

درصد تمامی سطح گوش به طور کامل بعد از حدود ۳۰ دقیقه بی حس شد. در ادامه با استفاده از پانچور مخصوص تعداد ۵ سوراخ در گوش راست و ۵ سوراخ در گوش چپ با قطر ۲ میلی متر زده شد. خرگوش مذکور به مدت ۳ روز تحت شرایط کاملاً استریل نگهداری شد و در پایان روز سوم مجدداً با ایجاد شرایط بی حسی برای گوش، بر روی سوراخ‌های قبلی با پانچوری به قطر ۴ میلی متر سوراخ جدیدی ایجاد شد و حلقه بلاستمای بر داشت گردید. سپس حلقه‌های بلاستمای در ۷ مرحله، شامل ۶ مرحله قرارگیری در سرم فیزیولوژی استریل و یک مرحله قرارگیری در محیط کشت، کاملاً استریل شدند. قابل ذکر است در مجموع انجام پژوهش از ۵۰۰ میلی لیتر DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium) و ۱۰۰ میلی لیتر FBS (Fetal Bovine Serum) استفاده شد، به طوری که هر بار تهیه محیط کشت جهت مصرف، شامل ۸۵ میلی لیتر DMEM و ۱۵ میلی لیتر FBS و ۵۰۰ میکرولیتر پنی سیلین-استرپتومایسین بود.^{۱۶} سپس داربست مthane آماده شده تحت شرایط استریل به زیر هود لامینار منتقل شده و هر یک عدد داربست مthane گوسفند، در مرکز یک حلقه بلاستمای قرار گرفت. سپس تمامی نمونه‌ها در داخل پلیت‌های ۶ خانه‌ای مخصوص کشت قرار گرفته و مقدار ۳ میلی لیتر محیط کشت به آن‌ها افزوده شد و پلیت‌ها به انکوباتور CO₂ منتقل شدند. نمونه‌ها در روزهای ۵، ۱۰، ۱۵، ۲۰، ۲۵، ۳۰ بعد از خروج از محیط کشت و انجام عملیات بافتی با رنگ‌های هماتوکسیلین اتوزین و پیک اندیگو رنگ آمیزی شدند و رفتارهای سلولی از جمله مهاجرت، تمایز و تکثیر سلول‌های شبه جنینی بلاستمای از حلقه به درون ماتریکس سلول‌زدایی شده مthane به عنوان داربست، توسط میکروسکوپ نوری مورد بررسی قرار گرفت. رنگ آمیزی هماتوکسیلین اتوزین به عنوان رنگ آمیزی معمولی استفاده شد، که رنگ هماتوکسیلین هسته‌ها را بنفش و اتوزین سیتوپلاسم را صورتی نمود. رنگ پیک اندیگو (مخلوط ۱۰۰ میلی لیتر اسید پیکریک اشباع + ۰/۱ گرم پودر اندیگو کارمین) به عنوان یک رنگ اختصاصی با شدت‌های اسیدوفیلی متفاوت می‌باشد، که در مسیر معمول رنگ آمیزی هماتوکسیلین اتوزین به جای رنگ اتوزین از رنگ پیک اندیگو استفاده کردیم. با این رنگ، زمینه که ماتریکس بافت همبند و کلاژن است به همراه اپتلیوم به رنگ سبز مغز پسته‌ای در می‌آید و هسته‌ها با رنگ هماتوکسیلین، قهوه‌ای کم‌رنگ می‌شوند.

تجزیه و تحلیل اطلاعات به دست آمده با نرم‌افزار آماری Minitab-16 انجام شد. بر روی داده‌ها آزمون‌های ANOVA یک‌طرفه و تست توکی در سطح معنی‌داری ۰/۰۵ > P انجام شد.

شاخص اول، میانگین تعداد سلول‌های مهاجرت یافته به داربست در روزهای مختلف کشت است. بدین منظور برای شمارش تعداد سلول‌های مهاجرت یافته به داربست، از لنز چشمی میکروسکپی مخصوص شمارش استفاده شد. تمامی لام‌ها در درشت‌نمایی ۴۰× مورد بررسی قرار گرفتند و ۵ نقطه قراردادی در میدان دید در تمامی تکرارها شمرده شده، ضمناً تمامی سلول‌های موجود در داخل محوطه مخصوص لنز مورد شمارش قرار گرفتند. برای بررسی شاخص دوم که میانگین تغییرات اندازه هسته سلول‌های

