

Histological study of the interactions between blastema tissue originated from the pinna of New Zealand white rabbit and natural 3D elastic scaffold *in vitro*

Kazemi T, M.Sc^{1*}, Mahdavi Shahri N, Ph.D², Moghadam Matin M, Ph.D³,
Fereidouni M, Ph.D⁴, Kazemi SH, M.Sc⁵

1- Graduated student of cell developmental biology, biology group, faculty of science, Mashad Ferdowsi University

2- Biology group, faculty of science, Mashad Ferdowsi University

3- Biology group, faculty of science, Mashad Ferdowsi University

4- Biology group, faculty of science, Mashad Ferdowsi University

5- Ph.D. Student, Member of chemistry group, faculty of science, Mashad Ferdowsi University

* Email corresponding author: Tahmineh_kazemi@yahoo.com

Received: 18 Jan. 2011

Accepted: 20 Apr. 2011

Abstract

Aim: The aim was to investigate the interactions and cellular behavior of the blastema tissue and natural 3D elastic scaffold *in vitro*.

Material and Methods: In this study cows aorta was used as a scaffold. To prepare a very porous elastic scaffold, the cells and collagen were removed by treating that with 50 mg/ml cyanogen bromide in 70% formic acid. The prepared scaffold were then placed inside the blastema rings and kept in culture media for 40 days. The interaction between blastema tissues and elastic scaffolds were studied in 10 days intervals.

Results: Microscopic studies in different day on blastema tissue and scaffold revealed that the cells and collagen fibers were omitted successfully from the elastic scaffold. Moreover, histological studies indicated that the cells had penetrated into the scaffold. In addition cell division, probable differentiation of blastema cells to fibroblast and myocyte and also angiogenesis due to inductive effect of elastic scaffold were observed.

Conclusion: Our results indicated that, it is possible to prepare a natural elastic scaffold from aorta by treatment with cyanogen bromide. On the other hand, this scaffold may have inductive effects on cell behaviors such as migration, adhesion, cell division and probably differentiation. Further studies are required to confirm the identity of cells and other properties of the scaffold and also its possible use in engineering of vascular tissue.

Key words: Blastema Tissue, Decellularization, Differentiation, 3D Matrix

مطالعه هیستولوژیکی اثر متقابل بافت بلاستمای لاله گوش خرگوش نژاد نیوزلندی و داربست سلول زدایی شده سه بعدی طبیعی الاستیک در شرایط *in vitro*

تهمینه کاظمی. ^۱M.Sc.*، ناصر مهدوی شهری. ^۲Ph.D.^۱، مریم مقدم متین. ^۳Ph.D.، مسعود فریدونی. ^۴Ph.D.،
سید حسن کاظمی. ^۵M.Sc.

- ۱- دانش آموخته کارشناس ارشد زیست شناسی سلولی تکوینی، گروه زیست شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه فردوسی مشهد
- ۲- گروه زیست شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه فردوسی مشهد
- ۳- گروه پژوهشی سلولی مولکولی، پژوهشکده فناوری زیستی، دانشکده علوم، دانشگاه فردوسی مشهد
- ۴- گروه زیست شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه فردوسی مشهد
- ۵- دانشجوی دکتری، گروه شیمی، دانشکده علوم، دانشگاه فردوسی مشهد

* پست الکترونیک نویسنده مسئول: Tahmineh_kazemi@yahoo.com

تاریخ پذیرش: ۱۳۹۰/۱/۳۱

تاریخ دریافت: ۱۳۸۹/۱۰/۲۸

چکیده

هدف: هدف از این پژوهش بررسی برهم کنش و رفتارهای سلولی بافت بلاستما در مجاورت داربست آئورتی بود.

مواد و روش‌ها: در این تحقیق آئورت گاو به عنوان داربست استفاده شد. ابتدا سلول‌ها و کلاژن بافت آئورت با استفاده از محلول برمید سیانوژن و فرمیک اسید حذف گردید تا داربستی بسیار متخلخل به دست آید. سپس داربست‌های تهیه شده درون حلقه‌هایی از بافت بلاستمایی که تجمعی از سلول‌های تمایز نیافته با قابلیت تقسیم و تمایز سلولی مشابه با سلول‌های بنیادی جنینی می‌باشند، قرار داده شده و در محیط کشت به مدت ۴۰ روز نگهداری شدند. سپس ارتباط بین بافت بلاستما و داربست الاستیک به فاصله هر ۱۰ روز مورد بررسی قرار گرفت.

نتایج: مطالعات میکروسکوپی در مورد بلاستما و داربست همراه آن در روزهای مختلف کشت، علاوه بر تایید حذف سلول‌ها و رشته‌های کلاژن، نفوذ تدریجی سلول‌های بلاستمایی به داخل داربست الاستیک و تغییراتی از قبیل رگزایی، شکل‌گیری بافت همبند و تمایز احتمالی سلول‌های بلاستمایی به فیبروبلاست و میوسیت در اثر القاء داربست الاستیک را نشان داد.

نتیجه‌گیری: نتایج نشان دادند که امکان تهیه یک داربست طبیعی الاستیک از آئورت به وسیله تیمار با برمید سیانوژن وجود دارد. از طرف دیگر، این داربست می‌تواند دارای اثر القایی بر رفتارهای سلولی از قبیل مهاجرت، چسبندگی، تقسیم و احتمالاً تمایز باشد. هرچند مطالعات بیشتری برای اثبات هویت سلول‌ها و سایر ویژگی‌های این داربست و همچنین امکان استفاده از آن در روش‌های مهندسی بافت عروقی مورد نیاز است.

واژگان کلیدی: بافت بلاستمایی، تمایز، داربست سه بعدی، سلول زدایی

مقدمه

در بسیاری از عرصه‌های پزشکی یکی از متداول‌ترین راه‌حل‌های نقص عضو یا بافت، پیوند آن‌ها از اهدا کنندگان است. این اهدا کننده می‌تواند خود بیمار باشد یا افرادی که از نظر ایمنولوژیک با فرد بیمار مشابه می‌باشند. حتی در مورد پیوند اعضا حیوانات به انسان نیز تلاش‌هایی صورت گرفته است (۱ و ۲). یکی از بزرگ‌ترین مشکلات پیوند اندام، کمبود بافت یا اندام دهنده می‌باشد. آنچه در این روند مورد نیاز است فراهم‌سازی تسهیلات یا تکنیکی جهت القاء ترمیم و بازسازی در بافت آسیب دیده است تا بتواند خود را ترمیم کند (۳).

امروزه با توجه به تعداد کم اهدا کنندگان بافت و آلودگی‌های ویروسی آن، سعی در طراحی بافت به کمک سلول و داربست‌های گوناگون اعم از طبیعی یا سنتزی شده است. این امر منتهی به ایجاد مفهومی جدید در علم شده که مهندسی بافت خوانده می‌شود (۴). هدف از مهندسی بافت تقلید از طبیعت برای حل محدودیت‌های معالجات کلینیکی و درمانی است (۴ و ۵).

