

پتانسیل درمانی فیروبلاست‌های کشت‌شده بر داربست نانوفیبر PLA/CS در ترمیم زخم پوستی رت‌های نژاد ویستار

الهام حویزی^{۱*} (Ph.D)، طیبه محمدی^۱ (Ph.D)، سمیه ابراهیمی باروق^۲ (Ph.D)، شیما توکل^{۳،۴} (Ph.D)

۱- گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه شهید چمران اهواز، اهواز، ایران

۲- گروه مهندسی بافت و علوم سلولی کاربردی، دانشکده فن‌آوری‌های نوین پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی تهران، تهران، ایران

۳- هسته تحقیقاتی نانوحامل‌های دارویی، مرکز تحقیقات علوم دارویی رازی، دانشگاه علوم پزشکی ایران، تهران، ایران

۴- مرکز پژوهش‌های علمی دانشجویان، دانشگاه علوم پزشکی تهران، تهران، ایران

چکیده

سابقه و هدف: درمان زخم‌های مزمن در کشورهای توسعه‌یافته به دلیل افزایش جمعیت سالمندان، به موضوع قابل اهمیتی در سلامت افراد تبدیل گردیده است. اگرچه امروزه مسئله زخم‌های مزمن امری رایج است، اما درمان آن‌ها بسیار مشکل و محدود است. در این مطالعه ما مزایای پیوند سلول‌های فیروبلاست کشت‌شده بر داربست PLA/CS در ترمیم زخم‌های پوستی را مورد ارزیابی قرار دادیم.

مواد و روش‌ها: در این مطالعه سلول‌های فیروبلاستی بر داربست نانوفیبر PLA/CS کشت و سپس در مدل موش بزرگ آزمایشگاهی پیوند شدند. داربست PLA/CS با روش الکتروریسی ساخته شد. هم‌چنین از روش‌های رنگ‌آمیزی بافتی برای بررسی تراکم سلولی و میزان کلاژن استفاده شد.

یافته‌ها: مشاهدات ماکروسکوپی و نتایج حاصل از رنگ‌آمیزی بافتی نشان داد که در گروه تیمار شده با داربست حاوی سلول سرعت ترمیم و بهبود زخم در مقایسه با نمونه‌های کنترل سریع‌تر اتفاق افتاد. بررسی‌های *in vivo* نشان داد که تیمار با داربست حاوی سلول‌های فیروبلاستی به طور معنی‌داری سبب افزایش تراکم سلول‌ها و افزایش میزان تولید کلاژن در مقایسه با نمونه‌های کنترل گردید.

نتیجه‌گیری: این نتایج نشان‌دهنده پتانسیل درمانی سلول‌های فیروبلاستی کشت‌شده بر داربست PLA/CS در بهبودی زخم‌های پوستی در شرایط *in vivo* می‌باشد.

واژه‌های کلیدی: داربست PLA/CS، ترمیم، فیروبلاست، مهندسی بافت.

مقدمه

عفونت، محدودیت حرکتی، کوتاهی بافت اسکارهای محدودکننده، مشکلات زیبایی و عوارض ناخواسته ناشی از آن جلوگیری کند. با شناسایی مراحل اختصاصی التیام زخم و مکانیسم‌های موثر بر روند التیام می‌توان به ترمیم و معالجه زخم کمک نمود [۱]. روش‌های درمان زخم در طی زمان

انسان از زمانی که با به عرصه حیات گذاشت در معرض سوانح طبیعی و جنگ‌ها مواجه با جراحات و ابتلا به زخم بوده است. بنابراین مراقبت از زخم و نحوه ترمیم آن از مهم‌ترین مسائل بشر محسوب می‌شده تا از عوارضی هم‌چون

شده با منافذ فراوان، فضایی شبیه به ماتریکس خارج سلولی بدن برای سلول‌ها فراهم می‌سازد که بر موفولوژی، جهت گیری، چسبندگی، مهاجرت، تکثیر، تمایز و عمل‌کرد سلول‌ها موثر است [۹]. امروزه استفاده از داربست‌های مصنوعی به علت مزیت‌های فراوان از جمله انعطاف‌پذیری و قیمت مناسب به شدت در حال گسترش است. از جمله مهم‌ترین و معمول‌ترین داربست‌های مورد استفاده می‌توان به PLA، PCL، PGA و PLGA اشاره کرد [۱۰، ۱۱]. از نقطه نظر علوم بیولوژیک تمام ارگان‌ها و اعضا بدن از نانوساختارها تشکیل شده‌اند و به همین دلیل نانوالیاف سازگاری خوبی را برای مصارف بیوپزشکی هم‌چون پروتزها، سیستم‌های ره‌ایش دارو و تولید پوست و ارگان‌های مصنوعی بدن پیدا نموده‌اند. امروزه نانوتکنولوژی با ورود خود به عرصه‌های مختلف علمی به همراه مهندسی بافت تحولی شگرف را به وجود آورده است [۱۲]. در سال‌های اخیر روش‌های مختلفی برای تولید داربست‌ها مطرح گردیده است. در میان انواع روش‌های تولید داربست، روش الکتروریسی یا همان Electrospinning بیش‌تر از همه مورد توجه قرار گرفته است. مبنای الکتروریسی، استفاده از نیروی میدان الکتریکی بین قطره معلق محلول یا مذاب در نوک موئینه و صفحه جمع‌کننده است. زمانی که شدت میدان الکتریکی بر کشش سطحی محلول یا مذاب پلیمری غلبه پیدا می‌کند، یک جت باردار از قطره خارج شده و به سمت صفحه هدف حرکت می‌کند و الیاف به صورت لایه‌ای بی‌شکل قرار می‌گیرند [۱۳].

در این بررسی کشت فیبروبلاست‌ها بر داربست PLA/CS (polylactic acid/chitosan) انجام شد و مجموعه حاصل، روی زخم‌های ایجاد شده در مدل حیوانی انتقال داده شد و میزان بهبودی زخم بعد از انجام این پیوند از نظر زمانی و کیفیت ترمیم در گروه تجربی پیگیری و با گروه شاهد که پیوند دریافت نکرده‌اند از نظر بافت‌شناسی مقایسه گردید.

