بسم الله الرحمن الرحيم

الهی!

نه شناخت تو را توان، نه ثنای تو را زبان؛

نه دریای جلال و کبریای تو را کران؛

پس تو را مدح و ثنای، چون توان؟

تو را که داند، که تو را تو دانی و تو؛

تو را نداند کس، تو را تو دانی و بس...

شکر خدا که ریزه خور خوانتان شدم

دلبسته‌ی حریم خراسانتان شدم

لایق نبوده‌ام که شوم همجوارتان

مبهوت این کرامت و احسانتان شدم

تقدیم به:

آستان پرمهر ثامن الحجج حضرت علی بن موسی الرضا (ع)

او که در جوارش قلبم آرام می‌گرفت، روحم لطیف می‌گشت و لحظات ناب زیارتش اندیشه‌ام را زلال می‌ساخت...

من لم یشکر المنعم من المخلوقین لم یشکر الله عزوجل

سپاسگزار کسانی هستم که سرآغاز تولد من هستند. از یکی زاده می شوم و از دیگری جاودانه؛ سپاسگزارم از سه وجود مقدس زندگی؛ پدر، مادر، استاد. . .

سپاس از پدر و مادر عزیزم؛

به پاس تعبیر عظیم و انسانی شان از کلمه ایثار و از خودگذشتگی؛ به پاس عاطفه سرشار و گرمای امید بخش وجودشان که در این سردترین روزگاران بهترین پشتیبان است؛ به پاس قلب های بزرگشان که فریادرس است و سرگردانی و ترس در پناهشان به شجاعت می گراید؛ و به پاس محبت های بی دریغشان که هرگز فروکش نمی کند؛

سپاس از اساتید گرانقدرم؛

آنان که روشنایی بخش تاریکی جان، هستند و ظلمت اندیشه را نور می بخشند. چگونه سپاس گویم مهربانی و لطفشان را که سرشار از عشق و یقین است. چگونه سپاس گویم تأثیر علم آموزیشان را که چراغ روشن هدایت را بر کلبه ی محقر وجودم فروزان ساخته است. آری در مقابل این همه عظمت و شکوه، مرا نه توان سپاس است و نه کلام وصف. . .

زحمات و حمایت های بی دریغ اساتید راهنمای بزرگوارم جناب آقای دکتر مهدوی شهری و سرکار خانم دکتر مقدم متین که افتخار شاگردی ایشان نصیبم گردید را ارج می نهم؛ به پاس صبر، مهربانی و محبت بی دریغشان. . .

از راهنمایی های ارزنده اساتید مشاور بزرگوارم جناب آقای دکتر فریدونی و سرکار خانم دکتر لاری که با الطاف بی دریغ خود مرا از نظرات ارزشمندشان بهره مند ساختند قدردانی می نمایم.

از اساتید گرانقدر جناب آقای دکتر افشار قوچانی و جناب آقای دکتر بهرامی که مسئولیت قضاوت این پایان نامه را تقبل نمودند کمال تشکر و قدردانی را دارم.

از زحمات بی دریغ جناب آقای نخعی، سرکار خانم دکتر خیرآبادی و سرکار خانم طبسی که در طول انجام این پروژه صمیمانه یاریم کردند سپاسگزارم.

و در پایان، از دوستان خوب و عزیزم خانم ها نخعی، نادری، یوسفی، دهمرده، غریبی، جمیل و آقایان توسلی و رفیق دوست که لحظات شیرین مراحل انجام این پایان نامه را در کنارشان تجربه نمودم صمیمانه قدردانی می نمایم.

همتم بدرقه ی راه کن ای طایر قدس　　که دراز است ره مقصد و من نوسفرم

ملیحه اکبرزاده نیاکی

پاییز ۱۳۹۱

دانشگاه فردوسی مشهد

گروه زیست‌شناسی

پایان‌نامه کارشناسی ارشد

رشته زیست شناسی گرایش سلولی تکوینی

با عنوان:

بررسی بافت شناسی بر هم کنش بین بافت بلاستمای لاله گوش خرگوش نر نژاد نیوزلندی *(Oryctolagus cuniculus)* و ماتریکس‌های سه بعدی طبیعی مری موش صحرایی در شرایط *in vitro*.

