فصلنامه علمی پژوهشی فیزیولوژی و تکوین جانوری
شماره پیاپی ۴۰، جلد ۱۱، شماره ۱، زمستان ۹۶، صفحه ۲۹ تا ۴۱

مقایسه بستر های پلی ساکاریدی ساخته شده از سیانوباکتری *Anabaena ISC55* بر رده های سلولی فیبروبلاست و اندوتلیال

فاطمه فتاحی حسن آباد[۱]، **مهروز دزفولیان**[۲]
۱-کارشناس ارشدگروه میکروبیولوژی ،دانشکده علوم ، دانشگاه آزاد اسلامی واحد کرج، کرج ، البرز ، ایران . **mehrdezfulian@yahoo.com**
۲- استادیارگروه میکروبیولوژی ،دانشکده علوم ، دانشگاه آزاد اسلامی واحد کرج، کرج ، البرز ، ایران .

تاریخ دریافت: ۹۵/۷/۵ تاریخ پذیرش:۹۶/۸/۲۰

چکیده

زمینه و هدف: برای ترمیم بافت ها و رشد سلول ها نیاز به بستر هایی از پلی مرهای طبیعی به همراه مواد شیمیایی می باشد. بهترین بستر ها ترکیبیاتی هستند که ضمن رشد، فاقد تاثیرات سمی نیز بر سلول ها باشند. با توجه به این که سیانو باکتری ها، فتوتروف های میکروسکوپی هستند که به سرعت روی محیط کشت های معدنی ساده رشد نموده و غنی از ترکیبات پلی مری می باشند، می-توانند به عنوان منابع جدید مقرون به صرفه برای کاربردهای پزشکی مورد استفاده قرار گیرند. در مطالعه حاضر پلیمر موجود در کپسول خارجی سیانوباکتری آنابنا به عنوان ماده پایه در تکثیر و رشد سلول های فیبروبلاست L929 و اندوتلیال استفاده شد تا امکان استفاده از این پلی ساکارید در مهندسی بافت و در ترمیم زخم ارزیابی گردد.

روش کار: پلی ساکارید سیانوباکتری *Anabaena ISC55* استخراج و به عنوان ماده پایه به همراه هیالورونیک اسید و کلاژن به تنهایی و یا در ترکیب با یکدیگر در ساخت بستر سلولی جهت تکثیر و رشد سلول های فیبروبلاست L929 و اندوتلیال HUVEC استفاده شد. میزان زنده ماندن، تکثیر، توانایی ایجاد کلنی و چسبندگی سلول ها در ترکیبات مختلف ساخته شده به وسیله تست MTT و تست سنجش کلون زایی و تست چسبندگی بررسی گردید. تمام نتایج به دست آمده با نرم افزار آماری SPSS نسخه ۲۱ تجزیه و تحلیل شد.

یافته‌ها: افزایش تکثیر سلول های اندوتلیال و کاهش تکثیر در فیبروبلاست ها، در غلظت های خاص به طور معنی داری مشاهده شد. کلون زایی درهر دو نوع سلول مورد مطالعه حفظ گردید.

نتیجه گیری: این بستر برای تولید رگ مصنوعی و پانسمان زخم مناسب می باشد.

واژه های کلیدی: پلی ساکارید، فیبروبلاست، اندوتلیال.

مقدمه

هرساله میلیون ها نفر مبتلا به بیماری های قلبی عروقی تشخیص داده می شوند. بسیاری از این بیماران نیاز به عمل بایپس عروق کرونر دارند. امروزه برای کاربردهای بالینی نیاز به ایجاد رگ ها برای پیوند عروق وجود دارد(۱۲). گروهی از دانشمندان کشت سلول ها در ماتریکس کلاژن را به عنوان جایگزینی برای عروق شریانی معرفی کرده اند(۲۷). تاکنون انواع بسیاری از ماتریکس ها برای بافت های مختلف طراحی شده است تا در پیوند عروق به کار گرفته شود(۶-۲۲). آنژیوژنز یا نورگ زایی، روند رشدو ایجاد رگ های خونی جدید می باشد و یک عامل اصلی در بهبود زخم به شمار می-رود. اکثر مطالعات نشان می دهد که نورگ زایی به دلیل تهیه اکسیژن و مواد مغذی لازم برای حمایت از رشد سریع سلول ها واسطه ترمیمی بسیار مهمی می باشد. آنژیوژنز در زخم های سطحی به دلیل افزایش تولید(Vascular endothelial growth factor(VEGF می باشد(۲۳)که فاکتور رشد اندوتلیال عروقی بوده، گلیکوپروتئین همودایمری است که ۴۰ تا۴۵ کیلودالتون وزن و یک میتوژن قوی برای سلول های اندوتلیال عروقی است که می تواند رگ زایی در داخل بدن را

القاء نماید. امروزه برای ایجاد رگ از موادی نظیر Dacron (polyethylene terephthalate) و Goretex (expanded polytetrafluoroethylene) استفاده می-شود که در مرحله کارآزمایی های بالینی بوده(۱۴) ولی هنوز تحت تاثیر فشار کارآزمایی های بالینی موفق نمی باشد. در مطالعه ای از polyglycolic acid and epsilon-caprolactone/L-lactide استفاده شده و برای ۵ سال پیوند ایجاد شده از رگ مصنوعی ساخته شده مورد استفاده قرار گرفت ولی به دلیل ضایعات تنگی جدار رگ استفاده طولانی تر امکان پذیر نبود. به نظر می رسد به ترکیباتی نیاز می باشد که احتمال ضایعات تنگی در آن ها به طور کامل منتفی باشد(۱۶). در حال حاضر با وجود دستاوردهای بزرگ و برخی کارآزمایی های بالینی انسانی، هنوز این چالش باقی مانده است(۱۷-۱۹). از سوی دیگر اسکار های دائمی که بعد از بهبود زخم باقی می مانند در بهبود صدمات بافتی ناشی از ایسکمی(انفارکتوس میوکارد، سکته مغزی)، تروما، جراحی و التهاب مانعی بزرگ در التیام به شمار می‌روند. گزینه های کنونی در کاهش تشکیل اسکار بیشتر مرتبط با مداخله محلی است و راه های متفاوتی برای آن وجود دارد. بهبود زخم یک فرآیند پویا و مهم می باشد که هدف از آن بازگرداندن ساختار بافت آسیب دیده است. بهبود زخم اغلب به سه مرحله تقسیم می شود(۸). اولین مرحله التهاب می باشد، که در نتیجه حضور ماکروفاژها و نوتروفیل ها در محل آسیب می باشد(۲۳-۲۹). ماکروفاژها به پاکسازی پاتوژن ها و باقی مانده های سلولی در محل زخم کمک می کنند. دومین مرحله، فاز تکثیر و و فاز فیبروتیک است. سلول های التهابی ماتریکس متالوپروتئیناز، سایتوکاین ها و فاکتور های رشد را آزاد می کنند که منجر به مرحله تکثیر و فیبروتیک از ترمیم زخم می شود که به همراه رگ زایی می باشد(یا نورگ زایی) در بخش آسیب دیده می-باشد(۴-۱۳). این یک گام مهم در بهبود زخم در بسیاری از بافت ها است این رگ های خونی سبب حمل و نقل اکسیژن و مواد مغذی، و سلول های التهابی مورد نیاز برای بهبود سریع تر زخم می شوند. در نهایت، در مرحله سوم، پس ازبسته شدن زخم بازسازی در تلاش برای برقراری مجدد معماری بافت طبیعی انجام می شود. با این حال، تداوم حضور سلول های میوفیبروبلاست و یا رگ زایی بیش از حد می تواند در عملکرد بافت اختلال ایجاد نماید(۲۴-۲۸). در هردو مورد ذکر شده رشد مناسب سلول های اندوتلیال از اهمیت بسیاری برخوردار است. تولید فاکتورهای رشد اندوتلیالی، کلاژن، فیبرونکتین و سایر مولکول های موثر دیگر عموماً توسط فیبروبلاست-ها صورت می گیرد، لذا به یک بستر مناسب برای کشت سلول های اندوتلیال مورد نیاز می باشد که در عین حال این بستر بتواند شرایط کنترل شده ای را برای کشت سلول های فیبروبلاست تامین سازد. معمولاً در ساخت این بسترها از سوبستراهایی که به طور طبیعی در بدن وجود دارند، نظیر کلاژن و پلی ساکارید هایی نظیر هیالورونیک اسید استفاده می شود این ترکیبات زیست سازگار و قابل تجزیه معمولاً دارای کم ترین عوارض جانبی بوده و مواد حاصل از تجزیه آن ها نیز زیان آور نمی باشند. این پلیمرهای طبیعی نویدی برای بهبود بازسازی بافت های آسیب دیده هستند، چرا که آن‌ها بسیار نفوذ پذیر هستند و نقل و انتقال مواد غذایی و متابولیت ها را آسان می کند(۷). با توجه به این که سیانوباکتری‌ها دارای اثرات فیزیولوژی جالبی هستند و استفاده از آن ها در کشاورزی، پزشکی، داروسازی، شیلات و محیط زیست، صنایع غذایی، تصفیه پساب ها و حتی صنایع هوا-فضا، این موجودات را از نظر زیست فناوری موجه جلوه می دهد. ترکیبات بسیاری با قابلیت-های بیولوژیک مختلف از آن ها شناسایی شده است(۱). ترکیباتی که خاصیت ضد باکتریایی(۱۴)، خاصیت ضد

