فهرست

پیشگفتار ۷

فصل ۱: اصول نانوتکنولوژی ۹

۱-۱مقدمه ۹

۱-۲ فرآیند بهبود زخم ۹

۱-۳ انواع و خصوصیات پانسمان ۱۰

۱-۴ پانسمان‌های نوین ۱۱

فصل ۲: نانوتکنولوژی کاربردی ۱۳

۲-۱ مواد و تجهیزات ۱۳

۲-۲ رعایت اصول اخلاقی پژوهش ۱۴

۲-۳ چگونگی ساخت نانوالیاف کیتوزان/ پلی‌اتیلن اکساید، حاوی دارو یا عصاره گیاهی با روش الکتروریسی ۱۴

۲-۴ رسم منحنی کالیبراسیون دارو ۲۵

۲-۵ بررسی رهایش دارو از نانوالیاف کامپوزیتی ۲۶

۲-۶ محاسبه درصد تخلخل (ε) ۲۷

۲-۷ آزمون زیست سازگاری و بررسی رشد و تکثیر سلولی بر روی نانوالیاف (کشت سلولی) ۲۸

۲-۸ طیف نگاری مادون قرمز (FTIR) ۳۵

۲-۹ محل نگهداری حیوانات آزمایشگاهی ۳۸

۲-۱۰ نشانه گذاری حیوانات آزمایشگاهی ۳۸

۲-۱۱ درمان ۳۹

۲-۱۲ روش قرار دادن نانوالیاف بر روی زخم ۳۹

۲-۱۳ نحوه اندازه‌گیری قطر و مساحت زخم و تعیین حجم اولیه و نهایی احشای داخلی در حیوان آزمایشگاهی ۴۰

۲-۱۴ بررسی هیستوپاتولوژی ۴۱

۲-۱۵ ارزیابی عفونت ثانویه ۴۲

۲-۱۶ ارزیابی اثر دارو با تصویر برداری درون تنی (In-vivo imaging) در حیوان آزمایشگاهی ۴۲

فصل ۳: اصول و کاربرد استریولوژی ۴۵
۳-۱ پروب (Probe) ۴۶
۳-۲ روش‌های نمونه برداری ۴۸
۳-۳ انتخاب میدان دید (نمونه برداری از سطح بافت) ۵۰
۳-۴ مفهوم Unbiased & Biased ۵۱
۳-۵ خطای نمونه‌گیری ۵۲
۳-۶ محاسبه میزان چروکیدگی (Shrinkage) ۵۲
۳-۷ محاسبه پارامترهای استریولوژی ۵۳
۳-۸ استفاده از نرم افزارهای استریولوژی ۵۹
فصل ۴: اصول مهندسی بافت و سلول ۶۱
۴-۱ سلول‌های بنیادی (Stem cell) ۶۲
۴-۲ انواع سلول‌های بنیادی ۶۲
۴-۳ تمایز (Differentiation) ۶۴
۴-۴ تمایز سلول‌های بنیادی ۶۵
۴-۵ روش تمایز در In vivo ۶۶
۴-۶ روش‌های تمایز در In vitro ۶۶
۴-۷ Co-culture with Differentiated Cells ۶۸
۴-۸ Cell-conditioned ۶۸
فصل ۵: واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز (PCR) (Polymerase Chain Reaction) ۷۱
۵-۱ واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز (PCR) (Polymerase Chain Reaction) ۷۱
۵-۲ Nested – PCR ۷۹
فهرست منابع ۸۱
واژه‌یاب ۸۶
اطلس رنگی ۸۸

پیشگفتار

کشورمان ایران با شرایط جغرافیایی منحصر بفرد و قرار گرفتن در مسیر دو منطقه ژئوجغرافیایی کهن هند و آفریقا مرکز بسیار مستعدی در زمینه بیماری‌های مختلف است. علوم پایه پزشکی، دامنه وسیعی از ماکرواکولوژیکی تا میکرواکولوژیکی و علوم مرتبط با آنها را شامل می شود، در نتیجه در بین شاخه‌های علوم پزشکی اهمیت زیادی پیدا کرده است به طوری که نه تنها از نظر رشد و توسعه بلکه به لحاظ کاربردهای عملی در سایر علوم نیز نقش بسیار مهمی را ایفا می‌کند. برخلاف تصورات قبلی، علوم پایه پزشکی، پویا و در حال تغییر هستند به طوری که منتج به طرح درمان‌های جدید در طب بالینی شده‌اند. توسعه نگرش‌ها در این علوم باعث کسب اطلاعات جدیدی در شناخت و درک بهتر بیماری‌ها شده است. از این رو امید است با تنظیم کتاب حاضر و تاکید بر جنبه‌های عملی و آزمایشگاهی توانسته باشیم گامی هر چند کوچک در این جهت برداریم.

