بررسی اثر فرایند سلول زدایی بر بافت غشاء اشنایدریان سینوس فک بالا به عنوان داربست در مهندسی بافت

سعیده خواجه احمدی*، امین راهپیما#، ناصر مهدوی شهری***، سمیه نادری****

* استادیار آسیب شناسی دهان، فک و صورت، مرکز تحقیقات دندانپزشکی، دانشکده دندانپزشکی، دانشگاه علوم پزشکی مشهد

** استادیار جراحی دهان، فک و صورت، مرکز تحقیقات بیماری‌های دهان، فک و صورت، دانشکده دندانپزشکی، دانشگاه علوم پزشکی مشهد

*** استاد گروه زیست شناسی، گروه تحقیقات سلول‌های بنیادی پژوهشکده فناوری زیستی، دانشکده علوم، دانشگاه فردوسی مشهد

**** کارشناس ارشد زیست سلول تکوینی

تاریخ ارائه مقاله : ۹۱/۳/۱ – تاریخ پذیرش : ۹۱/۹/۳۰

Decellularized Human Maxillary Sinus Schneiderian Membrane as a Potential Scaffold for Tissue Engineering

Saeedeh KhajehAhmadi*, Amin Rahpeyma#, Nasser MahdaviShahri***, Somayeh Nadrri******

** Assistant Professor of Oral & Maxillofacial Pathology, Dental Research Center, School of Dentistry, Mashhad University of Medical Sciences, Mashhad, Iran*

*** Assistant Professor of Oral & Maxillofacial Surgery, Oral & Maxillofacial Diseases Research Center, School of Dentistry, Mashhad University of Medical Sciences, Mashhad, Iran*

**** Professor, Dept of Biology, Stem cell Research Group, Institute of Biotechnology, School of Science, Ferdowsi University of Mashhad, Mashhad, Iran*

***** Master of Sciences Degree, Cellular and Developmental Biology*

Received: 21 May 2012; Accepted: 20 December 2012

Introduction: Biological matrix has received special attention in recent medical and biological researches. Cells of tissue are supported by extracellular matrix (ECM). Extracellular matrix is used as a scaffold for morphogenesis, proliferation, migration, and differentiation in tissue engineering. Extracellular matrix of natural tissues can be used as a scaffold for reconstructing biological tissues in tissue engineering. Human maxillary sinus membrane consists of cells and ECM which contain collagen, elastin, and proteoglycans. Collagen can be used as a natural scaffold via high level of biocompatibility.

Materials & Methods: In this study, Human maxillary sinus membrane were decellularized by two techniques , physical method (liquid nitrogen) and chemical procedures via increment concentration of sodium dodecyl sulfate (SDS) in three groups. The samples were fixed with Bouin's fixator, and then were stained with Hematoxylin & Eosin. decellularised Human maxillary sinus membrane was evaluated with scanning electrone microscope.

Results: Histological evaluation of decellularized scaffolds revealed that cells of the schneiderian membrane tissues were completely removed via concentration of 1% of SDS. Scanning Electrone Microscope (SEM) (Leo-VP1450, Germany) of the scaffolds indicated that collagen fibers of connective tissue remained intact. In 0.5 and 0.1% concentrations of SDS, few cells were observed at peripheral of ECM, so decellularization process was not complete.

Conclusion: According to the results, scaffolds prepared from Human Maxillary Sinus Membrane could be used as a suitable scaffold for In vitro investigation and reconstruction and tissue engineering.

Key words: Tissue engineering, maxillary sinus, schneiderian membrane, decellularizing.

 # Corresponding Author: rahpeymaas@mums.ac.ir

J Mash Dent Sch 2013; 37(1): 37-46 .

چکیده

مقدمه: واژه ماتریکس بیولوژی جایگاه مهمی در تحقیقات بیولوژی و پزشکی اخیر کسب نموده است. در بافت‌های زنده سلول‌ها توسط یک ساختار به نام ماتریکس خارج سلولی حمایت می‌شوند. ماتریکس خارج سلولی به عنوان یک داربست برای مورفوژنز بافتی، تکثیر، مهاجرت،

مولف مسؤول، نشانی: مشهد. میدان پارک، دانشکده دندانپزشکی، گروه جراحی دهان، فک و صورت. تلفن: ۱۵-۸۸۲۹۵۰۱-۰۵۱۱

E-mail: rahpeymaas@mums.ac.ir

تمایز بافتی و حفظ این تمایز عمل می‌کند. ماتریکس خارج سلولی در مهندسی بافت جهت جایگزینی بافتی استفاده شود. بافت غشای سینوس حاوی سلول و ماتریکس خارج سلولی متشکل از کلاژن، الاستین و انواع پروتئوگلیکان‌ها می‌باشد. با توجه به سازش‌پذیری زیستی بالای کلاژن می‌توان از آن در تحقیقات مهندسی بافت به عنوان داربست طبیعی استفاده کرد.

