مقاله پژوهشی

ارمغان دانش، مجله علمی پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی یاسوج
دوره ۲۳، شماره۲، خرداد و تیر۱۳۹۷(شماره پی در پی۱۲۷)

Archiv

Downloaded from armaghanj.yums.ac.ir at 10:19 +0330 on Tuesday November 6th 2018

تکثیر سلول‌های فیبروبلاست بر داربست کیتوزان در حضور هیالورونیک اسید

سیده سارا هاشمی[۱]، سیده سمیه رجبی[۲]، رضا محمودی[۳]، امیر قنبری[۳]، مهرزاد جعفری برمک[۳*]

[۱]مرکز تحقیقات سوختگی، دانشگاه علوم پزشکی شیراز، شیراز، ایران،[۲]کمیته تحقیقات دانشجویی، دانشگاه علوم پزشکی یاسوج، یاسوج، ایران،
[۳]مرکز تحقیقات سلولی و مولکولی، دانشگاه علوم پزشکی یاسوج، یاسوج، ایران

تاریخ وصول: ۱۳۹۶/۷/۷ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۷/۱/۲۸

چکیده

زمینه و هدف: مهندسی بافت روش جدیدی برای جایگزینی اجزاء بافت تخریب شده به وسیله پلیمرهای زیست تخریب‌پذیر می‌باشد که به صورت داربستی سه بعدی برای رشد و تکثیر سلول‌های بنیادی تهیه می‌گردد. به این منظور در این مطالعه از داربست کیتوزان استفاده شد تا در حضور هیالورونیک اسید، میزان تکثیر سلول‌های فیبروبلاست مورد ارزیابی قرار گیرد.

روش بررسی: در این مطالعه تجربی از پودرکیتوزان، داربستی جهت رشد سلول‌های فیبروبلاست تهیه گردید. سپس جهت مطالعه‌های بعدی گروه‌های زیر طراحی شدند؛ گروه۱: داربست کیتوزان با هیالورونیک اسید، گروه ۲: داربست کیتوزان بدون هیالورونیک اسید، گروه ۳(کنترل۱): سلول فیبروبلاست با هیالورونیک اسید و گروه ۴ (کنترل۲): سلول فیبروبلاست بدون هیالورونیک اسید. پوست ختنه‌گاه انسان تهیه و سلول‌های فیبروبلاست موجود در لایه درم آن پس از انجام مراحل تکنیک‌های آزمایشگاهی، جداسازی و سلول‌ها به همراه محیط کشت DMEM به فلاسک‌های کشت منتقل ودر انکوباتور CO_2 دار نگهداری شدند. پس از چند بار پاساژسلولی، ده هزارسلول در چاهک‌های ۹۶ خانه ای حاوی محیط کشت DMEM منتقل و با استفاده از روش MTT و رنگ‌آمیزی DAPI ، تکثیر سلول های فیبروبلاست بر روی داربست کیتوزان بررسی گردید. نتایج به دست آمده پس از بررسی یکنواختی داده‌ها با استفاده از آزمون‌های آنوا و تست تعقیبی توکی نرم افزارگراف پد مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت.

یافته‌ها : میانگین تست MTT در داربست کیتوزان بدون هیالورونیک اسید در ۲۴ ساعت در مقایسه با گروه‌های کنترل با و بدون هیالورونیک اسید و گروه کیتوزان با هیالورونیک اسید افزایش آماری معنی‌دار نشان داد($p<۰/۰۱۲$) مقدار Pیقا نوشته شود. میانگین تست MTT در گروه کنترل بدون هیالورونیک اسید در ۴۸ ساعت در مقایسه با گروه داربست کیتوزان با و بدون هیالورونیک اسید و گروه کنترل با هیالورونیک اسید افزایش آماری معنی‌دار نشان داد($p<۰/۰۰۴$) مقدار Pیقا نوشته شود. میانگین بقاء در داربست کیتوزان با و بدون هیالورونیک اسید در ۷۲ ساعت در مقایسه با گروه‌های کنترل با و بدون هیالورونیک اسید از نظر آماری معنی‌دار نبود.

نتیجه گیری : نتایج این تحقیق نشان داد که داربست های کیتوزان با استفاده از خواص هیدروفیلیک خودزیست سازگاری بهتری با سلول های فیبروبلاست داشتند، اما حضور اسید هیالورونیک با کیتوزان روند رشد فیبروبلاست را کاهش داد. به احتمال زیاد، کیتوزان به تنهایی در ساختارهایی که برای احیای مناطق آسیب دیده پوست استفاده می شود، یک داربست مناسب برای تکثیر سلول های فیبروبلاست آسیب دیده است.

