



ساخت داربست پرده آمینون دسلولار-ژلاتین و ارزیابی آن جهت استفاده در کارهای مهندسی بافت

شیوا اسدپور^{۱*}، الهام زنده‌دل^۲، مریم انجم‌شعاع^۳، محراب عسکریانپور^۴، اکرم کرمی‌دهکردی^۴

۱- گروه مهندسی بافت و علوم سلولی کاربردی، دانشکده فناوری‌های نوین، دانشگاه علوم پزشکی شهرکرد، شهرکرد، ایران.

۲- مرکز تحقیقات سلولی و مولکولی، پژوهشکده علوم پایه سلامت، دانشگاه علوم پزشکی شهرکرد، شهرکرد، ایران.

۳- گروه علوم تشریحی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی شهرکرد، شهرکرد، ایران.

۴- گروه مامایی، دانشکده پرستاری، دانشگاه علوم پزشکی شهرکرد، شهرکرد، ایران.

تاریخ دریافت: ۱۴۰۲/۰۵/۳۰، تاریخ پذیرش: ۱۴۰۲/۱۰/۱۱

چکیده

مقدمه: تکنیک‌های سلول‌زدایی به‌طور گسترده‌ای در ساخت داربست‌های مناسب برای بازسازی بافت‌های آسیب‌دیده استفاده می‌شوند تا از این طریق به مشکل کمبود بافت‌های اهداکننده غلبه کنند. ماتریکس خارج سلولی سلول‌زدایی شده، مزیت‌های مختلفی از جمله حفظ ویژگی‌های ریزمحیط طبیعی را نسبت به مواد سنتزی دارد. پرده آمینون دارای ویژگی‌هایی از قبیل در دسترس بودن، ارزان بودن، ایمنی‌زایی کم، اثرات ضدالتهابی و ترمیمی می‌باشد. از طرفی ژلاتین، یک پلیمر طبیعی و زیست‌سازگار می‌باشد که تعاملات مناسب با چسبندگی و رشد سلول‌ها دارد. از این رو، در این مطالعه داربست‌های پرده آمینون سلول‌زدایی شده-ژلاتین برای کاربرد در مهندسی بافت ساخته شدند و سپس مورد ارزیابی قرار گرفتند.

مواد و روش: در ابتدا پرده آمینون انسان سلول‌زدایی شد و میزان سلول‌زدایی شدن با استفاده از رنگ‌آمیزی همانتوکسیلین-ائوزین ارزیابی شد. سپس داربست‌ها ساخته شدند. بعد از ساخت داربست‌ها، مشخصه‌یابی فیزیکی، شیمیایی و مکانیکی داربست‌ها انجام شد. علاوه بر این، سلول‌های بنیادی مزانشیمی مشتق از اندومتر رحم بر روی داربست‌ها کشت داده شدند و میزان زیست‌سازگاری داربست‌ها با روش MTT ارزیابی شد.

نتایج: نتایج نشان داد که بافت آمینون به خوبی سلول‌زدایی شده بود. سطح داربست‌ها در تصاویر SEM ناهموار بود. تمام داربست‌ها آب دوست بودند ولی داربست‌های گروه پرده آمینون سلول‌زدایی شده-ژلاتین به دلیل وجود پلیمر ژلاتین آبدوست دارای خاصیت آب دوستی بیشتری بودند. داربست‌های ساخته شده، جذب آب یا تورم را داشتند. نتایج خواص مکانیکی داربست‌ها نشان داد که داربست‌ها دارای استحکام مکانیکی مناسب بودند. همچنین نتایج آزمون زیست‌سازگاری نشان داد که تکثیر سلول‌های بنیادی مزانشیمی مشتق از اندومتر رحم روی داربست‌های گروه پرده آمینون سلول‌زدایی شده-ژلاتین بیشتر از گروه کنترل (گروه فقط سلول) بود.

نتیجه‌گیری: داربست‌های ساخته شده با استفاده از پرده آمینون-ژلاتین، پتانسیل مناسبی جهت استفاده در کارهای مهندسی بافت را دارند.

واژه‌های کلیدی: پرده آمینون، دسلولار کردن، ژلاتین، مهندسی بافت.

*نویسنده مسئول: دانشگاه علوم پزشکی شهرکرد، پژوهشکده علوم پایه سلامت، مرکز تحقیقات سلولی و مولکولی، گروه مهندسی بافت و علوم سلولی کاربردی، دانشکده فناوری‌های نوین، تلفن: ۹۱۴۸۴۵۳۵۵۱

Email: Shiva.asadpour2020@gmail.com، شماره: ۰۳۸-۳۳۳۳۵۶۵۲

ارجاع: شیوا اسدپور، الهام زنده‌دل، مریم انجم‌شعاع، محراب عسکریان‌پور، اکرم کرمی‌دهکردی. ساخت داربست پرده آمینون دسلولار-ژلاتین و ارزیابی آن جهت استفاده در کارهای مهندسی بافت. مجله دانش و تندرستی در علوم پایه پزشکی ۱۴۰۲؛ ۱۸(۴): ۴۹-۵۸.



مقدمه

مهندسی بافت از زمان ظهورش در اواسط دهه ۱۹۸۰، به‌عنوان یک زمینه هیجان‌انگیز و چند رشته‌ای با هدف توسعه جایگزین‌های بیولوژیکی جهت بازسازی بافت‌های آسیب دیده مطرح می‌باشد. سلول‌ها، داربست‌ها و سیگنال‌های محرک رشد سلول‌ها عموماً به‌عنوان عوامل سه‌گانه مهم در مهندسی بافت شناخته می‌شوند. داربست‌های مهندسی بافت، پشتیبانی ساختاری و مکانیکی برای اتصال سلول‌ها و متعاقباً رشد بافت‌ها را فراهم می‌کنند (۱). داربست‌ها، سازه‌هایی با عملکردهای فیزیکی و بیولوژیکی خاص و پیچیده هستند که از طریق سیگنال‌های بیوشیمیایی و فیزیکی با سلول‌ها و با محیط بدن تعامل دارند. داربست‌ها اجزای مهمی برای مهندسی بافت هستند. با این حال، محققان اغلب هنگام انتخاب داربست برای مهندسی بافت با تنوع زیادی از انتخاب‌ها مواجه می‌شوند (۲-۴).

انواع متعددی از ماتریکس خارج سلولی (ECM) در بافت‌های انسان وجود دارد که معمولاً دارای چندین جزء و ترکیب خاص بافت هستند. در مورد عملکرد ماتریکس خارج سلولی در بافت‌ها، آنها را می‌توان به‌طور کلی به پنج دسته طبقه‌بندی کرد: ۱- ماتریکس خارج سلولی، پشتیبانی ساختاری و محیط فیزیکی را برای سلول‌های مستقر در آن بافت فراهم می‌کند تا به سیگنال‌ها متصل شوند، رشد و مهاجرت کنند. ۲- ماتریکس خارج سلولی، به بافت خواص ساختاری و بنابراین مکانیکی می‌دهد، مانند سفتی و کشش که با عملکرد بافت مرتبط است. به‌عنوان مثال، دسته‌های ضخیم کلاژن نوع I در تاندون که به خوبی سازماندهی شده‌اند، در برابر کشش بسیار مقاوم هستند و مسئول استحکام کششی بالای تاندون‌ها هستند. از سوی دیگر، فیبرهای کلاژن و الیاف الاستین پوست که به‌طور تصادفی توزیع شده‌اند، مسئول استحکام و خاصیت ارتجاعی آن هستند. ۳- ماتریکس خارج سلولی، ممکن است به‌طور فعال نشانه‌های زیست فعال را برای تنظیم فعالیت‌های سلول‌های مستقر در آن ارائه کند. به‌عنوان مثال، توالی RGD روی فیبرونکتین رویدادهای اتصال به سلول را فراهم می‌کند (۵). در حالی که الگوی توپولوژیکی منظم ماتریکس خارج سلولی، نحوه قرار گرفتن سلول‌ها را تعیین می‌کند (۶). ۴- ماتریکس خارج سلولی، ممکن است به‌عنوان مخزن فاکتورهای رشد عمل کند و فعالیت‌های زیستی آنها را تقویت کند. به‌عنوان مثال، پروتئوگلیکان‌های سولفات هیالین، دیمیرزاسیون bFGF و در نتیجه فعالیت آن را تسهیل می‌کنند (۷). ۵- ماتریکس خارج سلولی، یک محیط فیزیکی تجزیه‌پذیر فراهم می‌کند تا در پاسخ به چالش‌های رشدی، فیزیولوژیکی و پاتولوژیک در طی فرآیندهای پویایی بافت یعنی مورفوژنز، هموستاز و ترمیم زخم، به‌ترتیب اجازه دهد که عروق جدید تشکیل شده و بافت بازسازی شود.

