The Split Well: a New Method for Comparing Nano-Scaffolds in Electron Microscopy

Javad Momeni[1], Mehdi Hadi Jafari[2], Hadi Aligholi[3], Sajad Sahab Negah[1,2*]

[1]Neuroscience Research Center, Mashhad University of Medical Sciences, Mashhad, Iran
[2]Shefa Neuroscience Research Center, Khatam Alanbia Hospital, Tehran, Iran
[3]Department of Neuroscience, School of Advanced Medical Sciences and Technologies, Shiraz University of Medical Sciences, Shiraz, Iran

Article Info:

Received: **26 Apr 2023** ***Revised:*** **31 May 2023** ***Accepted*****: 3 June 2023**

ABSTRACT

Introduction: Comparing the nanostructure of multiple scaffolds for tissue engineering using electron microscopy poses significant challenges in terms of time and cost. To overcome this, we have developed a novel method that enables the assessment of two different scaffolds on a single slide in scanning electron microscopy (SEM). ***Materials and Methods:*** The Pura Matrix scaffold was used to study this method. Firstly, each scaffold was positioned at the bottom of a well, ensuring that every sample was placed on one specific side of the well. Then, each sample was washed with PBS and fixed with glutaraldehyde. After the scaffolds were fixed, they were washed three times with PBS and finally dried overnight at room temperature. After 24 hours, the samples were coated in gold and then observed using SEM. ***Results:*** In this study, we utilized this method successfully to investigate the structures of different self-assembling peptides. Our split-well approach not only saves time for researchers and reduces confounding variables but also minimizes the cost of services by allowing simultaneous evaluation of two scaffolds. ***Conclusion:*** Our findings demonstrate that researchers can achieve precise comparisons using similar magnifications. Overall, the split-well approach proves to be a cost-effective and accurate method for comparing different scaffolds in tissue engineering.

Keywords:

1. Cell Culture Techniques
2. Tissue Engineering
3. Methods

***Corresponding Author:** Sajad Sahab Negah

Email: *Sahabnegahs@mums.ac.ir*

[Downloaded from shefayekhatam.ir on 2024-09-01]

[DOI: 10.61186/shefa.11.2.75]

چاهک تقسیم شده: روشی جدید برای مطالعهٔ مقایسه‌ای داربست‌ها در میکروسکوپ الکترونی

جواد مومنی[۱]، مهدی هادی جعفری[۲]، هادی علیقلی[۳]، سجاد سحاب نگاه[۱،۲*]

[۱]مرکز تحقیقات علوم اعصاب، دانشگاه علوم پزشکی مشهد، مشهد، ایران
[۲]مرکز تحقیقات علوم اعصاب شفا، بیمارستان خاتم الانبیاء، تهران، ایران
[۳]گروه علوم اعصاب، دانشکده علوم و فناوری‌های نوین پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی شیراز، شیراز، ایران

اطلاعات مقاله:
دریافت: ۶ اردیبهشت ۱۴۰۲ **اصلاحیه:** ۱۰ خرداد ۱۴۰۲ **پذیرش:** ۱۳ خرداد ۱۴۰۲

چـــــکیده

مقدمه: در مهندسی بافت مقایسه نانوساختار داربست‌های متعدد با استفاده از میکروسکوپ الکترونی چالش‌های مهمی را از نظر زمان و هزینه ایجاد می‌کند. برای غلبه بر این چالش‌ها، ما یک روش جدید را توسعه داده‌ایم که ارزیابی دو داربست مختلف را در یک اسلاید در میکروسکوپ الکترونی روبشی (SEM) امکان‌پذیر می‌سازد. ***مواد و روش‌ها:*** برای مطالعه این روش از داربست Pura Matrix استفاده شد. در ابتدا، هر داربست در کف یک چاهک قرار داده شد و اطمینان حاصل شد که هر نمونه در یک سمت مشخص از چاهک قرار می‌گیرد. سپس هر نمونه با PBS شسته و با گلوتارآلدئید تثبیت شد. پس از تثبیت داربست‌ها، سه بار با PBS شسته و در نهایت یک شب در دمای اتاق خشک شدند. پس از ۲۴ ساعت، نمونه ها با طلا پوشش داده شدند و سپس با استفاده از SEM مشاهده شدند. ***یافته‌ها:*** در این مطالعه، ما برای بررسی ساختار پیتیدهای مختلف خودساخته با موفقیت از این روش استفاده کردیم. رویکرد چاهک تقسیم شده ما نه تنها باعث صرفه‌جویی در زمان برای محققان و کاهش متغیرهای مخدوش کننده می‌شود، بلکه هزینه خدمات را با امکان ارزیابی همزمان دو داربست به حداقل می‌رساند. ***نتیجه‌گیری:*** یافته‌های ما نشان می‌دهد که محققان می‌توانند با استفاده از بزرگنمایی‌های مشابه به مقایسه‌های دقیقی دست یابند. به طور کلی، روش چاهک تقسیم شده روشی مقرون به صرفه و دقیق برای مقایسه داربست‌های مختلف در مهندسی بافت است.

