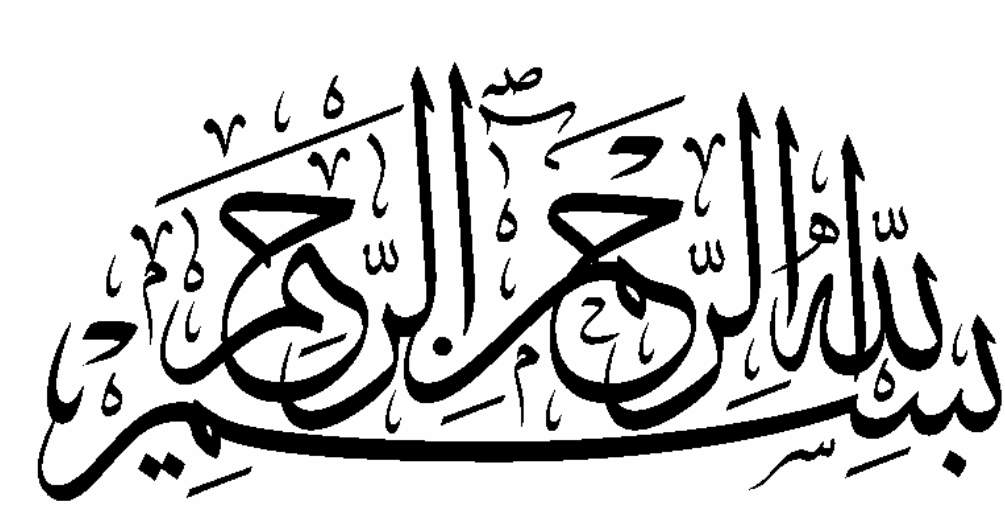
بسم الله الرحمن الرحيم

دانشگاه فردوسی مشهد
گروه زیست‌شناسی

پایان‌نامه کارشناسی ارشد

رشته زیست شناسی گرایش سلولی تکوینی

با عنوان:

مطالعه رویدادهای هیستولوژیکی حاصل از بر هم کنش بین بافت بلاستمای لاله گوش خرگوش نر نژاد نیوزلندی *(Oryctolagus cuniculus)* و داربست سه بعدی طبیعی الاستیک در شرایط *in vitro*

استادان راهنما

دکتر ناصر مهدوی شهری

دکتر مریم مقدم متین

استاد مشاور

دکتر مسعود فریدونی

تحقیق و تألیف

تهمینه کاظمی

پاییز 1389

چکیده:

بیماری های رگ های محیطی و عروق کرونر یکی از دلایل اصلی مرگ و میر در جوامع مختلف می باشند. تعداد معدودی از سرخرگ ها و سیاهرگ های خودی با ابعاد مناسب، به منظور جایگزینی با رگ های معیوب در دسترس هستند که نتایج پزشکی استفاده از آن ها چندان موفقیت آمیز نبوده و با مشکلات فراوان از قبیل نیاز به جراحی های مکرر با خطر و هزینه زیاد همراه است. به همین دلیل نزدیک به بیست سال است که تلاش به منظور ایجاد رگ های خونی به روش مهندسی بافت آغاز شده و یکی از تکنولوژی های امید بخش در طراحی بافت مناسب، مشابه با بافت سالم می باشد. داربست، سلول و فاکتورهای رشد سه رکن اصلی در مهندسی بافت می باشند. از آنجا که اکثر سلول های پستانداران وابسته به چسبندگی هستند، استفاده از داربست مناسب جهت کشت این سلول ها که دارای شبکه ای متخلخل به منظور عمل تغذیه رسانی سلول و دفع ضایعات سلولی به خارج داربست باشد، و زمینه تشکیل ماتریکس خارج سلولی و رگ زایی را فراهم نماید، بسیار مهم است. یکی دیگر از عناصر مورد نیاز در موفقیت مهندسی بافت، انتخاب سلول های مناسب 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 موجودات زنده می توانند ایجاد گردند. این سلول ها قابلیت های تقسیم و تمایز سلولی را مشابه با سلول های بنیادی جنینی دارا می باشند. در این تحقیق آئورت گاو به عنوان داربست استفاده شد و چون تنها تاثیرماتریکس الاستیک بر روی بافت بلاستمایی مورد نظربود، سلول ها و کلاژن بافت آئورت با استفاده از محلول 50 mg/ml برمید سیانوژن در70% فرمیک اسید حذف گردید و به این ترتیب داربستی بسیار متخلخل به دست آمد. سپس داربست های تهیه شده درون حلقه های بلاستمایی قرار داده شده و در محیط کشت به مدت 40 روز نگهداری شدند. نمونه برداری از بلاستما و داربست همراه آن هر ده روز یک بار صورت گرفت. مطالعات میکروسکوپی و آماده سازی نمونه ها بر اساس رنگ آمیزی های هماتوکسیلین- ائوزین و اورسئین- پیک ایندیگو کارمین- هماتوکسیلین، حذف سلول ها و رشته های کلاژن از داربست آماده شده را تایید نمود. علاوه بر این، مطالعات بافتی در روز دهم نفوذ سلول های بلاستمایی به داخل داربست الاستیک را نشان داد. در روز بیستم علاوه بر نفوذ، تقسیم و تمایز احتمالی سلول های بلاستمایی به سلول های فیبروبلاستی و میوسیت مشاهده گردید. نتایج در روز سی ام مشابه با روز بیستم بود و علاوه بر آن، تغییراتی از قبیل رگ زایی و شکل گیری بافت همبند نیز دیده شد. در روز چهلم، داربست و سلول های بلاستمایی احتمالا به دلیل مرگ سلولی از بین رفتند. بنا بر این نتایج نشان دادند که امکان تهیه یک داربست طبیعی الاستیک از آئورت به وسیله تیمار با برمید سیانوژن وجود دارد. این داربست می تواند دارای اثر القایی بر رفتارهای سلولی از قبیل مهاجرت، چسبندگی، تقسیم و احتمالا تمایز باشد. هرچند مطالعات بیشتری برای اثبات هویت سلول ها و سایر ویژگی های این داربست و همچنین امکان استفاده از آن در روش های مهندسی بافت عروقی مورد نیاز است.

