

بررسی بافت‌شناسی برهم‌کنش بین بافت بلاستمای حاصل از لاله‌ی گوش خرگوش نر نژاد نیوزلندی و داربست مری سلول‌زدایی شده‌ی خرگوش

دکتر ناصر مهدوی شهری^۱، ملیحه اکبرزاده نیاکی^۲، دکتر مریم مقدم متین^۳،
دکتر مسعود فریدونی^۴، دکتر رویا لاری^۵

مقاله پژوهشی

چکیده

مقدمه: ماتریکس خارج سلولی (ECM یا Extracellular matrix) یک جزء کلیدی در نگهداری و بازسازی بافت‌ها و اندام‌ها است و دارای اثرات القایی بر بسیاری از رفتارهای سلولی می‌باشد. هدف این مطالعه، بررسی برهم‌کنش ماتریکس سلول‌زدایی شده‌ی مری خرگوش با بافت بلاستمای حاصل از پانچ لاله‌ی گوش خرگوش نر نژاد نیوزلندی بود. بافت بلاستما تجمعی از سلول‌های تمایز نیافته است که قابلیت تقسیم و تمایز سلولی را مشابه سلول‌های جنینی دارا می‌باشند.

روش‌ها: در این مطالعه‌ی تجربی، پس از جداسازی مری خرگوش، روش‌های فیزیکی و شیمیایی سلول‌زدایی شامل انجماد و ذوب مکرر، و تیمار با شوینده‌های Triton X-100 و SDS (Sodium dodecyl sulfate) انجام گرفت. بافت بلاستما، با دو مرحله‌ی پانچ با فاصله‌ی زمانی ۴۸ ساعت از گوش خرگوش به دست آمد. پس از مراحل شستشو، داربست‌های سلول‌زدایی شده درون حلقه‌ها مونتاژ و کشت داده شدند.

یافته‌ها: مطالعات بافت‌شناسی نشان داد که در بهترین حالت، تکنیک انجماد-ذوب سریع در ازت مایع و استفاده از Triton X-100 ۱ درصد به مدت ۲۴ ساعت و به دنبال آن، تیمار با SDS ۰/۵ درصد به مدت ۴۸ ساعت منتهی به حذف سلول‌ها همراه با حفظ پروتئین‌های کلاژن و الاستین موجود در ماتریکس مری شد. همچنین، مهاجرت سلول‌های بافت بلاستما به داربست مری در هفته‌ی دوم کشت مشاهده گردید.

نتیجه‌گیری: این بررسی نشان داد که ECM سلول‌زدایی شده‌ی مری می‌تواند دارای اثرات القایی بر تکثیر، مهاجرت و چسبندگی سلول‌های بافت پویای بلاستما باشد.

واژگان کلیدی: مهندسی بافت، سلول‌زدایی، داربست مری، بافت بلاستما، برهم‌کنش سلول - ماتریکس

ارجاع: مهدوی شهری ناصر، اکبرزاده نیاکی ملیحه، مقدم متین مریم، فریدونی مسعود، لاری رویا. بررسی بافت‌شناسی برهم‌کنش بین بافت بلاستمای حاصل از لاله‌ی گوش خرگوش نر نژاد نیوزلندی و داربست مری سلول‌زدایی شده‌ی خرگوش. مجله دانشکده پزشکی

اصفهان ۱۳۹۲؛ ۳۱ (۲۶۱): ۱۸۷۵-۱۸۶۵

۱- استاد، گروه زیست‌شناسی، دانشکده‌ی علوم و گروه پژوهشی بیوتکنولوژی سلولی و مولکولی، پژوهشکده‌ی فن‌آوری زیستی، دانشگاه فردوسی مشهد، مشهد، ایران

۲- کارشناس ارشد، گروه زیست‌شناسی، دانشکده‌ی علوم، دانشگاه فردوسی مشهد، مشهد، ایران

۳- دانشیار، گروه زیست‌شناسی، دانشکده‌ی علوم و گروه پژوهشی بیوتکنولوژی سلولی و مولکولی، پژوهشکده‌ی فن‌آوری زیستی، دانشگاه فردوسی مشهد، مشهد، ایران

۴- دانشیار، گروه زیست‌شناسی، دانشکده‌ی علوم، دانشگاه فردوسی مشهد، مشهد، ایران

۵- استادیار، گروه زیست‌شناسی، دانشکده‌ی علوم، دانشگاه فردوسی مشهد، مشهد، ایران

Email: ma_ak112@stu-mail.um.ac.ir

نویسنده‌ی مسؤول: ملیحه اکبرزاده نیاکی

مقدمه

مشتق از ماتریکس خارج سلولی مری سلول‌زدایی شده، اثرات القایی ماتریکس مری را بر رفتارهایی همچون قطیبت، چسبندگی، تکثیر و تمایز این سلول‌ها اثبات نموده است (۹، ۷). طبق این مطالعات، استفاده از بافت مری سلول‌زدایی شده به عنوان داربست طبیعی جهت مطالعه‌ی اثرات القایی ماتریکس بر رفتارهای سلولی، مطلوب به نظر می‌رسد.

