جهت خرید فایل به سایت www.kandoocn.com مراجعه نمایید یا با شماره های ۰۹۳۶۶۰۲۷۴۱۷ و ۰۹۳۰۳۵۲۲۸۸۶ تماس حاصل نمایید

مهندسی بافت

پیدایش مهندسی بافت به عنوان یک رشته تحصیلی دانشگاهی و صنعت جهانی در حدود ۱۰ سال پیش، فرصت های بی نظیری را در جهت توسعه معالجات پیشرفته برای درمان بیماریهای ارثی یا اکتسابی بوجود آورده است.

مهندسی بافت ترکیبات نوین سلول ها، بیومواد بی یاخته (غیر سلولی) داروها، فراورده های ژنی، ژن های قابل طراحی، تشخیص، ساخت و رهایش همزمان یا ترتیبی عامل های درمانی را در بر می گیرد.

تعریف مهندسی بافت: مهندسی بافت از ترکیب علم بیولوژی مواد و علم مهندسی یا به عبارتی Biotech جهت بیان ارتباطات ساختاری بافت های فیزیولوژیکی و طبیعی پستانداران در راستای توسعه روشهای نوین ترمیم بافت و جایگزین سازی بافت تشکیل شده است.

در حقیقت مهندسی بافت با استفاده از روش های درمانی متنوع اندام های مصنوعی زیستی، ناتوانی اندامی را درمان کرده و هدف جایگزینی بافت را به جای اندام های معیوب یا از کار افتاده دنبال می کند.

انواع فرایند مهندسی بافت

۱- بیوپسی سلول های بافت نمونه

۲- انجام آزمون های ایمنی و ذخیره سازی کاشتنی

۳- کشت سلولها بر روی داربست پلیمری شامل فاکتورهای رشد و ...

۴- فراکاشت (transplant) بافت تهیه شده.

۱-بیوپسی سلول های بافت نمونه

بسته به اینکه برداشت سلول از بافت خود شخص (allogenic Cells) یا بافت بیگانه (Xenogenic Cells) باشد. شرایط آزمون ایمنی متفاوت خواهد بود.

الف- بیوپسی سلول از خود فرد: در این حالت موارد ایمنی شخص دریافت کننده به کسب عامل های غیر موروثی (میکروبی، ویروسی، بیماری زا) در آزمایشگاه محدود می شود.

جهت خرید فایل به سایت www.kandoocn.com مراجعه نمایید یا با شماره های ۰۹۳۶۶۰۲۷۴۱۷ و ۰۹۳۰۳۵۲۲۸۸۶ تماس حاصل نمایید

ب- بیوپسی سلول از بافت بیگانه: شرایط آزمون در صورتی که بافت از فرد فوت شده یا اهدا کننده زنده به دست آید، تفاوت دارد. در این حالت سلول ها تا زمان تعیین ایمنی نهایی در یخچال و شرایط سرد نگهداری می شوند. (قرنطینه) . استاندارهای ایمنی جهت نگهداری اعضاء معمولی بدن انسان برای بافت های Xenografts مشابه بانک خون بوده و نیازمند بررسی اهدا کننده از جنبه های مختلف بیماری زایی است که از آن جمله می توان ویروس HIV و انواع هپاتیت B و C را نام برد. علاوه بر مسائل ایمنی مربوط به انتقال عوامل بیماری زا ایمنی شناسی و پایداری بردارهای ژن ها تغییر یافته نیز باید مورد ارزیابی قرار گیرد. همچنین در صورتی که سلول های کاشته شده از نظر ژنتیکی اصلاح شده باشند پاسخ شخص دریافت کننده به فنوتیپ تغییر یافته سلول ها نیازمند مطالعه و بررسی خواهد داشت.

پس از آزاد شدن بافت ها از قرنطینه پردازش مهندسی بافت آغاز می شود.

۲- انجام آزمون های ایمنی و ذخیره سازی کاشتی

بافت های مشتق شده از خود شخص معمولاً تحت آزمون بیماری های خونی مادر زادی قرار نمی گیرند. پردازش بافت ها جهت کشت سلولی یا ذخیره سازی مستقیم باید همراه با ایمنی کارکنان آزمایشگاه باشد. مسئله دیگر، حفاظت مواد غذایی (nutritions) با استفاده از ظروف کشت باز (برای مثال ظروف پتری) یا ظروف غیر قابل نفوذ مانند (بطری های غلطان و فلاسک های با درپوش صافی) است که خطر پراکنده شدن ماده در تماس با سلول های انسانی تست نشده را به حداقل می‌رساند.

