

***In vitro* experimental study of interactions between blastema tissue and three-dimensional matrix derived from bovine cancellous bone and articular cartilage**

Tavassoli A, M.Sc¹, Shahabipour F, M.Sc¹, Mahdavi Shahri N, Ph.D^{1,2*},
Moghadam Matin M, Ph.D^{1,2}, Fereidoni M, Ph.D¹

1- Department of Biology, Faculty of Sciences, Ferdowsi University of Mashhad, Mashhad, Iran

2- Cell and Molecular Research Group, Institute of Biotechnology, Ferdowsi University of Mashhad, Mashhad, Iran

* Email corresponding author: mahdavin@um.ac.ir

Received: 17 Jan. 2011

Accepted: 9 Apr. 2011

Abstract

Aim: Extracellular matrix (ECM), in addition to physical role can control the cellular behavior such as proliferation, differentiation and migration. With respect to dimension, architecture, cell polarity and microenvironment similar to *in vivo*, it is important to study cellular behavior in the three dimensional culture compare to two dimensions. In this study, ECM derived from bovine articular cartilage and cancellous bone were used as a three dimensional environments to study the movement and polarity of cells from blastema tissues.

Material and Methods: In order to remove cells from the cancellous bone and articular cartilage, physicochemical methods including snap freeze–thaw and sodium dodecyl sulfate (SDS) as an ionic detergent were used. Then the prepared decellulized matrix were assembled with the rings of the blastema tissues originated from pinnas of male New Zealand white rabbits and cultured in different days *in vitro*.

Results: The removals of the cells have been confirmed by histotechniques. In addition adhesion, polarity and migration of the blastema cells around the trabeculae of bone and articular cartilage ECM took place.

Conclusion: This study showed that the co-culture of blastema tissue with dynamic cells and 3D scaffolds might be a suitable model to study cell behavior such as migration and polarity *in vitro*.

Keywords: Extracellular matrix, Articular Cartilage, Sodium Dodecyl Sulfate, Cell polarity

مطالعه تجربی اعمال متقابل بین بافت بلاستما با ماتریکس سه بعدی مشتق شده از بافت استخوان اسفنجی و غضروف مفصلی گاو در شرایط *in vitro*

امین توسلی. M.Sc.^۱، فهیمه شهابی پور. M.Sc.^۱، ناصر مهدوی شهری. Ph.D.^{۱*}، مریم مقدم متین. Ph.D.^۲،

مسعود فریدونی. Ph.D.^۱

۱- دانشگاه فردوسی مشهد، دانشکده علوم، گروه زیست شناسی

۲- دانشگاه فردوسی مشهد، پژوهشکده فناوری زیستی، گروه سلولی و مولکولی

* پست الکترونیک نویسنده مسئول: mahdavin@um.ac.ir

تاریخ پذیرش: ۱۳۹۰/۱/۲۰

تاریخ دریافت: ۱۳۸۹/۱۰/۲۷

چکیده

هدف: ماتریکس خارج سلولی علاوه بر نقش فیزیکی، می‌تواند کنترل کننده رفتارهای سلولی از قبیل تکثیر، تمایز و مهاجرت سلولی نیز باشد. مطالعه رفتار سلولی در ماتریکس‌های سه بعدی می‌تواند از نظر بُعد، معماری و قطبیت سلولی ریز محیطی مشابه با شرایط *in vivo* فراهم کند. در اینجا از ماتریکس خارج سلولی مشتق شده از استخوان اسفنجی و غضروف مفصلی گاو به عنوان بستری سه بعدی برای مطالعه مهاجرت و قطبیت سلول‌های بافت بلاستمایی استفاده گردید.

مواد و روش‌ها: برای حذف سلول‌ها از ماتریکس خارج سلولی، از روش فیزیکی و شیمیایی سلول زدایی شامل فریز-ذوب سریع و شوینده یونی سدیم دودسیل سولفات (SDS) استفاده گردید. سپس ماتریکس‌های سه بعدی تهیه شده با حلقه بافت بلاستمایی حاصل از پانچ لاله گوش خرگوش نر نژاد نیوزلندی در شرایط *in vitro* در روزهای مختلف کشت داده شد.

نتایج: با استفاده از رنگ آمیزی‌های بافتی، حذف سلول‌ها از بافت تأیید شد. آنچه که بعد از کشت بافت بلاستما در کنار ماتریکس خارج سلولی استخوان اسفنجی و غضروف مفصلی اتفاق افتاد، چسبندگی، قطبیت و مهاجرت سلول‌های بافت بلاستما در این ماتریکس بود.

نتیجه گیری: نتایج این تحقیق نشان می‌دهد کشت بافت بلاستما که دارای سلول‌های پویایی است، در کنار داربست مشتق شده از ماتریکس خارج سلولی که ویژگی سه بعدی دارد، می‌تواند مدل مناسبی جهت بررسی رفتارهایی همچون قطبیت و حرکت سلولی در شرایط *in vitro* فراهم نماید.

واژگان کلیدی: ماتریکس خارج سلولی، غضروف مفصلی، سدیم دودسیل سولفات، قطبیت سلولی

مقدمه

در بافت‌های پستانداران، سلول‌ها فقط با یکدیگر در ارتباط نیستند، بلکه با یک ساختار حامی بنام ماتریکس خارج سلولی (Extracellular matrix) نیز در ارتباط می‌باشند (۱). ECM شامل ترکیبات مختلفی از جمله پروتئین‌های کلاژن، پلی ساکارید هیالورونان، پروتئوگلیکان‌ها و همچنین پروتئین‌های چسبنده‌ای می‌باشد که به پروتئین‌های گیرنده سطح سلولی و سایر اجزای ماتریکس چسبیده و به ماتریکس قدرت و استحکام می‌بخشد. سلول‌های هر بافت قادر به برهم کنش با ECM اطراف خود می‌باشند و این برهم کنش بین ECM و سلول‌های یک بافت در جهت گیری و رفتار سلول‌ها نقش اساسی بازی می‌کند. برهم کنش سلول‌های بافت با ECM، علاوه بر فراهم نمودن ساختار سه بعدی (3D) مناسب، مسیرهای پیام رسانی را برای رفتارهای سلولی از قبیل چسبندگی، مهاجرت، تمایز و تکثیر سلولی فراهم می‌سازد که این برای فرآیندهایی از قبیل، تکوین بافت، ترمیم زخم، پاسخ‌های ایمنی و پیشبرد سرطان مهم است (۲). برای مطالعه فرآیندهای بیولوژیکی فوق نیاز به بررسی سلول‌ها در شرایط *in vitro* است اما رشد سلول‌ها بر روی محیط دو بعدی (2D) ظرف کشت از نظر مورفولوژی، برهم کنش سلول - سلول و سلول - ماتریکس و رشد فیزیولوژیکی و طبیعی با محیط *in vivo* سه بعدی بافت تفاوت‌هایی دارد (۳-۴). بنابراین استفاده از مدل 3D بهتر می‌تواند ریز محیط‌های بافت‌های زنده را جهت بررسی رفتارهای سلولی تداعی کند. تا کنون داربست‌های 3D بی‌شماری به عنوان جانشین‌های ECM جهت مطالعه رفتار و برهم کنش سلولی مورد استفاده قرار گرفته‌اند. این داربست‌ها متشکل از مولکول‌های طبیعی و یا پلیمرهای سنتزی می‌باشند، اما آن‌ها نقص‌هایی از جمله خاصیت هیدروفیلیسیته پائین، عدم اجازه کنترل چسبندگی سلول‌ها، معماری مصنوعی بافت داربستی و عدم کنترل سختی مکانیکی دارند (۵).