یکی از معضلات اصلی بهداشتی در کشورهای مختلف، بیماری‌های قلبی-عروقی است که علیرغم پیشرفت‌های اخیر در درمان بیماری‌های قلبی، میزان بروز، بستری و مرگ و میر ناشی از آن در حال افزایش است (۶). به منظور بهبود و افزایش طول عمر این بیماران و ارتقاء سلامت جامعه، محققان با توجه به اصول مهندسی بافت سعی در ایجاد بافت‌های قلبی-عروقی مانند دریچه‌های قلبی، ماهیچه‌های قلبی، پری‌کاردیوم و رگ‌ها دارند (۷ و ۸). ایجاد رگ‌های زیست‌سازگار با ابعاد مناسب به منظور جایگزینی با رگ‌های محیطی و عروق کرونر آسیب دیده هدف اصلی مهندسی بافت عروقی است (۹، ۱۰، ۱۱، ۱۲، ۱۳، ۱۴ و ۱۵). روشی که امروزه بیشتر در مهندسی بافت عروقی متداول است، کشت سلول‌ها روی یک داربست سه بعدی در شرایط *in vitro* است. این داربست‌ها به عنوان یک پشتیبان فیزیکی و قالبی برای اتصال سلول‌ها و تکوین بافت عمل می‌کنند. استخراج مواد طبیعی از ترکیبات ماتریکس خارج سلولی و ساخت داربست‌های طبیعی با استفاده از پروتئین‌های تخلیص شده از ماتریکس خارج سلولی روشی است که به صورت گسترده‌ای در مهندسی بافت استفاده می‌شود (۱۶). الاستین، یکی از عمده‌ترین پروتئین‌های ماتریکس خارج سلولی مهره‌داران و سازنده رشته‌های الاستیک است. الاستین در آنورت، شش‌ها، مثانه و پوست یافت شده و تخمین زده می‌شود که تا ۵۰ درصد

وزن خشک رگ‌ها را تشکیل می‌دهد (۱۷). با توجه به گسترش بیماری‌های عروقی و تلاش برای ایجاد رگ‌های خونی به روش مهندسی بافت، استفاده از داربست‌های الاستینی در سطح دنیا مورد توجه قرار گرفته است. در تحقیق حاضر، قابلیت مهاجرت و تمایز سلول‌های بافت بلاستمایی که طی پدیده ترمیم در بخش‌هایی از بدن برخی جانوران مثل خرگوش نیوزلندی ایجاد می‌گردند و از نظر قابلیت تکثیر و تمایز، بسیار مشابه سلول‌های جنینی بوده و قادرند تحت تأثیر عوامل مختلف به انواعی از سلول‌های تخصص یافته تمایز یابند (۱۸ و ۱۹)، در مجاورت داربست سه بعدی طبیعی آنورت با توجه به خصوصیات القایی این داربست بر روی سلول‌ها مورد بررسی قرار گرفته است. به عبارت دیگر دیواره آنورت به عنوان یک داربست برای کشت سلول‌های بلاستمایی استفاده شد تا بر هم کنش بین بافت بلاستما و داربست آنورتی به کار برده شده مشخص گردد. علاوه بر آن در سیر تکوین بافت بلاستما همراه با این داربست چه بافت‌ها و چه رفتارهای سلولی احتمالی مشاهده خواهد شد و سلول‌های بلاستمایی تحت تاثیر القاء داربست به چه سلول‌هایی تمایز خواهند یافت مورد بررسی قرار گرفت.

مواد و روش‌ها

به منظور تهیه یک داربست طبیعی سه بعدی الاستیک، باید بافتی از بدن انتخاب می‌شد که رشته‌های الاستیک یکی از اجزاء اصلی تشکیل دهنده آن باشد. علاوه بر این، بافت انتخاب شده باید از جهت تهیه داربست در ابعاد و تعداد دلخواه نیز مناسب می‌بود. به همین دلیل آنورت گاو به علت بزرگ و قطور بودن به عنوان بافت منبع تهیه داربست الاستیک انتخاب گردید و قطعاتی استوانه‌ای شکل از این بافت با ابعاد تقریبی ۵×۵ میلی‌متر به عنوان داربست جدا شدند. سپس با استفاده از محلول ۵۰ mg/ml برمید سیانوژن در اسید فرمیک ۷۰٪ سلول و کلاژن موجود در داربست‌های آماده حذف گردید تا علاوه بر تشکیل یک داربست متخلخل، ماهیت زیستی طبیعی یعنی الاستیک بودن داربست‌ها حفظ گردد. پس از آنکه مطالعات بافت شناسی کارآیی روش فیزیکی به کار رفته را در حذف اجزاء بافت شامل سلول‌ها، کلاژن، عضله و بافت همبند و باقی گذاشتن رشته‌های الاستین به اثبات رساند، اقدام به تهیه بافت بلاستمایی گردید تا با داربست آماده شده الحاق گردد.

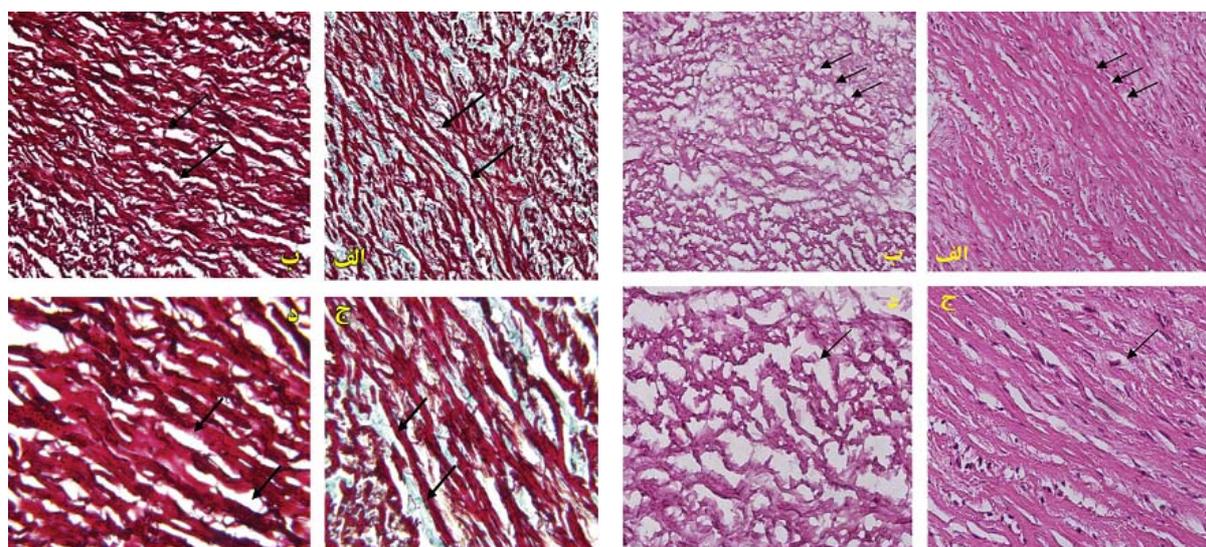
به منظور تهیه حلقه بلاستمایی، از گوش خرگوش نر نژاد نیوزلندی (*Oryctolagus cuniculus*) استفاده گردید و با

رنگ آمیزی با رنگ حیاتی آبی متیلن استفاده شد. پس از مراحل پاساژ بافتی و تهیه برش، نمونه‌ها با روش های هماتوکسیلین-اوتوزین، اورسئین- پیک ایندیگو کارمین- هماتوکسیلین و آلسیان بلو- پاس رنگ آمیزی شدند. سپس مطالعات هیستولوژیکی صورت گرفتند.

