

بِسْمِ اللَّهِ الرَّحْمَنِ الرَّحِيمِ



دانشگاه فردوسی مشهد

گروه زیست‌شناسی

پایان‌نامه کارشناسی ارشد

رشته زیست‌شناسی گرایش سلولی تکوینی

با عنوان:

مطالعه اعمال متقابل بین بافت کلیه سلول زدایی شده خرگوش و بافت بلاستمای حاصل
از پانچ لاله گوش خرگوش نر نژاد نیوزلندی (*Oryctolagus cuniculus*) بر اساس
مطالعات بافت‌شناسی در شرایط *in vitro*.

استادان راهنما

دکتر ناصر مهدوی شهری

دکتر مریم مقدم متین

استاد مشاور

دکتر رویا لاری

تحقیق و تألیف

فرشته سخاوتی

تابستان ۱۳۹۱

سپاس خدای را که سخنوران، در ستودن او بمانند و شمارندگان، شمردن نعمت های او ندانند. و سلام و درود بر محمد و خاندان پاک او، طاهران معصوم، هم آنان که وجودمان وامدار وجودشان است؛ و نفرین پیوسته بر دشمنان ایشان تا روز رستاخیز...

با درود فراوان به روح پدر بزرگوارم و سپاس بیکران بر همدلی و همراهی مادر دلسوز و مهربانم که سجده ایثارش گل محبت را در وجودم پروراند و دامن گهربارش لحظه های مهربانی را به من آموخت. همچنین از همسر عزیزم که با ایجاد محیط امن و آرام، در اتمام این پروژه با صبر و شکیبایی مثال زدنی خویش، مشوق و یار و یاور من بود، بسیار متشکرم.

از استادان فرهیخته و فرزانه جناب آقای دکتر ناصر مهدوی شهری و سرکار خانم دکتر مریم مقدم متین که از راهنمایی های بی دریغشان و محضر پر فیض تدریسهشان بهره ها برده ام، نهایت تشکر را دارم.

همچنین از استاد مشاور محترم سرکار خانم دکتر رویا لاری بسیار سپاسگذارم.

از اساتید گرانقدر جناب آقای دکتر بهرامی و جناب آقای دکتر افشار که با راهنمایی و داوری های ارزشمندشان این پایان نامه را قضاوت نمودند نیز بسیار سپاسگذارم.

فهرست مطالب

| | |
|----|---------------------|
| V | چکیده |
| VI | مقدمه و اهداف |
| IX | علائم اختصاری |

فصل اول: کلیات

| | |
|----|---------------------------------------------------------|
| ۲ | ۱-۱ کلیاتی در مورد مهندسی بافت کلیه |
| ۴ | ۱-۱-۱ روش های مهندسی بافت |
| ۵ | ۲-۱-۱ داربست ها و مهندسی بافت |
| ۶ | ۲-۱ سلول زدایی بافت |
| ۷ | ۱-۲-۱ روش های سلول زدایی بافت و مواد مورد استفاده |
| ۱۲ | ۲-۲-۱ استریل کردن داربست |
| ۱۲ | ۳-۱ ماتریکس خارج سلولی |
| ۱۶ | ۱-۳-۱ چسبندگی سلول با ماتریکس |
| ۱۷ | ۲-۳-۱ نفوذ پذیری ECM |
| ۱۸ | ۴-۱ بافت بلاستما |
| ۲۰ | ۱-۴-۱ چطور می توان باعث القا و رشد بلاستما شد |
| ۲۱ | ۵-۱ اعمال متقابل سلول- سلول |
| ۲۲ | ۶-۱ انواع سلول های بنیادی |
| ۲۳ | ۱-۶-۱ سلول های بنیادی جنینی |
| ۲۴ | ۲-۶-۱ سلول های بنیادی بالغ |
| ۲۵ | ۷-۱ رفتارهای سلولی |
| ۲۵ | ۱-۷-۱ تقسیم سلولی |
| ۲۵ | ۲-۷-۱ تمایز سلولی |
| ۲۶ | ۳-۷-۱ مرگ سلولی |
| ۲۸ | ۴-۷-۱ مهاجرت سلولی |
| ۳۰ | ۸-۱ شکل زایی کلیه در پستانداران |
| ۳۱ | ۱-۸-۱ پیشرفت لوله های کلیوی |