اساتید راهنما

دکتر ناصر مهدوی شهری

دکتر مریم مقدم متین

اساتید مشاور

دکتر مسعود فریدونی

دکتر رؤیا لاری

پژوهش و نگارش

ملیحه اکبرزاده نیاکی

فهرست مطالب

چکیده VII

علائم اختصاری VIII

مقدمه و اهداف IX

فصل اول: کلیات

۱ - ۱ مهندسی بافت ۲

۱ - ۱ - ۱ داربست‌ها ۲

۱ - ۱ - ۲ سلول‌زدایی از بافت‌ها جهت تهیه داربست‌های مهندسی بافت ۴

۱ - ۱ - ۲ - ۱ سلول‌زدایی فیزیکی ۵

۱ - ۱ - ۲ - ۲ سلول‌زدایی شیمیایی ۶

۱ - ۱ - ۲ - ۲ - ۱ اسید و باز ٦

۱ - ۱ - ۲ - ۲ - ۲ شوینده‌های غیر یونی ٦

۱ - ۱ - ۲ - ۲ - ۳ شوینده‌های یونی ۷

۱ - ۱ - ۲ - ۳ سلول‌زدایی آنزیمی ۷

۱ - ۱ - ۲ - ۳ - ۱ آنزیم‌های پروتئولیتیک ۷

۱ - ۱- ۲ - ۳ - ۲ نوکلئازها ۸

۱ - ۲ ماتریکس خارج سلولی (ECM) ۸

۱ - ۲ - ۱ ترکیب ماتریکس خارج سلولی ۹

۱ - ۲ - ۱ - ۱ کلاژن؛ یک پروتئین ساختاری ۹

۱ - ۲ - ۱ - ۲ گلیکوزآمینوگلیکان‌ها و پروتئوگلیکان‌ها ۱۱

۱ - ۲ - ۱ - ۳ فیبرونکتین و لامینین؛ گلیکوپروتئین‌های چسبنده ۱۲

۱ - ۲ - ۱ - ۴ اینتگرین‌ها ۱۳

۱ - ۲ - ۱ - ۵ کادهرین‌ها ۱۵
۱ - ۲ - ۱ - ۶ الاستین ۱۶
۱ - ۲ - ۲ بعد ماتریکس خارج سلولی ۱۷
۱ - ۲ - ۳ خصوصیات مکانیکی ماتریکس خارج سلولی ۱۸
۱ - ۲ - ۴ اعمال ماتریکس خارج سلولی ۱۸
۱ - ۲ - ۴ - ۱ ECM در مهاجرت ۱۸
۱ - ۲ - ۴ - ۲ ECM در ریخت‌زایی ۱۹
۱ - ۲ - ۴ - ۳ ECM در پیام‌دهی فاکتور رشد ۱۹
۱-۲-۴-۴ ECM در تمایز ۲۰
۱ - ۳ کلیاتی از بافت بلاستما ۲۱
۱ - ۳ - ۱ بلاستما و منشاء آن برای ترمیم ۲۱
۱ - ۴ رگ‌زایی ۲۴
۱ - ۵ رفتارهای سلولی ۲۴
۱ - ۵ - ۱ تقسیم سلولی ۲۴
۱ - ۵ - ۲ مهاجرت سلولی ۲۵
۱ - ۵ - ۲ - ۱ مکانیسم مهاجرت انفرادی و مهاجرت گروهی ۲۶
۱ - ۵ - ۲ - ۲ مهاجرت پروتئولیتیک ۲۸
۱ - ۵ – ۲ - ۳ مهاجرت سلولی در محیط‌های دو بعدی و سه بعدی ۲۹
۱ - ۵ - ۳ تمایز سلولی ۳۰
۱ - ۵ - ۴ مرگ سلولی ۳۱
۱ - ۶ بافت‌شناسی مری ۳۲
۱ - ۷ مولکول‌های موجود در ماتریکس خارج سلولی مری ۳۳
۱ - ۸ تکوین مری: ۳۴

