

مطالعه یک مورد سلول زدایی بافت لته کامی انسان و آماده سازی مدلی سه بعدی (3D matrix) برای کاربرد در تحقیقات مقدماتی مهندسی بافت لته

مجتبی چروی^{۱*}، ناصر مهدوی شهری^۱، جواد بهارآرا^۱، سیدعلی بنی هاشم راد^۲، جینا خیاط زاده^۱،

خدیجه نژاد شاهرخ آبادی^۱، سمیه نادری^۱

۱- گروه زیست شناسی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد مشهد، ایران
۲- دانشکده دندانپزشکی و مرکز تحقیقات دندانپزشکی، دانشگاه علوم پزشکی مشهد، ایران
* پست الکترونیک نویسنده مسئول: Mojtaba_cheravi@yahoo.com

تاریخ پذیرش: ۱۳۹۰/۸/۱۷

تاریخ دریافت: ۱۳۹۰/۵/۲۶

چکیده

هدف: هدف این تحقیق تهیه شبکه خارج سلولی (ماتریکس) سه بعدی از بافت لته کامی و بررسی امکان کاربرد داربست‌های طبیعی (Scaffolds) تهیه شده در تحقیقات کشت سلولی و مهندسی بافت می‌باشد.

مواد و روش‌ها: به منظور تهیه داربست‌ها، بافت لته کامی انسان به صورت بیوپسی تهیه و سلول زدایی به روش فیزیکی (قرار دادن در تانک ازت و شستشو با آب مقطر) شیمیایی با درصدهای متفاوتی از سدیم دودسیل سولفات (غلظت‌های ۱، ۰/۷۵، ۰/۵، ۰/۲۵ و ۰/۱ درصد) در ۵ گروه انجام شد. سپس جهت تست داربست سلول زدایی شده با غلظت ۱ درصد محلول SDS، از سلول‌های شبه جنینی بافت بلاستما برای کشت بر روی این داربست سه بعدی استفاده گردید.

نتایج: کاهش درصد SDS به پایین تر از ۰/۵ درصد به طور معنی داری باعث کاهش سلول زدایی بافت شد ($P < 0/05$). مطالعه میکروسکوپی در مورد بلاستما و داربست همراه آن در روزهای مختلف کشت نفوذ سلولی، مهاجرت، چسبندگی و تمایز را نشان داد.

نتیجه گیری: نتایج این تحقیق نشان می‌دهد که امکان تهیه یک داربست طبیعی از بافت لته کامی به وسیله تیمار با SDS وجود دارد. از طرف دیگر نتایج مطالعات هیستولوژیک نشان می‌دهد که داربست‌های سلول زدایی شده لته کامی می‌تواند همچون لته آزاد داربست زیستی سه بعدی مناسبی برای حرکت، تمایز، چسبندگی و مهاجرت سلول‌ها باشد. آزمایشات بیشتر جهت تعیین ماهیت سلول‌های تمایز یافته می‌تواند به پیشرفت دانش ما در رابطه با برهم کنش‌های سلول - ماتریکس کمک کنند.

واژگان کلیدی: بافت بلاستما، سدیم دودسیل سولفات، ماتریکس خارج سلولی، مهندسی بافت

مقدمه

مهندسی بافت یکی از علوم جدید است که در سال های اخیر در درمان ضایعات بافتی و اندامی و حتی جایگزینی کامل یک اندام، بسیار مورد توجه قرار گرفته است (۱). مهندسی بافت مولد یک حوزه مطالعاتی جدید است که در آن اصول مهندسی و بیولوژی را جهت اصلاح بافت زنده آسیب دیده بکار می گیرد و موجب تجدید، ترمیم و حفظ عمل بافت می شود (۲). داربست، سلول و فاکتورهای رشد، سه رکن اصلی در مهندسی بافت هستند. یک داربست ایده آل باید دارای تخلخل مناسب برای انتشار مواد غذایی بوده و امکان پاک سازی مواد زائد را داشته و دارای پایداری مکانیکی مناسبی جهت تثبیت و انتقال بار باشد (۳). علاوه بر این، شیمی سطح ماده باید چسبندگی سلول و علامت دهی داخل سلولی را به نحوی ارتقا دهد که سلول ها فنوتیپ طبیعی خودشان را بروز دهند (۴). مولکول های ماتریکس خارج سلولی (ECM) (Extracellular matrix) مانند فیبرونکتین، لامینین و رسپتورهای گلیکوپروتئینی سطح سلولی آنها در مهاجرت و تمایز سلولی نقش دارند. در واقع اجزای ماتریکس خارج سلولی زیر بنای مهندسی بافت را تشکیل می دهند. دینامیک سلول - ماتریکس نقش مهمی در تسهیل و سازماندهی بسیاری از فرایندهای سلولی بازی می کند. ماتریکس خارج سلولی علاوه بر نقش اتصالی و داربستی برای سلول ها، به آماده سازی و جداسازی فاکتورهای رشد مورد نیاز سلول ها کمک می کنند. با توجه به ویژگی فوق، استفاده از داربست های طبیعی حاصل از سلول زدایی بافت های موجودات زنده مفید بنظر می رسد (۵). سلول زدایی فرآیندی است که طی آن تمامی سلول های یک اندام یا بافت از آن جدا می شوند، به طوری که فقط شبکه خارج سلولی و چهارچوب ما بین سلول ها به صورت دست نخورده باقی بماند. سلول زدایی از بافت ها و ارگان ها جهت استفاده از ماتریکس های خارج سلولی برای ایجاد داربست های زیستی به طور موفقیت آمیزی در مهندسی بافت و پزشکی ترمیمی انجام شده است (۶). اولین درخواست های کلینیکی به منظور استفاده از سلول های انسانی در مهندسی بافت برای بافت پوست با استفاده فیبروبلاست ها، کراتینوسیت ها و داربست در سال ۱۹۸۰ آغاز شد. اندکی پس از آن تلاش به منظور بازسازی بافت های دهانی، استخوان اسفنجی و پریدونتیکس یا اطراف دندانانی انجام گرفت (۷). تاثیر مهندسی بافت در دندانپزشکی ناشی از درخواست های بی شمار آن در بافت های مرتبط با حفره دهانی بوده، چرا که درمان های پزشکی برای ضایعات بافت های