- ۲-۸-۱ القای متقابل در طی تکوین کلیه ۳۲
- ۳-۸-۱ کارکرد کلیه ۳۳
- ۴-۸-۱ روش های درمانی جدید ۳۵
- ۵-۸-۱ گذر مزانشیمی به اپی تلیالی در تکامل کلیه ۳۶
- ۶-۸-۱ نقش ماتریکس خارج سلولی در تکامل کلیه ۳۷
- ۷-۸-۱ جستجو برای سلول های بنیادی کلیوی به منظور احیاء کلیه ۳۹
- ۹-۱ مروری بر تحقیقات گذشته در زمینه پروژه حاضر ۴۰

فصل دوم : مواد و روش ها

- ۱-۲ فهرست وسایل مورد استفاده در این تحقیق ۴۲
- ۲-۲ فهرست مواد مورد استفاده در این تحقیق ۴۳
- ۳-۲ روش تهیه داربست کلیه ۴۵
- ۳-۲-۱ تهیه بافت کلیه خرگوش ۴۵
- ۳-۲-۲ تهیه مواد و محلول های مورد استفاده در سلول زدایی ۴۵
- ۳-۲-۳ انجام مراحل سلول زدایی ۴۵
- ۳-۲-۴ سم زدایی و استریل کردن داربست ها به منظور کشت ۴۶
- ۴-۲ تهیه بافت بلاستمایی ۴۷
- ۴-۲-۱ نگهداری از حیوانات ۴۷
- ۴-۲-۲ تهیه حلقه بلاستمایی ۴۸
- ۵-۲ مراحل کشت داربست و بافت بلاستما در شرایط *in vitro* ۵۰
- ۵-۲-۱ استریل کردن وسایل جهت کشت ۵۰
- ۵-۲-۲ تهیه محیط کشت مورد استفاده ۵۰
- ۵-۲-۳ کشت داربست ها در میان حلقه های بلاستمایی ۵۱
- ۶-۲ مطالعات و بررسی های نهایی بافت شناسی بر روی داربست و بلاستمای کشت شده ۵۲
- ۶-۲-۱ پاساژ بافت ۵۲
- ۶-۲-۱-۱ فیکس کردن بافت ۵۲
- ۶-۲-۱-۲ آگیری ۵۲
- ۶-۲-۲ آغشتگی با پارافین ۵۳
- ۶-۲-۳ قالب گیری ۵۳

| | |
|----|---------------------------------------------------------|
| ۵۴ | تهیه مقاطع بافتی ۴-۶-۲ |
| ۵۳ | ژلاتینه کردن لام ها ۱-۴-۶-۲ |
| ۵۴ | برش گیری ۲-۴-۶-۲ |
| ۵۴ | رنگ آمیزی ۵-۶-۲ |
| ۵۵ | روش رنگ آمیزی هماتوکسیلین-انوزین ۱-۵-۶-۲ |
| ۵۵ | رنگ آمیزی هماتوکسیلین وایگرت- پیک ایندیگو ۲-۵-۶-۲ |
| ۵۶ | رنگ آمیزی- PAS ۳-۵-۶-۲ |

فصل سوم : نتایج

| | |
|----|--------------------------------------------------------------------------------------------|
| ۵۸ | داربست مشتق شده از کلیه سلول زدایی شده خرگوش ۱-۳ |
| ۵۸ | ۱-۱-۳ مطالعه سلول زدایی بافت کلیه به کمک رنگ آمیزی H&E |
| | ۲-۱-۳ مطالعه سلول زدایی بافت کلیه به کمک رنگ آمیزی هماتوکسیلین وایگرت - پیک ایندیگو |
| ۶۰ | ۳-۱-۳ مطالعه سلول زدایی بافت کلیه به کمک رنگ آمیزی PAS |
| ۶۲ | ۲-۳ بررسی رفتار و نفوذ سلول های بافت بلاستما در داربست کلیه در شرایط <i>in vitro</i> |
| ۶۲ | ۱-۲-۳ بررسی رفتار سلول های بافت بلاستما و داربست کلیه ۵ روز پس از کشت |
| ۶۳ | ۲-۲-۳ بررسی رفتار سلول های بافت بلاستما و داربست کلیه ۱۰ روز پس از کشت |
| ۶۴ | ۱-۲-۲-۳ بررسی داربست کنترل پس از گذشت ۱۰ روز در محیط کشت |
| ۶۵ | ۳-۲-۳ بر هم کنش سلول های بافت بلاستما و داربست کلیه بعد از ۱۵ روز کشت |
| ۶۸ | ۱-۳-۲-۳ بررسی داربست کنترل پس از ۱۵ روز قرار گیری در محیط کشت |
| ۶۹ | ۴-۲-۳ مطالعات و بررسی های بافت شناسی در روز بیستم پس از کشت |
| ۷۲ | ۱-۴-۲-۳ بررسی داربست کنترل پس از بیست روز |
| ۷۳ | ۵-۲-۳ برهم کنش سلول های بافت بلاستما و داربست کلیه بعد از ۳۰ روز کشت |
| ۷۴ | ۱-۵-۲-۳ بررسی داربست کنترل پس از ۳۰ روز کشت |