مالاریایی(۲۶) خاصیت ضد التهابی دارد(۱۸). هم چنین اگزوپلی ساکارید استخراج شده از باکتری های پروبیوتیک موجب تسریع روند بهبود زخم در موش صحرایی می شود(۲) و اگزوپلیمرهای تولید شده توسط سه گونه از آنابنا که عمدتاً متشکل از کربوهیدرات(٪۵۰-۱۷) هستند، به علت فعالیت هموستاتیکشان به همراه خواص دیگر مانند سمیت سلولی، ظرفیت جذب آب، فعالیت ضد باکتریایی، و مهار رشد باکتری، قابلیت تجزیه بیولوژیک که مربوط به یک عامل پانسمان زخم است می توانند به عنوان منابع جدید پانسمان های شریان بند مقرون به صرفه برای زخم‌های تروماتیک در کشورهای توسعه نیافته و در حال توسعه استفاده شوند(۲۰). به همین دلیل در مطالعه حاضر برای رسیدن به یک بستر مناسب علاوه بر ترکیبات ذکر شده از پلی ساکارید سیانوباکتری *Anabaena ISC55* نیز استفاده و تاثیرات بسترهای جدید آماده شده بر روی سلول های فیبروبلاست و اندوتلیال مورد ارزیابی صورت گرفت.

مواد و روش ها

کشت سیانوباکتری

سیانوباکتری مورد نظر در این پژوهش به شماره Anabaena ISC55 از بانک ویژه کشت و تکثیر ریزجلبک ها دانشگاه شهید بهشتی،پژوهشکده علوم کاربری به صورت کشت خالص تهیه و در محیط کشت اختصاصی(BG-0) کشت و استخراج گردید(۹).

تهیه داربست ها

برای تهیه داربست ها پلی ساکارید استخراج شده سیانوباکتری، اسید هیالورونیک و کلاژن I به تنهایی و به شکل ترکیبات مختلفی تهیه و سلول های کشت شده در این بستر ها از نظر تکثیر، میزان چسبندگی و تشکیل کلنی مورد بررسی قرار گرفتند. برای این کار غلظت های ۱، ۱/۵، ۲، ۲/۵ و ۳ میلی گرم بر میلی لیتر از پلی-ساکارید، هیالورونیک اسید و کلاژن به تنهایی و یا به همراه هم در چاهک های پلیت ۹۶ خانه ای ریخته و سلول های فیبروبلاست و یا اندوتلیال به آن ها اضافه گردید(۳). غلظت های بالاتر این مواد اثر سایتوتوکسیتی روی هر دو رده سلولی داشتند.

کشت سلول

در این پژوهش از سلول های فیبروبلاست موش رده L929 و سلول های اندوتلیال انسانی رده HUVEC تهیه شده از بانک سلولی انستیتو پاستور ایران استفاده گردید. این سلول ها در محیط کشت RPMI - 1640 به همراه پنی سیلین۱۰۰IU/mL، استرپتومایسین ۱۰۰mg/mLو سرم جنین گوساله ۱۰٪ در شرایط کشت درون انکوباتور ۵٪ CO_2، رطوبت۹۵٪ و دمای ۳۷ درجه سانتی گراد کشت شدند. تعداد سلول های زنده و نسبت آن ها به سلول های مرده با رنگ آمیزی تریپان بلو و لام نئوبار و مشاهده و شمارش با میکروسکوپ معکوس تعیین گردید.

ارزیابی میزان تکثیر سلول ها به روش MTT Assay

نمک تترازولیوم، زرد و محلول در آب می باشد. این نمک با آنزیم سوکسینات دهیدروژناز شکسته و به ترکیب نامحلولی به نام فورمازان احیا و به صورت کریستال های بنفش رنگ در زیر میکروسکوپ به راحتی قابل تشخیص است. میزان رنگ تولید شده با تعداد سلول هایی که از نظر متابولیک فعال هستند رابطه مستقیم دارد. به هر خانه از پلیت ۹۶ خانه ای ۱۰۰ میکرولیتر از محیط کشت که حاوی ۸۰۰۰۰ سلول بود، اضافه گردید. غلظت های مختلف از مواد مورد آزمایش به هرخانه از پلیت اضافه و برای هر غلظت از ۳ خانه استفاده و سه خانه به عنوان کنترل در نظر گرفته شد. سلول ها و ماده مورد نظر هر خانه به خوبی مخلوط شدند. پس از گذشت ۲۴ ساعت پلیت ها از انکوباسیون خارج، تست MTT انجام گردید. محصول فورمازان حاصله با حلال ایزوپروپانول اسیدی حل و جذب نوری رنگ ایجاد شده در طول موج ۵۷۰ nm با دستگاه الایزا پلیت

ریدر خوانده شد. رنگ ایجاد شده با سلول های زنده نسبت مستقیم داشت. برای هر نمونه از داربست های ساخته شده این آزمایش سه بار تکرار گردید و نتایج با توجه به فرمول زیر تفسیر شد.

$$\text{سایتوتوکسیسیتی} = \left(1 - \frac{\text{متوسط OD تست}}{\text{متوسط OD کنترل}}\right) \times 100$$

$$\text{زیستایی سلول} = (1 - \text{سایتوتوکسیسیتی}) \times 100$$

تست چسبندگی

کشت سلول ها به تعداد ۸۰۰۰۰ سلول در هر چاهک انجام گردید، سپس چاهک ها با ۱۰۰ میکرولیتر 1X PBS شسته و سلول ها با کریستال ویوله ۱٪ به مدت ۱۵ دقیقه رنگ آمیزی شدند. بعد از اتمام زمان رنگ آمیزی، رنگ کریستال ویوله تخلیه شده و سلول ها مجدداً با 1X PBS شسته و تعداد سلول های چسبیده با میکروسکوپ مورد بررسی قرار گرفت.

