

تولید داربست‌های نانولیفی پوسته- مغزی رسانا جهت بهبود ترمیم ضایعه نخاعی

فاطمه زمانی^{۱*}، محمد امانی تهران^۲، آرش زمینی^۳

۱ استادیار، دانشگاه حضرت معصومه «سلام الله علیها»، قم، ایران

۲ استاد، دانشکده مهندسی نساجی، دانشگاه صنعتی امیرکبیر، تهران، ایران

۳ استادیار، گروه آناتومی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی گیلان، رشت، ایران



تاریخ دریافت:

۹۶/۱۰/۱۳

تاریخ پذیرش:

۹۶/۱۲/۱۹

چکیده

از آنجا که درمان ضایعات نخاعی به علت پیچیدگی سیستم اعصاب مرکزی به سادگی امکان پذیر نیست، راه کارهای بازسازی و ترمیم بافت عصب در دنیا بسیار مورد توجه واقع شده است. در این پژوهش دو نوع داربست نانولیفی سه بعدی رسانا (پلی لاکتیک گلایکولیک اسید- پلی کاپرولاکتان/پلی آنیلین: PCL/PANI-PLGA) و نارسانا (پلی لاکتیک گلایکولیک اسید- پلی لاکتیک گلایکولیک اسید PLGA-PLGA) با ساختار پوسته- مغزی طراحی و توسط یک شیوه الکتروریسی ترکیبی تولید شده است. سامانه الکتروریسی ترکیبی طراحی شده دارای یک سامانه گردابی و یک سامانه دو نازله بوده و قادر به تولید داربست استوانه‌ای سه بعدی با پوسته زیر نانومقیاس و مغزی آرایش یافته (میکرورشته‌های آرایش یافته شامل نانوالیاف آرایش یافته) می‌باشد. بر اساس آزمایش‌ها و بررسی‌ها در شرایط برون تنی و درون تنی، بیشترین میزان تکثیر سلول‌های عصبی بر روی داربست سه بعدی با مغزی رسانا مشاهده گردید. در بررسی‌های حیوانی نیز نتایج آزمایش حرکتی بیانگر بهبود معنادار نمونه‌های پیوند زده شده نسبت به نمونه‌های شاهد می‌باشد.

داربست الکتروریسی شده، ساختار پوسته- مغزی سه بعدی،
ترمیم نخاع، ساختار نانولیفی رسانا.

واژگان کلیدی

(۱) مقدمه

در ارتباط با بازسازی بافت عصبی چالش‌های بسیاری وجود دارد. راه‌کارهای زیادی که می‌تواند بازسازی سیستم اعصاب محیطی را بهبود بخشد، به علت پیچیدگی سیستم اعصاب مرکزی بطور مستقیم نمی‌توانند برای ضایعات مغز و نخاع به کار برده شوند [۲، ۱]. تاکنون راه‌کارهای بسیاری برای ترمیم آسیب‌های عصبی ارائه شده است. از جمله از مهندسی بافت عصبی به عنوان یک روش جایگزین برای ترمیم بافت، جهت تولید و سپس پیوند داربست‌های پلیمری به همراه سلول‌های عصبی استفاده شده است [۳]. محققان متعددی ترمیم نخاع را از طریق داربست‌های زیستی حاوی سلول‌های بنیادی عصبی و یا مزانشیمی (Mesenchymal) مورد بررسی قرار داده‌اند [۴]. تدابیر گوناگونی مانند انتخاب نوع پلیمر، نوع طراحی، ساخت داربست و مواد همراه با داربست جهت افزایش هر چه بیشتر کارایی داربست‌های عصبی به کار رفته است [۶، ۵].

ویژگی‌های فیزیکی، شیمیایی و الکتریکی داربست‌های مهندسی شده بر بازسازی عصب موثر است. خصوصیات شیمیایی مانند آب‌دوستی و ترکیب مواد، خصوصیات فیزیکی مانند تخلخل، آرایش یافتگی و زبری داربست‌ها می‌تواند برهم‌کنش داربست با سلول‌ها را بهبود بخشد [۷-۱۲]. محققان بسیاری تلاش کرده‌اند تا از راه تحریک الکتریکی، که تنها بر مواد رسانا می‌تواند انجام شود، نیز جهت بازسازی عصبی استفاده کنند [۱۳، ۱۴]. این پدیده به علت طبیعت ذاتی سلول‌های عصبی است [۱۵-۱۷]. این پدیده به علت طبیعت ذاتی سلول‌های عصبی است که سیگنال‌های الکتروشیمیایی را از طریق سیستم عصبی انتقال می‌دهند [۱۸].

از آنجا که پلیمرهای رسانا بطور همزمان هم خصوصیات شیمیایی و فیزیکی پلیمرهای آلی و هم خصوصیات الکتریکی فلزات را ارائه می‌دهند، زیست مواد قابل توجهی برای کاربردهای مهندسی بافت هستند. بنابراین این مواد می‌توانند سیگنال‌های الکتریکی را جهت ترمیم بافت‌های آسیب دیده به سلول‌ها برسانند [۱۹-۲۳]. در بین پلیمرهای رسانا پلی‌آنیلین به عنوان یک پلیمر رسانای آلی بسیار مورد مطالعه قرار گرفته است [۲۴-۲۰]. پژوهش‌های صورت گرفته قابلیت زیست سازگاری پلی‌آنیلین برای اینکه بستری برای کشت سلول باشد را نشان می‌دهند [۲۵، ۲۶].

امروزه داربست‌های نانولیفی الکتروزیستی شده بخاطر شباهت ساختاری آن به ماتریس خارج سلولی بدن، سطح موثر بالا، تخلخل و ظرفیت جذب بالا بستر مناسبی برای چسبندگی، مهاجرت و رشد سلول هستند [۹-۱۲]. برخی محققان بسترهای لیفی دو بعدی رسانا با ترکیب پلی‌آنیلین با سایر پلیمرها را تولید کرده‌اند [۲۷-۲۹]. بنابراین داربست‌های لیفی به عنوان هدایت کننده عصب، با ارائه ترکیبی

از نفوذپذیری، سطح موثر بالا برای چسبندگی و رشد سلول، و سیگنال‌های توپوگرافیکی امکان هدایت عملکردهای سلولی را دارند. بسته به روش تولید، سیگنال‌های زیست‌شیمیایی نیز می‌توانند در داربست‌های لیفی به عنوان یک عامل اضافی برای بهبود تولید مجدد عصب قرار گیرند.