نتایج

نتایج مطالعه حاضر نشان داد که یک داربست سلول زدایی شده، متشکل از یک پروتئین خالص ماتریکس خارج سلولی می تواند از بافت آئورت تهیه شود، بدون اینکه ساختار طبیعی آن به هم بخورد. با تیمار آئورت توسط برمید سیانوژن تمام سلول ها و کلاژن از آئورت تازه حذف شده (شکل ۱-۱ و ۱-۲)؛ در نتیجه داربست الاستینی حاصل گردید که از لایه های متعدد فیبرهای هم مرکز با ساختاری تقریباً مشابه با لایه الاستیک آئورت طبیعی تشکیل یافته و دارای ویژگی های مورد نیاز برای استفاده در مهندسی بافت است.

استفاده از انبرهای ویژه، سوراخ هایی به قطر ۲ میلی متر در مناطق میانی گوش دور از عروق خونی ایجاد گردید. ۴۸ ساعت پس از پانچ اول، بافت اطراف سوراخ توسط انبری با قطر ۴/۵ میلی متر به صورت یک حلقه برداشته شد. بلافاصله پس از برداشت حلقه ها، مراحل شستشوی بافت روی آنها انجام پذیرفت. مراحل شستشو در حیوان خانه و آزمایشگاه توسط سرم فیزیولوژی صورت پذیرفت و تنها در آخرین مرحله شستشو در زیر هود و قبل از انتقال حلقه ها به پلیت های ۶ خانه، شستشو با محیط کشت انجام گرفت. یک روز قبل از جداسازی و شستشوی حلقه های بلاستمایی، داربست های آماده شده با سرم فیزیولوژی، محلول فسفات بافر سالین و در مرحله آخر با محیط کشت شستشو و پس از اینکه ۲۴ ساعت در محیط کشت در انکوباتور قرار داده شدند، به حلقه های بلاستمایی شستشو و آماده شده الحاق گردیدند. نمونه های مذکور تا ۴۰ روز در انکوباتور با دمای ۳۷ درجه سانتی گراد و ۵ درصد CO₂ نگهداری شدند. سلول های بلاستمایی حدود ۱۰ روز پس از قرارگیری حلقه های بلاستمایی در محیط کشت، از حلقه ها ریزش می کنند، بنابراین پس از طی این مدت و در روزهای دهم، بیستم، سی ام و چهلم پس از کشت اقدام به برداشتن حلقه ها و داربست درون آن از محیط کشت گردید. در ابتدا پس از برداشت هر یک از نمونه ها از محیط کشت، برای مطالعه اینکه آیا سلول های بلاستمایی در سطح داربست آئورت زنده مانده و حضور دارند، از



شکل ۱- (راست): مشاهده حذف سلول ها و در هم ریختن نظم رشته ها در نمونه تست و منفذ دار شدن آن (ب و د) در مقایسه با نمونه کنترل (الف و ج). برخی فضاهای خالی ناشی از حذف سلول ها در تصاویر با پیکان مشخص شده اند. (رنگ آمیزی هماتوکسیلین-اوتوزین. الف و ب درشت نمایی ۲۰X و ج و د درشت نمایی ۴۰X)

شکل ۱-۲ (چپ): مشاهده حذف کلاژن و سلول های ماهیچه صاف از نمونه تست (ب و د) در مقایسه با نمونه کنترل (الف و ج). حذف کلاژن و سلول ها از فضای بین رشته های الاستیک در تصاویر با پیکان مشخص شده است. (رنگ آمیزی اورسئین- پیک ایندیگو کارمین- هماتوکسیلین. الف و ب درشت نمایی ۲۰X و ج و د درشت نمایی ۴۰X)

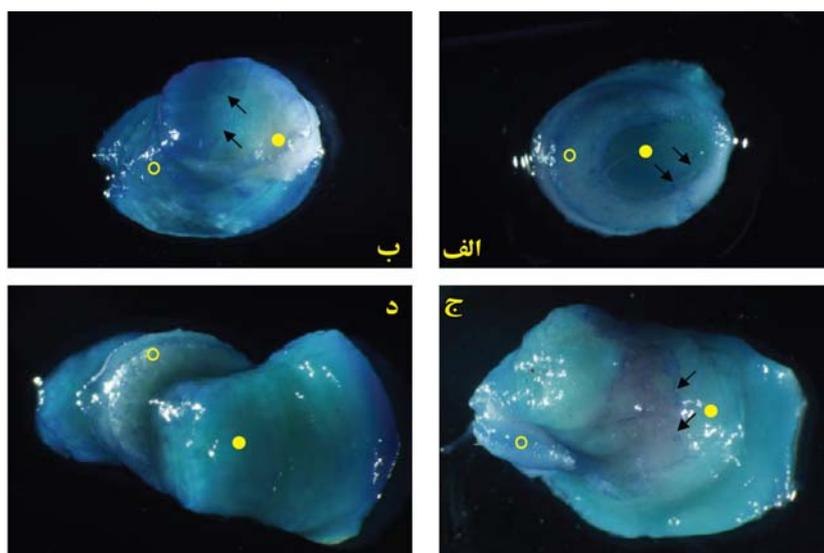
روز بیستم پس از کشت، نفوذ سلول‌های بلاستمایی به لایه‌های درونی داربست افزایش یافته و از تراکم سلول‌ها در حاشیه داربست که در روز دهم مشاهده می‌شود، کاسته شده بود. همچنین در این روز، اپیتلیوم رگی در داربست مشاهده گردید. بنابراین، می‌توان نتیجه گرفت داربست آماده شده توانسته زمینه لازم برای رگ‌زایی را فراهم کند. احتمالاً القای رگ‌زایی توسط فاکتورهای رشد فیبروبلاستی صورت گرفته که از فاکتورهای اصلی روند رگ‌زایی می‌باشند. علاوه بر مشاهده فیبروبلاست‌ها به تعداد فراوان، سلول‌هایی با ویژگی‌های میوسیت نیز مشاهده شد (شکل ۴).