واژه های کلیدی : کیتوزان ،داربست، سلول فیبروبلاست،هیالورونیک اسید

[*]**نویسنده مسئول : مهرزاد جعفری برمک،** یاسوج، دانشگاه علوم پزشکی یاسوج، مرکز تحقیقات سلولی و مولکولی
Email: mehrzadj14@gmail.com

www.SID.ir

Archive of SID

Downloaded from armaghanj.yums.ac.ir at 10:19 +0330 on Tuesday November 6th 2018

مقدمه

در طی آسیب‌های بافتی، سلول‌های بنیادی بافت آسیب دیده ممکن است به صورت محدود توانایی بازسازی را داشته باشند، اما وقتی که شدت آسیب بافتی زیاد باشد و این امر سبب از بین رفتن سلول‌های بنیادی بافت گردد، دیگر استفاده از داروهای معمول کمک کننده نیست و کاربردی نخواهد داشت، به این منظور برای درمان بافت آسیب دیده می‌توان به وسیله روش‌های آزمایشگاهی یا مهندسی بافت ساختاری مشابه بافت آسیب دیده تهیه کرد(۱). مهندسی بافت شامل روش‌های مهندسی و علوم زیستی به منظور درک ومقایسه ارتباط بین ساختار و عمل، در بافت های پستانداران سالم و آسیب دیده و طراحی جانشین‌های بیولوژیکی به منظور بازسازی بافت استفاده می‌شود (۵-۲).

به طور طبیعی بازسازی بافت به سه عامل، داربست، سلول و فاکتور رشد نیاز دارد، که داربست به عنوان قالب برای رشد و تکثیر سلول و ساختار اصلی بافت بوده که شبکه‌ای از نانو الیاف پیچیده و منظم می‌باشد(۶)، اما نانو الیاف مصنوعی به عنوان ماتریکس خارج سلولی استفاده می‌گردد و هر چه که ساختار داربست مصنوعی به ساختار ماتریکس طبیعی شبیه تر باشد، شانس موفقیت این ماتریکس مصنوعی در ایجاد رفتار سلولی مناسب بیشتر است(۱۰-۷). این نانوالیاف‌ها به روش های مختلف تهیه می‌شوند، ولی در نهایت بایستی از ویژگی‌های زیست ـ محیطی از جمله سازگاری، تخریب‌پذیری و تخلخل برخوردار باشند(۱۳و۱۲).

نانو الیاف‌ها چه به صورت طبیعی یا مصنوعی، بایستی با داشتن ویژگی‌های خاص، محیطی مناسب برای ارسال و دریافت سیگنال‌های زیستی را فراهم کنند تا سلول‌های مزانشیمی و فیبروبلاست بتوانند با پروتئین‌های غشاء سلولی و پروتئین‌های حد واسط به این ساختارها اتصال یافته و عملکرد خود را نشان دهند. از جمله این نانو الیاف‌ها کیتوزان و هیالورونیک اسید به دلیل خواص زیستی مناسب مورد توجه محققین قرار گرفته است.

کیتوزان یک پلی ساکارید خطی است و حاوی شاخه‌های استیل و آمین می‌باشد و در پوسته آبزیانی مانند؛ میگو، خرچنگ یا دیواره قارچ ها وجود دارد. ساختار آمینی‌کیتوزان در محیط اسیدی تبدیل به آمین نوع چهارم شده که آن را به یک پلی کاتیون تبدیل می‌کند. از طرفی زنجیره‌های پلی ساکاریدی آن در میدان الکتریکی از هم جدا می‌شود بنابراین آن را نمی‌توان الکتروریسی کرد(۱۹-۱۴).

هیالورونیک اسید به عنوان یک پلیمر، بخش عمده‌ای از ماتریکس خارج سلولی را در بافت همبند شامل می‌شود، این پلی ساکارید یک گلیکوزآمینوگلیکان مهم ماتریکس خارج سلولی است که خواص فراوانی از جمله اتصال به مولکول‌های آب، ذخیره فاکتورهای رشد، اتصال به گیرنده‌ها،

www.SID.ir

Archive of SID

Downloaded from armaghanj.yums.ac.ir at 10:19 +0330 on Tuesday November 6th 2018

رگسازی، تکثیر، مهاجرت سلولی و ترمیم نواحی آسیب دیده را به عهده دارد(۲۱و ۲۰).

سلول‌های فیبروبلاست یکی از سلول‌های مهم بافت همبند می‌باشد که با سنتز ماتریکس خارج سلولی این بافت را به طور مداوم احیاء می‌کند(۲۱). فیبروبلاست‌ها با ترشح فاکتورهای مختلف از جمله سیتوکین‌ها و فاکتورهای رشد باعث رگسازی و فعال شدن سیستم ایمنی می‌شوند(۲٤ـ۲۲).

با توجه به خصوصیات پلیمری ذکر شده کیتوزان و هیالورونیک اسید و هم‌چنین عملکرد سلول فیبروبلاست. هدف از این مطالعه تهیه داربست کیتوزان و تکثیر سلول‌های فیبروبلاست در حضور اسید هیالورونیک بود.

روش بررسی

در این مطالعه تجربی از کیتوزان داربستی جهت رشد سلول های فیبروبلاست تهیه شد. سپس جهت مطالعه‌های بعدی گروه‌های زیر طراحی شدند؛ گروه۱: داربست کیتوزان با هیالورونیک اسید، گروه ۲: داربست کیتوزان بدون هیالورونیک اسید، گروه ۳(کنترل۱): سلول فیبروبلاست با هیالورونیک اسید، گروه ۴ (کنترل۲): سلول فیبروبلاست بدون هیالورونیک اسید.

