

## بررسی اثر داربست مثانه گوسفند نژاد اهلی بر روی سلول‌های بلاستما در شرایط

### برون‌تنی

**نگار صغیری<sup>1</sup>**، هاشم راستی<sup>2</sup>، جواد بهارآرا<sup>3</sup>، ناصر مهدوی شهری<sup>4</sup>، مهدی مرجانی<sup>5</sup>، سید حسن علوی<sup>6</sup>، فاطمه ناصری<sup>7</sup>

1- کارشناس ارشد زیست شناسی تکوین، عضو باشگاه پژوهشگران جوان، دانشگاه آزاد اسلامی واحد مشهد، مشهد، ایران. [saghiribiologist@gmail.com](mailto:saghiribiologist@gmail.com)

2- دانشجوی دکتری زیست شناسی تکوین جانوری، عضو باشگاه پژوهشگران جوان، دانشگاه آزاد اسلامی واحد مشهد، مشهد، ایران.

3- دانشگاه آزاد اسلامی واحد مشهد، مرکز تحقیقات بیولوژی کاربردی تکوین جانوری، دانشیار، دکتری سلولی تکوینی، مشهد، ایران.

4- دانشگاه آزاد اسلامی واحد مشهد، دانشکده علوم، استاد سیتولوژی هیستولوژی، گروه زیست شناسی، مشهد، ایران.

5- دانشگاه آزاد اسلامی واحد کرج، گروه علوم درمانگاهی، دانشیار دانشکده دامپزشکی، کرج، ایران.

6- دانشیار آناتومی، بخش میکروسکوپ الکترونی، پژوهشکده بوعلی، دانشگاه علوم پزشکی مشهد، ایران.

7- کارشناس ارشد فیزیولوژی، بخش میکروسکوپ الکترونی، آزمایشگاه مرکزی دانشگاه فردوسی مشهد، ایران.

تاریخ دریافت: 93/1/25 تاریخ پذیرش: 93/2/27

### چکیده

مقدمه و هدف: داربست‌های زیستی که از ماتریکس خارج سلولی تشکیل شده‌اند قابلیت تسهیل تجدید ساختار در تعداد زیادی از بافت‌ها را دارا می‌باشند. این مطالعه به منظور بررسی اثر القایی داربست مثانه گوسفند نژاد اهلی بر روی سلول‌های بافت بلاستما در شرایط برون تنی انجام شد.

روش کار: ابتدا مثانه گوسفند با قرارگیری در SDS یک درصد به مدت 24 ساعت همراه با چرخش آرام کاملاً سلول‌زدایی شد. سپس به منظور تهیه بافت بلاستما با پانچور مخصوص لاله‌های گوش خرگوش نژاد نیوزیلندی پانچ و حلقه بلاستمایی حاصل شد. در ادامه داربست سلول‌زدایی شده در شرایط استریل در مرکز حلقه بلاستما قرار گرفته و به محیط کشت انتقال داده شد. سپس جهت مطالعات میکروسکوپ نوری از رنگ‌های هماتوکسیلین اتوزین و پیک اندیگو و آبی تولوئیدین استفاده شد. همچنین نمونه‌هایی از روزهای 15 و 20 برای مطالعه با میکروسکوپ الکترونی گذاره آماده سازی شد.

یافته‌ها: رشته‌های کلاژن در ماتریکس مثانه بعد از سلول‌زدایی حفظ شده بودند. در روزهای 15 و 20 کشت بیشترین مهاجرت سلول‌های بلاستمایی به داربست مثانه دیده شد. در روز 10 و 15 کشت تعدادی سلول نابالغ در مسیر تمایز به سلول‌های فیبروبلاست و آدیپوسیت مشاهده شد. در روز 15 کشت تمایز سلول‌های بلاستما به سلول‌های پوششی و در روز 20 کشت تمایز آن‌ها به سلول‌های فیبروبلاست و آدیپوسیت مشاهده گردید.

نتیجه گیری: داربست مثانه قابلیت القای سلول‌های بلاستمایی را دارد و باعث می‌شود سلول‌های بلاستمایی علاوه بر مهاجرت به آن به انواعی از سلول‌ها تمایز یابند این رویداد با توجه به آن که از هیچ عامل رشد و محرک دیگری در محیط کشت استفاده نشده بود حائز اهمیت است.

واژه‌های کلیدی: مثانه، بلاستما، سلول‌زدایی، داربست، تمایز.

### مقدمه

قادر می‌سازد (20). ماتریکس خارج سلولی مشتمل بر مخلوطی از پروتئین‌ها، پروتئوگلیکان‌ها و ماکرومولکول‌ها است که باعث رشد سلول‌ها می‌شود (22). میزان چسبندگی ماتریکس خارج سلولی به سلول از طریق اینتگرین‌ها و رسپتورهای سطح سلولی

یکی از چالش‌های جدید که محققین با آن مواجه‌اند، کشف مفاهیم ساخت و ترمیم بافت‌های انسانی با مواد بیولوژیکی زنده، به کمک جامعیت بخشیدن به تکنولوژی‌های مهندسی است. این قبیل تکنولوژی‌ها ما را به شبیه‌سازی عملکردی و ساختاری بافت‌های نرمال