در راستای افزایش کارایی بازسازی عصبی، ساختارهای پلیمری سه بعدی می‌توانند در ترمیم بافت موثر واقع شوند [۳۰-۳۲]. مور و همکارانش [۵]، داربست‌های چند کانالی را برای بهبود بازسازی اکسون نخاع تولید کردند. اما به علت قطر بزرگ کانال‌ها، بافت همبند بیشتری تولید می‌شد و در نتیجه فضای مفید کمتری جهت رشد اکسون‌ها باقی می‌ماند [۶]. بنابراین برای غلبه بر این نقطه ضعف به شیوه متفاوتی جهت تولید داربست نیاز است. تولید یک داربست سه بعدی با الیاف موازی با سامانه الکتروزیستی مرسوم به راحتی امکان‌پذیر نیست. در تحقیقات گذشته، محققان موفق به تولید داربست الکتروزیستی شده سه بعدی همسانگرد (یا غیرهمسانگرد اما در جهت عمود بر محور داربست) شده‌اند [۳۳، ۳۴]. درحالیکه، برای ضایعات نخاعی، الیاف باید در طول محور داربست آرایش یافته و موازی باشند و تولید این نوع داربست سه بعدی مشکل به نظر می‌رسد.

ساختارهای لیفی ۲ بعدی موازی می‌توانند با استفاده از تکنولوژی الکتروزیستی بدست آیند [۳۵]. بر اساس پژوهش‌های صورت گرفته، داربست‌های الکتروزیستی شده موازی منجر به رشد سلول‌ها در راستا و جهت الیاف می‌شوند [۳۶-۳۹]. به‌علاوه محققان نشان داده‌اند که طراحی داربست‌ها با ناهم‌واری‌های نانومقیاس، رشد و تکثیر سلول‌ها را بهبود می‌دهد [۴۰-۴۲].

در این پژوهش جهت بهبود رشد سلول در یک جهت خاص و همچنین نفوذ سلول به داخل ساختار سه بعدی داربست، ضمن طراحی یک شیوه الکتروزیستی ترکیبی جدید، دو نوع داربست نارسانا و رسانای سه بعدی جدید طراحی و تولید شد به گونه‌ای که همزمان اصلاح فیزیکی، شیمیایی و الکتریکی داربست نیز بر آنها صورت پذیرفته است. در داربست نارسانا پلیمر PLGA در مغزی و پوسته (-PLGA) از ترکیب PCL و PANI در مغزی (PCL/PANI-PLGA) استفاده شد. سپس با انجام بررسی‌های درون‌تنی و برون‌تنی دو نوع داربست سه بعدی تولید شده مورد مقایسه قرار گرفتند.

(۲) تجربیات**(۱) مواد**

پلیمرهای مورد استفاده در این پژوهش پلی‌لاکتیک گلایکولیک اسید (-PLGA, LA/GA: 85/15; $[\mu] = 5.9$ dL/g; Boehringer-

رشد و تکثیر سلول‌های عصبی بر پوسته داربست، داربست‌های لیفی با ناهمواری‌های در اندازه نانو بر سطح آن‌ها تولید شد. جهت تولید داربست استوانه‌ای با ساختار پوسته-مغزی، از دو مرحله مختلف الکتروریسی با تنظیمات خاص خود برای هر محلول پلیمری استفاده می‌شود. مغزی داخلی داربست، شامل میکروورشته‌های نانولیفی آرایش‌یافته، و با استفاده از یک سامانه الکتروریسی گردابی تولید شد [۴۳]. سپس میکروورشته‌ها توسط پوسته خارجی با ناهمواری نانومتری، تهیه شده با سامانه الکتروریسی دو نازله، پوشش داده شد [۴۴، ۴۵]. برای تولید مغزی آرایش‌یافته در سامانه الکتروریسی گردابی، نانوالیاف بر روی یک حمام آب جمع‌آوری می‌شوند. یک سوراخ در کف یک ظرف قرار دارد و اجازه می‌دهد که آب به داخل ظرف قرار گرفته در زیر ظرف اول ریخته شود. سرعت چرخش در سطح پایین تنظیم می‌شود به گونه‌ای که یک جریان گردابی آهسته ایجاد شود. نانوالیاف قرار گرفته بر سطح آب در یک سمت ظرف توسط یک حلقه راهنما جمع‌آوری می‌شوند و سپس توسط دو غلتک کشش دهنده واسط، کشیده می‌شوند. سرانجام، میکروورشته‌های موازی حول استوانه چرخان پیچیده شده و به عنوان هسته داربست استفاده می‌شوند. جهت تشکیل پوسته استوانه‌ای داربست با ابعاد دلخواه و سطح زبر، یک سامانه الکتروریسی دو نازله در شرایط با رطوبت بالا استفاده می‌شود. در این سامانه، دو نازل با بار مخالف در مقابل یکدیگر واقع شده‌اند و یک استوانه خنثی در میانه میدان الکتریکی جهت تشکیل شکل استوانه‌ای داربست قرار گرفته است. میکروورشته‌ها درحالی که به یک قطعه نخ وصل شده‌اند، به سامانه الکتروریسی تغذیه می‌شوند. سپس انتهای دیگر آن بیرون کشیده می‌شود. بنابراین ساختار پوسته-مغزی داربست‌ها توسط الیاف با زبری نانومتری درحالی که سطح میکروورشته‌ها را می‌پوشاند، تشکیل می‌شود. شکل ۱، سازوکار تهیه داربست استوانه‌ای و تصویر سطح جانبی نمونه‌ای از داربست‌های سه بعدی الکتروریسی شده را نشان می‌دهد.

(Ingelheim)، پلی کاپرولاکتان (PCL, Mw=80,000; Sigma-AI-) و پلی‌آنیلین (drich) (Sigma-Aldrich) می‌باشند. همچنین از دی‌متیل‌فرمامید (DMF/ Merck)، کلروفرم (Merck) و کامفورسولفونیک اسید (CSA; Sig-) (ma-Aldrich) برای تولید داربست استفاده شد.

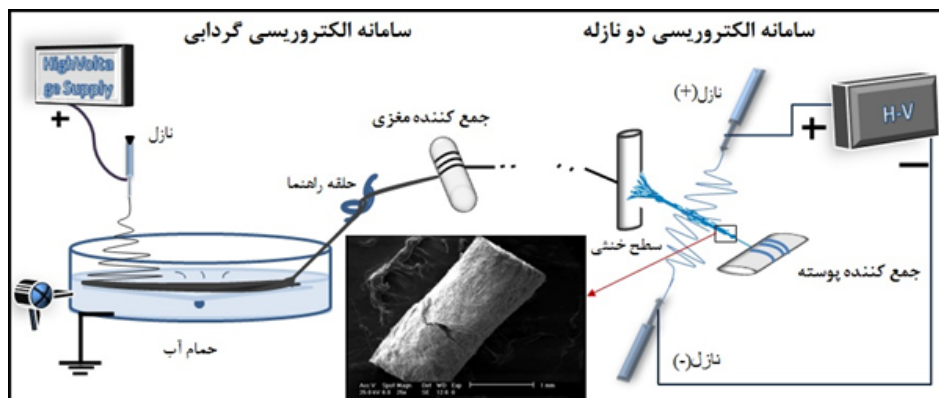
۲(۲) آماده سازی محلول پلیمری

برای تهیه یک محلول همگن، محلول ۳٪ وزنی-حجمی PLGA در مخلوط حلال کلروفرم/دی‌متیل‌فرمالدهید (۲۰/۸۰) در دمای محیط به مدت ۱۲ ساعت بر روی همزن مغناطیسی قرار گرفت. از آنجا که پلیمرهای هادی در حالت عادی رسانا نیستند، جهت تهیه محلول PCL/PANI، ابتدا لازم است با انجام عملیات دپ یا پروتونه کردن و با استفاده از دوپانت‌ها، پلی‌آنیلین از حالت عایق به فرم هادی تبدیل گردد.

