

## چاپ زیستی اعضای بدن: از رویای علمی تا فناوری رو به رشد

حسین فخرزاده\*<sup>۱</sup>، باقر لاریجانی<sup>۱</sup>

واذ تخلق من الطین کهیئه الطیر باذنی فتنفخ فیها فتکون طیرا باذنی

سوره مائده-آیه ۱۱۰

### چکیده

رفتار مجموعه سلول ها یا قطعات بافتی در محیط مناسب همانند قطرات آب است. در شرایط ایده آل از این پدیده می توان در ساختن بافت های با شکل مشخص استفاده کرد. کاربرد فناوری طراحی و الگوسازی سریع (RPT: Rapid Prototyping Technology) در مهندسی بافت منجر به پدید آمدن فناوری جدید چاپ زیستی شده است که پتانسیل بالایی در توانایی ساخت اعضای بدن در آینده خواهد داشت.

واژگان کلیدی: مورفوژنز، چاپ زیستی، طراحی و الگوسازی سریع

۱- مرکز تحقیقات غدد درون ریز و متابولیسم، دانشگاه علوم پزشکی تهران

\* نشانی: تهران، خیابان کارگر شمالی، بیمارستان دکتر شریعتی، طبقه پنجم، مرکز تحقیقات غدد درون ریز و متابولیسم؛ تلفن:

۸۸۰۲۶۹۰۲-۳؛ نمابر: ۸۸۰۲۹۳۹۹؛ پست الکترونیک: emrc@tums.ac.ir

## مقدمه

یک صد سال قبل، زیست‌شناس دریایی، هنری ویلسن با مطالعات کلاسیک خود نشان داد که تکه‌های جدا از هم اسفنج‌های دریایی می‌توانند به یکدیگر متصل شده و مجدداً اسفنج کامل اولیه را بازسازی کنند [۱]. در سال ۱۹۶۲ مالکولم اشتاینبرگ از دانشگاه پرینستون فرضیه‌ای ارائه داد که بر مبنای آن حرکات منجر به رشد و شکل‌گیری یا **مورفوژنتیک** سلول‌های بافت‌ها را می‌توان همانند حرکات قطرات مایع تبیین و پیش‌بینی کرد [۲]. در شرایط مناسب سلول‌ها مانند قطرات مایع در محیط حرکت کرده و به یکدیگر متصل می‌شوند تا به کمترین میزان **کشش سطحی** که پایدارترین حالت است دست یابند. قطرات آب پس از اتصال به هم شکل یک گره را پیدا می‌کنند که کمترین انرژی سطحی را دارد. اگر دو گونه مایع مانند روغن و آب را با هم مخلوط کنیم، پس از مدتی روغن و آب در دو فاز متفاوت از هم جدا می‌شوند و آب که چسبناک‌تر است و کشش سطحی بیشتری دارد درون روغن که لغزنده‌تر است و کشش سطحی کمتری دارد محاط می‌شود (شکل ۱). در این وضعیت انرژی سطحی یا بین سطحی سیستم به حداقل می‌رسد که پایدارترین حالت است [۳]. مجموعه سلول‌های غیر همسان نیز در جریان مورفوژنز با روشی مشابه از یک دیگر متمایز می‌شوند (شکل ۱).

مبنای مولکولی که رفتار حرکتی بافت‌ها را همچون مایعات در نظر می‌گیرد **فرضیه اتصال متباین**<sup>۱</sup> یا DAH است که توسط اشتاینبرگ وضع شد. همان‌گونه که این فرضیه تصریح می‌کند بافت‌های مختلف دارای کشش سطحی مشخص و قابل اندازه‌گیری هستند که منشأ آن سلول‌های تشکیل‌دهنده هر بافت است (شکل ۲).

