

# تأثیر زمان هضم آنزیم پپسین بر خواص هیدروژل حساس به دمای مستخرج از پرده آمینوتیک انسانی

گل آرا کفیلی<sup>۱</sup>، الناز تمجید<sup>۲</sup>، حسن نیک‌نژاد<sup>۳</sup>، عبدالرضا سیم‌چی<sup>۱،\*،۴</sup>

۱- دانشجوی دکتری نانوفناوری، پژوهشکده علوم و فناوری نانو، دانشگاه صنعتی شریف، تهران، ایران

۲- استادیار، گروه نانوزیست فناوری، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران

۳- دانشیار، گروه فارماکولوژی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، تهران، ایران

۴- استاد، دانشکده مهندسی و علم مواد، دانشگاه صنعتی شریف، تهران، ایران

\*صندوق پستی ۱۴۵۸۸۸۹۶۹۴، تهران، ایران

simchi@sharif.edu

پذیرش: ۱۴۰۱/۰۲/۱۰

دریافت: ۱۴۰۰/۰۲/۲۵

## چکیده

پرده آمینوتیک انسان به‌عنوان معدود بافت‌های دگرپیوند انسانی در دسترس محسوب می‌شود که کاربرد بالینی فراوانی در حوزه ترمیم زخم دارد. زیست‌سازگاری، خاصیت ضدباکتری، ایمنی‌زایی کم و جلوگیری از به جای ماندن اثر زخم از جمله ویژگی‌های این ماده است. تهیه پرده آمینوتیک به صورت هیدروژل می‌تواند موجب امکان استفاده از آن به‌عنوان حامل سلول، هیدروژل تزریقی و همچنین بستری مناسب برای کشت سلول شود. در این پژوهش، اثر زمان هضم بر ریزساختار، سینتیک ژل شدن و خواص رئولوژیکی و زیستی هیدروژل حاصل از پرده آمینوتیک انسانی بررسی شده است. نتایج حاصل از پژوهش نشان داد که حداقل زمان لازم برای هضم کامل پودر پرده آمینوتیک ۲۴ ساعت است. آزمون‌های رئولوژیکی مبین آن بود که با افزایش زمان انحلال به ۷۲ ساعت، مدول برشی، قطر الیاف تشکیل شده در هیدروژل و سرعت ژل شدن افزایش می‌یابد. آزمون‌های زیست‌سازگاری توسط سلول‌های فیروبلاست L929 نیز نشان داد که افزایش زمان انحلال تأثیری بر سمیت سلولی ندارد. همچنین دریافت شد که به دلیل وجود مولکول‌های سازنده زیست فعال در محیط برون سلولی پرده آمینوتیک، رشد و تکثیر سلول‌ها بهتر می‌شود. نتیجه این پژوهش می‌تواند در توسعه هیدروژل‌های مهندسی بافت بر پایه پرده آمینوتیک انسانی مفید واقع شود.

**کلید واژگان:** پرده آمینوتیک؛ هضم؛ هیدروژل؛ خواص رئولوژیکی؛ سینتیک ژل شدن

## ۱-مقدمه

اغلب مواد زیستی قابلیت تقلید تمامی پیچیدگی های محیط برون سلولی<sup>۱</sup> (ECM) طبیعی را ندارند و بنابراین نمی توانند ریخت شناسی<sup>۲</sup> و عملکرد طبیعی سلول ها را باز سازی کند. این محیط حاوی مولکول های ساختاری و عملکردی ترشح شده از سلول های موجود در هر بافت می باشد و بنابراین، آرایش و ترکیب زیست شیمیایی آن برای هر نوع از بافت متمایز است [۱]. استفاده از هیدروژل مستخرج از محیط برون سلولی بافت های طبیعی می تواند محیطی بهینه برای رشد بافت فراهم کند. چو<sup>۳</sup> و همکاران [۲] برای اولین بار استفاده از هیدروژل مستخرج از بافت به عنوان جوهر زیستی را توسعه دادند. نتایج حاصل از این پژوهش نشان داد که جوهر زیستی مستخرج از بافت های چربی، غضروف و قلب خوک توانایی فراهم کردن شرایط مناسب برای زنده ماندن و عملکرد طولانی مدت سلول ها را دارا می باشد.

از بین بافت های مختلف، بافت پرده آمینوتیک (آمیون) انسانی به دلیل زیست سازگاری عالی، فعالیت ضد التهابی، ایمنی زایی کم و خاصیت ضد باکتریایی از اهمیت ویژه ای برخوردار است [۳]. امروزه، بافت پرده آمینوتیک برای ترمیم زخم و و مدیریت سوختگی پوست کاربرد فراوانی دارد [۴]. با وجود مزایای استفاده از بافت پرده آمینوتیک در کاربردهای کلینیکی، برخی محدودیت های اساسی مانند چگالی زیاد بافت<sup>۴</sup> باعث محدودیت نفوذ و مهاجرت سلول ها می شود [۵]. لذا فراوری پرده آمینوتیک به صورت هیدروژل، می تواند گزینه مناسب تری برای حمل سلول ها یا نفوذ و مهاجرت سلول ها برای باز سازی بافت مورد نظر باشد [۵، ۶]. پرده آمینوتیک نیز مانند سایر بافت های

سلول زدایی شده می تواند از طریق هضم با آنزیم پیپسین، انحلال یافته و به صورت هیدروژلی با شکل دلخواه فراوری شود، به گونه ای که از عملکرد<sup>۵</sup> و ریخت طبیعی سلول ها حمایت به عمل آید [۶]. با توجه به دردسترس بودن پرده آمینوتیک انسانی به عنوان معدود بافت های پیوندی از انسانی دیگر<sup>۶</sup> و همچنین استفاده بالینی آن در حوزه پزشکی، فراوری پرده آمینوتیک به صورت هیدروژل می تواند به عنوان روشی قابل اعتماد در سلول درمانی، تزریق به فرد میزبان و ترمیم زخم محسوب شود [۵].

تشکیل هیدروژل مستخرج از بافت شامل دو مرحله کلی انحلال محیط برون سلولی به ترکیبات تک پار<sup>۷</sup> پروتئین و خنثی سازی کنترل شده با دما/ pH برای تشکیل مجدد پیوند های بین مولکولی اجزای تک پار به ژل همگن می باشد [۱]. بنابراین، عوامل مختلفی مانند غلظت، استحکام یونی، pH و زمان انحلال بر خواص هیدروژل نهایی تأثیر گذار است. به طور مثال، افزایش غلظت نمک از ۰/۵ برابر PBS تا ۱/۵ برابر PBS موجب تأخیر در ژل شدن از ۲۰ دقیقه تا بیش از ۸ ساعت و همچنین کاهش مدول هیدروژل می شود [۷].

یکی از مهم ترین عوامل تأثیر گذار بر خواص هیدروژل، زمان هضم با آنزیم پیپسین می باشد. عملکرد پیپسین بسیار حساس به محل شکاف<sup>۸</sup> می باشد. به طور مثال، آنزیم پیپسین به صورت انتخابی تلوپپتیدهای کلاژن نوع I را با سرعت بیشتری نسبت به ساختار ماریچ سه گانه<sup>۹</sup> بدون شکاف ویژه<sup>۱۰</sup> هضم می کند [۸]. ژائو و همکاران<sup>۱۱</sup> چاپ پذیری هیدروژل مستخرج از بافت تاندون بعد از انحلال به مدت ۳ (گرانروی زیاد)، ۱۲ (گرانروی متوسط) و ۷۲ (گرانروی کم) ساعت را مورد بررسی قرار دادند. نتایج

<sup>۱</sup> Monomer<sup>۲</sup> Cleavage site<sup>۳</sup> Triple helix<sup>۴</sup> Non-specific cleavage<sup>۵</sup> Zhao et al.<sup>۱</sup> Extracellular matrix (ECM)<sup>۲</sup> Morphology<sup>۳</sup> Cho et al.<sup>۴</sup> High density of texture<sup>۵</sup> Physiology<sup>۶</sup> Allograft

پس از جدا کردن پرده آمینوتیک، برای حذف لکه های خون شستشو با بافر PBS حاوی ۱ درصد حجمی/حجمی، پنیسیلین ۱/۱ سترپتومايسين انجام شد. برای سلول زدایی از بافت، پرده آمینوتیک با سطح اپیتلیال به سمت بالا در پتری دیش قرار داده شد و به مدت ۱۰ دقیقه با ۰/۰۵ درصد تریپسین-EDTA در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد انکوبه و برای خشی شدن اثر تریپسین در PBS غوطه ور شد. سپس سلول ها با استفاده از خراشنده سلول<sup>۵</sup> از سطح پرده آمینوتیک جدا شدند و مجدداً پرده آمینوتیک در PBS قرار گرفت. نمونه های بافت سلول زدایی شده در زیر هود با جریان آرام<sup>۶</sup> تحت شرایط استریل خشک شدند. پرده آمینوتیک سلول زدایی شده با استفاده از آسیاب بلوطی به صورت پودر تهیه شد.

#### ۲-۲ تهیه هیدروژل مستخرج از پرده آمینوتیک

برای تهیه هیدروژل، پودر پرده آمینوتیک با غلظت ثابت ۲ در صد وزنی/حجمی در ۱۰/۰۱ M HCl به همراه ۱۰ درصد وزنی/وزنی آنزیم پپسین به مدت ۶، ۱۲، ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت در دمای اتاق مخلوط شد. سپس، تنظیم pH در حد ۷/۴ با استفاده از محلول NaOH با غلظت ۱M انجام شد. هیدروژل تهیه شده پس از قرارگیری به مدت ۱ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد به ژل تبدیل شد.

#### ۳-۲ ارزیابی فرایند سلول زدایی از بافت

برای انجام رنگ آمیزی بافت شناسی<sup>۷</sup>، بافت پرده آمینوتیک قبل و بعد از سلول زدایی در فرمالین ۴ درصد تثبیت<sup>۸</sup> و آب گیری<sup>۹</sup> نمونه ها در سری اتانول ۳۰، ۵۰، ۷۰ و ۹۰ درصد هر کدام به مدت ۴۵ دقیقه انجام شد. نمونه های تثبیت شده با PBS شسته شدند و سپس به مدت یک شبانه روز در اتانول مطلق غوطه ور شدند. پس از بلوک

نشان داد که زمان کوتاه انحلال موجب بهبود چاپ پذیری، دقت شکل گیری<sup>۱</sup> و چیده شدن<sup>۲</sup> جوهر زیستی مستخرج از تاندون می شود [۹]. در پژوهش انجام شده توسط پولیوت و همکاران<sup>۳</sup>، اثر هضم توسط آنزیم پپسین بر خواص هیدروژل مستخرج از بافت ریه خوک بررسی شد. آنها نشان دادند که برخلاف تصور رایج در خصوص هیدروژل های مستخرج از بافت، زمان های کوتاه انحلال در حد ۴ تا ۲۴ ساعت، حمایت مناسبتری از سلول های رده ریه فراهم می آورد که به علت ریزساختار همگن تر و خواص مکانیکی مطلوب در این نمونه ها است [۱۰].