علاوه بر داربست، انتخاب منبع سلولی مناسب نیز نقش مهمی در مطالعه‌ی رفتار سلول‌ها در هنگام برهم‌کنش با داربست دارد و اغلب، منابع سلولی مورد استفاده شامل سلول‌های فیروبلاستی، بنیادی و سرطانی می‌باشد. اما برای شبیه‌سازی هر چه بیشتر شرایط حاکم بر سلول‌ها در شرایط *In vivo* می‌توان از کشت بافت‌های پویا مانند بافت‌هایی که در پدیده‌ی ترمیم در جانوران پرسلولی نقش دارند، استفاده نمود. بافت بلاستما شامل گروهی از سلول‌های تمایز نیافته است که در بخش‌های در حال ترمیم بدن برخی موجودات زنده می‌توانند ایجاد گردند. چنین بافتی را می‌توان دو روز پس از پانچ کردن لاله‌ی گوش خرگوش ایجاد نمود. این گروه از سلول‌ها قادرند به سرعت تقسیم و متمایز شوند و پس از مدتی ناحیه‌ی پانچ شده را به طور کامل ترمیم کنند (۱۱-۱۰). در بررسی سلول‌های به دست آمده از حلقه‌های بافت بلاستمای حاصل از پانچ لاله‌ی گوش خرگوش که برای اولین بار توسط محمودی و همکاران انجام گرفت، بیان ژن‌هایی از قبیل Oct4 و Sox2 که ویژه‌ی سلول‌های بنیادی جنینی ESCs می‌باشند، در این سلول‌ها شناسایی شد (۱۲). بدین ترتیب، بافت پویای بلاستمای حاصل از پانچ لاله‌ی گوش خرگوش می‌تواند مدل مناسبی به عنوان منبع

داربست‌ها به عنوان یکی از مهم‌ترین ارکان مهندسی بافت، نقش مهمی در فراهم کردن ساختار سه بعدی برای رشد سلول‌ها در شرایط *In vitro* ایفا می‌کنند (۱). در میان داربست‌های مورد استفاده در مهندسی بافت اعم از داربست‌های مصنوعی مثل پلیمرهای سنتزی و داربست‌های طبیعی متشکل از ماتریکس خارج سلولی، استفاده از داربست‌های طبیعی مشتق از بافت‌های سلول‌زدایی شده، سازگاری زیستی بالاتری نشان داده است (۲).

ECM (Extracellular matrix) توسط سلول‌های ساکن در همه‌ی بافت‌ها و اندام‌ها ترشح می‌شود و ضمن ایجاد یک داربست و پشتیبان برای سلول‌ها، در برهم‌کنش پویا با جمعیت سلولی مجاورش قرار دارد. برهم‌کنش سلول-ماتریکس، نقش مهمی در تسهیل و سازمان‌دهی بسیاری از فرایندهای سلولی ایفا می‌کند (۳-۴). ترکیب مولکولی و سازمان‌یابی مولکول‌های سازنده‌ی ECM نقش مهمی در پاسخ سلول‌ها به ماتریکس اطرافشان دارد (۵). بسته به نوع بافت، ماتریکس و اجزای تشکیل دهنده‌ی آن می‌تواند متفاوت باشد (۶).

مری، اندامی ارتجاعی است که در ماتریکس خارج سلولی خود طیف گسترده‌ای از مولکول‌ها از قبیل کلاژن، الاستین، فیبرونکتین و لامینین را دارا می‌باشد. این اندام، از نظر بافت‌شناسی از لایه‌های مختلف سلولی شامل اپی‌تلیوم سنگفرشی مطبق، آستر مخاط، عضله‌ی مخاطی، زیر مخاط و لایه‌های عضلانی تشکیل شده است (۷-۸). مطالعات حاصل از سلول‌زدایی مری موش صحرائی و کشت سلول‌های اپی‌تلیال مری بر روی داربست‌های طبیعی

ترتیب در محلول Triton X-۱۰۰ و سپس در محلول SDS (Sodium dodecyl sulfat) قرار گرفتند تا بهترین میزان حذف سلولی و در عین حال حفظ محتوای ماتریکس، به دست آید.

مطالعات بافت‌شناسی و رنگ‌آمیزی‌های هماتوکسیلین ائوزین، Diamidino-۲-phenylindole (DAPI)، پیکروسیروس‌رد و اورسئین جهت بررسی میزان حذف سلولی، حفظ کلاژن و حفظ الاستین موجود در ماتریکس خارج سلولی، به منظور انتخاب بهترین داربست انجام گرفت. پس از تهیه داربست مطلوب، جهت استریل نمودن و آماده‌سازی داربست جهت کشت، نمونه‌ها به مدت ۳۰ دقیقه در اتانول ۷۰ درصد قرار داده شد و در زیر هود لامینار پس از یک دقیقه شستشو با آب مقطر استریل، به مدت ۱ ساعت در PBS (Phosphate buffered saline) استریل نگاه‌داری شدند. ترتیب مراحل آماده‌سازی داربست سلول‌زدایی شده مری خرگوش در جدول ۱ و گروه‌های مختلف سلول‌زدایی با تیمارهای شیمیایی متفاوت، در جدول ۲ نمایش داده شده است.

جهت تهیه ی حلقه بلاستمایی، پس از حذف موهای سطح پشتی و شکمی گوش خرگوش توسط کرم موبر و بی‌حس نمودن آن با استفاده از اسپری لیدوکائین، پانچ‌هایی به قطر ۲ میلی‌متر در لاله ی گوش خرگوش ایجاد شد. پس از گذشت ۴۸ ساعت، پانچ‌های بزرگ‌تری به قطر ۴ میلی‌متر در محل پانچ‌های قبلی ایجاد گردید؛ به نحوی که بافت بلاستمایی به صورت حلقه از ناحیه ی پانچ شده جدا شد. پس از جداسازی حلقه ی بلاستما، به منظور جلوگیری از آلودگی، ۷ بار با سرم فیزیولوژی شستشو داده شد و به زیر هود لامینار انتقال یافت.

سلولی، جهت مطالعه‌ی رفتارهای سلولی به شمار رود. هدف از این مطالعه، بررسی برهم‌کنش ماتریکس سلول‌زدایی شده‌ی مری خرگوش با بافت بلاستمای حاصل از پانچ لاله‌ی گوش خرگوش نر نژاد نیوزلندی بود.