واژه‌های کلیدی:
۱-تکنیک‌های کشت سلول
۲-مهندسی بافت
۳-روش‌ها

***نویسنده مسئول:** سجاد سحاب نگاه

پست الکترونیک: *Sahabnegahs@mums.ac.ir*

[Downloaded from shefayekhatam.ir on 2024-09-01]

[DOI: 10.61186/shefa.11.2.75]

مقدمه

در سال‌های اخیر، جهت نزدیک شدن به حالت طبیعی و به منظور بررسی شرایط رشد، بقاء، تکثیر و تمایز سلولی، سلول‌های عصبی را در محیط‌های سه بعدی کشت می‌دهند. در همین راستا استفاده از انواع داربست‌ها نقش کمک کننده‌ای در بهبود کیفی این محیط‌های کشت سه بعدی داشته است. به منظور ارزیابی کیفیت داربست‌ها روش‌های مختلفی وجود دارد. یکی از متداول‌ترین این روش‌ها استفاده از میکروسکوپ الکترونی روبشی[1] (SEM) است (۱). SEM یک پرتو الکترونی متمرکز را روی سطح نمونه اسکن می کند. الکترون‌های موجود در پرتو، که به‌عنوان الکترون‌های اولیه شناخته می‌شوند، پس از واکنش با نمونه، سیگنال‌های مختلفی تولید می‌کنند که می‌توان از آن‌ها برای به دست آوردن تصاویری که توپوگرافی سطح و ترکیب مواد را نشان می‌دهد، استفاده کرد (۲). هنگامی که الکترون اولیه وارد یک نمونه می‌شود، اغلب قبل از تماس با ذره دیگر، مسافت مشخصی را طی می‌کند. پس از برخورد با این ذره، الکترون اولیه در مسیر جدیدی حرکت می‌کند که به پراکنش[2] معروف است. ورود پرتو الکترونی به نمونه و رویدادهای پراکنشی منجر به تشکیل یک لوله واکنش دهنده قطره‌ای تصویر[3] می‌شود (۲). الکترون‌های ثانویه زمانی تولید می‌شوند که الکترون‌های اولیه الکترون‌های نمونه را خارج کنند. آنها انرژی کمی دارند و نمی‌توانند از قسمت‌های عمیق‌تر لوله واکنش دهنده (reaction vessel) فرار کنند. بنابراین، الکترون های ثانویه شناسایی شده در SEM منحصراً از سطح یا ناحیه نزدیک به سطح نمونه منشا می‌گیرد (۲). علاوه بر اطلاعات توپوگرافی، مورفولوژی و ترکیب، یک میکروسکوپ الکترونی روبشی می‌تواند شکستگی‌های سطحی را شناسایی و تجزیه و تحلیل کند، اطلاعاتی را از ریزساختارها ارائه دهد، آلودگی‌های سطحی را بررسی کند، تغییرات فضایی در ترکیبات شیمیایی را آشکار کند، آنالیزهای شیمیایی کیفی ارائه دهد و ساختارهای کریستالی را شناسایی کند (۳).

