

حذف سلول از استخوان اسفنجی گاو جهت استفاده در جایگزین استخوان:**مقایسه دو روش شیمیایی با استفاده از سدیم دودسیل سولفات (SDS) و TritonX-100****چکیده**

زمینه و هدف: حفظ ساختار بیولوژیکی ذاتی اولیه استخوان اسفنجی می‌تواند آن را برای یک داربست مناسب برای مهندسی بافت استخوان موفق مهیا سازد. علاوه بر این، حذف سلول‌های متعلق به بستر آن برای افزایش زیست سازگاری و کاهش پاسخ‌های ایمنولوژیکی حیاتی است.

روش‌ها: در این مطالعه از روش‌های شیمیایی برای سلول‌زدایی داربست‌های سه بعدی تهیه شده از بافت اسفنجی استخوان لگن گوساله استفاده شد. برای این منظور، نمونه‌های استخوانی که از استخوان لگن گوساله بریده شده بودند چربی‌زدایی شدند و سپس سلول‌های آنها با استفاده از روش شیمیایی و کاربرد سدیم دودسیل سولفات / SDS sodium dodecyl sulfate و TritonX-100 با غلظت‌های مختلف حذف شدند. نمونه‌ها با رنگ‌آمیزی هماتوکسیلین و اوژین، رنگ‌آمیزی تری کروم و میکروسکوپ نوری مشخصه‌یابی شدند. در پایان، به منظور اطمینان از عدم وجود مواد سمی در داربست، آزمون سمیت سلولی انجام شد.

یافته‌ها: نتایج نشان می‌دهد که نمونه‌های سلول‌زدایی شده با TritonX-100 با غلظت ۲٪ و ترکیب محلول TritonX-100 با غلظت ۳٪ و SDS با غلظت ۲٪ (T3S4)، می‌توانند جایگزین بافت استخوانی اسفنجی آسیب دیده شوند. نتایج نشان داد که بافت استخوانی اسفنجی لگن گوساله، به عنوان یک زونگرافت که تحت سلول‌زدایی با محلول‌های شیمیایی SDS و TritonX-100 قرار گرفته است، می‌تواند یک داربست مناسب برای مهندسی بافت استخوان ایجاد کند. بافت طبیعی استخوان با حفظ الیاف کلاژن و وجود تخلخل در ساختار آن می‌تواند محیط مناسبی برای بازسازی بافت فراهم کند.

نتیجه‌گیری: نتایج نشان می‌دهد که بافت استخوانی سلول‌زدایی شده با ترکیب T3S4 را می‌توان به عنوان یک داربست طبیعی مناسب جهت استفاده در مهندسی بافت استخوان و پزشکی ترمیمی، مورد ارزیابی‌های تکمیلی قرار داد.

واژگان کلیدی: بافت استخوانی، زونگرافت، داربست بافتی، جایگزین‌های استخوان، مهندسی سلولی

دریافت مقاله: ۸ ماه قبل از چاپ؛ مراحل اصلاح و بازنگری: ۳ بار؛ پذیرش مقاله: ۱ ماه قبل از چاپ

* ناهید حسن‌زاده نعمتی، **زهرا انصاری نژاد، **ستاره نیک‌ضمیر

مقدمه

* استادیار، دکترای تخصصی، گروه مهندسی پزشکی، دانشکده علوم و فناوری‌های پزشکی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد علوم و تحقیقات، تهران، ایران.

** کارشناس ارشد، گروه مهندسی پزشکی، دانشکده علوم و فناوری‌های پزشکی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد علوم و تحقیقات، تهران، ایران.

ترمیم عیوب استخوانی هر ساله هزینه زیادی را در دنیا برای درمان به خود اختصاص می‌دهد^(۱). پیوند استخوان یکی از رایج‌ترین روش‌های ترمیمی است. پیوند اتوگرافت به‌رغم مشکلاتی مانند محدودیت منابع، درد مزمن و افزایش زمان جراحی، مناسب‌ترین جایگزین بافتی است^(۲،۳) و به دلایل زیادی همچنان روش استاندارد طلایی برای پر کردن استخوان است^(۴). با این حال، این روش دارای معایبی مانند: ایجاد عوارض در محل تحویل دهنده بافت، دشواری در جراحی و درد مداوم پس از عمل است^(۵). آلوگرافت گزینه دیگری است که در آن نیز مشکلاتی نظیر تحریک واکنش دفاعی بدن و انتقال میکروارگانیسم از جسد به دریافت کننده پیوند وجود دارد^(۶). تشابه فیزیولوژیکی و بیومکانیکی بافت استخوان مدل‌های حیوانی بزرگ مانند سگ، گوسفند و گاو، به استخوان انسان، زمینه استفاده از آنها را برای پیوندهای زونگرافت مساعد کرده است^(۷،۸). در این میان، استخوان اسفنجی گاو با دارا بودن خواص نزدیک به استخوان انسان، یک بیومتریال مناسب برای جراحی‌های ارتوپدی محسوب می‌شود^(۹). بیومتریال اخیر می‌تواند به عنوان داربست، بستری مساعد برای کشت سلول خود شخص باشد و محدودیت‌های مربوط به پیوندهای استخوان را نداشته باشد. در سال‌های اخیر، تحقیقات زیادی بر روی نگهداری ECM داربست بیولوژیکی انجام گرفته است^(۱۰).

برای به دست آوردن داربست‌های طبیعی از بافت‌های بدن موجودات زنده، فرآیند سلول‌زدایی از بافت یا ارگان مورد نظر ضروری است که طی آن تمامی سلول‌های یک اندام یا بافت از آن جدا و فقط ماتریکس خارج سلولی باقی می‌ماند^(۱۱،۱۲). به این ترتیب، ECM به عنوان محیطی عمل می‌کند که در آن سلول‌های جدید اتصال یافته، ارتباط برقرار کرده و برهم‌کنش می‌کنند، در نتیجه، پویایی و رفتار سلول را تنظیم و به حفظ فنوتیپ‌ها و عملکردهای سلولی خاص بافت کمک می‌کند. از خواص ECM در مهندسی بافت و تحقیقات پزشکی ترمیمی با هدف بازگرداندن عملکرد بافت‌های آسیب دیده یا ناکارآمد کاملاً استفاده شده است^(۱۳). سلول‌زدایی بافت به عنوان روشی رایج برای به

نویسنده مسئول:

ناهید حسن‌زاده نعمتی

Email:
nahid.hasanzadeh@

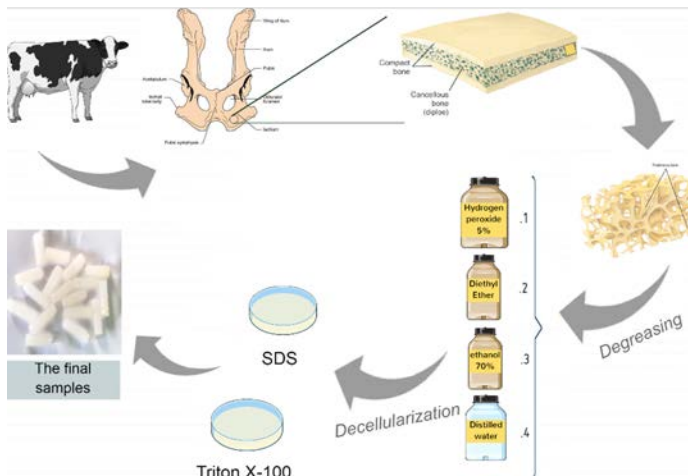
گزینه مناسب‌تری برای سلول‌زدایی بافت دیسک مفصل گیجگاهی است. در پژوهش حاضر بافت اسفنجی استخوان لگن گوساله با استفاده از روش‌های شیمیایی یونی SDS و غیریونی TritonX-100 و ترکیب این دو روش، سلول‌زدایی شد. این بافت سلول‌زدایی شده می‌تواند به عنوان بستر مطلوبی برای کشت سلولی در مهندسی بافت استخوان مورد استفاده قرار گیرد.

