Medical Journal of Tabriz University of Medical Sciences and Health Services
Vol. 35, No. 5, Dec. – Jan. 2013, Pages: 82-87

Preparation of Electrospun Nanofibrous PLGA / Gelatin for Tissue Engineering

Marziyeh Hedayati[1], Shiva Irani[1], Mojgan Zandi[2], Seyed Mahdi Saeed[2], Seyed Mohammad Atyabi[3*]

[1]Department of Biology, Science and Research Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran
[2]Department of Biomaterial, Iran Polymer and Petrochemical institute, Tehran, Iran
[3]Department of Pilot Biotechnology, Pasteur Institute of Iran, Tehran, Iran

Received: 15 Feb, 2013 Accepted: 11 Apr, 2013

Abstract

Background and Objectives: The tissue engineering with possible opportunity for repairing, replacing, maintaining, or improving the function of damaged tissue or organ had made a promising approach for treating human life quality. Nano-fibrous electrospun substrates which provide three dimensional substrate can mimic the extra cellular matrix to support the growth of cells. Combination of natural and synthetic polymers improves the strong signaling pathways and also proper cell behavior on the scaffold. In this study nano fibers were prepared with gelatin, PLGA and Gelatin/PLGA via electrospinning; and the cell growth and proliferation of fibroblast L929 on these scaffolds were evaluated. Gelatin was used to improve the biological property of the PLGA nanofibers.

Materials and Methods: After making the Nano-fibers the SEM was used to take some to take some photos, then growth of fibroblast cells was analyzed using the SEM and reverse microscopics.

Results: Microscopic images showed that the first 24 hours of cell culture, cells behaved similarly in the three scaffolds but After 72 hours; the Gt/PLGA nanofibers provided a better substrate for adhesion and proliferation. While gelatin Nano-fibers had less growth rate after 72 hours. Also these results were confirmed by SEM.

Conclusion: PLGA/Gt nanofiber due to activation of signaling pathways relevant in adhesion protein expression and replication are suitable for tissue engineering. This behavior may be very similar to the natural structure of the extracellular matrix.

Keywords: Nano fiber, Electrospun, GT, PLGA/ GT

*Corresponding author:
E-mail: mohammadatyabi@yahoo.com

مقاله پژوهشی

تهیه نانوفیبرهای الکتروریسی شده ژلاتین/ PLGA جهت مهندسی بافت

مرضیه هدایتی: دانشگاه آزاد اسلامی، واحد علوم و تحقیقات تهران، دانشکده علوم پایه، مرکز تحقیقات مهندسی زیست فناوری، گروه زیست شناسی، تهران، ایران
شیوا ایرانی: دانشگاه آزاد اسلامی، واحد علوم و تحقیقات تهران، دانشکده علوم پایه، مرکز تحقیقات مهندسی زیست فناوری، گروه زیست شناسی، تهران، ایران
مژگان زندی: پژوهشگاه پلیمر و پتروشیمی ایران،گروه بیومتریال، تهران، ایران
سیدمهدی سعید: پژوهشگاه پلیمر و پتروشیمی ایران،گروه بیومتریال، تهران، ایران
سیدمحمد اطیابی: انستیتوپاستور ایران، گروه فن آوریهای نوین، بخش پایلوت بیوتکنولوژی، تهران، ایران، نویسنده رابط:
E-mail: mohammadatyabi@yahoo.com

دریافت: ۹۱/۱۱/۲۷ پذیرش: ۹۲/۱/۲۲

چکیده

زمینه و اهداف: مهندسی بافت با هدف ترمیم، جایگزینی، حفظ و بهبود عملکرد بافت و یا اندام آسیب دیده، امیدهای تازه ای را در درمان بشر بوجود آورده است. نانوفیبرهای الکتروریسی شده، با فراهم آوردن یک محیط سه بعدی، در تقلید از ماتریکس خارج سلولی طبیعی بدن، نقش حمایت از رشد سلول ها را بر عهده دارند. پلیمرهای طبیعی در ترکیب با پلیمرهای سنتزی، با راه اندازی مسیرهای پیام رسانی قوی تر، می توانند سبب بروز رفتار سلولی مناسب شوند.

