

Applied molecular biology
Vol.4, issu.8, Autumn. 2025
pp.19-48

A Review of Biological Scaffolds and Their Role in Cell Culture: Introduce of the best ones

Sajad Davoodi¹, Alireza jalali¹, Jamil Zargan*²

1. MS.c of molecular biology of the cell, Department of Biological Sciences, Faculty of Basic Sciences, Imam Hossein University, Tehran, Iran;

Sj.Dvm@ihu.ac.ir- jalalialireza8329@ihu.ac.ir

2. Associate Professor, Department of Biological Sciences, Faculty of Basic Sciences, Imam Hossein University, Tehran, Iran.

* Corresponding author: zargan44@gmail.com; ORCID: 0000-0002-1655-4265

Article history:

Received: 14/10/2025

Revised: 09/11/2025

Accepted: 06/12/2025

Abstract

Cell culture is a general term referring to the growth of cells in an artificial medium outside their normal form under controlled conditions. Two-dimensional cell cultures have been the gold standard for decades in many research and applied areas. In 2D cell culture, living cells grow as a monolayer in flasks or on other flat surfaces used for culturing. Recently, three-dimensional cell culture has made great strides toward implementation in biomedical research and medication development due to its increased precision and efficiency in simulating the *in vivo* environment. In such an environment, the cells proliferate as spheroids, or clusters/clumps, matrix-free or with matrix. Biological scaffolds are one class of materials of various physiological activities, resembling the extracellular matrix. These 3D cultures, as identified earlier, may be scaffold-based or scaffold-free which will be described in this paper.

Keywords: Cell culture, three-dimensional cell culture, biological scaffolds.

زیست‌شناسی مولکولی کاربردی

سال چهارم / شماره ۸ / پاییز ۱۴۰۴

صفحات ۴۸-۱۹

مروری بر داربست‌های زیستی و نقش آن‌ها در کشت سلول: معرفی برترین داربست‌ها

سجاد داودی مهد^۱، علیرضا جلالی^۱، جمیل زرگان^{۲*}

۱. دانشجوی کارشناسی ارشد، گروه علوم زیستی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه جامع امام حسین (ع)،

تهران، ایران؛ Sj.Dvm@ihu.ac.ir- jalalialireza8329@ihu.ac.ir

۲. دانشیار، گروه علوم زیستی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه جامع امام حسین (ع)، تهران، ایران؛

* نویسنده مسئول: zargan44@gmail.com, ORCID ID: 0000-0002-1655-4265

تاریخ بارگزاری: ۱۴۰۴/۰۷/۲۲ تاریخ بازنگری: ۱۴۰۴/۰۸/۱۸ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۴/۰۹/۱۵

چکیده

تأمین رشد سلول‌ها در شرایط مصنوعی و تحت کنترل، به‌طوری که از شرایط طبیعی خود متمایز باشند را کشت سلول می‌نامند. در دهه‌های گذشته، کشت سلول دوبعدی (2D) اصلی‌ترین رویکرد کشت سلول در زمینه‌های متعدد بوده است. در این روش، سلول‌های زنده به‌صورت تک‌لایه‌ای بر محیط کشت مسطح نظیر فلاسک رشد می‌کنند. اخیراً گام‌های شاخصی به‌سوی اجرای کشت سلول سه‌بعدی (3D) در پژوهش‌های زیست پزشکی و توسعه دارویی، متناظر با صحت و کارایی آن در نمونه‌های آزمایشگاهی برداشته شده است. سلول‌ها در چنین شرایطی به‌صورت دسته‌ها یا خوشه‌هایی موسوم به اسفروئید، با استفاده از یک داربست یا بدون آن رشد می‌کنند. داربست‌های زیستی را مجموعه‌ای از مواد موجود در داربست خارج سلولی یا سنتز شده می‌دانند که توانایی تقلید از آن‌ها را دارد و همچنین دارای نقش‌های فیزیولوژیک گوناگونی نیز می‌باشد. همان‌طور که توضیح داده شد کشت‌های سه‌بعدی می‌توانند وابسته به داربست یا بدون داربست باشند که ما در این مقاله به‌طور خلاصه به بررسی آن‌ها خواهیم پرداخت.

کلمات کلیدی: کشت سلول، کشت سه‌بعدی سلول، داربست‌های زیستی

مقدمه

داربست‌های زیستی را مجموعه مواد موجود در ماتریکس خارج سلولی [۱] و یا سنتز شده به تقلید از آن‌ها [۲] می‌دانند که دارای نقش‌های گوناگون هستند. به‌طور کلی می‌توان از میان این نقش‌ها به مواردی همچون تقویت کارایی ترانسسانی سلولی، راهی برای اطمینان سلول‌ها از صحت ترانسسانی انجام شده، افزایش حساسیت (دقت) ترانسسانی (که از این حیث اهمیت دارد که ممکن است با طی فاصله از سلول یا ناحیه مبدأ به‌سوی سلول یا ناحیه مقصد، شدت پیام مخابره شده کاهش یابد و تا نیل به مقصد، توانایی رسانش پیام را نداشته باشد؛ به‌عنوان مثال غلظت آن به تدریج در ریزمحیط اطراف سلول کاهش یابد، اما با وجود پروتئین‌های داربستی و سطح بهینه‌ای که در اختیار سلول‌ها قرار می‌دهند کیفیت لازم برای ترانسسانی تأمین خواهد شد)، هماهنگ کردن مسیرهای ترانسسانی مختلف (این پروتئین‌ها، با تشکیل مجموعه‌ای به‌نام سیگنالوزوم (signalosome یا نام دیگر transducisome) چنین عملکردی را نشان می‌دهند)، اشاره کرد [۳] که از محاسن اصلی آن، امکان کسب نتایج همگون و تکرارپذیر بودن آن‌ها می‌باشد. [۴ و ۵]

کشت سلول، به رشد سلول‌ها در شرایط مصنوعی و تحت کنترل گفته می‌شود، به‌گونه‌ای که از شرایط طبیعی خود متمایز باشند. [۶]

از کاربردهای وسیع کشت سلول می‌توان به مطالعه در حوزه زیست‌شناسی سلولی و مولکولی، سنجش داروها و آنالیزهای سمیت، ردگیری نقش بیماری‌زایی یک ژن به‌خصوص و یا پژوهش در حوزه سرطان اشاره کرد و همچنین با توجه به فرصت‌های منحصر به فردی که کشت سلول برای محقق فراهم می‌آورد، در بررسی و توسعه محصولات نظیر واکسن‌ها و پروتئین‌های نو ترکیب نیز کاربرد پیدا می‌کند. [۵ و ۶]

از آنجا که تولید یک دارو فرایندی زمانبر و نیازمند چندین مرحله مانند شناسایی هدف، آزمایش‌های پیش‌کلینیکی و سنجش‌های درمانی [۶ و ۷] است، این مسئله بسیار حائز اهمیت خواهد بود که محقق در بدایت امر نسبت به فعل و انفعالات زیستی، سازوکارهای بیوشیمیایی، سمیت و احتمال نتایج غیرمنتظره اشراف پیدا کند؛ به همین دلایل است که کشت سلول، کمک شایان‌ذکری به درک تأثیرات دارویی بر سلول‌ها

عرضه داشته و امکان توسعه داروهای با کارایی و ضریب سلامت مطلوب را فراهم کرده است. [۶ و ۷]

در دهه‌های گذشته، کشت سلول دوبعدی (2D) اصلی‌ترین رویکرد در زمینه‌های متعدد بوده است؛ رویکردی کم‌هزینه، رایج و در دسترس به جهت نظارت بر اثر دارو(ها) بر سلول؛ هرچند که نیاز به شبیه‌سازی و قرابت بیشتر به شرایط *in-vivo*، کاربرد آن را با محدودیت مواجه ساخته است. [۸ و ۹] در این رویکرد، سلول‌های زنده و زایا به صورت تک‌لایه‌ای بر بستر مسطح نظیر فلاسک‌های شیشه‌ای یا پلی‌استیرنی رشد کرده و سلول‌های مرده از سطح جدا می‌شوند. [۱۰]

نتیجتاً، با یکپارچه شدن توزیع مواد مغذی و عوامل رشد در محیط کشت، سلول‌ها دسترسی و نرخ تقسیم بیشتری نسبت به شرایط *in-vivo* خواهند داشت، اما ریخت‌شناسی سلول‌ها کاملاً با آنچه در شرایط *in-vivo* مشهود است، متفاوت خواهد بود؛ یعنی با پهنای و کشیدگی بیشتر. [۱۰]

اخیراً گام‌های شاخصی به سوی اجرای کشت سلول سه‌بعدی (3D) در زمینه زیست پزشکی و توسعه دارویی برداشته شده است؛ رویکردی که به علت توانایی شبیه‌سازی شرایط *in-vivo*، برای درک شکل سلول، میان‌کنش‌های بین‌سلولی و ریزمحیط اطراف آن‌ها مورد استفاده قرار می‌گیرد. [۱۰] سلول‌ها در چنین شرایطی به صورت دسته‌ها یا خوشه‌هایی موسوم به اسفروئید، خواه با استفاده از داربست، خواه بدون آن رشد می‌کنند. [۶]

کشت سه‌بعدی سلول بر پایه داربست/ ماتریکس، یا به طریق رونشاندن سلول‌ها بر روی داربست عاری از سلول انجام می‌گیرد و یا از طریق پخش سلول‌ها در یک داربست مایع که سپس فرایندهایی نظیر قوام‌بخشی به داربست و یا پلیمریزاسیون آن را در پی خواهد داشت. [۱۱]

معمول‌ترین داربست‌ها، یا از منشأ زیستی هستند یا سنتزی [۱۲] که جهت استفاده در کشت سلول سه‌بعدی، بایست شاخصه‌هایی را نظیر عدم تحریک ایمنی،^۱ عدم سمیت

۱. در درمان مبتنی بر ایمپلنت مطرح می‌شود.

