چکیده

عملکرد عمده استخوان در سیستم اسکلتی، فراهم آوردن حمایت ساختاری برای بدن و اندام های حیاتی آن است. همچنین استخوان منبع اصلی مواد معدنی بوده و سیستم های اهرمی مناسب برای انقباض عضله را فراهم می کنند. با درنظرگرفتن این اعمال، می توان تاثیر از دست رفتن استخوان برهموستازی بدن را براحتی تصور کرد. به دنبال شکستگی های استخوان در طی تصادفات، بسیاری بیماران از ترمیم نشدن ضایعات استخوانی و مشکلات زیبایی شناختی و روانی متعاقب آن رنج می برند. یکی از راه های درمان، استفاده از داربست مناسب استخوانی به همراه سلول های بنیادی و انتقال آن به محل ضایعه است. در این پژوهش، داربست های نانوکامپوزیتی، از مخلوط محلول آبی ژلاتین با پودر نانوساختاری شیشه ی بیواکتیو سنتز شده به روش سل- ژل تهیه شدند. مخلوط فوق سپس به صورت لایه ای ریخته گری شده و در مرحله ی بعد با فرایند خشک سازی انجمادی، محتوای آب آن به روش تصعید خارج شد. محصول به دست آمده به منظور افزایش استحکام مکانیکی در محلول گلوتارآلدهید شبکه ای شدند. در ادامه مغزاستخوان های فمور و تیبیای موش صحرایی خارج شده ودر محیط DMEM[1] کشت شدند. جهت بررسی میزان زیست سازگاری داربست های تهیه شده از سلول های بنیادی مزانشیمی موش صحرایی تحت محیط کشت DMEM استفاده شد.در مرحله ی بعد سلول ها بر روی داربست ها کاشته شده و در ضایعه ایجاد شده در استخوان کالواریای موش صحرایی کار گذاشته شدند.از ضایعه استخوانی در فواصل ۸،٦،٤و۱۲ هفته پس از جراحی عکس رادیولوژی تهیه شد. تست سمیت سلولی حاکی از عدم سمیت و زیست سازگاری داربست یاد شده بود. کاشت داربست- سلول در روی استخوان کالواریای موش صحرایی

[1] Dulbecco's Modified Eagle Medium

نیز نشان از ترمیم خوب استخوان داشت. براساس نتایج تحقیق حاضر، داربست نانوکامپوزیتی زلاتین / شیشه بیواکتیو به همراه سلول های بنیادی توانست کمک شایان توجهی به رشد و ترمیم استخوان کند، به طوری که امید است بتوان در آینده جایگزین مناسبی برای استخوان باشد.

واژه های کلیدی: نانوکامپوزیت ها- شیشه بیواکتیو- زلاتین- سلول های بنیادی- مهندسی بافت- استخوان- داربست

فصل اول:

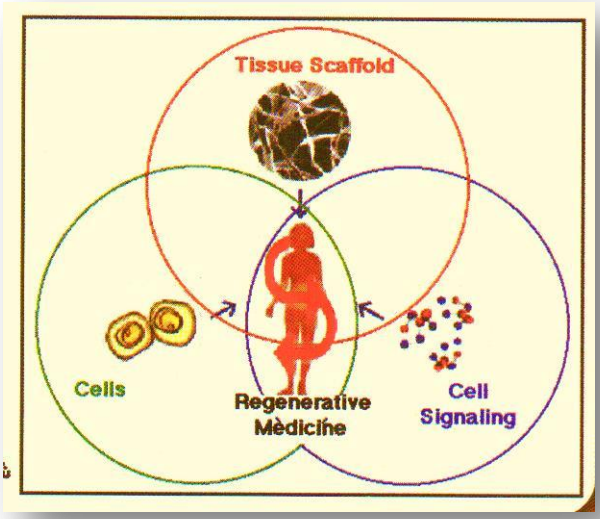
کلیات طرح

۱-۱مقدمه

عملکرد عمده استخوان در سیستم اسکلتی، فراهم آوردن حمایت ساختاری برای بدن و اندام های حیاتی آن است. استخوان منبع اصلی مواد معدنی بوده و همچنین سیستم های اهرمی مناسب برای انقباض عضله را فراهم می کنند. با درنظرگرفتن این اعمال، می توان تاثیر از دست رفتن استخوان برهموستازی بدن را براحتی تصور کرد(۱). اتفاقات گوناگونی مانند جنگ، بیماری، تصادفات و بلایای طبیعی موجب آسیب به بافت استخوانی از جمله جمجمه می گرددو شایع ترین علت مرگ ومیر در تصادفات ضربات به سر است. اکثریت آسیبهای استخوانی ایجاد شده دربدن به طورخودبخودی وبا حداقل درمان بهبود می یابند، بااین حال در برخی موارد به دلایل متعدد از قبیل جوش خوردن نابجای استخوان، ازبین رفتن کامل استخوان در اثر تومور وعفونت محل ضایعه التیام خودبخودی انجام نمی شود و مداوای بیشتر ضرورت پیدا می کند. درچنین مواردی ارتوپدها از روشهای مختلفی از قبیل پیوند استخوان ویا ایمپلنتهای فلزی جهت ترمیم کامل استخوان بهره می گیرند(۲). عمل برداشتن استخوان از فرد بسیار دردناک بوده وپس از برداشتن، ضایعه ای درمحل ایجاد می شود که این آسیب نیز نیاز به ترمیم دارد، به علاوه روشهای برداشتن استخوان از فرد بیمار با خطر آلودگی همراه است(۴،۳). از عوارض بسیارمهم ایمپلنت های فلزی، رهاشدن یون های مضر وتجمع آنها در اعضای مختلف بدن و در نتیجه افزایش احتمال سرطان است(۵). توانایی سلول های بنیادی مزانشیمی در تمایز به رده سلول های استخوانی نویدبخش این مسئله است که در آینده نزدیک بتوان از این سلول ها در سلول درمانی ضایعات وسیع استخوانی استفاده کرد. برخی از محققین معتقدند که در ضایعات استخوانی، چنانچه از استراتژی سلول درمانی استفاده می شود بهتر است

سلول های مورد استفاده کاملاً تمایز یافته باشند و اگر غیرازاین باشد (سلول های بنیادی به صورت تمایزنیافته پیوند شوند) ممکن است در محل پیوند سلول های ناخواسته غیراستخوانی (دراثرتمایز سلول های پیوند شده) بوجود آید و درنتیجه کارایی پیوند را کاهش دهد. با درنظر گرفتن این مطلب، اهمیت مطالعات مربوط به تمایز به سلول های استخوانی سلول های بنیادی مزانشیمی در محیط آزمایشگاهی ومهندسی بافت آشکار می گردد. هنگامیکه اصطلاحاتی همچون بافتهای مهندسی شده، مهندسی بافت و طب ترمیم بکاربرده می شود، آنچه در ذهن تداعی می گردد جایگزینی، ترمیم[۱] و بازسازی[۲] بافتها وارگانهای تخریب شده است.امروزه با توجه به تعداد کم اهداکنندگان بافت وآلودگیهای ویروسی آن سعی در طراحی بافت به کمک سلول وداربستهای گوناگون اعم از طبیعی یا مصنوعی شده است.این امر منتهی به ایجاد مفهومی جدید در علم شده است که مهندسی بافت خوانده می شود. مهندسی بافت علمی بین رشته ای بوده وعلوم گوناگونی همچون زیست شناسی سلولی، بیوشیمی، مهندسی شیمی ومهندسی مواد را به کمک می طلبد. هدف از مهندسی بافت تقلید از طبیعت برای حل محدودیتهای کلینیکی ودرمانی است(۷،٦). مهندسی بافت بر اساس سه ترکیب اصلی بافتهای بیولوژیکی یعنی ماتریکس خارج سلولی[۳]، مولکولهای پیام رسان[٤] وسلول، بنیان نهاده شده است که به ترتیب توسط داربست، فاکتورهای رشد وسلول شبیه سازی می شود (شکل ۱-۱).

[۱] Repair
[۲] Regeneration
[۳] Extra Cellular Matrix (ECM)
[٤] Signalling Molecules



شکل ۱-۱ شمایی از اعضای اجزای مهندسی بافت شامل سلول، داربست و فاکتورهای رشد، که می توانند مسیرهای پیام رسانی مختلفی را درون سلول فعال کنند.

داربستها به اشکال مختلف همچون ژل، فوم[۱] ، فیبر[۲]، میکرو ونانو ذرات می باشند که می توانند با مولکولهای پیام رسان که در فرایندهای ریخت زایی، شکل گیری وتمایز سلولی نقش دارند همراه شده(۸)، جهت بازسازی محیط بدن موجود زنده و همچنین افزایش تکثیر وتمایز سلولها وحمل فاکتورهای رشد در آزمایشگاه استفاده شوند(۸،۷). البته سلولهای ترکیب شده با داربستها خود پیامهای مورد نیاز جهت بازسازی بافت را تا حدی فراهم می کنند. اما آنها قادر به فراهم کردن تمامی سیگنالهای تمایز سلولی نمی باشند، بدین جهت استفاده از فاکتورهای رشدو تمایزامری غیرقابل اجتناب به نظر می رسد. از میان انواع سلولهای بکاربرده شده در مهندسی بافت، سلولهای بنیادی با توجه به ویژگی های منحصر به فردی چون تمایز به انواع سلولها وخودنوزایی[۳] از نظر ترمیم بافت