مواد و روش‌ها: در این پژوهش، نانوفیبرهایی از ژلاتین (GT) و کوپلیمر لاکتیک و گلیکولیک اسید ترکیب شده با ژلاتین (GT/PLGA)، با روش الکتروریسی تهیه گردید و رشد و تکثیر سلول های فیبروبلاست L929 بر روی این دو نوع داربست مقایسه گردید. از ژلاتین، بمنظور بهینه کردن ساختار نانوفیبر تهیه شده از PLGA استفاده شد. پس از ساخت نانوفیبرها، با استفاده از میکروسکوپ الکترونی (SEM)، تصاویری از آنها تهیه گردید. رشد سلول‌های فیبروبلاستی بر روی این داربست ها با میکروسکوپ معکوس و الکترونی مورد مطالعه قرار گرفت.

یافته ها: تصاویر میکروسکوپی در ۲۴ ساعت پس از کشت، رفتار سلولی تقریبا یکسانی را بر روی هر دو داربست نشان داد، اما با ادامه ی کشت تا ۷۲ ساعت، نانوفیبرهای ژلاتین PLGA/توانستند بستر مناسب تری جهت تکثیر سلولی فراهم کنند. نانوفیبرهای GT، در ۷۲ ساعت کمترین میزان رشد سلول را نشان دادند. این یافته ها نیز، با میکروسکوپ الکترونی، مورد تایید واقع شد.

نتیجه گیری: نتایج این پژوهش نشان داد که نانوفیبرهای تهیه شده از ژلاتین/ PLGA بدلیل برانگیختن مسیرهای پیام رسانی دخیل در حیات و رشد سلول عملکرد بهتری را نشان دادند.

کلید واژه ها: نانو فیبر، الکتروریسی، ژلاتین، کوپلیمرلاکتیک وگلیکولیک اسید/ژلاتین

مقدمه

مهندسی بافت روشی بر پایه‌ی سلول درمانی بمنظور جایگزینی یا بهبود عملکرد بافت آسیب دیده است. در مهندسی بافت ابتدا یک ماده متخلخل به عنوان داربست برای رشد سلول‌ها تهیه شده و سپس عوامل رشد بر روی آن قرار می‌گیرند (۳-۱).
پلیمرهای طبیعی و مصنوعی می توانند به عنوان بستری جهت رشد سلولی بر روی آن ها در مهندسی بافت بکار روند. پلیمرهای مورد استفاده باید ویژگی زیست سازگاری و زیست تخریب پذیری را دارا باشند (۶-۴). پاسخهای بیولوژیکی بیشتر توسط ساختار و شیمی سطح بسترها کنترل می شود. بنابراین اصلاح سطح داربست پلیمری با حفظ خواص فیزیکی و مکانیکی پلیمر اهمیت بسزایی دارد (۷). از آنجاکه رفتار سلول تابع دو عامل مهم ژنوم و محیط است، می توان شرایط را برای بیان پروتئین‌های دخیل در رشد سلول، به نحو مؤثری فراهم ساخت. واکنش سلول با ماتریکس خارج سلولی، سلول با سلول و سلول با فاکتورهای محلولی همچون فاکتور رشد (GF) همگی از عوامل دخیل در رشد سلول می باشند (۹و۸). در میان این سه عامل، واکنش سلول

با ماتریکس خارج سلولی از اهمیت ویژه ای برخوردار است. از این رو در مهندسی بافت داربست در نقش ماتریکس خارج سلولی، عمل کرده و به حمایت از رشد سلول می پردازد. هر چقدر ساختار داربست به ساختار ماتریکس طبیعی نزدیک تر باشد، شانس موفقیت داربست در ایجاد رفتار سلولی مناسب نیز، بیشتر است (۱۲-۱۰). بر اساس اطلاعاتی که از مسیرهای پیام رسانی سلولی وجود دارد، می توان لیگاندهایی را بر روی بستر در نظر گرفت که رسپتورهای آن در سطح سلول وجود دارند. این کار سبب افزایش تمایل سلول به سطحی که بر روی آن قرار گرفته، می شود و به دلیل واکنش با لیگاند مورد نظر، پاسخ های قوی تری را ارائه می دهد که در این میان پروتئین های موجود در ماتریکس طبیعی بدن گزینه مناسبی برای رسیدن به هدف است (۱۴و۱۳). ژلاتین یک پلیمر طبیعی جاذب آب است و می‌تواند به نرم کردن و منعطف سازی داربست کمک کند. همچنین به دلیل زیست سازگاری بسیار بالای ژلاتین، حضور این پلیمر در داربست می‌تواند در چسبندگی سلول بر روی داربست نقش مؤثری داشته باشد (۱۶و۱۵).