کلمات کلیدی: سلول زدایی، داربست سه بعدی الاستیک، بافت بلاستمایی، تمایز

فصل اول: کلیات

1-1 کلیاتی درباره مهندسی بافت.....1

1-1-1 اصول مهندسی بافت.....1

1-1-2 داربست.....3

1-1-2-1 خصوصیات داربست های به کار برده شده در مهندسی بافت.....5

1-1-2-2 داربست های سنتزی.....6

1-1-2-3 داربست های طبیعی.....8

1-1-2-4 داربست های دو بعدی و سه بعدی.....10

1-1-3 فاکتور های رشد.....11

1-1-3-1 اصول ریخت زایی به کار برده شده در مهندسی بافت.....13

1-1-3-2 عوامل مکانیکی.....13

1-1-4 سلول های استفاده شده در مهندسی بافت.....14

1-1-4-1 سلول های بنیادی.....14

1-1-4-2 انواع سلول های بنیادی بر اساس قابلیت تمایز.....14

1-1-4-3 انواع سلول های بنیادی بر اساس منشا.....15

1-1-4-4 سلول های بلاستمایی.....17

1-2 کلیاتی درباره بافت بلاستما.....17

1-2-1 تعریف بافت بلاستما.....17

1-2-2 پدیده ترمیم و تشکیل بافت بلاستما.....18

1-2-3 ترمیم در لاله گوش خرگوش و تشکیل حلقه بلاستمایی.....22

1-2-4 زیست شناسی خرگوش ها.....24

1-3 مهندسی بافت عروقی.....25

1-3-1 تکوین اولیه دستگاه قلبی- عروقی در پستانداران.....25

1-3-2 دستگاه گردش خون.....27

1-3-3 رگ هایی با قطرهایی بیشتر از یک اندازه معین.....28

1-3-4 شریان های الاستیک بزرگ (آئورت).....29

1-3-5 بیماری های عروقی و مهندسی بافت.....30

4-1 مروری بر بیولوژی الاستین 32
1-4-1 ژن الاستین 32
2-4-1 عوامل القایی و کنترل کننده ژن الاستین 33
3-4-1 محصولات ژن الاستین 34
4-4-1 مکان و زمان بیان الاستین 35
5-4-1 پیام رسانی توسط الاستین 36
6-4-1 پروتئین EBP و ایجاد گیرنده الاستین 36
7-4-1 پدیده الاستوژنز 37
8-4-1 جایگاه الاستین در بیولوژی ماتریکس خارج سلولی 38
9-4-1 نقش الاستین در تکوین اولیه مهره داران 39
10-4-1 جایگاه الاستین در مهندسی بافت 40
5-1 هدف 40

فصل دوم: مواد و روش ها

1-2 مواد مورد استفاده 42
2-2 وسایل مورد استفاده 44
3-2 جانور مورد استفاده 45
4-2 آماده سازی داربست 45
1-4-2 تهیه داربست سه بعدی طبیعی الاستیک 45
2-4-2 سلول زدایی از داربست آئورت 47
5-2 نحوه تهیه حلقه های بلاستمایی 48
6-2 مطالعات کشت بافت 50
1-6-2 الحاق داربست و حلقه بلاستمایی به یکدیگر 50
2-6-2 تهیه مواد و محلول های مورد استفاده 52
1-2-6-2 استریل کردن وسایل 52
2-2-6-2 تهیه محیط کشت ذخیره DMEM 52
3-2-6-2 تهیه محیط کشت مورد استفاده 53
4-2-6-2 آماده سازی سرم جنینی گاو 53

2-6-2-5 تهیه محلول فسفات بافر سالین 53
2-7 شرایط نگهداری و کشت بافت بلاستمایی 54
2-8 تعویض محیط کشت.....54
2-9 برداشت نمونه ها از محیط کشت.....54
2-10 مطالعه زنده بودن سلول ها به کمک رنگ آمیزی آبی متیلن 55
2-11آماده سازی نمونه ها جهت تهیه مقاطع میکروسکوپی.....55
2-12 روش رنگ آمیزی هماتوکسیلین - ائوزین 57
2-13 روش رنگ آمیزی هماتوکسیلین 57
2-14 روش رنگ آمیزی اورسئین- پیک ایندیگو کارمین- هماتوکسیلین 58
2-15 روش رنگ آمیزی پاس- آلسیان بلو 59
2-16عکس برداری و بررسی نمونه ها.....60
2-17 مطالعات آماری 60