تا آنجا که مطالعات این گروه نشان می دهد، تاکنون بررسی نظام مندی بر تأثیر زمان هضم با آنزیم پپسین روی خواص هیدروژل مستخرج از بافت پرده آمینوتیک انسان انجام شده است. بنابراین، هدف از این پژوهش مطالعه و بررسی اثر زمان انحلال پرده آمینوتیک روی خواص رئولوژیکی، ساختاری و زیستی هیدروژل آمینون می باشد.

#### ۲- مواد و روش ها

در این پژوهش از تریپسین-EDTA (Bioidea، ایران)، پنیسیلین ۱/۱ سترپتومايسين (Gibco، ایالات متحده آمریکا)، کلریدریک اسید (Merck، آلمان)، محیط کشت DMEM (Gibco، ایالات متحده آمریکا)، پودر MTT (Sigma، ایالات متحده آمریکا)، آنزیم پپسین (Sigma، ایالات متحده آمریکا)، FBS (Bioidea، ایران)، گلو تارا لدهید (Merck، آلمان)، DMSO (Biotech DNA، ایران) استفاده شد.

#### ۲-۱ آماده سازی و سلول زدایی بافت پرده آمینوتیک

جفت حاصل از زایمان سزارین از مادرهای سالم با نتیجه منفی ویروس ایدز، سیفیلیس<sup>۴</sup>، هپاتیت B و C تهیه شد.

<sup>۱</sup> Laminar

<sup>۷</sup> Histological staining

<sup>۸</sup> Fix

<sup>۹</sup> Dehydration

<sup>۱</sup> Shape fidelity

<sup>۲</sup> Stacking

<sup>۳</sup> Pouliot et al.

<sup>۴</sup> Syphilis

<sup>۵</sup> Cell scraper

گیری و انتقال لایه نازکی از بافت روی لام، رنگ آمیزی هماتوکسیلین و ائوزین<sup>۱</sup> برای بررسی هسته سلول، سیتوپلاسم سلول و محیط برون سلولی و رنگ آمیزی تری کروم ماسونی<sup>۲</sup> برای بررسی کیفی کلاژن به مدت ۱۵ دقیقه انجام شدند.

برای بررسی ریزساختار با استفاده از میکروسکوپ الکترونی روبشی، بافت پرده آمینوتیک قبل و بعد از سلول زدایی با فرمالین ۴ درصد تثبیت شد. نمونه های آب گیری شده در شرایط استریل زیر هود با جریان آرام خشک شدند و تصویربرداری با میکروسکوپ الکترونی روبشی با مدل VEGA\TESCAN-XMU (ساخت جمهوری چک) با ولتاژ کاری ۱۵ کیلو ولت انجام شد.

۲-۴ ارزیابی خواص زیستی هیدروژل مستخرج از پرده آمینوتیک

#### ۲-۴-۱ کشت سلول L929

سلول های L929 در فلاسک ۲۵ با استفاده از محیط کشت DMEM حاوی ۱۰ درصد FBS در انکوباتور CO<sub>2</sub> و دمای ۳۷°C کشت داده شدند. وقتی فراوانی سلول ها به حدود ۸۰-۹۰ درصد رسید، سلول ها با استفاده از ۰/۲۵ درصد تریپسین-EDTA از کف ظرف جدا شد و اثر تریپسین با افزودن محیط کشت خنثی شد. سپس سانتریفیوژ با ۱۵۰۰ دور بر دقیقه به مدت ۵ دقیقه انجام شد تا سلول ها رسوب کنند. محیط روی سلول ها خارج و محیط کشت جدید به سلول ها افزوده شد. چندین بار پیتاژ انجام شد تا سوسپانسیون سلولی یکنواخت شود. سپس، غلظت سلولی با روش رنگ آمیزی با تریپان بلو تعیین شد.

#### ۲-۴-۲ بررسی سمیت سلولی با آزمون MTT

سمیت سلولی هیدروژل ها با ارزیابی MTT عصاره های مستخرج از هیدروژل مطابق با ISO 10993-5 انجام شد. قبل از مطالعات کشت سلولی، هیدروژل ها با غوطه وری در ۷۰ درصد اتانول به مدت یک شبانه روز استریل شدند

و سپس دو بار در آب استریل شسته و خشک شدند. پس از تابش نور UV به مدت یک ساعت، دیسک های هیدروژل با مساحت سطح حدود ۳ سانتی متر مربع در ۱ میلی لیتر محیط کشت حاوی FBS ۱۰ در صد در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد به مدت ۱، ۴ و ۷ روز انکوبه شدند. بعد از انکوباسیون، محیط کشت های حاوی عصاره جمع آوری شدند. محیط کشت حاوی FBS به عنوان کنترل در نظر گرفته شد. برای انجام آزمون MTT، ۱۰<sup>۴</sup> سلول در هر خانه از ظرف ۹۶ خانه کاشته و به مدت ۲۴ ساعت انکوبه شدند. ۴ تکرار برای هر نمونه در نظر گرفته شد. عصاره ها روی تک لایه سلول های L929 در ظرف ۹۶ خانه به مقدار ۱۰۰ ماکرو لیتر به ازای هر خانه ریخته و به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد انکوبه شدند. سپس، محیط روی سلول ها با ۱۰۰ ماکرو لیتر ماده MTT تهیه شده در محیط کشت فاقد FBS با غلظت ۰/۵ میلی گرم بر میلی لیتر تعویض و سلول ها به مدت ۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد انکوبه شدند. محیط از چاهک ها خارج و کریستال های فرمازان در ۱۰۰ ماکرو لیتر DMSO حل شدند. جذب نمونه ها در ۵۴۵ نانومتر با استفاده از خوانشگر الیزا (BIOTEK، مدل MRP4، ساخت کشور آمریکا) ثبت و زنده مانی سلولی با استفاده از معادله ۱ محاسبه شد [۱۱].

معادله ۱

= درصد زنده مانی سلول

۱۰۰ × میانگین جذب نمونه / میانگین جذب کنترل

۲-۴-۳ خواص رئولوژیکی هیدروژل مستخرج از پرده

#### آمینوتیک

آزمون های رئولوژی با دستگاه رئومتر (Anton Paar، ساخت کشور آمریکا) با استفاده از رئومتری صفحه

<sup>۱</sup> Masson's trichrome (MTS)

<sup>۲</sup> Hematoxylin and Eosin (H&E)

۱۰۰ ماکرولیتر از هیدروژل در هر چاهک از ظرف ۹۶ خانه ریخته شد. ۵ تکرار برای هر نمونه در نظر گرفته شد. دستگاه خوانشگر (BIOTEK, مدل PowerWave XS, ساخت کشور آمریکا) ابتدا تا ۳۷ درجه سانتی‌گراد پیش‌گرم شد و سپس ظرف ۹۶ خانه داخل دستگاه قرار گرفت و جذب چاهک‌ها در طول موج ۴۰۵ نانومتر هر دو دقیقه یک‌بار به مدت ۴۰ دقیقه اندازه‌گیری شد. مقادیر جذب ثبت و منحنی نرماله رسم شد. برای نرماله کردن مقادیر جذب از معادله ۵ استفاده شد. در این معادله، A مقدار جذب در زمان مشخص، A<sub>0</sub> مقدار جذب اولیه و A<sub>max</sub> حداکثر مقدار جذب است [۱۳].

معادله ۵

$$\text{Normalized Absorption (NA)} = \frac{A - A_0}{A_{\max} - A_0}$$

### ۳- نتایج

#### ۳-۱ سلول‌زدایی از بافت پرده آمیوتیک

سلول‌های اپیتلیال روی غشای پایه پرده آمیوتیک قبل از سلول‌زدایی در شکل ۱(الف) قابل مشاهده‌اند. نتایج رنگ‌آمیزی هماتوکسیلین و ائوزین نشان می‌دهد که سلول‌ها به خوبی از طریق فرایند سلول‌زدایی حذف شده‌اند (شکل ۱(ب)). سطح سنگ‌فرشی بافت پرده آمیوتیک در تصویر میکروسکوپ الکترونی روبشی تأیید کننده حضور سلول‌های اپیتلیال می‌باشد (شکل ۱(ه)) که با انجام فرایند سلول‌زدایی حذف شده‌اند. شبکه نانولیفی پرده آمیوتیک سلول‌زدایی شده در شکل ۱(و) مشخص است. رنگ‌آمیزی تری‌کروم ماسونی برای بررسی کیفی کلاژن در بافت پرده آمیوتیک قبل و بعد از سلول‌زدایی انجام شده است. پس از سلول‌زدایی، سلول‌های اپیتلیال از سطح پرده آمیوتیک حذف شده‌اند. اما کماکان رنگ آبی

موازی<sup>۱</sup> با قطر ۲۵ mm حاوی مخزن خنک‌کننده<sup>۲</sup> برای تنظیم دما انجام شد. نمونه‌های هیدروژل در دمای ۴ °C حمل شدند و مقداری از هیدروژل روی صفحه رثومتر ریخته شد. لبه صفحه‌های حاوی نمونه برای جلوگیری از تبخیر با روغن سیلیکون پوشانده شد. برای انجام آزمون روبش دمایی<sup>۳</sup>، دمای نمونه با نرخ ۵ درجه سانتی‌گراد بر دقیقه از ۴ تا ۳۷ درجه سانتی‌گراد افزایش یافت و سپس به مدت ۶۰ دقیقه در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد باقی ماند. حین افزایش دما و ژل شدن نمونه، مدول نوسانی<sup>۴</sup> و کرنش نمونه به ترتیب روی ۱ هرتز و ۱ درصد تنظیم شدند. خواص ویسکوالاستیک خطی هیدروژل‌ها با استفاده از آزمون روبش فرکانس بین ۰/۰۱ تا ۱۰۰ هرتز در دمای ثابت ۳۷ درجه سانتی‌گراد و کرنش ۱ درصد بررسی شد. رفتار رئولوژیکی نمونه‌ها در دمای اتاق و محدوده نرخ برشی ۰/۰۱-۱۰۰۰ بر ثانیه بررسی شد.