مواد و روش‌ها: در این مطالعه سلول‌زدایی از بافت غشای سینوس ماگزیلا توسط روش‌های فیزیکی (ازت مایع) و شیمیایی با استفاده از غلظت‌های متفاوت سدیم دودسیل سولفات در سه گروه انجام شد. پس از تثبیت بافت در بوئن و مراحل پاساژ بافتی، رنگ آمیزی هماتوکسیلین – ائوزین و پیکروسیروس رد صورت گرفت. ماتریکس سلول‌زدایی شده حاصل از غشای سینوس با استفاده از میکروسکوپ الکترونی نگاره مورد مطالعه قرار گرفت.

یافته‌ها: مطالعات بافت‌شناسی داربست‌ها نشان دادند که در غلظت ۱ درصد سدیم دودسیل سولفات سلول‌زدایی از بافت غشاء اشنایدریان سینوس ماگزیلا به طور کامل صورت گرفته است و همچنین بر طبق مطالعات میکروسکوپ نوری و الکترونی مشخص شد که رشته‌های کلاژن سالم باقی مانده‌اند. اما در غلظت‌های ۰/۵ و ۰/۱ درصد، در حاشیه‌های ماتریکس میزان کمی از حضور سلول‌ها مشاهده شد و سلول‌زدایی به صورت کامل انجام نشده بود.

نتیجه‌گیری: نتایج این مطالعه بیانگر این است که داربست طبیعی حاصل، با حفظ ترکیبات اصلی می‌تواند بستر مناسبی جهت بررسی رفتارهای سلولی باشد و مدل مناسبی به عنوان تحقیقات اولیه در ترمیم و کاربرد در مهندسی بافت باشد.

واژه‌های کلیدی: مهندسی بافت، غشاء اشنایدریان، سینوس ماگزیلا، سلول‌زدایی.

مجله دانشکده دندانپزشکی مشهد / سال ۱۳۹۲ دوره ۳۷ / شماره ۱ : ٤٦-۳۷ .

مقدمه

جدار سینوس ماگزیلا از مخاط تنفسی ,با سلول‌های مترشحه موکوس مژک‌دار استوانه‌ای و یک لایه پریوست پوشیده شده است. ابعاد سینوس در افراد بالغ، ٣٤ میلی‌متر در جهت قدامی، حدود ۳۳ میلی‌متر در بعد طولی و ۲۳ میلی‌متر در جهت عرضی است. حجم کلی فضای سینوس حدود ۱۵ الی ۲۰ میلی لیتر می‌باشد. مژک‌های سلول‌های پوششی سینوس ماگزیلری، حرکتی در حدود ۱۰۰۰ ضربه در دقیقه نشان می‌دهند که این تحرک باعث رانده شدن مایع به سمت استئوم می‌گردد. غشای اشنایدرین مفروش‌کننده سینوس ماگزیلاری می‌باشد. بافت همبندی آن حاوی سلول‌های مزانشیمی پیش‌ساز با توانایی تولید استخوان و رشته‌های کلاژن می‌باشد. اپیتلیوم پوشاننده غشای سینوس تمام خصوصیات اپیتلیوم تنفسی را دارا است. باکتری‌ها و سایر پارتیکل‌ها توسط حرکات مژه‌های این اپیتلیوم از سینوس خارج می‌شوند.[1] بعد از تولد سینوس ماگزیلا با فشار هوا در قسمت آلوئولر توسعه می‌یابد و متقارن با درجه رشد ماگزیلا و رویش دندان‌ها به سمت قدامی تحتانی قائده جمجمه توسعه می‌یابد. با رویش دندان‌ها قسمتی از استخوان آلوئول به تحلیل و توسعه ادامه داده تا کف سینوس در سطح کف حفره بینی قرار گیرد. توسعه سینوس ماگزیلا به طور عادی بعد از رویش دندان‌های دائمی متوقف می‌گردد. لکن بعد از کشیدن دندان‌های مولر بالا توسعه سینوس ادامه خواهد یافت تا این که فضای آلوئولر را اشغال نماید. سینوس ماگزیلر گاهی تا لبه ستیغ آلوئول بی دندان ادامه می‌یابد. غشا سینوس در دندانپزشکی و جراحی کارگذاری ایمپلنت در نواحی خلفی ماگزیلای آتروفیک اهمیت دارد. با از دست رفتن دندان‌ها در خلف فک بالا پدیده پنوماتیزاسیون پیش می‌آید یعنی سینوس ماگزیلاری به داخل زوائد آلوئول گسترش می‌یابد و اصطلاحاً کف سینوس ماگزیلاری پایین می‌آید. در این حالت استخوان در دسترس بین لبه کرست کف سینوس ماگزیلاری کاهش پیدا می‌کند و جهت کارگذاری ایمپلنت دندانی با طول مناسب نیاز به جراحی سینوس لیفت خواهد بود. اصول این جراحی شامل ایجاد پنجره استخوانی در دیواره طرفی

سینوس ماگزیلاری، بلند کردن با احتیاط غشای سینوس از درون زوائد آلوئولر و بالا نگه داشتن این غشای بلند شده با استفاده از بیومتریال استخوان اتولوگ یا سنتتیک و ایمپلنت دندانی می‌باشد. آگاهی از جزئیات ساختار غشای سینوس خصوصاً داربست این بافت، در فهم بیشتر این عمل و ابداع روش‌های نوین در این جراحی کمک خواهد کرد. اصول مهندسی بافت از رژنراسیون و ترمیم طبیعی بافت‌ها گرفته شده است. بنابر این هر دو به سه عنصر اصلی احتیاج دارند: سلول، سیگنال و داربست که این مفهوم اغلب به صورت مثلث نشان داده می‌شود.

