

## ماتریکس سلول زدایی شده ریه و نقش آن به عنوان داربستی در تمایز سلول‌های بلاستمایی در آزمایشگاهی شرایط

\* **ماهان تکبیری:** کارشناسی ارشد سلولی - تکوینی، گروه زیست شناسی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد مشهد، ایران (نویسنده مسئول).  
mt\_takbiri@yahoo.com

**ناصر مهدوی شهری:** استاد سیتولوژی و هیستولوژی، گروه زیست شناسی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه فردوسی مشهد، ایران. Mahdavin@um.ac.ir  
**جواد بهارآرا:** دانشیار بیولوژی تکوین جانوری، گروه زیست شناسی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد مشهد، ایران. baharara@yahoo.com

تاریخ پذیرش: ۹۴/۶/۲۵

تاریخ دریافت: ۹۴/۳/۱۸

### چکیده

**زمینه و هدف:** امروزه افزایش بیماران دارای نقص عضو و ارگان و همچنین وجود چالش‌های درمانی در محدوده پیوند اعضا و انتقال عضو باعث تسریع در روند ایجاد علومی همچون پزشکی ترمیمی و مهندسی بافت شده است. موفقیت و پیشرفت در این عرصه مستلزم انتخاب یک داربست مناسب؛ به عنوان میانجی سیگنال‌های بیوشیمیایی و بیوفیزیکی است. ماتریکس خارج سلولی (ECM) به عنوان یک داربست می‌تواند برای مورفوژنز بافتی، تکثیر سلولی، مهاجرت، تمایز بافتی و حفظ این تمایز عمل کند. در این تحقیق از بافت ریه سلول زدایی شده خرگوش برای تهیه ماتریکس سه‌بعدی (داربست) استفاده شد. **روش کار:** در این مطالعه تجربی به منظور تهیه داربست ابتدا از بافت ریه خرگوش نمونه‌برداری و نمونه‌های تهیه شده بر اساس روش‌های فیزیکی (Snap freezing) و شیمیایی (دترجنت SDS) سلول زدایی گردید. سپس جهت بررسی اعمال متقابل بین داربست و بافت بلاستمایی، داربست‌ها درون حلقه‌های بلاستمایی قرار داده شدند؛ و به مدت ۳۰ روز به محیط کشت منتقل شدند. نمونه‌برداری از بافت بلاستما و داربست همراه آن هر ۵ روز یک بار انجام گرفت. **یافته‌ها:** مطالعات بافتی و تصاویر میکروسکوپی، حذف سلول‌ها از داربست‌های آماده شده و ایجاد تخلخل در داربست بافت ریه را تأیید نمود. به علاوه، نتایج مطالعات در مورد بلاستما و داربست همراه آن در روزهای مختلف پس از کشت رفتارهای مهاجرت، نفوذ، تقسیم و تمایز را نشان داد. **نتیجه‌گیری:** نتایج نشان دادند که امکان تهیه یک داربست طبیعی سه‌بعدی از ریه به وسیله تیمار با SDS وجود دارد. داربست تهیه شده می‌تواند دارای اثر القایی بر رفتارهای سلولی از قبیل مهاجرت، نفوذ، تقسیم و احتمالاً تمایز باشد هر چند مطالعات بیشتری برای اثبات هویت سلول‌ها و سایر ویژگی‌های این داربست ضروری است. همچنین به نظر می‌رسد داربست حاصل از سلول زدایی بافت ریه می‌تواند به عنوان مدلی در تحقیقات مقدماتی مهندسی بافت ریه کاربرد داشته باشد.

**کلیدواژه‌ها:** مهندسی بافت ریه، سلول زدایی، داربست‌های زیستی، بافت بلاستما

### مقدمه

زیستی برای مورفوژنز بافتی، تکثیر سلولی، مهاجرت و تمایز بافتی و حفظ این تمایز عمل می‌کند (۱). انواع مختلف سلول‌ها مکانیسم‌های مختلفی را برای مهاجرت در داخل و به سوی ماتریکس خارج سلولی به کار می‌گیرند (۲۷) از نظر بیولوژیکی اجزاء فعال EMC در تعمیر بافتی، ترمیم، مهندسی بافت و در برنامه‌ریزی و کاربرد سلول‌های بنیادی برای جایگزینی بافت‌ها استفاده می‌شوند (۱، ۲۵). ماتریکس خارج سلولی در بافت‌ها و ارگان‌ها به صورت یک واسط و میانجی بین سلول‌ها عمل می‌کند. به این دلیل و دلایل ذکر شده در بالا ماتریکس خارج سلولی به عنوان یک داربست بیولوژیکی برای کاربردهای

بیشتر سلول‌ها در ارگان‌های پرسلولی، با یک شبکه پیچیده انفعالی خارج سلولی در ارتباط هستند (۱)؛ بنابراین در چینی‌جای زنده سلول‌ها به تنهایی به یکدیگر متصل نشده‌اند بلکه توسط یک ساختار دیگر به نام ماتریکس خارج سلولی (ECM) Extracellular matrix حمایت می‌شوند. ECM تنها به عنوان یک ناظر غیرفعال نیست بلکه در رویدادهای بسیار مهمی که در رشد و نمو بافت و ارگان دخیل است دارای نقش بوده است (۲۵)، ترکیبات و ساختار ECM روی رفتار و فنوتیپ سلول‌های مستقر در آن تأثیر می‌گذارد. EMC به عنوان یک داربست

مهم در موفقیت پیوند است (۲). به همین دلیل استفاده از مواد طبیعی به عنوان جایگزین‌های بافت‌های بدن می‌تواند بسیاری از مشکلات موجود در زمینه پیوند اعضا را حل کند (۲،۷). بافت شش مرکب است از سلول‌ها و ماتریکس خارج سلولی که شامل تنوع ماکرومولکول‌های بیولوژیکی و آب است. مهم‌ترین ماکرومولکول‌ها در تعیین خصوصیات مکانیکی ECM بافت شش؛ کلاژن، الاستین و پروتئوگلیکانها می‌باشند (۴). علت انتخاب بافت ریه، درصد و اندازه تخریل بالای این بافت و وجود رشته‌های کلاژن و الاستیک بود؛ زیرا درصد تخریل و اندازه آن و همچنین وجود کلاژن از مشخصه‌های مهم داربست‌های به کار برده شده در مهندسی بافت می‌باشد (۳۰). داربست‌های مورد استفاده در مهندسی بافت باید دارای درصد تخریل بالایی باشند تا یک شبکه منفذدار مرتبط به هم به منظور عمل تغذیه رسانی سلول، دفع ضایعات سلولی به خارج از داربست، تشکیل ماده زمینه برون سلولی و رگ زایی فراهم گردد. بافت شش به علت ویژگی ساختاری خود دارای درصد تخریل بالایی بوده، به دلیل این ویژگی اعمال تغذیه رسانی، دفع ضایعات و رگ زایی به خوبی در این بافت امکان پذیر می‌باشد (۲۰). برای تهیه داربست از بافت شش تنها کافی است سلول‌ها حذف شوند و با این کار می‌توان به یک شبکه تور مانند که دارای منافذ بسیار و درصد تخریل بالایی است دست‌یابیم. به طور خلاصه ترکیبات ماتریکس خارج سلولی در شش یک اتصال میانی - داخلی بین مولکول‌ها تشکیل داده که این فرایند برای رشد و نمو و عمل نرمال شش ضروری به نظر می‌رسد. رشته‌های الاستیک که یک جزء مهم در ماتریکس خارج سلولی هستند برای عمل کششی و برگشت ریه در طی تنفس به حالت اولیه و عمل نرمال شش بسیار حیاتی و ضروری هستند (۱۶) همچنین رشته‌های کلاژن که از ترکیبات مهم ECM در شش بوده، استحکام کششی ماتریکس خارج سلولی ریه را فراهم می‌کند و برای بقا و تعمیر شش به صورت نرمال ضروری است (۲۳،۲۹). با توجه به اینکه

