پژوهش درپزشکی (مجله پژوهشی دانشکده پزشکی)
دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی درمانی شهید بهشتی
دوره ۳۶، شماره ۱، بهار ۱۳۹۱، صفحات ۴ تا ۱۰

مقاله اصلی
(Original Article)

بررسی تأثیر سایز حفرات داربست‌های کیتوزان- ژلاتین در اتصال سلول‌های اپیتلیال پردهٔ آمنیون به منظور کاربرد در مهندسی بافت

فاطمه خاتمی[۱،۲]، دکتر حسن نیک نژاد[۲]، دکتر نریمان مصفا*[۱]، دکتر حبیب الله پیروی[۲]

[۱] گروه ایمونولوژی، دانشکدهٔ پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی
[۲] مرکز تحقیقات نانوتکنولوژی و مهندسی بافت، بیمارستان طالقانی، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی

چکیده

سابقه و هدف: *امروزه پردهٔ آمنیون، به عنوان یک منبع با ارزش سلولی، کاربردهای فراوانی به ویژه در حیطهٔ طب ترمیمی دارد. از سوی دیگر ایجاد بسترهای سه بعدی با ویژگی‌های مطلوب برای کشت سلول، که بسته به نوع سلول نیز می‌باشد، اهمیت زیادی پیدا کرده است. لذا این تحقیق با هدف طراحی بسترهای مناسب برای به کارگیری سلول‌های اپیتلیال پردهٔ آمنیون در تحقیقات مهندسی بافت انجام شد.*

روش بررسی: *این مطالعه به صورت تجربی انجام پذیرفت. ابتدا داربست‌های سه بعدی کیتوزان و کیتوزان-ژلاتین با روش Freeze-Dry در دماهای متفاوت (۲۰-، ۸۰-، ۱۹۶-) از مرحله پیش انجماد آماده‌سازی و سایز حفرات با میکروسکوپ الکترونی ارزیابی شد. همچنین با استفاده از فرمول مناسب، تخلخل (Porosity) داربست‌ها اندازه‌گیری شد. در مرحلهٔ بعد، سلول‌های اپیتلیالی جدا شده از پردهٔ آمنیون روی داربست‌های با سایز حفرات متفاوت کشت داده شدند. از تصاویر SEM و تست MTT نیز برای تایید اتصال سلول‌های مورد نظر به داربست استفاده گردید.*

یافته‌ها: *طراحی مورد هدف با موفقیت انجام پذیرفت که حاصل انجام تکرارپذیری این مطالعه بود. نتایج میکروسکوپ الکترونی حاکی از سایز حفرات بزرگتر در دمای بالاتر و در مدت زمان طولانی‌تر از مرحلهٔ پیش انجماد بود (۲۰-). تخلخل ۷۳ درصد داربست‌ها برای کشت سلول مطلوب بود. از سوی دیگر نتایج MTT سلول‌ها روی داربست، اهمیت سایز حفرات (۱۰۰ ~ میکرون) را در اتصال سلول به بستر تایید کرد.*

نتیجه‌گیری: *به نظر می‌رسد که داربست های کیتوزان- ژلاتین و کیتوزان با سایز حفرات بزرگ‌تر، باعث افزایش شانس اتصال سلول‌های اپیتلیال پردهٔ آمنیون به بستر شده و از این رو می‌توانند به عنوان یک بستر ساخته شده از مواد طبیعی برای اهداف مهندسی بافت استفاده شوند.*

واژگان کلیدی: *داربست، کیتوزان، سلول‌های اپیتلیال پردهٔ آمنیون.*

مقدمه

طی چند سال اخیر تحقیقات در زمینهٔ تعیین ویژگی‌های ساختاری و سلولی پردهٔ آمنیون اهمیت به سزایی یافته است. غشای آمنیوتیک یکی از لایه‌های اطراف جنین و دارای یک ردیف سلول اپیتلیال می‌باشد. این سلول‌ها دارای خصوصیاتی مشابه سلول‌های بنیادی (stem cell) بوده، برخی از مارکرهای سلولهای بنیادی را در سطح خود بیان کرده و قابلیت تمایز به هر سه ردهٔ سلولهای جنینی (اکتودرم، مزودرم، اندودرم) را دارند (۱). از این رو، این سلول‌ها منبع با ارزشی برای اهداف درمانی بوده و به ویژه کاربردهای فراوانی در مهندسی بافت

آدرس نویسنده مسئول: تهران، گروه ایمونولوژی، دانشکدهٔ پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی ، دکتر نریمان مصفا (**e-mail:** mossafan@sbmu.ac.ir)
تاریخ دریافت مقاله: ۱۳۹۰/۲/۲۷
تاریخ پذیرش مقاله: ۱۳۹۰/۱۱/۲۳