۳-۳ جمع بندی مطالعه رفتار سلول های بافت بلاستمایی انتقال یافته به داربست کلیه سلول زدایی شده بر اساس مطالعات مورفولوژی (کیفی) در شرایط *in vitro* ۷۵

فصل چهارم: بحث و نتیجه گیری

۱-۴ بررسی فرآیند سلول زدایی کلیه خرگوش ۷۸

۱-۴-۱ ارزیابی روش سلول زدایی انجام شده ۷۹

۲-۴ بررسی رفتار بافت بلاستما و داربست کلیه در محیط کشت ۸۳

۳-۴ نتیجه گیری ۸۶

۴-۴ پیشنهادات ۸۷

منابع ۸۹

چکیده

با توجه به مشکلات فراوان بیماران کلیوی، این بیماران اغلب نیازمند پیوند کلیه می باشند تا بتوانند به طور درازمدت به زندگی خود ادامه دهند. این عمل هم بسیار پر هزینه بوده و هم کیفیت زندگی را تحت تأثیر خود قرار می دهد. این روش دارای مشکلات زیادی می باشد از جمله اینکه تعداد اهدا کنندگان کلیه کم است. مشکلات ناسازگاری و مشکلات و زیان های ناشی از مصرف طولانی مدت داروهای سرکوب کننده ایمنی نیز باید در نظر گرفته شوند. مهندسی بافت یک حوزه مطالعاتی است که به منظور ایجاد ساختارهای بافتی زنده و عملکردی برای جایگزینی بافت یا اندام های آسیب دیده در افراد بیمار به کار رفته و شاید بتواند در این زمینه مفید باشد. یکی از روش های مهندسی بافت برای ایجاد ساختارهای بافتی جایگزین، جدا کردن سلول ها از فرد بیمار، گسترش دادن این جمعیت سلولی روی یک داربست مناسب و در نهایت پیوند زدن بافت حاصل به فرد بیمار می باشد. یکی از منابع سلولی، بافت بلاستما است که تجمعی از سلول های تمایز نیافته می باشد که در بخش هایی از پیکر بعضی از موجودات زنده می توانند ایجاد گردند. این سلول ها قابلیت های تقسیم و تمایز سلولی را مشابه با سلول های جنینی دارا می باشند. در این تحقیق از داربست مشتق شده از ماتریکس خارج سلولی (ECM) کلیه خرگوش به عنوان داربست سه بعدی جهت بررسی رفتار سلول های بافت بلاستما استفاده گردید. برای این کار ابتدا قطعات کلیه تهیه و سپس با روش انجماد-ذوب مکرر و استفاده از شوینده سدیم دودسیل سولفات (SDS)، بافت حاصل سلول زدایی گردید. بررسی های بافت شناسی حاصل نشان داد که پس از سلول زدایی تنها ماتریکس خارج سلولی کلیه باقی مانده و سلول ها بطور کامل حذف شده اند. همچنین بافت بلاستما با استفاده از پانچ لاله گوش خرگوش نر نژاد نیوزلندی، تهیه و به صورت حلقه از گوش خرگوش جدا گردید. سپس حلقه بلاستمایی با داربست کلیه سلول زدایی شده مونتاژ و در شرایط *in vitro* در محیط کشت نگهداری شدند. نمونه های مذکور در روزهای ۵، ۱۰، ۱۵، ۲۰ و ۳۰ بعد از کشت مورد مطالعات بافت شناسی قرار گرفتند. نتایج بدست آمده از مطالعات، نفوذ سلول های بلاستمایی به داخل داربست را نشان داد و مشخص شد که بهترین زمان نفوذ سلول ها روز بیستم پس از کشت می باشد. میتوان گفت داربست مشتق شده از بافت کلیه می تواند محیط مناسبی برای حرکت و مهاجرت سلول ها فراهم نموده و مدل مناسبی برای بررسی برهم کنش بین سلول ها و ماتریکس خارج سلولی در شرایط *in vitro* باشد.