مهندسی بافت گسترش پیدا کرد (۱۶). داربست، سلول و فاکتورهای رشد سه رکن اصلی مهندسی بافت را تشکیل می‌دهند (۹). داربست‌ها می‌توانند محیطی مشابه با ماده زمینه برون سلولی برای سلول‌ها فراهم کنند و به دلیل پاسخ‌های مناسب ایمونولوژیک، خواص آنتی ژنیک ملایم، توانایی بهبود چسبندگی سلولی و خاصیت هموستازی بسیار مورد توجه می‌باشند. این داربست‌ها به عنوان یک پشتیبان فیزیکی و قالبی برای اتصال سلول‌ها و تکوین بافت عمل می‌کنند. روشی که امروزه بیشتر در مهندسی بافت متداول است کشت سلول‌ها روی یک داربست سه بعدی در شرایط آزمایشگاهی (*in vitro*) است (۱۲) وقتی اصطلاحاتی همچون بافت‌های مهندسی شده، مهندسی بافت و پزشکی ترمیمی به کار برده می‌شود آنچه در ذهن تداعی می‌گردد جایگزینی، ترمیم و بازسازی بافت‌ها و ارگان‌های تخریب شده می‌باشد. امروزه با توجه به تعداد کم اهدا کنندگان بافت و آلودگی‌های ویروسی آن سعی در طرح بافت به کمک سلول و داربست‌های گوناگون اعم از طبیعی یا سنتزی شده است به طور کلی داربست‌های به کار برده شده در مهندسی بافت باید در شرایط فیزیولوژیکی بتوانند شبکه‌ای چند منظوره همانند ماده زمینه برون سلولی ایجاد نمایند (۱۶، ۱۴، ۶). با توجه به مطالب فوق، استفاده از ماتریکس خارج سلولی بافت‌های موجودات زنده، جهت تولید داربست‌های طبیعی مفید به نظر می‌رسد. بدین منظور، از روش سلول زدایی استفاده می‌شود. سلول زدایی بافت و ارگان به طور موفقیت آمیزی در انواع مهندسی بافت و پزشکی ترمیمی استفاده شده است. در مواردی که تنها تأثیر ماتریکس مورد بررسی قرار می‌گیرد باید تأثیرات و القاء‌های ناشی از سلول‌های بافت حذف گردد (۱۵، ۲۰). این بافت‌های فاقد سلول، بیشتر ویژگی‌های مکانیکی طبیعی خود را حفظ نموده و موجب سازمان‌دهی مجدد بافت، رگ زایی و سلول زایی مجدد می‌شوند. این در حالی است که استفاده از مواد سنتزی در ترمیم، مشکلاتی مانند عدم رگ زایی در محل پیوند را در بردارد که باعث مشکلات پاتولوژیک فراوان شده و مانعی

همچنین SDS از بافت نمونه‌ها به مدت ۲۰-۱۵ دقیقه در محلول Phosphate-buffered Saline (PBS) با غلظت ۱۰٪ قرار گرفتند و سپس چندین مرحله با آب مقطر شستشو داده شدند و در نتیجه داربست موردنظر جهت انتقال به محیط کشت آماده شد. سپس به منظور تهیه سلول‌های بلاستمایی، ابتدا موهای سطح پشتی و شکمی گوش خرگوش توسط کرم موبر زدوده شد و بعد با استفاده از اسپری لیدوکائین ۱۰٪ بی‌حسی موضعی در محل پانچ ایجاد گردید. پس از گذشت حدود ۳۰ دقیقه و با بی‌حس شدن گوش حیوان، با استفاده از دستگاه پانچر سوراخ‌هایی به قطر ۲mm در مناطق میانی گوش و دور از عروق خونی (مابین شریان مرکزی و وریدهای محیطی) ایجاد شد. ۷۲ ساعت بعد از پانچ اولیه، پانچ دوم با قطر ۴mm در اطراف سوراخ اولیه زده شد و به این ترتیب حلقه بلاستمایی را از گوش حیوان جدا کردیم. بلافاصله بعد از برداشت، حلقه‌ها جهت حذف آلودگی چندین بار در سرم فیزیولوژی شستشو داده شدند (۹،۱۰).

در نهایت به منظور بررسی نقش داربست ریه در مورد رفتار تمایزی سلول‌های بلاستمایی، هر داربست درون یک حلقه بلاستمایی آماده شده قرار گرفت و به این ترتیب حلقه بلاستمایی و داربست با هم الحاق گردیدند تا امکان بررسی نقش داربست در روی رفتار احتمالی سلول‌های بلاستمایی فراهم گردد. سپس هر کدام از حلقه‌ها و داربست همراه آن به داخل یک خانه از پلیتهای ۱۲ خانه‌ای منتقل شدند سپس در هر خانه ۳ میلی لیتر (ml) محیط کشت DMEM ریخته شد. بعد از این مراحل پلیت مذکور به انکوباتور با دمای ۳۷ درجه سانتی گراد و ۵ درصد CO<sub>2</sub> منتقل شد.

**آماده‌سازی نمونه‌ها جهت تهیه مقاطع میکروسکوپی:** به منظور بررسی اثرات القایی داربست بر روی رفتار سلول‌های بلاستمایی، نمونه‌ها در روزهای پنجم، دهم، پانزدهم، بیستم، بیست و پنجم و سی ام پس از کشت از محیط کشت خارج شدند تا مورد مطالعه میکروسکوپی قرار گیرند... پس از برداشت هر یک از نمونه‌ها در

وجود سازش‌پذیری زیستی بالا یکی از ویژگی‌های داربست‌های طبیعی است و کلاژن به‌عنوان داربست طبیعی دارای این خصوصیت می‌باشد؛ بنابراین می‌تواند امکان جایگزینی آسان سلول و فاکتور رشد را فراهم کند (۳۰) در نتیجه به علت وجود این ویژگی‌ها (وجود کلاژن و الاستیک) در بافت شش می‌توان از آن در تحقیقات مهندسی بافت به‌عنوان داربست طبیعی استفاده کرد.

هدف از این پژوهش استفاده از بافت ریه به‌عنوان یک داربست برای کشت سلول‌های بلاستمایی بود؛ به‌علاوه بررسی برهم‌کنش بین بافت بلاستما و داربست حاصله و بررسی رفتارهای احتمالی سلول‌های بلاستمایی در سیر تکوین بافت بلاستما همراه با این داربست از دیگر اهداف این پژوهش محسوب می‌شود.

## روش کار

در این تحقیق برای بررسی اعمال متقابل بین بافت بلاستمای لاله گوش خرگوش نر نژاد نیوزلندی و داربست ریه به‌منظور مطالعات مهندسی این بافت، اقدام به تهیه داربست سه‌بعدی ریه گردید.

در این تحقیق برای تهیه داربست مورد نظر، از بافت ریه خرگوش استفاده کردیم. برای حذف سلول‌های بافت شش تیمارهای فیزیکی و شیمیایی استفاده شد. ابتدا تعدادی از قطعات که برای تهیه داربست در نظر گرفته شده بود به مدت ۴-۳ روز در فریزر در دمای ۴- درجه سانتی گراد گذاشته شدند، سپس جهت snap freezing نمونه‌های تهیه‌شده در ظرف‌های اپندرومورف قرار گرفتند سپس ظرف‌های حاوی نمونه‌ها به مدت ۲ دقیقه در ازت مایع قرار داده شدند، بعد از این مدت نمونه‌ها از ازت خارج و به مدت ۵ دقیقه در محلول نرمال سالین به‌منظور جذب این محلول قرار گرفتند و سپس دوباره نمونه‌ها به ازت مایع منتقل شدند که این روند حدوداً ۷-۵ مرتبه تکرار شد. بعد از اتمام این مرحله نمونه‌های ازته شده در محلول Sodium Dodecyl Sulfate (1%) (SDS) به مدت ۲۴ ساعت گذاشته شدند، سپس به‌منظور خروج هسته‌ها، بقایای سلولی و

روزهای مختلف روش Duncan مورد استفاده قرار گرفت.

