

مهندسی بیومتریال‌ها به عنوان کنام سلول‌های بنیادی

زهرا عیوضی‌زاده^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

سلول‌های 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 سلول‌ها دنبال می‌شود، تکثیر آن‌ها در محیط کشت با حفظ پرتوانی و تمایز آن‌ها به سمت رده سلولی موردنیاز، است.

با رشد و گسترش علم زیست‌شناسی و شناخت بیش‌تر کنام سلولی، مشخص شد که فاکتورهای بیوشیمیایی تنها عوامل دخیل در سرنوشت سلولی نیستند. با تحقیقات گسترده‌ای 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 سلول‌های بنیادی، هدف، ساختن بیومتریالی است که بتواند با اعمال تمام این شرایط، کنام سلولی را برای سلول‌ها تداعی کند.

واژه‌های کلیدی: سلول‌های بنیادی، کنام سلولی، فاکتورهای بیوفیزیکی، عوامل مکانیکی، عوامل هندسی، عوامل الکتریکی

مقدمه

پیشرفت‌های اخیر علم مهندسی سلول‌های بنیادی استراتژی درمانی جدیدی را به روی بیماری‌های لاعلاج باز کرده‌است. با این وجود موفقیت نهایی، گرو توانایی ما در کنترل سرنوشت سلول‌های بنیادی و تولید سلول‌ها در مقیاس درمانی است (۶۱).

سلول‌های بنیادی توانایی خودنوزایی و تمایز را دارند. خاصیت خودنوزایی به سلول‌های بنیادی این امکان را می‌دهد تا با حفظ حالت غیرتمایزی خود به محل آسیب برسند. این سلول‌ها را از نظر پتانسیل تمایزی می‌توان به ۴ دسته همه-توان، پرتوان، چندتوان و تک‌توان تقسیم نمود. سلول‌های

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

سلول‌های بنیادی بالغ، چند توان و تک توان هستند اما سلول‌های بنیادی جنینی (ESCs)، سلول‌های جنسی جنینی (EGCs) و سلول‌های سرطانی جنینی (ECCs)، همه توان هستند. سلول‌های پرتوان القایی یا iPSC ها که از برنامه‌ریزی مجدد سلول‌های سوماتیک حاصل می‌شوند نیز پرتوان هستند (۵۴).

با توجه به این‌که سلول‌های بنیادی پرتوان (PSCs) نسبت به دسته‌های دیگر دارای مزایایی هم‌چون توانایی تکثیر بالا در شرایط مناسب، توانایی تمایز به انواع مختلف سلول‌های بدن و قابلیت ایجاد اصلاحات ژنتیکی، هستند، در مهندسی بافت و طب بازساختی بیش‌تر کاربرد دارند. اگرچه سلول‌های بنیادی بالغ همانند سلول‌های بنیادی هماتوپوئیک، برای درمان

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. لیگاندهای چسبندگی سلول (CAMs)، پروتئین هایی هستند که بر روی سطح سلول ها واقع شده اند. زمانی که اتصالی 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 خودنوزایی سلول های بنیادی ایفا می کنند. مولکول های ECM مثل کلاژن I، لامینین، ویترونکتین و فیبرونکتین جایگاه اتصالی 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 خودنوزایی 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 گلیکوزامینوگلیکان 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 خودنوزایی، 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 سلولی (ICM) داخل بلاستوسیت استخراج می شوند، و iPSCs تشکیل می دهند (۵۴). آنچه 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 بیشتری در حفظ پتانسیل پرتوانی و تمایز به ردهی خاص داشته باشد (۵۴).

کنام سلول های بنیادی یک میکرو محیط پیچیده، دینامیک و π 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

بر اساس 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 بیش تر 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 بیش تر 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 بیش تر از کنام سلول های هماتوپوئیتیک تخمین زد (۵۴). در مطالعه ای

Dongyuan و همکارانش میزان حفظ بنیادینگی ESCs را بر روی ژلهایی 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 بیش تر 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 زل‌های 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 آن‌ها تمایز سلول‌ها را بررسی کردند. در این مطالعه مشاهده شد، زمینه‌های نرم‌تر (۴-۳۵ kPa) نسبت به زمینه‌های سفت‌تر (۱۷۱-۲۴۷ kPa) بیش‌تر موجب تکثیر و بیان ژن‌های مربوط به اندودرم (AFP، Sox17 و Hnf4) در ESCs موشی شدند (۳۳).

۲.۱.۲- عوامل مکانیکی دینامیک

برخلاف این که در اکثر مقاله‌های سفتی زمینه به‌عنوان تنها عامل مکانیکی کنترل‌کننده سرنوشت سلولی به حساب می‌آید، اما این عامل تنها یک عامل استاتیک دخیل در رفتار سلولی است و در حالت طبیعی بدن شاهد عوامل دینامیک در حین پرورده‌های سلولی مثل رشد، تقسیم، فیروز، تشکیل سرطان و ... هستیم (۲۴). با توجه به‌وجود چنین عواملی، دانشمندان به دنبال ایجاد شرایط دینامیک بر روی سلول‌ها و بررسی رفتار آن‌ها هستند.

برای مثال در مقاله‌ای که توسط غضنفری و همکارانش به چاپ رسید، تأثیر کشش‌های دوره‌ای بر روی تکثیر سلول‌های بنیادی مزانشیمی و تمایز آن‌ها به سمت سلول‌های ماهیچه‌ای نرم بررسی شد. نتایج این مطالعه نشان داد که کشش دوره‌ای با افزایش دامنه کشش و تعداد آن‌ها، باعث افزایش تکثیر سلول‌های بنیادی مزانشیمی انسانی و تمایز آن‌ها به سمت سلول‌های ماهیچه‌ای نرم بدون افزودن فاکتورهای رشد می‌شود (۲۲، ۲۳). حتی اعمال نیروی مکانیکی دوره‌ای با شرایط دیگر می‌تواند سلول‌های بنیادی مزانشیمی را بدون افزودن فاکتورهای رشد، با بازده بالایی به سمت سلول‌های ماهیچه‌ای استخوانی تمایز دهد (۲۵).

اعمال کشش و تنش علاوه بر این که بر روی بیان ژن‌ها سلولی اثر می‌گذارد، می‌تواند بر روی مورفولوژی و سفتی سلول نیز مؤثر باشد. با توجه به مطالعه‌ای که در سال ۲۰۱۷ انجام شد، اعمال کشش تک‌محور به سلول‌های بنیادی مشتق شده از چربی، می‌تواند بر روی اسکلت سلولی، جهت‌مندی سلول، خواص الاستیک سلولی اثرگذار باشد و باعث بیان ژن‌های سلول ماهیچه‌ای نرم شود. نتایج نشان داد که اعمال کشش-های دوره‌ای به مدت ۲۴ ساعت باعث کشیده شدن پاپک‌های

به سمت سلول‌های بافت عصب تمایز می‌یابند، زمینه‌هایی با سفتی بیش‌تر کنام سول‌های ماهیچه‌ای را تقلید می‌کند و زمینه‌های کامل سفت، باعث تمایز سلول‌ها به سمت استخوان می‌شوند. از طرفی مشاهده شد که هر چه از مدت زمان کشت این سلول‌ها بر روی زمینه‌های مذکور می‌گذرد، احتمال بازگشت آن‌ها کم‌تر خواهد بود (۱۵). در مطالعه‌ای دیگر با تهیه‌ی زمینه‌هایی از جنس PAA با سفتی‌های متفاوت (kPa ۴-۸۰) تمایز ESCs از طریق بیان مارکرهای cTnT به سلول‌های قلبی، بررسی شد و مشاهده شد که هیدروژل‌هایی با سفتی ۴/۱۸-۴/۴۹ kPa در طی ۱۵ و ۳۰ روز بیش‌ترین میزان بیان مارکر مورد نظر را دارند (۲۷).