مواد و روش‌ها

۱. **چربی‌زدایی:** نمونه‌های استخوانی استوانه‌ای شکل، با قطر ۵ میلی‌متر و ارتفاع ۱۰ میلی‌متر بریده شده از بخش اسفنجی استخوان لگن گوساله با آب مقطر شستشو داده شدند و سپس به مدت ۴۵ دقیقه درون محلول آب اکسیژنه ۵ درصد غوطه‌ور شدند. در مرحله بعد، نمونه‌ها در محلول دی‌اتیل‌اتر به مدت ۴۸ ساعت قرار داده شدند. پس از آن، نمونه‌ها با الکل ۷۰ درصد به مدت یک ساعت شستشو داده شدند. در پایان مرحله چربی‌زدایی، نمونه‌ها ۵ مرتبه با آب مقطر شستشو داده شدند و تا شروع مرحله سلول‌زدایی، نمونه‌ها به مدت یک ساعت در آب مقطر قرار داده شدند.

۲. **سلول‌زدایی:** نمونه‌های استخوانی چربی‌زدایی شده، به سه دسته تقسیم شدند: در گروه اول، نمونه‌ها در سدیم‌دوسیل‌سولفات با غلظت‌های ۲٪ و ۲/۵٪ و ۳٪ (با نام‌های S2 و S2.5 و S3) به مدت ۱ ساعت، در دمای محیط غوطه‌ور شدند. در گروه دوم، نمونه‌ها در TritonX-100 با غلظت‌های مشابه گروه اول، با نام‌های T2 و T2.5 و T3 به مدت ۸ ساعت در دمای محیط قرار داده شدند. در گروه سوم نیز، نمونه‌ها با هر دو ماده SDS و TritonX-100 به شرح جدول ۱ سلول‌زدایی شدند. تمام ۹ نمونه، بعد از سلول‌زدایی با محلول بافر PBS به مدت نیم ساعت شستشو شدند. برای زدودن SDS از نمونه‌ها از اتانول ۷۵ درصد و سپس برای از بین رفتن اثر الکل از آب مقطر استریل استفاده شد. سپس نمونه‌ها با سرم فیزیولوژی استریل شدند. مراحل آماده‌سازی و سلول‌زدایی نمونه‌ها در شکل ۱ به صورت شماتیک مشخص شده است.

شکل ۱. خلاصه تصویری مراحل آماده‌سازی نمونه‌های سلول‌زدایی شده



دست آوردن ماتریس خارج سلولی سلول‌زدایی شده (DCEM)^۱ در دهه اخیر است^(۱۴). ماتریس معدنی بیومیمیک (biomimetic)، باعث افزایش خاصیت القای استخوانی / Osteoinductivity و قابلیت هدایت استخوانی / Osteoconductivity می‌شود و در نتیجه برای تکثیر و تمایز استئوبلاست‌ها ضروری است^(۱۵). خاصیت هدایت استخوانی این ماتریس‌ها با ارائه چارچوبی برای افزایش سلول و تولید استخوان جدید پس از حذف مواد معدنی، فراهم می‌شود. همچنین خاصیت القای استخوانی این ماتریس‌ها به طور عمده توسط فاکتورهای رشد باقی‌مانده تعیین می‌شود که با روش‌های آماده‌سازی ارتباط مستقیم دارند^(۱۶). در میان پروتکل‌های مختلف مورد استفاده برای دستیابی به سلول‌زدایی بافت، تکنیک‌های شیمیایی و آنزیمی عمدتاً موفقیت‌آمیز هستند. تکنیک‌های فیزیکی می‌توانند به ماتریس آسیب برسانند، در حالی که تکنیک‌های شیمیایی می‌توانند ترکیب شیمیایی ECM را تغییر دهند^(۱۹،۲۱). به همین دلیل، تنظیم پروتکل سلول‌زدایی، در هر رویکرد خاص از اهمیت فوق‌العاده‌ای برخوردار است.

دترجنت‌ها مواد شیمیایی هستند که به منظور حل کردن غشای سلولی و تفکیک ساختار داخلی سلول به کار می‌روند. در بین آنها، TritonX-100 متداول‌ترین دترجنت در فرآیندهای سلول‌زدایی است که فعل و انفعالات چربی با چربی و چربی با پروتئین را هدف قرار می‌دهد، اما فعل و انفعالات پروتئین با پروتئین را دست نخورده باقی می‌گذارد^(۲۱،۲۰). این دترجنت برای ماتریس‌هایی که جزء اصلی آنها پروتئین‌ها هستند، بسیار مفید و کاربردی است، این در حالی است که برای بافت‌هایی که گلیکوز‌آمینوگلیکان‌ها (GAG)^۲ به عنوان جزء اصلی ماتریس محسوب می‌شوند، مناسب نیست. در کنار TritonX-100، سدیم‌دوسیل‌سولفات (SDS) یکی دیگر از شوینده‌های رایج به منظور سلول‌زدایی است که یونی است و فرمول شیمیایی آن C12H25NaO4S می‌باشد. این دترجنت تمایل به تخریب پروتئین‌ها دارد و ممکن است در غلظت‌های بالا سبب تغییر ساختار ماتریس شود^(۲۳،۲۲).

