

## بررسی هیستولوژیکی برهم کنش میان سلول‌های بنیادی مزانشیمی رت ویستار با ماتریکس لته انسان در شرایط آزمایشگاهی

زهرا یارجانلی\*، ناصر مهدوی شهری\*\*،#، مریم مقدم متین\*\*\*، مسعود فریدونی\*\*\*\*، سیدعلی بنی هاشم راد\*\*\*\*\*

\* دانشجوی کارشناسی ارشد زیست سلولی تکوینی، گروه زیست شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه فردوسی مشهد

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

\*\*\* دانشیار گروه زیست شناسی، گروه تحقیقاتی سلول‌های بنیادی، پژوهشکده فناوری زیستی، دانشکده علوم، دانشگاه فردوسی مشهد

\*\*\*\* استادیار گروه زیست شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه فردوسی مشهد

\*\*\*\*\* استادیار پرودانتیکس، مرکز تحقیقات دندانپزشکی، دانشکده دندانپزشکی، دانشگاه علوم پزشکی مشهد

تاریخ ارائه مقاله: ۹۰/۵/۱۱ - تاریخ پذیرش: ۹۰/۷/۱۲

### *In Vitro* Histological Investigation of Interactions between Rat's Mesenchymal Stem Cells and Human Gingival Matrix

Zahra Yarjanli\*, Nasser MahdaviShahri\*\*,#, Maryam MoghaddamMatin\*\*\*, Masoud Fereidoni\*\*\*\*, SeyedAli BanihashemRad\*\*\*\*\*

\* Student of Cellular and Developmental Biology, Dept of Biology, School of Science, Ferdowsi University of Mashhad, Mashhad, Iran.

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

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

\*\*\*\* Assistant Professor, Dept of Biology, School of Science, Ferdowsi University of Mashhad, Mashhad, Iran.

\*\*\*\*\* Assistant Professor of Periodontics, Dental Research Center, School of Dentistry, Mashhad University of Medical Sciences, Mashhad, Iran.

Received: 2 August 2011; Accepted: 4 October 2011

**Introduction:** Extracellular matrix of natural tissues can be used as a scaffold for reconstructing biological tissues and organs. In this study, decellularized human gingival matrix was used as a scaffold for investigating the interactions of rat's bone marrow mesenchymal stem cells with human gingival matrix.

**Materials & Methods:** To reach this goal, human gingival tissues were decellularized by two detergents sodium dodecyl sulfate (SDS) and Triton X-100. After washing and sterilization procedures, scaffolds were divided into 3 groups. Low density (LD) group was cultivated with  $8 \times 10^4$  cells/cm<sup>2</sup>, high density (HD) group was cultivated with  $8 \times 10^5$  cells/cm<sup>2</sup>, and control (C) group, was maintained in culture medium without any cells. Microscopic sections were prepared from the scaffolds before and after 1, 2 and 4 weeks of culture with mesenchymal cells and were stained with Hematoxylin-Eosin. Repeated measure ANOVA was used to study the cell density alteration significance within the matrixes and post tests of means comparisons were performed within and between the groups. Also, gingival samples before and after decellularization procedure were investigated by scanning electron microscopy.

**Results:** Histological study of decellularized scaffolds revealed that nuclear and cellular components of the tissues were completely removed. Scanning electron microscopy of the scaffolds indicated that collagen fibers of connective tissue remained intact. Study of the scaffolds 1, 2 and 4 weeks after culture, revealed penetration of mesenchymal stem cells in scaffold, migration of cells towards connective tissue's papilla, and moreover epithelium-like structures. Statistical analysis indicated that cell density in HD group was significantly ( $P < 0.05$ ) higher than LD group. Cell density in both LD and HD groups significantly increased at 2<sup>nd</sup> week and decreased after 4 weeks of culture.

**Conclusion:** According to the results, scaffolds prepared from human gingival matrix can be a suitable scaffold for studying *In vitro* cell behaviors during oral wound healing.

**Key words:** Extracellular matrix, epithelium, interaction, scaffold, human gingiva, mesenchymal stem cells.

# Corresponding Author: mahdavin@um.ac.ir

J Mash Dent Sch 2012; 36(1): 79-90.

### چکیده

**مقدمه:** ماتریکس خارج سلولی بافت های طبیعی را می توان برداشت و به عنوان داربست زیستی برای بازسازی بافت ها و اندام ها بکار برد. در این مطالعه از ماتریکس سلول زدایی شده بافت لثه انسان، به عنوان داربستی جهت بررسی برهم کنش های هیستولوژیک میان سلول های بنیادی مزانشیمی گرفته شده از مغز استخوان رت ویستار و ماتریکس خارج سلولی بافت لثه انسان، استفاده گردید.

**مواد و روش ها:** برای وصول به این هدف، ابتدا بافت های لثه انسان با استفاده از دو شوینده سدیم دودسیل سولفات (SDS) و تریتون X-100 سلول زدایی شدند. پس از مراحل شستشو و استریلیزاسیون، داربست ها به سه گروه تقسیم شدند: گروه کم تراکم (LD) که با  $8 \times 10^4$  cells/cm<sup>2</sup> سلول زدایی شد و گروه پرتراکم (HD) که با  $8 \times 10^6$  cells/cm<sup>2</sup> سلول کشت شدند و گروه کنترل (C) که بدون سلول در محیط کشت نگه داشته شد. از داربست های تهیه شده قبل و پس از گذشت ۱، ۲ و ۴ هفته از کشت با سلول های مزانشیمی، مقاطع میکروسکوپی تهیه و با استفاده از هماتوکسیلین-ئوزین رنگ آمیزی شدند. معنی داری تغییرات تراکم سلولی داربست های سلولی به روش Repeated measure ANOVA و پس از آزمون مقایسه میانگین ها به طور درون و برون گروهی بررسی شد و همچنین تعدادی از نمونه های لثه قبل و پس از فرآیند سلول زدایی مورد مطالعات میکروسکوپ الکترونی نگاره قرار گرفتند.