در این تحقیق جهت پروتونه کردن پلی‌آنیلین از اسید آلی کامفورسولفونیک استفاده شد. به این شیوه که میزان مول مساوی از پلی‌آنیلین (۱۰ mg) و کامفورسولفونیک اسید (۱۳ mg) در دی‌متیل‌فرمامید (۱ ml)، به عنوان حلال، مخلوط شده و به مدت ۲۴ ساعت در دمای اتاق بر همزن مغناطیسی قرار داده می‌شود. الکتروریسی پلی‌آنیلین به علت وزن مولکولی پایین و انحلال پذیری کم آن امکان پذیر نیست [۲۱-۲۴]. بنابراین برای غلبه بر این نقطه ضعف از ترکیب پلی‌آنیلین با پلیمری که قابلیت الکتروریسی داشته باشد استفاده می‌شود. برای تهیه ترکیب PCL/PANI با نسبت وزنی ۲٪ در حلال کلروفرم/دی‌متیل‌فرمامید (۳۰/۷۰) با غلظت ۱۳٪ وزنی-حجمی، پلی‌آنیلین پروتونه شده حدود ۳۰ دقیقه قبل از الکتروریسی به محلول PCL اضافه شده تا ترکیب همگن تولید گردد.

۳(۲) الکتروریسی و آماده سازی داربست‌های سه بعدی

برای تشکیل یک داربست استوانه‌ای با ابعاد دلخواه و جهت بهبود



شکل ۱: تولید داربست نانولیفی پوسته مغزی با سامانه الکتروریسی گردابی و سامانه الکتروریسی دو نازله

شستشو با اتانول ۷۰٪ به مدت ۳۰ دقیقه، ۳ بار با PBS (محلول نمک فسفات با خاصیت بافری) سترون شده به مدت ۳۰ دقیقه شستشو داده شدند. داربست‌ها در اندازه $3 \times 3 \times 3 \text{ mm}^3$ در یک پلیت ۲۴ تایی قرار داده شدند. سلول‌های A-172 گرفته شده از مغز انسان، نگهداری شده در محیط کشت DMEM و ۱۰٪ FBS، بطور مستقیم و با چگالی 5×10^4 بر روی داربست‌ها کشت داده شدند. سلول‌های A-172 از بانک سلولی انستیتو پاستور ایران تهیه گردید. داربست‌ها در محیط کشت قرار داده شدند و در انکوباتور (37°C ، $5\% \text{ CO}_2$ و $95\% \text{ رطوبت}$) به مدت ۵ روز نگهداری شدند. در نهایت میزان جذب رنگ هر چاهک توسط دستگاه الایزا ریدر خوانده شد. ساختار سلول‌ها بر روی داربست نیز ۵ روز پس از کشت سلول توسط SEM مشاهده شد.

۶(۲) مطالعات درون تنی (In vivo)

۱(۶(۲) پیوند ضایعه نخاعی

۲۴ سر موش صحرایی بالغ Wistar با محدوده وزنی ۲۵۰-۳۰۰ گرم، تحت عملیات جراحی قرار گرفتند تمامی اعمال جراحی با کمک میکروسکوپ انجام پذیرفت. نیمه سمت چپ نخاع در محاذات مهره T9- T10 به طول ۳ و عرض ۱/۵ میلی‌متر بطور کامل برش داده و از محل برداشته شد. در گروه اول و دوم به ترتیب گروه داربست نارسانا و رسانا (هر یک ۶ سر موش صحرایی) پس از جراحی، داربست استوانه‌ای در محل ضایعه، پیوند شد. موش‌ها در گروه سوم (گروه شاهد با نخاع آسیب دیده- ۶ سر موش صحرایی)، بدون پیوند داربست، تحت جراحی مشابه با گروه اول و دوم قرار گرفتند و در گروه چهارم (گروه لامینکتومی- ۶ سر موش صحرایی) نیز بدون آسیب به نخاع جراحی شدند.

پس از انجام جراحی، ماهیچه و پوست موش‌های صحرایی لایه به لایه دوخته و سپس داخل قفس گرم گذاشته شدند. به همه موش‌های صحرایی تا ۵ روز آنتی‌بیوتیک داده شد. تمامی آزمایشات صورت گرفته بر موش‌های صحرایی بر طبق دستورالعمل کمیته استفاده و مراقبت از حیوانات در انستیتو پاستور ایران انجام گرفت.

۲(۶(۲) آماده‌سازی بافت

جهت بررسی‌های بافت‌شناسی، نمونه‌های حیوانی ۸ هفته پس از پیوند با استفاده از پارافرمالدهید ۴٪ در PBS ($\text{pH}=7.4$) پرفیوژن گشتند. ستون مهره‌ها به دقت بریده و از بدن حیوان خارج می‌شود و نخاع به صورت محافظت شده بدون داربست یا با داربست به مدت ۴۸ ساعت در پارافرمالدهید ۴٪ قرار داده شدند. جهت انجام فرایند بافت‌شناسی، قطعات نخاع آب‌گیری و در پارافین قرار داده شدند. سپس از بلوک‌های بافتی، مقاطعی با ضخامت ۰/۷ میکرومتر تهیه و با هماتوکسیلین و

در فرایند الکترورسی حاضر که در ۲ مرحله انجام می‌شود از یک منبع انرژی با ولتاژ بالا و یک سرنگ پمپ تغذیه محلول (KDS100، KD Scientific Inc., USA) استفاده می‌شود. مقادیر بهینه مربوط به پارامترهای الکترورسی شامل ولتاژ، نرخ تغذیه و فاصله ریسندگی در جدول ۱ آمده است. فاصله ریسندگی در سامانه اول که به صورت عمودی قرار داده شده، فاصله بین آب و سوزن (با قطر ۰,۷ میلی‌متر) تنظیم شده است و در سامانه دوم که به صورت افقی قرار داده شده است فاصله بین دو نازل می‌باشد.