توانایی غشاء مخاطی مفروش‌کننده سینوس ماگزیلاری در تولید استخوان در محیط آزمایشگاه توسط مطالعات مختلفی بررسی شده است.[۲-٤] البته مطالعات در این زمینه کافی نمی‌باشد و تحقیقات هیستولوژیک بیشتری نیاز است. این غشاء دارای سلول‌های چند توان مزانشیمی می‌باشد. این توانایی اساسی روش سینوس لیفت باز بدون استفاده از مواد پیوندی اتوژن یا مواد سنتتیک می‌باشد.[۵-۹] در این روش بالا بردن غشاء کف سینوس ماگزیلاری و بالا نگهداشتن این غشاء با استفاده از ایمپلنت‌هایی دندانی بدون استفاده از استخوان فرد یا مواد جایگزین استخوان منجر به استخوان‌سازی اطراف ایمپلنت خواهد شد. در این مطالعه به بررسی داربست غشاء اشنایدرین در محیط آزمایشگاه پرداخته شد، که تاکنون در این زمینه در نمای هیستوپاتولوژیک مطالعه‌ای صورت نگرفته است.

در بافت‌های زنده سلول‌ها به تنهایی به یکدیگر متصل نشده‌اند، بلکه توسط یک ساختار دیگر به نام ماتریکس خارج سلولی حمایت می‌شوند. ماتریکس خارج سلولی در بافت‌ها و ارگان‌ها به عنوان یک واسط و میانجی بین سلول‌ها عمل می‌کند. از جمله نقش‌هایی که ماتریکس خارج سلولی در بافت غشاء اشنایدریان سینوس ماگزیلا بازی می‌کند عبارتند از: ایجاد انبساط مکانیکی، نیروی انقباضی و خاصیت ارتجاعی، کنترل رفتارهای سلولی از طریق اتصال فاکتورهای رشد. روشی که امروزه بیشتر در مهندسی بافت متداول است کشت سلول‌ها روی یک داربست سه بعدی در شرایط آزمایشگاهی است. به طور کلی داربست‌های به کاربرده شده در مهندسی بافت باید در شرایط فیزیولوژیکی بتوانند شبکه‌ای چندمنظوره همانند ماده زمینه برون سلولی ایجاد نمایند. در سال‌های اخیر استفاده از ماتریکس خارج سلولی به عنوان یک داربست بیولوژیکی برای کاربردهای مهندسی بافت گسترش پیدا کرده است.[۱۰] اینگونه داربست‌ها می‌توانند محیطی مشابه با ماده زمینه برون سلولی برای سلول‌ها فراهم کنند و به دلیل پاسخ‌های مناسب ایمنولوژیک، خواص آنتی‌ژنیک ملایم، توانایی بهبود چسبندگی سلولی و خاصیت هموستازی بسیار مورد توجه می‌باشند.

سلول‌زدایی بافت و ارگان به طور موفقیت‌آمیزی در انواع مهندسی بافت و پزشکی ترمیمی استفاده شده است. متدها و روش‌های سلول‌زدایی به علت وجود تنوع زیادی که در بافت‌ها و ارگان‌ها وجود دارد، بسیار متفاوت است. راندمان و کارایی برداشت سلول از یک بافت به خاستگاه و منشاء بافت و خصوصیات فیزیکی و شیمیایی و متدهای انزیماتیک به کار رفته بستگی دارد. هر کدام از این روش‌ها ترکیبات بیوشیمیایی، ساختارهای بافتی و رفتار مکانیکی ماتریکس خارج سلولی باقیمانده را تحت تاثیر قرار داده و ممکن است سبب تغییر آن شوند. داربست‌های مورد استفاده در مهندسی بافت باید دارای درصد تخلخل بالایی باشند تا یک شبکه منفذدار مرتبط به هم به منظور عمل تغذیه رسانی سلول، دفع ضایعات سلولی به خارج داربست، تشکیل ماده زمینه برون سلولی و رگ‌زایی فراهم گردد. روش‌های سلول‌زدایی معمول مورد استفاده در تهیه

داربست‌ها عبارتند از: روش‌های فیزیکی مانند استفاده از انجماد، فشار مکانیکی و تحریک مکانیکی، روش‌های شیمیایی مانند استفاده از تریتون و سدیم دودسیل سولفات و روش‌های آنزیمی از قبیل اندونوکلئازها، اگزونوکلئازها.[۱۱] در این تحقیق تلاش گردید که از روش‌های عمومی سلول‌زدایی که برای بیشتر بافت‌ها استفاده می‌شود الگو گرفته و بافت غشاء اشنایدریان سینوس ماگزیلا را با استفاده از روش‌های مختلف فیزیکی و شیمیایی سلول‌زدایی نمائیم.

از آنجا که مطالعه در مورد ساختار حمایت‌کننده غشاء اشنایدریان سینوس ماگزیلا، غشاء پوشاننده سطح داخلی سینوس ماگزیلا، کم است، در این مطالعه به بررسی داربست سلول‌زدایی شده این غشای با استفاده از میکروسکوپ الکترونی پرداخته شد.