بهترین داربست برای یک بافت مهندسی شده باید بتواند ماتریکس خارج سلولی بافت طبیعی را تقلید کند. با این وجود، عملکردهای متعدد، ترکیب پیچیده و ماهیت پویای ماتریکس خارج سلولی در بافت‌های طبیعی، تقلید

دقیق آن را دشوار می‌سازد. بنابراین، مفهوم داربست در مهندسی بافت تقلید از عملکردهای ماتریکس خارج سلولی طبیعی است، در نتیجه، نقش‌های مهمی که داربست‌ها در بافت‌های مهندسی شده بازی می‌کنند، مشابه عملکرد ماتریکس خارج سلولی در بافت‌های طبیعی است و با ویژگی‌های ساختاری، بیولوژیکی و مکانیکی آنها مرتبط است (۸).

از مواد زیستی مختلف از قبیل مواد پلیمری و سرامیکی برای ساخت داربست‌ها استفاده می‌شود (۹). علاوه بر این، از بافت‌های طبیعی سلول‌زدایی شده نیز برای ساخت داربست‌ها استفاده می‌شود. علیرغم کاربرد گسترده و پیشرفت سریع داربست‌های ساخته شده از پلیمرهای طبیعی و سنتزی، این داربست‌ها به‌دلیل مشکلات و محدودیت‌ها در غلبه بر ایمنی‌زایی، شبیه‌سازی ریزمحیط بافت طبیعی، داشتند خواص مکانیکی یا بیوشیمیایی مشابه بافت طبیعی، ظرفیت ترمیم و بازسازی محدودی دارند. خوشبختانه، ظهور داربست‌های ماتریکس خارج سلولی سلول‌زدایی شده، روش مناسبی را برای غلبه بر این موانع فراهم می‌کند و یک محیط بهینه و ایمن با ساختارهای سه‌بعدی و اجزای مختلف زیست فعال دارد که بافت طبیعی را تقلید می‌کند (۱۰ و ۱۱).

ماتریکس خارج سلولی سلول‌زدایی شده، به‌عنوان یک داربستی است که محیط بافت طبیعی را حفظ می‌کند، تکثیر سلولی را تقویت می‌کند و نشانه‌هایی برای تمایز سلول‌های بنیادی ارائه می‌دهد. استفاده از ماتریکس خارج سلولی دسلولار شده، به‌عنوان یک عامل درمانی در حال افزایش است. برای ایجاد ماتریکس خارج سلولی سلول‌زدایی شده، از بافت‌های آلوگرافت یا زونگرافت استفاده می‌شود. بافت‌های آلوگرافت، یعنی بافت‌های مربوطه یک فرد دیگر است که معمولاً از اجساد یا زباله‌های بافتی بیمارستانی تهیه می‌شوند و بافت‌های زونگرافت، از حیوانات به‌دست می‌آیند. ماتریکس خارج سلولی سلول‌زدایی شده، شبیه‌سازی‌کننده‌ترین داربست‌های طبیعی هستند که در مهندسی بافت بسیاری از بافت‌ها از جمله دریچه‌های قلب، عروق، اعصاب، پوست، تاندون و لیگامان استفاده می‌شوند. در این روش، آنتی ژن‌های سلولی آلوژن یا بیگانه‌زا را از بافت‌ها حذف می‌کنند، زیرا آنها پس از کاشت در بدن، باعث ایمنی‌زایی می‌شوند، اما اجزای ماتریکس خارج سلولی را حفظ می‌کنند. بنابراین سیستم ایمنی را بعد از کاشت در بدن تحریک نمی‌کنند (۱۲).

تکنیک‌های مختلفی برای سلول‌زدایی تخصصی بافت‌ها وجود دارد تا سلول‌ها حذف شده و ماتریکس خارج سلولی باقی بماند. در این تکنیک‌ها معمولاً ترکیبی از روش‌های فیزیکی، شیمیایی و آنزیمی استفاده می‌شود. به‌طور خلاصه، غشای سلولی قبل از جداسازی اجزای سلولی از ماتریکس خارج سلولی با روش‌های مختلف مثلاً روش آنزیمی (مانند درمان با تریپسین/EDTA)، روش‌های فیزیکی (مانند چرخه‌های انجماد و ذوب) و یا روش‌های شیمیایی (محلول‌های یونی مانند محلول‌های هیپو یا

نمونه‌ها در درون ظرف گزلبول به مدت ۵ دقیقه قرار گرفتند. در مرحله‌ی بعدی در درصد‌های مختلف نزولی الکل اتیلیک (۷۰، ۸۰ و ۹۰) فرو برده شدند تا در طی ۳ دقیقه، آبدی صورت گیرد. سپس لام‌ها با استفاده از رنگ هماتوکسیلین به مدت ۱۵ دقیقه رنگ‌آمیزی شدند و پس از اتمام زمان به مدت ۳ تا ۵ دقیقه با آب مقطر شستشو داده شدند. در این مرحله برای اینکه رنگ‌آمیزی‌های صورت گرفته تثبیت شوند، لام‌ها به مدت ۳ دقیقه در محلول کربنات لیتیوم قرار داده شدند و سپس با آب مقطر شستشو انجام شد. در نهایت، نمونه‌ها به مدت ۵ تا ۱۰ دقیقه داخل ظرف حاوی محلول ائوزین فرو برده شدند و برای آبیگری در درصد‌های مختلف صعودی الکل اتیلیک از ۷۰ به ۹۰ به مدت ۳ دقیقه قرار گرفتند. در مرحله‌ی بعدی نیز برای شفاف کردن نمونه‌ها، آنها به مدت ۳ دقیقه در محلول گزلبول قرار گرفتند. بعد از مونت کردن لام‌های تهیه شده با چسب پاتولوژی، نمونه‌ها در زیر میکروسکوپ مورد بررسی قرار گرفتند.

ساخت داربست‌ها:

ابتدا محلول ژلاتین تهیه شد و سپس بافت پرده آمینون دسلولار داخل آن قرار گرفت. بعد از ۲۰ دقیقه، بافت پرده آمینون دسلولار از محلول فوق خارج و فریز درایر شد. گروه‌های مورد مطالعه شامل: داربست دسلولار شده آمینون و داربست آمینون دسلولار-ژلاتین بودند.

بررسی مورفولوژی داربست‌ها با میکروسکوپ الکترونی روبشی برای بررسی ریز ساختار داربست‌ها، از میکروسکوپ الکترونی روبشی استفاده شد. برای این کار باید نمونه‌ها آماده‌سازی می‌شدند. جهت آماده‌سازی ابتدا نمونه‌ها در ابعاد کوچک برش داده شد. سپس با کمک دستگاه اسپاترینگ بر روی نمونه‌ها یک لایه نازک طلا پوشش داده شد و نمونه‌ها آماده دیدن با میکروسکوپ الکترونی شد. سپس تصاویر با استفاده از میکروسکوپ الکترونی تهیه شدند.