مجموعه حاضر در ۵ فصل که شامل "اصول نانوتکنولوژی"، "نانوتکنولوژی کاربردی"، "اصول و کاربرد استریولوژی"، "اصول مهندسی بافت و سلول" و "واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز (PCR)" نگارش شده است. هر فصل با تکیه بر دیاگرام‌ها، تصاویر و جداول متعدد سعی در تسهیل یادگیری مطالب دارد. کتاب حاضر به عنوان ابزاری برای دسترسی به تحلیل، استخراج و انجام آزمایشات در سطح مولکول، نانو و بررسی استریولوژی تاکید دارد و برای استفاده محققین رشته‌های مختلف علوم زیستی تنظیم و در آن به برخی پروتکل‌ها و تکنیک‌های پایه اشاره شده است. زیرا وجود کتابی چندمنظوره می‌تواند زمینه‌ساز تحقیق را برای علاقمندان هموار سازد. برخی از تصاویر در انتهای کتاب، در قالب اطلس رنگی گنجانده شده تا در درک بهتر مفاهیم کمک کننده باشد.

کتاب حاضر به طور کامل و جامع به نیازهای پایه تحقیقاتی علاقمندان به تحقیقات زیست پزشکی پرداخته که در چاپ‌های بعدی سعی خواهد شد تا مطالب تخصصی‌تر و به‌روزتر به آن اضافه گردد. متن کتاب چندین بار توسط مولفین مورد بازبینی قرار گرفته است اما علیرغم این تلاش‌ها، این کتاب خالی از نقص نخواهد بود. لذا از خوانندگان عزیز تقاضا می‌گردد ضمن برقراری ارتباط با مولفین نقایص کتاب را بیان کرده تا در چاپ‌های بعدی مورد بازبینی و اصلاح قرار گیرد.

مولفین

بهار ۱۴۰۱

فصل ۱

اصول نانوتکنولوژی

۱-۱مقدمه

یکی از چالش‌های اصلی پزشکان یافتن راهی برای بهبود روند بازسازی و ترمیم بافت‌های آسیب دیده است. عوامل متعددی مانند تصادفات، سوختگی‌ها، شکستگی‌های وسیع و همچنین عوامل عفونی می‌توانند منجر به ایجاد زخم در بدن شوند.

امروزه نانوبیوتکنولوژی با ورود به عرصه‌های مختلف علمی منجر به تحولاتی شگرف شده است و طراحی داروهای طبیعی بدلیل حداقل عوارض جانبی به شدت مورد توجه قرار گرفته‌اند. یکی از این زمینه‌ها در ترمیم و بازسازی بافت‌های آسیب دیده مهندسی بافت می‌باشد. در ساخت بافت، نیاز به داربستی با ساختار فیزیکی و مکانیکی مناسب است تا امکان مهاجرت، رشد و تکثیرسلولی، دستیابی به یک مورفولوژی خاص، چسبندگی و در نهایت ایجاد بافتی جدید را فراهم کند وآن را جایگزین بافت آسیب دیده در بدن نماید.

۱-۲ فرآیند بهبود زخم

بهبود زخم به ترتیب از فازهای Haemostasis، Inflammation، Proliferation وRemodelling تشکیل شده است. بعد از جلوگیری از خونریزی در فاز هموستاز، ارتشاح نوتروفیل‌ها و ماکروفاژها جهت جلوگیری از عفونت در فاز التهاب دیده می‌شوند. سلول‌های التهابی واسطه‌هایی را که برای Granulation tissue formation لازم است را ترشح می‌کنند، Transforming growth factor-β (TGF-β) یک Inflammatory cytokine است که سرعت تکثیر سلولی و آپپتوز را تنظیم می‌کند، در ادامه فاکتورهای رشد متعددی مانند Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) و Fibroblast Growth Factor (FGF) در محل زخم ترشح می‌شوند. تمام عوامل Pro-angiogenic، تکثیر و تمایز سلولی را آغاز می‌کنند ولی التهاب بیش از حد، خود با تولید Reactive Oxygen Species (ROS) و پروتئازها باعث کاهش میزان بهبودی می‌گردد. بدنبال آن فاز تمایز با تکثیر سریع سلول‌های فیبروبلاست و ترشح کلاژن جهت ایجاد

یک Extracellular matrix جدید رخ می‌دهد. طی بازسازی، الیاف کلاژن بالغ شده و زخم با تشکیل اسکار بهبود می‌یابد. شکل‌گیری مویرگ‌ها، نتیجه تکثیر سلول‌های اندوتلیال است که اکسیژن و مواد مغذی فیبروبلاست‌ها را فراهم می‌کند. هرچه زخم عمیق‌تر باشد اسکار بیشتر خواهد بود. هنگامی که مرحله بهبودی در هر یک از مراحل فوق متوقف شود زخم مزمن خواهد شد.