نانوفیبرها انتخاب مناسبی برای ایفای نقش ماتریکس خارج سلولی طبیعی در شرایط آزمایشگاهی هستند. در سالهای اخیر نانوفیبرهای الکتروریسی شده، به دلیل نزدیک بودن ساختار آن ها با ساختار فیبری بافت های بدن و ماتریکس خارج سلولی و همچنین سطح موثر بسیار بالا برای چسبندگی و رشد سلول ها، مورد توجه زیادی قرار گرفته‌اند و مطالعات بر روی این داربست‌ها بسیار گسترش یافته است. روش ریسندگی الکتریکی پر کاربردترین روش ساخت نانوفیبرها است. در ریسندگی الکتریکی محدودیت برای نوع پلیمر وجود ندارد و برای انواع پلیمرها به کاربرده می شود و بدین ترتیب بسیار متنوع است. این تنوع به محققین کمک می‌کند تا براساس هدف مورد نظر خود بستر مناسب را به کار برند. از مزیت های عمده الکتروریسی، انعطاف پذیری بالا، سهولت تهیه، تنوع بسترهای پلیمری (آلی، آبی)، تخلخل بالا و وضوح فیبر از داربست به دست آمده می باشد. محققین با اعمال تغییرات در شرایط فرآیندی، محلولی و حتی محیطی مانند تغییر در شدت جریان خروج محلول از سرنگ، فاصله صفحه جمع کننده تا سرنگ و یا مقدار ولتاژ، توانسته اند اندازه حفرات در این نوع داربست ها را تغییر دهند (۲۳-۱۷).

در این پژوهش، کوپلیمر لاکتیک و گلیکولیک اسید (PLGA) به عنوان یک پلیمر سنتزی زیست سازگار که محصولات تخریب آن لاکتیک اسید و گلیکولیک اسید است و به طور کامل قابل دفع در بدن می‌باشند، استفاده شد. همچنین نانوفیبری مرکب از PLGA و GT تهیه شد تا تأثیر بهینه کردن داربست با پلیمرهای طبیعی مورد بررسی قرار گیرد.

مواد و روش‌ها

ساخت نانوفیبرهای GT و ژلاتین/ PLGA با روش الکتروریسی:

برای تهیه محلول ۸٪ PLGA/GT و ۸٪ ژلاتین، هر یک جداگانه در تری فلئور اتانول (TFE) با استفاده از تکان دهنده مغناطیسی در دمای اتاق (۲۵ درجه سانتی گراد) تهیه شده و به نسبت ۱:۱ مخلوط شدند. و برای محلول، پلیمرهای PLGA و GT در تری فلئور اتانول در نسبت ۱:۱ مخلوط شد و سپس حل شدند. جهت ساخت فیبرها از دستگاه الکتروریسی مدل CO881007NYI ساخت شرکت نانو ساختار آسیا کشور ایران که در پژوهشگاه پلیمر و پتروشیمی ایران موجود است، استفاده شد. قطر سرنگ ۵ میلی متر، سرعت جریان ۱ میلی لیتر/ساعت و ولتاژها به ترتیب ۲۲ و ۲۵ و ۲۵ کیلوولت در نظر گرفته شد. فیبرها هر یک، در سه مرحله جداگانه بر روی ورق های آلومینیومی که فاصله سرنگ تا آن ۱۸۰ میلی متر بود جمع آوری شدند. جنس سرنگ استیل ضد زنگ می باشد. سرعت تزریق برای هر ۳ داربست مختلف، ۲۵۰ دور در ساعت بود که برای جمع آوری نانوفیبرها استفاده شد. پس از تهیه نانوفیبرها، به منظور بررسی مورفولوژی و مقایسه ساختار آنها با یکدیگر، پس از پوشش آنها با لایه ای از طلا، عکسبرداری با میکروسکوپ الکترونی (Hitachi S3000N) در ولتاژ ۱۵ kV انجام شد.