دست‌خوش تغییرات زیادی شده است. امروزه زخم و ترمیم آن از نظر اهمیت، جایگاه خاصی را به خود اختصاص داده است. التیام زخم فرایندی پیچیده و منظم است و مستلزم تعامل بین انواع مختلف سلول‌ها، پروتئین‌های ساختمانی، فاکتورهای رشد و پروتئینازها می‌باشد. سلول‌های ماست‌سل، فیبروبلاست‌ها و ماکروفاژها نقش مهمی در ترمیم زخم دارند [۲]. در ناحیه زخم سیستم گردش خون متحمل آسیب زیادی شده که سبب ارسال پیام از سلول‌های آسیب‌دیده و نهایتاً منجر به رگ‌زایی جدید شده و در این راستا فیبروبلاست‌ها با ایجاد چارچوب پیوندی رگ‌های خونی جدید را حمایت می‌کنند [۳، ۴]. به طور کلی هر عاملی که رگ‌زایی را تشدید کند موجب تسریع بهبود زخم می‌شود. بعد از ایجاد جراحی فیبروبلاست‌های به وجود آورنده بافت جدید، در عرض دو تا سه روز ظاهر شده و در هفته اول بعد از آسیب به حداکثر تعداد خود می‌رسند. ماکروفاژها با ساختن موادی مانند لاکتات‌ها، اساسی‌ترین عامل تحریک فیبروبلاست محسوب می‌شوند. فیبروبلاست‌ها مقادیر زیادی ماتریکس پروتئینی رسوب می‌دهند که در آن کلاژن فراوان بوده و قدرت کشش پوست را افزایش می‌دهد. تجدید اپیدرم بعد از یک دوره چند ساعته شروع شده و تا زمانی که کراتینوسیت‌ها، درم را بیوشانند طول می‌کشد. بنابراین روند التیام زخم معمولاً بر اساس منطقه‌ای از زخم که توسط بافت گرانوله ترمیم شده و میزان گسترش و تجدید اپیدرم و بافت همبند، آنژیوژنز، پدیدار شدن کلاژن و پروتئوگلیکان‌ها سنجیده می‌شود [۵-۷]. در سال‌های اخیر مهندسی بافت به عنوان یک رشته آکادمیک فرصت بی‌ظیری را برای پیشرفت و بهبودی روش‌های درمانی جهت درمان بیماری‌های پوستی فراهم کرده است [۸]. مطالعات نشان می‌دهد استفاده از مهندسی بافت و سلول درمانی و تولید پوست مصنوعی نقش موثری در تسریع ترمیم زخم داشته و سبب افزایش رگ‌زایی در محل آسیب‌دیده می‌گردد. شرایط کشت سه بعدی در مقایسه با کشت دو بعدی به شرایط تکوین در *in vivo* مشابه‌تر می‌باشد. داربست‌های نانوفیروز با تشکیل شبکه‌ای از الیاف بهم تنیده

مواد و روش‌ها

کشت و تمایز سلول‌های فیروبلاست. سلول‌های فیروبلاست رده STO از موسسه پاستور تهران خریداری شدند. سلول‌های STO در محیط کشت DMEM (Gibco) با ۱۰٪ FBS (Gibco) در انکوباتور حاوی ۵٪ CO₂ با ۹۰٪ رطوبت و در دمای ۳۷°C نگهداری شدند. بعد از این که حدود ۸۰٪ فلاسک پر شد سلول‌ها پاساژ و حدود ۱۰^۴×۵ سلول در ظرف کشت (Bacterial Petri Dishes) ۲۴ خانه بر داربست در محیط معمول قرار داده شدند و ۲۴ ساعت بعد این محیط با محیط DMEM حاوی EGF (Sigma) با غلظت ۱۰ ng/ml و ۱۰٪ سرم bFGF (Sigma) با غلظت ۱۰ ng/ml و غلظت ۱٪ تعویض شد. محیط هر روز تعویض و سلول‌ها به مدت یک هفته در این شرایط نگهداری شدند.

تهیه داربست نانوفیبری PLA/gelatin با روش الکترورسی. برای تهیه داربست ابتدا پلیمر PLA (polylactic acid, Sigma) با غلظت ۲/۵ wt٪ و ژلاتین (Sigma) با غلظت ۱۰ wt٪ در حلال HFIP (هگزا فلورو ایزوپروپانول) در دمای اتاق به مدت ۲۴ ساعت حل شد تا محلولی شفاف حاصل گردید سپس محلول در سرنگ پلاستیکی ۵ میلی‌لیتری قرار داده و در دستگاه الکترورسی جاسازی گشت. برای رسیدن این محلول از سوزن gauge 22 استفاده شد. ولتاژ بین ۱۲ تا ۱۴ کیلوولت، سرعت تزریق ۰/۵ میلی‌لیتر در ساعت، فاصله سر سوزن تا غلطک ۱۰ سانتی‌متر و سرعت چرخش غلتک ۱۰۰۰ rpm تنظیم گشت. این محلول به مدت ۱۵ ساعت روی ورقه الومینیومی بافته شد و سپس داربست حاصل به مدت ۲۴ ساعت در شرایط خلا خشک گردید.

کشت سلول‌های STO بر داربست PLA/gelatin بعد از تهیه، داربست به قطعاتی با قطر ۱۶ میلی‌متر تقسیم و برای استریل شدن به مدت ۲۴ ساعت در مقابل تابش امواج UV قرار داده شد سپس در پلیت ۲۴ خانه تعیبه و به مدت ۲۴ ساعت در PBS محتوی غلظت بالای پنی‌سلین - استرپتومایسین قرار داده شد سپس تعداد cell/well ۱۰^۴×۵

سلول در هر خانه ریخته و برای افزایش چسبندگی سلولی از غلظت ۰/۱٪ ژلاتین استفاده گردید و ۲۴ ساعت بعد محیط تمایزی اضافه گردید.

