

مهندسی بیومتریال ها به عنوان کنام سلول های بنیادی

زهرا عیوضی زاده^۱، عاطفه سلوک^۱، محمدعلی شکرگزار^{۲*}

۱ - گروه بیومتریال، دانشکده مهندسی پزشکی، دانشگاه صنعتی امیرکبیر، تهران، ایران

۲ - مؤسسه پاستور ایران، بانک سلولی ملی ایران، تهران، ایران

چکیده

سلول های بنیادی به علت دارا بودن قابلیت خودنوزایی و توانایی تمایزی بالا، پتانسیل بالایی در کاربرد مهندسی بافت و طب بازساختی دارند. دو هدف عمده که در کشت این نوع سلول ها دنبال می شود، تکثیر آن ها در محیط کشت با حفظ پرتوانی و تمایز آن ها به سمت رده سلولی مورد نیاز، است.

با رشد و گسترش علم زیست شناسی و شناخت بیش تر کنام سلولی، مشخص شد که فاکتورهای بیوشیمیایی تنها عوامل دخیل در سرنوشت سلولی نیستند. با تحقیقات گسترده ای که در این زمینه انجام شد، به این نتیجه رسیدند که برای تقلید از کنام سلولی برای رسیدن به هدف خاص علاوه بر فاکتورهای بیوشیمیایی، کنترل فاکتورهای بیوفیزیکی مانند عوامل مکانیکی، هندسی و الکتریکی، نیز ضروری است.

در بحث مهندسی سلول های بنیادی، هدف، ساختن بیومتریالی است که بتواند با اعمال تمام این شرایط، کنام سلولی را برای سلول ها تداعی کند.

واژه های کلیدی: سلول های بنیادی، کنام سلولی، فاکتورهای بیوفیزیکی، عوامل مکانیکی، عوامل هندسی، عوامل الکتریکی

مقدمه

بنیادی را می توان از جنین یا موجود متولد شده استخراج کرد به همین دلیل بر اساس منبع استخراجی دو نوع سلول بنیادی جنینی و بالغ خواهیم داشت (۵۹).

سلول های بنیادی بالغ، چند توان و تک توان هستند اما سلول های بنیادی جنینی (ESCs)، سلول های جنسی جنینی (EGCs) و سلول های سرطانی جنینی (ECCs)، همه توان هستند. سلول های پرتوان القایی یا iPSC ها که از برنامه ریزی مجدد سلول های سوماتیک حاصل می شوند نیز پرتوان هستند (۵۴).

با توجه به این که سلول های بنیادی پرتوان (PSCs) نسبت به دسته های دیگر دارای مزایایی هم چون توانایی تکثیر بالا در شرایط مناسب، توانایی تمایز به انواع مختلف سلول های بدن و قابلیت ایجاد اصلاحات ژنتیکی، هستند، در مهندسی بافت و طب بازساختی بیش تر کاربرد دارند. اگرچه سلول های بنیادی بالغ همانند سلول های بنیادی هماتوپوئیک، برای درمان

پیشرفت های اخیر علم مهندسی سلول های بنیادی استراتژی درمانی جدیدی را به روی بیماری های لاعلاج باز کرده است. با این وجود موفقیت نهایی، گرو توانایی ما در کنترل سرنوشت سلول های بنیادی و تولید سلول ها در مقیاس درمانی است (۶۱).

سلول های بنیادی توانایی خودنوزایی و تمایز را دارند. خاصیت خودنوزایی به سلول های بنیادی این امکان را می دهد تا با حفظ حالت غیرتمایزی خود به محل آسیب برسند. این سلول ها را از نظر پتانسیل تمایزی می توان به ۴ دسته همه-توان، پرتوان، چندتوان و تک توان تقسیم نمود. سلول های

نویسنده مسئول:

مؤسسه پاستور ایران، بانک سلولی ملی ایران

پست الکترونیکی: mashokrgozar@yahoo.com

تاریخ دریافت: ۱۳۹۶/۰۷/۲۴

تاریخ پذیرش: ۱۳۹۶/۰۹/۱۸

۱. سیگنال های بیوشیمیایی

سیگنال های بیوشیمیایی همان فاکتورهای رشد و عوامل محلولی است که از دیرباز تاکنون به محیط های کشت افزوده می شدند و تأثیر آن ها تا حد زیادی شناخته شده است. در ادامه به طور خلاصه چند مثال از وجود این سیگنال ها در کنام سلولی را بررسی می شود.

اولین قدم در ارتباط سلول و محیط اطراف آن چسبندگی است. سلول ها دارای گیرنده هایی برای اتصال سلول-سلول و سلول-زمینه هستند. لیگندهای چسبندگی سلول (CAMs)، پروتئین هایی هستند که بر روی سطح سلول ها واقع شده اند. زمانی که اتصال بین سلول ها و سلول و ECM برقرار می شود، CAM هایی چون کدهرین ها، اینتگرین ها، سلکتین ها و ایمونوگلوبین ها در این اتصال شرکت می کنند (۵۴). هم چنین برخی از پروتئین های ECM نقش به سزایی را در پتانسیل تمایزی و خودنوازی سلول های بنیادی ایفا می کنند. مولکول های ECM مثل کلاژن I، لامینین، ویترونکتین و فیبرونکتین جایگاه اتصال مناسبی برای ESCs ایجاد می کنند و باعث می شوند که سلول بتواند خاصیت پرتوانی خود را حفظ کند (۵۴). برای مثال فیبرونکتین یک جزء کلیدی در چسبندگی و خودنوازی ESC موشی به حساب می آیند و مقدار بیش از حد فیبرونکتین باعث پهن شوندگی و تمایز این سلول ها می شوند (۳۰). به علاوه گلیکوزآمینوگلیکان های (GAGs) موجود در ECM مثل هیالورونیک اسید (HA) خواص منحصر به فردی دارند. برای مثال HA با وزن مولکولی کم برای حفظ ESCs در حالت تمایز نیافته در کشت طولانی مدت مناسب هستند (۱۹، ۳۶). بنابراین فاکتورهای محلول، اتصال های سلولی و ECM همگی جزئی از کنام سلول های بنیادی به حساب می آیند و می توانند بر روی سرنوشت سلول که می تواند خودنوازی، تمایز، خاموشی، آپوپتوز و ... باشد، تأثیرگذار باشند (۵۱).

عوامل شیمیایی مورد استفاده در کنترل سرنوشت سلول های بنیادی یا در داخل ساختار داربست تعبیه می شوند یا توسط یک حامل به سلول منتقل می شوند. با توجه به این که اتصال سلول-زمینه برای عملکرد سلول بسیار اهمیت دارد، و این چسبندگی در شرایط طبیعی توسط مولکول های ECM مثل پلی پپتیدها و پلی ساکاریدها انجام می گیرد، می توان در ساخت ECM مصنوعی از این مولکول ها استفاده کرد و با تقلید

بیماری هایی چون سرطان خون استفاده می شوند اما استفاده از آن ها در بازسازی و درمان عضو از دست رفته به علت محدودیت تکثیر آن ها در محیط آزمایشگاهی، دور از دسترس است. در مقابل PSCs می توانند منابع سلولی پایان ناپذیری به حساب بیایند و از آن ها در درمان بیماری هایی مثل اختلال های هماتوپوئتیکی، آسیب های کبدی و آسیب های نخاعی استفاده کرد (۵۴).

دو دسته مهم از PSCs را، ESCs، که از توده ی سلولی (ICM) داخل بلاستوسیت استخراج می شوند، و iPSCs تشکیل می دهند (۵۴). آن چه که در کشت سلول های بنیادی پرتوان برای استفاده کلینیکی اهمیت دارد، توانایی کنترل آن ها برای تمایز به سلول های رده خاص یا تکثیر آن ها همراه با حفظ پرتوانی است. برای دستیابی به این هدف در گذشته سلول ها را در محیط کشت های دوبعدی حاوی اجزاء و فاکتور های رشد، کشت می دادند. در حالی که استفاده از بیومتریال های جدید با محیط سه بعدی خاص و خواص فیزیکی-شیمیایی بهینه می تواند بازده بیش تری در حفظ پتانسیل پرتوانی و تمایز به رده ی خاص داشته باشد (۵۴).

کنام سلول های بنیادی یک میکرو محیط پیچیده، دینامیک و n بعدی است که سلول های بنیادی در آن قرار دارند و شامل ماتریکس خارج سلولی (ECM) و مولکول های محلولی که توسط سلول های آن محیط ترشح می شود، است. رفتار سلول ها همواره تحت تأثیر تحریکات و ویژگی های کنام آن ها است. بنابراین سرنوشت سلول های بنیادی در ارتباط مستقیم با کنام آن ها قرار دارد (۴۹). امروزه مطالعه های گسترده ای بر روی مهندسی میکرو محیط هایی برای کنترل رفتار سلول ها در حال انجام است. یک کنام مهندسی شده مناسب برای سلول های بنیادی نیازمند حضور عوامل مختلف فیزیکی و بیوشیمیایی هم چون برهم کنش سلول-سلول و سلول-زمینه، بیومولکول های تعبیه شده در محیط، نفوذ اکسیژن، نیروی مکانیکی خارجی و عوامل بسیار دیگر است (۵۴، ۵۹).

استفاده از بیومتریال ها در کشت سلول های بنیادی، تلاش برای شبیه سازی کنام سلولی است. وجود کنام سلولی باعث ایجاد و انتقال سیگنال های مختلف به سلول می شود که این سیگنال ها به دو دسته اصلی سیگنال های بیوشیمیایی و بیوفیزیکی تقسیم بندی می شوند (۲۶).

زیستی شرایط مناسب را برای چسبندگی سلول فراهم کرد (۴۹).

از جمله مواد شیمیایی که برای کنترل رفتار سلولها استفاده می شود می توان به ابریشم، کیتوسان، پلی یورتان و ... اشاره کرد. برای مثال کامپوزیت ابریشم و سلولز باعث تمایز کندروژنیک MSCs شود. حتی برخی از سکانس های پپتیدی مانند RGD, IKVAV و YIGSR که جزء پروتئین های ECM هستند، نیز برای کنترل رفتار SCها استفاده می شوند. این پپتیدها با برهم کنش با مولکول های چسبندگی مثل اینتگرین ها بر روی سطح سلول و لیگاند های ECM به طور مستقیم عملکرد سلول ها را تنظیم می کنند (۴۹).

۲. سیگنال های بیوفیزیکی

سیگنال های فیزیکی جزء عواملی هستند که به تازگی شناخته شده اند و مطالعه های گسترده ای در این زمینه در حال انجام است (۵۱). در ادامه به عوامل بیوفیزیکی دخیل در سرنوشت سلول های بنیادی پرداخته می شود و مروری بر مطالعه های انجام شده بر تأثیر این عوامل بر روی رفتار سلول ها انجام خواهد شد. فاکتورهای بیوفیزیکی دخیل در سرنوشت سلول های بنیادی را می توان در سه گروه عوامل مکانیکی، عوامل مورفولوژیکی و عوامل الکتریکی قرار داد (۲۶، ۴۸).

۱.۲ - عوامل مکانیکی

سلول های بنیادی به سیگنال های مکانیکی که به آنها وارد می شود پاسخ می دهند. سیگنال های مکانیکی در بدن می توانند به صورت ایستا عمل کنند مثل سفتی زمینه، یا به صورت دینامیک مانند بارگذاری های کششی و فشاری یا تنش های برشی بر روی رفتار سلولی اثر بگذارند (۴۸).

۱.۱.۲ - عوامل مکانیکی ایستا

براساس گزارش های ثبت شده، سفتی زمینه یکی از مهم ترین پارامترهای مؤثر بر رفتارهای سلولی از جمله چسبندگی، تکثیر، مهاجرت و تمایز به رده های خاص سلولی است (۵۴). بیومتریال هایی که سفتی آنها در حد سفتی ECM سلول مورد نظر است تا حد زیادی می تواند بر روی فنوتیپ سلولی تأثیرگذار باشند (۵۵). PSCs الاستیسیته سطح را احساس

می کنند و نسبت به آن پاسخ می دهند. اکثر مطالعه های انجام شده در این مورد بیشتر بر روی زمینه هایی از جنس پلی-آکریل آمید (PAA) انجام می گیرد (۵۴).

