

## سلول زدایی شیمیایی بافت غضروف طبیعی به منظور استفاده در مهندسی بافت غضروف

دکتر ناهید حسن زاده نعمتی\*، زهره انصاری نژاد\*\*، دکتر مهدی موحدی\*\*\*

### چکیده:

**زمینه و هدف:** آنتی ژن‌های سلولی از داربست‌های بیولوژیکی گرفته شده از بافت‌ها و اندام‌های سلول زدایی شده حذف و بسیاری از پروتئین‌های ساختاری و عملکردی ماتریکس خارج سلولی حفظ می‌شوند. لذا این داربست‌ها کارآرایی قابل توجهی برای استفاده در مهندسی بافت از جمله مهندسی بافت غضروف داراست. روش‌های شیمیایی یکی از فن‌های سلول زدایی می‌باشد که در پژوهش حاضر مورد توجه قرار گرفته است.

**مواد و روش‌ها:** برای این منظور از غلظت‌های مختلف سدیم دو دسیل سولفات به عنوان یک ماده شوینده یونی شیمیایی و تریتون X-100 به عنوان یک ماده شوینده غیر یونی شیمیایی برای سلول زدایی غضروف گرفته شده از گاو استفاده شد. برای بررسی تأثیر فرایندهای آماده‌سازی بر ساختار بافت و موفقیت سلول زدایی بافت و مشاهده هسته سلول‌ها به ترتیب از میکروسکوپ الکترونی روبشی و رنگ‌آمیزی هماتوکسیلین - انوزین استفاده گردید. همچنین سمیت داربست و چسبندگی سلولی بر روی آن مورد بررسی قرار گرفت.

**یافته‌ها:** با توجه به رنگ‌آمیزی اختصاصی تریکروم، رنگ آبی مشاهده شده، حفظ کلاژن در داربست سلول زدایی شده را تأیید کرد. سلول‌های فیبروبلاست کشت داده شده بر روی نمونه سلول زدایی شده با محلول (2%) سدیم دو دسیل سولفات و (4%) تریتون X-100 تکثیر یافته و چسبندگی خوبی نشان داد.

**نتیجه‌گیری:** نتایج حاصل از این مطالعه، حاکی از آن است که داربست تهیه شده به روش سلول زدایی شیمیایی بافت غضروف طبیعی می‌تواند کاندید مناسبی برای استفاده در مهندسی بافت غضروف باشد.

واژه‌های کلیدی: مهندسی بافت غضروف، ماتریکس خارج سلولی، سلول زدایی، سدیم دو دسیل سولفات

نویسنده پاسخگو: دکتر ناهید حسن زاده نعمتی

تلفن: 44867161

E-mail: [Nahid\\_hasanzadeh@yahoo.com](mailto:Nahid_hasanzadeh@yahoo.com)

\* استادیار، دانشکده علوم و فناوری‌های پزشکی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد علوم و تحقیقات تهران، گروه مهندسی پزشکی

\*\* کارشناسی ارشد، دانشکده علوم و فناوری‌های پزشکی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد علوم و تحقیقات تهران، گروه مهندسی پزشکی

\*\*\* استادیار، گروه مهندسی پزشکی، دانشکده فنی مهندسی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد شهرکرد

تاریخ وصول: 1400/03/12

تاریخ پذیرش: 1400/06/10

## زمینه و هدف

با توجه به تاریخچه داربست‌ها، باید گفت امروزه هدف اصلی استفاده از داربست‌ها بازسازی مجدد بافت‌های بدن است. هر بافت ویژگی‌های بیولوژیکی و نیز فیزیکی مانند اندازه و شکل خاص خود را دارد. بنابراین هر داربست در عمل باید توانایی وارد کردن آثار بیولوژیکی و مکانیکی خاص را به منظور بهبود و تغییر رفتار سلولی دارا باشد. بدین منظور هر داربست براساس خواص بافت هدفش طراحی می‌شود.<sup>2</sup>

انتخاب نوع و جنس داربست مهمترین بخش کار است به طوری که در نهایت جایگزین بافت آسیب دیده می‌شود. داربست نه تنها اجازه اتصال سلول‌ها را به خود می‌دهد، بلکه باعث مهاجرت سلول‌ها، نقل و انتقال فاکتورهای بیوشیمیایی، انتشار مواد غذایی، مواد زاید و نیز مواد تولیدی سلول‌ها می‌شود.<sup>3</sup>

برای رسیدن به این هدف، داربست باید دارای یک سری ویژگی‌های ساختاری باشد.<sup>3</sup> ویژگی‌های داربست‌ها شبیه به ماتریکس خارج سلولی است که نقش مهم در تکثیر علائم و پیام‌های فیزیکی و شیمیایی دارند.<sup>4</sup> ماده زمینه یا ماتریکس خارج سلولی دارای پروتئین‌هایی مثل فیبرونکتین،<sup>5</sup> کلاژن<sup>6</sup> و ژلاتین<sup>8</sup> است که بر مبنای این مواد داربست‌های بسیاری ساخته شد. بیشتر استراتژی‌ها برای مهندسی بافت غضروف بر پایه زیست مواد قابل جذب به عنوان داربست موقت برای نگهداری کندروسیت‌ها یا سلول‌های بنیادی استوار است.<sup>9,8</sup> داربست‌ها به صورت الگویی سه بعدی برای اتصال سلول‌ها و تشکیل بافت در محیط آزمایشگاه یا بدن استفاده می‌شوند.<sup>10</sup> همچنین می‌توانند به عنوان حامل‌هایی برای رهایش کنترل شده مولکول‌های زیست فعال در بافت‌های مهندسی شده بکار می‌روند.<sup>11</sup> آنها سلول‌ها را هدایت می‌کنند تا رشد کرده، ماتریکس خارج سلولی و سایر مولکول‌های بیولوژیکی را تهیه کنند و تشکیل بافت عمل کننده و یا عضو خاص را سهولت بخشند.<sup>12</sup> داربست‌ها باید با سلول‌ها برهمکنش مثبت داشته باشند تا سبب افزایش عملکردهای چسبندگی، رشد، مهاجرت و تقسیم سلولی شوند.<sup>13</sup> همچنین داربست باید خواص مکانیکی لازم را به خصوص در نواحی مفصلی دارا باشد.<sup>14</sup>

امروزه استفاده از داربست‌های بیولوژیکی در مهندسی بافت در سطح دنیا بسیار رواج یافته است. این داربست‌ها می‌توانند محیطی مشابه با ماده زمینه‌ای برون سلولی برای سلول‌ها فراهم کنند و به دلیل پاسخ‌های مناسب ایمنولوژیک، خواص آنتی‌ژنیک ملایم، رگ زایی، توانایی بهبود چسبندگی سلولی و خاصیت هموستازی بسیار مورد توجه هستند.<sup>15</sup> این در حالی است که استفاده از مواد سنتزی در ترمیم، مشکلاتی مانند عدم رگ زایی در محل پیوند را در بر دارد که باعث مشکلات پاتولوژیک فراوان شده و مانعی مهم در موفقیت پیوند محسوب می‌شود. با این حال داربست‌های طبیعی نیز محدودیت‌هایی دارند از جمله: وزن مولوکلی بالا، زیست تخریب پذیری بالا (یعنی تخریب سریع تر از ترمیم اتفاق می‌افتد) و آلرژی‌زا باشند.<sup>16,6</sup>

