

مقایسه رفتار سلول‌های بنیادی مزانشیمی مغز استخوان رت و سلول‌های بلاستمایی لاله گوش خرگوش کاشته شده در داربست بافت فاقد سلول لته انسان

ناصر مهدوی شهری^{۱*} Ph.D.، مریم مقدم متین^۲ Ph.D.، مسعود فریدونی^۳ Ph.D.، احمد رضا بهرامی^۴ Ph.D.، سعیده خواجه احمدی^۱ Ph.D.، زهرا یارجانلی^۴ M.Sc.، سمیه نادری^۴ M.Sc.، مرتضی بهنام رسولی^۱ Ph.D.، علی مقیمی^۲ Ph.D.، محمد علیزاده نمینی^۲ M.Sc.

- ۱- گروه تحقیقاتی بیوتکنولوژی سلول‌های بنیادی، پژوهشکده فناوری زیستی، دانشگاه فردوسی مشهد، مشهد، ایران
 - ۲- گروه زیست شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه فردوسی مشهد، مشهد، ایران
 - ۳- گروه پاتولوژی دهان، فک و صورت، مرکز تحقیقات دندانپزشکی، دانشگاه علوم پزشکی مشهد، مشهد، ایران
 - ۴- دانش آموخته کارشناسی ارشد، گروه زیست شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه فردوسی مشهد
- * پست الکترونیک نویسنده مسئول: Mahdavin@um.ac.ir

تاریخ پذیرش: ۱۳۹۱/۲/۲۴

تاریخ دریافت: ۱۳۹۰/۶/۲۳

چکیده

هدف: هدف از این مطالعه تهیه ماتریکس‌های سه بعدی از بافت لته انسان و مقایسه القا رفتارهای سلول‌های بنیادی مزانشیمی و بلاستمایی در داربست‌های تهیه شده بود.

مواد و روش‌ها: بافت‌های حاصل از جراحی‌های لته در کلینیک دندانپزشکی با استفاده از دو شوینده سدیم دودسیل سولفات و تریتون X-100 سلول‌زدایی شدند و پس از مراحل شستشو و استریلیزاسیون، به عنوان داربستی جهت کشت با سلول‌های بنیادی مزانشیمی مغز استخوان رت مورد استفاده قرار گرفتند. این داربست‌ها قبل و پس از ۲۱ و ۴ هفته کشت سلول بر روی آن‌ها با استفاده از میکروسکوپ نوری و الکترونی بررسی شدند. همچنین داربست سه بعدی تهیه شده، در حلقه بلاستمایی حاصل از پانچ لاله گوش خرگوش قرار داده شد و نمونه‌ها پس از ۱، ۲ و ۴ هفته بعد از کشت بر اساس تکنیک‌های هیستولوژی مورد ارزیابی قرار گرفتند.

نتایج: مطالعه داربست‌ها با میکروسکوپ الکترونی نگاره حفظ ماتریکس اپی‌تلیوم و رشته‌های کلاژن موجود در بافت را نشان داد. در هر دو نمونه ساختارهایی مشابه اپی‌تلیوم ایجاد گردید. علاوه بر آن در سلول‌های بلاستمایی مهاجرت یافته به داربست، القا ترشح سلولی نیز مشاهده شد.

نتیجه گیری: داربست حاصل از لته انسان، می‌تواند بستر مناسبی جهت بررسی رفتارهای سلولی باشد. البته آزمایش‌های بیشتر جهت تعیین ماهیت سلول‌های تمایز یافته می‌توانند به پیشرفت دانش ما در رابطه با برهم‌کنش‌های سلول ماتریکس کمک کنند.

واژگان کلیدی: سلول‌های بنیادی مزانشیمی، بافت بلاستما، لته، ماتریکس سه بعدی

مقدمه

هر بافتی در بدن از سلول‌ها و یک ماتریکس خارج سلولی تشکیل شده که ماتریکس نقش یک داربست سه بعدی را دارد. سلول‌ها در سطح این داربست قرار می‌گیرند و به طور مداوم با آن در تعامل هستند (۱ و ۲).

داربست‌های سنتزی و طبیعی از انواع داربست‌های مورد استفاده در مهندسی بافت می‌باشند (۳). از آنجا که در داربست‌های بیولوژیکی مشتق از بافت‌ها و اندام‌های سلول‌زدایی شده، آنتی‌ژن‌های سلولی حذف شده و بسیاری از پروتئین‌های ساختاری و عملکردی ماتریکس خارج سلولی حفظ می‌شوند، این داربست‌ها به طور موفقیت آمیزی در مهندسی بافت مورد استفاده قرار گرفته‌اند. هدف از فرایند سلول‌زدایی، برداشت مواد سلولی و هسته‌ای و در عین حال حفظ یکپارچگی و به حداقل رساندن هر گونه آسیب به ترکیب و فعالیت زیستی ماتریکس خارج سلولی می‌باشد. تاکنون مطالعات زیادی در زمینه روش‌های آماده سازی داربست‌ها صورت گرفته و بافت‌های مختلفی از جمله مئانه، سیستم عروقی، دریچه‌های قلب، غضروف زانو، رباط و تاندون به منظور تولید جایگزین‌های بافتی، سلول‌زدایی شده‌اند و در بسیاری از این مطالعات از سدیم دودسیل سولفات (SDS) و یا تریتون برای سلول‌زدایی بافت استفاده شده است (۴).

بافت مخاط دهان از دو جز شامل اپی‌تلیوم سنگفرشی مطبق و بافت همبند در زیر آن تشکیل شده است. در بافت همبند، دونوع رشته اصلی کلاژن (بیشتر نوع I و III) و الاستین مشاهده می‌شود. این بافت دارای اجزا سلولی و خارج سلولی است که جز خارج سلولی شامل الیاف و ماده زمینه‌ای است و این ماده زمینه‌ای فضای موجود در بین سلول‌ها و الیاف را پر می‌کند و حاوی مقدار زیادی آب، پروتئوگلیکان‌ها (اسید هیالورونیک و کندرویتین سولفات) و گلیکوپروتئین‌ها (عمدتا فیبرونکتین) می‌باشد (۵).

Yamada و همکارانش (۶) فیبروبلاست‌های لثه را بر روی اسفنج‌هایی از کلاژن نو ترکیب نوع I و III انسانی کشت و این اسفنج را در محیط کشت قرار دادند. تکثیر فیبروبلاست‌ها پس از چند روز در داربست محتوی کلاژن نوع III نسبت به نوع I بیشتر بود.