بررسی‌های مورفولوژی با میکروسوپ الکترونی. مورفولوژی، قطر و منافذ لیاف تهیه شده و همچنین چگونگی آرایش سلولی بر داربست با میکروسکوپ الکترونی SEM مورد بررسی قرار گرفت. برای آماده‌سازی داربست‌های دارای سلول ابتدا نمونه‌ها با PBS به مدت پنج دقیقه شسته و با گلو تاردهید ۲/۵٪ به مدت یک ساعت تثبیت و سپس آبگیری با الکل‌های ۳۰٪، ۵۰٪، ۷۰٪، ۸۰٪، ۹۰٪، ۱۰۰٪ به صورت صعودی هر کدام به مدت پانزده دقیقه انجام گرفت سپس با ذرات طلا پوشانده و عکس‌برداری توسط میکروسکوپ الکترونی انجام گرفت. قطر لیاف و اندازه منافذ با استفاده از نرم‌افزار measurement اندازه‌گیری گردید.

ارزیابی میزان بقای سلولی با روش MTT. میزان بقای سلول‌های کشت داده شده بر روی داربست نانوفیبروز در مقایسه با محیط کشت دو بعدی با استفاده از 3-(4, 5-di-methylthiazol-2-yl)-2, 5-diphenyl tetrazolium bromide (MTT) با غلظت ۵ mg/ml ارزیابی شد. این تست در روزهای ۱، ۳، ۵ و ۷ بعد از قرار دادن سلول‌ها در محیط کشت دو بعدی و سه بعدی انجام شد به این صورت که در زمان مناسب بعد از کشت سلول‌ها در پلیت‌های ۲۴ خانه، محیط کشت خارج و به هر خانه حدود ۳۰۰ میلی‌لیتر محیط تازه حاوی ۳۰ میکرولیتر از محلول MTT اضافه شد، بعد از ۳ تا ۴ ساعت انکوباسیون با دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد محلول MTT خارج و به هر خانه ۲۰۰ میکرولیتر DMSO (Dimethyl Sulfoxide) اضافه شد سپس جذب نمونه در طول موج ۵۷۰ با استفاده از دستگاه الیزا ریدر خوانده شد.

روش ایجاد زخم. در این تحقیق از ۲۰ رت نر نژاد Wistar تهیه شده از انستیتو پاستور ایران استفاده شد. حیوانات در قفس‌های استاندارد با شرایط روز و شب طبیعی و در دمای ۲۷±۲ سانتی‌گراد نگهداری می‌شدند. ابتدا حیوانات با استفاده

نرم افزار Excel انجام گرفت و تفاوت‌های با $P < 0.05$ معنی دار در نظر گرفته شد.

نتایج

بررسی مورفولوژی سلول‌های STO کشت داده شده بر داربست PLA/CS. بررسی مورفولوژی داربست PLA/CS و چگونگی استقرار سلول‌های STO بر داربست به وسیله عکس برداری با میکروسکوپ الکترونی SEM انجام گرفت. میکروگراف الکترونی داربست نانوفیبر PLA/CS در شکل ۱ نشان داده شده است و متوسط قطر الیاف با نرم افزار measurement حدوداً ۱۰۰ نانومتر تخمین زده شده است (شکل ۱) تصویر هم‌چنین نشان‌دهنده ادغام موفق پلیمر PLA با کیتوزان و تولید فیبرهای یکنواخت و بدون بید و در ابعاد نانو می‌باشد. شکل ۱ هم‌چنین نشان‌دهنده چگونگی استقرار سلول‌های STO بر داربست PLA/CS می‌باشد و نشان می‌دهد که داربست نانوفیبر PLA/CS می‌تواند بستر مناسبی برای چسبندگی، استقرار و بقای سلول‌های STO فراهم آورد. بررسی بقا سلول‌های STO با استفاده از روش MTT روش MTT برای مقایسه و بررسی میزان بقا سلول‌های STO در شرایط کشت دو بعدی و سه بعدی در روزهای ۱، ۳، ۵ و ۷ انجام گرفت. روش MTT بر اساس احیا شدن نمک زرد رنگ تترازولیوم به کریستال‌های بنفش رنگ فورمازون به وسیله آنزیم دهیدروژناز میتوکندریایی حاصل از سلول‌های زنده و فعال از نظر متابولیکی انجام می‌گیرد. نتایج حاصله نشان‌دهنده افزایش میزان بقا سلول‌های STO بر داربست در مقایسه با کشت در شرایط دو بعدی می‌باشد اگر چه این افزایش در روز ۱ معنی دار نیست اما با گذشت ۵ و ۷ روز از زمان استقرار سلول‌ها بر داربست افزایش بقا سلولی بر داربست کاملاً مشهود و در مقایسه با کشت دو بعدی به طور معنی داری افزایش یافت که در نمودار مربوطه نمایش داده شده است (شکل ۲).

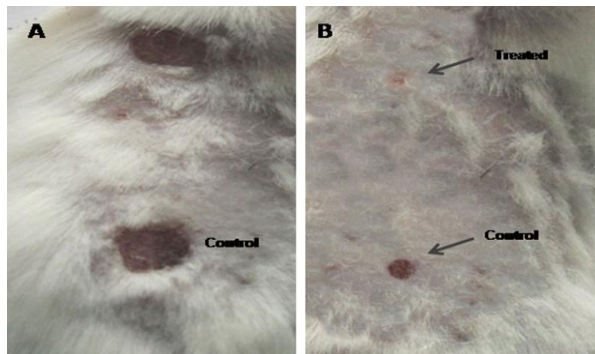
از محلول اتر (مرک آلمان) در محفظه سر بسته بی‌هوش و پس از مشاهده علائم بی‌هوشی موی پوست ناحیه پشت گردن و قسمت فوقانی و قسمت فوقانی خلفی تراشیده و با بتادین ضد عفونی شدند. سپس پوست این ناحیه به شکل دایره و به قطر تقریباً ۲ سانتی‌متر به طور کامل برداشته شد. و سپس محل زخم با داربست حاوی سلول پوشیده و بسته شد. در مورد گروه کنترل درمانی صورت نگرفت.

نحوه مراقبت بعد از جراحی. رت‌های جراحی شده به صورت انفرادی قرار گرفتند و دسترسی آزادانه به غذا و آب داشتند. روز جراحی روز صفر محسوب و از روز صفر تا زمان‌های معین سطح زخم گروه تجربی با داربست پوشیده شده از سلول‌های فیبروبلاست پوشیده شد و در مورد زخم گروه کنترل درمانی صورت نگرفت.

