

## مطالعات تجربی کنشهای متقابل بین بافت بلاستما و ماتریکسهای سه بعدی سلول زدایی شده مئانه خرگوش نژاد نیوزیلندی در شرایط *in vitro*

هاشم راستی<sup>۱\*</sup>، ناصر مهدوی شهری<sup>۲</sup>، جواد بهارآرا<sup>۳</sup>، نگار صغیری<sup>۴</sup> M.Sc.

۱- دانشجوی کارشناسی ارشد زیست شناسی سلولی تکوینی دانشگاه آزاد اسلامی واحد مشهد، گروه زیست شناسی، دانشکده علوم پایه، عضو باشگاه پژوهشگران جوان دانشگاه آزاد اسلامی واحد مشهد، مشهد، ایران  
۲- دانشگاه آزاد اسلامی واحد مشهد، گروه زیست شناسی، دانشکده علوم پایه، مشهد، ایران  
\* پست الکترونیک نویسنده مسئول: [h\\_rasti88@yahoo.com](mailto:h_rasti88@yahoo.com)

تاریخ پذیرش: ۱۳۹۰/۵/۲۶

تاریخ دریافت: ۱۳۹۰/۳/۲۶

### چکیده

**هدف:** هدف اصلی این پژوهش مطالعات تجربی رویدادهای هیستولوژیکی حاصل از اعمال متقابل بین بافت بلاستما و مئانه سلول زدایی شده خرگوش نیوزیلندی در محیط کشت بود.

**مواد و روش‌ها:** سلول‌زدایی مئانه خرگوش بر اساس روش فیزیکی با قرار دادن قطعات بافت مئانه در فریزر ۴- درجه سانتی‌گراد به مدت ۲۴ ساعت و سپس قرار دادن مئانه در ازت مایع انجام شد. در ادامه در روش شیمیایی، مئانه را در سدیم دودسیل سولفات (SDS) ۱ درصد به مدت ۲۴ ساعت قرار گرفت و سلول‌زدایی مئانه بطور کامل انجام شد. برای تهیه بافت بلاستما با پانچ لاله‌های گوش خرگوش نر نژاد نیوزیلندی و برداشت حلقه بلاستمایی ایجاد شده با پانچ دیگری بعد از ۷۲ ساعت داربست سلول‌زدایی شده در شرایط استریل در مرکز حلقه بلاستما قرار گرفت و به محیط کشت انتقال داده شد. نمونه‌های کشت بعد از انجام مراحل بافتی با رنگ‌های هماتوکسیلین ائوزین، پیک اندیگو و پیکروفوشین رنگ آمیزی شد.

**نتایج:** مطالعات میکروسکوپ نوری نشان داد که سلول‌های بلاستمایی در روز ۱۵ کشت به صورت کلنی‌های سلولی دارای اتصال بطور کامل به داخل داربست سلول‌زدایی شده مئانه مهاجرت کرده‌اند. همچنین در این روز سلول‌های بلاستمایی به سلول‌های اپیتلیومی تمایز یافته و به نظر می‌رسد اپیتلیوم پلی‌مورف مئانه در وسط داربست تشکیل شده است. همچنین در روزهای دیگر کشت رویدادهایی از فرایند انژیوژنز در داربست مذکور مشاهده گردید.

**نتیجه‌گیری:** مئانه سلول‌زدایی شده خرگوش نیوزیلندی به عنوان داربست، قابلیت القا سلول‌های بلاستمایی را در جهت مهاجرت به داربست، ایجاد اتصالات بین سلول‌های بلاستمایی و تمایز فراهم نموده است.

**واژگان کلیدی:** داربست بدون سلول، مئانه، خرگوش نیوزیلندی، ماتریکس سه بعدی

## مقدمه

فرایندهای ریختزایی و اندامزایی تحت کنترل کمپلکسی از مکانیسم‌های تنظیمی هستند که تعیین کننده ویژگی‌های سلول‌ها و بافت‌های مختلف به سمت سازمان‌یابی صحیح در بافت و یا اندام می‌باشد. مولکول‌های تنظیمی کننده این مکانیسم‌های تنظیمی هم مواد قابل انتشاری هستند که توسط رسپتورهای سطح سلولی ویژه شناسایی می‌شوند و هم اجزای ماتریکس خارج سلولی اند که اعمال متقابل سلول-سلول و سلول-ماتریکس را تنظیم کرده و رفتار سلول و بافت مورد نظر را تعیین می‌کنند (۱). عوامل گوناگونی باعث القای تمایز سلول‌های بنیادی می‌شود که از جمله آن می‌توان به تماس فیزیکی این سلول‌ها با سلول‌های مجاور (یعنی ارتباطات متقابل بین سلولی) و مولکول‌های ویژه موجود در محیط اطراف اشاره کرد. بنابراین در هر مقطع زمانی سلول‌های مجاور و فاکتورهای رشد و ترکیبات ماتریکس خارج سلولی باعث تعدیل و تنظیم فرایندهای تمایز، تقسیم و آپوپتوز سلول‌های بنیادی می‌شوند (۲). در سال ۱۹۹۳، لانگر و واکانتی مهندسی بافت را مولد یک حوزه مطالعاتی جدید تعریف کردند که در آن اصول مهندسی و بیولوژی جهت اصلاح بافت زنده آسیب دیده بکار گرفته می‌شد و موجب تجدید ترمیم و حفظ عمل بافت می‌گشت (۳). در خلال دهه ۱۹۹۰، مهندسی بافت به سرعت پیشرفت کرد. در این دهه موضوع جانشین‌های بیولوژیکی بافت‌های بدن به منظور بازسازی بافت مطرح شد. اکنون نیز مهندسی بافت به عنوان طراحی جایگزین‌های بافت یا ارگان مطرح می‌باشد (۴). مهندسی بافت براساس سه ترکیب اصلی بافت‌های بیولوژیکی یعنی ماتریکس خارج سلولی، مولکول‌های پیام رسان و سلول بنیان نهاده شده است که بترتیب توسط داربست، فاکتورهای رشد و سلول شبیه سازی می‌شود. یکی از ویژگی‌های مهم داربست‌های مهندسی بافت داشتن شبکه متخلخل مرتبط بهم جهت تغذیه رسانی سلول، دفع ضایعات سلولی، تشکیل ماتریکس خارج سلولی و رگزایی است (۵، ۶). این داربست‌های بیولوژیکی تشکیل شده از ماتریکس خارج سلولی (Extracellular matrix=ECM) هستند که عموماً برای تجدید بنای بافت‌های آسیب دیده یا بافت‌های از دست رفته استفاده می‌شود (۷). سیستم ادراری و مثانه مستعد انواع شرایط پاتولوژیکی از زمان تکوین جنینی تا بزرگسالی می‌باشد. تعدادی از مواد سنتزی و بافت‌های طبیعی