Izumi و همکارانش (۷) سلول‌های اپی‌تلیال گرفته شده از مخاط دهان بیمار را ۴ هفته قبل از جراحی روی یک ماتریکس درم آلژینیک فاقد سلول (آلودرم) کشت دادند و از آن برای پیوند

داخل دهانی استفاده نمودند.

یکی از سلول‌های مورد استفاده در مهندسی بافت‌های مختلف، سلول‌های بنیادی مزانشیمی می‌باشد. در ابتدا تصور بر این بود که پتانسیل تمایزی این سلول‌ها محدود به دودمان‌های سلولی مزانشیم است (۵). اما بعدها مشخص گردید که در شرایط متفاوت کشت، توانایی تمایز به سلول‌هایی با منشا غیر مزانشیم را نیز دارا می‌باشند (۸). از این رو از سلول‌های بنیادی مزانشیم در درمان آسیب‌های نخاعی، ایسکمی‌های میوکاردی، آسیب به استخوان، بیماری‌های نورودژنراتیو و پوست استفاده گردیده است (۹ و ۱۰).

سلول‌ها در طی تمایز کراتینوسیتی دستخوش تغییرات اسکلت سلولی و مورفولوژیکی می‌گردند. تغییر مورفولوژیکی اصلی پهن شدن پیش رونده سلول می‌باشد. همچنین اجسام غشا دار مختلف شامل گرانول کراتوهیالین درون سلول پدیدار می‌گردند. علاوه بر این، اتصالات دسموزومی میان سلول‌ها تشکیل شده و در ادامه روند تمایز، بخش عمده‌ای از ماکرومولکول‌ها و اندامک‌های درون سلولی از بین می‌روند (۱۱). زمانی که زخمی ایجاد می‌گردد، نه تنها کراتینوسیت‌های موجود در مجاورت زخم، بلکه کراتینوسیت‌های موجود در ضمیمه پوستی نیز به بستر زخم مهاجرت می‌کنند و جزایر کوچکی تشکیل داده و در بازسازی اپیتلیوم مشارکت می‌نمایند (۱۲).

سلول‌های بافت بلاستما، که در ناحیه سوراخ شده لاله گوش خرگوش بصورت حلقوی تشکیل می‌گردد سلول‌های با ویژگی سلول‌های بنیادی بوده و می‌توانند تحت تاثیر عوامل محیطی در جهات مختلف تمایز یابند (۱۳).

هدف از انجام این مطالعه بررسی تعامل بین سلول‌های بنیادی مزانشیمی در مقایسه با سلول‌های بافت بلاستمای لاله گوش خرگوش در داربست سه بعدی طبیعی بدست آمده از بافت لثه انسان می‌باشد.

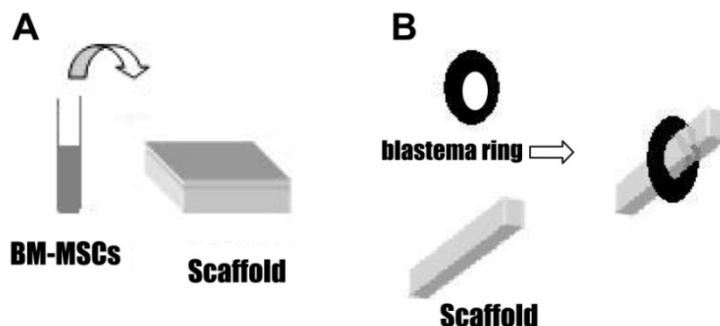
مواد و روش‌ها

نمونه‌های لثه انسان با کمک متخصص و جراح لثه در کلینیک تخصصی دندانپزشکی و با رعایت اصول اخلاقی مربوطه تهیه گردید. نمونه‌ها متعلق به مردان و زنان ۲۰ تا ۴۰ ساله، فاقد بیماری‌های سیستمیک و غیرسیگاری بودند که جهت درمان‌های ترمیمی-پروتز و جراحی دندان عقل نهفته به کلینیک مراجعه نموده بودند. قطعات لثه حاصل از جراحی‌ها در سرم فیزیولوژی

در گروه A برای کشت سلول‌ها بر روی داربست‌های سلول‌زدایی شده لته، ابتدا آن‌ها را تریپسینه نموده تا از فلاسک جدا گردند. پس از سانتریفیوژ و تعیین تعداد سلول‌ها با لام نئوبار، سوسپانسیون سلولی با تراکم 2×10^5 سلول در $50 \mu\text{l}$ میکرولیتر تهیه گردید. داربست‌ها پس از ۲۴ ساعت نگهداری در محیط کشت، در ظروف کشت ۲۴ خانه ای قرار گرفتند و 2×10^5 سلول بنیادی مزانشیم مغز استخوان بر روی آن‌ها کشت شد (شکل ۱A). یک ساعت پس از افزودن سوسپانسیون سلولی به داربست‌ها، به هر چاهک ۱ میلی‌لیتر محیط کشت افزوده شده و ظرف کشت به انکوباتور انتقال یافت و هر ۳ تا ۴ روز یک بار محیط کشت آن تعویض گردید. در گروه B، جهت تهیه بافت بلاستما از خرگوش‌های نر سفید نژاد نیوزلندی ۶ تا ۸ 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 سانتی‌گراد و روشنایی ۱۲ ساعت در شبانه روز قرار داشتند. در تمامی مراحل انجام این پژوهش، مصوبات مربوط به اصول کار با حیوانات آزمایشگاهی رعایت گردید. بعد از بی حس کردن گوش خرگوش توسط لیدوکائین با استفاده از دستگاه پانچه چند سوراخ به قطر ۲ میلی‌متر در لاله گوش خرگوش ایجاد شد و بعد از گذشت سه روز، در محل مربوطه پانچ دیگری به قطر ۴ میلی‌متر زده شد و حلقه‌ی بلاستمایی جدا گردید. بعد از جدا سازی حلقه بلاستمایی، جهت آلودگی زدایی، حلقه‌ها ۷ بار با سرم فیزیولوژی استریل شستشو داده شدند و سپس در زیر هود لامینار و در شرایط کاملاً استریل، داربست‌های تهیه شده در میان حلقه‌های بلاستمایی تهیه شده قرار داده شدند (تصویر ۱B). در این مطالعه از محیط کشت DMEM و دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد با $5\% \text{CO}_2$ درصد استفاده شد.

