

تاثیر پلی ساکارید سیانوباکتری *Nostoc. sp* ISC 113 بر میزان تکثیر و چسبندگی سلول های اندوتلیال به منظور ترمیم رگ

ام فروه ملکی^۱، مهروز دزفولیان^۲

۱- کارشناس ارشد گروه میکروبیولوژی، دانشکده علوم، واحد کرج، دانشگاه آزاد اسلامی، البرز، ایران.

۲- استادیار گروه میکروبیولوژی، دانشکده علوم، واحد کرج، دانشگاه آزاد اسلامی، البرز، ایران. mehrdezfulian@yahoo.com

تاریخ دریافت: ۹۴/۱۱/۲۸ تاریخ پذیرش: ۹۵/۲/۱۰

چکیده

زمینه و هدف: کاربردهای مواد خارج سلولی موجودات دریایی در سطح وسیعی رو به گسترش است. از جمله این مواد پلی ساکاریدها هستند. بخشی از موادی که سیانوباکتری ها ترشح می کنند پلی ساکارید است. در مطالعه حاضر پلی ساکارید سیانوباکتری *Nostoc. sp* ISC 113 به عنوان داربست سلولی بر روی سلول های اندوتلیال مورد ارزیابی قرار گرفت. روش کار: پلی ساکارید از سیانوباکتری *Nostoc. sp* ISC 113 استخراج شد. داربست های سلولی از این پلی ساکارید به همراه کلاژن و هیالورونیک اسید ساخته و تاثیر آن بر رشد و تکثیر به وسیله سنجش MTT و میزان کلنی زایی سلول ها در حضور پلی ساکاریدها با استفاده از روش سنجش کلنی بررسی گردید و چسبندگی رده سلولی HUVEC در شرایط *in vitro* به وسیله رنگ آمیزی کریستال ویوله و مطالعات میکروسکوپی ارزیابی شد. یافته ها: داده های به دست آمده از سنجش MTT نشان داد که بستر ساخته شده از پلی ساکارید سیانوباکتری *Nostoc* سبب افزایش تکثیر، چسبندگی و کلنی زایی در سلول های HUVEC می شود. نتیجه گیری: پلی ساکارید سیانوباکتری *Nostoc* می تواند به عنوان پلی مر طبیعی جهت ساخت داربست های سلولی و ترمیم مویرگ ها مورد استفاده قرار گیرد.

واژه های کلیدی: *Nostoc. sp* ISC 113، پلی ساکارید، داربست، رده سلولی HUVEC، سنجش MTT.

مقدمه

نداشتن یک ساختار اولیه برای شروع روند رشد و درعین حال محدودیت حجم بافتی و تعداد سلول مورد نیاز برای کاشت موفقیت آمیز در داخل بدن از مهم ترین مسایل است، چرا که فاصله سلول ها از شبکه های مویرگی نباید بیش از چند میکرومتر باشد، تا به مبادله مواد غذایی و هم چنین ضایعات حاصل از سوخت و ساز سلولی پرداخته و امکان ادامه حیات را داشته باشند (۲۳). مهندسی بافت روشی است که در آن سلول ها از یک بیمار گرفته شده و پس از کشت و افزایش تعداد، آن ها را در روی یک داربست مناسب کشت می دهند. تحریکات مناسب شیمیایی، زیستی، مکانیکی و الکتریکی اعمال می شود و طی مدت زمان کوتاهی

یکی از اجزای اصلی در مهندسی بافت داربست، سلول ها و فاکتورهای رشد هستند. داربست یک ساختار سه بعدی است که به عنوان چارچوبی برای هدایت سلول ها مورد استفاده قرار می گیرد و جایگزینی برای ماتریکس خارج سلولی محسوب می شود. سلول ها به درون داربست نفوذ کرده و با توجه به سیگنال های فیزیکی و شیمیایی که در محیط اطراف آن ها قرار دارد شروع به رشد، تمایز، تکثیر و مهاجرت نموده و در صورت مساعد بودن شرایط محیطی ماتریکس خارج سلولی را ترشح و بافت جدید را ایجاد می نمایند (۴). بحث معلق بودن سلول ها،

گلیکوز آمینو گلیکان ها هستند، مورد توجه قرار گرفته- اند (۳۰، ۷). داربست های زیست سازگار مختلفی تاکنون برای ترمیم بافت ها ساخته شده است. مهم ترین موادی که امروزه برای ساخت رگ های مصنوعی استفاده می شوند عبارتند از پلی اتیلن، پلی تترافلورواتیلن و ترفنالات. با این حال، با توجه به ایجاد لخته و پس زدن، هیچ یک از این مواد برای تولید گرافت کمتر از ۶ میلی متر قطر مناسب نیست. گرافت های کمتر از ۶ میلی متری برای ورید سافن، ورید پستانی داخلی و یا شریان رادیال به عنوان یک جایگزین عروقی مورد نیاز می باشد (۲۷). پلیمرهای کلاژن، گلیکوز آمینو گلیکان، پلی ساکاریدها شامل آلژینات، کیتوزان، هیالورونات از مواد مورد استفاده در داربست سلولی هستند (۲۵، ۲۱). برای افزایش پایداری پلیمرهای پلی ساکاریدی از ترکیب گلیکوز آمینو گلیکان و هیالورونیک اسید استفاده می شود. مواد طبیعی معمولاً سازگاری زیستی بسیار خوبی دارند. بنابراین سلول ها به راحتی و با زیستایی عالی در آن ها قرار گرفته و رشد می کنند (۵). سلول های اصلی دخیل در فرآیند رگ زایی سلول های اندوتلیالی هستند که عروق خونی را پوشانده و تقریباً تمام ساختمان مویرگ های خونی را تشکیل می دهند. از حفظ و رشد سلول های HUVEC در محیط کشت می توان جهت ارزیابی عوامل مختلف موثر شامل مهارکننده ها و القاکننده های رگ زایی استفاده کرد (۹). با توجه به مطالب مذکور، هدف از انجام این تحقیق بررسی پلی مر موجود در کپسول خارجی نوستوک (*Nostoc . sp* ISC 113) به عنوان منبع در ساخت داربست های زیست سازگار بوده، تا امکان استفاده از این پلی ساکاریدها در مهندسی بافت بررسی شود.