همانطور که می‌دانیم بافت‌های موجودات زنده از سلول‌های هسته‌دار در یک ECM فشرده که تشکیل شبکه‌ای 3D از مولکول‌های الیافی را داده‌اند تشکیل شده است (۷۶). لذا می‌توان از ECM بافت‌های موجودات زنده جهت بررسی رفتار سلول‌ها در هنگام برهم کنش با آن در شرایط *in vitro* استفاده کرد. برای این کار از روش‌های سلول‌زدایی جهت حذف تاثیر

سلول‌های بافت از ECM می‌توان بهره برد، تا در نهایت تنها ECM از بافت باقی بماند و بتوان از آن به عنوان داربست استفاده نمود (۸، ۹، ۱۰ و ۱۱)

بجز سوبسترا، تعیین نوع منبع سلولی نیز نقش مهمی در مطالعه رفتار سلول‌ها در هنگام برهم کنش با سوبسترا دارد، و معمولاً منبع سلول‌هایی که جهت بررسی رفتارهای سلولی استفاده می‌شود سلول‌های فیبروبلاستی، بنیادی و یا سرطانی می‌باشند (۸-۱۱). اما برای شبیه سازی هر چه بیشتر شرایط حاکم بر سلول‌ها در شرایط *in vivo* می‌توان از کشت بافت‌های پویا مانند بافت‌هایی که در پدیده ترمیم در جانوران پرسلولی نقش دارند، استفاده نمود. مطالعات نشان داده است، طی روند ترمیم، بافتی به نام بلاستما که دارای سلول‌هایی با قابلیت تکثیر و تمایز، مشابه سلول‌های جنینی تشکیل می‌شود و قادرند در شرایط *in vivo* به انواعی از سلول‌های تخصص یافته تمایز یابند (۱۲-۱۴). یکی از بهترین مثال‌های تشکیل بافت بلاستما در پستانداران، جایگزینی همه بافت‌ها پس از ایجاد سوراخ در لاله گوش خرگوش نر نژاد نیوزلندی است (۱۵-۱۷).

هدف از انجام این تحقیق در مرحله اول، تهیه داربست‌های 3D مشتق شده از ECM استخوان اسفنجی و غضروف مفصلی استخوان ران گاو بود. برای این کار از سلول‌زدایی استخوان اسفنجی و غضروف مفصلی اپی‌فیز ران گاو به منظور تهیه داربست ECM استفاده گردید. در بخش دوم این تحقیق، برهم کنش بین ECM‌های 3D تهیه شده، با بافت بلاستمای حاصل از لاله گوش خرگوش نر نژاد نیوزلندی مورد بررسی قرار گرفت.

مواد و روش‌ها

آماده سازی داربست سه بعدی مشتق شده از ECM: ابتدا استخوان طویل ران گاو بلافاصله پس از قربانی شدن تهیه شد. سپس از غضروف مفصلی و استخوان اسفنجی اپی‌فیز ران گاو قطعات استوانه‌ای شکلی به قطر ۲ میلی‌متر جدا گردید. نمونه‌های حاصل توسط سرم فیزیولوژی شستشو شده و سپس در دمای ۴- درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند، تا مرحله فیزیکی سلول‌زدایی آغاز گردد. سپس نمونه‌ها از فریزر خارج گشته و بعد از ذوب شدن در دمای آزمایشگاه، با سرم فیزیولوژی نمونه‌ها چند بار شستشو داده شدند. در مرحله بعد جهت snap freezing (فریز کردن آبی) به مدت ۲ دقیقه در ازت مایع قرار گرفت و سپس بمدت ۱۰ دقیقه در سرم فیزیولوژی با دمای

بافت بلاستما در شرایط استریل مونتاژ گشت و در ظروف شش خانه‌ای کشت قرار گرفتند و در هر خانه ظرف کشت میزان ۲ میلی‌لیتر محیط کشت DMEM همراه با ۱۵ درصد FBS و μl ۱۰۰ آنتی‌بیوتیک پنی‌سیلین / استرپتومایسین ریخته شد، سپس به انکوباتور ۳۷ درجه سانتی‌گراد با CO_2 ۵ درصد منتقل گردید. نمونه‌ها در ۴، ۱۰، ۲۰ و ۳۰ روز بعد از کشت مورد بررسی قرار گرفتند.

مطالعات بافت شناسی: بعد از فیکس کردن، آب‌گیری و قالب‌گیری با پارافین برش‌هایی با قطر ۷ میکرون صورت گرفت. جهت رنگ‌آمیزی ابتدا برش‌ها دیپارافینه و آب‌دهی شد. سپس با رنگ‌های هماتوکسیلین-ائوزین (H&E)، آبی تولوئیدین، پیکروفوشین و پیکروسیروس رد رنگ‌آمیزی گردید. از رنگ‌آمیزی H&E جهت نشان دادن سلول‌های زدایی از بافت‌های غضروف مفصلی و استخوان اسفنجی و همچنین بررسی برهم‌کنش با بافت بلاستما استفاده گردید. رنگ آبی تولوئیدین برای نشان دادن محتوی پروتئوگلیکان‌های ECM غضروف مفصلی استفاده شد. همچنین پیکروسیروس رد بعنوان رنگ اختصاصی برای تعیین محتوی کلاژن داربست‌های ECM مورد استفاده قرار گرفت.

نتایج

نتایج حاصل از این تحقیق، در دو بخش نتایج تهیه داربست ECM، مشتق شده از غضروف مفصلی و استخوان اسفنجی استخوان ران گاو و همچنین بررسی برهم‌کنش بین ماتریکس‌های تهیه شده با بافت بلاستمایی در شرایط *in vitro* ارائه می‌گردد.