و در دمای صفر درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند. پس از جدا نمودن قطعات اضافی، اندازه بافت‌ها به 3×6 میلی‌متر رسید. به منظور سلول‌زدایی بافت‌ها، نمونه‌ها بمدت ۲ دقیقه جهت انجماد سریع وارد ازت مایع گردیدند و سپس برای ذوب شدن سریع به مدت ۵ دقیقه در آب مقطر وارد شدند. این فرایند انجماد-ذوب، ۶ بار تکرار شد و بعد از آن از محلول ۱ درصد سدیم دودسیل سولفات (SDS) (Cinna Gen, Iran) به مدت ۲۴ ساعت و سپس محلول ۱ درصد تریتون X-100 (Cinna Gen, Iran) به مدت ۱۲ ساعت استفاده گردید. به منظور خروج شوینده‌ها از بافت، نمونه‌ها به مدت ۲ ساعت در بافر نمکی فسفات (PBS) (Bio Gene, UK) قرار گرفتند (۱۴، ۱۵ و ۱۶). به منظور استریلیزاسیون داربست‌ها، نمونه‌ها به مدت ۳۰ دقیقه در اتانل ۷۰ درصد قرار گرفتند و پس از شستشو با آب مقطر استریل، به مدت ۱ ساعت در PBS استریل قرار داده شدند.

برای آماده سازی سلول‌های بنیادی مزانشیم مغز استخوان Bone Marrow Mesenchymal Stem Cell (BM-MSCs) رت نر بالغ نژاد ویستار با استفاده از کلروفرم بی‌هوش و استخوان ران آن در شرایط کاملاً استریل جدا گردید. ابتدا دو سر استخوان جدا و محتویات آن با تزریق محیط کشت (Gibco, USA) و DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium) حاوی ۱۰ درصد سرم جنینی گاو (FBS) (Gibco, USA) و ۱۰ میکرو لیتر پنی سیلین / استرپتومایسین (Biosera, UK) به داخل آن استخراج شد و سپس سوسپانسیون حاصل به فلاسک کشت انتقال و در انکوباتور با دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد و $5\% \text{CO}_2$ درصد نگهداری گردید. ۲۴ ساعت پس از کشت اولیه، محیط رویی خارج و سلول‌های چسبیده به کف فلاسک باقی ماندند (۱۷). محیط کشت سلول‌ها هر ۳ الی ۴ روز یک بار تعویض گردید و سلول‌ها پس از پاساژ چهارم مورد استفاده قرار گرفتند.



شکل ۱: (A) کشت سلول‌های بنیادی مزانشیم مغز استخوان روی داربست. (B) قرار گرفتن داربست در داخل حلقه بلاستمایی.

نمونه‌ها با گلو تار آلدئید و اسمیم تتراکساید ثابت و با درجات صعودی اتانل آبیگری شدند و پس از آغشتگی با رزین قالب گیری شدند. سپس از نمونه‌ها مقاطع نازک با ضخامت ۸۰ نانومتر تهیه و رنگ آمیزی شده با میکروسکوپ الکترونی گذاره مشاهده و عکسبرداری شدند.

نتایج

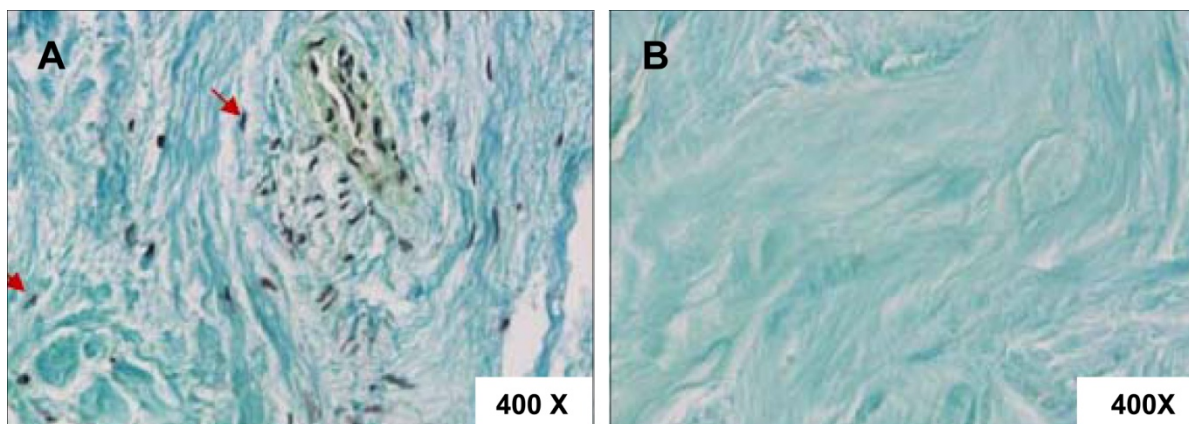
در این مطالعه بافت لته انسان طی مراحل مختلف سلول‌زدایی شده و به عنوان داربست و عامل القاکننده‌ای برای تمایز BM-MSCs رت و سلول‌های بلاستمایی استفاده گردید. برای سلول‌زدایی از انجماد سریع در ازت مایع، سپس ۱ درصد SDS به مدت ۲۴ ساعت و تریتون ۱ درصد به مدت ۱۲ ساعت استفاده گردید. اجزای سلولی طی فرآیند سلول‌زدایی بطور کامل از بافت لته حذف شدند (شکل ۲).

به منظور بررسی بیشتر و دقیق تر تغییرات ساختاری بافت لته طی فرآیندهای آماده سازی، داربست تهیه شده با استفاده از میکروسکوپ الکترونی نگاره مورد مطالعه قرار گرفت. همانطور که شکل ۳ نشان می دهد، ساختار کلی بافت لته پس از فرآیند سلول‌زدایی حفظ شده (۳A) و اپی تلایوم لته مانند یک توری خالی از سلول (۳B) و متصل به بافت همبند باقی مانده است. علاوه بر این رشته های کلاژن بافت همبند نیز سالم و دست نخورده مانده‌اند (۳D).