آزمایشگاهی و ترمیم بافت از لحاظ عملکردی در شرایط درون‌تنی می‌باشد (10). بررسی مطالعات انجام شده در مهندسی بافت و پزشکی ترمیمی بیان می‌دارد که بافت‌های مختلف در مراحل مختلف پیشرفت هستند: برخی در گذشته کاربرد کلینیکی پیدا نموده‌اند، تعداد کمی در مرحله تجربیات پیش کلینیکی بوده و برخی دیگر در مرحله تحقیق و پژوهش می‌باشند. پیشرفت‌های اخیر پیشنهاد می‌کنند که بافت‌های مهندسی شده ممکن است در آینده کاربردهای کلینیکی گسترده‌ای در جهت سودمندی و گسترش هرچه بهتر برای تولید جایگزین‌های بافتی به منظور حل مشکلات بیماران در طب ترمیم پیدا نماید (2). سلول‌های بافت بلاستما، سلول‌هایی با ویژگی‌های سلول‌های جنینی و تا حدودی با اختصاصات و ویژگی‌های سلول‌های بنیادی در دوران جنینی هستند. این سلول‌ها احتمالاً تحت تاثیر عوامل محیطی می‌توانند در جهات مختلف تمایز یابند (26). سلول‌های پروجینیور جدا شده از بافت بلاستما دارای پتانسیل آدیپوژنیک، استئوژنیک و کندروژنیک هستند (6). مطالعه روی این سلول‌ها به دانشمندان در فهم بهتر طبیعت بافت بلاستما و ظرفیت ترمیم آن‌که در مواضع ویژه در بعضی پستانداران شامل خرگوش و یا موش نژاد MRL محدود شده است کمک می‌نماید (11). یکی از بهترین مثال‌های تشکیل بافت بلاستما در پستانداران، جایگزینی همه بافت‌ها پس از ایجاد سوراخ در لاله‌گوش خرگوش نر نژاد نیوزلندی است. بلاستما سلول‌هایی توده‌ای شکل و شبیه به سلول‌های مزانشیمی هستند که به‌طور واضح در موضعی که بافت‌ها جراحت یافته‌اند، ایجاد می‌شوند و سلول‌های این بافت ویژگی چندتوانی دارند این سلول‌ها در محل پیوند تحت تاثیر سیگنال‌های محیطی واجد توانایی تبدیل به بافت‌های مختلف می‌باشند. هم‌چنین دو تا سه روز بعد از پانچ لاله‌های گوش خرگوش نر

باعث رفتارهای سلولی متفاوت می‌گردد (15). مواد مستقر در ماتریکس خارج سلولی دارای فواید بسیار زیاد ذاتی نسبت به مواد سنتزی در کاربردهای جراحی و پزشکی می‌باشند. پروتئین‌های مستقر در ماتریکس خارج سلولی باعث استحکام مکانیکی مشخص و حفظ فعالیت زیستی می‌شوند و این پروتئین‌ها ترمیم بافت را تسریع می‌بخشند (16). داربست‌های طبیعی با منشاء ماتریکس خارج سلولی بافت‌ها به عنوان بیومتریال به دلیل سازگاری زیستی و پتانسیل ترمیمی برای کاربردهای مختلف طب ترمیم و مهندسی بافت استفاده می‌شوند (8). چالش مهندسان بافت بهینه کردن داربست یا سیستم‌های مناسب جهت جداسازی، تکثیر و تمایز سلول‌های مورد نظر است تا بتواند رشد هماهنگ و سه بعدی بافت را پیش برد. بنابر این اولین نیاز جهت رشد مناسب سلول‌ها، داربست مناسب می‌باشد تا سلول‌ها بتوانند در محیط سه بعدی رشد کنند. با این حال این داربست‌ها نیاز به ویژگی‌های خاصی از جمله سازگاری زیستی و تخلخل مناسب هستند (7). دستگاه ادراری و مئانه مستعد بیماری‌های مختلف از زمان جنینی تا بزرگسالی می‌باشد. در این رابطه برخی از مواد سنتتیک و بافت‌های طبیعی برای نوسازی نقص‌های عملکردی مئانه موضوع تحقیق می‌باشد، مواد طبیعی شامل الوگرافت‌های مئانه، قطعات معدی روده ای، پوست، ماهیچه، جفت، لایه زیر مخاطی روده کوچک و ماتریکس سلول‌زدایی شده مئانه می‌باشد (17). گروه‌های مختلف پزشکی و غیر پزشکی در جهان به سمت به‌دست آوردن کاربردهای عملی که مورد پسند متقاضیان و مقرون به صرفه باشد حرکت می‌کنند و هدف اصلی آن‌ها روشن کردن ابهامات ماتریکس خارج سلولی برای دستاوردهای مهندسی بافت می‌باشد (14). مهندسی بافت موفق، هدف بلند پروازانه‌ای است که شامل ساخت بافت جدید در محیط

