

УНИВЕРЗИТЕТ У КРАГУЈЕВЦУ
ФАКУЛТЕТ МЕДИЦИНСКИХ НАУКА



МАСТЕР РАД

**Оптимизација параметара електроспининга за продукцију матрица
за контролисано *in vitro* одгајање ћелија**

Ментор:
Др Марко Живановић

Студент:
Алек Аврамовић 02/2021

Крагујевац, 2025.

Садржај

Скраћенице	1
1. Увод	2
1.1. Ткивно инжењерство	2
1.1.1. Матрице – ћелијски носачи.....	3
1.2. Употреба полимера у ткивном инжењерству	5
1.2.1. Природни полимери	6
1.2.2. Синтетички полимери	9
1.3. Технике које се користе за процесуирање матрица	10
1.3.1. Конвенционалне технике за процесуирање матрица	11
1.3.2. Напредне технике за процесуирање матрица	13
1.4. Методе карактеризације матрице са применом у ткивном инжењерству	17
1.4.1 Карактеризација матрица коришћењем скенирајуће електронске микроскопије (<i>SEM</i>)	17
1.4.2. Одеђивање процентуалне порозности методом замене течности	18
1.4.3. Одређивање хидрофилних/хидрофобних карактеристика добијене матрице	19
1.4.4. Одређивање коефицијента биоразградивости добијене матрице	19
1.5. <i>In vitro</i> методе у ткивном инжењерству.....	19
1.6. Употреба електроспинованих матрица у ткивном инжењерству и регенеративној медицини	21
1.6.1. Регенеративни потенцијал матрица у ткивном инжењерству коже	22
1.6.2. Регенеративни потенцијал матрица у инжењерству нервног ткива	24
1.6.3. Регенеративни потенцијал матрица у инжењерству коштаног ткива	25
1.6.4. Регенеративни потенцијал матрица у инжењерству хрскавице	27
1.6.5. Регенеративни потенцијал матрица у инжењерству крвних судова (васкуларног ткива).....	28
2. Циљ истраживања	31
3. Методологија	31
3.1. Материјали	31
3.2. Електроспининг.....	31
3.3. Тест цитотоксичности (<i>MTT</i>)	32
3.4. Scratch метода <i>in vitro</i>	33
3.5. Карактеризација морфологије влакана	33
3.6. Статистичка анализа	33
4. Резултати	34
4.1. Морфологија влакана.....	34
4.2. <i>MTT</i> тест	34
4.3. Скреч метода	35
5. Дискусија.....	36
6. Закључци	39
7. Литература.....	40

Скраћенице

ECM (енг. *extracellular matrix*) – екстрацелуларни матрикс

RCP (енг. *recombinant collagen protein*) – технике синтезе колагена

PCL (енг. *polycaprolactone*) - поликапролактон

PEG (енг. *polyethylene glycol*) - полиетиленгликол

SCPL (енг. *solvent casting/particulate leaching*) – техника испирање соли

TIPS (енг. *thermally induced phase separation*) – термички индуковано фазно раздвајање

FDT (енг. *freeze drying technique*) – техника лиофилизације

RP (енг. *rapid prototyping*) – брза израда прототипова

SLS (енг. *selective laser sintering*) – селективно ласерско синтеровање

PLGA (енг. *poly lactic-co-glycolic acid*) – полигликолактидна киселина

TGF-1 (енг. *transforming growth factor 1*) – трансформишући фактор раста-1

bFGF (енг. *basic fibroblast growth factor*) – базични фактор раста фибробласта

CNS (енг. *central nervous system*) – централни нервни систем

PNS (енг. *peripheral nervous system*) – периферни нервни систем

RSC (енг. *rat schwann cells*) – шванове ћелије пацова

PEO (енг. *polyethylene oxide*) – полиетилен оксид

MSC (енг. *mesenchymal stem cells*) – мезенхималне матичне ћелије

PLLA (енг. *poly-L-lactic acid*) – поли-л-лактидна киселина

PVDF (енг. *polyvinylidene fluoride*) – поливинилиден флуорид

VEGF (енг. *vascular endothelial growth factor*) – ендотелијални васкуларни фактор раста

SEM (енг. *scanning electron microscope*) – скенирајућа електронска микроскопија

PBS (енг. *phosphate buffered saline*) – фосфатни говеђи пуфер

MRC-5 (енг. *medical research council cell strain 5*) – фибробласти плеуре плућа фетуса

PVA (енг. *polyvinyl alcohol*) – поливинил алкохол

1. Увод

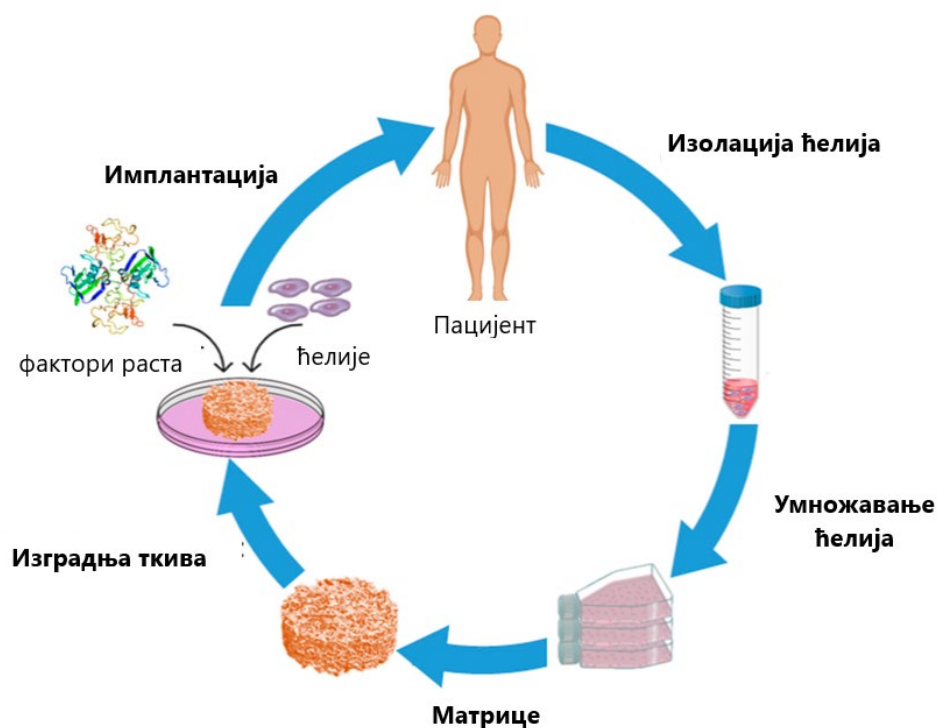
Вековима уназад, људска популација је била изложена различитим спољашњим и унутрашњим факторима који су умногоме допринели отежавању животних функција. Суочавање са различитим бактеријским и вирусним инфекцијама, инфламаторним и малигним болестима и системским дегенеративним поремећајима условила је модерну медицину да драстично унапредује и омогући дужи и квалитетнији живот људској врсти.

Крајем другог и почетком трећег миленијума, модерна наука је прихватила концепт мултидисциплинарности, а тиме је отпочет нови научни поредак. Многе науке, попут медицине, биологије и хемије отпочеле су сарадњу са информационим и инжињерским наукама, а као резултат дошло је до развоја нових мултидисциплинарних приступа. Један такав приступ који показује велику перспективу у лечењу људске популације јесте ткивно инжењерство.

1.1. Ткивно инжењерство

Повреде и дегенерација ткива и органа су све чешће појаве у клиничкој пракси. Иако је медицина унапредовала, могућност замене повређених или оболелих ткива и органа је у великој мери ограничена због смањене доступности и биокомпатибилности донора. С тим у вези, научници се све више базирају на проналажење алтернативних метода замене, а један од њих јесте ткивно инжењерство.

Ткивно инжењерство представља мултидисциплинарни приступ који подразумева коришћење основних принципа ћелијске биологије и машинског инжењерства у циљу развоја нових ткива и органа. Основна технологија ткивног инжењерства се може представити у неколико корака (Слика 1). Први корак подразумева изолацију ћелија из одређеног извора који може бити алогеног, ксеногеног или аутологог порекла. Затим се ћелије умножавају у ћелијским културама или биореакторима. Други корак подразумева засејавање ћелија на матрице уз присуство одговарајућег медијума богатог хранљивим материјама и факторима раста. У оваквим условима ћелије се размножавају и диференцирају, међусобно се повезују, а потом адхерирају за матрицу и као крајњи производ настаје вештачко ткиво. Овакво ткиво морфолошки и функционално мора да подсећа на ткиво које треба заменити. Трећи уједно и последњи корак подразумева трансплантацију новонасталога ткива у тело пацијента (Mathew et al., 2016).



Слика 1. Шематски приказ основне технологије ткивног инжењерства

Приликом процесуирања новог ткива, веома је битно узети у обзир тип ћелије, ћелијску сигнализацију и карактеристике матрица. Иако је међућелијска комуникација сигналним молекулима неопходна за синтезу новог ткива, највише пажње се усмерава на карактеристике матрица због своје подесности (Rim et al., 2013).

У ткивном инжењерству процес генезе ткива се може извести на два начина, *in vitro* и *in vivo* приступом. *In vitro* приступ представља генезу новог ткива у лабораторијским условима, које се потом убацује у пацијента на оштећено подручје. *In vivo* приступ се заснива на убацивању матрица које садрже биомолекуле потребне за регенерацију оштећеног ткива у животињске моделе. Који год приступ да се примењује неопходно је направити биоразградиву матрицу која ће имитирати екстрацелуларни матрикс (Mathew et al., 2016; Sudhakar et al., 2015).

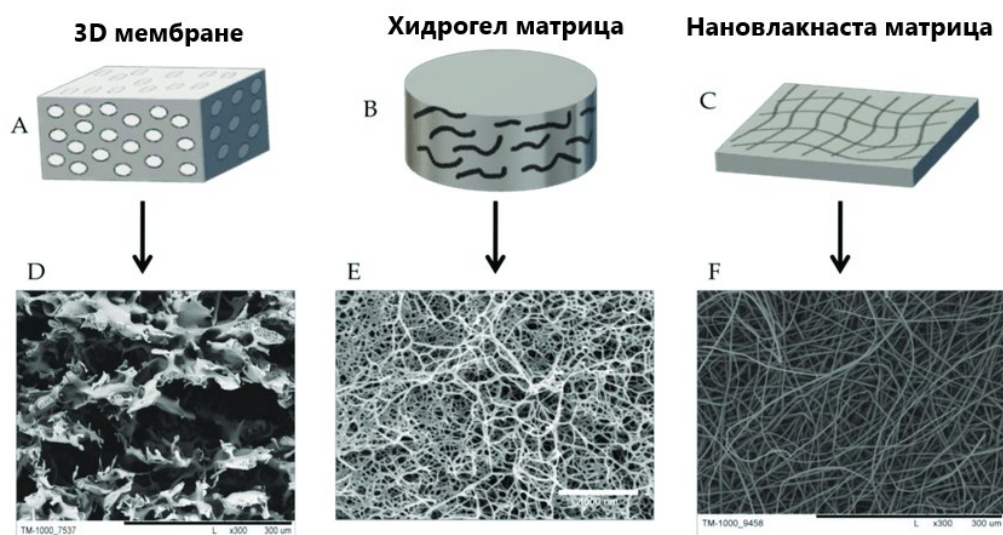
1.1.1. Матрице – ћелијски носачи

Микроокружење људског организма у којем ћелије живе назива се екстрацелуларни матрикс (енг. *extracellular matrix* – *ECM*). ECM је производ резидентних ћелија, који се константно мења у зависности од фактора спољашње средине као што су концентрација кисеоника, рН вредност, доступност хранљивих материја и механичко оптерећење (Mathew et al., 2016). У оваквим природним условима ћелије се несметано размножавају, расту, међусобно комуницирају и на тај начин формирају ткиво.

Циљ ткивног инжењерства јесте да се конструише носач који би имао сличне карактеристике као екстрацелуларни матрикс. Највећи проблем представља још увек непотпуно разумевање функција ЕСМ, као и његова интеракција са ћелијама. С тим у вези, деценијама уназад научници покушавају да конструишу идеалну матрицу, носач/подлогу на којој би ћелије у *in vitro* условима могле да остваре своје физиолошке функције и награде ново ткиво.

У зависности од начина процесуирања, постоје три основна типа (Слика 2) ћелијских носача (Balasubramanian et al., 2022):

1. Мембранозне матрице – добијају се методом 3D штампања;
2. Хидрогел матрице – добијају се директним физичко-хемијским умрежавањем полимера;
3. Нановлакнасте матрице – добијају се методом електроспининга



Слика 2. Основна подела матрица у ткивном инжењерству

1.1.1.1. Карактеристике идеалне матрице

Приликом конструисања матрице, потребно је задовољити више критеријума: механичка својства, порозност, биокompatибилност, биоразградивост и биоактивност.

У ткивном инжењерству, неопходно је узети у обзир механичка својства биоматеријала који ће се користити за креирање матрица. Најпре, механичка својства матрице треба прилагодити механичким својствима ткива којег треба заменити. На пример, ако ће се матрица користити за фиксирање костију или замену зглобних елемената неопходно је да поседује високу механичку чврстоћу не би ли испољила максималан степен функционалности. Приликом процесуирања

матрица за инжењерство кожног ткива потребно је користити биоматеријале који поседују висок степен еластичности (Mathew et al., 2016).

О ком год ткиву да је реч, идеална структура матрица треба да се одликује високим степеном порозности. Матрице треба да обилују повезаном структуром пора не би ли се ћелијама омогућила потребна комуникација, као и довољна количина хранљивих материја. Такође, порозна природа матрица може поспешити неоваскуларизацију. У ткивном инжењерству порозне скеле се најчешће користе за конструисање вештачких крвних судова и коже, као и за реконструкцију костију и хрскавице (Pearce et al., 2020; Mathew et al., 2016).

Пре него што се вештачко ткиво угради на оштећено место, потребно је да буде компатибилно са организмом. Сваки биоматеријал има одређен степен биокомпатибилности у односу на ткиво домаћина. Једноставно речено, биокомпатибилност је својство материјала да приликом контакта са ткивом не ремети његове физиолошке функције. У случају да матрица није компатибилна са ткивом домаћина, може доћи до озбиљних компликација у виду акутне и хроничне токсичности, генотоксичности, хемотоксичности, имунотоксичности и канцерогенезе (Mathew et al., 2016).

Након што вештачко ткиво изврши своју функцију, потребно је да се разгради и да сви његови продукти буду елиминисани из организма. У идеалном случају, брзина разградње матрица треба да буде пропорционална брзини регенерације жељеног ткива (Pearce et al., 2020).

1.2. Употреба полимера у ткивном инжењерству

Као што је већ напоменуто, да би се синтетисало ново ткиво, неопходно је направити погодну матрицу која ће одржавати потпору ћелијама и имитирати екстрацелуларни матрикс (ECM). Екстрацелуларни матрикс ствара специфично микроокружење у којем ћелије међусобно комуницирају и формирају нова ткива. С тим у вези, ECM представља кључну карику у ткивном инжењерству (Sudhakar et al., 2015). Како би матрица што више наликовала ECM, веома је битно изабрати одговарајући материјал за њену синтезу. У ове сврхе, до сада су коришћени метални, керамички и полимерни биоматеријали. Због добре биокомпатибилности, биоразградивости и механичке чврстоће, најбоље су се показали полимерни биоматеријали (Venkatesan et al., 2015).

Полимер је супстанца или материјал који се састоји од веома великих молекула или макромолекула састављених од многобројних понављајућих подјединица. Полимери, природни и синтетички, створени су полимеризацијом многих малих молекула, познатих као мономери. Њихова велика молекулска маса, у односу на једињења малих молекула, омогућава им јединствена физичка својства, укључујући жилавост, високу еластичност, и склоност стварању аморфних и полукристалних структура. Због широког спектра својстава, у ткивном инжењерству

се користе и синтетички и природни полимери о којима ће бити више речи у наставку текста (Табела 1).