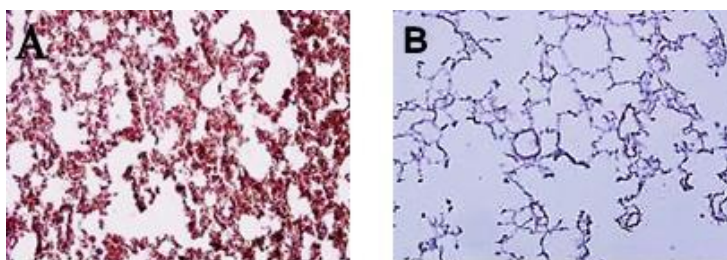
### یافته‌ها

مطالعات میکروسکوپی و آماده‌سازی نمونه‌ها حذف سلول‌ها از داربست آماده شده را نشان داد (شکل ۱). با توجه به مطالعات انجام‌شده محلول (SDS 1%) تنها سلول‌های بافت را حذف کرده و در روی ساختار ماتریکس خارج سلولی شش که متشکل از کلاژن، الاستیک و گلیکوز آمین گلیکانها است (۲۹) تأثیری نداشته و این ترکیبات در داربست سلول زدایی شده در طول زمان کشت سالم باقی مانده‌اند (شکل ۲، A, B, C, D, E, F). (شکل ۳، ۳۰، ۲۳).

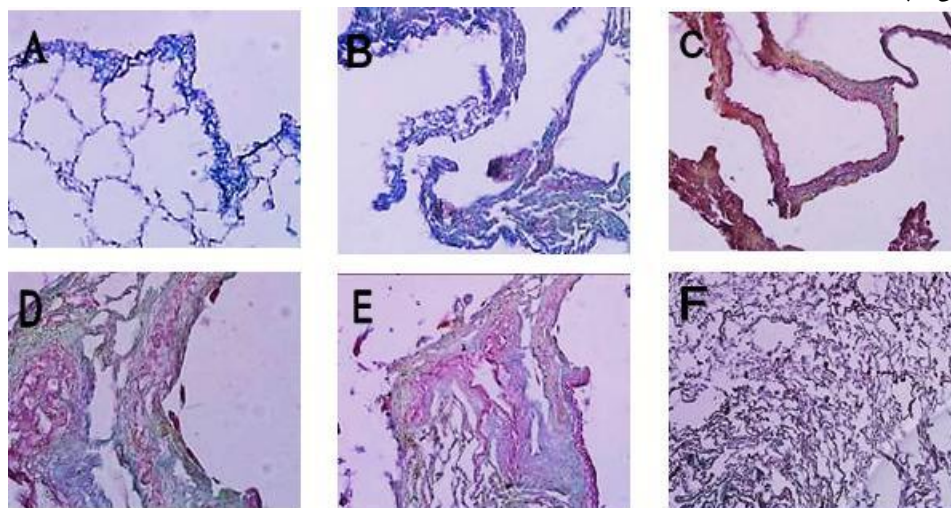
نتایج به‌دست‌آمده از مطالعات بافتی کارایی روش به‌کاربرده شده را در حذف سلول‌ها و حفظ

زمان‌های مشخص نمونه‌ها به داخل محلول فیکساتور PBF منتقل گردیده و سپس مراحل پاساژ بافتی مطابق روش معمول انجام شد. سپس جهت مشاهده رفتارهای سلولی، رنگ‌آمیزی‌های مختلف از جمله (هماتوکسیلین-ائوزین، اورسئین-پیک، پاس-هماتوکسیلین و پیک ایندیگوکارمین) انجام شد و نمونه‌های آماده شده با میکروسکوپ نوری (Olympus, Japan) و الکترونی (Germany Leo-910) (SEM) مشاهده شدند.

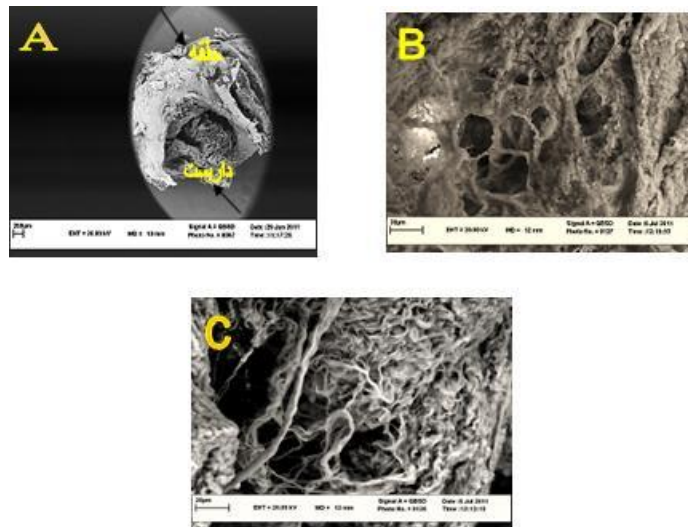
**مطالعات آماری:** جهت بررسی میزان نفوذ سلول‌های بلاستمایی به داربست ریه و تجزیه و تحلیل آماری داده از نرم‌افزار آماری (SPSS) و آنالیز واریانس (ANOVA) استفاده شد و نمودار با استفاده از نرم‌افزار (Excel) رسم گردید، همچنین جهت تعیین اختلاف معنی‌دار بین



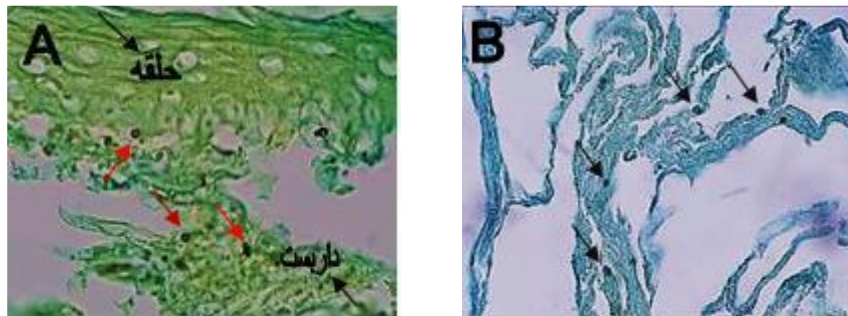
شکل ۱- تصاویر میکروسکوپی بافت ریه (A) قبل از سلول زدایی (نمونه کنترل)، (بزرگ‌نمایی 40X). (B) بعد از سلول زدایی (نمونه تست). (بزرگ‌نمایی 40X). رنگ‌آمیزی اورسئین - پیک



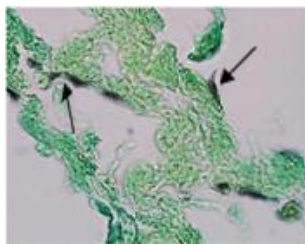
شکل ۲- مشاهده حضور رشته‌های کلاژن و الاستیک در داربست آماده شده در طی روزهای مختلف پس از کشت: (A) روز پنجم پس از کشت (بزرگ‌نمایی 40X) (B) روز دهم پس از کشت (40X) (C) روز پانزدهم پس از کشت (بزرگ‌نمایی 40X) (D) روز بیستم پس از کشت (بزرگ‌نمایی 40X) (E) روز بیست و پنجم پس از کشت (بزرگ‌نمایی 40X) (F) روز سی ام پس از کشت (بزرگ‌نمایی 20X) رنگ‌آمیزی اورسئین - پیک، در این رنگ‌آمیزی رشته‌های کلاژن به رنگ آبی و الاستیک به رنگ قرمز دیده می‌شوند.



