علیرضا فرخ، دکتر طاهره ناجی
گروه آموزشی علوم سلولی مولکولی، دانشکده علوم و فناوری های نوین واحد علوم دارویی تهران

مهندسی بافت؛ روشی برای ترمیم بافت ها—بخش دوم

روش های شیمیایی

در روش شیمیایی سلول زدایی، از مواد شیمیایی مختلف مانند استفاده از تیمارهای اسیدی و بازی، شوینده های غیریونی و یونی استفاده می شود. تیمارهای اسیدی و بازی برای حل کردن اجزای سیتوپلاسمی سلول ها و حذف اسیدهای نوکلئیک به کار می رود. اسیدهایی از قبیل اسیداستیک، اسیدهیدروکلریک، اسید سولفوریک و هیدروکسید آمونیوم به طور موثری باعث ازهم پاشیدن غشاهای سلولی و اندامک های داخل سلولی می شود (۲۹). تریتون X-۱۰۰ یکی از شوینده های غیریونی است که به طور وسیعی بررسی شده است. سلول زدایی با تریتون X-۱۰۰ نتایج متفاوتی را نشان می دهد. برای نمونه: سلول زدایی دریچه قلبی با این ماده پس از ۲٤ ساعت، منجر به حذف کامل هسته ها از بافت می شود. بررسی های دیگر نشان داده که در بافت هایی از قبیل رگ های خونی، تاندون و لیگامنت که تا ٤ روز در معرض این ماده قرار گرفته اند، هسته ها به طور کامل حذف نشده اند. کارآیی این ماده بستگی به بافت مورد استفاده و روش هایی که به صورت ترکیبی با تریتون X-۱۰۰ برای سلول زدایی به کار می روند، دارد (۳۵). سدیم دودسیل سولفات (SDS)، متداول ترین شوینده یونی است و در بسیاری از بررسی به عنوان ماده سلول زدا در مرحله شیمیایی استفاده شده است. دترجنت یونی SDS با توجه به ساختار دوگانه دوستش (دارای یک سر آنیونی آب دوست و یک دم دوازده کربنه اشباع آب گریز) می تواند با غشاهای سلولی برهم کنش داده و سبب لیزشدن غشاء سلولی و غشاء هسته شود (۲۵).

روش های آنزیمی

روش آنزیمی سلول زدایی، شامل هضم پروتئین ها توسط پروتئازها و هضم اسیدهای نوکلئیک با استفاده از نوکلئازها شامل اندونوکلئازها و اگزونوکلئازها است. تریپسین یکی از رایج ترین آنزیم های پروتئولیتیک مورد استفاده در فرآیندهای سلول زدایی است که اتصالات پپتیدی را از انتهای کربوکسیل اسیدآمینه های آرژینین (Arg) و لیزین (Lys) می شکند. نوکلئازها از قبیل اندونوکلئازها باعث هیدرولیز پیوندهای داخلی زنجیره های ریبونوکلئیک اسید و داکسی ریبونوکلئیک می شود و در نهایت DNA و RNA را تخریب می کنند. از آنجایی که DNA، اتصال محکمی با پروتئین های ماتریکس خارج سلولی دارند و به راحتی نمی توان باقیمانده های DNA را از بافت حذف نمود، می توان از روش های آنزیمی برای حذف آنها استفاده کرد (۳۵). مهندسی بافت حیطه ای چند رشته ای از اصول و کاربرد روش های مهندسی و علوم زیستی، به منظور شناخت بنیادی رابطه بین ساختار و عملکرد در بافت های طبیعی و بیمار است. این حیطه ترکیبی از سلول ها، مهندسی، مواد و فاکتورهای فیزیکی و شیمیایی مناسب است که هدف آن حفظ حالت پایدار بافت یا بهتر کردن عملکرد بافت هدف یا جایگزین کردن عملکرد زیستی بافت است (۷ و ۵۲). دلیل در بحث طب ترمیمی و مهندسی بافت استفاده از سلول های بنیادی مشاهده می شود. اصطلاح مهندسی بافت به شکل امروزی اولین بار در ۱۹۸۵ توسط فونگ (Fung) مطرح گشت و از سال ۱۹۸۷یعنی پس از جلسه بنیاد ملی علوم (NSF: National Science Foundation) سرمایه گذاری ها روی مهندسی بافت آغاز شد. پیشرفت های اخیر در زمینه مهندسی بافت به منظور غلبه بر محدودیت های روش های مرسوم پیوند عضو و پیوند مواد است (٤۲). در این زمینه توانایی بالقوه برای ساخت عضو و بافت های مصنوعی وجود دارد به طوری که بافت و عضو پیوند زده شده پس از پیوند، همراه با فرد گیرنده رشد کند. با این روش راه حل دایمی برای درمان بافت های آسیب دیده وجود دارد، به طوری که نیازی به درمان های مکمل نبوده و در نتیجه هزینه درمان بسیار کاهش می یابد (۳۷).

