

## تهیه داربست زیستی مشتق از مئانه گوسفند و بررسی زیست سازگاری و ویژگی‌های مکانیکی داربست

رضا نجفی‌زنگیر M.Sc.، اسداله اسدی Ph.D.\*، صابر زهری Ph.D.

-دانشگاه محقق اردبیلی، دانشکده علوم پایه، گروه زیست‌شناسی، اردبیل، ایران

\* پست الکترونیک نویسنده مسئول: Asady.asad@Gmail.com

تاریخ پذیرش: ۱۳۹۸/۱۱/۲۹

تاریخ دریافت: ۱۳۹۸/۱۰/۱۸

### چکیده

**هدف:** تهیه داربست زیستی مشتق از مئانه گوسفند با روش ترکیبی (فیزیکی و شیمیایی) و بررسی زیست سازگاری داربست

**مواد و روش‌ها:** سلول‌زدایی مئانه گوسفند به روش فیزیکی و شیمیایی انجام شد. قطعات مئانه به مدت ۲۴ ساعت در فریزر ۴- درجه سانتی‌گراد قرار گرفته و هر ۶ ساعت به مدت ۱۰ دقیقه در محلول (۰/۱ درصد) سدیم آزید گذاشته شد. بعد از ۲۴ ساعت به مدت ۲ و ۱ ساعت به ترتیب در فریزر ۲۰- و ۴۰- درجه سانتی‌گراد قرار داده شدند. سپس نمونه‌ها در ۵ مرحله ۲ دقیقه‌ای توسط لوله سرد در ازت مایع قرار گرفته و توسط بافر فسفات نمکی حاوی (۰/۱ درصد) سدیم آزید شست‌وشو شدند. در سلول‌زدایی شیمیایی تمامی قطعات مئانه به مدت ۲۴ ساعت در محلول سدیم دودسیل سولفات همراه با هم‌زدن آرام گرفته، پس از شست‌وشوی نمونه‌ها با آب مقطر، به وسیله اتانول ۷۵ درصد و پراستیک اسید ۰/۲ درصد استریل شدند و در نهایت به مدت ۲۴ ساعت در محلول نمک فسفات قرار گرفتند.

**نتایج:** مطالعات میکروسکوپی نوری و الکترونی نشان داد که سلول‌های بنیادی کشت شده بر روی داربست مئانه گوسفند، در روزهای ۳، ۵ و ۷ با گذشت زمان سازگاری افزایش یافته و در پایان روز ۷ داربست مئانه بیشترین زیست سازگاری را نشان می‌دهد.

**نتیجه‌گیری:** مئانه گوسفند سلول‌زدایی شده، زیست سازگاری مناسبی را دارا بوده و به‌عنوان داربست زیست سازگار غیرسمی بالقوه در مهندسی بافت و پزشکی بازساختی می‌تواند مطرح شود.

**واژگان کلیدی:** داربست، سلول‌های بنیادی مزانشیم، زیست سازگاری، مئانه

## مقدمه

مهندسی بافت بر اساس سه ترکیب اصلی بافت‌های بیولوژیکی، یعنی ماتریکس خارج سلولی، مولکول‌های پیام‌رسان و سلول بنیان نهاده شده است که به ترتیب توسط داربست، فاکتورهای رشد و سلول شبیه سازی می‌شود. یکی از ویژگی‌های مهم داربست‌های مهندسی بافت داشتن شبکه متخلخل مرتبط به هم جهت رساندن اکسیژن، غذا و متابولیت‌های مورد نیاز، دفع دی‌اکسید کربن و سایر مواد دفعی، تشکیل ماتریکس خارج سلولی و رگ‌زایی است (۱، ۲). این داربست‌های بیولوژیکی تشکیل شده از ماتریکس خارج سلولی هستند که عموماً برای تجدید بنای بافت‌های آسیب دیده یا بافت‌های از دست رفته استفاده می‌شود (۳). به طور خاص ماتریکس مئانه‌ی خوک به عنوان داربست زیستی شناخته شده مورد بررسی قرار گرفته است که اجزای ماتریکس خارج سلولی آن شامل کلاژن، فیبرونکتین، لامینین، گلیکوزآمینوگلیکان‌ها، عوامل رشد، کموکاین و سیتوکین می‌باشد (۴). بسیاری از این مولکول‌ها نقش تاثیر گذاری در مکانیسم‌های پاسخ به بافت آسیب دیده دارند. علاوه بر این چندین مولکول در ساختمان ماتریکس مئانه خوک یافت شده است که اثرات قابل ملاحظه‌ای بر روی رفتار سلول بعد از تخریب دارد. به عنوان مثال پپتید کوچک RDG که در فیبرونکتین یافت شده است در اتصال سلول‌ها با گیرنده‌ی اینترگرین درگیر است (۵). داربست مئانه به طور موفقیت‌آمیز در ترمیم بخش‌های مختلف بدن از جمله قلب (۶) دستگاه ادراری تحتانی (۷) بافت ریه (۸) مری (۹) به صورت موفقیت‌آمیز استفاده شده است. داربست‌های طبیعی عبارتند از داربست‌هایی که از مواد موجود در طبیعت، بدن انسان، گیاهان، حشرات یا حیوانات به دست می‌آیند. داربست‌های آلی شامل کلاژن، فیبرونکتین، کیتوزان، ژلاتین، فیبرین و آلژینات می‌باشند. این مواد اغلب سوپسترای طبیعی برای چسبندگی، تمایز و تکثیر سلول‌ها فراهم می‌کنند، اما این

گروه از داربست‌ها خصوصیات مکانیکی ضعیف و غیرقابل کنترلی دارند (۱۰). ماتریکس خارج سلولی شامل کمپلکس متفاوتی از ساختار و عملکرد پروتئین‌ها است که نقش مهمی در مورفوژنز و حفاظت از سلول و ساختار بافت بازی می‌کنند. داربست‌های ماتریکس خارج سلولی شامل مولکول‌های ساختاری و عملکردی ترشح شده توسط سلول‌های هر بافت بوده و بنابراین ترکیب بندی و توزیع ترکیبات ماتریکس خارج سلولی به منبع بافت بستگی دارد. ماتریکس خارج سلولی تشکیل دهنده این داربست‌ها از انواعی بافت‌ها از جمله دریچه‌های قلبی، لایه زیر مخاطی روده کوچک و مئانه مشتق شده است. ساختار و عملکرد مولکول‌های ماتریکس خارج سلولی شرایط ارتباط سلول‌ها با سلول‌های مجاور و ارتباط سلول‌ها با محیط خارج را فراهم می‌کند (۱۱). هدف از این پژوهش تولید داربست زیستی مشتق از مئانه و بررسی زیست سازگاری داربست سلول‌زدایی شده به وسیله سلول‌های بنیادی مزانشیمی جدا شده از مغز استخوان ران موش صحرایی می‌باشد.

