

In vitro Comparison of Viability of Human Gingival Fibroblast Cells on Collagen Barriers

Asieh Mozaffari¹,
Mona Akbari^{2,3},
Zohreh Yazdi⁴,
Azadehzeinab Titidezh⁵

¹ Assistant Professor, Department of Periodontics, Dental Caries Prevention Research Center, Qazvin University of Medical Sciences, Qazvin, Iran

² Periodontics Resident, Student Research Committee, Qazvin University of Medical Sciences, Qazvin, Iran

³ Assistant Professor, Department of Periodontics, School of Dentistry, Zanjan University of Medical Sciences, Zanjan, Iran

⁴ Associate Professor, Social Determinants of Health Research Center, Qazvin University of Medical Sciences, Qazvin, Iran

⁵ Assistant Professor, Department of Oral and Maxillofacial Pathology, Dental Caries Prevention Research Center, Qazvin University of Medical Sciences, Qazvin, Iran

(Received November 29, 2021 ; Accepted October 2, 2022)

Abstract

Background and purpose: Human gingival fibroblasts cultured on collagen membrane is an alternative treatment method in guided regeneration. This *in vitro* study aimed at evaluating and comparing the human gingival fibroblasts viability on two types of collagen-rich membranes.

Materials and methods: Human gingival fibroblast cells (HGF1-RT1) were cultured on two types of collagen-rich membranes, including Regen and CenoMembrane. After 24 and 72 hours, the MTT test was performed. ANOVA test and Post Hoc Tukey were applied to compare MTT mean values in different groups and times.

Results: After 24 and 72 hours, the highest rates of viability of fibroblast cells were observed in the control group and the Regen membrane, and the lowest viability was seen in the CenoMembrane group. Cell viability in control group was significantly higher than the CenoMembrane and in Regen membrane was significantly higher than the CenoMembrane ($P < 0.05$). There were no significant differences between the Regen membrane and the control group ($P > 0.05$).

Conclusion: Based on MTT assay, the viability of fibroblasts after 24 and 72 hours was higher in the Regen membrane compared with the CenoMembrane.

Keywords: fibroblast, cell culture, CenoMembrane, Regen

J Mazandaran Univ Med Sci 2022; 32 (215): 151-156 (Persian).

Corresponding Author: Mona Akbari - Student Research Committee, Qazvin University of Medical Sciences, Qazvin, Iran.
(E-mail: abedianlab@yahoo.co.uk)

مقایسه آزمایشگاهی حیات سلول‌های فیبروبلاست لتهی انسانی بر داربست‌های حاوی کلاژن

آسیه مظفری¹
منا اکبری^{2و3}
زهره یزدی⁴
آزاده زینب تی تی دژ⁵

چکیده

سابقه و هدف: کشت فیبروبلاست‌های لته انسانی بر روی غشای کلاژنی به عنوان یک روش درمانی جایگزین در رژنراسیون هدایت شونده به کاررفته است. مطالعه آزمایشگاهی حاضر، حیات فیبروبلاست‌های لتهی را روی دو نوع غشای غنی از کلاژن ارزیابی و مقایسه کرده است.

مواد و روش‌ها: سلول‌های فیبروبلاست لتهی انسان (HGF1-RT1) روی دو نوع غشای غنی از کلاژن قابل جذب Regen و CenoMembrane کشت داده شدند. 24 و 72 ساعت بعد تست MTT انجام شد. برای مقایسه میانگین MTT در گروه‌ها و زمان‌های مختلف از آزمون ANOVA و تست تعقیبی Tukey استفاده شد.

یافته‌ها: پس از 24 و 72 ساعت بیش‌ترین حیات سلول‌های فیبروبلاست در گروه‌های کنترل و غشا Regen بود و کم‌ترین میزان در CenoMembrane بود. حیات سلول‌ها در گروه کنترل به‌طور معنی‌داری بیش‌تر از غشای CenoMembrane و در غشای Regen به‌طور معنی‌داری بیش‌تر از CenoMembrane بود ($P < 0/05$) تفاوت آماری معنی‌داری بین گروه کنترل و غشای Regen وجود نداشت ($P > 0/05$).