تست کلنی زایی

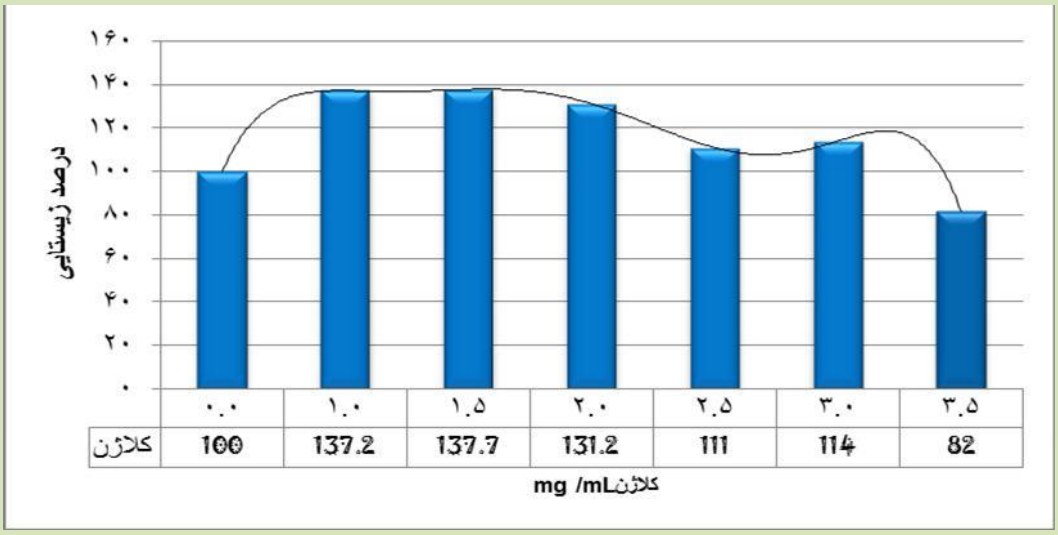
به منظور بررسی توانایی تکثیر سلول ها در ایجاد کلنی های جدید محیط کشت سلولی به همراه افزودن آگارز ۲ درصد استریل در پلیت های شش خانه آماده شد، سلول های تکثیر شده، تریپسینه و سلول های مورد شمارش قرار گرفت و به رقت ۱۵۰۰ سلول در هر ۱۰۰ میکرولیتر رسانده شد. پس از ۱۴ روز کلونی های تشکیل شده زیر میکروسکوپ معکوس شمارش گردید(۱۱).

تحلیل آماری

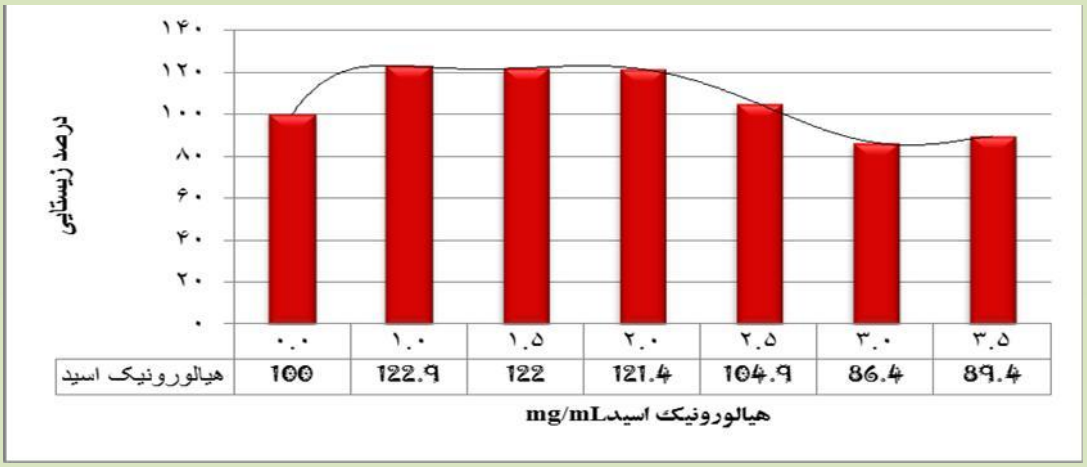
تمام داده ها با استفاده از نرم افزارهای Excel 2013 و SPSS 21 و آزمون های one way ANOVA تجزیه و تحلیل گردیدند.

نتایج

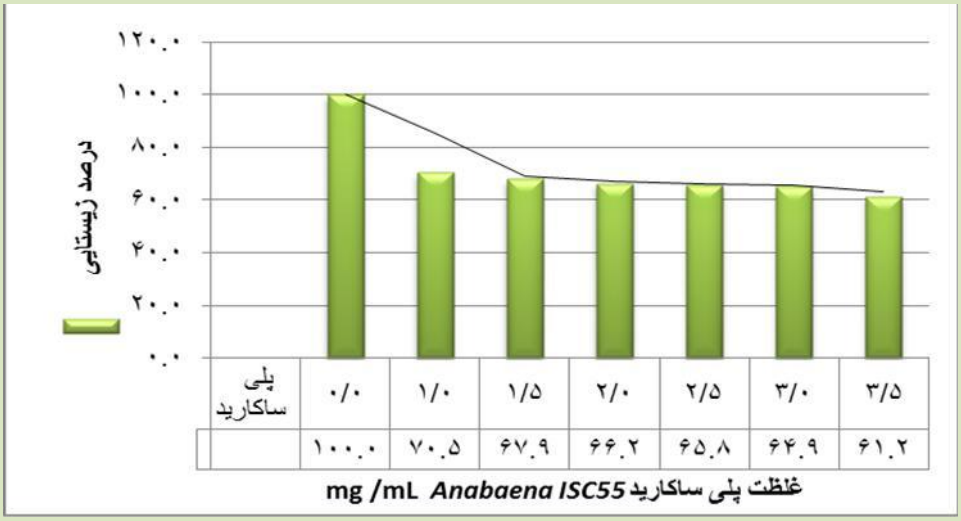
نتایج حاصل و تجزیه و تحلیل آماری مقایسه ای تاثیر ترکیبات مختلف پلی ساکارید Anabaena ISC55 بر رده سلولی L929 و اندوتلیال HUVEC با نرم افرار spss صورت گرفت. در این مطالعه ابتدا میزان رشد و تکثیر سلول های فیبروبلاست L929 در غلظت های مختلف از کلاژن، هیالورونیک اسید و پلی ساکارید Anabaena ISC55 با MTT assay مورد سنجش قرار گرفت و تاثیرات حاصل از این ترکیبات بر روی رده سلولی فیبروبلاست L929 در نمودار های ۱ الی ۳ آورده شده است. کلاژن سبب افزایش زیستایی سلول ها از غلظت ۱ تا ۳/۵ میلی گرم بر میلی لیتر شده است(نمودار۱). سلول ها در بستر هیالورونیک اسید رشد و تکثیر مناسبی داشته و زیستایی سلول ها از غلظت ۱ تا ۲ میلی گرم بر میلی لیتر افزایش یافته است(نمودار۲). سلول های L929 کشت داده شده در بستر پلی ساکارید Anabaena ISC55 از غلظت ۱ تا ۳/۵میلی گرم کاهش رشد داشتند(نمودار۳). پس از بررسی تاثیرات بستر های ساخته شده از کلاژن، هیالورونیک اسید و پلی ساکارید Anabaena ISC55 برتکثیر سلول های L929 بطور جداگانه، داربست های ساخته شده از ترکیب دو ماده کلاژن و پلی ساکارید Anabaena ISC55 ، هیالورونیک اسید و پلی ساکارید Anabaena ISC55 بر روی سلول های L929 و HUVEC تاثیر داده شد تا میزان تکثیر سلول ها بر روی بستر ترکیبی جدید بررسی گردد. تاثیر بستر ساخته شده در تکثیر سلول ها تفاوت دارد. در غلظت ها ی ۱ تا ۲/۵ میلی گرم در میلی لیتر در تکثیر سلول ها ی فیبروبلاست و اندوتلیال مشاهده شد(نمودار ۴ و ۵) .



