فهرست مطالب

پیشگفتار ۷

فصل اول: روش‌های شیمیایی سلول زدایی بافت‌ها ۹

عوامل مؤثر بر سلول‌زدایی بافت‌ها ۱۰

آثار سلول‌زدایی بر ECM ۱۹

فصل دوم: روش‌های فیزیکی سلول زدایی بافت‌ها ۵۱

شوک حرارتی ۵۲

فشار مکانیکی و هیدرواستاتیک ۵۳

گرادیان فشار (تغییرات فشار) ۵۴

الکتروپوریشن (نفوذپذیر کردن غشا سلول) ۵۶

امواج اولتراسونیک ۵۷

خلاء ۵۹

مایع فوق بحرانی ۶۰

غوطه‌وری و ایجاد تلاطم ۶۱

پرفیوژن ۶۲

روش‌های ترکیبی ۶۴

فصل سوم: روش‌های آنزیمی سلول زدایی بافت‌ها ۶۹

آنزیم‌های سلول‌زدایی بافت‌ها ۷۰

فصل چهارم: استریل‌سازی بافت‌های سلول زدایی شده ۸۵

روش‌های فیزیکی ۸۶

روش‌های شیمیایی ۸۸

فناوری‌های استریل کننده نوین ۹۲

آنتی بیوتیک‌ها ۹۳

فصل پنجم: اصلاح سطح در بافت‌های سلول زدایی شده ۱۰۱

اصلاح سطح بافت‌های سلول‌زدایی توسط اتصالات عرضی ۱۰۱

اصلاح سطحی بافت‌های سلول‌زدایی شده توسط پپتیدها ۱۰۹

اصلاح سطح بافت‌های سلول‌زدایی شده توسط کاتکولها ۱۰۹

اصلاح سطحی بافت‌های سلول‌زدایی شده توسط ترکیبی از عوامل ۱۱۰
فصل ششم: مشخصه یابی بافت‌های سلول زدایی شده ۱۱۳
تعیین مقدار DNA ۱۱۶
تعیین کمی میزان اجزای ECM گلیکوزامینوگلیکان و کلاژن ۱۱۷
میکروسکوپ‌های الکترونی SEM و TEM ۱۲۴
چسبندگی سلولی ۱۲۶
خواص مکانیکی ۱۲۷
ارزیابی زیست سازگاری با تست MTT ۱۲۸
زایموگرافی ۱۲۹
زیست تخریب پذیری ۱۲۹
بررسی خون سازگاری ۱۲۹
فصل هفتم: سلول دار کردن مجدد بافت‌های سلول زدایی شده ۱۳۵
منابع سلولی ۱۳۵
تعداد سلول‌ها ۱۴۳
روش‌های سلول دار کردن مجدد ۱۴۴
کاشت سلول ۱۴۴
استراتژی‌های کاشت سلول ۱۴۴
فصل هشتم: محصولات تجاری از بافت‌های سلول زدایی شده ۱۴۷
منابع ECM سلول‌زدایی‌شده ۱۴۸
استفاده‌ی بالینی بیومواد بر پایه‌ی ECM سلول‌زدایی شده ۱۴۹
کاربردهای ارتوپدی و دندانپزشکی ۱۵۰
کاربردهای جراحی پلاستیک و ترمیمی ۱۵۴
کاربردهای قلبی عروقی ۱۵۷
سایر برنامه‌های کاربردی ۱۶۶
چالش‌های تکنیکی و پیوندی استفاده‌ی بالینی از داربست‌های ECM سلول‌زدایی‌شده ۱۷۲
واژه یاب ۱۷۷