روش‌ها

در این مطالعه‌ی تجربی، جهت تهیه‌ی داربست‌های مری سلول‌زدایی شده و همچنین تهیه‌ی حلقه‌های بلاستمایی، از خرگوش‌های نر نژاد نیوزلندی ۶ تا ۸ ماهه با وزن تقریبی ۲/۵ کیلوگرم استفاده گردید. در طول مدت انجام آزمایش، این حیوانات در حیوان‌خانه‌ی دانشکده‌ی علوم پایه‌ی دانشگاه فردوسی مشهد نگهداری شدند و تحت یک رژیم پایه‌ی انفرادی در قفس و با حرارت کنترل شده‌ی ۲۰ درجه‌ی سانتی‌گراد و روشنایی ۱۲ ساعت در شبانه‌روز قرار داشتند. تمام مراحل این پژوهش با رعایت مصوبات مربوط به اصول کار با حیوانات آزمایشگاهی انجام شد.

جهت تهیه‌ی داربست مری، تلفیقی از روش‌های فیزیکی و شیمیایی سلول‌زدایی انجام گرفت. به طور مختصر، پس از برداشت مری، نمونه‌ها در سرم فیزیولوژی شستشو داده شدند و به مدت یک هفته، در دمای صفر درجه‌ی سانتی‌گراد نگهداری شدند. پس از ذوب و شستشوی مجدد نمونه‌ها در سرم فیزیولوژی، تکنیک انجماد و ذوب سریع و مکرر در ازت مایع (Snap freeze technique) انجام گرفت.

در مرحله‌ی بعدی، روش شیمیایی سلول‌زدایی به کار برده شد (۹، ۷). بدین صورت که نمونه‌ها در سه گروه با درصدها و در بازه‌های زمانی مختلف، به

هر خانه‌ی ظرف کشت، ۲ میلی‌لیتر محیط کشت (DMEM (Dulbecco's modified eagle medium) اضافه شده و نمونه‌ها در انکوباتور O_2 ۵ درصد و دمای ۳۷ درجه‌ی سانتی‌گراد نگهداری شدند. مراحل کلی روش انجام آزمایش در شکل ۱ نشان داده شده است. مطالعات بافت‌شناسی شامل رنگ‌آمیزی هماتوکسیلین ائوزین و روش PAS (Periodic acid schiff) بر روی داربست‌های کشت داده شده، با فواصل زمانی یک هفته‌ای، جهت بررسی برهم‌کنش سلول‌های بافت بلاستما با این داربست‌ها انجام گرفت.

یافته‌ها

مطالعات بافت‌شناسی نشان می‌دهد که مری طبیعی خرگوش همانند سایر جوندگان، شامل چندین لایه‌ی سلولی از قبیل اپی‌تلیوم سنگفرشی، مطبق شاخی، آستر مخاط، عضله‌ی مخاطی، زیر مخاط، لایه‌های عضلانی حلقوی و طولی و آدوانتیس می‌باشد.

بر اساس نتایج حاصل از رنگ‌آمیزی هماتوکسیلین ائوزین، بیشترین میزان حذف سلولی با حفظ ساختار، در گروه ۲ تیمار شده با ۱ درصد Triton X-100 به مدت ۲۴ ساعت و سپس

جدول ۱. ترتیب مراحل آماده‌سازی داربست سلول‌زدایی شده‌ی مری خرگوش. زمان و درصد تیمار با شوینده‌ها در گروه‌های مختلف، متفاوت بود.

مراحل آماده‌سازی داربست سلول‌زدایی شده

۱	انجماد آهسته در دمای صفر درجه‌ی سانتی‌گراد (۱ هفته)
۲	انجماد- ذوب سریع در ازت مایع (۶ تکرار)
۳	تیمار با Triton X-100
۴	تیمار با SDS
۵	اتانول ۷۰ درصد (۳۰ دقیقه)
۶	شستشو در آب مقطر استریل (۱ دقیقه)
۷	شستشو با PBS (۱ ساعت)

