فصلنامه علمی پژوهشی فیزیولوژی و تکوین جانوری
شماره پیاپی ۳۳، جلد ۹، شماره ۲، بهار ۹۵، صفحه ۱ تا ۱۱

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

ام فروه ملکی[۱]، مهروز دزفولیان[۲]

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

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

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

## چکیده

**زمینه و هدف: کاربردهای مواد خارج سلولی موجودات دریایی در سطح وسیعی رو به گسترش است. از جمله این مواد پلی ساکارید ها هستند. بخشی از موادی که سیانوباکتری ها ترشح می کنند پلی ساکارید است. در مطالعه حاضر پلی ساکارید سیانوباکتری *Nostoc.sp* ISC 113 به عنوان داربست سلولی بر روی سلول های اندوتلیال مورد ارزیابی قرار گرفت.**

**روش کار: پلی ساکارید از سیانوباکتری *Nostoc. sp* ISC 113 استخراج شد. داربست های سلولی از این پلی ساکارید به همراه کلاژن و هیالورونیک اسید ساخته و تاثیر آن بر رشد و تکثیر به وسیله سنجش MTT و میزان کلنی‌زایی سلول ها در حضور پلی ساکاریدها با استفاده از روش سنجش کلنی بررسی گردید و چسبندگی رده سلولی *HUVEC* در شرایط *in vitro* به وسیله رنگ آمیزی کریستال ویوله و مطالعات میکروسکوپی ارزیابی شد.**

**یافته‌ها: داده های به دست آمده از سنجش MTT نشان داد که بستر ساخته شده از پلی ساکارید سیانوباکتری *Nostoc* سبب افزایش تکثیر، چسبندگی و کلنی زایی در سلول های HUVEC می شود.**

**نتیجه‌گیری: پلی ساکارید سیانوباکتری *Nostoc* می تواند به عنوان پلی مر طبیعی جهت ساخت داربست های سلولی و ترمیم مویرگ ها مورد استفاده قرار گیرد.**

**واژه‌های کلیدی:** *Nostoc. sp* ISC 113، پلی ساکارید، داربست، رده سلولی HUVE، سنجش MTT.

## مقدمه

یکی از اجزای اصلی در مهندسی بافت داربست، سلول ها و فاکتورهای رشد هستند. داربست یک ساختار سه بعدی است که به عنوان چارچوبی برای هدایت سلول ها مورد استفاده قرار می گیرد و جایگزینی برای ماتریکس خارج سلولی محسوب می شود. سلول ها به درون داربست نفوذ کرده و با توجه به سیگنال های فیزیکی و شیمیایی که در محیط اطراف آن ها قرار دارد شروع به رشد، تمایز، تکثیر و مهاجرت نموده و در صورت مساعد بودن شرایط محیطی ماتریکس خارج سلولی را ترشح و بافت جدید را ایجاد می نمایند(۴). بحث معلق بودن سلول‌ها، نداشتن یک ساختار اولیه برای شروع روند رشد و درعین حال محدودیت حجم بافتی و تعداد سلول مورد نیاز برای کاشت موفقیت آمیز در داخل بدن از مهم-ترین مسایل است، چرا که فاصله سلول ها از شبکه‌های مویرگی نباید بیش از چند میکرومتر باشد، تا به مبادله موادغذایی و هم چنین ضایعات حاصل از سوخت و ساز سلولی پرداخته و امکان ادامه حیات را داشته باشند(۲۳). مهندسی بافت روشی است که در آن سلول ها از یک بیمار گرفته شده و پس از کشت و افزایش تعداد، آن ها را در روی یک داربست مناسب کشت می دهند. تحریکات مناسب شیمیایی، زیستی، مکانیکی و الکتریکی اعمال می شود و طی مدت زمان کوتاهی