**یافته ها:** مطالعه هیستولوژیک داربست ها پس از سلول زدایی نشان داد که هسته ها و اجزای سلولی به طور کامل از بافت حذف شده اند. بررسی با میکروسکوپ الکترونی نگاره مشخص کرد که طی فرآیند سلول زدایی، رشته های کلاژن در بافت همبند سالم مانده است. مطالعه داربست ها ۱، ۲ و ۴ هفته پس از کشت نفوذ سلول های بنیادی مزانشیمی در داربست، مهاجرت سلول ها به سمت پایلای بافت همبند و تشکیل ساختارهای شبه اپیتلیوم را نشان داد. آنالیزهای آماری مشخص کرد که تراکم سلولی در داربست های گروه HD به طور معنی داری ( $P < 0.05$ ) بیشتر از گروه LD بود. تراکم سلولی در هر دو گروه LD و HD در هفته دوم افزایش معنی دار و در هفته چهارم کاهش معنی داری یافت.

**نتیجه گیری:** نتایج حاصل نشان می دهد که داربست حاصل از ماتریکس لثه انسان می تواند بستر مناسبی جهت بررسی رفتارهای سلولی طی ترمیم زخم های دهانی در شرایط آزمایشگاهی باشد.

**واژه های کلیدی:** ماتریکس خارج سلولی، اپیتلیوم، برهم کنش، داربست، لثه انسان، سلول های بنیادی مزانشیمی. مجله دانشکده دندانپزشکی مشهد / سال ۱۳۹۱ دوره ۳۶ / شماره ۱: ۹۰-۷۹.

### مقدمه

لثه بخشی از مخاط جوینده است که زواید آلوئولی فک ها را می پوشاند و گردن دندان ها را احاطه می کند. در مقایسه با بافت نرم پوشاننده لب ها و گونه ها، لثه اغلب اتصال محکمی به استخوان زیرین تشکیل می دهد که به مقاومت در برابر سایش با مواد غذایی کمک می کند. لثه از نظر آناتومیکی به سه ناحیه مارژینال (آزاد)، چسبنده (متصل) و بین دندانی تقسیم می گردد.<sup>(۱)</sup> لثه آزاد و چسبنده توسط خطی به موازات حاشیه لثه از هم جدا می گردند. لثه از نظر میکروسکوپی از اپیتلیوم مکعبی مطبق، تیغه میانی و آستر مخاط زیرین تشکیل شده است.<sup>(۲)</sup> فیبرهای لثه که به نگهداری لثه در مجاورت دندان کمک می کند، اساساً از کلاژن نوع I و تاحدی کلاژن نوع III تشکیل شده اند.<sup>(۳)</sup> وجود کلاژن، این بافت را در مقابل آماس

مقاوم تر از مخاط آلوئولی می کند.<sup>(۴)</sup>

به دلیل تراکم بالای کلاژن در مخاط دهان، در چندین مطالعه از ترکیبات متفاوت کلاژن برای تهیه داربست جهت درمان زخم های حفره دهان استفاده شده است. Butler و همکارانش، ماتریکس های متخلخل کلاژن-گلیکوز آمینوگلیکان پوشیده با الاستومر سیلیکان را با سلول های اپیتلیال مخاط دهان انسان کشت دادند و به پشت موش پیوند زدند.<sup>(۵)</sup> ماتریکس های کلاژنی ممکن است در مهندسی بافت کام و هر جای دیگر حفره دهان مناسب باشند، اما محیط دهانی به طور کامل با محیط پوست تفاوت دارد. به علاوه، نشان داده شده که درمان زخم در پوست و حفره دهان کاملاً متفاوت می باشد.<sup>(۶)</sup> از معایب ماتریکس های کلاژنی طول عمر محدود، مقاومت اندک در برابر انقباض، همچنین اتصال ضعیف اپیدرم به

بود که جهت درمان‌های ترمیمی-پروتز و جراحی دندان عقل نهفته به کلینیک مراجعه کرده بودند. قطعات لته حاصل از جراحی‌ها در سرم فیزیولوژی در دمای صفر درجه در یخچال نگهداری شدند. پس از جدا نمودن قطعات اضافی، اندازه بافت‌ها به  $5\text{mm} \times 5\text{mm}$  رسید. به منظور سلول‌زدایی بافت‌ها، از محلول ۱٪ SDS در فسفات بافر سالین (PBS) به مدت ۲۴ ساعت و سپس محلول ۱٪ تریتون X-100 در PBS به مدت ۱۲ ساعت (همراه با همزدن دستی و در دمای اتاق) استفاده گردید. به منظور خروج شوینده‌ها از بافت، نمونه‌ها به مدت ۲ ساعت در PBS قرار گرفتند، سپس در اتانل ۷۰٪ غوطه‌ور شدند. این مرحله از کار ۸ بار تکرار شد تا از خروج SDS از بافت، اطمینان حاصل گردد. به منظور استریلیزاسیون، داربست‌ها به مدت ۳۰ دقیقه در اتانل ۷۰٪ قرار گرفتند (از این مرحله به بعد زیر هود لامینار انجام گرفت). برای حذف الکل، داربست‌ها با آب مقطر استریل شسته و به مدت ۱ ساعت در PBS استریل قرار داده شدند.

برای آماده‌سازی سلول‌های بنیادی مزانشیمی مغز استخوان، رت نر بالغ نژاد ویستار با استفاده از کلروفرم بیهوش و استخوان فمور آن در شرایط کاملاً استریل جدا گردید. ابتدا دو سر استخوان جدا و محتویات آن با تزریق محیط کشت<sup>۱</sup> DMEM حاوی ۱۰٪ سرم جنینی گاو (FBS) و  $10\ \mu\text{l}$  پنی‌سیلین / استرپتومایسین به داخل آن استخراج شد و سوسپانسیون حاصل به فلاسک انتقال یافت و در انکوباتور با دمای  $37^\circ\text{C}$  و ۵٪  $\text{CO}_2$  نگهداری گردید. پس از ۲۴ ساعت از کشت اولیه محیط کشت آن تعویض گردید و سلول‌های چسبنده به کف فلاسک باقی ماندند. محیط کشت سلول‌ها هر ۳-۴ روز یکبار تعویض گردید و سلول‌ها پس از پاساژ چهارم مورد استفاده قرار گرفتند.

