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

* **ماهـان تکبیـری**: کارشناسـی ارشـد سـلولی- تکـوینی، گـروه زیسـت شناسـی، دانشـکده علـوم پایـه، دانشـگاه آزاد اسـلامی، واحـد مشـهد، ایـران (*نویسـنده مسـئول). 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 دریافت: ۹۴/۳/۱۸ تاریخ پذیرش: ۹۴/۶/۲۵

چکیده

زمینه و هدف: امروزه افزایش بیماران دارای نقص عضو و ارگان و همچنین وجود چالش‌های درمانی در محدوده پیوند اعضاء و انتقال عضو باعث تسریع درروند ایجاد علومی همچون پزشکی ترمیمی و مهندسی بافت شده است. موفقیت و پیشرفت در این عرصه مستلزم انتخاب یک داربست مناسب؛ به‌عنوان میانجی سیگنال‌های بیوشیمیایی و بیوفیزیکی است. ماتریکس خارج سلولی (ECM) به‌عنوان 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 به‌منظور تهیه داربست ابتدا از بافت ریه خرگوش نمونه‌برداری و نمونه‌های تهیه‌شده 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 تائید نمود. به‌علاوه، 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 به‌وسیله تیمار با SDS وجود دارد. داربست تهیه شده می‌تواند دارای اثر القایی بر رفتارهای سلولی از قبیل مهاجرت، نفوذ، تقسیم و احتمالاً تمایز باشد هرچند 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 به‌عنوان مدلی در تحقیقات مقدماتی مهندسی بافت ریه کاربرد داشته باشد.

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

مقدمه

بیشتر سلول‌ها در ارگانیسم‌های پرسلولی، با یک شبکه پیچیده انفعالی خارج سلولی در ارتباط هستند (۱)؛ بنابراین در چینی‌جاهای زنده سلول‌ها به‌تنهایی به یکدیگر متصل نشده‌اند بلکه توسط یک ساختار دیگر به نام ماتریکس خارج سلولی (Extracellular matrix (ECM حمایت می‌شوند. ECM تنها به‌عنوان یک ناظر غیرفعال نیست بلکه در رویدادهای بسیار مهمی که در رشد و نموی بافت و ارگان دخیل است دارای نقش بوده است (۲۵)، ترکیبات و ساختار ECMروی رفتار و فنوتیپ سلول‌های مستقر در آن تأثیر می‌گذارد. EMC به‌عنوان یک داربست 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 به‌سوی ماتریکس خارج سلولی به کار می‌گیرند (۲۷) ازنظر 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 به‌صورت یک واسط و میانجی بین سلول‌ها عمل می‌کند. به این دلیل و دلایل ذکرشده در بالا ماتریکس خارج سلولی به‌عنوان یک داربست بیولوژیکی برای کاربردهای

[Downloaded from rjms.iums.ac.ir on 2024-03-28]

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 ایمنولوژیک، خواص آنتی ژنیک ملایم، توانایی بهبود چسبندگی سلولی و خاصیت هموستازی بسیار مورد توجه می‌باشند. این داربست‌ها به‌عنوان 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 سه‌بعدی در شرایط آزمایشگاهی (*in vitro*) است (۱۲) وقتی اصطلاحاتی همچون بافت‌های مهندسی‌شده، مهندسی بافت و پزشکی ترمیمی به کاربرده 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 کاربرده شده در مهندسی بافت باید در شرایط فیزیولوژیکی بتوانند شبکه‌ای چند منظوره همانند ماده زمینه برون سلولی ایجاد نمایند (۶،۱۴،۱۶). 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 موفقیت‌آمیزی در انواع مهندسی بافت و پزشکی ترمیمی استفاده‌شده است. در مواردی که تنها تأثیر ماتریکس موردبررسی قرار می‌گیرد باید تأثیرات و القاءهای ناشی از سلول‌های بافت حذف گردد (۲۰،۱۵). 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 مهم در موفقیت پیوند است (۲). به همین دلیل استفاده از مواد طبیعی به‌عنوان جایگزین‌های بافت‌های بدن می‌تواند بسیاری از مشکلات موجود در زمینه پیوند اعضاء 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 تخلخل بالای این بافت و وجود رشته‌های کلاژن و الاستیک بود؛ زیرا درصد تخلخل و اندازه آن و همچنین وجود کلاژن از مشخصه‌های مهم داربست‌های به‌کاربرده شده در مهندسی بافت می‌باشد (۳۰). داربست‌های مورداستفاده در مهندسی بافت باید دارای درصد تخلخل بالایی باشند تا یک شبکه منفذدار مرتبط به هم به‌منظور 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 تخلخل بالایی بوده، به دلیل این ویژگی اعمال تغذیه رسانی، دفع ضایعات و رگ زایی به‌خوبی در این بافت امکان‌پذیر 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 تخلخل 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 به‌صورت نرمال ضروری است (۲۳،۲۹). با توجه به اینکه