برای سلول‌ها^۱ و به‌طور کلی، خواص فیزیکی-شیمیایی مناسب دارا باشند. [۱۱]
در این مقاله، به معرفی تعدادی از پرکاربردترین داربست‌های زیستی به‌کار رفته در سامانه‌های کشت سه‌بعدی سلول و بررسی نقش آن‌ها در این سامانه پرداخته خواهد شد.

داربست‌های زیستی و سامانه‌های سه‌بعدی کشت سلول

کاربرد داربست‌های زیستی، یادآور سامانه‌های سه‌بعدی کشت سلول است که معمولاً از آن‌ها به‌عنوان بیوراکتور یاد می‌شود. طبعاً بهبود کارایی این سامانه‌ها به مفهوم داربست گره خورده است. در این بین، اما سامانه‌های طراحی شده متحمل برخی نقاط ضعف هستند که از جمله آن‌ها می‌توان به عدم پویایی بیوشیمیایی و ایجاد کردن شرایطی ایستا برخلاف آنچه در بافت دیده می‌شود، خطرات ناشی از انتقال آلودگی‌ها یا بیماری‌های انسانی-حیوانی در هنگام آماده‌سازی داربست، نبود عمومیت و تکرارپذیری با توجه به شرایط ویژه مورد نیاز هر نوع سلول، وابستگی به دستورالعمل‌های اختصاصی برای جداسازی پروتئین‌های تولید شده، بی‌اثری بیوشیمیایی یا inert بودن^۲ برخی داربست‌ها مانند داربست‌های مبتنی بر PEG و نیاز آن‌ها به برخی اصلاحات برای رشد سلول‌ها و نیاز به کنترل و تنظیم بسیار دقیق‌تر نسبت به سامانه‌های کشت دوجعدی سلول اشاره کرد. [۱۳]

چنانچه واضح است، بسیاری از این نواقص و محدودیت‌ها به‌واسطه گزینش داربست مناسب، بهبودپذیر هستند. در این راستا، بهتر است داربست‌هایی مورد توجه پژوهشگر قرار گیرند که پیشینه تحقیقاتی بهتری داشته باشند؛ از داربست‌های زیستی (طبیعی) می‌توان به داربست‌های مبتنی بر غشای پایه (basement membrane matrix) (نظیر ماتریژل BDTM)، کالترکس (Cultrex)، داربست‌های مبتنی بر عصاره غشای پایه (basement membrane extract) و هیالورونیک اسید و از میان داربست‌های سنتزی به پلی‌اتیلن گلیکول (PEG)، پلی‌وینیل الکل (PVA)، پلی‌لاکتیک-کو-گلیکولید (PLG) و

۱. این مسئله در درمان‌های مبتنی بر ایمپلنت، بیشتر مورد بحث قرار می‌گیرد.

۲. به‌عنوان مثال، چنین داربست‌هایی قابلیت برقراری میان‌کنش‌های مطلوب با سلول‌ها را ندارند.

پلی‌کاپرولاکتون (PLA) یاد کرد. [۱۱]

همچنین از پرکاربردترین داربست‌ها که عمدتاً منشأ زیستی دارند می‌توان کلاژن، ترکیب کلاژن-کیتوزان، ماتریژل و داربست‌های فیبرینوژنی، آلژینات، داربست‌های پیوراماتریکس (scaffolds Puramatrix) و داربست‌های مبتنی بر پلی‌اتیلن گلیکول را نام برد. [۱۱]

پیش از معرفی برخی از داربست‌های یاد شده، لازم به ذکر است که استفاده از این داربست‌ها، نه تنها هر یک، ملزومات خود را می‌طلبد، بلکه به منظور دنبال کردن اهداف به خصوصی مورد توجه پژوهشگر واقع می‌شوند. از نمونه‌های این قبیل اهداف، می‌توان به اساس ریزسیال (Microfluidic) در سامانه سه‌بعدی کشت سلول اشاره کرد که شرایط انتشار مطلوب مواد مغذی، اکسیژن، پایداری pH و غیره را فراهم می‌کند.

روش‌های کشت سه‌بعدی سلول براساس ریزسیال

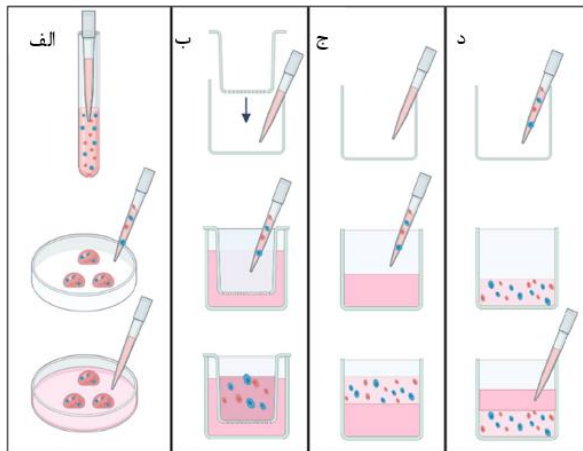
به‌طور کلی این روش‌ها با دو رویکرد مبتنی بر ژل (gel-based) و عاری از ساختار ژلی (gel-free) قابل اجرا هستند. [۱۳]

رویکرد مبتنی بر ژل

در رویکرد مبتنی بر ژل، داربست‌ها اساساً متخلخل‌اند و وجود حفرات، امکان جابه‌جایی مواد مغذی، اکسیژن و گازهای ضروری، ترانسپانسی پیام، دفع مواد زائد و معماری سه‌بعدی مناسب را فراهم می‌کند. [۱۴]

هیدروژل‌ها از مهم‌ترین داربست‌های این رویکرد هستند. [۱۵] طبق تعریف، هیدروژل‌ها شبکه‌های پلیمری سه‌بعدی با پیوندهای متقابل هستند که اساساً موادی آبدوست بوده و قادرند مقادیر زیادی مایع بین شاخه‌های پلیمری خود جذب کنند. [۱۶] از پارامترهای مهم هیدروژل‌ها که برای کشت سه‌بعدی سلول حیاتی هستند [۱۶] می‌توان اندازه حفرات، ضخامت فیبر در داربست‌های رشته‌ای، سختی و ظرفیت رونشینی سلولی (cell-seeding) را نام برد. روش‌های رایج برای کشت سه‌بعدی سلول با استفاده از هیدروژل‌ها در شکل ۱ آمده است. [۱۷]

با توجه به اهمیت این بخش و پرکاربرد بودن هیدروژل‌ها، در ادامه مقاله به تفصیل بیشتر از آن‌ها پرداخته می‌شود.



شکل ۱. روش‌های رایج کشت سلول با استفاده از هیدروژل‌ها؛ هیدروژل‌ها به دلیل داشتن خصوصیات مطلوبی همچون آبدوست بودن، تأمین شرایط مورد نیاز برای کشت سلول، همواره مورد توجه پژوهشگران هستند.

الف) روش گنبدی (dome)؛ سلول‌ها با هیدروژل‌ها مخلوط شده، سپس به شکل قطراتی (گنبدی‌شکل) در محیط کشت کاشته شده و به‌دقت با محیط کشت پوشانده می‌شوند.

ب) تعبیه چاهکی (insert wells)؛ ابتدا محیط کشت اضافه می‌شود و سپس سوسپانسیون سلولی (مخلوط سلول و هیدروژل) اضافه می‌شود و لایه‌ای دیگر از محیط کشت آن را می‌پوشاند؛ اسفروئیدهای ناهمگون در انتهای چاهک تشکیل می‌شوند.

ج) انتهای ژلی در چاهک (gel-bottom support)؛ انتهای چاهک با لایه‌ای ضخیم از هیدروژل پوشانده می‌شود؛ در بخش بالایی، سوسپانسیون سلولی قرار می‌گیرد.

د) روش آمیختگی (embedding technique)؛ سلول‌هایی که با هیدروژل مخلوط می‌شوند، در انتهای ظرف قرار گرفته و سپس با لایه‌ای از محیط کشت پوشانده می‌شوند تا رشد اسفروئیدها در داربست تأمین شود. [۱۷]

از دیگر مزایای هیدروژل‌ها، آن است که معمولاً میان‌کنش‌های مناسبی با سلول‌ها می‌دهند که این در مورد هیدروژل‌های آلژیناتی صدق نمی‌کند؛ به‌ویژه که اگر درصد خلوص بسیار بالایی داشته باشند، به‌خودی‌خود گیرنده‌ای برای شناسایی توسط سلول‌ها ندارند و عملاً بی‌اثر (inert) دسته‌بندی می‌شوند. [۱۳ و ۱۸] استفاده از پروتئین‌های خارج سلولی مانند کلاژن، فیبرین، هیالورونیک اسید، فیبرونکتین، یا موادی دیگر نظیر آگارز و پلی‌اتیلن گلیکول دی‌آکریلات (که برای تقلید از خواص ماتریکس خارج سلولی کاربرد دارند) و یا مخلوطی از موارد یاد شده را می‌توان برای ساخت داربست‌های مناسب رویکرد مبتنی بر ژل، مورد استفاده قرار داد. [۱۳ و ۱۹] در این بین، برخی مواد مانند هیالورونیک اسید [۲۰] و کلاژن [۲۱] به‌عنوان عوامل القای رشد سلول‌های اندوتلیالی جهت مطالعه اثر فاکتور رشد اندوتلیال عروقی (VEGF)^۱ بر روی رشد و مهاجرت آن‌ها مورد استفاده قرار گرفته‌اند. [۱۳] در حقیقت میزان تراکم سلولی، پرفیوژن^۲ و انتشار مواد، به‌واسطه وجود کانال‌های ریزسیال در سامانه کشت سلول سه‌بعدی، به‌راحتی قابل رصد است. [۱۳]

چنانچه بر خواننده آشکار شد، تخلخل داربست عاملی تعیین‌کننده در ایجاد این کانال‌ها و اساس ریزسیال می‌باشد. در این رابطه می‌توان داربست‌ها را به دو نوع کلی داربست‌های درشت حفره (macro porous) با اندازه حفرات بیشتر از ۱۰۰ میکرومتر، و داربست‌های ریزحفره (micro porous) با اندازه حفرات کمتر از ۱۰ میکرومتر دسته‌بندی کرد. [۲۲]

پیش‌تر اشاره شد که از مهم‌ترین مشکلات سامانه‌های سه‌بعدی امروزی، بروز و انتقال آلودگی و بیماری‌های انسانی-حیوانی است که در حین آماده‌سازی داربست‌ها اتفاق می‌افتند. بر این مبنای، بایست به‌دنبال راهکارهایی برای استریل‌سازی داربست‌هایی نظیر هیدروژل‌ها بود تا از این مشکل جلوگیری شود.