در مقاله‌ای دیگر در همان سال، هیدروژل آکریلامید ترکیب شده با کلاژن برای بهبود چسبندگی سلولی و در سفتی‌های مختلف از ۰/۲ kPa تا ۴۰ kPa تهیه شد. ESCs موشی بر روی آن‌ها کشت داده شد و مشاهده شد تشکیل لایه سلولی ماهیچه‌ای قلبی عروقی بر روی هیدروژلی با سفتی مشابه ماهیچه قلبی موش (۶ kPa) بیش‌تر از نمونه‌های دیگر است. هم‌چنین تشکیل جسم جنینی همراه با انقباض بر روی زمینه ۶ kPa تقریباً ۷ برابر سایر نمونه‌ها گزارش شد، اگرچه فرکانس ضربه تمام نمونه‌ها تقریباً یکسان بود. هم‌چنین سطح mRNAهای Actn2 و Tnnt2 که بیانگر تمایز به سمت سلول‌های قلبی است، در نمونه ۶ kPa مقداری افزایش یافته است. تمایز جسم جنینی به رده قلبی، به مقدار زیادی تحت تأثیر انتقال سیگنال و برهم‌کنش بین مولکول‌های چسبندگی سلولی است و هرچه سفتی زمینه به عضله قلب نزدیک‌تر باشد، می‌تواند این انتقال سیگنال را تسریع کند و تمایز قلبی را بهبود بخشد. البته زمینه‌های بسیار نرم و بسیار سخت مانع انتقال این سیگنال‌ها می‌شوند. زمینه‌های بسیار نرم توانایی انتقال سیگنال را ندارند و زمینه‌های بسیار سخت میزان تماس سلول-سلول را کاهش می‌دهند و منجر به مهاجرت سلولی می‌شوند که در اثر آن میکرومحیط سه‌بعدی جسم جنینی دچار اختلال می‌شود (۶۶).

اما همان‌طور که با استفاده از پلی‌مرهای مصنوعی می‌توان زمینه‌هایی هیدروژلی با سفتی متفاوت تهیه کرد، با استفاده از پلی‌مرهای طبیعی مثل کلاژن، آلجینات، هیالورونیک اسید، ابریشم و ... و تغییر غلظت آن‌ها و درصد کراس‌لینک شدن آن‌ها می‌توان هیدروژل‌هایی با سفتی متفاوت تهیه کرد (۵۴).

VE-کدهین^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 به‌سزایی 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 به‌سمت 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).

علاوه‌بر 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

¹ VE-catherin

وجود آمدن کلونی‌هایی بسیار فشرده شدند، در حالی که سطوحی با دندریمرهایی با نسل بالاتر، باعث تشکیل کلونی‌هایی با ساختار حلقه مانند شدند (شکل ۳). علت این پدیده را می‌توان جذب فیبرونکتین دانست. زمانی که از نسل‌های بالاتر دندریمر استفاده می‌شود، به علت جذب اولیه فیبرونکتین، سلول‌های تغذیه‌کننده شروع به ترشح فیبرونکتین می‌کنند که منجر می‌شود برهم‌کنش سلول-زمینه افزایش یابد و تماس سلول-سلول کاهش یابد (۳۸).

در بحث تمایز PSCs نه تنها برهم‌کنش اینتگرین-لیگاند، بلکه الگوی توپوگرافی‌های میکرو/نانو نیز می‌تواند بر روی رفتار میانه و طولانی مدت سلول‌ها مثل مهاجرت، کشش سایتواسکتال^۱ و ... مؤثر باشد. طراحی نانو/میکرو توپوگرافی در تمایز PSCها بیش‌تر در ایجاد توپوگرافی‌های شیار مانند در تمایز سلول‌های عصبی که به رشد آکسون در طول توپوگرافی نیاز دارند، مربوط می‌شود. این زمینه عواملی مثل ترکیب الگوها، اندازه (عمق) شیارها و منظم یا تصادفی بودنشان می‌تواند به عنوان پارامترهای کلیدی شناخته شود (۵۴). پدر یکی از مطالعه‌های در این زمینه، Pan و همکارانش تأثیر گریته‌ها 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 نانوگریته‌ها با بیان بیش‌تر مارکرهای مربوط به عصب مثل NeuroD1 و NeuroG1 بیش‌تر از میکروگریته‌ها به سمت عصب تمایز می‌یابند و مورفولوژی سلول‌ها در جهت گریته‌ها کشیده می‌شوند (شکل ۴). مکانیسم این پدیده هنوز روشن نیست، اما واضح است که در شیارهای کوچک‌تر، نیروی موینگی منجر به کشیدگی سلول می‌شود در حالی که شیارهای بزرگ‌تر سلول‌ها تمایل به اتصال به لبه‌ها دارند و نقاط اتصالی بیش‌تری ایجاد می‌کند. اگرچه میزان کشیدگی در نمونه‌هایی با توپوگرافی ۲ μm بیش‌تر است، اما ارتباط مستقیمی بین کشیدگی سلول و رفتار تمایزی آن وجود ندارد. این‌گونه تصور می‌شود که گریته‌های ۲ μm می‌توانند به‌خوبی با میانگین اندازه فیلوپدی^۲ جفت شوند، بنابراین سلول‌ها را به‌صورت قوی‌تری هدایت می‌کنند. از طرف دیگر مکانیسم دریافت سیگنال در مقیاس نانو متفاوت است به این معنی که سلول‌ها در فاصله بین گریته‌ها دچار خمیدگی می‌شوند و دیگر بین محورهای گریته کشیده نمی‌شوند. با توجه به توضیح‌های ارائه شده، اگرچه اندازه گریته‌ها

حدود ۴۶۵-۷۵ nm دست پیدا کرد. زمانی که ESCs انسانی بر روی این سطوح کشت داده می‌شوند، سطوح زیرتر را به سطوح صاف‌تر ترجیح می‌دهند (شکل ۱). روش استفاده از CNTs اگرچه سطوحی با توپوگرافی نانو ایجاد می‌کند اما به علت توپوگرافی تصادفی آن دارای محدودیت‌هایی است (۸). به‌همین علت با استفاده از روش‌های نانولیتوگرافی، الگوهای نانوستونی و نانوشیاری و ... تولید می‌کنند. با این روش می‌تواند توپوگرافی سطح را کنترل کرد.