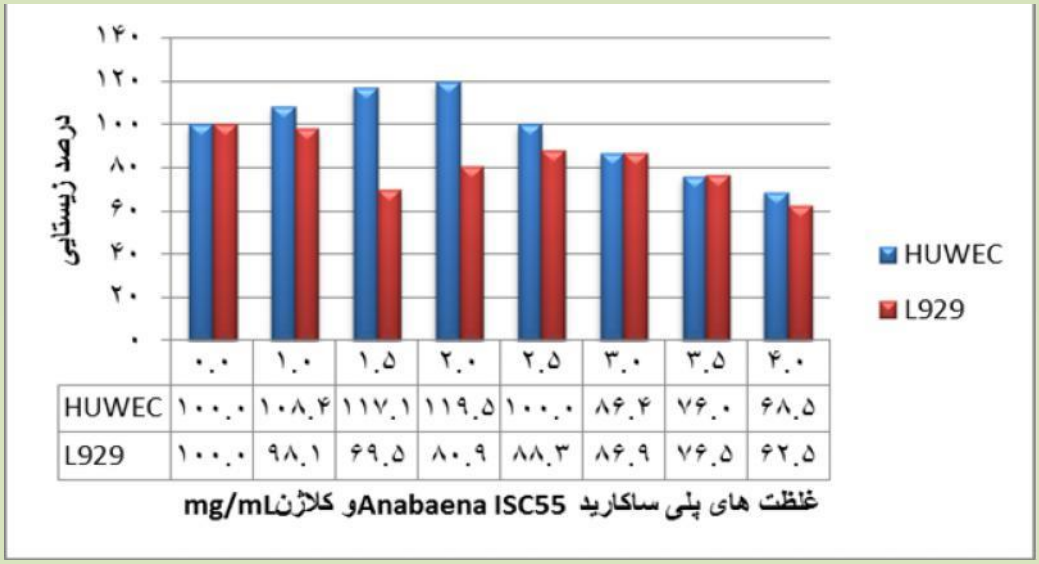
نمودار ۱- تاثیر کلاژن بر رشد سلول های L929 .



نمودار ۲- تاثیر هیالورونیک اسید بررشد سلول های L929.

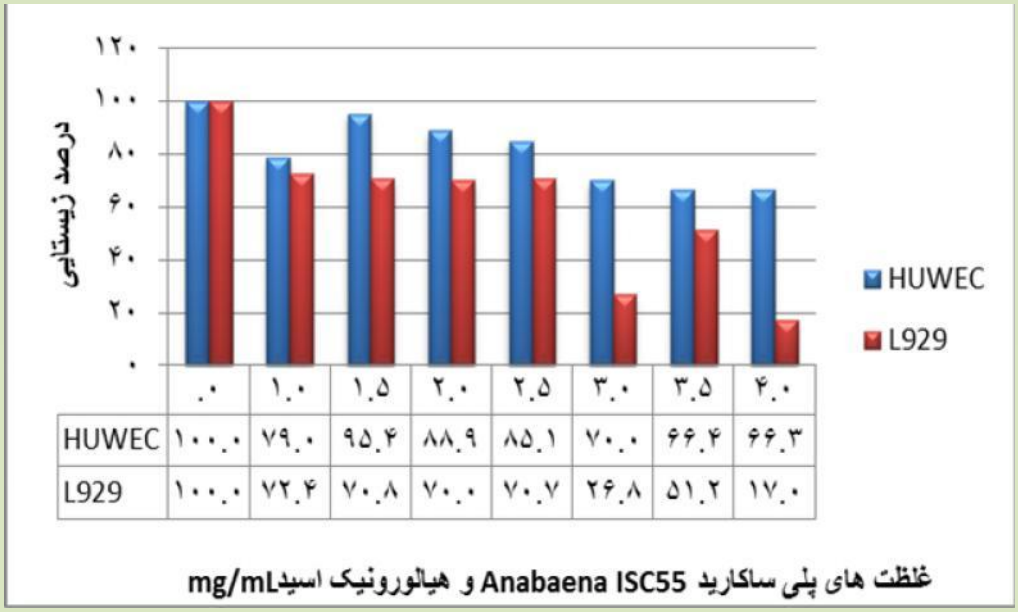


نمودار ۳-تاثیر پلی ساکارید *Anabaena ISC55* بر رشد سلول های L929.



	۰.۰	۱.۰	۱.۵	۲.۰	۲.۵	۳.۰	۳.۵	۴.۰
HUWEC	۱۰۰.۰	۱۰۸.۴	۱۱۷.۱	۱۱۹.۵	۱۰۰.۰	۸۶.۴	۷۶.۰	۶۸.۵
L929	۱۰۰.۰	۹۸.۱	۶۹.۵	۸۰.۹	۸۸.۳	۸۶.۹	۷۶.۵	۶۲.۵

