

تهیه داربست سه بعدی پوست انسانی و بررسی برهم کنش سلول های چسبنده مغز استخوان رت با داربست تهیه شده

لیلا ایزی^۱، رویا لاری^{۲*}، ناصر مهدوی شهری^۳، مهرنگار رجحان نژاد^۴، علی بیرجندی نژاد^۵

^۱ کارشناسی ارشد زیست سلولی تکوینی، گروه زیست شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه فردوسی مشهد، مشهد، ایران

^۲ استادیار گروه زیست شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه فردوسی مشهد، مشهد، ایران

^۳ استاد گروه زیست شناسی، گروه تحقیقاتی سلول های بنیادی، پژوهشکده فناوری زیستی، دانشکده علوم، دانشگاه فردوسی مشهد، مشهد، ایران

^۴ کارشناسی ارشد زیست سلولی تکوینی، گروه زیست شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه فردوسی مشهد، مشهد، ایران

^۵ دانشیار گروه پزشکی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی مشهد، مشهد، ایران

* نشانی نویسنده مسئول: مشهد، میدان آزادی، دانشگاه فردوسی، دانشکده علوم، گروه زیست شناسی، رویا لاری

E-mail: rlari@um.ac.ir

وصول: ۹۴/۷/۲۰، اصلاح: ۹۴/۹/۱، پذیرش: ۹۴/۱۲/۱۷

چکیده

زمینه و هدف: ماتریکس بافت های سلول زدایی شده به دو دلیل به عنوان یک سیستم داربستی ایده آل در نظر گرفته می شوند، اولین دلیل شباهت ساختاری و مکانیکی با بافت های طبیعی و دومین دلیل وجود پروتئین های ماتریکس خارج سلولی است، که بعد از سلول زدایی باقی می ماند و می توانند در تمایز سلول ها نقش ایفا کنند. هدف از این مطالعه بررسی رفتار سلول های چسبنده ی مغز استخوان رت کشت داده شده بر روی ماتریکس سلول زدایی شده ی بافت پوست انسانی است.

مواد و روش ها: در این پژوهش سلول زدایی بافت پوست انسانی با سه روش فیزیکی (انجماد آهسته، انجماد - ذوب سریع)، آنزیمی (تریپسین ۰/۲۵ درصد) به مدت ۱۸ ساعت، و شیمیایی (SDS یا Sodium dodecyl sulfate یک درصد) به مدت ۱۲ ساعت انجام گرفت. از داربست های تهیه شده، ۱، ۲، ۳ و ۴ هفته پس از کشت با تعداد 4×10^5 سلول، مقاطع میکروسکوپی تهیه و با رنگ آمیزی های مختلف مورد بررسی قرار گرفتند.

یافته ها: مطالعه هیستولوژیک داربست ها پس از سلول زدایی نشان دهنده ی حذف هسته ها و اجزای سلولی و حفظ رشته های کلاژن بافت بود. مطالعه ی داربست ها ۱، ۲، ۳ و ۴ هفته پس از کشت، چسبندگی و تکثیر سلول ها را نشان داد. همچنین در هر چهار هفته شاهد نفوذ و مهاجرت سلول ها به درون داربست نبودیم. بررسی های آماری اختلاف معناداری را در درصد تراکم سلولی در هفته ی دوم در مقایسه با سایر هفته ها نشان داد ($P < 0.001$).

نتیجه گیری: نتایج حاصل نشان می دهد که ECM (Extracellular Matrix) بجا مانده از سلول زدایی بافت پوست انسانی بستر مناسبی جهت بررسی رفتار سلول های چسبنده مغز استخوان رت RABMCs (Marrow Cells Rat Adherent Bone) می باشد.

واژگان کلیدی: ماتریکس خارج سلولی، سلول زدایی، داربست، پوست انسان، سلول های چسبنده مغز استخوان رت.

مقدمه

پوست از نظر بافت شناسی و جنین شناسی شامل دو قسمت مشخص با منشأ جنینی متفاوت می باشد: اپیدرمیس یا روپوست مشتق از اکتودرم سطحی، درمیس یا میان پوست مشتق از مزودرم (۱ و ۲). اپیدرمیس لایه ی بالایی و نسبتاً نازکی است، ۰/۱ تا ۰/۲ میلی متر ضخامت دارد (۵). درمیس بافت همبندی است که مسئول ویژگی های مکانیکی پوست بوده و بسیار ضخیم تر از اپیدرم است. این لایه از فیبروبلاست ها با منشأ مزودرم، کلاژن ها، الاستین، پروتئوگلیکان ها، فیبرونکتین و ماده ی زمینه تشکیل شده است. علاوه بر این، درم حاوی عروق خونی و لنفاتیک با منشا مزودرم- گیرنده های عصبی درد، لمس، حرارت و فشار با منشأ ستیغ عصبی- غدد چربی، غدد عرق و فولیکول های مو با منشأ نورواکتودرم می باشد. اپیدرم و درم توسط غشا پایه به هم متصل شده اند (۱). پروتئین های تشکیل دهنده ی غشاء پایه، کلاژن نوع IV، VII و لامینین هستند که به وسیله ی فیبروبلاست های درم سنتز می شوند (۳). هیپودرم در زیر درم قرار دارد و از بافت چربی با منشأ مزودرم تشکیل شده است (۱). مهندسی بافت روش درمانی نوید بخشی است که سلول ها، داربست ها و فاکتورهای ریز محیطی را با هم ترکیب کرده تا سیگنال های مختلفی را برای ترمیم و بازسازی بافت های آسیب دیده القاء کند (۴). داربست ها به عنوان پشتیبان فیزیکی ساختار و تنظیم کننده ی فعالیت سلول عمل می کنند. به طور برجسته ساختار داربست (تخلخل، متوسط اندازه ی منافذ، شکل منافذ، ارتباط منافذ با یکدیگر) و ویژگی های مکانیکی آن بر روی رفتارهای سلولی مثل چسبندگی، رشد و تمایز تأثیر می گذارند (۵). بافت ها و اندام های سلول زدایی شده، داربست های سه بعدی بسیار ایده آل برای مهندسی بافت می باشند (۶). سلول زدایی یک مرحله ی مهم در تکوین این داربست های زیستی است که برای جلوگیری از پاسخ ایمنی ناسازگار ایجاد می شود (۷). تا کنون

تحقیقی دال بر سلول زدایی بافت پوست انسانی در ایران صورت نگرفته است. در مطالعات انجام شده در سطح جهانی نیز، عمل سلول زدایی پس از جدا کردن اپیدرم از درم صورت گرفته، که این امر به دلیل حذف ساختار متراکم و بسیار فشرده اپیدرم، سبب تسهیل فرآیند سلول زدایی می شود (۸). در این مطالعه برای اولین بار سلول زدایی کامل بافت پوست انسان (اپیدرم به همراه درم) صورت گرفت که این محصول می تواند به منظور استفاده های کلینیکی در درمان سوختگی های شدید مورد استفاده قرار گیرد. عدم جداسازی اپیدرم از درم با هدف حفظ بیشتر رطوبت بدن تا ترمیم کامل زخم های پوستی انجام شد.

