# کالج پروژه

www.collegeprozheh.ir

دانلود پروژه های دانشگاهی

بانک موضوعات پایان نامه

دانلود مقالات انگلیسی با ترجمه فارسی

آموزش نگارش پایان نامه ، مقاله ، پروپوزال

دانلود جزوه و نمونه سوالات استخدامی

دانلود پرسشنامه

**دانشگاه آزاد اسلامی**
**واحد علوم و تحقیقات**
دانشکده مهندسی پزشکی

سمینار کارشناسی ارشد مهندسی پزشکی- بیومواد

عنوان سمینار:

# ساخت داربست های مهندسی بافت به روش ***Gas Foaming***

استاد:
سرکار خانم دکتر اورنگ

تهیه کننده:
مهدی کاظم زاده

اردیبهشت ۱۳۸۲

فهرست


| عنوان | صفحه |
| --- | --- |
| ➢ پیشگفتار | ۱ |
| ➢ نتایج قانونمند و استاندارد شده | ۵ |
| ➢ گزینش و جداسازی سلول | ۳۵ |
| ➢ تولید داربست‌های پلیمری: قالب گیری حلال | ۷۲ |
| ➢ تولید داربست‌های پلیمری: لایه سازی غشاء | ۸۴ |
| ➢ تولید داربست‌های پلیمری: انجماد - خشک سازی | ۱۰۶ |
| ➢ تولید داربست‌های پلیمری: اشکال کامپوزیت پلیمر- سرامیک | ۱۲۱ |
| ➢ تولید داربست‌های پلیمری: جداسازی فاز | ۱۴۲ |
| ➢ تولید داربست‌های پلیمری: پلیمریزاسیون (بسپارش) | ۱۶۲ |
| ➢ تولید داربست‌های پلیمری: پردازش اسفنج گازی | ۱۷۶ |
| ➢ بر هم کنش‌های سلولی سطح مصنوعی: بیومواد خود مجتمع | ۱۹۲ |
| ➢ بر هم کنش‌های سلولی سطح مصنوعی: چسبندگی سلول هدف | ۲۱۶ |

## پیش گفتار

یکی از معضلات بزرگی که علم پزشکی از دیرباز با آن درگیر بوده است، ارائه درمانی قطعی برای بازسازی بافت های از کار افتاده و یا معیوب است. متداول ترین شیوه در درمان این نوع بافت ها، روش سنتی پیوند است که خود مشکلات عدیده ای را به دنبال دارد. از جمله این مشکلات می توان به کمبود عضو اهدائی، هزینه بالا و اثرات جانبی حاصل از پیوند بافت بیگانه (Allograft) که مهمترین آنها همان پس زنی بافت توسط بدن پذیرنده است اشاره کرد. این محدودیت ها دانشمندان را بر آن داشت تا راه حلی مناسب برای این معضل بیابند.

مهندسی بافت با عمر حدوده ۱ ساله خود روشی نوید بخش در تولید گزینه های بیولوژیکی برای کاشتنی ها (Implants) و پروتزها ارائه کرده و وعده بزرگ تهیه اندام های کاملاً عملیاتی برای رفع مشکل کمبود عضو اهدائی را می دهد. اهداف مهندسی بافت فراهم سازی اندام های کارآمد یا جایگزین های قسمتی از بافت برای بیمارانی با ضعف یا از کارافتادگی اندام و یا بیماری های حاد است که این امر با استفاده از روش‌های درمانی متنوع اندام مصنوعی- زیستی تحقق می یابد. بنا به تعریف، مهندسی بافت رشته ای است که 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 روش های نوین ترمیم بافت و جایگزین سازی بافت، توسعه یافته است. مهندسی بافت شامل مباحثی نظیر ترکیبات نوین سلول ها، بیومواد غیرسلولی، داروها، فرآورده های ژنی یا ژن هایی می باشد که قابل طراحی، تشخیص و ساخت بوده و امکان رهایش آنها به طور همزمان یا ترتیبی به عنوان عامل های درمانی میسر باشد.

اگرچه داروها یا بیومواد غیر سلولی به مواد بسیاری اطلاق می گردد اما درمان های منهدسی بافت در واقع منحصر به فرد هستند.

**داربست مهندسی بافت**

در مهندسی بافت، سلول ها بر روی یک بستر از جنس پلیمر زیست تخریب پذیر بسیار متخلخل استقرار یافته، رشد و تکثیر می یابند. روند رشد این سلول ها در جهت بازسازی بافت در سه بعد است. یکی از اساسی ترین قسمت های مهندسی بافت، داربست های زیست تخریب پذیر هستند که تحت نام Scaffold شناخته می شوند. این داربست ها در حقیقت بستری متخلخل با ساختاری شبیه به ماتریس برون سلولی بافت (ECM) هستند که رشد سلول را به سمت تشکیل بافت مورد نظر جهت می دهند. از آنجا کلیه سلول های بدن به غیر از سلول های سیستم خون رسانی و بافت های جنینی خاص بر روی ECM رشد می کنند، ایجاد یک بستر مصنوعی در محیط in vitro بسیار اهمیت دارد. با رشد سلول ها بر روی داربست، داربست تخریب می شود. جنس این داربست ها پلیمر و در بعضی موارد کامپوزیت پلیمر- سرامیک است. پلیمر های متداول مورد استفاده در مهندسی بافت در جدول ۱ آورده شده است.

پر استفاده ترین پلیمر ها در مهندسی بافت پلیمرهای خانواده پلی- $\alpha$ هیدروکسی اسید شامل PLA , PGA و PLGA هستند که به طور گسترده بـه عنـوان داربسـت مـورد استفاده قرار می گیرند. داربسـت هـای کامپوزیـت پلیمـر-سـرامیک در مـوارد ارتوپـدی استفاده شده و از مهمترین سرامیک های به کار رفته در آنها می توان بـه تـری کلسـیم فسفات، تتراکلسیم فسفات و هیدورکسی آپاتیت اشاره کرد. علت به کـارگیری سـرامیک ها در داربست، افزایش استحکام پلیمر، چسبندگی به اسـتخوان و قابلیـت تحـرک رشـد درون استخوان است. بهینه ترین کامپوزیت در این مورد ترکیب PLGA و هیدروکسـی آپاتیت شناخته می شود.

مکانیزم تخریب PLA , PGA و کوپلیمر هـای آنهـا بـر اسـاس هیـدرولیز تصـادفی باندهای استری زنجیره پلیمری است. محصول نهایی این تخریب آب و $CO_2$ اسـت کـه به آسانی از بدن دفع می شوند. یک داربست ایده آل باید دارای تخلخـل مناسـب بـرای انتشار مواد غذایی بوده و امکان پاکسازی مواد زائد را داشـته و دارای پایـداری مکـانیکی مناسبی جهت تثبیت و انتقال بار باشد. علاوه بر این، شیمی سطح ماده بایـد چسـبندگی سلول و علامت دهی داخل سـلولی (intracellular signaling) را بـه نحـوی ارتقـاء دهد که سلول ها فنوتیپ طبیعی خودشان را بروز دهند. برای رشد سریع سلول، داربست باید دارای میکروساختار بهینه باشد، فاکتورهای مهم یک داربست عبارتند از اندازه خلـل و فرج، شکل و مساحت ویژه سطح. خلل و فرج موجود در داربست در حقیقت مسـیرهای غذارسانی سلول ها و دفع پسماندهای سلولی هستند. برای مثال خلل و فرج بهینه بـرای رشد سلولهای فیبروبلاست درون رسـت $45\mu m$، خلـل و فـرج مناسـب بـرای بازسـازی پوست یک پستاندار بالغ $\mu m$ 20-125 , $\mu m$ 30-350 برای بازسازی استخوان اسـت.

بنابراین هدف اصلی در ساخت داربست، کنترل دقیق اندازه خلل و فرج و تخلخل است. مورد دیگر نحوه ایجاد چسبندگی مناسب سلول به سطح داربست است که در این مورد هم شیوه های متفاوتی به کار برده می شود، یکی از ساده ترین شیوه ها به کارگیری رشته های کوچک پپتیدی در پروتئین های ECM است که به عنوان واسطه مسئولیت چسبندگی سلول به بیومواد را بر عهده دارند. اجزاء گوناگون سرم قابل حل (پروتئین ها، پپتیدها) و رشته RGD برای تسهیل چسبندگی سلول شناخته شده اند.

**روش های ساخت داربست**

بافت های مختلف باهم تفاوت دارد، داربست های مصنوعی به کار ECM از آنجا که رفته برای هر بافت نیز با هم فرق می‌کند. تهیه داربست هایی با ماتریس های مختلف نیازمند به کارگیری روش های ساخت متفاوتی است که هر یک شیوه و کاربرد منحصر به خود را دارد. از جمله این روش ها می توان به

Melt Casting , Freeze Drying , Membrane Lamination , Solvent Casting

Gas Foaming , Polymerization, Phase Separation

اشاره کرد. شکل داربست یا به عبارتی Morphology آن باید دقیقاً شبیه بافت معیوب باشد. برای شبیه سازی شکل داربست با قسمت ناقص اندام (defect) از شیوه های کامپیوتری همانند CAD استفاده می شود. داربست پردازش شده بر اساس این الگو مورفولوژی دقیقی از ناحیه معیوب بافت خواهد داشت.

در ذیل خلاصه ای از روش های مهم ساخت داربست آمده است.

**قالب گیری حلال (Solvent Casting)**: قالب گیری حلال یک روش ساده برای تولید داربست مهندسی بافت است. در این روش پلیمر در یک حلال مناسب حل شده و

در قالب ریخته می شود. سپس حلال حذف گردیده و حالت پلیمر را در شکل مورد نظر حفظ می‌کند. این شیوه به شکل های قابل حصول محدود می شود. غالباً تنها طرح های قابل شکل‌گیری در این روش صفحات صاف و لوله ها هستند. البته با قراردادن صفحات صاف روی هم نیز می توان به اشکال پیچیده تر دست یافت. در این شیوه می توان با شستن ذراتی مانند کریستال های نمک کاشته شده درون پلیمر که Progen خوانده می شود، داربست را به صورت متخلخل درآورد. مزیت اصلی قالب گیری حلال سادگی ساخت بدون احتیاج به تجهیزات خاص است. همچنین از آنجا که عمل ساخت در دمای اتاق انجام می گیرد نرخ تخریب پلیمر زیست تخریب پذیر به روش قالب گیری حلال کمتر از فیلم های قالب گرفته شده از طریق تراکم خواهد بود. عیب اصلی قالب گیری حلال باقی ماندن احتمالی حلال سمی درون پلیمر است. برای رفع این عیب باید به پلیمر اجازه داد تا کاملاً خشک شده و سپس با استفاده از خلاء حلال باقی مانده را خارج نمود. عیب دیگر این روش احتمال تغییر یافتن ماهیت پروتئین و دیگر مولکول های موجود در پلیمر به واسطه استفاده از حلال است. (شکل ۲)

**لایه سازی غشاء** (Membrane Lamination): لایه سازی غشاء روش های درمانی از طریق سلول های کپسوله شده برای رهایش گسترده ای از محصولات به دست آمده از مولکول های کوچک (برای مثال، دوپامین، انکفالین ها) تا محصولاتی با ژن های بسیار

بزرگ (مانند فاکتورهای رشد، ایمیونوگلوبولین ها) را در بر می گیرد. رهایش مـواد فعـال در مناطق خاصی از بدن به طور سنتی توسط کپسول های پلیمری تخریب پـذیر و غیـر تخریب پذیر که حاوی یک یا چند دارو هستند احاطه شده است. در این حـوزه مـواد در حین ساخت با یک ماتریس پلیمری ترکیب شده و سپس بعد از مدت زمانی مشـخص از میان ماده (diffusion) و یا در خلال تخریب ماده (erusion) آزاد می شـوند. در ایـن جا کنترل مناسب کنتیک های آزاد شده از اهمیت خاصی برخوردار است. یـک مثـال در این مورد کنتیک های رها شده مرتبه صفر به دست آمده از میله هـای کـوپلیمر اسـتات اتیلن- ونیل (EVAc) به کار رفته در رهایش عامل های شیمی درمانی در مغز است. در طول دو دهه اخیر محققان تلاش کرده اند که مـواد را از ناقـل هـای رهـایش هیبریـدی زیست مصنوعی (bioartificial) که شامل لایه های غشا بر سطح اجزاء سلولی کپسوله شده که درون غشا هستند آزاد کنند. کاربرد و هدف اصـلی سـلول هـای کپسـوله شـده، درمان دردهای مزمن بیماری پارکینسون و دیابت نـوع I، همچنـین نـاتوانی هـای دیگـر ناشی از افت ترشح عملکرد سلول است که با کاشت اندام یا درمان های دارویی بـه طـور کامل قابل مداوا نیستند. کپسوله کردن بافت عموما به دو شـکل انجـام مـی گیـرد: لایـه بندی غشا میکروکپسوله و ماکرو متخلخل در میکرو کپسوله سازی یک یا چند سلول بـا پراکندگی‌های کروی فـراوان (بـا قطـر 100-300 nm) کپسـوله مـی شـوند. در مـاکرو کپسوله سازی تعداد زیادی از سلول ها یا توده های سلولی در یک یا چند کپسول نسـبتاً بزرگ کاشته می شوند. مزیت روش دوم، پایداری شیمیایی و مکانیکی و سادگی بازیافـت در صورت نیاز است. اولین دستگاهی که به این روش تأئیدیه ایالت متحده را کسب کرده است دستگاهی به نام کبدیار (Liver assist)

**انجماد- خشک سازی (Freeze- Drying)**: این شیوه بـرای تولیـد داربسـت هـای PLG بسیار متخلخل با مزیت قابلیت تلفیق رشد پایه پروتئینی و فاکتورهای تفاضلی در زمان پردازش، معرفی شده است. این شیوه قادر به ایجاد داربست هایی با تخلخل بیشـتر از ۹۰٪ و کنترل خلاء و فرج هایی به انـدازه $\mu m$ 200 -20 اسـت. ایـن روش پـردازش شامل ایجاد یک امولسیون از طریق هموژنیزه کردن محلـول پلیمـر- حـلال و آب، سـرد کردن سریع امولسیون جهت حفظ ساختار حالت مایع و حذف حلال و آب در اثر انجماد و خشک سازی است. (شکل ۳)

در این فرایند، در ابتدا دو محلول مخلوط شدنی فاز آب و یـک فـاز آلـی را تشـکیل مـی دهند. فاز آلی توسط حل شدن PLG با ویسکوزیته ذاتی ویژه $\eta_{inh}$در MC ایجاد مـی شود. فاکتورهای زیست فعال و عوامل فعال را می توان در این فاز حل کرد. فاز آب از آب فوق خالص به همراه آب یا بدون افزودنی هـای حـل شـدنی مختلـف ماننـد فاکتورهـای زیست فعال هیدروفیل تشکیل شده است. سـپس فـاز آلـی و آب در یـک لولـه آزمـایش

شیشه ای که 40% حجم آن آب است به هم اضافه شده و دو لایه نامخلوط را شکل می‌دهند. این لایه های نامخلوط به وسیله یک همگن ساز دستی که در سرعت های مختلف نتظیم می شود همگن شده و در یک قالب مناسب (برای مثال، شیشه یا مس) ریخته می شود سپس با گذاشتن سریع قالب بر روی بلوک مس در کنار نیتروژن مایع با دمای ($-196^0C$ ~) سرد می شود. نمونه های فوق در یک دستگاه انجماد- خشک سازی سفارشی motorr 20 و دمای آغازین $-110^0C$ منجمد و خشک می شوند. بعد از اینکه دمای داخل امولسیون برای یک ساعت در $-110^0C$ به تعادل رسید، دستگاه تراکم ساز خاموش شده و دستگاه متراکم ساز و امولسیون به آرامی در طی 12h تا دمای اطاق گرم می شوند. نمونه های به دست آمده در یک دستگاه خشک ساز خلا در دمای اتاق برای ذخیره سازی و حذف بیشتر هر گونه حلال باقیمانده قرارداده می شوند.

**جداسازی فاز (Phase Separation)**: این روش بر اساس جداسازی فاز مایع- جامد در محلول پلیمر در اثر بلورینگی حلال عمل می‌کند. اسفنج به دست آمده در اثر فرآیند جداسازی فاز مایع- جامد دارای مورفولوژی لوله ای شکل ناهمگون با یک ساختار نردبانی شکل داخلی است. اسفنج فوق با شبکه ای از خلل و فرج های پیوسته توسط القای گرمایی جداسازی فاز مایع- مایع ایجاد می شود. ماتریس رشته ای مصنوعی با فیبرهایی با قطری به مقیاس نانومتر توسط فرآیند ژل سازی به وسیله القای گرمایی تهیه می شوند. ماتریس های نانو رشته ای با ساختار ماکرومتخلخل به وسیله ترکیب روش پالایش پروژن و فرآیند ژل سازی به وسیله القای گرمایی به دست می آیند. اسفنج های متخلخل پلیمرهای زیست تخریب پذیر و آپاتیت های استخوانی معدنی شکل توسط فرآیند جداسازی فاز مایع- جامد و فرآیند زیست تقلیدی تهیه می شوند.

جداسازی فاز محلول پلیمر را می توان به چندین روش ایجاد کرد، که شامل جداسازی از طریق غیر حلال، جداسازی فاز از طریق شیمیایی و جداسازی فاز از طریق گرمایی (TIPS) می شود. در فرایند TIPS که یک روش نسبتاً جدید برای تهیه غشاهای متخلخل است، دمای محلول پلیمر کاهش یافته و جداسازی فاز رخ می دهد که فاز اول آن غنی از پلیمر و فاز دوم فقیر از پلیمر است. بعد از خارج سازی حلال از طریق عصاره گیری، تبخیر یا تصعید، پلیمر موجود در فاز غنی از پلیمر به شکل اسکلت سخت شده و فضاهای اشغال شده توسط حلال در فاز عاری از پلیمر به صورت خلل و فرج اسفنج پلیمر در می آیند. غشاهای به دست آمده از این فرایند معمولاً دارای خلل و فرجی با قطر چندین میکرومتر بوده و معمولاً برای داربست های مهندسی بافت مناسب نیستند. (شکل ۴)

**بسپارش (Ploymerization)**: داربست های به دست آمده از طریق روش بسپارش کاندیدهای خوبی برای مهندسی بافت به شمار رفته و به دلیل سهولت ساخت نسبت به روش های دیگر ساخت داربست ارجحیت دارند. با وجودیکه پلیمرهای متخلخلی را می توان به این روش بسپارش کرد اما تعداد کمی از آنها منجر به داربست های متخلخل می شوند. در این روش ترکیب منومر در حضور حلالی که منومر در آن قابل حل ولی پلیمر غیر قابل حل است، درون قالب بسپارش می شود. گذار حلالیت در خلال بسپارش منجر

به دو فاز می گردد، ساختار زیستی پیوسته پلیمر و حلال. بدین ترتیب داربست تولیده شده در نتیجه بسپارش برای ایجاد خلل و فرج های درهم نیازی به پالایش پروژن ندارند. اسفنج ها یا داربست های PHEMA ساخته شده به این روش دارای قابلیت دخول سلول بوده و حلال مازاد آنها معمولاً آب است. اسفنج های PHEMA به منظور افزایش حجم پستان و جایگزینی غضروف بینی نگهدارنده بین بافت قرنیه و هسته مرکزی و جایگزین بافت های نرم به کار برده می شوند. یکی از معایب این اسفنج‌ها، آهکی شدن آنها پس از مرور زمان است. این اسفنج ها قابلیت تحمل اتوکلاو را داشته و به سادگی به اشکال مختلف تغییر فرم می دهند.

**اسفنج سازی گازی (Gas Foaming):** روش اسفنج سازی گازی به دلیل قابلیت تخلخل پذیری بالا بدون به کارگیری دمای بالا یا حلال آلی حائز اهمیت است. با حذف دمای بالا و حلال آلی می توان مولکول های زیست فعال بزرگ شامل فاکتورهای رشد را با حفظ فعالیت زیستی در پلیمر مجتمع ساخت. پلیمری که در این روش پردازش می شود PLGA است. در این روش گرانول های PLGA و پروژن که معمولاً کلرید سدیم است در یک کانتینر با فشار بالا (در حدود 5.5 Mpa) با$CO_2$ به مدت 24h به تعادل می رسند. در این مدت گاز $CO_2$ در پلیمر که اکنون در تعادل ترمودینامیکی به حالت سیال در آمده است حل می شود. سپس فشار را به سرعت کاهش می دهند. افت سریع فشار سبب به هم خوردن تعادل ترمودینامیکی و در نتیجه تشکیل هسته حباب های $CO_2$ در پلیمر می گردد. پلیمر که پس ازکاهش فشار تمایل به رسیدن به حالت جامد دارد به شکل اسفنج منبسط میشود. ذرات پلیمری منفرد در اطراف ذرات پروژن منبسط شده و پس از پالایش پروژن فوق یک داربست بسیار متخلخل با خلل و فرج های باز

کنترل شده به دست می آید. از جمله مزایـای ایـن روش کنتـرل انـدازه خلـل و فـرج و قابلیت ایجاد داربست های بزرگ، عدم استفاده از حلال آلی و دمای بالا را می تـوان نـام برد. (شکل ۵)

شکل ۶، طرح بسیار ساده ای از فرآیند مهندسی بافت را نمـایش مـی دهـد. در ابتـدایی ترین مرحله این نمودار، بافت از طریق biopsy خارج می گـردد. بافـت فـوق مـی‌توانـد Autograft (بافت خود فرد) یا Allograft (بافت فرد دیگـر) یـا Xenograft (بافـت گونه دیگر) باشد. بافت به دست آمده در این مرحله همانند بانک خون وارد قرنطینه شده و از جنبه‌های مختلف بیمـاری زایـی ماننـد وجـود ویـروس HIV یـا هپاتیـت C,B، و تغییرات بردارهای ژنی مورد بررسی قرار می گیرند. بافت ها تا زمان تعیین ایمنی نهـایی در قرنطینه و شرایط سرد نگهداری می شوند.

مرحله بعد شامل تست های ایمنی است که شـامل آزمـون بافـت از نظـر Sterility در محیط تیوگلیکولات یا مواد تصویب شده دیگـر،تعیین سـمیت توسـط آزمـایش LAL و تست میکوپلاسما توسط کشت مستقیم در محیط Sentry Cell Culture می‌شود.

پس از مراحل فوق پردازش بافت که شامل دو قسمت گزینش و جداسازی سلول از بافت است شروع می گـردد. در مرحلـه جداسـازی، سـلول‌هـا از طـرق مختلـف از بافـت جـدا می‌شوند. این طرق شامل روش‌های برون کاشت، آنزیمـی، مکـانیکی، تجزیـه شـیمیایی،

تزریقی و ترکیبی می‌شود. گزینش سلولی بر اساس خاصیت منحصر بـه فـردی کـه یـک سلول را از دیگری متمایز می کنـد ماننـد چگـالی، انـدازه، نشـانه گـذاری، گـذرگاههای منحصر به فرد متابولیکی و احتیاجات غذایی صورت می گیرد.

سلولهای بدست آمده بر روی داربست کاشته شده و در محیط کشت سـلولی کـه شـامل مخلوطی از مواد غذایی ضروری (نمک‌ها، آمینـو اسـیدها، ویتـامین‌هـا، کربوهیـدرات‌هـا، اسیدهای چرب)، بافرها (تثبیت کننده‌ها) و عناصـر ردیـابی بصـورت مکمـل فاکتورهـای میتوژنیک مشتق شده از حیوان، هورمون‌های مصنوعی و فاکتورهای رشد می باشد قـرار می گیرد. انواع خاصی از سلولهای برای تکثیر نیازمند هم کشـتی بـا سـلولهای feeder هستند.

سلولها برای مدتی معین بر روی داربست کشت یافته و سپس در محل آنـاتومیکی مـورد نظر Transplant می شوند.

لازم به ذکر است که کلیه مراحل مهندسی بافت تحت نظارت دقیق سـازمان غـذا و دارو (FDA) صورت می پذیرد.

**مهدی کاظم زاده**

نتایج قانونمند و استاندارد شده

# REGULATORY ISSUES AND STANDARDIZATION

استیون- تی- بویس

**-پیشگفتار**

پیدایش مهندسی بافت به عنوان یک رشته تحصیلی دانشگاهی و صنعت جهانی فرصت های بی نظیری را در جهت یافتن روشهای نوین معالجه برای درمان بیماریهای مادرزادی یا اکتسابی بوجود آورده است. مهندسی بافت شامل مباحثی نظیر ترکیبات نوین سلولها، بیومواد غیر سلولی، داروها، فراورده های ژنی، یا ژنهایی می باشد که قابل طراحی تشخیص و ساخت بوده و امکان رهایش آنها به طو همزمان یا ترتیبی به عنوان عاملهای درمانی میسر باشد. اگرچه داروها یا بیومواد غیر سلولی به مواد بسیاری اطلاق می شوند اما درمانهای مهندسی بافت درواقع منحصر به فرد هستند. بنابراین فقدان استانداردهایی که توسط آنها اثر بخشی و ایمنی مورد ارزیابی قرار گیرد. مشخصه عمومی درمانهای مهندسی بافت در اوایل قرن بیست و یکم خواهد بود. علیرغم نبود استانداردهای مورد نیاز برای ارزیابی، مسئولیت اداره کل خوراک دارو ایالات متحده (FDA). در جهت حفاظت عموم از خطرات تهدید کننده سلامتی مرتبط با درمانهای تحقیقی به قوت خود باقی است. FDA انتظار دارد که درمان های تصویب شده برای استفاده در ایالات متحده ایمن و مؤثر باشد. معیارهای ایمنی برای تجهیزات پزشکی مستلزم برتری فواید احتمالی نسبت به خطرات احتمالی درمان یا بیماری درمان نشده است.

معیار اثر بخشی تجهیزات باید نشان دهنده کارآیی دستگاه برای کاربردهای هدفمند و حتی المقدور امکان استعمال و بازگرداندن نقص فیزیولوژیکی ایجاد شده توسط بیماری در بخش قابل ملاحظه ای از جمعیت هدف باشد. این استانداردهای قانونمند در مورد

درمانهای مهندسی بافت درست همانند تجهیزات پزشکی متداول داروها یا مواد بیولوژیکی استفاده می شوند. به هر حال چندگانگی در اکثر درمان های مهندسی بافت به همراه فقدان مستندات، ارزیابی FDA را در ایمنی و تأثیرپذیری آنها دشوار می‌سازد با این وجود FDA با برقراری رشهای نوین در ارزیابی ایمنی و تأثیر پذیری، به طور بسیار پویا نسبت به این پتانسیل عظیم که منافع عمومی را در راستای مهندسی بافت در بر دارد انجام وظیفه نموده است. ابتکارات جدید FDA با اتفاق نظرهمگانی با شرکت اساتید دانشگاه، صاحبان صنایع و دولت مردان با هدف ایجاد راهنما و استانداردهایی جهت ارزیابی ترکیبات و عملکرد بافت های مهندسی شده صورت گرفت. یکی از مهمترین این ابتکارات شرکت کردن FDA در یک کارگروهی با انجمن سنجش و مواد آمریکا (ASTM) برای پایه ریزی استانداردهای محصولات پزشکی و مهندسی بافت است. توسعه استانداردها توسط ASTM نوید تسهیل در فرایندهای ارزیابی معرفی بافت های مهندسی شده جهت به ارمغان آوردن منافع گوناگون پزشکی در کوتاهترین زمان ممکن و کمترین هزینه را می دهد. شرکت در تلاش ASTM به منظور توسعه استاندردها، داوطلبانه بوده و برای عموم آزاد است. این امر بیشترین امکان را در پایه ریزی استانداردهای جامع برای مهندسی بافت فراهم نموده و با استانداردهای بین المللی همخوانی دارد. همچنین پایه علمی گسترده ای در علوم پایه و پزشکی برای FDA ایجاد می‌کند. این فصل چندین موضوع ویژه ضوابط درمانهای مهندسی بافت را مورد بررسی قرار می دهد. البته این مبحث هیچ گونه سیاست یا موضع فکری را از FDA نشان نداده و در حوزه خود نیز جامع نمی باشد.

-ملاحظات ایمنی SAFETY CONSIDERATION

بدلیل تشکیل اجزای بنیادی بافت از سلولها، اکثر درمانهای مهندسی بافت شامل سلولها می شوند علاوه بر این مزیت اساسی مهندسی بافت، نگهداری یا حذف بافت اهدا شده از دریافت کننده است. تحقق این مزیت بستگی به تکثیر یک یا چند توده سلولی در شرایط خارج بدنی (in vitro) و یا درون بدنی (in vivo) دارد. تکثیر توده های سلولی به لطف روشهای مهندسی بدون نیاز به کشت سلولی خارج بدنی صورت می گیرد. بسیاری از سیستمهای کشت سلولی شامل ترکیبات مشتق شده از حیوان و سایر آلاینده های شیمیایی یا بیولوژیکی است. علاوه بر این اگر سیستم حاوی سلولهای دگرزا (allogenic) یا بیگانه را باشد انتقال عوامل اکتسابی ممکن می شود. هم بیمار و هم کارکنان آزمایشگاه باید در قبال عوامل بیماری زای احتمالی محافظت شوند به منظور حصول اطمینان کافی از ایمنی در درمان های مهندی بافت FDA استانداردهایی را که عمدتاً از مراکز تحقیقاتی و ارزیابی بیولوژیکی (CBER) به دست آمده است. را اعمال می‌کند. این استانداردها شامل موارد ذیل بوده اما تنها به آنها محدود نمی شود این موارد عبارتند از: اجزاء محیط، به دست آوردن بافت، ذخیره سازی و به کارگیری کاشتنی و سنجش ایمنی محصول نهائی.

-اجزاء محیط: MEDIA COMPONENTS

یک محیط کشت سلولی سنتی شامل مخلوطی از مواد غذایی ضروری (نمک ها، آمینواسیدها، ویتامین ها، کربوهیدرات ها، اسیدهای چرب)، بافرها، (تثبیت کننده ها) و عناصر ردیابی می باشد که با عوامل میتوژنیک مشتق شده از حیوان، هورمون های

مصنوعی، یا فاکتورهای رشد باز ترکیبی تکمیل می گردد. انواع خاص سلول ها نیز جهت تکثیر نیاز.مند کشت همزمان با سلولهای تغذیه کننده هستند. کشت سلولی سنتی با سرکوب همزمان سلولهای دیگر بافت اصلی سبب تحریک رشد انتخابی انواع سلولهای هدف می گردد. اما به دلیل اینکه درمان های مهندسی بافت می تواند در برگیرنده چنیدین نوع سلول باشد برای تکثیر انتخابی سلولهای کشت شده یا خوابانیدن ساختارهایی که شامل انواع سلولها هستند محیطهای متعددی را می توان مورد استفاده قرار داد. در نتیجه آماده سازی مواد مهندسی بافت می تواند شامل ارتباط اجزاء آنها با محیط هایی دارای فرمولاسیون های مختلف باشد. هر محیط فرمولاسیون منحصر به فردی از مواد غذایی ضروری و مکمل خود را داشته که باید به طور جداگانه‌ای مورد ملاحظه قرار گیرد و جهت ایمنی بیمار که در معرض مستقیم قرارداد به صورت ترکیب با دیگر فرمولاسیون‌ها در نظر گرفته شود. مواد غذایی ضروری می توانند حامل آلاینده‌های شیمیایی باشند که در حین فرایند پالایش زوده نشده اند سلولهای مکمل یا تغذیه کننده می توانند شامل آلاینده های بیولوژیکی باشند که سبب عفونت شده و یا از رشد سلولها برای کاشتنی نهایی جلوگیری می کنند.

هرگونه تماس با ترکیبات مشتقات حیوانی یا انسانی ممکن است سبب انتقال ژن های ایمنی دگرزا یا بیگانه زا به دریافت کننده گردد به طور کلی هر ترکیب از هر محیطی را می‌توان توسط گواهی تجزیه و تحلیل شناسائی نمود. این گواهی ترکیبات شیمیایی و آزمون های بیولوژیکی را که برای عوامل بیماری زا به وسیله FDA وضع شده است. توصیف می‌کند. گواهی تجزیه و تحلیل از طریق سازندگان اغلب محیط های تجاری در دسترس قرار داده می شوند. به طور ایده آل، کلیه محیط های به کار رفته در ساخت

کاشتنیهای مهندسی بافت باید برای تعیین ترکیباتشـان دارای درجـه خلـوص در سـطح دارویی باشند. متأسفانه تعریف این سطح بیوشیمیایی هنوز برای بسیاری از سلولهایی که در شرایط خارج بندی جهت پیوند رشد داده می شوند به دست نیامده است. با وجود این اهمیت پالایش بیوشیمیایی در محیط کشت سلولی شناخته شده و به طور وسیعی بـرای بیش از دو دهه مورد مطالعه قرار گرفته است. در نتیجه تاکنون نمونـه هـای بسـیاری از محیط های بیوشیمیایی برای کشت ترکیبی و یا انتخابی سـلولهای انسـان تعریـف شـده است. اصول پایه ریزی شده توسط این موارد باید به وسیله محققان و توسـعه دهنـدگان کاشتنی های مهندسی بافت اعمال شود تا استعمال ترکیبات مشتقات حیوانی یا انسـانی در کشت سلولی کاهش یافته یا حذف گردید. درجه داروی محـیط هـا بـرای محصـولات پزشـکی مهندسـی بافـت یـک هـدف قابـل دسـیابی بـوده و در دسـترس بـودن چنـین محصولاتی احتمال ایمنی بیماران را افزایش می دهد. البته محیطهای از این نوع ممکـن است هزینه قابل ملاحظه ای را به ساخت کاشتنی های مهندسی بافت بیافزایند.

-اکتساب بافت TISSUE ACQUISITION

تنوع و انعطاف پذیری روشهای مهندسی بافت امکان افزودن سـلولهای اتولوگ(خـودی)، آلوژنیک (دگرزا) یا زنوژینک (بیگانه زا) را به کاشتنیهای ساخته شده فراهم نموده اسـت. نکات ایمنی دریافت کننده سلولهای اتولوگ خودی به طور عمـومی بـه دریافـت عوامـل اکتسابی(میکروبی، ویروسی، عفونی) در آزمایشگاه محدود می‌شود. البته تلفیق سـلولهای دگرزا یا بیگانه زا از امکان انتقال عوامل بیماری زا را اهدا کننده های غیر اتولـوگ فـراهم می‌کند. برای بافت های الوژیک، استانداردهای ایمنی جهت نگهـداری متـداول بافتهـای انسانی با عصاره های بافت مقرر شده است. این اسـتانداردها مشـابه بانـک خـون بـوده و

نیازمند بررسی اهدا کننده ها از جنبه های مختلف بیماری زایی است. که از آن جمله می‌توان ویروس ضد ایمنی انسان (HIV) و انواع هپاتیت B و C را نام برد.

در فرآیند های ساخت دستگاههای مهندسی بافت تعیین وضعیت مساعد اهدا کننده نیازمند تلفیق آزمون های بیماری زایی با فرایند های بهتر آزمون های ساخت (GMPS) دارد. مشابه بانک های بافت چه بافتها برای کاشتن به کاربرده شوند، و چه طرد شوند، به مهندسان بافت جهت ثبت و ردیابی تاریخچه بافتها از زمان اهدا شدن در خلال فرآیند تا نگهداری و تنظیم نهایی نیاز خواهد بود.

چنانچه بافت اهدا شده برای بررسی بیماری زایی فرا خوانده شود مسئولیت آگاهی دادن به پزشکی که وظیفه کاشتن بافت توزیع شده را دارد بر عهده توزیع کننده بافت خواهد بود. مهندسان بافت تا زمانی که کاشتنی های مهندسی بافت حاوی اجزاء باشند، به عنوان صاحبان بانک بافت قلمداد شده و همان مسئولیت را بر عهده خواهند داشت. همچنین شرایط آزمون در صورتیکه بافت از فرد فوت شده یا اهداء کننده زنده بدست آمده باشد متفاوت خواهد بود. در پایان تستهای تبدیل بافت تا چندین ماه پس از اهداء مورد نیاز است. تا زمان تعیین ایمنی نهایی، بافت ها یا سلولها در قرنطینه و اغلب در یخچالها یا شرایط سرد نگهداری می شوند. قرنطینه بافت های بدست آمده از افراد فوت شده نیز قبل از عرضه جهت پیوند توسط بانک های بافت انجام می پذیرد. بنابراین مهندسان بافت که با سلولهای آرلوژنیک سرو کار دارند ممکن است از قوانین ایمنی بانکهای بافت به عنوان یک مرجع جامع بهره مند گردند. در حقیقت تمامی قوانین وابسته به FDA در مورد کسب ایمنی و پردازش بافت های انسان تحت عنوان استانداردهای بانکداری بافت از انجمن آمریکایی بانک های بافت بیان می شود.

بدست آوردن بافت های آلوژنیک نیازمند ارائه وجه مناسبی از کاربردهای هدفمند است هم شرکتهای مهندسی بافت و هم بانک های بافت وظیفه توزیع بافت ها و یا مشتقات بافت را به صورت تجارت انتفاعی یا غیر انتفاعی بر عهده دارند. با وجود اینکه استانداردهای ایمنی و تاثیر پذیری تحت نظارت دادرسی فدرال تنظیم می شود اما اهدای بافت تحت نظارت دادرسی فدرال تنظیم می گردد. بدلیل اینکه اهدای اندام و بافت بر رضایت اهداء کننده یا خانواده وی احتیاج دارد، فرم رضایت نامه باید به وضوح هدف استفاده از بافت را نشان دهد. شفافیت این موضوع باید به حدی باشد که مورد استفاده ای را که بدست آوردن بافت با آن هدف صورت می پذیرد کاملاً تصریح نماید، پیوند مستقیم برای کاربردهای درمانی، بررسی های تحقیقاتی، با استفاده از بافت به عنوان منابع اصلی مواد جهت ساخت محصولی دیگر.

اخیراً استانداردهای مشابهی برای استفاده ایمن از بافت های زنوژنیک توسط FDA پیشنهاد شده است. بدلیل کاربرد بافت زنوژنیک در حفظ پتانسیل ذخائر عظیم بافت های معمولی از گونه های بسیار مختلف، یا بافت های حاصل از حیوانات با ژنهای تغییر یافته، توسعه استانداردها در این بخش بسیار درخور توجه است.

علاوه بر موضوعات ایمنی مربوط به انتقال عوامل بیماری زا، ایمنی زایی و پایداری بردارهای ژن های تغییر یافته نیز باید مورد ارزیابی قرار گیرند. همچنین اگر سلولهای اصلاح شده از نظر ژنتیکی پیوند شده باشند، پاسخ مشخص دریافت کننده به فنو تیپ تغییر یافته سلول ها نیازمند مطالعه خواهد بود. توسعه یک چارچوب قانونمند که احتمالات مختلف پیوند بافت های زنوژنیک با مشتقات آنها را در نظر بگیرد هنوز به صورت رقابتی بین مهندسان بافت و FDA باقی مانده است.

-ساخت و نگهداری کاشتی IMPLANT FABRICATION AND STORAGE

پس از بدست آوردن بافت ها و آزاد شدن آنها از قرنطینه، فرآیند مهندسی بافت آغاز می‌شود با وجود تضمین های خاص در مورد عاری بودن بافت های آلوژنیک یا زنوژنیک از عوامل بیماری زا، بافت های گرفته شده از خود شخص معمولاً تحت آزمون بیماریهای خونی مادرزادی قرار نمی گیرند. در نتیجه هر بافت انسانی تست نشده را باید آلوده به عوامل بیماری زای مرگ آور فرض کرد.

بردارش بافت ها جهت کشت سلولی یا نگهداری مستقیم باید همراه با ایمنی کارکنان آزمایشگاه باشد. این استانداردهای ایمنی مهندسی بافت می توانند از طرف سیاستهای بازدارنده بیمارستان در برابر بیماریهای خونی مادرزادی تصویب شود. بطور کلی این شیوه های اعمال شده برای حفاظت کارکنان شامل دستکش ها، لباس های ایمنی و روشهای بازدارنده سلولها یا بافت می شود. عموماً اتاقک های ایمنی بیولوژیکی کلاس II برای جلوگیری از فرآیند های کشت سلولی قابل قبول هستند. مسئله دیگری که باید لحاظ شود حفاظت از محیطهای غذایی با استفاده از ظرفهای کشت باز (برای مثال ظرف پتوی) یا ظروف غیر قابل نفوذ (مانند بطری های غلتان و فلاسک های با درپوش صافی) است که خطر قرار گرفتن محیطها را در تماس با سلولهای انسانی تست نشده به حداقل می رساند.

-آزمون ایمنی محصول نهائی از نظر سترون شدگی، سمیت و میکوپلاسها

SAFETY TESTING OF THE FINAL PRODUCT FOR STERILITY, ENDOTOXIN, AND MYCOPLASMA

کاشتنی های مهندسی بافت باید از نظر آلاینده هـای بیولـوژیکی ایجـاد شـده در خـلال پردازش برای بیماران کاملاً ایمن باشند. این تضمین به وسـیله آزمـون سـترون شـدگی، سمیت و میکوپلاسما، در محصـول نهـائی قبـل از آزاد سـازی محصـول انجـام می‌شـود. سترون شدگی یک کاشتنی که شامل سلولهای زنده می باشد ممکن است نیازمند آزمون های سترون شدگی قبل از آزادسازی و در زمـان پیونـد زدن باشـد. آزمـون هـا سـترون شدگی را می تواند در محیط تیوگلیکـولات (thioglycollate) و یـا محیطهـای قابـل قبول دیگر برای تشخیص میکروارگانیزم ها انجام داد.

تعیین سمیت توسط آزمایش لیمولـوس آموبوسـیت لیسـات (LAL) انجـام مـی گیـرد. میکوپلاسماها جزء خانواده انگلهای درون سلولی هستند که بعضی از آنها می توانند برای انسان بیماری زا باشند. شناسائی قارچ توسط کشـت مسـتقیم در محـیط کشـت سـلول نگهبان به وسیله پیوند (هیبریداسیون) در محل (in sifu) یا به وسیله آزمایش واکـنش زنجیره پلیمری (PCR) انجام می گیرد.

اجزای آزمایشات سترون شدگی نسبتاً ساده و ارزان است. البته آزمونهای مربوط به مـواد سمی و قارچ ها پیچیده و گران هستند. در نتیجه انجام هر آزمونی در هر مرحله از آماده سازی کاشتنی مهندسی بافت می تواند به لحاظ اقتصادی امکان پـذیر نباشـد. در عـوض توسعه الگوریتم نمونه برداری جهت کنتـرل رونـد آمـاده سـازی کاشـتنی هـای متعـدد می‌تواند جوابگو باشد. طرح ویژه الگوریتم آزمون غالباً برای قراردادهای سـاخت در مـورد هر کدام از انواع کاشتنی مهندسی بافت منحصر به فرد است.

-ملاحظات تأثیرپذیری EFFECTIVENESS CONSIDERATION

تعیین تأثیرپذیری تجهیزات مهندسی بافت باید شامل تشخیص و اندازه گیری نکات خاصی باشد که نشان گر تغییری سودمند در شرایط بیماری هستند البته همه درمانهایی که به عنوان مهندسی بافت شناخته شده اند نیاز به داده های مؤثر قبل از شروع بازاریابی ندارند. تمایز بین شرایط تأثیر بیولوژیکی و تجهیزات بعداً در مبحث استانداردهای FDA مربوط به خطرات و ترکیبات گفته می‌شود برای طرح هایی که نیاز به آزمون های تأثیر پذیری دارند اشکال سنتی ارزیابی مناسبند.

آزمون پیش بالینی شامل شناسائی خارج بدنی ترکیبات است. (یعنی آناتومی و فیزیولوژی) مطالعات حیوانی، واکنش میزبان به کاشتنی ها، تغییرات جنبشی کاشتنی و ترمیم ساختار و عملکرد بافت آسیب دیده را مشخص می کند. البته تجهیزات مهندسی بافت نیازمند ارزیابی های متفاوت از آنهائی است که برای کاشتنی های غیر زنده به کار می روند. کاشتنی های غبر زنده و غیر قابل جذب (مانند لگن فلزی پا مفاصل زانو، پیوندهای عروقی از جنس تفلون) تمایل دارند به طور نامحدود و به صورت فصل مشترک با بافت های میزبان باقی بمانند. تأثیر کاشتنی های از این نوع معمولاً سریع، پایدار و با دوام است. در مقام مقایسه، اکثر کاشتنی های مهندسی بافت شامل یک جزء قابل جذب و یک جزء سلولی هستند. با وجود استانداردهای کامل و جامع در صورت شکست پلیمرهای غیر سلولی تخریب پذیر (برای مثال، پلی لاکتیک اسید) و افزودن سلولها به پلیمر های تصویب شده یا نشده توسط FDA ممکن است نیازمند هر دو ارزیابی بالینی و پیش بالینی باشد.

کاشتنی های مهندسی بافت که شامل سلول هستند می توانند پردازش های آنابولیک یا مصنوعی را در سلولهای پیونده زده شده یا بافت های میزبان تحریک کنند. پردازش های

مصنوعی در کاشتنی های مهندسی بافت همچنین جهت تعیین نرخ و میزان تأثیرات درمانی ممکن است نیاز به ارزیابی قبل یا بعد از پیوند زدن داشته باشند.

- ارزیابی پیش بالینی CLINIVAL ASSESSMENT

تجهیزات مهندسی بافت در زمان ساخت و قبل از پیوند زدن نیاز به آزمون بیمه کیفیت (QA) دارند تا تضمین کند که خصوصیات طراحی با ترکیب مطابقت دارد.

این مشخصه ها با آناتومی و فیزیولوژی بافت هدف قابل مقایسه هستند. به دلیل اینکه مهندسی بافت هنوز نسبتاً در مراحل اولیه خود به سر می برد آناتومی و فیزیولوژی کاشتی ساخته شده در اغلب موارد زیر مجموعه ای از بافت آسیب ندیده در نظر گرفته خواهد شد. اگر کاشتنی شامل سلولهای زنده باشد، آزمون زیست پذیری (Viability) به عنوان شاخص پیش گویی قابلیت دستگاه برای اصلاح آناتومی و فیزیولوژی بعد از پیوند توصیه می‌شود. تا زمانی که دستگاههای محققین مختلف جهت ترمیم بافت مشابه (مثلاً استخوان) به کار گرفته میشود استانداردهای QA برای کلیه دستگاهها باید از استاندارد مقایسه ای استخوان آسیب ندیده استفاده کنند. توسط این فرایند یک دستگاه ممکن است قابلیت اندازه گیری افزایش استحکام استخوان را تا 30% , 50% , 70% و ... را در شرایط خارج بدنی دارا باشد. چنین سنجشهایی احتمالاً میزان تأثیر را در زمان پیوند و نرخی را که در آن عملکرد می تواند بهبود یابد پیش بینی می کنند.

پیش بینی تأثیر گذاری معمولاً به مطالعات حیوانی به عنوان قمستی از ارزیابی پیش بالینی محتاج است. در این مطالعات نتیاج نهائی تجهیزات مهندسی بافت می‌تواند مستقیماً با سنجش های متعارف نتایج بالینی سازگار شود با سازگار کردن نتایج نهائی موجود در مدل های حیوانی می توان تجهیزات مهندسی بافت را مستقیماً برای کاشت

بافت های خود شخص یا بافت های مشابه هموژن (ایزوژنیک) به جای کاشتنی های جذب نشدنی و غیر زنده استفاده کرد. نتایج این مطالعات پیش بالینی می تواند داده هایی را جهت توجیه ابتدایی تحقیقات بالینی فراهم کند. بدون اجرای مطالعات پیش بالینی موفق، انتظار می رود که احتمال موفقیت تحقیقات بالینی نیز کاهش یابد.

-ارزیابی بالینی CLINICAL ASSESMENT

تقریباً تمامی تجهیزات مهندسی بافت قبل از کسب مجوز بازاریابی توسط FDA نیاز به اثبات تاثیر گذاری بالینی دارند. اگر چه درمانهای تحقیقاتی با مهندسی بافت می تواند بسیار متنوع و پیچیده باشند اما طرح های تحقیقاتی برای سنجش تاثیر گذاری چنین نیستند. مقایسه یک دستگاه تحقیقاتی با استاندارد رایج درمان به عنوان کنترل مثبت یا با درمان شبه دارویی به عنوان کنترل منفی یک ارزیابی بسیار معتبر را فراهم می کند البته برخلاف داروها، به حساب آوردن دستگاههای شبه دارو در طرح تحقیقاتی بسیار مشکل تر است. بنابراین مقایسه کردن با استاندارد رایج درمان اساس ارزیابی کاشتین های مهندسی بافت را پایه ریزی می کند. با توجه به کاربرد مطلوب و هدف پزشکی که دستگاه بخاطر آن طراحی شده است نکات اصلی برای تعیین تاثیر گذاری بالینی از تشخیص معمولی، درمان و پیش بینی هدف بدست می آید. همچنین، با توجه به بیماری تحت معالجه، می توان درمان تحقیقاتی را بصورت طرح بیماران جفت – جفت یا به شکل تصادفی از میان جمعیت بیماران تحت مطالعه مورد مقایسه قرارداد. بطور کلی میزان تاثیر پذیری با کاهش سمپتوم بالینی یا بهبود عملکرد فیزیولوژیکی قابل محاسبه است. اگر مهندسان بافت نکاتی خارج از مصوبه های استانداردهای مراقبت بالینی برای

تاثیر گذاری بالینی طراحی یا انتخاب کنند، فرایند ارزیابی بخاطر شرایط مورد نیاز بـرای قانونمند کردن نکات اصلی مربوطه طولانی می‌شود.

در اکثر نمونه ها، فرایند تحقیق بالینی برای تجهیزات مهندسی بافـت بـا تجهیـزات غیـر جذب شونده و غیر زنده متمایز نیست. مطالعات انجام گرفتـه تحـت معافیـت تحقیقـاتی دستگاه (IDE) صورت گرفته و فازهای سنتی (I,II,III) را بـرای جمـع آوری داده هـا قبل ازصدور موافقت نامه پیش بازاریابی (PMA) دنبال مـی کنـد. البتـه موافقـت نامـه بازاریابی برای یک دستگاه پزشکی را می توان از طریق قرار داد توسعه محصول (PDP) نیز بدست آورد که شامل مکانیزم تشریح بهسازی تجهیزات پرشکی سال ۱۹۷۶ می‌شود. درمانهای مهندسی بافت که حاوی مواد بیولوژیکی هسـتند ممکـن اسـت بـه گواهینامـه کاربرد بیولوژیکی (BLA) FDA یا مصوبه ساخت قبل از شـروع بازاریـابی نیـاز داشـته باشند.

