانگین اندازه $60-70 \mu\text{m}$ و اندازه منافذ $25-5 \mu\text{m}$ در داربست‌ها تشکیل می‌شود (شکل ۴-الف). از طرفی، باتوجه به تصاویر شکل ۵، در دماهای کمتر از 4°C داربستی میکروکروی تشکیل شد که دارای دیواره‌های میکرومتخلخل با ساختار میکرولیفی بود. حال آنکه، در دماهای بیش از 8°C داربستی با ساختار میکروسلولی باز و دیواره منافذ یکپارچه، تشکیل شد. نتایج نشان داد، با افزایش مقدار آب به ۱۵٪، میکروکره‌ها ناپدید و شبکه‌های متخلخل ایجاد می‌شوند.



شکل ۵- داربست‌های تهیه شده از ۱۰٪ پلی‌کاپرولاکتون در دی‌اکسان-آب (با نسبت وزنی ۱۰:۹۰) در دماهای مختلف ژل‌شدن [۳۶].



شکل ۶- نمایی از تولید داربست متخلخل سه‌بعدی با روش حلال‌شویی ذرات-اسفنج‌شدن گازی [۲۳].

روش می‌تواند در مهندسی بافت قرنیه [۳۸]، کبد [۳۹]، استخوان [۴۰]، رگ، عصب [۴۱] و غیره به‌کار رود. شکل ۶ نمایی از تولید داربست متخلخل سه‌بعدی با روش حلال‌شویی ذرات-اسفنج‌شدن گازی را نشان می‌دهد.

Ji و همکاران داربست‌های سه‌بعدی پلی‌لاکتیک اسید-پلی‌اتیلن گلیکول (PDLLA/PEG) را با استفاده از روش اسفنج‌شدن گازی تهیه کردند. بدین منظور، نسبت‌های وزنی مختلف از مخلوط PLA/PEG در حلال دی‌کلرومتان حل شد. مخلوط داخل قالب تفلون نجسب (۵ cm × ۱۵ cm) ریخته شد و در خشکانه در شرایط خلأ به مدت ۲ روز قرار گرفت تا دی‌کلرومتان تبخیر شود و فیلمی غیرشفاف به‌دست آید. به‌منظور ایجاد تخلخل، نمونه‌های پلیمری در محفظه پر فشار قرار گرفتند. این محفظه در حمام آب قرار داد شد تا دمای آن به وسیله گرم‌کن چرخشی کنترل شود. پس از تعادل گرمایی و تخلیه هوا، سامانه با استفاده از گاز CO₂ با فشار ۶۰-۱۶۰ bar زیر فشار قرار گرفت. محفظه از سامانه جدا شده و به مدت ۲ h در این شرایط نگهداری شد. سپس، فشار سامانه با سرعت ۱۰ bar/min کاهش داده شد. در این مقاله، میانگین اندازه منافذ داربست‌ها در محدوده ۱۵۰-۵۰ μm تخمین زده شد. همان‌طور که در شکل ۷ نشان داده شده است، در دمای زیر بحرانی (۲۵°C)، متوسط قطر منافذ در PDLLA/PEG کمی کوچک‌تر از منافذ تشکیل شده در شرایط ابر بحرانی است. از آنجا که با افزایش دما، تراکم گاز CO₂ کم می‌شود، انحلال‌پذیری و هسته‌زایی گاز در بستر پلیمر کاهش می‌یابد. بنابراین، به‌سبب تحرک بیشتر گاز CO₂ منافذ بزرگ‌تری تشکیل می‌شوند. همچنین، در فشار زیر بحرانی (۶۰ bar)، منافذ بزرگ‌تری نسبت به شرایط ابر بحرانی ایجاد می‌شود. این موضوع به دلیل افزایش انحلال‌پذیری گاز CO₂ در پلیمر در اثر ازدیاد فشار

نانولیفی درشت متخلخل پلی‌کاپرولاکتون با چگالی کم و تخلخل زیاد از فرایند جدایی فاز و با استفاده از شکر به‌عنوان منفذساز تولید شدند [۳۶].

روش اسفنج‌شدن گازی

در بسیاری از روش‌های تولید داربست سه‌بعدی، لازم است از حلال‌های آلی و دمای زیاد استفاده شود. حلال‌های باقی‌مانده در داربست پس از اتمام فرایند، می‌توانند به سلول‌ها و بافت‌های اطراف آسیب برسانند و حتی ماهیت مولکول‌های زیست‌فعال قرار گرفته در داربست را تغییر دهند. روش اسفنج‌شدن گازی به استفاده از حلال و دمای زیاد نیاز ندارد و برای مواد حساس به گرما استفاده می‌شود. در این روش از گاز کربن دی‌اکسید پر فشار برای تولید داربست‌های بسیار متخلخل استفاده می‌شود. بدین منظور، پلیمر چند روز در محفظه‌ای با CO₂ پر فشار قرار داده می‌شود تا کاملاً از گاز اشباع شود. در این مدت، گاز CO₂ در پلیمر حل می‌شود که اکنون در تعادل ترمودینامیکی به حالت سیال درآمده است. سپس، فشار به‌سرعت کاهش داده می‌شود. این موضوع سبب به هم خوردن تعادل ترمودینامیکی، هسته‌زایی و رشد منافذ CO₂ درون داربست می‌شود. در این شرایط، CO₂ محلول ناپایدار شده و از فاز پلیمر جدا می‌شود.

مولکول CO₂ برای به‌حداقل رساندن انرژی آزاد، خوشه‌ای شده و در نتیجه منافذ هسته ایجاد می‌شود. پلیمر که پس از کاهش فشار تمایل به دستیابی به حالت جامد دارد، به‌شکل اسفنج منبسط می‌شود. این منافذ باعث گسترش درخور توجه حجم پلیمر و کاهش تراکم آن می‌شوند. بدین ترتیب، ساختار متخلخل سه‌بعدی پس از تکمیل فرایند تشکیل می‌شود. تخلخل و ساختار متخلخل داربست به مقدار گاز حل شده در پلیمر بستگی دارد. با این روش، اسفنج پلیمری با اندازه منافذ تا ۱۰۰ μm و تخلخل ۹۳٪ را می‌توان تهیه کرد. از جمله مزایای روش اسفنج‌شدن گازی، کنترل اندازه خلل و فرج و قابلیت ایجاد داربست‌های حجیم، عدم استفاده از حلال آلی و دمای زیاد را می‌توان نام برد. از سوی دیگر، با ترکیب روش حلال‌شویی ذرات و اسفنج‌شدن گازی تخلخل و اتصال داخلی منافذ بهبود درخور توجهی می‌یابد. در این حالت، تخلخل داربست با استفاده از ذرات منفذساز کنترل می‌شود. پلیمر در اطراف این ذرات مخلوط می‌شود تا ماتریس پلیمری پیوسته تشکیل دهد. مخلوط پلیمری و منفذساز زیر فشار زیاد قرار می‌گیرند تا کاملاً با گاز کربن دی‌اکسید اشباع شوند. پس از کاهش فشار و حذف منفذساز داربست بسیار متخلخلی به‌دست می‌آید [۲۱، ۲۳، ۳۷]. این

منافذ بزرگ‌تر تشکیل می‌شوند [۴۳].

