

Experimental studies on the effect of the scaffold derived decellularized bovine mesentery on the behavior of Blastema cells *In vitro*

Bibi Fatemeh Fani Yazdi¹, Esmail Fattahi^{2*},
Naser Mahdavi Shahri³,

Mohammad Mahdi Ghahramani Seno⁴

1. Ph. D., Department of Biology, Islamic Azad

University, Ayatollah Amoli Branch, Amol, Iran

2. Assistant Professor of Developmental Biology,
Ayatollah Amoli Branch Azad University, Amol, Iran

3. Professor, Department of Cell Biology, Kavian,
Higher Education Institute, Mashhad, Iran

4. Assistant Professor, Division of Biotechnology,
Department of Pathobiology, School of Veterinary
Medicine, Ferdowsi University of Mashhad, Mashhad, Iran
(Received: Nov. 11, 2019 – Accepted: May 5, 2020)

مطالعات تجربی اثر داربست سلول‌زدایی‌شده مزانتر گاو بر رفتار سلول‌های بلاستمایی در شرایط *In vitro*

بی‌بی فاطمه فانی یزدی^۱، اسماعیل فتاحی^{۲*}،

ناصر مهدوی شهری^۳، محمد مهدی قهرمانی سنو^۴

۱. دکتری، گروه زیست‌شناسی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد آیت الله آملی،

آمل، ایران

۲. استادیار، گروه زیست‌شناسی دانشگاه آزاد واحد آیت‌الله آملی

۳. استاد، گروه زیست‌شناسی سلولی و مولکولی، مؤسسه آموزش عالی

کاویان، مشهد، ایران

۴. استادیار، گروه ژنتیک مولکولی، دانشگاه فردوسی مشهد، مشهد، ایران

(تاریخ دریافت: ۱۳۹۷/۸/۲۰ – تاریخ پذیرش: ۱۳۹۹/۲/۱۶)

Abstract

The interaction between ECM and cells plays an important role in the direction of cellular behavior. So far, different scaffolds have been developed to examine the behavior of cells in three-dimensional conditions. The aim of this study was to investigate the interaction between the mesenteric decellularized scaffold of the bovin and the blastema tissue originated from the pinna of New Zealandwhite rabbit. Mesenteric bovine tissue (5 mm×5 mm) was decellularized using physical methods (slow freezing and snap freeze-thaw) and chemical agents (sodium dodecyl sulfate (SDS) and Triton X-100) followed by washing and sterilization procedures. These parts were assembled as scaffolds inside the blastema rings from rabbit's pinna. Sampling was carried out on days 7, 10, 15 and 21. Interactions between the scaffolds and the blastema tissue cells were studied by histological and fluorescence microscopy and electron microscopy. The study of the behavior of Blastema cells in different days of culture in addition to the migration and maintenance of Blastema cells on mesenteric decellularized scaffold showed that these scaffolds were able to restore the structure of blood capillaries, fibroblast and fat cells. Based on histological findings, the results indicate that the Blastema tissue has dynamic cells that can migrate into the scaffold. Furthermore the characteristics of the mesenteric decellularized ECM can support adhesion, migration and differentiation of blastema cells in vitro.

Keywords: Blastema, Bovine mesentery scaffold, cell matrix interaction, Decellularization, maintenance.

چکیده

برهم‌کنش بین ماتریکس خارج سلولی و سلول‌ها در جهت‌گیری رفتار سلول‌ها نقش اساسی دارد. تاکنون داربست‌های مختلفی جهت بررسی رفتار سلول‌ها در شرایط سه بعدی ساخته شده‌اند. هدف از این مطالعه، بررسی برهم‌کنش بین داربست سلول‌زدایی‌شده مزانتر گاو با بافت بلاستمای حاصل از لاله گوش خرگوش نر نژاد نیوزلند سفید است. بافت مزانتر با ابعاد ۵mm×۵mm تهیه و پس از استفاده از روش‌های فیزیکی (انجماد آهسته و ذوب سریع) و روش‌های شیمیایی (استفاده از سدیم دوسیل سولفات SDS و تریتون X-100) سلول‌زدایی شده و سپس مراحل شستشو و استریل کردن صورت گرفت. این قطعات به‌عنوان داربستی در حلقه‌های بافت بلاستمای حاصل از پانچ لاله گوش خرگوش مونث و کشت داده شد. در روزهای ۷، ۱۰، ۱۵ و ۲۱ کشت، نمونه‌برداری انجام گردید. برهم‌کنش‌های بین داربست و سلول‌های بافت بلاستما به‌کمک روش‌های بافت‌شناسی و مطالعات میکروسکوپی نوری، فلورسنت و الکترونی نگاره و گذاره، مورد مطالعه قرار گرفت. مطالعه رفتار سلول‌های بلاستمایی در روزهای مختلف کشت علاوه بر مهاجرت و استقرار سلول‌های بلاستما روی داربست سلول‌زدایی‌شده مزانتر نشان داد که این داربست قادر به بازیابی ساختار مویرگ‌های خونی، سلول‌های فیبروبلاستی و چربی نیز می‌باشند. براساس یافته‌های بافت‌شناسی، نتایج نشان داد که بافت بلاستما دارای سلول‌های پویایی است که می‌توانند به داخل داربست مهاجرت کنند. از طرف دیگر ویژگی‌های ماتریکس سلول‌زدایی مزانتر گاو، می‌تواند اتصال، مهاجرت و احتمالاً تمایز سلول‌های بلاستمایی را در شرایط *In vitro* پشتیبانی نماید.

واژه‌های کلیدی: برهم‌کنش سلول ماتریکس، بلاستما، داربست سه‌بعدی مزانتر، سلول‌زدایی، مهاجرت.

مقدمه

ماتریکس خارج سلولی^۱ دارای اثرات عمیق ساختاری و بیولوژیکی در فرایندهای تکوین بوده و با ایجاد مرزهای بافتی نقش ساختاری مهمی در ریخت‌زایی ایفا می‌کند، که این نقش تنها محدود به پشتیبانی ساختاری نبوده؛ بلکه اجزای ماتریکس خارج سلولی با اتصال به گیرنده‌های سطح سلولی می‌تواند آشار پیام‌دهی را القا کرده و منتهی به ترجمه برخی از عوامل رشد گردند (Badylak et al., 2009).

