Downloaded from amuj.arakmu.ac.ir at 13:16 +0330 on Monday November 20th 2017

Arak Medical University Journal (AMUJ) *Original Article*
2012; 15(62): 26-31

The study of the interactions between blastema tissues originated from the pinna of New Zealand rabbit and a cellular human gingiva (as a scaffold) *in vitro*

Sadegh-Moghaddam-Abbaspour S(M.Sc)[1*], Mahdavi Shahri N(PhD)[2], Shariat Zadeh S.M.A(PhD)[3]

1- Department of Biology, Islamic Azad University, Jahrom Branch, Jahrom, Iran
2- Department of Biology, Faculty of Sciences, Institute of Biotechnology, Ferdowsi University of Mashhad, Mashhad, Iran
3- Department of Biology, Faculty of Sciences, Arak University, Arak, Iran

Received: 27 May 2011, Accepted: 16 Aug 2011

Abstract

Background: Obtaining cells from the patient, expanding cell population on a scaffold, and, eventually, grafting the tissue to the patient is one of the tissue engineering techniques to create replacement tissue structures. Blastema tissue is one of the cellular sources in this regard. This study investigated the use of human gum tissue to prepare a scaffold and the interaction between the three-dimensional tissue scaffold and blastema tissue.

Materials and Methods: In this experimental study, human gingiva was prepared and through snap freezing method and the use of sodium dodecyl sulfate (SDS) and Triton X-100, went through cell bleaching. Then the provided scaffoldings were placed in 2-day-old blastema rings and stored in culture media for 25 days. Sampling of the blastema and scaffolding tissues was done once every five days.

Results: The results confirmed the removal of the cells from the prepared scaffolds. Also, histological studies in the fifth and tenth days indicated cell penetration into the blastema scaffolds. In the fifteenth day, in addition to penetration, blastema cells division and differentiation as well as epidermis genesis were observed. In the twentieth and twenty-fifth days, infiltration, cell division, and differentiation processes continued.

Conclusion: The findings of this study indicated the possibility of creating a natural scaffold of human gingiva through this method. This scaffold can have an inductive effect on cell behaviors such as such as migration, adhesion, division, and probable differentiation. However, further studies for demonstrating the identity of the cells and other properties of such a scaffold as well as the possibility of using it in gingiva tissue engineering are recommended.

Keywords: Blastema tissue, cell bleaching, cell matrix interactions, differentiation, gingiva three dimensional scaffolds

*Corresponding author:
Address: Department of Biology, Islamic Azad University of Jahrom, Jahrom, Iran
Email: ssadeghmoghaddam@yahoo.com

Downloaded from amuj.arakmu.ac.ir at 13:16 +0330 on Monday November 20th 2017

مقاله پژوهشی

مجله علمی پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی اراک
سال 15، شماره 3 (شماره پیاپی 62)، مرداد 1391، 31-26

مطالعه برهم کنش های بین بافت بلاستمای گوش خرگوش نژاد نیوزلندی و ماتریکس سلول زدایی شده لثه انسان (به عنوان داربست) در شرایط *in vitro*

سارا صادق مقدم عباسپور[1*]، ناصر مهدوی شهری[2]، سید محمد علی شریعت زاده[3]

1- دانشجوی کارشناسی ارشد زیست شناسی تکوینی، گروه زیست شناسی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد جهرم، ایران
2- استاد، دکترای تخصصی بافت شناسی و جنین شناسی، گروه زیست شناسی، پژوهشکده فناوری زیستی، دانشگاه فردوسی مشهد، مشهد، ایران
3- استاد، دکترای تخصصی بافت شناسی و جنین شناسی، گروه زیست شناسی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه اراک، اراک، ایران

تاریخ دریافت: 90/3/7 تاریخ پذیرش: 90/5/26

چکیده

زمینه و هدف: یکی از روش‌های مهندسی بافت برای ایجاد ساختارهای بافتی جایگزین، جدا کردن سلول‌ها از فرد بیمار، گسترش دادن جمعیت سلولی روی یک داربست و در نهایت پیوند زدن بافت حاصل به فرد بیمار می‌باشد. یکی از منابع سلولی، بافت بلاستما است. در این مطالعه سعی شد از بافت لثه انسان در تهیه داربست استفاده شود و اینترکشن‌های بین این داربست سه بعدی با بافت بلاستما بررسی شود.