هر بافتی در بدن از سلول‌ها و یک ماتریکس خارج سلولی تشکیل شده که ماتریکس نقش یک داربست سه بعدی را دارد. سلول‌ها در سطح این داربست قرار می‌گیرند و به طور مداوم با آن در تعامل هستند.<sup>17,18</sup> برای به دست آوردن داربست‌های طبیعی از بافت‌های بدن موجودات زنده، فرایند سلول زدایی از بافت یا ارگان مورد نظر ضروری است. سلول زدایی فرایندی است که طی آن تمامی سلول‌های یک اندام یا بافت از آن جدا و فقط ماتریکس خارج سلولی باقی می‌ماند.<sup>19</sup>

از آنجا که در داربست‌های بیولوژیکی مشتق از بافت‌ها و اندام‌های سلول زدایی شده، آنتی‌ژن‌های سلولی حذف شده و بسیاری از پروتئین‌های ساختاری و عملکردی ماتریکس خارج سلولی حفظ می‌شوند، این داربست‌ها به طور موفقیت‌آمیزی در مهندسی بافت مورد استفاده قرار گرفته‌اند.<sup>20</sup> هدف از فرایند سلول زدایی، برداشت مواد سلولی و هسته‌ای و در عین حال حفظ یکپارچگی و به حداقل رساندن هر گونه آسیب به ترکیب و فعالیت زیستی ماتریکس خارج سلولی می‌باشد. تاکنون مطالعات زیادی در زمینه روش‌های آماده سازی داربست‌ها صورت گرفته و بافت‌های مختلفی از جمله مثانه، سیستم عروقی، دریچه‌های قلب، غضروف زانو، رباط و تاندون به منظور تولید جایگزین‌هایی بافتی، سلول زدایی شده‌اند.<sup>21</sup>

روش‌های سلول زدایی عبارتند از: روش‌های فیزیکی، شیمیایی و آنزیمی است که در آن از انواعی از شوینده‌ها، آنزیم‌ها و حلال‌ها برای تجزیه سلول‌ها استفاده می‌گردد. این فرآوردی‌ها به طور مؤثری ایجاد پاسخ‌های ایمنی در بافت میزبان را می‌کاهند و فضاهای آزادی را ایجاد می‌کنند که سلول‌های میزبان می‌توانند در آنها تکثیر شوند.<sup>23و22</sup>

در روش شیمیایی سلول زدایی، از مواد شیمیایی مختلف مانند تیمارهای اسیدی و بازی، شوینده‌های غیر یونی و یونی استفاده می‌گردد.<sup>24</sup> تیمارهای اسیدی و بازی برای حل نمودن اجزای سیتوپلاسمی سلول‌ها و حذف اسیدهای نوکلئیک به کار می‌روند. اسیدهایی از قبیل اسیداستیک، اسید هیدروکلریک، اسید سولفوریک و هیدروکسید آمونیوم به طور مؤثری باعث از هم پاشیدن غشاهای سلولی و اندامک‌های داخل سلولی می‌شوند.<sup>25</sup> از جمله موادی که در روش شیمیایی سلول زدایی می‌توان از آن بهره گرفت، تریتون x-100 و سدیم دودسیل سولفات می‌باشد.<sup>26</sup> شوینده‌های غیر یونی به دلیل اینکه اثرات نسبتاً ملایمی بر روی ساختار بافت دارند، به طور مؤثری در پروتوکول‌های سلول زدایی استفاده می‌شوند. این شوینده‌ها واکنش بین چربی - چربی را مختل می‌کند ولی کاری به پروتئین-پروتئین ندارند.<sup>27</sup> تریتون x-100 با فرمول شیمیایی  $C_{14}H_{22}O(C_2H_4O)_n$  یکی از شوینده‌های غیر یونی است که به طور وسیعی مورد مطالعه قرار گرفته است.<sup>28</sup> این ماده شوینده در ساختار خود یک زنجیره پلی اتیلن اکساید آبدوست و یک حلقه هیدروکربن آگریز آروماتیک دارد. به صورت مایع نسبتاً ویسکوز و شفاف موجود است. مکانیسم اثر شوینده‌های غیر یونی بدین شکل است که این شوینده‌ها به صورت تک به تک به پروتئین‌های اینتگرال متصل شده و باعث جدا شدن پروتئین‌های اینتگرال می‌شود. اگر نیاز به جداسازی پروتئین‌های محیطی باشد، از محلول نمکی غلیظ استفاده می‌گردد چون این پروتئین‌ها با پیوندهای سست یونی متصل می‌شوند.<sup>29</sup>

هدف از انجام این تحقیق، تهیه داربست‌های بیولوژیکی مشتق از بافت سلول زدایی شده غضروف به روش شیمیایی با استفاده از سدیم دو دسیل سولفات و تریتون X-100 می‌باشد. از میکروسکوپ الکترونی روبشی برای مشاهده ساختار داربست استفاده شد و برای بررسی موفقیت سلول زدایی بافت و مشاهده هسته سلول‌ها، از رنگ آمیزی هماتوکسیلین- ائوزین بهره گرفته شد. در پایان به منظور اطمینان یافتن از عدم حضور مواد سمی در داربست، آزمون سمیت سلولی و چسبندگی سلولی انجام گرفت.

رگ‌های خونی، تاندون و لیگامنت که تا 4 روز در معرض این ماده قرار گرفته‌اند؛ هسته‌ها به طور کامل حذف نشده‌اند. کارآرایی این ماده بستگی به بافت مورد استفاده و روش‌هایی که به صورت ترکیبی با تریتون x-100 برای سلول زدایی به کار می‌روند دارد.<sup>30</sup> از سوی دیگر، شوینده‌های یونی در حل کردن غشاء هسته سلول و غشاء سیتوپلاسم بسیار مؤثرند ولی به دلیل تخریب پیوند پروتئین-پروتئین، باعث دنا توره شدن پروتئین‌ها می‌شوند.<sup>27</sup> متداول ترین شوینده یونی، سدیم دو دسیل سولفات است و در بسیاری از مطالعات به عنوان ماده سلول زدا در مرحله شیمیایی استفاده شده است. سدیم دودسیل سولفات با فرمول  $C_{12}H_{25}NaO_4S$  رایج ترین سولفات‌های سطح فعال آنیونی (مواد فعال سطحی آنیونی) از پاک کننده‌های سنتزی با قدرت زیاد و به طور دقیق تر جزو مواد فعال سطحی یا مواد مؤثر می‌باشد.<sup>24</sup> ماده شوینده یونی می‌تواند با غشاهای سلولی برهم کنش داده و سبب لیز شدن غشاء سلولی و غشاء هسته گردد.<sup>31و32</sup> بعد از اضافه کردن این ماده شوینده و احاطه کردن پروتئین‌ها، پروتئین‌ها بار نسبتاً همسان پیدا کرده و به صورت خطی در می‌آیند. بدین ترتیب جداسازی فقط بر اساس اندازه صورت می‌پذیرد.<sup>33</sup> تعداد مولکول‌های سدیم دودسیل سولفات متناسب با تعداد آمینواسیدهای یک پروتئین است. هر مولکول سدیم دودسیل سولفات دو بار منفی به پروتئین می‌دهد. همچنین باعث می‌شود که نیروهایی که در تا شدن و تغییر شکل دادن پروتئین‌ها شرکت می‌کنند، از بین بروند. به هر حال "سدیم دودسیل سولفات" رایج ترین ماده شوینده مورد استفاده در محلول سازی پروتئین‌ها است.<sup>34</sup>