ارتباط بین تنش برشی (τ) و نرخ برشی (γ̇) در آزمون سیلان<sup>۵</sup> با استفاده از مدل‌های پلاستیک بینگهام<sup>۶</sup> (معادله ۲)، هرشل-بالکلی<sup>۷</sup> (معادله ۳) و کاسون<sup>۸</sup> (معادله ۴) ارزیابی شدند [۱۲]. در این معادلات، μ گرانشی پلاستیک<sup>۹</sup>، τ<sub>y</sub> تنش تسلیم، K و n پارامترهای وابسته به ساختار می‌باشند که از طریق آزمایش‌ها به دست می‌آیند.

$$\tau = \tau_y + \mu \gamma \quad \text{معادله ۲}$$

$$\tau = \tau_y + K (\gamma)^n \quad \text{معادله ۳}$$

$$\tau^{1/2} = \tau_y^{1/2} + K (\gamma)^{1/2} \quad \text{معادله ۴}$$

#### ۲-۵ سینتیک ژل شدن هیدروژل

سینتیک ژل شدن کدورت سنجی<sup>۱۰</sup> از طریق طیف سنجی تعیین شد. برای این منظور، هیدروژل با pH تنظیم شده روی ۷/۴ در دمای ۴° درجه سانتی‌گراد نگهداری شد و

<sup>۱</sup> Bingham Plastic model

<sup>۲</sup> Herschel-Bulkley model

<sup>۳</sup> Casson model

<sup>۴</sup> Plastic viscosity

<sup>۵</sup> Turbidimetric gelation kinetic

<sup>۱</sup> Parallel plate geometry

<sup>۲</sup> Peltier cell

<sup>۳</sup> Temperature sweep

<sup>۴</sup> Oscillatory moduli

<sup>۵</sup> Flow test

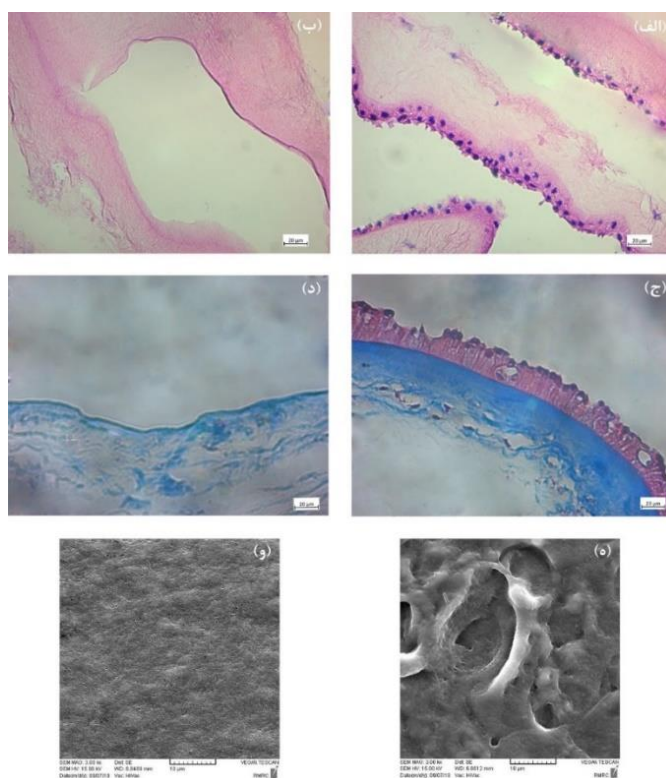
نشان دهنده حفظ کلاژن در ساختار پرده آمنیوتیک می‌باشد. حفظ پروتئین‌های ساختاری به‌ویژه کلاژن در ساختار بافت پس از انجام فرایند سلول‌زدایی برای تهیه هیدروژل مستخرج از بافت سلول‌زدایی شده ضروری می‌باشد.

### ۲-۳ سینتیک ژل شدن هیدروژل

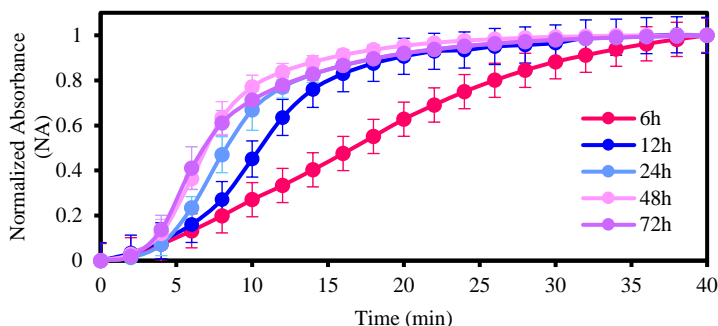
نتایج منحنی جذب نرماله شده، نشان‌دهنده تأثیر زمان هضم بر منحنی ژل شدن نمونه می‌باشد. مطابق اطلاعات کمی مندرج در جدول ۱، زمان سپری شده تا آغاز فرایند ژل شدن (زمان تأخیری<sup>۱</sup>) از روند جهت‌داری بین ساعت‌های انحلال مختلف برخوردار نیست.

جدول ۱ داده‌های مستخرج از منحنی سینتیک ژل شدن هیدروژل آمیون در زمان‌های مختلف انحلال.

مشخصات نمونه	سرعت ژل شدن	زمان ۱/۲ (دقیقه)	زمان تأخیری (دقیقه)
AM-6h	۰/۰۳۷ ± ۰/۰۰۳	۱۷/۲۷ ± ۰/۹۲	۳/۸۹۲ ± ۱/۷۲۶
AM-12h	۰/۰۹۸ ± ۰/۰۱۱	۱۰/۶۸۶ ± ۱/۵۸۰	۵/۵۷۲ ± ۱/۲۸۰
AM-24h	۰/۱۲۴ ± ۰/۰۱۳	۸/۱۶۶ ± ۱/۳۴۲	۴/۱۲۲ ± ۱/۶۹۶
AM-48h	۰/۱۴۹ ± ۰/۰۱۸	۶/۸۹۸ ± ۰/۹۱۲	۳/۵۲۲ ± ۰/۹۸۱
AM-72h	۰/۱۳۲ ± ۰/۰۱۶	۶/۷۹۲ ± ۰/۷۹۸	۲/۹۵۴ ± ۰/۳۶۷



شکل ۱ تصاویر رنگ‌آمیزی هماتوکسیلین و اتوزین پرده آمنیوتیک (الف) قبل از سلول‌زدایی و (ب) بعد از سلول‌زدایی. تصاویر رنگ‌آمیزی تری‌کروم ماسونی بافت پرده آمنیوتیک (ج) قبل از سلول‌زدایی و (د) بعد از سلول‌زدایی. تصاویر میکروسکوپ الکترونی روبشی از پرده آمنیوتیک (ه) قبل از سلول‌زدایی و (و) بعد از سلول‌زدایی.



شکل ۲ منحنی کدورت سنجی هیدروژل آمینون انحلال یافته در زمان های مختلف.

زمان انحلال، فیبریل کلاژن به صورت آنزیمی تبدیل به مولکول های کوچک کلاژن یا زیر فیبریل<sup>۱</sup> نشده است؛ در حالی که برای فرایند خودآرایی، هضم کلاژن و تشکیل واحدهای مولکولی کلاژن یک امر ضروری است [۹]. مولکول کلاژن از سه زنجیره چندپپتیدی<sup>۲</sup> در هم تنیده تشکیل شده است و مشابه یک طناب سه شاخه می باشد. تلوپپتیدهای غیر مارپیچی<sup>۳</sup> به دو انتهای مولکول اتصال یافته اند و به عنوان منبع اصلی پادزا<sup>۴</sup> محسوب می شوند. کلاژن فقیر از تلوپپتید<sup>۵</sup> با حذف تلوپپتید به وسیله آنزیم های غیر شاخص<sup>۶</sup> مانند پپسین در محیط اسیدی تهیه می شود [۱۴]. در فرایند خودآرایی، ابتدا مولکول های کلاژن توده هایی را تشکیل می دهند تا زیر فیبریل ها ایجاد شوند. سپس زیر فیبریل ها خودآرایی یافته و فیبریل ها و دسته های فیبریلی<sup>۷</sup> را تشکیل می دهند و تجمع این فیبریل ها، الیاف<sup>۸</sup> را ایجاد می کند [۱۵]. بدون تشکیل مولکول های کلاژن یا زیر فیبریل ها مشابه با شرایط هیدروژل آمینون انحلال یافته به مدت ۶ ساعت، فرایند خودآرایی کلاژن اتفاق نمی افتد. منحنی کدورت سنجی هیدروژل آمینون انحلال یافته به مدت ۱۲ ساعت از سرعت

نتایج آزمون کدورت سنجی نشان می دهد که کاهش زمان انحلال منجر به کاهش سرعت ژل شدن نمونه هنگام انکوباسیون در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد می شود. این اختلاف بین نمونه انحلال یافته به مدت ۶ ساعت با سایر نمونه ها مشهودتر است. تشکیل هیدروژل مستخرج از بافت سلول زدایی شده یک فرایند بر پایه خودآرایی کلاژن است که با حضور گلیکوزامینوگلیکان ها، پروتئوگلیکان ها و سایر پروتئین ها تنظیم می شود. بنابراین، سیتیک بسپارش متأثر از ویژگی زیست شیمیایی طبیعی بافت و پروتئین های باقی مانده بعد از فرایند سلول زدایی و انحلال است [۱]. زمان های انحلال ۶ و ۱۲ ساعت برای هضم کامل پودر پرده آمینوتیک کافی نیستند زیرا ذرات پودری درون هیدروژل نمایان هستند که به معنی عدم انحلال کامل ذرات بافت است. منحنی کدورت سنجی به شکل S نشان دهنده فرایند خودآرایی مولکول های کلاژن است. مطابق شکل ۲، برای هیدروژل آمینون با زمان انحلال ۶ ساعت، منحنی کاملاً S شکل نیست. عدم خودآرایی کامل کلاژن در این نمونه به علت هضم غیر کامل پودر پرده آمینوتیک می باشد. در این نمونه، به علت ناکافی بودن

<sup>۱</sup> Telopeptide-poor collagen

<sup>۲</sup> Non-specific enzymes

<sup>۳</sup> Bundles of fibrils

<sup>۴</sup> Fibers

<sup>۵</sup> Sub-fibrillar

<sup>۶</sup> Polypeptide chains

<sup>۷</sup> Non-helical telopeptides

<sup>۸</sup> Antigen

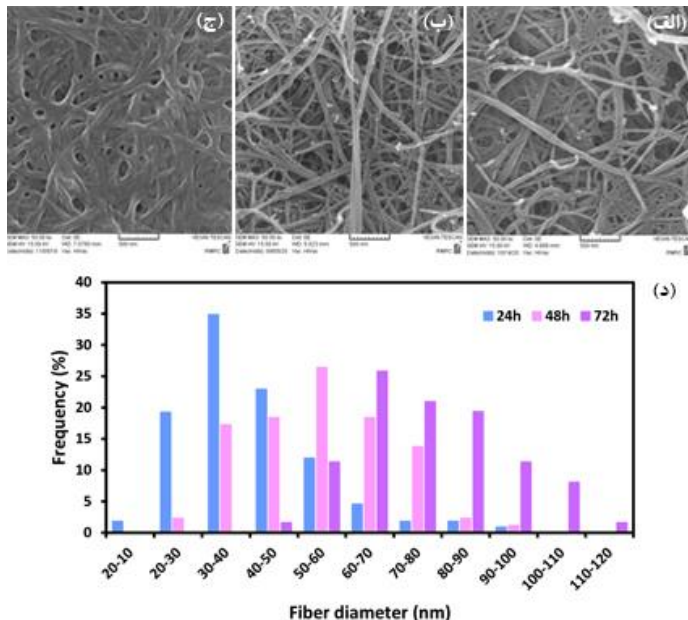
### ۳-۳ ریزساختار هیدروژل

تصاویر تهیه شده از ریزساختار هیدروژل آمینون تهیه شده از محلول‌ها با زمان انحلال ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت به همراه توزیع اندازه قطر الیاف در شکل ۳ نشان داده شده است. مشاهده می‌شود که اندازه قطر الیاف با افزایش زمان انحلال از ۲۴ تا ۷۲ ساعت به ترتیب  $14/11 \pm 40/51$ ،  $14/66 \pm 54/55$  و  $15/66 \pm 76/42$  نانومتر است.