دهانی و دندانانی سالیانه میلیونها انسان را در بر می گیرد (۸). بافت دهانی به دلیل وجود سلول های بنیادی جوانه دندانانی با خصوصیات مشابه سلول های بنیادی مزانشیمی قادر به تمایز به عاج دندان، سلول های چربی و عصبی در شرایط آزمایشگاهی و بدنی، همواره مورد توجه مهندسی بافت بوده است (۹). با توجه به اینکه بافت لثه خود از سه قسمت لثه چسبنده، لثه آزاد و مارژینال و لثه چسبنده تشکیل شده، حاوی مقدار زیادی الیاف کلاژن است. کلاژن به عنوان داربست طبیعی دارای سازش پذیری زیستی بالا به عنوان یکی از ویژگی های داربست طبیعی است و امکان جایگزینی آسان سلول و فاکتور رشد را فراهم می کند (۱۰، ۱۱). بافت بلاستما گروهی از سلول های تمایز نیافته ای هستند که در بخش هایی از بدن یک موجود زنده با شباهت بسیار زیادی به سلول های جنینی قادر به تقسیم و تمایز می باشند و در پیدایش اعضا یا فرایند ترمیم و بازسازی بافت های آسیب دیده مشارکت می نمایند. گوش خرگوش مدل مناسبی برای مطالعات بافت بلاستما بوده و با ایجاد سوراخی در لاله گوش تمام بافت از دست رفته در آن محل دوباره بازسازی می گردد. تشکیل این بافت و بازسازی مجدد در ناحیه آسیب دیده طی فرایندهای تکثیر سلولی، سنتز اجزای ماتریکس خارج سلولی، مهاجرت و تمایز سلولی صورت می گیرد (۱۲).

هدف از انجام این تحقیق در مرحله اول، تهیه داربست های سه بعدی مشتق شده از ماتریکس خارج سلولی بافت لثه کامی انسان بود. همچنین تاثیر غلظت های مختلفی از سدیم سولفات (SDS) به عنوان یک دترجنت یونی که در فرایندهای سلول زدایی استفاده می شود مورد بررسی قرار گرفت. در بخش دوم این تحقیق جهت آزمایش داربست، بر هم کنش بین داربست تهیه شده و بافت بلاستمای حاصل از گوش خرگوش نر نژاد نیوزلندی مورد بررسی قرار گرفت.

مواد و روش ها

سلول زدایی بافت لثه کامی به منظور تهیه داربست طبیعی: قطعات بافت لثه کامی انسان با کمک متخصص و جراح لثه در کلینیک تخصصی دندانپزشکی از نواحی از سطح کامی دندان که نیاز به اعمال جراحی لثه از قبیل: افزایش طول تاج دندان به منظور انجام ترمیم و یا از ناحیه جراحی دندان های عقل نهفته فک بالا، با اجازه و توجیه بیماران و با رعایت اصول اخلاقی مربوطه تهیه گردید (این قطعات اضافی در حالت طبیعی دور ریخته می شوند). نمونه ها متعلق به مردان و زنان ۲۰ تا ۴۵

تهیه بافت بلاستما: جهت تهیه بافت بلاستما از خرگوش‌های نر سفید نژاد نیوزلندی ۸-۶ ماهه با وزن تقریبی ۲/۵ کیلوگرم که از موسسه تحقیقاتی سرم سازی رازی مشهد تهیه شده بودند، استفاده گردید. در تمام زمان استفاده از این حیوانات، آن‌ها در حیوان خانه دانشگاه نگهداری شدند و تحت یک رژیم غذایی پایه به صورت انفرادی در قفس و با درجه حرارت کنترل شده 20 ± 2 درجه سانتی گراد و روشنایی ۱۲ ساعت در شبانه روز قرار داشتند. با رعایت نکات اخلاقی و بعد از بی حس کردن گوش خرگوش توسط لیدوکائین، با استفاده از دستگاه پانچ چند سوراخ به قطر ۲ میلی متر در لاله گوش خرگوش ایجاد شد و بعد از گذشت سه روز در محل سوراخ اولیه، پانچ دیگری به قطر ۴ میلی متر زده شد و حلقه ی بلاستمایی جدا گردید. بعد از جدا سازی حلقه بلاستمایی، جهت حذف آلودگی چندین بار با سرم فیزیولوژی استریل شستشو داده شد.

قرار دادن داربست آماده شده درون بلاستما و مطالعه

بافت شناسی: بعد از آماده سازی داربست و بافت بلاستما، در زیر هود لامینار و در شرایط کاملا استریل داربست‌های تهیه شده در میان حلقه‌های بلاستمایی قرار داده شدند و در ظروف شش خانه ای کشت قرار گرفتند. در هر خانه میزان ۴ میلی لیتر محیط کشت DMEM با ۱۵ درصد FBS و ۵۰۰ میکرو لیتر آنتی بیوتیک پنی‌سیلین / استرپتومایسین ریخته شد. سپس نمونه‌ها به انکوباتور ۳۷ درجه سانتی گراد با CO_2 ، ۵ درصد منتقل گردید.

به منظور بررسی مهاجرت سلول‌ها از حلقه بلاستمایی به داربست، تا ۲۵ روز کشت ادامه یافت. طی روزهای مختلف (۵، ۱۰، ۱۵، ۲۰، ۲۵) نمونه‌های کشت یافته به منظور مطالعات بافت شناسی برداشته شده، در محلول بوئن فیکس و پاساژ بافت مطابق روش معمول انجام شد. به منظور مشاهده رفتار سلول‌های مهاجر از بلاستما به درون داربست از رنگ آمیزی هماتوکسیلین-ئوزین و پیکروفوشین استفاده شد.