اثر SDS و / یا TritonX-100 برای سلول‌زدایی برخی از بافت‌ها قبلاً مورد مطالعه قرار گرفته است^(۲۷،۲۵). مطالعه Seddon و همکارانش^(۲۸) نشان داد که دترجنت‌های یونی از طریق اختلال در فعل و انفعالات پروتئین-پروتئین، سبب تغییر ماهیت پروتئین‌ها می‌شوند. در مقابل، Schaner و همکارانش^(۲۹) به این نتیجه رسیدند که SDS در میان چندین دترجنت مورد مطالعه، یک گزینه مناسب برای مهندسی بافت عروق است و توسط آن سلول‌زدایی از بافت عروق و استخراج سلول‌ها بدون ایجاد تغییر قابل توجه در مورفولوژی و مقاومت ماتریکس خارج سلولی بافت حاصل می‌شود. همچنین مطالعات Lumpkins و همکارانش^(۳۰) نشان داد که SDS در مقایسه با TritonX-100 و استون

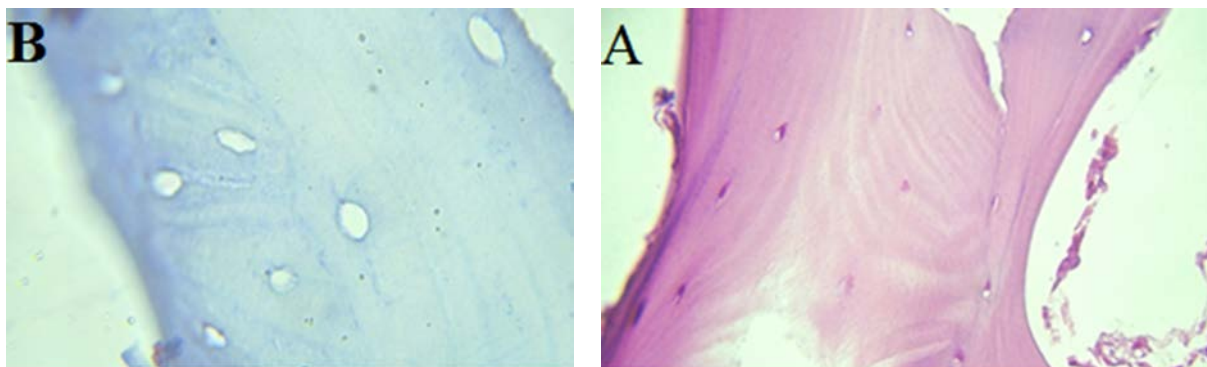
1. Decellularized Extracellular Matrix (DCEM).
2. Glycosaminoglycans.

جدول ۱. نمونه‌های سلول‌زدایی شده با SDS و TritonX-100

Type	مرحله ۱	مرحله ۲	مرحله ۳
S3T2	قرار دادن در SDS* ۰.۳٪ به مدت ۳ ساعت	شستشو و استریل	قرار دادن در Triton X-100 ۰.۲٪ به مدت ۵ ساعت
S2.5T4	قرار دادن در SDS ۰.۲/۵٪ به مدت ۳ ساعت	"	قرار دادن در Triton X-100 ۰.۴٪ به مدت ۳ ساعت
T3S4	قرار دادن در Triton X-100 ۰.۳٪ به مدت ۴ ساعت	"	قرار دادن در SDS ۰.۴٪ به مدت ۲ ساعت

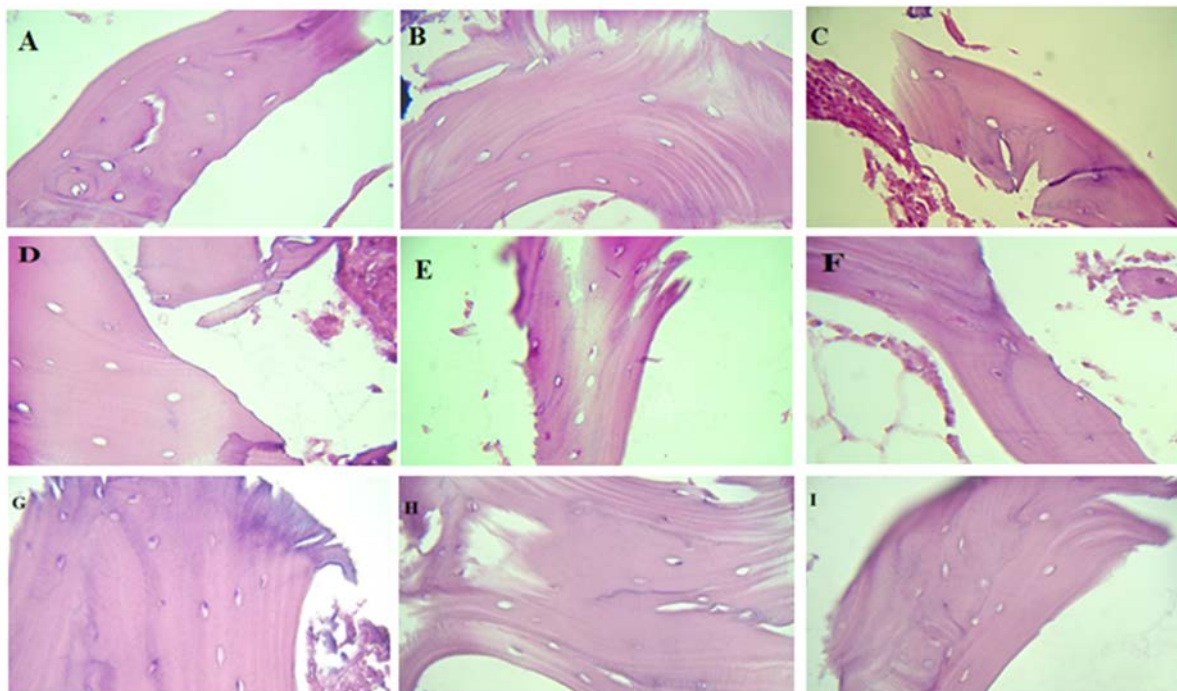
*. SDS: sodium dodecyl sulfate

شکل ۲. تصویر (A) رنگ آمیزی H&E و (B) تری کروم از نمونه استخوانی قبل از فرآیند سلول‌زدایی (با بزرگنمایی 40X)



شکل ۳. تصویر رنگ آمیزی H&E از نمونه‌های

(با بزرگنمایی 40X) S2 (A) ، S2.5 (B) ، S3 (C) ، T2 (D) ، T2.5 (E) ، T3 (F) ، S3T2 (G) ، S2.5T4 (H) و T3S4 (I)



داده است (شکل ۳ - D,E,F). مقایسه روش تلفیقی از دو محلول شیمیایی نیز با توجه به شکل ۳ (G,F,I) نشان داد که در نمونه T3S4 بقایای سلولی وجود نداشته است. اما در غلظت‌های دیگر، سلول‌ها به خوبی حذف نشده‌اند و تراکم هسته‌های سلولی بیشتر به چشم می‌خورد. مطالعات نشان داده است که رشته‌های کلاژن دارای اثرات القایی روی سلول‌ها هستند و تراکم آنها بر رفتارهای سلولی مؤثر است، بنابراین حفظ آنها در داربست حائز اهمیت است. از این رو، ساختار داربست‌های تهیه شده با رنگ‌آمیزی اختصاصی از قبیل تری کروم و میکروسکوپ نوری مورد مطالعه قرار گرفتند. حفظ رشته‌های کلاژن و وجود تخلخل در داربست سلول‌زدایی شده، محیط مناسبی برای جایگزینی سلول‌های بنیادی فراهم می‌کند.