بررسی‌های بافت‌شناسی. برای مطالعات بافتی در روز چهاردهم و بیست و هشتم نمونه برداری بافتی صورت گرفت. در هر مرحله پنج رت از هر گروه به صورت تصادفی انتخاب شد. پس از کشتن حیوانات با کلروفرم، ناحیه زخم و پوست سالم مجاور آن از فاسیای عمقی زیرین جدا شد. نمونه‌ها شستشو و پس از ثبوت در محلول فرمالین ۲ درصد و طی مراحل آماده‌سازی بافت در پارافین قالب‌گیری شدند. سپس از مقاطع توسط میکروتوم برش‌هایی به ضخامت هفت میکرون به صورت سریال تهیه و با هماتوکسیلین-اوئوزین جهت مشاهده رگ، سلول‌های التهابی و فیبروبلاست و ماسون‌تری کروم برای مشاهده کلاژن رنگ‌آمیزی شدند. به منظور شمارش سلولی از نرم افزار Image tool استفاده شد. برای اندازه‌گیری تراکم رگ‌های خونی، سلول‌های فیبروبلاست و اندازه‌گیری میزان کلاژن در ناحیه از زخم به روشی که نواحی از عکس‌های حاصل به صورت تصادفی انتخاب و شمارش در بزرگ‌نمایی‌های بالا انجام گرفت.

روش آماری. نتایج با استفاده از نرم‌افزار SPSS (Ver.16) و آزمون آماری t مستقل و به صورت میانگین \pm انحراف معیار مورد ارزیابی قرار گرفت. رسم نمودارها در

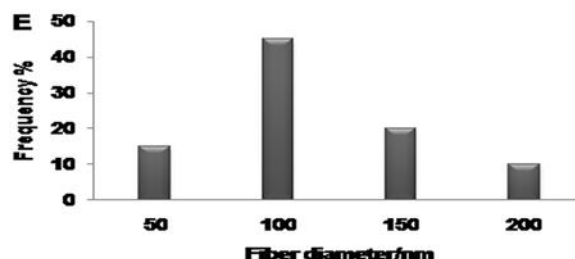
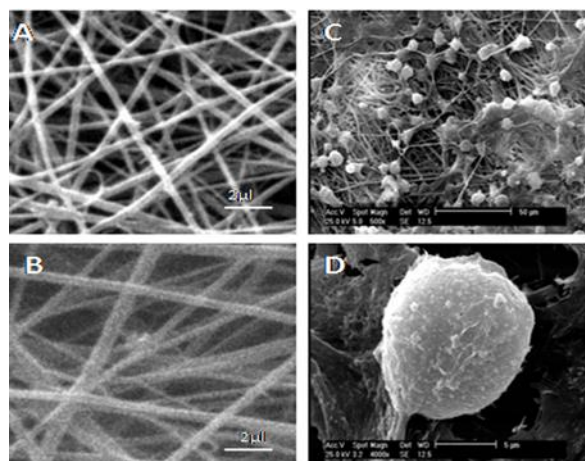
نمونه زخم های ایجاد شده در پوست رت های مورد آزمایش که به وسیله سلول های فیبروبلاست کشت شده بر داربست به مدت ۲۸ روز تیمار شدند به طور محرزگی نسبت به نمونه کنترل (بدون تیمار) با سرعت بیش تری بهبود یافتند (شکل ۳).



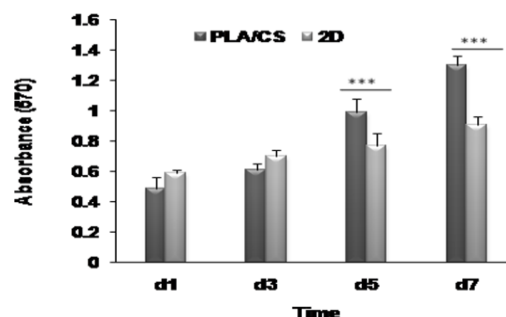
شکل ۳. مشاهدات ماکروسکوپی روند بهبود زخم و کاهش اندازه زخم در نمونه های تجربی به طور معنی داری نسبت به نمونه های کنترل سریع تر اتفاق افتاد (۲۸ روز بعد از تیمار)

مشاهدات بافت شناسی در روز چهاردهم. مشاهدات بافت شناسی حاصل از رنگ آمیزی ائوزین-هموتوکسیلین و ماسون تری کروم نشان داد که در روز چهاردهم در گروه تجربی روند اپیتلیزاسیون نسبت به گروه کنترل به طور محرزگی سریع تر است و تعداد سلول های فیبروبلاستی در بافت در حال بهبودی در مقایسه با گروه کنترل به صورت چشمگیری بیش تر است. در گروه تجربی ناحیه اسکار کوچک تر بوده و رنگ آبی کلاژن نسبت به گروه کنترل پررنگ تر است و این در حالی است که در گروه کنترل اپیتلیزاسیون هنوز کامل نشده است و بافت اسکار در حال تشکیل است. هم چنین مشاهدات رنگ آمیزی ماسون تری کروم نشان می دهد که ناحیه زخم در حال ترمیم نسبت به گروه تجربی دارای رشته های کلاژنی کم تری می باشد (شکل ۴ و ۶).

مشاهدات بافت شناسی در روز بیست و هشتم. مشاهدات بافت شناسی حاصل از رنگ آمیزی ائوزین-هموتوکسیلین و ماسون تری کروم نشان داد که در روز بیست و هشتم در گروه تجربی لایه اپیتلیال در مقایسه با گروه کنترل (بدون تیمار) کامل و شاخی شده است و رشته های کلاژن منظم و موازی با اپیتلیال است. هم چنین شدت رنگ آبی رشته های کلاژن در



شکل ۱. میکروگراف میکروسکوپ الکترونی. (A) نانوفیبرهای داربست الکتروریسی شده PLA/CS - نانوفیبرهای داربست الکتروریسی شده PLA/CS با بزرگنمایی بالاتر (C) - سلول های STO کشت شده بر داربست (D) - سلول های STO کشت شده بر داربست با بزرگنمایی بالاتر (E) - نمودار میانگین قطر فیبرهای داربست نانوالیاف PLA/CS که میانگین بیش ترین الیاف حدوداً ۱۰۰ نانومتر اندازه گیری شد.