گوسفند آماده استفاده گردید (9، 1). این داربست به مدت 4 روز برای تهیه حلقه بلاستمایی در فریزر 20- درجه سانتی‌گراد نگهداری شد. بدین منظور یک راس خرگوش انتخاب و در دستگاه مخصوص نگهداری خرگوش (مهارکننده) جهت پانچ لاله‌گوش قرار گرفت. بعد از موزدایی گوش‌ها با کرم موبر با استفاده اسپری لیدوکائین 10٪ تمامی سطح گوش بی‌حس و با استفاده از دستگاه مخصوص پانچ 5 سوراخ در گوش راست و 5 سوراخ در گوش چپ با قطر 2 میلی‌متر ایجاد گردید. خرگوش مذکور به مدت 3 روز تحت شرایط کاملاً استریل نگهداری و در پایان روز سوم مجدداً با ایجاد شرایط بی‌حسی گوش بر روی سوراخ-های قبلی سوراخ‌هایی به قطر 4 میلی‌متر ایجاد و حلقه بلاستمایی برداشته شد (24). حلقه‌های بلاستمایی در 7 مرحله شامل 6 مرحله قرارگیری در سرم فیزیولوژی استریل و یک مرحله قرارگیری در محیط کشت، کاملاً استریل شدند. محیط کشت مورد استفاده شامل 85 میلی‌لیتر (Dulbecco's Modified Eagle's Medium, Gibco) DMEM و 15 میلی‌لیتر سرم جنینی گاوی (Fetal Bovine Serum, Biosera) FBS و 500 میکرولیتر پنی‌سیلین - استرپتومایسین (Pen/Step, Sigma) بود (25). سپس هریک از داربست‌های مثانه آماده شده تحت شرایط استریل به زیر هود لامینار منتقل و در مرکز یک حلقه بلاستمایی قرار داده شدند. سپس تمامی نمونه‌ها در داخل پلیت‌های 6 خانه‌ای مخصوص کشت تعبیه و مقدار 3 میلی‌لیتر محیط کشت به آن‌ها افزوده شد، پلیت‌ها به انکوباتور CO<sub>2</sub> منتقل و هر 2 تا 3 روز یک‌بار محیط کشت تعویض گردید. نمونه‌ها در روزهای 5، 10، 15، 20، 25، 30 بعد از خروج از محیط کشت و انجام عملیات بافتی با رنگ‌های هماتوکسیلین اتوزین و پیک اندیگو و وان گیسون رنگ‌آمیزی و توسط میکروسکوپ نوری (Olympus-

نژاد نیوزیلندی با تشکیل بافت بلاستما در حاشیه و اطراف زخم امکان ترمیم و بازسازی سوراخ‌های ایجاد شده فراهم می‌گردد (19). در پژوهش حاضر اثر داربست مثانه گوسفند نژاد اهلی بر روی بافت بلاستما در شرایط برون‌تنی بررسی شده است.

### مواد و روش‌ها

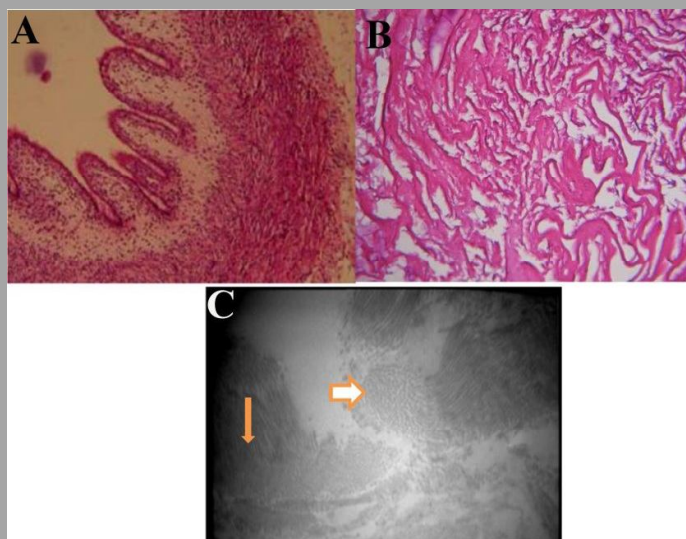
این پژوهش تجربی، آزمایشگاهی است و در سال 1391-1392 در دانشگاه آزاد اسلامی واحد مشهد انجام شد. خرگوش‌های سفید نر نژاد نیوزیلندی مورد استفاده در این پژوهش با وزن تقریبی 3 کیلوگرم و با سن 4 تا 6 ماهه از موسسه تحقیقاتی رازی تهران خریداری و به حیوان‌خانه دانشکده علوم دانشگاه آزاد اسلامی مشهد انتقال داده شدند. در تمامی مراحل انجام این پژوهش، مصوبات مربوط به اصول کار با حیوانات آزمایشگاهی هم چون دسترسی آزادانه به آب و غذا، کشتن بدون درد، جلوگیری از درد ناشی از پانچ کردن رعایت شد. برای تهیه داربست سلول‌زدایی شده مثانه گوسفند نژاد اهلی، تعدادی مثانه گوسفند از کشتارگاه دام مشهد خریداری و به آزمایشگاه انتقال یافت، سپس بافت مورد نظر به قطعات کوچک‌تر و مساوی تقسیم و سلول‌زدایی انجام شد. با توجه به این‌که عوامل موثر زیادی برای سلول‌زدایی هر بافت و اندام وجود دارد که این عوامل بستگی به چند فاکتور شامل تعداد سلول‌های بافت، چگالی، محتوای لیپید و ضخامت بافت دارد (13). از روش شیمیایی برای سلول‌زدایی استفاده گردید. در روش سلول‌زدایی شیمیایی تمامی قطعات مثانه به مدت 24 ساعت در محلول سدیم دو دسیل سولفات یک درصد (SDS, merck) همراه با چرخش آرام قرار داده شدند، سپس نمونه‌ها توسط آب مقطر استریل شستشو و به‌وسیله اتانول 75٪ و پراستیک اسید 0/2٪ استریل و در نهایت به مدت 24 ساعت در PBS قرار داده شدند، بدین ترتیب داربست مثانه

روی گرید قرار داده و توسط میکروسکوپ الکترونی گذاره (Zeiss) عکس‌برداری شد.