استنتاج: حیات فیبروبلاست‌ها روی غشا Regen پس از 24 و 72 ساعت براساس تست MTT، در مقایسه با CenoMembrane بیش‌تر بود.

واژه‌های کلیدی: فیبروبلاست، کشت سلول، Regen، CenoMembrane

مقدمه

پوستی آسلولار (Acellular Dermal Matrix; ADM) اشاره کرد (4). ADM می‌تواند با موفقیت در کسب پوشش ریشه (5)، حفظ ساکت دندان پس از کشیدن دندان (6)، به عنوان داربست در فرایند guided bone regeneration (7) و افزایش عرض بافت کراتینیزه در اطراف دندان (8) ایمپلنت (9) و ضخامت بافت مارژینال (10) مورد استفاده

سلول‌های فیبروبلاست لته نقش مهمی را در رژنریشن بافت نرم در داخل دهان ایفا می‌کنند (1) مطالعات در جهت ترمیم و تشکیل بافت نرم، نیازمند تکثیر و انتقال فیبروبلاست‌ها و نیز حضور یک داربست مناسب بیولوژیک می‌باشند. از جمله محصولات داربستی می‌توان به کلاژن (2) چیتوسان (chitosan) (3) و آلوگرافت ماتریکس

E-mail: Mona_akbari91@yahoo.com

مؤلف مسئول: منا اکبری - قزوین: بلوار شهید با هنر، دانشگاه علوم پزشکی قزوین، کمیته تحقیقات دانشجویی

1. استادیار، گروه پرودانتیکس، مرکز تحقیقات پیشگیری از پوسیدگی دندان، دانشگاه علوم پزشکی قزوین، قزوین، ایران
2. دستیار تخصصی پرودانتیکس، کمیته تحقیقات دانشجویی، دانشگاه علوم پزشکی قزوین، قزوین، ایران
3. استادیار، گروه پرودانتیکس، دانشکده دندانپزشکی، دانشگاه علوم پزشکی زنجان، زنجان، ایران
4. دانشیار، مرکز تحقیقات عوامل اجتماعی موثر بر سلامت، دانشگاه علوم پزشکی قزوین، قزوین، ایران
5. استادیار، گروه پاتولوژی دهان و دندان، مرکز تحقیقات پیشگیری از پوسیدگی دندان، دانشگاه علوم پزشکی قزوین، قزوین، ایران

تاریخ دریافت: 1400/9/8 تاریخ ارجاع جهت اصلاحات: 1400/9/28 تاریخ تصویب: 1401/7/10

قرار گیرد. به دلیل حجم بالای مطالعات در حال انجام در حوزه درمان‌های موکوژنژیوال و پیوندهای لثه‌ای و جایگزین‌های آن و تمایل بیش‌تر به استفاده از محصولات ساخت ایران و کمبود مطالعات بر روی این دو داربست، از دو آلوگرافت ماتریکس پوستی آسلولار ساخت ایران Regen و CenoMembrane در این مطالعه استفاده شد.

مواد و روش‌ها

این مطالعه‌ی تجربی توسط کمیته اخلاق در پژوهش (کد: IR.QUMS.REC.1398.205) دانشگاه علوم پزشکی قزوین به تصویب رسیده است. حیات سلول‌های فیبروبلاست لثه انسانی رده RT1 (RT1 (HGF1-RT1) (Pasteur, Tehran, Iran) بر روی غشای CenoMembrane (Acellular Dermal Allograft, tissue regeneration corporation) قابل جذب هیدروفیل با ضخامت 200 تا 600 میکرون و غشای قابل جذب Regen (Acellular Dermis) فرآورده بافت ایرانیان، تهران، ایران) با ضخامت 300 تا 400 میکرون بررسی شد. از آنجایی که حداقل 4 بار تکرار تست جهت حداکثر دقت نتایج حاصل مورد نیاز است، 4 نمونه از هریک از این دو غشا در هر کدام از بازه‌های زمانی 24 و 72 تهیه شد و تعداد کل نمونه‌ها برای هر گروه، 8 نمونه محاسبه شد (12، 11).