۱ - ۹ مروری بر تاریخچه مهندسی بافت مری ۳۶
۱ - ۱۰ سوابق پژوهشی ۳۸

فصل دوم: مواد و روش‌ها

۲ - ۱ فهرست وسایل مورد استفاده در این پژوهش ۴۰
۲ - ۲ فهرست مواد مورد استفاده در این پژوهش ۴۱
۲ - ۳ تهیه مواد و محلول‌های مورد استفاده در سلول‌زدایی ۴۴
۲ - ۳ - ۱ بافر تریس ۴۴
۲ – ۳ - ۲ تهیه محلول Triton X-100 ..... ۴۴
۲ - ۳ - ۳ تهیه محلولSDS ۴۵
۲ - ۳ - ۴ تهیه محلول فسفات بافر سالین (PBS) ۴۵
۲ - ۴ تهیه مواد و محلول‌های مورد استفاده در کشت ۴۵
۲ - ۴ - ۱ تهیه محیط کشت ذخیره ۴۵
۲ - ۴ - ۲ تهیه محیط کشت مورد استفاده ۴۶
۲- ۵ استریل کردن وسایل ۴۶
۲ - ۶ تهیه داربست مشتق شده از ماتریکس خارج سلولی مری ۴۷
۲ - ۶ - ۱ تشریح و خروج بافت مری خرگوش و موش صحرایی ۴۷
۲ - ۶ - ۲ سلول‌زدایی بافت مری خرگوش و موش صحرایی ۴۸
۲ - ۶ - ۳ سم‌زدایی و استریل کردن داربست‌ها جهت کشت ۴۹
۲ - ۷ تهیه بافت بلاستمایی ۵۰
۲ – ۷ - ۱ پرورش و نگهداری حیوانات ۵۰
۲ - ۷ - ۲ تهیه حلقه بلاستمایی ۵۱
۲ - ۸ کشت داربست مری در میان حلقه بلاستمایی ۵۲
۲ - ۹ مطالعات بافت‌شناسی ۵۴

۲ - ۹ - ۱ تثبیت بافت ۵۴
۲ - ۹ - ۲ آبگیری ۵۴
۲ - ۹ - ۳ شفاف سازی ۵۵
۲ - ۹ - ۴ آغشته سازی با پارافین ۵۵
۲ - ۹ - ۵ قالب گیری ۵۵
۲ - ۹ - ۶ تهیه مقاطع بافتی ۵۵
۲ - ۹ - ۶ - ۱ ژلاتینه کردن لام‌ها ۵۵
۲ - ۹- ۶ - ۲ برش‌گیری ۵۶
۲ - ۹- ۷ رنگ آمیزی ۵۷
۲ - ۹ - ۷ - ۱ رنگ‌آمیزی هماتوکسیلین – ائوزین (H&E) ۵۷
۲ - ۹ – ۷ - ۲ رنگ آمیزی پیکروسیروس رِد – هماتوکسیلین وایگرت ۵۹
۲ – ۹ – ۷ - ۳ رنگ آمیزی PAS ۶۰
۲ - ۹ - ۷ - ۴ رنگ آمیزی آبی‌تولوئیدین ۶۲
۲ - ۹ - ۷ - ۵ رنگ آمیزی پیکروفوشین ۶۲
۲ - ۹ - ۷ - ۶ رنگ‌آمیزی اورسئین – پیک ایندیگو – هماتوکسیلین ۶۳
۲ - ۱۰ روش بررسی آماری ۶۴

فصل سوم: نتایج

۳ - ۱ نتایج بافت‌شناسی مری طبیعی و داربست‌های سلول‌زدایی‌شده مشتق از مری خرگوش و موش صحرایی ۶۶
۳ – ۱ - ۱ نتایج بافت‌شناسی مری طبیعی و میزان حذف سلولی در داربست مری سلول‌زدایی‌شده در خرگوش و موش صحرایی با رنگ‌آمیزی هماتوکسیلین ـ ائوزین (H&E) ۶۶
۳ - ۱ - ۲ نتایج بررسی میزان حفظ محتوای ماتریکس خارج سلولی در داربست‌های تهیه شده ۶۹
۳ - ۱- ۲ - ۱ نتایج بررسی حفظ محتوای بافت پیوندی و کلاژن داربست با رنگ‌آمیزی پیکروفوشین ۶۹

۳ – ۱ – ۲ - ۲ نتایج مطالعه میزان حفظ کلاژن موجود در داربست مری خرگوش و موش صحرایی با رنگ‌آمیزی پیکروسیروس رد ۷۰

۳ - ۱ - ۲ - ۳ مطالعه میزان حفظ فیبرهای الاستین موجود در داربست مری خرگوش و موش صحرایی با رنگ‌آمیزی اورسئین – هماتوکسیلین – پیک ایندیگو ۷۲

۳ - ۲ مطالعه داربست‌های کشت داده شده با حلقه‌های بافت بلاستما ۷۳

۳ – ۲ – ۱ بررسی برهم کنش سلول‌های بافت بلاستما با داربست مری در شرایط *in vitro* در روز پنجم کشت ۷۴

۳ – ۲ – ۲ بررسی برهم کنش سلول‌های بافت بلاستما با داربست مری در شرایط *in vitro* در روز دهم کشت ۷۶

۳ – ۲ – ۲ – ۱ مشاهده نفوذ سلول‌های موجود در حلقه بلاستما به داربست مری با استفاده از رنگ‌آمیزی هماتوکسیلین - ائوزین ۷۶