در بحث حفظ پرتوانی سلول‌های پرتوان، ESCs انسانی کلونی‌های فشرده‌ای با سطح بالای بیان مارکرهای غیر تمایزی بر روی نانوستون‌های با قطر کم (۱۲۰-۱۷۰ nm) تولید می‌کند. در محدوده کوچک کلونی‌های سلولی چسبندگی محدودی را با نانوستون‌ها برقرار می‌کند. برهم‌کنش محدود سلول-زمینه بر روی ستون‌هایی با قطر کم، از پهن شدن سلول‌ها جلوگیری می‌کند، اما منجر می‌شود نیروی سلولی بر روی برهم‌کنش سلول-سلول توسط E کدهرین‌ها متمرکز شود که به حالت پرتوانی سلول نزدیک‌تر است (۴).

نه تنها اندازه توپوگرافی بلکه شکل آن‌ها می‌تواند بر روی رفتار PSCs تأثیرگذار باشد. برای مثال بر روی سطوح شیاری و ستونی از جنس ژل PAA، کلونی‌های مسطح تشکیل می‌شود در حالی که بر روی سطوح شش‌گوشه، کلونی‌های کروی تشکیل می‌شود. اگرچه مکانیسم این اتفاق نیازمند مطالعه‌های گسترده‌تری است، اما می‌توان علت این پدیده را تفاوت نقاط اتصال سلول به زمینه و انقباض‌های سلولی دانست (۴۵).

حتی ایجاد سطوحی با الگویی مشابه به شکل سلول تمایزی مورد نیاز نیز می‌تواند باعث تمایز سلول بنیادی به سمت سلول هدف شود. در این روش به‌طور معمول سلول تمایزی را بر روی سطوحی شکل‌پذیر اغلب سیلیکونی کشت می‌دهند و بعد از اعمال شرایطی یا افزودن مواد دیگر وقتی سطح مورفولوژی سلول را به خود گرفت، سلول‌ها را شسته و سلول‌های بنیادی را روی آن کشت می‌دهند. مشاهده شده است که این کار باعث تمایز سلول‌های 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 نسل‌های متفاوت دندریمر بررسی شد. در این مطالعه مشاهده شد، که سطوحی با دندریمرهای نسل‌های پایین‌تر به‌علت بهبود اتصال‌های سلول-سلول باعث به-

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 پیش‌تری نیاز دارد (۱۱،۵۲).

تأثیر نانوگریت با سایر الگوهای دیگر (مثل نانوستون‌ها و نانوجاه‌ها) نیز مقایسه شده است. الگوهای نانوگریت شرایطی تک‌بعدی و غیریکنواخت را برای سلول فراهم می‌کنند در حالی که نانوستون‌ها و نانوجاه‌ها 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 سایتواسکتون‌ها 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 ۲D (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، خشک‌کشی 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

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

در زمینه مهندسی سلول‌های بنیادی با استفاده از داربست‌های سه‌بعدی از پیش تهیه شده، مطالعه‌های بسیار زیادی انجام شده که در این مقاله مروری، تنها به جدیدترین مطالعه‌ها پرداخته می‌شود.

الکتروریس یکی از ساده‌ترین و تطبیق‌پذیرترین روش‌های ساخت داربست‌های نانو/میکرو لیفی است که با این روش می‌توان به رنج وسیعی از ترکیب‌ها و مورفولوژی‌ها (جهت‌مندی و اندازه الیاف) دست پیدا کرد (۴۲، ۵۶، ۷۷). جالب‌ترین نکته در استفاده از شبکه نانوالیافی، تقلید الیاف ECM است (۷۲). البته به‌علت این‌که مت‌های تشکیل شده با این روش ضخامت کمی دارند، ساختار آن‌ها را شبه سه‌بعدی در نظر می‌گیرند (۳۱). به‌علاوه ساختار نانولیفی داربست‌های الکتروریسی شده به‌علت قطر بسیار کم باعث می‌شوند که داربست سختی کمی داشته باشد و بتواند انعطاف‌پذیری و الاستیسیته مناسب را برای سلول‌ها فراهم کنند (۷۲).

نقش به‌سزای ساختار نانولیفی الکتروریسی شده، در حفظ پرتوانی سلول‌های بنیادی با ترکیب‌های 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 $0.1 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ تا $5/8 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ تنظیم شد. نتایج نشان دادند که سلول‌ها بر روی الیافی با قطر متوسط (۴۰۰ nm) و غلظت بالای ژلاتین ($4/8 \mu\text{g}/\text{cm}^2$)، می‌توانند در مدت زمان بیش‌تری بدون کاهش ظرفیت خودنوزایی، تکثیر یابند (۴۴) (شکل ۷).

علاوه بر قطر الیاف در این کاربرد، جهت‌گیری الیاف نیز بر روی سرنوشت سلولی تأثیرگذار است. برای مثال در مطالعه‌ای توسط زمانی و همکارانش، مشخص شد که MSCs انسانی بر روی نانوالیافی از جنس PVA که با سکانس RGD اصلاح شدند و به‌صورت تصادفی شکل گرفتند، نسبت به‌حالت آرایش یافته زنده‌مانی و چسبندگی بیش‌تری دارند. آن‌ها علت این پدیده را سطح تماس بیش‌تر الیاف رندم با سلول‌ها مطرح کردند (۷۵).

یکی از راه‌های تهیه داربست‌های متخلخل از پیش تهیه شده خشک‌کاپی سرمایشی^۱ است. برای مثال در مطالعه‌ای در سال ۲۰۱۲ با تهیه داربستی از جنس کلاژن-کیتوسان با این روش، تمایز ADSCs به کراتینوسیت‌ها بر روی این داربست‌ها برای درمان سوختگی‌های عمیق مورد بررسی قرار گرفت. نتایج این مطالعه نشان داد که با قرار دادن داربست حامل سلول در محل زخم در طول ۱۴ روز می‌توان شاهد تشکیل لایه‌های درم و اپی‌درم بود (۶۸).

استفاده از محیط‌های سه‌بعدی می‌تواند در حفظ طولانی‌مدت پرتوانی نیز نقش داشته باشد. به‌تازگی در مطالعه‌ای مشخص شده است که استفاده از محیط‌های سه‌بعدی مثل ساختار فیبری متخلخل می‌تواند فنوتیپ سلول‌ها را در حالت کروی حفظ نماید در حالی که این سلول‌ها در محیط‌های دوبعدی حالت مسطحی به خود می‌گیرند. این تغییر فنوتیپ سلولی را می‌توان به توزیع متفاوت پروتئین‌های غشاء بین محیط‌های دو و سه بعدی مرتبط کرد که نقش مهمی را در اتصال‌های سلول-سلول و برهم‌کنش سلول-ماتریکس ایفا می‌کند و در نهایت منجر به حفظ بنیادینگی ESCs با بیان بیش‌تر Oct4 و بیان کم‌تر Sox2 به‌صورت هم‌زمان می‌شوند (۷۳).