۱. Vascular endothelial growth factor

۲. به‌طور کلی به جریان مایعات در کل سامانه سه‌بعدی کشت سلول اشاره دارد.

استریلاسیون هیدروژل‌ها

استریل‌سازی هیدروژل‌ها پیش از استفاده در کشت سلول از روش‌هایی همچون استفاده از پرتو گاما یا UV، قرار دادن در معرض اتیلن‌اکسید، تیمار هیدروژل‌های تازه تشکیل شده با اتانول، یا استریلاسیون به‌واسطه گاز فشرده کربن دی‌اکسید ممکن خواهد بود. [۱۴] برای استفاده هیدروژل‌ها جهت کپسوله‌سازی سلول‌ها، بایست محلول‌های پیش‌ساز نیز قبل از تشکیل هیدروژل استریل شوند؛ [۱۴ و ۲۳] همچنین می‌توان از فیلتر کردن محلول‌ها (اگر گرانروی بالایی نداشته باشند) و یا استفاده از تشعشعات میکروبی‌زدای UV بر محلول یا پلیمر خشک نیز استفاده کرد. [۲۳] در این خصوص بایست به برخی نکات توجه بسیار داشت؛ به‌عنوان مثال تیمار طولانی با پرتو UV می‌تواند موجب فروپاشی کلاژن شده و یا پرتوهای گاما می‌توانند آلزینات را تخریب کنند. [۱۴]

رویکرد عاری از ساختار ژلی

به‌رغم مزیت‌های بسیار در داربست‌های ژلی همچون هیدروژل‌ها، وجود محدودیت فضایی در انتقال گازها و مواد غذایی، تأثیر منفی بر زنده‌مانی سلول‌ها ایجاد می‌نماید؛ [۱۳]

داربست‌هایی که در این رویکرد به‌کار می‌روند، می‌توان به داربست‌های پلی‌اتیلن ایمن-هیدرازید، که نوعی متصل‌کننده (Linker) پلیمری بین‌سلولی است اشاره کرد که برای کشت سلول‌های سرطانی انسانی مورد استفاده واقع شده است؛ [۱۳ و ۱۸] هرچند که سلول‌های یاد شده برای میان‌کنش بهتر با هیدرازیدها اصلاح شده بودند تا فقدان داربست‌های هیدروژلی و محاسن آن‌ها، روند کشت سلول را با محدودیت مواجه نسازد. [۱۳ و ۱۸]

لازم به ذکر است که پژوهش‌ها بیشتر به استفاده از هیدروژل‌ها و روش‌های مبتنی بر آن‌ها پرداخته‌اند؛ بنابراین اشاره به روش‌های غیروابسته به هیدروژل‌ها در این مقاله خالی از لطف نخواهد بود.

روش‌های غیروابسته به هیدروژل‌ها [۱۳]

روش ریزچاهک (Microwell)، روش اسفروئیدی (قطره معلق (Hanging drop))، روش مبتنی بر دی‌الکتروفورز و روش مبتنی بر ترکیب پلی‌الکترولیتی از مثال‌های مهم این حوزه هستند. [۱۳]

روش ریزچاهک به منظور کاهش وابستگی به داربست‌های وابسته به ژل طراحی شده و به این ترتیب است که سلول‌ها در انتهای ریزچاهک‌های یک ظرف پرفیوژ می‌شوند و محیط کشت از بخش‌های فوقانی تأمین می‌شود. [۱۳]

در روش اسفروئیدی، ریزحباب‌هایی با هدف شبیه‌سازی کانال‌های هیدروژلی و تأمین ریزسیالی، با استفاده از انبساط گازی پلی‌دی‌متیل سیلوکسان (PDMS)^۱ انجام می‌شود. [۱۳]

روش مبتنی بر دی‌الکتروفورز، روشی مشتق از جای‌دهی سلولی (cell sorting) و آرایش درجا (in situ assembling) است که از نمونه تحقیقات موفق با استفاده از این روش، کشت سلول‌های کبدی و اندوتلیالی در یک ساختار سه‌بعدی شبه‌سینوزوئیدی است. [۱۳] در تحقیق گزارش شده توسط گوپتا و همکاران، تنها سلول‌هایی در کشت باقی ماندند که به واسطه نیروی الکتروفورز، به سوی فضاهای آراسته با کلاژن هدایت شدند؛ این فضاها برای آرایش سلول‌ها طراحی شده بودند. [۱۳]

روش چهارم، به این گونه انجام می‌شود که سلول‌ها با استفاده از ترکیبات پلی‌الکترولیتی، درون کانال‌هایی که به چندین ریزستون منتهی هستند تثبیت می‌شوند که از نمونه انجام شده با این روش، می‌توان به کشت سلول‌های بنیادی انسانی مشتق از بافت چربی و تمایز آن‌ها به نوروسفرها اشاره کرد. در این گزارش، ریزستون‌ها با فیبرونکتین پوشش‌دهی اولیه شده و سپس رشد نوروسفرها بدون نیاز به هیدروژل‌ها انجام شده است. [۱۳]

تا اینجا توضیحاتی در رابطه با انواع داربست‌ها از جوانب گوناگون ارائه شد. در ادامه همان‌طور که پیش‌تر نیز گفته شد، اختصاصاً به معرفی تعدادی از داربست‌ها که بیشتر

۱. Polydimethylsiloxane

مورد توجه پژوهشگران واقع شده‌اند پرداخته می‌شود.

معرفی شماری از مهم‌ترین داربست‌ها

داربست‌های کلاژنی سه‌بعدی

به راحتی می‌توان ضخامت‌های گوناگون از فیبرهای کلاژنی را با کنترل پلیمریزاسیون به دست آورد که از طریق تغییر در pH و دما (دمای پیش از انکوباسیون) انجام می‌شود. [۱۳] به عنوان مثال، غشاهای کلاژنی برگرفته از استخوان‌های اسفنجی گوساله برای مدت ۸ ساعت در استیک اسید ۰٫۵ مولار و در دمای ۴ درجه غوطه‌ور می‌شوند؛ سپس برای ۱۵ دقیقه مخلوط شده و سپس به وسیله سدیم هیدروکسید ۴ مولار خنثی می‌شوند. [۲۴]

محلول همگون حاصل، برای مدت ۵ روز در آب دیونیزه دیالیز و لیوفیلیزه می‌شود. متوسط اندازه حفرات ۵۰ میکرومتر بوده و قطعات به ابعاد $۱ \times ۵ \times ۵$ میلی‌متر تهیه می‌شوند؛ همچنین پیوندهای متقابل^۱ با استفاده از مواد واکنشگری همچون کربو دی‌ایمید (دی‌متیل آمینوپروپیل-۳-۳-اتیل-۱-EDAC)^۲ و N-هیدروکسی سوکسینید انجام می‌شود؛ [۲۴] سپس لیوفیلیزه مجدد، استریلاسیون و ذخیره‌سازی صورت می‌گیرد. [۲۴]

نتایج رشد رده سلولی U87^۳ در این داربست بسیار مطلوب بوده است. [۲۴] سلول‌های فیبروبلاست پستانی انسان در داربست کلاژنی با ضخامت‌های مختلف کشت داده شده و نتایج نشان داده‌اند که استفاده از کلاژن‌های ضخیم‌تر، زنده‌مانی سلول‌ها و همچنین فشار وارد بر فیبرها را افزایش می‌دهد، [۱۳] اما ممکن است بسته به نوع سلول، این موضوع دستخوش تغییر شود؛ به عنوان مثال، سلول‌های بنیادی مزانشیمی انسانی (HMSCs)،^۴ زنده‌مانی بیشتری در داربست‌های با درجه سختی

۱. برقراری میان‌کنش درون ساختار داربست، جهت افزایش کارایی و بهبود خصوصیات فیزیکی-شیمیایی.

۲. 1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl) carbodiimide

۳. G Stem Cell-like U87

۴. Human Mesenchymal Stromal Cells

پایین‌تر نشان می‌دهند و افزودن آلژینات موجب انعطاف‌پذیری و تشکیل اسفروئید در کشت سلول‌های توموری می‌شود. [۲۵]

کشت سلول‌های گلیوما در داربست‌های کلاژنی، حساسیت شیمیایی مشابه با سلول‌های طبیعی فراهم کرده که زمینه را برای آزمایش‌های درمانی و سنجش عملکرد دارو مهیا می‌سازد. [۲۴] نتایج یک گزارش تحقیقاتی نشان داده‌اند که درجه سختی داربست بر ریخت‌شناسی سلول‌های گلیوبلاستوما، تکثیر، شکل‌گیری، بیان ژن و مقاومت دارویی آن‌ها تأثیر دارد. [۲۵]

نکته مهم این است که ساختار و معماری داربست می‌تواند از طریق درجه سختی مواد مورد استفاده برای تشکیل آن، کنترل شده و استحکام هیدروژل می‌تواند عاملی برای القای رشد سلول‌ها و بقایشان در شبکه سه‌بعدی باشد. [۲۵] به‌طور کلی، داربست باید دارای ویژگی‌های پایدار و قابل اعتماد باشد؛ به این ترتیب که بتوان با استفاده از آن، رشد و مهاجرت سلولی (با توجه به درجه سختی داربست) را تنظیم کرد. [۲۵]

اسفنج‌های قابل جذب کلاژنی (ACS)^۱

گرچه صفت قابل جذب بودن را بیشتر برای بحث ایمپلنت‌ها در نظر می‌گیرند، اما در این مقاله، اسفنج‌های کلاژنی نیز مورد اشاره واقع می‌شوند.

