مجله علمی دانشگاه علوم پزشکی کردستان / دوره بیست و یکم / خرداد و تیر 1395/ 33-22

بررسی برهم کنش لاین سلولی L929 با داربست سه بعدی پوست انسانی

مهرنگار رجحان نژاد [1]، رویا لاری[2]، ناصر مهدوی شهری[3]، لیلا ایزی[1]، علی بیرجندی نژاد[4]

1. دانشجوی کارشناسی ارشد زیست سلولی تکوینی، گروه زیست شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه فردوسی مشهد، مشهد، ایران.

2. استادیار گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه فردوسی مشهد، مشهد، ایران (مولف مسوول)، تلفن ثابت: 051-38797022، royalari@gmail.com

3. استاد گروه زیست شناسی، پژوهشکده فناوری زیستی، دانشکده علوم، دانشگاه فردوسی مشهد، مشهد، ایران.

4. دانشیار ، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی مشهد، مشهد، ایران.

چکیده

زمینه و هدف: داربست ایده آل برای مهندسی بافت، باید از ماتریکس خارج سلولی تقلید کند تا سبب تسهیل رشد و تمایز سلول ها شود. داربست های زیستی از سلول زدایی بافت های حیوانی یا انسانی حاصل می شوند ماتریکس خارج سلولی بافت های طبیعی را می توان برای کاربردهای ترمیمی حتی به صورت زنوژنیک، استفاده نمود. در این تحقیق برای اولین بار سلول زدایی کامل بافت پوست انسان (اپیدرم به همراه درم) صورت گرفت. این محصول می تواند به منظور استفاده های کلینیکی در درمان سوختگی های شدید مورد استفاده قرار گیرد. عدم جداسازی اپیدرم از درم می تواند در حفظ بیشتر رطوبت بدن تا ترمیم کامل زخم های پوستی مشارکت داشته باشد.

روش بررسی: بافت های پوست انسانی با ترکیب سه روش فیزیکی (انجماد آهسته، انجماد- ذوب سریع)، آنزیمی (تریپسین 0/25 درصد به مدت 18 ساعت) و شیمیایی (sodium dodecyl sulfate (SDS) 1 درصد به مدت 12 ساعت) سلول زدایی شدند . سپس داربست های سه بعدی تهیه شده با تعداد 5×10^5 سلول کشت داده شدند. سرانجام، نمونه ها در هفته های ۱،۲، 3 و 4 بعد از کشت با رنگ آمیزی های مختلف مورد بررسی های هیستولوژیکی قرار گرفتند.

یافته ها: مطالعات میکروسکوپی داربست با رنگ آمیزی های مختلف، حذف سلول ها و حفظ رشته های کلاژن را در بافت پوست انسان تایید نمودند. با مطالعه ی آزمایشگاهی رفتار سلول ها در هفته های مختلف کشت، چسبندگی و تکثیر سلول ها ی L929 مشاهده گردید. در آنالیز های آماری درصد تراکم سلولی در هفته ی دوم در مقایسه با سایر هفته ها اختلاف معناداری را نشان داد $P<0/001$ از هفته سوم تعداد سلولها کاهش پیدا کردند.

نتیجه گیری: نتایج نشان داد که ECM به جا مانده از پوست انسانی، داربست مناسبی برای استقرار، رشد و تمایز سلول های L929 می باشد.از طرف دیگر، به دلیل تراکم بالای فیبرهای کلاژن و تخلخل پایین داربست های تهیه شده، هیچ نفوذ و مهاجرتی به درون درم روی نداد.

کلید واژه ها: ماتریکس خارج سلولی، پوست انسان، سلول زدایی، سلول های فیبروبلاستی L929، داربست.

وصول مقاله: 94/2/8 اصلاحیه نهایی: 94/11/4 پذیرش: 94/11/24

[Downloaded from sjku.muk.ac.ir on 2026-10-31]

[DOI: 10.22102/21.2.22]

مقدمه

پوست انسان بزرگترین اندام بدن و جزء بافت های نرم می باشد (1) که 1/6 مترمربع از سطح بدن را پوشانده و 16% وزن بدن یک انسان بالغ را تشکیل می دهد (2). پوست وظایف متعددی از جمله حفظ رطوبت، تنظیم دمای بدن، حفظ بدن از نفوذ میکروب ها و عوامل مضر خارجی و انتقال احساسات را انجام می دهد (1). این بافت شامل سه لایه ی اپیدرمیس، درمیس و هیپودرمیس می باشد. ضخامت اپیدرم 0/1 تا 0/2 میلی متر بوده و 95% سلول هایش کراتینوسیت است. درمیس ضخیم ترین لایه ی پوست است. جمعیت سلولی عمده ی درم فیبروبلاست ها هستند. کلاژن نوع I ، III و رشته های الاستیک عمده ی فیبرهای موجود در این لایه می باشند. ماتریکس بین سلولی درم متشکل از گلیکوزآمینوگلیکان ها(GAGs)، گلیکوپروتئین ها (GPs)، پروتئوگلیکان (PGs)، فیبرونکتین، فیبرین، هپارین و رسپتورهای اینتگرینی می باشد (2). داربست به عنوان الگو برای سازماندهی سلول و تکوین بافت در فرآیند مهندسی بافت عمل می کند (3). یکی از کاربردهای عمده ی بافت پوست مهندسی شده جانشین شدن آن برای التیام زخم های جلدی است (4). داربست ها بر اساس منبع شان به دو گروه طبقه بندی می شوند: طبیعی (برای مثال کلاژن) و سنتزی (برای مثال پلی گلیکولید) (5). ماتریکس های طبیعی سلول زدایی شده از سلول زدایی بافت های حیوانی یا انسانی حاصل می شوند که حذف سلول های آن ها با روش های متنوع سلول زدایی صورت می گیرد (6). تاکنون، از ماتریکس خارج سلولی (ECM یا Extracellular matrix) سلول زدایی شده به عنوان یک اسکفولد در مهندسی بافت بسیاری از ارگان ها مثل قلب، شش، کبد، کلیه، پانکراس و روده استفاده شده است (7).

