

## تهیه مناسب‌ترین داربست طبیعی کلیه انسان: مقایسه دو روش سلول‌زدایی

## چکیده

دریافت: ۱۴۰۲/۱۱/۲۱ ویرایش: ۱۴۰۲/۱۱/۲۸ پذیرش: ۱۴۰۲/۱۲/۲۷ آنلاین: ۱۴۰۳/۰۱/۱۵

**زمینه و هدف:** مهندسی بافت دارای پتانسیل مناسبی برای افزایش کلیه‌های موردنیاز جهت پیوند کلیه می‌باشد. هدف از این مطالعه، شناخت روش مناسب جهت تهیه داربست‌های کلیه انسانی می‌باشد.

**روش بررسی:** این مطالعه تحقیقی در دانشگاه علوم پزشکی مشهد از اردیبهشت تا شهریور ۱۳۹۸ انجام گردید. در این مطالعه دو روش سلول‌زدایی کلیه انسان با هم مقایسه شدند. در روش اول از مواد شوینده Triton X-100 (1A) 1% و SDS (1B) 1% (سدیم دودسیل سولفات) و به دنبال آن از DNase I استفاده شد. در روش دوم از SDS (2A) 0.5% و SDS (2B) 1% استفاده گردید. کارایی هر یک از روش‌های سلول‌زدایی با استفاده از رنگ‌آمیزی هماتوکسیلین و اتوزین (H&E)، DAPI، استخراج DNA بافت و رنگ‌آمیزی ایمونوهیستوشیمی بررسی شد.

**یافته‌ها:** نتایج رنگ‌آمیزی H&E کلیه انسانی سلول‌زدایی شده حذف موفق هسته‌های سلولی و حفظ بهتر ماتریکس خارج سلولی را در قطعات مجاورت داده شده با تریتون (1A) در مقایسه با قطعات مجاورت داده شده با SDS (1B) نشان داد. اندازه‌گیری DNA داربست‌ها نشان داد که تریتون X-100 جهت کاهش DNA در مقایسه با سایر روش‌های سلول‌زدایی موثرتر می‌باشد. رنگ‌آمیزی IHC حفظ کلاژن IV و لامینین را طی سلول‌زدایی با تریتون X-100 در روز پنج‌شنبه نشان داد. نتایج IHC حذف کامل آنتی‌ژن لوکوسیت انسانی (HLA) را در داربست‌های کلیه انسانی تهیه شده با تریتون در روز پنج‌شنبه نشان داد.

**نتیجه‌گیری:** یافته‌های این مطالعه نشان می‌دهد که تریتون X-100 ماده شوینده مناسب‌تری برای سلول‌زدایی کلیه انسان در مقایسه با SDS می‌باشد.

**کلمات کلیدی:** کلیه انسان، ماتریکس خارج سلولی، سلول‌زدایی، تریتون X-100، سدیم دودسیل سولفات.

سمیرا شهرکی<sup>۱\*</sup>، محمود توکلی<sup>۲</sup>، ابوالفضل خواجه‌راد<sup>۳</sup>، مریم مقدم متین<sup>۴</sup>، محمد اصل‌زارع<sup>۵\*</sup>

۱- گروه فیزیولوژی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی زاهدان، زاهدان، ایران.

۲- گروه فیزیولوژی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی مشهد، مشهد، ایران.

۳- گروه اورولوژی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی مشهد، مشهد، ایران.

۴- مرکز تحقیقات کاربردی زیست پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی مشهد، مشهد، ایران.

۵- گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه فردوسی مشهد، مشهد، ایران.

\* نویسنده مسئول: مشهد، دانشگاه علوم پزشکی مشهد، مرکز تحقیقات اورولوژی و نفرولوژی.

تلفن: ۰۵۱-۳۸۴۱۷۴۰۴

E-mail: Zarem@mums.ac.ir

## مقدمه

تعداد بیماران مبتلا به مرحله نهایی بیماری‌های کلیه (End Stage Renal Disease) سالانه رو به افزایش است. علل اصلی نارسایی کلیه عبارتند از: گلوومرولونفریت، دیابت، نفروپاتی، بیماری‌های کلیوی پلی‌کیستیک، سندرم آلپورت و عوامل دیگر که به تدریج موجب کاهش میزان فیلتراسیون گلومرولی می‌شود. درمان‌های رایج برای این

بیماران با توجه به کاهش قابل توجه عملکرد کلیه درمان با روش‌های جایگزینی کلیه می‌باشد. دیالیز و پیوند کلیه دو روش متداول در درمان جایگزینی کلیه می‌باشند.<sup>۱</sup> استفاده از داروهای حفاظت‌کننده در طولانی مدت امکان‌پذیر نمی‌باشد، بنابراین استفاده از درمان‌های جایگزینی کلیه شامل همودیالیز و پیوند ضروری است. از لحاظ آماری در بیماران دیالیزی هنوز میزان مرگ‌ومیر بالایی مشاهده می‌شود.<sup>۲،۳</sup> پیوند کلیه بهترین درمان برای بیماران ESRD می‌باشد. از

در مقایسه با داربست‌های مصنوعی شامل محدودیت کنترل خواص فیزیکی و شیمیایی، عدم توانایی در تعدیل میزان تخریب داربست‌ها و مشکل سترون کردن آنها می‌باشد.<sup>۱۱،۱۲</sup> به منظور تهیه داربست‌های طبیعی از بافت‌های بدن موجودات زنده، فرآیند سلول‌زدایی انجام می‌شود و در طی آن تمامی سلول‌های یک اندام یا بافت از آن جدا و فقط ماتریکس خارج سلولی باقی می‌ماند. میزان سلول‌زدایی از بافت به نوع بافت و روش‌های سلول‌زدایی مورداستفاده وابسته است.<sup>۱۳،۱۴</sup> این روش‌ها ترکیبی از روش‌های فیزیکی، شیمیایی و آنزیمی می‌باشند که در آن انواعی از شوینده‌ها، آنزیم‌ها و حلال‌ها برای تجزیه سلول‌ها استفاده می‌گردد.<sup>۱۵،۱۶</sup> در تمام بافت‌ها و اندام‌ها ماتریکس خارج سلولی یک جزء دینامیک، زنده و حیاتی است. اجزای ECM از جمله کلاژن I، IV، لامینین و فیبرونکتین در اتصالات سلولی و رشد سلول نقش دارند.<sup>۱۷</sup> برهم‌کنش سلول‌های بافت با ECM، علاوه بر فراهم نمودن ساختار سه بعدی مناسب، مسیرهای پیام‌رسانی را برای رفتارهای سلولی از قبیل چسبندگی، مهاجرت، تکثیر و تمایز سلولی فراهم می‌سازد که این عوامل برای فرآیندهایی از قبیل تکوین بافت، ترمیم زخم، پاسخ‌های ایمنی و پیشبرد سرطان اهمیت دارد.<sup>۱۸</sup> با توجه به اینکه در سال‌های اخیر مطالعات متعددی در مورد بازسازی اندام‌های نسبتاً ساده مانند عروق، مثانه، مجاری هوایی فوقانی و مری در انسان با موفقیت انجام شده است، با وجود این بازسازی اندام‌های پیچیده مانند کلیه با چالش‌های متعدد همراه است و نیاز به رویکردهای متفاوت و جدید دارد.<sup>۲</sup> علی‌رغم مطالعات متعددی که جهت بازسازی کلیه روی حیوانات مختلف انجام شده<sup>۱۹-۲۲</sup>، ولی تاکنون مطالعات محدودی در مورد تولید داربست ECM کلیه انسان انجام شده است.<sup>۲۳،۲۴</sup> لذا در این مطالعه در نظر است روش‌های موثر سلول‌زدایی کلیه انسان و تولید داربست‌های مناسب طبیعی کلیه جهت رسلولاریزه کردن داربست‌های طبیعی بررسی شود.

## روش بررسی

تهیه قطعات قشری-مرکزی کلیه انسانی، در این مطالعه به دلیل عدم امکان استفاده از کلیه‌های سالم، از قسمت‌های سالم کلیه بیمارانی که به دلیل بیماری‌هایی مانند تومورها و یا نقص در عملکرد از بدن بیمار خارج شده بودند، استفاده شد. تمامی کلیه‌های مورداستفاده

طرفی علی‌رغم افزایش تعداد بیمارانی که در لیست انتظار پیوند کلیه هستند، تعداد دهنده‌های کلیه مناسب هم از اجساد و هم از دهنده‌های زنده رو به کاهش است.<sup>۱</sup> مهندسی بافت یک علم بین رشته‌ای است که اصول و روش‌های مهندسی و علوم زیستی را در جهت پیشرفت جایگزین‌های زیستی برای ذخیره، حفظ و بهبود عملکرد بافت‌ها و اندام‌های آسیب دیده به اجرا در می‌آورد.<sup>۴</sup> اساس مهندسی بافت استفاده از داربست‌ها می‌باشد که برای سلول‌های کشت داده شده روی آن مانند یک اسکلت عمل می‌کنند و سلول‌ها را قادر می‌سازد تا رفتارهای موردنیاز جهت تولید بافت‌ها و اندام‌ها با اندازه و شکل مطلوب را بروز دهند.<sup>۶،۷</sup> برای ساخت داربست‌های مورداستفاده از سه گروه جداگانه مواد زیستی شامل سرامیک، پلیمرهای سنتزی و طبیعی استفاده می‌شود و هر یک از این مواد زیستی مزایا و معایب خاصی دارد.<sup>۸</sup> هیدروکسی آپاتیت طبیعی و سنتزی و بتا تری کلسیم فسفات، سرامیک‌های مورداستفاده در مهندسی بافت استخوان هستند. آنها دارای سازگاری زیستی هستند و دارای پروتئین آزاد می‌باشند، همچنین این داربست‌ها باعث تحریک واکنش‌های ایمنولوژیک نمی‌شوند.<sup>۹،۱۰</sup> داربست پلیمری مورداستفاده در مهندسی بافت شامل پلی‌گلیکولیک اسید، پلی‌لاکتیک اسید و پلی‌کاپرولاکتون می‌باشد.<sup>۴</sup> قابلیت تولید در مقیاس بالا و امکان کنترل خصوصیات نظیر میزان استحکام، و میزان تخلخل از مزایای این داربست‌ها می‌باشد. داربست‌های سنتزی با مشکلاتی مانند تولید مواد سمی در زمان تجزیه آنها، عدم رگ‌زایی، ایجاد پاسخ ایمنی و ویژگی‌های مکانیکی ضعیف همراه می‌باشند.<sup>۹،۱۱</sup> پلیمرهای طبیعی شامل پروتئین‌های حاصل از (Extra Cellular Matrix, ECM) از قبیل کلاژن، فیبرینوزن، آلبومین، هیالورونیک اسید و گلیکوزآمینو گلیکان‌ها می‌باشد. از خواص این داربست‌ها تخریب‌پذیری قابل قبول، سازگاری زیستی بالا همراه با سمیت پایین، عدم ایجاد حساسیت و داشتن خواص مکانیکی است که مخصوص بافت‌های طبیعی می‌باشد.<sup>۱۱،۱۲</sup> علاوه بر این، یک دسته دیگر از داربست‌های طبیعی، داربست‌های طبیعی ماتریکس خارج سلولی هستند که از گیاهان و حیوانات تهیه می‌شوند و محیط مناسبی برای کشت سلول‌ها فراهم می‌کنند. فراهم آوردن سامانه پیام‌رسانی به سلول‌ها از طریق برهم‌کنش با گیرنده‌های سطحی، تجزیه به وسیله آنزیم‌های سلولی و رگ‌زایی از ویژگی‌های مهم داربست‌های طبیعی می‌باشد. معایب استفاده از داربست‌های طبیعی