استریل کردن داربست ها: پس از مرحله سنتز، داربست ها در اندازه های ۱×۱ سانتی مترمربع بریده شده و به مدت ۳ ساعت در معرض بخار گلوتار آلدئید قرار گرفت. سپس درون ظرف های استریل هر دو سمت داربست ها به کمک اشعه فرابنفش (UV) به مدت ۲۰ دقیقه استریل شد.

کشت سلول: فلاسک های ۲۵ سانتی مترمربع حاوی سلول فیبروبلاستی L929 از انیستیتو پاستور ایران خریداری شد. این سلول ها در محیط RPMI-1640 (Gibco) حاوی ۱۰٪ سرم (FBS, Gibco) و محلول آنتی بیوتیک آنتی مایکوتیک ۱۰۰x(Sigma، ۱۰۰۰۰ واحد پنی سیلین، ۱۰ میلی گرم استرپتومایسین و ۲۵µg آمفوتریسین در هر میلی لیتر)، در انکوباتور Co_2 با رطوبت ۹۵٪ و دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد، نگهداری شد. هر ۴۸ ساعت محیط کشت سلول ها تعویض گردید.

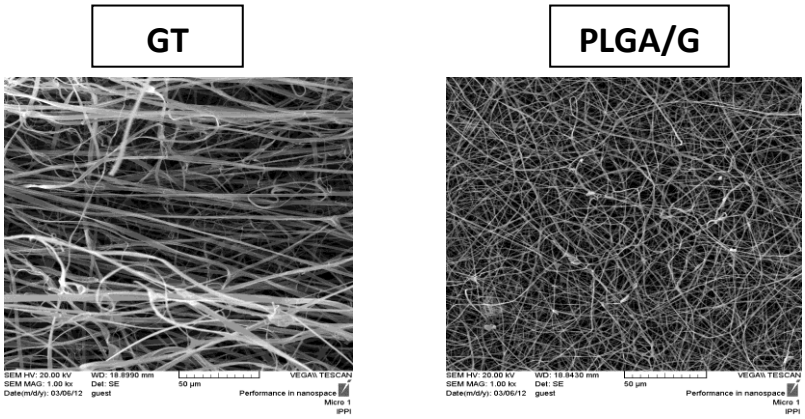
بررسی رشد سلول بر روی نانوفیبرها: به منظور بررسی زیست سازگاری و رشد سلول ها بر روی داربست ها، از سلول های فیبروبلاستی رده L929، استفاده شد. زمانیکه تراکم سلول ها در فلاسک کشت سلول به حد قابل قبول رسید، با استفاده از محلول تریپسین ۰.۲۵٪-EDTA ، سلول ها از ظرف کشت سلول جدا شده و پس از شمارش، به تعداد$۱۰^۳$ ×۵ سلول در هر چاهک، درسه پلیت ۲۴ خانه متفاوت برای ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت که از قبل داربست های استریل یک سانتی متر مربع در آن قرار داشت، کشت داده شد. به منظور رشد سلول بر روی داربست ابتدا سوسپانسیون سلولی با حداقل مقدار محیط کشت بر روی داربست قرار داده شد و بمدت دو ساعت در انکوباتور ۳۷C° گذاشته شد سپس محیط حاوی ۱۰٪ سرم به میزان ۱ میلی لیتر به هر خانه اضافه شد. روند رشد و تکثیر سلولی بر داربست ها توسط میکروسکوپ معکوس (BELL, INV-100FL)، با بزرگ نمائی x200 مشاهده و عکسبرداری شد.

میکروسکوپ الکترونی: بمنظور اثبات حضور سلول ها بر روی نانوفیبرها و مقایسه میزان رشد و گسترش سلول ها، تصاویری با میکروسکوپ الکترونی (Hitachi S3000N) در ولتاژ ۱۵ kV تهیه شد. به همین منظور پس از خارج کردن محیط کشت و شستشوی داربست ها با محلول بافر فسفات نمکی(PBS)، داربست ها در گلوتارآلدئید ۲٪ بمدت ۱ ساعت قرار گرفتند. سپس در غلظت های ۳۰، ۵۰، ۷۰، ۹۰ و۱۰۰ درصد اتانول بمدت ۱۵ دقیقه برای هر درصد، آبگیری شدند. بعد از این مرحله نمونه ها با لایه‌ای از طلا پوشانده شد و با میکروسکوپ الکترونی تصویربرداری انجام شد.