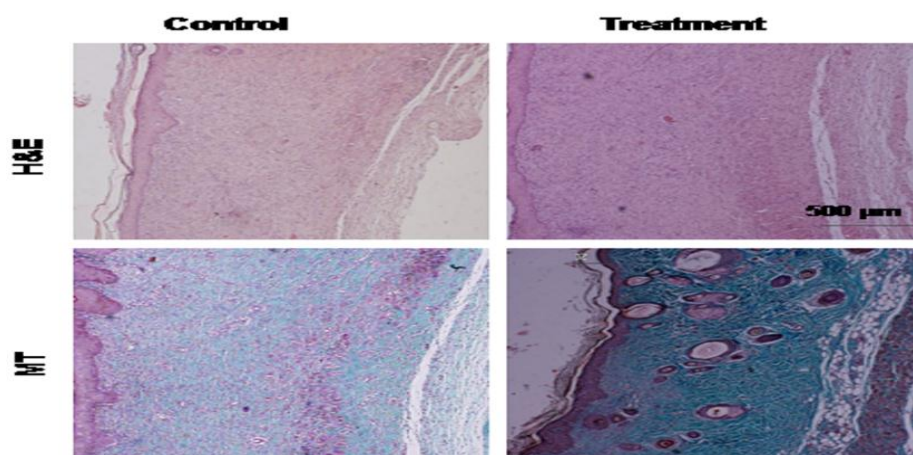


شکل ۲. نتایج حاصل از MTT سلول های STO کشت داده شده بر داربست نانوفیبر PLA/CS و در شرایط کشت دوبعدی (D2) به عنوان کنترل در روزهای ۱، ۳، ۵ و ۷ بعد از کشت ($p < 0.05$). مقادیر به صورت میانگین \pm انحراف معیار می باشد و آزمایش سه بار تکرار گردیده است ($n = 3$).

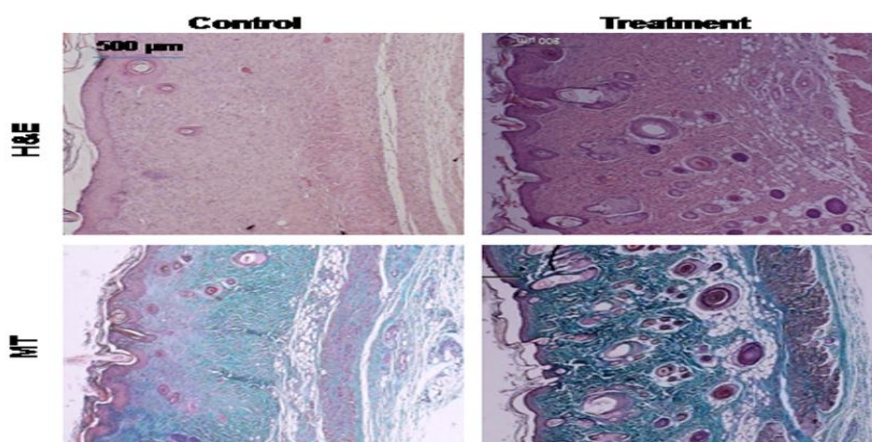
مشاهدات ماکروسکوپی. در مشاهدات ماکروسکوپی روند بهبود زخم و کاهش اندازه زخم در روزهای مختلف در نمونه های تجربی به طور معنی داری نسبت به نمونه های کنترل سریع تر اتفاق افتاد. همان گونه که در شکل ۳ مشاهده می شود

به طور معنی داری کم تر است هم چنین میزان تشکیل کلاژن در روز بیست و هشتم در مقایسه با روز چهاردهم افزایش یافته و به طور کلی بهبودی نسبتاً کامل زخم مشاهده گردید (شکل ۵ و ۶).

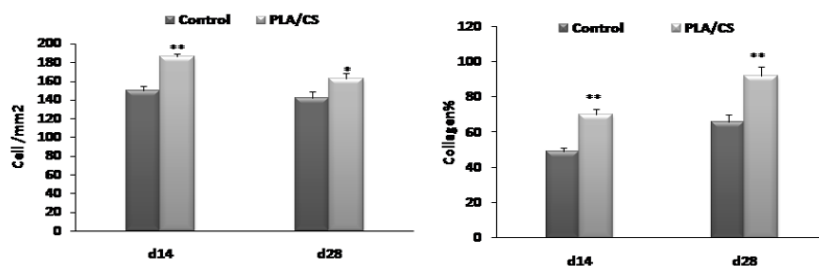
گروه تجربی بیش تر از گروه کنترل می باشد و تعداد سلول های فیبروبلاستی نسبت به کنترل بیش تر ولی در مقایسه با روز چهاردهم کاهش یافته است. در گروه کنترل بیش تر ضخامت بافت ترمیمی را اسکار فرا گرفته و تعداد سلول های فیبروبلاستی و میزان تشکیل کلاژن در مقایسه با گروه تجربی



شکل ۴. پاسخ هیستولوژیکی زخم های ایجاد شده نسبت با داربست PLA/CS حاوی سلول های فیبروبلاست ۱۴ روز بعد از تیمار. MT: رنگ آمیزی ماسون تریکروم H&E: رنگ آمیزی اتوزین - همتوکسیلین



شکل ۵. پاسخ هیستولوژیکی زخم های ایجاد شده نسبت به داربست PLA/CS حاوی سلول های فیبروبلاست ۲۸ روز بعد از تیمار. MT: رنگ آمیزی ماسون تریکروم H&E: رنگ آمیزی اتوزین - همتوکسیلین



شکل ۶. نمودار تعداد سلول های مشاهده شده حاصل از رنگ آمیزی اتوزین - همتوکسیلین ۱۴ و ۲۸ روز بعد از تیمار و نمودار درصد کلاژن تولید شده حاصل از رنگ آمیزی ماسون تریکروم ۱۴ و ۲۸ روز بعد از تیمار