[۱] Foam
[۲] Fiber
[۳] Self renewal

ضایعه دیده انتخاب مناسبی بوده و بسیار مورد توجه قرار گرفته اند(۷).سرنوشت سلولهای بنیادی توسط پیامهای داخلی وخارجی تنظیم می شود.تنظیم کنندگان داخلی به طورعمده شامل فاکتورهای رونویسی وفاکتورهای کنترل کننده حفظ ونگهداری، تقسیم وتمایز سلولی می باشد، که در نهایت خود وابسته به تنظیم کنندگان غیرارادی (خودکار) است که بوسیله سیگنالهای خارجی حاصل از کنام[۱] مانند فاکتورهای محلول، هم کنشهای سلول – سلول ومولکولهای سطحی – ماده زمینه خارج سلولی، تعدیل می شود. در کشت سلولهای بنیادی بر روی داربستها، هم کنشها از طریق کشت، دانسیته سلولهای بکاربرده شده وطراحی داربست، خصوصیات مکانیکی وسطحی آن تعیین می گردد. این سیگنالهای خارجی ومحیطی سبب تغییراتی در بیان ژنهای موثر در نگهداری و تمایز سلول می شود(۷).

۱- ۲اصول مهندسی بافت

مهندسی بافت به عنوان یک علم بین رشته ای فرصت بی نظیری را برای پیشرفت و بهبودی روشهای درمانی جهت درمان بیماریهای مادرزادی واکتسابی فراهم کرده است. در بسیاری از عرصه های پزشکی یکی از پر تقاضاترین راه حل های نقص ارگان یا بافت، پیوند آنها از اهداکنندگان بوده است. این اهداکننده می تواند:

– خود بیمار باشد(اتولوگ[۲]) مانند پیوند پوست قسمتی از بدن یک فرد به ناحیه ای دیگر از بدن همان فرد.

[۱] Niche
[۲] Autologous

– یا افرادی که از نظر ایمونولوژیک با فرد مشابه باشند (آلوگرافت[1]) مانند پیوند مغز استخوان،همچنین بافت اهدایی می تواند از افراد فوت شده (مرگ مغزی) باشد مانند اهدا قلب پیوندی.

– امروزه حتی در مورد پیوند اعضاء حیوانات (زنوگرافت[2]) نیز به انسان تلاشهایی صورت گرفته که تاکنون موفقیتهایی در پیوند قرنیه ودریچه قلب خوک کسب شده است (۱۰،۹).

البته در مورد پیوندهای آلوگرافت وزنوگرافت محدودیتها و مشکلات فراوانی وجود دارد، از جمله مشکلات ایمنولوژیک که حاصل از پروتئین های بیگانه ای است که عضو پیوندی بیان می کند، جهت غلبه بر این معضل یا باید سیستم ایمنی گیرنده سرکوب شود، یا اینکه بافتهای زنوگرافت (از حیوانات) توسط مواد شیمیایی غیرایمونولوژیک شود. علاوه براین، احتمال انتقال عوامل عفونی مانند رتروویروس ها وپریون نیز وجود دارد، راه حلهای بسیاری برای رفع این مشکل وجود دارد، برای مثال استفاده از حیوانات ترانس ژن یا شبیه سازی شده، اما مشکلات اخلاقی و سیاسی موجود در این روند همچنان مانعی برسر این راهها است.آنچه در این روند مورد نیاز است فراهم سازی تسهیلات یا تکنیکی جهت القا ترمیم و بازسازی در بافت آسیب دیده است تا بتواند خود را ترمیم کند. باید گفت که مهندسی بافت در این عرصه مفید به نظر می رسد. این روش از روشهای درمانی استاندارد به کار برده شده در درمان تا اندازه ای متفاوت است چرا که در آن بافتهای طراحی شده به بیمار پیوند زده می شود، که حاصل آن درمان اختصاصی و دائمی بیماری است(۱۱).

