

*Research Article*

## **Investigating the Effect of Collagen Electrospun Scaffold, Zinc Oxide Nano-particle Containing Stem Cells Derived from Adipose tTissue on Diabetic wWound in Rats**

**Ghazaleh Larijani<sup>1</sup>, Kazem Parivar<sup>1\*</sup>, Nasim Hayati Roudbari<sup>1</sup>, Parichehreh Yaghmaei<sup>1</sup>, Nasser Amini<sup>2\*</sup>**

1. Department of Biology, Science and Research Unit, Islamic Azad University, Tehran, Iran

2. Cellular and Molecular Research Center, Iran University of Medical Sciences, Tehran, Iran

\*Corresponding authors: kazem\_parivar@yahoo.com, Amini\_ot@yahoo.com

Received: 20 May 2024

Accepted: 9 July 2024

DOI:

### **Abstract**

Chronic wounds, including diabetic wounds, have poor healing, long-duration healing, and weak collagen deposition. Fabrication nanofiber scaffolds can have a higher surface-to-volume ratio for cell penetration and proliferation. Also, the addition of positively charged oxidized antibacterial agents can better penetration into the cells. In this study, we investigated the effect of collagen nanofibers along with zinc oxide Nano-particle and stem cells on diabetic wound. Collagen characterization was done using the FTIR test. Collagen/ZnO NP nanofibers were characterized by SEM, FTIR, swelling test, MTT, and cell adhesion techniques. The diameter of nanofibers was  $05 \pm 79$  nm. Also, MTT and SEM images showed that cells on nanofibrous scaffolds combined with zinc oxide Nano-particle have better cell growth, proliferation, and adhesion. The results obtained from the animal and immunohistochemistry study also showed that the speed of wound healing and collagen production was better in the group with collagen, zinc oxide, and mesenchymal cells. Therefore, it can be said that the zinc oxide Nano-particle can be considered a new Nano-particle in electrospun fibers that increase cell viability and proliferation.

**Keywords:** Collagen, Electrospun, Stem cells, Zink oxide Nano-particle, Diabetic wound.

## بررسی تاثیر داربست الکتروریسی شده کلاژن، نانو اکسید روی حاوی سلول‌های بنیادی مشتق از بافت چربی بر روی زخم دیابتیک در موش صحرائی

غزاله لاریجانی<sup>۱</sup>، کاظم پریور<sup>۱\*</sup>، نسیم حیاتی رودباری<sup>۱</sup>، پریچهره یغمایی<sup>۱</sup>، ناصر امینی<sup>۲\*</sup>

۱- گروه زیست‌شناسی، واحد علوم و تحقیقات، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران

۲- مرکز تحقیقات سلولی و مولکولی، دانشگاه علوم پزشکی ایران، تهران، ایران

\*نویسندگان مسئول: kazem\_parivar@yahoo.com و Amini\_ot@yahoo.com

تاریخ پذیرش: ۱۴۰۳/۰۴/۱۹

تاریخ دریافت: ۱۴۰۳/۰۲/۳۱

DOI:

### چکیده

زخم‌های مزمن، از جمله زخم‌های دیابتی، ترمیم ضعیف، بهبود طولانی مدت و رسوب کلاژن ضعیف دارند. ساخت داربست‌های نانوالیافی می‌تواند نسبت سطح به حجم بیشتری برای نفوذ و تکثیر سلولی داشته باشد. همچنین افزودن عوامل آنتی باکتریال اکسید شده با بار مثبت می‌تواند نفوذ بهتری به داخل سلول‌ها داشته باشد. در این مطالعه اثر نانوالیاف کلاژن به همراه نانوذرات اکسید روی و سلول‌های بنیادی بر زخم دیابتی بررسی شد. مشخصه یابی کلاژن با استفاده از آزمون FTIR انجام شد. نانوالیاف کلاژن و ZnO NP با تکنیک‌های SEM، FTIR، آزمون تورم، MTT و چسبندگی سلولی مشخص شدند. قطر نانوالیاف  $79 \pm 05$  نانومتر بود. همچنین تصاویر MTT و SEM نشان داد که سلول‌های روی داربست‌های نانوالیافی همراه با نانوذرات اکسید روی رشد، تکثیر و چسبندگی بهتری دارند. نتایج به‌دست‌آمده از مطالعه حیوانی و ایمونوهیستوشیمی نیز نشان داد که سرعت بهبود زخم و تولید کلاژن در گروه دارای کلاژن، اکسید روی و سلول‌های مزانشیمی بهتر بود. بنابراین می‌توان گفت که نانو ذره اکسید روی را می‌توان یک نانوذره جدید در لیاف الکتروریسی شده در نظر گرفت که باعث افزایش زنده ماندن و تکثیر سلول می‌شود.

کلمات کلیدی: کلاژن، سلول‌های بنیادی، الکتروریسی، نانو اکسید روی، زخم دیابتیک.

### مقدمه

علت مهم ترمیم ضعیف زخم دیابتی التهاب طولانی مدت، عروق و اپیتلیزه شدن ضعیف و رسوب کلاژن کمبود است (۱۶). کلاژن نوع I شایع‌ترین جزء ماتریکس خارج سلولی و یک بیومتریال ایده‌آل برای آماده‌سازی جایگزین پوستی است (۷، ۸، ۱۲). کلاژن نوع I یک محصول تصفیه شده است که قبلاً در دستگاه‌های پزشکی به عنوان جایگزین پوست استفاده می‌شود که توسط سازمان غذا و دارو (FDA) تأیید

دیابت شیرین یک بیماری متابولیک مزمن است که بیش از ۳۴۰ میلیون نفر را تحت تاثیر قرار می‌دهد که نزدیک به ۲۰ درصد از آنها در جهان مبتلا به زخم‌های دیابتی می‌شوند. بر اساس گزارش قبلی، در هر ۳۰ ثانیه، یک پا به دلیل اختلال در ترمیم زخم در بیماران دیابتی در سراسر جهان قطع می‌شود (۱۳). این زخم‌های مزمن یک تهدید سلامت جامعه هستند و هزینه‌های مادی و روحی برای جامعه به‌همراه دارند.

شده است (۱۴). بنابراین، مواد زیستی پانسمان زخم با توانایی بهبود زخم دیابتی به طور گسترده مورد مطالعه قرار گرفته است. مطالعات نشان دادند کلاژن نوع I، می‌تواند با رسوب کلاژن جهت‌یافته و اپیتلیال‌سازی مجدد سریع، بهبود زخم را بهبود بخشد (۳، ۶). با این حال، کلاژن طبیعی نوع I دارای محدودیت‌هایی در آماده‌سازی هیدروژل/داربست است که عمدتاً به دلیل استحکام مکانیکی ضعیف، پایداری حرارتی و مقاومت آنزیمی است (۵). الکتروزیسی یک تکنیک کارآمد، همه‌کاره و موفق برای تولید نانوالیاف از طیف گسترده‌ای از مواد است. تشکیل نانوالیاف الکتروزیسی شده از پلیمرهای مختلف طبیعی و مصنوعی به عنوان پانسمان زخم استفاده می‌شود (۱). از آنجایی که نانوذرات اکسید روی (ZnO NPs) به مواد زخم مختلف اضافه شده‌اند تا ویژگی‌های ضد باکتریایی ارائه دهند و همچنین سازمان غذا و داروی ایالات متحده ZnO را به عنوان "به طور کل ایمن شناخته شده" طبقه‌بندی کرده است در این داربست از نانوذرات اکسید روی استفاده کردیم. چون نانوذرات اکسید روی دارای ویژگی‌های ضد باکتریایی قوی، زیست‌سازگار، خود تمیز شونده، سازگار با پوست هستند و می‌توانند برای انواع اهداف تخصصی زیست‌پزشکی برای کاهش عفونت در ترمیمی زخم مخصوصاً در بیماران دیابتی که مستعد عفونت در زخم می‌باشند مورد استفاده قرار گیرند (۱۷، ۲۰). تحقیقات اخیر نشان داده است که سلول‌های بنیادی مزانشیمی را می‌توان به عنوان یک رویکرد درمانی کارآمد در پزشکی بازساختی مورد استفاده قرار داد (۱۸). علاوه بر این، اثربخشی درمان با سلول‌های بنیادی در برخی آزمایشات بالینی برای بهبود زخم تایید شده است. به عنوان یک رویکرد درمانی، سلول‌های بنیادی مشتق از چربی (ADSCs) و سلول‌های بنیادی مشتق از مغز استخوان در هر دو