برهم‌کنش بین ماتریکس خارج سلولی و سلول‌ها در جهت‌گیری رفتار سلول‌ها نقش اساسی دارد، اما بیشتر تحقیقات در مهندسی بافت، بیولوژی سرطان و سلول‌های بنیادی در مدل‌های دوبعدی انجام شده است (Even-Ram & Yamada, 2005). در مطالعات دوبعدی حرکت سلول‌ها به‌صورت اتصال و جداشدن است و عملاً سدهای فضایی که در حالت *In vivo* هستند، وجود ندارند. بنابراین استفاده از مدل‌های سه بعدی بهتر می‌تواند ریزمحیط‌های بافت‌های زنده را جهت بررسی رفتارهای سلولی تداعی کند. تاکنون داربست‌های مختلفی جهت بررسی رفتار سلول‌ها در شرایط سه بعدی ساخته شده‌اند، که از آن جمله می‌توان به ماتریکس‌های الیافی کلاژن سنتزی، ماتریکل‌ها و غیره اشاره نمود، اما هر یک از این داربست‌ها دارای نقایصی مانند عدم اجازه کنترل چسبندگی سلول‌ها و غیره بوده‌اند (Friedl & Wolf, 2003). همان‌طور که می‌دانیم بافت‌های موجودات زنده از سلول‌های هسته‌دار در یک ماتریکس خارج سلولی فشرده که تشکیل شبکه‌ای سه بعدی از مولکول‌های الیافی را داده‌اند تشکیل شده است، لذا می‌توان از ماتریکس خارج سلولی بافت‌های موجودات زنده جهت بررسی رفتار مهاجرتی سلول‌ها استفاده کرد. برای این کار از روش‌های سلول‌زدایی^۲ جهت حذف تأثیر سلول‌های بافت از

ماتریکس خارج سلولی می‌توان بهره برد، تا در نهایت تنها ماتریکس خارج سلولی از بافت باقی بماند و بتوان از آن به‌عنوان داربست استفاده نمود.

بافت بلاستما^۳ گروهی از سلول‌های تمایز نیافته‌ای هستند که در بخش‌هایی از بدن یک موجود زنده قادر به تقسیم و تمایز می‌باشند. این سلول‌ها می‌توانند در پیدایش و تکامل اعضا و یا فرایند ترمیم و بازسازی بافت‌های آسیب دیده مشارکت نمایند. یکی از بهترین مثال‌های ترمیم در پستانداران، جایگزینی همه بافت‌ها پس از ایجاد سوراخ در لاله گوش خرگوش^۴ نژاد نیوزلندی است (Goss & Grimes, 1975).

مطالعات نشان داده‌اند که سلول‌های بافت بلاستما از نظر قابلیت تکثیر و تمایز بسیار مشابه سلول‌های جنینی بوده و قادرند تحت تأثیر عوامل محیطی مختلف در شرایط *In vivo* به انواعی از سلول‌ها تمایز یابند (Clayet et al., 2015). بنابراین شاید بتوان از سلول‌های این بافت به‌عنوان یک منبع سلولی جدید جهت مطالعات رفتار سلول‌ها در هنگام برهم‌کنش با داربست‌های سه بعدی بهره جست.

هدف از تحقیق اخیر در مرحله اول، تهیه داربست سه بعدی^۵ مشتق‌شده از ماتریکس خارج سلولی بود. برای این کار از سلول‌زدایی مزاتر گاو استفاده گردید. در بخش دوم پروژه، بر هم‌کنش بین داربست سه بعدی مشتق‌شده از مزاتر با بافت بلاستمای حاصل از لاله گوش خرگوش نر نژاد نیوزلندی مورد بررسی قرار گرفت.

مواد و روش‌ها

در این مطالعه تجربی جهت تهیه داربست‌های مزاتر سلول‌زدایی شده و همچنین تهیه حلقه بلاستمای از خرگوش‌های نر نژاد نیوزلندی شش تا هشت ماهه با وزن تقریبی دو نیم کیلوگرم استفاده گردید.

3. Blastema Tissue

4. PINNA

5. 3-D Scaffold

1. Extra cellular matrix(ECM)

2. Decellularization

شرایط استریل کامل داربست مزانتر گاو در داخل حلقه بلاستمایی قرار داده شد و به ظروف کشت شش خانه منتقل گردید. به هر خانه ظرف کشت دو میلی‌لیتر محیط کشت DMEM^۵ اضافه شده و نمونه‌ها در انکوباتور CO₂ و دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند (Hashemzadeh et al., 2015). جهت بررسی برهمکنش سلول‌های بافت بلاستما با این داربست‌ها نمونه‌برداری در روزهای هفت، ۱۰، ۱۵ و ۲۱ پس از کشت انجام گردید.

نمونه‌های برداشت‌شده طی مطالعات میکروسکوپ نوری، فلورسنت و الکترونی SEM و TEM در روزهای مذکور مورد بررسی قرار گرفتند.

نتایج

پس از آماده‌سازی داربست‌های مزانتر گاو، این داربست‌ها آماده به‌کارگیری جهت مطالعه رفتار سلول‌های بافت بلاستما شدند. مطالعات بافت‌شناسی و تصاویر تهیه‌شده توسط میکروسکوپ الکترونی نگاره به‌خوبی داربست‌های مونتاژشده در داربست‌های تهیه‌شده را نشان می‌دهد (شکل ۱).

مطالعات بافت‌شناسی داربست‌های مونتاژشده با حلقه بلاستما در روز هفتم پس از کشت نشان داد که هیچ‌گونه نفوذ سلولی در این زمان از حلقه بلاستما به داخل داربست سلول‌زدایی‌شده انجام نشده است (شکل ۲-A و B).

همچنین بررسی داربست‌های مونتاژشده با بلاستما پس از رنگ‌آمیزی DAPI حضور سلول‌های بلاستمایی در حلقه یک هفته پس از مونتاژ را نشان داد. از طرفی فقدان هسته‌ها در داربست سلول‌زدایی‌شده در تکنیک DAPI قابل مشاهده بود (شکل ۳).

لازم به‌ذکر است رنگ‌آمیزی DAPI هم در سلول‌های زنده و هم در سلول‌های فیکس‌شده قابل

جهت تهیه داربست مزانتر تلفیقی از روش‌های فیزیکی و شیمیایی سلول‌زدایی انجام گرفت (Crapo et al., 2011). به‌طور مختصر پس از برداشت مزانتر نمونه‌ها در سرم فیزیولوژی شستشو داده شدند و به مدت یک‌هفته در دمای صفر درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند. پس از ذوب و شستشوی مجدد نمونه‌ها در سرم فیزیولوژی تکنیک انجماد سریع^۱ انجام گرفت (Naderi et al., 2013).

در مرحله بعدی روش شیمیایی سلول‌زدایی به‌کار برده شد. به این صورت که نمونه‌ها در محلول Triton X-100 و سپس در محلول SDS^۲ قرار گرفتند. مطالعات بافت‌شناسی و رنگ‌آمیزی‌های هموتوکسیلین ائوزین، DAPI^۳، تریکروم ماسون و مطالعات میکروسکوپ الکترونی SEM و TEM جهت بررسی میزان حذف سلولی و حذف کلاژن موجود در ماتریکس خارج سلولی انجام گرفت. جهت استریل نمودن و آماده‌سازی داربست به‌منظور کشت نمونه‌ها به‌مدت ۳۰ دقیقه در اتانول ۷۰ درصد قرار داده شد و در زیر هود لامینار پس از یک دقیقه شستشو با آب مقطر استریل به‌مدت یک ساعت در PBS^۴ استریل نگهداری شدند (Gilbert et al., 2006).