۴(۲) بررسی ساختاری داربست

ساختار داربست‌ها توسط میکروسکوپ الکترونی روبشی (SEM) مشاهده شد. پیش از تهیه تصاویر از سطح مقطع، داربست‌ها در نیتروژن مایع برش داده می‌شوند. جهت تهیه تصاویر SEM، ابتدا لایه نانوالیاف به مدت ۱۲۰ ثانیه و تحت جریان ۱۰ mA با طلا پوشش داده شد و سپس ساختار الیاف نانو توسط SEM، تحت ولتاژ ۱۵ کیلوولت مشاهده گردید. اندازه‌گیری متوسط قطر الیاف و قطر منافذ سطحی داربست با استفاده از نرم‌افزار Image J و اندازه‌گیری تداخل سطحی داربست با نرم‌افزار Image Processing 1 انجام شد. شاخص آرایش یافتگی، درصد الیاف آرایش یافته را نشان می‌دهد که بر اساس زاویه الیاف محاسبه می‌شود. جهت ارائه شاخص مناسبی از داربست سه بعدی، پارامتر حجم مخصوص تعیین می‌شود. این پارامتر بر اساس معادله ۱ بدست می‌آید. چگالی داربست نیز بر اساس جرم، قطر و طول نمونه‌های استوانه‌ای بدست می‌آید. جهت اندازه‌گیری میزان رسانایی داربست‌ها از روش 2-probe استفاده شد. در این روش، رسانایی داربست‌ها با استفاده از فرمول ۲ محاسبه می‌شود.

$$v = (1/p_{\text{scaffold}}) = (V_s/M_s) \quad (1)$$

$$\sigma = L/A.R \quad (2)$$

در حالی که L ، A و R به ترتیب ضخامت، سطح مقطع و مقاومت الکتریکی نمونه‌ها هستند. مقاومت الکتریکی نمونه‌های نازک که قبلاً هیدراته شده‌اند بین دو صفحه رسانا از جنس پلاتین توسط دستگاه Autolabpotentiostat/galvanostat PGSTAT 302N, Eco (Chemie, the Netherlands) اندازه‌گیری می‌شوند.

۵(۲) مطالعات برون تنی (In vitro)

آزمایش MTT جهت ارزیابی تکثیر سلول بر داربست‌های رسانا و نارسانا صورت پذیرفت [۳۶]. پس از الکترورسی، داربست‌ها با محلول اتانول ۷۰٪ شستشو داده شد. جهت سترون کردن داربست‌ها قبل از کشت، به مدت ۲ ساعت تحت اشعه فرابنفش قرار داده شدند. پس از

بسیاری از پلی‌آنیلین منجر به افزایش گرانروی محلول نخواهد شد [۲۹،۳۷]. بعلاوه مخلوط PANI/CSA انحلال پذیری کمی در DMF دارد. با اضافه کردن محلول پلی‌آنیلین ۱٪ وزنی - حجمی به محلول PCL، محلول قابلیت الکترورسی پیدا کرد.

مغزی داربست الکترورسی شده، تولید شده با سامانه گردابی، دارای نانوالیاف کاملاً آرایش‌یافته (با شاخص آرایش یافتگی ۱۰۰٪) و سطح الیاف صاف می‌باشد. میانگین قطر الیاف، اندازه حفره و تخلخل مغزی برای داربست نارسانا به ترتیب $650 \pm 85 \text{ nm}$ و $2.5 \pm 1 \mu\text{m}$ و $3.0 \pm 2.3\%$ و برای داربست رسانا به ترتیب $246 \pm 52 \text{ nm}$ ، $1.2 \pm 0.88 \mu\text{m}$ و $1.9 \pm 2.6\%$ بدست آمد. میکرو رشته‌های موازی، تخلخل‌های پیوسته هم راستا در اندازه میکرو (فاصله بین میکرو رشته‌ها) تولید می‌کنند؛ بنابراین سلول‌های عصبی می‌توانند به داخل ساختار داربست نفوذ کرده و اطراف میکرو رشته‌ها بر روی نانوالیاف موازی چسبیده و در راستای محور داربست استوانه‌ای تکثیر شوند. این سلول‌ها بر روی داربست‌های رسانا نسبت به داربست‌های نارسانا کشیدگی بیشتری پیدا می‌کنند (شکل ۲).

پیوسته داربست، تولید شده با سامانه الکترورسی دو نازله، یک ساختار لیفی متخلخل و ناهموار، دارای زبری در محدوده نانو می‌باشد. سلول‌ها به علت تخلخل بیشتر پیوسته نسبت به تخلخل مغزی، می‌توانند به ساختار داخلی داربست نفوذ کنند. میانگین قطر الیاف، اندازه منفذ و تخلخل سطح پیوسته داربست‌ها به ترتیب $1511 \pm 292 \text{ nm}$ ، $14 \pm 6 \mu\text{m}$ و $1 \pm 4.1\%$ می‌باشد. الیاف با ناهمواری‌های نانومقیاس، رشد و تکثیر سلول‌های عصبی بر پیوسته داربست را افزایش می‌دهند.

اُوزین (H&E) و همچنین با آنتی‌بادی ضد نوروفیل‌مانت 200 kD ، رنگ شدند.

۳(۶) ارزیابی فعالیت حرکتی

جهت سنجش توانایی حرکت اندام خلفی حیوان از مقیاس "BBB" استفاده گردید. در این آزمون حیوان در یک ناحیه باز به قطر ۹۰ سانتی‌متر و ارتفاع دیواره ۲۰ سانتی‌متر قرار گرفته و نحوه حرکت حیوان مورد مشاهده و ارزیابی قرار می‌گیرد. بر اساس جدول ارزیابی مقیاس BBB به حرکات حیوان نمره داده می‌شود. این ارزیابی قبل از جراحی جهت اطمینان از سالم بودن حیوانات و همچنین در هفته ۲، ۴، ۶ و ۸ پس از جراحی جهت سنجش پیشرفت حرکتی انجام پذیرفت.

۷(۲) تحلیل آماری

تمامی مقادیر به صورت میانگین \pm انحراف استاندارد نشان داده شده‌اند. تحلیل‌ها با استفاده از تحلیل واریانس یک طرفه توسط نرم افزار SPSS انجام شد. تفاوت آماری معنادار در سطح خطای ۰.۰۵ در نظر گرفته می‌شود.

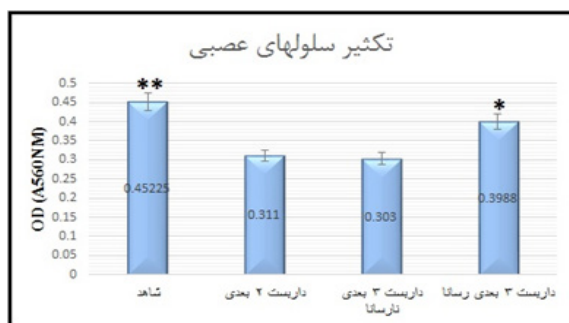
۳ نتایج و بحث

۱(۳) خصوصیات داربست

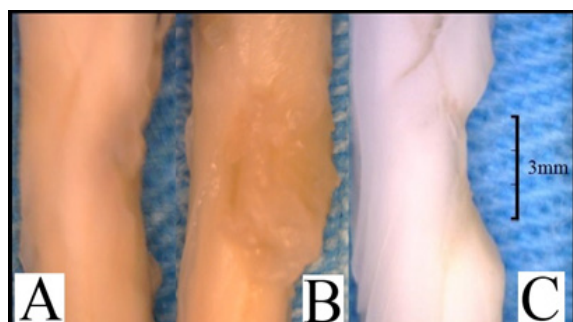
شرایط الکترورسی به گونه‌ای بهینه شد که داربست‌های نانولیفی یکنواخت و بدون بید تولید گردد. محلول پلی‌آنیلین به علت گرانروی کم آن، به تنهایی قادر به تولید الیاف نیست. حتی اضافه کردن درصد