آن را می‌توان ذکر نمود. همچنین بعضی از این ماتریکس‌های کلاژن منجر به بروز عوارض ایمنی می‌گردند.<sup>(۷)</sup>

علاوه بر داربست‌های کلاژنی، از ماتریکس‌های طبیعی مانند آلودرم جهت پیوند در داخل دهان<sup>(۸)</sup> استفاده شده است. آلودرم از پوست جسد انسان و از طریق فرآیند فریز-خشک ساخته شده است که عناصر ضروری ساختمان بافت شامل توزیع و معماری دستجات کلاژن را آسیب نمی‌زند.<sup>(۹)</sup> Clark و همکارانش از آلودرم برای درمان شکاف کام استفاده نمودند و پیشنهاد کردند که آلودرم برای استفاده در بستن اولیه شکاف‌های وسیعی که در کام سخت و نرم ایجاد می‌گردد، یک داربست سالم و مؤثر می‌باشد.<sup>(۱۰)</sup> با این حال، استفاده از آلودرم به عنوان یک مدل تست در شرایط آزمایشگاهی مقرون به صرفه نمی‌باشد. به علاوه، بافت همبند گرفته شده از پوست به دلیل تفاوت در منشأ آن می‌تواند مورفولوژی اپیتلیوم و در نتیجه تکوین مدل مخاط دهان را تحت تأثیر قرار دهد.<sup>(۱۱)</sup>

با این حال، تاکنون داربستی از لته انسان به منظور بررسی برهم‌کنش سلول‌ها با مخاط دهان طی ترمیم زخم تهیه نشده است. از این رو در این مطالعه تلاش شد بافت لته با استفاده از روش‌های مختلف فیزیکی و شیمیایی سلول‌زدایی گردد و به عنوان داربستی جهت مطالعه رفتار سلول‌های بنیادی مزانشیمی مغز استخوان رت ویستار بکار رود.

### مواد و روش‌ها

نمونه‌های لته انسان با کمک متخصص و جراح لته در کلینیک تخصصی دندانپزشکی و با رعایت اصول اخلاقی مربوطه تهیه گردید. نمونه‌ها متعلق به مردان و زنان ۲۰-۴۵ ساله، فاقد بیماری‌های سیستمیک و غیرسیگاری

1. Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM)

رشته‌های کلاژن از رنگ‌آمیزی H&P استفاده گردید. بدین صورت که مقاطع پس از پارافین زدایی و آب‌دهی، به مدت ۵-۷ دقیقه با هماتوکسیلین و ایگرت رنگ‌آمیزی شدند. پس از شستشو با آب مقطر لام‌ها به مدت ۱۰-۴ ثانیه با پیک ایندیگوکارمین رنگ‌آمیزی شدند. مشابه قبل مراحل آب‌دهی، شفاف سازی و مونتاز انجام گرفت. سپس لام‌ها با میکروسکوپ نوری (Olympus IX70) ساخت ژاپن) مشاهده و تصاویر با دوربین عکاسی Canon متصل به میکروسکوپ تهیه شدند.

به منظور تهیه مقاطع میکروسکوپ الکترونی نگاره Leo (VP1450-ساخت آلمان) نمونه‌ها پس از شستشو با سرم فیزیولوژی، به مدت ۲۴ ساعت در فیکساتور گلوترالدئید ۲/۵٪ با بافر کاکودیلات سدیم ۰/۱ مولار تثبیت شدند. پس از شستشو با بافر، با فیکساتور اسمیم تتراکساید ۱٪ با بافر کاکودیلات سدیم ۰/۱ مولار به مدت ۱ ساعت تثبیت گردیدند. پس از شستشو با بافر، نمونه‌ها با درجات صعودی اتانل (۳۰٪، ۵۰٪، ۷۰٪، ۹۰٪ و ۱۰۰٪) 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 ساخت آلمان) مشاهده و تصویربرداری شدند.

برای بررسی تراکم سلولی، ۳ نمونه داربست از هر غلظت آماده گردید. سلول‌ها در مقاطع تهیه شده با رنگ‌آمیزی H&E و با بزرگنمایی 100X شمارش شده و در مساحت  $1\text{cm}^2$  محاسبه گردید. محاسبات آماری برای بررسی اثربخشی تیمارها با بکارگیری برنامه رایانه‌ای Repeated measure از آنالیز متغیرهای Graph Pad Prism استفاده شد. برای بررسی معنی‌داری تفاوت میانگین‌ها در هر گروه تیمار از پس آزمون آماری Tukey استفاده شد. نمودار با استفاده از نرم افزار Excel رسم گردید.

برای کشت سلول‌ها بر روی داربست‌های لته، ابتدا آن‌ها را تریپسینه نموده تا از فلاسک جدا گردند. پس از جدا شدن سلول‌ها از ظرف، محتویات آن در فالدکون ۲۰ml ریخته شد. پس از سانتریفیوژ و تعیین تعداد سلول‌ها با لام نئوبار، دو سوسپانسیون سلولی با میزان‌های  $2 \times 10^4$  و  $5 \times 10^4$  سلول در  $50\mu\text{l}$  تهیه گردید.

داربست‌ها پس از ۲۴ ساعت نگهداری در محیط کشت، در ظروف کشت ۲۴ خانه‌ای قرار گرفتند. داربست‌ها به سه گروه ۱۲ تایی کم‌تراکم، پرتراکم و کنترل تقسیم گردیدند. گروه کم تراکم با میزان  $50\mu\text{l} / 2 \times 10^4$  cells و گروه پرتراکم با  $50\mu\text{l} / 2 \times 10^4$  cells بر روی هر داربست کشت شدند و در گروه کنترل تنها محیط کشت به داربست‌ها اضافه گردید. پس از افزودن سوسپانسیون سلولی به داربست‌ها، به هر چاهک ۱ml محیط کشت افزوده و هر ۴-۳ روز یک‌بار محیط کشت آن‌ها تعویض گردید.

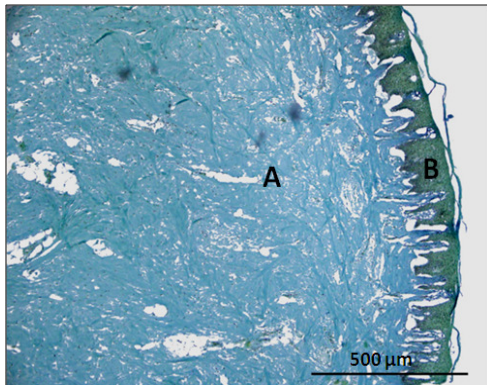
جهت مطالعه مورفولوژی و کنترل سلول‌زدایی، داربست‌ها قبل و ۱، ۲ و ۴ هفته پس از کشت با استفاده از فیکساتور بوئن تثبیت و پس از مراحل پاساژ بافتی و آغشتگی به پارافین، قالب‌گیری شدند. از قالب‌ها مقاطعی با ضخامت ۵ میکرون تهیه گردید و سپس با هماتوکسیلین-ائوزین (H&E) و هماتوکسیلین و ایگرت - پیک ایندیگو کارمین (H&P) رنگ‌آمیزی شدند.