برای نوسازی نقص‌های عملکردی مثانه مورد تحقیق هستند. مواد طبیعی شامل الیوگرافت‌های مثانه، قطعات معدی روده‌ای، پوست، ماهیچه، پری‌کاردیوم، جفت، سخت شامه، لایه زیر مخاطی روده کوچک و ماتریکس سلول‌زدایی شده مثانه می‌باشد (۸). بلاستما سلول‌های توده‌ای شکل و شبیه به سلول‌های مزانشیمی هستند که بطور واضح در موضعی که بافت‌ها جراحات دیده‌اند ایجاد می‌گردند و سلول‌های این بافت ویژگی چند توانی دارند این سلول‌ها در محل پیوند تحت تاثیر سیگنال‌های محیطی قرار می‌گیرند و در نتیجه این سلول‌ها توانایی تبدیل به بافت‌های مختلف را دارند. همچنین دو تا سه روز بعد از پانچ لاله‌های گوش خرگوش نیوزیلندی با تشکیل بافت بلاستما در حاشیه و اطراف زخم امکان ترمیم و بازسازی سوراخ‌های ایجاد شده فراهم می‌گردد (۹). بنابراین هدف اصلی این پژوهش گزارش رویدادهای هیستولوژیکی حاصل از کنش‌های متقابل بین بافت بلاستما لاله گوش خرگوش نر نژاد نیوزیلندی و مثانه سلول‌زدایی شده خرگوش به عنوان داربست در محیط کشت است.

## مواد و روش‌ها

خرگوش‌های سفید نر نژاد نیوزیلندی مورد استفاده در این پژوهش با وزن تقریبی ۳ کیلوگرم و با سن ۴ تا ۶ ماهه از موسسه تحقیقاتی انستیتو پاستور تهران خریداری شدند و سپس به حیوان خانه دانشکده علوم دانشگاه آزاد اسلامی مشهد انتقال یافتند. خرگوش‌ها در شرایط ۱۲ ساعت روشنایی و ۱۲ ساعت تاریکی در دمای میانگین ۲۱ درجه سانتی‌گراد قرار گرفته و با خوراک مخصوص خرگوش روزانه تغذیه شدند. در تمامی مراحل انجام این پژوهش، مصوبات مربوط به اصول کار با حیوانات آزمایشگاهی هم چون دسترسی آزادانه به آب و غذا، کشتن بدون درد، جلوگیری از درد ناشی از پانچ کردن مثل استفاده از لیدوکائین رعایت گردیده است. برای تهیه داربست سلول‌زدایی شده مثانه خرگوش ابتدا یک راس خرگوش با پنبه آغشته به غلظت بالایی از کلروفرم بیهوش و معدوم گردید سپس با استفاده از ابزار تشریح ناحیه انتهای شکمی شکافته شده و بافت مثانه خارج شد. پس از قرار دادن مثانه در محلول نرمال سالین ۰/۹ درصد به مدت ۵ دقیقه مثانه بطور کامل با قیچی نوک تیز باز شده و به قطعات مساوی تقسیم و به داخل یک عدد لوله فالكون منتقل شدند. سپس سریعاً مرحله سلول‌زدایی فیزیکی مثانه آغاز

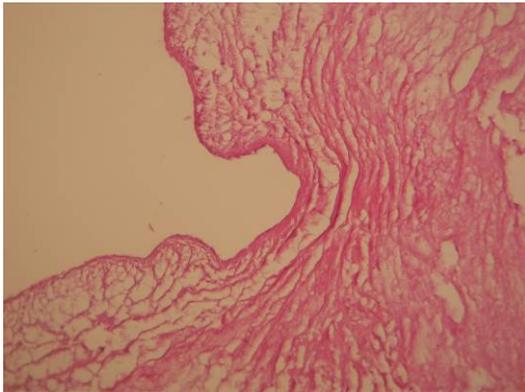
داربست مئانه آماده شده تحت شرایط استریل به زیر هود لامینار منتقل شده و هر یک عدد داربست مئانه خرگوش در مرکز یک حلقه بلاستمایی قرار گرفت. تمامی نمونه‌ها سپس در داخل پلیت‌های ۶ خانه‌ای مخصوص کشت قرار گرفته و مقدار ۳ میلی‌لیتر محیط کشت به آنها افزوده شد و پلیت‌ها به انکوباتور CO<sub>2</sub> دار منتقل شدند و هر ۲ تا ۳ روز یکبار محیط کشت تعویض شد. نمونه‌ها در روزهای ۵، ۱۰، ۱۵، ۲۰، ۲۵، ۳۰ بعد از خروج از محیط کشت و انجام عملیات بافتی با رنگ‌های هماتوکسیلین ائوزین (H&E)، پیک اندیگو و پیکروفوشین (وان‌گیسون) رنگ آمیزی شدند. رنگ آمیزی هماتوکسیلین ائوزین به عنوان رنگ آمیزی معمولی استفاده شد بطوریکه رنگ هماتوکسیلین هسته‌ها را بنفش و ائوزین سیتوپلاسم را صورتی می‌کند. رنگ پیک اندیگو (مخلوط ۱۰۰ میلی‌لیتر اسید پیکریک اشباع + ۰/۱ گرم پودر اندیگو کارمین) بعنوان یک رنگ اختصاصی با شدت‌های اسیدوفیلی متفاوت می‌باشد بطوریکه در مسیر معمول رنگ آمیزی هماتوکسیلین ائوزین به جای رنگ ائوزین از رنگ پیک اندیگو استفاده شد. با این رنگ، زمینه که ماتریکس بافت همبند و کلاژن است به همراه اپیتلیوم به رنگ سبز مغز پسته‌ای در می‌آید و هسته‌ها با رنگ هماتوکسیلین قهوه‌ای کم رنگ می‌شوند. رنگ پیکروفوشین یاوان‌گیسون (مخلوط ۱۰۰ میلی‌لیتر اسید پیکریک اشباع + ۰/۱ گرم پودر فوشین اسید) بعنوان یک رنگ اختصاصی دیگر می‌باشد، بطوریکه در مسیر معمول رنگ آمیزی هماتوکسیلین ائوزین به جای رنگ ائوزین از پیکروفوشین استفاده شد با این رنگ، کلاژن قرمز آتشین و اپیتلیوم زرد یا کرمی رنگ شده و هسته‌ها با هماتوکسیلین قهوه‌ای رنگ می‌شوند.

تجزیه و تحلیل اطلاعات بدست آمده با استفاده نرم افزار آماری Minitab 16 انجام شد و آزمون‌های تحلیل واریانس یک طرفه (ANOVA) و تست توکی بر روی داده‌ها انجام گرفت.  $P \leq 0.05$  به عنوان سطح معنی‌دار در نظر گرفته شد.

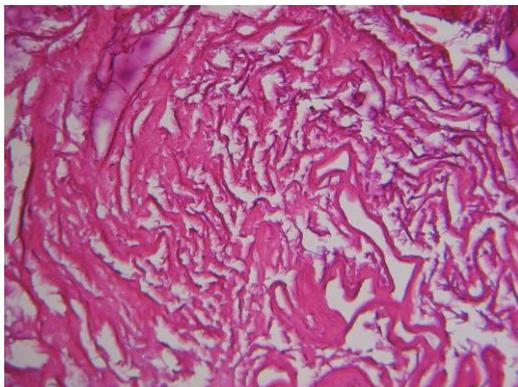
شاخص اول میانگین تعداد سلول‌های مهاجرت یافته به داربست در روزهای مختلف کشت است. بدین منظور برای شمارش تعداد سلول‌های مهاجرت یافته به داربست از لنز چشمی میکروسکوپی مخصوص شمارش استفاده شد. تمامی لام‌ها با درشتنمایی  $40\times$  مورد بررسی قرار گرفتند و ۵ نقطه قراردادی در میدان دید در تمامی تکرارها مورد شمارش قرار گرفت. ضمناً تمامی سلول‌های موجود در داخل محوطه مخصوص لنز مورد شمارش قرار گرفتند.