آزمون روش طیف‌سنجی مادون قرمز (FTIR)

FTIR داربست‌ها در محدوده‌ی طول موج 4۰۰۰-۴۰۰۴ cm⁻¹ جهت شناسایی گروه‌های عاملی و پیوندهای تشکیل شده در نمونه‌ها استفاده شد. این آزمون بر روی یک دستگاه طیف‌سنجی انجام شد. تجزیه و تحلیل FTIR با استفاده از حالت ATR انجام شد و ۱۶ اسکن برای به‌دست آوردن هر طیف گرفته شد. جهت انجام این آزمون نمونه‌ها به پژوهشگاه پلیمر و پتروشیمی ایران فرستاده شدند.

اندازه‌گیری میزان آب دوستی سطح داربست‌ها

نمونه‌ها در ورقه‌های ۲ سانتی‌متر × ۲ سانتی‌متر بر روی فویل آلومینیومی بریده شدند. سپس آب دوستی داربست‌ها، با استفاده از دستگاه اندازه‌گیری زاویه تماس ساکن (Jikan CAG-10، ایران) اندازه‌گیری شد. این آزمون برای هر گروه در سه تکرار انجام شد.

بررسی خواص مکانیکی داربست‌ها با استفاده از منحنی تنش- کرنش

هیپرتونیک) لیز می‌شوند. سپس اجزای سلولی با استفاده از مواد دترجنت حذف می‌شوند (۱۰، ۱۳ و ۱۴).

غشای آمینون انسانی، به دلیل ویژگی‌های بیولوژیکی عالی از جمله خواص ضد میکروبی، ضد التهابی، ایمنی‌زایی کم و خواص ضد رگ‌زایی به‌طور گسترده‌ای به‌عنوان داربست طبیعی در مهندسی بافت استفاده می‌شود. علاوه بر این، ماتریکس خارج سلولی پرده آمینون، سرشار از مولکول‌های فعال زیستی از جمله فاکتور رشد کراتینوسیت (KGF)، فاکتور رشد فیبروبلاست پایه (b-FGF)، فاکتور رشد بتا (TGF-β)، و فاکتور رشد اپیدرمی (EGF) می‌باشد. تمامی این ویژگی‌ها، پرده آمینون دسلولار شده را به یک کاندید مناسب برای ترمیم و بازسازی آسیب‌های بافتی تبدیل می‌کند (۱۵).

ژلاتین یکی از پلیمرهای طبیعی است که از هیدرولیز کلاژن به‌دست می‌آید و نسبت به کلاژن ایمنی‌زایی پایینی دارد. ژلاتین به‌عنوان یک ماده طبیعی و زیست سازگار و زیست تخریب‌پذیر می‌تواند تعامل مناسبی با سلول ایجاد کرده و در تکثیر، تمایز و چسبندگی سلولی نقش ایفا کند (۱۶ و ۱۷). هدف از این مطالعه ساخت داربست با استفاده از پرده آمینون دسلولار شده و ژلاتین و ارزیابی خواص آن جهت استفاده در مهندسی بافت بود. پرده آمینون از طریق یک پروتکل ساده و مقرون به صرفه سلول‌زدایی شد. سپس داربست دسلولار ساخته شده از نظر فیزیکی، شیمیایی و مکانیکی بررسی شد. در نهایت، تعاملات داربست‌ها با سلول‌های بنیادی مزانشیمی مورد ارزیابی قرار گرفت.

مواد و روش‌ها

سلول‌زدایی پرده آمینون

پرده آمینون از زباله‌های دور ریز بیمارستان هاجر شهرکرد تهیه شد و از کوریون و جفت جدا گردید. به‌طور خلاصه، ابتدا پرده آمینون با فسفات بافر سالین شستشو داده شد تا خون و سایر اجزا شسته شوند. سپس پرده آمینون در منفی ۲۰ درجه سانتی‌گراد فریز شد. بعد از ۱۰ ساعت پرده آمینون از فریزر خارج شد و در دمای اتاق قرار گرفت. پرده آمینون داخل محلول حاوی دترجنت و تریتون به مدت ۲۴ ساعت قرار داده شد سپس با آب شستشو انجام شد.

رنگ‌آمیزی هماتوکسیلین- ائوزین یک روش رنگ‌آمیزی معمول و روتین در اکثر آزمایشگاه‌های پاتولوژی است. در این روش هسته و سیتوپلاسم با دو رنگ متفاوت رنگ‌آمیزی شده و نشان داده می‌شوند. هسته سلول رنگ بنفش و سیتوپلاسم رنگ صورتی یا قرمز به خود می‌گیرد. پرده آمینون دسلولار شد سپس به کمک فرمالین ۱۰ درصد در فسفات بافر سالین تثبیت شد. بعد از ۲۴ ساعت، آب‌گیری بافت با غلظت‌های مختلف الکل انجام شد. سپس بافت داخل پارافین گذاشته شد و به کمک میکروتوم مقاطع نازک از نمونه تهیه شد. در نهایت برای نمونه‌های قرار گرفته روی لام، رنگ‌آمیزی هماتوکسیلین- ائوزین انجام شد؛ بدین صورت که ابتدا پارافین‌زدایی از نمونه بافت صورت گرفت تا رنگ هماتوکسیلین بتواند در سلول نفوذ کند، لذا

نتایج

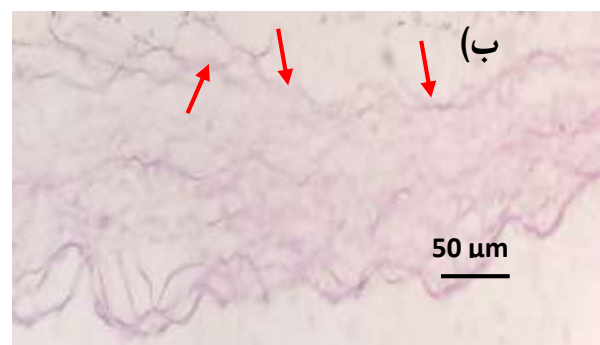
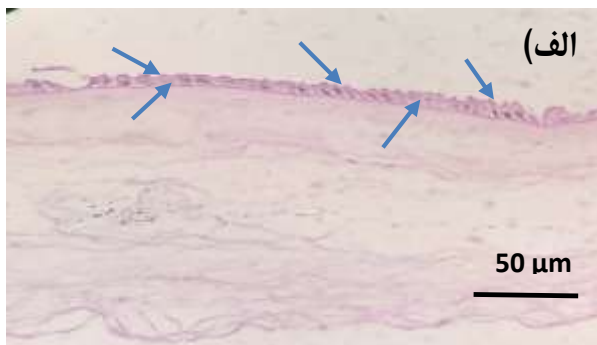
نتایج رنگ‌آمیزی H&E از پرده آمنیون سالم و دسلولار شده که مربوط به بافت انسان می‌باشد در شکل ۱ نشان داده شده است. همان‌طور که در تصاویر ملاحظه می‌گردد (شکل ۱ قسمت A)، سلول‌ها در پرده آمنیون انسان قابل مشاهده هستند ولی بعد از دسلولار کردن (شکل ۱ قسمت B)، سلول‌های موجود در بافت کاملاً حذف شده‌اند و ماتریکس خارج سلولی دست نخورده و سالم باقی مانده است.

در شکل ۱ الف) پرده آمنیون انسان دست نخورده، ب) پرده آمنیون سلول‌زدایی شده. فلش‌های قرمز و آبی لایه اپی‌تلیال پرده آمنیون را نشان می‌دهد که در شکل الف) سلول‌های لایه اپی‌تلیال مشاهده می‌گردد (فلش‌های آبی) ولی در شکل ب) که سلول‌زدایی انجام شده است این سلول‌ها دیده نمی‌شوند (فلش‌های قرمز).