[Downloaded from rjms.iums.ac.ir on 2024-03-28]

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) درنتیجه 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 برهم‌کنشبین بافت بلاسما و داربست حاصله و بررسی رفتارهای احتمالی سلول‌های بلاسمایی 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 گرفته‌شده 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، بعدازاین 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 هسته ها، بقایای سلولی و 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 به‌منظور تهیه سلول‌های بلاستمایی، ابتدا موهای سطح پشتی و شکمی گوش خرگوش توسط کرم موبر زدوده شد و بعد با استفاده از اسپری لیدوکائین ۱۰٪ بی حسی موضعی در محل پانچ ایجاد گردید. پس از گذشت حدود ۳۰ دقیقه و با بی حس شدن گوش حیوان، با استفاده از دستگاه پانچر سوراخ هایی 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 ازگوش حیوان جدا کردیم. بلافاصله بعد از برداشت، حلقه ها جهت حذف آلودگی چندین بار در سرم فیزیولوژی شستشو داده شدند (۹،۱۰).

در نهایت به‌منظور 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 حلقه ها و داربست همراه آن به داخل یک خانه از پلیتهای ۱۲ خانه ای منتقل شدند سپس در هر خانه ۳ میلی لیتر (ml) محیط کشت DMEM ریخته شد. بعدازاین مراحل پلیت مذکور به انکوباتور با دمای ۳۷ درجه سانتی گراد و ۵ درصد CO_2 منتقل شد.

آماده‌سازی نمونه‌ها جهت تهیه مقاطع میکروسکوپی: به‌منظور بررسی اثرات القائی 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

[Downloaded from rjms.iums.ac.ir on 2024-03-28]

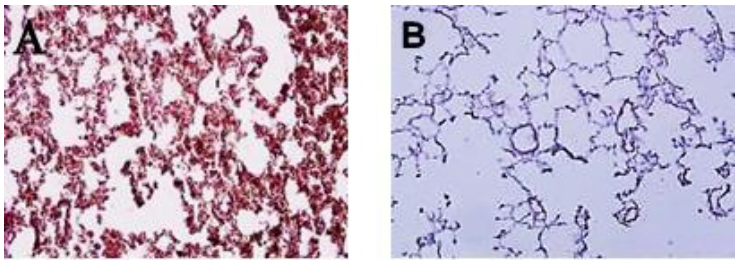
زمان‌های مشخص نمونه‌ها به داخل محلول فیکساتور PBF منتقل گردیده و سپس مراحل پاساژ بافتی مطابق روش معمول انجام شد. سپس جهت مشاهده رفتارهای سلولی، رنگ‌آمیزی‌های مختلف از جمله (هماتوکسیلین- ائوزین- اورسئین- پیک، پاس- هماتوکسیلین و پیک ایندیگوکارمین) انجام شد و نمونه‌های آماده شده با میکروسکوپ نوری (Olympus, Japan: IX700) 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 روزهای مختلف روش Duncan مورداستفاده قرار گرفت.