کشت سلولی فیبروبلاست‌ها

سلول‌ها در محیط کشت کامل (حاوی DMEM استریل، 100 IU/ml پنی‌سیلین (Gibco, USA)، 100 mg/ml استرپتومایسین (Gibco) و 10 درصد FBS (Fetal bovine serum) (Gibco)) در دمای 37 درجه، رطوبت 98 درصد و 5 درصد CO₂ کشت داده شدند. محیط 3 بار در هفته عوض شد و پس از رسیدن سلول‌ها به تراکم 80 درصد، محیط کشت خالی شد و فلاسک با PBS (Phosphate buffered saline) شستشو داده شد. سپس فیبروبلاست‌ها با استفاده از محلول تریپسین/EDTA 0/25 درصد از کف پلیت جداسازی شدند و پس از

کنده‌شدن سلول‌ها، به فالکن 15 میلی‌لیتری منتقل شدند و سپس محلول تریپسین، با استفاده از محیط کشت کامل، خنثی شد. سپس سلول‌ها به مدت 3 دقیقه و در دور rpm 1300 سانتریفیوژ شدند و مایع رویی دور ریخته شد و به سلول‌های کف فالکن، محیط کشت جدید اضافه شد. برای هر مقطع زمانی، یک پلیت 24 خانه در نظر گرفته شد. در هر پلیت تعداد 12 عدد چاهک برای هریک از گروه‌های 3 گانه (دو نوع غشا و یک گروه کنترل) تهیه شد.

کشت سلول‌ها بر روی غشاهای کلاژنی

غشاها در ابعاد 6×6 میلی‌متری تکه تکه شده و در سالیان استریل در فلاسک‌های 50 میلی‌لیتری برای 10 دقیقه شسته شدند. سپس به یک محلول جدید منتقل شدند و این روند برای 2 مرتبه دیگر تکرار شد. فیبروبلاست‌های آماده شده با تراکم 6×10^4 سلول در هر خانه بر روی غشاها جایگذاری شدند. برای گروه کنترل سلول‌ها بدون هیچ غشایی کشت داده شدند.

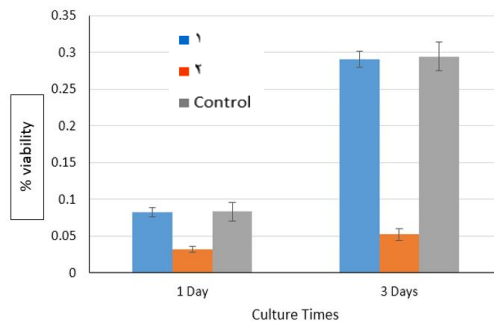
ارزیابی حیات سلولی توسط MTT assay

24 و 72 ساعت بعد از کشت سلولی (12، 13) تعیین زنده بودن سلول‌ها روی غشاها توسط تست MTT با استفاده از 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide, Sigma) انجام شد. تشکیل رنگ بنفش فرمازان که به دلیل فعالیت دهیدروژناز میتوکندریایی سلول‌های زنده صورت گرفت، توسط microplate reader (Anthos, Austria) در طول موج 570 نانومتر خوانده شد.

تجزیه و تحلیل داده‌ها

مقایسه میانگین MTT در گروه و زمان‌های مختلف توسط آزمون‌های One-way ANOVA و آزمون تعقیبی Tukey آزمون Two-way ANOVA و آزمون تعقیبی Tukey برای در نظر گرفتن توام گروه و زمان، استفاده شدند. آنالیز داده‌ها توسط نرم‌افزار SPSS 22/0 با در نظر گرفتن سطح معنی‌داری کم‌تر از 0/05 انجام شد.