کاشتنی های مهندسی بافت باید از نظر آلاینده های بیولوژیکی ایجاد شده در خلال پردازش برای بیماران کاملاً ایمن باشد. این تضمین بوسیله آزمون استریلیزاسیون، سمیت و قارچ در محصول نهایی قبل از آزادسازی محصول انجام می شود.

آزمون استریلیزاسیون: در محیط تیوگیلیکولات یا هر ماده تصویب شده دیگر برای بررسی میکرو ارگانیزم ها انجام می گیرد.

آزمون سمیت: بوسیله آزمایش لیمولوس آموبوسیت لیسات (LAL) انجام می گیرد.

جهت خرید فایل به سایت www.kandoocn.com مراجعه نمایید یا با شماره های ۰۹۳۶۶۰۲۷۴۱۷ و ۰۹۳۰۳۵۲۲۸۸۶ تماس حاصل نمایید

آزمون قارچ: شناسایی میکوپلاسماها (قارچ ها) توسط کشت مستقیم در محیط کشت نگهبان (Sentry cell culthure) بوسیله پیوند هیبریدیزاسیون in situ یا به وسیله آزمایش واکنش زنجیر بسپارگر (PCR) انجام می گیرد.

-اجرای آزمون استریلیزاسیون نسبتاً ساده و ارزان بوده در حالیکه آزمون های سمیت و قارچ پیچیده و گران هستند. بنابراین انجام هر آزمون در هر مرحله آماده سازی کاشتنی مهندسی بافت از نظر اقتصادی عملی نیست. بنابراین از الگوریتم نمونه برداری برای کنترل روند آماده سازی چندین کاشتنی استفاده می شود.

۳-کشت

هدف از کشت سلول های اولیه تهیه مقدا کافی از سلولهای قابل رشد واجد شرایط می باشد که تضمین کننده شباهت توزیع نهایی با توزیع یافت شده در بافت اصلی است.

محیط کشت سلولی شامل مخلوطی از مواد غذایی ضروری (نمک ها، آمینو اسیدها، ویتامین ها، کربوهیدارت ها، اسیدهای چرب) بافرها (تثبیت کننده های PH) و عناصر ردیابی به صورت مکمل فاکتورهای میتوژنیک مشتق شده از حیوان و هورمون های مصنوعی و فاکتورهای رشد می باشد. البته انواع خاصی از سلول ها برای تکثیر نیازمند هم کشتی با سلول های «خواننده (feeder)» هستند.

استفاده از کشت سلولی به عنوان مدلی برای شرایط in vivo تا حدود زیادی به الزامات زیر نیازمند است.

محل آناتومی- پاتولوژی (آسیب شناسی) - نرمالسی - درجه ایسکمی

گزینش و ایزولاسیون Selection & Isolation

ایزولاسیون: تحقیقات نشان داده است که انواع سلول های مشابه مانند سلوهای فیبروبلاست، اندوتلیال یا پری ادیپوسایت ها در محل های آناتومی مختلف دارای مشخصه های متفاوت هستند. اما این موضوع که سلول های آناتومی یک محل نیز مشخصه های متفاوت از خود نشان می دهند هنوز به خوبی شناخته شده نیست.

جهت خرید فایل به سایت www.kandoocn.com مراجعه نمایید یا با شماره های ۰۹۳۶۶۰۲۷۴۱۷ و ۰۹۳۰۳۵۲۲۸۸۶ تماس حاصل نمایید

استراتژی های مختلفی برای ایزولاسیون یا به عبارتی خارج کردن (جداسازی) سلول از بافت وجود دارد از جمله:

