Daneshvar Medicine
Basic and Clinical Research Journal Vol. 30, No. 2, 2022

Research Paper

Evaluation of collagen scaffold synthetized by enzymatic method and its efficacy for loading neonatal fibroblast cells

Roqieh Shalbafian[1], Sona Zare[2], Rahim Ahmadi[1,3*], Sanaz Sahraee[4], Maryam Hassan Nasab[5]

1. Department of Biology, Faculty of Basic Sciences, Hamedan Branch, Islamic Azad University, Hamedan, Iran
2. Skin and Stem Cell Research Center, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, Iran
3. Department of Biology, Avicenna International College, Budapest, Hungary
4. Department of Biology, Faculty of Basic Sciences, East Tehran Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran
5. Medical Biotechnology Research Center, Ashkezar Branch, Islamic Azad University, Ashkezar, Yazd, Iran

*** Corresponding author e-mail: drrahahmadi@yahoo.com**

Citation: Shalbafian R, Zare S, Ahmadi R, Sahraee S, Hassan Nasab M. Evaluation of collagen scaffold synthetized by enzymatic method and its efficacy for loading neonatal fibroblast cells.
Daneshvar Medicine 2022; 30(2):1-11.
doi: 10.22070/DANESHMED.2022.15373.1140

Abstract

Background and Objective: Collagen scaffolds are one of the suitable scaffolds for stem cell loading, but the viability of fibroblast cells loaded on collagen scaffolds is one of the important issues. Therefore, the present study investigated the viability of fibroblasts loaded on collagen scaffold.

Materials and Methods: In this in vitro experimental study, human skin samples were obtained from neonates during circumcision surgery and bovine collagen was prepared. Fibroblast cells were counted using a hemocytometer after isolation from tissue fragments. Cell viability was evaluated using flow cytometry. Vimentin marker were used to identify fibroblast cells. Fibroblast cells were cultured on hydrogels. MTT method was used to evaluate the cytotoxic effect of hydrogels on cells. Data were analyzed using independent t-test.

Results: The viability of fibroblast cells isolated from the foreskin was 89% on the first day after isolation. The results of immunocytochemical examination confirmed the identity of fibroblast cells. MTT results showed that collagen hydrogel had no significant toxicity on loaded fibroblasts. The results of fluorescent microscopy showed that the viability of cells loaded on hydrogel was 96%.

Conclusion: The results of this study showed that collagen scaffolds are suitable for loading fibroblast cells isolated from the foreskin and can be used in tissue engineering and transfer of fibroblast cells to damaged areas.

Keywords: Foreskin, Fibroblast cells, Collagen scaffold, Viability

Received: 13 Mar 2022
Last revised: 18 Jun 2022
Accepted: 26 Jun 2022

مقاله پژوهشی

ارزیابی ویژگی های داربست کلاژنی سنتز شده به روش آنزیمی و کارایی آن جهت لود کردن سلول‌های فیبروبلاست نئوناتال

نویسندگان: رقیه شالبافیان[۱]، سونا زارع[۲]، رحیم احمدی[۱،۳*]، ساناز صحرایی[٤]، مریم حسن نسب[٥]

۱- گروه زیست شناسی، دانشکده علوم پایه، واحد همدان، دانشگاه آزاد اسلامی، همدان، ایران

۲- مرکز تحقیقات پوست و سلول‌های بنیادی، دانشگاه علوم پزشکی تهران، تهران، ایران

۳- گروه بیولوژی، کالج بین المللی اویسینا، بوداپست، مجارستان

٤- گروه زیست شناسی، دانشکده علوم پایه، واحد تهران شرق، دانشگاه آزاد اسلامی ، تهران، ایران

٥- مرکز تحقیقات بیوتکنولوژی پزشکی، واحد اشکذر، دانشگاه آزاد اسلامی، اشکذر، یزد، ایران