مقاطع تهیه شده در رنگ‌آمیزی H&E پس از مراحل پارافین زدایی و آب‌دهی، به مدت ۵-۷ دقیقه با هماتوکسیلین (Art 4302) رنگ‌آمیزی شده و پس از شستشو با آب جاری و قرارگیری در الکل ۷۰ به مدت ۲-۱ دقیقه با ائوزین (C.I.Nr. 45380) رنگ‌آمیزی شدند. سپس مراحل آب‌دهی، شفاف سازی و مونتاز انجام گرفت. در این پژوهش جهت تشخیص بهتر هسته‌ها از

## یافته‌ها

گسترده‌تری قرار گرفته بودند. علاوه بر این، در هفته چهارم در اطراف داربست بخش‌هایی از ماتریکس در حال تخریب و جدایی از آن (تصویر ۵-B) مشاهده گردید که در میان آن‌ها آثار سلولی و گاهی خود سلول‌ها نیز وجود داشتند.

در این مطالعه داربست‌ها با دو میزان سلولی متفاوت  $8 \times 10^4$  و  $8 \times 10^5$  cells/cm<sup>2</sup> کشت شدند. بررسی‌های آماری (جدول ۱ و نمودار ۱) نشان داد که تراکم سلولی در داربست‌های پرتراکم نسبت به داربست‌های کم‌تراکم به طور معنی‌داری بیشتر بود. علاوه بر این، تعداد سلول‌ها در هر دو نوع داربست، در هفته دوم افزایش معنی‌دار و در هفته چهارم کاهش معنی‌داری را نشان داد.



تصویر ۱: نمای کلی لته انسان؛ ساختار کلی بافت لته انسان شامل بافت همبند (A) و اپیتلیوم (B) را با درشت‌نمایی 10X و با رنگ‌آمیزی H&P نشان می‌دهد.

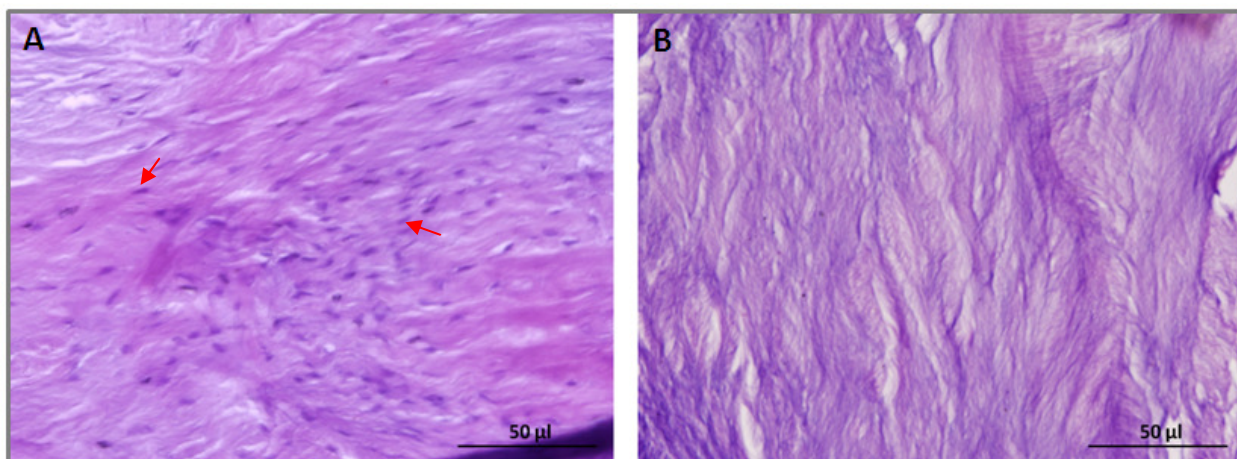
در این مطالعه به منظور تهیه داربست از لته انسان (تصویر ۱)، بافت‌های لته ابتدا با استفاده از ترکیبی از روش‌های فیزیکی و شیمیایی سلول‌زدایی گردیدند. همانطور که در تصویر ۲ مشاهده می‌گردد، مطالعه هیستولوژیک داربست‌ها با رنگ‌آمیزی H&E نمایانگر حذف هسته‌ها و اجزای سلولی از بافت لته پس از فرآیند سلول‌زدایی می‌باشد.

جهت بررسی تأثیر فرآیندهای آماده‌سازی بر ساختار رشته‌های کلاژن بافت از میکروسکوپ الکترونی نگاره استفاده گردید. در تصویر ۳ مشاهده می‌شود که اپیتلیوم بافت همبند حفظ گردیده و رشته‌های کلاژن بافت سالم باقی مانده‌اند.