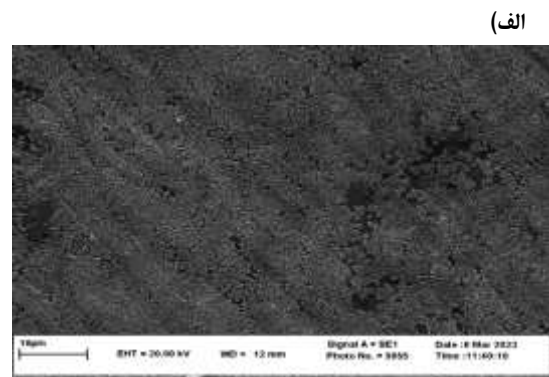
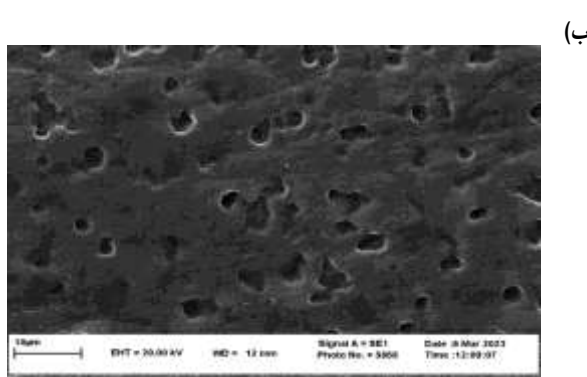
نتایج مربوط به بررسی ریزساختار داربست‌ها با استفاده از SEM، در شکل ۲ نشان داده شده است. بر اساس تصاویر، سطح داربست‌ها ناهموار بوده و دارای تخلخل‌هایی می‌باشد که برای رشد سلول‌ها مناسب بودند.

جهت آزمون کشش از دستگاه SANTAM مدل STM-1 (ساخت ایران) استفاده شد که داربست‌ها در ابعاد ۱۰ میلی‌متر × ۵۰ میلی‌متر برش داده شدند. سپس نمونه‌ها در بین فک‌های دستگاه اندازه‌گیری خواص مکانیکی قرار داده شد و میزان کشش داربست‌ها مورد ارزیابی قرار گرفت. آزمون تعیین خواص مکانیکی داربست‌ها، به صورت ۳ تکرار در هر گروه انجام شد.

میزان زنده مانی و فعالیت متابولیکی سلول‌های بنیادی مزانشیمی اندومتر رحم انسان روی داربست‌ها از طریق MTT-ASSAY تعیین شد. سلول‌های بنیادی مزانشیمی اندومتر رحم انسان در مطالعات قبلی استخراج شده بود (۱۸) که از دانشگاه علوم پزشکی تهران، دانشکده فناوری‌های نوین پزشکی تهیه شدند. در ابتدا داربست‌ها به ابعاد ۶ میلی‌متر در ۶ میلی‌متر بریده شدند. بعد از استریل کردن داربست‌ها با الکل و نور ماورابنفش، سلول‌ها (10^3 × ۳ سلول در هر چاهک در داخل پلیت‌های ۹۶ خانه) کاشته شدند. سپس محیط کشت روی داربست‌ها ریخته شد. بعد از ۱، ۳ و ۵ روز، محیط کشت خارج شد و محلول MTT به هر داربست اضافه شد و پلیت در تاریکی در ۳۷ درجه سانتی‌گراد برای ۴ ساعت انکوبه شد. سپس محلول MTT خارج شد و DMSO به پلیت کشت اضافه گردید. در نهایت میزان تشکیل کریستال‌های فورامازان با میکروپلیت ریدر (الایزا) تعیین شد.



شکل ۱- رنگ‌آمیزی هماتوکسیلین-انوزین پرده آمنیون



شکل ۲- بررسی ریز ساختار داربست‌ها به کمک تصاویر SEM

عاملی ذیل در نمودار وجود داشت که نشان دهنده وجود ژلاتین در داربست‌ها بود:

OH (3407-3461 Cm^{-1}), CH (2900-2973 Cm^{-1}), C=O (1652-1704 Cm^{-1}), c=c (1550-1560 Cm^{-1}) و C-O-C (1240-1265 Cm^{-1})

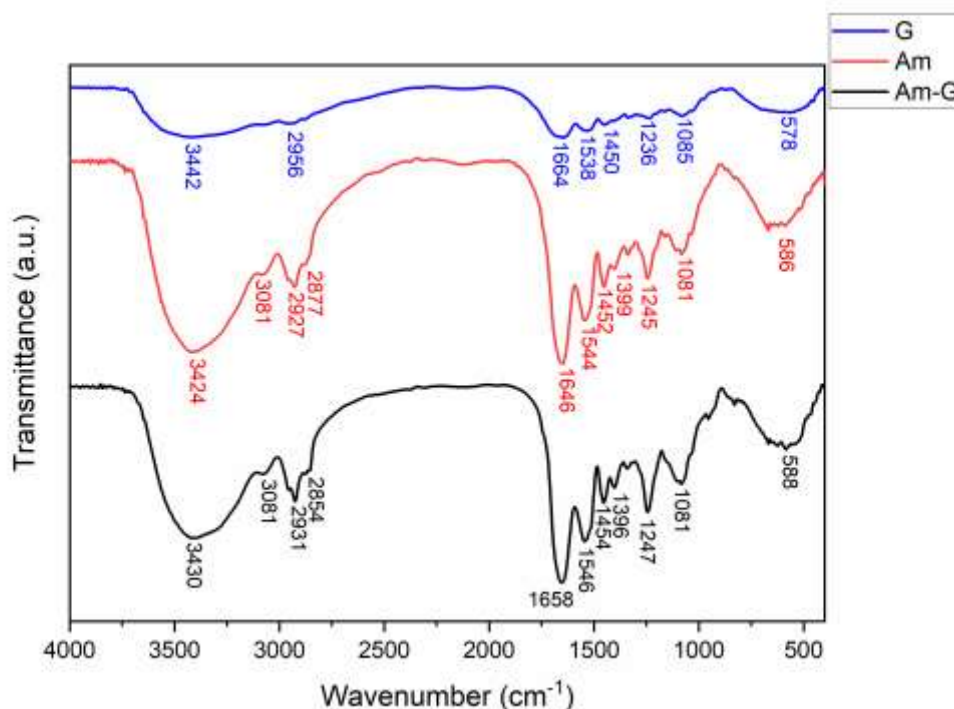
همچنین پیک‌های مربوطه گروه‌های عاملی ذیل مشاهده شدند که نشانگر وجود آمینون دسلولار بود:

-NH (3407-3461 Cm^{-1}), C=O (1652-1704 Cm^{-1}), C=N (1550-1560 Cm^{-1})

در شکل ۲ الف) پرده آمینون سلول زدایی شده، ب) پرده آمینون سلول زدایی شده-ژلاتین. سطح داربست‌ها، ناهموار بوده و دارای تخلخل‌های ریز می‌باشد.

جهت بررسی وجود زیست مواد استفاده شده در داخل داربست‌ها، آزمون FTIR انجام شد. نتایج مربوطه این آزمون در شکل ۳ نشان داده شده است. طیف FTIR در محدوده طول موج ۴۰۰-۴۰۰۰ cm^{-1} ثبت شد.

گروه‌های عاملی موجود در زیست مواد مختلف، پیک‌ها را نشان می‌دهند که نشان دهنده وجود آن زیست ماده می‌باشد. پیک‌های مربوطه گروه‌های



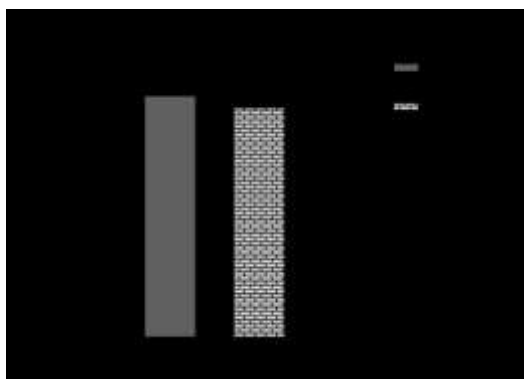
شکل ۳- نمودارهای مربوطه آزمون FTIR در داربست‌های ساخته شده

این پیک‌ها نشان دهنده وجود ژلاتین در داربست‌ها بودند:

OH (3407-3461 Cm^{-1}), CH (2900-2973 Cm^{-1}), C=O (1652-1704 Cm^{-1}), c=c (1550-1560 Cm^{-1}) و C-O-C (1240-1265 Cm^{-1})

و پیک‌های -NH (3407-3461 Cm^{-1}), C=O (1652-1704 Cm^{-1}), C=N (1550-1560 Cm^{-1}) نشان دهنده وجود پرده آمینون دسلولار در داربست‌ها بودند.

