



سلولز باکتریایی پوشیده شده با ژلاتین، داربستی برای مهندسی بافت قلب

محدثه صالح قمری^۱، منصور مشرقی^{۲،۳}، مریم مقدم متین^۴، زینب نشاطی^{۴*}

۱- گروه زیست شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه فردوسی مشهد، مشهد، ایران

۲- گروه پژوهشی زیست فناوری صنعتی، پژوهشکده فناوری زیستی، دانشگاه فردوسی مشهد، مشهد، ایران

۳- مرکز پژوهشی نانو، دانشگاه فردوسی مشهد، مشهد، ایران

۴- گروه پژوهشی روش‌های تشخیص و درمان‌های نوین، پژوهشکده فناوری زیستی، دانشگاه فردوسی مشهد، مشهد، ایران

چکیده

مقدمه

انفارکتوس قلبی یکی از دلایل اصلی مرگ و میر در سرتاسر جهان است. میزان بازسازی بافت قلبی پس از انفارکتوس قلبی محدود است. ترکیب سلول درمانی با فناوری مهندسی بافت می‌تواند منجر به کاربردهای بالینی گسترده‌ای گردد. در این مطالعه، داربست‌هایی را برای پشتیبانی از چسبندگی و رشد کاردیومیوسیت‌ها به منظور کاربرد در مهندسی بافت قلب مورد بررسی قرار دادیم.

مواد و روش‌ها

ابتدا داربست سلولز باکتریایی (BC) تهیه گردید و با ژلاتین پوشش داده شد تا ساختاری از سلولز پوشیده شده با ژلاتین (BCG) بدست آید. خصوصیات داربست‌های BC و BCG با استفاده از میکروسکوپ الکترونی روبشی، میکروسکوپ الکترونی روبشی نشر میدانی و میکروسکوپ نیروی اتمی و روش رطوبت‌پذیری مورد بررسی قرار گرفت. در ادامه جهت سنجش کارایی (میزان چسبندگی و بقای سلولی) داربست‌های مزبور، کاردیومیوسیت‌های بطنی نوزاد رت بر روی داربست‌ها کشت داده شدند و با فیبروبلاست‌های پوستانسانی (HDF) مورد مقایسه قرار گرفتند.

یافته‌ها

نتایج نشان داد که قطر متوسط نانوفیبریل‌ها و زبری سطح به منظور کشت کاردیومیوسیت‌ها مناسب می‌باشد. فعالیت انقباضی خودبخودی کاردیومیوسیت‌ها تا پایان دوره آزمایش، ماندگار بود ولی از روز ۵ تا ۷ به تدریج اندکی کاهش یافت. با توجه به نتایج تصاویر میکروسکوپ نوری، چسبندگی HDFs بر روی داربست‌ها در تمام طول دوره آزمایش، بیش از چسبندگی کاردیومیوسیت‌ها بود.

نتیجه‌گیری

BC و BCG علاوه بر نداشتن سمیت سلولی، دارای خصوصیات فیزیکیوشیمیایی مناسب جهت حفظ شکل ظاهری و عملکرد انقباضی سلول‌های کاردیومیوسیت نوزاد دوروزه رت می‌باشند.

کلیدواژه‌ها

مهندسی بافت قلب، داربست سلولز باکتریایی، ژلاتین، کاردیومیوسیت‌های بطنی نوزاد رت

مقاله پژوهشی اصیل

تاریخ دریافت: ۱۴۰۲/۰۳/۱۷

تاریخ پذیرش: ۱۴۰۲/۰۷/۲۳

*نویسنده مسئول: زینب نشاطی، گروه

زیست شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه

فردوسی مشهد، مشهد، ایران

تلفن: ۰۵۱-۳۸۸۰۵۴۷۸

پست الکترونیک:

neshati@um.ac.ir



مقدمه

محدودیت تهیه اندام‌ها و بافت‌ها و ناسازگاری آن‌ها برای پیوند، همچنین خطرهایی مانند درد و عفونت، سبب ضرورت گسترش مهندسی بافت شده است. روش‌هایی مانند سلول درمانی اگرچه در مواردی که نقص به میزان اندک است، می‌توانند استفاده شوند ولی این روش‌ها دارای محدودیت‌هایی مانند هدر رفتن میزان قابل توجهی از سلول‌ها می‌باشند. در این موارد استفاده از سلول‌های رشد داده شده در داربست سه بعدی، مناسب‌تر به نظر می‌رسد. داربست‌ها به عنوان یک پشتیبان برای سلول‌ها هستند، به انتقال سلول‌ها به درون ناحیه آسیب‌دیده، کمک کرده و یک چهارچوب سه بعدی را به منظور تکثیر سلول‌ها، تولید ماتریکس خارج سلولی (ECM) و بافت جدید، فراهم می‌کنند و بنابراین سبب تسهیل تشکیل بافت‌ها و اندام‌ها می‌شوند (۴-۱)؛ بنابراین، برای ارتقای سیستم تحویل سلول و جایگزینی سلول‌ها در مکان مناسب، داربست‌ها در بسیاری از رویکردهای درمانی استفاده شده‌اند (۵-۸). بر اساس نوع بافت مورد نظر و کاربرد اختصاصی آن، مواد تشکیل دهنده داربست و ویژگی‌های آن‌ها متفاوت می‌باشند (۲). داربست‌ها می‌توانند از مواد طبیعی یا سنتزی ساخته شوند. همچنین باید از نظر زیستی، سازگار بوده و چسبندگی و رشد سلول‌ها را تقویت کنند (۱). بیماری‌های قلبی، دلیل اصلی مرگ و میر در سراسر جهان هستند (۹). انفارکتوس قلبی^۱ یا حمله قلبی، در اثر گرفتگی رگ‌های قلبی و عدم رسیدن اکسیژن و مواد غذایی به کاردیومیوسیت‌ها و در نتیجه مرگ این سلول‌ها ایجاد می‌گردد (۳، ۱۰). کاردیومیوسیت‌های بالغ، سلول‌های تمایز یافته‌ای می‌باشند که ظرفیت بازسازی محدودی را نشان می‌دهند؛ بنابراین فیبروبلاست‌های قلبی، با تکثیر خود جایگزین کاردیومیوسیت‌های مرده می‌گردند

که منجر به از دست رفتن دائمی بافت انقباضی می‌شود (۱۱-۱۳)؛ در نتیجه، عملکرد بطن چپ دچار اختلال می‌گردد و در صورت عدم درمان، نارسایی قلبی ایجاد می‌گردد (۳، ۱۰). روش‌های مبتنی بر سلول با ورود کاردیومیوسیت‌های جدید به قلب آسیب دیده، گزینه درمانی امیدوارکننده‌ای در مطالعات اخیر بوده‌اند. در مهندسی بافت قلب، ورقه قلبی یا داربست حاوی کاردیومیوسیت‌های انقباضی جدید، جایگزین بافت آسیب دیده شده و عملکرد قلب را بهبود می‌بخشد (۸، ۱۲). کاردیومیوسیت‌های موجود بر روی داربست، از طریق اتصالات فاصله‌دار، با یکدیگر ارتباط الکتروفیزیولوژیکی برقرار کرده و فعالیت انقباضی هماهنگی را نشان می‌دهند (۱۴). سلولز یک پلی ساکارید نامحلول در آب است. این ماکرومولکول در طبیعت به مقدار فراوان توسط گیاهان و بسیاری از میکروارگانیسم‌ها تولید می‌شود. سلولز در تمام موجودات ساختار شیمیایی یکسانی دارد (۱۵). ولی بر اساس منبع تولید، سازمان یافتگی ساختاری متفاوتی دارد که همین موضوع سبب ایجاد ویژگی‌های متفاوت فیزیکی این ساختار نیز می‌گردد. سلولز باکتریایی یا BC دارای مزایای مختلفی نسبت به سلولز گیاهی است. سلولز باکتریایی بر خلاف سلولز گیاهی دارای ترکیباتی مثل لیگنین، همی‌سلولز یا اجزای پکتین نبوده و جداسازی و خالص‌سازی آن به نسبت ساده است. BC دارای ساختار شبکه‌ای در هم تنیده نانوالیافی بسیار ظریف و سازمان یافته‌ای است، از لحاظ شیمیایی همگن بوده، سازگاری زیستی و تخلخل بالایی دارد و فیبریل‌های نانومتری آن بسیار نازک‌تر از سلولز گیاهی است (۱۵، ۱۶)؛ به علاوه قدرت کششی قابل تنظیمی داشته و گروه‌های OH آن را می‌توان به راحتی عامل‌دار نمود (۱). همچنین برخی از ویژگی‌های این ماده مانند تخلخل، ساختار سه بعدی و سطح را می‌توان تغییر

². Bacterial cellulose (BC)

¹. Myocardial infarction



داد (۱۷). ویژگی‌های شیمیایی و فیزیکی داربست بر روی چسبندگی، تکثیر و تمایز سلولی نقش دارد. BC به دلیل بلورینگی بالا، خلوص و زیست‌سازگاری مناسب، ظرفیت جذب بالای آب و ویژگی‌های مکانیکی خوب مثل استحکام و انعطاف پذیری، کاربردهای بسیاری در زمینه زیست‌پزشکی مانند پدهای پزشکی، پانسمان زخم و داربست‌های مهندسی بافت دارد (۱۵، ۱۸). همچنین به دلیل شبکه نانوفیبری سه بعدی آن که مشابه ماتریکس خارج سلولی طبیعی است، کاندیدای مناسبی جهت داربست می‌باشد (۱۹) و در مقایسه با سطوح صاف فاقد ساختار نانو، ساختار سه بعدی نانوسلولز باکتریایی برای چسبندگی سلول‌ها مناسب می‌باشد (۲۰). BC از لحاظ آرایش نامنظم نانوفیبریل‌های آن، با کلاژن شباهت ساختاری داشته (۲۰، ۲۱) اما در مقایسه با کلاژن دارای تخلخل بیشتر و قدرت مکانیکی بالاتری است (۲۳). کلاژن جز اصلی ECM قلب است و سازه‌های مورد استفاده در مهندسی بافت قلب، نیاز به یک ساختار و توپوگرافی شبه ECM قلبی و الیافی در اندازه فیبریل‌های کلاژن دارند (۳). ژلاتین از دنا توره کردن پروتئین کلاژن فیبری نامحلول تهیه می‌شود. برخی از خواص ژلاتین مانند فراوانی، زیست سازگاری، وجود گروه‌های عملکردی و قابلیت چسبندگی، مقرون به صرفه بودن و زیست تخریب پذیری، به آن ویژگی‌های درمانی و بازساختی می‌دهد (۱۵، ۲۴). چسبندگی سلولی را می‌توان با کمک توالی‌هایی مثل RGD (توالی از اسیدهای آمینه آرژینین، گلیسین، اسید آسپارتیک) که در چندین پروتئین ماتریکس خارج سلولی مانند کلاژن، لامینین و فیبرونکتین یافت می‌شوند، بهبود بخشید (۲۵). ژلاتین نیز دارای توالی RGD است و سبب تقویت چسبندگی سلولی می‌گردد (۲۶). هیدروژل‌های ژلاتینی دارای قدرت کششی قابل تنظیم هستند. بافت‌های میوسیتی قلب رت‌های تازه متولد