در مطالعه‌ای بر روی iPSCs موشی، مشخص شد که میکروکپسول‌های آلجینات ترکیب شده با پلی‌اتیلن‌گلاپکول (PEG) توانایی بسیار خوبی در گسترش تعداد iPSCs با تمایز حداقلی به سمت اندودرم دارند. به‌علاوه بیدها می‌توانند عوامل انتقال سیگنال، مثل مولکول‌های چسبندگی یا فاکتورهای رشد را توزیع کنند و بر روی رفتار سلول‌ها تأثیر بگذارند (۷۰). در مقاله‌ای دیگر، هیدروژل آلجینات به‌صورت میکروالیاف سه‌بعدی تهیه می‌شود تا در شرایط بدون سلول تغذیه کننده^۲ و همراه با ترکیب‌های مشخص بتواند به‌صورت طولانی‌مدت خاصیت خودنوزایی ESCs و iPSCs را حفظ کند. میکروالیاف از طریق برهم‌کنش بین محلول پلی‌مری کاتیونی (کیتین) و آنیونی (سدیم آلجینات) تشکیل می‌شود و سلول‌ها داخل آن‌ها کپسوله می‌شوند. این سیستم یکنواخت است و توانایی بارگذاری مقدار زیادی سلول را باحفظ خودنوزایی سلول‌ها دارد. به‌علاوه سلول‌ها در این محیط قادرند

¹ Freez drying

² Feeder-free

لایه‌ی جنینی تشکیل شدند (۷۶). در مطالعه‌ی دیگر Kerscher و همکارانش نشان دادند که هیدروژل‌هایی بر اساس PEG-فیبرینوزن می‌تواند باعث تمایز iPSCs کشت داده شده بشود و در ۱۹ روز رفتار تپشی از خود نشان دهند (۳۷).

در مقاله‌ای که به‌تازگی به چاپ رسید، یک دستگاه میکرونی تهیه شد که می‌توانست PSCs را کشت دهد و مولکول‌های 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 شکل‌های متفاوت در مقیاس میکرو تهیه شد تا همگنی جسم جنینی را بهبود دهد. داخل این دستگاه میکرونی، میکرو کانال‌هایی با اندازه کنترل شده برای ره‌ایش بیومولکول‌ها تعبیه شدند. تمایز عصبی با بررسی ره‌ایش محلول رتینوئیک اسید در فاصله زمانی مشخص مورد بررسی قرار گرفت. در غلظت‌های بالای رتینوئیک اسید، بیان Sox-1 و القای عصبی قوی گزارش شد. به‌علاوه اندازه جسم جنینی-هایی که به رتینوئیک اسید نزدیک‌تر بودند، به‌علت تکثیر سلول‌های مشتق‌شده بزرگ‌تر بود. بنابراین این دستگاه توانایی کنترل تشکیل اسفروئید و رفتار تمایزی PSCs را از طریق ره‌ایش کنترل‌شده مولکول‌های سیگنالینگ را دارند. اگرچه این میکرو دستگاه‌های ساخته شده از PDMS برای کاربرد in-vivo قابل استفاده نیستند، اما می‌توان از آن برای بررسی برهمکنش سلول‌ها با بیومولکول‌ها و زمینه و همچنین غربالگری‌های ترکیبی استفاده نمود (۱۲).

علاوه بر ژل‌ها، داربست‌های سه‌بعدی تهیه شده با روش‌های دیگر نیز می‌توانند بر روی رفتار تمایزی سلول‌ها تأثیر بگذارند. یکی از کارهایی که برای تأیید تأثیر محیط سه‌بعدی بر روی رفتارهای سلولی انجام شد نشان داد که MSCs کشت داده شده بر روی میکروکره‌ها نسبت به سلول‌هایی که بر روی سطوح تک‌لایه کشت داده شده‌اند، سطح بالایی از ژن‌های استئوبلاست را بیان می‌کنند که می‌توان علت این امر را در تفاوت نیروی انقباضی وارد بر آن‌ها دانست (۶۵). به‌تازگی در مقاله‌ای یک فوم گرافنی سه‌بعدی تهیه شد و تمایز سلول‌های بنیادی عصبی (NSCs) بر روی آن مورد بررسی قرار گرفت. در نتایج به‌دست آمده مشخص شد که ساختار سه‌بعدی فوم-های گرافنی نسبت به محیط‌های دوبعدی، بیان Ki67 را

میکروکره‌های پلیمری اغلب برای حمایت، کشت و تکثیر سلول‌ها در شرایط دینامیک استفاده می‌شوند و در نهایت به بافت آسیب‌دیده فرستاده می‌شوند (۵۷). به‌علاوه می‌توان توسط آن‌ها مولکول‌های درمانی را برای تأمین عوامل انتقال سیگنال به سلول‌ها را منتقل کرد (۵۴).

همانند توضیح‌های ارائه شده در مورد تأثیر محیط کشت سه‌بعدی بر روی حفظ پرتوانی، تمایز PSCs در محیط‌های سه‌بعدی قابلیت کنترل بیش‌تری دارد. هم‌چنین کشت PSCs در محیط سه‌بعدی و داربست‌ها این امکان را می‌دهد که از ساختمان تمایز یافته PSCs به‌طور مستقیم در بیماری‌ها و بافت آسیب‌دیده استفاده شد.

به‌تازگی از هیدروژل میکرو متخلخل آلجینات برای کشت ESCs و iPSCs موشی برای تشکیل کلونی و جسم جنینی و تمایز آن به سمت سلول‌های هیپاتیک استفاده شد. سیستم هیدروژلی توانایی تبادل مواد غذایی و مواد حیاتی برای PSCs کپسوله‌شده را فراهم می‌کند. بعد از کشت PSCs برای ۱۰ روز در کپسول‌های هیدروژلی، جسم جنینی تشکیل شد، به‌دنبال سلول‌ها به‌طور مستقیم به سمت لایه اندودرم رفتند و به‌دنبال آن با اعمال شرایط تمایزی، سلول‌ها 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 به‌طور چشم‌گیری افزایش یافت (۳۹).

یکی از مزایای ویژه آلجینات، سفتی آن است که می‌تواند به‌راحتی سلول‌ها را برای تمایز به رده خاص هدایت کند. برای مثال کپسول‌های هیدروژلی آلجینات که ESCs انسانی داخل آن قرار داشتند، با غلظت‌های متفاوت $BaCl_2$ کراس لینک شده تا درجات متفاوتی از سفتی $4-80$ kPa را ایجاد کنند. ESCs انسانی کپسوله شده در ژلی با سفتی متوسط، از طریق انتقال سیگنال $TGF-\beta$ باعث تمایز سلول‌ها به سمت پانکراس شدند. از طرف دیگر سلول‌های کپسوله شده در ژلی با بیش‌ترین سفتی تکثیر و رشد کمی داشتند که علت این امر را می‌توان دوز بالای باریوم و هم‌چنین سفتی زمینه دانست (۶۰). یکی دیگر از کارهایی که در این زمینه انجام شد، تلفیق کلاژن و ماتریزل برای تأمین ترکیب‌های ECM و حمایت فیزیکی برای توسعه و تمایز ESCs بود که با کشت ESCs موشی داخل ژل سه‌بعدی کلاژن/ماتریزل و رشد تجمعی آن و تشکیل جسم جنینی، بعد از ۷ روز کشت، مشاهده شد که هر سه

مدت زندهمانی طولانی منجر به تشکیل تراتوما می‌شود (۵۰٪ در حیوانات) (شکل ۵). علت کاهش احتمال تشکیل تراتوما در حالت دوم، بهبود تمایز سلول‌ها در محیط *in-vivo* است که به زندهمانی بیش‌تر سلول‌ها، توانایی مهاجرت آن‌ها به علت وجود فاکتورهای رشد و اصلاح‌های انجام شده، مربوط است. بنابراین با مهندسی ژل‌هایی همانند این نمونه می‌توان تمایز سلول‌ها را بهبود بخشید اما همان‌طور که ذکر شد تاکنون نتوانستند در پیوند طولانی‌مدت تشکیل تراتوما را مهار کنند (۱۷).