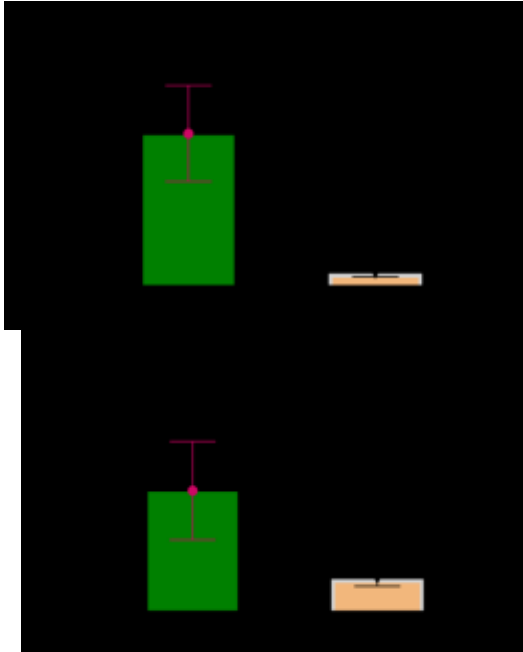
میزان آب دوستی یا آب‌گیری سطح داربست‌ها، با استفاده از آزمون اندازه‌گیری زاویه تماس آب به دست آمد. نتایج مربوطه این آزمون در شکل ۴ نشان داده شده است. بر طبق نتایج، زاویه تماس برای گروه پرده آمینون دسلولار = $42/4$ درجه و گروه پرده آمینون دسلولار-ژلاتین = $40/25$ درجه بود. افزودن ژلاتین به داربست‌ها، باعث کاهش زاویه تماس آب شده است.



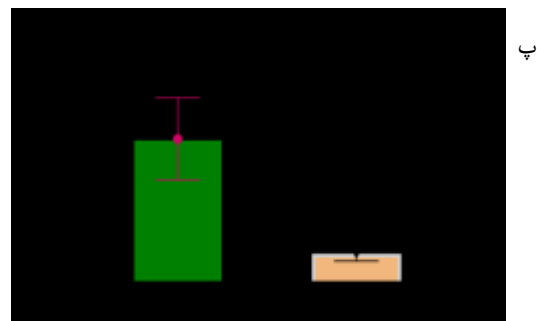
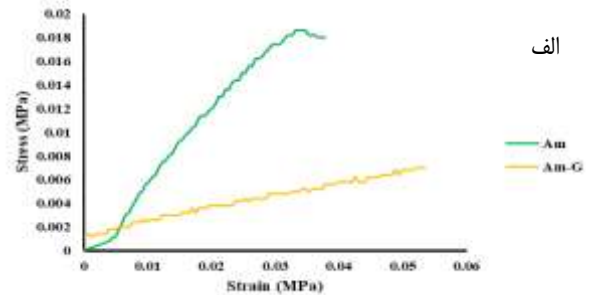
شکل ۴- اندازه‌گیری زاویه تماس آب داربست‌ها

زاویه تماس آب در پرده آمینون سلول زدایی شده $42/4$ درجه و در گروه پرده آمینون سلول زدایی شده-ژلاتین $40/25$ درجه می‌باشد.

در مورد مدول یانگ داربست‌ها، گروه پرده آمینون دسلولار (MPa) 0.732 ± 0.299 نسبت به گروه پرده آمینون دسلولار-ژلاتین (MPa) 0.196 ± 0.044 مدول یانگ بیشتری داشت. در واقع، با افزودن ژلاتین به‌طور معنی‌داری مدول یانگ در مقایسه با گروه پرده آمینون دسلولار-ژلاتین کاهش پیدا کرده است ($P < 0.001$).



خواص مکانیکی داربست‌های ساخته شده توسط آزمون کشش اندازه‌گیری شد. نتایج مربوط به این آزمون در شکل ۵ نشان داده شده است. براساس نتایج حداکثر استرس یا استحکام مکانیکی داربست‌ها به‌صورت ذیل بوده است: گروه پرده آمینون دسلولار (0.196 ± 0.044 MPa) و گروه پرده آمینون دسلولار-ژلاتین (0.732 ± 0.299 MPa).



شکل ۵- اندازه‌گیری خواص مکانیکی داربست‌ها. الف) نمودارهای تنش-کرنش، ب) نمودار حداکثر استرس، پ) نمودار کشش در نقطه شکست و ت) نمودار مدول یانگ برای داربست‌ها

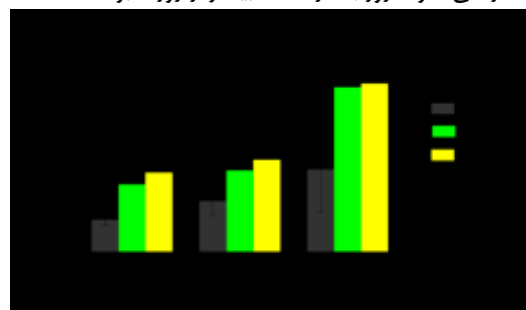
پرده آمینون سلول‌زدایی شده، استرس، کشش و مدول یانگ بالاتری نسبت به گروه پرده آمینون سلول‌زدایی شده-ژلاتین دارد.

با گذشت زمان یعنی در روزهای ۳ و ۵ میزان رشد سلول‌ها افزایش یافته است و میزان رشد سلول‌ها روی داربست‌ها، بالاتر از گروه کنترل (گروه فقط سلول) می‌باشد.

بحث

سلول‌زدایی، یک رویکرد امیدوارکننده در مهندسی بافت جهت ساخت داربست‌ها می‌باشد که مزیت‌های زیادی نسبت به مواد سنتزی دارد و به یکی از حوزه‌های تحقیقاتی مورد توجه در مهندسی بافت تبدیل شده است، زیرا می‌تواند یک سازه سه بعدی با خواص ساختاری، فیزیکی، بیومکانیکی و بیولوژیکی مشابه به بافت طبیعی را ارائه دهد. در واقع بافت‌های سلول‌زدایی شده بیشتر شبیه به بافت طبیعی بوده و از این رو در مهندسی بافت، مورد توجه هستند (۱۹ و ۲۰). سلول‌زدایی روشی برای حذف اجزای سلولی از اندام‌ها و بافت‌ها برای ایجاد و حفظ یک ریز محیط ماتریکس خارج سلولی است. با توجه به منبع تهیه شده بافت، داربست‌های ماتریکس خارج سلولی سلول‌زدایی شده شامل ماتریکس خارج سلولی سلول‌زدایی شده اتوگرفت، آلوگرفت و زئوگرفت هستند. از آنجایی که داربست‌های سلول‌زدایی شده

جهت بررسی زیست‌سازگاری داربست‌های ساخته شده، آزمون MTT انجام شد. سلول‌های بنیادی مزانشیمی اندومتر رحم روی داربست‌های استریل کشت داده شدند. سپس آزمون MTT انجام شد. نتایج مربوط به این آزمون در شکل ۶ نشان داده شده است. طبق نتایج به‌دست آمده، همه داربست‌ها زیست‌سازگار بودند و سمیت نداشتند. میزان رشد سلول‌های بنیادی مزانشیمی روی داربست‌ها بیشتر از گروه کنترل بود. همچنین میزان رشد سلول‌ها در طی ۳ و ۵ روز بعد از کشت بیشتر از روز ۱ بود.