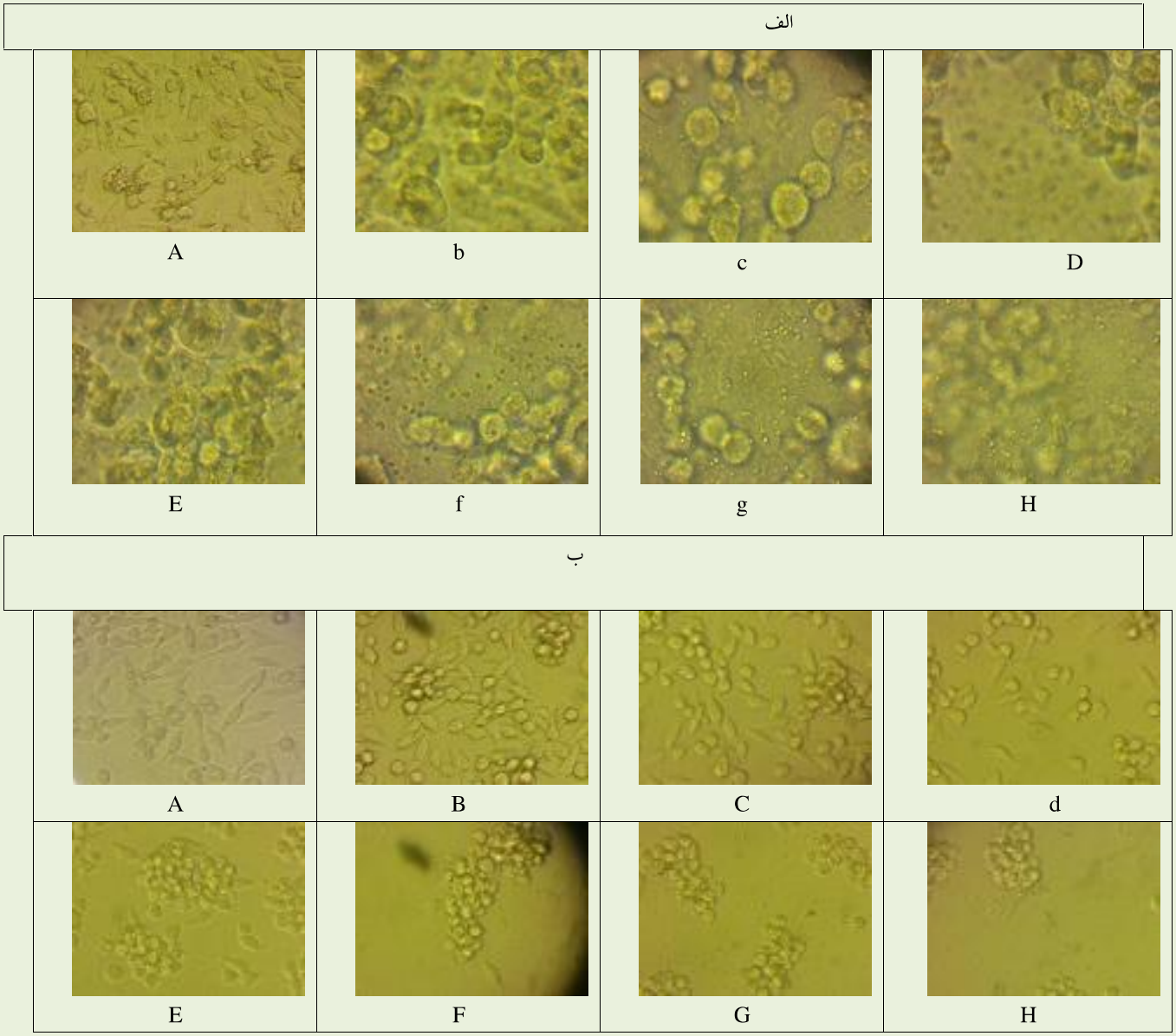
نمودار ٤- تاثیر کلاژن و پلی ساکارید *Anabaena ISC55* بر رشد سلول های L929 وHUVEC



	۰.۰	۱.۰	۱.۵	۲.۰	۲.۵	۳.۰	۳.۵	۴.۰
HUWEC	۱۰۰.۰	۷۹.۰	۹۵.۴	۸۸.۹	۸۵.۱	۷۰.۰	۶۶.۴	۶۶.۳
L929	۱۰۰.۰	۷۲.۴	۷۰.۸	۷۰.۰	۷۰.۷	۲۶.۸	۵۱.۲	۱۷.۰

نمودار٥- تاثیر هیالورونیک اسیدو پلی ساکارید *Anabaena ISC55* بر رشد سلول های L929 وHUVEC

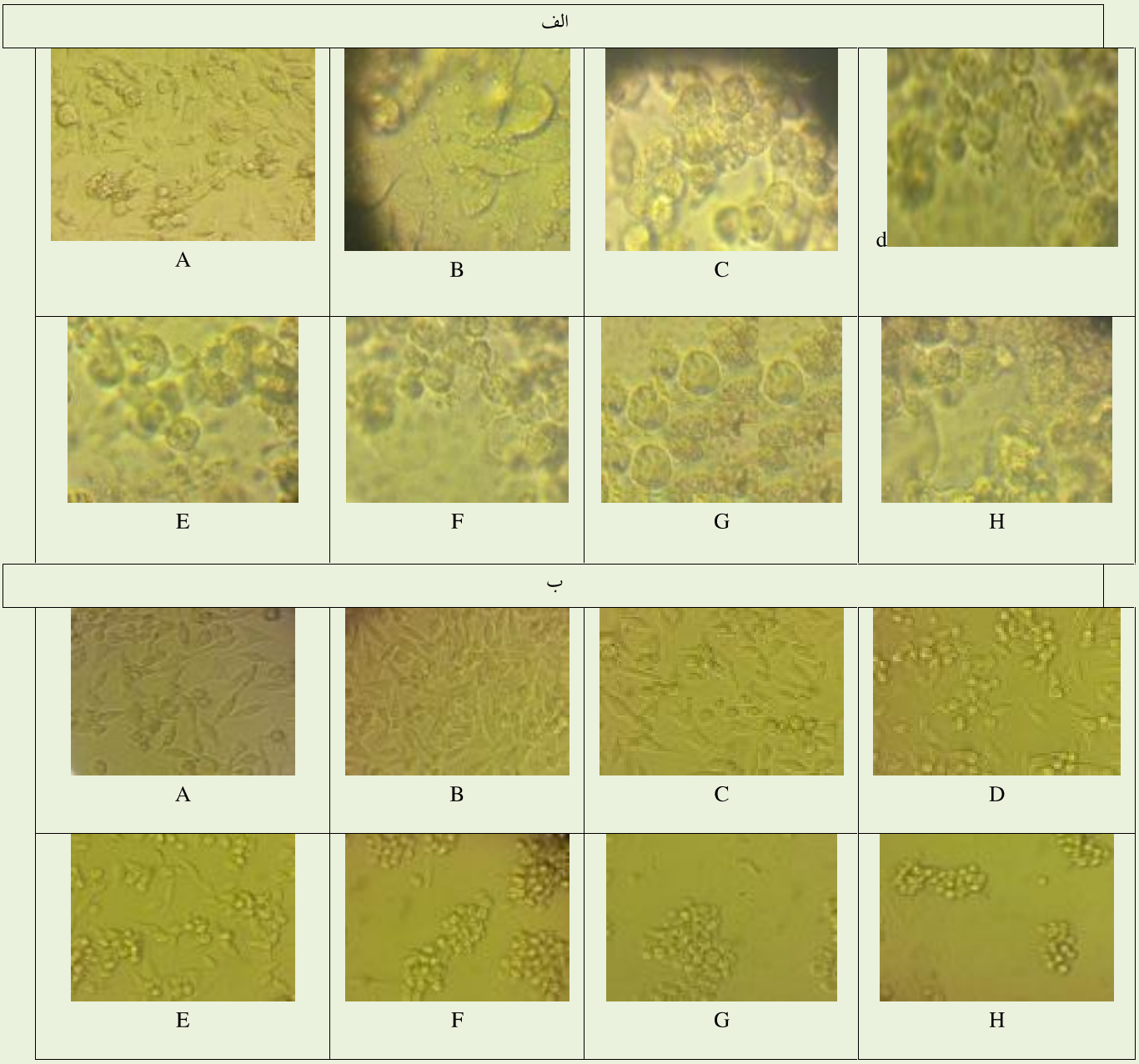
در بررسی میکروسکوپ معکوس تغییرات مورفولوژی سلول های فیبروبلاست در بستر ساخته شده از پلی ساکارید ***Anabaena ISC5*** و اسید هیالورونیک در غلظت ۲/۵ میلی گرم در میلی لیتر مشاهده شد. این در حالیست که تغییرات مورفولوژی گسترده در سلول ها HUVEC مشاهده نگردیده است. پس از بررسی مورفولوژی سلول ها سطح چسبندگی سلول ها به بستر با رنگ آمیزی کریستال ویوله مورد بررسی قرار گرفت. در سلول های فیبروبلاست در غلظت های ۲، ۲/۵ و ۳ میلی گرم در میلی لیتر میزان چسبندگی کاهش یافت، در حالی که در سلول های HUVEC تغییرات چسبندگی مشاهده نشد. میزان توانایی ایجاد کلنی جدید با سلول‌های رشد کرده بر روی بستر های پلی ساکارید ***Anabaena ISC55*** و کلاژن بر روی محیط کشت جامد شده باآگارز انجام گردید.