سلول‌زدایی از بافت غضروف مفصلی و استخوان اسفنجی:

پس از انجام فرایند سلول‌زدایی، تصویر ماکروسکوپی وجود خلل و فرج در ماتریکس استخوان اسفنجی را نشان می‌دهد، همچنین بافت سلول‌زدایی شده غضروف مفصلی نیز در تصویر B شکل ۱ نشان داده شده است (شکل ۱).

مطالعه سلول‌زدایی غضروف مفصلی و استخوان اسفنجی توسط رنگ‌آمیزی H&E نشان می‌دهد که نمونه‌های تحت تیمار سلول‌زدایی نسبت به نمونه کنترل کاملاً فاقد سلول شده است (شکل‌های ۲ و ۳). رنگ‌آمیزی پیکروسیروس رد که جهت ارزیابی کیفی کلاژن بافت‌ها بکار می‌رود و توسط میکروسکوپ پلاریزان عکس‌برداری شده، نشان می‌دهد فیبریل‌های کلاژن در

۳۷ درجه سانتی‌گراد ذوب گردید. این مرحله ۵ مرتبه تکرار شد و با بافر فسفات (PBS) شستشو داده شد. مرحله بعد، روش شیمیایی سلول‌زدایی بود. بطوریکه ابتدا نمونه‌ها بمدت ۳ ساعت با شوینده یونی سدیم دودسیل سولفات (SDS, Merck) ۲/۵ درصد به آرامی هم زده شدند. در انتها نمونه‌ها با بافر PBS بمدت نیم ساعت شستشو گردید.

جهت استریل کردن و پاک کردن SDS از روی نمونه‌ها، داربست‌ها آماده شده توسط کیف مولی پر استریل در سه مرحله استریل و سم‌زدایی گردید. برای این کار ابتدا توسط الکل ۷۵ درصد نمونه‌ها شستشو داده شدند، سپس برای از بین رفتن اثر الکل ۷۵ درصد از آب مقطر استریل استفاده گردید. نمونه‌ها در مرحله بعد توسط سرم فیزیولوژی نیز استریل شدند تا اثر آب مقطر بر روی داربست‌ها باقی نماند. در آخرین مرحله نمونه‌ها به مدت ۱۰ دقیقه در محیط کشت DMEM (Dulbecco's modified Eagle medium, Gibco) همراه با ۱۵ درصد سرم جنینی گاو (FBS) (Fetal bovine serum, biosera) در انکوباتور ۳۷ درجه سانتی‌گراد با CO_2 ۵ درصد قرار گرفتند.

تهیه بافت بلاستما: در اجرای این پژوهش جهت تهیه حلقه

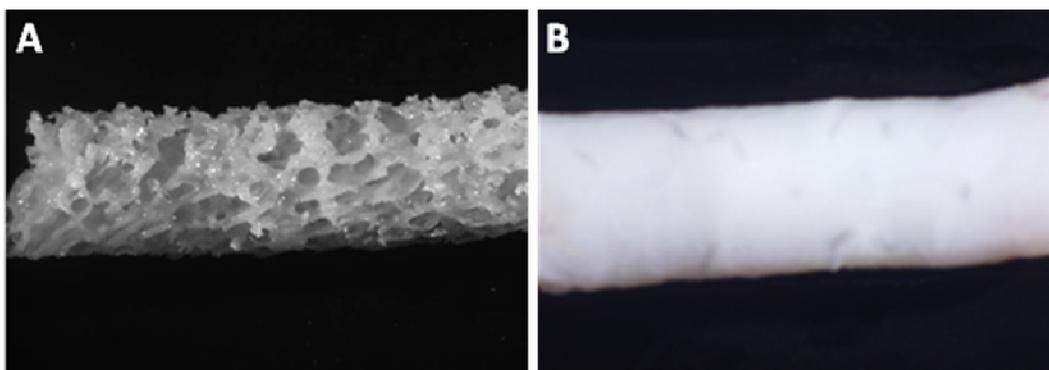
بلاستما از لاله گوش خرگوش سفید نژاد نیوزلندی جنس نر ۶-۸ ماهه و با وزن تقریبی ۲/۵ کیلوگرم که از موسسه واکسن و سرم سازی رازی مشهد تهیه گشته بود، استفاده گردید. جهت تهیه حلقه‌ای از بافت بلاستما، ابتدا با استفاده از کرم موبر موهای سطح پشتی و شکمی لاله گوش حذف گردید. و بعد از بی‌حسی موضعی لاله گوش توسط محلول لیدوکائین ۱۰ درصد، سوراخ‌هایی با قطر ۲ میلی‌متر با پنچر مخصوص انجام گرفت، موقعیت سوراخ‌ها با توجه به سیستم عروقی موجود بر روی لاله گوش، بین شریان مرکزی و وریدهای محیطی قسمت میانی گوش انتخاب شدند. بعد از دو روز، پانچ دوم در اطراف سوراخ‌های پانچ شده اول با قطر ۴ میلی‌متر انجام گرفت تا حلقه بلاستما از لاله گوش جدا گردد. بعد از جداسازی حلقه بلاستما، جهت آلودگی‌زدایی ۷ بار با سرم فیزیولوژی استریل در زیر هود لامینار شستشو داده شد تا آماده ورود به محیط کشت گردد.

مونتاژ داربست ECM با بافت بلاستما: بعد از تهیه و

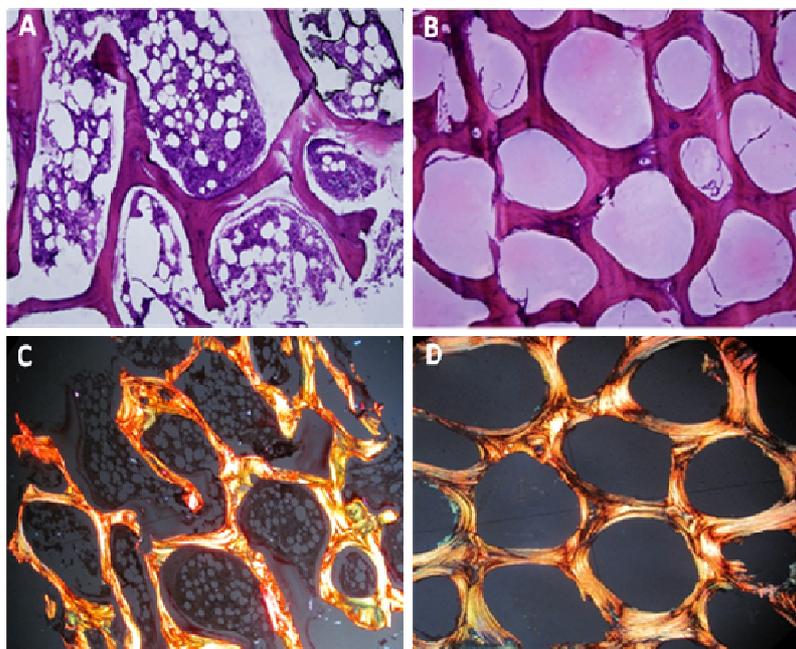
آلودگی‌زدایی ECM و بافت بلاستما، داربست‌های ECM با بافت بلاستما مونتاژ شده و کشت داده شدند. برای این کار هر یک از داربست‌های ECM غضروفی و استخوان اسفنجی در میان حلقه

بررسی برهم کنش بین داربست ECM با بافت بلاستما: بعد از مونتاژ ECM غضروف مفصلی و استخوان اسفنجی در درون حلقه بلاستمایی و قرار گیری در محیط کشت در روزهای ۴، ۱۰، ۲۰ و ۳۰ بعد از کشت، ناحیه دارای هم بافت بلاستمایی و هم ECM که ایجاد بر هم کنش در آن قسمت امکان پذیر بود، مورد بررسی قرار گرفت (شکل های ۴، ۵، ۶ و ۷).