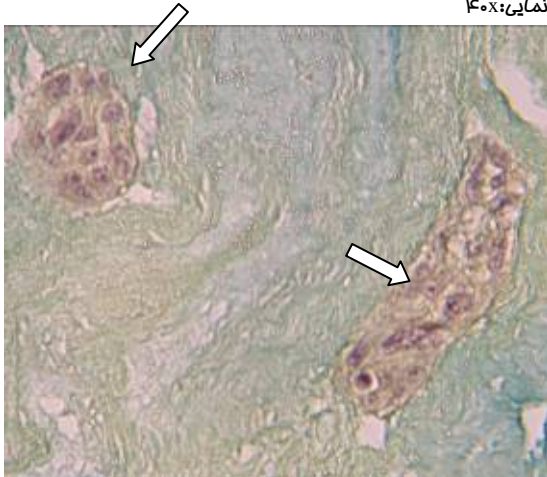
ترکیب و ساختار ماتریکس خارج سلولی تاثیر می‌پذیرد، بنابراین محیط‌های سه‌بعدی منشاء گرفته شده از بافت مthane می‌توانند در ترمیم بافت مthane و جایگزینی آن موثر واقع شوند. هدف از پژوهش حاضر بررسی برهم کنش سلول‌های بافت بلاستما لاله گوش خرگوش نر نژاد نیوزیلندی در ماتریکس سلول‌زدایی شده مthane گوسفند اهلی (Ovis Aries) به عنوان داربست سه‌بعدی در محیط کشت می‌باشد.

روش کار

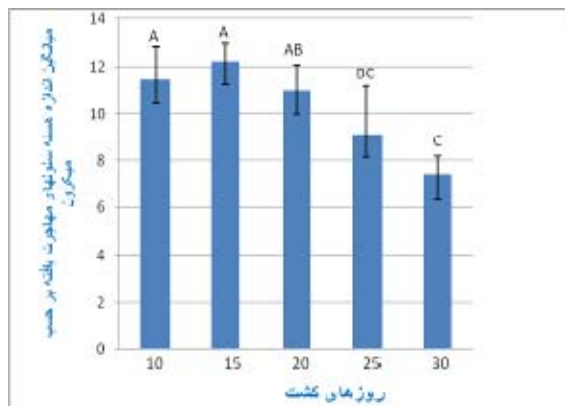
در مطالعه حاضر که یک مطالعه تجربی آزمایشگاهی است، تعداد ۵ راس خرگوش سفید نر نژاد نیوزیلندی با وزن تقریبی ۳-۲ کیلوگرم و با سن ۶-۴ ماه از موسسه تحقیقاتی انستیتو پاستور تهران خریداری شدند و سپس به حیوان‌خانه دانشکده علوم دانشگاه آزاد اسلامی مشهد انتقال یافتند. خرگوش‌ها در شرایط ۱۲ ساعت روشنایی و ۱۲ ساعت تاریکی در دمای میانگین ۲۱°C قرار گرفته و با خوراک مخصوص خرگوش روزانه تغذیه شدند. در تمامی مراحل انجام این پژوهش، مصوبات مربوط به اصول اخلاقی کار با حیوانات آزمایشگاهی هم‌چون دسترسی آزادانه به آب و غذا، کشتن بدون درد، جلوگیری از درد ناشی از پانچ کردن مثل استفاده از لیدوکائین رعایت گردیده است. قابل ذکر است این تحقیق به مدت ۱۲ ماه در سال ۱۳۸۹ انجام شده است. برای تهیه داربست سلول‌زدایی شده مthane گوسفند نژاد اهلی، تعدادی مthane گوسفند از کشتارگاه دام مشهد گرفته و به آزمایشگاه انتقال یافت، سپس بافت مورد نظر به قطعات کوچک‌تر و مساوی تقسیم و به داخل یک عدد لوله فالکون منتقل شدند، سپس سریعاً روش سلول‌زدایی فیزیکی مthane آغاز شد. با توجه به این که عوامل موثر زیادی برای سلول‌زدایی هر بافت و ارگان وجود دارد و این عوامل بستگی به چند فاکتور شامل تعداد سلول‌های بافت، چگالی، محتوای لیپید و ضخامت بافت دارد،^{۱۱} از روش ترکیبی فیزیکی^{۱۲،۱۳} و شیمیایی^{۱۴،۱۵} برای سلول‌زدایی مthane استفاده شد. به طوری که قطعات مthane به مدت ۲۴ ساعت در فریزر ۴°C- قرار گرفتند و هر ۶ ساعت یک‌بار به مدت ۱۰ دقیقه در آب مقطر استریل قرار داده شدند. بعد از پایان ۲۴ ساعت قطعات به مدت ۲ ساعت و ۱ ساعت، به ترتیب در فریزر ۲۰°C- و ۴۰°C- قرار گرفته و سپس آماده قرارگیری در ازت مایع شدند. قطعات مthane در ۵ مرحله ۲ دقیقه‌ای توسط کرایو تیوب در ازت مایع قرار گرفتند و سپس توسط فسفات‌بافر سالین (PBS) شستشو شدند. بدین ترتیب سلول‌زدایی در مرحله فیزیکی به پایان رسید. در مرحله سلول‌زدایی شیمیایی تمامی قطعات مthane را به مدت ۲۴ ساعت در محلول سدیم دودسیل سولفات (SDS) ۱ درصد همراه با چرخش آرام قرار دادیم، سپس نمونه‌ها توسط آب مقطر استریل شستشو شده و به وسیله اتانول ۷۵ درصد و پراستیک اسید ۰/۲ درصد استریل شدند و در نهایت به مدت ۲۴ ساعت در PBS قرار گرفتند. به این ترتیب داربست مthane گوسفند آماده استفاده شد. این داربست به مدت ۴ روز در فریزر ۲۰°C- نگهداری شد تا تهیه حلقه بلاستمای انجام شود. بدین منظور یک راس خرگوش انتخاب شده و در دستگاه مخصوص نگهداری خرگوش (مهارکننده) جهت پانچ لاله گوش و تهیه بافت بلاستما قرار گرفت. بعد از موزدایی گوش‌ها با کرم موبر و با استفاده از اسپری لیدوکائین ۱۰