۱-آنزیمی
۲-مکانیکی
۳-تجزیه شیمیایی
۴- ریزش
۵-ترکیبی از بقیه

- روش آنزیمی: یکی از جدید ترین شیوه ها در ایزولاسیون سلول و تکثیر سلولی در محیط in vitro قطعه قطعه کردن بافت است. در این روش تا زمانی است که انتشار مواد غذایی و گازها محدود نشود. بافت به قطعات بسیار کوچک خرد می شود. سپس قطعات بافت در ظروف کشت بافت که با سرم جنینی گاو و یا ماتریس های دیگر پوشیده شده است، قرارداده می شود. ترکیب ماده و پوشش سطح و همچنین جداسازی انواع سلول از کلاف های مویرگی میتواند اثر قابل توجهی به نوع سلول نهایی تولید شده داشته باشد. قطعات بدست آمده بافت را برای تثبیت اتصال در زیر پوشش قرار می دهند زیرا تماس مستقیم با سطح کشت موفق explant ضروری است. در مواردی که بتوان جهت کشت، آنزیم را در معرض محیط قرار داد، بافت با غلظت آنزیمی بهینه برای مدت کوتاهی در دمای اتاق و یا برای مدت طولانی تری در دمای $4^{\circ}c$ نگهداری می شود. (جهت سازگاری). در مواردی که بافت نمونه کوچک باشد، روش های جداسازی آنزیمی یا مکانیکی بسیار شدید بوده و سلول های فراوانی از دست می روندکه ادامه کار را غیر ممکن می سازد.
- روش مکانیکی: شیوه مکانیکی قطعه کردن بافت شامل روش گردابی تکان دادن در شیکر چرخشی، پودرسازی با پیپت هایی با قطره های متفاوت، عبور بافت از میان شبکه های نایلون یا فولاد زنگ نزن و خرد کردن بافت با سوزن های نازک می شود. این فرایند تعلیق سلول را زودتر از گوارش آنزیمی ایجاد میکند. این روش ها به طور کلی برای همه بافت ها مؤثر نیستند. تشخیص نوع روش، بستگی به مقدار نیروی اعمال شده به بافت داشته که این جنبه میتواند سبب آسیب

جهت خرید فایل به سایت www.kandoocn.com مراجعه نمایید یا با شماره های ۰۹۳۶۶۰۲۷۴۱۷ و ۰۹۳۰۳۵۲۲۸۸۶ تماس حاصل نمایید

شود. زیرا سلول ها به برش حساس می باشند. بطور مثال برش سلولهای استئوبلاست جمجمه نوزاد موش سبب تغییر مورفولوژی و کاهش تدریجی کلسیم بین سلولی شود. این روش در مورد بافت های نرم مانند طحال گره های لنفی، کبد، تومورهای نرم و احتمالاً مغز قابل اجرا است. سلول های تومور خیلی مؤثرتر توسط گوارش آنزیمی جدا می شود تا روش های مکانیکی.

گزینش: گزینش بر اساس خاصیت های منحصر به فردی که یک سلول را از دیگری متمایز می کند، مانند چگالی و اندازه، نشانه گذاری، گذرراههای منحصر به فرد متابولیکی و احتیاجات غذایی انجام می شود.

-چگالی و اندازه: در سانتریفوژ نرخ ته نشینی ذرات به نیروی اعمال شده چگالی و ویسکوزیته مایع بستگی دارد. بنابراین با یک نیرو ویسکوزیته معین نرخ ته نشینی متناسب با اندازه ذرات بوده و در نتیجه نرخ ته نشینی در زمان صفر شدن اختلاف بین چگالی ذره و چگالی مایع به صفر نزدیک می شود. همچنین نرخ ته نشینی با افزایش نیروی سانتریفوژ افزایش یافته و در اثر بالا رفتن و یسکوزیته مایع کاهش می یابد.

استفاده از گرادیان جداسازنیز اجازه تشکیل محلول هایی با چگالی مناسب برای باند کردن سلول ها بر طبق چگالی شناوری(buoyant) بدون اینکه سلول ها تحت هیچ گونه تنش اسمزی یا یونی قرارداشته باشند را می دهد. ماده گرادیان قادر است که براساس چگالی یا اندازه سلول ها را تفکیک کند. برای گزینش بر مبنای چگالی، ماده گرادیان به نحوی ساخته می شود که حیطه چگالی آن، کل محدوده چگالی سلول های موجود در ترکیب را در برگیرد. چگالی یک سلول می تواند توسط خاصیت اسمزی محلول تحت تأثیر قرار گیرد.

-نشانه گذاری منحصر به فرد سلول ها (توسط مارکر):

ساختمان سلول ها در بافت ها با توجه به عملکردشان در درون سلول ناهمگن است. این ساختارها نه تنها نشانگر عملکرد منحصر به فرد سلول هاست بلکه وسیله ای برای تشخیص آنها می باشد، به خصوص اگر این ساختارها در سطح سلول باشد.