از این اسفنج‌ها برای کشت رده‌سلولی ST2^۲ و رشد و تمایز به بافت استخوانی استفاده شده است. [۲۵] همچنین از دو پروتئین محرک استخوان‌سازی (osteopromotive) (پروتئین نوترکیب مورفوژنتیک استخوان انسان ۹ و ۲ (rhBMP9) و rhBMP2^۳) برای افزایش نرخ رشد و تمایز استفاده شده که rhBMP9 عملکرد بهتری داشته است. [۲۶]

اتصال سلول‌ها طی ۸ ساعت انجام شده و بازده تقریبی ۱۰۰٪ نسبت به بافت طبیعی

۱. Absorbable Collagen Sponge

۲. رده سلولی استرومایی مشتق از مغز استخوان یا bone marrow-derived stromal cell line

۳. recombinant human bone morphogenetic protein

در این خصوص نشان داده‌اند. [۲۶] از منابع طبیعی برای تولید این اسفنج‌ها می‌توان به اسفنج کلاژنی خوکی نوع ۱ و ۳ (ACS, porcine-origin native types I and III porcine collagen sponge) اشاره کرد. [۲۶]

قطعات ACS به ضخامت ۱ میلی‌متر برش می‌خورند و در ظروف ۲۴ چاهکه جای می‌گیرند و به مدت ۵ دقیقه قبل از مرحله رونشینی سلولی در معرض rhBMP9 یا rhBMP2 قرار می‌گیرند؛ آرایش سطح‌محور فیبرهای کلاژنی در این داربست، نسبت سطح به حجم بسیار بالایی ایجاد می‌کند. [۲۶]

همچنین بررسی جوانب اقتصادی بین استفاده از پودر این محصول (جهت ترمیم استخوان و ایمپلنت) و پیوندهای استخوانی در بریتانیا نشان داد که رویکرد اول، به طرز معناداری کارآمدتر است. [۲۷]

هیالورونیک اسید (HA)

هیالورونیک اسید از گلیکوزامینوگلیکان‌های موجود در ریزمحیط اطراف بافت‌هاست. [۲۸] زیست‌سازگاری، زیست‌تخریب‌پذیری (این موضوع بیشتر مورد توجه تحقیقات درمانی مبتنی بر بحث ایمپلنت‌ها هستند) و حضور گروه‌های عاملی (نمایانگر فعالیت زیستی)، استفاده از آن را برای طراحی داربست جهت کشت سه‌بعدی و مهندسی بافت مناسب گردانده است. [۲۵ و ۲۹ و ۳۰]

هیالورونیک اسیدها را القاگر رشد سلول و تمایز می‌دانند [۲۵] و از این جهت، دور از ذهن نیست که در ریزمحیط اطراف بافت‌های توموری نیز یافت شوند. [۳۱]

حضور گروه‌های کربوکسیلی و هیدروکسیلی، به برقراری پیوندهای متقابل از نوع اتری یا استری، یا تغییرات کووالانسی جهت تشکیل دیگر موتیف‌های واکنش‌گر یاری می‌دهد. [۲۵] از نمونه داربست‌های ساخته شده با استفاده از هیالورونیک اسید، داربست‌هایی با نام اختصاری HA-SPDP-NAC می‌باشد [۲۵] که به‌طور خلاصه، از ترکیب N-استیل سیستئین (NAC)^۱ با پیوند دی‌سولفیدی به سوکسینیمیدیل ۳- (۲-)

۱. N-acetylcysteine

پیریدیل دی‌تیو) پروپیونات (SPDP)^۱ تشکیل می‌شود. [۲۵ و ۳۲] سپس با استفاده از کربو دی‌ایمید (Carbodiimide)،^۲ گروه کربوکسیل هیالورونیک اسید فعال شده تا با ترکیب یاد شده (SPDP-NAC) از طریق تشکیل پیوند آمیدی، واکنش دهد. [۲۵]

فرایند ژلاسیون در سنتز این داربست، واکنش معاوضه تیو-دی سولفیدی است. [۳۲] این فرایند را می‌توان از طریق مخلوط شدن گلیکوپروتئین‌های غنی از سیستئین موجود در موکوس با هیالورونیک اسید تیوله شده انجام داد. [۳۲]

این رویکرد، هر دو ویژگی گرانروی و خواص الاستیک هیدروژل را به طرز چشمگیری افزایش می‌دهد. [۳۳] از طرفی این هیدروژل، سمیتی برای سلول نداشته و با درجات سختی بالاتر، ریخت‌شناسی سلول‌ها را تحت تأثیر قرار می‌دهد. [۲۵]

در پژوهشی دیگر، درجات مختلف از پتیدی به‌نام فلوئورنیل متوکسی کربونیل دی‌فنیل آلانین (FmocFF) با ویژگی خودآرایی،^۳ برای تنظیم میزان سختی آن استفاده شده است. [۳۴] این رویکرد، باعث ایجاد شبکه‌ای رشته‌ای با الاستیسیته بالا می‌شود. [۲۵]

ترکیب هیالورونیک اسید و پلی-N-ایزوپروپیل اکریل آمید (PNIPAAm)^۴ برای کشت و حمایت سلول‌های بنیادی پرتوان انسان مناسب است. [۲۵]

آلژینات هیدروژل

آلژینات، پلی‌ساکاریدی خطی است که از باکتری و یا جلبک قهوه‌ای به دست می‌آید. [۱۶] کیفیت و مقدار آلژینات استخراج شده از جلبک‌های قهوه‌ای، به نوع گونه آن و همچنین فصل برداشت جلبک‌ها از آب وابسته است. [۱۶] ایران از بهترین منابع

۱. succinimidyl 3-(2-pyridyldithio) propionate

۲. یک گروه عاملی با فرمول شیمیایی $RN=C=NR$

۳. self-assembly

۴. Poly (N-isopropyl acrylamide)

طبیعی برای جلبک‌های قهوه‌ای‌ست؛ به طوری که دارای ۸۱ گونه در خلیج فارس و دریای عمان، و همچنین در حوزه دریاچه خزر است. [۳۵] پژوهشگران علاقه‌مند می‌توانند این موضوع را یکی از بزرگ‌ترین امتیازها جهت استفاده از داربست‌های آلژیناتی برای کشت سلول سه‌بعدی به حساب آورند.

مقدار آلژینات موجود در دیواره سلول جلبک، سهمی تا ۴۰٪ جرم جلبک قهوه‌ای خشک شده را تشکیل می‌دهد که به دست آوردن این مقدار، بستگی زیادی به روش استخراج دارد. [۳۶]

آلژینات از دو واحد تکرارشونده L- گلورونیک اسید (L-Gluconic acid) که به اختصار G نامیده می‌شوند) و D- مانورونیک اسید (D-mannuronic acid) که به اختصار M نامیده می‌شوند) که با پیوندهای ۱ به ۴ گلیکوزیدی به یکدیگر متصل شده‌اند، تشکیل شده است. [۳۶] تعداد واحدهای MM، GG، و یا MG تعیین‌کننده خصوصیات فیزیکی ترکیب هستند؛ به این ترتیب که گرانروی ترکیب به میزان واحدهای M بستگی دارد، درحالی‌که حالات ژل مانند از مقدار واحدهای G بیشتر ناشی می‌شود. [۳۷] ژل‌های نرم‌تر، از سدیم آلژینات با نسبت M به G پایین‌تر ناشی می‌شوند. [۱۶]

اگر pH محلول حاوی آلژینات طوری اسیدی شود که پایین‌تر از pKa مولکول بیاید، آلژینات به حالت نامحلول در می‌آید؛ اما در حالت محلول، مولکول شکلی از پیچ‌های تصادفی گسترده به خود می‌گیرد که ناشی از دافعه الکتروستاتیکی درون مولکولی بین بارهای منفی مجاور است. [۱۸] چنانچه پیش‌تر نیز ذکر شد دما در فرایند تهیه داربست، تأثیر به‌سزایی بر میزان ژلاسیون و سختی آن ایفا می‌کند. [۱۶]

هرچند که آلژینات ماده‌ای زیست‌سازگار، زیست‌تخریب‌پذیر و غیرسمی است، اما چندین نقص دارد؛ ضعف در چسبندگی زیستی، اینرسی زیستی (موادی که در مواجهه با بافت یا نمونه زنده زیستی، واکنش یا پاسخی از خود نشان نمی‌دهند، که می‌تواند به علت عدم تعریف گیرنده بر سطح سلول‌ها برای شناسایی مولکول مورد نظر باشد؛ این موضوع پیش‌تر نیز اشاره شده بود. [۱۸]) و دشوار بودن استخراج و تخلیص آلژینات از جلبک‌های دریایی. [۱۶] محصولات گوناگون برپایه آلژینات، به‌رغم داشتن خواص

فیزیکی-شیمیایی مشابه ممکن است حاوی آلودگی‌هایی باشند که موجب القای واکنش‌های نابجای سلولی، یا میان‌کنش‌های ناخواسته و کنترل نشده بین سلول و داربست شود. [۱۸] با این وجود که حذف ناخالصی‌ها در مراحل بعد از استخراج قابل انجام است، هزینه و زمان گزافی بر پژوهشگر تحمیل می‌کند. [۳۸] به‌طور کلی می‌توان آلودگی‌ها را به دسته‌های اندوتوکسین‌ها، عناصر آلاینده و توده‌های زیست‌میکروبی [۱۸] دسته‌بندی کرد.