شد. با توجه به اینکه عوامل موثر زیادی برای سلول‌زدایی هر بافت و ارگان وجود دارد که این عوامل بستگی به چند فاکتور شامل تعداد سلول‌های بافت، چگالی، محتوای لیپید و ضخامت بافت دارد (۱۰)، از روش ترکیبی فیزیکی (۱۲، ۱۱) و شیمیایی (۱۴، ۱۳) برای سلول‌زدایی استفاده شد. به طوریکه قطعات مئانه به مدت ۲۴ ساعت در فریزر ۴- درجه سانتی‌گراد قرار گرفتند و هر ۶ ساعت یکبار به مدت ۱۰ دقیقه در آب مقطر استریل قرار می‌گرفتند. بعد از پایان ۲۴ ساعت به مدت ۲ ساعت و ۱ ساعت به ترتیب مئانه در فریزر ۲۰- و ۴۰- درجه سانتی‌گراد قرار گرفته و سپس آماده قرار گیری در ازت مایع شدند، به طوریکه مئانه‌ها در ۵ مرحله ۲ دقیقه‌ای توسط کرایو تیوب در ازت مایع قرار گرفتند و سپس توسط فسفات بافر سالین (PBS) شستشو شدند. بدین ترتیب سلول‌زدایی به روش فیزیکی به پایان رسید (۱۲، ۱۱). در روش سلول‌زدایی شیمیایی، تمامی قطعات مئانه به مدت ۲۴ ساعت در محلول سدیم دو دسیل سولفات (SDS) ۱ درصد همراه با چرخش آرام قرار داده شدند سپس نمونه‌ها توسط آب مقطر استریل شستشو شده و بوسیله اتانول ۷۵ درصد و پراستیک اسید ۰/۲ درصد استریل شدند و در نهایت به مدت ۲۴ ساعت در PBS قرار گرفتند. بدین ترتیب داربست مئانه خرگوش آماده استفاده شد (۱۴، ۱۳). این داربست را به مدت ۴ روز در فریزر ۲۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شد تا تهیه حلقه بلاستمایی انجام شود. بدین منظور یک راس خرگوش انتخاب شده و در دستگاه مخصوص نگهداری خرگوش (مهارکننده) جهت پانچ لاله گوش قرار گرفت. بعد از مو‌زدایی گوش‌ها با کرم موبر با استفاده اسپری لیدوکائین ۱۰ درصد تمامی سطح گوش بطور کامل بعد از حدود ۳۰ دقیقه بی حس شد. در ادامه با استفاده از پانچور مخصوص تعداد ۵ سوراخ در گوش راست و ۵ سوراخ در گوش چپ با قطر ۲ میلی‌متر زده شد. خرگوش مذکور به مدت ۳ روز تحت شرایط کاملاً استریل نگهداری شد و در پایان روز سوم مجدداً با ایجاد شرایط بی حسی برای گوش بر روی سوراخ‌های قبلی با پانچوری به قطر ۴ میلی‌متر سوراخ جدیدی ایجاد شد و حلقه بلاستمایی برداشت گردید. سپس حلقه‌های بلاستمایی در ۷ مرحله شامل ۶ مرحله قرار گیری در سرم فیزیولوژی استریل و یک مرحله قرار گیری در محیط کشت، کاملاً استریل شدند.

محیط کشت شامل ۸۵ میلی‌لیتر DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium) و ۱۵ میلی‌لیتر سرم جنینی گاو (Fetal Bovine Serum=FBS) و ۵۰۰ میکرولیتر پنی‌سیلین - استرپتومایسین بود (۱۵). سپس

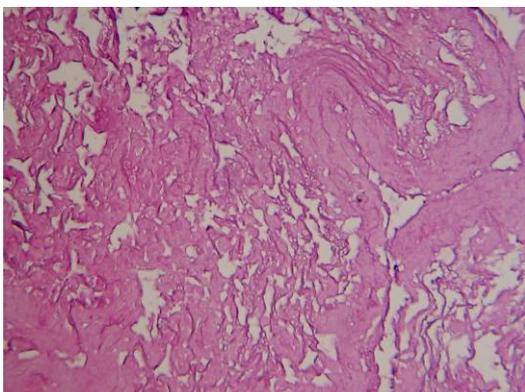


شکل ۲: بافت مثانه خرگوش بعد از سلول‌زدایی  
رنگ آمیزی: هماتوکسیلین-انوزین، درشتنمایی: ۱۰۰x



شکل ۳: نمونه کنترل که یک داریست سلول‌زدایی شده بدون بافت بلاستما در محیط کشت است و فاقد سلول می‌باشد.  
رنگ آمیزی: هماتوکسیلین-انوزین، درشتنمایی: ۱۰۰x

نتایج شاخص هر روز کشت از نمونه‌هایی که داریست سلول‌زدایی شده در مرکز حلقه بلاستما قرار گرفت بوسیله مطالعات دقیق میکروسکوپ نوری نمونه‌های رنگ آمیزی شده با هماتوکسیلین انوزین، پیک اندیگو و پیکروفوشین بدست آمد: در روز ۵ کشت، هیچ گونه سلول بلاستمایی از حلقه بلاستمایی به درون داریست مثانه مهاجرت نکرده بود (شکل ۴, ۵).

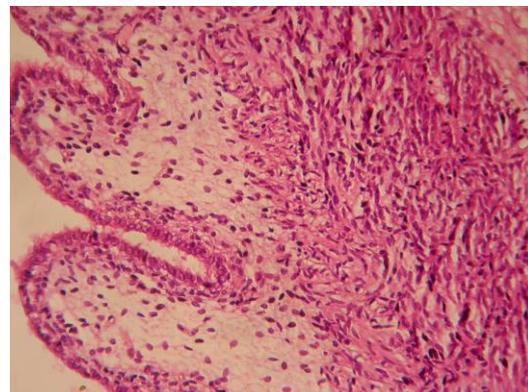


شکل ۴: روز ۵ کشت، هیچ سلولی به داریست مهاجرت نکرده وجود ندارد.  
رنگ آمیزی: هماتوکسیلین-انوزین، درشتنمایی: ۱۰۰x