Archive of SID
www.SID.ir

دارند. از جمله مشکلاتی که در رابطه با سلول های بنیادی و بویژه سلولهای اپیتلیال پرده آمنیون مطرح است، اتصال این سلول‌ها به بستر بوده و فراهم آوردن شرایط مناسب برای بهبود اتصال این سلولها چالش پیش روی محققین می‌باشد. یکی از اهداف مهندسی بافت، تولید داربست های متخلخل (scaffold) به منظور فراهم کردن ریز ساختار مناسب برای اتصال، مهاجرت و رشد سلول و نیز به عنوان الگویی برای ایجاد بافت جدید می‌باشد. این داربست‌ها که در حکم ماتریکس خارج سلولی هستند (extracellular matrix)، می‌توانند بسته به مواد سازنده خود به دو شکل سنتتیک و طبیعی باشند. در مقایسه با پلیمرهای سنتتیک، ماکرومولکول‌های طبیعی باعث تسهیل اتصال، بقاء و در نهایت تمایز سلول می‌شوند .

داربست‌های مورد استفاده در مهندسی بافت باید دارای چندین ویژگی باشند، از جمله: زیست سازگاری، تجزیه‌پذیری بدون تولید محصولات سمی برای سلول، پایداری، ویژگی‌های مکانیکی و در نهایت اندازهٔ حفرات مناسب. نفوذپذیری ساختارهای سه بعدی مورد استفاده در مهندسی بافت برای انتشار مواد غذایی و خروج مواد زاید از اهمیت بسیاری برخوردار است و عامل موثر در این امر سایز و ارتباط حفرات ساختار با یکدیگر می باشد (۲، ۳). از سوی دیگر سایز حفره میزان انتقال پیام توسط اجزاء ماتریکس خارج سلولی را تعیین می‌کند، به نحوی که تعیین کننده درگیری گیرنده‌های سلولی با ماتریکس خارج سلولی می‌باشد (۱).

با توجه به موارد یاد شده انتخاب ماده سازنده داربست و استفاده از تکنیک مناسب از اهمیت زیادی برخوردار است. در سال‌های اخیر استفاده از کیتوزان به دلیل ویژگی‌های جالب بیولوژیکی این ساختار قندی، از جمله زیست سازگاری و ایجاد کمپلکس‌های پلی‌الکترولیت گسترش یافته است. به دلیل در دسترس بودن و ویژگی‌های ذکر شده، از کیتوزان در تهیه داربست‌های مورد استفاده در جایگزینی غضروف، میکروپارتیکل برای رهایش کنترل شده دارو و در تولید بستر مناسب برای رشد سلولهای فیبروبلاست در ترمیم پوست استفاده می‌شود (۵، ۶).

همچنین مطالعاتی در زمینه اثر دما در شکل گیری حفرات با سایزهای مختلف درساختارهای متشکل از کیتوزان و کلاژن صورت گرفته است، ولی مطالعه‌ای که به طور ویژه برای ارزیابی اتصال سلول‌های اپیتلیال پردهٔ آمنیون روی داربست‌های کیتوزان و ژلاتین باشد، تاکنون انجام نشده است.

مواد و روشها

این تحقیق به صورت تجربی ودر شرایط آزمایشگاهی انجام پذیرفت.

تهیه داربست‌های کیتوزانی، ژلاتینی و کیتوزان-ژلاتین

برای تهیه داربست‌های سه بعدی کیتوزان و کیتوزان-ژلاتین، مواد مذکور در آب مقطر حاوی ۱٪ اسید استیک حل شدند. سپس ژل‌های مورد نظر در ظروف کشت ۲۴ خانه ریخته شدند و در زمان‌های ۱، ۲ و ۴ ساعت و در دماهای ۲۰-، ۸۰- و ۱۹۶- از مرحلهٔ پیش انجماد (Pre-freeze) قرار گرفتند. در نهایت به منظور ایجاد ساختار حفره‌ای، نمونه‌ها توسط دستگاه Freeze-dryer به مدت ۲۴ ساعت در شرایط خلاء قرار گرفتند (۶).

بررسی فراساختاری داربست‌های مورد نظر با میکروسکوپ الکترونی

نمونه‌های تهیه شده از نظر سایز و نیز کیفیت ساختار با میکروسکوپ الکترونی (Scanning Electron Microscope) بررسی شدند، بدین صورت که سایز حفرات مناطق مختلف داربست اندازه گیری و میانگین آن برای هر دما و زمان تعیین شد.