مواد و روش‌ها

۱۵ عدد نمونه غشای سینوس متعلق به مردان ۳۰-۲۰ ساله، فاقد بیماری‌های سیستمیک و غیرسیگاری انتخاب شدند. نمونه‌ها حین جراحی اوستئومی لفورت I (راست فکی) از مازاد غشای اشنایدرین با ملاحظات آسپتیک و با رعایت اصول اخلاقی نمونه‌ها به دست آمدند و در محلول PBS[۱] به آزمایشگاه منتقل شدند.

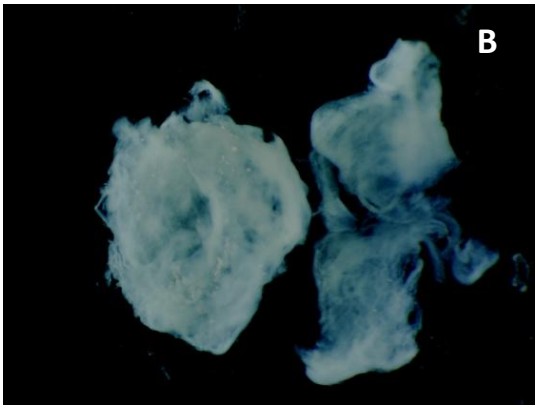
برای حذف سلول‌ها از بافت غشاء اشنایدریان سینوس ماگزیلا از تیمارهای فیزیکی و شیمیایی استفاده شد. در روش فیزیکی سلول‌زدایی، در ابتدا نمونه‌ها به مدت ٤-۳ روز در فریزر ۲۰- قرار داده شدند، سپس با استفاده از روش انجماد سریع توسط ازت مایع درصد بیشتری از سلول‌ها حذف گردید. در این روش ابتدا نمونه‌های تهیه شده در درون کرایوتیوب‌های ۲ml قرارگرفته و به مدت ۲ دقیقه در ازت مایع قرار داده شدند، بعد از این مدت نمونه‌ها از ازت خارج و به مدت ۵ دقیقه در محلول سرم فیزیولوژی قرار گرفتند و سپس دوباره نمونه‌ها به ازت مایع منتقل شدند که این روند حدود ۷-۵ مرتبه تکرار شد. سپس به سه گروه تقسیم شده و ۲٤ ساعت در شوینده سدیم دو دسیل سولفات (CinnaGen, Iran) با غلظت‌های ۰/۱، ۰/۵، ۱٪ قرار داده شدند. در طی این مدت به آرامی هم زده شدند. بعد از آن چندین مرحله شستشو با آب مقطر داده شد. به منظور مطالعات بافتی، از محلول بوئن جهت فیکس کردن نمونه‌ها استفاده شد. بعد از انجام مراحل آبگیری، پارافین دهی و قالب‌گیری، مقاطع پارافینی از بافت‌های سلول‌زدایی شده در هر گروه تهیه و به منظور بررسی موفقیت سلول‌زدایی، از رنگ‌آمیزی هماتوکسیلین - ائوزین و رنگ فلورسنت DAPI[۲] استفاده شد. رنگ فلورسنت DAPI می‌تواند با رشته‌های DNA متصل شده و بنابراین مارکر مناسبی برای نشان دادن هسته سلول‌ها می‌باشد. رنگ‌آمیزی پیکروسیروس رد نیز به عنوان یک رنگ اختصاصی برای تعیین محتوی کلاژن در بافت مورد استفاده قرار گرفت که نتیجه آن ایجاد کلاژن قرمز رنگ در زمینه کم رنگ و هسته سیاه یا قهوه‌ای است. به منظور تهیه تصاویر میکروسکوپ الکترونی نگاره SEM (Scanning Electron Microscope) نمونه‌ها با گلوترآلدئید و اسمیم تتراکساید ثابت و با درجات صعودی اتانل آبگیری شدند. پس از خشک شدن، نمونه‌ها روی گرید قرار گرفتند و با پوشش طلا-پالادیوم پوشانده شدند. نمونه‌ها با میکروسکوپ الکترونی نگاره (Leo-VP1450, Germany) مشاهده و تصویر برداری گردیدند.