شرایط پیش بالینی و بالینی برای ترمیم زخم و بازسازی بافت مورد مطالعه قرار گرفتند (۹). هدف از این مطالعه، بررسی کارایی *in vivo* یک داربست الکتروزیسی شده کلاژن و نانو اکسید روی همراه با سلول‌های بنیادی برای درمان زخم دیابتی در مدل موش بود. ما پس از مشخصه‌یابی داربست به بررسی‌های ایمنو‌هیستوشیمی و سایز زخم در زخم دیابتی ایجاد شده در موش صحرائی پرداختیم.

### مواد و روش‌ها

**استخراج کلاژن:** استخراج کلاژن نوع ۱ از بافت تاندون پای گوسفندی انجام شد. ابتدا نمونه‌ها تاندون گاو چندین بار با آب سرد استریل شسته شدند، سپس تاندون‌ها به طور کامل تمیز و بافت اضافی برداشته شد. نمونه‌های تاندون به قطعات ۱ سانتی متری بریده و به مدت ۳ ساعت در یخچال در آب دیونیزه قرار داده شد. پس از گذشت ۳ ساعت، نمونه‌ها کاملاً در آسیاب برقی له شده، و روی استیردر یخچال با دمای ۴ درجه سانتی گراد درون بشری حاوی محلول  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  0.01 مولار به مدت ۴۸ ساعت قرار داده شدند. پس از ۴۸ ساعت، نمونه‌ها با PBS شسته و در محلول حاوی ۰/۰۵ مولار اسید استیک، پپسین و EDTA روی استیردر همان شرایط قبلی در یخچال با دمای ۴ درجه قرار داده شدند. ۲۴ ساعت بعد دوباره به بشر حاوی تاندونها در یخچال مقداری محلول بالا اضافه شد. پس از حل شدن کامل تاندونها در محلول هنگامی که کاملاً به حالت ژله‌ای درآمدند، محلول حاوی نمونه‌ها به مدت ۱۵ دقیقه با دور 5000RPM سانتریفیوژ شدند. سپس محلول رویی سانتریفیوژ شده برداشته و پلیت کف فالكون دور ریخته شد. به محلول بالایی جدا شده سدیم کلراید 4M اضافه شد به مدت ۴۸ ساعت بر روی استیردر یخچال با دمای ۴ درجه سانتی گراد قرار گرفت تا

آنها را به قطعات کوچک‌تر تقسیم کرده و درون پلیت کشت سلول قرار داده و توسط UV به مدت دو ساعت استریل شدند. ۵۰۰۰ سلول بنیادی بر روی داربست قرار داده و سپس محیط کشت سلولی کامل به پلیت اضافه کرده و آن‌ها را درون انکوباتور به مدت ۱۲ ساعت قرار دادیم و بعد از آن برای بخش حیوانی استفاده کردیم.

**آزمون طیف سنج مادون قرمز تبدیل فوریه (ATR-FTIR):** هدف در این تست اندازه‌گیری میزان نور نمونه در هر طول موج است. این تست از تکنیک‌های مورد استفاده برای تعیین ساختار ثانویه پلی پپتیدها و پروتئین هاست. با استفاده از این تست، پیوندهای شیمیایی عناصر و تغییرات در این پیوندها قبل و بعد از کراس‌لینک شدن بررسی میشود. به منظور بررسی پیوندها و گروه‌های عاملی موجود در کلاژن و پی جی اس سنتز شده و فایبرهای الکترورسی شده از دستگاه FTIR مدل AVATAR شرکت THERMO ساخت کشور آمریکا در شرکت بیم گستر تابان استفاده گردید.

**SEM:** برای مشاهده توزیع اندازه و مورفولوژی داربست و قطر آن و یا سطح مقطع و همچنین اندازه ذرات و ساختار نانو ذرات از میکروسکوپ الکترونی روبشی (FE SEM) مدل MAIA3 شرکت TESKAN واقع در آزمایشگاه آریا الکترون اپتیک استفاده شد. نمونه‌ها قبل از قرار گرفتن در دستگاه در ابعاد ۱×۱ بریده شده و با لایه نازکی از طلا پوشیده شدند.

**تست سمیت و زنده‌مانی سلولی:** داربست‌ها در یک پلیت کشت ۹۶ خانه قرار داده شد و پس از استریل شدن دو طرف با یووی تعداد ۵۰۰۰ سلول به هر داربست منتقل شد. محیط DMEM-F12 % همراه با FBS اضافه شده و پلیتها در انکوباتور ۹۷٪ دمای ۳۷ درجه سانتیگراد و ۵٪ CO<sub>2</sub> انکوبه شدند. پس از آن در روزهای ۱، ۳ و ۵ داربست‌ها با ۲۰۰ لاندا

کاملاً مخلوط شوند. پس از اضافه کردن نمک، محلول ژله‌ای ماندی بوجود آمد که آن از صافی عبور داده شد و به کیسه دیالیز انتقال پیدا کرد. و کیسه دیالیز حاوی کلاژن درون بشری که شامل ۰/۰۲ مولار Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> بود، در یخچال بر روی استیرر در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۴۸ ساعت قرار گرفت و سپس به مدت ۱۰ روز در آب دیونیزه بر روی استیرر در همان شرایط دمایی ۴ درجه قرار گرفت. بعد از ۱۰ روز کلاژن‌ها از کیسه دیالیز درآمده و برش خوردند، در پتری دیش قرار گرفته و با فویل پوشانده شد و در فریزر ۸۰- به مدت ۲۴ ساعت قرار گرفتند و توسط دستگاه فریز-درایر به مدت ۲۷ ساعت خشک شدند.

**الکترورسی:** ابتدا محلول کلاژن به شرح زیر تهیه می‌شود. ۱ گرم پودر کلاژن نیم مولار را در ۵ میلی-لیتر محلول اسید استیک ۸۰ درصد (که ۴ میلی‌لیتر اسید استیک و ۱ میلی‌لیتر آب مقطر است) ریخته و به مدت ۴ ساعت در استیرر در دمای اتاق گذاشته تا کاملاً حل شود. محلول تهیه شده در سرنگی به ظرفیت ۵ سی‌سی گرفته شده و در دستگاه الکترورسی قرار گرفت. نیدل سرنگ 22G و فاصله نیدل سرنگ تا کالکتور دستگاه ۱۵ سانتی‌متر می‌باشد. نرخ جریان دستگاه 1ml/h و ولتاژ 18v می‌باشد. به محلول شرح داده شده در بالا مقدار ۱ درصد نانو اکسید روی که از شرکت نانو پارس لیما تهیه شده و به شکل پودر سفید رنگ با ابعاد ۲۰ نانومتر است، اضافه شده و به مدت ۱ ساعت بر روی استیرر قرار گرفته تا کاملاً حل شود سپس محلول آماده شده در سرنگ ۵ سی‌سی در دستگاه الکترورسی قرار گرفته و با نرخ جریان ۰/۵ میلی‌لیتر/ساعت و ولتاژ ۲۰ ولت رسیده شد.