-فعالیت های قانون مند REGVLATORY ACTIVIES OF FDA

درمان های تحقیقاتی مهندسی بافت، نمایشی منحصر به فرد از رقابـت سـازمان FDA، مرکز تجهیزات سلامتی و رادیولوژی (CDRH)، مرکـز تحقیقـات و ارزیـابی بیولـوژیکی (CBER) و مرکز تحقیقـات و ارزیـابی دارو (CDER) اسـت. شـاید بتـوان گفـت کـه اکثریت کاشتنی های مهندسی بافت را سلول هایی تشکیل می دهند که تاریخچه بیشتر آنها توسط CBER بررسی شده اسـت، ایـن کاشـتنی هـا همچنـین شـامل پلیمرهـای پالایش شده‌ای هستند که اغلب توسط CBER بازنگری شده اند. از آنجا که مهندسـی بافت می تواند مباحث رهایش دارو و یا سنتز دارو توسط روش های تغییر ژن را نیز در بر

گیرد، بافت های مهندسی خاص نیز ممکن است به بازنگری توسط CBER نیاز داشته باشند. این رقابت های جدید بصورت خیلی پویشگرایانه توسط FDA در خلال گفتگوهای انجام شده با افراد مجرب و عموم مردم مورد ملاحظه قرار گرفته است، همچنین به توسعه مکانیزم های بین مرکزی جهت تسهیل بازنگری درمان های ترکیبی توجه شده است. این مقدمات به طرح و پایه ریزی قوانین و سیاست های جدید تعیین ایمنی و تاثیر درمان های ترکیبی منتج شده است.

در طول سال های ۱۹۹۰ تلاش های قابل ملاحظه FDA سبب توسعه پایه علمی شد که کلیه نمایندگی ها به آن مراجعه کرده و با ایجاد یک اتفاق نظر همگانی، کلیه شرکت کنندگان از آن سود می برند.

-طبقه بندی سنتی تحت عناوین تجهیزات، مواد بیولوژیکی یا داروها

TRADITIONAL CLASSFICATIONS AS DEVICES, BIOLOGICS, OR DRUGS

لایحه فدرال غذا، دارو و لوازم آرایشی سال ۱۹۳۸ اختیاراتی را برای قانون مندی غذا، دارو لوازم آرایش، تجهیزات و داروهای حیوانات جهت ایمنی آنها وضع کرد. بهسازی تجهیزات پزشکی سال ۱۹۷۶ و لایحه تجهیزات پزشکی ایمن سال ۱۹۹۰ کلمه «دستگاه» را برای طبقه بندی کلیه تجهیزات پزشکی، وضع حق صلاحیت صفحات مشورتی، جلوگیری از تقلب و چسباندن مارک های نادرست و نیاز به پیروی از اصول درست ساخت GMPS تعریف کرد. اجرای این اختیارات وسیع توسط FDA گاهاً به بازنگری IDE که نیازمند تکمیل و استخدام کادر متقاضیان صنعتی در اوضاع نامساعد رقابتی بود منتج می شد. کنگره در سال ۱۹۷۷ با تصویب لایحه نوین سازی FDA

(۳۵) به این مشکلات پاسخ داد که در حال حاضر نیز اجرا می شوند. تصویب ایـن قـانون سبب محدود کردن زمان پاسخ گویی FDA به درخواست هـای تحقیقـاتی و در نتیجـه پاسخ محققان به سوالات FDA شد. عـلاوه بـر ایـن وجـود تعهـدات FDA نسـبت بـه سرمایه گذاری های کنگره به شدت زمان بازنگری درمان تحقیقاتی و بررسـی سفارشـات معوقه را کاهش داد.

CBER در دهه گذشته سهم به سزایی در توسعه استانداردهای پیشرو در مورد کاشتنی های مهندسی بافت داشته است خلاصه مقدمات CBER تحت طـرح فعالیـت بافـت در آدرس

http://www.fda.gov/cber/tissve/tissve.htm

که شامل قـوانین و توسـعه سیاسـت، توسـعه اسـناد راهنمـا، بررسـی هـا و مصـوبات، و هماهنگی سیاست ها قانون مند و علمی است آورده شده است. یکی از فراگیرترین جنبه های این طرح، توسعه ای تحت عنوان روش پیشنهادی برای قانون مند کردن محصولات پایه سلولی و بافتی (۲۱)

است (جدول ۱-۱ و ۲-۱) . در حال حاضر این ساختار کاملاً به اجرا درنیامـده اسـت امـا موضوعات بنیادی مثل انتقال بیماری های مسری، کنترل های پردازش، ایمنی بـالینی و تاثیر گذاری، ارتقاء و بر چسب گـذاری، مـانیتور کـردن و مطالعـه، سـلول هـای سـاقه و استخوان کافن زدایی شده مورد ملاحظه قرار گرفته اند. اخیراً موضـوع فرکاشـت میزبـان توسط CBER مورد توجه قرار گرفته است.

CBER در دسامبر ۱۹۹۹ پیش نویس راهنمایی را برای صنایع منتشـر کـرد کـه درآن خطرات انتقال زونوسیس (عوامل بیماری زای حیـوانی) توسـط فراکاشـت میزبـان مـورد

آزمایش قرار گرفته بود. این اسناد همچنین خطرات مستقیم دریافت کننده زونویس و خطرات غیر مستقیم انتقال بعدی ناشی از تماس نزدیک (برای مثال، همسر) شخص دریافت کننده فرا کاشت را بیان می کند. این پیش نویس شرح می دهد که شخص دریافت کننده کاشتنی و نزدیکان وی باید از اهدای خون و بافت جلوگیری کنند تا احتمال انتقال بیماری محدود شود. این مطالب، بخش بسیار کوچکی از ملاحظات گسترده ای را نشان می دهد که در حال حاضر مورد بحث FDA قرار دارند.CBER و CDRH با هم اکثریت غالب مطالب مربوط به محصولات مهندسی بافت را مورد توجه قرار داده اند.

پردازش های کنترل ترکیبات محصول نهایی جهت اطمینان از ایمنی کاشتنی های مهندسی بافت ضروری است. برای ایجاد چنین اطمینانی، FDA نیازمند همکاری نزدیک با GMPS است. این شرایط برای حفاظت دریافت کننده و کارکنان آزمایشگاه که قبلاً مورد بحث قرار گرفت و همچنین حفظ و نگهداری رکوردهای جامع فرایندهای پردازشی فراهم شده است. در مورد تجهیزات، در هنگام شروع بازاریابی روند ساخت GMP مورد نیاز خواهد بود، اما توصیه می‌شود که این بخش در فاز III (چند مرکز) سطح تحقیقاتی قبل از بازاریابی صورت گیرد. از نظر تاریخی، استانداردهای GMP بخاطر در نظر نگرفتن پردازش بافت به عنوان یک فرایند ساخت در مورد بافت های نگهداری شده در بانک اعمال نمی شود. البته، در حال حاضر آزمون های بهینه بافت (GTPs) توسعه یافته و برای بدست آوردن و استعمال بافت ها جهت کاشتن (۳۶،۴) بکارگرفته می شوند. GTPs از هر منبع بیولوژیکی جهت استعمال بافت ها استفاده می کند.

-شرایط (مقتضیات) قانون مندی متناسب با خطر و ترکیبات

REGULATORY REQVIREMENTS DEPENDENT ON RISIC AND COMPOSITION

همانطور که پیشتر گفته شد، کاشتنی های مهندسی بافت عمدتاً بصورت دستگاه و مواد بیولوژیکی هستند. در اغلب موارد، سلولهای اندامی با پلیمرهای ترکیب شده و یا سلول غیر اندامی به تنهایی یا به همراه پلیمرها به عنوان دستگاههای کلاس II(دارای خطر قابل ملاحظه ای هستند) که نیازمند اثبات اثر گذاری هستند شناخته می شوند. البته سلول های اندامی به تنهایی یا یک ماتریس بافت سلولی نیازی به داشتن مجموعه ای از داده های مبتنی بر اثر گذاری ندارد.

سلولهای زنده اندامی که بصورت خارج بدن (exvivo) ساخته می شوند و هدف ترمیم ساختارها را دنبال می کنند نیازی به اثبات تاثیر پذیری در حال حاضر ندارند. سلول هایی از این نوع می توانند شامل کراتینو سایت ها و کندرو سایت های اندامی کشت یافته و مغز استخوان پردازش شده باشند. علاوه بر این، تنظیم انبوهی (جمعیت) سلولهای اندامی بسیار مشابه بافت‌های نگهداری شده در بانک است که به دلیل داشتن اثر گذاری ذاتی، نیازی به مطالعات اثر گذاری ندارند. طبقه بندی های کم خطر مشابه از این نوع به ماتریس های سلولی مشتق شده از بافت انسانی اطلاق می شوند. در نتیجه اگر هیچ گوه داده ای مبتنی بر تاثیر گذاری جمع آوری نشده باشد، هیچ نوع ادعایی درمورد تاثیر گذاری در تبلیغات و یا برچسب ها نیز نمی توان داشت.

# گزینش و جداسازی سلول

# CELL ISOLATION AND SELECTION

ساروین کارمیول

## پیشگفتار

این فصل دو مقوله: گزینش (Selection) و جداسازی(Isolation) سلول را در بر میگیرد. تقسیم بندی فوق از نظر اولویت صورت گرفته است. برای کسب بهینه ترین نتیجه، بهتر است که ایزولاسیون و گزینش به طور همزمان صورت گیرد. بغیر از سلول‌های سیستم خون سازی و بافت‌های جنینی خاص سلول‌های معمولی دیگر ذاتاً به ماتریس‌های خارج سلولی مرتبط می شوند. شیوه‌های متفاوت پاره کردن (گسیختن) ماتریس‌ها نه تنها بر کارائی گوراش آنزیمی بلکه بر جمعیت سلولی تأثیر می گذارد. همچنین سیستم کشت سلولی که شامل ماده بازال (بنیادی) و مکمل‌ها است نه تنها با فراهم کردن مواد غذایی و شرایط مناسب بر بقای سول‌ها تأثیر می گذارد بلکه می تواند یک پتانسیل گزینشی قابل ملاحظه را در ترجیح یک نوع سلول بر دیگری اعمال کند.

نوشته‌های فراوانی درمورد موضوعات این فصل وجود دارد. ایزولاسیون و پاک سازی سلول‌ها یک فرایند پیچیده است و یکی از اهداف این فصل کمک به آسان نمودن این پیچیدگی است. برای کسب اطلاعات مفصل در مورد جنبه‌های گوناگون کشت سلولی لطفاً به نوشته‌های فرشنی اشتودزینسکی و مسترز مراجعه کنید.

## - ایزولاسیون سلول CELL ISOLATION

تحقیقات به خوبی نشان می دهد که انواع سلول‌های مشابه مانند سلول‌های فیبروبلاست، اندوتلیال یا پری ادیپوسایت‌ها در محل‌های آناتومی مختلف دارای مشخصه‌های متفاوت هستند. اما این موضوع که چگونه سلولهای آناتومی یک محل نیز مشخصه‌های متفاوت از خود نشان می دهند هنوز به خوبی شناخته شده نیست. ناهمگنی سلولی (هیتروژنیتی) در اثر خصوصیات ویژه آنها رخ می دهد. این خصوصیات می تواند یکی از پارامترهای عملیاتی جمعیت سلولی باشد. پدیده فوق با این تصور که خصیصه‌ها لزوماً در داخل جمعیت سلولی دارای توزیع همگن (هموژن) نیستند قابل توجیه است. فیبروبلاست‌ها جمعیتی هستند که در داخل محل آناتومی از خود خصوصیات فنوتیپیکی متفاوت نشان می دهند، مطالعات فرایز و همکارانش همچنین لکیک و همکارانش را بر روی موش، ریه انسان، لثه (پیرادندانی) و هتروژنیتی (ناهمگن) فیبروبلاست لثوی ملاحظه کنید. همچنین مشاهده شده است که فیبروبلاست‌ها عکس العمل‌های متفاوتی به تحریکات کلاژن‌های آزاد شده توسط تومور یا سلول‌های قلیا خواه (mast cells) نشان می دهند. علاوه بر این فنوتیپ‌های مختلف سلول‌های اندوتلیال عروق کوچک در کورپوس لوتئوم (جسم زرد گاو) (bovine corpus luteum) با در نظر گرفتن اکتین، سایتوکراتین و ویمنتین حساس به گاما، اینترفرون ( IFN-$\gamma$) نشان دهنده هتروژینتی است. منطقی است اگر کل جمعیت سلولها را با توجه به خصیصه‌هایشان در هتروژنیتی (ناهمگن) دخیل بدانیم. هدف سنتی از انجام کشت سلول‌های اولیه تهیه مقدار کافی از سلول‌های قابل رشد واجد شرایط می باشد که تضمین کننده شباهت توزیع نهایی سلول‌ها با توزیع

یافته شده در بافت اصلی است. استفاده از کشت سلولی به عنوان مدلی برای شرایط داخلی بدنی (in vivo) تا حد.ود زیادی به الزامات زیر نیازمند است. چندین فاکتور مؤثر بر نتیجه عبارتند از: محل آناتومی، پاتولوژی (آسیب شناسی)، نرمالسی (normalsy) یا درجه ایسکمی (کم خونی) میزان فراوانی بافت به کار رفته بر این فاکتورها تأثیر می گذارد. طبیعت متنوع معماری بافت به روش‌های مختلفی برای توزیع سلول نیازمند است. برای مثال استخوان، مغز، ماهیچه‌های اسکلتی کبد و طحال دارای پیوندهای ماتریس سلول- سلول و سلول- برون سلولی هستند. نتیجه این شرایط این است که هیچ قراردادی همه انواع بافت را پوشش نمی دهد. در مورد نحوه ایجاد کشت اولیه و تجزیه بافت مطالب چندی منتشر شده است که تلاش در بهینه سازی این موضوعات برای سلول نتیجه بخش خواهد بود.

-توضیح

استراتژی‌های مختلفی برای ایزولاسیون سلول‌های موجود در بافت‌های سخت وجود دارد از جمله: روشهای برون کاشت (explantation) آنزیمی، مکانیکی و تجزیه شیمیایی، (chemical disaggregation) تزریقی (perfusion) یا ترکیبی از آنها. یکی از جدید ترین شیوه‌ها در جداسازی سلول و تکثیر سلول‌ها در داخل آزمایشگاه (in vitro) برون کاشت قطعه‌های بافت است. در این روش تا زمانی که انتشار مواد غذایی و گازها محدود نشود بافت به قطعات بسیار کوچک خرد میشود. این عمل با بریدن و کوچک سازی بافت مورد نظر تا اندازه ای مناسب صورت می گیرد. سپس قطعات باف در ظروف کشت بافت که با سرم جنینی گاو (fetal bovine serum) یا ماتریس‌های دیگر

پوشیده شده است قرار داده می شود. ترکیب ماده و پوشش سطح همان طور که در ایزولاسیون انواع سلول از گلومرول‌ها (glomerulus) نشان داده شده است، می تواند اثر قابل توجهی بر نوع سلول نهایی تولید شده داشته باشد. همچنین می توان قطعات بافت را برای تثبیت اتصال در زیر پوشش قرار داد زیرا تماس مستقیم با سطح کشت بافت برای کشت موفق برون کاشتنی (explant) ضروری است.

عموماً برای قرار دادن بافت در محیط کشت از دستگاههای مکانیکی استفاده شده و هیچ گونه آنزیمی اضافه نمی گردد. کشت اولیه توسط روش برون کاشت نسبت به دیگر روشها زمان بیشتری را طلب می‌کند، اما روش برون کاشت به خاطر استفاده از خاصیت حساسیت پتانسیلی سلول مورد نظر به ترکیب آنزیم دارای مزایای بیشتری است. اگر آنزیم قابل ارائه در محیط باشد می توان بافت را با غلظت آنزیمی بهینه برای مدت کوتاهی در دمای اتاق و یا برای مدت طولانی تری در دمای ۴ ˚c نگهداری کرد. در اینجا هدف، تجزیه بافت نیست بلکه سازگار کردن مناسب ماتریس برون سلولی جهت حرکت مؤثر سلول مورد نظر است.

دلیل انتخاب روش برون کاشت، حفظ سطح غشاء عملیاتی است. همچنین در مواردی که نمونه بافت موجود کوچک باشد روش جداسازی آنزیمی با مکانیکی بسیار مخرب بوده و سلول‌های فراوانی از دست می روند که ادامه کار را غیر ممکن می سازد. تأثیر آنزیم‌های پروتئولیتیک بر اجزا سطح سلول شناخته شده است، به طور مثال، ایموگلوبولین سطح (Ig) در اثر پروناز و کیموتریپسین به سرعت از لنفوسیت‌های B جدا شده ولی در اثر تریپسین و پاپائین این عمل کندتر انجام می شود و توسط کولاژن‌ها

اصلاً صورت نمی گیرد. همچنین تریپسین در مقایسه با کلاژن فسفولیپیدها و اسیدهای چرب رادیواکتیو بیشتری را از غشاء اندوتلیال سلول آزاد می‌کند.

کشت اولیه برون کاشتی به قابلیت حرکت نوع سلول مورد نظر بستگی دارد از معایب این روش بالاتر بودن پتانسیل رشد انواع سلول آلاینده نسبت به سلول مورد نظر و مشکل پیوستگی قطعات بافت است. از طرف دیگر اگر سلول مورد نظر پر تحرک ترین سلول باشد این روش می تواند تکنیک منتخب باشد.

یکی دیگر از موارد مورد توجه از بین رفتن مشخصه‌های فنوتیپیک سلول‌های به واسطه گوارش آنزیمی است. اگر سلول‌ها دقیقاً بعد از جداسازی مورد استفاده قرار گیرند، گوارش آنزیمی ضروری است. البته اگر هدف ایجاد یک جمعیت کشت سلولی آزمایشگاهی باشد شرایط اولیه سطح سلول از اهمیت کمتری برخوردار خواهد بود. ساختارهای غشائی با پارامتر تحمل وارونگی توصیف شده و برای یک جمعیت سالم سلولی می توان فرض کرد که ساختارهای سطح قابل ترمیم خواهند بود.

البته این وضعیت برای هر نوع سلولی معتبر است.

- مکانیکی MECHANICAL

روش‌های مکانیکی قطعه قطعه کردن بافت شامل روش گردابی، تکان دادن در شیکر چرخشی، پودر سازی با پیپت‌هایی با قطرهای متفاوت، عبور بافت از میان شبکه‌های نایلون و یا فولاد ضد زنگ و خرد کردن بافت با سوزن‌های نازک می شود. این فرایندها تعلیق سلول را زودتر از گوارش آنزیمی ایجاد می کنند، البته محدودیتهایی در این مورد

وجود دارد. این روش‌ها به طور کلی برای همه بافتها مؤثر نیستند. تشخیص نوع روش بستگی به مقدار نیروی اعمال شده به بافت داشته که این جنبه می تواند سبب آسیب شود. سلول‌ها به برش حساس بوده و آسیب جدی می بینند. برش سلولهای استوبلاست شکل MC3T3-E1 به دست آمده از جمجمه نوزاد موش سبب تغییر مورفولوژی (شکل) و کاهش تدریجی کلسیم بین سلولی باقی مانده گردید. همچنین رشد سلول‌های اندوتلیال به واسطه تنش برشی تیغه ای متوقف شد. ادامه این بحث در صفحات بعد آمده است. البته در مورد برخی از بافت‌های نرم از جمله طحال، تیموس، گره‌های لنفی کبد جنینی و تومورهای نرم و احتمالاً مغز می توان تجزیه مکانیکی را بدون آسیب سلولی اجرا کرد.

روش‌های مکانیکی در پاسخ به اثرات بالقوه زیان آور آنزیم‌ها درطول گوارش توسعه پیدا کردند. هنگامی که شرایط ایزولاسیون مناسب برای وسایل مکانیکی مهیا باشد این روش بر روش گوارش آنزیمی بخصوص بازسازی سلولی ارجعیت دارد. تحت این شرایط کاهش معرف‌هایی مانند آنزیم‌ها وجود منابع، تأثیرات و هر گونه مطلب قانون مند دیگر را غیر ضروری می سازد. البته زمانی که روش‌های مکانیکی با گوارش آنزیم همراه شود مؤثر تر خواهد بود. لایه لایه کردن بافت با چاقوی جراحی برای کم کردن اندازه بافت و در نتیجه افزایش سطح منجر به ایزولاسیون مؤثر تر می گردد.

-گوارش آنزیم ENZYME DIGESTION

نوع آنزیم به کار رفته بر نتیجه گوارش تحت عناوین بازده، راندمان محصول، قابلیت رشد و سمیت تأثیر می گذارد. ایزولاسیون سلول‌ها از تومورهای سخت با استفاده از تجزیه

آنزیمی یا مکانیکی منجر به فراوانی‌های متفاوت می شود. در بافت ایزوله شـده بـه روش آنزیمی، زیر جمعیت آنوپولید (aneuploid subpopulation) در مقایسه با بافـت بـه دست آمـده از تجزیـه مکـانیکی نمایـان تـر اسـت. کـه بیـانگر آسـیب پـذیری متفـاوت جمعیت‌های مختلف سلول‌های بافت در برابر ترکیبات آنزیمی است. همچنین درمطالعات انجام شده بر فرایند جداسازی هپاتوسایت موش در هنگام استفاده از EDTA بـه جـای کولاژن محتویات سایتوکروم P ۴۵۰ قابل شناسائی به روش طیفی و مدت دار و حفـظ و نگهداری سیستم اکسید از با کار کرد ترکیبی بـه دسـت آمـد. در مـورد ایـن مشـاهدات استثناهائی نیز وجود دارد: مطالعات نشان می دهد که سلول‌های توموری را می تـوان بـا استفاده از گـوارش آنـزیم بسـیار مـؤثر تـر از روش‌هـای مکـانیکی جـدا کـرد . و اینکـه کلاژن‌های ایزولـه شـده پیـگ هپـاتو سـایت‌هـا خیلـی بیشـتر از EDTA ایزولـه شـده هپاتوسایت‌ها زنده می مانند. یک تفسیر در مورد این نتایج متنوع بـر مبنـای حساسـیت نسبی سلول‌ها نسـبت بـه آنـزیم‌هـا و تجزیـه مکـانیکی اسـتوار اسـت. تـأثیر بسـیاری از متغیرهای غیر قابل کنترل نیز (به طور مثال شرایط بافت) بر این مشـاهدات اضـافه مـی شود.

هپاتو سایت‌های ایزوله شده مـوش بـالغ بـه وسـیله تزریـق تریپسـین و کـلاژن نشـانگر خصوصیات متفاوت بود: هپاتو سایت‌های کلاژنی دارای بازده چسبندگی دو برابـر بـوده و مدت طولانی تری در محیط کشت باقی می ماندند، همچنـین تولیـد آلبـومین بیشـتری داشته و فعالیت تیروسین آمینو ترانسفراز در آنها در مقایسه با هپاتو سایت‌های جدا شده توسط تریپسین بیشتر است. در جداسازی پروسین از جزایر لوزالمعده توسط گـوارش بـا کلاژن، جزایر بزرگ به فعالیتهای پائین تریپتیک و نتایج جداسـازی ضـعیف بـه فعالیـت

بالای تریپتیک مرتبط می شود. باز داشتن تریپسین توسط پفابلوک (Pefabloc) منجر به بهبود تکثیر جداسازی در جزایر لوزالمعده می شود. نکته جالب در مورد ایزولاسیون توسط گوراش با آنزیم خارجی نقشی است که ترشح داخلی آنزیم‌های پروتئولیتیک به واسطه فرایند گوارش ایفا می کند که این ترشح خاص بافت است. بافت‌های به دست آمده از اهدا کنندگان مختلف نسبت به گوارش آنزیم عکس العمل‌های متفاوتی نشان می دهد. از آن جا که لوزالمعده محل سنتز تریپسین است باید به جداسازی سلول‌های جزایر لوزالعمده توجه داشت تا امکان ایجاد فراگوارش وجود نداشته باشد.

امروزه می دانیم که تریپسین می تواند به غشاء سطح آسیب وارد کند، اما ظاهراً نقش ذاتی تریپسین نیز در این مورد دخالت دارد. مطالعه دمایی تریپسین در طول یک مسیر متوالی نشان داد که دماهای زیر ۱۵ ˚c زیست پذیری (viability) و تکثیر را افزایش می دهد این وضعیت با تأثیر دما بر پدیده‌های ذاتی دیگر غشاء سازگاری می دارد. اگر مشکل اصلی زیست پذیری باشد، استفاده از دمای پائین تر در طول گوارش پیشنهاد می شود.

برای گوارش بافت، اغلب کلاژنهای تجاری به دست آمده از کلستریدیوم هیستولیتیکم مورد استفاده قرار می گیرند. تغییرات درجه ناخالصی بازدهی و سمیت توصیف کننده ترکیبات خام هستند ترکیبات خام تعریف نشده هستند و از کلاژنازهای مختلف، پروتئازها، فسفولیپازها و باکتریهای همراه با محصول مانند اندوتاکسین تشکیل می شوند. با توجه به نبود یک تعریف مشخص برای ترکیبات کلاژن‌ها، وجود تفاوت‌های قابل

ملاحظه بین محصولات فروشندگان مختلف و حتی یک فروشنده ثابت دور از ذهن نیست. تلاش برای تصفیه ترکیبات کلاژناز خام توسط بازده گوارش بافت احیا شده توصیف شده و نشان دهنده حضور پروتئازهای تصفیه شده که یک استراتژی مؤثر است، جهت تأئید عدم وجود اثرات زیانبخش باید دقت لازم به عمل آید. استفاده از سیستم‌های آنزیمی مشخص با افزایش تعداد محصولات درمان سلولی اهمیت بیشتری پیدا می‌کند. سازمان‌های قانونمند برای نیل به اهداف خود نیازمند شرح کامل اجزاء معرف‌های به کار رفته در ترکیبات محصولات هستند. وجود اجزاء نامشخص مانند ترکیبات آنزیم سبب ایجاد رقابت شدید میگردد.

-تروما TRAUMA

بافت‌های بیرون آورده شده دچار ایسکمی می شوند. مدل‌های ایسکمی بازتزریقی (Ischemia-reperfusion models) توسط واکنش‌های انفجار گونه اکسیژن (ROS) توصیف می شوند. البته در اثر تولید سوپر اکسید و پراکسیداسیون لیپید در نبود باز تزریق نیز امکان صدمه دیدن وجود دارد یک اظهار نظر ظاهراً درست بیان می‌کند که در طول ایسکمی میزان $O_2$ کافی برای حفظ محصول سوپر اکسید وجود دارد. این گفته به نظر صحیح می رسد زیرا به کار گیری دیسموتاز سوپر اکسید (SOD) سیگنال ROS را تضعیف می‌کند. اگر SOD به عنوان ضد اکسید کننده اضافه شود باید کاتالاز نیز اضافه گردد زیرا محصول دیسموتاسیون سوپراکسید پراکسید هیدورژن است که به تنهایی قابلیت آسیب رسانی دارد. همچنین رادیکالهای آزاد تحت شرایط هیپوکسی در سلول‌های ماهیچه ای نرم شریان ریوی موش نشان داده شدند.

به کار گیری ضد اکسیده کننده‌هایی مانند ویتامین E ، ان- استیل- ال- سایستاین یا دی فنیلین یدوئیم نشان دهنده کاهش سطوح ROS و مرگ سلوهای بعدی است. همچنین بازدارنده‌های پروتئاز مانند $\alpha_2$ ماکروگلوبولین و ضد اکسید کننده‌های ان- استیلن- ال سایستاین تعداد سلول‌های آزمایشگاهی ژرم (germ cells) نخستین خوک را افزایش می دهد. طولانی شدن و قرار گیری در معرض ROS منجر به مرگ بافت یا اپوپتوزیس می گردد. قرار گرفتن در معرض شدت بالا به مدت طولانی می تواند به مکانیزم اپوپتوتیک آسیب وارد کرده و مستقیماً منجر به مرگ بافت شود. فاکتورهای رشد مانند فاکتور سلول استم(ساقه) و فاکتور باز دارنده سرطان خون (لوسمی) می تواند جلوی اپوپتوزیس را گرفته و سبب بقای سلول ژرم نخستین جنین موش شود.

هنگامی که سلول‌های چسبنده از هم باز می شوند حالت اپوپتوزیس یا به اصطلاح آنویکیس را می گیرند. ROS نیز با تأثیر گالکتین-۳ بر آپوپتوزیس در این شکل گیری سهیم است . افزودن اسید بانگکرکیک که یک بازدارنده انتقال نفوذپذیری میتوکندری است به طور قابل ملاحظه ای آنویکسیس استئوکلاست‌ها را همانند حضور z -VAD-FMK که یک بازدارنده کاسپیس است کاهش می دهد در ایزولاسیون سلول جزایر پانکراس ترکیبات (محتویات) مرتبط با ماتریس خارج سلولی برای مدت طولانی تری در محیط کشت زنده باقی مانده و در آزمون ترشح انسولین بهتر عمل می کنند همچنین سلول‌های جنینی پانکراس با ملاحظه و رعایت موارد آپوپتوتیک و تغذیه ای از مرگ ایمن بوده وان- استیل- ال- سایستاین از اپتوزیس در سلول‌های جرم انسانی در محیط آزمایشگاه جلوگیری می کنند. ایزوله کردن برخی از انواع سلول‌ها مشکل است. فاکتورهای زیادی در موفق بودن ایزولاسیون سلول و استقرار بعدی سیستم کاشت

سلول دخیل هستند. ملاحظه ترومای سلول در بهتر شدن نتیجه نهایی تفکیک سلولی کمک می‌کند.

-سنجش زیست پذیری (بقاسنجی) MEASUREMENT OF VIABILITY

تغییر پذیری ذاتی عکس العمل‌های بافت به وضعیت‌های گوناگون کشت سلولی نیاز به وسیله ای برای ارزیابی زیست پذیری سلول‌های حاصل از این شرایط را دارد. سنجش زیست پذیری در بهینه سازی روش‌های کشت اولیه نسبتاً راحت است. بهترین راه برای ارزیابی زیست پذیری سلول استفاده از روش‌هایی است که اثر تروما را مورد ملاحظه قرار می دهد. به طور کلی کاهش استحکام (یکپارچگی) غشاء سلول در آخرین مراحل تروما اتفاق می افتد که این امر منجر به تخمین بیش از اندازه زیست پذیری سلو می گردد. برای مثال شروع و پیشرفت اپوپتوسیس (opoptosis) بدون ایجاد اختلال در غشاء سلول رخ می دهد. با وجود ترکیب دوباره فسفولیپیدها معمولاً فسفا تیدیل سرین با ورقه داخلی غشاء دولایه پلاسما مرتبط شده و در طول اپوپتوسیس به قسمت بیرونی منتقل می شود. آرایش نهایی سلول که آشکار شدن آن ممکن است مدت‌ها طول بکشد تا حد زیادی به وقایع زیان آوری که عامل آغاز آپوپتوسیس است بستگی دارد. از طرف دیگر آسیب ممکن است چنان شدید باشد که یکپارچگی سلول در چندین دقیقه لطمه ببیند، بنابراین ارزیابی یکپارچگی سلول می تواند مفید باشد.

آزمون‌های زیست پذیری مختلفی برای اندازه گیری یکپارچگی غشاء وجود دارد. یکی از متداولترین روش‌ها، ممانعت آبی تریپان نام دارد که بر مبنای ویژگی ممانعت سلول‌های زنده و رنگی شدن آنها و نفوذپذیری سلول‌های غیر زنده و رنگی شدن آنها استوار است.

ایـــن آزمـــون شـــامل نگهـــداری سوسپانســـیون ســـلول بـــرای مـــدت کوتـــاهی (<۵ min) است. دلیل کوتاه بودن این زمان آسیب دیدن سلول‌های زنده و جذب رنـگ توسط آنهاست.

یک نمونه از سنجش مستقیم جذب رنگ توسط سلول‌هـای زنـده در ذیـل آمـده اسـت. سلول‌های زنده رنگ غیر فلورسنت دی استیل فلورسئین را میگیرند، سپس درون سـلول استیل مویتیز آزاد شده و فلورسئین تولید می گردد که فلورسـنت بـوده و غشـاء سـلول نسبت به آن ناتراوا است. در طول موج‌های گسیلی با تحریک مناسب سـلول‌هـای زنـده، رنگ فلورسان سبز از خود ساطع می‌کنند. این خصوصیت را مـی تـوان هـم بـا محاسـبه بصری توسط میکروسکوپ فلورسان و هم توسط تفکیک سلولی اندازه گیری کـرد. سـرم می تواند دی استیل فلورسئین را هیدرولیز کند، بنابراین آزمون‌های به اصطلاح طـولانی مدت در صورتی که سرم جزئی از ماده باشـد توصـیه نمـی شـود. همچنـین فلورسـانس فلورسئین بستگی به PH داشته و نیازمند بافرهای (تثبیت کننده‌های) غیـر بیوکربنـاتی است. این عامل عمدتاً در آزمون بقا سنجی از دخول محیط کشت سلولی جلوگیری مـی کنند مگر اینکه توسط بافرهای موثر غیر بیوکربناتی ماننـد HEPES یـا بافرهـای آلـی دیگر محافظت شوند.

حساسیت بهتـر بـا ترکیـب یدپروپیـدیم و دی اسـتیل فلورسـئین بـه دسـت مـی آیـد. یدیروپیدیم نسبت به سلول‌های زنده ناتراوا و نسبت به سلولهای غیـر زنـده تـراوا اسـت. تحت این شرایط سلول‌های زنده از خود نور سبز فلورسانت و سلول‌هـای غیـر زنـده نـور قرمز روشن (درخشان) ساطع می کنند. در مقایسه با روش تریپسین آبـی مشـخص مـی

شود که پایداری روش دی استیل فلورسئین- یدپروپیدیم در حضور رنگ‌ها در مدت زمان طولانی بیشتر است. وضعیت انرژی سلول با توجه به غلظت نوکلئوتید آدینیلیت یکی از نشانه‌های مهم زیست پذیری به شمار می رود. این رابطه به دلیل دخالت میتوکندری در آغاز اپوپتوزیس منطقی است. یکی از پارامترهای سطح انرژی سلول بار انرژی است این شاخص توسط نسبت ذیل معین می‌شود:

[ATP]+0.5[ADP]/[ATP]+ADP]+[AMP] مقدار این نسبت برای سلول‌های طبیعی در حدود ۰/۹ بوده و شروع کاهش از این مقدار نشانگر آغاز اتلاف زیست پذیری است. برای مثال اندوتلیال کشت شده و سلول‌های P388D1 پس از تحمل تنش اکسید کننده (اکسیدانت) افت بار انرژی از ۰/۹۵ تا ۰/۶۶ را در دقیقه اول نشان می دهند، در صورتی که در روش تریپان آبی تا قبل از ۳۰ دقیقه نخست پس از شروع تنش هیچ گونه تغییری مشاهده نمی شود.

-گزینش

SELECTION

گزینش بر اساس خاصیت‌های منحصر به فردی که یک سلول را از دیگری متمایز می‌کند مانند چگالی اندازه، نشانه‌های اختصاصی (مارکر) گذر راههای منحصر به فرد متابولیکی و احتیاجات غذایی صورت می پذیرد.

-چگالی و اندازه

DENSITY AND SIZE

در سانتریفوژ نرخ ته نشینی ذرات به نیروهـای اعمـال شـده چگـالی و وسـکوزیته مـایع بستگی دارد. بنابراین با یک نیرو و ویسکوزیته معین نرخ ته نشینی متناسب با اندازه ذره و اختلاف بین چگالی ذره و چگالی مایع خواهد بود. در نتیجه نرخ تـه نشـینی در زمـان 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 رفـتن ویسـکوزیته مـایع کاهش می یابد.

از آنجا که چگالی و ویسکوزیته مایع اثر قابل ملاحظه ای بر نرخ ته نشین ذرات دارد مواد و محلول های گرادیانی گوناگونی بر اسـاس ایـن خـواص توسـعه پیـدا کـرده انـد. مـواد کنتراست ترکیب شده با «ید» که در ابتدا برای مطالعات بالینی کنتراست اشعه x توسعه یافتند در ایزولاسیون سلولی نیز مفیـد واقـع شـدند. سـری‌هـای مختلفـی از ایـن مـواد کنتراست بر اساس ساختار یونی غیر یونی، منومری یا دیمری وجـود دارنـد. دامنـه ایـن مواد از متریزوات تا متریزامید گسترش یافته است. (که اولی از گونه غیـر یـونی اسـت) و نیکودنز که یک ماده با سمیت کمتر بوده و و برای ایزولاسیون نوتروفیـل‌هـا، پلاکـت‌هـا، سلول‌های استلیت (ستاره شکل) پری آسینار لوزالعمده یا سلول‌های کوپفر اسـتفاده مـی شود. فیکول که یک پلی سوکرز مصنوعی است به طور گسترده در ایزولاسیون گونه‌هـای سلولی مگا کـاریو سـیتها هپاتوسـیت‌هـا، سـلول‌هـای جزایـر لوزالعمـده، نوتروفیـل‌هـا و لنفوسیت‌ها به کار برده می شود. ترکیب دیاتریزوات سدیم (ماده کنتراست یونی-هیپاک) با فیکول یا ترکیب متریزوات سدیم با فیکول (لیمفوپرپ) عمدتاً در گـزینش سـلول‌هـای خونی به کار گرفته می شود. یک ماده گزینشی نسبتاً جدید، پرکول است کـه از کلوئیـد سیلیس پلی دیسپرس با پوشش پـولی ونیـل پیرلیـدن (PVP) تشـکیل شـده و کـاربرد

فراوانی پیدا کرده است. پوشش PVP سبب خنثی کردن نسبی سیلیس از نظر پایداری PH و استقامت یونی فیزیولوژیکی می شود. برای دیدن مباحث مربوط به انواع سلول‌هایی که توسط پکرول از خون و ارگانهای مختلف دیگر جدا شده اند به منابع مراجعه کنید. این مواد گزینش گر به عنوان نخستین گام در کاهش سلول سازی ترکیبات سلولی به نحوی که دیگر روش‌های خاص جدا سازی را نیز بتوان به خدمت گرفت استفاده میشوند.

این مواد گرادیانی اجازه تشکیل محلول‌هایی با چگالی مناسب برای باند کردن سلول‌ها طبق چگالی شناوری (buoyant) بدون اینکه سلول‌ها تحت هیچ گونه تنش اسمزی یا یونی قرار داشته باشند را می دهد. ماده گرادیانی قادر است که بر اساس چگالی یا اندازه سلول‌ها را تفکیک کند. برای گزینش بر مبنای چگالی ماده گرادیانی به نحوی ساخته می‌شود که حیطه چگالی آن کل محدوده چگالی سلول‌های موجود در ترکیب را در بر میگرد. این فرایند جهت اطمینان از این مسئله است که تحت نیروی سانتریفوژ اعمال شده، سلول‌ها به سطح تعادلی تحت عنوان سطح ایزوپیکنیک رسیده اند که در این سطح چگالی محیط میشوند. تحت این شرایط اندازه نقش مهمی را ایفا نمی‌کند.

چگالی یک سلول می تواند توسط خاصیت اسمزی محلول تحت تأثیر قرار بگیرد. در یک محیط‌هایپرتونیک (پرفشار) سلول کوچک شده و چگالی شناوری به واسطه حذف آب افزایش می یابد زیرا ماده‌هایپرتونیک سلول‌ها را متورم کرده و چگالی شناوری آنها را کاهش می دهد. میزان اسمزی یک ماده بخصوص در هنگام جداسازی ایزوپیکنیک باید

کنترل شود. مشخصه این مواد نشانگر توانایی آنها در رسیدن به کنترل غیر وابسته به چگالی و خاصیت اسمزی است.

جداسازی سلول‌ها بر اساس اندازه یا سرعت نیازمند این است که ماده گرادیانی کم چگال تر از سلول‌های موجود در ترکیبی باشد که باید جداسازی شود. تحت این شرایط گرادیانی سلول‌ها وضعیت ایزوپیکنیک نداشته و جداسازی بر اساس اندازه مشخص می شود به این صورت که سلول‌های بزرگ سریعتر از سلول‌های کوچک جابجا می شوند. این وضعیت قبل از رسیدن سلول‌ها به کف لوله متوقف می شود. جداسازی ایزوپیکنیک به سرعت سانتریفوژ بالاتری نسبت به جداسازی سرعتی نیاز دارد. اگر سلول مورد نظر به سرعت‌های بالا حساس باشد در جداسازی ایزوپیکنیک باید توجه کافی مبذول شود.

برای دستیابی به موادی با چگالی‌های مختلف از روشهای پیوسته یا ناپیوسته استفاده می شود. گرادیان‌های ناپیوسته، تغییرات ناگهانی و یا واسطه‌هایی را در طول لوله سانتریفوژ ایجاد می کنند. تغییر یک چگالی خاص در هنگامی که ماده جداساز به عنوان بالشتک عمل می‌کند می تواند عمل جداسازی سلول را انجام دهد مانند وضعیت لویکوسیت‌های تک هسته ای در زمان استفاده از گرادیان پکرول. همچنین می توان از یک سری تغییرات ناگهانی چگالی برای جداسازی اعصاب دوپا مینرژیک شکمی و سینه ای جنین موش و جداسازی اسپرم بارور X از اسپرم بارور Y استفاده کرد. گرادیان‌های چگالی ناپیوسته بدلیل جمع شدن سلول‌ها در حد فاصل‌ها می توانند سبب ایجاد عوامل خارجی ناخواسته (آرتیفکت) شده و شناخت سلول‌های با چگالی متفاوت وابسته به ناهمسانی چگالی در گرادیان‌های ناپیوسته را مشکل می سازند. گرادیان‌های پیوسته به وسیله

گرادیان سازها یا به صورت پکرول توسط گرادیان‌های خود ساز شکل میگرند. پکرول در اثر نیروی سانتریفوژ بیشتر از ۱۰۰۰۰g شروع به ته نشینی می‌کند. و از آنجائی که پکرول یک کلوئید چند طیفی (پلی دیسپرس) است ذرات با نرخ‌های متفاوت ته نشین می شوند که سبب ایجاد گرادیان نرم میشود. تحت این شرایط ممکن است سوسپانسیون سلول با پکلرول آمیخته شده و عمل سانتریفوژ در سرعت‌های بالا منجر به تولید گرادیانی شود که پس از آن، سلول‌ها بر اساس گرادیان شکل گرفته جدا می شوند. در این مورد دو نگرانی وجود دارد. اول اینکه نرخ بالای سانتریفوژ ممکن است به سلول‌ها آسیب برساند و دوم اینکه احتمال جذب پکرول توسط لیزوزوم‌ها وجود دارد البته پکرول جهت جداسازی انواع لیزوزومال‌های با چگالی‌های مختلفی در هپاتوسیتهای موش بدون تأثیر در چگالی لیزوزوم‌ها به کار برده می شود.

-نشانه‌های اختصاصی (مارکر)سلول UNIQUE CELL MARKERS

ساختمان سلول‌ها در بافت‌ها با توجه به عملکردشان در درون سلول ناهمگن است. این ساختارها نه تنها نشانگر عملکرد منحصر به فرد سلول‌هاست بلکه وسیله ای برای تشخیص آنها می باشد بخصوص اگر این ساختار در سطح سلول باشد. گزینش استثنائی پادتن‌های منوکلونال (تک تاگی) سبب ایجاد روش‌ها و تجهیزات مختلفی شده است که به منظور بهره برداری از این اختلافات به کار برده می شوند.

-دسته بندی سلول فلورسنت فعال شده (**FACS**)

Fluorescent- Activated Cell Sorting (FACS)

دسته بندی 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 پادتن‌های منوکلونال می باشد. عملکرد این دستگاه بر اساس قابلیت ایجاد جریانی از سلول‌های منفرد است که به طور انتخابی توسط صفحات منحرف کننده با بارهای مخالف قابل تغییر جهت هستند. در ابتدا ترکیبی از سلول‌ها با پادتن‌های مونوکلونال جفت شده با نشانه‌های فلوروسنتی نگهداری میشود، سپس سلول‌هایی که دارای اپیتوپ (epitope) مناسب هستند با پادتن‌های نشان دار باند می شوند. در این دستگاه ترکیب به صورت جریانی از سلول‌ها در می آیند که به وسیله مبدل لرزشی به قطره‌های کوچک شکسته می شود. سپس باریکه لیزر به سلول‌ها تابانده شده و پرتو حاصل توسط فوتومالتی پلیر (تشدید کننده نوری) دریافت می گردد و متعاقباً پردازش انجام می گیرد. سلول‌ها در خلال این پردازش به نحوی باردار می شوند که به خوبی توسط صفحات باردار منحرف کننده قابل انحراف باشند. از آنجا که دستگاه قادر به انتگرال گیری کلیه اطلاعات است پس از برخورد باریکه لیزر با سلول‌های مورد نظر، یک بار مختصر به صفحات منحرف کننده اعمال می شود که نتیجه آن انحراف سلول‌های نشان دار و از دست رفتن سلول‌های بدون نشان است به طور کلی عمل جداسازی در دستگاه FACS بر اساس هر گونه خصوصیت سلولی که توسط پراکندگی یا انتشار نور باشد انجام می‌گیرد. با توجه به پیچیدگی دستگاه، عمل دسته بندی می تواند بر روی بیشتر از یک

پارامتر انجام شود، از جمله، اندازه گیری شکل سلول اندازه سلول و انواع ویژگی‌هایی که توسط برچسب گذاری فلورسانس (نشانه گذاری فلورسانس) قابل بررسی هستند. شناسایی سلول‌ها در سیستم هماتوپوئیتیک (خون سازی) با استفاده از روش سلول سنجی روان انجام پذیرفته است. این سلول‌ها به خوبی قابل تشخیص بود و پادتن‌های مونو کلونال فراوانی در تضمین نتیجه بخش بودن آنها وجود دارد. این شناخت به همراه ایزولاسیون می تواند کاملاً مؤثر بوده و در نتیجه سلول‌های کم چگالی توسط این روش به خوبی تفکیکی می شوند.

-دسته بندی رشته ای ایمنی مغناطیسی و دسته بندی سلول مغناطیس فعال شده (**MACS**)

Immunomagnetic Bead Sorting and Magnetic Activated Cell Sorting (MACS)

روش دسته بندی رشته ای ایمنی مغناطیسی و دسته بندی سلول مغناطیسی فعال شده از پادتن‌های مونوکلونال و دیگر مولکول‌های گزینش شده با خاصیت مغناطیسی برای گزینش سلول سود می برد. به طور کلی، در این روش ترکیبی، آمیزش سلول با پادتن اصلی مونوکلونال برای اپیتوپ معینی نگهداری می شود. رشته‌های مغناطیسی با پادتن‌های ثانویه گوناگونی پوشیده شده و سلول‌ها و رشته‌ها با هم رشد می یابند. سلول‌های نشاندار ویژه با اتصال به ذرات مغناطیسی پادتن ثانویه را حمل می کنند. لوله ای که ترکیب فوق را حمل می‌کند در مقابل مغناطیس قرار داده می شود در نتیجه رشته‌های حامل سلول به سمت مغناطیس کشیده می شوند. سلول‌های غیر متصل به

رشته مغناطیسی را می توان به بیرون منتقل کرد، این فرایند را می توان چندین بار تکرار نمود تا سلول‌های غیر متصل به کلی خارج شوند.مثالی از این روش در مطالعات تصفیه سلول‌های $\beta$ از جزایر لانگرهانس موش آورده شده است. یک نمونه از گزینش غیر پادتنی که رشته مغناطیسی را مورد استفاده قرار می دهد در مطالعاتی که در آن سلول‌های اندوتلیال میکروشریانی از داخل جزایر لانگرهانس پاکسازی شد، آمده است. رشته‌های پوشیده شده با آلگولتینین-1 اولکس یوروپاوس (Ulex europaus) برای باند کردن سلول‌های اندوتلیال شریان‌های بسیار کوچک استفاده شدند. این ایزولاسیون نشان دهنده ویژگی منحصر به فرد سلول‌های اندوتلیال است که نظریه مبنی بر اهمیت محل آناتومی درحالت فنوتیپیک سلول‌های مشابه را تأئید می‌کند. گزینش می تواند مثبت یا منفی باشد: مثبت یعنی سلول مورد نظرنشان دار بوده و تحت تأثیر میدان مغناطیس قرار می گیرد و منفی یعنی آلاینده سلول غالب نشان دار بوده و باند شده است و سلول مورد نظر پاک گردیده است(منتقل گردیده است.)

مزیت گزینش منفی این است که سلول‌های مورد نظر به رشته‌های مغناطیسی پیچیده نشده ولی رشته‌های بزرگ ممکن است بر اتصالات بعدی روی سطوح کشت بافت تأثیر بگذارند. اگر نیاز به گزینش مثبت باشد پاکسازی رشته‌ها از سلول‌های مورد نظر صورت گرفته و این عمل با استفاده از ضدسرم ضد فب (anti-Fab) انجام می شود. رشته‌ها توسط گوارش آنزیمی پاک می شوند اما این کار ممکن است بر سلول تأثیر بگذارند. دو روش دیگری به نام گزینش سلول (CELLection) DNA کوتاه بین رشته ای و پادتن توسط دی (DNASE) از هم باز می شوند. در این روش رشته‌های داینا ( Dyna beads) از داینال (Dynal) مورد استفاده قرار می گیرند. طراحی دیگر رشته MACS

که توسط میلتنی بیوتک با مسئولیت محدود صورت گرفت این معایب را نـدارد اگـر چـه رشته‌های داینا از دیدی دیگر با توجه به داشتن توانایی در احیای سریع سلول یک مزیت به حساب می آیند. استفاده از رشته‌های میلتنی ۵۰ nm بـه یـک سـتون گـزینش نیـاز دارند. در قسمت نخست ستون سلولهایی قرار دارند که دارای نشـان‌هـای ویـژه هسـتند. باقیمانده ستون را تا زمانی که میدان مغناطیسی برقرار است، رشته مغناطیسـی تشـکیل می دهد. ستون فوق قابل شستشو بوده و در اثر شستشو سلول‌های غیر متصل بـه رشـته مغناطیسی خـارج مـی شـوند. بـه محـض برداشـتن میـدان مغناطیسـی از روی سـتون سلول‌های متصل به رشته شسته می شوند. مطالعات انجام شده بر روی رشته‌های داینا و سیستم ستون‌های میلتنی از میدان‌های نسبتاً مغناطیسی مرتبط با این ذرات بهـره مـی برند. در این دو مرحله گـزینش دو نـوع سـلول نشـانه دار سـطحی بـدون حـذف اولـین مجموعه از رشته‌های مغناطیسی به کار برده می شوند. در ابتدا گزینش مثبت با سیستم میلتنی رخ می دهد که توسط گزینش مثبت یا منفی رشته‌های داینـا دنبـال مـی شـود. توان مغناطیسی گزینش گر داینال قادر به جذب رشته‌های بزرگ تر داینا بوده اما توانائی جذب رشته‌های کوچک میلتنی را ندارد.

دستگاه FACS برای دسته بندی سلول پرهزینه است. بنابراین دسته بندی مغناطیسـی به عنوان روش ایزولاسیون و گردآوری سلول در هنگام استفاده از پادتن‌های مونوکلونـال برای جداسازی سلول‌ها ترجیح داده می شود. هر دو این روش‌هـا بـرای کـار بـا سیسـتم سلول خون سازی نسبت به سلول‌های بافت‌های دیگر سازگارتر هستند. سلول‌ها سیسـتم خون سازی تا حدود زیادی با ماتریس برون سلولی (extracellular matrix) ارتبـاط نداشته و به خوبی برای سوسپانسیون (تعلیق) کارآیی دارند. این دو مشخصه شرایط لازم

برای بهره گیری از مزایای این روش‌ها را فراهم می‌کند. با این وجود سلول‌های بافت‌های سخت ذیل توسط این گونه روشهای ایمنی گزینش می شوند: سلول‌های کشت یافته ماهیچه‌ای سلول‌های اندوتلیال آئورت، گزینش سلول‌های لومینال ومایواپیتلیال پستانی، گزینش بخش‌های مختلف نفرون پروگزیمال، غنی سازی زیر جمعیت‌های سلول‌های اپیتلیال تنفسی و گزینش سلولهای حاوی کالی کرین از سلول‌های لوله ای کلیوی محدودیتی که برای سلول‌های غیر خون ساز وجود دارد چسبندگی بیشتر آنهاست که اجازه شارش مناسب در ستون‌ها را نمی دهد. گردش جریان در FACS از سلول‌های توده ای جلوگیری می کند، بدین ترتیب سبب بهبود خلوص می گردد.