جهت تهیه حلقه بلاستمایی پس از حذف موهای سطح پستی و شکمی گوش خرگوش توسط کرم موبر و بی‌حس‌نمودن آن با استفاده از اسپری لیدوکائین، پانچ‌هایی به قطر دو میلی‌متر در لاله گوش خرگوش ایجاد شد. پس از گذشت ۴۸ ساعت پانچ‌های بزرگ‌تری به قطر چهار میلی‌متر در محل پانچ‌های قبلی ایجاد گردید، به‌نحوی که بافت بلاستمایی به‌صورت حلقه از ناحیه پانچ شده جدا شد. پس از جداسازی حلقه بلاستما به‌منظور جلوگیری از آلودگی هفت بار با سرم فیزیولوژی شستشو داده شد و به زیر هود لامینار انتقال داده شد. سپس در

1. Snap freeze technique

2. Sodium dodecyl sulfate

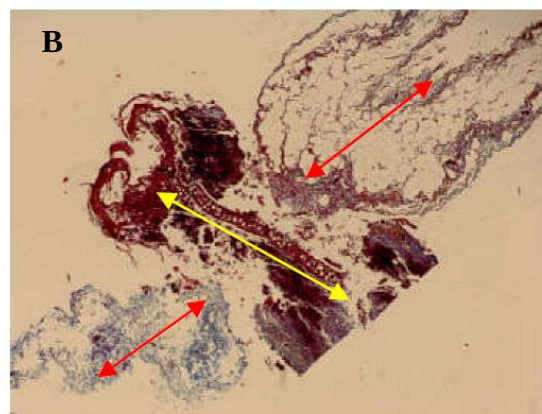
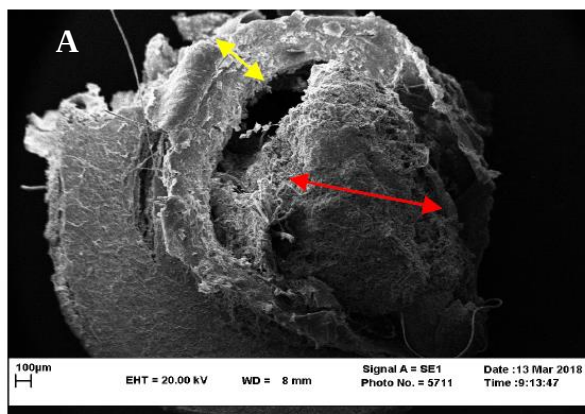
3. Diamidino2 phenylindole

4. Phosphate buffered saline

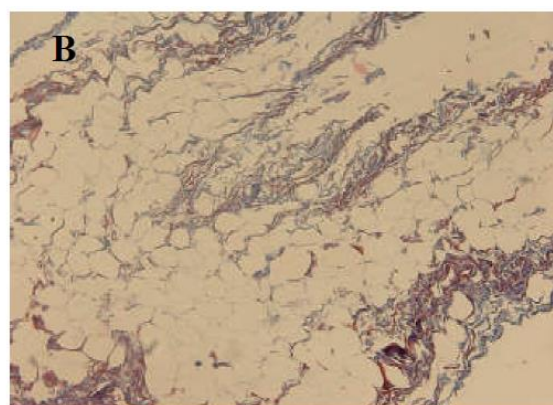
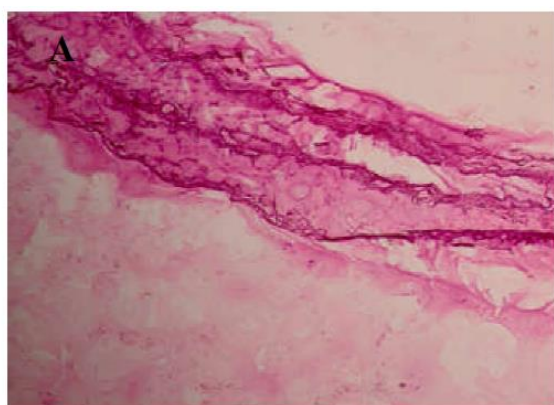
5. Dulbecco's modified eagle medium

رنگ‌آمیزی DAPI برای نشان‌دادن حضور هسته سلول‌ها در بافت بلاستما و عدم وجود هسته‌ها در داربست سلول‌زدایی‌شده مزانتر استفاده شد.

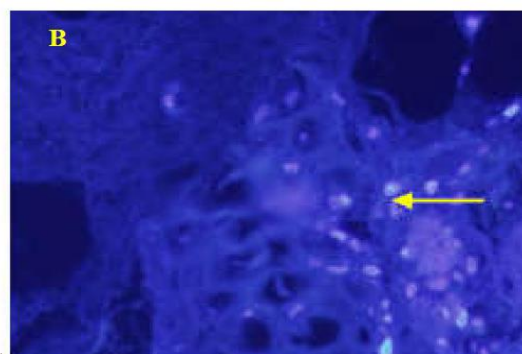
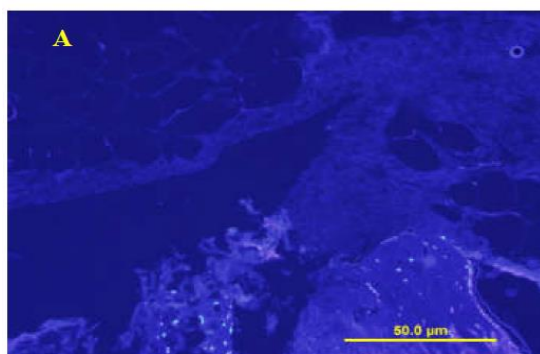
استفاده است. این رنگ با نفوذ از غشای هسته می‌تواند هم برای تعیین وجود هسته و هم ارزیابی مورفولوژی سلول‌ها به‌کار رود. در این مرحله از آزمایش از



شکل ۱. نمایش داربست مونتاژ شده (شاخص قرمز) در حلقه بلاستما (شاخص زرد). تصویر تهیه‌شده توسط میکروسکوپ الکترونی نگاره به خوبی قرار گرفتن داربست سلول‌زدایی‌شده در داخل حلقه بلاستمای را تأیید می‌کند. (B) مقطعی از داربست مزانتر مونتاژ شده (شاخص قرمز) در حلقه بلاستما (شاخص زرد)، تکنیک رنگ‌آمیزی تریکروم ماسون. بزرگ‌نمایی ۱۰۰X.



شکل ۲. مقطعی از داربست مزانتر هفت روز پس از کشت. (A) رنگ‌آمیزی H.E. (B) رنگ‌آمیزی تریکروم ماسون. بزرگ‌نمایی ۲۰۰X.

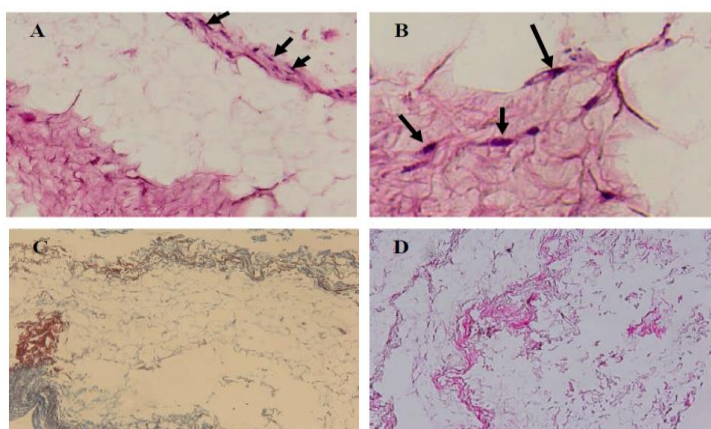


شکل ۳. تصاویر میکروسکوپ فلورسنت در روز هفتم کشت. شاخص، حضور هسته‌ها را در بافت بلاستما نشان می‌دهد. (A) بزرگ‌نمایی ۱۰۰X. (B) بزرگ‌نمایی ۱۰۰۰X.