### نتایج

**نتایج سلول‌زدایی:** بررسی مقایسه‌ای مثانه گوسفند نژاد اهلی در نمونه‌های تجربی بعد از سلول‌زدایی به روش شیمیایی با نمونه کنترل بیان‌گر انجام سلول‌زدایی به طور کامل بود (شکل 1، A و B). همچنین مطالعه میکروسکوپ الکترونی گذاره از مثانه سلول‌زدایی شده، نشان داد که رشته‌های کلاژن در داربست حفظ شده‌اند (شکل 1، C).

ix70) مطالعه و با دوربین (canon) عکس‌برداری انجام شد. در ادامه جهت تأیید تمایز سلول‌ها که در برش‌های 7 میکرونی و رنگ‌آمیزی‌های هیستولوژیک دیده شده بود، مطالعات میکروسکوپ الکترونی گذاره به همراه برش‌های یک میکرونی با دستگاه اولترا میکروتوم (Leica) تهیه شد. سپس از رنگ آبی تولوئیدین جهت رنگ‌آمیزی برش‌های semiting یک میکرونی استفاده و پس از تأیید حضور نمونه مورد نظر در ناحیه برش از همان ناحیه برش 70 نانومتر گرفته و



شکل 1- A برش عرضی از مثانه گوسفند قبل از سلول‌زدایی، نمونه کنترل (رنگ آمیزی هماتوکسیلین ائوزین) x 100.

B: بافت مثانه گوسفند بعد از سلول‌زدایی (رنگ آمیزی هماتوکسیلین ائوزین) درشت نمایی x 100.

C: عکس‌برداری با میکروسکوپ الکترونی گذاره از مثانه سلول‌زدایی شده: پیکان فیبرهای کلاژن با برش عرضی و طولی را در داربست نشان می‌دهد. درشت نمایی x 2500

### نتایج کشت

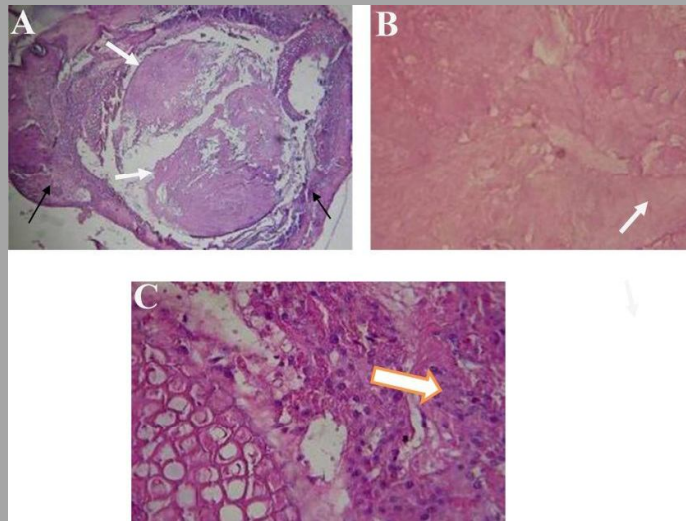
روز 5 کشت:

هیچ سلولی از حلقه بلاستمایی به داربست مهاجرت نکرده بود. سلول‌های بلاستمایی فقط در داخل حلقه دیده شدند (شکل 2، A تا C).

روز 10 کشت: مهاجرت سلول‌های بلاستما از حلقه به داربست رخ داده بود (شکل 3، A). حفظ رشته‌های

کلاژن در داربست بعد از سلول‌زدایی با رنگ‌آمیزی

وان گیسون و عکس‌برداری میکروسکوپ الکترونی گذاره تأیید شد (شکل 3، B و C). در مقاطع یک میکرونی که با آبی تولوئیدین رنگ‌آمیزی شده‌اند، تعدادی سلول نابالغ در مسیر تمایز بلاستما به سلول‌های دیگر مشاهده شدند (شکل 3، D).



شکل 2- روز 5 کشت A: حلقه بلاستما در اطراف و داربست در مرکز حلقه مشخص است، هیچ سلولی از حلقه بلاستما به داربست مهاجرت نکرده است. پیکان‌های مشکی نشان‌گر حلقه بلاستما در اطراف و پیکان‌های سفید نشان‌گر داربست مثانه در مرکز می‌باشد. B: هیچ سلولی به داربست مهاجرت نکرده است. درشت نمایی 100x  
C: حضور سلول‌های بلاستما فقط در حلقه بلاستمایی دیده می‌شود. رنگ آمیزی هماتوکسیلین اتوزین - درشت نمایی 400x

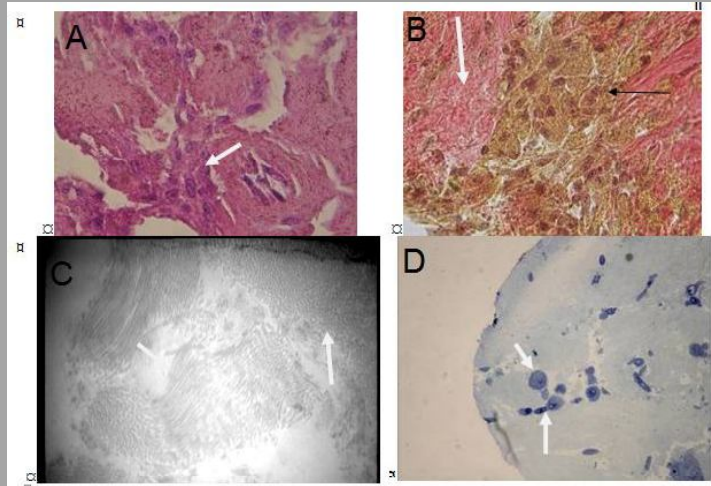
در روز 25 و 30 کشت: سلول‌های مهاجرت کرده به داربست در حال کوچک شدن هستند و به نظر می‌رسد آغاز غیر فعال شدن سلول‌ها و از بین رفتن شکل طبیعی و چروک شدن آن‌ها می‌شود (شکل 6، A و B).