SDS: Sodium dodecyl sulfate

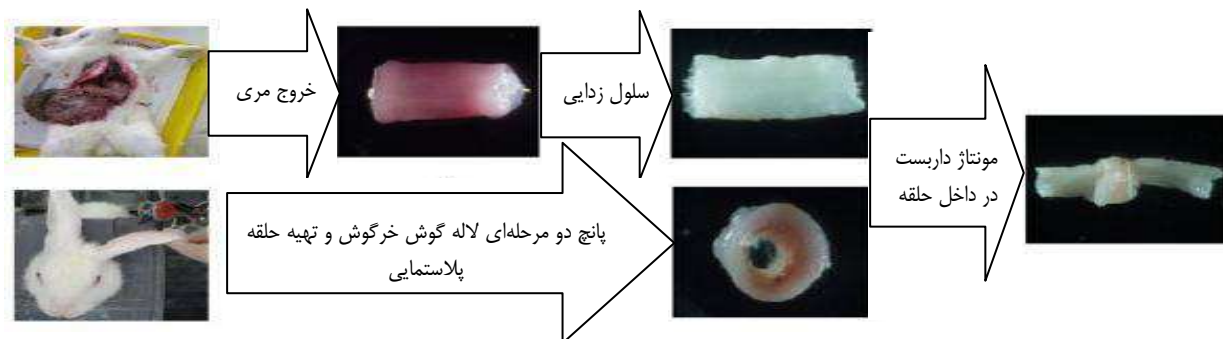
PBS: Phosphate buffered saline

جدول ۲. گروه‌های مختلف سلول‌زدایی با تیمارهای شیمیایی متفاوت

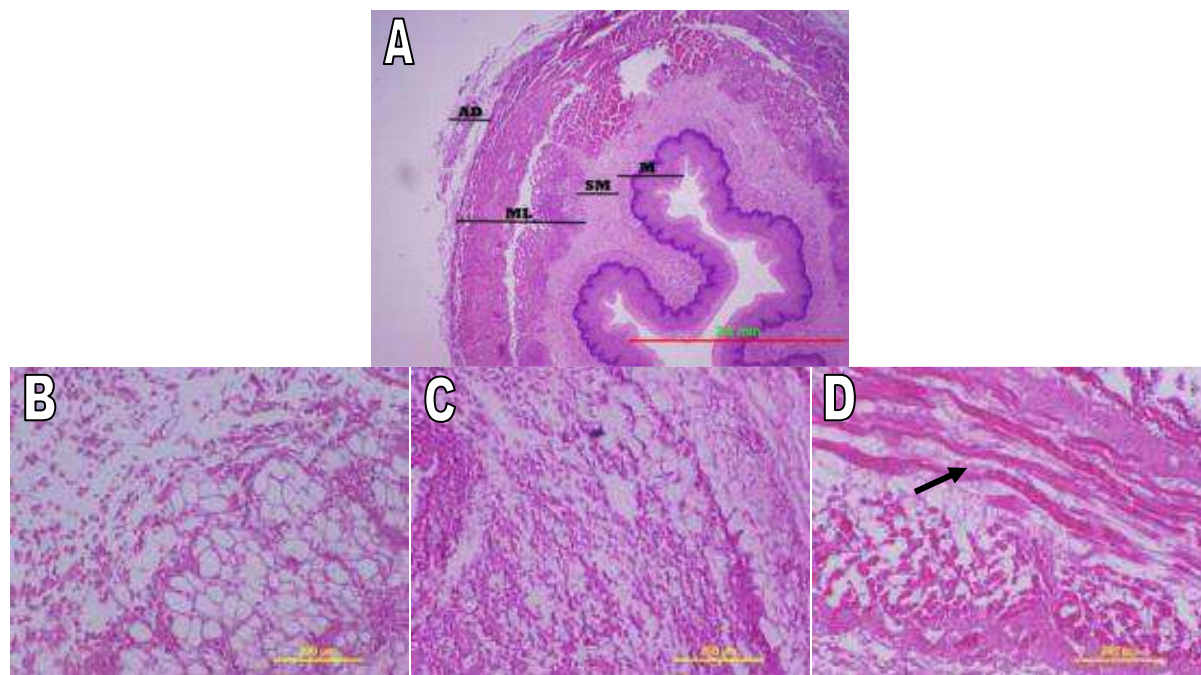
گروه	Triton X-100	SDS
۱	۱ درصد ۴۸ ساعت	۰/۵ درصد، ۴۸ ساعت
۲	۱ درصد ۲۴ ساعت	۰/۵ درصد، ۴۸ ساعت
۳	-	۱ درصد، ۴۸ ساعت

SDS: Sodium dodecyl sulfate

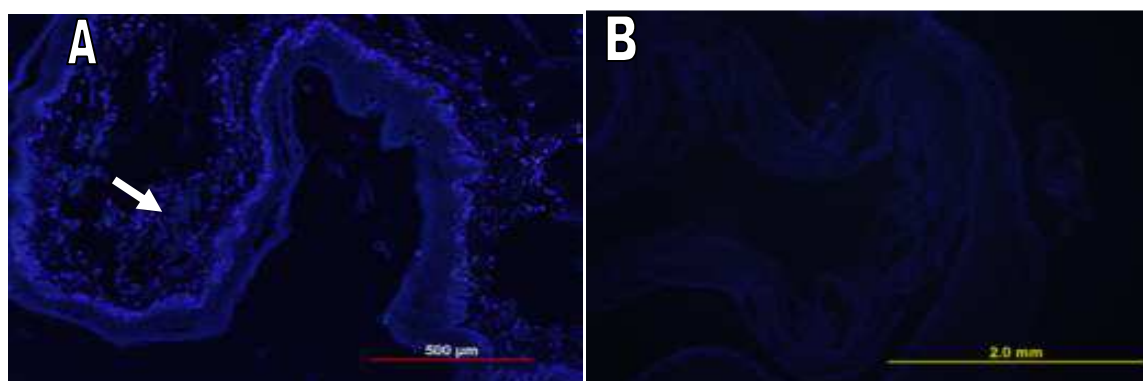
سپس در شرایط استریل کامل، داربست مری خرگوش که به صورت نواری بریده شده بود، در داخل حلقه‌ی بلاستمایی قرار داده شد و به ظرف کشت شش‌خانه‌ای (۶ Well plate) منتقل گردید. به



شکل ۱. مراحل آماده‌سازی داربست مونتاژ شده در حلقه‌ی بلاستما جهت کشت



شکل ۲. نمایش مری طبیعی و گروه‌های مختلف سلول‌زدایی مری خرگوش با استفاده از رنگ‌آمیزی هماتوکسیلین اتوزین. (A) لایه‌های مختلف مری طبیعی شامل M مخاط، SM زیر مخاط، ML لایه عضلانی، AD آدانئیس. (B) گروه ۱ تیمار شده با Triton X-100 ۱ درصد به مدت ۴۸ ساعت و سپس SDS (Sodium dodecyl sulfate) ۰/۵ درصد به مدت ۴۸ ساعت، از هم گسستگی در ماتریکس خارج سلولی را نشان می‌دهد. (C) گروه ۲ تیمار شده با Triton X-100 ۱ درصد به مدت ۲۴ ساعت و سپس SDS ۰/۵ درصد به مدت ۴۸ ساعت، سلول‌زدایی موفق با حفظ انسجام ماتریکس را نشان می‌دهد. (D) در گروه ۳ تیمار شده با SDS ۱ درصد به مدت ۴۸ ساعت، سلول‌زدایی ناموفق بود. بقایای سلول‌های لایه عضلانی مری با پیکان نمایش داده شده است. (A) بزرگ‌نمایی ۴۰x، (B) و (C) بزرگ‌نمایی ۲۰۰x.