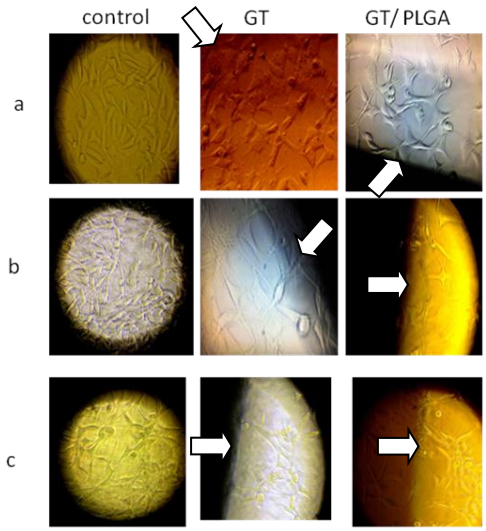
یافته‌ها

مورفولوژی نانوفیبرها: پس از تهیه داربست ها و پوشش دهی آنها با لایه ای از طلا، بمنظور بررسی مورفولوژی و مقایسه ساختار فیبرها با یکدیگر، به کمک میکروسکوپ الکترونی، تصاویری تهیه شد (شکل۱). تصاویر نشان می دهد که ساختارهای نانوفیبری متفاوتی در استفاده از ژلاتین به تنهایی و PLGA/ ژلاتین با یکدیگر، به دست می آید که هر ساختار می تواند تأثیر متفاوتی در رشد سلول داشته باشد.

رشد سلول ها بر روی نانوفیبرها: تصاویر میکروسکوپ معکوس، زیست سازگاری نانوفیبرها را تأیید کرد و در مورد هر سه داربست در ۲۴ ساعت پس از کشت، جهت گیری و تمایل سلول ها به سمت آنها مشاهده گردید. اما با ادامه کشت در ۴۸ و ۷۲ ساعت، در میان داربست ها، نانوفیبر ژلاتینPLGA/ افزایش میزان رشد و جهت گیری سلول ها را نشان داد. این درحالی بود که داربست ژلاتین کاهش میزان رشد را داشته و دارای کمترین جهت گیری سلول ها در ۷۲ ساعت پس از کشت بود.



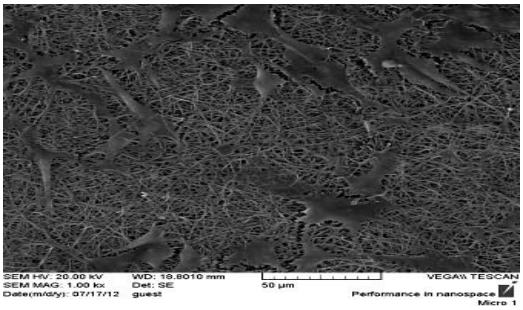
شکل۱: تصاویر حاصل از میکروسکوپ الکترونی از داربست های GT، ژلاتین/ PLGA



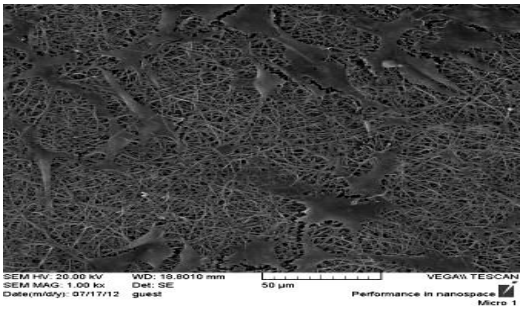
شکل ۲:نمایش رشد سلول بر روی داربست های ژلاتین و ژلاتینPLGA/ پس از (a) ۲۴، (b) ۴۸ و (c) ۷۲ ساعت. مناطق تیره ای که با پیکان مشخص شده اند، داربست ها هستند. این تصاویر رشد و تمایل سلول ها را به سمت داربست ها نشان می دهد