ممکن است این سلول‌ها از میوفیبرو بلاست‌ها حاصل شده باشند. میوفیبروبلاست‌ها از تغییر شکل و ساختار فیبروبلاست‌ها حاصل می‌گردند و خصوصیات فیبروبلاست و عضله صاف را دارا می‌باشند؛ و علاوه بر دارا بودن ویژگی‌های مورفولوژیک یک فیبروبلاست، حاوی مقدار زیادی ریز رشته اکتین و میوزین نیز می‌باشند که مانند عضلات صاف عمل می‌کنند. البته خود سلول‌های بلاستمایی، ویژگی‌هایی مشابه سلول‌های مزانشیمی دارند و احتمال دارد که به صورت مستقیم به میوسیت تمایز یافته باشند. در روز بیستم، تشکیل رشته‌های کلاژن و بافت همبند نسبت به روز دهم افزایش یافته و فواصل بین رشته‌های الاستین، توسط رشته‌های کلاژن پر شده است (شکل ۴).

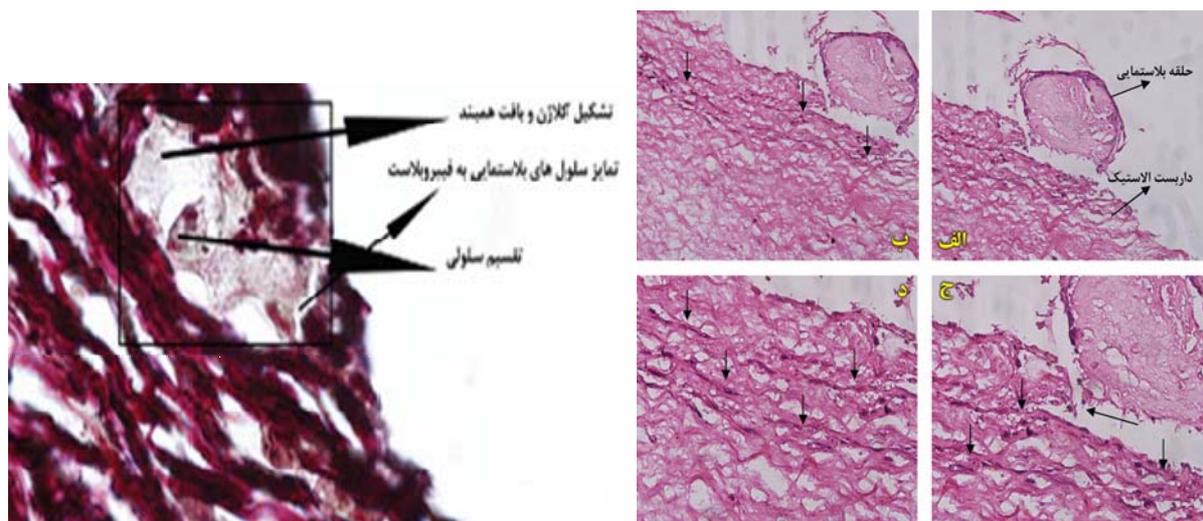
این داربست، دارای تخلخل مناسب بوده و سمیتی نشان نداد. علاوه بر این، سطح و ترکیب داربست توانست موجب چسبندگی، تکثیر و نفوذ سلول‌ها به درون داربست شود، ضمن اینکه ترکیب داربست تا روز چهارم کشت هیچ گونه تغییر و از هم پاشیدگی نشان نداد. به همین دلیل به نظر می‌رسد این داربست می‌تواند برای مدت طولانی نگهداری شده و به دلیل خاصیت ارتجاعی بالایی که دارد، به عنوان جایگزینی برای بافت‌هایی که قابلیت انبساط دارند استفاده گردد.

رنگ آمیزی سلول‌ها با رنگ حیاتی آبی متیلن، زنده بودن و حضور سلول‌ها در سطح داربست را در روزهای دهم، بیستم و سی‌ام پس از کشت تایید کرد، در حالی که در روز چهارم پس از کشت، سلولی در سطح داربست مشاهده نگردید. به نظر می‌رسد در این روز سلول‌های بلاستمایی از بین رفته‌اند (شکل ۲).

مطالعات بافت شناسی در روز دهم پس از کشت، نشان داد که سلول‌های بلاستمایی در قسمت‌های ابتدایی داربست که در مجاورت حلقه بلاستمایی قرار داشته، نفوذ کرده‌اند (شکل ۳-۱). علاوه بر این در سطح داربست، سلول‌های فیبروبلاستی مشاهده می‌شوند که به صورت نرمال فعالیت داشته و رفتارهایی مانند تقسیم سلولی در آن‌ها مشاهده گردید (شکل ۳-۲). همچنین فیبروبلاست‌ها، رشته‌های کلاژن را ساخته‌اند که به خوبی در سطح داربست مشاهده می‌شود. می‌توان نتیجه گرفت که القاء داربست الاستینی موجب تمایز سلول‌های بلاستمایی در روز دهم پس از کشت به فیبروبلاست، هر چند به تعداد اندک شده است.



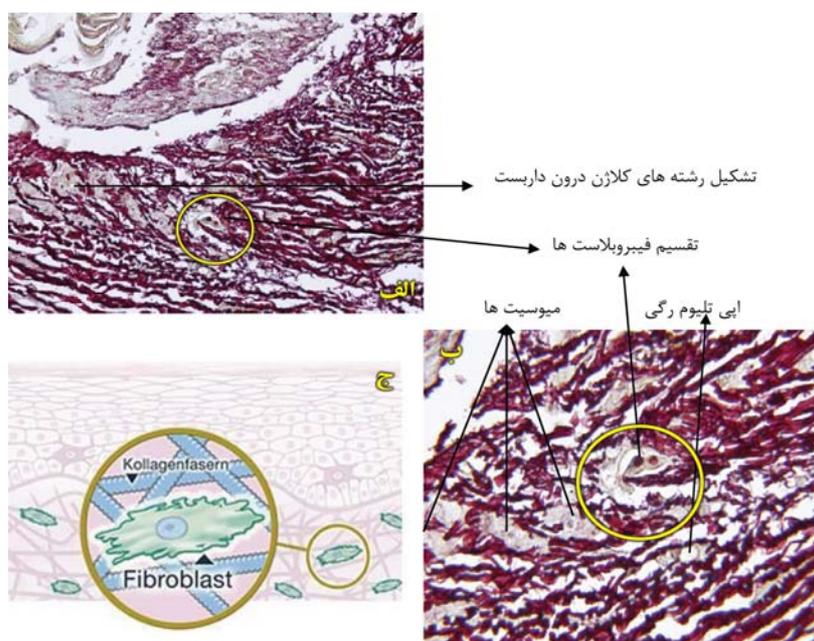
شکل ۲: مشاهده حضور سلول‌های بلاستمایی در سطح داربست آنورث در روزهای دهم (الف)، بیستم (ب) و سی‌ام (ج) پس از کشت. در روز چهارم (د) پس از کشت، سلولی در سطح داربست مشاهده نمی‌شود. سلول‌ها در سطح داربست الاستیک با پیکان مشخص شده‌اند. (رنگ آمیزی آبی متیلن و مشاهده با استرنو میکروسکوپ: عدسی ۱، زوم ۲) در تصاویر، حلقه بلاستمایی با دایره توخالی و داربست الاستیک با دایره توپر مشخص شده‌اند.