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 (8). 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.

فیبروبلاست ها سلول های غیررگی و غیر اپی تلیالی از بافت همبند می باشند. از جمله وظایف مهم فیبروبلاست ها می توان به: ایجاد ماتریکس خارج سلولی (ECM)، تنظیم تمایز اپی تلیالی، تنظیم التهاب، نقش در تشکیل غشاء پایه از طریق ترشح کلاژن IV و لامینین و ترمیم زخم اشاره کرد. فیبروبلاست ها همچنین منبع مهمی از پروتئازهای تخریب کننده ی ECM از قبیل ماتریکس متالوپروتئینازها (MMPs) می باشند که نقش حیاتی در نوسازی و حفظ هموستاز ECM دارند(9). در این تحقیق از رده ی سلولی L929 که منشاء فیبروبلاستی موشی دارند و پتانسیل تمایزی آنها در تحقیقات قبلی نشان داده شده است استفاده شد (10). هدف این مطالعه شناخت بر هم کنش لاین سلولی L929 با داربست سه بعدی پوست انسانی بود.

روش بررسی

در یک مطالعه مداخله ای آزمایشگاهی ، نمونه های پوست انسان با همکاری متخصص مربوطه در بیمارستان جوادالائمه ی مشهد و با رعایت اصول اخلاقی تهیه گردید. نمونه متعلق به یک خانم 40 ساله بدون سابقه ی بیماری خاص بود که جهت انجام جراحی زیبایی شکم به بیمارستان مراجعه کرده بود و پس از دریافت به سرم فیزیولوژی در دمای ^{o}C 4- منتقل شد. پس از جدا نمودن چربی های اضافی نمونه پوست به قطعاتی با ابعاد 5×5 سانتی متر تقسیم و درون فالکون حاوی سرم فیزیولوژی در دمای ^{o}C 20- ذخیره شدند. در این مطالعه به منظور سلول زدایی بافت پوست، سه

[Downloaded from sjku.muk.ac.ir on 2026-10-31]

[DOI: 10.22102/21.2.22]

روش فیزیکی، آنزیمی وشیمیایی به کار گرفته شد. به منظور انجام مرحله ی فیزیکی سلول زدایی که شامل انجماد و ذوب سریع می باشد، یک فالکون حاوی نمونه از فریز خارج شده و در دمای اتاق ذوب، سپس به قطعات 0/5×0/5 سانتی متر تقسیم شد و پس از قرار گرفتن در کرایوتیوب های 2 میلی لیتری به مدت 2 دقیقه در ازت مایع (انجماد سریع) و پس از آن بلافاصله درون بوکال حاوی آب جاری به مدت 5 دقیقه قرار گرفتند (ذوب سریع). مرحله انجماد و ذوب سریع 6 مرتبه تکرار گردید. سپس نمونه ها از کرایوتیوب ها خارج و به مدت 30 دقیقه توسط فسفات بافر سالین(PBS) شستشو داده شدند (11). به منظور انجام مرحله ی آنزیمی سلول زدایی از محلول تریپسین 0/25% در PBS به مدت 18 ساعت و در دمای 25°C استفاده شد (12). پس از اتمام این مرحله نیز نمونه ها با PBS(30 دقیقه) شستشو داده شدند و در نهایت به منظور انجام مرحله ی شیمیایی سلول زدایی از محلول سدیم دودسیل سولفات (SDS)1 % در PBS به مدت 12 ساعت استفاده شد. به منظور استریل نمودن داربست ها، نمونه ها پس از انتقال به زیر هود لامینار، به مدت 30 دقیقه در اتانول 70 % قرار گرفتند. پس از آن چندین مرتبه با آب مقطر استریل شستشو، و به مدت 1 ساعت در آب مقطر استریل قرار داده شدند. در آخرین مرحله نمونه ها پس از چندین مرتبه شستشو با PBS استریل، به مدت 1 ساعت نیز در این محلول قرار گرفتند.

کرایوتیوب حاوی سلول های فیبروبلاستی L929 از محل آزمایشگاه سلولی مولکولی دانشکده علوم دانشگاه فردوسی مشهد، تهیه و پس از باز شدن در بن ماری $37\ ^{0}C$ به زیر هود لامینار منتقل شد. سپس یک میلی لیتر محیط کشت به آن اضافه گردید. سوسپانسیون سلولی یک دست حاصله را به فلاسک 25 سانتی متر مربع منتقل و 4 میلی لیتر محیط کشت به آن اضافه شد.