تعیین تخلخل (Porosity) داربست‌های کیتوزان-ژلاتین

Porosity داربست‌های کیتوزان-ژلاتین توسط روش جانشینی مایع (Liquid Exchange) اندازه گیری شد (۷). اتانول مطلق به عنوان مایع جانشین شونده انتخاب شد، زیرا بدون اینکه داربست را حل و یا باعث تغییر در ساختار آن شود، به راحتی در داخل داربست نفوذ می‌کند. برای انجام تست ابتدا داربست در داخل حجم مشخصی از اتانول (W_d) به مدت ۵ دقیقه غوطه‌ور شد تا حباب‌های هوا به طور کامل خارج شود، سپس تغییر حجم اتانول به عنوان W1 ثبت شد. داربست به آرامی از داخل اتانل خارج و حجم اتانول باقیمانده به عنوان W_w در نظر گرفته شد. در نهایت porosity با استفاده از رابطهٔ زیر به دست آمد:

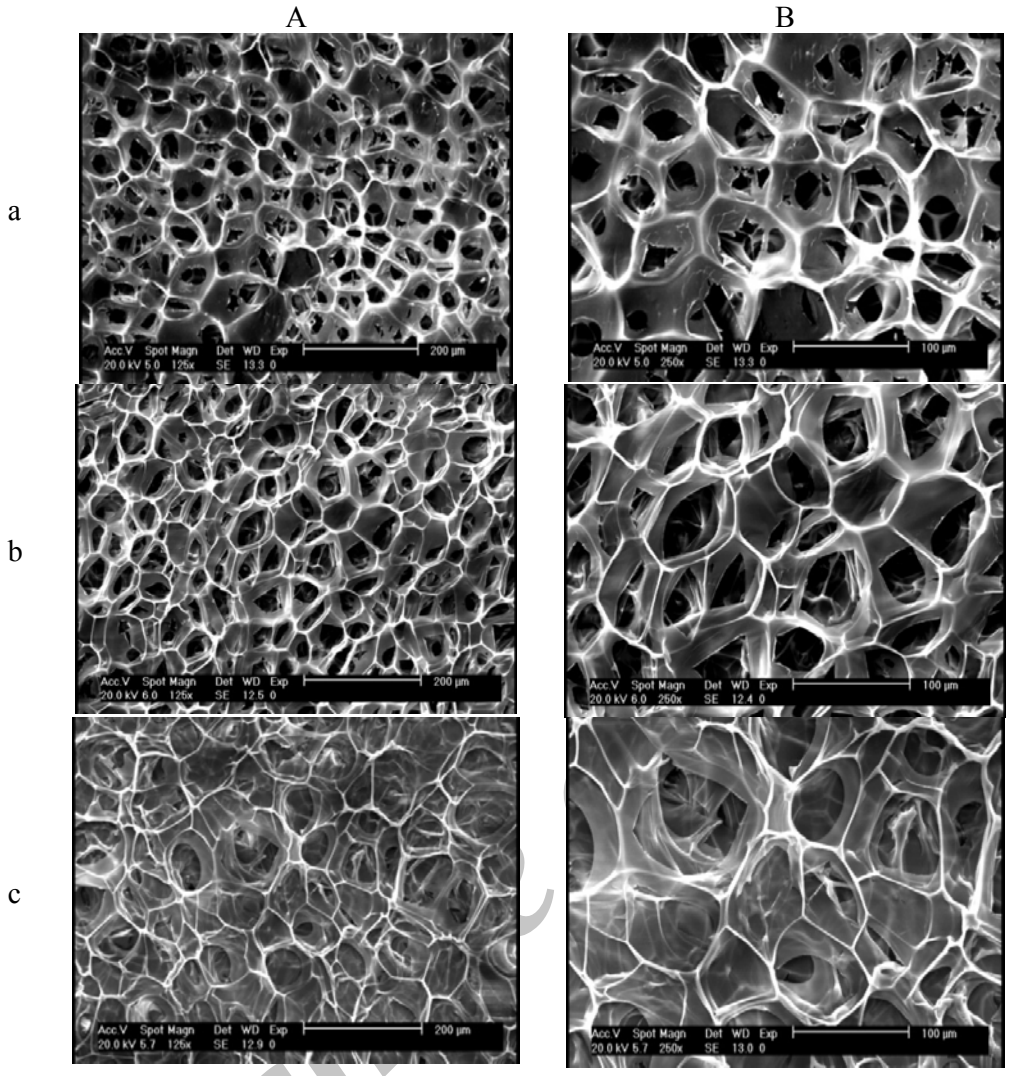
$$\varepsilon(\%) = (W_w - W_d)/(W_w - W_1) \times ٪۱۰۰$$

خنثی سازی و افزایش پایداری داربست‌ها

از اتانول مطلق برای افزایش پایداری داربست‌ها استفاده شد بدین صورت که ۰/۵ میلی‌لیتر اتانول مطلق روی داربست‌ها ریخته شد و پس ۳۰ دقیقه الکل و اسید (استیک اسید به کار رفته در تهیه ژل داربست‌ها) در شستشوی داربست با PBS از داربست ها خارج شد. این مرحله قبل از کشت سلول روی بستر انجام می شود.