## مواد و روش‌ها

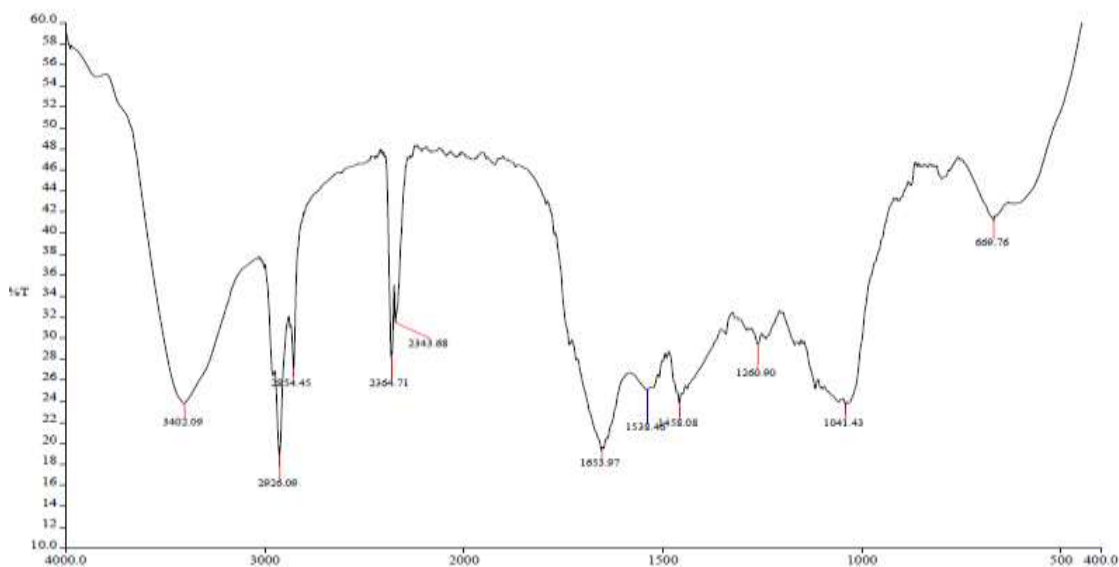
**مواد:** ۱- محیط کشت سلولی گلوکز پایین (DMEM\_LG) تهیه شده از شرکت (GIBCO) ۲- سرم جنین گاوی (FBS) از شرکت (Biowest) ۳- دی‌متیل سولفوکسید (DMSO) (Merck آلمان) ۴- تریپان بلو تهیه شده از شرکت (Merck آلمان) ۵- اتیلن دی‌آمین تترا استیک اسید (EDTA) تهیه شده از شرکت (GIBCO) ۶- پلیت ۲۴ خانه (Nest) ۷- فلاسک کشت T-25 (Nest) ۸- دی‌متیل تیازول (MTT) از شرکت (Atocel)

**تهیه داربست مئانه:** برای تهیه داربست سلول زدایی شده مئانه گوسفند، ۸ عدد مئانه گوسفند از کشتارگاه اردبیل تهیه شده و در محلول نرمال سالین ۰/۹ قرار داده و به آزمایشگاه انتقال داده شد. مئانه به طور کامل با قیچی نوک تیز باز شده و به قطعات مساوی تقسیم و به داخل

فیزیکی به پایان رسید. در روش سلول زدایی شیمیایی، تمامی قطعات مئانه به مدت ۲۴ ساعت در محلول سدیم دودسیل سولفات (SDS) همراه با چرخش آرام قرار داده شدند سپس نمونه‌ها توسط آب مقطر استریل شست و شو شده و به وسیله اتانول ۷۵ درصد و پراستیک اسید ۰/۲ درصد استریل شدند و در نهایت به مدت ۲۴ ساعت در PBS قرار گرفتند. بدین ترتیب داربست مئانه گوسفند تهیه شد. داربست‌ها در فریزر ۲۰- درجه نگهداری شدند.

**بررسی ویژگی‌های فیزیک و شیمیایی داربست توسط طیف سنجی FTIR.** به منظور بررسی ساختار ترکیبات داربست مئانه از طیف سنجی FTIR استفاده شد. برای این کار ابتدا داربست مئانه به قطعات کوچک تقسیم شده و بعد از خشک شدن توسط خشک کن انجمادی (فریز درایر)، به وسیله طیف سنجی FTIR مورد بررسی قرار گرفت. (شکل ۱) و (جدول ۱)

یک عدد لوله فالكون منتقل شدند. سپس سریعاً مرحله سلول زدایی فیزیکی مئانه آغاز شد. با توجه به این‌که عوامل موثر زیادی برای سلول زدایی هر بافت و ارگان وجود دارد که این عوامل بستگی به چند فاکتور شامل تعداد سلول‌های بافت، چگالی، محتوای لیپید و ضخامت بافت دارد (۱۲) از روش ترکیبی فیزیکی (۱۳، ۱۴) و شیمیایی (۱۵، ۱۶) برای سلول زدایی استفاده شد. به طوری که قطعات مئانه به مدت ۲۴ ساعت در فریزر ۴- درجه سانتی‌گراد قرار گرفتند و هر ۶ ساعت یک‌بار به مدت ۱۰ دقیقه در آب مقطر حاوی (۰/۱ درصد) سدیم آزید استریل قرار گرفتند. بعد از پایان ۲۴ ساعت، به مدت ۲ ساعت در فریزر ۲۰- و ۱ ساعت در ۴۰- درجه سانتی‌گراد قرار گرفته شد و سپس آماده قرارگیری در ازت مایع شدند، به طوری که مئانه‌ها در ۵ مرحله ۲ دقیقه‌ای توسط کرایو تیوب در ازت مایع قرار گرفتند و سپس توسط فسفات بافر سالین حاوی (۰/۱ درصد) سدیم آزید شست و شو شدند. بدین ترتیب سلول زدایی به روش