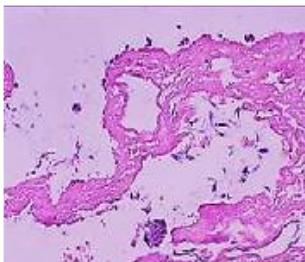
شکل ۳- تصاویر به دست آمده از بافت سلول زدایی شده ریه خرگوش با استفاده از میکروسکوپ الکترونی SEM. (A) موقعیت داربست و حلقه بلاستمایی نسبت به یکدیگر در محیط کشت (B,C) نمایه درونی داربست متخلخل آماده شده همراه با رشته‌های کلاژن و الاستیک



شکل ۴- (A) موقعیت حلقه و داربست نسبت به یکدیگر و مشاهده مهاجرت سلول‌های بلاستمایی از حلقه به سمت داربست در روز پنجم پس از کشت (فلش‌های قرمز نشان‌دهنده مهاجرت سلول‌ها هستند) (بزرگ نمای 40X) (B) جایگیری و نفوذ سلول‌های بلاستمایی در داربست، فلش‌ها نشان‌دهنده سلول‌های بلاستمایی نفوذ کرده به داربست می‌باشد (بزرگ‌نمایی 20X). رنگ آمیزی پیک ایندیگو



شکل ۵- فلش‌ها نشان‌دهنده تقسیم و تمایز سلول‌های بلاستمایی در آئول‌های بافت ریه می‌باشند (بزرگ‌نمایی 100X): رنگ آمیزی پیک ایندیگو



شکل ۶- مشاهده مهاجرت و نفوذ تعداد بسیاری زیادی از سلول‌ها به داربست در روز پانزدهم پس از کشت (بزرگ‌نمایی 40X) رنگ آمیزی هماتوکسیلین-اِئوزین (H-E)

رشته‌های کلاژن و الاستیک و در نتیجه تهیه داربست را تأیید نمود.

### بررسی اثر القائی داربست شش بر روی

### سلول‌های بلاستمایی: به منظور بررسی اثر القائی

داربست ریه بر روی رفتار سلول‌های بلاستمایی نمونه‌های الحاق شده داربست و بافت بلاستما در

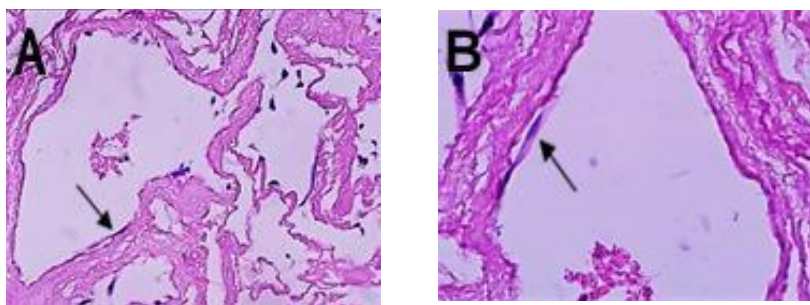
روزهای پنجم، دهم، پانزدهم، بیستم، بیست و پنجم و سی ام پس از کشت مورد مطالعه قرار

گرفتند. مطالعات بافت‌شناسی و میکروسکوپی نشان داد که پس از گذشت تنها پنج روز از کشت،

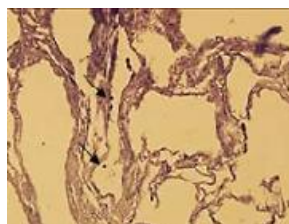
سلول‌های بلاستمایی از حلقه به سمت داربست مهاجرت کرده و بیشتر در قسمت‌های حاشیه‌ای

داربست قابل رؤیت هستند؛ به علاوه سلول‌های نفوذ کرده در این روز فاقد هرگونه تمایزی بوده و به

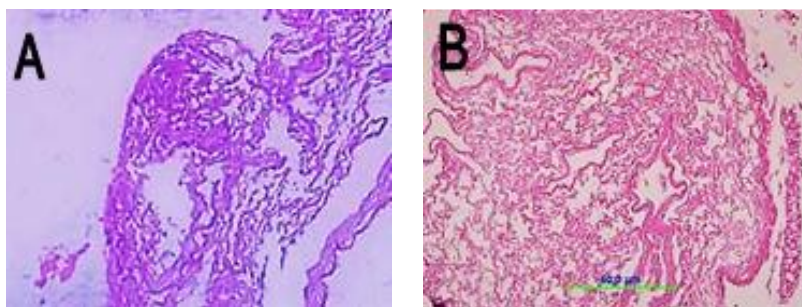
شکل کروی و در حالت غیرفعال در داربست مشاهده شدند (شکل ۴). در روز دهم پس از کشت



شکل ۷- مشاهده تمایز سلول‌های بلاستمایی به سلول‌های اندوتلیوم در عروق خونی بافت ریه در نمونه روز پانزدهم (A) بزرگ‌نمایی (B) (40X) بزرگ‌نمایی (100X). رنگ‌آمیزی هماتوکسیلین-اُئوزین (H-E)



شکل ۸- نمایه کلی داربست در روز بیستم پس از کشت، فلش نشان‌دهنده تعداد کمی سلول در داربست بوده. (بزرگ‌نمایی 20X)، رنگ‌آمیزی پاس - هماتوکسیلین

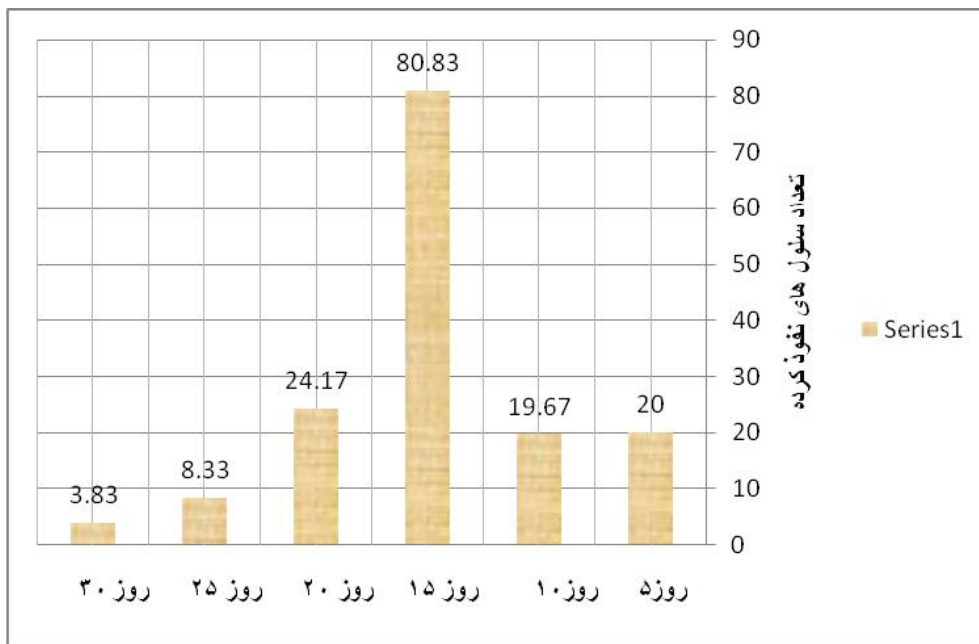


شکل ۹- نمایه کلی داربست (A) داربست در روز بیست و پنجم پس از کشت، (B) داربست در روز سی ام پس از کشت، بزرگ‌نمایی 20X، رنگ‌آمیزی هماتوکسیلین - اُئوزین (H.E)

داربست مشاهده کرد؛ که علت آن می‌تواند تخریب بافتی و مرگ سلولی باشد. همچنین ساختار داربست نسبت به روزهای قبل تفاوت دارد به طوری که می‌توان حالت متراکم شدن در داربست را مشاهده کرد (شکل ۹)؛ که این حالت می‌تواند احتمالاً به خاطر افزایش ساخت رشته‌های کلاژن در این روز در داربست باشد.