در بحث حفظ پرتوانی PSCs، مواد پلی مری بسیاری تهیه شدند تا سطح سفتی آنها در حدی باشد که PSCs روی آنها با حفظ پرتوانی خود تکثیر پیدا کنند، اما در حقیقت منبع زیادی مبنی بر سفتی مناسب برای حفظ پرتوانی PSCs موجود نیست و مطالعه های بیشتر بر روی سطوح با سفتی های متفاوت در حال انجام است. البته با توجه به سفتی ECM در بافت های متفاوت، می توان سفتی مناسب این کاربرد را کم تر از سفتی بافت های عصبی و بیشتر از کنام سلول های هماتوپوئیتیک تخمین زد (۵۴). در مطالعه ای Dongyuan و همکارانش میزان حفظ بنیادینگی ESCs را بر روی ژل هایی با سفتی متفاوت (۶/۱ kPa و ۴۶/۷ kPa) بررسی کردند و مشاهده نمودند که میزان بیان Oct-4 و Nanog بر روی سطوح نرم تر بیشتر بوده است و این سطوح توانسته اند بنیادینگی را بهتر حفظ کنند (۴۵). اگرچه در توضیح های ارائه شده به نظر می رسد که هرچه سطح نرم تر باشد برای حفظ پرتوانی مناسب تر است، اما در مطالعه ای که به تازگی انجام شد، سه زمینه از جنس پلی وینیل الکل با سفتی های متفاوت (۱۰/۳، ۲۵ و ۳۰/۴ kPa) تهیه شد و میزان پرتوانی سلول های کشت داده شده بر روی آنها بررسی شد. طی آزمایش های صورت گرفته مشاهده شد که سلول ها بر روی زمینه ای با سفتی متوسط (۲۵ kPa) نسبت به نمونه های سفت تر و نرم تر در طی ۲۰ پاساژ توانستند پرتوانی خود را در حد بهینه حفظ کنند. می توان علت این تناقض را تأثیر عوامل دیگر مثل شیمی سطح، ترکیب و حتی نوع سلول دانست (۲۸).

با توجه به توضیح های ارائه شده در قسمت های قبلی و حساسیت شدید سلول ها نسبت به الاستیسیته زمینه ای که روی آن کشت پیدا می کنند، حتی تغییر بسیار اندک در میزان الاستیسیته زمینه می تواند منجر به از دست رفتن پرتوانی سلول و تمایز به رده خاص گردد. بنابراین محققان در تلاشند تا با مهندسی کردن سفتی زمینه، PSCs را به سمت سلول بافت هدف تمایز دهند. یکی از اولین مطالعه ها در این زمینه در سال ۲۰۰۶ توسط Engler و همکارانش انجام شد. آنها در این مطالعه نشان دادند که PSCs بر روی زمینه های نرم تر

برای مثال در سال ۲۰۱۵، Jaramillo و همکارانش ژل های فیبرینی با سفتی متفاوت (۴-۲۴۷ kPa) با تغییر غلظت فیبرینوژن و نسبت کراسلینک فیبرینوژن-ترومبین، تهیه کردند و با کشت ESCs موشی بر روی آن ها تمایز سلول ها را بررسی کردند. در این مطالعه مشاهده شد، زمینه های نرم تر (۴-۳۵ kPa) نسبت به زمینه های سفت تر (۱۷۱-۲۴۷ kPa) بیش تر موجب تکثیر و بیان ژن های مربوط به اندودرم (AFP، Sox17 و Hnf4) در ESCs موشی شدند (۳۳).

۲.۱.۲- عوامل مکانیکی دینامیک

برخلاف این که در اکثر مقاله های سفتی زمینه به عنوان تنها عامل مکانیکی کنترل کننده سرنوشت سلولی به حساب می آید، اما این عامل تنها یک عامل استاتیک دخیل در رفتار سلولی است و در حالت طبیعی بدن شاهد عوامل دینامیک در حین پرورده های سلولی مثل رشد، تقسیم، فیروز، تشکیل سرطان و ... هستیم (۲۴). با توجه به وجود چنین عواملی، دانشمندان به دنبال ایجاد شرایط دینامیک بر روی سلول ها و بررسی رفتار آن ها هستند.

برای مثال در مقاله ای که توسط غضنفری و همکارانش به چاپ رسید، تأثیر کشش های دوره ای بر روی تکثیر سلول های بنیادی مزانشیمی و تمایز آن ها به سمت سلول های ماهیچه ای نرم بررسی شد. نتایج این مطالعه نشان داد که کشش دوره ای با افزایش دامنه کشش و تعداد آن ها، باعث افزایش تکثیر سلول های بنیادی مزانشیمی انسانی و تمایز آن ها به سمت سلول های ماهیچه ای نرم بدون افزودن فاکتورهای رشد می شود (۲۲، ۲۳). حتی اعمال نیروی مکانیکی دوره ای با شرایط دیگر می تواند سلول های بنیادی مزانشیمی را بدون افزودن فاکتورهای رشد، با بازده بالایی به سمت سلول های ماهیچه ای استخوانی تمایز دهد (۲۵).

اعمال کشش و تنش علاوه بر این که بر روی بیان ژن ها سلولی اثر می گذارد، می تواند بر روی مورفولوژی و سفتی سلول نیز مؤثر باشد. با توجه به مطالعه ای که در سال ۲۰۱۷ انجام شد، اعمال کشش تک محور به سلول های بنیادی مشتق شده از چربی، می تواند بر روی اسکلت سلولی، جهت مندی سلول، خواص الاستیک سلولی اثرگذار باشد و باعث بیان ژن های سلول ماهیچه ای نرم شود. نتایج نشان داد که اعمال کشش - های دوره ای به مدت ۲۴ ساعت باعث کشیده شدن پاپک های

به سمت سلول های بافت عصب تمایز می یابند، زمینه هایی با سفتی بیش تر کنام سول های ماهیچه ای را تقلید می کند و زمینه های کامل سفت، باعث تمایز سلول ها به سمت استخوان می شوند. از طرفی مشاهده شد که هر چه از مدت زمان کشت این سلول ها بر روی زمینه های مذکور می گذرد، احتمال بازگشت آن ها کم تر خواهد بود (۱۵). در مطالعه ای دیگر با تهیه زمینه هایی از جنس PAA با سفتی های متفاوت (۴-۸۰ kPa) تمایز ESCs از طریق بیان مارکرهای cTnT به سلول های قلبی، بررسی شد و مشاهده شد که هیدروژل هایی با سفتی ۴/۱۸-۴/۴۹ kPa در طی ۱۵ و ۳۰ روز بیش ترین میزان بیان مارکر مورد نظر را دارند (۲۷).

در مقاله ای دیگر در همان سال، هیدروژل آکریلامید ترکیب شده با کلاژن برای بهبود چسبندگی سلولی و در سفتی های مختلف از ۰/۲ kPa تا ۴۰ kPa تهیه شد. ESCs موشی بر روی آن ها کشت داده شد و مشاهده شد تشکیل لایه سلولی ماهیچه ای قلبی عروقی بر روی هیدروژلی با سفتی مشابه ماهیچه قلبی موش (۶ kPa) بیش تر از نمونه های دیگر است. هم چنین تشکیل جسم جنینی همراه با انقباض بر روی زمینه ۶ kPa تقریباً ۷ برابر سایر نمونه ها گزارش شد، اگرچه فرکانس ضربه تمام نمونه ها تقریباً یکسان بود. هم چنین سطح mRNA های Actn2 و Tnnt2 که بیانگر تمایز به سمت سلول های قلبی است، در نمونه ۶ kPa مقداری افزایش یافته است. تمایز جسم جنینی به رده قلبی، به مقدار زیادی تحت تأثیر انتقال سیگنال و برهم کنش بین مولکول های چسبندگی سلولی است و هرچه سفتی زمینه به عضله قلب نزدیک تر باشد، می تواند این انتقال سیگنال را تسریع کند و تمایز قلبی را بهبود بخشد. البته زمینه های بسیار نرم و بسیار سخت مانع انتقال این سیگنال ها می شوند. زمینه های بسیار نرم توانایی انتقال سیگنال را ندارند و زمینه های بسیار سخت میزان تماس سلول-سلول را کاهش می دهند و منجر به مهاجرت سلولی می شوند که در اثر آن میکرومحیط سه بعدی جسم جنینی دچار اختلال می شود (۶۶).

اما همان طور که با استفاده از پلی مرهای مصنوعی می توان زمینه هایی هیدروژلی با سفتی متفاوت تهیه کرد، با استفاده از پلی مرهای طبیعی مثل کلاژن، آلجینات، هیالورونیک اسید، ابریشم و ... و تغییر غلظت آن ها و درصد کراسلینک شدن آن ها می توان هیدروژل هایی با سفتی متفاوت تهیه کرد (۵۴).

VE-کدهرین^۱ را افزایش داد و اعمال ترکیبی هر دو نوع تحریک باعث افزایش چشمگیر بیان آن شد (۶۷).

۲.۲ - عوامل هندسی

منظور از عوامل هندسی بیومتریال‌ها، مورفولوژی بیومتریالی است که سلول در تماس با آن قرار می‌گیرد. در بخش عوامل تأثیر گذار هندسی، آنچه بیش‌تر مورد توجه قرار می‌گیرد هندسه‌ی سطح بیومتریال (اولین نقطه از بیومتریال که سلول در تماس با آن قرار می‌گیرد) است. هندسه سطح بیومتریال‌ها از طریق ایجاد توپوگرافی‌هایی در مقیاس میکرو و نانو قابل مهندسی کردن است.

وجود این توپوگرافی‌ها بر روی سطح بیومتریال در مقیاس ۲ بعدی بر روی رفتار سلول تأثیر می‌گذارد اما زمانی‌که بیومتریال کنام ۳ بعدی سلول را تداعی می‌کند، عوامل دیگری چون اندازه تخلخل‌ها، شکل آن‌ها و ارتباط بین آن‌ها اهمیت پیدا می‌کند و می‌تواند بر روی سرنوشت سلولی تأثیرگذار باشد (۴۸).

۱.۲.۲-عوامل هندسی ۲D (توپوگرافی سطحی)

توپوگرافی سطح در مقیاس میکرو و نانو نقش اساسی در برهم‌کنش سلول-بیومتریال ایفا می‌کند. این توپوگرافی‌ها بر روی رفتار سلول‌های پرتوان تأثیر می‌گذارد و علت این امر این است که مولکول‌های چسبندگی و اینتگرین‌های PSCs این میکرو/نانو توپوگرافی‌ها را تشخیص می‌دهد و برهم‌کنش زمینه-گیرنده باعث پهن شدن سلول، برهم‌کنش سلول-سلول و بیان فنوتیپی سلول می‌شود (۵۴).

برای ایجاد توپوگرافی‌های مختلف بر روی سطح استراتژی‌های مختلفی اعم از پوشش‌دهی سطوح با نانوذرات با اندازه‌های مختلف (مثل نانولوله‌های کربن CNT)، لیتوگرافی نوری (برای ایجاد نانوستون‌ها، نانوشیارها و ...)، (۵۴) لیتوگرافی نرم، لیتوگرافی پرتو متمرکز و لیتوگرافی نانوپرینت (۹) استفاده کرد.

CNTها به‌طور معمول برای ایجاد سطوحی با ساختار نانولوله‌ای استفاده می‌شود. می‌توان با سونیکیت کردن CNTs در مدت زمان‌های متفاوت به سطوحی با زبری متفاوت در

سلولی و جهت‌گیری آن‌ها شده است (۵۸). در اکثر مطالعه‌های که انجام شده، محققان به این نتیجه رسیدند که اگرچه اعمال نیروی مکانیکی به سلول‌ها تأثیر به سزایی در هدایت تمایزی سلول‌های بنیادی دارند، اما برای دریافت پاسخ بهتر، نیاز است که از این تحریکات در کنار عوامل بیوشیمیایی استفاده شود (۲۲،۳۵،۵۸).

هم‌چنین می‌توان با اعمال فشار هیدروستاتیک از طریق محیط کشت به سلول‌های بنیادی، سلول‌ها را به سمت رده‌ای از سلول‌ها که در بدن تحت فشار مکانیکی هستند تمایز داد. برای مثال در مطالعه در بررسی تأثیر فشار هیدروستاتیک بر روی تمایز کندروژنیک MSCs مشتق شده از چربی انسانی، مشخص شد که بهینه‌ترین مقدار فشاری که باعث بیان کلاژن نوع □ نزدیک به غضروف طبیعی می‌شود، ۵ MPa است (۶۲) که اگر با فاکتورهای رشد تمایزی همراه شود می‌تواند در تمایز MSCs به سلول‌های کندروژنیک تأثیر بیش‌تری داشته باشد (۶۲،۶۳،۶۴).