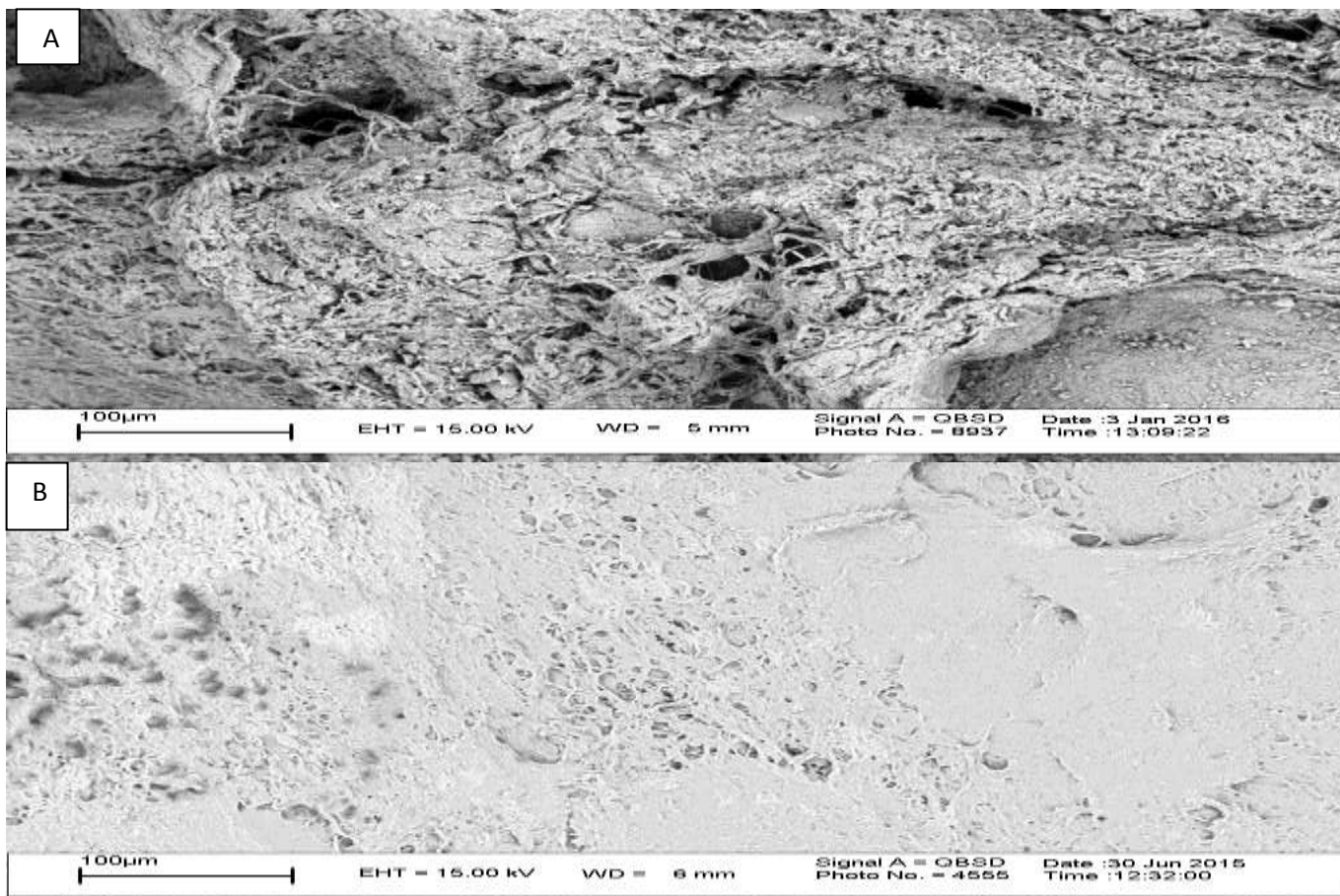
شکل ۱: طیف سنجی (FTIR) طیف مربوط به داربست مئانه دارای سلول

جدول ۱: موقعیت پیک های (FTIR) برای داربست مئانه

Wavenumber (cm <sup>-1</sup> )	Assignment	
3700 – 3500	O-H	hydroxyl groups
3300 – 3200	N-H	proteins (amide A)
2930 – 2920	C-H & CH <sub>2</sub>	methylene in fatty acids
2850 – 2860	C-H & CH <sub>2</sub>	methylene in fatty acids
1740 – 1750	C=O	esters
1650 – 1660	C=O	amide I (Proteins)
1540 – 1550	C-N	amide II (proteins)
1450 – 1460	C-H & CH <sub>2</sub>	methylene (Lipids and/or Proteins)
1310 – 1240	Amide III	(proteins)
1088 – 1040	P=O	PO <sub>2</sub> – phosphodiester

داربست توسط میکروسکوپ الکترونی SEM تصاویر سه بعدی تهیه شد. برای تهیهی این تصاویر ابتدا داربست‌ها به قطعات کوچک‌تر تقسیم شده سپس داربست‌ها با الکل، آب‌گیری شده و داخل خشک‌کن انجمادی قرار گرفت و داربست‌ها پس از خشک شدن توسط میکروسکوپ عکس‌برداری شدند (شکل ۲).