پیشگفتار

پزشکی بازساختی و مهندسی بافت از مفاهیم جدیدی هستند که با گسترش روزافزون علم پزشکی و دانش زیست‌شناسی ایجاد گردیده‌اند و از آنها به عنوان پزشکی آینده یاد می‌شود. کمتر از ۲۰ سال است که این مفاهیم وارد حیطه پزشکی شده و به یکی از حوزه‌های مورد علاقه دانشگاه‌ها، مراکز پژوهشی و شرکت‌های بیوتکنولوژی تبدیل گردیده‌اند. داربست‌های زیستی سلول‌زدایی شده، در چند سال اخیر رشد قابل توجهی در مهندسی بافت داشته‌اند. بیومواد تهیه شده از ماتریکس خارج سلولی با دارا بودن فاکتورهای گوناگون پروتئینی و عوامل دیگر زیستی فعال، در بازسازی بافت آسیب دیده نقش فعال و موثری ایفا نموده‌اند. بیومواد مبتنی بر بافت‌های سلول‌زدایی شده، دارای کلیه فاکتورهای زیستی موجود در ماتریکس خارج سلولی بوده و از نظر ساختاری، مشابه بافت طبیعی هستند. روش‌های متنوعی برای سلول‌زدایی بافت‌ها وجود دارد و انتخاب روش مناسب به منظور حفظ ساختار طبیعی زمینه خارج سلولی و در عین حال حذف حداکثری سلول‌ها و عوامل وراثتی حائز اهمیت است.

نظر به اهمیت آشنایی دانشجویان تحصیلات تکمیلی به‌ویژه مقاطع دکتری تخصصی رشته‌هایی چون مهندسی بافت، با داربست‌های سلول‌زدایی شده و تجربه‌ی هر چند کوتاه تدریس این واحدهای درسی توسط برخی نویسندگان این کتاب و تجربه‌ی خوب نویسندگان در تحقیقات مبتنی بر سلول‌زدایی بافت‌ها، بهانه‌ای برای تألیف و گردآوری کتاب حاضر شد.

همانطور که از نام کتاب مشخص است، نوشتار حاضر تنها مقدمه‌ای برای آشنایی با سلول‌زدایی بافتها است. نویسندگان امیدوارند این کتاب مورد استفاده‌ی علاقمندان قرار بگیرد و آماده‌ی دریافت نظرات و پیشنهادات خوانندگان عزیز می‌باشد.

با احترام
نویسندگان
بهار ۱۴۰۲

فصل اول

روش‌های شیمیایی سلول‌زدایی بافت‌ها

به عنوان یک جزء حیاتی در مهندسی بافت، داربست‌ها باعث پایداری مکانیکی و ساختاری بافت شده همچنین با پشتیبانی از اتصال و تکثیر سلول‌های اگزوژن، تحویل فاکتورهای رشد مورد نیاز برای بازسازی بافت را تسهیل می‌نمایند. داربست‌ها می‌توانند از بافت‌های طبیعی (منابع حیوانی یا انسانی) یا با استفاده از مواد مصنوعی ساخته شوند. داربست‌های طبیعی زیست سازگار و تجزیه‌پذیر بوده، ویژگی‌های بیولوژیکی متناسب با ریز محیط بافت طبیعی را دارند و منجر به ارتقاء مناسب تعاملات سلولی می‌شوند.

سلول‌زدایی، فرآیند حذف سلول‌ها و اجزای آن‌ها از ماتریکس خارج سلولی [1](ECM) برای تولید یک ماتریکس طبیعی با حفظ یکپارچگی مکانیکی می‌باشد. ECM به طور عمده از آب، پروتئین‌ها (عمدتاً کلاژن) و پلی‌ساکاریدها تشکیل می‌شوند. ترکیب و چیدمان اجزای ECM و شرایط ریزمحیط ماتریکس (به عنوان مثال خواص مکانیکی،CO_2، PH و غلظت) از بافتی به بافت دیگر بر اساس عملکرد و سلول‌های ساکن در آن که اجزای ECM را ترشح می‌نمایند، متفاوت می‌باشد. روش‌های سلول‌زدایی بافت‌های مورد استفاده برای تهیه‌ی داربست‌های بیولوژیکی متشکل از ECM در مطالعات درون‌تن و برون‌تن (in vivo و in vitro) و همچنین به طور گسترده‌ای برای کاربردهای بالینی که شامل‌ترمیم و بازسازی بافت‌های اسکلتی-عضلانی، قلبی-عروقی، ادراری-تناسلی، گوارش، سیستم عصبی مرکزی و ... است به کار می‌روند.