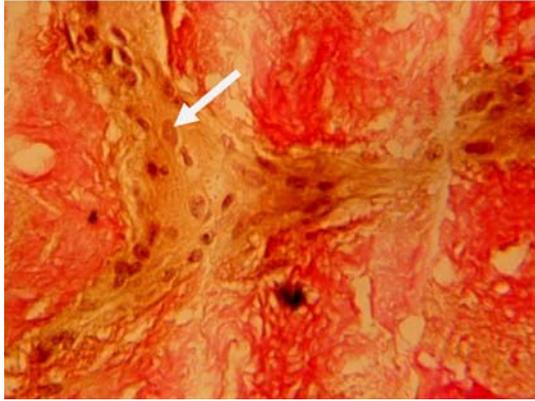
برای بررسی شاخص دوم که میانگین تغییرات اندازه هسته سلول‌های مهاجرت یافته به داخل داریست است از لنز چشمی میکروسکوپی مخصوص که دارای خط کش اندازه گیری بود استفاده شد. هر یک واحد این خط کش در درشتنمایی ۴۰x وقتیکه در عدد ۳/۲ ضرب شود واحد اندازه‌گیری بر حسب میکرون خواهد شد. تمامی لام‌ها در درشتنمایی ۴۰x مورد بررسی قرار گرفتند و ۵ نقطه قراردادی در میدان دید در تمامی تکرارها مورد اندازه‌گیری قرار گرفت. همچنین به دلیل آنکه انواع مختلفی از شکل‌های هسته اعم از کروی، بیضی و کشیده در سلول‌های مهاجرت کرده به داریست دیده می‌شود، جهت یک اندازه‌گیری دقیق برای هسته‌های موجود در میدان دید، برای هر هسته قطر کوچک با قطر بزرگ بعد از اندازه‌گیری جمع شده و بر عدد ۲ تقسیم شد تا عدد دقیقی از اندازه هسته سلول‌های مهاجرت یافته به داریست بدست آید.

## نتایج

مطالعات میکروسکوپ نوری و رنگ آمیزی هماتوکسیلین انوزین نشان داد که مناسب ترین داریست تولید شده با حفظ ساختار ماتریکس خارج سلولی (ECM) مثانه استفاده از روش ترکیبی فیزیکی و شیمیایی است که بکار برده شد. بافت مثانه خرگوش نیوزیلندی قبل از سلول‌زدایی (شکل ۱) و بافت مثانه بعد از سلول‌زدایی به ترتیب در شکل‌های ۱ و ۲ نشان داده شده است. نمونه کنترل در هر روز کشت یک قطعه داریست سلول‌زدایی شده بدون بافت بلاستما است که در محیط کشت قرار گرفت. هیچ سلولی در تمامی نمونه‌های کنترل در روزهای مختلف کشت دیده نشد. (شکل ۳).



شکل ۱: بافت مثانه خرگوش قبل از سلول‌زدایی  
رنگ آمیزی: هماتوکسیلین-انوزین، درشتنمایی: ۴۰x



شکل ۸: روز ۱۰ کشت. مهاجرت سلول‌های بلاستما به داربست پیکان: یک سلول بلاستما در مجموعه سلول‌های با هم مهاجرت کرده بلاستمایی به داربست.  
رنگ آمیزی: پیکروفوشین. درشتنمایی:  $40 \times$

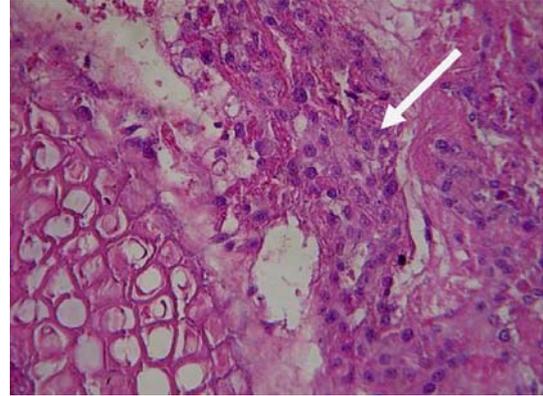


شکل ۹: روز ۱۰ کشت. مهاجرت سلول‌های بلاستما به داربست. پیکان: نمایی از یک کلنی سلولی بلاستمایی مهاجرت کرده به داربست.  
رنگ آمیزی: پیکروفوشین. درشتنمایی:  $40 \times$

در روز ۱۵ کشت بیشترین مهاجرت سلول‌های بلاستمایی به داربست دیده شد و به نظر می‌رسد این کلنی‌های سلولی دارای اتصال با هدف تشکیل اپیتلیوم به درون داربست مهاجرت کرده بودند زیرا در این روز اپیتلیوم پلی‌مورف مثانه در وسط داربست تشکیل شده بود. با استفاده از رنگ آمیزی اختصاصی پیک اندیگو، این امکان ایجاد شد که اپیتلیوم از بافت همبند تشخیص داده شود (شکل ۱۰، ۱۱، ۱۲، ۱۳).

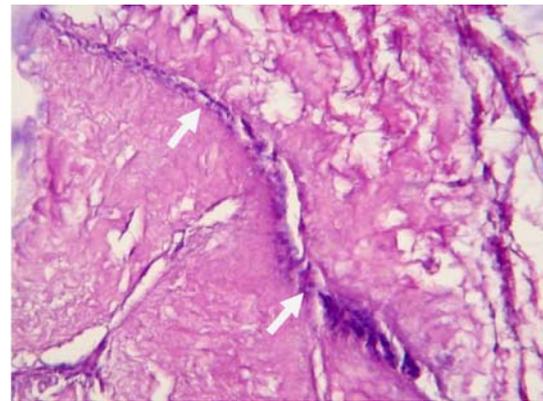
در روز ۲۰ کشت، مهاجرت سلول‌های بلاستمایی به درون داربست کاهش یافته بود اما در این روز تشکیل تعدادی سلول فیبروبلاست در داربست دیده شد. همچنین به نظر می‌رسد در این روز رویدادهایی از فرایند انژیوژنز در داربست صورت گرفته باشد (شکل ۱۴).

در روز ۲۵ کشت، بنظر می‌رسد مهاجرت سلول‌ها ادامه داشته ولی به غیر از سلول‌های اپیتلیومی سلول دیگری دیده نمی‌شود. در این روز هنوز سلول‌ها به صورت کلنی‌های سلولی دارای اتصال هستند (شکل ۱۵).

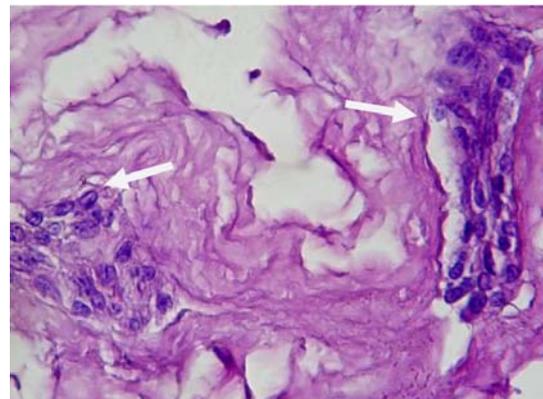


شکل ۵: روز ۵ کشت. پیکان: حضور سلول‌های بلاستما فقط در حلقه بلاستما.  
رنگ آمیزی: هماتوکسیلین. درشتنمایی:  $40 \times$

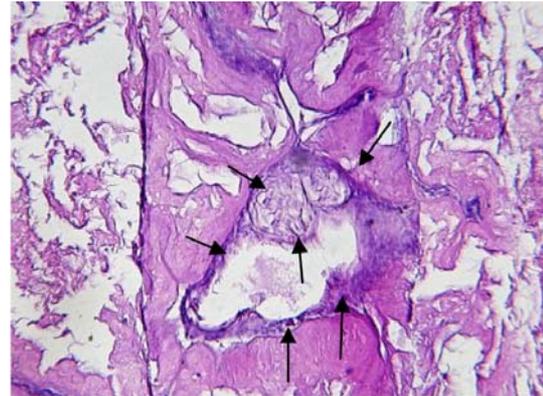
در روز ۱۰ کشت، شروع مهاجرت سلول‌های بلاستمایی به درون داربست مثانه دیده شد. این سلول‌ها در قالب کلنی‌های سلولی دارای اتصال به داربست، مهاجرت کرده بودند (شکل ۶، ۷، ۸، ۹).