از آنجا که میزان نشانه‌های اختصاصی سلول در بافت نسبت به زمان گذرا است این روش باید به سرعت در روند ایزولاسیون اعمال شوند تا احتمال حضور نشانه‌های مطلوب افزایش یابد. سلول‌های اپیتلیال در شرایط کشت سلولی استاندارد قطبیت و عملکرد متمایز خود را از دست می دهند، هپاتوسیت یک نمونه قابل ذکر در این مورد است. انواع دیگر سلول‌ها نیز با حالت‌های مشابه به شرایط کشت سلولی استاندارد پاسخ می دهند. باقی ماندن سلول‌ها به حالت تعلیق (سوسپانسیون) برای مدت زمان طولانی می‌تواند آنوئیکها را فعال کرده و زیست پذیری و تولید سلول را کاهش دهد. علاوه بر این، سلول‌های تحت آزمایش FACS و گزینش ایمنی مغناطیس سلول، نشان دهنده تغییراتی در یکپارچگی غشاء بوده که به واسطه نیروهای هیدرودینامیک یا میدان‌های مغناطیسی ایجاد شده است. همچنین رشته‌ها می توانند با مصرف آنتی ژن مقادیر قابل ملاحظه ای از آن را از سطح سلول‌های زنده و فعال جدا کنند. ایزولاسیون آئوزینوفیل‌ها (آئوزین پذیرها) توسط MACS نشان دهنده تضعیف عکس العمل نسبت به جاذب‌های

شیمیایی LTB4 و PAF است در حالی که تصفیه اولیه پکرول به این صورت بر ائوزینوفیل تأثیر نمی گذارد.

یکی از تفاوت‌های بین FACS و MACS این است که FACS می تواند کمی (سنجش پذیر) باشد. از آنجا که درجه فلورسانس می تواند معیاری برای FACS باشد، امکان ایزوله کردن سلول با درجات مختلف شدت فلوروسانس وجود دارد. در مورد MACS، مسأله به فرم همه یا هیچ است. البته ترکیب MACS و سانتریفوژ با گرادیان چگالی می تواند تمایزاتی بر اساس درجه میزان آنتی ژن موجود در سطح فراهم کند. سلولی که میزان آنتی ژن بیشتری داشته باشد دارای رشته‌های متصل بیشتری بوده و درنتیجه چگالی بالاتری خواهد داشت، چنین سلولهایی در گرادیان چگالی سریعتر ته نشین می شوند.

ترکیب فرایند دسته بندی سلول فعال شده فلورسانس و رشته مغناطیسی برای ایجاد تصفیه بهتر لازم نیست. قرار دادهای تأئید نشده در مورد موضوع خون سازی برای همه سلول‌های بافت‌های سخت مناسب نیست. شاید توسعه روش‌هایی برای غلبه بر محدودیتهای بالا لازم باشد. چنین تلاشی کاملاً مفید بوده و در مواردی ضروری است. سلول‌های اجدادی (Progenitor) تقریباً در کلیه اندام‌های یک ارگانیزم رشد یافته پیدا می شوند. ایزولاسیون این سلول‌ها به روش‌های ایزولاسیون حساس نیازمند است. این سلول‌ها به سختی قابل رؤیت بوده و بنابراین روش‌های ماکروایزولاسیون که ایزولاسیون سنتی کشت سلولی را شامل می شوند مناسب نخواهند بود قرار دادهای موجود برای سلول‌های خون ساز می تواند پایه ای برای پیشرفت‌های بیشتر باشد. با ملاحظه شرایط

ذکر شده فوق، این قرار دادها را می توان تقریباً برای هر سلولی که به طور مناسب توسط نشانه‌های اختصاصی نشان دار شده باشد به صورت موفقیت آمیز توسعه داد.

-جداسازی Panning

جداسازی روش ایمنی دیگری است که در آن لکتین‌ها برای باند کردن انواع سلول‌های خاص مانند سلول‌های اپیتلیال لثه پیوندی یا سلول‌های اپیتلیال آرواره ای (آلوئولار) نوع II مورد استفاده قرار می گیرند. ظروف کشت سلولی با پادتن مناسب یک نشانه خاص سلولی ترکیب می شوند. سپس مخلوط سلول به ظروف کشت سلولی پوشیده شده با پادتن اضافه می گردد. در این حالت سلول‌های نشانه دار به ظرف چسبیده و سلول‌های بدون نشانه به آسانی خارج می شوند. این روش به قابلیت سطحی که پادتنها به آن می چسبند بستگی دارد، تا کمترین جاذبه را برای سلول‌های ناخواسته داشته باشد، در غیر این صورت تمایز بین سلولی کاهش می یابد. عمل جداسازی در مدهای مثبت یا منفی قابل استفاده است؛ وضعیت مثبت برای انتخاب سلول‌های مطلوب و منفی برای انتخاب و خارج سازی سلول‌های نامطلوب در نظر گرفته می شود. به منظور خارج سازی سلول‌های جدا شده از طرق آنزیمی و مکانیکی می توان بهره برد. این روش برای ایزوله کردن سلول‌های تروفوبلاست انسان از ترکیب پرزهای جفت جفت تریپسین زده سلول‌های آغازین ژرم، و فیبروبلاست ها از ترکیب کراتینوسیت، برای گزینش مثبت سلولهای لانگرهانس و کراتینوسیتها و لنفوسیت‌ها مورد استفاده قرار میگیرد.

-مشخصه‌های غذایی و متابولیکی (سوخت وساز)

METABOLIC AND NUTRITIONAL CHARACTERISTICS

از نیازهای غذایی و متابولیکی گوناگون سلول‌های مختلف نیز می توان به منظور گزینش در خلال ایجاد کشت‌های اولیه بهره گرفت. در این موارد شرایط از اهمیت ویژه ای برخوردار هستند زیرا پاسخ سلول‌ها به این وسایل ممکن است به شرایط معینی احتیاج داشته باشد. برای مثال، سمیت مورد نظر ممکن است در حضور سرم به واسطه داشتن پتانسیل سم زدایی ظاهر نشود. همچنین از آنجا که سرم شامل مجموعه گوناگونی از مواد غذایی است، بهره گیری از احتیاجات غذایی مختلف در حضور سرم دشوار می شود. (تضعیف می شود).

-متابولیک (سوخت و ساز) METABOLIC

ایزوزیم‌ها (Isozymes) به طور ناهمگنی در میان انواع مختلف سلول‌ها توزیع شده اند استرازهای غیر خاص نمونه‌های خوبی از این پدیده به شمار می روند. حالت‌های متفاوت استراز ایزوزیمها در سلول‌های اندتلیال و پریسایت‌ها مبنای اصلی تمایز بین این دو نوع سلول است. غلظت mM ۵۰ ال- لوسین متیل استر برای سلول‌های اندوتلیال سمی بوده ولی برای پریسایت‌ها سمی نمی باشد و منجر به ته نشینی سلولهای اندوتلیال می گردد. به طور مشابه ال- لوسین- ال- لوسین متیل استر در مقایسه با سلول‌های B و T کمک کننده ترجیحاً لنفوسیت‌های سمی را می کشد. لیزوزمال تیول پروتئاز دی پپتیدیل

پپتیدازI، می تواند ال- لوسین- ال- لوسین متیل استر را به محصولات هضم کننده غشاء تبدیل کند. در غلظت‌های بالا آنزیم در لنفوسیتهای سمی بیشتر از سلوهای دیگر ظاهر می شود که در نهایت ته نشین می شوند. همچنین تحلیل گرانولوسیت‌ها و مونوسیت‌ها از سلول‌های تجمع یافته افرسیس را می توان با تکوین در کنار ال- فنیلالانین متیل استر هیدروکلراید به دست آورد. سپس سلولهای CD34+ به وسیله ایزولاسیون رشته مغناطیسی تصفیه می شوند. پالایش اولیه گرانولوسیتها و مونوسیتها بازدهی ایزولاسیون را افزایش می دهد.

آلاینده فیبروبلایست یک مشکل متداول در کاشت بافت می باشد. تلاش برای کنترل رشد فیبروبلاست با استفاده از بهره برداری از فقدان فعالیت ال-آمینو اکسیداز، آنزیمی که دی- والین را به ال- والین تبدیل می‌کند، انجام می شود. سلول‌های مطلوب نیازمند انجام این تبدیل به طور مناسب هستند. در ماده ای که دی والین جایگزین ال-والین می شود قابلیت گزینش مشاهده می شود. البته گزارشات ضد و نقیضی در این مورد وجود دارد. فیبروبلاست‌ها از گلیوبلاستومای چند شکل و اولیگودندروگلیوما در محیطی که در آن دی- والین جایگزین ال- والین می شود کشت می گردد و با محیط استاندارد حاوی ال-والین مقایسه می شود. هر سه نوع سلول در برابر دی- والین مقاومت کرده و تغییر شکل مورفولوژیکی قابل ملاحظه ای دارند. همچنین با وجود اینکه احتمال توقف فیبروبلاست‌ها توسط دی-والین وجود دارد اما آنها لزوماً کشته نشده و ممکن است با قرار گرفتن دوباره سلول در محیط حاوی ال-والین شروع به رشد نمایند. در انتها نتیجه میگیریم که دی والین جلوی رشد فیبروبلاست انسانی را در محیط آزمایشگاه نمی گیرد. قبل از انجام هر گونه تلاشی برای متوقف کردن رشد فزاینده فیبروبلاست توسط ماده

دی- والین، عوامل متعددی باید در نظر گرفته شود. اول اینکه دی والین تهیه شده باید دارای آلاینده ال- والین کمی باشد. مقادیر کم ال-والین ممکن است سبب کاهش سرعت تکثیر شود اما باعث طولانی شدن بقا می گردد. همچنین غلظت بهینه دی-والین ممکن است برابر غلظت اصلی ال-والین نباشد. میزان تأثیر دی-والین به اندازه ایزومر-ال نمی باشد. میزان بازدهی جابجائی نسبی دی- والین و ایزومر –ال یکسان نبوده و در درون سلول، دی والین به نوع ال تبدیل می شود. زمان مورد نیاز برای این فرایند سبب افزایش الزامات برای نوع دی می گردد. به طور ایده آل در صورت امکان بهتر است ماده ای عاری از دی- ال- والدین تهیه شده و سپس با غلظت مناسب دی والین مورد نیاز تیتر کرد.

هپاتوسیت شامل یک چرخه مؤثر اوره می باشد. در نبود ال- آرژنین هر یک از چرخه‌های میانی اوره قادر به بازسازی ال-آرژنینی است. از نظر سنتی برای جایگزینی ال- آرژنین از ال- اورنیتین استفاده می شود. دیگر آلاینده‌های بالقوه سلول در ایزولاسیون هپاتوسیت دارای فعالیت چرخه اوره قابل ملاحظه ای نبوده و در نبود ال- آرژنین زنده باقی نمی مانند. ظاهراً احتمال رخ دادن عمل تغذیه متقابل( cross feeding) در هنگامی که هپاتوسیتها ماده را برای سلول‌های آرژنین غیر قابل تکثیر آماده می کنند بسیار کم است.

سودمندی ماده عاری از ال- آرژنین بستگی به چرخه عملیاتی اوره دارد. هر گونه آسیب سلولی که به طور مستقیم یا غیر مستقیم بر چرخه اوره تأثیر بگذارد بر زیست پذیری هپاتوسیتها تحت شرایط عاری از آرژنین نیز اثر می گذارد. اگر شک داشته باشیم که

وجود هپاتوسیتها مطلوب یا نامطلوب است استفاده از مـاده عـاری از ال-آرژنـین توصـیه نمی شود. به طور کلی این سطح گزینش ضروری نیست، زیرا هپاتوسیتها را می تـوان در کشت اصلی با بهره گیری از اختلاف فاحش اندازه سلول بین هپاتوسیتها و دیگر سلولهای کبد با خلوص بالا به دست آورد.

شرایط کشت سلولی دیگر که برای انواع سـلولهای مختلـف انتخـاب مـی شـود خاصـیت اسمزی ماده است. سلول‌ها در برابر تغییرات اسمزی عکس العمل‌های تطبیق پـذیر ولـی غیر یکسان دارند. سلولهای سرتولی ایزوله شده از لوله‌های تخمدان حاوی سـلولهای ژرم آلاینده می باشند. ارائه محیط‌های کشت به یک محیط‌هایپوتونیـک (کـم کشـش) بـرای مدت زمان معین منجر به پاک سازی انتخابی سلول‌های ژرم بدون تأثیر قابل ملاحظه بر سلول‌های سرتولی می شود. همچنین سلول‌های اپیتلیال تجمع یافته مجرای درونی کلیه زیاد تطبیق پذیر نیستند. علاوه بر این مشاهده شد که غلظت NaCl می تواند بر افزایش سلول‌های اپیتلیال تجمع یافته مجرای کلیدهای نوزاد خرگوش تأثیر بگذارد.

-تغذیه ای NUTRITIONAL

حتی اگر سلول‌های تحت کشت با محیط آزمایش سازگار شوند. مشخصه‌هـای مهم فنوتیپ بدن را حفظ می کنند مانند آنچه در مورد سلولهای پروسـتات و نـایژک‌هـا نشان داده شده است. توانایی سلول‌ها درتکثیر و بیان مشخصه‌هـای منحصـر بـه فـرد در کشت سلولی به فاکتورهای رشد، سایتوکین‌ها، هورمونها، مـاتریس‌هـای بـرون سـلولی و ترکیبات غذایی ماده وابسته است. درک عمکرد این اجزاء برای فهمیدن عملکـرد و بقـای سلول‌ها در محیط آزمایشگاه لازم است.

شرایط غذایی سلول مورد نظر شامل تیتراسیون میزان بهینه کلیه اجزاء ماده مـی باشـد. برای دستیابی به این هدف منحنی‌های رشد با پاسخ‌های دوزی مختلـف در چگـالی‌هـای سلول کلونال (بافت- زاد) مورد نیاز خواهد بود. شرایط کلونال به خاطر اینکه چگالی‌هـای بالای سلولی ماده و معایب مبهم آن را تحت تأثیر قرار می دهد. مهم هستند این فعالیت در هنگام استفاده از روش‌های سنتی بسیار وقت گیر است. بهره گیری از سـخت افـزار و نرم افزار موجود برای تصویربرداری با ظرفیت پذیرش بالا می تواند به طور قابـل تـوجهی زمان مورد نیاز برای تکمیل تیتراسیون‌ها را کاهش دهد.

توسعه محیط عاری از سرم نشان دهنده وجود شرایط غذایی متفاوت برای انواع مختلـف سلول است. با وجود مقادیر زیاد سلول‌های مورد نیاز با اجزاء کیفی مشابه در محیط بازال خود شرایط کمی آن‌ها متفاوت خواهد بود. سـلول‌هـای مختلـف در یـک ارگـانیزم چنـد سلولی به وسیله مایع برون سلولی حاوی اکسیژن، دی اکسـید کـربن، گلـوکز، لاکتیـت، آمینواسیدها و مواد غذایی مهـم دیگـر، فاکتورهـای رشـد و هورمونهـای مشـتق شـده از پلاسما و یا سلولهای محیط احاطه شده اند. از آنجا که سلول‌هـای مختلـف، برنامـه‌هـای متابولیکی متفاوتی دارند این محیط‌ها نیز متفاوت خواهند بود. برای مثال فیبروبلاست‌ها و کراتینوسیتهای یک نمونه پوستی در محیط‌های مربوطه تکثیر نمـی شـوند. تفـاوت در غلظت کلسیم و آدنین ظاهراً مؤثرترین عامل در رشـد انتخـابی مـی باشـد. رشـد بهینـه کراتینوسیتها در غلظت‌های نسبتاً کم کلسـیم رخ میدهـد. غلظـت کلسـیم بهینـه بـرای فیبروبلاست سبب لایه لایه شدن کراتینوسیتها شده و آنهـا دیگـر قابلیـت عبـور سـریال (زنجیروار) را در زمانی که غلظت بهینه کلسیم برای کراتینوسـیتها در کمـک بـه تکثیـر فیبروبلاست بسیار کم اسـت نخواهـد داشـت. همچنـین سـلول‌هـای اپیتلیـال پسـتانی،

فیبروبلاست‌ها توسط عکس العمل‌های متفاوت شان نسبت به شرایط زیر بستری و اجزاء ماده از همدیگر تشخیص داده می شوند.

کلسیم اثر قابل ملاحظه ای پر وضعیت فنوتیپ سلول اپتیتال می گـذارد. غلظـت نسـبتاً بالای کلسیم سبب لایه لایه شدن سلول‌ها شده و همان طور که در سلول‌هـای اپیتلیـال مری موش مشاهده شد، عمل جداسازی را آسان می‌کنـد. کراتینـو سـیت‌هـای سـطحی پوست (اپیدرمال) موش با میزان بهینه ۰/۰۳mM رشد کـرده و در نهایـت در ۱/۰mM کلسیم جدا می شوند. سلول‌های اوروتلیال انسان در ۰/۰۶mM کلسیم تکثیر یافته و در غلظت‌های بالاتر جدا و پوسته می شوند. سرم نیز می تواند سلول‌های اپیتلیـال را از هـم جدا کند. سلول‌های اپیتلیال نایژک یک انسان طبیعی در حضور سرم به صـورت پوسـته پوسته جدا شده در حالی که سلولهای کار سینوم ریه در حضـور سـرم جـدا نمـی شـود. همچنین شرایط کشت که به رشد سلولهای اپیتلیال لومینال طبیعـی کمـک می‌کنـد از رشد سلول‌های نئوپلاستیک حمایت نمی کند.

در یک محیط عاری از سرم یا مشخص از نظر شیمیایی، ترکیبات غذایی تـاثیر شـدیدی بر رفتار سلولی می گذارد. شرایط تغذیـه ای خـاص، تکثیـر سـلولی را محـدود می‌کنـد. فاکتورهای رشد و مولکولهای اطلاعـاتی دیگـر، همچنـین مـاتریس بـرون سـلولی بـرای سلولهایی که به طور طبیعی با آن در ارتباط هستند با ترکیب ماده بـازال بـر هـم کـنش داده تا به یک فنوتیپ ویژه دست پیدا کند. اپیتلیای تجمع یافته در مجرای کلیه جنینی به مواد مختلف با الگوهای متفاوت پاسخ مـی دهـد. سـری مـواد MCDB 150 بـرای کراتینوسیتها توسعه یافته است. کـاربرد MCDB 150 بـرای سـلولهای اپیتلیـال غـده

بزاقی موش نشان دهنده عدم توانایی برای زیر کشت گسترده در محیط عاری از سرم است. البته افزایش سطوح بهینه در عصاره ایزولوسین به سلول‌های اپیتلیال بزاقی اجازه می دهد که به صورت ترتیبی (سریال) زیر کشت بروند.کراتینو سیتهای انسانی اثبات کننده نیازهای غذایی به اینوزیتون و کولین تشدید اثر میتوژنیک فاکتور رشد اپیدرمال توسط ال-سرین سرم، انسولین، فاکتور رشد کراتینوسیت وعصاره غده هیپوفیز گاوی است. همچنین حضور اتانولامین نیاز سرمی سلولهای اپیتلیال پستانی موش را برای تکثیر کاهش می دهد. برای انواع سلولهایی که نسبت به سرم عکس العمل نشان می دهند سرم می تواند با فراهم آوردن مواد غذایی به محیط میتواند سبب کم شدن نیاز سرمی گردد.

در شرایط نبود سرم نیاز غذایی آشکارتر می گردد. غلظت بالای پیروات ولاکتیت در کبد موش به همراه فعالیت گلوکز سنتز DNA را افزایش می دهد. در نبود سرم مقدار کم سلنیوم برای رشد کلونال فیبروبلاست‌ها و خط سلول همستر چینی ضروری است. همچنین مقدار کم روی معدنی با توجه به غلظت به کار رفته نشان دهنده اثر مثبت یا منفی آپوپتوسیس در تیموسیتهای موش است. علاوه بر این جداسازی پیگ پری ادیپوسیت در محیط کم منیزیم دشوار است. همچنین گزینش سلول‌های لوله پروکسیمال انسانی با استفاده از فرایند متابولیکی(سوخت و ساز) گلوکونئوژنیک موثر قابل دستیابی است. سلول‌های اولیه (اصلی) در یک محیط هورمونی عاری از سرم بدون گلوکز یا انسولین کشت شده و در این حالت سلول‌هایی که قابلیت گلوکز نئوژنزیس را ندارند آسیب می بینند.

امکان دیگر بهینه سازی شیوه ترکیبی است. یک ماده غنـی ماننـد M -199 Ham's F12 یا سری MCDB به تنهایی یا به صورت ترکیبی مورد استفاده قرا می گیرند. ایـن عمل یک اقدام منطقی بوده و نتایج مطلوبی را به دنبال دارد. برای مثال سلول‌های میـان پوش روده ای کشت یافته در ماده M-199 عـاری از سـرم بـه منظـور مطالعـه تنظـیم ترومبین ماتریس فعالیت متالوپروتناز استفاده می شوند.

سلول‌های دانه ای (گرانولوزا) نارس خرگـوش کشـت یافتـه در M -199 بـرای بررسـی آندروستندوئین و فیبرونکتین مختلف سلولی ایجاد شده توسط هورمون تحریـک کننـده غدد لنفاوی استفاده می شوند. کاربرد ترکیب دولیکو تصحیح شده توسـط مـاده ایگـل و Ham's F12 به همراه ماده بازال عصبی در محیط عاری از بافت در کشت نـرون‌هـای بازال کولینرژیک پیشانی موش نشان داد که مکمل فاکتور رشد به تنهـایی بـرای جبـران ترکیب غذایی محدود کافی نیست. برای کشت اپیتلیم انسـانی سـطح تخمـدان در یـک محیط مشخص از ترکیب ماده 199 یا MCDB 105 استفاده می شود.

-نتیجه گیری

جهت تسهیل دشواری ذاتی عمل ایزولاسیون و گزینش تلاش‌هایی صورت گرفتـه اسـت. بافت‌ها متغیرهای طبیعی هستند که در مقابل کشت از خود مقاومت نشـان مـی دهنـد. شرایط اولیه مانند عمر بافت و عملکرد بافت بسیار حیاتی هستند. زیـرا ایـن عوامـل اثـر تعیین کننده ای بر نتیجه نهایی دارند. محقق می تواند با استفاده نادرست از شناسه‌هـا و شرایط نامناسب در اتلاف زیست پذیری سهم داشته باشد. بنابراین در تعیین شناسه‌هـا و

فرایندها باید دقت صد چندانی کرد. یکی از مقاصد این فصل نشـان دادن دشـواری‌هـای ایزولاسیون و ملاحظاتی است که در کسب موفقیت نهایی مفید واقع می شود.

# تولید داربست های پلیمری : قالب گیری حلال

# PROCESSING OF POLYMER SCAFFOLDS : SOLVENT CASTING

گرگوری- ای- رات کوفسکی، چریل-ای- میله، و سوریا- کی-مالاپراگادا

## پیشگفتار

قالب گیری حلال یک روش ساده برای تولید ساختارها در مهندسی بافت است. در این روش پلیمر در یک حلال مناسب حل شده و در قالب ریخته می شود. سپس حلال حذف گردیده و حالت پلیمر را در شکل دلخواه (مورد نظر)حفظ می‌کند این شیوه به شکل های قابل حصول محدود می شود. عموماً، صفحات صاف و لوله ها تنها طرح های قابل شکل گیری هستند اما با قرار دادن صفحات صاف روی هم نیز می توان ترکیبات پیچیده تری تهیه کرد (فصل ۵۹، لایه بندی غشاء را ببینید) فیلم ها را می توان با شستن ذراتی مانند کریستال های نمک کاشته شده درون پلیمر به صورت متخلخل در آورد. همچنین ترکیب حلال- پلیمر را می توان در یک غیر حلال پلیمر که قابلیت مخلوط شدن در حلال اول را دارد قرار داد. این روش به نام وارونگی فاز یا جداسازی (فصل ۶۲، جداسازی فاز را ببینید) شناخته شده و برای شکل دادن به غشاهای متخلخل نامتقارن استفاده می شود.

مزیت اصلی قالب گیری حلال، سادگی ساخت بدون احتیاج به تجهیزات خاص است. همچنین به دلیل اینکه عمل ساخت در دمای اتاق انجام می گیرد نرخ تخریب پلیمر زیست تخریب پذیر به روش قالب‌گیری حلال کمتر از فیلم های قالب گرفته شده از طریق تراکم خواهد بود. (شکل ۱-۵۸) عیب اصلی قالب گیری حلال باقی ماندن احتمالی

حلال سمی دورن پلیمر است. برای رفع این عیب باید به پلیمر اجازه داد تا کاملاً خشک شده و سپس با استفاده از خلا (مکش) حلال باقی مانده را خارج نمود. همچنین استفاده از حلال می تواند ماهیت پروتئین و دیگر مولکولهای موجود در پلیمر را تغییر دهد که این حالت در فیلم های ساخته شده توسط شیوه های دیگر مانند قالب گیری تراکمی (فشاری) نیز می تواند رخ دهد.

-انتخاب حلال CHOICE OF SOLVENT

فاکتورهایی را که باید در زمان انتخاب حلال در نظر گرفت عبارتند از: قدرت حلال، نرخ تبخیر، ویسکوزیته، بقای حلال و خصوصیات سمیت. حلال ها به وسیله نیروهای بین مولکولیشان طبقه بندی می شوند (جدول ۱-۵۸). اینها فاکتورهایی هستند که بر چگونگی بر هم کنش حلال با پلیمر تأثیر گذاشته و قدرت و بقای حلال را تحت تأثیر قرار می دهد. پارامتر قابلیت حلالیت برای تعیین قدرت حلال به کار برده می شود. سرعت حل شدن پلیمر توسط حلال متناسب با پارامتر قابلیت حلالیت است. پارامترهای قابلیت حلالیت برای حلال های متداول در جدول ۲-۵۸ آمده است . پارامتر قابلیت حلالیت برای پلیمرها از طریق آزمایش و استفاده از حلال های مختلف یا بر اساس مقادیر محاسبه شده بر روی گروهی از پلیمرها تعیین می شود. روش های توسعه یافته دیگری نیز وجود دارند که از نیروهای پاشیدگی(dispersion forces ),قطبیت و باند شدن هیدروژن در پارامتر حلالیت حدسی(نظری) استفاده می کنند.

نرخ تبخیر بستگی به نقطه جوش حلال دارد. حلال هایی با نقطه جوش پائین با نرخ سریعتری تبخیر می شوند. عمل خشک کردن فیلم قالب حلال در دو مرحله اتفاق می

افتد. در مرحله اول، حلال با نرخی تقریباً معادل با حلال خالص، تنها از فـیلم بخـار مـی شود. و در نهایت فیلم به صورت ژلاتینی درآمده و تبخیر به واسطه انتشار حلال در میان پلیمر محدود می شود. در خلال این مرحله، فاکتورهای دیگری مانند نوع پلیمـر، حالـت فیزیکی (شیشه ای یا لاستیکی) و ممانعت فضایی حلال بسیار مهـم تـر از تبخیـر اسـت. حلال های بیشتری در پلیمرهای شیشه ای نسبت به پلیمرهای لاستیکی باقی می مانند. شکل مولکول حلال وابسته به پلیمر تعیین کننده انتشار حلال در میان مـاتریس اسـت. همواره مقدار کمی حلال به واسطه تعادل ایجاد شده با پلیمـر در درون فـیلم بـاقی مـی ماند. مقدار حلال باقی مانده در درون پلیمر بستگی به بر هم کنش حلال با پلیمر دارد.

شرایط محیطی متفاوت می تواند بر مقدار حلال باقی مانـده در فـیلم اثـر داشـته باشـد. تبخیر یک حلال در شرایط خاص توسط فشار بخار تعیین می گـردد. رطوبـت هـوا مـی تواند نرخ تبخیر را کاهش دهد. همچنین قرار دادن فیلم در خلاء تبخیر حلال را افزایش می دهد.گرم کردن فیلم هم سبب تبخیر بیشتر حـلال مـی شـود امـا مـی توانـد باعـث تخریب پلیمر نیز شود.

ویسکوزیته یک سیال، معیار مقاومت آن در برابر شارش است. که به دمـا، نیروهـای بـین مولکولی و وزن مولکولی حلال بستگی دارد. برای یک محلول حلال- پلیمـر، ویسـکوزیته

مؤثر بستگی به بر هم کنش حلال- پلیمر و ساختار و وزن مولکولی پلیمر دارد. با این حال، مدل های ریاضی مانند معادلات مارک-هونیک- ساکورادا برای پیش بینی ویسکوزیته محلول به کار برده می شوند. البته برای تعیین پارامترهای به کار رفته در چنین مدل هایی، هنوز سنجش های آزمایشگاهی ضروری است. ویسکوزیته که تعیین کننده وضعیت شارش محلول در طول فرایند قالب گیری است، برای فیلم های قالب-حلال از اهمیت ویژه ای برخوردار است. این عامل همچنین، یکنواختی (همدیسی) ضخامت فیلم را تضمین می‌کند. برای ساخت فیلم های نازک باید از محلول بالزجت کم (ویسکوزیته پائین) استفاده کرد.

فاکتور نهایی که در انتخاب حلال اهمیت دارد سمیت حلال است. به خاطر طبیعت ناپایدار حلال‌ها، حلال های آلی بسیار قابل اشتعال بوده و باید در هنگام به کار بردن آنها در تولید فیلم های قالب- حلال محتاط عمل کرد. از آنجا که مقدار حلال باقیمانده در فیلم پلیمر به صورت تعادلی است، حلال انتخاب شده باید در سطوح غیر سمی برای سلول ها نگهداری شود. تحقیقات سمیت باید بر روی فیلم های قالب- حلال و همچنین پلیمر خالص انجام گیرد تا از عدم وجود مرگ بیش از حد سلول بر اثر حلال اطمینان پیدا کنیم.

با توجه به تنوع گسترده پلیمرهای موجود برای مهندسی بافت و تعداد زیـاد حـلال هـا، انتخاب ترکیب مناسب می تواند دشوار باشد. جدول ۳-۵۸ فهرستی از پلیمرهای مختلف به کار رفته در مهندسی بافت را به همراه حلال های معمول آنها نشان می دهد. به طـور کلی اغلب پلیمرها در برخی انواع حلال های آلی قابل حل شدن هسـتند. اگـر چـه پلـی ارتواسترها را می توان بدون استفاده از حلال برای ساخت دستگاهها به کار بـرد. حلالـی که درنهایت انتخاب می شود، باید قابلیت پاک شدن (خارج شدن) از فیلم پلیمر را داشته باشد تا از میزان سمیت همزمان با تضمین قابلیت مناسب قالب ریزی کاسته شود.

-قالب ریزی حلال SOLVENT CASTING

در ساخت فیلم های قالب- حلال معمولاً پلیمر در حلالی بـا غلظـت ۳۰٪-۱۰ حـل مـی شود. مقدار غلظت بستگی به ویسکوزیته محلول نهایی و کاربرد مورد نظر فـیلم قالبـت-حلال دارد. غلظت پائین سبب یکنواختی ضخامت فیلم می شود اما فیلم های نازک تری به دست خواهد آمد. برای به دست آوردن فیلم های ضخیم تر از قالـب ریـزی و خشـک کردن مکرر استفاده می شود. غلظت پائین همچنین زمان خشک کردن بیشتری را بـرای اطمینان از تبخیر کافی (مناسب) حلال از فیلم طلب می‌کند.

برای به دست آوردن شکل مورد نظر می توان محلول پلیمـر را بـر روی سـطح مختلفـی ریخـت. نوارهـای پوششـی شیشـه ای (Glass coverslips) و ظـروف پتـری وسـایل متداولی هستند که در شکل دهی فیلم های مسطح نازک به کار برده می شوند. سـطوح نچسب مانند تفلون را نیز می توان برای کمک به جداسازی فیلم از قالب مـورد اسـتفاده قرار داد. سطوح دیگر ممکن است نیاز به آزاد سازی شناسه داشته باشند که می تواند در رشد دانه های سلول بر روی بستر اثر بگذارد. قالب ریزی حـلال را مـی تـوان عـلاوه بـر ساخت فیلم های مسطح برای شکل دهی مجاری لوله ای نیز به کار بـرد. در ایـن حالـت یک میله به درون محلول پلیمر فرو برده شده و سپس خشک میشود. معمولاً ازمیله های شیشه ای برای این کار استفاده می گردد. هرچند میله های پلی وینیل الکل پیشـنهادی دارای مزیت حذف آب توسط انحلال بدون احتمال تغییر شـکل لولـه هسـتند. از طریـق

پرداخت (زدودن) یون واکنش پذیر می توان برای ساخت قالب های میکروالگوهایی (micro patterned) از جنس ویفرهای سیلیکونی استفاده کرد چنین قالب هایی را می توان برای ساخت فیلم هایی با سطوح میکروالگوهایی که به طور فیزیکی رشد سلول ها را هدایت می کنند به کار برد. (شکل ۲-۵۸).

برای شکل دهی فیلم های فوق نازک ($<5\mu m$) از پوشش دهنده چرخشی استفاده می‌شود، (شکل ۳-۵۸). پوشش دهنده چرخشی از یک برآمدگی تشکیل شده است که با سرعت ۱-۵۰۰۰ rpm می چرخد. خلاء از درون این برآمدگی به داخل کشیده می شود تا تضمین کننده ثبوت قالب در محل خود باشد. سرعت دورانی و شتاب و زمان چرخشی قابل کنترل هستند. زمانی که قالب در محل خود قرار گرفت و چرخش تنظیم شد، محلول پلیمر درون سطح در حال چرخش ریخته شده و نیروهای سانتریفوژ سبب پخش شدن محلول به فیلمهای بسیار نازک با ضخامت یکنواخت می شود. سرعت دوران، ویسکوزیته محلول و چگالی همه فاکتورهایی هستند که ضخامت فیلم را تعیین می کنند.

قالب گیری حلال می تواند همچنین از مشخصه های خود پلیمر جهت ایجاد فیلم های منحصر به فرد بهره ببرد. فیلم های ساخته شده از کوپلیمرهای بلوکی می توانند دارای ویژگی هایی باشند که در هوموپلیمرها دیده نمی شوند. برای مثال فیلم های ساخته شده با پولی جی- بنزیل ال- گلوتامیت کوپلیمر شده با اتیلن (PBLG-PEO) حل شده در کلروفرم می تواند بر چسبندگی و تکثیر سلول ها بر سطح تأثیر بگذارند. PBLG یک پلیمر آب گریز است در صورتی که PEO آب دوست است. فیلم های قالب- حلال PBLG-PEO داری ساختار هایی جدا از هم میکروفازی هستند که

متناسب با مقدار PEO بر چسبندگی سلول اثر میگذارد. فیلم های لانگ موئیر- بلوجت به وسیله قرار دادن محلول پلیمر بر لایه آب ساخته می شوند. در این نوع فیلم، کوپلیمر بلوکی خودش را به نحوی به صورت تک لایه ردیف می‌کند که انتهای PEO به سمت آب و PBLG به سمت خارج باشد. سپس فیلم ها را می توان از سطح آب به هر بستر مناسب دیگر منتقل کرد. چنین فیلم هایی از یک طرف اجازه چسبندگی سلولی را داده و از طرف دیگر ممانعت می کنند.

بعد از ریخته شدن محلول به فیلم اجازه می دهیم تا خشک شود. در ابتدا، حلال از محلول با نرخ تحمیل شده توسط نقطه تبخیر حلال خالص، بخار می شود. بعد از اینکه فیلم به صورت ژل در آمد، تبخیر توسط انتشار حلال از میان ماتریس پلیمر محدود می شود. زمان خشک شدن متناسب با ضخامت فیلم و نقطه تبخیر حلال تغییر می‌کند. حذف اضافی حلال با قرار دادن فیلم در خلاء انجام می شود. به طور کلی، فیلم قبل از قرارگرفتن در خلاء باید در فشار معمولی تا زمان سخت شدن خشک شود.

خلاء باید به تدریج کاهش یابد تا از تبخیر ناگهانی حلال باقیمانده درون ماتریس پلیمر جلوگیری کند. این وضعیت می تواند منجر به تغییر شکل فیلم به صورت حفره های بزرگ شود (شکل ۴-۵۸). به طور کلی باید فیلم فرصت داشته باشد تا برای ۶ الی ۸ ساعت خشک شده و سپس به مدت ۲۴ ساعت تحت خلاء قرار گیرد تا از خارج شدن کامل حلال اطمینان حاصل شود.

با خارج شدن فیلم خشک شده از قالب فیلم آماده استفاده خواهد بـود. بـرای بـه دسـت آوردن شکل نهایی شاید نیاز به پردازش های اضافی نیز باشد. فیلم را می توان بـه شـکل متفاوت یا حتی به فرم حلقه (رل) و به صورت مجراهای لوله ای درآورد. همچنین سـطح را می توان جهت ارتقاء چسندگی سلول یا تکثیر سلولی توسط فاکتورهای مختلف اصلاح کرد.

-تحلیل سطح SURFACE ANAYSIS

فیلم های قالب- حلال مهندسی بافت با در آمیختن فاکتورهـای مختلـف در سطح به چسبندگی سلول یا ارتقاء رشد سلولی کمک مـی‌کنـد. روش هـای تحلیلـی متنوعی برای تشریح سطح این فیلم ها توسعه یافته اند. در ابتـدا، از روش میکروسـکوپی نوری و اسکن الکترونی می توان برای تشریح توپولوژی سـطح بـه روش معمـول بررسـی بصری استفاده کرد. شیوه های پیشـرفته تـری نیـز بـرای تعیـین جزئیـات توپـوگرافی و ارزیابی توده و ترکیب شیمیایی سطح فیلم وجود دارد.

میکروسکوپی نیروی اتمی (AFM) را می توان برای ارزیابی غیر مخرب توپوگرافی سطح فیلم به کار برد. در AFM، نور لیزر از یک بازوی ستونی که در پاسخ بـه تغییـرات تـراز سطح فیلم حرکت می‌کند منعکس می شـود. قـدرت تفکیـک در ایـن وسـیله درحـدود ۰/۱nm است. عمل اسکن این بازو بر روی سطح ممکن است در صـورت بـر هـم کـنش

نوک (رأس) شی با مولکولهای ضعیف مهار شده سطحی سبب تغییر شکل اشیاء نرم شود.

اطلاعات شیمیایی در مورد ساختار مولکولی ماده توده فیلم از طریق طیف نگاری تبدیل فوریه انعکاس کلی تضعیف شده مادون قرمز (ATR-FTIR) که مبتنی بر نوارهای ارتعاشی واحدهای باند شده است، به دست می آید. ترکیبات سطح با استفاده از طیف نگاری الکترون برای تحلیل شیمیایی (ESCA) یا طیف نگاری فوتوالکترون اشعه X(XPS) و طیف سنجی ثانویه توده یونی (SIMS) ارزیابی می شود. ESCA می تواند تا عمق ۱۰۰ ˚A سطح را آنالیز کند، در حالیکه SIMS تنها به عمق ۱۵-۱۰ ˚A می رسد. ESCA از پرتوهای X فرودی برای آزاد کردن الکترون های تراز هسته که به وسیله تحلیل گر طیف انرژی شناسائی می شوند استفاده می‌کند. این روش می تواند برای بررسی دینامیک های سطح پلیمر و پویایی (دینامیک) پروتئین رونشین استفاده شود. SIMS را می توان برای تکمیل اطلاعات به دست آمده از ESCA به کار برد. از ترکیب SIMS با طیف شیمیایی می توان جهت تعیین گونه های شیمیایی حتی پروتئین رونشین شده (جمع شده) بر سطوح فیلم استفاده کرد.

از سنجش های زاویه تماس(contact angle) می توان برای تعیین قابلیت خیس شوندگی سطح فیلم بهره برد. هنگامی که یک قطره مایع با سطح فیلم در تماس بوده و با رطوبت اطراف در تعادل باشد زاویه بین سطحی مایع- گاز و بین سطحی مایع- جامد را می توان برای تعیین انرژی سطح به کار برد. انرژی سطح نشان دهنده قطبیت گروههای عملیاتی در ارتفاع ۱۰-۲ ˚A است. آب گریزی یا آب دوستی سطح فیلم در تعیین بر هم کنش های سلولی با سطح فیلم اهمیت دارند.

این روش ها ابزار آلات ارزشمندی را طلب می‌کند تا کاربرد فیلم های قالب- حلال را به منظور ساختارهای پشتیبان برای بافت ها ارزیابی کند. در تفسیر نتایج باید دقت کافی مبذول داشت زیرا شیوه های متفاوت در محیط هایی که بسیار نامشابه با شرایط بیولوژیکی می باشند صورت می گیرند. برای مثال ESCA و SIMS تحت شرایط خلاء بسیار زیاد، انجام می شود که سبب باقی ماندن حلال درون فیلم می گردد. با این وجود شیوه های بسیار متنوعی برای توصیف سطح وجود دارد که هر کدام باید با جزئیات ارزیابی گردد تا مناسبت آنالیز فیلم های قالب- حلال را مشخص نماید.

-چکیده

قالب ریزی حلال یک روش ساده و ارزان است که به منظور تولید بستر هایی برای کاربردهای مهندسی بافت به کار گرفته می شود. حلال های بی شماری برای حل کردن پلیمرها در دسترس هستند اما در انتخاب حلال باید دقت داشت تا در زمان حذف (خارج سازی) هر گونه اثر سمی از سلول های کاشته شده، پایداری پلیمر حفظ شود. این شیوه اجازه شکل گیری اشکال ساده مانند صفحات تخت و لوله ها با قابلیت ورقه ورقه شدن، شستن (پالایش) ذره ای و قالب ریزی دوار برای تهیه ساختار پیچیده تر را می دهد. همچنین از آنجا که قالب ریزی در دمای اتاق انجام می گیرد در اثر فشار قالب ریزی و بیرون زدن، تخریب القایی گرما برای پلیمر رخ نمی دهد. هنگامی که فیلم ها ساخته شدند روش های تحلیلی مختلفی مانند ESCA و SIMS و سنجش های زاویه تماس را می توان جهت تشریح ساختار پلیمر همچنین مواد رونشین شده (جمع شده) بر سطح بستر به کار برد.

این تفاوت ها در مقتضیات قانون ها به برخی ازدرمان های خـاص اجـازه داده اسـت کـه بدون مطالعات اثر گذاری به سرعت به بازار راه یابند. در نمونه های انتخاب شده، عملکرد بالینی این درمان ها بسیار نامید کننده و ناهمسان بوده است. بنابراین، پزشکان بالینی، و بیماران باید بدانند که در دسترس بودن درمان مهندسی بافـت ضـمانتی بـر کـارآیی آن نیست. همانند محصولات مصرفی دیگر، مسئولیت نهایی بر عهده خریدار است تا قبـل از انتخاب و تجویز درمان مهندسی بافت به قول معروف چشم و گوش خود را باز کند.

تولید داربست های پلیمری: لایه سازی غشاء

# PROCESSING OF POLYMER SCAFFOLDS : MEMBRANE LAMINATION

**فرانک-تی- جنتایل**

لایه سازی غشاء برای درمان سلول های کپسوله شدن برای رهایش دامنه گسترده ای از محصولات به دست آمده از مولکول های کوچک (برای مثال، دوپامین، انکفالین‌ها) تا محصولاتی با ژن های بسیار بزرگ (مانند فاکتورهای رشد، ایمیونوگلوبولین ها (گلوبولین های ایمنی)) را در بر می گیرد. بسیاری از بیماری ها درمدل های حیوانی کوچک و بزرگ و موارد انسانی مطالعه شده اند. اهداف بیماری شامل از کار افتادگی کبد، دیابت نوع I ، درد مزمن، آلزایمر، اسکلروزه شدن سلول های عصبی مسئول حرکت عضلات (amyotrophic lateral sclerosia)، کره هنگینگتون (Huntington's chorea) و بیماری پارکینسون است. کلیه دستگاهها دارای سطوحی از ایمنی سلولهای بیگانه زا یاد گرزا (زنوژنیک یا آلوژنیک) هستند. اولین دستگاهی که در حال دریافت تأئیدیه در ایالت متحده است دستگاهی به نام «کبدیار» است (liver assist) (به عبارت دیگر، کاشت یک پل(bridge )در کبد) نکات کلیدی در استفاده از مواد جهت ساخت این دستگاهها عبارتند از: ۱- غشاء زیست سازگار، اجزاء دستگاه و مواد ماتریس ۲- کاشتنی های مستحکم و ۳- موادی که قابلیت تبدیل به غشاهایی با ویژگی های مناسب کاشت را داشته باشند. این فصل بر روش های تأثیر گذار بر غشا یا سنجش توان آن و خصوصیات کاشت تأکید می‌کند. هر دو این خصوصیات برای هر سیستم تجاری کاشت حیاتی خواهد بود. خصوصیات کاشت غشا برای همه سیستم ها بحرانی است چه دستگاه کاشتنی باشد وچه خارج بدنی. شیوه های ساخت غشا می توانند غشاءهایی با قدرت دو

تا چهار برابر قدرت غشاء های معکوس فاز سنتی تهیه کنند. با استفاده از ابزار آلات جدید سنجش وزن های ملکولی کوچک و بزرگ می توان غشاهایی با ترکیبات ایزولاسیون ایمنی و نرخ رهایش دلخواه را برای کاربردهای بی شماری تهیه دید که بالقوه پرگستره و سیعی از درمان بیماری اثر می گذارند.

پشگفتار

یک حوزه مهم برای بیومواد‌ها، رهایش مواد فعال در مناطق خاصی از بدن (invivo) است. به طور سنتی این حوزه توسط کپسول های پلیمری تخریب پذیر و غیره تخریب پذیر که شامل یک یا چند دارو هستند احاطه شده است. در این حوزه مواد در حین ساخت با یک ماتریس پلیمری ترکیب شده و سپس بعد از مدت زمانی از میان ماده یا در خلال تخریب ماده آزاد می شوند. در اینجا کنترل مناسب کنتیک های آزاد شده از اهمیت خاصی برخوردار است. یک مثال در این مورد کنتیک های رها شده مرتبه صفر به دست آمده از میله های کوپلیمر استات اتیلن- ونیل (EVAc) به کار رفته در رهایش عاملهای شیمی درمانی در مغز است. در طول دو دهه پیش محققان تلاش کرده اند که مواد را از ناقل های رهایش هیبریدی زیست مصنوعی (bioartificial) که شامل لایه های غشا بر سطح اجزا سلولی کپسوله شده که درون غشا هستند آزاد کنند، (به عبارت دیگر درمان غشاء کپسوله شده سلول).

هدف از تحقیقات درمان غشاء کپسوله شده سلول توسعه کاشتنی های حاوی سلول های زنده بیگانه زا یا دگر زا برای درمان شرایط وخیم و ناتوانی های انسانی است. برداشت از توانایی عبارت است از سلولها یا توده های کوچک بافت که توسط لایه غشا انتخابی احاطه می شوند و اجازه عبور آزادانه اکسیژن و دیگر احتیاجات متابولیسمی همراه با آزاد

سازی ترشحات سلولی زیست فعال را می دهند اما از عبور عامل هـای سـمی بـزرگ تـر سیستم ایمنی دفاعی بدن جلوگیری می کنند.

کاربردهای اصلی و هدف از درمان سلول کپسوله شده عبارتنـد از : درد مـزمن، بیمـاری پارکینسون و دیابت نوع I ، همچنین ناتوانی های دیگر ناشی از افت ترشح عملکرد سلول که با کاشت اندام یا درمان های دارویی به طور کامل قابل مداوا نیسـتند. عـلاوه بـر ایـن شرایطی که بالقوه قابلیت پاسخ دهی به حفظ رهایش موضعی فاکتورهـای رشـد و دیگـر تصحیح کننده های پاسخ بیولوژیک را داشته باشند با این روش بررسی شـده انـد. گونـه های متضاد درمان سلول های ایزوله شده ایمنی در مدل های کوچک و بزرگ حیـوانی و انسانی شامل درد مزمن، بیماری پارکینسون، دیابت نوع I، و از کار افتادگی وخـیم کبـد (خارج بدنی) و در چندین گروه از مدل های حیوانی کره هتگینکتون، هموفیلی، بیمـاری آلزایمر، اسکلروزه شدن سلول های عصبی مسئول حرکت عضلات و صرع مـی باشـند. از این میان به نظر می رسد که از کار افتادگی وخیم کبـد اولـین درمـانی باشـد کـه بـرای استفاده تجاری در انسان تأئید می شود.

کپسوله کردن بافت عموماً به دو شکل انجام می گیرد: لایه بندی غشـاء میکروکپسـوله و ماکرومتخلخل (درون عروقی و برون عروقی) در میکروکپسوله سازی یک یا چند سلول با پراکنـدگی هـای کـروی فـراوان (بـا قطـر 100-300nm) کپسـوله مـی شـوند. در ماکروکپسوله سازی تعداد زیادی از سلول ها یا توده های سلولی در یک یا چند کپسـول نسبتاً بزرگ کاشته می شوند. (برای فیبرهای توخالی، ابعاد معمول 0.5-6nm) قطـر، بـا طول کلی 0.5-10cm) مزایای روش آخر عبارت است از پایداری شیمیایی و مکانیکی و سادگی بازیافت در صورت نیاز یا خطر.

-روابط خصوصیات ساختاری برای پلیمرهای به کار رفته در لایه بندی غشاء

STRUCTURE– PROPERTY RELATIONSHIPS FOR POLYMERS USED IN MEMBRANE LAMINATON

ثابت بودن خصویات غشاء انتخاب شده و ماده غشاء درطـول زمـان اهمیـت زیـادی دارد. تخریب غشاء شامل تغییر خصوصیات فیزیکی و ویژگی های انتقالی در طول زمان میشود که به دلیل بر هم کنش با محیط داخل بدن میباشد. خصوصیات اصلی کـه قابـل تغییـر هستند، اندازه خلل و فرج (و توزیع سراسری اندازه خلـل و فـرج) و ضـرائب پخشـندگی انتقال توده می باشند.

دامنه وسیعی از مواد غشاء را می توان برای اندام های مصنوعی از این نـوع بـه کـار بـرد. یکی از پر استفاده ترین مواد برای این کاربرد، پلی اکریلونیتریل- کوپلیمر شده با- ونیـل کلرایـــد [P(AN-VC)] اســـت. P(AN-VC) یـــک کـــوپلیمر آمـــاری (statistical copolymer)ساخته شده از مونومرهای نیتریل و ونیل کلراید است کـه در بسیاری از مطالعات لایه سازی غشاء سلول به کار رفته است. کاندیدهای دیگر عبارتند از، پلـی اکریلونیتریـل (PAN)، پلـی سـولفون (PS)، پلـی اتـر سـولفون (PES) پلـی ونپلیدین دی فلوراید (PVDF)، پلی آمیدها (PA)، پلی کربنات (PC)، پلی اتر ایمایدها (PEI) پلی پـروپیلن (PP)، و پلـی اتـیلن (PE). عـلاوه بـر ایـن مـواد سـاخته شـده از پلیمرهای متعارف غشاها از ساختارهای کامپوزیت تهیه مـی شـوند . از جملـه غشـاهای ساخته شده از (پلی اکریلونیتریل- کوپلیمر شده با ونیل کلراید)- (پلی اکسیداتیلن).