در همین راستا و برای بررسی حضور و حفظ رشته‌های کلاژن نتایج از رنگ‌آمیزی تری کروم نشان داد در تمام گروه‌ها رشته‌های کلاژن به میزان زیادی نسبت به نمونه کنترل حفظ شده است (شکل ۴). نتایج آزمون سمیت نمونه‌های مذکور نیز در شکل ۵ آورده شده است. مشاهدات پس از ۲۴ ساعت، حاکی از آن است که هیچگونه سمیتی در نمونه‌ها وجود ندارد (شکل ۵ - A,B,C,D). با این وجود پس از گذشت ۴۸ ساعت تعداد سلول‌ها در اثر تکثیر نسبت به زمان ۲۴ ساعت افزایش یافته است و تصاویر (شکل ۵ - E,F,G,H) نشان می‌دهد که در هر سه نمونه، در مقایسه با نمونه کنترل (شکل ۵ - E) سمیتی وجود ندارد. اما با افزایش زمان در نمونه S2 اندکی سمیت دیده می‌شود (شکل ۵ - F). مشاهدات کلی بیانگر آن است که از بین ۳ نمونه‌ای که مورد آزمون سمیت قرار گرفته‌اند، نمونه T3S4 گزینه‌ای

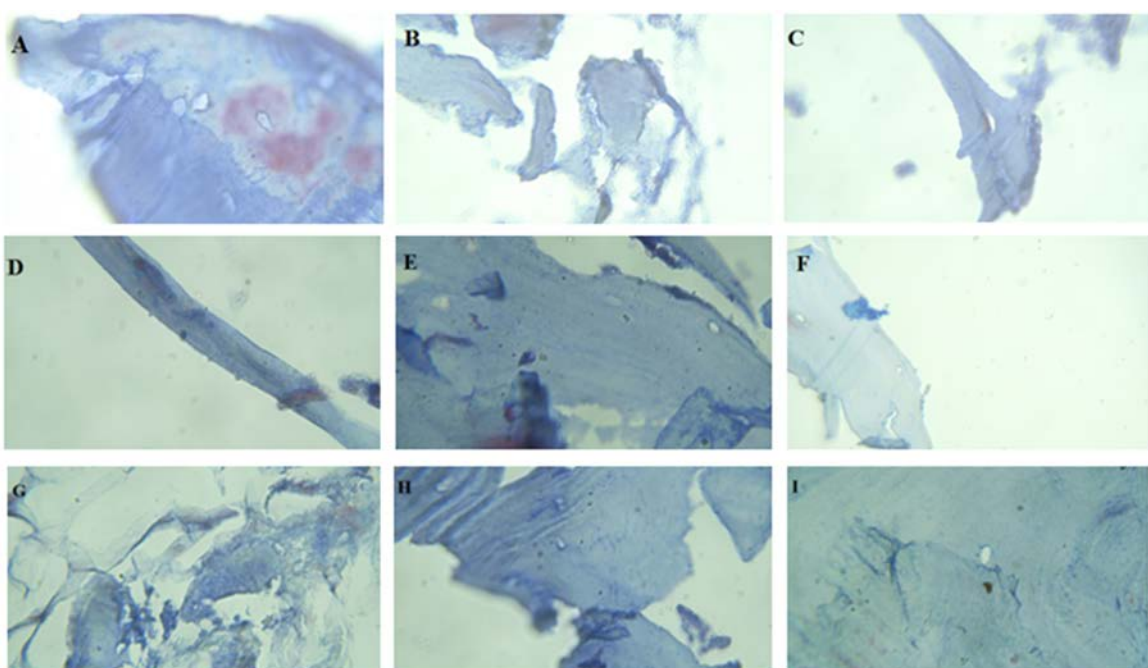
۳. مشخصه‌یابی نمونه‌ها: نمونه‌ها بعد از آماده‌سازی با رنگ‌های هماتوکسیلین - اتوزین (H&E) و تری کروم رنگ‌آمیزی شدند. از رنگ‌آمیزی H&E برای نشان دادن سلول‌زدایی از بافت استخوان اسفنجی استفاده شد و همچنین تری کروم به عنوان رنگ اختصاصی برای تعیین محتوای کلاژن داربست‌های ECM مورد استفاده قرار گرفت. در انتها، به منظور اطمینان از نبود سمیت در نمونه‌ها، آزمون سمیت سلولی انجام گرفت که برای آزمون مذکور نمونه‌ها توسط الکل ۷۰٪ استریل شدند. نمونه‌ها در ظرف ۶ خانه‌ای قرار داده شدند که هر نمونه جداگانه در یک خانه بود و یک خانه بدون نمونه به عنوان کنترل در نظر گرفته شد. بعد از قرار دادن نمونه‌ها، در هر یک از خانه‌ها ۵mL سوسپانسیون سلولی ریخته و در انکوباتور قرار داده شد. بعد از ۲۴ و ۴۸ ساعت انکوباسیون، نمونه‌ها در زیر میکروسکوپ اینورت (Nikon TE-100) مورد ارزیابی کیفی قرار گرفتند.

