



همایش ملی بیوتکنولوژی، بیوشیمی و مهندسی زیستی
دانشگاه پیام نور استان یزد، مرکز تفت
۲۰-۲۲ اردیبهشت ماه ۱۳۹۱



مقایسه روش سلول زدایی ماتریکس خارج سلولی مری بین موش صحرایی و خرگوش نر

ملیحه اکبرزاده^۱، ناصر مهدوی شهری^۱، مریم مقدم متین^۲، مسعود فریدونی^۱، رویا لاری^۱

۱- گروه زیست شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه فردوسی مشهد، مشهد، ایران

۲- گروه پژوهشی بیوتکنولوژی سلولی و مولکولی، پژوهشکده فناوری زیستی، دانشگاه فردوسی مشهد، مشهد، ایران

m_niaky@yahoo.com

چکیده:

در این تحقیق ترکیبی از روش های فیزیکی و شیمیایی سلول زدایی جهت بررسی مقایسه ای سلول زدایی مری موش صحرایی نر نژاد ویستار و خرگوش نر نژاد نیوزلندی بکار گرفته و مقایسه شد. جهت انجام سلول زدایی فیزیکی، انجماد آهسته در دمای صفر درجه سانتیگراد و سپس انجماد و ذوب مکرر در ازت مایع انجام گرفت. از دو شوینده سدیم دو دسیل سولفات (SDS) و Triton X-100 جهت انجام سلول زدایی شیمیایی استفاده گردید و درصدهای متفاوتی از آن ها جهت دستیابی به بیشترین میزان حذف سلولی و در عین حال حفظ محتوای ماتریکس خارج سلولی (ECM) مورد آزمایش قرار گرفت. مطالعات بافت شناسی و رنگ آمیزی هماتوکسیلین اتوزین نشان داد که بیشترین میزان حذف سلولی در مری خرگوش در گروه تیمار شده با ۱٪ Triton X-100 به مدت ۲۴ ساعت و به دنبال آن ۰/۵٪ SDS به مدت ۴۸ ساعت صورت می گیرد، در حالی که مری موش صحرایی بیشترین میزان سلول زدایی را در گروه تیمار شده با ۱٪ Triton X-100 به مدت ۴۸ ساعت و ۰/۵٪ SDS به مدت ۴۸ ساعت نشان داد. رنگ آمیزی پیکروسپیروس رد نیز حفظ محتوای کلاژن موجود در ECM را در هر دو مری سلول زدایی شده موش صحرایی و خرگوش نشان داد. نتایج این مطالعه بیانگر این است که داربست های طبیعی حاصل از سلول زدایی بافت مری موش صحرایی و خرگوش به روش های فوق، با حفظ ترکیبات اصلی می توانند بستر مناسبی جهت بررسی رفتارهای سلولی و مدل های مناسبی به عنوان گام های اولیه در ترمیم و کاربردهای احتمالی در مهندسی بافت باشند.

لغات کلیدی: داربست - سلول زدایی - ماتریکس خارج سلولی - مهندسی بافت

۱- مقدمه:

مهندسی بافت یکی از پیشرفت های شایان تقدیر در علم طب ترمیم می باشد که اخیرا کاربرد وسیعی در بازسازی و بهبود عملکرد بافت های آسیب دیده یافته است. داربست ها به عنوان یکی از ارکان اصلی مهندسی بافت نقش مهمی در فراهم کردن ساختار سه بعدی برای رشد سلول ها در شرایط *in vitro* ایفا می کنند (Saxena, 2010). به طور کلی دو نوع داربست اعم از داربست های مصنوعی مثل پلیمرهای سنتزی و داربست های طبیعی متشکل از ماتریکس خارج سلولی (ECM) در مهندسی بافت به کار می روند (Badylak, et al., 2009). در این بین، استفاده از داربست های طبیعی مشتق از بافت های سلول زدایی شده مختلف در مقایسه با مواد داربستی سنتزی، در تحقیقات جانوری و مطالعات کلینیکی نتایج موفق تری در پی داشته است (Beckstead, et al., 2005). این داربست ها دارای اثرات القایی بر رفتار سلول های کشت شده بر روی آن ها می باشند. اولین قدم جهت شناخت اثرات القایی