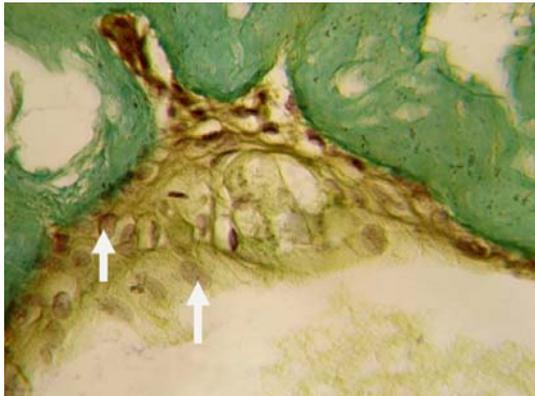
شکل ۶: روز ۱۰ کشت. شروع مهاجرت سلول‌های بلاستمایی. پیکانها: سلول‌های بلاستمایی به صورت متصل بهم به داربست مهاجرت کرده‌اند.  
رنگ آمیزی: هماتوکسیلین-انوزین. درشتنمایی:  $10 \times$



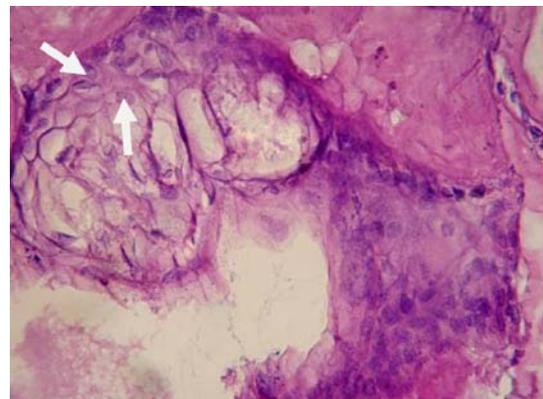
شکل ۷: روز ۱۰ کشت. نمایی از چند کلنی سلولی پیکانها: سلول‌های بلاستمایی به صورت کلنی به داربست مهاجرت کرده‌اند.  
رنگ آمیزی: هماتوکسیلین-انوزین. درشتنمایی:  $40 \times$



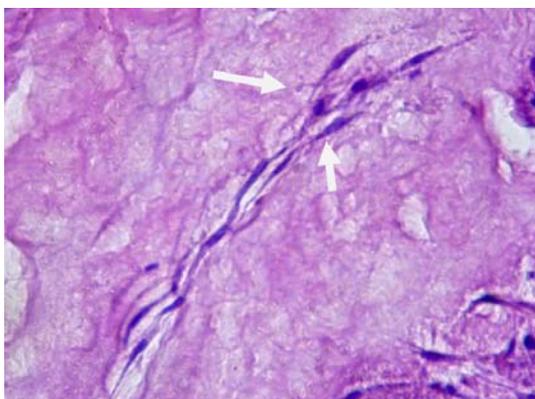
شکل ۱۰: روز ۱۵ کشت. تشکیل اپیتلیوم پلی مورف در مرکز داربست. پیکانها: محدوده تشکیل اپیتلیوم پلی مورف را نشان می دهد. رنگ آمیزی: هماتوکسیلین-انوزین. درشتنمایی: ۱۰۰x



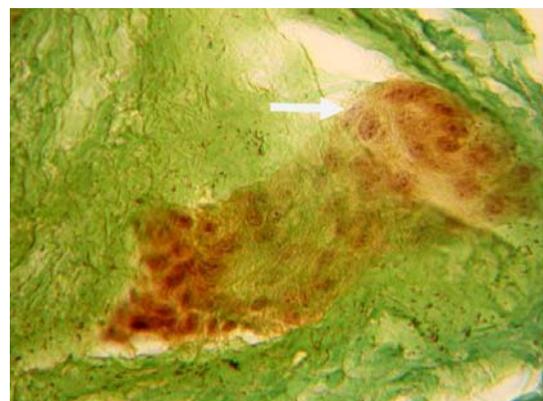
شکل ۱۳: روز ۱۵ کشت. پیکانها: سلول های بلاستمایی تمایز یافته به سلول اپیتلیومی. رنگ آمیزی: پیک اندیگو درشتنمایی: ۴۰۰x



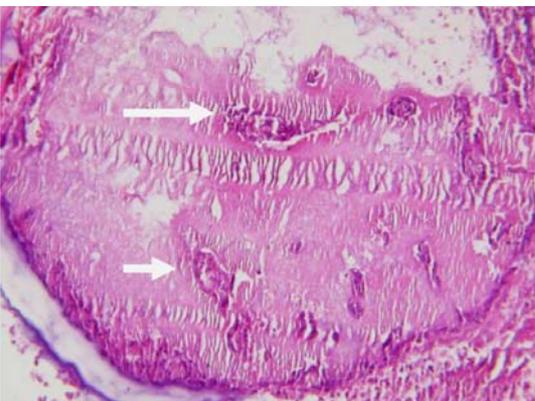
شکل ۱۱: روز ۱۵ کشت. نمای نزدیک تشکیل اپیتلیوم پلی مورف (اپیتلیوم زایی) پیکانها: سلول های بلاستمایی تمایز یافته به سلول های اپیتلیومی را نشان می دهد. رنگ آمیزی: هماتوکسیلین-انوزین. درشتنمایی: ۴۰۰x



شکل ۱۴: روز ۲۰ کشت. پیکانها: سلول های بلاستمایی تمایز یافته به فیبروبلاست و حضور آنها در داربست. رنگ آمیزی: هماتوکسیلین-انوزین. درشتنمایی: ۴۰۰x

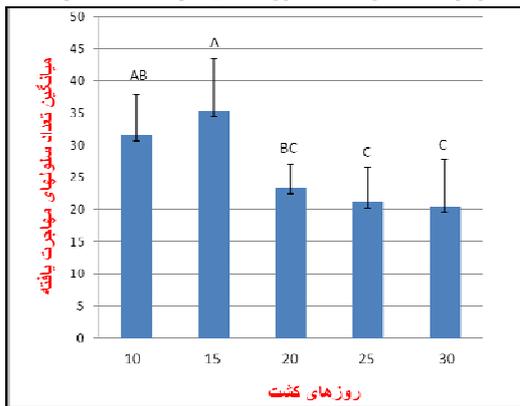


شکل ۱۲: روز ۱۵ کشت. پیکان: سلول های بلاستمایی مهاجرت کرده به داربست به سلول های اپیتلیومی تمایز یافته اند. رنگ آمیزی: پیک اندیگو. درشتنمایی: ۴۰۰x