بحث و نتیجه گیری

موفقیت در مهندسی بافت پوست، به طور عمده بر پایه‌ی تنظیم رفتار سلولی و پیشرفت بافت از طریق توسعه‌ی یک داربست مشابه با ماده زمینه خارج سلولی طبیعی که بتواند کشت سلولی را حمایت نماید، می‌باشد. همان‌طور که یک ماده زمینه خارج سلولی طبیعی، یک محیط ایده‌آل از نظر شیمیایی، الکتریکی و توپوگرافی را برای چسبندگی و تکثیر سلول‌ها را فراهم می‌نماید، مهندسی بافت نیز نیاز به یک داربست زیست‌سازگار، خنثی از نظر ایمنولوژیکی، هدایت‌کننده، زیست تخریب‌پذیر برای حمایت رشد و ترمیم ضایعات پوستی محسوب می‌گردد [۱۴، ۱۵]. مطالعات ما نشان داد که داربست نانوفیبر PLA/CS دارای این خصوصیات برای مهندسی بافت پوست بوده و سلول‌های فیبروبلاست به راحتی بر روی این داربست قرار گرفته و تکثیر و گسترش یافته و هیچ‌گونه ناسازگاری با این داربست را نشان نمی‌دهند. در این تحقیق داربست نانوفیبر PLA/CS هم‌راه با کشت و تکثیر سلول‌های فیبروبلاستی تهیه و بر مدل حیوانی رت پیوند زده شد که ارزیابی‌های صورت گرفته نشانگر شکل‌گیری کامل بافت پوستی و جایگزینی پوست جدید در محل‌های پیوند شده را نشان داد.

در سال‌های اخیر استفاده از سلول‌های بنیادی به عنوان یکی از راه‌های درمان بر پایه سلول درمانی در مهندسی بافت پوست حائز اهمیت گردیده است. در سال ۲۰۰۷ Wu و همکارانش اعلام کردند که سلول‌های بنیادی مزانشیمی به‌واسطه تواناییشان در تمایز و آنژیوژنز سبب افزایش چشمگیری در بهبود زخم‌های پوستی می‌گردند [۱۶، ۱۷]. در سال ۲۰۱۰ Huang و همکارانش با تکیه بر مهندسی بافت پوست و سلول درمانی موفق به تولید بافت پوست مصنوعی و درمان موفق ضایعات پوستی شدند [۱۸]. در سال ۲۰۰۸ Zhang و همکارانش با کشت هم‌زمان سلول‌های اپیدرمی و فیبروبلاستی بر داربست فیبرین و پیوند این سلول‌ها به مدل حیوانی موفق به افزایش معنی‌داری در روند بهبود زخم‌های پوستی شدند [۱۹]. هم‌چنین در سال ۲۰۱۳ Chlapanidas و

همکارانش اعلام کردند که با استخراج سلول‌های بنیادی از بافت چربی و کشت دادن این سلول‌ها بر فیلم فیبرینی و سپس پیوند به مدل حیوانی موفق به درمان چشمگیری در زمینه مهندسی بافت پوست گردیدند [۲۰]. بنابراین این تحقیقات نشان‌دهنده استفاده رایج از تکنیک‌های مهندسی بافت به عنوان یک استراتژی سودمند در درمان مناسب‌تر بیماری‌های پوستی می‌باشد که نتایج حاصل از این تحقیق نیز تاییدکننده اثرات مثبت استفاده از داربست در جهت درمان زخم‌های پوستی با کارایی بالا می‌باشد.

امروزه محققان درصددند که با تقلید هر چه بیش‌تر از شرایط *in vivo* کارایی در شرایط *in vitro* را ارتقا بخشند، علم مهندسی بافت با ارائه انواع داربست‌ها در محیط کشت سلولی که می‌تواند تقلیدی از فضای خارج سلولی در بدن باشد برای رسیدن به این مقصود از اهمیت خاصی برخوردار است [۲۱، ۲۲]. پیشرفت‌های اخیر در روش الکترورسی امکان تولید الیافی پیوسته و جامد با قطرهایی در محدوده چندین نانومتر را به هم‌راه کنترل ساختار بین مولکولی سطحی ایجاد نموده است. طبق بررسی‌های انجام شده مشخص شده که استفاده از فرایند الکترورسی بهترین روش تولید نانوالیاف از مواد پلیمری می‌باشد که در آن تولید نانوالیاف به‌صورت مداوم انجام می‌گیرد [۲۳، ۲۴]. بنابراین ما در تحقیق حاضر از روش الکترورسی برای تهیه داربست نانوفیبر PLA/CS استفاده نمودیم.

یکی از بهترین روش‌ها برای تعدیل خصوصیات داربست‌های پلیمری ادغام آن‌ها با یک ماده طبیعی به منظور افزایش خواص زیستی است. کیتوسان یک پلیمر طبیعی بسیار کارآمد است که خاصیت آب‌دوستی و زیست سازگاری بالایی دارد و می‌تواند سبب افزایش معنی‌داری در توان چسبندگی پلیمرهای مصنوعی برای اتصال، رشد و تکثیر سلولی گردد [۲۵، ۲۶]. مطالعات نشان می‌دهد که کیتوسان از جمله پلیمرهای طبیعی است که در مهندسی بافت پوست به دلیل خواصش به عنوان ماده‌ای مناسب مطرح می‌گردد [۲۷]. بنابراین در این مطالعه برای تعدیل و بهبود داربست PLA از

نتایج نشان می‌دهد که داربست PLA/CS تهیه شده با روش الکتروریسی، داربستی با زیست سازگاری و توپوگرافی سطحی مناسب برای چسبندگی، بقا و کشت سلولی بوده و در اثر پیوند هیچ‌گونه عارضه جانبی منفی ایجاد نمی‌کند. این داربست همراه با کشت هم‌زمان فیبروبلاست‌ها و قرار دادن آن در محل زخم موجب بهبود روند ترمیم زخم می‌گردد. به نظر می‌رسد پیوند داربست PLA/CS همراه با کشت سلول‌های فیبروبلاست بر آن سبب افزایش تعداد فیبروبلاست‌ها در محل زخم و افزایش مقدار کلاژن و احتمالاً افزایش میزان رگ‌زایی و در نتیجه تسریع و کوتاه شدن زمان بهبودی جراحات گردیده است. البته با توجه به محدودیت‌های این تحقیق، مطالعات پیش‌تر در این زمینه توصیه می‌گردد.