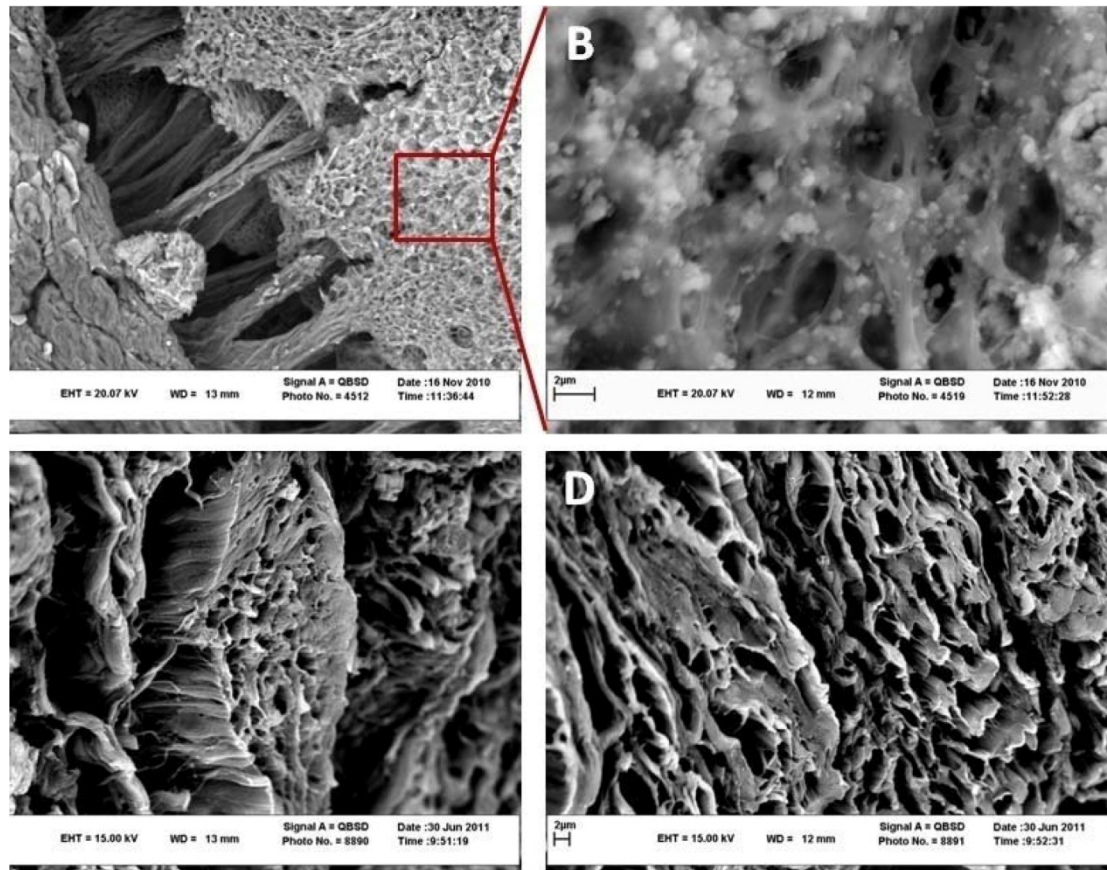
در بررسی‌های بافت شناسی به منظور بررسی مهاجرت سلول‌ها به داربست مراحل پاساژ بافت مطابق روش معمول انجام شد و رنگ آمیزی هماتوکسیلین -ائوزین (H&E)، پیکروفوشین، پیک ایندیگو کارمین و رنگ آمیزی پاس- پیک ایندیگو صورت گرفت. در رنگ آمیزی پیکروفوشین (مخلوط ۱۰۰ میلی لیتر اسید پیکریک اشباع + ۰/۱ گرم پودر فوشین اسید) کلاژن قرمز آتشین و اپی تلایوم زرد یا کرمی رنگ می‌شود. رنگ پیک ایندیگو (مخلوط ۱۰۰ میلی لیتر اسید پیکریک اشباع + ۰/۱ گرم پودر ایندیگوکارمین) به عنوان یک رنگ اختصاصی با شدت‌های اسیدوفیلی متفاوت می باشد. با این رنگ، زمینه که ماتریکس بافت همبند و کلاژن است به همراه اپی تلایوم به رنگ سبز مغز پسته‌ای در می آید و هسته ها با رنگ هماتوکسیلین قهوه ای کم رنگ می‌شوند. از معرف پرئودیک اسید - شیف (PAS) برای جستجو و بررسی گلیکوپروتئین‌ها استفاده می‌شود. در تکنیک پاس ترکیبات موکوسی حاوی اسید سیالیک و هگروزها به رنگ صورتی یا قرمز یا مایل به ارغوانی براق در می‌آیند.

در مطالعات میکروسکوپ الکترونی نگاره (SEM) (Leo-VP1450, Germany) به منظور تهیه تصاویر، نمونه‌ها با گلو تار آلدئید و اسمیم تتراکساید ثابت و با درجات صعودی اتانل آبیگری شدند. پس از خشک شدن، نمونه‌ها روی گرید قرار گرفتند و با پوشش طلا - پالادیوم پوشانده شده و تصویر برداری انجام شد.

در بررسی میکروسکوپ الکترونی گذاره (TEM) (Leo-910, Germany) جهت تهیه مقاطع میکروسکوپی،



شکل ۲: لته انسان قبل (A) و بعد (B) از فرآیند سلول‌زدایی (رنگ آمیزی پیک ایندیگو). پیکان‌ها مشخص کننده هسته سلول‌ها می باشند.