مواد و روش‌ها: در این مطالعه تجربی، ابتدا لثه انسان تهیه شد و سپس با روش Snap freezing و استفاده از دترژنت سدیم دودسیل سولفات Sodium Dodecyl Sulfate (SDS) و Triton X-100 بافت حاصل سلول‌زدایی گردید. بررسی‌های بافت‌شناسی با رنگ آمیزی‌های مربوطه انجام شد. سپس داربست‌های تهیه شده درون حلقه‌های بلاستمایی 2 روزه خرگوش قرار داده شد و در محیط کشت به مدت 25 روز نگهداری شدند. نمونه‌برداری از بافت بلاستما و داربست همراه آن هر 5 روز یک بار صورت گرفت.

یافته‌ها: نتایج، حذف سلول‌ها از داربست آماده شده را تایید نمود. علاوه بر این نتایج بافتی در روز پنجم و دهم، نفوذ سلول‌های بلاستمایی به داخل داربست را نشان داد. در روز پانزدهم علاوه بر نفوذ، تقسیم و تمایز احتمالی سلول‌های بلاستمایی مشاهده گردید. هم‌چنین اپیدرم زایی نیز قابل مشاهده بود. در روز بیستم و بیست و پنجم، روند نفوذ، تقسیم و تمایز سلول‌ها هم‌چنان ادامه داشت.

نتیجه‌گیری: نتایج نشان دادند که امکان تهیه یک داربست طبیعی از لثه انسان به این روش وجود دارد. این داربست می‌تواند دارای اثر القایی بر رفتارهای سلولی از قبیل مهاجرت، چسبندگی، تقسیم و احتمالاً تمایز باشد. هر چند مطالعات بیشتری برای اثبات هویت سلول‌ها و سایر ویژگی‌های این داربست و هم‌چنین امکان استفاده از آن در روش‌های مهندسی بافت لثه‌ای مورد نیاز است.

واژگان کلیدی: بافت بلاستمایی، سلول‌زدایی، برهم کنش سلول ماتریکس، تمایز، داربست سه بعدی لثه‌ای

***نویسنده مسئول:** جهرم، دانشگاه علوم جهرم، دانشکده علوم پایه، گروه زیست شناسی

Email: ssadeghmoghaddam@yahoo.com

Downloaded from amuj.arakmu.ac.ir at 13:16 +0330 on Monday November 20th 2017

مقدمه

سلول‌های پستانداران، نه تنها با یکدیگر بلکه با ماتریکس خارج سلولی (Extracellular matrix-ECM) در ارتباط هستند. برهم کنش بین ماتریکس خارج سلولی و سلول‌ها در جهت‌گیری و رفتار سلول‌ها نقش اساسی دارد. اما بیشتر تحقیقات در مهندسی بافت، بیولوژی سرطان و سلول‌های بنیادی در مدل‌های دو بعدی انجام شده است(1). در مطالعات دو بعدی حرکت سلول‌ها به صورت اتصال و جدا شدن بوده و عملاً سدهای فضایی که در شرایط داخل بدن (in vivo) هستند، وجود ندارند. بنابراین استفاده از مدل‌های سه بعدی بهتر می‌تواند ریز محیط‌های بافت‌های زنده را جهت بررسی رفتارهای سلولی تداعی کند. تا کنون داربست‌های مختلفی جهت بررسی رفتار سلول‌ها در شرایط سه بعدی ساخته شده‌اند که از آن جمله می‌توان به ماتریکس‌های الیافی کلاژن سنتزی و ماتریژل‌ها اشاره نمود. اما هر یک از این داربست‌ها دارای نقایصی مانند عدم اجازه کنترل چسبندگی سلول‌ها وغیره می‌باشند(2). می‌توان از ماتریکس خارج سلولی بافت‌های موجودات زنده جهت بررسی رفتار مهاجرتی سلول‌ها استفاده کرد. برای این کار از روش‌های سلول زدایی جهت حذف تاثیر سلول‌های بافت از ماتریکس خارج سلولی می‌توان بهره برد تا در نهایت تنها ماتریکس خارج سلولی از بافت باقی بماند و بتوان از آن به عنوان داربست استفاده نمود.