بافت جدید تشکیل می گردد. به طور نظری، با این روش ما قادر به ساخت هرگونه بافتی خواهیم بود(۱۷). اجزای اصلی مهندسی بافت عبارتند از: سلول، داربست، فاکتورهای رشد(۳۲). Holt و همکاران در سال ۲۰۰۳، و Tonnesen و Karlsen در سال ۲۰۰۲ گزارش کردند که پلی ساکاریدها به دلیل سازگاری زیستی و هزینه پایین آن ها نقش مهمی درکاربردهای پزشکی و داروسازی به ویژه در زمینه انتقال دارو دارند(۳۵، ۱۳). سیانوباکتری ها به صورت تک سلولی، کلنی و ریسه ای مشاهده می شود. در انواع کلنی، سلول ها در داخل یک زمینه پلی‌ساکاریدی قرار گرفته اند. نوستوک سیانوباکتری از جنس سیانوباکتری های تثبیت کننده نیتروژن و جز خانواده Nostocaceae است(۲ ،۱). با استفاده از اگزوپلی ساکاریدهای به دست آمده از باکتری های موجود در دریاهای عمیق توانسته اند استخوان آسیب دیده در رت را ترمیم دهند. در حالی که حیوانات کنترل با یک کلاژن ساده بهبود قابل توجهی پیدا ننموده اند. این پلی ساکاریدها در طول ترمیم به عنوان یک ماتریکس موقت خارجی و زیست سازگار، ذخیره‌سازی ماکرومولکول های ماتریکس خارج سلولی و مهاجرت هر دو نوع سلول استئوبلاست و اندوتلیال را حمایت و همراهی می کنند. از این رو از این اگزوپلی ساکاریدها می توان به عنوان یک داربست زیستی مفید در پوست و مهندسی ترمیم استفاده کرد(۳۶). از سوی دیگر هیالورونیک اسید نقش زیادی در ترمیم بافت و بازسازی آن دارد. هیالورونیک اسید درهنگام ایجاد زخم، فضای مناسبی را جهت مهاجرت سلول ها ایجاد می کند. چنین اتفاقی در دوران جنینی، به مهاجرت سلول ها در زمان تشکیل جنین کمک می کند(۱۴). میکروارگانیسم های دریایی به عنوان گزینه های جدید در بیوتکنولوژی برای تولید پلی ساکاریدهای فعال زیستی که دارای خواص گلیکوزآمینوگلیکان ها هستند، مورد توجه قرار گرفته-اند(۳۰، ۷). داربست های زیست سازگار مختلفی تاکنون برای ترمیم بافت ها ساخته شده است. مهم ترین موادی که امروزه برای ساخت رگ های مصنوعی استفاده می شوند عبارتند ازپلی اتیلن، پلی‌تترافلوروواتیلن و ترفتالات. با این حال، با توجه به ایجاد لخته و پس زدن، هیچ یک از این مواد برای تولید گرافت کمتر از ۶ میلی متر قطر مناسب نیست. گرافت های کمتر از ۶ میلی متری برای ورید سافن، ورید پستانی داخلی و یا شریان رادیال به عنوان یک جایگزین عروقی مورد نیاز می باشد(۲۷). پلیمرهای کلاژن، گلیکوزآمینو گلیکان، پلی ساکاریدها شامل آلژینات، کیتوزان، هیالورونات از مواد مورد استفاده در داربست سلولی هستند(۲۵ ،۲۱). برای افزایش پایداری پلیمرهای پلی ساکاریدی از ترکیب گلیکوزآمینوگلیکان و هیالورونیک اسید استفاده می شود. مواد طبیعی معمولاً سازگاری زیستی بسیار خوبی دارند. بنابراین سلول ها به راحتی و با زیستایی عالی در آن ها قرار گرفته و رشد می‌کنند(۵). سلول های اصلی دخیل در فرآیند رگ زایی سلول‌های اندوتلیالی هستند که عروق خونی را پوشانده و تقریباً تمام ساختمان مویرگ های خونی را تشکیل می دهند. از حفظ و رشد سلول های HUVEC در محیط کشت می توان جهت ارزیابی عوامل مختلف موثر شامل مهارکننده ها و القاکننده های رگ زایی استفاده کرد(۹). با توجه به مطالب مذکور، هدف از انجام این تحقیق بررسی پلی مر موجود در کپسول خارجی نوستوک(*Nostoc. sp* ISC 113) به عنوان منبع در ساخت داربست های زیست سازگار بوده، تا امکان استفاده از این پلی ساکاریدها در مهندسی بافت بررسی شود.

## مواد و روش ها

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

**بررسی میزان بقاء سلول ها و سمیت پلی‌ساکاریدها**

آزمایش MTT که یک روش رنگ سنجی است که بر اساس احیا و شکسته شدن کریستال های زرد رنگ تترازولیوم با فرمول شیمیائی ۳ و۴ و۵– دی متیل تیازول ۲ و ۵–دی فنیل تترازولیوم برمید به وسیله آنزیم سوکسینات دهیدروژناز و تشکیل کریستال های آبی رنگ نامحلول انجام شد. در این تست ها سلول ها در بسترهایی از هیالورونیک اسید، کلاژن و پلی ساکاریدهای سیانوباکتری ها کشت داده شدند. در هر تست از غلظت های مختلفی از هیالورونیک اسید، کلاژن و پلی ساکارید استفاده و میزان رشد و تکثیر سلول ها در حضور مقادیر مختلف این سه ماده با دستگاه الایزا ریدر در طول موج ۵۷۰ نانومتر سنجش گردید(۲۰).

$$\text{میزان سایتوتوکسیتی} = 1 - \frac{\text{متوسط تست OD}}{\text{متوسط کنترل OD}} \times 100$$

میزان زیستایی سلول ها=۱۰۰– میزان سایتوتوکسیتی

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

**بررسی میزان چسبندگی سلول ها در حضور پلی ساکاریدهای استخراج شده از سیانوباکتری ها**

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

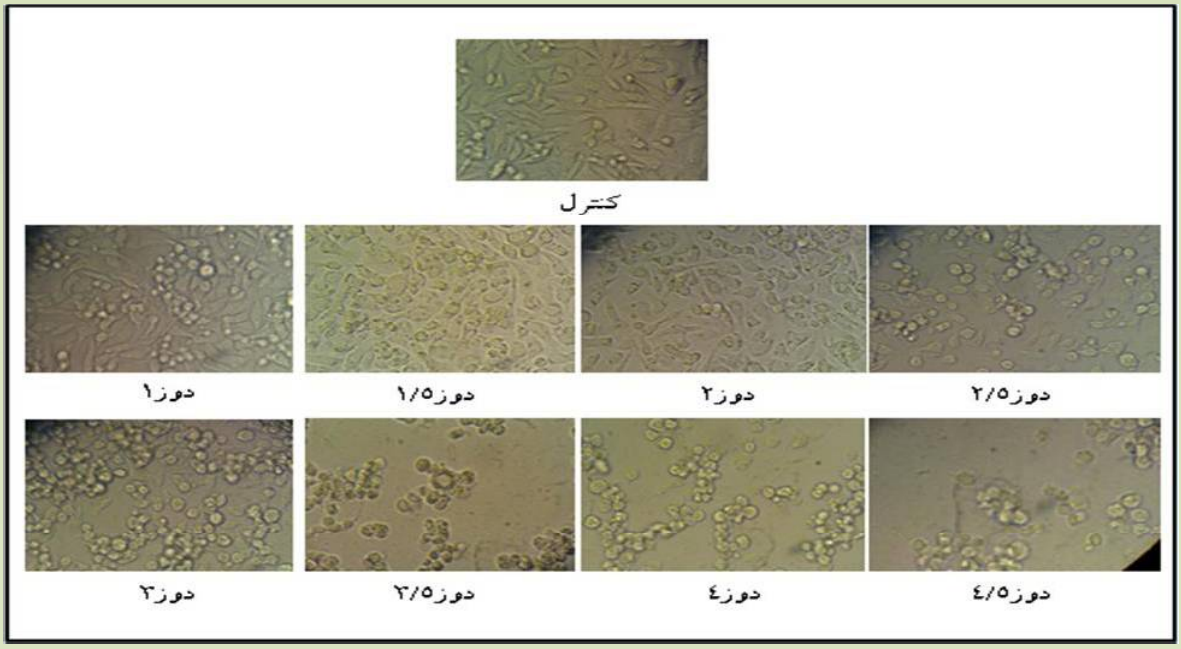
**بررسی توانایی ایجاد کلنی های جدید(** colony assay**)**