کلمات کلیدی:

کلیه سلول زدایی شده، بافت بلاستما، اعمال متقابل سلول و ماتریکس، مهاجرت سلولی

مقدمه و اهداف

ماتریکس خارج سلولی (ECM) داربست‌هایی را برای حمایت سلولی در همه بافت‌ها و اندام‌ها بوجود می‌آورد. در حقیقت ECM مجموعه‌ای پیچیده از مولکول‌های ماتریکس و شامل گلیکوپروتئین‌ها، فیبرونکتین، لامینین، پروتئوگلیکان‌ها و پروتئین‌های غیرماتریکسی از جمله فاکتورهای رشد می‌باشد. اتصال سلولی به ECM سبب القاء ساختارهای سطحی سلول‌های جدا از هم برای ارتباط شدید با ماتریکس می‌شود که اصطلاحاً به چسبندگی‌های سلول - ماتریکس معروف بوده و برهم‌کنش مستقیم سلول با محیط خارج سلولی را میسر می‌کند. چسبندگی سلول - ماتریکس برای مهاجرت سلولی، سازمان‌دهی بافتی و تمایز ضروری است، همچنین این چسبندگی نقش محوری در تکوین جنینی، تغییر وضع و هموستاز بافت و اندام‌ها دارد. چسبندگی ماتریکس خارج سلولی به سلول سبب پیام‌رسانی جهت همکاری با دیگر مسیرهای تنظیم فرآیندهای بیولوژیکی از قبیل بقا و تکثیر سلولی، بهبود زخم و تومورزایی می‌شود (Berrier *etal.*, 2007). ترکیب ECM بیش از اینکه حضور ساده‌ای به عنوان داربست خارج سلولی داشته باشد در تنظیم فنوتیپ سلولی اهمیت دارد (Greiling *etal.*, 1997). می‌توان از ماتریکس خارج سلولی بافت‌های موجودات زنده جهت بررسی رفتار مهاجرتی سلول‌ها استفاده کرد. برای این کار از روش‌های سلول زدایی جهت حذف تاثیر سلول‌های بافت از ماتریکس خارج سلولی می‌توان بهره برد، تا در نهایت تنها ماتریکس خارج سلولی از بافت باقی‌ماند و بتوان از آن به عنوان داربست استفاده نمود. با حذف محتوای سلولی بافت‌دهنده تمام آنتی‌ژنهای سطح سلول نیز همراه با آن حذف می‌شوند و در نتیجه در صورتی که بتوان از آن در زمینه‌ی درمان استفاده کرد دیگر احتیاجی به استفاده از مواد سرکوب‌کننده سیستم ایمنی در زمان پیوند نیست (Atala *etal.*, 2009).

برای بررسی اعمال متقابل سلول و داربست ایجاد شده از ماتریکس این داربست باید دارای شبکه متخلخل مرتبط بهم باشد تا عمل تغذیه رسانی سلول، دفع ضایعات سلولی به خارج داربست، تشکیل ماتریکس خارج سلولی و رگزایی فراهم گردد. درصد تخلخل و اندازه منافذ از مشخصات مهم داربست

های مهندسی بافت هستند (Hollister *et al.*, 2005). این داربست سلول زدایی شده به عنوان یک ساختار ماتریکس خارج سلولی سه بعدی کامل بهره برداری می شود که به عنوان یک الگو برای بازسازی تمام ارگان استفاده می شود (Zhang *et al.*, 2009).

علاوه بر ماتریکس خارج سلولی که به عنوان داربست طبیعی استفاده می شود، از داربست های مصنوعی یا سنتزی نیز می توان استفاده کرد. از موادی که در ساخت داربست های سنتزی به کار برده می شوند می توان به پلیمرهای تخریب پذیر سنتزی، پلیمرهای قابل تزریق، هیدروژل ها و سرامیک ها اشاره نمود. سیگنال های خارج سلولی علاوه بر فاکتورهای رشد، شامل اعمال متقابل سلول - ماتریکس، اعمال متقابل سلول - سلول و محرک های فیزیکی شیمیایی و مکانیکی می باشند که در بررسی اعمال متقابل بین سلول و ماتریکس در مهندسی بافت مورد مطالعه قرار می گیرند (Beckstead *et al.*, 2005).

در این طرح از ماتریکس خارج سلولی بافت کلیه خرگوش و سلول های بلاستما استفاده می شود. در واقع هدف اصلی از این طرح بررسی واکنش و اعمال متقابل بین ماتریکس سلول زدایی شده کلیه خرگوش و بافت بلاستما می باشد. بافت بلاستما شامل گروهی از سلولهای تمایز نیافته ای است که در بخشهایی از بدن موجود زنده می توانند ایجاد گردند. این سلولها قابلیت تقسیم و تمایز سلولی را مشابه با سلولهای جنینی دارا می باشند (Corcoran *et al.*, 1999). برای مثال، چنین تجمعی را چند روز بعد از آسیب از طریق پانچ نمودن لاله گوش خرگوش می توان ایجاد نمود. انجام این چنین تحقیقاتی پایه های اولیه برای شروع مسیر انجام مهندسی بافت می باشد. برای دستیابی به تکنولوژی مهندسی بافت در ابتدا باید چنین کنش های متقابل و واکنش های بین بافت ها و سلول های مختلف با ماتریکس های متفاوت بافتی و همچنین چگونگی کشت آنها بررسی گردد. با توجه به اهمیت و پیچیدگی بافت کلیه شاید این پروژه گام بسیار کوچکی در جهت فهم بیشتر در مورد این بافت حیاتی بوده و الهام بخش کار های بعدی و در مهندسی این بافت باشد، چرا که پیوند کلیه امروزه بیش از ۷۰٪ از پیوند های اعضا بدن را به خود اختصاص داده است و کمبود دهندگان کلیه

