مروری

آماده‌سازی داربست‌های سه بعدی سلول‌زدایی شده به عنوان مدلی برای مهندسی بافت و ارزیابی عملکرد آنها با استفاده از بافت بلاستما در شرایط آزمایشگاهی

دکتر ناصر مهدوی شهری*[۱]، دکتر مریم مقدم متین[۲]، دکتر مسعود فریدونی[۳]، دکتر مرتضی بهنام رسولی[۴]
دکتر علی مقیمی[۴]، دکتر احمدرضا بهرامی[۵]، محمد علیزاده نمینی[۶]، سمیه نادری[۷]، معصومه خیرآبادی[۶]، فاطمه ناصری[۸]

۱- استاد سیتولوژی - هیستولوژی، گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه فردوسی مشهد، گروه تحقیقاتی بیوتکنولوژی سلول‌های بنیادی، پژوهشکده فناوری زیستی، دانشگاه فردوسی مشهد. ۲- دانشیار بیولوژی مولکولی، گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه فردوسی مشهد، گروه تحقیقاتی بیوتکنولوژی سلولی و مولکولی، پژوهشکده فناوری زیستی، دانشگاه فردوسی مشهد. ۳- دانشیار فیزیولوژی جانوری، گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه فردوسی مشهد. ٤- استاد فیزیولوژی جانوری، گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه فردوسی مشهد. ٥- استاد بیولوژی مولکولی، گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم دانشگاه فردوسی مشهد، گروه تحقیقاتی بیوتکنولوژی سلولی و مولکولی، پژوهشکده فناوری زیستی، دانشگاه فردوسی مشهد. ٦- کارشناس ارشد، فیزیولوژی، گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه فردوسی مشهد. ۷- کارشناس ارشد، زیست شناسی سلولی - تکوینی، گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه فردوسی مشهد. ۸- کارشناس ارشد، فیزیولوژی جانوری، آزمایشگاه مرکزی، دانشگاه فردوسی مشهد.

چکیده

مهندسی بافت براساس سه ترکیب اصلی بافت‌های بیولوژیکی شامل داربست، سلول و عوامل رشد بنیان نهاده شده است. داربست‌های زیستی مشتق از بافت‌ها و اندام‌های سلول‌زدایی شده به‌طور موفقیت‌آمیزی در مهندسی بافت مورد استفاده قرار گرفته‌اند. مطالعات سلول‌زدایی بیانگر آن است که داربست‌های طبیعی حاصل از بافت‌های سلول‌زدایی شده، با حفظ ترکیبات اصلی می‌توانند بستر مناسبی برای بررسی رفتارهای سلولی باشند و 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. بافت بلاستما که طی روند ترمیم زخم در برخی از موجودات ایجاد می‌شود؛ دارای سلول‌هایی با قابلیت تکثیر و تمایز، مشابه سلول‌های جنینی است و می‌تواند مدل مناسبی را برای بررسی برهم‌کنش‌ها و رفتارهای سلولی در شرایط آزمایشگاهی فراهم نماید. در این مقاله مروری به بیان روش‌های آماده‌سازی داربست‌های سه‌بعدی مشتق از ماتریکس خارج سلولی بافت‌های مختلف از قبیل غضروف، استخوان، لثه، آئورت، مثانه و ارزیابی عملکرد آنها با استفاده از بافت بلاستما پرداخته شده است.

کلید واژه‌ها : *داربست‌های طبیعی سه بعدی ، مهندسی بافت ، سلول‌زدایی ، بافت بلاستما ، پزشکی ترمیمی*

* نویسنده مسؤول : دکتر ناصر مهدوی شهری ، پست الکترونیکی mahdavin@um.ac.ir
نشانی : مشهد، دانشگاه فردوسی، دانشکده علوم، تلفن و نمابر ۰۵۱۱-۸۷٦۲۲۲۷
وصول مقاله : ۹۱/۱۰/۱۳ ، اصلاح نهایی : ۹۲/۲/۳۰ ، پذیرش مقاله : ۹۲/۳/٤

مقدمه

امروزه با توجه به تعداد کم اهداء کنندگان بافت و آلودگی‌های ویروسی آن، سعی در طراحی بافت به کمک سلول و داربست‌های گوناگون اعم از طبیعی یا سنتزی شده است. این امر منتهی به ایجاد مفهومی جدید در علم شده که مهندسی بافت خوانده می‌شود. مهندسی بافت به عنوان یک علم دانشگاهی فرصت بی‌نظیری را برای پیشرفت و بهبود روش‌های درمانی برای درمان بیماری‌های مادرزادی و اکتسابی فراهم کرده است و داربست، عوامل رشد و سلول سه رکن اصلی آن را تشکیل می‌دهند (۱و۲). داربست‌ها به عنوان یک پشتیبان فیزیکی و قالبی برای اتصال سلول‌ها و تکوین بافت عمل می‌کنند. داربست‌هایی که در مهندسی بافت به‌کار می‌روند باید دارای خصوصیات زیر باشند:

الف) استحکام و توان مکانیکی مناسب برای الگوبرداری از شرایط موجود زنده؛ ب) سازگاری زیستی مناسب با بافت موردنظر؛ ج) قابلیت پیام‌دهی مناسب برای هدایت رشد بافت و جلوگیری از رد پیوند و د) شبکه متخلخل مرتبط بهم به منظور عمل تغذیه‌رسانی سلول، دفع ضایعات سلولی به خارج داربست، تشکیل ماتریکس خارج سلولی و رگزایی. درصد تخلخل و اندازه منافذ از مشخصات مهم داربست‌های مهندسی بافت است (۳و۴).

به‌طور کلی داربست‌های مورد استفاده در مهندسی بافت به دو

گروه داربست‌های سنتزی و طبیعی تقسیم‌بندی می‌شوند. از موادی که در ساخت داربست‌های سنتزی به کار برده می‌شوند؛ می‌توان به پلیمرهای تخریب‌پذیر سنتزی (مانند پلی گلیکولیک اسید، پلی‌لاکتیک اسید و کوپلیمرهای آنها)؛ پلیمرهای قابل تزریق (مانند پلی‌پروپیلن فومرات و پلی‌انیدریدهای دی متااکریلات)؛ هیدروژل‌ها (مانند پلی‌هیدروکسی اتیل متااکریلات (PHEMA)، سلولز، پلی‌وینیل الکل (PVA) و پلی‌اتیلن گلیکول) و بیوسرامیک‌ها اشاره نمود. داربست های سنتزی قابل تولید در مقیاس های بالا و قابل کنترل از نظر خصوصیاتی نظیر میزان استحکام، سرعت تجزیه، مقدار تخلخل و ساختار میکروسکوپی هستند (۵). در عین حال این مواد هنوز دور از حالت ایده‌آل هستند. زیرا گران قیمت بوده، باعث پاسخ‌های ایمنی شده و علاوه بر این در زمان تجزیه باعث تولید مواد سمی می‌شوند که موجب التهاب می‌گردد. امروزه استفاده از داربست های طبیعی در مهندسی بافت در سطح دنیا بسیار رواج یافته است. این داربست‌ها می‌توانند محیطی مشابه با ماده زمینه‌ای برون سلولی برای سلول ها فراهم کنند و به دلیل پاسخ های مناسب ایمنولوژیک، خواص آنتی‌ژنیک ملایم، رگ‌زایی، توانایی بهبود چسبندگی سلولی و خاصیت هموستازی بسیار مورد توجه هستند. این در حالی است که استفاده از مواد سنتزی در ترمیم، مشکلاتی مانند عدم رگ‌زایی در محل پیوند را در بر دارد که باعث مشکلات پاتولوژیک فراون شده و مانعی مهم در موفقیت پیوند محسوب می‌شود (۶). از موادی که تاکنون در ساخت داربست های طبیعی به‌کار برده شده؛ می‌توان به پلیمرهای تخریب‌پذیر طبیعی، پروتئین‌های حاصل از ماتریکس خارج سلولی (ECM) (Extracellular matrix) از قبیل کلاژن، الاستین، فیبرونکتین و یا ماتریکس خارج سلولی مشتق از بافت‌ها و اندام‌های سلول‌زدایی شده اشاره کرد (۷و۸).