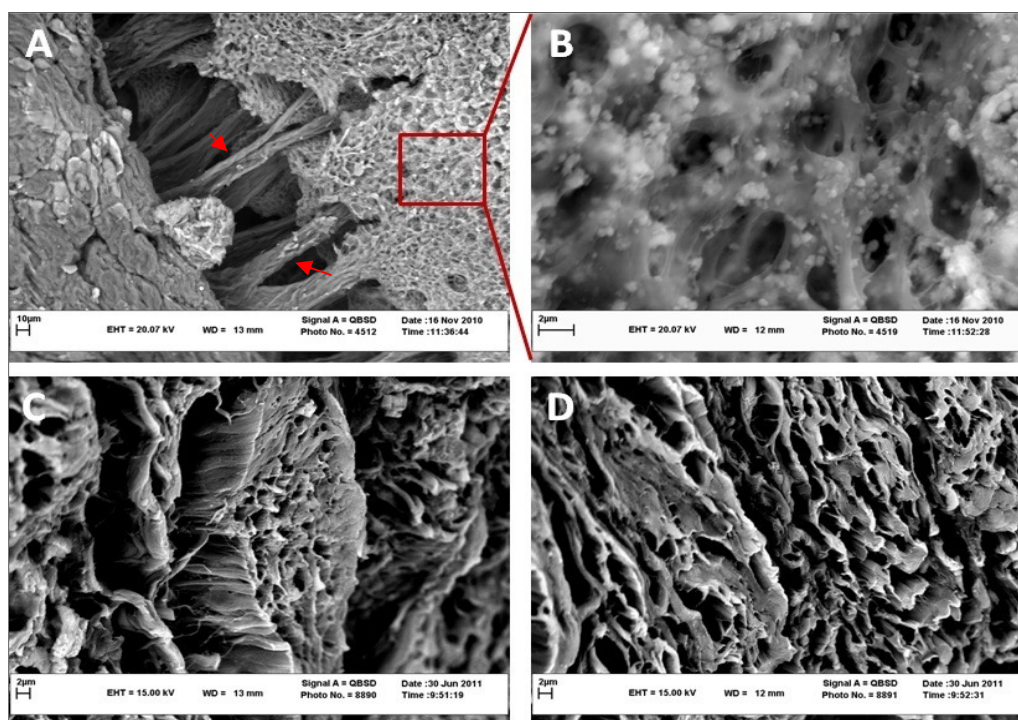
داربست‌های تهیه شده قبل و ۱، ۲ و ۴ هفته پس از کشت با سلول‌های بنیادی مزانشیمی گرفته شده از مغز استخوان رت مورد بررسی قرار گرفتند. مطالعات بافت‌شناسی یک هفته پس از کشت سلول‌ها بر روی داربست لته (تصویر ۴) نمایانگر استقرار سلول‌ها در سطح داربست از جمله اپیتلیوم (تصویر ۴-A)، نفوذ سلول‌ها به بافت همبند و مهاجرت سلول‌ها به مجاورت پاپیلاهای بافت همبند (تصویر ۴-B) می‌باشد.

همانطور که در شکل ۵ مشخص است، سلول‌هایی که در هفته اول به صورت یک لایه روی اپیتلیوم قرار داشتند در هفته دوم تقسیم شده و ساختاری چند لایه شبیه اپیتلیوم (تصویر ۵-A) را تشکیل دادند.

از نتایج جالب هفته چهارم تشکیل ساختارهایی شبیه حوضچه‌های خونی در بافت همبند را می‌توان ذکر نمود. لایه‌های سلولی بر روی اپیتلیوم به شکل منظم‌تر و

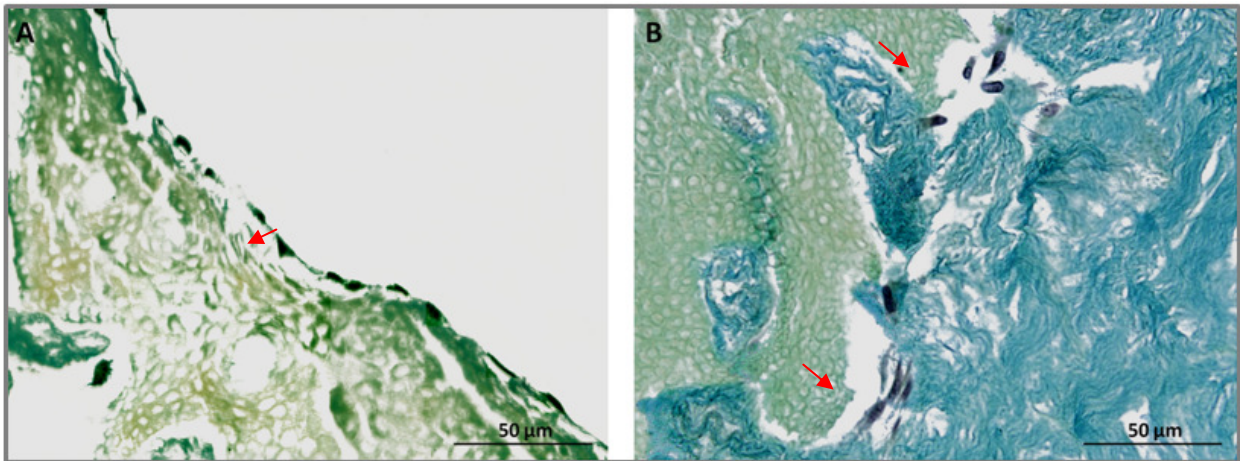


تصویر ۲: لته انسان قبل و بعد از فرآیند سلول زدایی؛ لته قبل (A) و بعد (B) از فرآیند سلول زدایی با رنگ آمیزی H&E و درشت نمایی 40X حذف اجزای سلولی را نشان می دهد و پیکان نمایانگر سلول ها می باشد.

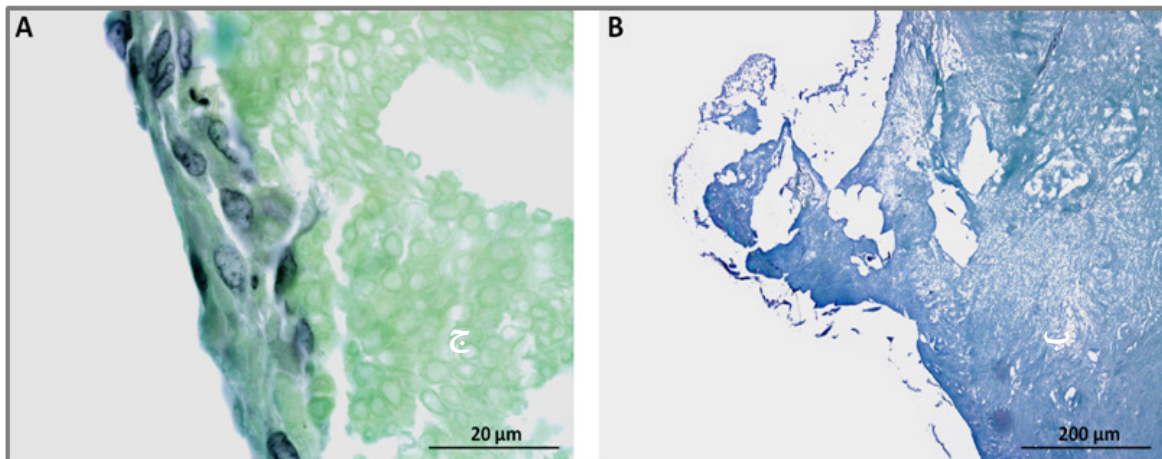


تصویر ۳: بررسی لته انسان پس از سلول زدایی با میکروسکوپ الکترونی نگاره؛ شکل A حفظ ساختار کلی لته انسان پس از سلول زدایی، شکل B ایتلیوم را به صورت یک توری خالی از سلول و شکل C و D رشته های کلاژن را در لته سالم و لته سلول زدایی شده نشان می دهد. پیکان نشانگر پایلهای بافت همبند می باشد.





