

**دانشگاه آزاد اسلامي**

# **واحد علوم و تحقيقات**

دانشكده مهندسي پزشكي

سمينار كارشناسي ارشد مهندسي پزشكي- بيومواد

عنوان:

ساخت داربست هاي مهندسي بافت به روش اسفنج سازي گازي

استاد:

تهيه كننده:

فهرست

|  |  |
| --- | --- |
| عنوان | صفحه |
| * پيشگفتار | 1 |
| * نتايج قانونمند و استاندارد شده | 5 |
| * گزينش و جداسازي سلول | 35 |
| * توليد داربست‏هاي پليمري: قالب گيري حلال | 72 |
| * توليد داربست‏هاي پليمري: لايه سازي غشاء | 84 |
| * توليد داربست‏هاي پليمري: انجماد - خشك سازي | 106 |
| * توليد داربست‏هاي پليمري: اشكال كامپوزيت پليمر- سراميك | 121 |
| * توليد داربست‏هاي پليمري: جداسازي فاز | 142 |
| * توليد داربست‏هاي پليمري: پليمريزاسيون (بسپارش) | 162 |
| * توليد داربست‏هاي پليمري: پردازش اسفنج گازي | 176 |
| * بر هم كنش‏هاي سلولي سطح مصنوعي: بيومواد خود مجتمع | 192 |
| * بر هم كنش‏هاي سلولي سطح مصنوعي: چسبندگي سلول هدف | 216 |

|  |  |
| --- | --- |
| عنوان | صفحه |
| * پيشگفتار | 1 |
| * نتايج قانونمند و استاندارد شده | 5 |
| * گزينش و جداسازي سلول | 35 |
| * توليد داربست‏هاي پليمري: قالب گيري حلال | 72 |
| * توليد داربست‏هاي پليمري: لايه سازي غشاء | 84 |
| * توليد داربست‏هاي پليمري: انجماد - خشك سازي | 106 |
| * توليد داربست‏هاي پليمري: اشكال كامپوزيت پليمر- سراميك | 121 |
| * توليد داربست‏هاي پليمري: جداسازي فاز | 142 |
| * توليد داربست‏هاي پليمري: پليمريزاسيون (بسپارش) | 162 |
| * توليد داربست‏هاي پليمري: پردازش اسفنج گازي | 176 |
| * بر هم كنش‏هاي سلولي سطح مصنوعي: بيومواد خود مجتمع | 192 |
| * بر هم كنش‏هاي سلولي سطح مصنوعي: چسبندگي سلول هدف | 216 |

پيش گفتار

يكي از معضلات بزرگي كه علم پزشكي از ديرباز با آن درگير بوده است، ارائه درماني قطعي براي بازسازي بافت هاي از كار افتاده و يا معيوب است. متداول ترين شيوه در درمان اين نوع بافت ها، روش سنتي پيوند است كه خود مشكلات عديده اي را به دنبال دارد. از جمله اين مشكلات مي توان به كمبود عضو اهدائي، هزينه بالا و اثرات جانبي حاصل از پيوند بافت بيگانه Allograft)) كه مهمترين آنها همان پس زني بافت توسط بدن پذيرنده است اشاره كرد. اين محدوديت ها دانشمندان را بر آن داشت تا راه حلي مناسب براي اين معضل بيابند.

مهندسي بافت با عمر حدوده 1 ساله خود روشي نويد بخش در توليد گزينه هاي بيولوژيكي براي كاشتني ها (Implants) و پروتزها ارائه كرده و وعده بزرگ تهيه اندام هاي كاملاً عملياتي براي رفع مشكل كمبود عضو اهدائي را مي دهد. اهداف مهندسي بافت فراهم سازي اندام هاي كارآمد يا جايگزين هاي قسمتي از بافت براي بيماراني با ضعف يا از كارافتادگي اندام و يا بيماري هاي حاد است كه اين امر با استفاده از روش‌هاي درماني متنوع اندام مصنوعي- زيستي تحقق مي يابد. بنا به تعريف، مهندسي بافت رشته اي است كه از تركيب علم بيولوژي مواد و علم مهندسي يا به عبارتي Biotech جهت بيان ارتباطات ساختاري بافت هاي فيزيولوژيكي و طبيعي پستانداران در راستاي توسعه روش هاي نوين ترميم بافت و جايگزين سازي بافت، توسعه يافته است. مهندسي بافت شامل مباحثي نظير تركيبات نوين سلول ها، بيومواد غيرسلولي، داروها، فرآورده هاي ژني يا ژن هايي مي باشد كه قابل طراحي، تشخيص و ساخت بوده و امكان رهايش آنها به طور همزمان يا ترتيبي به عنوان عامل هاي درماني ميسر باشد. اگرچه داروها يا بيومواد غير سلولي به مواد بسياري اطلاق مي گردد اما درمان هاي منهدسي بافت در واقع منحصر به فرد هستند.