سلول زدایی با تریتون x-100 نتایج متفاوتی را نشان می‌دهد. به عنوان مثال سلول زدایی دریچه قلبی با این ماده پس از 24 ساعت، منجر به حذف کامل هسته‌ها از بافت می‌شود. مطالعات دیگر نشان داده؛ در بافت‌هایی از قبیل

## مواد و روش‌ها

## 1-2. برش نمونه برای سلول زدایی

در ابتدا نمونه غضروفی از زانو گاو تازه قربانی شده، با چاقو نسوج نرم آن را جدا کرده و سپس با مته تریفان به شکل استوانه‌هایی با قطر 5 میلی‌متر برش داده شد. در این پژوهش سلول زدایی به روش شیمیایی با استفاده از سدیم دو دسیل سولفات و تریتون X-100 انجام گردید و 5 نمونه سلول‌زدایی شده آماده شد که در ذیل به آن اشاره شده است.

## 2-2- سلول زدایی به روش شیمیایی با استفاده

## از سدیم دو دسیل سولفات و تریتون X-100

نمونه‌ها در ساعت‌های معینی در شوینده یونی سدیم دو دسیل سولفات با غلظت‌های 2 و 2/5 و 3 درصد در دمای محیط غوطه‌ور گردید. سپس نمونه‌ها با بافر فسفات سالین 0/1 مولار به مدت نیم ساعت شستشو داده شد. برای استریل کردن، ابتدا نمونه‌ها را توسط الکل 75 درصد شستشو داده

شد، سپس برای از بین رفتن اثر الکل 75 درصد، از آب مقطر استریل استفاده گردید. در انتها برای خنثی نمودن اثرات آب مقطر روی داربست‌ها، نمونه‌ها به مدت چند دقیقه در سرم فیزیولوژی قرار گرفت.

در مرحله بعدی، نمونه‌ها را در مدت زمان مشخص در شوینده غیر یونی تریتون X-100 با غلظت‌های 4 و 3 درصد در دمای محیط غوطه‌ور شد و نمونه‌های S2T3، T4S2، T3S4، S3T4، S2/5%T4 به دست آمد که در جدول 1 به تفصیل به شرح این 5 نمونه پرداخته شده است (جدول 1).

برای مقایسه، نمونه‌های کنترلی نیز تهیه گردید که هیچگونه عملیات سلول زدایی بر روی آنها انجام نگرفت. نمونه‌های کنترل برای رنگ‌آمیزی هماتوکسیلین - آنوزین در فرمالین 10% (در دمای محیط) غوطه‌ور شد و نمونه کنترل برای ارزیابی میکروسکوپ الکترونی روبشی در دمای محیط قرار گرفت. مراحل آگیری توسط درجات صعودی اتانول و قرار دادن در آون خلاء برای خشک کردن نمونه انجام شد.

جدول 1 - مراحل فرآیند سلول زدایی شیمیایی بافت غضروف

شماره نمونه	مرحله اول	مرحله دوم
S2T4	نمونه غضروف به مدت 3 ساعت در محلول سدیم دودسیل سولفات 2% غوطه‌ور گردید	نمونه غضروف به مدت 4 ساعت در محلول TritonX 100 4% غوطه‌ور گردید
S2/5T3	نمونه غضروف به مدت 3 ساعت در محلول سدیم دودسیل سولفات 2/5% غوطه‌ور گردید	نمونه غضروف به مدت 3 ساعت در محلول TritonX 100 3% غوطه‌ور گردید
S3T4	نمونه غضروف به مدت 2 ساعت در محلول سدیم دودسیل سولفات 3% غوطه‌ور گردید	نمونه غضروف به مدت 2 ساعت در محلول TritonX 100 4% غوطه‌ور گردید
T3S4	نمونه غضروف به مدت 4 ساعت در محلول TritonX 100 3% غوطه‌ور گردید	نمونه غضروف به مدت 2 ساعت در محلول سدیم دودسیل سولفات 4% غوطه‌ور گردید
T4S2	نمونه غضروف به مدت 3 ساعت در محلول TritonX 100 4% غوطه‌ور گردید	نمونه غضروف به مدت 4 ساعت در محلول سدیم دودسیل سولفات 2% غوطه‌ور گردید

## 2-3. مشخصه یابی نمونه‌ها

برای بررسی تأثیر فرایندهای آماده‌سازی بر ساختار کلاژن و بررسی میزان تخلخل نمونه‌ها از میکروسکوپ الکترونی روبشی استفاده شد. بررسی موفقیت سلول زدایی بافت و مشاهده هسته سلول‌ها نیز از طریق از رنگ‌آمیزی هماتوکسیلین - ائوزین انجام شد. به همین منظور ابتدا نمونه‌های T4S2, S2/5% T4, S3T4, T3S4, T4S2 در محلول فرمالین 10 درصد تثبیت شدند. بعد از انجام مراحل آگیری و قالب گیری با پارافین، با استفاده از میکروتوم برش‌های 8 میکرونی از نمونه‌ها تهیه شد و لام‌های بدست آمده توسط رنگ ائوزین - هماتوکسیلین رنگ‌آمیزی گردید که در نتیجه آن، هسته‌های سلول‌ها به صورت رنگ بنفش در یک زمینه ی صورتی رنگ قابل رویت می‌باشد.<sup>35</sup>