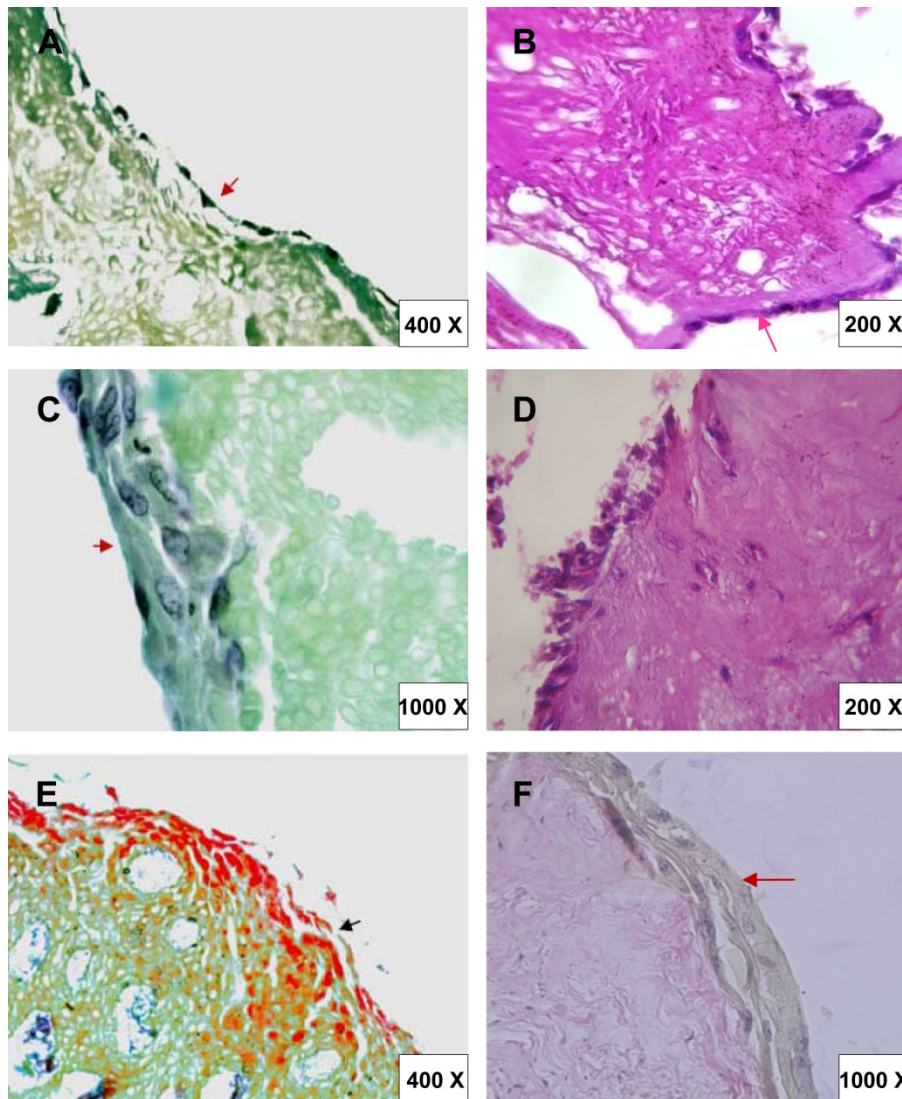
شکل ۳: بررسی لته انسان پس از سلول زدایی با میکروسکوپ الکترونی نگاره. (A) حفظ ساختار کلی لته انسان پس از سلول زدایی. (شکل B) اپی تلیوم را به صورت یک توری خالی از سلول و شکل C و D به ترتیب رشته های کلاژن را قبل و پس از سلول زدایی نشان می دهد.

میکروسکوپ الکترونی گذاره نشان می‌دهد که اتصالات دسموزومی تشکیل داده‌اند. در گروه B، پس از کشت داربست با بلاستما در هفته اول سلول‌هایی از بافت بلاستما، در حال نفوذ به داربست مشاهده می‌شدند. هفته دوم بعد از کشت، سلول‌های بیشتری به داربست نفوذ و تعداد سلول‌های موجود در داربست افزایش یافته بودند. در هفته چهارم تشکیل ساختارهای مشابه اپی تلیوم در سطح داربست مشاهده شد (شکل ۴). علاوه بر این در گروه B از هفته دوم رفتارهای ترشحي (پاسخ پاس مثبت) نیز در سلول‌های مهاجرت یافته به داربست مشاهده شد (شکل ۷ و جدول ۱).

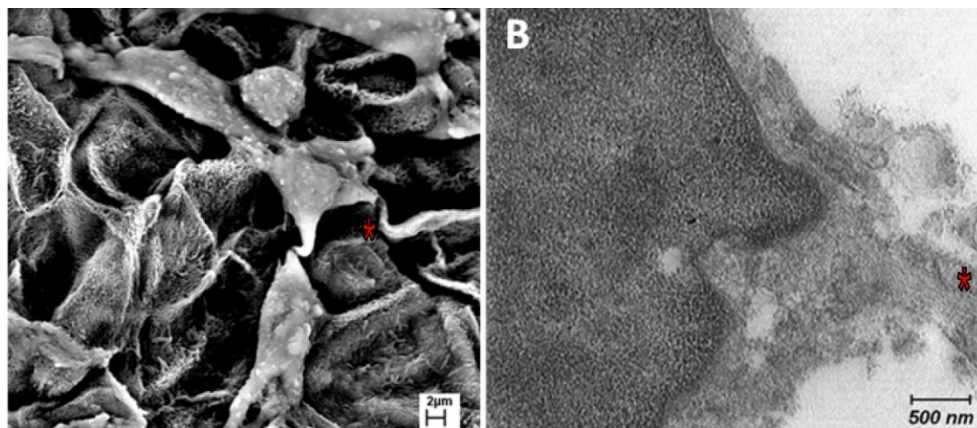
در این مطالعه در گروه A از سلول‌های بنیادی مزانشیمی گرفته شده از مغز استخوان رت ویستار برای کشت بر روی داربست لته استفاده گردید. بر اساس شکل ۴ سلول‌ها در هفته اول توانستند یک لایه بر روی اپی تلیوم، تشکیل دهند. در هفته دوم این سلول‌ها تکثیر یافته و ساختاری مشابه اپی تلیوم را به وجود آوردند. در هفته چهارم سلول‌ها ظاهر کشیده و دوکی شکل داشته و ساختارهای منظم تری را تشکیل داده بودند. سلول‌های بنیادی مغز استخوان رت در هفته اول کشت توانستند روی داربست استقرار یافته و پاهای کاذب تشکیل دهند. در شکل ۵ پاهای کاذب سلول‌ها با دید میکروسکوپ الکترونی نگاره و گذاره مشخص می‌باشد. شکل ۶ سلول‌ها را در هفته دوم کشت با دید

جدول ۱: رفتارهای سلولی مشاهده شده در طی دوره مورد مطالعه. مشاهده (+) و عدم مشاهده (-). نتایج حاصل یک بررسی کیفی است.

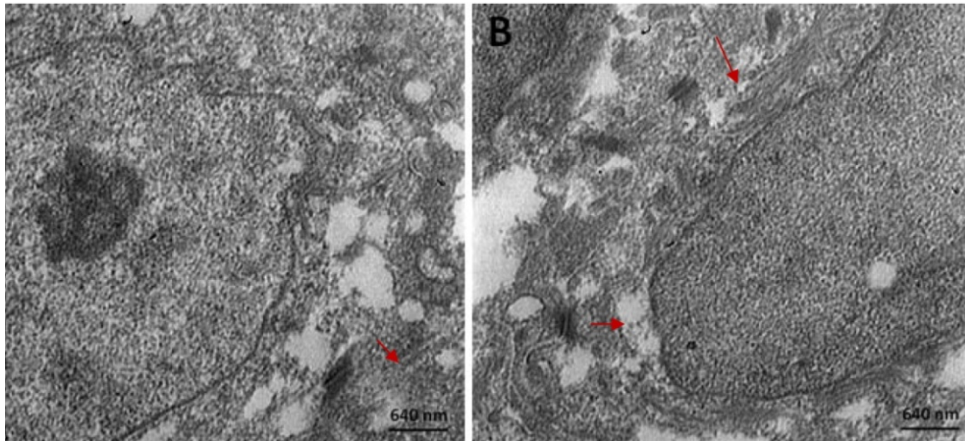
رفتار سلولی	چسبندگی (اتصالات دسموزومی)	مهاجرت (تشکیل پاهای کاذب)	تقسیم سلولی	ترشح سلولی	نوع سلول
سلول‌های بنیادی مزانشیمی	+	+	+	-	
سلول‌های بلاستما	+	+	+	+	