سلول های بنیادی مزانشیمی

ترمیم آسیب ها و صدمات وارده به بافت غضروفی هنوز یکی از مهم ترین مشکلاتی است که در زمینه ارتوپدی وجود دارد. با این حال اخیرا روش های مهندسی بافت پتانسیل قابل قبولی را جهت حل این مشکلات و بازسازی بافت غضروفی نشان داده اند (۳۹). مهندسی بافت، علم طراحی و تولید بافت های جدید

برای ترمیم اندام های آسیب دیده و جایگزینی قسمت های از دست رفته به علت عوامل مختلف است. در بین بافت های بدن، غضروف به دلیل عدم انجام رگ زایی مناسب، پتانسیل بالایی برای تولید مجدد ندارد و از این رو یک نمونه مناسب برای مهندسی بافت به شمار می رود (۳۸). در آسیب دیدگی ها و عیوب بزرگ، روند خود ترمیمی انجام شده توسط بدن، کارساز نبوده و پیوند غضروف لازم می شود. دانشمندان از سال ها قبل قادر به کشت سلول ها در خارج از بدن بودند، ولی فناوری رشد شبکه های پیچیده و سه بعدی سلولی برای جایگزینی بافت آسیب دیده اخیرا توسعه یافته است. برای ساخت یک بافت به شیوه های مهندسی، نیاز به طراحی یک داربست با ساختار فیزیکی مناسب با امکان چسبندگی سلول ها به آن، مهاجرت، تکثیر و تمایز سلولی و در نهایت رشد و جایگزینی بافت جدید است (۳۳).

مهندسی بافت از دیدگاهی دیگر

پیوند مصنوعی یا ارگان های پیوند شده یک درمان موفق برای بیماری های درمان ناپذیر یا بافت های از دست رفته است. هرچند چنین مداخله ای توسط فقدان ارگان محل چالش است و این موضوع محل بحث های قدیمی است. مهندسی بافت به عنوان یک رویکرد توسعه سریع به منظور شناسایی مسائل این چنینی و محتوای اصلی پزشکی احیا کننده، پدیدار شده است. مهندسی بافت یک فیلد مربوط به رشته های مختلف علمی است که اصول و روش های علم بیومهندسی ماده رو به کار می برد و علم زیستی به سمت مجمع بدل یا جانشینی بیولوژی می رود که ترمیم و نگه داری کرده و همچنین عملکردهای بافت را به دنبال آسیب توسط بیماری یا فرآیندهای جراحتی بهبود خواهد بخشید (٤٤). اصول عمومی مهندسی بافت شامل سلول های زنده ترکیب شده با یک محافظ سینتتیک/طبیعی یا داربست برای ساختن و ایجاد یک زندگی سه بعدی است که معادل عملکردی، ساختاری و مکانیکی است یا نسبت به بافت که جایگزین شده، بهتر است (۵۳). توسعه چنین ایجادی به یک انتخاب درست از چهار جزو کلیدی نیازدارد:

۱) سکوب یا چهارچوب یا داربست
۲) فاکتورهای رشد
۳) ماتریکس خارج سلولی
٤) سلول ها (۵۰).

داربست ها، ساختارهای بافت سه بعدی هستند که راهنمای سازماندهی، رشد وتمایزسلول ها هستند. داربست ها باید برای تامین نیازهای زیستی و تغذیه ای بافت، سازگار باشند. فاکتورهای رشد، پپتیدهای محلول هستند که قادرند به گیرنده های سلولی بچسبند و پاسخ سلولی به تمایز یا تکثیر بافت را القاء کنند (٤٢). این شرایط توسط نحوه قرار گیری سلول ها و واکنش متقابل آن با داربست بافتی پیش می رود. سرانجام توسعه ساختار حیاتی شامل تامین مناسب سلول هایی است که دارای قابلیت تکثیر بالا، آسان برای برداشت و داشتن توانایی تمایزبه انواع سلول ها با عملکردهای اختصاصی هستند (٤و٤٠). در مواردی که برداشت مستقیم امکان پذیر نیست، مانند آنچه که در بسیاری از بیمارانی که به مرحله نارسایی و از بین رفتن بافت مورد نظر مبتلا شده اند یا سلول های جنینی با ظرفیت تکثیر محدود در کشت که اصولا تعداد سلول های لازم را به دست نمی دهند، سلول بنیادی به عنوان منبع سلول های جایگزین هستند (۳۰ و ٤۷ و ۵۳). با وجود پیشرفت تحقیقات در خصوص سلول های بنیادی جنینی، محدودیت های بحث اخلاقی و قانونی از میان خواهد رفت.