همان‌طور که در نمودار دیده می‌شود روزهای ۳۰ ام و ۲۵ ام تعداد سلول‌های کمتری به داربست نفوذ کرده بین روزهای ۵ و ۱۰ و ۲۰ تفاوت زیادی وجود ندارد. ولی همان‌گونه که در نمودار زیر مشاهده می‌کنیم بیشترین میزان نفوذ مربوط به روز پانزدهم پس از کشت است (نمودار ۱).

علاوه بر نفوذ، تقسیم و تمایز احتمالی سلول‌های بلاستمایی به سلول‌های پنوموسیتی در دیواره آلوئول‌ها مشاهده گردید (شکل ۵). در روز پانزدهم پس از کشت علاوه بر مشاهده افزایش قابل توجه در میزان مهاجرت سلول‌های بلاستمایی به داربست (شکل ۶)، قرارگیری تعدادی از این سلول‌ها در دیواره عروق خونی و تمایز احتمالی این سلول‌ها به سلول‌های اندوتلیوم عروق خونی مشاهده شد (شکل ۷). در روز بیستم پس از کشت روند نفوذ و مهاجرت سلول‌های بلاستمایی اما به میزان کمتر نسبت به روز پانزدهم ادامه داشت (شکل ۸). بر طبق مطالعات بافت‌شناسی و تصاویر به‌دست‌آمده در روزهای بیستم و پنجم و سی ام پس از کشت مشخص شد که تعداد سلول‌ها نسبت به روزهای قبل در سطح داربست بسیار کاهش یافته به طوری که به سختی می‌توان سلولی در



نمودار ۱- نمودار میله‌ای میانگین تعداد سلول‌های نفوذ کرده به درون داربست در روزهای مختلف پس از کشت. روز سی ام کمترین میزان نفوذ را نشان می‌دهد همچنین روز پانزدهم بیشترین میزان نفوذ سلول‌ها را به درون داربست نشان می‌دهد همان‌طور که در نمودارها می‌بینیم از روز پانزدهم به بعد این تعداد رو به کاهش نهاده است.

### بحث و نتیجه‌گیری

امروزه بسیاری از بیماری‌های ریوی بدون درمان باقی‌مانده است و به‌صورت امراض جسمی و مهمی پدیدار شده که باعث مرگ‌ومیر می‌شوند. پیوند اعضا برای بسیاری از این بیماران تنها راه درمانی باقی می‌ماند که تقریباً ۵۰٪ احتمال موفقیت وجود دارد. چندین سال است که آزمایشات بسیاری در زمینه‌های بهبود بیولوژی ریه و پتانسیل درمانی برای بیماری‌های ریوی آغاز شده است. مطالعات پیشنهاد می‌کند که پایه سلول درمانی، استفاده از سلول‌های اجدادی و سلول‌های بنیادی مشتق شده از بافت‌های بالغ بوده، بنابراین می‌توان امیدوار بود که این نوع سلول‌ها به‌عنوان پتانسیل درمانی برای ترمیم و تعمیر بافت ریه و به‌عنوان منبع سلولی برای مهندسی این بافت در آینده ای نزدیک به کار روند (۳۳-۳۵).

تحقیقات اخیر، روی شناسایی سیستم‌های کشت ۳ بعدی و مهندسی زیستی برای تولید بافت ریه کاربردی در شرایط *in vivo* و *ex vivo* فوکوس کرده است. این تحقیقات یک روند افزایشی در موفقیت ترمیم و تعمیر بافت‌هایی

نظیر پوست، رگ‌ها، غضروف و استخوان داشته است. جالب توجه اینکه سلول‌های بنیادی جدا شده از مایع آمنیوتیک، خون بند ناف، بافت‌های چربی یا مغز استخوان می‌توانند واکنش‌هایی روی داربست‌های مختلف مانند داربست‌های بیوسنتتیک داشته باشند. همچنین می‌توانند تولیدکننده غضروف تراکه آ برای استفاده در ترمیم نقص‌های مادرزادی تراکه آ و بافت زردپی جهت استفاده در نقص‌های مادرزادی دیافراگم باشند. تحقیقات اخیر موفقیت‌هایی را در استفاده کلینیکی راه‌های هوایی مهندسی‌شده، نشان داده است. یکسری مطالعات دیگر در هر دو شرایط *in vivo* and *in vitro* انجام شده است که تغییر فنوتیپی سلول‌های جنینی ریه کشت شده در یک 3D گلیکوزامین را به ساختارهای شبه آلوژلاری در داربست نشان می‌دهد. به‌علاوه تحریک سلول‌های جنینی شش موش در داربست‌های ترکیبی با ایزومرهای مختلفی از قبیل فاکتورهای رشد فیبروبلاستی باعث تفاوت در خصوصیات رشد و نمو و ترمیم شش شد. از طریق کاربرد اختصاصی و مناسب فاکتورهای رشد و نیروی فیزیکی، یک نایژه کاربردی حاصل آمد که در

پیوند استفاده شد. همچنین از طریق مهندسی بافت، یک بخش یک برانش ساخته و سپس به یک بیمار با تنگی مجرا پیوند شد. این مطالعات اثبات کرد که سلول‌های مزانشیمی و دیگر جمعیت‌های سلول‌های بنیادی می‌توانند در شرایط *Ex vivo* استفاده شوند (۳۳-۳۴). مهندسی بافت از پتانسیل این سلول‌ها و دوره جدیدی برای پیوند بافت ریه خبر می‌دهد.

به‌منظور موفقیت مهندسی بافت باید شرایطی مشابه با محیط موجود زنده فراهم گردد تا رشد و فعالیت سلول در آن به‌طور طبیعی انجام گیرد. به همین دلیل امروزه استفاده از داربست‌های طبیعی در مهندسی بافت در سطح دنیا بسیار رواج یافته است (۱۴). بافت‌های طبیعی پتانسیل بالایی به‌عنوان جایگزین‌های بافتی در بدن دارند. استفاده از بافت‌های طبیعی انسان و حیوانات مختلف در تحقیقات زیادی مورد بررسی قرار گرفته است (۵) نتایج نشان می‌دهد که مواد زیستی طبیعی معمولاً به یک تیمار قبلی فیزیکی یا شیمیایی نیاز دارند تا آن‌ها را از تجزیه زیستی حفظ کند، ایمنی زایی آن‌ها را کاهش دهد و همچنین بافت را استرلیزه کند. روش‌های مختلفی به این منظور مورد بررسی قرار گرفته است. 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 (۱۳).

در این پژوهش تلاش گردید تا ابتدا بافت شش را با استفاده از روش‌های فیزیکی و شیمیایی سلول زدایی نموده، سپس از آن به‌عنوان داربستی جهت کشت سلول‌های بلاستمایی استفاده کنیم و در پایان به کمک روش‌های مختلف بافت شناسی رفتارهای احتمالی سلول‌های بلاستمایی مورد بررسی و مطالعه قرار گیرد. روش‌های آماده‌سازی داربست از ECM بافت‌ها، مورفولوژی سطح و ویژگی‌های مکانیکی داربست را تا اندازه ای تحت تأثیر قرار می‌دهد (۳۲). در بسیاری از مطالعات از SDS و یا تریتون برای سلول زدایی

بافت استفاده شده است و نتایج متناقضی را در رابطه با کارایی آن‌ها در سلول زدایی و میزان آسیب به بافت گزارش کردند (۳). مشخص شده است که انجماد سریع با تشکیل کریستال‌های یخی موجب تخریب غشاء سلول می‌گردد و به فرایند سلول زدایی کمک می‌کند، اما با تخریب ECM و گسستگی آن موجب تغییر ساختمان بافت می‌گردد؛ با این حال نسبت به انجماد آهسته آسیب کمتری به بافت وارد می‌کند (۳۲). سدیم دودسیل سولفات (SDS) از شوینده‌های آنیونی عمومی می‌باشد که در سرتاسر جهان استفاده می‌گردد. با انحلال غشاء، دنا توره نمودن پروتئین‌ها و حذف پروتئین‌های سیتوپلاسمی و هسته‌ای، موجب سلول زدایی بافت و کاهش پاسخ ایمنوژنیک پس از پیوند داربست می‌گردد (۲۶).