مواد و روش ها

بافت جدید تشکیل می گردد. به طور نظری، با این روش ما قادر به ساخت هر گونه بافتی خواهیم بود (۱۷). اجزای اصلی مهندسی بافت عبارتند از: سلول، داربست، فاکتورهای رشد (۳۲). Holt و همکاران در سال ۲۰۰۳، و Tonnesen و Karlsen در سال ۲۰۰۲ گزارش کردند که پلی ساکاریدها به دلیل سازگاری زیستی و هزینه پایین آن ها نقش مهمی در کاربردهای پزشکی و داروسازی به ویژه در زمینه انتقال دارو دارند (۳۵، ۱۳). سیانوباکتری ها به صورت تک سلولی، کلنی و ریشه ای مشاهده می شود. در انواع کلنی، سلول ها در داخل یک زمینه پلی ساکاریدی قرار گرفته اند. نوستوک سیانوباکتری از جنس سیانوباکتری های تثبیت کننده نیتروژن و جز خانواده Nostocaceae است (۲، ۱). با استفاده از آگزوپلی ساکاریدهای به دست آمده از باکتری های موجود در دریا های عمیق توانسته اند استخوان آسیب دیده در رت را ترمیم دهند. در حالی که حیوانات کنترل با یک کلاژن ساده بهبود قابل توجهی پیدا نموده اند. این پلی ساکاریدها در طول ترمیم به عنوان یک ماتریکس موقت خارجی و زیست سازگار، ذخیره سازی ماکرومولکول های ماتریکس خارج سلولی و مهاجرت هر دو نوع سلول استئوبلاست و اندوتلیال را حمایت و همراهی می کنند. از این رو از این آگزوپلی ساکاریدها می توان به عنوان یک داربست زیستی مفید در پوست و مهندسی ترمیم استفاده کرد (۳۶). از سوی دیگر هیالورونیک اسید نقش زیادی در ترمیم بافت و بازسازی آن دارد. هیالورونیک اسید در هنگام ایجاد زخم، فضای مناسبی را جهت مهاجرت سلول ها ایجاد می کند. چنین اتفاقی در دوران جنینی، به مهاجرت سلول ها در زمان تشکیل جنین کمک می کند (۱۴). میکروارگانسیم های دریایی به عنوان گزینه های جدید در بیوتکنولوژی برای تولید پلی ساکاریدهای فعال زیستی که دارای خواص

نمودارها بر اساس غلظت پلی ساکاریدها در محور افقی و میزان زیستایی سلول ها در محور عمودی رسم شد.

بررسی میزان چسبندگی سلول ها در حضور پلی ساکاریدهای استخراج شده از سیانوباکتری ها
بعد از مشخص شدن غلظتی از پلی ساکارید که بیشترین رشد و زنده ماندن سلول ها در آن مشاهده شد، تست چسبندگی سلول ها در همان غلظت انجام گرفت. در پلیت های ۹۶ خانه ۱۰۰ میکرولیتر سوسپانسیون سلول به همراه پلی ساکاریدهای مربوطه ریخته و در انکوباتور قرار گرفت. بعد از ۲۴ ساعت پلیت ها از انکوباتور خارج شده و رویه سلول ها خالی و ۵۰ میکرولیتر فرمالدهید ۴ در هر خانه جهت تثبیت سلول ها ریخته شد. بعد از ۵ دقیقه فرمالدهید از روی سلول ها خالی شده و ۵۰ میکرولیتر کریستال ویوله افزوده و به مدت ۲ الی ۵ دقیقه در پلیت باقی می ماند. بعد از گذشت این زمان کریستال ویوله خالی شده و با ۱۰۰ میکرولیتر PBS یک درصد دو مرتبه خانه های پلیت مورد شستشو و عکسبرداری انجام گردید (۱۸).

بررسی توانایی ایجاد کلنی های جدید (colony assay)

با توجه به نتایج تست های MTT، غلظتی از پلی ساکارید که سلول ها در آن توانایی زنده ماندن بیشتری داشتند به دست آمد. تست سنجش کلنی در همان غلظت انجام تا سطح توانایی ایجاد کلنی های جدید سلولی در حضور این پلی ساکارید ها محاسبه شود. برای بررسی توانایی تکثیر سلول ها در ایجاد کلنی های جدید محیط کشت سلولی به همراه افزودن آگارز ۲ درصد استریل در پلیت های شش خانه آماده و سلول های تریپسینه شده، مورد شمارش قرار گرفت و به رقت ۱۵۰۰ سلول در هر ۱۰۰ میکرولیتر رسانده شد. پس از ۱۴ روز کلونی های تشکیل شده زیر میکروسکوپ معکوس شمارش گردید (۱۰).

استخراج پلی ساکارید از سیانوباکتری *Nostoc. sp* ISC 113 به وسیله روش فیشر انجام شد (۸). سلول های HUVEC از بانک سلول انستیتو پاستور ایران اخذ گردید و از محیط کشت RPMI با ۱۰ درصد سرم جنین گاوی (FBS) به همراه آنتی بیوتیک پنی سیلین - استرپتومایسین استفاده شد. برای بررسی تاثیر پلی ساکارید سیانوباکتری ها، ۱، ۱/۵، ۲، ۲/۵ و ۳ میلی گرم بر میلی لیتر از پلی ساکارید تهیه و تاثیر آن بر روی سلول ها مورد بررسی قرار گرفت. دوزهای بالاتر برای سلول ها کشنده بودند (۳). تست ها در پلیت های ۹۶ خانه انجام گرفت. در هر خانه ی پلیت ۱۰۰ میکرولیتر سوسپانسیون سلولی ریخته شد. سپس محلول پلی ساکارید در غلظت های متفاوت اضافه گردید. در این تست ها از پلی ساکارید هیالورونیک اسید و کلاژن I به عنوان کنترل استفاده گردید.