### ۴-۳ خواص رئولوژیکی هیدروژل

خواص رئولوژیکی هیدروژل آمینون تهیه شده در زمان‌های مختلف انحلال در شکل ۴ نشان داده شده است. شکل ۴(الف) منحنی روبش دمایی هیدروژل از دمای ۴ تا ۳۷ درجه سانتی‌گراد را نشان می‌دهد. در اینجا حساسیت دمایی هیدروژل‌ها از حدود ۳۰ درجه سانتی‌گراد به بعد کاملاً مشهود است و به آغاز فرایند خودآرایی الیاف کلاژن در هیدروژل آمینون اشاره دارد.

ژل شدن بیشتری نسبت به نمونه ۶ ساعت برخوردار است. احتمال می‌رود در این نمونه نیز مشابه با هیدروژل مستخرج از بافت تاندون [۹]، پس از انحلال به مدت ۱۲ ساعت، فیبریل‌های کلاژن موجود در بافت به صورت زیرفیبریل‌ها انحلال می‌یابند اما انحلال در این مدت زمان تا حدی پیش نمی‌رود که مولکول‌های کلاژن یا پپتید کلاژن<sup>۱</sup> ایجاد شوند. در چنین وضعیتی، زیرفیبریل در pH اسیدی در حالت تعادل قرار دارد و با خنثی شدن pH، حالت تعادلی از بین رفته و زیرفیبریل‌ها تجمع می‌یابند تا دسته‌های فیبریل یا الیاف ایجاد شوند. در زمان انحلال ۲۴ تا ۷۲ ساعت، مولکول‌های کلاژن و زیرفیبریل‌ها در pH اسیدی در حالت تعادل قرار دارند و با تنظیم pH و دمای طبیعی بدن<sup>۲</sup>، تعادل به هم ریخته و تروپوکلاژن<sup>۳</sup> آرایش می‌یابد تا فیبریل‌ها و الیاف تشکیل شوند [۱۶]. بنابراین طبق آزمایش‌های طراحی شده در این مقاله، حداقل زمان لازم برای انحلال پرده آمینوتیک ۲۴ ساعت است.



شکل ۳ تصاویر میکروسکوپ الکترونی روبشی از هیدروژل آمینون انحلال یافته به مدت (الف) ۲۴، (ب) ۴۸ و (د) ۷۲ ساعت. (ج) توزیع اندازه قطر الیاف در هیدروژل‌های آمینون انحلال یافته به مدت ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت (خط مقیاس تصاویر برابر با نانومتر ۵۰۰ است).

<sup>۱</sup> Tropocollagen

<sup>۲</sup> Collagen peptide

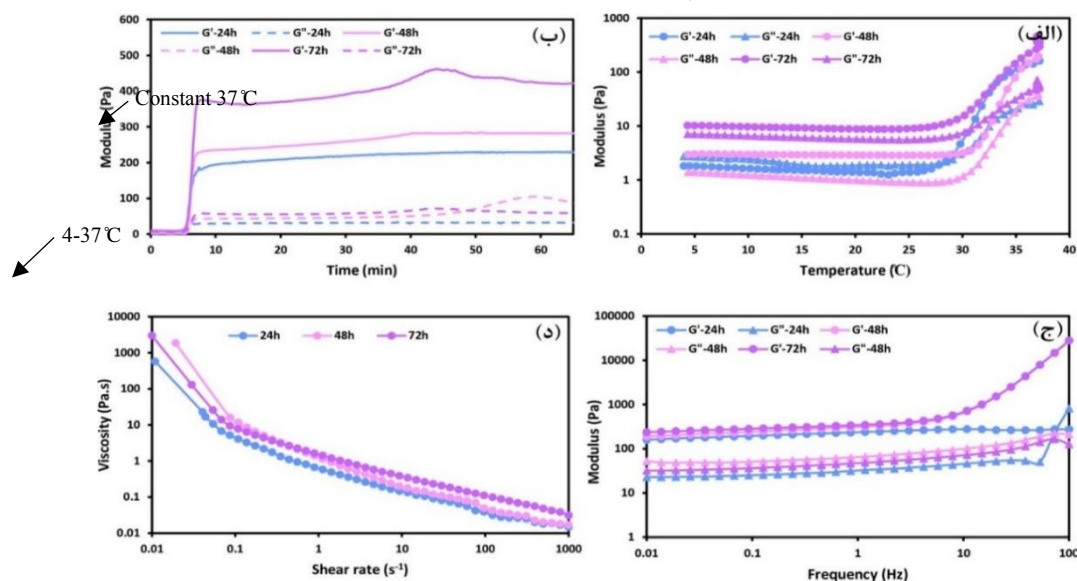
<sup>۳</sup> Physiologic temperature



۲۸۲ و ۴۲۰ پاسکال افزایش یافته است. منحنی روبش فرکانس نمونه‌های هیدروژل (شکل ۴ج)) نشان‌دهنده ساختار پایدار هیدروژل‌های تهیه شده در زمان‌های انحلال مختلف تحت شرایط پویا<sup>۲</sup> است. گرانروی هیدروژل‌های حساس به دما از عوامل مهم در هنگام تزریق است که روی زنده‌مانی سلول‌های محصور شده<sup>۳</sup> در هیدروژل نیز به شدت تأثیرگذار می‌باشد. کاهش گرانروی با افزایش نرخ برش نشانگر رفتار رئولوژیکی رقیق شدن برشی<sup>۴</sup> است که باعث افزایش سیالیت هنگام اعمال تنش می‌شود.

برای بررسی بیشتر رفتار رئولوژیکی هیدروژل‌ها، داده‌های تنش برشی-نرخ برشی در آزمون سیلان با سه مدل پلاستیک بینگهام، هرشل-بالکلی و کاسون تطبیق داده شدند. داده‌های مستخرج از مدل سازی در جدول ۲ ارائه شده است. مشاهده می‌شود که هر سه هیدروژل بهترین تطابق را با مدل هرشل-بالکلی دارند.

شکل ۴(ب) مربوط به منحنی روبش زمانی هیدروژل می‌باشد که در بخش ابتدای منحنی، دما از ۴ تا ۳۷ درجه سانتی‌گراد با نرخ ۵ درجه سانتی‌گراد بر دقیقه افزایش یافته و سپس به مدت ۱ ساعت در دمای ثابت ۳۷ درجه سانتی‌گراد ادامه یافته است. حساسیت دمایی هیدروژل به دمای طبیعی بدن قابل مشاهده است. با قرارگیری در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد مدول به‌طور ناگهانی و با شیب زیادی افزایش می‌یابد و در نهایت در ناحیه مسطح<sup>۱</sup> با گذشت زمان شیب تغییرات مدول بسیار کم است. مدول ذخیره بیشتر از مدول اتلافی در تمامی نمونه‌ها نشانگر ژل شدن در نتیجه قرارگیری در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد است. با وجود اشتراک ویژگی حساسیت به دمای طبیعی بدن بین تمامی نمونه‌ها، مدول نهایی بین هیدروژل‌های تهیه‌شده در زمان‌های مختلف انحلال با یکدیگر تفاوت دارد، به‌طوری که با افزایش زمان انحلال از ۲۴ تا ۷۲ ساعت، مدول هیدروژل آمینون به ترتیب از ۲۲۹ پاسکال به



شکل ۴ رئولوژی هیدروژل آمینون انحلال یافته به مدت ۲۴، ۴۸، و ۷۲ ساعت: (الف) آزمون روبش دما، (ب) آزمون روبش زمان در دمای ۳۷°C، (ج) آزمون روبش فرکانس و (د) آزمون سیلان.

<sup>۱</sup> Encapsulated cells

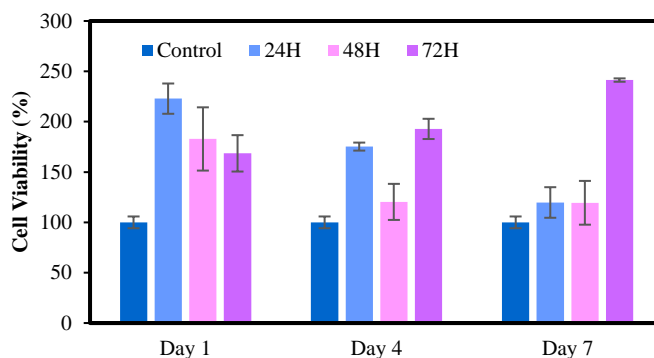
<sup>۲</sup> Shear-thinning

<sup>۱</sup> Plateau zone

<sup>۲</sup> Dynamic

جدول ۲ داده‌های مستخرج از پارامترهای رئولوژیکی هیدروژل آمینون تهیه‌شده در زمان‌های انحلال ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت

نمونه	مدل	k	n	$\tau_y$ (Pa)	$R^2$
AM-24h	بینگهام	$0.10566 \pm 0.00054$	-	$1/16946 \pm 0.13224$	0.9498
	هرشل-بالکلی	$0.17964 \pm 0.02095$	$0.73318 \pm 0.01767$	$0.54074 \pm 0.06968$	0.99293
	کاسون	$0.09768 \pm 0.0017$	-	$1/76682 \pm 0.06505$	0.9865
AM-48h	بینگهام	$0.1652 \pm 0.00069$	-	$2/00101 \pm 0.17648$	0.93448
	هرشل-بالکلی	$0.27058 \pm 0.0375$	$0.58165 \pm 0.02082$	$1/0608 \pm 0.10687$	0.99038
	کاسون	$0.09388 \pm 0.00187$	-	$1/40376 \pm 0.08094$	0.98307
AM-72h	بینگهام	$0.03619 \pm 0.00198$	-	$3/35327 \pm 0.49366$	0.88004
	هرشل-بالکلی	$1/1649 \pm 0.05769$	$0.48278 \pm 0.0074$	$0.32356 \pm 0.10965$	0.9983
	کاسون	$0.14362 \pm 0.00457$	-	$2/39205 \pm 0.26421$	0.95798



شکل ۵ سنجش زنده‌مانی و فعالیت سلولی از طریق آزمون MTT عصاره‌های ۱، ۴ و ۷ روزه حاصل از هیدروژل‌های آمینون تهیه‌شده در زمان‌های انحلال ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت.