درمان‌های پزشکی برای ضایعات بافت‌های دهانی و دندانی سالیانه میلیون‌ها انسان را در بر می‌گیرد. کلاژن لثه به عنوان داربست طبیعی دارای سازش پذیری زیستی بالایی می‌باشد که این یکی از ویژگی‌های داربست طبیعی بوده(3) و امکان جایگزینی آسان سلول و فاکتور رشد را فراهم می‌کند(4، 5).

بافت بلاستما گروهی از سلول‌های تمایز نیافته‌ای هستند که در بخش‌هایی از بدن یک موجود زنده قادر به تقسیم و تمایز می‌باشند. این سلول‌ها می‌توانند در پیدایش و تکامل اعضاء و یا فرایند ترمیم و بازسازی بافت‌های آسیب دیده مشارکت نمایند. یکی از بهترین مثال‌های ترمیم در پستانداران، جایگزینی همه بافت‌ها پس از ایجاد سوراخ در لاله گوش خرگوش نژاد نیوزلندی(6) است.

هدف از این مطالعه تهیه داربست سه بعدی مشتق شده از ماتریکس خارج سلولی بود. برای این کار از سلول زدایی لثه انسان استفاده گردید. در بخش دوم پروهشی، بر هم کنش بین داربست سه بعدی مشتق شده از لثه با بافت بلاستمای حاصل از لاله گوش خرگوش نر نژاد نیوزلندی مورد بررسی قرار گرفت.

مواد و روش‌ها

در این مطالعه تجربی، لاله گوش خرگوش نر نژاد نیوزلندی به عنوان منبع تهیه بافت بلاستمایی انتخاب شد. قبل از سوراخ کردن لاله‌های گوش، موهای این قسمت حذف گردید و از محلول لیدوکائین جهت ایجاد بی حسی موضعی استفاده شد. به کمک انبرهای مخصوص سوراخ‌هایی به قطر 2 میلی‌متر در قسمت‌های فاقد رگ گوش ایجاد گشت. پس از گذشت 2 روز از پانچ اولیه، حلقه کامل بافت بلاستمایی تشکیل شده از لاله گوش جدا شد. نمونه‌ها یک بار به محض خارج کردن حلقه بلاستمایی، دو بار در محیط آزمایشگاه و دو بار زیر هود به منظور حذف آلودگی‌ها با نرمال سالین شست و شو داده شدند.

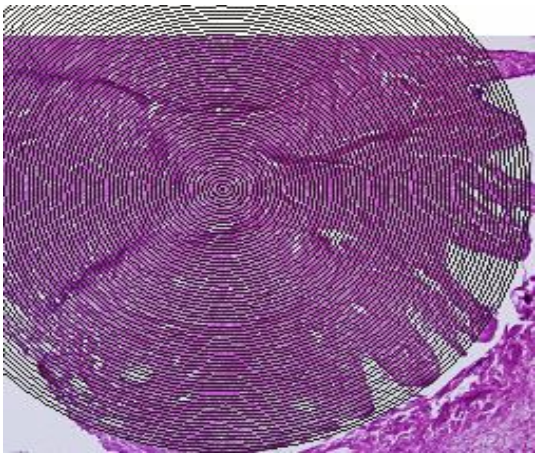
لثه بلافاصله پس از جدا شدن از دندان توسط سرم فیزیولوژی شستشو گردید و به مدت 2-1 هفته در دمای منهای 4 درجه سانتی‌گراد نگهداری شد، سپس به قطعات کوچک استوانه‌ای شکل (7 یا 8 میلی‌متر طول و 2 میلی‌متر قطر) تقسیم گردید و با 5 بار Snap freezing و استفاده از دترژنت سدیم دودسیل سولفات (Sodiam Dodecyl Sulfate-SDS) به مدت 24 ساعت و تریتون 100x (Triton 100X) به مدت 12 ساعت بافت حاصل سلول زدایی گشت.