جدول ۱: شرایط الکترورسی و خواص ساختاری داربست‌های سه بعدی تولید شده

داربست	داربست رسانا و نارسانا		داربست رسانا (PCL/PANI-PLGA)		داربست نارسانا (PLGA-PLGA)	
	پوسته	مغزی	مغزی	مغزی	مغزی	مغزی
	انحراف معیار	میانگین	انحراف معیار	میانگین	انحراف معیار	میانگین
شرایط الکترورسی:						
ولتاژ (Kv)	۱۵		۱۲		۱۹	
نرخ تغذیه (ml/h)	۱		۱		۱	
فاصله ریسندگی (cm)	۱۴		۱۰		۱۵	
خواص ساختاری:						
قطر الیاف (nm)	۱۵۱۰	۲۹۲	۲۴۶	۵۲	۶۵۰	۸۵
اندازه منفذ (μm)	۱۴	۶	۱.۲	۰.۸۸	۲.۵	۱
رسالایی (S/cm)	-----	-----	3.21×10^{-4}	-----	-----	-----
تخلخل سطح (%)	۳۵	۴.۱	۲۶	۱.۹	۳.۰	۲.۳
حجم مخصوص داربست (cm ³ /g)	-----	-----	۱۴.۱۲	-----	۳۱.۰۳	-----
شاخص آرایش یافتگی	۹۸	-----	۱۰۰	-----	۱۰۰	-----



شکل ۳: تکثیر سلول‌های A-172 بر روی پلیت شاهد، داربست الکترونیسی شده رسانا (۳ بعدی) و نارسانا (۲ و ۳ بعدی)، ۵ روز پس از کشت سلول.



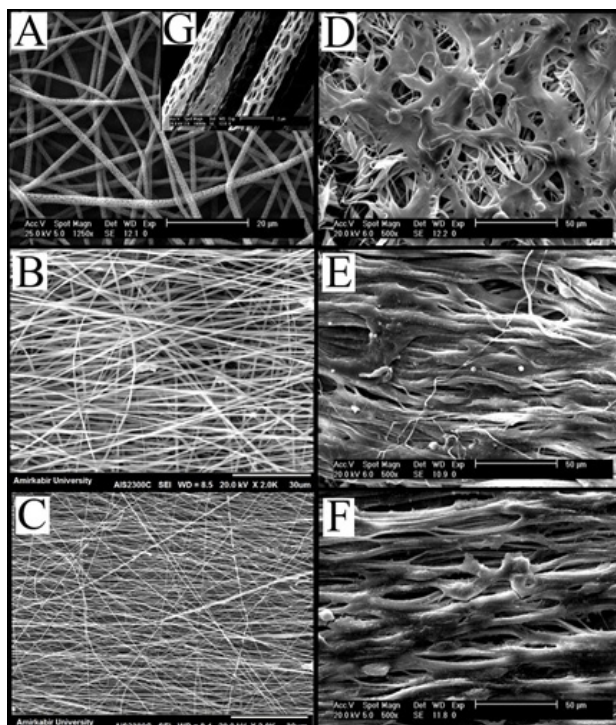
شکل ۴: نمای پشتی نخاع موش ۲ ماه پس از آسیب. (A): نمونه پیوند شده با داربست الکترونیسی شده نارسانا، (B): نمونه پیوند شده با داربست الکترونیسی شده رسانا، (C): نمونه شاهد.

را بهبود می‌بخشد. بنابراین سلول‌ها به خوبی بر الیاف پوسته دارای نانو تخلخل چسبیده و در راستای الیاف آرایش یافته مغزی رشد می‌یابند.

۳(۳) تکثیر سلول‌های عصبی بر داربست نانولیفی PLGA

نتایج بدست آمده از آزمایش MTT، ۵ روز پس از کشت سلول نشان می‌دهد که گرچه تکثیر سلول‌های عصبی انسان بر داربست‌های نانولیفی کمتر از تکثیر این سلول‌ها بر پلیت کشت سلول (به عنوان نمونه شاهد) است، اما تفاوت معناداری بین زیست‌پذیری سلول بر داربست سه بعدی نارسانا و داربست‌های صفحه‌ای یا ۲ بعدی وجود ندارد. علاوه بر این تکثیر این سلول‌ها بر داربست‌های نانولیفی ۳ بعدی رسانا بطور معنادار بیش از تکثیر این سلول‌ها بر داربست‌های نانولیفی ۲ و ۳ بعدی نارسانا است. (شکل ۳).

تفاوت ساختاری و فیزیکی دو نوع داربست ۳ بعدی رسانا و نارسانا از نظر زیست‌سازگاری، اندازه منافذ، تخلخل سطح و حجم مخصوص داربست (جدول ۱) می‌تواند علت اصلی تفاوت مشاهده شده در زیست‌پذیری سلول‌ها باشد. با توجه به اینکه احتمال نفوذ و چسبندگی سلول با افزایش این عوامل بهبود می‌یابد و همچنین با وجود زیست سازگاری بهتر داربست نارسانا نسبت به داربست رسانا، انتظار می‌رود نتایج بهتری در زیست‌پذیری سلول‌ها بر داربست‌های نارسانا مشاهده گردد، اما نتایج MTT خلاف آن را نشان می‌دهد. باید توجه داشت



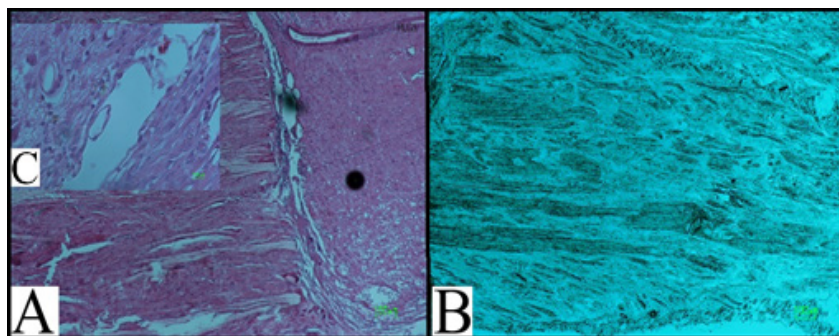
شکل ۲: تصاویر SEM داربست‌ها (A-C)؛ قبل و (D-F)؛ بعد از کشت سلول. تصاویر (A,D)؛ پوسته داربست‌ها، (B,E) مغزی داربست نارسانا، (C,F) مغزی داربست رسانا، (G) زبری نانومقیاس الیاف پوسته داربست‌ها را نشان می‌دهند.

این داربست لیفی با ساختار میکرو و نانو مقیاس خود، که توپوگرافی و عملکرد بیولوژیکی ماتریس خارج سلولی طبیعی را تقلید می‌کند، می‌تواند به عنوان بستر مناسبی برای مهندسی بافت عصب در نظر گرفته شود [۱۱،۱۰].