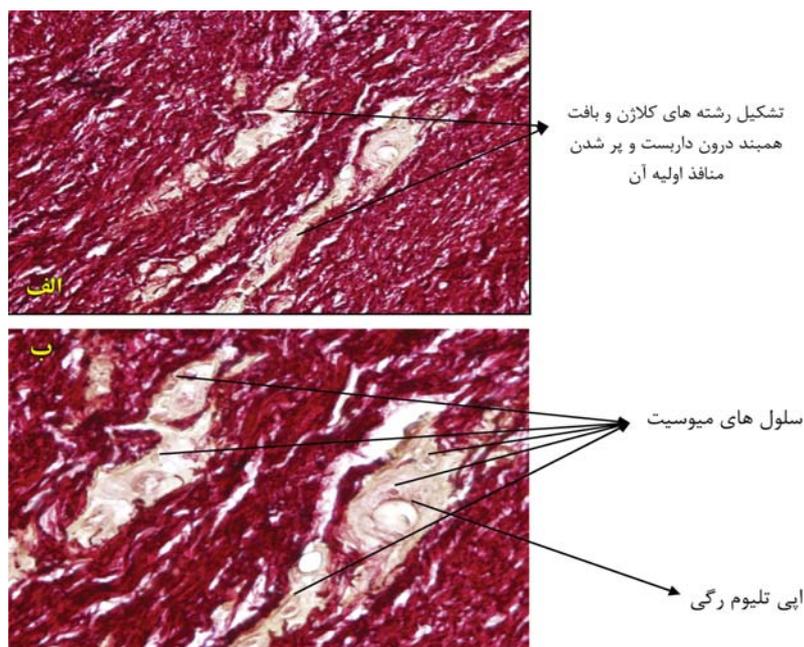
شکل ۳- (راست): مشاهده مهاجرت سلول ها از حلقه بلاستمای به درون داربست و نفوذ آن ها در قسمت های ابتدایی داربست. سلول های بلاستمای در تصاویر ب، ج و د با پیکان مشخص شده اند. (رنگ آمیزی هماتوکسیلین-انوزین. الف و ب درشت نمایی $20\times$ و ج و د درشت نمایی $40\times$)
شکل ۳- (چپ): مشاهده نفوذ، تقسیم و تمایز سلول های بلاستمای به فیبروبلاست و تشکیل بافت همبند. (رنگ آمیزی اورسئین- پیک ایندیگو کارمین- هماتوکسیلین. درشت نمایی $100\times$)

یافته باشند. در روز بیستم، تشکیل رشته های کلژن و بافت همبند نسبت به روز دهم افزایش یافته و فواصل بین رشته های الاستین، توسط رشته های کلژن پر شده است (شکل ۴).
مشابه با روز بیستم، در روز سی ام پس از کشت نیز میوسیت ها در سطح داربست مشاهده شدند. در این روز فیبروبلاستی در سطح داربست مشاهده نگردید و علاوه بر تشکیل اپیتلیوم رگی، رشته های کلژن و بافت همبند در تمام سطح داربست به صورت واضحی مشاهده شدند. (شکل ۵).

ممکن است این سلول ها از میوفیبروبلاست ها حاصل شده باشند. میوفیبروبلاست ها از تغییر شکل و ساختار فیبروبلاست ها حاصل می گردند و خصوصیات فیبروبلاست و عضله صاف را دارا می باشند؛ و علاوه بر دارا بودن ویژگی های مورفولوژیک یک فیبروبلاست، حاوی مقدار زیادی ریز رشته اکتین و میوزین نیز می باشند که مانند عضلات صاف عمل می کنند. البته خود سلول های بلاستمای، ویژگی هایی مشابه سلول های مزانشیمی دارند و احتمال دارد که به صورت مستقیم به میوسیت تمایز



شکل ۴: مشاهده تشکیل رشته های کلژن درون داربست، وجود سلول های فیبروبلاستی درون داربست و تقسیم آن ها، تشکیل رشته های بافت همبند توسط فیبروبلاست ها و تشکیل اپی تلیوم رگی (الف و ب). (رنگ آمیزی اورسئین- پیک ایندیگو کارمین- هماتوکسیلین. الف درشت نمایی $20\times$ و ب درشت نمایی $40\times$). تصویر ج، طرحی شماتیک از یک سلول فیبروبلاستی در حال کلژن زایی می باشد.

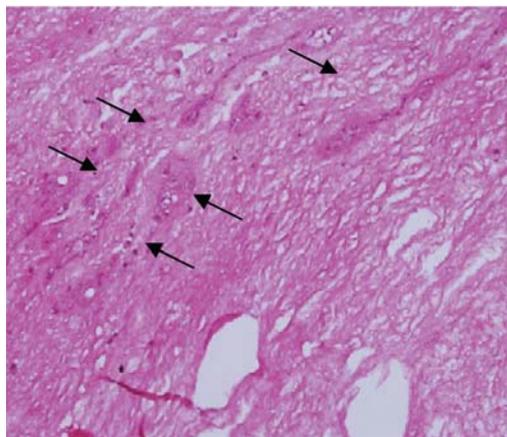


شکل ۵: مشاهده تشکیل بافت همبند، اپیتلیوم رگی و میوسیت درون داربست در روز سی ام پس از کشت. (رنگ آمیزی اورسئین- پیک ایندیگو کارمین- هماتوکسیلین، الف درشت نمایی ۲۰X و ب درشت نمایی ۴۰X)

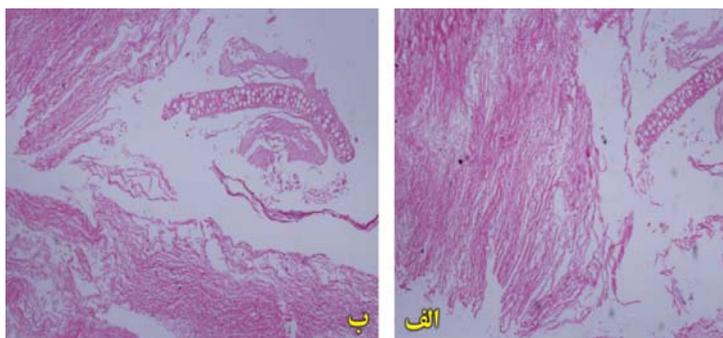
در روز چهارم، بر خلاف روزهای قبل، سلول چندانی در سطح داربست قابل مشاهده نبود. به نظر می رسد بازه زمانی بین ۱۰ تا ۳۰ روز مناسب ترین زمان جهت نگهداری و تمایز سلول ها بوده و در روز چهارم بنا به دلایلی از قبیل تخریب بافتی و مرگ سلولی، سلول ها از بین رفته اند (شکل ۷).