داربست تهیه شده در زیر هود و در شرایط استریل داخل حلقه بلاستمایی قرار داده شد و در محیط کشت به مدت 25 روز نگهداری گردید. به منظور جلوگیری از آلودگی‌های میکروبی و تغذیه سلول‌ها، محیط کشت نمونه‌ها هر دو روز یک بار تعویض گردید. هر 5 روز، یکی از نمونه‌ها به منظور انجام مطالعات بافتی از محیط

Downloaded from amuj.arakmu.ac.ir at 13:16 +0330 on Monday November 20th 2017

کشت خارج گردید. سپس با اجرای روش‌های هیستولوژی و استفاده از رنگ آمیزی‌های هماتوکسیلین - ائوزین، رنگ آمیزی آبی آنیلین- هماتوکسیلین وایگرت، رنگ آمیزی هماتوکسیلین وایگرت - پیک ایندیگو، رنگ آمیزی هماتوکسیلین وایگرت - پیک ایندیگو کارمین و رنگ آمیزی هماتوکسیلین وایگرت - پیکروفوشین، نمونه‌ها رنگ آمیزی شدند.

جهت بررسی میزان نفوذ سلول‌های بافت بلاستما به داربست لثه‌ای ، با استفاده از نرم افزار CorelDRAW12، دایره‌ای با درجه بندی یکسان بر روی تصاویر میکروسکوپی عکس‌برداری شده با میکروسکوپ در روزهای مختلف بعد از کشت با بزرگنمایی 10X مونتاژ گردید و از ناحیه تماس (برهم کنش) بین بافت بلاستما با داربست لثه‌ای سلول زدایی شده، میزان نفوذ سلول‌ها به داربست با شمارش تعداد گریدها تا مرز آخرین سلول نفوذ کرده، محاسبه شد (فاصله هر گرید از بعدی حدود 30 میکرون است). تعداد سلول‌های نفوذ کرده، با چشم شمارش گردید (شکل 1).

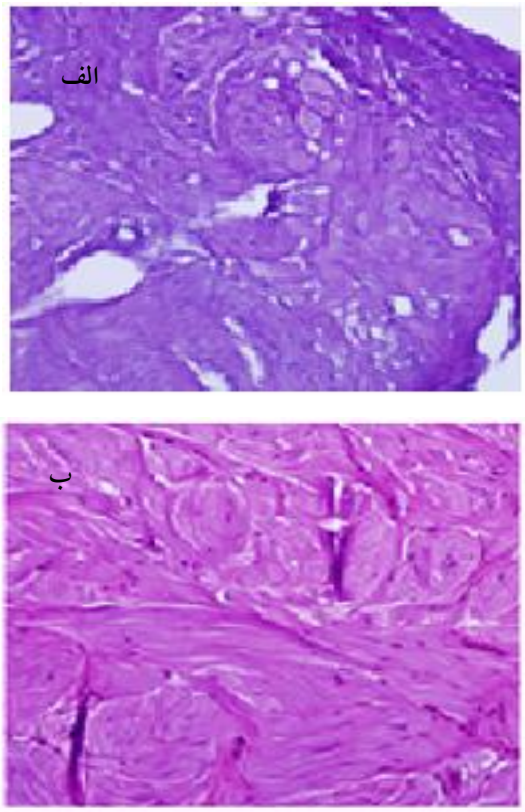


شکل 1. چگونگی گرید بندی نمونه ده روز کشت داده شده

برای تجزیه و تحلیل آماری داده نرم افزار آماری SPSS و آنالیز واریانس (ANOVA) مورد استفاده قرار گرفت. p کوچکتر از 0/05 به عنوان سطح معنی دار در نظر گرفته شد.