کیتوزان و هیالورونیک اسید از شرکت سیگما ـ آلدریچ و اسید استیک به عنوان حلال پودر کیتوزان از شرکت های داخلی خریداری شد.

محلول ۰/٤ درصد کیتوزان در اسید استیک ۳۰ درصد به وسیله هم‌زن مغناطیسی حل شد. این محلول در یک ظرف شیشه‌ای آزمایشگاهی تخلیه شد تا حلال آن تبخیر شود و داربست به صورت یک صفحه پهن (فیلم) شکل گیرد.

در این تحقیق، به منظور بررسی عامل‌های سازنده در ساختار شیمیایی کیتوزان آن را به صورت قرص تهیه و با استفاده از طیف سنج FTIR، مدل RX1 ساخت شرکت Perkin-Elmer بررسی شد.

برای بررسی خاصیت باکتریواستاتیکی کیتوزان که به وسیله محققین ذکر شده است(۱۹ـ۱۴)، دو نوع باکتری شامل استافیلوکوک ارئوس و سودوموناس ائروجینوزا انتخاب شد. سپس برای بررسی کشت میکروبی ۱۰۰ میکرولیتر از محلول کیتوزان را به درون چاهک‌های کوچک ایجاد شده روی محیط مولر هینتون آغشته به باکتری وارد و به مدت ۲۴ ساعت در انکوباتور ۳۷ درجه نگهداری گردید.

به منظور کشت سلول‌های فیبروبلاست، ابتدا پوست تهیه شده از ختنه گاه انسان را در PBS حاوی آنتی‌بیوتیک پنی‌سیلین و استرپتومایسین، شستشو و سپس هیپودرم پوست را جدا کرده و پوست به تکه‌های کوچک ۱×۱ سانتی متر برش زده شد و در محلول دیسپاز به مدت ۱۸ ساعت در یخچال نگهداری شد. به منظور خنثی‌سازی اثر دیسپاز بروی تکه‌های پوست محیط کشت کامل که حاوی DMEM و سرم جنین گاوی ۱۰ درصد و Penstrep می‌باشد، اضافه شد

www.SID.ir

Archive of SID

Downloaded from armaghanj.yums.ac.ir at 10:19 +0330 on Tuesday November 6th 2018

و سپس محیط را تخلیه و مقداری تریپسین به پوست اضافه و به مدت ۵ دقیقه انکوبه و دوباره برای خنثی کردن اثر آنزیم بر روی پوست محیط کشت DMEM اضافه، با تیغ جراحی اپیدرم از درم جدا گردید. بعد از انجام این مراحل سلول‌های فیبروبلاست جدا شده از درم با دور ۱۸۰۰ و به مدت ۵ دقیقه و با دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد سانتریفیوژ شد، تا سلول‌ها در لوله رسوب کنند. رسوب سلول‌ها به فلاسک کشت حاوی سلول و محیط کشت منتقل و در انکوباتور CO_2 دار، در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد قرار داده شدند. برای تکثیر سلولی و به دست آوردن تعداد سلول فراوان، عمل پاساژ سلولی سه مرتبه انجام شد. در ادامه با استفاده از رنگ تریپان بلو و لام نئوبار تعداد سلول‌ها در یک میلی‌لیتر از محیط کشت شمارش و محاسبه شد. هم‌چنین برای تعیین درصد سلول‌های فیبروبلاست در محیط کشت از دستگاه فلوسایتومتری(مدل Facscalibur) استفاده شد.

برای بررسی تکثیر وبقاء سلولی، ابتدا داربست کیتوزان پانچ شد و پس از استریل کردن با اشعه ماورا بنفش، درون چاهک‌های پلیت آزمایشگاهی قرار داده و ده هزار سلول فیبروبلاست و ۲۰ میکرولیتر محلول هیالورونیک اسید اضافه و سپس پلیت‌ها به مدت ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت انکوبه و بعد ازآن درون هر چاهک ۲۰ میکرولیتر محلول MTT اضافه و سپس پلیت‌ها به مدت ۴ ساعت انکوبه و سپس محلول MTT تخلیه و ۱۰۰ میکرولیتر محلول DMSO اضافه و به مدت نیم ساعت در انکوباتور ۳۷ درجه سانتی‌گراد نگهداری گردیدند و جذب نوری پلیت ها با دستگاه الایزا و با طول موج ۴۹۰ نانومتر خوانده شدند.

پس از اتمام کار پلیت‌های مورد استفاده طبق دستورالعمل مرکز تحقیق‌های سوختگی دانشگاه شیراز معدوم شدند.

داده‌های جمع‌آوری شده با استفاده از نرم‌افزارSPSS و آزمون‌های آماری آنوا و تست تعقیبی توکی تجزیه و تحلیل شدند.

یافته‌ها

بررسی ساختار شیمیایی پودر کیتوزان به وسیله دستگاه FTIR نشان داد که کیتوزان عمدتاً از گروه‌های مختلف شیمیایی از جمله گروه OH- ، C=O و N-H ساخته شده که با ساختار شیمیایی استاندارد آن مطابقت دارد. این عوامل شیمیایی می‌توانند در محیط‌های آبی به خوبی حل شوند و پیوندهای ئیدروژنی فراوانی با مولکول آب اطراف خود داشته باشند، بنابراین کیتوزان می‌تواند تمایل فراوانی به جذب آب داشته باشد(نمودار۱).