1. Phosphate-buffered saline

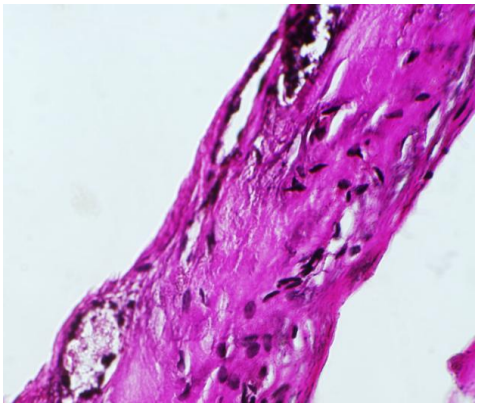
2. 4'-6-Diamidino-2-phenylindole

یافته‌ها

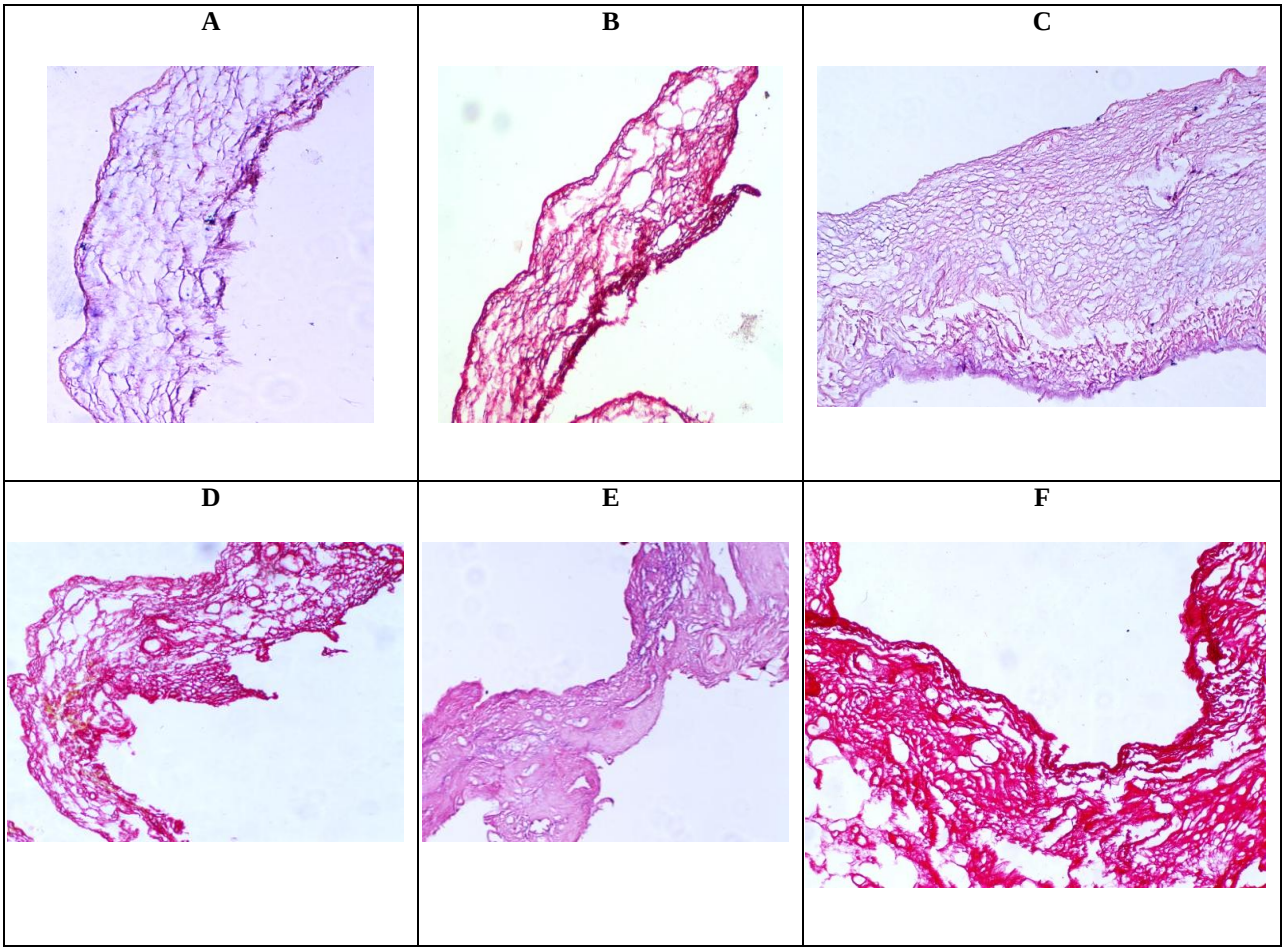
در این تحقیق جهت آماده‌سازی داربست از غشای سینوس انسان (تصویر ۱) بافت‌های غشای سینوس بوسیله روش‌های فیزیکی و شیمیایی سلول‌زدایی شدند. در تصویر ۲، نمای هیستوپاتولوژی بافت غشای سینوس ماگزیلا مشاهده می‌شود. طبق مطالعات بافت شناسی، در غلظت ۱ درصد SDS سلول‌زدایی از بافت غشاء اشنایدریان سینوس ماگزیلا به طور کامل صورت گرفته است. اما در غلظت‌های ۰/۵ و ۰/۱ درصد، در حاشیه‌های ماتریکس میزان کمی از حضور سلول‌ها مشاهده می‌شود (تصاویر 3 A,C,E). در همین راستا و جهت بررسی حضور و حفظ رشته‌های کلاژن از رنگ‌آمیزی پیکروسیروس رد نیز استفاده گردید. طبق نتایج به دست آمده در تمام گروه‌ها رشته‌های کلاژن به میزان زیادی نسبت به نمونه کنترل حفظ گردیده بود (تصاویر 3 B,D,F). اما درهم‌آمیختگی رشته‌های کلاژن و در نتیجه تخلخل ماتریکس خارج سلولی در گروه سلول‌زدایی شده با غلظت یک درصد سدیم دودسیل سولفات بیشتر از سایر گروه‌های مطالعه شده در این بررسی بود. از آنجا که تخلل در مهندسی بافت جهت نفوذ سلول‌ها به داربست دارای اهمیت می‌باشد، غلظت یک درصد برای سلول‌زدایی در مهندسی بافت مناسب‌تر می‌باشد. حذف سلول‌ها، حفظ رشته‌های کلاژن و منافذ ایجاد شده در غشای سینوس با استفاده از میکروسکوپ الکترونی در تصویر ٤ نشان داده شده است. بنابراین نتایج به دست آمده از مطالعات بافتی کارایی روش به کار برده شده را در حذف سلول‌ها، حفظ رشته‌های کلاژن و وجود تخلخل در نتیجه تهیه داربست مناسب را تایید نمود.