شده، در این سوسترا قابلیت انقباضی خود را به مدت سه هفته در محیط کشت حفظ می‌کنند (۲۶). ژلاتین، در ترکیب با BC، به عنوان یک داربست ابتکاری برای انواع مختلف سلول، با اتصال سلولی مناسب و استحکام کششی استفاده شده است (۲۷-۲۹). ترکیب ژلاتین با سلولز باکتریایی ماده‌ای ایجاد کرده است که تحت فشارهای مداوم توانایی تورم برگشت پذیر داشته بنابراین می‌تواند به عنوان غضروف مصنوعی مفصل مورد استفاده قرار گیرد (۳۰). همچنین داربست‌های BC/ژلاتین بارگذاری شده با فاکتور رشد اندوتلیال رگی (VEGF) اصلاح شده با هپارین برای تکثیر و مهاجرت سلول‌ها با موفقیت استفاده شده است (۱۹). در مطالعه دیگری از سلولز باکتریایی سولفات‌ه/پلی وینیل‌الکل (BCS/PVA) به عنوان داربستی کارا برای چسبندگی و تکثیر فیبروبلاست‌های موشی L929 استفاده گردید (۳۱). Mihardja و همکارانش، با استفاده از پلیمر ترکیبی متیل سلولز و پپتیدهای RGD و Hep III توانستند چسبندگی سلولی و بازسازی میوکارد را در یک مدل جونده افزایش دهند (۳۲). هدف مطالعه حاضر، ساخت داربستی با ویژگی‌های مشابه ECM بافت قلبی به منظور تقویت چسبندگی و عملکرد انقباضی کاردیومیوسیت‌ها بوده است که بتواند در مواردی مثل انفارکتوس قلبی که سلول‌های انقباضی قلب (کاردیومیوسیت‌ها) از بین می‌روند مورد استفاده قرار گیرد. بر اساس مطالعات انجام شده، تاکنون BC به تنهایی یا در ترکیب با ژلاتین برای بررسی چسبندگی و رشد کاردیومیوسیت‌ها استفاده نشده است. در این مطالعه، ریخت شناسی و اندازه نانوفیبریل‌ها، اندازه منافذ، توپوگرافی ساختار و آبدوستی داربست‌های مبتنی بر BC مورد ارزیابی قرار گرفت و قابلیت آن‌ها برای پشتیبانی از اتصال و عملکرد مناسب کاردیومیوسیت‌های بطنی رت



های نوزاد (nr-vCMCs) مورد بررسی قرار گرفت و با فیبروبلاست‌های پوستی انسانی (HDF)^۲ مقایسه شد.

مواد و روش‌ها

کشت باکتری: گلوکوناستوباکتر زایلینوس (PTCC 1734) از سازمان پژوهش‌های علمی و صنعتی ایران (تهران، ایران) تهیه شد. باکتری در محیط HS آگار حاوی $2\% (w/v)$ - D گلوکز (QUELAB)، $0.5\% (w/v)$ پپتون (QUELAB)، $0.5\% (w/v)$ عصاره مخمر (QUELAB)، $0.2\% (w/v)$ دی سدیم هیدروژن فسفات (Na_2HPO_4) و $1.15\% (w/v)$ اسید سیتریک (Merck) و 1.5% آگار کشت داده شد. ویژگی‌های ریخت شناسی باکتری توسط مشاهدات میکروسکوپی و رنگ‌آمیزی گرم تأیید گردید.

آماده سازی داربست

تولید و خالص سازی BC: به منظور تهیه مایع تلقیح باکتری، باکتری مورد نظر در 5 میلی‌لیتر محیط HS به مدت 24 ساعت در $28^\circ C$ درجه سانتی‌گراد کشت داده شد. سپس مایع تلقیح به نسبت 1 به 10 ، به محیط کشت جدید HS (ارلن و یا پلیت 48 خانه) اضافه شد و به مدت 7 شبانه روز در دمای $28^\circ C$ در شرایط ایستا گرماگذاری شد (33 ، 34). غشای سلولزی تولید شده در محیط مایع، پس از 7 روز برداشته شد و در $0.1N NaOH$ به مدت 1 ساعت در $80^\circ C$ جوشانده شد. سپس در آب دیونیزه به مدت 1 ساعت در $80^\circ C$ حرارت داده شد تا بقایای محیط کشت و باکتری ها از غشای سلولزی خارج شود. در مرحله بعد، غشای سلولزی چندین بار در آب دیونیزه غوطه‌ور شد تا pH به $7/4 - 7/2$ برسد. غشای سلولزی در اتوکلاو استریل و تا زمان مصرف در دمای $4^\circ C$ نگهداری شد.

پوشش دهی سلولز باکتریایی با ژلاتین: به منظور پوشش دهی سلولز با ژلاتین و تولید BCG^۳، سلولز به مدت 30 دقیقه در محلول ژلاتین 1% ، غوطه‌ور شد.

مشخصه یابی داربست

خشک نمودن سلولز باکتریایی: به منظور مشخصه‌یابی BC و BCG، ابتدا نمونه‌ها به مدت یک شبانه روز در فریزر $20^\circ C$ - نگهداری شدند. سپس در دستگاه خشک کننده انجمادی به مدت 24 ساعت در دمای $65^\circ C$ - و فشار $0.05mbar$ خشک شده و نمونه آماده شده برای مشخصه یابی مورد استفاده قرار گرفت.

میکروسکوپ الکترونی روبشی (نگاره) (SEM) و میکروسکوپ الکترونی روبشی نشر میدانی (FE-SEM):^۴ ورقه‌های BC و BCG، بر روی یک پایه (stub) قرار گرفته و با روکش طلا-پالادیوم (Au-Pa) به مدت $180s$ ، پوشش‌دهی شدند. سپس نمونه‌ها به وسیله میکروسکوپ الکترونی روبشی مدل LEO 1450VP، از لحاظ ریخت شناسی و اندازه منافذ بررسی شدند. به منظور بررسی نمونه‌ها با میکروسکوپ الکترونی روبشی نشر میدانی (FE-SEM)، مدل Model LMU TESCAN BRNO- Mira3، نمونه‌ها با روکش طلا به مدت $120s$ و $20mA$ پوشش دهی شدند. ریخت‌شناسی شبکه، قطر و اندازه منافذ و نانوفیبریل‌ها با استفاده از نرم‌افزار ImageJ بررسی شد (35 ، 36).

میکروسکوپ نیروی اتمی (AFM):^۵ به منظور تهیه تصاویر توپوگرافی از نمونه‌ها از دستگاه AFM مدل Ara research Brisk استفاده شد. تصویربرداری با استفاده از حالت ضربه زدن، انجام شد. پایه دستگاه، سیلیکون بوده و

³. Bacterial cellulose-Gelatin (BCG)

⁴. Scanning electron microscopy (SEM)

⁵. Field emission- Scanning electron microscopy (FE-SEM)

⁶. Atomic force microscopy (AFM)

¹. Neonatal rat-ventricular cardiomyocytes (nr-vCMCs)

². Human dermal fibroblast (HDF)



شعاع نوک آن ۸mm با فرکانس رزونانس ۳۲۵KHz و ثابت نیرو 40 N/m^2 می‌باشد. پردازش تصاویر، محاسبه زبری سطح، ابعاد نانوفیبریل‌ها و منافذ با استفاده از نرم‌افزار Imager (ایران) تعیین شد (۳۷-۳۹).

زاویه تماسی: زاویه تماسی نمونه‌های خشک به وسیله سیستم اندازه‌گیری زاویه تماسی تعیین شد. مایع انتخاب شده، آب دیونیزه بوده و روش اندازه‌گیری قطره بی‌پایه مورد استفاده قرار گرفت. همچنین حجم قطره آب قرار گرفته بر روی غشاها ۲ میکرولیتر انتخاب گردید (۳۹، ۴۰).

