تهیه پودر ماتریکس خارج سلولی از بافت چربی جهت مهندسی بافت

صنمبر صدیقی[1*]، امیر حسین توکلی[2]
نیر داداش پور[3]، کاظم حسینی[4]

۱- گروه داخلی، فوق تخصص خون و انکولوژی، مرکز تحقیقات سرطان، دانشگاه علوم پزشکی تهران، تهران، ایران.
۲- گروه روانپزشکی، مرکز تحقیقات و بانک فرآورده‌های پیوندی، دانشگاه علوم پزشکی تهران، تهران، ایران.
۳- گروه زیست‌شناسی مولکولی، دانشگاه علوم و تحقیقات آزاد اسلامی تهران، تهران، ایران.
۴- مرکز تحقیقات و بانک فرآورده‌های پیوندی، مجتمع بیمارستانی امام‌خمینی (ره)، تهران، ایران.

* نویسنده مسئول: تهران، خیابان استاد قریب، مجتمع بیمارستانی امام‌خمینی (ره)، انستیتو کانسر، بخش مدیکال انکولوژی
تلفن: ۶۱۱۹۲۷۶۳-۰۲۱
E-mail: ssadighi@tums.ac.ir

چکیده

دریافت: ۱۳۹۲/۱۱/۲۱ پذیرش: ۱۳۹۳/۰۴/۲۲ آنلاین: ۱۳۹۳/۰۶/۲۰

زمینه و هدف: به‌تازگی داربست‌های تهیه شده از بافت‌های زنده، به‌عنوان بستر رشد و تکثیر سلول بنیادی مورد توجه رشته پزشکی ترمیمی و مهندسی بافت قرار گرفته‌اند. مواد زیستی طبیعی به روشی نیاز دارند تا آنها را از تجزیه حفظ کرده، ایمنی‌زایی را کاهش داده و بافت را استریلیزه کند. هدف این مطالعه تهیه داربست از بافت چربی انسانی و بررسی ساختار پروتیینی پودر سلول‌زدایی شده حاصل از آن است.

روش بررسی: این مطالعه از نوع تولید مواد و بررسی تحلیلی روش‌ها است. بافت چربی مورد نیاز از مواد زاید حاصل جراحی لیپوساکشن و با کسب رضایت شفاهی بیماران تامین گردید. جراحی زیبایی مربوط به نواحی پهلو و شکم خانم‌های در رده سنی ۴۲-۳۸ ساله در یک کلینیک خصوصی طی زمستان ۱۳۹۱ تا بهار ۱۳۹۲ انجام شد. جهت تهیه داربست مناسب، سلول‌زدایی بافت چربی انسان با استفاده از روش‌های فیزیکی، شیمیایی و هضم آنزیمی انجام گردید. نمونه داربست حاصله تحت بررسی میکروسکوپ الکترونی و بررسی تحلیلی توسط ژل الکتروفورزیس با تکنیک (Blue-Native) و بیان ژن‌های لامینین، فیبرونکتین، کلاژن تیپ ۱، کلاژن تیپ ۴، دسمین، اکتین، اینتگرین، به روش Real Time- Polymerase Chain Reaction (RT-PCR) قرار گرفت.

یافته‌ها: تقریبا از هر ml ۲۰۰ بافت چربی mg ۱۰ ماتریکس به‌دست آمد. فقدان سلول و ماهیت پروتیینی (به‌طور عمده کلاژن نوع یک و چهار، فیبرونکتین و لامینین) پودر ماتریکس حاصله، با رنگ‌آمیزی ایمینوهیستوشیمی، بررسی ژنتیک و کروماتوگرافی تایید شد. مشاهدات میکروسکوپ الکترونی خصوصیات ساختمانی سه بعدی مناسب داربست از جمله مشخصه متخلخل نمونه‌ها را مشخص نمود.

نتیجه‌گیری: ارزیابی تحلیلی و مقایسه‌ای بیان پروتیین‌های اختصاصی نشان داد که پودر ماتریکس تهیه شده از بافت چربی در این مطالعه علی‌رغم به‌کارگیری روش‌های هضم آنزیمی غنی از ترکیبات کلاژن و دارای توانایی عملکرد ترمیمی و ساختاری است و به‌ویژه می‌تواند فرصت جدیدی برای پیشرفت روش‌های ترمیم بافت نرم ایجاد کند.

کلمات کلیدی: بافت چربی، سلول‌زدایی، داربست طبیعی، مهندسی بافت.

