مقاله پژوهشی

# ارزیابی ویژگی‌های داربست کیتوزانی سنتز شده به روش آنزیمی و کارایی آن جهت لود کردن سلول‌های فیبروبلاست نئوناتال

**اکرم فدوی[۱]، رحیم احمدی[۱و۲*]، سپیده شهباز گهروئی[۳] و مریم حسن نسب[۴]**

**۱- گروه زیست شناسی، دانشکده علوم پایه، واحد همدان، دانشگاه آزاد اسلامی، همدان، ایران**
**۲- گروه بیولوژی، کالج بین المللی اویسینا، بوداپست، مجارستان**
**۳- گروه زیست شناسی، دانشکده علوم پایه، واحد کرج، دانشگاه خوارزمی، ایران**
**٤- مرکز تحقیقات بیوتکنولوژی پزشکی، واحد اشکذر، دانشگاه آزاد اسلامی، اشکذر، یزد، ایران**

*نویسنده مسئول: رحیم احمدی، دکتری تخصصی، drrahahmadi@yahoo.com

تاریخ دریافت مقاله: ۱۴۰۰/۲/۱۸ تاریخ بازنگری: ۱۴۰۰/۴/۲۵ تاریخ پذیرش مقاله: ۱۴۰۰/۶/۲۴

**چکیده**

**زمینه و هدف:** مطالعات بسیاری نشان داده‌اند که داربست‌های کیتوزان می توانند جهت لود کردن سلولهای بنیادی مورد استفاده قرار گیرند اما نتایج هنوز هم در این مورد چالش برانگیزند. براین اساس مطالعه حاضر به ارزیابی ویژگی‌های داربست کیتوزانی سنتز شده به روش آنزیمی و کارایی آن جهت لود کردن سلول‌های فیبروبلاست نئوناتال پرداخته است.

**روش بررسی:** طی این تحقیق تجربی-زمایشگاهی پوست ختنه‌گاه نوزاد انسان تهیه و سلول‌های فیبروبلاست لایه درم آن جداسازی شده و کشت شدند. میزان زنده‌مانی سلول‌ها به روش فلوسایتومتری و تعیین هویت سلول‌ها با استفاده از مارکر وایمنتین صورت گرفت. پس از تهیه هیدروژل کیتوزان، سلول های فیبروبلاست بر روی آن لود شدند و اثر سمیت هیدروژل بر سلول‌ها با استفاده از روش MTT ارزیابی شد. داده‌ها با استفاده از آزمون تی – تست مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت.

**نتایج:** شمارش سلول‌ها نشان داد که هر فلاسک T75 متراکم، حدود ۲ میلیون سلول داشت. سلول‌های جداسازی شده مارکر ویمنتین را در سطح بالایی بیان کردند. فیبروبلاست‌ها با چسبندگی مناسب و توزیع یکنواخت برروی هیدروژل کیتوسان مشاهده شدند. طبق نتایج تست MTT ، هیدروژل تهیه شده اثر سمیت معناداری بر سلول‌های فیبروبلاست نداشت.

**نتیجه‌گیری:** نتایج این تحقیق نشان دادند که داربست کیتوزان می‌تواند داربست مناسبی برای لود کردن سلول‌های فیبروبلاست و انتقال این سلولها جهت پیوند به بافتهای آسیب دیده باشد.

**واژه‌های کلیدی:** کیتوزان، سلول‌های فیبروبلاست، زنده مانی

## مقدمه

کیتوزان پلی ساکارید خطی($C8H_{13}NO_5$) محلول در آب است که بواسطه گروه‌های آمین خود دارای بار مثبت بوده و این امر موجب شده به عنوان یک چسب زیستی عمل کند و به آسانی به سطوح با بار منفی مانند غشاهای مخاطی متصل شود (Ahmed *et al.*, 2018). همچنین زیست تخریب‌پذیر بوده و سازگاری بالایی با محیط زیست دارد (Ahmadi *et al.*, 2015). بدلیل داشتن خواص آنتی‌اکسیدانی، ضدمیکروبی (Herfehdoost *et al.*, 2015)، ضد باکتری، ضد قارچی و غیرسمی بودن در برخی از پانسمان‌ها برای تسریع در بهبود زخم از آن استفاده می‌گردد (Zhao *et al.*, 2011). همچنین این داربست

جهت لود شدن برخی سلول‌ها به ویژه فیبروبلاست‌ها مورد استفاده قرار می گیرد. فیبروبلاست‌ها از سلول‌های اصلی بخش میانی پوست وجز سلول‌های بنیادی و فراوان‌ترین سلول‌های بافت همبند هستند و مانند دیگر سلول‌های بافت همبند، از مزانشیم اولیه مشتق می‌شوند (Ahmed *et al.*, 2020). این سلول‌ها دارای یک سیتوپلاسم منشعب ویک هسته بیضوی یا خال‌دار هستند (Ahmed *et al.*, 2020) و مواد آلی ماتریکس خارج سلولی و کلاژن را سنتز می‌کند. فیبروبلاست‌ها نقش مهمی در حفظ یکپارچگی ساختاری بافت‌های همبند با ترشح مداوم پیش سازهای ماتریکس خارج سلولی و در پاسخ ایمنی به آسیب بافتی ایفا می‌کنند (Frairia and Berta, 2011) و سبب پاکسازی میکروارگانیسم‌های مهاجم می شوند (Barrett and Puré, 2020). هنگامی که یک بافت آسیب می‌بیند، فیبروبلاست‌های مجاور به محل زخم مهاجرت می‌کنند تا با سنتز مقدار زیادی کلاژن در محل، بافت را ترمیم کنند (Smith *et al.*, 1997). طول عمر یک فیبروبلاست، که در جنین جوجه اندازه‌گیری شده است برابر ۳ ± ۵۷ روز است (Marsh *et al.*, 2013).