اساس مهندسی بافت

در سال ۱۹۳۳ مفهوم مهندسی بافت برای اولین بار مطرح شد هنگامی که سلول های تومور موش روی یک صفحه پلیمر زیستی که در داخل حفره شکم جنین جوجه گذاشته شده بود کشت داده شد(۸). چندین دهه بعد چیک و همکاران نشان دادند که سلول های بتا پانکراس موش های صحرایی، قابلیت رشد روی مویرگ های مصنوعی یا محیط کشت را دارند و حتی سلول های رشد یافته در پاسخ به تغییرات سطح گلوکز، قابلیت تولید انسولین را هم دارا هستند(۱۸). بروک و همکاران در اوایل ۱۹۸۰، پوست مصنوعی را با فیبروبلاست های کشت شده روی داربست کلاژن برای آسیب ناشی از سوختگی های گسترده، به طورموفقیت آمیزی ایجاد کردند که تا به امروز هم مورد استفاده بالینی قرار می گیرد. تلاش ها، امروزه برای به دست آوردن مهندسی یک گونه بافت و انواع ارگان با تاکید روی کاربرد سلول های بنیادی است. نهایتا هدف مهندسی بافت تولید مجدد بافت ها و بازیابی عملکرد ارگان از طریق کاشت سلول و کاربرد ماتریکس در بیمار است (۳۰ و ۵۳). منبع سلول های تجهیز شده در مهندسی بافت، می تواند مشتق از خود بیمار یا آلوژنیک (از یک انسان اعطا کننده با سازکاری ایمنی)، یا ناجورژن (از یک اهدا کننده متفاوت) باشد (٤۷).

مروری بر تحقیقات انجام شده

ساخت بافت عروقی یا رگ ها از بافت های آسیب دیده یا پیوند مصنوعی، یک چالش اصلی در مهندسی بافت است. سلول های بنیادی پلوری پوتنت انسانی، یا جنینی می تواند با تحریک والقای مناسب، تعداد زیادی از سلول های عروقی را تولید کنند. پروتکول های مختلفی برای تولید سلول های

عضلانی صاف عروقی از سلول های بنیادی پلوری پوتنت انسانی توصیف شده است. علاوه براین، پری سایت ها از سلول های بنیادی پلوری پوتنت انسانی مشتق شده است که با همتاهای فیزیولوژیکی شان، مشابه هستند(٤). با کمک مهندسی بافت سلولی–ورقه ای، می توان یک ماتریکس خارج سلولی (ECM) ایجاد کرد تا به عنوان ساختارهای داربست آزاد مورد استفاده قرار گیرد. سلول های بنیادی مشتق شده بافت چربی(ASCs) مولتی پوتنت هستند و نسبت به سلول های بنیادی مشتق شده مغز استخوان (BMSCs) راحت تر قابل دستیابی اند. اگرچه سلول های ورقه ای بنیادی مشتق شده بافت چربی (ASCs)، قبلا نمایش حالت مولتی پوتنت را گزارش داده اند، نئوتروفین ۳ (NT–۳) و آنتی نوگوآ به عنوان فاکتور رشد بهبود تولید آکسون در مدل های حیوانی را نشان دادند، بومی سازی، انتقال موضعی و پایدار به سیستم عصبی مرکزی (CNS) یک چالش بحرانی برای این ها و سایر درمان های ماکرومولکولی باقی مانده است. سیستم انتقال داروهای قابل تزریق (DDS)، قبلا توسعه یافته است که می تواند حمل موضعی مطمئن به نخاع ستون فقرات را فراهم کند. این DDS ترکیبی از پلی (PLGA) (lactic–co–glycolic acid) نانوذرات (NPS) پراکنده در یک هیدروژل متیل سلولز هیالورونان، برای حمل موزون فعال زیستی از NT–۳ و آنتی نوگوآ است. بعلاوه، تلقیح همزمانNT–۳ و آنتی نوگوآ با کمک DDS، تراکم آکسون تولید شده را افزایش می دهد و عملکرد انتقال عصبی را بهبود می بخشد. مزایای مشاهده شده این np/hydrogel DDS برای NT–۳ و آنتی نوگوآ سودمندی DDS به عنوان یک استراتژِی حمل موضعی برای پروتکل های درمانی در CNS را نشان می دهد (٢٦). استخوان یک بافت عروقی شده عالی است و احیای موثر ساختمان به نورگ زایی به طور ویژه برای نقایص جدی اندازه استخوان نیاز دارد. یک ماده زیستی هیبریدی جدید شامل نانوکلسیم سولفات (ncS) و فیبرین هیدروژل برای ارائه و فاکتورها رگ زایی یا آنژیوژنیک، فاکتور رشد اندوتلیال عروقی (VEGF) و فاکتور رشد فیبروبلاست ۹ (FGF۹) به سلول های مزانشیمی وجود دارد که برای تولید عروق جدید ارتباط موثر بین سلول های مزانشیمی پلوری پوتنسیال و داربست خارج سلولی در کنار دسترسی به فاکتور رشد ضروری است. در مورد تولید استخوان جدید، حضور پروتئین ۲–بیان کننده مرفوژنیک استخوان MSc در nCS و هیدروژل های فیبرین بهبود احیای استخوان را به طور معنی داری بهبود بخشیده است؛ در حالیکه FGF۹ به تنهایی تاثیر معنی داری نداشت، ترکیب FGF۹ و VEGF توام شده با فیبرین نورگ زایی و تشکیل استخوانی بیشتر، سبب شدند به طور کلی، نتایج ما که ترکیب nCS با تایید تشکیل استخوان با یک فیبرین بر پایه VEGF/FGF۹ سیستم را پویا می کنند (تشکیل استخوانی تاییدی) که یک استراتژی موثر و خلاقانه است که به طور معنی داری تشکیل استخوانی خارج ازبدن(in vivo) را افزایش داد (٥٤). در دهه گذشته، مفهوم مهندسی بافت با استفاده از تکنولوژی هایی که ازمجموعه های چند سلولی استفاده می کنند و میکرو بافت های ۳بعدی به عنوان داربست بافتی و استفاده از فاکتور رشد خارجی، امکان کشت یک یا بیشترسلول ها را در ۳بعد فراهم می کند، ممکن است عملکرد بافتی را که وابسته به شرایط واقعی داخل بدن است، همانند سازی کند.