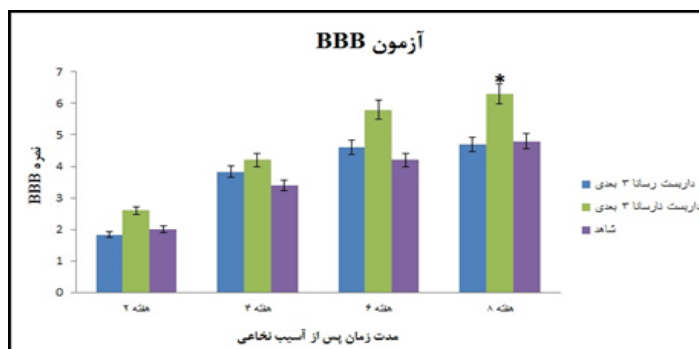
خصوصیات داربست‌های نانولیفی شامل قطر الیاف (nm)، اندازه منفذ (μm)، رسانایی (S/cm)، تخلخل سطح (%، حجم مخصوص cm^3/g) و شاخص آرایش یافتگی (% داربست‌های ۳ بعدی در جدول ۱ آورده شده است. الیاف بسیار نازک رسانا با متوسط قطری کمتر از ۲۵۰ nm با موفقیت با استفاده از فرایند الکترونیسی با ترکیب پلیمر رسانا (پلی‌انیلین) با PCL تولید شده است. مطابق آزمایش‌های صورت گرفته، اضافه کردن PANI به PCL، قطر PCL را حدود ۵۰% کاهش می‌دهد (از 560 ± 79 nm به 246 ± 52 nm). رسانایی بدست آمده $(3.21 \times 10^{-5} \text{ S/cm})$ که با تحقیقات دیگر نیز قابل مقایسه است، برای مهندسی بافت مقدار مناسبی است [۱۳، ۱۴، ۱۹].

۲(۳) تعامل سلول‌های عصبی با داربست نانولیفی

تصاویر (شکل ۲: D-F) تعامل بین سلول‌های عصبی (A-172) و داربست‌های نانولیفی الکترونیسی شده را ۵ روز پس از کشت سلول نشان می‌دهد. زبری سطح افزایش یافته در مقیاس نانو، ساختار سطحی بافت‌های طبیعی را تقلید می‌کند و چسبندگی و تکثیر سلول‌ها



شکل ۵: مقطع طولی نخاع پیوند زده شده (A): رنگ آمیزی هماتوکسیلین - اتوزین (H&E) نخاع پیوند زده شده، (B): تصویر ایمونوهیستوکمیستری آنتی بادی نروفیلانمنت kD ۲۰۰ در محل ضایعه، ۲ ماه پس از پیوند. مقیاس ۱۰۰ μm، (C): رگ های خونی.



شکل ۶: نمایش آزمایش BBB، طی ۸ هفته پس از ایجاد جراحت.

شاهد در هفته هشتم پس از جراحی مشخص می‌شود که بافت میزبان به درون داربست نفوذ کرده و در سراسر طول آن دیده می‌شود. وجود رشته الیاف تخریب نشده در ساختار نمونه پیوند شده با داربست رسانا نشان از عدم تخریب کامل مغزی داربست دارد. این مسئله به علت تخریب پذیری طولانی تر پلی آنیلین و همچنین PCL نسبت به PLGA می‌باشد. جهت انجام فرایند بافت شناسی لازم است از تمامی نمونه‌های آماده شده به صورت بلوک‌های بافتی، مقاطعی با ضخامت ۰/۷ میکرومتر تهیه گردد اما بلوک‌های تهیه شده از نخاع پیوند زده شده با داربست‌های رسانا به علت عدم تخریب کامل الیاف مغزی آن قابلیت برش خوردن را نداشته و در نتیجه امکان انجام آزمایش بافت شناسی بر این گروه میسر نشد.

بنابراین در این بخش تصاویر مربوط به گروه داربست نارسانا بررسی می‌گردد. شکل ۵ نشان می‌دهد که رگ‌های خونی و المان‌های سلولی بسیاری داخل ساختار داربست شده‌اند. در ضمن در مرز بین داربست - بافت نخاع میزبان در برخی نقاط کیست‌های کوچکی با حداکثر پهنای ۲۰۰ میکرومتری دیده می‌شود.

در هفته ۸ پس از پیوند، رنگ آمیزی با آنتی بادی ضد نروفیلانمنت (NF-200) نشان دهنده رشد رشته‌های عصبی و آکسون‌ها به داخل داربست می‌باشد. این رشته‌ها بیشتر در طول سطح داربست تشکیل و از داربست به عنوان پل استفاده کرده و طول ضایعه را طی کرده و

که پوسته هر دو نوع داربست یکسان و دارای ساختار مشابهی است. بنابراین شرایط نفوذ سلول‌ها به داخل ساختار داربست‌ها یکسان است. همچنین زبری سطح افزایش یافته در مقیاس نانو، که ساختار سطحی بافت‌های طبیعی را تقلید می‌کند، چسبندگی و تکثیر سلول‌ها بر سطح پوسته هر دو نوع داربست را بطور یکسان بهبود می‌بخشد. به این ترتیب عمده تفاوت در سطح مخصوص داربست‌ها به علت سنگین بودن وزن PCL/PANI نسبت به PLGA در مغزی داربست‌ها می‌باشد. از سوی دیگر رسانایی و قطر کمتر الیاف مغزی رسانا نسبت به الیاف مغزی نارسانا می‌تواند عوامل مثبت مؤثر در بهبود رشد و تکثیر سلول‌های عصبی بر داربست ۳ بعدی رسانا نسبت به داربست نارسانا باشد.

۴(۳) مشاهدات حیوانی

بلافاصله پس از ایجاد ضایعه در نخاع، هیچ یک از موش‌ها قادر به حرکت پای چپ خود نبودند. پیوند داربست‌ها بلافاصله پس از ایجاد ضایعه صورت پذیرفت. اکثر موش‌ها (۹۰٪) پس از جراحی زنده ماندند و برخی از آن‌ها به علت شدت جراحت و یا کاهش وزن قابل توجه در طی ۱ ماه اول پس از جراحی زنده نماندند.

۵(۳) بافت شناسی

مطابق شکل ۶، از مقایسه نمونه‌های پیوند شده با داربست و نمونه

موازی با الیاف PLGA در تصاویر بافت‌شناسی مشاهده می‌شوند.

۶(۳) احیاء عملکردی

عملکرد حرکتی اندام خلفی چپ با استفاده از مقیاس (Basso-Be-attie-Bresnahan BBB) ارزیابی شد. نتایج رفتاری حیوان هر دو هفته با آزمایش BBB در یک دوره کنترل ۲ ماهه جمع‌آوری شد (شکل ۶). قبل از آسیب رسانی، تمامی حیوانات فعالیت حرکتی نرمالی نشان دادند که نمره ۲۱ در مقیاس BBB را دریافت کردند. همه حیوانات باید پس از آسیب، اندام خلفی سمت ضایعه آنها کاملاً فلج شده و نمره صفر دریافت کنند در غیر این صورت از آزمون خارج می‌گردند. نمرات BBB برای نمونه‌های شاهد در طی ۲ ماه پس از آسیب نخاع ۴٫۸ می‌باشد درحالی‌که، گروه داربست، احیاء حرکت پای عقب را نشان می‌دهد که ۳ هفته پس از پیوند به تدریج افزایش یافته است. ۸ هفته پس از پیوند، تمامی حیوانات پیوند زده شده با داربست نارسانا نمرات BBB را $6,3 \pm 0,79$ نشان می‌دهند که به‌طور معنادار بیش‌تر از آنچه که توسط گروه‌های دیگر بدست آمده است، می‌باشد. درحالی‌که میانگین نمرات BBB حیوانات پیوند زده شده با داربست‌های ۳ بعدی رسانا، $4,7 \pm 0,40$ بدست آمد.

