ORIGINAL ARTICLE

Effect of a 3D Scaffold of Decellularized Rat Stomach Tissue on The Function of Insulin-Producing Cells (MIN6)

Layasadat Khorsandi[1,2]
Abbas Heidari-Moghadam[3]
Darioush Bijan Nejad[1,4]
Mahmoud Orazizadeh[1,2]
Fereshteh Nejaddehbashi[1,4]
Yousef Asadi-Fard[1,5]

[1]Cellular and Molecular Research Center, Medical Basic Sciences Research Institute, Ahvaz Jundishapur University of Medical Sciences, Ahvaz, Iran
[2]Professor, Department of Anatomical Sciences, Faculty of Medicine, Ahvaz Jundishapur University of Medical Sciences, Ahvaz, Iran
[3] Assistant Professor, Department of Anatomical Sciences, School of Medicine, Dezful University of Medical Sciences, Dezful, Iran
[4] Assistant Professor, Department of Anatomical Sciences, Faculty of Medicine, Ahvaz Jundishapur University of Medical Sciences, Ahvaz, Iran
[5] PhD Student in Anatomical Sciences, Faculty of Medicine, Ahvaz Jundishapur University of Medical Sciences, Ahvaz, Iran

(Received December 18, 2022; Accepted November 4, 2023)

Abstract

Background and purpose: Type 1 diabetes (T1D) is an insulin-dependent disease, that results from the destruction of pancreatic islets beta cells. The main objective of this study was to determine the effects of decellularized gastric matrix (DSM) on the function of Min6 cells (a beta cell line).

Materials and methods: In this experimental study, the stomachs of Wistar rats were decellularized with sodium dodecyl sulfate (SDS) and Triton X-100. The DSM was characterized by scanning electron microscopy, determination of residual DNA and histological examinations. After seeding the Min6 cells on the DSM scaffold, the glucose challenge test and mRNA expression of insulin-related genes were examined to evaluate the function of the cells.

Results: The main components of the DSM, such as collagens and glycosaminoglycans, remained intact after decellularization. In addition, the very low DNA residues and the suitable mechanical behavior of the DSM provided an ideal extracellular microenvironment for the Min6 cells. The glucose challenge test showed that the seeded cells secreted more insulin and C-peptide in the DSM than in the 2D culture. The expression of specific insulin-related genes such as Pdx-1, INS, MAF-A, and Glut-2 was significantly higher in the recellularized scaffold than in the traditional 2D cells.

Conclusion: These results show that DSM is a suitable scaffold for the stabilization of artificial pancreatic islets.

Keywords: Decellularized stomach matrix, Insulin, Min6 cell line

J Mazandaran Univ Med Sci 2023; 33 (Supple 1):1-10 (Persian).

Corresponding Author: Yousef Asadi-Fard, Faculty of Medicine, Ahvaz Jundishapur University of Medical Sciences, Ahvaz, Iran. Email: usef.fard@yahoo.com)

[Downloaded from jmums.mazums.ac.ir on 2026-11-06]

پژوهشی

مجله دانشگاه علوم پزشکی مازندران
دوره سی و سوم شماره ویژه نامه 1 آبان سال 1402 (10-1)

اثر داربست سه‌بعدی حاصل از بافت سلول‌زدایی شده‌ی معده‌ی رت بر عملکرد سلول‌های انسولین‌ساز MIN6

لعیاسادات خرسندی[1و2]
عباس حیدری مقدم[3]
داریوش بیژن نژاد[1و4]
محمود اوراضی زاده[1و2]
فرشته نژاددهباشی[1و4]
یوسف اسدی فرد[1و5]

چکیده

سابقه و هدف: دیابت نوع یک (T1D) نوعی بیماری وابسته به انسولین است که در نتیجه تخریب سلول‌های بتای جزایر پانکراس ایجاد می‌شود. هدف اصلی این مطالعه تعیین اثرات ماتریکس سلول‌زدایی شده معده (DSM) بر عملکرد سلول‌های MIN6 (یک رده‌ی سلولی بتا) بود.

مواد و روش‌ها: در این تحقیق آزمایشگاهی، معده‌ی موش‌های بزرگ آزمایشگاهی نژاد Wistar با سدیم دودسیل سولفات (SDS و Triton X-100) سلول‌زدایی شدند. داربست‌های سلول‌زدایی شده توسط تکنیک‌های بافتی و رنگ‌آمیزی H&E، DAPI و میکروسکوپ روبشی (SEM) ارزیابی شدند. پس از کشت سلول‌های MIN6 روی DSM، تست چالش ترشح گلوکز و بیان mRNA ژن‌های مرتبط با انسولین برای ارزیابی عملکرد سلول‌ها اجرا شد.

یافته‌ها: اجزای اصلی DSM مانند کلاژن‌ها و گلیکوزآمینوگلیکان‌ها پس از سلول‌زدایی باقی ماندند. علاوه بر این، DNA باقی‌مانده بسیار کم بود و DSM ریزمحیط خارج سلولی ایده ال برای سلول‌های MIN6 فراهم کرد. تست چالش ترشح گلوکز نشان داد که سلول‌های کشت داده شده در DSM نسبت به کشت دوبعدی، انسولین بیش‌تری ترشح می‌کنند. بیان ژن‌های خاص مرتبط با انسولین، مانند Pdx-1، INS، MAF-A و Glut-2 در داربست سلول‌ریزی شده به‌طور قابل توجهی، بیش‌تر از سلول‌های کشت‌شده در شرایط دوبعدی بود.