میکروسکوپ الکترونی: به منظور بررسی رشد سلول بر روی داربست از میکروسکوپ الکترونی استفاده شد. نتایج بدست آمده تائید کننده داده های حاصل از بررسی میکروسکوپ نوری بود و نشان داد که داربست های ژلاتینPLGA/ شرایط مناسب تری را برای رشد و تکثیر سلولی ایجاد کرده اند. شکل ۳ تصویر تهیه شده از رشد وگسترش سلول های فیبربلاستی را بر روی نانوفیبرها در ۷۲ ساعت پس از کشت نشان می دهد. گسترش سلول ها بر روی نانوفیبر ژلاتینPLGA/ به خوبی مشخص است.

PLGA/ GT



GT



شکل ۳: میکروگراف الکترونی از رشد سلول‌های فیبربلاستی بر روی نانوفیبرهای الکتروریسی شده

بحث

روش های رایج در درمان اندام از دست رفته به خوبی عمل نمی کنند و مهندسی بافت در این راستا امیدهای تازه ای را بوجود آورده است. در این رویکرد، از داربست های پلیمری به عنوان بستری برای کاشت سلول ها و حمایت فیزیکی از آن ها و در نهایت، تشکیل اندام های جدید استفاده می شود (۳-۱). ژلاتین به عنوان یکی از پروتئین های اصلی در ماتریکس خارج سلولی طبیعی بدن، نقش مهمی در چسبندگی و رشد سلول ها ایفا می‌کند. این پلیمر طبیعی، انتخاب مناسبی برای ساخت داربست های مهندسی بافت محسوب می شود. با آنکه ژلاتین چسبندگی و رشد سلولی را بهبود می بخشد ولی به دلایل ناپایداری و عدم استحکام، به سرعت تخریب می شود (۹). پلی استری مانند PLGA نیز با آنکه دارای فاکتورهای ضروری مانند زیست سازگاری، قابلیت پردازش و سرعت تخریب قابل کنترل، خواص مکانیکی مطلوب و نیز پایداری بیشتری در مقایسه با پلیمر طبیعی همچون ژلاتین است. ولی خواص سطحی مطلوبی برای چسبندگی سلول ها فراهم نمی کند. به همین دلیل می توان یک پلیمر مناسب را به منظور بهبود خواص سطحی وارد ساختار آن کرد. مخلوط ژلاتین/ PLGA، بدلیل برقراری پیوندهای کوالانت بسیار قوی بین پلیمرها، ترکیب مناسبی برای ساخت داربست های مورد استفاده در مهندسی بافت می باشد (۲۲). اما روشی که برای ساخت این ترکیب به کار می رود نیز حائز اهمیت است. در این مطالعه، ابتدا سه داربست نانو فیبری از ژلاتین، PLGA و ژلاتینPLGA/ با روش الکتروریسی تهیه شد. روش الکتروریسی با انعطاف پذیری و قابلیت کنترل بالا، به تولید ساختارهایی می پردازد که می توانند به تقلید از ساختار نانوفیبری ماتریکس خارج سلولی طبیعی، پشتیبانی مؤثری برای سلول در شرایط آزمایشگاهی فراهم آورند. به منظور بررسی زیست سازگاری و رفتار سلولی بر روی داربست های تهیه شده، ازکشت سلول های فیبروبلاست بر روی داربست استفاده شد. سلول های فیبروبلاست بکار رفته در این تحقیق، بعد از کشت به سمت داربست ها کشیده شدند و شروع به چسبیدن به داربست کردند. نتایج نشان داد که داربست ها در ایجاد سیگنال قوی برای مهاجرت سلول‌ها به سمت آن و رشد و تکثیر بر روی داربست ها، خصوصا در ۲۴ ساعت پس از کشت، موفق عمل کردند. درادامه روند رشد تا ۷۲ ساعت، به ترتیب نانوفیبر ژلاتین، PLGA و ژلاتین/ PLGA کاهش رشد را نشان دادند. به نظر می رسد که ژلاتین بدلیل ناپایداری و سرعت تخریب بالا قادر به حمایت از سلول بمدت طولانی نبوده است. از طرفی PLGA به تنهایی بدلیل خصوصیات سطحی نامطلوب، نتایج قابل قبولی را نشان نداد. در نانوفیبر ژلاتین/ PLGA، ژلاتین موجب ارتقای خواص فیزیکی، شیمیایی و زیستی به همراه انعطاف پذیرتر کردن PLGA می شود و علاوه بر این، آب دوستی غشا را افزایش می دهد. این می تواند دلیل عملکرد بهتر داربست نانولیفی ژلاتین پیوند یافته باPLGA در مقایسه با دو داربست دیگر باشد. بنابراین ترکیب دو پلیمر ژلاتین و PLGA و نیز ساختار نانوفیبری داربست حاصل، بستری مناسب برای رشد سلول های فیبروبلاستی فراهم کرد. چندین مطالعه در گذشته، همانند یافته های حاصل از این مطالعه، به کار بردن پلیمرهای طبیعی را در بهینه کردن ساختار نانوفیبرهای تهیه شده از پلیمرهای مصنوعی را تأیید می کند. از جمله، در سال ۲۰۰۸، Munirah از گروه فیزیولوژی، دانشکده پزشکی، دانشگاه Kebangsaan مالزی و Kim از مدیریت پژوهش و فناوری، بر روی استفاده از داربست ترکیبی از فیبرین و کوپلیمر لاکتیک و گلیکولیک اسید در مهندسی بافت غضروف مفصل در محیط درون بدن (in vivo)، مطالعه کرده که در نتیجه، داربست هیبرید فیبرین و PLGA باعث ترویج تشکیل بافت غضروفی گردید. آنها دریافتند که این ترکیب می تواند به عنوان یک وسیله بالقوه حامل سلول و ساختاری پایه‌ای برای مهندسی بافت غضروف مفصلی به کار رود. در سال Ma۲۰۱۰ و همکاران (از مرکز مواد پزشکی و مهندسی، دانشگاه هاربین مهندسی) Wang (از گروه ارتوپدی، بیمارستان وابسته به دانشگاه علوم پزشکی هاربین) داربستی از PLGA با ترکیبات زیستی ژلاتین با روش الکتروریسی تولید کردند. در نهایت، داربست هایی که حاوی ژلاتین بوده با افزایش چسبندگی و تکثیر سلول به طور مؤثری در بازسازی استخوان نقش داشته اند (۲۵و۲۴).