ساختار فیزیکی غشاهای به کار رفته در لایه های غشاء به وسیله شرایط متابولیکی سلول های کپسوله شده ،اندازه مواد درمانی آزاد شده، درجه حفاظت ایمنی مورد نیاز، و زیست

سازگاری مناسب بافت تعیین می شود. مهم ترین خصیصه انتقالی غشاها به وسیله شرایط متابولیکی سلول کپسوله شده تعیین می گردد. غشا باید دارای گذرگاههای کافی مواد غذایی برای سلولهای کپسوله شده باشد تا آنها را زنده و فعال حفظ کند. همچنین در ضمن حفظ عملکرد سلول ها ،غشاء باید دارای خلل و فرج هایی مناسب برای عبور آزادانه عامل های درمانی به محل هدف باشد. اگر سلول های کپسوله شده نیاز به حفاظت ایمنی داشته باشند، غشاء باید از ورود عناصر ایمونولوژیکی (Immunological) به درون کپسول جلوگیری کند. علاوه بر این، شکل (مورفولوژی) غشاء تأثیر شدیدی بر زیست سازگاری در حد فاصل غشاء- میزبان خواهد داشت. خصوصیات انتقالی و شکل (مورفولوژی) خارجی را می توان توسط روش هایی که بعداً ذکر می شوند دستکاری کرد، (تغییر داد).

غشاهای نیمه تراوا به طور گسترده در مطالعات ماکروکپسوله سازی سلول های مترشحه انسولین برای درمان دیابت نوع I به کار برده می شوند. غشاءهای نیمه تراوای وارونگی فاز، با استفاده از پلیمر P(AN-VC) به کار رفته در کپسوله سازی سلول های مترشحه انسولین ساخته می شوند. روش به کار رفته توسط این دسته شامل جایگزینی جزایر لانگرهانس است که حاوی سلول های $\beta$ مترشحه انسولین در یک غشاء فیبری توخالی است که اجازه ترشح انسولین از طریق تحریک گلوکوزی در ضمن حفظ زیست پذیری (حیات) سلول توسط انتشار اکسیژن و مواد غذایی به درون کاشتنی را می دهد.

روش هایی مشابه کپسوله کردن سلول های مترشحه انسولین وجود دارند که از غشاء های میکرومتخلخل ساخته شده از پلی اورتان (PU) و پلی ۲ هیدروکسی اتیل متاکریلات (PHEMA) استفاده می کنند. در غشاء PU با حل کردن یک شکل

دهنده، خلل و فرج حبس شده تشکیل می شود، در صورتی که غشاء PHEMA توسط عاملهای شبکه ساز ایجاد می شود.

لایه سازی غشاء بر روی جزایر لانگرهانس همچنین در تجهیزات درون شریانی درون کاشت و برون کاشت بررسی شده است. با وجود اینکه اساس چنین سیستم هایی هنوز بر مبنای انتشار است اما اجزاء پیوندی هنوز وجود دارند. در طراحی این دستگاهها سلول ها در اطراف غشاء قرار گرفته و خون از میان مجرای غشاء عبور می‌کند. چیک و همکارانش مطالعاتی را بر روی کوپلیمر P(AN-VC) در فیبرهای چند گانه غضروفی انجام داده اند. مواد غشائی دیگر مانند غشاهای PS نیمه تراوا نیز توسط سان و همکارانش ارزیابی شده است. سگا و همکارانش از دستگاههای فیبری چند گانه ساخته شده از پلی ونیل الکل (PVA) جهت میکروکپسوله کردن سلول های مترشحه انسولین استفاده کردند.

سولیوان و همکارانش با استفاده از روش مشابهی، از یک غشاء دهانه بزرگ منفرد درون پانکراس مصنوعی قابل کاشت که خون از میان آن عبور می‌کرد استفاده کردند. دستگاههای تک فیبره ساخته شده از غشاکهای نیمه تراوای PA نیز توسط کاتاپانو و همکارانش در این سیستم به کار گرفته شدند.

علاوه بر جزایر لانگرهانس سلول های غدد درون ریز نیز به وسیله غشاهای حفاظتی ایمنی P(AN-Ve) در طرح درمانی پرکاری تیروئید تحت بررسی قرار گرفتند. کریستنسون و همکارانش کمبود ایمنی غده تیموس را با غشاء مشابهی ارزیابی کردند.

بافت همبند (رشته ای) میکرومتخلخل PS، در هنگام کاشته شدن با هپاتوسیت ها به شکل تجهیزات فوق بدنی (مادی) به عنوان دستگاه کبدیار به کار گرفته می شود. خون

هپارین زده به دورن غضروف پمپ می شود تا خروج متابولیت های مضر را تسریع کند. این دستگاه به زودی توسط سازمان غذا و دارو (اداره خوراک و دارو) برای فروش به عنوان پل کاشتنی کبد تأئید می شود. همچنین برای درمان نقص (کمبود) رشد و تسکین دردهای مزمن از میکروکپسوله ها استفاده می شود.

لایه سازی سلول های غشا برای درمان بیماری های مختل کننده سیستم عصبی مانند پارکینسون در گروه جوندگان و میمون ها توسط آئبیشر و همکارانش بررسی شده است. آنها از P(AN-VC) به عنوان ماده غشاء استفاده کردند. کپسوله کردن و کاشت سلول هایی که از خود فاکتور رشد عصبی (NGF) ترشح می کنند توسط هوف من و همکارانش و وین و همکارانش بررسی شد. وی بقای نرون های بازال کولینرژیک مغز قدامی قوس های لبه ای صدمه دیده مشو را ثابت کرد. ناتوانی حافظه دریادگیری در بیماری آلزایمر نتیجه از دست رفتن (اختلال) این نرون هاست.

-فرایند لایه سازی غشاء MEMBRANE LAMINATION PROCESSING

وارونگی فاز PHASE INVERSION

اکثریت غشاهای میکروپالایش (MF) و فراپالایش (UF) ترموپلاستیک جهت کپسوله کردن سلول ها از طریق وارونگی فاز محلول پلیمر همگن ساخته می شوند. غشاهای فراپالایش دارای خلل و فرج هایی با اندازه هایی در حدود ۵nm تا ۰/۱ $\mu m$ هستند در حالی که غشاهای میکروپالایش (یا میکرومتخلخل) دارای خلل و فرج هایی در محدوده ۰/۵ تا ۳ $\mu m$ هستند. وارونگی فاز یک روش چند جنبه ای است، که اجازه شکل گیری غشاهایی با حدود گذردهی، مورفولوژی و جرم مولکولی نامی بسیار وسیع را می دهد.

مورفولوژی و خصوصیات غشاء بستگی به پارامترهای ترمودینامیک و کینتیک های فرایند دارد. پلیمر در یک حلال مناسب حل می شود. سپس محلول به صورت یک صفحه تخت یا یک فیبر توخالی (پوک) برجسته قالبگیری می شود. به عنوان قسمتی از فرایند ریخته گری یا برجسته سازی، محلول پلیمر توسط انتقال فاز که با تغییر دما یا ترکیبات محلول صورت می گیرد، ته نشین می شود. این فرایند شامل انتقال یک محلول پلیمر مایع تک فاز به یک سیستم دو فاز می شود که از یک فاز غنی از پلیمر که ساختار غشاء را شکل می دهد و یک فاز ثانویه مایع فقیر از پلیمر که خلل و فرج های غشاء را شکل می دهد تشکیل می شود. هر پلیمری که بتواند یک محلول همگن تشکیل دهد که تحت دما و ترکیبات خاص به دو فاز تفکیک شود، در این فرایند قابل استفاده است. پارامترهای ترمودینامیک و کنتیک (جنبشی) مانند پتانسیل شیمیایی اجزا و انرژی آزاد ترکیب اجزاء، وضعیتی را که در آن تفکیک فازی رخ می دهد تعیین می‌کند. این فرایند با نمودار فاز سه متغیره پلیمر حلال غیر حلال قابل توصیف است.

-وارونگی فاز انعقاد گرمایی (ژل سازی گرمایی)

THERMAL GELATION PHASE INVERSION

فرایند وارونگی فاز القای گرمایی از پلیمر حل شده در دمای بالا در یک حلال بالقوه (نهفته) (حلالی که برای یک پلیمر خاص در دمای پائین از خود حلالیت کمی نشان می دهد) استفاده می‌کند که به خاطر ضعف توان حلال دردمای پائین در زمان سرد شدن یک محلول ژلاتینی تولید می‌کند. سپس باید با استفاده از یک سیال دیگر که حلال بالقوه را در خود حل می‌کند و برای پلیمر غیر حلال است، حلال های بالقوه غیر متغیر

را از ژل خارج کرد. فرایند انعقاد گرمایی قابلیت تولیدساختارهای فراپالایش یا میکرو پالایش متقارن یا نامتقارن را دارد.

-ته نشینی القایی انتشار DIFFUSION – INDUCED PRECIPITATION

ته نشینی بر مبنای انتشار نیاز به حذف حلال دارد که منجر به حل نشدن پلیمر می شود. در یک روش، حلالی که پلیمر درآن حل می شود در اثر تماس با بخار غیر حلال، تبخیر، یا فرو رفتن کامل در حمام غیر حلال خارج می شود. تبخیر یک حلال متغیر با غشاء قالبگیری شده، یک ساختار همگن چگال ایجاد می‌کند. شیوه های بخار یا فرورفتن کامل، به انتشار غیر حلال درون محلول بستگی دارد که به واسطه کاهش حلالیت سبب ته نشینی پلیمر می گردد.

-پس رفتارهای فیلم های چگالی POST-TREATMENTS OF DENSE FILMS

برخی از انواع خاص غشاهای MF توسط کشش مکانیکی یا زدودن (پرداخت) شیمیایی فیلم های چگال تهیه می شود. برای مثال غشاهای پلی تترا فلورواتیلن با قرار دادن فیلم تحت تنش کششی تهیه می شود. غشاهای پلی کربنات توسط فرایند زدودن مسیر تهیه می گردند. غشاهایی که برای ماکروکپسوله سازی ارزیابی می شوند. عموماً از نوع MF یا UF هستند. یک غشاء UF بر اساس نوع غشا به گونه هایی با جرم مولکولی در حدود ۳۰۰-۳۰۰۰۰۰ مشخص می شود. کاشت اکثر سلول های زنوگرافت (xenograft) به غشا UF نیازمند است، در حالی که سلول های آلوگرافت (allograft) یا دارای امتیاز ایمنی (Immunoprivileged) به طور موفقیت آمیزی در غشاهای درجه MF که گونه ها را در محدوده ۰/۱-۱۰nm نگه می دارد کپسوله شده و به تنهایی از تماس سلول کاشته شده با سلول میزبان جلوگیری می‌کند.

## خصوصیات غشاء MEMBRANE PROPERTIES

### قدرت (توان) STRENGTH

کشسانی (ارتجاع) یک وسیله پزشکی در محیط داخل بدن نهایتاً سبب محدود شدن نتیجه مطلوب می گردد. طراحی ترکیب نهایی یک وسیله، میزان توان مورد نیاز غشاء را مشخص میکند. باید توجه داشت که، توان غشا به طور کلی با جابجایی انتشاری در سری های مشابه نسبت معکوس دارد. غشاء همچنین باید دارای چند درجه انعطاف پذیری باشد تا در حین کاشت و بازیافت سالم باقی بماند. اگر اجزاء دیگر وسیله به عنوان عضو محتمل توان مورد استفاده قرار گیرد، گزینه ساختار غشاء، ابعاد، ترکیب و مواد به آنهایی که سبب بهینه شدن خصوصیات انتقالی می شوند، محدود می گردد.

اگر توان غشاء به خاطر توان کلی دستگاه محدود گردد، غشاء باید با ملاحظات خاصی از جمله تغییر ابعاد، ترکیبات و ساختار غشاء برای افزایش توان ساخته شود. انتخاب ماده ای ذاتاً مستحکم تر (به عبارت دیگر با قوام تر) یا با وزن مولکولی بالاتر که غشاء باآن قالب گیری می شود باید باعث افزایش کلی خصوصیات مکانیکی شود. غشاهای UF یا MF را میتوان با ایجاد میکروحفره هایی درون دیواره یا به شکل ابر باز سلولی (open cell foam) با میکروحفره های متصل به هم ساخت. با تلفیق روش هایی که سبب افزایش ساختار شبکه ای همگن درون دیواره غشا می شود می توان توان کششی را افزایش داد. همچنین با زیاد شدن سطح مقطع غشاء به واسطه ضخیم کردن دیواره ها می توان توان را نیز افزایش داد. کاهش تخلخل کلی غشاء سبب بالا رفتن توان سرتاسری غشاء می شود. مثال هایی که شامل ساختارهای ماکروحفره ای و شبکه ای همگن هستند به ترتیب در شکل های ۱-۵۹ و۲-۵۹ آورده شده است.

مورفولوژی (شکل) خارجی غشاها در طول ساخت یا در اثر پس رفتارهایی که برای اصلاح عکس العمل مطلوب برای یک کاشتن موفق صورت می گیرد، تغییر می‌کند. با استفاده از روش های مختلف وارونگی فاز سطح خارجی غشا می تواند از پوست پس زده شده تا ساختارهایی که برای ورود به سلولها به داخل دیواره (با قطر تقریبی $\mu m$ ۱۰) به اندازه کافی بزرگ هستند، گسترش یابد، ترکیب مناسب انتقال غشا و مورفولوژی های دیگر نیز با استفاده از غشاهای کامپوزیت قابل تهیه است. باگز و همکارانش از چنین غشاهایی برای درمان دیابت نوع I استفاده کردند.

## مشخصه های انتقال TRANSPORT CHARACTRISTIC

بسیاری از سنجش های متفاوت انتقال شامل گذردهی هیدرولیک، پس زنی ماده حل شده و ضریب پراکندگی را می توان برای تعیین مشخصه های پدیده شناسی انتقال غشاء کپسوله شده به کار برد. نفوذ پذیری هیدرولیک و پس زنی ماده حل شده به فرایندهای همرفتی بستگی پیدا می‌کند. که در آنها حرکت توده سیال از طریق اختلاف فشار فراغشایی به دست می آید. این مقاومت های همرفت برای آب و جریان ماده حل شده به ترتیب از طریق اندازه گیری نفوذپذیری هیدرولیک و پس زنی ماده حل شده به دست می آید. انتشار فرایندی است که توسط آن مولکول ها به واسطه گرادیانهای غلظت به جنبش درآمده و با حرکت «برونی» از منطقه با غلظت زیاد به منطقه با غلظت کم جابجا می شوند. اندازه گیری خصوصیات انتشاری و همرفت غشاء کپسوله شده نشانگر ظرفیت حفظ ایزولاسیون ایمنی است.

### -روش های همرفت Convective Techniques

نفوذ پذیری هیدرولیک (HP) یک غشا از طریق شارش همرفت آب در یک فشار فراغشایی ثابت معین می گردد. نفوذپذیری هیدرولیک با ملاحظه سطح منطقه در معرض و فشار فراغشایی نرمالیزه می شود که منجر به ایجاد واحدهای شار- سطح- فشار می گردد. محدوده غشاهای همودیالیز امروزی در نفوذپذیری هیدرولیک از ۲-۶ $ml/[hm^2mmHg]$ برای غشاای کم شار و ۱۰-۲۰۰ $ml/[hm^2mmHg]$ برای غشاهای پرشار است. این پارامتر عملیاتی که با درصد خلل و فرج‌های سطح که به طور پیوسته در دیواره غشا وجود دارند متناسب است، از اندازه خلل و فرج و توزیع اندازه خلل

و فرج ها میانگین گرفته و آنها را در یک پارامتر نشان می دهد. سنجش های آزمایشگاهی را میتوان با شارش های نظری محاسبه شده از معادلات هاگن- پسیلی مقایسه کرد.

$$Q_f = \frac{\Delta p n \pi r^4}{8 l \eta \tau} \quad (۱$$

در حالی که $Q_f$ = شارش حجمی آب ($m^3/s$)، n= تعداد خلل و فرج ها (بدون واحد(بعد)) $\eta$ = ویسکوزیته ([Kg/[m.s)، r= شعاع خلل و فرج $\tau$ (m) ,= پیچیدگی (انحنا) (بدون بعد)، l= ضخامت غشا (m) و $\Delta p$ اختلاف فشار در طول غشاء ($N\backslash m^2$) می باشند. ضخامت لایه پوست برای فراپالایش نامتقارن غشاء پلی فنیلین اکسید (PPO) با استفاده از محلول ذرات کلوئیدی طلا سنجیده شده و توزیع اندازه خلل و فرج های باز توسط روش پرم پورومتری تعیین می شود. با فرض پیچیدگی (انحنا) 1 در معادله (۱) شارش آب برای غشاهای PPO محاسبه می شود که با مقادیر اندازه گیری شده همخوانی دارد. مقایسه شارش نظری و اندازه گیری شده آب خالص نشان دهنده وابستگی پارامترهای مورفولوژیکی غشاء به دست آمده از روش پرم پورومتری و روش ذرات کلوئیدی طلا به خصوصیات انتقال غشاء است.

در بررسی های ثانویه شعاع خلل و فرج ها برای نمایش نکلئوپور بر مبنای سنجش شار محاسبه شد. محاسبات به دست آمده برای تخمین ضخامت هیدوردینامیک دکستران روشین شده (قابل صرفنظر) پلی اتیلن اکسید (PEO) (۶-۷nm) و پلی ونیل پیرولیدون (PVP) (۳-۶nm) به عنوان ردیاب در آزمایشات انتشار به کار می رود.

اندازه خلل و فرج غشا را می توان با تعیین نرخ فراپالایش شار نیز ارزیابی کرد. شار فراپالایشی $J_f$ به صورت نسبت شار حجمی $Q_f$ بر واحد سطح غشاء A مطابق معادله ذیل تعریف می شود.

$$J_f = \frac{Q_f}{A} \quad (۲)$$

نرخ حذف ماده حل شده M عبارت است از:

$$M = Q_f c_f \quad (۳)$$

جائی که $c_f$ غلظت ماده حل شده فراپالایشی است. غلظت ماده حل شده فراپالایشی به غلظت توده نگهداری شده $c_{wb}$ در ضریب پالایش مشاهده شده S بستگی دارد.

$$S = \frac{c_f}{c_{wb}} \quad (۴)$$

البته در برخی متن ها ضریب پس زنی ماده حل شده R به کار برده می شود.

$$R = \mathbf{1} - S \quad (۵)$$

از ترکیب معادلات (۲) تا (۵) می توان ارتباط شار ماده حل شده $J_S$ را با شار فراپالایشی و ضریب پالایش مشاهده شده به شکل زیر درآورد.

$$J_S = J_f c_{wb} \quad (۶)$$

بنابراین با داشتن شار فراپالایشی غلظت توده حل شده و ضریب پس زنی غشا برای ماده حل شده می توان شارش ماده حل شده در میان غشا را محاسبه کرد.

محدوده اندازه های ماده حل شده نشان دهنده پروفیل (نمای) ضریب پس زنی غشاء است. این پروفیلهای را می توان توسط برش نامی وزن مولکولی (nMWCO) که نشان

دهنده اندازه متوسط خلل و فرج است، به دست آورد. در حالی که شیب منحنی نشان دهنده توزیع اندازه خلل و فرج می باشد.

پلاریزاسیون غلظت ایجاد شده به وسیله آرایش لایه مرزی در طول سنجش پس زنی می تواند اثر شدیدی بر منحنی های پس زنی اندازه گیری شده داشته باشد. برای به دست آوردن پروفیل خهای پس زنی که به جای اثرات هیدرودینامیک نشان دهنده خصوصیات غشاء هستند باید شرایط عملیاتی شارش بر مبنای هندسه فیبرکنترل شود. این کار شامل تنظیم نرخ های جریان لومینار جهت ایجاد مجموعه ای از نرخ های برشی و تنظیم شار نفوذی برای کمینه کردن پلیرازاسیون غلظت می شود.

مواد حل شده متداول در تولید منحنی های پس زنی شامل پروتئین های گلوبولی (آلبومین سرم گاوی (BSA)، MW=67KDa ؛ IgG ، اوال بومین، MW59Kda ؛ و میوگلوبین ، MW 16Kda ] و پولی ساکارید ها مانند دکسترال و فیکول هستند. این محلول ها را می توان به تنهایی یا به صورت ترکیبی از ردیاب هایی با اندازه های مختلف تهیه کرد. سیستم های تشخیص پروتئین شامل اسپکترومتری (طیف سنجی) برای محلول های تک جزئی و کروماتوگرافی (size exclusion chromatography)اندازه مجاز تزویج شده با طیف سنجی UV برای ترکیبات پروتئین می باشند. برای بالا بردن حساسیت، آنزیم هایی مانند لاکتیت دهیدروژناز، یا پیروات کیناز را می توان با آزمون های آنزیمی مربوطه یا پروتئین نشان دار فلورسئین تزویج شده با شناساننده های فورسنانس مورد استفاده قرار داد.

از محلول های دکستران چند طیفی ( $\frac{g}{mol}$ ۲۰۰۰-۲۰۰۰۰۰۰) معمولاً برای ایجاد منحنی های پس زنی غشاء استفاده می شود. کروماتوگرافی اندازه مجاز به همراه

شناساننده‌های ضریب شکست برای تحلیل غلظت های پالایشی و انباشته شـده (ذخیـره ای) به شکل تابعی از وزن مولکولی به کار گرفته مـی شـود و دکسـتران هـای نشـان دار فلوروسئین باشنا شناساننده های ضریب شکست بـرای تحلیـل غلظـت هـای پالایشـی و انباشته شده (ذخیره‌ای) بـه شـکل تـابعی از وزن مولکـولی بـه کـار گرفتـه مـی شـود و دکستران های نشان دار فلورسئین با شناساننده های فلورسانس برای افزایش حساسـیت قابل استفاده هستند. خطای ذاتی ایجاد شده در غشاء منحنی های پس زنی پـروتئین بـا بکارگیری محلول های دکستران که دارای قابلیت باندشـدن کمـی بـا اکثـر سـاختارهای غشاء پلیمری هستند، به حداقل می رسد. تأثیر رونشینی پروتئین بر بسـته شـدن خلـل برای غشاء پلی سولفون و پلی اتر سولفون ثابـت شـده اسـت. ایـن و همکـارانش کـاهش MWCO از ۴۰KDa به ۱۴KDa را پس از قرار گرفتن در معرض محلول BSA کـه در برابر کاهش اندازه خلل و فرج در اثر رونشینی پروتئین ثابت باقی مـی مانـد را نشـان دادند. مقایسه ای میان منحنی های پس زنی دکستران و پروتئین بر اساس انـدازه مـاده حل شده نشان دهنده هماهنگی خوب برای منحنـی BSA اضـافه شـده بـه دکسـتران است.

-روش های انتشاری

آزمون تشریح MWCO همرفت، اطلاعاتی را در مورد خصوصیات پالایشی غشاء فـراهم کرده و توسط فرایندهای انتقال همرفت ایجاد شده در اثر فشار تحت تأثیر قرار می گیرد. انتقال مولکولی در بسیاری از دستگاههای ایزولاسیون ایمنی توسط فراینـدهای انتشـاری که به وسیله گرادیان های فشار ایجاد می شوند کنترل می گـردد. شـار انتشـاری را مـی توان بر اساس قانون فیک نشان داد:

$$F = -\frac{Deff\ \Delta c}{\Delta x} \quad (۷)$$

جایی که F= شار انتشاری در واحد سطح بخش $(g/[cm^2.s])$ , $D_{eff}$ = ضریب مؤثر انتشار $(cm^2/s)$ , $\Delta c \backslash \Delta x$ = گرادیان غلظت ماده حل شده در طول ضخامت غشاء $(g/cm^4)$ می باشند.

معادله (۷) را می توان به صورت ذیل خلاصه کرد.

$$F = k_m \Delta c \qquad (۸)$$

که ضخامت غشاء پخشندگی و ضریب تفکیک همگی در ضریب انتقال توده غشاء $k_m$ با واحد سانتی متر بر ثانیه نهفته است.

معادله (۷) بیان می‌کند که شار انتشاری با ضخامت غشا نسبت معکوس دارد اما گزینش گری مستقل ضخامت است. این امر منجر به توسعه غشاهای فوق نازک که دارای شرایط تفکیک قابل قبول شار انتشاری فراغشایی هستند شد. (توجه داشته باشید که این حالت برای غشاهای به کار رفته در کاربردهای همرفت نیز صدق می‌کند). غشاهای نامتقارن متداول بصورت یک سری لایه جداساز با بستر محافظ عمل می کنند. بستر محافظ حداقل مقاومت انتقالی و حداکثر استحکام مکانیکی را فراهم می‌کند. تعیین آزمایشگاهی خصوصیات انتشاری دستگاه در هر دو محدوده وزن مولکولی وزن بالا و پایین برای درک محیط کپسوله شده سلولی ضروری است.

انتقال مولکولی در یک دستگاه ایزولاسیون ایمنی به وسیله پس زنی (رانش) فضایی ایجاد شده توسط خلل و فرج های غشاء و تخلخل توده تخت تأثیر قرار میگیرد. خصوصیات انتشاری گونه های با وزن مولکولی کوچکتر توسط تخلخل سراسری غشاء

کنترل می شود، در حالی که خصوصیات انتشاری وزن مولکولی بزرگ تـر توسـط انـدازه خلل و فرج غشا کنترل می شود. جهت اندازه گیری انتقال تـوده انتشـاری بـرای شـارش بالا، گونه هایی با وزن مولکولی کم (۱۸۰-۱۰۰۰ g/mol ) و همچنین شارش کم، گونـه هایی بـا وزن مولکـولی بـالا (۶۰۰۰۰-۱۵۰۰۰۰ g/mol) بـرای غشـاهای فیبـر توخـالی P(AN-VC) روش هایی توسعه یافته اند.

دستگاه آزمایشگاهی اندازه گیری انتشار وزن مولکولی کوچک شامل یـک بخـش دیـالیز است که در آن یک محلول ردیاب پیرامون فیبر در خارج گـردش می‌کنـد در حـالی کـه محلول نمونه برداری به طرف پائین مجرای فیبر جریان دارد. نـرخ هـای شـارش طـوری تنظیم می شود که آرایش لایه مرزی درونی و خارجی فیبر حداقل باشد. ضرائب انتشار از اختلاف غلظت میان مجرا و حمام در یک نرخ شارش مجرای مشخص محاسبه می شوند. این آزمون برای اندازه گیری ضـرائب انتشـار در میـان ایـن غشـاهای شـارش آب نسـبتاً بـالاتری بـرای گلـوکز (MW 186) ویتـامین $B_{12}$(MW1.3kDa) و سـایتورکروم (MW13.4kDa).

برای گونه های مولکولی بزرگ، مقاوت های غشاء بسیار بزرگ تر از مقاومت ای لایه مرزی است، بنابراین طرح آزمایشگاهی، شار (جریان) را در بر نمی گیرد. اندازه گیری را می توان با انتشار ردیاب در طول غشاء در هر راستا انجام داد. زیرا سنجش در دو راستا نتایج یکسانی را برای مقدار ضریب انتشار می دهد. این آزمون برای سنجش میوگلوبین گونه های پروتئین BSA و IgG و گونه های دکستران از ۵۰۰۰۰MW تا ۳۰۰۰۰۰ توسعه یافته است. برای افزایش حساسیت اندازه گیری، گونه های نشان دار فلورسانت به کار برد می شود. شکل ۳-۵۹، نمودار انتشار دکستران در طول غشاء P(AN-VC) را با در نظر گرفتن آب کل به صورت تابعی از وزن مولکولی دکستران نشان می دهد.

خلاصه (چکیده)

لایه سازی غشاء برای درمان سلول کپسوله شده به منظور ارائه دامنه گسترده ای از محصولات نشأت گرفته از مولکلول های کوچک (برای مثال، دپامین، انکفالینز) تا محصولات ژنی بسیار بزرگ (برای مثال، فاکتورهای رشد، گلوبولین های ایمنی) تحت بررسی است. نکات کلیدی در استفاده از مواد جهت ساخت این دستگاهها عبارتند از: ۱- غشاء زیست سازگار، اجزاء دستگاه و مواد ماتریس ۲- کاشتنی های محکم و ۳- موادی که با خصوصیات انتقال مناسب درون غشاء قابل ساخت هستند. این فصل تلاش می‌کند

که به روش های تأثیر گذار یا سنجش استحکام غشاء و خصوصیات انتقال متمرکز شود. هر دو این خصوصیات برای هر سیستم کاشتنی تجاری ضروری است. خصوصیات انتقال غشاء برای کلیه سیستم ها حیاتی است، چه دستگاه کاشتنی باشد و چه برون بدنی. با استفاده از روش های ساخت غشا می توان غشاهایی با استحکام دو یا چهار برابر استحکام وارونگی فاز در غشاهای سنتی تولید کرد. با استفاده از تجهیزات جدید اندازه گیری انتقال با وزن مولکولی کوچک و بزرگ می توان غشاهایی با ترکیب ایزولاسیون ایمنی دلخواه ساخته و نرخ های تحویل محصولات را برای بسیاری از کاربردهایی که بالقوه بر درمان مجموعه گسترده ای از بیماریها تأثیر می گذارد، گزینش کرد.

تولید داربست های پلیمری : انجماد – خشک سازی

PROCESSING OF POLYMER SCAFFOLD : FREEZE - DRYING

کیومین وانگ و کوین – ای – هیلی

**پیشگفتار**

داربست های پلیمری بکار رفته به عنوان جانشین برای ماتریس برون سلولی ارثی (ECM)، برای بازسازی استخوان، غضروف، کبد، پوست و بافت‌های دیگر استفاده می‌شود. پلی لاکتید (PL)، پلی گلیکولید (PG) و کوپلیمرهای آنها (PLG) مواد مناسبی برای اعضاء جانشین به شمار می روند، زیرا در هنگام کاشت در اثر هیدرولیز بطور تصادفی تخریب شده و محصولات تخریبی آنها به شکل دی اکسید کربن و آب کلاً از بدن خارج می‌شود.

یک داربست ایده آل باید دارای تخلخل مناسب برای انتشار مواد غذایی بوده و امکان پاکسازی مواد زائد را داشته و دارای پایداری مکانیکی مناسبی جهت تثبیت و انتقال بار باشد. علاوه بر این، شیمی سطح ماده باید چسبندگی سلول و علامت دهی داخل سلولی را به نحوی ارتقاء دهد که سلول ها فنوتیپ طبیعی خودشان را بروز دهند. برای رشد سریع سلول، داربست باید همچنین دارای میکرو ساختار بهینه باشد (برای مثال، اندازه خلل و فرج، شکل، و مساحت ویژه سطح). اثر اندازه خلل و فرج کاشتن بر بازسازی بافت توسط آزمایشاتی که نشان دهنده اندازه خلل و فرج بهینه $45\mu m$ برای فیبر وبلاست درون رست بین ۲۰ و $125\mu m$ برای بازسازی پوست یک پستاندار بالغ و $30-350\mu m$ بسته به مکانیزم، برای بازسازی استخوان است، مشخص می‌شود. بدین ترتیب، هدف

اصلی در ساخت داربست ها برای بازسازی بافت، کنترل دقیق اندازه خلل و فرج و تخلخل است.

داربست های پلیمری زیست تخریب پذیر میکرو متخلخل توسط روش های متعددی که شامل قالب گیری حلال(solvent casting)- فرو شستن (پالایش)ذرات (particle leaching)، تفکیک فازی(phase separation)، تبخیر حلال (solvent evaporation) و باند کردن فیبر(fiber bonding) برای شکل دهی شبکه پلیمر هستند، آماده می شوند. این روشها به طور مفصل در فصل های دیگر آورده شده است. در این فصل، قصد داریم یک شیوه پردازش جدید برای ساخت داربست‌های PLG بسیار متخلخل با مزایای اضافی که قابلیت تلفیق رشد پایه پروتئینی و فاکتورهای تفاضلی در زمان پردازش را دارند معرفی کنیم. این شیوه خصوصاً ساخت دار بست هایی با تخلخل بیشتر از ۹۰٪ و توانایی کنترل خلال و فرج هایی به اندازه ۲۰ و $200\mu m$ را در بر می‌گیرد.

این روش پردازش شامل ایجاد یک امولسیون ازطریق هموژنیزه کردن (همگن سازی) محلول پلیمر – حلال و آب، سرد کردن سریع امولسیون جهت حفظ ساختارحالت مایع و حذف حلال و آب در اثر انجماد و خشک سازی است.

-مواد MATERIALS

پلی دی ال – لاکتید /گلیکولید (PLG) نرح مولی ۱۵ : ۸۵ ؛ پلیمرهای بیرمینگهام،

بیرمینگام، AL (ایالت آلاباما)

کلرید متیلین (Mc)، تشخیص باکستر(baxter diagnostics)، مک گراپارک، IL (ایالت ایلینوی) آب فوق خالص: درجه $18M\Omega.Cm,\ ASTM\ ,\ I$

$NaCl$ , $Cacl_2$ و آلبومین سرم گاوی (BSA)، سیگما – آلدریچ، سنت لوئیس، MO (ایالت میسوری) پلی اتیلن گلیکول (PEG)، شرکت شیمیایی فلوکا، رونکونکوما، NY (نیویورک)

-تجهیزات EQUIPMENT

هموژنایزر (همگن ساز)دستی، موسسه بین الملل امنی، واتربری (ایالت کنتیکت) تخلخل سنج جیوه ران (MIP)، تخلخل سنج اسکن خودکار ۳۳، موسسه (شرکت) کوانتاکروم، سیوست، (نیویورک) NY

وجود یک دستگاه انجماد – خشک ساز اصلاح شده ضروری است زیرا دستگاههای انجماد – خشک ساز تجاری قابلیت انجماد – حشک سازی MC یاحفظ دمش خلاء از بخارات MC را ندارند.

این سیستم از یک متراکم کننده (چگال ساز) (ویرتیس) 110c- ، متصل به یک تله نیتروژن مایع (ویرتیس، گاردینر، نیویورک)، متصل به یک پمپ خلاء مقاوم در برابر مواد شیمیایی (BOC , RV12) محصولات خلا (کششی) ادواردز، ویلمینگتون، ایالت ماساچوست) که قابلیت کشش خلاء به درون سیستم را تا حدود motorr ۲۰ دارند، تشکیل شده است.

## FABRICATION PROCESS فرایند ساخت

نمودار فرآیند ساخت در شکل ۱-۶۰ نشان داده شده است. در ابتـدا دو محلـول مخلـوط نشدنی، فاز آلی و فاز آب را تشکیل مـی دهنـد. فـاز آلـی توسـط حـل شـدن PLG بـا ویسکوزیته ذاتی ویژه $\eta_{inh}$ در MC چنان انجام می‌شود تا وزن در درصد حجم کل کل مطلوب امولسیون بدست آید. فاکتورهای زیست فعال هیدروفوبیکو عوامل فعال در سطح را نیز می توان در این فاز جهت تلفیق و ارائه و کنترل میکرو ساختار داربست حـل کـرد. فاز آب، از آب فوق خالص به همراه یا بـدون افزودنـی هـای حـل شـدنی مختلـف ماننـد فاکتورهای زیست فعال هیدروفیلیک برای تلفیق و ارائه ایجاد می‌شود. برای نمونه نمـک های $CaCl_2$ یا NaCl و یا عوامل فعال در سطح جهت کم بـه کنتـرل میکـرو سـاختار بکاربرده میشوند. فازهای آب و آلی در یک لوله آزمایش شیشه ای که ۴۰٪ حجم آن آب است، به هم اضافه شده و دو لایه نامخلوط را شکل میدهند. بر اساس مطالعات اولیه، این درصد حجم آب پایدارترین وضخیم ترین امولسیون مناسب برای سـاخت داربسـت‌هـا را ایجاد می کند.ترکیبات دیگر منجر به ذوب شدگی و یا وارونگی فاز می شوند (به عبـارت دیگر شکل گیری میکرو کره‌ها). این لایه‌های نامخلوط به وسیله یک همگن سـاز دسـتی که در سرعت های مختلف تنظیم میشود، همگـن شـده ودر یـک قالـب مناسـب ریختـه می‌شود (برای مثال، شیشه یا مس). سپس با گذاشتن سریع قالب بر روی بلوک مس کـه در کنار نیتروژن مایع با دمای (196c- ~) قرار دارد سرد می‌شود. سـپس نمونـه هـا در یکدستگاه انجماد –خشک ساز سفارشی ۲۰motorr و دمای آغازین 110C- منجمـد و خشک می شوند. بعد از اینکه دمای داخل امولسـیون بـرای یـک سـاعت در 110c- بـه

تعادل رسید، دستگاه متراکم ساز خـاموش شـده و دسـتگاه متراکمسـاز و امولسـیون بـه آرامی در طی ۱۲ ساعت تا دمای اطاق گرم می شوند. نمونه‌هـای بدسـت آمـده در یـک دستگاه خشک ساز خلاء در دمای اتاق برای ذخیره سازی وحذف بیشتر هر گونـه حـلال باقیماند قرارداده می شوند. جهت کمینه سازی اتلاف پروتئین در طول فرایندساخت، یک شبکه نفوذی پلی اکریلامید –کوپلیمرشده با – اتیلن گلیکول، با یک همگن سـاز ومـاده شیشه ای پیوند زده می‌شود تا رونشینی پروتئین(adsorption) از بین برود.

- تشـــریح (توصـــیف) داربســـت هـــا CHARACTERIZATION OF SCAFFOLDSمیکرو ساختار داربست ها را می تـوان از نظـر کیفـی بوسـیله میکروسکوپی اسکن الکترون ولتاژپایین (SEM)(1.3KV) و از نظر کمی توسـط روش تخلخل سنجی جیوه ران (MIP) برای تعیـین متوسـط خلـل و فـرج و تخلخـل کـه در جاهای دیگر نیز گفته شده است، تحلیل کرد. بطور کلی، کلیه داربست هـای امولسـیونی ساخته شده توسط روش انجماد – خشک سازی در محدوده درصد وزنی PLG که بطور خلاصه بیان شد و ۴۰٪ حجمی آب، دارای تخلخلی بیشتر از ۹۰٪ بـوده و دارای منـاطق

سطح ویژه ای در حدود $10\frac{m^2}{g}$ هستند. این داربست ها دارای خلل و فرج هـای بسـیار تو در تو با توزیع اندازه خلل و فرج بزرگ می باشند. بزرگ ترین خلل و فرج ها، بیشتر از $200\mu m$ هستند. البته، متوسط اندازه های خلل و فرج خاص با تغییر شرایط پـردازش مشخص است.

داربست ها از طرفی که امولسیون بعد از متخلخل شدن در قالب، در معرض محیط قـرار می گیرد، دارای پوسته غیر متخلخل هستند. داربست های ضخیم، همگن،از نظر فیزیکی قابل کنترل، بدون حفره های فراوان (۱mm< خلل و فرجهای) به عنوان داربسـت هـای خوب شناخته می شوند

- متغیر های پردازش تاثیر گذار بر میکرو ساختارداربست

PROCESSING VARIABLES AFFECTING SCAFFOLD MICROARCHITEVCTURE

به غیر از درصد حجم درحجم آب، اثـرات کلیـد متغیرهـای دیگـر نیزبرکیفیـت فیزیکـی ومیکرو ساختار داربست بررسی شدند. بدلیل اینکه این فرآیند، متغیرهای فراوانی را در بر می گیرد، ارزیابی اثرات آنها با بکارگیری یک طرح آزمایشگاهی کـه تمـامی فاکتورهـا را درنظر گیرد به تعداد آزمایشات تقریبا بی شماری نیازخواهد داشت.

برای مثال، در یک فرآیند ۴ متغیره، هر کدام با ۳ حالت ممکن، حداقل تعداد آزمایشـات برای ارزیابی متغیرهای تاثیر گذار بر میکرو ساختار داربسـت برابـر $۳^۴$=۸۱ خواهـد بـود. برای کمینه کردن تعداد آزمایشاتی که به آرایه های عمودی طراحـی شـده آمـاری نیـاز دارند، و برای تعیین مهم ترین متغیرهای کنتـرل، تحلیـل آزمایشـگاهی تـاگوچی مـورد استفاده قرار می گیرد. متغیرهای مورد بررسی شامل، غلظت PLG وزن مولکولی PLG،

سرعت همگن سازی، تثبیت کننده‌های امولسیون اضافی وعوامل فعال در سطح می شوند. جدول ۱-۶۰ حاوی چکیده ای از اثرات این متغیرها بر میکروساختار و کیفیت فیزیکی داربست است.

-غلظت PLG **PLG CONCENTRATION**

تاثیر سهم وزنی پلیمر (۵ و ۱۰ w/v پلیمر) بر میکروساختاروکیفیت فیزیکی داربست ارزیابی شده است. غلظت های پلیمر بیشتر از ۱۰٪ w/v برای ساخت داربست مناسب نیستند، زیرا ویسکوزیته بالای فاز آلی از همگن سازی مناسب جلوگیری میکند. نمونه هایی با ۵٪ w/v PLG، ذوب شدگی قابل ملاحظه ای را از خود نشان دادند که به میکروساختار آسیب وارد می کند، در حالیکه نمونه های با ۱۰٪ w/v PLG دارای کیفیت فیزیکی بهتری بودند. لذا ۵٪w/v PLG به عنوان متغیر پردازشی زیست پذیر در نظرگرفته نمی شود. ما همچنین مقدار میانی $7.5\%\frac{w}{v}$ را با موفقیت آزمایش کردیم.

- **وزن مولکولی** PLG PLG MOLECULAR WEIGHT

اثر $\eta_{inh}$ PLG، ۰/۵۷ و $0.88\frac{dl}{g}$ ارزیابی شد. افزایش $\eta_{inh}$ PLG سبب

بالا رفتن اندازه متوسط خلل و فرج و خصیصه های فیزیکی می‌شود. اندازه متوسط خلـل وفرج مستقیماً توسط ویسکوزیته محلول پلیمر تاثیر مـی پـذیرد.بنابراین نمونـه هـای بـا $\eta_{inh}$ بالاتر، ویسکوزتر (لزج تر) هستند. این مشاهدات می تواند بـدلیل دو فـاکتور ذیـل باشد : بر طبق قانون استوک، افزایش $\eta_{inh}$ نرخ خامه ای شدن را بوسیله افزایش چگالی محلول پلیمر وویسکوزیته امولسـیون کـاهش مـی دهـد. و بـر طبـق عبـارت اسـتوک – انیشـتین بـرای ضـریب انتشـار، افـزایش ویسـکوزیته محلـول پلیمر،نـرخ کرکینـه سازی(flocculation rate) را کاهش می دهد.

*-سرعت همگن سازی* ***HOMOGENIZING SPEED***

داربست های ساخته شده با سرعت های همگن سازی ۵۰۰۰ و rpm ۱۷۵۰۰ نشان مـی دهند که سرعت همگن سازی بالاتر منجر به بزرگ شدن اندازه متوسط خلل وفرج شـده و خصوصیات فیزیکی را بهبود می بخشد. این وضعیت دور از ذهن است زیرا تئوری بیـان می کند که افزایش نرخ برش سبب کاهش اندازه کروی فاز آب و در نتیجه اندازه خلـل و فرج می‌شود. البته افزایش نرخ برش حبابهای هوا را در امولسیون القا کرده و بدین ترتیب سبب ایجاد داربست هایی با اندازه خلل و فرج های بزرگ می‌شود. با وجود افزایش اندازه خلل و فرج، این روش پردازش متغیر بوده و کنترل آن دشوار است.در نـرخ هـای برشـی پایین تر، وجود حباب های هوا یک فاکتوربه حساب نمی آید.

- تثبیت کننده ها وعوامل فعال در سطح امولسیون

EMULSION STABILIZERS AND SURFACTANTS

اثرات تثبیت کننده ها و عوامل فعال در سطح امولسیون و غلظت آنها برمیکرو معماری و کیفیت فیزیکی داربست بررسی شده اند. تثبیت کننده های امولسیون و غلظت های تست شده آنها عبارت بودند از: $CaCl_2(0.1M\ ,\ 0.05\ ,\ 0.01\ ,0)$ $Nacl,(1M,0.1,0.01,0)$ این. الکترولیت ها قبل از مرحله همگن سازی به فاز آب اضافه شدند. بر اساس تئوری درجا گوئین لانداو – فروی – اوربک (DLVO) متوجه می شویم که وجود غلظت الکترولیت هایی مانند $CaCl_2$ و NaCl می تواند پایداری امولسیون های روغن درآب را با تاثیر گذاری بر طول دبی بخاطر نیروی پس زنی الکتریکی بین ذرات تغییر دهد.با وجود اینکه تئوریDLVO ناشی از ذرات کلوئیدی دریک محیط قطبی (به عبارت دیگر، امولسیون روغن درآب) است و امولسیون بکار رفته در اینجا بر عکس است، اما این تئوری به همراه مفهوم افزایش نیروهای پس زنی و الکتریکی با حدود طولانی جهت افزایش پایداری امولسیون در این کار بکار گرفته می‌شود. غلظت های مختلف الکترولیت برای فشرده سازی ذرات برای افزایش تخلخل نهایی و اجازه ندادن به ادغام شدن (یکپارچه شدن)همزمان ( به عبارت دیگر شکست امولسیون) انتخاب شده اند.

افزایش غلظت NaCl یا $CaCl_2$ به پایداری سازی (تثبیت) امولسیون کمک کرده واجازه آرایش داربست های ضخیم با متوسط اندازه خلل و فرج کوچک تر را می دهد. از آنجا که الکترولیت ها در فاز (ناپیوسته) آب هستند، NaCl یا $CaCl_2$ ذرات سطح آب را باردار کرده و سبب افزایش نیروهای پس زنی الکترواستاتیک با حدود طولانی (بلند) در میان حلال MC غیر قطبی می شوند. بدین ترتیب، بالا رفتن غلظت الکترولیت ظاهراً سبب افزایش نیروهای پس زنی الکترواستاتیک شده و با جلوگیری از تجمع و ادغام

نهایی، طول دبی را نیز که به تثبیت ذرات کوچکتر در امولسیون کمک می کند، افـزایش میدهد.

درمطالعات انجام شده بر روی دو عامل فعـال در سـطح PEG , BSA قبـل از مرحلـه همگن سازی به فاز آب افزوده می شوند PEG , BSA به امولسیون اضافه می شوند تـا به عنوان عامل فعال در سطح و تثبیت کننده فضایی عمل کرده تا از ادغام (یکپـارچگی) ذرات متفرق شده جلوگیری کند.توجه داشته باشید که، عوامل فعال در سطح دیگر مانند پلوروئیک‌ها، اسپان و تویین نیز می توانند مورد استفاده قـرار گرفتـه و متناسـب باعامـل فعال در سطح می توانند به فاز آب یا آلـی اضـافه شـوند. غلظـت PEG در 0.1 w/v٪ تثبیت می‌شود زیرا وارونگی فاز در غلظت های دیگر رخ مـی دهـد و در عـوض اثـر وزن مولکولی، متوسط وزنی PEG (Da ۳۵۰۰۰ یا ۲۰۰۰۰ $M_w$) بررسی شد. غلظت PEG طوری انتخاب شد تا در محدوده غلظت بحرانی ریز واره(micelle) (cmc) باشد که در حدود $M10^{-5} - 10^{-4}$ است . cmc به عنوان غلظتی که در آن آرایش ریز واره بحرانی می‌شود تعریف گردیده و آن غلظتـی اسـت کـه در آن اثـر عامـل فعـال در سـطح قابـل ملاحظه می‌شود.وزن های مولکولی متفاوت نیز می توانند مورد استفاده قرار گیرد. البتـه باید توجه داشت که وزن ملکولی متوسط وزنی $M_w$ بر cmc تاثیر می گذارد

افزایش $M_w$, PEG سبب کاهش اندازه خلل و فرج می‌شود. گرچه این عامل کم اهمیت ترین متغیر درمقایسه با فاکتورهای دیگر به حساب می آید، اما درکنترل کردن اندازه متوسط خلل و فرج اثر قابل ملاحظه ای دارد. توجه کنید که هر چقدر $M_w$ کوچکتر باشد تعداد مولکولهای PEG تا زمانی که $\%\frac{w}{v}$ مشابه به کار برده شود، بزرگتر می‌شود. این افزایش $M_w$، cmc را کاهش داده و به همراه غلظت PEG بالاتر، cmc با سرعت بیشتری بدست آمده و خارج می‌شود.

بدین ترتیب برای افزایش پایداری امولسیون، cmc پایین تر از ارجحیت دارد، زیرا شکل گیری ریز واره‌ها بسیار سریعتر شده و ذرات کوچکتر اجازه شکل گیری دارند.

برای BSA، اثر غلظت (امولسیون ۰/۰۲ ، ۰/۰۱، ۰/۲، ۰/۵، ۱ یا $۲\frac{mg}{ml}$) ارزیابی شد، همچنین داربست های بار شده با $۰/۰۱\,mg\frac{BSA}{ml}$ امولسیون و بدون هیچ گونه $CaCl_2$ یا PEG ساخته شدند تا افزایش اثرات آنها بررسی شود. غلظت BSA تا زمانی که از $۰/۲\ mg\frac{BSA}{ml}$ امولسیون تجاوز نکند، بر اندازه متوسط خلل و فرج تاثیر قابل ملاحظه ای ندارد (شکل ۲-۶۰). در غلظت های کمتر از $۰/۲\,mg\frac{BSA}{ml}$ امولسیون، متوسط اندازه های خلل و فرج بین ۵۵ و $۷۰\ \mu m$ بود. غلظت های بین ۰/۲ و $۱\,mg\frac{BSA}{ml}$ امولسیون، BSA به عنوان یک عامل فعال در سطح و محافظت کلوئید عمل کرده تا اندازه ذرات متفرق فاز (آب) را کاهش دهد (به عبارت دیگر، متوسط اندازه

خلل و فرج)؛ بدین ترتیب هر چقدر غلظت بالاتر باشد، متوسط اندازه خلل و فرج کوچک تر خواهد بود. به نظر می رسد که در غلظت های بیشتر از $۱\,\mathrm{mg}\frac{\mathrm{BSA}}{\mathrm{ml}}$ امولسیون، اثـر عامل فعال در سطح به حد عملی رسیده باشد زیرا متوسط اندازه خلل و فـرج در حـدود $۶/۵ \pm ۰/۸\,\mu\mathrm{m}$ بدست آمد. همه داربست ها دارای تخلخل و مساحت سطح ویژه بسـیار بالا هستند ( به ترتیب ۹۰٪ < و $\sim 10\frac{\mathrm{m}^2}{\mathrm{g}}$) کنترل اندازه متوسط خلل و فرج از طریق تنظیم غلظت پروتئین به توانایی پروتئین‌هـا در تـاثیر گـذاری بـر تثبیـت امولسـیون‌هـا بستگی دارد. پروتئین ها در حد فاصل امولسیون ها رونشـین و جمـع شـده و بـه عنـوان عوامل فعال در سطح و محافظ کلوئید عمل می کنند. واسطه امولسیون بکار رفته در این آزمایش شامل فاز هیدرو فوبیک (MC/PLG) است، آب زدایی لایه های هیدرو فوبیک از انرژی آزاد گیبز بین سطحی مطلوب پروتئین پیراگیر سطح هیدرو فوبیک می کاهید.