ماتریکس خارج سلولی

یک جایگزین برای پلیمرهای سنتزی استفاده از مواد طبیعی استخراج شده از ترکیبات ماتریکس خارج سلولی و ساخت داربست های طبیعی با استفاده از پروتئین های تخلیص شده از ECM است که به صورت گسترده‌ای در مهندسی بافت مورد استفاده قرار می‌گیرد (۸). برای درک اعمال مختلف ECM و کاربرد آن به عنوان یک داربست زیستی به منظور بازسازی بافت در پزشکی ترمیمی، شناخت دقیق ترکیب اساسی ECM ضروری است. در حال حاضر بسیاری از محققین در حال کسب دانش شناسایی لیگاند-اینتگرین و استفاده از اجزای ECM برای طراحی ماتریکس‌های مصنوعی هستند (۱۱-۹). ECM دارای اثرات عمیق ساختاری و بیولوژیکی در فرایندهای تکوین بوده و با ایجاد مرزهای بافتی نقش ساختاری مهمی در ریخت‌زایی ایفا می‌کند که این نقش تنها محدود به پشتیبانی ساختاری نبوده؛ بلکه اجزای ECM با اتصال به گیرنده‌های سطح سلولی می‌توانند آبشار پیام‌دهی را القاء کرده و منتهی به ترجمه برخی از عوامل رشد گردند (۱۲و۱۳).

ماتریکس خارج سلولی کمپلکس مولکولی متشکل از مولکول‌هایی مثل کلاژن، الاستین، گلیکوپروتئین‌ها، پروتئوگلیکان‌ها، گلیکوزآمینوگلیکان‌ها (GAGs)، عوامل رشد، سیتوکاین‌ها و انواع آنزیم‌ها بوده که از طریق ایجاد سیگنال‌هایی که بر مورفوژنز اثر دارد؛ نقش مهمی در تکامل سلولی بازی می‌کند (۱۴و۱۵).

کلاژن

کلاژن مهم ترین ترکیب بافت همبند پستانداران و تشکیل‌دهنده ۳۰درصد کل پروتئین های بدن انسان است. تاکنون بیش از ۲۰ نوع کلاژن متفاوت از لحاظ ژنتیکی شناخته شده است. همه کلاژن ها از سه زنجیره پلی‌پپتیدی آلفا تشکیل شده‌اند که به شکل یک مارپیچ بزرگ به دور یکدیگر می‌پیچند تا زنجیره سه‌گانه‌ای را تشکیل دهند. بعضی کلاژن ها به بافت معینی اختصاص دارند. برای نمونه کلاژن نوع II تنها در غضروف یافت می‌شود. کلاژن‌های نوع I، II و III فراوان‌ترین کلاژن‌های بدن انسان هستند که فیبریل‌های مسؤول استحکام کششی بافت را شکل می‌دهند. کلاژن علاوه بر نقش ساختاری و مکانیکی در تعیین اتصال سلولی و گسترش سلول و در نتیجه تمایز سلولی و حرکت آن نیز نقش دارد (۱۶و۱۷).

الاستین

خصوصیات الاستیکی بسیاری از بافت‌ها نظیر شش، پوست و عروق خونی به دلیل حضور رشته‌های الاستین در فضای خارج سلولی این بافت‌ها است. هرچند مهم‌ترین نقش الاستین فراهم کردن خاصیت ارتجاعی و ایجاد مقاومت برای بافت در مواجهه با فشارهای خارجی به خصوص ایجاد مقاومت در رگ ها برای حفظ آنها در برابر فشارهای همودینامیک در هنگام سیستول و دیاستول بطنی است؛ اما مطالعات اخیر در زمینه های زیست‌پزشکی، بیوشیمی و بیوفیزیک دامنه وسیعی از ویژگی های الاستین را که به واسطه الاستین و پپتیدهای مشتق از آن ایجاد می شود؛ آشکار ساخته است (۱۸).

گلیکوپروتئین‌ها

گلیکوپروتئین‌ها دسته‌ای از مولکول‌های ECM هستند که جایگاه‌های اتصالی متعددی دارند و قادر به اتصال به کلاژن و پروتئوگلیکان‌ها و نیز سطح سلول هستند. از این گلیکوپروتئین ها می توان به فیبرونکتین، لامینین، ویترونکتین، ترومبوسپوندین و تناسین اشاره نمود (۱۹). فیبرونکتین نه تنها در اتصال سلول به ماتریکس خارج سلولی، بلکه در مهاجرت‌های سلولی نیز نقش دارد و به علت ویژگی‌های اتصالی زیاد، به فراوانی در سیستم‌های کشت

سلول به منظور ایجاد چسبندگی و پراکنش مناسب سلول ها به‌کار می روند. تحقیقات نشان داده است که شبکه های فیبرونکتینی هدایت سیگنال‌ها را از طریق پروتئین‌های بینابینی همچون لامینین افزایش می‌دهند. همچنین این شبکه‌های فیبرونکتین به همراه عوامل رشد عصب دوست عامل موثری در ترمیم اعصاب محیطی و مرکزی هستند (۱۹). لامینین یکی از اجزای مهم غشای پایه است و اثرات زیادی بر روی سلول‌های مجاور خود می‌گذارد که از آن جمله چسبندگی سلولی، مهاجرت و تمایز سلولی است. از اثرات لامینین که در تهیه داربست‌ها مورد توجه قرار می‌گیرد؛ تشکیل ساختارهای عروقی توسط این مولکول است (۲۰).

گلیکوزآمینوگلیکان‌ها (GAGs) و پروتئوگلیکان‌ها

GAGs پلی‌ساکاریدهای خطی هستند که از تکرار واحدهای دی‌ساکاریدی تشکیل شده‌اند. رایج‌ترین آنها کندرویتین، کراتان، درماتان و هیالورونان است. از نقش‌های مهم GAGs اتصال و ذخیره عوامل رشد و سیتوکاین‌ها است. از آنجا که بسیاری از عوامل رشد دارای جایگاه اتصال به هپارین هستند؛ گلیکوزآمینوگلیکان‌های غنی از هپارین، اجزای مطلوبی به منظور استفاده در داربست‌های ترمیم بافت است. هیالورونیک اسید نیز برای استفاده در داربست‌های درمی به طور وسیع مورد مطالعه قرار گرفته است (۲۰و۲۱). به‌جز هیالورونان، همه گلیکوزآمینوگلیکان‌ها می‌توانند با پروتئین‌ها تجمع یافته و پروتئوگلیکان‌ها را ایجاد کنند. پروتئوگلیکان‌ها در بافت‌هایی مانند پوست در تجمع با سایر مولکول‌های ساختمانی، کمپلکس‌های خاصی را تشکیل می‌دهند که مسؤول آبدهی و سازماندهی اختصاصی ECM هستند. پروتئوگلیکان‌ها در سطح سلول نیز حضور داشته و در آنجا با اتصال به کلاژن، فیبرونکتین، ترومبوسپوندین و بعضی عوامل رشد به عنوان گیرنده عمل می‌کنند (۱۹). پروتئوگلیکان‌ها و گلیکوزآمینوگلیکان‌ها به علت این ویژگی‌های زیست‌شناسی، اغلب همراه با سایر مولکول های ECM از جمله کلاژن، به منظور تولید داربست‌های زیستی در مهندسی بافت استفاده می‌شوند.