نتایج حاصل از کشت میکروبی کیتوزان در حضور حلال اسید استیک و آنتی بیوتیک (سفتریاکسون) نشان داد که هاله‌های شفاف اطراف داربست کیتوزان در مقایسه با گروه اسید استیک و آنتی‌بیوتیک(سفتریاکسون) مربوط به اثرحلال اسید استیک موجود در داربست کیتوزان می‌باشد و کیتوزان اثر ضد میکروبی نداشت(تصویر۱).

www.SID.ir

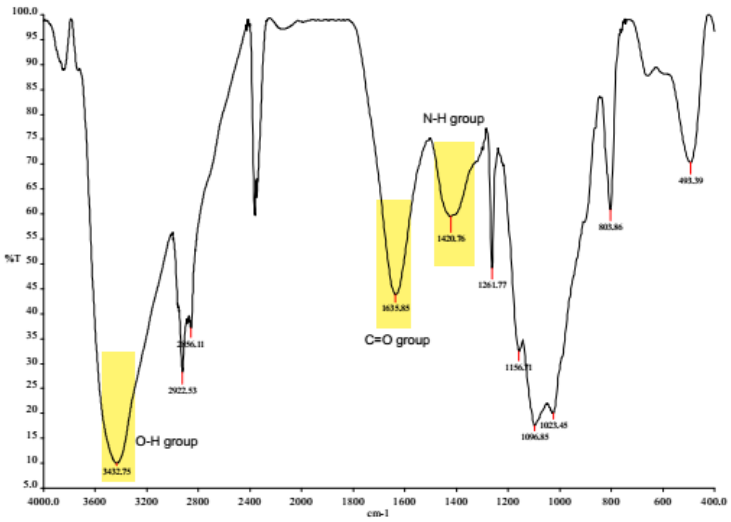
Archive of SID

Downloaded from armaghanj.yums.ac.ir at 10:19 +0330 on Tuesday November 6th 2018

نمودار ۲ نشان می‌دهد که میانگین درصد بقاء سلول بر اساس تست MTT در ۲۴ ساعت در گروه داربست کیتوزان بدون هیالورونیک اسید در مقایسه با گروه‌های کنترل(با و بدون هیالورونیک اسید) افزایش آماری معنی‌داری نشان می‌دهد($p<۰/۰۱۲$). هم‌چنین میانگین درصد بقاء سلول در گروه داربست کیتوزان بدون هیالورونیک اسید در مقایسه با کیتوزان با افزایش آماری معنی‌داری نشان می‌دهد.

نمودار ۳ نشان می‌دهد که میانگین درصد بقاء سلول بر اساس تست MTT در ۴۸ ساعت در گروه داربست کیتوزان(با و بدون هیالورونیک اسید) در مقایسه با گروه کنترل بدون هیالورونیک اسید، کاهش آماری معنی‌داری نشان می‌دهد($p<۰/۰۰۴$). هم‌چنین میانگین درصد بقاء سلول در گروه داربست کیتوزان بدون هیالورونیک اسید در مقایسه با کیتوزان از لحاظ آماری تفاوت معنی‌داری نشان نمی‌دهد.

نمودار ۴ نشان می‌دهد که میانگین درصد بقاء سلول بر اساس تست MTT در ۷۲ ساعت در گروه داربست کیتوزان(با و بدون هیالورونیک اسید) در مقایسه با گروه کنترل (با و بدون هیالورونیک اسید) تفاوت آماری معنی داری ندارد. بر اساس نتایج به دست آمده به نظر می‌رسد که هیالورونیک اسید بر فعالیت سلول فیبروبلاست اثر مهاری دارد.



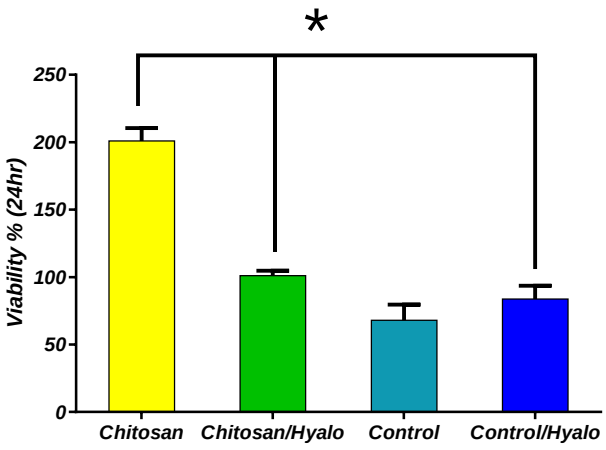
نمودار۱: گروه های شیمیایی در ساختار مولکولی داربست کیتوزان

www.SID.ir

Archive of SID

Downloaded from armaghanj.yums.ac.ir at 10:19 +0330 on Tuesday November 6th 2018

تصویر۱: بررسی اثر ضد میکروبی کیتوسان بر روی باکتری های استافیکوکوس ارئوس (a) و سودوموناس ائروجینوزا (b).