مقطر با آنزیم DNase I که در PBS رقیق شده بود به مدت یک ساعت مجاور گردیدند. در نهایت بافت‌ها با PBS شستشو داده شدند تا آنزیم به طور کامل حذف شود.<sup>۲۴</sup>

روش سلول‌زدایی دوم: قطعات کلیوی ابتدا جهت شستشو با آب مقطر به مدت ۱۲ ساعت در دمای ۴°C روی شیکر قرار گرفتند (200 rpm) و به دنبال آن در مجاورت محلول سلول‌زدایی که حاوی (Sodium Dodecyl Sulfate, SDS) با درصدهای ۰/۵٪ (که روش 2A نامگذاری می‌شود) و ۰/۱٪ (که روش 2B نامگذاری می‌شود) بود، غوطه‌ور شدند. محلول اولین بار هشت ساعت پس از قرار گرفتن اولیه نمونه‌ها در محلول سلول‌زدایی تعویض گردید، سپس هر ۴۸ ساعت تا زمانی که بافت‌ها به طور کامل سلول‌زدایی شدند تعویض محیط انجام گرفت.<sup>۲۶</sup> سپس قطعات کلیوی در زمان‌های دو، پنج و ۱۰ روز پس از مجاورت با SDS برداشته شده و به منظور حذف شوینده SDS به مدت پنج روز در PBS قرار گرفتند.<sup>۲۲</sup>

ارزیابی داربست‌های طبیعی کلیوی تهیه شده، به منظور بررسی فرآیند سلول‌زدایی، داربست‌های تهیه شده قشری-مرکزی توسط هر یک از روش‌های سلول‌زدایی تحت بررسی‌های بافت‌شناسی و بررسی مقدار DNA بافت قرار گرفتند. بررسی بافت‌شناسی داربست‌های طبیعی کلیوی تهیه شده، جهت ارزیابی ریخت‌شناسی داربست‌های طبیعی قشری-مرکزی تهیه شده توسط هر یک از روش‌های سلول‌زدایی یک و دو، رنگ آمیزی‌های هماتوکسیلین-اوتوزین (H&E) و (4',6-diamidino-2-phenylindole, DAPI) در زمان‌های مورد نظر انجام گردید. بدین منظور، نمونه‌ها بلافاصله در فرمالین ۱۰٪ (محلول تثبیت کننده) به مدت ۷۲ ساعت قرار داده شدند. سپس قالب‌گیری با استفاده از پارافین انجام شد و با دستگاه میکروتوم برش‌های پنج میکرونی تهیه گردید.

رنگ‌آمیزی H&E، در این روش ابتدا داربست‌های طبیعی قشری-مرکزی تهیه شده توسط هر دو روش سلول‌زدایی در روزهای مورد نظر و همچنین بافت‌های کلیه سلول‌زدایی نشده (گروه‌های شاهد) توسط گزینول پارافین زدایی و در اتانول با درجات نزولی آب‌دهی شدند. بدین ترتیب، نمونه‌ها به منظور رنگ‌آمیزی هسته توسط هماتوکسیلین و به منظور رنگ آمیزی سیتوپلاسم و رشته‌های همبندی با ائوزین رنگ شدند.<sup>۲۷</sup> در انتها نیز آب‌گیری توسط اتانول و شفاف‌سازی توسط گزینول انجام شد. سپس از نمونه‌های مورد نظر

توسط پزشک معالج تایید شد که قادر به پیوند و استفاده در بیماران نیازمند نبوده‌اند. کلیه‌های انسانی در بطری استریل حاوی سرم فیزیولوژی سرد، از بیمارستان‌های قائم و امام رضا دانشگاه علوم پزشکی مشهد تحویل گرفته شد و در دمای ۴°C و به سرعت به آزمایشگاه منتقل شدند. ابتدا بافت‌های چربی و کپسول اطراف کلیه جدا شد.<sup>۲۲</sup> سپس کلیه‌ها با استفاده از تیغ بیستوری به صورت قطعاتی با ابعاد ۲×۱×۱ mm برش زده شدند و قطعات کلیوی قشری-مرکزی تهیه شد.<sup>۲۴</sup> سپس این قطعات تهیه شده به صورت تصادفی به سه گروه زیر تقسیم‌شده و توسط روش‌های یک و دو سلول‌زدایی شدند. ۱- قطعات قشری-مرکزی کلیوی که با استفاده از روش یک سلول‌زدایی شدند. ۲- قطعات قشری-مرکزی کلیوی که با استفاده از روش دو سلول‌زدایی شدند. ۳- گروه شاهد: شامل قطعات قشری-مرکزی کلیوی بدون هیچ روش سلول‌زدایی.

سلول‌زدایی قطعات قشری-مرکزی کلیه انسانی، جهت سلول‌زدایی کردن قطعات کلیوی، از روش‌های مختلف فیزیکی و شیمیایی استفاده شد. ابتدا نمونه‌ها با سرم فیزیولوژی شستشو داده شدند. سپس نمونه‌ها به مدت دو دقیقه در نیتروژن مایع (۱۹۶°C-) غوطه‌ور شده و سپس به مدت پنج دقیقه در آب مقطر قرار گرفتند. در مرحله بعد، نمونه‌ها با PBS در دمای ۳۷°C شستشو داده شدند.<sup>۲۵</sup> قطعات قشری-مرکزی کلیه انسانی، به منظور تهیه داربست‌های طبیعی طی دو روش زیر سلول‌زدایی شدند و کارایی سلول‌زدایی با روش‌های بافت‌شناسی و تعیین مقدار DNA مورد بررسی قرار گرفت. به علاوه، تعدادی از این قطعات به عنوان نمونه شاهد در نظر گرفته شده و این قطعات جهت مطالعات بافت‌شناسی داخل محلول فرمالین ۱۰٪ به مدت ۷۲ ساعت تثبیت شدند.

روش اول سلول‌زدایی: قطعات کلیوی ابتدا با (phosphate-buffered saline, PBS) شستشو داده شدند، سپس به صورت تصادفی تعدادی از قطعات با ۱٪ تریتون X-100 (1 T X-100) (که روش 1A نامگذاری می‌شود) و تعدادی دیگر با ۱٪ SDS (که روش 1B نامگذاری می‌شود) مجاور شدند. نمونه‌ها در دمای ۴°C روی شیکر قرار گرفتند (200 rpm). سپس هر ۲۴ ساعت محیط مربوطه تعویض شد تا زمانی که بافت‌ها به طور کامل سلول‌زدایی شدند. بافت‌ها در زمان‌های دو، پنج، ۱۰ و ۱۴ روز از محلول‌های سلول‌زدایی کننده خارج شدند و پس از شستشو با آب

مدت یک ساعت با آنتی‌بادی ثانویه گرمخانه گذاری شدند. پس از شستشوی مجدد با PBS، نمونه‌ها در مجاورت ۳۰ میکرولیتر DAB قرار گرفتند. در نهایت نمونه‌ها با هماتوکسیلین رنگ، با درجات صعودی اتانول آب‌گیری و توسط گزیلول شفاف‌سازی شدند. در این روش واکنش ایمونوهیستوشیمیایی آنتی‌بادی با آنتی‌ژن مورد نظر به رنگ قهوه‌ای آشکار می‌شود.<sup>۲۲</sup> شدت رنگ ایجاد شده نشان‌دهنده میزان پروتیین مورد نظر در بافت کلیه بود. در نهایت از نمونه‌ها توسط میکروسکوپ نوری Olympus BX51 Japan تصویر تهیه گردید.

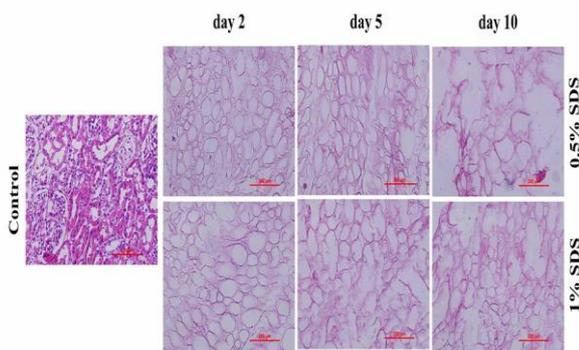
### یافته‌ها

بررسی کارایی روش‌های سلول‌زدایی داربست‌های قشری-مرکزی کلیه انسان توسط بافت‌شناسی، جهت بررسی بافت‌شناسی داربست‌های طبیعی قشری-مرکزی تهیه‌شده توسط هر یک از روش‌های سلول‌زدایی یک و دو، رنگ آمیزی‌های هماتوکسیلین-اٹوزین و DAPI در زمان‌های موردنظر (روزهای دو، پنج، ۱۰ و ۱۴ برای روش یک و روزهای دو، پنج و ۱۰ برای روش دو) انجام گردید. رنگ‌آمیزی هماتوکسیلین-اٹوزین داربست‌های طبیعی قشری-مرکزی کلیه انسانی تهیه شده توسط روش یک و دو، در این رنگ‌آمیزی، رنگ اٹوزینوفیلی صورتی نمایانگر انواع رشته‌های کلاژن و رنگ‌آمیزی بازوفیلی بنفش نمایانگر مواد هسته‌ای سلولی می‌باشد. نتایج حاصل از رنگ‌آمیزی هماتوکسیلین-اٹوزین، حذف سلول‌ها از قطعات کلیوی قشری-مرکزی، حفظ ساختارهای توبولی و گلوبولری داربست‌های تهیه شده در هر یک از روش‌های IA (تری‌تون ۱٪) و IB (SDS 1%) را در مقایسه با بافت‌های کلیه سلول‌زدایی نشده (گروه شاهد) نشان می‌دهد (شکل ۱). بررسی نمونه‌ها با رنگ‌آمیزی هماتوکسیلین-اٹوزین نمایانگر حفظ ساختارهای توبولی، عروقی، گلوبولری و حفظ ساختار پیچیده ماتریکس خارج سلولی داربست‌های تهیه شده در مقایسه با گروه‌های شاهد در روزهای دو، پنج و ۱۰ پس از مجاورت با تری‌تون می‌باشد. همچنین با افزایش زمان سلول‌زدایی و در روز ۱۴ پس از مجاورت با تری‌تون تخریب و آسیب ماتریکس خارج سلولی در داربست‌های طبیعی تهیه شده در مقایسه با گروه‌های شاهد مشاهده شد (شکل ۱). در این رنگ‌آمیزی عدم وجود