بررسی میزان بقاء سلول ها و سمیت پلی ساکاریدها
آزمایش MTT که یک روش رنگ سنجی است که بر اساس احیا و شکسته شدن کریستال های زرد رنگ تترازولیوم با فرمول شیمیائی ۳ و ۴ و ۵- دی متیل تیازول ۲ و ۵- دی فنیل تترازولیوم بر مید به وسیله آنزیم سوکسینات دهیدروژناز و تشکیل کریستال های آبی رنگ نامحلول انجام شد. در این تست ها سلول ها در بسترهایی از هیالورونیک اسید، کلاژن و پلی ساکاریدهای سیانوباکتری ها کشت داده شدند. در هر تست از غلظت های مختلفی از هیالورونیک اسید، کلاژن و پلی ساکارید استفاده و میزان رشد و تکثیر سلول ها در حضور مقادیر مختلف این سه ماده با دستگاه الایزا ریدر در طول موج ۵۷۰ نانومتر سنجش گردید (۲۰).

$$\text{میزان زیستایی سلول ها} = 1 - \frac{\text{میانگین OD تست}}{\text{میانگین OD کنترل}} \times 100$$

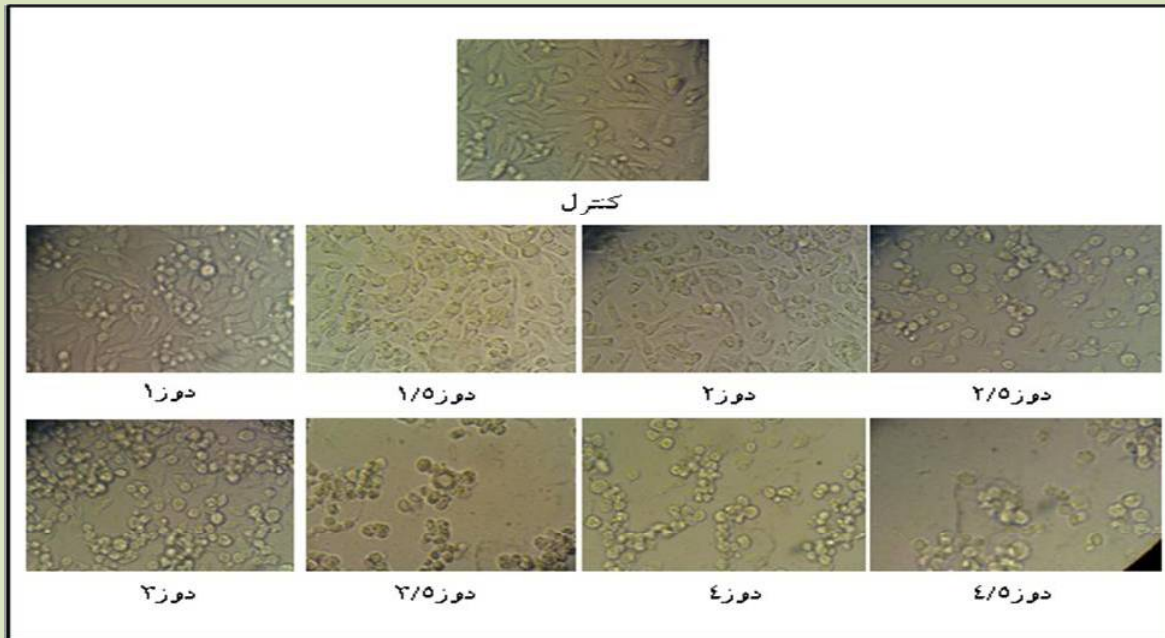
میزان زیستایی سلول ها = ۱۰۰ - میزان سایتوتوکسیتی

نتایج

آزمون MTT

بستر ساخته شده از هیالورونیک اسید بر روی

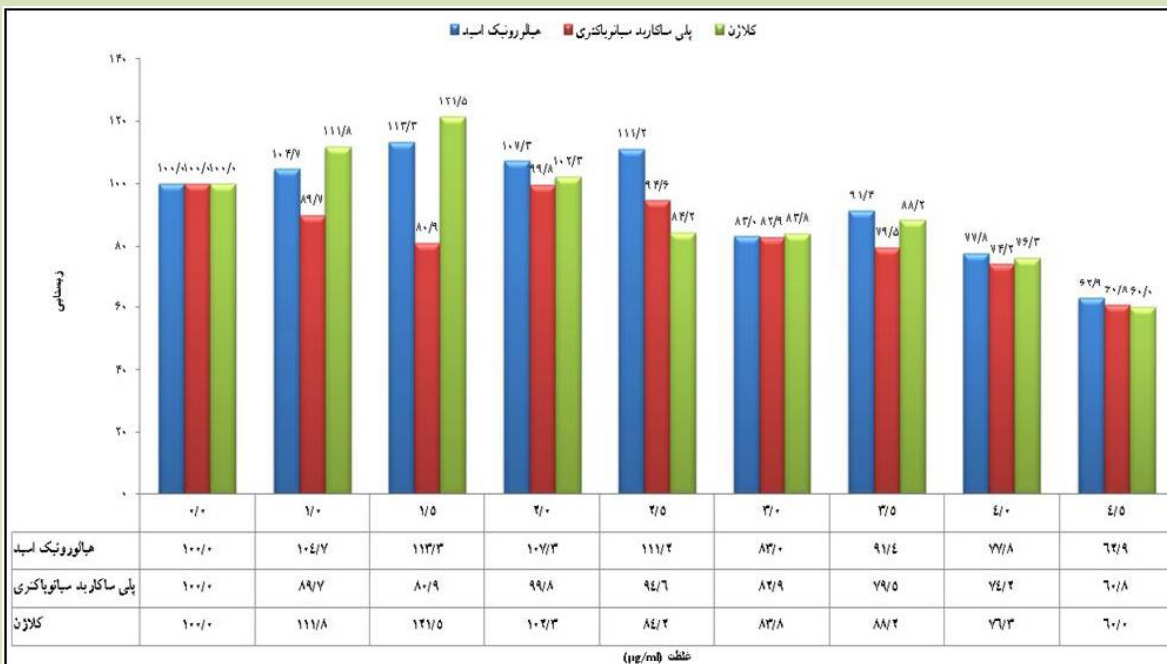
سلول های اندوتلیال HUVEC با غلظت های ۱ الی ۴/۵ میکروگرم در میلی لیتر اثر داده شد (شکل ۱).