برای کشت سلول ها بر روی داربست های پوست، داربست ها به مدت نیم ساعت در محیط کشت DMEM (Dulbeccȯ s Modified Eaglė s Medium) حاوی سرم جنینی گاوی (FBS= Fetal bovine serum) 15 %، درون انکوباتور قرار گرفتند و پس از تخلیه ی محیط کشت، سوسپانسیون سلولی با غلظت 5×10^{5} سلول (شمارش توسط لام نئوبار) در 75 میکرولیتر محیط کشت DMEM حاوی FBS 15 %، روی هر داربست کشت داده شد. پس از گذشت 2/5 ساعت سلول ها اتصالات لازم را با داربست های مذکور پیدا کردند. سپس داربست ها به دو گروه تقسیم شدند: داربست های فاقد سلول با محیط کشت معمولی(گروه کنترل) و داربست های واجد سلول با محیط کشت معمولی. در مرحله ی بعد یک میلی لیتر محیط کشت در هر یک از چاهک های پلیت 48 خانه ریخته و برای بررسی در روزهای 7، 14، 21 و 28 در انکوباتور نگهداری شدند. در طول این مدت محیط کشت سلولی هر خانه، روز در میان تعویض شد. جهت مطالعه مورفولوژی و کنترل سلول‌زدایی، داربست‌ها قبل و 1، 2، 3 و 4 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 5 میکرون تهیه گردید و سپس با هماتوکسیلین- ائوزین (H&E)، هماتوکسیلین وایگرت - پیک ایندیگو کارمین (H&P)، پیکروفوشین، پیکروسیروس رد و DAPI رنگ‌آمیزی شدند.

برای بررسی میزان تراکم سلولی در هر هفته 10 نمونه داربست از بین 50 نمونه ی مختص به هر هفنه انتخاب شد. به کمک نرم افزار ImageJ، مساحت هر داربست و سطح واجد سلول در هر داربست محاسبه، بر هم تقسیم و در 100 ضرب شدند(فرمول 1). محاسبات آماری با استفاده از نرم افزار Graph pad InStat و آنالیز یک طرفه ی ANOVA انجام گرفت. مقایسه ی میانگین ها با Tukey' s HSD post hoc test انجام و نمودارها با نرم افزار Excel رسم گردید. سطح معناداری $P<0/05$ در نظر گرفته شد.

[Downloaded from sjku.muk.ac.ir on 2026-10-31]

[DOI: 10.22102/21.2.22]

سطح واجد سلول

۱۰۰ ✖

مساحت هر داربست

فرمول 1. اندازه گیری میزان تراکم سلولی

یافته ها

به منظور تهیه داربست طبیعی از پوست انسان، بافت‌های پوست با به کار گیری ترکیبی از سه روش فیزیکی، آنزیمی و شیمیایی سلول‌زدایی گردیدند. همان طور که در تصاویر 1 و 2 مشاهده می‌گردد، مطالعه هیستولوژیک داربست‌ها با رنگ‌آمیزی های مختلف نشان دهنده حذف کامل هسته‌ها و اجزای سلولی از بافت پوست پس از انجام فرآیند سلول زدایی می‌باشد.

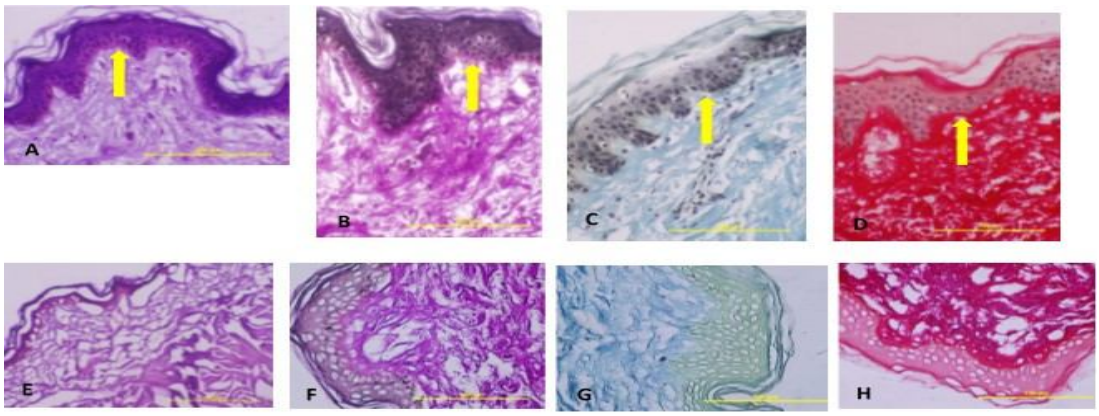
مطالعات بافت شناسی داربست ها در هفته های اول، دوم، سوم وچهارم پس از کشت با سلول های لاین سلولی L929 انجام گرفت. نمونه های کنترل جهت اطمینان از عدم آلودگی و سلول زدایی کامل داربست ها بکار گرفته شدند. در هفته ی اول پس از کشت، با استفاده از رنگ آمیزی های انجام شده، استقرار و چسبندگی تعداد زیادی از سلول ها در اکثر نواحی به صورت سطحی و تک لایه و در برخی نقاط داربست به صورت چند لایه نشان داده شد. شایان ذکر است که استقرار سلول ها تنها در نواحی بین درم و اپیدرم صورت گرفت (تصویر 3). در هفته ی دوم، افزایش تراکم سلولی و چندلایه ای شدن سلول ها را در نقاط بیشتری از سطح داربست مشاهده گردید. همچنین در برخی از سطوح داربست، سلول ها تشکیل ساختارهای شبه اپیدرمی را دادند. در این هفته نیز شواهدی مبنی بر مهاجرت سلول ها به درون داربست مشاهده نشد (تصویر 4). در هفته ی سوم،تراکم سلولی کاهش یافت و تک لایه سلولی منقطع گردید و از طرفی در اکثریت سلول ها روند دژنره شدن آغاز شد که به وضوح قابل مشاهده بود (تصویر 5). در هفته ی چهارم، کاهش قابل توجه تراکم سلول و دژنره شدن اکثریت سلول ها مشاهده شد. جالب توجه است که حتی در این هفته نیز شواهدی دال بر تخریب داربست مشاهده نگردید (تصویر 6). در نمونه های کنترل نیز پس از 4 هفته هیچ تخریبی در داربست ها دیده نشد.