است. این روند در جوهر زیستی مستخرج از تاندون با غلظت ۱۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر نیز مشاهده شده است [۱۸].

### ۳-۵ خواص زیستی هیدروژل

مطابق شکل ۵، فعالیت سوخت‌وساز<sup>۵</sup> سلول‌های L929 در تمامی هیدروژل‌های آمینون تهیه‌شده بیشتر از نمونه کنترل است. زمان کوتاه‌تر هضم با آنزیم پپسین موجب آزادسازی بیشتر ترکیبات حلال و آزادسازی کمتر اجزای اتصال عرضی یافته می‌شود که نهایتاً موجب ارتقای تکثیر سلول‌ها می‌شود [۱۹]. وجود مولکول‌های سازنده<sup>۶</sup> در هیدروژل به‌دست آمده از تجزیه، انحلال و بسپارش مجدد

مدل هرشل-بالکلی، معادله‌ای است که تنش برشی سیال را به تنش تسلیم، شاخص ثبات<sup>۱</sup> (k)، نرخ برشی و شاخص سیلان<sup>۲</sup> (n) ارتباط می‌دهد. در صورت اعمال تنش‌های کمتر از تنش تسلیم، سیال دارای رفتار جامدگونه<sup>۳</sup> است [۱۷]. زمانی که تنش‌های بیشتر از تنش تسلیم اعمال شوند، اگر n کمتر از ۱ باشد یعنی سیال دارای رفتار رئولوژیکی رقیق‌شدن برشی است و برای مقادیر n بیشتر از ۱، سیال دارای رفتار غلیظ‌شدن برشی<sup>۴</sup> است [۱۷]. افزایش شاخص سیلان (n) با کاهش زمان انحلال پرده آمینوتیک نشان‌دهنده کاهش شدت رقیق‌شدن برشی در زمان‌های کوتاه‌تر انحلال

<sup>۵</sup> Shear thickening

<sup>۶</sup> Metabolic

<sup>۷</sup> Constitutive molecules

<sup>۱</sup> Consistency index

<sup>۲</sup> Flow index

<sup>۳</sup> Solid properties

نقش ایفا نکردند و باعث کند بودن سرعت ژل شدن هیدروژل (S) و افزایش مدت زمان لازم تا تکمیل ۵۰ درصد از فرایند ژل شدن (زمان نیمه<sup>۵</sup>) شدند. با این وجود، زمان سپری شده تا شروع فرایند ژل شدن (زمان تأخیری) از روند جهت‌داری بین ساعت‌های مختلف انحلال برخوردار نبود که احتمالاً مرتبط با پیچیدگی ساختار فیزیکی شیمیایی بافت سلول‌زدایی شده است [۱۰]. این نتایج در تطابق با روند مشاهده شده در خصوص جوهر زیستی مستخرج از بافت تاندون می‌باشد [۱۸]. محیط برون‌سلولی، محیط پیچیده‌ای است و علاوه بر کلاژن، ترکیبات پروتئینی و گلیکوزامینوگلیکان مختلفی در آن موجود می‌باشند که در فرایند تشکیل ژل به ایفای نقش می‌پردازند. برخی از ترکیبات پروتئینی به‌عنوان جوانه‌زای عمل می‌کنند و حضور این نوع از پروتئین‌ها باعث افزایش سرعت ژل شدن می‌شود [۲۶]. بنابراین، سرعت بیشتر ژل شدن در زمان‌های انحلال طولانی‌تر در پژوهش حاضر می‌تواند ناشی از حضور عوامل پروتئینی جوانه‌زای بیشتر در این محلول‌ها باشد. البته ارزیابی این احتمال نیاز به بررسی‌های زیست‌شیمیایی بیشتر محیط برون‌سلولی پرده آمینوتیک سلول‌زدایی شده دارد که می‌تواند در پژوهش‌های آتی مد نظر قرار گیرد.

تأثیر زمان انحلال بر ریزساختار هیدروژل آمینون نیز بررسی شد. نتایج تصویربرداری با میکروسکوپ الکترونی روبشی نشان داد که قطر یاف در هیدروژل‌های با افزایش زمان انحلال افزایش می‌یابد. همان‌طور که در بخش‌های پیشین اشاره شد، انحلال کلاژن تا مرحله زیرفیل و مولکول کلاژن، مرحله‌ای کلیدی در انجام فرایند خودآرایی است. نتایج آنالیز الکتروفورز ژل پلی‌اکریل‌آمید-سدیم دود سیل سولفات<sup>۷</sup> روی بافت ریه نشان

بافت‌های سلول‌زدایی‌شده از عوامل مؤثر در حمایت از رشد و فعالیت سلول‌ها است [۲۰]. تجزیه داربست محیط برون‌سلولی موجب رهایش مولکول‌های ماتری کریپتیک<sup>۱</sup> مانند مشتقات الیگوپپتید و الیگوساکارید محیط برون‌سلولی طبیعی می‌شود [۲۱]. این مولکول‌ها دارای خواص زیست‌فعال مختلفی مانند فراخوانی سلول‌های بنیادی و پیش‌ساز<sup>۲</sup>، فعالیت ضد میکروبی و اثرات رگ‌زایی می‌باشند که موجب امیدواری در امکان کاربرد این هیدروژل‌ها در کاربردهای درون‌تنی می‌شود [۲۲-۲۴].

#### ۴- بحث

زمان انحلال پودر پرده آمینوتیک نقش مهمی در تعیین خواص نهایی هیدروژل مستخرج از آن ایفا می‌کند. در اغلب کارهای پژوهشی از زمان انحلال ۴۸ و ۷۲ ساعت برای تهیه هیدروژل مستخرج از بافت استفاده می‌شود تا بیشترین مقدار پروتئین حل شده به دست آید [۳، ۶، ۲۵]. اخیراً در برخی مقالات به خواص هیدروژل به‌دست آمده از زمان‌های کوتاه انحلال اشاره شده است که نشان می‌دهد زمان‌های کوتاه انحلال می‌تواند خواصی از قبیل چاپ‌پذیری<sup>۳</sup> مناسب، قابلیت شکل‌پذیری<sup>۴</sup> بیشتر و حمایت از تکثیر و تمایز سلول‌ها را فراهم کند [۹، ۱۰]. با توجه به کاربرد فراوان پرده آمینوتیک انسان در حوزه بالینی و مهندسی بافت، این بافت به‌عنوان منبع هیدروژل در پژوهش حاضر انتخاب شد و زمان‌های انحلال مختلف برای تهیه هیدروژل بررسی شدند.

نتایج پژوهش نشان داد که زمان انحلال ۶ و ۱۲ ساعت برای انحلال کامل ذرات پودر پرده آمینوتیک کافی نیست و ذرات هضم نشده در محلول به وضوح مشاهده شد. آزمون کدورت سنجی نیز نشان داد که بخش انحلال نیافته اجزای پروتئینی در زمان‌های کوتاه در فرایند خودآرایی

<sup>۵</sup>  $t_{1/2}$

<sup>۶</sup> Nucleator

<sup>۷</sup> Sodium dodecyl sulphate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE)

<sup>۱</sup> Matricryptic molecules

<sup>۲</sup> Progenitor cells

<sup>۳</sup> Printability

<sup>۴</sup> Shape fidelity

گیرد. با افزایش زمان انحلال هیدروژل آمینون، واحدهای اولیه کلاژن بیشتر و کوچک تری ایجاد می شوند که باعث آسان تر شدن حرکت مولکول های کلاژن از کنار هم می شود و به این ترتیب رفتار رقیق شدن برشی شدت می یابد که سازگار با کاهش در مقدار شاخص سیلان گزارش شده می باشد. مطابق منحنی های آزمون سیلان هیدروژل های آمینون، گرانیوی هیدروژل با افزایش زمان انحلال بیشتر شده است که با افزایش مقدار پارامتر رئولوژیکی  $k$  با افزایش زمان انحلال در تطابق است [۲۷].

تنش تسلیم هیدروژل نیز از جمله عواملی است که از تطبیق منحنی سیالیت رئولوژیکی با مدل های رئولوژیکی مر سوم از جمله مدل هر شل-بالکلی قابل دستیابی است. تنش تسلیم مستخرج از مدل هر شل-بالکلی نشان دهنده تنش باقی مانده<sup>۵</sup> هنگام برون یابی تا نرخ برشی صفر است [۲۸]. در مکانیک سیالات، تنش تسلیم به عنوان تنش مورد نیاز برای سیال جهت شروع سیلان تعریف می شود (این در حالی است که در مکانیک جامدات، تنش تسلیم به نقطه بین تغییر فرم الاستیک و پلاستیک اشاره دارد) [۱۷]. تنش تسلیم در تعیین دو ویژگی قابلیت تزریق ماده از طریق سرنگ (نیروی اولیه لازم برای ایجاد سیلان) و ثبات ماده پس از جای گیری در محل آسیب دیده<sup>۶</sup> (بدون حرکت ماندن در عدم حضور نیروی اعمالی) نقش مهمی ایفا می کند [۱۷]. موادی که تنش تسلیم ندارند، رفتار مایع گونه از خود نشان می دهند یعنی در اثر اعمال تنشی کوچک شروع به سیلان می کنند. از سوی دیگر، موادی با تنش تسلیم زیاد به راحتی قابلیت قالب گیری دارند، اما موادی با تنش تسلیم کم به راحتی سیلان می یابند و برای کاربردهای تزریقی گزینه مناسبی می باشند [۱۷]. مقادیر به دست آمده برای تنش تسلیم هیدروژل های آمینون انحلال یافته به مدت ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت نشان دهنده قابلیت تزریق بسیار