استنتاج: این نتایج در مجموع نشان داده است که DSM داربست مناسبی برای تثبیت جزایر مصنوعی پانکراس است.

واژه های کلیدی: ماتریکس سلول‌زدایی شده معده، رده سلولی MIN6، انسولین

مقدمه

دیابت نوع یک در اثر تخریب خودایمنی سلول‌های بتای پانکراس تولیدکننده انسولین ایجاد می‌شود(1). درمان رایج دیابت استفاده از انسولین اگزوژن در پاسخ به افزایش سطح گلوکز خون است.

مولف مسئول: نام: یوسف اسدی فرد–اهواز: دانشگاه علوم پزشکی جندی‌شاپور اهواز، دانشکده پزشکی E-mail: usef.fard@yahoo.com
1. مرکز تحقیقات سلولی و مولکولی خلیج فارس، پژوهشکده‌ی علوم پایه‌ی پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی جندی‌شاپور اهواز، اهواز، ایران
2. استاد، گروه علوم تشریحی، دانشکده‌ی پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی جندی‌شاپور اهواز، اهواز، ایران
3. استادیار گروه علوم تشریحی، دانشکده‌ی پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی دزفول، دزفول، ایران
4. استادیار، گروه علوم تشریحی، دانشکده‌ی پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی جندی‌شاپور اهواز، اهواز، ایران
5. دانشجوی دکترای علوم تشریحی، دانشکده‌ی پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی جندی‌شاپور اهواز، اهواز، ایران
تاریخ دریافت : 1401/9/27 تاریخ ارجاع جهت اصلاحات : 1402/8/6 تاریخ تصویب : 1402/8/13

[Downloaded from jmums.mazums.ac.ir on 2026-11-06]

با این‌حال، این روش عوارض ناشی از بیماری دیابت را درمان نمی‌کند(2). پیوند جزایر لانگرهانس یا جایگزینی سلول‌های بتا یگانه درمان مؤثر برای دیابت است(3). بااین‌حال، کاربرد پیوند جزایر باتوجه‌به نیاز به سرکوب طولانی‌مدت سیستم ایمنی و کمبود اهداکنندگان، با محدودیت روبه‌رو شده است(4). تولید سلول‌های ترشح‌شده‌ی انسولین (ISCs) می‌تواند مشکلات ذکرشده را برطرف کند. بااین‌حال، کاهش تدریجی ترشح انسولین پیوند ISCs برای درمان دیابت را محدود کرده است(5). در زمینه ظهور مهندسی بافت، داربست‌ها با هدف تقلید از بافت‌های بومی به‌منظور ارائه محیطی بهینه برای سلول‌ها، جایگزین ماتریکس خارج سلولی (ECM) می‌شوند. تولید موفقیت‌آمیز داربست‌های ماتریکس خارج سلولی در چندین بافت، مانند کبد، عصب، دستگاه تنفسی، غدد پستانی، تاندون و مثانه گزارش شده است(6-9). داربست‌های ECM را می‌توان با روش‌های مختلف سلول‌زدایی فیزیکی و آنزیمی تولید کرد(10). حذف سلول‌های آلوژن و بیگانه از بافت به القای کمترین پاسخ ایمنی توسط داربست‌های ECM منجر می‌شود. علاوه بر این، از بین بردن سلول‌ها ساختاری سه‌بعدی و ایدئال برای بازسازی بافت فراهم می‌کند(11). باتوجه‌به دلایل ذکرشده، در این مطالعه از ECM بافت معده به‌عنوان داربست استفاده شد. معده دارای ساختارهای مختلف بافتی، مانند عروق خونی، ماهیچه‌ها و بافت‌های همبند غنی از کلاژن، الاستین و گلیکوزآمینوگلیکان است. وجود ECM متعدد در معده مدل مناسبی برای مهندسی بافت فراهم می‌کند(12). رده‌ی سلول‌های بتای پانکراس موش MIN6 مدل مناسبی برای مطالعه مکانیسم آزمایش ترشح گلوکز است(13).

سلول‌های MIN6 وقتی در داربست‌های نرم قرار می‌گیرند، ترشح انسولین و حساسیت به گلوکز را افزایش می‌دهند(14). مطالعه‌ی حاضر با هدف بررسی تأثیر داربست سلول‌زدایی شده‌ی بافت معده بر عملکرد سلول‌های تولیدکننده‌ی انسوین MIN6 انجام شد.

مواد و روش‌ها

سلول‌زدایی بافت معده

در این مطالعه، از بافت معده‌ی موش‌های بزرگ آزمایشگاهی استفاده شد. این موش‌ها از مرکز حیوانات دانشگاه علوم پزشکی جندی‌شاپور اهواز تهیه شدند و در شرایط دمایی 21 درجه سانتی‌گراد نگهداری و با آب و غذای معمولی تغذیه شدند. این مطالعه به تأیید کمیته‌ی اخلاق کار با حیوانات آزمایشگاهی دانشگاه علوم پزشکی جندی‌شاپور اهواز (کد اخلاق: IR.AJUMS.ABHC.REC.1400.012) رسیده است. بافت معده تحت بیهوشی عمیق، برداشته شد و به مدت 24 ساعت، در دمای 70- درجه‌ی سانتی‌گراد نگهداری شد. برای سلول‌زدایی، ابتدا بافت از حالت انجماد خارج شد و به قطعات کوچک (1 سانتی‌مترمربع) تقسیم شد. پس از شست‌وشو با آب‌مقطر، در محلول سدیم دودوسیل سولفات (SDS) 1 درصد، به مدت 72 ساعت قرار داده شد و به‌مدت 1 ساعت، با آب‌مقطر شست‌وشو داده شد و پس از آن، به مدت 30 دقیقه در محلول ترایتون (X-100) 1 درصد برای حذف کامل SDS قرار گرفت. در نهایت، قطعات با PBS شسته شدند و پس از خشک شدن در دمای اتاق، در دمای 4 درجه‌ی سانتی‌گراد (یخچال) تا زمان کشت مجدد سلول، نگهداری شدند(12).