شکل ۶- نتایج مربوط به آزمون MTT طی روزهای ۱، ۳ و ۵ روز بعد از کشت سلول‌های بنیادی مزانشیمی اندومتر رحم روی داربست‌ها

جهت ارزیابی میزان آب دوستی و آب‌گریزی داربست‌های ساخته شده، آزمون زاویه تماس انجام شد. بر طبق نتایج همه داربست‌ها آب دوست بودند. گروه پرده آمینون-ژلاتین نسبت به گروه پرده آمینون آب دوست‌تر بودند. این می‌تواند به این دلیل باشد که ژلاتین یک پلیمر طبیعی آب دوست است که میزان جذب آب زیادی دارد (۱۷ و ۲۷) که با افزودن آن به پرده آمینون باعث افزایش آبدوستی سطح داربست شده است. از آنجایی که داربست‌هایی که میزان تورم و آب دوستی سطح خوبی داشته باشند می‌توانند بهتر تخریب شوند برای همین منظور در اینکار، میزان تورم داربست‌ها یا میزان جذب آب در داربست‌ها، از طریق آزمون تورم بررسی شد. همه داربست‌ها بعد از ۱۲۰ ساعت، جذب آب داشتند و متورم شده بودند. پرده آمینون دسلولار تورم پایینی نسبت به پرده آمینون دسلولار-ژلاتین داشت. ژلاتین پلیمر آب دوست هست که خاصیت جذب آب بالایی دارد (۱۷ و ۲۸)، با افزودن آن به داربست‌ها در گروه پرده آمینون دسلولار-ژلاتین، جذب آب افزایش یافته است.

داربست‌های ساخته شده استحکام مکانیکی و کششی مناسب داشتند. با افزودن ژلاتین به داربست‌ها، استحکام کششی کاهش پیدا کرده است. ازدیاد طول در نقطه شکست یا کشش در گروه پرده آمینون دسلولار-ژلاتین در مقایسه با گروه پرده آمینون دسلولار، کاهش قابل ملاحظه‌ای داشت ($P < 0.001$). در واقع با افزودن ژلاتین به داربست‌ها، کشش داربست‌ها به‌طور قابل ملاحظه‌ای کاهش پیدا کرده است. همچنین با افزودن ژلاتین به داربست‌ها (در گروه پرده آمینون دسلولار-ژلاتین)، مدول یانگ به‌طور معنی‌داری کاهش پیدا کرده است ($P < 0.001$).

میزان تکثیر سلول‌ها با آزمون MTT مورد بررسی قرار گرفت. سلول‌های بنیادی مزانشیمی استخراج شده از اندومتر رحم روی داربست‌ها کشت داده شدند و سپس آزمون MTT انجام شد. بر اساس نتایج آزمون، همه داربست‌ها زیست سازگار بودند. میزان رشد سلول‌های بنیادی مزانشیمی روی پرده آمینون سلول‌زدایی شده و پرده آمینون سلول‌زدایی شده-ژلاتین به‌طور قابل ملاحظه‌ای بیشتر از گروه کنترل یا فقط سلول‌ها بود. این افزایش رشد قابل ملاحظه می‌تواند به دلیل وجود پرده آمینون دسلولار شده و ژلاتین باشد. پرده آمینون حاوی فاکتورهای رشد زیادی می‌باشد که باعث افزایش رشد سلول‌ها می‌گردد. از این رو پرده آمینون با وجود این فاکتورهای رشد بستر مناسبی را برای رشد سلول‌ها فراهم می‌کند (۳۹). ماتریکس خارج سلولی یک ریزمحیط سازمان‌یافته خاص برای میتوز و مورفوز سلولی را فراهم می‌کند (۲۷). داربست‌های سلول‌زدایی شده به دلیل شباهت قابل توجهی که با بافت‌های اصلی دارند، حامل‌های امیدوارکننده‌ای برای سلول‌های بنیادی در مهندسی بافت هستند (۳۰). مثلاً در مطالعات قبلی، از کبد موش سلول‌زدایی شده، به‌عنوان داربست برای هدایت تمایز سلول‌های بنیادی به سلول‌های کبدی استفاده شدند (۳۱). همچنین رشد سلول‌ها در مطالعه مان می‌تواند به دلیل وجود ژلاتین باشد، همان‌طور که اشاره شد، ژلاتین حاوی

اتوگرفت با محدودیت‌های بافتی و عوارض جراحی مواجه هستند، اکثر داربست‌های سلول‌زدایی شده، از بافت‌های اهداکننده آلوژن یا زونژن می‌باشند (۲۱ و ۲۲).

پرده آمینون انسان دارای ویژگی‌های خاص و منحصر به فردی می‌باشد. از جمله اینکه ایمنی‌زایی کم دارد، خواص ضد میکروبی و ضد التهابی دارد و باعث جلوگیری از تشکیل زخم می‌شود. همچنین حاوی فاکتورهای رشد زیادی هست و با آزادسازی این فاکتورهای رشد مختلف، تکثیر سلولی را تقویت می‌کند. علاوه بر این‌ها، پرده آمینون، سایتوکاین‌ها و پروتئین‌های ماتریکس خارج سلولی مختلف را سنتز و ترشح می‌کند. غشای آمینون به دلیل شباهت به ساختار ماتریکس خارج سلولی طبیعی و زیست سازگاری عالی، توجه زیادی را در تحقیقات به خود جلب کرده است (۲۳ و ۲۴). ژلاتین، یک پلیمر زیست تخریب‌پذیر و زیست سازگار است که از داناتوره شدن حرارتی و شیمیایی کلژن به دست می‌آید. ژلاتین دارای توالی‌های اسید آمینه آرژینیل-گلیسیل-اسپارتیک اسید (RGD) است که این توالی چسبندگی، تکثیر و مهاجرت سلول را افزایش می‌دهد (۲۷-۲۵).

در این مطالعه پرده آمینون انسان دسلولار شد. غشاهای آمینون، بافت‌هایی هستند که جنین‌ها را در طول زایمان تغذیه و محافظت می‌کنند. اما محدودیت اصلی در استفاده از غشاهای آمینون، ضخامت محدود این بافت است، که بسیار نازک است. زیرا اکثر بافت‌ها به یک ماتریکس سه بعدی برای بازسازی نیاز دارند که ضخامت بیشتر داشته باشد. از این رو در این مطالعه برای رفع این محدودیت، با استفاده از پرده آمینون سلول‌زدایی شده و پلیمر ژلاتین داربست‌هایی ساخته شدند که ضخیم‌تر از پرده آمینون دسلولار بودند.

دسلولار کردن یک روش رایج برای به دست آوردن داربست‌ها است که روش‌های سلول‌زدایی مختلف از قبیل فیزیکی، مکانیکی و شیمیایی به تنهایی یا ترکیبی از این روش‌ها مورد استفاده قرار می‌گیرد. استفاده از روش ترکیبی نتایج بهتری دارد. از این رو، در این مطالعه پرده آمینون با روش‌های فیزیکی و شیمیایی سلول‌زدایی شدند. نتایج نشان داد که سلول‌های موجود در پرده آمینون به‌طور کامل حذف شده‌اند و ماتریکس خارج سلولی باقی مانده است (شکل ۱). مورفولوژی داربست‌ها که با تصاویر SEM بررسی گردید (شکل ۲) نشان داد که سطح داربست‌ها ناهموار بوده و دارای تخلخل می‌باشد. داشتن سطح ناهموار برای رشد سلول‌ها مناسب هستند. زیرا سلول‌ها تمایل دارند به سطوح ناهموار بیشتر بچسبند در حالی که سطوح صاف، بستر مناسبی برای چسبندگی سلول‌ها ایجاد نمی‌کند.

بر اساس نتایج FTIR، وجود زیست مواد استفاده شده برای ساخت داربست‌ها تأیید شد. با این آزمون، در طول موج‌های خاص، پیک‌هایی ظاهر شدند که مربوط به گروه‌های عاملی موجود در داخل زیست مواد بودند (شکل ۳). بنابراین وجود پرده آمینون و ژلاتین تأیید شد.