به طور کلی، زنجیره‌های قندی سطح سلول یا گلیکوکانژوگیت‌ها و همچنین ترکیبات قندی ماتریکس خارج سلولی یکی از عوامل مؤثر در کنش‌های سلولی از قبیل مهاجرت‌ها، تکثیر، شناسایی سلولی، هدف‌یابی مولکولی و تمایز سلولی است (۱۴).

اینتگرین

یکی از پروتئین‌هایی که نقش اصلی را در چسبندگی بین سلول و ماتریکس دارد؛ اینتگرین است. اینتگرین‌ها گیرنده‌های هترودایمری هستند که با جفت شدن بین زیرواحدهای 8α و 8β ایجاد می‌گردد. ۲۴ نوع گیرنده اینتگرینی مختلف وجود دارند که به لیگاندهای مختلفی از ECM با میل ترکیبی متفاوت متصل می‌شوند. اینتگرین با کمک به چسبندگی سلول - ماتریکس می‌تواند؛ سبب انتقال اطلاعات و پیام‌دهی بین بیرون و درون سلول گشته که این موضوع در فرآیندهای پراکندگی و مهاجرت سلولی از اهمیت ویژه‌ای برخوردار است (۲۲و۲۳).

سلول‌زدایی از بافت‌ها برای تهیه داربست‌های طبیعی

برای به دست آوردن داربست‌های طبیعی از بافت‌های بدن موجودات زنده، فرایند سلول‌زدایی از بافت یا ارگان مورد نظر ضروری است. سلول‌زدایی فرایندی است که طی آن تمامی سلول‌های یک اندام یا بافت از آن جدا و فقط ماتریکس خارج سلولی باقی می‌ماند. راندمان حذف سلول از بافت به منشاء بافت و روش‌های خاص سلول‌زدایی که استفاده شده؛ وابسته است (۲۶-۲۴). روش‌های سلول‌زدایی ترکیبی از روش‌های فیزیکی، شیمیایی و آنزیمی است که در آن از انواعی از دترجنت‌ها، آنزیم‌ها و حلال‌ها برای تجزیه سلول‌ها استفاده می‌گردد (جدول یک). این تیمارها به طور موثری ایجاد پاسخ‌های ایمنی در بافت میزبان را می‌کاهند و فضاهای آزادی را ایجاد می‌کنند که سلول‌های میزبان می‌توانند در آنها تکثیر شوند (۲۵و۲۷).

روش‌های فیزیکی

به طور کلی تیمارهای فیزیکی سلول‌زدایی باعث بهم‌ریختن غشاء سلول، آزاد شدن محتویات سلولی و تسهیل در حذف محتویات سلولی از ECM می‌گردند. روش‌های فیزیکی سلول‌زدایی شامل انجماد و ذوب سریع، اعمال نیروی مکانیکی از طریق اعمال فشار مستقیم و به‌کارگیری امواج صوتی است. در روش انجماد سریع با استفاده از ازت مایع، تشکیل کریستال های یخ در درون سلول عامل تخریب غشاء سلولی است که باعث خارج شدن محتویات سلول‌ها می‌شود. Azuma و همکاران در سال ۲۰۰۷ از روش فریز- انجماد سریع برای حذف سلول‌ها از قطعات تاندون به منظور مطالعات مهندسی بافت استفاده کردند. در عین حال روش فیزیکی معمولاً برای رسیدن به یک سلول زدایی کامل، کافی به نظر نمی‌رسد و بایستی با تیمارهای شیمیایی همراه شود (۲۸).

روش‌های شیمیایی

در روش شیمیایی سلول‌زدایی، از مواد شیمیایی مختلف مانند استفاده از تیمارهای اسیدی و بازی، شوینده‌های غیریونی و یونی استفاده می‌گردد. تیمارهای اسیدی و بازی برای حل نمودن اجزای سیتوپلاسمی سلول‌ها و حذف اسیدهای نوکلئیک به‌کار می‌روند. اسیدهایی از قبیل اسیداستیک، اسیدهیدروکلریک، اسید سولفوریک و هیدروکسید آمونیوم به طور موثری باعث ازهم‌پاشیدن غشاهای سلولی و اندامک‌های داخل سلولی می‌شوند (۲۹). تریتون X-100 یکی از شوینده‌های غیر یونی است که به طور

جدول ۱ : انواع مکانیسم‌های سلول‌زدایی (۳۰)

	روش	عملکرد	اثر روی سلول و ماتریکس خارج سلولی
فیزیکی	Snap freezing	تخریب غشاء سلولی	تخریب ECM
	نیروی مکانیکی	فشار می‌تواند سبب از هم‌پاشیدن سلول‌ها شود.	آسیب به ECM
	تلاطم مکانیکی	باعث تخریب سلول‌ها می‌گردد.	تخریب ECM
شیمیایی	اسید و باز	حل‌کردن ترکیبات سیتوپلاسمی و تخریب اسیدهای نوکلئیک	حذف گلیکوزآمینوگلیکان‌های بافت
	دترژنت‌های غیر یونی (Triton X-100)	برهم‌زدن برهم‌کنش‌های لیپید-لیپید و لیپید-پروتئین با حفظ برهم‌کنش‌های پروتئین-پروتئین	وابسته به بافت و حذف گلیکوزآمینوگلیکان‌ها
	دترژنت های یونی (SDS)	حل‌کردن غشاهای سیتوپلاسمی و هسته‌ای، برداشت باقیمانده هسته‌ای و پروتئین‌های سیتویلاسمی و تمایل به دناتوره کردن پروتئین‌ها	حذف گلیکوزآمینوگلیکان‌ها و آسیب به کلاژن بافت
	Sodium deoxycholateTriton X-200	مشابه دترژنت‌های یونی	درهم گسیختگی بیشتر ساختار بافت نسبت به SDS ، ثمربخشی برداشت سلول‌ها در هنگام اضافه کردن دترژنت های زویترونیک
	دترژنت‌های زویترونیک CHAPS	همان اثر ویژگی‌های دترژنت‌های یونی و غیریونی	بازده برداشت سلول با تخریب ECM مشابه با Triton X-100 است.
	Sulfobetaine-10 and -16 (SB-10, SB-16)	همان اثر ویژگی‌های دترژنت‌های یونی و غیریونی	برداشت سلول و تخریب کم ECM همراه با Triton X-200
	Tri(n-butyl) phosphate	حلال آلی که به برهم‌کنش‌های پروتئین-پروتئین آسیب می‌زند.	برداشت متفاوت سلول‌ها، از دست رفتن محتوی کلاژن با اثر اندک بر ویژگی‌های مکانیکی موثر برای لیز سلولی، اما ناکارآمد برای برداشت باقیمانده‌های سلولی
	Hypotonic and hypertonic solutions	تخریب سلولی با شوک اسموتیک	
	EDTA, EGTA	عوامل کی لیت ساز که به یون‌های دوظرفیتی فلزی متصل می‌شوند؛ از این رو برای جداکردن اتصال بین سلول و ECM اهمیت دارند.	اثر مشخصی ندارد؛ معمولاً با روش‌های آنزیمی مثل تریپسین همراه است.
آنزیمی	تریپسین	شکستن اتصالات پپتیدی از انتهای کربوکسیل Arg و Lys	تخریب ECM، حذف لامینین، فیبرونکتین، الاستین و گلیکوزآمینوگلیکان‌ها از ECM
	اندونوکلئازها	هیدرولیز اتصالات داخلی زنجیره‌های ریبونوکلئیک اسید و دوکسی ریبونوکلئیک اسید	می‌تواند باعث پاسخ‌های ایمنی شود.
	اگزونوکلئازها	هیدرولیز از انتهای زنجیره‌های ریبونوکلئیک اسید و دوکسی ریبونوکلئیک اسید	می‌تواند باعث پاسخ‌های ایمنی شود.