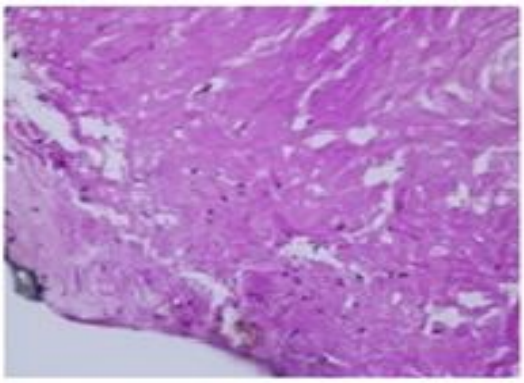
یافته ها

مطالعات میکروسکوپی و آماده سازی نمونه‌ها، حذف سلول‌ها از داربست آماده شده را نشان می‌دهد(شکل 2). علاوه بر این مطالعات بافتی در روز پنجم، نفوذ سلول‌های بلاستمایی به داخل داربست لثه را نشان داد. در روز دهم، افزایش در تعداد و عمق نفوذ سلول‌ها دیده شد(شکل 3). در روز پانزدهم علاوه بر نفوذ، تقسیم و تمایز احتمالی سلول‌های بلاستمایی به سلول‌های فیبروبلاستی و فیبروسیتی مشاهده گردید(شکل 4) و هم‌چنین اپیدرم زایی نیز قابل مشاهده بود(شکل5). در روز بیستم و بیست و پنجم روند نفوذ سلول‌های بلاستمایی به داربست لثه و تقسیم و تمایز احتمالی آنها به سلول‌های لثه انسان ادامه داشت. هم‌چنین میزان نفوذ متوسط سلول‌های نفوذ کرده به داربست لثه‌ای در روزهای مختلف بعد از کشت در نمودارهای 1 و 2 آمده است.

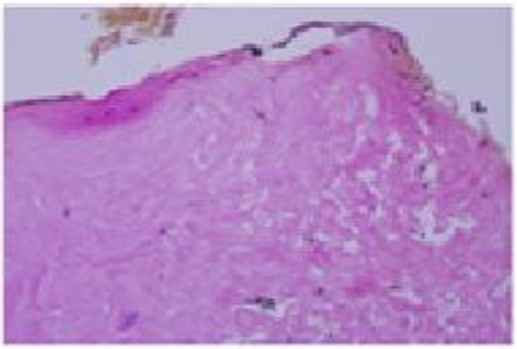


شکل 2-الف: نمایش سلول زدایی از بافت لثه با رنگ آمیزی هماتوکسیلین ـ ائوزین. در لثه فیبروبلاست ها در ماتریکس لثه به صورت پراکنده وجو دارند (بزرگنمایی20X). ب: نمونه تیمار شده جهت سلول زدایی که نقاط خالی نشان دهنده مناطق خالی شده از فیبروبلاست ها هستند (بزرگنمایی 20X).

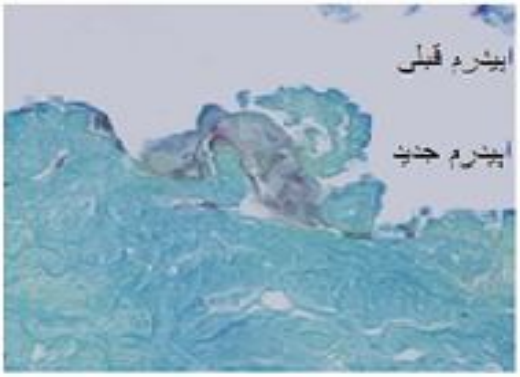
Downloaded from amuj.arakmu.ac.ir at 13:16 +0330 on Monday November 20th 2017