### بحث و نتیجه‌گیری

در پژوهش حاضر به منظور بررسی اثر داربست مثانه گوسفند بر روی رفتار سلول‌های بلاستمایی ابتدا از روش سلول‌زدایی استفاده گردید و در نهایت رفتار سلول‌های بلاستمایی در داربست مثانه مورد مطالعه قرار گرفت. برای تهیه داربست، یکی از مراحل مهم، حذف سلول‌ها از بافت‌ها و حفظ ماتریکس خارج سلولی می‌باشد به طوری که به ترکیبات ماتریکس خارج سلولی آسیبی وارد نشود. سلول‌زدایی بافت‌ها و ارگان‌ها تکنولوژی موفقیت آمیزی برای ایجاد داربست به منظور کاربردهای طب ترمیم و مهندسی بافت است (4،3).

روز 15 کشت: رنگ آمیزی پیک اندیگو و آبی تولوئیدین نشان داد علاوه بر مهاجرت سلول‌های بلاستما به داربست تمایز سلولی در داربست مثانه شروع شده است. در این روز حضور لایه‌ها و کلنی‌های سلولی که احتمالاً حاکی از تشکیل سلول‌های پوششی می‌باشد قابل مشاهده بود (شکل 4، A و B). در این روز نیز تعدادی سلول نابالغ که به نظر می‌رسد در مسیر تمایز به سلول‌های دیگر است دیده شد (شکل 4، C).

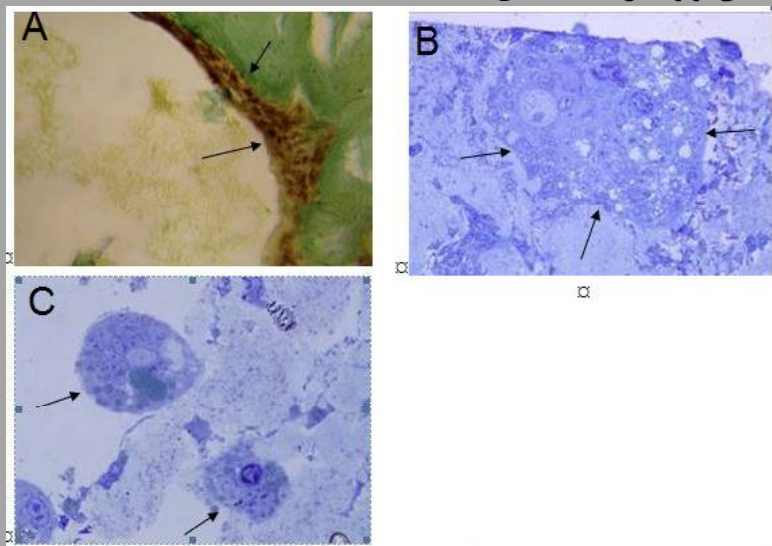
روز 20 کشت: علاوه بر سلول‌های پوششی حضور مشخص فیروبلاست و آدیپوسیت در داربست که حاصل تمایز سلول‌های بلاستمایی می‌باشد از وقایع این روز بود (شکل 5، A تا C). در این روز رخدادهایی از شروع فرآیند آنژیوژنز در داربست مشاهده شد (شکل 5، D).



شکل 3- روز 10 کشت: (A) پیکان سلول‌های بلاستمایی مهاجرت کرده به داربست مثانه را نشان می‌دهد. رنگ آمیزی همانوکسیلین ائوزین. درشت نمایی 400x

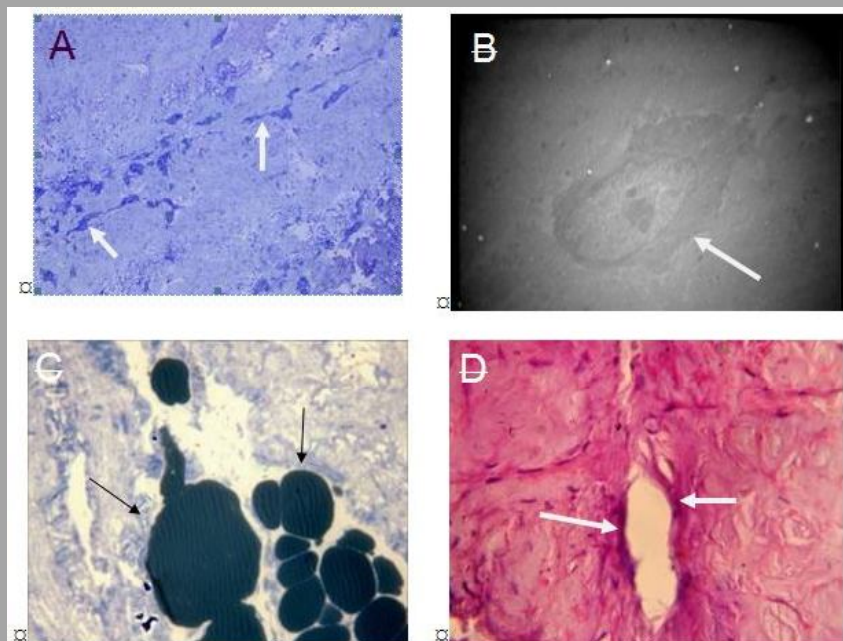
(B) پیکان مشکی سلول‌های بلاستمایی مهاجرت کرده به داربست مثانه را نشان می‌دهد. پیکان سفید حفظ رشته‌های کلاژن در داربست را بعد از سلول‌زدایی نشان می‌دهد که قرمز رنگ شده‌اند. رنگ آمیزی وان گیسون. درشت نمایی 400x  
(C) عکس برداری میکروسکوپ الکترونی گذاره. پیکان‌ها رشته‌های کلاژن با برش عرضی و طولی را نشان می‌دهد. درشت نمایی: 5000x