نمونه کنترل در هر روز کشت، یک قطعه داربست سلول‌زدایی شده بدون بافت بلاستما بود که در محیط کشت قرار گرفت. در هیچ یک از نمونه‌های کنترل در روزهای مختلف کشت، سلولی دیده نشد. در روز ۵ کشت هیچ‌گونه مهاجرت سلول بلاستمایی از حلقه بلاستما به درون داربست مthane صورت نگرفته، نمونه کنترل نیز در این روز فاقد سلول بود. در روز ۱۰ کشت در مقایسه با نمونه کنترل مشاهده شد که سلول‌های بلاستمایی به درون داربست مthane مهاجرت کرده‌اند. روز ۱۵ کشت در مقایسه با نمونه کنترل، دیده شد که سلول‌های بلاستمایی به صورت کلی‌های سلولی دارای اتصال به داربست مthane مهاجرت کرده‌اند. با استفاده از رنگ‌آمیزی اختصاصی پیک اندیگو مشخص شد که سلول‌های بلاستمایی مهاجرت یافته به داربست در این روز به سلول‌های اپیتلیومی تمایز یافته‌اند و رویدادهایی از تشکیل اپیتلیوم پلی‌مورف مthane در داربست در حال شکل‌گیری است (تصویر ۳).

تصویر ۳: نمای ریزبینی از روز ۱۵ کشت می‌باشد که تمایز سلول‌های بلاستمایی به سلول‌های اپیتلیومی در آن مشهود است. نوک پیکان: سلول‌های بلاستمایی تمایز یافته به سلول‌های اپیتلیالی (انسان می‌دهد. رنگ‌آمیزی پیک اندیگو، درشت‌نمایی: ۴۰x)



هم‌چنین آنالیز آماری مربوط به شاخص میانگین اندازه هسته‌ی سلول‌های مهاجرت یافته به داربست نشان داد که بزرگترین اندازه هسته، مربوط به این روز است (نمودار ۱).

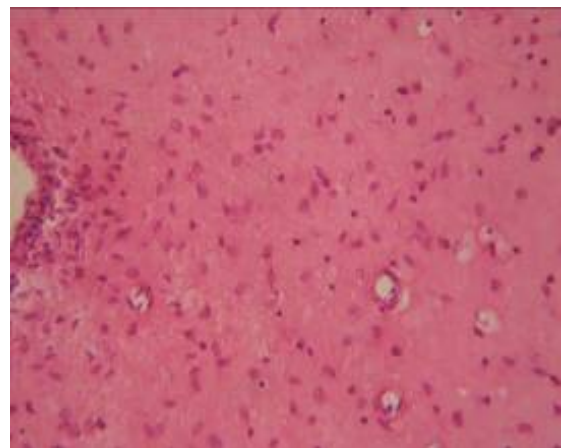


نمودار ۱: میانگین اندازه هسته سلول‌های مهاجرت کرده به داربست بر حسب میکرون. بزرگ‌ترین اندازه هسته‌ها متعلق به روز ۱۵ و کوچک‌ترین اندازه مربوط به روز ۳۰ می‌باشد ($p < 0.05$). ستون‌هایی که دارای حداقل یک حرف مشترک می‌باشند از نظر آماری و در سطح $p < 0.05$ فاقد اختلاف معنی‌دار هستند.