اندازه‌گیری کشش سطحی تعدادی از بافت‌های جنین بوسيله فورگاکس و همکاران، همچنین مطالعات تجربی گاث و گونزالس رییس بر روی *drosophila* و شبیه‌سازی‌های رایانه‌ای همگی مؤید نظریه فوق بوده‌اند [۴-۷]. **مورفوژنز** یک فرایند خود شکل‌گیری است که

منجر به تشکیل ساختارهای پیچیده یا اعضا می‌شود. اگرچه این پدیده تحت کنترل دقیق ژنتیکی قرار دارد، با این حال ژن‌ها فرم و شکل اعضا را ایجاد نمی‌کنند بلکه نیروهای فیزیکی عامل تعیین‌کننده آن هستند [۸-۱۰].

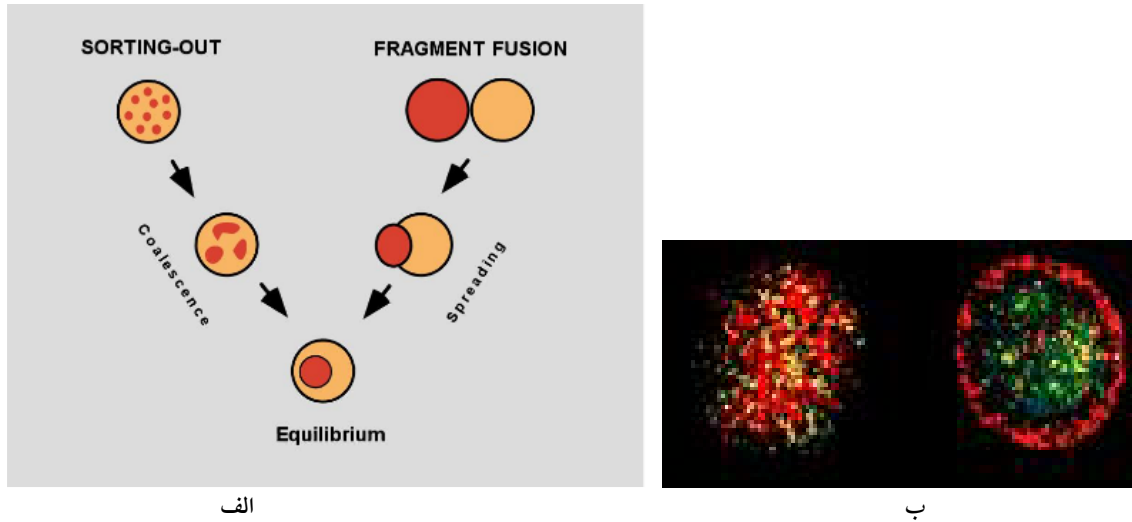
یک نتیجه کاربردی نظریه DAH این است که می‌توان روش‌های مدل‌سازی کمی را برای فهم و شبیه‌سازی پدیده‌های مورفوژنتیک بکار بست. رفتار همچون مایع سلول‌های بافتی، دانشمندان را قادر می‌سازد که ساختارهای بافتی را با روش چاپ لایه به لایه مجموعه سلول‌ها بازسازی کنند. در حالت ایده‌آل در سال‌های آینده بشر قادر خواهد بود که بخشی یا تمام اعضای بدن مانند کلیه، کبد و قلب را چاپ کند [۱۱، ۱۲].

## چاپ زیستی، مرکب زیستی و کاغذ زیستی

در مهندسی بافت معمولاً از ژلهایی که خاصیت سازگاری زیستی دارند به عنوان داربست استفاده می‌شود و سلول‌های مورد نظر روی این داربست‌ها تکثیر می‌شوند [۱۳]. روند شکل‌گیری قطعات بافتی حتی در ایده‌آل‌ترین حالت با این روش بسیار آهسته و کند است. متأسفانه در بسیاری از موارد و به دنبال تخریب اعضای بدن در اثر تروما، انفارکتوس و علل دیگر، زمان کافی برای تهیه عضو جانشین وجود ندارد. دانشمندان دانشگاه کارولینای جنوبی در سال ۲۰۰۳ روش چاپ اعضا را با استفاده از فرضیه اشتاینبرگ پایه‌گذاری کردند. فناوری چاپ زیستی بر این مبنایست که بافت‌های جنین از لحاظ کمی و کیفی خواص و رفتار **مایعات چسبناک کشسان** را دارند.