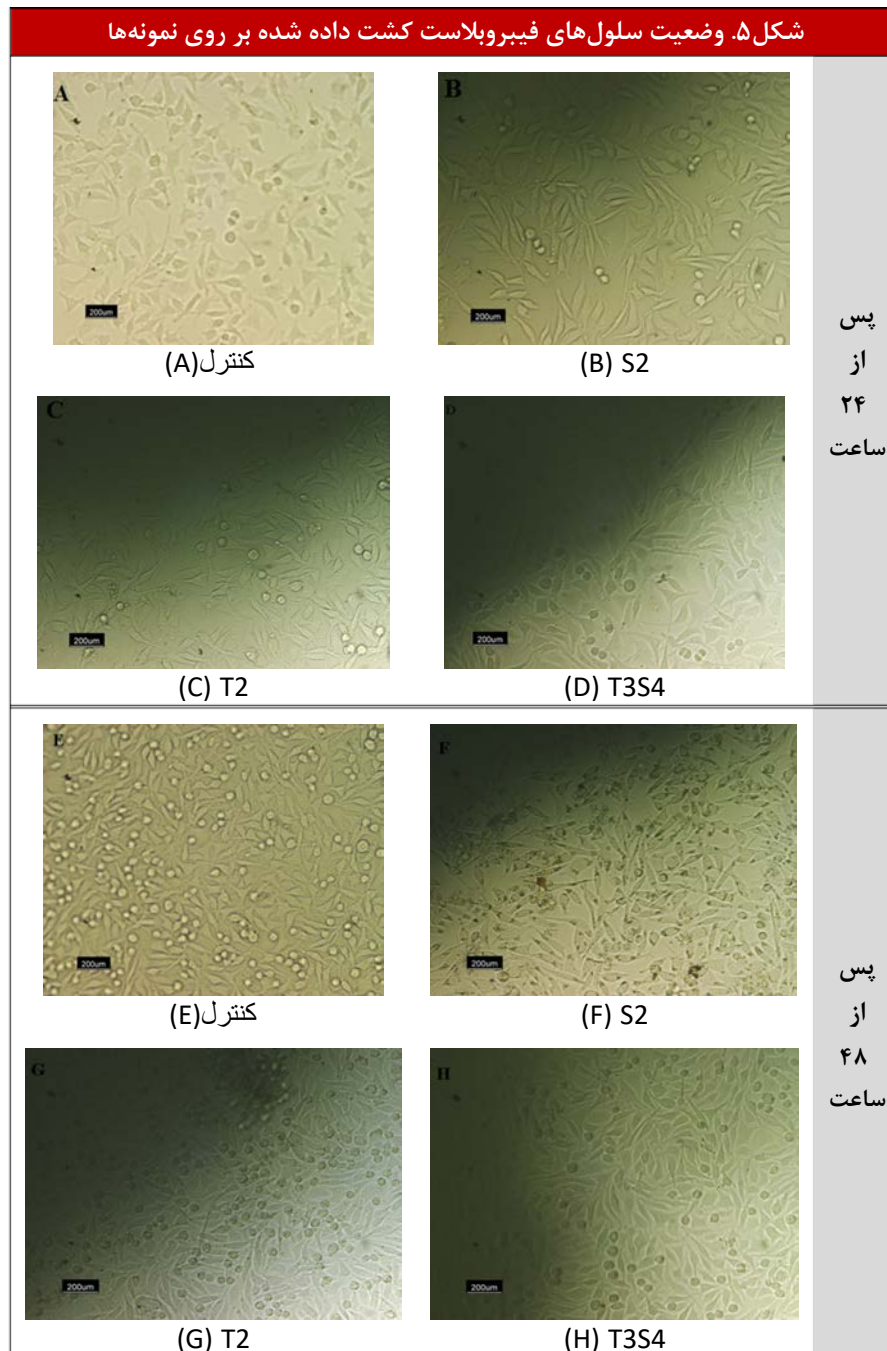
نتایج

نمای هیستوپاتولوژی و تری کروم بافت استخوان اسفنجی لگن گوساله قبل از سلول‌زدایی در شکل ۲ آورده شده است. با توجه به مطالعات بافت‌شناسی بعد از سلول‌زدایی (شکل ۳)، مشخص شد که حذف سلول‌ها در نمونه‌های سلول‌زدایی شده با SDS در غلظت‌های ۲/۵٪ و ۳٪ نسبت به غلظت ۲٪ بیشتر بوده است ولی این پاکسازی و حذف سلولی با تخریب ساختار همراه بود که برای تهیه داربست مطلوب نیست (شکل ۳ - A,B,C). مقایسه نمونه‌های سلول‌زدایی شده با محلول TritonX-100 نیز نشان می‌دهد غلظت ۲٪ بهترین نتیجه را

شکل ۴. تصویر رنگ آمیزی تری کروم از نمونه‌های:

T3S4 (I) ، S2.5T4 (H) ، S3T2 (G) ، T3 (F) ، T2.5 (E) ، T2 (D) ، S3 (C) ، S2.5 (B) ، S2 (A)





استخوان با انواع پیوند توصیه می‌شود^(۳۱،۵). استخوان اسفنجی منحصراً برای پر کردن عیوب به منظور تقویت استخوان استفاده می‌شود. استخوان اسفنجی اتولوگ دارای مزایایی است که از جمله آنها در دسترس بودن و ایمنی برای استفاده بالینی است. با این حال، این روش دارای معایبی مانند ایجاد عوارض در محل تحویل دهنده بافت، دشواری در جراحی و درد مداوم پس از عمل است^(۵). در این راستا، مهندسی بافت استخوان و استفاده از داربست‌های متخلخل، توانایی غلبه بر افزایش تقاضای بافت پیوندی اتوگرافت و آلوگرافت در بازسازی نواقص استخوانی را دارد^(۳۳،۳۲). سلول‌زدایی از بافت‌های آلوژنیک به منظور استفاده به عنوان یک داربست، یک مرحله مهم برای به حداقل

مناسب برای ساخت داربست طبیعی استخوانی است، زیرا این نمونه در مقایسه با محلول S2 فاقد نتیجه مشکوک در آزمون سمیت می‌باشد و همچنین نسبت به محلول T2 حذف سلولی بهتری از خود نشان داده است.

بحث

اگرچه استخوان توانایی بسیار خوبی برای ترمیم توسط مکانیسم‌های طبیعی دارد، اما در شرایط خاص بالینی مانند آسیب‌های گسترده، ناهنجاری‌های مادرزادی یا بیماری‌ها، ترمیم طبیعی استخوان ممکن است خیلی کند یا ناکافی باشد. بنابراین در چنین مواردی، بازسازی

در این پژوهش به منظور تعیین مناسب‌ترین شرایط سلول‌زدایی با محلول‌های SDS و TritonX-100 و محلول ترکیبی آنها، محلول‌ها و دوره‌های زمانی مختلفی ارزیابی شدند. برای این کار، ابتدا، نمونه‌های استخوانی با آب مقطر شستشو داده شدند، سپس، در یک محلول پراکسید هیدروژن ۵٪ و سپس، در دی‌اتیل‌اتر قرار گرفتند. سپس، با اتانول ۷۰٪ و بعد از آن ۵ مرتبه با آب مقطر شستشو داده شدند. سرانجام، همه نمونه‌ها با محلول‌های مختلف SDS و TritonX-100 و همچنین ترکیبی از آنها در دوره‌های زمانی مختلف تحت سلول‌زدایی قرار گرفتند. رنگ‌آمیزی H&E برای ارزیابی کیفیت سلول‌زدایی انجام گرفت.

نتایج ما نشان داد که حذف سلول‌ها در نمونه‌های سلول‌زدایی شده با SDS در غلظت‌های ۲/۵٪ و ۳٪ نسبت به غلظت ۲٪ بیشتر بوده است، ولی این پاکسازی و حذف سلولی با تخریب ساختار همراه است که برای تهیه داربست مطلوب نیست. از سوی دیگر، سلول‌زدایی با محلول TritonX-100 با غلظت ۲٪ نیز نسبت به غلظت‌های ۲/۵٪ و ۳٪، بهترین نتیجه را نشان داد. در روش‌های تلفیقی نیز نمونه T3S4 بهترین نتیجه حذف سلول را داشت. همچنین به منظور تأیید اثربخشی سلول‌زدایی، حضور کلاژن‌ها در ساختار نمونه‌ها توسط رنگ‌آمیزی تری کروم ارزیابی شد و نتایج حاکی از آن بود که در همه گروه‌ها، الیاف‌های کلاژن در مقدار بالاتری از نمونه شاهد حفظ شدند. به منظور مشاهده سمیت سلولی، نمونه‌ها طی ۲۴ ساعت و ۴۸ ساعت مورد ارزیابی قرار گرفتند که هیچ سمیتی در نمونه‌ها در مقایسه با نمونه شاهد مشاهده نشد (شکل ۵ - E)، اما با گذشت زمان، سمیت کمی در نمونه S2 دیده شد (شکل ۵ - F). مشاهدات کلی بیانگر آن است که از بین ۳ نمونه‌ای که مورد آزمون سمیت قرار گرفته‌اند، نمونه T3S4 گزینه‌ای مناسب برای ساخت داربست طبیعی استخوانی است. زیرا این نمونه در مقایسه با محلول S2 فاقد نتیجه مشکوک در آزمون سمیت است و همچنین نسبت به محلول T2 حذف سلولی بهتری از خود نشان داده است.