آلبومین با قابلیت تطبیق ساختاری بالا در تغییر شرایط محیطی، حتی اگر آب زدایی و یا بر هم کنش های دیگر نامطلوب باشند، تمایل به رونشینی در اغلب سـطوح را دارد. ایـن کارآیی بیشتر توسط بار خالص منفی فراوان آلبومین ایجاد می‌شود که پایـداری سـاختار مولکول در در محلول کاهش داده و احتمال رونشینی آنـی (خودجـوش) را افـزایش مـی دهد. این رونشینی ترجیحی پروتئین (BSA) در حد فاصل، بر پایداری امولسـیون و در نتیجه اندازه متوسط خلل و فرج داربست اثر می گذارد. البته، با حذف $CaCl_2$ و PEG، اثر عامل فعال در سطح BSA ( $۰/۰۱\frac{\mathrm{mg}}{\mathrm{ml}}$ امولسیون) تشدید شده و سبب کاهش شدید اندازه متوسط خلل و فرج از $58 \pm 2\,\mu\mathrm{m}$ به $33 \pm 8\,\mu\mathrm{m}$ مـی گـردد (شـکل ۳-۶۰).

تحلیل MIP توزیع اندازه خلل و فرج در شکل ۴-۶۰ نشان داده شـده اسـت. همچنـین، توزیع بزرگ اندازه خلل و فرج نیز با تمایز کامل در متوسط خلل و فرج بین گروههـای ۱ و ۲ نماش داده شده است. بدین ترتیب، اثرات $CaCl_2$ و PEG به اثـرات BSA اضـافه نمی شود.

-روش ارجح ساخت داربست

PREFERRED METHOD OF SCAFFOLD FACRICATION

بر اساس اطلاعات ذکر شده که در جـدول ۱-۶۰ خلاصـه شـده اسـت، مجموعـه ارجـح شرایط ساخت داربست با کنترل اندازه خلل و فرج و کیفیت خوب فیزیکی به شـرح زیـر می باشد؛ غلظت PLG،

$$[NaCl]=0\ ;\ [CaCl_2]=0.01M\ ,\ PLG\,\eta_{inh}=0.88dl/g\ ;\ \%10w/v$$

سرعت همگن سازی $PEGM_w = 25000\,Da;17500\,rpm$ . داربست های سـاخته شده بر اساس این پارامترها دارای کیفیت خوب فیزیکـی و انـدازه متوسـط خلـل و فـرج $57 \mp 5\mu m$ هستند. داربست هایی با کمترین اندازه متوسط خلل و فرج را می توان بـا افزودن غلظت های بالای BSA ( $6.5 \pm 1\mu m$ در $mg/ml$ ۲ امولسیون) یا NaCl

( $4.6 \pm 1\mu m$ در ۱M) بدست آورد. شرایط پردازش و اندازه متوسط خلل و فرج در جدول ۲-۶۰ خلاصه شده است.

**تولید داربست های پلیمری: اشکال کامپوزیت پلیمر – سرامیک**

PROCESSING OF POLYMER SCAFFOLDS : POLYMER – CERAMIC COMPOSITE FORMS

کاتو- تی – لاورن سین، هلن، اچ – لو، و یوسف خان

پلیمرها و سرامیک ها به طور جداگانه یا ترکیبی به شکل مکمل یا گزینه ای برای نسج آلوگرفت و زنوگوفت به عنوان جایگزین بافت سخت در کاربردهای دندانی و ارتوپدی بکار برده می شوند، و از آنجا که هر ماده خصوصیات ذاتی خود را دارد، برای کاربردهای خاصی مناسب خواهد بود. چندین پلیمر زیست تخریب پذیر در پروژه‌های تحقیقاتی و استفاده‌های بالینی برای کاربردهای ماهیچه ای – اسکلتی مورد آزمایش قرار گرفته اند. پلی ارتو استرها، پلی انیدریدها، پلی فسفازن ها و پلی آمینواسیدها همگی به عنوان جایگزین های استخوانی به واسطه تخریب پذیری منحصر به فرد و خصوصیات مکانیکی شان امتحان شده اند.

پلیمرهای تخریب پذیر خانواده پلی - $\alpha$ هیدروکسی اسید شامل پلی لاکتیک اسید (PLA)، پلی گلیکولیک اسید (PGA) و کوپلیمر آن پلی لاکتیک – کو-گلیکولیک اسید (PLAGA) به طور گسترده به عنوان صفحات تثبیت، پیچ ها و پین ها و همچنین دستگاههای رهایش دارو و داربست‌های مهندسی بافت مورد استفاده قرار می‌گیرند. سرامیک های مختلفی وجود دارند که به تنهایی یا به همراه پلیمر ها برای کاربردهای ارتوپدی ازجمله تری کلسیم فسفات، تتراکلسیم فسفات، هیدرو کسی آپاتیت و کامپوزیت های پایه مواد زیست فعال، بکار برده می شوند. این سرامیک ها با پلیمرهای تخریب پذیر و تخریب ناپذیر مختلفی ترکیب می شوند تا سبب اصلاح استحکام پلیمرها، چسبندگی به استخوان، تخلخل، و قابلیت تحریک درون رشد استخوان گردند. یک ار

مطلوب ترین این ترکیبات، ترکیب PLAGA و هیدروکسی آپاتیت به شکل یک کامپوزیت چند کاره قابل استفاده در مهندسی بافت است با توجه به این موضوع، سه روش مختلف برای ایجاد داربست کامپوزیت PLAGA و هیدروکسی آپاتیت بیان می‌شود: فیلم پلیمر – سرامیک تولید شده توسط روش قالب گیری حلال، ساختارهای پلیمر- سرامیک سنتز شده توسط روش تجمع حلال و ساختارهای پلیمر- سرامیک سنتز شده با استفاده از روش ژل – ریز (ریزدانه).

**-پیشگفتار**

مهندسی بافت را می توان به شکل کاربرد بیولوژیکی، شیمیایی و اصول مهندسی در جهت ترمیم، مرمت یا بازسازی بافت های زنده با استفاده از بیومواد، سلولها و فاکتورها به تنهایی و یا بصورت ترکیبی مورد استفاده قرارداد. هم سرامیک ها و هم پلیمرها دارای خصوصیات ذاتی کاملاً مجزایی بوده و هر یک از آنها بطور گسترده در شکل بیو مواد در بازسازی بافت های زنده بکار گرفته می شوند، که این کاربردها به خوبی در مدارک موجود ارائه شده است. برای مثال ، سرامیک ها در ترمیم بافت سخت از جمله کاربردهای ماهیچه ای – اسکلتی و دندان استفاده می شوند. پلیمرها نیز بطور گسترده در کل بدن به شکل جایگزین های موقت و دائم برای شریان ها استخوان‌ها، و مفاصل و بازسازی پلاستیکی و غیره بکار می روند.

معمولاً یک نوع ماده به تنهایی نمی تواند هم ویژگی های مطلوب مکانیکی و هم شیمیایی را برای یک کاربرد خاص برآورده سازد. در این نمونه ها مواد کامپوزیت که ترکیبی از مزایای هر دو ماده هستند بسیار مناسب تر خواهند بود. مطلوب ترین حالت در اینجا ترکیب پلیمرها و سرامیک ها به شکل یک کامپوزیت چند کاره قابل استفاده در

مهندسی بافت است. گزینه مصنوعی پلیمر – سرامیک به طور ویژه برای پیوندهای بیولوژیکی مانند بافت های پیوندی خود شخص یا نسج پیوندی بیگانه طراحی می شوند. این فصل به طور اجمالی کاربرد این دو نوع ماده را به تنهایی یا به صورت ترکیبی برای بازسازی بافت ماهیچه ای اسکلتی و دندانی شرح می دهد.

- پیوندهای متداول استخوان CONVENTIONAL BONE GRAFTS

- پیوند نسخ خود شخص AUTOGRAFTS

برترین استاندارد رایج در حال حاضر در پیوندهای استخوان، پیوند نسج خود شخص است که در آن بافت از استخوان تاج ایلیاک بیمار جدا شده و به قسمت آسیب دیده منتقل می‌شود. از نظر ساختاری پیوند نسوج خود شخص هم دارای قابلیت هدایت استخوانی (osteoconductive) و هم دارای قابلیت القای استخوانی (osteoinductive) است که منجر به فراهم شدن قالبی می‌شود که در آن بافت و عروق استخوان جدید در زمان تحریک بازسازی استخوان بوسیله جدا سازی سلولهای مزانشیمال در استئوبلاست های شکل دهنده استخوان توانایی رشد پیدا می کنند. البته، تعداد بافت های پیوندی از خود شخص محدود بوده و اغلب اوقات محل اهدا کننده دچار بیماری می‌شود. علاوه بر این، عمل جراحی لازم برای خارج سازی بافت سبب ایجاد دردها و عوارض بعدی می گردد.

- پیوند نسج بیگانه ALLOGRAFTS

اصول بالینی پیوند نسج بیگانه همانند پیوند نسج خود شخص است. در این مورد، بافت اهدا شده از شخص دوم یا جسد بدست می آید. این وضعیت مشکل بیماری محل اهدا کننده را رفع کرده اما محدودیت هایی را نیز به دنبال دارد. البته، خطر انتقال

بیماری و پس زنی کاشتن افزایش می یابد. با وجود این، این نوع پیوند یک ساختا رهدایت استخوانی را برای درون رویش استخوان فراهم کرده و فرایند ضروری استریلیزاسیون (سترون کردن) بافت در آن سبب کاهش پتانسیل القایی استخوان می‌شود که اغلب منجر به تشکیل ساختاری با ویژگی مکانیکی تقریباً مناسب می گردد.

در حال حاضر جایگزین های بافت استخوان دارای بازار قابل توجهی هستند. تنها در ایالات متحده، در حدود ۶/۲ میلیون شکستگی در سال رخ می دهد که در حدود ۵۰۰۰۰۰مورد آن به گونه ای از پیوند استخوان نیاز دارد. علاوه بر این، هزینه میانگین روند پیوند استخوان بالغ بر ۵۰۰۰ $ شده و هزینه کل دوره درمان در سال معادل ۲/۵$ بیلیون می‌شود.با وجود محدودیت های مربوط به پیوندهای بیولوژیکی، مهندسان و بالین شناسان در جهت توسعه جایگزینه هایی برای پیوند استخوان با هم همکاری می کنند.

-استدلالهایی برای بیومواد کامپوزیت

RATIONALE FOR COMPOSITE BIOMATERIALS

استخوان بیولوژیکی از دوفاز آلی و غیر آلی تشکیل شده است. در حدود ۷۰٪ فاز غیر آلی را فسفات کلسیم که اغلب به شکل مواد معدنی نیمه بلورین به نـام هیدروکسـی آپاتیـت تشکیل می دهد که مسئولیت استحکام مکانیکی استخوان را بر عهده دارد. انواع مختلفی از سرامیک ها زیست سازگار تشخیص داده شده و به رشد استخوان و پایـداری کاشـتنی کمک می کنند. برای مثال هایی از این نوع می توان، کورالین، سولفات کلسـیم، فسـفات کلسیم، شیشه زیست فعال 45S5 بکار برده شـده و مـی تـوان آنهـا را توسـط آمیخـتن خشک یا قالب گیری فشاری بـا پلیمرهـا ترکیـب کـرده و یـا توسـط تعـدیل شـیمیایی (chemical modifications) بر سطح پلیمر شکل داد. (جـدول ۱-۶۱). البتـه مـواد سرامیکی اغلب تخریب پذیر نبوده و به واسطه طبیعت شکننده و ویژگی کششی ضـعیف از نظر مکانیکی با استخوان طبیعی زیست سازگار نیستند.

درحال حاضر دسته های مختلفی از پلیمرها به عنوان کاندیـد تـرمیم اسـتخوان در نظـر گرفته می شوند. پلی متیل متـاکریلات (PMMA) از اوایـل ۱۹۶۰ بـه عنـوان سـیمان استخوانی مورد استفاده قرار گرفت و امروزه نیز بطور گسترده بـه تنهـایی و یـا گاهـاً بـه صورت ترکیب با موادی مانند فیبرهای تیتانیم و سرامیک ها بکار برده مـی شـوند. پلـی اتیلن پرتو زده گاما به دلیل داشتن مقاومت خستگی بالا و زیست سازگار بـودن بـه طـور گسترده در کاشتنی های جایگزین مفصل بکار گرفته می‌شود. در حال حاضـر پلیمرهـای تخریب پذیر فراوانی در پروژه های تحقیقاتی و اسـتفاده هـای بـالینی بـرای کاربردهـای

ماهیچه ای – اسکلتی تحت بررسی هستند. پلی ارتو استرها، پلی انیدریدها پلی فسفازن ها و پلی آمینو اسیدها بخاطر تخریب پذیری منحصر به فرد و ویژگی های مکانیکی همگی به عنوان جایگزین های استخوان آزموده شده اند. خانواده پلی $\alpha$ - هیدروکسی اسید، پلیمرهای تخریب پذیر شامل پلی لاکتیک اسید (PLA)، پلی گلیکولیک اسید و کوپلیمر آن پلی لاکتیک – کو – گلیکولیک اسید به طورگسترده به عنوان صفحات تثبیت کننده، پیچها و پین ها، همچنین دستگاههای رهایش دارو و داربست های مهندسی بافت مورد استفاده قرار می گیرند. PLAGA , PGA , PLA دارای مزایای اضافی هستند که توسط سازمان غذا و دارو آمریکا (FDA) تایید شده و به سادگی به شکل ساختارهای متخلخل با خصوصیات مکانیکی نزدیک به استخوان‌های میله ای(trabecular bones) در می آیند.

برای بهره گیری از مزایای فوق و کمینه سازی کمبودها، مواد سرامیکی با انواع پلیمرهای تخریب پذیر و تخریب ناپذیر ترکیب شده تا به شکل بیو موادهای کامپوزیت برای ترمیم استخوان درآیند. در اینجا بسیاری از تحقیقات فعلی و محصولات تجاری موجود تحت بازنگری قرار می گیرند.

-کامپوزیت های پایه کلسیم فسفات (فسفات کلسیم)

CALCIUM PHOSPHATE BASED COMPOSITES

فسفات کلسیم اول بار در اوائل ۱۹۷۰ به عنوان پرکننده ضایعات استخوانی صورت و موارد دندانی بکار برده شد. از آن زمان به بعد، این ماده به اشکال مختلف برای کاربردهای ارتوپدی پردازش شد. فسفات های کلسیم مانند فسفات تتراکلسیم وهیدروکسی آپاتیت داری زیست سازگاری، بلورینگی وتخریب پذیری متفاوت هستند.

فسفات تری کلسیم (TCP) در پیوند با دیگر سرامیک ها و سیمان های استخوانی و همچنین پلیمرهای مختلف نیز برای اصلاح خصوصیات مکانیکی و هدایت استخوانی بکار گرفته می شوند.اکنون TCP به عنوان جایگزین استخوان و وسیله رهایش برای باز ترکیب مورفوژنیک پروتئین ۲ استخوان انسان (BMP-2) بکار برده می‌شود. رشد استخوان  در ترکیب TCP با BMP-2 نسبت به TCP تنها، بیشتر است. کیکوچی و همکارانش، با ترکیب TCP و کو-پلی ال – لاکتید (CPLA) به یک کامپوزیت پلیمر – سرامیک دست یافتند که دارای پتانسیل هدایت استخوانی و استحکام مکانیکی TCP و تخریب پذیری CPLA بود.

مدول یانگ این کامپوزیت بدون هیچ گونه اتلاف استحکام خمشی در هنگام اضافه نمودن TCP به CPLA دو برابر CPLA تنها بود. زیست پذیری این کامپوزیت ارزیابی و تعیین شد تا مشابه کنترل فضاهای خالی سلولی ها به تنهایی باشد.

همچنین فسفات کلسیم را می توان با سیمان استخوان ترکیب کرده تا کامپویت های قابل جذب، خصوصیات مکانیکی مناسب بدست آورد. بروتو و همکارانش پودر TCP را به پلی متیل متا کریلات (PMMA) سیمان استخوان اضافه نمودند تا سیمان استخوانی قابل جذب با خصوصیات مکانیکی و پیوندی اصلاح شده جهت کمک نمودن به رشد بهینه استخوان شکل گیرد. اضافه نمودن TCP به PMMA تخلخل سیمان استخوان را افزایش داده اما استحکام فشاری را تا نقطه ای مشابه آنچه برای دیگر کاشتنی های متخلخل سرامیکی رخ می دهد کاهش می دهد.

**- هیدروکسی آپاتیت HYDROXYAPATITE**

هیدورکسی آپاتیت به طور گسترده به صورت تنها و یا ترکیب با پلیمرها برای شکل دهی اشکال کامپوزیت جایگزین استخوانی بکار برده می‌شود. مرجان دریایی که از جنس کربنات کلسیم است، به دلیل یکپارچگی درونی و طبیعت زیست واره آن به عنوان جانشین بافت استخوان استفاده می‌شود.

این ماده که در ابتدا برای تبدیل کربنات کلسیم به هیدروکسی آپاتیت پردازش می‌شود. به شکل تجاری توسط شرکت بین المللی اینتروپورکرانس تحت عنوان پرواستئون ۵۰۰ و ۵۰۰R عرضه می گردد. البته خصوصیات مکانیکی یک مرجان سالم برای حفظ بارهای بیولوژیکی معمولی که توسط استخوان غشائی تحمل می شود، کافی نیست.

بطور کلی، هیدروکسی آپاتیت (HA) به شکل ذره ای مورد استفاده قرار می گیرد و اندازه این ذرات متناسب با کاربرد سفارش داده می‌شود. ترکیب ذرات HA با قطر $15\mu m$ با سیمان استخوان PMMA برای افزایش درون رشد استخوان و چسبندگی به دستگاههای پروتز تثبیت شده توسط سیمان بکار می رود. موریتا و همکارانش متوجه شدند که علیرغم پیوند ضعیف بین ذرات HA و سیمان، اضافه نمودن HA، استحکام کششی، فشاری یا خمشی سیمان را کاهش نمی دهد. البته آزمون سیمان استخوان با ذرات HA نشان دهنده افزایش استحکام باند کششی در مقایسه با سیمان بدون ذرات HA بود که بر پیوند مستقیم HA با استخوان اشاره دارد. مطالعات انجام شده توسط والو و همکارانش اثر مقدار ذرات اضافه شده HA به سیمان استخوان پایه PMMA را بر چگالی سیمان، اندازه خلل و فرج و خصوصیات مکانیکی مورد آزمایش قرار داد. نتیجه این آزمون ها حاکی از کاهش چگالی سیمان استخوان با افزایش تخلل ناشی از افزایش میزان HA و کاهش بی اندازه تنش ایجاد شده در اثر افزایش اولیه HA بود. کاهش شدید تنش ایجاد شده در اثر افزایش میزان HA ناشی از پیوند ضعیف بین HA و سیمان استخوان بود که منجر به ایجاد حفره های بزرگ تر درون استخوان و نواحی بسیار بزرگ با پیوندهای نامناسب بین سیمان و HA می گردد. البته، مقادیر کم HA اضافه شده به سیمان استخوان هم سبب افزایش تنش ایجاد شده و هم چغرنگی شکست می‌شود.

آزمایشگاه ما بطور گسترده، امکان بکارگیری داربست پلیمر – کامپوزیت برای بازسازی و ترمیم بافت استخوان را مورد بررسی قرار داده است. داربست های متخلخل حاوی پلی لاکتید – کو – گلیکولید و بلورهای HA، توسط استئوبلاست های بدست آمده از

جمجمه موش شکل گرفته و کاشته می شوند. پس از طی ۲۴ ساعت، دیده می‌شود که استئوبلاست ها به سطح خارجی داربست چسبیده و حتی به درون ساختار متخلخل نفوذ کرده اند. تاثیر مقادیر HA بر خصوصیات مکانیکی و تخریبی در یک بررسی مجزا، مورد بررسی قرار گرفت. اضافه نمودن HA به داربست، مدول فشاری را تا حدود ۴۰۰٪ افزایش می دهد،در حالیکه میزان اتلاف توده را کاهش داده و در نتیجه تخریب داربست در طول ۶ هفته رخ می دهد. در نهایت توانایی داربست PLAGA-HA در کمک به تکثیر و تفکیک استئوبلاست و همچنین شکل گیری معدنی در طول ۲۱ روز مورد آزمایش قرار گرفت.

از این آزمایش مشاهده شد که سلولها تا ۲۱ روز تکثیر شده و یک لایه معدنی بر روی داربست PLAGA-HA تشکیل می دهند که نشان گر تفکیک سلولی است. داربست بکار رفته در این بررسی ها شامل ترکیبی از تخریب پذیری PLAGA با حمایت مکانیکی HA بود که به عنوان جایگزین مهندسی بافت برای ضایعات استخوانی است.

- کامپوزیت های پایه ماده زیست فعال

BIOACTIVE MATERIAL BASED COMPOSITES

مواد زیست فعال، مواد زیست سازگار با توانایی اضافی هستند که دارای قابلیت بهسازی شکل گیری استخوانی و باند شدن با بافت استخوان پیرامون هستند شیشه های زیست فعال به شکل شیشه های ذره ای زیست فعال 45S5 بطور گسترده به عنوان بیومواد بالقوه درکاربردهای مهندسی بافت ماهیچه ای اسکلتی بکار گرفته می شوند. توانایی شیشه زیست فعال 45S5 در پیوند با استخوان، اول بار توسط هنچ و همکارانش در اوایل سال ۱۹۷۰ گزارش شد. به واسطه واکنش های واسطه ای و میان سلولی، شیشه زیست فعال سبب رفع کمبود کلسیم و ایجاد لایه فسفات کربنات کلسیم شده که سبب پیوند شیمیایی با استخوان پیرامون می‌شود.

توانایی یک کاشتنی در تشکیل واسطه شیمیایی با بافت پیرامون در حذف شل شدگی که یکی از دلایل اصلی شکست کاشتنی مصنوعی است بسیار مهم است. در شیشه زیست فعال مشاهده شد که علاوه بر قابلیت پیوند با استخوان به چسبندگی، رشد و تفکیک استئوبلاست نیز کمک می کند.علاوه بر این، مواد زیست فعال سبب القایی – تفکیک سلولهای مزانشیمال درون استئوبلاست می شوند.

علیرغم طبیعت یکپارچگی استخوانی، هدایت استخوانی و القای استخوانی، شیشه های زیست فعال به واسطه ناهمخوانی مکانیکی با استخوان پیرامون به تنهایی دارای کاربردهای محدودی درشرایط تحمل بارمی باشند. البته، این مواد را می توان جهت تشکیل مواد کامپوزیت دارای پتانسیل ترمیم استخوان، با پلیمرها ترکیب کرد. فوجیتا و همکارانش با اضافه کردن و لفزوتونیت شیشه – سرامیک PMMA فرمول یک سیمان

استخوان زیست فعال را بدست آؤرند. این سیمان استخوان زیست فعال در مقایسه با PMMA تنها، استحکام پیوندی بیشتری بین سیمان استخوان و استخوان ران سگ ایجاد کرده و جذب استخوانی آن نسبت به PMMA تنها، بیشتر است. مارکونگو و همکارانش با ترکیب پلی سولفون با فیبرهای شیشه زیست فعال، میله های کامپوزیتی ایجاد کرده و آنها را در استخوان ران خرگوش قرار دادند تا آرایش باند مکانیکی بین بافت استخوان و کاشتنی کامپوزیتی را مورد بررسی قرار دهند. پس از ۶ هفته، استحکام بین سطحی مورد آزمایش قرارگرفته و دیده شد که میزان آن بیشتر از دو برابر پلی سولفون تنها است.

کامپوزیت های پلیمر – سرامیک را می توان با القای ته تشین مستقیم یک لایه فسفات کلسیم زیست فعال بر سطوح پلیمر نیز ساخت. در این روش، پلیمر در یک سیال شبیه سازی شده بدن (SBF) با غلظت یونی شبیه سیال میان بافتی (interstitial) غوطه ور می‌شود. پس از نگهداری ماده در SBF یک لایه آپاتیت به آرامی بر روی سطح شکل می‌گیرد. لایه‌های فسفات کلسیم با موفقیت بر روی فیبرهای تیتانیم، پلیمرهای آلی، کامپوزیت سرامیک – پلیمر، اتیلن – وینیل الکل و پلی لاکتید – کو – گلیکولید – تشکیل شدند. مورفی و همکارانش، از تشکیل شدن لایه اپتیت بر سطوح داربست های متخلخل سه بعدی گزارش داده و بعد از سپری شدن ۱۶ روز نگهداری، شاهد افزایش مدول فشاری بر روی پلیمر تنها، از ۵۰ kpa تا ۳۰۰ kpa بودند.

آزمایشگاه ما همچنین کامپوزیت های شیشه زیست فعال و پلیمرهای زیست تخریب پذیر را توسعه داده است که این مواد لایه های فسفات کلسیمرا در محیط آزمایشگاه تشکیل می دهند. از آنجا که شیشه زیست فعال دارای استحکام فشاری بالایی است می

تواند به عنوان یک تقویت کننده مکانیکی برای موادی با استحکام مکانیکی کمتر عمل کند. همچنین توانستیم فیلم های کامپوزیت (قالب گیری حلال) شیشه زیست فعال و کوپلیمر ۵۰: ۵۰ پلی لاکتید – کو – گلیکولید، با ساختارمتخلخل، سه بعدی، ریز کروی را بسازیم. این کامپوزیت ها در هنگام کاشت در محیط آزمایشگاه قادر به ایجاد لایه‌های فسفات کلسیم بر روی سطوح بوده و به رشد سریع و فراوان سلولهای استئوبلاست و شبه استئوبلاست انسان کمک می کنند (شکل ۱-۶۱). علاوه بر این، این سلول ها یک ماتریس معدنی را بر روی مواد کامپوزیت تشکیل می دهند. اقدامات آینده شامل آزمایشات درمانی، درون بدن و پتانسیل باند شدگی با استخوان این مواد کامپوزیت شیشه – پلیمر است.

-قرارداد الف : فیلم پلیمر – سرامیک شکل گرفته توسط روش قالب گیری حلال

-پیشگفتار

فیلم های نازک پلیمر – سرامیک را می توان در ابتدا با ذوب کردن پلیمر در یک حلال آلی و سپس اضافه نمودن سرامیک مورد نظر در شکل ذره ای، ساخت. سپس به حلال اجازه داده می‌شود تا تبخیر شده و فیلم پلیمر – سرامیک با ضخامت مطلوب بدست آید.

-مواد MATERIALS

- پلیمر (برای مثال لاکتید، پلی گلیکولید، پلی لاکتید – کو – گلیکولید)

حلال آلی (برای مثال، کلرید متیلن)

- گرانول های سرامیک (برای مثال، هیدروکسی آپاتیت، شیشه زیست فعال: انـدازه $1-500\,\mu\mathrm{m}$ )
- ظرف تفلون
- فلاسک (بطری) یا بشر ارلن مایر
- همزن، میله چرخان

-روشها METHODS

۱-کاهش وزن پلیمر مطابق نسبت مطلوب (وزن پلیمر به حجم حلال).

۲- اضافه نمودن حلال آلی به فلاسک ارلن مایر یا بشر با پوشش

۳-هم زدن مخلوط پلیمر – حلال تا زمان حل شدن پلیمر

۴-اضافه نمودن گرانول‌های سرامیک به مخلوط پلیمر – حلال

۵-عمل ترکیب تا زمان توزیع هموژن گرانول‌ها در مخلوط ادامه می یابد.

۶-ریختن محلول حلال – پلیمر درون ظرف تفلون تحت هود (هواکش) شیمیایی

۷-تبخیر آرام حلال

-ملاحظات مفید USEFUL NOTES

- با تغییر نسبت وزن پلیمر در حجم حلال، فیلم های نازک با ضخامت های متفاوت قابل تولید هستند.
- نرخ تبخیر، پارامتر کلیدی در تولید فیلم های نازک هموژن است. فیلم های متخلخل را می توان با شتاب دادن سرعت تبخیر حلال شکل داد. برای کاهش نرخ تبخیر، ظرف تفلون را می توان در فریزر $\left(-20^{\circ}\mathrm{C}\right)$ قرار داده و عمل تبخیر را در طول شب انجام داد.
- به جای ظرف تفلون می توان از اسپری یا کاغذ تفلون استفاده کرد.

-قرارداد ب: ساختارهای پلیمر – سرامیک سنتز شده توسط روش تجمع حلال

-پیشگفتار

ساختارهای پلیمر – سرامیک پایه ریزی شده براساس ریز کره ها را می توان بوسیله روش تجمع حلال که در آن ابتدا ریزکره‌ها از امولسیون های سنتی آب، روغن – آب تشکیل می شوند، ایجاد کرد. سپس ماتریس‌های تجمع یافته حلال پلیمر – سرامیک را می توان از طریق ترکیب حلال، ذرات نمک، گرانول های سرامیک و ریزدانه‌های از پیش سخت شده بدست آورد.اساس ساختار سه بعدی با تخلخل قابل کنترل، بر مبنای ترکیب روش فوق با پالایش نمک و فشرده سازی ریز کره‌هاست.

-ساخت ریز کره‌ها FABRICATION OF MICROSPHERES

- مواد MATERIALS

- پلیمر (برای مثال، پلی لاکتید، پلی گلیکولید، پلی لاکتید- کو- گلیکولید)
- حلال آلی (برای مثال، کلرید متیلین)
- بطری های شیشه ای کوچک بورو سیلیکات (با ظرفیت حجم ml ۳۰-۱۰)
- محلول پلی ونیل الکل (PVA) wt ۱٪
- ماشین گردابی (Vortex machine)
- همزن مکانیکی (حد rpm ۱۰۰۰-۱۰۰)
- بشر ml ۱۰۰۰
- لوله (خط) خلاء یا معادل آن
- دستگاه خشک کننده از طریق انجماد (Lyophilizer)
- دستگاه خشک ساز

-روشها METHODS

۱-کاهش وزن پلیمر مطابق نسبت مطلوب وزن پلیمر به حجم حلال

۲-اضافه نمودن پلیمر و حلال آلی به بطری کوچک شیشه ای و پوشش

۳-هم زدن (چرخاب) مخلوط حلال – پلیمر تا زمان حل شدن پلیمر.

۴-اضافه نمودن قطره ای محلول پلیمر به محلول ۱٪ PVA در حال چرخش

۵-هم زدن محلول پلیمر PVA ۱٪ با دور ۳۰۰ rpm برای حداقل ۴ ساعت برای تبخیر حلال

۶-جمع آوری ریز کره‌ها از طریق پالایش (تصفیه) خلاء

۷-شستشو با آب یون زدایی شده و خشک سازی در هوا برای حداقل ۲ ساعت در دمای اتاق

۸-خشک سازی از طریق انجماد ریزکره‌ها برای ۲۴ ساعت دیگر جهت حذف هر گونه حلال باقیمانده

۹-ذخیره کردن (نگهداری) ریز کره‌ها در دستگاه خشک ساز قبل از استفاده

- ملاحظات مفید USEFUL NOTES

- حجم PVA ۱٪ به حجم ترکیب پلیمر – حلال بستگی دارد. برای مثال با ۲۰ml مخلوط پلیمر-حلال، می بایست ۶۰۰ml محلول PVA ۱٪ بکار برده شود.
- توزیع نهایی اندازه ریز کره‌ها تابعی از سرعت چرخش (هم زدن) PVA۱٪ است.
- ریز کره با بالا رفتن زمان هم زدن سخت می شوند.
- ریز کره‌ها را می توان با استفاده از سیستم های مکانیکی غربال سازی در اندازه های مورد نظر صاف کرد.

- روش تجمع حلال SOLVENT – AGGREGATION METHOD

- مواد MATERIALS

- ریزکره‌های پلیمربا قطر مشخص (برای مثال ۲g)

- حلال آلی (برای مثال، کلرید متیلین ۲ml)
- ذرات NaCl با اندازه مشخص (برای مثال ۲g)
- گرانول‌های سرامیکی با اندازه مورد نظر (برای مثال، هیدروکسی آپاتیت، شیشه زیست فعال ۲g)
- قالب فولاد زنگ نزن یا تفلون
- پرس کارور
- آب یون زدایی شده

-روشها METHODS

۱-اندازه گیری مقادیر دلخواه ریزکره‌های پلیمری، NaCl و ذرات سرامیک

۲-ترکیب (مخلوط) خشک ریز کره‌ها، ذرات NaCl و گرانول‌های سرامیک بر اساس نرخ گزیده شده اوزان

۳-افزودن تدریجی مقدار کم حلال در زمان هم زدن ترکیب

۴-قرار دادن ترکیب درقالب تفلون

۵-بکارگیری پرس کارور جهت اعمال بار فشاری به قالب

۶-خشک سازی ساختارهای حاصله از طریق انجماد برای ۲۴ ساعت

۷-غوطه ور کردن ساختارها در ۳۰۰ml آب یون زدایی شده برای پالایش زدایی ذرات نمک به مدت حداقل ۲۴ ساعت.

۸-خشک سازی ساختارها از طریق انجماد برای ۲۴ ساعت

USEFUL NOTES - ملاحظات مفید

- مقادیر بسیار کوچک حلال در این روش مورد نیاز خواهد بود. این حلال جهت حل کردن سطح خارجی ریز کوه و اجازه پیوند ریزکره‌ها و تجمع ذرات سرامیک بر سطح بکاربرده می‌شود.
- قالب تفلون باید دارای ابعاد متناسب با ساختارمورد نظر باشد (برای مثال، استوانه ای و غیره)
- اندازه بلورهای NaCl ، میزان تخلخل واندازه خلل و فرج ساختار سه بعدی راکنترل می کند.
- تراکم ساختار با وجود اینکه خصوصیات مکانیکی ساختار را افزایش می دهد، لازم نیست.

- قرار داد ج : ساختارهای پلیمر – سرامیک سنتز شده بوسیله روش ژل ریزکره

- پیشگفتار

روش ژل ریز کره مشابه تجمع حلال است زیرا بر اساس روش ریز کره پایه ریزی شده است.البته، در این حالت، در حین فرایند تشکیل ریز کره،کره‌ها قبل ازحذف کامل حلال ایزوله می شوند. در این وضعیت ژل شکل، کره‌ها مجتمع شده و یک ساختار سه بعدی را ایجاد میکنند. ساختار متخلخل را می توان با افزودن NaCl تو خالی و ذرات سرامیک بوجود آورد(شکل ۲-۶۱).

- مواد MATERIALS

- پلیمر (برای مثال، پلی لاکتید، پلی گلیکولید، پلی لاکتید، کو، گلیکولید)
- حلال آلی (برای مثال، کلرید متیلین ۲ml)

ذرات NaCl با اندازه های مشخص (برای مثال، ۲g)

گرانول های سرامیک با اندازه مورد نظر (برای مثال، هیدروکسی آپاتیت، شیشه زیست فعال،۲g)

- قالب ساختار
- لوله های سانتریفوژ

آب یون زدایی شده (برای مثال ۳۰۰ml)

-روشها METHODS

۱-مراحل ۴-۱ در قرارداد ب را دنبال می‌کنیم.

۲-محلول پلیمر – PVA۱٪ را به مدت ۲-۱ ساعت هم زده تاژل ریزکره تشکیل شود.

۳-بیشتر PVA را حذف کرده و ژل ریز کره +PVA را به داخل لوله سانتریفوژ منتقل می کنیم.

۴- PVA باقیمانده را پس از ته نشینی ریز کره‌ها در کف لوله خارج می کنیم.

۵-مقادیر مورد نیاز NaCl و ذرات سرامیک را وزن می کنیم.

۶-ژل ریزکره‌ها، ذرات NaCl و گرانول های سرامیک را بر اساس نرخ اوزان گزینش شده ترکیب کرده و هم می زنیم.

۷-ترکیب حاصل را در قالب تفلون قرار داده و به مدت ۲۴ ساعت در معرض هوا خشک می‌کنیم.

۸-ساختارهارا ازقالب خارج کرده و در آب یون زدایی شده ۳۷ درجه سانتی گراد به مدت حداقل ۲۴ ساعت غوطه ور می کنیم تا ذرات NaCl پالایش زدایی شوند.

۹-ساختارها را برای ۲۴ ساعت از طریق انجماد خشک می کنیم.

## تولید داربست های پیلمری:جداسازی فاز

## PROCESSING OF POLYMER SCAFFOLDS : PHASE SEPARATION

رویون ژانگ و پیتر – اکس – ما

این فصل شامل روش های جدید آماده سازی داربست های پلیمر زیست تخریب پذیر مصنوعی ازمحلول های پلیمر از طریق جداسازی فاز است. همچنین قراردادهای مختلف ساخت داربست های بسیارمتخلخل مرتبط با فرآیندهای مختلف جداسازی فاز را دربر می گیرد. بلورینگی حلال در محلول پلیمرموجب جداسازی فاز مایع – جامد می گردد. اسفنج بدست آمده در اثر فرآیند جدا سازی فاز مایع – جامد دارای مورفولوژی لوله ای

شکل ناهمگون با یک ساختار نردبانی شکل داخلی است. اسفنج فوق با شبکه ای از خلل و فرج های پیوسته توسط القای گرمایی جدا سازی فاز مایع – مایع ایجاد می‌شود. ماتریس رشته ای مصنوعی با فیبرهایی با قطری به مقیاس نانومتر توسط فرایند القای گرمایی انعقاد(thermally induced gelation process) تهیه می شوند. ماتریس های نانو رشته ای با ساختار ماکرو متخلخل بوسیله ترکیب روش پالایش پروژن و فرآیند القای گرمایی ژلاتین بدست می آیند. اسفنج های متخلخل پلیمرهای زیست تخریب پذیر و آپاتیت های استخوانی معدنی شکل توسط فرآیند جدا سازی فاز مایع – جامد و فرآیند زیست تقلیدی تهیه می شوند.

**-پیشگفتار**

مهندسی بافت یک روش نوید بخش را در تولید گزینه های بیولوژیکی برای کاشتنی ها و پروتزها ارائه می دهد. در این روش وجود یک داربست بسیار متخلخل جهت استقرار سلولها و هدایت رشد آنها و بازسازی بافت در سه بعد الزامی است. پلیمرهای زیست تخریب پذیر مصنوعی مانند پلی – ال – لاکتید اسید (PLLA)، پلی گلیکولیک اسید (PGA) و پلی دی، ال – لاکتیک اسید – کو – گلیکولیک اسید (PLGA) به طور گسترده به عنوان داربست هایی برای فراکاشت سلول و مهندسی بافت بکار برده می شوند. روشهای مختلفی برای تهیه داربست های بسیار متخلخل از این پلیمرهای زیست تخریب پذیر ارائه شده اند. پالایش ذره ای یک روش تایید شده برای ساخت اسفنج های متخلخل در مهندسی بافت است. تکنولوژی‌های بافت به طور گسترده در ساخت چهار چوب‌های قابل بافت و غیر قابل بافت زیست تخریب پذیر برای مهندسی بافت بکار برده می شوند.

برای ساخت داربست ها از روش خشک سازی امولسیون از طریق انجماد، اسفنج سازی گاز و چاپ سه بعدی بهره برده می‌شود. امروزه روش جدید تهیه داربست های پلیمری زیست تخریب پذیر بسیار متخلخل یعنی جدا سازی فاز القای گرمایی محلول پلیمر و انتقال (خارج سازی) بعدی، بسیار مورد توجه است.

فرآیند جداسازی فاز کنترل شده برای سالهای متمادی برای تهیه غشاهای متخلخل پلیمر بکار برده می‌شد.جدا سازی فاز محلول پلیمر را می توان به چندین روش ایجاد کرد، که شامل جدا سازی فاز از طریق غیر حلال، جدا سازی فاز از طریق شیمیایی، و جدا سازی فاز از طریق گرمایی (TIPS) می‌شود. در فرآیند TIPS که یک روش نسبتاً جدید  برای تهیه غشاهای متخلخل است، دمای محلول پلیمر کاهش یافته و جداسازی فاز رخ می دهد که فاز اول آن دارای غلظت پلیمر بالا (فاز غنی از پلیمر) و فاز دوم دارای غلظت پلیمر کم (فاز عادی از پلیمر) است. بعد از خارج سازی حلال از طریق عصاره گیری، تبخیر یا تصعید، پلیمر موجود در فاز غنی از پلیمر به شکل اسکلت سخت شده و فضاهای اشغال شده در ابتدا توسط حلال، در فاز عادی از پلیمر به صورت خلل و فرج اسفنج پلیمر در می آیند. موفولوژی غشاء متخلخل متناسب با پلیمر، حلال، غلظت محلول پلیمر و دمای جداسازی فاز، تغییر می کند. غشاهای بدست آمده از این فرآیند معمولاً دارای خلل و فرجی با قطر چندین میکرومتر بوده و معمولاً برای داربست‌های مهندسی بافت مناسب نیستند. یک داربست باید دارای خلل و فرج هایی به اندازه کافی بزرگ برای کاشت سلول و سطحی به اندازه کافی وسیع برای چسبندگی سلول و همچنین افشانندگی(diffusivity) مناسب برای تراوش (نفوذ) مواد غذایی و متابولیت ها باشد. ما در این فصل بر توسعه روش های جداسازی فاز القای گرمایی برای ساخت

داربست هایی با مورفولوژی و خصوصیات تخلخلی کنترل شده بـرای فراکاشـت سـلول و کاربردهای مهندسی بافت تاکید می کنـیم (شـکل۱-۶۲). قراردادهـای توسـعه یافتـه در آزمایشگاه ما به عنوان مثالهایی برای شرح این مباحث بکار برده می شوند.

**-مواد** **MATERIALS**

-پلیمرها POLYMERS

پلی – ال – لاکتید اسید (PLLA)، پلی دی، ال – لاکتیک اسـید – کـو – گلیکولیـک اسید (۸۵/۱۵) (PLGA85) و پلی دی، ال – لاکتیک اسید – کو – گلیکولیـک اسـید (۵۰:۵۰) (PLGA50) بـا وسـیکوزیته ذاتـی در حـدود ۱/۶ ، ۱/۴ و ۰/۵ از بهرینگـر اینگلهایم (اینگلهایم، آلمان).

پلـی دی، ال – لاکتیـک اسـید – کـو – گلیکولیـک اسـید (۲۵ : ۷۵) (PLGA75) و ویسکوزیته ذاتی ۰/۶۵-۰/۵ از موسسه بین المللی تکنولوژی های مدیزورب (سینسیناتی، OH (ایالت اوهایو)

پلی دی ال – لاکتید (PDLLA) با وزن مولکول ۱۰۳۰۰۰ از شرکت شیمیایی سیگما (سنت لوئیس، MO (ایالت میسوری))

- حلال ها SOLVENTS

دیوکسان، تتراهیدروفوران (THF) , N , N– دی متیل فور مامید (DMF)، پریدین، متانول و بنزن از شرکت شیمیایی آلدریش (میلواکی، WI (ایالت ویسکانسین) هیدروکسی آپاتیت $\left[Ca_{10}(PO_4)_6(OH)_2\right]$ (HAP)، و کلیه نمک ها برای تهیه مایع شبیه سازی شده بدنی (SBF) از آلدریچ.

**-جدا ساز فاز جامد – مایع SOLID-LIQUID PHASE SEPARATION**

جداسازی فاز القای گرمایی بر اساس رفتار جنبشی و ترمودینامیک محلول پلیمر با تغییر دمای محلول عمل کرده و یک فرآیند پیچیده است. بلورینگ حلال در زمان کاهش دما می تواند موجب جداسازی فاز محلول پلیمر شود. این فرآیند جداسازی فاز را تحت عنوان فرآیند جداسازی فاز مایع- جامد تعریف می کنیم. در این حالت، دمای بلورینگی (نقطه انجماد) حلال بالاتر از دمای جداسازی فاز مایع – مایع محلول پلیمر است. هنگامی که دمای محلول کاهش می یابد، حلال به شکل بلور درآمده و پلیمر از سطح آن خارج می‌شود که همان جدا سازی فاز جامد – مایع محلول پلیمر است. مورفولوژی بلورهای حلال با حلال بکار رفته، غلظت پلیمر و دمای بلورینگی وگرادیان دمای اعمال شده به محلول پلیمر تغییر می کند. اسفنج‌هایی با مورفولوژی تخلخل متنوع به شل مدل‌های منفی بلورهای حلال قابل حصول است.

## -تهیه ماتریس های پلیمری PREPARATION OF POLYMER MATRICES

اسفنج PLLA و PLGA از طریق جداسازی فاز مایع – جامد بوسیله کاهش دمای محلول پلیمر و جهت ایجاد بلورینگی حلال و تصعید متعاقب حلال تهیه می‌شود. عموماً، در تهیه اسفنج مراحل ذیل طی می‌شود. در ابتدا پلیمر گزینش شده تحت چرخش مغناطیسی در دمای ۵۰C به مدت ۲ ساعت در حلال (اغلب، دی اکسین) حل می شد. سپس ۲ml محلول پلیمر – دی اکسین به ظرف تفلون اضافه می گردد (۵ml، که قبلاً تا دمای ۵۰C، گرم شده است) و حل می‌شود.

ظرف حاوی محلول به سرعت به یخچال یا فریزر با دمای از پیش تنظیم شده منتقل می‌شود تا حلال سخت شده و موجب جداسازی فاز مایع – جامد شود. ترکیب سخت شده به مدت ۲ ساعت سرد نگهداری شده و سپس به ظرف انجماد – خشک سازی، حمام نمک – یخ در دمای بین ۵C- و ۱۰C- منتقل می‌شود. نمونه ها سپس از طریق انجماد ۰/۵mmHg برای حداقل یک هفته خشک می شوند تا از حذف کامل حلال مطمئن شویم.

اسفنج های بدست آمده از جداسازی فاز مایع – جامد محلول پلیمر دارای مورفولوژی لوله ای بسیار ناهمگون، با ساختار داخلی نردبانی شکل هستند (شکل ۲-۶۲). در این روش، کانال ها موازی با جهت سخت شدن (جهت انتقال گرما) بوده و دارای بخش های تکراری با فاصله های یکنواخت عمود بر جهت سخت شدن (استحکام) هستند. قطر کانال‌ها و فاصل بین بخش های تکراری در کانال با نرخ سرد شدن و غلظت پلیمر و حلال مورد استفاده تغییر می کند. برای یک سیستم حلال – پلیمر، اندازه متوسط خلل و فرج با کاهش یافتن دما، زیاد می‌شود.

ساختار خلل و فرج بدست آمده از این پردازش به بلورینگی حلال بستگی دارد. زمانی که دمای محلول پلیمر کمتر از نقطه انجماد (دمای بلورینگی) حلال ($12^{\circ}C$ ~) باشد، حلال به شکل بلور در آمده و فاز پلیمر به صورت ناخالصی از سطح بلورینگی خارج می‌شود. فاز پیوسته غنی از پلیمر در اثر تجمع پلیمر خارج شده از هر بلور منفرد حلال شکل می گیرد. پس از تصعید بلورهای حلال، اسفنجی با مورفولوژی خلل و فرج هایی به شکل اثر انگشت بلورهای حلال ایجاد می‌شود. گرادیان دما در امتداد مسیر سخت شدن (استحکام) (از سطح نمونه تا مرکز نمونه) می تواند منجر به ساختار بسیار ناهمگون خلل و فرج شود.

-تهیه ماتریس های کامپوزیت پلیمر-HAP

PREPARATION OF POLYMER – HAP COMPOSITE MATRICES

اسفنج های کامپوزیت پلیمر وهیدروکسی اپتیت را می توان با جداسازی فاز مایع – جامد ترکیب حلال – پلیمر- HAP و تصعید متعاقب حلال تولید کرد. ترکیب حلال – پلیمر – HAP از طریق اضافه نمودن پودر HAP به محلول پلیمر بدست آمده، تهیه می‌شود. این ترکیب در طول شب در دمای اطاق چرخانده شده تا یک ترکیب هموژن بدست آید. سپس ترکیب تا زمان القای جداسازی فاز سردشده و حلال مانند فرایند ذکر شده برای ماتریس‌های پلیمر تحت خلاء تصعید می‌شود. در این روند، ۲ml ترکیب دی اکسین – PLLA-HAP بجای محلول پلیمر در ظرف تفلون بکار می رود تا اسفنج کامپوزیت بدست آید. ترکیب نهایی اسفنج کامپوزیت HAP-PLLA بوسیله غلظت محلول پلیمر و مقدار HAP در ترکیب تعیین می‌شود.

روش جدا سازی فاز مایع – جامد، یک ساختار پیوسته از خلل، فرج‌های نـامنظم متصـل به هم در اسفنج پلیمر- HAP که با اسفنج پلیمری خالص بسیار تفاوت دارد ایجاد مـی کند (شکل ۳-۶۲). انـدازه خلـل و فـرج هـای نـامنظم از چنـدین میکرومتـر تـا حـدود ۳۰۰ $\mu$m است. دیواره خلل و فرج ها از پلیمر و HAP تشکیل شده است.

ذرات HAP افزوده شده به محلول پلیمـر، بلـورینگی حـلال را بـه هـم زده و بـا تـاخیر انداختن در رشد بلور، بلورینگی حلال را تغییر می دهد و در نتیجه منجر به شکل گیری بلورهای نامنظم بیشتری می‌شود. از طرف دیگر، هم ذرات HAP و هـم پلیمـر از سـطح بلورینگی خارج شده و فاز غنی از پلیمر-HAP را ایجاد می کند. ذرات HAP بـه طـور تصادفی در ماتریس پلیمر توزیع می شوند. بعد از تصـعید حـلال، فـاز غنـی از پلیمـر-HAP چارچوب پیوسته اسفنج پلیمر – HAP را تشکیل داده و فضـاهای اشـغال شـده اولیه توسط بلورهای حلال بصورت خلل و فرج های اسفنج درمی آینـد. در نتیجـه رشـد نامنظم بلور حلال، خلل و فرج های نامنظم موفولوژی غالب اسـفنج کامپوزیـت پلیمـر-HAP را ایجاد می کنند.

در فرآیند جداسازی فاز مایع – جامد، میکروساختار اسفنج کامپوزیت را می توان با تغییر غلظت پلیمر، مقدار HAP، دمای فرونشانی، پلیمر، و حلال بکار رفته کنتـرل کـرد. هـم

اندازه خلل و فرج و هم میزان تخلخل با کاهش غلظت پلیمر و مقدار HAP افزایش می یابد. همچنین، خصوصیات مکانیکی اسفنج های کامپوزیت بطور قابل ملاحظه ای نسبت به اسفنج های پلیمری خالص بهبود می یابد. کامپوزیت‌های حاوی HAP، موادی با خصوصیات هدایت استخوانی خوب بوده و داربست های مناسبی برای مهندسی بافت استخوان به شمار می روند.