تعیین DNA موجود در داربست با استفاده از روش رسوب‌دهی نمک (Salting Out)

ابتدا، داربست‌ها با استفاده از دستگاه فریزدرایر خشک شدند (خشک شدن انجمادی). سپس، به قطعات کوچک تقسیم شدند و در بافر استخراج (1 M tris, 5 M NaCl; 0.5 M EDTA, pH = 8) و بافر لیزکننده (بافر استخراج حاوی پروتئیناز K و SDS 10 درصد) به مدت یک شب، انکوبه شدند. محتوای DNA بافت‌های هضم‌شده توسط نمک اشباع‌شده (5 مولار) رسوب داده شد. پروتئین‌های رسوب داده

[Downloaded from jmums.mazums.ac.ir on 2026-11-06]

شده حذف شدند و DNA در 100 میکرولیتر آب‌مقطر رقیق شد. مقدار کل DNA توسط دستگاه اسپکتروفتومتر نانودراپ تعیین شد(15).

ارزیابی داربست‌های سلول‌زدایی شده

بلافاصله پس از انجام فرایند سلول‌زدایی، بخشی از بافت مدنظر در بافر طبیعی فرمالین 10 درصد فیکس شد. سپس، با قرار دادن نمونه‌های بافتی در پارافین، قالب‌های بافتی تهیه شدند. پس از مقطع‌گیری با رنگ‌آمیزی H&E، DAPI، تری کروم و آلشین بلو، سلول‌زدایی کامل بافت معده بررسی شد.

کشت سلول‌های رده انسولین‌ساز MIN6 روی داربست سلول‌زدایی شده

رده‌ی سلولی MIN6 از مرکز ذخایر ژنتیکی ایران (تهران، ایران) خریداری شد. سلول‌های MIN6 در محیط DMEM حاوی FBS 10 درصد، 50 میکرومول beta-ME، 100 واحد درمیلی‌لیتر پنی‌سیلین/استرپتومایسین در دمای 37 درجه‌ی سانتی‌گراد و دی‌اکسید کربن 5 درصد کشت داده شدند. پس از تریپسینه کردن، سلول‌های MIN6 با غلظت 3×10^6 در 1 میلی‌لیتر محیط کشت، سوسپانسیون شدند. به‌منظور استریل کردن داربست برای کشت سلول، ابتدا داربست از یخچال خارج شد و به مدت 24 ساعت، در اتانول 70 درصد قرار گرفت. سپس، اتانول خارج شد و داربست به مدت 24 ساعت، در محیط کشت کامل قرار گرفت. سپس، سوسپانسیون سلولی روی داربست ریخته و محیط کشت هر دو روز، تعویض شد.

میکروسکوپ الکترونی روبشی SEM

برای بررسی ساختار سه‌بعدی بافت، پس از سلول‌زدایی و بعد از کشت دوباره‌ی سلول، نمونه‌ها در این دو مرحله، با استفاده از میکروسکوپ الکترونی روبشی بررسی شدند. برای آماده‌سازی قبل از تصویربرداری، ابتدا بافت‌ها در گلوتارآلدئید 2/5 درصد فیکس شدند و بعد از شست‌وشو در PBS، به مدت دو ساعت در ترا اکسیداسمیوم 1 درصد قرار گرفتند. پس از آبگیری با درجه‌های صعودی اتانول، نمونه با پوششی از طلا پوشانده شد و ساختار بافت بعد از سلول‌زدایی و پس از کشت سلول روی آن، با میکروسکوپ الکترونی روبشی بررسی شد.

تست Glucose challenge

هدف از این تست ارزیابی میزان حساسیت سلول‌ها در پاسخ به غلظت‌های مختلف گلوکز است. به این منظور، فلاسک‌های سلولی طی دو مرحله، ابتدا در مجاورت با DMEM-LG و سپس، در مجاورت با محیط DMEM-HG قرار داده شدند و در شرایط 37 درجه‌ی سانتی‌گراد و دی‌اکسید کربن 5 درصد به مدت 1 ساعت، انکوبه شدند و مایع رویی جمع‌آوری شد. مواد رویی قبل از تجزیه‌وتحلیل انسولین، در دمای 80- درجه سانتی‌گراد ذخیره شد.

روش Real-time PCR

پس از گذشت یک هفته از کشت سلول‌های MIN6، RNA سلول‌های کشت داده شده روی DSM و کشت دوبعدی با استفاده از محلول ترایزول (Qiagen, Germany) استخراج شد. از RNA استخراج‌شده با استفاده از کیت سنتز cDNA و بر اساس دستورالعمل شرکت سازنده (Takara, Japan)، cDNA ساخته شد. سپس، با استفاده از دستگاه Real time PCR و کیت SYBR Premix Ex Taq Kit، بیان ژن‌های MAF-A، Pdx-1، Glut-2 و INS بررسی شد.