همچنین رنگ‌آمیزی تری کروم نیز به عنوان یک رنگ اختصاصی برای تعیین محتوای کلاژن در بافت مورد استفاده قرار گرفت که در نتیجه آن، در صورت حفظ شدن و حضور کلاژن، رنگ آبی کاملاً مشهود می‌باشد.<sup>36</sup> برای انجام آزمون سمیت سلولی، مواد شیمیایی و محلول‌ها از قبیل محیط کشت آر پی ام آی -1640، گلوترآلدئید، سرم جنین گوساله 11، تریپسین / ادتا، پنسیلین و استرپتومایسین خریداری شدند. در این آزمون از سلول‌های فیروبللاست موش (L-929) تهیه شده از بانک سلولی انستیتو پاستور ایران استفاده گردید. ابتدا سلول‌ها به صورت انبوه در محیط کشت محیط کشت آر پی ام آی -1640 دارای 50 واحد پنسیلین و 50 میکروگرم استرپتومایسین در میلی لیتر محیط کشت تکمیل شده با 10% سرم جنین گوساله در فلاسک کشت در انکوباتور دمای °C 37 و 5% گاز کربنیک با رطوبت 85% کشت داده شدند. بعد از مدت 3 الی 4 روز (تشکیل لایه سلولی) سلول‌ها به وسیله آنزیم تریپسین (0/25%) از سطح فلاسک کنده شد و جهت استفاده سوسپانسیون با غلظت

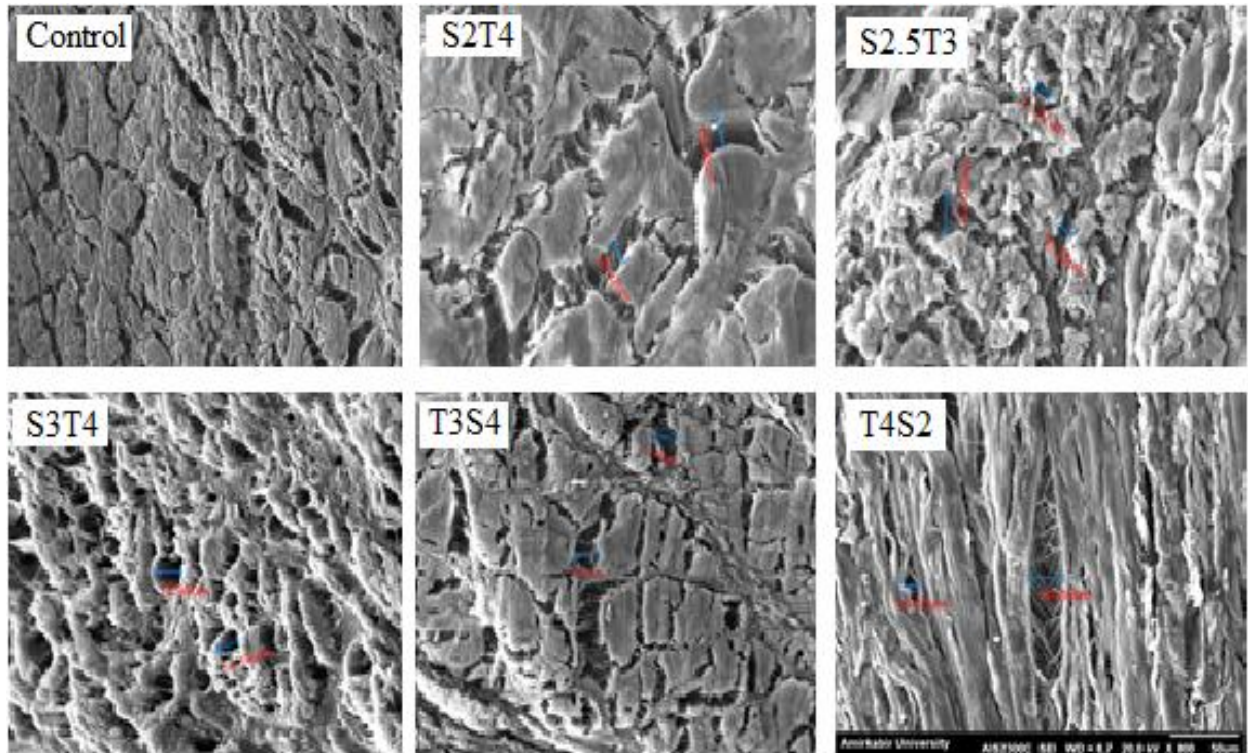
$10^4 \times 4$  سلول در میلی لیتر تهیه گردید. از طرفی نمونه‌ها به وسیله شستشو با الکل 70% استریل شدند. نمونه‌ها در ظرف 6 خانه‌ای قرار داده شدند (هر نمونه جداگانه در یک خانه) و یک خانه بدون نمونه به عنوان شاهد در نظر گرفته شد. بعد از قرار دادن نمونه‌های T4S2, S2/5% T4, S3T4, T3S4, T4S2 در هر یک از خانه‌ها، 5 میلی لیتر سوسپانسیون سلولی ریخته شد و در انکوباتور قرار داده شد. نمونه‌ها بعد از 24 و 48 ساعت انکوباسیون در زیر میکروسکوپ اینورت (نیکون ژاپن - 100) مورد ارزیابی کیفی قرار گرفتند.

## یافته‌ها

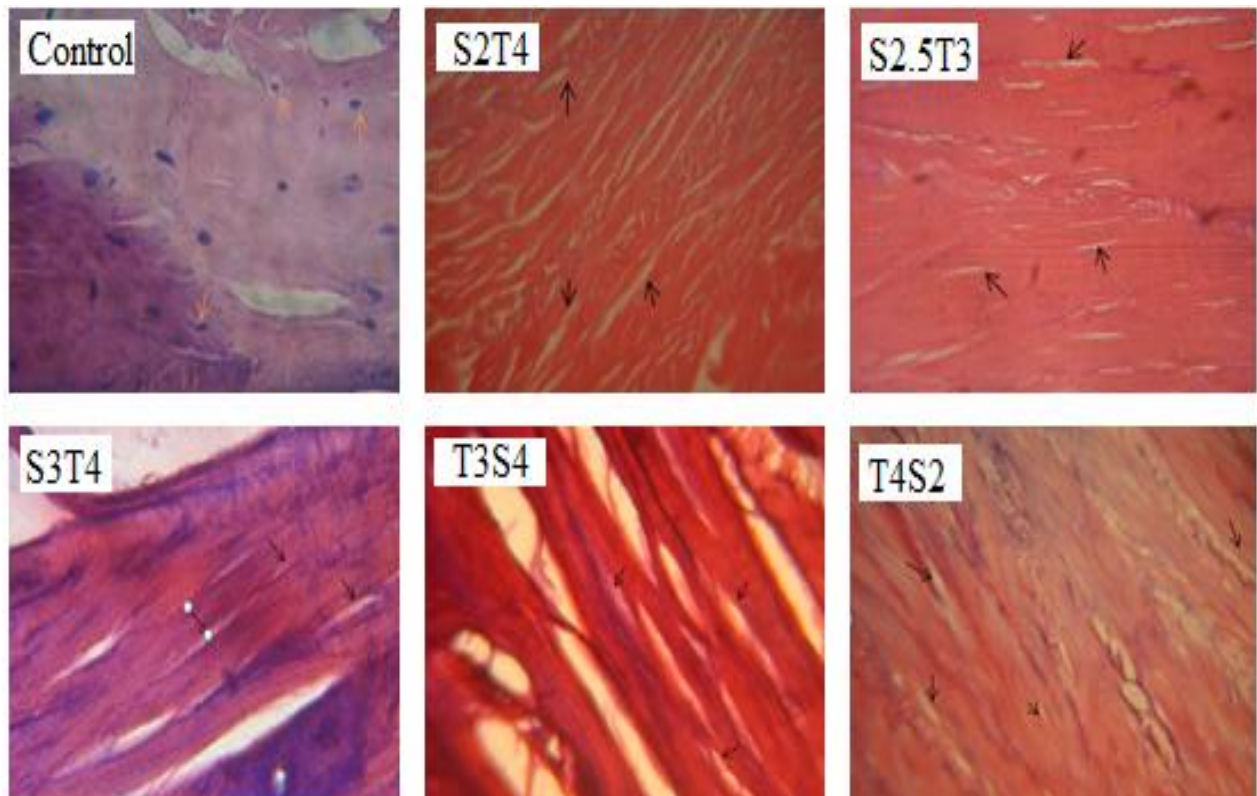
برای بررسی تأثیر فرایندهای آماده‌سازی بر ساختار کلاژن و بررسی میزان تخلخل نمونه‌های T4S2, S2/5% T4, S3T4, T3S4 از میکروسکوپ الکترونی روبشی استفاده گردید.