جدول ۲ : انواع رفتار سلولی مشاهده شده بعد از کشت بافت بلاستما با داربست‌های مختلف

ماتریکس سلول زدایی شده	رفتار سلولی چسبندگی	مهاجرت	تمایز احتمالی	تقسیم سلولی	ایجاد قطبیت	مرگ سلولی
غضروف	+	+	+	−	+	+
استخوان	+	+	+	−	−	+
استرومای لثه	+	+	+	+	−	+
آئورت	+	+	+	+	+	+
استرومای مثانه	+	+	+	+	−	+

مشاهده رفتار موردنظر با علامت (+) نشان داده شده است. نتایج حاصل یک بررسی کیفی است (۳۴-۳۱).

وسیعی مورد مطالعه قرار گرفته است. سلول‌زدایی با تریتون X-100 نتایج متفاوتی را نشان می‌دهد. به عنوان مثال سلول‌زدایی دریچه قلبی با این ماده پس از ۲۴ ساعت، منجر به حذف کامل هسته‌ها از بافت می‌شود. مطالعات دیگر نشان داده؛ در بافت‌هایی از قبیل رگ‌های خونی، تاندون و لیگامنت که تا ۴ روز در معرض این ماده قرار گرفته‌اند؛ هسته‌ها به طور کامل حذف نشده‌اند. کارآرایی این ماده بستگی به بافت مورد استفاده و روش‌هایی که به صورت ترکیبی با تریتون X-100 برای سلول‌زدایی به‌کار می‌روند؛ دارد (۳۰).

سدیم دو دسیل سولفات (SDS) متداول‌ترین شوینده یونی است

و در بسیاری از مطالعات به عنوان ماده سلول‌زدا در مرحله شیمیایی استفاده شده است. دترجنت یونی SDS با توجه به ساختار دوگانه دوستش (دارای یک سر آنیونی آب دوست و یک دم دوازده کربنه اشباع آب‌گریز) می‌تواند با غشاهای سلولی برهم‌کنش داده و سبب لیزشدن غشاء سلولی و غشاء هسته گردد (۳۵و۳۶). از مزیت‌های استفاده از SDS می‌توان به سادگی استفاده از آن، موفقیت در امر سلول‌زدایی در بافت‌های مختلف، توانایی انهدام سلول‌ها در تمام لایه‌های بافت به طور یکنواخت و حفظ ساختار ماتریکس خارج سلولی اشاره کرد؛ اما با توجه به اثر میزان غلظت این ماده در ایجاد سمیت و همچنین آسیب‌هایی که به کلاژن وارد می‌کنند؛ غلظت‌های استفاده شده از این نوع دترجنت‌ها نیز بسیار مهم و ضروری است (۳۹-۳۷). Mendoza-Novelo و همکاران در سال ۲۰۱۱ با استفاده از SDS سلول‌زدایی دریچه قلب گراز را با حفظ خواص مکانیکی و ساختاری بافت انجام دادند (۴۰). Elder و همکاران در سال ۲۰۰۹ نشان دادند که استفاده از SDS ۲درصد به مدت ۲-۱ ساعت بیشترین اثر را بر روی حذف سلول از بافت غضروفی دارد (۳۵).

روش‌های آنزیمی

روش آنزیمی سلول‌زدایی، شامل هضم پروتئین‌ها توسط پروتئازها و هضم اسیدهای نوکلئیک با استفاده از نوکلئازها شامل اندونوکلئازها و اگزونوکلئازها است. تریپسین یکی از رایج‌ترین آنزیم‌های پروتئولیتیک مورد استفاده در فرایندهای سلول زدایی است که اتصالات پپتیدی را از انتهای کربوکسیل اسیدآمینه های آرژینین (Arg) و لیزین (Lys) می‌شکند. نوکلئازها از قبیل اندونوکلئازها باعث هیدرولیز پیوندهای داخلی زنجیره‌های ریبونوکلئیک اسید و داکسی ریبونوکلئیک می‌شوند و در نهایت DNA و RNA را تخریب می‌کنند. از آنجایی که DNA اتصال محکمی با پروتئین‌های ماتریکس خارج سلولی دارند و به راحتی نمی‌توان باقیمانده‌های DNA را از بافت خذف نمود؛ می‌توان از روش‌های آنزیمی برای حذف آنها استفاده کرد (۳۰).

Yang و همکاران بافت غضروف انسانی را با استفاده از بافر هیپوتونیک، تریتون X-100 و یک محلول نوکلئاز سلول‌زدایی کردند. آنها توانستند یک داربست سه بعدی، متخلخل و بدون سلول مشتق از ماتریکس خارج سلولی غضروف ایجاد کنند. مطالعات آنها نشان داد که داربست ایجاد شده می‌تواند محیط سه‌بعدی مناسبی را برای چسبندگی، تکثیر و تمایز سلول‌های بنیادی مزانشیمی به کندروسیت فراهم کند و به عنوان یک بیومتریال برای مهندسی بافت غضروف به کار رود (۴۱).

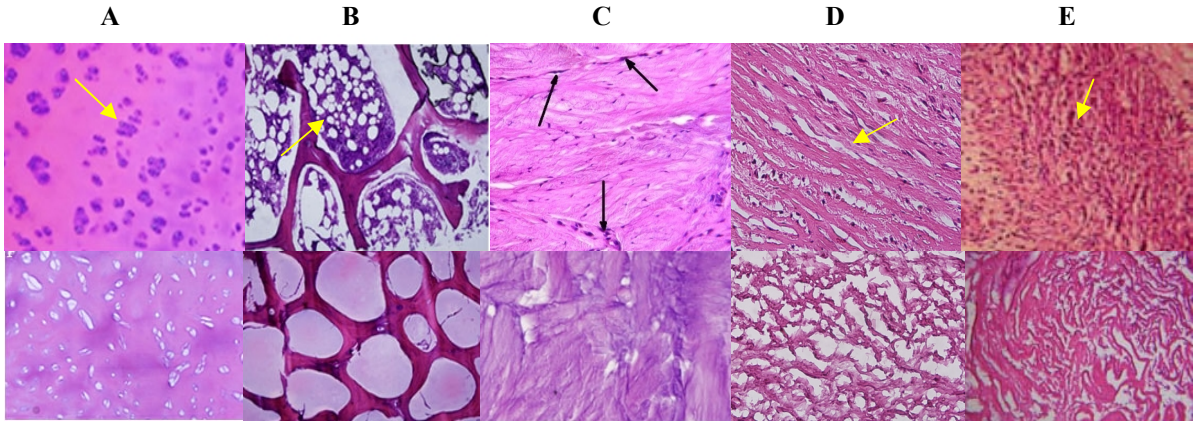
آماده‌سازی داربست‌های طبیعی سه‌بعدی به عنوان مدلی برای مهندسی بافت و ارزیابی عملکرد آنها با استفاده از بافت بلاستما