حتی اعمال کشش در تمام محورها بر روی MSCs مشتق شده از چربی و مغز استخوان نیز باعث تسریع بیان GATA4 (فاکتور رونویسی اختصاصی قلبی است و در تکامل قلبی جنین نقش مهمی را ایفا می‌کند) می‌شود. بنابراین با اعمال کشش در تمام محورها می‌توان سلول‌ها را به سمت سلول‌های قلبی و عروقی تمایز داد (۲).

علاوه بر غضروف و استخوان که تحت بار مکانیکی هستند، عروق نیز در بدن دو نوع بار مکانیکی را تحمل می‌کنند. یکی از آن‌ها تنش برشی است که خون به رگ وارد می‌کند و دیگری نیروی کشش اعمالی در اثر انقباض عروق است. بنابراین در سال ۲۰۱۳ این ایده به ذهن شجاعی و همکارانش رسید که اعمال کشش و تنش برشی به‌صورت دوره‌ای می‌تواند بر روی رفتار تمایزی MSCs به سمت سلول‌های عروقی نقش داشته باشد. آن‌ها طی تحقیقات خود به این نتیجه رسیدند که اعمال کشش دوره‌ای باعث کاهش بیان ژن‌ها Vwf و FLK-1 می‌شود در حالی که تنش برشی دوره‌ای بیان آن‌ها را افزایش می‌دهد و اعمال هر دو نیرو تأثیر کمی بر بیان این دو ژن دارد. از طرفی مشخص شد که هر دو نوع بارگذاری میزان بیان

^۱ VE-catherin

حدود ۷۵-۴۶۵ nm دست پیدا کرد. زمانی که ESCs انسانی بر روی این سطوح کشت داده می شوند، سطوح زیرتر را به سطوح صافتر ترجیح می دهند (شکل ۱). روش استفاده از CNTs اگرچه سطوحی با توپوگرافی نانو ایجاد می کند اما به علت توپوگرافی تصادفی آن دارای محدودیت هایی است (۸). به همین علت با استفاده از روش های نانولیتوگرافی، الگوهای نانوستونی و نانوشیاری و ... تولید می کنند. با این روش می تواند توپوگرافی سطح را کنترل کرد.

در بحث حفظ پرتوانی سلول های پرتوان، ESCs انسانی کلونی های فشرده ای با سطح بالای بیان مارکرهای غیر تمایزی بر روی نانوستون های با قطر کم (۱۲۰-۱۷۰ nm) تولید می کند. در محدوده کوچک کلونی های سلولی چسبندگی محدودی را با نانوستون ها برقرار می کند. برهم کنش محدود سلول-زمینه بر روی ستون هایی با قطر کم، از پهن شدن سلول ها جلوگیری می کند، اما منجر می شود نیروی سلولی بر روی برهم کنش سلول-سلول توسط E کدهرین ها متمرکز شود که به حالت پرتوانی سلول نزدیک تر است (۴).

نه تنها اندازه توپوگرافی بلکه شکل آن ها می تواند بر روی رفتار PSCs تأثیرگذار باشد. برای مثال بر روی سطوح شیاری و ستونی از جنس ژل PAA، کلونی های مسطح تشکیل می شود در حالی که بر روی سطوح شش گوشه، کلونی های کروی تشکیل می شود. اگرچه مکانیسم این اتفاق نیازمند مطالعه های گسترده تری است، اما می توان علت این پدیده را تفاوت نقاط اتصال سلول به زمینه و انقباضه های سلولی دانست (۴۵).

حتی ایجاد سطوحی با الگویی مشابه به شکل سلول تمایزی مورد نیاز نیز می تواند باعث تمایز سلول بنیادی به سمت سلول هدف شود. در این روش به طور معمول سلول تمایزی را بر روی سطوحی شکل پذیر اغلب سیلیکونی کشت می دهند و بعد از اعمال شرایطی یا افزودن مواد دیگر وقتی سطح مورفولوژی سلول را به خود گرفت، سلول ها را شسته و سلول های بنیادی را روی آن کشت می دهند. مشاهده شده است که این کار باعث تمایز سلول های بنیادی به سمت سلول تمایزی شده است (۴۷) (شکل ۲).

در مطالعه جالبی در مبحث حفظ پرتوانی PSCs، حفظ پرتوانی iPSCs انسانی بر روی سطوحی حاوی نسل های متفاوت دندریمر بررسی شد. در این مطالعه مشاهده شد، که سطوحی با دندریمرهای نسل های پایین تر به علت بهبود اتصال های سلول-سلول باعث به-

وجود آمدن کلونی هایی بسیار فشرده شدند، در حالی که سطوحی با دندریمرهایی با نسل بالاتر، باعث تشکیل کلونی هایی با ساختار حلقه مانند شدند (شکل ۳). علت این پدیده را می توان جذب فیبرونکتین دانست. زمانی که از نسل های بالاتر دندریمر استفاده می شود، به علت جذب اولیه فیبرونکتین، سلول های تغذیه کننده شروع به ترشح فیبرونکتین می کنند که منجر می شود برهم کنش سلول-زمینه افزایش یابد و تماس سلول-سلول کاهش یابد (۳۸).

در بحث تمایز PSCs نه تنها برهم کنش اینتگرین-لیگاند، بلکه الگوی توپوگرافی های میکرو/نانو نیز می تواند بر روی رفتار میانه و طولانی مدت سلول ها مثل مهاجرت، کشش سایتواسکلتال^۱ و ... مؤثر باشد. طراحی نانو/میکرو توپوگرافی در تمایز PSC ها بیش تر در ایجاد توپوگرافی های شیار مانند در تمایز سلول های عصبی که به رشد آکسون در طول توپوگرافی نیاز دارند، مربوط می شود. این زمینه عواملی مثل ترکیب الگوها، اندازه (عمق) شیاری و منظم یا تصادفی بودنشان می تواند به عنوان پارامترهای کلیدی شناخته شود (۵۴). پدر یکی از مطالعه های در این زمینه، Pan و همکارانش تأثیر گریت ها در مقیاس نانو (۳۵۰ nm) و مقیاس میکرو (۵ و ۲ μm) بر روی تمایز عصبی را مورد بررسی قرار دادند و نشان دادند iPSCs انسانی بر روی نانوگریت ها با بیان بیش تر مارکرهای مربوط به عصب مثل NeuroD1 و NeuroG1 بیش تر از میکروگریت ها به سمت عصب تمایز می یابند و مورفولوژی سلول ها در جهت گریت ها کشیده می شوند (شکل ۴). مکانیسم این پدیده هنوز روشن نیست، اما واضح است که در شیاری های کوچک تر، نیروی موینگی منجر به کشیدگی سلول می شود در حالی که شیاری های بزرگ تر سلول ها تمایل به اتصال به لبه ها دارند و نقاط اتصال بیش تری ایجاد می کند. اگرچه میزان کشیدگی در نمونه هایی با توپوگرافی ۲ μm بیش تر است، اما ارتباط مستقیمی بین کشیدگی سلول و رفتار تمایزی آن وجود ندارد. این گونه تصور می شود که گریت های ۲ μm می توانند به خوبی با میانگین اندازه فیلوپدیا^۲ جفت شوند، بنابراین سلول ها را به صورت قوی تری هدایت می کنند. از طرف دیگر مکانیسم دریافت سیگنال در مقیاس نانو متفاوت است به این معنی که سلول ها در فاصله بین گریت ها دچار خمیدگی می شوند و دیگر بین محور های گریت کشیده نمی شوند. با توجه به توضیح های ارائه شده، اگرچه اندازه گریت ها

¹ Cytoskeletal

² Filopodia

بر روی مورفولوژی سلول تأثیر می‌گذارد، اما تأثیر آن بر رفتار تمایزی سلول هنوز به‌طور کامل واضح نیست و به مطالعه‌های بیشتری نیاز دارد (۱۱، ۵۲).

تأثیر نانوگریت با سایر الگوهای دیگر (مثل نانوستون‌ها و نانوپناه‌ها) نیز مقایسه شده است. الگوهای نانوگریت شرایطی تک‌بعدی و غیریکنواخت را برای سلول فراهم می‌کنند در حالی که نانوستون‌ها و نانوپناه‌ها محیطی دوبعدی و یکنواخت را به‌وجود می‌آورند. نتایج نشان داده‌است که نانوگریت باعث تمایز بهتر ESC انسانی به سمت عصب می‌شوند، در حالی که الگوهای یکنواخت رفتار تمایزی سلول‌ها را به سمت سلول‌های گلیال می‌برند. سلول‌هایی که بر روی زمینه‌های غیر یکنواخت کشت داده می‌شوند، می‌توانند نانوتوپوگرافی کشیده را بپذیرند، در طول گریت کشیده شوند و سطوح بالایی از مارکرهای عصبی بالغ (Tuj-1) و نابالغ (MAP-2) را بیان کنند، درحالی‌که سلول‌هایی که بر روی زمینه‌های یکنواخت رشد می‌کنند، به‌صورت تصادفی‌تری در تماس با محیط اطرافشان هستند، در جهت‌های مختلف بیش‌تر کشیده می‌شوند بنابراین بیش‌تر روی سطح پهن می‌شوند و این رفتارها موجب بیان بیش‌تر مارکر GFAP می‌شود (۳).

در فرآیند انتقال مکانیکی^۱ اجزای داخل سلولی دخیل، به‌صورت شیمیایی و فیزیکی عوامل توپولوژیکی خارج سلولی را به‌عوامل داخل سلولی مثل سایتواسکلتون‌ها و حتی هسته منتقل می‌کنند و از این طریق می‌توانند تمایز PSC‌ها را کنترل می‌کنند (۱۸، ۲۶). همان‌طور که گفته شد، بیش‌تر مطالعه‌های انجام شده بر روی تأثیر توپوگرافی‌های مختلف بر روی سلول، در مورد سلول‌های عصبی انجام شده است. البته سلول‌های دیگری هم‌چون سلول‌های ماهیچه‌ای که به رفتار کششی حساس هستند نیز می‌توانند در این زمینه مورد بررسی قرار گیرند (۵۴).

۲.۲.۲- عوامل هندسی ۳D (ساختارهای متخلخل)

نه تنها محیط دوبعدی، بلکه محیط‌های سه‌بعدی نیز تأثیر به‌سزایی بر روی رفتارهای سلولی می‌گذارند (۶). در واقع محیط سه‌بعدی میکرومحیط قابل اعتمادتری را در اختیار سلول قرار می‌دهد، اما چالش استفاده از آن عدم توانایی انتقال یکنواخت عوامل بیوشیمیایی به سلول‌هاست. این عامل باعث می‌شود

سلول‌ها در نقاط مختلف محیط کشت رفتار متفاوتی را نشان دهند و یک محیط غیریکنواخت ایجاد کند که استراتژی‌های متعددی برای برطرف کردن این چالش مطرح شده است. برای مثال در مطالعه‌ای که توسط اسفندیاری و همکارانش انجام شد، از میکروذراتی از جنس سولفات آلجینات برای انتقال BMP4 به‌داخل توده سلولی استفاده شد (۱۶). بیش‌تر بیومتریال‌هایی که در این دسته مورد استفاده قرار می‌گیرند، داربست‌های کشت سلولی هستند. داربست‌ها ساختاری مصنوعی هستند که ساختار مورفولوژیک و عملکرد بافت اطراف را تقلید می‌کنند. میزان تخلخل بالا و اندازه تخلخل مناسب، از نیازهای کلیدی برای افزایش سطح آزاد موجود برای اتصال سلول‌ها و رشد بافت، توزیع یکنواخت سلول‌ها و انتقال مواد غذایی مناسب به حساب می‌آیند. بنابراین توسعه بیومتریال‌های جدید با روش‌های شکل‌دهی متفاوت می‌توانند نقش مهمی در موفقیت مهندسی سلول‌های بنیادی داشته باشند. توسعه داربست‌های سه‌بعدی بر اساس پلی‌مرهای تخریب‌پذیر، با استفاده از روش‌های نانوساختاری متفاوت گسترش پیدا کرده‌است. از جمله روش‌های تهیه داربست‌های سه‌بعدی می‌توان به ریخته‌گری محلول، خشک‌ایش انجمادی، الکتروریسی، پروتوتایپینگ سریع، جدایش فازی حرارتی (۴۸)، خودآرایی (۶۱) و ... اشاره کرد.