فصل سوم: نتایج

3-1 بررسی حذف سلول ها و کلاژن از داربست الاستیک آماده شده.....61
3-1-1 مطالعه حذف سلول ها از داربست الاستیک با استفاده از رنگ آمیزی هماتوکسیلین- ائوزین 61
3-1-2 مطالعه حذف کلاژن از داربست الاستیک با استفاده از رنگ آمیزی اورسئین- پیک ایندیگو کارمین- هماتوکسیلین 63
3-2 مطالعه زنده بودن سلول ها در سطح داربست الاستیک در روزهای مختلف نونه برداری به کمک رنگ حیاتی آبی متیلن 64
3-3 انجام مطالعات آماری روی نمونه ها در روزهای مختلف پس از کشت 65
3-3-1 مطالعات بافت شناسی در روز دهم پس از کشت.....66
3-3-2 مطالعات بافت شناسی در روز بیستم پس از کشت 70
3-3-3 مطالعات بافت شناسی در روز سی ام پس از کشت.....74
3-3-4 مطالعات بافت شناسی در روز چهلم پس از کشت.....79
3-4 نتایج مطالعات آماری.....82
3-5 نتیجه گیری کلی 85

فصل چهارم: بحث و نتیجه گیری

4-1 مقدمه 86
4-2 اهداف 92
4-3 استفاده از عروق سلول زدایی شده به عنوان مواد زیستی با ماهیت طبیعی برای جایگزینی و مهندسی بافت عروق..... 94
4-4 مقایسه سه روش متداول سلول زدایی از بافت آئورت..... 97
4-5 نتیجه گیری 99
4-6 پیشنهادات 104

منابع..... 107

1-1 کلیاتی درباره مهندسی بافت

1-1-1 اصول مهندسی بافت

وقتی اصطلاحاتی همچون بافت‌های مهندسی شده، مهندسی بافت[1] و طب ترمیم به کار برده می‌شود، آنچه در ذهن تداعی می‌گردد جایگزینی[2]، ترمیم[3] و بازسازی[4] بافت‌ها و ارگان‌های تخریب شده است. امروزه با توجه به تعداد کم اهدا کنندگان بافت و آلودگی‌های ویروسی آن سعی در طراحی بافت به کمک سلول و داربست‌های گوناگون اعم از طبیعی یا سنتزی شده است. این امر منتهی به ایجاد مفهومی جدید در علم شده است که مهندسی بافت خوانده می‌شود. مهندسی بافت، علمی چند منظوره بوده و علوم گوناگون همچون زیست‌شناسی سلولی، بیوشیمی، زیست‌شناسی مولکولی، مهندسی مواد، مهندسی شیمی و مهندسی زیستی را به کمک می‌طلبد، به طوری که پیشرفت علوم مهندسی ژنتیک، شبیه‌سازی و زیست‌شناسی سلول‌های بنیادی منجر به گشایش راه های جدیدی در این عرصه شده است (Satija, *et al.*, 2007).

هدف از مهندسی بافت تقلید از طبیعت برای حل محدودیت های معالجات کلینیکی و درمانی است (Satija, *et al.*, 2007; Koh and Atala, 2004a)، و به عنوان یک علم دانشگاهی فرصت بی‌نظیری را برای پیشرفت و بهبود روش‌های درمانی جهت درمان بیماری‌های مادرزادی و اکتسابی فراهم کرده است. هر چند این شاخه از علم نسبتاً جدید به نظر می‌رسد ولی اولین گزارش از مهندسی بافت در سال 1933 اعلام گردید. طی این گزارش سلول‌های توموری به منظور جلوگیری از هجوم سیستم ایمنی درون یک غشاء به خوک پیوند زده شدند. اما دوران جدید مهندسی بافت در اوایل دهه 1980 با استفاده کلینیکی و ترمیمی از جایگزین‌های پوست آغاز شد (Polak and Bishop, 2006; Suh, 2000).

[1] tissue engineering
[2] replacement
[3] repair
[4] regeneration

اصطلاح مهندسی بافت برای اولین بار در سال 1988 در کنگره National Science Foundation توسط Shalak و Fox چنین تعریف شد: مهندسی بافت شامل کاربرد اصول و روش‌های مهندسی و علوم زیستی به منظور درک و مقایسه ارتباط بین ساختار و عمل در بافت‌های پستانداران سالم و آسیب دیده و طراحی جانشین‌های بیولوژیکی به منظور ترمیم بافت یا تجدید فعالیت آن می باشد (Shalak and Fox, 1988).

سپس در سال 1993 Vacanti و Langer مهندسی بافت را چنین تعریف کردند: مهندسی بافت مولد یک حوزه مطالعاتی جدید است که در آن اصول مهندسی و زیست شناسی را جهت اصلاح بافت زنده آسیب دیده به کار می‌گیرند تا موجب تجدید، ترمیم و حفظ عمل بافت شود (Langer and Vacanti, 1993).

در خلال دهه 1990 مهندسی بافت به سرعت پیشرفت کرد، در این دهه موضوع جانشین‌های بیولوژیکی بافت‌های بدن به منظور بازسازی بافت مطرح شد. اکنون نیز مهندسی بافت به عنوان طراحی جایگزین‌های بافت یا اندام مطرح می‌باشد (Chapekar, 2000).

در بسیاری از عرصه‌های پزشکی یکی از پرتقاضاترین راه‌حل‌های نقص اندام یا بافت، پیوند آن ها از اهدا کنندگان بوده است. این اهدا کننده می‌تواند خود بیمار باشد یا افرادی که از نظر ایمونولوژیک با فرد بیمار مشابه باشند. امروزه حتی در مورد پیوند اعضا حیوانات به انسان نیز تلاش‌هایی صورت گرفته است (Polak and Bishap, 2006; Suh, 2000).