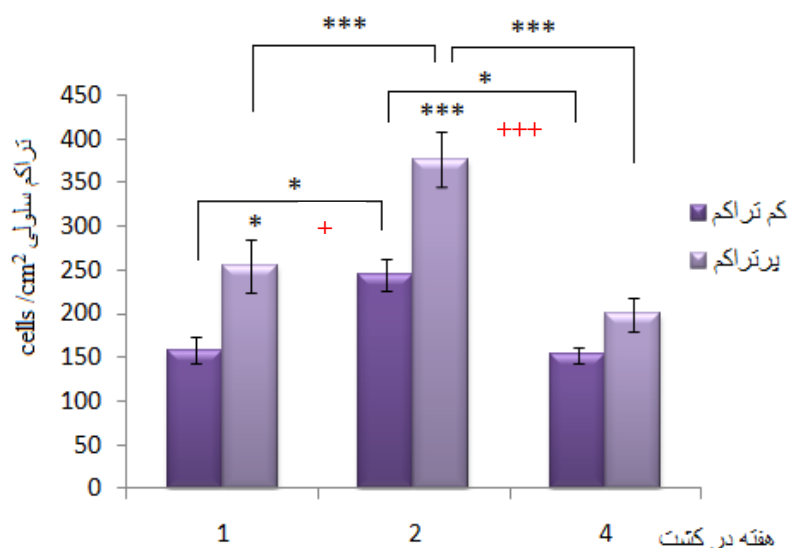
تصویر ۴ : مطالعه رفتار سلول‌های بنیادی مزانشیمی در هفته اول پس از کشت؛ استقرار سلول‌ها روی اپیتلیوم (A) و مهاجرت سلول‌ها به مجاورت پایپلاهای بافت همبند (B) را با رنگ آمیزی H&P و درشت نمایی 40X نشان می‌دهد و پیکان نمایانگر سلول‌ها می‌باشد.



تصویر ۵ : برهم‌کنش سلول‌های بنیادی مزانشیمی با داربست لته در هفته دوم و چهارم پس از کشت؛ شکل A تشکیل اپیتلیوم جدید بر روی اپیتلیوم قبلی در هفته دوم را با درشت نمایی 100X و شکل B تخریب داربست در هفته چهارم با درشت نمایی 10X و رنگ آمیزی H&P نشان می‌دهد.

جدول ۱ : مقایسه میانگین‌ها و انحراف معیارها بین گروه‌های کم تراکم و پرتراکم

SEM	Mean	گروه‌ها
۱۵/۲۴	۱۵۸/۲۲	کم تراکم هفته اول
۱۷/۶۴	۲۴۴/۴۴	کم تراکم هفته دوم
۹/۲۵	۱۵۲/۸۸	کم تراکم هفته چهارم
۳۰/۵۰	۲۵۵/۵۵	پرتراکم هفته اول
۳۱/۳۵	۳۷۶/۴۴	پرتراکم هفته دوم
۱۹/۳۴	۱۹۹/۱۸	پرتراکم هفته چهارم



نمودار ۱: مقایسه میانگین تراکم سلولی در داربست های کم تراکم و پر تراکم؛

## بحث

تأثیر قرار دهد. بررسی ها با کمک میکروسکوپ نوری و الکترونی نگاره (تصویر ۳)، تخریبی در ساختار کلی بافت لته و همچنین رشته های کلاژن بافت همبند نشان نداد و مشخص کرد که روش سلول زدایی موجب آسیب به بافت لته و تغییر در ویژگی های مکانیکی آن نگردیده است.

داربست های لته در هفته های اول، دوم و چهارم پس از کشت مورد مطالعات هیستولوژیک قرار گرفتند. همانطور که در تصویر ۴-B مشخص است، سلول های بنیادی مزانشیمی در هفته اول پس از کشت، به فاصله میان اپیتلیوم و بافت همبندی لته که غشای پایه قرار دارد، مهاجرت کردند و در مجاورت پایپلای های بافت همبند استقرار یافتند.

غشای پایه که زیر اپیتلیوم دهانی قرار دارد، سدی بین اپیتلیوم و بافت همبندی تشکیل می دهد. مولکول های لامینین و کلاژن نوع IV که توسط سلول های اپیتلیال

در این مطالعه تلاش شد تا با استفاده از دو شوینده SDS و تریتون X-100 بافت لته انسان سلول زدایی گردد. SDS با انحلال غشا، دناتوره کردن پروتئین ها، حذف پروتئین های سیتوپلاسمی و هسته ای موجب سلول زدایی بافت و کاهش پاسخ ایمنوژنیک پس از پیوند داربست می گردد. با این حال تمایل SDS به آسیب به ساختار طبیعی بافت، برداشت گلیکوزامین گلیکان (GAG) و تخریب کلاژن از معایب استفاده از آن می باشد. تریتون برهم کنش های لیپید-لیپید و لیپید-پروتئین را تخریب می کند اما به برهم کنش های پروتئین-پروتئین آسیب نمی زند. کارایی آن بسته به بافت بوده و موجب حذف GAG می گردد.<sup>(۱۲)</sup>

آسیب به ساختار بافت و رشته های کلاژن آن می تواند با اثر بر استحکام مکانیکی بافت، رفتار سلول ها را تحت



سلول‌ها بر روی اپیتلیوم استقرار یافته و یک لایه بر روی آن تشکیل داده بودند (تصویر ۴-۸)، در هفته دوم سلول‌ها تکثیر یافته و ضخامت این لایه را افزایش داده بودند (تصویر ۵-۸). این لایه‌های تازه تشکیل در هفته چهارم گسترده‌تر و منظم‌تر شده بودند. این ساختارهای مشابه اپیتلیوم تنها روی اپیتلیوم قبلی توانستند باقی بمانند و اتصالشان را به داربست حفظ کنند. احتمالاً اجزای کراتینی موجود در اپیتلیوم قبلی جایگاه مناسبی برای اتصال و تکثیر سلول‌های بنیادی مزانشیمی فراهم نموده است. چنانچه در قبل ذکر گردید از معایب داربست‌های کلازنی اتصال ضعیف اپیدرم به آن‌ها می‌باشد<sup>(۷)</sup> که این مطالعه پیشنهاد می‌کند که با افزودن اجزای کراتینی بر سطح آن‌ها می‌توان این ضعف را برطرف نمود.