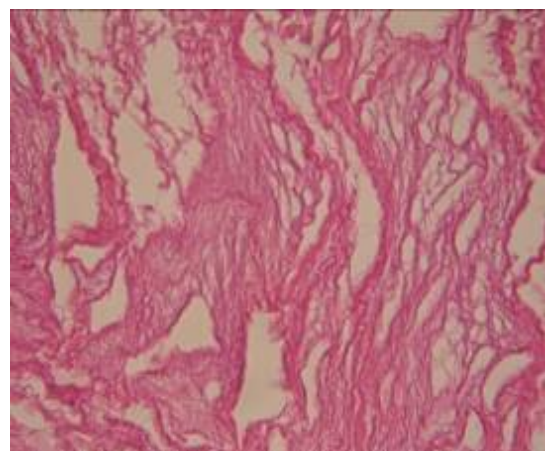
مهاجرت یافته به داخل داربست است، از لنز چشمی میکروسکوپی مخصوص که دارای خط‌کش اندازه‌گیری می‌باشد، استفاده شد. هر یک واحد این خط‌کش در درشت‌نمایی $40\times$ وقتی که در عدد $3/2$ ضرب شود، واحد اندازه‌گیری بر حسب میکرون خواهد شد. هم‌چنین به دلیل آن‌که انواع مختلفی از شکل‌های هسته اعم از کروی، بیضی و کشیده در سلول‌های مهاجرت کرده به داربست دیده می‌شد، جهت یک اندازه‌گیری دقیق برای هسته‌های موجود در میدان دید برای هر هسته قطر کوچک با قطر بزرگ بعد از اندازه‌گیری جمع و بر عدد ۲ تقسیم شد تا عدد دقیقی از اندازه هسته سلول‌های مهاجرت یافته به داربست به دست آید.

یافته‌ها

مطالعه میکروسکوپ نوری مقاطع رنگ‌آمیزی شده با هماتوکسیلین و ائوزین نشان داد که استفاده از روش ترکیبی فیزیکی و شیمیایی جهت تولید داربست، با حفظ ساختار ماتریکس خارج سلولی مthane مناسب بوده است. در ذیل بافت مthane گوسفند قبل از سلول‌زدایی (تصویر ۱) و بافت مthane بعد از سلول‌زدایی (تصویر ۲)، نشان داده شده است.

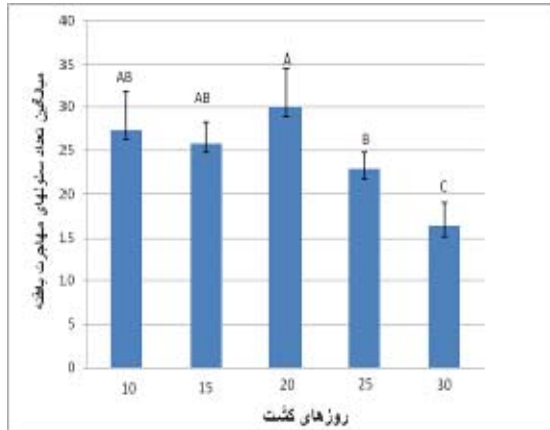


تصویر ۱: نمای ریزبینی از بافت مthane گوسفند قبل از سلول‌زدایی (رنگ آمیزی هماتوکسیلین ائوزین، درشت‌نمایی: ۴۰x)



تصویر ۲: نمای ریزبینی از بافت مthane گوسفند بعد از سلول‌زدایی می‌باشد که در آن هیچ سلولی دیده نمی‌شود و تنها ماتریکس خارج سلولی به رنگ صورتی قابل مشاهده است. رنگ آمیزی هماتوکسیلین ائوزین، درشت‌نمایی: ۱۰۰x

هم هستند. آنالیز آماری میانگین اندازه هسته سلول‌های مهاجرت یافته به داربست نشان داد که کوچک‌ترین اندازه هسته مربوط به این روز است، که می‌تواند نشانه غیر فعال بودن این سلول‌ها باشد (نمودار ۲).



نمودار ۲: میانگین تعداد سلول‌های مهاجرت یافته به داربست

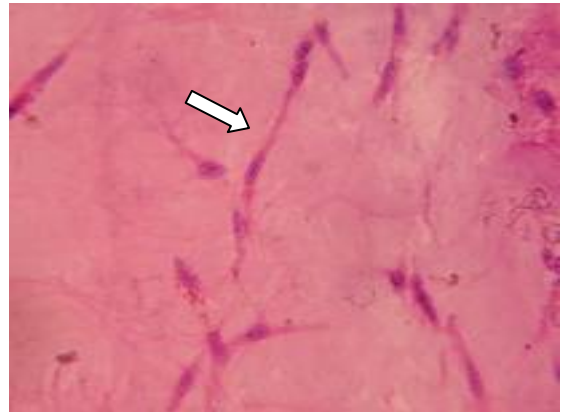
روز ۲۰ بیشترین تعداد سلول‌های مهاجرت یافته و روز ۳۰ کمترین تعداد سلول را نشان می‌دهد ($p < 0.05$). ستون‌هایی که دارای حداقل یک حرف مشترک می‌باشند از نظر آماری و در سطح $p < 0.05$ فاقد اختلاف معنی‌دار هستند.