نتایج

نتایج سلول زدایی

بافت لته کامی سلول زدایی شده با SDS ۰/۱ درصد تا حدی شدت رنگ پذیری ماتریکس نسبت به نمونه‌های کنترل کاهش پیدا کرده بود (شکل ۱) و لایه اپی تلیوم همچون یک لایه تور مانند با حفظ اتصالات بین سلولی که فاقد هسته و مواد سیتوپلاسمی بوده کاملا به لایه بازال و بافت همبند متصل باقی مانده بود (شکل ۲، A و B). در غلظت ۰/۲۵ درصد SDS، جدا شدن اپی تلیوم از بافت همبند و لایه بازال در برخی نواحی قابل

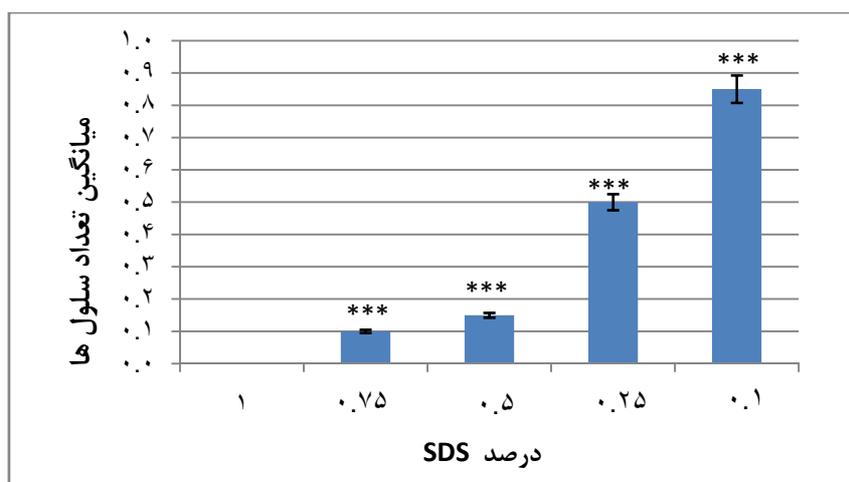
ساله، فاقد بیماری‌های سیستمیک و غیر سیگاری بودند. نمونه‌ها پس از انتقال به آزمایشگاه به قطعات یکسان برش داده شدند. نمونه‌های حاصل توسط سرم فیزیولوژی شستشو و حدود یک هفته در فریزر در دمای ۴- درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند. جهت فریز کردن آنی، نمونه‌ها درون کرایوتیوب‌های ۲ میلی لیتری قرار گرفته و بمدت ۲ دقیقه وارد ازلت مایع با دمای ۱۹۶- درجه سانتی‌گراد گردیدند. سپس برای ذوب شدن سریع به مدت ۵ دقیقه نمونه‌ها در آب مقطر با دمای ۲۷ درجه سانتی‌گراد وارد شدند. این فرایند، ۶ بار تکرار شد و بعد از آن نمونه‌ها برای شستشو به مدت یک ساعت در محلول (PBS) phosphate-buffered saline قرار داده شدند. سپس نمونه‌ها به ۵ گروه تقسیم و ۲۴ ساعت در شوینده ی سدیم دو دسیل سولفات (SDS, Merck) با ۵ غلظت مختلف (۰/۱، ۰/۷۵، ۰/۵، ۰/۲۵ و ۰/۱ درصد) قرار گرفتند و در طی این مدت به آرامی مخلوط شدند. بعد از آن به منظور خروج هسته‌ها، بقایای سلولی و همچنین شوینده‌ها از بافت، نمونه‌ها به مدت ۲ ساعت در PBS قرار گرفته، و سپس چندین مرحله با آب مقطر شستشو داده شد. جهت فیکس کردن نمونه‌ها از محلول بوئن استفاده گردید (برای ساخت این محلول مقدار ۷۵ میلی لیتر اسید پیکریک اشباع با ۲۵ میلی لیتر فرمالین ۳۷ درصد و ۵ میلی لیتر اسید استیک گلاسیال مخلوط شد). بعد از انجام مراحل آبگیری، پارافین دهی و قالب گیری، مقاطع پارافینی از بافت‌های سلول‌زدایی شده در هر گروه تهیه و به منظور بررسی موفقیت سلول‌زدایی، از رنگ آمیزی‌های هماتوکسیلین-ئوزین و پیکروفوشین استفاده شد. برای شمارش سلول‌هایی که در فرایند سلول زدایی از بین نرفته و در ماتریکس حضور دارند، از هر کدام از گروه‌های که با درصد متفاوتی از SDS سلول زدایی شده‌اند به طور تصادفی ۲۰ مقطع بافتی انتخاب و با استفاده از عدسی مدرج میکروسکوپ نوری و با درشت‌نمایی ۴۰x شمارش شد. جهت تعیین اختلاف معنی دار، با استفاده از نرم افزار آماری Minitab ویرایش ۱۶ و آنالیز ANOVA تست Tukey انجام گرفت و نمودار با استفاده از نرم افزار Excel رسم گردید. از نظر آماری مقادیر ($P < 0/05$) معنی دار در نظر گرفته شد.

کشت بافت: جهت کشت، از نمونه‌های سلول زدایی شده با غلظت ۱ درصد SDS که به طور کامل سلول زدایی شده بودند استفاده شد. بعد از سلول زدایی، نمونه‌ها به مدت نیم ساعت در الکل ۷۰ درجه و به مدت یک ساعت در PBS استریل قرار داده شدند. در آخرین مرحله نمونه‌ها به مدت ۲۴ ساعت در محیط کشت، DMEM (Dulbeccos modified Eagle medium، Euro clone) همراه با ۱۵ درصد سرم جنینی گاو (FBS) (Fetal bovine serum, biosera) در انکوباتور ۳۷ درجه سانتی‌گراد با CO_2 ، ۵ درصد نگهداری شدند.