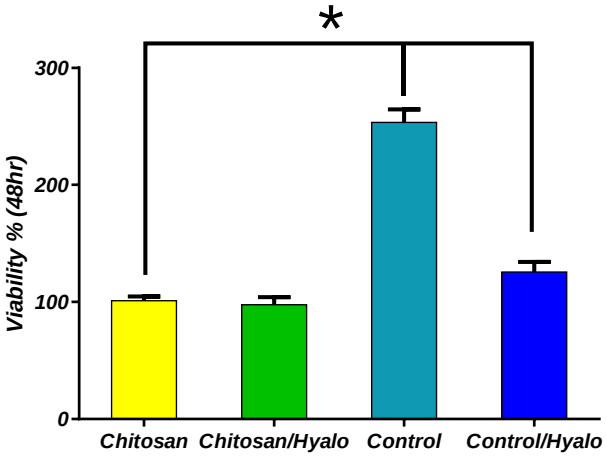


نمودار۲: میانگین درصد بقاء سلول در ۲۴ ساعت در گروه‌های مورد مطالعه

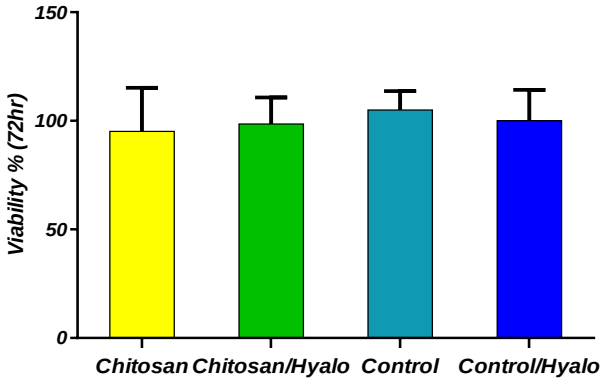
www.SID.ir

Archive of SID

Downloaded from armaghanj.yums.ac.ir at 10:19 +0330 on Tuesday November 6th 2018



نمودار۳: میانگین درصد بقاء در ۴۸ ساعت در گروه‌های مورد مطالعه



نمودار۴: میانگین درصد بقاء در ۷۲ ساعت در گرو های مورد مطالعه

بحث

مهندسی بافت به مشکلات مرتبط با جایگزین کردن بافت‌هایی که در اثر بیماری یا تروما از دست رفته‌اند، پاسخگو می‌باشد(۳). در طی آسیب‌های بافتی، سلول‌های بنیادی بافت آسیب دیده ممکن است به صورت محدود توانایی بازسازی را داشته باشند، اما وقتی که شدت آسیب بافتی زیاد باشد و این امر سبب از بین رفتن سلول‌های بنیادی بافت گردد، دیگر استفاده از داروهای معمول کمک کننده نیست و کاربردی نخواهد داشت، بدین منظور برای درمان بافت آسیب دیده می‌توان به وسیله روش‌های آزمایشگاهی ساختاری مشابه بافت آسیب دیده تهیه کرد(۵و٤).

در روش‌های جدید مهندسی بافت از پلیمرهای مصنوعی مانند کیتین، کیتوزان و کلاژن، به علت خواص زیستی مناسب مانند چسبندگی، سازگاری و ضد میکروبی استفاده می‌شود. هم‌چنین از مواد سنتزی و رایج مانند پلی‌یورتان، پلی کاپرولاکتان، ژلاتین، کلاژن و دیگر مواد پلیمری دیگر که دارا ی خواص فیزیکی و زیستی مناسبی هستند، استفاده

www.SID.ir

Archive of SID

Downloaded from armaghanj.yums.ac.ir at 10:19 +0330 on Tuesday November 6th 2018

می‌شوند. بنابراین در این طرح با استفاده از وی کیتوزان در حضور هیالورونیک اسید استفاده شد و میزان بقاء سلول‌های فیبروبلاست در داربست جدید مورد ارزیابی قرار گرفت.

نتایج تست زنده مانی در این تحقیق نشان داد که سلول‌هایی که بر روی داربست رشد کرده‌اند در مقایسه با گروه کنترل بقاء بیشتری را نشان دادند، شاید دلیل آن را بتوان به این نسبت داد که رشد و تکثیر سلول‌های فیبروبلاست بر روی داربست به علت سه بعدی بودن داربست، در مقایسه با گروه کنترل از سرعت بیشتری برخوردار است، ولی در گروه کنترل به علت تراکم سلول‌ها و انباشته شدن بر روی هم برخورد سلولی بیشتر و در نتیجه میزان تکثیر آنها کاسته شده است. از طرفی دیگر هیالورونیک اسید که یک پلی ساکارید طبیعی در بدن می‌باشد و نقش مهمی در تکثیر و فعالیت‌های سلول‌های بنیادی در موجود زنده دارد، در حالی که نتایج این تحقیق نشان می‌دهد که هیالورونیک اسید همراه با داربست کیتوزان از تکثیر سلول‌های فیبروبلاست می‌کاهد. شاید بتوان اذعان داشت که تجمع این دو ماده با هم ساختارهای پلی‌ساکاریدی بزرگترو متراکم تری می‌سازد که حجم بیشتری از مولکول‌های آب محیط را دربر گرفته در نتیجه سلول‌های فیبروبلاست در آن محصور شده، فعالیت و تکثیر آنها کند می‌گردد. هم‌چنین نتایج نشان داد که میزان تکثیر فیبروبلاست در زمان‌های ۴۸ و ۷۲ ساعت بر روی داربست کیتوزان کاسته شده است، شاید بتوان اظهار داشت که نیمه عمر کیتوزان بسته به دوز مصرفی کوتاه بوده در نتیجه ساختار سه بعدی آن سریع‌تر شکسته می‌شود و در نهایت زیست تخریب‌پذیری کیتوزان را ثابت می‌نماید. کاکریمن و همکاران نشان دادند که فیبروبلاست‌های کشت داده شده به صورت سه بعدی در مقایسه با کشت‌های دو بعدی سریع‌تر تکثیرمی‌شوند. به نظر می‌رسد این تفاوت‌ها به علت نزدیکی فضای سلول در کشت سه بعدی(کشت برروی داربست)نسبت به محیط موجود زنده باشد(۲۷).