Archive of SID

www.SID.ir



شکل ۱- میکروگراف های الکترونی داربست های کیتوزان-ژلاتین ایجاد شده در دمای ۲۰- ودر زمانهای a) ۱،b) ۲ و c) ۴ ساعت از مرحلهٔ پیش انجماد. بزرگنمایی تصاویر ستون A) 125 X، B) 250 X.

جداسازی سلول‌های اپیتلیال پردهٔ آمنیون

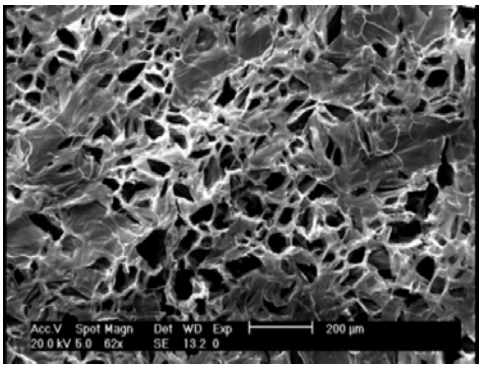
با اخذ رضایت کتبی، جفت همراه با پرده‌های جنینی، از مادران باردار سالم تحت عمل سزارین الکتیو اخذ شد و پس از انتقال به آزمایشگاه و جداسازی پرده‌های جنینی از جفت، پردهٔ آمنیون به روش مکانیکی (peeling) از پردهٔ کوریون جدا شد. در شرایط استریل سلول‌های اپی تلیال به روش هضم آنزیمی با تریپسین-EDTA ۰/۱۵ درصد از پردهٔ آمنیون جداسازی شدند. در نهایت حیات سلولی با تریپان بلو ارزیابی شد (۸).

کشت سلول‌های اپی‌تلیالی روی داربست‌های کیتوزان و کیتوزان-ژلاتین

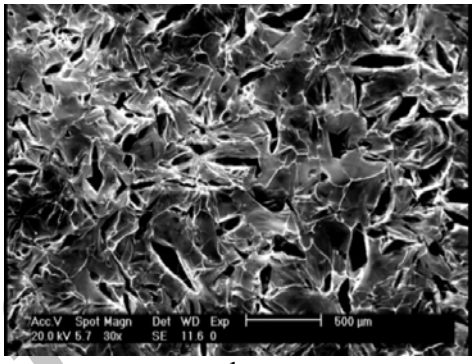
پس از انجام مرحلهٔ خنثی‌سازی، داربست‌ها به مدت یک ساعت در محیط DMEM قرار گرفتند و سپس محیط روی داربست‌ها خارج و 5×10^5 سلول روی هر بستر قرار داده شد. برای جلوگیری از تجمع سلول در یک قسمت، سوسپانسیون سلولی در نقاط مختلفی از سطح قرار گرفت. به منظور اتصال سلول، داربست به مدت یک ساعت در انکوباتور CO_2 با دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد قرار گرفت و پس از آن ۰/۵ میلی‌لیتر محیط DMEM/F12 همراه با آنتی‌بیوتیک (پنی سیلین – استرپتومایسین)، ۱۰ درصد FBS و ۱۰ نانوگرم در میلی‌لیتر فاکتور رشد EGF، در هر چاهک ریخته شد. سلول‌ها به مدت ۲۴ ساعت روی بسترهای ذکر شده در انکوباتور CO_2 کشت داده شدند.

Archive of SID

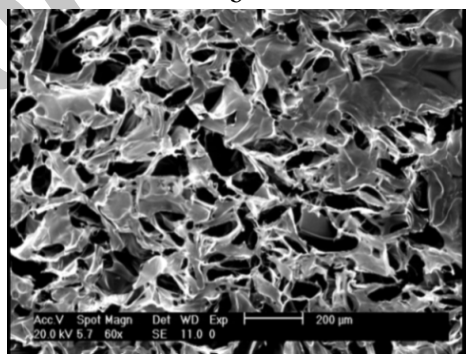
www.SID.ir



a



b



c

شکل ۲- میکروگراف های الکترونی داربست های کیتوزان-ژلاتین ایجاد شده در دمای ۸۰- ودر زمانهای a) ۱، b) ۲ و c) ۴ ساعت از مرحلهٔ پیش انجماد. بزرگنمایی تصویر a) 62 X، b) 30 X و c) 60 X

بررسی توان اتصالی سلول به بستر با تست MTT

برای بررسی اتصال سلول‌های اپی‌تلیال به داربست‌های کیتوزان و ژلاتین، از روش ماکروسکوپیک تغییر رنگ داربست به واسطهٔ اتصال سلول استفاده شد. بدین منظور 5×10^5 سلول روی داربست‌های تیمار شده با محیط کشت ریخته شد و با اضافه کردن ۰/۵ میلی‌لیتر محیط کشت کامل، به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه انکوبه شد. پس از طی این مدت، محیط روی داربست‌ها خارج و با PBS شستشه شدند تا احتمال شرکت سلول‌های شناور در ایجاد رنگ به حداقل برسد. محیط DMEM همراه با ۱۰ درصد از مادهٔ MTT به هر چاهک اضافه و به مدت ۴ ساعت در انکوباتور قرار گرفت. پس از خارج کردن محیط همراه با MTT، روی هر بستر دی‌متیل سولفوکساید (DMSO) اضافه گردید. داربست فاقد سلول به عنوان کنترل در نظر گرفته شد (۹).