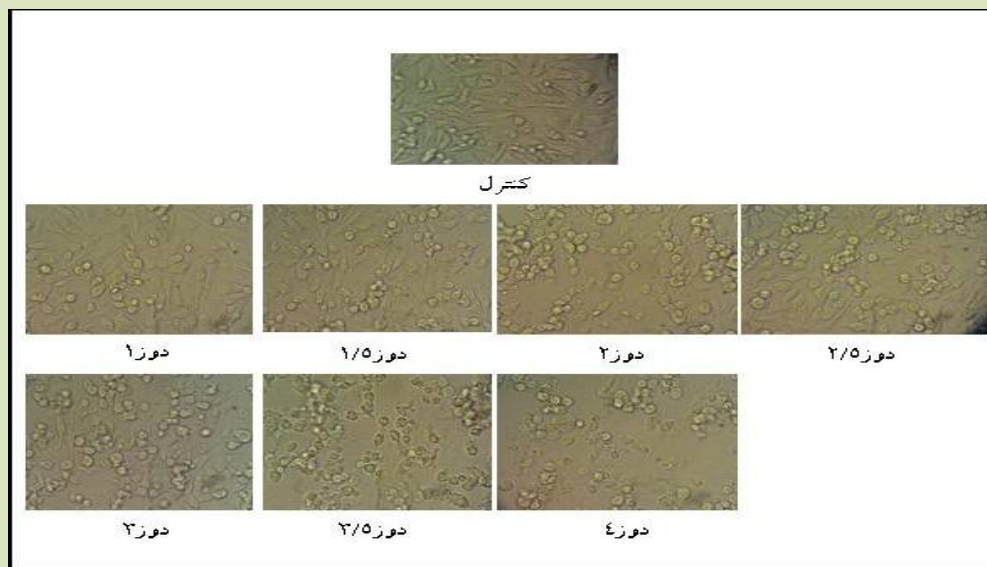
شکل ۱- اشکال سلول های HUVEC ۲۴ ساعت پس از مجاورت با غلظت های مختلف از هیالورونیک اسید با میکروسکوپ معکوس (۶۰۰ برابر)

مشاهده شد (شکل ۳). در مرحله بعد ترکیب این پلی- ساکارید با مواد پایه، یعنی هیالورونیک اسید و کلاژن I مورد بررسی قرار گرفت. برای این منظور بسترهایی از غلظت های مساوی از پلی ساکارید *Nostoc . sp* ISC 113 و هیالورونیک اسید ساخته شد (شکل ۴). در بسترهای ساخته شده از پلی ساکارید *Nostoc . sp* ISC 113 با هیالورونیک اسید بیشترین رشد و تکثیر سلول- های HUVEC در غلظت ($\mu\text{g/ml}$) ۱/۵ از این پلی- ساکارید و هیالورونیک اسید صورت گرفت (نمودار ۲). در بستر ساخته شده از پلی ساکارید *Nostoc . sp* ISC 113 با کلاژن بیشترین رشد و تکثیر سلول های HUVEC در غلظت ($\mu\text{g/ml}$) ۱ و ۱/۵ مشاهده شد (شکل ۵).

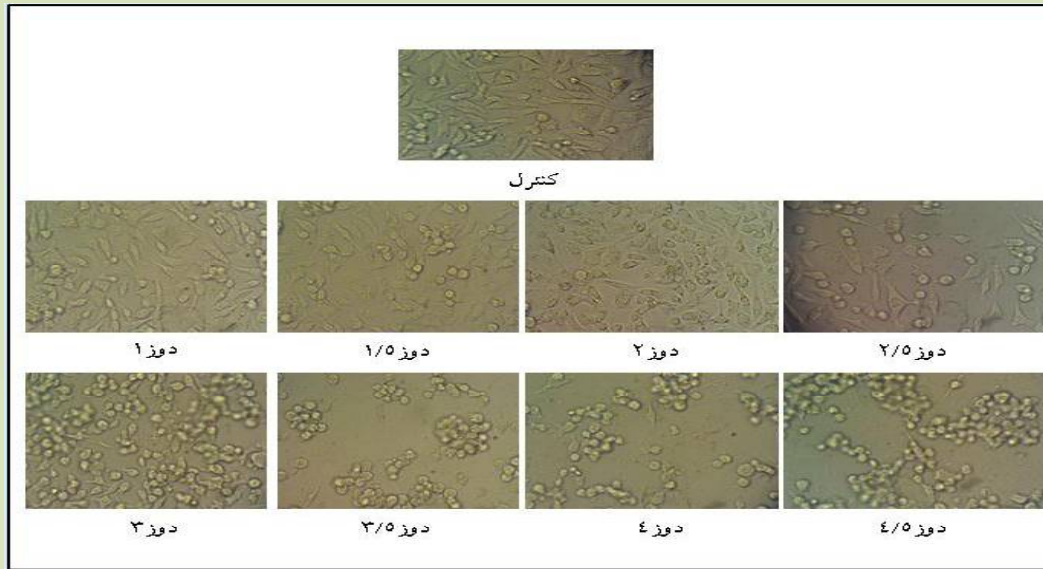
بیشترین رشد و تکثیر سلول ها در غلظت های ($\mu\text{g/ml}$) ۱ تا ۲/۵ صورت گرفت و افزایش غلظت هیالورونیک اسید سبب کاهش تکثیر سلول های اندوتلیال گردید. در بستر ساخته شده از کلاژن بیشترین رشد و تکثیر سلول ها در غلظت های ($\mu\text{g/ml}$) ۱ تا ۲ مشاهده شد (شکل ۲). در این بسترها نیز افزایش غلظت کلاژن سبب کاهش در میزان تکثیر سلول های اندوتلیال می- گردد. تاثیر پلی ساکارید *Nostoc . sp* ISC 113 بر تکثیر سلول HUVEC نشان داد این پلی ساکارید در بیشتر غلظت ها سبب کاهش رشد سلول های HUVEC می گردد (نمودار ۱). در بستری که از پلی ساکارید *Nostoc . sp* ISC 113 ساخته شد، بیشترین رشد و تکثیر سلول های HUVEC در غلظت ($\mu\text{g/ml}$) ۲ صورت گرفت و در بیشتر غلظت ها کاهش رشد