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

## نتایج

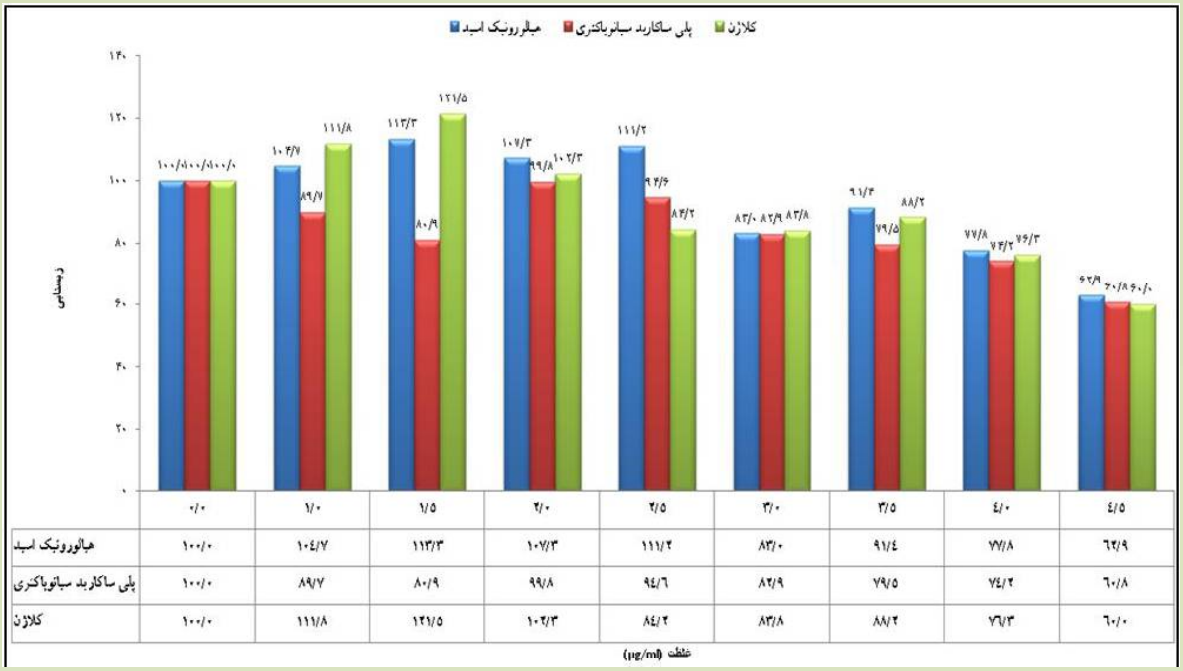
**آزمون** MTT

بستر ساخته شده از هیالورونیک اسید بر روی سلول‌های اندوتلیال HUVEC با غلظت های ۱ الی ۴/۵ میکروگرم در میلی لیتر اثر داده شد(شکل۱).



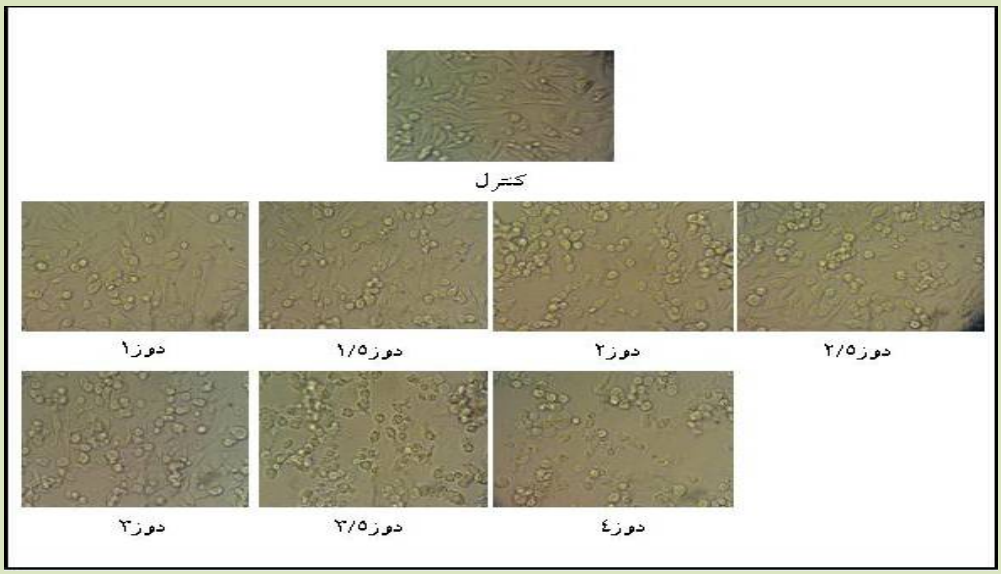

**شکل ۱- اشکال سلول های HUVEC ۲٤ ساعت پس از مجاورت با غلظت های مختلف از هیالورونیک اسید با میکروسکوپ معکوس ( ٦۰۰ برابر)**