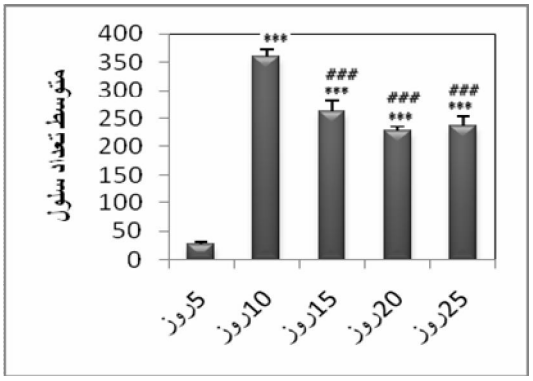
شکل3. برش عرضی از نمونه روز دهم بعد از کشت رنگ آمیزی هماتوکسیلین وایگرت - پیکروفوشین. در این شکل تراکم سلولی در مناطق نزدیک به حاشیه داربست به خوبی دیده می شود. فلش یک سلول نفوذ کرده به داخل داربست را نشان می دهد (بزرگنمایی 20X).



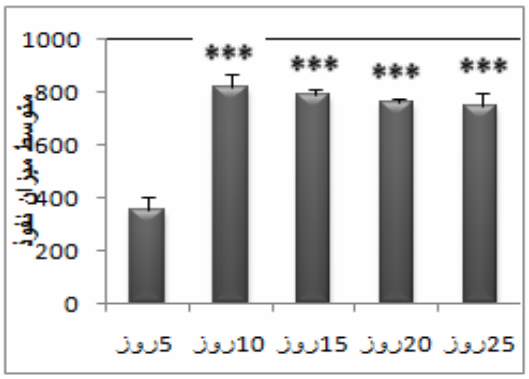
شکل4. مشاهده تمایز سلول‌های بلاستمایی به سلول‌های فیبروبلاستی و فیبروبلاستی لثه در نمونه پانزده روز بعد از کشت. فلش یک سلول تمایز یافته به فیبروبلاست را نشان می دهد. رنگ آمیزی هماتوکسیلین وایگرت - پیکروفوشین (بزرگنمایی20X).



شکل5. مشاهده اپیدرم زایی در نمونه پانزده روز بعد از کشت رنگ آمیزی هماتوکسیلین وایگرت ـ پیک ایندیگو. فلش ها بافت اپیدرم باقی مانده و اپیدرم تازه تشکیل شده را نشان می دهد(بزرگنمایی40X).



نمودار1. متوسط تعداد سلول‌های نفوذ کرده به داربست لثه ای در روزهای مختلف بعد از کشت. ***p<0/0001 نسبت به روز پنجم و ###p<0/0001 نسبت به روز دهم.



نمودار 2. متوسط میزان نفوذ سلول‌ها به داربست لثه ای در روزهای مختلف بعد از کشت. داده ها به صورت میانگین±انحراف معیار ارائه شده اند. ***p<0/0001 نسبت به روز پنجم.

بحث

مطالعات نشان داده‌اند که خرگوش‌ها و به خصوص لاله‌های گوش آنها مدل های تجربی زنده مناسبی به منظور مطالعات فرایند ترمیم، تمایز و تکوین سلولی می‌باشند(9-7). ویلیام بویس و همکاران در سال 1980 در تجربیات خود نشان دادند که بعد از پانچ لاله‌های گوش خرگوش با تشکیل بافت بلاستما در حاشیه و اطراف زخم، امکان ترمیم و بازسازی سوراخ‌های ایجاد شده با بازسازی تقریباً تمامی انواع بافت‌های تشکیل دهنده آن فراهم می گردد(7، 8). لذا با قرار دادن حلقه بلاستمایی ایجاد شده در گوش خرگوش، در اطراف داربست تهیه شده می‌بایستی انتظار داشت که در اثر القای داربست سلول‌های بلاستمایی