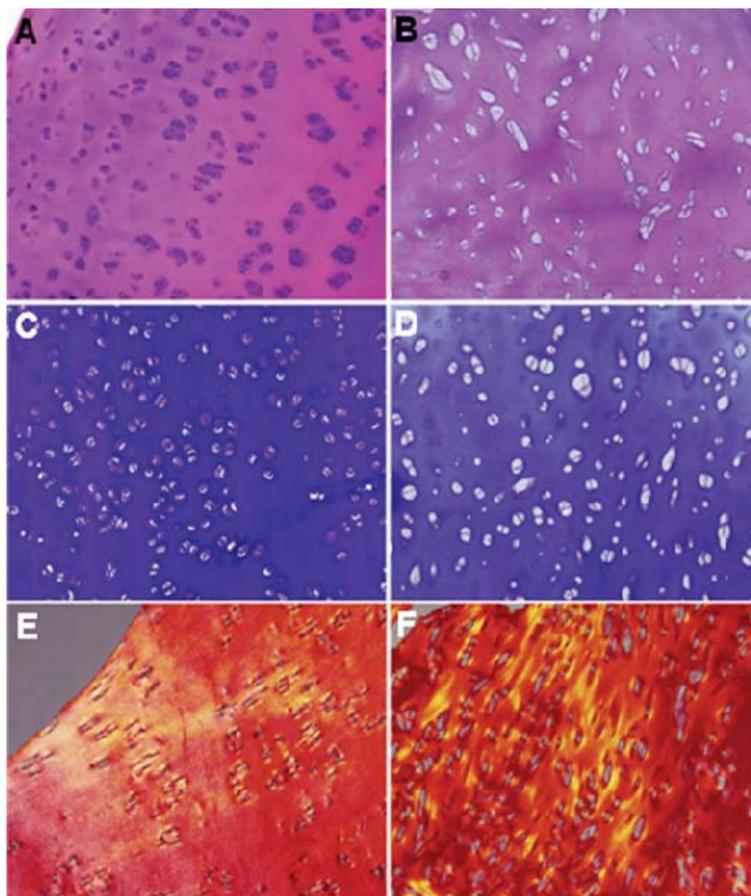
بعد از فرآیند سلول زدایی در ECM غضروف مفصلی و استخوان اسفنجی حفظ شده است. رنگ آبی تولوئیدین با رنگ آمیزی پروتئوگلیکان ها و گلیکوزآمینوگلیکان های ECM بافت غضروف مفصلی نشان می دهد در قبل و بعد از سلول زدایی این ترکیبات حفظ شده است (شکل ۳، C و D).



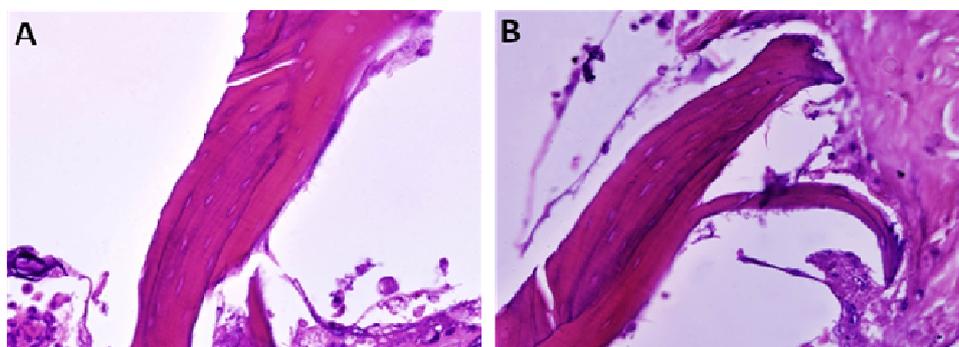
شکل ۱. تصویر ماکروسکوپی از ماتریکس سه بعدی تهیه شده از ECM استخوان اسفنجی و غضروف مفصلی سلول زدایی شده. (A) پس از فرآیند سلول زدایی، خلل و فرج فراوان در داربست استخوانی کاملاً مشخص می باشند. (B) بافت غضروف مفصلی پس از سلول زدایی. (دید استریمیکروسکوپ، درشتنمایی 10X)



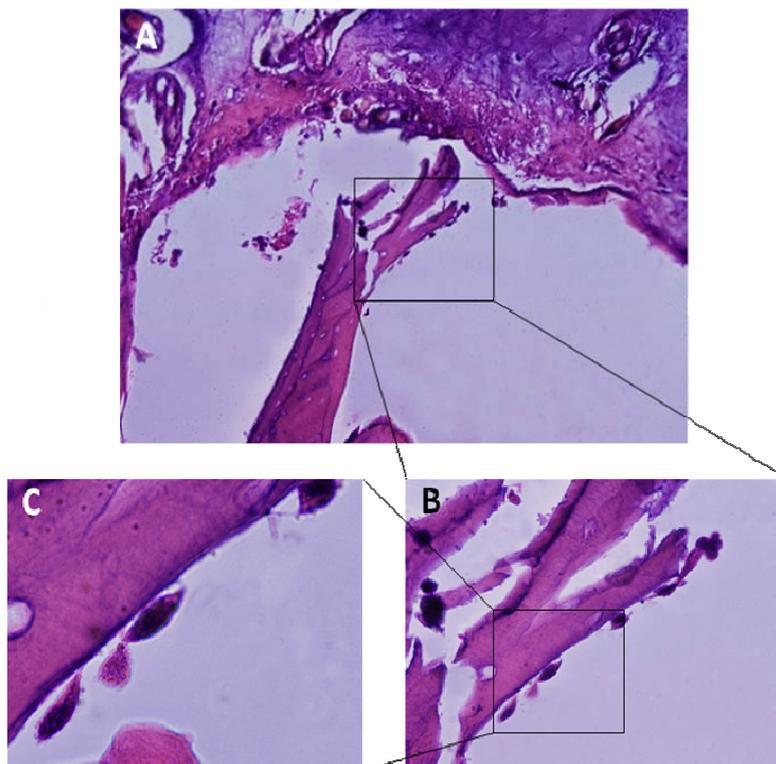
شکل ۲. نمونه استخوان اسفنجی کنترل و سلول زدایی شده. (A) بافت سلول دار استخوان اسفنجی به همراه سلول های استئوبلاست پراکنده شده در سطح ترابکولا و سلول های مغز استخوان در فضاهای بین تیغه های ترابکولا (درشتنمایی 40X). (B) بافت سلول زدایی شده استخوان اسفنجی با رنگ آمیزی H&E (درشتنمایی 40X). (C) بافت سلول دار استخوان اسفنجی به همراه رشته های کلاژن در رنگ آمیزی با پیکروسیروس رد (درشتنمایی 100X). (D) بافت سلول زدایی شده که دارای رشته های کلاژن باقی مانده پس از فرآیند سلول زدایی می باشد (درشتنمایی 100X).