(D) برش یک میکرونی از نمونه روز 10. پیکان سلول‌هایی را نشان می‌دهد که هنوز بالغ نیستند و در مسیر تمایز بلاستما به سلول‌های دیگر است. رنگ آمیزی آبی تولوئیدین. درشت نمایی 200x

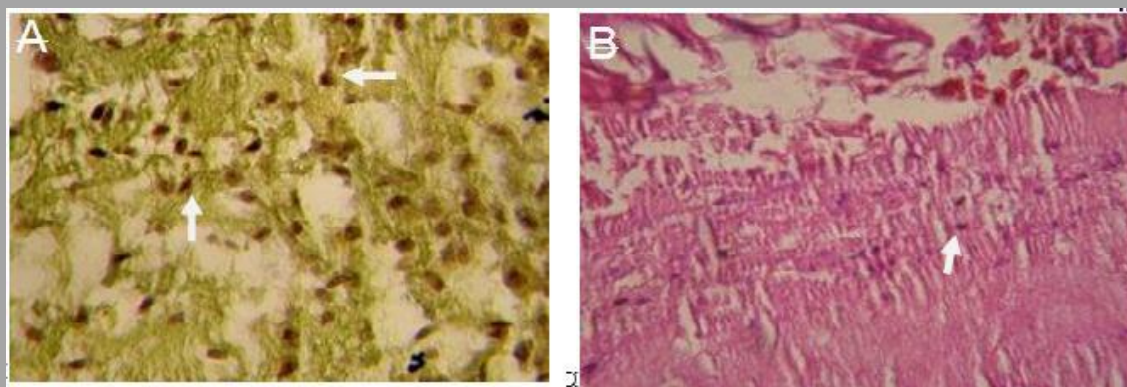


شکل 4- روز 15 کشت، A: برش هفت میکرونی از نمونه روز 15، سلول‌های بلاستمایی مهاجرت کرده به داربست در روز 15 به سلول‌های پوششی در حال تمایز هستند. پیکان‌ها سلول‌های تمایز یافته را نشان می‌دهد. رنگ آمیزی پیک اندیگو. درشت نمایی 400x .

B: برش یک میکرونی از نمونه روز 15. پیکان‌ها مجموعه‌ای از سلول‌های بلاستمایی مهاجرت کرده به داربست را که تحت تأثیر القانات ماتریکس مثانه به سلول‌های پوششی در حال تمایز هستند نشان می‌دهد. رنگ آمیزی آبی تولوئیدین. درشت نمایی 200x  
C: پیکان نمایی از یک سلول نابالغ را نشان می‌دهد که احتمالاً در مسیر تمایز به سلول‌های دیگر است. رنگ آمیزی آبی تولوئیدین. درشت نمایی 400x



شکل 5- روز 20 کشت A: پیکان‌ها تمایز سلول‌های بلاستما به فیبروبلاست در داربست، تحت تأثیر القانات ماتریکس مثانه را نشان می‌دهد. رنگ آمیزی آبی تولوئیدین. درشت نمایی 200x.  
 B: عکس برداری با میکروسکوپ الکترونی گذاره. پیکان نشان دهنده یک سلول فیبروبلاست می‌باشد که به بستر خود اتصال دارد. درشت نمایی: 2500x  
 C: برش یک میکرونی از نمونه روز 20. پیکان‌ها تمایز سلول‌های بلاستما به سلول‌های آدیپوسیت را نشان می‌دهد. رنگ آمیزی آبی تولوئیدین. درشت نمایی 400x  
 D: وقوع رخداد آنژیوژنز در داربست. رنگ آمیزی هماتوکسیلین ائوزین. درشت نمایی 400x



شکل 6- روز 25 و 30 کشت، A: از روز 25 تا 30 سلول‌های حاضر در داربست شروع به کوچک شدن کرده است و به نظر می‌رسد سلول‌ها در حال غیر فعال شدن و هم‌چنین چروک شدن هستند. پیکان‌ها بیان‌گر این سلول‌ها هستند. رنگ آمیزی پیک اندیکو. درشت نمایی 400x.  
 B: رنگ آمیزی هماتوکسیلین ائوزین. درشت نمایی 400x.

به مثانه سلول‌زدایی شده مهاجرت کرده و در آنجا رفتارهای تمایزی از خود نشان دادند. طبق گزارش بارنس موفقیت در سلول‌زدایی و ایجاد داربست مناسب

پژوهش حاضر نشان داد که سدیم دو دسیل سولفات ماده شیمیایی مناسبی جهت از بین بردن سلول‌های بافت مثانه گوسفند می‌باشد به دلیل آن‌که سلول‌های بلاستما