تولید داربست سه‌بعدی با تمرکز بر فرمول‌بندی اولیه محلول الکتروریسی

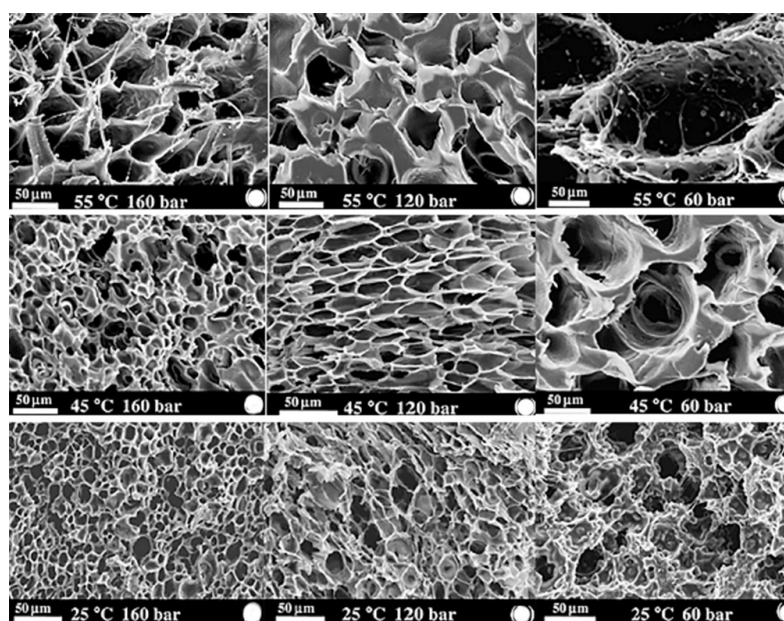
روش پیشنهادی برای ساخت لایه‌های با ساختار سه‌بعدی که کمتر به آن توجه شده است، تمرکز بر فرمول‌بندی اولیه محلول الکتروریسی است. انتخاب دقیق ترکیبات و خواص محلول، به‌عنوان نمونه افزایش رسانایی و کاهش کشش سطحی محلول با کمک عامل سطح‌فعال، استفاده از پلیمرهای رسانا و انتخاب حلال‌هایی که به خودگردایش (self-assembly) الیاف کمک می‌کنند، آرایش یافتن الیاف الکتروریسی شده را به‌طرف خارج از سطح صفحه جمع‌کننده (سه‌بعدی) امکان‌پذیر می‌سازد [۴۴].

استفاده از عامل سطح‌فعال

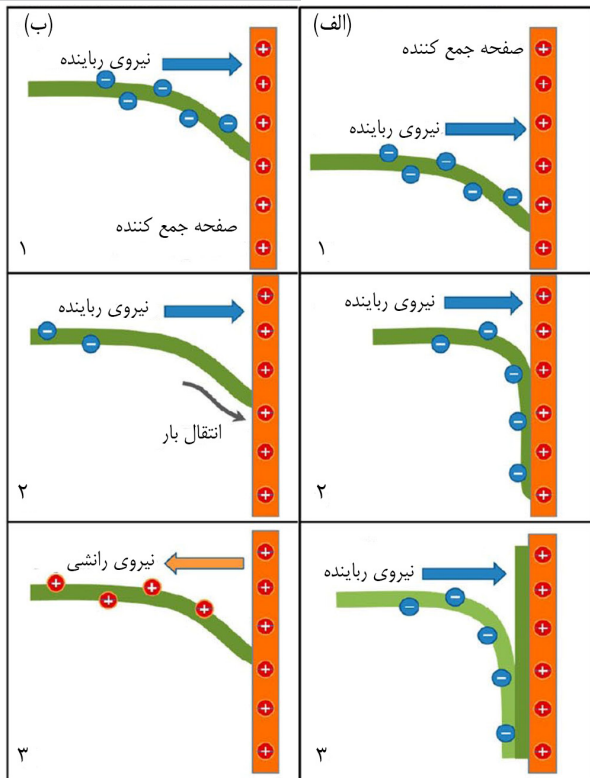
اتصال میسل‌ها به نانوالیاف را می‌توان روش جدیدی برای عامل‌دار کردن بیشتر نانوالیاف زیست‌پلیمری و مخلوط آن‌ها پیشنهاد کرد. برهم‌کنش عامل سطح‌فعال با پلیمر ممکن است، ساختار مولکولی و واکنش مولکول‌های پلیمری را تنظیم کند و خواص رئولوژی و بین‌وجهی پراکنده‌سازهای پلیمری را تغییر دهد. عامل سطح‌فعال یونی دارای سر آبدوست، ممکن است رسانایی الکتریکی محلول را بهبود دهد و ناپایداری خمشی در طول فرایند الکتروریسی ایجاد کند. همچنین، عامل سطح‌فعال موجب کاهش کشش سطحی و تغییر گرانشی محلول پلیمری

است که موجب اشباع شدن بیشتر گاز در سامانه و به دنبال آن افزایش تراکم هسته‌زایی گاز می‌شود. بنابراین، منافذ کوچک‌تر ایجاد می‌شوند. از طرفی، منافذ در شرایط زیربحرانی، به‌علت نفوذ کمتر گاز در پلیمر، یکنواختی کمتری دارند. این موضوع ممکن است، به‌دلیل کمبود زمان کافی برای توزیع یکنواخت کربن دی‌اکسید در فاز پلیمری اتفاق افتاده باشد. به‌طورکلی، اندازه منافذ اثر مشخصی روی متوسط جذب و خواص تخریبی و مکانیکی پلیمرها دارند. اندازه منافذ داربست را می‌توان متناسب با کاربردهای مختلف مهندسی بافت تعیین کرد [۴۲].

گروهی از پژوهشگران، اثر پارامترهای فرایند اسفنج‌شدن گازی را بر ساختار داربست‌های تهیه شده از PLA، بررسی کردند. نتایج ارزیابی نشان داد، افزایش فشار CO_2 موجب افزایش انحلال‌پذیری آن در PLA و افزایش چگالی هسته‌زایی می‌شود که به تشکیل منافذ کوچک‌تر با دیواره‌های ضخیم‌تر منجر می‌شود. به‌طورکلی، با افزایش فشار اشباع، انحلال‌پذیری گاز CO_2 در ماتریس پلیمری افزایش می‌یابد. در نتیجه، دمای انتقال شیشه‌ای (T_g) پلیمر کاهش یافته و مقدار گاز CO_2 در ساختار پلیمر افزایش می‌یابد. پس از برداشتن فشار و افزایش فشار اشباع گاز در بستر پلیمری، منافذ کوچک‌تر تشکیل می‌شوند. زمان‌های تخلیه و اشباع بلندتر و افزایش دما موجب تشکیل منافذ بزرگ‌تر با دیواره‌های نازک‌تر می‌شود، زیرا زمان تخلیه بلندتر امکان پیوستن منافذ را به یکدیگر فراهم می‌کند. در این شرایط، مقدار بیشتری گاز در ساختار وجود دارد. همچنین، انقباض گاز CO_2 افزایش می‌یابد که بدین ترتیب،



شکل ۷- تصاویر SEM از مقطع عرضی مخلوط‌های PDLLA-PEG با نسبت وزنی ۳۰:۷۰ در دما و فشارهای مختلف [۴۲].