مواد و روش ها

نمونه ی پوست با رعایت اصول اخلاقی از یک خانم ۴۰ ساله بدون سابقه ی بیماری خاص، طی عمل جراحی پلاستیک شکم از محل بیمارستان جوادالائمه مشهد تهیه گردید و پس از قرار دادن در سرم فیزیولوژی به دمای ۴°C- انتقال داده شد. سپس موها و چربی های اضافی جدا شده و پوست به قطعاتی با ابعاد ۵×۵ سانتی متر تقسیم و درون فالكون های حاوی سرم فیزیولوژی در دمای ۲۰°C- ذخیره شد.

در این پژوهش از روش های مختلف فیزیکی، آنزیمی و شیمیایی جهت سلول زدایی بافت پوست استفاده گردید. به منظور انجام مرحله ی فیزیکی سلول زدایی که شامل انجماد و ذوب سریع می باشد، یک فالكون حاوی نمونه از فریزر خارج شده و در دمای اتاق ذوب، سپس به قطعات ۰/۵×۰/۵ سانتی متر تقسیم شد و پس از قرار گرفتن در کرایوتیوب های ۲ میلی لیتری به مدت ۲ دقیقه در ازت مایع (انجماد سریع) و پس از آن بلافاصله درون بوکال حاوی آب جاری به مدت ۵ دقیقه قرار گرفتند (ذوب سریع). مرحله انجماد و ذوب سریع ۶ مرتبه تکرار گردید. سپس نمونه ها از کرایوتیوب ها

خارج و به مدت ۳۰ دقیقه توسط فسفات بافر سالین (PBS) شستشو داده شدند (۹). به منظور انجام مرحله ی آنزیمی سلول زدایی از محلول تریپسین ۰/۲۵٪ در PBS به مدت ۱۸ ساعت و در دمای 25°C استفاده شد (۱۰). پس از اتمام این مرحله نیز نمونه ها با PBS (۳۰ دقیقه) شستشو داده شدند و در نهایت به منظور انجام مرحله ی شیمیایی سلول زدایی از محلول SDS ۱٪ در PBS به مدت ۱۲ ساعت استفاده گردید. برای استریل نمودن داربست ها، نمونه ها پس از انتقال به زیر هود لامینار، به مدت ۳۰ دقیقه در اتانول ۷۰٪ قرار گرفتند. پس از آن چندین مرتبه با آب مقطر استریل شستشو، و به مدت ۱ ساعت در آب مقطر استریل قرار داده شدند. در آخرین مرحله نمونه ها پس از چندین مرتبه شستشو با PBS استریل، به مدت ۱ ساعت نیز در این محلول قرار گرفتند (۹).

به منظور استخراج مغز استخوان، رت های نر نژاد ویستار یک ماهه با کلروفورم بیهوش و استخوان های فمور و تیبیا جدا شدند. با استفاده از انبر مخصوص دو انتهای استخوان را شکسته و سرنگ حاوی ۵ میلی لیتر محیط کشت DMEM (Dulbecco's modified eagle) medium آماده (حاوی FBS (Fetal Bovine Serum) و آنتی بیوتیک) را از ناحیه ی سوزن (سوزن 23-gauge) در لومن استخوان وارد می کنیم. با فشار پیستون سرنگ، محیط کشت و به همراه آن مغز استخوان به درون فلاسک ۲۵ سانتی متر مربع تخلیه می شود. سپس درب فلاسک را بسته، با حرکات دورانی آرام سبب توزیع یکدست سلول ها در کف فلاسک شده و آن را به انکوباتور 37°C با ۵ درصد CO_2 منتقل می کنیم (۱۱). بعد از ۲۴ ساعت، تعویض محیط کشت با هدف حذف سلول های غیرچسبنده صورت می گیرد. سلول های مغز استخوان قبل از پاساژ اول مورد استفاده قرار گرفتند و در طی این مدت هر ۳ روز یک بار محیط کشت آن ها تعویض شد. پس از استریل کردن، داربست ها به مدت نیم ساعت در

محیط کشت DEME حاوی ۱۵ درصد FBS و آنتی بیوتیک درون انکوباتور قرار گرفتند و سپس محیط روی داربست ها خارج و داربست ها درون پلیت های ۴۸ خانه قرار گرفتند. سپس تعداد 4×10^5 سلول در ۷۵ میکرولیتر محیط کشت روی هر داربست قرار داده شد و پلیت ۴۸ خانه به انکوباتور انتقال یافت (شمارش سلول ها توسط لام نئویار صورت گرفت). برای جلوگیری از تجمع سلول در یک قسمت، سوسپانسیون سلولی در نقاط مختلفی از سطح قرار گرفت. پس از گذشت ۲/۵ ساعت سلول های مورد نظر اتصالات لازم را با داربست های مذکور پیدا کرده و سپس حدود ۱ میلی لیتر محیط کشت به هر یک از چاهک های پلیت ۴۸ خانه که حاوی داربست های فوق بود، ریخته و برای بررسی در روزهای ۷، ۱۴، ۲۱ و ۲۸ در انکوباتور انکوبه شدند. طی این مدت فقط محیط کشت سلولی تعویض شد (روز در میان). این مدت فرصت لازم برای چسبندگی و تکثیر مناسب روی داربست های مورد مطالعه را برای سلول ها فراهم می کرد (۱۲). در پایان داربست ها خارج و در فیکساتور قرار گرفتند.

جهت مطالعه مورفولوژی و کنترل سلول زدایی، داربست ها قبل و ۱، ۲، ۳ و ۴ هفته پس از کشت با استفاده از فیکساتور بوئن تثبیت و پس از مراحل پاساژ بافتی و آغشتگی به پارافین، قالب گیری شدند. از قالب ها مقاطعی با ضخامت ۵ میکرون تهیه گردید و سپس با هماتوکسیلین-ائوزین (H&E)، هماتوکسیلین وایگرت - پیک ایندیگو کارمین (H&P)، پیکروفوشین، پیکروسیروس رد و Diamidino-2-phenylindole (DAPI) رنگ آمیزی شدند.

برای بررسی میزان تراکم سلولی ۱۰ نمونه داربست از هر هفته انتخاب شد. به کمک نرم افزار ImageJ، مساحت هر داربست و سطح واجد سلول در هر داربست محاسبه، بر هم تقسیم و در ۱۰۰ ضرب شدند. محاسبات آماری با استفاده از نرم افزار Graph pad

انجام و نمودارها با نرم افزار Excel رسم گردید. سطح معناداری $P < 0.05$ در نظر گرفته شد.