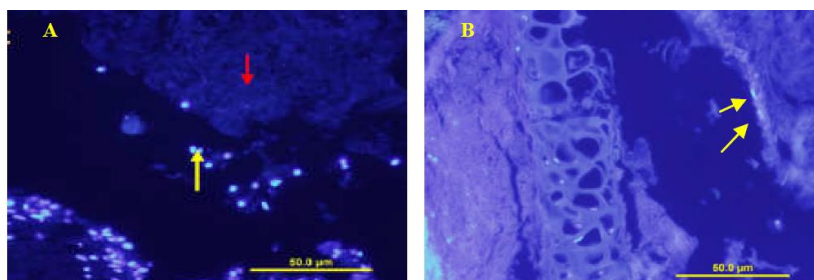
هجوم^۱ سلول‌ها از حلقه به سمت داربست مشاهده شد (شکل ۶- A و B و C). در این روز سلول‌ها به داخل داربست مزانتز نیز کاملاً نفوذ پیدا کرده و استقرار^۲ یافتند. حضور سلول‌ها در اکثر نقاط داربست، بدون نظم مشخص در سطح داربست به چشم می‌خورد، اما در بخش‌هایی از داربست، استقرار و آرایش سلول‌های دوکی شکل در دیواره مویرگ‌های خونی با ظاهری مشابه سلول‌های آندوتلیالی مشاهده شد (شکل ۶- D). علاوه بر این در این روز، سلول‌هایی با تیپ و شباهت فیبروبلاستی و یا فیبروسیت، با هسته کشیده و دوکی شکل قابل مشاهده است (شکل ۶- E). همچنین مطالعات بافتی با استفاده از تکنیک رنگ‌آمیزی تریکروم ماسون، سلامت داربست مزانتز و باقی‌ماندن فیبرهای کلاژن، ۱۵ روز بعد از کشت را نشان می‌دهد (شکل ۷).

بررسی بافت‌شناسی داربست سه بعدی سلول‌زدایی شده در روز دهم کشت نشان داد که سلول‌های بلاستمایی از بافت بلاستما به سمت داربست مزانتز مهاجرت کرده و به حاشیه داربست سلول‌زدایی نفوذ یافتند (شکل ۴- A و B). البته این سلول‌ها تعدادشان در ابتدا کم، اما به تدریج افزوده شد. در این زمان هنوز سلولی به عمق داربست نفوذ پیدا نکرده و حضور سلول‌ها تنها محدود به برخی نقاط سطح داربست بود (شکل ۴- D و C).

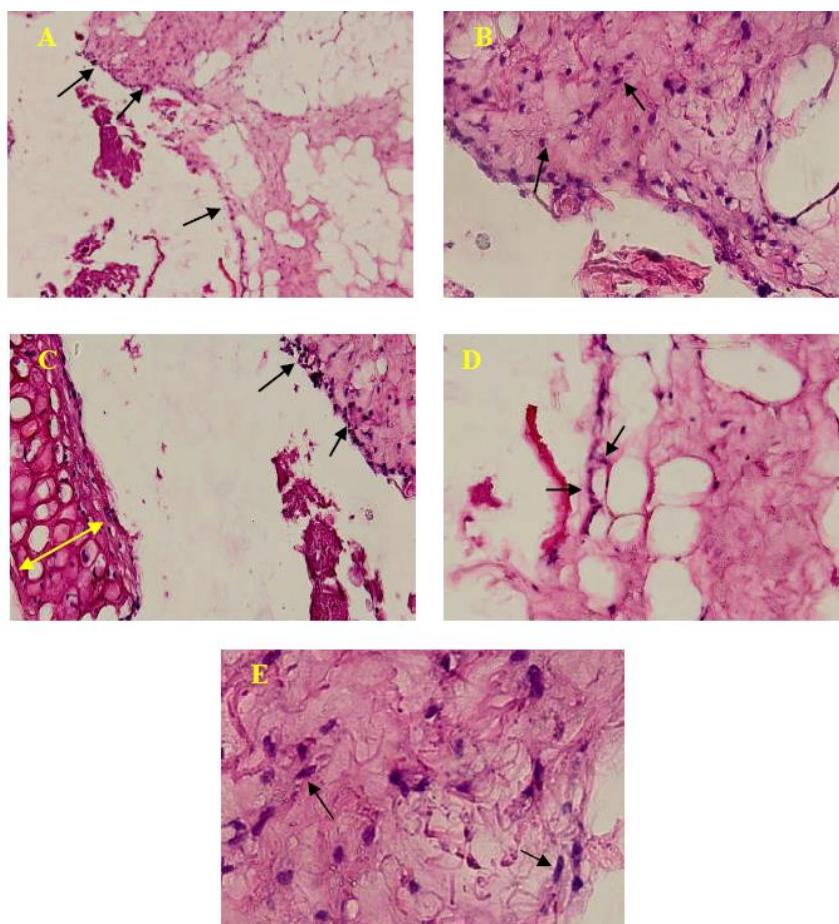
نتایج حاصل از رنگ‌آمیزی DAPI و مشاهدات میکروسکوپ فلورسنت نیز مهاجرت سلول‌های بلاستمایی ۱۰ روز پس از مونتاژ با داربست سلول‌زدایی‌شده را تأیید نمودند (شکل ۵). در بررسی‌های انجام‌شده در روز پانزده کشت، افزایش جمعیت سلول‌های بلاستمایی مهاجرت‌یافته و



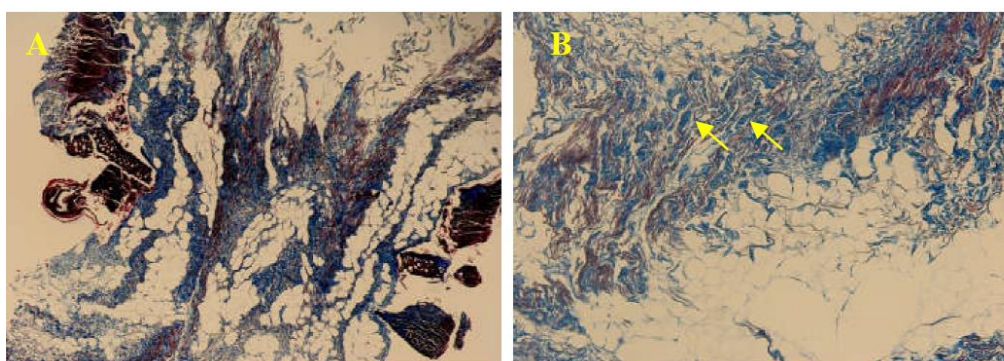
شکل ۴. مقطعی از داربست مزانتز در روز دهم پس از کشت. A, B) نفوذ اولیه سلول‌های بلاستمایی به داربست. رنگ‌آمیزی H.E. درشت‌نمایی ۴۰۰X. C) رنگ‌آمیزی تریکروم ماسون. بزرگ‌نمایی ۱۰۰X. D) رنگ‌آمیزی H.E. بزرگ‌نمایی ۱۰۰X.