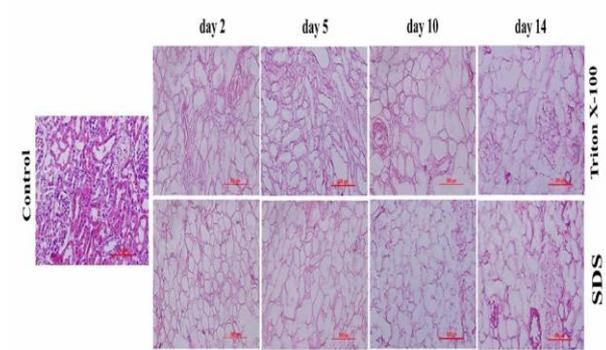
توسط میکروسکوپ Olympus BX51 Japan عکس‌برداری انجام شد.<sup>۲۸</sup> رنگ‌آمیزی با رنگ فلورسنت DAPI، رنگ‌آمیزی DAPI برای تأیید فرآیند سلول‌زدایی انجام گردید.<sup>۲۹</sup> جهت رنگ‌آمیزی داربست‌های طبیعی قشری-مرکزی تهیه شده توسط هر دو روش سلول‌زدایی در روزهای مورد نظر و همچنین بافت‌های کلیه سلول‌زدایی نشده (گروه‌های شاهد)، به کمک DAPI، پس از پارافین‌زدایی توسط گزیلول و آب‌دهی توسط درجات نزولی اتانول، لام‌ها به مدت پنج دقیقه در بافری که توسط استیک اسید و  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  تهیه شد، قرار گرفتند. سپس با استفاده از سمپلر یک قطره از محلول رقیق شده رنگ DAPI بر روی هر مقطع ریخته و لامل بر روی نمونه‌ها قرار داده شد. لام‌ها جهت رنگ‌آمیزی به مدت ۱۵-۱۰ دقیقه درون فویل آلومینیومی پیچیده شدند و در نهایت جهت مشاهده و عکس‌برداری مقاطع، از میکروسکوپ فلورسنت (Olympus, Japan) استفاده گردید.<sup>۳۰</sup> استخراج DNA بافت، مقدار DNA باقیمانده در داربست‌های طبیعی تهیه شده توسط هر دو روش سلول‌زدایی در روزهای مورد نظر و همچنین بافت‌های کلیه سلول‌زدایی نشده (گروه‌های شاهد)، با استفاده از کیت استخراج DNA ژنومی مطابق با دستورالعمل شرکت سازنده Denazist, Iran در زمان‌های مورد نظر اندازه‌گیری شد. پس از استخراج DNA از بافت‌ها، جذب نوری آنها با استفاده از دستگاه نانودراپ در طول موج ۲۶۰ nm و ۲۸۰ nm خوانده شد. ایمونوهیستوشیمی، پس از بررسی داربست‌های طبیعی قشری-مرکزی کلیه انسانی تهیه شده توسط روش‌های سلول‌زدایی یک و دو، روش سلول‌زدایی یک به‌عنوان مناسب‌ترین روش تهیه داربست در نظر گرفته شد و رنگ‌آمیزی ایمونوهیستوشیمی به منظور بررسی و تعیین مناسب‌ترین زمان تهیه داربست انجام شد. در این روش نمونه‌ها ابتدا توسط گزیلول پارافین‌زدایی و با درجات نزولی اتانول آب‌گیری شدند. در مرحله بعد، نمونه‌ها با بافر نمکی فسفات شستشو و سپس به منظور بازیافت آنتی‌ژن با آنزیم پروتیناز K (۶۰۰ U/ml) گرمخانه گذاری شدند. پس از شستشو با PBS، نمونه‌ها به ترتیب در مجاورت ۲۰ میکرولیتر BSA 1%، متانول ۳٪ (به منظور خنثی‌سازی پراکسیداز داخلی) و ۲۰ میکرولیتر 1% goat serum قرار گرفتند. سپس نمونه‌ها با آنتی‌بادی اولیه رقیق‌شده کلاژن IV، آنتی‌ژن لوکوسیت انسانی (HLA) و لاینین، به مدت ۲۴ ساعت در دمای  $4^{\circ}\text{C}$  و پس از یک مرحله شستشو با PBS، نمونه‌ها در دمای اتاق به

طرفی، با افزایش زمان سلول‌زدایی ساختارهای توبولی، گلومرولی و ساختار پیچیده ماتریکس خارج سلولی در داربست‌های طبیعی قشری-مرکزی تهیه شده توسط SDS 0.5% در مقایسه با گروه شاهد کمتر حفظ شده بود و تخریب بیشتر ماتریکس مشاهده شد. عدم وجود هسته‌های سلول در داربست‌های طبیعی قشری-مرکزی تهیه شده توسط SDS با غلظت 1٪ در مقایسه با بافت‌های کلیه سلول‌زدایی نشده نشان‌دهنده فرآیند سلول‌زدایی در تمامی زمان‌ها می‌باشد (شکل ۲). همچنین بررسی نمونه‌ها با رنگ‌آمیزی H&E نشان‌دهنده تخریب بیشتر و حفظ کمتر ساختارهای توبولی، گلومرولی و ساختار پیچیده ماتریکس خارج سلولی در داربست‌های طبیعی تهیه شده توسط SDS 1% در مقایسه با گروه‌های شاهد بود.

هسته‌های سلول داربست‌های قشری-مرکزی تهیه شده در زمان‌های دو، پنج، ۱۰ و ۱۴ روز پس از مجاورت با 1% SDS (روش 1B) در مقایسه با بافت‌های کلیه گروه‌های شاهد مویذ صحت فرآیند سلول‌زدایی در تمامی زمان‌ها می‌باشد. بررسی نمونه‌ها با رنگ‌آمیزی H&E نشان داد ساختارهای توبولی، عروقی و یکپارچگی ماتریکس خارج سلولی داربست‌های تهیه شده در مقایسه با گروه‌های شاهد در روزهای دو و پنج پس از مجاورت با 1% SDS حفظ شده است. همچنین با افزایش زمان سلول‌زدایی و در روزهای ۱۰ و ۱۴ پس از مجاورت با 1% SDS تخریب و آسیب ماتریکس خارج سلولی در داربست‌های طبیعی تهیه شده در مقایسه با گروه‌های شاهد مشاهده شد (شکل ۱).



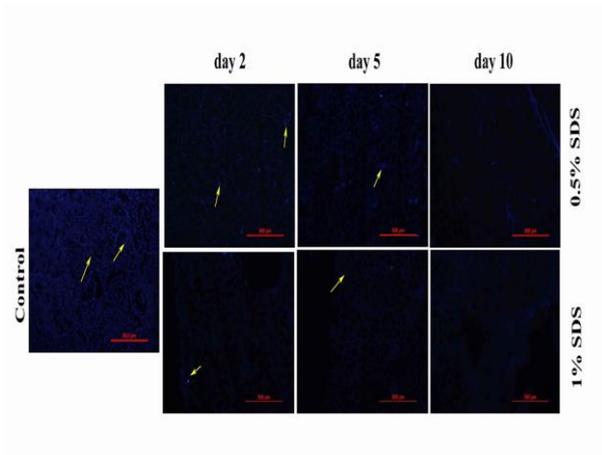
شکل ۲: بررسی کارایی روش سلول‌زدایی دو در نواحی قشری-مرکزی کلیه انسان توسط رنگ‌آمیزی هماتوکسیلین-ئوزین: تصاویر مربوط به مقاطع قشری-مرکزی بافت کلیه سلول‌زدایی نشده و داربست‌های تهیه شده در زمان‌های دو، پنج و ۱۰ روز پس از مجاورت با SDS 0.5% و SDS 1% می‌باشند. عدم وجود هسته‌های سلول در قطعات قشری-مرکزی سلول‌زدایی شده نشان‌دهنده تایید سلول‌زدایی در داربست‌های طبیعی قشری-مرکزی تهیه شده توسط SDS 0.5% و SDS 1% می‌باشد (بزرگنمایی ۲۰۰X).



شکل ۱: بررسی کارایی روش سلول‌زدایی یک در نواحی قشری-مرکزی کلیه انسان توسط رنگ‌آمیزی هماتوکسیلین-ئوزین: تصاویر مربوط به مقاطع قشری-مرکزی بافت کلیه سلول‌زدایی نشده و داربست‌های تهیه شده در زمان‌های دو، پنج، ۱۰ و ۱۴ روز پس از مجاورت با تریتون و SDS 1% می‌باشند. عدم وجود هسته‌های سلول در قطعات قشری-مرکزی سلول‌زدایی شده نشان‌دهنده تایید سلول‌زدایی در داربست‌های طبیعی قشری-مرکزی تهیه شده توسط تریتون و SDS 1% می‌باشد (بزرگنمایی ۲۰۰X).