بیشترین رشد و تکثیر سلول ها در غلظت های(µg/ml) ۱ تا ۲/۵ صورت گرفت و افزایش غلظت هیالورونیک اسید سبب کاهش تکثیر سلول های اندوتلیال گردید. در بسترساخته شده از کلاژن بیشترین رشد و تکثیر سلول ها در غلظت‌های(µg/ml) ۱ تا ۲ مشاهده شد(شکل۲). در این بسترها نیز افزایش غلظت کلاژن سبب کاهش در میزان تکثیر سلول های اندوتلیال می-گردد. تاثیر پلی ساکارید *Nostoc . sp* ISC 113 بر تکثیر سلول HUVEC نشان داد این پلی ساکارید در بیشتر غلظت ها سبب کاهش رشد سلول های HUVEC می گردد(نمودار۱). در بستری که از پلی ساکارید *Nostoc .sp* ISC 113 ساخته شد، بیشترین رشد و تکثیر سلول های HUVEC در غلظت(µg/ml) ۲ صورت گرفت و در بیشتر غلظت ها کاهش رشد مشاهده شد(شکل۳). در مرحله بعد ترکیب این پلی-ساکارید با مواد پایه، یعنی هیالورونیک اسید و کلاژن I مورد بررسی قرار گرفت. برای این منظور بستر هایی از غلظت های مساوی از پلی ساکارید *Nostoc .sp* ISC 113 و هیالورونیک اسید ساخته شد(شکل ۴). در بسترهای ساخته شده از پلی ساکارید *Nostoc .sp* ISC 113 با هیالورونیک اسید بیشترین رشد و تکثیر سلول-های HUVEC در غلظت(µg/ml) ۱/۵ از این پلی-ساکارید و هیالورونیک اسید صورت گرفت(نمودار۲). در بسترساخته شده از پلی ساکارید *Nostoc.sp* ISC 113 با کلاژن بیشترین رشد و تکثیر سلول های HUVEC در غلظت(µg/ml) ۱و ۱/۵ مشاهده شد(شکل۵) .

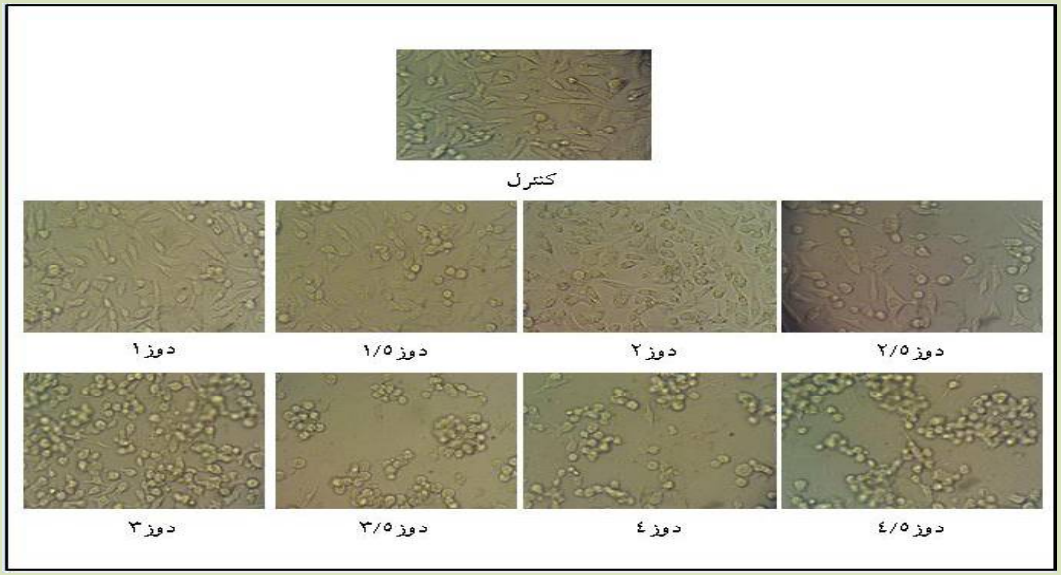



| | ۰/۰ | ۱/۰ | ۱/۵ | ۲/۰ | ۲/۵ | ۳/۰ | ۳/۵ | ٤/۰ | ٤/۵ |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| هیالورونیک اسید | ۱۰۰/۰ | ۱۰٤/۷ | ۱۱۳/۳ | ۱۰۷/۳ | ۱۱۱/۲ | ۸۳/۰ | ۹۱/٤ | ۷۷/۸ | ٦۴/۹ |
| پلی ساکارید سیانوباکتری | ۱۰۰/۰ | ۸۹/۷ | ۸۰/۹ | ۹۹/۸ | ۹٤/٦ | ۸۳/۹ | ۷۹/۵ | ۷٤/۲ | ٦۰/۸ |
| کلاژن | ۱۰۰/۰ | ۱۱۱/۸ | ۱۲۱/۵ | ۱۰۲/۳ | ۸٤/۲ | ۸۳/۸ | ۸۸/۲ | ۷٦/۳ | ٦۰/۰ |