شکل ۳. نمایش مری طبیعی و داربست مری سلول‌زدایی شده با استفاده از رنگ‌آمیزی فلورسنت Diamidino-2-phenylindole (DAPI). (A) هسته‌ها در بافت طبیعی مری با رنگ فلورسنت DAPI به صورت نقاط درخشان و نشان دهنده وجود سلول در بافت هستند. (B) تصویر داربست مری سلول‌زدایی شده به دلیل عدم وجود هسته‌ها، بسیار تیره دیده می‌شود. (A) بزرگ‌نمایی ۱۰۰x، (B) بزرگ‌نمایی ۴۰x.

گروه ۲ به مدت طولانی‌تری در معرض Triton X-100 بوده‌اند، دچار از هم گسستگی در ساختار

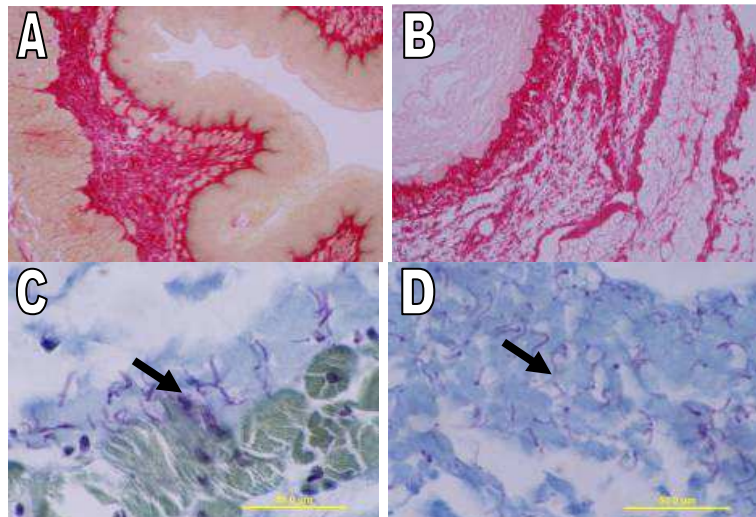
۰/۵ درصد SDS به مدت ۴۸ ساعت مشاهده شد. در حالی که نمونه‌های مربوط به گروه ۱ که نسبت به

حضور رشته‌های الاستین را در بافت مری سلول‌زدایی شده تأیید نمود (شکل ۴).

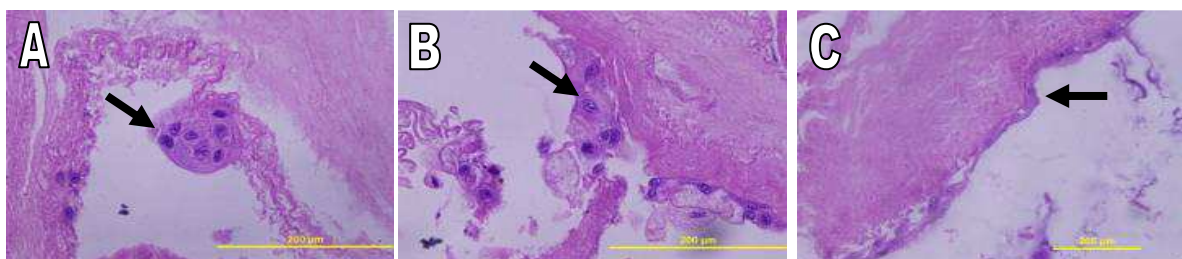
مطالعات حاصل از کشت بافت بلاستمای مونتاژ شده با داربست، مهاجرت و چسبندگی سلول‌های بافت بلاستما را به داربست مری نشان داد. شکل ۵ که حاصل رنگ‌آمیزی هماتوکسیلین ائوزین نمونه‌ی داربست مری در هفته‌ی دوم کشت می‌باشد، سلول‌های مهاجرت یافته را که به صورت منفرد و یا تجمعات سلولی در داربست استقرار یافته‌اند، نشان می‌دهد (شکل ۵).

ماتریکس خارج سلولی شده بودند و نمونه‌های گروه ۳ که تنها در معرض SDS قرار گرفته بودند، عدم سلول‌زدایی کامل را نشان دادند (شکل ۲).

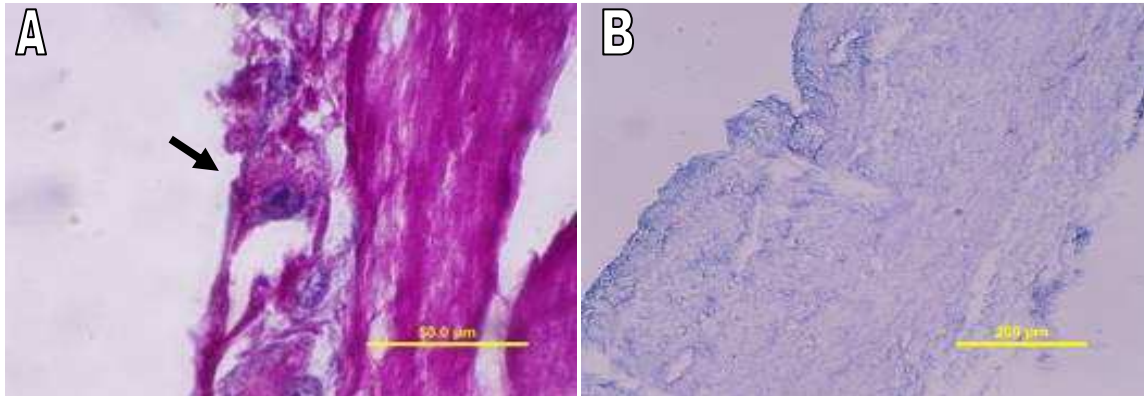
بررسی مری طبیعی و داربست مری سلول‌زدایی شده با استفاده از رنگ‌آمیزی فلورسنت DAPI، حذف کامل مواد هسته‌ای را از داربست سلول‌زدایی شده تأیید نمود (شکل ۳). رنگ‌آمیزی پیکروسیروس‌رد، حفظ محتوای کلاژن موجود در ماتریکس خارج سلولی مری سلول‌زدایی شده را به خصوص در لایه‌های آستر مخاط و زیرمخاط نشان داد. همچنین رنگ‌آمیزی اورسئین،