[1] Allograft
[2] Xenograft

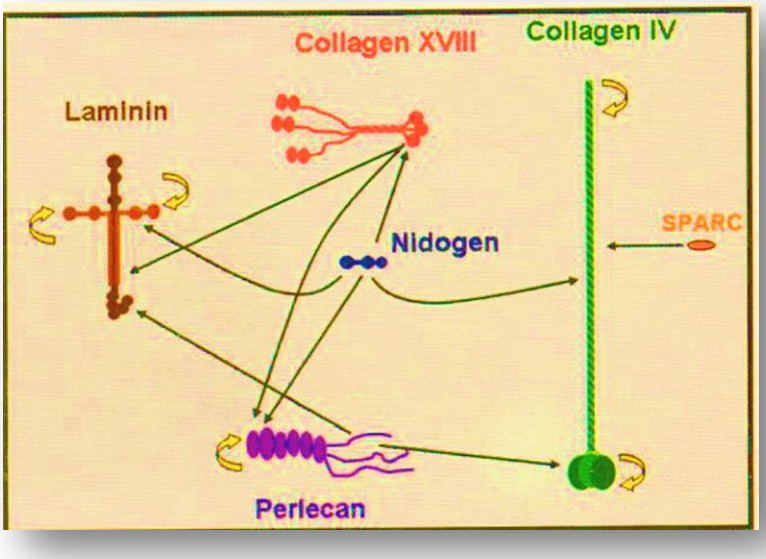
برای این منظور فراهم آوردن محیط واقعی و شرایط مطلوب ضروری به نظر می رسد، چرا که اگر شرایط نگهداری سلولها صحیح نباشد ممکن است بیان ژنهای مختلف، ارسال پیامها یا تولید فاکتورهای رشد، حرکت و چرخه سلولی تغییر یابد ومسیر تمایزی سلول تغییر نماید. تحقیقات نشان داده است که مهندسی بافت می تواند این شرایط را فراهم کند (۱۲،۷). داربست[۱] ، سلول وفاکتورهای رشد[۲] سه رکن اصلی مهندسی بافت را تشکیل می دهد(۱۳،۷).

۱-۳ ماده زمینه برون سلولی(ECM)

مدتها عقیده بر این بود که ECM تنها نقش داربستی را برای سلول و بافت ایفا می کند. در حالیکه در سالهای اخیر معلوم شده است که یک ارتباط ساختاری – عملی بین ECM وسلول های بافتی به ویژه بین اسکلت سلولی، هسته و اطلاعات ژنتیکی آن وجود دارد. در واقع ECM، دینامیک بافت را تعدیل می کند. این فرایند از طریق ایجاد توانایی جهت اتصالات موضعی، ذخیره سازی وآزادسازی فاکتورهای رشد به منظور هدایت سلول ها در زمان مناسب به مکان مطلوب صورت می گیرد. ماده زمینه برون سلولی متشکل از پروتئین های رشته ای در هم بافته ای است که در شبکه ای از زنجیره های گلیکوزآمینوگلیکان هیدراته به دام افتاده اند. بنابراین ECM داربستی را فراهم می کند که در ترکیب با مایع درون سلولی سبب مقاومت دربرابر کششهای حاصل از رشته ها واسترسهای فشار حاصل از شبکه هیدراته می شود(۱٤). مطالعات نشان داده است که ECM شامل اجزا ساختاری مانند انواع کلاژن، گلیکوپروتئین ها، اسید هیالورونیک، گلیکوزآمینوگلیکان، رتیکولین والاستین است (شکل ۱-۲) که جهت اتصال ECM با گیرنده های سلولی مناسب هستند. برای این منظور

[۱] Scaffold
[۲] Growth factor

مولکول های ECM دارای موقعیت های اختصاصی[1] متشکل از توالی اسیدهای آمینه ای است که اتصال سلولی را در این نواحی میسر می سازد. بهترین مثال توالی RGD (آژرینین، گلیسین و اسید آسپارتیک) است. موتیف های درگیر در اتصال سلولی در جدول ۱-۱ آورده شده است.



شکل ۱-۲ برخی از اجزا تشکیل دهنده ماده زمینه برون سلولی به صورت شماتیک دیده می شود.

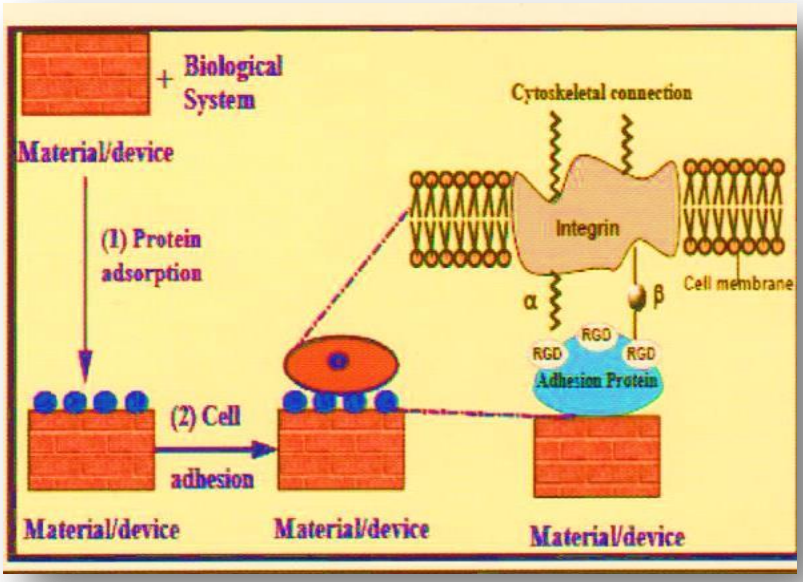
[1] Motif

ECM Protein	Peptide Sequence
RGD	Fibronectin, Vitronectin, Laminin, Collagen
YIGSR	Laminin
IKVV	Laminin
REDV	Fibronectin
DGEA	Collagen
KQAGDA	Fibrinogen
VAPG	Elastin

جدول ۱-۱ پپتیدهای کوتاه حاصل از پروتئین های ECM که با رسپتورهای سطح سلولی اتصال پیدا می کنند.