شکل ۱- تاثیر غلظت های مختلف پلی ساکارید *Anabaena ISC55* و اسید هیالورونیک

الف - سلول های HUVEC(a با بزرگنمایی X٦٠٠ b-h با بزرگنمایی X1000) ب- بر رده سلولی فیبروبلاست با بزرگنمایی ٦٠٠

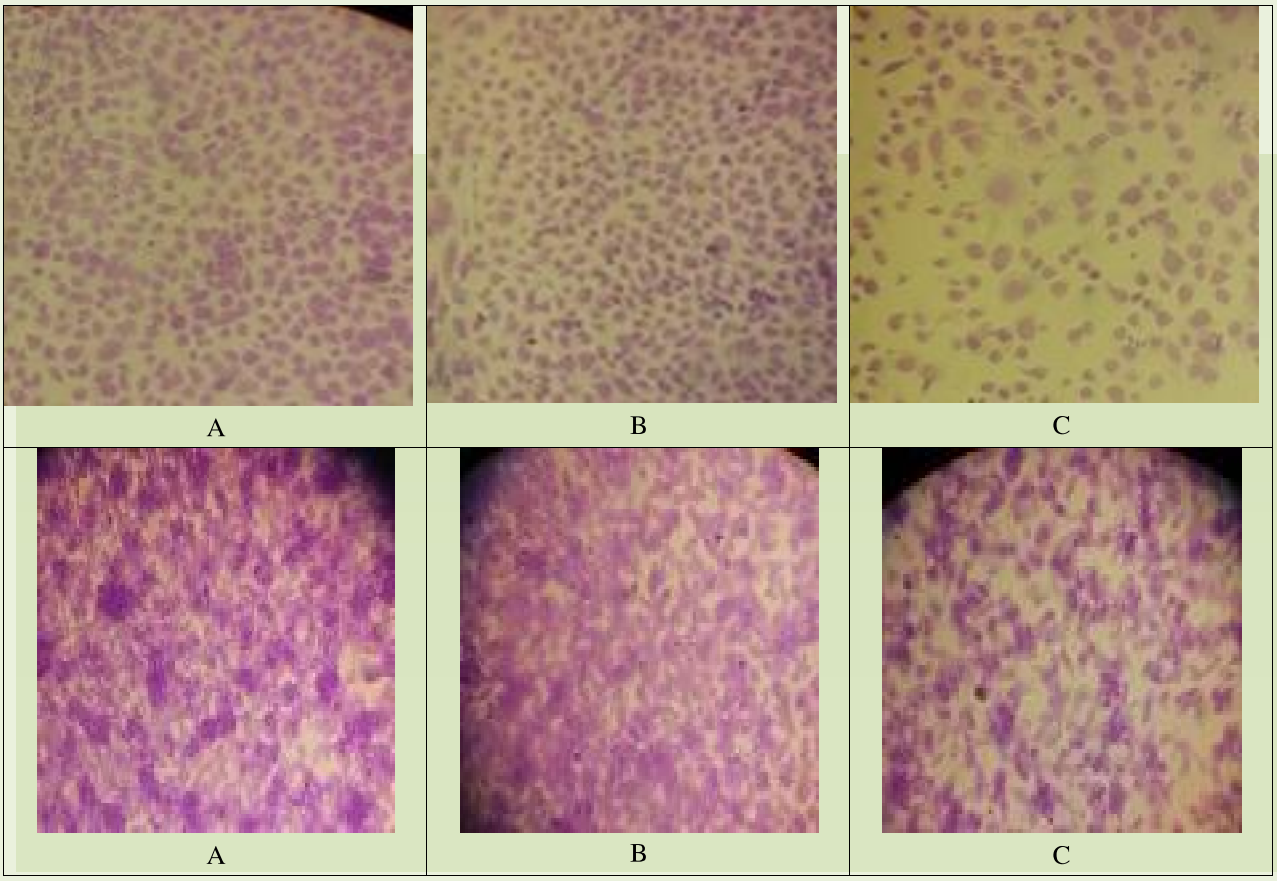
a: سلول های کنترل **b:** سلول ها در غلظت ۱ میلی گرم بر میلی لیتر **c**: سلول ها در غلظت۱/۵ میلی گرم بر لیتر. **d:** سلول ها در غلظت ۲ میلی گرم بر میلی لیتر. **e:** سلول ها در غلظت ۲/۵میلی گرم بر میلی لیتر. **f:** سلول ها در غلظت ۳ میلی گرم بر میلی لیتر. **g:** سلول ها در غلظت۳/۵ میلی گرم بر میلی لیتر. **h:** سلول ها در غلظت ۴ میلی گرم بر میلی لیتر



شکل۲ - تاثیر غلظت های مختلف پلی ساکارید *Anabaena ISC55* و کلاژن

الف- سلول های HUVEC (A با بزرگنمایی X٦٠٠ B-H با بزرگنمایی X1000) ب- بر رده سلولی فیبروبلاست با بزرگنمایی X٦٠٠

A: سلول های کنترل. **B:** سلول ها در غلظت ۱ میلی گرم بر میلی لیتر. **C :** سلول ها در غلظت۱/۵ میلی گرم بر لیتر. **D:** سلول ها در غلظت ۲ میلی گرم بر میلی لیتر. **E:** سلول ها در غلظت ۲/۵ میلی گرم بر میلی لیتر. **F:** سلول ها در غلظت ۳ میلی گرم بر میلی لیتر. **G:** سلول ها در غلظت ۳/۵میلی گرم بر میلی لیتر. **H:** سلول ها در غلظت ۴ میلی گرم بر میلی لیتر



شکل ۳ – تست چسبندگی ردیف بالا سلول های فیبروبلاست ردیف پایین سلول های HUVEC رشد کرده بر روی بستر های پلی ساکارید *Anabaena ISC55* وکلاژن بزرگنمایی X۶۰۰،

A: غلظت ۲ میلی گرم بر میلی لیتر، **B** :غلظت ۲/۵ میلی گرم بر میلی لیتر و **C** :غلظت ۳/۵ میلی گرم بر میلی لیتر

جدول -۱ مقایسه درصد فراوانی کلونی های ایجاد شده از سلول های فیبروبلاست و HUVEC رشد کرده در بسترهای پلی ساکارید *Anabaena ISC55* و هیالورونیک اسید و پلی ساکارید *Anabaena ISC55* و کلاژن

ماده اضافه شده به محیط کشت	تعداد کلنی شمارش شده فیبروبلاست	تعدادکلنی شمارش شده HUVEC
در محیط کشت ساده	۳۲۲۲±۲	۱۳۴۵ ± ۴/۵۰۹
پلی ساکارید *Anabaena ISC55* + هیالورونیک اسید	۳۸۸۰±۵	۱۴۵۰/۳۳۳۳±۱۴/۲۲۴۳۹
پلی ساکارید *Anabaena ISC55* + کلاژن	۳۸۰۳± ۶/۰۸۲۷۶	۲۱۹۴± ۱۳/۰۷۶۷۰*
پلی ساکارید *Anabaena ISC55* + کلاژن + هیالورونیک اسید	۳۱۰۴/۳۳۳۳±۱۴/۰۱۱۹۰	۱۰۹۱/۶۶۶۷ ± ۷/۶۳۷۶۳

داده ها به صورت میانگین ±انحراف معیار بیان گردیده است .