۳ – ۲ – ۲ – ۲ مشاهده تخریب بافت پیوندی داربست مری در محل نفوذ سلول‌های موجود در حلقه بلاستما با استفاده از رنگ‌آمیزی پیکروفوشین ۷۸

۳ - ۲ - ۲ - ۳ بررسی داربست مری مونتاژ شده با حلقه بلاستما در روز دهم کشت با استفاده از رنگ‌آمیزی پاس - هماتوکسیلین - پیک ایندیگو ۷۹

۳ – ۲ – ۳ بررسی برهم کنش سلول‌های بافت بلاستما با داربست مری در شرایط *in vitro* در روز پانزدهم کشت ۸۱

۳ - ۲ - ۴ بررسی برهم کنش سلول‌های بافت بلاستما با داربست مری در شرایط *in vitro* در روز بیستم کشت ۸۸

۳ – ۲ – ۵ بررسی برهم کنش سلول‌های بافت بلاستما با داربست مری در شرایط *in vitro* در روز بیست و پنجم کشت: ۹۲

۳ - ۳ نتایج آماری ۹۴

فصل چهارم: بحث و نتیجه‌گیری

۴ - ۱ آماده‌سازی داربست ۹۶

۴ - ۲ برهم‌کنش داربست مری با بافت بلاستما ۱۰۱

۴ - ۲ - ۱ مهاجرت سلول‌های بافت بلاستما به داربست سلول‌زدایی شده مری ۱۰۲

۴ - ۲ - ۲ تخریب داربست در محل نفوذ سلول‌ها ۱۰۵

۴ - ۲ - ۳ توده‌های سلولی واقع در داربست، تکثیر و یا مهاجرت گروهی؟ ۱۰۶

۴ - ۲ - ۴ بیوسنتز ترکیبات قنددار ۱۰۸

۴ - ۲ - ۵ استقرار سلول‌های مهاجرت‌یافته در دیواره رگ‌های خونی سلول‌زدایی شده ۱۱۰
۴ – ۲ - ۶ بررسی تغییرات اندازه هسته سلول‌های مهاجرت یافته در روزهای مختلف کشت ۱۱۰
۴ - ۳ نتیجه‌گیری ۱۱۱
۴ - ۴ پیشنهادات ۱۱۳
منابع ۱۱۴

چکیده

مقدمه: مهندسی بافت حوزه مطالعاتی جدیدی است که در آن اصول مهندسی و زیست‌شناسی جهت اصلاح بافت آسیب دیده بکار گرفته می‌شود. ماتریکس خارج سلولی (ECM) یک جزء کلیدی در نگهداری و بازسازی بافت‌ها و اندام‌ها بوده و دارای اثرات القایی بر بسیاری از رفتارهای سلولی می‌باشد. هدف این مطالعه، بررسی برهم‌کنش بافت بلاستمای حاصل از لاله گوش خرگوش با ماتریکس مری سلول‌زدایی شده موش صحرایی می‌باشد. بافت بلاستما تجمعی از سلول‌های تمایز نیافته است که قابلیت تقسیم را مشابه سلول‌های جنینی دارا می‌باشد.

مواد و روش‌ها: پس از برداشت مری از موش صحرایی نر نژاد ویستار، ترکیبی از روش‌های فیزیکی و شیمیایی سلول‌زدایی شامل تکنیک انجماد و ذوب مکرر در ازت مایع و استفاده از دو شوینده سدیم‌دودسیل‌سولفات (SDS) و Triton X-100 انجام گرفت. برای دست‌یابی به بهترین میزان حذف سلولی و در عین حال حفظ محتوای ماتریکس، درصدهای مختلفی از SDS و Triton X-100 در بازه‌های زمانی متفاوت مورد آزمایش قرار گرفت. پس از تهیه داربست، بافت بلاستما با دو مرحله پانچ با فاصله زمانی ۴۸ ساعت از گوش خرگوش به دست آمد. پس از مراحل شستشو، داربست‌های سلول‌زدایی شده درون حلقه‌ها مونتاژ و کشت داده شدند. در نهایت، مطالعات بافت‌شناسی جهت بررسی مهاجرت سلول‌های بافت بلاستمایی به داربست، در روزهای متفاوت پس از کشت انجام گرفت.