شبه اپیدرمی قرار گرفتند (تصویر ۴). در این هفته نیز شواهدی مبنی بر مهاجرت سلول ها به درون داربست قابل مشاهده نبود. در هفته ی سوم، کاهش تراکم سلولی و منقطع شدن تک لایه ی سلولی مشاهده شد. همچنین روند دژنره شدن در اکثریت سلول ها آغاز و قابل مشاهده بود (تصویر ۵). کاهش قابل توجه تراکم و دژنره شدن اکثریت سلول ها در هفته ی چهارم مشاهده شد. نکته ی قابل توجه در این هفته این بود که هیچ نشانه ای از تخریب داربست دیده نشد (تصویر ۶).

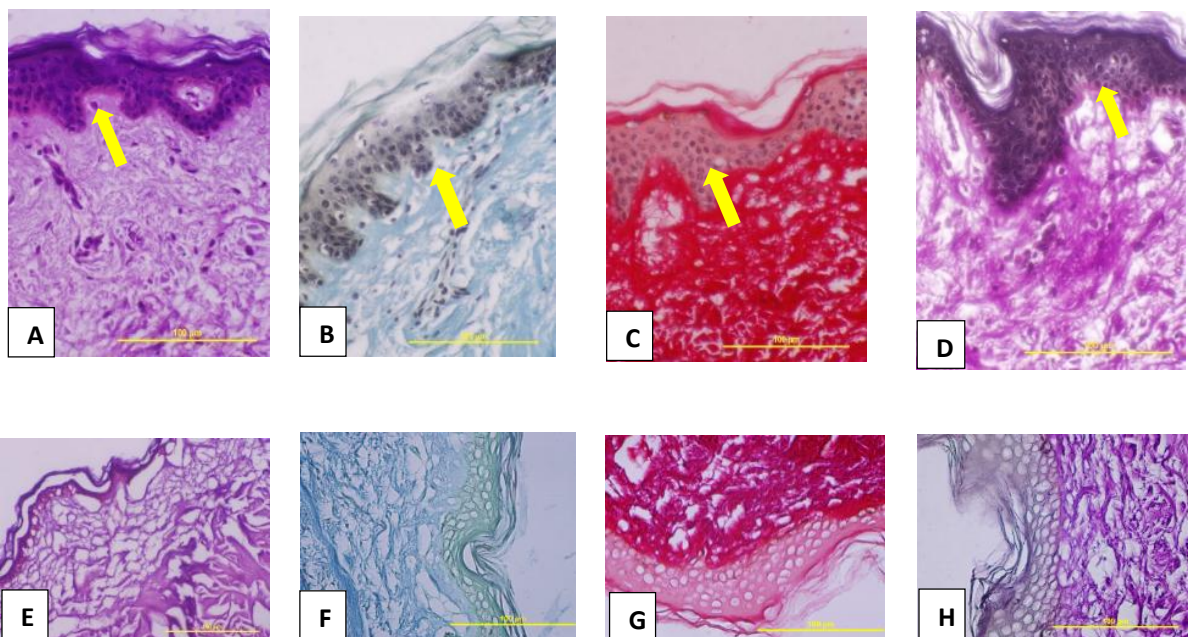
برای بررسی این که آیا نبود تخلخل در داربست و تراکم بسیار بالای فیبرهای کلاژن، می تواند عوامل باردارنده ی مهاجرت سلول ها باشند، بعد از فرآیند سلول زدایی بر روی سطح داربست شیاریهایی به طریق مصنوعی ایجاد کردیم. سپس سلول های چسبنده ی مغز استخوان رت را بر روی آن ها کشت دادیم. همان طور که در تصویر ۷ مشاهده می شود در هفته ی دوم نتایج نشان دهنده ی مهاجرت تعداد زیادی از سلول ها به درون

InStat و آنالیز یک طرفه ی ANOVA انجام گرفت. مقایسه ی میانگین ها با Tukey's HSD post hoc test

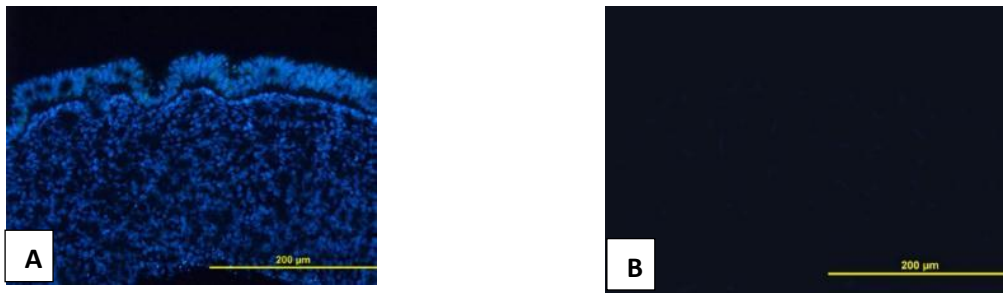
یافته ها

همان طور که در تصاویر ۱ و ۲ مشاهده می گردد، مطالعه هیستولوژیک داربست ها با رنگ آمیزی های مختلف نمایانگر حذف هسته ها و اجزای سلولی از بافت پوست پس از فرآیند سلول زدایی می باشد.

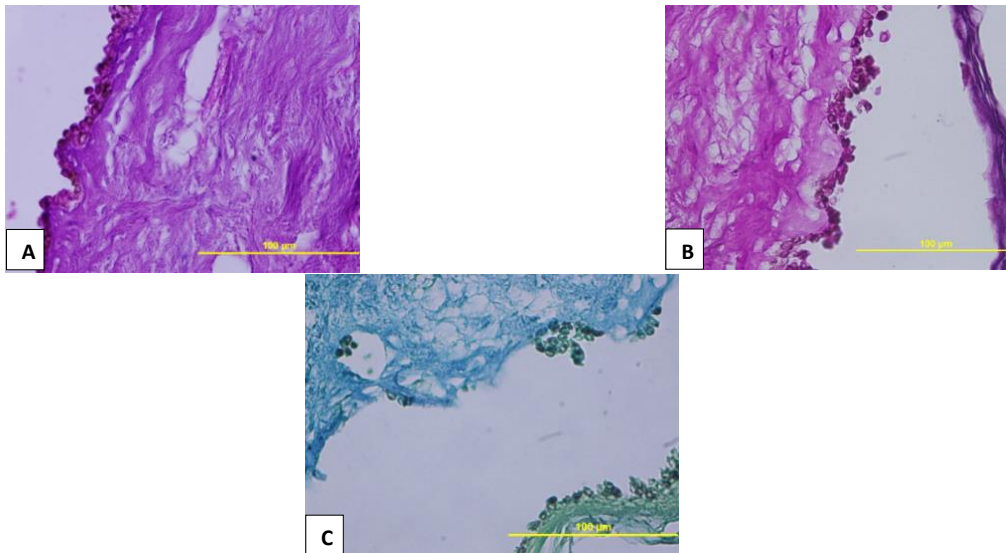
مطالعات بافت شناسی داربست ها در هفته ی اول پس از کشت با سلول های چسبنده ی مغز استخوان رت (RABMCs)، با استفاده از رنگ آمیزی های انجام شده، استقرار و چسبندگی تعداد زیادی از سلول ها را در اکثر نواحی به صورت سطحی و یک لایه و در برخی نقاط داربست به صورت چند لایه نشان دادند. نکته ی قابل توجه این است که سلول ها تنها در ناحیه ی بین درم و اپیدرم مستقر شدند (تصویر ۳). در هفته ی دوم، افزایش تراکم سلولی و چندلایه ای شدن سلول ها را در نقاط بیشتری از سطح داربست مشاهده کردیم. همچنین در برخی از سطوح داربست، سلول ها به صورت چندلایه و