علامت *نشان دهنده اختلاف معنی دار گروه های تجربی با گروه های کنترل و شاهد در سطح P< ۰/۰۵ می باشد.

بحث و نتیجه گیری

با توجه به اهمیت داربست ها در رشد وتکثیر سلول‌ها تاکنون انواعی از داربست ها با ترکیبات مختلف برای

سلول‌ها ساخته شده است. معمولاً در ساخت این داربست‌ها از سوبستراهایی که به طور طبیعی در بدن وجود دارند، نظیر کلاژن و پلی ساکارید هایی نظیر هیالورونیک اسید استفاده می شود این ترکیبات زیست سازگار و قابل تجزیه معمولاً دارای کمترین عوارض جانبی بوده و مواد حاصل از تجزیه آن ها نیز زیان آور نمی باشند. مثلاً درسال ۲۰۰۳ از ترکیبات هیالورونیک اسید درساخت داربست سلولی استفاده شد(۵)، درسال ۲۰۱۲ از کیتوزان و کلاژن درساخت داربست سلولی استفاده شده و سلول ها در این داربست قادر به بازسازی خود بودند(۱۵). درسال ۲۰۱۳ نشان داده شد که داربست سلولی ساخته شده از پلی گلوتامات کیتوزان می تواند باعث حمایت، چسبندگی و رشد سلول ها شود(۳۰). پژوهش های زیادی در مورد پلی ساکاریدهای دریایی به عنوان یکی از منابع مهم برای برنامه های کاربردی بیوتکنولوژی در حال انجام است و کاربرد این پلی-ساکارید ها در زمینه های بیوتکنولوژی مانند رسانش دارو، انتقال ژن، مهندسی بافت، درمان سرطان، پانسمان زخم، حس‌گرهای زیستی و تصفیه آب ثابت شده است(۲۵). خواص مهم پلی ساکاریدهای دریایی شامل سازگاری زیستی، غیرسمی بودن، کم هزینه و فراوانی است. پلی ساکارید های دریایی پایدار، زیست سازگار، زیست تخریب پذیر و غیر سمی هستند. فراوان ترین منبع پلی ساکارید جلبک دریایی است. بسیاری از پلی ساکاریدهای دریایی منابع طبیعی از موادی مانند آلژینات، کاراگینان، آگارز، موران، کیتین، کیتوزان و ... می باشند. اخیراً تحقیق و پژوهش در مورد پلی ساکاریدهای دریایی به عنوان یکی از منابع مهم برای برنامه های کاربردی بیوتکنولوژی در حال توسعه است(۲۱). در مطالعه حاضر برای اولین بار سلول های اندوتلیال و فیبروبلاست بر روی بستر ساخته شده از پلی-ساکارید Anabaena ISC55 مورد بررسی قرار گرفته و یافته ها با نتایج حاصل از تاثیرات ترکیبات کلاژن و اسیدهیالورونیک که در رشد و تکثیر انواعی از سلول ها موثرند مقایسه گردید. نتایج حاصل از MTT نشان داد که کلاژن و اسید هیالورونیک رشد و تکثیر در هر دو رده سلولی را افزایش می دهد، ولی پلی-ساکارید Anabaena ISC55 در دوزهای۱، ۱/۵ و ۲ بر روی تکثیر سلول های اندوتلیال تاثیر مثبت داشته اما تکثیر در فیبروبلاست ها را با کاهش معنی داری مواجه ساخته است. این فرآیند درحالی بوده که در بررسی کلون زایی هر دو نوع سلول مورد مطالعه مشخص نمود که توانایی کلون زایی حفظ شده و علاوه بر آن نسبت به سلول های کنترل از افزایش معنی داری نیز برخوردار بود. میزان چسبندگی به بستر در سلول های اندوتلیال بسیار بیشتر از سلول های فیبروبلاست مشاهده شد و این یافته ها همگی نشان داد که بستر ساخته شده برای تکثیر سلول های اندوتلیال بسیار مناسب می باشد و امکان جایگزنی سلول های اندوتلیال در ماتریکس وجود دارد و می تواند برای مهندسی بافت برای ساخت رگ مورد استفاده قرار گیرد. در هنگام تهیه رگ، استفاده از فیبروبلاست ها برای تامین نیاز های تغذیه ای و رشد بهتر سلول های اندوتلیال و ساخت میکرو محیطی نظیر بدن ضروری به نظر می رسد و این فرآیند می تواند در بستر ساخته شده به خوبی کنترل گردد، زیرا سرعت رشد دو نوع سلول کشت شده در غلظت های خاص، در این بستر تفاوت دارند. لذا بدون نیاز به افزودن فاکتورهای رشد جانبی، سلول های اندوتلیال نسبت به سلول های فیبروبلاست با آهنگ رشد بیشتری می توانند تکثیر شوند و این سلول های اندوتلیال با جای‌گزینی و برهم کنش با یک دیگر در تشکیل رگ، شرکت کنند. از سوی دیگر گزارش شده است که افزایش حضور و تکثیر سلول های اندوتلیال در محل زخم علاوه بر بهبود سریع تر زخم سبب عدم تشکیل اسکار نیز می گردد(۱۰)،

بنابراین بستر ساخته شده می تواند در ساخت پانسمان برای بهبود سریع تر و هم چنین عدم تشکیل اسکار نیز مورد استفاده واقع شود.

تشکر و قدردانی

تحقیق حاضر بخشی از پایان نامه کارشناسی ارشد انجام شده در گروه میکروبیولوژی دانشگاه آزاد اسلامی واحد کرج می باشد. بدین وسیله از سرکار خانم دکتر سلطانی و پژوهشکده علوم کاربردی برای کمک های ارزشمندشان در این مطالعه صمیمانه سپاسگزاریم.

منابع

۱–ریاحی، ح. ۱۳۷۸. جلبک شناسی، دانشگاه الزهرا. چاپ سوم. ۲۴۳۸–۸۱م. صفحات ۵۴–۳۷ و ۲۴۸–۲۴۳.

۲– شریفیان، س.، حیدری نصرآبادی، م.، جعفری، پ. ۱۳۹۰. بررسی اثر اگزوپلی ساکارید استخراج شده از باکتری پروبیوتیک بومی ایران بر روی ترمیم زخم پوستی در موش نر نژاد ویستار پس از ایجاد زخم. زیست شناسی تکوینی. شماره ۱. دوره ۴. ص ۵۵–۵۱.

۳– هواس بیگی ، م.، دزفولیان، م.، سلطانی، ن.، الهی، ف. ۱۳۹۳. بررسی خصوصیات ساختاری ساختاری و تاثیرات ضد سرطانی پلی ساکاردی استخراج شده از سیانوباکتری های Nostoc sp.ISC101 و Nostocsp.ISC26 بر روی رده سلولی لنفوبلاستویید(LCL). فصلنامه گیاه و زیست بوم. شماره ۳۱; ۲۷–۳۴.

4.Ardi, VC., Kupriyanova, TA., Deryugina, EI., Quigley, JP. (2007). Human neutrophils uniquely release TIMP-free MMP-9 to provide a potent catalytic stimulator of angiogenesis. Proc Natl Acad Sci, 104; 20262–20267.

5.Baier Leach, J., Bivens, KA., Patrick, Jr CW., Schmidt, CE. (2003). Photo cross linked hyaluronic acid hydrogels: natural, biodegradable tissue engineering scaffolds. Biotechnol Bioeng, 82; 578–89.