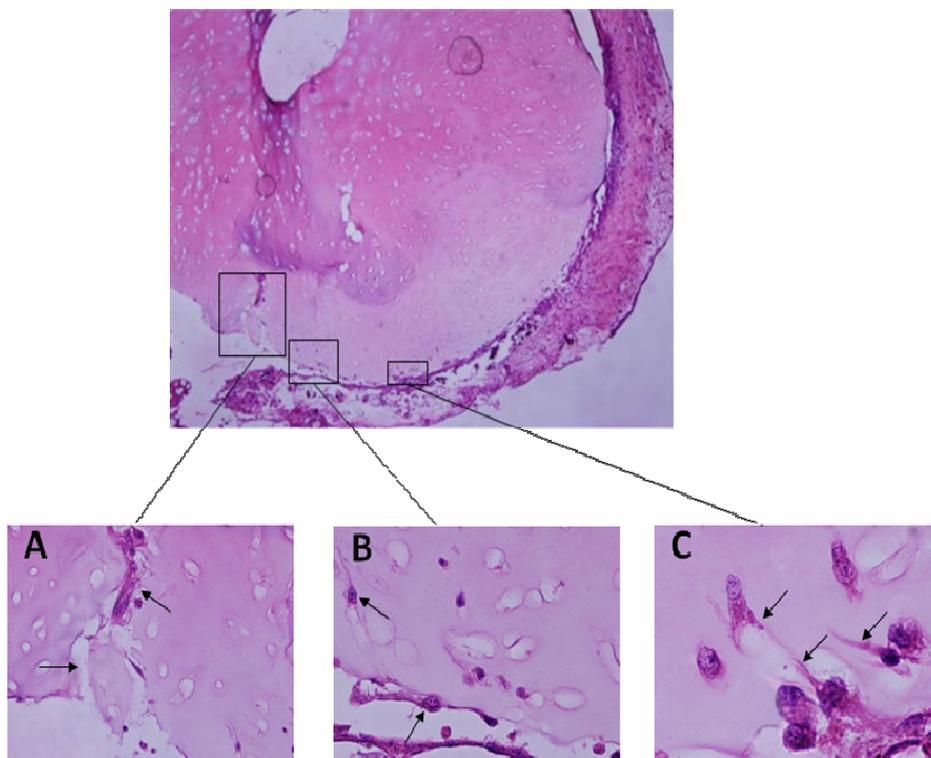
شکل ۳. نمونه های غضروف مفصلی کنترل و سلول زدایی شده. (A) رنگ آمیزی H&E نشان می دهد در غضروف مفصلی کندروسیت ها در ماتریکس غضروف بصورت پراکنده وجود دارند. (B) نمونه سلول زدایی شده، خالی کندروسیت ها مشخص است. (C) نمایی کلی از بافت غضروف مفصلی با رنگ آمیزی آبی تولوئیدین. (D) عدم تغییر رنگ ماتریکس لاجوردی نشان دهنده عدم از دست رفتن پروتئوگلیکان های ماتریکس غضروف است. (E) تصویر بافت غضروفی با میکروسکوپ پلاریزان. (F) رنگ قرمز آجری و درخشنده نشان دهنده پیکروسیروس رد که توسط میکروسکوپ پلاریزان گرفته شده است، وجود فیبریل های کلاژن در ماتریکس غضروف بعد از سلول زدایی می باشد (درشتنمایی 100X).



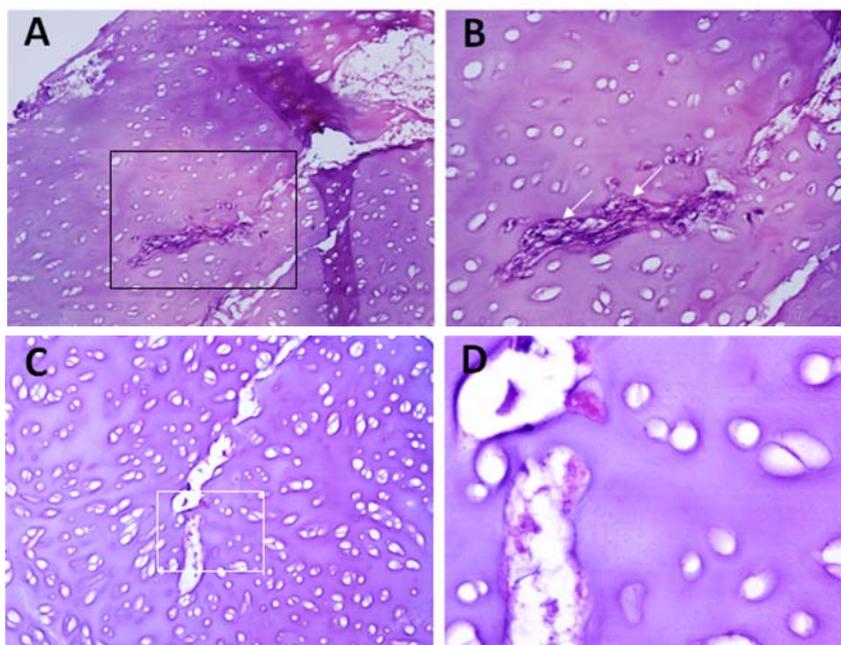
شکل ۴. مطالعه برهم کنش بین بافت بلاستمایی و داربست استخوان اسفنجی در روز دهم پس از کشت. (A) رنگ آمیزی H&E چسبندگی برخی از سلول های بافت بلاستمایی را در اطراف تیغه های تراکتولا قابل مشاهده است که با فلش ها نشان داده شده اند (درشتنمایی 100X). (B) پیکانها نشان دهنده شروع هجوم سلول ها از بافت بلاستمایی به داربست استخوانی می باشد (درشتنمایی 100X).