شکل ۵. تصاویر میکروسکوپ فلورسنت در روز دهم کشت. A) شاخص قرمز رنگ داربست سلول‌زدایی‌شده و شاخص زرد رنگ معرف سلول‌های بلاستمایی مهاجر است: بزرگ‌نمایی ۴۰۰X. B) شاخص، معرف سلول‌های بلاستمایی مهاجرت یافته به مزانتز. بزرگ‌نمایی ۱۰۰X.



شکل ۶. مقاطعی از داربست مزانتر مونتاژ شده در حلقه بلاستما روز ۱۵ کشت. رنگ‌آمیزی H.E. شاخص زرد معرف بافت بلاستما و شاخص‌های مشکی معرف سلول‌های مهاجرت‌یافته به داربست مزانتر. بزرگ‌نمایی به ترتیب ۱۰۰، ۴۰۰، ۲۰۰ و ۴۰۰X.



شکل ۷. مقاطعی از داربست مزانتر مونتاژ شده در حلقه بلاستما روز ۱۵ کشت. رنگ‌آمیزی تریکروم ماسون. (A) داربست مزانتر مونتاژ شده در بافت بلاستما. بزرگ‌نمایی ۱۰۰X. (B) مقطعی از داربست مزانتر، شاخص معرف دستجات کلاژن. بزرگ‌نمایی ۴۰۰X.

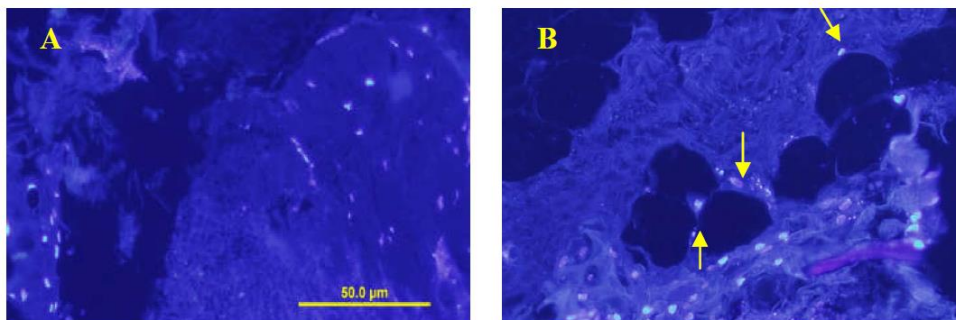
حاشیه فضاهای خالی سلول‌های چربی مزانتری، مشاهده شد (شکل ۸-B).

همچنین طی مطالعات میکروسکوپ الکترونی گذاره در روز بیست و یکم کشت، سلول‌هایی با تیپ و شباهت فیبروبلاستی و یا فیبروسیت در داربست مزانتر

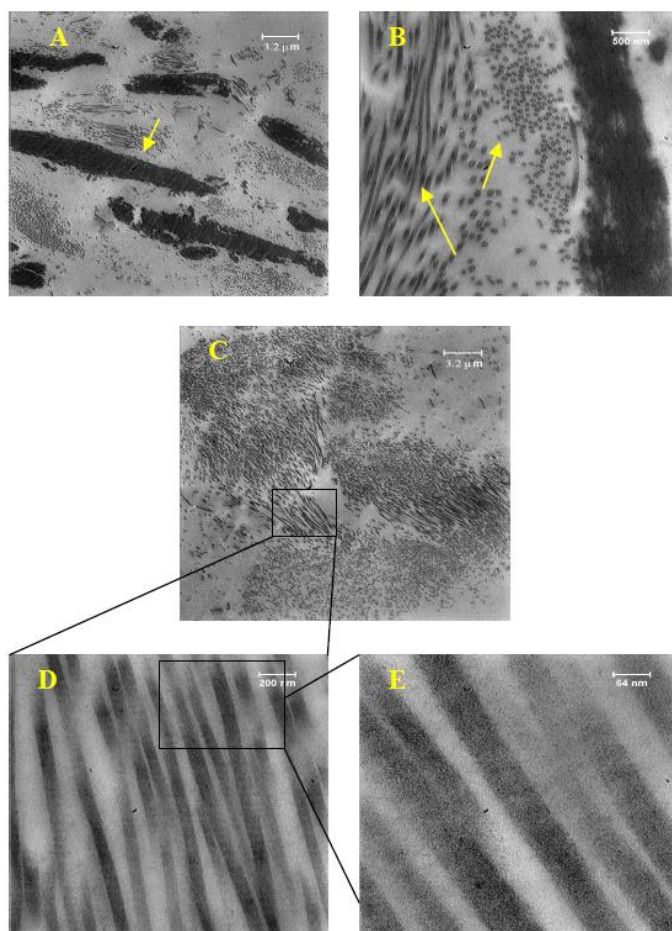
تصاویر بررسی شده با میکروسکوپ فلورسنت پس از استفاده از رنگ DAPI، حضور سلول‌های بلاستمایی را تا عمق وسیعی از داربست مزانتر، ۲۱ روز پس از مونتاژ با حلقه بلاستمایی نشان داد (شکل ۸-A). همچنین حضور نقاط درخشان که معرف هسته سلول‌هاست در

(شکل ۹- D و E). مطالعات بافتی با استفاده از تکنیک رنگ‌آمیزی تریکروم ماسون نیز حضور دستجات فراوان کلاژن در داربست و همچنین سلامت ماتریکس، ۲۱ روز بعد از کشت را تأیید می‌کند (شکل ۱۰).

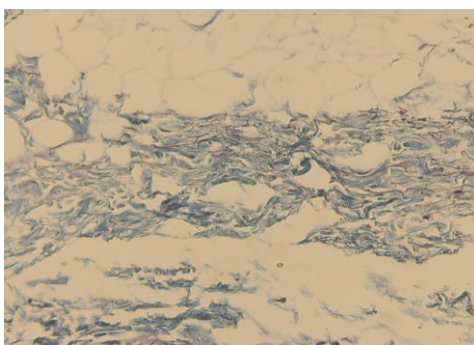
مشاهده شد (شکل ۹- A). همچنین همان‌طور که در تصویر مشاهده می‌شود، در اطراف این سلول‌ها کلاژن‌سازی به صورت گسترده صورت گرفته است (شکل ۹- B) و در درشت‌نمایی بالا، باندهای تاریک و روشن معرف فیبریل‌های کلاژن نیز رؤیت گردید



شکل ۸. نفوذ سلول‌های بلاستمایی تا عمق وسیعی از داربست سه بعدی مزانتر روز ۲۱ از کشت. درشت‌نمایی به ترتیب ۴۰۰X و ۱۰۰۰X.