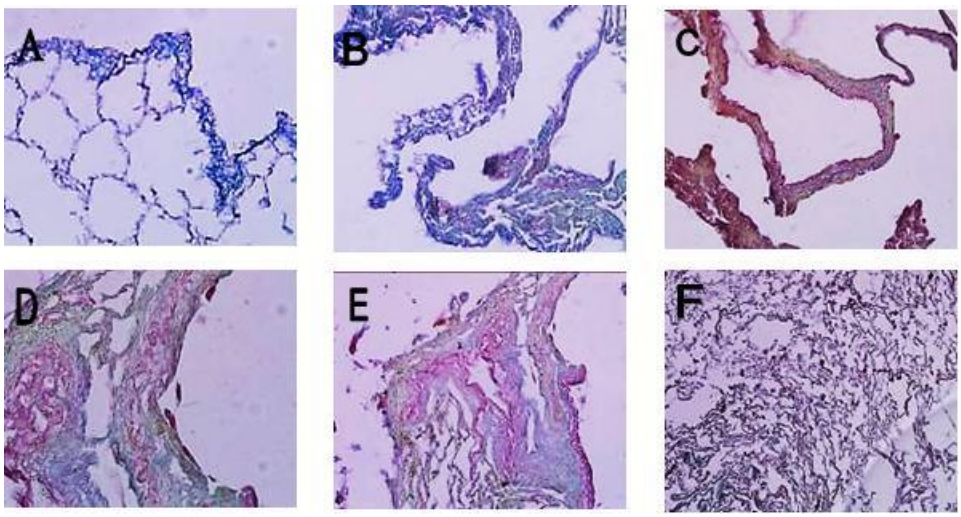
یافته‌ها

مطالعات میکروسکوپی و آماده‌سازی نمونه‌ها حذف سلول‌ها از داربست آماده شده را نشان داد (شکل ۱). با توجه به مطالعات انجام‌شده محلول (SDS1%) 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) (۲۳،۳۰).

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

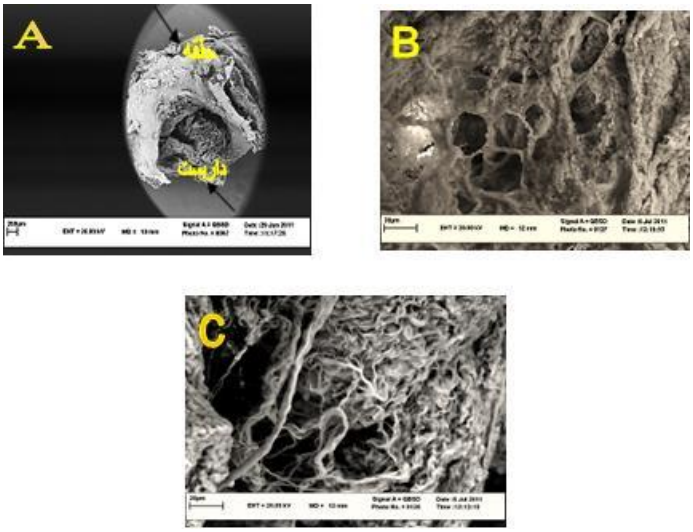


شکل ۱- تصاویر میکروسکوپی بافت ریه A) قبل از سلول زدایی (نمونه کنترل). (بزرگ‌نمایی 40X). B) بعد از سلول زدایی (نمونه تست). (بزرگ‌نمایی40X). رنگ‌آمیزی اورسئین – پیک