یکی از بزرگ‌ترین مشکلات پیوند اندام، کمبود بافت یا اندام دهنده می‌باشد. به علاوه استفاده دائمی از داروهای سرکوب کننده ایمنی باعث ایجاد اثرات متفاوتی می‌شود. در زمینه استفاده از حیوانات تراریخته یا شبیه‌سازی شده نیز مشکلات اخلاقی موجود در این روند مانعی بر سر راه این روش ها می باشد. آنچه در این روند مورد نیاز است فراهم‌سازی تسهیلات یا تکنیکی جهت القاء 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. مهندسی بافت از روش های درمانی رایج استاندارد به کار برده شده در درمان تا

اندازه ای متفاوت است چرا که در آن بافت‌های طراحی شده به بیمار پیوند زده شده، و حاصل آن درمان اختصاصی و دائمی بیماری می باشد (Fodor, 2003).

به منظور موفقیت مهندسی بافت، فراهم آوردن محیط واقعی و شرایط مطلوب ضروری به نظر می‌رسد 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 و مسیر تمایزی سلولی تغییر نماید؛ تحقیقات نشان داده اند که مهندسی بافت می‌تواند این شرایط را فراهم کند (Koh and Atala, 2004a; Koh and Atala, 2004b).

مهندسی بافت براساس سه ترکیب اصلی بافت‌های بیولوژیکی یعنی ماتریکس خارج سلولی (ECM)[1]، مولکول‌های پیام‌رسان[2] و سلول بنیان نهاده شده است که به ترتیب توسط داربست[3]، فاکتورهای رشد[4] و سلول شبیه سازی می‌شوند. بنابراین می‌توان گفت داربست، فاکتورهای رشد و سلول سه رکن اصلی مهندسی بافت را تشکیل می‌دهند (Chapekar, 2000; Koh and Atala; 2004a).

1-1-2 داربست

در مهندسی بافت، ماتریکس خارج سلولی توسط داربست شبیه‌سازی می‌شود. مدت‌ها عقیده بر این بود که ECM تنها نقش داربستی را برای سلول و بافت ایفا می‌کند؛ در حالی که در سال‌های اخیر معلوم شده است که یک ارتباط ساختاری- عملی بین ماتریکس خارج سلولی و سلول‌های بافتی به ویژه اسکلت سلولی، هسته و اطلاعات ژنتیکی آن وجود دارد. در واقع ماتریکس خارج سلولی، دینامیک بافت را تعدیل می‌کند؛ این فرآیند از طریق ایجاد توانایی جهت اتصالات موضعی،

1 Extra Cellular Matrix
2 Signaling Molecules
3 scaffold
4 Growth Factors

ذخیره‌سازی و آزادسازی فاکتورهای رشد به منظور هدایت سلول‌ها در زمان مناسب به مکان مطلوب صورت می‌گیرد.

ماده زمینه برون سلولی متشکل از پروتئین‌های رشته‌ای در هم بافته‌ای است که در شبکه‌ای از زنجیره‌های گلیکوزآمینوگلیکان هیدراته به دام افتاده‌اند. بنابراین ماتریکس خارج سلولی داربستی را فراهم می‌کند که در ترکیب با مایع درون سلولی سبب مقاومت در برابر کنش‌های حاصل از رشته‌ها و فشارهای حاصل از شبکه هیدراته می‌شود (Lutolf and Hubbell, 2005).

مطالعات نشان داده اند که ماتریکس خارج سلولی شامل اجزاء ساختاری مانند انواع کلاژن، گلیکوپروتئین‌ها، اسید هیالورونیک، گلیکوزآمینوگلیکان، رتیکولن و الاستین است که جهت اتصال ماتریکس خارج سلولی با گیرنده‌های سلولی مناسب می باشند (Massia and Hubbell, 1990a; Massia and Hubbell, 1990b).

ماده زمینه برون سلولی با گیرنده‌های اینتگرینی سطح سلول اتصال برقرار می‌کند. گیرنده‌های اینتگرینی سبب انتقال پیام های محیط خارج سلولی به درون سیتوپلاسم می‌شوند که این امر به نوبه خود آغازگرآبشار پیام‌رسانی[1] بوده و نتیجه آن مهار یا تحریک سیستم‌های تنظیم کننده داخلی می باشد. این سیستم پیام رسانی در نهایت بیان ژن‌های هسته‌ای را تحت تأثیر قرار داده و می‌تواند منجر به تغییر خصوصیات سلولی یا ماتریکس خارج سلولی شود که از طریق افزایش سنتز یا تخریب ماتریکس خارج سلولی صورت می‌گیرد. چسبندگی، مهاجرت، تقسیم سلولی، تمایز و تمایززدایی[2] بافت می‌توانند از طریق این مکانیسم سلولی کنترل شوند (Khademhosseini, *et al*., 2006).

علاوه بر عوامل ذکر شده، فاکتورهای رشد، سیتوکین‌ها، آنزیم‌های تخریب کننده ماتریکس و مهار کننده‌هایشان نیز در ماتریکس خارج سلولی ذخیره شده و تعدادی از آن ها با ماده زمینه برون سلولی واکنش داده و سبب تحریک فعالیت سلولی شده و بدین ترتیب منجر به تولید یا تخریب ماتریکس خارج سلولی می‌شوند (Basbaum and Werb, 1996).