مطالعات نشان داده است که ماده زمینه برون سلولی با گیرنده های اینتگرینی سطح سلول اتصال برقرار می کنند(شکل۱-۳) (۱۵)، به طوریکه در اثر همکنش های اینتگرین – ECM بین سلولهای اپی بلاست و شبکه لامینین غشاء پایه در حال تکامل است که ، سه لایه زاینده تشکیل می شود(۱٦).

گیرنده های اینتگرینی سبب انتقال سیگنال های (پیام) محیط خارجی به درون سیتوپلاسم می شود که این امر به نوبه خود آغازگر آبشار پیام رسانی (signaling) بوده که نتیجه آن مهار یا تحریک سیستم های تنظیم کننده داخلی است که در نهایت بیان ژنهای هسته ای را تحت تاثیر قرار می دهد. این امر می تواند منجر به تغییر خصوصیات سلولی یا ECM شده که از طریق افزایش سنتز یا تخریب ECM صورت می گیرد.



شکل ۱-۳ شمایی از همکنش RGD ماده زمینه خارج سلولی با گیرنده های اینتگرینی سطح سلول

این فرایند فعال[۱] خوانده می شود که چسبندگی، مهاجرت، تقسیم سلولی، تمایز و تمایززدایی[۲] بافت می تواند از طریق این مکانیسم سلولی کنترل شود (۱۷).علاوه بر عوامل ذکرشده، فاکتورهای رشد، سایتوکاین ها، آنزیم های تخریب کننده ماتریکس ومهارکننده هایشان نیز در ECM ذخیره شده وتعدادی از آنها با ماده زمینه برون سلولی واکنش می دهند و سبب تحریک فعالیت سلولی شده و بدین ترتیب منجر به تولید یا تخریب ECM می شود. اجزا ماکرومولکول ECM بوسیله پروتئازهای فعال شده سلولی، به طور عمده ماتریکس متالوپروتئیناز (MMP) وسرین پروتئازها، تخریب می شود(۱۸).

[۱] Dynamic reciprocity
[۲] Dedifferentiation

این امر سبب ایجاد پاسخ دینامیک متقابل شده وطی آن ECM سلولی وپروتئازهای آن سبب بازسازی ECM وآزادسازی اجزا فعال آن می شود. پروتئولیز سلولی اغلب برای مهاجرت و تهاجم سلولی در فضای سه بعدی مورد نیاز است، زیرا تخلخل ECM ممکن است سدی در مقابل فعالیت سلولی باشد ودر نتیجه سبب ممانعت از مهاجرت سلول شود. اهمیت ذخیره سازی فاکتورهای رشد در ECM این است که وقتی فاکتورهای رشد از طریق همکنش الکترواستاتیک با پروتئوگلیکانی همچون هپاران سولفات به مولکول های ECM متصل می شود غلظت موضعی آن به میزان مطلوب بالا رفته، در نتیجه ضمن تمرکز فعالیت ریخت زایی سلول، آنها را از تخریب آنزیمی حفظ می کند ودر برخی موارد ممکن است از طریق افزایش فعالیت بیولوژیک سبب مطلوب سازی همکنش گیرنده – لیگاند شود (۱۹،۲۰). از آنجائیکه فاکتورهای رشد در مقادیر بسیار کم برای تحریک پاسخهای بیولوژیک مورد نیاز است، توجه فراوانی به طراحی مواد زمینه مصنوعی برای عرضه فاکتورهای رشد جهت کنترل غلظت آنها معطوف شد، بطوریکه در ابتدا فاکتورهای رشد به ماتریکس متصل شده وپس از رفع نیاز سلولی از طریق فعالیت پروتئازها از ماتریکس جدا می شود، این روش تقلیدی از شرایط موجود در محیط موجود زنده است که طی آن فاکتورهای ذخیره شده در ECM طبیعی بوسیله سلول های آسیب دیده طی ترمیم بافتی آزاد می گردد (۲۱)، برای مثال، TGF – β می تواند تشکیل ECM وبه طور همزمان آنزیم های مهارکننده آن مانند متالوپروتئیناز را تحریک کند. بسیاری از مواد زیستی مصنوعی طوری طراحی شده اند که توسط هیدرولیز استری تخریب می شوند. البته هیدرولیز غیرآنزیماتیک ماتریکس در موجود زنده معمول نیست. پیشرفت فوق العاده ای در تقلید ECM طبیعی توسط مواد زیستی مصنوعی (ژل های پلیمری مصنوعی) حاصل شده است. پیشکسوتان این راه kopecek وهمکاران هستند که روش های جدید متعددی را برای تولید هیدروژل های