نتیجه‌گیری

در این پژوهش به منظور تعیین مناسب‌ترین شرایط سلول‌زدایی با محلول‌های SDS و TritonX-100 و محلول ترکیبی آنها، محلول‌ها و دوره‌های زمانی مختلفی ارزیابی شدند. برای این منظور، نمونه‌های استخوانی توسط محلول‌های مختلف SDS، TritonX-100 و ترکیب آنها در مدت زمان‌های مختلف سلول‌زدایی شدند. رنگ‌آمیزی H&E به منظور ارزیابی کیفیت سلول‌زدایی انجام گرفت و نتایج ما نشان داد که حذف سلول‌ها در نمونه‌های سلول‌زدایی شده با SDS در غلظت‌های ۲/۵٪ و ۳٪ نسبت به غلظت ۲٪ بیشتر بوده است ولی این پاکسازی و حذف سلولی با تخریب ساختار همراه است که برای تهیه داربست مطلوب نیست. از سوی دیگر سلول‌زدایی با محلول TritonX-100 با غلظت ۲٪ نیز نسبت به غلظت‌های ۲/۵٪ و ۳٪، بهترین نتیجه را نشان داد. در روش‌های تلفیقی نیز نمونه T3S4 بهترین نتیجه حذف سلول را داشت. همچنین به منظور تأیید اثربخشی

رساندن پاسخ ایمنی و کاهش خطر انتقال بیماری است. از آنجا که در مطالعات مختلف نتایج امیدوارکننده‌ای از پیوند چندین بافت حیوانی وجود دارد^(۳۷-۳۴)، هدف ما در این پژوهش، سلول‌زدایی بافت استخوان اسفنجی گاو برای استفاده به عنوان یک داربست بالقوه زئوگرافت برای مطالعه مهندسی بافت استخوان است. در مقایسه با سایر منابع استخوانی، استخوان اسفنجی گاو به دلیل شباهت به ساختار Haversian استخوان انسان، فعالیت متابولیکی بیشتر نسبت به استخوان متراکم، در دسترس بودن مقادیر زیادی از اپی‌فیز استخوان گاو و همچنین ویژگی القای استخوانی و هدایت استخوانی، به عنوان یک مدل مناسب برای مهندسی بافت در نظر گرفته شده است^(۳۸). برای دستیابی به داربست مناسب، حذف تمامی سلول‌ها، به صورتی که ساختار و عملکرد ماتریس سلول‌زدایی شده تحت تأثیر قرار نگیرد، الزامی است^(۳۹).

در این پژوهش، غشای سلول‌ها توسط مواد شوینده شیمیایی از بین رفته و از انواع مواد شیمیایی، از جمله مواد شوینده غیر یونی (TritonX-100) و یونی (SDS) استفاده شده است.

در برخی از تحقیقات، محلول SDS با در نظر داشتن الزامات استاندارد، منجر به حذف کامل و یا حداقل ۹۰٪ از DNA سلول‌های بافت میزبان در بافت‌ها و اندام‌های مختلف شده است، از جمله: بازوی موش^(۴۰)، قریه خوک^(۴۱)، ماهیچه قلبی خوک^(۴۲)، دریچه قلب خوک^(۴۳)، روده کوچک خوک^(۴۴)، کلیه خوک^(۴۵)، رگ انسان^(۴۶)، ریه‌های موش صحرایی، خوک و انسان^(۴۸،۴۷) و قلب انسان^(۴۹).

اگرچه SDS می‌تواند با موفقیت مواد تشکیل دهنده ناخواسته بافت را از بین ببرد، اما در عین حال، می‌تواند به پروتئین‌های ساختاری و سیگنالی‌نگ نیز آسیب برساند. به عنوان مثال، کلاژن موجود در دریچه‌های قلبی که با محلول SDS سلول‌زدایی شده‌اند، فشرده شده است^(۴۳) و یا ECM ریه‌های سلول‌زدایی شده انسان و خوک، نسبت به ساختار صاف اولیه بافت، رشته‌ای‌تر به نظر می‌رسند^(۴۸). SDS همچنین سمی است، بنابراین شستشوی کامل بافت سلول‌زدایی شده با آن ضروری است تا از زنده ماندن سلول‌هایی که دوباره در این بستر کشت داده می‌شوند، اطمینان حاصل شود^(۴۴). در حالی که اکثر بافت‌های سلول‌زدایی شده معمولاً باید با محلول‌هایی مانند نمک بافر فسفات (PBS) شسته می‌شوند، ولی حذف SDS به دلیل ماهیت یونی آن دشوارتر است. فرآیند شستشوی گسترده مورد نیاز به دنبال سلول‌زدایی، از دیگر معایب استفاده SDS به عنوان یک عامل سلول‌زدایی است^(۵۲). عامل غیر یونی تری‌تون X-100 اغلب برای حذف SDS باقی‌مانده استفاده می‌شود. این عمل به ویژه در سلول‌زدایی تزریقی کل اعضای بدن رایج بوده است^(۵۱،۴۹،۴۷،۴۴،۴۰). TritonX-100 نه تنها در فرآیند شستشو مفید است، بلکه معمولاً به تنهایی به عنوان یک محلول سلول‌زدایی مورد استفاده قرار می‌گیرد. این محلول از آنجا که غیر یونی است، از سختی کمتری نسبت به SDS برخوردار بوده و در نهایت به یکپارچگی ساختاری بافت آسیب کمتری وارد می‌آورد^(۵۲).

در بین نمونه‌ها، نمونه T3S4 گزینه مناسبی برای ساخت داربست استخوان طبیعی بود. نتایج به دست آمده در این پژوهش می‌تواند در ساخت داربست طبیعی مناسب برای مهندسی بافت و پزشکی ترمیمی استخوان مورد بهره‌برداری قرار گیرد.

سلول‌زدایی، حضور کلاژن‌ها در ساختار نمونه‌ها توسط رنگ‌آمیزی تری‌کروم ارزیابی شد و نتایج حاکی از آن بود که در همه گروه‌ها، الیاف‌های کلاژن در مقدار بالاتری از نمونه شاهد حفظ شدند. به منظور مشاهده سمیت سلولی، نمونه‌ها طی ۲۴ ساعت و ۴۸ ساعت مورد ارزیابی قرار گرفتند که هیچ سمیتی در نمونه‌ها در مقایسه با نمونه شاهد مشاهده نشد، اما با گذشت زمان، سمیت کمی در نمونه S2 دیده شد. مشاهدات کلی نشان می‌دهد که