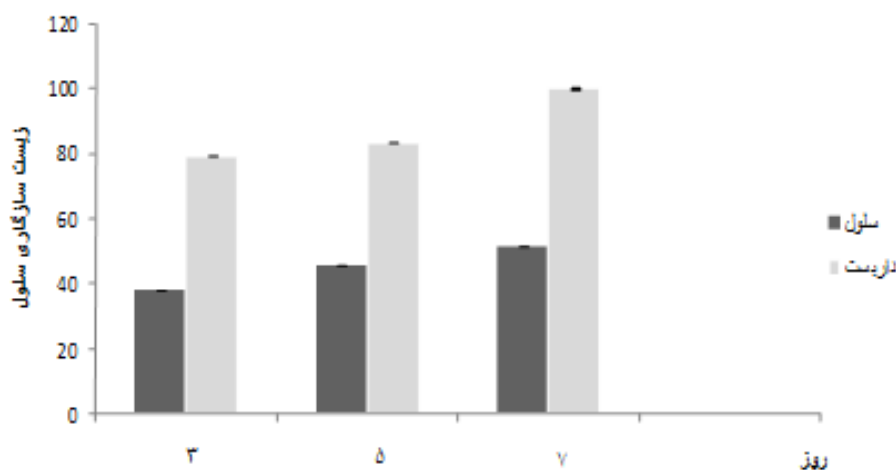
مطالعه مورفولوژی داربست مثانه به‌وسیلهی میکروسکوپ نوری و الکترونی: ابتدا داربست‌ها به‌منظور بررسی توسط میکروسکوپ نوری، پس از خشک کردن در خشک‌کن انجمادی در قالب پارافینی قرار داده و برش داده شد و پس از رنگ‌آمیزی در زیر میکروسکوپ نوری بررسی شد. برای بررسی ویژگی‌های مورفولوژیکی



شکل ۲: تصویر SEM اتصال سلول‌های بنیادی بر روی داربست مثانه. (A) تصویر نشان دهندهی اتصال سلول‌ها روی سطح داربست می‌باشد (B) داربست فاقد سلول

زیست سازگاری داربست‌ها: میزان زیست سازگاری سلول‌ها در این سنجش بر مبنای کاهش فعالیت آنزیم میتوکندریایی در سلول‌های بنیادی مزانشیمی مشتق از مغز استخوان کشت شده بر روی داربست‌ها، با استفاده از روش MTT تعیین شد. همان‌گونه که در ( نمودار ۱) مشخص است، میزان زیست سازگاری این سلول‌ها روی داربست در روزهای ۳، ۵ و ۷ مورد بررسی قرار گرفت.

کشت سلول بر روی داربست‌ها: داربست‌ها به مدت ۲۴ ساعت در اتانول ۷۰ درصد قرار داده شدند و پس از خشک شدن داربست‌ها دو طرف آن تحت اشعه فرابنفش قرار گرفت و سلول‌ها به وسیله روش چکاندن روی داربست قرار داده شد (۱۷). مورفولوژی و نحوه اتصال سلول‌ها بر روی سطح داربست‌ها به وسیله تصاویر حاصل از میکروسکوپ الکترونی مورد مطالعه قرار گرفت.



نمودار ۱: بررسی میزان بقا MSC بر روی داربست مئانه بر طبق سنجش MTT (n=3,  $p < 0.05$ ,  $maen \pm SE$  (standard error))

محلول، همان نمونه‌ها با مقدار زیادی آب دوبار تقطیر شسته و در دمای اتاق خشک شدند. نمونه‌های خشک شده نیز توزین شده و وزن آن‌ها ثبت شد.  $(W_t)$  با استفاده از رابطه‌های زیر، درصد جذب آب  $(W_A)$ ، کاهش وزن  $(W_L)$  داربست‌ها و نیز تغییرات pH بافرها محاسبه و نمودارهای مربوط به آن‌ها رسم شد (نمودار ۲).

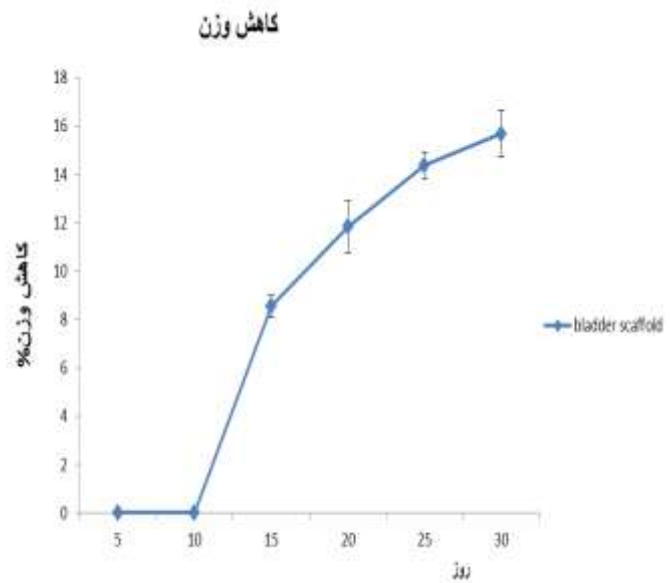
$$W_A\% = (W_a - W_0) / W_0 \times 100$$

$$W_L\% = (W_t - W_0) / W_0 \times 100$$

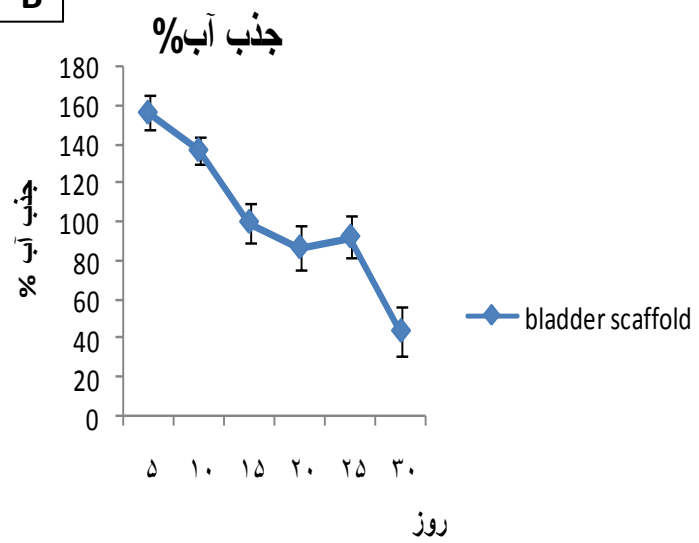
توزیع اندازه‌ی منافذ داربست‌ها: چگونگی توزیع منافذ در سطح داربست‌های مئانه با استفاده از نرم افزار Image J انجام شد و نتایج به دست آمده مورد بررسی قرار گرفت (شکل ۳)