مطالعات سلولی

جداسازی و کشت nr-vCMCs: جداسازی و کشت nr-vCMCs در پژوهش‌های قبل توضیح داده شده است (۴۱). به طور خلاصه، رت‌های نوزاد یک تا دو روزه با استفاده از ایزوفلوران ۵-۴٪ بیهوش شدند. پس از اثبات بیهوشی، سطح شکمی رت‌های نوزاد با اتانول ۷۰٪ ضد عفونی گردید و نمونه های قلب از این رت‌ها جدا شدند. سپس دهلیزها جدا شده و بطن‌ها به قطعات کوچک (۱ mm) تقسیم شدند. قطعات بدست آمده به ارلن دارای دانه‌های شیشه‌ای دایره مانند شامل محلول بافری تفکیک کننده دارای 0.1 mM CaCl_2 ، 5 mM MgCl_2 (Sigma-Aldrich، ۴۵۰ units/ml I کلاژناز، Germany)، $18/75 \text{ Kunitz units/ml DNase I}$ (Sigma-Aldrich) منتقل گردیدند و به مدت ۲۵ دقیقه در شرایط 60 rpm و دمای 37°C گرماگذاری شد. سلول‌های حاصل به فالکونی که قبلاً درون یخ قرار گرفته بود منتقل گردید. قطعات بافتی هضم نشده مجدداً به مدت ۱۵ دقیقه در همان بافر تفکیک کننده و شرایط دمایی سابق گرماگذاری شدند و بعد از هضم سلولی، به سلول‌های حاصل از دور اول، اضافه شدند. سپس تمام سلول‌های حاصل از تفکیک، به مدت ۵ دقیقه با دور 150 g در دمای محیط سانتریفیوژ شدند. محلول رویی حذف شده و رسوب حاصل با محیط رشد

شامل Ham's F10 دارای ۱۰٪ سرم جنینی گاو (FBS) و ۱۰٪ سرم اسب (HS) مخلوط شد. سوسپانسیون سلولی حاصل، درون پلیت‌های ۷ cm مخصوص کشت سلول قرار داده شد و تمامی پلیت‌ها به مدت ۷۵ دقیقه در دمای 37°C و ۵٪ CO_2 گرماگذاری شدند. در این مدت، سلول‌های غیر کاردیومیوسیتی به کف ظرف می‌چسبند. از سوی دیگر، کف پلیت‌های ۴۸ خانه یا ۹۶ خانه با ژلاتین ۱٪، داربست سلولزی و سلولزی غنی شده با ژلاتین، پوشانده شد. به منظور بدست آوردن سوسپانسیون سلولی کاردیومیوسیتی، سلول‌های غیر چسبیده به همراه قطعات بافتی از صافی سلولی نایلونی ۷۰ میکرونی (۷۰- mesh pore size; SPL) عبور داده شدند و درون فالکون جدید منتقل گردیدند. کاردیومیوسیت‌ها شمارش شدند و به تعداد 1.2×10^6 ، بر روی داربست‌های موجود در هر چاهک (خانه) قرار داده شده و در دمای 37°C و ۵٪ CO_2 گرماگذاری شدند. سلول‌های کشت شده در چاهک‌های پوشش داده شده با ژلاتین ۱٪ (بدون داربست) به عنوان گروه کنترل مورد ارزیابی قرار گرفتند.

پس از گرماگذاری شب تا صبح (overnight) کاردیومیوسیت ها، آن‌ها با مخلوط محیط رشد و میتومايسين 10 g/ml C (Sigma-Aldrich) به مدت ۹۰ دقیقه برای مهار تکثیر سلول‌های غیر میوسیت باقی مانده تیمار شدند. محیط رشد متعاقباً با محیط کشت کاردیومیوسیت (محلول ۱:۱ محیط DMEM low glucose (Life technology) و Ham's F10 که با ۲٪ سرم آلبومین گاوی (BSA)، ۵٪ سرم اسب، سدیم آسکوربات 0.4 mM و ۱٪ پنی‌سیلین/استرپتومايسين تکمیل شده بود) جایگزین شد. محیط کشت سلول‌ها روزانه تعویض می‌شد. برای تهیه محیط low glucose DMEM، $9/9 \text{ g/l}$ پودر DMEM و $7/3 \text{ g/l}$ NaHCO_3 در یک لیتر آب دیونیزه حل گردید و سپس فیلتر شد و در دمای 4°C



تعداد ضربان به صورت دستی در مدت زمان یک دقیقه شمارش گردید (۴۲-۴۴).

تجزیه و تحلیل آماری: تجزیه و تحلیل‌های آماری با استفاده از نرم‌افزار 7 GraphPad Prism و روش‌های One-way ANOVA و Two-way ANOVA و تحلیل مقایسه‌ای Tukey,s انجام شد. نتایج به صورت میانگین $\pm$ SD ترسیم شد. آزمایشات با سه بار تکرار انجام شده بود. $P \leq 0.05$ * به عنوان میزان معنی دار بودن نتایج در نظر گرفته شد.

ملاحظات اخلاقی: انجام این مطالعه مطابق با استانداردهای اخلاقی و ملی تحقیقات پزشکی در ایران بوده و توسط کمیته اخلاق دانشگاه فردوسی مشهد مورد تایید و با شناسه اخلاقی IR.UM.REC. 1398. 097 تصویب گردید.

یافته‌ها

کشت باکتری گلوکوناستوباکتر زایلینوس: برای بررسی خلوص، ریخت‌شناسی و واکنش گرم (رنگ آمیزی گرم)، باکتری *G.xylinus* (که در این تحقیق برای ساخت داربست سلولز باکتریایی استفاده شد)، در محیط کشت HS آگار کشت داده شد. پس از رشد باکتری و تهیه گستره، رنگ آمیزی گرم انجام شد. مشاهدات میکروسکوپی شکل میله‌ای (باسیلی) و گرم منفی بودن این باکتری را تایید نمود.

تولید سلولز و خالص‌سازی آن: به منظور تولید سلولز، باکتری در محیط مایع HS، کشت داده شد. پس از ۷ روز سلولز باکتریایی به قطر ۱mm در سطح محیط کشت غنی از اکسیژن تشکیل شد. به دلیل وجود اجزای محیط کشت و نفوذ آن در سلولز، رنگ سلولز قبل از خالص‌سازی زرد رنگ بود. به منظور حذف باکتری‌ها و اجزای باقیمانده محیط کشت، سلولز با استفاده از تیمار بازی، خالص‌سازی شده که در نهایت سلولزی به رنگ سفید به دست آمد.

نگهداری شد. محلول (Bovine serum albumin) BSA نیز با حل کردن ۱/۵۷ g/l BSA، ۰/۵۶ g/l L-آسکوربیک اسید، ۹۴۲/۸ g/l سدیم-پیرووات و ۹۰ g/l D-گلوکز در ۱۰۰۰ میلی‌لیتر آب دیونیزه آماده شد و پس از فیلتر شدن، در دمای ۴°C ذخیره شد.

کشت فیبروبلاست‌های پوستی انسانی: این سلول‌ها از پژوهشکده فناوری زیستی دانشگاه فردوسی مشهد به عنوان هدیه در اختیار ما قرار گرفتند. سلول‌های HDF به تعداد ۸۰۰۰ بر روی داربست‌های موجود در هر خانه از پلیت‌های ۴۸ خانه‌ای قرار گرفته و تحت محیط کشت (v/v) ۸۹/۵٪ DMEM high glucose حاوی (v/v) ۱۰٪ FBS و (v/v) ۰/۵٪ پنی‌سیلین و استرپتومایسین به مدت ۱۰ روز در دمای ۳۷°C و ۵٪ CO_2 گرما گذاری شدند. سلول‌های کشت شده در چاهک‌های پلی استیرنی (PS، بدون داربست) به عنوان گروه کنترل مورد ارزیابی قرار گرفتند.

تصویربرداری با میکروسکوپ نوری: برای بررسی ریخت‌شناسی، میزان چسبندگی و غلظت سلول‌های کشت شده بر روی ژلاتین و داربست‌ها در حالت زنده، با استفاده از دوربین (Canon DS12623, Japan) نصب شده بر روی میکروسکوپ نوری معکوس (Zeiss Axiovert S100, Germany) در روزهای ۱، ۳، ۵ و ۷ تصویربرداری انجام شد. تصویربرداری از سلول‌های HDF کشت شده بر روی چاهک‌های پلی استیرنی بدون داربست PS و داربست‌ها، در روزهای ۳، ۷ و ۱۰ انجام شد.

سنجش ضربان کاردیومیوسیت‌ها: به منظور بررسی رفتار انقباضی کاردیومیوسیت‌های کشت شده، ضربان آن‌ها به وسیله دوربین (Canon DS12623, Japan) نصب شده بر روی میکروسکوپ نوری معکوس (Zeiss Axiovert S100, Germany) در روزهای ۳، ۵ و ۷ فیلم‌برداری شد. سپس



در لابه‌لای نانوفیبریل‌ها نیز، منافذی وجود دارد که با همدیگر مرتبط‌اند. در میکروگراف الکترونی، نانوفیبریل‌ها در BC وضوح بیشتری نسبت به نمونه‌های BCG ژلاتینه دارند. پوشش ژلاتینی سبب این عدم وضوح می‌باشد. اگرچه میکروگراف الکترونی BCG بسیار مشابه BC است؛ اما به دلیل نفوذ ژلاتین درون منافذ سلولز، قطر و تعداد منافذ در BCG کمتر از BC است (شکل ۱ c). بیش از ۶۰٪ منافذ در BC و BCG کمتر از ۲۰۰ نانومتر قطر دارند. توزیع کلی منافذ، در جدول ۱ نشان داده شده است. متوسط قطر منافذ و BCG در محدوده کمتر از ۲۰۰ نانومتر، در BC ۵۷/۰ nm و $171/992 \pm 0/91$ nm BCG و در $134/125 \pm 0/91$ nm بوده است. همچنین، متوسط قطر نانوفیبریل‌ها در BC و BCG اختلاف معناداری ندارد (شکل ۱ d) و به ترتیب $34/62 \pm 0/27$ nm و $30/147 \pm 0/58$ nm می‌باشد.