عدم وجود اختلاف معنادار بین نمره حرکتی داربست‌های ۳ بعدی رسانا و گروه شاهد یک نتیجه مناسب می‌تواند باشد زیرا نشان می‌دهد که داربست رسانی طراحی شده، با مزایای ذکر شده آن، در بدن قابل استفاده خواهد بود. به این ترتیب می‌توان امید داشت که اگر از تحریک الکتریکی در بدن حیوان استفاده شود، داربست‌های رسانا در برابر گروه شاهد و یا حتی گروه داربست نارسانا، توانایی بیشتری در ترمیم ضایعات نخاعی را خواهند داشت.

۴) نتیجه گیری

در این پژوهش، اصلاحات فیزیکی، شیمیایی و الکتریکی بطور هم‌زمان برای بهبود داربست‌های مرسوم ۲ بعدی به کار گرفته شد. یک روش الکترورسی ترکیبی با سامانه الکترورسی گردابی و سامانه دو نازل جهت تهیه ۲ نوع داربست استوانه‌ای سه بعدی رسانا و نارسانا با پوسته زبر در مقیاس نانو و مغزی آرایش‌یافته، جهت ترمیم نخاع طراحی و مورد استفاده قرار گرفت. بررسی مورفولوژی سلول‌های عصبی بر روی داربست‌های سه بعدی نشان داد سلول‌ها به خوبی در راستای الیاف موازی شده داربست، آرایش یافته‌اند. داربست ۳ بعدی رسانا با پوسته زیست‌سازگار و مغزی رسانا میزان مناسبی از چسبندگی و تکثیر سلول را نسبت به داربست‌های ۲ و ۳ بعدی نارسانا و نمونه شاهد نشان داد. در مقابل داربست ۳ بعدی نارسانا ضمن بهبود بازسازی اکسون‌ها در طول نخاع پیوند زده شده، بهترین نتیجه احیاء عملکردی حیوان را

در آزمایش‌های رفتاری نشان می‌دهد. با توجه به نتایج بدست آمده، از آنجا که احیاء عملکردی داربست‌های رسانا و گروه شاهد تقریباً یکسان است، می‌توان از عدم سمیت و اثر منفی این داربست‌های رسانا بر ترمیم بافت اطمینان یافت. بنابراین داربست ۳ بعدی رسانا با ساختار ارائه شده می‌تواند به عنوان یک بایوساختار ایده‌آل جهت ترمیم ضایعات نخاعی به کمک تحریک الکتریکی پیشنهاد داده شود.

- [13] L. Ghasemi-Mobarakeh, MP. Prabhakaran, M. Morshed, MH. Nasr-Esfahani, S. Ramakrishna, Electrical stimulation of nerve cells using conductive nanofibrous scaffolds for nerve tissue engineering, *Tissue Engineering*, 15A (2009), 1-16.
- [14] MP. Prabhakaran, L. Ghasemi-Mobarakeh, G. Jin, S. Ramakrishna, Electrospun conducting polymer nanofibers and electrical stimulation of nerve stem cells, *J Biosci & Bioeng*, 112 (2011), 501-507.
- [15] A. Al-Majed, CM. Neumann, TM. Brushart, T. Gordon, Brief electrical stimulation promotes the speed and accuracy of motor axonal regeneration. *J Neurosci* 20 (2000), 2602-2608.
- [16] CY. Ho, CH. Yao, WC. Chen, WC. Shen, DT. Bau, Electroacupuncture and Acupuncture Promote the Rat's Transected Median Nerve Regeneration. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 2013 (2013), 1-8.
- [17] MC. Lu, CY. Ho, SF. Hsu, HC. Lee, JH. Lin, CH. Yao, YS. Chen, Effects of Electrical Stimulation at Different Frequencies on Regeneration of Transected Peripheral Nerve. *Neurorehabil Neural Repair*, 22 (2008), 367-373.
- [18] LMY. Yu, ND. Leipzig, MS. Shoichet, Promoting neuron adhesion and growth. *Materials Today*, 11b, 2008, 36-43.
- [19] Llorens E, Armelin E, Madrigal M, Valle L, Aleman C, Puiggali J, Nanomembranes and nanofibers from biodegradable conducting polymers. *polymers* 5 (2013), 1115-1157.
- [20] CE. Schmidt, VR. Shastri, JP. Vacanti, R. Langer, Stimulation of neurite outgrowth using an electrically conducting polymer. *Proc. Natl. Acad. Sci*, 94 (1997), 8948-8953.
- [21] PR. Bidez, AG. Macdiarmid, EC. Venancio, Y. Wei, PI. Lelkes, Polyaniline, an electroactive polymer, supports adhesion and proliferation of cardiac myoblasts. *J Biomater Sci Polymer*, 17 (2006), 199-212.
- [22] Q.Z. Yu, M M. Shi, M. Deng, M. Wang, H. Z. Chen, Morphology and conductivity of polyaniline sub-micron fibers prepared by electrospinning. *Mat Sci & Engin*, 150B (2008), 70-76.
- [23] A. Yang, Z. Huang, G. Yin, X. Pu, Fabrication of aligned, porous and conductive fibers and their effects on cell adhesion and guidance, *Colloid Surf. B, Biointerfaces*, 134 (2015), 469-474.
- [24] L. Ghasemi-Mobarakeh, M. Prabhakaran, M. Morshed, MH. Nasr-Esfahani, H. Baharvand, S. Kiani, S. Al-Deyab, S. Ramakrishna, Application of
- [1] J. P. Fisher, A. G. Mikos, and J. D. Bronzino, *Tissue Engineering*, CRC press-Taylor & Francis Group, 2007, 303-324.
- [2] Y. Xiong, Y. S. Zeng, C. G. Zeng, B. L. Du, L. M. He, D. P. Quan, W. Zhang, J. M. Wang, J. L. Wu, W. Li, J. Li, Synaptic transmission of neural stem cells seeded in 3-dimensional PLGA scaffolds. *Biomaterials*, 30 (2009), 3711-3722.
- [3] Y. Ikada, *Tissue Engineering Fundamentals and Applications*, Academic Press is an imprint of Elsevier, 2006, 173-188.
- [4] B. Shrestha, K. Coykendall, Y. Li, A. Moon, P. Priyadarshani, L. Yao, Repair of injured spinal cord using biomaterial scaffolds and stem cells. *Stem. Cell Research & Therapy*, 5 (2014), 91-102.
- [5] M. Moore, J. Friedman, Multiple-Channel Scaffolds to Promote Spinal Cord Axon Regeneration. *Biomaterials*, 27 (2006), 419-429.
- [6] A. Krysh, G. Rooney, Relationship between Scaffold Channel Diameter and Number of Regenerating Axons in the Transected Rat Spinal Cord, *Acta Biomaterialia*. 5, 7 (2009), 2551-2559.
- [7] NT. Hiep, BT. Lee, Electrospinning of PLGA/PCL blends for tissue engineering and their biocompatibility. *J Mater Sci: Mater Med*, 21 (2010), 1969-1978.
- [8] BL. Du, C. Zeng, W. Zhang, D. Quan, E. Ling, A comparative study of gelatin sponge scaffolds and PLGA scaffolds transplanted to completely transected spinal cord of rat. *J Biomed Mater Res*, 102A (2014), 1715-1725.
- [9] F. Zamani, M. Latifi, M. Amani-Tehran, MA. Shokrgozar. Effects of PLGA Nanofibrous Scaffolds Structure on Nerve Cell Directional Proliferation and Morphology, *Fiber Polym*, 14 (2013), 568-702.
- [10] F. Jahanmard, M. Amani-Tehran, F. Zamani, M. Nematollahi, L. Ghasemi, MH. Nasr-Esfahani. Effect of nanoporous fibers on growth and proliferation of cells on electrospun poly (ϵ -caprolactone) scaffolds. *Int J Poly Mat & Poly Biomat*, 63 (2013), 57-64.
- [11] F. Zamani, M. Amani-Tehran, M. Latifi, MA. Shokrgozar. The influence of surface nanoroughness of electrospun PLGA nanofibrous scaffold on nerve cell adhesion and proliferation. *J Mater Sci: Mater Med*, 24 (2013), 1551-1560.
- [12] F. Zamani, Engineering of structural properties of PLGA nanofibrous scaffold for neural cell culture, PhD Thesis, Amirkabir University of Technology, Iran, 2013.