به‌طورکلی، روش‌هایی که برای ایجاد محیط سه‌بعدی برای سلول‌ها استفاده می‌شود، می‌توانند از طریق ایجاد هیدروژل-هایی برای کپسوله کردن سلول‌ها و یا استفاده از داربست‌های از پیش تهیه شده، تأمین شوند. در استفاده از هیدروژل‌ها، سلول‌ها قبل از فرآیند ژل شدن داخل هیدروژل توزیع می‌شوند و ژل شدن آغاز می‌شود. در این فرآیند توزیع سلول‌ها داخل هیدروژل به‌صورت یکنواخت صورت می‌گیرد. در داربست‌های از پیش تشکیل شده، داربست به‌صورت فوم متخلخل، نانوالیاف یا میکروکره تهیه می‌شود و سلول‌ها روی آن‌ها کشت داده می‌شوند. مشکل این روش این است که سلول‌ها نمی‌توانند به‌صورت یکنواخت در آن توزیع یابند بنابراین پاسخ سلول‌ها در نقاط متفاوت داربست متفاوت خواهد بود به این معنا که سلول‌ها برای دریافت شبکه سه‌بعدی نیاز دارند که به عمق نفوذ کنند (۹، ۵۴، ۶۱).

¹ Mechanotransduction

یکی از راه های تهیه داربست های متخلخل از پیش تهیه شده خشکایش سرمایشی^۱ است. برای مثال در مطالعه ای در سال ۲۰۱۲ با تهیه داربستی از جنس کلاژن-کیتوسان با این روش، تمایز ADSCs به کراتینوسیت ها بر روی این داربست ها برای درمان سوختگی های عمیق مورد بررسی قرار گرفت. نتایج این مطالعه نشان داد که با قرار دادن داربست حامل سلول در محل زخم در طول ۱۴ روز می توان شاهد تشکیل لایه های درم و اپی درم بود (۶۸).

استفاده از محیط های سه بعدی می تواند در حفظ طولانی مدت پرتوانی نیز نقش داشته باشد. به تازگی در مطالعه ای مشخص شده است که استفاده از محیط های سه بعدی مثل ساختار فیبری متخلخل می تواند فنوتیپ سلول ها را در حالت کروی حفظ نماید در حالی که این سلول ها در محیط های دوبعدی حالت مسطحی به خود می گیرند. این تغییر فنوتیپ سلولی را می توان به توزیع متفاوت پروتئین های غشاء بین محیط های دو و سه بعدی مرتبط کرد که نقش مهمی را در اتصال های سلول-سلول و برهم کنش سلول-ماتریکس ایفا می کند و در نهایت منجر به حفظ بنیادینگی ESCs با بیان بیش تر Oct4 و بیان کم تر Sox2 به صورت هم زمان می شوند (۷۳).

در مطالعه ای بر روی iPSCs موشی، مشخص شد که میکروکپسول های آلجینات ترکیب شده با پلی اتیلن گلیکول (PEG) توانایی بسیار خوبی در گسترش تعداد iPSCs با تمایز حداقلی به سمت اندودرم دارند. به علاوه بیدها می توانند عوامل انتقال سیگنال، مثل مولکول های چسبندگی یا فاکتورهای رشد را توزیع کنند و بر روی رفتار سلول ها تأثیر بگذارند (۷۰). در مقاله ای دیگر، هیدروژل آلجینات به صورت میکروالیاف سه بعدی تهیه می شود تا در شرایط بدون سلول تغذیه کننده^۲ و همراه با ترکیب های مشخص بتواند به صورت طولانی مدت خاصیت خودنوزایی ESCs و iPSCs را حفظ کند. میکروالیاف از طریق برهمکنش بین محلول پلی مری کاتیونی (کیتین) و آنیونی (سدیم آلجینات) تشکیل می شود و سلول ها داخل آن ها کپسوله می شوند. این سیستم یکنواخت است و توانایی بارگذاری مقدار زیادی سلول را با حفظ خودنوزایی سلول ها دارد. به علاوه سلول ها در این محیط قادرند

در شرایط فریز با حفظ فنوتیپ و ژنوتیپ خودنوزایی ذخیره شوند (۴۶).

در زمینه مهندسی سلول های بنیادی با استفاده از داربست های سه بعدی از پیش تهیه شده، مطالعه های بسیار زیادی انجام شده که در این مقاله مروری، تنها به جدیدترین مطالعه ها پرداخته می شود.

الکتروریس یکی از ساده ترین و تطبیق پذیرترین روش های ساخت داربست های نانو/میکرو لیفی است که با این روش می توان به رنج وسیعی از ترکیب ها و مورفولوژی ها (جهت مندی و اندازه الیاف) دست پیدا کرد (۴۲، ۵۶، ۷۷). جالب ترین نکته در استفاده از شبکه نانوالیافی، تقلید الیاف ECM است (۷۲). البته به علت این که مت های تشکیل شده با این روش ضخامت کمی دارند، ساختار آن ها را شبه سه بعدی در نظر می گیرند (۳۱). به علاوه ساختار نانولیفی داربست های الکتروریسی شده به علت قطر بسیار کم باعث می شوند که داربست سختی کمی داشته باشد و بتواند انعطاف پذیری و الاستیسیته مناسب را برای سلول ها فراهم کنند (۷۲).

نقش به سزای ساختار نانولیفی الکتروریسی شده، در حفظ پرتوانی سلول های بنیادی با ترکیب های متفاوتی به اثبات رسیده است. برای مثال در یک بررسی سیستمیک، تأثیر اندازه نانوالیاف و غلظت ژلاتین بر روی خاصیت خودنوزایی ESCs انسانی بر نانوالیاف ژلاتین مورد بررسی قرار گرفت. در این پژوهش، اندازه نانوالیاف از ۷۰ تا ۵۰۰ نانومتر با تغییر غلظت ژلاتین از ۰/۱ $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ تا ۵/۸ $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ تنظیم شد. نتایج نشان دادند که سلول ها بر روی الیافی با قطر متوسط (۲۴۰ nm) و غلظت بالای ژلاتین ($۴/۸ \mu\text{g}/\text{cm}^2$)، می توانند در مدت زمان بیش تری بدون کاهش ظرفیت خودنوزایی، تکثیر یابند (۴۴) (شکل ۷).

علاوه بر قطر الیاف در این کاربرد، جهت گیری الیاف نیز بر روی سرنوشت سلولی تأثیرگذار است. برای مثال در مطالعه ای توسط زمانی و همکارانش، مشخص شد که MSCs انسانی بر روی نانوالیافی از جنس PVA که با سکانس RGD اصلاح شدند و به صورت تصادفی شکل گرفتند، نسبت به حالت آرایش یافته زنده مان و چسبندگی بیش تری دارند. آن ها علت این پدیده را سطح تماس بیش تر الیاف رندم با سلول ها مطرح کردند (۷۵).

^۱ Freeze drying

^۲ Feeder-free

میکروکره های پلیمری اغلب برای حمایت، کشت و تکثیر سلول ها در شرایط دینامیک استفاده می شوند و در نهایت به بافت آسیب دیده فرستاده می شوند (۵۷). به علاوه می توان توسط آن ها مولکول های درمانی را برای تأمین عوامل انتقال سیگنال به سلول ها را منتقل کرد (۵۴).

همانند توضیح های ارائه شده در مورد تأثیر محیط کشت سه-بعدی بر روی حفظ پرتوانی، تمایز PSCs در محیط های سه-بعدی قابلیت کنترل بیش تری دارد. همچنین کشت PSCs در محیط سه بعدی و داربست ها این امکان را می دهد که از ساختمان تمایز یافته PSCs به طور مستقیم در بیماری ها و بافت آسیب دیده استفاده شد.

به تازگی از هیدروژل میکرو متخلخل آلجینات برای کشت ESCs و iPSCs موشی برای تشکیل کلونی و جسم جنینی و تمایز آن به سمت سلول های هیپاتیک استفاده شد. سیستم هیدروژلی توانایی تبادل مواد غذایی و مواد حیاتی برای PSCs کپسوله شده را فراهم می کند. بعد از کشت PSCs برای ۱۰ روز در کپسول های هیدروژلی، جسم جنینی تشکیل شد، به دنبال سلول ها به طور مستقیم به سمت لایه اندودرم رفتند و به دنبال آن با اعمال شرایط تمایزی، سلول ها به رده هیپاتیک تمایز یافتند. در مقایسه با کشت تک لایه، سیستم هیدروژلی اعمالی باعث افزایش مارکرهای اندودرم و هیپاتیک شدند و تولید اوره و آلبومین به طور چشم گیری افزایش یافت (۳۹).

یکی از مزایای ویژه آلجینات، سفتی آن است که می تواند به راحتی سلول ها را برای تمایز به رده خاص هدایت کند. برای مثال کپسول های هیدروژلی آلجینات که ESCs انسانی داخل آن قرار داشتند، با غلظت های متفاوت $BaCl_2$ کراس لینک شده تا درجات متفاوتی از سفتی ۴-۸۰ kPa را ایجاد کنند. ESCs انسانی کپسوله شده در ژلی با سفتی متوسط، از طریق انتقال سیگنال $TGF-\beta$ باعث تمایز سلول ها به سمت پانکراس شدند. از طرف دیگر سلول های کپسوله شده در ژلی با بیش ترین سفتی تکثیر و رشد کمی داشتند که علت این امر را می توان دوز بالای باریم و همچنین سفتی زمینه دانست (۶۰). یکی دیگر از کارهایی که در این زمینه انجام شد، تلفیق کلاژن و ماتریزل برای تأمین ترکیب های ECM و حمایت فیزیکی برای توسعه و تمایز ESCs بود که با کشت ESCs موشی داخل ژل سه بعدی کلاژن/ماتریزل و رشد تجمعی آن و تشکیل جسم جنینی، بعد از ۷ روز کشت، مشاهده شد که هر سه

لایه ی جنینی تشکیل شدند (۷۶). در مطالعه ای دیگر Kerscher و همکارانش نشان دادند که هیدروژل هایی بر اساس PEG-فیبرینوزن می تواند باعث تمایز iPSCs کشت داده شده بشود و در ۱۹ روز رفتار تپشی از خود نشان دهند (۳۷).

در مقاله ای که به تازگی به چاپ رسید، یک دستگاه میکرونی تهیه شد که می توانست PSCs را کشت دهد و مولکول های انتقال سیگنال را در طی مدت زمان مشخص آزاد کند. در این مطالعه با استفاده از روش لیتوگرافی نرم قالبی از جنس PDMS با اندازه و شکل های متفاوت در مقیاس میکرو تهیه شد تا همگنی جسم جنینی را بهبود دهد. داخل این دستگاه میکرونی، میکرو کانال هایی با اندازه کنترل شده برای رهایش بیومولکول ها تعبیه شدند. تمایز عصبی با بررسی رهایش محلول رتینوئیک اسید در فاصله زمانی مشخص مورد بررسی قرار گرفت. در غلظت های بالای رتینوئیک اسید، بیان Sox-1 و القای عصبی قوی گزارش شد. به علاوه اندازه جسم جنینی-هایی که به رتینوئیک اسید نزدیک تر بودند، به علت تکثیر سلول های مشتق شده بزرگ تر بود. بنابراین این دستگاه توانایی کنترل تشکیل اسفروئید و رفتار تمایزی PSCs را از طریق رهایش کنترل شده مولکول های سیگنالینگ را دارند. اگرچه این میکرو دستگاه های ساخته شده از PDMS برای کاربرد in-vivo قابل استفاده نیستند، اما می توان از آن برای بررسی برهمکنش سلول ها با بیومولکول ها و زمینه و همچنین غربالگری های ترکیبی استفاده نمود (۱۲).