تصویر ۱ : تصویر ماکروسکوپی از غشاء اشنایدریان سینوس ماگزیلا. A) قبل از فرایند سلول‌زدایی B) پس از فرایند سلول‌زدایی.



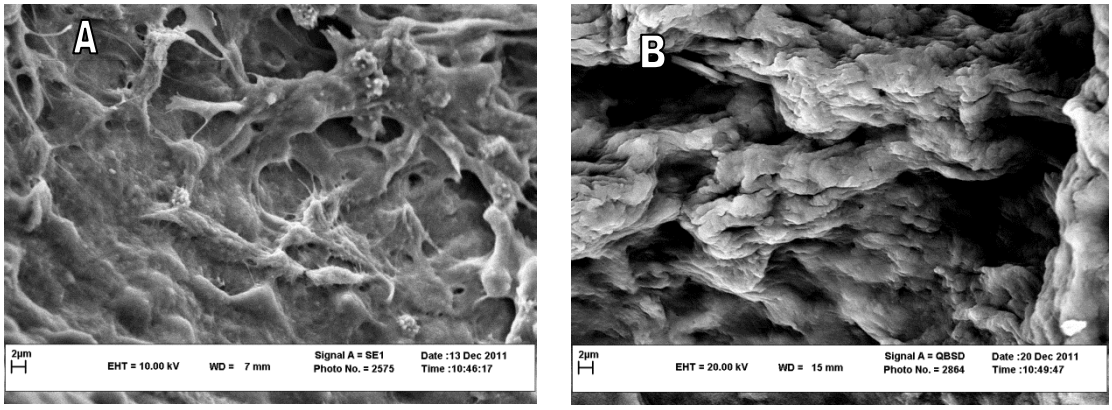
تصویر ۲ : بافت غشاء اشنایدریان سینوس ماگزیلا (رنگ‌آمیزی H&E- درشت نمایی ۲۰۰X).



تصویر ۳ : بررسی اثر سلول‌زدایی برحذف سلول‌ها و میزان کلاژن بافت غشاء اشنایدریان سینوس ماگزیلا.

A,C,E) سلول‌زدایی به ترتیب با غلظت‌های ۰/۱، ۰/۵ و ۱ درصد SDS (رنگ‌آمیزی H&E- درشت نمایی ۱۰۰X).

B,D,F) سلول‌زدایی به ترتیب با غلظت‌های ۰/۱، ۰/۵ و ۱ درصد SDS(رنگ‌آمیزی پیکروسیروس رد - درشت نمایی ۱۰۰X).



تصویر ٤ : بررسی غشاء اشنایدریان سینوس ماگزیلا قبل (A) و بعد (B) از مراحل سلول‌زدایی با غلظت یک درصد سدیم دودسیل سولفات با استفاده از میکروسکوپ الکترونی.

بحث

سلول‌زدایی بافت به طور موفقیت‌آمیزی در مهندسی بافت و پزشکی ترمیمی مورد استفاده قرار می‌گیرد. روش‌های سلول‌زدایی به دلیل تنوع زیاد بافت‌ها بسیار متفاوت است. روش‌های سلول‌زدایی معمول مورد استفاده در تهیه داربست‌ها عبارتند از: روش‌های فیزیکی، روش‌های شیمیایی و روش‌های آنزیمی.

سلول‌ها دارای محتوی چربی بالایی در غشاء خود هستند، بنابراین مواد شوینده‌ای (دترجنت) که سبب لیز این اجزاء سلولی شوند، می‌توانند باعث سلول‌زدایی بافت‌ها شوند. تحقیقات در بیش از ۱۵ سال گذشته، روی روش‌های سلول‌زدایی بهینه متمرکز شده‌اند. که به طور کلی شامل استفاده از پاک کننده‌های آنیونی، یونی و یا هیپوتونیک (به عنوان مثال سدیم دودسیل سولفات، تریتون X-100)، آنزیم‌ها (مانند تریپسین) و نوکلئازها (مانند DNase و RNase) با غلظت‌ها و زمان‌های متفاوت بوده است.