شباهت طبیعی کیتوزان با گلیکوزآمین‌گلیکان که از مهم‌ترین بخش‌های ماتریس خارج سلولی است، سبب گشته که کیتوزان در چند سال اخیر به عنوان داربست مهندسی بافت استفاده وسیعی داشته باشد. داربست کیتوزان با توجه به خاصیت هیدروفیل بودن ، زیست سازگاری بهتری با سلول‌های فبنیادی نشان می‌دهد و احتمالا می‌تواند در ساختارهایی که به صورت سنتزی جهت ترمیم نواحی آسیب دیده پوست تهیه می‌شود، نقش مناسب و تکمیل کننده‌ای داشته باشد (Russo *et al.*, 2020). نتایج مطالعات نشان داده‌اند که کشت طولانی مدت سلول‌های بنیادی در شرایط آزمایشگاهی با مشکلاتی از جمله از دست رفتن ویژگی‌های منحصر به فرد آن‌ها همراه است که با انتخاب داربست مناسب می‌توان این ضعف را مرتفع کرد (Wei *et al.*, 2020). در واقع داربست‌ها با ساختار متخلل ، محیط مناسبی را برای حفظ و نگهداری سلول‌های بنیادی فراهم می‌کنند (Weissman-Shomer and Fry, 1975). پژوهش‌ها حاکی از آن است که از داربست‌ها به عنوان محافظی به منظور رشد و تکثیر سلول‌های بنیادی برای توسعه استراتژی‌های کارا و جدید در مهندسی بافت و طب ترمیمی می‌توان استفاده نمود (Hashemi *et al.*, 2018). براساس مطالعات انجام شده، داربست‌ها، می‌توانند به عنوان بستر مناسبی برای بررسی برهم کنش‌های سلول و ماتریکس خارج سلولی به کار روند. در بسیاری از بافت‌ها، حضور سلول به تنهایی کافی نیست و لازم است داربست مناسبی برای قرار گرفتن سلول‌ها وجود داشته باشد تا امکان انتقال سلول به محل مناسب در بافت فراهم شود (Su *et al.*, 2019). مطالعات نشان داده اند با توجه به اینکه فیبروبلاست‌ها توانایی مهاجرت و قدرت تکثیر و انجام تقسیم میتوز را دارند، داربست‌های مناسب می‌توانند زمینه مناسبی برای فعالیت آن‌ها فراهم نمایند (Alves da Silva *et al.*, 2011; Nour-Eldeen *et al.*, 2020). نتایج آزمایشات گوناگون نشان می‌دهد که داربست‌ها می‌توانند ترشح سیتوکین فیبروبلاست‌ها را افزایش دهند و به خوبی با یکدیگر در تعامل باشند (An *et al.*, 2015). همچنین به دلیل سازگاری زیستی بالا، کیتوزان محیط مناسب برای بقای سلول‌های بنیادی را تضمین کند (Huang *et al.*, 2012; Jafari *et al.*, 2017). در عین حال، کیتوزان می‌تواند به عنوان عامل رشد برای کنترل آزادسازی مولکول‌های بازسازی کننده برای ترمیم بافت آسیب دیده، مورد استفاده قرار گیرد (Sun *et al.*, 2009). کیتوزان به دلیل سازگاری زیستی و تجزیه پذیری زیستی و فعالیت ضد میکروبی یکی از بیوپلیمرهای مورد بررسی برای کاربردهای ترمیم زخم است (Lu *et al.*, 2009; Boido *et al.*, 2019; Hu *et al.*, 2019). برخلاف یافته‌های تحقیقاتی که اثرات مثبت فراوانی از داربست‌های کیتوزان و استفاده از آن در مهندسی بافت بیان شده، برخی نتایج پژوهشی نشان داده‌اند که غشاهای کیتوزان هنگام استفاده برای پشتیبانی در مهندسی بافت به دلیل سفت و شکننده بودن دارای معایبی هستند و مقاومت مکانیکی پایینی دارند (Hashemi *et al.*, 2018).

باتوجه به کاربردهای گوناگون داربست کیتوزان در انتقال سلول‌های بنیادی به بخش‌های آسیب دیده (Mei *et al.*, 2005) و نیز با توجه به اثرات و کاربردهای آن در مهندسی بافت و فرآیندهای سلولی (Moeini *et al.*, 2020) و همچنین نظر به اینکه عمده مطالعات قبلی انجام شده در خصوص تهیه داربست‌های کیتوزان به روش شیمیایی معطوف شده (Zhang and Neau, 2002) وتحقیقات محدودی در حوزه ارزیابی ویژگی‌های داربست کیتوزانی سنتز شده به روش آنزیمی و کارایی آن جهت لود کردن سلول‌های فیبروبلاست نئوناتال صورت پذیرفته است، بر این اساس هدف از این مطالعه ارزیابی ویژگی‌های داربست کیتوزانی سنتز شده به روش آنزیمی و کارایی آن جهت لود کردن سلول‌های فیبروبلاست نئوناتال می‌باشد.

## روش مطالعه

**تهیه نمونه پوست ختنه‌گاه نوزاد:** در این تحقیق تجربی-آزمایشگاهی، نمونه پوست انسان ازختنه‌گاه (مربوط به نوزاد) طی عمل جراحی و با اخذ رضایت از والدین تهیه شد و با انتقال به لوله فالکون حاوی۵ سی‌سی بافر HBSS که در ۴ درجه قرار داشت، به آزمایشگاه کشت سلول انتقال یافت. تحت شرایط استریل نمونه پوست بریده و برای کاهش آلودگی میکروبی شستشو داده شد.