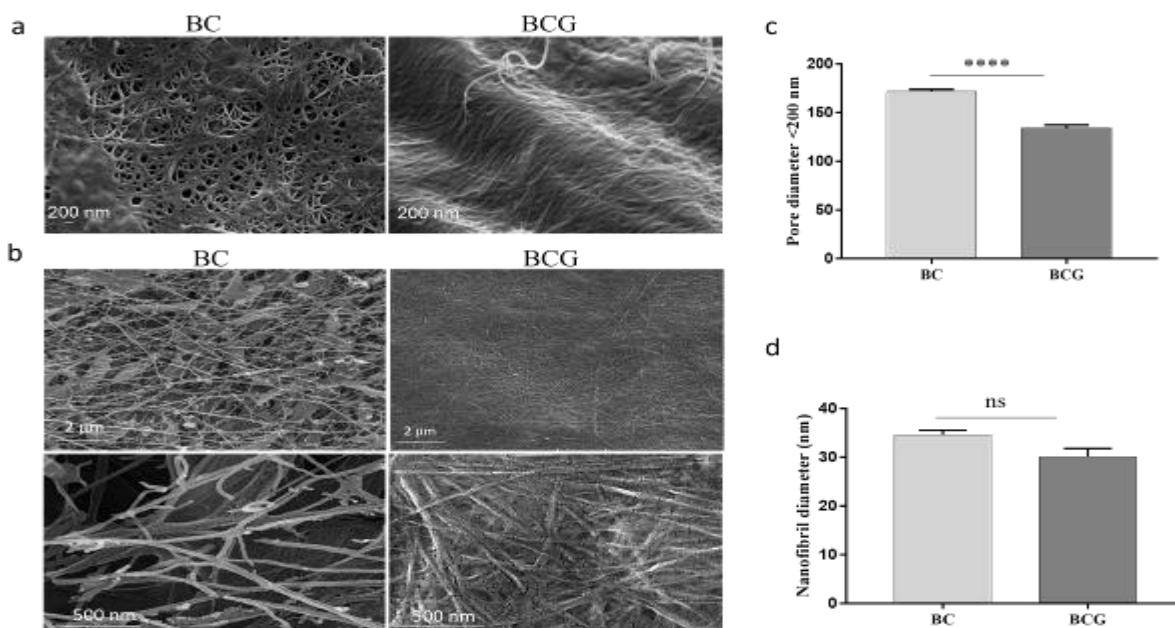
غنی‌سازی سلولز باکتریایی با ژلاتین: داربست BCG هم بر طبق روشی که در قسمت روش‌ها توضیح داده شد، با افزودن ژلاتین سنتز شد. داربست‌های BCG هم مانند BC حالت ژلاتینی داشته، سفید رنگ و قابل انعطاف بودند.

مشخصه‌یابی داربست‌ها

آماده‌سازی داربست‌های BC و BCG بوسیله روش خشک‌سازی انجمادی: به منظور مشخصه‌یابی داربست‌ها، ابتدا آن‌ها با استفاده از دستگاه خشک کننده انجمادی خشک شدند.

بررسی میکروگراف الکترونی (SEM و FE-SEM)

داربست‌های BC و BCG: میکروگراف‌های SEM و FE-SEM از نمونه‌های BC و BCG تهیه گردید. تصاویر بدست آمده از نمونه‌های BC و BCG شبکه‌ای سه بعدی از نانوفیبریل‌ها را نشان داد که در جهات مختلف در هم پیچیده اند و ساختار شبکه را پایدار نگهداشته‌اند (شکل ۱ a و b).



شکل ۱- خصوصیات ریخت شناسی داربست‌ها. (a) تصاویر SEM و FE-SEM (b) از داربست‌های BC و BCG در بزرگنمایی‌های مختلف. (c) تعیین قطر منافذ در محدوده کوچکتر از ۲۰۰ نانومتر، و (d) قطر نانوفیبریل، در داربست‌های BC و BCG. نتایج به عنوان میانگین $\pm$ SD ارائه شد. معنی داری آماری ($P \leq 0.05$ و $n=10$). سلولز باکتریایی، BCG؛ BC: پوشش داده شده با ژلاتین

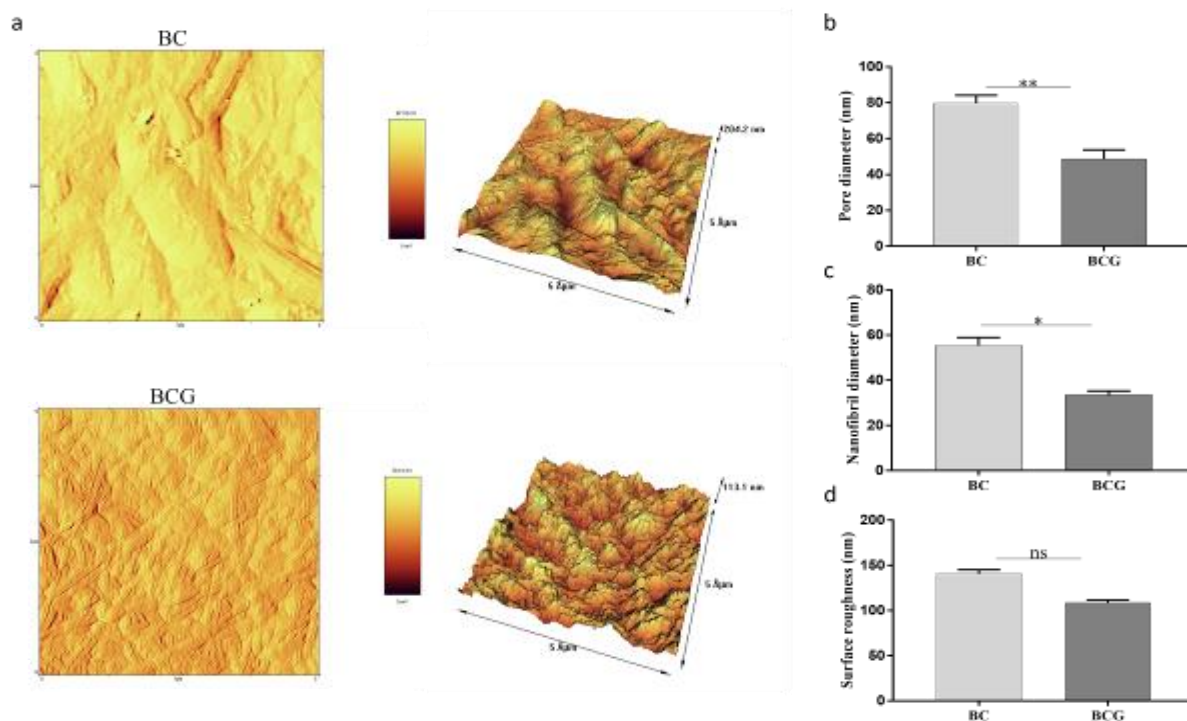


جدول ۱- درصد منافذ با اندازه‌های متفاوت در داربست‌ها

داربست	$> 200 \text{ nm}$	$200-500 \text{ nm}$	$1-5 \mu\text{m}$	$1-10 \mu\text{m}$	$10-100 \mu\text{m}$
BC	۶۱٪	۲۷٪	۱۲٪	-----	-----
BCG	۷۶/۷٪	۲۳/۲۵٪	-----	-----	-----

بررسی ویژگی‌های سطح داربست‌ها با AFM: به منظور بررسی توپوگرافی سطح، زبری سطح (R_a)، قطر نانوفیبریل‌ها و منافذ، تصاویر AFM داربست‌ها بررسی شد (شکل ۲). تمام داربست‌ها متخلخل بودند. شبکه BC تجمعی از فیبریل‌های درهم‌تنیده را نشان می‌دهد و پوشاندن سطح آن با ژلاتین سبب وضوح کمتر نانوفیبریل‌های سلولزی در BCG شده است. نتایج نشان می‌دهد که اندازه متوسط منافذ در BC بیش از BCG می‌باشد که دلیل این اختلاف

اندازه، می‌تواند وجود ژلاتین و نفوذ آن در منافذ سلولزی باشد (شکل ۲ b). متوسط قطر منافذ در نمونه‌های BC و BCG به ترتیب $1/28 \text{ nm} \pm 1/34 \text{ nm}$ ، $79/771 \pm 1/28 \text{ nm}$ و $48/595$ می‌باشد. متوسط قطر نانوفیبریل‌ها در نمونه‌های BC و BCG به ترتیب $1/01 \pm 55/407 \text{ nm}$ ، $8 \pm 0/8 \text{ nm}$ به دست آمد (شکل ۲ c). متوسط قطر نانوفیبریل‌ها در BC بیشتر از BCG بود.



شکل ۲- a توپوگرافی سطحی داربست‌های BC و BCG. ارزیابی (b) قطر منافذ (c) قطر نانوفیبریل و (d) زبری سطح در داربست‌های BC و BCG. نتایج به صورت میانگین $\pm$ SD بیان شد. معنی دار بودن آماری $n=10$ و $P \leq 0.05$: BC: سلولز باکتریایی، BCG: BC پوشش داده شده با ژلاتین



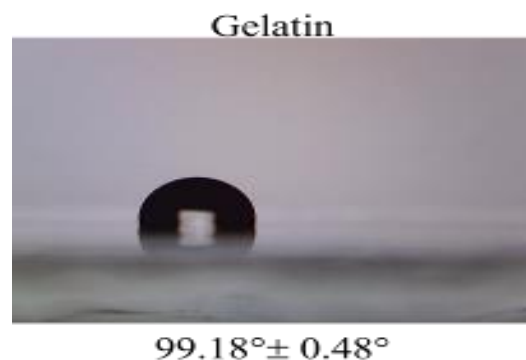
مطالعات سلولی

چسبندگی و ریخت شناسی سلولی: ریخت شناسی و چسبندگی سلول‌های کشت شده بر روی داربست‌های مختلف با استفاده از میکروسکوپ نوری معکوس بررسی شد (اشکال ۴ a و b). تصاویر میکروسکوپ نوری معکوس، وجود کاردیومیوسیت‌های دوکی شکل چسبیده بر روی ژلاتین ۱٪ (گروه کنترل)، BC و BCG را در روزهای ۱، ۳، ۵ و ۷ نشان داد. میزان کاردیومیوسیت‌های چسبیده به ژلاتین، بسیار بیشتر (تقریباً دو برابر) از تعداد آنان در داربست‌های BC و BCG بود (شکل ۴ a). تعداد کاردیومیوسیت‌های چسبیده در داربست‌های BC و BCG بسیار مشابه بوده و تا روز ۷ به تدریج کاهش یافت؛ اما میزان کاردیومیوسیت‌های متصل شده بر روی ژلاتین از روز ۱ تا ۷ کاهشی را نشان نداد. با توجه به تمایز یافته بودن سلول‌های کاردیومیوسیت، تعداد آن‌ها افزایش نیافت اما تصاویر میکروسکوپ، تا حدی گسترش و رشد این سلول‌ها را نشان داد.