ПОЛИМЕРИ КОЈИ СЕ КОРИСТЕ У ТКИВНОМ ИНЖЕЊЕРСТВУ		
ПРИРОДНИ ПОЛИМЕРИ		СИНТЕТИЧКИ ПОЛИМЕРИ
ПРОТЕИНИ	ПОЛИСАХАРИДИ	Полилактидна киселина PLA
Колаген – структурни протеин сисара, главна компонента ЕСМ.	Алгинат – синтетишу га смеђе алге и поједине бактерије.	Полигликолидна киселина PGA
Фибрин – сферопроtein који има веома битну улогу у згрушавању крви.	Хитозан – настаје хемијском обрадом хитина, који улази у састав егзоскелета инсеката и ракова.	Полилактидгликолна киселина PLGA
Фиброин – синтетишу га поједини пауци и свилене бубе. Представља језгро свиле.	Хијалуронска киселина – гликозаминогликан који улази у састав везивног и нервног ткива сисара.	Поликапролактон PCL
Фибронектин – улази у састав ЕСМ сисара.	Скроб – налази се у многим деловима биљака. Енергетска резерва.	Полиетиленгликол PEG
Желатин – добија се хидролизом колагена	Агар – улази у састав ћелијског зида црвених алги.	

Табела 1. Природни и синтетички полимери који се користе у ткивном инжењерству

1.2.1. Природни полимери

Природни полимери су молекули које синтетишу ћелије различитих организама (животиње, биљке, алге) (Lee et al., 2017). Због свог порекла природни полимери се чешће употребљавају у производњи матрица у поређењу са синтетичким полимерима. Наиме, структура која наликује на структуре екстрацелуларног матрикса, биокомпатибилност, биоразградивост и мања токсичност ових полимера омогућава добијање квалитетнијих матрица. Такве матрице имају биомиметичку архитектуру и у високом степену подржавају ћелијску адхезију, пролиферацију и диференцијацију. У зависности од хемијске структуре, природни полимери се

могу поделити на: 1. протеине (колаген, желатин, итд.) и 2. полисахариде (алгинат, хитозан итд.) (Venkatesan et al., 2015).

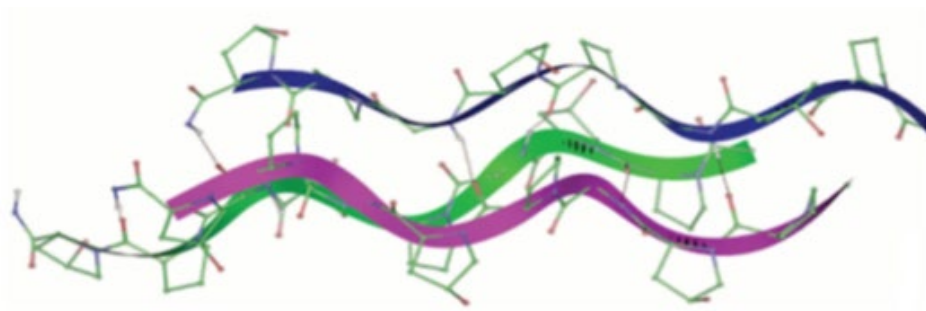
Колаген, најзаступљенији структурни протеин сисара, представља главну компоненту екстрацелуларног матрикса (Lee et al., 2017). Изграђен је од три полипептидна ланца (два $\alpha 1$ и један $\alpha 2$), која се међусобно преплићу формирајући троструку спиралу (Слика 3А). Полипептидни ланци су богати 4-хидроксипролином, пролином и глицином. Колаген има бројне карактеристике које га чине идеалним материјалом за синтезу матрица. Има изражену биокомпатибилност, слабу антигеност, и лако се комбинује са другим биоматеријалима. Најчешће се изолује из говеда, свиња и коња, али због могућности преноса патогена на човека, може се синтетисати и рекомбинантним техникама (енг. *RCP - recombinant collagen protein*) (Guo et al., 2021).

Желатин представља мешавину различитих пептида, добијену хидролизом колагена. Услед пуцања пептидних и водичних веза у колагену, формирају се насумично распоређени пептиди (Слика 3Б), те желатин нема одређену структуру (Liu et al., 2015). Основна карактеристика желатина јесте способност формирања хидрогела. Због ове карактеристике у ткивном инжењерству се користи за производњу матрица. Такође, висока биокомпатибилност и биоразградивост омогућавају лакшу апликацију у организам (Guo et al., 2021).

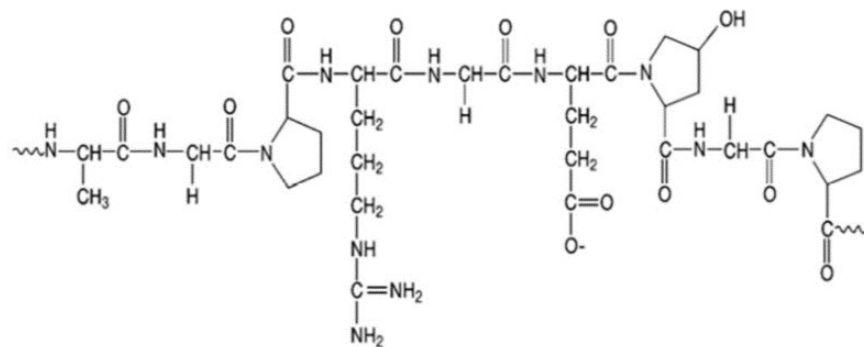
Алгинат је природни полисахарид којег синтетишу поједине врсте смеђих алги и бактерија. Његову хемијску структуру чине блокови остатака Д-мануронске и глукуронске киселине (Слика 3Ц). Однос у количини градивних блокова диктира физичка својства алгината као биоматеријала. Позитивне карактеристике овог полимера, као што су биокомпатибилност, нетоксичност и олакшана модификација хемијске структуре омогућавају израду погодних матрица. У ткивном инжењерству се користи у чврстој форми или форми хидрогела. Због смањене механичке чврстоће, најчешће се комбинује са другим биоматеријалима попут хидроксиапатита и хитозана (Guo et al., 2021).

Хитозан је линеарни полисахарид који се добија хемијском обрадом хитина. Хитин се у природи налази у егзоскелету инсеката и ракова, и ћелијском зиду појединих гљива. Хемијску структуру хитозана чине градивни блокови ацетил Д-глукозамина и Д-глукозамина (Слика 3Д). Хитозан се у ткивном инжењерству користи у облику хидрогела, нановлакна или као чврсти порозни биоматеријал. У погледу биомедицинске примене одликује се особинама високе биоразградивости и биокомпатибилности. Осим тога, хитозан испољава и одређену биоактивност. С тим у вези, интеракцијом са околним ћелијама потпомаже структурирању будућег ткива (Venkatesan et al., 2015). Матрице на бази хитозана су најчешће коришћене за регенерацију коже, нерава и хрскавице (Martins et al., 2014).

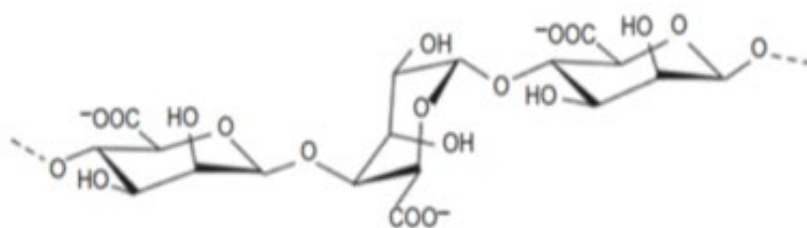
Поред описаних природних полимера, у ткивном инжењерству се користе и фиброин свиле, фибронектин, хијалуронска киселина, еластин, скроб и многи други.



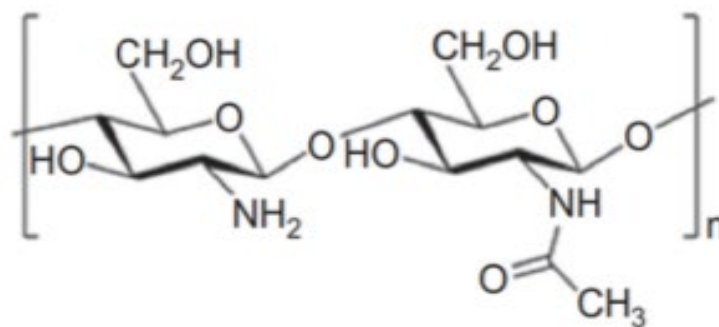
А - колаген



Б - желатин



Ц - алгинат



Д - хитозан

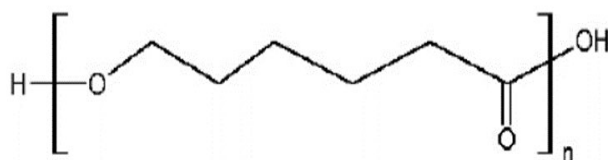
Слика 3. Шематски приказ хемијских структура описаних полимера

1.2.2. Синтетички полимери

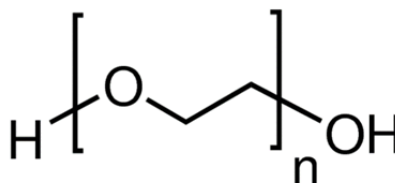
Због комплексних структура природних полимера, као и упитне имуногености дошло је до развоја синтетичких полимера. Синтетичке полимере карактерише контролисана структура и смањен потенцијал за имунски одговор. У ткивном инжењерству за добијање матрица се користе алифатични полиестри, полианхидриди, полифосфазени, полиуретани и хидрогелови. Најчешће коришћени полимери који су се најбоље показали у производњи матрица јесу алифатични полиестри и хидрогелови (Guo & Ma, 2014).

Алифатични полиестри показују одличне особине биоразградивости и биокомпатибилности са различитим људским ћелијама и ткивима. Такође, имају способност да формирају стабилне порозне материјале чија се структура ненарушава у *in vitro* условима култивације ћелија (Guo & Ma, 2014; Mountaki et al., 2021). Из ове групе полимера, поликапролактон (PCL) има широку биомедицинску примену (Слика 4А). PCL, хемијске формуле $(C_6H_{10}O_2)_n$ је биоразградив, полукристални полиестар који се користи у дуготрајним имплантатима и контролисаним апликацијама за ослобађање лекова. У ткивном инжењерству се користи у производњи матрица за одгајање фибробласта и остеобласта (Virijević et al., 2021). Поред PCL, за изградњу матрица, најчешће се користе полилактидна (енг. *poly(lactic acid)* – PLA) и полигликолна киселина (енг. *poly(glycolic acid)* – PGA).

Синтетички хидрогелови су полимери који имају способност да апсорбују значајне количине воде. Хидрофилност, биоразградивост и структура која подсећа на меко ткиво, хидрогеловима даје епитет најчешће коришћеним полимерима за производњу матрица у ткивном инжењерству. Најобимније проучени синтетички хидрогел је поли (етилен гликол) (PEG) (Guo & Ma, 2014). Његова структура се обично изражава као $H-(O-CH_2-CH_2)_n-OH$ (Слика 4Б).



А - PCL



Б - PEG

Слика 4. Приказ хемијске структуре поменутих синтетичких полимера

У ткивном инжењерству, PCL и PEG се користе као кополимери. Комбинацијом ових полимера добија се чврста матрица која показује висок степен биокомпатибилности и биоразградивости (Virijević et al., 2021).

1.3. Технике које се користе за процесуирање матрица

До сада је постигнут значајан напредак у ткивном инжењерству, поготово у синтези дво- и тро-димензионалних матрица које би потенцијално могле да се користе за замену оштећених ткива и органа. Међутим, у постојећој литератури постоје бројни недостаци, нарочито када се говори о практичној примени ткивног инжењерства, односно предклиничким и клиничким испитивањима. Штавише, у литератури се примећује да, иако су развијене нове технике за синтезу матрица, неке од ранијих техника се и даље користе. То имплицира да предности које нуди новија и напреднија технологија у поређењу са ранијим нису очигледне и о њима треба детаљно расправити.

Постоје бројне технике које се користе за обраду полимера у циљу синтезе матрица. У зависности од старости можемо их поделити у две велике групе (Табела 2): конвенционалне и напредне технике (Mabrouk, et al., 2020).

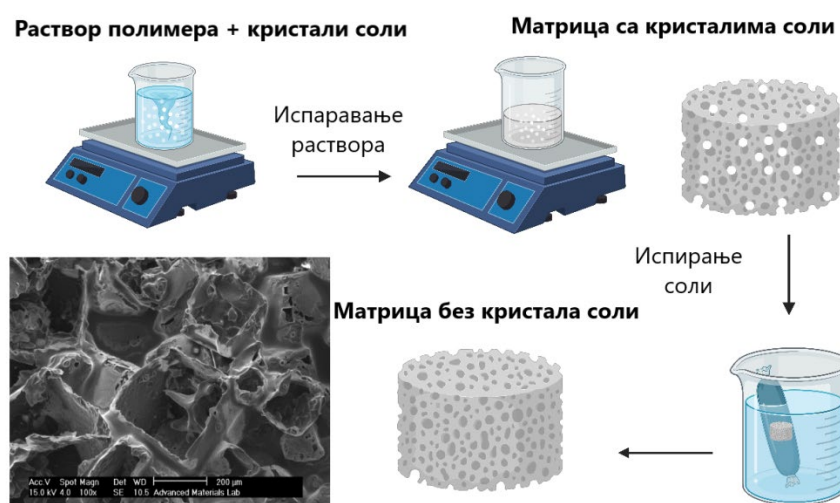
ТЕХНИКЕ КОЈЕ СЕ КОРИСТЕ ЗА ПРОЦЕСУИРАЊЕ МАТРИЦА	
КОНВЕНЦИОНАЛНЕ	НАПРЕДНЕ
Испирање соли (енг. <i>Solvent casting/particulate leaching SCPL</i>)	Брза израга прототипова (енг. <i>енг. Rapid prototyping – RP</i>) - тродимензионално штампање (енг. <i>3D printing</i>) - селективно ласерско синтеровање (енг. <i>Selective laser sintering – SLS</i>) - стереолитографија (енг. <i>Stereolithography</i>).
Калупљење растопљеног полимера (енг. <i>Melt molding</i>)	
Гасно пенушање (енг. <i>Gas foaming</i>)	
Термички индуковано фазно раздвајање (енг. <i>Thermally induced phase separation - TIPS</i>)	
Техника лиофилизације (енг. <i>Freeze drying technique</i>)	Електроспининг
Заснивају на уклањању одређених делова почетне структуре полимерног раствора.	Заснивају се на директној синтези матрица помоћу различитих полимера.
Тешко је контролисати величину пора и влакана	Могућност потпуне контроле над обликом, димензијама и механичким својствима матрица.
Најчешће користе синтетичке полимере.	Користе синтетичке и природне полимере.
Користе по ћелије штетне супстанце приликом израде матрица.	Могућност персонализоване терапије.

Табела 2. Конвенционалне и напредне технике за процесуирање матрица

1.3.1. Конвенционалне технике за процесуирање матрица

1.3.1.1. Испирање соли – SCPL

SCPL је најстарија техника за синтезу матрица. Ова техника користи кристале соли за стварање пора унутар полимера. Наиме, прво се кристали соли стављају у калуп, а затим се полимером попуњава преостали простор. Након што полимер очврсне, со се уклања помоћу растварача (Слика 5). Када се uklони сва со из полимера, формирањем шупљина настају поре матрице (Loh & Choong, 2013). Иако једноставност ове технике, као и могућност контроле порозности представљају позитиван исход у процесуирању матрица, неуједначен распоред честица соли кроз растварач ову технику чини отежавајућом (Mabrouk et al., 2020; Abdelaziz et al., 2023).



Слика 5. Шематски приказ SCPL технике

1.3.1.2. Гасно пенушање - Gas foaming

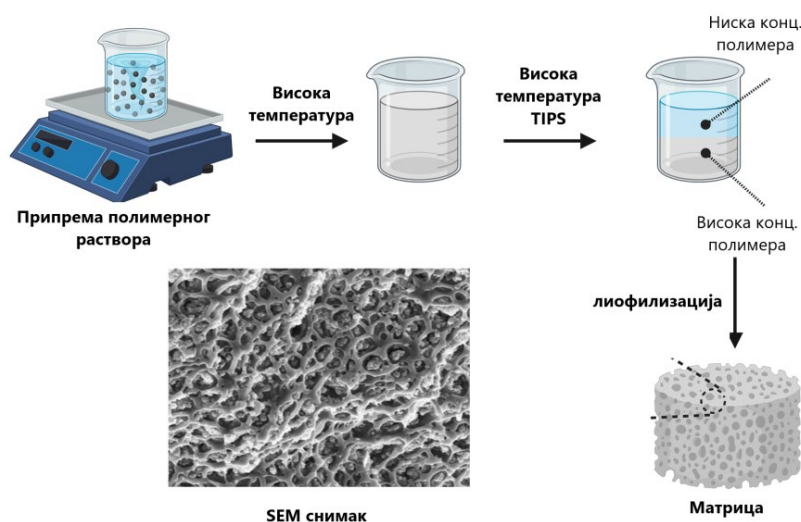
Назив ове технике потиче од пенушаве супстанце која се користи за израду полимера, док се гас користи као средство за стварање пора. Превасходно се формирају дискови полимера у које се упумпава гас (нпр. N₂ or CO₂) под високим притиском (Слика 6). Техника се завршава процесом лиофилизације, где као производ настаје матрица просечне величине пора од око 100 µm (Mabrouk et al., 2020; Eltom et al., 2019). Овом методом је веома тешко контролисати порозност матрице, јер се гас користи као порогено средство. Такође, због присуства високе температуре у процесу израде матрица, одбацује се могућност коришћења биоактивних молекула (Loh & Choong, 2013).