همچنین SEM به فرد اجازه می‌دهد تا یک نمایش سه بعدی از ساختارهای بیولوژیکی به دست آورد. به این ترتیب مطالعه SEM ساختارهای عصبی، ممکن است شکاف بین اطلاعات ارائه شده توسط تکنیک‌های گلژی کلاسیک و داده‌های ساختاری ظریف ارائه شده توسط میکروسکوپ الکترونی عبوری[4] (TEM) را پر کرده باشد (۴). بنابراین، مزایای یک میکروسکوپ الکترونی روبشی شامل طیف گسترده‌ای از کاربردها، تصویربرداری سه بعدی و توپوگرافی دقیق و اطلاعات همه کاره به دست آمده از آشکارسازهای مختلف است. SEMها نیز با آموزش مناسب کارکرد آسانی دارند و پیشرفت در فناوری کامپیوتر و نرم‌افزارهای مرتبط، عملیات را کاربرپسند می کند. علاوه بر این، پیشرفت‌های تکنولوژیکی در SEM های مدرن امکان تولید داده‌ها را به شکل دیجیتالی فراهم می‌کند (۸-۵، ۳). اما استفاده از SEM علاوه بر مزایای فراوانی که دارد جزء تکنیک‌های بسیار گران‌قیمت است که امکان تکرار آزمایشات را دشوار می‌سازد. از سوی دیگر مراحل آماده‌سازی تا عکس‌برداری مستلزم صرف مدت‌زمان قابل‌توجهی می‌باشد. همچنین در مبحث بیولوژی در برخی موارد نیاز به مقایسه‌های دقیق می‌باشد که با توجه به تنظیمات دستگاه و لزوم رعایت پروتکل‌های دقیق این امر را دشوار می‌کند (۳،۶). لذا با توجه به موارد ذکر شده ما در این پژوهش روشی را طراحی کردیم که هم از لحاظ و هم از لحاظ اقتصادی و هم از لحاظ بررسی و مقایسه دقیق بین دو داربست کارآمد باشد.

مواد و روش‌ها

آماده‌سازی میکروسکوپ الکترونی روبشی

برای بررسی این روش از داربست[5] PuraMatrix استفاده شد. ابتدا از هر داربست به میزان ۴ میکرولیتر بر روی کف یک چاهک قرار داده شد (تصویر ۱ الف). همان‌طور که در تصویر ۱ الف مشاهده می‌کنید هر نمونه در یک طرف چاهک قرار داده می‌شود. در این مرحله می‌توان با استفاده از مارکر نمونه‌ها را علامت‌گذاری کرد و یا جهت هر نمونه را یادداشت نمود. در ادامه هر یک از نمونه‌ها با PBS شسته شدند (تصویر ۱ ب) و سپس با گلوتارآلدئید[6] ۴ درصد به مدت ۲ ساعت فیکس شدند. در این مرحله ممکن است به دلیل افزایش حجم مایعات بر روی دو داربست مایعات با هم مخلوط گردند. این مورد خللی را در آزمایش وارد نمی‌کند (تصویر ۱ ج). پس از فیکس کردن داربست‌ها سه بار شستشوی مجدد با PBS انجام شد و در پایان در طول شب در دمای محیط خشک شدند (تصویر ۱ د). بعد از ۲۴ ساعت نمونه‌ها با طلا پوشش داده

[1] Scanning Electron Microscope
[2] Scattering
[3] Teardropshaped reaction vessel
[4] Transmission Electron Microscopy
[5] Scaffold
[6] Glutaraldehyde

[Downloaded from shefayekhatam.ir on 2024-09-01]
[DOI: 10.61186/shefa.11.2.75]

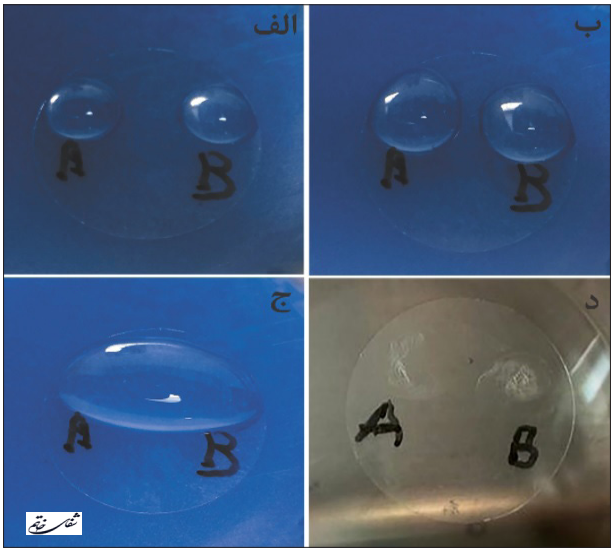
شدند و تحت SEM با ولتاژ شتاب دهنده ۱۵ کیلوولت مشاهده شدند و عکس‌برداری از نمونه‌ها انجام شد (۹).