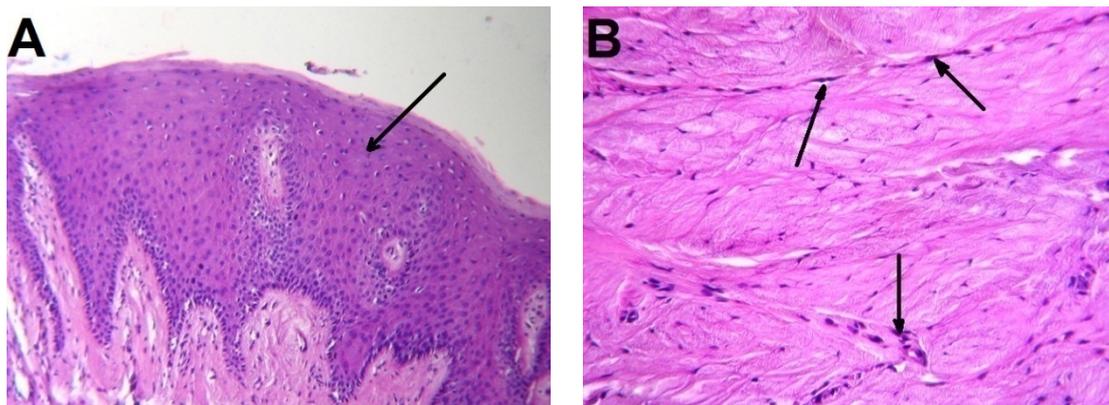
نتایج کشت بافت

رفتار سلول های بافت بلاستما در داربست سه بعدی لثه کامی در شرایط *in vitro* بعد از ۵، ۱۰، ۱۵، ۲۰، ۲۵ روز بررسی شد. نتایج هیستولوژیک نشان داد که ۵ روز پس از کشت هیچ سلول بلاستمایی به داربست نفوذ نکرده بود. مهاجرت سلول های بلاستما از روز ۱۰ در ماتریکس مشاهده شد و در روزهای ۱۵ و ۲۰ به ترتیب سلول های بیشتری در ماتریکس نفوذ کرده بود. از روز ۱۵ به بعد تمایز سلول ها به شبه فیبروبلاست مشاهده شد (شکل ۴).

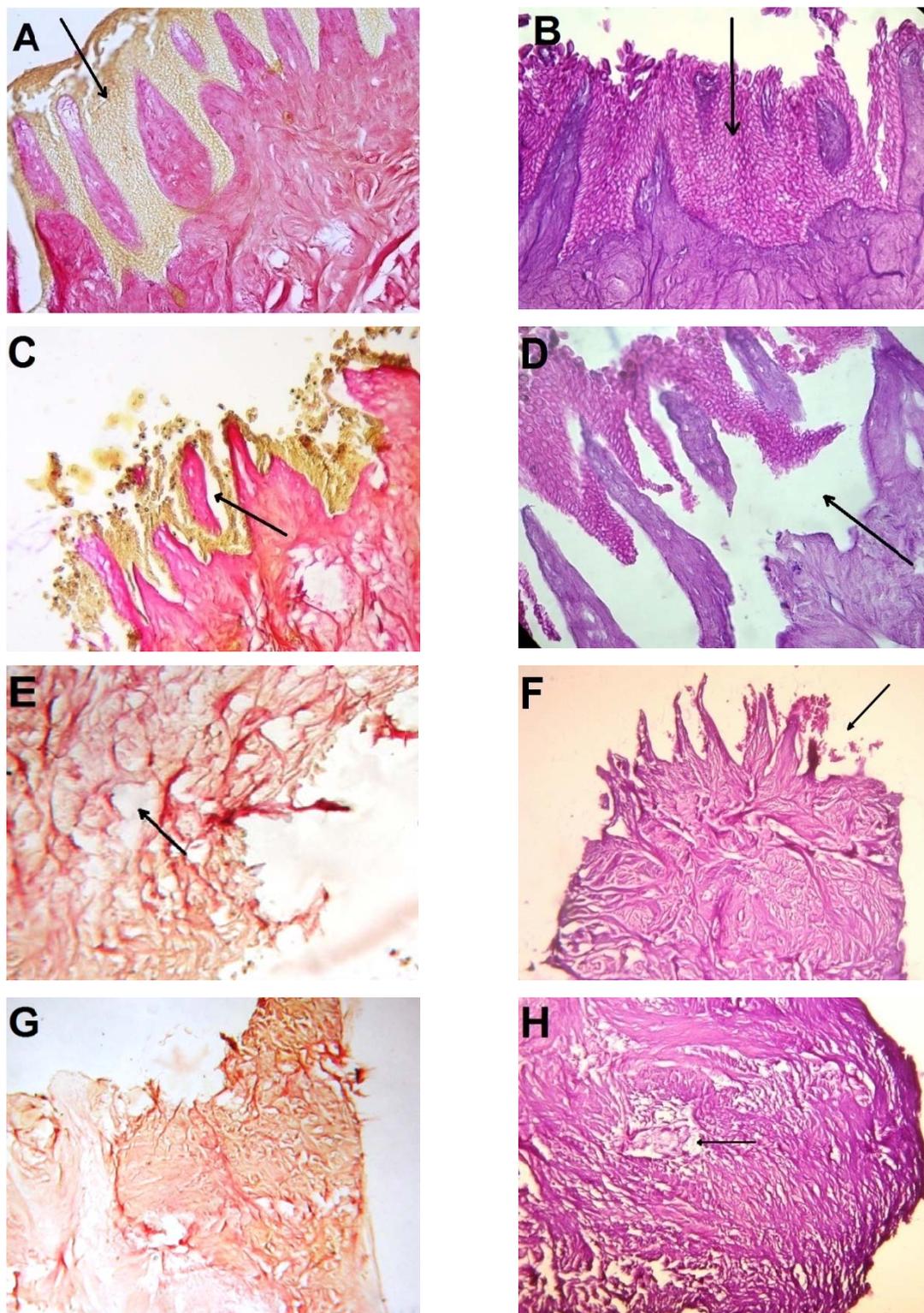
مشاهده بود (شکل ۲، C و D). در غلظت ۰/۵ درصد SDS لایه اپی تلیوم حذف ولی لایه بازال باقی مانده بود. از تغییرات واضح در بافت همبند می توان به تخریب الیاف کلاژن اشاره نمود که باعث ایجاد تخلخل در ماتریکس شده بود (شکل ۲، E و F). در غلظت ۰/۷۵ درصد SDS لایه بازال در اغلب نواحی حذف شده بود و تخلخل ماتریکس نیز افزایش یافته بود (شکل ۲، G و H). و در نهایت در غلظت ۱ درصد SDS چهارچوب اپی تلیوم و لایه بازال کاملاً حذف شده بود (شکل ۳). با کاهش غلظت SDS احتمال حضور سلول ها در داربست افزایش می یابد (نمودار ۱).