به جای استفاده از PSCs، از رده‌های تمایز یافته آن‌ها برای پیوند در بازسازی عصب استفاده می‌شود. به طوری که به‌تازگی از نوروهای مشتق شده از iPSC (iN) با استفاده از داربست‌های 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 می‌کند) تهیه شد و iN بر روی میکروالیاف تمایز یافتند. در مقایسه با الیاف نازک یا نمونه کنترل دوبعدی، الیاف ضخیم‌تر در طول ۱۲ روز، رشد عصبی گسترده‌تر و بیان بیش‌تر β III-tubulin، MAP2 و synaptophysin به همراه داشتند. معماری میکروالیاف باعث بهبود اتصال‌های بین سلولی شد و بر روی عملکرد و فنوتیپ iN های بالغ تأثیر گذاشت. هم‌زمان مارکرهای پر توانی شامل Oct-4 و Ki67 در محیط کشت دوبعدی در مقایسه با زمینه لیفی بیش‌تر بود که نشان‌دهنده این بود که ساختار نانولیفی می‌تواند به صورت انتخابی عوامل باقی‌مانده از سلول‌های پرتوان را کاهش دهد و از همین طریق در شرایط *in-vivo* باعث کاهش تشکیل تراتوما شود. با توجه به توضیح‌های ارائه شده، نرخ زندهمانی موش‌ها در حالت داربست میکرولیفی، ۳۸ برابر بیش‌تر از حالتی است که سلول‌ها به صورت مستقیم تزریق می‌شوند (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 فعالیت‌های سلولی مثل تقسیم سلولی، گسترش و مهاجرت گزارش دادند. بعد از آن ایده مطرح شد که می‌توان با استفاده از سیگنال‌های الکتریکی فعالیت‌های سلولی را کنترل کرد.

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

داربست‌های نانولیفی PCL/ژلاتین تهیه شده با استفاده از الکتروریسی دوفازه نیز برای تمایز غضروفی iPSCs استفاده می‌شوند. در این حالت سلول‌ها قادرند سطح بالاتری از مارکر-های غضروفی را در مقایسه با نمونه کنترل تولید کنند. هم-چنین زمانی که از آن‌ها به صورت *in-vivo* استفاده می‌شود، بیان ژن‌ها و پروتئین‌های اختصاصی غضروف و بازسازی غضروف در آن‌ها بیش‌تر است (۴۳). در مطالعه‌ای بر روی استفاده از داربست‌های 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 سلول‌ها روی این داربست‌ها توانستند مارکرهای مربوط به نورون را هم در سطح RNA و هم در سطح پروتئین بیان کنند (۵).

علاوه بر تأثیری که خود داربست‌ها لیفی بر روی رفتار سلولی می‌گذارند، قطر الیاف نیز در چگونگی پاسخ سلول‌ها به داربست تأثیرگذارند. برای مثال قانیان و همکارانش با بررسی رفتار تمایزی ESCs به سمت اندورم بر روی داربست‌های PCL تهیه شده با روش الکتروریسی در قطرهای متفاوت (۲۰۰، ۵۰۰، ۸۰۰، ۱۳۰۰) nm مشاهده کردند که سلول‌ها بروی الیافی با قطر ۲۰۰ nm در مقایسه با الیاف دیگر بیش‌تر به سمت اندورم متمایز شدند (۲۰).

حتی استفاده از ماترکس ابریشمی تهیه شده با روش خودآرایی از ابریشم نوترکیب می‌تواند یک محیط کشت برای کشت طولانی‌مدت و تمایز iPSCs و ESCs فراهم کند و یک سیستم با ترکیب‌های مشخص و بدون استفاده از ترکیب‌های حیوانی^۱ را در اختیار سلول‌ها قرار دهد (۷۴).

روش‌های درمانی با PSCs در محیط *in-vivo* در سیستم عصبی مرکزی مثل آسیب‌های نخاعی و مغز تأیید شده است. ژل‌های قابل تزریق تهیه شده از هیالورونیک اسید و متیل-سلولز اصلاح‌شده با RGD و PDGF-A، برای انتقال iPSC انسانی به آسیب نخاعی موش، استفاده شد. زمانی که سلول‌ها به طور مستقیم به محل آسیب تزریق می‌شوند، باعث تشکیل تراتوما (۱۰۰٪ در حیوانات) و زندهمانی کم می‌شوند. زمانی که آن‌ها را همراه با هیدروژل به محل تزریق می‌کنند، اغلب آن‌ها توانایی تمایز به سمت فنوتیپ گلیال را دارند اما هم‌چنان در

^۱ Xeno-free

در مطالعه‌ای با استفاده از پلی‌مرهای به‌طور ذاتی رسانا، ساختار نانولیفی با هدایت الکتریکی تهیه شد و تأثیر ترکیب ساختار نانولیفی و تحریک‌های الکتریکی بر روی فتوکروموسیتوما ۱۲ (PC12) رت و نورون‌های هیپوکامپ بررسی شد. مش‌های هادی در این مطالعه با رشد PPy بر روی الیاف منظم و تصادفی PLGA الکترورسی شده، تهیه شد و مشاهده شد که الیاف هادی در مقایسه با نمونه کنترل باعث رشد و تمایز سلول‌ها شدند و به‌نظر می‌سد الیاف PPy-PLGA داربست مناسبی برای بافت عصب باشد. از طرفی مطالعه‌هایی که بر روی تحریک‌های الکتریکی اعمال شده بر این داربست‌ها انجام شد، نشان داد که اعمال پتانسیل در حد 10 mV/cm بر داربست PPy-PLGA، نسبت به داربست‌های بدون تحریک الکتریکی، باعث $40\%-50\%$ افزایش طول نورون‌ها و $40\%-90\%$ تشکیل بیش‌تر نورون‌ها شد (شکل ۷). هم‌چنین مشاهده شد طول نورون‌ها و تعداد نورون‌ها تشکیل شده، بر روی الیاف منظم بیش‌تر از الیاف تصادفی و نامنظم است (۴۰).