شکل ۵. مطالعه برهم کنش بین بافت بلاستمایی و ECM استخوان اسفنجی در روز بیستم پس از کشت. (A) نفوذ بیشتر سلول ها به داخل داربست استخوان اسفنجی نشان داده شده است (درشتنمایی 100X). (B) چسبندگی تعدادی از سلول ها در حاشیه تراکولای استخوانی قابل مشاهده است (درشتنمایی 400X). (C) تصویر بزرگ شده B، فلش ها دو سلول چسبیده به تیغه تراکولای بافت استخوانی که دارای قطبیت هستند را نشان می دهند (درشتنمایی 1000X).



شکل ۶. مقطع عرضی از حلقه بلاستما با ECM غضروفی (بزرگنمایی 40X). در شکل A تخریب بافت ECM با فلش مشخص شده است (درشتنمایی 200X). در شکل B عده ایی از سلول ها نفوذ کرده اند در حالی که یک سلول به حاشیه ECM متصل شده است (درشتنمایی 400X). شکل C تشکیل استتاله های سیتوپلاسمی و هجوم سلول ها را از بافت بلاستما به داخل ECM غضروفی نشان می دهد (درشتنمایی 1000X).



شکل ۷. نمایش نفوذ سلول های بلاستمایی به درون بافت ECM غضروفی در روز های ۲۰ و ۳۰ بعد از کشت. در شکل A و B نمای کلی از توده سلول های در حال نفوذ به ECM غضروفی در روز ۲۰ بعد از کشت قابل مشاهده می باشد (درشتنمایی 40X A و 200X B درشتنمایی 100X). در شکل C مسیر نفوذ سلول ها از بافت بلاستمایی در ECM غضروفی و شکاف ایجاد شده در روز ۳۰ بعد از کشت قابل مشاهده می باشد (درشتنمایی 100X). در بزرگ نمایی بیشتر آثار سلول های تخریب شده در میان شکاف ایجاد شده مشاهده می شود (تصویر D درشتنمایی 200X).

بحث

می ترکد. بنابراین می توان انتظار داشت که در این دما، تمامی سلول ها با قرار گرفتن متناوب، دچار تغییر و تخریب در غشاء هایشان می شوند.

سپس با قرار دادن نمونه ها در ازت مایع، باعث تخریب هر چه بیشتر غشاءها و خارج شدن محتویات اندامک های سلولی و همچنین آسیب به پروتئین های سلولی می گردد. البته بدلیل ساختار فیبری و محکم پروتئین های ECM می توان انتظار داشت که تاثیر این تغییرات دمای روی ECM بسیار ناچیز باشد (۸).

در پروژه حاضر از SDS بعنوان ماده سلول زدا در مرحله شیمیایی سلول زدایی استفاده شد. از این رو مطالعات انجام گرفته نشان می دهد که شوینده یونی SDS بهترین ماده شیمیایی سلول زدا برای بافت های مختلف می باشد. مطالعات بافت شناسی و ارزیابی تست های مکانیکی مشخص کرده است که در غلظت های ۲ درصد تا ۳ درصد از این ماده، بهترین نتایج سلول زدایی مشاهده می گردد. از طرفی غلظت های بیشتر SDS باعث حذف پروتئوگلیکان ها از ماتریکس غضروفی می شود. SDS با توجه به ساختار دوگانه دوستش (دارای یک سر آنیونی آب دوست و یک دم دوازده کربنه اشباع آب گریز) می تواند با غشاء های سلولی بر هم کنش داده و سبب لیز شدن غشاء سلولی

همانطوریکه می دانیم هر بافت شامل دو جزء سلول ها و ECM است، پس در تهیه ماتریکس های مشتق شده از ECM عمل اصلی برداشتن سلول ها از بافت و باقی ماندن ECM است. ماتریکس های ECM شامل مولکول های عملکردی و ساختاری ترشح شده توسط سلول های هر بافت و اندام است، بنابراین ترکیب بندی و توزیع ترکیبات ECM به منبع بافت بستگی دارد. ECM که ماده تشکیل دهنده این داربست هاست از انواعی از بافت ها من جمله درپچه های قلبی، رگ های خونی، پوست، لایه زیر موکوسی روده کوچک (SIS)، مثانه، تاندون و لیگامندا مشتق شده است (۱۸).

در این پژوهش ابتدا لازم بود با عملیات سلول زدایی داربستی مشتق شده از ECM غضروف مفصلی و استخوان اسفنجی گاو بدست آید. لذا از دو روش فیزیکی و شیمیایی برای این کار استفاده شد. برای انجام مرحله فیزیکی سلول زدایی، ابتدا نمونه ها در فریزر ۴- درجه سانتی گراد قرار گرفت. استلال این کار این بود که بیشتر حجم سلول ها از آب تشکیل شده است و به این دلیل که تشکیل بزرگترین کریستال های یخ در این دما صورت می گیرد، غشاء سلول ها (چه غشاء سیتوپلاسمی و چه غشاء های داخلی) بر اثر ایجاد این کریستال های حجیم یخ

و غشاء هسته گردد (۱۹). همچنین SDS در سلول‌ها باعث unfold شدن پروتئین‌های سلولی و بدین ترتیب از بین رفتن آن‌ها می‌گردد (۲۰). در تحقیق حاضر رنگ آمیزی‌های اختصاصی از قبیل آبی تولوئیدین، نشان دهنده حفظ پروتئوگلیکان‌های ECM غضروف و پیکروسیروس رد که جهت ارزیابی کیفی کلاژن ECM غضروف و استخوان اسفنجی است، حاکی از حفظ ترکیب ECM در قبل و بعد از فرآیند سلول زدایی است (شکل‌های ۲ و ۳).

در حالت طبیعی بعد از پانچ گوش خرگوش، رشد اپی‌تلیوم گوش خرگوش نژاد نیوزلندی بصورت رشد بطرف مرکز می‌باشد (۱۶) و این باعث ترمیم سوراخ ایجاد شده در گوش خرگوش در شرایط *in vivo* می‌گردد. در اینجا از این خاصیت در لاله گوش خرگوش استفاده شد و بعد از قرار دادن در مجاورت داربست ECM غضروف مفصلی و استخوان اسفنجی در بین حلقه بافت حلقه بلاستمایی، برهم کنش آن‌ها در روزهای مختلف بررسی گشت.