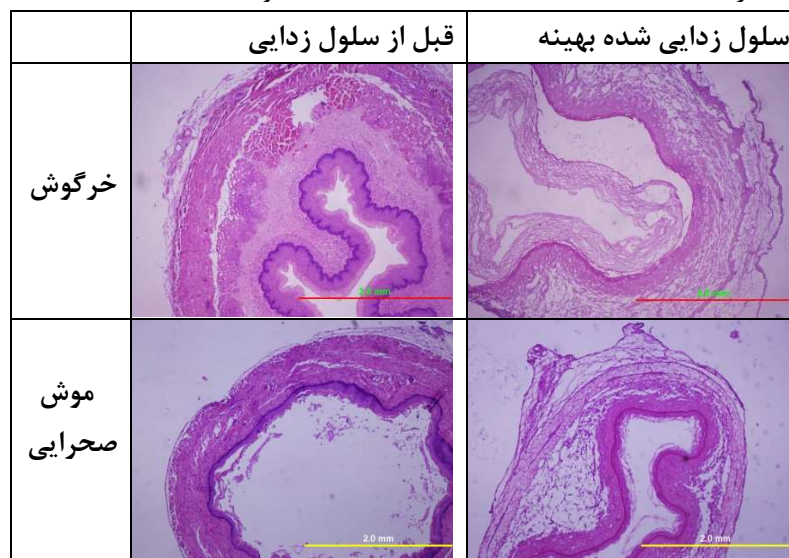
ماتریکس خارج سلولی، تلاش برای تولید یک بافت سلول زدایی شده است که دارای بیشترین میزان حذف سلولی و در عین حال حفظ محتوای ماتریکس باشد (Ozeki, et al., 2006; Seery, et al., 2000). هدف از این مطالعه، بررسی مقایسه ای روش های سلول زدایی مری موش صحرایی نر نژاد ویستار و مری خرگوش نر نژاد نیوزلندی بود.

۲- مواد و روش ها:

به منظور انجام سلول زدایی مری موش صحرایی نژاد ویستار و مری خرگوش نر نژاد نیوزلندی، ترکیبی از روش های فیزیکی و شیمیایی سلول زدایی انجام گرفت. به طور مختصر، پس از برداشت مری، نمونه ها در سرم فیزیولوژی شستشو داده شدند و به مدت یک هفته در دمای صفر درجه سانتیگراد نگهداری شدند. پس از ذوب و شستشوی مجدد نمونه ها در نرمال سالین، تکنیک انجماد و ذوب مکرر در ازت مایع انجام گرفت. در مرحله بعدی از شوینده سدیم دودسیل سولفات (SDS) و Triton X-100 جهت هضم غشا و اجزای سلولی استفاده گردید. برای دستیابی به بهترین میزان حذف سلولی و در عین حال حفظ محتوای ماتریکس، تیمارهای متفاوتی با درصدهای مختلف SDS و Triton X-100 در بازه های زمانی مختلف بر روی مری موش صحرایی و خرگوش مورد آزمایش قرار گرفت. سپس مطالعات بافت شناسی و رنگ آمیزی های هماتوکسیلین ائوزین و پیکروسیروس رد به ترتیب جهت بررسی میزان حذف سلولی و حفظ کلاژن موجود در ماتریکس خارج سلولی انجام گرفت.

۳- نتایج:

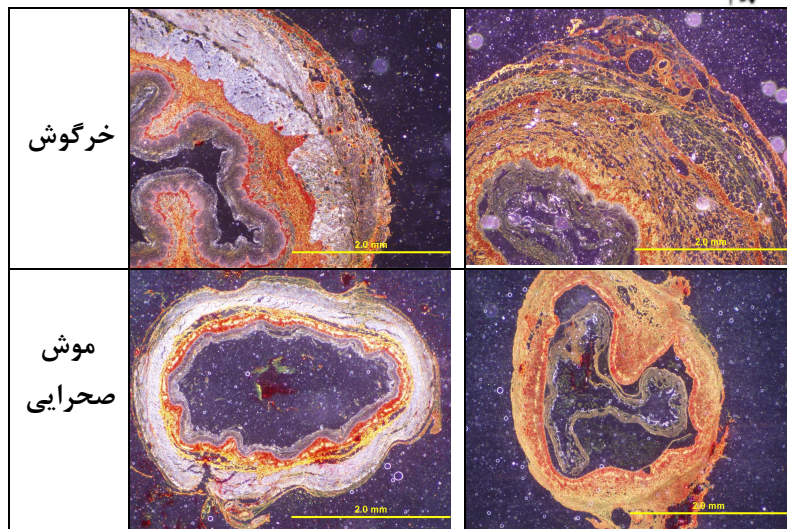
مطالعات بافت شناسی نشان می دهد که مری طبیعی جوندگان شامل چندین لایه سلولی از قبیل اپی تلیوم سنگفرشی مطبق شاخی، آستر مخاط، عضله مخاطی، زیرمخاط، لایه های عضلانی حلقوی و طولی و آداننتیس می باشد (شکل ۱). بر اساس نتایج حاصل از رنگ آمیزی هماتوکسیلین ائوزین، بیشترین میزان حذف سلولی در مری خرگوش در گروه تیمار شده با ۱٪ Triton X-100 به مدت ۲۴ ساعت و به دنبال آن ۵٪ SDS به مدت ۴۸ ساعت مشاهده شد، در حالی که مری موش صحرایی بیشترین میزان سلول زدایی را در گروه تیمار شده با ۱٪ Triton X-100 به مدت ۴۸ ساعت و ۵٪ SDS به مدت ۴۸ ساعت نشان داد (شکل ۱).