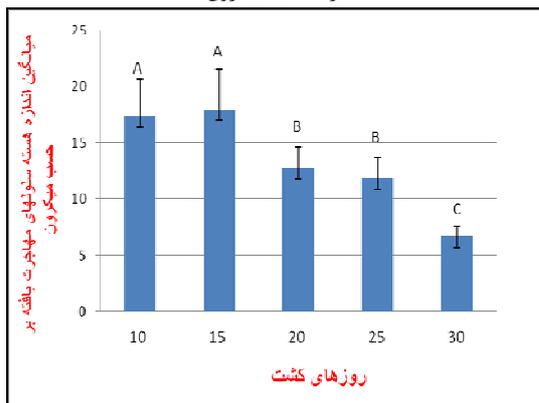
شکل ۱۵: روز ۲۵ کشت. پیکانها: حضور سلول های بلاستما در داربست. رنگ آمیزی: هماتوکسیلین-انوزین. درشتنمایی: ۱۰۰x

نمودار ۱: میانگین تعداد سلولهای مهاجرت یافته به داربست



ستون‌هایی که دارای حداقل یک حرف مشترک می‌باشند از نظر آماری و در سطح  $p \leq 0.05$  فاقد اختلاف معنی‌دار می‌باشند. مهم‌ترین اختلاف معنی‌دار بین روز ۱۵ با روز ۳۰ دیده می‌شود. بین روز ۱۰ با روز ۱۵ و ۲۰ اختلاف معنی‌دار وجود ندارد. بین روز ۱۰ با روز ۱۵ و ۲۰ اختلاف معنی‌دار وجود ندارد.

نمودار ۲: میانگین اندازه هسته سلولهای مهاجرت یافته به داربست بر حسب میکرون

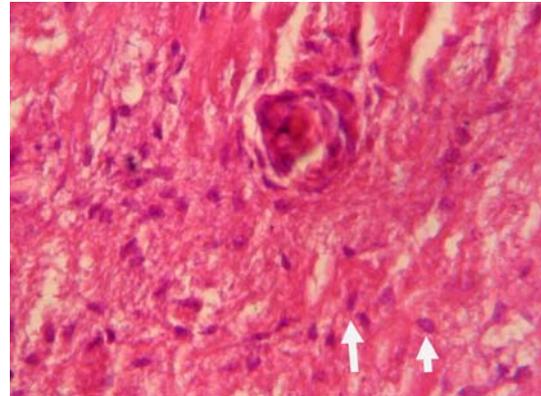


ستون‌هایی که دارای حداقل یک حرف مشترک می‌باشند از نظر آماری و در سطح  $p \leq 0.05$  فاقد اختلاف معنی‌دار هستند. مهم‌ترین اختلاف معنی‌دار بین روزهای ۱۰ و ۱۵ با روزهای ۲۰ و ۳۰ دیده می‌شود. بین روز ۲۰ و ۲۵ با روز ۳۰ اختلاف بین روز ۱۰ با روزهای ۲۵ و ۳۰ اختلاف معنی‌دار وجود دارد. بین روز ۱۰ با ۲۰ و ۲۵ اختلاف معنی‌دار وجود ندارد.

### بحث

در پژوهش حاضر مثنای سلول‌زدایی شده خرگوش نیوزیلندی به عنوان داربست مورد استفاده قرار گرفت و اعمال متقابل بین این بافت با بافت بلاستما در شرایط *in vitro* بررسی شد. ماتریکس خارج سلولی شامل کمپلکس متفاوتی از ساختار و عملکرد پروتئین‌ها است که نقش مهمی در مورفوزن و حفاظت از سلول و ساختار بافت بازی می‌کند (۱۶). داربست‌های ماتریکس خارج سلولی (Extracellular matrix=ECM) شامل مولکول‌های

در روز ۳۰ کشت، سلول‌های مهاجرت کرده به داربست به صورت پراکنده و بدون اتصال دیده می‌شوند. اندازه‌گیری هسته سلول‌ها در این روز نشان می‌دهد که هسته سلول‌ها نسبت به روزهای قبل بسیار کوچک شده که این احتمالاً نشانه غیر فعال شدن سلول‌ها می‌باشد (شکل ۱۶).



شکل ۱۶: روز ۳۰ کشت.

پیکانها: سلول‌های بلاستما مهاجرت کرده به داربست به صورت پراکنده و بدون اتصال بهم. رنگ آمیزی: هماتوکسیلین-انئوزین درشتنمایی:  $40 \times$

### آنالیزهای آماری

دو شاخص مورد بررسی آماری قرار گرفت. شاخص اول میانگین تعداد سلول‌های مهاجرت یافته به داخل داربست در روزهای مختلف کشت است. آنالیزها نشان می‌دهد که مهم‌ترین اختلاف معنی‌دار بین روز ۱۵ با ۳۰ دیده می‌شود. همچنین بین روز ۱۰ با روزهای ۲۵ و ۳۰ اختلاف معنی‌دار وجود دارد ولی بین روز ۱۰ با روز ۱۵ و ۲۰ اختلاف معنی‌دار وجود ندارد. بین روزهایی که اختلاف معنی‌دار وجود دارد  $p \leq 0.05$  می‌باشد (نمودار ۱).

شاخص دوم میانگین اندازه هسته سلول‌های مهاجرت یافته به داخل داربست در روزهای مختلف کشت است. آنالیزها نشان می‌دهد که اختلاف معنی‌دار بین روزهای ۱۰ و ۱۵ با روزهای ۲۰ و ۲۵ و همچنین روز ۳۰ دیده می‌شود بطوریکه مهم‌ترین اختلاف معنی‌دار بین روز ۱۵ (که هسته‌ها درشت هستند و نشانه فعال بودن آنها است و در این روز اپیتلیوم پلی‌مورف تشکیل شده است) با روز ۳۰ (که هسته‌ها به طور قابل توجهی کوچک شده‌اند و می‌تواند نشانه غیر فعال شدن آنها باشد) دیده می‌شود. همچنین بین روز ۲۰ و ۲۵ با روز ۳۰ اختلاف معنی‌دار وجود دارد. بین روز ۱۰ با ۱۵ و ۲۰ با ۲۵ اختلاف معنی‌دار وجود ندارد. بین روزهایی که اختلاف معنی‌دار وجود دارد  $p \leq 0.05$  است (نمودار ۲).

داربست ما در روز ۲۰ رخ داده می‌تواند دارای تطابق باشد. بررسی مطالعه دیگری در راستای مطالعه قبلی که توسط ساکسنا و همکارانش (۲۰) انجام گرفت نیز نشان داد که آنها سلول‌های اپی تلیال مری را از رت‌های جوان گرفته و در شرایط مصنوعی کشت دادند و توانستند سلول‌های اپیتلیال با مورفولوژی اپیتلیوم بالغ ایجاد کنند. همچنین آنها قابلیت ادامه حیات این سلول‌ها را بر روی داربست سه بعدی کلاژن بررسی نمودند. با توجه به مطالعات انجام شده در پژوهش حاضر و با توجه به شکل ۱۱،۱۰ به نظر می‌رسد که سلول‌های بلاستمایی شبه جنینی در داربست سلول‌زدایی شده قابلیت تمایز به سلول‌های اپیتلیومی ترانزیشنال بافت مثانه را دارند با این تفاوت که در این پژوهش از یک داربست طبیعی در کنار بافت بلاستما به عنوان منبع سلولی استفاده شد.