مصنوعی حساس به پروتئازها مانند پلاسمین، MMPها یا هر دو خانواده پروتئازی معرفی کرده اند (۲۲). حساسیت به آنزیمهای پروتئولیتیک این مواد بوسیله کوپلیمریزاسیون مرحله ای پلیمرهای هیدروفیلیک و حساسیت پروتئولیتیک اولیگوپپتیدها یا بلوکهای سازنده پروتئین یا بوسیله ایجاد پیوندهای متقاطع توسط نور در کوپلیمرهای پلی اتیلن گلیکول (PEG) انجام می شود(۲۲و۲۳).علاوه بر عوامل فوق الذکر الکترولیت ها وآب نیز در ECM وجود دارد.البته ترکیب ECM براساس نوع بافت متفاوت است، بنابراین تحمل فشردگی، کشش ویا انعطاف پذیری می تواند بسته به نیاز بافت تغییر کند که طی آن اجزاء ECM شکل موقتی به خود می گیرند، سپس این اجزاء به منظور ساخت اجزاء جدید به کمک پروتئازها حل می شوند. فقط از طریق چنین تخریب مداومی ECM نهایی شکل می گیرد.

مطالعات اخیر نشان داده است که عوامل مکانیکی نیز نقش مهمی در تنظیم سرنوشت سلول ها از جمله سلول های بنیادی دارد، محققین نشان داده اند که سیگنال های مکانیکی از طریق فعال سازی Rho ، یک GTPase کوچک، و Rho کیناز به اسکلت سلولی انتقال داده می شود که نقش مهمی نه تنها در تولید فاکتورهای محلول بلکه در اتصال سلول های بنیادی به سطوح سه بعدی دارد(۱۷). در این روند خصوصیات فیزیکی داربست مانند درصد تخلخل، غلظت و... نیز بر تمایز سلول ها بی تاثیر نیست. Taqvi نشان داد که کاهش میزان منافذ داربست سبب افزایش تمایز به سلولهای خونساز خواهد شد.علاوه بر این افزایش غلظت پلیمر منجر به افزایش خونسازی شده و افزایش دانسیته سلولی نیز سبب افزایش تولید پیشسازهای خونساز می شود(۲٤). همچنین شواهد نشان می دهد که

ایجاد شرایط کشت پویا[1] در سیستم های سه بعدی نیز سبب افزایش تمایز می شود که این امر از طریق کاهش بیان تعداد زیادی از ژنها ودر نتیجه مهار برخی از مولکول های موثر در بنیادینگی می شود. به طوریکه کشت سلولهای بنیادی بر داربست های داخل بیوراکتورهای چرخان سبب افزایش ایجاد سلول های خونساز نسبت به کشتهای دوبعد و محیطهای سه بعدی ساکن می شود.بنابراین خصوصیات شیمیایی، فیزیکی و مکانیکی بستر سلولی می تواند به طور مستقیم یا غیرمستقیم در کنترل سرنوشت سلول های بنیادی نقش داشته باشد(۲۵،۲٤). تکثیر و تمایز سلولی در فضای سه بعدی بافت اتفاق می افتد، پیش نیاز این پدیده نیز همکنش شدید سلول با ماتریکس است. با توجه به نقش مهم ECM در ریخت زایی[2] و فعالیت سلول ها طراحی محیط مناسب از اهمیت ویژه ای برخوردار است.

۱-٤ ECM مصنوعی می تواند سرنوشت سلول های بنیادی را کنترل کند: (مهندسی کنام سلول های بنیادی)

تشکیل بافت، هموستازی و ترمیم، وابسته به سلول های بنیادی وتعهدشان برای تمایز به خانواده های مختلف سلولی است. یکی از چالشهای عمده در مورد سلول های بنیادی کنترل سرنوشت آنها در محیط خارج از محیط طبیعی سلول است. سلول های بنیادی بزرگسال در ECM خاصی «کنام» ساکن هستند که دارای مخلوطی از عوامل محلول و نامحلول، سیگنال های بلند و کوتاه ECM است.این عوامل در نهایت رفتار سلول را تنظیم می کند. سلول های بنیادی بزرگسال خارج از محیط طبیعی، قدرت تکوینی خود را سریعاً از دست می دهند. از این رو طراحی مواد مصنوعی که

[1] Dynamic
[2] Morphogenesis

ریزمحیط طبیعی سلول های بنیادی را تقلید کند ممکن است وسیله قوی برای درک و کنترل فعالیت سلول های بنیادی باشد.از همین رو Mahoney و Saltzman ریزمحیط مصنوعی مفیدی را به عنوان وسیله ای برای پیوند طراحی کردند. این ریزمحیط از ذرات ریزی از جنس کوپلیمر پلی لاکتیک – گلیکولیک اسید پوشیده شده با پلی لیزین تهیه شده سپس با فاکتور رشد عصبی بتا بارگذاری شد. ترکیب ماتریکس چسبنده سلول و آزادسازی کنترل شده فاکتورهای ریخت زا به آنها اجازه کنترل تمایز و بقا سلول های مغز در مدل رت را داد.