سنجش تخریب پذیری داربست‌ها: مطالعه تخریب پذیری داربست مئانه در محلول بافر فسفات در محیط آزمایشگاهی و در  $pH = 7.4$  انجام شد. ۲۴ عدد از داربست در ابعاد  $1 \times 1 \text{ cm}^2$  توزین شد. سپس به منظور استریل کردن، نمونه‌ها به مدت یک شب در اتانول غوطه‌ور شده و سپس به مدت یک ساعت در معرض اشعه فرابنفش قرار گرفتند. داربست‌ها در ۸ عدد لوله فالكون حاوی ۱۰ میلی‌لیتر محلول نمکی PBS قرار داده شدند. و در دمای  $37^\circ\text{C}$  درجه سانتی‌گراد انکوبه شدند. طول دوره انکوباسیون ۳۰ روز در نظر گرفته شد و هر ۵ روز سه تا از نمونه‌ها از بافر خارج شده و پس از اندازه‌گیری pH بافر آب سطح نمونه‌ها توسط کاغذ صافی گرفته شد و سپس نمونه‌ها وزن شدند  $(W_a)$  به منظور خارج کردن نمک‌های معدنی

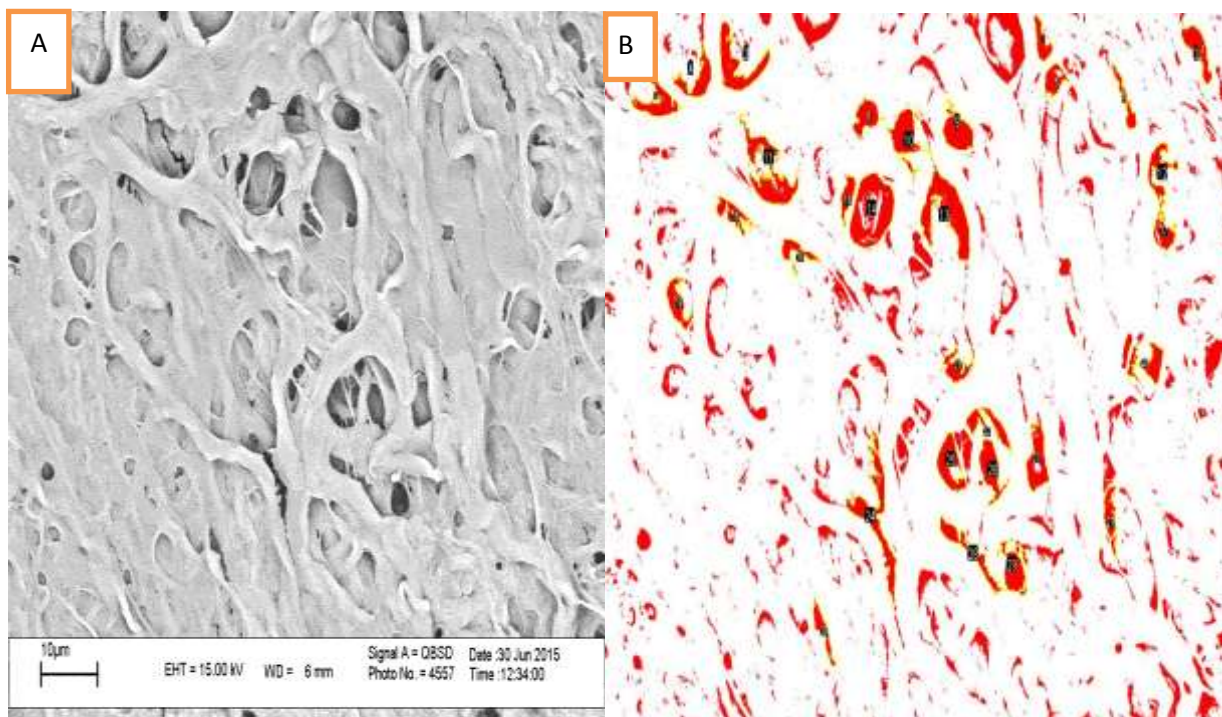
**A**



**B**



نمودار ۲: A) نمودار کاهش وزن داربست مثانه (bladder) در تست تخریب پذیری B) نمودار جذب آب داربست مثانه (bladder) در تست تخریب پذیری



شکل ۳: تصویر چگونگی توزیع منافذ داربست مئانه: (A) تصویر SEM (B) تصویر گرافیکی از موقعیت منافذ (C) نمودار توزیع منافذ

## نتایج

### مطالعات میکروسکوپ الکترونی نگاره

تصاویر میکروسکوپ الکترونی حاصل از سطح داربست نشان دهنده‌ی ساختمان متخلخل داربست می‌باشد. بررسی تصاویر SEM از سطح داربست نشان دهنده‌ی

پراکندگی یکسان منافذ در سطح داربست می‌باشد که از نظر فیزیکی سطح بزرگ‌تری را برای اتصال بهینه سلول‌ها فراهم می‌کند (شکل ۳). استفاده از سدیم دودسیل سولفات و پراستیک اسید در تهیه داربست باعث ایجاد

چگونگی توزیع منافذ در سطح داربست‌های مئانه با استفاده از نرم افزار Image J انجام شد و نتایج به دست آمده در نمودارها نشان داد که اندازه بزرگ‌ترین منفذ در داربست  $4 \times 10^7$  نانومتر مربع می‌باشد (جدول ۲).

منافذ بزرگ در سطح داربست می‌شود. نتایج نشان می‌دهد که استفاده از روش ترکیبی (فیزیکی، شیمیایی) موجب ایجاد منافذ بزرگ و منظم می‌شود.

### توزیع اندازه‌ی منافذ داربست‌ها

جدول ۲: تعداد و درصد منافذ موجود در سطح داربست

تعداد منافذ	مساحت اندازه گیری شده	مجموع مساحت کل منافذ	میانگین مساحت منافذ	درصد منافذ
۳۰	$7853892145 \text{ nm}^2$	$376986823 \text{ nm}^2$	$12566227 \text{ nm}^2$	۴/۸٪

روزهای اول بود. این افزایش جذب تا روز پنجم ادامه یافت از روز پنجم تا روز ۳۰ با تخریب داربست، میزان جذب روند کاهشی داشت. داده‌ها نشان می‌دهد تخریب پذیری و جذب آب از روز ۱۵ تا ۲۵ ثابت باقی مانده است. **کاهش وزن داربست:** درصد کاهش وزن در روزهای پنجم و دهم در حد صفر بود ولی از روز دهم تا پایان روز ۳۰ نرخ تخریب افزایش یافت. در روز دهم با ورود کامل PBS درون بافت مئانه، تخریب داربست افزایش یافت. بررسی داده‌ها نشان داد که حد اکثر ۱۶ درصد از وزن داربست پس از ۳۰ روز کاهش می‌یابد (نمودار ۲).