Wu و همکارانش نشان دادند که سلول‌های بنیادی مزانشیمی درمان زخم را در موش‌های دیابتی و غیردیابتی با تشکیل مجدد اپیدرم، نفوذ سلولی و رگزایی بهبود بخشیدند.<sup>(۱۶)</sup> آن‌ها مشارکت مستقیم سلول‌های بنیادی مزانشیمی مغز استخوان در بازسازی پوست و توانایی اپیتلیوم‌زایی آن‌ها را در شرایط *In vivo* نشان دادند. مطالعه اخیر تمایز سلول‌های بنیادی مزانشیمی بند ناف انسان به کراتینوسیت را در شرایط *In vitro* نشان داد<sup>(۱۷)</sup> اما توانایی تمایز BM-MSCs به کراتینوسیت در شرایط *In vitro* هنوز بررسی نشده است. این مطالعه پیشنهاد می‌کند که سلول‌های بنیادی مزانشیمی مغز استخوان توانایی تمایز به سمت کراتینوسیت‌ها را دارا می‌باشند.

برهم‌کنش‌های ماتریکس-سلول در شرایط *In vivo* یک فرآیند دوجہتی و پویا می‌باشد. سلول‌ها در بافت‌ها پیوسته اطلاعات محیط اطرافشان را از سیگنال‌های

تولید می‌شوند در تشکیل اپیتلیوم اهمیت دارند و سد اتصالی جداکننده حفره دهان از محیط میان بافتی را تثبیت می‌کنند. شکست این سد عامل مهمی در توسعه بیماری پریودونتال می‌باشد و اصلاح آن برای درمان موفق پریودونتال یا بازسازی آن ضروری است.<sup>(۷)</sup>

لامینین‌ها اجزای گلیکوپروتئینی مهم در غشای پایه می‌باشند و نقش مهمی در مهاجرت سلول‌های عصبی، تمایز و رشد آکسون‌ها ایفا می‌کنند.<sup>(۱۳)</sup> گلیکوپروتئین‌های چسبنده از جمله فیبرونکتین و لامینین، اجزای ECM را به یکدیگر و به سلول‌ها متصل می‌کنند. گلیکوپروتئین‌ها به گیرنده‌های اختصاصی روی سلول و اجزای غشای پایه مانند کلاژن نوع IV متصل می‌شوند و اتصال سلول اپیتلیالی را سرعت می‌بخشند.<sup>(۱۴)</sup> با توجه به موارد مذکور به نظر می‌رسد که احتمالاً لامینین موجب تحریک مهاجرت و اتصال سلول‌ها در ناحیه غشای پایه شده است.

میان سلول‌هایی که به مجاورت پایلاها مهاجرت کرده بودند، تعدادی سلول در حال تقسیم مشاهده شد. محققین نشان داده‌اند که لامینین به طور قابل توجهی دارای بعضی از توالی‌های مشابه فاکتور رشد می‌باشد که تنها زمان تجزیه در دسترس سلول قرار می‌گیرد.<sup>(۱۵)</sup> احتمالاً سلول‌ها در حین مهاجرت، لامینین را تجزیه نموده و موجب رهایی این توالی‌های مشابه فاکتور رشد گردیده‌اند. توالی‌های مشابه فاکتور رشد آزاد شده از لامینین ممکن است تقسیم سلولی در این ناحیه را تحریک نموده باشند که تأیید این مطلب نیاز به بررسی‌های دقیق‌تری دارد.

همانطور که در مقاطع تهیه شده از داربست‌ها در هفته‌های مختلف کشت دیده شد، در نمونه‌های هفته اول

همانطور که در تصاویر هفته چهارم (تصویر B-5) مشخص است سلول‌ها برای نفوذ به داخل بافت شروع به تجزیه و تخریب آن نموده‌اند. احتمالاً میزان بالای تجزیه باعث جدا شدن بخش‌هایی از داربست گردیده که موجب جدایی سلول‌ها از سطح و کاهش معنی‌دار تراکم سلولی در داربست گردیده است (نمودار ۱).

در برخی از مطالعات افزایش تعداد سلول‌های Seed شده بر روی داربست، تأثیری بر تراکم سلول‌ها در داخل داربست نداشته است و افزایش تعداد سلول‌ها باعث چسبیدن آن‌ها به یکدیگر و جدا شدنشان از سطح داربست گردیده است.<sup>(۱۹)</sup> اما آنالیز آماری (نمودار ۱) تفاوت معنی‌داری را بین گروه‌های کم تراکم و پرتراکم در هفته‌های اول و دوم پس از کشت نشان داد که در هفته چهارم این تفاوت معنی‌دار دیده نشد. این می‌تواند به علت تخریب بیشتر در داربست‌های پرتراکم ایجاد شده باشد. این مطالعه پیشنهاد می‌کند افزایش و یا کاهش تراکم سلولی به عوامل مختلفی از جمله نوع داربست و روش Seed کردن سلول‌ها بر روی داربست بستگی دارد و تنها با افزودن تعداد اولیه سلول‌ها نمی‌توان تراکم سلولی را در داربست به صورت طولانی مدت افزایش داد.

### نتیجه‌گیری

مطالعات هیستولوژیک مهاجرت سلول‌ها به مجاورت پایپلاهای بافت همبند، تقسیم سلولی و نفوذ به بافت همبند در هفته اول، تشکیل ساختارهای مشابه اپیتلیوم در هفته دوم، مهاجرت سلول‌ها به حوضچه‌های خونی و تخریب داربست در هفته چهارم را نشان داد. با توجه به نتایج حاصل، داربست تهیه شده از لته انسان می‌تواند بستر مناسبی جهت بررسی رفتارهای

ماتریکس خارج سلولی می‌پذیرند؛ سلول‌ها هم‌زمان ماتریکسشان را تولید می‌کنند و مکرراً آن را تغییر شکل می‌دهند.<sup>(۱۳)</sup>