نتایج: مطالعات بافت‌شناسی نشان داد که در بهترین حالت، استفاده از Triton X-100 ۱٪ به مدت ۴۸ ساعت و به دنبال آن تیمار با SDS ۰/۵٪ به مدت ۴۸ ساعت منجر به حذف سلول‌ها از مری موش صحرایی، همراه با حفظ پروتئین‌های کلاژن و الاستین موجود در ماتریکس آن شد. در روز دهم کشت، مهاجرت سلول‌ها به سمت داربست، همراه با تخریب بافت پیوندی و سنتز گلیکوپروتئین‌ها در نواحی نفوذ سلول‌ها مشاهده گردید. این مشاهدات، در روز پانزدهم کشت به طور گسترده‌تری ادامه یافت. در روز بیستم و بیست و پنجم کشت، تعداد سلول‌های مهاجرت‌کننده کاسته شده و اندازه هسته سلول‌ها نیز به طور معناداری رو به کاهش رفت.

بحث: این بررسی نشان داد که داربست مری سلول‌زدایی شده موش صحرایی، با دارا بودن مولکول‌های مهمی از جمله کلاژن و الاستین، در القاء رفتارهایی مثل مهاجرت، چسبندگی و احتمالاً تکثیر به سلول‌های بافت پویای بلاستما مؤثر بوده و ضمن حفظ ساختار و ترکیبات اصلی خود، می‌تواند به عنوان بستر مناسبی جهت بررسی رفتارهای سلولی و مدل مناسبی جهت کاربرد احتمالی در مهندسی بافت به کار رود.

لغات کلیدی: داربست مری، ماتریکس خارج سلولی، سلول زدایی، بافت بلاستما، برهم‌کنش سلول – ماتریکس.

علائم اختصاری

ECM: Extracellular matrix

FGF: Fibroblastic Growth Factor

EGF: Epidermal Growth Factor

GAG: Glycosaminoglycan

ESC: Embryonic Stem Cell

MSC: Mesenchymal Stem Cell

ASC: Adult Stem Cell

SLCs: Stem like cells

FBS: Fetal Bovine Serum

PBS: Phosphate Buffered Salin

DMEM: Dulbecco's Modified Eagle's Medium

PLLA: poly(L-lactic acid)

PLGA: poly(lactic-co-glycolic) acid

2-D: two-dimensional

3-D: three-dimensional

PAS: Periodic Acid Schiff

H&E: Hematoxylin & Eosin

SDS: Sodium dodecyl sulfate

MRL: Murphy Roths Large

Pref–1: Preadipocyte factor 1

مقدمه و اهداف

سلول‌های هر بافت قادر به برهم‌کنش با ماتریکس خارج سلولی (ECM) اطراف خود می‌باشند و ماتریکس خارج سلولی، با تأثیر بر تکثیر، دوام، شکل، مهاجرت و تمایز سلولی، رفتار سلول‌ها را تنظیم می‌نماید (Daley *et al*., 2008). برهم‌کنش سلول – ماتریکس نقش مهمی در تسهیل و سازماندهی بسیاری از فرایندهای سلولی ایفا می‌کند. ECM علاوه بر داشتن نقش پشتیبان و داربست برای سلول‌ها، در آماده‌سازی و جداسازی فاکتورهای رشد مورد نیاز سلول‌ها نیز شرکت می‌کند (Lutolf and Hubbell., 2005). داربست، سلول و فاکتورهای رشد سه رکن اساسی در مهندسی بافت می‌باشند و از آنجا که دوام اکثر سلول‌های پستانداران وابسته به چسبندگی است، استفاده از داربست و سطوح مناسب جهت کشت این سلول‌ها ضروری می‌باشد (Koh and Atala., 2004). اگرچه اطلاعات کنونی ما، حاصل کشت دو بعدی سلول‌ها بر روی سطوح صاف محیط کشت می‌باشد، ولی امروزه کاملاً پذیرفته شده است که سلول‌ها در درون بدن، در یک محیط سه بعدی، تکثیر و تمایز می‌یابند (Griffith and Swartz., 2006). داربست‌های زیستی مشتق از ECM ابزار مناسبی جهت فراهم نمودن محیط سه بعدی برای سلول‌ها، هم در محیط کشت و هم در درون بدن می‌باشند (Badylak, 2007). سلول‌زدایی بافت‌ها و اندام‌ها، یک فرایند مهم برای پردازش داربست‌های طبیعی مشتق از ECM می‌باشد. هدف نهایی هر فرآیند سلول‌زدایی، حذف مواد سلولی و هسته‌ای و در عین حال حفظ خصوصیات مکانیکی و فعالیت زیستی ECM باقی‌مانده است (Badylak *et al*., 2009). در این تحقیق از بافت سلول‌زدایی شده مری به عنوان داربست استفاده شد.