### ارزیابی داربست سلول‌زدایی شده از مئانه

#### گوسفند

بافت مئانه ی گوسفند با روش ترکیبی (شیمیایی و فیزیکی) سلول‌زدایی شد و و قطعات داربست سلول‌زدایی شده بعد از مرحله خشک کردن در قالب‌های پارفین قرار گرفت و برای اثبات درست بودن روش سلول‌زدایی رنگ آمیزی اتوزین-هماتوکسیلین شد و مورد ارزیابی قرار گرفت که سلول و هسته در سطح داربست وجود نداشت (شکل ۴).

### طیف سنجی FTIR

به‌منظور بررسی ساختار ترکیبات داربست مئانه از طیف سنجی FTIR استفاده شد. نتایج حاصل در شکل ۱ نشان داده شده است.

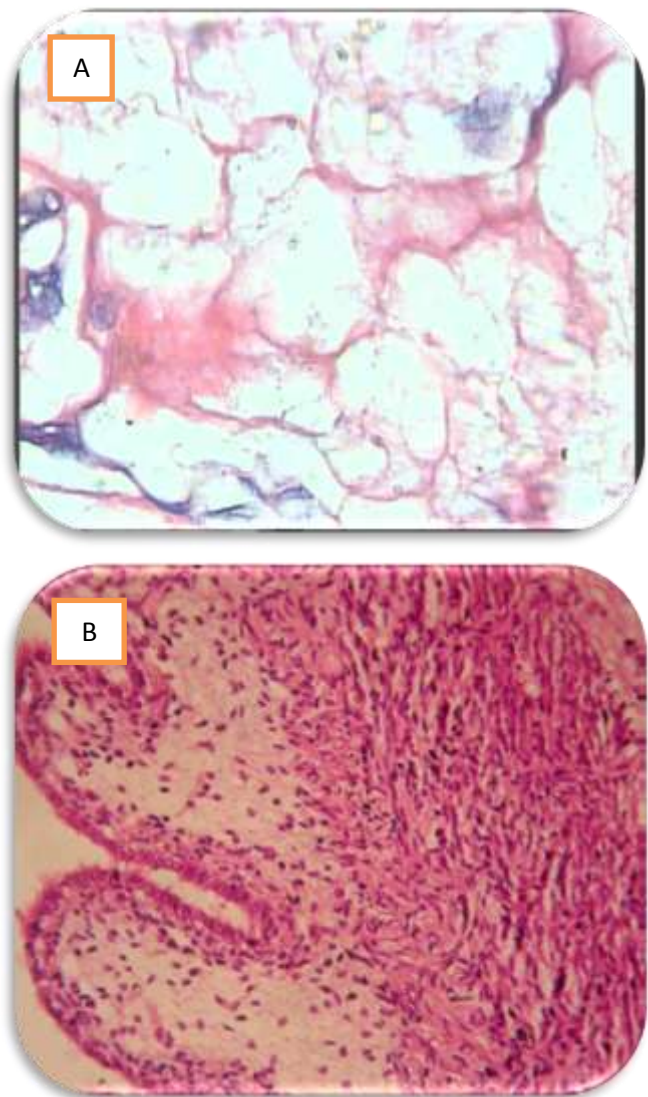
### زیست‌سازگاری داربست‌ها

میزان سازگاری سلول‌ها در این سنجش بر مبنای کاهش فعالیت آنزیم میتوکندریایی در سلول‌های بنیادی مزانشیمی مشتق از مغز استخوان موش صحرایی کشت شده بر روی داربست تعیین شد. همان‌گونه‌که در نمودار ۱ مشخص است میزان زیست‌سازگاری این سلول‌ها روی داربست از روز سوم تا روز هفتم در حال افزایش است. بررسی زیست‌سازگاری داربست نشان می‌دهد که در پایان روز ۷ بیشترین زیست‌سازگاری را داشت که نشان دهنده غیرسمی بودن داربست و مناسب بودن داربست برای رشد سلول بود و سلول‌های بنیادی روی داربست مئانه زیست‌پذیر هستند.

### سنجش تخریب پذیری داربست

جذب آب داربست: بررسی میزان جذب آب در طی ۵ روز اول در داربست نشان دهنده‌ی افزایش جذب در





شکل ۴: تصویر میکروسکوپ نوری از داربست مثانه: (A) داربست سلول زدایی شده بافت مثانه (B) مثانه قبل از سلول زدایی

#### بحث

مهم‌ترین گام در مهندسی بافت، انتخاب بیومواد مناسب برای ساخت داربست است (۱۸). داربست مطلوب الگویی برای بازسازی بافت است و نقش کلیدی در شکل‌گیری ساختار نهایی بافت مهندسی شده و عمل‌کرد نهایی آن برعهده دارد (۱۹). بیومواد مورد استفاده در داربست باید از چسبندگی، رشد و تکثیر سلولی، هم در *In vivo* و هم در شرایط *Invitro* حمایت به‌عمل آورند (۲۰). Ami و *go N* همکاران در مطالعه‌ای نشان دادند، داربست‌های ماتریکس مثانه خوک برای ترمیم پریکارد، ویژگی‌های مناسبی دارد و همچنین باعث بازگرداندن خصوصیات

بافتی می‌شود که می‌تواند به کاهش چسبندگی بعد از عمل و جلوگیری از عوارض مرتبط با آن کمک کند (۲۱). Sabetkish S و همکاران در مطالعه‌ای توانستند با حفظ ساختار ماتریکس سلولی و حذف سلول در مثانه خرگوش، سلول‌زدایی را انجام دهند (۲۲) داربست‌ها باید چندین ویژگی ضروری نظیر زیست سازگاری، زیست تخریب‌پذیری و فعالیت زیستی را داشته باشند. در این مطالعه تهیه داربست مثانه با روش ترکیبی (فیزیکی، شیمیایی) و بررسی ویژگی‌های مکانیکی آن و زیست سازگاری سلول بنیادی بر روی آن مورد ارزیابی قرار گرفت. تصاویر حاصل از سلول‌های کشت شده بر روی