VIII

این مشکل را به صورت یک بحران در آورده است. هدف اصلی ما در این تحقیق این است که کنش های متقابل میان بافت بلاستمای دو روزه لاله گوش خرگوش و ماتریکس سلول زدایی شده کلیه در محیط کشت (*in vitro*) بررسی شود و اینکه در صورت مجاورت ماتریکس بدون سلول کلیه و این بافت بلاستما چه تغییرات و تمایزاتی در این سلول ها ایجاد می شود.

ECM: extracellular matrix

ASC: Adult Stem Cell

MSC: Mesenchymal Stem

ESC: Embryonic Stem Cell

H&E: Hematoxylin & Eosin

PBS: Phosphate Buffered Salin

DMEM: Dulbecco's Modified Eagle's Medium

PAS: Periodic Acid Schiff

UB: ureteric bud

H&E: Hematoxylin & Eosin

2-D: two-dimensional

فصل اول

کلیات

۱-۱ کلیاتی در مورد مهندسی بافت کلیه^۱

مهندسی بافت یک مفهوم امید بخش برای طب پیوند اعضا در قرن ۲۱ می باشد. مهندسی بافت روشی است که از اصول و روش های رشته های مهندسی، زیست شناسی و پزشکی استفاده می کند. این روش از جایگزین های زیستی استفاده می کند که می تواند عملکرد بافت را حفظ کند و ارتقا ببخشد (Fuchs et al., 2001). درمان آسیب بافتی و از دست دادن اندام که بر اثر فساد بافتی رخ می دهد هنوز چالش بزرگی است. بیشتر روش های مناسبی که برای جایگزینی بافت آسیب دیده استفاده می شود با مشکلات و موانع زیادی روبروست. از کار افتادن یک اندام توسط فرآیند پیوند درمان می شود. اما به دلیل مشکلاتی که از طریق پاسخ های ایمنی ایجاد می شود و تعداد محدود دهندگان عضو، درمان توسط پیوند اعضا، با مشکل روبرو می شود. بنابراین باید به دنبال روش درمانی دیگر بود. از این جهت طب ترمیم^۲ و مهندسی بافت روش های جدیدی هستند که به منظور شناسایی مکانیسم های ترمیم بافت و یافتن راهی برای رشد مجدد بافت های آسیب دیده ایجاد شدند (Shokeir et al., 2010).

در رشته های مختلف پزشکی از جمله اورولوژی، مهندسی بافت پیشرفت هایی داشته است. این روش در جمع آوری و پیوند یک بافت عملکردی و آناتومیکی توانمند بوده است و باعث رضایتمندی بیشتر بیماران شده است و به طور قابل توجه کیفیت زندگی آن ها را بهبود بخشیده است. جایگزینی پیوند اعضا در مورد بافت های چند لایه و چند بعدی یا شکل گیری بافت فیزیولوژیکی احتیاج به روش های مناسب در مهندسی بافت دارد. برای جایگزینی بافت به منظور درمان باید یک پیوند فیزیولوژیکی صورت پذیرد و عملکرد بافت مهندسی شده یا تولید شده در بدن میزبان مورد ارزیابی قرار گیرد (Feil et al., 2010).

در توضیح کلی می توان مهندسی بافت را اینطور تعریف کرد، مهندسی بافت بطور عام به معنی توسعه و تغییر در زمینه رشد آزمایشگاهی مولکول ها و سلول ها در بافت و یا عضو، برای جایگزینی یا