چگونگی آماده‌سازی داربست‌های سه‌بعدی مشتق شده از ECM برای مطالعه رفتار سلول‌های بافت بلاستمایی

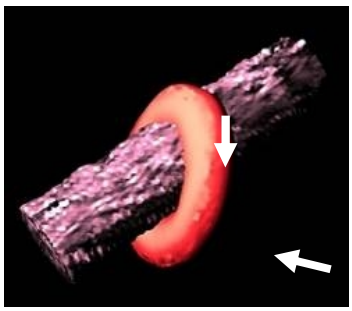
برای سلول‌زدایی غضروف مفصلی، استخوان اسفنجی اپی‌فیز ران گاو، لثه انسان و مثانه خرگوش در مرحله فیزیکی از روش فریز-ذوب سریع استفاده می‌شود. در روش شیمیایی سلول‌زدایی، نمونه‌های غضروف و استخوان به مدت سه ساعت در محلول SDS ۲/۵ درصد قرار می‌گیرند و در مورد بافت لثه و مثانه از SDS یک‌درصد به مدت ۲۴ ساعت استفاده می‌گردد. به منظور تهیه یک داربست سه بعدی الاستیک، با استفاده از محلول ۵۰ mg/ml برمید سیانوژن در اسید فرمیک ۷۰درصد به مدت ۲۰ ساعت، سلول و کلاژن موجود در بافت آئورت حذف می‌گردد تا علاوه بر تشکیل یک داربست متخلخل، ماهیت زیستی طبیعی یعنی الاستیک بودن داربست‌ها نیز حفظ گردد (۳۴-۳۱و۴۴-۴۲). در شکل یک بافت‌های مختلف قبل و بعد از فرایند سلول‌زدایی نشان داده شده است.

بافت بلاستما

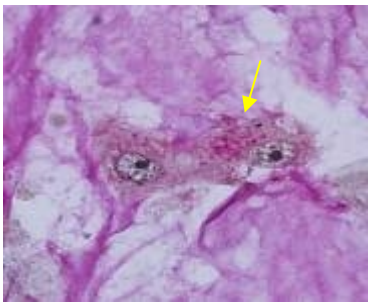
مطالعات نشان داده است که طی روند ترمیم زخم در برخی از موجودات از قبیل سمندر در محل زخم بافتی به نام بلاستما تشکیل می‌شود که دارای سلول‌هایی با قابلیت تکثیر و تمایز، مشابه سلول‌های جنینی است و قادرند تحت تأثیر عوامل مختلف به انواعی از سلول های تخصص یافته تمایز یابند (۴۸-۴۵). با وجود آن که پستانداران نسبت به سایر جانوران از قدرت ترمیم ضعیف‌تری برخوردارند؛ اما بررسی‌ها نشان داده‌اند که بعضی از بخش‌ها از جمله شاخ گوزن (۴۹)، گوش خرگوش (۵۰)، گوش موش (۵۱) و نیز بندانگشتان موش (۵۲) با قابلیت تکثیر بالای خود، ترمیم‌پذیرند. سلول های استحصال شده از بلاستمای گوش آسیب دیده موش MRL، پاسخ‌های مهاجرتی و تکثیری بالایی در شرایط آزمایشگاهی مشابه با سلول های اجدادی چند توان انسان نشان داد (۵۳). یکی از بهترین مثال‌های ترمیم در پستانداران، جایگزینی همه بافت‌ها پس از ایجاد سوراخ در لاله گوش خرگوش است. طی این عمل در اطراف سوراخ ایجاد شده، بافت بلاستما تشکیل می‌گردد که با تکثیر خود از اطراف به داخل، سلول های جدیدی را در محل سوراخ ایجاد می‌نماید که می‌توانند طی چند روز غضروف، بافت پیوندی، پوست ناحیه شکمی و پشتی و سایر بخش‌ها را کاملاً مشابه با بافت اولیه ایجاد نمایند (۵۴و۵۵). برای تهیه بافت بلاستما سوراخ‌هایی با قطر ۲ میلی‌متر در لاله گوش خرگوش‌های نژاد نیوزلندی جنس نر با پانچر مخصوص ایجاد می‌گردد. بعد از دو روز، پانچ دوم در اطراف



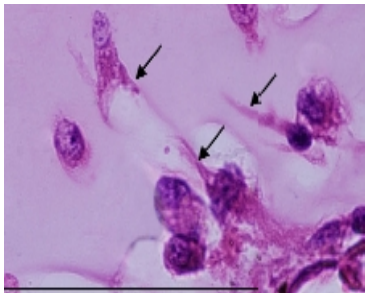
شکل ۱: تصاویر میکروسکوپی از بافت‌های مختلف قبل و بعد از فرایند سلول‌زدایی. فلش‌ها مشخص کننده هسته سلول‌ها، قبل از فرایند سلول‌زدایی است (۳۴-۳۱). (A) بافت غضروف، (B) استخوان، (C) لثه ، (D) آئورت و (E) مثانه.



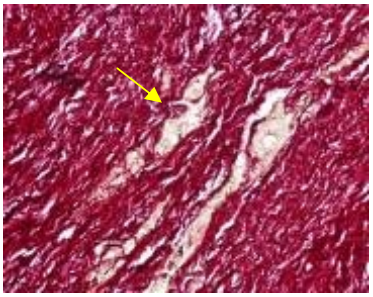
شکل ۲ : تصویر شماتیک از چگونگی مونتاژ داربست ECM با حلقه بلاستمایی حاصل از پانچ لاله گوش خرگوش. فلش‌ها نشان‌دهنده حلقه و جهت مهاجرت سلول‌های بافت بلاستمایی به داربست است.



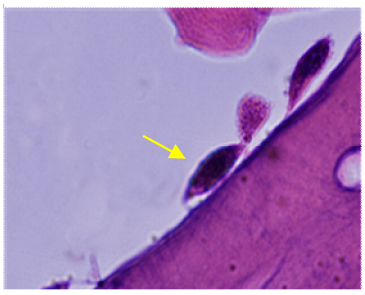
شکل ۵ : فلش نشان‌دهنده مشاهده پاسخ پاس مثبت در سلول‌های مهاجرت یافته به داربست لثه است (بزرگ‌نمایی 1000 X ، رنگ‌آمیزی پاس –پیک ایندیگو) (۳۲).



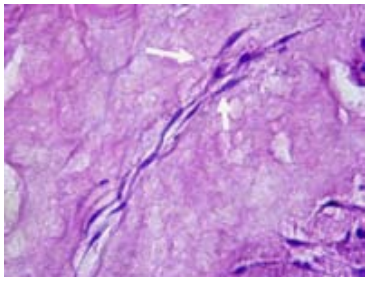
شکل ۳ : فلش‌ها نشان‌دهنده تشکیل استطاله‌های سیتوپلاسمی و هجوم سلول‌ها از بافت بلاستما به داخل داربست غضروفی است (بزرگ‌نمایی 1000 X، رنگ‌آمیزی H&E (۳۱).