**کاشت سلول‌های بنیادی بر روی داربست:** پس از کراس‌لینک شدن و ابگیری و شستشوی داربست، ابتدا

محل ضایعه قرار داده شدند. ابعاد داربست‌های مورد استفاده متناسب با اندازه‌ی ضایعه‌ی ایجاد شده طراحی و اجرا شد. پس از ایمپلنت داربست‌ها، پوست ناحیه پشت پانسمان شد و علائم حیاتی حیوانات تا زمان به هوش آمدن تحت بررسی قرار گرفت. حیوانات در قفس‌های جداگانه در دمای ۲۱ درجه سانتیگراد و با چرخه نور و تاریکی ۱۲ ساعت نگهداری شدند. و سایز زخم‌ها در روزهای ۱ و ۷ و ۱۴ اندازه‌گیری شدند.

**رنگ‌آمیزی هماتوکسیلین و ائوزین:** پس از آماده‌سازی بافتی و بلوک‌گیری و تهیه لام‌های بافتی از زخم‌ها در روزهای ۷ و ۱۴ در ادامه رنگ‌آمیزی هماتوکسیلین ائوزین انجام شده بود. این رنگ‌آمیزی جهت نشان دادن میزان ترمیم، ری اپیتلیزاسیون، گرانولاسیون و التهاب مورد مطالعه قرار می‌گیرند. در این مدل هسته سلول‌ها به رنگ آبی تیره و سیتوپلاسم به رنگ صورتی و قرمز دیده می‌شوند.

**رنگ‌آمیزی تری کروم ماسون:** این متد برای تعیین فیبرهای کلاژن در بافت‌هایی مانند پوست و قلب استفاده می‌شود. فیبرهای کلاژن در این رنگ‌آمیزی آبی، هسته سیاه، و زمینه به رنگ قرمز دیده خواهد شد. همانند رنگ‌آمیزی هماتوکسیلین/ائوزین، پس از پارافین‌زدایی و آب‌گیری در یک سری الکل نزولی، لام‌ها در محلول هماتوکسیلین آهن و ایگرت به مدت ۲۰ دقیقه انکوبه شدند. محلول هماتوکسیلین آبیرون و ایگرت با ترکیب دو محلول مختلف هماتوکسیلین به یک نسبت (محلول ۱: هماتوکسیلین ۱ درصد) در الکل ۹۶ درصد، محلول ۲: ۴ میلی لیتر محلول کلروفریک ۲۹ درصد (در آب مقطر) + ۱ میلی لیتر HCL ۳۷ درصد + ۹۵ میلی لیتر آب مقطر تهیه می‌شود. پس از رنگ‌آمیزی با محلول هماتوکسیلین آهن و ایگرت، اسلایدها در محلول الکل اسیدی غوطه‌ور شدند و سپس زیر آب جاری شسته شدند.

محلول MTT با غلظت 0.5 میلی‌گرم در میلی‌لیتر در محیط موجود در چاهک‌ها دمای ۹۷ درجه سانتی‌گراد به مدت ۴ ساعت تیمار شدند. پس از این مدت زمان محلول موجود در چاهک‌ها به آرامی و بطور کامل تخلیه شده و ۲۰۰ لاندا محلول دیمیتیل سولفوکسید افزوده شد و پلیت حاوی ساختارهای سلول-داربست به مدت ۱۰ دقیقه در دمای اتاق و بدور از نور برای تسهیل انحلال کریستال‌های فورازان شیک شدند. داربست‌ها از چاهک‌ها خارج شده و چگالی نوری (OD) توسط ELISA reader در طول موج ۵۴۰ نانومتر خوانده شد.

**حیوانات مورد مطالعه:** در این مطالعه از ۲۴ رت نژاد ویستار با سن ۳-۴ هفته و وزن ۲۰۰-۲۵۰ گرم از بیمارستان بقیه‌الله خریداری شد و در خانه حیوانات بیمارستان حضرت فاطمه تحت شرایط استاندارد ۱۲ ساعت نور و ۱۲ ساعت تاریکی با تنظیم اتوماتیک، دما و رطوبت کنترل شده، تهویه مناسب و آب و غذای مکفی در قفس‌های آلومینیومی نگه‌داری شدند. سپس با رژیم High fat و تزریق درون‌صفافی استرپتوزوتوسین دیابتی شدند. موش‌های دیابتی شده به صورت تصادفی در ۴ گروه آزمایشی تقسیم‌بندی شده و اعضای هر گروه به دو قسمت تقسیم شدند تا در دو دوره‌ی زمانی ۷ و ۱۴ روزه (هر دوره شامل ۳ سر رت ویستار) مورد بررسی قرار گرفتند. ابتدا حیوانات با تزریق داخل صفافی ۹۵ میلی‌گرم/کیلوگرم کتامین و ۵ میلی‌گرم/کیلوگرم زایلازین بیهوش گردیدند. سپس موش‌ها بر روی یک صفحه جراحی در وضعیت خوابیده بر روی شکم قرار گرفتند. پشت موش‌ها تراشیده شده و با بتادین ۴ درصد استریل شد. از مکان تراشیده شده با اکسپدر زخمی به وسعت ۲۰ میلی‌متر به فاصله دو سانتی‌متر از ستون مهره‌ها و در سمت چپ و راست بدن حیوان ایجاد گردید انتقال و پیوند داربست‌ها به وسیله‌ی یک پنس استریل در

**استخراج کلاژن و مشخصه یابی FTIR:** در شکل ۲ کلاژن استخراج شده بر طبق پرتکل شرح داده در بخش مواد و روش‌ها استخراج شد و در اسید استیک حل شد و برای مشخصه یابی آن نتایج حاصل از طیف سنجی تبدیل فوریه مادون قرمز در باندهای مربوط به گروه‌های شیمیایی و پیوندهای شیمیایی کلاژن استخراج شده نشان داده شده است (شکل ۳). این باندها عبارتند از:  $3277.45 \text{ cm}^{-1}$  برای آمید A به دلیل پیوند O-H و N-H،  $2924.73 \text{ cm}^{-1}$  برای آمید B،  $1629.61 \text{ cm}^{-1}$  برای پیوند I به دلیل پیوند کربونیل C-H،  $1532.85 \text{ cm}^{-1}$  برای آمید II به دلیل پیوند N-H و پیوند  $1232.72 \text{ cm}^{-1}$  برای آمید III به دلیل پیوند C-N و N-H.

**مورفولوژی داربست‌های الکترورسی:** عکس‌های SEM مورفولوژی سطحی الیاف کلاژن الکترورسی شده را نشان می‌دهد. شکل ۴ نشان می‌دهد که در حالی که داربست‌ها دارای ضخامت یکسان و تراکم الیاف مشابه بودند، همچنین دارای منافذ یکسانی بودند و در سه گروه کلاژن الکترورسی شده و کلاژن و نانوپارٹیکل اکسید روی و گروه کلاژن نانوپارٹیکل روی و سلول بنیادی در شکل ۴ نشان داده شده است. میانگین قطر الیاف در نانوفایبر کلاژن  $639 \pm 69$  است. همچنین قطر الیاف کلاژن ZnONP دارای تخلخل (۲۰ درصد) بوده است.