^۱Kidney tissue engineering

^۲Regenerative medicine

ترمیم قسمت آسیب دیده بدن است. دانشمندان از سال‌ها قبل قادر به کشت سلول‌ها در خارج از بدن بودند، ولی فناوری رشد شبکه‌های پیچیده و سه‌بعدی سلولی برای جایگزینی بافت آسیب دیده اخیراً توسعه یافته‌است. بر اساس تعریف برای ساخت یک بافت به شیوه‌های مهندسی، نیاز به طراحی یک داربست^۱ با ساختار فیزیکی مناسب با امکان چسبندگی سلول‌ها^۲ به آن، مهاجرت سلولی^۳، تکثیر سلولی^۴ و تمایز سلولی^۵ و در نهایت رشد و جایگزینی بافت جدید است. در مهندسی بافت ابتدا یک ماده متخلخل به عنوان ماتریکس خارج سلولی^۶ یا داربست برای رشد سلول‌ها تهیه شده و سپس فاکتورهای رشد^۷ بر روی آن قرار می‌گیرد. پس از رشد مناسب سلول‌ها در فضای تخلخل‌ها، داربست از محیط آزمایشگاه به درون بدن موجود زنده منتقل می‌شود. به تدریج رگ‌ها به داربست نفوذ می‌کنند تا بتوانند سلول‌ها را تغذیه نمایند. در بافت‌های نرم بدن الزاماً داربست تخریب شده و بافت جدید جایگزین آن می‌شود ولی در بافت‌های سخت، می‌توان از موادی بهره گرفت، که لزوماً تخریب پذیر نباشند. در مهندسی بافت از بسیاری از علوم مهندسی برای نیل به این هدف استفاده می‌شود. زیست‌شناسان سلولی و مولکولی، مهندسی مواد پزشکی، طراحان شبیه‌ساز کامپیوتر، متخصصان تصویر برداری میکروسکوپی و مهندسی رباتیک و نیز بسیاری تجهیزات پیشرفته نظیر بیوراکتورها که بافت‌ها در آنجا رشد نموده و تغذیه می‌شوند، همگی به نوعی در تحقیقات مهندسی بافت سهیم هستند. بافت‌های انسانی نظیر پوست، کبد، استخوان، ماهیچه، غضروف، تاندون، رگ‌های خونی از جمله مواردی هستند که تاکنون بررسی شده‌اند. هدف اولیه مهندسی بافت، شناسایی، ترمیم و بازسازی عیوب و نارسایی‌های بافتی است که برای آن اصول مهندسی و اصول بیولوژیک با هدف تولید جایگزین‌های کامل بافت‌های انسانی ترکیب می‌شوند (شکل ۱-۱).

^۱Scaffold

^۲Cell adhesion

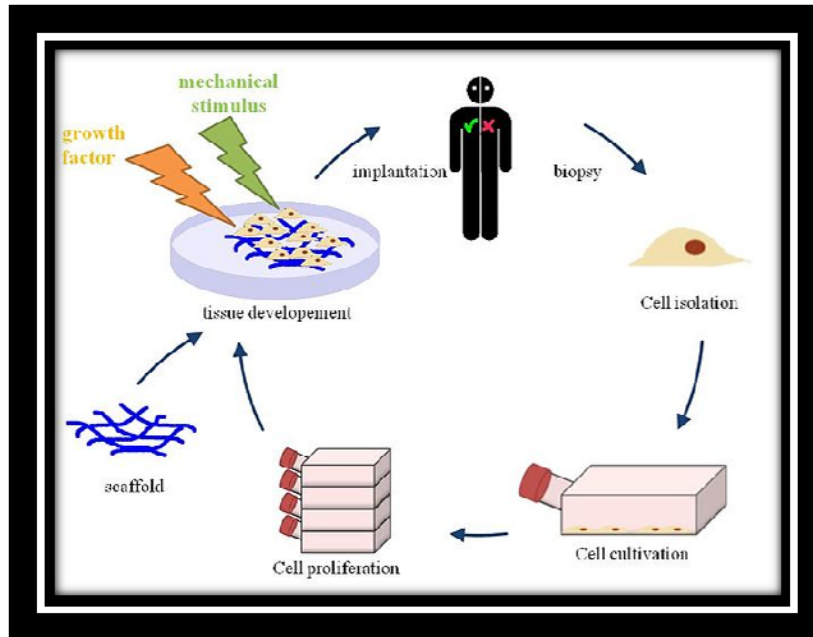
^۳Cell migration

^۴Cell division

^۵Cell differentiation

^۶Extra cellular matrix

^۷Growth factor



شکل ۱-۱ از بافت مورد نظر نمونه برداری می شود، سلول های سالم جدا شده و در محیط کشت تقسیم می شوند. پس از افزایش تعداد آنها بروی داربست مورد نظر، در محیط کشت قرار گرفته و با تحریکات فیزیکی و به کمک فاکتور های رشد بر روی داربست تکثیر یافته و تبدیل به بافتی می شوند که داربست به آنها القا می کند [http://ryortho.com].