نیست. در پژوهشی، ماتریکس خارج سلولی لایه‌ی زیر مخاطی روده‌ی کوچک بعد از سلول‌زدایی به عنوان داربست برای ترمیم اتصال عضله‌ی گاسترونموس و تاندون آشیل در سگ‌ها مورد استفاده قرار گرفت (27). این داربست‌ها به‌وسیله کشت سلول‌های اجدادی روی آن دوباره سلولی شده و سرانجام به‌طور کامل به‌جای عضله انقباضی و تاندون جایگزین شد (28). همان‌طور که در نتایج مشاهده شد به نظر می‌رسد ترکیبات ماتریکس خارج سلولی مئانه باعث القا و تمایز سلول‌های بلاستما در شرایط برون تنی شده‌اند. در مطالعه حاضر، در روز 20 کشت سلول‌های بلاستما تحت تاثیر ماتریکس مئانه به سلول‌های فیروبلاستی تمایز یافته‌اند. پیش از این نیز سانگ میونگ ری مطالعات خود را بر اساس کشت فیروبلاست در ماتریکس سه بعدی کلاژن انجام داد و این‌گونه بیان نمود که پروتئین اسکلت سلولی ویژه مورد استفاده سلول بسته به شرایط مکانیکی اطراف سازگار می‌شود (21). نتیجه دیگری که پس از گذشت 20 روز از کشت در نمونه‌های رنگ‌آمیزی شده با آبی تولوئیدین مشاهده شد، تمایز سلول‌های بلاستمایی به سلول آدیپوسیت در داربست بود. لارن فلاین محقق است که سلول‌های بنیادی منشا گرفته شده از بافت چربی اولیه انسانی (ASC) را بر روی ماتریکس سلول‌زدایی شده جفت (PDM) و داربست‌های هیالورونان (XLHA) کشت داد و میزان تکثیر و تمایز سلول‌های چربی را بر روی این داربست‌ها ارزیابی نمود و به این نتیجه رسید که محیط داربست تاثیر عمیقی بر روی تکثیر و تمایز آدیپوسیت از سلول‌های کشت شده Asc انسانی دارد (12). بنابراین از پژوهش حاضر می‌توان این‌گونه دریافت که داربست به‌دست آمده از بافت مئانه گوسفند ممکن است فراهم‌کننده مواد ایده‌آل جهت القاء تکثیر و تمایز سلول‌های آدیپوسیت باشد. نتایج پژوهش ما نشان می‌دهد که

جهت ترمیم و مهندسی بافت، مربوط به سیگنال‌های مولکولی ایجاد شده به‌وسیله ترکیبات ماتریکس خارج سلولی باقی‌مانده به همراه ساختارهای پروتئینی می‌باشد (5).

در پژوهش حاضر تمایز سلول‌های بافت بلاستما به تعدادی سلول نابالغ که در مسیر تمایز به سلول‌های فیروبلاست، پوششی و آدیپوسیت بودند مشاهده شد، به‌طوری‌که در روز 15 و 20 تمایز سلول‌های بلاستمایی به سلول‌های فیروبلاست، آدیپوسیت و پوششی رخ داد. بر همین اساس اسلامی‌نژاد و همکارانش در پژوهشی نشان دادند که سلول‌های بنیادی مشتق از بافت بلاستما قادرند به سلول استخوان، غضروف و سلول‌های چربی تمایز یابند، مشخصه‌ای که صفت ویژه سلول‌های بنیادی مزانشیمی است. سلول‌های بنیادی مشتق از بافت بلاستما تمایل دارند در یک سبک کلونوزنیک در شرایط برون تنی پراکنده شوند که تشکیل کلونی ویژگی دیگری برای سلول‌های بنیادی مزانشیمی است (6). سلول‌های تمایز نیافته از بلاستمای در حال ترمیم گوش خرگوش ظرفیت تکثیر بالایی داشته و قابلیت بیان مارکرهای سلول‌های بنیادی ویژه را دارد این سلول‌های فناپذیر OCT4 و SOX2 را بیان می‌کنند (18). در پژوهشی که توسط ساکسنا و همکارانش انجام گرفت سلول‌های اپی‌تلیال مری را از رت‌های جوان گرفته و در شرایط مصنوعی کشت دادند و توانستند سلول‌های پوششی با مورفولوژی اپی‌تلیوم بالغ ایجاد کنند هم‌چنین آن‌ها قابلیت ادامه حیات این سلول‌ها را بر روی داربست سه بعدی کلاژن بررسی کردند (23). بنابراین به نظر می‌رسد تمایز سلول‌های بلاستما به سلول‌های پوششی که در روز 15 کشت در تحقیق ما رخ داده است با تحقیق مذکور از جهاتی دارای قرابت است. استفاده موفق از داربست‌های برپایه‌ی ماتریکس خارج سلولی منحصر به بافت خاصی



مقاله حاضر طرح تحقیقاتی مصوب باشگاه پژوهشگران جوان دانشگاه آزاد اسلامی مشهد به شماره مصوب 90727 می‌باشد. لذا نویسندگان بدین‌وسیله مراتب تقدیر و تشکر خود را از همکاران محترم گروه زیست‌شناسی و مرکز تحقیقات بیولوژی تکوین جانوری دانشگاه آزاد اسلامی مشهد ابراز می‌دارند.

داربست مثانه گوسفند بستر سه بعدی مناسبی جهت کشت و بررسی رفتارهای تمایزی سلول‌های بلاستمایی می‌باشد. به نظر می‌رسد آماده‌سازی چنین داربست‌هایی بخش مهمی از پژوهش‌های آتی دانش زیست‌شناسی خواهد بود که می‌تواند کاربردهای گسترده‌ای در دانش پزشکی ترمیمی و مهندسی بافت داشته باشد.