یافته‌ها

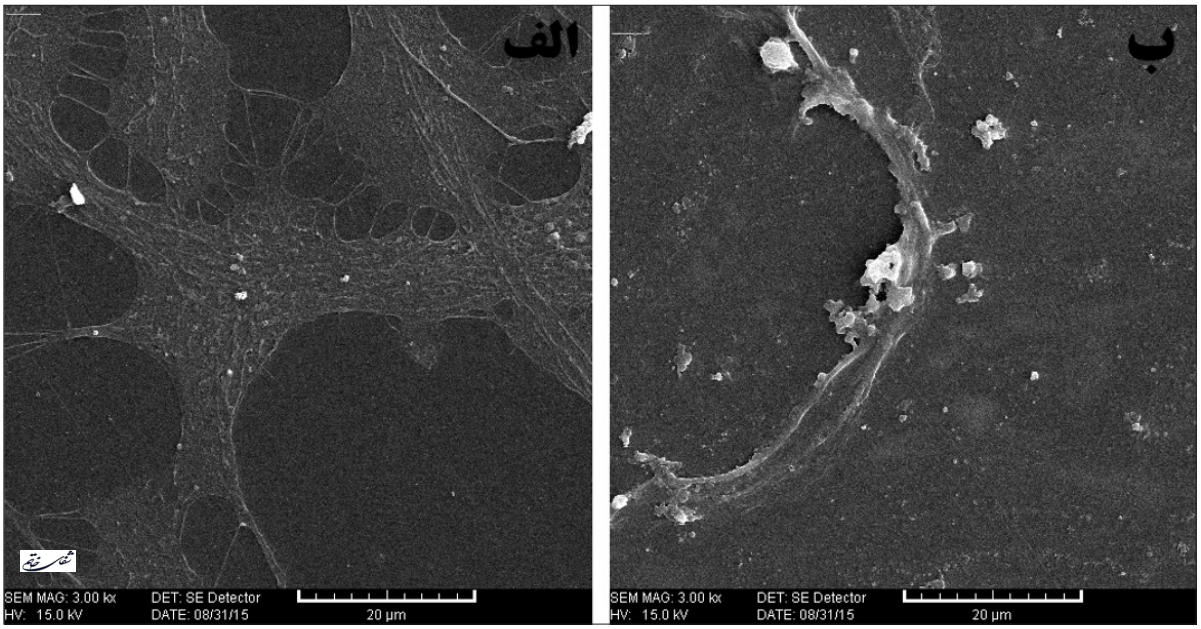
نتایج نشان داد که پس از قرارگیری داربست ها بر روی چاهک و انجام شستشو و تثبیت، اتصال داربست ها به بستر به خوبی انجام شد. در ادامه نمونه های داربست با طلا پوشانده شد و از آن تصاویر میکروسکوپ الکترونی روبشی در مقیاس میکرومتر (تصویر ۲) و نانومتر (تصویر ۳) تهیه شد.

بحث و نتیجه‌گیری

SEM یکی از تکنیک‌های رایج و بسیار دقیق است که جهت بررسی سه بعدی نمونه‌های بیولوژیکی از آن استفاده می‌شود و می‌توان آن را به‌عنوان یک روش موثر در تجزیه و تحلیل مواد آلی و معدنی در مقیاس