علاوه‌بر تحریک‌های الکتریکی، تحریک‌های الکترومغناطیسی (EM) نیز می‌تواند 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 پروتئین‌ها، لیپیدها، نوکلئیک‌اسیدها و یون‌های آزاد موجود در داخل سلول و حرکت ظریف آن‌ها باعث ایجاد میدان الکتریکی متغیر و به تبع آن تغییر میدان مغناطیسی می‌شود، به‌همین ترتیب تغییرهای میدان مغناطیسی میدان الکتریکی تولید می‌کند. غشاء سلولی کاندیدای اصلی منبع تولید سیگنال‌های EM است. این خاصیت غشاء به‌علت تبادل یون‌ها از داخل آن است. علاوه بر غشاء سلولی، سایتواسکتون-ها هم شامل اجزای قطبی است. سلول‌های زنده نه‌تنها سیگنال‌های EM را عبور می‌دهد بلکه می‌توانند آن را از محیط اطراف جذب کنند. تحقیقات نشان داده است که تکثیر و تمایز سلول‌ها تحت میدان EM تغییر می‌کند (۵۳). در مطالعه‌ای در سال ۲۰۱۱ مشخص شد که اعمال میدان EM به‌مدت ۲۱ روز با شرایط (۱۵ Hz و ۵ mT) به سلول‌های بنیادی مزانکایمال (MSC) انسانی باعث افزایش بیان کلاژن نوع □ و اجزای GAG محیط کشت می‌شود و باعث تمایز

باتوجه به این‌که سلول‌های عصبی، عضلانی، فیبروبلاست و استئوبلاست در بدن بیش‌تر تحت تحریکات الکتریکی هستند، می‌توان با استفاده از این سیگنال‌های الکتریکی سلول‌ها را به سمت سلول‌های قلبی و عروقی و عصبی تمایز داد (۲۱). برای ایجاد خواص الکتریکی در زمینه‌های پلی‌مری می‌توان از دو استراتژی استفاده کرد. یا نانساختارهای رسانا مثل نانوذره-های فلزی (نقره یا طلا) یا نانساختارهای کربنی (نانولوله‌ها، گرافن، نانوالیاف و ...) را داخل پلی‌مر قرار داده می‌شود (۶۹). یا از پلی‌مرهای به‌طور ذاتی رسانا (مثل پلی‌استیلن (PA)، پلی-پایرول (PPy)، پلی‌تیوفن (PT)، پلی‌انیلین (PANI) و ...) استفاده شود (۷،۳۲).

نانولوله‌های کربنی (CNT) به‌علت استحکام مکانیکی، رسانایی الکتریکی بالا و نسبت ابعادی زیاد، به‌عنوان افزودنی ایده‌آل به حساب می‌آید (۱۳). البته قرار دادن نانساختار کربن خالص داخل یک داربست سه‌بعدی کار دشواری است. در مطالعه‌ای که در سال ۲۰۱۷ انجام شد، نانولوله‌های کربنی برای تنظیم عوامل مکانیکی و الکتریکی کنام سلول بنیادی، وارد جسم جنینی موشی شد. این نانولوله‌ها توانستند انسجام مکانیکی و هدایت الکتریکی جسم جنینی را افزایش دهند. با بررسی بیان ژن‌های پرتوانی و اندازه جسم جنینی مشاهده شد که افزودن نانولوله‌های کربنی باعث کاهش تکثیر و افزایش نرخ تمایز سلول‌ها شدند. هم‌چنین به‌طرز عجیبی مشاهده شد که در روز پنجم کشت، تمایز قلبی نمونه‌های تقویت شده با نانولوله‌ها نسبت به نمونه‌های کنترل، تمایز قلبی بیش‌تری داشته‌اند (شکل ۶). از طرفی نشان دادند که با اعمال تحریک‌های الکتریکی به جسم جنینی تقویت شده با نانوالیاف، می‌توان تمایز قلبی را افزایش داد و تپش جسم جنینی را بهبود بخشید (۱).

استفاده از پلی‌مرهای به‌طور ذاتی رسانا به‌علت عدم توانایی آن‌ها در رسیدن، اغلب در ترکیب با یک پلی‌مر دیگر استفاده می‌شوند. استفاده از پلی‌مر دوم هم به این پلی‌مرها قابلیت رسیدن می‌دهد و هم‌زیست‌سازی آن‌ها را بهبود می‌بخشد. از طرفی امکان کنترل خواص الکتریکی پلی‌مر حاصله نیز وجود دارد. ترکیب این پلی‌مرها با پلی‌مر دیگر، به دو صورت تهیه محلول کامپوزیتی، یا پوشش انجام می‌گیرد. استفاده از پلی‌مر دوم به‌عنوان پوشش اغلب به‌صورت الکترورسی به شکل هسته-پوسته انجام می‌گیرد (۴۰).

پلی مرهای حساس به دما جزء رایج ترین سیستم های هوشمند به حساب می آیند. این پلی مرها با یک دمای بحرانی مشخصه-یابی می شوند که در آن دما، فاز پلی مر یا محلول پلی مری دچار تغییر می شود. در این دسته از پلی مرها عبور از دمای بحرانی می تواند باعث افزایش یا کاهش حلالیت پلی مر مربوطه گردد. می توان دمای بحرانی این پلی مرها را با افزودن گروه های هیدروفوبیک و هیدروفیلیک تغییر داد. یکی از رایج ترین پلی مرهای حساس به دما، PNIPAAm است که دمای بحرانی آن نزدیک بدن است. پلی مر دیگر PDEAAm است که دمای بحرانی آن ۲۵-۳۵ درجه سانتی گراد است (۲۹).

همان طور که قبل هم توضیح داده شد، می توان با اعمال میدان الکتریکی و میدان مغناطیسی به بیومتریال ها آن ها را کنترل کرد و از طریق کنترل آن ها بر سرنوشت سلولی تأثیرگذار بود.

نتیجه گیری:

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

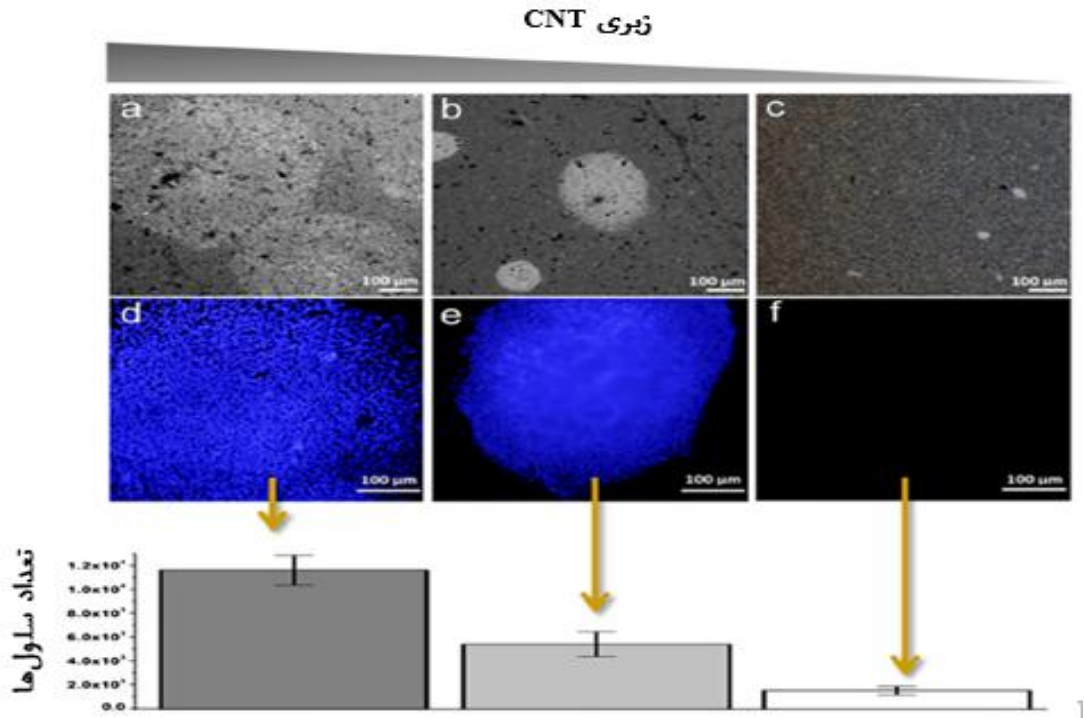
SCs به سمت غضروف می گردد (۵۰). در مقابل در مطالعه ای دیگر محققان نشان دادند که اعمال میدان EM با شرایط ۵۰ Hz و ۱ mT به MSCs انسانی باعث افزایش بیان مارکرهای عصبی و تمایز به سمت سلول های عصبی می شود (۵۳). حتی با اعمال میدان EM به صورت روزانه و با طول پالس ۳۰۰ μs و ۷/۵ Hz به همین سلول ها، می توان تمایز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