منابع

- Ashley B. Which scaffold for which application?. *Current Orthopaedics*. 2007;21(4):280-7. doi: 10.1016/j.cuor. 2007.06.005.
- Yuan J, Zhang WJ, Liu G, Wei M, Qi ZL, Liu W, Cui L, Cao YL. Repair of canine mandibular bone defects with bone marrow stromal cells and coral. *Tissue Eng Part A*. 2010 Apr;16(4):1385-94. doi: 10.1089/ten.TEA.2009.0472.
- Jwo-Lin W, Ying-Tai Z, Ching-Cherng T, Chin-I Lin, Shi-Wei L, Guan-Liang C, The assay of Bone Reaction after implantation of Calcium Sulfat and A Composite of Calcium Sulfat and Calcium Phosphate. *Journal of Medical and biological Engineering* 2003;23(4):205-212.
- Fernandez de Grado G, Keller L, Idoux-Gillet Y, Wagner Q, Musset AM, Benkirane-Jessel N, Bornert F, Offner D. Bone substitutes: a review of their characteristics, clinical use, and perspectives for large bone defects management. *J Tissue Eng*. 2018 Jun 4;9:2041731418776819. doi: 10.1177/2041731418776819.
- Fröhlich M, Grayson WL, Wan LQ, Marolt D, Drobnic M, Vunjak-Novakovic G. Tissue engineered bone grafts: biological requirements, tissue culture and clinical relevance. *Curr Stem Cell Res Ther*. 2008 Dec;3(4):254-64. doi: 10.2174/157488808786733962.
- Weitao Y, Kangmei K, Xinjia W, Weili Q. Bone regeneration using an injectable calcium phosphate/autologous iliac crest bone composites for segmental ulnar defects in rabbits. *J Mater Sci Mater Med*. 2008 Jun;19(6):2485-92. doi: 10.1007/s10856-008-3383-8.
- Goldstein SA. Tissue engineering: functional assessment and clinical outcome. *Ann N Y Acad Sci*. 2002 Jun;961:183-92. doi: 10.1111/j.1749-6632.2002.tb03079.x.
- Vacanti CA, Bonassar L J. An overview of tissue engineered bone. *Cline.Orthop*. 1999;17(4)343-352. doi: 10.1097/00003086-199910001-00036.
- Jerome CP, Peterson PE. Nonhuman primate models in skeletal research. *Bone*. 2001 Jul;29(1):1-6. doi: 10.1016/s8756-3282(01)00477-x.
- Andrew W, Michael M, Geoffrey H, Warrick Be, Hilary B. The evaluation of processed cancellous bovine bone as a bone graft substitute. *Clin.Oralimpl*. 2005;16:379-386. doi: 10.1111/j.1600-0501.2005.01113.x.
- Cukierman E, Pankov R, Yamada KM. Cell interactions with three-dimensional matrices. *Curr Opin Cell Biol*. 2002 Oct;14(5):633-9. doi: 10.1016/s0955-0674(02)00364-2.
- Badylak SF. Xenogeneic extracellular matrix as a scaffold for tissue reconstruction. *Transpl Immunol*. 2004; 12(3-4): 367-77. doi: 10.1016/j.trim.2003.12.016.
- Hussey, G.S., Dziki, J.L., Badylak S.F. Extracellular matrix-based materials for regenerative medicine. *Nat. Rev. Mater*. 2018; 3: 159-173. doi: 10.1038/s41578-018-0023-x.
- Mendibil u. et al. Tissue-Specific Decellularization Methods: Rationale and Strategies to Achieve Regenerative Compounds. *International Journal of Molecular Sciences*. 30 July 2020;21(15):5447. doi:10.3390/ijms21155447.
- Wu X et al. Mineralization of Biomaterials for Bone Tissue Engineering. *International Journal of bioengineering*. 2020;7(4):132. doi: 10.3390/bioengineering7040132.
- Wang W., Yeung K. Bone grafts and biomaterials substitutes for bone defect repair. *Bioactive Materials*. 2017;2:224-247. doi: 10.1016/j.bioactmat.2017.05.007.
- Keane TJ, Swinehart IT, Badylak SF. Methods of tissue decellularization used for preparation of biologic scaffolds and in vivo relevance. *Methods*. 2015 Aug;84:25-34. doi: 10.1016/j.ymeth.2015.03.005.
- Crapo P.M, Gilbert T.W, Badylak S.F. An overview of tissue and whole organ decellularization processes. *Biomaterials*. 2011;32:3233-3243. doi: 10.1016/j.biomaterials.2011.01.057.
- White LJ, Taylor AJ, Faulk DM, Keane TJ, Saldin LT, Reing JE, Swinehart IT, Turner NJ, Ratner BD, Badylak SF. The impact of detergents on the tissue decellularization process: A ToF-SIMS study. *Acta Biomater*. 2017 Mar 1;50:207-219. doi: 10.1016/j.actbio.2016.12.033.
- Woods T, Gratzer PF. Effectiveness of three extraction techniques in the development of a decellularized bone-anterior cruciate ligament-bone graft. *Biomaterials*. 2005 Dec;26(35):7339-49. doi: 10.1016/j.biomaterials.2005.05.066.
- Cartmell JS, Dunn MG. Effect of chemical treatments on tendon cellularity and mechanical properties. *J Biomed Mater Res*. 2000 Jan;49(1):134-40. doi: 10.1002/(sici)1097-4636(200001)49:1<134::aid-jbm17>3.0.co;2-d.
- Elder BD, Kim DH, Athanasiou KA. Developing an articular cartilage decellularization process toward facet joint cartilage replacement. *Neurosurgery*. 2010 Apr;66(4):722-7; discussion 727. doi: 10.1227/01.NEU.0000367616.49291.9F.
- Chen RN, Ho HO, Tsai YT, Sheu MT. Process development of an acellular dermal matrix (ADM) for biomedical applications. *Biomaterials*. 2004 Jun;25(13):2679-86. doi: 10.1016/j.biomaterials.2003.09.070.
- Tavassoli A, Matin MM, Niaki MA, Mahdavi-Shahri N, Shahabipour F. Mesenchymal stem cells can survive on the extracellular matrix-derived decellularized bovine articular cartilage scaffold. *Iran J Basic Med Sci*. 2015 Dec;18(12):1221-7.
- Gilbert TW, Sellaro TL, Badylak SF. Decellularization of tissues and organs. *Biomaterials*. 2006 Jul;27(19):3675-83. doi: 10.1016/j.biomaterials.2006.02.014.