**جداسازی و کشت سلول‌های فیبروبلاست:** قطعات پوست به لوله فالکون حاوی آنزیم دیسپاز و بافرHBSS جهت جداسازی درم از اپیدرم منتقل شد. برای جداسازی سلول‌ها از درم آنزیم کلاژناز

(۰/۱درصد) افزوده شد. محتویات داخل دیش به لوله فالکون۵۰ میلی‌لیترحاوی ۵ سی‌سی محیط کشتDMEM-HG دارای FBS 10% منتقل و حدود ۳۰-۲۰ بار پیتپاژ شد. محیط رویی تخلیه شد و بر روی ته نشست سلولی، ۵ میلی‌لیتر محیط کشت DMEM-HG فاقد سرم ریخته شد. سلول‌ها به مدت ۵ دقیقه با دور ۲۰۰ g در ۴ درجه سانتیگراد سانتریفوژ شدند. محیط رویی تخلیه شد و ۱ سی‌سی محیط کشت سلول‌های فیبروبلاست اضافه و سوسپانسیون سلولی تهیه شد. وقتی سلول‌ها چسبیدند (یک روز بعد از جداسازی)، محیط کشت سلول‌ها هر۳-۲ روزتعویض شد. پس از کشت اولیه و نیز طی روزهای بعد که تکثیر سلول‌ها ادامه داشت، فرایند رشد سلول‌ها مورد کنترل قرارگرفت و در روزهای مختلف پس از کشت و نیز پس از پر شدن فلاسک، از سلول‌های تکثیر یافته به وسیله میکروسکوپ اینورت، تصاویر میکروسکوپی تهیه شد. در نهایت شمارش سلول‌ها با استفاده از رنگ تریپان‌بلو و لام نئوبار دریک سی‌سی محیط کشت انجام و محاسبه شد. ۱ میلی‌لیتر از سلول‌ها پس از جداسازی جهت بررسی میزان زنده‌مانی به آزمایشگاه فلوسایتومتری ارسال شد.

**تعیین هویت سلول‌ها:** برای تعیین هویت سلول‌ها، ابتدا سلول‌های جدا شده از بافت بر روی لام سیالینیزه کشت داده شدند. پس از ۲۴ ساعت لام را با استون متانول فیکس کرده و سپس به مدت ۱۰ دقیقه در مایکروویو درون بافر با pH برابر ۹ قرار داده شد. پس از سرد شدن لام در دمای محیط، ۵ دقیقه شستشو باTBE صورت گرفت. سپس آب اکسیژنه بر روی لام ریخته شد و پس از ۵ دقیقه دوباره شستشو انجام گرفت. اطراف ناحیه سلولی مورد نظر با ماژیک مخصوص ایمنوسیتوشیمی مشخص گردید و ۱۰۰ میکرولیتر آنتی‌بادی ضد ویمنتین بر روی آن ریخته شد. سپس لام در محیط مربوط و سربسته به مدت ۱ ساعت قرار گرفت. پس از شستشو، آنتی‌بادی ثانویه بر روی لام ریخته شد و پس از ۳۰ دقیقه باز شستشو انجام گرفت. سپس دی‌آمینوپراکسیداز (کروموژن) اضافه شده آن‌گاه شستشو با آب شیر انجام گرفت. جهت رنگ‌آمیزی هسته‌ها، لام به مدت ۱ دقیقه در رنگ هماتوکسیلین قرار گرفت و پس از آن شستشو با آب شیر صورت گرفت. آبگیری و شفاف کردن با قراردادن لام به ترتیب در الکل‌های ۵۰، ۷۰ و ۹۶ هر کدام سه ضربه، الکل۱۰۰ یک دقیقه، الکل گزیلل ۳ ضربه و گزیلل ۵ دقیقه صورت گرفت و لام با چسب مخصوص مونت شد.

**تهیه هیدروژل کیتوزان:** برای تهیه هیدروژل کیتوزان، در یک بشر، ۱۰۰ سی‌سی آب‌مقطر و ۱۰ سی‌سی اسیداستیک خالص ریخته شد. ۱ گرم کیتوزان به آن اضافه شد. یک مگنت به داخل بشر انداخته شد و بر روی هیتر قرارداده شد تا کامل کیتوزان به طور کامل حل گردد. محلول سود غلیظ تهیه شد. بشر حاوی محلول کیتوزان در زیر هود بر روی هیتر قرار داده شد و تحت سنجش با pH متر قرار گرفت. سود آرام آرام اضافه شد تا pH آن به ۸/۵ تا ۹ برسد. محتویات بشر به داخل دو لوله فالکون ریخته شد و سانتریفوژ به مدت ۲ دقیقه و دور RPM 5000 انجام شد. آب هیدروژل با استفاده از استون جداسازی گردید و به زیر هود انتقال یافت. پودر کیتوزان و هیدروژل استریل شد. جهت این کار از تابش نور UV هود لامینار استفاده شد.

**کشت سلول‌ها بر روی کیتوزان:** جهت کشت سلول‌ها بر روی هیدروژل کیتوزان، هیدروژل در پلیت مورد نظر تهیه شد. سلول‌های فیبروبلاست از فریز درآمد و پس از رسیدن به تراکم مورد نظر، تریپسینه شده و بر روی هیدروژل منتقل شدند. هیدروژل حاوی سلول در انکوباتور قرار داده شد و هر روز تعویض محیط انجام شد و در نهایت نحوه قرارگیری سلول‌های فیبروبلاست بر روی کیتوزان توسط میکروسکوپ اینورت و میکروسکوپ الکترونی مورد بررسی قرار گرفت.