شکل ٦ : تمایز سلول‌های بافت بلاستمایی به سلول‌های شبه میوسیت در داربست الاستیک تهیه شده از بافت آئورت (بزرگ‌نمایی 200X، رنگ‌آمیزی اورسئین- پیک ایندیگو) (۳٤).



شکل ٤ : فلش نشان‌دهنده تغییرشکل سلول‌های بافت بلاستما و کشیده شدن آنها در حالت چسبیده به تیغه‌های استخوان اسفنجی است (بزرگ‌نمایی 1000 X ، رنگ‌آمیزی H&E) (۳۱).



شکل ۷ : تمایز سلول‌های بافت بلاستمایی مهاجرت یافته به داخل ECM مثانه به سلول‌های شبه فیبروبلاست (بزرگ‌نمایی 400 X، رنگ‌آمیزی H&E) (۳۳).

سوراخ‌های پانچ شده اول با قطر ۴ میلی‌متر انجام می‌گیرد تا حلقه بلاستما از لاله گوش جدا گردد. در نهایت داربست‌های حاصل از فرایند سلول‌زدایی در میان حلقه‌های بافت بلاستما در شرایط استریل مونتاژ می‌گردد (شکل ۲).

رفتار سلول‌های بافت بلاستمایی در مجاورت داربست‌های حاصل از فرایند سلول‌زدایی ECM

رفتار سلول‌های بافت بلاستمایی که از نظر قابلیت تکثیر و تمایز بسیار مشابه سلول‌های جنینی است و قادرند تحت تأثیر عوامل مختلف به انواعی از سلول‌های تخصص‌یافته تمایز یابند (۴۵و۴۸و۵۶)؛ در مجاورت داربست ECM غضروف، استخوان، لثه، آئورت و مثانه مورد بررسی قرار گرفته است.

در روز دهم بعد از کشت، قرار گرفتن سلول‌هایی در مرز بین بافت بلاستما و داربست ECM و نفوذ سلول‌های بافت بلاستما به داربست‌ها مشهود بوده است. روز بیستم بعد از کشت، سلول‌های بافت بلاستما با ایجاد استطاله‌هایی به داربست ECM غضروف مفصلی، نفوذ و توده‌های سلولی در درون داربست را تشکیل داده‌اند (شکل ۳).

در مورد داربست استخوان، در این روز تغییر شکل سلول‌های بافت بلاستما و کشیده شدن آنها در حالت چسبیده به تیغه‌های استخوان اسفنجی مشاهده شده است (شکل ۴). نکته قابل توجه در مورد داربست لثه، مشاهده رفتارهای ترشحی (پاسخ پاس مثبت) در سلول‌های مهاجرت یافته به داربست است (شکل ۵).

مطالعات بافتی در روز دهم نفوذ سلول‌های بافت بلاستمایی به داخل داربست الاستیک تهیه شده از بافت آئورت را نشان می‌دهد که در روز بیستم علاوه بر نفوذ، تمایز سلول‌های بلاستمایی به سلول‌های شبه‌میوسیت در داربست الاستیک (شکل ۶) و به سلول‌های شبه فیبروبلاست در داربست مثانه (شکل ۷) نیز مشاهده شد.

بنابراین آنچه که بعد از کشت بافت بلاستما در کنار ماتریکس خارج سلولی بافت‌های مورد مطالعه اتفاق افتاده است؛ چسبندگی، قطبیت، مهاجرت، تقسیم و تمایزاحتمالی سلول‌های بافت بلاستما در این داربست‌ها بوده است. داربست‌های حاصل از فرایند سلول‌زدایی توانسته است تا سوبسترای 3D مناسبی را برای چسبندگی، مهاجرت، ایجاد قطبیت، تقسیم سلولی و تمایز احتمالی سلول‌های بافت بلاستمایی فراهم آورد (جدول ۲). تحقیقات نشان داده است که رفتار سلول‌ها توسط گرادیانی از پیام‌های شیمیایی هدایت می‌شود و از طرفی دیگر برهم‌کنش فیزیکی بین سلول و سوبسترا نیز در این نوع رفتارها می‌تواند نقش داشته باشد (۵۷و۵۸). بنابراین در انواع رفتارهای سلولی مشاهده شده؛ احتمالاً اجزای ECM با تاکید بر نقش آنها در مورفوژنز و همچنین ترکیبات ترشح شده از سلول‌ها با مکانیسم مشابهی نقش داشته‌اند. نکته قابل توجه مشاهده رفتارهای ترشحی (پاسخ پاس مثبت) در سلول‌های مهاجرت یافته به داربست است. اهمیت حضور ترکیبات قندی ترشح شده در داربست به دلیل نقش احتمالی این ترکیبات به عنوان گیرنده پیام‌های مختلف محیطی یا درونی است که مسیر مهاجرت، تکثیر و تمایز سلول‌ها را در روند ترمیم جهت‌دهی می‌کنند.

نتیجه‌گیری

داربست‌های حاصل از ماتریکس خارج سلولی با حفظ ترکیبات اصلی می‌توانند بستر مناسبی برای بررسی رفتارهای سلولی باشند. به‌نظر می‌رسد آماده‌سازی چنین داربست‌هایی بخش مهمی از مطالعات آتی دانش زیست‌شناسی خواهد بود که می‌تواند کاربردهای گسترده‌ای در دانش پزشکی ترمیمی و مهندسی بافت داشته باشد. علاوه بر این نتایج نشان داده است که برای شبیه‌سازی هرچه بیشتر شرایط حاکم بر سلول‌ها در شرایط داخل بدن می‌توان از کشت بافت‌های پویا مانند بلاستما که در پدیده ترمیم در جانوران پرسلولی نقش دارند؛ استفاده نمود و کشت بافت بلاستما در کنار داربست مشتق شده از ماتریکس خارج سلولی که ویژگی سه‌بعدی دارد؛ می تواند مدل مناسبی را برای بررسی رفتارهای سلولی در شرایط آزمایشگاهی فراهم نماید.

تشکر و قدردانی

این مطالعه با پشتیبانی و حمایت مالی معاونت پژوهشی دانشگاه فردوسی مشهد و با حمایت پژوهشکده فناوری زیستی دانشگاه فردوسی مشهد و از محل بودجه مصوبه مربوط به طرح شماره ۳۷۱۴۵ انجام گردید.

References

1. Satija NK, Gurudutta GU, Sharma S, Afrin F, Gupta P, Verma YK, et al. Mesenchymal stem cells: molecular targets for tissue engineering. Stem Cells Dev. 2007 Feb;16(1):7-23.

2. Martino S, D'Angelo F, Armentano I, Kenny JM, Orlacchio A. Stem cell-biomaterial interactions for regenerative medicine. Biotechnol Adv. 2012 Jan-Feb;30(1):338-51.

3. Polak JM, Bishop AE. Stem cells and tissue engineering: past, present, and future. Skeletal Development and Remodeling in Health, Disease and Aging. 2006 Apr; 1068: 352-66.

4. Rezwan K, Chen QZ, Blaker JJ, Boccaccini AR. Biodegradable and bioactive porous polymer/inorganic composite scaffolds for bone tissue engineering. Biomaterials. 2006 Jun;27(18):3413-31.