- تهیه ماتریس های کامپوزیت پلیمر آپاتیت توسط فرآیند زیست تقلیدی

PREPARATION OF POLYMER-APATITE COMPOSITE MATRICES BY A BIOMIMETIC PROCESS

فرآیند زیست تقلیدی جهت شکل دهی آپاتیت در اسفنج های پلیمری بدست آمده از جداسازی فاز جامد- مایع بکار برده می‌شود. اسفنج های پلیمری توسط جدا سازی فاز جامد- مایع که در ارتباط با ماتریس‌های پلیمر تشریح شد، تهیه می شوند. مایع شبیه سازی شده بدن (SBF) با حل کردن مواد شیمیایی با درجه معرف ($Na_2So4$, $CaCl_2$, $MgCl_2$ .$6H_2O$ , $K_2HPO_4$. $3H_2O$, KCl, $NaHCo_3$ ,NaCl) در آب یون زدایی شده تهیه می شود، و غلظت های یون غیر آلی آنها ۱/۵ برابر پلاسمای خون انسان است. این مایع در PH برابر ۷/۴ در $37^\circ C$ با تریس (هیدرو کسی متیل) آمینومتان $\left[(CH_2OH)_3CNH_2\right]$ و اسید هیدروکلریک (HCl) تثبیت

می‌شود. پنج گونه اسفنج پلیمری مثلث شکل با ابعاد ۱۲mm*۸mm*۶mm در SBF ۱۰۰ml که در یک بطری شیشه ای حفظ شده است، در دمای $37^{\circ}C$ غوطه ور می شوند. SBF هر یک روز در میان عوض می‌شود. بعد از نگهداری در مدت زمان های مختلف، گونه ها از مایع خارج شده و در طول یک شب در ۱۰۰ml آب یون زدایی شده غوطه ور می شوند تا یون‌های غیر- آلی قابل حل خارج شوند، سپس در دمای اتاق خشک می‌شود.

اسفنج کامپوزیت بدست آمده دارای تعداد زیادی میکرو ذرات آپاتیت رشد یافته بر روی سطوح دیواره های خلل و فرج است (شکل ۴-۶۲). ذرات آپاتیت مشابه آپاتیت استخوان طبیعی در ترکیبات و ساختارهای تشریح شده با میکروسکوپی اسکن الکترونی (SEM)، اسپکتروسکوپی تفرق انرژی (EDS)، انکسار اشعه X (XRD) و تحلیل تبدیل فوریه IR (FTIR) می باشد. تعداد و اندازه ذرات با فاکتورهای مختلفی مانند، زمان نگهداری، غلظت یونی SBF، ناحیه سطح پلیمر و اصلاح سطح، کنترل می شوند. چگالی (تعداد ذرات در واحد سطح)، قطر متوسط ذره و جرم کل آپاتیت با زمان نگهداری افزایش می یابد. خصوصیات مکانیکی این ماتریس کامپوزیت جدید بطور قابل ملاحظه ای نسبت به

ماتریس پلیمر خالص اصلاح شده و نیز با زمان نگهداری افـزایش مـی یابـد. از آنجـا کـه ذرات آپاتیت بر روی دیواره های خلل و فرج تقلیـدی از اسـتخوان معـدنی تشـکیل مـی شوند، انتظار بهبود هدایت استخوانی می رود.

-جداسازی فاز مایع – مایع LIQUID – LIQUID PHASE SEPARATION

زمانی که دمای بلورنیگی حلال بسیار کمتـر از دمـای جداسـازی فـاز محلـول پلیمر آمورف باشد، در اثر کاهش دمای محلول پلیمر نسبت بـه بـالاترین دمـای بحرانـی محلول، تفکیک فاز مایع – مـایع رخ مـی دهـد. شـکل ۵-۶۲، نمـودار یـک فـاز تعـادلی معمولی سیستم محلول پلیمر آمـورف را نشـان مـی دهـد. منحنـی اسـپینودال منطقـه تفکیک فاز مایع – مـایع را بـه دو ناحیـه ترمودینـامیکی فراپایدار(ناحیـه بـین بینـودال اسپینودال) و ناحیه ترمودینامیکی ناپایدار (ناحیه محدود شده توسط اسپینودال) تقسـیم می کند.

زمانی که یک محلول پلیمر هموژن در اثر یکی از دو مکانیزم: هسته ای شدن و رویش یا تجزیه اسپینودال، تا دمای ترکیب کمتر از دمای تجزیه بینودال سـرد شـود، نیرویـی بـه وجود خواهد آمد که منجر به تفکیک سیستم به دو فاز غنی از پلیمـر و عـاری از پلیمـر می‌شود. در یک محلول پلیمر با غلظت بسیار کم، زمانی که نقطه دمای ترکیب زیر ناحیه فرا پایدار قرار گیرد، آرایش ساختار ممکن حاوی قطرات فـاز غنـی از پلیمـر پراکنـده در ماتریس فاز عاری از پلیمر می‌شود. در این حالت پس از خارج سازی حلال، پلیمر جامـد پودری شکل بدست می آید (شکل ۱-۶۲). زمانی کـه نقطـه دمـای ترکیـب زیـر ناحیـه ناپایدار قرار گیرد، ساختار زیست پیوسته ای بدست می آید که در آن فاز غنی از پلیمر و فاز عاری از پلیمر کاملاً با هم پیوند خورده اند که این وضعیت در اثر تجزیـه اسـپینودال

خواهد بود. اسفنجهای با ساختار شبکه خلل و فرجی پیوسته، پس از حذف حلال از این سیستم تفکیک فازی بدست می آیند (شکل ۱-۶۲) زمانی که نقطه دمای ترکیب زیر ناحیه فرا پایدار محلول پرغلظت پلیمر قرار گیرد، قطرات فاز عاری از پلیمر در ماتریس فاز غنی از پلیمر شکل گرفته و اسفنجی با ساختار خلل و فرج بسته بدست می آید. (شکل ۱-۶۲)

در یک محلول پلیمر نیمه بلورین، تفکیک فازی به سبب بلورینگی پلیمر بسیار پیچیده‌تر است. اگر دمای محلول پلیمر به اندازه کافی پایین باشد، محلول دچار نیروهای رانش برای تفکیک فاز مایع – مایع و بلورینگی پلیمر شده و ساختار نهایی سیستم را تعیین می‌کند بطور کلی، تفکیک فاز مایع – مایع سریعتر از بلورینگی پلیمر اتفاق می افتد. محلول در ابتدا تفکیک فاز مایع – مایع را تجربه کرده و سپس بلورینگی پلیمر در فاز غنی از پلیمر رخ می دهد که مورفولوژی محلول تفکیک فاز اساساً به تفکیک فاز مایع مایع بستگی پیدا می کند. در برخی موارد، محلول پلیمر در خلال فرآیند سردسازی به شکل ژل در میآید. ژل شدگی فرآیندی است که در آن کل محلول پلیمر به شکل ژل که شبکه ای از زنجیره های پلیمری همبر(cross-linked) با حلال به دام افتاده در شبکه است سخت می‌شود. در یک محلول پلیمری نیمه بلورین، چفت شدگی توده های کوچک

بلور، در شکل گیری ژل نقش کلیدی بازی می کنند. در اثر حذف حلال از ژل ساختار بسیار متخلخلی بدست می آید.

زمانی که دمای بلورینگی پلیمر بالاتر از دمای اسپینو دال باشد، بلورینگی پلیمر در محلول قبل از تفکیک فاز اسپینودال در طول فرآیند سردسازی رخ می دهد. اگر محلول پلیمر به اندازه کافی در دمای بالاتر از دمای اسپینودال نگهداری شود، محلول دچار تفکیک فاز القای بلورینگی شده که نوعی دیگر از تفکیک فاز مایع – جامد است. فاز غنی از پلیمر توسط هسته ای شدن و رویش بلورهای پلیمر ایجاد می‌شود. پلیمر پلاکت شکل در ماتریس فاز عاری از پلیمر به حالت تعلیق درامده و یا به سرعت د محلول ته نشین می‌شود. زمانی که غلظت پلیمر به اندازه کافی بالا باشد، عمل ژل شدگی نیز در فرآیند فاز تفکیک رخ می دهد که از آن می توان برای ساخت اسفنج های پلیمری استفاده کرد.

-تهیه ماتریس های پیوسته شبکه پلیمر

PREPARATION OF CONTINOUS NETWORK POLYMER MATRICES

تفکیک فاز مایع – مایع القا شده گرمایی محلول پلیمر را می توان با انتخاب یک حلال با نقطه انجماد پایین تر از دمای تفکیک فاز محلول پلیمر ایجاد کرد. برای پلی $\alpha$ - هیدروکسیل اسیدها، ترکیب دی اکسین و آب برای دستیابی به تفکیک فاز مایع – مایع بکاربرده می‌شود. یک محلول پلیمر صاف، (که قبلا تا دمای 60C گرم شده باشد) تا دمای از قبل تعیین شده سرد گشته تا عمل تفکیک فاز مایع – مایع صورت گیرد. سپس محلول منجمد شده به داخل ظرف خشک سازی – انجماد، در دمای بین 5C- و

10C- در حمام یخ – نمک منتقل می‌شود. بعد از خشک سازی از طریق انجماد برای یک هفته در ۰/۵mmHg، حلال کاملاً خارج شده و اسفنجی متخلخل باقی می ماند.

بسته به اینکه تفکیک فاز در کدام قسمت نمودار فاز دما – ترکیب محلول پلیر رخ دهد، از طریق تفکیک فاز مایع – مایع می توان، هم ماده پودری شکل و هم اسفنجی با شبکه خلل و فرج پیوسته همگن بدست آورد (شکل ۶-۶۲). ساختار نهایی ماتریس حاصل از تفکیک فاز مایع – مایع به غلظت محلول پلیمر، دمای فرونشانی (quenching temperature) و وزن مولکولی پلیمر بستگی دارد. بطور کلی، ساختار پودر شکل از محلول پلیمر با غلظت بسیار کم بدست می آید در حالیکه اسفنج با ساختار خلل و فرج همگن از محلول پلیمری که دارای غلظت نسبتا بالاتر است حاصل می‌شود. در غلظت یکسان، پلیمری که دارای وزن مولکولی بالاتری است برای ایجاد آرایش ساختار یکنواخت خلل و فرج همگن مطلوب تر است. در یک محدوده غلظت مشخص پلیمر، دمای فرونشانی کمتر (نرخ سرد سازی بالاتر) معمولاً منجر به ایجاد شبکه خلل و فرج در هم با اندازه خلل و فرج یکنواخت می‌شود. دمای فرونشانی بالاتر (نرخ سرد سازی پایین تر) منجر به خلل و فرج های بزرگ تر با توزیع اندازه خلل و فرج وسیع تر می گردد.

اندازه خلل و فرج اسفنج از تفکیک فاز مایع – مایع بدست آمده کـه معمـولاً از چنـدین میکرومتر تا چند ده میکرومتر است. فاز تفکیک شـده غیـر دقیـق (نـامرغوب) در طـول مراحل پایانی تفکیک فازی فاکتور دیگر است که بر مورفولـوژی فـاز سیسـتم تـاثیر مـی گذارد. زمانی که نمونه در دمای تفکیک فازی قـرار مـی گیـرد، انـدازه متوسـط قطـرات متناسب با کاهش تعداد قطرات در واحد حجم میل به افزایش می یابنـد، نیـروی رانـش برای چنین افزایشی در اندازه متوسط قطرات، تمایل سیستم در کمینه کردن انـرژی آزاد بین سطحی یا به حداقل رساندن سطح درون لایه ای بین فازهای غنی از پلیمر و عـاری از پلیمر است. این پدیده را می توان برای کنترل اندازه خلل و فـرج اسـفنج هـای تهیـه شده از تفکیک فاز مایع – مایع، بخصـوص بـرای سـاختارهای متخلخـل داربسـت هـای پلیمری مهندسی بافت که در آنها اندازه مناسب خلل و فرج برای کاشـت سـلول الزامـی است بکار برد.

-تهیه ماتریس های پلیمری با شبکه نانو رشته ای

PREPARATION OF POLYMER MATRICES WITH NANOFIBROUS NETWORK

برای تهیه ماتریس های نانو رشته ای PLLA بسیار متخلخـل از محلـول PLLA القـاء شده انعقاد گرمایی باید سیستم حلال مناسب انتخاب شود. بطور کلی، مراحـل پـردازش عبارتند از:

۱-محلول PLLA ۲ml (که قبلاً تا دمای ۵۰C گرم شده باشد) به ظرف تفلـون اضـافه می‌شود. ظرف حاوی محلول PLLA بلافاصله در یخچـال یـا فریـزر بـا دمـای از پـیش تعیین شده برای ژل شدن قرار داده می‌شـود. سیسـتم هـای حـلال مختلفـی (از جملـه

THF ، DMF ، پیریدین، THF- متانول، دی اکسین – متـانول، دی اکسـین-$H_2O$ ، دی اکسین – استون) برای تهیه ژل های پلیمر بکار برده می‌شود. زمان ژل سازی به دما، حلال و غلظت PLLA محلول بستگی دارد. بعد از ژل شـدگی و قبـل از شـروع مرحلـه بعدی، ژل در دمای ژلاتینی برای ۲ ساعت دیگر نگهداری می‌شود.

۲-ظرف حاوی ژل برای تعویض حلال در آب مقطر غوطه ور می‌شود. آب سه بـار در روز و به مدت ۲ روز عوض می گردد.

۳-سپس ژل از آب خارج شده و توسط تکـه کاغـذ صـافی پـالایش می‌شـود و در دمـای ۲۰C- به مدت ۲ ساعت در فریزر قرار می گیرد.

۴-ژل منجمد شده را در ظرف خشک ساز – انجماد در دمای ۵- تا ۱۰C- در حمام یـخ –نمک قرارداده و سپس تحت خلاء (۰/۵mmHg>) برای یـک هفتـه از طریـق انجمـاد خشک می کنیم.

از طریق فرآیند ژل سازی، می توان شبکه های سـه بعـدی نـانو رشـته ای را از محلـول PLLA بدست آورد (شکل ۷-۶۲). شبکه رشته ای دارای رشته هایی (فیبرهایی) با قطر ۵۰ تا ۵۰۰mm است. آرایش شبکه ای رشته هـا بـه دمـای ژل سـازی حـلال محلـول PLLA بستگی دارد. بطور کلی، در دمای ژل سازی پایین، ساختار نانو رشته ای، شـکل می گیرد. همچنین دمای ژل سازی برای ساختار رشته ای بستگی به حـلال بکـار رفتـه

دارد. برای یک محلـول PLLA-THF ، دمـای ژل سـازی بـرای تشـکیل سـاختار نـانو رشته‌ای باید کمتر از حدود ۱۵C باشد. تخلخل ماتریس نانو رشته ای با افـزایش غلظـت پلیمر کاهش می یابد در حالیکه خصوصیات مکانیکی (از قبیل مـدول یانـگ و اسـتحکام کششی) با غلظت پلیمر افزایش می یابد.

فرآیند ژل سازی ساخت مـاتریس هـای رشـته ای دارای مزایـای مختلفـی اسـت. کـه از آنجمله عدم نیاز به تجهیزات می باشد که بر عکس روش ساخت پارچه‌های غیر بافتی بـا تکنولوژی نساجی است. این فرآیند همچنین بسیار ساده تر است. ایجاد رشـته هـایی بـا قطر مشابه ماتریس های برون سلولی طبیعی با واحد نانومتر در تکنولوژی نساجی بسـیار مشکل و یا حتی غیرممکن است. این فرآیند را می توان بوسـیله قالـب، مسـتقیماً بـرای ساخت داربست به شکل آناتومی قسمتی از بدن بکار برد. نـرخ سـطح بـه حجـم در ایـن روش بسیار بالاتر از آن دسته پارچه های رشته ای غیر بافتی تکنولوژی نساجی یا اسفنج های ساخته شده با روش های دیگر است.

هر چقدر که مساحت سطح بالاتر باشد، چسبندگی سلول افزایش می یابد. برای بسـیاری از انواع سلولها جابجایی سلول، رشد و عملکردهـای متمـایز سـلول، همگـی بسـتگی بـه چسبندگی سلول دارند. بنابراین ماتریس های برون سلولی غیر بـافتی مصـنوعی شـرایط (محیط) بهتری برای چسبندگی، تکثیر و عملکرد سلول فراهم می کنند.

-تهیه ماتریس های پلیمری با ساختار پلاکت شکل

PREPARATION OF POLYMER MATRICES WITH PLATELETLIKE STRUCTURE

ماتریس PLLA بسیار متخلخل با ساختار پلاکت شکل از القای گرمایی ژلاتینی محلول PLLA در دمای نسبتاً بالا تهیه می شوند. همچنین حلال های بکار رفته در تهیه ماتریس های نانو رشته ای را می توان جهت ساخت ماتریس هایی با ساختار پلاکت شکل نیز بکار برد. فرآیند تهیه اسفنج ها با ساختار پلاکت شکل مشابه آن چیزی است که در رابطه با شبکه های نانو رشته ای توصیف شده البته، دمای ژل سازی باید متناسب با حلال بکار رفته، بالاتر باشد. برای یک محلول PLLA-THF، اسفنج های با ساختار پلاکت شکل در دمای ژل سازی بالاتر از ۲۰C شکل می گیرند (شکل ۸-۶۲). هسته سازی و رشد بلورهای PLLA در دمای بالاتر از دمای تفکیک فاز اسپینودال می توان سبب شکل گیری ساختار پلاکت شکل شود.

-تهیه ماتریس های نانو رشته ای با ساختار ماکرو متخلخل

PREPARATION OF NANOFIBROUS MATRICES WITH MACROPORE STRUCTURE

ماتریس رشته ای سه بعدی تهیه شده از ژلاتین محلول PLLA دارای خلل و فرج هایی با اندازه متوسط (فاصله بین رشته ها) چندین میکرومتر هستند. البته، داربست های مهندسی بافت باید دارای خلل و فرج های حداقل چند ده میکرومتر باشند تا به خوبی

دانه های سلول را در خود جای دهند. برای بدست آوردن داربست هایی با ساختار نانو رشته ای و خلل و فرج هایی به اندازه کافی بزرگ برای کشت سلولی، ترکیبی از روش‌های ژل سازی و پالایش پروژن بکار برده می‌شود.

ذرات شکر به عنوان پروژن برای تهیه داربست هایی با ساختار نانو رشته ای و معماری ماکرو متخلخل به کار برده می شوند. محلول پلیمر از پیش گرم شده به آرامی بر روی ذرات شکر در قالب چکانده شده و سپس تا دمای ژلاتینی از پیش تعیین شده سرد می‌شود. سپس کامپوزیت ژل – شکر در آب مقطر غوطه ور شده تا خروج حلال و پالایش شکر از کامپوزیت به طور همزمان انجام گیرد. ژل بعد از ۴ روز از آب خارج شده و با کاغذ صافی پاک گردیده و به مدت ۲ ساعت در دمای ۲۰C- در فریزر قرار داده می‌شود. ژل منجمد شده در دمای ۵- تا ۱۰C- در حمام یخ – نمک تحت خلاء (<۰/۵mmHg) برای یک هفته از طریق انجماد خشک می‌شود. با ترکیب روش ژل سازی و پالایش پروژن، یک ماتریس سه بعدی با معماری ماکرو متخلخل از کامپوزیت شکر – PLLA تهیه می‌شود. (شکل ۹-۶۲).

برخلاف دیواره خلل و فرج اسفنج های تهیه شده با روش سنتی پالایش نمک، دیواره خلل وفرج ماتریس های جدید دارای شبکه نانو رشته ای است. میکرو ساختار رشته ای به عنوان داربستی برای مهندسی بافت می تواند چسبندگی سلول ها را افزایش داده و ساختمان ماکرو متخلخل آن، ساختار متخلخلی ایجاد می کند که برای توزیع فضایی سلول مطلوب است.

تولید داربست های پلیمری: پلیمریزاسیون (بسپارش)

PROCESSING OF POLYMER SCAFFOLDS : POLYMERIZATION

پیشگفتار

**داربست های به دست آمده از طریق روش بسپارش کانیدهای خوبی برای مهندسی بافت به شمار رفته و به دلیل سهولت ساخت نسبت به روش دیگر ساخت داربست ارجحیت دارند. با وجودیکه پلیمرهای مختلفی را می توان به این روش بسپارش کرد. اما تعداد کمی از آنها منجر به داربست هایی با قابلیت دخول سلول یا همان داربست های متخلخل می شوند. برای نمونه پلی اتیلن گلیکول- مالتی-اکریلیت و پلی ۲- هیدروکسی اتیل متا اکریلات (PHEMA) می توانند به صورت شبکه ای یا به حالت اصلی بسپارش شوند، هر چند ساختار ایجاد شده به جای داربستی با خلل و فرج های بزرگ درهم برای نفوذپذیری سلول ها به شکل ژل می باشد. با دستکاری (تغییر) شرایط بسپارش می توان داربست های متخلخل از PHEMA و پلی- ان- ۲-هیدروکسی پروپیل متا اکریلامید (PHPMA) ایجاد کرد. به طور خلاصه ترکیب منومری (تک پار) در حضور حلالی که منومر در آن قابل حل ولی پلیمر غیر قابل حل است، درون قالب بسپارش می شود. گذار حلالیت درخلال بسپارش منجر به دو فاز می گردد، ساختار زیستی پیوسته پلیمر و حلال (شکل ۱-۶۳) بدین ترتیب، داربست تولید شده در نتیجه بسپارش برای ایجاد خلل و فرج های در هم نیازی به پالایش پروژن ندارد. برای داربست های PHEMA با قابلیت دخول سلول**

که اغلب به نام اسفنج های PHEMA خوانده می شوند حلال مازاد معمولاً آب است.

اسفنج های PHEMA نخستین بار در سال ۱۹۶۰ ساخته شده و اولین کاربرد بالینی آنها افزایش حجم پستان و جایگزینی عضروف بینی بود. اسفنج‌های PHEMA قابلیت تحمل اتوکلاو را داشته و به سادگی به اشکال مختلف تغییر فرم می دهند و به خاطر خصوصیات فیزیکی اسفنجی برای جراح مانند بافت نرم هستند. برخی از محققین ، اسفنج های PHEMA را جایگزین بافت نرم با قابلیت کاربردی متنوع نامیده اند. با این حال آهکی شدن آنها در محیط آزمایشگاه در مدت زمان طولانی سبب کند شدن سرعت توسعه اسفنج های PHEMA تا اوایل ۱۹۹۰ یعنی زمانی که چیریلا از اسفنج های PHEMA برای پروژه قرنیه مصنوعی استفاده کرد، شد. اسفنج های PHEMA از آن موقع به بعد به عنوان حاشیه متخلخل قرنیه مصنوعی که باموفقیت های بالینی فراوانی مواجه شد توسعه یافتند. داربست های PHEMA قابل نفوذ برای سلول ها بوده و به همین دلیل به عنوان یک قلاب (نگهدارنده) بین بافت قرنیه و هسته

مرکزی شفاف غیرقابل نفوذ به کار برده می شود همچنین میتوان با تلفیق اسفنج های PHEMA با کاشتنی چشمی (اربیتال) سبب نفوذ ماهیچه ها به داخل اجزاء PHEMA شد.

تست های آزمایشگاهی و درون بدنی اسفنج های PHEMA لزوم نفوذ (هجوم) سلول را برای کاربردهای مهندسی بافت ثابت کرده اند. اشکال مختلف داربست به واسطه پیامد بسپارش اجازه تغییر ساختار مصنوعی را در حین سنتز می دهد. این فصل روش تحلیل ساخت اسفنجهای PHEMA قابل تولید در آزمایشگاههای تحقیقاتی را تشریح می‌کند.

معرف ها(شناسگرها) REAGENTS

سیستم های آغاز کننده و منومر اسفنج های PHEMA گران نبوده و مواد شیمایی فوق آماده مصرف هستند. مواد شیمیایی فهرست شده در جدول ۱-۶۳ و ۲-۶۳ از آلیدرچ (میلواکی ایالت ویسکانسین) قابل خریداری هستند. آب به کار رفته معمولاً مقطر بوده و یون زدایی شده است و دارای مقاومت Ω ۱۸M می باشد، میلی پور میلی رو مثبت ۱۰ و میلی- کیویواف مثبت (بدفورد، ایالت ماساچوست)

-روش ها METHODS

مراحل کلیدی در سنتز اسفنج های PHEMA برای مقاصد پزشکی- زیستی عبارتند از:

- تهیه قالب

- تهیه فرمولاسیون
- اعمال- تزریق فرمولاسیون به قالب
- بسپارش و تشکیل داربست
- استخراج ساکس هلت (soxhlet) داربست
- استریلزاسیون (سترون کردن)
- نفوذ سلولی داربست
- پردازش ساختار بافت

**-تهیه قالب MOLD PREPARATION**

**قالب ها باید قبل از تهیه فرمولاسیون بسپارش آماده باشند. قالب باید هم در دسترس بوده (به عبارت دیگر شیشه یا پلی پروپیلن) و هم به طور کامل با الکل قابل پاک کردن باشند (به عبارت دیگر تفلون). از آنجا که PHEMA به پلی استایرن فولاد و لوله تایگون می چسبد حفظ کیفیت سطوح در هنگام استفاده از این مواد به عنوان قالب مشکل است.**

**-تهیه فرمولاسیون FORMULATION PREPARATION**

تهیه ترکیب منومر ساده است: ابتدا همه سیالات فهرست شده در جدول ۱-۶۳ را به غیر از عامل شتاب دهنده ( $N', N', N, N$ - تترامتیل اتیلن دیامین، TEMED ) در ظرف شیشه ای به هم اضافه می کنیم. ظرف را به مدت ۳ دقیقه در حمام اولتراسونیک- قرار می دهیم و مراقب هستیم تا دمای حمام ثابت باقی بماند. بعد از اضافه کردن عامل شتاب دهنده، ترکیب را برای ۳۰ ثانیه به آرامی تکان داده یا می غلطانیم. از حرکت شدید و تند خودداری می کنیم زیرا که ممکن است سبب ورود اکسیژن به داخل ترکیب شده و جنبش بسپارش را تغییر دهد. فرمولاسیون فوق را می توان اکنون به داخل قالب تزریق کرد.

-اعمال-تزریق فرمولاسیون به قالب

DISPENSING / INJECTION FORMULATION INTO MOLDS

فرمولاسیون به دست آمده را میتوان با یک سرنگ یک بار مصرف با سوزن درجه ۱۸ به قالب مورد نظر که دارای شکل و ابعاد مطلوب محصول نهایی است تزریق نمود. جلوگری از ایجاد حباب در زمان تزریق فرمولاسیون از اهمیت ویژه ای برخوردار است.

فرمولاسیون باید قبل از رخ دادن تفکیک فاز (به عبارت دیگر سفید شدگی) تزریق شود.

-بسپارش و تشکیل داربست

POLYMERIZATION AND FORMATION OF SCAFFOLD

از آنجا که دما بر جنبش بسپارش تأثیر می گذارد حفظ دمای ثابت قالب در طول بسپارش ضروری است. زمان بسپارش در حدود ۱۰-۲ ساعت در دمای اتاق بوده و به ترکیب دقیق فرمولاسیون بستگی دارد. فرمولاسیون های حاوی آغاز کننده ها و یا عامل های شبکه ساز کمتر معمولاً به زمان بیشتری برای شکل گیری قالب نیاز دارد. قالب ها معمولاً در طول شب باقی مانده و یا در فری با دمای ۵۰ ˚C به مدت ۳ ساعت پس از سپری شدن ۱۰-۲ ساعت نخستین از تبدیل کامل و باقی ماندن کمترین میزان منومرها قرار داده می شود. تفکیک فاز و ژل سازی دو تغیر فیزیکی هستند که در حین بسپارش قابل مشاهده هستند. تفکیک فاز یا سفید شدگی فرمولاسیون را می توان با طیف سنجی در ۵۵۰nm پس از ۶۰-۵ دقیقه (به عکس العمل کنتیک ها بستگی دارد) تشخیص داد. استفاده از کووت های پلی استایرن یک بار مصرف برای سنجش نور بهترین انتخاب است چرا که پلیمر به سطوح کوارتز می چسبد. بعد از تفکیک فاز، ترکیب در حالت سیال باقی مانده تا ذرات ژل فاز که متناسب با کنتیک ها می توانند از ۳۰ ثانیه تا ۱ ساعت زمان

اضافی ببرند جدا شود. توجه به این نکته مهم است که بـدانیم داربسـت نتیجـه تفکیـک فازی و سپس ژل شدگی است و اگر این ترتیب برعکس شود بـه جـای داربسـت ژل بـه دست می آید. تغییر فاز در ۷۵٪ آب در زمان وقوع ژل شدگی قبل از تفکیک فـاز سـبب غیر قابل نفوذ شدن ژل ها در برابر سلول ها می شـود. بنـابراین بهتـرین وضـعیت حفـظ تعادل ۸۰٪ آب در فرمولاسیون است تا حالت نفوذ پذیری داربست در برابر سـلول حفـظ شود. محدوده اندازه خلل و فرج متناسب با فرمولاسیون از ۲ تا $\mu m$ ۸۰ تغییر می‌کند.

-استخراج ساکس هلت داربست

SOXHLET EXTRACTION OF SCAFFOLD

تحقیقات چیفکوفی و همکارانش نشـان داد کـه آب اسـتخراج شـده از ژل های PHEMA و تزریق شده به درون پوست موش ها نسـبتاً دردنـاک اسـت. بنـابراین خارج کردن همه عوال سمی از اسفنج های PHEM قبل از اعمال به بافت بسـیار مهـم است. همچنین اگر اکریلامید که یک نورو توکسین قدرتمند است یک کومونومـور باشـد اهمیت دوچندان می شود. روش استخراج ساکس هلت راحـت تـرین و مـؤثرترین شـیوه برای خارج سازی مونور باقیمانده و یا هر آغاز گر غیر فعـال دیگـری اسـت. نمونـه هـای کوچک را می توان در انگشتانه یا کاست رشد قرار داده تا از کشیده شدن آنهـا بـه درون جریان خروجی محفظه نمونه جلوگیری کرد. اگر اسفنج های اصلاح شده نسبت بـه دمـا حساس بوه و یا شامل ذرات تخریب پذیر باشند مـی تـوان اسـتخراج را در دمـای پـائین توسط دستگاه جانبی سردساز متصل به محفظه نمونه یا با سیستم ساکس هلت به اجـرا در آورد. در زمان کار تحت خلاء از تطبیق ساز مدخل مویرگ خونی در یـک فلاسـک بـا کف گرد و دو گردنه جهت تولید رشته ای از حباب هـای هـوا بـرای جلـوگیری از ضـربه

استفاده می شود. استخراج اسفنج های PHEM معمولاً درطول شب انجام می شود. حداقل تعداد شستشوهای ضروری برای خارج کردن اجزا سمی نامشخص است اما مقدار یک یا دو استخراج ۴۰ml شاید کافی باشد. از روغن کاری بین مفاصل کاملاً حذر کرده و چربی احتمالی را با کلروفرم یا استون به خوبی پاک می کنیم.

-استریلیزاسیون (سترون کردن) STERILIZATION

اسفنج های PHEMA را میتوان تحت اتوکلاو قرار داده و ترجیحاً در آب داخل محفظه درب دار غیر پیچشی برای جلوگیری از افزایش فشار، غوطه ور ساخت. اسفنج های PHEMA در اثر حضور در چنین دماهایی کمترین تخریب را از خود نشان می دهند. از پرتودهی گاما ، (۲۵ KGy) نیز می توان بهره گرفت. التبه احتمال تغییر جزئی حجم شبکه یا بریدگی زنجیر وجود دارد.

-نفوذ سلولی داربست ها CELLULAR PENETRATION OF SCAFFOLDS

روش های استاندارد کشت سلولی را می توان برای کاشت اسفنج هاPHEMA استریل در محل بافت مورد نظر یا بارور کردن آنها با سلول ها برای کشت آزمایشگاهی به کار برد. برای بالا بردن نفوذ سلولی اسفنج های PHEMA می توان «پوسته» متخلخل کمتری که نمونه قالب گیری شده را احاطه کرده است برداشت. این کار را می توان با ماشین تراش (بر روی نمونه های منجمد) یا توسط تیغ (داربست های نیمه منجمد شده در دمای ۷۸- °C به مدت ۱۰ دقیقه) انجام داد. از غوطه ور شدن اسفنج ها در نیتروژن مایع باید حذر کرد چرا که سبب از هم پاشیدن اسفنج می شود.

البته این روش برای تصویر برداری میکروسکوپی اسکن الکترون (SEM) می تواند مفید باشد. (استخراج ساکس هلت، ترک خوردگی را کاهش می دهد) مطلوب است که اسفنج های PHEMA ساخته شده در حمام اولتراسونیک بدون پوسته باشند. البته گرمای تولید شده در سونیکاتور می تواند بر جنبش بسپارش اثر بگذارد.

-پردازش ساختار بافت HISTOLOGICAL PROCESSING

مورفولوژی کلی و تغییرات فوق ساختاری در برون کاشتی ها یا اسفنج های کشت شده PHEMA را میتوان توسط میکروسکوپ چشمی و میکروسکوپ انتقال الکترون (TEM) بر بافت پردازش شده در صمغ اپوکسی مشاهده کرد. کاشتنی های خارج شده از بدن باید به مدت ۴۸-۲۴ ساعت در ۲/۵٪ گلوتارآلدهید نگهداری شده و از قبل در ۱٪ اسمیوم تتراکساید تثبیت شوند. نمونه ها توسط محلول های درجه بندی شده اتانول آب گیری شده و سپس در اکسید پروپیلن غوطه ور می شوند. سپس نمونه به وسیله صمغ اپوکسی و تعویض روزانه صمغ قدیم با صمغ تازه به مدت ۷۲ ساعت پالایش می شوند. قسمت های نیمه نازک (۲ $\mu m$) برای میکروسکوپ چشمی و قسمت های فوق نازک (۰/۱nm) برای TEM توسط یک فرامیکروتوم (فراریزبر) با تیغه الماس بریده می شوند. لکه های بررسی شده برای آزمایش نور شامل هماتوکسیلین و ائوسین، قرمز الیزارین (روناس)، سه رنگ طبیعی (تری کروم) میسون و آبی تلوئیدین می شود. به غیر از لکه آبی تلوئیدین، بخش های دیگر باید با غوطه ور شدن به مدت ۲ دقیقه در اتوکسید سدیم وهیدراته شدن از طریق محلول های درجه بندی شده اتانول پلاستیکه شوند.

تجمع تحریک آمیز سلول را در اسفنج های برون کاشتنی PHEMA را می توان توسط تمرکز ایمنی شیمیایی یاخته های ماکروفاژ با استفاده از به کارگیری پادتن ها بر ماکروفاژهای بخش های منجمد شده و پارافینی بافت تثبیت شده در ۲٪ پارافرم آلدئید شناسائی کرد. نوتروفیلها را می توان با اعمال آنزیم شیمی بافت بر بخش های منجمد تثبیت شده در سیتوات – استون فرم آلدئید نگهداری شده در کلرواستات AS-D نفتال در PH ۶/۳ به مدت ۱۵ دقیقه در تاریکی و دمای $^{\circ}C$ ۳۷ شناسائی کرده و توسط هماتوکسیلین با لکه ها مقابله کرد. عبارت ماهیچه صاف $\alpha$– اکتین به عنوان علامت شیمیایی تبدیل مایوفیبربلاست به کار رفته و توسط روش های متمرکز سازی ایمنی یاخته شیمیایی در کشت سلولی قابل شناسائی است.

محصول ماتریس برون سلولی در برون کاشتنی ها PHEMA توسط اتورادیو گرافی شناسائی می شوند. کلاژن تولید شده توسط سلول ها ونوع آن را می توان با استفاده از پرولین [ ۳H –۳ و ۲]- (مقدماتی) و تمرکز ایمنی یاخته شیمیایی انواع کلاژن I- VI با پادتن های انسانی و کلاژن گاوی شناسائی کرد. این موضوع نشان می دهد که اسفنج های PHEMA هم نفوذ و هم ته نشینی سلول را میسر ساخته و یک داربست بافت سه بعدی پایدار و اشکل می دهد.

چگالی و زیست پذیری سلول را میتوان با استفاده از تصحیح روش لک اندازی فلورسانت که توسط پول و همکارانش صورت گرفت انجام داد. این روش بسیار حساس و قابل اطمینان از دو نوع رنگ فلورسانت استفاده می‌کند: ۵-کلرومتیل فلورسئین دی استیت (CMFDA) و اتیدیم و همودیمر (هم پار) ۱ که به ترتیب جهت شناسایی سلول های زنده و مرده مورد استفاده قرار می گیرد. نمونه های بافتی برون کاشته شده با اهداف

متفاوت همراه با CMFDA و یا با اتیدیم همـودیمر ۱ بـه مـدت ۲۴ سـاعت در ۳۷ ˚C نگهداری می شوند. بعد از آن گونه ها به طور مختصر در ۲٪ پارافرمالدهاید تثبیت شده و در دمای بهینه برش محیط پیرامون منجمد (OCT) می شوند. بخش های منجمد شده را می توان بر روی اسلایدهای پوشیده شده با آمینو پروپیل تـری تکسـی سـیلان جمـع آوری کرده و در میکروسوپ فلورسانت مشاهده نمود و بدین ترتیب تحلیل نیمه کمـی از سلول های زنده و مرده به عمل آورد.

-اشارات و فوت و فن ها TIPS AND KNOW – HOW

نرخ منومر در آب تنها فاکتور مهم در کنترل مورفولوژی نهایی است . متغیرهای دیگری که می توانند بر مورفولوژی نهایی تأثیر بگذارند شامل دمای زمان بسپارش، مقدار اکسیژن حل شده در ترکیب منومر و غلظت و نوع مواد شیمایی در ترکیب منومر است. تثبیت این پارامترها در زمان بررسی اثر تغییر یکی از آنها بسیار مهم است.

HEMA باید یک سیال صاف بوده و اگر هر گونه زردی در آن مشاهده شود باید منومر خارج گردد. HEMA معمولاً قبل از استفاده تحت خلاء تقطیر می شود و در صورتی که باز دارنده ها (ممانعت کننده ها) و هیدروکوئینین مونومتیل اتر (MEHQ) را از آن خارج کنیم زمان ذخیره سازی (نگهداری) آن کوتاه می شود. اگر HEMA با خلوص بالا حاوی کمتر از ۵۰ppm ، MEHQ خریداری شود و بطری آن به طور مرتب تعویض

شود HEMA را می توان بسادگی پس از دریافت استفاده کرد. بهتر است که منبع ویژه HEMA را انتخاب کرده و مقادیر کمی از آن به عنوان توزیع کننده، نگهداری شود و هر ۶ ماه یک بار یک بطری جدید سفارش داده شود.

معمولاً مقداری اتیلن دی متا اکریلیت (EDMA) در HEMA خریداری شده وجود دارد که برای بررسی حساسیت با تخریب پذیری می توان EDMA را به وسیله استخراج در هگزان خارج کرد. برای استفاده عمومی، نیازی به خارج سازی EDMAاز HEMA نبوده و برای ایجاد همخوانی (سازگاری) بین دسته ها توصیه می شود که HEMA را توسط غلظت مشخصی از EDMA خنثی کرد. این کار از واکنش کنتیک متغیرها جلوگیری کرده و خطاهای ناشی از رهایش مقادیر کم EDMA به ترکیب منومر را برطرف می‌کند. عامل شبکه ساز با اثر گذاری بر کنتیک های واکنش مصرف HEMA و همچنین کنتیک های تفکیک فاز در برابر ژل شدگی نقش پیچیده ای را در آرایش داربست بازی می‌کند. برخلاف ژل های PHEMA ارتباط زیادی بین غلظت عامل شبکه ساز و استحکام داربست های PHEMA وجود ندارد غلظت معمول به کار رفته EDMA برای داربست ها در حدود wt% ۰/۲۵ –۰/۱ است.

محلول تازه پرسولفات آمونیوم (APS) باید برای هر فرمولاسیون تهیه شده و ساده ترین روش برای این فرایند تکراری سنجش دقیق g(*) ۰/۱ و پوشاندن ظرف با آب تا g(*)۱ است. وزن ظرف باید در تعادل وزنی بین APS اضافی و آب محاسبه شود. اسفنج های PHEMA ساخته شده با غلظت های کم APS معمولاً ضعیف و چسبنده هستند. در صورتی که تمایل به واکنش آرام داشته باشیم به جای بازدارنده می توانیم از عامل شتاب دهنده با غلظت ضعیف تر استفاده کنیم.به طور کلی غلظت APS باید بیشتر از ۰/۳٪wt غلطت منومر باشد. برای غلظت های پائین تر منومر ممکن است نیاز به غلظت بالاتر باشد. برای مثال برای یک ترکیب ۱۰:۹۰، HEMA و آب، غلظت ۰/۵٪wt توصیه می شود. TEMED به محض دریافت با توزیع در ترکیب منومر توسط میکروپیپت استفاده می شود. TEMED یک اهدا کننده الکترون بسیار قدرتمند تر از دیگر عامل های شتاب دهنده (تسریع کننده) مانند متابی سولفات سدیم (SMBS) و اسید اسکوربیک بوده و در نتیجه نرخ واکنش آن بسیار سریع تر است. هنگامی که عامل شتاب دهنده SMBS باشد لایه لایه شدگی و استقرار ورفولوژی مشاهده می شود.

برای خارج کردن اکسیژن حل شده می توان گاز نیتروژن یا هلیوم را برای مدت زمان مشخصی (~۱۵ دقیقه) به شکل حباب در ترکیب منومر وا رد کرده و یا اینکه میتوان منو ر را به صورت عرضه شده (تحت پردازش قرار نگرفته) مصرف کرد. اسفنج

PHEMAرا که با گاز خنثی حباب دار شده اند را با آنهایی که نشده اند مقایسه نکنید. خروج اکسیژن حل شده بر نرخ واکنش و در نتیجه مورفولوژی تأثیر می گذارد. در صورت استفاده از منومر عرضه شده انسجام (هم خوانی) هر ترکیب ضروری است.

-نتایج و خط مشی آینده CONCLUSIONS AND FUTURE DIRECTIONSتهیه داربست نفوذ پذیر سلولی PHEMA ساخته شده توسط بسپارش HEMA در آب اضافی و اتوکلاوکردن آنها راحت بوده و گران نمی باشد. علاوه بر این طرح شیمی ارائه شده در این فصل اجازه ساخت مکرر داربست های PHEMA را می دهد. داربست های PHEMA در آب فرسوده نشده و تولید محصولات تخریبی نمی کند و حد فاصل سلول- سطح داربست پایدار است. اصلاح سطح مانند افزودن پپتید یا مولکول های زیست فعال تترینگ به این دار بست مصنوعی امکان پذیر بوده و از عملکرد هیدروکسیل بهره می برد.

اسفنج های PHEMA را میتوان با مقادیر بسیار کم عامل شبکه ساز (~۰/۰۵٪wt) ساخته و هر گونه ناخالصی EDMA قابل حذف کردن است. در صورتی که داربست های PHEMA جهت تخریب اصلاح شوند، آزمایشات ارزیابی تورم کاشتنی و محصولات سمی و تخریب پذیر لازم خواهد بود.

تشکیل داربست توسط بسپارش نسبت به روش های دیگر تهیه داربست دارای مزایایی است. داربست در حین بسپارش از نواحی عاری از پلیمر و غنی از پلیمر تشکیل شده و بدین ترتیب شکل و مورفولوژی را می توان بالقوه توسط تحریکات خارجی از قبیل نیروهای سانتریفوژ یا نور تغییر داد. چنین کنترلی بر شکل داربست، می تواند منجر به چندگانی مورفولوژی ها و هندسه آنها شده که برای کاربردهای مهندسی بافت مطلوب است.

-قوانین درون مرکزی و بازنگری درمان های مهندسی بافت

INTER – CENTER REGULATION AND REVIEW OF TISSUE-ENGINEERED THERAPIES

اغلب اوقات، در درمان های مهندسی بافت سلولهای همراه با پلیمر، سلول های دگرزا یا مشتقات بافت در خلال فرایند ساخت با هم ترکیب شده و قبل یا بعد از فرا کاشت به آنها دارو اضافه می گردد. این سطح پیچیدگی سبب شده است که FDA همکاریش را با CDRH ، CBER و CDER در بازنگری درمان های مهندسی بافت به شکل رسمی توسعه دهد. این همکاریها با شکل گیری گروه متمرکز بالینی درمان جراحات و مشاوره صنعتی : جراحات سوختگی و زخم های مزمن پوستی – محصولات جدید درمانی به صورت رسمی درآمد. همچنین پیچیدگی کاشتنی های مهندسی بافت گاها لزوم بازنگری درمان توسط مراکز مختلف FDA را واجب می دارد. در این موارد، مسئولیت اصلی بازنگری را یک مرکز با مشاوره دیگر مراکز در صورت نیاز بر عهده می گیرد. گفتگوی

اولیه با FDA قبل از ارائه یک درخواست جهت مطالعه درمان تحقیقاتی می تواند به ارسال مستقیم درخواست به مراکز مربوطه کمک کند.

از نظر تاریخی، سیاست های جدا و متمایز FDA سبب درک اهمیت استاندارد شده است. درسال ۱۹۹۷، همکاری FDA و موسسه ملی استاندارد و تکنولوژی (NIST) سرآغاز فرآیند توسعه استانداردهای برای محصولات پزشکی مهندسی بافت (TEMPs) بود. بعد از برگذاری چندین جلسه، توسط اساتید دانشگاه و صاحبان صنایع تصمیم گرفته شد که روند توسعه استاندارد تحت نظارت دولت قرار نگیرد (FDA, NIST) بلکه بصورت یک جریان عمومی با حمایت مالی دولت باشد. تصمیم دیگری که مورد توافق اکثریت قرار گرفت توسعه استاندارد های TEMPs توسط انجمن سنجش و مواد آمریکا (ASTM) بود. این مقدمات پایه گذار بخش مجزای کمیته FDA برای تجهیزات پزشکی ASTM شد. از سال ۱۹۹۷، پیشرفت های قابل ملاحظه ای در استقرار استانداردهای TEMPs صورت گرفته است.

-استاندارد سازی توسط STANDARDIZATION THROUGH THE ASTM

ASTM خود را بصورت ذیل معرفی می کند.

ASTM بعد از تاسیس در سال ۱۸۹۸، به یکی از بزرگ ترین کاندیدهای سیستم های توسعه مند استاندارد در جهان تبدیل شد. ASTM یک سازمان غیر انتفاعی است که تبادل نظر تولید کنندگان، کاربران مصرف کنندگان نهایی و علاقه مندان (دولت و اساتید دانشگاه) را فراهم آورده و با برگذاری جلسات در موضوعات مختلف مبادرت به نوشتن استانداردها برای مواد، محصولات، سیستم ها و سرویس ها می کند. ASTM با داشتن

۱۳۰ کمیته نویسنده استاندارد هر سال بیشتر از ۱۰۷۰۰ استاندارد را منتشر می کند. این استانداردها و دیگر اطلاعات فنی مربوط در سرتاسر جهان بکار برده می شوند.

از نظر تاریخی، کمیته FO4 مسئولیت توسعه استانداردهای تجهیزات پزشکی را بر عهده گرفته است. نمونه های ذیل چندین موضوع از هزاران عنوان مطرح شده در FO4 هستند که تنها به این موارد محدود نمی شوند: ۱- خصوصیات فلزهای بکار رفته در کاشتنی های جرامی ۲- روش های آزمون خمش استاتیک صفحات فلزی استخوان ۳- خصوصیات سیمان اکریلیک استخوان ۴- روش های تحلیل فلزات بازیافتی کاشتنی های شکسته بندی ۵-ضوابط مربوط به پلاستیک های اپوکسی گرما سخت قابل کاشت ۶- طبقه بندی الاستومرهای سیلیکونی بکار رفته در کاربردهای پزشکی و ۷-واژه نامه تخصصی مربوط به بیومواد پلیمری بکار رفته در تجهیزات جراحی و پزشکی. بر اساس تجربیات گسترده تجهیزات پزشکی و با توجه به پلیمرهای تخریب پذیر خاص (برای مثال، پلی لاکتیک اسید) تحت مطالعه PO4 که بصورت کاشتنی مهندسی بافت قابل استفاده هستند، روند توسعه استانداردها برای TEMPS تحت مدیریت کمیته تجهیزات پزشکی قرار گرفت. از آنجا که حرکت ASTM غیر انتفاعی بوده و FDA یا هر سازنده دیگر را در استانداردهای خود مرتبط نمی سازد اما، باید توجه داشت که FDA در روند ارزیابی درمان های تحقیقاتی خود به طور مکرر به استانداردهای ASTM رجوع می کند. اطمینان FDA از آنجا ناشی می‌شود که توسعه استانداردها توسط ASTM بصورت اتفاق نظر همگانی بین اساتید دانشگاه. صاحبان صنایع و دولت است. شرکت مستقیم FDA در روند ASTM حاکی از اهمیت اتفاق نظر در استانداردهای TEMPS است. انتظار می رود که سرمایه گذاری شرکت کنندگان علاقمند منجر به

آماده شدن تعداد زیادی از درمان های جدید در زمان کوتاه و هزینه کم شود. بنـابر ایـن مهندسان بافت که قصد دارند از تکنولوژی های بالینی جدیـد اسـتفاده کننـد از شـرکت کردن در جلسات ASTM در مورد TEMPs و آگاه شدن از آن سود خواهند برد.

-ساختار سازمانی بخش III کمیته PO4 ربای

ORGANIZATIONAL STRUCTURE OF COMMITTEE FO4

SIVISION IV FOR TEMPs

گفتگو در مورد مراحل ابتدایی بخش IV ، FO4 منجر به شناسایی دو مبحث بـزرگ در توسعه استانداردها می‌شود. ترکیبـات و عملکـرد. همچنـین مشـاهده می‌شـود کـه ایـن استانداردها جهت تایید باید با مـواد مرجـع مناسـب مقایسـه شـوند. بـرای بررسـی ایـن موضوعات پیچیده ده زیر کمیته (شکل ۱-۱) مستقر شدند. این زیر کمیتـه هـا بـه سـه گروه سازماندهی می شوند: طراحـی اجـزاء، ارزیـابی و شـرایط معمـولی TEMPs. زیـر مجموعه طراحی اجزاء زیر کمیته هایی برای بیو مواد مهندسی بافت سلول ها، بیومولکول ها و سیستم های رهایش هستند. زیر مجموعه ارزیابی را زیر کمیتـه هـای ارزیـابی (بـه عبارت دیگر پیش بالینی) و آزمون های بالینی تشکیل می دهند. شرایط معمـولی کلیـه TEMPS شامل زیر کمیته های عملکرد بیولوژیکی طبیعی، تشـریح بافـت، واژه نامـه و ایمنی میکروبی و عامل غیر موروئی است. علاوه براین، ۴۱ گـروه کـاری تحـت ایـن زیـر کمیته ها فعالیت می کنند که مسئول توسعه اسـتانداردهای موجـود در حیطـه مربوطـه هستند. در طول فرآیند سازمانی مشاهده شد که سه زیر کمیته (بیومواد مهندسی بافت، عملکرد بیولوژیکی طبیعـی و ارزیـابی) اسـتانداردها را در گروههـای اجرایـی بـرای یـک سیستم بافت یا اندام مشابه توسعه می دهند. با پذیرش این موضوع که تقریباً هر بافت یا

اندام در بدن انسان قابل مهندسی کردن است، گروههای اجرایی در زمینه بافت با هم یکی شده و ۱۰ موضوع ذیل را پوشش می دهند: قلبی عروقی، گوارشی، غدد درون ریز، خون سازی، پوشش بدن، ماهیچه اسکلتی، حسی عصبی، تنفسی، تولید مثل و ادراری. این ساختار سازمانی بخش IV کمیته FO4، ASTM یک چهار چوب جامع برای توسعه استانداردهای TEMPS فراهم می کند.