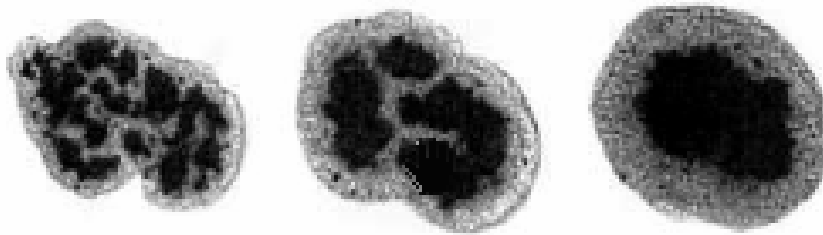
در فرایند چاپ اعضا از مجموعه سلول‌ها به‌عنوان مرکب و از ژلهای زیست سازگار به‌عنوان کاغذ استفاده می‌کنند [۱۴]. مرکب زیستی نیز می‌تواند یک‌رنگ (مجموعه سلول‌های هم‌نوع) یا چند رنگ (مجموعه گوناگونی از سلول‌ها) باشد. به‌عنوان مثال برای چاپ رگ‌های خونی از دو دسته سلول اندوتلیال و عضلانی صاف استفاده می‌شود. در این موارد خواص مورفوژنتیک شرح داده شده بر مبنای فرضیه DAH تضمین‌کننده آرایش صحیح انواع سلول‌ها نسبت به یکدیگر در ساختار نهایی خواهد بود.

1- Differential Adhesion Hypothesis

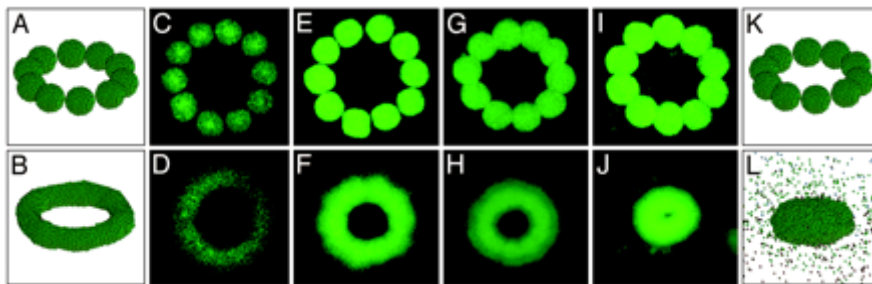


شکل ۱- جدا شدن فازي گونه های سلولی متفاوت از یکدیگر و خود شکل گیری بافت

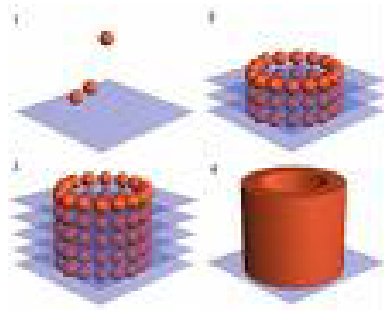
الف: خود شکل گیری بافت در اثر اتصال متباین ب: مخلوطی از دو گونه سلول های CHO که با استفاده از دستکاری ژنتیک ۵۰٪ با یکدیگر در بیان مولکول چسبندگی N-cadherin اختلاف دارند؛ وقتی در محیط کشت در کنار هم قرار می گیرند (چپ)، پس از ۱۶ ساعت به شکل نهایی (راست) در می آیند. سلول های چسبنده تر (سبز) در مرکز و سلول هایی که چسبندگی کمتری دارند (قرمز) در محیط قرار می گیرند.