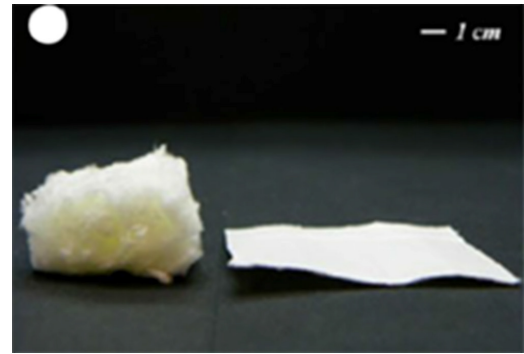


شکل ۹- نمایی از مراحل مختلف فرایند لایه‌نشانی الیاف روی جمع‌کننده‌ها در حالت: (الف) دوبعدی و (ب) سه‌بعدی [۱۸].

برخورد الیاف به جمع‌کننده انتقال بسیار سریع‌تر بار ایستای سطحی به صفحه را به دنبال دارد. بنابراین، الکترون‌های کمتری در الیاف باقی می‌ماند و جاذبه میان الیاف و جمع‌کننده کاهش می‌یابد. حتی گاهی قسمت‌هایی از الیاف که به جمع‌کننده نزدیک‌ترند، قابلیت دریافت و حمل بار مثبت و دفع آن را از جمع‌کننده دارند. درحالی‌که انتهای الیاف به سمت جمع‌کننده جذب شده و حرکت می‌کنند. در نتیجه، الیاف در جهت‌گیری‌های چندگانه روی جمع‌کننده جمع‌آوری می‌شوند و داربست سه‌بعدی شل و کرکی (fuffy) ایجاد می‌کنند.

در این پژوهش نشان داده شده است، با افزایش مقدار SDS مقاومت سطحی الیاف کاهش می‌یابد. گروه‌های سولفات SDS که در سطح الیاف متمرکز شده‌اند، می‌توانند موجب القای لایه سطحی آب در الیاف شوند. به‌طور خلاصه، در اثر افزودن SDS، پلیمر از عایق به نیمه‌رسانا تبدیل شده و قابلیت انتقال الکتریسیته ساکن از الیاف افزایش چشمگیری یافته است. این موضوع، نشانه افزایش حالت کرکی داربست است [۱۸].

در پژوهشی دیگر، گروهی از پژوهشگران داربست‌های لیفی بسیار ظریف سه‌بعدی پایدار در آب را از کراتین، برای مهندسی بافت غضروف تولید کردند. بدین منظور، کراتین در شرایط بازی



شکل ۸- تصویر رقمی داربست‌های سه‌بعدی و دوبعدی الکترورسی شده پروتئین ذرت [۱۸].

می‌شود [۱۷،۴۵،۴۶].

گروهی از پژوهشگران داربست‌های الکترورسی شده آرایش یافته سه‌بعدی را برای شبیه‌سازی ساختارهای ماتریس برون‌سلولی بافت نرم تولید کردند و به مطالعه ساختار و سازوکار آن‌ها پرداختند. برای این کار، آن‌ها از پروتئین ذرت و پلی‌اتیلن گلیکول (PEG) به همراه عامل سطح‌فعال سدیم دودسیل سولفات (SDS) استفاده کردند. به‌منظور تولید داربست‌های دوبعدی، پروتئین ذرت و PEG جداگانه در محلول آبی اتانول ۷۰٪ حل شده و الکترورسی شدند. برای تهیه داربست‌های سه‌بعدی، پروتئین ذرت و PEG هر یک در محلول آبی دارای SDS حل و الکترورسی شدند. در نهایت، کشت سلول روی این داربست‌ها انجام شد. در شکل ۸ داربست‌های دوبعدی و سه‌بعدی تهیه شده از ذرت نشان داده شده است. در حقیقت، اختلاف ساختار الکترورسی سه‌بعدی و دوبعدی به‌دست آمده در این پژوهش ناشی از اختلاف نیروی الکتریکی گذراست. در آغاز هر دو الکترورسی یاد شده، قطره سیال دارای بار منفی می‌شود. سپس، ازدیاد طول می‌یابد تا لیف تشکیل شود. الیاف الکترورسی شده معمولی (شکل ۹-الف) و سه‌بعدی (شکل ۹-ب) با مقدار زیادی بار منفی سطحی، به‌طور عمودی به سمت صفحه جمع‌کننده حرکت می‌کنند.

در روش الکترورسی متداول، در لحظه برخورد انتهای لیف به جمع‌کننده، مقاومت ویژه سطحی (surface resistivity) زیاد الیاف، سبب انتقال تعداد کمی از الکترون‌ها به جمع‌کننده می‌شود. سپس، الیاف و مقدار زیادی از الکترون‌های باقی‌مانده به‌شدت به‌وسیله جمع‌کننده مثبت جذب می‌شوند. در نتیجه، داربست‌های دوبعدی الکترورسی شده متداول از الیاف با آرایش موازی با صفحه جمع‌کننده به‌دست می‌آیند. در مقابل، در الکترورسی سه‌بعدی مقاومت سطحی کم الیاف موجب انتقال سریع بار از سطح الیاف به جمع‌کننده می‌شود.