۱-۳ انواع و خصوصیات پانسمان

جهت پانسمان زخم بطور سنتی از Cotton gauze استفاده می‌شود. امروزه پانسمان‌های مدرن Interactive یا Bioactive هستند. پانسمان‌های مدرن Interactive شامل فیلم‌ها، اسفنج‌ها، هیدروژل‌ها و ... می‌باشند که اثرات آنتی‌باکتریایی دارند، در حالیکه Bioactive پانسمان‌ها در بهبود زخم دخالت فعال می‌کنند.

تولید پانسمان‌های نانولیفی الکتروریسی شده می‌تواند نیازهای مهم ترمیم را مانند امکان نفوذ گازهایی مانند اکسیژن، محافظت از زخم در برابر عفونت ثانویه و جلوگیری از دهیدراتاسیون را تامین نماید. زخم پوشی ایده‌آل است که در عین ایجاد تخلخل بالاتر بتواند سد مناسب‌تری را علیه میکروارگانیسم‌ها ایجاد کند. همچنین باید جاذب ترشحات زخم بوده، مانع از عفونت سطح زخم شود و شرایط مناسبی را برای تبادلات گازی زخم فراهم آورد و به راحتی و بدون ایجاد آسیب از بافت جدا شود. Wound dressing با نانوالیاف الکتروریسی شده فواید بسیار زیادتری را نسبت به پانسمان‌های معمولی دارد زیرا که با سطح بسیار زیاد و ساختار میکروسکوپی آن‌ها، به سرعت شروع به تولید سیگنال‌های لازم، جهت جذب فیبروبلاست‌ها به لایه درم می‌کنند که با تسریع ایجاد ماتریکس خارج سلولی، ترمیم بافت آسیب دیده را سرعت می‌بخشند.

پلیمرهای طبیعی مانند کیتوزان (Chitosan)، در مصارف بیوپزشکی بدلیل خواص زیستی مناسب نظیر قابلیت زیست سازگاری، خواص ضد میکروبی، عدم سمیت، Giant cell migration، افزایش سرعت التیام زخم، Fibroblast activation و Stimulation of type IV collagen synthesis کاربرد زیادی دارند و بدلیل شباهت ساختاری بالایی آن به ماتریس خارج سلولی باعث شده تا در ترمیم بافت به عنوان یک نانوداربست (Nanoscaffold) بسیار شایان اهمیت باشد. همچنین، خصوصیات فیزیکی و شیمیایی این ماده باعث شده که از آن به عنوان ماده‌ای برای رهاسازی بطئی ماکرومولکول‌ها و داروها در پزشکی استفاده نمایند و اثرات تعدیل ایمنی آن با تاثیر بر ایمنی ذاتی و اکتسابی، سبب افزایش فعالیت سلول‌ها، ترشح سیتوکاین‌ها و کموکاین‌ها شده و در سطح سلول‌های ایمنی گیرنده‌هایی چون TLR-2، Detectin-1 و مانوز مسئول شناسایی آن می‌باشند. این ماده همچنین خاصیت ادجوانتی نیز داشته و منجر به فعال شدن اینفلامازوم در مسیر فاگوسیتوز می‌گردد.

کیتوزان پلیمری طبیعی و آبدوست است اما بدلیل بالا بودن وزن مولکولی و ویسکوزیته زیاد به پلیمر

آبدوست دیگری مانند پلی‌وینیل الکل (PVA) و پلی‌اتیلن اکساید (PEO) نیاز دارد. اما بدلیل برخی اثرات توکسیک PVA استفاده از PEO در تحقیقات پزشکی به عنوان پلیمری سنتتیک و biocompatible شایع‌تر است.