شکل ۲- نحوه چیدمان دو گونه سلول بر اساس پیش بینی نظریه DAH: مخلوطی از سلول های اپیتلیوم (تیره) و سلول های عصبی شبکیه (روشن) جنین جوجه به ترتیب پس از ۱۷، ۴۲ و ۷۳ ساعت از هم دیگر کاملاً متمایز می شوند.



شکل ۳- پیکره اولیه (ردیف بالا) و نهایی (ردیف پایین) مجموعه سلول های CHO در ژل زیست سازگار: در پانل A روایی ژل کم ( $\gamma cg = 2/0$ ) و در پانل B روایی ژل ایده آل ( $\gamma cg = 0/25$ ) است. غلظت کلژن در ژل به ترتیب  $1/0$  (E و F)،  $1/2$  (G و H) و  $1/7$  (I و J) میلی گرم بر میلی لیتر است. هسته سلول ها با مواد فلورسنت نشان دار شده اند. هر یک از مجموعه سلول های کروی حاوی ۲۳ سلول و قطر آن ۵۰۰ میکرون است. پیکره نهایی پس از ۱۶۸ ساعت ایجاد می شود.



شکل ۴- نمایش نموداری فناوری چاپ اعضا: قرار دادن لایه به لایه مجموعه های سلولی در ژل های زیست سازگار و سپس اتصال این لایه ها به هم و ایجاد یک بافت ۳ بُعدی

می شود که شرایط مختلف کاغذ زیستی یا همان ژل در تعیین پیکره نهایی بافت ایجاد شده نقش اساسی دارد و می توان بافت های مسطح، کروی یا استوانه ای را با غلظت های متفاوت آن چاپ کرد. با به کارگیری روش ریاضی شبیه سازی مونت کارلو به کمک رایانه می توان نتایج نهایی حاصل از قرار دادن مجموعه سلول ها در غلظت های مختلفی از ژل را پیش بینی کرد [۱۸]. در این روش انرژی کلی ناشی از کشش سطحی بین مجموعه های سلولی با یک دیگر و با ژل به وسیله فرمول

$$E = \gamma cg Bcg + K$$

محاسبه می شود.  $Bcg$  نماینده تعداد کل پیوند های شیمیایی بین سلول ها و ژل و  $\gamma cg$  نشان دهنده کشش بین سطحی سلول ها با ژل است. تحلیل تفصیلی نتایج مطالعات تجربی آشکار می کند که مهم ترین پارامتر تعیین کننده پیکره هندسی نهایی سلول ها پس از اتصال آنها به یکدیگر  $\gamma cg$  یا کشش بین سطحی میان سلول ها و ژل در محیط است. در شبیه سازی مونت کارلو نیز  $\gamma cg$  عامل اصلی تعیین کننده میزان روایی کاغذ زیستی است.

## چاپ اعضا

چاپ اعضا یک فناوری طراحی و ساخت سریع<sup>۲</sup> است که متناسب با نیازهای زیست پزشکی و بر مبنای رفتار

## چاپ ساختارهای بافتی استوانه ای

پژوهشگران دانشگاه Clemson برای نخستین بار در سال ۲۰۰۴ توانستند ساختارهای بافتی سطحی و استوانه ای را با کمک چاپ گره های جوهرافشان به چاپ برسانند [۱۶، ۱۵]. در شکل ۳ نتایج چاپ مجموعه سلول های تخمدانی هامستر چینی CHO<sup>۱</sup> در غلظت های متفاوت ژل های حاوی کلاژن نشان داده شده است. هنگامی که غلظت کلاژن در ژل ۱/۷ mg/ml باشد شرایط مناسبی ایجاد می شود که مجموعه های سلولی می توانند به پایین ترین سطح انرژی رسیده و به صورت یک مجموعه گروی واحد در کنار هم قرار گیرند. در این حالت ژل بیشترین روایی را دارد یعنی اجازه می دهد که مجموعه های سلولی به راحتی در آن حرکت کنند و شکل نهایی را بسازند [۱۷].