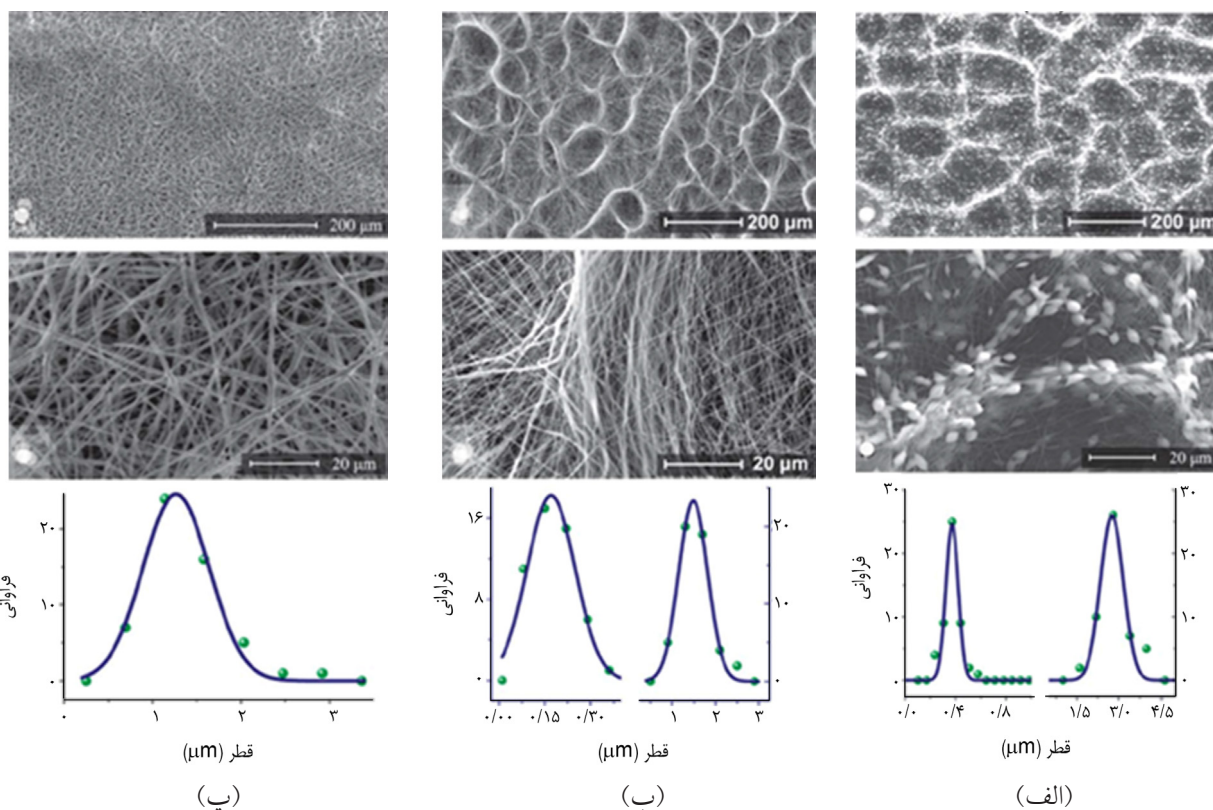
شکل ۱۰- نمایی از الیاف ناهمگن انباشته شده در جمع کننده [۴۷].

خودگردایش الیاف الکتروریسی شده

داربست‌های نانولیفی سه‌بعدی را در شرایط خاص و با بهره‌گیری از ویژگی‌های پلیمر و محلول پلیمری، می‌توان از روش خودگردایش تولید کرد. در حقیقت، با تمرکز بر جت الکتروریسی و بهینه‌سازی شرایط فرایند، رشد سریع داربست با ضخامت‌هایی تا مقیاس سانتی‌متر اتفاق می‌افتد. به‌عنوان نمونه، Ahirwal و همکاران، برای تهیه داربست‌های سه‌بعدی ضخیم از این روش استفاده کردند. آن‌ها به‌منظور تهیه محلول الکتروریسی، PCL را در دی‌متیل‌فرمامید (DMF) و دی‌کلرومتان (DCM) حل کرده و الکتروریسی کردند. از آنجاکه DMF حلال ضعیفی برای PCL است، بنابراین محلول پلیمری ناهمگن غلظت دارد. در نتیجه، توزیع دونمایی (bimodal) از قطر الیاف به‌دست می‌آید (الیاف با قطرهای ضخیم و بسیار

ضعیف از پُر استخراج شد. پس از حل کردن پروتئین استخراج شده، با افزودن SDS به محلول الکتروریسی، داربست سه‌بعدی تهیه شد. در نهایت، در اثر جداسدن SDS به‌وسیله شست‌وشو، داربست سه‌بعدی خالص کراتین به‌دست آمد. داربست تهیه شده با سلول کشت داده و ارزیابی شد. نتایج نشان داد، داربست سه‌بعدی تولید شده برای کاربرد در بافت غضروف مناسب است [۱۷].

Xu و همکاران گلوئین گندم (WG) را به‌منظور الکتروریسی الیاف بسیار نازک پودر پروتئین گندم با ساختار اتفاقی سه‌بعدی و پایدار در آب برای کاربرد در مهندسی بافت نرم، از گلوئین (ماده چسبنده گندم) استخراج کردند. سپس، WG به‌دست آمده را با ماده سطح‌فعال (سدیم دودسیل سولفات) در محلول آبی حل کردند تا در نهایت، داربست لیفی بسیار ریز سه‌بعدی با آرایش تصادفی تهیه شد. همچنین، این گروه پژوهشی پایداری در آب و کشت سلول را در داربست ساخته شده بررسی کردند. بر اساس نتایج به‌دست آمده، داربست پس از قرارگرفتن در مایع شبیه‌سازی بدن (phosphate buffered saline, PBS) به‌مدت ۳۵ روز با حفظ ساختار لیفی، پایداری در آب رضایت‌بخشی را نشان داد [۴۶].



شکل ۱۱- ساختار داربست و اندازه طول و توزیع قطر الیاف پلی‌کاپرولاکتون با غلظت: (الف) ۱۱٪ و (ب) ۱۳٪ هر دو با ولتاژهای سوزن ۱۵ kV و جمع‌کننده ۰ kV و (پ) ۱۳٪ با ولتاژ سوزن ۵ kV و ولتاژ جمع‌کننده ۱۰ kV - [۴۷].

تا با کنترل شرایط آزمایشگاهی، توده الیاف سه‌بعدی نامنظم را با ارتفاع ۱۰ cm و نرم‌تر از پنبه و ابریشم با قطر $6/8 - 1/2 \mu m$ ، مطابق شکل ۱۲ به‌دست آورند. در این روش، در آغاز الکتروریسی مخروطی کوچکی از الیاف در مرکز جمع‌کننده ظاهر شد که در آن میدان الکتریکی قوی‌تر بود. سپس، الیاف الکتروریسی شده به‌طور پیوسته و در ستون نامنظمی در سر مخروط تشکیل شد. اضافه‌کردن افزودنی موجب ازدیاد حالت سه‌بعدی ساختار می‌شود. حتی در آغاز الکتروریسی نیز الیاف جمع شده صاف نیستند. در حقیقت، به‌سبب رسانایی پلی‌استیرین بار مثبت محلول پلی‌استیرین به‌سرعت به جمع‌کننده منتقل می‌شود. از طرفی، بار منفی با انتقال از جمع‌کننده به الیاف، در نوک توده جمع می‌شود تا این نقطه دارای بار منفی شود. بارهای منفی ایجاد شده در سطح الیاف مانند جمع‌کننده جدید عمل کرده و الیاف ورودی با بار مثبت را جذب می‌کنند. بنابراین، الیاف جدید در نوک الیاف انباشته شده جمع می‌شوند. ریسندگی PS با افزودنی $Fe_2(SO_4)_3$ ، به‌دلیل ذرات باردار شده بیشتر، مانند Fe^{3+} ، به تشکیل توده الیاف نرم‌تر با قطر کمتر نسبت به الیاف PS خالص منجر می‌شود [۴۸].