در این پژوهش از روش‌های مختلفی برای سلول زدایی بافت ریه استفاده شد؛ که شامل روش‌های فیزیکی؛ انجماد آهسته، انجماد سریع در ازت مایع و روش‌های شیمیایی شامل؛ شوینده یونی SDS بود. با توجه به نتایج مطالعات دیگران، روش سلول زدایی ممکن است موجب آسیب به ساختار بافت شده باشد و میزان آسیب آن باید با مطالعات دقیق بررسی گردد. به علت اینکه بافت ریه دارای مقادیر بسیار زیادی از رشته‌های کلاژن ۱ و ۳ و رشته‌های الاستیک می‌باشد و این رشته‌ها بخش اصلی داربست را تشکیل می‌دهند (۲۳) و از آنجا که تراکم کلاژن بر رفتارهای سلولی مؤثر می‌باشد از این رو ساختار داربست‌های تهیه‌شده با رنگ‌آمیزی‌های مختلف و اختصاصی از قبیل اورسئین - پیک و پیک ایندیگو و میکروسکوپ الکترونی (SEM) مورد مطالعه قرار گرفت.

مطالعات نشان داد که رشته‌های کلاژن و الاستیک بافت سالم باقی مانده‌اند و چون ممکن است دارای اثرات القایی روی سلول‌ها باشند حفظ آن‌ها در داربست حائز اهمیت می‌باشد. بنابراین داربست حاصل از بافت ریه خرگوش پس از مراحل آماده‌سازی، ساختار کلی خود را حفظ نموده و حتی بعد از گذشت یک ماه از قرارگیری در محیط کشت ساختمان آن از هم نپاشید البته

به‌منظور موفقیت مهندسی بافت باید شرایطی مشابه با محیط موجود زنده فراهم گردد تا رشد و فعالیت سلول در آن به‌طور طبیعی انجام گیرد. به همین دلیل امروزه استفاده از داربست‌های طبیعی در مهندسی بافت در سطح دنیا بسیار رواج یافته است (۱۴). بافت‌های طبیعی پتانسیل بالایی به‌عنوان جایگزین‌های بافتی در بدن دارند. استفاده از بافت‌های طبیعی انسان و حیوانات مختلف در تحقیقات زیادی مورد بررسی قرار گرفته است (۵) نتایج نشان می‌دهد که مواد زیستی طبیعی معمولاً به یک تیمار قبلی فیزیکی یا شیمیایی نیاز دارند تا آن‌ها را از تجزیه زیستی حفظ کند، ایمنی زایی آن‌ها را کاهش دهد و همچنین بافت را استرلیزه کند. روش‌های مختلفی به این منظور مورد بررسی قرار گرفته است. 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 (۱۳).

در این پژوهش تلاش گردید تا ابتدا بافت شش را با استفاده از روش‌های فیزیکی و شیمیایی سلول زدایی نموده، سپس از آن به‌عنوان داربستی جهت کشت سلول‌های بلاستمایی استفاده کنیم و در پایان به کمک روش‌های مختلف بافت شناسی رفتارهای احتمالی سلول‌های بلاستمایی مورد بررسی و مطالعه قرار گیرد. روش‌های آماده‌سازی داربست از ECM بافت‌ها، مورفولوژی سطح و ویژگی‌های مکانیکی داربست را تا اندازه ای تحت تأثیر قرار می‌دهد (۳۲). در بسیاری از مطالعات از SDS و یا تریتون برای سلول زدایی

مزانشیمی گرفته شده از مغز استخوان رت می شود این مطالعه و مطالعات دیگر نشان داد که داربست های فاقد سلول و داربست های کلاژنی می توانند زمینه را برای مهاجرت، نفوذ، رشد و تکثیر سلول ها فراهم کنند. (۳۱). در روز دهم پس از کشت ما علاوه بر نفوذ، تقسیم و تمایز احتمالی سلول های بلاستمایی به سلول های پنوموسیتی در دیواره آلوئول ها را مشاهده کردیم، همچنین مطالعاتی مشابه در این زمینه انجام شده است که مشابه با نتایج این پژوهش می باشد، از جمله اینکه در سال ۲۰۱۱ تلاش هایی در رابطه با مهندسی بافت شش توسط جرمی و هارالد انجام شد. در این مطالعه سلول هایی را از شش جنینی استخراج کردند و درون دیسک های ژلاتینی کشت دادند. مشاهده شد که این سلول ها مشابه ساختار های الوئولاری در ریه سورفکتانت را ترشح کردند که آزمایشات اهمیت عمل متقابل سلول-ماتریکس را روشن کرد. ۱۹ طی یک آزمایش دیگر در شرایط مشابه سلول ها در دیسک های ژلاتینی کشت داده شدند و تمایز پنوموسیت ها دیده شد با این تفاوت که این بار به محیط کشت پروتئین های ECM ششی را اضافه کردند که این پروتئین ها تمایز پنوموسیت ها را هدایت و پشتیبانی می کرد. (۱۹). یک مشکل عمده در مهندسی بافت، رگ زایی داربست ها می باشد. تشکیل عروق جدید یک مرحله بحرانی در فرایند التیام زخم است، همچنین برای تشکیل بافت های جدید تشکیل حوضچه های خونی جدید ضروری است. با توجه به این مطالب برای استفاده از داربست ریه در مطالعات *in vivo* در آینده، بررسی تشکیل حوضچه های خونی در آن از اهمیت فراوانی برخوردار می باشد. همان طور که در مقاطع بافتی در روز پانزدهم نشان داده شد، سلول های بلاستمایی پس از نفوذ به داخل داربست به داخل بقایای عروق خونی موجود در داربست نفوذ کرده و در دیواره آن ها استقرار یافته بودند. در مطالعات *nillesen* و همکارانش ۵ نوع داربست سنتزی با ترکیب متفاوتی از کلاژن نوع ۱، هیالورونان و فاکتورهای رشد VEGF و FGF تهیه کردند و بر پشت رت پیوند زدند. آن ها نشان دادند در این داربست که دارای هر دو فاکتور رشد بود در

احتمال آسیب به اجزاء ماتریکس وجود داشت با این حال این اجزاء اثرات القایی خود را اعمال نمودند و موجب مهاجرت، تکثیر و تمایز سلول های بلاستمایی در داربست حاصله گردیدند. همچنین لامینین ها که از اجزای گلیکوپروتئینی مهم در غشای پایه می باشند، نقش مهمی در مهاجرت سلول های عصبی، تمایز و رشد آکسون ایفا می کنند و به عنوان پوششی برای بهبود چسبندگی و رشد سلول عصبی در سوبستراهای مختلف استفاده می گردند، پس ممکن است در مهاجرت سلول های بلاستمایی به داربست نقشی را ایفا نموده باشند (۱۱،۲۱). بررسی هایی صورت گرفته است که مشخص می کند داربست های زیستی مشتق شده از ECM در کاربردهای مهندسی بافت استفاده مؤثری دارند. ترکیب این داربست های زیستی شامل پروتئین های ساختاری و عملی بوده است که جزء ماتریکس خارج سلولی پستانداران است (۲۴).