شکل ۱- بررسی اثر سلول زدایی بر حذف سلولی بافت مری در بهترین شرایط ذکر شده در متن پس از رنگ آمیزی با هماتوکسیلین - ائوزین

رنگ آمیزی پیکروسیروس رد نیز حفظ محتوای کلاژن موجود در ماتریکس خارج سلولی مری های سلول زدایی شده را به خصوص در لایه های آستر مخاط و زیرمخاط نشان داد (شکل ۲).

سلول زدایی شده بهینه	قبل از سلول زدایی
----------------------	-------------------



شکل ۲- بررسی اثر سلول زدایی بر کلاژن ماتریکس خارج سلولی بافت های مری پس از رنگ آمیزی پیکروسیروس رد

۳- بحث:

از یافته های فوق می توان نتیجه گرفت که مری سلول زدایی شده می تواند به عنوان یک داربست طبیعی جهت کاربردهای احتمالی در مطالعات مهندسی بافت بکار رود. یکی از خصوصیات مهم یک داربست مناسب، دارا بودن سازگاری زیستی بالا می باشد (Saxena, 2010). Beckstead و همکارانش در سال ۲۰۰۵ در اولین قدم های مهندسی بافت، برهم کنش سلول های اپی تلیال مری را با داربست های سنتزی کلاژن به عنوان داربست مصنوعی و آلودرم پوست انسان به عنوان داربست طبیعی بررسی نموده و نشان دادند که داربست های طبیعی به دلیل دارا بودن سازگاری زیستی بالا از سازمان یابی و لایه بندی مناسب تری برخوردار بودند (Beckstead, et al., 2005). سلول زدایی به عنوان روشی مناسب جهت دستیابی به داربست طبیعی مشتق از ماتریکس خارج سلولی بکار می رود. هدف نهایی فرآیند سلول زدایی حذف مواد سلولی و هسته ای و در عین حال حفظ مولکول های موجود در ماتریکس خارج سلولی بافت مورد نظر است (Badylak, et al., 2009). طبق نتایج این آزمایش هر دو مری سلول زدایی شده موش صحرائی و خرگوش، کلاژن موجود در ماتریکس خارج سلولی خود را حفظ کردند. روش های مورد استفاده در فرآیند سلول زدایی بسته به نوع بافت و گونه جانوری، متفاوت است (Gilbert, et al., 2006). تفاوت موجود در بازه زمانی مورد نیاز جهت حذف مواد سلولی از مری موش صحرائی و خرگوش نیز احتمالاً به دلیل تفاوت در گونه جانوری و ساختار بافت می باشد. Triton X-100 شوینده قوی است که عمل شیمیایی اش می تواند به ماتریکس خارج سلولی آسیب وارد کند (Ozeki, et al., 2006). نتایج این مطالعه نشان می دهد که Triton X-100 برای حذف مواد سلولی مری موش صحرائی به ۴۸ ساعت زمان نیاز داشته ولی بازه زمانی ۲۴ ساعت جهت سلول زدایی مری خرگوش کافی بوده و زمان بیشتر از آن به ماتریکس مری خرگوش آسیب وارد می کرد. نتایج مطالعه حاضر بیانگر این است که داربست های طبیعی که از سلول زدایی بافت مری موش صحرائی و خرگوش به دست می آیند با حفظ ترکیبات اصلی می توانند بستر مناسبی جهت بررسی رفتارهای سلولی و مدل های مناسبی به عنوان گام های اولیه در ترمیم و کاربردهای احتمالی مهندسی بافت باشند.

منابع:

- [1] A. K. Saxena. Pediatric Surgery International. 2010, 26, 557
- [2] B. L. Beckstead, S. Pan, A. D. Bhrany, A. M. Bratt-Leal, B. D. Ratner, C. M. Giachelli. Biomaterials. 2005, 26, 6217
- [3] J. P. Seery, F. M. Watt. Current Biology. 2000, 10, 1447
- [4] M. Ozeki, Y. Narita, H. Kagami, N. Ohmiya, A. Itoh, Y. Hirooka, et al. Journal of Biomedical Materials Research. 2006, 79, 771
- [5] S. F. Badylak, D. O. Freytes, T. W. Gilbert. Acta Biomaterialia. 2009, 5, 1
- [6] T. W. Gilbert, T. L. Sellaro, S. F. Badylak. Biomaterials. 2006, 27, 3675