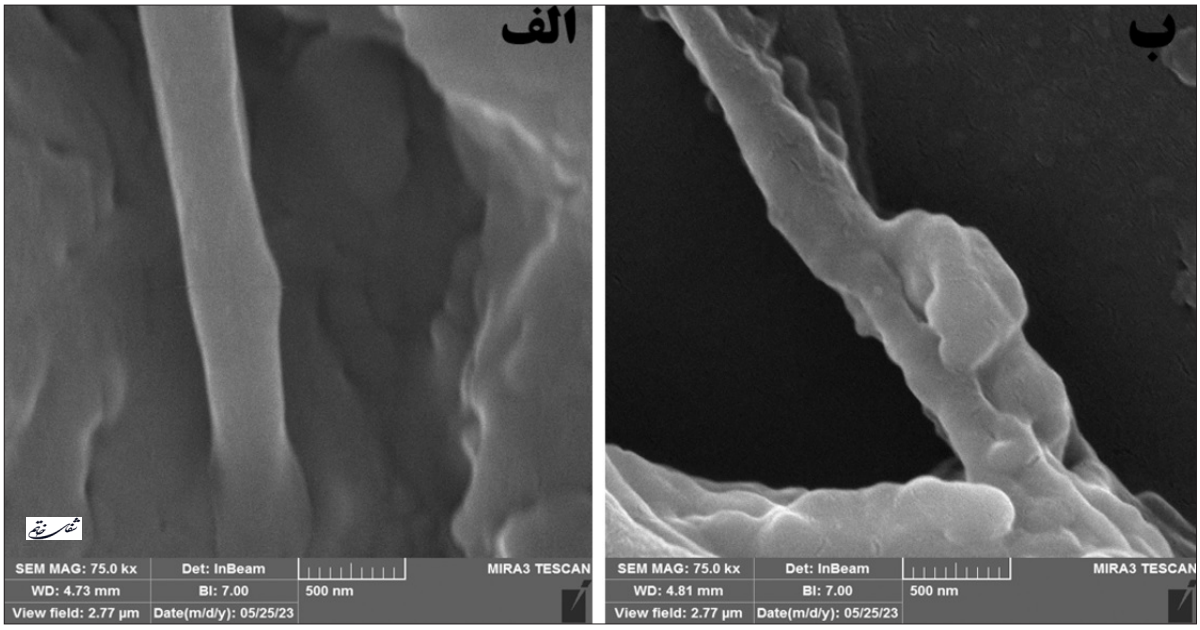


تصویر ۱- الف) قرارگیری دو داربست بر روی کف یک چاهک؛ ب) شستشوی داربست‌ها با PBS و اضافه‌کردن گلوتارآلدئید به داربست‌ها؛ ج) مخلوط‌شدن مایعات روی داربست‌ها؛ د) خشک شدن داربست در طول شب.



تصویر ۲- تصویر میکروسکوپ الکترونی روبشی: الف) داربست A؛ ب) داربست B (لازم به ذکر است که این تصاویر در سال ۱۳۹۵ برای مطالعه دیگری گرفته شده است).

[Downloaded from shefayekhatam.ir on 2024-09-01]
[DOI: 10.61186/shefa.11.2.75]



تصویر ۳- تصویر میکروسکوپ الکترونی روبشی: الف) داربست A؛ ب) داربست B

نانومتر (nm) تا میکرومتر (µm) در نظر گرفت. SEM با بزرگنمایی بسیار بالا در حدود ۳۰۰,۰۰۰-۱,۰۰۰,۰۰۰ x نسبت به میکروسکوپ‌های نوری در تولید تصاویر بسیار دقیق از طیف گسترده‌ای از مواد کاربرد دارد (۸). علی رغم این مزیت بزرگ، استفاده از این تکنیک گران قیمت است و هزینه زیادی را هم از لحاظ اقتصادی و هم از لحاظ زمانی به تحقیقات تحمیل می‌کند؛ بطوری هزینه یک بار استفاده از این تکنیک برای ۵ نمونه حدود ۸۰۰ دلار (۱۰) و در ایران حدود ۴۰ میلیون ریال می‌باشد (۱۱). همچنین مدت زمان آنالیز داده‌ها در حدود ۲۰-۱۰ روز به طول می‌انجامد.

از سوی دیگر، آماده‌سازی نمونه‌ها برای عکس‌برداری SEM دارای مراحلی می‌باشد که تحت‌تأثیر پژوهشگر می‌توانند به‌طور قابل ملاحظه‌ای منجر به تغییر در نتایج شود. این تأثیر منفی را می‌توان با استفاده از محققان باتجربه بالا که قادر به شناسایی آرتیفکت‌ها از داده‌های واقعی و همچنین مهارت آماده‌سازی هستند، به حداقل رساند. هیچ راه مطلقی برای حذف یا شناسایی تمام آرتیفکت‌های بالقوه وجود ندارد (۵، ۷). این موضوع خصوصا در زمینهٔ علوم زیستی و بالاخص بحث داربست‌ها حائز اهمیت است. لذا با کاهش تعداد متغیرهای مخدوش کننده که محقق نیز می‌تواند یکی از عوامل دخیل در آن‌ها می‌باشد می‌توان اعتبار و تکرار پذیری داده‌ها را به حداکثر ممکن رساند. لذا در این پژوهش به دنبال روشی جدید بودیم که بتواند هزینه اقتصادی و زمان لازم برای پژوهش‌های این حوزه را به کاهش دهد. همچنین، با استفاده از تکرار همزمان دو نمونه میزان اثرات متغیرهای مخدوش کننده که مربوط به اثرات پژوهشگر است، به حداقل برسد.