Слика 6. Шематски приказ технике пенушања гаса

1.3.1.3. Термички индуковано фазно раздвајање – TIPS

Ова техника процесуирања матрица заснива се на фазном раздвајању применом различите температуре. Конкретно, прво се при високој температури полимер раствара у одговарајућем растварачу. Такав раствор полимера се убацује у калуп који се постепено хлади до замрзавања. На крају, растварач се уклања процесом лиофилизације, а као крајњи производ настаје порозна структура нано размера (Слика 7). Ограничавајући фактор TIPS технике је што матрице обилују веома малим порама, што отежава ћелијуску комуникацију (Eltom et al., 2019; Loh & Choong, 2013).



Слика 7. Шематски приказ TIPS технике

1.3.1.4. Техника лиофилизације

Први корак у овој техници подразумева растварање синтетичког полимера помоћу одређеног растварача. Након растварања, добијени раствор се хлади до тачке смрзавања, при чему од растварача настају кристали леда (Слика 8). Крајњи корак подразумева примену процеса сублимације, при којем долази до испаравања растварача. Након испаравања, на местима где су се налазили кристали леда, остају празне структуре које представљају поре (Eltom et al., 2019; Abdelaziz et al., 2023). Избегавањем високих температура, ова метода је погодна за коришћење природних полимера у изради ћелијских носача. Међутим, велики недостатак се огледа у изради веома хетерогених матрица (Loh & Choong, 2013).



Слика 8. Шематски приказ лиофилизације

1.3.2. Напредне технике за процесуирање матрица

У досадашњим истраживањима, конвенционалне технике за процесуирање матрица за коришћење у ткивном инжењерству, су показале велике недостатке, укључујући бројне потешкоће приликом израде пора, контроле порозности и структуре самих матрица. Због бројних трендова који су се појавили у регенеративној медицини, створила се потреба за развојем нових техника за процесуирање. У последњих неколико деценија почеле су да се користе технике као што су брза израда прототипова и електроспининг.

1.3.2.1. Брза израда прототипова (енг. Rapid prototyping – RP)

За разлику од конвенционалних техника које се ослањају на уклањање делова почетне структуре полимерног раствора, да би се добила жељена матрица, RP технике користе процес адиције танких слојева материјала. Предност RP техника у односу на конвенционалне технике огледа се у могућности потпуне контроле над обликом, димензијама и механичким својствима, што омогућава креирање матрица са високим степеном биомимикрије (Abdelaziz et al., 2023). У погледу израде матрица, технике брзе израде прототипова могу да се користе за персонализовану производњу. С тим у вези, потенцијално сваки пацијент би могао да добије одговарајућу матрицу (Abdelaal et al, 2013).

У досадашњој литератури најчешће коришћене технике брзе израде прототипова су тродимензионално штампање (енг. 3D printing), селективно ласерско синтеровање (енг. Selective laser sintering – SLS) и стереолитографија (енг. Stereolithography).

Тродимензионално штампање матрица се одвија помоћу машине „штампача“ која прска раствор везива на слој прашкастих честица (полимера) позиционираних хоризонтално на платформи унутар машине. Услед контакта везива (лепка) и полимерних честица долази до формирања дводимензионалних слојева, што узрокује спуштање платформе. Овакви процеси се понављају више стотина пута док не настане матрица тродимензионалне структуре (Abdelaziz et al., 2023). За 3D штампање је карактеристично да се најчешће врши на собној температури, па се приликом процеса матрица могу уградити бројни термолабилни биомолекули (плазмиди, алгинат, хијалуронат, фибриноген, колаген итд.) (Roseti et al., 2017).

Биоштампање представља једну од техника тродимензионалног штампања. Ова најсавременија техника штампања, подразумева коришћење биолошког материјала (ћелија, ткива, биомолекула) у комбинацији са биоразградивим полимерима као базу за синтезу матрица. Конкретно, помоћу биоштампања је могуће изградити персонализовану матрицу (Eltom et al., 2019).

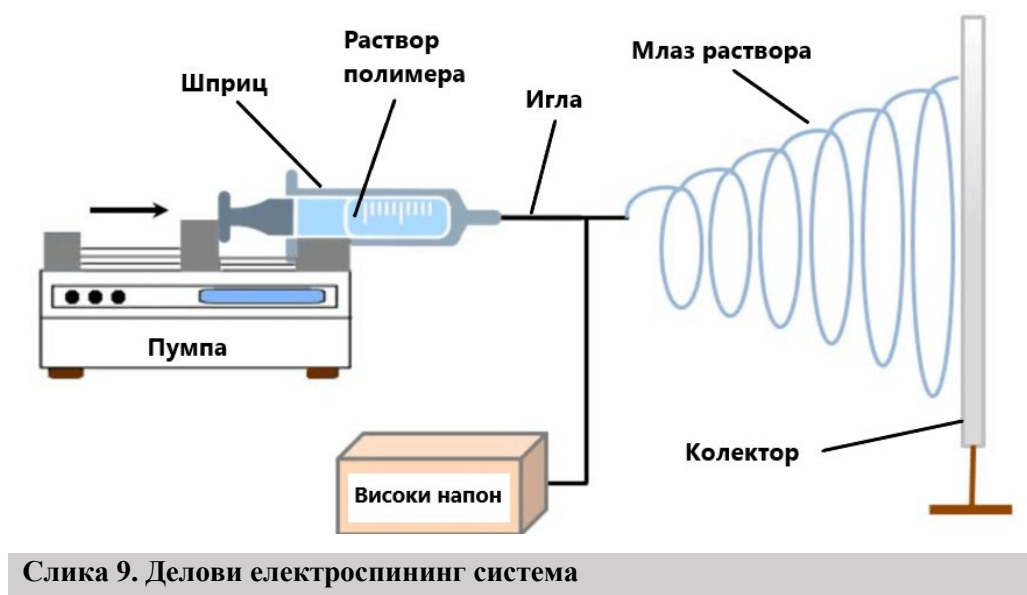
Селективно ласерско синтеровање је техника која за синтезу матрица користи ласерски сноп. Наиме, рачунарски контролисан ласерски сноп спаја прашкасте полимере градећи слојеве који се међусобно повезују. SLS је брза и исплатива техника која не захтева употребу органских растварача. Међутим, зато што је зависна од високе температуре, није могуће користити било какве биомолекуле у синтези матрица (Loh & Choong, 2013)

Стереолитографија је једна од првих техника брзе израде прототипова. Код ове технике, полимери у виду смоле се наносе на спуштајућу платформу. Након сваког наношења платформа се спушта, а слој смоле се суши помоћу ултра-љубичастих зрака (Abdelaziz et al., 2023).

1.3.2.2. Електроспининг

Данас веома популарна, електроспининг техника представља електрохидродинамички процес за добијање нановлакна пречника од неколико нанометара до неколико микрометара из раствора полимера (Živanović, 2020).

Електроспининг користи електростатичке силе за ‘истезање’ раствора из игле. Добијена влакна се прикупљају као скуп континуираних нановлакна на специјалној подлози. Електроспининг систем углавном чине четири компоненте: 1. пумпа; 2. капиларна цев са иглом малог пречника; 3. извор високог напона и 4. метални колектор (Слика 9). Пумпа покреће раствор полимера у капиларној цеви, при чему се на крају негативно наелектрисане игле формира кап раствора полимера. Ова кап се под утицајем високог напона деформише, а као резултат формира се *Taylor-ов* конус (Слика 10) и започиње формирање влакана. Такође, под утицајем високог напона долази до испаравања растварача, па се на колектору депонује мрежа сувих нановлакна (Unnithan et al., 2015).



1.3.2.2.1. Параметри електроспининг технике

Електроспинована нановлакна показују бројне позитивне карактеристике (велика порозности, мала величине пора и велика контактна површине) због којих се успешно користе у ткивном инжењерству за добијање матрица. Како би се добила погодна нановлакна потребно је оптимизовати целокупан процес електроспининга. Главни параметри који се узимају у обзир су: параметри раствора, процеса и амбијента (Živanović, 2020).



Слика 10. Формирање *Taylor-овог* конуса

1.3.2.2.1.1. Параметри раствора

Када се полимер у чврстом стању раствори у погодном растварачу, вискозност раствора је пропорционална концентрацији полимера. При формирању fine влакнасте мрежа концентрација раствора не би требало да буде нити прениска, нити превисока. Пожељно је постићи оптималну концентрацију раствора, јер се при врло ниским концентрацијама формирају зрна/перле, док се при веома високим концентрацијама раствора не формирају континуирана влакна (Unnithan et al., 2015).

Молекуларна маса или тежина је још један важан параметар који утиче на морфологију нановлакна, јер утиче на вискозност, површинску напетост и проводљивост материјала. Одржавање константне концентрације, коришћењем полимера са прениском молекулском масом доводи до стварања перлица, а не влакана, док велика молекулска тежина има за последицу производњу влакана великих пречника. Као што је већ напоменуто вискозност, концентрација раствора и молекуларна маса полимера су међусобно повезани. Конкретно, вискозност раствора може се подесити променом концентрације полимера у раствору (Unnithan et al., 2015).

На крају, два веома битна параметра која треба подесити да би се формирала добра мрежа нановлакна јесу површинска напетост и проводљивост. Коришћењем различитих растварача добијају се различите површинске напетости. Смањивање површинске напетости доводи до стварања нановлакна без куглица. Проводљивост раствора углавном се одређује према врсти полимера, коришћеном растварачу и присуству јонизујућих соли. При томе, раствори са већом проводљивошћу доводе до стварања нановлакна мањег пречника.

1.3.2.2.1.2. Параметри процеса

Примењени напон је пресудан фактор у електроспиновању јер праг напона мора да буде премашен како би се омогућило формирање Тејлоровог конуса. Брзина протока полимера у шприцу је још један битан параметар јер брзина преноса материјала и брзина млаза су директно повезани. Препоручује се спорија брзина како би се приуштило довољно времена за испаравање растварача (Virijević et al., 2021).

Удаљеност између колектора је међу значајним параметрима, мада је његов утицај мање значајан на морфологију влакана у поређењу са другим параметрима. Оптимална удаљеност мора бити изабрана тако да се омогући испаравање растварача из полимерног раствора (Unnithan et al., 2015).

1.3.2.2.1.3. Параметри амбијента

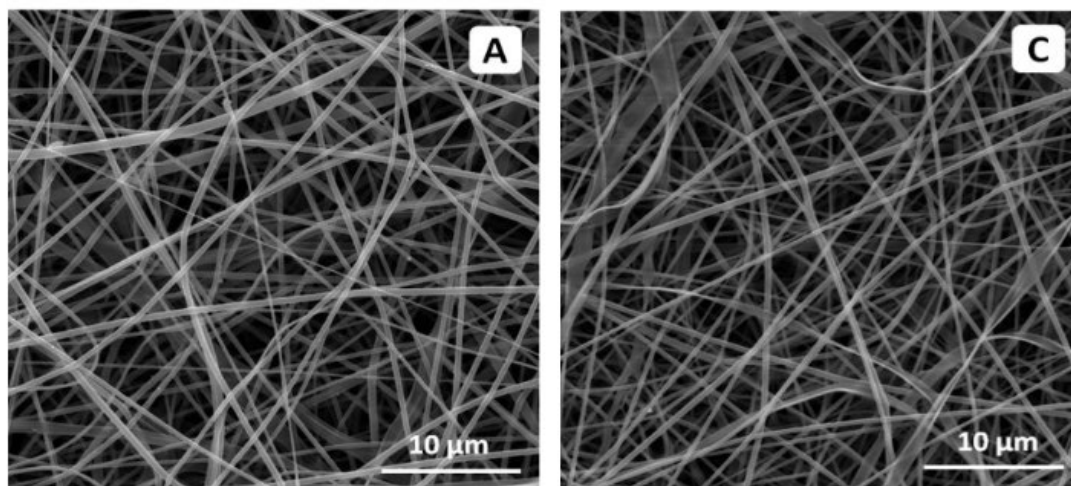
Параметри амбијента подразумевају влажност и температуру околине, температуру раствора и проток ваздуха. Углавном се подешавају у односу на особине раствора полимера.

1.4. Методе карактеризације матрице са применом у ткивном инжењерству

Након завршеног процесуирања матрица, следећи корак подразумева карактеризацију истих. Иако је хемијска структура матрица позната, потребно је одредити многе параметре, како би се утврдила њихова функционалност (Živanović & Filipović, 2022). Најчешће се одређују следећи параметри: изглед матрице (дијаметар влакана и количина пора), проценат порозности, способност материјала да апсорбује воду и коефицијент биоразградивости.

1.4.1 Карактеризација матрица коришћењем скенирајуће електронске микроскопије (SEM)

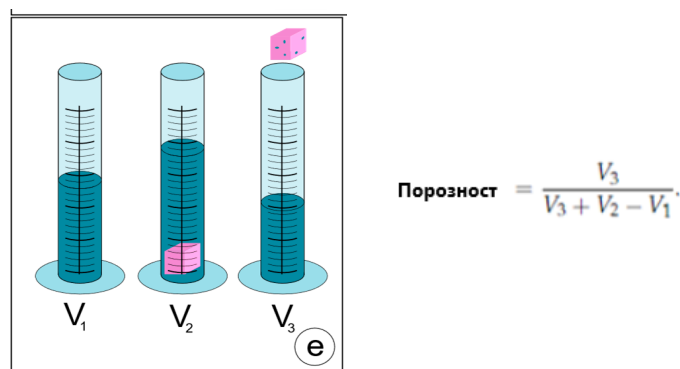
Помоћу скенирајуће електронске микроскопије могуће је добити слике високог квалитета (високе резолуције), па се ова метода најчешће употребљава у сврхе карактеризације матрица (Слика 11). С тим у вези, углавном се користи за одређивање порозности материјала и дијаметра нановлакна. Добијене слике се обрађују у програмима као што су ImageJ и DiameterJ (Živanović & Filipović, 2022).



Слика 11. Изглед нановлакнасте матрице - СЕМ

1.4.2. Одеђивање процентуалне порозности методом замене течности

Порозност је једна од најбитнијих карактеристика свих матрица које потенцијално могу да имитирају ЕСМ. С тим у вези постоји велики број метода помоћу којих се може одредити порозност природних и синтетичких носача ћелија, од којих већина изисткују компликоване и скупе процедуре. Метода замене течности представља веома економичну технику помоћу које се на брз и једноставан начин може одредити проценат порозности одређене матрице. Наиме, матрица се поставља у течност познате запремине (V_1) док се не испуне све поре, при чему се мери укупна запремина (V_2). Затим се натопљена матрица одстрањује, при чему се бележи крајња запремина течности (V_3). Помоћу добијених запремина, порозност се израчунава према једначини приказаној на слици 12. Течности које се користе у овој методи су најчешће етанол и хексан (Lopez-Marquez et al., 2022).



Слика 12. Метода замене течности

1.4.3. Одређивање хидрофилних/хидрофобних карактеристика добијене матрице

Способност матрица да апсорбују воду је веома битан фактор који се узима у обзир приликом карактеризације. У ове сврхе најчешће се користе две методе: мерење контактеног угла воде и проценат апсорпције воде.

Мерење контактеног угла воде се заснива на постављању капљице дејонизоване воде на површину ћелијског носача, при чему се контактни угао мери постављањем тангенте на трофазну тачку где површина течности додирује чврсту подлогу. За ову методу се користе специјални видео инструменти (нпр. *VCA Optima*), а слике се анализирају помоћу прилагођених софтвера.

У поређењу са горе поменутом методом, коефицијент апсорпције воде представља једноставнију и економичнију методу. Наиме, матрице се убацују у посуде са дејонизованом водом и остављају да осостоје у различитим временским интервалима (2, 5, 10, 15, 20, 25, 30, 45 и 60 минута). Такви узорци се суше на филтер папиру да би се уклонио вишак воде, а затим се одређује њихова тежина. На крају, за израчунавање процента апсорпције воде користи се следећа формула: Апсорпција воде (%) = $[(W_w - W_d)/W_d] \times 100\%$; W_d – тежина узорка пре квашења, W_w – тежина узорка после квашења (Hassan et al., 2016).