تصویر 1 مربوط به نمونه شاهد می‌باشد که هیچ گونه عملیات سلول‌زدایی بر روی آن صورت نگرفته است. همانطور که در تصویر مشاهده می‌شود، خلل و فرج مناسبی در ساختار فیزیکی نمونه ایجاد شده است (تصویر 1).

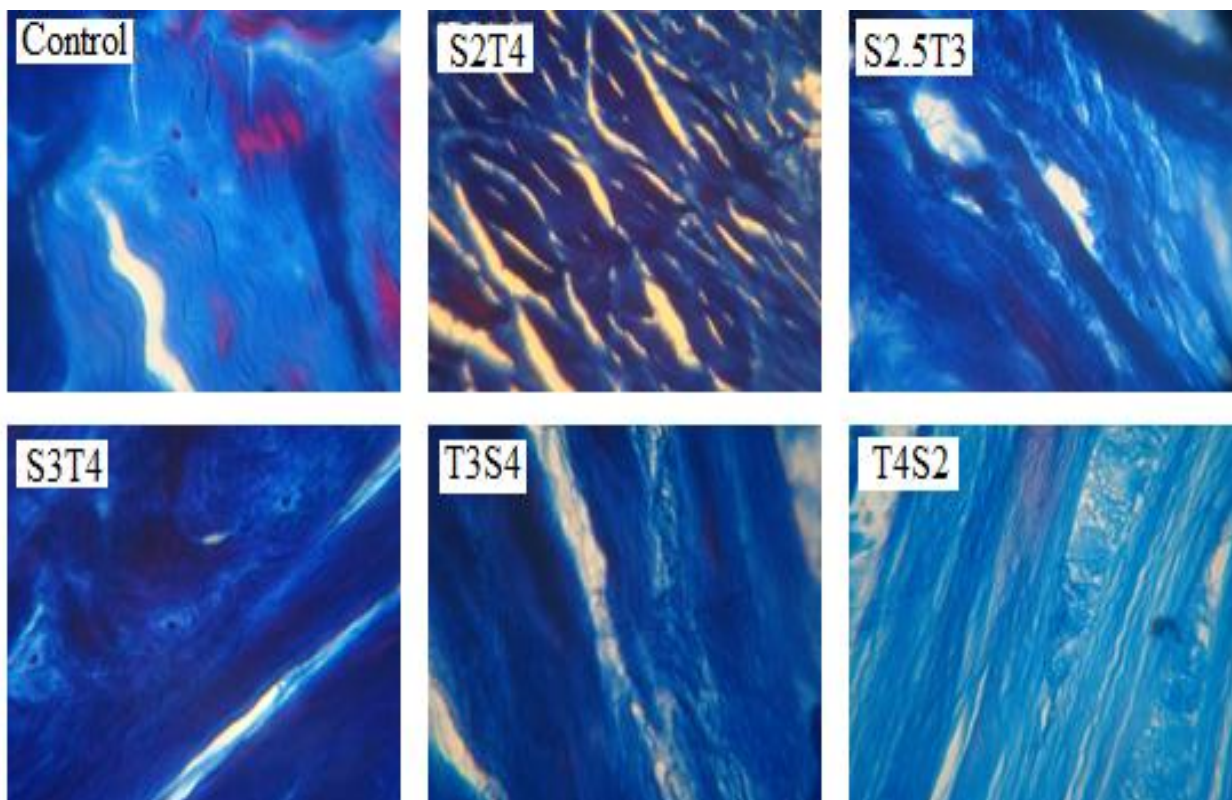
در تصویر 1، که به ترتیب مربوط به محلول‌های T4S2, S2/5% T4, S3T4, T3S4 می‌باشد، ملاحظه می‌شود که با افزایش میزان غلظت سدیم دو دسیل سولفات بر خلاف انتظار، سلول زدایی به صورت بهینه انجام نمی‌شود و با تکیه بر این فرضیه که سدیم دو دسیل سولفات یک ماده سمی است. بنابراین افزایش غلظت آن اثرات سمی و تخریب کننده‌ای را بر روی ساختار فیزیکی و ماتریس خارج سلولی داشته است که با هدف پروژه سلول زدایی که مبتنی بر حفظ ماتریکس خارج سلولی است، در تناقض بوده و چنین داربستی جهت رشد سلول‌ها مطلوب نمی‌باشد (تصویر 2).



تصویر 1- تصویر میکروسکوپ الکترونی روبشی نمونه سلول زدایی شده با محلول  $S2T4$ ،  $S2.5T3$ ،  $S3T4$ ،  $T3S4$  و  $T4S2$  و نمونه کنترل



تصویر 2- رنگ آمیزی هماتوکسیلین-ائوزین  $S2T4$ ،  $S2.5T3$ ،  $S3T4$ ،  $T3S4$  و  $T4S2$  و نمونه کنترل



تصویر 3- تصویر میکروسکوپ نوری با رنگ آمیزی اختصاصی تریکروم از نمونه سلول زدایی شده توسط نمونه‌های S2T4، S2.5T3، S3T4، T3S4 و T4S2 و نمونه کنترل

نوری با رنگ آمیزی اختصاصی تریکروم پیداست، به دلیل آبی رنگ شدن تصویر 3، می‌توان نتیجه گرفت که کلاژن در تمامی نمونه‌های سلول زدایی شده S 2T3، T4 2.5% S، T3S4، S3T4، T4S2 حفظ شده است (تصویر 3).