در مرحله ی بعد، با این هدف که آیا نبود تخلخل در داربست به دلیل تراکم بالای فیبرهای کلاژن، می تواند مانع مهاجرت سلول ها به درون داربست شود، بعد از انجام فرآیند سلول زدایی شیارهایی به صورت مصنوعی بر سطح داربست ایجاد گردید. سپس سلول های L929 بر روی داربست ها شیاردار کشت داده شد. پس از انجام مطالعات هیستولوژیکی در هفته ی دوم پس از کشت، نتایج نشان دهنده مهاجرت تعداد بسیاری از سلول های L929 به درون داربست در محل شیارها بود (تصویر 7).

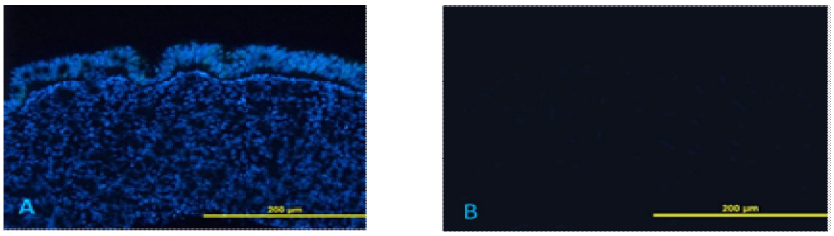
بررسی های آماری نشان داد که درصد تراکم سلول ها، در هفته ی دوم بیشترین و در هفته ی چهارم کمترین مقدار بود (نمودار 1).

[Downloaded from sjku.muk.ac.ir on 2026-10-31]

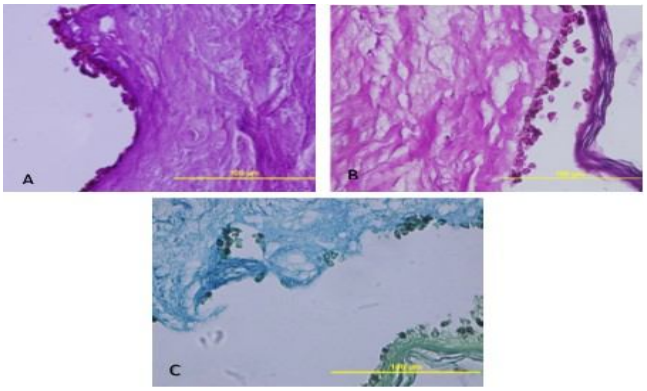
[DOI: 10.22102/21.2.22]



تصویر 1: پوست انسان قبل و بعد از فرآیند سلول‌زدایی؛ پوست قبل (**A**، **B**، **C** و**D**) و بعد (**E**، **F**، **G** و **H**) از فرآیند سلول‌زدایی با رنگ‌آمیزی های مختلف و درشت نمایی **40X** حذف اجزای سلولی را نشان می‌دهد. تصاویر (**A** و**E**) رنگ آمیزی **H&E**، تصاویر (**B** و **F**) رنگ آمیزی پیکروفوشین، تصاویر (**C** و **G**) رنگ آمیزی پیک ایندیگو کارمین و تصاویر (**D** و **H**) رنگ آمیزی پیکروسیروس رد. پیکان ها نمایانگر سلول‌ها می‌باشد.



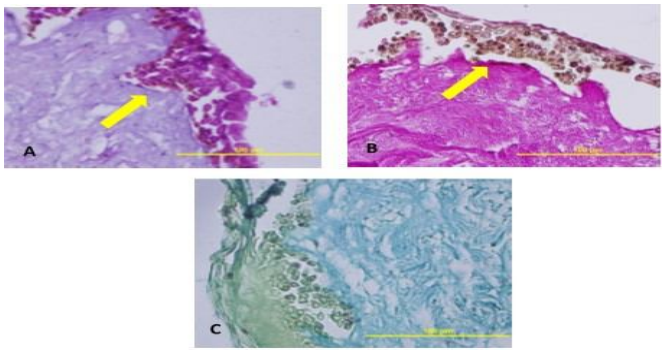
تصویر 2: پوست انسان قبل و بعد از فرآیند سلول‌زدایی؛ پوست قبل (**A**) و بعد (**B**) از فرآیند سلول‌زدایی با رنگ‌آمیزی **DAPI** و درشت نمایی **20X** حذف کامل اجزای سلولی را نشان می‌دهد.



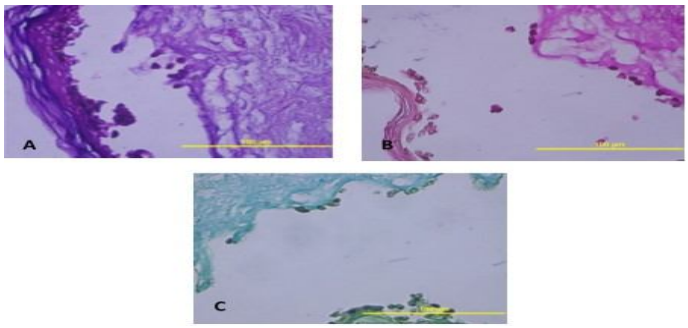
تصویر 3. رفتار سلول های **L929** کشت داده شده بر روی داربست در هفته ی اول پس از کشت با درشت نمایی **40X**. تصویر (**A**) رنگ آمیزی **H&E**، تصویر (**B**) رنگ آمیزی پیکروفوشین و تصویر (**C**) رنگ آمیزی پیک ایندیگو کارمین.