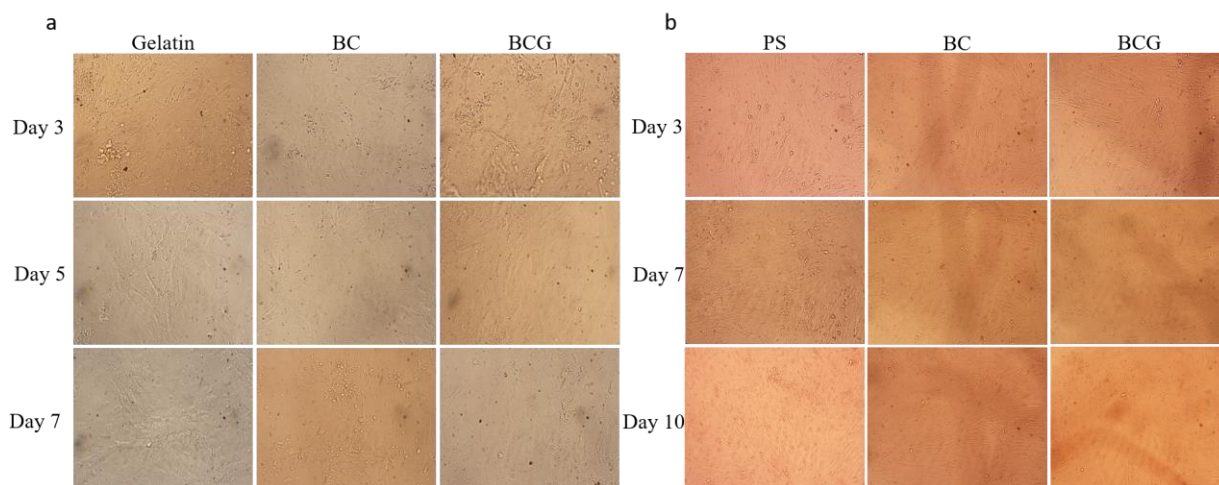
برای برآورد بیشتر قابلیت داربست‌ها برای چسبندگی سلولی، سلول‌های HDF نیز مورد ارزیابی قرار گرفته و اتصال و رشد آن‌ها بر روی داربست بررسی شد. در رابطه با سلول‌های HDF، تصاویر میکروسکوپ نوری، سلول‌هایی دوکی شکل در PS (گروه کنترل)، BC و BCG را نشان دادند. قابلیت چسبندگی و بنابراین تعداد فیبروبلاست‌ها در PS نسبت به BC و BCG بیشتر بود. تعداد فیبروبلاست‌های اتصال یافته بر روی BC و BCG نسبت به کاردیومیوسیت‌ها بیشتر بود و داربست‌ها قابلیت چسبندگی بهتری را برای فیبروبلاست‌ها نشان دادند.

همانطور که در شکل ۲ d مشاهده می‌گردد، در اثر پوشش دار شدن BC با ژلاتین، زبری سطح از $140/92 \pm 1/02$ nm در BC به $108/65 \pm 1/07$ nm در BCG کاهش یافته است (شکل ۲ d).

زاویه تماسی: زاویه بین خط پایه قطره و خط مماس با مرز قطره به عنوان زاویه تماسی در نظر گرفته می‌شود. عدد زاویه تماسی بین 48° – 62° نشان دهنده سطوح آبدوست ملایم هست و سطوح با زاویه تماسی 80° آبگریز ضعیف به شمار می‌آیند (۴۵–۴۷). بیشترین آبدوستی مربوط به BC و BCG بود. به دلیل جذب سریع آب، زاویه تماسی این دو داربست اندازه‌گیری نشد و فیلم جذب آن‌ها ضبط شد (ویدیو تکمیلی ۱، ۲). ژلاتین ۱٪ بالاترین زاویه تماسی به ارزش $99/18^\circ \pm 0/48^\circ$ را نشان داد که نشان دهنده آبگریزی ضعیف ژلاتین است (شکل ۳). تصاویر مربوط به زاویه تماسی BC و BCG به دلیل جذب سریع آب و آبدوستی بالا نشان داده نشده است.



شکل ۳- زاویه تماسی ژلاتین. تصاویر BC و BCG به دلیل جذب سریع آب و آبدوستی بالا نشان داده نشده است.

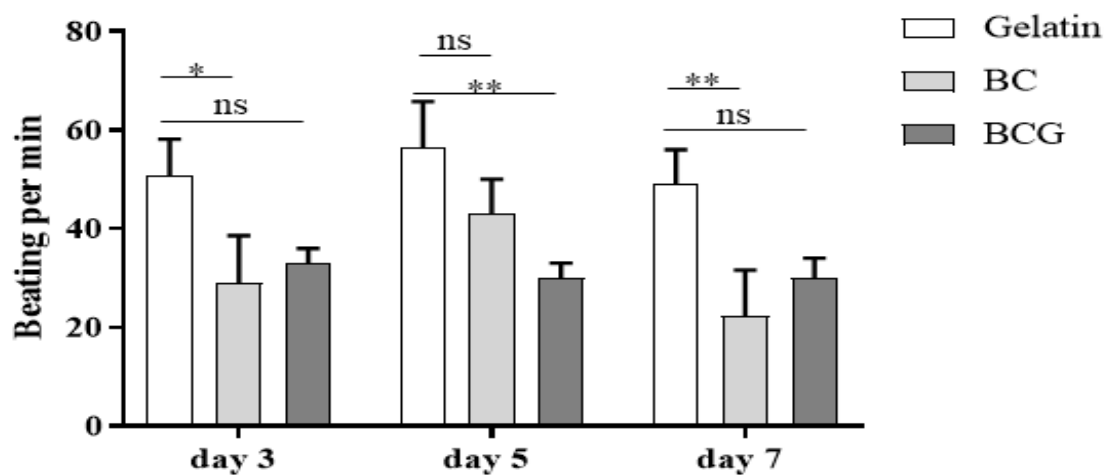


شکل ۴- تصاویر میکروسکوپ نوری (a) کاردیومیوسیت‌های کشت شده بر روی ژلاتین (کنترل)، BC و BCG و (b) سلول‌های HDF کشت شده بر روی PS (کنترل)، BC و BCG، ریخت شناسی دوکی شکل سلول‌ها در درشت نمایی $\times 20$ را نشان می‌دهند. PS: چاهک‌های پلی استیرنی، BC: سلولز باکتریایی، BCG: سلولز باکتریایی پوشیده شده با ژلاتین.

قابلیت انقباض کاردیومیوسیت‌ها

تکمیلی ۳ و ۴) و میزان ضربان در دقیقه در روزهای ۳، ۵ و ۷ به طور دستی محاسبه شد (شکل ۵). فیلم‌های ضبط شده در تمام گروه‌ها ضربان خودبخودی کاردیومیوسیت‌ها را نشان دادند. بیشترین میزان ضربان در میان گروه‌ها مربوط ژلاتین و از لحاظ زمانی مربوط به روز ۵ بعد از کشت بود.

کاردیومیوسیت‌ها از طریق اتصالات فاصله‌دار (gap junctions) با یکدیگر ارتباط برقرار کرده و به طور هماهنگ منقبض می‌گردند. رفتار انقباضی کاردیومیوسیت‌های کشت شده در ژلاتین، BC و BCG با استفاده از یک دوربین متصل به میکروسکوپ نوری تصویربرداری گردید (ویدیوهای



شکل ۵- میزان ضربان کاردیومیوسیت‌های قرار گرفته بر روی ژلاتین، BC و BCG در هر دقیقه در فواصل زمانی متفاوت بعد از کشت. BC: سلولز باکتریایی، BCG: سلولز باکتریایی پوشش داده شده با ژلاتین.



بحث

در مطالعه حاضر، پتانسیل کاربرد ساختارهای زیستی BC و BCG به عنوان داربست برای رشد nr-vCMCs مورد بررسی قرار گرفت. بدین منظور داربست‌های BC و BCG تهیه گردید و خواص فیزیکی و بیولوژیکی آن‌ها مورد ارزیابی قرار گرفت. BC یک پلیمر زیستی دارای ویژگی‌هایی مانند استحکام مکانیکی، زیست سازگاری و تخلخل کافی می‌باشد که به همین علت در مطالعات متعددی به عنوان داربست مناسب برای مهندسی بافت مورد استفاده قرار گرفته است (۴۵، ۴۸). علاوه بر این، ژلاتین که از طریق گرمادهی کلاژن حاصل می‌شود، نیز دارای توالی RGD است که سبب چسبندگی سلولی و مهاجرت می‌گردد (۲۶، ۴۹) در مطالعه حاضر، علاوه بر BC ترکیب BC-ژلاتین، یعنی BCG (BC پوشش داده شده با ژلاتین) نیز تهیه گردید.

تجزیه و تحلیل نتایج بدست آمده از تصاویر SEM، FE-SEM و AFM نشان می‌دهد که در هر دو ساختار BC و BCG تخلخل و ساختار شبکه‌ای نانوفیبریل‌ها به طور گسترده توزیع شده‌اند. ساختارهای شبکه‌ای و متخلخل سبب تحریک اتصالات سلولی شده و انتقال مواد مغذی و اکسیژن را تسهیل می‌کند. در داربست BCG به دلیل نفوذ ژلاتین به منافذ، اندازه قطر منافذ کاهش قابل توجهی را نشان داد که مطابق با نتایج سایر مقالات بود (۲۸، ۵۲-۵۰). به عنوان مثال در مطالعه Taokaew و همکارانش، تجمع ژلاتین در منافذ BCG، سبب کاهش اندازه آن‌ها شده بود (۲۸). اندازه بزرگ‌ترین منافذ در داربست‌های BC و BCG کمتر از ۱ میکرومتر بود، در حالی که اندازه کاردیومیوسیت‌ها حدود ۱۰-۱۰۰ میکرومتر است. در مورد بررسی قطر نانوفیبریل‌ها، Flaig و همکاران (۲۰۲۰) گسترش و مهاجرت nr-vCMCs را بر روی داربست‌های مختلف مقایسه کردند و دریافتند که داربست‌هایی با قطر الیاف ظریفتر (۶۰۰ نانومتر) می‌توانند

گسترش و مهاجرت کاردیومیوسیت‌ها را نسبت به الیاف ۱۳۰۰ نانومتری افزایش دهند (۵۳). در مطالعه ما نیز همانند برخی مطالعات، اندازه‌گیری قطر نانوفیبریل‌ها نشان داد که با افزودن ژلاتین عرض نانوفیبریل‌های سلولزی در داربست‌های BCG از $27 \pm 0 \text{ nm}$ به $62 \pm 34 \text{ nm}$ به $58 \pm 0 \text{ nm}$ کاهش یافت. مثلاً در مطالعات وطن‌خواه و همکاران، قطر نانوفیبریل‌های سلولز استات/ژلاتین که به عنوان ماده ترمیم پوست به کار رفت، با افزایش غلظت ژلاتین از $105 \pm 260 \text{ nm}$ به $52 \pm 198 \text{ nm}$ کاهش یافت و چسبندگی سلول‌ها در غشای دارای ژلاتین بیشتر بود (۵۰، ۵۴). به طور کلی در پژوهش ما، قطر نانوفیبریل‌ها در تمام داربست‌ها در مقیاس کمتر از میکرومتر (نانومتر) $30 \sim \text{nm}$ بود که این موضوع برای تنظیم رفتار سلولی و پشتیبانی مکانیکی داربست مفید است (۵۵).