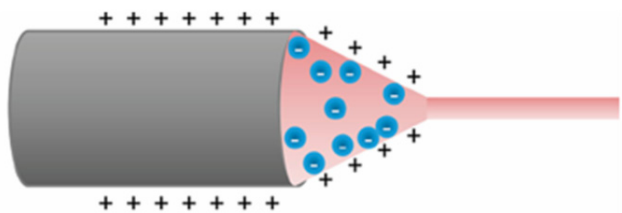
نقش عوامل مختلف در تولید داربست‌های الکتروریسی شده

چگالی بار

شکل‌های سه‌بعدی می‌توانند با تولید الیافی شامل مواد دارای چگالی بار زیاد و توزیع بار در سطح خارجی یا نزدیک سطح خارجی الیاف، تشکیل شوند. در حقیقت، طی الکتروریسی در اثر اعمال ولتاژ به سر سوزن، قطعه باردار شده می‌تواند به سمت مخروط تیلور و سطح جت الکتروریسی حرکت کند. این موضوع موجب ایجاد نیروی دافعه میان الیاف نزدیک به هم می‌شود. این پدیده می‌تواند برای آماده‌سازی الیاف الکتروریسی با ترکیبات سطحی مناسب به‌کار گرفته شود [۱۵،۴۴].

تغییر رطوبت نسبی

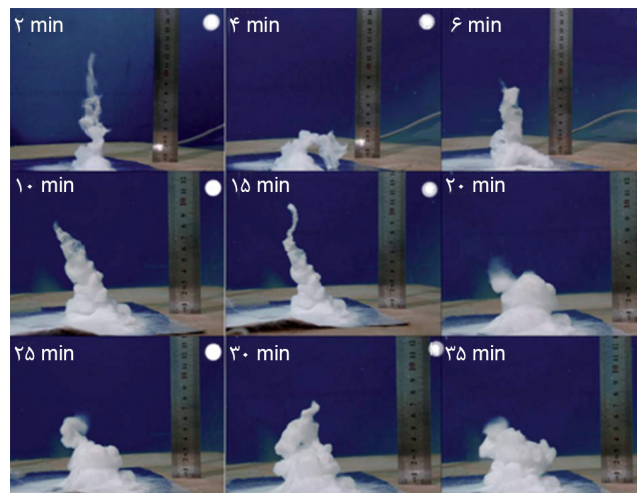
رطوبت نسبی نیز آثار مهمی بر الکتروریسی دارد. آب موجود در الیاف باعث می‌شود تا پلی‌الکترولیت به گروه‌های باردار جدا شود و




شکل ۱۳- نمایشی از توزیع بار در قطره تیلور [۴۴].


ظریف) که اساس تشکیل ساختار لانه زنبوری هستند. با توجه به تبخیر سریع DCM، وجود حلال DMF به‌منظور جلوگیری از بسته‌شدن سر سوزن لازم است. حلال باقی‌مانده در الیاف ضخیم موجب تماس بسیار خوب الیاف با جمع‌کننده می‌شود. از این رو، الیاف ضخیم افزون بر تشکیل دیواره‌های لانه زنبوری، نیروی موینگی نیز ایجاد می‌کنند. در حقیقت، حلال باقی‌مانده در الیاف برای خروج از سطح با نیروی الکتروستاتیکی رقابت می‌کند. این موضوع موجب فشاردادن لایه‌های الیاف به سمت سوزن می‌شود. البته باید توجه داشت، این نیروهای موینگی بسیار کوچک هستند. از سوی دیگر، الیاف ظریف به‌دلیل معلق‌بودن در هوا، به جمع‌کننده نمی‌چسبند و بار الکتریکی در آن‌ها باقی می‌ماند. بدین ترتیب، توزیع ناهمگنی از میدان الکتریکی در سطح جمع‌کننده انباشته می‌شود که قالب مناسبی در سطح جمع‌کننده به‌وجود می‌آورد و باعث ظهور اولین لایه لانه‌زنبوری می‌شود (شکل ۱۰). در این پژوهش، اثر ولتاژ نیز بررسی شد. نتایج نشان داد، با کاهش ولتاژ توزیع تک‌نمایی (monomodal) از قطر الیاف به‌دست می‌آید، اما هیچ خودگردایشی اتفاق نمی‌افتد و لانه زنبوری ایجاد نمی‌شود. در نتیجه، مشخص است که توزیع دونمایی قطر الیاف، شرط لازم برای خودگردایشی و تولید داربست متخلخل و سه‌بعدی است (شکل ۱۱) [۴۷].

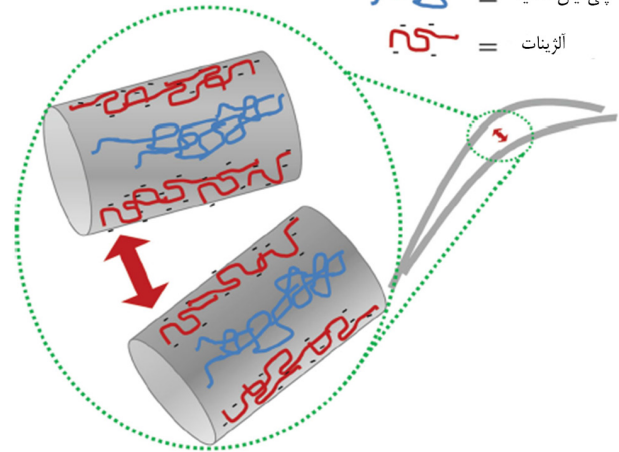
در پژوهشی دیگر Sun و همکاران داربست سه‌بعدی را با کمک ویژگی‌های خودگردایش پلی‌استیرین (به‌دلیل رسانایی) تولید کردند. بدین منظور، پلی‌استیرین (PS) با غلظت‌های مختلف را در DMF و THF حل کردند. این پژوهشگران برای مقایسه، مقدار کمی از افزودنی‌هایی مانند آکرلیک اسید، اتانول، نیتریک اسید و $Fe_2(SO_4)_3$ را به محلول پلی‌استیرین افزودند. این افراد موفق شدند



شکل ۱۲- فرایند رشد الیاف پلی‌استیرین و تولید داربست سه‌بعدی [۴۸].

پلی اتیلن اکسید = 

آلژینات = 



شکل ۱۴- نمایی از قرارگیری پلی اتیلن اکسید در مرکز آلژینات [۴۴].