مری، بخشی از لوله گوارش می‌باشد که از نظر بافت‌شناسی به طور کلی دارای چهار لایه مخاط، زیرمخاط، لایه عضلانی و آدوانتیس است. شرایط پاتولوژیکی بسیاری اعم از مشکلات مادرزادی و ناهنجاری‌های اکتسابی وجود دارند که برای درمان ریشه‌ای نیاز به برداشت مری و جایگزین‌سازی آن دارند. از آنجا که استفاده از پروتزهای مصنوعی مری عوارض نامطلوب گسترده‌ای را به دنبال داشته است، کاربرد مهندسی بافت در بازسازی بافت مری از اهمیت ویژه‌ای برخوردار می‌باشد. اخیرا ماتریکس

سلول‌زدایی شده مری به عنوان داربست برای مهندسی بافت مری موش صحرایی مورد استفاده قرار گرفته است. چنین بافت‌های سلول‌زدایی شده‌ای سازگاری زیستی بیشتری نسبت به مواد مصنوعی دارند. به علاوه، پروتئین‌های موجود در ماتریکس بافت‌های سلول‌زدایی شده، به نظر می‌رسد که اثر القائی روی تمایز سلول‌های اپی‌تلیال مری دارند (Ozeki *et al*., 2006; Seery *et al*., 2000). طبق این مطالعات، استفاده از بافت مری سلول‌زدایی شده به عنوان داربست طبیعی جهت مطالعه اثرات القائی ماتریکس بر رفتارهای سلولی، مطلوب به نظر می‌رسد. معمولاً منابع سلولی که جهت بررسی رفتارهای سلولی از آن‌ها استفاده می‌شود سلول‌های فیبروبلاستی، سلول‌های بنیادی و یا سلول‌های سرطانی می‌باشند. اما برای شبیه‌سازی هر چه بیشتر شرایط حاکم بر سلول‌ها در شرایط *in vivo* می‌توان از کشت بافت‌های پویا از قبیل بافت‌هایی که در پدیده ترمیم در جانوران پرسلولی نقش دارند، استفاده نمود (Tsonis, 2008). هدف از این مطالعه، برهم کنش ماتریکس سلول‌زدایی شده مری **با** بافت بلاستما لاله گوش خرگوش نر نژاد نیوزلندی بود.

بافت بلاستما شامل گروهی از سلول‌های تمایز نیافته است که در بخش‌های در حال ترمیم بدن موجود زنده می‌توانند ایجاد گردند. برخی از سلول‌های این بافت، قابلیت تقسیم و تمایز سلولی را مشابه با سلول‌های جنینی دارا می‌باشند (Corcoran and Ferretti., 1990). تحقیقات نشان داده است که سلول‌های بلاستمایی از تمایززدایی سلول‌های محل زخم ایجاد شده و قادر به تمایز به انواع سلول‌های بافت‌های مختلف در شرایط *in vivo* می‌باشند (Tsonis, 2008). چنین بافتی را می‌توان دو روز پس از پانچ کردن لاله گوش خرگوش ایجاد نمود. این گروه از سلول‌ها قادرند به سرعت تقسیم و متمایز شده و پس از مدتی ناحیه پانچ شده را کاملاً ترمیم کنند (Mahdavi-Shahri, *et al*., 2008).

فصل اول

کلیات

۱ – ۱ مهندسی بافت

مهندسی بافت[1]، حوزه مطالعاتی جدیدی می‌باشد که اصول مهندسی و علوم زیستی را در جهت درک ارتباط بین ساختار و عملکرد بافت طبیعی و بافت آسیب دیده به کار برده و ساخت جایگزین‌های زیستی را به منظور ترمیم، حفظ و یا بهبود عملکرد بافت یا اندام مورد نظر انجام می‌دهد (Langer, *et al.*, 1993). استراتژی مهندسی بافت به این صورت است که سلول‌های بنیادی برداشته شده از بیمار که در یک محیط اختصاصی رشد و تکثیر یافته‌اند، بر روی داربست‌هایی منتقل شده و سپس به بدن بیمار پیوند زده می‌شوند؛ بنابراین همکاری سلول بنیادی و تکنولوژی مواد زیستی تأثیر عمیقی بر کاربردهای بالینی مبتنی بر سلول‌های بنیادی برای ترمیم بافت دارد (Martino *et al.*, 2011).