قبلاً نشان داده شده است که سلول ها در طول فیبرهای کلاژن می توانند با خزیدن تغییر مکان بدهند و هرچه غلظت کلاژن در ژل بیشتر باشد، این توانایی خزش بیشتر است. حال اگر غلظت کلاژن در ژلاتین ۱/۰ mg/ml باشد حالت روایی آن کمتر می شود و پس از ۷ شبانه روز مجموعه سلول ها بصورت یک حلقه یا صفحه در کنار هم قرار می گیرند. پژوهشگران با چاپ لایه به لایه این حلقه های سلولی، می توانند یک بافت استوانه ای درست کنند. این روش قابلیت ایجاد یک رگ یا بخشی از لوله گوارش را نشان می دهد. در شکل ۴ نشان داده شده است که به دنبال چاپ چندین لایه از حلقه های سلولی (هر حلقه حاوی ۱۰ مجموعه سلولی) بر روی هم و در غلظت مناسبی از ژل، یک لوله ایجاد می شود. بنابراین مشاهده

### 2- Rapid Prototyping Technology

مجموعه ای از فناوری های مرتبط که در آن ها برای ساختن محصولات صنعتی و اجسام فیزیکی پیچیده مستقیماً از طراحی های رایانه ای آن اجسام استفاده می شود. در تمام این انواع فناوری ها مواد لازم را به صورت لایه به لایه بر روی هم قرار می دهند تا محصول نهایی ساخته شود.

<sup>۱</sup> Chinese Hamster Ovary cells

با پیشرفت هایی که در فناوری این چاپ گرها صورت می گیرد، در سال های آتی دانشمندان قادر به ساخت بافت های مختلف با کیفیت و قابلیت بالا خواهند بود. یکی از چالش های اساسی مهندسی بافت تأمین جریان خون کافی به منظور حفظ حیات و بقای سلول ها در بافت های بازسازی شده است. یک مزیت بسیار مهم فناوری چاپ زیستی این است که در آن مکانیسم هایی بطور بالقوه برای تأمین جریان خون ساختارهای بافتی سه بعدی تعبیه شده است [۲۲، ۲۳].

### نتیجه گیری

دانشمندان اخیراً نشان داده اند که چاپ زیستی اعضای بدن یا ساختن لایه به لایه بافت های بیولوژیک با کمک طراحی رایانه ای و چاپ گرهای زیستی یک فناوری قابل انجام است [۲۴]. اگرچه این فناوری بین رشته ای در حال حاضر در ابتدای راه خود قرار دارد ولی با شتاب فراوانی رو به رشد می باشد و دورنمای دستاوردهای آن در آینده چنان شگرف است که بنیاد ملی علوم<sup>۲</sup> و سازمان هوا-فضای امریکا<sup>۳</sup> حامیان اصلی پیش برد آن هستند. به نظر می رسد ابزار مادی معجزه مسیح (ع) در جان بخشیدن به پرنندگان گلی در حال فراهم شدن است و داستان علمی - تخیلی *مرد دویست ساله* آسیموف<sup>۴</sup> رنگی از واقعیت به خود می گیرد.

نباید فراموش کرد که اولین هواپیمای ساخته شده بشر بوسیله برادران رایت فقط ۳ دقیقه قادر به پرواز بود ولی امروزه جت های غول پیکر مهم ترین ابزار مسافرت در مسافت های طولانی هستند. به همین ترتیب با توجه به نیاز فزاینده بیماران به اعضای جایگزین و کمبود شدید آنها (مانند پانکراس در دیابتی ها، قلب در مبتلایان به کاردیومیوپاتی، کلیه در نارسایی پیشرفته کلیوی) پیش بینی می شود در قرن بیست و یکم چاپ گرهای سلولی و زیستی پیشرفته به عنوان مهمترین ابزار مهندسی بافت

همچون مایع Viscoelastic سلول ها در بافت ها شکل گرفته است [۱۹، ۲۰]. در این فناوری با کمک طراحی رایانه ای مواد زیستی شامل سلول ها و ماتریکس بین سلولی را لایه به لایه بر روی هم جایگزین می کنند تا در نهایت یک بافت سه بعدی درست شود.