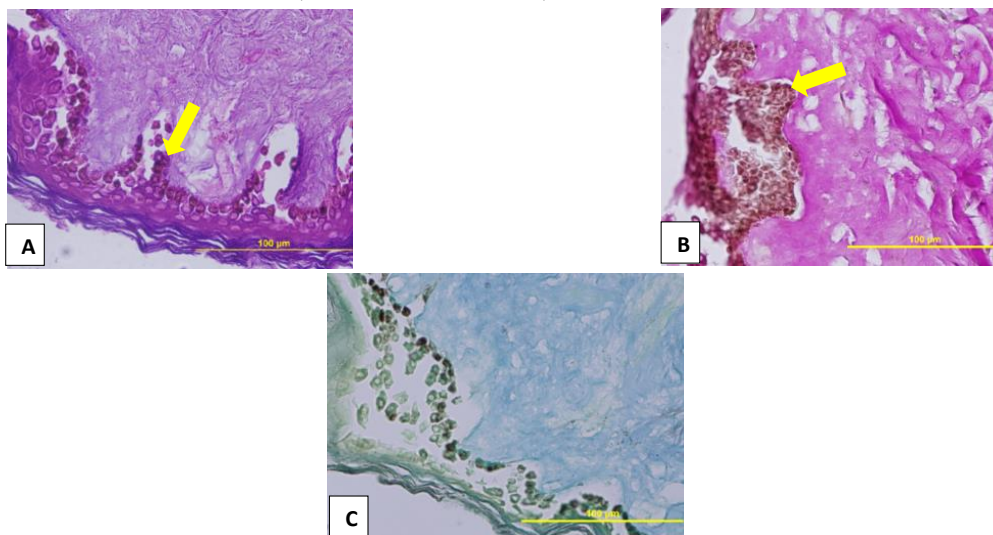
تصویر ۱: پوست انسان قبل و بعد از فرآیند سلول زدایی؛ پوست قبل (A, B, C, D) و بعد (E, F, G, H) از فرآیند سلول زدایی با رنگ آمیزی های مختلف و درشتنمایی 40X حذف اجزای سلولی را نشان می دهد و پیکان نمایانگر سلول ها می باشد. (A و E) رنگ آمیزی هماتوکسیلین-ئوزین، (B و F) رنگ آمیزی پیک ایندیگوکارمین، (C و G) رنگ آمیزی پیکروسیروس رد و (D و H) رنگ آمیزی پیکروفوشین.



تصویر ۲: پوست انسان قبل و بعد از فرآیند سلول‌زدایی؛ پوست قبل (A) و بعد (B) از فرآیند سلول‌زدایی با رنگ آمیزی DAPI و درشتنمایی 20X حذف اجزای سلولی را نشان می‌دهد.



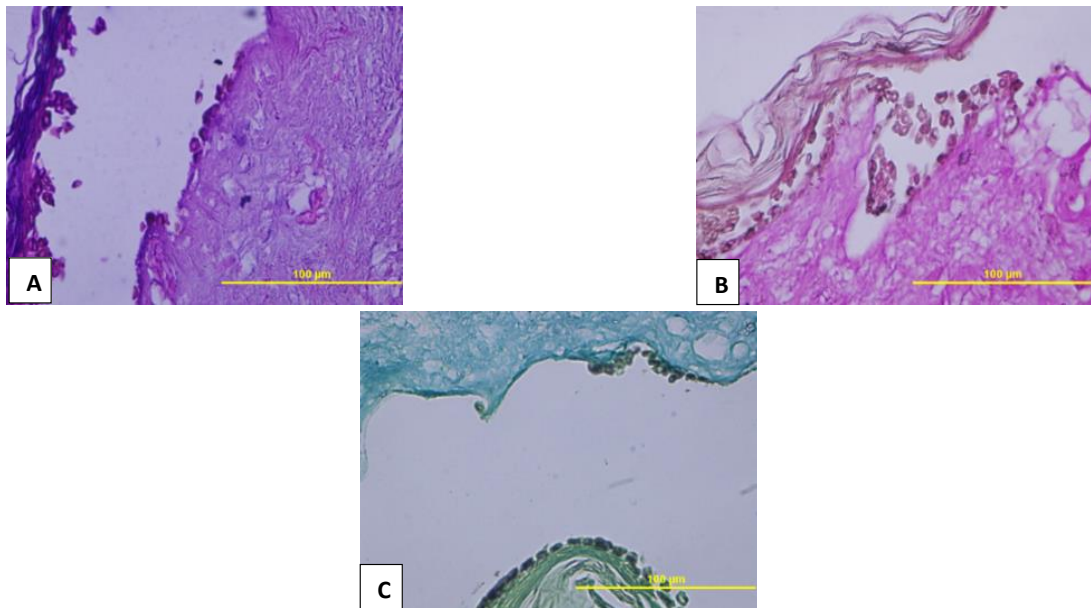
تصویر ۳: رفتار سلول‌های چسبنده‌ی مغز استخوان رت کشت داده شده بر روی داربست در هفته‌ی اول پس از کشت با درشتنمایی 40X: (A) رنگ آمیزی هماتوکسیلین-ئوزین، (B) رنگ آمیزی پیکروفوشین، (C) رنگ آمیزی پیک ایندیگوکارمین.