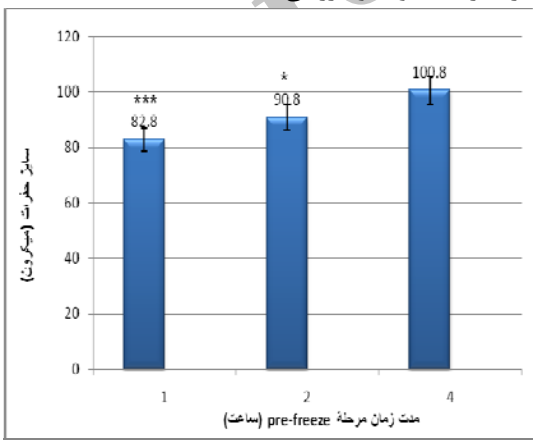
تحلیل آماری

برای تحلیل داده‌ها (اطلاعات مربوط به سایز حفرات داربست) از نرم افزار INSTAT و آزمون آماری ANOVA استفاده شد. نتایج به صورت میانگین ± انحراف معیار بیان شد و P<۰/۵ به عنوان اختلاف معنی‌دار در نظر گرفته شد.

یافته‌ها

مشاهدات میکروسکوپ الکترونی

داربست‌های تهیه شده در زمان‌ها و دماهای مختلف، از لحاظ سایز حفرات بررسی شدند. نتایج بیانگر رابطهٔ مستقیم بین کاهش دما و زمان با کوچکتر شدن اندازهٔ حفرات بود. بدین صورت که داربست‌هایی که به مدت یک ساعت در دمای ۸۰- و ۱۹۶- درجه سانتی‌گراد قرار گرفتند، حفرات کوچک‌تری از داربست‌هایی که در دمای پیش انجماد ۲۰- درجه سانتی‌گراد و در مدت زمان‌های ۲ و ۴ ساعت قرار گرفته بودند تشکیل دادند. از سوی دیگر اختلاف سایز حفرات را می‌توان با تغییر زمان (در دماهای بالا مثل ۲۰-) نیز مشاهده کرد. نتایج بیانگر اختلاف معنی دار سایز حفرات بین دمای ۱ و ۴ ساعت بود (نمودار ۱)، در حالی که اختلاف سایز بین زمان ۱ و ۲ ساعت خیلی معنی‌دار نبود. از این رو برای بررسی porosity داربست‌های تهیه شده در دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد که دارای سایز حفرات مطلوب بود ارزیابی شدند.



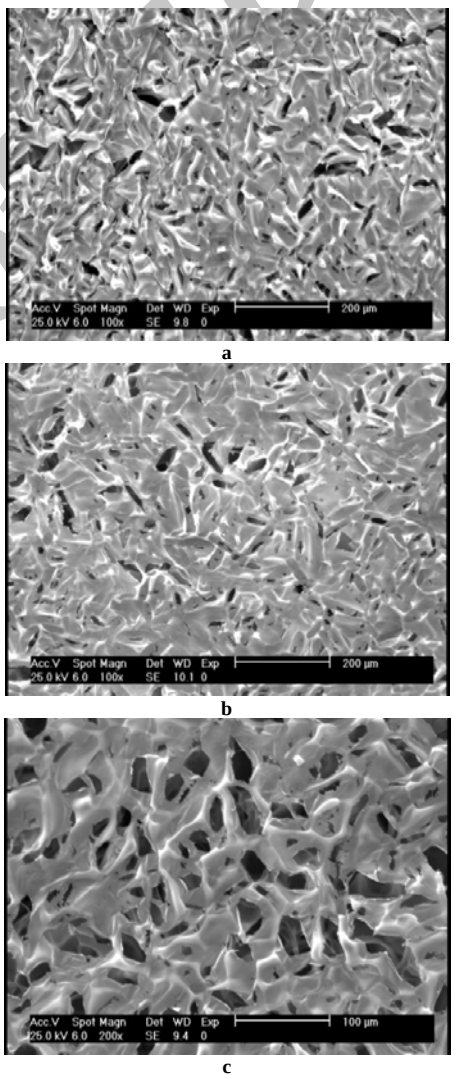
نمودار ۱- میزان سایز حفرات داربست برحسب مدت زمان (مرحله). داده‌ها حاکی از اختلاف معنی دار سایز حفرات در مدت زمان ۱ و ۴ ساعت از مرحلهٔ پیش انجماد می باشد ($p<۰/۰۵^{*}$؛ $p<۰/۰۰۱^{***}$)