[Downloaded from sjku.muk.ac.ir on 2026-10-31]

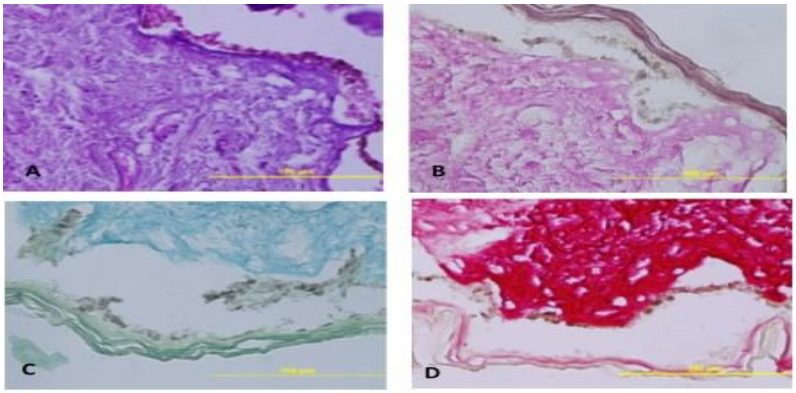
[DOI: 10.22102/21.2.22]



تصویر 4. رفتار سلول های **L929** کشت داده شده بر روی داربست در هفته ی دوم پس از کشت با درشت نمایی **40X** . تصویر (**A**) رنگ آمیزی **H&E**، تصویر (**B**) رنگ آمیزی پیکروفوشین و تصویر (**C**) رنگ آمیزی پیک ایندیگو کارمین. پیکان ها نشان دهنده ی ساختار شبه اپیدرمی می باشند.



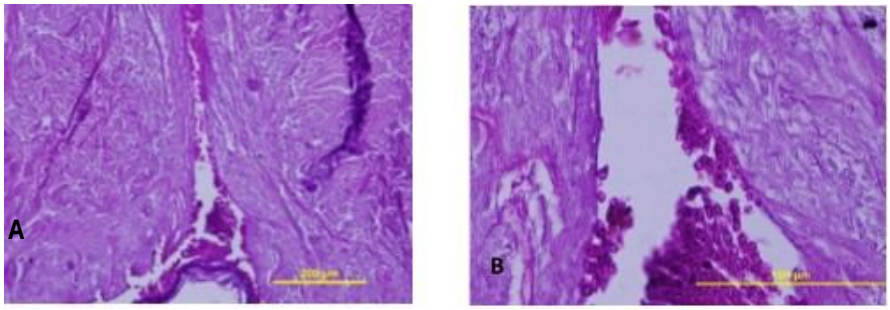
تصویر5. رفتار سلول های **L929** کشت داده شده بر روی داربست در هفته ی سوم پس از کشت با درشت نمایی **40X**. تصویر (**A**) رنگ آمیزی **H&E**، تصویر (**B**) رنگ آمیزی پیکروفوشین و تصویر (**C**) رنگ آمیزی پیک ایندیگو کارمین.



تصویر6. رفتار سلول های **L929** کشت داده شده بر روی داربست در هفته ی چهارم پس از کشت با درشت نمایی **40X**. تصویر (**A**) رنگ آمیزی **H&E**، تصویر (**B**) رنگ آمیزی پیکروفوشین، تصویر (**C**) رنگ آمیزی پیک ایندیگو کارمین و (**D**) رنگ آمیزی پیکروسیروس رد.

[Downloaded from sjku.muk.ac.ir on 2026-10-31]

[DOI: 10.22102/21.2.22]



تصویر7. مهاجرت تعداد زیادی از سلول های **L929** در هفته ی دوم با درشت نمایی **20X** (**A**) و **40X** (**B**) به درون شیارهایی که به روش مصنوعی در داربست ایجاد شده اند.



نمودار 1. درصد تراکم سلولی در واحد سطح در هفته های متفاوت کشت *** نسبت به همه ی هفته ها، (P<0/001)

[Downloaded from sjku.muk.ac.ir on 2026-10-31]

[DOI: 10.22102/21.2.22]

بحث

در این مطالعه برای اولین بار سلول زدایی بافت کامل پوست انجام شده است. در ابتدا به منظور سلول زدایی بافت پوست انسانی از دو روش فیزیکی (انجماد آهسته، انجماد –ذوب سریع) و شیمیایی (TritonX-100 و SDS) استفاده شد. SDS و TritonX-100 در درصدها و زمان های مختلف آزمایش گردید تا درکنار سلول زدایی کامل بافت پوست، کمترین آسیب به ECM وارد شود. مطالعات بافت شناسی انجام شده نشان داد که برخلاف بافت های غضروف و استخوان (13) تنها دو روش فیزیکی و شیمیایی برای سلول زدایی کامل بافت پوست خصوصآ در ناحیه ی اپیدرم کافی نیست. بنابراین روش آنزیمی (تریپسین) نیز به مراحل سلول زدایی اضافه گردید (14). نمونه های پوستی در زمان های مختلف در تریپسین قرار گرفتند تا کمترین زمان به همراه کمترین آسیب به ساختار ECM و قبل از این که اپیدرم از درم جدا شود، تعیین گردد. از آنجایی که حداکثر فعالیت آنزیم تریپسین در دمای 37 درجه ی سانتی گراد می باشد، همانند دیگر آنزیم ها (15)، نمونه ها در دمای 25 درجه سانتی گراد در آن قرار گرفتند تا آسیب کمتری به ساختار ECM وارد شود. 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 (16). SDS از جمله شوینده های یونی است که سبب حل کردن غشاهای سیتوپلاسمی و هسته ای، برداشت بقایای هسته ای و پروتئین های سیتوپلاسمی می شود (17). تریپسین یک سرین پروتئاز است که سبب شکستن رشته های کلاژن و الاستین شده، ولی محتوای GAGs را بهتر حفظ می کند (18). بنابراین ترکیب سه روش فیزیکی، آنزیمی و شیمیایی بهترین نتیجه را در سلول زدایی بافت پوست انسانی حاصل کرد که برای اولین بار در این پروژه به کار رفته است.