شیمیایی) و سترون‌سازی با سدیم دودسیل سولفات و پراستیک اسید مطلوب بوده و منجر به رشد و تکثیر سلول‌ها شده است. دست‌یابی به چنین مقدار از تخلخل در بحث مهندسی بافت ضروری است زیرا این مقدار تخلخل باعث می‌شود که سلول‌ها به‌طور یکنواخت در سراسر سطح داربست پخش شود. در بررسی طیف سنجی FTIR داربست مئانه فاقد سلول و حاوی سلول تمایز یافته، سهم اصلی پیک‌های جذبی مربوط به پروتئین‌ها در حدود ۳۰۰۰، ۲۹۳۰، ۲۹۲۵، ۲۸۵۰، ۱۷۴۰ و ۱۴۵۰  $\text{cm}^{-1}$  می‌باشد. و پیک‌های جذبی در حدود ۱۲۳۶ و ۱۰۸۰ مربوط به فسفات‌های متقارن و نامتقارن می‌باشد. پیک‌های جذبی مشاهده شده در حدود ۱۰۳۰ و ۱۲۰۰  $\text{cm}^{-1}$  مربوط به کشش ارتعاشات C-OH کربو هیدرات کلاژن و CN ستون فقرات کلاژن و  $\text{CH}_2$  تکان ارتعاشات زنجیره‌های جانبی کلاژن می‌باشد. پیک جذبی در ۱۲۳۶ و ۱۰۸۰ مربوط به  $\text{PO}_2$  (اسید نوکلئیک) و پیک‌های جذبی در ۲۹۲۵ و ۲۸۵۰ مربوط به کشش ارتعاشات ( $\text{CH}_2$ ,  $\text{CH}_3$ ) فسفو لیپیدها می‌باشد. پیک‌های جذبی مربوط به (۳۰۰۰ تا ۳۵۰۰) مربوط به N-H و پیک جذبی (۱۶۵۰ تا ۱۶۶۰) مربوط به آمید ۱ و پیک (۱۵۴۰ تا ۱۵۵۰) مربوط به آمید ۲ می‌باشد. پیک جذبی نزدیک به ۱۷۴۵ مربوط به C=O و پیک جذبی در محدوده (۵۷۰-۱۱۰۰) مربوط به  $\text{PO}_4$  می‌باشد.

#### نتیجه‌گیری

از یافته‌های مطالعه حاضر می‌توان نتیجه گرفت که داربست تهیه شده از مئانه گوسفند فاقد سلول دارای شرایط لازم برای پذیرش و سپس رشد و تکثیر سلول‌های بنیادی مزانشیم به‌دست آمده از مغز استخوان موش صحرائی می‌باشد. با توجه به این‌که داربست مئانه یک داربست طبیعی است امید می‌رود که در آینده بتوان در کاربردهای پزشکی از آن استفاده کرد.

داربست نشان دهنده‌ی این است که داربست مئانه دارای منافذ مناسب و چسبندگی خوب برای اتصال و رشد سلول در سطح آن می‌باشد. نمودارهای حاصل از تست MTT در روزهای مختلف هم اشاره به شرایط زیستی مناسب سلول‌ها در سطح داربست‌ها را دارد به‌طوری‌که از روز سوم تا روز هفتم رشد سلول‌ها در حال افزایش می‌باشد. ۰/۱ درصد SDS ثابت یک عامل بسیار موثر سلول‌زدایی بافت مئانه با حداقل اثرات بر سفتی، به‌وسیله مدول یانگ نشان داده شد تعدادی از تکنیک‌ها برای استریلاسیون ترمینال از جمله اشعه گاما، اکسید اتیلن، گلیسرین و PAA مورد بررسی قرار گرفته است. راه حل PAA ۰/۱ درصد یک عامل موثر برای استریل کردن به‌اندازه کافی ماتریکس مئانه گوسفند سلول‌زدایی شده است، بدون داشتن یک اثر مضر بر روی خواص مکانیکی داربست تجربه ما در این مطالعه و سایر مطالعات ما نشان می‌دهد که ضخامت بافت، تراکم و سلول‌زدایی ناقص احتمالا مانع نفوذ PAA به شکاف‌های ماتریس، و در نتیجه استریلاسیون ناکافی است بنابراین، این روش تنها برای ماتریس نسبتا نازک است که در آن آرایش کلاژن بیش از حد جمع و جور نیست، مناسب است. داربست ماتریکس مئانه گوسفند به‌دست آمده در اثر پردازش با ۰/۱ درصد SDS به‌دنبال sterilization با پراستیک اسید قادر به پشتیبانی از رشد سلول‌های مئانه انسان بود. هیچ شواهدی از سمیت سلولی در آزمایش پیدا نشده است. در واقع تکثیر سلول‌های بنیادی مغز استخوان نشان دهنده حضور فاکتورهای رشد می‌باشد. مورفولوژی داربست بدون سلول و دارای سلول به‌وسیله میکروسکوپ الکترونی مورد بررسی قرار گرفت. داربست مئانه بعد از سلول‌زدایی به‌روش ترکیبی (فیزیکی، شیمیایی) و قرارگرفتن در (۰/۱ درصد) سدیم دودسیل سولفات و پراستیک اسید (۰/۱ درصد) مورد بررسی قرار گرفت که نشان دهنده‌ی سطوح متخلخل با منافذ مرتبط به هم بود. بنابراین می‌توان نتیجه گرفت روش ترکیبی (فیزیکی،

neurosci J shefaye khatam. 2016; 2(1):1-16.

10. Brown AL, Brook-Allred TT, Waddell JE, White J, et al. Bladder acellular matrix as a substrate for studying in vitro bladder smooth muscle-urothelial cell interactions. *Biomaterials*. 2005; 26(5): 529-543.

11. Crapo PM, Gilbert TW, Badylak SF. An overview of tissue and whole organ decellularization processes. *Biomaterials*. 2011; 32(12): 3233-3243.