علاوه بر ژل ها، داربست های سه بعدی تهیه شده با روش های دیگر نیز می توانند بر روی رفتار تمایزی سلول ها تأثیر بگذارند. یکی از کارهایی که برای تأیید تأثیر محیط سه بعدی بر روی رفتارهای سلولی انجام شد نشان داد که MSCs کشت داده شده بر روی میکروکره ها نسبت به سلول هایی که بر روی سطوح تک لایه کشت داده شده اند، سطح بالایی از ژن های استئوبلاست را بیان می کنند که می توان علت این امر را در تفاوت نیروی انقباضی وارد بر آن ها دانست (۶۵). به تازگی در مقاله ای یک فوم گرافنی سه بعدی تهیه شد و تمایز سلول های بنیادی عصبی (NSCs) بر روی آن مورد بررسی قرار گرفت. در نتایج به دست آمده مشخص شد که ساختار سه بعدی فوم-های گرافنی نسبت به محیط های دوبعدی، بیان Ki67 را

افزایش دادند و منجر به تمایز سلول ها به سمت آستروسیت و نورون شدند (۴۱).

داربست های نانولیفی PCL/ژلاتین تهیه شده با استفاده از الکتروریسی دوفازه نیز برای تمایز غضروفی iPSCs استفاده می شوند. در این حالت سلول ها قادرند سطح بالاتری از مارکر-های غضروفی را در مقایسه با نمونه کنترل تولید کنند. هم-چنین زمانی که از آن ها به صورت in-vivo استفاده می شود، بیان ژن ها و پروتئین های اختصاصی غضروف و بازسازی غضروف در آن ها بیش تر است (۴۳). در مطالعه ای بر روی استفاده از داربست های نانولیفی، در سال ۲۰۱۵، MSCs را بر روی داربست نانولیفی PCL گرفت شده با کلاژن کشت دادند و با انجام آزمون PCR متوجه شدند که سلول ها روی این داربست ها توانستند مارکرهای مربوط به نورون را هم در سطح RNA و هم در سطح پروتئین بیان کنند (۵).

علاوه بر تأثیری که خود داربست ها لیفی بر روی رفتار سلولی می گذارند، قطر الیاف نیز در چگونگی پاسخ سلول ها به داربست تأثیر گذارند. برای مثال قانیان و همکارانش با بررسی رفتار تمایزی ESCs به سمت اندورم بر روی داربست های PCL تهیه شده با روش الکتروریسی در قطرهای متفاوت (۲۰۰، ۵۰۰، ۸۰۰، ۱۳۰۰) nm مشاهده کردند که سلول ها بروی الیافی با قطر ۲۰۰ nm در مقایسه با الیاف دیگر بیش تر به سمت اندودرم متمایز شدند (۲۰).

حتی استفاده از ماترکس ابریشمی تهیه شده با روش خودآرایی از ابریشم نو ترکیب می تواند یک محیط کشت برای کشت طولانی مدت و تمایز iPSCs و ESCs فراهم کند و یک سیستم با ترکیب های مشخص و بدون استفاده از ترکیب های حیوانی^۱ را در اختیار سلول ها قرار دهد (۷۴).

روش های درمانی با PSCs در محیط in-vivo در سیستم عصبی مرکزی مثل آسیب های نخاعی و مغز تأیید شده است. ژل های قابل تزریق تهیه شده از هیالورونیک اسید و متیل-سلولز اصلاح شده با RGD و PDGF-A، برای انتقال iPSC انسانی به آسیب نخاعی موش، استفاده شد. زمانی که سلول ها به طور مستقیم به محل آسیب تزریق می شوند، باعث تشکیل تراتوما (۱۰۰٪ در حیوانات) و زنده ماندن کم می شوند. زمانی که آن ها را همراه با هیدروژل به محل تزریق می کنند، اغلب آن ها توانایی تمایز به سمت فنوتیپ گلیال را دارند اما هم چنان در

^۱ Xeno-free

مدت زنده ماندن طولانی منجر به تشکیل تراتوما می شود (۵۰٪ در حیوانات) (شکل ۵). علت کاهش احتمال تشکیل تراتوما در حالت دوم، بهبود تمایز سلول ها در محیط in-vivo است که به زنده ماندن بیش تر سلول ها، توانایی مهاجرت آن ها به علت وجود فاکتورهای رشد و اصلاح های انجام شده، مربوط است. بنابراین با مهندسی ژل هایی همانند این نمونه می توان تمایز سلول ها را بهبود بخشید اما همان طور که ذکر شد تاکنون نتوانستند در پیوند طولانی مدت تشکیل تراتوما را مهار کنند (۱۷).

به جای استفاده از PSCs، از رده های تمایز یافته آن ها برای پیوند در بازسازی عصب استفاده می شود. به طوری که به تازگی از نورون های مشتق شده از iPSC (iN) با استفاده از داربست های میکرولیفی در مغز موش استفاده شده است. دو نمونه از میکروالیاف الکتروریسی شده (الیاف ضخیم برای نفوذ سلولی و الیاف نازک که نفوذ سلولی را محدود می کند) تهیه شد و iN بر روی میکروالیاف تمایز یافتند. در مقایسه با الیاف نازک یا نمونه کنترل دوبعدی، الیاف ضخیم تر در طول ۱۲ روز، رشد عصبی گسترده تر و بیان بیش تر β III-tubulin، MAP2 و synaptophysin به همراه داشتند. معماری میکروالیاف باعث بهبود اتصال های بین سلولی شد و بر روی عملکرد و فنوتیپ iN های بالغ تأثیر گذاشت. هم زمان مارکرهای پرتوانی شامل Oct-4 و Ki67 در محیط کشت دوبعدی در مقایسه با زمینه لیفی بیش تر بود که نشان دهنده این بود که ساختار نانولیفی می تواند به صورت انتخابی عوامل باقی مانده از سلول های پرتوان را کاهش دهد و از همین طریق در شرایط in-vivo باعث کاهش تشکیل تراتوما شود. با توجه به توضیح های ارائه شده، نرخ زنده ماندن موش ها در حالت داربست میکرولیفی، ۳۸ برابر بیش تر از حالتی است که سلول ها به صورت مستقیم تزریق می شوند (۱۰).

۲.۳ - عوامل الکتریکی

خواص الکتریکی زمینه، یک مبحث اساسی در بخش برهم-کنش سلول-بیومتریال است. در سال ۱۹۹۷، McCaig و همکارانش تولید میدان الکتریکی را در حین فعالیت های سلولی مثل تقسیم سلولی، گسترش و مهاجرت گزارش دادند. بعد از آن این ایده مطرح شد که می توان با استفاده از سیگنال های الکتریکی فعالیت های سلولی را کنترل کرد.

باتوجه به این که سلول های عصبی، عضلانی، فیبروبلاست و استئوبلاست در بدن بیش تر تحت تحریکات الکتریکی هستند، می توان با استفاده از این سیگنال های الکتریکی سلول ها را به سمت سلول های قلبی و عروقی و عصبی تمایز داد (۲۱). برای ایجاد خواص الکتریکی در زمینه های پلی مری می توان از دو استراتژی استفاده کرد. یا نانوساختارهای رسانا مثل نانوذره های فلزی (نقره یا طلا) یا نانوساختارهای کربنی (نانولوله ها، گرافن، نانوالیاف و ...) را داخل پلی مر قرار داده می شود (۶۹). یا از پلی مرهای به طور ذاتی رسانا (مثل پلی استیلن (PA)، پلی - پایرول (PPy)، پلی تیوفن (PT)، پلی انیلین (PANI) و ...) استفاده شود (۷، ۳۲).

نانولوله های کربنی (CNT) به علت استحکام مکانیکی، رسانایی الکتریکی بالا و نسبت ابعادی زیاد، به عنوان افزودنی ایده آل به حساب می آید (۱۳). البته قرار دادن نانوساختار کربن خالص داخل یک داربست سه بعدی کار دشواری است. در مطالعه ای که در سال ۲۰۱۷ انجام شد، نانولوله های کربنی برای تنظیم عوامل مکانیکی و الکتریکی کنام سلول بنیادی، وارد جسم جنینی موشی شد. این نانولوله ها توانستند انسجام مکانیکی و هدایت الکتریکی جسم جنینی را افزایش دهند. با بررسی بیان ژن های پرتوانی و اندازه جسم جنینی مشاهده شد که افزودن نانولوله های کربنی باعث کاهش تکثیر و افزایش نرخ تمایز سلول ها شدند. هم چنین به طرز عجیبی مشاهده شد که در روز پنجم کشت، تمایز قلبی نمونه های تقویت شده با نانولوله ها نسبت به نمونه های کنترل، تمایز قلبی بیش تری داشته اند (شکل ۶). از طرفی نشان دادند که با اعمال تحریک های الکتریکی به جسم جنینی تقویت شده با نانوالیاف، می توان تمایز قلبی را افزایش داد و تپش جسم جنینی را بهبود بخشید (۱).

استفاده از پلی مرهای به طور ذاتی رسانا به علت عدم توانایی آن ها در رسیدن، اغلب در ترکیب با یک پلی مر دیگر استفاده می شوند. استفاده از پلی مر دوم هم به این پلی مرها قابلیت رسیدن می دهد و هم زیست سازگاری آن ها را بهبود می بخشد. از طرفی امکان کنترل خواص الکتریکی پلی مر حاصله نیز وجود دارد. ترکیب این پلی مرها با پلی مر دیگر، به دو صورت تهیه محلول کامپوزیتی، یا پوشش انجام می گیرد. استفاده از پلی مر دوم به عنوان پوشش اغلب به صورت الکتروریسی به شکل هسته-پوسته انجام می گیرد (۴۰).

در مطالعه ای با استفاده از پلی مرهای به طور ذاتی رسانا، ساختار نانولیفی با هدایت الکتریکی تهیه شد و تأثیر ترکیب ساختار نانولیفی و تحریک های الکتریکی بر روی فتوکروموسیتوما ۱۲ (PC12) رت و نورون های هیپوکامپ بررسی شد. مش های هادی در این مطالعه با رشد PPy بر روی الیاف منظم و تصادفی PLGA الکتروریسی شده، تهیه شد و مشاهده شد که الیاف هادی در مقایسه با نمونه کنترل باعث رشد و تمایز سلول ها شدند و به نظر می رسد الیاف PPy-PLGA داربست مناسبی برای بافت عصب باشد. از طرفی مطالعه هایی که بر روی تحریک های الکتریکی اعمال شده بر این داربست ها انجام شد، نشان داد که اعمال پتانسیل در حد ۱۰ mV/cm بر داربست PPy-PLGA، نسبت به داربست های بدون تحریک الکتریکی، باعث ۴۰-۵۰٪ افزایش طول نورون ها و ۴۰-۹۰٪ تشکیل بیش تر نورون ها شد (شکل ۷). هم چنین مشاهده شد طول نورون ها و تعداد نورون ها تشکیل شده، بر روی الیاف منظم بیش تر از الیاف تصادفی و نامنظم است (۴۰).

علاوه بر تحریک های الکتریکی، تحریک های الکترومغناطیسی (EM) نیز می تواند بر سرگذشت سلولی تأثیرگذار باشد. عوامل الکترومغناطیسی داخلی هم بر ECM و هم بر ساختار سلولی تأثیرگذار است. منبع اصلی این میدان لرزش عوامل بیولوژیکی قطبی در داخل سلولی است. در واقع عوامل دوقطبی و باردار مثل پروتئین ها، لیپیدها، نوکلئیک اسیدها و یون های آزاد موجود در داخل سلول و حرکت ظریف آن ها باعث ایجاد میدان الکتریکی متغیر و به تبع آن تغییر میدان مغناطیسی می شود، به همین ترتیب تغییرهای میدان مغناطیسی میدان الکتریکی تولید می کند. غشاء سلولی کاندیدای اصلی منبع تولید سیگنال های EM است. این خاصیت غشاء به علت تبادل یون ها از داخل آن است. علاوه بر غشاء سلولی، سایتواسکلتون ها هم شامل اجزای قطبی است. سلول های زنده نه تنها سیگنال های EM را عبور می دهد بلکه می توانند آن را از محیط اطراف جذب کنند. تحقیقات نشان داده است که تکثیر و تمایز سلول ها تحت میدان EM تغییر می کند (۵۳). در مطالعه ای در سال ۲۰۱۱ مشخص شد که اعمال میدان EM به مدت ۲۱ روز با شرایط (۱۵ Hz و ۵ mT) به سلول های بنیادی مزانکایمال (MSC) انسانی باعث افزایش بیان کلاژن نوع □ و اجزای GAG محیط کشت می شود و باعث تمایز

SCs به سمت غضروف می گردد (۵۰). در مقابل در مطالعه‌ای دیگر محققان نشان دادند که اعمال میدان EM با شرایط ۵۰ Hz و ۱ mT به MSCs انسانی باعث افزایش بیان مارکرهای عصبی و تمایز به سمت سلول‌های عصبی می‌شود (۵۳). حتی با اعمال میدان EM به صورت روزانه و با طول پالس ۳۰۰ μs و ۷/۵ Hz به همین سلول‌ها، می‌توان تمایز آن‌ها را به سمت سلول‌های استخوانی تنظیم کرد (۷۱). در کشور خودمان نیز در این زمینه مطالعه‌های انجام گرفته است. برای مثال در سال ۲۰۱۶ جزایری و همکارانش، تأثیر تحریک‌های EM را بر روی بیان ژن‌های MSCs بررسی کردند. آن‌ها در تحقیق‌های خود به این نتیجه رسیدند که زمانی که MSC‌های گرفته شده از رت به مدت ۱۰ روز تحت میدان EM با شدت ۰/۲ mT و فرکانس ۱۵ Hz قرار گیرند، بیان ژن‌های استخوانی در آن‌ها تشدید می‌شود و اگر به همراه آن از محیط کشت تمایزی استخوانی استفاده گردد، می‌توان تمایز استخوانی با بازده بالا را از سلول‌ها انتظار داشت (۳۴).