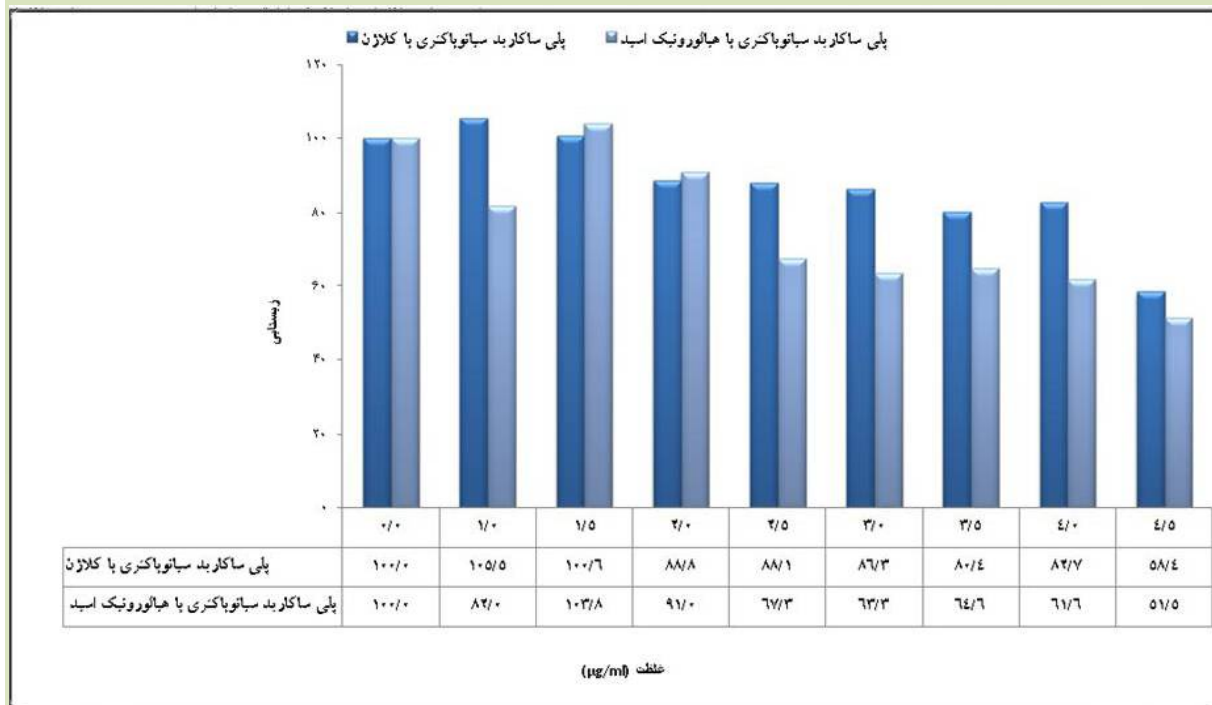
نمودار ۱- مقایسه تأثیرات پلی ساکارید سیانوباکتری *Nostoc .sp* ISC 113، هیالورونیک اسید و کلارن بر روی سلول های HUVEC



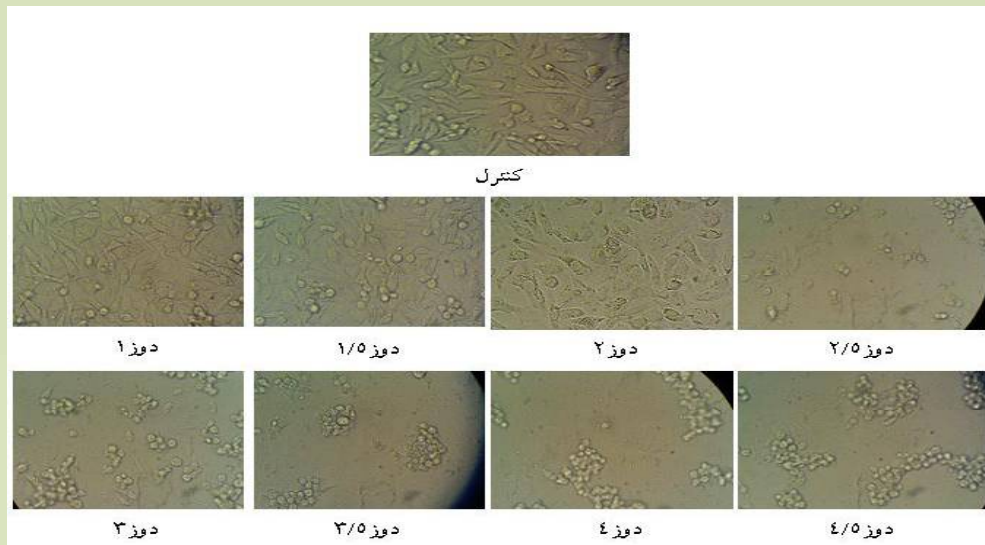
شکل ۲- اشکال سلول های HUVEC ۲۴ ساعت پس از مجاورت با غلظت های مختلف از کلارن با میکروسکوپ معکوس (بزرگنمایی ۶۰۰ برابر)



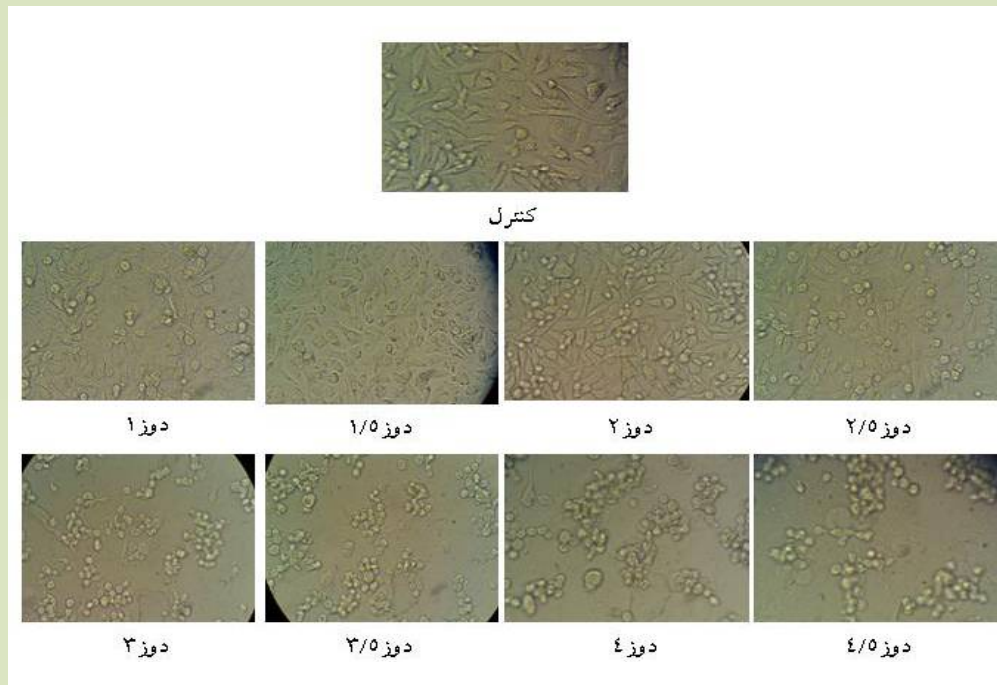
شکل ۳- اشکال سلول های HUVEC ۲۴ ساعت پس از مجاورت با غلظت های مختلف از پلی ساکارید *Nostoc . sp* ISC 113 با میکروسکوپ معکوس (بزرگنمایی ۶۰۰ برابر)