شکل ۹. تصاویر میکروسکوپ الکترونی گذاره بیست و یک روز پس از کشت. (A) حضور تعدادی از سلول‌ها در داربست مزانتر. (B) دستجات کلاژن در اطراف سلول‌ها. شاخص معرف دستجات طولی و عرضی کلاژن. (C) دستجات وسیع کلاژن در سطح داربست. (D, E) باندهای روشن و تاریک در طول فیبریل‌های کلاژن



شکل ۱۰. مقطعی از داربست مزانتر مونتاژ شده در حلقه بلاستما روز ۲۱ کشت. رنگ‌آمیزی تریکروم ماسون. بزرگ‌نمایی $\times 400$.

بحث و نتیجه‌گیری

در مهندسی بافت می‌توان از سه عامل داربست، سلول و عوامل رشد برای طراحی بافت و اندام عملکردی استفاده نمود. داربست‌های مشتق از ECM به عنوان داربست‌های طبیعی، در مهندسی بافت و پزشکی ترمیمی برای جایگزینی بافت و اندام به‌کاررفته و تمایز سلول‌های کشت‌شده را به یک بافت عملکردی تسهیل می‌کنند (Atala et al., 2006). روش‌های ارائه‌شده جهت تهیه داربست سلول‌زدایی‌شده دارای دو مزیت مهم شامل حذف تقریباً همه ترکیبات سلولی و حفاظت از ترکیبات ECM می‌باشد. عدم حضور مواد هسته‌ای در داربست سلول‌زدایی بسیار مهم است، زیرا حتی چند ماده هسته‌ای در داربست طبیعی ممکن است مشکلات جدی در زمینه سازگاری بافتی در محیط برون‌تنی ایجاد نماید (Pollot et al., 2016). به‌منظور دستیابی به بهترین نتیجه سلول‌زدایی مزانتر، از روش ترکیبی فیزیکی و شیمیایی استفاده شد تا علاوه بر حذف سلول‌ها از داربست مزانتر و تشکیل یک شبکه تور مانند با تخلخل مناسب، ماهیت زیستی کلاژن حفظ شود و زمینه برای نفوذ و مهاجرت سلولی به داخل داربست و چسبندگی و تکثیر سلولی ایجاد گردد. دترجنت‌های یونی از قبیل SDS با حل کردن غشای هسته تأثیر کارآمدی در سلول‌زدایی بافت دارند. SDS با توجه به ساختار دوگانه‌دوستش (یک سر آنیونی آب‌دوست و یک دم دوازده کربنه اشباع آب‌گریز) می‌تواند با غشاهای سلولی واکنش داده و

سبب لیزشدن غشای سلول و هسته گردد (Elder et al., 2009). از مزیت‌های استفاده از SDS می‌توان به سادگی استفاده از آن، موفقیت در امر سلول‌زدایی در بافت‌های مختلف، توانایی انهدام سلول‌ها در تمام لایه‌های بافت به‌طور یکنواخت و حفظ ساختار ماتریکس خارج سلولی اشاره کرد. در پژوهشی که در سال ۲۰۰۴ انجام شد، از روش‌های فیزیکی انجماد سریع و روش‌های شیمیایی جهت سلول‌زدایی استفاده شده است و SDS به‌عنوان ترکیبی مناسب جهت سلول‌زدایی کامل بافت و آسیب محدود به ماتریکس خارج سلولی معرفی گردید (Schaner et al., 2004). در پژوهش حاضر از داربست مزانتر سلول‌زدایی‌شده برای بررسی برهم‌کنش با بافت بلاستمای لاله گوش خرگوش نر نژاد نیوزیلندی استفاده شده است. تاکنون مدل‌ها و ترکیبات مختلفی در جهت تولید سوبستراهای سه‌بعدی برای بررسی برهم‌کنش بین سلول‌ها و ماتریکس خارج سلولی پیشنهاد شده است. تحقیقات گذشته از بیوپلیمرهای کلاژن، فیبرینوژن، فیبرونکتین و یا لامینین که همه آن‌ها سعی در تقلید شرایط پیچیده فیزیولوژی ماتریکس خارج سلولی را دارند استفاده شده است (Raeber et al., 2007). تحقیقات اخیر مشخص گردیده که داربست‌های زیستی تهیه‌شده از ماتریکس سلول‌زدایی‌شده بافت‌های جانوری، روند بازسازی را در بافت‌های آسیب‌دیده مانند عضلات اسکلتی، مری و دستگاه ادراری تسهیل می‌نماید (Wolf et al., 2012). از

شیمیایی هدایت می‌شود و از طرفی دیگر برهم‌کنش‌های فیزیکی بین سلول و سوبسترا نیز در این نوع حرکت می‌توانند نقش داشته باشند (Gilbert *et al.*, 2006). بنابراین شاید چسبندگی و مهاجرت سلول‌های بلاستمایی به درون داربست در نتیجه برهم‌کنش این سلول‌ها با اجزای ECM و سوبسترای موجود در داربست مزانتز و اثرات القایی این اجزا بوده است. از وقایع روز پانزدهم بر هم‌کنش بلاستما و داربست مزانتز، نفوذ بیشتر سلول‌های بلاستما به داخل داربست‌ها بود (شکل ۶- A، B و C). مطالعات نشان داده است که اندازه منافذ داربست نیز روی چسبندگی و تکثیر سلول‌های استئوبلاست در داخل داربست‌های سنتزی گلیکوزآمینوگلیکانی تأثیر مستقیم دارد (Murphy *et al.*, 2010). در پژوهش حاضر نیز می‌توان گفت داربست سلول‌زدایی‌شده مزانتز با اندازه مناسب منافذ و سطح تخلخل بسیار بالا (شکل ۴- C و D) که خاص این بافت است، باعث چسبندگی، مهاجرت، تکثیر و رشد سلول‌های بلاستمایی شده است. مطالعات تجربی MahdaviShahri *et al.* (2013) نشان داد که داربست به‌دست‌آمده از ریه خرگوش در طول کشت در مجاورت سلول‌های بلاستمایی، محتوی کلاژن و الاستین دست‌نخورده باقی‌مانده و منجر به موفقیت سلول‌های بلاستمایی در زمینه مهاجرت و نفوذ به داربست گردیده است. شکل ۷ از این پژوهش نیز، سلامت و دست‌نخورده باقی‌ماندن کلاژن را در روز پانزدهم از کشت نشان می‌دهد. از دیگر وقایع مشاهده‌شده در ماتریکس مسیر تمایزی ویژه‌ای بود که سلول‌های بلاستمایی جهت نفوذ به داربست انتخاب کردند. گروهی از سلول‌های بلاستمایی پس از نفوذ به داربست به سمت بقایای عروق خونی موجود در داربست نفوذ کرده و با سیتوپلاسم کشیده و هسته‌های دوکی شکل در دیواره آن‌ها مستقر شدند (شکل ۶- D). با توجه به این‌که داربست مزانتز حاوی مقادیر زیادی ماتریکس خارج سلولی از جمله کلاژن می‌باشد و نقش عمده کلاژن