**بررسی اثر سمیت هیدروژل بر فیبروبلاست‌ها:** برای بررسی میزان سمیت هیدروژل برای سلول‌ها از تست MTTاستفاده شد. بدین منظور نمونه هیدرروژل در پلیت ۹۶ خانه ریخته شد و سلول‌های فیبروبلاست با تراکم $10^5$ در هر چاهک کشت شدند. پس از ۴۸ ساعت محیط کشت رویی تخلیه و بر روی هر چاهک ۱۰۰ میکرولیتر DMSO ریخته و برای ۵ ساعت در انکوباتور قرار داده‌شد. سپس DMSO تخلیه و محلول MTT بر روی چاهک‌ها ریخته شد. پس از گذشت ۱۰ دقیقه جذب نوری نمونه ها توسط دستگاه الایزا ریدر در طول موج ۵۴۵ نانومتر خوانده شد (Hekmat *et al.*, 2020; Bahram Beygipour *et al.*, 2021; Rhmanian *et al.*, 2021).

**آنالیز آماری:** جهت تجزیه و تحلیل داده‌ها از نرم افزارPASW استفاده شد. پس از ورود داده‌ها، توزیع طبیعی داده‌ها توسط آزمون کولموگروف-اسمیرنوف مورد بررسی قرار گرفت. پس از اطمینان از توزیع طبیعی داده‌ها، تحلیل داده‌ها توسط آزمون t-تست انجام گردید.

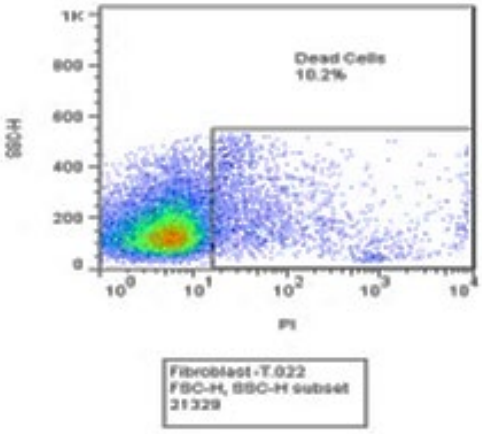
## نتایج

نتایج نشان دادند که پروسه جداسازی باید حداکثر چند ساعت بعد از عمل ختنه انجام شود. نگهداری نمونه برای یک روز یا بیشتر باعث آلودگی می‌شود و نتیجه دلخواه از جداسازی حاصل نمی‌شود. خرد کردن بافت تا حد امکان برای روش آنزیمی مناسب بوده و در این حالت آنزیم راحت‌تر عمل می‌کرد. انکوباسیون در ۳۷ درجه حداقل ۲ ساعت مناسب بود و در این بین شیک مکانیکی کمک کننده بود. آلودگی در محیط کشت ۲۴ تا ۴۸ ساعت اولیه قابل شناسایی بود. در بررسی با میکروسکوپ معکوس، ۷ روز پس از کشت اولیه، سلول‌های

فیبروبلاست چسبنده و دوکی شکل در اطراف بافت به صورت شعاعی مشاهده شدند ( شکل ۱).

**شکل ۱**– فیبروبلاست‌های جدا شده از پوست فوراسکین ۷–۶ روز پس از جداسازی (بزرگنمایی ۴۰).

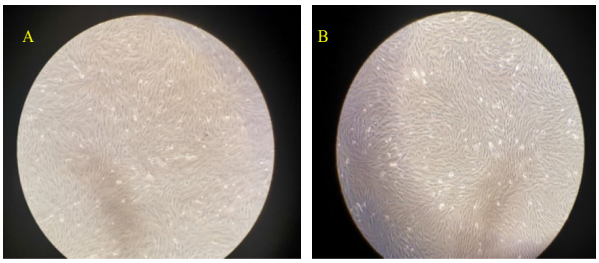
بررسی زنده مانی سلول ها با استفاده از فلوسایتومتری نشان داد که درصد بالایی از سلول‌های فیبروبلاست (۹۸/۲ درصد) در روز جداسازی زنده هستند و تعداد کمی از آن‌ها دچار آپوپتوز گردیده (شکل ۲).




**شکل ۲**– زنده‌مانی سلول‌های فیبروبلاست جدا شده از پوست فوراسکین در روز جداسازی

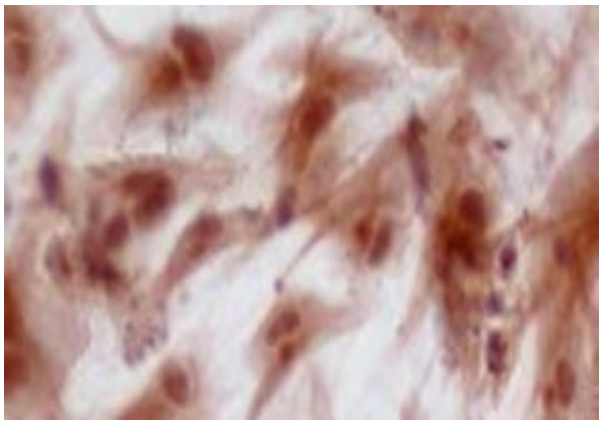
از سلول‌ها در پاساژ ۳ جهت انجام تجربیات استفاده شد. شمارش سلول‌ها نشان داد که هر فلاسک T75 متراکم، حدود ۲ میلیون سلول داشت (شکل ۳).

در بررسی میکروسکوپی سلول‌های فیبروبلاست با رنگ‌آمیزی ایمونوسیتوشیمی برای مارکر ویمنتین، همه‌ی سلول‌ها به صورت یکدست به رنگ قهوه‌ای مشاهده شدند. نتایج نشان‌داد که سلول‌های جداسازی شده مارکر ویمنتین را در سطح بالایی بیان می‌کنند (شکل ۴).