بحث

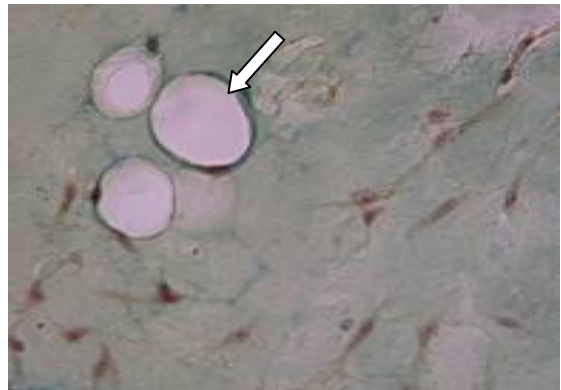
با توجه به نتایج حاصل که در روزهای مختلف کشت به دست آمد مشخص شد که مهاجرت سلول‌های بلاستمایی از حلقه بلاستما به داربست مثانه با گذشت ۱۰ روز از کشت شروع شد و در روز ۲۰ کشت به بیشترین حد خود رسید، ولی در روز ۳۰ کمترین مهاجرت سلول‌های بلاستمایی به داربست اتفاق افتاد. تمایز سلولی به عنوان یک مولفه مهم این پژوهش در روزهای ۱۵ و ۲۰ به طور شاخص مشاهده شد به طوری که رنگ‌آمیزی نمونه‌های روز ۱۵ با پیک اندیگو نشان داد که سلول‌های بلاستمایی مهاجرت یافته به داربست، به سلول‌های اپیتلیومی تمایز یافته‌اند. هم‌چنین در روز ۲۰ تمایز سلول‌های بلاستمایی به سلول‌های فیبروبلاست و آدیپوسیت در داربست مشهود بود.

Bolland و همکاران توانستند با حفظ ترکیبات اصلی، بافت مثانه خوک را سلول‌زدایی کنند. آن‌ها نشان دادند که ماتریکس به دست آمده، سازگاری زیستی با سلول‌های منشاء گرفته از مثانه را دارد و دارای پتانسیل مناسب برای استفاده در جراحی‌های دستگاه ادراری و کاربردهای مهندسی بافت می‌باشد.^{۱۷} در پژوهش حاضر نیز چنین سازگاری از ماتریکس مثانه سلول‌زدایی شده گوسفند، با سلول‌های شبه‌چینی بلاستما دیده شد، که این ماتریکس قابلیت هدایت و تمایز سلول‌ها را دارد. در سال ۲۰۰۵، Kawamura در طی یک سری آزمایشات، به ترمیم زردپی استخوان از طریق سلول‌های ماکروفاژ که در مراحل اولیه تکوین بودند، پرداخت. وی پیشنهاد نمود که این سلول‌ها به تدریج مجدداً در قسمت پیوند زردپی، ساکن می‌شوند.^{۱۸} در پژوهش حاضر نیز چنین رفتاری از سلول‌های شبه‌چینی بلاستما مشاهده شد، به طوری که این سلول‌ها به سمت بافتی که تنها شامل

در روز ۲۰ کشت با مقایسه نمونه کنترل، مشاهده شد که سلول‌های بلاستمایی مهاجرت یافته به داربست، در این روز به سلول‌های فیبروبلاستی تمایز یافته‌اند (تصویر ۴). هم‌چنین تمایز تعدادی از سلول‌های بلاستمایی به سلول‌های آدیپوسیت نیز در داربست دیده شد (تصویر ۵). به نظر می‌رسد که رویدادهایی از فرایند آنژیوژنز در این روز در داربست در حال رخ دادن است.



تصویر ۴: نمای ریزبینی از روز ۲۰ کشت می‌باشد که تمایز سلول‌های مهاجرت یافته بلاستمایی به فیبروبلاست در آن مشهود است. نوک پیکان تمایز سلول بلاستمایی به سلول فیبروبلاستی را نشان می‌دهد. رنگ‌آمیزی هماتوکسیلین انوزین، درشت‌نمایی: ۴۰x



تصویر ۵: نمای ریزبینی از روز ۲۰ کشت می‌باشد که تمایز سلول‌های مهاجرت یافته بلاستمایی به فیبروبلاست و آدیپوسیت در آن مشهود است. نوک پیکان تمایز سلول بلاستمایی به سلول آدیپوسیت را نشان می‌دهد. رنگ‌آمیزی پیک اندیگو، درشت‌نمایی: ۴۰x

آنالیز آماری مربوط به شاخص میانگین تعداد سلول‌های مهاجرت یافته به داربست نشان داد که بیشترین مهاجرت سلول‌های بلاستمایی به داربست در این روز اتفاق افتاده است، که این سلول‌ها به فیبروبلاست تمایز یافته‌اند ($p = 0.001$). (نمودار ۲) در روز ۲۵ کشت حضور کلنی‌های سلولی که به نظر می‌رسد سلول‌های بلاستمایی تمایز یافته به سلول‌های اپیتلیومی هستند، در داربست قابل تشخیص است. آنالیز آماری نشان داد اندازه هسته این سلول‌ها نسبت به سلول‌های روز ۱۵ کشت، کوچک‌تر است ($p = 0.001$) (نمودار ۲).