۱-۱-۱- روش های مهندسی بافت

روش های فاقد سلول که شامل استفاده از ماتریکس های طبیعی یا سنتزی است که با عنوان داربست معرفی می شوند که باعث افزایش توانایی طبیعی بدن در ترمیم بافت های خود می شود و همچنین به رشد بافت های جدید کمک می کند. داربست ها می توانند غنی از کلاژن باشند و به آهستگی تخریب شوند و در نهایت توسط ماتریکس خارج سلولی میزبان جایگزین شوند (Shokeir *et al.*, 2010). سلول های مورد استفاده می توانند از منابع مختلفی باشند از جمله سلول های اتولوگ و آلوژنیک که البته اولیت اول استفاده از سلول های اتولوگ است تا کمترین خطر ایجاد پاسخ های ایمنی را داشته

باشد. سلول‌ها اکثراً توسط بیوپسی (برداشت بافت زنده) بدست می‌آیند. بهترین مسئله‌ای که در مهندسی بافت باید به آن دست یافت، سازش پذیری زیستی، زیست تخریب‌پذیری، حداقل ایجاد واکنش‌های ایمنی و یکپارچگی کامل با محیط اطراف است. محصولات انسانی تولید شده توسط مهندسی بافت از سلول‌های سوماتیک اتولوگ و یا سلول‌های بنیادی بالغ حاصل می‌شوند که همراه با ماتریکس‌های زیست سازگار هستند و امید بخش درمان در زمینه پزشکی ترمیمی و پیوند اعضا هستند. برای بی نقص بودن عملکرد بافت‌های زیستی مصنوعی ایجاد شده، باید به این بافت‌ها برای عمل تغذیه‌شان خون‌رسانی شود. در مراحل اولیه این عمل تغذیه توسط انتشار صورت می‌گیرد اما برای ادامه بقای بافت جوانه زدن رگ‌های خونی درون آن ضروری است. برای فهم فرآیند فیزیولوژیکی رشد رگ خونی باید تکنیک‌های متفاوتی در مورد رگ‌زایی در ساختمان بافت مهندسی شده بررسی شود (Sutherland *et al.*, 1996).

روش درمانی برپایه سلول، استفاده از مواد زیستی یا ماتریکس‌های بدون سلول و ماتریکس‌های تیمار شده با سلول، روش‌های درمانی در مهندسی بافت است (John *et al.*, 2009). محیط کشت دو بعدی سلول (2D) به طور معمول به منظور مطالعه رفتار و عملکرد سلول استفاده می‌شود. در واقع یک روش پایه است برای توضیح مکانیسم‌های بیولوژیکی، تمایز سلولی و اثر درمانی قبل از شروع کار در شرایط و مدل‌های پیچیده‌تر *in vivo*. اگر چه، سلول‌هایی که در مدل‌های سنتی ۲ بعدی کشت می‌شدند، نمی‌توانند نمایش صحیحی از شکل سلول‌ها را بیان کنند، مانند آنچه که در محیط کشت سه بعدی از سلول‌ها دیده می‌شود (Schmeichet *et al.*, 2003).

۱-۱-۲ داربست‌ها و مهندسی بافت

در هنگام کشت بافت، استفاده از داربست و سطوح مناسب باعث چسبندگی سلول‌ها در بافت می‌شود. بنابراین داربست یا سیستم مناسبی که بتواند رشد سه بعدی بافت را پیش‌برد در کشت بافت دارای اهمیت است. با ایجاد محیطی مشابه با محیط موجود زنده رشد و فعالیت بافت به طور طبیعی صورت می‌گیرد (Chung and Burdick, 2008).

داربست هایی که در مهندسی بافت استفاده می شوند، باید دارای خصوصیات زیر باشند:

- استحکام و توان مکانیکی مناسب به منظور شباهت با شرایط موجود زنده.

- سازگاری زیستی مناسب

- قابلیت انتقال پیام مناسب برای هدایت رشد بافت و جلوگیری از رد پیوند.

- شبکه متخلخل مرتبط بهم به منظور عمل تغذیه رسانی سلول، دفع ضایعات سلولی به خارج

داربست، از مشخصات مهم داربست های مهندسی بافت، میزان تخلخل و اندازه منافذ می

باشند (Polak and Bishop, 2006). ماتریکس های طبیعی یا سنتزی می توانند به عنوان داربست

معرفی شوند که باعث افزایش توانایی طبیعی بدن در ترمیم بافت های خود می شود و همچنین به

رشد بافت های جدید کمک می کند. داربست ها می توانند غنی از کلاژن باشند و به آهستگی تخریب

شوند و در نهایت توسط ماتریکس خارج سلولی میزبان جایگزین می شوند. داربست ها می توانند از

بافت های اتولوگ^۱ و آلوژنیک^۲ یا زنوژنیک^۳ دیگر نیز گرفته شوند و سپس توسط روش های شیمیایی و

مکانیکی برای کشت نهایی سلول زدایی شوند (Brehmer et al., 2007).