References

- Karp JM, Langer R. Development and therapeutic applications of advanced biomaterials. *COBIOT* 2007;18:454-9. doi: 10.1016/j.cobio.2007.09.008
- Abpeikar Z, Milan PB, Moradi L, Anjomshoa M, Asadpour S. Influence of pore sizes in 3D-scaffolds on mechanical properties of scaffolds and survival, distribution, and proliferation of human chondrocytes. *Mech. Adv. Mater. Struct* 2022;29:4911-22. doi: 10.1080/15376494.2021.1943077
- Chan B, Leong K. Scaffolding in tissue engineering: general approaches and tissue-specific considerations. *Eur Spine J* 2008;17:467-79. doi: 10.1007/s00586-008-0745-3
- Nadi A, Moradi L, Ai J, Asadpour S. Stem cells and hydrogels for liver tissue engineering: synergistic cure for liver regeneration. *Stem Cell Rev Rep* 2020;16:1092-104. doi: 10.1007/s12015-020-10060-3
- Hersel U, Dahmen C, Kessler H. RGD modified polymers: biomaterials for stimulated cell adhesion and beyond. *Biomater* 2003;24:4385-415. doi: 10.1016/S0142-9612(03)00343-0
- Chew SY, Mi R, Hoke A, Leong KW. The effect of the alignment of electrospun fibrous scaffolds on Schwann cell maturation. *Biomater* 2008;29:653-61. doi: 10.1016/j.biomaterials.2007.10.025
- Schönherr E, Hausser H-J. Extracellular matrix and cytokines: a functional unit. *Dev Immunol* 2000;7:89-101. doi: 10.1155/2000/31748
- Spector M. Biomaterials-based tissue engineering and regenerative medicine solutions to musculoskeletal problems. *Swiss Med Wkly* 2007;137:157S-65S. doi: 10.4414/smw.2006.11310
- Nadi A, Khodaei M, Javdani M, Mirzaei SA, Soleimannejad M, Tayebi L, et al. Fabrication of functional and nano-biocomposite scaffolds using strontium-doped bredigite nanoparticles/polycaprolactone/poly lactic acid via 3D printing for bone regeneration. *Int J Biol Macromol* 2022;219:1319-36. doi: 10.1016/j.ijbiomac.2022.08.136
- Kasravi M, Ahmadi A, Babajani A, Mazloomnejad R, Hatamnejad MR, Shariatzadeh S, et al. Immunogenicity of decellularized extracellular matrix scaffolds: a bottleneck in tissue engineering and regenerative medicine. *Biomater. Res* 2023;27:1-24. doi: 10.1186/s40824-023-00348-z
- Zhang X, Chen X, Hong H, Hu R, Liu J, Liu C. Decellularized extracellular matrix scaffolds: Recent trends and emerging strategies in tissue engineering. *Bioact Mater* 2022;10:15-31.
- McInnes AD, Moser MA, Chen X. Preparation and use of decellularized extracellular matrix for tissue engineering. *J Funct Biomater* 2022;13:240. doi: 10.1016/j.bioactmat.2021.09.014
- Chai Z, Li Z. Applications of Decellularized Extracellular Matrix for Regenerative Medicine. *Bioeng Transl Med* 2021;651-89. doi: 10.1002/btm2.10110
- Kim YS, Majid M, Melchiorri AJ, Mikos AG. Applications of decellularized extracellular matrix in bone and cartilage tissue engineering. *Bioeng Transl Med* 2019;4:83-95. doi: 10.1002/btm2.10110
- Ashouri S, Hosseini SA, Hoseini SJ, Tara F, Ebrahimzadeh-Bideskan A, Webster TJ, et al. Decellularization of human amniotic membrane using detergent-free methods: Possibilities in tissue engineering. *Tissue and Cell* 2022;76:101818. doi: 10.1016/j.tice.2022.101818
- Abpeikar Z, Moradi L, Javdani M, Kargozar S, Soleimannejad M, Hasanzadeh E, et al. Characterization of macroporous polycaprolactone/silk fibroin/gelatin/ascorbic acid composite scaffolds and in vivo results in a rabbit model for meniscus cartilage repair. *Cartilage* 2021;13:1583S-601S.
- Zhao X, Lang Q, Yildirimer L, Lin ZY, Cui W, Annabi N, et al. Photocrosslinkable gelatin hydrogel for epidermal tissue engineering. *Adv Health Mater* 2016;5:108-18. doi: 10.1177/19476035211035418
- Mobarakeh ZT, Ai J, Yazdani F, Sorkhabadi SMR, Ghanbari Z, Javidan AN, et al. Human endometrial stem cells as a new source for programming to neural cells. *Cell Biol Int Rep* 2012;19:7-14. doi: 10.1042/CLB20110009

نواحی برای اتصال به سلول به اسم پپتیدهای RGD می‌باشد که باعث افزایش چسبندگی سلول‌ها به داربست و در نتیجه افزایش رشد سلول‌ها می‌شود.

در مطالعه حاضر، پرده آمینون انسانی سلول‌زدایی شد. سلول‌زدایی پرده آمینون با استفاده از رنگ‌آمیزی هماتوکسیلین-ئوزین، تأیید شد. سپس داربست‌ها با استفاده از پرده آمینون سلول‌زدایی شده و پلیمر طبیعی ژلاتین ساخته شدند. داربست‌های ساخته شده آب دوست بودند و بعد از غوطه‌ور کردن در فسفات بافر سالین، جذب آب یا تورم داشتند. خواص مکانیکی داربست‌ها مناسب بود. نتایج آزمون زیست‌سازگاری نشان داد که داربست‌ها زیست‌سازگار بودند و میزان تکثیر سلول‌های بنیادی مزانشیمی مشتق از اندومتر رحم روی داربست‌ها به ویژه داربست‌های پرده آمینون دسلولار-ژلاتین بیشتر از گروه کنترل بود. از این رو، داربست‌های آمینون دسلولار-ژلاتین پتانسیل خوبی برای استفاده در کارهای مهندسی بافت دارند.

تشکر و قدردانی

نویسندگان از دانشگاه علوم پزشکی شهرکرد جهت حمایت مالی طرح پایان‌نامه به شماره ۳۹۸۲ کمال تشکر را دارند.

ملاحظات اخلاقی

کمیته اخلاق دانشگاه علوم پزشکی شهرکرد (SKUMS) این مطالعه را تأیید کرد (IR.SKUMS.REC.1399.203).

تعارض منافع

نویسندگان اعلام می‌کنند که هیچ تضاد منافع مالی یا شخصی ندارند که بر کار گزارش شده در این مقاله تأثیر بگذارد.

مشارکت نویسندگان

شیوا اسدیپور: ایده‌پرداز، نظارت بر طرح، تأمین مواد، نوشتن مقاله، ویرایش مقاله. الهام زنده دل: انجام آزمایشات، جمع‌آوری داده‌ها، آنالیز آماری، مشارکت در نوشتن مقاله. مریم انجم شعاع: جمع‌آوری داده‌ها، آنالیز آماری، مشارکت در نوشتن مقاله. محراب عسکریانپور: انجام آزمایشات، جمع‌آوری داده‌ها، آنالیز آماری، مشارکت در نوشتن مقاله. اکرم کرمی دهکردی: تهیه نمونه، جمع‌آوری داده‌ها، مشارکت در نوشتن مقاله.

حمایت مالی

این مطالعه، توسط دانشگاه علوم پزشکی شهرکرد در طرح به شماره ۳۹۸۲ مصوب شده و حمایت مالی دریافت کرده است.

کد اخلاق

کمیته اخلاق دانشگاه علوم پزشکی شهرکرد (SKUMS) این مطالعه را تأیید کرده است (IR.SKUMS.MED.REC.1401.007).