5. Atala A. Regenerative medicine strategies. J Pediatr Surg. 2012 Jan;47(1):17-28.

6. Yang Q, Peng J, Guo Q, Huang J, Zhang L, Yao J, et al. A cartilage ECM-derived 3-D porous acellular matrix scaffold for in vivo cartilage tissue engineering with PKH26-labeled chondrogenic bone marrow-derived mesenchymal stem cells. Biomaterials. 2008 May; 29(15):2378-87.

7. Caplan AI. Tissue engineering designs for the future: new logics, old molecules. Tissue Eng. 2000 Feb;6(1):1-8.

8. Lu Q, Ganesan K, Simionescu DT, Vyavahare NR. Novel porous aortic elastin and collagen scaffolds for tissue engineering. Biomaterials. 2004 Oct;25(22):5227-37.

9. Kleinman HK, Philp D, Hoffman MP. Role of the extracellular matrix in morphogenesis. Curr Opin Biotechnol. 2003 Oct; 14(5):526-32.

10. Du J, Yarema KJ. Carbohydrate engineered cells for regenerative medicine. Adv Drug Deliv Rev. 2010 Jun; 62(7-8):671-82.

11. Grinnell F, Petroll WM. Cell motility and mechanics in three-dimensional collagen matrices. Annu Rev Cell Dev Biol. 2010;26:335-61.

12. Badylak SF, Freytes DO, Gilbert TW. Extracellular matrix as a biological scaffold material: structure and function. Acta Biomater. 2009 Jan;5(1):1-13.

13. Geiger B, Yamada KM. Molecular architecture and function of matrix adhesions. Cold Spring Harb Perspect Biol. 2011 May; 3(5)pii: a005033.

14. Rozario T, DeSimone DW. The extracellular matrix in development and morphogenesis: a dynamic view. Dev Biol. 2010 May; 341(1):126-40.

15. Kim SH, Turnbull J, Guimond S. Extracellular matrix and cell signalling: the dynamic cooperation of integrin, proteoglycan and growth factor receptor. J Endocrinol. 2011 May;209(2):139-51.

16. Ganganna K, Shetty P, Shroff SE. Collagen in histologic stages of oral submucous fibrosis: a polarizing microscopic study. J Oral Maxillofac Pathol. 2012 May-Aug; 16(2): 162-6.

17. Gordon MK, Hahn RA. Collagens. Cell Tissue Res. 2010; 339:247-57.

18. Debelle L, Tamburro AM. Elastin: molecular description and function. Int J Biochem Cell Biol. 1999 Feb;31(2):261-72.

19. Rosso F, Giordano A, Barbarisi M, Barbarisi A. From cell-ECM interactions to tissue engineering. J Cell Physiol. 2004 May; 199(2):174-80.

20. Badylak SF. Xenogeneic extracellular matrix as a scaffold for tissue reconstruction. Transpl Immunol. 2004 Apr;12(3-4):367-77.

21. Cohen M, Joester D, Geiger B, Addadi L. Spatial and temporal sequence of events in cell adhesion: from molecular recognition to focal adhesion assembly. Chembiochem. 2004 Oct; 5(10):1393-9.

22. Luo BH, Carman CV, Springer TA. Structural basis of integrin regulation and signaling. Annu Rev Immunol. 2007;25:619-47.

23. Barczyk M, Carracedo S, Gullberg D. Integrins. Cell Tissue Res. 2010 Jan;339(1):269-80.

24. Cukierman E, Pankov R, Yamada KM. Cell interactions with three-dimensional matrices. Curr Opin Cell Biol. 2002 Oct; 14(5):633-9.

25. Crapo PM, Gilbert TW, Badylak SF. An overview of tissue and whole organ decellularization processes. Biomaterials. 2011 Apr; 32(12):3233-43.

26. Ackbar R, Ainoedhofer H, Gugatschka M, Saxena AK. Decellularized ovine esophageal mucosa for esophageal tissue engineering. Technol Health Care. 2012;20(3):215-23.

27. Barnes CA, Brison J, Michel R, Brown BN, Castner DG, Badylak SF, et al. The surface molecular functionality of decellularized extracellular matrices. Biomaterials. 2011 Jan; 32(1):137-43.

28. Azuma C, Tohyama H, Nakamura H, Kanaya F, Yasuda K. Antibody neutralization of TGF-beta enhances the deterioration of collagen fascicles in a tissue-cultured tendon matrix with ex vivo fibroblast infiltration. J Biomech. 2007;40(10):2184-90.

29. Falke G, Yoo JJ, Kwon TG, Moreland R, Atala A. Formation of corporal tissue architecture in vivo using human cavernosal muscle and endothelial cells seeded on collagen matrices. Tissue Eng. 2003 Oct;9(5):871-9.

30. Gilbert TW, Sellaro TL, Badylak SF. Decellularization of tissues and organs. Biomaterials. 2006 Jul;27(19):3675-83.

31. Tavassoli A, Shahabipour F, Mahdavi Shahri N, Moghadam Matin M, Fereidoni M. [In vitro experimental study of interactions between blastema tissue and three-dimensional matrix derived from bovine cancellous bone and articular cartilage]. Journal of Cell and Tissue. 2010;1(1):53-62. [Article in Persian]

32. Mahdavi Shahri N, Moghadam Matin M, Fereidoni M, Bahrami AR, Khajeh Ahmadi S, Yarjanli Z, Naderi S, et al. [Behavioral comparison of cultured rat's bone marrow mesenchymal stem cells and rabbit's blastema in scaffold of decellularized human periodontal tissue]. Journal of Cell and Tissue. 2012;3(1):55-63. [Article in Persian]

33. Rasti H, Mahdavishahri N, Baharara J, Saghiri N. [Experimental studies of interactions between blastema tissue and three-demensional matrixes decellularized of New Zealand rabbit bladder in vitro]. Journal of Cell and Tissue. 2011; 2(1): 35-45. [Article in Persian]

34. Kazemi T, Mahdavi Shahri N, Moghadam Matin M, Fereidouni M, Kazemi Sh. [Histological study of the interactions between blastema tissue originated from the pinna of New Zealand white rabbit and natural 3D elastic scaffold in vitro]. Journal of Cell and Tissue. 2010; 1(1): 63-73. [Article in Persian]

35. Elder BD, Eleswarapu SV, Athanasiou KA. Extraction techniques for the decellularization of tissue engineered articular cartilage constructs. Biomaterials. 2009 Aug;30(22):3749-56.

36. Mahdavishahri N, Moghatam Matin M, Fereidoni M, Yarjanli Z, Banihashem Rad SA, Khajeh Ahmadi S. In vitro Assay of Human Gingival Scaffold in Differentiation of Rat's Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells to Keratinocystes. Iran J Basic Med Sci. 2012 Nov-Dec; 15(6): 1185-90.

37. Schaner PJ, Martin ND, Tulenko TN, Shapiro IM, Tarola NA, Leichter RF, et al. Decellularized vein as a potential scaffold for vascular tissue engineering. J Vasc Surg. 2004 Jul;40(1):146-53.

38. Alhamdani MS, Schröder C, Werner J, Giese N, Bauer A, Hoheisel JD. Single-step procedure for the isolation of proteins at near-native conditions from mammalian tissue for proteomic analysis on antibody microarrays. J Proteome Res. 2010 Feb; 9(2):963-71.

39. Reing JE, Brown BN, Daly KA, Freund JM, Gilbert TW, Hsiong SX, et al. The effects of processing methods upon mechanical and biologic properties of porcine dermal extracellular matrix scaffolds. Biomaterials. 2010 Nov;31(33):8626-33.