اولین بررسی تکنیک‌های سلول‌زدایی بافت و تأثیر آن بر خواص ECM در سال ۲۰۰۶ منتشر شد، پس از آن تکنیک‌های سلول‌زدایی جدید و ظهور سلول‌زدایی کل یک ارگان سه بعدی و همچنین اثرات مضر مواد سلولی باقی‌مانده در بدن، بیشتر شناخته شد. اخیراً ساختارهای ECM سه بعدی برای استفاده در کاربردهای مهندسی کل اندام مورد استفاده قرار گرفته‌اند. داربست‌های ECM توسط سلول‌زدایی بافت‌های انسانی و سایر موجودات که اغلب پستانداران هستند، تهیه می‌شوند که نشانه‌های بیولوژیکی‌ترمیم مناسب و عملکردی بافت‌ها را ارائه داده‌اند، ECM بر مهاجرت سلولی، تکثیر و تمایز و همچنین بر میتوژنز سلولی، کموتاکسی، تمایز سلولی و القای پاسخ‌های بازسازی بافت میزبان تأثیر می‌گذارد.

1. Extracellular matrix

این مکانیسم‌ها احتمالاً به دلیل ساختار ۳ بعدی، توپولوژی سطح و ترکیب ECM می‌باشد که در بروز این اثرات نقش دارند. حفظ ترکیبات ECM در طول فرآیند سلول‌زدایی منجر به ایجاد داربستی ایده‌آل برای بازسازی بافت می‌شود. با این حال همه‌ی روش‌های سلول‌زدایی همواره ساختار ECM را تا حدودی مختل نموده است. سلول‌زدایی بافت‌ها و اندام‌ها برای تولید داربست‌های زیستی به تعادل بین حفظ ساختار ECM و حذف مواد زائد سلولی مانند DNA، میتوکندری، لیپیدهای غشایی و پروتئین‌های سیتوزولی نیاز دارد، این اجزای باقی مانده‌ی سلولی می‌توانند یک پاسخ التهابی را ایجاد نموده و بازسازی را مهار نمایند. لازم به ذکر است که حذف کامل تمام سلول‌های باقی مانده با استفاده از روش‌های سلول‌زدایی، ممکن نمی‌باشد. از طرفی فرآیندهای سلول‌زدایی برای جلوگیری از اختلال در معماری ماتریکس ضروری می‌باشد. به این منظور روش‌های فیزیکی، شیمیایی و بیولوژیکی و یا حتی ترکیبی از روش‌های مذکور برای تولید داربست‌ها به کار می‌رود.

عوامل مؤثر بر سلول‌زدایی بافت‌ها

سلول‌زدایی هر بافت و اندام به عوامل زیادی از جمله تراکم سلولی بافت (به عنوان مثال کبد در مقابل تاندون) تراکم عناصر بافتی (به عنوان مثال درم در مقابل بافت چربی)، محتوای لیپیدی (مثلاً مغز در مقابل مثانه) و ضخامت آن (مثلاً درم در مقابل پریکارد) بستگی دارد.

عوامل و تکنیک‌های سلول‌زدایی به طریق شیمیایی

استفاده از روش‌های شیمیایی، سلول‌زدایی را تسهیل می‌نماید که شامل استفاده از شوینده‌های شیمیایی، اسیدها و بازها، الکل‌ها و محلول‌های هیپوتون و هیپرتون می‌باشد.

مواد شوینده

شوینده‌ها مولکول‌های آمفی‌پاتیک با سر قطبی و آبگریز می‌باشند، که قادرند ترکیبات آبگریز را در آب حل نمایند. مواد شوینده علاوه بر کاربرد در فرآیند سلول‌زدایی، در الکتروفورز ۲ بعدی نیز مورد استفاده قرار می‌گیرند. مواد شوینده بر اساس سر قطبی خود به ۳ دسته‌ی یونی، غیر یونی و دو قطبی (Zwitterionic) تقسیم می‌شوند که غشاهای سلولی و DNA را از پروتئین‌ها جدا نموده و بنابراین در حذف مواد سلولی از بافت مؤثر می‌باشند. با این حال این عوامل ساختار پروتئین‌ها را در ECM مختل می‌نمایند. حذف پروتئین‌های ECM و DNA توسط مواد شوینده با افزایش زمان زیادتر می‌شود که البته به نوع بافت و سن اهداء کننده ارتباط دارد. همچنین مشاهده شده است که ترکیب چند شوینده، از دست دادن پروتئین ECM را افزایش می‌دهد.