---

1 signaling
2 dedifferentiation

برای این که موفقیت مهندسی بافت به حداکثر برسد، باید سعی کرد محیطی مشابه با محیط موجود زنده فراهم نمود تا رشد و فعالیت سلول در آن به طور طبیعی انجام گیرد. بنابراین داربست‌های به کار برده شده در مهندسی بافت باید بتوانند شبکه‌های چند منظوره‌ای را ایجاد کنند که در شرایط فیزیولوژیکی، بیوشیمیایی و بیوفیزیکی مشابه ماتریکس خارج سلولی طبیعی عمل کرده، و محیط زیستی خاص را جهت به دست آوردن ویژگی‌های بافتی و سلول فراهم نمایند (Lutolf and Hubbell, 2005).

1-1-2-1 خصوصیات داربست‌های به کار برده شده در مهندسی بافت

به طور کلی داربست‌های به کار برده شده در مهندسی بافت باید در شرایط فیزیولوژیکی بتوانند شبکه‌ای چند منظوره همانند ماده زمینه برون سلولی ایجاد نمایند. برخی ویژگی‌هایی که این داربست ها می توانند داشته باشند به قرار زیر است:

- قدرت مکانیکی مناسب جهت تقلید از شرایط موجود زنده را داشته باشند (Langer and Vacanti, 1993; Koh and Atala, 2004a).

- زیست سازگار و زیست تخریب‌پذیر[1] باشند (Polak and Bishop, 2006; Koh and Atala, 2004a; Cao, *et al*., 2005).

- پاسخ‌های ایمنی را تحریک نکنند (Langer and Vacanti, 1993).

- دارای شبکه متخلخل مرتبط به هم[2] به منظور عمل تغذیه‌رسانی سلول، دفع ضایعات سلولی به خارج داربست، تشکیل ماده زمینه برون سلولی و رگ زایی[3] باشند (Rezwan, *et .al*., 2006).

- توانایی فراهم آوردن سیگنال‌های شیمیایی مناسب جهت هدایت رشد بافت را داشته باشد (Cao, *et al*., 2005).

1 biodegradable
2 interconnective network
3 angiogenesis

- توانایی فراهم آوردن اندازه و شکل مناسب برای جایگزینی در بافت هدف را داشته باشند (Cao, *et al.*, 2005).

- قابلیت استریل شدن را داشته باشند (Langer and Vacanti, 1993; Cao, *et al.*, 2005).

- توانایی تأثیر بر روی سلول‌های کشت شده بر روی داربست، جهت افزایش تکثیر[1] و تمایز در بافت را دارا باشند (Vats, *et al.*, 2005).

- قادر به ایجاد برهم کنش‌های اختصاصی با سایر سلول‌ها باشند (Taqvi and Roy, 2006).

داربست های مورد استفاده در مهندسی بافت را می توان به دو گروه داربست های سنتزی و طبیعی تقسیم نمود (Hayman, *et al.*, 2005)، که در بخش های بعدی به خصوصیات آن ها پرداخته می شود.

1-1-2-2 داربست‌های سنتزی

از موادی که در ساخت داربست‌های سنتزی به کار برده می‌شوند می‌توان به پلیمرهای تخریب‌پذیر سنتزی، پلیمرهای قابل تزریق، هیدروژل‌ها و سرامیک‌ها اشاره نمود.

1- پلیمرهای تخریب‌پذیر سنتزی: از جمله پلیمرهای تخریب پذیر سنتزی می توان به پلی استرهایی از قبیل پلی گلیکولیک اسید، پلی لاکتیک اسید و کوپلیمر های آن ها اشاره کرد که دارای تاریخچه طولانی در مصارف پزشکی هستند، به طوری که این پلیمرها در سال 1971، به عنوان نخ بخیه و در سال 1992 به عنوان پیچ، پلاک و داربست حامل سلول به کار برده شدند (Mathew, 2000; Gunatillake and Adhikari, 2003). پلی کاپرولاکتون نیز جزء خانواده پلی‌استرهای زیست سازگار می‌باشد. سرعت تخریب آن بسیار پایین‌تر از پلی‌لاکتیک اسید بوده و در نتیجه یک پلیمر مناسب جهت کاربردهای طولانی مدت می‌باشد، به طوری که زمان تخریب آن حدود 2 تا 3 سال

1 proliferation

است (Freed, *et al*., 1994). پلی انیدرید ها، تیروزین مشتق شده از پلی کربنات ها، پلی اورتو استر و پلی یورتان نیز از جمله اعضای این دسته می باشند (Lamaba, *et al*., 1998) .

2- پلیمرهای قابل تزریق و زیست تخریب‌پذیر: گسترش و توسعه ترکیبات پلیمری قابل تزریق در مهندسی بافت نیازمند پیش‌سازهایی با خواص فیزیکی و گروه های عاملی مناسب جهت گیرش در محل تزریق است. انجام گیرش مناسب به همراه ایجاد گرما و واکنش‌های شیمیایی حداقل و مناسب با ترکیبات بیولوژیکی نیز در انتخاب نوع ترکیبات پلیمری حائز اهمیت می باشد. اکثر پیش‌سازهای پلیمری قابل تزریق در ساختارشان حاوی گروه های عامل استری هستند. پلی‌پروپیلن فومرات[1] و پلی‌انیدریدهای دی متااکریلات، دو نوع پیش‌ساز پلیمری هستند که اخیراً جهت سیستم‌های پلیمریزاسیون درجا[2] برای مهندسی بافت استخوان معرفی شده‌اند (Heller, *et al*., 2002).