نتایج FTIR نشان داد که کیتوزان دارای خاصیت پلی‌کاتیونیک بوده، بنابراین تمایل زیادی به جذب آب دارد. این داربست می‌تواند ساختاری را برای سلول‌های فیبروبلاست ایجاد کند که با استفاده از ترشح‌های سلولی خود تکثیر و بقاء سلول‌های بنیادی را بیشتر کند. هم‌چنین سلول‌های فیبروبلاست با استفاده از پروتئین‌های حد واسط سنتزی خود به این شبکه سه بعدی می‌چسبد و با پروتئین‌های غشاء سلولی زواید فراوان خود نقش گیرندگی رشته‌های کلاژن و سلول‌های دیگر بافت پیوندی را به عهده می‌گیرد و با ارسال سیگنال‌های پروتئینی در هماهنگ نمودن سلول‌ها و استحکام ساختار بافتی نقش مهمی را ایفاء می‌نماید.

هم‌چنین در این تحقیق میانگین درصد بقاء سلول بر اساس تست MTT در ۲۴ ساعت در گروه داربست کیتوزان بدون هیالورونیک اسید در مقایسه با گروه‌های کنترل(با و بدون هیالورونیک اسید) افزایش آماری معنی داری نشان می‌دهد. دونجکو و

www.SID.ir

Archive of SID

Downloaded from armaghanj.yums.ac.ir at 10:19 +0330 on Tuesday November 6th 2018

همکاران(۲۰۱۵) در تحقیقی که بر روی داربست کلاژن با استفاده از هیالورونیک اسید و سلول‌های فیبروبلاست انجام دادند، گزارش کردند که در ترمیم آسیب‌های بافت پوششی مانند زخم، مهم ترین سلول در فرایند ترمیم آن، فیبروبلاست بوده که مسئول شروع رگزایی ونیز تشکیل درم ورشته‌های کلاژن می‌باشد(۲۸).

کوجیمیا و همکاران(۲۰۰۴)، تأثیر کیتین وکیتوزان در سنتز کلاژن در ترمیم سوختگی را بررسی کردند و نشان دادند که کیتوزان سبب افزایش سنتز کلاژن می‌شود(۳۳).

بوکارد و همکاران(۲۰۰۷)، از هیدروژل کیتوزان برای احیای پوست سوخته استفاده کردند، نتایج نشان داد که مواد کیتوزانی سبب مداوای عالی و هم‌چنین احیای بافت سوخته شد و نیز کیتوزان سبب القای سلول‌های التهابی دانه‌دار وافزایش مویرگ‌های خونی و کلاژن در بافت جدید گردید(۲۹).

کیتوزان به علت داشتن ساختار پلی ساکاریدی در اتصال بیشتر سلول فیبروبلاست به داربست نقش فراوانی اعمال می‌نماید و از طرفی ساختاری یونی کیتوزان در جذب مایع میان بافتی فعالیت فراوانی نشان می‌دهد که در نتیجه آن ایجاد ساختار محکم برای فعل و انفعالات سلول‌های بافت همبند و زمینه مساعد برای تکثیر سلول‌های بنیادی، رگ سازی و ترمیم می‌باشد. هم‌چنین ترکیب ساختاری کیتوزان در استحکام و زیست تخریب‌پذیری داربست‌های پلیمری نقش عمده ای را دارند. سیپه وهمکاران نشان دادند که داربست‌های طبیعی به علت زیست سازگاری، محیط مناسبی جهت چسبندگی سلول ها فراهم می‌کنند(۳۰).

تحقیق‌ها نشان می‌دهد که ساختار پلی‌ساکاریدی کیتوزان می‌تواند مانع رشد باکتری‌ها شود، اما نتایج این تحقیق نشان داد که کیتوزان نتوانسته است رشد باکتری‌هایی از جمله استافیلوکوک ارئوس و سودوموناس ائروجینوزا را مهار نماید، لذا پیشنهاد می‌شود با دوز بیشتری از کیتوزان موارد کشت میکروبی ارزیابی شود.

نتیجه‌گیری

نتایج این تحقیق نشان داد که داربست کیتوزان بدون حضورهیالورونیک اسید با توجه به خاصیت هیدروفیل بودن و زیست سازگاری با سلول‌های فیبروبلاست احتمالاً می‌تواند سبب بقاء و تکثیر سلول های فیبروبلاست شود.