ECM شبیه سازی شده همچنین باید اجازه بازسازی و ترمیم بافت را در موجود زنده بدهد. برای مثال فیبرین به عنوان ماتریکس جهت القا ترمیم مورد استفاده قرار گرفته است. در این امر وجود عوامل زیر لازم می باشد:

۱) لیگاند برای چسبیدن سلول ۲) مکانیسم تخریب نسبتاً سریع ۳) حمل سیگنال های ریخت زا برای جذب سلول های پیشساز در مسیرهای اختصاصی بافت (۲۱)، این ماتریکس طراحی شده، در استخوان ضایعه دیده کاشته شد، که در پی آن بازسازی استخوان مشاهده گردید (۲٦). البته استفاده از ECM مصنوعی در ترمیم، مشکلاتی مانند رگزایی در محل پیوند را دربر دارد (۲۷). عدم رگ سازی سبب مشکلات پاتولوژیک فراوان شده و مانعی مهم در موفقیت پیوند بافت مهندسی شده است. زیرا یکی از مسائل قابل توجه جهت بقای سلول های پیوند شده، تشکیل سریع و موثر عروق جهت فراهم سازی منبع غذایی و تبادل مواد زاید است، به طوریکه وقتی سلول ها در فاصله بیش از ۲۰۰ میکرومتر از عروق قرار گرفته باشند محدودیت دسترسی به اکسیژن پیش می آید که از تشکیل بافت جلوگیری کرده یا آن را به تاخیر می اندازد.

سه مکانیسم جداگانه در رشد عروق شناخته شده است:

- تولید عروق خونی (vasculogenesis، تشکیل de novo عروق خونی بوسیله پیش سازهای اندوتلیال)

- ایجاد عروق خونی در دوران جنینی (angiogenesis، جوانه زدن عروق از آنچه قبلاً وجود داشته است)

- ایجاد شریان (arteriogenesis، ایجاد عروق خونی از سلول های دیواره ای) (١٦).

بسیاری از سیگنال های محلول تنظیم کننده و گیرنده های لازم در این روند شناسایی شده است. سیگنال های اصلی شامل فاکتورهای رشد عروق[١] ، FGFs، TGF[٢] ،آنژیوپوئتینها[٣] ،افرین ها[٤] ، فاکتورهای رشد جفت و کموکاینهای مختلف است که وجود این فاکتورها بایستی در طراحی ماتریکسها درنظر گرفته شود(٢١،٢٧). در این میان (VEGF) نسبت به بسیاری از فاکتورها اختصاصی تر عمل می کند. به نظر می رسد الحاق چنین فاکتورهایی به داربست ها جهت آزادسازی کنترل شده و موضعی VEGF مناسب باشد. این داربست ها ابتدا سبب آزادسازی انفجاری VEGF در محل شده سپس رهش آن تا هفته ها ادامه پیدا می کند (٢١). احتمالاً این روند بتواند مشکل رگزایی در داربست های پیوند شده را حل کند.

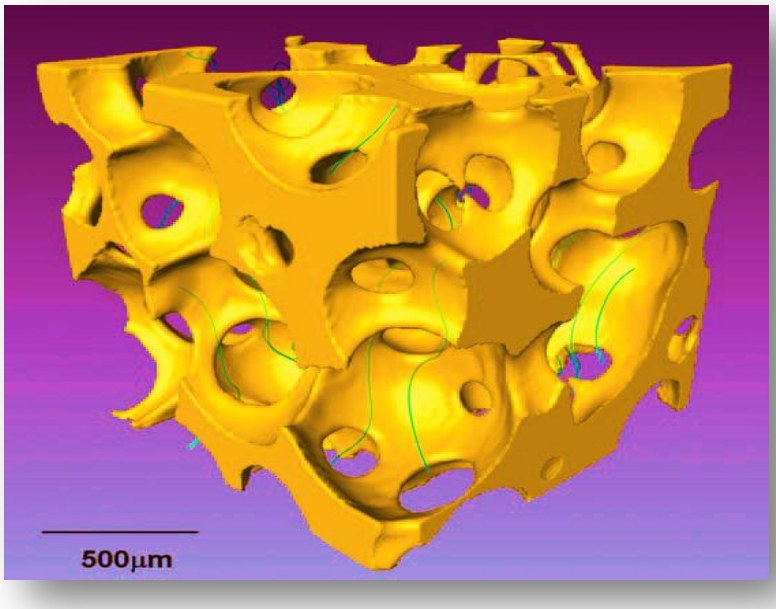
[١] Vascular Endothelial Growth Factor, VEGF
[٢] Transforming Growth Factor
[٣] Angiopoietines
[٤] Ephrins