نمودار ۲- مقایسه تأثیرات ترکیب پلی ساکارید سیانوباکتری *Nostoc . sp* ISC 113 با هیالورونیک اسید و کلاژن بر روی سلول های HUVEC



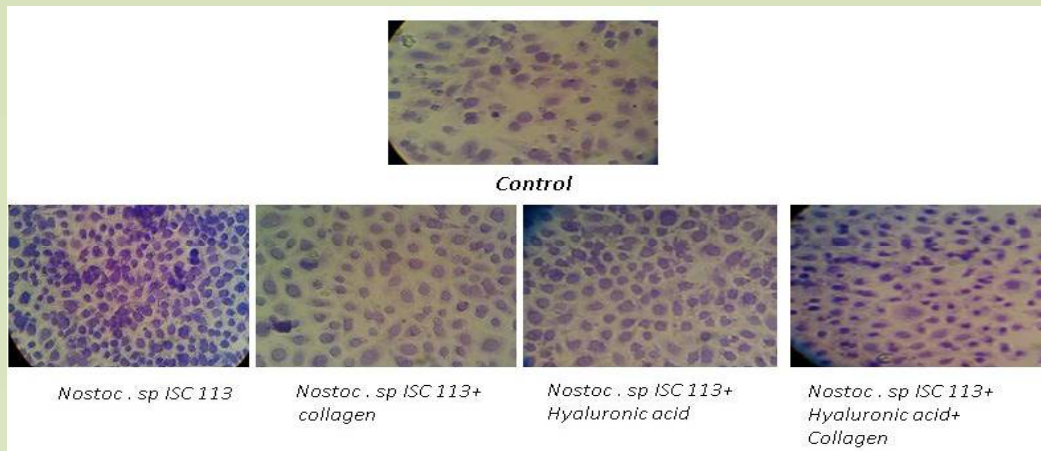
شکل ۴- اشکال سلول های HUVEC ۲۴ ساعت پس از مجاورت با غلظت های مختلف از ترکیب پلی ساکارید *Nostoc .sp* و هیالورونیک اسید با میکروسکوپ معکوس (بزرگنمایی ۶۰۰ برابر)



شکل ۵- اشکال سلول های HUVEC ۲۴ ساعت پس از مجاورت با غلظت های مختلف از ترکیب پلی ساکارید *Nostoc .sp* و کلاژن با میکروسکوپ معکوس (بزرگنمایی ۶۰۰ برابر)

تست چسبندگی
 میزان چسبندگی سلول های HUVEC در حضور پلی ساکاریدهای سیانوباکتری و هیالورونیک اسید و کلاژن مقایسه و این مقایسه نشان داد که پلی ساکارید *Nostoc .sp* ISC 113 باعث افزایش سطح چسبندگی سلول های HUVEC شد (شکل ۶).

تست چسبندگی
 میزان چسبندگی سلول های HUVEC در حضور پلی ساکاریدهای سیانوباکتری و هیالورونیک اسید و کلاژن مقایسه و این مقایسه نشان داد که پلی ساکارید



شکل ۶- چسبندگی سلول های HUVEC در حضور پلی ساکارید *Nostoc . sp ISC 113* ، هیالورونیک اسید و کلاژن با میکروسکوپ معکوس (بزرگنمایی ۶۰۰ برابر)

سنجش کلنی

بنابراین تست سنجش کلنی هم در این غلظت انجام شد. تعداد کلنی ها، در حضور پلی ساکارید سیانوباکتری نوستوک نسبت به حالت کنترل (در فقدان پلی ساکاریدها) افزایش معنی داری را نشان داد. پلی ساکارید استخراج شده از نوستوک سبب افزایش توان کلون زایی در سلول های HUVEC گردید.

با انجام تست کلنی زایی، تعداد کلنی های ایجاد شده در پلیت های شش خانه با استفاده از میکروسکوپ مورد شمارش قرار گرفت. برای این کار هر بخش پلیت به ۱۶ قسمت تقسیم و مورد شمارش قرار گرفت. با توجه به نتایج تست MTT به طور میانگین در غلظت (۱/۵ $\mu\text{g/mL}$) از پلی ساکارید بیشترین میزان رشد و تکثیر سلول ها صورت گرفت.

جدول ۱- میانگین کلنی های ایجاد شده در غلظت (۱/۵ $\mu\text{g/mL}$) افزایش غلظت ها تفاوت معنی داری را نشان ندادند.

انواع مواد موثر	خطای استاندارد	میانگین کلنی ها \pm انحراف معیار
کنترل	۸/۰۲۱	۱۳۵۲/۰۰ \pm ۱۳/۸۹۲
پلی ساکارید	۱۲/۲۵۲	۲۰۰۶/۳۳ \pm ۲۱/۲۲۱
کلاژن	۱۴/۶۷۸	۱۴۷۲/۳۳ \pm ۲۵/۴۲۳
هیالورونیک اسید	۴۵/۳۴۷	۱۴۰۲/۰۰ \pm ۱۷/۵۴۳
پلی ساکارید+ کلاژن	۱۰/۱۳۸	۱۶۴۲/۳۳ \pm ۱۷/۵۵۹
پلی ساکارید+هیالورونیک اسید	۴۴/۹۰۹	۱۷۱۹/۳۳ \pm ۷۷/۷۸۴
پلی ساکارید+هیالورونیک اسید+ کلاژن	۳۹/۱۹۳	۱۴۵۸/۳۳ \pm ۶۷/۸۸۵

میکروارگانسیم های دریایی و مزایای آن ها اثبات شده است (۱۵). پلی ساکاریدهای تولید شده توسط باکتری-ها، در دیواره سلولی نقش ساختاری و حفاظتی دارند. Cerning در سال ۱۹۹۵ گزارش کرد که در بیرون سلول این پلی ساکاریدها یک لایه چسبناک به نام کپسول را تشکیل می دهند که به طور کامل آن را داخل محیط به صورت یک ماده لزج ترشح می کنند

بحث و نتیجه گیری

امروزه در مهندسی بافت تلاش می شود از پلی- مرهای طبیعی جهت ساخت داربست سلولی استفاده شود. پلی مرهای مصنوعی به دلیل داشتن عوارض بالا مشکل ساز هستند. یکی از موادی که بسیار مورد توجه قرار گرفته است پلی مرهایی با ساختار پلی ساکاریدی می باشد. تولید پلی ساکارید فراوان توسط

سال ۱۹۹۹ یک نوع پلی ساکارید با عنوان HE800 از نوعی باکتری موجود در عمق دریا به نام *Vibrio diabolicus* استخراج کردند. این محققان تاثیر این ماده را روی سلول های فیروبلست انسانی مطالعه کردند. این تحقیق نشان داد که سلول های فیروبلست در یک محیط دو بعدی بعد از هضم ماتریکس خارج سلولی اطراف آن تکثیر و مهاجرت می کنند (۲۹).