قدردانی

از مرکز تحقیق‌های سلولی و مولکولی دانشگاه علوم پزشکی یاسوج و مرکز تحقیق‌های سوختگی دانشگاه شیرازبه دلیل حمایت از این پژوهش قدردانی می‌شود.

www.SID.ir

Archive of SID

Downloaded from armaghanj.yums.ac.ir at 10:19 +0330 on Tuesday November 6th 2018

REFERENCES

1.Martin P. Wound healing--aiming for perfect skin regeneration. Science 1997; 276 (5309): 75-81.
2.Shalak R, FOX C. Tissue engineering proceedings: Workshop held at granlibakken. *Lake Tahoe California February* 1988; 26: 26-9.
3.Godbey WT, Atala A. In vitro systems for tissue engineering. Annals of the new York Academy of Sciences 2002; 961(1): 10-26.
4.Longo UG, Lamberti A, Maffulli N, Denaro V. Tissue engineered biological augmentation for tendon healing: a systematic review. *British Medical Bulletin* 2010; 98(1): 31-59.
5.Servatkhah M. The in vitro effect of different cord blood platelet rich plasma concentrations on proliferation of dermal fibroblasts. Biosciences Biotechnology Research Asia 2016; 13(3): 1709-13.
6.Tan JY, Chua CK, Leong KF, Chian KS, Leong WS, Tan LP. Esophageal tissue engineering: An in-depth review on scaffold design. Biotechnology and Bioengineering 2012; 109(1): 1-15.
7.Gorna K, Sylwester G. Preparation, degradation, and calcification of biodegradable polyurethane foams for bone graft substitutes. Journal of Biomedical Materials Research Part A *2003; 67(3):* 813-7.
8.Mao JS, Zhao LG, Yin YJ, De Yao K. Structure and properties of bilayer chitosan–gelatin scaffolds. *Biomaterials 2003;* 24(6):1067-74.
9.Nishiya T, Lam RT. Interaction of stearylamine-liposomes with erythrocyte ghosts: analysis of membrane lipid mixing and aqueous contents mixing, and the effect of carboxymethyl chitin on the interaction. Colloids and Surfaces B Biointerfaces 1995; 4(1): 55-63.
10.Kumar G, Waters MS, Farooque TM, Young MF, Simon Jr CG. Freeform fabricated scaffolds with roughened struts that enhance both stem cell proliferation and differentiation by controlling cell shape. *Biomaterials 2012;* 33(16): 4022-30.
11.Holy CE, Cheng C, Davies JE, Shoichet MS. Optimizing the sterilization of PLGA scaffolds for use in tissue engineering. *Biomaterials* 2000; 22(1): 25-31.
12.Martins A, Araújo JV, Reis RL, Neves NM. Electrospun nanostructured scaffolds for tissue engineering applications. Nanomedicine 2007;2(6): 929-42.
13.Keira SM, Ferreira LM, Gragnani A, Duarte ID, Santos IA. Experimental model for fibroblast culture. *Acta Cirurgica Brasileira* 2004;19: 11-6.
14.Avitabile T, Marano F, Castiglione F, Bucolo C, Cro M, Ambrosio L, Ferrauto C, Reibaldi A. Biocompatibility and biodegradation of intravitreal hyaluronan implants in rabbits. *Biomaterials 2001;* 22(3): 195-200.
15.Özgenel, Güzin Yeşim. "Effects of hyaluronic acid on peripheral nerve scarring and regeneration in rats. *Microsurgery* 2003; 23(6): 575-81.
16.O'brien, Fergal J. Biomaterials & scaffolds for tissue engineering. *Materials Today* 2011; 14(3): 88-95.
17.Yuan Y. The interaction of Schwann cells with chitosan membranes and fibers in vitro. *Biomaterials* 2004; 25(18): 4273-8.
18.Muzzar E, Riccardo AA. Chitosan-based dietary foods. *Carbohydrate Polymers* 1996; 29(4): 309-16.
19.Khor E, Lee YL. Implantable applications of chitin and chitosan. *Biomaterials* 2003; 24(13): 2339-49.
20.Hynds DiAnna L, Diane M. Neurite outgrowth inhibition by chondroitin sulfate proteoglycan: stalling/stopping exceeds turning in human neuroblastoma growth cones. *Experimental Neurology* 1999; 160(1): 244-55.
21.Neuman Manuela G.In vitro anti-inflammatory effects of hyaluronic acid in ethanol-induced damage in skin cells. *Journal of Pharmacy & Pharmaceutical Sciences* 2011; 14(3): 425-437.
22.Toole BP. Hyaluronan and its binding proteins, the hyaladherins. *Current Opinion in Cell Biology* 1990; 2(5): 839-44.
23.Wang W, Acceleration of diabetic wound healing with chitosan-crosslinked collagen sponge containing recombinant human acidic fibroblast growth factor in healing-impaired STZ diabetic rats. *Life Sciences* 2008; 82(3): 190-204.
24.Freier T. Chitin-based tubes for tissue engineering in the nervous system. *Biomaterials* (2005); 26: 4624-32.
25.Özgenel GY. Effects of hyaluronic acid on peripheral nerve scarring and regeneration in rats. *Microsurgery* 2003; 26(3): 575-81.
26.O'brien FJ. Biomaterials & scaffolds for tissue engineering. *Materials today* 2011; 14(3): 88-95.
27.Cukierman E, Taking cell-matrix adhesions to the third dimension. *Science* 2001; 294: 1708-12.