۳. بیومتریال های هوشمند

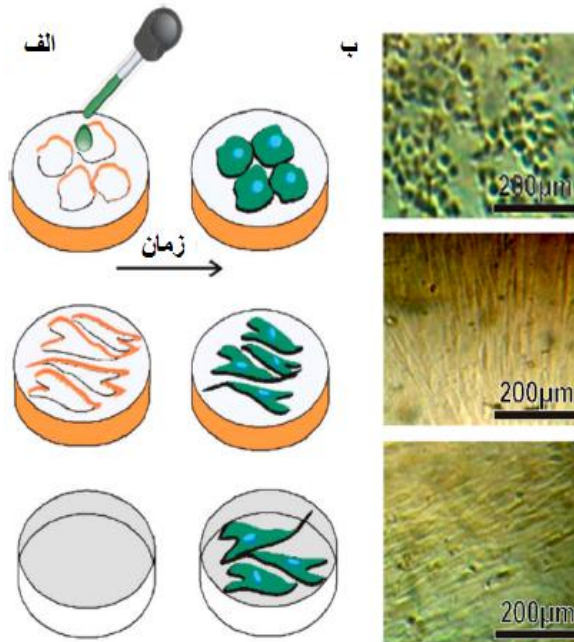
بیومتریال هایی که با تحریک خارجی فعال می شوند در حوزه طب بازساختی بسیار مورد توجه واقع شده اند. این مواد می توانند با اعمال مواردی مثل نور، دما، مغناطیس، الکتریسیته، pH و ... دچار تغییرهایی شوند. از این مواد می توان برای رهایش فاکتورهای محلول، تغییر شکل بافت، کپسوله کردن سلول و ... استفاده کرد (۵۰).

نور یک عامل محرک مناسب برای پلی مرهای حساس به نور است. این دسته از پلی مرها 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 می شود. از پلی مر این مولکول برای پوشش زمینه های کشت سلول های بنیادی برای رهایش فیبرینوژن، پلاکت و MSCs استفاده می شود. هم چنین این ماده می تواند به عنوان سطح کشت حساس به نور عمل کند، که در حضور نور UV باعث بهبود اتصال سلولی به سطح می شود و به صورت برگشت پذیر با اعمال نور مرئی و آنیل کردن حرارتی، سلول ها از سطح جدا می شوند (۱۴).

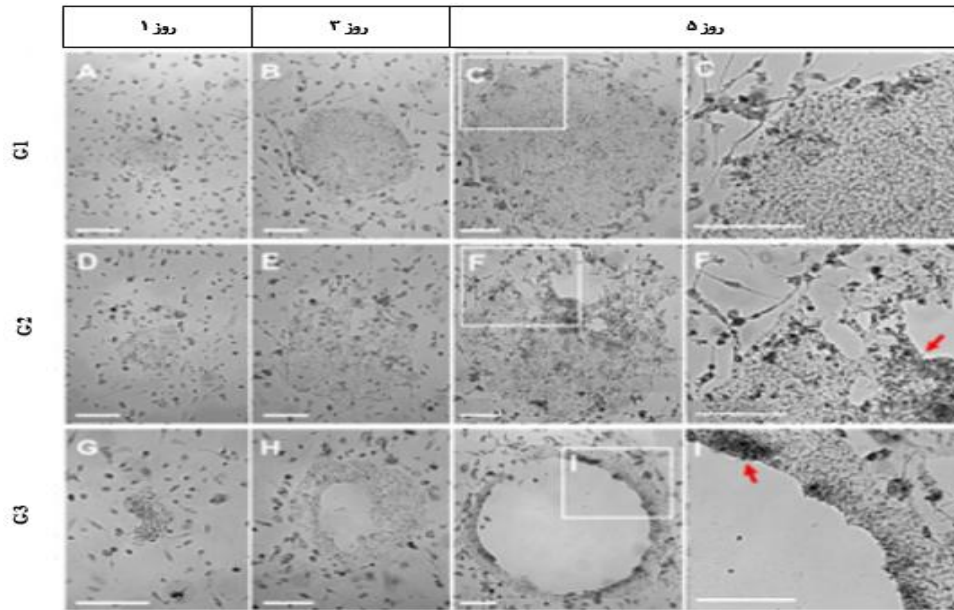
همچنین قابل ذکر است که برای مهندسی بیومتریالها در کشت و تمایز سلولهای بنیادی، ابتدا باید توجه شود چه هدفی مدنظر است، سپس کنامی که سلول در آن توانایی رسیدن به آن هدف را دارد شناسایی شود و سعی شود تا حد امکان شرایطی مشابه آن برای سلول فراهم شود. یا توجه به اینکه عوامل بسیار زیادی در سرنوشت سلول دخیل هستند، 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 بیماریها استفاده کرد، به مطالعه‌های پیش‌تری نیاز است.



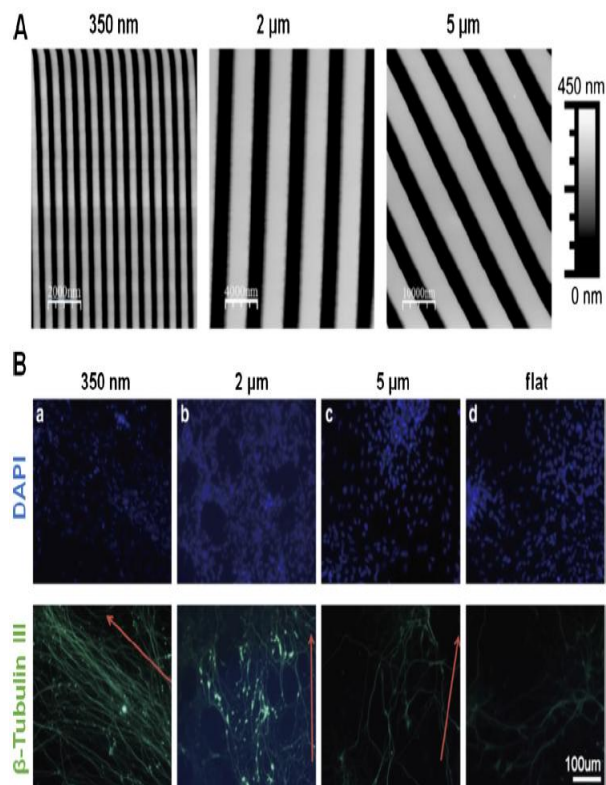
شکل ۱. IPSCs موشی کشت داده شده بر روی سطوح CNT با زبری‌های متفاوت. (a-c) کنتراست فازی و (d-f) رنگ آمیزی هسته‌ی Hoechst. بعد از ۱۲۰ ساعت کشت، سطوح با زبری بالا رشد بالای سلول‌ها، سطوحی با زبری متوسط تشکیل کلونی‌هایی با گسترش محدود و سطوح با زبری کم هیچ چسبندگی را بعد از ۳۶ ساعت نشان نمی‌دهند. نمودار نیز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