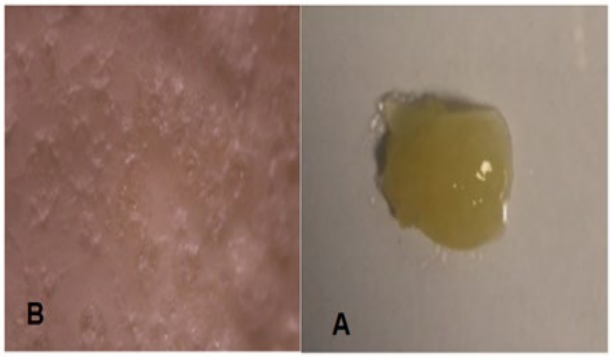

**شکل ۳**– فیبروبلاست‌های جدا شده از پوست فوراسکین در پاساژ دوم (A) و سوم (B) (بزرگنمایی ۴۰)

در بررسی میکروسکوپی سلول‌های فیبروبلاست با رنگ‌آمیزی ایمونوسیتوشیمی برای مارکر ویمنتین، همه‌ی سلول‌ها به صورت یکدست به رنگ قهوه‌ای مشاهده شدند. نتایج نشان‌داد که سلول‌های جداسازی شده مارکر ویمنتین را در سطح بالایی بیان می‌کنند (شکل ۴).



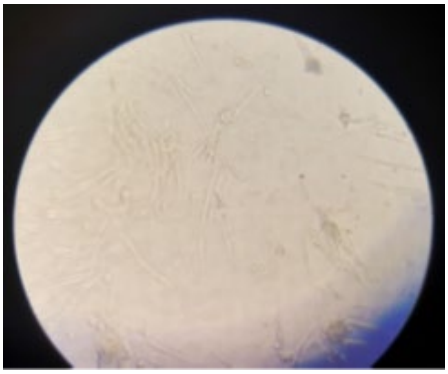
**شکل ٤**– رنگ آمیزی فیبروبلاست‌ها برای مارکر ویمنتین (بزرگنمایی۴۰۰).

نمونه کیتوزان تهیه شده  شیری رنگ بوده و از شفافیت نسبی برخوردار بوند. نتایج نشان داد نورUV به مدت ۱ ساعت جهت استریل نمونه‌های پودری و غیر خشک کافی بود (شکل ۵).



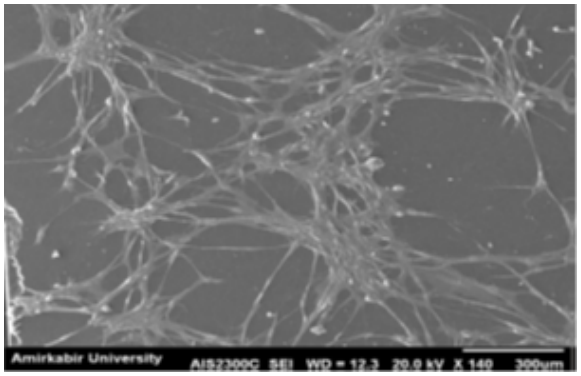

**شکل ٥**– مورفولوژی پلیمر کیتوزان با مشاهده چشمی(A) و مورفولوژی پلیمر کیتوزان با دستگاه اتواسکنر (B).

بررسی هیدروژل با میکروسکوپ اینورت، ۲۴ ساعت پس از کشت فیبروبلاست‌ها بر روی آن، فیبروبلاست‌های دوکی شکل را نشان داد (شکل ۶).

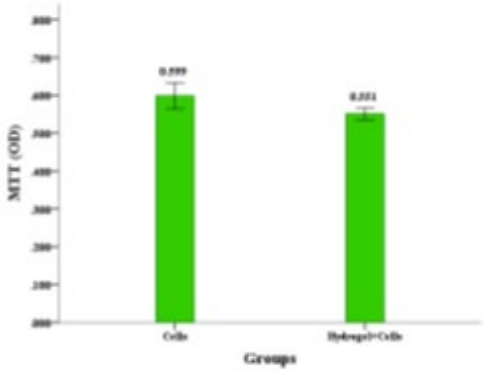


**شکل ٦-** فیبروبلاست‌های کشت شده بر روی هیدروژل کیتوزان

بررسی میکروسکوپ الکترونی نشان داد که فیبروبلاست‌ها برروی هیدروژل کیتوزان با چسبندگی مناسب و توزیع یکنواخت قرار گرفته بودند (شکل ۷).




**شکل ۷-** تصویر میکروسکوپ الکترونی از سلول‌های کشت شده فیبروبلاست بر روی کیتوزان




**نمودار ۱**- مقایسه زنده‌مانی سلول‌های فیبروبلاست در گروه فیبروبلاست (cells) و گروه هیدروژل کیتوزان حاوی فیبروبلاست (hydrogel+cells)