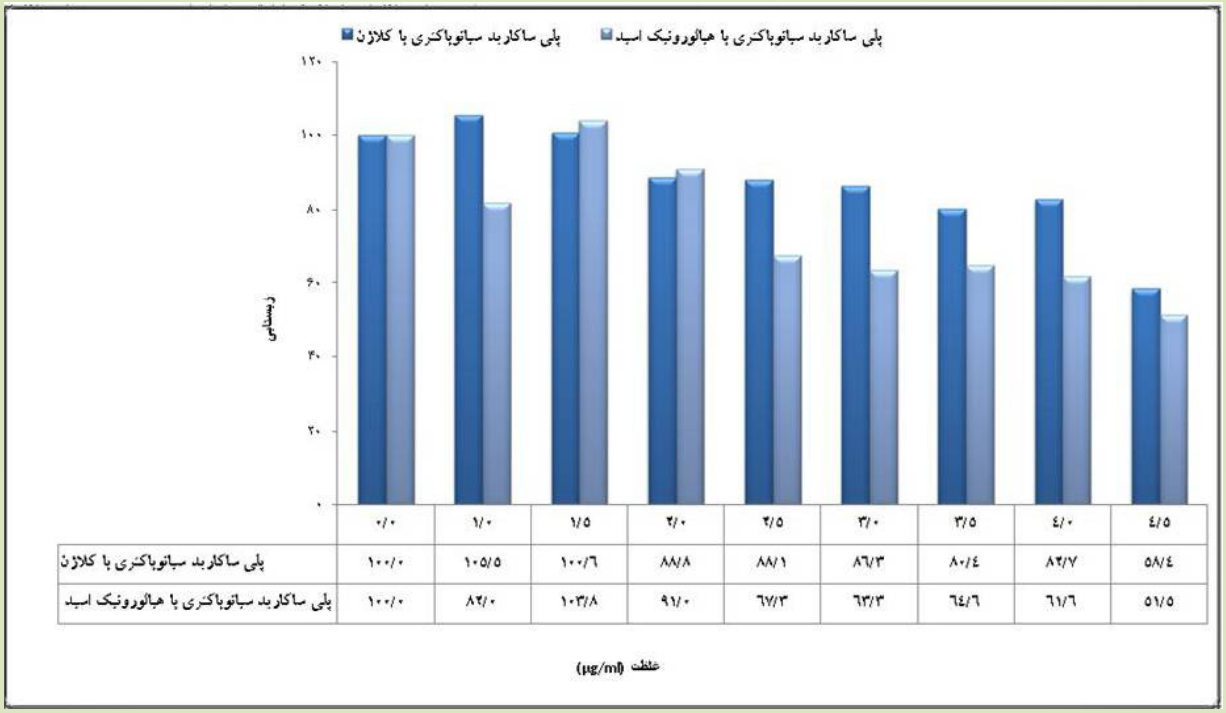
**نمودار ۱- مقایسه تاثیرات پلی ساکارید سیانوباکتری*Nostoc .sp* ISC 113 ، هیالورونیک اسید و کلاژن بر روی سلول های HUVEC**



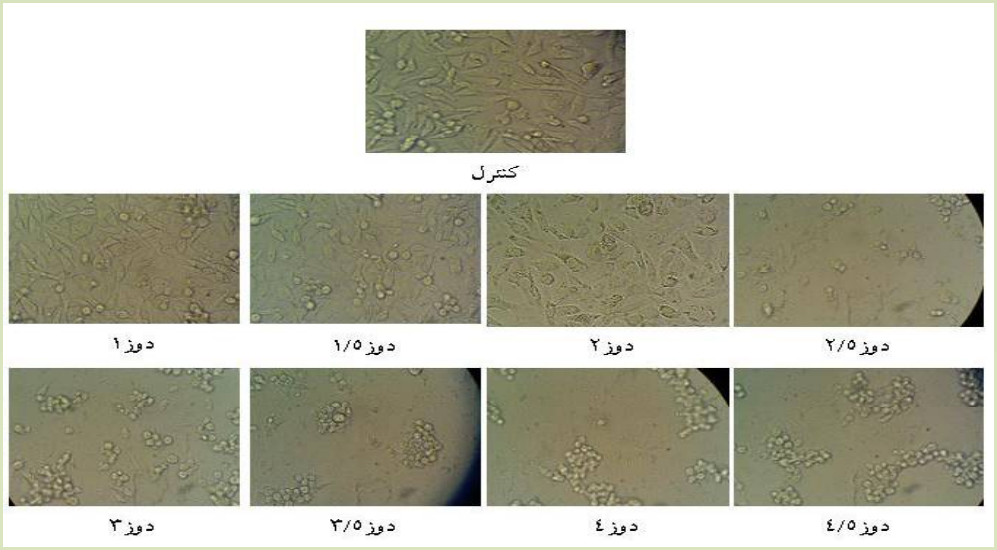

**شکل ۲- اشکال سلول های HUVEC ٢٤ ساعت پس از مجاورت با غلظت های مختلف از کلاژن با میکروسکوپ معکوس ( بزرگنمایی ٦۰۰ برابر)**