۱-۲ سلول زدایی بافت

هدف از سلول زدایی در واقع حذف کامل تمام محتوای سلولی و هسته سلولی از بافت می باشد در

صورتیکه به داربست باقی مانده یا ماتریکس کمترین آسیب وارد شود. بیشترین روش سلول زدایی مورد

استفاده ترکیبی از دو روش شیمیایی و فیزیکی می باشد. هدف اصلی از سلول زدایی در واقع کمترین

آسیب به ECM است و حفظ بیشترین خواص ذاتی مکانیکی و زیستی داربست می باشد. قوی ترین و

^۱autologous

^۲allogeneic

^۳xenogeneic

مؤثرترین روش‌های سلول‌زدایی ترکیبی از سه روش فیزیکی، شیمیایی و آنزیمی است. به طور کلی در یک روش سلول‌زدایی، غشا سلولی توسط تیمارهای فیزیکی یا حلال‌های یونی لیز می‌شود، سپس باید محتویات سلولی از ECM جدا گردد که توسط تیمارهای آنزیمی صورت می‌گیرد، حل کردن محتویات سیتوپلاسمی و هسته‌ای سلولی توسط استفاده از دترجنت‌ها و سپس حذف باقی‌مانده‌های سلولی از بافت می‌باشد. این مراحل می‌تواند با روش‌های مکانیکی برای تأثیر بیشتر همراه گردد. در ادامه سلول‌زدایی، برای جلوگیری از ایجاد پاسخ‌های بافت میزبان در مقابل مواد شیمیایی تمام باقی‌مانده‌های شیمیایی باید حذف گردند (Gilbert *et al.*, 2006).

۱-۲-۱ روش‌های سلول‌زدایی بافت و مواد مورد استفاده

در این جدول مواد و عوامل شیمیایی، عناصر و عوامل بیولوژیکی و عناصر و عوامل فیزیکی که باعث سلول‌زدایی از بافت‌ها می‌شوند، مشخص شده‌اند.

| (مواد و عوامل شیمیایی) | |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--|
| <p>عامل: اسید و باز</p> <p>روش عمل: حل کردن محتویات سیتوپلاسم سلولی و از هم گسیختن DNA و دناتوره کردن پروتئین‌ها</p> <p>اثر بر روی ECM: ممکن است باعث تخریب کلاژن، GAG (گلیکوز آمینو گلیکان) و فاکتورهای رشد گردد.</p> | |
| <p>عامل: دترجنت‌های غیر یونی</p> <p>روش عمل: تعامل پروتئین-DNA را از بین می‌برند، اتصالات لیپید-لیپید و لیپید-پروتئین را از</p> | |

| |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <p>بین می برد و به میزان کمتر ارتباط پروتئین-پروتئین را قطع می کنند. اثر بر روی ECM ندارد.</p> |
| <p>عامل: حلال های هایپوتونیک و هایپرتونیک</p> <p>روش عمل: محلول هایپوتونیک باعث لیز شدن سلولی می گردد و توسط اسمز و محلول هایپرتونیک اتصال DNA و پروتئین را قطع می کند.</p> <p>اثر بر روی ECM: به طور مؤثر باعث لیز شدن سلول می گردند اما به طور مؤثر باعث حذف باقیمانده های سلولی نمی شوند.</p> |
| <p>عامل: تریتون X-۱۰۰</p> <p>اثر بر روی ECM: حذف مؤثر سلول از بافت های نازک، حذف گلیکوز آمینوگلیکان، اثر کمتری نسبت به SDS دارد.</p> |
| <p>عامل: دترجنت یونی</p> <p>روش: حل کردن غشا سلول و هسته، دناتوره کردن پروتئین.</p> |
| <p>عامل: SDS</p> <p>اثر بر روی ECM: به طور مؤثر باعث حذف باقیمانده هسته ای و همچنین پروتئین های سیتوپلاسمی از بافت های متراکم می شود، حذف گلیکوز آمینوگلیکان و فاکتورهای رشد، تخریب کلاژن.</p> |
| <p>عامل: سدیم دئوکسیلات</p> <p>اثر: تأثیر آن بسیار وابسته به ضخامت بافت می باشد، حذف گلیکوز آمینو گلیکان و انقطاع</p> <p>Ultrastructure.</p> |
| |