تحلیل آماری

تمامی داده‌ها به‌صورت میانگین ± انحراف معیار، از سه بار آزمایش مستقل ارائه شدند. داده‌ها با استفاده از تکنیک‌های مختلف، مانند آنالیز واریانس one-way (ANOVA) و پس از آن، با آزمون Tukey (Tukey's test) برای هر بار آزمایش، تجزیه‌وتحلیل

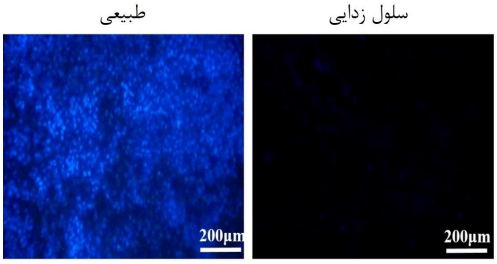
[Downloaded from jmums.mazums.ac.ir on 2026-11-06]

شـدند. داده‌هـای نان‌پارامتریـک توسـط آزمـون Kruskal-Wallis در تمام آزمون‌ها بررسی شد. سطح معنی‌داری P<0/05 و P<0/01 در نظر گرفته شد.

یافته‌ها

تعیین DNA باقی‌مانده در داربست سلول‌زدایی شده و رنگ‌آمیزی DAPI

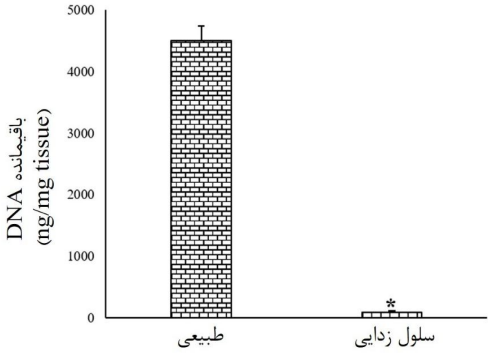
تصویر حاصل از رنگ‌آمیزی DAPI در بافت طبیعی و سلول زدایی شده‌ی معده به ترتیب، در تصویر شماره 1 نشان داده شده است. همان‌طور که تصاویر حاصل از رنگ‌آمیزی DAPI نشان می‌دهد، نقاط درخشان آبی‌رنگ در بافت طبیعی، به میزان زیادی دیده می‌شود که این مقدار در تصاویر بافت سلول زدایی شده به‌طور معناداری، کاهش پیدا کرده است. هم‌چنین، داده‌های حاصل از اندازه‌گیری مقدار DNA باقی‌مانده تفاوت معناداری در میزان DNA موجود در بافت سلول زدایی شده و طبیعی نشان می دهد (نمودار شماره 1).



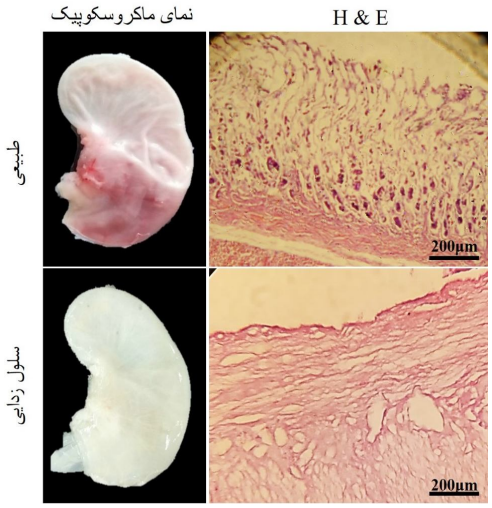
تصویر شماره 1: تصاویر میکروسکوپ فلورسنت حاصل از رنگ‌آمیزی DAPI از بافت معده در حالت طبیعی و سلول‌زدایی شده

نمای میکروسکوپ نوری پس از رنگ‌آمیزی H&E

تصاویر به‌دست‌آمده از میکروسکوپ نوری با رنگ‌آمیزی H&E نشان می دهد که به‌جز ماتریکس خارج سلولی، هیچ‌گونه سلولی در بافت معده پس از فرایند سلول زدایی وجود ندارد. تصاویر بالایی در شکل 2 بافت معده را بلافاصله پس از جداسازی و مقطع‌گیری و رنگ‌آمیزی H&E نشان می دهد که به‌عنوان کنترل مثبت و با ساختار طبیعی (همراه با هسته های مشخص) تهیه شده است. تصاویر پایین معده را پس از فرایند سلول زدایی و رنگ‌آمیزی با H&E نشان می دهند.



نمودار شماره 1: مقدار DNA باقی‌مانده در هر میلی‌گرم از بافت معده در حالت طبیعی و سلول‌زدایی شده، نتایج به‌صورت میانگین ± انحراف معیار بیان شده است. *P< 0/001



تصویر شماره 2: تصاویر ماکروسکوپیک و میکروسکوپ نوری از بافت معده در حالت طبیعی (بالا) و سلول‌زدایی (پایین)، رنگ‌آمیزی شده با H&E

نمای میکروسکوپ نوری پس از رنگ‌آمیزی تری کروم و آلشین بلو

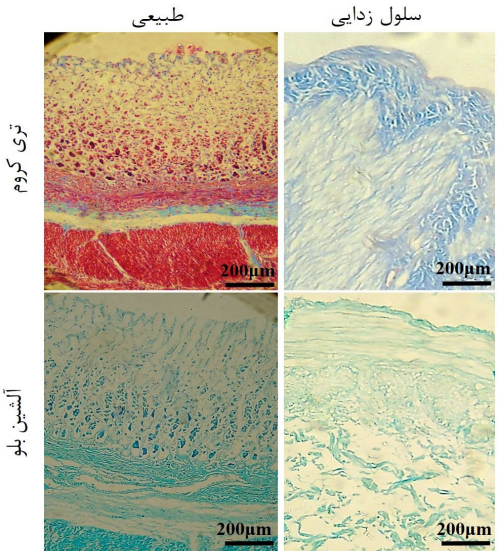
میزان کلاژن و گلیکوزآمینوگلیکان در بافت معده‌ی سلول‌زدایی شده و طبیعی با رنگ‌آمیزی تری کروم ماسون و آلشین بلو بررسی شد. تصاویر به‌دست‌آمده از میکروسکوپ نوری با رنگ‌آمیزی تری