در روز ۳۰ کشت مهاجرت سلول‌های بلاستمایی به داربست ادامه داشته ولی سلول‌های مهاجرت یافته به داربست به صورت پراکنده و بدون اتصال به

تحقیق Lindberg از سلول اپیتلیال انسان و فیروبلست برای کشت روی داربست SIS استفاده شده است، در حالی که در پژوهش حاضر با استفاده از بافت بلاستمایی به عنوان یک بافت پویا در مجاورت داربست مثانه تمایز سلولی به عنوان یک مولفه مهم تحقیق که تشکیل فیروبلست‌ها در روز ۲۰ موید این کار است، بررسی شده است. در تحقیقات Ferrtti نشان داده شده که سلول‌های بافت بلاستما قابلیت تمایز در جهات مختلف را دارا هستند.^{۲۳،۲۴} پژوهش‌های دیگری بر روی تکثیر و تمایز سلول‌های آدیپوسیت در محیط‌های کشت مصنوعی صورت گرفته است. Flynn به تکثیر و تمایز آدیپوز منشاء گرفته از سلول‌های بنیادی بر روی داربست طبیعی که ترکیبی از ماتریکس جفت سلول‌زادایی شده و هیالورونان بود پرداخته است.^{۲۵} در نتایج پژوهش حاضر سلول‌های شبه‌جنینی بلاستما در چنین داربستی توانایی تمایز به سلول‌های چربی را دارند. هم‌چنین با توجه به گزارش Halbleib مشخص شده است که داربست اسید هیالورونیک یک محیط سه‌بعدی مناسب برای تمایز سلول‌های انسانی پیش‌ساز آدیپوسیت در محیط کشت محسوب می‌شود.^{۲۶} Saxena سلول‌های اپیتلیال مری را از رت‌های جوان گرفته و در شرایط مصنوعی کشت داد و توانست سلول‌های اپیتلیال با مورفولوژی اپیتلیوم بالغ ایجاد کند، هم‌چنین آن‌ها قابلیت ادامه حیات این سلول‌ها را بر روی داربست سه بعدی کلاژن بررسی کردند.^{۲۷}

با توجه به مطالعات انجام شده در پژوهش حاضر به نظر می‌رسد که سلول‌های بلاستمایی شبه‌جنینی در داربست سلول‌زادایی شده قابلیت تمایز به سلول‌های اپیتلیومی ترانزیشنال بافت مثانه را دارند. نتایج مطالعه حاضر بیانگر آن است که داربست‌های طبیعی که از بافت مثانه گوسفند اهلی به دست می‌آیند، با حفظ ترکیبات اصلی می‌توانند بستر مناسبی جهت بررسی رفتارهای سلولی و مدل‌های مناسبی به عنوان گام‌های اولیه به سمت ترمیم و کاربردهای مهندسی بافت باشند. این چنین داربست‌های طبیعی قابلیت تمایز و مهاجرت و تکثیر سلول‌های بنیادی و شبه‌جنینی را دارند. 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.

سپاسگزاری

از همکاران محترم آزمایشگاه تحقیقات تکوینی جانوری دانشگاه آزاد اسلامی مشهد که در اجرای این طرح پژوهشی با کد ۱۱۱۳۰۵۱۷۸۸۲۰۰۸ همکاری داشته‌اند، سپاسگزاری می‌نمایم.