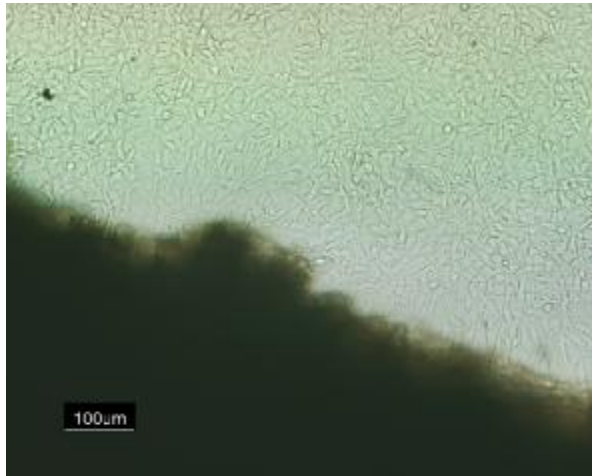
#### 3-4. نتایج آزمون سمیت سلولی

با در نظر گرفتن این موضوع که یکی از مهمترین ویژگی‌های یک داربست جهت کاربردهای مهندسی بافت، عدم سمیت و زیست سازگاری در محیط برون تن می‌باشد، بنابراین لازم است که داربست‌های طبیعی‌ای نیز که در این پروژه به واسطه فرآیند سلول زدایی به روش شیمیایی تهیه شده‌اند، تحت آزمون بررسی سمیت قرار گیرند تا از عدم سمیت آنها اطمینان حاصل گردد. به ویژه اینکه سمیت شوینده یونی سدیم دو دسیل سولفات که در این پروژه به کار گرفته شده، تأیید شده می‌باشد و باید از خارج شدن اثرات سمی آن از نمونه مطمئن شد.

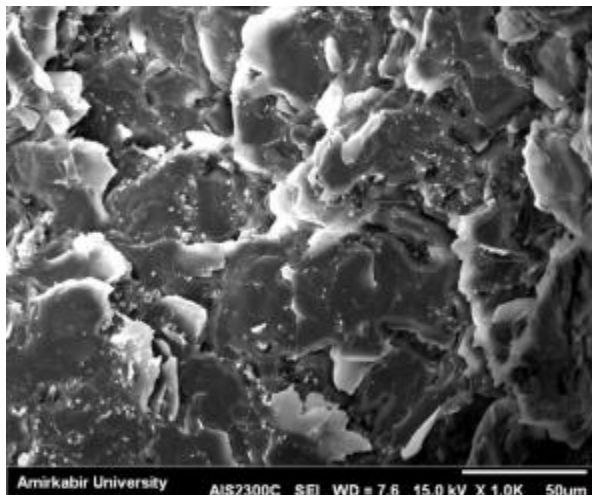
#### نتایج رنگ آمیزی هماتوکسیلین - ائوزین

در تصویر 2، تصاویر میکروسکوپ نوری برای مطالعه هیستولوژیک نمونه‌های S2T3، T4 2.5% S، S3T4، T3S4، T4S2 با رنگ آمیزی هماتوکسیلین - ائوزین نشان داده شده است که با بزرگنمایی 400 X گرفته شده است (تصویر 2). همانطور که در تصویر ملاحظه می‌شود، حفرات لاکونا حاوی رنگ بنفش می‌باشد و این نشان دهنده حضور هسته‌های سلولی در نمونه می‌باشد.

از آنجا که حفظ استحکام در غضروف بسیار حائز اهمیت می‌باشد، بنابراین حفظ کلاژن یکی از شرایط ضروری برای داشتن یک داربست ایده آل طبیعی از جنس غضروف می‌باشد. بدین منظور رنگ آمیزی اختصاصی تریکروم با هدف شناسایی رشته‌های کلاژنی در ساختار ماتریکس خارج سلولی انجام گرفت. در تصاویر 4-6، رنگ آمیزی در نمونه‌های S2T3، T4 2.5% S، S3T4، T3S4، T4S2 مشاهده می‌شود. همانطور که از تصاویر میکروسکوپ



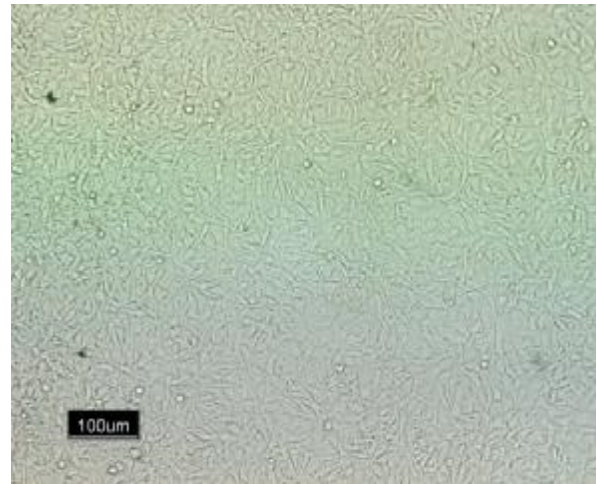
تصویر 6- وضعیت سلول‌های فیروبلاست کشت داده شده بر روی نمونه سلول زدایی شده توسط SDS 2% و Triton X100 4% پس از 48 ساعت



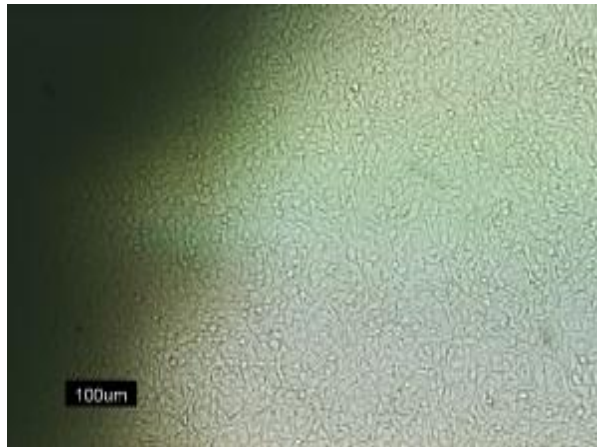
تصویر 7- تصویر میکروسکوپ الکترونی روبشی از چسبندگی سلولی

نتایج تصویر میکروسکوپ الکترونی روبشی در پایان به منظور اطمینان یافتن از چسبندگی سلولی در نمونه سلول زدایی شده از این نمونه عکس میکروسکوپ

نمونه تحت آزمون سمیت سلولی و چسبندگی قرار گرفت. پس از کشت سلول‌ها بر روی داربست مذکور، نتایج در طی 24 ساعت و 48 ساعت بررسی شد که این نتایج در تصویر 4، 5 و 6 کاملاً مشهود می‌باشد (تصاویر 4 - 6).



تصویر 4- وضعیت سلول‌های فیروبلاست کشت داده شده بر روی بافت پس از 24 ساعت نمونه کنترل



تصویر 5- وضعیت سلول‌های فیروبلاست کشت داده شده بر روی نمونه سلول زدایی شده توسط SDS 2% و Triton X100 4% پس از 24 ساعت

در این مطالعه نیز با توجه به نتایج تصاویر رنگ آمیزی هماتوکسیلین - ائوزین، به نظر می‌رسد که بهترین گزینه جهت فرآیند سلول زدایی به روش شیمیایی S2T4 می‌باشد. با توجه به نتایج، میزان سلول‌های تکثیر یافته و دارای پاهک قابل ملاحظه و مطلوب می‌باشد و این موضوع بیانگر این است که چسبندگی به خوبی اتفاق افتاده است و در این نمونه سمیتی مشاهده نشده است.