رنگ‌آمیزی DAPI داربست‌های طبیعی قشری-مرکزی کلیه انسانی تهیه شده توسط روش یک و دو، رنگ DAPI با عبور از غشاها و اتصال به مولکول‌های DNA، خاصیت درخشندگی از خود نشان می‌دهد به طوری که در مقاطع تهیه شده، هسته‌ها با میکروسکوپ فلورسنت به رنگ آبی درخشان دیده می‌شوند. از این رنگ‌آمیزی، جهت بررسی عدم وجود هسته در داربست‌های طبیعی قشری-مرکزی

در شکل ۲ داربست‌های قشری-مرکزی تهیه شده در روزهای دو، پنج و ۱۰ پس از مجاورت با SDS 0.5% (روش 2A) نشان داده شده است. در این رنگ‌آمیزی عدم وجود هسته‌های سلول در داربست‌های طبیعی تهیه شده توسط محلول SDS 0.5% (روش 2A) در مقایسه با بافت‌های کلیه سلول‌زدایی نشده (گروه شاهد) نشان‌دهنده صحت فرآیند سلول‌زدایی در تمامی زمان‌ها می‌باشد. از



شکل ۴: بررسی کارایی روش دو سلول‌زدایی قطعات قشری-مرکزی کلیه به کمک رنگ‌آمیزی DAPI. بافت قشری-مرکزی کلیه را قبل از سلول‌زدایی نشان می‌دهد که هسته‌های سلولی با رنگ‌آمیزی DAPI به صورت نقاط آبی فلورسنت، داربست‌های قشری-مرکزی تهیه شده دو روز، پنج روز و ۱۰ روز پس از مجاورت با 0.5% SDS (روش 2A)، داربست‌های قشری-مرکزی تهیه شده دو روز، پنج روز و ۱۰ روز پس از مجاورت با 1% SDS (روش 2B) با بزرگنمایی ۲۰۰X، پیکان‌ها هسته سلول‌ها را نشان می‌دهند.

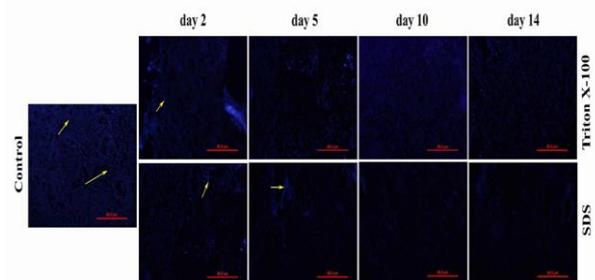
مقایسه کمی کارایی روش‌های سلول‌زدایی استفاده شده در بخش‌های مختلف کلیه انسانی با بررسی DNA موجود در بافت، به منظور ارزیابی کمی فرآیند سلول‌زدایی، استخراج DNA از داربست‌های طبیعی قشری-مرکزی در هر یک از روش‌های سلول‌زدایی صورت گرفت و میزان DNA آنها با بافت‌های کلیه در گروه‌های شاهد مقایسه گردید.

نتایج استخراج DNA داربست‌های طبیعی قشری-مرکزی کلیه انسانی تهیه شده توسط روش یک و دو، شکل A-5 مقایسه مقدار DNA استخراج شده در قطعات قشری-مرکزی کلیه انسانی مجاورت داده شده با تریتون (روش 1A) و SDS (روش 1B) را نشان می‌دهد. براساس نتایج به دست آمده، مقدار DNA قطعات قشری-مرکزی کلیه انسانی در زمان‌های دو، پنج، ۱۰ و ۱۴ روز پس از مجاورت با تریتون در مقایسه با گروه شاهد کاهش یافت و این کاهش معنادار بود به ترتیب ( $P < 0.001$ ،  $P < 0.01$ ). همچنین مقدار DNA قطعات قشری-مرکزی کلیه انسانی در زمان‌های دو، پنج، ۱۰ و ۱۴ روز پس از مجاورت با SDS در مقایسه با گروه شاهد کاهش یافت و این کاهش فقط در روز پنج معنادار بود ( $P < 0.05$ ).

کلیه انسانی و تایید فرآیند سلول‌زدایی در مقایسه با بافت کلیه سلول‌زدایی نشده (گروه‌های شاهد) استفاده گردید. مقاطع رنگ‌آمیزی شده با رنگ فلورسنت DAPI مربوط به داربست‌های قشری-مرکزی کلیه انسانی تهیه شده در زمان‌های دو، پنج، ۱۰ و ۱۴ روز پس از مجاورت با تریتون (روش 1A) و SDS (روش 1B) در شکل ۳ نشان داده شد.

همان‌طور که مشاهده می‌شود، در بافت قشری-مرکزی کلیه سلول‌زدایی نشده هسته سلول‌های اپی‌تلیالی و اندوتلیالی با استفاده از رنگ‌آمیزی DAPI، به صورت آبی فلورسنت مشخص شده، ولی در داربست‌های طبیعی قشری-مرکزی کلیه‌های انسانی تهیه شده توسط تریتون و SDS در تمامی روزها این نقاط درخشان مشاهده نمی‌گردد که موید حذف موفق سلول‌ها و مواد هسته‌ای در داربست‌ها می‌باشد. شکل ۴ داربست‌های قشری-مرکزی تهیه شده در روزهای دو، پنج و ۱۰ پس از مجاورت با 0.5% SDS و 1% را با رنگ فلورسنت DAPI نشان می‌دهد.

عدم وجود نقاط درخشان آبی نمایانگر حذف هسته سلول‌های اپی‌تلیالی و اندوتلیالی در داربست‌های طبیعی تهیه شده به هر دو روش 2A (SDS 0.5%) و 2B (SDS 1%) در مقایسه با بافت‌های کلیه گروه‌های شاهد می‌باشد که تایید صحت فرآیند سلول‌زدایی در هر دو غلظت SDS و در تمامی زمان‌های مورد بررسی می‌باشد.



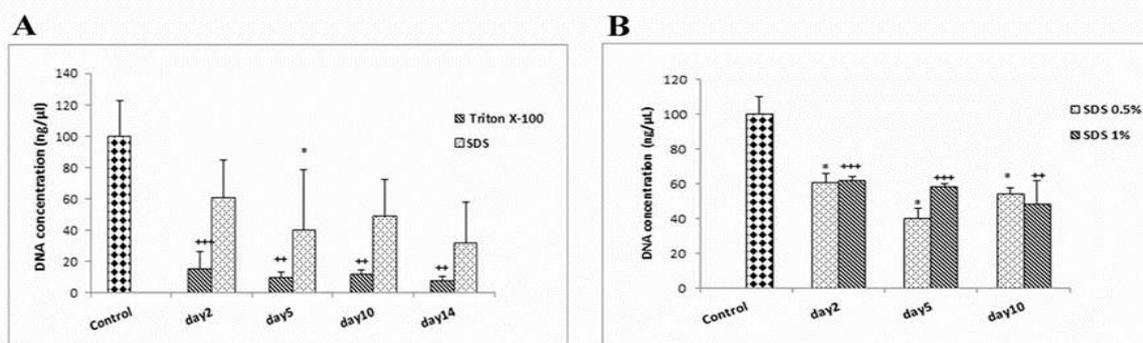
شکل ۵: بررسی کارایی روش یک سلول‌زدایی در قطعات قشری-مرکزی کلیه به کمک رنگ‌آمیزی DAPI. بافت قشری-مرکزی کلیه را پیش از سلول‌زدایی نشان می‌دهد که هسته‌های سلولی با رنگ‌آمیزی DAPI به صورت نقاط آبی فلورسنت، داربست‌های قشری-مرکزی تهیه شده دو روز، پنج روز، ۱۰ روز و ۱۴ روز پس از مجاورت با تریتون (روش 1A)، داربست‌های قشری-مرکزی تهیه شده دو روز، پنج روز، ۱۰ روز و ۱۴ روز پس از مجاورت با SDS (روش 1B) با بزرگنمایی ۲۰۰X، پیکان‌ها هسته سلول‌ها را نشان می‌دهند.

در این راستا، جهت تعیین بهترین زمان سلول‌زدایی توسط تریتون ۱٪، روش ایمونوهیستوشیمی برای داربست‌های طبیعی قشری-مرکزی کلیه انسانی سلول‌زدایی شده توسط تریتون ۱٪ در زمان‌های پنج و ۱۰ روز پس از مجاورت با تریتون انجام شد و توزیع پروتیین‌های موردنظر در داربست‌ها با گروه‌های شاهد مقایسه گردید. در این رنگ‌آمیزی هسته‌ها به رنگ بنفش و پروتیین‌های کلاژن IV، لامینین و HLA به رنگ قهوه‌ای نمایان می‌شوند.

هر چه رنگ قهوه‌ای موجود در نمونه‌های سلول‌زدایی شده بیشتر باشد، نشان‌دهنده حفظ بیشتر کلاژن IV و لامینین در ماتریکس خارج سلولی داربست‌های طبیعی قشری-مرکزی تهیه شده توسط تریتون می‌باشد. همچنین برای پروتیین HLA رنگ قهوه‌ای با شدت کمتر در نمونه‌های سلول‌زدایی شده، نمایانگر حذف بیشتر HLA می‌باشد.

مقدار DNA استخراج شده قطعات قشری-مرکزی کلیه انسانی در زمان‌های دو، پنج و ۱۰ روز پس از مجاورت با 0.5% SDS (روش 2A) در مقایسه با گروه شاهد کاهش معنادار نشان داد ( $P < 0.05$ ). همچنین مقدار DNA قطعات قشری-مرکزی کلیه انسانی در زمان‌های دو، پنج و ۱۰ روز پس از مجاورت با 1% SDS (روش 2B) هم در مقایسه با گروه شاهد کاهش معناری نشان داد به ترتیب ( $P < 0.01$ ,  $P < 0.01$ ) (شکل ۵-B).

بررسی ایمونوهیستوشیمی داربست‌های طبیعی قشری-مرکزی کلیه انسانی سلول‌زدایی شده توسط تریتون ۱٪ پس از بررسی نتایج بافت‌شناسی و تعیین میزان DNA داربست‌های قشری-مرکزی تهیه شده توسط هر دو روش سلول‌زدایی، روش استفاده از تریتون ۱٪ (روش 1A) به‌عنوان مناسب‌ترین روش جهت تهیه داربست‌های طبیعی کلیه انسانی انتخاب گردید.