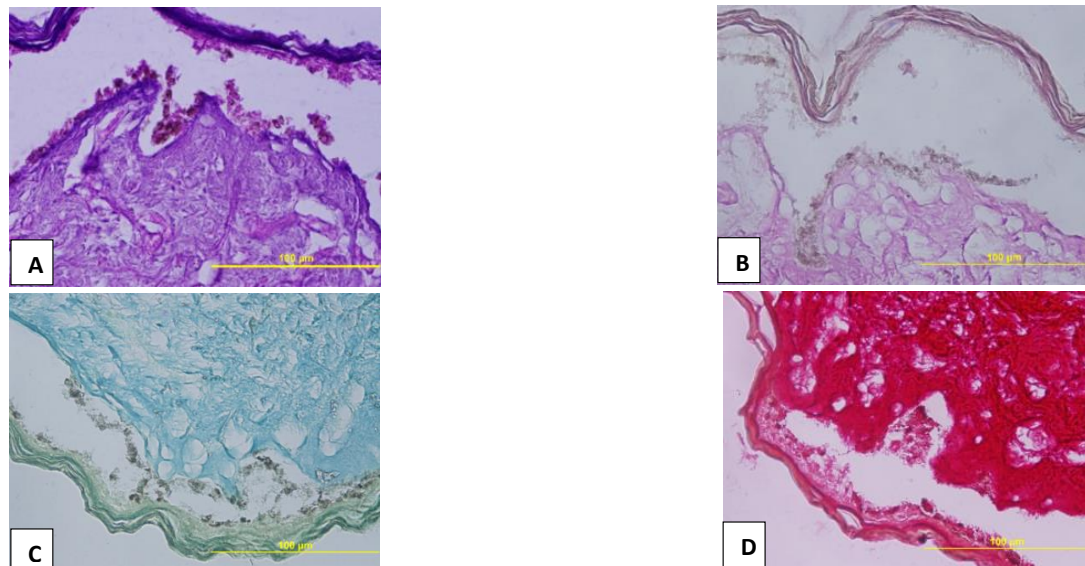
تصویر ۴: رفتار سلول‌های چسبنده‌ی مغز استخوان رت کشت داده شده بر روی داربست در هفته‌ی دوم پس از کشت با درشتنمایی 40X: (A) رنگ آمیزی هماتوکسیلین-ئوزین، (B) رنگ آمیزی پیکروفوشین، (C) رنگ آمیزی پیک ایندیگوکارمین. پیکان‌ها نشان دهنده‌ی ساختار شبه اپیدرمی می‌باشند.

بحث

شیارها بود. بررسی‌های آماری نشان داد که درصد تراکم سلول‌ها در هفته‌ی دوم بیشترین و در هفته‌ی چهارم کمترین مقدار بود (نمودار ۱).
مطالعات بافت‌شناسی انجام شده نشان داد که برخلاف بافت‌های غضروف و استخوان (۱۳) تنها دو



تصویر ۵: رفتار سلول های چسبنده ی مغز استخوان رت کشت داده شده بر روی داربست در هفته ی سوم پس از کشت با درشتنمایی 40X: (A) رنگ آمیزی هماتوکسیلین-ائوزین، (B) رنگ آمیزی پیکروفوشین، (C) رنگ آمیزی پیک ایندیگوکارمین.

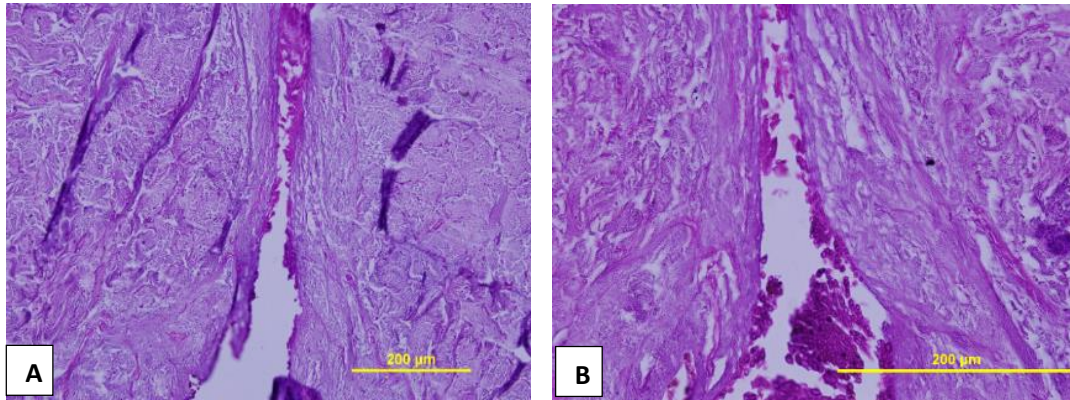


تصویر ۶: رفتار سلول های چسبنده ی مغز استخوان رت کشت داده شده بر روی داربست در هفته ی چهارم پس از کشت با درشتنمایی 40X: (A) رنگ آمیزی هماتوکسیلین-ائوزین، (B) رنگ آمیزی پیکروفوشین، (C) رنگ آمیزی پیک ایندیگوکارمین، (D) رنگ آمیزی پیکروسیروس رد.

(۱۴)، نمونه ها در دمای ۲۵ درجه سانتی گراد، در آن قرار گرفته تا آسیب وارده به ساختار پوست در حد ناچیز باشد.

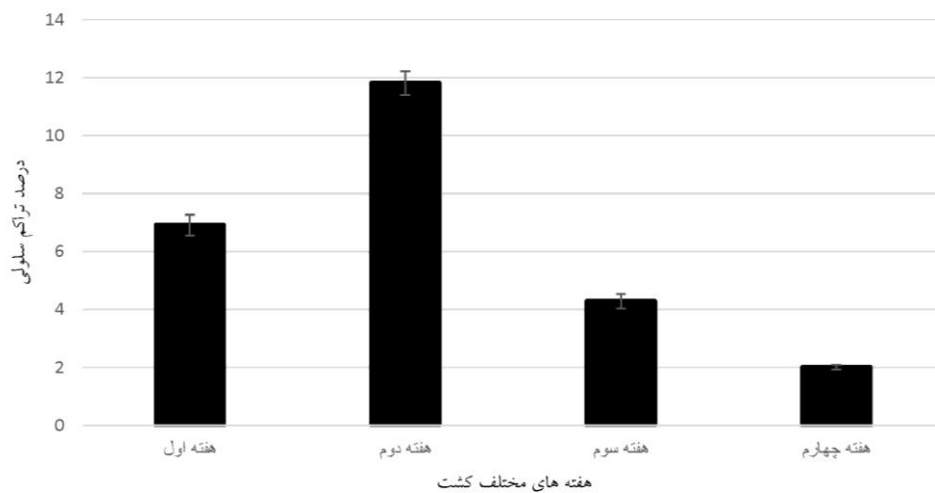
در انجماد سریع، کریستال های یخ درون سلولی شکل می گیرد که غشاهای سلولی را تخریب و منجر به لیز شدن سلول ها می شود (۱۵). SDS با توجه به ساختار دوگانه اش (دارای یک سر آنیونی آب دوست و یک دم کربنه ی اشباع آب گریز) می تواند با غشاهای سلولی

روش فیزیکی و شیمیایی برای سلول زدایی کامل بافت پوست خصوصاً در ناحیه ی اپیدرم کافی نیست. بنابراین روش آنزیمی (تریپسین) نیز به مراحل سلول زدایی اضافه گردید (۱۰). مدت زمان قرارگیری بافت پوست در تریپسین به صورتی تعیین شد که کمترین آسیب به ساختار پوست وارد شده و اپیدرم از درم جدا نشود. از آنجا که تریپسین مشابه آنزیم های دیگر در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد دارای حداکثر فعالیت خود می باشد



تصویر ۷: مهاجرت تعداد زیادی از سلول ها در هفته ی دوم به درون شیاری که به طریق مصنوعی در داربست ایجاد شده است. (A) درشتنمایی 20X و (B) درشت نمایی 40X

میزان تراکم سلولی



نمودار ۱: درصد تراکم سلولی در واحد سطح در هفته های متفاوت کشت. *** نسبت به همه ی هفته ها، ($P < 0.001$).