به موازات این رویدادها، حلقه بلاستمای نیز از روز دهم تا روز سی ام تغییر کرده و بافت غضروفی در آن تشکیل شده که به تدریج تا روز سی ام گسترش بیشتری یافته است. همچنین اپیتلیوم زایی در بافت بلاستما مشاهده می شود. در روز سی ام پس از کشت، از هم پاشیدگی نسبی بافت بلاستما قابل مشاهده بود (شکل ۸).

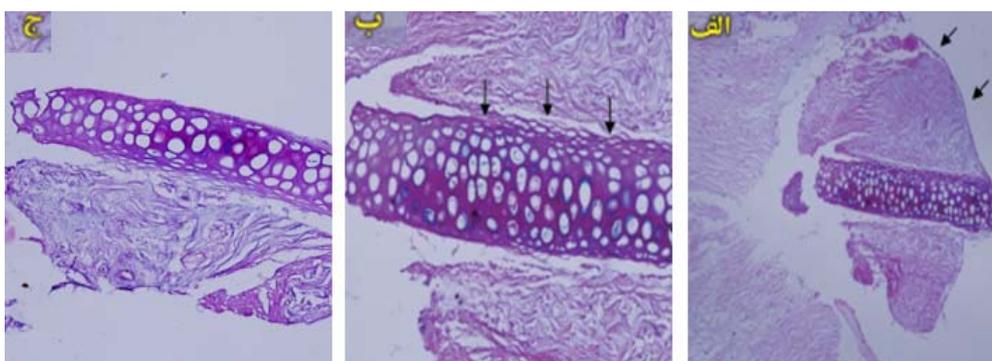
به نظر می رسد تا روز سی ام پس از کشت، یک ماتریکس خارج سلولی کاملاً جدید شامل رشته های کلاژن، رشته های الاستیک، بافت همبند، سلول های پیش ساز عضلات، مویرگ و... در داربست الاستینی تشکیل یافته است. به عبارتی بافت آئورت که تمام اجزاء آن به غیر از الاستین حذف شده بودند، مجدداً ساختاری تقریباً مشابه با حالت طبیعی اولیه خود به دست آورده است. در روز سی ام، گسترش سلول ها در سطح داربست افزایش یافته و نفوذ سلول ها تا قسمت های میانی و انتهایی داربست قابل مشاهده است (شکل ۶). نفوذ سلول ها به درون داربست از روز دهم تا روز سی ام به صورت تدریجی افزایش یافته و سطح گسترش سلول ها در هر مرحله نسبت به مرحله قبل بیشتر شده است.



شکل ۶: در روز سی ام پس از کشت، نفوذ سلول ها به درون داربست و گسترش آن ها تا قسمت های میانی و انتهایی آن مشاهده شد. پر شدن داربست الاستیک توسط سلول ها و رشته های کلاژن با پیکان مشخص شده است. (رنگ آمیزی هماتوکسیلین- اتوزین، درشت نمایی ۲۰X)



شکل ۷: از هم پاشیدگی حلقه بلاستمایی و عدم حضور سلول ها درون داربست در روز چهارم پس از کشت. (الف و ب رنگ آمیزی هماتوکسیلین-ائوزین، درشت نمایی ۱۰X)



شکل ۸: مشاهده تغییرات بلاستما در روز بیستم پس از کشت (الف و ب). تشکیل اپی تلیوم جدید و غضروف زایی در حلقه بلاستمایی به خوبی قابل مشاهده بود (ب و ج). در تصویر الف، اپی تلیوم جوان و در تصویر ب، بافت غضروفی و کندروسیت ها با پیکان مشخص شده اند. از هم پاشیدگی نسبی بافت بلاستما در روز سی ام، در تصویر ج قابل مشاهده است. (رنگ آمیزی آلسیان بلو- پاس. الف درشت نمایی ۱۰X، ب درشت نمایی ۴۰X و ج درشت نمایی ۲۰X)

به جراحی‌های مکرر با ریسک بالا و هزینه زیاد برای بیمار نیز وجود دارد. علاوه بر این، عروق پیوندی که ضخامت دیواره آنها کم است معمولا در جریان پیوند آسیب می‌بینند و خود فرد بیمار نیز ممکن است به دلایلی از قبیل قطع عضو و جایگزینی مکرر عروق فاقد عروق مناسب به منظور پیوند باشد (۲۵).

به نظر می‌رسد بافت‌های طبیعی پتانسیل بالایی به عنوان جایگزین‌های قلبی-عروقی داشته باشند. استفاده از بافت‌های طبیعی انسان و حیوانات مختلف در تحقیقات زیادی مورد بررسی قرار گرفته است (۲۷). نتایج نشان می‌دهد که مواد زیستی طبیعی معمولا به یک تیمار قلبی فیزیکی یا شیمیایی نیاز دارند تا آنها را از تجزیه زیستی حفظ کند، ایمنی زایی آنها را کاهش دهد و همچنین بافت را استریلیزه کند. روش‌های مختلفی به این منظور مورد بررسی قرار گرفته تا در نهایت روشی بهینه که در عین حفظ یکپارچگی مکانیکی بافت و حفظ ماهیت طبیعی آن، اهداف فوق را نیز برآورده سازد، یافت شود.

بحث

سالانه حدود ۶۰۰۰۰۰ رگ پیوندی جایگزین عروق آسیب دیده می‌شوند (۲۰). شریان‌ها عموما در اثر تشکیل پلاک‌های آترواسکلروزی آسیب می‌بینند که باعث تنگ شدن لومن رگ و در نتیجه صدمه دیدن لایه اندوتلیال می‌گردد. این آسیب‌ها در نهایت باعث ایجاد لخته خون و جلوگیری از جریان خون می‌شوند. هرچند از مواد سنتزی مختلفی برای ساخت عروق مصنوعی استفاده می‌شود، اما اغلب این مواد برای جایگزینی عروق با قطر کم چندان مناسب نیستند، چون احتمال ایجاد لخته خونی را افزایش می‌دهند. به همین دلیل برای جایگزینی عروق آسیب دیده، عموما از رگ‌های سالم خود فرد بیمار استفاده می‌شود (۲۱ و ۲۲). استفاده از عروق سایر افراد برای جایگزینی با عروق فرد بیمار، در شرایطی که فرد فاقد عروق مناسب برای پیوند است نیز در مواردی انجام می‌گیرد. اما مشکلاتی از قبیل کمبود افراد دهنده و همچنین اتساع عروقی از مواردی است که استفاده از چنین پیوندهایی را محدود کرده است (۲۳ و ۲۴). با اینکه استفاده از عروق پیوندی خود فرد بیمار معمولا نتایج بهتری حاصل می‌کند، اما معایبی از قبیل نیاز

ساده سلول‌هایی با خاصیت بنیادی و قابلیت تمایز بالا است که بتوان از آن‌ها جهت سلول درمانی استفاده کرد. چنانچه بتوان مکانیسم‌ها و ژن‌های دخیل در ایجاد چنین سلول‌هایی را شناسایی کرد تا بتوان منبع سلولی مشابهی را در انسان به دست آورد، می‌توان با استخراج چنین سلول‌هایی راه‌هایی نوین برای درمان بسیاری از بیماری‌ها از جمله بیماری‌های قلبی-عروقی در آینده گشود. البته هنوز مسائل مهمی چون انتخاب منابع سلولی، ساخت داربست، کشت سلولی، محیط کشت، خواص مکانیکی داربست-سلول و مدل‌های حیوانی مناسب در این فرآیند مطرح هستند. بنا بر این چالش‌های عمده در این امر عبارتند از: تکنولوژی سلول، تکنولوژی ساختار و الحاق ساختارهای طراحی شده در سیستم زنده.