3- هیدروژل‌ها: هیدروژل‌ها شبکه پلیمری با قابلیت متورم شدن در آب[3] هستند که از غوطه‌ور کردن ساختارهای دارای اتصالات عرضی درون آب یا محلول‌های زیستی حاوی آب تشکیل می‌شوند. از هیدروژل‌های معروف در مهندسی - پزشکی پلی‌هیدروکسی اتیل متااکریلات (PHEMA)، سلولز، پلی‌وینیل الکل (PVA) و پلی‌اتیلن گلیکول را می‌توان نام برد (Peppas, 1996).

4- بیو سرامیک‌ها: در سال 1963، ترکیبی از آلومینای متخلخل و رزین (اپوکسی) به نام سروزیوم معرفی شد که به عنوان جایگزین استخوان، انقلاب عظیمی را در کاربرد سرامیک‌ها در پزشکی ایجاد کرد. به طوری که امروزه بیوسرامیک‌ها به دلیل پایداری حرارتی و شیمیایی، استحکام و مقاومت به سایش بالا، ظاهر زیبا و مناسب و زیست سازگاری عالی در شکل‌های مختلف نظیر تک‌کریستال، پلی کریستال، کامپوزیت و پوشش مورد استفاده قرار می‌گیرند (Hench and Wilson, 1993).

1 poly propylene fumarate
2 *in situe* polymer
3 water swelling

3-2-1-1 داربست‌های طبیعی

به منظور موفقیت مهندسی بافت، باید شرایطی مشابه با محیط موجود زنده فراهم کرد تا رشد و فعالیت سلول در آن به طور طبیعی انجام گیرد. به همین دلیل امروزه استفاده از داربست‌های طبیعی[1] در مهندسی بافت در سطح دنیا بسیار رواج یافته است. از جمله موادی که به عنوان داربست طبیعی در مهندسی بافت کاربرد دارند، پلیمرهای زیست تخریب‌پذیر طبیعی هستند. یک جایگزین برای پلیمرهای سنتزی استفاده از مواد طبیعی استخراج شده از ترکیبات ماتریکس خارج سلولی و ساخت داربست‌های طبیعی با استفاده از پروتئین‌های تخلیص شده از ECM می باشد که به صورت گسترده‌ای در مهندسی بافت مورد استفاده قرار می گیرد (Lu, *et al*., 2003). در اینجا به طور مختصر به مثال هایی در این زمینه اشاره می شود:

1- پلیمرهای زیست تخریب‌پذیر طبیعی: از جمله این مواد می توان گلوکز آمینو گلیکان هایی از قبیل هیالورونیک اسید را نام برد. در سال 1976، از هیالورونیک اسید در جراحی چشم و به دنبال آن در مفاصل مصنوعی استفاده شد. هیالورونیک اسید در بافت‌های همبند نرم با غلظت فراوان یافت شده و یکی از ترکیبات مهم ماتریکس خارج سلولی و مایع زجاجیه چشم بوده و در غضروف، مفاصل، پرده سینویال و در بافت درم و اپیدرم پوست نیز یافت می‌شود (Caplan, 2006; Lee and Mooney, 2001).

2- پروتئین‌های حاصل از ماده زمینه برون سلولی: پروتئین‌های ECM از جمله موادی هستند که برای ساخت داربست‌های طبیعی به کار گرفته می‌شوند. این داربست‌ها می‌توانند محیطی مشابه با ماده زمینه‌ای برون سلولی برای سلول‌ها فراهم کرده و به دلیل پاسخ‌های مناسب ایمونولوژیک، خواص آنتی‌ژنیک ملایم، توانایی بهبود چسبندگی سلولی و خاصیت هموستازی بسیار مورد توجه می باشند. در اینجا به ذکر مثال هایی از این پروتئین ها پرداخته می شود:

---

1 natural scaffolds

2-1 کلاژن: کلاژن مهم‌ترین ترکیب بافت همبند پستانداران و تشکیل دهنده 30% کل پروتئین‌های بدن انسان می‌باشد که در بافت‌هایی هم چون پوست و استخوان که در آن ها انعطاف‌پذیری و استحکام دارای اهمیت می‌باشد، یافت می‌شود. این پلیمر دارای خواص فیزیکی و زیستی منحصر بفردی می باشد که موجب استفاده از آن به عنوان ماده زیستی شده است. از خصوصیات مهم کلاژن این است که در بدن موجود زنده پلمریزه و محکم‌تر می‌شود (Vander Rest, *et al*., 1990).

2-2 الاستین: الاستین یکی از عمده‌ترین پروتئین‌های ماتریکس خارج سلولی مهره‌داران و سازنده رشته‌های الاستیک است. الاستین در آئورت، شش‌ها، مثانه و پوست یافت شده و تخمین زده می‌شود که تا 50% وزن خشک رگ‌ها را تشکیل می‌دهد. این پروتئین به وسیله سلول‌های ماهیچه صاف رگ‌ها در لایه مدیای سرخرگ جایگزین شده و برای شکل گیری صحیح آئورت ضروری است. هر چند مهم‌ترین نقش الاستین فراهم کردن خاصیت ارتجاعی[1] و ایجاد مقاومت برای بافت در مواجهه با فشارهای خارجی خصوصاً ایجاد مقاومت در رگ‌ها برای حفظ آن ها در برابر فشارهای همودینامیک در هنگام سیستول و دیاستول بطنی است، امّا مطالعات اخیر در زمینه‌های زیست پزشکی، بیوشیمی و بیوفیزیک دامنه وسیعی از ویژگی‌های الاستین را که به واسطه الاستین و پپتیدهای مشتق از آن ایجاد می‌شود آشکار ساخته است (Debelle and Tamburro, 1998). با توجه به گسترش بیماری‌های عروقی و تلاش برای ایجاد رگ‌های خونی به روش مهندسی بافت، استفاده از داربست‌های الاستینی[2] در سطح دنیا مورد توجه قرار گرفته است. چون در این تحقیق از داربست الاستینی به منظور مطالعات مهندسی بافت عروقی استفاده شده است، در بخش دیگری از همین فصل مروری بر بیولوژی الاستین صورت خواهد گرفت.