همه ی روش های سلول زدایی بافت ها و ارگان ها تا حدودی سبب شکستن ساختار سه بعدی و از دست رفتن ترکیبات سطحی می شوند (19) با توجه به اینکه کلاژن بخش عمده ی ECM پوست را تشکیل می دهد، بررسی تغییرات تراکم آن، در روند سلول زدایی حائز اهمیت است .در این پروژه به منظور تعیین میزان آسیب روش سلول زدایی مورد استفاده به رشته های کلاژن، رنگ آمیزی های مختلفی از جمله پیکروفوشین و پیکروسیروس رد صورت گرفت. بر طبق نتایج بافتی، تراکم کلاژن بافت سلول زدایی شده در مقایسه با بافت پوست طبیعی تفاوت قابل توجهی نشان نداد (تصویر 6).

پس از کشت سلول های فیبروبلاستی L929 بر روی داربست، مطالعات بافت شناسی در فواصل زمانی 7 روزه روی آن ها صورت گرفت. در هر چهار هفته سلول ها بین درم و اپیدرم مستقر شده بودند که این امر احتمالآ به دلیل حضور غشاء پایه در این ناحیه می باشد. برای اطمینان از مؤثر بودن غشاء پایه در استقرار سلول ها بین درم و اپیدرم، سلول ها به دو روش بر روی داربست ریخته شدند: ریختن سوسپانسیون سلولی از سمت درمی داربست و ریختن سوسپانسیون سلولی از سمت اپیدرمی داربست. طبق نتایج بافت شناسی حاصله مشخص شد که در هر دو مورد سلول ها بازهم در بین لایه ی درم و اپیدرم مستقر شدند. غشاء پایه ساختاری سازمان دهی شده با ECM است که سبب چسبیدن سلول ها شده و به عنوان مرزی بین اپیدرم و درم عمل می کند. با وجود ساختار متفاوت ECM و غشاء پایه، این دو دارای انواع مشابهی از پروتئین ها شامل، GPs، کلاژن ها و پروتئوگلیکان های غنی از کربوهیدرات می باشند. لامینین در غشاء پایه و فیبرونکتین در بافت هم بند برای ایجاد اتصالات مستقیم بین سلول ها و ECM حیاتی هستند (19). لامینین مهم ترین جزء غشاء پایه می باشد که به طور گسترده و معمول به عنوان پوشش ظروف کشت سلول به کار می رود تا باعث افزایش اتصالات سلولی به کف ظروف و گسترش سلول ها شود (20). بنابراین می توان گفت احتمالا حضور ترکیبات ECM باعث تجمع و

[Downloaded from sjku.muk.ac.ir on 2026-10-31]

[DOI: 10.22102/21.2.22]

چسبندگی سلول ها در بین دو لایه ی درم و اپیدرم شده است.

تخلخل داربست سبب تسهیل مهاجرت سلولی و رشد رگ های خونی در داربست می شود. همچنین تخلخل سبب تعویض مؤثر مواد غذایی و محصولات دفعی بین سلول ها و محیط اطرافشان می شود. بررسی های بافتی با رنگ آمیزی H & E در هر چهار هفته تایید کننده ی عدم نفوذ و مهاجرت سلول ها به درون داربست بود. N. Kulpreechanan و همکاران در سال 2013، سه داربست polycaprolactone (PCL) به روش الکترواسپینگ با سایز فیبر 440nm، 960nm و 4.6µm تولید و میزان چسبندگی و تکثیر سلول های L929 را بر روی این داربست ها بررسی نمودند. نتایج نشان داد که سایز فیبرها بر چسبندگی سلول ها اثری نداشت اما داربست هایی با فیبرهای متوسط و بزرگ تکثیر بیشتری از سلول های L929 را نشان دادند (10). در سال 2006، مطالعه Helary و همکاران نشان داد فیبروبلاست ها بسیار دیرتر به درون ماتریکس های متراکم کلاژن در مقایسه با ماتریکس های سست نفوذ کردند که نشان می دهد تراکم بالای فیبرهای داریست مانعی بر سر راه نفوذ سلول ها به درون داربست می باشد(21). در سال 2008، Prasertsung و همکاران 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 (22). در سال 2013، Kuling و همکاران 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 که این امر می تواند به دلیل تراکم بالای فیبرهای کلاژن ADM باشد (23) احتمالاً این رویدادها می تواند به علت تراکم بسیار بالای فیبرهای کلاژنی و تخلخل بسیار پایین داربست پوست باشد و از طرفی سختی داربست پوست نیز سبب کاهش نرخ تکثیر سلول های L929 می شود (20). به هر حال، تراکم بالای فیبرهای کلاژن و تخلخل پایین، از ویژگی های ذاتی بافت پوست می باشد که سبب می شود پوست به عنوان یک سد محافظتی و منعطف در برابر عوامل پاتولوژیکی و فشارهای خارجی عمل کند و همچنین سبب حفظ رطوبت بدن می شود. بنابراین عدم نفوذ و مهاجرت سلول ها به درون داربست پوست انسانی امری طبیعی می باشد. در نتیجه، داربست پوست انسانی پتانسیل بسیار خوبی دارد تا به عنوان پوششی برای زخم های عمیق پوستی و سوختگی های شدید به کار رود تا از نفوذ عوامل بیماری زا و از دست رفتن رطوبت بدن در طی روند ترمیم، جلوگیری کند.