سلول‌ها زمانی که روی بافت همبندی لته ساکن شدند، درحقیقت با ساختاری مشابه داربست‌های متراکم کلاژن روبرو گردیدند. زیرا بافت لته شامل مقادیر زیادی کلاژن نوع I و میزان کمتری کلاژن نوع III می‌باشد.<sup>(۱)</sup> تراکم بالای کلاژن می‌تواند مهاجرت سلول‌ها را ممانعت کند. مطالعه Helary و همکارانش نشان داد زمانی که فیبروبلاست‌ها با ماتریکس‌های متراکم کلاژن روبرو شدند، دیرتر از ماتریکس‌های سست به داخل آن نفوذ کردند.<sup>(۱۸)</sup> در این مطالعه نیز تأخیر در مهاجرت سلول‌ها مشاهده گردید. بدین صورت که در هفته اول و دوم، سلول‌ها بیشتر در سطح و حاشیه داربست استقرار داشتند اما در هفته چهارم بیشتر به داخل آن نفوذ کرده بودند. این مطالعه پیشنهاد می‌کند که تراکم بالای ماتریکس می‌تواند مهاجرت سلولی را به تأخیر اندازد.

در این مطالعه از دو میزان متفاوت  $2 \times 10^4$  و  $2 \times 10^5$  سلول برای کشت بر روی داربست‌ها استفاده گردید. نتایج مشابهی در مورد دو گروه کم تراکم و پرتراکم به دست آمد. بدین صورت که در هفته دوم افزایش معنی‌دار و در هفته چهارم کاهش معنی‌دار در تراکم سلولی مشاهده گردید. افزایش تراکم سلولی در هفته دوم پیشنهاد می‌کند که داربست لته بر سلول‌های مزانشیمی اثر میتوژنیک داشته است. مطالعات نیز نشان داده که تراکم بالای کلاژن موجب القای تقسیم سلولی در فیبروبلاست‌ها می‌گردد.<sup>(۱۸)</sup> اما کاهش معنی‌دار در هفته چهارم ممکن است به دلیل تخریب داربست بر اثر نفوذ سلولی ایجاد شده باشد.

### تشکر و قدردانی

این طرح به پشتیبانی مالی پژوهشکده فناوری زیستی دانشگاه فردوسی مشهد و از بودجه مصوبه مربوط به طرح کاربردی شماره ۲۹۴۴، همچنین معاونت محترم پژوهشی دانشگاه فردوسی مشهد و با همکاری خانم مروراید ساعی نسب انجام شده است که بدین وسیله مراتب قدردانی از ایشان اعلام می‌گردد.

سلولی در طی درمان زخم‌های داخل دهانی باشد. امید است در آینده با تهیه داربست‌های قابل پیوند با منشأ لته انسانی، مشکلات مربوط به جراحی‌های آزاد لته حل گردد.

### منابع

- Itoiz ME, Carranza FA. The gingiva. In: Newman MG, Takei HH, Carranza, FA. Carranza's Clinical Periodontology. 9<sup>th</sup> ed. Philadelphia: W.B. Saunders Co; 2002. P. 30.
- Seo BM, Miura M, Gronthos S, Bartold PM, Batouli S, Brahim J, et al. Investigation of multipotent postnatal stem cells from human periodontal ligament. *Lancet* 2004; 364(9429): 149-55.
- Langer R, Vacanti JP. Tissue engineering. *Science* 1993; 260(5110): 920-6.
- Chapekar MS. Tissue engineering: Challenges and opportunities. *J Biomed Mater Res* 2000; 53(6): 617-20.
- Butler CE, Navarro FA, Park CS, Orgill DP. Regeneration of neomucosa using cell-seeded collagen-GAG matrices in athymic mice. *Ann Plast Surg* 2002; 48(3): 298-304.
- Jansen RG, van Kuppevelt TH, Daamen WF, Kuijpers-Jagtman AM, Von den Hoff JW. Tissue reactions to collagen scaffolds in the oral mucosa and skin of rats: Environmental and mechanical factors. *Arch Oral Biol* 2008; 53(4): 376-87.
- Stark HJ, Boehnke K, Mirancea N, Willhauck MJ, Pavesio A, Fusenig NE, et al. Epidermal homeostasis in long-term scaffold-enforced skin equivalents. *J Invest Dermatol Symp Proc* 2006; 11(1): 93-105.
- 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(2): 188-97.
- Kataoka T, Umeda M, Shigeta T, Takahashi H, Komori T. A new in vitro model of cancer invasion using AlloDerm, a human cadaveric dermal equivalent: A preliminary report. *Kobe J Med Sci* 2010; 55(5): 106-15.
- Clark JM, Saffold SH. Decellularized dermal grafting in cleft palate repair. *Arch Facial Plast Surg* 2003; 5(1): 40-4.
- Moharamzadeh K, Brook IM, Van Noort R, Scutt AM, Smith KG, Thornhill MH. Development, optimization and characterization of a full-thickness tissue engineered human oral mucosal model for biological assessment of dental biomaterials. *J Mater Sci Mater Med* 2008; 19(4): 1793-801.
- Gilbert TW, Sellaro TL, Badylak SF. Decellularization of tissues and organs. *Biomaterials* 2006; 27(19): 3675-83.
- Salmerón-Sánchez M, Altankov G. Cell-protein-material interaction in tissue engineering. In: Eberli D. *Tissue Engineering*. 1<sup>st</sup> ed. New York: Springer-verlag New York Inc; 2009. P. 546.
- Couchman JR, Austria MR, Woods A. Fibronectin-cell interactions. *J Invest Dermatol* 1990; 94(6): 7-14.
- Francesco R, Antonio G, Manlio B, Alfonso B. From cell-ECM interactions to tissue engineering. *J Cell Physiol* 2004; 199(2): 174-80.
- 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.

17. Tran CT, Huynh DT, Gargiulo C, Nguyen PT, Tran TT, Huynh MT, et al. *In vitro* culture of keratinocytes from human umbilical cord blood mesenchymal stem cells: The Saigonese culture. *Cell Tissue Bank* 2011; 12(2): 125-33.
18. Helary C, Ovtracht L, Coulomb B, Godeau G, Giraud-Guille MM. Dense fibrillar collagen matrices: A model to study myofibroblast behavior during wound healing. *Biomaterials* 2006; 27(25): 4443-52.
19. Dar A, Shachar M, Leor J, Cohen S. Optimization of cardiac cell seeding and distribution in 3D porous alginate scaffolds. *Biotechnol Bioeng* 2002; 80(3): 305-12.