تشکر و قدردانی

نویسندگان این مقاله مراتب سپاس و تشکر خود را از کلیه دوستان و همکاران به واسطه حمایت‌هایشان در انجام این پروژه اعلام می‌دارند.

منابع

- [1] Atiyeh BS, Hayek SN, Gunn SW. New technologies for burn wound closure and healing--review of the literature. *Burns* 2005; 31: 944-956.
- [2] Heunis TD, Dicks LM. Nanofibers offer alternative ways to the treatment of skin infections. *J Biomed Biotechnol* 2010; 2010.
- [3] Tangsadthakun C, Kanokpanont S, Sanchavanakit N, Pichyangkura R, Banaprasert T, Tabata Y, et al. The influence of molecular weight of chitosan on the physical and biological properties of collagen/chitosan scaffolds. *J Biomater Sci Polym Ed* 2007; 18: 147-163.
- [4] van den Berg LM, Zijlstra-Willems EM, Richters CD, Ulrich MM, Geijtenbeek TB. Dectin-1 activation induces proliferation and migration of human keratinocytes enhancing wound re-epithelialization. *Cell Immunol* 2014; 289: 49-54.
- [5] Raja, Sivamani K, Garcia MS, Isseroff RR. Wound re-epithelialization: modulating keratinocyte migration in wound healing. *Front Biosci* 2007; 12: 2849-2868.
- [6] Sivamani RK, Pullar CE, Manabat-Hidalgo CG, Rocke DM, Carlsen RC, Greenhalgh DG, et al. Stress-mediated increases in systemic and local epinephrine impair skin wound healing: potential new indication for beta blockers. *PLoS Med* 2009; 6: e12.
- [7] Hoveizi E, Nabiani M, Parivar K, Rajabi-Zeleti S, Tavakol S. Functionalisation and surface modification of electrospun polylactic acid scaffold for tissue engineering. *Cell Biol Int* 2014; 38: 41-49.

کیتوسان استفاده نمودیم. در سال ۲۰۱۳ Pezeshki و همکارانش نیز موفق به درمان زخم‌های پوستی با استفاده از پیوند سلول‌های فیبروبلاستی کشت داده شده بر داربست کیتوسان/ژلاتین شدند [۲۸]. سلول‌های فیبروبلاست موثرترین سلول‌ها در پدیده ترمیم زخم هستند. این سلول‌ها با افزایش تعداد در محل آسیب‌دیده و ساخت ماتریکس و فیبرهای کلاژن در روند تشکیل بافت سالم دخالت می‌نمایند [۲۹]. نتایج تحقیق حاضر نیز نشان داد که تعداد سلول‌های فیبروبلاست در مقایسه با گروه کنترل در روزهای چهارده و بیست و هشتم افزایش یافته است. تغییرات رنگ در نمونه‌های با رنگ‌آمیزی ماسون تری کروم نشان می‌دهد که سنتز کلاژن در نمونه‌های تجربی نسبت به نمونه‌های کنترل سریع‌تر شروع شده و میزان کلاژن نیز بیش‌تر می‌باشد که با نتایج افزایش تعداد سلول‌های فیبروبلاستی در گروه تجربی هم‌خوانی داشته است. پدیده آنژیوژنز عامل مهمی در تغذیه و بهبود زخم به شمار می‌رود که در روند ترمیم زخم اتفاق می‌افتد. بدون این مرحله تهاجم ماکروفاژها و فیبروبلاست‌ها به درون زخم به واسطه عدم وجود اکسیژن با شکست مواجه می‌شود. اگر ساخت عروق دچار اختلال شود مهاجرت فیبروبلاست‌ها نیز دچار توقف می‌شود. بررسی ما نشان می‌دهد که پیوند سلول‌های فیبروبلاستی و هم‌چنین وجود داربست PLA/CS نیز می‌تواند میزان رگ‌زایی را تحریک و تنظیم نماید. در این تحقیق کاستی‌هایی از قبیل تعداد کم نمونه و بررسی در روزهای محدود را داشتیم که این تعداد کم نمونه به علت مشکلات تهیه حیوان و پروسه کاری بود و اگر تعداد نمونه‌ها بیش‌تر بود حتماً نتیجه بهتر آماری گزارش می‌شد و محدودیت دیگر این بود که در همه موارد جانشین پوستی روی زخم بالایی قرار گرفت ولی بهتر بود به صورت اتفاقی آن‌ها روی زخم‌های تجربی قرار می‌گرفتند. کاستی بعدی این بود که بهتر بود هم‌زمان با ارائه نتایج مربوط به گروه‌های تجربی شاهد نتایج حاصل از پیوند داربست بدون سلول را نیز گزارش می‌کردیم.

Zhongguo Xiu Fu Chong Jian Wai Ke Za Zhi 2008; 22: 196-201.

[20] Chlapanidas T, Tosca MC, Farago S, Perteghella S, Galuzzi M, Luccioni G, et al. Formulation and characterization of silk fibroin films as a scaffold for adipose-derived stem cells in skin tissue engineering. *Int J Immunopathol Pharmacol* 2013; 26: 43-49.

[21] Gillette BM, Rossen NS, Das N, Leong D, Wang M, Dugar A, et al. Engineering extracellular matrix structure in 3D multiphase tissues. *Biomater* 2011; 32: 8067-8076.

[22] Hoveizi E, Khodadadi S, Tavakol S, Karima O, Nasiri-Khalili MA. Small molecules differentiate definitive endoderm from human induced pluripotent stem cells on PCL scaffold. *Appl Biochem Biotechnol* 2014; 173: 1727-1736.

[23] Zhang S, Gelain F, Zhao X. Designer self-assembling peptide nanofiber scaffolds for 3D tissue cell cultures. *Semin Cancer Biol* 2005; 15: 413-420.

[24] Hoveizi E, Nabiuini M, Parivar K, Ai J, Massumi M. Definitive endoderm differentiation of human-induced pluripotent stem cells using signaling molecules and IDE1 in three-dimensional polymer scaffold. *J Biomed Mater Res A* 2014; 102: 4027-4036.