1.4.4. Одређивање коефицијента биоразградивости добијене матрице

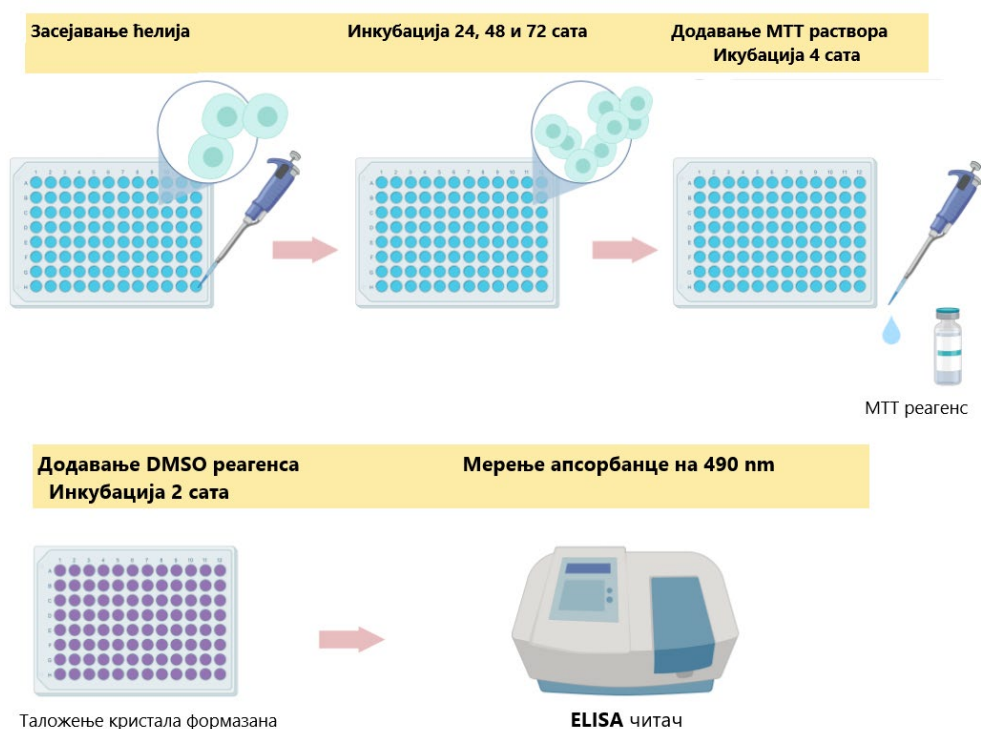
Матрице које се користе као подлоге за развој нових ткива за биомедицинску примену, углавном се праве да буду биоразградиве, односно након што обаве своју функцију у организму временом нестану. За утврђивање овог параметра најчешће се користи PBS (енг. *Phosphate buffer saline*), фосфатни пуфер који имитира физиолошке услове организма. Наиме, матрица се урони у фосфатни пуфер, а затим се мери њен губитак масе у јединици времена. На овај начин, осим биоразградивости, може се утврдити и време за које ће се матрица разградити у физиолошком раствору (Živanović & Filipović, 2022).

1.5. *In vitro* методе у ткивном инжењерству

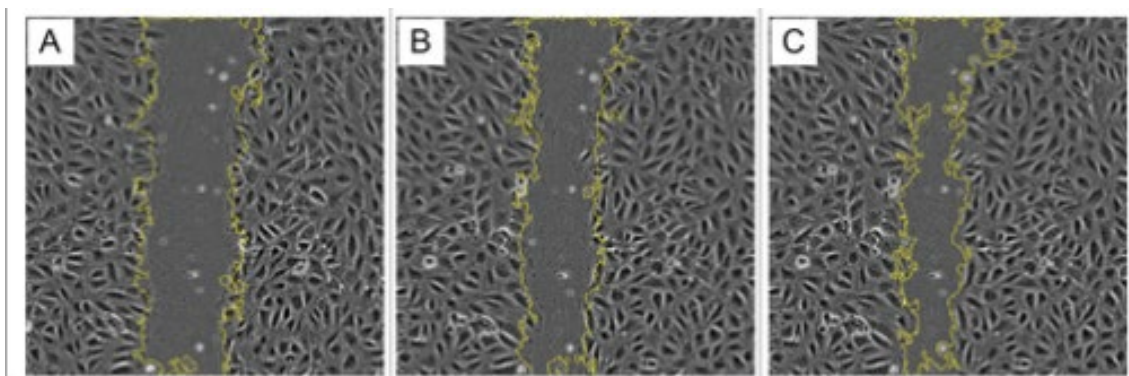
Поред испитивања физичких и хемијских својстава матрица, потребно је одредити и биолошку активност истих. То подразумева примену бројних тестова који укључују ћелијске културе, не би ли се утврдила компатибилност између материјала и одређених ћелија. У лабораторијама се најчешће користе тестови за одређивање токсичности/вијабилности (енг. *MTT assay*) и миграторних способности (енг. *Scratch assay*) датих ћелија. За испитивање ћелијског контакта са матрицом користе се различити адхезиони тестови.

MTT тест (Слика 13) вијабилности је стандардизована метода помоћу које се може утврдити колики је степен токсичности/нетоксичности одређене хемикалије (молекула) на одређену ћелијску линију. Ћелије се првенствено засејавају на стерилне матрице, у медијуму, а потом се постављају у инкубатор (37°C , 5% CO₂) на одређени временски период (најчешће 24, 48, 72h). Након инкубације ћелије се третирају MTT реагенсом (3-(4,5-диметилтиазол-2-ил)-2,5-дифенилтетразолијум бромид). Принцип ове методе се даље заснива на редукцији жутог MTT реагенса до љубичастих кристала формазана. Живе ћелије помоћу ензима митохондијалне дехидрогеназе редукују MTT реагенс до формазана, па је интензитет љубичасте боје једнак броју живих ћелија. Апсорбанца се одређује помоћу ELISA читача на 490 nm (Živanović & Filipović, 2022).

Scratch тест (Слика 14) представља једноставну и економичну методу за проучавање миграторних способности ћелија у *in vitro* условима. Метода се извршава у неколико једноставних корака. Основни корак подразумева стварање огреботине - „ране“ на једнослојним ћелијским културама. Овакве културе се документују сликом и инкубирају у различитим временским интервалима (24h, 48h, 72h итд.). Након сваког периода инкубације, ћелијске културе се поново фотографишу. Овакав след се понавља док „огреботина“ на ћелијској култури не зарасте. Крајњи корак подразумева поређење добијених слика, како би се квантификовао стерен миграције (Liang et al., 2007). У ткивном инжењерству ова метода је погодна за истраживање јер показује на који начин матрица може да утиче на миграторне способности ћелија.



Слика 13. Поступак MTT теста



Слика 14. Микроскопски снимак постепеног затварања ожиљка током Scratch теста

Како би ћелије могле да створе ново ткиво, веома је битно испитати њихов адхезиони потенцијал на ћелијске носаче. У ове сврхе користе се различите методе помоћу којих је могуће утврдити интензитет ћелијске адхезије. **Имунохистохемијска техника бојења фалоидином** представља стандард у оваквим истраживањима. Наиме, фалоидин спречава деполимеризацију актинских филамената, спречавајући хидролазну активност актина F, што даље спречава ћелијско кретање. Бојењем актинских филамената, могуће је утврдити интензитет ћелијске адхезије, јер је агрегација актина директно пропорционална броју прилепљених ћелија. Узорци (матрице са засејаним ћелијама) се прво фиксирају 2% параформалалдехидом током 15 минута. Након испирања, помоћу TritonX раствора врши се пермеабилizација ћелија током 30 минута. Након низа поновног испирања, узорци се боје TRITC (фалоидин-тетраметилродамин Б изотиоцијанат) и DAPI бојом како би се обезбедила видљивост актинских филамената и ћелија. Овако фиксирани и обојени узорци се даље анализирају помоћу конфокалног микроскопа (Herrero-Herrero et al., 2021).

1.6. Употреба електроспинованих матрица у ткивном инжењерству и регенеративној медицини

Услед немогућности конвенционалне медицине да пронађе решење у лечењу многих дегенеративних болести и ткивних оштећења, у протеклих неколико деценија појавила се нова грана медицине, регенеративна медицина. Ова релативно млада грана медицине, вођена законима регенерације људског организма, има за циљ да поправи и унапреди функцију оштећеног ткива или органа. С тим у вези, последњих неколико година, у великом броју медицинских публикација стављен је акценат на истраживање функција матичних ћелија, као и на њихову потенцијалну примену у поправци оштећених ткива и органа.

Иако регенеративна медицина показује велики потенцијал у лечењу оштећених ткива и органа, испоставило се да као самостална област не може да функционише. Поводом тога, дошло је до сарадње медицинских и инжењерских наука, а као производ настала је област регенеративно инжењерство (Flores-Rojas et al., 2023). Ова мултидисциплинарна област, комбинацијом регенеративне медицине и ткивног инжењерства, има за циљ да направи идеалан ћелијски носач. Ћелијски носачи – матрице, дизајнирани да имитирају екстрацелуларни матрикс (олакшавају транспорт материја, промовишу ћелијску адхезију итд.) користе се као база на коју се засејавају матичне ћелије. Као крајњи продукт целокупног процеса настаје вештачко ткиво.

У претходним поглављима било је речи о техникама које се користе за синтезу матрица. С тим у вези, досадашња истраживања су показала велики потенцијал матрица добијеним електроспининг методом. Наиме, електроспиноване матрице имају бројне карактеристике које одговарају екстрацелуларном матриксу, укључујући висок однос површине и запремине, уједначеност нановлакна, висок степен порозности, економичност и лакоћу функционализације са биоактивним молекулима. Штавише, овакве матрице веома лако могу да контролишу брзину ослобађања биоактивних молекула, што их чини погодним кандидатима за испоруку фактора раста и антибиотика приликом трансплатације (Khorshidi, et al., 2016). Такође, помоћу електроспининга могуће је направити матрице, различитих геометријских облика 2D или 3D структуре попут наноцеви, нанокаишева и мреже нановлакна, које се могу користити у различитим областима регенеративне медицине (Qiao et al., 2019; Xue et al., 2019). У наставку текста биће речи о конкретној употреби електроспинованих матрица у различитим сверама регенеративне медицине.

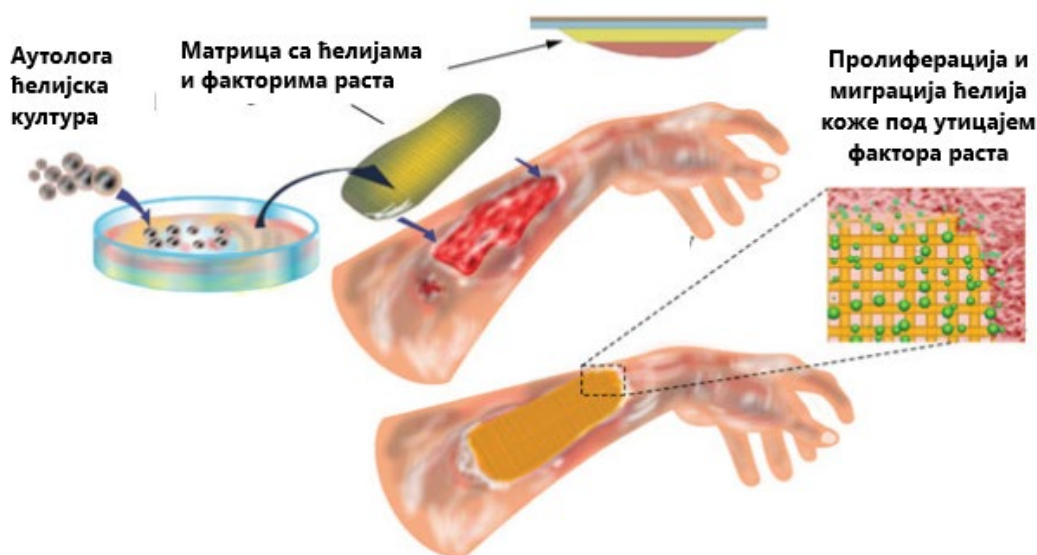
1.6.1. Регенеративни потенцијал матрица у ткивном инжењерству коже

Кожа представља највећи људски орган. С обзиром на то да делује као штит, кожа је прва на удару од различитих врста оштећења. ЕСМ коже је веома сложене грађе, претежно изграђене од фибрила колегена и еластина распоређених у фину мрежасту структуру (Tsepkenko et al., 2019). Кожа је изграђена од два основна слоја: епидермиса и дермиса. Сходно величини оштећења, кожа има одређени регенеративни капацитет. У бази епидермиса, налазе се матичне ћелије које обнављају кератиноците, док дермис који има већи регенеративни капацитет, поседује сву потребну машинерију која се активира приликом зарастања рана (Losquadro, 2017).

Коришћење електроспинованих матрица у сврхе регенерације коже представља велики изазов за ткивно инжењерство. С обзиром на то да поседују мрежасту структуру сличну екстрацелуларном матриксу коже, нановлакнасте електроспиноване матрице имају велики потенцијал у ткивном инжењерству (Слика 15).

Досадашња истраживања у ткивном инжењерству коже показала су да за израду матрица могу да се користе и природни (хитозан, желатин, колаген, фиброин свиле) и синтетички (PLGA и PCL) полимери (Flores-Rojas et al., 2023). Студије које испитују утицај пречника влакана откриле су да влакна величине од 350 до 1100 nm, повећавају пролиферативну моћ фибробласта, што доводи до формирања правилно распоређених ћелијских слојева унутар вештачког ткива. Такође, показало се да је распоред нановлакна матрица веома битна карактеристика приликом израде вештачке коже. С тим у вези, матрице са укрштеним распоредом нановлакна повећавају брзину миграције кератиноцита и фибробласта, у поређењу са матрицама једносмерног распореда (Sun et al., 2018).

У појединим *in vitro* студијама испитивано је неколико молекула фактора раста, укључујући трансформишући фактор раста - 1 (TGF-1) и базични фактор раста фибробласта (bFGF). Уградња поменутих молекула у композитне матрице показала је обећавајуће резултате. Сходно томе, у оба случаја обезбеђена је нормална функција фибробласта коже, праћена инхибицијом хипертрофичног зарастања ране (Chen et al., 2022; Wang et al., 2017). У инжењерство коже се улажу велики напори како би се у што већој мери унапредиле методе трансплантације вештачке коже.



Слика 15. Шематски приказ инжењерства коже – трансплантација вештачке коже. Потенцијална примена електроспинованих матрица у персонализованој терапији регенерације кожних оштећења.

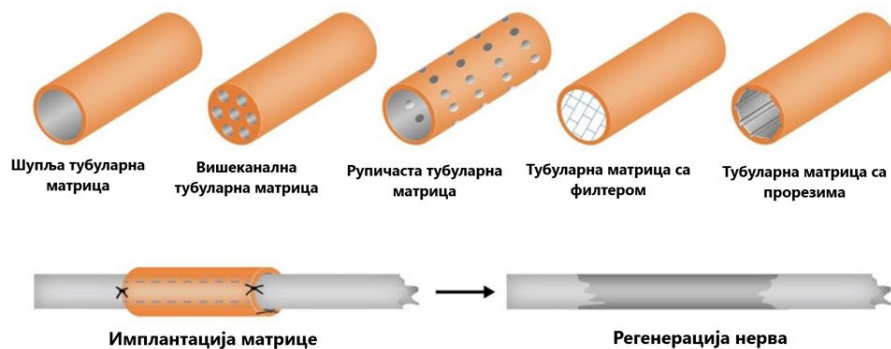
1.6.2. Регенеративни потенцијал матрица у инжењерству нервног ткива

У научним круговима се и дан данас сматра да 99% неурона у људском телу нема способност деобе. Изузетак чине неурони слузокоже носа, који се обнављају на одређени број месеци. И поред овакве чињенице, поједини типови неурона у телу имају способност регенерације, тачније репарације одређених делова. Наиме, моторни неурони приликом блажих траума имају способност репарације својих аксона. У процесу који се назива Валеријанова дегенерација, делови оштећеног аксона подлежу морфолошким промена које доводе до опоравка оштећеног нерва. Целокупан процес је завистан од присуства Шванових ћелија (Gaudet et al., 2011).