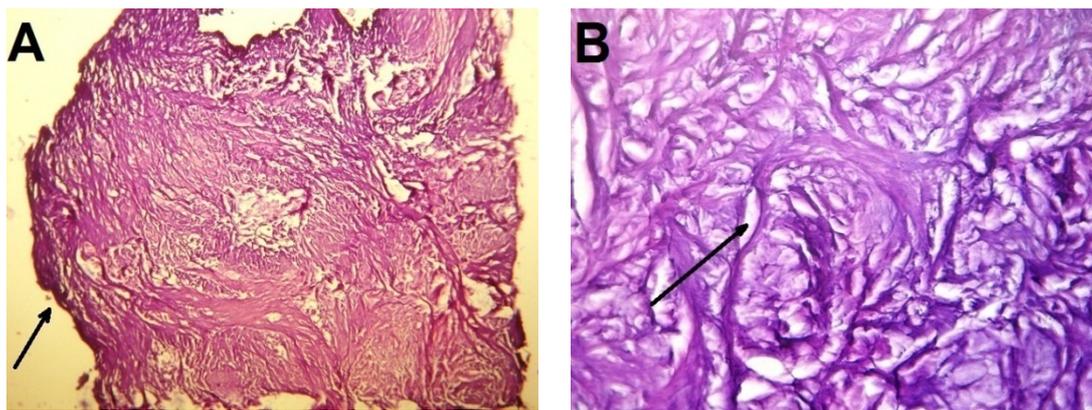
نمودار ۱: میانگین تعداد سلول ها در داربست های سلول زدایی شده با درصد های متفاوتی از سدیم دودسیل سولفات (SDS) میانگین ها به صورت $Mean \pm SEM$ نمایش داده شدند ($P = 0.001$)***نسبت به غلظت ۱ درصد.



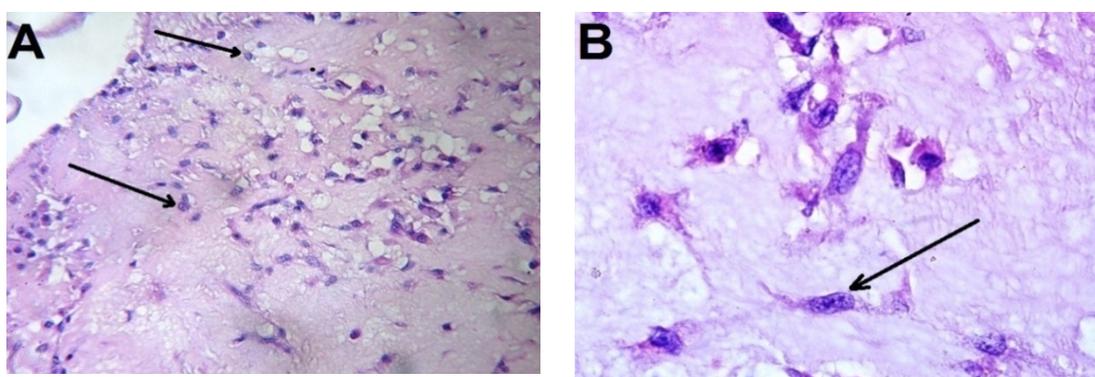
شکل ۱: نمونه های بافت لثه کامی کنترل. (A) فلش نشان دهنده اپی تلیوم کراتینیزه. (بزرگ نمایی ۱۰۰X). (B) بافت همبند. فلش ها نشان دهنده فیبروبلاست ها می باشد (بزرگ نمایی ۴۰۰X). رنگ آمیزی همانوکسیلین-ائوزین.



شکل ۲: بافت سلول زدایی شده لته کامی در غلظت های مختلف سدیم دودسیل سولفات (SDS)؛ (A-B) غلظت ۰/۱ درصد، فلش ها نشان دهنده لایه اپی تلیوم بوده که به بافت همبند متصل هستند. (C-D) غلظت ۰/۲۵ درصد، فلش ها نشان دهنده جدا شدن اپی تلیوم از بافت همبند می باشند. (E-F) غلظت ۰/۵ درصد، فلش ها در شکل E تخریب الیاف کلاژن و در شکل F بقایای اپی تلیوم بر روی بافت همبند را نشان می دهند. (G-H) غلظت ۰/۷۵ درصد، فلش ها نشان دهنده تخریب ماتریکس می باشند. (A, C, E, G) رنگ آمیزی پیکروفوشین جهت نشان دادن رشته های کلاژن (A, B, D, F, H) رنگ آمیزی هماتوکسیلین-انوزین (بزرگ نمایی X ۴۰۰).



شکل ۳: بافت سلول زدایی شده لته کامی با غلظت ۱ درصد (A) فلش نشان دهنده از بین رفتن اپی تلیوم به طور کامل است (بزرگ نمایی 100X). (B) بافت همبند که به طور کامل سلول زدایی شده. فلش نشان دهنده تخلخل به وجود آمده در ماتریکس است (بزرگ نمایی 400X). رنگ آمیزی هماتوکسیلین-انوزین.



شکل ۴: مطالعه برهمکنش بین بافت بلاستما و داربست لته کامی در روز ۲۵ پس از کشت. (A) نمای کلی از داربست و سلول‌های بلاستمایی نفوذ یافته به داخل داربست که توسط فلش‌ها نشان داده شده‌اند. (بزرگ نمایی 400X). (B) سلول‌های نفوذ یافته و تمایز آنها به سلول‌های شبه فیبروبلاست (بزرگ نمایی 1000X) رنگ آمیزی هماتوکسیلین-انوزین.

طبق نتایج، کاهش غلظت SDS به طور معنی داری باعث کاهش سلول زدایی بافت لته کامی شد که این کاهش غلظت، تغییرات هیستولوژیکی متفاوتی را به دنبال داشت. یکی از موارد مهم در سلول زدایی، راندمان حذف سلول از بافت می باشد که وابسته به نوع بافت و روش‌های فیزیکی، شیمیایی و آنزیماتیک به کار گرفته شده می‌باشد. هر یک از این روش‌ها در فرایند سلول زدایی روی ترکیبات بیوشیمیایی داربست تاثیر دارند (۶). با توجه به نحوه عمل دترجنت‌های یونی از قبیل SDS در حل کردن سلول و غشای هسته و همچنین حفظ ماهیت پروتئین‌های سیتوپلاسمی، این نوع دترجنت‌ها تاثیر کارآمدی در سلول زدایی بافت‌ها دارند. علاوه بر آن با توجه به تاثیر میزان غلظت این مواد در ایجاد سمیت و همچنین آسیب‌هایی که به کلاژن وارد می‌کنند، غلظت‌های استفاده شده از این نوع دترجنت‌ها نیز بسیار مهم و ضروری می‌باشد (۱۴، ۱۵، ۱۶). از این رو در این تحقیق غلظت‌های متفاوتی از SDS را برای ایجاد یک داربست مطلوب مورد آزمایش قرار گرفت. Schaner و همکاران