Helary و همکاران در سال ۲۰۰۵ در ادامه پژوهش بالا تکثیر و مهاجرت فیروبلست ها را در سراسر مناطق بافت همبند در طول مدت کشت مورد مطالعه قرار دادند (۱۲). Slevin و همکاران در سال ۲۰۰۷ اعلام کردند که الیگوساکاریدهای هیالورونیک اسید تکثیر سلول های اندوتلیال، مهاجرت و تمایز را تحریک می کند. این پلی ساکاریدها می توانند به طور مفید در درمان بافت و به عنوان عوامل دارویی و بیومواد برای ترمیم و مهندسی بافت استفاده شوند (۳۳). Simon- Colin و همکاران در سال ۲۰۰۸ و Guezennec و همکاران در ۲۰۰۳ در میان میکروارگانسیم های موجود در عمق دریا، طیف گسترده ای از باکتری ها را استخراج کردند تا ترکیبات تولیدی آن ها مانند پلی- مرها و پلی ساکاریدها (اگزوپلی ساکاریدها) مورد بررسی قرار گیرد (۳۱، ۱۱). مطالعه حاضر نشان داد که می توان از بسترهای ساخته شده از هیالورونیک اسید و کلاژن I و پلی ساکارید سیانوباکتری نوستوک *Nostoc sp* ISC 113. ترکیبات طبیعی و ساختار های موثر و کنترل شده ای برای ترمیم عروق ساخت. این پلی ساکارید از نظر تاثیر بر رشد و تکثیر و چسبندگی سلول های HUVEC ارزیابی شد. تاثیر پلی ساکاریدهای این نوع از سیانوباکتری ها بر رشد و تکثیر سلول ها تا به حال مورد بررسی قرار نگرفته بود. این مطالعه نشان داد پلی ساکارید تولید شده توسط این سیانو باکتری، باعث کاهش مقدار تکثیر می شود، هرچند که این کاهش

که می تواند به عنوان یک چسبنده زیستی استفاده شود (۶). طبق گزارشات Sutherland در سال ۱۹۹۸، Otero در سال ۲۰۰۳ و Rehm در سال ۲۰۱۰ طبیعت زیست سازگار و غیرسمی بعضی از این اگزوپلی ساکاریدها ما را بر آن داشته است که از آن ها در کاربردهای پزشکی فراوان به عنوان داربست یا ماتریکس در مهندسی بافت یا حامل دارو و پانسمان زخم استفاده کنیم. در نتیجه این موضوع باعث جذاب- تر شدن این پلی ساکاریدها در مقایسه با پلی- ساکاریدهای به دست آمده از گیاهان و ریز جلبک ها می شود. Rehm بیان کرد که بعضی از این بیوپلی مرها در داخل بدن به تدریج تخریب می شوند که همین موضوع آن ها را برای جایگزینی بافت و کنترل رهایش دارو مناسب می کند (۳۴ ۲۸ ۲۲). Parker و همکاران در سال ۱۹۹۶ بیان کردند که سیانوباکتری ها مانند طیف گسترده ای از میکروارگانسیم های دیگر، قادر به سنتز و ترشح مواد پلی مری خارج سلولی که عمدتاً از هتروپلی ساکاریدها هستند، تشکیل شده اند. این اگزوپلی ساکاریدها می تواند با سطح سلول پیوند داشته باشد و به عنوان پوشش و ماده چسبنده عمل کند یا داخل محیط احاطه کننده وارد شوند (۲۴). Lewis (۱۶) در سال ۱۹۵۶ تعدادی از *Chlamidomonas spp* را برای تولید پلی ساکارید خارج سلولی مورد آزمایش قرار داد. مفیدترین آن ها *C. mexicana* است که ۲۵ درصد بازده تولید کل آن ها پلی ساکارید است.

Moore و Tischer (۱۹) در سال ۱۹۶۴ هم چنین سطوح بالای تولیدات خارج سلولی را برای تعدادی از جلبک های سبز- آبی گزارش کردند. Ramus در سال ۱۹۷۲ گزارش کرد جلبک قرمز *Porphyridium cruentum* و *P. aeruginum* به علت این که مقدار زیادی پلی ساکاریدهای خارج سلولی تولید می کنند، ارزش تجاری دارند (۲۶). Rougeaux و همکاران در

بررسی قرار گرفت، که تا به امروز تاثیر پلی ساکارید-های آن ها بررسی نشده بود. این نمونه سیانوباکتری از چاه های نفتی توسط اساتید ایرانی جدا سازی، شناسایی و نام گذاری شده است.

معنی دار نیست اما در عوض سبب افزایش چسبندگی سلول های اندوتلیال و افزایش توان کلون زایی سلول ها شد که این دو مورد برای ساخت یک داربست که بتواند در ترمیم شرکت کند، ویژگی های بسیار ارزشمندی می باشد. در این پژوهش سیانوباکتری مورد