مقدمه

یکی از بزرگ‌ترین مشکلات پیوند اندام، کمبود بافت یا اندام دهنده است.[1] آنچه در این روند مورد نیاز است، فراهم‌سازی تسهیلات یا تکنیکی جهت القای ترمیم و بازسازی بافت آسیب دیده است.[1] اگرچه پیوند بافت چربی خام از نظر سازگاری نسجی، پاسخ ایمنی و عدم رد پیوند مورد توجه می‌باشد، اما همیشه موفقیت‌آمیز نبوده و احتمال بازجذب تدریجی در طول زمان، تشکیل کیست و نکروز موضعی موجب نیاز به تزریقات مکرر برای رسیدن به نتیجه مطلوب می‌گردد.[2] از طرفی پیوند چربی خام به دلیل نارسایی

Archive of SID
www.SID.ir

عروق‌زایی مجدد، بازده نامطلوبی دارد.[۲] امروزه با توجه به تعداد کم اهداکنندگان بافت و آلودگی‌های ویروسی آن، سعی در مهندسی بافت به کمک داربست‌های گوناگون اعم از صنایی و یا طبیعی شده است. داربست‌های مصنوعی نقص‌هایی ازجمله خاصیت آب دوستی کم و عدم توانایی کنترل چسبندگی سلول‌ها دارند و با ایجاد واکنش جسم خارجی، سازگاری کمتری به بافت میزبان نشان می‌دهند.[۱] بنابراین یکی از اهداف تکنولوژی مواد بیولوژیک استفاده از ماتریکس خارج سلولی موجود زنده به‌عنوان داربست طبیعی است. ماتریکس خارج سلولی در ترمیم نسوج صدمه دیده و یا تخریب شده نقش حمایت کننده دارد و تشکیل بافت اسکار را به حداقل می‌رساند و با رهاسازی فاکتورهای رشد و پپتیدهای بیواکتیو جلب کننده سلول‌های بنیادی، به روند ترمیم بافت کمک می‌کند.[۳] از جمله علل ارجحیت این تکنیک فقدان ایمونوژنیسیته، فقدان عوارض جانبی ناشی از گرافت مصنوعی و امکان استفاده از سلول‌های خود فرد بیمار است.[۳]

داربست تهیه شده از بافت چربی خود بیمار می‌تواند روش جدیدی در ترمیم نقایص بافت نرم، نه فقط از نظر جراحی زیبایی مانند کاشت سینه، بلکه برای بازسازی بافت‌های از دست‌رفته که در نتیجه برداشت تومور، سوختگی‌های شدید و نقایص ارثی و مادرزادی ایجاد شده‌اند ارایه کند.[۴]

بافت چربی یکی از فراوان‌ترین و در دسترس‌ترین بافت‌ها در بدن می‌باشد و به دلیل داشتن مقادیر زیاد سلول بنیادی در مقایسه با مغز استخوان و همچنین دسترسی آسان به حجم بزرگی از چربی طی روند لیپوساکشن، منبع مناسبی را برای جداسازی سلول‌های بنیادی و تهیه داربست طبیعی فراهم کرده است.[۵و۶] با توجه به نکات گفته شده این پژوهش بر آن است تا با تهیه داربست طبیعی از نمونه چربی انسان و بررسی دقیق خصوصیات ساختاری و ترکیب پروتیینی آن، راهکار مناسبی جهت رفع بخشی از کاستی‌های موجود در زمینه مهندسی بافت و پزشکی ترمیمی ارایه نماید.

روش بررسی

روش تهیه پودر ماتریکس خارج سلولی از بافت چربی انسانی به عنوان داربست طبیعی جمع‌آوری نمونه چربی: در طی زمستان ۱۳۹۱ تا بهار ۱۳۹۲برای انجام این پژوهش نمونه بافت چربی سه بیمار از نواحی پهلو و شکم بیماران در رده سنی ۴۲-۳۸ ساله که بنا به نظر جراح متخصص و نه انجام طرح مذکور، در کلینیک مرکز زیبایی تحت عمل جراحی لیپوساکشن قرار گرفته بودند و با کسب رضایت شخصی شفاهی از بیماران تهیه کردیم.

لیپوساکشن: عمل جراحی شامل خارج کردن چربی زیرپوستی با استفاده از کانولای متصل به پمپ تخلیه کننده است. کانولا میله کوچک حاوی سوراخ‌های فراوان است که از طریق برش‌های کوچک ۶-۵ میلیمتری وارد فضای زیرپوست می‌شود. در این روش، رگ‌های خونی و عصب رسانی به پوست محل عمل حفظ می‌شود. با کاهش حجم چربی، پوست رویی به مرور زمان به قسمت عضلانی زیرین نزدیک‌تر شده و در نهایت منجر به اصلاح حجم آن قسمت می‌شود.

انتقال نمونه چربی به آزمایشگاه: برداشت ml ۳۰۰-۲۵۰ بافت چربی توسط جراح، در اتاق عمل و تحت شرایط کاملا استریل انجام گرفت. نمونه چربی داخل کیسه استریل حاوی سرم فیزیولوژی (محلول رینگر) قرارداده شد، به‌طوری که سرم تمام سطح بافت چربی را پوشاند و بافت چربی در آن شناور گردید و در یک فلاسک حاوی یخ، در حداقل زمان (کمتر از چهار ساعت) به آزمایشگاه منتقل گردید. برای فرآوری ماتریکس از بافت چربی، ما از سه روش تیمار فیزیکی، مکانیکی و شیمیایی استفاده کردیم. بدین منظور برای تیمار فیزیکی روش فریز- دفریز (دمای ۸۰- و ۳۷ درجه سانتی‌گراد) به‌کار برده شد و پس از چهار نوبت، ۶-۵ بار شستشوی نمونه انجام شد تا مایع زیرین بافت چربی شفاف گردید.