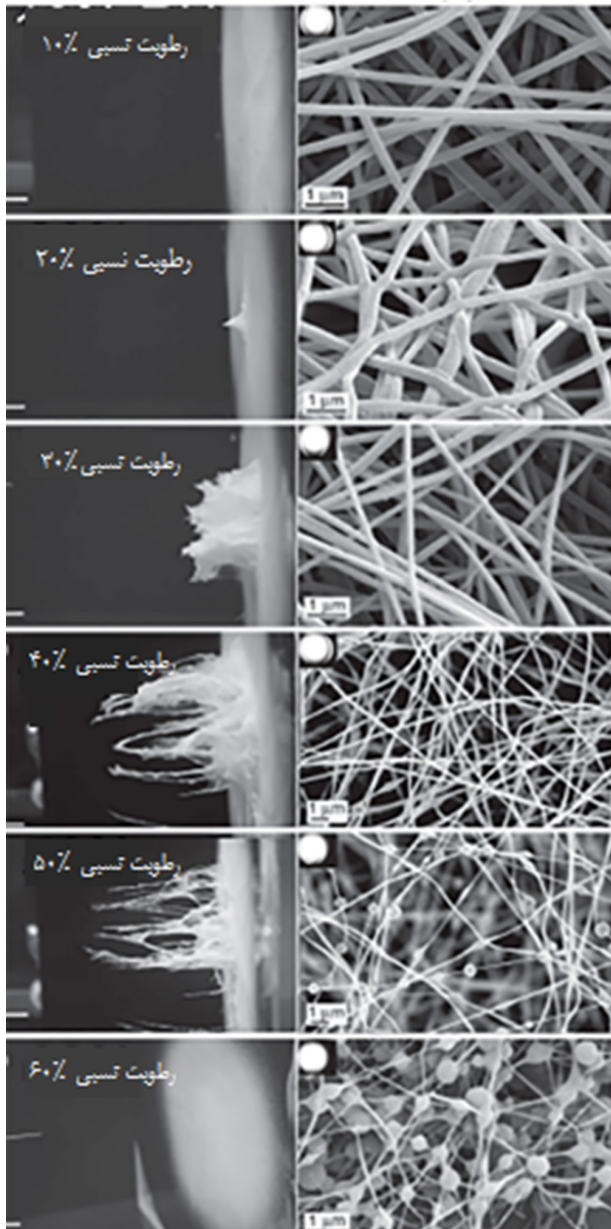
چگالی بار پلیمر افزایش یابد. در نتیجه، هر لیف به وسیله دافعه بار لیاف مجاور خود دوباره آرایش می‌یابد. در نهایت، داربستی با ساختار سه‌بعدی تشکیل می‌شود. اما افزایش بیش از اندازه رطوبت سبب افزایش طول رشته‌ها شده و به دلیل افزایش چگالی سطح و ناپایداری شلاقی (whipping instabilities)، لایه لیاف در سطحی بزرگ‌تر تشکیل می‌شود [۱۵، ۴۴].

تعدادی از پژوهشگران با استفاده از روش الکتروریسی و دافعه بار مناسب، از نانوالیاف آلژینات لایه سه‌بعدی تهیه کردند. بدین منظور، از محلول شامل آلژینات و پلی اتیلن اکسید با و بدون عامل سطح فعال غیر یونی، پلورونیک F127 (Pluronic F127)، استفاده شد.

سدیم آلژینات پلی الکترولیت آنیونی است که در میدان الکتریکی واکنش الکتریکی نشان می‌دهد. از آنجا که آلژینات دارای گروه‌های باردار شده منفی (کربوکسیلیک اسید) است، در این لیاف قسمت‌های باردار منفی جذب میدان الکتریکی مثبت در دیواره سوزن و سطح خارجی مخروط تیلور می‌شوند (شکل ۱۳). بدین ترتیب، آلژینات در محلی نزدیک به فصل مشترک هوا و محلول جت الکتروریسی متمرکز می‌شود، در حالی که PEO در داخل باقی می‌ماند (شکل ۱۴). از این رو، بارهای منفی در سطح لیاف تجمع می‌یابند. در نتیجه، به دلیل اعمال ولتاژ منفی به جمع‌کننده میان لیاف مجاور دافعه ایجاد شده و موجب دور شدن لیاف از جمع‌کننده می‌شود.

از طرف دیگر، در این پژوهش با تغییر رطوبت محیط الکتروریسی، غلظت یون‌های تفکیک شده در لیاف نیز تغییر داده شد که موجب ایجاد دافعه بار بیشتر میان لیاف شده است. در نتیجه، با دفع لیاف

تصاویر SEM عکس



شکل ۱۵- تصاویر SEM از داربست ساخته شده در رطوبت‌های نسبی مختلف [۴۴].

دارای پایه آلژینات به وسیله لیاف مجاور، ساختار سه‌بعدی تولید شد. همان‌طور که در شکل ۱۵ نشان داده شده است، با افزایش رطوبت ضخامت و ارتفاع داربست افزایش می‌یابد. اما افزایش بیش از اندازه رطوبت به ناپایداری شلاقی منجر می‌شود و از تشکیل لایه سه‌بعدی جلوگیری می‌کند.

همچنین نتایج این پژوهش نشان داد، عامل سطح فعال F127 تشکیل دانه را در مخلوط آلژینات-پلی اتیلن اکسید کاهش می‌دهد و به تشکیل لایه سه‌بعدی کمک می‌کند. در حقیقت، عامل سطح فعال موجب کاهش کشش سطحی محلول می‌شود. در نتیجه، آلژینات به

همچنین، مهاجرت سلول به داخل داربست دوبعدی به دلیل اندازه کوچک منافذ مشکل است. از این رو، امروزه تولید داربست‌های سه‌بعدی و متخلخل دارای اهمیت است. اکثر روش‌های فیزیکی تولید داربست به دستگاه‌های ویژه نیاز دارند. بدین سبب، در این مقاله افزون بر مرور روش‌های شیمیایی تولید داربست‌های سه‌بعدی با کمک تغییر شرایط محیط و محلول الکتروورسی، سایر روش‌های شیمیایی تولید داربست سه‌بعدی مانند روش‌های حلال‌شویی ذرات، جدایی فاز و اسفنج‌شدن گازی نیز بررسی شد. بنابراین، از نتایج پژوهش‌های مرور شده در مقاله حاضر، می‌توان برای دستیابی به روش بهینه‌ای در تولید داربست‌های سه‌بعدی و متخلخل، به منظور ترمیم بافت مدنظر در مهندسی بافت بهره برد.

سطح هوا و آب مهاجرت می‌کند. بدین ترتیب، دافعه الیاف بیشتر شده و لایه سه‌بعدی تشکیل می‌شود [۴۴].

نتیجه‌گیری

استفاده از فناوری تولید الیاف در مقیاس نانو در زمینه مهندسی بافت موضوعی است که به دلیل شباهت ساختار بافت طبیعی به لیفچه‌ها در مقیاس نانو بسیار جالب توجه است. الکتروورسی روشی شناخته شده در دنیاست که قابلیت تولید داربست‌هایی با ساختار نانو را دارد. با وجود این، در الکتروورسی معمولی لایه‌های دوبعدی تولید می‌شود که کاربردهای آن را در بافت سه‌بعدی محدود می‌کند.