12. Omae H, Zhao C, Sun YL, An KN, et al. Multilayer tendon slices seeded with bone marrow stromal cells: a novel composite for tendon engineering. *J Orthop Res*. 2009; 27(7): 937-942.

13. Gilbert TW, Sellaro TL, Badylak SF. Decellularization of tissue and organ. *Biomaterials*. 2006; 27(19): 3675-3683.

14. Abousleiman RI, Reyes Y, McFetridge P, Sikavitsas V. The Human Umbilical Vein: A Novel Scaffold for Musculoskeletal Soft Tissue Regeneration. *J Artif Organs* 2008; 32(9): 735-742.

15. Barnes CA, Brison J, Michel R, Brown BN, et al. The surface molecular functionality of decellularized extracellular matrices. *J Biomaterials*. 2011; 32(1):137-143.

16. Mansourizadeh F, Asadi A, Oryan S, Nematollahzadeh A, et al. M. PLLA/HA Nano composite scaffolds for stem cell proliferation and differentiation in tissue engineering. *Mol Biol Res Commun*. 2013;2(1):1-10.

17. Jennifer CJ Chen, David J Goldhamer: Skeletal muscle stem cells. *Reproduc Biol Endocrin*. 2003; 1(1):1-7

18. Holzwarth JM, Ma PX. Biomimetic nanofibrous scaffolds for bone tissue engineering *Biomaterials*. 2011;32(36):9622-9629.

19. Ma PX. Biomimetic materials for tissue engineering. *Adv Drug Deliv Rev*. 2008; 60(2):184-198.

20. Marolt D, Campos IM, Bhumiratana S, Koren A, et al. Engineering bone tissue from human embryonic stem cells. *Proc Natl Acad Sci*. 2012; 109(22): 8705-8709.

## تشکر و قدردانی

نویسندگان این مقاله از حمایت مالی دانشگاه محقق اردبیلی و دانشگاه علوم پزشکی آزاد اردبیل قدردانی می‌کنند.

## منابع

1. Polak JM, Bishop AE. Stem cells and tissue engineering: past, present and future. *Ann N Y Acad Sci*. 2006; 1068:352-366.

2. Cao Y, Lees J. Scaffolds, stem cells and tissue engineering: A potent combination. *Aust J Chem*. 2005; 58(10): 691-703.

3. Tottey S, Johnson SA, Badylak SF, Crapo PM, et al. The effect of source animal age upon extracellular matrix scaffold properties. *Biomaterials*. 2011; 32(1):128-36.

4. Ruoslahti E. RGD and other recognition sequences for integrins. *Ann Rev Cell Dev Biol*. 1996; 12: 697-715.

5. Robinson K, Li J, Mathison M, Redkar A, et al. Extracellular matrix scaffold for cardiac repair. *Circulation*. 2005; 112:135-143.

6. Badylak SF, Freytes DO, Gilbert TW. Extracellular matrix as a biological scaffold material: structure and function. *Acta Biomater*. 2009; 5(1): 1-13.

7. Petersen TH, Calle EA, Zhao L et al. Tissue-engineered lungs for in vivo implantation. *Science*. 2010; 329(5991): 538-41.

8. Stankus JJ, Freytes DO, Badylak SF, Wagner WR. Hybrid nanofibrous scaffolds from electrospinning of a synthetic biodegradable elastomer and urinary bladder matrix. *J Biomater Sci Polym Ed*. 2008; 19(5):635-652.

9. Parastoo Barati Dowom, Kambiz Roshanaei, Sajad Sahab Negah, Hadi Aligholi, et al. Functional Role of Natural and Synthetic Scaffolds in Tissue Engineering of Central Nervous System.

21. Amigo N1, Riganti JM2, Ramirez M2, Andrea L2, et al. Urinary Bladder Matrix Scaffolds Promote Pericardium Repair in a Porcine Model. 2020; 249:216-224.
22. Sabetkish S1, Sabetkish N1, Kajbafzadeh. AM2. In-vivo regeneration of bladder muscular wall with whole decellularized bladder matrix: A novel hourglass technique for duplication of bladder volume in rabbit model. 2019 Dec 27. pii: S0022-3468(19)30883-8.

## Preparation of biological scaffolds derived from bladder sheep and evaluation of Bio compatibility and mechanical properties of the scaffold

Najafi Zangir R M.SC<sup>1</sup>, Asadi A Ph.D.<sup>1\*</sup>, Zahri S Ph.D.<sup>2</sup>

1. Department of Biology, Faculty of Basic Science, University of Mohaghegh Ardabili, Ardabil, Iran

\* Email corresponding author: Asady.asad@Gmail.com

Received: 8 Jan. 2020

Accepted: 18 Feb. 2020

---

### Abstract

**Aim:** This study was aimed to preparation of sheep urinary bladder derived from biological scaffold by a combined (physical and chemical) method and evaluation of scaffold biocompatibility.

**Materials and Methods:** Urinary bladder decellularization was performed by physical and chemical methods. In the physical method, the bladder fragments were incubated at -4 °C for 24 h and intervalled the fragments each 6 h by placing for 10 min in 0.1% sodium azide solution. After 24 h, the samples were placed at -20 and -40 °C for 2 and 1 h, respectively. The bladder fragments were held in a cryotube and emerged in liquid nitrogen by five two-minute steps, and finally washed by the PBS buffer containing 0.1% sodium azide. In the chemical decellularization, all of the physically treated bladder fragments were placed in a sodium dodecyl sulphate solution under slow stirring for 24 h. The samples were rinsed with sterile distilled water, sterilized with 75% ethanol and 0.2% peracetic acid and finally were placed in PBS for 24 h.

**Results:** The light and electron microscopy studies revealed the biocompatibility of seeded stem cells on the sheep bladder bioscaffold, in 3rd, 5th and 7th days. The most biocompatibility was observed in the end of 7th day.

**Conclusion:** Decellularized urinary bladder scaffold revealed biocompatibility which could be considered as a potential nontoxic and biocompatible bioscaffold for application in tissue engineering regenerative medicine.

**Keywords:** scaffold, urinary bladder, mesenchymal stem cells, biocompatibility