تیمار شیمیایی: به منظور تیمار شیمیایی از هضم آنزیمی تریپسین و تریتون X-100 استفاده گردید.[۸-۹] قبل از شروع هضم آنزیمی نمونه‌ی چربی را چند بار ماساژ دستی دادیم تا بافت به‌صورت یکنواخت‌تر و همگن‌تر در بیاید. بعد لوله‌های فالکون حاوی نمونه دوباره سانتریفوژ شدند و روغن و دبری‌ها دور ریخته شد. در این مرحله بافت سفید رنگ ته نشین شده در قسمت تحتانی لوله‌ها قابل مشاهده بود. به منظور حذف اتانول و استیک اسید نمونه‌ها سانتریفوژ شده و محلول رویی دور ریخته شد. ولی بافت سفید تحتانی همچنان حفظ می‌گردید. در ادامه، شستشو با محلول Phosphate Buffered Saline (PBS) انجام گرفت. سپس بر روی بافت سفید داخل لوله فالکون، N- پروپانول ۱۰۰٪ ریخته شد. لوله‌های حاوی نمونه به مدت ۴۸-۲۴ ساعت در دستگاه freeze-drying (Alpha 1-4, Martin

Archive of SID

www.SID.ir

(Christ, Osterode, Germany) جهت لیوفیلیزیشن قرار گرفتند. در نهایت ماتریکس چربی آماده شده به‌صورت پودر سفید رنگی تهیه گردید.

بررسی‌های میکروسکوپ الکترونی نگاره: بررسی خصوصیات سطحی و ساختاری پودر ماتریکس آماده شده، به وسیله میکروسکوپ الکترونی نگاره Scanning Electron Microscope (SEM) انجام گرفت. بدین منظور برش‌های نازکی از نمونه تهیه گردید. بعد از سایه‌اندازی نمونه با ذرات طلا توسط دستگاه کوتر، با ولتاژ شتاب دهنده ۲۰ KV عکس‌برداری انجام شد.[۱۰]

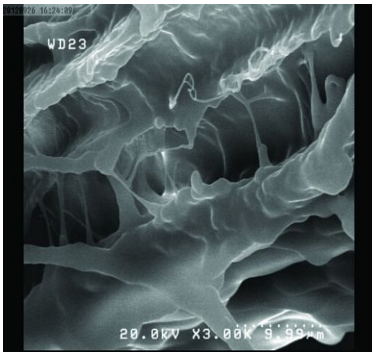
بررسی‌های بافت‌شناسی ماتریکس چربی سلول‌زدایی شده انسانی توسط رنگ‌آمیزی هماتوکسیلین- ائوزین (H&E) و بررسی‌های ایمنوهیستوشیمی ماتریکس چربی سلول‌زدایی شده چربی انجام گردید. ما در این پژوهش از اشعه گاما برای استریل کردن پودر ماتریکس مشتق از چربی استفاده کردیم. در مرحله بعد بررسی پروتئومیک دابست تهیه شده توسط ژل کروماتوگرافی (روش Blue-native) و بیان ژنی به روش Real-time Polymerase Chain Reaction (RT-PCR) انجام گردید.[۱۳-۱۱] آنتی‌بادی‌ها همگی از Abcam plc., Cambridge, MA, USA فراهم شدند.

یافته‌ها

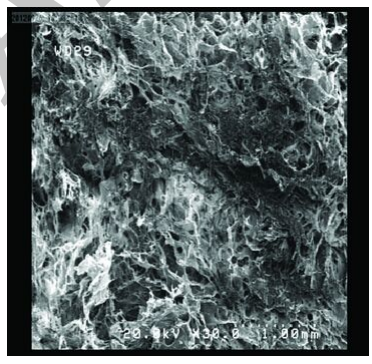
پس از تیمار فیزیکی، مکانیکی و شیمیایی نمونه اولیه بافت چربی، در نهایت بافت سفید رنگ ژله مانندی به دست آمد که به‌عنوان ماتریکس خارج سلولی بافت چربی نام‌گزاری شد و پس از قرار گرفتن در دستگاه Frezzing-drying به صورت پودر قابل تزریق درآمد. در بررسی ساختار پودر Extracellular Matrix (ECM) چربی توسط SEM شکل ۱، پودر ECM بافت چربی انسانی دارای هر دو معماری سطحی زبر (ناهموار) (بخش الف) و صاف (بخش ب) بود. معماری زبر می‌تواند بیانگر ترکیبات کلاژنی ECM و سطوح صاف نیز می‌تواند بیانگر غشاء پایه و ساختار عروقی باشد. نتایج رنگ‌آمیزی هماتوکسیلین- ائوزین ماتریکس چربی سلول‌زدایی شده (شکل ۲) نشانگر فقدان اجزای هسته در دابست تهیه شده در این مطالعه بود.