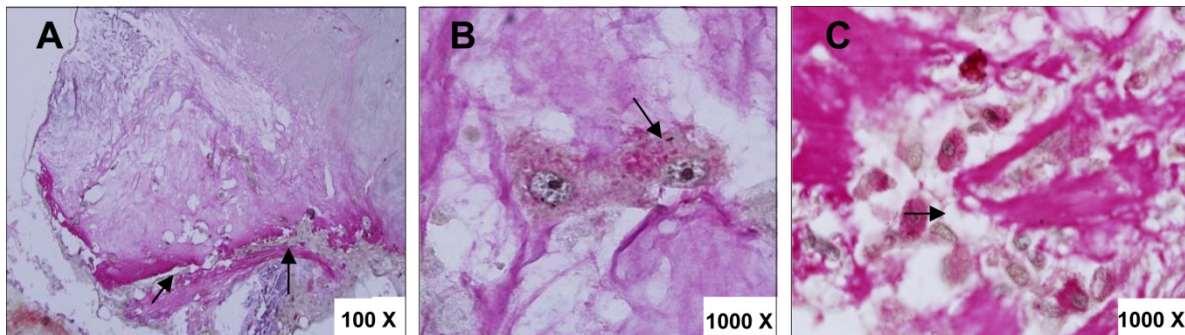
شکل ۴: مقایسه برهم‌کنش سلول‌های بنیادی مزانشیمی (A و C، E) و سلول‌های بلاستمایی (B و D، F) با ماتریکس خارج سلولی لته. لایه جدید شبه اپی‌تلیوم در هفته اول (A)، در هفته دوم (C) (رنگ آمیزی بیگ ایندیگو) و در هفته چهارم (E) (رنگ آمیزی کارمین). نفوذ سلول‌های بلاستمایی به داربست در هفته اول پس از کشت (B)، دو هفته پس از کشت (D) (رنگ آمیزی هماتوکسیلین-ائوزین) و تشکیل لایه‌های شبه اپی‌تلیوم در هفته چهارم (F) (رنگ آمیزی پیکروفوشین).



شکل ۵: تشکیل پاهای کاذب سلول‌ها در هفته اول کشت سلول‌های بنیادی مزانشیمی. (A) سلول‌ها از نمای میکروسکوپ SEM (B) پای کاذب سلول از نمای میکروسکوپ TEM. (ستاره، نمایانگر پاهای کاذب سلول‌ها می‌باشد).



شکل ۶: تشکیل اتصالات دسموزومی توسط سلول‌های بنیادی مزانشیمی در هفته دوم کشت و تمایز احتمالی به سمت سلول‌های شبه کراتینوسیت را نشان می‌دهد (علامت پیکان نمایانگر اتصالات دسموزومی است).



شکل ۷: مقطع عرضی از حلقه بلاستما با داربست در روزهای مختلف بعد از کشت. (A) فلش‌ها تغییر رنگ حاشیه‌ی داربست را که در اثر نفوذ سلول‌ها دو هفته بعد از کشت ایجاد شده است را نشان می‌دهند. (B) سلول‌های بلاستمایی پاس مثبت نفوذ یافته به داربست در هفته دوم بعد از کشت. (C) سلول‌های بلاستمایی پاس مثبت نفوذ یافته به داربست، چهار هفته بعد از کشت (رنگ آمیزی پاس-پیک ایندیگو)

اما بر اساس مطالعات میکروسکوپ الکترونی نگاره، بافت لثه پس از مراحل آماده سازی، ساختمان کلی خود را حفظ نمود و ماتریکس اپی تلیوم نیز متصل به بافت همبند زیرینش باقی ماند. علاوه بر این، رشته‌های کلاژن موجود در بافت همبند نیز سالم مانده بودند.

Wu و همکارانش (۲۶) نشان دادند که BM-MSCs درمان زخم را در موش‌های دیابتی و غیردیابتی با افزایش تشکیل مجدد اپی‌درم، نفوذ سلولی و رگ‌زایی بهبود بخشیدند. بخش مهمی از این سلول‌ها زیر واحدهای سیتوکراتین را بیان نمودند و ساختارهای دانه‌ای شکل و علاوه بر آن ساختارهایی مشابه غدد عرق یا چربی را تشکیل دادند.

در مطالعه حاضر BM-MSCs پس از استقرار بر روی ماتریکس اپی تلیوم قبلی، پهن شده و تک لایه‌ای بر روی آن تشکیل دادند و در هفته دوم سلول‌ها تقسیم شدند و ساختاری چندلایه را بوجود آوردند. مطالعات میکروسکوپ الکترونی گذاره نشان داد که این سلول‌ها اتصالات دسموزومی تشکیل دادند. این مشاهدات

بحث

در این پژوهش تلاش گردید ابتدا لثه انسان را با استفاده از روش‌های فیزیکی و شیمیایی سلول‌زدایی نموده و سپس از آن به عنوان داربستی جهت کشت سلول‌های بنیادی مزانشیمی گرفته شده از مغز استخوان رت و ویستار (گروه A) و همچنین سلول‌های بلاستمایی لاله گوش خرگوش (گروه B) استفاده شود.

در مطالعات اخیر از ماتریکس سلول‌زدایی شده بافت‌های غضروف، استخوان، میزنا، رگ بند ناف و درم به عنوان داربست در مهندسی بافت استفاده گردیده است (۱۸-۲۳). در این مطالعه نیز ماتریکس سلول‌زدایی شده لثه انسان به دلیل دارا بودن مقادیر بالای کلاژن و همچنین وجود سیتوکراتین‌های مختلف در بافت همبندش به عنوان داربست و بستری جهت القای مهاجرت و تمایز سلولی استفاده گردید (۲۴).