روش‌های آماده‌سازی داربست از ماتریکس خارج سلولی بافت‌ها، مورفولوژی سطح و ویژگی‌های مکانیکی داربست را تا اندازه‌ای تحت تأثیر قرار می‌دهد. در حالی که در فرایند سلول‌زدایی تا حد زیادی فراساختار ماتریکس حفظ می‌شود، اما الگوهای قرارگیری رشته‌های کلاژن، توزیع فیبرها و گلیکوزآمینوگلیکان‌ها می‌تواند تغییر کند. که این نتایج، تغییر در عملکرد بیومکانیکی ماتریکس، می‌تواند با بکارگیری روش‌های مختلف جهت سلول‌زدایی، حتی سخت‌تر و شدیدتر شود. مطالعات مختلف نشان داده است که کارآیی و راندمان یک روش سلول‌زدایی خاص تا حد زیادی وابسته به خصوصیات بافت مورد نظرآن بافت می‌باشد. بنابراین با توجه به این نتایج، ایجاد تعادل در از بین بردن کامل سلول‌ها (هر گونه بقایای سلولی باعث پاسخ سیستم ایمنی می‌شود) و در مقابل حفظ بیومکانیک بافت دشوار می‌باشد. در بسیاری از مطالعات از سدیم دودسیل سولفات و یا تریتون برای سلول‌زدایی بافت‌ها استفاده شده است و نتایج متناقضی

در رابطه با کارایی آنها در سلول‌زدایی و میزان آسیب به بافت گزارش شده است.[۱۳-۱۱] در این پژوهش از روش‌های فیزیکی شامل انجماد آهسته، انجماد سریع در ازت مایع و از روش‌های شیمیایی شامل شوینده یونی سدیم دودسیل سولفات جهت سلول‌زدایی استفاده شد. مشخص شده است که انجماد سریع با تشکیل کریستال‌های یخی موجب تخریب غشاء سلول می‌گردد و به فرایند سلول‌زدایی کمک می‌کند، اما با تخریب ماتریکس خارج سلولی و گسستگی آن موجب تغییر ساختمان بافت می‌گردد، با این حال نسبت به انجماد آهسته آسیب کمتری به بافت وارد می‌کند. سدیم دودسیل سولفات از شوینده‌های آنیونی عمومی می‌باشد که در سرتاسر جهان استفاده می‌گردد و سمیت این ماده شیمیایی مشخص شده است. سدیم دودسیل سولفات موجب آسیب به غشاها و تغییر در متابولیسم کربن می‌شود و پاسخ استرس اکسیداتیو را القاء می‌کند و با انحلال غشاء، دناتوره نمودن پروتئین‌ها و حذف پروتئین‌های سیتوپلاسمی و هسته‌ای، موجب سلول‌زدایی بافت و کاهش پاسخ ایمنوژنیک پس از پیوند داربست می‌گردد. مطالعه Seddon و همکارانش[۱٤] نشان داده است که پاک‌کننده‌های یونی از طریق اختلال در فعل و انفعالات پروتئین-پروتئین سبب تغییر ماهیت پروتئین‌ها می‌شوند. در مقابل Schaner و همکارانش[۱٥] به این نتیجه رسیدند که سدیم دودسیل سولفات در میان چندین دترجنت مورد مطالعه، یک گزینه مناسب برای مهندسی بافت عروق می‌باشد و توسط آن سلول‌زدایی از بافت عروق و استخراج سلول‌ها بدون ایجاد تغییر قابل توجه در مورفولوژی و مقاومت ماتریکس خارج سلولی بافت حاصل می‌گردد. بررسی آنها با میکروسکوپ الکترونی نشان داد که SDS در غلظت ۰/۰۷۵ سلول‌زدایی را به طور کامل باعث شده و از لحاظ ترکیبات ماتریکس خارج سلولی، فیبرهای کلاژن دست نخورده و فیبرهای الاستین به میزان کمی کاهش می‌یابد. همچنین مطالعات Lumpkins و همکارانش[۱٦] نشان داد که سدیم دودسیل سولفات در مقایسه با تریتون X-100 و استن یک گزینه مناسب جهت سلول‌زدایی از بافت دیسک مفصل گیجگاهی است. مطالعات آنها نشان داد که در اندازه دیسک‌ها بعد از فرایند سلول‌زدایی با غلظت یک درصد سدیم دودسیل سولفات نسبت به قبل از آن تغییری ایجاد نمی‌شود.

Yang و همکارانش[۱۷] 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 سه بعدی مناسبی را برای چسبندگی، تکثیر و تمایز سلول‌های بنیادی مزانشیمی به کندروسیت فراهم کند و به عنوان یک بیومتریال جهت مهندسی بافت غضروف کاربرد داشته باشد.

کلاژن، به عنوان یک داربست دارای سازش‌پذیری زیستی بالایی است که امکان جایگزینی آسان سلول‌ها و فاکتورهای رشد را فراهم می‌کند. مطالعات نشان داده است که رشته‌های کلاژن دارای اثرات القایی روی سلول‌ها می‌باشند و تراکم آن‌ها بر رفتارهای سلولی موثر است، بنابراین حفظ آنها در داربست حائز اهمیت می‌باشد. اما بر اساس مطالعات میکروسکوپ الکترونی نگاره، بافت لثه پس از مراحل آماده‌سازی ساختمان کلی خود را حفظ نمود. رشته‌های کلاژن موجود در بافت همبند نیز سالم مانده بودند. این رشته‌ها بخش اصلی داربست را تشکیل می‌دهند و از آنجا که تراکم کلاژن بر رفتارهای سلولی