نتیجه رنگ‌آمیزی ایمنوهیستوشیمی برای پروتیین کلاژن نوع IV و لامینین نشان داد که این پروتیین‌ها در ماتریکس تهیه شده از بافت چربی حفظ شده است و رنگ‌پذیری مثبت است. جهت بررسی بیان ژنی کمپلکس پروتیینی از پرایمرهای اختصاصی کیت Fermentas, Burlington, Ontario, Canada استفاده شد. نتیجه بررسی RT-PCR ماتریکس چربی در مقایسه با ترکیب موجود در سلول‌های بنیادی بافت چربی در نمودار ۱ مشاهده شد.

سلول‌های بنیادی بافت چربی: متشکل از سلول‌های کشت یافته بر سطح پلیت کشت سلول در شرایط In-Vitro، این سلول‌ها از نظر بیان مارکرهای سطحی اختصاصی مثبت، نظیر CD105, CD73, CD90 و بیان منفی نظیر CD34, CD45 ارزیابی شده و مورد تایید قرار گرفتند.[۱۴]



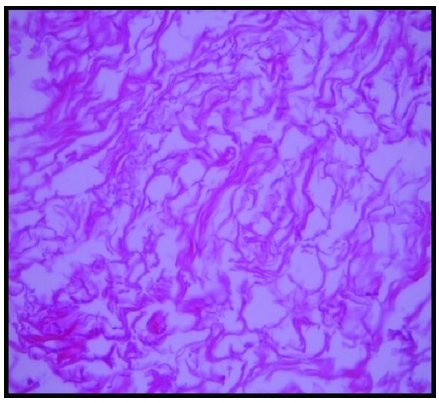
الف



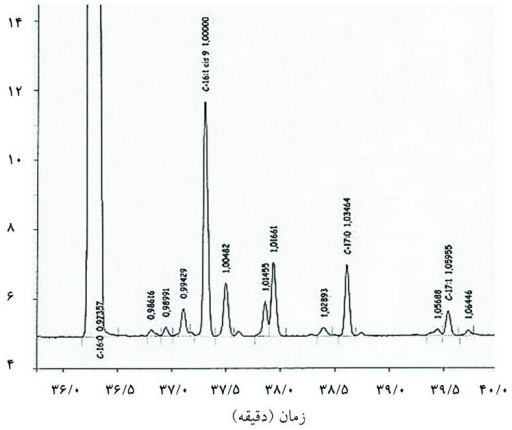
ب

شکل ۱: پودر ECM بافت چربی انسانی دارای هر دو معماری سطحی زبر (ناهموار) (بخش الف) و صاف (بخش ب)

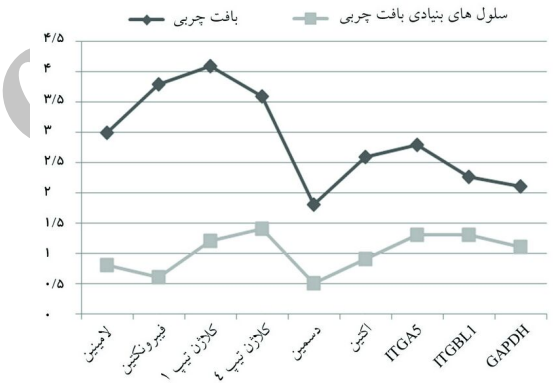
Archive of SID
www.SID.ir



شکل ۲: رنگ‌آمیزی هماتوکسیلین- ائوزین پودر ماتریکس بافت چربی انسان در بزرگ‌نمایی ۱۰۰ میکروسکوپ نوری: در این روش هسته به دلیل خاصیت اسیدی، رنگ بازی هماتوکسیلین را پذیرفته و به رنگ بنفش در می‌آید و سیتوپلاسم به علت خاصیت بازی، رنگ اسیدی ائوزین را به خود گرفته و قرمز رنگ می‌شود.



نمودار ۲: آزمایش Gas chromotogeraphy را بروی ECM نشان می‌دهد. بزرگترین پیک: C-16:0 097357 مربوط به کلاژن تایپ ۱ می‌باشد



نمودار ۱: مقایسه ترکیب پروتیینی داربست بافت چربی با سلول‌های بنیادی به روش RT-PCR به‌طور مشخص بیان ژنی پروتیین‌های کلاژن تیپ یک، فیبرونکتین و لامینین در نمونه داربست این مطالعه حدود سه برابر بیش از سلول بنیادی بود.