[25] Hoveizi E, Nabiuini M, Parivar K, Ai J, Massumi M. Definitive endoderm differentiation of human induced pluripotent stem cells (hiPSCs) using signaling molecules and IDE1 in three-dimensional polymer scaffold. *J Biomed Mater Res A* 2014; 102: 4027-4036.

[26] Hoveizi E, Tavakol S, Ebrahimi-Barough S. Neuroprotective effect of transplanted neural precursors embedded on PLA/CS scaffold in an animal model of multiple sclerosis. *Mol Neurobio* 2015; 51: 1334-1342.

[27] Fang P, Gao Q, Liu WJ, Qi XX, Li GB, Zhang J, et al. Survival and differentiation of neuroepithelial stem cells on chitosan bicomponent fibers. *Chin J Physiol* 2010; 53: 208-214.

[28] Pezeshki-Modaress M, Rajabi-Zeleti S, Zandi M, Mirzadeh H, Sodeifi N, Nekookar A, et al. Cell-loaded gelatin/chitosan scaffolds fabricated by salt-leaching/lyophilization for skin tissue engineering: In vitro and in vivo study. *J Biomed Mater Res A* 2014; 102: 3908-3917.

[29] Massumi M, Hoveizi E, Baktash P, Hooti A, Ghazizadeh L, Nadri S, et al. Efficient programming of human eye conjunctiva-derived induced pluripotent stem (ECiPS) cells into definitive endoderm-like cells. *Exper Cell Res* 2014; 322: 51-61.

[8] Xing ZC, Han SJ, Shin YS, Kang IK. Fabrication of biodegradable polyester nanocomposites by electrospinning for tissue engineering. *Biomaterials* 2008; 29: 4065-4073.

[9] Meng ZX, Wang YS, Ma C, Zheng W, Li L, Zheng YF. Electrospinning of PLGA/gelatin randomly-oriented and aligned nanofibers as potential scaffold in tissue engineering. *Mater Sci Eng* 2010; 30:1204-1210.

[10] Kim HW, Yu HS, Lee HH. Nanofibrous matrices of poly (lactic acid) and gelatin polymeric blends for the improvement of cellular responses. *J Biomed Mater Res A* 2008; 87: 25-32.

[11] Pham QP, Sharma U, Mikos AG. Electrospinning of polymeric nanofibers for tissue engineering applications: a review. *Tissue Eng* 2006; 12: 1197-1211.

[12] Chao G, Xiaobo S, Chenglin C, Yinsheng D, Yuepu P, Pinghua L. A cellular automaton simulation of the degradation of porous polylactide scaffold: I. Effect of porosity. *Mater Sci Eng* 2009; 29: 1950-1958.

[13] Chai JH, Wu QS. Electrospinning preparation and electrical and biological properties of ferrocene/poly (vinylpyrrolidone) composite nanofibers. *Beilstein J Nanotechnol* 2013; 4: 189-197.

[14] Prabhakaran MP, Vatankeh E, Ramakrishna S. Electrospun aligned PHBV/Collagen nanofibers as substrates for nerve tissue engineering. *Biotechnol Bioeng* 2013; 110: 2775-2784.

[15] Kang X, Xie Y, Powell HM, James Lee L, Belury MA, Lannutti JJ, et al. Adipogenesis of murine embryonic stem cells in a three-dimensional culture system using electrospun polymer scaffolds. *Biomater* 2007; 28: 450-458.

[16] Wu L, Ding J. Effects of porosity and pore size on in vitro degradation of three-dimensional porous poly (D,L-lactide-co-glycolide) scaffolds for tissue engineering. *J Biomed Mater Res A* 2005; 75: 767-777.

[17] Wu Y, Chen L, Scott PG, Tredget EE. Mesenchymal stem cells enhance wound healing through differentiation and angiogenesis. *Stem Cell* 2007; 25: 2648-2659.

[18] Huang S, Xu Y, Wu C, Sha D, Fu X. In vitro constitution and in vivo implantation of engineered skin constructs with sweat glands. *Biomater* 2010; 31: 5520-5525.

[19] Zhang C, Wang N, Chen H, Zhou G, Zhang G, Han B. [Experimental study on repairing full-thickness cutaneous deficiency with tissue engineered skin].

Healing potential of fibroblast cells cultured on a PLA/CS nanofibrous scaffold in skin regeneration in Wistar rat

Elham hoveizi (Ph.D)^{*1}, Tayebeh Mohammadi (Ph.D)¹, Somayeh Ebrahimi-barough (Ph.D)², Shima Tavakol (Ph.D)^{3,4}

1- Dept. of biology, Faculty of Sciences, Shahid Chamran University of Ahvaz, Ahvaz, Iran

2 - Dept. of Tissue Engineering and Applied Cell Sciences, Faculty of Advanced Technologies in Medicine, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, Iran

3 - Drug Nanocarriers Research Core, Razi Drug Research Center, Iran University of Medical Sciences, Tehran, Iran

4 - Student's Scientific Research Center, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, Iran

(Received: 7 Mar 2015; Accepted: 19/ Sep 2015)

Introduction: Chronic wound treatment has become a major health issue in developed countries, because of their increasing elderly populations. Although chronic wounds are common problem in all population, treatment for these disabling conditions remains limited and largely ineffective. In this study, we examined the benefits of transplantation of fibroblast cells, cultured on PLA/CS (Poly lactic acid/ Chitosan) scaffold, in wound healing.

Materials and Methods: In this study, fibroblast cells were cultured on nanofibrous PLA/CS scaffold then transplanted in rat. The PLA/CS scaffold was prepared by electrospinning method. Also histological staining methods were used to evaluate cell density and amount of collagen.

Results: The macroscopic observations and histological staining showed that the wound healed much quicker in PLA/CS scaffold in compare to control group. In vivo assessment showed that treatment with fibroblast cell loaded scaffolds significantly promoted cell density and amount of collagen in rat compared to control group.

Conclusion: These results indicated that the capacity of nanofibrous PLA/CS scaffold cultured with fibroblast cells in vivo wound healing.

Keywords: PLA/CS Scaffold, Regeneration, Fibroblast, Tissue Engineering

* Corresponding author. Tel: +98 61 33331045

e.hoveizi@yahoo.com