در این مطالعه روش جدیدی ارائه شده است که می‌توانند با استفاده از چاهک تقسیم شده (بارگذاری همزمان دو داربست بر روی یک چاهک) میزان هزینه و زمان را به میزان ۵۰ درصد کاهش دهد. همچنین در مواردی که نیاز به مقایسه دقیق بین دو نمونه می‌باشد، به‌طور مثال در مقایسه بین دو داربست، به‌دلیل اینکه هر دو نمونه در یک زمان واحد و شرایط آماده سازی کاملا یکسان تحت عکس برداری میکروسکوپ الکترونی قرار می‌گیرد، این مقایسه بسیار دقیق می‌باشد و اثر متغیرهای مخدوش کننده به حداقل ممکن می رسد. کارایی این تکنیک در پژوهش سحاب و همکاران به اثبات رسیده است (۹). یکی از محدودیت‌های این روش این است که پس از پوشش‌دهی نمونه با جایگاه دو داربست بخوبی مشخص نمی‌باشد و ممکن است هنگام عکس برداری میکروسکوپ الکترونی فیلدهای مختلف دو داربست دارای اشتراک قرار گیرند که برای رفع این مشکل می توان با علامت‌گذاری این چالش را حل نمود. در این روش برای اولین‌بار دو داربست بر روی یک چاهک لود گردید و تحت شرایط کاملاً یکسان و به‌طور هم‌زمان عکس‌برداری میکروسکوپ الکترونی انجام شد. نتایج این پژوهش نشان داد که این روش نسبت به روش‌های سنتی (لود هر نمونه بر روی یک چاهک) هم از لحاظ زمانی و هم از لحاظ اقتصادی کارآمدی بیشتری دارد (۵۰ درصد کاهش زمان و هزینه) و امکان مقایسه هم زمان و دقیق دو داربست را به دلیل شرایط آماده‌سازی کاملاً یکسان و به‌حداقل‌رساندن متغیرهای مخدوش‌کننده فراهم می‌آورد.

[Downloaded from shefayekhatam.ir on 2024-09-01]
[DOI: 10.61186/shefa.11.2.75]

منابع

1. Inkson BJ. 2 - Scanning electron microscopy (SEM) and transmission electron microscopy (TEM) for materials characterization. In: Hübschen G, Altpeter I, Tschuncky R, Herrmann H-G, editors. Materials Characterization Using Nondestructive Evaluation (NDE) Methods: Woodhead Publishing; 2016. p. 17-43.

2. Lewczuk B, Szyryńska N. Field-Emission Scanning Electron Microscope as a Tool for Large-Area and Large-Volume Ultrastructural Studies. Animals : an open access journal from MDPI. 2021;11(12).

3. Fischer ER, Hansen BT, Nair V, Hoyt FH, Dorward DW. Scanning electron microscopy. Current protocols in microbiology. 2012; Chapter 2: Unit 2B.

4. Meller K. General methods in scanning electron microscopy of the nervous system. Springer; 1981.

5. Scanning Electron Microscope Internet2023 [Available from: https://www.microscopemaster.com/scanning-electron-microscope.html.

6. Balzano A, Merela M, Čufar K. Scanning electron microscopy protocol for studying anatomy of highly degraded waterlogged archaeological wood. Forests. 2022; 13(2): 161.

7. Mehdizadeh KA, Tahermanesh K, Chaichian S, Joghataei MT, Moradi F, Tavangar SM, et al. How to prepare biological samples and live tissues for scanning electron microscopy (SEM). 2014.

8. Mohammed A, Abdullah A, editors. Scanning electron microscopy (SEM): A review. Proceedings of the 2018 International Conference on Hydraulics and Pneumatics-HERVEX, Băile Govora, Romania; 2018.

9. Sahab Negah S, Khaksar Z, Aligholi H, Mohammad Sadeghi S, Modarres Mousavi SM, Kazemi H, et al. Enhancement of neural stem cell survival, proliferation, migration, and differentiation in a novel self-assembly peptide nanofibber scaffold. Molecular neurobiology. 2017; 54: 8050-62.

10. University I. Electron Microscopy Pricing Internet2023 [Available from: https://medicine.iu.edu/service-cores/facilities/electron-microscopy/pricing.

11. Rayan P. SEM Lab Internet 2023 [Available from: https://partowrayan.com/nano-lab/sem-lab/.

[Downloaded from shefayekhatam.ir on 2024-09-01]

[DOI: 10.61186/shefa.11.2.75]