ماتریکس خارج سلولی بود و سلول‌های آن به روش فیزیکی و شیمیایی از بین رفته بودند، مهاجرت کردند. ماتریکس خارج سلولی شامل کمپلکس متفاوتی از ساختار و عملکرد پروتئین‌هاست که نقش مهمی در مورفوزن و حفاظت از سلول و ساختار بافت و عملکرد آن بازی می‌کند.^{۱۹} ماتریکس خارج سلولی را می‌توانیم به عنوان یک کد مورفوزنتیک در نظر بگیریم که با توجه به سلول‌هایی که با آن در تماس است، تغییر می‌شود. اطلاعات در ماتریکس خارج سلولی از طریق رسپتورهای اختصاصی در سطح سلول، می‌تواند اثر عمیقی بر روی رفتارهای سلول از جمله چسبندگی، قطبیت سلول، مهاجرت و سیگنال‌هایی که بقاء سلول، تمایز و تکثیر را تنظیم می‌کنند، داشته باشد. زمینه‌های سلولی در بافت‌های مختلف بسیار متنوع هستند و هر نوع، برای عملکرد ویژه‌ای اختصاص یافته است. اجزاء عمده‌ی تشکیل‌دهنده‌ی زمینه سلولی، پروتئوگلیکان‌ها و گلیکوزآمین گلیکان و گلیکوپروتئین‌های کلاژنی و غیر کلاژنی می‌باشند.^{۲۰} در پژوهش حاضر به نظر می‌رسد سلول‌های شبه‌جنینی بلاستمایی در ماتریکس سلول‌زادایی شده از بافت مثانه گوسفند، به سلول‌های فیروبلست، اپیتلیوم ترانزیشنال و آدیپوسیت تمایز یافته‌اند. با توجه به تحقیقاتی که در محیط‌های سه‌بعدی بر روی رفتارهای سلول فیروبلستی صورت گرفته، مشخص شده است که ماتریکس‌های سه بعدی نه تنها باعث جابجایی سلول‌ها شده، بلکه باعث تغییر مدل‌یابی ماتریکس نیز می‌شوند.^{۲۱} این چنین نتایجی با مطالعه حاضر سازگاری دارد، چرا که با توجه به مطالعات بافت‌شناسی این پژوهش، مشاهده شد که سلول‌های شبه‌جنینی بلاستما به درون داربست مهاجرت کرده و پس از گذشت ۲۰ روز با تاثیر ماتریکس حاصله، سلول‌های بلاستمایی به فیروبلست تمایز یافته‌اند. بنابراین تحقیق و بررسی بر روی فیروبلست‌ها در محیط‌های سه‌بعدی ماتریکس کلاژن فرصت‌های جدیدی را برای فهم اثرات متقابل و سازگاری که بین سلول‌ها و ماتریکس در اطراف بافت‌ها رخ می‌دهد را پیشنهاد می‌کند. Lindberg الگوی رشد سلول‌های اپیتلیال انسان و فیروبلست‌ها را که روی ماتریکس خارج سلولی منشا گرفته از لایه زیر مخاطی روده کوچک (SIS: Small Intestinal Submucosa) کشت شده بودند را مورد بررسی قرار داد. این محقق مشاهده نمود که فیروبلست‌ها معمولاً وقتی که با سلول‌های اپیدرمی روی SIS کشت می‌شوند، به داربست هجوم می‌آورند. هم‌چنین توانایی داربست در فراهم کردن بستری جهت اتصال فیروبلست‌ها و سلول‌های اپیدرمی و مهاجرت، تکثیر و تمایز با حضور ترکیبات غشایی پایه، ما را هدایت می‌کرد که این مدل شاید برای مطالعات اثرات متقابل سلول-ماتریکس و برای تحقیقات جانشینی درم مناسب باشد.^{۲۲} البته در

References

1. Glotzbach JP, Wong VW, Gurtner GC, Longaker MT. Regenerative medicine. *Curr Probl Surg* 2011; 48(3): 148-212.
2. Langer R, Vacanti JP. Tissue engineering. *Science* 1993; 260(5110): 920-926.
3. Chapekar MS. Tissue engineering: challenges and opportunities. *J Biomed Mater Res* 2000; 53(6): 617-620.
4. Koh CJ, Atala A. Tissue engineering, stem cells and cloning: Opportunities for regenerative medicine. *J Am Soc Nephrol* 2004; 15(5): 1113-1125.
5. Liu Y, Bharadwaj Sh, Lee SJ, et al. Optimization of a natural collagen scaffold to aid cell-matrix penetration for urologic tissue engineering. *Biomaterials* 2009; 30(23-24): 3865-73.