آلژینات‌ها به شکل‌های مختلف نظیر هیدروژل، میکروکپسول، میکروسفر، فیبر، فوم و اسفنج تولید می‌شوند. [۱۶]

صرف‌نظر از کاربردهای صنعتی آلژینات نظیر استفاده در صنایع غذایی، کشاورزی، آرایشی-بهداشتی و غیره، زیست تخریب‌پذیری، سهولت ژلاسیون و عدم سمیت در آن باعث شده تا حتی در بین مواد اولیه جهت ترمیم استخوان نیز مورد استفاده قرار بگیرد. [۲۹] لازم به ذکر است که برای استفاده در صنایع پزشکی، نیاز به تهیه آلژینات با درصد خلوص بسیار بالا وجود دارد تا از ایمنی‌زایی احتمالی جلوگیری شود. [۴۰]

اگر پژوهشگر با علم کافی به شیمی پیوند در این حوزه فعالیت کند، این امکان را خواهد داشت تا فرضاً با ترکیب دو ماده گوناگون، از ویژگی‌های مثبت هر یک در محصول نهایی استفاده کرده و ویژگی‌های منفی هر یک را پوشش دهد؛ به‌عنوان مثال با ترکیب ژلاتین (پروتئین) و آلژینات، ترکیبی موسوم به آلژینات دآلدئید ژلاتین تولید می‌شود [۴۱] و از آنجا که آلژینات در زمینه‌هایی مانند رونشینی و میان‌کنش‌های سلولی ضعف دارد و همچنین در شرایط کینتیکی غیرکنترل شده، تجزیه‌پذیری کندی دارد، با وجود ژلاتین افزوده شده، تجزیه‌پذیری، چسبندگی سلولی و نسبت اثر آن بر رشد و مهاجرت سلولی تقویت می‌شود. [۴۱] این ترکیب موجب کاهش شکنندگی آلژینات در طی آزمایش‌های طولانی‌تر و همچنین افزایش خاصیت چسبندگی سلولی و تلقین ترشح VEGF می‌شود. [۴۲]

ژلاتین همچنین می‌تواند به داربست آلژیناتی استحکام بیشتری ببخشد. [۴۳] از ویژگی‌های آلژینات، میل رغبت‌های گوناگون به یون‌های دوظرفیتی است که به این دلیل، استفاده از چنین یون‌هایی در فرایند تولید داربست‌های آلژیناتی اهمیت پیدا

می‌کند که بر دیگر خصیصه‌هایی نظیر جذب آب، پایداری و رشد سلول تأثیر می‌گذارد. [۳۷]

در یک پژوهش از یون کلسیم (Ca^{2+}) و پرزهای کوچک سلولزی برای ایجاد پیوندهای متقابل استفاده شد. [۱۶] نتایج حاکی از بهبود خواص مکانیکی هیدروژل و پایداری بیشتر رهانش دارو بود (نرخ آزادسازی بایست شیبی مساعد برای سلول‌ها داشته باشد که بسته به حساسیت سلول‌ها و شرایط مقتضی، ممکن است افزایش اندک در این شیب، سمیت سلولی در پی داشته باشد) و عوارض ناشی از سمیت برای سلول‌ها نداشت. [۱۶] درصد خلوص بالا از اهمیت بسیاری برخوردار است؛ [۴۰] چراکه فرضاً برخی اندوتوکسین‌های باقیمانده در مواد اولیه، می‌توانند به گیرنده CD_{14} (گیرنده‌ای برای ترکیبات لیپوپلی ساکاریدی و پروتئین‌های متصل به لیپوپلی ساکارید [۴۴]) متصل شده و متعاقباً باعث تحریک سیستم ایمنی شوند. [۱۶]

چندین روش برای تهیه ژل‌های آلژیناتی در ادامه مقاله معرفی می‌شود.

انواع ژلاسیون برای سنتز آلژینات. [۱۶ و ۱۸ و ۴۵]

ژلاسیون یونی که خود به دو زیربخش تقسیم می‌شود و ژلاسیون کووالانسی از انواع این روش‌ها هستند.

از آنجا که آلژینات‌ها میل ترکیبی بالایی نسبت به فلزهای قلیایی خاکی دارند، می‌توان با روش یونی، هیدروژل‌هایی در حضور کاتیون‌های دو ظرفیتی (به استثنای Mg^{2+}) تشکیل داد. میل رغبت آلژینات نسبت به سه کاتیون دو ظرفیتی به ترتیب یون‌های $Ca^{2+} < Sr^{2+} < Ba^{2+}$ است.

پیش‌تر نیز اشاره شد که با افزایش میزان واحدهای G، طول آن‌ها و وزن مولکولی، الاستیسیتهی ژل، تخلخل و پایداری آن افزایش می‌یابد. تخلخل ژل آلژینات در مقیاس نانو، در بازه ۵ الی ۲۰۰ نانومتر قابل تغییر است. این موضوع، امکان دسترسی به مواد غذایی، دفع مواد زاید و سنتز محصولات نظیر انسولین، دوپامین، اندوستاتین و فاکتورهای رشد عصبی را در اختیار سلول‌ها قرار می‌دهد.

تیمار ژل‌های یونی با عوامل جاذب یون‌های دو ظرفیتی نظیر سیترات و اتیلن

دی‌آمین تتراستیک اسید (EDTA)^۱ یا هگزامتافسفات، منجر به حل شدن آن‌ها خواهد شد. این ویژگی امکان آزادسازی آرام و یا سریع سلول‌هایی را که درون هیدروژل آلژیناتی به دام افتاده‌اند، برای سلسله آزمایش‌های بعدی مانند فلوسایتومتری فراهم می‌کند. پیوندهای متقابل بین کاتیون‌های دو ظرفیتی و آلژینات، آن‌ا برقرار می‌شود. لازم به ذکر است که آلژینات‌های تولید شده مبتنی بر روش‌های یونی، در درازمدت پایداری خود را از دست می‌دهند که این موضوع بیشتر به حل شدن آن‌ها و برقراری میان‌کنش‌های یونی با مولکول‌های حلال برمی‌گردد. [۴۰]

الف) در روش تراوشی ژلاسیون یونی، اجازه می‌دهند تا یون‌های سازنده ژل از مخزنی بزرگ و خارجی به درون محلول آلژینات تراوش کند. این روش برای آماده‌سازی بیدهای هیدروژلی از طریق غوطه‌ور کردن محلول حاوی آلژینات درون محلول حاوی یون‌های سازنده ژل (معمولاً CaCl_2)، معمول است.

ب) در روش داخلی ژلاسیون یونی، با آزادسازی کنترل شده یون‌های سازنده ژل از یک منبع بی‌اثر (بدون القای واکنش‌های ناخواسته یا غیره) که در محلول آلژینات قرار گرفته یا معلق است، تعریف می‌شود. نمونه‌هایی از این منابع یونی شامل نمک‌های کربناتی (CaCO_3 یا SrCO_3)، کلسیم EDTA، کلسیم سترات، کلسیم سولفات، کلسیم آلژینات و کلسیم گلوکونات می‌باشد.

آزادسازی یون‌های سازنده ژل می‌تواند به‌واسطه تغییر در pH آغاز شود. ترکیب گلوکونو- δ - لاکتون (GDL)^۲ و سایر عوامل کلات‌کننده یونی، می‌توانند محلولیت نمک‌های کلسیمی (کلسیم آلژینات، کلسیم سولفات) را با محدودیت مواجه کنند.

وجود ترکیب GDL با نسبت مولی ۲ به ۱ نسبت به منابع کربناتی ($\text{SrCO}_3/\text{CaCO}_3$) منجر به تولید ژل‌های خنثی خواهد شد. در مقایسه با روش ژلاسیون تراوشی، یون‌ها در این روش با حالتی کنترل شده و در طی بازه زمانی مشخصی، از منابع به‌سوی آلژینات توزیع می‌شوند.

۱. Ethylenediaminetetraacetic Acid

۲. Glucono delta-lactone

در رویکرد دوم، با افزودن گروه‌های متاکریلاتی به اسکلت آلژیناتی از طریق کووالانسی و در حضور منبع UV و یک آغازگر نوری واکنش، می‌توان هیدروژل‌های کووالانسی تولید کرد. اگر سلول‌های مورد نظر، پیش از برقراری پیوندهای متقابل ناشی از تحریک نوری در محلول آلژیناتی معلق باشند (سوسپانسیون)، قابلیت توزیع یکنواخت در سراسر هیدروژل را خواهند داشت.

مشتقات آلژیناتی: آلژینات‌های مزدوج با پپتید

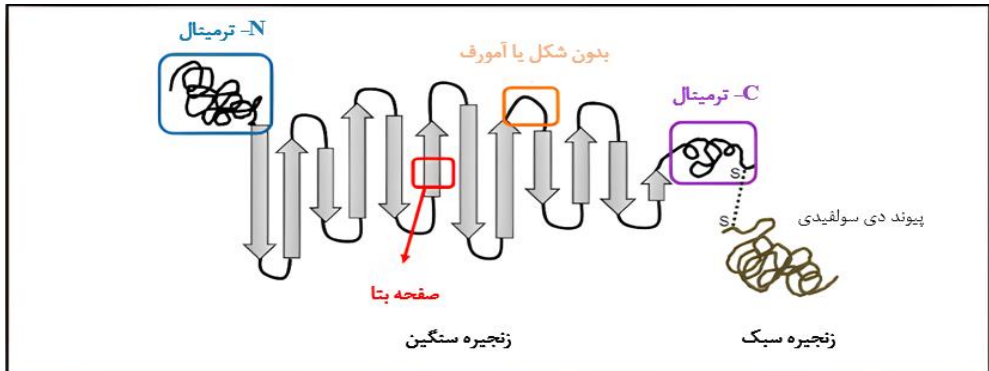
نشان داده شده است که عرضه توالی پپتیدی RGD عاملی مهم در تنظیم رفتار سلولی است. [۴۶] افزودن توالی آمینو اسیدی آرژنین (R)، گلاسین (G) و آسپارتیک اسید (D) به سدیم آلژینات می‌تواند باعث تحریک رشد و تأثیر بر چسبندگی سلولی و تمایز آن‌ها شود. همچنین نشان داده است که توالی RGD می‌تواند در راه‌اندازی میان‌کنش‌ها با سلول‌ها مؤثر افتد؛ به این طریق که توالی‌های RGD توسط گیرنده‌های سلولی مورد شناسایی قرار می‌گیرند. [۱۶ و ۴۶]