طرف دیگر، بافت بلاستما دارای انواع متفاوتی از سلول‌های تمایزنیافته می‌باشد که قابلیت ترمیم و تمایز داشته و می‌توانند در روند ترمیم بافت‌های آسیب دیده مورد استفاده قرار گیرد. در این میان گوش خرگوش مدل مناسبی جهت مطالعات بافت بلاستمایی می‌باشد. در حالت طبیعی بعد از پانچ گوش خرگوش، رشد اپی‌تلیوم به سمت مرکز می‌باشد که باعث ترمیم سوراخ‌های ایجادشده در گوش خرگوش در شرایط *In vivo* می‌گردد (Gardiner *et al.*, 1986). در بررسی حاضر نیز از خاصیت ذکرشده در بافت گوش خرگوش استفاده و بعد از قرار دادن داربست مزانتز در میان حلقه بلاستمایی اثر برهم‌کنش سلول‌های بافت بلاستما در مواجهه با داربست در روزهای مختلف بررسی شد. از آنجاکه بافت بلاستما دارای سلول‌های پویایی می‌باشد، کشت بافت بلاستما در کنار داربست مشتق‌شده از ماتریکس خارج سلولی که ویژگی سه‌بعدی دارد می‌تواند مدل مناسبی جهت بررسی رفتارهایی هم‌چون قطبیت و حرکت سلولی در شرایط *In vitro* را فراهم نماید. مطالعه در روز هفتم بعد از کشت نشان داد که هیچ سلولی به داربست‌های سلول‌زدایی‌شده نفوذ نکرده است (شکل‌های ۲ و ۳)، اما در روز دهم برهم‌کنش، شاهد حضور سلول‌هایی در حاشیه داربست مزانتز بودیم (شکل‌های ۴- A و ۵). همچنین سلول‌های مهاجر فرم کشیده و دوکی داشته و ظاهری شبیه به فیبروبلاست را نشان می‌دادند (شکل ۴- B). با توجه به این اصل که بافت بلاستما قابلیت ترمیم و بازسازی تقریباً تمامی انواع بافت‌های تشکیل‌دهنده در محل پانچ‌شده را دارد (Hashemzadeh *et al.*, 2015)، لذا پس از قراردادن حلقه بلاستمایی در اطراف داربست تهیه‌شده، می‌توان انتظار داشت که در اثر القای داربست، سلول‌های بلاستمایی، به سمت داربست مهاجرت کرده و تکثیر و تمایز یابند. علاوه بر برهم‌کنش‌های فیزیکی بین سلول و ماتریکس، تحقیقات نشان داده است که حرکت سلول‌ها توسط گرادیانی از پیام‌های

در رگزایی به اثبات رسیده است (Andreal et al., 2017)، مشاهده رگزایی در داربست مزانتر دور از انتظار نبود. بنابراین احتمالاً می‌توان نتیجه گرفت که داربست مزانتر توانسته در روز پانزدهم کشت، سبب القای تمایز سلول‌های بلاستمایی به سلول‌های اندوتیلیالی شود و زمینه لازم برای رگزایی را فراهم کند. علاوه بر این، رخداد بسیار مهم دیگر در این روز، مشابه با نتایج مشاهده‌شده در روز دهم کشت، تمایز احتمالی تعدادی از سلول‌ها با تیپ و ظاهری شبیه فیبروبلاست و فیبروسیت در داربست مزانتر مشاهده شد که با کشیدگی و افزایش تراکم هسته سلول‌ها همراه بود (شکل ۶-E). مطالعات نشان داده است که محتویات داربست زیستی مشتق‌شده از ماتریکس خارج سلولی، معمولاً موجب بازسازی بافت‌های آسیب دیده می‌شوند (Tottey et al., 2011). بنابراین می‌توان چنین استنباط کرد که اثر القایی داربست سلول‌زدایی‌شده مزانتر، باعث تمایز احتمالی سلول‌های بلاستمایی به این سلول‌ها بوده است. از وقایع مشاهده‌شده ۲۱ روز پس از کشت، استقرار سلول‌هایی با فرم پهن و کشیده در حاشیه فضاهای خالی بقایای سلول‌های چربی، در عمق داربست مزانتر بود (شکل ۸). مطالعات نشان داده است که سلول‌های بافت بلاستما قابلیت تمایز در جهات مختلف را دارا هستند (Corcoran & Ferrtti, 1999). طی ارزیابی به‌عمل‌آمده از میزان تکثیر و تمایز سلول‌های چربی اولیه انسانی (ASC) کشت‌یافته روی ماتریکس سلول‌زدایی‌شده جفت (PDM) و داربست‌های هیالورونان (XLHA)، مشخص گردید که محیط داربست تأثیر عمیقی روی تکثیر و تمایز آدیپوسیت از سلول‌های کشت‌شده Asc انسانی دارد (Flynn et al., 2008). نتایج حاصل از پژوهش حاضر نیز به لحاظ تمایز احتمالی سلول‌های مهاجر به آدیپوسیت،

تحت تأثیر القاءات داربست مزانتر، با نتایج مذکور مطابقت دارد. آدیپوسیت‌ها^۱ واحد سلول‌های چربی^۲ هستند و معمولاً در بافت همبند سست دیده می‌شوند. این سلول‌ها، از سلول‌هایی با ظاهر مشابه فیبروبلاست تمایز می‌یابند. به این ترتیب که سلول به فرم کاملاً کشیده درآمده، محتوی لایه نازکی از سیتوپلاسم و هسته فشرده در این فضای محدودشده و در اطراف قطره چربی^۳ مستقر می‌شود (Maillet, 1979). تصاویر حاصل از میکروسکوپ الکترونی گذاره در روز بیست و یکم کشت، سلول‌هایی با تیپ و شباهت فیبروبلاستی و یا فیبروسیت را نشان داد (شکل ۸-A). به‌طور مشابه، مطالعات نشان داده است که داربست مثانه گاو، با اثر بر سلول‌های بلاستمایی، باعث تمایز آن‌ها به سلول‌های فیبروبلاست شده است (Baharara et al., 2012). فیبروبلاست، سلولی است با سیتوپلاسم ستاره‌ای شکل و هسته بیضوی و روشن. در مواردی که فعالیت سلول کاهش می‌یابد، اندازه سلول کوچک‌تر شده و هسته آن پر رنگ و دوکی دیده می‌شود که در این حالت این سلول‌ها را فیبروسیت نیز می‌نامند. به‌عبارت دیگر، در مواردی که سلول فعال نباشد، سیتوپلاسم کمتر و هسته پر رنگ دوکی دارد که در این صورت به‌نام فیبروسیت یا فیبروبلاست غیرفعال نامیده می‌شود. همچنین همان‌طور که در شکل ۸-B مشاهده می‌شود، در اطراف این سلول‌ها دستجات وسیع کلاژن با باندهای تاریک و روشن قابل مشاهده است. از آنجاکه باندهای تاریک و روشن، معرف فیبریل‌های کلاژن جوان هستند (Maillet, 1979). به‌نظر می‌رسد دوباره کلاژن‌سازی صورت گرفته است. بنابراین تحت تأثیر القاءات داربست سلول‌زدایی‌شده مزانتر، ماتریکس جدیدی در حال ساخت بوده که این ماتریکس حتی با

1. Adipocyte
2. Fat cells
3. Fat droplet

سلول‌های دلخواه هدایت نمود. بر این اساس داربست مزانتر احتمالاً می‌تواند روند آنژیوژنز را در داربست القا نموده و همچنین می‌تواند زمینه تمایز سلول‌های بلاستمایی به فیبروبلاست و فیبروسیت و آدیپوسیت را فراهم آورد. به عبارت بهتر، نتایج این پژوهش نشان داد که مزانتر سلول‌زدایی‌شده توانسته است تا سوبسترای 3D مناسبی را برای رفتارهای سلولی از قبیل مهاجرت، نفوذ و تمایز فراهم کرده و به عنوان یک داربست مناسب جهت مهندسی بافت مزانتر استفاده شود.