می دهد که با افزایش زمان انحلال، مقدار پروتئین های قابل حل با وزن مولکولی بالا (بیشتر از ۲۵۰ کیلو دالتون) کاهش و مقدار پروتئین های قابل حل کوچک (وزن مولکولی کمتر از ۲۵۰ کیلو دالتون) افزایش می یابد. بررسی بیشتر با آزمون وسترن-بلات<sup>۱</sup> نشان می دهد که با افزایش زمان انحلال، مقدار کلاژن سه واحدی<sup>۲</sup> کاهش و کلاژن تک پار و زیر تک پار<sup>۳</sup> افزایش می یابد [۱۰]. این نتایج قابل انطباق با یافته های این پژوهش است. با افزایش زمان انحلال، واحدهای پایه بیشتری برای فرایند خود آرایی ایجاد می شوند و به این ترتیب با تنظیم شرایط طبیعی بدن، فرایند خود آرایی به نحو بهتری انجام شده و نهایتاً دسته های فیبریل و الیاف بزرگتری در هیدروژل نهایی تشکیل می شوند. نتایج آزمون رئولوژی نشان دهنده حساسیت دمایی هیدروژل های آمینون در تمامی زمان های انحلال است که می تواند موجب گسترش کاربرد هیدروژل آمینون در کاربردهای هیدروژل تزریقی با ژل شدن در دمای بدن شود. همچنین، مشاهده شد که تشکیل بیشتر واحدهای اولیه کلاژن در نتیجه انحلال به مدت طولانی تر منجر به بهبود فرایند خود آرایی کلاژن پس از تنظیم pH و فرارگیری در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد می شود که با افزایش در مقدار مدول ذخیره هیدروژل همراه است. در نرخ برشی کمتر، الیاف کلاژن از هم جدا شده و در اثر نیروی برشی به راحتی از کنار هم می لغزند. با افزایش نرخ برشی، الیاف کلاژن به تک پارهای کلاژن تفکیک می یابند و سیلان محلول آمینون بسیار راحت تر اتفاق می افتد که نهایتاً منجر به کاهش گرانیوی می شود [۲۷]. این روند کاهش گرانیوی با افزایش نرخ برشی نشانگر رفتار رئولوژیکی رقیق شدن برشی<sup>۴</sup> در هیدروژل های آمینون است که با مقدار شاخص سیلان ( $n$ ) کمتر از ۱ به دست آمده از مدل رئولوژیکی هر شل-بالکلی مورد تایید قرار می

<sup>۱</sup> Shear-thinning<sup>۲</sup> Residual stress<sup>۳</sup> Defect site<sup>۱</sup> Western-blot<sup>۲</sup> Trimeric collagen<sup>۳</sup> Sub-monomeric collagen

زیستی با فرمولاسیون بر پایه هیدروژل آمینون از جمله اهداف این گروه تحقیقاتی به شمار می‌آید و نتایج حاصل از آن در آینده نزدیک منتشر خواهند شد.

بررسی فعالیت سوخت‌وساز سلول L929 نشان می‌دهد که سلول‌های فیرو بلاست در عصاره هیدروژل ۷ روزه تهیه شده از انحلال به مدت ۷۲ ساعت فعالیت بیشتری نسبت به زمان‌های انحلال کوتاه‌تر دارد. در کل شایان ذکر است که در تمامی زمان‌های انحلال، درصد زنده‌مانی سلول‌ها بیشتر از نمونه کنترل است. زمان‌های طولانی‌تر از عصاره گیری نمایانگر شرایط دقیق‌تری از هیدروژل آمینون و ترکیبات محتوی آن است و با گذشت زمان و تخریب هیدروژل، ترکیبات بیشتری از آن آزاد می‌شوند. این موضوع نشان‌دهنده قابلیت تکثیر سلول‌ها با عصاره حاصل از هیدروژل آمینون است که می‌تواند به دلیل غنی بودن محیط برون سلولی از انواع پروتئین‌ها، گلیکوزامینوگلیکان‌ها و فاکتورهای رشد باشد که به تکثیر سلول‌ها و افزایش فعالیت سوخت‌وساز آنها می‌انجامد [۲۵]. این مسئله همچنین بیانگر ارتباط بین خواص فیزیکی و ساختاری هیدروژل آمینون با رفتار و فعالیت سلول‌ها می‌باشد. با وجود رشد و فعالیت سلول‌ها در تمامی عصاره‌های حاصل از هیدروژل، تکثیر سلول‌ها در عصاره حاصل از هیدروژل با قطر الیاف بیشتر و مدول مکانیکی بالاتر از سایر نمونه‌ها بیشتر است. استحکام مکانیکی داربست هیدروژلی از اهمیت به‌سزایی در مهندسی بافت برخوردار است و تأثیر آن بر فعالیت‌های سلولی به‌طور چشمگیری مورد بررسی قرار گرفته است [۳۱]. انجام فرایند سلول‌زدایی و انحلال بافت موجب کاهش چشمگیری در خواص مکانیکی نسبت به بافت پایه می‌شود که دلیل آن تأثیر مخرب عوامل حذف‌پادزای سلولی بر ریزساختار بافت می‌باشد. بنابراین قابلیت تنظیم خواص مکانیکی

مناسب آنها می‌باشد. یعنی با اعمال مقدار کمی نیروی اولیه، این هیدروژل به راحتی سیلان یافته و در محل مورد نظر تزریق می‌شود. از سوی دیگر، این هیدروژل خاصیت حساسیت به دمای طبیعی بدن دارد و در اثر قرارگیری در دمای بدن، شروع به تشکیل ژل و ساختاری پایدار می‌کند که باعث می‌شود تا هیدروژل بتواند در محل نقص ثابت خود را حفظ کند. تنش تسلیم در بررسی فرایند چاپ پذیری جوهرهای زیستی نیز کاربرد دارد و مقدار آن باید به‌گونه‌ای در فرمولاسیون جوهر زیستی لحاظ شود تا در عین دستیابی به پایداری ساختاری مناسب، زنده‌مانی سلول‌های محصورشده داخل هیدروژل نیز کاهش نیابد. به طور مثال، تنش تسلیم بیشتر از ۱۰۰ پاسکال تضمینی برای جلوگیری از افتادگی<sup>۱</sup> ساختار چاپ شده تلقی می‌شود [۲۸]. البته جوهرهای زیستی با تنش تسلیم کمتر از ۱۰۰ پاسکال نیز ممکن است قابلیت چاپ داشته باشند، اما تنش تسلیم ۱۰۰ پاسکال به‌عنوان قانونی عمومی برای حمایت از انباشته شدن<sup>۲</sup> لایه‌های مختلف چاپ شده روی هم مطرح می‌باشد [۱۷]. طبق مقادیر تنش تسلیم گزارش شده در جدول ۲، هیدروژل آمینون با غلظت ۲ درصد وزنی/حجمی تهیه‌شده در زمان‌های مختلف انحلال، قابلیت چاپ مناسبی نخواهد داشت و نمی‌توان شکل پذیری مناسبی از این هیدروژل با روش چاپ سه‌بعدی به دست آورد. البته شایان ذکر است که جوهرهای زیستی مستخرج از بافت‌های طبیعی عموماً به تنهایی قابلیت چاپ مناسبی ندارند و برای استفاده از این نوع هیدروژل‌ها در فرایند چاپ زیستی سه‌بعدی، از چارچوب‌های حمایتی از جنس پلی‌کاپرولاکتون<sup>۳</sup> [۲]، اتصال عرضی شیمیایی با عواملی مانند ویتامین ریبولوین<sup>۴</sup> [۲۹]، یا تشکیل ساختار هیبریدی از طریق ترکیب با سایر پلیمرها مانند سدیم آلژینات [۳۰] استفاده می‌کنند. تهیه جوهر

<sup>۱</sup> Poly caprolactone

<sup>۴</sup> Riboflavin

<sup>۱</sup> Sagging

<sup>۲</sup> Stacking

داربست‌های هیدروژلی مستخرج از بافت‌های سلول‌زدایی شده از اهمیت ویژه‌ای برخوردار است و عموماً با استفاده از عوامل اتصال دهنده<sup>۱</sup> مختلف شیمیایی یا طبیعی بهبود داده می‌شود که البته گاهی موجب سمیت سلولی نیز می‌شوند [۳۲-۳۴].

داربست‌های مستخرج از کلاژن حیوانی از رایج‌ترین مواد مورد استفاده در ترمیم و بازسازی بافت به‌شمار می‌آیند که از جمله علل آن می‌توان به زیست سازگاری عالی، روش فراوری ساده و زیست تخریب‌پذیری طی فرایندهای طبیعی اشاره کرد [۶]. با این وجود، پژوهش‌های اخیر نشان می‌دهند که هیدروژل مستخرج از بافت‌های سلول‌زدایی شده به روش انحلال با آنزیم پپسین به دلیل حفظ پروتئین‌های چسبندگی سلولی (از جمله کلاژن و الاستین)، گلیکوزامینوگلیکان‌ها و فاکتورهای رشد، خواص مکانیکی و فیزیولوژیکی مناسبی برای کشت سلول ارائه می‌کنند [۳۵]. بنابراین، هیدروژل‌های برپایه محیط برون سلولی به دلیل ترکیب زیست‌شیمیایی، ساختار و حضور مولکول‌های زیست‌فعال، محیط مناسبی را برای کشت یا حمل سلول<sup>۲</sup> فراهم می‌آورند. با این وجود، پاسخ ایمنی شدید انسان به پادزاهای پستانداران مانند واکنش‌گر زنی آلفا-گال<sup>۳</sup>، هنگام استفاده از بافت‌های حیوانی یک مشکل اساسی به‌شمار می‌آید [۳۶].

هیدروژل مستخرج از پرده آمنیوتیک انسان، ماده‌ای زیست سازگار محسوب می‌شود که باعث بهبود چسبندگی، تکثیر و مهاجرت سلول‌ها می‌شود و در کاربردهای تزریقی به‌عنوان جایگزین مناسب‌تری برای کلاژن مستخرج از گونه‌های حیوانی مطرح است [۶]. تکثیر سلول‌ها در عصاره‌های مستخرج از هیدروژل آمنیون ناشی از فاکتورهای رشد و سیتوکین‌های<sup>۴</sup> مختلف حفظ شده در

هیدروژل آمنیون است که می‌تواند فعالیت‌های سلولی مختلف را تنظیم کند [۲۵]. همچنین نشان داده شده است که استفاده از عصاره آمنیون در هیدروژل هیالورونیک اسید باعث افزایش تکثیر سلول‌های کراتینوسیت<sup>۵</sup> به‌علت حضور فاکتورهای رشد NGF، bFGF، HB-EGF، HGF، IGF1، EGF و FGF-7 در محلول آمنیون می‌شود [۲۵]. امکان استفاده از بافت‌های انسانی در کاربردهای بالینی باعث کاهش نیاز به داربست‌های مستخرج از بافت‌های حیوانات خواهد بود. طبق پژوهش انجام شده توسط ریژوک و همکاران<sup>۶</sup> [۶]، مقایسه بین هیدروژل مستخرج از پرده آمنیوتیک انسان و هیدروژل کلاژن گاوی نشان دهنده چگالی و توپولوژی ساختاری مشابه این دو می‌باشد. با این وجود، هیدروژل آمنیون از سرعت ژل شدن بیشتری نسبت به هیدروژل کلاژن برخوردار است که می‌تواند به دلیل حضور اجزایی مازاد بر کلاژن نوع I با قابلیت ایجاد اتصال عرضی و یا بر اثر برهمکنش مولکولی بین کلاژن و سایر ترکیبات موجود در داربست آمنیون باشد [۶].