[Downloaded from jmums.mazums.ac.ir on 2026-11-06]

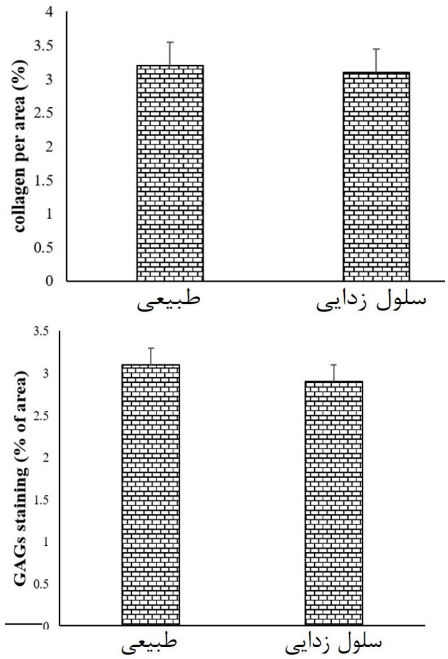
کروم ماسون و آلشین بلو نشان داد که تغییر درخور توجهی در مقدار ترکیبات کلاژن و هم‌چنین، گلیکوزآمینوگلیکان‌ها پس از فرایند سلول‌زدایی بافت معده، ایجاد نشد. آنالیز داده‌های کمی حاصل از تصاویر به‌دست‌آمده به کمک نرم‌افزار Image J از رنگ‌آمیزی معده‌ی سلول‌زدایی شده و طبیعی کاهش معنی داری را در میزان کلاژن و گلیکوزآمینوگلیکان‌ها نشان نداد (تصویر شماره 3) (نمودار شماره 2).

بررسی داربست معده با میکروسکوپ SEM پس از سلول زدایی و کشت سلول

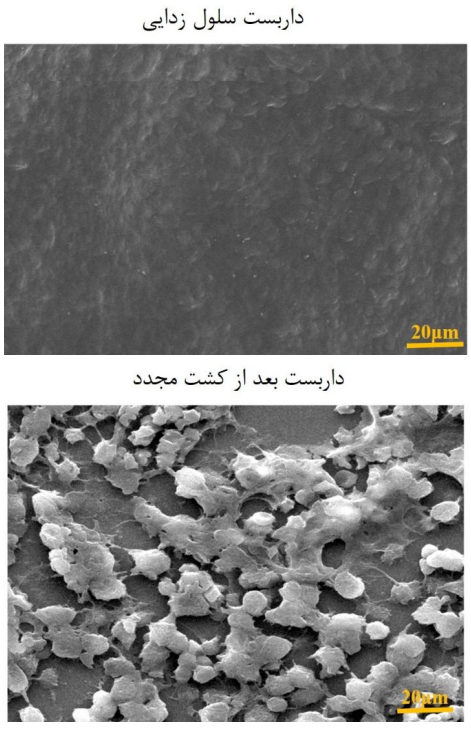
تصویر A در تصویر شماره 4 سطح داربست معده را بدون وجود سلول‌های عضو نشان می‌دهد. پس از گذشت 5 روز از کشت سلول‌های MIN6 روی داربست معده، با استفاده از SEM، مورفولوژی و موقعیت سلول‌های فیکس‌شده روی داربست بررسی شد. تصاویر به‌دست‌آمده حاکی از رشد و تکثیر سلول‌ها روی داربست بود. تصاویر نشان داد که سلول‌ها با یکدیگر و با داربست زیرین اتصال برقرار کرده‌اند (تصویر شماره 4).



تصویر شماره 3: تصاویر میکروسکوپ نوری حاصل از رنگ‌آمیزی تری کروم و آلشی بلو از بافت معده در حالت طبیعی و سلول‌زدایی شده، بافت معده‌ی طبیعی و سلول‌زدایی شده‌ی رنگ‌آمیزی شده با تری کروم (A, C) و آلشین بلو (B&D.) (خط مقیاس: 200µm)



نمودارشماره 2: آنالیز کمی مقدار کلاژن و گلیکوزآمینوگلیکان در بافت معده‌ی طبیعی و سلول‌زدایی شده، نتایج به‌صورت میانگین ± انحراف معیار بیان شده است.

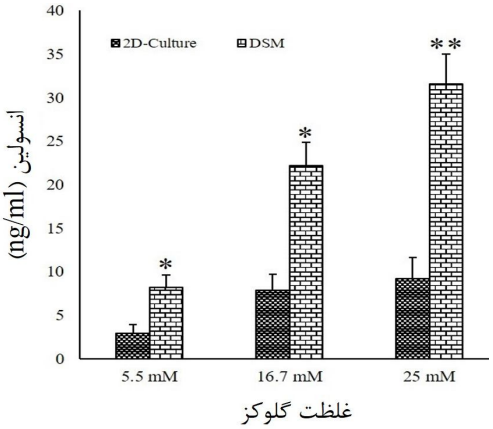


تصویر شماره 4: A. تصویر SEM از معده پس از فرایند سلول‌زدایی، B. تصویر SEM سلول‌های MIN6 کشت‌داده شده روی داربست معده 5 روز پس از کشت