مطالعات مختلف آثار تخریبی روش‌های سلول‌زدایی و استریلیزاسیون بر ساختمان بافت را گزارش نموده‌اند (۱۴ و ۲۵)،

نتیجه گیری

ماتریکس سلول‌زدایی شده لته انسان توانست در هر دو گروه A و B موجب استقرار سلول‌ها و تشکیل ساختارهای مشابه اپی‌تلیوم گردد. بر اساس یافته‌های ما در این پژوهش می‌توان بیان کرد که احتمالاً سلول‌های منشا گرفته از بافت بلاستما در مقایسه با سلول‌های بنیادی مزانشیمی قابلیت حیات بیشتری داشته‌اند زیرا طبق مطالعات هیستولوژیکی، در هفته چهارم بعد از کشت سلول‌های بلاستمایی مشاهده شده در داربست دارای هسته‌های روشن و بزرگ بودند، و این در حالی است که در مورد سلول‌های بنیادی مزانشیمی، هسته‌ها به صورت نکروزه مشاهده می‌شدند. بنابراین احتمالاً بافت بلاستمایی می‌تواند منبع مناسب‌تری برای مطالعه فرایند مهاجرت سلولی و القاء ترشحات سلولی باشد.

تشکر و قدردانی

این طرح به 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 با عنوان "مطالعات تجربی و مقدماتی آماده سازی نیمه صنعتی داربست‌های سه بعدی (Bioscaffold یا 3D matrix) به منظور کاربرد در مهندسی بافت" و با همکاری دکتر سید علی بنی هاشم راد خانم مروارید ساعی نسب انجام شده است که بدین وسیله مراتب قدردانی از ایشان اعلام می‌گردد.

منابع

- Müh E, Zimmermann J, Kneser U, Marquardt J, et al. Lysineurethanedimethacrylate-a novel generation of amino acid based monomers for bone cements and tissue repair. *Biomaterials*. 2002; 23: 2849-2854.
- Agrawal CM, Ray RB. Biodegradable polymeric scaffolds for musculoskeletal tissue engineering. *J Biomed Mater Res*. 2001; 55: 141-150.
- Naderi H, Matin MM, Bahrami AR. Review paper: Critical Issues in Tissue Engineering: Biomaterials, Cell Sources, Angiogenesis, and Drug Delivery Systems. *J Biomater Appl*. 2011; 26, 383-417.
- Abousleiman RI, Reyes Y, McFetridge P, Sikavitsas V. The human umbilical vein: a novel scaffold for musculoskeletal soft tissue regeneration. *Artif Organs*. 2008; 32:735-742.

پیشنهاد می‌کند که احتمالاً سلول‌های BM-MSCs در اثر القای داربست لته انسان شروع به تمایز به سمت کراتینوسیت‌ها نموده‌اند. گرچه جهت تعیین سرنوشت کراتینوسیتی، مطالعات تکمیلی از جمله روش‌های مولکولی و یا ایمنوسیتوشیمی ضروری می‌نماید.

مطالعات نشان می‌دهند که ماتریکس بافت همبند لته موجب القای کراتینیزه شدن در سلول‌ها می‌گردد (۱۱). در مطالعاتی که از هیدروژل‌های کلاژنی به عنوان معادل‌های درمی استفاده گردید، پایداری ضعیف اپی‌تلیوم بر روی داربست، تمایز ناقص آن و تخریب داربست در مراحل اولیه مشاهده شد (۲۷). در حالی که نتایج این طرح نشان داد که ماتریکس باقی مانده از اپی‌تلیوم می‌تواند بستر مناسبی جهت اتصال محکم سلول‌ها به آن را فراهم نماید.

گروهی از محققین، فیبروبلاست‌های لته‌ای و درمی انسانی را در ماتریکس سه بعدی کلاژن به منظور مطالعه تغییرات ماتریکس کشت دادند و ترشح ماتریکس خارج سلولی را توسط این دو نوع سلول بررسی کردند. آنها با مطالعه‌ی metalloproteinases matrix (MMPs) دریافتند که بیان این فاکتورها در ابتدا در سیتوپلاسم سلولی سلول‌های فیبروبلاستی کشت داده شده، متمرکز بوده و سپس در ترکیبات خارج سلولی توزیع شده است (۲۸).

Qi و همکارانش (۲۹) نیز تمایز سلول‌های بنیادی مزانشیمی گرفته شده از سینوویوم رت را در داربست آلژینات نشان دادند. آن‌ها از چندین عامل القاکننده تمایز کندروژنیک شامل TGF- β 3, BMP-2, پرولین، پیرووات، آسکوربات-۲ فسفات و دگزامتازون استفاده نمودند و تکثیر سلولی، تولید ماتریکس جدید و تمایز کندروژنیک سلول‌ها را مشاهده کردند.

در مورد کشت سلول‌های بلاستمایی علاوه بر ایجاد ساختارهای شبه اپی‌تلیوم، از نکات مورد توجه که از هفته دوم، مشاهده و در روزهای بعد شدت و وسعت بیشتری یافته بود، تغییر ترکیبات داربست در اثر برهم کنش با سلول‌های بلاستمایی بود (جدول ۱). نواحی از داربست که محل نفوذ و استقرار سلول‌های بلاستمایی بود نسبت به رنگ پاس-پیک ایندیگو، پاسخ مثبت نشان داد. لذا می‌توان نتیجه گرفت که در مطالعه حاضر سلول‌ها بلاستمایی همزمان با نفوذ به داربست، شروع به سنتز و ترشح ترکیباتی به درون داربست کرده‌اند (شکل ۷).