2-3. فیبرونکتین: شبکه‌های فیبرونکتین با اعمال نیروی برشی تک جهت بر روی پلاسمای خالص متراکم، به دست می‌آیند. تحقیقات نشان داده است که شبکه‌های فیبرونکتینی هدایت سیگنال‌ها را از طریق پروتئین‌های بینابینی[3] همچون لامینین افزایش می‌دهند. همچنین این شبکه‌های فیبرونکتین

1 elasticity
2 elsastin scaffolds
1 interstitial

به همراه فاکتورهای رشد عصب دوست[1] عامل موثری در ترمیم اعصاب محیطی و مرکزی می‌باشند (بیگدلی، 1380).

4-2-1-1 داربست‌های دو بعدی و سه بعدی

از آنجا که اکثر سلول‌های پستانداران وابسته به چسبندگی بوده و اگر زمینه (سوبسترای) مناسب جهت اتصال سلولی موجود نباشد از بین خواهند رفت، لازم است از داربست و سطوح مناسب جهت کشت این سلول‌ها استفاده گردد (Koh and Atala, 2004).

کشت سلول ها به طور مرسوم در آزمایشگاه در ظروف کشت سلول انجام می‌گیرد. در این حالت سلول‌ها در کف ظرف به صورت دو بعدی (2D) تکثیر می‌یابند. اخیراً دانشمندان دریافته‌اند که کشت سه بعدی[2] سلول‌ها تغییرات شگفت‌انگیزی را در ساختار و عملکرد آن‌ها به وجود می‌آورد. Cukrierman و همکاران نشان داده‌اند که فیبروبلاست‌های کشت داده شده به صورت سه بعدی در مقایسه با کشت‌های دو بعدی سریع تر تکثیر شده و مهاجرت می‌کنند. به نظر می‌رسد این تفاوت‌ها به علت نزدیکی فضای سلول در محیط سه بعدی به محیط موجود زنده باشد (Cukierman, *et al.*, 2001; Cukierman, 2005).

در این راستا Liu و همکاران نشان داده‌اند که کشت سلول‌های بنیادی جنینی موش در بستر سه بعدی از جنس تانتالیوم[3] با منافذ فراوان، تمایز را به سلول‌های خون‌ساز نسبت به شرایط کشت دو بعدی تشدید می‌کند (Liu and Roy, 2005). همچنین نشان دادند که کشت سه بعدی سلول‌های بنیادی موش بر روی داربست‌های فیبرینی و فیبرین همراه با پلی‌اتیلن گلیکول می تواند بر بیان نشانگرهای بنیادینگی[4] تأثیر داشته باشد (Liu, *et al.*, 2006). علاوه بر این، تحقیقات نشان داده اند که فرآیند تکوین سلول‌های بنیادی به سلول‌های عصبی در سیستم کشت دو بعدی مشابه این

1 neurotrophic
2 3-dimensional
4 tantalium
4 stemness

فرآیند در جنین ولی ناقص‌تر از آن است؛ چرا که تشکیل شبکه توسط این نورون‌ها به دو بعد محدود می‌شود و این امر به وضوح متفاوت از پیچیدگی اتصالات تشکیل شده در سلول‌های عصبی در موجود زنده می باشد. مطالعه توانایی نورون‌های انسانی برای تشکیل آکسون در محیط کشت سه بعدی نشان داد که تمایز سلول‌ها در این حالت افزایش می‌یابد؛ به عنوان مثال ژل‌های پلیمری همراه شده با مواد زیست فعال باعث رشد اکسونی و ترمیم اعصاب ضایعه دیده در آزمایشگاه می‌شوند. بنابراین به نظر می‌رسد که سیستم‌های کشت سه بعدی می‌توانند نقش مهمی را در تحقیقات علوم اعصاب و کاربردهای درمانی آن داشته باشند (Hayman, *et al*., 2005). همچنین مطالعات نشان داده است که بیان ژن‌هایی که در رشد، تکثیر و تمایز نقش دارند در کشت سه بعدی نسبت به دو بعدی افزایش قابل توجهی پیدا می‌کند (Liu, *et al*., 2006). در حال حاضر چالش مهندسان بافت بهینه کردن داربست یا سیستم‌های مناسب جهت جداسازی، تکثیر و تمایز سلول‌های مورد نظر طوری که بتواند رشد هماهنگ و سه بعدی بافت را میسر سازد؛ می باشد.

3-1-1 فاکتورهای رشد

در داخل بدن، سلول‌ها سیگنال‌هایی جهت کنترل رفتار و همانندسازی خود از اطراف دریافت می‌کنند، این سیگنال‌ها به صورت فاکتورهای رشد و مواد مترشحه دیگر به وسیله سلول‌های مجاور و اندام‌های کنترل کننده مرکزی در بدن ارسال می‌گردند. فاکتورهای رشد برای ترمیم بافت ضروری هستند. در شرایط کشت سلول، سرم اضافه شده به محیط کشت برخی از این سیگنال‌های شیمایی را فراهم می‌کند. این تحریکات همچنین شامل ارتباطات شیمیایی و مکانیکی سلول با سلول‌های مجاور و بستر خارج سلولی است. سلول‌هایی که این تحریکات را دریافت نکنند بافتی طبیعی را ایجاد نمی‌کنند (Zhiming, *et al*., 2000).