فیبروئین ابریشم سه‌بعدی

فیبروئین ابریشم را در مقالات برای مهندسی بافت به کار برده‌اند؛ به‌خصوص بافت‌های حساسی مانند بافت استخوانی (حساس به تأمین مواد (Mineralization) و معماری که داربست این معماری را تأمین می‌کند). [۴۷]

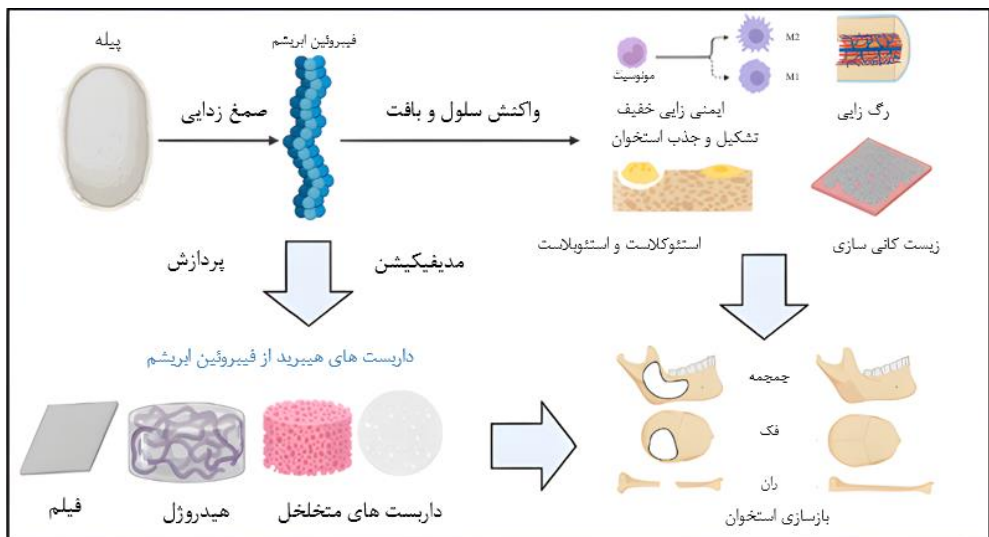
ماده اصلی آن از کرم ابریشم (از گونه‌هایی همچون *Bombyx mori* و *Antheraea assama* و *Antheraea pernyi* که ظاهراً از مورد سوم نتایج بهتری حاصل شده است). [۴۸] گرفته می‌شود. در ساختمان ابریشم فیبروئین، مارپیچ‌های آلفا با توزیع تصادفی قرار گرفته‌اند که در صورت تأمین پیوندهای هیدروژنی (درون یا بین مولکولی)، قادرند به صفحات بتا تبدیل شده و در نتیجه برای تبدیل به یک داربست مستحکم (به‌جای حالت محلول) آماده می‌شوند. [۴۹]

در شکل ۲، شمایی از ساختمان دوم پروتئین فیبروئین ابریشم را مشاهده می‌کنید.



شکل ۲. ساختمان دوم پروتئین فیبروئین ابریشم؛ به پیوند دی سولفیدی در پایانه C پروتئین دقت کنید، هرچند pH بر تمامی بخش‌های پروتئین تأثیرگذار است، اما حساسیت پروتئین بیشتر منوط به همین بخش می‌باشد. [۴۸]

بسته به نوع ماده زیست فعال اضافه شده می‌توان از فیبروئین ابریشم، انواع مختلفی از داربست‌ها را نظیر فیلم (لایه نازک)، هیدروژل و اسفنج تولید کرد (شکل ۳). [۴۸] از مهم‌ترین مزایای این داربست می‌توان به خصوصیات مکانیکی رضایت‌بخش، زیست تخریب‌پذیری قابل کنترل، تنظیم‌پذیری ساختاری، آرایش ساختاری مناسب زیست فعال بودن و سطح عملکردی قابل اصلاح اشاره کرد. [۴۸]



شکل ۳. خلاصه‌ای از روند تهیه و تولید داربست‌ها از فیبروئین ابریشم؛ [۴۸] فرایند با صمغ‌زدایی

از پيله ابريشم برای استخراج فیبروئين آغاز می‌شود. سپس فیبروئين پردازش و اصلاح (مدیفیکاسیون) شده و به اشکال مختلفی مانند فیلم، هیدروژل و داربست‌های متخلخل تبدیل می‌شود. این داربست‌ها به دلیل زیست‌سازگاری بالا، واکنش سلولی و بافتی مناسب، ایمنی‌زایی خفیف، رگ‌زایی، تشکیل و جذب استخوان و زیست‌کانی‌سازی، برای بازسازی استخوان‌های مختلف مانند جمجمه، فک و ران کاربرد دارند. فرایند اتوکلاو نیز در این فرایند نقش دارد. در شکل ۳ به‌طور خلاصه، به انواع داربست‌هایی که از فیبروئين ابريشم تهیه می‌شوند و همچنین برخی کاربردهای حائز اهمیت آن اشاره شده است.

مهم‌ترین معایب این داربست عبارت‌اند از این‌که فیبروئين ابريشم به تنهایی داربست مناسبی نیست و معمولاً به یک ماده اضافه (ترکیب زیست فعال) برای تأمین پیوند هیدروژنی، استحکام و بهبود تأمین مواد معدنی نیاز دارد؛ [۴۸] همچنین در آزمایش‌ها و سنجش‌های طولانی‌تر، به‌رغم زیست تخریب‌پذیری خوب می‌تواند در اثر آنزیم‌های بدن فیبرهایی تولید کند که موجب تحریک ایمنی شود. [۴۸]

برای تهیه این داربست در این مقاله به دو روش اشاره می‌شود.

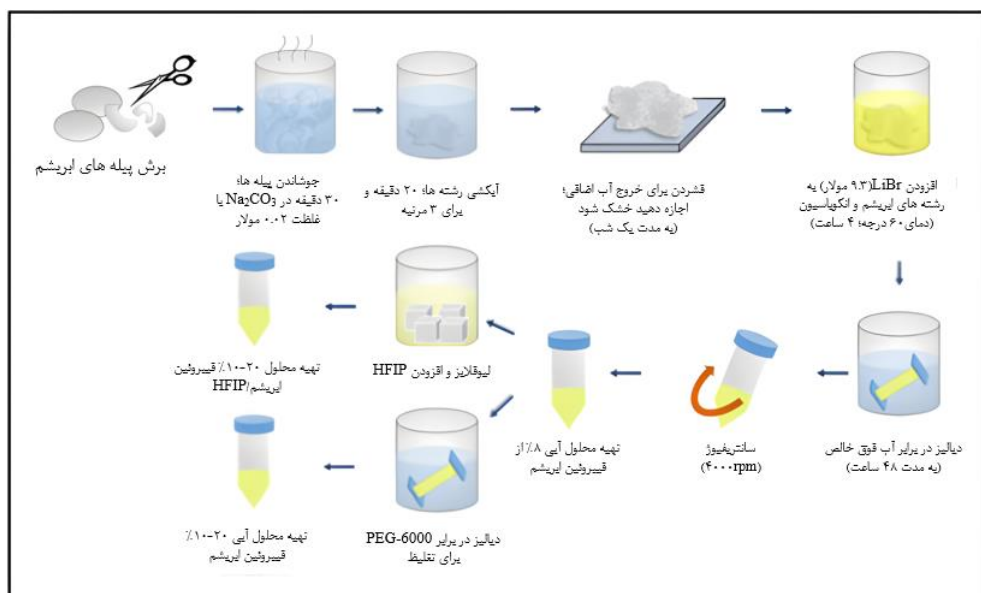
در روش اول [۵۰] ابتدا صمغ‌زدایی پيله‌های کرم ابريشم به‌واسطه محلول Na_2CO_3 برای ایجاد پروفیلامنت انجام می‌شود. سپس محلول ۹,۳ مولار لیتیوم برمید (LiBr) و حرارت در حمام آب داغ ۶۰ درجه برای حل کردن پروفیلامنت خشک شده با جرم‌های مختلف آماده می‌شود. پس از حل شدن کامل، محلول‌های ترکیبی در غشای دیالیز از پیش تیمار شده (۱۴-۱۲ کیلو دالتون) ریخته شده و غشا برای دیالیز در آب فوق خالص (ultra-pure) قرار می‌گیرد. آب فوق خالص هر ۴ ساعت به مدت ۳ روز برای حذف مقادیر اضافه Li^+ و Br^- و ناخالصی‌های موجود در محلول تعویض می‌شود. در نهایت، کیسه دیالیز حاوی محلول فیبروئين ابريشم در محلول با غلظت ۱۰ درصد پلی‌اتیلن گلیکول قرار داده می‌شود تا تغلیظ صورت پذیرد. نویسندگان این منبع اعلام کرده که با این روش، به محلول‌های ۰,۱، ۱ و ۴ درصد دست پیدا کرده است. در نهایت ذخیره‌سازی در دمای ۴ درجه صورت می‌پذیرد.

در روش دوم [۵۱] پيله‌های کرم ابريشم به قطعات کوچک برش می‌خورند و برای مدت ۳۰ دقیقه در سدیم کربنات ۰,۰۲ مولار می‌جوشند. رشته‌های ابريشم فیبروئين با

آب دیونیزه برای ۳ مرتبه و مدت ۲۰ دقیقه شست‌وشو و سپس خشک می‌شوند. سپس رشته‌ها در محلول ۹,۳ مولار لیتیم بروماید، دمای ۶۰ درجه و برای چهار ساعت جهت سنتز محلول ۲۰٪ جرم به حجمی حل می‌شوند.

محلول به دست آمده، با آب دیونیزه و با استفاده از کیسه دیالیز ۳,۵ کیلو دالتون، با برش وزنی مولکولی (MWCO)^۱ در دمای اتاق، به مدت ۴۸ ساعت جهت حذف لیتیم بروماید دیالیز می‌شود. پس از دیالیز، سانتریفیوژ محلول‌های ابریشم فیبروئیدی در ۴۰۰۰ rpm انجام می‌شود. برای رسیدن به محلول ۸٪، فیلتراسیون با صافی سلولی (زدایش آلودگی‌های نامحلول) انجام می‌شود.