منابع:

1. Ackbar R, Ainoedhofer H, Gugatschka M, Saxena AK. Decellularized ovine esophageal mucosa for esophageal tissue engineering. Technol Health Care. 23-215 :(3) 20 ;2012.

2. Atala A. Tissue engineering and regenerative medicine: concepts for clinica application. Rejuvenation Res 31-15 :7 ;2004.

3. Awad HA, Wickham MQ, Leddy HA, GimbleJM, Guilak F. Chondrogenic differentiation of adipose-derived adult stem cells in agarose, alginate, and gelatin scaffolds. Biomaterials. 22-3211 :(16) 25 ;2004.

4. Ayelet Dar and Joseph Itskovitz-Eldor. 2015. Therapeutic potential of perivascular cells from Journal of Tissue Engineering and Regenerative Medicine human pluripotent stem cells. Volume 9, Issue 9, September 2015, Pages: 987–977.

5. Azuma C, Tohyama H, Nakamura H, Kanaya F, Yasuda K. Antibody neutralization of TGF-beta enhances the deterioration ofcollagen fascicles in a tissue-cultured tendon matrix with ex vivo fibroblast infiltration. J Biomech. 90-2184 :(10) 40 ;2007.

6. Barnes CA, Brison J, Michel R, Brown BN, Castner DG, Badylak SF, et al. The surface molecular functionality of decellularized extracellular matrices. Biomaterials. 2011 Jan; 43-137 :(1) 32.

7. Badylak SF, Freytes DO, Gilbert TW. Extracellular matrix as biological scaffold material: structure and function. Acta Biomater. 2009 Jan; 13-1 :(1) 5.

8. Belle. Tissue engineering, an overview. In: Belle, editor. Tissue Engineering: Current Perspectives: Birkhauser Verlag AG 15-3 .1993.

9. Bisceglie V. Über die antineoplastische immunität; heterologe einpflanzung von tumoren in hühner-embryonen. Ztschr Krebsforsch 140-40:122 ;1933.

10. Bjornson CR, Rietze RL, Reynolds BA, Magli MC, Vescovi AL. Turning brain into blood: a hematopoietic fate adopted by adult neural stem cells in vivo. Science 537-534 :283 ;1999..

11. Burke JF, Yannas IV, Quinby WC Jr, Bondoc CC, Jung WK. Successful use of a physiologically acceptable artificial skin in the treatment of extensive burn injury. Ann Surg. 428-413 :194 ;1981.

12. Cao Y, Lees J. Scaffolds, stem cells and tissue engineering: A potent combination. Australian Journal of Chemistry. :(10) 58 ;2005 703-691.

13. Caplan AI. Tissue engineering designs for the future: new logics, old molecules. Tissue Eng.