یافته ها و بحث



نمودار شماره 1: درصد حیات سلول های فیبروبلاست توسط تست MTT در هر 3 گروه در زمان های 24 و 72 ساعت

بنابراین مشخص شد که غشای Regen در فراهم کردن شرایط برای حیات سلول های فیبروبلاست لتهی انسانی، مشابه گروه کنترل بود ولی CenoMembrane به طور معنی داری کم تر از دو گروه دیگر اجازه زنده ماندن فیبروبلاست ها را داد. اسماعیل نژاد و همکاران در سال 2021 در بررسی حیات فیبروبلاست های لته انسانی بر روی 4 نوع ADM شامل Surederm، Mucoderm، Regen با ضخامت متوسط و Regen ضخیم در بازهای 24، 48 و 72 ساعت و 7 روز مشاهده کردند که حیات سلول ها در Regen ضخیم در مقایسه با سه گروه دیگر به طور معنی داری کم تر بود به گونه ای که در روز هفتم هیچ سلولی بر روی این غشا وجود نداشت. Regen با ضخامت متوسط که مشابه با غشای مورد استفاده در مطالعه حاضر می باشد نتایج مشابهی با Mucoderm نشان داد و حیات سلول ها بر روی ساختار کلاژنی منحصر به فرد Surederm در این مطالعه نسبت به انواع دیگر برتری داشت. با توجه به تشابه ضخامت غشای Regen مورد استفاده در این مطالعه و تشابه روش انجام کار و تعداد نمونه ها با مطالعه ی حاضر می توان برتری Regen به CenoMembrane را توجیه کرد (13) مقدس و همکاران در سال 2020 در بررسی اثر دو نوع ADM رایج CenoMembrane و Regen بر چسبندگی و زنده ماندن و مورفولوژی سلول های فیبروبلاست لته انسانی مشاهده کردند که اثر دو داربست، بر روی چسبندگی و

بیش ترین میزان حیات سلول ها بر اساس تست MTT پس از 24 و 72 ساعت، در گروه های کنترل و غشا Regen بوده و در غشای CenoMembrane کم ترین میزان بود. (جدول شماره 1 و نمودار شماره 1) تفاوت بین گروه کنترل و غشای CenoMembrane و Regen از لحاظ آماری معنی دار بود ($P < 0/05$) ولی بین گروه کنترل و غشای Regen تفاوت معنی داری دیده نشد ($P > 0/05$). حیات فیبروبلاست ها در هر دو غشا از مقطع زمانی 24 ساعت به 72 ساعت افزایش یافت که این افزایش در گروه Regen به طور معنی داری بیش تر از CenoMembrane بود ($P < 0/05$). مقایسه دو به دو توسط آنالیز Tukey نشان داد که مقادیر MTT در هر دو زمان در غشای CenoMembrane به طور معنی داری کم تر از سایر گروه ها بوده است ($P < 0/001$) اما تفاوت معنی داری بین گروه کنترل و غشای Regen یافت نشد ($P > 0/05$) (جدول شماره 2).

جدول شماره 1: میانگین و انحراف معیار حیات سلول های فیبروبلاست توسط تست MTT در هر 3 گروه در زمان های 24 و 72 ساعت

زمان	گروه	میانگین	انحراف معیار
24 ساعت	کنترل	0/08	0/012
	CenoMembrane	0/03	0/004
	Regen	0/08	0/006
72 ساعت	کنترل	0/29	0/274
	CenoMembrane	0/05	0/043
	Regen	0/29	0/277

جدول شماره 2: مقایسه دو به دو گروه های مختلف در زمان های 24 و 72 ساعت در آنالیز Tukey (1: غشای Regen و 2: غشای CenoMembrane)

زمان	گروه A	گروه B	اختلاف میانگین (A-B)	P value
24 ساعت	1	2	0/060	0/000
	کنترل	1	-0/001	0/985
	2	کنترل	-0/050	0/000
	کنترل	2	-0/051	0/000
72 ساعت	1	2	0/2380	0/000
	کنترل	1	-0/004	0/904
	2	کنترل	-0/238	0/000
	کنترل	2	-0/242	0/000

*: $P < 0/05$ به عنوان معنی دار بودن از لحاظ آماری در نظر گرفته می شود

روی ADM را به صورت آزمایشگاهی بررسی کردند و مشاهده شد که در کشت‌های سلولی، افزایش تعداد سلول به ثبات تعاملات سلول با سلول وابسته است که تکثیر سلول‌های فیروبلاست را محدود کرده و موجب القای خروج آن‌ها از سیکل سلولی می‌شود. بنابراین می‌توان تفاوت در نتایج دو غشای مطالعه حاضر را به توانایی آن‌ها در فراهم کردن بستر باثبات جهت تعاملات سلول با سلول دانست که غشای Regen عملکرد موفق‌تری داشته است (12).