Нервни систем је изграђен из два основна дела: централни (*CNS*) и периферни (*PNS*) нервни систем. Унутар целокупног система неурони су окружени глијалним ћелијама. Ове ћелије неуронима обезбеђују потпору, трофичке факторе, као и многе регулаторне факторе неопходне за нормално функционисање ћелије. С обзиом на то да је *PNS* због недостатка коштаног штита подложнији физичким траумама лекари се углавном суочавају са оштећењима периферних нерава (Porović & Sinkjær, 2013). Један од најчешћих хируршких захвата који се изводи приликом оштећења периферног нерва јесте аутолого калемљење. Ова процедура најчешће подразумева узимање одређеног дела суралног нерва пацијента, који се помоћу синтетичког калема имплантира на оштећени нерв (Gaudin et al., 2016). Међутим, оваква врста аутоотрансплантације често доводи до губитка функционалности донорског нерва и многих других компликација које могу утицати на живот пацијента (Muheremu & Ao, 2015).

Узимајући у обзир природу и деликатност аутологе трансплантације нерава, коришћење електроспинованих матрица може имати велики потенцијал у регенерацији нерава. Велики број *in vitro* студија на одређеним неуралним ћелијама је показао да матрице изграђене од природних и синтетичких материјала показују висок степен биокомпатибилности, електрокондуктивности и биоразградивости (Gregory & Phillips, 2021). С тим у вези је једно истраживање које су спровели Sadeghi и сарадници 2019. Године. Наиме, они су користећи PC-12 ћелијску линију, показали да матрице изграђене од хитозана у високом степену подржавају адхезију испитиваних ћелија (Sadeghi et al., 2019). Fadaie и сарадници су открили да композитне матрице изграђене од хитозана и PCL подржавају адхезију и пролиферацију RSC (енг. *Rat Schwann cells*) ћелија (Fadaie et al., 2018). Поред поменутих матрица, високу биокомпатибилност и електропроводљивост показују и матрице изграђене од колагена, целулозе и PLGA (Zha et al., 2019).

У бројним студијама се помињу тубуларни нервни водичи (Слика 16), специјалне врсте матрица у облику канала за које се сматра да имају велики потенцијал у ткивном инжењерингу (Vijayavenkataraman, 2020).



Слика 16. Шематски приказ тубуларних нервних водича

С тим у вези, *in vivo* истраживања на животињским моделима су показала да тубуларне електроспиноване матрице потенцијално могу да послуже као потпорне структуре за повезивање и регенерацију повређених нерава, подстичући причвршћивање, пропацију, раст неурита и регенерацију аксона дуж нервних влакана (Entekhabi et al., 2021). Конкретно, *Jing* и сарадници су извршили имплантацију PLGA каналних матрица и нервних влакана у пацове са дефектом ишијадичног нерва. Резултати су након постоперативног периода од дванаест недеља показали функционални опоравак (Jing et al., 2018). *Kriebel* и сарадници су користили PCL/колаген матрице за трансплантацију 15mm дугачког сегмента у оштећени нерв пацова. У поређењу са стандардним калемом, PCL/колаген матрице су омогућиле бржи опоравак моторичких функција (Kriebel et al., 2017).

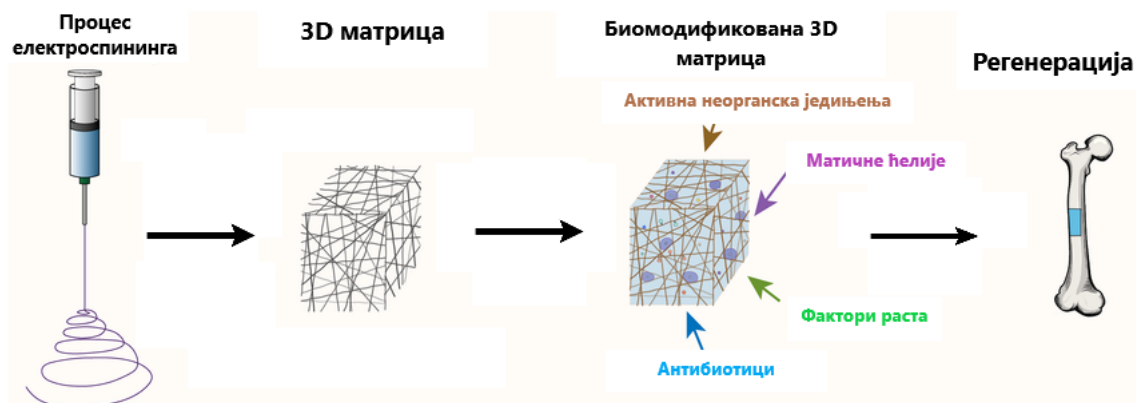
Упркос значајном напретку регенеративне медицине, појавом потенцијалних нових метода трансплантација, прецизно опонашање структуре и функције нерава остаје велики изазов за научну јавност.

1.6.3. Регенеративни потенцијал матрица у инжењерству коштаног ткива

Оштећење коштаног ткива је веома честа појава у људској популацији. Таква оштећења најчешће настају услед физичких траума, тумора и многих дегенеративних болести. Сходно томе, у последњих двадесет година научници су масовно почели да проучавају различите аспекте инжењерства коштаног ткива. Данас, ова водећа област ткивног инжењерства нуди различите обећавајуће приступе за регенерацију коштаног ткива (Shin et al., 2012).

С обзиром на то да су стандардне методе трансплантације коштаног сегмената веома компликоване, електроспиноване матрице би могле да се користе као потенцијална алтернатива. Конкретно, стандардни третман аутологе трансплантације би могао бити унапређен. Овакав вид регенерације подразумева употребу матрица у комбинацији са коштаном матичним ћелијама и

факторима раста (Слика 17). Основна карактеристика која електроспиноване матрице издваја од других, јесте велика сличност између морфологије нановлакана и екстрацелуларног матрикса коштаног ткива (Yu et al., 2016). Типичне матрице добијене електроспинингом имају веома фину нановлакнасту мрежу. С тим у вези, како би се физички ојачао носач ћелија научници су дизајнирали матрице са активним неорганским једињењима. Испоставило се да додавање неорганских активних једињења побољшава механичка својства матрица (Ding et al., 2016) и цитокомпатибилност полимерних нановлакана (Gao et al., 2016). Такође, овакве измене побољшавају адхезију и диференцијацију остеобласта, кључне процесе у калцификацији матрица (Dhinasekaran et al., 2021). Конкретно, композитне матрице изграђене од хидроксиапатита и природних полимера, попут колагена, хитозана и фиброина показују високу биокопатибилност према остеобластима (Kim et al., 2014). Велики број истраживања је показао да природни полимери имају већи афинитет према биоактивним једињењима, у поређењу са синтетичким полимерима. Оваква чињеница се приписује интеракцијама између хидроксиапатита и бочних остатака аминокиселина протеинских полимера (Zhou et al., 2015).



Слика 17. Шематски приказ инжењерства коштаног ткива. Конструкција биомодификоване матрице добијене електроспинингом за персонализовану терапију приликом регенерације костију

Иако електроспиноване матрице показују висок потенцијал у инжењерству коштаног ткива, велика препрека представља величина пора. Наиме, поре електроспинованих матрица су малих димензија (100-1000 nm), што теоретски не одговара ћелијама коштаног ткива (Pramanik et al., 2012). Према томе, како би се конструисало што израженије вештачко ткиво костију, будући тренд у инжењерству коштаног ткива би требало да представља производњу матрица са већим пречником пора.

1.6.4. Регенеративни потенцијал матрица у инжењерству хрскавице

Хрскавица је врста везивног ткива која због недостатка крвних судова и нерава не поседује способност регенерације. Оваква чињеница је и привукла пажњу научним круговима који се баве ткивним инжењерством (Correia et al., 2015). Сходно томе, развијене су одређене методе које би потенцијално заминиле тренутне принципе клиничке праксе.

У људском телу постоји три различита типа хрскавице: фиброзна, претежно изграђена од колагених влакана; еластична, богата еластином; и хијалинска хрскавица, у чијем екстрацелуларном матриксу доминирају колаген и гликозаминогликани (Flores-Rojas et al., 2023). У медицинској клиничкој пракси најучесталија су оштећења хијалнске хрскавице, која игра кључну улогу у покретању зглоба. С тим у вези, највећи број публикација у ткивном инжењерству је везано за овај тип хрскавице (Ahmadian et al., 2023). Основна функција зглобне хрскавице огледа се у смањивању трења зглоба, при чему долази до равномерне расподеле механичког притиска створеног на површини зглоба (Chen et al., 2016). Морфолошки, хијалинску хрскавицу чине хондроците и екстрацелуларни матрикс претежно изграђен од колагена типа II и различитих гликозаминогликана (протеогликани и хијалуронска киселина) (Calejo et al., 2020).

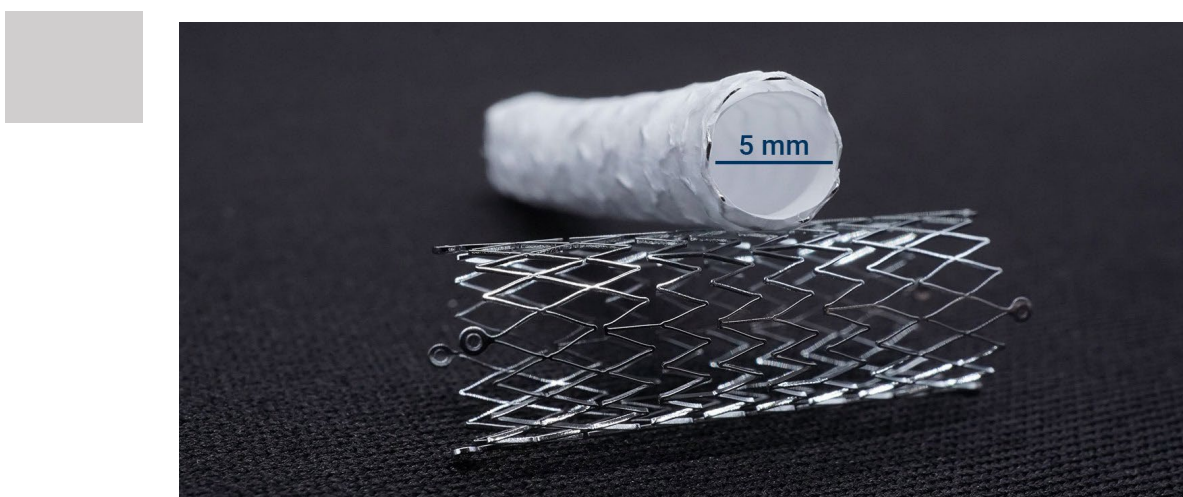
У претклиничкој пракси за репарацију зглобне хрскавице најчешће су коришћене техника микрофрактуре и аутолога имплантација хондроцита. Обе методе имају бројне недостатке, праћене одређеним нежељеним ефектима (Wang et al., 2017; Knutsen et al., 2016). Сходно томе, ткивно инжењерство је понудило различите технике које као основу користе ћелијске носаче добијене комбинацијом хидрогелова и нановлакна. Овакве матрице су показале велики потенцијал у регенерацији хрскавице (Brunelle et al., 2018). Наиме, електроспининг/хидрогел матрице због своје морфологије и хидрофилности веома добро имитирају екстрацелуларни матрикс хрскавичавог ткива. Присуство fine структуре нановлакна омогућава висок интензитет еластичности матрица, што је неопходно у регенерацији хрскавице (Wood et al., 2016).

Досадашња истраживања су показала високу биокompatibilност различитих природних и синтетичких полимера. Природни полимери, укључујући колаген, фиброин свиле, хитозан и хијалуронску киселину у високом степену промовишу пролиферацију хондроцита (Ahmadian et al., 2023). Од синтетичких полимера најбоље су се показали PCL и PEO. Испоставило се да порозне композитне матрице изграђене од ова два полимера омогућавају брзу ћелијску инфилтрацију хондроцита и MSC ћелија (Flores-Rojas et al., 2023).

Упркос великим напорима да се постигну што бољи резултати у инжењерству хрскавице, и даље велики проблем представља природно ограничен регенеративни капацитет хрскавице услед недостатка крвних судова и нерава. С тим у вези, требало би обратити пажњу на бројне факторе раста и сигналне молекуле који би могли да се користе у оваквој врсти регенерације.

1.6.5. Регенеративни потенцијал матрица у инжењерству крвних судова (васкуларног ткива)

Болести кардиоваскуларног система представљају једне од водећих узрочника смртности људи, поготово када се говори о зачепљењу крвних судова. Једна од најучесталији, атеросклероза представља поремећај који настаје накупљањем плакова унутар крвних судова. Овим се смањује површина лумена крвног суда, што доводи до смањеног протока крви. Конвенционалне технике за лечење атеросклерозе користе различите облике трансплантата и стент метода (Hasan et al., 2014). Услед све веће учесталости болести и ограниченог клиничког капацитета, ткивно инжењерство је пронашло свој концепт и у овом аспекту регенеративне и реконструктивне медицине. У последњих двадесет година уложени су велики напори како би се произвели одговарајући вештачки носачи ћелија и биоразградиви стентови (Слика 18).



Слика 18. Упоредни приказ конвенционалног и биоразградивог стента

Многа истраживања су показала да матрице добијене електроспинингом показују велики потенцијал као замена за стент методу која се користи приликом зачепљења крвних судова. Наиме, вишеструким електроспинингом на колектору облика ротирајућег трна могуће је произвести цевасте матрице пречника лумена до 6 mm. Овакве матрице показују веома добра биомеханичка својства и висок степен биокомпатибилности (Gong et al., 2016). Међутим, када се говори о акутној тромбози, израда цевастих матрица мањег пречника представља велики изазов. У досадашњој литератури је приказано неколико приступа који побољшавају особине матрица намењене за мање крвне судове. С тим у вези је и једна *in vivo* студија коју су спровели *Spadaccio* и сарадници. Они су на моделу реконструкције абдоминалне аорте белих зечева користили цевасте PCL/PLLA матрице обложене хепарином. Резултати су показали високу цитокопатибилност, док је дејством хепарина интралуминална тромбоза сведена на минимум (*Spadaccio et al.*, 2016). *Lee* и сарадници су комбинацијом техника електроспининга и

тродимензионалног штампања произвели двослојне PCL матрице обложене васкуларним ендотелним фактором раста (VEGF – *vascular endothelial growth factor*). Током *in vitro* и *in vivo* тестирања, матрице имобилизоване васкуларним фактором раста изазвале су висок степен пролиферације васкуларних ћелија праћен неоангиогенезом, у поређењу са нетретираним групама (Lee et al., 2019). Приложени резултати поменутих студија показују да одређена побољшања матрица могу представљати иновативан концепт у инжењерству крвних судова који треба следити и унапредити.

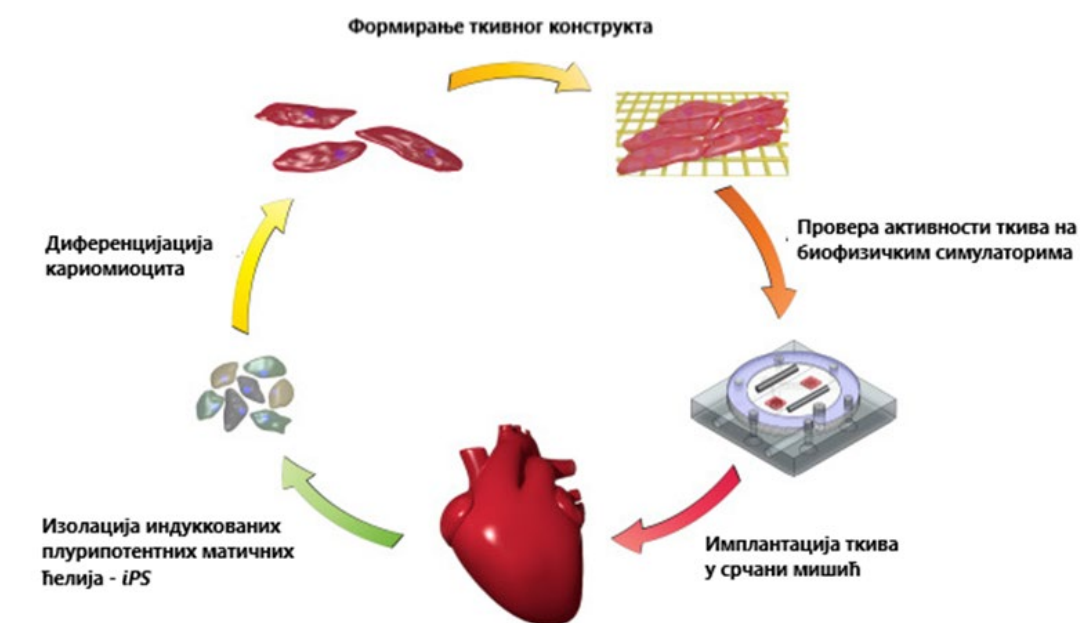
1.6.6. Регенеративни потенцијал матрица у инжењерству срчаног ткива

Срчана инсуфицијенција представља низ обољења која су водећи узрок смртности у свету. Оштећењем срца, долази до трајних структурних и функционалних промена унутар срчаног ткива. С обзиром на веома слаб регенеративни потенцијал срчаног мишића и незадовољавајући резултат кардиохирургије, пацијенти са тешком ихсуфицијенцијом срца често бивају подвргнути веома компликованим трансплантационим методама (Nguyen-Truong et al., 2020). Сходно томе, развојем метода за регенерацију срчаног мишића, потпуно би се променио тренутан исход болести.