مؤثر می‌باشد، از این رو ساختار داربست‌های تهیه شده با رنگ‌آمیزی اختصاصی از قبیل پیکروسیروس رد و میکروسکوپ الکترونی مورد مطالعه قرار گرفتند. داربست‌های مورد استفاده در مهندسی بافت باید دارای درصد تخلخل بالایی باشند تا یک شبکه منفذدار مرتبط به هم به منظور عمل تغذیه رسانی سلول، تشکیل ماده زمینه برون‌سلولی و رگ‌زایی فراهم نمایند. حفظ رشته‌های کلاژن و وجود تخلل در داربست سلول‌زدایی شده غشای سینوس، محیط مناسبی برای جایگزینی سلول‌های بنیادی فراهم می‌نماید و در نهایت ساختار سه بعدی این غشا می‌تواند به عنوان الگوی طبیعی جهت ساخت داربست‌های پلیمری پیشنهاد شود.

مطالعات دیگری لازم است تا با استفاده از داربست ایجاد شده در این تحقیق محیط مناسبی برای تمایز سلول‌های بنیادی به سلول‌های استخوانی و تولید بافت استخوانی فراهم شود.

نتیجه گیری

با توجه به نتایج حاصل از این تحقیق، داربست به دست آمده از غشای سینوس انسان می‌تواند بستر مناسبی در مهندسی بافت جهت جراحی‌های سینوس لیفت قبل از کاربرد ایمپلنت‌های دندانی باشد.

تشکر و قدردانی

بدینوسیله از معاونت پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی مشهد به عنوان حمایت‌کننده مالی این پژوهش تقدیر و تشکر می‌شود.

منابع

1. Graziano A, Benedetti L, Massei G, Cusella de Angelis MG, Ferrarotti F, Aimetti M. Bone production by human maxillary sinus mucosa cells. J Cell Physiol 2012; 227(9): 3278-81.
2. Srouji S, Ben-David D, Lotan R, Riminucci M, Livne E, Bianco P. The innate osteogenic potential of the maxillary sinus (Schneiderian) membrane: An ectopic tissue transplant model simulating sinus lifting. Int J Oral Maxillofac Surg 2010; 39(8): 793-801.
3. Srouji S, Kizhner T, Ben David D, Riminucci M, Bianco P, Livne E.The Schneiderian membrane contains osteoprogenitor cells: *In vivo* and in vitro study. Calcif Tissue Int 2009; 84(2): 138-45.
4. Kim SW, Lee IK, Yun KI, Kim CH, Park JU. Adult stem cells derived from human maxillary sinus membrane and their osteogenic differentiation. Int J Oral Maxillofac Implants 2009; 24(6): 991-8.
5. Chen TW, Chang HS, Leung KW, Lai YL, Kao SY. Implant placement immediately after the lateral approach of the trap door window procedure to create a maxillary sinus lift without bone grafting: A 2-year retrospective evaluation of 47 implants in 33 patients. J Oral Maxillofac Surg 2007; 65(11): 2324-8.
6. Price AM, Nunn M, Oppenheim FG, Van Dyke TE. Denovo bone formation after the sinus lift procedure. J Periodontol 2011; 82(9): 1245-55.
7. Sohn DS, Lee JS, Ahn MR, Shin HI. New bone formation in the maxillary sinus without bone grafts. Implant Dent 2008; 17(3): 321-31.
8. Thor A, Sennerby L, Hirsch JM, Rasmusson L. Bone formation at the maxillary sinus floor following simultaneous elevation of the mucosal lining and implant installation without graft material: An evaluation of 20 patients treated with 44 Astra Tech implants. J Oral Maxillofac Surg 2008; 66(10): 2195-6.
9. Lundgren S, Andersson S, Gualini F, Sennerby L. Bone reformation with sinus membrane elevation: A new surgical technique for maxillary sinus floor augmentation. Clin Implant Dent Relat Res 2004; 6(3): 165-73.
10. Badylak SF. Xenogeneic extracellular matrix as a scaffold for tissue reconstruction. Transpl Immunol 2004; 12(3-4): 367-77.
11. Gilbert TW, Sellaro TL, Badylak SF. Decellularization of tissues and organs. Biomaterials 2006; 27(19): 3675-83.

12. Butcher JT, Mahler GJ, Hockaday LA. Aortic valve disease and treatment: The need for naturally engineered solutions. Adv Drug Deliv Rev 2011; 63(4-5): 242-68.
13. Naso F, Gandaglia A, Formato M, Cigliano A, Lepedda AJ, Gerosa G, et al. Differential distribution of structural components and hydration in aortic and pulmonary heart valve conduits: Impact of detergent-based cell removal. Acta Biomater 2010; 6(12): 4675-88.
14. Seddon AM, Curnow P, Booth PJ. Membrane proteins, lipids and detergents: Not just a soap opera. Biochim Biophys Acta 2004; 1666 (1-2): 105-17.
15. 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; 40(1): 146-53.
16. Lumpkins SB, Pierre N, McFetridge PS. A mechanical evaluation of three decellularization methods in the design of a xenogeneic scaffold for tissue engineering the temporomandibular joint disc. Acta Biomater 2008; 4(4): 808-16.
17. 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; 29(15): 2378-87.