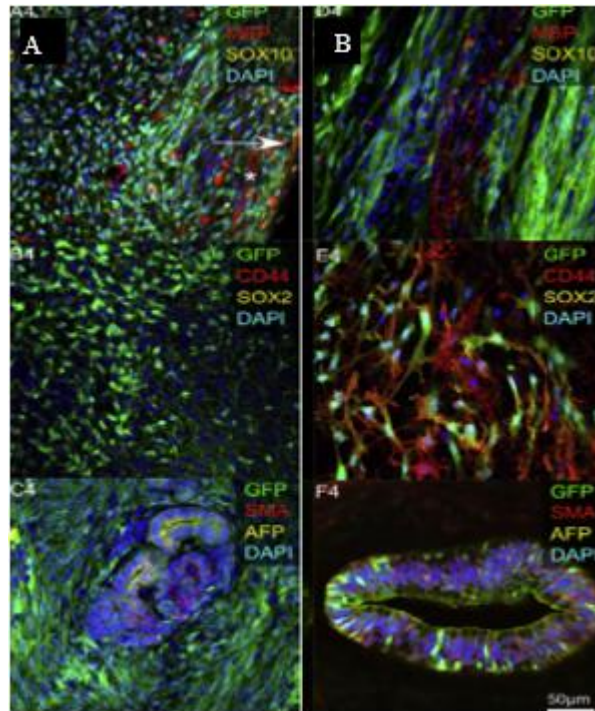
شکل ۲. ایجاد مورفولوژی سلول‌های تمایزی بر روی سطوح شکل‌پذیر و کشت سلول‌های بنیادی بر روی آن برای هدایت تمایز سلول به سمت رده خاص. (الف) شکل شماتیکی از تغییر تمایزی یک نوع سلول بنیادی بر روی سطوحی با توپوگرافی متفاوت. (ب) تصاویر SEM به‌دست آمده از سلول‌های تمایز یافته بعد از کشت بر روی این سطوح (۴۷).



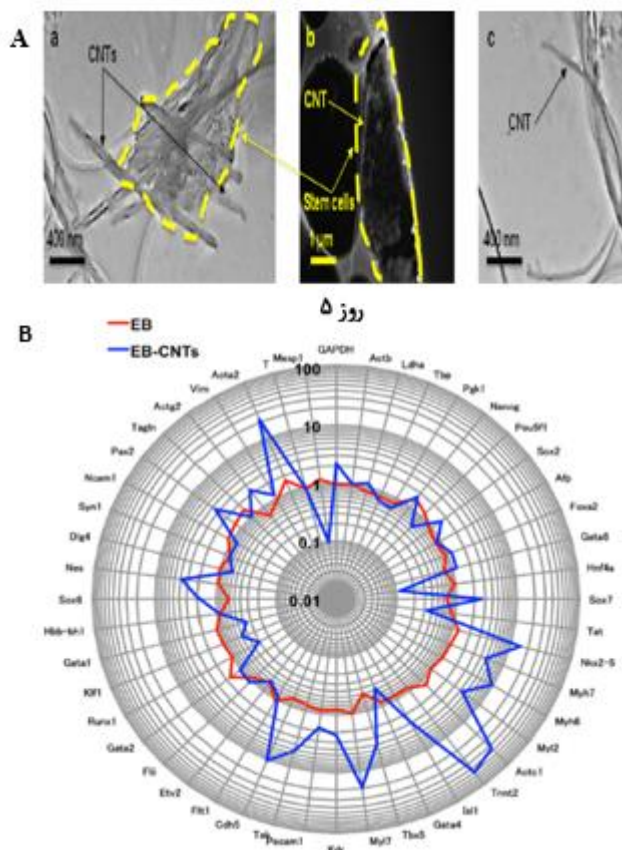
شکل ۳. مورفولوژی و پرتوانی iPSCs انسانی کشت داده شده بر روی زمینه‌های حاوی دندیرمر با نسل‌های متفاوت (G1، G3 و G5). تصویر نوری سلول‌ها در طول ۵ روز از کشت. سلول‌های آپتوز کرده با فلش قرمز مشخص شده‌اند (۳۸).



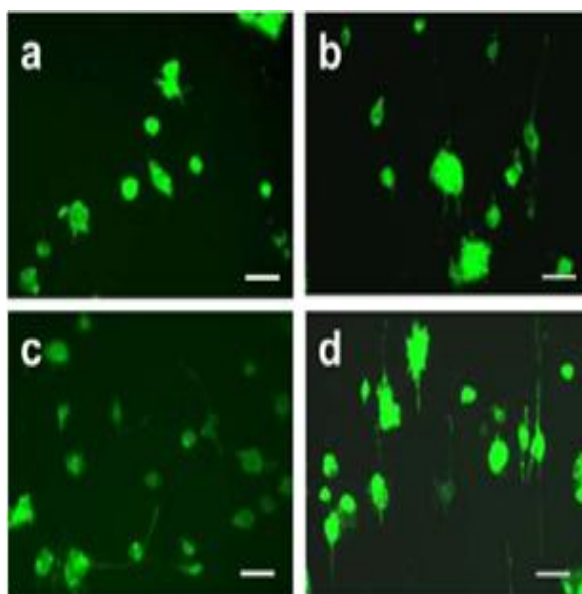
شکل ۴. بررسی تأثیر نانو/میکرو شیارها بر روی تمایز عصبی iPSCs انسانی. (A) تصویر AFM زمینه‌های متفاوت. (B) تصویر ایمونواستینینگ iPSCs انسانی کشت داده شده بر روی سطوح متفاوت برای ۷ روز که نشان‌دهنده beta-III-tubulin با رنگ سبز و جهت‌گیری‌ها با رنگ قرمز است (۵۲).



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



شکل ۶. وارد کردن CNTs داخل جسم جنینی برای تغییر رفتار تمایزی آن از طریق تحریک الکتریکی. (A) تصویر TEM از جسم جنینی تغییر یافته. (B) بررسی بیان ژن با تکنولوژی بالا برای مقایسه رفتار تمایزی جسم جنینی طبیعی و جسم جنینی همراه با CNTs (۱). (۱)



شکل ۷. تحریک‌های الکتریکی PC12 از طریق PPy-PLGA (PPy-RF و PPy-AF) در ۰ و ۰.۱ mV/cm (a) و PPy-RF تحریک نشده. (b) PPy-RF در ۰.۱ mV/cm (c) و PPy-AF بدون تحریک و در ۱۰ mV/cm (d). (۴۰)

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, Haghhighipour 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, Haghhighipour 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. Haghhighipour 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, Haghhighipour 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, Haghhighipour 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, Haghhighipour 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, Haghhighipour 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, Haghhighipour 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, Haghhighipour 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-Shadpour 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, Haghhighipour 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 electrospaying for neural tissue regeneration. *Nanomedicine Nanotechnology, Biol Med*. 2015; 11:693–704.