Са морфолошког аспекта, срчани зид је изграђен из три слоја од којих миокард заузима највећу површину. Ткиво миокарда је изграђено од две врсте мишићних влакана, од којих једна врста гради контрактилну мускулатуру, а друга врста влакана гради проводну мускулатуру. Оваква аутопотентна морфологија миокарда одговорна је за несметане контракције и релаксације мишићних влакана срца. Инфаркт миокарда је једно од најчешћих обољења срца, настало због потпуне тромбозе коронарних артерија. Услед недостатка кисеоника и хранљивих материја, долази до деструкције кариомиоцита, које се постепено замењују хетерогеним нефункционалним фиброзним ткивом (Inamdar & Inamdar, 2016). Како би се спречио овакав исход болести, ткивно инжењерство има задатак да осмисли ћелијске носаче који би могли да задовоље морфолошке и механичке карактеристике миокарда (Слика 19). С тим у вези, због специфичне испреплетане структуре влакана миокарда, електроспиноване матрице имају велики потенцијал у инжењерству срчаног ткива (Ren et al., 2017).

У досадашњим истраживањима у ткивном инжењерству помоћу природних и синтетичких материјала конструисане су дводимензионалне и тродимензионалне матрице. Испоставило се да тродимензионалне електроспиноване матрице изграђене од синтетичких полимера испољавају механичка својства слична миокарду, док природне матрице испољавају бољу имунокомпатибилност (Rodrigues, et, al., 2018).

Због сложене структуре срчаног зида, истраживачи су произвели вишеслојне 3D матрице које омогућавају контролисану орјентацију слојева вештачког ткива, чиме би потенцијално могла да се побољша структура и функција оштећеног миокарда. Такође, овакве матрице нуде могућност укључивања електрохемијских сигнала који би додатно могли да побољшају регенерацију (Jin et al., 2018; Zhao et al., 2015). С тим у вези је једно истраживање које су спровели Dorkhani и сарадници. Наиме, ови научници су конструисали композитне матрице изграђене од PVDF (енг. *Polyvinylidene Fluorid*) и желатина и импрегниране честицама графена које су показивале пиезоелектрична својства. Користећи мишије ембрионалне кардиомиоците у *in vitro* експериментима биокопатибилности, дошли су до закључка да механичка и пиезоелектрична својства материјала повећавају биокопатибилности матрица. Након одређеног времена инкубације ембрионални кардиомиоцити су показивали издужену морфологију сличу ћелијама природног миокарда (Dorkhani et al., 2023). Оваква врста студије показује да коришћење пиезоелектричних матрица у ткивном инжењерству има велики потенцијал при стварању вештачког ткива миокарда.



Слика 19. Шематски приказ инжењерства срчаног ткива. Потенцијална употреба електроспинованих матрица у персонализованој терапиј регенерације оштећеног миокарда

2. Циљ истраживања

Електроспининг је техника која се користи у области ткивног инжењерства, посебно за развој матрица за потребе *in vitro* култивисања ткива и органа. Тренутно је много напора усмерено на истраживање у побољшању метода у овој области које пружају веома корисне алтернативе за постојеће методе регенеративне медицине.

Фокус овог истраживања био је усмерен на оптимизацију параметара електроспининга за производњу матрица. Уз употребу три различита биокompatibilна полимера () и растварача у различитим условима електроспининга произведене су матрице изграђене од влакана нано размера. Производња нано влакана матрица је у директној вези са параметрима електроспининга, па је стога значај оптимизације овог процеса био од изузетне важности. Такође, извршено је засејавање, култивација и одржавање ћелијске линије фибробласта плеуре плућа, *MRC-5* као и карактеризација добијеног примитивног ткива у *in vitro* условима. Матрице и примитивна ткива су анализирани микроскопским методама као и методама *in vitro* одређивања ћелијске вијабилности.

3. Методологија

3.1. Материјали

У овом истраживању направљене су три серије раствора полимера различитог порекла: 1.) 19% PCL:PEG у CHCL₃:DMF; 2.) 20%PCL у CHCL₃:DMF; и 3.) 17% хитозан у CHCL₃:AcA (cc). Поли (ε-капролактон) (PCL) (просечно Mn ~ 80.000, 440744-500G) и поли (етиленгликол) (PEG) (просечно Mn ~ 4,000, 81240-1 kg) купљени су од *Sigma-Aldrich* компаније. Хлороформ (CHCL₃) је купљен од *Macron Fine Chemicals* (4444-25), док је *N,N*-Диметилформаид (DMF, 99,5%) купљен од компаније *Fisher Scientific* (Д/3841/17). У овој студији све хемикалије су коришћене без даљег пречишћавања.

3.2. Електроспининг

Матрице су процесуиране вертикалном електроспининг методом. Уређај за електроспининг је конструисан у лабораторији за Биоинжењеринг, при институту за Информационе Технологије у Крагујевцу. Апарат се састоји од: шприц пумпе, игле (Јапан,

величина 21), колектора и снабдевача високог напона. Цео процес је контролисан компјутерским софтвером који је такође конструисан у Лабораторији за Биоинжењеринг.

Све три врсте матрица су направљене у истим условима средине (24°C). У шприц са причвршћеном иглом су убачени раствори полимера. Електрично поље је оформљено помоћу високог напона – 15 kV. Постепеним повећавањем напона постигнуто је формирање Тајлоровог конуса. Под утицајем електростатичких сила растварач из раствора је испарио, док су влакна успешно прикупљена на алуминијумском колектору.

3.3. Тест цитотоксичности (МТТ)

Цитокомпатибилност, пролиферација и виталност ћелија култивисаних на матрицама одређивани су МТТ стандардизованим протоколом (Протокол Лабораторије за Биоинжењеринг CB-005). МТТ је хемијско једињење (3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyltetrazolium bromide), које представља раствор тетразолијумове соли жуте боје. Тест ћелијске цитотоксичности се заснива на редукцији тетразолијумове соли у нерастворљивом формагану под утицајем митохондријалног ензима живих ћелија. Услед таложења кристала формагана долази до промене боје, која указује на проценат живих и мртвих ћелија.

Матрице су испиране 70% етанолом, а затим постављане под УВ светло у периоду од два сата. Непосредно пре експеримента, матрице су подељене на више округлих делова (5mmx5mm). Тако припремљене матрице су постављане на дно сваког бунарића стерилне плоче (96-well plate) у коју је додат медијум (DMEM), а затим инкубиране током 24h. Након тога, медијум је уклоњен и скеле су засејане ћелијском линијом MRC-5. Оптимизована густина засејаних ћелија у сваком бунарићу била је 2.5×10^4 cells/100 μ L. За позитивну контролу, ћелије су засејаване без матрица.

Плоча је инкубирана на 37°C уз присуство 5% CO₂ у различитим временским интервалима (24 и 72h). Након тога, супернатант је уклоњен, а матрице су испиране са 2 ml PBS. МТТ раствор (25 μ L, 5 mg/mL), помешан са медијумом (100 μ L) је додат у сваки бунарић плоче која је потом инкубирана на 37°C током четири сата. Након инкубације медијум је уклоњен, а у бунариће је додато 150 μ L DMSO. Услед редукције МТТ једињења помоћу живих ћелија, дошло је до појаве љубичастих кристала формагана. Апсорбанца је мерена на 490 nm на ELISA Rayto читачу. Добијени подаци су изражени као средња вредност $\pm$ стандардна грешка.

3.4. Scratch метода in vitro

За засејавање здраве ћелијске линије фибробласта плућа (MRC-5) коришћена је плоча са шест бунара. Здраве ћелије фибробласта плућа су засејаване у стерилне шестоделне плоче (енг. *6-well plate*), тако да густина ћелијске суспензије буде $5 \cdot 10^4$ ћелија/по бунарићу. Ћелије су инкубиране 24 сата на 37°C уз присуство 5% CO_2 . Након постизања конфлуентности од 80-90%, у средишњем нивоу извршено је раздвајање ћелијског монослоја. Огреботина је извршена коришћењем врха пипете од 10 μL . Након гребања, бунарићи су испрани PBS-ом ради уклањања одлепљених ћелија. У тако засејане бунариће су додаване претходно стерилисане матрице, које су затим инкубиране у физиолошким условима наредна 24 сата. Ћелијска миграција у нивоу огреботине посматрана је коришћењем оптичког микроскопа (Delta Optical Genetic PRO microscope, Пољска) у два наврата: пре постављања матрица и 24 сата након постављања матрица. За мерење простора у нивоу огреботине коришћен је софтверски модел Image J према једначини:

$$\text{Wound gap (\%)} = \frac{(W_0 - W_d)}{W_0} \times 100$$

W_0 означава ширину огреботине пре постављања матрица, док W_d означава ширину огреботине након што је извршена инкубација у трајању од 24 сата.

3.5. Карактеризација морфологије влакана

Морфологија влакана је детектована помоћу инвертног микроскопа. За одређивање пречника влакана за сваки узорак је анализирано пет слика коришћењем софтверског пакета Image J (верзија 1.48). Просечне карактеристике влакана су процењене у односу на најмање 100 мерења по микрографији. За анализу унутрашње величине пора коришћена је техника систем прага, која се заснива на раздвајању пиксела који су позиционирани у дефинисаном опсегу. Резултати су обрађени у *Excel* софтверу и изражени су као средња вредност $\pm$ стандардна грешка.

3.6. Статистичка анализа

Сви подаци су представљени као средња вредност $\pm$ стандардна грешка (SE). Једносмерни *ANOVA* тест је коришћен за одређивање статистичке значајности. Величина корелације између варијабли израчуната је коришћењем SPSS статистичког софтверског пакета (Чикаго, ИЛ, САД) (*SPSS* за *Windows*, верзија 17, 2008).

4. Резултати

4.1. Морфологија влакана

Након синтезе матрица, за посматрање морфологије влакана коришћен је инвертни микроскоп. Помоћу програма Image J утврђене су средње вредности пречника влакана које су приказане у Табели 3.

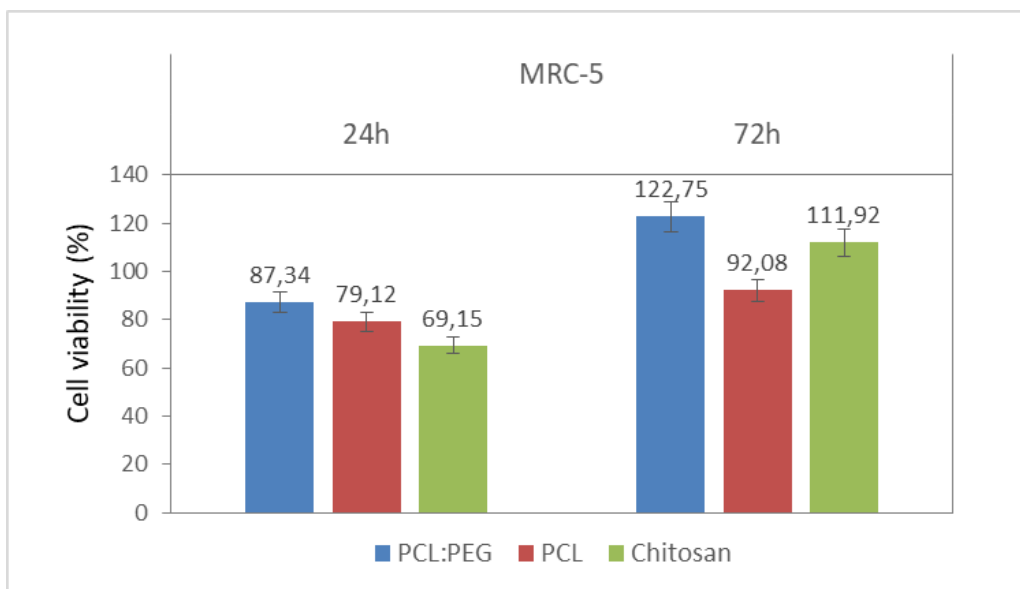
Врста полимера	Средња вредност пречника влакна
PCL:PEG	330 nm
PCL	455 nm
Хитозан	287 nm

Табела 3. Средња вредност влакана за сваку матрицу

4.2. МТТ тест

Не би ли се утврдила биокомпатибилност добијених матрица, на њих су засејаване здраве ћелије плућне марамице (*MRC-5*), које су се одржавале у два временска интервала – 24 и 72 h. Резултати добијени МТТ тестом су показали високу одрживост ћелија, нарочито након 72 h (Слика 20). Сви резултати су упоређивани са контролним узорком.

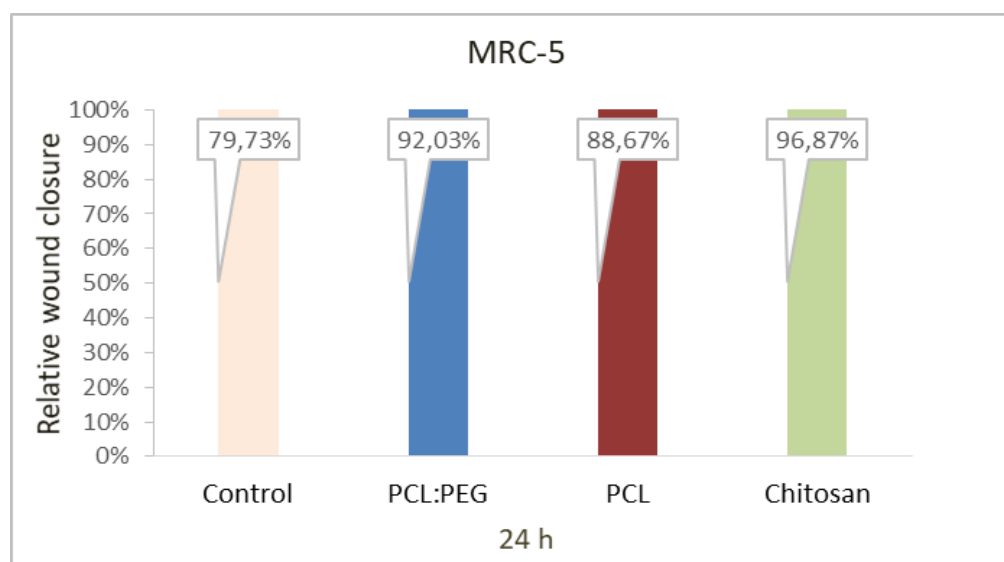
У првих 24 сата, виталност ћелија најбоље се показала на матрицама које воде порекло од вештачких материјала – PCL:PEG – 87,34 и PCL – 79,12%. У поређењу са вештачким материјалима, ћелије, које су засејаване на хитозанским матрицама природног порекла, су показале нешто мањи проценат вијабилности – 69,15%. Након 72 сата ћелијска вијабилност се драстично повећала код све три врсте матрица. Најбољу вијабилност су показале ћелије засејане на PCL:PEG – 122,75% и хитозан – 111,92% матрицама, док су ћелије засејане на PCL матрицама показале нешто мањи скок вијабилности – 92,08%.



Слика 20. Проценат одрживости MRC-5 ћелија при контакту са PCL:PEG, PCL и хитозанским матрицама након 24 и 72 часовног третмана.

4.3. Скреч метода

Резултати добијени *scratch* методом показали су високу миграторну способност ћелија које су биле у контакту са испитиваним матрицама (Слика 21). Сви резултати су упоређивани са контролним узорком. Најбољу покретљивост ћелије су оствариле током контакта са хитозанским матрицама – 96,87%.



Слика 21. Процентуални приказ пролиферације и миграције MRC-5 фибробласта унутар пукотине при контакту са испитиваним матрицама након 24 часа инкубације

5. Дискусија

Услед недостатака у техникама модерне медицине, у 21. веку дошло је до експанзије мултидисциплинарних области комбиновањем различитих грана наука. Једна од њих јесте ткивно инжењерство, које за циљ има да „поправи“ (регенерише) оштећена ткива или органе користећи биолошке, хемијске, физичке, инжињерске и медицинске принципе и законе. Као што је већ напоменуто у претходним пасусима, циљ ткивног инжењерства јесте у изради биокомпатибилних матрица – носача који имитирају екстрацелуларни матрикс. Такве матрице представљају „темел“ за изградњу вештачког ткива. Оне поред биокомпатибилности морају да задовоље многе параметре, као што су биоразградивост, порозност и нетоксичност не би ли се користиле у регенеративној медицини.