[Downloaded from jmums.mazums.ac.ir on 2026-11-06]

نتایج تست GSIS

برای بررسی میزان ترشح انسولین، GSIS با استفاده از غلظت‌های پایین و بالای گلوکز برای تحریک مراحل ترشح انسولین انجام شد. سلول‌های MIN6 به مدت 5 روز، روی داربست سلول‌زدایی شده معده کشت داده شدند و ترشح انسولین پس از 2 ساعت انکوباسیون ایستا، در غلظت‌های مختلف گلوکز تعیین شد. سلول‌های MIN6 کشت داده شده روی داربست DSM در ترشح انسولین در پاسخ به گلوکز نسبت به کشت دوبعدی، کارآمدتر بودند. نتایج GSIS نشان داد که با تحریک گلوکز در غلظت بالا یا پایین، سلول‌های MIN6 کشت داده شده روی داربست DSM می‌توانند به‌طور درخور توجهی، انسولین بیش‌تری را در مقایسه با سلول‌های کشت دوبعدی ترشح کنند که این اختلاف از لحاظ آماری، معنی‌دار بود (**0/**05>P*) (نمودار شماره 3).



نمودار شماره 3: میزان ترشح انسولین سلول‌های MIN-6 کشت داده شده روی داربست سلول‌زدایی شده‌ی معده در مقایسه با کشت دوبعدی در پاسخ به غلظت‌های مختلف گلوکز پنج روز پس از کشت سلولی، نتایج به‌صورت میانگین ± انحراف معیار بیان شده است و 0/05>P* و 0/001>P**

نتایج Real time PCR

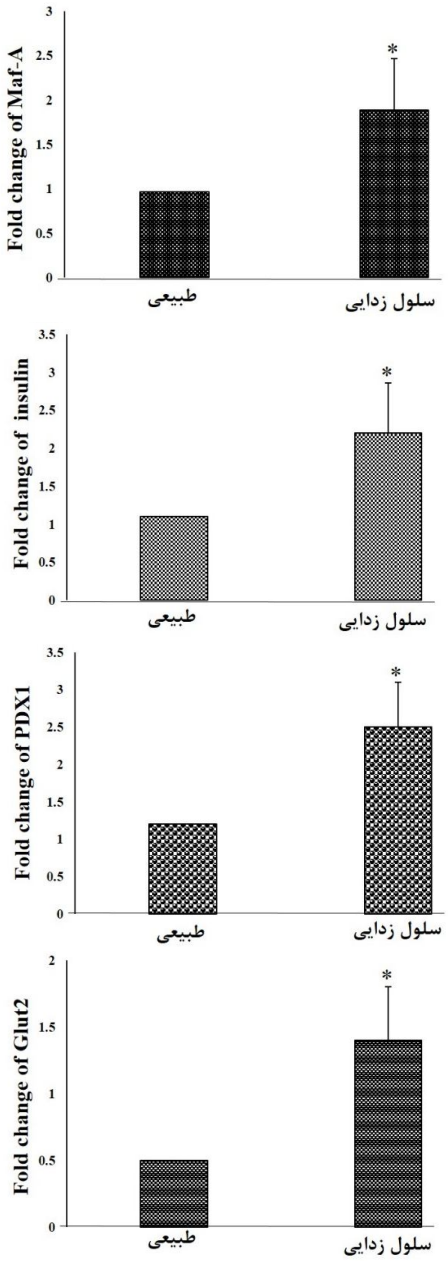
داده‌های کمی به‌دست‌آمده از RT- PCR نشان داد که بیان ژن‌های مرتبط با تولید انسولین، شامل ژن انسولین، PDX-1، MafA و Glut-2، در سلول‌های کشت داده شده روی داربست سلول‌زدایی شده معده نسبت به سلول‌های کشت دوبعدی بیش‌تر بود که این اختلاف برای تمامی ژن‌ها از لحاظ آماری، معنی‌دار بود. داربست سلول‌زدایی شده‌ی معده بیان mRNA ژن PDX-1 (2 برابر)، ژن MafA (1/9 برابر)، ژن انسولین (2 برابر) و ژن Glut-2 (2/8 برابر) را در سلول‌های MIN6 نسبت به کشت دوبعدی افزایش داد.

بحث

مطالعه حاضر روشی آسان برای ارائه‌ی داربست بدون سلول معده با آسیب کم ECM و بستری برای کشت سلولی سه‌بعدی است. نتایج این مطالعه نشان داد که داربست معده می‌تواند عملکرد سلول‌های بتا را با افزایش بیان ژن‌های اختصاصی انسولین و افزایش ترشح انسولین در پاسخ به تحریک گلوکز بهبود بخشد. ازآن‌جاکه تزریق انسولین نمی‌تواند درمان قطعی بیماری دیابت باشد، باید از طریق مهندسی بافت، بافت پانکراس را جایگزین کرد. انتخاب ماده زیستی مناسب به‌عنوان ماتریکس خارج سلولی به نوع و خصویات بافت مدنظر بستگی دارد(16). داربست‌هایی که از آن‌ها در مهندسی بافت استفاده می‌شود، می‌بایست از ویژگی‌هایی برخوردار باشند که برای بازسازی سلولی حیاتی است و خصوصیات مکانیکی لازم را نیز فراهم می‌کند(17). مطالعات صورت‌گرفته در زمینه‌ی مهندسی بافت به‌منظور درمان بیماری دیابت شامل کشت سلول‌های انسولین‌ساز روی داربست‌های مصنوعی، طبیعی یا ترکیبی از این دو است. بیش‌تر تحقیقات انجام‌شده درباره داربست‌های سلول‌زدایی شده شامل کشت سلول‌های انسولین‌ساز روی داربست پانکراس، کبد، ریه و کلیه سلول‌زدایی شده است. به طور مثال، ECM روده‌ی کوچک، درم، مثانه، پریکارد و دریچه‌های قلبی، غشای آمنیون و در نهایت، عضله و فاسیا نمونه‌هایی از داربست‌های تأییدشده توسط FDA هستند که برای ترمیم بافت نرم به کار گرفته شده‌اند(18). معده دارای ساختارهای