#### نتیجه‌گیری

در این پژوهش، سلول زدایی از بافت غضروف گاو با محلول‌های شیمیایی سدیم دودسیل سولفات و تریتون X-100. با هدف ساخت یک داربست سه بعدی از میکروسکوپ الکترونی روبشی انجام گرفت. نتایج بدست آمده از تصاویر رنگ آمیزی هماتوکسیلین - ائوزین، تری کروم، آزمون سمیت و چسبندگی سلولی داربست S2T 4، بیانگر این است که داربست حاصل از ماتریکس خارج سلولی با حفظ ترکیبات اصلی می‌تواند بستر مناسبی برای بررسی رفتارهای سلولی باشد. این داربست می‌تواند به عنوان یک داربست طبیعی مناسب جهت کاربرد در مهندسی بافت و پزشکی ترمیمی مورد ارزیابی‌های کامل تری قرار گیرد.

الکترونی روبشی بعد از آزمون سمیت تهیه نمودیم و طبق نتایجی که تصویر 7 نشان داده، چسبندگی سلولی قابل ملاحظه است (تصویر 7).

#### بحث

میزان حذف سلول‌ها در نمونه‌های سلول‌زدایی شده با محلول‌های S2T3، T4، S2/5%، T3S4، T4S2 قابل قبول است و حفرات لاکونا به خوبی از هسته سلول‌ها خالی است و هسته سلول‌ها در حال پیکنوله شدن است، اما نمونه سلول‌زدایی شده با محلول S2T3 ضمن حذف خوب سلول‌ها، PH مناسب و حدود 7/3 را داراست در حالی که این موضوع در مورد نمونه‌های دیگر صدق نمی‌کند. بنابراین نمونه سلول‌زدایی شده با محلول S2T4 گزینه مناسبی برای تهیه داربست طبیعی بنظر می‌رسد.

در مطالعه‌ای که نصیری و همکارانش بر روی داربست متخلخل سلول زدایی شده از بافت غضروف گاو با محلول شیمیایی سدیم دودسیل سولفات / کیتوسان انجام دادند، نشان داده شد این داربست پتانسیل لازم برای رشد و چسبندگی سلول‌های غضروفی دارا می‌باشد.<sup>37</sup> همچنین در مطالعه‌ای دیگر، لو و همکارانش از داربست سلول زدایی شده در محیط درون تن بهره گرفتند و نتایج بسیار مطلوبی در جهت بازسازی و ترمیم بافت صورت پذیرفت.<sup>38</sup>

**Abstract:**

## **Chemical Decellularization of Natural Cartilage Tissue for Use in Cartilage Tissue Engineering**

*Hassanzadeh Nemati N. PhD<sup>\*</sup>, Ansari Nezhad Z. MS<sup>\*\*</sup>, Movahedi M. PhD<sup>\*\*\*</sup>*

(Received: 2 June 2021

Accepted: 1 Sep 2021)

**Introduction & Objective:** Nowadays, culturing cells on a three-dimensional scaffold in vitro in cartilage tissue engineering is of interest to researchers. Because in biological scaffolds derived from degenerated tissues and organs, cellular antigens are removed and many structural and functional proteins of the extracellular matrix are preserved, these scaffolds have been successful in tissue engineering.

**Materials & Methods:** The aim of the present study was to prepare biological scaffolds derived from cartilage detoxified tissue using different concentrations of Sodium Dodecyl Sulfate (SDS) as a chemical ionic detergent and Triton X-100 as a non-ionic detergent. In this regard, scanning electron microscopy was used to evaluate the effect of preparation processes on collagen structure and porosity of samples and hematoxylin-eosin staining was used to evaluate the success of tissue decellularization and cell nucleus observation. The toxicity of scaffold and cell adhesion on it was also investigated.

**Results:** Due to the specific staining of the trichrome, the observed blue color confirmed the retention of collagen in the decellularized scaffold. The cultured fibroblasts were amplified on a decellularized sample with Sodium Dodecyl Sulfate (2%) and Triton X-100 (4%) solutions showed good adhesion.

**Conclusions:** The results of this study indicate that scaffolds prepared by chemical detoxification of natural cartilage tissue can be a good candidate for use in cartilage tissue engineering.

***Key Words: Cartilage Tissue Engineering, Extracellular Matrix, Decellularization, Sodium Dodecyl Sulfate, Triton X-100***

\* Assistant Professor, Department of Biomedical Engineering, Science and Research Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran

\*\* Master, Department of Biomedical Engineering, Science and Research Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran

\*\*\* Assistant Professor, Department of Biomedical Engineering, Shahrekord Branch, Islamic Azad University, Shahrekord, Iran