شکل ۵: مقایسه کمی روش‌های سلول‌زدایی 1A و 1B قطعات قشری-مرکزی کلیه انسانی توسط استخراج DNA موجود در بافت: نمایش داده‌ها به صورت  $\text{mean} \pm \text{SEM}$  و بررسی آماری به روش Repeated measures می‌باشد. اختلاف معنادار  $P < 0.05$  می‌باشد.  $P < 0.01$  \*\*،  $P < 0.001$  \*\*\* مقایسه قطعات قشری-مرکزی مجاورت داده شده با تریتون در مقایسه با گروه شاهد (قطعات قشری مرکزی کلیه سلول‌زدایی نشده)،  $P < 0.05$  \* مقایسه قطعات قشری-مرکزی مجاورت داده شده با SDS در مقایسه با گروه شاهد (قطعات قشری-مرکزی کلیه سلول‌زدایی نشده)، (A) ( $n=4$ ). مقایسه کمی روش‌های سلول‌زدایی 2A و 2B قطعات قشری-مرکزی کلیه انسانی توسط استخراج DNA موجود در بافت: نمایش داده‌ها به صورت  $\text{mean} \pm \text{SEM}$  و بررسی آماری به روش Repeated measures می‌باشد. اختلاف معنادار  $P < 0.05$  می‌باشد.  $P < 0.05$  \* مقایسه قطعات قشری-مرکزی مجاورت داده شده با SDS 0.5% در مقایسه با گروه شاهد (قطعات قشری مرکزی کلیه سلول‌زدایی نشده)،  $P < 0.01$  \*\*،  $P < 0.001$  \*\*\* مقایسه قطعات قشری-مرکزی مجاورت داده شده با SDS 1% در مقایسه با گروه شاهد (قطعات قشری-مرکزی کلیه سلول‌زدایی نشده) (B) ( $n=4$ ).

یکنواخت و متصل به هم کلاژن IV در غشای پایه توبول‌ها و گلوامرول‌ها در روزهای پنج و ۱۰ قابل‌مشاهده می‌باشد. نتایج ایمونوهیستوشیمی داربست‌های طبیعی قشری-مرکزی کلیه انسانی نشان دهنده حفظ شبکه به هم پیوسته لامینین در طی فرآیند

شکل ۶ نتایج ایمونوهیستوشیمی داربست‌های قشری-مرکزی تهیه شده در زمان‌های پنج و ۱۰ روز پس از مجاورت با تریتون ۱٪ را برای پروتیین کلاژن IV نشان می‌دهد. شبکه به هم پیوسته کلاژن در طی فرآیند سلول‌زدایی کاملاً حفظ شده است، همچنین، شبکه

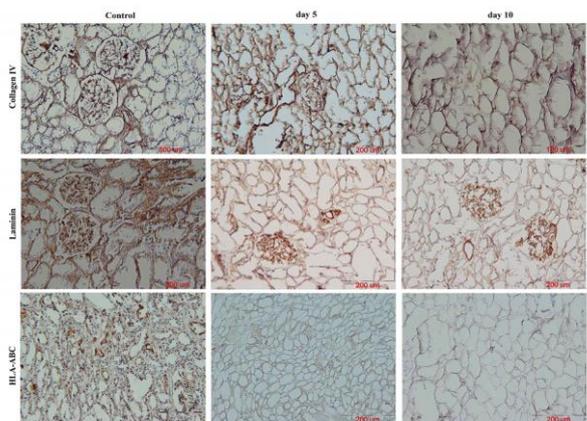
## بحث

افزایش شیوع بیماری‌هایی مانند دیابت، فشارخون بالا و عوارض ناشی از آنها به‌ویژه نارسایی کلیه باعث شده است که CKD و ESRD به یک مشکل بهداشت عمومی در سراسر جهان تبدیل شود. افزایش خطر ابتلا به این بیماری و مرگ‌ومیر بیماران، هزینه اجتماعی-اقتصادی زیادی را برای سیستم‌های بهداشتی-درمانی ایجاد می‌کند.<sup>۳۳،۳۴</sup> در ایران میزان شیوع این بیماری ۳۸۰ مورد در هر میلیون نفر گزارش شده است.<sup>۳۳</sup> با وجود افزایش تعداد دهنده‌های کلیه از دهنده‌های زنده و مرده، هنوز تعداد گیرندگان که در لیست انتظار پیوند هستند، بسیار بالاست.<sup>۳۴</sup> میزان مرگ‌ومیر در بیمارانی که به مدت طولانی دیالیز می‌شوند، بسیار بالاتر از گروه بیمارانی است که تحت جراحی پیوند عضو قرار گرفته‌اند، در نتیجه نیاز به یک منبع نامحدود برای ارگان‌های پیوندی وجود دارد. یکی از منابع بالقوه، کلیه‌هایی هستند که بلافاصله پس از خارج کردن از بدن فرد دهنده به دلایلی مانند ناهنجاری‌های تشریحی، گلودرولوسکلروز پیشرفته، آتروفی توبولی، فیبروز بینابینی، بیماری عروق کلیه و نکروز قشر کلیه امکان پیوند آنها مقدور نمی‌باشد.<sup>۲</sup> باتوجه به پیشرفت مهندسی بافت و پزشکی بازساختی، روشی برای استفاده از این اندام‌ها جهت پیوند یافت خواهد شد.<sup>۳۵،۳۶</sup> یکی از اهداف مهندسی بافت ترمیم بافت‌های آسیب دیده با استفاده از ترکیب سلول‌های بدن و داربست‌های متخلخل است، که این داربست‌ها به‌عنوان الگو برای ترمیم بافت عمل می‌کنند و تکیه‌گاهی برای رشد سلول‌ها می‌باشد.<sup>۷،۶</sup> یک جایگزین برای پلیمرهای سنتزی استفاده از مواد طبیعی استخراج شده از ماتریکس خارج سلولی، ساخت داربست‌های طبیعی با استفاده از پروتئین‌های تخلیص شده از ECM و داربست‌های ECM سلول‌زدایی شده از بافت‌ها می‌باشند.<sup>۳۵</sup> ساختار داربست‌های طبیعی ECM مشتق شده از بافت، مشابه با بافت‌های طبیعی بوده و ماتریکس خارج سلولی ساختار طبیعی خود و مولکول‌های ویژه‌ای که مهاجرت و تکثیر سلول‌ها را افزایش می‌دهند، حفظ می‌کند.<sup>۳۶</sup>

در مطالعه حاضر، جهت ارزیابی اثرات سلول‌زدایی بر ساختار ECM، گلودرول‌ها، مویرگ‌ها و توبول‌ها و یافتن یک روش موثر برای تهیه داربست‌های طبیعی کلیه انسانی که بتواند تکثیر و تمایز سلول‌های بنیادی را حمایت کند، دو روش سلول‌زدایی مورد مقایسه

سلول‌زدایی در غشای پایه توبول‌ها و گلودرول‌ها می‌باشد، اما در روز ۱۰ سلول‌زدایی کاهشی در بیان لامینین در داربست‌های تهیه شده در مقایسه با بافت‌های کلیه سلول‌زدایی نشده (گروه شاهد) مشاهده گردید (شکل ۶).

نتایج ایمونوهیستوشیمی برای HLA در داربست‌های طبیعی قشری-مرکزی کلیه انسانی نشان داد، که این آنتی‌ژن در طی فرآیند سلول‌زدایی در مقایسه با بافت‌های کلیه سلول‌زدایی نشده (گروه‌های شاهد) حذف می‌شود و با افزایش زمان سلول‌زدایی در میزان حذف HLA تغییر اندکی مشاهده گردید (شکل ۶). در نتیجه در روزهای پنج و ۱۰ حداقل واکنش‌های ایمونولوژیکی ایجاد خواهد شد. در مجموع، باتوجه به نتایج حاصل از رنگ‌آمیزی ایمونوهیستوشیمی پروتئین‌های کلاژن IV، لامینین و HLA در نظر گرفتن کاهش بیان لامینین در داربست‌های تهیه شده در مقایسه با بافت‌های کلیه گروه شاهد، روز پنج به عنوان مناسب‌ترین زمان جهت تهیه داربست‌های طبیعی قشری-مرکزی کلیه انسانی انتخاب گردید.



شکل ۶: بررسی بیان کلاژن IV، لامینین و HLA در قطعات قشری-مرکزی انسانی توسط رنگ‌آمیزی ایمونوهیستوشیمی: تصاویر مربوط به قطعات قشری-مرکزی بافت کلیه سلول‌زدایی نشده و داربست‌های قشری-مرکزی تهیه شده در زمان‌های پنج و ۱۰ روز توسط تریتون می‌باشند، که در مجاورت آنتی‌بادی کلاژن IV، لامینین و HLA قرار گرفته است (بزرگنمایی ۲۰۰X)، پروتئین کلاژن IV، لامینین و HLA به رنگ قهوه‌ای و هسته سلول‌ها به رنگ آبی نمایان می‌شوند. هر چه رنگ قهوه‌ای موجود در نمونه‌های سلول‌زدایی شده بیشتر باشد، نشان‌دهنده حفظ بیشتر کلاژن IV، لامینین در ماتریکس خارج سلولی داربست‌های طبیعی قشری-مرکزی تهیه شده توسط تریتون می‌باشد و در مورد HLA هر چه رنگ قهوه‌ای موجود در نمونه‌های سلول‌زدایی شده کمتر باشد، نشان‌دهنده حذف بیشتر HLA در ماتریکس خارج سلولی داربست‌های طبیعی قشری-مرکزی تهیه شده توسط تریتون می‌باشد.

می‌شود، از سوی دیگر با شکستن پیوندهای پروتئین-پروتئین موجب دنا توره شدن کامل پروتئین‌ها شده و در نتیجه موجب تغییرات ساختاری قویتر در مقایسه با تریتون می‌شوند. SDS به‌طور معمول برای از بین بردن سلول‌های بافت نسبت به سایر شوینده‌ها موثرتر است، اما در مقایسه با شوینده‌های غیر یونی آسیب بیشتری به ECM وارد می‌کند.<sup>۳۷، ۴۰</sup> در بررسی حاضر در روش یک پس از مقایسه دو ماده سلول‌زدایی تریتون و SDS نشان داده شد که در داربست‌های تهیه‌شده به کمک تریتون آسیب ساختاری کمتری در مقایسه با داربست‌های تهیه‌شده به کمک SDS مشاهده شد و تریتون در کاهش مقدار DNA، مؤثرتر از SDS عمل کرده است. مطالعات قبلی، سلول‌زدایی کلیه‌های انسانی به کمک روش پرفیوژن SDS 0.5% حذف سلول‌ها و حفظ ساختارهای گلومرولی، عروقی و توبولی داربست‌ها را نشان دادند.<sup>۳۲، ۳۴</sup> بنابراین، در مطالعه حاضر روش سلول‌زدایی دو در راستای مطالعات قبلی به‌منظور مقایسه درصد‌های SDS 0.5% و 1% (روش‌های 2A و 2B) روی قطعات کلیه انسانی طراحی گردید. در روش دو نتایج بافت‌شناسی با رنگ‌آمیزی H&E و DAPI، صحت فرآیند سلول‌زدایی و حذف بقایای سلولی در تمامی زمان‌های مورد بررسی در قطعات قشری-مرکزی کلیه‌های انسانی توسط هر دو درصد SDS را نشان داد. هم‌سو با یافته‌های مطالعه حاضر، در بررسی انجام‌شده در کلیه‌های رت که با استفاده از SDS 1% سلول‌زدایی شدند، رنگ‌آمیزی H&E عدم وجود هسته‌های سلولی و حفظ ساختارهای عروقی، گلومرول‌ها و توبول‌ها را نشان داد.<sup>۴۱</sup> در بررسی انجام‌شده کلیه گوسفند با استفاده از SDS 1% و تریپسین به مدت پنج روز به‌طور کامل سلول‌زدایی شد و در عین حال ساختار سه بعدی کلیه حفظ شد.<sup>۴۲</sup> با این وجود در مطالعه حاضر، نتایج بافت‌شناسی هماتوکسیلین-اوتوزین مبین تخریب ماتریکس توسط درصد‌های SDS 0.5% و 1% بود، همچنین در داربست‌های تهیه‌شده توسط SDS 1% آسیب ساختاری بافت‌ها بیشتر مشاهده شد. از سوی دیگر، نتایج استخراج DNA نشان داد که هر دو درصد SDS موجب کاهش مقدار DNA قطعات قشری-مرکزی کلیه انسانی در مقایسه با بافت کلیه گروه شاهد شدند، اما تفاوت قابل توجهی بین کاهش DNA داربست‌های تهیه‌شده با هر دو درصد SDS مشاهده نشد. اگرچه توسط مواد و روش‌های مختلف سلول‌زدایی می‌توان حذف سلول از بافت را انجام داد، اما عوامل