40. Mendoza-Novelo B, Avila EE, Cauich-Rodríguez JV, Jorge-Herrero E, Rojo FJ, Guinea GV, et al. Decellularization of pericardial tissue and its impact on tensile viscoelasticity and glycosaminoglycan content. Acta Biomater. 2011 Mar;7(3):1241-8.

41. Yang B, Zhang Y, Zhou L, Sun Z, Zheng J, Chen Y, Dai Y. Development of a porcine bladder acellular matrix with well-preserved extracellular bioactive factors for tissue engineering. Tissue Eng Part C Methods. 2010 Oct;16(5):1201-11.

42.Yarjanli Z, MahdaviShahri N, MoghaddamMatin M, Fereidoni M, BanihashemRad SA. [In Vitro Histological Investigation of Interactions between Rat's Mesenchymal Stem Cells and Human

Gingival Matrix]. J Mashad Dent Sch. 201236(1): 79-90. [Article in Persian]

43. Sadegh Moghaddam Abaspour S, Mahdavi Shahri N, Shariat Zadeh S. [The study of the interactions between blastema tissues originated from the pinna of New Zealand rabbit and a cellular human gingiva (as a scaffold) in vitro]. J Arak Univ Med Sci. 2012; 15(3):26-31. [Article in Persian]

44. Baharara J, Mahdavishahri N, Saghiri N, Rasti H. [Histological study of interaction between blastema tissue and decellularized three-dimensional matrix of bladder]. Zahedan J Res Med Sci. 2012;14(7): 8-13. [Article in Persian]

45. Corcoran JP, Ferretti P. RA regulation of keratin expression and myogenesis suggests different ways of regenerating muscle in adult amphibian limbs. J Cell Sci. 1999 May;112 (Pt 9):1385-94.

46. Brockes JP, Kumar A. Plasticity and reprogramming of differentiated cells in amphibian regeneration. Nat Rev Mol Cell Biol. 2002 Aug;3(8):566-74.

47. Tsonis PA. Regeneration in vertebrates. Dev Biol. 2000 May; 221(2):273-84.

48. Tsonis PA. Stem cells and blastema cells. Curr Stem Cell Res Ther. 2008 Jan;3(1):53-4.

49. Goss RJ. Problems of antlerogenesis. Clin Orthop Relat Res. 1970; 69: 238-72.

50. Goss RJ, Grimes LN. Epidermal downgrowths in regenerating rabbit ear holes. J Morphol. 1975 Aug;146(4):533-42.

51. Gourevitch D, Clark L, Chen P, Seitz A, Samulewicz SJ, Heber-Katz E. Matrix metalloproteinase activity correlates with blastema formation in the regenerating MRL mouse ear hole model. Dev Dyn. 2003 Feb;226(2):377-87.

52. Borgens RB. Mice regrow the tips of their foretoes. Science. 1982 Aug;217(4561):747-50.

53. Arthur LM, Heber-Katz E. The role of p21 in regulating mammalian regeneration. Stem Cell Res Ther. 2011 Jun;2(3):30.

54. Gardiner DM, Muneoka K, Bryant SV. The migration of dermal cells during blastema formation in axolotls. Dev Biol. 1986 Dec; 118(2):488-93.

55. Mahdavi Shahri N, Naseri F, Kheirabadi M, Babaie S, Sadeghie Shakib F, Azarniya M. The ultra structural study of blastema in pinna tissues of rabbits with transmission electron microscope. Journal of Biological Sciences. 2008; 8:993-1000.

56. Pietsch P. The effect of heteropic musculature on myogenesis during limb regeneration in amblystoma larva. The Anatomocal Record. 1961; 741:295-303.

57. Flynn LE, Prestwich GD, Semple JL, Woodhouse KA. Proliferation and differentiation of adipose-derived stem cells on naturally derived scaffolds. Biomaterials. 2008 Apr;29(12):1862-71.

58. Soucy PA, Romer LH. Endothelial cell adhesion, signaling, and morphogenesis in fibroblast-derived matrix. Matrix Biol. 2009 Jun; 28(5):273-83.

Review Article

Preparation of decellularized three dimentional scaffolds as the model for tissue engineering and their functional assessments in vitro application of blastema tissue

**Mahdavi Shahri N (PhD)*[1], Moghaddam Matin M (PhD)[2], Fereidoni M (PhD)[3]
Behnam Rassouli M (PhD)[4], Moghimi A (PhD)[4], Bahrami AR (PhD)[5]
Namini MA (MSc)[6], Naderi S (MSc)[7], Kheirabadi M (MSc)[6], Naseri F (MSc)[8]**

[1]Professor, Histology and Cytology, Department of Biology, Faculty of Science, Stem Cell Biotechnology Research Group, Institute of Biotechnology, Ferdowsi University of Mashhad, Mashhad, Iran. [2]Associate Professor, Molecular Biology, Department of Biology, Faculty of Science, Cell and Molecular Biotechnology Research Group, Institute of Biotechnology, Ferdowsi University of Mashhad, Mashhad,Iran. [3]Associate Professor , Physiology, Department of Biology, Faculty of Science, Ferdowsi University of Mashhad, Mashhad, Iran. [4]Professor, Physiology, Department of Biology, Faculty of Science, Ferdowsi University of Mashhad, Mashhad, Iran. [5]Professor, Molecular Biology, Department of Biology, Faculty of Science, Cell and Molecular Biotechnology Research Group, Institute of Biotechnology, Ferdowsi University of Mashhad, Mashhad, Iran. [6]MSc of Physiology, Department of Biology, Faculty of Sciences, Ferdowsi University of Mashhad, Mashhad, Iran. [7]MSc of Developmental Biology, Department of Biology, Faculty of Sciences, Ferdowsi University of Mashhad, Mashhad, Iran. [8]MSc of Physiology, Central Laboratory, Ferdowsi University of Mashhad, Mashhad, Iran.

Abstract

Tissue engineering is based on three main factors including scaffolds, cells and growth factors. Natural scaffolds derived from decellularized tissues and organs have been successfully used in tissue engineering. Decellularization studies have shown that natural scaffolds which maintaine their main structure and properties could be a suitable tool for studying cellular behaviors and preparation of such scaffolds is an important part of future research in biology that may have extensive applications in regenerative medicine and tissue engineering. Blastema tissue which is produced after injuries in some organisms has embryonic cell characteristics, and can be a suitable model for evaluation of cell behaviors in various tissues. In this review, the process of decellularization, process involved in preparation of 3D scaffolds derived from extracellular matrix of various tissues including cartilage, bone, gingiva, aorta and bladder, and assessment of their interactions with blastema tissue under in vitro conditions are discussed.

Keywords: 3D natural scaffolds, Tissue engineering, Decellularization, Blastema tissue, Regenerative medicine

---

*** Corresponding Author: Mahdavi Shahri N (PhD), E-mail: mahdavin@um.ac.ir**

Received 2 January 2013 **Revised** 20 May 2013 **Accepted** 25 May 2013

This paper should be cited as: Mahdavi Shahri N, Moghaddam Matin M, Fereidoni M, Behnam Rassouli M, Moghimi A, Bahrami AR, Namini MA, Naderi S, Kheirabadi M, Naseri F. [Preparation of decellularized three dimentional scaffolds as the model for tissue engineering and their functional assessments in vitro application of blastema tissue]. J Gorgan Uni Med Sci. 2014; 15(4): 8-17. [Article in Persian]