BRIEF REPORT

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

Asieh Mozaffari[1],
Mona Akbari[2,3],
Zohreh Yazdi[4],
Azadehzeinab Titidezh[5]

[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 Regan 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)

گزارش کوتاه

مجله دانشگاه علوم پزشکی مازندران
دوره سی و دوم شماره 215 آذر سال 1401 (156-151)

مقایسه آزمایشگاهی حیات سلول‌های فیبروبلاست لثه‌ی انسانی بر داربست‌های حاوی کلاژن

آسیه مظفری[1]
منا اکبری[2و3]
زهره یزدی[4]
آزاده زینب تی تی دژ[5]

چکیده

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

مواد و روش‌ها: سلول‌های فیبروبلاست لثه‌ای 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.

واژه های کلیدی: فیبروبلاست، کشت سلول، Regen، CenoMembrane

مقدمه

سلول‌های فیبروبلاست لثه 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 نیزحضور یک داربست مناسب بیولوژیک می‌باشند. از جمله محصولات داربستی می‌توان به کلاژن(2) چیتوسان (chitosan)(3) و آلوگرافت ماتریکس 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

مولف مسئول: منا اکبری - قزوین: بلوار شهید با هنر، دانشگاه علوم پزشکی قزوین، کمیته تحقیقات دانشجویی E-mail: Mona_akbari91@yahoo.com
1. استادیار، گروه پریودانتیکس، مرکز تحقیقات پیشگیری از پوسیدگی دندان، دانشگاه علوم پزشکی قزوین، قزوین، ایران
2. دستیار تخصصی پریودانتیکس، کمیته تحقیقات دانشجویی، دانشگاه علوم پزشکی قزوین، قزوین، ایران
3. استادیار، گروه پریودانتیکس، 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 روش ها

این مطالعه‌ی تجربی توسط کمیته اخلاق در پژوهش (کد:IR.QUMS.REC.1398.205) دانشگاه علوم پزشکی قزوین به‌تصویب رسیده است. حیات سلول‌های فیبروبلاست لثه انسانی رده RT1 (Pasteur,Tehran,Iran HGF1-RT1) بر روی غشای CenoMembrane (Aellular 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 درهر 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 ازمحلول 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 به‌مدت 3 دقیقه و در دور rpm 1300 سانتریفیوژ شدند و مایع رویی دور ریخته شد و به سلول‌های کف فالکن، محیط‌کشت 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 سالین 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 10^4 × 6 سلول در هر خانه بر روی غشاها ها 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(13،12) 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 درنظر گرفتن توام گروه و زمان، استفاده شدند. آنالیز داده‌ها توسط نرم‌افزار SPSS vs. 22/0 با در نظر گرفتن سطح معنی‌داری کم‌تر از 0/05 انجام شد.

یافته ها و بحث

بیش‌ترین میزان حیات سلول‌ها براساس تست MTT پس از 24 و 72 ساعت، در گروه‌های کنترل و غشا Regen بوده و در غشای CenoMembrane کم‌ترین میزان بود. (جدول شماره 1 و نمودار شماره 1) تفاوت بین گروه کنترل و غشای CenoMembrane و هم‌چنین بین غشای Regen و CenoMembrane از لحاظ آماری معنی‌دار بود(P<0/05) ولی بین گروه کنترل و غشای Regen تفاوت معنی‌داری دیده نشد (P>0/05). حیات فیبروبلاست‌ها در هر دو غشا از مقطع زمانی 24 ساعت به 72 ساعت افزایش یافت که این افزایش در گروه Regen به‌طور معنی‌داری بیش‌تر 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 به‌طور معنی‌داری کم‌تر از سایر گروه‌ها بوده است(P<0/001) اما تفاوت معنی‌داری بین گروه کنترل و غشای Regen یافت نشد (P>0/05)(جدول شماره 2).