Biomaterials, 29 (2008), 4532–4539.

[37] A. Hurtado, J. Cregg, H. Wang, D. Wendell, M. Oudega, Robust CNS regeneration after complete spinal cord transection using aligned poly-L-lactic acid microfibers. *Biomaterials*, 32 (2011), 6068–6079.

[38] S. Shang, F. Yang, X. Cheng, X. Walboomer, J. Jansen, The effect of electrospun fiber alignment on the behaviour of rat peridontal ligament cells. *Eur. Cell. Mater*, 19 (2010), 180–19.

[39] K. Aviss, J. Gough, S. Downes, Aligned electrospun polymer fibers for skeletal muscle regeneration, *Eur. Cell. Mater*, 19 (2010), 193–204.

[40] T. W. Chung, D. Z. Liu, S. Y. Wang, S. S. Wang, Enhancement of the growth of human endothelial cells by surface roughness at nanometer scale, *Biomaterials*, 24 (2003), 4655–4661.

[41] Y. W. Chun, D. Khang, K. M. Haberstroh, T. J. Webster, The role of polymer nanosurface roughness and submicron pores in improving bladder urothelial cell density and inhibiting calcium oxalate stone formation, *Nanotechnology*, 20 (2009), 085104 (8pp).

[42] D. C. Miller, K. M. Haberstroh, T. J. Webster, PLGA nanometer surface features manipulate fibronectin interactions for improved vascular cell adhesion, *J. Biomed. Mater. Res. A*, 81 (2007), 678–684.

[43] M. Yousefzadeh, M. Latifi, W. Teo, M. Amani-Tehran, S. Ramakrishna, Producing continuous twisted yarn from Well-aligned nanofibers by water vortex. *Polym. Eng. Sci*, 51 (2011), 323–329.

[44] F. Dabirian, S A. Hosseini, Novel method for nanofibre yarn production using two differently charged nozzles, *Fibers Text East Eur*, 17 (2009), 45–47.

[45] F. Hajiani, A A. Jeddi, A A. Gharehaghaji, An Investigation on the effects of twist on geometry of the electrospinning triangle and polyamide 66 nanofiber yarn strength, *Fiber Polym*, 1 (2010), 244–252.

conductive polymers, scaffolds and electrical stimulation for nerve tissue engineering, *J Tissue Eng Regen Med*, 5 (2011), 17–35.

[25] CH. Wang, YQ. Dong, K. Sengothi, KL. Tan, ET. Kang, In-vivo tissue response to polyaniline. *Synthetic Metals*, 102 (1999), 1313–1314.

[26] S. Kamalesh, P. Tan, J. Wang, T. Lee, E. Kang, CH. Wang, Biocompatibility of electroactive polymers in tissues, *J Biomed Mater Res*, 52 (2000), 467–478.

[27] ID. Norris, MM. Shaker, FK. Ko, AG. MacDiarmid, Electrostatic fabrication of ultrafine conducting fibers: polyanilinerpolyethylene oxide blends, *Synthetic Metals*, 114 (2000), 109–114.

[28] M. Li, Y. Guo, Y. Wei, AG. MacDiarmid, PI. Lelkes, Electrospinning polyaniline-contained gelatin nanofibers for tissue engineering applications. *Biomaterials*, 27 (2006), 2705–2715.

[29] M. Yanilmaz, AS. Sarac, A review: effect of conductive polymers on the conductivities of electrospun mats, *Textile Res J*, 84 (2014), 1325–1342.

[30] H. Tabesh, Gh. Amoabediny, N. SalehiNik, The role of biodegradable engineered scaffolds seeded with Schwann cells for spinal cord regeneration, *Neurochemistry International*, 54 (2009), 73–83.

[31] A. Subramanian, U. Krishnan, S. Sethurama, Development of biomaterial scaffold for nerve tissue engineering: Biomaterial mediated neural regeneration, *J Biomed Scie*, 16 (2009), 108–119.

[32] N. Madigan, S. McMahon, T. Brien, M. Yaszemski, A. Windebank, Current tissue engineering and novel therapeutic approaches to axonal regeneration following spinal cord injury using polymer scaffolds, *Respiratory Physiology & Neurobiology*, 169 (2009), 183–199.

[33] W. He, Z. Ma, W. Teo, Y. Dong, P. Robless, T. Lim, S. Ramakrishna, Tubular nanofiber scaffolds for tissue engineered small-diameter vascular grafts, *J. Biomed. Mater. Res*, 90A (2009), 205–216.

[34] S. Hee, J. Yoo, G. Lim, A. Atala, J. Stitzel, In vitro evaluation of electrospun nanofiber scaffolds for vascular graft application, *J. Biomed. Mater. Res*, 83A (2007), 999–1008.

[35] D. Liang, B.S. Hsiao, B. Chu, Functional electrospun nanofibrous scaffolds for biomedical applications, *Advanced Drug Delivery Reviews*, 59 (2007), 1392–1412.

[36] L. Ghasemi-Mobarakeh, M. P. Prabhakaran, M. Morshed, Electrospun poly(3-caprolactone)/gelatin nanofibrous scaffolds for nerve tissue engineering,