شکل ۴. نمایش مری طبیعی و داربست مری سلول‌زدایی شده با استفاده از رنگ‌آمیزی‌های پیکروسیروس‌رد و اورسئین. رنگ قرمز در شکل‌های A و B نشان دهنده‌ی حضور کلاژن در مری طبیعی (A) و سلول‌زدایی شده (B) می‌باشد. رشته‌های بنفش رنگ الاستین، در مری طبیعی (C) و سلول‌زدایی شده (D) با پیکان نمایش داده شده است. (A و B) بزرگ‌نمایی ۱۰۰×، (C و D) بزرگ‌نمایی ۱۰۰۰×.



شکل ۵. نمایش رنگ‌آمیزی هماتوکسیلین ائوزین از داربست مری کشت داده شده با بافت بلاستما در هفته‌ی دوم کشت. سلول‌های بافت بلاستما با نشان دادن رفتار مهاجرت و چسبندگی، به صورت منفرد (C) و یا با تشکیل توده‌های سلولی (A و B)، در درون داربست استقرار یافتند. (A و B) بزرگ‌نمایی ۴۰۰×، (C) بزرگ‌نمایی ۲۰۰×.



شکل ۶. نمایش رنگ‌آمیزی پاس هماتوکسیلین از داربست مری کنترل و کشت داده شده با بافت بلاستما در هفته‌ی دوم کشت. (A) سلول‌های مهاجرت یافته به داربست مری، در هفته دوم پس از کشت، پاسخ پاس مثبت را نشان دادند. (B) در حالی که داربست کنترل کشت داده شده، بدون مونتاز با بافت بلاستما، به صورت پاس منفی دیده می‌شود. (A) بزرگ‌نمایی $1000\times$ ، (B) بزرگ‌نمایی $200\times$.

و لایه‌بندی مناسب‌تری برخوردار بودند (۱۳). Bhrany و همکاران با استفاده از تلفیقی از روش‌های شیمیایی و آنزیمی، داربست سلول‌زدایی شده‌ی مری موش صحرایی را تهیه و برهم‌کنش آن را با سلول‌های اپی‌تلیال مری بررسی نمودند. در این مطالعه تیمار شیمیایی با ۱ درصد Triton X-۱۰۰ به مدت ۴۸ ساعت و سپس ۰/۵ درصد SDS به مدت ۴۸ ساعت به عنوان روش شیمیایی سلول‌زدایی انجام گرفت (۷).

از طرفی، Ozeki و همکاران با مقایسه‌ی روش‌های مختلف سلول‌زدایی مری موش صحرایی نشان دادند که مری‌های سلول‌زدایی شده با ۱۰۰- Triton X از نظر استحکام مکانیکی ترد و شکننده و از نظر ساختار بافت‌شناسی، دچار به هم ریختگی و عدم انسجام در ساختار خارج سلولی لایه‌های مخاط و زیر مخاط بودند (۹). از این رو، در پژوهش حاضر سعی گردید گروه‌های مختلفی با درصدها و زمان‌های متفاوت تیمار با Triton X-۱۰۰ و SDS طراحی گردد تا در نهایت گروهی انتخاب شود که ضمن حذف حداکثر مواد سلولی، کمترین آسیب را به

از هفته‌ی دوم کشت، در سلول‌های مهاجرت یافته به داربست مری، پاسخ مثبت پاس (رفتار ترشحي) مشاهده گردید، در حالی که داربست‌های کنترل کشت داده شده پاسخ منفی پاس را نشان دادند (شکل ۶).

بحث

در این پژوهش داربست مشتق شده از ماتریکس خارج سلولی مری خرگوش با استفاده از تلفیقی از روش‌های فیزیکی و شیمیایی، سلول‌زدایی گردید و به منظور بررسی اثرات القایی‌اش بر رفتار سلول‌های بافت بلاستمای حاصل از لاله‌ی گوش خرگوش، به صورت مونتاز شده درون حلقه‌ی بلاستما کشت داده شد. یکی از خصوصیات مهم یک داربست مناسب، دارا بودن سازگاری زیستی بالا می‌باشد (۱).

Beckstead و همکاران در اولین قدم‌های مهندسی بافت، برهم‌کنش سلول‌های اپی‌تلیال مری را با داربست‌های سنتزی کلاژن به عنوان داربست مصنوعی و آلودرم پوست انسان به عنوان داربست طبیعی بررسی نمودند و نشان دادند که داربست‌های طبیعی به دلیل دارا بودن سازگاری زیستی بالا از سازمان‌یابی

ماتریکس خارج سلولی بافت وارد نماید.

بدین ترتیب همان‌طور که در شکل ۲ نمایش داده شده است، تیمار ۴۸ ساعته‌ی مری با ۱ درصد Triton X-۱۰۰ منجر به از هم گسیختگی ماتریکس خارج سلولی مری خرگوش شد. در حالی‌که تیمار ۲۴ ساعته‌ی این ماده آسیب کمتری به بافت وارد نموده است. Bhrany و همکاران در مطالعه‌ی خود، حذف کامل محتویات سلولی و در عین حال، حضور مولکول‌های مهم ماتریکس خارج سلولی از قبیل کلاژن، الاستین، لامینین و فیرونکتین را در داربست مری سلول‌زدایی شده اثبات نمودند (۷). در مطالعه‌ی حاضر نیز حذف کامل محتویات سلولی و هسته‌ی سلول‌ها با رنگ‌آمیزی‌های هماتوکسیلین ائوزین و DAPI و نیز حفظ مولکول‌های کلاژن و الاستین در ماتریکس سلول‌زدایی شده‌ی مری با رنگ‌آمیزی‌های پیکروسیروس‌رد و اورسئین نشان داده شد (شکل‌های ۲، ۳ و ۴).