نتایج بدست آمده از مشاهدات میکروسکوپی AFM شامل قطر نانوفیبریل‌ها و منافذ، توپوگرافی سطح و R_a داربست‌ها مطابق با نتایج سایر مطالعات بود (۳۸، ۵۶-۵۸). همچنین نتایج اندازه منافذ و نانوفیبریل‌ها با روش AFM با نتایج بدست آمده از SEM و FE-SEM مطابقت داشت. سطوح با زبری بیشتر می‌توانند جذب پروتئین و چسبندگی سلولی را افزایش دهند (۳۹، ۵۹، ۶۰). به طوریکه در مطالعه Ran و همکاران، افزودن ژلاتین به BC باعث کاهش زبری سطح و کاهش تکثیر، چسبندگی و تمایز سلول‌های بنیادی مزانشیمی مشتق از مغز استخوان رت شده بود (۳۸). در مطالعات ما، طبق نتایج AFM، اگرچه زبری سطح BC بالاتر از BCG بود؛ اما این اختلاف معنی‌دار نبود و بنابراین چسبندگی سلولی نیز در این دو گروه تفاوت چندانی نداشت. زاویه تماسی آب مربوط به داربست‌ها نقش مهمی در اتصال، تکثیر و گسترش سلولی دارد (۶۱، ۶۲). داربست‌هایی که زاویه تماس آب آن‌ها بین 62° - 48° می‌باشد داربست



سلول‌ها (به دلیل آبدوستی شدید BC و BCG) بوده است و داربست‌ها خاصیت سمیت سلولی نداشته‌اند.

با مطالعه رفتارهای انقباضی کاردیومیوست‌ها در داربست‌ها، ما اثبات کردیم که BC و BCG سوبستراهایی بودند که توانستند رشد و ضربان خودبخودی کاردیومیوست‌ها را بدون هر گونه عامل خارجی پشتیبانی کنند. ضربان سلولی از همان روزهای ابتدایی کشت شروع شد. این ضربان سلولی در نمونه‌های ژلاتین و BC در روز ۵ افزایش یافته و تا روز ۷ کاهش یافت. در پژوهش Ye و همکاران، شمارش دستی تعداد ضربان کاردیومیوست‌های بطنی رت نوزاد کشت شده بر روی سلولز آنیزوتروپ، تعداد حدود ۳۰ بار ضربان در دقیقه در روز پنجم کشت را نشان می‌دهد (۶۳) که در مقایسه با پژوهش ما در روز پنجم، مشابه BCG (۳۰) در دقیقه) بوده و نسبت به BC (۴۳) در دقیقه) کمتر بوده است. مزیت مطالعه حاضر استفاده از سلول‌های کاردیومیوست نوزاد دو روزه رت بود که این سلول‌ها نسبت به کاردیومیوست‌های رت بزرگسال در واکنش به محیط جداسازی سلولی، حساسیت کمتری نشان داده و به میزان بسیار بیشتری استخراج می‌شوند. همچنین، کاردیومیوست‌های نوزاد رت قابلیت انقباض خودبخودی را در همان ساعات اولیه جداسازی و کشت در شرایط *in vitro* دارند، درحالی‌که این قابلیت در رده‌های سلولی کاردیومیوست و سلول‌های قلبی بزرگسالان دیده نشده و یا ناچیز می‌باشد. البته پژوهش حاضر با محدودیت‌هایی نیز روبه‌رو بوده است به طوریکه کاردیومیوست‌های نوزاد رت توانایی کشت طولانی مدت را ندارند. رده‌های سلولی کاردیومیوست‌ها (مانند H9C2 و HL-1 دهلیزی) از لحاظ توانایی ذخیره طولانی مدت و توانایی کشت‌های متوالی، نسبت به سلول‌های کاردیومیوست نوزاد رت مزیت دارند (۶۷-۶۴).

هایی مناسب برای اتصال پروتئین و سلول می‌باشند و به عنوان سطوح آبدوست ملایم در نظر گرفته می‌شوند (۴۵). در صورتیکه سطوح با زاویه تماس ۸۰ درجه، آگریزی ضعیفی دارند اما همچنان به میزان کافی برای چسبندگی و هم‌ردیفی کاردیومیوست‌ها مناسب می‌باشند (۴۷). نتایج پژوهش ما نشان داد که زاویه تماس آب برای BC و BCG بسیار کمتر از ژلاتین است. این می‌تواند به دلیل وجود مقدار بالای گروه‌های OH- در BC و BCG باشد. چسبندگی کمتر کاردیومیوست‌ها به داربست‌ها هم می‌تواند به دلیل آبدوستی شدید BC و BCG باشد. البته در مراحل جداسازی کاردیومیوست‌ها و هضم بافت قلبی، ممکن است بر روی پروتئین‌های موثر بر چسبندگی اثرات تخریبی اندکی اعمال شده باشد که دلیلی بر چسبندگی کمتر کاردیومیوست‌ها نسبت به سلول‌های HDF باشد. زاویه تماسی آب برای ژلاتین ۱/۰٪، حدود ۹۹° بود که آگریزی (ضعیف) آن را نشان می‌دهد که شاید تا حدی برای چسبندگی سلولی کافی باشد. همچنین دلیل چسبندگی بیشتر سلول‌ها در ژلاتین نسبت به داربست‌ها را می‌توان وجود گروه‌های RGD موجود در ژلاتین دانست.

برای کارایی چسبندگی سلولی داربست‌های BC و BCG از سلول‌های nr-vCMCs و HDF استفاده گردید. میزان چسبندگی سلول‌های HDF پس از ۷ روز کشت بر روی BC و BCG از ۵۰ درصد کمی کمتر بود، در حالی که در همان روز مقدار چسبندگی سلول‌های nr-vCMCs به این داربست‌ها حدود ۱۰٪ بود؛ بنابراین چسبندگی کاردیومیوست‌ها بر روی داربست‌ها تا روز ۷ کاهش بسیار یافته بود، در حالی که برای HDFs این کاهش کمتر بود. با توجه به اینکه میزان سلول‌های HDF حتی در چاهک‌های PS (بدون داربست) هم در طول زمان کاهش یافته بود، بنابراین تعداد کمتر سلول‌ها در روزهای آخر کشت به دلیل مشکلات چسبندگی



داربستی را ایجاد نمود که علاوه بر نداشتن سمیت سلولی، دارای زبری سطح و قطر نانوفیبریل متناسب با خصوصیات و نیاز کاردیومیوسیت‌ها بود. به طوریکه سلول‌های کاردیومیوسیت نوزاد دو روزه رت توانستند شکل ظاهری و عملکرد انقباضی خود را بر روی داربست حفظ کنند.

تشکر و قدردانی

این مقاله از پایان‌نامه دانشجویی مقطع دکتری زیست-شناسی سلولی و مولکولی دانشگاه فردوسی مشهد (شماره تصویب ۳/۴۷۷۸۱) استخراج شده است. ضمن تشکر و قدردانی از دانشگاه فردوسی مشهد بابت تامین هزینه‌های این پژوهش، از پژوهشکده فناوری زیستی دانشگاه فردوسی مشهد (دکتر فاطمه بهنام رسولی) نیز برای اهدای سلول‌های فیبروبلاستی پوستی انسانی (HDF) قدردانی می‌شود.

تعارض منافع

نویسندگان اظهار می‌دارند هیچ گونه تعارض منافعی در مورد این مقاله وجود ندارد.

در این پژوهش، سلول‌های nr-vCMC با ظاهر دوکی و بدون فاصله با سلول‌های مجاور بر روی داربست‌های BC و BCG مشاهده شدند و توانستند فعالیت انقباضی خود را نیز حفظ کنند. سلول‌های HDF چسبندگی بهتری را نسبت به nr-vCMCs بر روی داربست‌ها نشان دادند. پوشش دهی BC با ژلاتین سبب چسبندگی بهتر سلول‌های nr-vCMC و HDFs به آن نشد که می‌تواند به دلیل غلظت بسیار پایین ژلاتین در BCG باشد؛ بنابراین، به نظر می‌رسد بتوان با افزایش غلظت ژلاتین و یا سایر پروتئین‌های ماتریکس خارج سلولی، سبب کاهش درجه آبدوستی و افزایش گروه‌های RGD شد و در نتیجه به چسبندگی و رشد بیشتر کاردیومیوسیت‌ها کمک نمود. همچنین می‌توان با تغییرات شیمیایی BC و حتی قرار دادن آنزیم‌هایی در داربست، موجبات تجزیه آن را در شرایط *in vivo* فراهم آورد و داربست مناسب‌تری را برای مهندسی بافت قلب تهیه نمود.