۳. بیومتریال‌های هوشمند

بیومتریال‌هایی که با تحریک خارجی فعال می‌شوند در حوزه طب بازسازی بسیار مورد توجه واقع شده‌اند. این مواد می‌توانند با اعمال مواردی مثل نور، دما، مغناطیس، الکتریسیته، pH و ... دچار تغییرهایی شوند. از این مواد می‌توان برای رهایش فاکتورهای محلول، تغییر شکل بافت، کپسوله کردن سلول و ... استفاده کرد (۵۰).

نور یک عامل محرک مناسب برای پلی‌مرهای حساس به نور است. این دسته از پلی‌مرها پتانسیل استفاده در رهایش دارو و فاکتورهای رشد را دارند. برای مثال spiropyran یک مولکول حساس به نور است، که در حضور نور UV از حالت هیدروفوبیک به هیدروفیلیک تبدیل می‌شود. از پلی‌مر این مولکول برای پوشش زمینه‌های کشت سلول‌های بنیادی برای رهایش فیبرینوژن، پلاکت و MSCs استفاده می‌شود. هم‌چنین این ماده می‌تواند به عنوان سطح کشت حساس به نور عمل کند، که در حضور نور UV باعث بهبود اتصال سلولی به سطح می‌شود و به صورت برگشت‌پذیر با اعمال نور مرئی و آنیل کردن حرارتی، سلول‌ها از سطح جدا می‌شوند (۱۴).

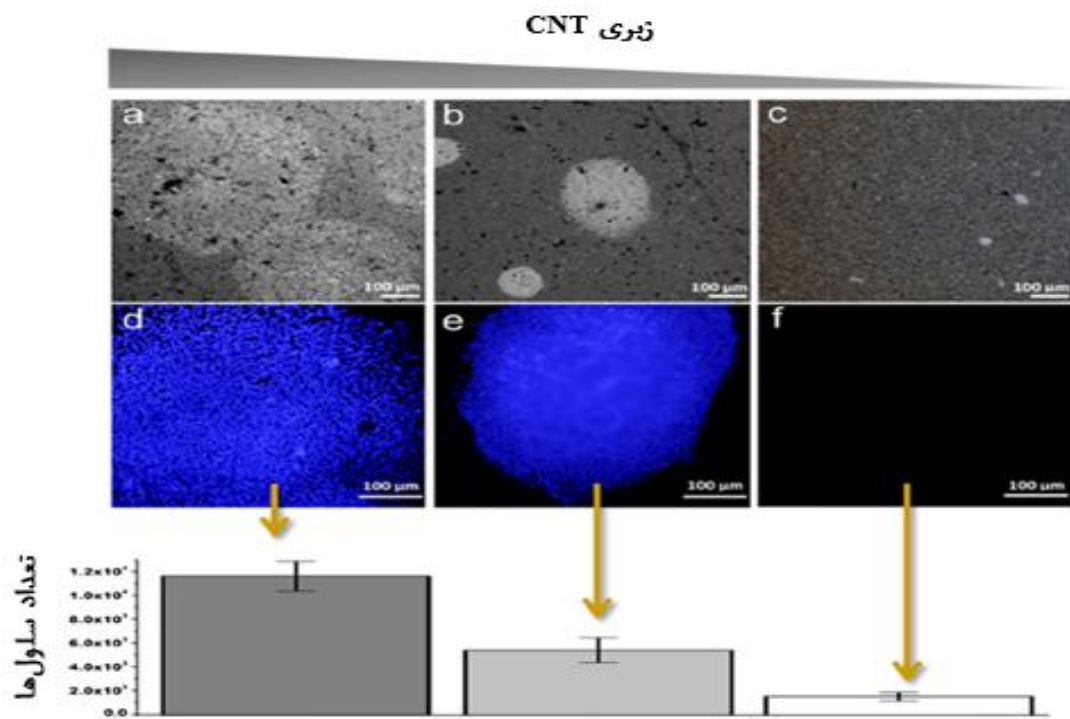
پلی‌مرهای حساس به دما جزء رایج‌ترین سیستم‌های هوشمند به حساب می‌آیند. این پلی‌مرها با یک دمای بحرانی مشخصه-یابی می‌شوند که در آن دما، فاز پلی‌مر یا محلول پلی‌مری دچار تغییر می‌شود. در این دسته از پلی‌مرها عبور از دمای بحرانی می‌تواند باعث افزایش یا کاهش حلالیت پلی‌مر مربوطه گردد. می‌توان دمای بحرانی این پلی‌مرها را با افزودن گروه‌های هیدروفوبیک و هیدروفیلیک تغییر داد. یکی از رایج‌ترین پلی‌مرهای حساس به دما، PNIPAAm است که دمای بحرانی آن نزدیک بدن است. پلی‌مر دیگر PDEAAm است که دمای بحرانی آن ۲۵-۳۵ درجه سانتی‌گراد است (۲۹).

همان‌طور که قبل هم توضیح داده شد، می‌توان با اعمال میدان الکتریکی و میدان مغناطیسی به بیومتریال‌ها آن‌ها را کنترل کرد و از طریق کنترل آن‌ها بر سرنوشت سلولی تأثیرگذار بود.

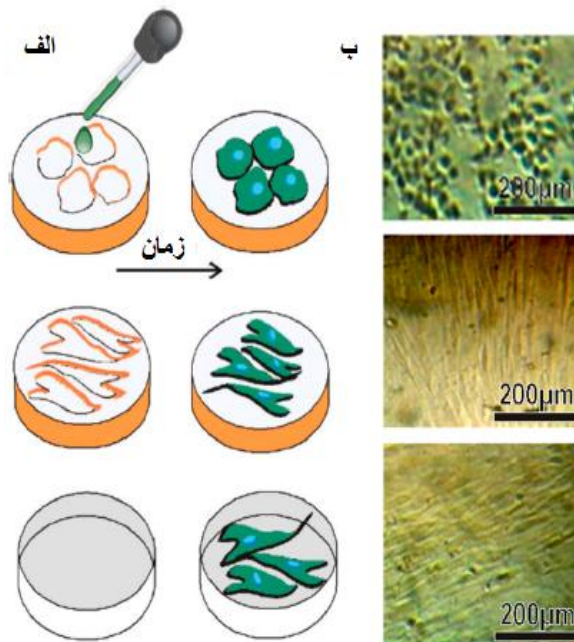
نتیجه‌گیری:

با توجه به آن‌چه گفته شد، PSCs کورسوی امیدی به روی رشد و پیشرفت مهندسی بافت و طب بازسازی گشوده‌اند. اما همواره کنترل آن‌ها در شرایط آزمایشگاه و داخل بدن دشوار بوده و دانشمندان پیوسته در حال انجام مطالعه‌های گسترده در این زمینه هستند. برای استفاده از PSCs در کلینیک دو هدف عمده پیش روی محققان قرار دارد. ۱. تلاش برای تکثیر سلول‌ها در محیط کشت با حفظ پرتوانی و ۲. تمایز آن‌ها به سمت رده سلولی مورد نیاز. برای رسیدن به این اهداف، سلول‌ها باید در محیطی قرار گیرند که کنام طبیعی آن‌ها را برایشان تداعی کند. در گذشته برای کشت و نگهداری سلول‌ها، از محیط کشت دوبعدی همراه با برخی فاکتورهای بیوشیمیایی استفاده می‌شد اما اکنون با توسعه علم بیولوژیک، مشخص شده است که علاوه بر سیگنال‌های بیوشیمیایی، سیگنال‌های بیوفیزیکی نیز در کنام سلولی منتقل می‌شوند و بر روی رفتار سلولی تأثیر می‌گذارند. سیگنال‌های بیوفیزیکی را می‌توان با استفاده از فاکتورهای الکتریکی، هندسی و مکانیکی کنترل کرد. بنابراین در مهندسی سلول‌های بنیادی سعی داریم تا با استفاده از بیومتریال‌ها، کنامی برای سلول فراهم شود که شبیه به کنام طبیعی سلول بوده و تمام عوامل دخیل در آن برای هدف خاص، قابل کنترل باشد.

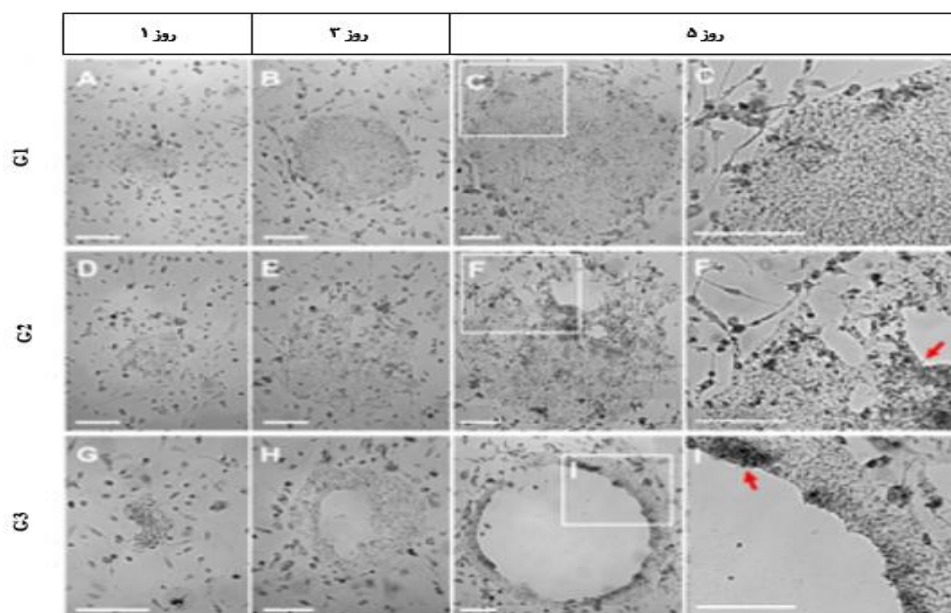
همچنین قابل ذکر است که برای مهندسی بیومتریال ها در کشت و تمایز سلول های بنیادی، ابتدا باید توجه شود چه هدفی مدنظر است، سپس کنامی که سلول در آن توانایی رسیدن به آن هدف را دارد شناسایی شود و سعی شود تا حد امکان شرایطی مشابه آن برای سلول فراهم شود. یا توجه به اینکه عوامل بسیار زیادی در سرنوشت سلول دخیل هستند، محققان هنوز نتوانستند بیومتریالی طراحی کنند که به صورت کامل این شرایط را فراهم کند، بنابراین برای رسیدن به این توانایی که بتوان از PSCs با بازده بالا در درمان بیماری ها استفاده کرد، به مطالعه های بیش تری نیاز است.