نتیجه گیری

در این مطالعه داربست های ژلاتین/PLGA بمنظور مطالعه کاربرد در مهندسی بافت تهیه گردید. به دلیل تاثیر روش ساخت داربست بر روی رشد و تکثیر سلول روش الکترو ریسندگی جهت تولید نانو فیبر استفاده شد. نانو فیبر ساختار مشابه ماتریکس خارج سلولی ایجاد می کند که از این طریق می توان پیام مناسب

جهت دریافت پاسخ سلولی مناسب ایجاد کرد. نتایج حاصل از میکروسکوپ الکترونی نانو فیبرها نشان داد که نانو فیبرهای ژلاتین/ PLGA در ترکیب با هم ساختارهای متفاوتی ایجاد کردند این ساختارهای متفاوت در چسبندگی و تکثیر سلول متفاوت عمل می کند. نتایج حاصل از کشت سلول فیبربلاستی L929 نشان داد که نانو فیبر ژلاتین/PLGA به دلیل بالا بودن خواص مشترک PLGA و ژلاتین رشد سلولی مناسبتری را ایجاد کرده است بعلاوه تصاویر حاصل از میکروسکوپ الکترونی نانو فیبر سلول نیز حضور سلولها را بر روی نانو فایبر تایید کرد. داده های حاصل بیانگر این است که نانو فیبرهای تهیه شده از ژلاتین/PLGA بدلیل برانگیختن مسیرهای پیام رسانی دخیل در حیات و رشد سلول عملکرد بهتری را نشان دادند.