نتیجه‌گیری

ژلاتین و سلولز هر دو خصوصیات مناسبی برای استفاده در مهندسی بافت قلب دارند و ترکیب آنها در این مطالعه

References

1. Courtenay JC, Johns MA, Galembeck F, Deneke C, Lanzoni EM, Costa CA, et al. Surface modified cellulose scaffolds for tissue engineering. *Cellulose*. 2017;24(1):253–67.
2. Drury JL, Mooney DJ. Hydrogels for tissue engineering: Scaffold design variables and applications. *Biomaterials*. 2003;24(24):4337–51.
3. Jawad H, Lyon AR, Harding SE, Ali NN, Boccaccini AR. Myocardial tissue engineering. *British Medical Bulletin*. 2008;87(1):31–47.
4. Ma PX. Scaffolds for tissue fabrication. *Materials Today* [Internet]. 2004;7(5):30–40. Available from: [http://dx.doi.org/10.1016/S1369-7021\(04\)00233-0](http://dx.doi.org/10.1016/S1369-7021(04)00233-0)
5. Arai K, Kitsuka T, Nakayama K. Scaffold-based and scaffold-free cardiac constructs for drug testing. *Biofabrication*. 2021;13(4).



6. Kaiser NJ, Kant RJ, Minor AJ, Coulombe K. Optimizing blended collagen-fibrin hydrogels for cardiac tissue engineering with human iPSC-derived cardiomyocytes. *ACS Biomaterials Science and Engineering*. 2019;5(2):887–99.
7. Riaud M, Martinez MC, Montero-Menei CN. Scaffolds and extracellular vesicles as a promising approach for cardiac regeneration after myocardial infarction. *Pharmaceutics*. 2020;12(12):1–23.
8. Tajabadi M, Goran Orimi H, Ramzgouyan MR, Nemati A, Deravi N, Beheshtizadeh N, et al. Regenerative strategies for the consequences of myocardial infarction: Chronological indication and upcoming visions. *Biomedicine & Pharmacotherapy* [Internet]. 2022;146(December 2021):112584. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2021.112584>
9. Reis LA, Chiu LLY, Liang Y, Hyunh K, Momen A, Radisic M. Acta Biomaterialia A peptide-modified chitosan – collagen hydrogel for cardiac cell culture and delivery. *Acta Biomaterialia* [Internet]. 2012;8(3):1022–36. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.actbio.2011.11.030>
10. Domenech M, Ph D, Polo-corrales L, Ph D, Ramirez-vick JE, Ph D. Tissue Engineering Strategies for Myocardial Regeneration : Acellular vs Cellular Scaffolds ? :1–70.
11. Cetin Y, Sahin MG, Kok FN. Application potential of three-dimensional silk fibroin scaffold using mesenchymal stem cells for cardiac regeneration. *Journal of Biomaterials Applications*. 2021;36(4):740–53.
12. Haroglu D, Eken A, Gönen ZB, Bahar D. Development of a three dimensional (3D) knitted scaffold for myocardial tissue engineering. Part II: biological performance of the knitted scaffolds. *Journal of the Textile Institute*. 2021;
13. Li J, Zhao Y, Zhu W. Targeting angiogenesis in myocardial infarction: Novel therapeutics (Review). *Experimental and Therapeutic Medicine*. 2021;23(1).
14. Venugopal JR, Prabhakaran MP, Mukherjee S, Ravichandran R, Dan K, Ramakrishna S. Biomaterial strategies for alleviation of myocardial infarction. *Journal of the Royal society interface*. 2012;9(66):1–19.
15. Ye S, Jiang L, Su C, Zhu Z, Wen Y, Shao W. International Journal of Biological Macromolecules Development of gelatin / bacterial cellulose composite sponges as potential natural wound dressings. *International Journal of Biological Macromolecules* [Internet]. 2019;133:148–55. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2019.04.095>
16. Jae YJ, Joong KP, Ho NC. Bacterial cellulose production by *Gluconacetobacter hansenii* in an agitated culture without living non-cellulose producing cells. *Enzyme and Microbial Technology*. 2005;37(3):347–54.
17. Entcheva E, Bien H, Yin L, Chung CY, Farrell M, Kostov Y. Functional cardiac cell constructs on cellulose-based scaffolding. *Biomaterials*. 2004;25(26):5753–62.
18. Müller FA, Müller L, Hofmann I, Greil P, Wenzel MM, Staudenmaier R. Cellulose-based scaffold materials for cartilage tissue engineering. *Biomaterials*. 2006;27(21):3955–63.
19. Wang B, Lv X, Chen S, Li Z, Yao J, Peng X, et al. Use of heparinized bacterial cellulose based scaffold for improving angiogenesis in tissue regeneration. *Carbohydrate Polymers* [Internet]. 2018;181(March 2017):948–56. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2017.11.055>
20. Ahrem H, Pretzel D, Endres M, Conrad D, Courseau J, Müller H, et al. Laser-structured bacterial nanocellulose hydrogels support ingrowth and differentiation of chondrocytes and show potential as cartilage implants. *Acta Biomaterialia* [Internet]. 2014;10(3):1341–53. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.actbio.2013.12.004>
21. Martínez Ávila H, Schwarz S, Feldmann EM, Mantas A, Von Bomhard A, Gatenholm P, et al. Biocompatibility evaluation of densified bacterial nanocellulose hydrogel as an implant material for auricular cartilage regeneration. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 2014;98(17):7423–35.

22. Lee SH, Lim YM, Jeong SI, An SJ, Kang SS, Jeong CM, et al. The effect of bacterial cellulose membrane compared with collagen membrane on guided bone regeneration. *Journal of Advanced Prosthodontics*. 2015;7(6):484–95.
23. Leor J, Amsalem Y, Cohen S. Cells , scaffolds , and molecules for myocardial tissue engineering. 2005;105:151–63.
24. M. Cakmak A, Unal S, Sahin A, N. Oktar F, Sengor M, Ekren N, et al. 3D Printed Polycaprolactone/Gelatin/Bacterial Cellulose/Hydroxyapatite Composite Scaffold for Bone Tissue Engineering. *Polymers*. 2020;12(1962):14.
25. Andrade FK, Moreira SMG, Domingues L, Gama FMP. Improving the affinity of fibroblasts for bacterial cellulose using carbohydrate-binding modules fused to RGD. *Journal of Biomedical Materials Research - Part A*. 2010;92(1):9–17.
26. McCain ML, Agarwal A, Nesmith HW, Nesmith AP, Parker KK. Micromolded Gelatin Hydrogels for Extended Culture of Engineered Cardiac Tissues. *Biomaterials*. 2015;35(21):5462–71.
27. Swingler S, Gupta A, Gibson H, Kowalczyk M, Heaselgrave W, Radecka I. Recent advances and applications of bacterial cellulose in biomedicine. *Polymers*. 2021;13(3):1–29.
28. Taokaew S, Seetabhawang S, Siripong P, Phisalaphong M. Biosynthesis and characterization of nanocellulose-gelatin films. *Materials*. 2013;6(3):782–94.
29. Kirdponpattara S, Phisalaphong M, Kongruang S. Gelatin-bacterial cellulose composite sponges thermally cross-linked with glucose for tissue engineering applications. *Carbohydrate Polymers* [Internet]. 2017;177(August):361–8. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2017.08.094>
30. Nakayama A, Kakugo A, Gong JP, Osada Y, Takai M, Erata T, et al. High mechanical strength double-network hydrogel with bacterial cellulose. *Advanced Functional Materials*. 2004;14(11):1124–8.
31. Palaninathan V, Raveendran S, Rochani AK, Chauhan N, Sakamoto Y, Ukai T, et al. Bioactive bacterial cellulose sulfate electrospun nanofibers for tissue engineering applications. *Journal of Tissue Engineering and Regenerative Medicine*. 2018;12(7):1634–45.
32. Mihardja SS, Gonzales JA, Gao D, Sievers RE, Fang Q, Stillson CA, et al. Biomaterials The effect of a peptide-modified thermo-reversible methylcellulose on wound healing and LV function in a chronic myocardial infarction rodent model. *Biomaterials* [Internet]. 2013;34(35):8869–77. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.biomaterials.2013.07.028>
33. Trovatti E, Serafim LS, Freire CSR, Silvestre AJD, Neto CP. Gluconacetobacter sacchari: An efficient bacterial cellulose cell-factory. *Carbohydrate Polymers* [Internet]. 2011;86(3):1417–20. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.carbpol.2011.06.046>
34. Mohammadkazemi F, Azin M, Ashori A. Production of bacterial cellulose using different carbon sources and culture media. *Carbohydrate Polymers*. 2015;117:518–23.
35. Salari M, Sowti Khiabani M, Rezaei Mokarram R, Ghanbarzadeh B, Samadi Kafil H. Preparation and characterization of cellulose nanocrystals from bacterial cellulose produced in sugar beet molasses and cheese whey media. *International Journal of Biological Macromolecules* [Internet]. 2019;122:280–8. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2018.10.136>
36. Jose Gouveia P, Rosa S, Ricotti L, Abecasis B, Almeida H V, Monteiro L, et al. Flexible nanofilms coated with aligned piezoelectric microfiber preserve the contractility of cardiomyocytes. *Biomaterials*. 2017;139(May):213–28.
37. Khan S, Ul-islam M, Wajid M, Israr M, Jang JH, Kong PJ. Nano-gold assisted highly conducting and biocompatible bacterial cellulose-PEDOT:PSS films for biology-device interface applications. *International Journal*