روند چاپ اعضا شامل سه مرحله متوالی است که عبارتند از پیش فراوری، فراوری و پس فراوری.

در مرحله پیش فراوری *طرح گسترده اولیه* عضو مورد نظر با شبیه سازی رایانه ای طراحی می شود. بدین منظور می توان از تصاویر بازسازی شده دیجیتال آن عضو خاص که با MRI یا CT تهیه شده یا از *مدل های ریاضی* کمک گرفت [۲۱].

امروزه اگرچه پیشرفت های فراوانی در فناوری های تصویربرداری بالینی صورت گرفته است با این حال هنوز قدرت *تفکیک* این تکنیک ها به حدی نرسیده است که توزیع دقیق اجزای تشکیل دهنده بافت را در مقیاس سلولی مشخص نماید و به منظور تهیه طرح ایده آل بافت ها باید پیشرفت های بیشتری در فناوری تصویربرداری صورت گیرد.

در مرحله فراوری چاپ رایانه ای بافت به صورت لایه به لایه تا تشکیل ساختار سه بعدی مورد نظر صورت می گیرد. بافت هایی که در این مرحله تولید می شوند هنوز قابلیت عملکرد ندارند.

در مرحله پس فراوری ساختارهای ایجاد شده در *زیست واکنش گر های مناسب*<sup>۱</sup>، با شرایط زیست مکانیکی بدن وفق داده می شوند.

در سال ۲۰۰۳، ویلسون و بولاند از بخش مهندسی زیست دانشگاه کلمسُن با ایجاد تغییراتی در چاپ گرهای جوهرافشان معمولی (مدل Cannon BJ 2200)، چاپ گرهای سلولی ساختند که قادر است به جای مرکب، محلول هایی از سلول یا ژل را با حداقل آسیب رسانی به حیات آن ها از روزه های تعبیه شده در سوزن های سر این چاپ گرها بر روی ژل های مناسب چاپ نماید [۱۵].

2- National Science Foundation (NSF)

3-National Aeronautics and Space Association (NASA)

۴- کتاب Bicentennial Man نوشته آیزاک آسیموف داستان تحول و تبدیل تدریجی

یک روبات (robot) به یک انسان واقعی را شرح می دهد.

1- Bioreactors

در لبه مرزی آن دانش است؛ سیاستگذاران علمی کشور باید با فراهم آوردن بودجه و امکانات کافی و سازمان دهی جوانان مستعد و نخبه علاقمند، آزمایشگاه ها و جزایر کیفی در بالاترین سطح در زمینه مهندسی بافت و چاپ زیستی تأسیس نموده و به ظرفیت سازی در این مورد اهتمام ورزند، همانگونه که کشورهای شرق آسیا گام هایی در این زمینه برداشته اند، تا در آینده بتوانیم از دستاوردهای اقتصادی-اجتماعی توسعه این فناوری در کشورمان برخوردار گردیم.

کاربردهای گسترده و فراگیری در تهیه اعضای مورد نیاز بیماران پیدا خواهند کرد.

## جایگاه فناوری چاپ زیستی در ایران

همانگونه که بیان شد در حال حاضر این فناوری بسیار جوان است؛ در حدی که حتی در مواردی نیاز به تدوین واژه های جدید برای درک و تبیین مفاهیم آن می باشد. با این حال از آنجا که تجربه توسعه کشورها در سده اخیر نشان داده که بهترین راه انتقال هر فناوری، پژوهش پیشگام