## بحث

نتایج این مطالعه نشان می‌دهند با توجه به مورفولوژی مناسب هیدروژل کیتوزان تهیه شده و امکان پخش و گستردگی یکنواخت سلولها بر روی آن و نیز عدم اثر معنادار سمیتی کیتوزان بر سلول‌ها، هیدروژل کیتوزان می‌تواند بستر مناسبی برای لود شدن سلول‌های فیبروبلاست باشد و این امر می‌تواند در استفاده از این داربست در مهندسی بافت حایز اهمیت باشد. موافق با این یافته، پژوهش‌های دیگری نشان داده‌اند که استفاده از داربست کیتوزان در حضور سلول‌های فیبروبلاستی در تسریع بهبود زخم موثر بوده است چنانکه در مطالعه ای درخصوص کاربردهای داربست کیتوزان در بهبود زخم، نتایج نشان داده‌اند کیتوزانبه دلیل ویژگی های مناسب فیزیکوشیمیایی می تواند بستر مناسبی جهت لود شدن سلولهای فیبروبلاست بوده و باعث افزایش تکثیر سلول‌های فیبروبلاستی گردد (Sahariah and Másson, 2017). هیدروژلهای دیگری نیز در این خصوص مورد بررسی قرار گرفته‌اند و یافته‌های پژوهشی نشان داده‌اند هیدروژل‌های مبتنی بر ژلاتین نیز می توانند بستر مناسبی برای لود شدن سلول‌های بنیادی باشند (Bodnar *et al.*, 2005). در واقع کیتوزان دارای سازگاری زیستی بالا است و به دلیل ساختار فیزیکوشیمیایی مناسب می‌تواند محیط مناسب برای قرارگیری و رشد و تکثیر سلول‌های بنیادی باشد (Huang *et al.*, 2012; Jafari *et al.*, 2017). علاوه بر این کیتوزان خود به تنهایی عامل رشد بوده و در القای بافت‌های آسیب دیده جهت تولید مواد و مولکولهای ترمیم کننده نقش دارد (Sun *et al.*, 2009) و بر این مبنا جهت پانسمان زخم و بافت‌های آسیب دیده بسیار مناسب می باشد. کیتوزان دارای فعالیت ضد میکروبی قابل توجه است و از این جهت همراه با لود شدن سلولها بر روی آن و انتقال آنها به ناحیه آسیب دیده می تواند در التیام نواحی آسیب دیده بافتی نقش مهمی ایفا نماید (Lu *et al.*, 2009; Boido *et al.*, 2019; Hu *et al.*, 2019). از سویی کیتوزان می تواند سبب القای سنتز کلاژن در بافتهای اسیب دیده گردد (Mirtaghavi *et al.*, 2020) و بر این اساس هرگاه سلولهای فیبروبلاست بر روی آن بخوبی لود شوند می‌تواند ضمن انتقال مناسب این سلول‌ها به نواحی آسیب دیده به همراه سلول‌های فیبروبلاست در ترمیم بافت شرکت نماید. کیتوزان می‌تواند به صورت پوششی بادوام، جاذب آب و زیست سازگار (Ikeda *et al.*, 2014; Jin *et al.*, 2021) سبب تسریع بهبود سوختگی‌ها گردد (Singh *et al.*, 2017) و طبعا در این مورد هرگاه سلول‌های فیبروبلاست نیز بر کیتوزان لود شوند انتظار بر آن خواهد بود که ترمیم سوختگی با سرعت بسیار بیشتری انجام گیرد. علاوه بر این، کیتوزان قادر است آب را جذب کرده و به طور طبیعی در اثر آنزیم‌های بدن تجزیه شود و نیازی به برداشت آن بعد از بهبود سوختگی نیست (Azmana *et al.*, 2021) و این امر نشانگر آن

است که کیتوزان هم از نظر ویژگی‌های فیزیکی و شیمیایی بستر مناسبی جهت لود کردن سلولهای بنیادی است و هم خود دارای ویژگی‌هایی است که به التیام آسیب‌های بافتی کمک می‌نماید. گرچه در مقابل برخی یافته‌های پژوهشی نشان داده‌اند که غشاهای کیتوزان به دلیل سفت و شکننده بودن در هنگام استفاده به عنوان پانسمان ممکن است دارای معایبی باشند و مقاومت مکانیکی کمی داشته باشند (Hashemi *et al.*, 2018). بررسی دقیق خواص فیزیکوشیمیایی هیدروژل کیتوزان و توانایی این هیدروژل در لود کردن انواع سلولهای بنیادی و نقش دقیق آن در ترمیم بافتی و تمرکز بر روی بررسی عوارض جانبی آن به ویژه در مطالعات انسانی می‌تواند نتایج دقیقتری در خصوص امکان استفاده از هیدروژل کیتوزان در ترمیم بافت‌های آسیب دیده در انسان فراهم نماید.

## نتیجه‌گیری

در مجموع نتایج حاصل از این پژوهش نشان داده‌اند که داربست کیتوزان یک داربست مناسب برای لود کردن سلول‌های فیبروبلاستی مشتق شده از سلول‌های جدا شده از پوست ختنه‌گاه بوده و می‌تواند در مهندسی بافت و انتقال سلول‌های بنیادی به نواحی آسیب دیده کاربرد داشته باشد.

## تقدیر و تشکر

این پژوهش با حمایت مالی شبکه جهانی تحقیقات، آموزش و رخدادها (GREEN) اجرا شده، بدین وسیله از تمامی کسانی که در اجرای این تحقیق یاریگر محققان این پژوهش بوده‌اند، تقدیر و تشکر به عمل می‌آید.

مجوز کمیته اخلاق درپژوهش‌های زیست پزشکی از طرف سازمان معاونت تحقیقات و فناوری دانشگاه علوم پزشکی تهران با شناسه IR.TUMS.VCR.REC.1397.506 و نیز از طرف سازمان پزشکی قانونی کشور با شناسه IR.LMO.REC.1397.021 دریافت شد

## مراجع

Ahmadi, F., Oveisi, Z., Samani, S.M. and Amoozgar, Z. 2015. Chitosan based hydrogels: Characteristics and pharmaceutical applications. Research in pharmaceutical sciences, 10(1): 1.

Ahmed, K.B.M., Khan, M.M.A., Siddiqui, H. and Jahan, A. 2020. Chitosan and its oligosaccharides, a promising option for sustainable crop production-a review. Carbohydrate polymers, 227: 115331.