**آزمون جذب آزمون:** نمودار در شکل ۵ نسبت تورم نانوالیاف الکترورسی شده را نشان می‌دهد. در مقایسه با داربست‌های دیگر، نانوالیاف کلاژن و اکسید روی و سلول تورم نسبتاً کمتری داشتند اما اختلاف معنادری با دو گروه دیگر نداشتند. همانطور که در شکل ۵ مشاهده می‌شود برای فواصل ۱۰، ۲۰، ۳۰ و ۴۰ ساعت به ترتیب، معادله ۱ درجات تورم ۰.۴، ۰.۴، ۰.۷، ۱.۴، ۳، ۸، ۲۲، ۷۱ درصد و ۰.۹، ۰.۴۳، ۱۵ درصد تورم نشان دادند.

سپس اسلایدها به مدت ۵ دقیقه در رنگ آمیزی اسید فوشیا غوطه ور شدند. نمونه‌ها با محلول اسید استیک ۱ درصد شسته و به مدت ۱۰ دقیقه در محلول فسفومولیدن ۱ درصد (در آب مقطر) قرار داده شدند. سپس اسلایدها در محلول آبی آنیلین ۲ درصد (در اسید استیک/آب مقطر به نسبت ۱:۴۰) به مدت ۵ دقیقه نگهداری شدند. در نهایت لام‌ها دوباره آبگیری و شفاف شدند و سطح لام‌ها با یک لامل پوشانده شد. **آنالیز آماری:** داده‌های کمی برای هر دوره آزمایشی در سه تکرار به دست آمد و به صورت (میانگین  $\pm$  انحراف معیار) ارائه شد. تجزیه و تحلیل آماری با استفاده از نرم‌افزار SPSS و آزمون واریانس آماری یک‌طرفه (ANOVA) انجام شد. داده‌ها در سه سطح معنی‌دار هستند ( $p \leq 0.05$ ،  $p \leq 0.01$  و  $p \leq 0.001$ ) مورد ارزیابی قرار گرفتند.

## نتایج

**فلوسایتومتری:** از روش فلوسایتومتری برای ارزیابی مشخصات ایمونوفنوتایپ سلول‌های بنیادی مزانشیمی کشت شده در پاساژ ۳-۴ استفاده شد. سلول‌ها با آنتی‌بادی‌های مونوکلونال فلورسانس ایزوتیوسیانات بیان 4 مارکر اصلی سلول‌های بنیادی مزانشیمی (CD44، CD105، CD90، CD73) و عدم بیان مارکرهای رده‌های خون‌ساز (CD45، CD34) مورد ارزیابی قرار گرفتند. آنالیز تعدادی از شاخص‌های سلول‌های بنیادی توسط فلوسیتومتری نشان دهنده مثبت بودن درصد بالایی از سلول‌های بنیادی مزانشیمی نسبت به مارکرهای سلول‌های بنیادی مزانشیمال از جمله CD44، CD73، CD90 و CD105 و همچنین منفی بودن نسبت به مارکرهای هماتوپویتیک CD45 و CD34 بوده است. شکل ۱ میزان بیان هر مارکر را نشان می‌دهد.

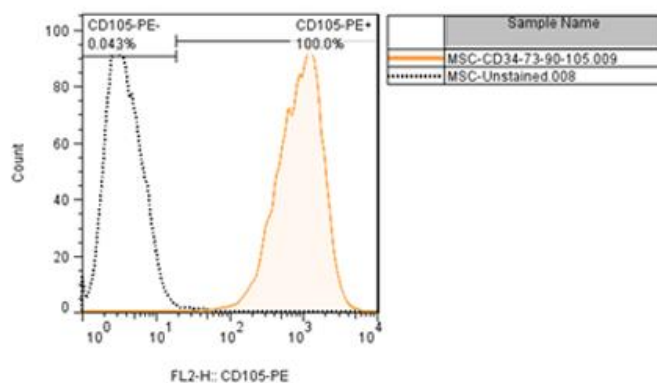
هیستوپاتولوژیک استفاده شد. شکل ۸ عکس زخم‌های موش را در روزهای اول و ۷ و ۱۴ پس از ایجاد مدل زخم نشان می‌دهد و سایز زخم‌ها نشان از این داشت که گروهی که کلاژن و نانوپارتیکل اکسید روی و سلول بنیادی داشتند زخم موش زودتر بسته شد و اسکار کمتری به جا مانده است و برای تایید آن رنگ‌آمیزی هماتوکسیلین و ائوزین و تری کروم ماسون انجام شد.

**رنگ آمیزی بافتی:** نمونه‌های بافتی پس از رنگ‌آمیزی با هماتوکسیلین/ائوزین و تری کروم زیر میکروسکوپ نوری مشاهده شدند. تصاویر مربوط به رنگ‌آمیزی این نمونه‌ها در شکل ۹ نشان داده شده است. لایه نازکی از درم در نمونه گروه - کلاژن-روی و همراه سلول‌های بنیادی در زمان ۷ روز پس از جراحی، بر روی سطح ماهیچه زیر پوست مشاهده می‌شود که نشان دهنده ترمیم در این ناحیه می‌باشد. پس از گذشت ۱۴ روز، لایه‌های اپیدرم و درم به وسط زخم در گروه‌های کلاژن-روی و گروه کلاژن خالی مهاجرت کرده و سطح زخم را می‌پوشاند. همان طور که در شکل ۶ نشان داده شده است، ۱۴ روز پس از جراحی، لایه اپیدرم و همچنین درم در گروه کلاژن-روی و سلول‌های بنیادی بیشتر از گروه‌های دیگر بوده است.

**آزمون تخریب داربست:** شکل ۶ رفتار تخریبی داربست‌های کلاژن را نشان می‌دهد. داربست‌های الکتروریسی شده پس از ۲۱ روز درصد کاهش وزن متوسطی را نشان دادند. تفاوت معناداری در تخریب داربست‌ها دیده نشد. در پایان بعد از بطور میانگین ۱۷ درصد وزن خود را از دست دادند به سطح صاف روی نمودار رسیدند.

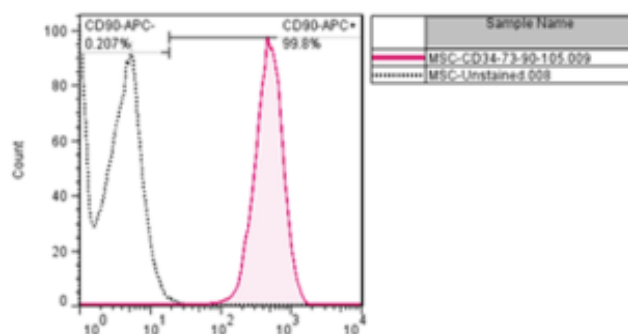
**بررسی زیست سازگاری داربست:** بر روی داربست‌های نانوالیافی سنجش MTT سه بار در فواصل زمانی ۱، ۳ و ۵ روز انجام شد. در شکل ۴، یافته‌های آزمون نشان داده شده است. نتایج به‌دست‌آمده نشان می‌دهد که داربست‌های الکتروریسی شده کاملاً زیست‌سازگار هستند و حضور نانوپارتیکل اکسید زینک باعث افزایش چسبندگی و تکثیر سلولی می‌شود. شکل ۷ نشان می‌دهد که تکثیر سلولی از روز ۱ تا روز ۵ در همه موارد افزایش یافت. طبق یافته‌های شکل ۴، در روزهای ۱ و ۵، سلول‌های گروه کلاژن/ZnONPs به‌طور معناداری ( $p < 0.01$ ) سریع‌تر از گروه کنترل رشد کردند.