*نویسنده مسئول: رحیم احمدی **Email: drrahahmadi@yahoo.com**

دریافت: ۱۴۰۰/۱۲/۲۲
آخرین اصلاح‌ها: ۱۴۰۱/۰۳/۲۸
پذیرش: ۱۴۰۱/۰۴/۰۵

چکیده

مقدمه و هدف: داربست‌های کلاژنی یکی از داربست‌های مناسب جهت لود شدن سلول‌های بنیادی می باشند، اما میزان زنده‌مانی سلولهای فیبروبلاست لود شده بر روی داربستهای کلاژنی از مسایل مهم می باشد. براین اساس مطالعه حاضر به بررسی میزان زنده‌مانی سلولهای فیبروبلاست لود شده بر داربست کلاژنی پرداخته است.

مواد و روش ها: در این مطالعه تجربی آزمایشگاهی، نمونه پوست انسان طی عمل جراحی ختنه از نوزادان دریافت شد و کلاژن گاوی به صورت آماده تهیه شد. سلول‌های فیبروبلاست پس از جدا شدن از قطعات بافتی به وسیله لام هموسیتومتر شمارش شدند. زنده‌مانی سلول‌ها با استفاده از روش‌های فلوسایتومتری بررسی شدند. به منظور بررسی هویت سلول‌های فیبروبلاست از مارکر ویمنتین استفاده شد. سلول‌های فیبروبلاست بر روی هیدروژل کشت شدند. به منظور بررسی اثر سیتوتوکسیک هیدروژل بر سلول‌ها از روش MTT استفاده شد. داده‌ها با استفاده از آزمون تی تست مستقل آنالیز شدند.

نتایج: زنده‌مانی سلول‌های فیبروبلاست جدا شده از پوست ختنه گاه در اولین روز پس از جدا سازی برابر ۸۹ درصد بود. نتایج حاصل از بررسی ایمنوسیتوشیمی هویت سلول‌های فیبروبلاست را تایید کرد. نتایج MTT نشان دادند که هیدروژل کلاژن اثر سمیت معناداری بر سلول‌های فیبروبلاست لود شده نداشت. نتایج بررسی میکروسکوپی فلورسنت نشانگر آن بود که زنده مانی سلول‌های لود شده بر هیدروژل برابر ۹٦ درصد بود.

نتیجه‌گیری: نتایج حاصل از این پژوهش نشان دادند که داربست‌های کلاژنی جهت لود کردن سلول‌های فیبروبلاست جدا شده از پوست ختنه گاه مناسب بوده و می توانند در مهندسی بافت و انتقال سلول‌های فیبروبلاست به نواحی آسیب دیده کاربرد داشته باشند.