نمونه‌های کشت داده شده در هفته‌ی دوم پس از کشت، مهاجرت سلول‌ها را از حلقه‌ی بلاستما به سمت داربست کشت داده شده درون آن نشان داد (شکل ۵). لایه‌های مخاط و زیر مخاط بافت مری، غنی از مولکول‌های کلاژن نوع I و III می‌باشند. همچنین، مری یک اندام بسیار ارتجاعی است که حاوی مقادیر بسیاری از رشته‌های الاستین در بافت پیوندی خود به ویژه در لایه‌ی مخاط در اطراف عضله‌ی مخاطی، رگ‌های خونی و در زیر غشای پایه‌ی اپی‌تلیوم و آدوانتیس می‌باشد. همه‌ی این مولکول‌ها نقش به‌سزایی در القای چسبندگی و قطبیت و ایجاد مسیرهایی برای مهاجرت سلول‌ها ایفا می‌کنند (۱۴).

Fujimoto و همکاران با بررسی برهم‌کنش سلول‌های کراتینوسیت با داربست سنتزی الاستین، اثر القایی قوی الاستین را بر مهاجرت و تمایز نهایی سلول‌های کراتینوسیت کشت داده شده اثبات نمودند (۱۵). Bhrany و همکاران حفظ کلاژن و الاستین را در داربست سلول‌زدایی شده‌ی مری و اثر القایی ماتریکس خارج سلولی بر رفتارهای قطبیت، چسبندگی، مهاجرت و تکثیر سلول‌های اپی‌تلیال کشت شده بر روی این داربست‌ها را نشان دادند (۷). بدین ترتیب، می‌توان کلاژن و الاستین موجود در داربست را به عنوان یکی از عوامل احتمالی مسؤول در القای مهاجرت و چسبندگی سلول‌های مهاجرت یافته از حلقه‌ی بلاستما به داربست مری برشمرد. Lindberg و همکاران نشان دادند که داربست مشتق از بافت پیوندی زیر مخاط روده‌ی خوک، توانایی القای اثر میتوژنیک بر سلول‌های اپیدرمی را دارا هستند و موجب افزایش تکثیر سلولی می‌گردند (۱۶). وجود توده‌های سلولی موجود در داربست می‌تواند نشان دهنده‌ی اثر القایی ماتریکس خارج سلولی مری بر تکثیر سلول‌های مهاجرت یافته باشد.

از معرف PAS به منظور جستجو و بررسی حضور گلیکوپروتئین‌ها استفاده شد. رنگ صورتی یا قرمز مایل به ارغوانی داربست‌های کشت داده شده با بافت بلاستما، نشان‌دهنده‌ی پاسخ PAS مثبت و حضور گلیکوپروتئین‌ها در این داربست‌ها می‌باشد. با توجه به پاسخ پاس منفی داربست‌های فاقد بافت بلاستما، می‌توان حضور این گلیکوپروتئین‌ها را به فعالیت ترشحی سلول‌های مهاجرت یافته از بافت بلاستما نسبت داد (شکل ۶). این استنباط موافق با نتایج مطالعه Friedl و همکاران می‌باشد که بر نقش

استفاده از بافت بلاستما که در فرایند ترمیم در برخی موجودات زنده تشکیل می‌شود، می‌تواند منبع سلولی مناسبی جهت بررسی رفتار سلول‌ها در شرایط مختلف بافتی باشد.

گلیکوپروتئین‌ها از جمله کاده‌رین در چسبندگی‌های سلولی و ضرورت حضور آن‌ها در مهاجرت‌های سلولی تأکید داشته‌اند (۱۷).

نتیجه‌گیری

در مجموع، داربست مری سلول‌زدایی شده‌ی حاصل از این تحقیق، با دارا بودن مولکول‌های مهمی از جمله کلاژن و الاستین، در القای رفتارهایی مثل مهاجرت، چسبندگی و تکثیر سلول‌های بافت پویای بلاستما مؤثر بود و ضمن حفظ ساختار و ترکیبات اصلی خود، می‌توانست به عنوان بستر مناسبی جهت بررسی رفتارهای سلولی و مدل مناسبی جهت کاربرد احتمالی در مهندسی بافت به کار رود. از سوی دیگر، چسبندگی و مهاجرت سلول‌های بافت بلاستما به داربست‌های کشت داده شده، نشان می‌دهد که

تشکر و قدردانی

تأمین بخشی از هزینه‌های این تحقیق از محل گرانت پژوهشی مربوط به فرم شماره‌ی ۳ با عنوان «بررسی هیستولوژیکی اثرات متقابل بین بافت بلاستمای لاله‌ی گوش خرگوش نر نژاد نیوزلندی و ماتریکس‌های سه بعدی سلول‌زدایی شده‌ی کوریون مری خرگوش در شرایط *In vitro*» توسط معاونت پژوهشی دانشگاه فردوسی مشهد فراهم گردید. پژوهشگران بر خود لازم می‌دانند مراتب سپاس و امتنان خود را از حوزه‌ی معاونت پژوهشی این دانشگاه ابراز نمایند.