۱ – ۱ – ۱ داربست‌ها

در مهندسی بافت، داربست‌ها به عنوان ماتریکس خارج سلولی مصنوعی عمل کرده و اعمال زیستی و مکانیکی آن را انعکاس می‌دهند. همچنین داربست‌ها با فراهم نمودن یک فضای سه بعدی برای سلول‌ها، امکان تشکیل بافت جدید با ساختار و عملکرد مناسب را ایجاد می‌کنند (Kim *at al.*, 1998). از آنجا که اکثر سلول‌های پستانداران، وابسته به چسبندگی بوده و عدم دسترسی به یک سطح چسبنده منجر به مرگ آن‌ها می‌گردد، داربست‌ها یک سوبسترای چسبنده برای اتصال سلول‌ها فراهم می‌نمایند. داربست‌هایی که در مهندسی بافت به کار می‌روند باید دارای خصوصیات زیر باشند:

- استحکام و توان مکانیکی مناسب جهت الگوبرداری از شرایط موجود زنده.
- سازگاری زیستی مناسب با بافت مورد نظر.
- قابلیت پیام‌دهی مناسب جهت هدایت رشد بافت و جلوگیری از پس زدن پیوند.

[1]- Tissue engineering

- شبکه متخلخل مرتبط بهم به منظور عمل تغذیه‌رسانی سلول، دفع ضایعات سلولی به خارج داربست، تشکیل ماتریکس خارج سلولی و رگ‌زایی[۱]. درصد تخلخل و اندازه منافذ از مشخصات مهم داربست‌های مهندسی بافت می‌باشند (Polak and Bishop, 2006).

- قابلیت استریل شدن[۲] (Cao, 2005).

- توانایی تأثیر بر روی ژن‌های سلول‌های بنیادی، جهت افزایش تکثیر و تمایز در ترمیم بافت (بهاروند، ۱۳۸۷).

به طور کلی دو دسته داربست در مهندسی بافت کاربرد دارند که عبارت‌اند از:

- داربست‌های مصنوعی مانند پلیمرهای سنتزی از قبیل پلی‌لاکتیک‌اسید[۳] (PLLA) و پلی‌لاکتیک‌کوگلی‌کولیک‌اسید[۴] (PLGA)

- داربست‌های طبیعی مانند پروتئین‌های حاصل از ماده زمینه خارج سلولی (کلاژن[۵]، الاستین[۶]، فیبرونکتین[۷]) و یا ماتریکس خارج سلولی مشتق از بافت‌ها و اندام‌های سلول‌زدایی شده[۸].

هر دو نوع داربست دارای مزایا و معایب مربوط به خود می‌باشند؛ برای مثال، داربست‌های مصنوعی، قابل تولید در مقیاس‌های بالا و قابل کنترل از نظر خصوصیاتی نظیر میزان استحکام، سرعت تجزیه، مقدار تخلخل و ساختار میکروسکوپی می‌باشند (Atala., 2011). در عین حال، داربست‌های طبیعی متشکل از ECM دارای سازگاری زیستی بالاتری بوده و نشان داده‌اند که بازسازی مجدد بسیاری از بافت‌های مختلف را هم در مطالعات جانوری و هم در کاربردهای کلینیکی انسانی، تسهیل می‌کنند (Badylak *et al*., 2009). امروزه اثبات شده است که ECM پستانداران داربست مناسبی برای بسیاری از کاربردهای درمانی بوده و تاکنون در موارد متعددی از کاربردهای مهندسی بافت، از قبیل بازسازی

[1]- Angiogenesis
[2]- Sterilization
[3]- poly(L-lactic acid)
[4]- poly(lactic-co-glycolic acid)
[5]- Collagen
[6]- Elastin
[7]- Fibronectin
[8]- Decellularized

پیشابراه، جایگزینی مری، معالجه زخم‌های مزمن پوستی و بازسازی مجاری هوایی مورد استفاده قرار گرفته است (Badylak *et al*., 2009). پروتئین‌های موجود در ECM که حجم اعظم آن را تشکیل می‌دهند از نظر تکاملی بسیار محافظت شده هستند و این شباهت توالی، دلیل پاسخ ایمنی مطلوب آن‌ها پس از پیوندشان می‌باشد. در پیوندهای غیراتولوگ[1]، اجزای سلولی بافت، مسئول ایجاد واکنش ایمنی و پس زدن بافت در میزبان می‌باشند (Barnes *et al*., 2011). به دلیل حذف اثر آنتی‌ژن‌های سلولی زنوگرافت[2] و آلوگرافت[3] و در عین حال حفظ پروتئین‌های ساختاری و عملکردی تشکیل‌دهنده ECM، داربست‌های زیستی مشتق شده از بافت‌ها و اندام‌های سلول‌زدایی‌شده به‌طور موفقیت‌آمیزی در مهندسی بافت مورد استفاده قرار گرفته‌اند (Gilbert *et al*., 2006). بافت سلول‌زدایی‌شده، غنی از کلاژن بوده و با حذف مواد سلولی و هسته‌ای از بافت، طی فرایند سلول‌زدایی به دست می‌آیند (Atala., 2011).