-روند توسعه استانداردها PROCESS FOR STANDARDS DEVELOPMENT

اگر چه مهندسی بافت بصورت یک رشته تحصیلی نوظهور شناخته می‌شود اما روند توسعه استاندارد ASTM بخوبی پایه گذاری شده است.زیر کمیته ها مسئول تعریف حوزه فعالیت خود که شامل توسعه استانداردها درون حیطه موضوعی شان است می باشند.

هیچنین گروههای اجرایی موظف به تهیه پیش نویس استانداردهای مربوط به عناوین ویژه حیطه موضوعی شان هستند. معمولاً این عناوین ویژه شامل واژه نامه، مواد و روش های تحلیل تجهیزات پزشکی، یا اجزاء دستگاههایی را که برای بازاریابی تایید شده و یا تحت بررسی هستند، می‌شود.

پیش نویس های استانداردهای TEMPs می توانند شامل طبقه بندی سطوح خطر TEMPs مطابق الگوریتمی که بر اساس اجزاء محصول، محل فعالیت، هدف درمانی، مدهای اصلی عمل برای دستیابی به اثر درمانی، مدت زمان درمان و عمر TEMP، به هر TEMP یک عنوان عددی – حرفی را نسبت می دهد باشد. پیش نویس استانداردها برای بازنگری ازگروه اجرایی به زیر کمیته ارائه شده و متعاقباً برای رای گیری اعضاء به کمیته اجرایی بخش IV ارجاع می‌شود. در طول مدت رای گیری، اعضا فرصت اظهار نظر دارند. کلیه نظرات اعضای ASTM لحاظ شده و با موافقت اکثریت مورد بررسی قرار می گیرد. سپس استاندارد برای پذیرش رای گیری می‌شود. بعد از اینکه استانداردها توسط گروههای اجرایی خاص بسط داده شده و مورد پذیرش قرار گرفت، گروههای اجرایی منحل می شوند تا زمانی که بازنگری دوباره استاندارد مورد نیاز باشد زیر کمیته ها تا زمانی که بخش یا کمیته تشخیص دهد باقی می مانند.

جزئیات جریان ASTM برای توسعه استانداردها در وب سایت اینترنتی ذیل موجود است، (http://www.astm.org)

- رابطه با FDA RELATIONSHIP WITH FDA

همانطور که قبلاً اشاره شد، اهمیت استانداردهایASTM برای FDA با شرکت مستقیم نماینده فدرال در سازمان مجمع فنی و جریان امور مورد تاکید قرار می گیرد. درک و احاطه استانداردهای ASTM مورد قبول FDA برای تعیین ایمنی و اثر گذاری، احتمال مراجعه FDA به استانداردهای ASTMرا در ارزیابی درمان های تحقیقاتی افزایش می دهد. البته، در زمان نبود استانداردهای واقعی برای مهندسی بافت، اهمیت استانداردهای ASTM افزایش می یابد زیرا FDA اساساً یک سازمان استاندارد نیست. اگر چه FDA توسط استانداردهای ASTM محاصره نشده است اما توسعه این اسناد با روند همگانی فعلی ممکن است FDA را از حالت استقلال خارج کرده تا استانداردهای مورد تایید در مجمع را توسعه دهد. تا زمانی که ASTM موضوعات مورد توجه FDA را مورد ملاحظه قرار می دهد، کل روال ASTM شرایط FDA را بر آورده می سازد. شرکت FDA در ASTM می تواند بیشترین اثرات قانونمند را بر ASTM داشته باشد. از طرف دیگر هوشیاری دیگر رقیبان شرکت کننده در ASTM از منحرف شدن مسیر توسعه استانداردها توسط FDA جلوگیری می کند. با در نظر گرفتن اهداف متقابل در مهندسی بافت و همکاری در جهت نیل به این اهداف،ASTM و FDA در حال بوجود آوردن یک ارتباط سازنده هستند که در آینده منجر به شکل گیری بیشترین تعداد درمان های پیشرفته مهندسی بافت در جهت فراهم سازی بزرگ ترین منفعت پزشکی یعنی کم کردن خطر برای بیماران می‌شود.

-هماهنگی بین المللی INTERNATIONAL HARMONIZATION

بحث فعلی موضوعات قانون مند مربوط به مهندسی بافت در ایالت متحده درامور ملاحظه قرار داده است. در صورتیکه، مهندسی بافت یک زمینه پژوهشی جهانی است که

باید اصول ایمنی و تاثیرپذیری را بدون توجه به مکان در نظر بگیرد. تقریباً اکثر مـواردی که تاکنون شرح داده شد (وضعیت مساعد اهـدا کننـده، انتقـال بیمـاری، تعیـین خطـر) توسط سازمان بین المللی استانداردها (ISO) مورد توجه قـرار گرفتـه اسـت. بنـابر ایـن برای ارتقاء سطح دسترسی بین المللی درمان های جدید، استانداردهای توسعه یافتـه در ایالت متحده باید با استانداردهای متداول ISO هم خوانی داشـته و بـر عکـس(۴۵، ۳۴، ۲۹) البته باید توجه داشت که استانداردهای ISO و US بخاطر فاکتورهای اقلیمی بطور مثال مشاهده بیماری جنون گاوی (BSE) در اروپا که در ایالت متحده دیده نشده است دارای تفاوت هایی نیز هستند. با این همـه، همـاهنگی بـین المللـی اسـتانداردها سـبب پیشرفت مهندسی به عنوان یک زمینه پژوهشی و صنعتی درجهان می‌شود.

-مسئولیت‌ها، آئین‌ها و چشمداشت ها در آینده

FUTURE PROSPECTS, ETHICS, AND RESPONSIBILITY

با وجود اینکه، اکثر تازه واردانی که با کاربردهای درمانی مهندسی بافت آشنا مـی شـوند بطور مطلوب تحت تاثیر قرار می‌گیرند امـا بافـت هـای مهندسـی عمومـا در مقایسـه بـا بافت‌های سالم مربوطه از نظر آناتومی و فیزیولوژی به صورت ناقص باقی می مانند. علاوه بر این ساخت اندام های کاملاً عملیاتی هنوز بصورت یک آرزوی تحقق نیافته باقی مانـده است. با این حال، اصول صحیح بافت سازی و اندام سازی برای محققان آینده پایه ریـزی شده است. همچنین توان فوق العاده مهندسی بافت امکان تصحیح آگاهانه بافـت هـا بـه منظور توسعه عملکرد بیولوژیکی را فراهم ساخته است. علارغم این پتانسیل خود جـوش مهندسی بافت، افزایش عملکرد طبیعی همچنین سبب بالا رفتن وحشـت از ایجـاد نـژاد انسانی دیگر می‌شود.با وجود اینکه بافـت هـای نظیـر ایـن بـر طبـق اصـول و مقـررات و

باورهای اخلاقی تحت بررسی قرار می گیرند اما کنگره ایالـت متحـده در حـال بـازنگری قوانینی است که تعیین می کنند آیا بودجه فدرال ایالت متحـده صـرف تحقیـق بـر روی بافت های جنینی یا سلول های ساقه جنین برای فرا کاشت در بشر میشـود یـا نـه. اگـر قوانین فراکاشت بافت تصویب شوند لزوم اجرای آنها بـه یکـی از مسـئولیت هـای FDA تبدیل خواهد شد. در چنین مباحثی، نقش FDA فراتر از اصول ایمنـی و تـاثیر گـذاری خواهد بود. در نتیجه این وظیفه طرفداران مهندسی بافت است که از محیط قانون مندی که در آن کار می کنند آگاه بوده و در مقدمه معرفـی تعهـدات مهندسـی بافـت شـرکت کنند. برای درک بیشترین تعداد بهره های پزشکی مهندسی بافت، باید روال کشف دانش ساخت کاشتنی ها در آزمایشگاه با شرکت در روال تنظیم سازی و پایه ریزی استانداردها جهت تسهیل ارزیابی ترکیبات و اجرا همراه شود.

# گزینش و جداسازی سلول

# CELL ISOLATION AND SELECTION

ساروین کارمیول

## پیشگفتار

این فصل دو مقوله: گزینش (Selection) و جداسازی(Isolation) سلول را در بر میگیرد. تقسیم بندی فوق از نظر اولویت صورت گرفته است. برای کسب بهینه ترین نتیجه، بهتر است که ایزولاسیون و گزینش به طور همزمان صورت گیرد. بغیر از سلول‌های سیستم خون سازی و بافت‌های جنینی خاص سلول‌های معمولی دیگر ذاتاً به ماتریس‌های خارج سلولی مرتبط می شوند. شیوه‌های متفاوت پاره کردن (گسیختن) ماتریس‌ها نه تنها بر کارائی گوراش آنزیمی بلکه بر جمعیت سلولی تأثیر می گذارد. همچنین سیستم کشت سلولی که شامل ماده بازال (بنیادی) و مکمل‌ها است نه تنها با فراهم کردن مواد غذایی و شرایط مناسب بر بقای سول‌ها تأثیر می گذارد بلکه می تواند یک پتانسیل گزینشی قابل ملاحظه را در ترجیح یک نوع سلول بر دیگری اعمال کند.

نوشته‌های فراوانی درمورد موضوعات این فصل وجود دارد. ایزولاسیون و پاک سازی سلول‌ها یک فرایند پیچیده است و یکی از اهداف این فصل کمک به آسان نمودن این پیچیدگی است. برای کسب اطلاعات مفصل در مورد جنبه‌های گوناگون کشت سلولی لطفاً به نوشته‌های فرشنی اشتودزینسکی و مسترز مراجعه کنید.

## - ایزولاسیون سلول CELL ISOLATION

تحقیقات به خوبی نشان می دهد که انواع سلول‌های مشابه مانند سلول‌های فیبروبلاست، اندوتلیال یا پری ادیپوسایت‌ها در محل‌های آناتومی مختلف دارای مشخصه‌های متفاوت هستند. اما این موضوع که چگونه سلولهای آناتومی یک محل نیز مشخصه‌های متفاوت از خود نشان می دهند هنوز به خوبی شناخته شده نیست. ناهمگنی سلولی (هیتروژنیتی) در اثر خصوصیات ویژه آنها رخ می دهد. این خصوصیات می تواند یکی از پارامترهای عملیاتی جمعیت سلولی باشد. پدیده فوق با این تصور که خصیصه‌ها لزوماً در داخل جمعیت سلولی دارای توزیع همگن (هموژن) نیستند قابل توجیه است. فیبروبلاست‌ها جمعیتی هستند که در داخل محل آناتومی از خود خصوصیات فنوتیپیکی متفاوت نشان می دهند، مطالعات فرایز و همکارانش همچنین لکیک و همکارانش را بر روی موش، ریه انسان، لثه (پیرادندانی) و هتروژنیتی (ناهمگن) فیبروبلاست لثوی ملاحظه کنید. همچنین مشاهده شده است که فیبروبلاست‌ها عکس العمل‌های متفاوتی به تحریکات کلاژن‌های آزاد شده توسط تومور یا سلول‌های قلیا خواه (mast cells) نشان می دهند. علاوه بر این فنوتیپ‌های مختلف سلول‌های اندوتلیال عروق کوچک در کورپوس لوتئوم (جسم زرد گاو) (bovine corpus luteum) با در نظر گرفتن اکتین، سایتوکراتین و ویمنتین حساس به گاما، اینترفرون ( IFN-$\gamma$) نشان دهنده هتروژینتی است. منطقی است اگر کل جمعیت سلولها را با توجه به خصیصه‌هایشان در هتروژنیتی (ناهمگن) دخیل بدانیم. هدف سنتی از انجام کشت سلول‌های اولیه تهیه مقدار کافی از سلول‌های قابل رشد واجد شرایط می باشد که تضمین کننده شباهت توزیع نهایی سلول‌ها با توزیع

یافته شده در بافت اصلی است. استفاده از کشت سلولی بـه عنـوان مـدلی بـرای شـرایط داخلی بدنی (in vivo) تا حد.ود زیادی به الزامات زیر نیازمنـد اسـت. چنـدین فـاکتور مـؤثر بـر نتیجـه عبارتنـد از: محـل آنـاتومی، پـاتولوژی (آسـیب شناسـی)، نرمالسـی (normalsy) یا درجه ایسکمی (کم خونی) میزان فراوانی بافـت بـه کـار رفتـه بـر ایـن فاکتورها تأثیر می گذارد. طبیعت متنوع معماری بافت به روش‌های مختلفی برای توزیـع سلول نیازمند است. برای مثال استخوان، مغز، ماهیچه‌های اسکلتی کبـد و طحـال دارای پیوندهای ماتریس سلول- سلول و سلول- برون سلولی هستند. نتیجه ایـن شـرایط ایـن است که هیچ قراردادی همه انواع بافت را پوشش نمی دهد. در مورد نحوه ایجـاد کشـت اولیه و تجزیه بافت مطالب چندی منتشر شـده اسـت کـه تـلاش در بهینـه سـازی ایـن موضوعات برای سلول نتیجه بخش خواهد بود.

-توضیح

استراتژی‌های مختلفی برای ایزولاسیون سلول‌های موجود در بافت‌های سخت وجود دارد از جمله: روشهای برون کاشت (explantation) آنزیمی، مکانیکی و تجزیـه شـیمیایی، (chemical disaggregation) تزریقـی (perfusion) یـا ترکیبـی از آنهـا. یکـی از جدید ترین شیوه‌ها در جداسازی سلول و تکثیر سلول‌ها در داخل آزمایشگاه (in vitro) برون کاشت قطعه‌های بافت است. در این روش تا زمانی که انتشار مـواد غـذایی و گازهـا محدود نشود بافت به قطعات بسیار کوچک خرد میشود. این عمـل بـا بریـدن و کوچـک سازی بافت مورد نظر تا اندازه ای مناسب صورت می گیرد. سپس قطعات باف در ظـروف کشت بافت که با سرم جنینـی گـاو (fetal bovine serum) یـا مـاتریس‌هـای دیگـر

پوشیده شده است قرار داده می شود. ترکیب ماده و پوشش سطح همان طور که در ایزولاسیون انواع سلول از گلومرول‌ها (glomerulus) نشان داده شده است، می تواند اثر قابل توجهی بر نوع سلول نهایی تولید شده داشته باشد. همچنین می توان قطعات بافت را برای تثبیت اتصال در زیر پوشش قرار داد زیرا تماس مستقیم با سطح کشت بافت برای کشت موفق برون کاشتنی (explant) ضروری است.

عموماً برای قرار دادن بافت در محیط کشت از دستگاههای مکانیکی استفاده شده و هیچ گونه آنزیمی اضافه نمی گردد. کشت اولیه توسط روش برون کاشت نسبت به دیگر روشها زمان بیشتری را طلب می‌کند، اما روش برون کاشت به خاطر استفاده از خاصیت حساسیت پتانسیلی سلول مورد نظر به ترکیب آنزیم دارای مزایای بیشتری است. اگر آنزیم قابل ارائه در محیط باشد می توان بافت را با غلظت آنزیمی بهینه برای مدت کوتاهی در دمای اتاق و یا برای مدت طولانی تری در دمای ۴ ˚c نگهداری کرد. در اینجا هدف، تجزیه بافت نیست بلکه سازگار کردن مناسب ماتریس برون سلولی جهت حرکت مؤثر سلول مورد نظر است.

دلیل انتخاب روش برون کاشت، حفظ سطح غشاء عملیاتی است. همچنین در مواردی که نمونه بافت موجود کوچک باشد روش جداسازی آنزیمی با مکانیکی بسیار مخرب بوده و سلول‌های فراوانی از دست می روند که ادامه کار را غیر ممکن می سازد. تأثیر آنزیم‌های پروتئولیتیک بر اجزا سطح سلول شناخته شده است، به طور مثال، ایموگلوبولین سطح (Ig) در اثر پروناز و کیموتریپسین به سرعت از لنفوسیت‌های B جدا شده ولی در اثر تریپسین و پاپائین این عمل کندتر انجام می شود و توسط کولاژن‌ها

اصلاً صورت نمی گیرد. همچنین تریپسین در مقایسه با کلاژن فسفولیپیدها و اسیدهای چرب رادیواکتیو بیشتری را از غشاء اندوتلیال سلول آزاد می‌کند.

کشت اولیه برون کاشتی به قابلیت حرکت نوع سلول مورد نظر بستگی دارد از معایب این روش بالاتر بودن پتانسیل رشد انواع سلول آلاینده نسبت به سلول مورد نظر و مشکل پیوستگی قطعات بافت است. از طرف دیگر اگر سلول مورد نظر پر تحرک ترین سلول باشد این روش می تواند تکنیک منتخب باشد.

یکی دیگر از موارد مورد توجه از بین رفتن مشخصه‌های فنوتیپیک سلول‌های به واسطه گوارش آنزیمی است. اگر سلول‌ها دقیقاً بعد از جداسازی مورد استفاده قرار گیرند، گوارش آنزیمی ضروری است. البته اگر هدف ایجاد یک جمعیت کشت سلولی آزمایشگاهی باشد شرایط اولیه سطح سلول از اهمیت کمتری برخوردار خواهد بود. ساختارهای غشائی با پارامتر تحمل وارونگی توصیف شده و برای یک جمعیت سالم سلولی می توان فرض کرد که ساختارهای سطح قابل ترمیم خواهند بود.

البته این وضعیت برای هر نوع سلولی معتبر است.

- مکانیکی MECHANICAL

روش‌های مکانیکی قطعه قطعه کردن بافت شامل روش گردابی، تکان دادن در شیکر چرخشی، پودر سازی با پیپت‌هایی با قطرهای متفاوت، عبور بافت از میان شبکه‌های نایلون و یا فولاد ضد زنگ و خرد کردن بافت با سوزن‌های نازک می شود. این فرایندها تعلیق سلول را زودتر از گوارش آنزیمی ایجاد می کنند، البته محدودیتهایی در این مورد

وجود دارد. این روش‌ها به طور کلی برای همه بافتها مؤثر نیستند. تشخیص نوع روش بستگی به مقدار نیروی اعمال شده به بافت داشته که این جنبه می تواند سبب آسیب شود. سلول‌ها به برش حساس بوده و آسیب جدی می بینند. برش سلولهای استوبلاست شکل MC3T3-E1 به دست آمده از جمجمه نوزاد موش سبب تغییر مورفولوژی (شکل) و کاهش تدریجی کلسیم بین سلولی باقی مانده گردید. همچنین رشد سلول‌های اندوتلیال به واسطه تنش برشی تیغه ای متوقف شد. ادامه این بحث در صفحات بعد آمده است. البته در مورد برخی از بافت‌های نرم از جمله طحال، تیموس، گره‌های لنفی کبد جنینی و تومورهای نرم و احتمالاً مغز می توان تجزیه مکانیکی را بدون آسیب سلولی اجرا کرد.

روش‌های مکانیکی در پاسخ به اثرات بالقوه زیان آور آنزیم‌ها درطول گوارش توسعه پیدا کردند. هنگامی که شرایط ایزولاسیون مناسب برای وسایل مکانیکی مهیا باشد این روش بر روش گوارش آنزیمی بخصوص بازسازی سلولی ارجعیت دارد. تحت این شرایط کاهش معرف‌هایی مانند آنزیم‌ها وجود منابع، تأثیرات و هر گونه مطلب قانون مند دیگر را غیر ضروری می سازد. البته زمانی که روش‌های مکانیکی با گوارش آنزیم همراه شود مؤثر تر خواهد بود. لایه لایه کردن بافت با چاقوی جراحی برای کم کردن اندازه بافت و در نتیجه افزایش سطح منجر به ایزولاسیون مؤثر تر می گردد.

-گوارش آنزیم ENZYME DIGESTION

نوع آنزیم به کار رفته بر نتیجه گوارش تحت عناوین بازده، راندمان محصول، قابلیت رشد و سمیت تأثیر می گذارد. ایزولاسیون سلول‌ها از تومورهای سخت با استفاده از تجزیه

آنزیمی یا مکانیکی منجر به فراوانی‌های متفاوت می شود. در بافت ایزوله شـده بـه روش آنزیمی، زیر جمعیت آنوپولید (aneuploid subpopulation) در مقایسه با بافـت بـه دست آمـده از تجزیـه مکـانیکی نمایـان تـر اسـت. کـه بیـانگر آسـیب پـذیری متفـاوت جمعیت‌های مختلف سلول‌های بافت در برابر ترکیبات آنزیمی است. همچنین درمطالعات انجام شده بر فرایند جداسازی هپاتوسایت موش در هنگام استفاده از EDTA بـه جـای کولاژن محتویات سایتوکروم P ۴۵۰ قابل شناسائی به روش طیفی و مدت دار و حفـظ و نگهداری سیستم اکسید از با کار کرد ترکیبی بـه دسـت آمـد. در مـورد ایـن مشـاهدات استثناهائی نیز وجود دارد: مطالعات نشان می دهد که سلول‌های توموری را می تـوان بـا استفاده از گـوارش آنـزیم بسـیار مـؤثر تـر از روش‌هـای مکـانیکی جـدا کـرد . و اینکـه کلاژن‌های ایزولـه شـده پیـگ هپـاتو سـایت‌هـا خیلـی بیشـتر از EDTA ایزولـه شـده هپاتوسایت‌ها زنده می مانند. یک تفسیر در مورد این نتایج متنوع بـر مبنـای حساسـیت نسبی سلول‌ها نسـبت بـه آنـزیم‌هـا و تجزیـه مکـانیکی اسـتوار اسـت. تـأثیر بسـیاری از متغیرهای غیر قابل کنترل نیز (به طور مثال شرایط بافت) بر این مشـاهدات اضـافه مـی شود.

هپاتو سایت‌های ایزوله شده مـوش بـالغ بـه وسـیله تزریـق تریپسـین و کـلاژن نشـانگر خصوصیات متفاوت بود: هپاتو سایت‌های کلاژنی دارای بازده چسبندگی دو برابـر بـوده و مدت طولانی تری در محیط کشت باقی می ماندند، همچنـین تولیـد آلبـومین بیشـتری داشته و فعالیت تیروسین آمینو ترانسفراز در آنها در مقایسه با هپاتو سایت‌های جدا شده توسط تریپسین بیشتر است. در جداسازی پروسین از جزایر لوزالمعده توسط گـوارش بـا کلاژن، جزایر بزرگ به فعالیتهای پائین تریپتیک و نتایج جداسـازی ضـعیف بـه فعالیـت

بالای تریپتیک مرتبط می شود. باز داشتن تریپسین توسط پفابلوک (Pefabloc) منجر به بهبود تکثیر جداسازی در جزایر لوزالمعده می شود. نکته جالب در مورد ایزولاسیون توسط گوراش با آنزیم خارجی نقشی است که ترشح داخلی آنزیم‌های پروتئولیتیک به واسطه فرایند گوارش ایفا می کند که این ترشح خاص بافت است. بافت‌های به دست آمده از اهدا کنندگان مختلف نسبت به گوارش آنزیم عکس العمل‌های متفاوتی نشان می دهد. از آن جا که لوزالمعده محل سنتز تریپسین است باید به جداسازی سلول‌های جزایر لوزالعمده توجه داشت تا امکان ایجاد فراگوارش وجود نداشته باشد.

امروزه می دانیم که تریپسین می تواند به غشاء سطح آسیب وارد کند، اما ظاهراً نقش ذاتی تریپسین نیز در این مورد دخالت دارد. مطالعه دمایی تریپسین در طول یک مسیر متوالی نشان داد که دماهای زیر ۱۵ ˚c زیست پذیری (viability) و تکثیر را افزایش می دهد این وضعیت با تأثیر دما بر پدیده‌های ذاتی دیگر غشاء سازگاری می دارد. اگر مشکل اصلی زیست پذیری باشد، استفاده از دمای پائین تر در طول گوارش پیشنهاد می شود.

برای گوارش بافت، اغلب کلاژنهای تجاری به دست آمده از کلستریدیوم هیستولیتیکم مورد استفاده قرار می گیرند. تغییرات درجه ناخالصی بازدهی و سمیت توصیف کننده ترکیبات خام هستند ترکیبات خام تعریف نشده هستند و از کلاژنازهای مختلف، پروتئازها، فسفولیپازها و باکتریهای همراه با محصول مانند اندوتاکسین تشکیل می شوند. با توجه به نبود یک تعریف مشخص برای ترکیبات کلاژن‌ها، وجود تفاوت‌های قابل

ملاحظه بین محصولات فروشندگان مختلف و حتی یک فروشنده ثابت دور از ذهن نیست. تلاش برای تصفیه ترکیبات کلاژناز خام توسط بازده گوارش بافت احیا شده توصیف شده و نشان دهنده حضور پروتئازهای تصفیه شده که یک استراتژی مؤثر است، جهت تأئید عدم وجود اثرات زیانبخش باید دقت لازم به عمل آید. استفاده از سیستم‌های آنزیمی مشخص با افزایش تعداد محصولات درمان سلولی اهمیت بیشتری پیدا می‌کند. سازمان‌های قانونمند برای نیل به اهداف خود نیازمند شرح کامل اجزاء معرف‌های به کار رفته در ترکیبات محصولات هستند. وجود اجزاء نامشخص مانند ترکیبات آنزیم سبب ایجاد رقابت شدید میگردد.

-تروما TRAUMA

بافت‌های بیرون آورده شده دچار ایسکمی می شوند. مدل‌های ایسکمی بازتزریقی (Ischemia-reperfusion models) توسط واکنش‌های انفجار گونه اکسیژن (ROS) توصیف می شوند. البته در اثر تولید سوپر اکسید و پراکسیداسیون لیپید در نبود باز تزریق نیز امکان صدمه دیدن وجود دارد یک اظهار نظر ظاهراً درست بیان می‌کند که در طول ایسکمی میزان $O_2$ کافی برای حفظ محصول سوپر اکسید وجود دارد. این گفته به نظر صحیح می رسد زیرا به کار گیری دیسموتاز سوپر اکسید (SOD) سیگنال ROS را تضعیف می‌کند. اگر SOD به عنوان ضد اکسید کننده اضافه شود باید کاتالاز نیز اضافه گردد زیرا محصول دیسموتاسیون سوپراکسید پراکسید هیدورژن است که به تنهایی قابلیت آسیب رسانی دارد. همچنین رادیکالهای آزاد تحت شرایط هیپوکسی در سلول‌های ماهیچه ای نرم شریان ریوی موش نشان داده شدند.

به کار گیری ضد اکسیده کننده‌هایی مانند ویتامین E ، ان- استیل- ال- سایستاین یا دی فنیلین یدوئیم نشان دهنده کاهش سطوح ROS و مرگ سلوهای بعدی است. همچنین بازدارنده‌های پروتئاز مانند $\alpha_2$ ماکروگلوبولین و ضد اکسید کننده‌های ان- استیلن- ال سایستاین تعداد سلول‌های آزمایشگاهی ژرم (germ cells) نخستین خوک را افزایش می دهد. طولانی شدن و قرار گیری در معرض ROS منجر به مرگ بافت یا اپوپتوزیس می گردد. قرار گرفتن در معرض شدت بالا به مدت طولانی می تواند به مکانیزم اپوپتوتیک آسیب وارد کرده و مستقیماً منجر به مرگ بافت شود. فاکتورهای رشد مانند فاکتور سلول استم(ساقه) و فاکتور باز دارنده سرطان خون (لوسمی) می تواند جلوی اپوپتوزیس را گرفته و سبب بقای سلول ژرم نخستین جنین موش شود.

هنگامی که سلول‌های چسبنده از هم باز می شوند حالت اپوپتوزیس یا به اصطلاح آنویکیس را می گیرند. ROS نیز با تأثیر گالکتین-۳ بر آپوپتوزیس در این شکل گیری سهیم است . افزودن اسید بانگکرکیک که یک بازدارنده انتقال نفوذپذیری میتوکندری است به طور قابل ملاحظه ای آنویکسیس استئوکلاست‌ها را همانند حضور z -VAD-FMK که یک بازدارنده کاسپیس است کاهش می دهد در ایزولاسیون سلول جزایر پانکراس ترکیبات (محتویات) مرتبط با ماتریس خارج سلولی برای مدت طولانی تری در محیط کشت زنده باقی مانده و در آزمون ترشح انسولین بهتر عمل می کنند همچنین سلول‌های جنینی پانکراس با ملاحظه و رعایت موارد آپوپتوتیک و تغذیه ای از مرگ ایمن بوده وان- استیل- ال- سایستاین از اپتوزیس در سلول‌های جرم انسانی در محیط آزمایشگاه جلوگیری می کنند. ایزوله کردن برخی از انواع سلول‌ها مشکل است. فاکتورهای زیادی در موفق بودن ایزولاسیون سلول و استقرار بعدی سیستم کاشت

سلول دخیل هستند. ملاحظه ترومای سلول در بهتر شدن نتیجه نهایی تفکیک سلولی کمک می‌کند.

-سنجش زیست پذیری (بقاسنجی) MEASUREMENT OF VIABILITY

تغییر پذیری ذاتی عکس العمل‌های بافت به وضعیت‌های گوناگون کشت سلولی نیاز به وسیله ای برای ارزیابی زیست پذیری سلول‌های حاصل از این شرایط را دارد. سنجش زیست پذیری در بهینه سازی روش‌های کشت اولیه نسبتاً راحت است. بهترین راه برای ارزیابی زیست پذیری سلول استفاده از روش‌هایی است که اثر تروما را مورد ملاحظه قرار می دهد. به طور کلی کاهش استحکام (یکپارچگی) غشاء سلول در آخرین مراحل تروما اتفاق می افتد که این امر منجر به تخمین بیش از اندازه زیست پذیری سلو می گردد. برای مثال شروع و پیشرفت اپوپتوسیس (opoptosis) بدون ایجاد اختلال در غشاء سلول رخ می دهد. با وجود ترکیب دوباره فسفولیپیدها معمولاً فسفا تیدیل سرین با ورقه داخلی غشاء دولایه پلاسما مرتبط شده و در طول اپوپتوسیس به قسمت بیرونی منتقل می شود. آرایش نهایی سلول که آشکار شدن آن ممکن است مدت‌ها طول بکشد تا حد زیادی به وقایع زیان آوری که عامل آغاز آپوپتوسیس است بستگی دارد. از طرف دیگر آسیب ممکن است چنان شدید باشد که یکپارچگی سلول در چندین دقیقه لطمه ببیند، بنابراین ارزیابی یکپارچگی سلول می تواند مفید باشد.

آزمون‌های زیست پذیری مختلفی برای اندازه گیری یکپارچگی غشاء وجود دارد. یکی از متداولترین روش‌ها، ممانعت آبی تریپان نام دارد که بر مبنای ویژگی ممانعت سلول‌های زنده و رنگی شدن آنها و نفوذپذیری سلول‌های غیر زنده و رنگی شدن آنها استوار است.

ایـــن آزمـــون شـــامل نگهـــداری سوسپانســـیون ســـلول بـــرای مـــدت کوتـــاهی (<۵ min) است. دلیل کوتاه بودن این زمان آسیب دیدن سلول‌های زنده و جذب رنـگ توسط آنهاست.

یک نمونه از سنجش مستقیم جذب رنگ توسط سلول‌هـای زنـده در ذیـل آمـده اسـت. سلول‌های زنده رنگ غیر فلورسنت دی استیل فلورسئین را میگیرند، سپس درون سـلول استیل مویتیز آزاد شده و فلورسئین تولید می گردد که فلورسـنت بـوده و غشـاء سـلول نسبت به آن ناتراوا است. در طول موج‌های گسیلی با تحریک مناسب سـلول‌هـای زنـده، رنگ فلورسان سبز از خود ساطع می‌کنند. این خصوصیت را مـی تـوان هـم بـا محاسـبه بصری توسط میکروسکوپ فلورسان و هم توسط تفکیک سلولی اندازه گیری کـرد. سـرم می تواند دی استیل فلورسئین را هیدرولیز کند، بنابراین آزمون‌های به اصطلاح طـولانی مدت در صورتی که سرم جزئی از ماده باشـد توصـیه نمـی شـود. همچنـین فلورسـانس فلورسئین بستگی به PH داشته و نیازمند بافرهای (تثبیت کننده‌های) غیـر بیوکربنـاتی است. این عامل عمدتاً در آزمون بقا سنجی از دخول محیط کشت سلولی جلوگیری مـی کنند مگر اینکه توسط بافرهای موثر غیر بیوکربناتی ماننـد HEPES یـا بافرهـای آلـی دیگر محافظت شوند.

حساسیت بهتـر بـا ترکیـب یدپروپیـدیم و دی اسـتیل فلورسـئین بـه دسـت مـی آیـد. یدیروپیدیم نسبت به سلول‌های زنده ناتراوا و نسبت به سلولهای غیـر زنـده تـراوا اسـت. تحت این شرایط سلول‌های زنده از خود نور سبز فلورسانت و سلول‌هـای غیـر زنـده نـور قرمز روشن (درخشان) ساطع می کنند. در مقایسه با روش تریپسین آبـی مشـخص مـی

شود که پایداری روش دی استیل فلورسئین- یدپروپیدیم در حضور رنگ‌ها در مدت زمان طولانی بیشتر است. وضعیت انرژی سلول با توجه به غلظت نوکلئوتید آدینیلیت یکی از نشانه‌های مهم زیست پذیری به شمار می رود. این رابطه به دلیل دخالت میتوکندری در آغاز اپوپتوزیس منطقی است. یکی از پارامترهای سطح انرژی سلول بار انرژی است این شاخص توسط نسبت ذیل معین می‌شود:

[ATP]+0.5[ADP]/[ATP]+ADP]+[AMP] مقدار این نسبت برای سلول‌های طبیعی در حدود ۰/۹ بوده و شروع کاهش از این مقدار نشانگر آغاز اتلاف زیست پذیری است. برای مثال اندوتلیال کشت شده و سلول‌های P388D1 پس از تحمل تنش اکسید کننده (اکسیدانت) افت بار انرژی از ۰/۹۵ تا ۰/۶۶ را در دقیقه اول نشان می دهند، در صورتی که در روش تریپان آبی تا قبل از ۳۰ دقیقه نخست پس از شروع تنش هیچ گونه تغییری مشاهده نمی شود.

-گزینش

SELECTION

گزینش بر اساس خاصیت‌های منحصر به فردی که یک سلول را از دیگری متمایز می‌کند مانند چگالی اندازه، نشانه‌های اختصاصی (مارکر) گذر راههای منحصر به فرد متابولیکی و احتیاجات غذایی صورت می پذیرد.

-چگالی و اندازه

DENSITY AND SIZE

در سانتریفوژ نرخ ته نشینی ذرات به نیروهـای اعمـال شـده چگـالی و وسـکوزیته مـایع بستگی دارد. بنابراین با یک نیرو و ویسکوزیته معین نرخ ته نشینی متناسب با اندازه ذره و اختلاف بین چگالی ذره و چگالی مایع خواهد بود. در نتیجه نرخ تـه نشـینی در زمـان 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 رفـتن ویسـکوزیته مـایع کاهش می یابد.

از آنجا که چگالی و ویسکوزیته مایع اثر قابل ملاحظه ای بر نرخ ته نشین ذرات دارد مواد و محلول های گرادیانی گوناگونی بر اسـاس ایـن خـواص توسـعه پیـدا کـرده انـد. مـواد کنتراست ترکیب شده با «ید» که در ابتدا برای مطالعات بالینی کنتراست اشعه x توسعه یافتند در ایزولاسیون سلولی نیز مفیـد واقـع شـدند. سـری‌هـای مختلفـی از ایـن مـواد کنتراست بر اساس ساختار یونی غیر یونی، منومری یا دیمری وجـود دارنـد. دامنـه ایـن مواد از متریزوات تا متریزامید گسترش یافته است. (که اولی از گونه غیـر یـونی اسـت) و نیکودنز که یک ماده با سمیت کمتر بوده و و برای ایزولاسیون نوتروفیـل‌هـا، پلاکـت‌هـا، سلول‌های استلیت (ستاره شکل) پری آسینار لوزالعمده یا سلول‌های کوپفر اسـتفاده مـی شود. فیکول که یک پلی سوکرز مصنوعی است به طور گسترده در ایزولاسیون گونه‌هـای سلولی مگا کـاریو سـیتها هپاتوسـیت‌هـا، سـلول‌هـای جزایـر لوزالعمـده، نوتروفیـل‌هـا و لنفوسیت‌ها به کار برده می شود. ترکیب دیاتریزوات سدیم (ماده کنتراست یونی-هیپاک) با فیکول یا ترکیب متریزوات سدیم با فیکول (لیمفوپرپ) عمدتاً در گـزینش سـلول‌هـای خونی به کار گرفته می شود. یک ماده گزینشی نسبتاً جدید، پرکول است کـه از کلوئیـد سیلیس پلی دیسپرس با پوشش پـولی ونیـل پیرلیـدن (PVP) تشـکیل شـده و کـاربرد

فراوانی پیدا کرده است. پوشش PVP سبب خنثی کردن نسبی سیلیس از نظر پایداری PH و استقامت یونی فیزیولوژیکی می شود. برای دیدن مباحث مربوط به انواع سلول‌هایی که توسط پکرول از خون و ارگانهای مختلف دیگر جدا شده اند به منابع مراجعه کنید. این مواد گزینش گر به عنوان نخستین گام در کاهش سلول سازی ترکیبات سلولی به نحوی که دیگر روش‌های خاص جدا سازی را نیز بتوان به خدمت گرفت استفاده میشوند.

این مواد گرادیانی اجازه تشکیل محلول‌هایی با چگالی مناسب برای باند کردن سلول‌ها طبق چگالی شناوری (buoyant) بدون اینکه سلول‌ها تحت هیچ گونه تنش اسمزی یا یونی قرار داشته باشند را می دهد. ماده گرادیانی قادر است که بر اساس چگالی یا اندازه سلول‌ها را تفکیک کند. برای گزینش بر مبنای چگالی ماده گرادیانی به نحوی ساخته می‌شود که حیطه چگالی آن کل محدوده چگالی سلول‌های موجود در ترکیب را در بر میگرد. این فرایند جهت اطمینان از این مسئله است که تحت نیروی سانتریفوژ اعمال شده، سلول‌ها به سطح تعادلی تحت عنوان سطح ایزوپیکنیک رسیده اند که در این سطح چگالی محیط میشوند. تحت این شرایط اندازه نقش مهمی را ایفا نمی‌کند.

چگالی یک سلول می تواند توسط خاصیت اسمزی محلول تحت تأثیر قرار بگیرد. در یک محیط‌هایپرتونیک (پرفشار) سلول کوچک شده و چگالی شناوری به واسطه حذف آب افزایش می یابد زیرا ماده‌هایپرتونیک سلول‌ها را متورم کرده و چگالی شناوری آنها را کاهش می دهد. میزان اسمزی یک ماده بخصوص در هنگام جداسازی ایزوپیکنیک باید

کنترل شود. مشخصه این مواد نشانگر توانایی آنها در رسیدن به کنترل غیر وابسته به چگالی و خاصیت اسمزی است.

جداسازی سلول‌ها بر اساس اندازه یا سرعت نیازمند این است که ماده گرادیانی کم چگال تر از سلول‌های موجود در ترکیبی باشد که باید جداسازی شود. تحت این شرایط گرادیانی سلول‌ها وضعیت ایزوپیکنیک نداشته و جداسازی بر اساس اندازه مشخص می شود به این صورت که سلول‌های بزرگ سریعتر از سلول‌های کوچک جابجا می شوند. این وضعیت قبل از رسیدن سلول‌ها به کف لوله متوقف می شود. جداسازی ایزوپیکنیک به سرعت سانتریفوژ بالاتری نسبت به جداسازی سرعتی نیاز دارد. اگر سلول مورد نظر به سرعت‌های بالا حساس باشد در جداسازی ایزوپیکنیک باید توجه کافی مبذول شود.

برای دستیابی به موادی با چگالی‌های مختلف از روشهای پیوسته یا ناپیوسته استفاده می شود. گرادیان‌های ناپیوسته، تغییرات ناگهانی و یا واسطه‌هایی را در طول لوله سانتریفوژ ایجاد می کنند. تغییر یک چگالی خاص در هنگامی که ماده جداساز به عنوان بالشتک عمل می‌کند می تواند عمل جداسازی سلول را انجام دهد مانند وضعیت لویکوسیت‌های تک هسته ای در زمان استفاده از گرادیان پکرول. همچنین می توان از یک سری تغییرات ناگهانی چگالی برای جداسازی اعصاب دوپا مینرژیک شکمی و سینه ای جنین موش و جداسازی اسپرم بارور X از اسپرم بارور Y استفاده کرد. گرادیان‌های چگالی ناپیوسته بدلیل جمع شدن سلول‌ها در حد فاصل‌ها می توانند سبب ایجاد عوامل خارجی ناخواسته (آرتیفکت) شده و شناخت سلول‌های با چگالی متفاوت وابسته به ناهمسانی چگالی در گرادیان‌های ناپیوسته را مشکل می سازند. گرادیان‌های پیوسته به وسیله

گرادیان سازها یا به صورت پکرول توسط گرادیان‌های خود ساز شکل میگرند. پکرول در اثر نیروی سانتریفوژ بیشتر از ۱۰۰۰۰g شروع به ته نشینی می‌کند. و از آنجائی که پکرول یک کلوئید چند طیفی (پلی دیسپرس) است ذرات با نرخ‌های متفاوت ته نشین می شوند که سبب ایجاد گرادیان نرم میشود. تحت این شرایط ممکن است سوسپانسیون سلول با پکلرول آمیخته شده و عمل سانتریفوژ در سرعت‌های بالا منجر به تولید گرادیانی شود که پس از آن، سلول‌ها بر اساس گرادیان شکل گرفته جدا می شوند. در این مورد دو نگرانی وجود دارد. اول اینکه نرخ بالای سانتریفوژ ممکن است به سلول‌ها آسیب برساند و دوم اینکه احتمال جذب پکرول توسط لیزوزوم‌ها وجود دارد البته پکرول جهت جداسازی انواع لیزوزومال‌های با چگالی‌های مختلفی در هپاتوسیتهای موش بدون تأثیر در چگالی لیزوزوم‌ها به کار برده می شود.

-نشانه‌های اختصاصی (مارکر)سلول UNIQUE CELL MARKERS

ساختمان سلول‌ها در بافت‌ها با توجه به عملکردشان در درون سلول ناهمگن است. این ساختارها نه تنها نشانگر عملکرد منحصر به فرد سلول‌هاست بلکه وسیله ای برای تشخیص آنها می باشد بخصوص اگر این ساختار در سطح سلول باشد. گزینش استثنائی پادتن‌های منوکلونال (تک تاگی) سبب ایجاد روش‌ها و تجهیزات مختلفی شده است که به منظور بهره برداری از این اختلافات به کار برده می شوند.

-دسته بندی سلول فلورسنت فعال شده (**FACS**)

Fluorescent- Activated Cell Sorting (FACS)

دسته بندی 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 پادتن‌های منوکلونال می باشد. عملکرد این دستگاه بر اساس قابلیت ایجاد جریانی از سلول‌های منفرد است که به طور انتخابی توسط صفحات منحرف کننده با بارهای مخالف قابل تغییر جهت هستند. در ابتدا ترکیبی از سلول‌ها با پادتن‌های مونوکلونال جفت شده با نشانه‌های فلوروسنتی نگهداری میشود، سپس سلول‌هایی که دارای اپیتوپ (epitope) مناسب هستند با پادتن‌های نشان دار باند می شوند. در این دستگاه ترکیب به صورت جریانی از سلول‌ها در می آیند که به وسیله مبدل لرزشی به قطره‌های کوچک شکسته می شود. سپس باریکه لیزر به سلول‌ها تابانده شده و پرتو حاصل توسط فوتومالتی پلیر (تشدید کننده نوری) دریافت می گردد و متعاقباً پردازش انجام می گیرد. سلول‌ها در خلال این پردازش به نحوی باردار می شوند که به خوبی توسط صفحات باردار منحرف کننده قابل انحراف باشند. از آنجا که دستگاه قادر به انتگرال گیری کلیه اطلاعات است پس از برخورد باریکه لیزر با سلول‌های مورد نظر، یک بار مختصر به صفحات منحرف کننده اعمال می شود که نتیجه آن انحراف سلول‌های نشان دار و از دست رفتن سلول‌های بدون نشان است به طور کلی عمل جداسازی در دستگاه FACS بر اساس هر گونه خصوصیت سلولی که توسط پراکندگی یا انتشار نور باشد انجام می‌گیرد. با توجه به پیچیدگی دستگاه، عمل دسته بندی می تواند بر روی بیشتر از یک

پارامتر انجام شود، از جمله، اندازه گیری شکل سلول اندازه سلول و انواع ویژگی‌هایی که توسط برچسب گذاری فلورسانس (نشانه گذاری فلورسانس) قابل بررسی هستند. شناسایی سلول‌ها در سیستم هماتوپوئیتیک (خون سازی) با استفاده از روش سلول سنجی روان انجام پذیرفته است. این سلول‌ها به خوبی قابل تشخیص بود و پادتن‌های مونو کلونال فراوانی در تضمین نتیجه بخش بودن آنها وجود دارد. این شناخت به همراه ایزولاسیون می تواند کاملاً مؤثر بوده و در نتیجه سلول‌های کم چگالی توسط این روش به خوبی تفکیکی می شوند.

-دسته بندی رشته ای ایمنی مغناطیسی و دسته بندی سلول مغناطیس فعال شده (**MACS**)

Immunomagnetic Bead Sorting and Magnetic Activated Cell Sorting (MACS)

روش دسته بندی رشته ای ایمنی مغناطیسی و دسته بندی سلول مغناطیسی فعال شده از پادتن‌های مونوکلونال و دیگر مولکول‌های گزینش شده با خاصیت مغناطیسی برای گزینش سلول سود می برد. به طور کلی، در این روش ترکیبی، آمیزش سلول با پادتن اصلی مونوکلونال برای اپیتوپ معینی نگهداری می شود. رشته‌های مغناطیسی با پادتن‌های ثانویه گوناگونی پوشیده شده و سلول‌ها و رشته‌ها با هم رشد می یابند. سلول‌های نشاندار ویژه با اتصال به ذرات مغناطیسی پادتن ثانویه را حمل می کنند. لوله ای که ترکیب فوق را حمل می‌کند در مقابل مغناطیس قرار داده می شود در نتیجه رشته‌های حامل سلول به سمت مغناطیس کشیده می شوند. سلول‌های غیر متصل به

رشته مغناطیسی را می توان به بیرون منتقل کرد، این فرایند را می توان چندین بار تکرار نمود تا سلول‌های غیر متصل به کلی خارج شوند.مثالی از این روش در مطالعات تصفیه سلول‌های $\beta$ از جزایر لانگرهانس موش آورده شده است. یک نمونه از گزینش غیر پادتنی که رشته مغناطیسی را مورد استفاده قرار می دهد در مطالعاتی که در آن سلول‌های اندوتلیال میکروشریانی از داخل جزایر لانگرهانس پاکسازی شد، آمده است. رشته‌های پوشیده شده با آلگولتینین-1 اولکس یوروپاوس (Ulex europaus) برای باند کردن سلول‌های اندوتلیال شریان‌های بسیار کوچک استفاده شدند. این ایزولاسیون نشان دهنده ویژگی منحصر به فرد سلول‌های اندوتلیال است که نظریه مبنی بر اهمیت محل آناتومی درحالت فنوتیپیک سلول‌های مشابه را تأئید می‌کند. گزینش می تواند مثبت یا منفی باشد: مثبت یعنی سلول مورد نظرنشان دار بوده و تحت تأثیر میدان مغناطیس قرار می گیرد و منفی یعنی آلاینده سلول غالب نشان دار بوده و باند شده است و سلول مورد نظر پاک گردیده است(منتقل گردیده است.)

مزیت گزینش منفی این است که سلول‌های مورد نظر به رشته‌های مغناطیسی پیچیده نشده ولی رشته‌های بزرگ ممکن است بر اتصالات بعدی روی سطوح کشت بافت تأثیر بگذارند. اگر نیاز به گزینش مثبت باشد پاکسازی رشته‌ها از سلول‌های مورد نظر صورت گرفته و این عمل با استفاده از ضدسرم ضد فب (anti-Fab) انجام می شود. رشته‌ها توسط گوارش آنزیمی پاک می شوند اما این کار ممکن است بر سلول تأثیر بگذارند. دو روش دیگری به نام گزینش سلول (CELLection) DNA کوتاه بین رشته ای و پادتن توسط دی (DNASE) از هم باز می شوند. در این روش رشته‌های داینا ( Dyna beads) از داینال (Dynal) مورد استفاده قرار می گیرند. طراحی دیگر رشته MACS

که توسط میلتنی بیوتک با مسئولیت محدود صورت گرفت این معایب را نـدارد اگـر چـه رشته‌های داینا از دیدی دیگر با توجه به داشتن توانایی در احیای سریع سلول یک مزیت به حساب می آیند. استفاده از رشته‌های میلتنی ۵۰ nm بـه یـک سـتون گـزینش نیـاز دارند. در قسمت نخست ستون سلولهایی قرار دارند که دارای نشـان‌هـای ویـژه هسـتند. باقیمانده ستون را تا زمانی که میدان مغناطیسی برقرار است، رشته مغناطیسـی تشـکیل می دهد. ستون فوق قابل شستشو بوده و در اثر شستشو سلول‌های غیر متصل بـه رشـته مغناطیسی خـارج مـی شـوند. بـه محـض برداشـتن میـدان مغناطیسـی از روی سـتون سلول‌های متصل به رشته شسته می شوند. مطالعات انجام شده بر روی رشته‌های داینا و سیستم ستون‌های میلتنی از میدان‌های نسبتاً مغناطیسی مرتبط با این ذرات بهـره مـی برند. در این دو مرحله گـزینش دو نـوع سـلول نشـانه دار سـطحی بـدون حـذف اولـین مجموعه از رشته‌های مغناطیسی به کار برده می شوند. در ابتدا گزینش مثبت با سیستم میلتنی رخ می دهد که توسط گزینش مثبت یا منفی رشته‌های داینـا دنبـال مـی شـود. توان مغناطیسی گزینش گر داینال قادر به جذب رشته‌های بزرگ تر داینا بوده اما توانائی جذب رشته‌های کوچک میلتنی را ندارد.

دستگاه FACS برای دسته بندی سلول پرهزینه است. بنابراین دسته بندی مغناطیسـی به عنوان روش ایزولاسیون و گردآوری سلول در هنگام استفاده از پادتن‌های مونوکلونـال برای جداسازی سلول‌ها ترجیح داده می شود. هر دو این روش‌هـا بـرای کـار بـا سیسـتم سلول خون سازی نسبت به سلول‌های بافت‌های دیگر سازگارتر هستند. سلول‌ها سیسـتم خون سازی تا حدود زیادی با ماتریس برون سلولی (extracellular matrix) ارتبـاط نداشته و به خوبی برای سوسپانسیون (تعلیق) کارآیی دارند. این دو مشخصه شرایط لازم

برای بهره گیری از مزایای این روش‌ها را فراهم می‌کند. با این وجود سلول‌های بافت‌های سخت ذیل توسط این گونه روشهای ایمنی گزینش می شوند: سلول‌های کشت یافته ماهیچه‌ای سلول‌های اندوتلیال آئورت، گزینش سلول‌های لومینال ومایواپیتلیال پستانی، گزینش بخش‌های مختلف نفرون پروگزیمال، غنی سازی زیر جمعیت‌های سلول‌های اپیتلیال تنفسی و گزینش سلولهای حاوی کالی کرین از سلول‌های لوله ای کلیوی محدودیتی که برای سلول‌های غیر خون ساز وجود دارد چسبندگی بیشتر آنهاست که اجازه شارش مناسب در ستون‌ها را نمی دهد. گردش جریان در FACS از سلول‌های توده ای جلوگیری می کند، بدین ترتیب سبب بهبود خلوص می گردد.