# **داربست مهندسي بافت**

در مهندسي بافت، سلول ها بر روي يك بستر از جنس پليمر زيست تخريب پذير بسيار متخلخل استقرار يافته، رشد و تكثير مي يابند. روند رشد اين سلول ها در جهت بازسازي بافت در سه بعد است. يكي از اساسي ترين قسمت هاي مهندسي بافت، داربست هاي زيست تخريب پذير هستند كه تحت نام Scaffold شناخته مي شوند. اين داربست ها در حقيقت بستري متخلخل با ساختاري شبيه به ماتريس برون سلولي بافت (ECM) هستند كه رشد سلول را به سمت تشكيل بافت مورد نظر جهت مي دهند. از آنجا كليه سلول هاي بدن به غير از سلول هاي سيستم خون رساني و بافت هاي جنيني خاص بر روي ECM رشد مي كنند، ايجاد يك بستر مصنوعي در محيط in vitro بسيار اهميت دارد. با رشد سلول ها بر روي داربست، داربست تخريب مي شود. جنس اين داربست ها پليمر و در بعضي موارد كامپوزيت پليمر- سراميك است. پليمر هاي متداول مورد استفاده در مهندسي بافت در جدول 1 آورده شده است.

پر استفاده ترين پليمر ها در مهندسي بافت پليمرهاي خانواده پلي- هيدروكسي اسيد شامل PGA , PLA و PLGA هستند كه به طور گسترده به عنوان داربست مورد استفاده قرار مي گيرند. داربست هاي كامپوزيت پليمر-سراميك در موارد ارتوپدي استفاده شده و از مهمترين سراميك هاي به كار رفته در آنها مي توان به تري كلسيم فسفات، تتراكلسيم فسفات و هيدوركسي آپاتيت اشاره كرد. علت به كارگيري سراميك ها در داربست، افزايش استحكام پليمر، چسبندگي به استخوان و قابليت تحرك رشد درون استخوان است. بهينه ترين كامپوزيت در اين مورد تركيب PLGA و هيدروكسي آپاتيت شناخته مي شود.

مكانيزم تخريب PGA , PLA و كوپليمر هاي آنها بر اساس هيدروليز تصادفي باندهاي استري زنجيره پليمري است. محصول نهايي اين تخريب آب و  است كه به آساني از بدن دفع مي شوند. يك داربست ايده آل بايد داراي تخلخل مناسب براي انتشار مواد غذايي بوده و امكان پاكسازي مواد زائد را داشته و داراي پايداري مكانيكي مناسبي جهت تثبيت و انتقال بار باشد. علاوه بر اين، شيمي سطح ماده بايد چسبندگي سلول و علامت دهي داخل سلولي (intracellular signaling) را به نحوي ارتقاء دهد كه سلول ها فنوتيپ طبيعي خودشان را بروز دهند. براي رشد سريع سلول، داربست بايد داراي ميكروساختار بهينه باشد، فاكتورهاي مهم يك داربست عبارتند از اندازه خلل و فرج، شكل و مساحت ويژه سطح. خلل و فرج موجود در داربست در حقيقت مسيرهاي غذارساني سلول ها و دفع پسماندهاي سلولي هستند. براي مثال خلل و فرج بهينه براي رشد سلولهاي فيبروبلاست درون رست ، خلل و فرج مناسب براي بازسازي پوست يك پستاندار بالغ 30-350 , 20-125 براي بازسازي استخوان است. بنابراين هدف اصلي در ساخت داربست، كنترل دقيق اندازه خلل و فرج و تخلخل است. مورد ديگر نحوه ايجاد چسبندگي مناسب سلول به سطح داربست است كه در اين مورد هم شيوه هاي متفاوتي به كار برده مي شود، يكي از ساده ترين شيوه ها به كارگيري رشته هاي كوچك پپتيدي در پروتئين هاي ECM است كه به عنوان واسطه مسئوليت چسبندگي سلول به بيومواد را بر عهده دارند. اجزاء گوناگون سرم قابل حل (پروتئين ها، پپتيدها) و رشته RGD براي تسهيل چسبندگي سلول شناخته شده اند.

## روش هاي ساخت داربست

از آنجا كه ECM بافت هاي مختلف باهم تفاوت دارد، داربست هاي مصنوعي به كار رفته براي هر بافت نيز با هم فرق مي‌كند. تهيه داربست هايي با ماتريس هاي مختلف نيازمند به كارگيري روش هاي ساخت متفاوتي است كه هر يك شيوه و كاربرد منحصر به خود را دارد. از جمله اين روش ها مي توان به  
Melt Casting , Freeze Drying , Membrane Lamination , Solvent Casting

Gas Foaming , Polymerization, Phase Separation

اشاره كرد. شكل داربست يا به عبارتي Morphology آن بايد دقيقاً شبيه بافت معيوب باشد. براي شبيه سازي شكل داربست با قسمت ناقص اندام (defect) از شيوه هاي كامپيوتري همانند CAD استفاده مي شود. داربست پردازش شده بر اساس اين الگو مورفولوژي دقيقي از ناحيه معيوب بافت خواهد داشت.