Ahmed, S., Ali, A. and Sheikh, J. 2018. A review on chitosan centred scaffolds and their applications in tissue engineering. International journal of biological macromolecules, 116: 849-862.

Alves da Silva, M.L., Martins, A., Costa-Pinto, A., Correlo, V., Sol, P., Bhattacharya, M., Faria, S., Reis, R. and Neves, N. 2011. Chondrogenic differentiation of human bone marrow mesenchymal stem cells in chitosan-based scaffolds using a flow-perfusion bioreactor. Journal of tissue engineering and regenerative medicine, 5(9): 722-732.

An, Y., Jing, H., Ming, L., Liu, S. and Jin, Y. 2015. Bone marrow mesenchymal stem cell aggregate: An optimal cell therapy for full-layer cutaneous wound vascularization and regeneration. Scientific reports, 5(1): 1-12.

Azmana, M., Mahmood, S., Hilles, A.R., Rahman, A., Arifin, M.A.B. and Ahmed, S. 2021. A review on chitosan and chitosan-based bionanocomposites: Promising material for combatting global issues and its applications. International journal of biological macromolecules, 185: 832-848.

Bahram Beygipour, Y., Ahmadi, R. and Zafari, H. 2021. Evaluation of cytotoxic effects of dandelion extract on cervical cancer cells (hela) in comparison with normal embryonic kidney cells (hek293). Research in Karyotic Cell & Tissue, 2(1): 1-7..

Barrett, R.L. and Puré, E. 2020. Cancer-associated fibroblasts and their influence on tumor immunity and immunotherapy. Elife, 9: e57243.

Bodnar, M., Hartmann, J.F. and Borbely, J. 2005. Preparation and characterization of chitosan-based nanoparticles. Biomacromolecules, 6(5): 2521-2527.

Boido, M., Ghibaudi, M., Gentile, P., Favaro, E., Fusaro, R. and Tonda-Turo, C. 2019. Chitosan-based hydrogel to support the paracrine activity of mesenchymal stem cells in spinal cord injury treatment. Scientific reports, 9(1): 1-16.

Frairia, R. and Berta, L .۲۰۱۱ .Biological effects of extracorporeal shock waves on fibroblasts. A review. Muscles, ligaments and tendons journal, 1(4): 138.

Hashemi, S., Rajabi, S., Mahmoudi, R., Ghanbari, A. and Jafari Barmak, M. 2018. The investigation of proliferation of fibroblasts on chitosan scaffold in the presence of hyaluronic acid. Armaghane danesh, 23(2): 134-145.

Hekmat, A., Mohsenpour, K., Atyabi, S.M. and Bakhshandeh, H. 2020. The effects of titanium dioxide nanoparticles coatings in the extent of their effectiveness: DNA interaction. New Cellular and Molecular Biotechnology Journal, 10(39): 61-78.

Herfehdoost, G., Sadri, M., Pashmforosh, N. and Emamgholi, A. 2015. The preparation of nanofibers chitosan/polyethylene oxide (peo)/from (and) henna) extract (plant for medicine application. Medical Journal of Tabriz University of Medical Sciences, 37(5): 14-19.

Hu, X., Zhou, X., Li, Y., Jin, Q., Tang, W., Chen, Q., Aili, D. and Qian, H. 2019. Application of stem cells and chitosan in the repair of spinal cord injury. International Journal of Developmental Neuroscience, 76: 80-85.

Huang, W.-Y., Yeh, C.-L., Lin, J.-H., Yang, J.-S., Ko, T.-H. and Lin, Y.-H. 2012. Development of fibroblast culture in three-dimensional activated carbon fiber-based scaffold for wound healing . Journal of Materials Science: Materials in Medicine, 23(6): 1465-1478.

Ikeda, T., Ikeda, K., Yamamoto, K., Ishizaki, H., Yoshizawa, Y., Yanagiguchi, K., Yamada, S. and Hayashi, Y. 2014. Fabrication and characteristics of chitosan sponge as a tissue engineering scaffold. BioMed research international, 2014.

Jafari, M., Paknejad, Z., Rad, M.R., Motamedian, S.R., Eghbal, M.J., Nadjmi, N. and Khojasteh, A. 2017. Polymeric scaffolds in tissue engineering: A literature review. Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials, 105(2): 431-459.

Jin, L., Yoon, S.-J., Lee, D.H., Pyun, Y.C., Kim, W.Y., Lee, J.H., Khang, G., Chun, H.J. and Yang, D.H. 2021. Preparation of foam dressings based on gelatin, hyaluronic acid, and carboxymethyl chitosan containing fibroblast growth factor-7 for dermal regeneration. Polymers, 13(19): 3279.

Lu, W.-N., Lü, S.-H., Wang, H.-B., Li, D.-X., Duan, C.-M., Liu, Z.-Q., Hao, T., He, W.-J., Xu, B. and Fu, Q. 2009. Functional improvement of infarcted heart by co-injection of embryonic stem cells with temperature-responsive chitosan hydrogel. Tissue Engineering Part A, 15(6): 1437-1447.

Marsh, T., Pietras, K. and McAllister, S.S. 2013. Fibroblasts as architects of cancer pathogenesis. Biochimica et Biophysica Acta) BBA)-Molecular Basis of Disease, 1832(7): 1070-1078.

Mei, N., Chen, G., Zhou, P., Chen, X., Shao, Z.-Z., Pan, L.-F. and Wu, C.-G. 2005. Biocompatibility of poly (ε-caprolactone) scaffold modified by chitosan—the fibroblasts proliferation in vitro. Journal of biomaterials applications, 19(4): 323-339.