اخیراً هیدروژل مستخرج از بافت پرده آمنیوتیک توجه بسیاری از محققان را به خود جلب نموده است و در مهندسی بافت‌های مختلف، پتانسیل مناسبی برای این هیدروژل می‌توان متصور بود. برای نمونه می‌توان به موارد زیر در خصوص کارکرد هیدروژل آمنیون در مهندسی بافت اشاره کرد. بافت ماهیچه قلب پس از سکته قلبی توانایی چندانی در ترمیم و بازسازی ندارد که نهایتاً منجر به برجای ماندن اثر زخم، مدل‌سازی مجدد<sup>۷</sup> بطن چپ و نهایتاً از کار افتادن قلب می‌شود [۳۷]. پژوهش انجام شده توسط هنری و همکاران<sup>۸</sup> [۳۸] نشان می‌دهد که تزریق هیدروژل حساس به دمای آمنیون، به ترمیم و بازسازی

<sup>۵</sup> Keratinocytes

<sup>۶</sup> Ryzhuk et al.

<sup>۷</sup> Remodeling

<sup>۸</sup> Henry et al.

<sup>۱</sup> Cross linker agents

<sup>۲</sup> Cell delivery

<sup>۳</sup>  $\alpha$ -gal epitope

<sup>۴</sup> Cytokines

رئولوژیکی پایه هیدروژل آمینون از جمله رفتار سیلان رئولوژیکی، حساسیت به دمای طبیعی بدن و پایداری ساختاری تحت شرایط پویا پرداخته شد. همچنین، عدم سمیت هیدروژل آمینون برای استفاده در کاربردهای زیستی ارزیابی اولیه شد. مطابق نتایج حاصل از آزمون MTT، این هیدروژل اثرات سمیت برای سلول‌های فیروبلاست L929 از خود نشان نداد و لذا می‌توان امید داشت که بتوان از این هیدروژل به‌عنوان حامل سلول یا برای کشت سه‌بعدی سلول‌ها در سایر پژوهش‌ها بهره برد. نتایج به دست آمده از پژوهش حاضر، حاکی از آن است که حتی در یک غلظت ثابت از هیدروژل آمینون می‌توان با تغییر زمان انحلال، هیدروژلی با استحکام مکانیکی متغیر به دست آورد بدون اینکه نیاز به استفاده از عامل اتصال دهنده عرضی باشد. بنابراین، تغییر در زمان هضم توسط آنزیم پپسین می‌تواند به‌عنوان روشی برای کنترل خواص هیدروژل‌های مستخرج از بافت به کار برده شود؛ بدون اینکه آسیبی به فعالیت زیستی سلول‌ها وارد شود. بدیهی است در مطالعات آینده ضروری است که بررسی‌های بیشتری روی خواصی همچون استحکام خزشی و آسودگی تنش هیدروژل آمینون انجام شود. برای بررسی اثربخشی بالینی این هیدروژل در کاربرد تزریق درجه<sup>۱۵</sup> در بدن، پسماند<sup>۱۶</sup> و وابستگی به نرخ کرنش هیدروژل آمینون نیز بایستی ارزیابی شود.

#### ۵- نتیجه‌گیری

پژوهش حاضر نشان داد که زمان هضم بافت پرده آمینوتیک سلول‌زدایی شده توسط آنزیم پپسین بر سینتیک

بافت قلب پس از سکته قلبی کمک می‌کند. تزریق هیدروژل آمینون به قلب دچار شده به سکت، انقباض قلب را بهبود می‌بخشد و تصلب بافت<sup>۱</sup> را کاهش می‌دهد. در پژوهش دیگری که توسط لی و همکاران<sup>۲</sup> [۳۹] انجام شد، هیدروژل قابل تزریق آمینون برای جلوگیری از تصلب بافت اندومتري<sup>۳</sup> با تقویت اپیتلیالیزاسیون مجدد<sup>۴</sup> اندومتريوم آسیب‌دیده به کار رفته است. چسبندگی داخل رحمی<sup>۵</sup>، معروف به سندروم آشرمن<sup>۶</sup>، عارضه‌ای است که در نتیجه آسیب اندومتريوم<sup>۷</sup> بعد از کورتاژ<sup>۸</sup> یا عمل هیستروسکوپی<sup>۹</sup> بروز می‌یابد [۴۰]. جلوگیری از چسبندگی داخل رحمی (IUA) با استفاده از هیدروژل آمینون از طریق سرکوب فاکتور رشد تبدیلی بتا-۱<sup>۱۰</sup> انجام می‌شود که در ایجاد IUA نقش اساسی ایفا می‌کند [۴۱]. ویژگی حساسیت به دمای هیدروژل آمینون و ژل شدن آن در دمای بدن، باعث می‌شود تا این هیدروژل به راحتی شکل نامنظم حفره رحم را پر کند و با پوشش محل زخم از تماس با ناحیه آسیب‌دیده جلوگیری کند [۳۹]. نمونه دیگری از کاربرد هیدروژل آمینون استفاده از آن به‌عنوان هیدروژل حامل سلول‌های بنیادی مستخرج از چربی<sup>۱۱</sup> در درمان آرتروز<sup>۱۲</sup> است [۴۲]. هیدروژل آمینون نه تنها از عملکرد سلول‌های بنیادی مستخرج از بافت چربی حمایت می‌کند، بلکه اثر توأم این سلول‌ها و هیدروژل آمینون از پاسخ‌های کاتابولیک<sup>۱۳</sup> التهابی در کندروسیت‌ها<sup>۱۴</sup> ممانعت به عمل می‌آورد.

در این پژوهش به بررسی تأثیر زمان انحلال با آنزیم پپسین بر ریز ساختار، سینتیک ژل شدن و برخی خواص

<sup>۹</sup> Hysteroscopic operation

<sup>۱۰</sup> Transforming growth factor  $\beta$ -1 (TGF  $\beta$ -1)

<sup>۱۱</sup> Adipose-derived stem cells (ADSCs)

<sup>۱۲</sup> Osteoarthritis

<sup>۱۳</sup> Catabolic responses

<sup>۱۴</sup> Chondrocytes

<sup>۱۵</sup> In situ injection

<sup>۱۶</sup> Hysteresis

<sup>۱</sup> Fibrosis

<sup>۲</sup> Li et al.

<sup>۳</sup> Endometrial fibrosis

<sup>۴</sup> Re-epithelialization

<sup>۵</sup> Intrauterine adhesion (IUA)

<sup>۶</sup> Asherman syndrome (AS)

<sup>۷</sup> Endometrium

<sup>۸</sup> Curettage

- [3] X. Peng, X. Wang, C. Cheng, X. Zhou, Z. Gu, L. Li, J. Liu, X. Yu, Bioinspired, Artificial, Small-Diameter Vascular Grafts with Selective and Rapid Endothelialization Based on an Amniotic Membrane-Derived Hydrogel, *ACS Biomaterials Science & Engineering* 6(3) (2020) 1603-1613.
- [4] G. Castellanos, A. Bernabe-Garcia, J.M. Moraleda, F.J. Nicolas, Amniotic membrane application for the healing of chronic wounds and ulcers, *Placenta* 59 (2017) 146-153.
- [5] D. Nasiry, A.R. Khalatbary, M.-A. Abdollahifar, A. Amini, M. Bayat, A. Noori, A. Piryaei, Engraftment of bioengineered three-dimensional scaffold from human amniotic membrane-derived extracellular matrix accelerates ischemic diabetic wound healing, *Archives of Dermatological Research* (2020) 1-16.
- [6] V. Ryzhuk, X.-x. Zeng, X. Wang, V. Melnychuk, L. Lankford, D. Farmer, A. Wang, Human amnion extracellular matrix derived bioactive hydrogel for cell delivery and tissue engineering, *Materials science & engineering. C, Materials for biological applications* 85 (2018) 191.
- [7] T.D. Johnson, S.Y. Lin, K.L. Christman, Tailoring material properties of a nanofibrous extracellular matrix derived hydrogel, *Nanotechnology* 22(49) (2011) 494015.
- [8] R. Holmes, S. Kirk, G. Tronci, X. Yang, D. Wood, Influence of telopeptides on the structural and physical properties of polymeric and monomeric acid-soluble type I collagen, *Materials Science and Engineering: C* 77 (2017) 823-827.
- [9] F. Zhao, J. Cheng, M. Sun, H. Yu, N. Wu, Z. Li, J. Zhang, Q. Li, P. Yang, Q. Liu, Digestion degree is a key factor to regulate the printability of pure tendon decellularized extracellular matrix bio-ink in extrusion-based 3D cell printing, *Biofabrication* 12(4) (2020) 045011.
- [10] R.A. Pouliot, B.M. Young, P.A. Link, H.E. Park, A.R. Kahn, K. Shankar, M.B. Schneck, D.J. Weiss, R.L. Heise, Porcine lung-derived extracellular matrix hydrogel properties are dependent on pepsin digestion time, *Tissue Engineering Part C: Methods* 26(6) (2020) 332-346.
- [11] N. Eslahi, A. Simchi, M. Mehrjoo, M.A. Shokrgozar, S. Bonakdar, Hybrid cross-linked hydrogels based on fibrous protein/block copolymers and layered silicate nanoparticles: tunable thermosensitivity, biodegradability and mechanical durability, *RSC advances* 6(67) (2016) 62944-62957.
- [12] E. Tamjid, B.H. Guenther, Rheology and colloidal structure of silver nanoparticles dispersed in diethylene glycol, *Powder Technology* 197(1-2) (2010) 49-53.
- [13] D.O. Freytes, J. Martin, S.S. Velankar, A.S. Lee, S.F. Badylak, Preparation and rheological

ژل شدن، ریزساختار، خواص رئولوژیکی و خواص زیستی هیدروژل به دست آمده تأثیرگذار است. یافته‌ها مبین آن بود که زمان‌های انحلال ۶ و ۱۲ ساعت برای هضم پودر پرده آمینوتیک و تهیه هیدروژل یکنواخت کافی نیست. با افزایش زمان انحلال از ۲۴ تا ۷۲ ساعت، واحدهای پایه کلاژن (یعنی مولکول تک‌پار یا زیرفیبریل) بیشتری تشکیل شده که با تنظیم شرایط طبیعی بدن، این واحدهای سازنده خودآرایی نموده و الیاف کلاژنی را ایجاد می‌کنند. افزایش زمان انحلال موجب افزایش مدول ذخیره، افزایش سرعت ژل شدن و افزایش قطر الیاف در شبکه لیفی نهایی هیدروژل آمینون نیز می‌شود. هیدروژل‌های تهیه شده با زمان‌های مختلف انحلال، اثر سمیتی روی سلول‌های فیبروبلاست از خود نشان ندادند. این مطالعه تأیید کننده تأثیر پارامتر زمان هضم بافت در خواص نهایی هیدروژل تهیه شده می‌باشد که می‌توان با امکان تغییر در خواص نهایی از آن به‌عنوان داربست برای مهندسی بافت استفاده کرد.

**تشکر و قدردانی:** از دانشگاه صنعتی شریف بابت گرنت با شماره GrantQA970816 و از صندوق حمایت از پژوهشگران و فناوران کشور بابت گرنت با شماره Grant95-S-48740 قدردانی می‌شود.