مطالعه در روز چهارم بعد از کشت نشان داد که در آن روز هیچ سلولی به داربست ECM غضروف مفصلی و استخوان اسفنجی نفوذ نکرده است (شکل نشان داده نشده است). اما در روز دهم بعد از کشت، قرار گرفتن سلول‌هایی در مرز بین بافت بلاستما و داربست ECM غضروف مفصلی و استخوان اسفنجی نفوذ سلول‌های بافت بلاستما با ایجاد استتاله‌هایی سعی در تخریب داربست ECM غضروف مفصلی و نفوذ به آن را داشتند. (شکل ۶). اما سوال این است که چه عاملی سبب تخریب داربست در هنگام نفوذ سلول‌ها به آن می‌شود. طبق مطالعات انجام شده بر روی سلول‌های توموری در حال تهاجم، یکی از دلایل تخریب ECM در هنگام مهاجرت سلول‌ها، متالوپروتئینازهای ماتریکس (MMPs) هستند. جالب این جاست که یکی از فاکتورهای لازم در فعال کردن MMPs، پاهای کاذب تهاجمی (invadopodia) در سلول‌های توموری است. در حقیقت بیان MMPs در سلول‌های توموری و همچنین سلول‌های استرومایی اطراف تومور برای متاستاز و تهاجم توموری لازم هستند (۲۱). علاوه بر این سلول‌های بافت بلاستما در داربست ECM استخوان اسفنجی بیشتر به حاشیه تراپکولارها متصلند (شکل ۴).

روز ۲۰ام بعد از کشت با تخریب و نفوذ بیشتری از سلول‌های بافت بلاستمایی در درون داربست ECM غضروف مفصلی همراه است. نکته قابل توجه در این روز تشکیل توده‌های سلولی در

درون داربست است (شکل ۷). همانطوری که اشاره شد بر اثر تاثیر سلول‌های بافت بلاستما داربست غضروفی تخریب شده است اما مطالعات Reing و همکاران در سال ۲۰۰۹ نشان می‌دهد که محصولات تخریب داربست نیز دارای فعالیت کموتاکتیکی و میتوژنیک برای سلول‌های پیش ساز چند توان هستند. بنابراین همانطوری که بافت بلاستما باعث تخریب داربست غضروفی می‌گردد، تجزیه داربست نیز می‌تواند عاملی برای تکثیر سلول‌های بافت بلاستما گردد (۲۲). در این روز تغییر شکل سلول‌های بافت بلاستما و کشیده شدن آن‌ها در حالت چسبیده به تیغه‌های استخوان اسفنجی نیز اهمیت دارد (شکل ۵). تحقیقات نشان داده است که حرکت سلول‌ها توسط گرادپانی از پیام‌های شیمیایی هدایت می‌شود و از طرفی دیگر برهم کنش‌های فیزیکی بین سلول و سوبسترا نیز در این نوع حرکت می‌تواند نقش داشته باشند. از طرفی طی فرایند استخوان سازی داخل غضروفی، سلول‌های استئوبلاست با آرایشی ردیفی و منظم در اطراف تیغه‌های استخوانی قرار می‌گیرند (۲۳). در این

تحقیق هم در روزهای ۱۰ و ۲۰ پس از کشت آرایش ردیفی سلول‌ها در اطراف تیغه‌های استخوانی مشاهده گردید که شروع فرایند احتمالی استخوان سازی می‌باشد (شکل‌های ۴ و ۵).

در روز ۳۰ام بعد از کشت عملاً سلول‌ها وارد شده به داربست بسیار کم هستند و یا حداقل سلول‌ها کاملاً مورفولوژی روزهای ۱۰ام و ۲۰ام را از دست داده‌اند (شکل ۷، C و D). این امکان وجود دارد در این روز، سلول‌های بافت بلاستمایی توانایی زیست خود را از دست داده باشند. اما حرکت سلول‌های بافت بلاستما در روز سی‌ام پس از کشت به داربست استخوان اسفنجی بیشتر بوده و همزمان این سلول‌ها چسبندگی به اطراف تیغه‌های تراپکولا را نیز نشان دادند (شکل نشان داده نشده است).

نتیجه گیری

نتایج حاصل از بخش اول این تحقیق، یعنی بحث سلول زدایی و تشکیل داربست 3D از ECM غضروف مفصلی و استخوان اسفنجی گاو نه تنها می‌تواند سوبسترای 3D جهت بررسی رفتار سلولی باشد، بلکه می‌تواند آغازی در جهت خلق بافت‌های جایگزین غیر ایمونوژنیک در مهندسی بافت باشد. همچنین در بخش دوم این تحقیق نشان داده شد، استفاده از بافت بلاستما که در هنگام زخم در برخی از موجودات تشکیل می‌گردد و دارای ویژگی‌های سلول‌های جنینی است، می‌تواند در بررسی رفتار سلول‌ها در شرایط مختلف بافتی، مدل مناسبی باشد.

مطالعه در روز چهارم بعد از کشت نشان داد که در آن روز هیچ سلولی به داربست ECM غضروف مفصلی و استخوان اسفنجی نفوذ نکرده است (شکل نشان داده نشده است). اما در روز دهم بعد از کشت، قرار گرفتن سلول‌هایی در مرز بین بافت بلاستما و داربست ECM غضروف مفصلی و استخوان اسفنجی نفوذ سلول‌های بافت بلاستما با ایجاد استتاله‌هایی سعی در تخریب داربست ECM غضروف مفصلی و نفوذ به آن را داشتند. (شکل ۶). اما سوال این است که چه عاملی سبب تخریب داربست در هنگام نفوذ سلول‌ها به آن می‌شود. طبق مطالعات انجام شده بر روی سلول‌های توموری در حال تهاجم، یکی از دلایل تخریب ECM در هنگام مهاجرت سلول‌ها، متالوپروتئینازهای ماتریکس (MMPs) هستند. جالب این جاست که یکی از فاکتورهای لازم در فعال کردن MMPs، پاهای کاذب تهاجمی (invadopodia) در سلول‌های توموری است. در حقیقت بیان MMPs در سلول‌های توموری و همچنین سلول‌های استرومایی اطراف تومور برای متاستاز و تهاجم توموری لازم هستند (۲۱). علاوه بر این سلول‌های بافت بلاستما در داربست ECM استخوان اسفنجی بیشتر به حاشیه تراپکولارها متصلند (شکل ۴).