قرار گرفت. روش اول برای اولین بار به‌منظور مقایسه دو عامل سلول‌زدایی رایج (تریتون و SDS) همراه با روش آنزیمی روی قطعات کلیه انسان انجام شد. در این روش نتایج بافت‌شناسی هماتوکسیلین-اوتوزین و DAPI نشان داد که تریتون و SDS به‌طور مؤثری در تمام زمان‌های دو، پنج، ۱۰ و ۱۴ روز در قطعات قشری-مرکزی کلیه‌های انسانی سلول‌زدایی را انجام دادند. البته براساس نتایج رنگ‌آمیزی هماتوکسیلین-اوتوزین یکپارچگی ماتریکس خارج سلولی، ساختارهای توبولی، گلومرولی و ساختار سه بعدی داربست‌های تهیه‌شده توسط تریتون در مقایسه با داربست‌های تهیه‌شده با استفاده از SDS بیشتر حفظ شده بود. با توجه به اهمیت حذف کامل DNA از داربست به‌منظور جلوگیری از واکنش‌های نامطلوب ایمنی در میزبان، بررسی مقادیر DNA باقیمانده در داربست حایز اهمیت می‌باشد.<sup>۳۷، ۳۸</sup> بنابراین، براساس نتایج استخراج DNA، هم تریتون و هم SDS موجب کاهش مقدار DNA قطعات قشری-مرکزی کلیه انسانی در مقایسه با بافت کلیه گروه شاهد شدند، که البته در تایید نتایج بافت‌شناسی این کاهش معنادار در داربست‌های تهیه‌شده توسط تریتون در مقایسه با داربست‌های تهیه‌شده توسط SDS بیشتر بود. همچنین میزان کاهش DNA بافت در داربست‌های تهیه‌شده توسط تریتون (روش 1A) نسبت به بافت کلیه سلول‌زدایی نشده بیشتر از داربست‌های تهیه‌شده توسط SDS (روش 1B) بود. هم‌سو با یافته‌های حاصل از بررسی حاضر، در یک مطالعه که در سال ۲۰۱۴ انجام شد، سلول‌زدایی کلیه رت با استفاده از تریتون انجام شد. بافت‌شناسی و اندازه‌گیری مقدار DNA داربست‌های تهیه‌شده، حذف سلول‌ها را همراه با حفظ ساختار اصلی بافت نشان داد.<sup>۳۹</sup> در بررسی انجام‌شده توسط Choi و همکاران، کلیه خوک به دو روش استفاده از تریتون و SDS سلول‌زدایی شد. در داربست‌های تهیه‌شده توسط تریتون ساختارهای سه بعدی عروق خونی، ساختارهای توبولی و همچنین یکپارچگی غشای پایه بیشتر حفظ شده بود و تریتون به‌عنوان یک عامل مناسب جهت سلول‌زدایی کلیه خوک تایید شد.<sup>۴۴</sup> در توضیح این مشاهدات می‌توان گفت که مواد شوینده غیر یونی مانند تریتون با شکستن پیوندهای چربی-چربی و چربی-پروتئین منجر به جدایی سلول‌ها از یکدیگر و لیز شدن غشای سلول می‌شود. در حالی‌که شوینده‌های یونی مانند SDS غشاهای سیتوپلاسمی و هسته‌ای را حل کرده و باعث لیز شدن سلول‌های بافت‌های متراکم

عمل کرده است. بنابراین با توجه به نتایج این مطالعه تریتون به عنوان شوینده مناسب تر و روش IA به عنوان روش منتخب جهت سلول‌زدایی کلیه انسان انتخاب و سایر بررسی‌های انجام شده در این مطالعه فقط با این روش انجام شد.

پس از انتخاب تریتون و روش IA به عنوان مناسب‌ترین روش سلول‌زدایی، به منظور تعیین زمان بهینه روش ایمونوهیستوشیمی برای داربست‌های طبیعی قشری-مرکزی کلیه انسانی سلول‌زدایی شده توسط تریتون ۱٪ در زمان‌های پنج و ۱۰ روز برای حضور پروتئین‌های کلاژن IV، لامینین و HLA انجام شد. در چند سال اخیر، تلاش‌های بسیاری جهت بهینه‌سازی روش‌های تولید داربست‌های طبیعی صورت گرفته است، کلاژن IV و لامینین اجزای اصلی غشای پایه کلیه هستند و هر دو در زنده‌مانی، مهاجرت و تمایز سلول‌ها دخالت دارند.<sup>۶۵،۶۶</sup> کلاژن IV بیشترین ترکیب غشای پایه کلیه می‌باشد و لامینین هم مهم‌ترین ترکیب غشای پایه گلومرول را تشکیل می‌دهد که نقش مهمی در تشکیل توبول‌ها و تکوین کلیه دارد.<sup>۲۲،۶۷</sup> در مطالعه حاضر، نتایج حاصل از ایمونوهیستوشیمی در روز پنج نشان داد که سلول‌زدایی نواحی قشری-مرکزی کلیه انسانی تاثیر قابل توجهی روی میزان کلاژن IV و لامینین داربست‌های تهیه شده توسط تریتون ۱٪ ندارد و فقط با افزایش زمان، در روز ۱۰ سلول‌زدایی، کاهش در بیان لامینین در داربست‌های تهیه شده در مقایسه با بافت گروه شاهد مشاهده گردید. هم‌راستا با این یافته‌ها، در مطالعه‌ی که توسط Choi و همکاران انجام شد، داربست‌های کلیه خوک تهیه شده با تریتون دارای کلاژن IV و لامینین بیشتری در مقایسه با داربست‌های تهیه شده توسط SDS بودند. ضمناً مقدار لامینین در مقایسه با کلاژن IV در داربست‌های تهیه شده توسط تریتون کاهش بیشتری نشان داد.<sup>۲۴</sup> همچنین، در مطالعه انجام شده توسط Nakayama و همکاران، نتایج نشان داد که سلول‌زدایی کلیه‌های میمون با ۱٪ SDS موجب کاهش بیان کلاژن IV و لامینین در داربست‌ها شده است. در بررسی آنها بیان کلاژن IV در مقایسه با بافت سلول‌زدایی نشده متوسط و بیان لامینین کم بود.<sup>۳۶</sup> بنابراین، نتایج این مطالعات نیز تایید کننده مطالعه حاضر در انتخاب تریتون به عنوان روش مناسب‌تر برای حفظ کلاژن IV و لامینین در داربست‌های کلیه در طی فرآیند سلول‌زدایی می‌باشد. با توجه به اینکه تریتون دارای یک گروه آب دوست می‌باشد که به پروتئین‌های

مختلف ممکن است ترکیب ECM را تغییر دهند و باعث ایجاد اختلال ساختاری در داربست‌ها شوند. بنابراین، به حداقل رساندن این اثرات نامطلوب هدف اصلی سلول‌زدایی می‌باشد.<sup>۳۷</sup> بنابراین، در راستای مقایسه انجام شده بین دو ماده تریتون و SDS در روش یک و پیشنهاد تریتون به عنوان شوینده بهتر جهت سلول‌زدایی قطعات کلیه انسان و با توجه به آسیب ساختاری مشاهده شده در داربست‌های قشری-مرکزی کلیه‌های انسانی تهیه شده با محلول‌های ۰.۵٪ SDS و ۱٪ مورد استفاده در روش دو، در نتیجه استفاده از SDS با درصد‌های متفاوت نیز نمی‌تواند باعث کاهش اثرات نامطلوب این ماده بر ساختار داربست کلیه انسان شده و در نتیجه تریتون به عنوان گزینه مناسب‌تر جهت سلول‌زدایی در این مطالعه مطرح می‌شود. البته، گزارش‌های متناقضی در مورد اثرات SDS و تریتون بر ویژگی‌های بافت‌های سلول‌زدایی شده مختلف وجود دارد. به عنوان مثال، بعضی از مطالعات نشان داده‌اند که SDS کلاژن را در یک داربست خاص از بین می‌برد، در نتیجه باعث کاهش قدرت مکانیکی بافت می‌شود، در حالی که SDS ممکن است بر روی کلاژن ECM حتی در بافت‌های نسبتاً مشابه تاثیر قابل توجهی نداشته باشد.<sup>۳۳،۴۴</sup> تاکنون بررسی‌های متعددی در مورد کارایی انواع روش‌های سلول‌زدایی کلیه در جوندگان، گوسفند، خوک، میمون و حتی انسان مورد بررسی قرار گرفته‌اند و در تعدادی از این مطالعات نیز روش‌های سلول‌زدایی به صورت ترکیب دو شوینده انجام شده است. Leuning و همکاران سلول‌زدایی کلیه انسان را با استفاده از SDS و تریتون با هم انجام دادند. نتایج این پژوهش سلول‌زدایی بافت کلیه را همراه با حفظ ریزمعماری بافت نشان داد.<sup>۳۳</sup> با این وجود، مطالعات اندکی به طور اختصاصی مقایسه تاثیر روش‌های مختلف سلول‌زدایی بر روی ترکیبات ECM، ساختار توبول‌ها و گلومرول‌ها به منظور تهیه داربست‌های بهینه جهت رسلولاریزاسیون مناسب را گزارش کرده‌اند. اگرچه حذف کامل سلول‌های بافت کلیه جهت تهیه داربست‌ها ضروری می‌باشد، اما حفظ ECM، جهت تکثیر و بازسازی بافت از اهمیت ویژه‌ای برخوردار است. در مطالعه کنونی پس از مقایسه روش‌های یک و دو سلول‌زدایی، مشاهده شد که تریتون هم‌راستا با مطالعات مذکور که در حیوانات مختلف انجام شده اند، توانسته موجب حذف سلول‌های بافت کلیه انسان شود و در عین حال در حفظ و نگهداری بهتر ساختار سه بعدی ECM هم موثرتر از SDS