## References:

- Farokhi M, Jonidi Shariatzadeh F, Solouk A, Mirzadeh H. Alginate based scaffolds for cartilage tissue engineering: a review. *International Journal of Polymeric Materials and Polymeric Biomaterials*. 2020; 69(4): 230-47.
- Zadehnajar P, Akbari B, Karbasi S, Mirmusavi MH. Preparation and characterization of poly  $\epsilon$ -caprolactone-gelatin/multi-walled carbon nanotubes electrospun scaffolds for cartilage tissue engineering applications. *International Journal of Polymeric Materials and Polymeric Biomaterials*. 2020; 69(5): 326-37.
- Zhang Y, Liu X, Zeng L, Zhang J, Zuo J, Zou J, et al. Polymer fiber scaffolds for bone and cartilage tissue engineering. *Advanced Functional Materials*. 2019; 29(36): 1903279.
- Smith L, Ma P. Nano-fibrous scaffolds for tissue engineering. *Colloids and surfaces B: biointerfaces*. 2004; 39(3): 125-31.
- Lee JH, Lee HB. A wettability gradient as a tool to study protein adsorption and cell adhesion on polymer surfaces. *Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition*. 1993; 4(5): 467-81.
- Dhollander AA, Sánchez VRG, Almqvist KF, Verdonk R, Verbruggen G, Verdonk PC. The use of scaffolds in the treatment of osteochondral lesions in the knee: current concepts and future trends. *The journal of knee surgery*. 2012; 25(03): 179-86.
- Yang Q, Peng J, Guo Q, Huang J, Zhang L, Yao J, et al. A cartilage ECM-derived 3-D porous acellular matrix scaffold for in vivo cartilage tissue engineering with PKH26-labeled chondrogenic bone marrow-derived mesenchymal stem cells. *Biomaterials*. 2008; 29(15): 2378-87.
- Caplan AI. Tissue engineering designs for the future: new logics, old molecules. *Tissue engineering*. 2000; 6(1): 1-8.
- Lu Q, Ganesan K, Simionescu DT, Vyavahare NR. Novel porous aortic elastin and collagen scaffolds for tissue engineering. *Biomaterials*. 2004; 25(22): 5227-37.
- Hollander AP, Dickinson SC, Sims TJ, Brun P, Cortivo R, Kon E, et al. Maturation of tissue engineered cartilage implanted in injured and osteoarthritic human knees. *Tissue engineering*. 2006; 12(7): 1787-98.
- Nava MM, Draghi L, Giordano C, Pietrabissa R. The effect of scaffold pore size in cartilage tissue engineering. *Journal of applied biomaterials & functional materials*. 2016; 14(3): e223-e9.
- Lee ET, Wang J. *Statistical methods for survival data analysis*: John Wiley & Sons; 2003.
- Sawhney HS, editor *3D geometry from planar parallax*. CVPR; 1994.
- Brittberg M, Lindahl A, Nilsson A, Ohlsson C, Isaksson O, Peterson L. Treatment of deep cartilage defects in the knee with autologous chondrocyte transplantation. *New england journal of medicine*. 1994; 331(14): 889-95.
- Ibsirlioglu T, Elçin AE, Elçin YM. Decellularized biological scaffold and stem cells from autologous human adipose tissue for cartilage tissue engineering. *Methods*. 2020; 171: 97-107.
- Li Y, Liu Y, Xun X, Zhang W, Xu Y, Gu D. Three-dimensional porous scaffolds with biomimetic microarchitecture and bioactivity for cartilage tissue engineering. *ACS applied materials & interfaces*. 2019; 11(40): 36359-70.
- Müh E, Zimmermann J, Kneser U, Marquardt J, Mühlaupt R, Stark B. Lysineurethanedimethacrylate-a novel generation of amino acid based monomers for bone cements and tissue repair. *Biomaterials*. 2002; 23(14): 2849-54.
- Agrawal CM, Ray RB. Biodegradable polymeric scaffolds for musculoskeletal tissue engineering. *Journal of Biomedical Materials Research: An Official Journal of The Society for Biomaterials, The Japanese Society for Biomaterials, and The Australian Society for Biomaterials and the Korean Society for Biomaterials dicine*. 2019; 4(1): 83-95. 2001; 55(2): 141-50.
- Cukierman E, Pankov R, Yamada KM. Cell interactions with three-dimensional matrices. *Current opinion in cell biology*. 2002; 14(5): 633-40.
- Kim YS, Majid M, Melchiorri AJ, Mikos AG. Applications of decellularized extracellular matrix in bone and cartilage tissue engineering. *Bioengineering & Translational Me*
- Abousleiman RI, Reyes Y, McFetridge P, Sikavitsas V. The human umbilical vein: a novel scaffold for musculoskeletal soft tissue regeneration. *Artificial organs*. 2008; 32(9): 735-41.
- Crapo PM, Gilbert TW, Badylak SF. An overview of tissue and whole organ decellularization processes. *Biomaterials*. 2011; 32(12): 3233-43.
- Ackbar R, Ainoedhofer H, Gugatschka M, Saxena AK. Decellularized ovine esophageal mucosa for esophageal tissue engineering. *Technology and Health Care*. 2012; 20(3): 215-23.
- Zahmati AHA, Alipoor R, Shahmirzadi AR, Khor V, Abolhasani MM. Chemical decellularization methods and its effects on extracellular matrix. *Internal Medicine and Medical Investigation Journal*. 2017; 2(3): 76-83.
- Falke G, Yoo JJ, Kwon TG, Moreland R, Atala A. Formation of corporal tissue architecture in vivo using human cavernosal muscle and endothelial cells seeded on collagen matrices. *Tissue engineering*. 2003; 9(5): 871-9.
- Milan PB, Pazouki A, Joghataei MT, Mozafari M, Amini N, Kargozar S, et al. Decellularization and preservation of human skin: A platform for tissue engineering and reconstructive surgery. *Methods*. 2020; 171: 62-7.

27. Seddon AM, Curnow P, Booth PJ. Membrane proteins, lipids and detergents: not just a soap opera. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes*. 2004; 1666(1-2): 105-17.
28. Bakhtiar H, Rajabi S, Pezeshki-Modaress M, Ellini MR, Panahinia M, Alijani S, et al. Optimizing Methods for Bovine Dental Pulp Decellularization. *Journal of Endodontics*. 2020.
29. Wang F, Zhang J, Wang R, Gu Y, Li J, Wang C. Triton X-100 combines with chymotrypsin: A more promising protocol to prepare decellularized porcine carotid arteries. *Bio-Medical Materials and Engineering*. 2017; 28(5): 531-43.
30. Gilbert TW, Sellaro TL, Badylak SF. Decellularization of tissues and organs. *Biomaterials*. 2006; 27(19): 3675-83.
31. Elder BD, Eleswarapu SV, Athanasiou KA. Extraction techniques for the decellularization of tissue engineered articular cartilage constructs. *Biomaterials*. 2009; 30(22): 3749-56.
32. Wang W, Li P, Li W, Jiang J, Cui Y, Li S, et al. Osteopontin activates mesenchymal stem cells to repair skin wound. *PLoS One*. 2017; 12(9): e0185346.
33. Cai Z, Gu Y, Xiao Y, Wang C, Wang Z. Porcine carotid arteries decellularized with a suitable concentration combination of Triton X-100 and sodium dodecyl sulfate for tissue engineering vascular grafts. *Cell and Tissue Banking*. 2020: 1-10.
34. Mendoza-Novelo B, Avila EE, Cauich-Rodríguez JV, Jorge-Herrero E, Rojo FJ, Guinea GV, et al. Decellularization of pericardial tissue and its impact on tensile viscoelasticity and glycosaminoglycan content. *Acta biomaterialia*. 2011; 7(3): 1241-8.
35. Hong H, Seo YB, Lee JS, Lee YJ, Lee H, Ajiteru O, et al. Digital light processing 3D printed silk fibroin hydrogel for cartilage tissue engineering. *Biomaterials*. 2020; 232: 119679.
36. Zubillaga V, Alonso-Varona A, Fernandes S, Salaberria AM, Palomares T. Adipose-Derived Mesenchymal Stem Cell Chondrospheroids Cultured in Hypoxia and a 3D Porous Chitosan/Chitin Nanocrystal Scaffold as a Platform for Cartilage Tissue Engineering. *International Journal of Molecular Sciences*. 2020; 21(3): 1004.
37. Nasiri B, Mashayekhan S. Fabrication of porous scaffolds with decellularized cartilage matrix for tissue engineering application. *Biologicals*. 2017; 48: 39-46.
38. Luo Z, Bian Y, Su W, Shi L, Li S, Song Y, Zheng G, Xie A, Xue J. Comparison of various reagents for preparing a decellularized porcine cartilage scaffold. *American journal of translational research*. 2019; 11(3): 1417.