**بررسی ترمیم زخم سوختگی:** به منظور بررسی روند ترمیم زخم، ناحیه زخم در روزهای هفتم و چهاردهم مورد بررسی قرار گرفت و از رنگ‌آمیزی هماتوکسیلین-ائوزین و تری کروم ماسون برای بررسی



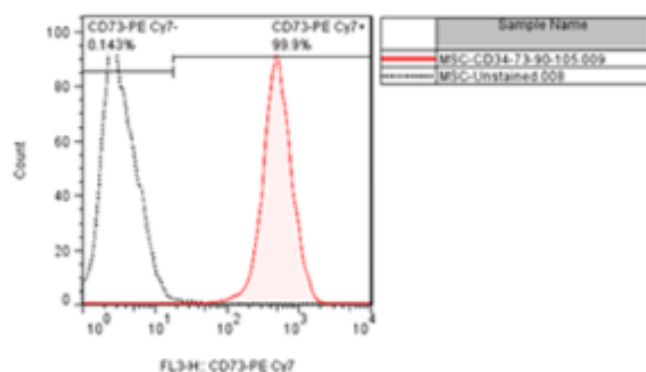
شکل ۱- نتایج ارزیابی مارکر CD105 سلول‌های بنیادی مزانشیمی براساس تست فلوسایتومتری

Figure 1. Evaluation results of CD105 marker of mesenchymal stem cells based on flow cytometry test



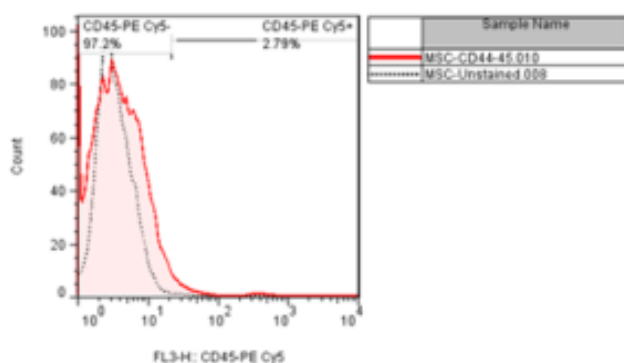
شکل ۲- نتایج ارزیابی مارکر CD90 سلول‌های بنیادی مزانشیمی براساس تست فلوسایتومتری

Fig 2. Evaluation results of CD90 marker of mesenchymal stem cells based on flow cytometry test



شکل ۳- نتایج ارزیابی مارکر CD73 سلول‌های بنیادی مزانشیمی براساس تست فلوسایتومتری

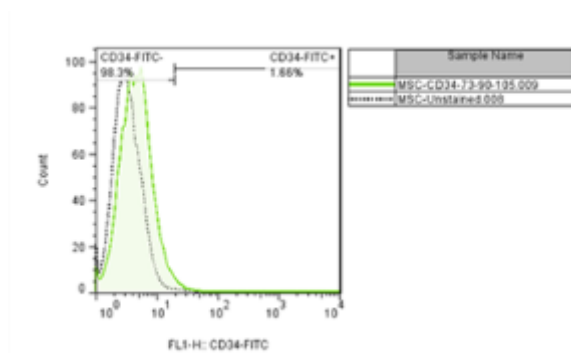
Fig 3. Evaluation results of CD73 marker of mesenchymal stem cells based on flow cytometry test



شکل ۴- نتایج ارزیابی مارکر CD45 سلول‌های بنیادی مزانشیمی براساس تست فلوسایتومتری

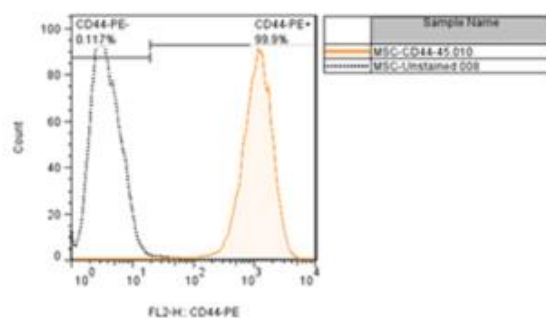
Fig 4. Evaluation results of CD45 marker of mesenchymal stem cells based on flow cytometry test





شکل ۵- نتایج ارزیابی مارکر CD34 سلول‌های بنیادی مزانشیمی براساس تست فلوسایتمتری

Fig 5. Evaluation results of CD34 marker of mesenchymal stem cells based on flow cytometry test



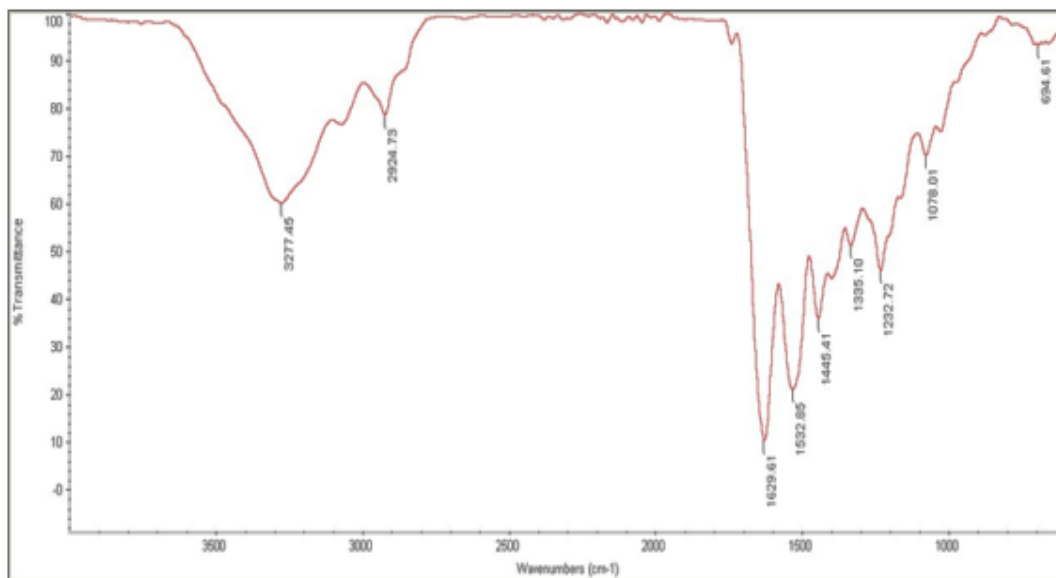
شکل ۶- نتایج ارزیابی مارکر CD44 سلول‌های بنیادی مزانشیمی براساس تست فلوسایتمتری

Fig 6. Evaluation results of CD44 marker of mesenchymal stem cells based on flow cytometry test