شوینده‌های یونی

شوینده‌های یونی ترکیبات قوی هستند که می‌توانند به طور کامل غشاهای سلولی را از بین ببرند و پروتئین‌ها را به طور کامل دناتوره نمایند. سدیم دودسیل سولفات[1] (SDS)، سدیم دئوکسی کولات (SDC)[2] و هیپوکلریت سدیم (شکل ۱-۱) از جمله متداول‌ترین عوامل سلول‌زدایی یونی می‌باشند. این شوینده‌ها قادرند به طور مؤثر غشاهای سیتوپلاسمی، لیپیدها و DNA را حل نمایند. SDS به طور گسترده در فرآیند سلول‌زدایی استفاده می‌شود. در مقایسه با سایر شوینده‌ها SDS در حذف بقایای سلولی مانند ترکیبات هسته‌ای و سیتوپلاسمی از بافت‌های متراکم و ضخیم مانند قلب کارایی بیشتری دارد. از این رو رایج‌ترین ماده‌ی شوینده‌ی مورد استفاده در فرآیند سلول‌زدایی می‌باشد.

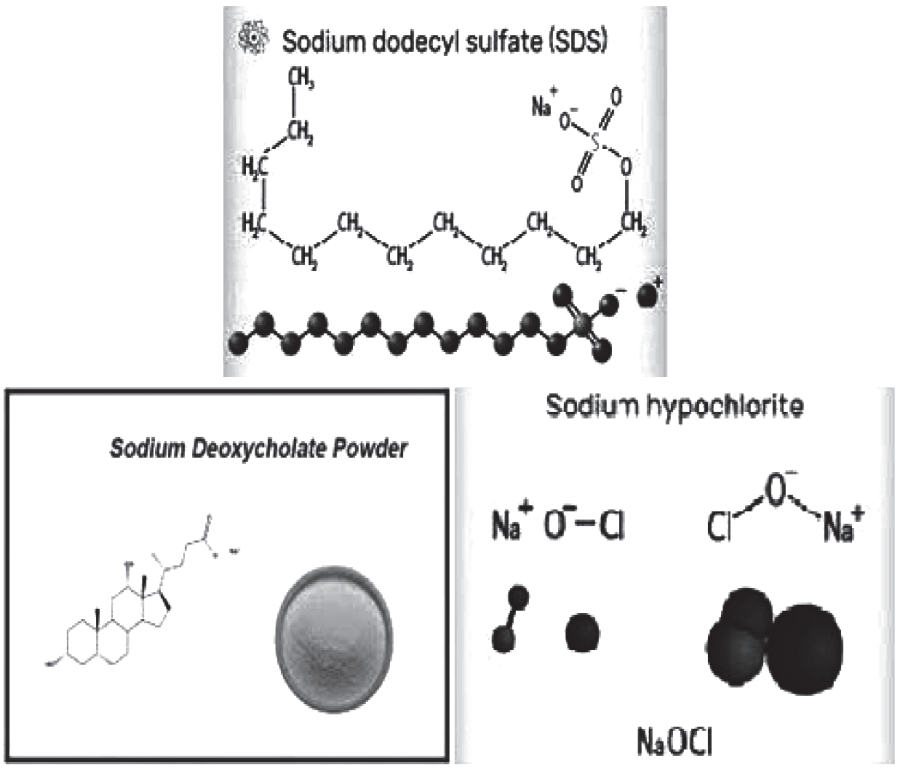
SDS (۱٪) رایج‌ترین غلظت مورد استفاده در فرآیند سلول‌زدایی می‌باشد. با این حال برخی از مطالعات از یکسری غلظت‌های SDS (۰/۰۲۵، ۰/۰۱، ۰/۱، ۰/۷۵ و ۰/۰۵ درصد) برای سلول‌زدایی که به از بین بردن سلول‌ها و حفظ معماری و ترکیب‌بندی بافت کمک می‌نماید، استفاده نموده‌اند. SDS معمولاً برای دناتوره کردن و باز کردن پروتئین‌ها برای الکتروفورز پلی‌آکریل آمید به کار می‌روند و همچنین در صورت استفاده، پیوندهای کوالانسی بین پروتئین‌ها را مختل می‌نماید. برای به حداقل رساندن اثرات نامطلوب SDS بر اجزای ماتریکس باقی‌مانده‌ی بافت سلول‌زدایی‌شده، به طور ایده‌آل از چند غلظت پایین این معرف همراه با زمان قرارگیری کوتاه در دماهای پایین استفاده می‌نمایند.