نتیجه گیری

نتایج مطالعه حاضر نشان داد که یک داربست سلول زدایی شده، متشکل از یک پروتئین خالص ماتریکس خارج سلولی می‌تواند از بافت آئورت تهیه شود، بدون اینکه ساختار طبیعی آن به هم بخورد. آئورت سلول زدایی شده گاو می‌تواند زمینه مناسب برای تکثیر سلولی را فراهم کرده و به عنوان یک داربست برای مهندسی بافت عروقی خصوصاً در مورد دریچه‌های قلبی و پیوندهای عروقی استفاده شود. هرچند سلول زدایی با روش‌های مختلفی انجام می‌شود، اما در این پژوهش با استفاده از یک روش فیزیکی نسبتاً ساده و ارزان، داربستی آماده شد که درصد تخلخل بالایی داشت و بنابراین مهاجرت و تکثیر سلولی را تسهیل نمود. داربست الاستینی آماده شده از تیمار آئورت تازه گاو با محلول برمید سیانوژن در فرمیک اسید به دست آمد. برمید سیانوژن می‌تواند موجب شکستگی در دنباله متیونین پروتئین‌ها شود. متیونین اسید آمینه‌ای است که در همه پروتئین‌ها از قبیل کلاژن وجود دارد، اما در الاستین حضور ندارد (۳۶). بنا بر این با استفاده از برمید سیانوژن، می‌توان همه اجزاء بافت به جز الاستین را حذف نمود. علاوه بر این، مطالعات بافتی در روز دهم نفوذ سلول‌های بلاستمایی به داخل داربست الاستیک را نشان داد. در روز بیستم علاوه بر نفوذ، تقسیم و تمایز احتمالی سلول‌های بلاستمایی به سلول‌های فیبروبلاستی و میوسیت مشاهده گردید. نتایج در روز سی‌ام مشابه با روز بیستم بود و علاوه بر آن، تغییراتی از قبیل رگ‌زایی و شکل‌گیری بافت همبند نیز دیده شد. در روز چهلیم، داربست و سلول‌های بلاستمایی احتمالاً به دلیل مرگ سلولی از بین رفتند. بنا بر این

در میان روش‌های مختلف، سلول زدایی روشی است که به اهداف مورد نظر نزدیک‌تر شده است. با استفاده از این روش، پاسخ‌های ایمنی کاهش یافته و همچنین موادی با ماهیت زیستی طبیعی ایجاد می‌شوند که برای کشت سلولی و کاربردهای مهندسی بافت مناسب هستند. مواد زیستی طبیعی امتیازات مکانیکی، شیمیایی و زیستی فراوانی نسبت به مواد مصنوعی دارند و به همین دلیل دارای پتانسیل چشمگیری به منظور کاربرد در درمان به روش مهندسی بافت می‌باشند (۲۵). روش‌های مختلفی از قبیل تیمار با دترجنت‌ها، هضم آنزیمی و روش‌های صوتی برای حذف سلول‌ها از بافت استفاده می‌شوند. عدم حذف کامل سلول‌ها از بافت می‌تواند باعث وقوع مشکلاتی شود، به عنوان مثال باقیمانده محتویات سلول‌ها و موادی از قبیل فسفولیپیدها، باعث کلسیفیه شدن بافت می‌شوند، زیرا این مواد می‌توانند با کریستال‌های کلسیمی پیوند برقرار کنند (۲۸، ۲۹، ۳۰، ۳۱ و ۳۲). همچنین باقیمانده سلول‌ها موجب پاسخ‌های ایمنی می‌گردند. به عنوان مثال حضور موادی مانند لیپیدها و پروتئوگلیکان‌های سلولی می‌تواند باعث پاسخ‌های ایمنی شوند (۳۳). علاوه بر این، حتی پس از حذف سلول‌ها و باقیمانده آنها، ماتریکس خارج سلولی بافت، سلول زدایی شده می‌تواند به تنهایی باعث ایجاد پاسخ‌های ایمنی شود (۳۴). در نتیجه، مطالعات پیشنهاد می‌کنند که گرچه حذف سلول‌ها باعث کاهش پاسخ‌های ایمنی می‌شود، اما ممکن است برای حذف کامل پاسخ‌های ایمنی و التهابی کافی نباشد و بهتر است موادی مانند فیبرونکتین نیز از ماتریکس خارج سلولی حذف گردند (۳۵). به طور کلی می‌توان گفت پروتئین‌های ماتریکس خارج سلولی از جمله موادی هستند که می‌توانند به عنوان یک داربست با ترکیب زیستی طبیعی و ساختار سه بعدی به صورت وسیعی در مهندسی بافت استفاده شوند. این داربست‌ها می‌توانند شبکه‌ای چند منظوره جهت ایجاد محیط زیستی خاص به منظور به دست آوردن ویژگی‌های بافتی و سلولی تحت شرایط فیزیولوژیکی ایجاد نمایند. علاوه بر این پاسخ‌های ایمنولوژیک را تحریک نکرده، برای سلول‌ها سمی نیستند و خاصیت هومئوستازی بالایی دارند. تحقیق حاضر نشان داد سلول‌های بلاستمایی تحت اثر القایی داربست سه بعدی طبیعی الاستیک، ساختاری مشابه با بافت آئورت اولیه ایجاد کرده اند. با اینکه سلول‌های بلاستمایی هنوز به طور کامل تعیین هویت نشده‌اند و قابلیت‌های تمایزی آن‌ها به طور کامل روشن نیست، اما نتایج حاصل از پژوهش‌های مختلف، امید بخش یافتن راهی‌های نوین در زمینه استخراج