6.Cleary, MA., Geiger, E., Grady, C., Best, C., Naito, Y., Breuer, C. (2012). Vascular tissue engineering: the next generation. Trends Mol Med, 18(7); 394-404.

7.Dai, T., Tanaka, M., Huang, YY., Hamblin, MR. (2011). Chitosan preparations for wounds and burns: antimicrobial and wound-healing effects. Expert Rev Anti Infect Ther, 9; 857.

8.Fini, ME. (1999). Keratocyte and fibroblast phenotypes in the repairing cornea. Prog Retin Eye Res, 18; 529–551.

9.Fischer, M.H., Nanxiong, Y.U., Gray, R., John, R., Laurens, A., Marlett, J.A. (2004). The gel forming polysaccharide of *Psyllium husk* (*Plantago ovata* Forsk). Carbohydrate Res, 339; 2009-2017.

10. Franco, D., Milde, F., Klingauf, M., Orsenigo, F., Dejana, E., Poulikakos, D.(2013). Accelerated endothelial wound healing on microstructured substrates under flow. Biomaterials, 34(5); 1488-97.

11. Franken, NA., Rodermond, HM., Stap, J., Haveman, J., van Bree, C. (2006). Clonogenic assay of cells in vitro. Nat Protoc, 1(5); 2315-9.

12. Go, AS., Mozaffarian, D., Roger, VL., Benjamin, EJ., Berry, JD., Borden, WB. (2013). Heart disease and stroke statistics. a report from the american heart association. Circulation, 127; 21-23.

13. Gong, Y., Koh, DR. (2010). Neutrophils promote inflammatory angiogenesis via release of preformed VEGF in an in vivo corneal model. Cell Tissue Res, 339; 437–448.

14. Gutierrez, M., Tidgewell, K., Capson, T.L., Engene, N., Almanza, A., Schemies, J. (2010). Malyngolide dimer, a bioactive symmetric cyclodepside from the *Panamanian marine* cyanobacterium Lyngbya majuscula. J. Nat. Prod, 73; 709–711.

15. Hayashi, Y., Yamada, S., Guchi, K. Y., Koyama, Z., Ikeda, T. (2012). Chitosan and fish collagen as biomaterials for regenerative medicine. Advances in Food and Nutrition Research, 65; 107–120.

16. Hibino, N., McGillicuddy, E., Matsumura, G., Ichihara, Y., Naito, Y., Breuer, C.(2010). Late-term results of tissue engineered vascular grafts in humans. J Thorac Cardiovasc Surg, 139(2); 431-6, 436.e1-2.

17.L'Heureux, N., McAllister, TN., de la Fuente, LM. (2007). Tissue-engineered blood vessel for adult arterial revascularization. N Engl J Med, 357; 1451-1453.

18. Malloy, K.L., Villa, F.A., Engene, N., Matainaho, T., Gerwick, L., Gerwick, W.H. (2011). Malyngamide 2, an oxidized lipopeptide with nitric oxide inhibiting activity from a Papua New Guinea marine cyanobacterium. J. Nat. Prod, 74:95–98..

19. McAllister, TN., Maruszewski, M., Garrido, SA., Wystrychowski, W., Dusserre, N., Marini, A. (2009). Effectiveness of haemodialysis access with an autologous tissue-engineered vascular graft: a multicentre cohort study. Lancet, 373(9673); 1440-6.

20. Parwani, L., Bhatnagar, M., Sharma, V., Ganguly, J., Bhatnagar, A. (2013). Exopolymers from *Tolypothrix tenuis* and three *Anabaena sp.*(Cyanobacteriaceae) as novel blood clotting agents forwound management. Carbohydrate Polymers, 99; 692– 699.

21. Panchanathan, M., Junghwan, Oh. (2016). Marine polysaccharide-based nanomaterials as a novel source of nano biotechnological applications. International Journal of Biological Macromolecules, 82; 315–327

22. Peck, M., Gebhart, D., Dusserre, N., McAllister, TN., L'Heureux, N.(2012). The evolution of vascular tissue engineering and current state of the art. Cells Tissues Organs , 195(1-2); 144-58.

23. Phillipson, M., Kubes, P.(2011). The neutrophil in vascular inflammation. Nat Med, 17; 1381–1390.

24. Retini, C., Vecchiarelli, A., Monari, C., Tascini, C., Bistoni, F. (1996). Capsular polysaccharide of *Cryptococcus neoformans* induces prion flammatory cytokine release by human neutrophils. Infect Immun, 64; 2897–2903.

25. Raveendran, S., Dhandayuthapani, B., Nagaoka, Y., Yoshida, Y., Maekawa, T. (2013). Carbohydr. Polym, 92; 1225–1233

26. Tripathi, A., Puddick, J., Prinsep, M.R., Rottmann, M., Chan, K.P., Chen, D.Y., Lagunamide, C. (2011). A cytotoxic cyclo depsipeptide from the marine *Cyanobacterium lyngbya* majuscula. Phytochemistry, 72; 2369–2375.

27. Weinberg, CB., Bell, E. (1986). A blood vessel model constructed from collagen and cultured vascular cells. Science, 24 ;231(4736); 397-400.

28. Whitcher, JP., Srinivasan, M., Upadhyay, MP. (2001). Corneal blindness: a global perspective. Bull World Health Organ, 79; 214–221.

29. Wilson, K. (1997). Wound healing: the role of macrophages. Nurs Crit Care, 2; 291–296.

30. Yan, S. F., Zhang, K. X., Liu, Z. W., Zhang, X., Gan, L., Cao, B. (2013). Fabrication of poly(l-glutamic acid)/chitosan polyelectrolyte complex porous scaffolds for tissue engineering. Journal of Materials Chemistry B, 1;1541-1551.

The Comparison of Polysaccharide Matrices on Fibroblast and Endothelial Cells

F. Fatahi Hasanabad [1] , **M. Dezfulian [2]**

1. MSc , Developmental biology, Department of microbiology, College of basic science, Karaj branch, Islamic Azad university, Karaj ,Alborz, Iran.

2. Assistant professor, Department of microbiology, College of basic science, Karaj branch, Islamic Azad university, ,Karaj ,Alborz, Iran. **mehrdezfulian@yahoo.com**

Received:2016.27. 9 **Accepted: 2017. 11. 11**

Abstract

Inroduction & Objective:The tissue repair and cell growth needed the matrix of of natural and chemical polymer substrate. The best matrixes are compounds that, while growing, have no toxic effects on the cells.The cyanobacteria are microscopic photoautotrophs and grow quickly in simple mineral medium so it can use as new sources for medical applications. In the present study, the extracted polymer from external capsule of *Anabaena* used as base material for proliferation and cell growth of L929 fibroblast and HUVEC endothelial cells for the evaluation of the possible use of this polysaccharide in tissue engineering and wound healing.

Material and Methods:The *Anabaena* ISC55 polysaccharide was extracted as a base material with hyaluronic acid and collagen alone or in combination with each other in making the matrix for the proliferation and growth of L929 fibroblast and HUVEC endothelial cells and it was evaluated for tissue engineering and wound healing. The level of survival, proliferation, and cell adhesion ability to create colonies in different combinations was assessed by MTT assay and colony assay and adhesion test was conducted. All results were analyzed with SPSS software (version 21).

Results:The increased endothelial cell proliferation and reduce the proliferation of fibroblasts, in particular concentrations were significant. Both studied cell lines were retained the colony formation.

Conclusion:This matrix is suitable for the production of artificial blood vessels and dressing.

Keywords: Polysaccharide, Fibroblast, Endothelial