6. Berna G, Leon-Quinto T, Ensenat-Waster R, et al. Stem cell and diabetes. *Biomed Pharmacother* 2001; 55(4): 206-12.
7. Badylak SF. Xenogeneic extracellular matrix as a scaffold for tissue reconstruction. *Transpl Immunol* 2004; 12(3-4): 367-77.
8. Dutta RC, Dutta AK. Comprehension of ECM-Cell dynamics: A prerequisite for tissue regeneration. *Biotechnol Adv* 2010; 28(6): 764-69.
9. Brown AL, Brook-Allred TT, Waddell JE, et al. Bladder acellular matrix as a substrate for studying in vitro bladder smooth muscle-urothelial cell interactions. *Biomaterials* 2005; 26(5): 529-543.
10. Tsoni S. Stem cell from differentiated cells. *Molecular Interventions* 2004; 4(2): 81-83.
11. Crapo PM, Gilbert TW, Badylak SF. An overview of tissue and whole organ decellularization processes. *Biomaterials* 2011; 32(12): 3233-43.
12. Omae H, Zhao C, Sun YL, et al. Multilayer tendon slices seeded with bone marrow stromal cells: A novel composite for tendon engineering. *J Orthop Res* 2009; 27(7): 937-42.
13. Gilbert TW, Sellaro TL, Badylak SF. Decellularization of tissue and organ. *Biomaterial* 2006; 27(19): 3675-83.
14. Abousleiman RI, Reyes Y, McFetridge P, et al. The Human umbilical vein: A novel scaffold for musculoskeletal soft tissue regeneration. *Artif Organs* 2008; 32(9): 735-42.
15. Barnes CA, Brison J, Michel R, et al. The surface molecular functionality of decellularized extracellular matrices. *Biomaterials* 2011; 32(1): 137-43.
16. Tian H, Bharadwaj S, Liu Y, et al. Myogenic differentiation of human bone marrow mesenchymal stem cells on a 3D nano fibrous scaffold for bladder tissue engineering. *Biomaterials* 2010; 31(5): 870-7.
17. Bolland F, Korossis S, Wilshaw SP, et al. Development and characterisation of a full-thickness acellular porcine bladder matrix for tissue engineering. *Biomaterials* 2007; 28(6): 1061-70.
18. Kawamura S, Ying L, Kim HJ, et al. Macrophages accumulate in the early phase of tendon-bone healing. *J Orthop Res* 2005; 23(6): 1425-32.
19. Badylak SF. The extracellular matrix as a scaffold for tissue reconstruction. *Semin Cell Dev Biol* 2002; 13(5): 377-83.
20. Rozario T, DeSimone DW. The extracellular matrix in development and morphogenesis: A dynamic view. *Dev Biol* 2010; 341(1): 126-40.
21. Grinnell F. Fibroblast biology in three-dimensional collagen matrices. *Trends Cell Biol* 2003; 13(5): 264-9.
22. Lindberg K, Badylak SF. Porcine small intestinal submucosa (SIS): A bioscaffold supporting in vitro primary human epidermal cell differentiation and synthesis of basement membrane proteins. *Burns* 2001; 27(3): 254-66.
23. Corcoran JP, Ferrtti P. RA regulation of keratin expression and myogenesis suggests different ways of regenerating muscle in adult amphibian limbs. *J Cell Sci* 1999; 112(pt9): 1385-94.
24. Shahri NM. Geometrical and histological model for mammalian wound repair and regeneration. *J Wound Repair and Regeneration* 2003; 11: 513-26.
25. Flynn LE, Prestwich GD, Semple JL and Woodhouse KA. Proliferation and differentiation of adipose-driven stem cells on naturally derived scaffolds. *Biomaterials* 2008; 29(12): 1862-71.
26. Halbleib M, Skurk T, de Luca C, et al. Tissue engineering of white adipose tissue using hyaluronic acid-based scaffolds. I: In vitro differentiation of human adipocyte precursor cells on scaffolds. *Biomaterials* 2003; 24(18): 3125-32.
27. Saxena AK, Ainoedhofer H, Höllwarth ME. Esophagus tissue engineering: In vitro generation of esophageal epithelial cell sheets and viability on scaffold. *J Pediatr Surg* 2009; 44(5): 896-901.

Histological Study of Interaction between Blastema Tissue and Decellularized Three-Dimensional Matrix of Bladder, in vitro

Javad Baharara,¹ Naser Mahdavishahri,² Negar Saghiri,³ Hashem Rasti³

Background: The objective of this study was to assess the interaction between blastema tissue and three-dimensional decellularized ovine bladder, in vitro.

Materials and Method: To produce decellularized ovine bladder, combination of physico-chemical methods were used. Pieces of bladder tissue were put in -4°C and then samples were put in liquid nitrogen; then all samples were decellularized in 1% wt/vol solution of SDS. After wards the ears of New Zealand rabbits were anaesthetized with lidocaine spray, and punched a hole manually with a special puncher, after 72 hours with another puncher a circular blastema from the edge of holes were separated. The decellularized samples put in the middle of blastema ring and transfer to the culture. After histological stages the samples stained with hematoxylin-eosin and pick indigo. The quantitative data were analyzed by ANOVA and TUKY test at the level of $p < 0.05$.

Results: Light microscopic studies showed that blastema cells migrated into the bio-scaffold also the maximum migration occurs on the day 20 ($p=0.001$). On the day 15 and 20 blastema cells differentiated into the epithelial fibroblasts and adiposite cells were clear.

Conclusion: It seems that bladder decellularized matrix can be a suitable scaffold for differentiation blastema cells.

Keywords: Bladder, Extracellular matrix, New Zealand rabbit, Tissue engineering

1. Associate Professor of Biology, Mashhad Branch, Islamic Azad University, Mashhad, Iran.
2. Professor of Biology, Ferdowsi University, Mashhad, Iran.
3. MSc in cell & developmental biology, Mashhad Branch, Islamic Azad University, Young Researchers Club, Mashhad, Iran.