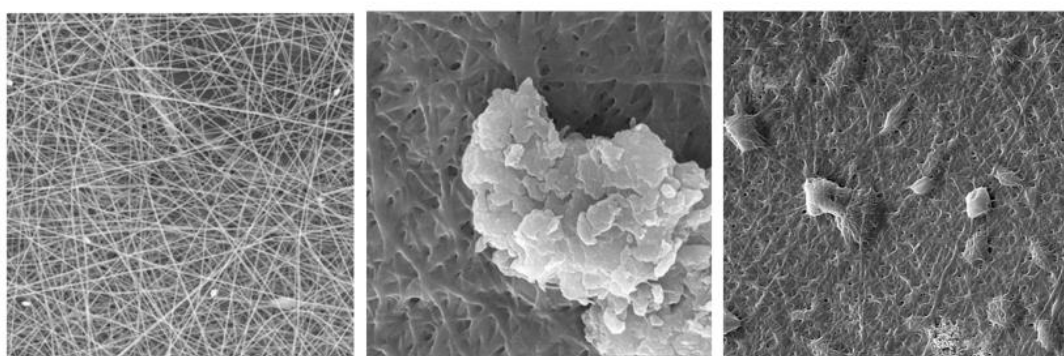


شکل ۲- استخراج کلاژن از تاندون گاو و فریز درای کردن آن

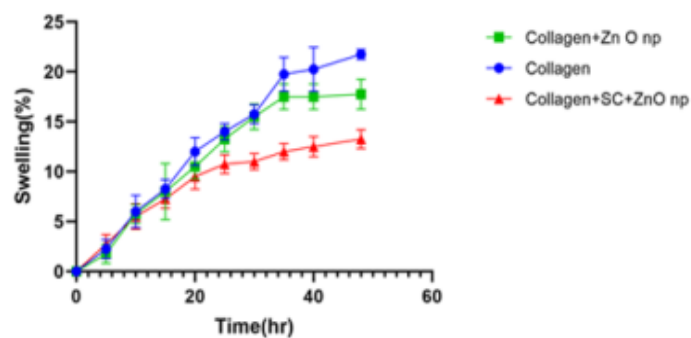
Figure 2. Extracting collagen from bovine tendon and freeze-drying it



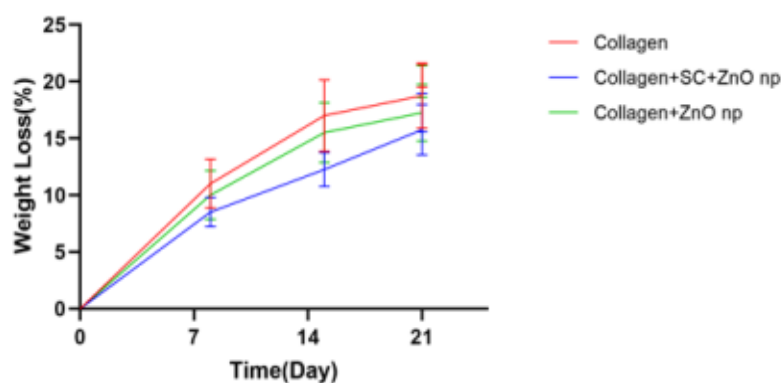
شکل ۳- مشخصه یابی کلاژن استخراج شده با استفاده از تست FTIR  
Figure 3. Characterization of extracted collagen using FTIR test



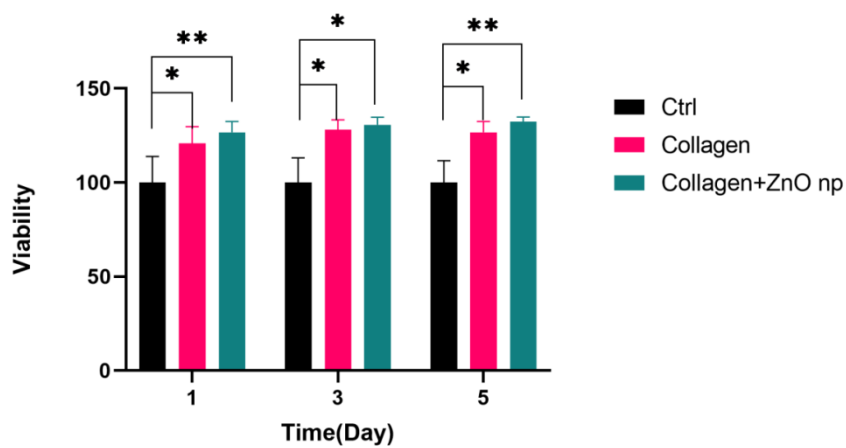
شکل ۴- عکسبرداری SEM از داربست کلاژنی الکترورسی شده و سلول‌های بنیادی دانه گذاری شده روی آن  
Figure 4. SEM photography of electrospun collagen scaffold and seeded stem cells on it



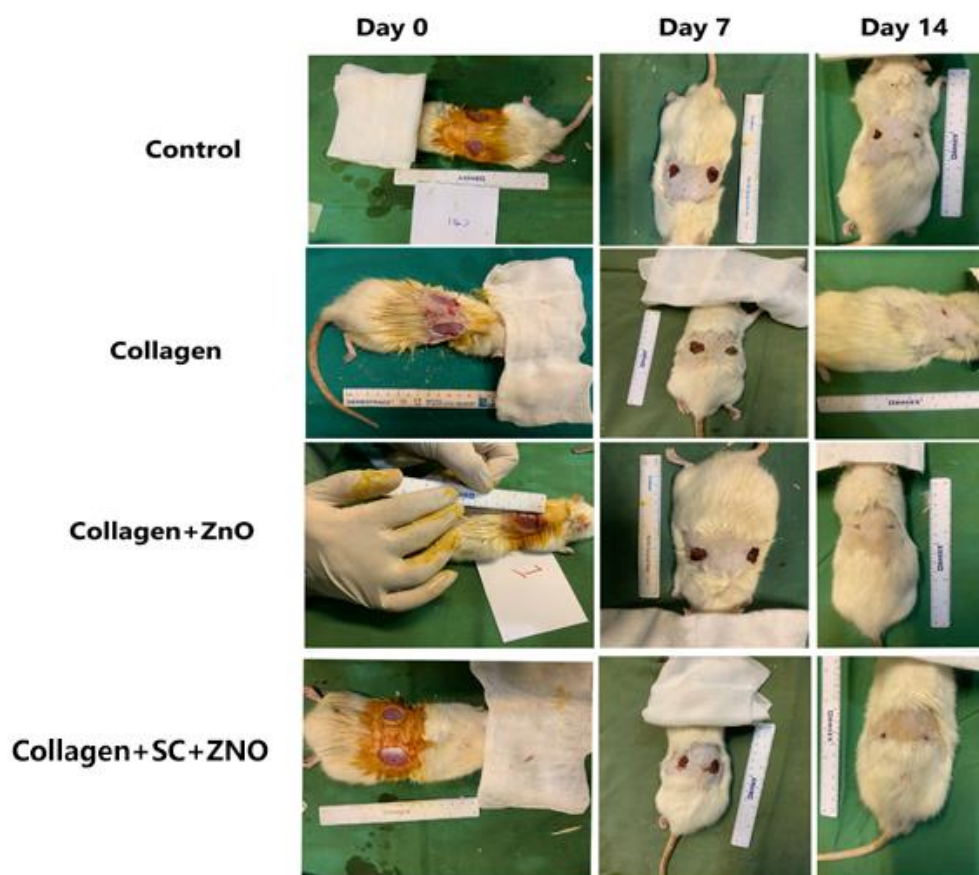
شکل ۵- تست تورم نمونه‌های کلاژن الکترورسی شده در زمانبندی‌های ۰، ۲۰، ۴۰ ساعته  
Figure 5. Swelling test of electrospun collagen samples in timings of 0, 20 and 40 hours.