لیند برگ و همکارانش (۲۱) الگوی رشد سلول‌های اپیتلیال انسان و فیبروبلاست‌ها را که روی ماتریکس خارج سلولی منشا گرفته از SIS کشت شده‌اند را مورد بررسی قرار دادند دیده شد که فیبرو بلاست‌ها معمولا وقتی که با سلول‌های اپیدرمی روی SIS کشت می‌شوند به داربست هجوم می‌آورند همچنین توانایی داربست در حمایت کردن اتصال فیبروبلاست‌ها و سلول‌های اپیدرمی و مهاجرت، تکثیر و تمایز با حضور ترکیبات غشای پایه ما را هدایت می‌کرد که این مدل شاید برای مطالعات بر هم کنش سلول - ماتریکس و برای تحقیقات جانمایی درم مناسب باشد. البته در تحقیق لیند برگ از سلول اپیتلیال انسان و فیبروبلاست برای کشت روی داربست SIS استفاده شد ولی در پژوهش حاضر تلاش شد که از بافت بلاستمایی به عنوان یک بافت پویا در مجاورت داربست مثانه، تمایز سلولی را به عنوان یک مولفه مهم تحقیق دنبال کنیم که تشکیل فیبروبلاست‌ها در روز ۲۰ موید این کار است (شکل ۱۴). بطوریکه در تحقیقات شهری در سال ۲۰۰۳ نشان داده شده که سلول‌های بافت بلاستما قابلیت تمایز در جهات مختلف را دارا هستند (۲۲).

### نتیجه‌گیری

نتایج پژوهش حاضر نشان می‌دهد که بافت بلاستما و داربست مثانه خرگوش نیوزیلندی مدل مناسبی برای بررسی کنش‌های متقابل بافتی در یک ساختار سه بعدی است. یافته‌های این پژوهش اعم از تشکیل اپیتلیوم پلی‌مورف مثانه (شکل ۱۰، ۱۱) و همچنین ایجاد فیبروبلاست‌ها (شکل ۱۴) و رویدادهایی از فرایند انژیوژن‌زرا می‌توان نقش تاثیر ماتریکس خارج سلولی مثانه

ساختاری و عملکردی ترشح شده توسط سلول‌های هر بافت بوده و بنابراین ترکیب بندی و توزیع ترکیبات ماتریکس خارج سلولی به منبع بافت بستگی دارد. ماتریکس خارج سلولی که ماده تشکیل دهنده این داربست‌ها است از انواعی از بافت‌ها از جمله دریچه‌های قلبی، لایه زیر مخاطی روده کوچک و مثانه مشتق شده است. ساختار و عملکرد مولکول‌های ECM شرایط ارتباط سلول‌ها با سلول‌های مجاور و ارتباط سلول‌ها با محیط خارج را فراهم می‌کند (۱۷). روش‌های مهندسی بافت با استفاده از داربست‌های متخلخل سنتزی که سلول روی آن کشت می‌شود پتانسیل قابل توجهی برای القای احیای بافت‌ها به ایجاد دیواره مثانه و عملکرد آن دارد بطوری که درووا و همکارانش (۱۸) با مطالعه القای رشد اوروتلیال در *in vivo* با استفاده از داربست پلی‌گلی‌کولیک اسید (Poly glycolic acid=PGA) کشت شده با سلول‌های فیبروبلاستی موش به این نتیجه رسیدند که در پیوند کشت شده با سلول ایجاد یک اپیتلیوم چند لایه با حداقل ۵ لایه از سلول‌های اپیتلیالی در مرکز داربست دیده می‌شود که این اپیتلیوم با اپیتلیوم سیستم ادراری موش شباهت دارد. بنابراین به نظر می‌رسد با توجه به اینکه در تحقیق حاضر در روز ۱۵ کشت اپیتلیوم پلی‌مورف مثانه در مرکز داربست تشکیل شد (شکل ۱۱،۱۰) می‌توان قرابت نتایج این دو تحقیق را گزارش کرد با این تفاوت که در پژوهش ما از داربست طبیعی استفاده شد.

در پژوهش دیگری کامپودونیکو و همکارانش (۱۹) با کشت سلول‌های مثانه روی داربستی از لایه زیر مخاطی روده کوچک خوک (Small intestinal submucosa=SIS) به منظور مطالعه تجربی مهندسی پیوندهای سیستم ادراری مشاهده کردند که در نمونه‌های روز ۱۰ افزایش ضخامت لایه اپیتلیال سیستم ادراری به صورت پیکر بندی دو لایه دیده می‌شود و در روز ۲۰ در همه پیوندها لایه ترانزیشنال به صورت دو لایه مرتب شده‌اند و شبیه سلول‌های اوروتلیال طبیعی هستند. همچنین در روز ۲۰ انژیوژن‌ز بوسیله تکوین چندین رگ جدید در ماتریکس دیده می‌شود. با توجه به نتایج تحقیق کامپودونیکو و با عنایت به نتایج تحقیق حاضر احتمالا می‌توان گفت که مهاجرت سلول‌های بلاستمایی به داربست با هدف تشکیل اپیتلیوم در داربست در روز ۱۵ انجام شده است (شکل ۱۱،۱۰) بنابراین تشکیل شدن اپیتلیوم پلی‌مورف در مرکز داربست را می‌توان یکی از رویدادهای حاصل از کنش‌های متقابل بین دو بافت مذکور دانست. همچنین انژیوژن‌ز رخ داده در روز ۲۰ با رویدادهایی از فرایند انژیوژن‌ز که در