## مآخذ

1. Wilson HV. On some phenomena of coalescence and regeneration in sponges. *J Exp Zool* 1907; 5: 245-258.
2. Steinberg MS. Mechanism of tissue reconstruction by dissociated cells. II. Time course of events. *Science* 1962; 137: 762-3.
3. Torsa S. & Mason SG. Coalescence of two immiscible liquid drops. *Science* 1969; 163: 813-4
4. Foty R.A, pfleger C.M, Fogacs and steinberg M.S. Surface tensions of embryonic tissue predict their mutual development behavior. *Development* 1996; 122: 1611-20.
5. Godt D and Tepass U. Drosophila oocyte localization is mediated by differential cadherin-based adhesion. *Nature* 1998; 395: 387-91.
6. Gonzalez- Reyes A and St Johnston D. Patterning of the follicle cell epithelium along the anterior- posterior axis during drosophila oogenesis. *Development* 1998; 125: 2837-46.
7. Glazier JA, Graner F. Simulation of the differential adhesion driven rearrangement of biological cells. *Phys Rev E* 1993; 47: 2128-2154.
8. Whitesides GM, Boncheva M. Beyond molecules: Self-assembly of mesoscopic and macroscopic components. *Proc Natl Acad Sci USA* 2002 Apr 16; 99 (8): 4769-74
9. Newnan SA, Comper WD, 'Generic' physical mechanisms of morphogenesis and pattern formation. *Development* 1990; 110 (1): 1-18.
10. Neagu A, Jakab K, Jamison R, Forgacs G. Role of physical mechanisms in biological self- organization *Phys Rev Lett* 2005; 95: 178104 (1-4).
11. Jakab K, Damon B, Neagu A, Kachurin A, Forgacs G. Three- dimensional tissue constructs built by bioprinting. *Biorheology* 2006; 43: 509-13.
12. Jakab K, Neagu A, Mionov V, Forgacs G. Organ printing: Fiction or science *Biorheology* 2004; 41(3-4): 371-5
13. Bonassar LJ, Vacanti CA. Tissue Engineering: the first decade and beyond. *J Cell Bioch* 1998; 30-31: 297-303.
14. Mironov V, Markwald R, Forgacs G. Organ printing: self- assembling cell aggregates as "bioink". *Sci & Med* 2003; 9(12): 69-71.
15. Wilson WC, Boland T: Cell and organ printing 1: Protein and cell printers. *Anat Rec part A* 2003; 272 A: 491-6.
16. Boland T, Mironov V, Gutowoska A, Roth EA, Markwald RR. Cell and organ printing 2: Fusion of cell aggregates in three-dimensional gels. *Ana Rec part A* 2003; 272 A: 497-502.
17. Jakab H, Neagu A, Mironov V, Markwald RR, Forgacs G. Engineering biological structures of prescribed shape using self-assembling multicellular systems *Proc Natl Acad Sci* 2004; 101(9): 2864-9.
18. Neagu A, Kosztin I, Jakab K, Barz B, Neagu M, Jamison R, Forgacs G: computational modeling of tissue self-assembly *Mod Phys Let B* 2006; 20(20): 1217-1231.
19. Pfista A, Landers R, Laib A, Hubner U, Schmelzeisen R, Muphaupt R. Biofunctional Rapid prototyping for tissue- engineering applications: 3D bioplotting versus 3D printing *J Polym Sci Part A: Polym Chem* 2004; 42: 642-38.
20. Sun W, Lal P. Recent development on computer aided tissue engineering- a review. *Comput Methods Programs Biomed* 2002; 67: 85-103.
21. Mironov V, Boland T, Trusk T, Forgacs G, Markwald RR. Organ printing: computer-aided jet-based 3D tissue

- engineering. *Trends Biotechnol* 2003; 21: 157-161.
22. Langer RS, Vacanti JP. Tissue engineering: the challenges ahead. *Sci Am* 1999; 280: 86-9.
23. Mooney DJ, Miko AG: Growing new organs. *Sci Am* 1999; 280: 60-5.
24. Mironov V, Prestwich G, Forgacs G. Bioprinting living structures. *J Mater Chem* 2007; 17: 2054 – 60