19. Amini N, Hivechi A, Asadpour S, Ebrahimzadeh K, Kargozar S, Gholipourmalekabadi M, et al. Fabrication and characterization of bilayer scaffolds made of decellularized dermis/nanofibrous collagen for healing of full-thickness wounds. *Drug Deliv Transl Res* 2023;1-14. doi: [10.1007/s13346-023-01292-0](https://doi.org/10.1007/s13346-023-01292-0)
20. Yüksel S, Aşık MD, Aydın HM, Tönük E, Aydın EY, Bozkurt M. Fabrication of a multi-layered decellularized amniotic membranes as tissue engineering constructs. *Tissue and Cell* 2022;74:101693. doi: [10.1016/j.tice.2021.101693](https://doi.org/10.1016/j.tice.2021.101693)
21. Rana D, Zreiqat H, Benkirane-Jessel N, Ramakrishna S, Ramalingam M. Development of decellularized scaffolds for stem cell-driven tissue engineering. *J Tissue Eng Regen Med* 2017;11:942-65. doi: [10.1016/j.jtice.2021.101693](https://doi.org/10.1016/j.jtice.2021.101693)
22. Rashtbar M, Hadjati J, Ai J, Shirian S, Jahanzad I, Azami M, et al. Critical-sized full-thickness skin defect regeneration using ovine small intestinal submucosa with or without mesenchymal stem cells in rat model. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater* 2018;106:2177-90. doi: [10.1002/jbm.b.34019](https://doi.org/10.1002/jbm.b.34019)
23. Gholipourmalekabadi M, Mozafari M, Salehi M, Seifalian A, Bandehpour M, Ghanbarian H, et al. Development of a cost-effective and simple protocol for decellularization and preservation of human amniotic membrane as a soft tissue replacement and delivery system for bone marrow stromal cells. *Adv Healthc Mater* 2015;4:918-26. doi: [10.1002/adhm.201400704](https://doi.org/10.1002/adhm.201400704)
24. Gholipourmalekabadi M, Sameni M, Radenkovic D, Mozafari M, Mossahebi-Mohammadi M, Seifalian A. Decellularized human amniotic membrane: how viable is it as a delivery system for human adipose tissue-derived stromal cells? *Cell Prolif* 2016;49:115-21. doi: [10.1111/cpr.12240](https://doi.org/10.1111/cpr.12240)
25. Abpeikar Z, Javdani M, Mirzaei SA, Alizadeh A, Moradi L, Soleimannejad M, et al. Macroporous scaffold surface modified with biological macromolecules and piroxicam-loaded gelatin nanofibers toward meniscus cartilage repair. *Int. J. Biol. Macromol* 2021;183:1327-45. doi: [10.1016/j.ijbiomac.2021.04.151](https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2021.04.151)
26. Purohit SD, Bhaskar R, Singh H, Yadav I, Gupta MK, Mishra NC. Development of a nanocomposite scaffold of gelatin–alginate–graphene oxide for bone tissue engineering. *Int. J. Biol. Macromol* 2019;133:592-602. doi: [10.1016/j.ijbiomac.2019.04.113](https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2019.04.113)
27. Sarvari R, Agbolaghi S, Beygi-Khosrowshahi Y, Massoumi B, Bahadori A. 3D scaffold designing based on conductive/degradable tetrapolymeric nanofibers of PHEMA-co-PNIPAAm-co-PCL/PANI for bone tissue engineering. *JUFNGSM* 2018;51:101-14. doi: [10.22059/JUFNGSM.2018.02.02](https://doi.org/10.22059/JUFNGSM.2018.02.02)
28. Abpeikar Z, Javdani M, Alizadeh A, Khosravian P, Tayebi L, Asadpour S. Development of meniscus cartilage using polycaprolactone and decellularized meniscus surface modified by gelatin, hyaluronic acid biomacromolecules: A rabbit model. *Int. J. Biol. Macromol* 2022;213:498-515. doi: [10.1016/j.ijbiomac.2022.05.140](https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2022.05.140)
29. Dadkhah Tehrani F, Firouzeh A, Shabani I, Shabani A. A review on modifications of amniotic membrane for biomedical applications. *Front Bioeng Biotechnol* 2021;8:606982. doi: [10.3389/fbioe.2020.606982](https://doi.org/10.3389/fbioe.2020.606982)
30. Hoshiba T, Chen G, Endo C, Maruyama H, Wakui M, Nemoto E, et al. Decellularized extracellular matrix as an in vitro model to study the comprehensive roles of the ECM in stem cell differentiation. *Stem Cells Int* 2016;2016. doi: [10.1155/2016/6397820](https://doi.org/10.1155/2016/6397820)
31. Navarro-Tableros V, Herrera Sanchez MB, Figliolini F, Romagnoli R, Tetta C, Camussi G. Recellularization of rat liver scaffolds by human liver stem cells. *Tissue Eng Part A* 2015;21:1929-39. doi: [10.1089/ten.TEA.2014.0573](https://doi.org/10.1089/ten.TEA.2014.0573)



Fabrication of a Decellularized Amniotic Membrane-Gelatin Scaffold and its Evaluation for Using in Tissue Engineering Applications

Shiva Asadpour (Ph.D.)^{1,2*}, Elham Zendedel (Ph.D. Student)², Maryam Anjomshoa (Ph.D.)³, Mehrab Askariyanpoor (M.D.)³, Akram KaramiDehkordi (M.Sc.)⁴

1- Dept. of Tissue Engineering and Applied Cell Sciences, School of Advanced Technologies in Medicine, Shahrekord University of Medical Sciences, Shahrekord, Iran.

2- Cellular and Molecular Research Center, Basic Health Sciences Institute, Shahrekord University of Medical Sciences, Shahrekord, Iran.

3- Dept. of Anatomical Sciences, Faculty of Medicine, Shahrekord University of Medical Sciences, Shahrekord, Iran.

4- Dept. of Midwifery, School of Nursing and Midwifery Shahrekord University of Medical Sciences, Shahrekord, Iran.

Received: 21 August 2023, Accepted: 1 January 2024

Abstract:

Introduction: Decellularization techniques are widely used in the fabrication of suitable scaffolds for the regeneration of damaged tissues, addressing the issue of insufficient donor tissues. The amnion membrane has qualities such as availability, affordability, low immunogenicity, and anti-inflammatory and regenerative effects. Gelatin is a natural and biocompatible polymer with favorable interactions for cell adhesion and growth. Thus, this study focused on creating and assessing gelatin-decellularized amniotic membrane scaffolds for potential use in tissue engineering.

Methods: Initially, the amniotic membrane underwent decellularization, and the extent of this process was assessed using hematoxylin-eosin staining. Following the fabrication of the scaffolds, their physical, chemical, and mechanical properties, were characterized. Additionally, mesenchymal stem cells derived from the uterine endometrium were cultured on the scaffolds, and their biocompatibility was assessed through an MTT assay.

Results: The findings indicated successful decellularization of the amnion tissue. Scanning electron microscope (SEM) images revealed a rough surface on the scaffolds. While all scaffolds exhibited hydrophilic properties, those made of the gelatin-decellularized amniotic membrane were particularly hydrophilic due to the presence of the hydrophilic gelatin polymer in their structure. The constructed scaffolds demonstrated water absorption and swelling. Additionally, the results of the mechanical properties assessment indicated that the scaffolds possessed adequate strength. In terms of biocompatibility, the proliferation of stem cells derived from the uterine endometrium on the scaffolds surpassed that of the control group (cell only).

Conclusion: The scaffolds fabricated with amino-gelatin curtains show promising potential for use in tissue engineering applications.

Keywords: Amniotic membrane, Decellularization, Gelatin, Tissue engineering.

Conflict of Interest: No

*Corresponding author: Sh. Asadpour, Email: Shiva.asadpour2020@gmail.com

Citation: Asadpour Sh, Zendedel E, Anjomshoa M, Askariyanpoor M, KaramiDehkordi A. Fabrication of a decellularized amniotic membrane-gelatin scaffold and its evaluation for using in tissue engineering applications. Journal of Knowledge & Health in Basic Medical Sciences 2024;18(4):49-58.