References

1. Saxena AK. Tissue engineering and regenerative medicine research perspectives for pediatric surgery. *Pediatr Surg Int* 2010; 26(6): 557-73.
2. Badylak SF, Freytes DO, Gilbert TW. Extracellular matrix as a biological scaffold material: Structure and function. *Acta Biomater* 2009; 5(1): 1-13.
3. Daley WP, Peters SB, Larsen M. Extracellular matrix dynamics in development and regenerative medicine. *J Cell Sci* 2008; 121(Pt 3): 255-64.
4. Lutolf MP, Hubbell JA. Synthetic biomaterials as instructive extracellular microenvironments for morphogenesis in tissue engineering. *Nat Biotechnol* 2005; 23(1): 47-55.
5. Hynes RO. The extracellular matrix: not just pretty fibrils. *Science* 2009; 326(5957): 1216-9.
6. Yurchenco PD. Basement membranes: cell scaffoldings and signaling platforms. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 2011; 3(2).
7. Bhrany AD, Beckstead BL, Lang TC, Farwell DG, Giachelli CM, Ratner BD. Development of an esophagus acellular matrix tissue scaffold. *Tissue Eng* 2006; 12(2): 319-30.
8. Rishniw M, Rodriguez P, Que J, Burke ZD, Tosh D, Chen H, et al. Molecular aspects of esophageal development. *Ann N Y Acad Sci* 2011; 1232: 309-15.
9. Ozeki M, Narita Y, Kagami H, Ohmiya N, Itoh A, Hirooka Y, et al. Evaluation of decellularized esophagus as a scaffold for cultured esophageal epithelial cells. *J Biomed Mater Res A* 2006; 79(4): 771-8.
10. 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; 112 (Pt 9): 1385-94.
11. Mahdavi Shahri N, Naseri F, Kheirabadi M, Babaie S, Sadeghie Shakib F, Azarniya M. The Ultra Structural Study of Blastema in Pinna Tissues of Rabbits with Transmission Electron Microscope. *Journal of Biological Sciences* 2008; 8: 993-1000.
12. Mahmoudi Z, Moghaddam Matin M, Saeinasab M, Nakhai-Rad S, Mirahmadi M, Mahdavi Shahri N, et al. Blastema cells derived from rabbit ear show stem cell characteristics. *Journal of Cell and Molecular Research* 2011; 3(1): 25-31.

13. Beckstead BL, Pan S, Bhrany AD, Bratt-Leal AM, Ratner BD, Giachelli CM. Esophageal epithelial cell interaction with synthetic and natural scaffolds for tissue engineering. *Biomaterials* 2005; 26(31): 6217-28.
14. Tan JY, Chua CK, Leong KF, Chian KS, Leong WS, Tan LP. Esophageal tissue engineering: an in-depth review on scaffold design. *Biotechnol Bioeng* 2012; 109(1): 1-15.
15. Fujimoto N, Tajima S, Ishibashi A. Elastin peptides induce migration and terminal differentiation of cultured keratinocytes via 67 kDa elastin receptor in vitro: 67 kDa elastin receptor is expressed in the keratinocytes eliminating elastic materials in elastosis perforans serpiginosa. *J Invest Dermatol* 2000; 115(4): 633-9.
16. 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. *Burns* 2001; 27(3): 254-66.
17. Friedl P, Hegerfeldt Y, Tusch M. Collective cell migration in morphogenesis and cancer. *Int J Dev Biol* 2004; 48(5-6): 441-50.

The Histological Study of the Interactions between Rabbit Decellularized Esophagus Scaffold and the Blastema Tissue Obtained from the Pinna of New Zealand White Rabbit

Nasser Mahdavi-Shahri PhD¹, Maliheh Akbarzadeh-Niaki MSc²,
Maryam Moghadam-Matin PhD³, Masoud Fereidoni PhD⁴, Roya Lari PhD⁵

Original Article

Abstract

Background: The extracellular matrix (ECM) is a key component during regeneration and maintenance of tissues and organs and has inductive effects on the behaviors of cells. The objective of this study was to investigate the interactions between rabbit's esophageal scaffold with blastema tissue cells obtained from the pinnas of New Zealand white rabbits. Blastema is a collection of undifferentiated cells that are able to propagate and differentiate in a manner similar to embryonic cells.

Methods: In this experimental study, after removing the esophagus, physical and chemical decellularization methods including snap-freeze thaw and treatment with Triton X-100 and sodium dodecyl sulfate (SDS), as detergents, were performed. To prepare the blastema tissue, the pinnas of New Zealand white rabbits were punched and after 48 hours, the blastema tissue was obtained by a second punch. After washing, the scaffolds were assembled inside the blastema rings and cultured in Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM).

Findings: Histological studies demonstrated that using snap-freeze thaw and then treatment with 1% Triton X-100 for 24 hours followed by 0.5% SDS for 48 hours was the best decellularization procedure for preparing scaffolds from rabbit's esophagus. Furthermore, adhesion and migration of blastema tissue cells to esophageal scaffold were observed after two weeks of culture.

Conclusion: It can be concluded that the extracellular matrix of the decellularized esophagus can have inductive effects on the proliferation, migration and adhesion of the blastema tissue cells.

Keywords: Tissue engineering, Decellularization, Esophageal scaffold, Blastema tissue, Cell-matrix interaction

Citation: Mahdavi-Shahri N, Akbarzadeh-Niaki M, Moghadam-Matin M, Fereidoni M, Lari R. **The Histological Study of the Interactions between Rabbit Decellularized Esophagus Scaffold and the Blastema Tissue Obtained from the Pinna of New Zealand White Rabbit.** J Isfahan Med Sch 2014; 31(261): 1865-75

1- Professor, Department of Biology, School of Science AND Cell and Molecular Research Group, Institute of Biotechnology, Ferdowsi University of Mashhad, Mashhad, Iran

2- Department of Biology, School of Science, Ferdowsi University of Mashhad, Mashhad, Iran

3- Associate Professor, Department of Biology, School of Science AND Cell and Molecular Research Group, Institute of Biotechnology, Ferdowsi University of Mashhad, Mashhad, Iran

4- Associate Professor, Department of Biology, School of Science, Ferdowsi University of Mashhad, Mashhad, Iran

5- Assistant Professor, Department of Biology, School of Science, Ferdowsi University of Mashhad, Mashhad, Iran

Corresponding Author: Malihe Akbarzadeh-Niaki MSc, Email: ma_ak112@stu-mail.um.ac.ir