در ذيل خلاصه اي از روش هاي مهم ساخت داربست آمده است.

**قالب گيري حلال (Solvent Casting)‍:** قالب گيري حلال يك روش ساده براي توليد داربست مهندسي بافت است. در اين روش پليمر در يك حلال مناسب حل شده و در قالب ريخته مي شود. سپس حلال حذف گرديده و حالت پليمر را در شكل مورد نظر حفظ مي‌كند. اين شيوه به شكل هاي قابل حصول محدود مي شود. غالباً تنها طرح هاي قابل شكل‌گيري در اين روش صفحات صاف و لوله ها هستند. البته با قراردادن صفحات صاف روي هم نيز مي توان به اشكال پيچيده تر دست يافت. در اين شيوه مي توان با شستن ذراتي مانند كريستال هاي نمك كاشته شده درون پليمر كه Progen خوانده مي شود، داربست را به صورت متخلخل درآورد. مزيت اصلي قالب گيري حلال سادگي ساخت بدون احتياج به تجهيزات خاص است. همچنين از آنجا كه عمل ساخت در دماي اتاق انجام مي گيرد نرخ تخريب پليمر زيست تخريب پذير به روش قالب گيري حلال كمتر از فيلم هاي قالب گرفته شده از طريق تراكم خواهد بود. عيب اصلي قالب گيري حلال باقي ماندن احتمالي حلال سمي درون پليمر است. براي رفع اين عيب بايد به پليمر اجازه داد تا كاملاً خشك شده و سپس با استفاده از خلاء حلال باقي مانده را خارج نمود. عيب ديگر اين روش احتمال تغيير يافتن ماهيت پروتئين و ديگر مولكول هاي موجود در پليمر به واسطه استفاده از حلال است. (شكل 2)

**لايه سازي غشاء (**Membrane Lamination**):** لايه سازي غشاء روش هاي درماني از طريق سلول هاي كپسوله شده براي رهايش گسترده اي از محصولات به دست آمده از مولكول هاي كوچك (براي مثال، دوپامين، انكفالين ها) تا محصولاتي با ژن هاي بسيار بزرگ (مانند فاكتورهاي رشد، ايميونوگلوبولين ها) را در بر مي گيرد. رهايش مواد فعال در مناطق خاصي از بدن به طور سنتي توسط كپسول هاي پليمري تخريب پذير و غير تخريب پذير كه حاوي يك يا چند دارو هستند احاطه شده است. در اين حوزه مواد در حين ساخت با يك ماتريس پليمري تركيب شده و سپس بعد از مدت زماني مشخص از ميان ماده (diffusion) و يا در خلال تخريب ماده (erusion) آزاد مي شوند. در اين جا كنترل مناسب كنتيك هاي آزاد شده از اهميت خاصي برخوردار است. يك مثال در اين مورد كنتيك هاي رها شده مرتبه صفر به دست آمده از ميله هاي كوپليمر استات اتيلن- ونيل (EVAc) به كار رفته در رهايش عامل هاي شيمي درماني در مغز است. در طول دو دهه اخير محققان تلاش كرده اند كه مواد را از ناقل هاي رهايش هيبريدي زيست مصنوعي (bioartificial) كه شامل لايه هاي غشا بر سطح اجزاء سلولي كپسوله شده كه درون غشا هستند آزاد كنند. كاربرد و هدف اصلي سلول هاي كپسوله شده، درمان دردهاي مزمن بيماري پاركينسون و ديابت نوع I، همچنين ناتواني هاي ديگر ناشي از افت ترشح عملكرد سلول است كه با كاشت اندام يا درمان هاي دارويي به طور كامل قابل مداوا نيستند. كپسوله كردن بافت عموما به دو شكل انجام مي گيرد: لايه بندي غشا ميكروكپسوله و ماكرو متخلخل در ميكرو كپسوله سازي يك يا چند سلول با پراكندگي‌هاي كروي فراوان (با قطر 100-300 nm) كپسوله مي شوند. در ماكرو كپسوله سازي تعداد زيادي از سلول ها يا توده هاي سلولي در يك يا چند كپسول نسبتاً بزرگ كاشته مي شوند. مزيت روش دوم، پايداري شيميايي و مكانيكي و سادگي بازيافت در صورت نياز است. اولين دستگاهي كه به اين روش تأئيديه ايالت متحده را كسب كرده است دستگاهي به نام كبديار (Liver assist)