۱-۵ داربست ها[1]

سلول های زنده برای تقلید بافت باید با توجه به رفتار مورد نیاز از لحاظ ریخت زایی و تکوین در محل مطلوب مورد استفاده قرار گیرند. آنچه در تکنولوژی ساختاری قابل توجه است عبارت است از طراحی و مهندسی ساختارهایی شبیه به بافت که قابلیت کاربرد در کلینیک را نیز داشته باشد. در این روند از زیست مواد (داربست ها) استفاده می شود.

چالش مهندسان بافت بهینه کردن داربست یا سیستم های مناسب جهت جداسازی، تکثیر و تمایز سلول های مورد نظر است تا بتواند رشد هماهنگ وسه بعدی بافت را پیش ببرد. برای اینکه موفقیت مهندسی بافت به حداکثر برسد، باید سعی کرد محیطی مشابه با موجود زنده فراهم کرد تا رشد وفعالیت سلول به طور طبیعی انجام گیرد (شکل ۱-٤). این امر فاکتورهای شیمیایی وفیزیکی وسیعی را شامل می شود که به همکنش های فیزیکی (ماکرومولکولهای نامحلول مثل کلاژن)، شیمیایی (ماکرومولکول های محلول مثل سایتوکاین ها) و همکنش سلول - سلول و پروتئین با سلول های مجاور تقسیم می شوند.

[1] Scaffolds



شکل ۱-٤ ساختار داخلی داربست (٦١)

مواد بیولوژیک ومصنوعی هردو در طب ترمیمی ومهندسی بافت نقش مهمی به عهده دارند (۲۱). این ترکیبات سبب تولید ریزمحیط هایی می شوند که مشابه ECM بافت شده و تمایز و شکل زایی بافت هدف را هدایت می کند (۲۸،۱٤،۹).

به طور کلی داربست های بکاربرده شده در مهندسی بافت باید دارای خصوصیات زیر باشند:

- قدرت مکانیکی مناسب جهت تقلید ازشرایط موجود زنده را داشته باشد (۲۹،۷). البته لازم به ذکر است که خواص مکانیکی داربست در مهندسی بافت های سخت از اهمیت بیشتری برخوردار است.اندازه ودرصد تخلخل، روش ساخت داربست، خواص مواد تشکیل دهنده آن از عوامل موثر بر خواص مکانیکی داربست هستند. به طور مثال استحکام کششی با افزایش بلورینگی پلیمر افزایش

می یابد واز طرفی نیز ممکن است در حین ساخت داربست، جرم مولکولی پلیمر کاهش یافته و درنتیجه خواص مکانیکی آن تغییر کند(۳۰).

- زیست سازگار و زیست تخریب پذیر باشد (۳۱،۹،۷).

ازنظر زیست سازگاری مواد غیربیولوژیکی به سه دسته خنثی[۱] ، قابل جذب[۲] و زیست فعال[۳] تقسیم می شوند (۹). تخریب داربست براساس مکانیسم های تخریب زیستی[٤] ، هیدرولیز (فرسایش زیستی)[٥] و جذب زیستی[٦] صورت می گیرد. مدت زمان تخریب داربست تعیین کننده طول عمر آن است، به طوریکه عمر داربست بایستی کمی طولانی تر از مدت زمان ترمیم بافت باشد به عبارتی سرعت تشکیل بافت سریعتر از سرعت تخریب داربست باشد. عوامل مختلفی برسرعت تخریب اثرمی گذارند که برخی آنها عبارتند ازترکیبات شیمیایی و ساختار فضایی، شرایط محیطی، تنش وکرنش، بلورینگی، اندازه مورفولوژی (همچون درصد تخلخل)، نظم زنجیره ها، افزودنی ها، وزن مولکولی(۳۲).

- داربست بایستی دارای درصد تخلخل[۷] بالایی باشد(۳۰).

داربست های مهندسی بافت دارای شبکه متخلخل مرتبط بهم[۸] هستند تا عمل تغذیه رسانی سلول، دفع ضایعات سلولی به خارج داربست، تشکیل ECM ماتریکس سلولی ورگزایی[۹] فراهم شود.

---

۱ Bioinert
۲ Resorbable
۳ Bioactive
٤ Biodegradable
٥ Bioerousion
٦ Bioresorbable
۷ Porosity
۸ Interconnective network
۹ Angiogenesis