**تأییدیه اخلاقی:** جفت حاصل از عمل سزارین با کسب رضایت از مادران سالم تهیه شده است.

**تعارض منافع:** هیچ‌گونه تعارض منافی وجود ندارد.

**منابع مالی:** هزینه‌های این مطالعه از اعتبار مالی اساتید راهنما و مشاور پژوهش تأمین شده است.

## ۶- منابع

- [1] L.T. Saldin, M.C. Cramer, S.S. Velankar, L.J. White, S.F. Badylak, Extracellular matrix hydrogels from decellularized tissues: structure and function, *Acta biomaterialia* 49 (2017) 1-15.
- [2] F. Pati, J. Jang, D.-H. Ha, S.W. Kim, J.-W. Rhie, J.-H. Shim, D.-H. Kim, D.-W. Cho, Printing three-dimensional tissue analogues with decellularized extracellular matrix bioink, *Nature communications* 5 (2014) 3935.



hydrogel accelerates full-thickness wound healing, *Stem cells translational medicine* 6(11) (2017) 2020-2032.

[26] J.M. Mattson, R. Turcotte, Y. Zhang, Glycosaminoglycans contribute to extracellular matrix fiber recruitment and arterial wall mechanics, *Biomechanics and modeling in mechanobiology* 16(1) (2017) 213-225.

[27] C. Li, L. Duan, Z. Tian, W. Liu, G. Li, X. Huang, Rheological behavior of acylated pepsin-solubilized collagen solutions: Effects of concentration, *Korea-Australia Rheology Journal* 27(4) (2015) 287-295.

[28] F.P. Melchels, M.M. Blokzijl, R. Levato, Q.C. Peiffer, M. De Ruijter, W.E. Hennink, T. Vermonden, J. Malda, Hydrogel-based reinforcement of 3D bioprinted constructs, *Biofabrication* 8(3) (2016) 035004.

[29] J. Jang, T.G. Kim, B.S. Kim, S.-W. Kim, S.-M. Kwon, D.-W. Cho, Tailoring mechanical properties of decellularized extracellular matrix bioink by vitamin B2-induced photo-crosslinking, *Acta biomaterialia* 33 (2016) 88-95.

[30] G. Gao, J.H. Lee, J. Jang, D.H. Lee, J.S. Kong, B.S. Kim, Y.J. Choi, W.B. Jang, Y.J. Hong, S.M. Kwon, Tissue engineered bio-blood-vessels constructed using a tissue-specific bioink and 3D coaxial cell printing technique: a novel therapy for ischemic disease, *Advanced functional materials* 27(33) (2017) 1700798.

[31] S. Sasikumar, S. Chameettachal, B. Cromer, F. Pati, P. Kingshott, Decellularized extracellular matrix hydrogels—cell behavior as function of matrix stiffness, *Current Opinion in Biomedical Engineering* (2019).

[32] J.M. Singelyn, K.L. Christman, Modulation of material properties of a decellularized myocardial matrix scaffold, *Macromolecular bioscience* 11(6) (2011) 731-738.

[33] P.A. Link, R.A. Pouliot, N.S. Mikhael, B.M. Young, R.L. Heise, Tunable hydrogels from pulmonary extracellular matrix for 3D cell culture, *Journal of visualized experiments: JoVE* (119) (2017).

[34] J. Visser, P.A. Levett, N.C. te Moller, J. Besems, K.W. Boere, M.H. van Rijen, J.C. de Grauw, W.J. Dhert, P.R. van Weeren, J. Malda, Crosslinkable hydrogels derived from cartilage, meniscus, and tendon tissue, *Tissue engineering part A* 21(7-8) (2015) 1195-1206.

[35] J.A. DeQuach, V. Mezzano, A. Miglani, S. Lange, G.M. Keller, F. Sheikh, K.L. Christman, Simple and high yielding method for preparing tissue specific extracellular matrix coatings for cell culture, *PloS one* 5(9) (2010) e13039.

[36] U. Galili, Avoiding detrimental human immune response against Mammalian extracellular matrix

characterization of a gel form of the porcine urinary bladder matrix, *Biomaterials* 29(11) (2008) 1630-1637.

[14] Y.K. Lin, D.C. Liu, Effects of pepsin digestion at different temperatures and times on properties of telopeptide-poor collagen from bird feet, *Food Chemistry* 94(4) (2006) 621-625.

[15] D.L. Christiansen, E.K. Huang, F.H. Silver, Assembly of type I collagen: fusion of fibril subunits and the influence of fibril diameter on mechanical properties, *Matrix Biology* 19(5) (2000) 409-420.

[16] S. Zhu, Q. Yuan, T. Yin, J. You, Z. Gu, S. Xiong, Y. Hu, Self-assembly of collagen-based biomaterials: preparation, characterizations and biomedical applications, *Journal of Materials Chemistry B* 6(18) (2018) 2650-2676.

[17] J.M. Townsend, E.C. Beck, S.H. Gehrke, C.J. Berkland, M.S. Detamore, Flow behavior prior to crosslinking: The need for precursor rheology for placement of hydrogels in medical applications and for 3D bioprinting, *Progress in polymer science* 91 (2019) 126-140.

[18] B. Toprakhisar, A. Nadernezhad, E. Bakirci, N. Khani, G.A. Skvortsov, B. Koc, Development of bioink from decellularized tendon extracellular matrix for 3D bioprinting, *Macromolecular bioscience* 18(10) (2018) 1800024.

[19] C. Williams, K. Sullivan, L.D. Black III, Partially digested adult cardiac extracellular matrix promotes cardiomyocyte proliferation in vitro, *Advanced healthcare materials* 4(10) (2015) 1545-1554.

[20] M.T. Wolf, K.A. Daly, E.P. Brennan-Pierce, S.A. Johnson, C.A. Carruthers, A. D'Amore, S.P. Nagarkar, S.S. Velankar, S.F. Badylak, A hydrogel derived from decellularized dermal extracellular matrix, *Biomaterials* 33(29) (2012) 7028-7038.

[21] G.E. Davis, K.J. Bayless, M.J. Davis, G.A. Meininger, Regulation of tissue injury responses by the exposure of matricryptic sites within extracellular matrix molecules, *The American journal of pathology* 156(5) (2000) 1489-1498.

[22] E.P. Brennan, J. Reing, D. Chew, J.M. Myers-Irvin, E. Young, S.F. Badylak, Antibacterial activity within degradation products of biological scaffolds composed of extracellular matrix, *Tissue engineering* 12(10) (2006) 2949-2955.

[23] T.L. Adair-Kirk, R.M. Senior, Fragments of extracellular matrix as mediators of inflammation, *The international journal of biochemistry & cell biology* 40(6-7) (2008) 1101-1110.

[24] J.D. Mott, Z. Werb, Regulation of matrix biology by matrix metalloproteinases, *Current opinion in cell biology* 16(5) (2004) 558-564.

[25] S.V. Murphy, A. Skardal, L. Song, K. Sutton, R. Haug, D.L. Mack, J. Jackson, S. Soker, A. Atala, Solubilized amnion membrane hyaluronic acid

[40] D. Yu, Y.-M. Wong, Y. Cheong, E. Xia, T.-C. Li, Asherman syndrome—one century later, *Fertility and sterility* 89(4) (2008) 759-779.

[41] X. Chen, J. Sun, X. Li, L. Mao, Y. Zhou, L. Cui, W. Bai, Antifibrotic effects of decellularized and lyophilized human amniotic membrane transplant on the formation of intrauterine adhesion, *Experimental and clinical transplantation: official journal of the Middle East Society for Organ Transplantation* 17(2) (2018) 236-242.

[42] M. Bhattacharjee, J.L.E. Ivirico, H.-M. Kan, R. Bordett, R. Pandey, T. Otsuka, L.S. Nair, C.T. Laurencin, Preparation and characterization of amnion hydrogel and its synergistic effect with adipose derived stem cells towards IL1 $\beta$  activated chondrocytes, *Scientific reports* 10(1) (2020) 1-15.

implants, *Tissue Engineering Part B: Reviews* 21(2) (2015) 231-241.

[37] G.H. Kim, N. Uriel, D. Burkhoff, Reverse remodelling and myocardial recovery in heart failure, *Nature Reviews Cardiology* 15(2) (2018) 83-96.

[38] J.J. Henry, L. Delrosario, J. Fang, S.Y. Wong, Q. Fang, R. Sievers, S. Kotha, A. Wang, D. Farmer, P. Janaswamy, Development of injectable amniotic membrane matrix for postmyocardial infarction tissue repair, *Advanced healthcare materials* 9(2) (2020) 1900544.

[39] X. Li, P. Li, C. Wang, T. Shang, H. Han, Y. Tong, Y. Kang, J. Fang, L. Cui, A Thermo-Sensitive and Injectable Hydrogel Derived From Decellularized Amniotic Membrane to Prevent Intrauterine Adhesion by Accelerating Endometrium Regeneration, Available at SSRN 3885862.

# Effect of Pepsin Digestion Time on the Properties of Temperature Sensitive Human Amniotic Membrane Derived Hydrogel

Golara Kafili<sup>1</sup>, Elnaz Tamjid<sup>2</sup>, Hassan Niknejad<sup>3</sup>, Abdolreza Simchi<sup>1,4,\*</sup>

<sup>1</sup> Institute for Nanoscience and Nanotechnology, Sharif University of Technology, Tehran, Iran.

<sup>2</sup> Department of Nanobiotechnology, Faculty of Biological Sciences, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran.

<sup>3</sup> Department of Pharmacology, School of Medicine, Shahid Beheshti University of Medical Sciences, Tehran, Iran.

<sup>4</sup> Department of Materials Science and Engineering, Sharif University of Technology, Tehran, Iran.

simchi@sharif.edu

Receipt: 2021/05/15

Accepted: 2022/04/30

## Abstract

The human amniotic membrane (HAM) is one of the rare allograft tissues that are in use in clinical trials. Biocompatibility, antibacterial effect, low immunogenicity, and scar prevention are properties that have made HAM attractive for tissue engineering (TE) applications, for example, as a cell carrier, injectable hydrogel, and cell culture substrate. In this research, the effect of digestion time on the structure, gelation kinetics, rheological and biological properties of amniotic membrane-derived hydrogels was studied. The results determined that digestion with pepsin should be performed at least for 24 h. Prolonging the digestion time to 72 h increased the shear modulus, fiber diameter, and gelation rate. Cytocompatibility assays with L929 fibroblast cells showed that the digestion time had no effect on the cell toxicity of the hydrogels. However, cell proliferation was improved due to preserved constitutive bioactive molecules. The results of this research can be used to develop amniotic membrane-derived hydrogels for TE applications.

**Keywords:** Amniotic membrane, Digestion, Hydrogel, Rheological properties, Gelation kinetics