مراجع

1. Sundaramurthi D., Krishnan U.M., and Sethuraman S., Electrospun Nanofibers as Scaffolds for Skin Tissue Engineering, *Polym. Rev.*, **54**, 348-376, 2014.
2. Suganya S., Venugopal J., Agnes Mary S., Ramakrishna S., Lakshmi B.S., and Giri Dev V.R., Aloe Vera Incorporated Biomimetic Nanofibrous Scaffold: A Regenerative Approach for Skin Tissue Engineering, *Iran. Polym. J.*, **23**, 237-248, 2014.
3. Bhardwaj N., Sow W.T., Devi D., Ng K.W., Mandal B.B., and Cho N.J., Silk Fibroin-Keratin Based 3D Scaffolds as A Dermal Substitute for Skin Tissue Engineering, *Integr. Biol.*, **7**, 53-63, 2015.
4. Shahini A., Yazdimamaghani M., Walker K.J., Eastman M.A., Hatami-Marbini H., Smith B.J., Ricci J.L., Madihally S.V., Vashae D., and Tayebi L., 3D Conductive Nanocomposite Scaffold for Bone Tissue Engineering, *Int. J. Nanomed.*, **9**, 167-181, 2014.
5. Liu J., Nie H., Xu Z., Guo F., Guo S., Yin J., Wang Y., and Zhang C., Construction of PRP-Containing Nanofibrous Scaffolds for Controlled Release and Their Application to Cartilage Regeneration, *J. Mater. Chem. B*, **3**, 581-591, 2015.
6. Li W.J., Tuli R., Okafor C., Derfoul A., Danielson K.G., Hall D.J., and Tuan R.S., A Three-Dimensional Nanofibrous Scaffold for Cartilage Tissue Engineering Using Human Mesenchymal Stem Cells, *Biomaterials*, **26**, 599-609, 2005.
7. Deepthi S., Jeevitha K., Nivedhitha Sundaram M., Chennazhi K.P., and Jayakumar R., Chitosan-Hyaluronic Acid Hydrogel Coated Poly(caprolactone) Multiscale Bilayer Scaffold for Ligament Regeneration, *Chem. Eng. J.*, **260**, 478-485, 2015.
8. Bishi D.K., Guhathakurta S., Venugopal J.R., Cherian K.M., and Ramakrishna S., Low Frequency Magnetic Force Augments Hepatic Differentiation of Mesenchymal Stem Cells on A Biomagnetic Nanofibrous Scaffold, *J. Mater. Sci., Mater. Med.*, **25**, 2579-2589, 2014.
9. Kucinska-Lipka J., Gubanska I., Janik H., and Sienkiewicz M., Fabrication of Polyurethane and Polyurethane Based Composite Fibres by The Electrospinning Technique for Soft Tissue Engineering of Cardiovascular System, *Mater. Sci. Eng. C*, **46**, 166-176, 2015.
10. Weightman A., Jenkins S., Pickard M., Chari D., and Yang Y., Alignment of Multiple Glial Cell Populations in 3D Nanofiber Scaffolds: Toward the Development of Multicellular Implantable Scaffolds for Repair of Neural Injury, *Nanomedicine*, **10**, 291-295, 2014.
11. Zhu W., Masood F., O'Brien J., and Zhang L.G., Highly Aligned Nanocomposite Scaffolds by Electrospinning and Electrospraying for Neural Tissue Regeneration, *Nanomedicine*, **11**, 693-704, 2015.
12. Liu H., Ding X., Zhou G., Li P., Wei X., and Fan Y., Electrospinning of Nanofibers for Tissue Engineering Applications, *J. Nanomater.*, **2013**, 1-12, 2013.
13. Ravichandran R.K., Sundaramurthi D., Gandhi S., Sethuraman S., and Krishnan U.M., Bioinspired Hybrid Mesoporous