8. Brown AL, Brook-Allred TT, Waddell JE, White J, et al. Bladder acellular matrix as a substrate for studying in vitro bladder smooth muscle-urothelial cell interactions. *J Biomaterials*. 2005; 26:529-543.
9. Ferrtti P, Corcoran JP. RA regulation of keratin expression and myogenesis suggests different ways of regenerating muscle in adult amphibian limbs. *J of Cell Sci*. 1999; 112:1385-94.
10. Crapo PM, Gilbert TW, Badylak SF. An overview of tissue and whole organ decellularization processes. *J Biomaterials*. 2011; 32:3233-3243.
11. Omae H, Zhao C, Sun YL, An KN, et al. Multilayer tendon slices seeded with bone marrow stromal cells: a novel composite for tendon engineering. *J Orthop Res*. 2009; 27:937-942.
12. Gilbert TW, Sellaro TL, Badylak SF. Decellularization of tissue and organ. *J Biomaterials*. 2006; 27:3675-3683.
13. Abousleiman RI, Reyes Y, McFetridge P, Sikavitsas V. The Human Umbilical Vein: A Novel Scaffold for Musculoskeletal Soft Tissue Regeneration. *J Artif Organs* 2008; 32:735-742.
14. Barnes CA, Brison J, Michel R, Brown BN, et al. The surface molecular functionality of decellularized extracellular matrices. *J Biomaterials*. 2011; 32:137-143.
15. Tian H, Bharadwaj Sh, Liu Y, Ma H, et al. Myogenic differentiation of human bone marrow mesenchymal stem cells on a 3D nano fibrous scaffold for bladder tissue engineering. *J Biomaterials*. 2010; 31:870-877.
16. Badylak SF. The extracellular matrix as a scaffold for tissue reconstruction. *Cell & Developmental Biology*. 2002; 13:377-383.
17. Badylak SF, Freytes DO, Gilbert TW. Extracellular matrix as a biological scaffold material: Structure and function. *J Act Bio*. 2009; 5:1-13.
18. Drewa T, Sir J, Czajkowski R, Wozniak A. Scaffold Seeded With Cells Is Essential in Urothelium Regeneration and Tissue Remodeling In Vivo After Bladder Augmentation Using. in *Vitro Engineered Graft*. *J Trans Proceed*. 2006; 38:133-135.
19. Campodonico F, Benelli R, Michelazzi A, Ognio E, et al. Bladder Cell Culture on Small Intestinal Submucosa as Bioscaffold: Experimental Study on Engineered Urothelial Grafts. *J Eur Uro*. 2004; 46:531-537.
20. Saxena AK, Ainoedhofer H, Hollwarth ME. Esophagus tissue engineering: in vitro generation of esophageal epithelial cell sheets and viability on scaffold. *J Ped Surg*. 2009; 44(5): 896-901.

بر تمایز سلول‌های بافت بلاستمایی دانست. زیرا ماتریکس خارج سلولی از طریق رسپتورهای اختصاصی موجود در سطح سلول می‌تواند اثر عمیقی بر روی رفتارهای سلول شامل چسبندگی، قطبیت سلول و مهاجرت گذاشته و برسیگنال‌هایی که بقاء سلول، تمایز و تکثیر را تنظیم می‌کنند موثر باشد (۲۳). تلاش‌های مهندسی بافت و پزشکی ترمیمی در پژوهش‌های امروزه برای انواع بافت‌ها و ارگان‌های بدن انسان در حال انجام است. پیشرفت‌های اخیر پیشنهاد می‌کند که بافت‌های مهندسی شده ممکن است در آینده کاربردهای کلینیکی گسترده‌ای پیدا کنند که این کاربردها در جهت ایجاد شرایط بهتر برای حضور جایگزین‌های بافتی در طب پیوند و ترمیم می‌باشد (۲۴). همچنین اشاره به این نکته قابل توجه است که می‌توان در آینده با ادامه پژوهش‌های مشابه و هدف‌دار در این زمینه شرایطی را جهت توجه هرچه بیشتر به صنعتی شدن این داربست‌ها و به خصوص نوع هوشمند آن فراهم نمود.

### تشکر و قدردانی

با تشکر و سپاس فراوان از معاونت محترم پژوهش و فناوری دانشگاه آزاد اسلامی واحد مشهد که پژوهش حاضر را مورد حمایت قرار دادند.

### منابع

1. Km Y. Cell surface interactions with extracellular materials. *J Annu Rev Biochem*. 1983; 52:761-799.
2. Berna G, Leon-Quinto T, Ensenat-Waster R, Montanya E, et al. Stem cell and diabetes. *J Biomed and pharmaco*. 2001; 55:206-212.
3. Langer R, Vacanti JP. *Tissue engineering Science*. 1993; 260:920-926.
4. Chapekar MS. Tissue engineering: challenges and opportunities. *J Biomed Mater Res*. 2000; 53:617-620.
5. Polak JM, Bishop AE. Stem cells and tissue engineering: past, present and future. *Ann N Y Acad Sci*. 2006; 1068:352-366.
6. Cao Y, Lees J. Scaffolds, stem cells and tissue engineering: A potent combination. *Aust J Chem*. 2005; 58:691-703.
7. Tottey S, Johnson SA, Crapo PM, Reing JE, et al. The effect of source animal age upon extracellular matrix scaffold properties. *J Biomaterials*. 2011; 32(1):48-54.

21. Lindberg K, Badylak SF. Porcine small intestinal submucosa (SIS): a bioscaffold supporting in vitro primary human epidermal cell differentiation and synthesis of basement membrane proteins. *J BURNS*. 2001; 27:254-266.
22. Shahri N M. Geometrical and histological model for: mammalian wound repair and regeneration. *J Wound Repair and Regeneration*. 2003; 11:513-526.
23. Rozario T, Desimone DW. The extracellular matrix in development and morphogenesis: A dynamic view. *J d bio*. 2010; 341:126-140.
24. Atala A. Engineering organs. *J C Op Biotech*. 2009; 20:575-592.

## Experimental studies of interactions between blastema tissue and three-dimensional matrixes decellularized of New Zealand rabbit bladder *in vitro*

Rasti H, M.Sc.<sup>1\*</sup>, Mahdavishahri N, Ph.D.<sup>2</sup>, Baharara J, Ph.D.<sup>2</sup>, Saghiri N, M.Sc.<sup>1</sup>

1. MSc in cell & developmental biology, Dept Biology, Mashhad Branch, Islamic Azad University, Young Researchers Club, Mashhad, Iran

2. Dept Biology, Mashhad Branch, Islamic Azad University, Mashhad, Iran

\* Email corresponding author: [h\\_rasti88@yahoo.com](mailto:h_rasti88@yahoo.com)

Received: 16 Jun. 2011

Accepted: 17 Aug. 2011

---

### Abstract

**Aim:** The histological events in experimental studies of interaction between blastema tissue and decellularized bladder of New Zealand rabbit *in vitro* was the aim of this investigation.

**Material and methods:** In order to decellularization of rabbit's bladder, in physical way, the pieces of bladder tissue were frozen at -4°C for 24 hours, and kept in liquid nitrogen. In chemical Method, the bladder in 1% wt/vol solution of sodium dodecyl sulfate (SDS) for 24 hours to decellularization was kept. For blastema tissue preparation with the help of a special punch, New Zealand rabbit ear (pinna) was pierced, after 72 hours with the help of another puncher, a circular blastema from the edge of holes was separated and the decellularized samples were kept in to the middle of the blastema ring and then, transferred to the culture media in a sterile condition. The samples with hematoxylin & eosin, pick indigo and pickrofushin (van gaison) were stained.

**Results:** In this study, the studies of light microscopy showed that, colonial cells that connected together were perfectly migrated inside the scaffold on the day 15. On the same day, the blastema cells were differentiated to epithelial dimensional matrix cells and bladder transitional epithelium created in the center of scaffold. Angiogenesis was observed in scaffold on the next days.

**Conclusion:** It appears, the decellularized bladder of New-Zealand rabbit as a bio-scaffold is capable to provide a proper environment, induce blastema cells to migrate into the scaffold and create connections between blastema cells and differentiation.

**Keywords:** Acellular scaffold, Bladder, New Zealand rabbit, 3D Matrix