5. Yura T, Osataka H, Inoue T. Three-Dimensional structure of connective tissue papillae in the human gingiva. *Yonago Acta medica*. 2000; 43(1): 39-46.
6. 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 Periodontology*. 2006; 77:672-677.
7. Izumi K, Ferinberg SE, Iida A, Yoshizawa M. Intraoral grafting of an ex vivo produced oral mucosa equivalent: a preliminary report. *Int J Oral Maxillofac Surg*. 2003; 32:188-197.
8. Musina RA, Bekchanova ES, Belyavskii AV, Sukhikh GT. Differentiation potential of mesenchymal stem cells of different origin. *Bull Exp Biol Med*. 2006; 141:147-151.
9. Hwang NS, Zhang C, Hwang YS, Varghese S. Mesenchymal stem cell differentiation and roles in regenerative medicine. *Wiley Interdiscip Rev Syst Biol Med*. 2009; 1(1): 97-106.
10. Tran CT, Huynh DT, Gargiulo C, Nguyen PT, et al. In vitro culture of keratinocytes from human umbilical cord blood mesenchymal stem cells: the Saigonese culture. *Cell Tissue Bank*. 2011; 12(2): 125-133.
11. Eckert RL, Rorket EA. Molecular biology of keratinocyte differentiation. *Environ Health Perspect*. 1989; 80:109-116.
12. O'Toole EA. Extracellular matrix and keratinocyte migration. *Experimental Dermatology*. 2001; 26: 525-530.
13. Tsonis PA. Stem cell from differentiated cells. *Molecular interventions*. 2004; 4: 81-83.
14. Gilbert TW, Sellaro TL, Badylak SF. Decellularization of tissues and organs. *Biomaterials*. 2006; 27: 3675-3683.
15. Yarjanli Z, Mahdavi Shahri N, Moghaddam Matin M, Fereidoni M, et al. In Vitro Histological Investigation of Interactions between Rat s Mesenchymal Stem Cells and Human Gingival Matrix. *J Mashhad Dental School*. 2011; 36: 79-90.
16. Cheravi M, Mahdavi Shahri N, Baharara J, Banihashem Rad SA, et al. A Case Study of Decellularization of Human Palatal Gingiva Tissue and Preparation Three-Dimensional Model for Use in Primary Research Gingival Tissue Engineering. *J Cell & Tissue*. 2011; 2: 107-116.
17. Dennis JE, Merriam A, Awadallah A, Yoo JU, et al. A quadripotential mesenchymal progenitor cell isolated from the marrow of an adult mouse. *J Bone Miner Res*. 1999; 14: 700-709.
18. Elder BD, Eleswarapu SV, Athanasiou KA. Extraction techniques for the decellularization of tissue engineered articular cartilage constructs. *Biomaterials*. 2009; 30: 3749-56.
19. Fröhlich M, Grayson WL, Marolt D, Gimble JM, et al. Bone grafts engineered from human adipose-derived stem cells in perfusion bioreactor culture. *Tissue Eng Part A*. 2010; 16:179-89.
20. Narita Y, Kagami H, Matsunuma H, Murase Y, et al. Decellularized ureter for tissue-engineered small-caliber vascular graft. *J Artif Organs*. 2008; 11:91-99.
21. Abousleiman RI, Reyes Y, McFetridge P, Sikavitsas V. The human umbilical vein: a novel scaffold for musculoskeletal soft tissue regeneration. *Artif Organs*. 2008; 32: 735-742.
22. Clark JM, Saffold SH, Israel JM. Decellularized dermal grafting in cleft palate repair. *Arch Facial Plast Surg*. 2003; 5: 40-44.
23. Bannasch H, Stark GB, Knam F, Horch RE, et al. Decellularized dermis in combination with cultivated keratinocytes in a short- and long-term animal experimental investigation. *J Eur Acad Dermatol Venereol*. 2008; 22: 41-9.
24. Tamizi M, Amouian B, Mahdavi N. Clinical and histological evaluation of the effect of storage time on healing and success of free gingival graft stored in normal saline. *J M Dental S*. 1996; 20:38-49.
25. Wiegand C, Abel M, Ruth P, Wilhelms T, et al. Effect of the sterilization method on the performance of collagen type I on chronic wound parameters in vitro. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater*. 2009; 90: 710-9.
26. Wu Y, Chen L, Scott PG, Tredget EE. Mesenchymal stem cells enhance wound healing through differentiation and angiogenesis. *Stem Cells*. 2007; 25(10): 2648-59.
27. Stark HJ, Boehnke K, Mirancea N, Willhauck MJ, et al. Epidermal homeostasis in long-term scaffold-enforced skin equivalents. *J Investig Dermatol Symp Proc*. 2006; 11: 93-105.
28. Miller CC, Septier D, Lecolle BS, Decoster CL, et al. Human dermal and gingival fibroblasts in a three-dimensional culture: a comparative study on matrix remodeling. *Clin Oral Invest*, 2002; 6: 39-50.
29. Qi J, Chen A, You H, Li K, et al. Proliferation and chondrogenic differentiation of CD105-positive enriched rat synovium-derived mesenchymal stem cells in three-dimensional porous scaffolds. *Biomed Mater*. 2011; 6(1), 015006.

Behavioral Comparison of Cultured Rat's Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells and Rabbit's Blastema in Scaffold of Decellularized Human Periodontal Tissue

Mahdavi Shahri N, Ph.D.^{1, 2*}, Moghadam Matin M, Ph.D.^{1, 2}, Fereidoni M, Ph.D.², Bahrami A.R, Ph.D.^{1, 2}, Khajeh Ahmadi S, Ph.D.³, Yarjanli Z, M.Sc.⁴, Naderi S, M.Sc.⁴, Behnam Rassouli M, Ph.D.², Moghimi A, Ph.D.², Alizadeh Namini M, M.Sc.²

1. Stem Cell Biotechnology Research Group, Institute of Biotechnology, Ferdowsi University of Mashhad, Mashhad, Iran
2. Department of Biology, Faculty of Science, Ferdowsi University of Mashhad, Mashhad, Iran
3. Assistant Professor of Oral and Maxillofacial Pathology, Dental Research Center Faculty of Dentistry, Mashhad University of Medical Sciences, Mashhad, Iran
4. M.Sc. Graduate, Department of Biology, Faculty of Science, University of Mashhad, Mashhad, Iran

* Email corresponding author: Mahdavin@um.ac.ir

Received: 14 Sep. 2011

Accepted: 13 May. 2012

Abstract

Aim: The main goal of this research was to prepare three-dimensional matrix of gingival palate tissues and compare the behavior of bone marrow mesenchymal stem cells and blastema on the scaffolds.

Material and methods: The tissues obtained from gingival surgeries in periodontal clinic were decellularized using detergents including sodium dodecyl sulfate and Triton X-100 then after washing and sterilization, were used as scaffold for culturing the rat's mesenchymal stem cells. The scaffolds were studied by light and electron microscopy before and after 1, 2, and 4 weeks of culture. In addition the prepared scaffolds were assembled within the rings of blastema tissues from rabbit's pinna. Then the scaffolds were similarly studied by histological techniques after 1, 2, and 4 weeks of culture.

Results: Scanning electron microscopy showed that epithelial matrix and collagen fibers in connective tissue remained intact. In both samples epithelium-like structures were observed. Also in the blastema cells migrating to the scaffolds cell secretion was also observed.

Conclusion: Human gingival matrix can be a suitable scaffold for studying the cell behaviors. More research should be carried out to determine the identity of differentiated cells, which finally can improve our knowledge regarding the cell-matrix interactions.

Keywords: Mesenchymal stem cells, Blastema Tissue, Gingiva, 3D Matrix