SDS می‌تواند منجر به حذف کامل مواد سلولی، حفظ کلاژن و گلیکوپروتئین‌ها و همچنین حفظ جهت‌گیری فیبرها در آئورت، بافت عضلانی، کلیه‌ها و تاندون‌ها در موش صحرایی شود. این ماده می‌تواند میزان GAGs[3] را تا حدود ۵۰٪ و همچنین محتوای فاکتور رشد را به طور قابل توجهی کاهش دهد. SDS موثرتر از سایر شوینده‌ها برای حذف هسته‌ها از بافت‌ها و اندام‌های فشرده مانند کلیه، مفصل گیجکاهی-فکی با حفظ وضعیت مکانیکی مناسب بافت، می‌باشد. اگرچه قدرت پاک‌کنندگی SDS از بسیاری از مواد شوینده‌ی دیگر قوی‌تر است، اما در مقایسه با سایر شوینده‌ها اثرات مخرب بیشتری نیز دارد.

یکی از معایب استفاده از SDS به عنوان ماده‌ی شوینده کاهش مقدار GAGs و فاکتورهای رشد از ECM می‌باشد. همچنین به دلیل تمایل شدید SDS به پروتئین‌ها، این معرف قادر است برهمکنش‌های پروتئین-پروتئین را مختل نماید. بنابراین ممکن است منجر به از دست دادن یکپارچگی کلاژن و تغییر در ساختار ECM شود. استفاده از SDS در غلظت‌های مختلف منجر به آسیب‌های مختلف در سطوح ECM می‌شود. مطالعاتی اثرات تخریبی SDS را بر کلاژن و ویمنتین (که جزء پروتئین‌های اسکلت سلولی است) را گزارش داده‌اند، لذا این معرف می‌تواند تأثیر منفی بر سازگاری سلولی داشته باشد.

1. Sodium dodecyl sulfate
2. Sodium deoxycholate
3. Glycosaminoglycan

همانطور که گفتیم میزان تخریب یک شوینده به نوع ماده‌ی شوینده، مدت زمان قرار گرفتن در معرض آن، نوع بافت و سن اهدا کننده‌ی بافت بستگی دارد.SDS در سلول‌زدایی بسیار مؤثر بوده است. درمان با SDS به صورت بهینه منجر به حذف کامل سلول‌ها و حذف ۹۰٪ از DNA در بافت‌ها و اندام‌های مختلف شامل قرنیه، میوکارد، دریچه‌ی قلب، روده‌ی باریک و کلیه‌ی خوک، بازوی رت، ورید، ریه‌ها و قلب انسان می‌شود. در حالیکه SDS می‌تواند به طور مؤثر اجزای بافت را حذف نماید، ممکن است برای سازماندهی و پیام‌رسانی پروتئین‌ها مضر باشد. همانطور که ذکر شد SDC یک شوینده‌ی یونی دیگر است که در سلول‌زدایی استفاده می‌شود، اما در مقایسه با SDS قدرت تخریب بیشتری دارد و معمولاً در ترکیب با شوینده‌های دوقطبی استفاده می‌شود.



شکل ۱-۱: انواع شوینده‌های یونی

شوینده‌های غیریونی

این شوینده‌ها اثرات مخرب کمتری بر ساختار ECM دارند. با این حال به طور گسترده‌ای در فرآیند سلول‌زدایی استفاده می‌شوند. شوینده‌های غیریونی می‌توانند پیوندهای لیپیدی-لیپیدی و لیپیدی-پروتئین