Порозност је једна од најважнијих карактеристика матрице. Како би ћелије успеле да направе ново ткиво, морају константно комуницирати са околном средином коју чини екстрацелуларни матрикс. С тим у вези, једна од најважнијих улога матрице јесте да обезбеди несметану комуникацију између ћелија и екстрацелуларног матрикса. Досадашње студије су показале да механичка својства матрица попут величине пречника пора и пречника влакана имају велики утицај на везивање, миграцију, пролиферацију и диференцијацију ћелија (Ameer et al., 2019).

У ткивном инжењерству постоји велики број метода за процесуирање матрица. Једна од најјекономичнијих и најбржих метода јесте електроспининг који се најчешће користи за развој матрица за потребе *in vitro* култивисања ткива и органа. Овакве матрице изграђене су од фине мреже нановлакана.

Фокус овог истраживања био је у процесуирању матрица помоћу електроспининга, и њихова провера биокомпатибилности са здравим хуманим фибробластима плеуре плућа (MRC-5). Синтетисане су три различите матрице следећих средњих вредности пречника нановлакана: PCL - 455 nm; PCL:PEG - 330 nm; и хитозан - 287 nm. Карактеризација влакана извршена је помоћу инвертног микроскопа и накнадног мерења пречника влакана.

Први корак у испитивању биокомпатибилности синтетисаних матрица и њиховој потенцијалној примени у регенеративној медицини представља *in vitro* студију испитивања њиховог цитотоксичног ефекта применом МТТ теста.

Како би одређена матрица могла бити потенцијални носач ћелија за изградњу вештачког ткива неопходно је испитати њен ефекат на здравим ћелијама. Сходно томе, потребно је утврдити да ли и у којој мери синтетисане матрице утичу на популацију здравих ћелија. С тим у вези, циљ овог истраживања био је испитивање цитотоксичних ефеката синтетисаних матрица на здраве

хумане фибробласте плућа. Резултати ове студије показали су да све три испитиване потенцијалне матрице показују високу биокompatibilност према *MRC-5* ћелијама током 24 и 72 часовног третмана.

Занимљива чињеница јесте да током прва 24 часа третмана најмању биокompatibilност је показала матрица од природне супстанце хитозана – 69,15%, док су PCL:PEG показале – 87,34%, PCL – 79,12%. Након 72 сата ћелијска вијабилност се драстично повећала код све три врсте матрица. Најбољу вијабилност су показале ћелије засејане на PCL:PEG – 122,75% и хитозан – 111,92% матрицама, док су ћелије засејане на PCL матрицама показале нешто мањи скок вијабилности – 92,08%

Резултати многих досадашњих истраживања биокompatibilности поменутих матрица су показали сличне резултате у односу на наше испитивање матрица.

Стим у вези је једно истраживање које су спровели *Arbade* и сарадници 2020. године. Аутори поменутог истраживања су испитивали биокompatibilност PCL и PCL:PEG матрица, при чему су као контролне ћелије користили *gMSCs* (људске месенхимске матичне ћелије гингивалног порекла). Резултати истраживања ових аутора показали су да је одрживост *MSCs* након 24 сата инкубације између 85 и 88%, и да се тај проценат повећава са повећањем времена инкубације (*Arbade et al.*, 2020). Овим се потврђују и резултати овог истраживања у коме је показана висока биокompatibilност PCL и PCL:PEG матрица.

У следећем истраживању *Bolaina-Lorenzo* и сарадници су испитивали биокompatibilност PCL и хитозанских матрица користећи *L929* фибробласте. Резултати истраживања ових аутора показали су да у првих 24 сата инкубације биокompatibilност PCL матрица износи око 60%, а хитозанских матрица износи 80%. Обе матрице су показале високу одрживост фибробласта након 72 сата инкубације – преко 110% (*Bolaina- Lorenzo et al.*, 2016). Наши резултати показују већу биокompatibilност PCL матрица, и мању биокompatibilност хитозанских матрица у првих 24 сата инкубације. Мањи афинитет ћелија за хитозанске матрице у првих 24 сата инкубације се може објаснити просечним пречником влакана. Наиме, у нашем истраживању пречник нановлакана хитозанских матрица је скоро дупло мањи у односу на пречник нановлака PCL матрица. С тим у вези примарна инфилтрација ћелија је у овом случају смањена.

Након потврде веома високе биокompatibilности PCL, PCL:PEG и хитозанских матрица, стекао се услов за испитивање миграторних способности *MRC-5* у присуству поменутих матрица. За ове потребе коришћен је *wound scratch* тест. Резултати овог истраживања показали су да све три испитиване матрице омогућавају висок степен миграције фибробласта у периоду од 24 часа. Највећи миграторни потенцијал ћелије су оствариле при контакту са хитозанском матрицом – 96,87 %.

С тим у вези је и једно истраживање које су спровели *Adeli* и сарадници. Наиме, аутори поменутог истраживања су испитивали миграторни потенцијал *L929* фибробласта у присуству матрица изграђених од PVA (поли-винил алкохол) и хитозана. У испитавање је било укључено осам типова матрица са различитим процентуалним уделом PVA и хитозана. Резултати поменутог истраживања су показали да највећи миграторни потенцијал фибробласти показују при конткату са PVA/CH матрицама у којима је удео поменутих супстанци једнак (50/50%), а уједно цу то матрице са највећим уделом хитозана. Проценат затворености ожиљка након 24 сата инкубације износио је 93 %. (*Adeli et al.*, 2018).

6. Закључци

У овом истраживању, помоћу електроспининга направљене су три различите нановлакнасте матрице PCL, PCL:PEG и хитозан. Морфологија и пречник нановлакна установљен је помоћу инвертног микроскопа. Испоставило се да су састав и микроструктура биоматеријала кључни за ћелијске интеракције, нарочито пречник влакана.

Помоћу МТТ теста утврђено је да све три врсте матрица подржавају раст и пролиферацију ћелија. У зависности од процењеног параметра, добијени су различити резултати на сваком биоматеријалу, а они су у корелацији са средњим пречником влакана. Најбољи резултати биокомпатибилности добијени су коришћењем PCL:PEG матрице са просечним пречником нановлакна од 330 nm. У поређењу са њом, најлошије се показала PCL матрица чији је пречник влакана већи за 125 nm.

Скреч методом је потврђено да све три матрице подржавају ћелијску миграцију фибробласта. Уз врло мале разлике, најбоље се показала матрица изграђена од хитозана. Овим се може претпоставити да матрице изграђене од природних материјала боље подржавају покретљивост ћелија.

На основу анализираних резултата овог истраживања, апсолутно је доказана биокомпатибилност поменутих носача ћелија. С тим у вези, значајност оваквих резултата представља битан предуслов за даља истраживања биокомпатибилности на другим ћелијским линијама, као и *in vivo* истраживања на животињским моделима.

Тренутне тактике регенеративне медицине и ткивног инжењерства фокусирају се на структурну регенерацију оштећеног ткива трансплантацијом матрица/ћелије/биомолекули комплекса. С тим у вези, биокомпатибилне матрице (ћелијски носачи) представљају кључну карику ткивног инжењерства јер пружају повољно окружење за раст и диференцијацију ћелија, што резултује регенерацији ткива. Велики број радова у ткивном инжењерству је показао да највећи потенцијал за ћелијске носаче имају матрице настале електроспининг методом. Наиме, повољна структурна и механичка својства и морфолошка сличност са ЕСМ, овим матрицама даје предност у односу на матрице настале другим техникама. Истовремено, електроспиноване матрице нежељене реакције организма домаћина, у виду генотоксичности и имунокомпатибилности, свODE на минимум. Према томе у будућности, неопходна је апсолутна оптимизација процеса електроспининга, деградације матрица и репродукције ћелија како би се предклиничка лабораторијска испитивања заменила клиничком праксом. Уколико се омогући овакав исход, употреба електроспинованих матрица могла би да промени исход великог броја поремећаја и медицинских захвата.

7. Литература

1. Mathew, A., Augustine, R., Kalarikal, N., & Thomas, S. (2016). Tissue Engineering: Principles, Recent Trends and the Future. *Nanomedicine and Tissue Engineering*, 31–82. doi:10.1201/b19867-3
2. Rim, N. G., Shin, C. S., & Shin, H. (2013). Current approaches to electrospun nanofibers for tissue engineering. *Biomedical materials* (Bristol, England), 8(1), 014102. <https://doi.org/10.1088/1748-6041/8/1/014102>
3. Sudhakar, C. K., Upadhyay, N., Verma, A., Jain, A., Narayana Charyulu, R., & Jain, S. (2015). Nanomedicine and Tissue Engineering. *Nanotechnology Applications for Tissue Engineering*, 1–19. doi:10.1016/b978-0-323-32889-0.00001-7
4. Balasubramanian, D., Agraharam, G., Girigoswami, A., Banu, M. N., & Girigoswami, K. (2022). Applications of Nanoscaffolds in Tissue Engineering. *Current Pharmacology Reports*, Volume 8, Issue 3, pages 171-187. 10.1007/s40495-022-00284-x
5. Pearce, H. A., Kim, Y. S., Diaz-Gomez, L., & Mikos, A. G. (2020). Tissue Engineering Scaffolds. *Biomaterials Science*, 1317–1334.e1. doi:10.1016/b978-0-12-816137-1.00082-9
6. Venkatesan, J., Kim, S.-K., & Wong, T. W. (2015). Chitosan and Its Application as Tissue Engineering Scaffolds. *Nanotechnology Applications for Tissue Engineering*, 133–147. doi:10.1016/b978-0-323-32889-0.00009-1
7. Lee, S. J., Yoo, J. J., & Atala, A. (2017). Biomaterials and Tissue Engineering. *Clinical Regenerative Medicine in Urology*, 17–51. doi:10.1007/978-981-10-2723-9_2
8. Guo, L., Liang, Z., Yang, L., Du, W., Yu, T., Tang, H., ... Qiu, H. (2021). The role of natural polymers in bone tissue engineering. *Journal of Controlled Release*, 338, 571–582. doi:10.1016/j.jconrel.2021.08.055

9. Liu, D., Nikoo, M., Boran, G., Zhou, P., & Regenstein, J. M. (2015). Collagen and Gelatin. *Annual Review of Food Science and Technology*, 6(1), 527–557. doi:10.1146/annurev-food-031414-111800
10. Martins, A., da Silva, M. A., Costa-Pinto, A., Reis, R. L., & Neves, N. M. (2014). Bio-Inspired Integration of Natural Materials. *Bio-Inspired Materials for Biomedical Engineering*, 125–150. doi:10.1002/9781118843499.ch8
11. Guo, B., & Ma, P. X. (2014). Synthetic biodegradable functional polymers for tissue engineering: a brief review. *Science China Chemistry*, 57(4), 490–500. doi:10.1007/s11426-014-5086-y
12. Mountaki, S.A.; Kaliva, M.; Loukelis, K.; Chatzinikolaidou, M.; Vamvakaki, M. Responsive Polyesters with Alkene and Carboxylic Acid Side-Groups for Tissue Engineering Applications. *Polymers* 2021, 13, 1636. <https://doi.org/10.3390/polym13101636>
13. Katarina Virijević, Jelena Grujić, Mihajlo Kokanović, Dalibor Nikolić, Marko Živanović, Nenad Filipović Electrospinning and Electrospun Nanofibrous Materials – Promising Scaffolds in Tissue Engineering. *Proceedings of the International Conference on Medical and Biological Engineering – CMBEBIH*, 21–24 April 2021, Mostar, Bosnia and Herzegovina; IFMBE Proceedings, Vol. 84, p. 726-733
14. Mabrouk, M., Beherei, H. H., & Das, D. B. (2020). Recent progress in the fabrication techniques of 3D scaffolds for tissue engineering. *Materials Science and Engineering: C* 110, 110716. doi:10.1016/j.msec.2020.110716
15. Loh, Q. L., & Choong, C. (2013). Three-Dimensional Scaffolds for Tissue Engineering Applications: Role of Porosity and Pore Size. *TISSUE ENGINEERING: Part B*, Volume 19. DOI: 10.1089/ten.teb.2012.0437
16. Abdelaziz, A.G., Nageh, H., Abdo, S.M., Abdalla, M.S., Amer, A.A., Abdal-hay, A., Barhoum, A. A. (2023). Review of 3D Polymeric Scaffolds for Bone Tissue Engineering: Principles, Fabrication Techniques, Immunomodulatory Roles, and Challenges. *Bioengineering*, 10, 204. <https://doi.org/10.3390/bioengineering10020204>

17. Eltom, A., Zhong, G., & Muhammad, A. (2019). Scaffold Techniques and Designs in Tissue Engineering Functions and Purposes: A Review. *Advances in Materials Science and Engineering* Volume 2019. <https://doi.org/10.1155/2019/3429527>

18. Abdelaal O. A., & Darwish, S. M. (2013). Review of Rapid Prototyping Techniques for Tissue Engineering ScaBolds Fabrication: Characterization and Development of Biosystems and Biomaterials. In Öchsner et al. (Ed.) *Characterization and Development of Biosystems and Biomaterials, Advanced Structured Materials* 29. Cham: Springer. DOI: 10.1007/978-3-642-31470-4_3

19. Roseti, L., Parisi, V., Petretta, M., Cavallo, C., Desando, G., Bartolotti, I., & Grigolo, B. (2017). Scaffolds for Bone Tissue Engineering: State of the art and new perspectives. *Mater. Sci. Eng. C* 2017, 78, 1246–1262. DOI: 10.1016/j.msec.2017.05.017

20. Živanović, M. N. (2020). Use of electrospinning to enhance the versatility of drug delivery. In W. F. Lai (Ed.), Vol. 13. *Systemic delivery technologies in anti-aging medicine: Methods and applications. Healthy ageing and longevity*. Cham: Springer. https://doi.org/10.1007/978-3-030-54490-4_14.

21. Unnithan, A. R., Arathyram, R. S., & Kim, C. S. (2015). Electrospinning of Polymers for Tissue Engineering. *Nanotechnology Applications for Tissue Engineering*, 45–55. doi:10.1016/b978-0-323-32889-0.00003-0

22. Živanović, M. N. and Filipović, N. (2022). Tissue engineering - Electrospinning approach. In Filipović, N. (Ed.) *CARDIOVASCULAR AND RESPIRATORY BIOENGINEERING*. Cham: Elsevier.

23. Lopez-Marquez, A., Gareis, I. E., Dias, F.J., Gerhard, C., & Lezcano, M. F. (2022) Methods to Characterize Electrospun Scaffold Morphology: A Critical Review. *Polymers (Basel)*, 24;14(3):467. doi: 10.3390/polym14030467

24. Hassan, M. I., Chong L. H., & Sultana N. (2016). WETTABILITY AND WATER UPTAKE PROPERTIES OF PLA AND PCL/GELATIN-BASED ELECTROSPUN SCAFFOLDS. *ARPJN Journal of Engineering and Applied Sciences*, VOL. 11, No 23.