بحث

به‌تازگی واژه ماتریکس بیولوژیک، جایگاه مهمی را در پژوهش‌های زیست‌شناسی و پزشکی کسب نموده است. بررسی و امکان به‌کارگیری مواد موجود در ماتریکس خارج سلولی با عنوان داربست‌های طبیعی در تحقیقات مهندسی بافت، یکی از اهداف این گونه مطالعات می‌باشد.[۱۵و۱۶] در بررسی مراجع فارسی بیشتر مطالعات مقدماتی توسط Baharara و Mahdavishahr بر روی بافت لثه و مثانه بود.[۱۷و۱۸] در جستجوی مراجع بین‌المللی اطلاعات محدودی در مورد تهیه داربست از بافت چربی به‌دست آوردیم. ما در ابتدا بر اساس بعضی پروتکل‌های موجود از روش غیرآنزیمی برای فرآوری بافت همبندی لیپوآسپیره استفاده کردیم.[۱۹] این روش جهت استخراج سلول بنیادی چربی موفقیت‌آمیز بود.[۱۴] ولی روش مناسبی برای جداکردن بافت چربی و تهیه داربست نبود. در نتیجه در مطالعه حاضر داربست طبیعی از نمونه بافت چربی حاصل از لیپوساکشن با استفاده از روش سلول‌زدایی، ابتدا آسلولار گشته و پودر ماتریکس خارج سلولی حاصل مورد بررسی ساختاری و تحلیل محتوای پروتیینی قرار گرفته است.

بهینه‌سازی پروتکل‌های سلول‌زدایی نیازمند برقراری تعادل بین کاهش آنتی‌ژنیسیته و حفظ ساختار ECM است. روش‌های مختلف سلول‌زدایی به‌طور گسترده‌ای مورد بررسی قرار گرفته‌اند که شامل تیمارهای فیزیکی، شیمیایی آنزیمی می‌باشد.[۲۰و۲۱] به‌کارگیری هر کدام از این تیمارها به تنهایی برای سلول‌زدایی کامل کافی نیستند. بنابراین به منظور افزایش کیفیت سلول‌زدایی، کاهش ایمنی‌زایی ECM و استریلیزه کردن بافت پروتکل سلول‌زدایی باید ترکیبی از هر سه روش باشد.[۱] در این مطالعه نیز از هر سه روش فیزیکی، شیمیایی و آنزیمی استفاده کردیم.

www.SID.ir
Archive of SID

فریز- دفریز به طور موثری سلول‌های داخل بافت و اندام را از بین می‌برد در حالی‌که ترکیبات بین سلولی و غشاء باقی می‌ماند مگر اینکه به وسیله فرآیندهای بعدی حذف شود. تنها یک سیکل فریز- دفریز می‌تواند پاسخ‌های ایمنی نامطلوب نظیر نفوذ لکوسیتی را در داربست‌های ECM عروقی کاهش دهد.[۲۲]

ممکن است چندین سیکل فریز- دفریز در طول سلول‌زدایی بافت استفاده گردد، بدون آنکه کاهش چشمگیری در پروتیین‌های ECM بافت هدف به‌وجود آید.[۲۳] در این مطالعه ابتدا نمونه‌ها در فریزر $^{\circ}C$ ۴- قرار گرفتند. استدلال این کار این بود که بیشتر حجم سلول‌ها از آب تشکیل شده است، با تشکیل بزرگترین کریستال‌های یخ در این دما، غشاء سلول‌ها (چه غشاء سیتوپلاسمی و چه غشاءهای داخلی) بر اثر ایجاد کریستال‌های حجیم یخ می‌ترکد. بنابراین می‌توان انتظار داشت که تمامی سلول‌ها با قرار گرفتن متناوب در این دما دچار تغییر و تخریب در غشاهایشان می‌شوند. سپس با قرار دادن نمونه‌ها در تانک ازت، باعث تخریب هر چه بیشتر غشاءها و خارج شدن محتویات اندامک‌های سلولی و همچنین آسیب به پروتیین‌های سلولی می‌گردد. البته به دلیل ساختار فیبری و محکم پروتیین‌های ECM می‌توان انتظار داشت که تاثیر این تغییرات دمایی روی ECM بسیار ناچیز باشد.[۲۴و۲۵]

به هر حال به علت ویژگی چسبندگی ECM و تمایل ترکیبات سلولی برای چسبیدن به پروتیین‌های ECM به غیر از روش‌های فیزیکی و مکانیکی، عوامل شیمیایی و آنزیمی قوی به منظور تسهیل حذف باقی‌مانده‌های سلولی ضروری است.

به منظور لیپیدزدایی درجنت‌های غیریونی مانند تریتون X-100 موثرتر از درجنت‌های یونی نظیر دئوکسی کولات هستند. از این رو برای تهیه داربست ECM بافت چربی انسانی از درجنت تریتون X-100 استفاده کردیم. این درجنت توسط سایر پژوهشگران نیز در تهیه داربست‌های طبیعی از بافت‌هایی نظیر دریچه‌های قلب[۲۶و۲۷] برای اهداف مهندسی بافت مورد استفاده قرار گرفته است.