وجود بودن در محیط کشت، سالم و دست‌نخورده و قابل اطمینان باقیمانده است (شکل ۹).

آنچه که در روزهای مختلف پس از کشت با کمک مطالعات بافت‌شناسی بررسی شد، نشان داد که داربست طبیعی تهیه‌شده از مزانتر گاو، می‌تواند عاملی برای القای رفتارهای سلولی باشد. از آنجاکه سلول‌های بلاستمایی دارای قابلیت مشابه سلول‌های بنیادی هستند، می‌توان این سلول‌ها را به کمک عوامل القایی مختلف داربست به کاررفته در این تحقیق، جهت تمایز به سمت

REFERENCES

- Andreal, G.; Eva, F.; Sticova, E.; Kosinova, L. (2017). The Optimal Timing for Pancreatic Islet Transplantation into Subcutaneous Scaffolds Assessed by Multimodal Imaging. *Contrast Media & Molecular Imaging*; 13: 69-77.
- Atala, A.; Bauer, S.B.; Soker, S.; Yoo, J.J.; Retik, A.B. (2006). Tissue-engineered autologous bladders for patients needing cystoplasty. *The lancet*; 367(9518): 1241-1246.
- Badylak, S.F.; Freytes, D.O.; Gilbert, T.W. (2009). Extracellular matrix as a biological scaffold material: structure and function. *Acta Biomater*; 5(1):1-13.
- Baharara, J.; Mahdavi Shahri, N.; Saghir, N.; Rasti, H. (2012). Histological study of interaction between blastema tissue and decellularized three-dimensional matrix of bladder. *Zahedan J Res Med Sci*; 14(7): 8-13.
- Clay, M.P.; Vera, L.C.; Martins, A. (2015). Metalloproteinases and Wound Healing. *Adv Wound Care*; 4(4): 225-234.
- Corcoran, J.P.; Ferrtti, P.R.A. (1999). regulation of keratin expression and myogenesis suggests different ways of regenerating muscle in adult amphibian limbs. *J Cell Sci*; 112(pt9): 1385-94.
- Crapo, P.M.; Gilbert, T.W.; Badylak, S.F. (2011). An overview of tissue and whole organ decellularization processes. *Biomaterials*; 32: 3233-3243.
- Elder, B.D.; Eleswarapu, S.V.; Athanasiou, K.A. (2009). Extraction techniques for the decellularization of tissue engineered articular cartilage constructs. *Biomaterials*; 30(22): 3749-3756.
- Even-Ram, S.; Yamada, K.M. (2005). Cell migration in 3D matrix. *Curr Opin Cell Biol*; 17(5): 524-532.
- Flynn, L.E.; Prestwich, G.D.; Semple, J.L.; Woodhouse, K.A. (2008). Proliferation and differentiation of adipose-derived stem cells on naturally derived scaffolds. *Biomaterials*; 29(12): 1862-1871.
- Friedl, P.; Wolf, K. (2003). Tumour-cell invasion and migration: diversity and escape mechanisms. *Nat Rev Cancer*; 3(5): 362-374.
- Gardiner, D.M.; Muneoka, K.; Bryant, S.V. (1986). the migration of dermal cells during blastema formation in axolotls. *Dev Biol*; 118(2): 488-493.
- Gilbert, T.W.; Sellaro, T.L.; Badylak, S.F. (2006). Decellularization of tissues and organs. *Biomaterials*; 27: 3675-3683.
- Goss, R.J.; Grimes, L.N. (1975). Epidermal downgrowths in regenerating rabbit ear holes. *J*

- Morphol; 146(4): 533-542.
- Hashemzadeh, M.R.; MahdaviShahri, N.; Bahrami, A.R.; Kheirabadi, M.; Naseri, F.; Atighi, M. (2015). Use of an in vitro model in tissue engineering to study wound repair and differentiation of blastema tissue from rabbit pinna. In *Vitro Cell. Dev. Biol. Animal*; 51(7): 680-9.
- MahdaviShahri, N.; Baharara, J.; Takbiri, M.; KhajehAhmadi, S. (2013). In Vitro Decellularization of Rabbit Lung Tissue. *Cell Journa*; 15(1): 83-88.
- Maillet, M. (1979). *Les tissus de soutien*. 3rd edn. Vigot editions paris.
- Mantovani, M.; Carmem, T.; Correa-Giannella, C. (2018). Decellularized pancreas bioscaffold generation aiming at Type 1 Diabetes therapeutic. *DiabetesMetab*; 14(2): 22-29.
- Murphy, C.M.; Haugh, M.G.; Obrien, F.J. (2010). The effect of mean pore size on cell attachment, proliferation and migration in collagen glycosaminoglycan scaffolds for bone tissue Engineering Biomaterials; 31: 461-466.
- Naderi, S.; KhayatZadeh, J.; Mahdavi Shahri, N.; NejadShahrokhAbady, K.; Cheravi, M.; Baharara, J.; *et al.* (2013). Three-dimensional scaffold from decellularized human gingiva for cell cultures: glycoconjugates and cell behavior. *Cell J*; 15: 166-175.
- Pollot, B.E.; Goldman, S.M.; Wenke, J.C.; Corona, B.T. (2016). Decellularized extracellular matrix repair of volumetric muscle loss injury impairs adjacent bone healing in a rat model of complex musculoskeletal trauma. *J. Trauma Acute Care Surg*; 81(5): 184-190.
- Raeber, G.P.; Lutolf, M.P.; Hubbell, J.A. (2007). Mechanisms of 3-D migration and matrix remodeling of fibroblasts within artificial ECMs. *ActaBiomater*; 3(5): 615-629.
- Schaner, P.J.; Martin, N.D.; Tulenko, T.N.; Shapiro, I.M.; Tarola, N.A.; Leichter, R.F.; Carabasi, R.A.; Dimuzio, P.J. (2004). Decellularized vein as a potential scaffold for vascular tissue engineering. *Vascular surgery*; 40(1): 146-53.
- Tottey, S.; Johnson, S.A.; Crapo, P.M.; Reing, J.E.; Zhang, L.; Jiang, H.; *et al.* (2011). The effect of source animal age upon extracellular matrix scaffold properties. *Biomaterials*; 32(1): 128-36.
- Wolf, M.T.; Daly, K.A.; Reing, J.E.; Badylak, S.F. (2012). Biologic scaffold composed of skeletal muscle extracellular matrix. *Biomaterials*; 33(10): 2916-2925.