فلورسنت DAPI سلول زدایی کامل بافت پوست را تأیید نمودند (تصاویر ۱ و ۲). همه ی روش های سلول زدایی بافت ها و ارگان ها سبب اثر چشمگیر بر روی محتوای بیوماکرومولکول های ECM می شوند (۱۷) و از آنجا که کلاژن، جزء اصلی ECM پوست است، بررسی تغییرات تراکم کلاژن در روند سلول زدایی با استفاده از رنگ آمیزی های پیکروفوشین و پیکروسیروس رد صورت گرفت. در بررسی های میکروسکوپی مقاطع تهیه شده تغییر چشمگیری در میزان تراکم رشته های کلاژن مشاهده نشد.

به منظور کشت سلول ها بر روی داربست، سلول ها هم از سمت درم و هم از سمت اپیدرم بر روی

بر هم کنش داده و سبب لیز شدن غشاء سلول و غشاء هسته گردد (۱۶). تریپسین یکی از رایج ترین آنزیم های پروتئولیتیک مورد استفاده در فرآیندهای سلول زدایی است که حداکثر فعالیت آنزیماتیک آن در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد و PH برابر ۸ می باشد (۱۵). قوی ترین و موثرترین روش های سلول زدایی ترکیبی از تیمارهای فیزیکی، شیمیایی و آنزیمی است (۱۶). بنابراین ترکیب سه روش ذکر شده بهترین نتیجه را در سلول زدایی بافت پوست انسانی حاصل کرد که برای اولین بار در این مطالعه استفاده شد. رنگ آمیزی های مختلف از جمله هماتوکسیلین- ائوزین، هماتوکسیلین و ایگرت- پیک ایندیگو کارمین، پیکروسیروس رد، پیکروفوشین و رنگ

داربست ریخته شدند. نتایج بافت شناسی نشان داد در هر دو حالت سلول ها در فضای بین درم و اپیدرم مستقر می شوند که این امر احتمالاً به دلیل وجود غشای پایه بین درم و اپیدرم می باشد. غشاء پایه یک جز مهم ECM است که از گلیکوپروتئین تراپمیک لامینین، کلاژن نوع IV، پرلکان، اتاکتین، نیدوزن و فاکتورهای رشد متفاوت تشکیل شده است (۱۸). از این میان لامینین مهم ترین جزء غشاء پایه می باشد که به طور گسترده ای به عنوان پوشش ظروف کشت سلول به کار می رود تا باعث افزایش اتصالات سلولی و گسترش سلول ها شود (۱۹).

همانطور که در مقاطع تهیه شده از داربست ها در هفته های مختلف کشت دیده شد، در نمونه های هفته اول، تعداد زیادی از سلول ها در اکثر نواحی به صورت سطحی و یک لایه و در برخی نقاط داربست به صورت چند لایه استقرار داشتند (تصویر ۳). در هفته ی دوم، افزایش تراکم سلولی و چندلایه ای شدن سلول ها را در نقاط بیشتری از سطح داربست مشاهده کردیم. همچنین در برخی از سطوح داربست، سلول ها به صورت چندلایه و شبه اپیدرمی قرار گرفتند (تصویر ۴). در سال ۲۰۰۷، Wu و همکارانش نشان دادند که سلول های بنیادی مزانشیمی، درمان زخم را در موش های دیابتی و غیردیابتی با تشکیل مجدد اپیدرم، نفوذ سلولی و رگزایی بهبود بخشیدند (۲۰). آن ها مشارکت مستقیم سلول های بنیادی مزانشیمی مغز استخوان در بازسازی پوست و توانایی اپیتلیومزایی آن ها را در شرایط *In vivo* نشان دادند. مطالعه اخیر تمایز سلول های بنیادی مزانشیمی بند ناف انسان به کراتینوسیت را در شرایط *In vitro* نشان داد (۲۱) اما توانایی تمایز BM-MSCs به کراتینوسیت در شرایط *In vitro* هنوز بررسی نشده است. این مطالعه پیشنهاد می کند که سلول های بنیادی مغز استخوان توانایی تمایز به سمت کراتینوسیت ها را دارا می باشند.

نکته ی قابل توجه این است که در هر چهار هفته، شاهد نفوذ سلولی نبودیم یا میزان نفوذ سلولی بسیار اندک

بود، احتمال دارد این رویداد به دلیل تراکم بسیار بالای فیبرهای کلاژن و تخلخل بسیار پایین داربست های تهیه شده باشد. مهاجرت سلولی کمتر در داربست با شبکه ی کلاژن رشته ای متراکم در مقایسه با ساختار کلاژن رشته ای متخلخل دیده می شود. زیرا کلاژن به عنوان سد فیزیکی عمل کرده و از ورود سلول ها به درون داربست جلوگیری می کند (۲۲).

در سال ۲۰۰۶، مطالعه Helary و همکارانش نشان داد زمانی که فیبروبلاست ها با ماتریکس های متراکم کلاژن روبرو شدند، دیرتر از ماتریکس های سست به داخل آن نفوذ کردند (۲۳). در سال ۲۰۰۸، Prasertsung و همکارانش به این نتیجه رسیدند که ADM (Acellular Dermal Matrix) مشتق شده از پوست خوک یک ساختار بسیار متراکم را فراهم می آورد که این امر از مهاجرت سلول ها به داخل داربست جلوگیری می کند (۲۴). در سال ۲۰۱۳، Kuling و همکارانش میزان نفوذ سلولی را در پنج محصول تجاری مشتق از درمیس با هم مقایسه کرده و به این نتیجه رسیدند که میزان نفوذ سلولی در AlloDerm که یک محصول تجاری مشتق از درمیس انسانی است بسیار اندک بود (۲۵). بنابراین تحقیقات مختلف نشان می دهد که میزان نفوذ و مهاجرت سلول ها در داربست های طبیعی مشتق از درمیس (با منشأ انسانی یا حیوانی)، بدلیل تراکم بسیار بالای فیبرهای کلاژن بسیار اندک است. اندازه ی منافذ، تخلخل و ارتباط منافذ با یکدیگر میزان نفوذ سلولی و رشد سلول درون داربست را سبب می شود و بر روی تعداد زیادی از فرآیندهای سلولی اثر گذار است. همچنین تخلخل برای انتشار مواد غذایی، متابولیت ها و محصولات دفعی ضروری است (۲۶).

در سال ۲۰۰۸، Prasertsung و همکارانش از محلول اسید استیک ۰/۵ مولار برای ایجاد تخلخل در ADM خوکی استفاده کردند (۲۴). بدلیل عدم مشاهده ی نفوذ و مهاجرت سلول ها به درون داربست در طی چهار

ها به درون داربست و عدم ترشح MMPs توسط سلول ها باشد.