در بررسی عملکرد این درجنت مهم در تهیه داربست‌های طبیعی مشخص شده است که اثرات به‌نسبت ملایم بر روی ساختار بافت داشته و ضمن اینکه برهم کنش‌های لیپید- لیپید و پروتیین- لیپید را تخریب کرده تاثیری روی برهم کنش پروتیین- پروتیین نداشته و به نحوی که پروتیین‌های داخل بافت پس از تیمار با این درجنت شکل فعال خود را حفظ می‌کنند. مطالعات نشان داده است که کاربرد تریتون X-100 در حذف سلول از بافت دارای نتایج متفاوتی است و به‌طور عمده به نوع بافت مورد استفاده برای تهیه داربست بستگی دارد. طی مطالعه انجام گرفته توسط Brown و همکارانش، سه روش سلول‌زدایی برای جداسازی ECM از بافت چربی مورد بررسی قرار گرفت.[۲۰] در روش اول از تریتون X-100، در روش دوم از آنزیم لیپاز و در روش سوم از سدیم دو دسیل سولفات (SDS) و دئوکسی کولات استفاده شد. مقایسه نتایج حاصل از هر سه روش از نظر سلول‌زدایی، توانایی حفظ ساختار و عملکرد ترکیبات ECM، رشد و تمایز سلول‌های بنیادی مشتق از بافت چربی کشت شده بر روی آنها به سلول چربی ثابت کرد که فقط در ECM حاصل از تیمار با تریتون X-100 اکثر ترکیبات لیپیدی حذف شده بودند و ECM به دست آمده داربست موثری را برای مهندسی بافت و پزشکی ترمیمی ارایه می‌کند.

در مطالعه حاضر نتایج بررسی هیستولوژیک داربست تهیه شده از بافت چربی انسان با روش رنگ‌آمیزی هماتوکسیلین- ائوزین نشان می‌دهد که داربست حاصله به‌طور کامل فاقد سلول شده است. همچنین به جهت این که سلول‌های بافت چربی نسبت به مارکر S-100 و ویمنتین مثبت هستند، نتایج ایمنوهیستوشیمی نیز حاکی از عدم حضور این مارکرها در داربست تهیه شده از بافت چربی انسان بود. که نشان دهنده عدم حضور سلول در داربست تهیه شده می‌باشد.

به هر حال عوامل شیمیایی و آنزیمی ممکن است با ترکیبات ECM تعامل داشته و ترکیب ساختار طبیعی ECM را تغییر دهد.[۲۱] در این مطالعه نتایج بررسی ساختار سطحی و معماری سه بعدی ECM چربی توسط میکروسکوپ الکترونی نشان داد بافت چربی در تیمار با تریتون X-100 و تیمار آنزیمی معماری سه بعدی خود را همچنان حفظ کرده بود.

همچنین نتایج بررسی تحلیلی ترکیب پروتیینی توسط ژل کروماتوگرافی و بیان ژنی ماتریکس تولیدی مشخص نمود که ترکیبات اصلی داربست خارج سلولی مانند کلاژن یک و چهار و لامینین به خوبی حفظ شده است. ترکیب اصلی ECM چربی کلاژن است، که طی روند سلول‌زدایی مورد استفاده در این مطالعه توالی آمینواسیدی فیبریل‌های خود را در حفظ نموده است. داربست مشتق از بافت چربی انسان که در این مطالعه تهیه شده است، پتانسیل

Archive of SID
www.SID.ir

جدیدی برای حل بسیاری از چالش‌های کلینیکی درمان بیماران دچار نقایص بافت نرم مادرزادی یا اکتسابی (کاهش چربی زیرپوستی در نتیجه عمل جراحی یا ضربه، برداشت تومور) و بیماران کاندید جراحی پلاستیک و ترمیمی فراهم می‌کند.

این گروه سهم زیادی از هزینه‌های درمانی را در دنیا به خود اختصاص می‌دهند. بنابر گزارش جامعه جراحی پلاستیک آمریکا در سال ۲۰۰۸ نزدیک به پنج میلیون جراحی ترمیمی توسط جامعه جراحان پلاستیک آمریکا گزارش شد که تقریبا ۷۵٪ آنها در نتیجه برداشت تومور ایجاد شده بودند. این داده‌ها اشاره به نیاز بسیار زیاد برای گرافت‌های بافت چربی قابل پیوند با عملکرد بیولوژیکی ایده‌آل برای بازسازی نقص دارد. این نوع بافت‌های پیوندی علاوه بر احیای عملکرد طبیعی بافت، به وسیله بازگرداندن زیبایی عضو سبب کاهش اضطراب و احساسات منفی روانی بیماران مبتلا به ناهنجاری بافت نرم می‌شوند.[۲]

به نظر می‌رسد که پودر ECM چربی تهیه شده در این مطالعه مناسب برای طرح‌های بعدی در زمینه مهندسی بافت و پزشکی ترمیمی است و به ویژه می‌تواند فرصت جدیدی برای پیشرفت روش‌های ترمیم بافت نرم ایجاد کند.