www.SID.ir

Archive of SID

28.Donejko M. Hyaluronic acid abrogates ethanol-dependent inhibition of collagen biosynthesis in cultured human fibroblasts. *Drug design development and therapy 2015;* 9: 6225.
29.Boucard N. The use of physical hydrogels of chitosan for skin regeneration following third-degree burns. *Biomaterials* 2007; 28: 3478-88.
30.Sipe, JD. Tissue engineering and reparative medicine. *Annals of the New York Academy of Sciences* 2002; 961(1): 1-9.
31.Chung TW. Enhancing growth and proliferation of human gingival fibroblasts on chitosan grafted poly (ε-caprolactone) films is influenced by nano-roughness chitosan surfaces. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine* 2009; 20(1): 397-404.
32.GautamS, Amit KD, Narayan CM. Fabrication and characterization of PCL/gelatin composite Nano fibrous scaffold for tissue engineering applications by electrospinning method. *Materials Science and Engineering: C* 2013; 33(3): 1228-35.
33.Kojima K, Okamoto Y, Kojima K, Miyatake K, Fujise H, Shigemasa Y, Minami S. Effects of chitin and chitosan on collagen synthesis in wound healing. Journal of Veterinary Medical Science 2004; 66(12): 1595-8.

Downloaded from armaghanj.yums.ac.ir at 10:19 +0330 on Tuesday November 6th 2018

www.SID.ir

Arc

Armaghane-danesh, Yasuj University of Medical Sciences Journal (YUMSJ)

Original Article

The Investigation of Proliferation of Fibroblasts on Chitosan Scaffold in the Presence of Hyaluronic Acid

Hashemi SS[1], Rajabi S[2], Mahmoudi R[3], Ghanbari A[3], Jafari Barmak M[3*]

[1]Burning Research Center, Shiraz University of Medical Sciences, Shiraz, Iran, [2]Student Research Committee, Yasuj University of Medical Sciences, Yasuj, Iran, [3]Cellular and Molecular Research Center, Yasuj University of Medical Sciences, Yasuj, Iran

Received: 29 Sep 2017 Accepted: 17 Apr 2018

Abstract

Background & Aim: Tissue engineering is a new method for the replacement of degraded tissue components by biodegradable polymers, which is provided as a three-dimensional scaffold for growth and proliferation of stem cells. In this study, chitosan scaffold was used to evaluate the proliferation of fibroblasts in the presence of hyaluronic acid.

Methods: In this experimental study, powder scaffolds were prepared for growth of fibroblastic cells. The following groups were designed for later studies: Group 1: Chitosan scaffold with hyaluronic acid, Group 2: Chitosan without hyaluronic acid scaffold, Group 3 (control 1): Hyaluronic acid fibroblast cell and Group 4 (control 2): Hyaluronic acid fibroblaster cell. The human foreskin was prepared and the fibroblasts of the dermal layer were removed after separation, and the cells were transferred to the culture flasks with DMEM medium and stored in a CO2-containing incubator. After several passages, 10,000 cells were transferred to 96 wells containing DMEM medium and MTT and DAPI staining method was used to amplify fibroblasts on the chitosan scaffold. The obtained results were analyzed by ANOVA and Tukey's post hoc test after uniformity of data analysis.

Results: The mean survival rate of chitosan without hyaluronic acid scaffold in 24 hours was significantly higher than that of control with and without hyaluronic acid and chitosan group with hyaluronic acid ($P < 0.05$). The mean survival in the control group without hyaluronic acid increased significantly in 48 hours compared to the chitosan scaffold with and without hyaluronic acid and the control group with hyaluronic acid ($P < 0.05$). The mean survival time in chitosan scaffold with and without hyaluronic acid in 72 hours was not statistically significant compared to control groups with and without hyaluronic acid.

Conclusion: Chitosan scaffold showed better biocompatibility with fibroblasts due to its hydrophilic property, but the presence of hyaluronic acid with chitosan reduced the fibroblast growth trend. Chitosan may be alone in structures that are synthesized to repair damaged areas of the skin, a good scaffold for proliferation of damaged fibroblast cells.

Key Words: Chitosan, Scaffold, Fibroblasts, Hyaluronic Acid, foreskin

[*]**Corresponding author**: **Jafari Barmak M,** Cellular and Molecular Research Center, Yasuj University of Medical Sciences, Yasuj, Iran

Email: mehrzadj14@gmail.com

Please cite this article as follows:
Hashemi SS, Rajabi S, Mahmoudi R, Ghanbari A, Jafari Barmak M. The Investigation of Proliferation of Fibroblasts on Chitosan Scaffold in the Presence of Hyaluronic Acid. Armaghane-danesh 2018; 23 (2): 134-145.

Downloaded from armaghanj.yums.ac.ir at 10:19 +0330 on Tuesday November 6th 2018

www.SID.ir