بحث

فرایندهای ریخت زایی و اندام زایی، تحت کنترل کمپلکسی از مکانیسم‌های تنظیمی هستند که تعیین کننده ویژگی‌های سلول‌ها و بافت‌های مختلف، به سمت سازمان یابی صحیح در بافت و یا اندام می‌باشد. مولکول‌های تنظیم کننده این مکانیسم‌های تنظیمی هم مواد قابل انتشاری هستند که توسط رسپتورهای سطح سلولی ویژه شناسایی می‌شوند و هم اجزای ماتریکس خارج سلولی‌اند که اعمال متقابل سلول-سلول و سلول-سلول را تنظیم می‌کنند و رفتار سلول و بافت مورد نظر را تعیین می‌نمایند (۱۳). در این پژوهش ابتدا با عملیات سلول زدایی، داربستی مشتق شده از ECM لته کامی به دست آمد که از دو روش فیزیکی و شیمیایی برای این کار استفاده شد. در روش فیزیکی از انجماد آهسته و سریع استفاده شد و استدلال این کار این بود که تشکیل کریستال‌های یخ می‌تواند به تخریب غشاء کمک کند. همچنین در مرحله شیمیایی سلول زدایی از SDS به عنوان ماده سلول زدا استفاده گردید.

موجب تشکیل بافت ها و ارگان های مختلفی از قبیل، پر، پولک، دندان ها، اپی درمیس، کبد، غدد بزاقی و مخاط دهان می گردد. و مشخص شده است که بافت همبند در زیر اپی تلیوم باعث تمایز اپی تلیوم پوشاننده می گردد (۲۱). در واقع تفاوت سلولی یک اپی تلیوم کراتینیزه با غیر کراتینیزه در تنوع سایتوکراتین های موجود در لثه است که کراتینیزه شدن را به همراه خواهد داشت. با توجه به مطالب عنوان شده می توان گفت که تفاوت در بافت همبند زیرین می تواند تنوع در سایتوکراتین ها را باعث گردد (۲۲). پس ماتریکس خارج سلولی بافت همبند که توسط فرایند سلول زدایی بدست می آید می تواند در جهت ایجاد داربست های مناسب برای تحقیقات مهندسی بافت مورد استفاده قرار بگیرد. Ott و همکارانش (۲۳) با بکار بردن قلب های گرفته شده از موش و بکار بستن تکنیک سلول زدایی کامل از اندام بر روی آنها و نهایتاً تزریق ترکیبی از سلول های زنده به این اندامها، موفق به تولید بافت فعال قلبی شده اند. Guo-feng و همکارانش (۲۴) توسط آنزیم های تریپسین و ریونوکلئاز، آنورت جنین خوک را سلول زدایی کردند که نتیجه آن تولید داربستی جهت مهندسی بافت رگی بود. نتایج آنها نشان داد که سلول های اندوتلیالی چسبندگی و تکثیر خود را بر روی این داربست بخوبی حفظ می کنند. Long و همکاران (۲۵) دریچه قلب خوک را با غلظت های مختلف تریپسین و سپس DNase تیمار کردند. این دریچه با استفاده از میکروسکوپ نوری، SEM و TEM مورد بررسی قرار گرفت که نتیجه آن تولید یک داربست فاقد سلول بود. بعد از این سلول های اندوتلیالی خوک و انسانی و همچنین میوفیبروبلاست های سگی به روی این داربست اضافه شد. آنالیز های میکروسکوپ الکترونی و رنگ آمیزی هماتوکسیلین-ائوزین و ایمنوهیستوشیمی نشان داد که این سلول ها به سطح و درون این داربست نفوذ کرده و شروع به رشد و تکثیر نموده اند.

در حالت طبیعی بعد از پانچ گوش خرگوش، رشد اپی تلیوم گوش خرگوش نژاد نیوزلندی به صورت رشد به طرف مرکز می باشد و این باعث ترمیم سوراخ ایجاد شده در گوش خرگوش در شرایط *in vivo* می گردد. در اینجا از این خاصیت گوش خرگوش استفاده شد و بعد از قرار دادن حلقه بلاستمایی در مجاورت داربست، برهمکنش آن در روزهای مختلف بررسی گردید (۲۶). توسلی و همکاران (۲۷) با کشت بافت بلاستما در کنار ماتریکس خارج سلولی استخوان اسفنجی و غضروف مفصلی نشان دادند که کشت بافت بلاستما که دارای سلول های پویایی است، در کنار داربست مشتق شده از ماتریکس خارج سلولی که ویژگی سه بعدی دارد می تواند مدل مناسبی جهت بررسی رفتارهایی همچون قطبیت و حرکت سلولی در شرایط *in vitro* باشد.

(۱۷) با استفاده از SDS با غلظت ۰/۱ درصد، بافت دیواره رگ را به میزان ۹۶ درصد سلول زدایی کردند و توسط میکروسکوپ الکترونی و مطالعات ایمنوهیستوشیمی، ثابت کردند که در این غلظت SDS، ماتریکس خارج سلولی و ساختار غشای پایه حفظ شده و بافت مقاومت کافی را برای پیوند و استفاده در مطالعات مهندسی بافت دارا می باشد. بافت همبند لثه که دارای مقادیر زیادی کلاژن نوع I و III می باشد، بخش اصلی داربست را تشکیل داده است و از آنجا که تراکم کلاژن بر روی رفتارهای سلولی موثر می باشد، حفظ آن پس از فرایند سلول زدایی حائز اهمیت است. همچنین حفظ غشاء پایه و اپی تلیوم در تهیه داربست از نکات جالب توجه می باشد زیرا می تواند تاثیر مهمی بر روی رفتارهای سلولی از جمله مهاجرت و تمایز سلول ها به کراتینوسیت ها داشته باشد (۱۸). همانطور که در قسمت نتایج اشاره شد کاهش غلظت SDS به پایین تر از ۰/۵ درصد تفاوت های قابل ملاحظه ای نسبت به غلظت های بالاتر نشان می دهد. نخستین تفاوت میزان تخلخل کمتر داربست و به هم پیوستگی بافت همبند بود. دومین تفاوت حفظ ساختار اپی تلیوم بر روی بافت همبند بود که با توجه به تخریب هسته و اجزای سلولی اپی تلیوم به شکل یک توری خالی از سلول باقی مانده بود. همچنین این نکته قابل ذکر است که در داربست هایی که با غلظت پایین تر سلول زدایی شدند احتمال حضور سلول ها نیز افزایش می یابد که این خود از موانع و مشکلات در جهت تهیه داربست مطلوب می باشد. به نظر می رسد با توجه به حفظ ساختار اپی تلیوم، غشای پایه نیز حفظ شده باشد اما این امر نیازمند بررسی با مطالعات ایمنوهیستوشیمی و رنگ آمیزی های اختصاصی می باشد تا نتایج رضایت بخشی را به همراه داشته باشد.