در طی مهاجرت سلول ها، آنزیم های پروتئولیتیک از قبیل ماتریکس متالوپروتئینازها (MMPs) و پروتئازها فعال شده و یا بیان آن ها افزایش می یابد. MMPs یک خانواده ی بزرگ از اندوپپتیدازهای شامل Zn+2 و وابسته به کلسیم هستند که مسئول تخریب همه ی اجزای ECM شامل کلاژنازاها، الاستین، ژلاتین، GAGs و PGs می باشند (۲۸).

در سال ۲۰۰۷، De Becker و همکارانش به این نتیجه رسیدند که MMP-2 در مهاجرت BM-MSCs انسانی نقش دارد (۲۹). در همان سال، Ries و همکارانش نقش MMP-1 و MMP-2 را در مهاجرت BM-MSCs تایید کردند (۳۰). بنابراین این احتمال وجود دارد که به دلیل عدم وجود MMPs مهاجرت سلولی مشاهده نشد. از طرفی احتمالاً به دلیل عدم مهاجرت، سلول ها MMPs ترشح نکردند و تخریبی در داربست ایجاد نشد.

نتیجه گیری

پس از کشت سلول ها بر روی داربست تهیه شده مشخص شد که ECM بجا مانده از سلول زدایی بافت پوست انسانی سبب القاء چسبندگی، تکثیر و تمایز سلول ها می شود. از طرفی نفوذ و مهاجرت سلول ها به درون داربست بدلیل تراکم بسیار بالای فیبرهای کلاژن، مشاهده نشد.

با توجه به نتایج حاصل، این محصول می تواند پتانسیل این را داشته باشد که مشابه آلودرم به عنوان پوشش بسیار مناسبی برای زخم های عمیق پوستی و زخم های ناشی از سوختگی استفاده شود.

تشکر و قدردانی

تأمین بخشی از هزینه های این تحقیق توسط معاونت پژوهشی دانشگاه فردوسی مشهد فراهم گردید

هفته، تصمیم به ایجاد تخلخل در داربست گرفته شد. در این مطالعه نیز به منظور ایجاد تخلخل، داربست ها به مدت ۳ ساعت در محلول اسید استیک ۰/۵ مولار غوطه ور شدند. پس از کشت RABMCs بر روی داربست های درمی تیمار شده با اسید استیک، بررسی های هیستولوژیکی نشان داد که تعداد بسیار اندکی از سلول ها به صورت یک لایه در سطح داربست قرار گرفتند و تشکیل ساختارهای چند لایه مشاهده نشد. این امر می تواند احتمالاً بدین دلیل باشد که اسید استیک طی مراحل شستشو و استریل کردن داربست به طور کامل حذف نشده و سبب تأثیر منفی بر روی رفتار سلولی شده است. دلیل دیگر شاید این باشد که به همراه حذف اپیدرم، ترکیبات غشاء پایه از جمله لامینین نیز حذف شده اند. علیرغم استفاده از اسید استیک به منظور ایجاد تخلخل در داربست، باز هم شاهد نفوذ و مهاجرتی به درون داربست در طی دو هفته پس از کشت نبودیم. این امر احتمالاً بدین دلیل است که میزان تخلخل ایجاد شده در داربست ها با این روش باز هم از حد ایده آل بسیار پایین تر بود. یک داربست متخلخل با تخلخل بیش از ۹۰ درصد به عنوان داربستی ایده آل در مهندسی بافت محسوب می گردد (۲۷).

بافت پوست سد محافظتی بدن در برابر نفوذ عوامل بیماری زا بوده و سبب حفظ رطوبت بدن می شود، پس عدم نفوذ و مهاجرت سلول ها به درون داربست امری طبیعی است. بنابراین داربست تهیه شده پتانسیل این را دارد که به عنوان پوششی برای زخم های عمیق پوستی و آسیب های ناشی از سوختگی استفاده شود، چون هم مانع از نفوذ عوامل بیماری زا و هم سبب حفظ رطوبت می شود.

نکته ی قابل توجه در هفته ی چهارم این بود که با گذشت ۲۸ روز از کشت سلول ها، شاهد تخریبی در داربست نبودیم. احتمال دارد این رویداد به دلیل تراکم بالای فیبرهای کلاژن، در نتیجه ممانعت از مهاجرت سلول

(شماره طرح: ۲۶۹۳۸). پژوهشگران بر خود لازم می دانند مراتب سپاس و امتنان خود را از حوزه ی معاونت پژوهشی این دانشگاه ابراز نمایند. این طرح برگرفته از پایان نامه می باشد.