Archive of SID
www.SID.ir

قابل ذکر است که زمان مرحلهٔ pre-freeze در تخلخل داربست نقش مهمی نداشته بلکه درصد مواد سازنده اهمیت دارد. شکل‌های ۱ تا ۳، تفاوت سایز و وجود ارتباط بین حفرات ساختار های کیتوزان-ژلاتین را در دما و زمان‌های متفاوت از مرحلهٔ پیش انجماد نشان می‌دهد. به دلیل تشابه تصاویر داربست های کیتوزان با کیتوزان-ژلاتین ازتکرار آن خودداری شده است.

Porosit

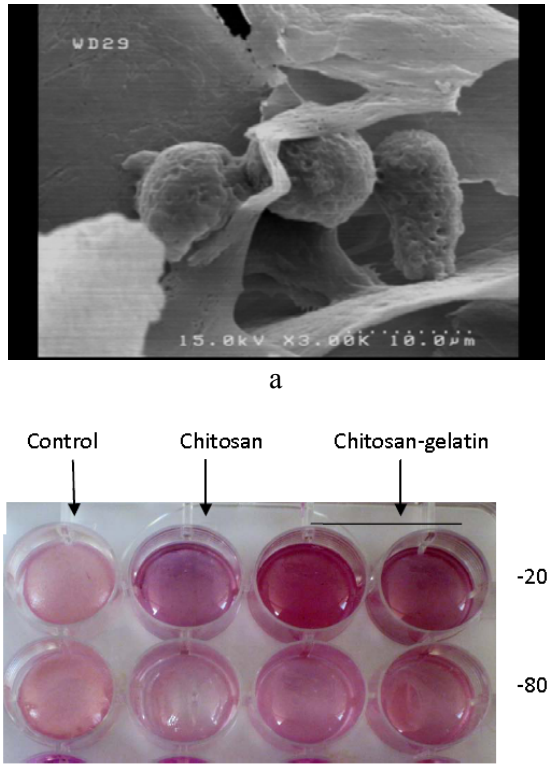
تخلخل داربست‌ها طبق روش ذکر شده و با سه بار تکرار اندازه گیری شد. میزان تخلخل پذیری در داربست کیتوزان برابر ۷۲/۳±۱/۱۵ و در داربست کیتوزان برابر ۸۵/۷±۲/۳۱ بود و آزمون نشان داد که این اختلاف به لحاظ آماری معنی دار است ($p<۰/۰۰۰۱$).



شکل ۳- میکروگراف های الکترونی داربست های کیتوزان-ژلاتین ایجاد شده در دمای 196- ودر زمانهای a) ۱، b) ۲ و c) ۴ ساعت از مرحلهٔ پیش انجماد. بزرگنمایی تصویر a) 62 X، b) 100 X و c) 200 X.

تست MTT

بررسی حیات و تأیید اتصال سلول به داربست با استفاده از تست MTT و نیز تصاویر SEM انجام شد. اختلاف رنگ نمونهٔ کنترل فاقد سلول و داربست حاوی سلول در شکل ۴ نشان داده شده است.



شکل ۴- (A) میکروگراف الکترونی سلولهای اپیتلیال پردهٔ آمنیون روی داربست. (B) در این شکل اتصال سلول های اپیتلیال به داربست های کیتوزانی و کیتوزان-ژلاتین که در ایجاد رنگ بیشتر نقش دارند تایید شده است، در ضمن اثر سایز بزرگتر حفرات (داربست های ایجاد شده در دمای ۲۰-) در افزایش اتصال سلولها به داربست به واسطهٔ اختلاف رنگ مشهود است.

بحث

تفاوت‌های بیولوژیک رفتاری بین سلول‌های موجود در بدن و سلولهای کشت شده در محیط in vitro تعدادی از محققین را بر آن داشت تا مطالعات خود را روی مدل‌های سه بعدی، که شرایط ریز محیط بافت‌های زنده را بهتر نشان می‌دهند متمرکز کنند. مدل‌های سه بعدی که برای شبیه‌سازی محیط‌های طبیعی (به ویژه ماتریکس خارج سلولی) طراحی شده‌اند، بر بسیاری از رفتارهای سلولی همچون توانایی در اتصال، مهاجرت و تمایز اثرگذارند. از جمله این تفاوت‌ها غلظت نسبتاً پایین

Archive of SID
www.SID.ir

لیگاندهای سطحی (اهداف اینتگرین‌های سلول) به ازای واحد سطح در بستر دوبعدی است، در حالی که مدل‌های سه‌بعدی اغلب شامل دسته لیگاندهای متراکم و فیبریلار است. هم‌چنین بسترهای دوبعدی نوعی پلاریزاسیون پشتی- شکمی (Dorsal-ventral) را به سلول تحمیل می‌کند که در شرایط in vivo و نیز مدل‌های سه بعدی مشاهده نمی‌شود. زیرا محیط‌های سه بعدی به سلول اجازه می‌دهند تا سلول از همهٔ سطوح خود به بستر متصل شده و نه تنها به عنوان یک حمایت‌گر فیزیکی عمل می‌کنند، بلکه با فراهم کردن اطلاعات مضاعف، سلول‌ها را وارد مسیرهای تمایزی معین می‌نمایند.