۱ - ۱ - ۲ سلول‌زدایی از بافت‌ها جهت تهیه داربست‌های مهندسی بافت

هدف نهایی یک فرایند سلول‌زدایی، حذف مواد هسته‌ای و سلولی تا بیشترین حد ممکن و در عین حال به حداقل رساندن اثر نامطلوب بر ساختار، ترکیب، فعالیت زیستی و یکپارچگی مکانیکی ECM باقی‌مانده است. هر مرحله سلول‌زدایی علاوه بر حذف سلول‌ها، ساختمان سه بعدی طبیعی ECM را تغییر می‌دهد بنابراین دقت در انتخاب روش سلول‌زدایی جهت دست‌یابی به داربستی با بیشترین حذف سلولی و کم‌ترین آسیب وارده به ECM و حفظ مولکول‌های موجود در آن ضروری به نظر می‌رسد (Lu *et al*., 2012 ; Badylak *et al*., 2009). روش‌های مورد استفاده در فرایند سلول‌زدایی و میزان کارایی آن‌ها بسته به نوع بافت و گونه جانوری، متفاوت است (Gilbert *et al*., 2006). همچنین کارایی روش سلول‌زدایی برای هر بافت و اندامی به فاکتورهایی نظیر ضخامت بافت، چگالی و تراکم

[1]- Non-autologous graft
[2]- Xenograft
[3]- Allograft

سلولی آن بافت یا اندام بستگی دارد (Lu *et al*., 2012). به طور کلی سلول‌زدایی بافت‌ها و اندام‌ها شامل سه روش فیزیکی، شیمیایی و آنزیمی می‌باشد.

۱ - ۱ - ۲ - ۱ سلول‌زدایی فیزیکی

روش فیزیکی سلول‌زدایی شامل انجماد و ذوب سریع[۱]، هم‌زدن[۲]، امواج صوتی[۳] و فرایندهای فشاری می‌باشد. انجماد و ذوب سریع معمولاً در ازت مایع در دمای C °۱۹۶- انجام می‌گیرد و مکانیسم عمل آن بدین ترتیب می‌باشد که با انجماد سریع بافت، کریستال‌های یخ در داخل سلول‌ها تشکیل شده و باعث پاره شدن غشاء سلول و در نتیجه لیز شدن سلول می‌شود (Roberts *et al*., 1991). اگر چه سیکل انجماد و ذوب سریع، غشاء سلول‌ها را از بین برده و برخی از پروتئین‌های داخل سلولی را آزاد می‌کند ولی بسیاری از اجزای سلولی مانند هسته نمی‌تواند از سلول خارج شود و تکرار سیکل حتی تا حد ۱۰ بار نیز به تنهایی نمی‌تواند هسته سلول را خارج کند (Lu *et al*., 2012). بنابراین باید با مراحل سلول‌زدایی بعدی دنبال شود تا مواد سلولی از بافت برداشته شود (Gilbert *et al*., 2006). فشار می‌تواند سبب از هم پاشیدگی سلول‌ها شده و آن‌ها را از بافت جدا کند، البته امکان آسیب به ECM توسط فشارهای مکانیکی وجود دارد (Freytes *et al*., 2004). هم‌زدن باعث تخریب سلول‌ها می‌گردد ولی معمولاً همراه با تیمارهای شیمیایی انجام می‌گیرد تا به لیز شدن سلول و برداشتن محتویات سلولی کمک کند اگرچه هم زدن زیاد می‌تواند همانند برداشت مواد سلولی باعث تخریب ECM نیز شود (Schenke-Layland *et al*., 2003). به طور کلی تیمارهای فیزیکی سلول‌زدایی باعث بهم ریختن غشاء سلول، آزاد شدن محتویات سلولی و تسهیل در حذف محتویات سلولی از ECM می‌گردند. در عین حال، روش فیزیکی معمولاً برای رسیدن به یک سلول‌زدایی کامل، کافی به نظر نمی‌رسد و باید با تیمارهای شیمیایی همراه شود (Gilbert *et al*., 2006) رایج‌ترین روش برای سلول‌زدایی بافت‌ها معمولاً تلفیقی از روش‌های فیزیکی و شیمیایی می‌باشد.

[1]- Snap freeze - thaw
[2]- Agitation
[3]- Sonication