جهت خرید فایل به سایت www.kandoocn.com مراجعه نمایید یا با شماره های ۰۹۳۶۶۰۲۷۴۱۷ و ۰۹۳۰۳۵۲۲۸۸۶ تماس حاصل نمایید

- گزینش توسط سلول فلورسنت فعال شده (FACS)

گزینش توسط سلول فلورسنت فعال شده به روش سلول سنجی (سایتومتری) روان انجام می شود که یکی از پیشرفته ترین تجهیزات در جهت بهره برداری از تکنولوژی پادتن های مونوکلونال می باشد. عملکرد این دستگاه بر اساس قابلیت ایجاد جریانی از سلول های منفرد است که به طور انتخابی توسط صفحات منحرف کننده با بارهای مخالف قابل تغییر جهت هستند. در ابتدا ترکیبی از سلول ها با پادتن های مونوکلونال جفت شده با نشانه ها فلوروسنتی نگهداری می شود. سپس سلولهایی که دارای epitope مناسب هستند با پادتن های نشان دار باند می شوند. در این دستگاه ترکیب به صورت جریانی از سلولها در می آید که بوسیله مبدل لرزشی به قطره های کوچک شکسته می شوند. سپس باریکه لیزر به سلول ها تابانده شده و پرتو حاصل توسط photomultiplier دریافت می گردد. و متعاقباً پردازش لازم انجام می گیرد.سلول ها درخلال این پردازش به نحوی باردار می شوند که به خوبی توسط صفحات باردار منحرف کننده قابل انحراف باشند. پس از برخورد باریکه لیزر با سلولهای مورد نظر یک بار مختصر به صفحات منحرف کننده اعمال می شود که نتیجه آن انحراف سلول های نشان دار و از دست رفتن سلول های بدون نشان است. بطور کلی عمل گزینش در دستگاه FACS بر اساس هر گونه خصوصیت سلولی که توسط پراکندگی یا انتشار نور باشد انجام می گیرد. با توجه به پیچیدگی دستگاه عمل گزینش می تواند بر روی بیشتر از یک پارامتر انجام شود. از جمله شکل سلول، اندازه سلول، و انواع ویژگی هایی که توسط مارکر فلورنس قابل بررسی هستند.

-گزینش از طریق سلول مغناطیسی فعال شده (MACS)

این شیوه از پادتن های مونوکلونال و دیگر مولکولهای گزینش شده با خاصیت مغناطیسی برای گزینش سلول استفاده می کنند. در این روش رشته های مغناطیسی با پادتن های ثانویه گوناگونی پوشیده شده و سلول ها و رشته ها با هم پرورش می یابند. سلول های نشانه دار ویژه با اتصال به ذرات مغناطیسی پادتن ثانویه را حمل می کنند.لوله ای که ترکیب فوق را حمل می کند در مقابل مغناطیس قرارداده می شود.

جهت خرید فایل به سایت www.kandoocn.com مراجعه نمایید یا با شماره های ۰۹۳۶۶۰۲۷۴۱۷ و ۰۹۳۰۳۵۲۲۸۸۶ تماس حاصل نمایید

در نتیجه رشته های حامل سلول به سمت سلول کشیده می شوند. سلول های غیر متصل به رشته مغناطیسی را می توان به بیرون منتقل کرد، این فرایند را میتوان چندین بار تکرار نمود تا سلولهای غیر متصل به کلی خارج شوند. مثالی از این روش در مطالعات تصفیه سلول های β از جزایر لانگرهانس موش است.

-گزینش بر اساس احتیاجات غذایی.

توانایی سلولها در تکثیر و بیان مشخصه های منحصر به فرد در کشت سلولی به فاکتورهای رشد، سایتوکین ها، هورمون ها، ماتریس های برون سلولی و ترکیبات غذایی همچنین شامل تیتراسیون سطوح بهینه کلیه اجزاء ماده می شود.