شکل ۶- تست تخریب تدریجی داربست‌های کلاژنی در زمانبندی ۰، ۷، ۱۴، ۲۱ ساعته  
Figure 6. Gradual degradation test of collagen scaffolds in 0, 7, 14, 21 hours

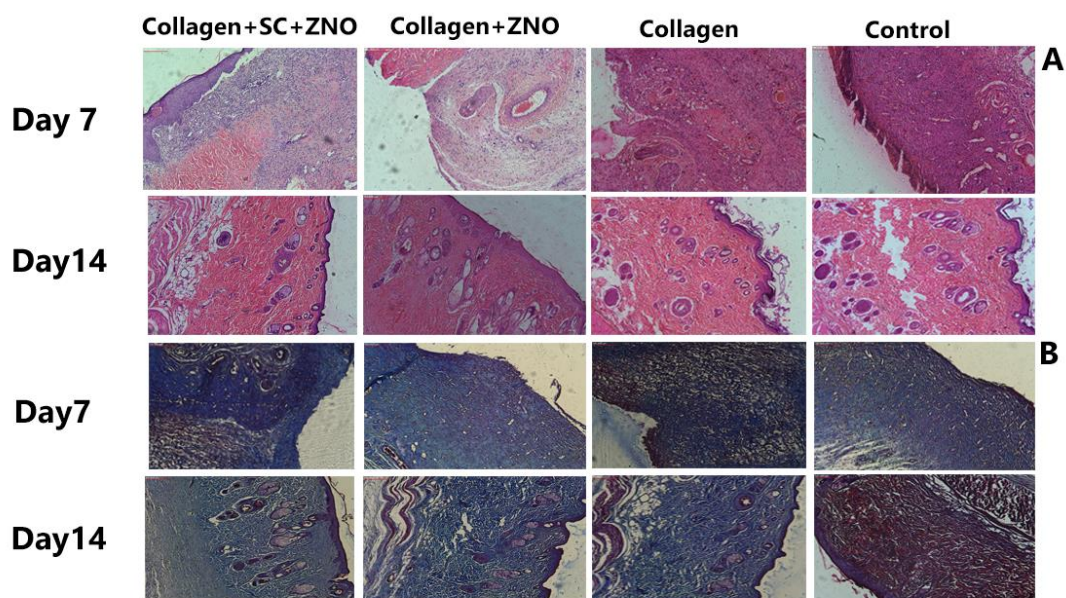


شکل ۷- تست سمیت سلولی داربست‌های الکتروریسی شده براساس تست MTT در زمانبندی‌های ۰.۱، ۰.۳، ۰.۵ روز  
Figure 7. Cytotoxicity test of electrospun scaffolds based on MTT test in 1, 3, 5 days.



شکل ۸- ایجاد مدل زخم در موش صحرایی و گذاشتن داربست بر روی زخم و اندازه گیری سایز زخم‌ها  
 Figure 8. Rat wound model and placing a scaffold on the wound and measuring the size of the wounds

8



شکل ۹- تست ایمنوهیستوشیمی از نمونه‌های بیوپسی از زخم و رنگ آمیزی H&E و تری کروم

Figure 9. Immunohistochemical testing of wound biopsy samples and H&E and trichrome staining

### بحث

سلول‌های بنیادی و بررسی نقش این داربست‌ها در روند ترمیم زخم دیابتی و ساخت جایگزین پوستی مناسب بود. بدین منظور، ابتدا سلول‌های بنیادی مزانشیمی از بافت چربی انسانی جدا و استخراج شدند و سپس به روش فلوسایتومتری با نشانگرهای CD34 و CD45، CD73، CD90، CD44، CD105 مشخصه یابی شدند. مطالعات فلوسیتومتری درصد بالایی از خلوص سلول‌های مزانشیمی را نشان می‌دهد. به طوری که بیش از ۹۹ درصد سلول‌ها الگوی سلول‌های مزانشیمی را نشان می‌دهند. بررسی ساختاری پیوندهای شیمیایی کلاژن توسط FTIR انجام گردید و طیف‌های FTIR کلاژن در محدوده  $400-4000\text{ cm}^{-1}$  بود. گروه آمید A مربوط به فرکانس کششی N-H و در محدوده  $3306\text{ cm}^{-1}$  و گروه آمید B در محدوده  $2918\text{ cm}^{-1}$  می‌باشد. موقعیت آمید باند I کلاژن در محدوده  $1633\text{ cm}^{-1}$  و مربوط به ارتعاش کششی C-H، آمید باند II در محدوده  $1532\text{ cm}^{-1}$  و مربوط به ارتعاش کششی N-H و C-N و آمید باند III در محدوده  $1230\text{ cm}^{-1}$  جذب گردید که نشان دهنده ساختار ماریچی باند‌ها بود. عدم سمیت داربست‌های بافتی از اهمیت بسیار بالایی برخوردار است. داربست مناسب درمهندسی بافت باید چسبندگی مناسبی برای سلول داشته باشد تا بتواند تکیه‌گاهی برای رشد و مهاجرت سلول را فراهم کند. به این منظور، در این پژوهش از سلول‌های بنیادی استخراج شده از بافت چربی برای آزمون زنده ماندن سلولی استفاده شد. نتایج حاصل از آزمون میزان زنده ماندن سلول (MTT) بر روی داربست‌ها نشان داد که در کلاژن/ZnONPs زنده ماندن سلول‌ها از گروه کنترل به طور قابل ملاحظه‌ای بالاتر بوده است. اضافه کردن روی باعث افزایش رشد و تمایز سلولی شده است. نفوذپذیری و

در مطالعه حاضر به منظور تسهیل روند درمان زخم‌های دیابتی پانسمانی مبتنی بر داربست الکترورسی شده کلاژن و ZnONPs و سلول‌های بنیادی تعیین شد. نتایج حاصل از بررسی بهبود زخم دیابتی بر اساس میزان اپیتلیزاسیون در گروه‌های تیمار شده با داربست در روز ۷ و ۱۴ نشان داد که در گروه‌های و کلاژن-روی و سلول بنیادی نسبت به گروه کنترل و کلاژن و کلاژن روی میزان اپیتلیزاسیون افزایش داشته است. نتایج حاصل از بررسی بهبود زخم بر اساس سایز در گروه‌های تیمار شده با داربست در روز ۷ و ۱۴ در زخم دیابتی نشان داد که در گروه کلاژن-روی و سلول بنیادی نسبت به گروه کنترل و سایر گروه‌ها افزایش داشته است. نانوالیاف کلاژن یک ماده نسبتاً جدید است. این اندازه نانو نسبت سطح به حجم بالاتری را فراهم می‌کند. الکترورسی تکنیک اولیه‌ای است که برای تولید لیاف نانو کلاژن زیست سازگار استفاده می‌شود. نانوذرات کلاژن برای کاربردهای درمانی به عنوان سیستم‌های دارورسانی درمانی آزمایش شده‌اند. به عنوان مثال، یک نانوساختار کلاژن هیدروکسی آپاتیت حاوی طلا در شرایط آزمایشگاهی آزمایش شد و نشان داد که چسبندگی، رشد و تکثیر سلولی را تقویت می‌کند (۱۰). وجود نانو اکسید روی در داربست کلاژنی موجب خواص آنتی باکتریال شده است و علاوه بر این در گروه‌هایی که نانو اکسید روی داشتند فرایند بسته شدن زخم سریعتر بوده است. نانو اکسید روی عمل ضد میکروبی و پرولیفراتیو خود را از طریق دو مکانیسم اصلی انجام می‌دهد: آزادسازی یون‌های روی، فعل و انفعالات الکترواستاتیکی (۴). هدف از این مطالعه، ساخت داربست‌های بر پایه پلیمرهای کلاژن پی جی اس و نانو اکسید روی و

روی در ترمیم زخم بهتر از دیگر داربست‌های نانوالیافی عمل کرد. برای استفاده در کاربردهای مهندسی بافت پوست، نانوالیاف کلاژن/ZnONPs و سلول‌های بنیادی را می‌توان به عنوان یک داربست بالقوه زیست سازگار در نظر گرفت.