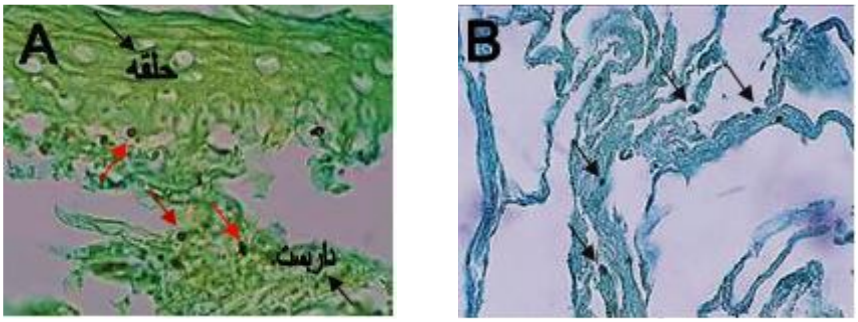


شکل ۲- مشاهده حضور رشته‌های کلاژن و الاستیک در داربست آماده شده در طی روزهای مختلف پس از کشت: A) روز پنجم پس از کشت (بزرگ‌نمایی B(40X روز دهم پس از کشت (40X) C) روز پانزدهم پس از کشت (بزرگ‌نمایی40X) D) روز بیستم پس از کشت (بزرگ‌نمایی40X) E) روز بیست و پنجم پس از کشت (بزرگ نمای40X)، F) روز سی ام پس از کشت (بزرگ‌نمایی 20x) رنگ‌آمیزی اورسئین – پیک، در این رنگ‌آمیزی رشته‌های کلاژن به رنگ آبی و الاستیک به رنگ قرمز دیده می‌شوند.

[Downloaded from rjms.iums.ac.ir on 2024-03-28]



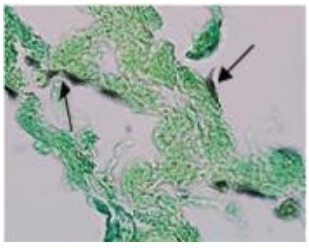
شکل ۳- تصاویر به‌دست‌آمده از بافت سلول زدایی شده ریه خرگوش با استفاده از میکروسکوپ الکترونی SEM. A) موقعیت داربست و حلقه بلاستمایی نسبت به یکدیگر در محیط کشت B,C) نمایه درونی داربست متخلخل آماده شده همراه با رشته‌های کلاژن و الاستیک



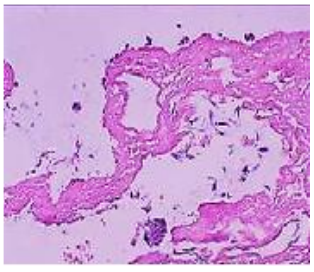
شکل ۴- A) موقعیت حلقه و داربست نسبت به یکدیگر و مشاهده مهاجرت سلول‌های بلاستمایی از حلقه به سمت داربست در روز پنجم پس از کشت(فلش‌های قرمز نشان‌دهنده مهاجرت سلول‌ها هستند) (بزرگ نمای 40X) B) جایگیری و نفوذ سلول‌های بلاستمایی در داربست، فلش‌ها نشان‌دهنده سلول‌های بلاستمایی نفوذ کرده به داربست می‌باشد(بزرگ‌نمایی20X). رنگ‌آمیزی پیک ایندیگو

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

بررسی اثر القائی داربست شش بر روی سلول‌های بلاستمایی: به‌منظور 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؛ به‌علاوه 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

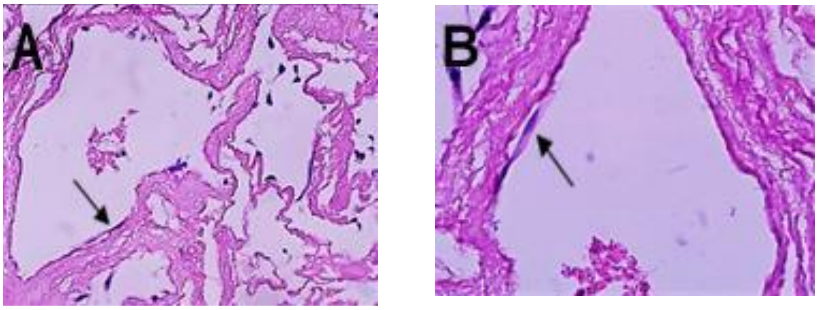


شکل ۵- فلش‌ها نشان‌دهنده تقسیم و تمایز سلول‌های بلاستمایی در آلوئول‌های بافت ریه می‌باشند (بزرگ‌نمایی100X)؛ رنگ‌آمیزی پیک ایندیگو