- Silica–Gelatin Sandwich Construct for Bone Tissue Engineering, *Microporous Mesoporous Mater.*, **187**, 53–62, 2014.
14. Holzwarth J.M. and Ma P.X., 3D Nanofibrous Scaffolds for Tissue Engineering, *J. Mater. Chem.*, **21**, 10243-10251, 2011.
 15. Jeong S.I., Burns N.A., Bonino C.A., Kwon I.K., Khan S.A., and Alsberg E., Improved Cell Infiltration of Highly Porous 3D Nanofibrous Scaffolds Formed by Combined Fiber–Fiber Charge Repulsions and Ultra-Sonication, *J. Mater. Chem. B*, **2**, 8116-8122, 2014.
 16. Ng R., Zang R., Yang K.K., Liu N., and Yang S.T., Three-Dimensional Fibrous Scaffolds with Microstructures and Nano-textures for Tissue Engineering, *RSC Adv.*, **2**, 10110-10124, 2012.
 17. Xu H., Cai S., Xu L., and Yang Y., Water-Stable Three-Dimensional Ultrafine Fibrous Scaffolds from Keratin for Cartilage Tissue Engineering, *Langmuir*, **30**, 8461–8470, 2014.
 18. Cai S., Xu H., Jiang Q., and Yang Y., Novel 3D Electrospun Scaffolds with Fibers Oriented Randomly and Evenly in Three Dimensions to Closely Mimic the Unique Architectures of Extracellular Matrices in Soft Tissues: Fabrication and Mechanism Study, *Langmuir*, **29**, 2311–2318, 2013.
 19. Mendonça R.H., de Oliveira Meiga T., da Costa M.F., and da Silva Moreira Thiré R.M., Production of 3D Scaffolds Applied to Tissue Engineering Using Chitosan Swelling as a Porogenic Agent, *J. Appl. Polym. Sci.*, **129**, 614-625, 2013.
 20. Subia B., Kundu J., and Kundu S., *Biomaterial Scaffold Fabrication Techniques for Potential Tissue Engineering Applications*, Intech Open Access, India, 141-158, 2010.
 21. Patel H., Bonde M., and Srinivasan G., Biodegradable Polymer Scaffold for Tissue Engineering, *Trends Biomater. Artif. Organs*, **25**, 20-29, 2011.
 22. Mano J., Silva G., Azevedo H.S., Malafaya P., Sousa R., Silva S.S., Boesel L.F., Oliveira J.M., Santos T.C., Marques A.P., Neves N.M., and Reis R.L., Natural Origin Biodegradable Systems in Tissue Engineering and Regenerative Medicine: Present Status and Some Moving Trends, *J. Royal Soc. Interface*, **4**, 999-1030, 2007.
 23. Chung H.J. and Park T.G., Surface Engineered and Drug Releasing Pre-Fabricated Scaffolds for Tissue Engineering, *Adv. Drug Delivery Rev.*, **59**, 249-262, 2007.
 24. Bartis D. and Pongrácz J., *Three Dimensional Tissue Cultures and Tissue Engineering*, University of Pécs, Hungary, 1-53, 2011.
 25. Pan Z., Qu Z.h., Zhang Z., Peng R., and Yan C., Particle-Collision and Porogen-Leaching Technique to Fabricate Polymeric Porous Scaffolds with Microscale Roughness of Interior Surfaces, *Chin. J. Polym. Sci.*, **31**, 737-747, 2013.
 26. Modarees M.P., Mirzadeh H., and Zandi M., Fabrication of a Porous Wall and Higher Interconnectivity Scaffold Comprising Gelatin/Chitosan via Combination of Salt-Leaching and Lyophilization Methods, *Iran. Polym. J.*, **21**, 191-200, 2012.
 27. Lebourg M., Serra R.S., Estellés J.M., Sánchez F.H., Ribelles J.G., and Antón J.S., Biodegradable Polycaprolactone Scaffold with Controlled Porosity Obtained by Modified Particle-Leaching Technique, *J. Mater. Sci., Mater. Med.*, **19**, 2047-2053, 2008.
 28. Cannillo V., Chiellini F., Fabbri P., and Sola A., Production of Bioglass® 45S5–Polycaprolactone Composite Scaffolds via Salt-Leaching, *Compos. Struct.*, **92**, 1823-1832, 2010.
 29. Budyanto L., Goh Y., and Ooi C., Fabrication of Porous Poly(L-lactide) (PLLA) Scaffolds for Tissue Engineering Using Liquid–Liquid Phase Separation and Freeze Extraction, *J. Mater. Sci., Mater. Med.*, **20**, 105-111, 2009.
 30. Zhang H., Liu X., Yang M., and Zhu L., Silk Fibroin/Sodium Alginate Composite Nano-Fibrous Scaffold Prepared Through Thermally Induced Phase-Separation (TIPS) Method for Biomedical Applications, *Mater. Sci. Eng., C*, **55**, 8-13, 2015.
 31. Chen J.S., Tu S.L., and Tsay R.Y., A Morphological Study of Porous Polylactide Scaffolds Prepared by Thermally Induced Phase Separation, *J. Taiwan Inst. Chem. Eng.*, **41**, 229-238, 2010.
 32. Ma P.X. and Elisseff J., *Scaffolding in Tissue Engineering*, CRC, New York, 3-638, 2005.
 33. Dziadek M., Pawlik J., Menaszek E., Stodolak-Zych E., and Cholewa-Kowalska K., Effect of the Preparation Methods on Architecture, Crystallinity, Hydrolytic Degradation, Bioactivity, and Biocompatibility of PCL/Bioglass Composite Scaffolds, *J. Biomed. Mater. Res. Part B*, **103**, 1580–1593, 2014.
 34. Mi H.Y., Jing X., Yu E., McNulty J., Peng X.F., and Turg L.S., Fabrication of Triple-Layered Vascular Scaffolds by Combining Electrospinning, Braiding, and Thermally Induced Phase Separation, *Mater. Lett.*, **161**, 305-308, 2015.
 35. Chen H., Truckenmuller R., Van Blitterswijk C., and Moroni L., *Fabrication of Nanofibrous Scaffolds for Tissue Engineering Applications*, Woodhead, Netherlands, 158-183, 2013.
 36. Liu S., He Z., Xu G., and Xiao X., Fabrication of Polycap-

- rolactone Nanofibrous Scaffolds by Facile Phase Separation Approach, *Mater. Sci. Eng., C*, **44**, 201-208, 2014.
37. Mooney D.J., Baldwin D.F., Suh N.P., Vacanti J.P., and Langer R., Novel Approach to Fabricate Porous Sponges of Poly(D,L-lactic-co-glycolic acid) without the Use of Organic Solvents, *Biomaterials*, **17**, 1417-1422, 1996.
38. Zellander A., Gemeinhart R., Djalilian A., Makhous M., Sun S., and Cho M., Designing a Gas Foamed Scaffold for Keratoprosthesis, *Mater. Sci. Eng., C*, **33**, 3396-3403, 2013.
39. Stampella A., Rizzitelli G., Donati F., Mazzarino M., de la Torre X., Botrè F., Giardi M.F., Dentini M., Barbeta A., and Massimi M., Human Hepatoma Cell Lines on Gas Foaming Templated Alginate Scaffolds for In Vitro Drug-Drug Interaction and Metabolism Studies, *Toxicol. In Vitro*, **30**, 331-340, 2015.
40. Petrie Aronin C.E., Cooper J.A. (Jr.), Sefcik L.S., Tholpady S.S., Ogle R.C., and Botchwey E.A., Osteogenic Differentiation of Dura Mater Stem Cells Cultured In Vitro on Three-Dimensional Porous Scaffolds of Poly(ϵ -caprolactone) Fabricated via Co-extrusion and Gas Foaming, *Acta Biomater.*, **4**, 1187-1197, 2008.
41. Di Maio E., Salerno A., and Iannace S., Scaffolds with Tubular/Isotropic Bi-modal Pore Structures by Gas Foaming and Fiber Templating, *Mater. Lett.*, **93**, 157-160, 2013.
42. Ji C., Annabi N., Hosseinkhani M., Sivaloganathan S., and Dehghani F., Fabrication of Poly-D,L-Lactide/Polyethylene Glycol Scaffolds Using the Gas Foaming Technique, *Acta Biomater.*, **8**, 570-578, 2012.
43. Rouholamin D., Smith P.J., and Ghassemieh E., Control of Morphological Properties of Porous Biodegradable Scaffolds Processed by Supercritical CO₂ Foaming, *J. Mater. Sci.*, **48**, 3254-3263, 2013.
44. Bonino C.A., Efimenko K., Jeong S.I., Krebs M.D., Alsberg E., and Khan S.A., Three-Dimensional Electrospun Alginate Nanofiber Mats via Tailored Charge Repulsions, *Small*, **8**, 1928-1936, 2012.
45. Kriegel C., Kit K.M., McClements D.J., and Weiss J., Electrospinning of Chitosan-Poly (Ethylene Oxide) Blend Nanofibers in The Presence of Micellar Surfactant Solutions, *Polymer*, **50**, 189-200, 2009.
46. Xu H., Cai S., Sellers A., and Yang Y., Electrospun Ultrafine Fibrous Wheat Glutenin Scaffolds with Three-Dimensionally Random Organization and Water Stability for Soft Tissue Engineering, *J. Biotechnol.*, **184**, 179-186, 2014.
47. Ahirwal D., Hébraud A., Kádár R., Wilhelm M., and Schlatter G., From Self-assembly of Electrospun Nanofibers to 3D cm Thick Hierarchical Foams, *Soft Matter*, **9**, 3164-3172, 2013.
48. Sun B., Long Y.Z., Yu F., Li M.M., Zhang H.D., Li W.J., and Xu T.X., Self-assembly of a Three-Dimensional Fibrous Polymer Sponge by Electrospinning, *Nanoscale*, **4**, 2134-2137, 2012.