جهت تهیه محلول‌های فیبروئین ابریشم بر پایه HFIP، محلول آبی فیبروئین ابریشم ابتدا لیوفیلیزه، سپس در HFIP حل می‌شود تا محلول‌های ۱۰، ۲۰ و ۳۰ درصد فیبروئین ابریشم تولید شود. محلول‌های آبی ۱۰٪ و ۲۰٪ وزنی فیبروئین ابریشم با دیالیز در برابر محلول پلی‌اتیلن گلیکول ۱۰٪ وزنی، به مدت ۱۲ تا ۲۴ ساعت تهیه می‌شوند. شکل ۴ روش دوم را به صورت شماتیک نشان می‌دهد.



۱. Molecular weight cut-off

شکل ۴. خلاصه‌ای از روش پیشنهادی دوم را مشاهده می‌کنید؛ دقت شود که جوشاندن پيله‌ها در Na_2CO_3 به جهت حذف پروتئین سریسین از ابریشم صورت می‌پذیرد که خواص نامطلوبی برای کشت سلول دارد. [۵۱] برای توضیحات بیشتر به متن مراجعه کنید.

سرامیک‌های درشت حفره دوفازی کلسیم فسفات (MBCP)^۱

این ترکیب ساختاری متخلخل، بدون سمیت برای بدن و زیست سازگار دارد. [۵۲] در تحقیقات انجام شده، این ترکیب به جهت استفاده در ترمیم بافت و به صورت ایمپلنت مورد استفاده قرار گرفته و فضایی متخلخل برای تسریع تقسیم سلول‌های استخوانی فراهم کرده است. [۵۳]

این ماده از ترکیب دو ماده هیدروکسی آپاتیت (Hydroxylapatite)؛ که در اینجا با HA نشان داده شده است) و بتادتری کلسیم فسفات (β -TCP)^۲ حاصل شده و خاصیت زیست فعال دارد. [۵۴] نسبت وزنی هیدروکسی آپاتیت ۶۰٪ به ازای ۴۰٪ β -TCP به عنوان میزان بهینه گزارش شده است. [۲۲] مهم‌ترین مزیتی که این سرامیک‌ها فراهم می‌کنند، کلنی‌سازی سلول‌ها (Cell colonization) است. [۵۵]

از دیگر خصوصیات که در استفاده از این داربست مورد توجه واقع شده‌اند می‌توان به اندازه حفرات (۵۶۵ میکرومتر بهترین نتایج را داشته است)، درصد تخلخل (۴۰-۵۰٪) و حساسیت به فشارهای مکانیکی شدید و عدم القای واکنش منفی یا التهاب پس از انتقال به بدن حیوان مدل اشاره کرد. [۲۲]

اگر پژوهشگر بخواهد از این سرامیک‌ها استفاده کند، بهتر است یک بستر اولیه مانند رشته‌های اکتین در نظر بگیرد تا این سرامیک‌ها روی آن بستر سوار شوند (در تحقیقات حوزه ایمپلنت، سرامیک‌ها در ارتباط با استخوان اصلی بوده‌اند؛ فرضاً اگر بخشی از تنه استخوان از بین رفته باشد، سرامیک‌ها طوری در آن فضا تعبیه می‌شوند تا به تنه استخوان تکیه داده باشند). [۵۶]

برای انتخاب بستر پایه جهت سوار کردن این سرامیک‌ها می‌توان از مواد غیرآلی

۱. Macroporous Biphasic Calcium Phosphate Ceramics

۲. β - tri-Calcium phosphate

مانند آلومینا (اکسید آلومینیوم)، زیرکونیا (اکسید زیرکونیوم)، فسفات‌های کلسیم، سولفات‌های کلسیم، کربنات کلسیم، شیشه‌های زیست‌فعال و مواد آلی یا پلیمری همچون کلاژن، کیتین، آگارز، هیدروکسی استرها، پلی‌لاکتیک/ پلی‌گلیکولیک اسید استفاده کرد. [۵۶]

لازم به ذکر است که در کشت موفقیت‌آمیز سلول‌های غضروف (chondrocyte)، از این سرامیک‌ها استفاده شده است؛ به این صورت که مواد القاگر تقسیم (osteoinductive) مانند رتینوئیک اسید نیز استفاده شده تا تقسیم سلولی افزایش یابد. [۵۶ و ۵۷] در این گزارش، برای قرار گرفتن سلول‌ها در MBCP برای کشت، تلاشی انجام نشده و ظرفیت جذب این داربست بالا و کافی بوده است. [۵۶]

جمع‌بندی و نتیجه‌گیری

جهت طراحی سامانه کشت سه‌بعدی سلول برپایه داربست، مهم‌ترین اولویت‌ها شامل امکانات و تجهیزات، نوع رده سلولی و هدف پژوهشگر هستند. بایست توجه داشت که هدف پژوهشگر، مهم‌ترین عامل در انتخاب گزینه نهایی جهت اجرای کشت سه‌بعدی است. کشت سه‌بعدی سلول در ایمپلنت، نیازمند تحقیقاتی از قبیل بررسی عدم سمیت برای رده سلولی و همین‌طور عدم ایمنی‌زایی مخاطره‌آمیز و سمیت برای بدن است. از طرفی، زیست تخریب‌پذیری و زیست سازگاری نیز مطرح هستند؛ درحالی‌که برای استفاده از داربست جهت ارتقای بازدهی کشت (خارج از بدن) و پژوهش‌هایی غیر از ایمپلنت، نیازی به برخی از این الزامات، مانند زیست تخریب‌پذیری و یا عدم سمیت برای بدن نیست.

عدم تضاد منافع: تأیید می‌شود این مقاله توسط نویسندگان نام برده، آماده و ارسال شده و به مسئولیت‌های ایشان در گروه علوم زیستی از دانشکده علوم پایه دانشگاه جامع امام حسین (ع)، ارتباطی ندارد.

منابع

1. Costa, A., Naranjo, J.D., Londono, R., Badylak, S.F. (2017). "Biologic Scaffolds". *Cold Spring Harb Perspect Med*; 7(9).
2. Park, J.Y., Park, S.H., Kim, M.G., Park, S-H, Yoo, T.H., Kim, M.S. (2018). *Biomimetic scaffolds for bone tissue engineering. Biomimetic Medical Materials: From Nanotechnology to 3D Bioprinting*, 109-21.
3. Hata, Y., Iida, J. (2009). Scaffold Protein. In: Binder MD, Hirokawa N, Windhorst U, editors. *Encyclopedia of Neuroscience*. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg; 3613-6.
4. Riss, T.L., Moravec, R.A., Duellman, S.J., Niles, AL. "Treating cells as reagents to design reproducible assays". *SLAS DISCOVERY: Advancing the Science of Drug Discovery*, 26(10):1256-67.
5. Segeritz, C-P, Vallier, L. (2017). *Cell culture: Growing cells as model systems in vitro*. Basic science methods for clinical researchers: Elsevier, 151-72.
6. Ballav, S., Deshmukh, A.J., Siddiqui, S., Aich, J., Basu, S. (2021). *Two-dimensional and three-dimensional cell culture and their applications*. Cell Culture-Advanced Technology and Applications in Medical and Life Sciences.
7. Ghanemi, A. (2015). "Cell cultures in drug development: Applications, challenges and limitations". *Saudi Pharm J*, 23(4):453-4.
8. Kapałczyńska, M., Kolenda, T., Przybyła, W., Zajączkowska, M., Teresiak, A., Filas, V., et al. (2018). "2D and 3D cell cultures - a comparison of different types of cancer cell cultures". *Arch Med Sci*, 14(4):910-9.
9. Jensen, C., Teng, Y. (2020). "Is it time to start transitioning from 2D to 3D cell culture?" *Frontiers in molecular biosciences*, 7:33.
10. Duval, K., Grover, H., Han, L.H., Mou, Y. (2017). "Pegoraro AF, Fredberg J, Chen Z. Modeling Physiological Events in 2D vs. 3D Cell Culture". *Physiology (Bethesda)*, 32(4):266-77.
11. Edmondson, R., Broglie, J.J., Adcock, A.F., Yang, L. (2014). "Three-dimensional cell culture systems and their applications in drug discovery and cell-based biosensors". *Assay and drug development technologies*, 12(4):207-18.
12. Campuzano, S., Pelling, A.E. (2019). "Scaffolds for 3D cell culture and cellular agriculture applications derived from non-animal sources". *Frontiers in Sustainable Food Systems*, 3:38.
13. Gupta, N., Liu, J.R., Patel, B., Solomon, D.E., Vaidya, B., Gupta, V. (2016). "Microfluidics-based 3D cell culture models: Utility in novel drug discovery and delivery research". *Bioengineering & translational medicine*, 1(1):63-81.
14. Caliari, S.R., Burdick, J.A. (2016). "A practical guide to hydrogels for cell culture". *Nature methods*, 13(5):405-14.
15. Lou, J., Mooney, D.J. (2022). "Chemical strategies to engineer hydrogels for cell culture". *Nature Reviews Chemistry*, 6(10):726-44.