MHC در داربست‌ها اطمینان حاصل شود، زیرا پیوند مواد زیستی موجب تحریک پاسخ ایمنی می‌شود و اگر مواد ایمنی‌زا از داربست حذف نشود، پاسخ ایمنی ایجاد شده در بدن میزبان باعث رد پیوند می‌شود.<sup>۴۰</sup> در نتیجه پیوند داربست‌های طبیعی در صورتی که به درستی تهیه شده باشند، توسط سیستم ایمنی پذیرفته می‌شود و تحریک سلول‌های میانجی‌گری کننده رد پیوند ایجاد نخواهد شد.<sup>۴۱</sup>

در مطالعه‌ای که در سال ۲۰۱۴ جهت سلول‌زدایی کلیه‌های انسانی توسط پرفیوژن شریانی SDS 0.05% انجام شد، نتایج ایمونوهیستوشیمی حذف آنتی‌ژن‌های HLA را در طی فرایند سلول‌زدایی نشان داد.<sup>۳۴</sup> هم‌سو با یافته‌های این مطالعه، در بررسی حاضر نیز نتایج ایمونوهیستوشیمی حذف HLA (MHC class I) را در داربست‌های طبیعی قشری-مرکزی کلیه انسانی در طی فرآیند سلول‌زدایی نشان داد. با عنایت به اینکه حذف HLA جهت جلوگیری از ایجاد پاسخ‌های ایمنی مهم می‌باشد در نتیجه می‌توان پیشنهاد کرد که در صورت پیوند داربست‌های کلیه انسانی تهیه شده با کمک تریتون حداقل یا عدم واکنش‌های ایمنی مورد انتظار خواهد بود.

باتوجه به اینکه یکی از اهداف این مطالعه تعیین زمان مناسب برای تهیه داربست‌های کلیه انسان با استفاده از تریتون بود و از آنجایی که حذف پروتئین‌های ECM با افزایش زمان قرار گرفتن در مجاورت شوینده‌ها بیشتر می‌شود و با در نظر گرفتن نتایج ایمونوهیستوشیمی پروتئین‌های کلاژن IV، لامینی و HLA روز پنجم به‌عنوان زمان مناسب‌تر جهت تهیه داربست‌های طبیعی قشری-مرکزی کلیه انسانی به‌منظور انجام مطالعات بعدی انتخاب گردید.

سپاسگزاری: این مقاله حاصل بخشی از پایان نامه / طرح تحقیقاتی تحت عنوان "تهیه مناسب‌ترین داربست طبیعی کلیه انسان: مقایسه دو روش سلول‌زدایی" در مقطع دکتری تخصصی فیزیولوژی پزشکی در سال ۱۳۹۸ و کد MUMS 941327 می‌باشد که با حمایت دانشگاه علوم پزشکی مشهد اجرا شده است.

محلول در آب نفوذ نمی‌کند، در نتیجه باعث از بین رفتن پیوندهای ذاتی و ساختار پروتئین‌های محللول در آب نمی‌شود. همچنین، به دلیل توانایی متوسط تریتون جهت شکستن پیوندهای پروتئین-پروتئین یکپارچگی ECM در داربست‌های سلول‌زدایی شده با تریتون حفظ می‌شود.<sup>۳۷،۴۰</sup> از طرف دیگر، در مطالعه‌ای که Ross و همکاران انجام دادند، داربست‌های کلیه رت به کمک تریتون و SDS به منظور بهینه کردن روش‌های سلول‌زدایی تهیه شدند، رنگ‌آمیزی ایمونوهیستوشیمی شبکه به‌هم پیوسته لامینین و کلاژن IV را نشان داد. در این تحقیق داربست‌ها به کمک تریتون تهیه شدند و در انتها فقط از SDS برای حذف سلول‌های باقیمانده استفاده شد.<sup>۴۱</sup> بنابراین عقیده بر این است که در داربست‌های تهیه شده با تریتون توزیع اجزای اصلی ECM مانند کلاژن IV و لامینین که برای رشد، تکثیر و تمایز سلول‌ها ضروری می‌باشند در ماتریکس داربست‌ها حفظ می‌شوند. SDS به‌طور معمول برای از بین بردن سلول‌های بافت نسبت به سایر شوینده‌ها موثرتر است، اما در مقایسه با شوینده‌های غیر یونی آسیب بیشتری به ECM وارد می‌کند.<sup>۳۷،۴۱</sup> اگرچه در داربست‌های کلیه انسانی که توسط SDS و تریتون باهم تهیه شدند، اجزای ECM شامل کلاژن و لامینین حفظ شدند.<sup>۳۳،۴۸</sup> همچنین در بررسی دیگری که توسط Peloso و همکاران انجام شد، نتایج ایمونوهیستوشیمی حفظ کلاژن IV ماتریکس خارج سلولی را در طی فرآیند سلول‌زدایی بافت کلیه انسانی توسط پرفیوژن شریانی SDS 0.05% را نشان داد.<sup>۴۹</sup> ولی تاکنون مطالعه‌ای جهت سلول‌زدایی کلیه انسانی توسط تریتون به تنهایی انجام نشده است. در مطالعه حاضر حضور کلاژن IV و لامینین در داربست‌های تهیه شده توسط تریتون، که نشان‌دهنده حفظ غشای پایه گلمرولی و اجزای کلیدی ECM می‌باشد و از ساختار توبول‌ها و مویرگ‌ها در داربست‌ها حمایت می‌کند نشان داده شد. از سوی دیگر، مولکول‌های MHC مهم‌ترین آنتی‌ژن‌ها برای تحریک رد پیوند می‌باشند. بنابراین لازم است از حذف کامل مولکول‌های

## References

- Uzarski JS, Xia Y, Belmonte JC, Wertheim JA. New strategies in kidney regeneration and tissue engineering. *Current opinion in nephrology and hypertension* 2014;23(4):399-405.
- Karczewski M, Malkiewicz T. Scaffolds from surgically removed kidneys as a potential source of organ transplantation. *BioMed Research International* 2015;2015(1):325029.
- Peloso A, Katari R, Murphy SV, Zamboni JP, DeFrancesco A, Farney AC, et al. Prospect for kidney bioengineering: shortcomings of the status quo. *Expert opinion on biological therapy* 2015;15(4):547-58.
- Mhaske M, Kedar P, Bansode S. Tissue engineering: a review. *Tissue Eng* 2017;2:280-5.