Maia و همکاران در سال 2011 مشاهده کردند که توزیع و چسبندگی سلول‌های فیروبلاست روی سطح داربست ADM، یکنواخت و تعداد سلول‌ها در لایه‌های عمقی‌تر کم بود و گفته شد که انتخاب یک داربست با فیبرهای کلاژن با تراکم کم‌تر موجب توزیع و چسبندگی یکنواخت‌تر سلول‌ها خواهد شد. بنابراین تفاوت در دانسیته کلاژنی دو غشا در مطالعه حاضر، ممکن است یکی از عوامل توجه‌کننده تفاوت مشاهده شده باشد (15) با توجه به نتایج متناقض در مطالعات، بهتر است مطالعات بیش‌تری در این زمینه برای نتیجه‌گیری دقیق‌تر انجام گیرد. نتایج مطالعه حاضر نشان داد که غشای غنی از کلاژن Regen مشابه گروه کنترل از حیات فیروبلاست‌های لته‌ای حمایت می‌کند و حیات فیروبلاست‌های لته‌ای در غشای غنی از کلاژن CenoMembrane به‌طور معنی‌داری کم‌تر از دو گروه دیگر بود.

سپاسگزاری

نویسندگان مقاله از انستیتو پاستور تهران به جهت همکاری با انجام مطالعه حاضر در این مرکز کمال تشکر را دارند.

حیات سلول‌های فیروبلاست لته انسانی تفاوت معنی‌داری نداشت و ارزیابی حیات سلول‌های فیروبلاست در زمان‌های 24 و 48 ساعت و 7 روز نشان داد که حیات سلول‌ها در هر دو گروه با گذشت زمان افزایش می‌یابد (14) این مطالعه نتیجه گرفت که کیفیت ADM می‌تواند به‌طور معنی‌داری رفتار سلولی و بلوغ بافت‌ها را متأثر کند. اختلاف مطالعه‌ی حاضر با مطالعه مقدس را می‌توان به تفاوت در بازه‌های زمانی و روش اجرای مطالعه و احتمالاً تفاوت در ضخامت غشاهای مورد استفاده در دو مطالعه مرتبط دانست. نتایج متفاوت حیات سلولی بر روی ADM‌های مختلف در مطالعات زیادی عنوان شده است. باید در نظر داشت که فرایند ساخت ماتریکس‌های ADM بسیار پیچیده و حساس به تکنیک انجام کار می‌باشد. حین ساخت این ماتریکس‌ها لایه‌ی اپیدرم پوست و تمامی سلول‌های لایه درم حذف می‌شوند و فایبرهای کلاژن و الاستین که اجزای سازنده ماتریکس پوستی هستند در جهت‌گیری طبیعی خود نسبت به غشای پایه جدا شده و خشک و منجمد می‌شوند و سپس استریل می‌شوند. به دلیل نبود پروتکل استاندارد جهت فرآوری غشاهای حساسیت‌این تکنیک، رفتاری‌های متفاوت فیروبلاست‌ها روی انواع مختلف ADM می‌تواند مرتبط با تفاوت در روند فرآوری آن‌ها و در نتیجه تفاوت در ویژگی‌های سطحی باشد. بنابراین الگوی کلاژنی منحصر به فرد فایبرها در غشاهای با نتایج برتر در مطالعات می‌تواند عامل برتری آن‌ها باشد که در مطالعه حاضر غشای Regen نتایج بهتری نشان داده است (13).