از مزایای دیگر محیط‌های سه بعدی، پراکنش اینتگرین‌های سطحی سلول بوده که در مسیرهای سیگنالینگ اثرگذار است. برای مثال اینتگرین‌ها یک نوع فعالیت تطابقی در پاسخ به سختی محیط (وابسته به ماهیت بستر) نشان می‌دهند و سطح بیان مولکول‌هایی چون پروتئین‌های اتصال کانونی (Focal FAP=Adhesion Proteins) شامل تالین، پاکسیلین و P130 را تغییر می‌دهند. از این رو مدل‌های سه بعدی با تقلید شرایط in vivo به ما اجازه می‌دهند تا فاکتورهای اختصاصی را در شرایط نزدیک به حالت فیزیولوژیک، با توجه به ابعاد، معماری و نیز پلاریتی سلول بررسی کنیم (۱۰).

از فاکتورهای مؤثر بر ویژگی‌های داربست‌ها و نیز توانایی اتصال و مهاجرت سلول در آن، اجزاء سازنده و غلظت آنها می‌باشد. در این تحقیق نخست با استفاده از کیتوزان و ژلاتین داربست‌های مناسب آماده سازی شد. مزایای استفاده از کیتوزان، زیست سازگاری، قابلیت جذب زیستی و عدم شکل گیری پاسخهای ایمنی علیه آن (اهداف پیوند) و در دسترس بودن آن می‌باشد. علاوه بر این، مولکول قندی کیتوزان با ایجاد اتصال متقاطع (Cross-link) موجب پایداری داربست شده و به ایجاد حفرات همگن در ساختار کمک می‌کند. ژلاتین نیز به دلیل دارا بودن سکانس شبه RGD (لیگاند بسیاری از اینتگرین‌های سلولی)، در بهبود اتصال سلول به داربست مؤثر بوده و ترکیب آن با کیتوزان به پراکنش لیگاندهای اینتگرین (RGD) در ساختار و ایجاد بستر مناسب برای کشت سلول کمک می‌نماید (۱۳-۱۱). مرحلهٔ اول ساخت داربست‌های کیتوزان-ژلاتین در دما و زمان‌های متفاوت از مرحلهٔ پیش انجماد بود. از آنجایی که سایز حفرات داربست وابسته به تغییرات دمایی و مدت زمان این مرحله است، با تغییر هر یک از این عوامل وان داربستی با سایز حفرات مناسب برای کشت سلول تهیه کرد (۱۳، ۱۴). با توجه به اینکه اتصال و گسترش سلول و حتی حیات آن متاثر از اندازه و ارتباط حفرات داربست می‌باشد، انتخاب درست سایز حفرات از اهمیت زیادی برخوردار است (۱۵، ۱۶). محدودهٔ ایده‌آل این سایز بسته به مواد مورد استفاده و نوع سلول متغیر است ولی در منابع گوناگون محدودهٔ ۱۵۰-۱۰۰ میکرون برای حمایت رشد و مهاجرت اکثر سلول‌ها مناسب است. به عنوان مثال مطالعه‌ای که روی بسترهای کیتوزان و ژلاتین صورت گرفت حاکی از کاهش قابل ملاحظهٔ حیات سلول‌های فیبروبلاست و اندوتلیال روی داربست‌هایی با سایز حفرهٔ ۸۰-۵۰ میکرون نسبت به داربست‌های کیتوزانی با اندازه حفرات ۱۵۰-۱۰۰ میکرون بود (۶). نتایج مشاهدات تصاویر میکروسکوپ الکترونی نشان داد که با کاهش دما، سایز حفرات کاهش معنی‌داری داشته و از سوی دیگر افزایش مدت زمان مرحلهٔ پیش انجماد به ویژه در ۳-۲ ساعت اول در افزایش اندازهٔ حفرات نقش دارد، به طوری که تفاوت بین مدت زمان ۱ و ۴ ساعت معنی‌دارتر بود (نمودار ۱). داربست‌های ایجاد شده در دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد سایز حفرات حدود ۱۰۰ میکرون را نشان دادند و برای مراحل بعدی مطالعه و کشت سلول انتخاب شدند. دومین عامل مهم، تخلخل داربست است که ارتباط چندانی با دما و مدت زمان مرحلهٔ پیش انجماد نداشته و غلظت اجزاء سازنده بر آن مؤثر است. تخلخل داربست‌ها نیز محاسبه شد و میانگین بالای ۷۰ درصد نتیجهٔ مورد قبولی بود.