Mirtaghavi, A., Luo, J. and Muthuraj, R. 2020. Recent advances in porous 3d cellulose aerogels for tissue engineering applications: A review. Journal of Composites Science, 4(4): 152.

Moeini, A., Pedram, P ,.Makvandi, P., Malinconico, M. and d'Ayala, G.G. 2020. Wound healing and antimicrobial effect of active secondary metabolites in chitosan-based wound dressings: A review. Carbohydrate polymers, 233: 115839.

Nour-Eldeen, G., Abdel-Rasheed, M., El-Rafei, A.M ,. Azmy, O. and El-Bassyouni, G.T. 2020. Adipose tissue-derived mesenchymal stem cells and chitosan/poly (vinyl alcohol) nanofibrous scaffolds for cartilage tissue engineering. Cell Regeneration, 9(1): 1-12.

Rhmanian, N., Hekmat, A. and Hajebrahimi, Z. 20 .۲۱ Effect of simulated microgravity condition on cells proliferation and myostatin gene expression in differentiated skeletal muscle cells (c2c12). Journal of Space Science and Technology.

Russo, B., Brembilla, N.C. and Chizzolini, C. 2020. Interplay between keratinocytes and fibroblasts: A systematic review providing a new angle for understanding skin fibrotic disorders. Frontiers in immunology, 11: 648.

Sahariah, P. and Másson, M. 2017. Antimicrobial chitosan and chitosan derivatives: A review of the structure–activity relationship. Biomacromolecules, 18(11): 3846-3868.

Singh, R., Shitiz, K. and Singh, A. 2017. Chitin and chitosan: Biopolymers for wound management. International wound journal, 14(6): 1276-1289.

Smith, R.S., Smith, T.J., Blieden, T.M. and Phipps, R.P. 1997. Fibroblasts as sentinel cells. Synthesis of chemokines and regulation of inflammation. The American journal of pathology, 151(2): 317.

Su, T., Huang, K., Ma, H., Liang, H., Dinh, P.U., Chen, J., Shen, D., Allen, T.A., Qiao, L. and Li ,Z. 2019. Platelet-inspired nanocells for targeted heart repair after ischemia/reperfusion injury. Advanced functional materials, 29(4): 1803567.

Sun, L., Wang, S., Zhang, Z., Wang, X. and Zhang, Q. 2009. Biological evaluation of collagen–chitosan scaffolds for dermis tissue engineering. Biomedical Materials, 4(5): 055008.

Wei, C.-J., Gu, Y.-H., Wang, W., Ren, J.-Y., Cui, X.-W., Lian, X., Liu, J., Wang, H.-J., Gu, B. and Li, Q.-F. 2020. A narrative review of the role of fibroblasts in the growth and development of neurogenic tumors. Annals of Translational Medicine, 8.(۲۱)

Weissman-Shomer, P. and Fry, M. 1975. Chick embryo fibroblasts senescence in vitro: Pattern of cell division and life span as a function of cell density. Mechanisms of ageing and development, 4: 159-166.

Zhang, H. and Neau, S.H. 2002. In vitro degradation of chitosan by bacterial enzymes from rat cecal and colonic contents. Biomaterials, 23(13): 2761-2766.

Zhao, L.-M., Shi, L.-E., Zhang, Z.-L., Chen, J.-M., Shi, D.-D., Yang, J. and Tang, Z.-X. 2011. Preparation and application of chitosan nanoparticles and nanofibers. Brazilian Journal of Chemical Engineering, 28: 353-362.

Research in Karyotic Cell &Tissue, Volume 2, Issue 2, 2021 Pages 1-7

Research Article

# Evaluation of Chitosan Scaffold Synthetized by Enzymatic Method and Its Efficacy for Loading Neonatal Fibroblast Cells

**Akram Fadavi[1], Rahim Ahmadi[1,2*], Sepidehand Shahbaz Gahrouei[3], Maryam Hassan Nasab[4]**

[1] Department of Biology, Faculty of Basic Sciences, Hamedan Branch, Islamic Azad University, Hamedan, Iran
[2] Avicenna International College, Budapest, Hungary
[3] Department of Biology, Faculty of Basic Sciences, Karaj Branch, Kharazmi University, Iran
[4] Medical Biotechnology Research Center, Ashkezar Branch, Islamic Azad University, Ashkezar, Yazd, Iran

*Correspondence to Rahim Ahmadi, Ph.D., drrahahmadi@yahoo.com

Received 8th May 2021 Revised 16th July 2021 Accepted 15th September 2021

## Abstract

**Background and aim**: Many studies have shown that chitosan scaffolds can be used to load stem cells, but the findings are still challenging. Therefore, the present study evaluated the properties of chitosan scaffolds synthesized by the enzymatic method and their efficiency for loading neonatal fibroblast cells.

**Methods:** During this experimental-laboratory study, the human neonatal foreskin was prepared and the fibroblast cells of the dermal layer were isolated and cultured. Cell viability was determined by flow cytometry and cell identity was determined using a Vimentin marker. After the preparation of chitosan hydrogel, fibroblast cells were loaded on it and the cytotoxic effect of hydrogel on cells was evaluated using the MTT assay. Data were analyzed using a t-test.

**Results** :Cell counts showed that each dense T75 flask contained about 2 million cells. Isolated cells expressed the Vimentin marker at a high level. Fibroblasts were observed with good adhesion and uniform distribution on chitosan hydrogel. According to the results of the MTT test, the prepared hydrogel had no significant toxicity effect on fibroblast cells.

**Conclusion :**The results of this study showed that chitosan scaffolding can be a suitable scaffold for loading fibroblast cells and transporting these cells for transplantation to damaged tissues.

***Keywords*:** Chitosan, Fibroblast cells, Viability