سپاسگزاری: این مقاله حاصل طرح پژوهشی با عنوان "بررسی ترکیب پروتیینی ماتریکس آسلولار بافت چربی انسانی با به‌کارگیری روش‌های آنزیمی" با کد ۹۲-۰۲-۵۲-۲۳۴۴۶ است و با حمایت معاونت پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی تهران انجام گردیده است.

References

1. Hashemi ZS, Soleimani M. Tissue engineering scaffolds: History, types and construction methods. *J Iranian Anat Sci* 2011;9(35):145-68.
2. Katz AJ, Llull R, Hedrick MH, Futrell JW. Emerging approaches to the tissue engineering of fat. *Clin Plast Surg* 1999;26(4):587-603, viii.
3. Crapo PM, Tottey S, Slivka PF, Badylak SF. Effects of biologic scaffolds on human stem cells and implications for CNS tissue engineering. *Tissue Eng Part A* 2014;20(1-2):313-23.
4. Badylak SF, Freytes DO, Gilbert TW. Extracellular matrix as a biological scaffold material: Structure and function. *Acta Biomater* 2009;5(1):1-13.
5. Cornwell KG, Landsman A, James KS. Extracellular matrix biomaterials for soft tissue repair. *Clin Podiatr Med Surg* 2009;26(4):507-23.
6. Hudson TW, Liu SY, Schmidt CE. Engineering an improved acellular nerve graft via optimized chemical processing. *Tissue Eng* 2004;10(9-10):1346-58.
7. Brown BN, Freund JM, Han L, Rubin JP, Reing JE, Jeffries EM, et al. Comparison of three methods for the derivation of a biologic scaffold composed of adipose tissue extracellular matrix. *Tissue Eng Part C Methods* 2011;17(4):411-21.
8. Cornwell KG, Landsman A, James KS. Extracellular matrix biomaterials for soft tissue repair. *Clin Podiatr Med Surg* 2009;26(4):507-23.
9. Chan BP, Leong KW. Scaffolding in tissue engineering: general approaches and tissue-specific considerations. *Eur Spine J* 2008;17 Suppl 4:467-79.
10. Choi JS, Yang HJ, Kim BS, Kim JD, Lee SH, Lee EK, et al. Fabrication of porous extracellular matrix scaffolds from human adipose tissue. *Tissue Eng Part C Methods* 2010;16(3):387-96.
11. Schingger H. Blue native electrophoresis. In: Hunte C, von Jagow G, Schngger H, editors. Membrane Protein Purification and Crystallization: A Practical Guide. San Diego, CA: Academic Press; 2003. p. 5105-30.
12. Claeys D, Geering K, Meyer BJ. Two-dimensional Blue Native/sodium dodecyl sulfate gel electrophoresis for analysis of multimeric proteins in platelets. *Electrophoresis* 2005;26(6): 1189-99.
13. Singelyn JM, Sundaramurthy P, Johnson TD, Schup-Magoffin PJ, Hu DP, Faulk DM, et al. Catheter-deliverable hydrogel derived from decellularized ventricular extracellular matrix increases endogenous cardiomyocytes and preserves cardiac function post-myocardial infarction. *J Am Coll Cardiol* 2012;59(8):751-63.
14. Sadighi S, Khoshzban A, Tavakoli A, Khatib Semnani R, Sobhani Z, Dadashpur Majidabad N. Isolation, amplification and identification of mesenchymal stem cells derived from human adipose tissue. *Tehran Univ Med J* 2014;72(1):27-32.
15. Seif-Naraghi SB, Salvatore MA, Schup-Magoffin PJ, Hu DP, Christman KL. Design and characterization of an injectable pericardial matrix gel: a potentially autologous scaffold for cardiac tissue engineering. *Tissue Eng Part A* 2010;16(6):2017-27.
16. Gilbert TW, Stolz DB, Biancaniello F, Simmons-Byrd A, Badylak SF. Production and characterization of ECM powder: implications for tissue engineering applications. *Biomaterials* 2005;26(12):1431-5.
17. Baharara J, Mahdavishahri N, Saghiri N, Rasti H. Histological comparison of blastoma and acellular matrix of bladder: an invitro study. *J Zaheden Med Res* 2010:1-7. [Persian]
18. Gheravi M, Mahdavishahr N, Baharara J. Study of one case of acellular human hard palate: Primary research. *Cell Tissue J* 2011;116:102-7. [Persian]
19. Choi JS, Yang HJ, Kim BS, Kim JD, Kim JY, Yoo B, et al. Human extracellular matrix (ECM) powders for injectable cell delivery and adipose tissue engineering. *J Control Release* 2009;139(1):2-7.
20. Brown BN, Freund JM, Han L, Rubin JP, Reing JE, Jeffries EM, et al. Comparison of three methods for the derivation of a biologic scaffold composed of adipose tissue extracellular matrix. *Tissue Eng Part C Methods* 2011;17(4):411-21.
21. Badylak SF, Park K, Peppas N, McCabe G, Yoder M. Marrow-derived cells populate scaffolds composed of xenogeneic extracellular matrix. *Exp Hematol* 2001;29(11):1310-8.
22. Omae H, Zhao C, Sun YL, An KN, Amadio PC. Multilayer tendon slices seeded with bone marrow stromal cells: a novel composite for tendon engineering. *J Orthop Res* 2009;27(7):937-42.