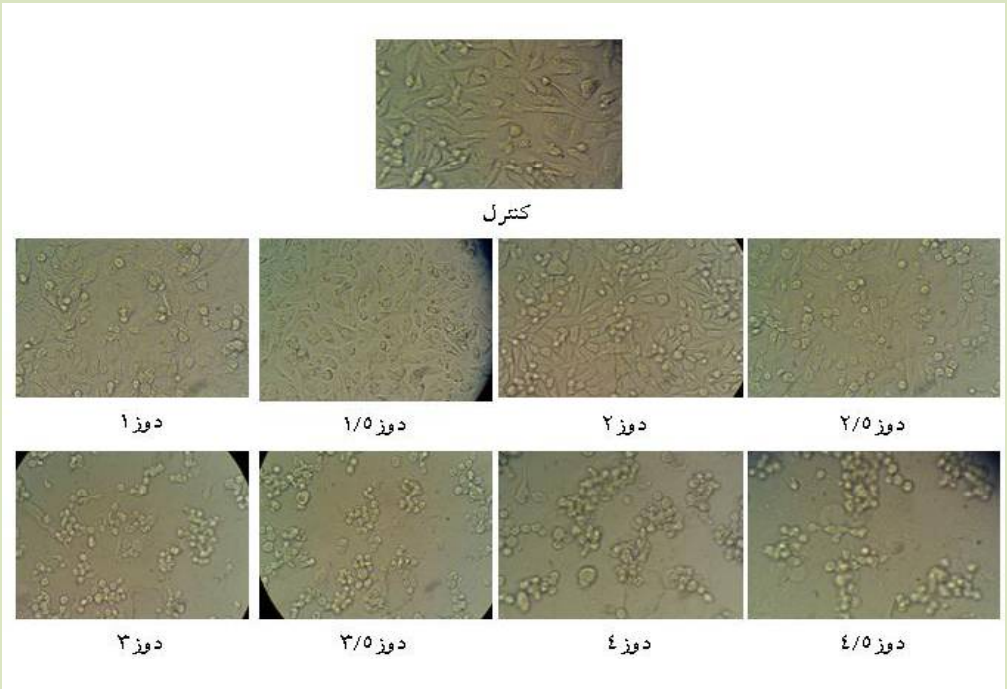

**شکل ۳-اشکال سلول های HUVEC ٢٤ ساعت پس از مجاورت با غلظت های مختلف از پلی ساکارید *Nostoc .sp* ISC 113با میکروسکوپ معکوس (بزرگنمایی ٦۰۰ برابر)**




**نمودار۲- مقایسه تاثیرات ترکیب پلی ساکارید سیانوباکتری*Nostoc .sp* ISC 113 با هیالورونیک اسید و کلاژن بر روی سلول‌های HUVEC**



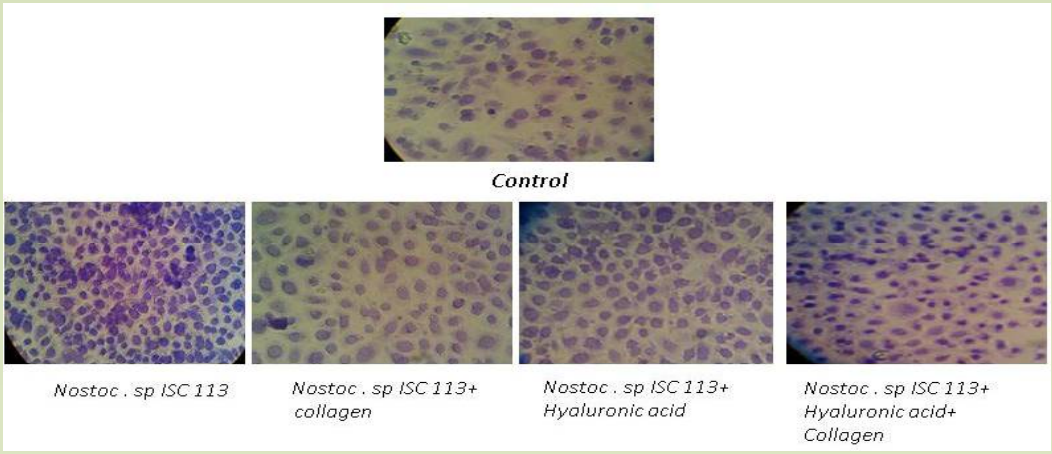

**شکل ٤-اشکال سلول های HUVEC ٢٤ ساعت پس از مجاورت با غلظت های مختلف از ترکیب پلی ساکارید *Nostoc .sp* ISC 113 و هیالورونیک اسید با میکروسکوپ معکوس(بزرگنمایی ٦٠٠ برابر)**




**شکل ٥-اشکال سلول های HUVEC ٢٤ ساعت پس از مجاورت با غلظت های مختلف از ترکیب پلی ساکارید *Nostoc .sp* ISC 113 و کلاژن با میکروسکوپ معکوس(بزرگنمایی ٦٠٠ برابر)**

**تست چسبندگی**

میزان چسبندگی سلول های HUVEC در حضور پلی ساکاریدهای سیانوباکتری و هیالورونیک اسید و کلاژن مقایسه و این مقایسه نشان داد که پلی ساکارید *Nostoc. sp* ISC 113 باعث افزایش سطح چسبندگی سلول های HUVEC شد(شکل۶).