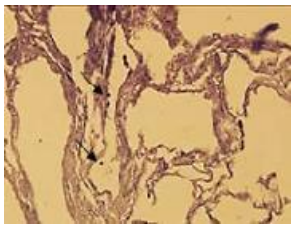


شکل۶- مشاهده مهاجرت و نفوذ تعداد بسیاری زیادی از سلول‌ها به داربست در روز پانزدهم پس از کشت (بزرگ‌نمایی 40X) رنگ‌آمیزی هماتوکسیلین- ائوزین (H-

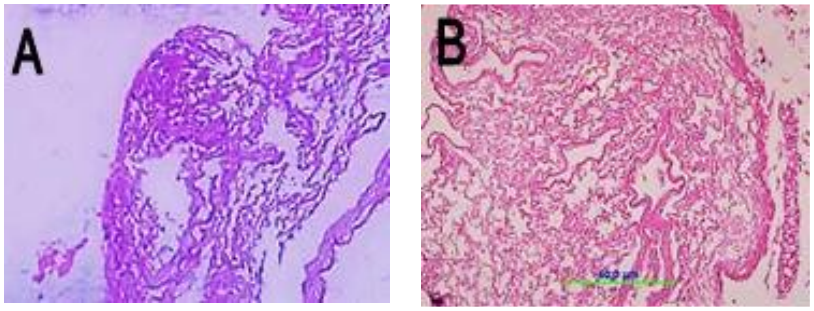
[Downloaded from rjms.iums.ac.ir on 2024-03-28]



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

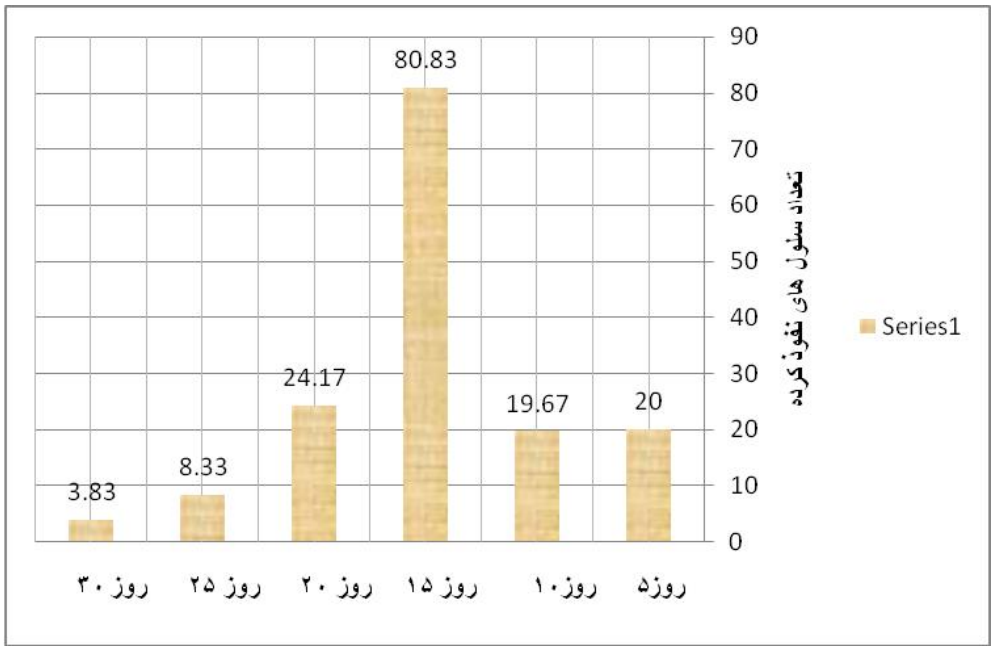


شکل ۹- نمایه کلی داربست A) داربست در روز بیست و پنجم پس از کشت، B) داربست در روز سی ام پس از کشت، بزرگ‌نمایی 20X، رنگ‌آمیزی هماتوکسیلین – ائوزین (H.E)