chung و همکاران در سال 2013 سلول ها ی L929 را بر روی داربست های پلیمری واجد ساختار نانو(PLGA) با سایز منافذ متفاوت کشت دادند و میزان تکثیر سلول ها را بررسی کردند. نتایج نشان داد که تکثیر سلول های l929 در PLGA با سایز منافذ 118nm افزایش می یابد (24). Prasersung و همکاران از اسید استیک 0.5 مولاربرای ایجاد تخلخل در ADM خوکی استفاده کردند که سبب ایجاد منافذی 100 میکرونی در ADM شد و آن را با داربست کلاژنی سنتزی مقایسه نمودند تا میزان نفوذ سلول ها را در دو نوع داربست را بررسی کنند. نتایج نشان داد که میزان نفوذ سلولی در داربست متخلخل شده به میزان قابل توجهی افزایش یافته بود (22). در این تحقیق نیز ، از اسید استیک 0/5 مولار به مدت 3 ساعت برای متخلخل کردن داربست ها استفاده نمودیم (نتایج نشان داده نشده). مطالعات بافت شناسی پس از کشت سلول های L929 بر روی داربست های درمی اسید استیکی تهیه شده نشان داد که میزان بسیار اندکی از سلول ها و آن هم تنها به صورت تک لایه در سطح داربست قرار گرفتند. این امر می تواند به دلیل عدم حذف کامل اسید استیک از داربست طی مراحل شستشو و استریل کردن داربست و یا حذف ترکیبات غشاء پایه به همراه حذف اپیدرم از درم، روی داده باشد. شاید

[Downloaded from sjku.muk.ac.ir on 2026-10-31]

[DOI: 10.22102/21.2.22]

استفاده ی اسید استیک در طی مراحل سلول زدایی (بعد از مرحله ی فیزیکی) می توانست سبب حذف کامل آن در طی مراحل بعدی سلول زدایی شود. پیشنهاد می شود که از کمترین غلظت ممکن اسید استیک، با کمترین زمان اثر و بعد از مرحله فیزیکی استفاده شود تا در طی مراحل بعدی شاهد حذف کامل اسید استیک از بافت پوست باشیم. از طرفی با وجود استفاده از اسید استیک باز هم نفوذ و مهاجرتی از سلول ها به درون داربست مشاهده نشد .این امر احتمالا می تواند به این علت باشد که میزان تخلخل ایجاد شده با استفاده از اسید استیک 0/5 مولار بسیار کمتر از درصد تخلخل ایده آل بوده است (تخلخل کمتر از 10 درصد داربست درمی تهیه شده در مقابل تخلخل بیش از90 درصدی ایده آل در داربست ها) (نتایج مربوط به آزمون اسید استیک نشان داده نشده است).

نکته ی مهمی که در هفته ی چهارم جلب توجه می کرد، عدم تخریب داربست بود احتمالا این امر، به عدم تخلخل داربست به دلیلی تراکم بسیار بالای فیبرهای کلاژن آن، باز می گردد. این احتمال می رود که نبود تخلخل در داربست، مانع مهاجرت سلول ها و در نتیجه عدم ترشح آنزیم‌های خانواده‌ی ماتریکس متالوپروتئیناز (MMPs Matrix metalloproteinases) می گردد و به علت عدم ترشح این آنزیم ها، تخریبی در داربست روی نمی دهد. MMPs اندوپپتیدازهایی وابسته به Zn+2 و Ca+2 هستند که در PH طبیعی فعال می باشند (25). تا کنون حداقل 26 عضو از آن ها شناخته شده است. این آنزیم ها می توانند اجزاء ECM را تجزیه کنند (26). Maryam G Rohani و همکاران در سال 2003، نقش MMP-1 را در مهاجرت کراتینوسیت ها به داخل درم تآیید کردند. MMP-1 برای مهاجرت کراتینوسیت های انسانی بر روی کلاژن درم ضروری است (27). بنابراین نبود ترشح MMPs به دلیل عدم مهاجرت سلولی، می تواند دلیل احتمالی مشاهده نشدن هیچ تخریبی حتی پس از 28 روز در داربست باشد.

محرک های مختلفی از جمله آسیب های بافتی، تراکم بالای سلولی، استرس های حرارتی می توانند سبب آغاز روند آپوپتوز گردند (28). یکی دیگر از وقایع مشاهده شده، کاهش تراکم سلولی در هفته های سوم و چهارم بود. در این بازه زمانی تصاویری نشان دهنده حالت قطعه قطعه شدن سلول بود واین احتمال می رود که آغاز روند آپوپتوز، عامل از بین رفتن سلول ها باشد که البته نیاز به تحقیق و مطالعه بیشتر دارد.

نتیجه گیری

در این پروژه تلاش شد تا از طریق آزمودن درصدها و زمان های متفاوت اثر SDS، Triton X-100 و Trypsin کمترین آسیب به ساختار سه بعدی ECM وارد شود. پس از تایید بهترین روش سلول زدایی با رنگ آمیزی های مختلف، بر هم کنش سلول های L929 با داربست پوست تهیه شده، بررسی شد. نتایج نشان داد که ECM به جا مانده از پوست انسانی، داربست مناسبی برای استقرار، رشد و تمایز سلول های L929 می باشد. از طرفی به دلیل عدم مشاهده ی نفوذ و مهاجرت سلول ها به درون داربست (به علت تراکم بالای فیبرهای کلاژن و تخلخل پایین)، پوست کامل سلول زدایی شده ی انسانی می تواند مشابه آلودرم، پوشش بسیار مناسبی برای زخم های عمیق پوستی و زخم های ناشی از سوختگی های شدید باشد.