References

1. Wong DJ & Chang HY. Skin tissue engineering. StemBook [Internet]. Cambridge (MA): Harvard Stem Cell Institute; 2009.
2. Marieb E. Human anatomy and physiology: Benjamin/Cummings Publishing Company. (1989).
3. MacNeil, S. Biomaterials for tissue engineering of skin. *Materials today*. 2008; 11(5): 26-35.
4. Malafaya PB, Silva GA & Reis RL. Natural-origin polymers as carriers and scaffolds for biomolecules and cell delivery intissue engineering applications. *Advanced drug delivery reviews*. 2007; 59(4): 207-233.
5. Harley BA, Leung JH, Silva ECCM & Gibson LJ. Mechanical characterization of collagen-glycosaminoglycan scaffolds. *Acta biomaterialia*. 2007; 3(4): 463-474.
6. Fini M, Bondioli, E., Castagna A, Torricelli P, Giavaresi G, Rotini R, et al.. Decellularized human dermis to treat massive rotator cuff tears: in vitro evaluations. *Connective tissue research*. 2012; 53(4): 298-306.
7. Gilbert TW, Freund JM & Badylak SF. Quantification of DNA in biologic scaffold materials. *JSR*. 2009; 152(1): 135-139.
8. Rodrigues AZ, Oliveira PD, Novaes Jr AB, Maia LP, Souza SLS & Palioto DB. Evaluation of in vitro human gingival fibroblast seeding on acellular dermal matrix. *Braz. Dent. J*. 2010; 21(3): 179-189.
9. Naderi S, Khayat Zadeh J, Mahdavi Shahri N, Nejad Shahrokh Abady K, Cheravi M, Baharara J, et al.. Three-Dimensional Scaffold from Decellularized Human Gingiva for Cell Cultures: Glycoconjugates and Cell Behavior. *Cell Journal (Yakhteh)*. 2013; 15(2): 166-175.
10. Chen RN, Ho HO, Tsai YT & Sheu MT. Process development of an acellular dermal matrix (ADM) for biomedical applications. *Biomaterials*. 2004; 25(13): 2679-2686.
11. Dennis JE, Merriam A, Awadallah A, Yoo JU, Johnstone B & Caplan AI. A quadripotential mesenchymal progenitor cell isolated from the marrow of an adult mouse. *JBMR*. 1999; 14(5): 700-709.
12. Mottaghi Talab F, Mottaghi Talab V, Farrokhi M, Eslami Far A, Shokr Gozar MA. Biocompatibility study of chitosan/ polyvinyl alcohol nanocomposite for proliferation of nerve cells. *Journal of Medical Science: Pathobiology*. 2009; 12(3): 51-60. (persian)
13. Tavassoli A, Shahabipour F, Mahdavi Shahri N, Moghadam Matin M, Fereidoni M. In vitro experimental study of interactions between blastoma tissue and three-dimensional matrix derived from bovine cancellous bone and articular cartilage. *Journal of cell and tissue*. 2010; 1(1): 53-62. (persian)
14. Voet D Voet JG & Pratt CW. *Fundamentals of biochemistry: life at the molecular level*. Hoboken: NJ: Wiley. 2008.
15. Gilbert TW, Sellaro TL & Badylak SF. Decellularization of tissues and organs. *Biomaterials*. 2006; 27(19): 3675-3683.
16. Mahdavi shahri N, Moghadam Matin M, Fereidoni M, Yarjanli Z, Banihashem Rad SA & Khajeh Ahmadi S. In vitro Assay of Human Gingival Scaffold in Differentiation of Rat's Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells to Keratinocystes. *IJBMS*. 2012; 15(6): 1185-1190.
17. Xing Q, Vogt C, Leong KW & Zhao F. Highly Aligned Nanofibrous Scaffold Derived from Decellularized Human Fibroblasts. *Advanced Functional Materials*. 2014; 24(20): 3027-3035.
18. Kleinman HK, Philp D & Hoffman MP. Role of the extracellular matrix in morphogenesis. *Current opinion in biotechnology*. 2003; 14(5): 526-532 .
19. Rosso F, Giordano A, Barbarisi M & Barbarisi A. From cell-ECM interactions to tissue engineering. *Journal of cellular physiology*. 2004; 199(2): 174-180.
20. Wu Y, Chen L, Scott PG, Tredget EE. Mesenchymal stem cells enhance wound healing through differentiation and angiogenesis. *Stem Cells*. 2007; 25(10): 2648-2659.
21. 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 Saigonesse culture. *Cell Tissue Bank*. 2011; 12(2): 125-133.
22. Hillmann G, Steinkamp-Zucht A, Geurtsen W, Gross G & Hoffmann A. Culture of primary human gingival fibroblasts on biodegradable membranes. *Biomaterials*. 2002; 23(6): 1461-1469.
23. 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): 4443-4452.
24. Prasertsung I, Kanokpanont S, Bunaprasert T & Damrongsakkul S. Characterization Of Regenerated ADM Scaffolds From Porcine Acellular Dermis. *The 3rd International Symposium on Biomedical Engineering*. 344-346.
25. Kulig KM, Luo X, Finkelstein EB, Liu X, Goldman SM, Sundback CA, et al.. Biologic properties of

- surgical scaffold materials derived from dermal ECM. *Biomaterials*. 2013; 34(23): 5776-5784 .
26. Rnjak-Kovacina J & Weiss AS. Increasing the pore size of electrospun scaffolds. *Tissue Engineering Part B: Reviews*. 2011; 17(5): 365-372.
 27. Ishaug-Riley SL, Crane-Kruger GM, Yaszemski MJ & Mikos AG. Three-dimensional culture of rat calvarial osteoblasts in porous biodegradable polymers. *Biomaterials*. 1998; 19(15): 1405-1412.
 28. Verma RP & Hansch C. Matrix metalloproteinases (MMPs): chemical–biological functions and (Q) SARs. *Bioorganic & medicinal chemistry*. 2007; 15(6): 2223-2268.
 29. De Becker A, Van Hummelen P, Bakkus M, Vande Broek I, De Wever J, De Waele M et al.. Migration of culture-expanded human mesenchymal stem cells through bone marrow endothelium is regulated by matrix metalloproteinase-2 and tissue inhibitor of metalloproteinase-3. *Haematologica*. 2007; 92(4): 440-449.
 30. Ries C, Egea V, Karow M, Kolb H, Jochum M & Neth P. MMP-2, MT1-MMP, and TIMP-2 are essential for the invasive capacity of human mesenchymal stem cells: differential regulation by inflammatory cytokines. *Blood*. 2007; 109(9): 4055-4063.

Preparation of human 3D skin matrix and investigation of the interaction between rat adherent bone marrow cells and prepared matrix

Leila Izi

Student of Cellular and Developmental Biology, Department of Biology, Faculty of Science, Ferdowsi University of Mashhad, Mashhad, Iran.

**Roya Lari*

Assistant Professor, Department of Biology Faculty of Science, Ferdowsi University of Mashhad, Mashhad, Iran.

Nasser Mahdavi Shahri

Professor, Department of Biology, Stem cell Research Group, Institute of Biotechnology, Faculty of Science, Ferdowsi University of Mashhad, Mashhad, Iran.

Mehrnegar Rojhan Nezhad

Student of Cellular and Developmental Biology, Department of Biology, Faculty of Science, Ferdowsi University of Mashhad, Mashhad, Iran.

Ali Birjandi Nejad

Associate Professor, Mashhad University of Medical Sciences, Mashhad, Iran.

Received:12/10/2015, Revised:22/11/2015, Accepted:07/03/2016

Correspondence Author:

Roya Lari,
Ferdowsi University of Mashhad,
Mashhad, Iran
E-mail: rlari@um.ac.ir

Abstract

Background: Decellularised tissues matrix is considered as an ultimate scaffolding system for two reasons: firstly it has mechanical and structural similarity with natural tissue, secondly extra cellular matrix proteins remain intact after decellularization, which are important for cell differentiation. The aim of this study is investigation behavior rat adherent bone marrow cells cultured in decellularised matrix of human skin.

Materials and Methods: In this study, human skin tissues were decellularised by three methods: physical (slow freezing and snap freeze–thaw), enzymatic (trypsin 0.25%, 18 hours) and chemical (sodium dodecyl sulfate- SDS 1%, 12 hours). After washing and sterilization procedures, scaffolds cultivated with 4×10^5 rat adherent bone marrow cells. Finally, histological studies were performed after 1, 2, 3 and 4 weeks of culture and investigated with different staining.

Results: Histological study of decellularised scaffolds revealed that nuclear and cellular components of the tissues were completely removed and collagen fibers remained intact. At 1, 2, 3 and 4 weeks of culture, in vitro analysis showed adhesion and also proliferation of rat adherent bone marrow cells. Also, we did not observe any penetration and migration of the cells into scaffolds. Statistical analysis indicated significant difference in percentage of cell density in specimens cultured after 2 weeks versus the other specimens ($P < 0.001$).

Conclusion: the overall results showed that remnant ECM (Extracellular Matrix) of human skin can be a suitable scaffold for studying Rat Adherent Bone Marrow Cells behavior.

Key words: *Extracellular matrix, Decellularization, Scaffold, Human skin, Rat adherent bone marrow cells.*