علاوه بر نفوذ، تقسیم و تمایز احتمالی سلول‌های بلاستمایی به سلول‌های پنوموسیتی در دیواره آلوئول ها 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 بافت شناسی 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 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 ۵و ۱۰و 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).

[Downloaded from rjms.iums.ac.ir on 2024-03-28]



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 می توان امیدوار بود که این نوع سلول ها به‌عنوان پتانسیل درمانی برای ترمیم و تعمیر بافت ریه و به‌عنوان منبع سلولی برای مهندسی این بافت در آینده ای نزدیک به کار روند (۳۵-۳۳).

تحقیقات اخیر، روی شناسایی سیستم‌های کشت ۳ بعدی و مهندسی زیستی برای تولید بافت ریه کاربردی در شرایط in vivo وex vivo فوکوس کرده است. این تحقیقات یک روند افزایشی در موفقیت ترمیم و تعمیر بافت‌هایی نظیر پوست، رگ ها، غضروف و استخوان داشته است. جالب توجه اینکه سلول‌های بنیادی جدا شده از مایع آمنیوتیک، خون بند ناف، بافت‌های چربی یا مغز استخوان می‌توانند واکنش هایی روی داربست‌های مختلف مانند داربست‌های بیوسنتتیک داشته باشند. همچنین می‌توانند تولید کننده غضروف تراکه آ برای استفاده در ترمیم نقصهای مادر زادی تراکه آ و بافت زردپی جهت استفاده در نقص‌های مادرزادی دیافراگم باشند. تحقیقات اخیر موفقیت هایی را در استفاده کلینیکی راهه‌ای هوایی مهندسی‌شده، نشان داده است. یکسری مطالعات دیگر در هر دو شرایط in vivo and in vitro انجام‌شده است که تغییر فنوتیپی سلول‌های جنینی ریه کشت شده در یک 3D گلیکوزامین را به ساختارهای شبه آلوؤلاری 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

[Downloaded from rjms.iums.ac.ir on 2024-03-28]

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 به طور 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 موردبررسی 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 موردبررسی قرار گرفته است. در میان روش‌های مختلف، سلول زدایی روشی است که به اهداف موردنظر 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 موردبررسی 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 استفاده‌شده است و نتایج متناقصی 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؛ بااین‌حال نسبت به انجماد آهسته آسیب کمتری به بافت وارد می‌کند (۳۲). سدیم دودسیل سولفات (SDS) از شوینده های آنیونی عمومی می‌باشد که در سرتاسر جهان استفاده می‌گردد. با انحلال غشاء، دناتوره نمودن پروتئین ها و حذف پروتئین‌های سیتوپلاسمی و هسته ای، 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 وروش های 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 رشته ها 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 اورسئن – 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

[Downloaded from rjms.iums.ac.ir on 2024-03-28]