با این توضیح چرا داربست های زیستی که از ماتریکس خارج سلولی تشکیل شده اند برای کاربردهای پزشکی ترمیمی و جایگزینی بافت ها یا ارگان ها مناسب هستند؟ مطالعات نشان داده است که ECM شامل اجزای ساختاری مانند انواع کلاژن، گلیکوپروتئین ها، اسیدهیالورونیک، گلیکوزآمین گلیکان ها، رتیکولین و الاستین است که جهت اتصال ECM با گیرنده های سلولی مناسب هستند. ECM در واقع نمایان گر محصولات ترشح شده از سلول های مستقر در هر بافت یا ارگان می باشد (۱۹). Karring و همکارانش (۲۰) در مطالعه ای که بر روی هفت میمون با پیوندهای خاصی که در ناحیه حفره دهانی انجام داده بودند با در نظر گرفتن کراتینیزه شدن اپی تلیوم غیر کراتینیزه توسط بافت همبند، مشخص گردید که بافت همبند در زیر اپی تلیوم باعث تمایز اپی تلیوم پوشاننده می گردد. اثرات متقابل بافت های Epithelio-Mesenchymal در دوران جنینی

منابع

1. Ennett AB, Mooney DJ. Tissue engineering strategies for in vivo neovascularisation. *Expert Opin. Biol. Ther.* 2002; 2:805-818.
2. Langer R, Vacanti JP. Tissue engineering. *Science.* 1993; 260: 920-926.
3. Koh CJ, Atala A. Tissue engineering, stem cells and cloning: opportunities for regenerative medicine. *Journal of American Society of Nephrology.* 2004; 15: 1113-1125.
4. Cao Y, Lees J. Scaffolds, stem cells and tissue engineering: A potent combination. *Australian Journal of Chemistry.* 2005; 58(10): 691-703.
5. Ranjna C, Aroop K. Comprehension of ECM-Cell dynamics: A prerequisite for tissue regeneration. *Biotechnology Advances.* 2010; 28: 764-769.
6. Gilbert TW, Sellaro TL, Badylak SF. Decellularization of tissues and organs. *Biomaterials.* 2006; 27: 3675-3683.
7. Yoshito Ikada. Challenges in tissue engineering: *J. R. Soc. Interface.* 2006;3(10): 589-601.
8. Darnell Kaigler, David Mooney. Tissue Engineering's Impact on Dentistry. *Journal of dental education.* 2001; 65: 691-703.
9. Gronthos S, Mankani M, Brahim J, Robey PG, Shi S. Postnatal human dental pulp stem cells (DPSCs) in vitro and in vivo. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2000; 97: 13625-13630.
10. Thibodeau B, Teixeira F, Yamauchi M, Caplan D, Trope M. Pulp revascularization of immature dog teeth with apical periodontitis. *J Endod.* 2007; 33: 68-90.
11. Feng Z, Yamato M, Akutsu, Nakamura T, Okano T, Umezumi M. Investigation on the mechanical properties of contracted collagen gels as a scaffold for tissue engineering. *Artificial Organs.* 2003; 27: 84-90.
12. Paul GJ, Gerjo JVM, Carel DA, Henriette L. A new in vivo model for testing cartilage grafts and biomaterials: the rabbit pinna punch-hole model. *Biomaterials.* 2001; 22: 1407-1414.
13. Brown B, Lindberg K, Reing J, Stolz DB, Badylak SF. The basement membrane component of biologic scaffolds derived from extracellular matrix. *Tissue Eng.* 2006; 12(3): 519-526.
14. Alhamdani MS, Schroder C, Werner J, Giese N, Bauer A, et al. Singlestep procedure for the isolation of proteins at near-native conditions from mammalian tissue for proteomic analysis on antibody microarrays. *J Proteome Res.* 2010; 9(2): 963-971.
15. 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; 31(33): 8626-8633.
16. Yang B, Zhang Y, Zhou L, Sun Z, Zheng J, Chen Y, et al. Development of a porcine bladder

مطالعه در روز پنجم بعد از کشت نشان داد که هیچ سلولی به درون داربست مهاجرت نکرده است. مهاجرت سلول های بلاستمایی از روز پانزدهم بعد از کشت آغاز شد و اوج نفوذ سلول ها به درون داربست در روز بیست و پنجم مشاهده شد. در این روز تغییر شکل سلول های بافت بلاستما و کشیده شدن این سلول ها را می توان مشاهده کرد. Yamada K و همکارانش (۲۸) با کشت فیبروبلاست های لثه بر روی اسفنج هایی از کلاژن نو ترکیب تیپ I و III انسانی کشت دادند و این اسفنج را در محیط کشت قرار داده، تکثیر فیبروبلاست ها پس از چند روز در داربست محتوی کلاژن تیپ III نسبت به نوع I بیشتر بود و نشان دادند که این لثه تشکیل شده در محیط کشت به دلیل تکثیر خوب سلولی و آزاد شدن فاکتور رشد مشتق شده از اندوتلیال رگی در محیط کشت می تواند در درمان کلینیکی برای بیماریهای لثه استفاده شود. با توجه به این که بافت لثه کامی شامل مقادیر بالایی کلاژن نوع I و III می باشد در نتیجه می تواند عاملی برای القاء تمایز سلول های بافت بلاستما به سمت فیبروبلاست باشد.