Downloaded from amuj.arakmu.ac.ir at 13:16 +0330 on Monday November 20th 2017

با ایجاد پای کاذب، به سمت داربست مهاجرت کرده و تقسیم و تمایز یابند به طوری که در آینده بتوان از این طریق بافت لثه ساخت و بدون رد پیوند به بیماران پیوند زد. در این پژوهش تلاش گردیده است نتایج کیفی (مطالعات هیستولوژی) و بررسی‌های کمی مورد توجه قرار گیرد. برداشت نمونه‌ها از محیط کشت در روزهای 5، 10، 15، 20 و 25 مورد بررسی قرار گرفته و تعداد و میزان نفوذ سلول‌های بلاستما به صورت کمی مورد ارزیابی قرار داده شد و مشاهده گردید سلول‌ها در برهم کنش با داربست روند خوبی از لحاظ تعداد سلول‌های نفوذ کرده و میزان نفوذ دارند. نتایج این تحقیق به صورت کلی مشخص نموده است که داربست سلول زدایی شده مناسبی به این روش ساخته می‌شود و دارای اثر القایی خوبی بر روی مهاجرت سلول‌های بلاستما و هم‌چنین تقسیم و تمایز و اپیدرم‌زایی آنها است. چنین تحقیقاتی در پژوهش‌های بوهل و همکاران در سال 1998 نیز مورد ارزیابی قرارگرفته و نشان داده شده است که می‌توان با کشت سلول‌های بنیادی بر روی داربست نتایجی از تمایز وتکوین سلول‌ها و تولید بافت به دست آورد(10).

نتیجه گیری

نتایج حاصل از این تحقیق نشان داد که داربست مشتق شده از ماتریکس خارج سلولی لثه‌ای می‌تواند به عنوان داربست در مهندسی بافت لثه به کار رود، هم‌چنین این داربست می‌تواند سوبسترای سه بعدی مناسبی را برای حرکت و مهاجرت سلول‌ها فراهم نماید. از طرفی مونتاژ داربست سلول زدایی شده لثه با بافت بلاستما، مدل مناسبی برای بررسی برهم کنش بین سلول‌ها و ماتریکس خارج سلولی در شرایط آزمایشگاهی فراهم می‌کند.

تشکر و قدر دانی

بدین وسیله از جناب آقای دکتر علی بنی هاشم، به خاطر تامین لثه انسان و خانم‌ها زهرا یارجانلی، فهیمه شهابی پور و آقای امین توسلی که ما را در طول انجام این پروژه یاری نموده‌اند تشکر و قدر دانی می‌نماییم.

منابع

1. Even-Ram S, Yamada KM. Cell migration in 3D matrix. Current opinion in cell biology. 2005; 17(5):524-32.
2. Friedl P, Wolf K. Tumour-cell invasion and migration: diversity and escape mechanisms. Nature Reviews Cancer. 2003;3(5):362-74.
3. Sharma B, Elisseeff JH. Engineering structurally organized cartilage and bone tissues. Annals of biomedical engineering. 2004; 32(1): 148-59.
4. Feng Z, Yamato M, Akutsu T, Nakamura T, Okano T, Umezu M. Investigation on the mechanical properties of contracted collagen gels as a scaffold for tissue engineering. Artificial organs. 2003;27(1):84-91.
5. Thibodeau B, Teixeira F, Yamauchi M, Caplan DJ, Trope M. Pulp revascularization of immature dog teeth with apical periodontitis. Journal of Endodontics. 2007;33(6):680-9.
6. Goss RJ, Grimes LN. Epidermal downgrowths in regenerating rabbit ear holes. Journal of morphology. 1975;146(4):533-42.
7. Gronthos S, Mankani M, Brahim J, Robey PG, Shi S. Postnatal human dental pulp stem cells (DPSCs) in vitro and in vivo. Proceedings of the National Academy of Sciences. 2000; 97(25): 13625-30.
8. Gronthos S, Zannettino ACW, Hay SJ, Shi S, Graves SE, Kortesidis A, et al. Molecular and cellular characterisation of highly purified stromal stem cells derived from human bone marrow. Journal of cell science. 2003; 116(9): 1827-35.
9. Batouli S, Miura M, Brahim J, Tsutsui T, Fisher L, Gronthos S, et al. Comparison of stem-cell-mediated osteogenesis and dentinogenesis. Journal of dental research. 2003; 82(12):976-81.
10. Bohl KS, Shon J, Rutherford B, Mooney DJ. Role of synthetic extracellular matrix in development of engineered dental pulp. Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition. 1998; 9(7):749-64.