احتمال آسیب بـه اجـزاء مـاتریکس وجـود داشـت بااین‌حال این اجـزاء اثـرات القـایی خـود را اعمـال نمودند و موجب مهاجرت، تکثیر و تمایز سلول‌های بلاستمایی در داربست حاصله گردیدنـد. همچنـین لامینین‌ها کـه از اجـزای گلیکـوپروتئینی مهـم در غشای پایـه می‌باشـند، نقـش مهمـی در مهـاجرت سـلول‌های عصـبی، تمـایز و رشـد آکسـون ایفـا می‌کنند و به‌عنوان پوششی برای بهبود چسبندگی و رشـد سـلول عصـبی در سوبسـتراهای مختلـف استفاده می گردند، پس ممکن اسـت در مهـاجرت سلول‌های بلاسـتمایی بـه داربسـت نقشـی را ایفـا نموده باشند (۱۱،۲۱). بررسی هایی صورت کرفتـه است کـه مشـخص می‌کنـد داربسـت‌های زیسـتی مشتق شده از ECM در کاربردهای مهندسی بافت استفاده مـؤثری دارنـد. ترکیـب ایـن داربسـت‌های زیستی شامل پروتین های ساختاری و عملی بـوده است که جزء ماتریکس خـارج سـلولی پسـتانداران است (۲۴).

داربست‌های تهیه‌شده از ماتریکس خارج سـلولی اخیـــراً توســـعه و پیشـــترفتی را در بازســـازی ساختارهای وابسته به نای و تارهـای صـوتی نشـان دادند. در سـال ۲۰۰۴ دریچـه قلـب خـوکی را بـا غلظت های مختلف تریپسـین و سـپس DNAase تیمار کردند. این دریچه با استفاده از میکروسـکوپ نوری SEM, TEM موردبررسـی قـرار گرفـت کـه نتیجه آن تولید یک داربست فاقد سلول بود. سپس سلول‌های اندوتلیال خـوکی و انسـانی و همچنـین میوفیبروبلاست‌های سـگی بـه روی ایـن داربسـت اضـافه شـد. آنالیزهـای میکروسـکوپ الکترونـی و رنگ‌آمیزی‌های H.E و ایمنو هیستو شـیمی نشـان دادکه این سلول‌ها به سطح و درون داربسـت نفـود کرده و شروع به رشد و تکثیرکرده بودند. همچنین مطالعـات دیگـری در زمینـه تـأثیر داربسـت‌های کلاژنی در روی میزان تکثیر سلول‌ها انجام شد. در این مطاله داربسـت‌های متـراکم کلاژنـی بـه‌عنوان معادل های درمی استفاده شدند که میـزان بـالای تکثیر سلول‌های فیبروبلاسـتی در ایـن داربسـت‌ها مشاهده شـد، عـلاوه بـر ایـن نشـان داده شـد کـه داربسـت سـه‌بعدی تهیه‌شـده از کـلاژن موجـب افـزایش تکثیـر سـلولی در سـلول‌های بنیـادی مزانشیمی گرفته‌شده از مغز استخوان رت می‌شـود ایـن مطالعـه و مطالعـات دیگـر نشـان داد کـه داربسـت‌های فاقـد سـلول و داربسـت‌های کلاژنـی می‌توانند زمینـه را بـرای مهـاجرت، نفـوذ، رشـد و تکثیر سلول‌ها فراهم کنند. (۳۱). در روز دهم پس از کشت ما علاوه بر نفوذ، تقسیم و تمایز احتمالی سلول‌های بلاستمایی به سلول‌های پنوموسـیتی در دیـواره آلوئـول هـا را مشـاهده کـردیم، همچنـین مطالعاتی مشابه در این زمینه انجام‌شده اسـت کـه مشابه با نتایج این پژوهش می‌باشد، از جمله اینکـه در سال ۲۰۱۱ تلاش هایی در رابطـه بـا مهندسـی بافت شش توسط جرمی و هارالد انجام شد. در این مطالعه سلول هـایی را از شـش جنینـی اسـتخراج کردند و درون دیسک های ژلاتینی کشـت دادنـد. مشاهده شد که این سلول ها مشابه سـاختار هـای الوئلاری در ریه سـورفکتانت را ترشـح کردنـد کـه آزمایشات اهمیت عمل متقابل سلول- مـاتریکس را روشن کرد.۱۹ طی یک آزمـایش دیگـر در شـرایط مشابه سلول ها در دیسک های ژلاتینی کشت داده شدند و تمایز پنوموسیت‌ها دیده شد با این تفـاوت که این بار بـه محـیط کشـت پروتئین‌هـای ECM ششی را اضافه کردند کـه ایـن پـروتئین‌هـا تمـایز پنوموسیت‌ها را هدایت و پشتیبانی می کرد. (۱۹). یک مشـکل عمـده در مهندسـی بافـت، رگ زایـی داربست‌ها می‌باشد. تشکیل عروق جدید یک مرحله بحرانی در فرایند التیام زخم است، همچنین بـرای تشکیل بافت‌هـای جدیـد تشـکیل حوضـچه هـای خونی جدید ضروری است. با توجه به ایـن مطالـب برای استفاده از داربست ریه در مطالعـات in vivo در آینده، بررسی تشکیل حوضچه هـای خـونی در آن از اهمیت فراوانی برخوردار می‌باشد. همان طـور که در مقاطع بافتی در روز پانزدهم نشان داده شد، سلول‌های بلاستمایی پس از نفوذ به داخل داربست به داخل بقایای عروق خـونی موجـود در داربسـت نفوذ کرده و در دیواره آن‌ها استقرار یافته بودند. در مطالعات nillesen و همکـارانش ۵ نـوع داربسـت سـنتزی بـا ترکیـب متفـاوتی از کـلاژن نـوع ۱، هیالورونان و فاکتورهای رشد FGFو VEGF تهیه کردند و بر پشت رت پیوند زدند. آن‌ها نشان دادنـد در این داربست که دارای هر دو فاکتور رشد بود در