[Downloaded from jmums.mazums.ac.ir on 2026-11-06]

مختلف بافتی، مانند عروق خونی، ماهیچه‌ها و بافت‌های همبند غنی از کلاژن، الاستین و گلیکوزآمینوگلیکان است. وجود ECM متعدد در معده مدل مناسبی برای مهندسی بافت فراهم می‌کند. بافت معده غنی از رشته‌های کلاژن، الاستین و گلیکوزآمینوگلیکان‌های سولفاته است. گلیکوزآمینوگلیکان‌های سولفاته در تمایز و برهم‌کنش‌های سلولی مؤثر هستند. رشته‌های کلاژن و الاستین حمایت ساختاری و مکانیکی را برای داربست فراهم می‌کنند. این پروتئین‌ها ویژگی‌های لازم داربست را برای استفاده در مهندسی بافت فراهم می‌کنند. ماتریکس سلول‌زدایی شده علاوه بر حفظ ساختار سه‌بعدی ماتریکس خارج سلولی، حاوی ماکرومولکول‌هایی نظیر لامینین و فاکتور رشد اندوتلیال و فاقد مجموعه‌ی اصلی سازگاری بافتی (Major histocompatibility complex antigen) و عرضه آنتی‌ژن است(19)؛ بنابراین، در این مطالعه، تأثیر داربست حاصل از سلول‌زدایی معده‌ی رت بر عملکرد سلول‌های انسولین‌ساز MIN6 ارزیابی شد. نتایج حاصل از این مطالعه سلول‌زدایی بافت معده با پروتکل استفاده‌شده را با موفقیت تأیید کرد. پروتکل سلول‌زدایی در این مطالعه توانست به‌طور مؤثر، عناصر سلولی و باقی‌مانده‌ی DNA را حذف کند و ساختار ماتریکس خارج سلولی معده را باقی بگذارد. اجزای اصلی ECM، یعنی کلاژن و GAGs نیز در داربست معده باقی ماندند. رنگ‌آمیزی DAPI و H&E نشان داد که پروتکل سلول‌زدایی مطالعه حاضر به طور مؤثر، بقایای DNA را از داربست بافت‌های طحال و معده حذف می‌کند (تصویر شماره 3-4 و 3-5). حذف DNA باقی‌مانده و بقایای سلولی به قرارگیری بهتر سلول‌ها در داربست، کاهش پاسخ ایمنی و هم‌چنین، افزایش بقای سلول‌های کشت داده شده منجر می‌شود. حفظ پروتئین‌های ECM طبیعی برای تکثیر سلولی در ECM سلول‌زدایی شده و هم‌چنین، تسهیل اتصال و سیگنال‌دهی سلول ضروری است.



نمودار شماره 4: میزان بیان ژن‌های مرتبط با تولید انسولین (PDX-1، Glut-2، Maf-A و انسولین) در سلول‌های MIN-6 کشت داده شده روی داربست سلول‌زدایی شده‌ی معده در مقایسه با کشت دو بعدی پنج روز پس از کشت سلولی، نتایج به‌صورت میانگین ± انحراف معیار بیان شده است و P<0/05*

در مطالعه صورت‌گرفته توسط Webber و همکاران، مشخص شد که کپسوله شدن سلول‌های MIN6 روی داربست PEG حاوی کلاژن نوع یک و دو و لامینین،

[Downloaded from jmums.mazums.ac.ir on 2026-11-06]

علاوه بر افزایش زیست‌پذیری سلول‌ها، ترشح انسولین را نیز افزایش می‌دهد(20). نتایج مطالعه‌ی حاضر نیز افزایش تولید انسولین و بیان ژن را در سلول‌های کشت داده شده روی داربست تأیید کرد. هم‌چنین، در مطالعه‌ای دیگر، پس از کپسوله کردن سلول‌های انسولین‌ساز با کلاژن نوع چهار، حمایت مکانیکی و فیزیولوژیکی داربست از سلول‌های انسولین‌ساز گزارش شد که مطابق با یافته‌های مطالعه‌ی ما است(21). Davis و همکاران نقش مثبت پروتئین‌های ماتریکس خارج سلولی، شامل کلاژن نوع چهار و لامینین را در بهبود عملکرد سلول‌های جزایر پانکراس گزارش کردند (22). مطالعه‌ی حاضر نیز مناسب بودن داربست سلول‌زدایی شده‌ی معده برای حمایت از سلول‌های انسولین‌ساز MIN6 و بهبود عملکرد آن‌ها در شرایط برون‌تنی را تأیید کرد.

در پایان، می‌توان نتیجه گرفت که داربست معده با تقلید ریزمحیط سلول‌های بتای پانکراس و با داشتن پروتئین‌های مختلف ماتریکس خارج سلولی و برقراری ارتباط بین سلول و ماتریکس باعث بهبود عملکردهای سلولی می‌شود.