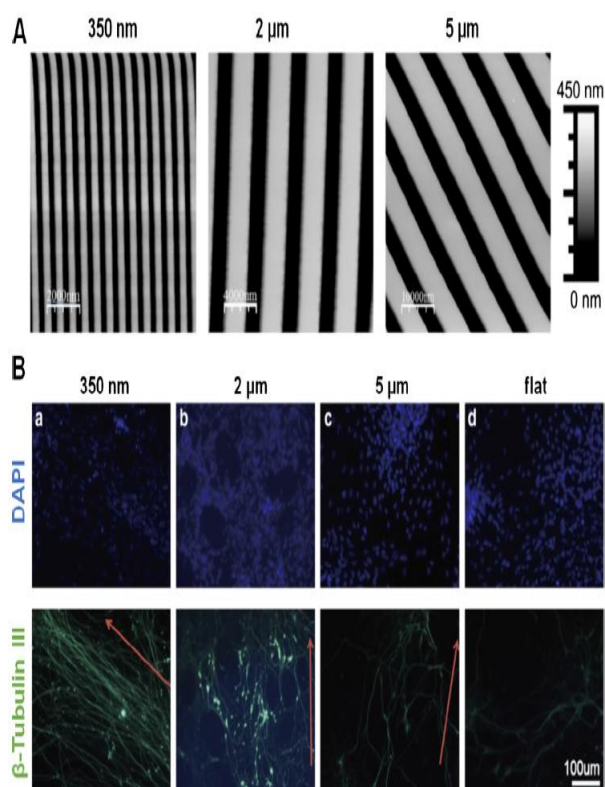
شکل ۱. iPSCs موشی کشت داده شده بر روی سطوح CNT با زبری های متفاوت. (a-c) کنتراست فازی و (d-f) رنگ آمیزی هسته‌ی Hoechst. بعد از ۱۲۰ ساعت کشت، سطوح با زبری بالا رشد بالای سلول‌ها، سطوحی با زبری متوسط تشکیل کلونی‌هایی با گسترش محدود و سطوح با زبری کم هیچ چسبندگی را بعد از ۳۶ ساعت نشان نمی‌دهند. نمودار نیز تعداد سلول‌ها را در هر شرایط در ۳۶ ساعت کشت نشان می‌دهد (۸).



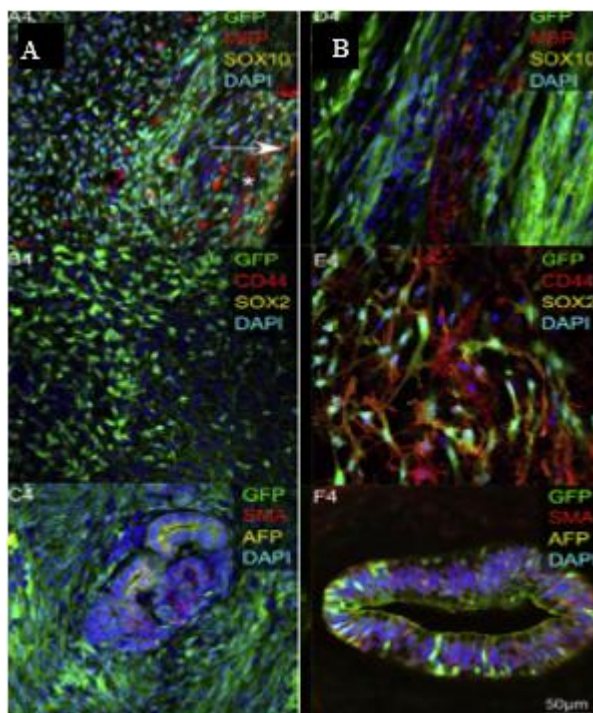
شکل ۲. ایجاد مورفولوژی سلول‌های تمایزی بر روی سطوح شکل‌پذیر و کشت سلول‌های بنیادی بر روی آن برای هدایت تمایز سلول به سمت رده خاص. (الف) شکل شماتیکی از تغییر تمایزی یک نوع سلول بنیادی بر روی سطوحی با توپوگرافی متفاوت. (ب) تصاویر SEM به‌دست آمده از سلول‌های تمایز یافته بعد از کشت بر روی این سطوح (۴۷).



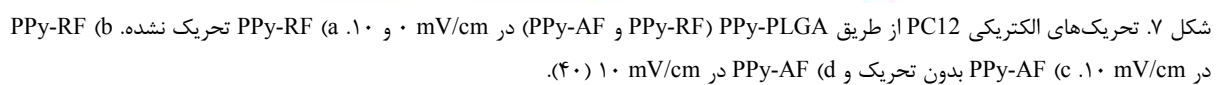
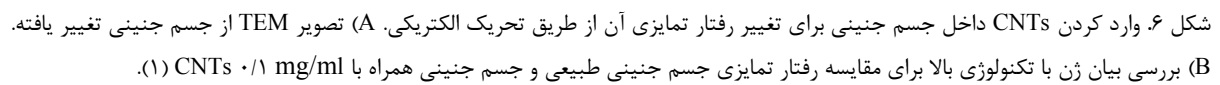
شکل ۳. مورفولوژی و پرتوانی iPSCs انسانی کشت داده شده بر روی زمینه های حاوی دندریمر با نسل های متفاوت (G1، G3 و G5). تصویر نوری سلول ها در طول ۵ روز از کشت. سلول های آپتوز کرده با فلش قرمز مشخص شده اند (۳۸).



شکل ۴. بررسی تأثیر نانو/میکرو شیارها بر روی تمایز عصبی iPSCs انسانی. (A) تصویر AFM زمینه های متفاوت. (B) تصویر ایمونواستینینگ iPSCs انسانی کشت داده شده بر روی سطوح متفاوت برای ۷ روز که نشان دهنده beta-III-tubulin با رنگ سبز و جهت گریت ها با رنگ قرمز است (۵۲).



شکل ۵. تزریق iPSCs انسانی کپسوله شده داخل هیدروژل حاوی RGD و PDGF-A به صورت *in-vivo* (A) سلول هایی که داخل هیدروژل انتقال پیدا کردند، مارک های رده گلیال (MBP (قرمز) و SOX10 (زرد)) را بیان کردند اما CD44 (قرمز) یا SOX2 (زرد) را بیان نکردند. همچنین سلول های کم-تری مارک های مزودرمال (SMA (قرمز)) یا اندودرمال (AFP (زرد)) را بیان کردند. (B) سلول هایی که بدون حضور هیدروژل منتقل شدند، مارک های رده گلیال را بیان نکردند اما CD44 و مارک های اندودرمال و مزودرمال را بیان کردند (۱۷).



منابع

1. Ahadian S, Yamada S, Estili M, Liang X, Banan Sadeghian R, Nakajima K, et al. Carbon nanotubes embedded in embryoid bodies direct cardiac differentiation. *Biomed Microdevices*. 2017; 19:57.
2. Amin S, Banijamali SE, Tafazoli-Shadpour M, Shokrgozar MA, Dehghan MM, Haghighipour N, et al. Comparing the effect of equiaxial cyclic mechanical stimulation on GATA4 expression in adipose-derived and bone marrow-derived mesenchymal stem cells. *Cell Biol Int*. 2014; 38:219–27.
3. Ankam S, Suryana M, Chan LY, Moe AAK, Teo BKK, Law JBK, et al. Substrate topography and size determine the fate of human embryonic stem cells to neuronal or glial lineage. *Acta Biomater*. 2013; 9:4535–45.
4. Bae D, Moon S-H, Park BG, Park S-J, Jung T, Kim JS, et al. Nanotopographical control for maintaining undifferentiated human embryonic stem cell colonies in feeder free conditions. *Biomaterials*. 2014; 35:916–28.
5. Bagher Z, Azami M, Ebrahimi-Barough S, Mirzadeh H, Solouk A, Soleimani M, et al. Differentiation of Wharton's Jelly-Derived Mesenchymal Stem Cells into Motor Neuron-Like Cells on Three-Dimensional Collagen-Grafted Nanofibers. *Mol Neurobiol*. 2016; 53:2397–408.
6. Baker BM, Chen CS. Deconstructing the third dimension – how 3D culture microenvironments alter cellular cues. *J Cell Sci*. 2012; 125:3015–24.
7. Balint R, Cassidy NJ, Cartmell SH. Conductive polymers: Towards a smart biomaterial for tissue engineering. *Acta Biomater*. 2014; 10:2341–53.
8. Brunner EW, Jurewicz I, Heister E, Fahimi A, Bo C, Sear RP, et al. Growth and Proliferation of Human Embryonic Stem Cells on Fully Synthetic Scaffolds Based on Carbon Nanotubes. *ACS Appl Mater Interfaces*. 2014; 6:2598–603.
9. Burdick JA, Prestwich GD. Hyaluronic acid hydrogels for biomedical applications. *Adv Mater*. 2011; 23:41–56.
10. Carlson AL, Bennett NK, Francis NL, Halikere A, Clarke S, Moore JC, et al. Generation and transplantation of reprogrammed human neurons in the brain using 3D microtopographic scaffolds. *Nat Commun*. 2016; 7:10862.
11. Chan LY, Birch WR, Yim EKF, Choo ABH. Temporal application of topography to increase the rate of neural differentiation from human pluripotent stem cells. *Biomaterials*. 2013; 34:382–92.
12. Cosson S, Lutolf MP. Hydrogel microfluidics for the patterning of pluripotent stem cells. *Sci Rep*. 2015; 4:4462.
13. Dottori M, Armentano I, Fortunati E KJ. Production and properties of solventcast poly(ϵ -caprolactone) composites with carbon nanostructures. *J Appl Polym Sci*. 2011; 119: 3544–52.
14. Edahiro, J., K. Sumaru, Y. Tada, K. Ohi TT, M. Kameda, T. Shinbo, et al. In situ control of cell adhesion using photoresponsive culture surface. *Biomacromolecules*. 2005; 6:970–4.
15. Engler AJ, Sen S, Sweeney HL, Discher DE. Matrix Elasticity Directs Stem Cell Lineage Specification. *Cell*. 2006; 126:677–89.
16. Esfandiari F, Ashtiani MK, Sharifi-Tabar M, Saber M, Daemi H, Ghanian MH, et al. Microparticle-Mediated Delivery of BMP4 for Generation of Meiosis-Competent Germ Cells from Embryonic Stem Cells. *Macromol Biosci*. 2017; 17:1600284.
17. Führmann T, Tam RY, Ballarin B, Coles B, Elliott Donaghue I, van der Kooy D, et al. Injectable hydrogel promotes early survival of induced pluripotent stem cell-derived oligodendrocytes and attenuates longterm teratoma formation in a spinal cord injury model. *Biomaterials*. 2016; 83:23–36.
18. García JR, García AJ. Cellular mechanotransduction: Sensing rigidity. *Nat Mater*. 2014; 13:539–40.
19. Gerecht S, Burdick JA, Ferreira LS, Townsend SA, Langer R, Vunjak-Novakovic G. Hyaluronic acid