تشکر و قدردانی

این مقاله حاصل طرح تحقیقاتی با عنوان " تهیه داربست سه بعدی پوست انسانی و بررسی برهم کنش لاین سلولی L929 با این داربست" مصوب دانشگاه فردوسی مشهد در سال 1392 با کد 26966 می‌باشد و تأمین بخشی از هزینه‌های آن توسط معاونت پژوهشی این دانشگاه صورت گرفته. نویسندگان بر خود لازم می‌دانند مراتب سپاس و امتنان خود را از حوزه‌ی معاونت پژوهشی این دانشگاه ابراز نمایند.

[Downloaded from sjku.muk.ac.ir on 2026-10-31]

[DOI: 10.22102/21.2.22]

Reference

1. Martin P. Wound healing aiming for perfect skin regeneration. Science. 1997; 276:75-81.
2. Marieb EN. Essentials of human anatomy & physiology. 9th ed. San Francisco, CA: Pearson/Benjamin Cummings; 2009.
3. Tan JY, Chua CK, Leong KF, Chian KS, Leong WS & Tan LP. Esophageal tissue engineering: An in-depth review on scaffold design. Biotechnology and Bioengineering. 2012; 109: 1-15.
4. Gharravi AM, Orazizadeh M, Hashemitabar M, Ansari-Asl K, Banoni S, Alifard A & Izadi S. Status of tissue engineering and regenerative medicine in Iran and related advanced tools: Bioreactors and scaffolds. Journal of Biomedical Science and Engineering. 2012; 5: 217-227.
5. Zhong SP, Zahng YZ, Lim CT. Tissue scaffolds for skin wound healing and dermal reconstruction. Nanomedicine & Nanobiotechnology. 2010; 2:510-525.
6. Sano H, Orbay H, Terashi H, Hyakusoku H & Ogawa R. Acellular adipose matrix as a natural scaffold for tissue engineering. Journal of Plastic, Reconstructive & Aesthetic Surgery. 2014;67:99-106.
7. Kurtz A & Oh SJ. Age related changes of the extracellular matrix and stem cell maintenance .Preventive medicine. 2012; 54: S50-S56.
8. Rodrigues AZ, Oliveira PTD, Novaes Jr AB, Maia LP, Souza SLS & Palioto DB. Evaluation of in vitro human gingival fibroblast seeding on acellular dermal matrix. Brazilian dental journal. 2010; 21:179-189.
9. Kalluri R & Zeisberg M. Fibroblasts in cancer. Nature journal. 2006; 6: 392-401.
10. Kulpreechanan N, Bunaprasert T, Damrongsakkul S, Kanokpanont S, Rangkupan R. Effect of Polycaprolactone Electrospun Fiber Size on L929 Cell Behavior. Advanced Materials Research.2013; Vol. 701, pp: 420-424.
11. 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: 166-175.
12. Chen RN, Ho HO, Tsai YT & Sheu MT. Process development of an acellular dermal matrix (ADM) for biomedical applications. Biomaterials. 2004; 25: 2679-2686.
13. Tavassoli A, Shahabipour F, Mahdavi Shahri N, Moghadam Matin M, Fereidoni M. In vitro experimental study of interactions between blastoma tissue and three-dimentional matrix derived from bovine cancellous bone and articular cartilag. Journal of cell and tissue. 2010; 1: 53-62.
14.Chen RN, Ho HO, Tsai YT & Sheu MT. Process development of an acellular dermal matrix (ADM) for biomedical applications. Biomaterials. 2004; 25: 2679-2686.
15. Voet D, Voet JG & Pratt CW. Fundamentals of biochemistry: life at the molecular level. 4th ed. Hoboken: NJ: Wiley. 2008.
16. Gilbert TW, Sellaro TL & Badylak SF. Decellularization of tissues and organs. Biomaterials. 2006; 27: 3675-3683.
17. Waldrop FS, Puchtler H, Meloan SN & Younker TD. Histochemical investigations of different types of collagen. Acta Histochemica. Supplementband. 1979; 21: 23-31.
18.Crapo PM, Gilbert TW & Badylak SF. An overview of tissue and whole organ decellularization processes. Biomaterials. 2011; 32: 3233-3243.
19. Rosso F, Giordano A, Barbarisi M & Barbarisi A. From cell–ECM interactions to tissue engineering. Journal of cellular physiology. 2004; 199: 174-180.

[Downloaded from sjku.muk.ac.ir on 2026-10-31]

[DOI: 10.22102/21.2.22]

20. 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: 4443-4452.
21. Prasertsung I, Kanokpanont S, Bunaprasert T & Damrongsakkul S. Characterization Of Regenerated ADM Scaffolds From Porcine Acellular Dermis. The 3rd International Symposium on Biomedical Engineering.2008; 344-346.
22. Kulig KM, Luo X, Finkelstein EB, Liu X, Goldman SM, Sundback CA, et al. Biologic properties of surgical scaffold materialsderived from dermal ECM. Biomaterials. 2013; 34: 5776-5784.
23. Cheng Chung I, Ching-Wen Li & Gou-Jen Wang. The influence of different nanostructured scaffolds on fibroblast growth. Science and Technology of Advanced Materials. 2013;14: 5-8.
24. Vu TH & Werb Z. Matrix metalloproteinases: effectors of development and normal physiology. Genes & development. 2000; 14: 2123-2133.
25. 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: 4055-4063.
26. Rohani MG, Pilcher BK, Chen P & Parks WC. Cdc42 Inhibits ERK-mediated Collagenase-1 (MMP-1) expression in collagen-activated human keratinocytes. Journal of Investigative Dermatology. 2013; 134:1230-1237.
27. Hacker G. The morpholohy of apoptosis. Cell Tissue Res. 2000; 301: 5-17.

[Downloaded from sjku.muk.ac.ir on 2026-10-31]

[DOI: 10.22102/21.2.22]