سپاسگزاری

نتایج ارائه‌شده در این مقاله بخشی از پایان‌نامه‌ی دانشجویی دکتری تخصصی علوم تشریحی است و دانشگاه علوم پزشکی جندی‌شاپور اهواز (کد: CMRC-0007) از آن حمایت کرده است. صمیمانه، از همه‌ی افرادی که در این مطالعه همکاری کردند، تشکر می‌کنیم.

References

1. Aghazadeh Y, Nostro MC. Cell therapy for Type 1 diabetes: Current and future strategies. Curr Diab Rep 2017; 17(6): 37-45.
2. Salg GA, Giese NA, Schenk M, Hüttner FJ, Felix K, Probst P, et al. The emerging field of pancreatic tissue engineering: A systematic review and evidence map of scaffold materials and scaffolding techniques for insulin-secreting cells. J Tissue Eng 2019; 10: 2041731419884708.
3. Mirmalek-Sani SH, Orlando G, McQuilling JP, Pareta R, Mack DL, Salvatori M, et al. Porcine pancreas extracellular matrix as a platform for endocrine pancreas bioengineering. Biomaterials 2013; 34(22): 5488-95.
4. Ludwig B, Reichel A, Steffen A, Zimerman B, Schally AV, Block NL, et al. Transplantation of human islets without immunosuppression. Proc Natl Acad Sci U S A 2013; 110(47): 19054-19058.
5. Niknamasl A, Ostad SN, Soleimani M, Azami M, Salmani MK, Lotfibakhshaiesh N, et al. A new approach for pancreatic tissue engineering: human endometrial stem cells encapsulated in fibrin gel can differentiate to pancreatic islet beta-cell. Cell Biol Int 2014; 38(10): 1174-1182.
6. Yang W, Xia R, Zhang Y, Zhang H, Bai L. Decellularized liver scaffold for liver regeneration. Methods Mol Biol 2018; 1577: 11-23.
7. Wüthrich T, Lese I, Haberthür D, Zubler C, Hlushchuk R, Hewer E, et al. Development of vascularized nerve scaffold using perfusion-decellularization and recellularization. Mater Sci Eng C Mater Biol Appl 2020; 117: 111311.
8. Simões IN, Vale P, Soker S, Atala A, Keller D, Noiva R, et al. Acellular urethra bioscaffold: decellularization of whole urethras for tissue engineering applications. Sci Rep 2017; 7: 41934.
9. Roth SP, Erbe I, Burk J. Decellularization of large tendon specimens: combination of

[Downloaded from jmums.mazums.ac.ir on 2026-11-06]

manually performed freeze-thaw cycles and detergent treatment. Methods Mol Biol 2018; 1577: 227-237.

10. Mendibil U, Ruiz-Hernandez R, Retegi-Carrion S, Garcia-Urquia N, Olalde-Graells B, Abarrategi A. Tissue-specific decellularization methods: rationale and strategies to achieve regenerative compounds. Int J Mol Sci 2020; 21(15): 5447-5476.
11. Loh QL, Choong C. Three-dimensional scaffolds for tissue engineering applications: role of porosity and pore size. Tissue Eng Part B Rev 2013; 19(6): 485-502.
12. Zambaiti E, Scottoni F, Rizzi E, et al. Whole rat stomach decellularisation using a detergent-enzymatic protocol. Pediatr Surg Int 2019; 35(1): 21-27.
13. Nakashima K, Kanda Y, Hirokawa Y, Kawasaki F, Matsuki M, Kaku K. MIN6 is not a pure beta cell line but a mixed cell line with other pancreatic endocrine hormones. Endocr J 2009; 56(1): 45-53.
14. Nyitray CE, Chavez MG, Desai TA. Compliant 3D microenvironment improves β-cell cluster insulin expression through mechanosensing and β-catenin signaling. Tissue Eng Part A 2014; 20(13-14): 1888-1895.
15. Crapo PM, Gilbert TW, Badylak SF. An overview of tissue and whole organ decellularization processes. Biomaterials 2011; 32(12): 3233-3243.
16. Ahmed TA, Dare EV, Hincke M. Fibrin: A versatile scaffold for tissue engineering applications. Tissue Eng Part B Rev 2008; 14(2): 199-215.
17. Park JS, Yang HN, Woo DG, Jeon SY, Park KH. Chondrogenesis of human mesenchymal stem cells in fibrin constructs evaluated in vitro and in nude mouse and rabbit defects models. Biomaterials 2011; 32(6): 1495-1507.
18. Wang L, Johnson J, Zhang Q. Decellularized Porcine Stomach Extracellular Matrix for Tissue Engineering and Repair. Plast Reconstr Surg 2014; 133(3): 108.
19. Wang X, Chan V, Corridon PR. Decellularized blood vessel development: Current state-of-the-art and future directions. Front Bioeng Biotechnol 2022; 10:951644.
20. Weber LM, Anseth KS. Hydrogel encapsulation environments functionalized with extracellular matrix interactions increase islet insulin secretion. Matrix Biol 2008; 27(8): 667-673.
21. Llacua LA, Hoek A, de Haan BJ, de Vos P. Collagen type VI interaction improves human islet survival in immunoisolating microcapsules for treatment of diabetes. Islets 2018; 10(2): 60-68.
22. Davis NE, Beenken-Rothkopf LN, Mirsoian A, Kojic N, Kaplan DL, Barron AE, Fontaine MJ. Enhanced function of pancreatic islets co-encapsulated with ECM proteins and mesenchymal stromal cells in a silk hydrogel. Biomaterials 2012; 33(28): 6691-6697.

[Downloaded from jmums.mazums.ac.ir on 2026-11-06]