- hydrogel for controlled self-renewal and differentiation of human embryonic stem cells. *Proc Natl Acad Sci*. 2007; 104:11298–303.
20. Ghanian MH, Farzaneh Z, Barzin J, Zandi M, Kazemi-Ashtiani M, Alikhani M, et al. Nanotopographical control of human embryonic stem cell differentiation into definitive endoderm. *J Biomed Mater Res Part A*. 2015; 103:3539–53.
 21. Ghasemi-Mobarakeh L, Prabhakaran MP, Morshed M, Nasr-Esfahani MH, Baharvand H, Kiani S, et al. Application of conductive polymers, scaffolds and electrical stimulation for nerve tissue engineering. *J Tissue Eng Regen Med*. 2011; 5:e17–35.
 22. Ghazanfari S, Tafazzoli-Shadpour M, Shokrgozar MA. Effects of cyclic stretch on proliferation of mesenchymal stem cells and their differentiation to smooth muscle cells. *Biochem Biophys Res Commun*. 2009; 388:601–5.
 23. Ghazanfari S, Tafazzoli-Shadpour M, Shokrgozar MA, Haghighipour N, Amirizadeh N, Rangraz EJG. Analysis of alterations in morphologic characteristics of mesenchymal stem cells by mechanical stimulation during differentiation into smooth muscle cells. *Yakhteh Med J*. 2010; 12:73–80. (persian in text full)
 24. Guvendiren M, Burdick JA. Dynamic mechanical properties control adult stem cell fate. 2017;:6–7.
 25. Haghighipour N, Heidarian S, Shokrgozar MA, Amirizadeh N. Differential effects of cyclic uniaxial stretch on human mesenchymal stem cell into skeletal muscle cell. *Cell Biol Int*. 2012;36:669–75.
 26. Halvaei M, Solouk A, Abolfathi N, Haghighipour N. Effect of Mechanical Stimulations on the Fate of Stem Cells – A Review. *Modares J Med Sci Pathobiol*. 2013; 16:1–23. (persian in text full)
 27. Hazeltine LB, Badur MG, Lian X, Das A, Han W, Palecek SP. Temporal impact of substrate mechanics on differentiation of human embryonic stem cells to cardiomyocytes. *Acta Biomater*. 2014; 10:604–12.
 28. Higuchi A, Kao S-H, Ling Q-D, Chen Y-M, Li H-F, Alarfaj AA, et al. Long-term xeno-free culture of human pluripotent stem cells on hydrogels with optimal elasticity. *Sci Rep*. 2016; 5:18136.
 29. Huang NF, Li S. Regulation of the matrix microenvironment for stem cell engineering and regenerative medicine. *Ann Biomed Eng*. 2011; 39:1201–14.
 30. Hunt GC, Singh P, Schwarzbauer JE. Endogenous production of fibronectin is required for self-renewal of cultured mouse embryonic stem cells. *Exp Cell Res*. 2012; 318:1820–31.
 31. Jang J-H, Castano O, Kim H-W. Electrospun materials as potential platforms for bone tissue engineering. *Adv Drug Deliv Rev*. 2009; 61:1065–83.
 32. Janmanee R, Chuekachang S, Sriwichai S, Baba A, Phanichphant S. Functional conducting polymers in the application of SPR biosensors. *J Nanotechnol*. 2012; 2012: 620309.
 33. Jaramillo M, Singh SS, Velankar S, Kumta PN, Banerjee I. Inducing endoderm differentiation by modulating mechanical properties of soft substrates. *J Tissue Eng Regen Med*. 2015; 9:1–12.
 34. Jazayeri M, Sc M, Shokrgozar MA, Ph D, Haghighipour N, Ph D. Effects of Electromagnetic Stimulation on Gene Expression of Mesenchymal Stem Cells and Repair of Bone Lesions. *Cell J*. 2017; :34–44.
 35. Jazayeri M, Shokrgozar MA, Haghighipour N, Mahdian R, Farrokhi M, Bonakdar S, et al. Evaluation of mechanical and chemical stimulations on osteocalcin and Runx2 expression in mesenchymal stem cells. *MCB Mol Cell Biomech*. 2015; 12:197–213.
 36. Joddar B, Kitajima T, Ito Y. The effects of covalently immobilized hyaluronic acid substrates on the adhesion, expansion, and differentiation of embryonic stem cells for in vitro tissue engineering. *Biomaterials*. 2011; 32:8404–15.
 37. Kerscher P, Turnbull IC, Hodge AJ, Kim J, Seliktar D, Easley CJ, et al. Direct hydrogel encapsulation of pluripotent stem cells enables ontomimetic differentiation and growth of engineered human heart tissues. *Biomaterials*. 2016; 83:383–95.
 38. Kim M-H, Kino-oka M. Switching between self-renewal and lineage commitment of human induced

pluripotent stem cells via cell-substrate and cell-cell interactions on a dendrimer-immobilized surface. *Biomaterials*. 2014; 35:5670-8.

39. Lau TT, Ho LW, Wang D-A. Hepatogenesis of murine induced pluripotent stem cells in 3D micro-cavitary hydrogel system for liver regeneration. *Biomaterials*. 2013; 34:6659-69.

40. Lee JY, Bashur CA, Goldstein AS, Schmidt CE. Polypyrrole-coated electrospun PLGA nanofibers for neural tissue applications. *Biomaterials*. 2009; 30:4325-35.

41. Li N, Zhang Q, Gao S, Song Q, Huang R, Wang L, et al. Three-dimensional graphene foam as a biocompatible and conductive scaffold for neural stem cells. *Sci Rep*. 2013; 3:1604.

42. Liu C, Zhu C, Li J, Zhou P, Chen M, Yang H, et al. The effect of the fibre orientation of electrospun scaffolds on the matrix production of rabbit annulus fibrosus-derived stem cells. *Bone Res*. 2015; 3:15012.

43. Liu J, Nie H, Xu Z, Niu X, Guo S, Yin J, et al. The Effect of 3D Nanofibrous Scaffolds on the Chondrogenesis of Induced Pluripotent Stem Cells and Their Application in Restoration of Cartilage Defects. *PLoS One*. 2014; 9:e111566.

44. Liu L, Yoshioka M, Nakajima M, Ogasawara A, Liu J, Hasegawa K, et al. Nanofibrous gelatin substrates for long-term expansion of human pluripotent stem cells. *Biomaterials*. 2014; 35:6259-67.

45. Lü D, Luo C, Zhang C, Li Z, Long M. Differential regulation of morphology and stemness of mouse embryonic stem cells by substrate stiffness and topography. *Biomaterials*. 2014; 35:3945-55.

46. Lu HF, Narayanan K, Lim SX, Gao S, Leong MF, Wan ACA. A 3D microfibrillar scaffold for long-term human pluripotent stem cell self-renewal under chemically defined conditions. *Biomaterials*. 2012; 33:2419-30.

47. Mahmoudi M, Bonakdar S, Shokrgozar MA, Aghaverdi H, Hartmann R, Pick A, et al. Cell-imprinted substrates direct the fate of stem cells. *ACS Nano*. 2013; 7:8379-84.

48. Martino S, D'Angelo F, Armentano I, Kenny JM, Orlacchio A. Stem cell-biomaterial interactions for regenerative medicine. *Biotechnol Adv*. 2012; 30:338-51.

49. Mashinchian O, Turner L-A, Dalby MJ, Laurent S, Shokrgozar MA, Bonakdar S, et al. Regulation of stem cell fate by nanomaterial substrates. *Nanomedicine*. 2015; 10:829-47.

50. Mayer-Wagner S, Passberger A, Sievers B, Aigner J, Summer B, Schiergens TS J V, et al. Effects of low frequency electromagnetic fields on the chondrogenic differentiation of human mesenchymal stem cells. *Bioelectromagnetics*. 2011; 32:283-90.

51. Metallo CM, Mohr JC, Detzel CJ, De Pablo JJ, Van Wie BJ, Palecek SP. Engineering the stem cell microenvironment. *Biotechnol Prog*. 2007; 23:18-23.

52. Pan F, Zhang M, Wu G, Lai Y, Greber B, Schöler HR, et al. Topographic effect on human induced pluripotent stem cells differentiation towards neuronal lineage. *Biomaterials*. 2013; 34:8131-9.

53. Park J-E, Seo Y-K, Yoon H-H, Kim C-W, Park J-K JS. Electromagnetic fields induce neural differentiation of human bone marrow derived mesenchymal stem cells via ROS mediated EGFR activation. *Neurochem Int*. 2013; 62:418-24.

54. Perez RA, Choi S-J, Han C-M, Kim J-J, Shim H, Leong KW, et al. Biomaterials control of pluripotent stem cell fate for regenerative therapy. *Prog Mater Sci*. 2016; 82:234-93.

55. Perez RA, Seo S-J, Won J-E, Lee E-J, Jang J-H, Knowles JC, et al. Therapeutically relevant aspects in bone repair and regeneration. *Mater Today*. 2015; 18:573-89.

56. 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; 33:524-34.

57. Qutachi O, Vetsch JR, Gill D, Cox H, Scurr DJ, Hofmann S, et al. Injectable and porous PLGA microspheres that form highly porous scaffolds at body temperature. *Acta Biomater*. 2014; 10:5090-8.

58. Rabbani M, Tafazzoli-Shadpour M, Shokrgozar MA, Janmaleki M, Teymoori M. Cyclic Stretch Effects on Adipose-Derived Stem Cell Stiffness, Morphology and Smooth Muscle Cell Gene Expression. *Tissue Eng Regen Med*. 2017; 14:279–86.
59. Ratner BD, editor. Biomaterials Science An Introduction to Materials in Medicine. 2013.
60. Richardson T, Barner S, Candiello J, Kumta PN, Banerjee I. Capsule stiffness regulates the efficiency of pancreatic differentiation of human embryonic stem cells. *Acta Biomater*. 2016; 35:153–65.
61. Roy K, editor. Biomaterials as Stem Cell Niche. Springer Verlag Berlin Heidelberg. 2010.
62. Safshekan F, Hemmati A, Tafazzoli-Shadpour M, Shokrgozar MA, Haghighipour N, Mahdian R. Effect of hydrostatic pressure amplitude on chondrogenic differentiation of human adipose derived mesenchymal stem cells. *19th Iran Conf Biomed Eng ICBME*. 2012:131–4.
63. Safshekan F, Shadpour Mt, Shokrgozar Ma, Haghighipour N, Alavi Sh. Effects of Short-Term Cyclic Hydrostatic Pressure on Initiating and Enhancing the Expression of Chondrogenic Genes in Human Adipose-Derived Mesenchymal Stem Cells. *J Mech Med Biol*. 2014; 14:1450054.
64. Safshekan F, Tafazzoli-Shadpour M, Shokrgozar MA, Haghighipour N, Mahdian R, Hemmati A. Intermittent Hydrostatic Pressure Enhances Growth Factor-Induced Chondroinduction of Human Adipose-Derived Mesenchymal Stem Cells. *Artif Organs*. 2012; 36:1065–71.
65. Shekaran A, Sim E, Tan KY, Chan JKY, Choolani M, Reuveny S, et al. Enhanced in vitro osteogenic differentiation of human fetal MSCs attached to 3D microcarriers versus harvested from 2D monolayers. *BMC Biotechnol*. 2015; 15:102.
66. Shkumatov A, Baek K, Kong H. Matrix Rigidity-Modulated Cardiovascular Organoid Formation from Embryoid Bodies. *PLoS One*. 2014; 9:e94764.
67. Shojaei S, Tafazzoli-Shahdpour M S, MA HN. Effects of mechanical and chemical stimuli on differentiation of human adipose-derived stem cells into endothelial cells. *Int J Artif Organs*. 2013;36.
68. Shokrgozar MA, Fattahi M, Bonakdar S, Kashani IR, Majidi M, Haghighipour N, et al. Healing potential of mesenchymal stem cells cultured on a collagen-based scaffold for skin regeneration. *Iran Biomed J*. 2012; 16:1–9. (persian in text full)
69. Sun S, Titushkin I C. Regulation of mesenchymal stemcell adhesion and orientation in 3D collagen scaffold by electrical stimulus. *Bioelectrochemistry*. 2006;62:133-41.
70. Tabata Y, Horiguchi I, Lutolf MP, Sakai Y. Development of bioactive hydrogel capsules for the 3D expansion of pluripotent stem cells in bioreactors. *Biomater Sci*. 2014; 2:176–83.
71. Tsai M-T, Li W-J, Tuan RS CW. Modulation of osteogenesis in human mesenchymal stem cells by specific pulsed electromagnetic field stimulation. *J Orthop Res*. 2009;27:1169-74.
72. Wang X, Ding B, Li B. Biomimetic electrospun nanofibrous structures for tissue engineering. *Mater Today*. 2013; 16:229–41.
73. Wei J, Han J, Zhao Y, Cui Y, Wang B, Xiao Z, et al. The importance of three-dimensional scaffold structure on stemness maintenance of mouse embryonic stem cells. *Biomaterials*. 2014; 35:7724–33.
74. Wu S, Johansson J, Damdimopoulou P, Shahsavani M, Falk A, Hovatta O, et al. Spider silk for xeno-free long-term self-renewal and differentiation of human pluripotent stem cells. *Biomaterials*. 2014; 35:8496–502.
75. Zamani Y, Rabiee M, Shokrgozar MA, Bonakdar S, Tahriri M. Response of human mesenchymal stem cells to patterned and randomly oriented Poly(Vinyl Alcohol) nano-fibrous scaffolds surface-modified with Arg-Gly-Asp (RGD) ligand. *Appl Biochem Biotechnol*. 2013; 171:1513–24.
76. Zhou J, Zhang Y, Lin Q, Liu Z, Wang H, Duan C, et al. Embryoid bodies formation and differentiation from mouse embryonic stem cells in collagen/Matrigel scaffolds. *J Genet Genomics*. 2010; 37:451–60.
77. Zhu W, Masood F, O'Brien J, Zhang LG. Highly aligned nanocomposite scaffolds by electrospinning and electrospraying for neural tissue regeneration. *Nanomedicine Nanotechnology, Biol Med*. 2015; 11:693–704.

