



## تهیه داربست های طبیعی سه بعدی جهت مطالعات مهندسی بافت

ناصر مهدوی شهری ، فهیمه شهابی پور، مریم مقدم متین، امین توسلی، مسعود فریدونی، علی مقیمی، معصومه خیرابادی، محمد علیزاده

گروه زیست‌شناسی دانشکده علوم پایه، دانشگاه فردوسی مشهد

پژوهشکده بیوتکنولوژی و مهندسی بافت دانشگاه فردوسی مشهد

در سال های اخیر واژه ماتریکس بیولوژی، جایگاه مهمی را در تحقیقات زیست شناسی و پزشکی کسب نموده است. بررسی و امکان بکارگیری از مواد موجود در ماتریکس خارج سلولی، در تحقیقات مهندسی بافت یکی از اهداف این گونه مطالعات می باشد. در واقع محققان مهندسی بافت به دنبال راهکارهای جدیدی به منظور غلبه بر مشکلات پیوند اعضا یا اندام های مصنوعی می باشند. داربست ها یکی از ضروریات مهندسی بافت بشمار می روند، چرا که سلول های پستانداران وابسته به چسبندگی هستند و اگر زمینه ای مناسب جهت اتصال سلولی در دسترس نباشد، از بین خواهند رفت. اخیرا داربست های بی شماری متشکل از مواد سنتزی و یا مواد مشتق شده از بافت های طبیعی از قبیل اسید هیالورونیک و کلاژن، مورد مطالعه قرار گرفته است. روش دیگر تهیه داربست سلول زدایی از بافت های موجودات زنده برای حذف مولکول های آنتی ژنیک و سلول ها از بافت می باشد. بافت سلول زدایی شده ساختار و ترکیبی مشابه با بافت طبیعی دارد و روند بازسازی توسط این داربست ها با کاشت سلول ها بر روی آنها هدایت می شود. روش های مختلفی برای سلول زدایی کردن بافت های طبیعی موجودات زنده وجود دارد، مثل استفاده از روش های شیمیایی، فیزیکی و آنزیمی. در این تحقیق ما از استخوان اپی فیز ران گوساله ۴ ماهه استفاده کردیم. بدین منظور با استفاده از پانچر از قسمت ذکر شده استوانه ای به طول ۱ سانتی متر و قطری حدود ۲ میلی متر نمونه برداری صورت گرفت و سپس به منظور حذف سلولهای چربی، داربست فوق را با آب جوش تیمار کردیم. برای حذف سلولهای استخوانی با انجام عملیات فریز-انجماد سریع و به صورت سیکلی، نمونه های ذکر شده در ازن مایع در دمای -۱۹۶ °C قرار گرفتند. در مرحله بعدی جهت شستشوی محتویات سلولی باقیمانده از غلظتهای مختلف SDS به همراه دستگاه همزن استفاده نمودیم در مرحله نهایی از بافر PBS، همراه با هم زدن آرام برای شستشوی SDS استفاده نمودیم و برای ذخیره سازی نمونه ها، آنها را در دمای -۲۰ نگهداری کردیم. در مرحله شستشو و کشت بافت، به منظور حذف SDS و عدم آسیب رساندن به سلولها، از الکل در قیف بوخنر استفاده شد و سپس در مرحله بعدی آب مقطر استریل و در نهایت با نرمال سالین داربستهای مربوطه شستشو داده شدند. داربستهای مربوطه توسط روشهای میکروسکوپی و ماکروسکوپی مورد مطالعه قرار گرفتند. بدین منظور از داربستهای فوق تصاویری به کمک استرئومیکروسکوپ و سپس برشهایی توسط تکنیکهای بافتی آماده شد. با توجه به خصوصیات استانداردهای داربست ها از جمله، تخلخل پذیری، نداشتن سلول به منظور حذف خواص ایمونژنیسته و عدم سمیت، به نظر می رسد داربست های آماده شده می تواند برای تحقیقات مهندسی بافت مورد استفاده قرار گیرد و از طرفی با توجه به دارا بودن ویژگی های سه بعدی، ساختار طبیعی و روش های آسان و قابل دسترس تهیه این داربست ها، به نظر می رسد مدل مناسبی برای تحقیقات مهندسی بافت باشند. در ادامه این پژوهش، هدف کشت سلول های مختلف بر روی داربست های تهیه شده حاصل اجرای این تحقیق می باشد.

لغات کلیدی: داربست - ماتریکس سه بعدی - مهندسی بافت - سلول زدایی

### Providing natural three-dimensional scaffold for Tissue Engineering Studies

Nasser Mahdavi Shahri, Fahimeh Shahabipour, Maryam M Matin, Amin Tavassoli, Masoud Fereydoni, Ali Moghimi, Masoume Kheyrabadi, Mohamad Alizadeh

Department of Biology, Faculty of Science, Ferdowsi University of Mashhad, mashhad, Iran

Cell and Molecular Research Group, Institute of Biotechnology, Ferdowsi University of Mashhad, Mashhad, Iran

In recent years, matrix biology has an important role in biological and medical research. A clear understanding of the extracellular matrix in tissue engineering research is one of the major goal in these fields. Researchers looking for new strategies to overcome problems of organ transplant or artificial organ. Scaffolds are one of the necessities in tissue engineering as mammalian cells needs adhesion. If these cells can not adhere through the matrix, it will damage. Recently, numerous scaffolds have been investigated that consist of synthetic material or materials derived from natural tissue such as collagen, hyaluronic acid. In



addition, scaffold can prepare from natural tissue that become decellularized in order to remove cells & antigenic molecules .Decellulized tissue similar to nature ones, can provided an inductive microenvironment for seeded cells on it .There are different methods to remove cells such as chemical, physical and enzymatic . In this study, we used epiphysal bovine bone, age around 4 month & was divided into small cylindrical pieces 1 cm in length & 2 mm in diameter by pancher instrument .Samples treated with boiling water in order to remove fat cells .Then samples was exposed to wet snap freezing -thaw in liquid nitrogen at a -196 °c so as osteocytes was removed .The next step for washing the remaining cells, different concentration of SDS was used with slow agitation .Finally, the samples immersed in PBS solution for washing SDS & stored at -20°c . samples was washed in BÜchner funnel with alcohol, distilled water & sterile normal saline, respectively in order to remove SDS & toxicity from scaffolds. Our scaffolds was studied by macroscopic & microscopic methods .Thus, we prepared section of our scaffolds by Histological techniques & 3D -image by stereomicroscope .Previous study was shown that the standard feature of scaffold that including, porosity, lacking cells to achieve remove antigengenic & toxicity properties .It seems that this scaffold can be used in tissue engineering & in the other hand, having the characteristics of natural three -dimensional seems to make suitable this scaffolds for tissue engineering research .In continuing this research, culture of different cells on a scaffold will implement .

*Keywords: tissue engineering, scaffolds, 3D-matrix, decellularized*

دانشگاه فردوسی مشهد

شهریور ۱۳۸۹