10. Niklason LE, Gao J, Abbott WM. Functional arteries grown in vitro. *Science*. 1999; 284: 489-493.
11. Mitchell SL, Niklason LE. Requirement for growing tissue-engineered vascular grafts. *Cardiovascular Pathology*. 2003; 12: 59-64.
12. Daly CD, Campbell GR, Walker PJ, Campbell JH. In vivo engineering of blood vessels. *Front Bioscience*. 2004; 9: 1915-1924.
13. Borschel GH, Huang YC, Calve S. Tissue engineering of recellularized small diameter vascular grafts. *Tissue Engineering*. 2005; 11: 778-786.
14. Swartz DD, Russell JA, Andreadis ST. Engineering of fibrin-based functional and implantable small-diameter blood vessel. *Journal of Heart Physiology*. 2005; 288: 1451-1460.
15. Kietly CM. Elastic fibres in health and disease. *Expert Review Molecular Medicine*. 2006; 8: 123.
16. Lu Q, Ganesan K, Simionescu DT, Vyavahare RN. Novel porous aortic elastin and collagen scaffolds for tissue engineering. *Biomaterials*. 2003; 25: 5227-5237.
17. Debelle L, Tamburro AM. Elastin: molecular description and function. *Journal of Biochemistry and Cell Biology*. 1998; 31: 261-272.
18. Pietsch P. The effect of heteropic musculature on myogenesis during limb regeneration in amblystoma larva. *The Anatomical Record*. 1961; 741: 295-303.
19. Corcoran JP, Ferretti P. RA regulation of keratin expression and myogenesis suggests different ways of regeneration muscle in adult amphibian limbs. *Journal of Cell Science*. 1999; 112: 1385-1394.
20. Ku DN, Allen RC. Vascular grafts: Bronzino JD, editor. *The Biomedical Engineering Hand Book*. Boca Raton, FL: CRC Press. 1995; P: 1985-1996.
21. Canver CC. Conduit options in coronary artery bypass surgery. *Chest*. 1995; 108: 1150-1155.
22. Bhan A, Gupta V, Choudhary SK. Radial artery in CABG: could the early results be comparable to internal mammary artery graft? *Annual Thoracic Surgery*. 1999; 67: 1631-1636.
23. Laub GW, Muralidharan S, Clancy R, McGrath LB. Cryopreserved allograft veins as alternative coronary artery bypass conduits: early phase results. *Annual Thoracic Surgery*. 1992; 54: 826-831.
24. Korb H, Browski A, Esbati A, Schlesiger U, et al. Cryopreservation of veins as an alternative to autografts in coronary bypass grafting. *Journal of Cardiovascular Surgery*. 1994; 35: 223-226.

نتایج نشان دادند که امکان تهیه یک داربست طبیعی الاستیک از آنورت به وسیله تیمار با برمید سیانوژن وجود دارد. این داربست می‌تواند دارای اثر القایی بر رفتارهای سلولی از قبیل مهاجرت، چسبندگی، تقسیم و احتمالاً تمایز باشد.

تشکر و قدردانی

مولفین مراتب تشکر و امتنان خود را از حوزه معاونت پژوهشی دانشگاه فردوسی مشهد بخاطر تامین بخشی از هزینه‌های این پژوهش که از محل گرانت پژوهشی مربوط به طرح " مطالعات تجربی و مقدماتی آماده سازی نیمه صنعتی داربست‌های سه بعدی (Bioscaffold یا 3D matrix) به منظور کاربرد در مهندسی بافت " فراهم گردیده ابراز می‌نمایند.

منابع

1. Polak JM, Bishop AE. Stem cells and tissue engineering: past, present, and future. *Academic Science*. 2006; 1068: 352-366.
2. Suh H. Tissue restoration, tissue engineering and regenerative medicine. *Yonsei Medicine*. 2000; 41: 681-684.
3. Fodor WL. Tissue engineering and cell based therapies, from the bench to the clinic: the potential to replace, repair and regenerator. *Reproductional Biology Endothelial*. 2003; 1: 102.
4. Satija NK, Gurdutta GU, Sharma S, Afrin F, et al. Mesenchymal stem cells: molecular targets for tissue engineering. *Stem Cells*. 2007; 16: 7-23.
5. Koh CJ, Atala A. Tissue engineering, stem cells, and cloning: opportunities for regenerative medicine. *Journal of American Nephrol*. 2004; 15: 1113-1125.
6. Nordlie MA, Wold LE, Kloner RA. Genetic contributors toward increased risk for isochemic heart disease. *Journal of Molecular Cell Cardiol*. 2005; 39: 667-679.
7. Shinoka T, Breuer CK, Tanel RE, Zund G, et al. Tissue engineering heart valves: valve leaflet replacement study in a lamb model. *Ann Thorac Surg*. 2005; 60: S513-S516.
8. Zund G, Hoerstrup SP, Schoeberlein A, Lachat M, et al. Tissue engineering: a new approach in cardiovascular surgery: seeding of human fibroblasts followed by human endothelial cells on resorbable mesh. *Eur J Cardio-Thorac Surg*. 1998; 13: 160-164.
9. Lheureux N, Paquet S, Labbe R, Geramin L, et al. A completely biological tissue-engineered human blood vessel. *FASEB Journal*. 1998; 12: 47-56.

25. Schmidt CE, Baier JM. Acellular vascular tissue: natural biomaterials for tissue repair and tissue engineering. *Biomaterials*. 2000; 21: 2215-2231.
26. Zdrahala RJ. Small caliber vascular grafts. Part I. State of the art. *Journal of Biomaterials Application*. 2005; 10: 309-329.
27. Hilbert SL, Ferrans VJ, Jones M. Tissue- derived biomaterials and their use in cardiovascular prosthetic devices. *Med Prog Technol*. 1989; 14: 115-163.
28. Valente M, Bortolotti V, Thiene G. Ultra structural substrates of dystrophic calcification in porcine bioprosthetic valve failure. *Am J Pathol*. 1985; 119: 12-21.
29. Maranto AR, Schoen FJ. Phosphatase enzyme activity is retained in glutaraldehyde treated bioprosthetic valves. *ASAIO Trans*. 1988; 34: 827-830.
30. Courtman DW, Pereira CK, Kashef V, McComb D, et.al. Development of a pericardial acellular matrix biomaterial: biochemical and mechanical effects of cell extraction. *J Biomed Mater Res*. 1994; 28: 655-666.
31. Levy RJ, Schoen FJ, Anderson HC, et.al. Cardiovascular implant classification: a survey and update. *Biomaterials*. 1991; 12: 707-714.
32. Shoen FJ, Levy RJ, Nelson AC, Bernhard WF, Nashef A, Hawley M. Onset and progression of experimental bioprosthetic heart valve calcification. *Lab Invest*. 1985; 52: 523-532.
33. Dahm M, Lyman WD, Schwell AB, Factor SM, et.al. Immunogenicity of glutaraldehyde- tanned bovine pericardium. *Journal of Cardiovascular Surgery*. 1999; 99: 1082-90.
34. Coito AJ, Kupiec- Weglinski JW. Extracellular matrix proteins: bystanders or active participant in the allograft rejection cascade? *Ann Transplant*. 1996; 1: 14-18.
35. Courtman DW, Wilson GJ. Development of an acellular matrix vascular xenograft: modification of the *in vivo* immune response in rats. *Proceedings of The Society for Biomaterials 25th Annual Meeting*. 1999; p: 20.
36. Daamen WF, Hafman T, Veerkamp JH, Van Kuppevelt TH. Comparison of five procedures for the purification of insoluble elastin. *Biomaterials*. 2001; 22:1997-2005.