روز ۲۰ام بعد از کشت با تخریب و نفوذ بیشتری از سلول‌های بافت بلاستمایی در درون داربست ECM غضروف مفصلی همراه است. نکته قابل توجه در این روز تشکیل توده‌های سلولی در

مطالعه در روز چهارم بعد از کشت نشان داد که در آن روز هیچ سلولی به داربست ECM غضروف مفصلی و استخوان اسفنجی نفوذ نکرده است (شکل نشان داده نشده است). اما در روز دهم بعد از کشت، قرار گرفتن سلول‌هایی در مرز بین بافت بلاستما و داربست ECM غضروف مفصلی و استخوان اسفنجی نفوذ سلول‌های بافت بلاستما با ایجاد استتاله‌هایی سعی در تخریب داربست ECM غضروف مفصلی و نفوذ به آن را داشتند. (شکل ۶). اما سوال این است که چه عاملی سبب تخریب داربست در هنگام نفوذ سلول‌ها به آن می‌شود. طبق مطالعات انجام شده بر روی سلول‌های توموری در حال تهاجم، یکی از دلایل تخریب ECM در هنگام مهاجرت سلول‌ها، متالوپروتئینازهای ماتریکس (MMPs) هستند. جالب این جاست که یکی از فاکتورهای لازم در فعال کردن MMPs، پاهای کاذب تهاجمی (invadopodia) در سلول‌های توموری است. در حقیقت بیان MMPs در سلول‌های توموری و همچنین سلول‌های استرومایی اطراف تومور برای متاستاز و تهاجم توموری لازم هستند (۲۱). علاوه بر این سلول‌های بافت بلاستما در داربست ECM استخوان اسفنجی بیشتر به حاشیه تراپکولارها متصلند (شکل ۴).

روز ۲۰ام بعد از کشت با تخریب و نفوذ بیشتری از سلول‌های بافت بلاستمایی در درون داربست ECM غضروف مفصلی همراه است. نکته قابل توجه در این روز تشکیل توده‌های سلولی در

acellular matrix scaffold for in vivo cartilage tissue engineering with PKH26-labeled chondrogenic bone marrow-derived mesenchymal stem cells. *Biomaterials*. 2008 May;29(15):2378-87.

11. Cukierman E, Pankov R, Yamada KM. Cell interactions with three-dimensional matrices. *Curr Opin Cell Biol*. 2002 Oct;14(5):633-9.

12. Corcoran JP, Ferretti P. RA regulation of keratin expression and myogenesis suggests different ways of regenerating muscle in adult amphibian limbs. *J Cell Sci*. 1999 May;112 (Pt 9):1385-94.

13. Brookes JP, Kumar A. Plasticity and reprogramming of differentiated cells in amphibian regeneration. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2002 Aug;3(8):566-74.

14. Tsonis PA. Regeneration in vertebrates. *Dev Biol*. 2000 May 15;221(2):273-84.

15. Goss RJ, Grimes LN. Epidermal downgrowths in regenerating rabbit ear holes. *J Morphol*. 1975 Aug;146(4):533-42.

16. Gardiner DM, Muneoka K, Bryant SV. The migration of dermal cells during blastema formation in axolotls. *Dev Biol*. 1986 Dec;118(2):488-93.

17. Mahdavi-Shahri NN, F. Kheirabadi, M. Babaie, S. Sadeghie, F. Azarniya, M. The Ultra Structure Study of Blastema in Pinna Tissues of Rabbits with Transmission Electron Microscope. *J Biol Sci*. 2008;8:993-1000.

18. Badylak SF, Freytes DO, Gilbert TW. Extracellular matrix as a biological scaffold material: Structure and function. *Acta Biomater*. 2009 Jan;5(1):1-13.

19. Elder BD, Eleswarapu SV, Athanasiou KA. Extraction techniques for the decellularization of tissue engineered articular cartilage constructs. *Biomaterials*. 2009 Aug;30(22):3749-56.

20. Otzen DE. Protein unfolding in detergents: effect of micelle structure, ionic strength, pH, and temperature. *Biophys J*. 2002 Oct;83(4):2219-30.

21. Hofmann UB, Eggert AA, Blass K, Brocker EB, Becker JC. Expression of matrix metalloproteinases in the microenvironment of spontaneous and experimental melanoma metastases reflects the requirements for tumor formation. *Cancer Res*. 2003 Dec 1;63(23):8221-5.

22. Reing JE, Zhang L, Myers-Irvin J, Cordero KE, Freytes DO, Heber-Katz E, et al. Degradation products of extracellular matrix affect cell migration and proliferation. *Tissue Eng Part A*. 2009 Mar;15(3):605-14.

23. Gilbert TW, Sellaro TL, Badylak SF. Decellularization of tissues and organs. *Biomaterials*. 2006 Jul;27(19):3675-83.

بطوریکه در این تحقیق رفتارهایی همچون چسبندگی، تکثیر، قطبیت و حتی مرگ سلولی قابل مشاهده بود.

تشکر و قدردانی

پژوهشگران بر خود لازم می‌دانند مراتب سپاس و امتنان خود را از حوزه معاونت پژوهشی دانشگاه فردوسی مشهد بخاطر تامین بخشی از هزینه‌های این تحقیق که از محل گرانت پژوهشی مربوط به فرم شماره ۲ بنام "مطالعات تجربی و مقدماتی آماده سازی نیمه صنعتی داربست‌های سه بعدی (Bioscaffold یا 3D matrix) به منظور کاربرد در مهندسی بافت" فراهم گردیده ابراز نماید.

منابع

1. Yamada KM, Cukierman E. Modeling tissue morphogenesis and cancer in 3D. *Cell*. 2007 Aug 24;130(4):601-10.
2. Even-Ram S, Yamada KM. Cell migration in 3D matrix. *Curr Opin Cell Biol*. 2005 Oct;17(5):524-32.
3. Birgersdotter A, Sandberg R, Ernberg I. Gene expression perturbation in vitro--a growing case for three-dimensional (3D) culture systems. *Semin Cancer Biol*. 2005 Oct;15(5):405-12.
4. Nelson CM, Bissell MJ. Of extracellular matrix, scaffolds, and signaling: tissue architecture regulates development, homeostasis, and cancer. *Annu Rev Cell Dev Biol*. 2006;22:287-309.
5. Kim BS, Mooney DJ. Development of biocompatible synthetic extracellular matrices for tissue engineering. *Trends Biotechnol*. 1998 May;16(5):224-30.
6. Holmbeck K, Szabova L. Aspects of extracellular matrix remodeling in development and disease. *Birth Defects Res C Embryo Today*. 2006 Mar;78(1):11-23.
7. Discher D, Dong C, Fredberg JJ, Guilak F, Ingber D, Janmey P, et al. Biomechanics: cell research and applications for the next decade. *Ann Biomed Eng*. 2009 May;37(5):847-59.
8. 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 Jul;27(7):937-42.
9. Hazgui S, Bonnet N, Cutrona J, Nawrocki-Raby B, Polette M, Chouchane L, et al. 3D culture model and computer-assisted videomicroscopy to analyze migratory behavior of noninvasive and invasive bronchial epithelial cells. *Am J Physiol Cell Physiol*. 2005 Dec;289(6):C1547-52.
10. Yang Q, Peng J, Guo Q, Huang J, Zhang L, Yao J, et al. A cartilage ECM-derived 3-D porous