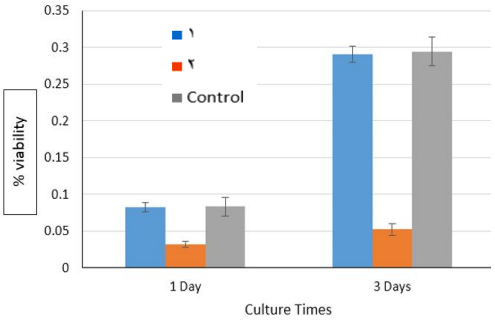
جدول شماره 1: میانگین و انحراف‌معیار حیات سلول‌های فیبروبلاست توسط تست MTT در هر 3 گروه در زمان‌های 24 و 72 ساعت

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

جدول شماره 2: مقایسه دو به دوگروه‌های مختلف در زمان‌های 24 و 72 ساعت در آنالیز Tukey (1: غشای Regen و2 غشای CenoMembrane)

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

*: P< 0/05 به عنوان معنی‌دار بودن از لحاظ آماری در نظر گرفته می‌شود



نمودار شماره 1: درصد حیات سلول‌های فیبروبلاست توسط تست MTT در هر 3 گروه در زمان‌های 24 و 72 ساعت

بنابراین مشخص شد که غشای Regen در فراهم کردن شرایط برای حیات سلول‌های فیبروبلاست لثه‌ی انسانی، مشابه گروه کنترل بود ولی CenoMembrane به‌طور معنی‌داری کم‌تر از دو گروه دیگر اجازه زنده ماندن فیبروبلاست‌ها را داد. اسماعیل‌نژاد و همکاران در سال 2021 در بررسی حیات فیبروبلاست‌های لثه انسانی بر روی 4 نوع ADM شامل Mucoderm، Surederm، Regen با ضخامت متوسط و Regen ضخیم در بازهای 24، 48 و 72 ساعت و 7 روز مشاهده کردند که حیات سلول‌ها در Regen ضخیم در مقایسه با سه گروه دیگر به‌طور معنی‌داری کم‌تر بود به گونه‌ای 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 می‌باشد نتایج مشابهی با Mucoderm نشان داد و حیات سلول‌ها بر روی ساختار کلاژنی منحصر به فرد Surederm در این مطالعه نسبت به انواع دیگر برتری داشت. باتوجه به تشابه ضخامت غشای Regen مورد استفاده در این مطالعه و تشابه روش انجام کار و تعداد نمونه‌ها با مطالعه‌ی حاضر می‌توان 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 سلول‌های فیبروبلاست لثه انسانی مشاهده کردند که اثر دو داربست، بر روی چسبندگی و

حیات سلول‌های فیبروبلاست لثه انسانی تفاوت معنی‌داری نداشت و ارزیابی حیات سلول‌های فیبروبلاست در زمان‌های 24 و 48ساعت 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 متاثر کند. اختلاف مطالعه‌ی حاضر با مطالعه مقدس را می‌توان به تفاوت در بازه‌های زمانی و روش اجرای مطالعه و احتمالا تفاوت در ضخامت غشاهای مورد استفاده در دو مطالعه مرتبط دانست. نتایج متفاوت حیات سلولی بر روی ADM های 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 درجهت‌گیری طبیعی خود نسبت به غشای پایه جدا شده و خشک و منجمد می‌شوند و سپس استریل می‌شوند. به دلیل نبود پروتکل استاندارد جهت فرآوری غشاها و حساسیت این تکنیک، رفتاری‌های متفاوت فیبروبلاست‌ها 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 زیست پذیری فیبروبلاست‌های لثه‌ای انسانی بر 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 فیبروبلاست 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 فیبروبلاست 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 توجیه‌کننده‌ی 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 فیبروبلاست‌های لثه‌ای حمایت می‌کند و حیات فیبروبلاست‌های لثه‌ای 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.

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 acelluar 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. Esmaeilnejad 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.