25. Liang, C.-C., Park, A. Y., & Guan, J.-L. (2007). In vitro scratch assay: a convenient and inexpensive method for analysis of cell migration in vitro. *Nature Protocols*, 2(2), 329–333. doi:10.1038/nprot.2007.30
26. Herrero-Herrero, M., Alberdi, S., Gonzalez, M., Vilariño-Feltrer, G., Rodríguez-Hernández, Vallés-Lluch, A., & Villar, V. (2021). Influence of chemistry and fiber diameter of electrospun PLA, PCL and their blend membranes, intended as cell supports, on their biological behavior. *Polymer Testing* 103:107364. 10.1016/j.polymertesting.2021.107364
27. Flores-Rojas, G. G., Gómez-Lazaro, B., López-Saucedo, F., Vera-Graziano, R., Bucio, E. & Mendizábal, E. (2023). Electrospun Scaffolds for Tissue Engineering: A Review. *Macromol* 2023, 3, 524–553. <https://doi.org/10.3390/macromol3030031>
28. Khorshidi, S., Solouk, A., Mirzadeh, H., Mazinani, S., Lagaron, J.M., Sharifi, S., & Ramakrishna, S. (2016). A review of key challenges of electrospun scaffolds for tissue-engineering applications. *J. Tissue Eng. Regen. Med.* 2016, 10, 715–738. DOI: 10.1002/term.1978
29. Qiao, Y., Shi, C., Wang, X., Wang, P., Zhang, Y., Wang, D., Qiao, R., Wang, X., & Zhong, J. (2019). Electrospun Nanobelt-Shaped Polymer Membranes for Fast and High-Sensitivity Detection of Metal Ions. *ACS Appl. Mater. Interfaces* 2019, 11, 5401–5413. DOI: 10.1021/acsami.8b19839
30. Xue, J., Wu, T., Dai, Y., & Xia, Y. (2019). Electrospinning and electrospun nanofibers: Methods, materials, and applications. *Chem. Rev.* 2019, 119, 5298–5415. <https://doi.org/10.1021/acs.chemrev.8b00593>
31. Tsepkenko, A., Tsepkenko, V., Dash, S., Mishra, A., Bader, A., Melerzanov, A., & Giri, S. (2019). The regenerative potential of skin and the immune system. *Clin Cosmet Investig Dermatol.* 2019 Jul 15; 12:519–532. doi: 10.2147/CCID.S196364
32. Losquadro, W.D. (2017). Anatomy of the Skin and the Pathogenesis of Nonmelanoma Skin Cancer. *Facial Plast. Surg. Clin. N. Am.* 2017,25, 283–289. DOI: 10.1016/j.fsc.2017.03.001

33. Sun, L., Gao, W., Fu, X., Shi, M., Xie, W., Zhang, W., Zhao, F., & Chen, X. (2018). Enhanced wound healing in diabetic rats by nanofibrous scaffolds mimicking the basketweave pattern of collagen fibrils in native skin. *Biomater. Sci.* 2018, 6, 340–349. <https://doi.org/10.1039/C7BM00545H>
34. Chen, J., Zhang, G., Zhao, Y., Zhou, M., Zhong, A., & Sun, J. (2022). Promotion of skin regeneration through co-axial electrospun fibers loaded with basic fibroblast growth factor. *Adv. Compos. Hybrid Mater.* 2022, 5, 1111–1125. DOI:10.1007/s42114-022-00439
35. Wang, L., Yang, J., Ran, B., Yang, X., Zheng, W., Long, Y., & Jiang, X. (2017) Small Molecular TGF- β 1-Inhibitor-Loaded Electrospun Fibrous Scaffolds for Preventing Hypertrophic Scars. *ACS Appl. Mater. Interfaces* 2017, 9, 32545–32553. DOI: 10.1021/acsami.7b09796
36. Gaudet, A. D., Popovich, P. G., Ramer, M. S. (2011). Wallerian degeneration: gaining perspective on inflammatory events after peripheral nerve injury. *J Neuroinflammation*; 8(1): 110-122.
37. Popović, D. B., & Sinkjær, T. (2013). Diseases and Injuries of the Central Nervous System Leading to Sensory–Motor Impairment. In Farina, D., et al. (Ed.) *Introduction to Neural Engineering for Motor Rehabilitation*; Piscataway, NJ, USA; pp. 3–20.
38. Gaudin, R., Knipfer, C., Henningsen, A., Smeets, R., Heiland, M., & Hadlock, T. (2016). Approaches to peripheral nerve repair: Generations of biomaterial conduits yielding to replacing autologous nerve grafts in craniomaxillofacial surgery. *BioMed Res. Int.* 3856262. <https://doi.org/10.1155/2016/3856262>
39. Muheremu, A., & Ao, Q. (2015). Past, Present, and Future of Nerve Conduits in the Treatment of Peripheral Nerve Injury. *BioMed Res. Int.*, 237507. DOI: 10.1155/2015/237507
40. Gregory, H., & Phillips, J. B. (2021). Materials for peripheral nerve repair constructs: Natural proteins or synthetic polymers? *Neurochem. Int.* 2021, 143, 104953. DOI: 10.1016/j.neuint.2020.104953

41. Sadeghi, A., Moztarzadeh, F., Mohandes, J. A. (2019). Investigating the effect of chitosan on hydrophilicity and bioactivity of conductive electrospun composite scaffold for neural tissue engineering. *Journal of Biological Macromolecules*. Vol. 121, 625-632. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2018.10.022>

42. Fadaie M., Mirzaei E., Geramizadeh B., & Asvar, Z. (2018). Incorporation of nanofibrillated chitosan into electrospun PCL nanofibers makes scaffolds with enhanced mechanical and biological properties. *Carbohydr Polym*. 2018; 199:628–640.
DOI: 10.1016/j.carbpol.2018.07.061

43. Zha, F., Chen, W., Zhang, L., & Yu, D. (2019): Electrospun natural polymer and its composite nanofibrous scaffolds for nerve tissue engineering, *Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition*, DOI: 10.1080/09205063.2019.1697170

44. Vijayavenkataraman, S. (2020). Nerve guide conduits for peripheral nerve injury repair: a review on design, materials and fabrication methods. *Acta Biomater*. 106, 54–59. doi: 10.1016/j.actbio.2020.02.003

45. Entekhabi, E., Haghbin-Nazarpak, M., Shafieian, M., Mohammadi, H., Firouzi, M., Hassannejad, Z. (2021). Fabrication and in vitro evaluation of 3D composite scaffold based on collagen/hyaluronic acid sponge and electrospun polycaprolactone nanofibers for peripheral nerve regeneration. *J. Biomed. Mater. Res. Part A* 2021, 109, 300–312. DOI: 10.1002/jbm.a.37023

46. Jing, W., Ao, Q., Wang, L., & Huang, Z. (2018). Constructing conductive conduit with conductive fibrous infilling for peripheral nerve regeneration. *Chem Eng J*. 345:566–577. DOI:10.1016/j.cej.2018.04.044

47. Kriebel, A., Hodde, D., Kuenzel, T., Engels, J., Brook, G., & Mey, J. (2017). Cell-free artificial implants of electrospun fibres in a three-dimensional gelatin matrix support sciatic nerve regeneration in vivo. *J Tissue Eng Regen Med*. 11(12):3289–3304. DOI: 10.1002/term.2237

48. Shin, S. H., Purevdorj, O., Castano, O., Planell, J. A., Kim, H. W. (2012). A short review: Recent advances in electrospinning for bone tissue regeneration. *J. Tissue Eng*. 2012, 3; 2041731412443530. DOI:10.1177/2041731412443530

49. Yu, Y., Hua, S., Yang, M., Fu, Z., Teng, S., Niu, K., Zhao, Q. & Yi, C. (2016). Fabrication and characterization of electrospinning/3D printing bone tissue engineering scaffold. *RSC Adv.* 2016, 6, 110557–110565. <https://doi.org/10.1039/C6RA17718B>
50. Ding, Y., Li, W., Müller, T., Schubert, D. W., Boccaccini, A.R., Yao, Q., Roether, J. A. (2016). Electrospun Polyhydroxybutyrate/Poly(- caprolactone)/58S Sol-Gel Bioactive Glass Hybrid Scaffolds with Highly Improved Osteogenic Potential for Bone Tissue Engineering. *ACS Appl. Mater. Interfaces* 2016, 8, 17098–17108. DOI: 10.1021/acsami.6b03997
51. Gao, X., Song, J., Ji, P., Zhang, X., Li, X., Xu, X., Wang, M., Zhang, S., Deng, Y., Deng, F., & Wei, S. (2016). Polydopamine-templated hydroxyapatite reinforced polycaprolactone composite nanofibers with enhanced cytocompatibility and osteogenesis for bone tissue engineering. *ACS Appl. Mater. Interfaces* 8, 3499–3515. DOI: 10.1021/acsami.5b12413
52. Dhinasekaran, D., Vimalraj, S., Rajendran, A. R., Saravanan, S., Purushothaman, B., & Subramaniam, B. (2021). Bio-inspired multifunctional collagen/electrospun bioactive glass membranes for bone tissue engineering applications. *Mater. Sci. Eng. C*, 126, 111856. DOI: 10.1016/j.msec.2020.111856
53. Kim, H., Che, L., Ha, Y., & Ryu, W. (2014). Mechanically-reinforced electrospun composite silk fibroin nanofibers containing hydroxyapatite nanoparticles. *Mater. Sci. Eng. C*, 40, 324–335. DOI: 10.1016/j.msec.2014.04.012
54. Zhou, Y.; Yao, H.; Wang, J.; Wang, D.; Liu, Q.; Li, Z. Greener synthesis of electrospun collagen/hydroxyapatite composite fibers with an excellent microstructure for bone tissue engineering. *Int. J. Nanomed.* 2015, 10, 3203–3215. DOI: 10.2147/IJN.S79241
55. Pramanik, S., Pingguan-Murphy, B., & Abu Osman, N. A. (2012). Progress of key strategies in development of electrospun scaffolds. *Bone tissue. Sci. Technol. Adv. Mater.* 13, 043002. DOI: 10.1088/1468-6996/13/4/043002
56. Correia, C. R., Reis, R. L., & Mano, J. F. (2015). Multiphasic, Multistructured and Hierarchical Strategies for Cartilage Regeneration. In Bertassoni & Coelho (Eds.) *Engineering Mineralized and Load Bearing Tissues. Advances in Experimental Medicine and Biology*, Volume 881, Springer; 143–60.

57. Ahmadian, E., Eftekhari, A., Janas, D., & Vahedi, P. (2023). Nanofiber scaffolds based on extracellular matrix for articular cartilage engineering: A perspective. *Nanotheranostics*, 7(1): 61-69. doi: 10.7150/ntno.78611
58. Chen, W., Chen, S., Morsi, Y., El-Hamshary, H., El-Newhy, M., Fan, C., & Mo, X. (2016). Superabsorbent 3D Scaffold Based on Electrospun Nanofibers for Cartilage Tissue Engineering. *ACS Appl Mater Interfaces*; 8:24415–25. DOI: 10.1021/acsami.6b06825
59. Calejo, I., Costa-Almeida, R., Reis, R. L., Gomes, M. E. (2020). A Physiology-Inspired Multifactorial Toolbox in Soft-to-Hard Musculoskeletal Interface Tissue Engineering. *Trends in Biotechnology*; 38:83–98. DOI: 10.1016/j.tibtech.2019.06.003
60. Wang, K. C., Frank, R. M., Cotter, E. J., Christian, D. R., & Cole, B. J. (2017). Arthroscopic Management of Isolated Tibial Plateau Defect With Microfracture and Micronized Allogeneic Cartilage–Platelet-Rich Plasma Adjunct. *Arthroscopy Techniques*; 6(5):e1613-e1618. DOI: 10.1016/j.eats.2017.06.018
61. Knutsen, G., Drogset, J. O., Engebretsen, L., Grøntvedt, T., Ludvigsen, T. C., Løken, S., Solheim, E., Strand, T., & Johansen, O. (2016). A Randomized Multicenter Trial Comparing Autologous Chondrocyte Implantation with Microfracture: Long-Term Follow-up at 14 to 15 Years. *J Bone Joint Surg Am* 17;98(16):1332-9. DOI: 10.2106/JBJS.15.01208
62. Brunelle, A. R., Horner, C. B., Low, K., Ico, G. & Nam, J. (2018). Electrospun thermosensitive hydrogel scaffold for enhanced chondrogenesis of human mesenchymal stem cells. *Acta Biomater*; 66, 166–176. DOI: 10.1016/j.actbio.2017.11.020
63. Wood, A. T., Everett, D., Budhwani, K. I., Dickinson, B., Thomas, V. (2016). Wet-laid soy fiber reinforced hydrogel scaffold: Fabrication, mechano-morphological and cell studies. *Mater. Sci. Eng*; 63, 308–316. DOI: 10.1016/j.msec.2016.02.078
64. Hasan, A., Memić, A., Annabi, N., Hassain, M., Paul, A., Dokmeci, M. R., Dehghani, F., & Khademhosseini, A. (2014). Electrospun scaffolds for tissue engineering of vascular grafts. *Acta Biomaterialia*, Volume 10, Issue 1, 2014; pp 11-25 <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2013.08.022>

65. Gong, W., Lei, D., Li, S., Huang, P., Qi, Q., Sun, Y., Zhang, Y., Wang, Z., You, Z., Ye, X., & Zhao, W. (2016). Hybrid small-diameter vascular grafts: Anti-expansion effect of electrospun poly ϵ -caprolactone on heparin-coated decellularized matrices. *Biomaterials* 2016, 76, 359–370. DOI: 10.1016/j.biomaterials.2015.10.066
66. Spadaccio, C., Nappi, F., De Marco, F., Sedati, P., Sutherland, F. W. H., Chello, M., Trombetta, M., & Rainer, A. (2016). Preliminary in vivo evaluation of a hybrid armored vascular graft combining electrospinning and additive manufacturing techniques. *Drug Target Insights* 2016, 10:1–7. doi: 10.4137/DTI.S35202
67. Lee, S. J., Kim, M. E., Nah, H., Seok, J. M., Jeong, M. H., Park, K., Kwon, I. K., Lee, J. S., & Park, S. A. (2019). Vascular endothelial growth factor immobilized on mussel-inspired three-dimensional bilayered scaffold for artificial vascular graft application: In vitro and in vivo evaluations. *J. Colloid Interface Sci.* 2019, 1:537:333-344. doi: 10.1016/j.jcis.2018.11.039.
68. Nguyen-Truong, M., Li, Y. V., & Wang, Z. (2020). Mechanical Considerations of Electrospun Scaffolds for Myocardial Tissue and Regenerative Engineering. *Bioengineering* 2020, 7(4), 122; <https://doi.org/10.3390/bioengineering7040122>
69. Inamdar, A. A., & Inamdar, A. C. (2016). Heart Failure: Diagnosis, Management and Utilization. *J Clin Med.* 2016; 29;5(7):62. doi: 10.3390/jcm5070062.
70. Ren, J., Xu, Q., Chen, X., Li, W., Guo, K., Zhao, Y., Wang, Q., Zhang, Z., Peng, H., & Li, Y. G. (2017). Superaligned Carbon Nanotubes Guide Oriented Cell Growth and Promote Electrophysiological Homogeneity for Synthetic Cardiac Tissues. *Adv. Mater.* 2017, 29 (44). doi: 10.1002/adma.201702713.
71. Rodrigues, I. C. P., Kaasi, A., Maciel Filho, R., Jardini, A. L., & Gabriel, L. P. (2018). Cardiac tissue engineering: Current state-of-the-art materials, cells and tissue formation. *Einstein Sao Paulo* 2018, 16 (3):eRB4538. doi: 10.1590/S1679-45082018RB4538
72. Jin, G., He, R., Sha, B., Li, W., Qing, H., Teng, R., & Xu, F. (2018). Electrospun three-dimensional aligned nanofibrous scaffolds for tissue engineering. *Mater. Sci. Eng. C* 2018, 92, 995–1005. DOI: 10.1016/j.msec.2018.06.065

73. Zhao, G., Zhang, X., Lu, T. J., & Xu, F. (2015). Recent Advances in Electrospun Nanofibrous Scaffolds for Cardiac Tissue Engineering. *Adv. Funct. Mater.* 2015, 25, 5726–5738. <https://doi.org/10.1002/adfm.201502142>

74. Dorkhani, E., Noorafkan, Y., Salehi, Z., Ghiass, M. A., Tafti, S. H. A., Heirani-Tabasi, A., & Tavafoghi, M. (2023). Design and fabrication of polyvinylidene fluoride-graphene oxide/gelatine nanofibrous scaffold for cardiac tissue engineering. *J. Biomater. Sci. Polym. Ed.* 2023, 34, 1195–1216.

75. Ameer, J. M, PR, A. K., & Kasoju, N. (2019). Strategies to Tune Electrospun Scaffold Porosity for Effective Cell Response in Tissue Engineering. *Journal of Functional Biomaterials*, 10(3), 30. doi:10.3390/jfb10030030

76. Arbade, G. K., Srivastava, J., Tripathi, V., Lenka, N., & Patro, T. U. (2020). Enhancement of hydrophilicity, biocompatibility and biodegradability of poly(ϵ -caprolactone) electrospun nanofiber scaffolds using poly(ethylene glycol) and poly(L-lactide-co- ϵ -caprolactone-co-glycolide) as additives for soft tissue engineering. *Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition*, 1–17. DOI: 10.1080/09205063.2020.1769799

77. Bolaina-Lorenzo, E., Martínez-Ramos, C., Monleón-Pradas, M., Herrera-Kao, W., Cauch-Rodríguez, J. V., & Cervantes-Uc, J. M. (2016). Electrospun polycaprolactone/chitosan scaffolds for nerve tissue engineering: physicochemical characterization and Schwann cell biocompatibility. *Biomedical Materials*, 12(1), 015008. doi:10.1088/1748-605x/12/1/015008

78. Adeli, H., Khorasani, M. T., & Parvazinia, M. (2018). Wound dressing based on electrospun PVA/chitosan/starch nanofibrous mats: Fabrication, antibacterial and cytocompatibility evaluation and in vitro healing assay. *International Journal of Biological Macromolecules*. doi:10.1016/j.ijbiomac.2018.10.11