## تشکر و قدردانی

### منابع

1. Abousleiman, R. I., Reyes, Y., McFetridge, P., Sikavitsas, V. (2008). The human umbilical vein: a novel scaffold for musculoskeletal soft tissue regeneration. *J Artif Organs*, 32; 735-742.
2. Atala, A. (2009). Engineering organs. *Curr Opin Biotechnol*, 20(5); 575-592.
3. Badylak, S. F., Kochupura, P. V., Cohen, I. S., Doronin, S. V., Saltman, A. E., Gilbert, T. W. (2006). The use of extracellular matrix as an inductive scaffold for the partial replacement of functional myocardium. *Cell Transplant*, 15(1), S29-40.
4. Badylak, S. F., Vorp, D. A., Spievack, A. R., Simmons-Byrd, A., Hanke, J., Freytes, D. O. (2005). Esophageal reconstruction with ECM and muscle tissue in a dog model. *J Surg Res*, 128(1); 87-97.
5. Barnes, C. A., Brison, J., Michel, R., Brown, B. N., Castner, D. G., Badylak, S. F. (2011). The surface molecular functionality of decellularized extracellular matrices. *Biomaterials*, 32(1); 137-143.
6. Baghban Eslaminejad, M., Bordbar, S. (2013). Isolation and characterization of the progenitor cells from the blastema tissue formed at experimentally-created rabbit ear hole. *Iran J Basic Med Sci*, 16(2); 109-115.
7. Bokhari, M., Carnachan, R. J., Cameron, N. R., Przyborski, S. A. (2007). Novel cell culture device enabling three-dimensional cell growth and improved cell function. *Biochem Biophys Res Commun*, 354(4); 1095-1100.
8. Chun, S. Y., Lim, G. J., Kwon, T. G., Kwak, E. K. (2007). Identification and characterization of bioactive factors in bladder submucosa matrix. *Biomaterials*, 28(29); 4251-4256.
9. Crapo, P. M., Gilbert, T. W., Badylak, S. F. (2011). An overview of tissue and whole organ decellularization processes. *J Biomaterials*, 32; 3233-3243.
10. Dutta, R. C., Dutta, A. K. (2010). Comprehension of ECM-Cell dynamics: A prerequisite for tissue regeneration. *J Biotech Adv*, 28(6); 764-769.
11. Edwards, R. G. (2008). From embryonic stem cells to blastema and MRL mice. *Reproductive BioMedicine Online*, 16(3); 425-461.
12. Flynn, L. E., Prestwich, G. D., Semple, J. L., Woodhouse, K. A. (2008). Proliferation and differentiation of adipose-derived stem cells on naturally derived scaffolds. *Biomaterials*, 29(12); 1862-1871.
13. Gilbert, T. W. (2012). Strategies for tissue and organ decellularization. *J Cell Biochem*, 113; 2217-2222.
14. Glotzbach, J. P., Wong, V. W., Gurtner, G. C., Longaker, M. T. (2011). Regenerative Medicine. *Curr Probl Surg*, 48; 148-212.
15. Heino, J., Käpylä, J. (2009). Cellular receptors of extracellular matrix molecules. *Curr Pharm Des*, 15(12); 1309-1317.
16. Hoganson, D. M., Owens, G. E., O'Doherty, E. M., Bowley, C. M., Goldman SM, Harilal DO, Neville CM, Kronengold RT, Vacanti JP. Preserved extracellular matrix components and retained biological activity in decellularized porcine mesothelium. *Biomaterials*. 2010; 31(27):6934-6940.
17. Liu, Y., Bharadwaj, Sh., Lee, S. J., Atala, A., Zhang, Y. (2009). Optimization of a natural collagen scaffold to aid cell-matrix penetration for urologic tissue engineering. *Biomaterials*, 30(23-24); 3865-3873.
18. Mahmoudi, Z., Moghaddam-Matin, M., Saeinasab, M., Nakhaei-Rad, S., Mirahmadi, M., Mahdavi Shahri, N. (2011). Blastema cells derived from rabbit ear show stem cell characteristics. *J Cell Mol Res*, 3; 25-31.

19. Mahdavi-Shahri, N. F., Kheirabadi, M., Babaie, S., Sadeghie, F., Azarniya, M. (2008). The ultra structure study of blastema in pinna tissues of rabbits with transmission electron microscope. *J Biol Sci*, 8; 993-1000.
20. Metcalfe, M. D., Willis, H., Beare, A., Ferguson, M. W. J. (2006). Characterizing regeneration in the mammalian external ear. *Journal Anat*, 209(4); 439-446.
21. Rhee, S. (2009). Fibroblasts in three dimensional matrixes: cell migratial and matrix remodeling. *Expmol med*, 41(12); 858-865.
22. Rozario, T., Desimone, D. W. (2010). The extracellular matrix in development and morphogenesis: A dynamic view. *J d bio*, 341; 126-140.
23. Saxena, A. K., Ainoedhofer, H., Hollwarth, M. E. (2009). Esophagus tissue engineering: in vitro generation of esophageal epithelial cell sheets and viability on scaffold. *J Ped Sur*, 44; 896-901.
24. Shahri, N. M. (2003). Geometrical and histological model for: mammalian wound repair and regeneration. *J Wound Repair and Regeneration*, 11; 513-526.
25. Tian, H., Bharadwaj, Sh., Liu, Y., Ma, H., Ma, P. X., Atala, A. (2010). Myogenic differentiation of human bone marrow mesenchymal stem cells on a 3D nano fibrous scaffold for bladder tissue engineering. *J Biomaterials*, 31; 870-877.
26. Tsonis, P. A. (2000). Regeneration in vertebrates. *Dev Biol*, 221(2); 273-284.
27. Turner, N. J., Badylak, J. S., Weber, D. J., Badylak, S. F. (2012). Biologic scaffold remodeling in a dog model of complex musculoskeletal injury. *J Surg Res*, 176(2); 490-502.
28. Turner, N. J., Yates, A. J. Jr., Weber, D. J., Qureshi, I. R., Stolz, D. B., Gilbert, T. W. (2010). Xenogeneic extracellular matrix as an inductive scaffold for regeneration of a functioning musculotendinous junction. *Tissue Eng Part A*, 16(11); 3309-3317.