فاکتورهای رشد به پروتئین‌های ماتریکس خارج سلولی یا گلیکوز آمینو گلیکان‌ها متصل می‌شوند. فاکتورهای رشد تکثیر، تمایز، مهاجرت و مرگ سلول‌ها و هم‌چنین سنتز و مدل‌یابی مجدد ماتریکس

را کنترل می‌کنند. بنابراین ماتریکس خارج سلولی نقشی اساسی در کنترل فعالیت سیگنال‌دهی فاکتورهای رشد دارد. واکنش متقابل بین فاکتورهای رشد و محیط ماتریکس به پروتئین‌های متصل شونده به فاکتورهای رشد که امکان ذخیره یا آزاد شدن آن ها را با توجه به نیاز سلول‌ها فراهم می کنند، وابسته است (Taipale and Keski, 1999).

فاکتورهای رشد در ماتریکس خارج سلولی ذخیره شده و تعدادی از آن ها با ماده زمینه برون سلولی واکنش داده، سبب تحریک فعالیت سلولی شده و بدین ترتیب منجر به تولید یا تخریب ماده زمینه برون سلولی می‌شوند. اجزاء ماکرو مولکولی ماتریکس خارج سلولی به وسیله پروتئازهای فعال شده سلولی، از جمله ماتریکس متالو پروتئیناز (MMP) وسرین پروتئازها تخریب می‌شوند (Basbaum and Werbs, 1996). از آنجا که فاکتورهای رشد در مقادیر بسیار کم برای تحریک پاسخ‌های بیولوژیک مورد نیاز می باشند، توجه فراوانی به طراحی مواد زمینه مصنوعی برای عرضهٔ کنترل شده فاکتورهای رشد معطوف شده به طوری که در ابتدا فاکتورهای رشد به ماتریکس متصل شده و پس از رفع نیاز سلولی از طریق فعالیت پروتئازها از ماتریکس حذف می‌شوند، این روش تقلیدی از شرایط موجود در محیط موجود زنده است که طی آن فاکتورهای ذخیره شده در ماتریکس خارج سلولی طبیعی به وسیله سلول‌های آسیب دیده طی ترمیم بافتی آزاد می‌گردند (Hayman, *et al*; 2005).

1-1-3-1 اصول ریخت‌زایی به کار برده شده در مهندسی بافت

ریخت‌زایی در خلال تکوین بافت به وسیله تعدادی از پروتئین‌ها مانند پروتئین‌های Wnt, hedgehog (hhgs)، لیگاندهای Notch و اعضای خانواده TGFβ مانند BMPs یا FGFs تنظیم می گردد. این عوامل خود نوزایی، مهاجرت، تمایز و سایر فرآیندهای سلول‌های بنیادی و

پیش‌سازها را کنترل می‌کنند. فرآیند ریخت‌زایی مشاهده شده در طی تکوین جنین شبیه به وقایعی است که در زمان ترمیم روی می‌دهد و بنابراین ترمیم ممکن است به عنوان تکرار فرآیندهای اساسی تکوین در نظر گرفته شود. شناخت بیشتر اصول سلولی و مولکولی تکوین و ترمیم، راه را جهت ترمیم مؤثرتر و مهندسی بافت هموار می‌کند. تولید ماتریکس‌هایی برای جذب سلول‌های مناسب در ترمیم و همچنین تحریک، تکثیر و تمایز سلول‌های اختصاصی بافت یا مهار کردن سیگنال‌های سرکوب کننده مثال هایی در این زمینه می باشند (Hayman, *et al.*, 2005).

1-1-3-2 عوامل مکانیکی

مطالعات اخیر نشان داده اند که عوامل مکانیکی نیز نقش مهمی در تنظیم سرنوشت سلول‌ها از جمله سلول‌های بنیادی دارند. محققین نشان داده‌اند که سیگنال‌های مکانیکی از طریق فعال‌سازی Rho ، یک GTPase کوچک و Rho کیناز به اسکلت سلولی انتقال داده شده و نقش مهمی نه تنها در تولید فاکتورهای محلول بلکه در اتصال سلول‌های بنیادی به سطوح سه بعدی دارند (Khademhosseini, *et al*, 2006). در این روند خصوصیات فیزیکی داربست مانند درصد تخلخل، غلظت و ... نیز بر تمایز سلول‌ها بی تأثیر نیست. Taqvi و Ray نشان دادند که کاهش میزان منافذ داربست سبب افزایش تمایز به سلول‌های خون ساز خواهد شد. علاوه بر این افزایش غلظت پلیمر منجر به افزایش خون سازی شده و افزایش دانسیته سلولی نیز سبب افزایش تولید پیش‌سازی‌های خون‌ساز می گردد (Taqvi and Ray, 2006).

1-1-4 سلول‌های استفاده شده در مهندسی بافت

یکی از عوامل مورد نیاز در موفقیت مهندسی بافت انتخاب سلول‌های مناسب و منبع سلولی معتبر می‌باشد. یکی از عمده‌ترین منابع به کار رفته در مهندسی بافت، سلول‌های بنیادی می‌باشند (Long,