داربست های تهیه شده از ماتریکس خارج سلولی اخیراً توسعه و پیشرفت های را در بازسازی ساختارهای وابسته به نای و تارهای صوتی نشان دادند. در سال ۲۰۰۴ دریچه قلب خوکی را با غلظت های مختلف تریپسین و سپس DNAase تیمار کردند. این دریچه با استفاده از میکروسکوپ نوری SEM, TEM مورد بررسی قرار گرفت که نتیجه آن تولید یک داربست فاقد سلول بود. سپس سلول های اندوتلیال خوکی و انسانی و همچنین میوفیبروبلاست های سگی به روی این داربست اضافه شد. آنالیزهای میکروسکوپ الکترونی و رنگ آمیزی های H.E و ایمنو هیستوشیمی نشان داد که این سلول ها به سطح و درون داربست نفوذ کرده و شروع به رشد و تکثیر کرده بودند. همچنین مطالعات دیگری در زمینه تأثیر داربست های کلاژنی در روی میزان تکثیر سلول ها انجام شد. در این مطالعه داربست های متراکم کلاژنی به عنوان معادل های درمی استفاده شدند که میزان بالای تکثیر سلول های فیبروبلاستی در این داربست ها مشاهده شد، علاوه بر این نشان داده شد که داربست سه بعدی تهیه شده از کلاژن موجب افزایش تکثیر سلولی در سلول های بنیادی

از آنجائی که ماتریکس خارج سلولی بافت ریه شامل کلاژن نوع I و III می‌باشد که از اجزاء اصلی ماتریکس به حساب می‌آیند بنابراین می‌تواند این چنین نتیجه گرفت که نبود سلول چندانی در روزهای بیست و پنجم و سی ام پس از کشت در داربست می‌تواند به خاطر تراکم بالای کلاژن در این روزها در داربست باشد که به‌عنوان یک سد فیزیکی عمل کرده و مانع مهاجرت سلول‌ها شده است. از دیگر عوامل نبود سلول در داربست می‌توان مرگ سلولی را ذکر کرد... از عوامل مرگ سلولی می‌توان به تراکم بالای سلول‌ها، تخریب بافتی، شرایط کنترل نشده زمان کشت، ایجاد آشفته‌گی در ماتریکس و تغییر در استحکام مکانیکی آن نیز اشاره کرد.

به نظر می‌رسد سلول‌های بلاستمایی احتمالاً دارای قابلیت‌هایی مشابه سلول‌های بنیادی هستند؛ بنابراین می‌توان این سلول‌ها را به کمک عوامل القائی مختلف، به تمایز به سمت سلول‌های دلخواه هدایت نمود (۹،۱۰). نتایج این پژوهش نشان داد که یک داربست سلول زدایی شده همراه با درصد تخلخل بالا متشکل از پروتئین‌های ماتریکس خارج سلولی می‌تواند از بافت ریه تهیه شود. ریه سلول زدایی شده می‌تواند زمینه مناسب برای رفتارهای سلولی از قبیل مهاجرت، نفوذ، چسبندگی، تقسیم و تمایز را فراهم کرده و به‌عنوان یک داربست برای مهندسی بافت ریه استفاده شود. به طور کلی می‌توان گفت پروتئین‌های ماتریکس خارج سلولی از جمله موادی هستند که می‌توانند به‌عنوان یک داربست با ترکیب زیستی طبیعی و ساختار سه‌بعدی به‌صورت وسیعی در مهندسی بافت استفاده شوند.

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 امیدبخش راه‌های نوین در زمینه استخراج ساده سلول‌هایی با خاصیت بنیادی و قابلیت‌های تمایزی بالاست که بتوان از آن‌ها جهت سلول درمانی استفاده کرد. چنانچه بتوان مکانیسم‌ها و ژن‌های دخیل در ایجاد چنین

روزهای اولیه پس از پیوند، حوضچه‌های خونی بیشتری تشکیل گردید.

با توجه به اینکه ریه دارای مقادیر بالایی از کلاژن نوع یک است و در مطالعه انجام‌شده کلاژن نوع ۱ جزء اصلی است و نقش عمده‌ای در پروسه رگ زایی دارد مشاهده رگ زایی در داربست ریه دور از انتظار نبود (۲۱). همچنین در تمایز سلول‌های بلاستمایی به سلول‌های اندوتلیوم نیز شاید بتوان گفت که سلول‌های بلاستمایی پس از قرار گرفتن در عروق خونی با تولید و ترشح فاکتورهای نظیر فاکتور رشد اندوتلیالی رگی (VEGF) در روند رگ زایی نقش داشته باشند. فاکتور VEGF با تحریک تکثیر سلول‌های اندوتلیال، مهاجرت و سازمان‌دهی سلول‌ها به شکل لوله، نقش کلیدی در رگ زایی ایفا می‌کند؛ بنابراین می‌توان نتیجه گرفت که داربست آماده شده توانسته در این روز سبب القاء تمایز سلول‌های بلاستمایی به سلول‌های اندوتلیالی شود و زمینه لازم برای رگ زایی را فراهم کند (۲). یک سری آزمایشات برای سنجش تأثیر میزان رشته‌های کلاژن بر روی رفتارهای سلولی انجام شد. از جمله این آزمایشات مطالعه‌ای بود که Helary و همکارانش درباره رفتار سلول‌ها در سال ۲۰۰۶ در داربست‌های کلاژنی انجام دادند.

مطالعات آن‌ها نشان داد که میزان تراکم کلاژن بر رفتارهای سلولی تأثیرگذار است به‌عنوان مثال تراکم بالای کلاژن می‌تواند مهاجرت فیبروبلاست‌ها را مهار کند. همچنین Rodrigues و همکارانش در سال ۲۰۱۰، سلول‌های فیبروبلاستی را در داربست‌های سلول زدایی شده پوست در شرایط آزمایشگاهی کشت دادند و توزیع، تکثیر و زیست‌پذیری فیبروبلاست‌ها را در این ماتریکس بررسی کردند. نتایج نشان داد که فیبروبلاست‌ها فقط تا ۱۴ روز شرایط مناسبی را برای چسبندگی سلولی و توزیع در ماتریکس دارا بودند (۱۱). طبق این آزمایشات مشخص شد که میزان تراکم کلاژن بر رفتارهای سلولی از قبیل مهاجرت تأثیرگذار است که این حالت می‌تواند به خاطر این باشد که رشته‌های کلاژن به‌عنوان یک سد فیزیکی عمل می‌کنند و سلول‌ها قادر به تغییر این سد نیستند.

830.

8. Cukierman E, Pankov R, Yamada KM. Cell interactions with three-dimensional matrices. *Curr Opin Cell Biol*; 2002.14(5):633-9.

9. Mahdavi-Shahri N, Kheirabadi F, Babaie M, S. Sadeghie F, Azarniya M. The Ultera [Structure Study of Blastema in Pinna Tissues of Rabbits with Transmission Electron Microscope.] *Journal of Biological Science*; 2008.8:993-1000. (Persian)

10. Mahdavi-shahri N. [Geometrical and histological model for mammalian wound repair and regeneration. *Journal of Wound Repair and Regeneration*]; 2003. 11: 513-526. (Persian).

11. Suh HN, Han HJ, et al. Collagen I regulates the self-renewal of mouse embryonic stem cells through  $\alpha 2\beta 1$  integrin- and DDR1-dependent Bmi-1. *Journal of cellular physiology*; 2011.12:3422-3432.

12. Freed LE, Vunjak- Novakovic G, Biran RJ. Biodegradable polymerscaffolds for tissue engineering. *Biotechnology*; 1994. 12: 689-693.

13. Schmidt CE, Baier JM. Acellular vascular tissue: natural biomaterials for tissue repair and tissue engineering. *Biomaterials*; 2000. 21: 2215-2231.

14. Lutolf MP, Hubbell JA. Synthetic biomaterials as instructive extracellular microenvironments for morphogenesis in tissue engineering. *Nature biotechnology*; 2005. 23(1):47-55.

15. Cortilla J, Niles J, Vunto A, Bellter A, Pham A, M. et al. Influence of Cellular Neural Lung Matrix on Murine Embryonic Stem Cell Differentiation and Tissue Formation; *Wound repair and regeneration*; 2010. 8:2565-2568.

16. Imai K, D'Armiento J. Activation of an Embryonic Gene Product in Pulmonary Emphysema, *CHEST*; 2000. 117(5\_suppl\_1):229S.