پلی‌اتیلن اکساید (پلی‌اتیلن گلیکول) ماده‌ای است غیر سمی، بی بو، خنثی و روان کننده که در داروهای متعددی به عنوان حلال، عامل پخش کننده، پایه پماد و عامل جذب در قرصهای مختلف به کار می‌رود. در عین حال در نانوتکنولوژی از آن برای کاهش ویسکوزیته کیتوزان و تهیه نانوالیاف نیز استفاده می‌گردد. این ماده در میان زنجیره‌های کیتوزان قرار می‌گیرد و مانع دفع بارهای همنام و از هم گسستن زنجیره‌های آن می‌شود که منجر به افزایش حلالیت و کاهش ویسکوزیته آن جهت الکتروریسی می‌گردد. طی مطالعاتی که در گذشته انجام شده پس از الکتروریسی و بررسی تصاویر نانوالیاف بدست آمده با میکروسکوپ الکترونی، نسبت ۹۰ به ۱۰ به عنوان نسبت بهینه اختلاط پلیمرهای کیتوزان و پلی‌اتیلن اکساید برای تهیه نانوالیاف مناسب انتخاب گردیده است. این ترکیب قابلیت الکتروریسی کیتوزان را افزایش داده منجر به افزایش آبدوستی نانوداربست و پوشش دهی مناسب‌تر زخم با هدف محافظت، بازدارندگی از تهاجم میکروارگانیسم‌ها و تسریع در روند ترمیم می‌گردد.

۱-۴ پانسمان‌های نوین

در سال‌های اخیر استفاده از نانوالیاف در درمان بیماری‌های انسان به عنوان یک ترکیب زیست سازگار (Biocompatible) و زیست تجزیه‌پذیر (Biodegradable) و قابلیت آنها در تحریک سیستم ایمنی مانند کموتاکسی، فعال‌سازی ماکروفاژها و نیز تحریک ترشح سیتوکاین هایی نظیر IL-1، IL-10، IL-12 ، TNF-α و سلول‌های T سایتو توکسیک به عنوان یک رویکرد جدید در تحقیقات پزشکی مطرح است. طی دوره درمان دارو باید در مرحله اول، با توجه به نیاز بدن، تحویل موضع شود و ثانیا، باید بتواند ماده فعال گیاهی را به محل عمل هدایت نماید. فرم‌های تجویزی متعارف از جمله درمان دارویی طولانی مدت، قادر به پاسخگویی به هیچ کدام از این موارد نیستند.

امروزه سیستم‌های تحویل (Delivery) داروهای مختلف و مکانیسم‌های هدف‌گیری دارو، در جهت به حداقل رساندن تخریب دارویی رو به توسعه هستند. یکی از راه‌های پیشنهادی توسط سازمان جهانی بهداشت، کاربرد گیاهان و مواد خوراکی طبیعی در از بین بردن میکروارگانیسم‌ها می‌باشد که طبق آمار این سازمان، در حال حاضر حدود ۸۰ درصد از جمعیت جهان از داروهای گیاهی برای درمان خود استفاده می‌کنند. تولیدات طبیعی بدلیل آنکه عوارض جانبی کمتر، قیمت پایین‌تر و دسترسی بالاتری دارند، منابعی جدید و انتخابی برای درمان طیف وسیعی از بیماری‌ها هستند. با توجه به عوارض جانبی و عدم پاسخ مناسب به داروهای رایج در درمان برخی عفونت‌های جلدی، با توجه به این موضوع که بهبودی سریع‌تر

ضایعات جلدی سبب ایجاد اسکار کمتر برای بیمار می‌شود، از این رو یافتن درمان جایگزین مناسب خصوصا در ابعاد نانو، در درمان آنها بسیار حائز اهمیت است.

از طرفی درمان با داروهای معمول دارای اثرات جانبی زیادی بوده و بسیار هزینه بر است، همچنین بروز موارد مقاومت دارویی در کشورهای مختلف نیز به عنوان یک هشدار و چالش عمده در موفقیت درمانی، مطرح می‌باشد. در دهه اخیر با بوجود آمدن این محدودیت‌ها در استفاده از داروهای شیمیایی زمینه‌های تحقیقات گیاهی وسعت یافته است، بنابراین تولید داروهای جدید علیه میکروارگانیسم‌ها یک نیاز فوری تلقی می‌شود. در تحقیقات فیتو فرمولاسیون در داروهای گیاهی استفاده از نانوذرات آن‌ها نیز، دارای مزایایی از جمله افزایش حلالیت و قابلیت زیستی، حفاظت از سمیت، افزایش فعالیت‌های دارویی، افزایش ثبات، بهبود توزیع ماکروفاژها، تحویل مداوم ماده فعال، حفاظت از تخریب فیزیکی، شیمیایی و غیره بوده است.