از آنجا که میزان نشانه‌های اختصاصی سلول در بافت نسبت به زمان گذرا است این روش باید به سرعت در روند ایزولاسیون اعمال شوند تا احتمال حضور نشانه‌های مطلوب افزایش یابد. سلول‌های اپیتلیال در شرایط کشت سلولی استاندارد قطبیت و عملکرد متمایز خود را از دست می دهند، هپاتوسیت یک نمونه قابل ذکر در این مورد است. انواع دیگر سلول‌ها نیز با حالت‌های مشابه به شرایط کشت سلولی استاندارد پاسخ می دهند. باقی ماندن سلول‌ها به حالت تعلیق (سوسپانسیون) برای مدت زمان طولانی می‌تواند آنوئیکها را فعال کرده و زیست پذیری و تولید سلول را کاهش دهد. علاوه بر این، سلول‌های تحت آزمایش FACS و گزینش ایمنی مغناطیس سلول، نشان دهنده تغییراتی در یکپارچگی غشاء بوده که به واسطه نیروهای هیدرودینامیک یا میدان‌های مغناطیسی ایجاد شده است. همچنین رشته‌ها می توانند با مصرف آنتی ژن مقادیر قابل ملاحظه ای از آن را از سطح سلول‌های زنده و فعال جدا کنند. ایزولاسیون آئوزینوفیل‌ها (آئوزین پذیرها) توسط MACS نشان دهنده تضعیف عکس العمل نسبت به جاذب‌های

شیمیایی LTB4 و PAF است در حالی که تصفیه اولیه پکرول به این صورت بر ائوزینوفیل تأثیر نمی گذارد.

یکی از تفاوت‌های بین FACS و MACS این است که FACS می تواند کمی (سنجش پذیر) باشد. از آنجا که درجه فلورسانس می تواند معیاری برای FACS باشد، امکان ایزوله کردن سلول با درجات مختلف شدت فلوروسانس وجود دارد. در مورد MACS، مسأله به فرم همه یا هیچ است. البته ترکیب MACS و سانتریفوژ با گرادیان چگالی می تواند تمایزاتی بر اساس درجه میزان آنتی ژن موجود در سطح فراهم کند. سلولی که میزان آنتی ژن بیشتری داشته باشد دارای رشته‌های متصل بیشتری بوده و درنتیجه چگالی بالاتری خواهد داشت، چنین سلولهایی در گرادیان چگالی سریعتر ته نشین می شوند.

ترکیب فرایند دسته بندی سلول فعال شده فلورسانس و رشته مغناطیسی برای ایجاد تصفیه بهتر لازم نیست. قرار دادهای تأئید نشده در مورد موضوع خون سازی برای همه سلول‌های بافت‌های سخت مناسب نیست. شاید توسعه روش‌هایی برای غلبه بر محدودیتهای بالا لازم باشد. چنین تلاشی کاملاً مفید بوده و در مواردی ضروری است. سلول‌های اجدادی (Progenitor) تقریباً در کلیه اندام‌های یک ارگانیزم رشد یافته پیدا می شوند. ایزولاسیون این سلول‌ها به روش‌های ایزولاسیون حساس نیازمند است. این سلول‌ها به سختی قابل رؤیت بوده و بنابراین روش‌های ماکروایزولاسیون که ایزولاسیون سنتی کشت سلولی را شامل می شوند مناسب نخواهند بود قرار دادهای موجود برای سلول‌های خون ساز می تواند پایه ای برای پیشرفت‌های بیشتر باشد. با ملاحظه شرایط

ذکر شده فوق، این قرار دادها را می توان تقریباً برای هر سلولی که به طور مناسب توسط نشانه‌های اختصاصی نشان دار شده باشد به صورت موفقیت آمیز توسعه داد.

-جداسازی Panning

جداسازی روش ایمنی دیگری است که در آن لکتین‌ها برای باند کردن انواع سلول‌های خاص مانند سلول‌های اپیتلیال لثه پیوندی یا سلول‌های اپیتلیال آرواره ای (آلوئولار) نوع II مورد استفاده قرار می گیرند. ظروف کشت سلولی با پادتن مناسب یک نشانه خاص سلولی ترکیب می شوند. سپس مخلوط سلول به ظروف کشت سلولی پوشیده شده با پادتن اضافه می گردد. در این حالت سلول‌های نشانه دار به ظرف چسبیده و سلول‌های بدون نشانه به آسانی خارج می شوند. این روش به قابلیت سطحی که پادتنها به آن می چسبند بستگی دارد، تا کمترین جاذبه را برای سلول‌های ناخواسته داشته باشد، در غیر این صورت تمایز بین سلولی کاهش می یابد. عمل جداسازی در مدهای مثبت یا منفی قابل استفاده است؛ وضعیت مثبت برای انتخاب سلول‌های مطلوب و منفی برای انتخاب و خارج سازی سلول‌های نامطلوب در نظر گرفته می شود. به منظور خارج سازی سلول‌های جدا شده از طرق آنزیمی و مکانیکی می توان بهره برد. این روش برای ایزوله کردن سلول‌های تروفوبلاست انسان از ترکیب پرزهای جفت جفت تریپسین زده سلول‌های آغازین ژرم، و فیبروبلاست ها از ترکیب کراتینوسیت، برای گزینش مثبت سلولهای لانگرهانس و کراتینوسیتها و لنفوسیت‌ها مورد استفاده قرار میگیرد.

-مشخصه‌های غذایی و متابولیکی (سوخت وساز)

METABOLIC AND NUTRITIONAL CHARACTERISTICS

از نیازهای غذایی و متابولیکی گوناگون سلول‌های مختلف نیز می توان به منظور گزینش در خلال ایجاد کشت‌های اولیه بهره گرفت. در این موارد شرایط از اهمیت ویژه ای برخوردار هستند زیرا پاسخ سلول‌ها به این وسایل ممکن است به شرایط معینی احتیاج داشته باشد. برای مثال، سمیت مورد نظر ممکن است در حضور سرم به واسطه داشتن پتانسیل سم زدایی ظاهر نشود. همچنین از آنجا که سرم شامل مجموعه گوناگونی از مواد غذایی است، بهره گیری از احتیاجات غذایی مختلف در حضور سرم دشوار می شود. (تضعیف می شود).

-متابولیک (سوخت و ساز) METABOLIC

ایزوزیم‌ها (Isozymes) به طور ناهمگنی در میان انواع مختلف سلول‌ها توزیع شده اند استرازهای غیر خاص نمونه‌های خوبی از این پدیده به شمار می روند. حالت‌های متفاوت استراز ایزوزیمها در سلول‌های اندتلیال و پریسایت‌ها مبنای اصلی تمایز بین این دو نوع سلول است. غلظت mM ۵۰ ال- لوسین متیل استر برای سلول‌های اندوتلیال سمی بوده ولی برای پریسایت‌ها سمی نمی باشد و منجر به ته نشینی سلولهای اندوتلیال می گردد. به طور مشابه ال- لوسین- ال- لوسین متیل استر در مقایسه با سلول‌های B و T کمک کننده ترجیحاً لنفوسیت‌های سمی را می کشد. لیزوزمال تیول پروتئاز دی پپتیدیل

پپتیدازI، می تواند ال- لوسین- ال- لوسین متیل استر را به محصولات هضم کننده غشاء تبدیل کند. در غلظت‌های بالا آنزیم در لنفوسیتهای سمی بیشتر از سلوهای دیگر ظاهر می شود که در نهایت ته نشین می شوند. همچنین تحلیل گرانولوسیت‌ها و مونوسیت‌ها از سلول‌های تجمع یافته افرسیس را می توان با تکوین در کنار ال- فنیلالانین متیل استر هیدروکلراید به دست آورد. سپس سلولهای CD34+ به وسیله ایزولاسیون رشته مغناطیسی تصفیه می شوند. پالایش اولیه گرانولوسیتها و مونوسیتها بازدهی ایزولاسیون را افزایش می دهد.

آلاینده فیبروبلایست یک مشکل متداول در کاشت بافت می باشد. تلاش برای کنترل رشد فیبروبلاست با استفاده از بهره برداری از فقدان فعالیت ال-آمینو اکسیداز، آنزیمی که دی- والین را به ال- والین تبدیل می‌کند، انجام می شود. سلول‌های مطلوب نیازمند انجام این تبدیل به طور مناسب هستند. در ماده ای که دی والین جایگزین ال-والین می شود قابلیت گزینش مشاهده می شود. البته گزارشات ضد و نقیضی در این مورد وجود دارد. فیبروبلاست‌ها از گلیوبلاستومای چند شکل و اولیگودندروگلیوما در محیطی که در آن دی- والین جایگزین ال- والین می شود کشت می گردد و با محیط استاندارد حاوی ال-والین مقایسه می شود. هر سه نوع سلول در برابر دی- والین مقاومت کرده و تغییر شکل مورفولوژیکی قابل ملاحظه ای دارند. همچنین با وجود اینکه احتمال توقف فیبروبلاست‌ها توسط دی-والین وجود دارد اما آنها لزوماً کشته نشده و ممکن است با قرار گرفتن دوباره سلول در محیط حاوی ال-والین شروع به رشد نمایند. در انتها نتیجه میگیریم که دی والین جلوی رشد فیبروبلاست انسانی را در محیط آزمایشگاه نمی گیرد. قبل از انجام هر گونه تلاشی برای متوقف کردن رشد فزاینده فیبروبلاست توسط ماده

دی- والین، عوامل متعددی باید در نظر گرفته شود. اول اینکه دی والین تهیه شده باید دارای آلاینده ال- والین کمی باشد. مقادیر کم ال-والین ممکن است سبب کاهش سرعت تکثیر شود اما باعث طولانی شدن بقا می گردد. همچنین غلظت بهینه دی-والین ممکن است برابر غلظت اصلی ال-والین نباشد. میزان تأثیر دی-والین به اندازه ایزومر-ال نمی باشد. میزان بازدهی جابجائی نسبی دی- والین و ایزومر –ال یکسان نبوده و در درون سلول، دی والین به نوع ال تبدیل می شود. زمان مورد نیاز برای این فرایند سبب افزایش الزامات برای نوع دی می گردد. به طور ایده آل در صورت امکان بهتر است ماده ای عاری از دی- ال- والدین تهیه شده و سپس با غلظت مناسب دی والین مورد نیاز تیتر کرد.

هپاتوسیت شامل یک چرخه مؤثر اوره می باشد. در نبود ال- آرژنین هر یک از چرخه‌های میانی اوره قادر به بازسازی ال-آرژنینی است. از نظر سنتی برای جایگزینی ال- آرژنین از ال- اورنیتین استفاده می شود. دیگر آلاینده‌های بالقوه سلول در ایزولاسیون هپاتوسیت دارای فعالیت چرخه اوره قابل ملاحظه ای نبوده و در نبود ال- آرژنین زنده باقی نمی مانند. ظاهراً احتمال رخ دادن عمل تغذیه متقابل( cross feeding) در هنگامی که هپاتوسیتها ماده را برای سلول‌های آرژنین غیر قابل تکثیر آماده می کنند بسیار کم است.

سودمندی ماده عاری از ال- آرژنین بستگی به چرخه عملیاتی اوره دارد. هر گونه آسیب سلولی که به طور مستقیم یا غیر مستقیم بر چرخه اوره تأثیر بگذارد بر زیست پذیری هپاتوسیتها تحت شرایط عاری از آرژنین نیز اثر می گذارد. اگر شک داشته باشیم که

وجود هپاتوسیتها مطلوب یا نامطلوب است استفاده از مـاده عـاری از ال-آرژنـین توصـیه نمی شود. به طور کلی این سطح گزینش ضروری نیست، زیرا هپاتوسیتها را می تـوان در کشت اصلی با بهره گیری از اختلاف فاحش اندازه سلول بین هپاتوسیتها و دیگر سلولهای کبد با خلوص بالا به دست آورد.

شرایط کشت سلولی دیگر که برای انواع سـلولهای مختلـف انتخـاب مـی شـود خاصـیت اسمزی ماده است. سلول‌ها در برابر تغییرات اسمزی عکس العمل‌های تطبیق پـذیر ولـی غیر یکسان دارند. سلولهای سرتولی ایزوله شده از لوله‌های تخمدان حاوی سـلولهای ژرم آلاینده می باشند. ارائه محیط‌های کشت به یک محیط‌هایپوتونیـک (کـم کشـش) بـرای مدت زمان معین منجر به پاک سازی انتخابی سلول‌های ژرم بدون تأثیر قابل ملاحظه بر سلول‌های سرتولی می شود. همچنین سلول‌های اپیتلیال تجمع یافته مجرای درونی کلیه زیاد تطبیق پذیر نیستند. علاوه بر این مشاهده شد که غلظت NaCl می تواند بر افزایش سلول‌های اپیتلیال تجمع یافته مجرای کلیدهای نوزاد خرگوش تأثیر بگذارد.

-تغذیه ای NUTRITIONAL

حتی اگر سلول‌های تحت کشت با محیط آزمایش سازگار شوند. مشخصه‌هـای مهم فنوتیپ بدن را حفظ می کنند مانند آنچه در مورد سلولهای پروسـتات و نـایژک‌هـا نشان داده شده است. توانایی سلول‌ها درتکثیر و بیان مشخصه‌هـای منحصـر بـه فـرد در کشت سلولی به فاکتورهای رشد، سایتوکین‌ها، هورمونها، مـاتریس‌هـای بـرون سـلولی و ترکیبات غذایی ماده وابسته است. درک عمکرد این اجزاء برای فهمیدن عملکـرد و بقـای سلول‌ها در محیط آزمایشگاه لازم است.

شرایط غذایی سلول مورد نظر شامل تیتراسیون میزان بهینه کلیه اجزاء ماده مـی باشـد. برای دستیابی به این هدف منحنی‌های رشد با پاسخ‌های دوزی مختلـف در چگـالی‌هـای سلول کلونال (بافت- زاد) مورد نیاز خواهد بود. شرایط کلونال به خاطر اینکه چگالی‌هـای بالای سلولی ماده و معایب مبهم آن را تحت تأثیر قرار می دهد. مهم هستند این فعالیت در هنگام استفاده از روش‌های سنتی بسیار وقت گیر است. بهره گیری از سـخت افـزار و نرم افزار موجود برای تصویربرداری با ظرفیت پذیرش بالا می تواند به طور قابـل تـوجهی زمان مورد نیاز برای تکمیل تیتراسیون‌ها را کاهش دهد.

توسعه محیط عاری از سرم نشان دهنده وجود شرایط غذایی متفاوت برای انواع مختلـف سلول است. با وجود مقادیر زیاد سلول‌های مورد نیاز با اجزاء کیفی مشابه در محیط بازال خود شرایط کمی آن‌ها متفاوت خواهد بود. سـلول‌هـای مختلـف در یـک ارگـانیزم چنـد سلولی به وسیله مایع برون سلولی حاوی اکسیژن، دی اکسـید کـربن، گلـوکز، لاکتیـت، آمینواسیدها و مواد غذایی مهـم دیگـر، فاکتورهـای رشـد و هورمونهـای مشـتق شـده از پلاسما و یا سلولهای محیط احاطه شده اند. از آنجا که سلول‌هـای مختلـف، برنامـه‌هـای متابولیکی متفاوتی دارند این محیط‌ها نیز متفاوت خواهند بود. برای مثال فیبروبلاست‌ها و کراتینوسیتهای یک نمونه پوستی در محیط‌های مربوطه تکثیر نمـی شـوند. تفـاوت در غلظت کلسیم و آدنین ظاهراً مؤثرترین عامل در رشـد انتخـابی مـی باشـد. رشـد بهینـه کراتینوسیتها در غلظت‌های نسبتاً کم کلسـیم رخ میدهـد. غلظـت کلسـیم بهینـه بـرای فیبروبلاست سبب لایه لایه شدن کراتینوسیتها شده و آنهـا دیگـر قابلیـت عبـور سـریال (زنجیروار) را در زمانی که غلظت بهینه کلسیم برای کراتینوسـیتها در کمـک بـه تکثیـر فیبروبلاست بسیار کم اسـت نخواهـد داشـت. همچنـین سـلول‌هـای اپیتلیـال پسـتانی،

فیبروبلاست‌ها توسط عکس العمل‌های متفاوت شان نسبت به شرایط زیر بستری و اجزاء ماده از همدیگر تشخیص داده می شوند.

کلسیم اثر قابل ملاحظه ای پر وضعیت فنوتیپ سلول اپتیتال می گـذارد. غلظـت نسـبتاً بالای کلسیم سبب لایه لایه شدن سلول‌ها شده و همان طور که در سلول‌هـای اپیتلیـال مری موش مشاهده شد، عمل جداسازی را آسان می‌کنـد. کراتینـو سـیت‌هـای سـطحی پوست (اپیدرمال) موش با میزان بهینه ۰/۰۳mM رشد کـرده و در نهایـت در ۱/۰mM کلسیم جدا می شوند. سلول‌های اوروتلیال انسان در ۰/۰۶mM کلسیم تکثیر یافته و در غلظت‌های بالاتر جدا و پوسته می شوند. سرم نیز می تواند سلول‌های اپیتلیـال را از هـم جدا کند. سلول‌های اپیتلیال نایژک یک انسان طبیعی در حضور سرم به صـورت پوسـته پوسته جدا شده در حالی که سلولهای کار سینوم ریه در حضـور سـرم جـدا نمـی شـود. همچنین شرایط کشت که به رشد سلولهای اپیتلیال لومینال طبیعـی کمـک می‌کنـد از رشد سلول‌های نئوپلاستیک حمایت نمی کند.

در یک محیط عاری از سرم یا مشخص از نظر شیمیایی، ترکیبات غذایی تـاثیر شـدیدی بر رفتار سلولی می گذارد. شرایط تغذیـه ای خـاص، تکثیـر سـلولی را محـدود می‌کنـد. فاکتورهای رشد و مولکولهای اطلاعـاتی دیگـر، همچنـین مـاتریس بـرون سـلولی بـرای سلولهایی که به طور طبیعی با آن در ارتباط هستند با ترکیب ماده بـازال بـر هـم کـنش داده تا به یک فنوتیپ ویژه دست پیدا کند. اپیتلیای تجمع یافته در مجرای کلیه جنینی به مواد مختلف با الگوهای متفاوت پاسخ مـی دهـد. سـری مـواد MCDB 150 بـرای کراتینوسیتها توسعه یافته است. کـاربرد MCDB 150 بـرای سـلولهای اپیتلیـال غـده

بزاقی موش نشان دهنده عدم توانایی برای زیر کشت گسترده در محیط عاری از سرم است. البته افزایش سطوح بهینه در عصاره ایزولوسین به سلول‌های اپیتلیال بزاقی اجازه می دهد که به صورت ترتیبی (سریال) زیر کشت بروند.کراتینو سیتهای انسانی اثبات کننده نیازهای غذایی به اینوزیتون و کولین تشدید اثر میتوژنیک فاکتور رشد اپیدرمال توسط ال-سرین سرم، انسولین، فاکتور رشد کراتینوسیت وعصاره غده هیپوفیز گاوی است. همچنین حضور اتانولامین نیاز سرمی سلولهای اپیتلیال پستانی موش را برای تکثیر کاهش می دهد. برای انواع سلولهایی که نسبت به سرم عکس العمل نشان می دهند سرم می تواند با فراهم آوردن مواد غذایی به محیط میتواند سبب کم شدن نیاز سرمی گردد.

در شرایط نبود سرم نیاز غذایی آشکارتر می گردد. غلظت بالای پیروات ولاکتیت در کبد موش به همراه فعالیت گلوکز سنتز DNA را افزایش می دهد. در نبود سرم مقدار کم سلنیوم برای رشد کلونال فیبروبلاست‌ها و خط سلول همستر چینی ضروری است. همچنین مقدار کم روی معدنی با توجه به غلظت به کار رفته نشان دهنده اثر مثبت یا منفی آپوپتوسیس در تیموسیتهای موش است. علاوه بر این جداسازی پیگ پری ادیپوسیت در محیط کم منیزیم دشوار است. همچنین گزینش سلول‌های لوله پروکسیمال انسانی با استفاده از فرایند متابولیکی(سوخت و ساز) گلوکونئوژنیک موثر قابل دستیابی است. سلول‌های اولیه (اصلی) در یک محیط هورمونی عاری از سرم بدون گلوکز یا انسولین کشت شده و در این حالت سلول‌هایی که قابلیت گلوکز نئوژنزیس را ندارند آسیب می بینند.

امکان دیگر بهینه سازی شیوه ترکیبی است. یک ماده غنـی ماننـد M -199 Ham's F12 یا سری MCDB به تنهایی یا به صورت ترکیبی مورد استفاده قرا می گیرند. ایـن عمل یک اقدام منطقی بوده و نتایج مطلوبی را به دنبال دارد. برای مثال سلول‌های میـان پوش روده ای کشت یافته در ماده M-199 عـاری از سـرم بـه منظـور مطالعـه تنظـیم ترومبین ماتریس فعالیت متالوپروتناز استفاده می شوند.

سلول‌های دانه ای (گرانولوزا) نارس خرگـوش کشـت یافتـه در M -199 بـرای بررسـی آندروستندوئین و فیبرونکتین مختلف سلولی ایجاد شده توسط هورمون تحریـک کننـده غدد لنفاوی استفاده می شوند. کاربرد ترکیب دولیکو تصحیح شده توسـط مـاده ایگـل و Ham's F12 به همراه ماده بازال عصبی در محیط عاری از بافت در کشت نـرون‌هـای بازال کولینرژیک پیشانی موش نشان داد که مکمل فاکتور رشد به تنهـایی بـرای جبـران ترکیب غذایی محدود کافی نیست. برای کشت اپیتلیم انسـانی سـطح تخمـدان در یـک محیط مشخص از ترکیب ماده 199 یا MCDB 105 استفاده می شود.

-نتیجه گیری

جهت تسهیل دشواری ذاتی عمل ایزولاسیون و گزینش تلاش‌هایی صورت گرفتـه اسـت. بافت‌ها متغیرهای طبیعی هستند که در مقابل کشت از خود مقاومت نشـان مـی دهنـد. شرایط اولیه مانند عمر بافت و عملکرد بافت بسیار حیاتی هستند. زیـرا ایـن عوامـل اثـر تعیین کننده ای بر نتیجه نهایی دارند. محقق می تواند با استفاده نادرست از شناسه‌هـا و شرایط نامناسب در اتلاف زیست پذیری سهم داشته باشد. بنابراین در تعیین شناسه‌هـا و

فرایندها باید دقت صد چندانی کرد. یکی از مقاصد این فصل نشـان دادن دشـواری‌هـای ایزولاسیون و ملاحظاتی است که در کسب موفقیت نهایی مفید واقع می شود.

تولید داربست های پلیمری: پردازش اسفنج گازی

# PROCESSING OF POLYMER SCFFOLDS : GAS FOAM PROCESSING

توماس- پی- ریچارد سون، مارتین-سی- پیترز و دیوید- جی- مونی

مهندسی بافت وعده بزرگ تهیه اندام های کاملاً عملیاتی برای رفع مشکل کمبود عضو اهدایی را داده است. روش های متداول آزمایشگاهی تشکیل این گونه بافت ها را معمولاً از دستگاههای مختلط (هیبرید) شامل داربست های پلیمری زیست تخریب پذیر و سلول های این بافت ها استفاده می کنند. روش های متعددی در شکل دهی و پردازش پلیمرها برای استفاده در مهندسی بافت توسعه یافته است که هر فرایند مجزای آن، دارای ویژگی و عملکرد منحصر به فردی در تشکیل داربست های مهندسی بافت است. با توجه به این روش ها، پیشرفت های قابل ملاحظه ای در حال شکل گیری است که یکی از مهمترین آنها اسفنج سازی گازی است. اسفنج سازی گازی به دلیل قابلیت تخلخل پذیری بالای اسفنج های داربست پلیمری بدون به کارگیری دمای بالا یا حلال های ارگانیک (آلی) حائز اهمیت است. با حذف شرایط دمای بالا و حلال های آلی می توان مولکولهای زیست فعال بزرگ حاوی فاکتورهای رشد را با حفظ فعالیت زیستی در پلیمر مجتمع ساخت. (داربست های پلیمری را میتوان به عنوان حامل مواد مورد نیاز پروتئین ها برای ایجاد پاسخ سلولی (برای مثال، جابجائی، (مهاجرت) و تکثیر) و بستری برای چسبندگی سلول قلمداد کرد که هر دو برای رشد بافت های آزمایشگاهی بسیار مهم هستند. فعالیت آزمایشگاهی ما بر استفاده از این روش در پردازش کوپلیمرهای اسیدهای لاکتیک و گلیکولیک و کپسوله کردن پروتئین ها و پلاسمید DNA کد کننده پروتئین

ها برای تغییر رفتار سلولی مورد نظر مهندسی بافت متمرکز می شود. این فصل نظریه و روند اسفنج سازی گازی را با ملاحظه جنبه عملی پردازش اسفنج مورد بحث قرار می دهد.

-پیشگفتار

اهداف مهندسی بافت فراهم سازی اندام های کارآمد یا جایگزینی قسمتی از بافت برای بیمارانی با ضعف (از کار افتادگی) اندام، آسیب یا بیماری وخیم است. محققان برای تهیه و تأمین جایگزین هایی کارآمد برای بافت، اقدام به تهیه پلیمرهایی نموده اند که در آنها گونه های سلولی متفاوت (مثل سلولهای استخوان زا و غضروف زا و غیره) را کشت داده اند؛ و بدین منظور کلیه رهیافت های مبتنی بر آزمونهای داخل بدن و یا خارج بدن موجود زنده (in vivo , in vitro) مد نظر قرار گرفته است. علاوه بر این، پیشرفت های قابل ملاحظه ای در استفاده از ترکیباتی که سبب تحریک بافت خود شخص گیرنده در پاسخ به دستگاه شده و تولید بافتی که تقریباً عملیات معادل بافت صدمه دیده یا غایب را انجام می دهد صورت گرفته است.

اهداف استراتژی فعلی، توسعه داربست های زیست تخریب پذیری است که در آنها یا سلول ها به طور مستقیم کاشته شده و یا فاکتورهای القایی بافت (برای مثال، فاکتورهای رشد) کپسوله می شوند، که البته ترکیب هر دو استراتژی فوق نیز در نظر گرفته می شود. در این روش فرض می شود که پلیمر ویژگی های ساختاری ضروری را برای نفوذ، تکثیر سلولی، ته نشینی ماتریس برون سلولی و سازمان دهی سلولی که در نهایت منجر به یک بافت سازمان دهی شده کاملاً کارآمد می شود فراهم آورد. فرض دیگر این است که این پردازش های سلولی برابر با نرخ تخریب پلیمر یا نزدیک به آن باشد. در سال های

اخیر ساختارهای پلیمری متعددی (برای مثال، فیلم ها، اسفنج ها و غیره) توسط پردازش های گوناگون توسعه یافته و قابلیت استحکام مکانیکی، تخلخل پذیری، نرخ ترکیب و آزاد سازی مولکول های زیست سازگار آنها مورد آزمایش قرار گرفته است. این کار نشان می دهد که روش های مختلف ساخت پلیمر دارای قابلیت های مجزایی برای دستیابی به هدف نهایی یعنی جایگزینی بافت کارآمد هستند. این روش ها به وسیله پارامترهای سهولت پردازش، تخلخل پذیری پلیمر، نسبت های متغیر سطح به حجم و سازگاری با مولکول های زیست فعال از یکدیگر تمیز داده می شوند. در بخش بعدی روشهای متداولی که برای کاربردهای مهندسی بافت توسعه داده شده اند بطور خلاصه بازنگری شده و سپس روش اسفنج سازگاری در بخش های آتی تشریح می شود. این فصل بر پردازش پلی- لاکتیک- کوگیکولیک اسید (PLGA) که یک ماده بسیار متداول در داربست های مهندسی بافت است تمرکز می‌کند.

-پردازش پلیمرهای به کار رفته در مهندسی بافت

PROCESSING OF POLYMERS FOR USE IN TISSUE ENGINEERING

پلیمرهای متنوعی در مهندسی بافت مورد استفاده قرار می گیرند اما تأکید این فصل بر پردازش PLGA است. پلیمرهای حاوی اسید لاکتیک و اسیدگلیکولیک به طور گسترده در مهندسی بافت به کار رفته و به مدت ۲۵ سال به عنوان نخ بخیه زیست تخریب پذیر مورد استفاده قرار گرفته اند که نشان دهنده زیست سازگاری مناسب آنهاست. شیوه های مختلفی با مزایا و مضرات شاخص برای ساخت داربست های PLGA توسعه یافته که به غیر از روش اسفج سازگاری بقیه به پردازش PLGA در حالت مایع نیازمند است. این

روش های پردازش به صورت خلاصه در اینجا مورد بازنگری قرار می گیرند. چهار روش پر کاربرد عبارتند از؛ قالب گیری حلال، تفکیک فاز، قالب گیری مذاب و اسفنج سازی گازی که به طور مفصل در بخش های بعدی مطرح می شوند. هر کدام از این روشهای پردازش دارای قابلیت های خاصی در مهندسی بافت هستند.

قسمت باقیمانده فصل بر یک روش دیگر اشاره می‌کند که به حلال های آلی یا دمای بالا نیاز ندارد. پردازش اسفنج سازی گازی به طور مفصل به همراه نظریه آرایش (شکل گیری)، پارامترهای ساخت و ترکیب، کاربرد های اسفنج های گازی، قرار داد استاندارد تهیه و یک توضیح مختصر در مورد روش های توصیف آنها، تشریح می شود.

روش قالب گیری حلال شامل انحلال PLGA در یک حلال آلی است (برای مثال کلرید متیلن) که با یک پروژن قابل حل در آب که معمولاً نمک است ترکیب شده و محلول را در یک قالب سه بعدی از پیش مشخص قالب گیری می کنند. سپس به حلال اجازه داده می شود تا تبخیر شده و داربست نهایی برای خارج سازی نمک پالایش می شود که این امر سبب ایجاد خلل و فرج هایی با اندازه ابعاد ذرات نمک می گردد، مزایای این روش پردازش عبارتند از: تخلخل کنترل شده که توسط توده بلورهای نمک موجود در ترکیب تحمیل می‌شود اندازه خلل و فرج که به وسیله ابعاد بلورهای نمک کنترل می گردد درجات مختلف بلورینگی که توسط ترکیب ویسکوزیته ذاتی پلیمر تعیین می شود و نرخ سطح به حجم که به وسیله نسبت نمک به پلیمر تعیین می گردد. عیب اصلی این روش استفاده از حلال های آلی جهت قالب ریزی پلیمر است که می توانند سبب کاهش فعالیت کاهش فعالیت مولکول های زیست القایی (برای مثال، پروتئین ها) شود که بعد از ساخت نیز می توانند به شکل مقادیر کوچک باقی بمانند. روش دیگر شکل دهی

داربست ها به کار گیری تفکیک فاز کنترل شده است. این شیوه از مشخصه های تفکیک پلیمر حل شده در حلال آلی (برای مثال، نفتالین مذاب) بهره می برد. زمانی که PLGA و حلال به طور همگن آمیخته شوند، فاکتور زیست فعال در ترکیب وارد می شود. با کاهش دمای ترکیب، تفکیک فاز مایع- مایع القا شده و متعاقب آن هر فاز متبلور می شود. مولکول زیست فعال در پلیمر به دام افتاده و بخش آلی در اثر تصعید خارج می شود. مزایای این روش حفظ فعالیت زیستی مولکول های کوچک (برای مثال پپتید) و تولید داربست های بزرگ تر است. در صورتی که از گرما استفاده نشود مولکول های بزرگ تری که در معرض از دست دادن ماهیت طبیعی هستند(برای مثال فاکتورهای رشد ، آنزیم ها) به حلال های آلی وارد می شوند. بدین ترتیب پردازش تفکیک فاز می تواند منجر به از دست دادن (اتلاف) فعالیت این مولکول ها گردد. علاوه بر این ممکن است که باقیمانده حلال آلی بر جای بماند که باعث لطمه زدن به زیست سازگاری داربست ها می شود.

پردازش قالب ریزی مذاب از دمای بالا برای ذوب کردن PLGA و ترکیب آن با پروژن استفاده کرده و ترکیب به دست آمده در نهایت در شکل مورد نظر قالب ریزی می شود. پروژن این فرایند که اغلب میکروکره های ژلاتینی هستند پس از پالایش، یک داربست متخلخل از خود به جای میگذارند. این روش دارای بسیاری از مزایای مشابه قالب گیری حلال از قبیل توانایی کنترل اندازه خلل و فرج و حد درجه تخلخل و بلورینگی می باشد. مزیت دیگر این روش عدم نیاز به حلال های آلی است که احتمال باقی ماندن حلال آلی راو در داربست ها از بین می برد. شرایط دمایی بالا جهت ذوب PLGA می تواند سبب

تغییر ساختارهای سه اتمی و چهار اتمی مولکول‌های زیستی مورد نیاز برای فعالیت زیستی گردد.

-اسفنج سازی گازی GAS FOAMING

اسفنج سازی گازی فرایندی جهت پردازش PLGA در داربست های بسیار متخلخل است که نه به دماهای بالا و نه به حلال های آلی نیاز دارد. این امر سبب یکپارچگی مولکولهای زیست فعال(برای مثال، پروتئین ها، پلاسمید DNA) با حداقل اتلاف فعالیت می گردد. پردازش فوق شکل گیری یک داربست پیوسته PLGA ازترکیب اولیه گسسته ذرات PLGA(شکل ۱-۶۴) را ممکن می سازد. ذرات PLGA و پروژن که معمولاً کلرید سدیم هستند با فشار بالای $CO_2$ به تعادل رسیده و پس از آن فشار $CO_2$ به سرعت کاهش می یابد. افت فشار سبب تشکیل هسته حباب ها از $CO_2$ حاصل از عدم تعادل ترمودینامیکی می شود. به واسطه انتشار مقادیر رو به افزایش گاز به حباب ها آنها منبسط گردیده و در نهایت منجر به انبساط ذرات پلیمری منفرد در اطراف ذرات پروژن می شود. ذرات ناپیوسته PLGA جهت شکل دهی یک ماده پیوسته با خلل و فرج باز گداخته می شوند. پروژن به دست آمده را می توان پالایش کرده تا یک داربست بسیار متخلخل با خلل و فرج های بازPLGA ایجاد شود، (شکل ۲-۶۴). اسفنج سازی گازی بسیاری از پارامترهای مشابه روشهای دیگر پردازش را در برگرفته و بدین ترتیب دارای بسیاری از مزایای مشابه آنها از جمله کنترل اندازه خلل و فرج و تخلخل و توانایی ایجاد داربست های بزرگ می باشد. بعلاوه، این روش دارای مزیت های دیگری نیز هست. به واسطه تخلخل بالای داربست چگالی های بالای سلول ها را می توان متناسب با تخلخل کم ترکیب PLGA به دستگاه وارد کرد. بعلاوه تخلخل بالا می

تواند مشکلات ناشی از انتشار محدود مواد غذایی را به درون بافت در حال رشد و یا مواد زاید را از آن بافت به حداقل رسانده و بدین طریق زیست پذیری سلول را افـزایش دهـد. اسفنج سازی گازی از نظر ساخت دارای یک مزیت است که در آن ادامه پـردازش قابـل بررسـی بـوده و بـه پـردازش دسـته ای (batch processing)محدود نمی شود. شاید بزرگتـرین مزیـت ایـن روش در شـکل گیری داربست های PLGA در فقدان حلال های آلی و دمای بالا باشد. ایـن موضـوع از آن جهت مهم است که پروتئین ها در اثر تماس با حلال های آلی و در مـرز بـین حـلال های آلی و بافر (تثبیت کننده) سیال حاوی پروتئین از حالت طبیعی خارج مـی شـوند. پلاسمید DNA و پروتئین های بزرگ شامل فاکتورهای رشد و آنزیم ها مـی تواننـد بـا حداقل تخریب به شکل بالقوه درون داربست ها تجمع یابند. همچنین از آنجا کـه هـدف نهایی تهیه داربست ها ارائه آنها به عنوان جایگزینی هـای بافـت یـا دسـتگاههای القـایی جهت بازسازی بافت است، نبود پس ماندهای آلی در داربسـت هـای اسـنفج گـازی یـک مزیت قابل ملاحظه به حساب می‌آید.

-تئوری THEORY

جنبه حیاتی این فرایند هسته ای شدن و رشد خلل و فرج هـای گـاز در حالـت گـاز در داربست ها است که به ایجاد بی ثباتی ترمودینامیکی همراه اسـت. در چنـین سیسـتمی سه نوع اساسی هسته ای شدن وجود دارد که بر طبق تئوری کلاسیک هسـته ای شـدن عبارتند از: همگن، نامتجانس (هتروژن) و ترکیبی به طور خلاصه هسته ای شدن همگـن زمانی رخ می‌دهد که مولکولهای $CO_2$ که در ابتدا در فشار بالا در پلیمر حل شده اند در

پاسخ به نیروی رانش ترمودینامیکی به منظور تغییر فاز، ترکیب شده و حباب های گازی کوچک همگنی در کل پلیمر ایجاد می کنند تغییرات انرژی آزاد کنترل کننده این فرایند با فشار گاز و انرژی سطح حد فاصل پلیمر- حباب مرتبط است. در هنگام آزاد سازی فشار، در ابتدا حباب های $CO_2$ هسته ای شده و به اندازه بحرانی می رسند. انرژی آزاد حباب ها در اثر انبساط بیشتر حباب ها ناشی از انتشار $CO_2$ از پلیمر اطراف به داخل حباب کاهش می‌یابد. فرایند هسته ای شدن نامتجانس در اثر هسته ای شدن حباب های گاز در هر تعدادی از بین سطحی ها ایجاد می شود، که شامل بین سطحی گاز با پلیمر، ذرات تجمع یافته درون اسفنج (برای مثال، NaCl، ساکروز) یا هر دو می شود. این بین سطحی ها از نظر ترمودینامیک محل های مناسبی برای شکل گیری حباب ایجاد کرده و این فرایند با مهار (کنترل) محل شکل گیری خلل و فرج ها می تواند به طور بالقوه جهت کنترل ساختار خلل و فرج درون داربست ها به کار برده شوند. هسته ای شدن ترکیبی، ترکیبی از هسته ای شدن همگن و نامتجانس است. تصور می شود که هسته ای شدن ترکیبی مکانیزمی باشد که آرایش خلل و فرج راو در پردازش اسفنج گازی که ناشی از اجزا متعدد در دیسک قالب گیری شده (PLGA , NaCl) است کنترل می‌کند.

-پارامترهای ساخت و ترکیب

FABRICATION AND COMPOSITION PARAMETERS

پارامترهای مختلفی، ساخت داربست های بسیار متخلخل PLGA را کنترل می‌کند. از جمله این پارامترها می توان به نوع گاز به کار رفته و مقادیر و مشخصه های پروژن اشاره کرد. داربست های اسفنج گازی توسط گاز $Co_2$ ساخته می شوند. قابلیت گازهای دیگر (مانند $N_2, He$) نیز در ایجاد داربست های متخلخل مورد بررسی قرار گرفته اند که البته با موافقت چندانی مواجه نشدند. تخلخل بالای به دست آمده در هنگام استفاده از گاز $Co_2$ وابستگی زیادی به نرخ آزاد سازی فشار گاز ندارد. افزایش نرخ آزاد سازی اثری بر تخخل داربست نداشته در حالیکه آزادسازی بسیار سریع منجر به کاهش تخلخل تا حد ۹۳٪ می گردد. موفقیت های به دست آمده توسط گاز $Co_2$ در مقایسه با گازهای دیگر تنها به خاطر حلالیت بالای آن در پلیمر است که ناشی از بر هم کنش $Co_2$ با گروههای کربونیل PLGA می باشد.

تخلخل پذیری راو می توان همچنین توسط پروژن موجود در دیسک با تغییر اندازه و مقدار بلورهای NaCl که متداول ترین پروژن های مورد استفاده هستند اصلاح کرد. معمولاً، NaCl را تا ابعاد نسبتاً باریک (برای مثال $۲۵۰\ \mu m < d < ۴۵۰\ \mu m$) غربال کرده و با تغییر ابعاد غربال، اندازه خلل و فرج همزمان قابل تغییرات است. علاوه بر این توسط درصد وزنی NaCl تجمع یافته در اسفنج در طول پردازش تخلخل بالاتر نیز قابل حصول است. (برای مثال ۹۸٪ < ، ام- سی- پیترز و دی- جی- مونی مشاهدات ثبت نشده)

پارامترهای دیگر ساخت که شامل فشار اعمال شده به قالب کامپوزیت PLGA- NaCl و زمان مورد نیاز برای پالایش NaCl (راندمان پردازش) می شود هنوز به طول کامل مورد مطالعه قرار نگرفته اند و تصور نمی شود که پارامترهای اصلی کنترل اثر گذار بر خصوصیات مکانیکی داربست PLGA ، کنتیک های (جنبش های) فرسایش و تخلل باشند. البته عمل پالایش مستقیماً بر نرخ رهایش پروتئین‌های تجمع یافته تأثیر گذاشته و در «قرار داد ترکیب» تشریح می شود.

-کاربردهای داربست های اسنفج گازی

USE FOR GAS-FOAMED SCAFFOLDS

بر اساس ویژگی اول، فرایند اسفنج سازی گازی در شکل دهی اسفنج های PLGA این کامپوزیت‌ها با موفقیت قابل ملاحظه ای در دستگاههای رهایش، پروتئین های هدف یاب (ردیاب) و DNA پلاسمید، و فراکاشت سلولی به کار گرفته شده اند. رهایش پروتئین یکی از کاربردهای اسنفج های گازی است. پروتئین ها (برای مثال فاکتورهای رشد) را می توان در خلال مرحله ساخت درون یک دیسک مجتمع کرده و به شکل کنترل شده ای آزاد ساخت (رهایش کرد). پروفیل (نمودار) یک آزادسازی معمولی از دیسک در شکل ۳-۶۳ نشان داده شده است. این نمودار آزادسازی کنترل شده پیوسته فاکتور رشد عروقی (VEGF) را که برای گسترش عروق خونی مهم است را نشان می دهد. حائز اهمیت است که VEGF آزاد شده از داربست های اسفنج گازی، فعالیت زیستی بالایی را هم در محیط آمایشگاه و هم درون بدن حفظ می‌کند. این امر حاکی از آن است که پروتئین های پیچیده و بزرگ دیگر نیز را بتوان به آسانی با استفاده از اسفنج های گازی آزاد ساخت. فعالیت های اخیر با بسط بررسی های فوق PLGA را توسط کانی سازی(mineralization) اصلاح کرده و داربست های PLGA غنی از فسفات کلسیم حاوی VEGF را برای مهندسی بافت استخوان ارائه کرده است.

علاوه بر پروتئین ها DNA پلاسمید را نیز می توان با موفقیت آزاد کرد. اخیراً یک پلاسمید کد شده پلاکت مشتق شده فاکتور رشد که از دیسک های اسفنج گازی PLGA آزاد شده است هم در آزمایشگاه و هم در داخل بدن مورد مطالعه قرار گرفته

است. DNA پلاسمید تجمع یافته در داربست، منجر به راندمان بالای انتشار شده که نشان دهنده اشغال DNA فعال و تغییر شکل پروفیل ژن های آنها توسط ارتقاء رشد و تفکیک سلول های داربست و ایجاد فاکتورهای آنژیوژنیک لازم جهت حفظ و ادامه رشد بافت های بزرگ مطرح می‌کند.

اسفنج های گاز نیز برای استفاده به عنوان دستگاههای فراکاشت سلول مورد بررسی قرار گرفته اند. فراکاشت سلول ممکن است بتواند از نظر کارکردی معادل ساختارهای بافت مورد استفاده به عنوان جایگزین قسمتی از اندام و یا برای الگوهای بازسازی عمل کند. البته روش های فراکاشت سلول در اثر جابجایی مواد غذایی به درون و مواد زائد به خارج از بخش درونی داربست محدود شده وبدین ترتیب وجود یک سیستم عروقی برای بقای سلول های کاشته شده و رشد بافت های بزرگ تر که برای حفظ عملکرد خود بر سیستم خون رسانی کامل نیازمندند ضروری است. یک سیستم عروقی کارآمد می تواند در اثر ترکیب فراکاشت سلول با سلول آنژیوژنیک رها شده از داربست ها، افزایش (رشد) یابد. تحقیقاتی که از روش های مختلف پردازش برای شکل دهی ساختارهای بافت غضروف، چربی، و استخوان استفاده می کنند نشانگر پتانسیل بزرگ PLGA در شکل دهی انواع مختلف بافت ها است.

## -قرارداد تهیه PREPARATION PROTOCOL

این بخش، قرارداد متعارف تهیه داربست PLGA را بـه وسـیله پـردازش اسـفنج گـازی تشریح می‌کند. این فرایند توسط شکل گیری دیسک کامپوزیتی PLGA- NaCl اولیه، اسفنج سازی گازی دیسک به وسیله $CO_2$، وپالایش جهت ایجاد داربست متخلخل مورد تأکید قرار می گیرد. این قرارداد در مورد اسفنجی بـا ضـخامت ۳mm و شـعاع ۱۳mm ارائه شده است.

## -شکل گیری دیسک DISK FORMATION

برای ایجاد یک دیسک ۱۳mm*۳mm، کلاً ۸۰۰mg ماده مورد نیاز است که بـه طـور معمول شامل ۷۶۰mg، NaCl و ۴۰mg، PGLA می شـود. همچنـین پـروژن هـایی مانند ساکروز و غیره نیز می توانند شامل این آرایش باشند. نسبت نمک (یاسـاکروز) بـه پلیمر منجر به یک داربست بسـیار متخلخـل بـا اسـتحکام مکـانیکی مناسـب (۷۵ kPa <مدول فشاری) می گردد. در صورتی که متحتویات PLGA به طور قابـل ملاحظـه ای کاهش یابد، اسفنج ها استحکام مکانیکی و تخلخل پذیری ناپایداری از خـود نشـان مـی دهند. NaCl پالایش شده (غربال شده) (۱۰۶ $\mu m$ < d < ۴۲۵ $\mu m$). ایـن ترکیـب به صورت فشاری در قالب اسفنج به مـدت ۱ دقیقـه در ۱۵۰۰psi بـا اسـتفاده از پـرس کارور قالب گیری شده تا شکل دیسک راو به خود گیرد. در صورتیکه داربست می بایست حاوی پروتئین نیز باشد می توان حجمی از پروتئین حل شده در بافر را در لولـه شیشـه

ای سیلیکونی که با $N_2$ مایع منجمد شده و قبل از ترکیب با NaCl خشک شده است به PLGA اضافه نمود.

-اسفنج سازی گازی GAS FOAMING

پس از اتمام قالب گیری فشاری PLGA- NaCl (± پروژن) به درون دیسک، کامپوزیت در ظرف فشار قرار می گیرد. (شکل ۱-۶۴). فشار $CO_2$ تا حداقل ۸۰۰psi برای تعادل با دیسک PLGA افزایش می یابد. زمان تعدل باید حداقل ۱۶ ساعت باشد تا از حل شدن مناسب $CO_2$ قبل از آزاد شدن فشار اطمینان حاصل شود. بعد از این مدت نگهداری با $CO_2$، فشار در طول ۳-۲ دقیقه آزاد می گردد. نرخ آزاد شدن گاز تغییر چندانی در یکپارچگی اسنفج ها ایجاد نمی کند، هر چند نرخ آزاد سازی سریع ممکن است بر تخلخل اسفنج تأثیر بگذارد.

-پالایش LEACHING

پروژن از دیسک مربوط به اسفنج گازی پالایش می شود. این فرایند منجر به ایجاد خلل و فرج های درهم و باز عاری از پروژن می گردد. اسفنج های شکل گرفته با استفاده از NaCl ۷۶۰mg برای هر دیسک (۱۳mm*۳mm) با ۲۵ml آبی که دوبار تقطیر شده است، پالایش می شود. نکته مهم برای کاربرد تحلیل ثبات زمان پالایش است که در طول آن در کامپوزیت معین PLGA- NaCl ، پالایش NaCl با نرخ قابل پیش بینی رخ داده و آزاد سازی پروتئین به طور همزمان اتفاق می افتد. بنابراین داربست ها تنها برای ۲۴ ساعت پالایش می شوند که قبل از این موعد پالایش NaCl پایان یافته است. پالایش اضافی بر تخریب و فرسایش دیسک PLGA تأثیر گذاشته و از

آن مهم تر سبب آزاد سازی پروتئین می گردد. به منظور سنجش دقیق پـروتئین تجمـع یافته و کنتیک‌های آزاد شده و نیز پیش بینی غلظت پروتئین در هر زمان آزمـایش مـی بایست پارامترهای اولیه موجود در قرارداد آزمایشگاهی راو به اجرا درآورد. پـس از اتمـام پالایش دیسک ها شاخص بندی می شوند (برای مثال بـا توجـه بـه تخلخـل، آزادسـازی پروتئن و غیره).

-شاخص بندی CHARACTERIZATION

فاکتورهای متعددی بر پردازش و یکپـارچگی نهـایی دیسـک هـای اسـنفج گازی PLGA تأثیر مـی گذارنـد. پـس از سـاخت یـک شـاخص اولیـه جهـت ارزیـابی یکپارچگی دیسک، استحکام مکانیکی، تخلخـل، آزادسـازی فاکتورهـا و پروفیـل تخریـب صورت می گیرد. میرکروسکوپ اسکن الکترون (SEM) تحلیل مورفولـوژی نابهنجـار در دیسک راو ممکن ساخته و ثبت بصری از خلل و فرج های شکل گرفتـه، ایجـاد می‌کنـد. حدود مقیاس در دسـترس توسـط SEM، تصـویر بـزرگ و جزئیـات میکروسـاختارهای دیسک راو میسر می‌کند. جهت ارزیابی خصوصیات مکانیکی (برای مثال، مدول فشـاری) دیسک ها در معرض تست های مکانیکی قرار می گیرند تا تغییر شکل دیسـک در پاسـخ به تنش اعمال شده اندازه گیری شود. تخلخل سنجی بـرای انـدازه گیـری حجـم حفـره ساختار سه بعدی انجام می شود. تخلخلی ترکیبی است از خلل و فرج هـای بسـته و بـاز که از طریق SEM قابل شناسائی بـوده و بوسـیله انـدازه گیـری حجـم تحمیلـی جیـوه سنجیده می شود. همچنین، میکروسکوپی نیروی اتمی نیز جهت کسب اطلاعـات جـامع تر در مورد ساختار خلل و فرج قابل استفاده است. تخریب و فرسایش PLGA به عنوان تابعی از اتلاف توده دیسک یا اتلاف یکپارچگی مکانیکی با زمان قابل اندازه گیری است.

-چکیده

پردازش اسنفج گازی پلیمرها در ماتریس های مهندسی بافت دارای مزایـای منحصـر بـه فردی است که از آن جمله میتوان شکل دهی داربست هـای حـاوی فاکتورهـای زیسـت فعال را نام برد. حذف شرایط حلال های آلـی و دمـایی بـالای سـاخت، قابلیـت رهـایش مولکولهای بزرگ و پیچیده مانند فاکتورهای رشد، آنزیمها و DNA پلاسمید را با حذف فعالیت زیستی جهت ارتقاء کاربردهای القایی مهندسی بافت میسر می سازد.