References

1. Chapekar MS. Tissue Engineering: Challenges and Opportunities. *J Biomed Mater Res Appl Biomater* 2000; **53**(6): 617–662.
2. Chen G, Ushida T, Tateishi T. Scaffold Design for Tissue Engineering. Macromol. *Bio Sci* 2002; **2**: 67-77.
3. Jefeson S. Cell and tissue engineering. IBN has filed over 1,168 patent applications on its inventions (2000); 20-25.
4. Holy E, Davies E, Shoichet S. Optimizing the sterilization of PLGA scaffolds for use in tissue engineering. *Biomaterials* 2001; **22**: 25-31.
5. Özgen C, Yıldız F. Electrospun nanofibrous scaffolds for tissue engineering. *Tissue Eng* 2007; **10:** 1510-1517.
6. Keira S, Ferreira L, Gragnani A. Experimental model for fibroblast culture. *Cell Physiol* 2004; **98**: 341-346.
7. Li W.J, Shanti R.M, Tuan R.S. Electro spinning Technology for Nanofibrous Scaffolds in Tissue Engineering. *Cell Biol* 2007; 136-177.
8. Li W.J, Laurencin C.T, Caterson E.J, Tuan R.S, Ko F.K. Electrospun Nanofibrous structure: A novel scaffold for tissue engineering. *J Biomed Mater Res* 2002; **60**: 614-620.
9. Mengyana Li, Guo Y, MacDiarmid AG, Lelkes PI. Electro spinning polyaniline-contained gelatin nanofibers for tissue engineering applications. *Biomaterials* 2006; **27**(13): 2705-2715.
10. Pham Q, Sharma U, Mikos AG. Electro spinning of Polymeric Nano fibers for Tissue Engineering Applications: A Review. *Tissue Engineering* 2006; **12**(5): 1197-1211.
11. Shattil SJ, Newman PJ. Integrins: dynamic scaffolds for adhesion and Signaling in platelets. *Blood* 2004; **104**(6): 1606-1615.
12. Wu Sh.C, Chang W.H, Dong Gu.C. Cell adhesion and proliferation enhancement by gelatin nanofiber scaffolds. *J Bioact Compat Polym* 2009; **24**: 158-166.
13. Li W, Sharama U, Frank kk. Effective control of cell behavior on conducting polymers. *Journal of biomedical materials research* 2009; **60**(4): 613-621.
14. Stevens M.M, George J.H. Exploring and Engineering the Cell Surface Interface. *SCIENCE* 2005; 310: 1135-1138.
15. Stupack D.G, Cheresh D.A. Get a ligand, get a life: integrin's, signaling and cell Survival. *Journal of Cell Science* 2007; **115**: 3729-3738.
16. Broussard JA, Webb DJ, Kaverina I. Asymmetric focal adhesion disassembly in motile cells. *Curr Opin Cell Biol* 2008; **20**: 85–90.
17. Lee T.C, Niederer P. Scaffolds & Surfaces. In: Basic Engineering for Medics and Biologists, An ESEM Primer on Engineering for Medicine, (Eds.) 2010; **152**: 187 (online).
18. Yoo S.J, Kim J, Lee C.S, Nam Y. Simple and Novel Three Dimensional Neuronal Cell Culture Using a Micro Mesh Scaffold. *Exp Neurobiol* 2011; **20**(2): 110-115.
19. Kumbar S.G, James R, Nukavarapu S.P, Laurencin C.T. Electrospunnanofiber scaffolds: engineering soft tissues. *Biomed Mater* 2008; **3**: 874–880.
20. Ratanavaraporn J, Damrongsakkul S. Comparison of Gelatin and Collagen Scaffolds for Fibroblast Cell Culture. *Journal of Metals, Materials and Minerals* 2006; **16**(1): 31-36.
21. Xie Z, Zhang X, Schwartz P. Biomedical Materials Based on Electrospun Polymeric Fibers. *Polymer* 2010; **50**: 2815.
22. Meng Z.X, Wang Y.S, Ma C, Zheng W, Li L, Zheng Y.F. Electrospinning of PLGA/gelatin randomly-oriented and aligned Nano fibers as potential scaffold in tissue engineering. *Materials Science and Engineering C* 2010; **30**: 1204–1210.
23. Mayne E. Cellular Signaling Immune System Communication. *Garland Science MBBCH* 2002; **2**: 203-241.
24. Schiff, Judith Ann. "An unsung hero of medical research." Retrieved 2006-04-19.Yale Alumni Magazine, February 2002.
25. Mayler A, Kasko X. Animals and alternatives in testing. Archived from the original on 2006-02-25. Retrieved 2006-04-19.