[Downloaded from rjms.iums.ac.ir on 2024-03-28]

روزهای اولیه پس از پیوند، حوضچه های 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 فاکتورهایی نظیر فاکتور رشد اندوتلیالی رگی (VEGF) درروند 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 به‌عنوان‌مثال تراکم بالای کلاژن می‌تواند مهاجرت فیبروبلاست ها 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 زیست پذیری فیبروبلاست ها را در این ماتریکس بررسی کردند. نتایج نشان داد که فیبروبلاست ها 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. از آنجائی که ماتریکس خارج سلولی بافت ریه شامل کلاژن نوع I و III می‌باشد که از اجزاء اصلی ماتریکس به‌حساب می‌آیند بنابراین می‌توان این‌چنین 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 آشفتگی 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.

بااینکه 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

[Downloaded from rjms.iums.ac.ir on 2024-03-28]

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 می توان با انجام مطالعات گسترده تری از قبیل آنالیز DNA وپروتئین ها جهت بررسی سلول زدایی و حذف پروتئین ها از بافت داربست و همچنین تعیین ویژگی های مکانیکی داربست از قبیل مقاومت در برابر کشش و فشار به درک بهتری از نتایج این پژوهش برسیم، علاوه بر این می توان جهت بررسی قابلیت های تمایزی سلول های 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 parechymal disease. Respiratory Physiligy& Neobiology; 2008. 163: 33-34

5. Hilbert SL, Ferrans VJ, Jones M. Tissue-derived biomaterials and their use in cardiovasculaprosthetic divices. 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: 827-830.

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 foe 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 α2β1 integrin- and DDR1-dependent Bmi-1. Journal of cellular physiology; 2011.12:3422-3432.

12. Freed LE, Vunjak- Novakovic G, Biran RJ. Biodegradable polymers caffords 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

[Downloaded from rjms.iums.ac.ir on 2024-03-28]

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 repaire 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.

[Downloaded from rjms.iums.ac.ir on 2024-03-28]

Original Article http://rjms.iums.ac.ir

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
Naser Mahdavi Shahri, PhD, Professor of Cytology and Histology, Department of Biology, Ferdowsi University of Mashhad, Iran. Mahdavin@um.ac.ir
Javad Baharara, PhD, Associate Professor of Developmental Biology, Department of Biology, Islamic Azad University, Mashhad Branch, Iran. 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

[Downloaded from rjms.iums.ac.ir on 2024-03-28]