5. Perin L, Da Sacco S, De Filippo RE. Regenerative medicine of the kidney. *Advanced drug delivery reviews*. 2011;63(4-5):379-87.
6. Wasyleczko M, Sikorska W, Chwojnowski A. Review of synthetic and hybrid scaffolds in cartilage tissue engineering. *Membranes* 2020;10(11):348.
7. O'Brien FJ. Biomaterials & scaffolds for tissue engineering. *Mater Today* 2011;14(3):88-95.
8. Sodian R, Hoerstrup SP, Sperling JS, Daebritz S, Martin DP, Moran AM, et al. Early in vivo experience with tissue-engineered trileaflet heart valves. *Circulation* 2000;102(suppl\_3):Iii-22-Iii-9.
9. Kuniakova M, Klein M, Galfiova P, Csobonyeiova M, Feitscherova C, Polak S, et al. Decellularization of the human urethra for tissue engineering applications. *Experimental Biology and Medicine* 2023;248(12):1034-42.
10. Naderi H, Matin MM, Bahrami AR. Critical issues in tissue engineering: biomaterials, cell sources, angiogenesis, and drug delivery systems. *Journal of biomaterials applications* 2011;26(4):383-417.
11. Ma PX, Langer R. Degradation, structure and properties of fibrous nonwoven poly (glycolic acid) scaffolds for tissue engineering. *MRS Online Proceedings Library Archive* 1995;394.
12. Eisel P, Yeh J, Latvala RK, Shea LD, Mooney DJ. Porous carriers for biomedical applications based on alginate hydrogels. *Biomaterials* 2000;21(19):1921-7.
13. Crapo PM, Gilbert TW, Badylak SF. An overview of tissue and whole organ decellularization processes. *Biomater* 2011;32(12):3233-43.
14. Ackbar R, Ainoedhofer H, Gugatschka M, Saxena AK. Decellularized ovine esophageal mucosa for esophageal tissue engineering. *Technique and Health Care* 2012;20(3):215-23.
15. Barnes CA, Brison J, Michel R, Brown BN, Castner DG, Badylak SF, et al. The surface molecular functionality of decellularized extracellular matrices. *Biomaterials* 2011;32(1):137-43.
16. Kasper DL, Fauci AS, Hauser SL, Longo DL, Jameson JL, Loscalzo J. Harrison's principles of internal medicine: McGraw Hill Education; 2015.
17. Ahmadian Kia N, Bahrami AR, Ebrahimi M, Matin MM, Neshati Z, Almohaddesin MR, et al. Comparative analysis of chemokine receptor's expression in mesenchymal stem cells derived from human bone marrow and adipose tissue. *Journal of molecular neuroscience : MN* 2011;44(3):178-85.
18. Yu YL, Shao YK, Ding YQ, Lin KZ, Chen B, Zhang HZ, Zhao LN, Wang ZB, Zhang JS, Tang ML, Mei J. Decellularized kidney scaffold-mediated renal regeneration. *Biomaterials* 2014;35(25):6822-8.
19. Ross EA, Abrahamson DR, St. John P, Clapp WL, Williams MJ, Terada N, et al. Mouse stem cells seeded into decellularized rat kidney scaffolds endothelialize and remodel basement membranes. *Organogenesis* 2012;8(2):49-55.
20. Sullivan DC, Mirmalek-Sani S-H, Deegan DB, Baptista PM, Aboushwareb T, Atala A, et al. Decellularization methods of porcine kidneys for whole organ engineering using a high-throughput system. *Biomater* 2012;33(31):7756-64.
21. Nakayama KH, Batchelder CA, Lee CI, Tarantal AF. Decellularized rhesus monkey kidney as a three-dimensional scaffold for renal tissue engineering. *Tissue Eng Part A* 2010;16(7):2207-16.
22. Orlando G, Booth C, Wang Z, Totonelli G, Ross CL, Moran E, et al. Discarded human kidneys as a source of ECM scaffold for kidney regeneration technologies. *Biomater* 2013;34(24):5915-25.
23. Leuning DG, Witjas FM, Maanaoui M, de Graaf AM, Lievers E, Geuens T, Avramut CM, Wiersma LE, van den Berg CW, Sol WM, de Boer H. Vascular bioengineering of scaffolds derived from human discarded transplant kidneys using human pluripotent stem cell-derived endothelium. *American Journal of Transplantation* 2019;19(5):1328-43.
24. Choi SH, Chun SY, Chae SY, Kim JR, Oh SH, Chung SK, Lee JH, Song PH, Choi GS, Kim TH, Kwon TG. Development of a porcine renal extracellular matrix scaffold as a platform for kidney regeneration. *Journal of Biomedical Materials Research Part A* 2015;103(4):1391-403.
25. Rafighdoust A, Shahri NM, Baharara J. Decellularized kidney in the presence of chondroitin sulfate as a natural 3D scaffold for stem cells. *Iranian journal of basic medical sciences* 2015 Aug;18(8):788.
26. Nakayama KH, Batchelder CA, Lee CI, Tarantal AF. Renal tissue engineering with decellularized rhesus monkey kidneys: age-related differences. *Tissue Engineering Part A* 2011;17(23-24):2891-901.
27. Fischer AH, Jacobson KA, Rose J, Zeller R. Hematoxylin and eosin staining of tissue and cell sections. *Cold Spring Harbor Protocols* 2008;2008(5):pdb.prot4986.
28. Burgkart R, Tron A, Proding P, Culmes M, Tuebel J, Van Griensven M, Saldamli B, Schmitt A. Decellularized kidney matrix for perfused bone engineering. *Tissue Engineering Part C: Methods* 2014;20(7):553-61.
29. Kapuscinski J. DAPI: a DNA-specific fluorescent probe. *Biotechnic & Histochemistry* 1995;70(5):220-33.
30. Kajbafzadeh A-M, Javan-Farazmand N, Monajemzadeh M, Baghayee A. Determining the optimal decellularization and sterilization protocol for preparing a tissue scaffold of a human-sized liver tissue. *Tissue Engineering Part C: Methods* 2013;19(8):642-51.
31. Haghighi M, HEYDARI RA, Zamyadi M, MAHDAVI MM, NOUROUZI S, Rajolani H, Ahrabi S, Zamani M. *Dialysis in iran* 2008.
32. Modi GK, Jha V. The incidence of end-stage renal disease in India: a population-based study. *Kidney Int* 2006;70(12):2131-3.
33. Nafar M, Aghighi M, Dalili N, Abedi BA. Perspective of 20 years hemodialysis registry in Iran, on the road to progress. *Iranian Journal of Kidney Diseases* 2020;14(2):95.
34. Katari R, Peloso A, Zambon JP, Soker S, Stratta RJ, Atala A, et al. Renal bioengineering with scaffolds generated from human kidneys. *Nephron Experimental Nephrology* 2014;126(2):119-24.
35. Lu Q, Ganesan K, Simionescu DT, Vyavahare NR. Novel porous aortic elastin and collagen scaffolds for tissue engineering. *Biomaterials* 2004;25(22):5227-37.
36. Harley BA, Gibson LJ. In vivo and in vitro applications of collagen-GAG scaffolds. *Chemical Engineering Journal* 2008;137(1):102-21.
37. Crapo PM, Gilbert TW, Badylak SF. An overview of tissue and whole organ decellularization processes. *Biomater* 2011;32(12):3233-43.
38. Nagata S, Hanayama R, Kawane K. Autoimmunity and the clearance of dead cells. *Cell* 2010;140(5):619-30.
39. Finesilver G, Kahana M, Mitrani E. Kidney-specific microscaffolds and kidney-derived serum-free conditioned media support in vitro expansion, differentiation, and organization of human embryonic stem cells. *Tissue Eng Part C Methods* 2014;20(12):1003-15.
40. Lin YQ, Wang LR, Pan LL, Wang H, Zhu GQ, Liu WY, et al. Kidney bioengineering in regenerative medicine: An emerging therapy for kidney disease. *Cytotherapy* 2016;18(2):186-97.
41. Remuzzi A, Figliuzzi M, Bonandrini B, Silvani S, Azzollini N, Nossa R, Benigni A, Remuzzi G. Experimental evaluation of kidney regeneration by organ scaffold recellularization. *Scientific reports* 2017;7(1):43502.
42. Almelkar SI, Bethapudi S, Rath SN. Development of an experimental model of a decellularized kidney scaffold by perfusion mode and analyzing the three-dimensional extracellular matrix architecture by edge detection method. *Indian journal of nephrology* 2018;28(5):339-44.
43. Woods T, Gratzer PF. Effectiveness of three extraction techniques in the development of a decellularized bone-anterior cruciate ligament-bone graft. *Biomater* 2005;26(35):7339-49.
44. Cartmell JS, Dunn MG. Effect of chemical treatments on tendon cellularity and mechanical properties. *Journal of Biomedical Materials Research: An Official Journal of The Society for Biomaterials, The Japanese Society for Biomaterials, and The Australian Society for Biomaterials and the Korean Society for Biomaterials* 2000;49(1):134-40.
45. Ross EA, Williams MJ, Hamazaki T, Terada N, Clapp WL, Adin C, et al. Embryonic stem cells proliferate and differentiate when

- seeded into kidney scaffolds. *J Am Soc Nephrol* 2009;20(11):2338-47.
46. Miner JH. Renal basement membrane components. *Kidney Int* 1999;56(6):2016-24.
47. Caralt M, Uzarski JS, Iacob S, Obergfell KP, Berg N, Bijonowski BM, et al. Optimization and critical evaluation of decellularization strategies to develop renal extracellular matrix scaffolds as biological templates for organ engineering and transplantation. *American Journal of Transplant* 2015;15(1):64-75.
48. Guyette JP, Gilpin SE, Charest JM, Tapias LF, Ren X, Ott HC. Perfusion decellularization of whole organs. *Nature protocols* 2014;9(6):1451.
49. Peloso A, Petrosyan A, Da Sacco S, Booth C, Zambon JP, O'Brien T, et al. Renal Extracellular Matrix Scaffolds From Discarded Kidneys Maintain Glomerular Morphometry and Vascular Resilience and Retains Critical Growth Factors. *Transplantation* 2015;99(9):1807-16.
50. Keyser JL. Renal ontogeny and evaluation of decellularized kidney scaffolds for tissue engineering in a rhesus monkey model 2012.

## Creation of the suitable natural human kidney scaffold: comparison of 2 decellularization methods

Samira Shahraki Ph.D.<sup>1,2</sup>  
 Mahmoud Tavakkoli M.D.<sup>3</sup>  
 Abolfazl Khajavirad M.D.,  
 Ph.D.<sup>2,4</sup>  
 Maryam Moghadam Matin  
 Ph.D.<sup>5</sup>  
 Mohammad Aslzare M.D.<sup>3</sup>

1- Department of Physiology,  
 School of Medicine, Zahedan  
 University of Medical Sciences,  
 Zahedan, Iran.

2- Department of Physiology,  
 School of Medicine, Mashhad  
 University of Medical Sciences,  
 Mashhad, Iran.

3- Department of Urology, School  
 of Medicine, Mashhad University of  
 Medical Sciences, Mashhad, Iran.

4- Applied Biomedical Research  
 Center, Mashhad University of  
 Medical Sciences, Mashhad, Iran.

5- Department of Biology, Faculty  
 of Science, Ferdowsi University of  
 Mashhad, Mashhad, Iran.

\* Corresponding author: Urology and  
 Nephrology Research Center, Mashhad  
 University of Medical Sciences,  
 Mashhad, Iran.  
 Tel: +98-51-38417404  
 E-mail: Zarem@mums.ac.ir

### Abstract

Received: 10 Feb. 2024 Revised: 17 Feb. 2024 Accepted: 17 Mar. 2024 Available online: 03 Apr. 2024

**Background:** A range of diseases can result in end-stage renal disease (ESRD), characterized by a gradual decline in kidney function and associated with significant morbidity and mortality. Currently, renal transplantation as the most effective treatment for managing ESRD. Tissue engineering presents a considerable opportunity to expand the available supply of donor organs for kidney transplants. The aim of this research was to develop a suitable technique for preparing decellularized kidney scaffolds from human tissues.

**Methods:** The present study was carried out from April 2019 to August 2019 in Mashhad University of Medical Sciences. In this study, two decellularization protocols were compared using sections of human kidney tissue. Therefore, two human kidneys which collected from Ghaem and Imam Reza hospitals were used. In the first protocol, detergents such as 1% Triton X-100 (1A) and 1% SDS (Sodium Dodecyl Sulfate) (1B) were employed, followed by the application of DNase I. The second protocol utilized 0.5% SDS (2A) and 1% SDS (2B). The effectiveness of these techniques was evaluated using hematoxylin and eosin (H&E) staining, 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI), DNA quantification, and immunohistochemistry (IHC).

**Results:** Based on H&E staining results, comparison of the decellularized and native human kidney tissues showed a successful elimination of cell nuclei and the ameliorate extracellular matrix preservation in triton-treated scaffolds (1A) in comparison with the SDS-treated scaffolds (1B) at all times protocols. Furthermore, DNA quantification illustrated triton X-100 in removing DNA was more effective in eliminating DNA from kidney tissues compared to other protocols in renal tissues. In addition, IHC staining demonstrated that the expression of collagen IV and laminin was preserved throughout the decellularization process with Triton X-100 on day fifth. Also, IHC staining indicated human leukocyte antigen (HLA) was completely eliminated in the cortex-medulla of human scaffolds treated with Triton X-100 within day fifth.

**Conclusion:** Our results demonstrated that triton X-100 outperformed SDS as a detergent for decellularizing human kidneys. Meanwhile these results indicate suitable method for decellularization of human kidneys to produce functional kidneys.

**Keywords:** human kidney, Extracellular matrix, decellularization, triton x-100, sodium dodecyl sulfate.