نتیجه گیری

نتایج ما در بخش اول این پژوهش یعنی سلول زدایی از بافت لثه کامی انسان و تشکیل یک داربست سه بعدی از ECM این بافت نشان داد که غلظت های متفاوتی از دترجنت یونی SDS که به طور گسترده در فرایندهای سلول زدایی مورد استفاده قرار می گیرد، نتایج متفاوتی را در پی دارد. نتایج این تحقیق نشان می دهد امکان تهیه یک داربست طبیعی از بافت لثه کامی به وسیله تیمار با SDS وجود دارد. ما در قسمت پایانی این آزمایش جهت تست داربست، از سلول های شبه جنینی بافت بلاستما لاله گوش خرگوش نر نیوزلندی برای کشت در داربست سه بعدی تهیه شده با غلظت ۱ درصد که به طور کامل سلول زدایی شده بود استفاده کردیم تا تاثیرات ماتریکس خارج سلولی را بر روی این سلول های تمایز نیافته مشاهده کنیم. نتایج اولیه و بررسی های هیستولوژیکی نشان داد که داربست های سلول زدایی شده لثه کامی می تواند مدل سه بعدی مناسبی برای حرکت، تمایز، چسبندگی و مهاجرت سلول ها باشد.

تشکر و قدردانی

مراتب سپاس بی پایان خود را از تمامی اساتید بزرگوارم ابراز داشته و همچنین از مدیریت محترم گروه زیست شناسی و معاونت پژوهشی دانشگاه آزاد مشهد که تامین کننده بخشی از هزینه های مالی پایان نامه بودند تشکر می نمایم.

- acellular matrix with well-preserved extracellular bioactive factors for tissue engineering. *Tissue Eng Part C Methods*. 2010; 16(5): 1201-1211.
17. Schaner PJ, Martin ND, Tulenko TN, Shapiro IM, et.al. Decellularized vein as a potential scaffold for vascular tissue engineering. *Journal of Vascular Surgery*. 2004; 40: 146-153.
18. Liang R, Woo SL, Nguyen TD, Liu PC, Almarza A. Effects of a bioscaffold on collagen fibrillogenesis in healing medial collateral ligament in rabbits. *J Orthop Res*. 2008; 26(8): 1098-1104.
19. Bock N, Riminucci A, Dionigi C, Russo A, et.al. A novel route in bone tissue engineering: Magnetic biomimetic scaffolds. *Acta Biomaterialia*. 2010; 6: 786-796.
20. Karring T, Lang NP, Loe H. Rol of connective tissue in determining epithelial Differentiation. *J.Perio.Res*. 1974; 10: 1792-1798.
21. Ledo Arin, N: An experimental analysis of liver development. *Med.biol*. 1975; 53: 427-432.
- 22- Mackenzie IC, Fusening E. Regeneration of organized ephithelial structure. *J.Invest. Dermato*. 1983; 81: 1895-1903.
23. Ott CH, Matthiesen ST, Goh KS, Black DL et.al. Perfusion- decellularized matrix: using nature's platform to engineer a bioartificial heart. *Nature Medicine*. 2008; 14:213-221.
24. Guo-feng LIU, Zhi-juan HE, Xue-feng HAN, et.al. Decellularized aorta of fetal pigs as a potential scaffold for small diameter tissue engineered vascular graft. *Chinese medical journal*. 2008; 121(15): 1389-1406.
25. Long L, Wu C , Pan L, Qi X , et.al, Preparation of heart valve scaffold and cell seeding. *Sheng Wu Yi, Xue Gong Cheng Xue Za Zhi*. 2004; 21(4):610-623.
26. Gardiner, DM, Muneoka K, Bryant SV. The migration of dermal cells during blastema formation in axolotls. *Dev Biol*. 1986; 118(2): 488-493.
27. Tavassoli A, Shahabipour F, Mahdavi Shahri N, Moghadam Matin M, Fereidoni M. [In vitro experimental study of interaction between blastema tissue and three-dimensional matrix derived from bovine cancellous bone and articular cartilage.] *Journal of Cell & tissue*. 2010; 1(1): 53-62. Persian.
28. Yamada K, Yamaura J, Katoh M, Hata K, et.al. Fabrication of cultured oral gingiva by tissue engineering techniques without materials of animal origin. *J Periodontol*. 2006; 77(4): 672-677.

A Case Study of Decellularization of Human Palatal Gingiva Tissue and Preparation Three-Dimensional Model for Use in Primary Research Gingival Tissue Engineering

Cheravi M^{1*}, Mahdavi shahri N¹, Baharara J¹, Banihashem Rad SA², Khayat zadeh J¹, Nejad shahrokh abady KH¹, Naderi S¹

1. Department of Biology, Faculty of Sciences, Islamic Azad University, Mashhad Branch, Mashhad, Iran

2. Department of Periodontics, School of Dentistry and Dental Research Center of Mashhad University of Medical Sciences, Mashhad, Iran

* Email corresponding author: Mojtaba_cheravi@yahoo.com

Received: 17 Aug. 2011

Accepted: 8 Nov. 2011

Abstract

Aim: The main goal of this research was to prepare a three-dimensional matrix from gingival palate tissues and investigate the possible application of this scaffold in cell culture and tissue engineering.

Materials and methods: In order to fabricate the scaffolds, the biopsy samples of human palate gingival tissue were prepared surgically and divided in 5 groups then decellularization of the samples were carried out via physical method (put in nitrogen tanks and rinsing with distilled water) as well as chemical method using different concentrations of SDS (0.1%, 0.25%, 0.5%, 0.75% and 1%). Furthermore to evaluate the scaffold prepared with 1% SDS, embryonic like cells from blastema tissue were seeded on the three-dimensional scaffold.

Results: Concentration of SDS below 0.5% caused significant reduction ($p < 0.05$) of decellularization of the tissues. Microscopic studies of blastema tissue on the scaffold in different days revealed the penetration, migration, adhesion and differentiation of the cells.

Conclusion: This study showed that, it is possible to prepare a natural scaffold from palatal gingiva tissue using SDS treatment. On the other hand, the results of histologic studies showed that the decellularized scaffolds of palatal gingiva might be suitable as three-dimensional bioscaffold for movement, adhesion, differentiation and migration of cells. More investigation is needed to determine the identity of the differentiated cells which further it can help to improve our knowledge about cell-matrix interaction.

Key words: Blastema tissue, Decellularization, Palate gingiva tissue, Tissue engineering