سلولهای مختلف ارگانیزم چند سلولی بوسیله مایع برون سلولی حاوی اکسیژن دی اکسید کربن، گلوکوز، لاکتیت، آمینو اسیدها و مواد غذایی مهم دیگر، فاکتورهای رشد و هورمون های مشتق شده از پلاسما و از سلول های محیط احاطه شده اند. از آنجا که سلول های مختلف خصوصیات متابولیسمی متفاوت دارند، این محیط ها نیز متفاوت خواهند بود. برای مثال، فیبروبلاستها و کراتینوسایت های یک نمونه پوست در محیط های یکسان تکثیر نمی شوند. تفاوت در غلظت کلیسم و آدنین ظاهراً مؤثرترین عامل در رشد انتخابی می باشند. رشد بهینه کراتینوسایت ها در غلظت‌های نسبتاً کم کلسیم رخ می دهد. غلظت کلسیم بهینه برای فیبروبلاست ها سبب لایه لایه شدن کراتینوسایت ها شده و آنها دیگر قابلیت عبور سریال را در زمانی که غلظت بهینه کلسیم برای کراتینوسایت ها در کمک به تکثیر فیبروبلاست بسیار کم است، نخواهند داشت. همچنین سلولهای اپیتلیال پستانی و فیبروبلاست تها توسط عکس العمل های متفاوت شان نسبت به شرایط زیر بسته بندی و اجزاء ماده از همدیگر تشخیص داده میشوند. کلیسم اثر قابل ملاحظه ای بر وضعیت فنوتیپ سلول اپیتال می گذارد. غلظت نسبتاً بالای کلسیم سبب لایه لایه شدن سلول ها شده و مثلاً در سلول های اپیتلیال مری موش عمل گزینش را آسان می کند. سرم نیز می‌تواند سلولهای اپیتلیال را از هم جدا کند، برای مثال سلول های اپیتال نایژک یک

جهت خرید فایل به سایت www.kandoocn.com مراجعه نمایید یا با شماره های ۰۹۳۶۶۰۲۷۴۱۷ و ۰۹۳۰۳۵۲۲۸۸۶ تماس حاصل نمایید

انسان طبیعی در حضور سرم به صورت پوسته پوسته جدا شده درحالیکه کارسینوم ریه در حضور سرم جدا نمی‌شود.

www.kandoocn.com

جهت خرید فایل به سایت www.kandoocn.com مراجعه نمایید یا با شماره های ۰۹۳۶۶۰۲۷۴۱۷ و ۰۹۳۰۳۵۲۲۸۸۶ تماس حاصل نمایید

۱-قالب گیری حلال Solvent Casting

برای ساخت صفحات صاف و لوله های نازک و یا ایجاد ترکیبات پیچیده تر توسط قراردادن صفحات صاف بر روی یکدیگر به کار می رود.

۲-لایه سازی غشاء Membrane Lamination

برای درمان سلولهای کپسوله شده برای رهایش دامنه گسترده ای از محصولات بدست آمده از مولکولهای کوچک (مانند دوپامین) تا محصولاتی با ژن های بسیار بزرگ (مانند فاکتورهای رشد)

۳-انجماد- خشک سازی Freeze - Drying

شامل داربست های PLG بسیار تخلخل (بیش از ۹۰٪) با قابلیت رشد پایه پروتئینی و توانایی کنترل خلل و فرج هایی به اندازه ۲۰ تا ۲۰۰ mm

۴-اشکال کامپوزیت پلیمر- سرامیک Polymeric - Ceramic Composite Forms

به عنوان گزینه ای برای نسنج خود پیوند و دگر پیوند به عنوان جایگزین بافت سخت در کاربردهای دندانی و ارتوپدی.

۵-جداسازی فاز Phase Seperation

برای ایجاد ماتریس های نانو رشته های با قطری به مقیاس نانومتر و ساختار ماکرو متخلخل

۶-پلیمریزاسیون Polymerization

این روش از پلیمریزاسیون PHEMA و PHPMA استفاده کرده و در کاربرد های غضروف بینی ، افزایش حجم پستان ونگهدارنده بافت بین قرنیه و هسته مرکزی شفاف چشم بکار میرود.

جهت خرید فایل به سایت www.kandoocn.com مراجعه نمایید یا با شماره های ۰۹۳۶۶۰۲۷۴۱۷ و ۰۹۳۰۳۵۲۲۸۸۶ تماس حاصل نمایید

منـابع

۱- Methods In Tissue Engineering

۲- Internet Resosurces.

WWW. Tissueengineering. Com

WWW. Bme . sunysb . edu / bme / research

WWW. Columc . missouri . edu / images

WWW. Guide . stanford . edu / RRD . html

WWW. Unmed . edu / main / experts / exper ۴۲ .htm

www.kandoocn.com