16. Łabowska, M.B., Cierluk, K., Jankowska, A.M., Kulbacka, J., Detyna, J., Michalak, I. (2021). "A review on the adaption of alginate-gelatin hydrogels for 3D cultures and bioprinting". *Materials*, 14(4):858.
17. Abuwatfa, W.H., Pitt, W.G., Husseini, G.A. (2024). "Scaffold-based 3D cell culture models in cancer research". *Journal of Biomedical Science*, 31(1):7.
18. Andersen, T., Auk-Emblem, P., Dornish, M. (2015). "3D cell culture in alginate hydrogels. Microarrays", 4(2):133-61.
19. Valdoz, J.C., Johnson, B.C., Jacobs, D.J., Franks, N.A., Dodson, E.L., Sanders, C., et al. (2021). "The ECM: To Scaffold, or Not to Scaffold, That Is the Question". *Int J Mol Sci*, 22(23).
20. Pardue, E.L., Ibrahim, S., Ramamurthi, A. (2008). "Role of hyaluronan in angiogenesis and its utility to angiogenic tissue engineering". *Organogenesis*, 4(4):203-14.
21. Wei, S., Li, Z., Shi, Q., Luan, X., Yuan, X., Li, Y., et al. (2022). "Collagen-binding vascular endothelial growth factor (CBD-VEGF) promotes liver regeneration in murine partial hepatectomy". *Mol Med Rep*, 26(5).
22. Gauthier, O., Bouler, J-M, Aguado, E., Pilet, P., Daculsi, G. (1998). "Macroporous biphasic calcium phosphate ceramics: influence of macropore diameter and macroporosity percentage on bone ingrowth". *Biomaterials*, 19(1-3):133-9.
23. S. A. Bento, C., Gaspar, M.C., Coimbra, P., de Sousa, H.C., E. M. Braga, M. (2023). "A review of conventional and emerging technologies for hydrogels sterilization". *International Journal of Pharmaceutics*, 634:122671.
24. Lv, D., Yu, S-c, Ping, Y-f, Wu, H., Zhao, X., Zhang, H., et al. (2016). "A three-dimensional collagen scaffold cell culture system for screening anti-glioma therapeutics". *Oncotarget*, 56904: 4(35)7, 6.
25. Baruffaldi, D., Palmara, G., Pirri, C., Frascella, F. (2021). "3D cell culture: recent development in materials with tunable stiffness". *ACS applied bio materials*, 4(3):2233-50.
26. Fujioka-Kobayashi, M., Schaller, B., Saulacic, N., Pippenger, B.E, Zhang, Y., Miron, R.J. (2017). "Absorbable collagen sponges loaded with recombinant bone morphogenetic protein 9 induces greater osteoblast differentiation when compared to bone morphogenetic protein 2". *Clinical and experimental dental research*, 3(1):32-40.
27. Cumming, D., Song, F., Taylor, R.S., Zahra, M., Williams, A., Eggington, S. (2022). "Cost-effectiveness of 4 mg diboterminal alfa/absorbable collagen sponge versus iliac crest bone graft for lumbar degenerative disc disease in the United Kingdom". *Journal of Medical Economics*, 25(1): 59-65.
28. Garantziotis, S., Savani, R.C. (2019). "Hyaluronan biology: A complex balancing act of structure, function, location and context". *Matrix Biol*, 78-79:1-10.
29. Pratt, R.L. (2021). "Hyaluronan and the Fascial Frontier". *Int J Mol Sci*, 22(13).

30. Suo, A., Xu, W., Wang, Y., Sun, T., Ji, L., Qian, J. (2019). "Dual-degradable and injectable hyaluronic acid hydrogel mimicking extracellular matrix for 3D culture of breast cancer MCF-7 cells". *Carbohydrate polymers*, 211:336-48.
31. Kim, H., Cha, J., Jang, M., Kim, P. (2019). "Hyaluronic acid-based extracellular matrix triggers spontaneous M2-like polarity of monocyte/macrophage". *Biomaterials Science*, 7(6):2264-71.
32. Grosso, R., de-Paz, M.V. (2021). "Thiolated-Polymer-Based Nanoparticles as an Avant-Garde Approach for Anticancer Therapies-Reviewing Thiomers from Chitosan and Hyaluronic Acid". *Pharmaceutics*, 13(6).
33. Asim, M.H., Silberhumer, S., Shahzadi, I., Jalil, A., Matuszczak, B., Bernkop-Schnürch, A. (2020). "S-protected thiolated hyaluronic acid: In-situ crosslinking hydrogels for 3D cell culture scaffold". *Carbohydrate polymers*, 237:116092.
34. Raeburn, J., Pont, G., Chen, L., Cesbron, Y., Lévy, R., Adams, D.J. (2012). "Fmoc-diphenylalanine hydrogels: understanding the variability in reported mechanical properties". *Soft matter*, 8(4):1168-74.
35. Panahi, H.K.S., Dehghani, M., Aghbashlo, M., Karimi, K., Tabatabaei, M. (2019). "Shifting fuel feedstock from oil wells to sea: Iran outlook and potential for biofuel production from brown macroalgae (ochrophyta; phaeophyceae)". *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 112:626-42.
36. Bojorges, H., López-Rubio, A., Martínez-Abad, A., Fabras, M.J. (2023). "Overview of alginate extraction processes: Impact on alginate molecular structure and techno-functional properties". *Trends in Food Science & Technology*, 104142.
37. Abka-Khajouei, R., Tounsi, L., Shahabi, N., Patel, A.K., Abdelkafi, S., Michaud, P. (2022). "Structures, Properties and Applications of Alginates". *Mar Drugs*, 20(6).
38. Dobrinčić, A., Balbino, S., Zorić, Z., Pedisić, S., Bursać Kovačević, D., Elez Garofulić, I., Dragović-Uzelac, V. (2020). "Advanced Technologies for the Extraction of Marine Brown Algal Polysaccharides". *Mar Drugs*, 18(3).
39. Naudot, M., Davrou, J., Djebara, A.E., Barre, A., Lavagen, N., Lardièrre, S., et al. (2020). "Functional Validation of a New Alginate-based Hydrogel Scaffold Combined with Mesenchymal Stem Cells in a Rat Hard Palate Cleft Model". *Plast Reconstr Surg Glob Open*, 8(4):e2743.
40. Lee, K.Y., Mooney, D.J. (2012). "Alginate: properties and biomedical applications". *Prog Polym Sci*, 37(1):106-26.
41. Cadamuro, F., Ardenti, V., Nicotra, F., Russo, L. (2023). "Alginate-Gelatin Self-Healing Hydrogel Produced via Static-Dynamic Crosslinking". *Molecules*, 28(6):2851.
42. Sheng, W., Song, Q., Su, X., Lu, Y., Bai, Y., Ji, F., et al. (2023). "Sodium alginate/gelatin hydrogels loaded with adipose-derived mesenchymal stem cells promote wound healing in diabetic rats". *J Cosmet Dermatol*, 22(5):1670-9.
43. Wang, L., Zhang, H.J., Liu, X., Liu, Y., Zhu, X., Liu, X., You, X. "A

- physically cross-linked sodium alginate–gelatin hydrogel with high mechanical strength". *ACS Applied Polymer Materials*, 3(6):3197-205.
44. Granucci, F., Zanoni, I. (2013). "Role of CD14 in host protection against infections and in metabolism regulation". *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 3.
 45. Serafin, A., Culebras, M., Collins, M.N. (2023). "Synthesis and evaluation of alginate, gelatin, and hyaluronic acid hybrid hydrogels for tissue engineering applications". *International Journal of Biological Macromolecules*, 233: 123438.
 46. Kumar, V.B., Tiwari, O.S. (2023). "Finkelstein-Zuta G, Rencus-Lazar S, Gazit E. Design of Functional RGD Peptide-Based Biomaterials for Tissue Engineering". *Pharmaceutics*, 15(2).
 47. Liu, H., Wang, C., Sun, X., Zhan, C., Li, Z., Qiu, L., et al. (2022). "Silk fibroin/collagen/hydroxyapatite scaffolds obtained by 3D printing technology and loaded with recombinant human erythropoietin in the reconstruction of alveolar bone defects". *ACS Biomaterials Science & Engineering*, 8(12):5245-56.
 48. Wu, H., Lin, K., Zhao, C., Wang, X. (2022). "Silk fibroin scaffolds: A promising candidate for bone regeneration". *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 1054379.
 49. Yan, K., Zhang, X., Liu, Y., Cheng, J., Zhai, C., Shen, K., et al. (2023). "3D-bioprinted silk fibroin-hydroxypropyl cellulose methacrylate porous scaffold with optimized performance for repairing articular cartilage defects". *Materials & Design*, 225:111531.
 50. Xu, Z., Li, K., Zhou, K., Li, S., Chen, H., Zeng, J., Hu, R. (2023). "3D Printing Silk Fibroin/Hydroxyapatite/Sodium Alginate Composite Scaffolds for Bone Tissue Engineering". *Fibers and Polymers*, 24(1):275-83.
 51. Choi, Y-J., Cho, D-W, Lee, H. (2021). "Development of silk fibroin scaffolds by using indirect 3D-bioprinting technology". *Micromachines*, 13(1):43.
 52. Somers, N., Lasgorceix, M. (2021). Overview of substitutes for bone replacement: natural and synthetic products. 978-0-12-818542-1.
 53. Goyenvalle, E., Aguado, E., Pilet, P., Daculsi, G. (2010). "Biofunctionality of MBCP ceramic granules (TricOs) plus fibrin sealant (Tisseel) versus MBCP ceramic granules as a filler of large periprosthetic bone defects: an investigative ovine study". *J Mater Sci Mater Med*, 21(6):1949-58.
 54. Sulaiman, S.B., Keong, T.K., Cheng, C.H., Saim, A.B., Idrus, R.B. (2013). "Tricalcium phosphate/hydroxyapatite (TCP-HA) bone scaffold as potential candidate for the formation of tissue engineered bone". *Indian J Med Res*, 137(6):1093-101.
 55. Sommer, K.P., Krolinski, A., Mirkhalaf, M., Zreiqat, H., Friedrich, O., Vielreicher, M. (2023). "Protocol for Cell Colonization and Comprehensive Monitoring of Osteogenic Differentiation in 3D Scaffolds Using Biochemical

- Assays and Multiphoton Imaging". *Int J Mol Sci*, 24(3).
56. Teixeira, C.C., Nemelivsky, Y., Karkia, C., Legeros, R.Z. (2006). "Biphasic calcium phosphate: a scaffold for growth plate chondrocyte maturation". *Tissue Engineering*, 12(8):2283-9.
57. Nie, L., Chen, D., Fu, J., Yang, S., Hou, R., Suo, J. (2015). "Macroporous biphasic calcium phosphate scaffolds reinforced by poly-L-lactic acid/hydroxyapatite nanocomposite coatings for bone regeneration". *Biochemical Engineering Journal*, 98:29-37.