منابع

10. Franken, N.A., Rodermond, H.M., Stap, J., Haveman, J. (2006). Clonogenic assay of cells in vitro. *Nat Protoc*, 1(5); 2315-9.
11. Guezennec, J. (2003). From extreme environments to biologically active exopolysaccharides. *Commun Agric. Appl. Biol. Sci*, 68; 227-234.
12. Helary, C., Foucault-Bertaud, A., Gaston Godeau, G., Coulomb, B., Giraud Guille, M. M. (2005). Fibroblast populated dense collagen matrices and cell migration. cell density and metalloproteinases expression. *Biomaterials*, 26; 1533-1543.
13. Holte, O., Onsøyen, E., Myrvold, R., Karlsen, J. (2003). Sustained release of water-soluble drug from directly compressed alginate tablets. *Eur. J. Pharm. Sci*, 20; 403-407.
14. Juhlin, L. (1997). Hyaluronan in Skin. *J. Int. Med*, 242; 61-66.
15. Laurienzo, P. (2010). Marine polysaccharides in pharmaceutical applications. *Mar. Drugs*, 8; 2435-2465.
16. Lewis, R A. (1956). Extracellular polysaccharides of green algae. *Can. J. Microbiol*, 2; 665-672.
17. Liu, C., Xia, Z., Czernuszka, J. T. (2007). Design and development of three-dimensional scaffolds for tissue engineering. *Chem Eng Research Design*, 85(7); 1051-64.
18. Morris, MC, Depollier, J., Mery, J., Heitz, F. (2001). A peptide carrier for the delivery of biologically active proteins into mammalian cells. *Nature Biotechnology*, 19; 1173 - 1176.
19. Moore, B. G., Tischer, R. G. (1964). Extracellular polysaccharides of algae: effects on life-support system. *Science*, 145; 586-587.
20. Mosmann, T. J. (1983). Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *Immunol. Methods*, 65; 55-63.
21. Nettles, D., Elder, S., Gilbert, J. (2002). Potential use of chitosan as a cell scaffold material for cartilage tissue engineering. *Tissue Eng*, 8; 1009-16- 27.
- ۱-ریاحی، ح. ۱۳۷۸. جلبک شناسی، دانشگاه الزهراء. چاپ سوم. ۸۱-۲۴۳۸م.
- ۲-شکروی، ش، سلطانی، ن، بافته چی، ل. ۱۳۷۸. سیانوباکتری، دانشگاه آزاد اسلامی واحد گرگان. چاپ اول. ص ۱۲۳، ۲۵۵۷۰.
- ۳-هواس بیگی، م، دزفولیان، م، سلطانی، ن، الهی، ف. ۱۳۹۳. بررسی خصوصیات ساختاری و تاثیرات ضد سرطانی پلی ساکاریدی استخراج شده از سیانوباکتری های *Nostoc . sp* ISC101 و *Nostoc . sp* ISC26 بر روی رده سلولی لنفوبلاستوئید (LCL). فصلنامه گیاه و زیست بوم. شماره ۳۱. ۲۷-۳۴.
4. Akbari, A., Ghavimi, S., Solati, H.M., Ebrahimpzadeh, M. (2011). *Iranian Journal of Orthopaedic Surgery*, 9(4); 185-90.
5. Baier Leach, J., Bivens, K., Patrick, Cw., Jr, Schmidt, C. (2003). Photocrosslinked hyaluronic acid hydrogels: natural, biodegradable tissue engineering scaffolds. *Biotechnol Bioengin*, 82; 578-89.
6. Cerning, J. (1995). Production of exopolysaccharides by *Lactic acid* bacteria and dairy propionibacteria. *lact. 75*; 463-472.
7. Collic-Jouault, S., Zanchetta, P., Helley, D., Ratiskol, J., Siquin, C., Fischer, A. M. (2004). Microbial polysaccharides of marine origin and their potential in human therapeutics. *Pathol. Biol*, 52; 127-130.
8. Fischer, M.H., Nanxiong, Y.U., Gray, R., John, A. (2004). The gel forming polysaccharide of *Psyllium husk (Plantago ovate* Forsk). *Carbohydrate Res*, 339; 2009-2017.
9. Fox, S., Gasparini, G., Harris, A. (2001). Angiogenesis: pathological, prognosis, and their link to trial design and anticancer drugs. *Lancet Oncol*, 2; 278-89.

22. Otero, A., Vincenzini, M. (2003). Extracellular polysaccharide synthesis by *Nostoc* strains as affected by source and light intensity. *J. Biotechnol*, 102; 143-152.
23. Palsson, B. O., Bhatia, S. N. (2004). *Tissue engineering* prentice hall; 1-17. 61-73, 75-86.
24. Parker, D. L., Schram, B. R., Plude, J. L., Moore, R. E. (1996). Effect of metal cations on the viscosity of a pectin-like capsular polysaccharide from the cyanobacterium *Microcystis flos-aquae* c3-40. *Applied and Environmental Microbiology*, 62; 1208-1213.
25. Perets, A., Baruch, Y., Weisbuch, F., Shoshany, G., Neufeld, G., Cohen, S. (2003). Enhancing the vascularization of three-dimensional porous alginate scaffolds by incorporating controlled release basic fibroblast growth factor microspheres. *J Biomed Mater Res A*, 65; 489-97.
26. Ramus, J. S. (1972). The production of extracellular polysaccharides by the unicellular red alga *Porphyridium eurugineum*. *J. Phycol*, 8; 97-111.
27. Ravi, S., Chaikof, E.L. (2010). Biomaterials for vascular tissue engineering. *Regen. Med*, 5(1); 107-20.
28. Rehm, B. H. A. (2010). Bacterial polymers biosynthesis modifications and applications. *Nat. Rev. Microbiol*, 8; 578-592.
29. Rougeaux, H., Kervarec, N., Pichon, R., Guezennec, J. (1999). Structure of the exopolysaccharide of *Vibrio diabolicus* isolated from a deep-sea hydrothermal vent. *Carbohydr. Res*, 322; 40-45.
30. Senni, K., Pereira, J., Gueniche, F., Delbarre-Ladrat, C., Siquin, C., Ratiskol, J. (2011). Marine polysaccharides: A source of bioactive molecules for cell therapy and tissue engineering. *Mar. Drugs*, 9; 1664-1681.
31. Simon-Colin, C., Raguénès, G., Cozien, J., Guezennec, J. G. (2008). *Halomonas profundus* sp. nova new PHA-producing bacterium isolated from a deep-sea hydrothermal vent shrimp. *J. Appl. Microbiol*, 104; 1425-1432.
32. Skalak, R., Fox, C. F. (1988). *Tissue engineering proceedings for a workshop held at granlibakken lake. Tahoe California, NY: Alan Liss.*
33. Slevin, M., Krupinski, J., Gaffney, J., Matou, S., West, D., Delisser, H. (2007). Hyaluronan-mediated angiogenesis in vascular disease: Uncovering RHAMM and CD44 receptor signaling pathways. *Matrix Biol*, 26; 58-69.
34. Sutherland, I. W. (1998). Novel and established applications of microbial polysaccharides. *Tibtech*, 16; 41-46.
35. Tonnesen, H. H., Karlsen, J. (2002). Alginate in drug delivery systems. *Drug Dev. Ind. Pharm*, 28; 621-630.
36. Zanchetta, P., Lagarde, N., Guezennec, J. (2003). A new bone-healing material a hyaluronic acid-like bacterial exo polysaccharide. *Calcif. Tissue Int*, 72; 74-79.