Rodrigues و همکاران در سال 2010 توزیع و تکثیر و زیست‌پذیری فیروبلاست‌های لته‌ای انسانی بر

References

1. Erdag G, Sheridan RL. Fibroblasts improve performance of cultured composite skin substitutes on athymic mice. *Burns* 2004; 30(4): 322-328.
2. Morelli T, Neiva R, Nevins ML, McGuire MK, Scheyer ET, Oh T-J, et al. Angiogenic biomarkers and healing of living cellular constructs. *J Dent Res* 2011; 90(4): 456-462.

3. Lotfi G, Shokrgozar MA, Mofid R, Abbas FM, Ghanavati F, Bagheban AA, et al. A clinical and histologic evaluation of gingival fibroblasts seeding on a chitosan-based scaffold and its effect on the width of keratinized gingiva in dogs. *J periodontol* 2011; 82(9): 1367-1375.
4. Jhaveri HM, Chavan MS, Tomar GB, Deshmukh VL, Wani MR, Miller Jr PD. Acellular dermal matrix seeded with autologous gingival fibroblasts for the treatment of gingival recession: A proof-of-concept study. *J periodontol* 2010; 81(4): 616-625.
5. Guan W, Liao H, Guo L, Wang C, Cao Z. Root coverage using a coronally advanced flap with or without acellular dermal matrix: a meta-analysis. *J Periodontal Implant Sci* 2016; 46(1): 22-34.
6. Borges GJ, Novaes Jr AB, de Moraes Grisi MF, Palioto DB, Taba Jr M, De Souza SLS. Acellular dermal matrix as a barrier in guided bone regeneration: a clinical, radiographic and histomorphometric study in dogs. *Clin Oral Implants Res* 2009; 20(10): 1105-1115.
7. Moreira ARO, Santamaria MP, Silvério KG, Casati MZ, Nociti Junior FH, Sculean A, et al. Coronally advanced flap with or without porcine collagen matrix for root coverage: a randomized clinical trial. *Clin Oral Investig* 2016; 20(9): 2539-2549.
8. Liu C, Su Y, Tan B, Ma P, Wu G, Li J, et al. Reconstruction of attached soft tissue around dental implants by acellular dermal matrix grafts and resin splint. *Int J Clin Exp Med* 2014; 7(12): 4666-4676.
9. Shkreta M, Atanasovska-Stojanovska A, Dollaku B, Belazelkoska Z. Exploring the gingival recession surgical treatment modalities: A literature review. *Open Access Maced J Med Sci* 2018; 6(4): 698-708.
10. Kim BS, Mooney DJ. Development of biocompatible synthetic extracellular matrices for tissue engineering. *Trends Biotechnol* 1998; 16(5): 224-230.
11. Vahabi S, Yadegary Z, Karamshahi M. Evaluating the adhesion of human gingival fibroblasts and MG-63-osteoblast-like cells to activated PRP-coated membranes. *Cell Tissue Bank* 2019; 20(3): 339-349.
12. Rodrigues AZ, Oliveira PTd, Novaes Jr AB, Maia LP, Souza SLSd, Palioto DB. Evaluation of in vitro human gingival fibroblast seeding on acellular dermal matrix. *Braz Dent J* 2010; 21(3): 179-189.
13. Esmailnejad A, Kadkhodazadeh M, Mohammadi S, Yadegari Z, Amid R. Viability, Distribution and Penetration of Human Gingival Fibroblasts into Three Types of Acellular Dermal Matrix Membranes. *Journal of Maxillofacial and Oral Surgery* 2021: 1-12.
14. Moghaddas O, Miremadi B, Jafari ES. Effect of two commercial acellular dermal scaffolds on biological behavior of human gingival fibroblasts. *J Adv Periodontol Implant Dent* 2020; 12(2): 84-89.
15. Maia LP, Novaes Jr AB, Souza SL, Grisi MF, Taba Jr M, Palioto DB. In vitro evaluation of acellular dermal matrix as a three-dimensional scaffold for gingival fibroblasts seeding. *J Periodontol* 2011; 82(2): 293-301.