**شکل٦- چسبندگی سلول های HUVEC در حضور پلی ساکارید *Nostoc .sp* ISC 113 ، هیالورونیک اسید و کلاژن با میکروسکوپ معکوس (بزرگنمایی ٦٠٠ برابر)**

### سنجش کلنی

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

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

**جدول ۱- میانگین کلنی های ایجاد شده در غلظت(µg/mL) ۱/۵ افزایش غلظت ها تفاوت معنی داری را نشان ندادند.**

| انواع مواد موثر | خطای استاندارد | میانگین کلنی ها ±انحراف معیار |
|---|---|---|
| **کنترل** | ۸/۰۲۱ | ۱۳۵۲/۰۰±۱۳/۸۹۲ |
| **پلی ساکارید** | ۱۲/۲۵۲ | ۲۰۰۶/۳۳ ± ۲۱/۲۲۱ |
| **کلاژن** | ۱۴/۶۷۸ | ۱۴۷۲/۳۳±۲۵/۴۲۳ |
| **هیالورونیک اسید** | ۴۵/۳۴۷ | ۱۴۰۲/۰۰±۷۸/۵۴۳ |
| **پلی ساکارید+ کلاژن** | ۱۰/۱۳۸ | ۱۶۴۲/۳۳±۱۷/۵۵۹ |
| **پلی ساکارید+هیالورونیک اسید** | ۴۴/۹۰۹ | ۱۷۱۹/۳۳±۷۷/۷۸۴ |
| **پلی ساکارید+هیالورونیک اسید +کلاژن** | ۳۹/۱۹۳ | ۱۴۵۸/۳۳±۶۷/۸۸۵ |

## بحث و نتیجه گیری

امروزه در مهندسی بافت تلاش می شود از پلی-مرهای طبیعی جهت ساخت داربست سلولی استفاده شود. پلی‌مرهای مصنوعی به دلیل داشتن عوارض بالا مشکل ساز هستند. یکی از موادی که بسیار مورد توجه قرار گرفته است پلی‌مرهایی با ساختار پلی ساکاریدی می باشد. تولید پلی ساکارید فراوان توسط میکروارگانیسم های دریایی و مزایای آن ها اثبات شده است(۱۵). پلی ساکاریدهای تولید شده توسط باکتری-ها، در دیواره سلولی نقش ساختاری و حفاظتی دارند. Cerning در سال ۱۹۹۵ گزارش کرد که در بیرون سلول این پلی ساکاریدها یک لایه چسبناک به نام کپسول را تشکیل می دهند که به‌طور کامل آن را داخل محیط به صورت یک ماده لزج ترشح می کنند

که می تواند به عنوان یک چسبنده‌ی زیستی استفاده شود(۶). طبق گزارشات Sutherland در سال ۱۹۹۸، Otero در سال ۲۰۰۳ و Rehm در سال ۲۰۱۰ طبیعت زیست سازگار و غیرسمی بعضی از این اگزوپلی ساکاریدها ما را برآن داشته است که از آن ها در کاربردهای پزشکی فراوان به عنوان داربست یا ماتریکس در مهندسی بافت یا حامل دارو و پانسمان زخم استفاده کنیم. در نتیجه این موضوع باعث جذاب-تر شدن این پلی ساکاریدها در مقایسه با پلی-ساکاریدهای به دست آمده از گیاهان و ریز جلبک ها می شود. Rehm بیان کرد که بعضی از این بیوپلی‌مرها در داخل بدن به تدریج تخریب می شوند که همین موضوع آن ها را برای جایگزینی بافت و کنترل رهایش دارو مناسب می کند(۳۴ ۲۸ ۲۲). Parker و همکاران در سال ۱۹۹۶ بیان کردند که سیانوباکتری ها مانند طیف گسترده ای از میکروارگانیسم های دیگر، قادر به سنتز و ترشح مواد پلی‌مری خارج سلولی که عمدتاً از هتروپلی‌ساکاریدها هستند، تشکیل شده اند. این اگزوپلی ساکاریدها می تواند با سطح سلول پیوند داشته باشد و به عنوان پوشش و ماده چسبنده عمل کند یا داخل محیط احاطه کننده وارد شوند(۲۴). Lewis (۱۶) در سال ۱۹۵۶ تعدادی از *Chlamidomonas spp* را برای تولید پلی‌ساکارید خارج سلولی مورد آزمایش قرار داد. مفیدترین آن ها *C.mexicana* است که ۲۵ درصد بازده تولید کل آن ها پلی ساکارید است. Moore و Tischer(۱۹) در سال ۱۹۶۴ هم چنین سطوح بالای تولیدات خارج سلولی را برای تعدادی از جلبک‌های سبز- آبی گزارش کردند. Ramus در سال ۱۹۷۲ گزارش کرد جلبک قرمز *Porphyridium cruemtum* و*P.aerugineum* به علت این که مقدار زیادی پلی ساکاریدهای خارج سلولی تولید می کنند، ارزش تجاری دارند(۲۶). Rougeaux و همکاران در سال ۱۹۹۹ یک نوع پلی‌ساکارید با عنوان HE800 از نوعی باکتری موجود در عمق دریا به نام *Vibrio diabolicus* استخراج کردند. این محققان تاثیر این ماده را روی سلول های فیبروبلاست انسانی مطالعه کردند. این تحقیق نشان داد که سلول های فیبروبلاست در یک محیط دو بعدی بعداز هضم ماتریکس خارج سلولی اطراف آن تکثیر و مهاجرت می کنند(۲۹). Helary و همکاران در سال ۲۰۰۵ در ادامه پژوهش بالا تکثیر و مهاجرت فیبروبلاست ها را در سراسر مناطق بافت همبند در طول مدت کشت مورد مطالعه قرار دادند(۱۲). Slevin و همکاران در سال ۲۰۰۷ اعلام کردند که الیگوساکاریدهای هیالورونیک اسید تکثیر سلول های اندوتلیال، مهاجرت و تمایز را تحریک می کند. این پلی ساکاریدها می توانند به طور مفید در درمان بافت و به عنوان عوامل دارویی و بیومواد برای ترمیم و مهندسی بافت استفاده شوند(۳۳). Simon-Colin و همکاران در سال ۲۰۰۸ و Guezennec و همکاران در ۲۰۰۳ در میان میکروارگانیسم های موجود در عمق دریا، طیف گسترده ای از باکتری ها را استخراج کردند تا ترکیبات تولیدی آن ها مانند پلی-مرها و پلی‌ساکاریدها(اگزوپلی‌ساکاریدها) مورد بررسی قرار گیرد(۳۱، ۱۱). مطالعه حاضر نشان داد که می توان از بسترهای ساخته شده از هیالورونیک اسید و کلاژن I و پلی‌ساکارید سیانوباکتری نوستوک *Nostoc sp* ISC 113 .ترکیبات طبیعی و ساختار های موثر و کنترل شده‌ای برای ترمیم عروق ساخت. این پلی ساکارید از نظر تاثیر بر رشد و تکثیر و چسبندگی سلول های HUVEC ارزیابی شد. تاثیر پلی ساکاریدهای این نوع از سیانوباکتری ها بر رشد و تکثیر سلول ها تا به حال مورد بررسی قرار نگرفته بود. این مطالعه نشان داد پلی‌ساکارید تولید شده توسط این سیانو باکتری، باعث کاهش مقدار تکثیر می شود، هرچند که این کاهش