از آنجایی که کاربرد داربست‌ها علاوه بر برآوردن اهداف in vitro، به صورت ایده‌آل می‌تواند جایگزین تشکیلات از دست رفته در طب ترمیمی باشد، لازم است تا ابتدا عملکرد آنها را در حفظ حیات و کارایی سلول‌ها بررسی کنیم. مرحلهٔ دوم مطالعه، بررسی حیات و اتصال سلول به داربست با استفاده از تصاویر SEM و تست MTT بود. نتایج MTT، تغییر رنگ بسترهای حاوی سلول را نسبت به نمونه‌های شاهد نشان داد. به دلیل جذب مقداری از رنگ فورمازان توسط داربست، تست MTT به شکل رایج انجام نشد، بلکه تایید اتصال سلول با مشاهدهٔ اختلاف رنگ بین داربست تحت کشت و شاهد به دست آمد.

نتایج این پژوهش بیانگر مناسب بودن داربست‌های کیتوزان-ژلاتین به منظور کشت سلول‌های اپیتلیال پردهٔ آمنیون و بهره گیری از آن در پژوهش‌های مهندسی بافت می‌باشد.

REFERENCES

1. Marcus AJ, Woodbury D. Fetal stem cells from extra-embryonic tissues: do not discard. J Cell Mol Med 2008; 12: 730-42.

Archive of SID

www.SID.ir

2. Lawrence BJ, Madihally SV. Cell colonization in degradable 3D porous matrices. Cell Adh Migr 2008; 2: 9-16.

3. Huyashi T. Biodegradable Polymer for Tissue Engineering. J Pro Polym Sci 1994; 19: 663-702.

4. Murphy CM, Haugh MG, O'Brien FJ. The effect of mean pore size on cell attachment, proliferation and migration in collagen-glycosaminoglycan scaffolds for bone tissue engineering. Biomaterials 2010; 31: 461-6.

5. Kean T, Roth S, Thanou M. Trimethylated chitosans as non-viral gene delivery vectors: cytotoxicity and transfection efficiency. J Control Release 2005; 103: 643-53.

6. Huang Y, Onyeri S, Siewe M, Moshfeghian A, Madihally SV. In vitro characterization of chitosan-gelatin scaffolds for tissue engineering. Biomaterials 2005; 26: 7616-27.

7. Zhao F, Yin Y, Lu WW, Leong JC, Zhang W, Zhang J, et al. Preparation and histological evaluation of biomimetic three-dimensional hydroxyapatite/chitosan-gelatin network composite scaffolds. Biomaterials 2002; 23: 3227-34.

8. Miki T, Lehmann T, Cai H, Stolz DB, Strom SC. Stem cell characteristics of amniotic epithelial cells. Stem Cells 2005; 23: 1549-59.

9. Gelinsky M, Welzel PB, Simon P, Bernhardt A, Konig U. Porous three-dimensional scaffolds made of mineralised collagen: Preparation and properties of a biomimetic nanocomposite material for tissue engineering of bone. J Chem Engineering 2007; 137: 84-96.

10. Even-Ram S, Yamada KM. Cell migration in 3D matrix. Curr Opin Cell Biol 2005; 17: 524-32.

11. Ma L, Gao CH, Mao ZH, Zhou J, Shen J, Hu X, et al. Collagen/chitosan porous scaffolds with improved biostability for skin tissue engineering. J Biomaterials 2003; 24: 4833-41.

12. Griffon D, Sedighi M, Schaeffer D, Eurell J, Johnson A. Chitosan scaffold: interconnective pore size and cartilage engineering. Acta Biomat 2006; 2: 313-20.

13. Shen F, Cui YL, Yang FL, Yao KD, Dong XH. A study on the fabrication of porous chitosan/gelatin network scaffold for tissue engineering. Poly Int 2000; 49: 1596-99.

14. Jing XI, Jing LI, Lin ZHU, Gong Y, Zhao N, Zhang X. Effect of quenching temperature and time on pore diameter of poly(3-hydroxybutirate-co-3-hydroxyhexanoate) porous scaffolds and MC3T3-E1 osreoblast response to the scaffolds. Tsinghua Science & Technology 2007; 12: 366-71.

15. Brien FJ, Harley BA, Yannas IV, Gibson LJ. The effect of pore size on cell adhesion in collagen-GAG scaffolds. Biomaterial 2005; 26: 433-41.

16. O'Brien FJ, Harley BA, Waller MA, Yannas IV, Gibson LJ, Prendergast PJ. The effect of pore size on permeability and cell attachment in collagen scaffolds for tissue engineering. Technol Health Care 2007; 15: 3-17.

Archive of SID

www.SID.ir