- of Biological Macromolecules [Internet]. 2017;107(September):865–73. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2017.09.064>
38. Ran J, Jiang P, Liu S, Sun G, Yan P, Shen X, et al. Constructing multi-component organic / inorganic composite bacterial cellulose-gelatin / hydroxyapatite double-network scaffold platform for stem cell-mediated bone tissue engineering. Materials Science & Engineering C [Internet]. 2017;78(April 12):130–40. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.msec.2017.04.062>
39. Qiao H, Guo T, Zheng Y, Zhao L, Sun Y, Liu Y, et al. A novel microporous oxidized bacterial cellulose/arginine composite and its effect on behavior of fibroblast/endothelial cell. Carbohydrate Polymers [Internet]. 2018;184(July 2018):323–32. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2017.12.026>
40. Gutiérrez-Hernández JM, Escobar-García DM, Escalante A, Flores H, González FJ, Gatenholm P, et al. In vitro evaluation of osteoblastic cells on bacterial cellulose modified with multi-walled carbon nanotubes as scaffold for bone regeneration. Materials Science and Engineering C [Internet]. 2017;75:445–53. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.msec.2017.02.074>
41. Neshati Z, Schali J MJ, De Vries AAF. The proarrhythmic features of pathological cardiac hypertrophy in neonatal rat ventricular cardiomyocyte cultures. Journal of Applied Physiology. 2020;128(3):545–53.
42. Lei Q, He J, Li D. Electrohydrodynamic 3D Printing of Layer-specifically Oriented, Multiscale Conductive Scaffolds for Cardiac Tissue Engineering. Nanoscale. 2019;11(32):15195–205.
43. Sun H, Zhou J, Huang Z, Qu L, Lin N, Liang C, et al. Carbon nanotube-incorporated collagen hydrogels improve cell alignment and the performance of cardiac constructs. International Journal of Nanomedicine. 2017;12:3109–20.
44. Tao ZW, Mohamed M, Hogan M, Gutierrez L, Birla RK. Optimizing a spontaneously contracting heart tissue patch with rat neonatal cardiac cells on fibrin gel. Journal of Tissue Engineering and Regenerative Medicine. 2017;11(1):153–63.
45. Chiaoprakobkij N, Seetabhawang S, Sanchavanakit N, Phisalaphong M. Fabrication and characterization of novel bacterial cellulose / alginate / gelatin biocomposite film. Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition [Internet]. 2019;30(11):961–82. Available from: <https://doi.org/10.1080/09205063.2019.1613292>
46. Zhukova Y, Hiepen C, Knaus P, Osterland M, Prohaska S, Dunlop JWC, et al. The role of titanium surface nanostructuring on preosteoblast morphology , adhesion , and migration. Advanced Functional Materials. 2017;1601244:1–13.
47. Sanzari I, Dinelli F, Humphrey E. Microstructured hybrid scaffolds for aligning neonatal rat ventricular myocytes. Materials Science & Engineering C [Internet]. 2019;109783. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.msec.2019.109783>
48. Ashrafi Z, Lucia L, Krause W. Bioengineering tunable porosity in bacterial nanocellulose matrices. Soft matter. 2019;15(45):9359–67.
49. Davidenko N, Schuster CF, Bax D V, Farndale RW, Hamaia S, Best SM, et al. Evaluation of cell binding to collagen and gelatin : a study of the effect of 2D and 3D architecture and surface chemistry. Journal of Materials Science: Materials in Medicine [Internet]. 2016;0–1. Available from: <http://dx.doi.org/10.1007/s10856-016-5763-9>
50. Chen Y, Zhou X, Lin Q. Bacterial cellulose / gelatin composites: in situ preparation and glutaraldehyde treatment. Cellulose. 2014;21(August):2679–2693.
51. Chhavi S, K BN, Puneet P. Ternary nano-biocomposite films using synergistic combination of bacterial cellulose with chitosan and gelatin for tissue engineering applications. Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition [Internet]. 2020;32(2):166–88. Available from: <http://dx.doi.org/10.1080/09205063.2020.1822122>

52. Mirtaghavi A, Baldwin A, Tanideh N, Zarei M, Muthuraj R, Cao Y, et al. Crosslinked porous three-dimensional cellulose nanofibers-gelatin biocomposite scaffolds for tissue regeneration. *International Journal of Biological Macromolecules*. 2020;164:1949–59.
53. Flaig F, Rago H, Simon A, Revet G, Kitsara M, Kitasato L, et al. Design of functional electrospun scaffolds based on poly (glycerol sebacate) elastomer and poly (lactic acid) for cardiac tissue engineering. *ACS Biomaterials Science and Engineering*. 2020;6(4):2388–400.
54. Vatankhah E, Prabhakaran MP, Jin G, Mobarakeh LG, Ramakrishna S. Development of nanofibrous cellulose acetate/gelatin skin substitutes for variety wound treatment applications. *Journal of biomaterials applications*. 2014;28(6):909–21.
55. D. Dozois M, C. Bahlmann L, Zilberman Y, Tang X (Shirley). Carbon nanomaterial-enhanced scaffolds for the creation of cardiac tissue constructs: a new frontier in cardiac tissue engineering. *Carbon* [Internet]. 2017;338–49. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.carbon.2017.05.050>
56. Fernandes M, Gama M, Pedro Souto A, Dourado F. Development of novel bacterial cellulose composites for the textile and shoe industry. *Microbial biotechnology*. 2019;12(4):650–61.
57. Li G, Nandgaonkar AG, Wang Q, Zhang J, Krause WE, Wei Q, et al. Laccase-immobilized bacterial cellulose / TiO₂ functionalized composite membranes: Evaluation for photo- and bio-catalytic dye degradation. *Journal of Membrane Science* [Internet]. 2017;525(November 2016):89–98. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.memsci.2016.10.033>
58. Treesuppharat W, Rojanapanthu P, Siangsano C, Manuspiya H, Ummartyotin S. Synthesis and characterization of bacterial cellulose and gelatin-based hydrogel composites for drug-delivery systems. *Biotechnology Reports* [Internet]. 2017;15(March):84–91. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.btre.2017.07.002>
59. Scopelliti PE, Borgonovo A, Indrieri M, Giorgetti L, Milani P, Carbone R, et al. The effect of surface nanometre-scale morphology on protein adsorption. *PLoS ONE*. 2010;5(7):1–9.
60. Rechendorff K, Hovgaard MB, Foss M, Zhdanov VP, Besenbacher F. Enhancement of protein adsorption induced by surface roughness. *Langmuir* [Internet]. 2006;22:10885–8. Available from: <https://doi.org/10.1021/la0621923>
61. Chiaoprakobkij N, Suwanmajo T, Sanchavanakit N, Phisalaphong M. Curcumin-Loaded Bacterial Cellulose / Alginate / Gelatin as a multifunctional biopolymer composite film. *Molecules* [Internet]. 2020;25(17):3800. Available from: <https://doi.org/10.3390/molecules25173800>
62. Zhao G, Zhang X, Li B, Huang G, Xu F, Zhang X. Solvent-free fabrication of carbon nanotube/silk fibroin electrospun matrices for enhancing cardiomyocyte functionalities. *ACS Biomaterials science & engineering*. 2020;(February 3):1630–40.
63. Ye D, Yang P, Lei X, Zhang D, Li L, Chang C, et al. Robust anisotropic cellulose hydrogels fabricated via strong self-robust anisotropic cellulose hydrogels fabricated via strong self-aggregation forces for cardiomyocytes unidirectional growth. *Chemistry of materials*. 2018;30(15):5175–5183.
64. Onódi Z, Visnovitz T, Kiss B, Hambalkó S, Koncz A, Ágg B, et al. Systematic transcriptomic and phenotypic characterization of human and murine cardiac myocyte cell lines and primary cardiomyocytes reveals serious limitations and low resemblances to adult cardiac phenotype. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*. 2022;165(November 2021):19–30.
65. Kuznetsov A V., Javadov S, Sickinger S, Frotschnig S, Grimm M. H9c2 and HL-1 cells demonstrate distinct features of energy metabolism, mitochondrial function and sensitivity to hypoxia-reoxygenation. *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Cell Research* [Internet]. 2015;1853(2):276–84. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbamcr.2014.11.015>



66. Watkins SJ, Borthwick GM, Arthur HM. The H9C2 cell line and primary neonatal cardiomyocyte cells show similar hypertrophic responses in vitro. *In Vitro Cellular and Developmental Biology - Animal*. 2011;47(2):125–31.
67. Ehler E, Moore-morris T, Lange S. Isolation and Culture of Neonatal Mouse Cardiomyocytes. 2013;(September):1–10.



Bacterial Cellulose Encapsulated in Gelatin as a Scaffold for Cardiac Tissue Engineering

Mohaddeseh Salehghamari¹, Mansour Mashregi^{1,2,3}, Maryam M. Matin^{1,4}, Zeinab Neshati^{1,4,*}

1- Department of Biology, Faculty of Science, Ferdowsi University of Mashhad, Mashhad, Iran

2- Industrial Biotechnology Research Group, Institute of Biotechnology, Ferdowsi University of Mashhad, Mashhad, Iran

3- Nano Research Center, Ferdowsi University of Mashhad, Mashhad, Iran

4- Novel Diagnostics and Therapeutics Research Group, Institute of Biotechnology, Ferdowsi University of Mashhad, Mashhad, Iran.

Original Article

Received: 7 Jun 2023

Accepted: 15 Oct 2023

*Corresponding Author:

Zeinab Neshati, Department of Biology, Faculty of Science, Ferdowsi University of Mashhad, Mashhad, Iran.

TEL: +98-(0)51-38805478

Email: neshati@um.ac.ir

ABSTRACT

Introduction

Myocardial infarction is one of the leading causes of death worldwide. The rate of heart tissue regeneration is limited following myocardial infarction. The combination of cell therapy and tissue engineering technology can lead to widespread clinical applications. In this study, we investigated the capability of the scaffolds to support cardiomyocyte attachment and growth cardiac tissue engineering.

Materials and Methods

A bacterial cellulose (BC) scaffold was prepared and coated with gelatin to form a gelatin-coated BC (BCG) scaffold. BC and BCG scaffolds were characterized using SEM, FE-SEM, AFM, and contact angle measurements. Neonatal rat-ventricular cardiomyocytes (nr-vCMCs) were cultured on scaffolds to explore the capability of the scaffolds (for cell attachment and survival) and were compared with human dermal fibroblasts (HDFs)

Results

The results showed that the average diameter of nanofibrils and surface roughness were suitable for cardiomyocyte culture. The contractile activity of nr-vCMCs remained during culture duration, but the mean beating frequency gradually decreased from the fifth to seventh day of culture. According to the results of light microscopy images, the adhesion of HDFs on the scaffolds was greater than cardiomyocyte attachment throughout the cell culture duration.

Conclusion

In addition to not being cytotoxic, BC and BCG have the appropriate physicochemical properties to preserve the morphology and contractile function of neonatal rat cardiomyocytes.

Keywords

Cardiac tissue engineering, Bacterial cellulose scaffold, Gelatin, Neonatal rat-ventricular cardiomyocytes

► **Please cite this article as:** Salehghamari M, Mashregi M, Matin M. M, Neshati Z. Bacterial Cellulose Encapsulated in Gelatin as a Scaffold for Cardiac Tissue Engineering. J Neyshabur Univ Med Sci 2022;10(2):153-171.