معنی دار نیست اما در عوض سبب افزایش چسبندگی سلول های اندوتلیال و افزایش توان کلون زایی سلول‌ها شد که این دو مورد برای ساخت یک داربست که بتواند در ترمیم شرکت کند، ویژگی های بسیار ارزشمندی می باشد. در این پژوهش سیانوباکتری مورد بررسی قرار گرفت، که تا به امروز تاثیر پلی ساکارید-های آن ها بررسی نشده بود. این نمونه سیانوباکتری از چاه های نفتی توسط اساتید ایرانی جدا سازی، شناسایی و نام گذاری شده است.

## منابع


**۱**-ریاحی، ح. **۱۳۷۸.** جلبک شناسی، دانشگاه الزهرا. چاپ سوم. ۸۱-۲۴۳۸م.

**۲**-شکروی، ش.، سلطانی، ن.، بافته چی، ل. **۱۳۷۸.** سیانوباکتری، دانشگاه آزاد اسلامی واحدگرگان. چاپ اول.ص۱۲۳،۷۰،۲۵.

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

**4.**Akbari, A., Ghavimi, S., Solati, H.M., Ebrahimzadeh, M. (2011). Iranian Journal of Orthopaedic Surgery, 9(4); 185-90.

**5.**Baier Leach, J., Bivens, K., Patrick, Cw., Jr, Schmidt, C. (2003). Photocrosslinked hyaluronic acid hydrogels: natural, biodegradable tissue engineering scaffolds. Biotechnol Bioengin, 82; 578-89.

**6.**Cerning, J. (1995). Production of exopolysaccharides by *Lactic acid* bacteria and dairy propionibacteria lait. 75; 463–472.

**7.**Colliec-Jouault, S., Zanchetta, P., Helley, D., Ratiskol, J., Sinquin, C., Fischer, A. M. (2004). Microbial polysaccharides of marine origin and their potential in human therapeutics. Pathol. Biol, 52; 127–130.

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

**9.**Fox, S., Gasparini, G., Harris, A. (2001). Angiogenesis: pathological, prognosis, and their link to trial design and anticancer drugs. Lancet Oncol, 2; 278-89.

**10.**Franken, N.A., Rodermond, HM., Stap, J., Haveman, J. (2006). Clonogenic assay of cells in vitro. Nat Protoc, 1(5); 2315-9.

**11.**Guezennec, J. (2003). From extreme environments to biologically active exopolysaccharides. Commun Agric. Appl. Biol. Sci, 68; 227–234.

**12.**Helary, C., Foucault-Bertaud, A., Gaston Godeau, G., Coulomb, B., Giraud Guille, M. M. (2005). Fibroblast populated dense collagen matrices and cell migration. cell density and metalloproteinases expression. Biomaterials, 26; 1533–1543.

**13.**Holte, O., Onsøyen, E., Myrvold, R., Karlsen, J. (2003). Sustained release of water-soluble drug from directly compressed alginate tablets. Eur. J. Pharm. Sci, 20; 403–407.

**14.**Juhlin, L. (1997). Hyaluronan in Skin. J. Int. Med, 242; 61–66.

**15.**Laurienzo, P. (2010). Marine polysaccharides in pharmaceutical applications. Mar. Drugs, 8; 2435-2465.

**16.**Lewis, R A. (1956). Extracellular polysaccharides of green algae. Can. J. Microbiol, 2; 665–672.

**17.**Liu, C., Xia, Z., Czernuszka, J. T. (2007). Design and development of three-dimensionalscaffolds for tissue engineering. Chem Eng Research Design, 85(7); 1051–64.

**18.** Morris, MC, Depollier, J., Mery, J., Heitz. F. (2001). A peptide carrier for the delivery of biologically active proteins into mammalian cells. Nature Biotechnology, 19; 1173 - 1176.

**19.**Moore, B. G., Tischer, R. G. (1964). Extracellular polysaccharides of algae: effects on life-support system. Science, 145; 586–587.

**20.**Mosmann, T. J. (1983). Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. Immunol. Methods, 65; 55–63.

**21.**Nettles, D., Elder, S., Gilbert, J. (2002). Potential use of chitosan as a cell scaffoldmaterial for cartilage tissue engineering. Tissue Eng, 8; 1009-16- 27.

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

.

.