17. Lu Q, Ganesan K, Simionescu DT, Narendra R. Vyavahare. Novel porous aortic elastin and collagen scaffolds for tissue engineering, *Biomaterials*; 2004. 25: 5227-5237

18. Tsonis PA, Michael T. Role of Retinoic Acid in Lens Regeneration. *Developmental Dynamics*; 2000. 219:588-593.

19. Song JJ, Ott HC. Organ engineering based on dcellularized matrix scaffolds. *Molecular medicine*; 2011.17(8): 424-32

20. Gilbert TW, Sellaro TL, Badylak SF. Decellularization of tissues and organs. *Biomaterials*; 2006. 27:3675-3683.

21. Ho H, Suh J, Na H. Laminin regulates mouse embryonic stem cell migration: The *American Journal of Physiology*; 2010. C:1159(11).

22. Piesch, P. The effect of heteropic musculature on myogenesis during limb regeneration in *amblystoma larve*. *The Anatomical Record*; 1961. 741: 295-303.

23. Pelosi A, Severginin P, Rocco PR. The

سلول‌هایی را شناسایی کرد شاید بتوان منبع سلولی مشابهی را در انسان به دست آورد، در نتیجه با استخراج چنین سلول‌هایی راه‌هایی نوین برای درمان بسیاری از بیماری‌ها از جمله بیماری‌های ریوی در آینده گشود.

البته شایان ذکر است که می‌توان با انجام مطالعات گسترده تری از قبیل آنالیز DNA و پروتئین‌ها جهت بررسی سلول زدایی و حذف پروتئین‌ها از بافت داربست و همچنین تعیین ویژگی‌های مکانیکی داربست از قبیل مقاومت در برابر کشش و فشار به درک بهتری از نتایج این پژوهش برسیم، علاوه بر این می‌توان جهت بررسی قابلیت‌های تمایزی سلول‌های بلاستمایی با سلول‌های بنیادی و مقایسه نتایج بدست آمده با پژوهش حاضر از کشت سلول‌های بنیادی روی این داربست استفاده کرد.

### تقدیر و تشکر

بدین‌وسیله از مسئولین دانشگاه فردوسی مشهد و خانم زهرا یارجانلی و آقای امین توسلی که در طول انجام این پژوهش ما را یاری نمودند تشکر و قدردانی می‌نماییم.

### منابع

1. Kleinman HK, Philp D, Hoffman MP. Role of the extracellular matrix in morphogenesis. *Biotechnology*; 2003. 14:526-532.

2. AB Ennett, Mooney DJ. Tissue engineering strategies for in vivo neovascularisation; *Expert Opin Biol Ther*; 2002. 2(8):805-18.

3. Narita Y, Kagami H. Decellularized ureter for tissue-engineered small-caliber vascular graft. *Artificial*; 2008.11: 91-99

4. Suki B, Jason HT. Bates Extracellular matrix mechanics in lung parenchymal disease. *Respiratory Physiology & Neobiology*; 2008. 163: 33-34

5. Hilbert SL, Ferrans VJ, Jones M. Tissue-derived biomaterials and their use in cardiovascular prosthetic devices. *Med Prog Technol*; 1988; 14: 115-163.

6. Cukierman E. Cell migration analysis within fibroblast-derived 3D matrices. *Methods of Molecular Biology*. 2005. 294: 79-93.

7. Maranto AR, Schoen FJ. Phosphatase enzyme activity is retained in glutaraldehyde treated bioprosthetic valves. *ASAIO Trans*. 1988. 34: 827-

extracellular Matrix of the lung: Intensive care medicine; 2007.2007 320-334.

24. Badylack SF. Xenogenetic extracellular matrix as a scaffold for tissue reconstruction. *Transparent immunology*; 2004. 12: 367-377.

25. Badylack SF. The extracellular matrix as a scaffold for tissue reconstruction. *Transplant Immunology*; 2002. 13: 377-383.

26- Sirisattha S, Momose Y, Kitagawa E, Iwahashi H. Toxicity of anionic detergent determined by saccharomyces cerevisia microarray analysis. *Water res*; 2004.38, 6170.

27. Even-Ram S, Yamada KM. Cell migration in 3D matrix. *Cell Biology*; 2005. 17: 524-532.

28. Tsonis PA. Regenerative biology: the emerging of tissue reparaire and restoration. *Differentiation*; 2002. 70: 397-409.

29. Ulrich Martin, Methods for studying stem cells: Adult stem cells for lung repair. *Methods*; 2008. 45: 121-132.

30. Lu L, Currier BL, Yaszemski MJ. Synthetic bone substitutes. *Current Opinion in Orthopedics*; 2000. 11:P. 383-390.

31. Long L, Wu C, Pan L, Qi X, Hong T. Preparation of heart valve scaffold and cell seeding. *Sheng WuYi, Xue Gong Cheng Xue Za Zhi*. 2004. 21(4):610-623.26.

32. Komori T. A new in vitro model of cancer invasion using alloderm a human cadaveric dermal equivalent. *Kobe J Med Sci*; 2010. 55,106-115.

33. Sueblinvong V, Weiss DJ. Stem cells and cell therapy approaches in lung biology and diseases. *Translational Research* 2010.156:188-205.

34. Sueblinvong V, Weiss DJ. cell therapy approaches for lung diseases: current status. *Pharmacology* 2009; 9:268-273.

35. Song JJ, Ott HC. Organ engineering based on decellularized matrix scaffolds. *Molecular medicine* 2011. 17(8): 424-32.

## Decellularized matrix of lung tissues and its role as a scaffold in the differentiation of blastema cells in vitro

**\*Mahan Takbiri**, MSc, Developmental Biology, Department of Biology, Islamic Azad University, Mashhad Branch, Iran (\*Corresponding author). [mt\\_takbiri@yahoo.com](mailto:mt_takbiri@yahoo.com)

**Naser Mahdavi Shahri**, PhD, Professor of Cytology and Histology, Department of Biology, Ferdowsi University of Mashhad, Iran. [Mahdavin@um.ac.ir](mailto:Mahdavin@um.ac.ir)

**Javad Baharara**, PhD, Associate Professor of Developmental Biology, Department of Biology, Islamic Azad University, Mashhad Branch, Iran. [baharara@yahoo.com](mailto:baharara@yahoo.com)

### Abstract

**Background:** Increasing number of patients facing end-organ failure, as well as the therapeutic challenges surrounding allotransplantation, has catalyzed the evolution of tissue engineering and regenerative medicine. The successful recapitulation of development requires choosing an ideal scaffold material as a mediator of biochemical and biophysical signals. The extracellular matrix (ECM) functions as a scaffold for tissue morphogenesis and provides cues for cell proliferation and differentiation. Rabbit decellularized lung tissue was used for fabrication of scaffold.

**Methods:** In this experimental study, the fabrication of scaffold from rabbit lung tissue was done via snap freezing method, use of sodium dodecyl sulfate (SDS) and cell bleaching. Interactions between scaffold and blastema tissue were evaluated and scaffolds were placed in blastema rings and stored in culture media for 30 days. Sampling of blastema and scaffolding tissues was done for every five days.

**Results:** Histological and microscopic analysis confirmed the removal of cells from prepared scaffolds and porosity was done for lung tissue scaffold. The penetration, proliferation and differentiation of cells was also studied when blastema tissues were cultured on scaffold by using different days

**Conclusion:** In this study, a three-dimensional natural scaffold was fabricated from lung tissue using SDS treatment. The prepared scaffolds can have an inductive effect on the cell behaviors such as migration, penetration, division, and probable differentiation. However, further studies are necessary to demonstrate the identity and behavior of the cells and scaffold characterization. It seems obtained scaffold after decellularization of lung tissue can be used as suitable model for primary research in lung tissue engineering.

**Keywords:** Tissue engineering, Decellularization, Natural scaffold, Blastema tissue