Archive of SID

www.SID.ir

23. Gurkan UA, Cheng X, Kishore V, Uquillas JA, Akkus O. Comparison of morphology, orientation, and migration of tendon derived fibroblasts and bone marrow stromal cells on electrochemically aligned collagen constructs. *J Biomed Mater Res A* 2010;94(4):1070-9.
24. Woods T, Gratzer PF. Effectiveness of three extraction techniques in the development of a decellularized bone-anterior cruciate ligament-bone graft. *Biomaterials* 2005;26(35):7339-49.
25. Liu GF, He ZJ, Yang DP, Han XF, Guo TF, Hao CG, et al. Decellularized aorta of fetal pigs as a potential scaffold for small diameter tissue engineered vascular graft. *Chin Med J (Engl)* 2008;121(15):1398-406.
26. Wainwright JM, Czajka CA, Patel UB, Freytes DO, Tobita K, Gilbert TW, et al. Preparation of cardiac extracellular matrix from an intact porcine heart. *Tissue Eng Part C Methods* 2010;16(3):525-32.
27. Akhyari P, Kamiya H, Haverich A, Karck M, Lichtenberg A. Myocardial tissue engineering: the extracellular matrix. *Eur J Cardiothorac Surg* 2008;34(2):229-41.

Archive of SID

www.SID.ir

TUMJ monthly Tehran University Medical Journal *Tehran University Medical Journal, September 2014; Vol. 72, No. 6: 352-359* *Original Article*

Production of extracellular matrix powder for tissue engineering

Sanambar Sadighi M.D.[1*]
Amir Hosien Tavaccoli M.D.[2]
Nayer Dadash poor M.A.[3]
Kazem Hosieny M.Sc.[4]

1- Department of Internal Medicine, Cancer Research Center, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, Iran.
2- Department of Psychiatric, Tissue Bank And Research Center, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, Iran.
3- Department of Molecular Biology, Tehran Azad University of Research and Sciences, Tehran, Iran.
4- Researcher of Tissue Bank Research Center, Tehran, Iran.

[*] Corresponding author: Medical Oncology Ward-Cancer Institute-Imam Khomeini Complex-Gharib Ave-Keshavarz Blvd., Tehran, Iran.
Tel: +98- 21-61192763
E-mail: ssadighi@tums.ac.ir

Abstract

Received: 10 Feb. 2014 Accepted: 13 Jul. 2014 Available online: 11 Sep. 2014

***Background*:** With the aim of regenerating healthy tissues, different tissue engineering strategies pointed to extracellular matrix (ECM)-based scaffolds in tissue engineering and regenerative medicine and wound healing. It is a multidisciplinary science works to create biocompatible scaffolds with perfect physical parameters, mechanical integrity and high porosity to promote cell growth, migration and angiogenesis. With the increased incidence of obesity, subcutaneous adipose tissue is abundant and readily accessible. Liposuction surgeries yield from 100 mL to 3 L of lipoaspirate tissue.
We present our prepared acellular ECM powders derived from human adipose tissue obtained from lipoaspirate, which contains large amounts of collagen suitable for induction of adipogenesis.

***Methods*:** The study had been carried out from December 2012 to March 2013 in Tissue Bank and Research Center in Imam Khomeini Hospital Tehran, Iran. Fresh human adipose tissue was obtained by liposuction of abdominal fat pad in a private Day Clinic. By using wasted material of liposuction, we obtained 100 to 200 cc fat tissue from each patient. After physical (freeze-thaw-slicing-manual massage) and chemical (enzymatic-detergent-acid digestion) treatment, an acellularized matrix was created from fat tissue. The final material lyophilized and ground to powder. We analyzed ultra structure and biochemical properties of obtained ECM powder by using electron microscopy, immunohistochemistry (IHC) examination and proteomic studies.

Results: After mechanical and chemical process of decellularization, scanning electron micrographs of the samples showed smooth and contiguous collagenous components throughout the scaffold. IHC showed strong positive labeling for collagen IV and no evidence of nuclear material in the specimen.
Separation of protein complex by Blue Native Polyacrylamide gel electrophoresis (BN-PAGE) has proven type I collagen triple helices associate to form banded fibrils. RNA preparation and Gene Expression Analysis (RT-PCR) by using specific primers for laminin, fibronectin, collagen type I and IV, desmin, and actin showed strong staining of our fat tissue scaffold with collagen type I, fibronectin, collagen IV and laminin.

Conclusion: The results show that our decellularization method produced an adipose ECM scaffold rich of collagen fibers, suitable and effective substrate for use in soft tissue engineering and regenerative medicine.

Keywords: adipose tissue, extra cellular matrix, powder, tissue engineering.

Archive of SID

www.SID.ir