#### منابع

1. Ashraf S.S., Parivar K., Roodbari N. H., Mashayekhan S., Amini N. 2022. Fabrication and characterization of biaxially electrospun collagen/alginate nanofibers, improved with *Rhodotorula mucilaginosa* sp. GUMS16 produced exopolysaccharides for wound healing applications. *International Journal of Biological Macromolecules*, 196:194-203 .
2. Chu Z., Zhao T., Li L., Fan J., Qin Y. 2017. Characterization of antimicrobial poly (lactic acid)/nano-composite films with silver and zinc oxide nanoparticles. *Materials*, 10(6), 659 .
3. Gu L., Shan T., Ma Y.X., Tay F. Niu L.. 2019. Novel biomedical applications of crosslinked collagen. *Trends in biotechnology*, 37(5):464-491 .
4. Himmler M., Schubert D.W., Dähne L., Egri G., Fuchsluger T. 2022. Electrospun PCL Scaffolds as Drug Carrier for Corneal Wound Dressing Using Layer-by-Layer Coating of Hyaluronic Acid and Heparin. *International Journal of Molecular Sciences* , 23(5): 2765-2775.
5. Li H., Chen X., Ren K., Wu L., Chen G. Scientific Reports. 2023. Qualitative study on diabetic cutaneous wound healing with radiation crosslinked bilayer collagen scaffold in rat model. *Nature*, 13(1), 6399 .
6. Long G., Liu D., He X., Shen Y., Zhao Y., Hou X. 2020. A dual functional collagen scaffold coordinates angiogenesis and inflammation for diabetic wound healing. *Biomaterials Science*, 8(22):6337-6349 .

انتقال کافی ترشحات زخم به دور از نواحی آسیب دیده، به عنوان مثال، ترکیبی از سیپروفلوکساسین (CIP) لود شده با ژل/غشاهای فیبر PGS توسط آیتی نجف آبادی و همکاران گزارش شده است (۱۱). در همین راستا، راگوواران و همکاران. نشان داد که جاسازی nZnO در هیدروژل‌های آلژینات سدیم-صمغ اقاچیا سمیت سلولی قابل توجهی کمتری نسبت به نانو اکسید لخت دارد و در عین حال خواص درمانی خوب زخم را حفظ می‌کند. در واقع، ماتریکس هیدروژل توانست به طور موثری تماس بین nZnO و سلول‌ها را کاهش دهد و آزادسازی Zn<sup>2+</sup> را کنترل کند (۱۵). در کاری توسط چو، فعالیت ضد میکروبی یک فیلم پلی لاکتیک اسید nZnO/علیه *E. coli* بلافاصله پس از قرار گرفتن در معرض نمونه‌ها و پس از ۱۲ ساعت اندازه گیری شد. مهار تنها پس از ۱۲ ساعت گزارش شد و به انتشار تدریجی nZnO از ماتریکس متخلخل نسبت داده شد (۲). به طور کلی، اثر ضد میکروبی nZnO-BNCs با محتوای نانو پرکننده افزایش می‌یابد (۱۹).

#### نتیجه‌گیری

در مطالعه حاضر، رویکرد الکتروریسی ترکیبی با موفقیت برای ساخت نانوالیاف کلاژن و ZnONPs همراه با سلول‌های بنیادی مورد استفاده قرار گرفت. هدف از این تحقیق، توسعه نانوالیاف کلاژنی بود که به طور مناسب با سلول‌ها سازگار بوده و دارای خواص مکانیکی، بیولوژیکی و بهبود زخم بر اساس ارزیابی‌های *in vitro* و *in vivo* باشد. این نتایج نشان دهنده شکل همگن و صاف و تخلخل زیاد در داربست کلاژن/ZnONPs بود. داربست‌هایی با نانوالیاف کلاژن و روی زیست سازگار و غیرسمی بودن آنها توسط روش MTT و مورفولوژی سلولی تایید شده است. علاوه بر این، نانوالیاف کلاژن و

14. Rafat M., Jabbarvand M., Sharma N., Xeroudaki M., Tabe S., Omrani R. Lennikov A. 2023. Bioengineered corneal tissue for minimally invasive vision restoration in advanced keratoconus in two clinical cohorts. *Nature biotechnology*, 41(1):70-81 .
15. Raguvaran R., Manuja B. K., Chopra M., Thakur R., Anand T., Kalia A., Manuja A. 2017. Sodium alginate and gum acacia hydrogels of ZnO nanoparticles show wound healing effect on fibroblast cells . *International journal of biological macromolecules*,96:185-191.
16. Senturk B., Demircan B. M., Ozkan A. D., Tohumeken S., Delibasi T., Gule, M. O., Tekinay A. 2017. Diabetic wound regeneration using heparin-mimetic peptide amphiphile gel in db/db mice. *Biomaterials science*, 5(7):293-1303 .
17. Shaba E.Y., Jacob J.O., Tijani J.O., Suleiman M. (2021). A critical review of synthesis parameters affecting the properties of zinc oxide nanoparticle and its application in wastewater treatment. *Applied Water Scienc.*, 11(2), 48.
18. Shah K.K., Pritt B.S., Alexander M.. 2017. Histopathologic review of granulomatous inflammation. *Journal of clinical tuberculosis and Diseases, other Mycobacterial*, 7:1-12 .
19. Siyanbola T., Sasidhar K., Rao B., Narayan R., Olaofe O., Akintayo E., Raju K. 2015. Development of functional polyurethane–ZnO hybrid nanocomposite coatings from Thevetia peruviana seed oil. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 92(2):267-275 .
20. Zhu Z., Jin L., Yu F., Wang F., Weng Z., Liu J., Wang X. Advanced Healthcare Materials. 2021. ZnO/CPAN modified contact lens with antibacterial and harmful light reduction capabilities. 10(13):210025.
7. Lou D., Luo Y., Pang Q., Tan W. Bioactive Materials. 2020. Gene-activated dermal equivalents to accelerate healing of diabetic chronic wounds by regulating inflammation and promoting angiogenesis. *Bioactive Materials*, 5(3):667-679 .
8. Mbese Z., Alven S., Aderibigbe B. Polymers. 2021. Collagen-based nanofibers for skin regeneration and wound dressing applications. *Polymers*, 13(24):4368-4377.
9. Mirzaei-Parsa M. J., Ghanbari H., Alipoor B., Tavakoli A., Najafabadi M.R. H., Faridi-Majidi R. 2019. Nanofiber-acellular dermal matrix as a bilayer scaffold containing mesenchymal stem cell for healing of full-thickness skin wounds. *Cell, & research, tissue*, 375:709-721.
10. Mondal S., Hoang G., Manivasagan P., Moorthy, M.S., Phan T.T.V., Kim H. Ceramics International. 2019. Rapid microwave-assisted synthesis of gold loaded hydroxyapatite collagen nano-bio materials for drug delivery and tissue engineering application. *Ceramics Internationa,l* 45(3):977-2988 .
11. Najafabadi, S. A. A., Mohammadi, A., & Kharazi, A.Z. 2020 Polyurethane nanocomposite impregnated with chitosan-modified graphene oxide as a potential antibacterial wound dressing. *Materials Science and Engineering*, 115:110899.
12. Naomi R., Bahari H., Ridzuan P.M., Othman, F.J.P. 2021. Natural-based biomaterial for skin wound healing (Gelatin vs. collagen): *Expert review*, 13(14): 2319-2327.
13. Qian B., Li J., Guo K., Guo N., Zhong A., Yang J. Xiong L. 2021. Antioxidant biocompatible composite collagen dressing for diabetic wound healing in rat model. *Regenerative Biomaterials*, 8(2).