26. Butcher JT, Mahler GJ, Hockaday LA. Aortic valve disease and treatment: the need for naturally engineered solutions. *Adv Drug Deliv Rev.* 2011 Apr 30;63(4-5):242-68. doi: 10.1016/j.addr.2011.01.008.
27. Naso F, Gandaglia A, Formato M, Cigliano A, Lepedda AJ, Gerosa G, Spina M. Differential distribution of structural components and hydration in aortic and pulmonary heart valve conduits: Impact of detergent-based cell removal. *Acta Biomater.* 2010 Dec;6(12):4675-88. doi: 10.1016/j.actbio.2010.06.037.
28. Seddon AM, Curnow P, Booth PJ. Membrane proteins, lipids and detergents: not just a soap opera. *Biochim Biophys Acta.* 2004 Nov 3;1666(1-2):105-17. doi: 10.1016/j.bbamem.2004.04.011.
29. Schaner PJ, Martin ND, Tulenko TN, Shapiro IM, Tarola NA, Leichter RF, Carabasi RA, Dimuzio PJ. Decellularized vein as a potential scaffold for vascular tissue engineering. *J Vasc Surg.* 2004 Jul;40(1):146-53. doi: 10.1016/j.jvs.2004.03.033
30. Lumpkins SB, Pierre N, McFetridge PS. A mechanical evaluation of three decellularization methods in the design of a xenogeneic scaffold for tissue engineering the temporomandibular joint disc. *Acta Biomater.* 2008 Jul;4(4):808-16. doi: 10.1016/j.actbio.2008.01.016. -16.
31. Staubli AE, De Simoni C, Babst R, Lobenhoffer P. TomoFix: a new LCP-concept for open wedge osteotomy of the medial proximal tibia--early results in 92 cases. *Injury.* 2003 Nov;34 Suppl 2:B55-62. doi: 10.1016/j.injury.2003.09.025.
32. Meijer GJ, de Bruijn JD, Koole R, van Blitterswijk CA. Cell-based bone tissue engineering. *PLoS Med.* 2007 Feb;4(2):e9. doi: 10.1371/journal.pmed.0040009.
33. Hutmacher DW. Scaffold design and fabrication technologies for engineering tissues--state of the art and future perspectives. *J Biomater Sci Polym Ed.* 2001;12(1):107-24. doi: 10.1163/156856201744489
34. Greenwald AS, Boden SD, Goldberg VM, Khan Y, Laurencin CT, Rosier RN; American Academy of Orthopaedic Surgeons. The Committee on Biological Implants. Bone-graft substitutes: facts, fictions, and applications. *J Bone Joint Surg Am.* 2001;83-A Suppl 2 Pt 2:98-103. doi: 10.2106/00004623-200100022-00007.
35. Kim SH, Shin JW, Park SA, Kim YK, Park MS, Mok JM, Yang WI, Lee JW. Chemical, structural properties, and osteoconductive effectiveness of bone block derived from porcine cancellous bone. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater.* 2004 Jan 15;68(1):69-74. doi: 10.1002/jbm.b.10084.
36. McFetridge PS, Daniel JW, Bodamyali T, Horrocks M, Chaudhuri JB. Preparation of porcine carotid arteries for vascular tissue engineering applications. *J Biomed Mater Res A.* 2004 Aug 1;70(2):224-34. doi: 10.1002/jbm.a.30060.
37. Ketchedjian A, Jones AL, Krueger P, Robinson E, Crouch K, Wolfenbarger L Jr, Hopkins R. Recellularization of decellularized allograft scaffolds in ovine great vessel reconstructions. *Ann Thorac Surg.* 2005 Mar;79(3):888-96; discussion 896. doi: 10.1016/j.athoracsur.2004.09.033.
38. David V, Guignandon A, Martin A, Malaval L, Lafage-Proust MH, Rattner A, Mann V, Noble B, Jones DB, Vico L. Ex Vivo bone formation in bovine trabecular bone cultured in a dynamic 3D bioreactor is enhanced by compressive mechanical strain. *Tissue Eng Part A.* 2008 Jan;14(1):117-26. doi: 10.1089/ten.a.2007.0051.
39. Gilbert TW, Sellaro TL, Badylak SF. Decellularization of tissues and organs. *Biomaterials.* 2006 Jul;27(19):3675-83. doi: 10.1016/j.biomaterials.2006.02.014.
40. Jank B J, Xiong L, Moser P T et al. Engineered composite tissue as a bioartificial limb graft. *Biomaterials.* 2015; 61: 246– 256. doi:10.1016/j.biomaterials.2015.04.051
41. Pang K, Du L, Wu X. A rabbit anterior cornea replacement derived from acellular porcine cornea matrix, epithelial cells and keratocytes. *Biomaterials.* 2010 Oct;31(28):7257-65. doi: 10.1016/j.biomaterials.2010.05.066.
42. Wang B, Borazjani A, Tahai M, Curry AL, Simionescu DT, Guan J, To F, Elder SH, Liao J. Fabrication of cardiac patch with decellularized porcine myocardial scaffold and bone marrow mononuclear cells. *J Biomed Mater Res A.* 2010 Sep 15;94(4):1100-10. doi: 10.1002/jbm.a.32781.
43. Zhou J, Fritze O, Schleicher M, Wendel HP, Schenke-Layland K, Harasztosi C, Hu S, Stock UA. Impact of heart valve decellularization on 3-D ultrastructure, immunogenicity and thrombogenicity. *Biomaterials.* 2010 Mar;31(9):2549-54. doi: 10.1016/j.biomaterials.2009.11.088.
44. Syed O, Walters NJ, Day RM, Kim HW, Knowles JC. Evaluation of decellularization protocols for production of tubular small intestine submucosa scaffolds for use in oesophageal tissue engineering. *Acta Biomater.* 2014 Dec;10(12):5043-5054. doi: 10.1016/j.actbio.2014.08.024.
45. Sullivan DC, Mirmalek-Sani SH, Deegan DB, Baptista PM, Aboushwareb T, Atala A, Yoo JJ. Decellularization methods of porcine kidneys for whole organ engineering using a high-throughput system. *Biomaterials.* 2012 Nov;33(31):7756-64. doi: 10.1016/j.biomaterials.2012.07.023.
46. Schaner PJ, Martin ND, Tulenko TN, Shapiro IM, Tarola NA, Leichter RF, Carabasi RA, Dimuzio PJ. Decellularized vein as a potential scaffold for vascular tissue engineering. *J Vasc Surg.* 2004 Jul;40(1):146-53. doi: 10.1016/j.jvs.2004.03.033. 2004.
47. Gilpin SE, Guyette JP, Gonzalez G, Ren X, Asara JM, Mathisen DJ, Vacanti JP, Ott HC. Perfusion decellularization of human and porcine lungs: bringing the matrix to clinical scale. *J Heart Lung Transplant.* 2014 Mar;33(3):298-308. doi: 10.1016/j.healun.2013.10.030.
48. O'Neill JD, Anfang R, Anandappa A, Costa J, Javidfar J, Wobma HM, Singh G, Freytes DO, Bacchetta MD, Sonett JR, Vunjak-Novakovic G. Decellularization of human and porcine lung tissues for pulmonary tissue engineering. *Ann Thorac Surg.* 2013 Sep;96(3):1046-55; discussion 1055-6. doi: 10.1016/j.athoracsur.2013.04.022.
49. Guyette JP, Charest JM, Mills RW, Jank BJ, Moser PT, Gilpin SE, Gershlak JR, Okamoto T, Gonzalez G, Milan DJ, Gaudette GR, Ott HC. Bioengineering Human Myocardium on Native Extracellular Matrix. *Circ Res.* 2016 Jan 8;118(1):56-72. doi: 10.1161/CIRCRESAHA.115.306874.
50. Uygun B, Soto-Gutierrez A, Yagi H. et al. Organ reengineering through development of a transplantable recellularized liver graft using decellularized liver matrix. *Nat Med.* 2010;16: 814–820. doi: 10.1038/nm.2170.
51. Ott H, Matthiesen T, Goh SK. et al. Perfusion-decellularized matrix: using nature's platform to engineer a bioartificial heart. *Nat Med.* 2008;14: 213–221. doi:10.1038/nm16.
52. Gilpin A, Yang Y. Decellularization Strategies for Regenerative Medicine: From Processing Techniques to Applications. *Biomed Res Int.* 2017;2017:9831534. doi: 10.1155/2017/9831534.