واژه های کلیدی: پوست ختنه گاه، سلول‌های فیبروبلاست، داربست کلاژنی، زنده مانی

مقدمه

داربست کلاژنی ابزاری در مهندسی بافت برای بازسازی بافت‌ها است که ترکیبی از سلول‌ها، مهندسی مواد و فاکتورهای فیزیکی و شیمیایی هستند. هدف آن‌ها حفظ حالت پایدار بافت، بهتر کردن عملکرد بافت هدف یا جایگزین کردن عملکرد زیستی بافت است (۱). در این میان مواد بر پایه کلاژن به دلیل فراوانی پایداری بالا، زیست سازگاری زیاد، ایمنی‌زایی کم، خواص مکانیکی مناسب، قابلیت شکل‌دهی به اشکال فیزیکی متفاوت، ایجاد پیوندهای عرضی قابل کنترل و ایجاد چسبندگی و رشد سلولی مناسب مورد استفاده قرار می‌گیرند (۳،۲). نوزده نوع کلاژن مختلف شناخته شده است که کلاژن نوع ۱ فراوان‌تر از بقیه است و جهت کشت سه بعدی و پیوند کندروسیت‌های اتولوگ انسانی و سلول‌های بنیادی در شرایط درون‌تنی مورد استفاده قرار می‌گیرد (٤). زیست مواد کلاژنی معمولا از بافت‌های با استحکام زیاد مانند درمیس و تاندون بدست می‌آیند (٤،۲). مطالعات نشان می‌دهند که داربست‌های کلاژنی دارای اثرات ضد میکروبی، ضد قارچی، ضد سرطانی، ترمیم بافتی، تکثیر و حفاظت سلولی هستند (۵). از طرفی، فیبروبلاست فراوان‌ترین سلول در بافت پیوندی است که منشا مزانشیمی دارد (۷،٦). عملکرد اصلی فیبروبلاست‌ها ترشح مواد پیش‌ساز ماتریکس برون سلولی برای حفظ انسجام ساختاری بافت پیوندی می‌باشد. در مواقع آسیب، فیبروبلاست‌ها می‌توانند اجزای سازنده لازم برای جایگزینی بافت زخمی را سنتز کنند. شکل پذیری ذاتی و انعطاف پذیری فیبروبلاست‌ها این نوع سلول را به یک ابزار معمول برای تحقیقات بالینی و پایه مطرح کرده است (۸).

سلول‌های بنیادی می‌توانند به داربست‌های با ساختار سه بعدی واکنش نشان دهند (۹). در واقع از داربست‌های سه بعدی برای رشد و تکثیر سلول‌های بنیادی استفاده می‌شود (۱۰). تحقیقات متعددی نشانگر کاربردهای سلول‌های بنیادی در مهندسی بافت می‌باشند و در این راستا مطالعات بسیاری نشان داده‌اند که فیبروبلاست‌ها می‌توانند در ترمیم آسیب‌های بافتی مورد استفاده قرار گیرند (١٤-١١). گرچه بحث استفاده از داربست‌ها جهت کاشت سلول‌های بنیادی و اثرات داربست‌ها بر سلول‌های بنیادی و کاربرد آن‌ها در ترمیم بافت‌های مختلف از مباحثی است که موضوع پژوهش‌های مهندسی بافت در سال‌های اخیر می‌باشد (۱۷-۱۵). یافته‌های پژوهشی (۱۷) در همین راستا داربست‌های کلاژنی مورد توجه محققین بوده و مزایای استفاده از آن‌ها در تحقیقات مهندسی بافت نشان داده شده است (۱۸،۱۹). گرچه در مقابل با یافته‌های تحقیقاتی که موید استفاده از داربست‌های کلاژنی جهت لود کردن سلول‌های فیبروبلاست می‌باشند برخی نتایج پژوهشی نشان داده‌اند این داربست‌ها دارای خاصیت مناسبی نبوده و در مواردی زنده‌مانی سلول‌ها را با مشکلاتی روبرو ساخته و پدیده ترمیم به خوبی انجام نمی گیرد (۲۵،۲٦). در این راستا پژوهش‌ها نشان داده‌اند که در صورت داربست کلاژنی در مواردی حفاظت مناسبی از سلول‌ها به عمل نیاورده همچنین پس از مدتی که سلول‌ها وارد مناطق عمیق‌تر داربست می‌شوند، دچار کمبود غذایی و اکسیژن شده و بدین ترتیب زنده مانی آن‌ها کاهش می‌یابد (۳۰-۲۷).

باتوجه به کاربرد گوناگون داربست‌های کلاژنی در انتقال سلول‌های بنیادی به بافت‌های آسیب دیده (۳۱) و نیز باتوجه به اثرات کاربردی متعدد در فرایندهای سلولی مانند مهاجرت، تکثیر و تمایز سلولی (۳۲) و همچنین نظر به این که عمده مطالعات قبلی در خصوص کاربرد داربست‌های کلاژنی در مهندسی بافت معطوف به بررسی روش‌های فیزیکی تهیه داربست و اثرات آن بر سلول‌های فیبروبلاست بوده‌اند و تحقیقات محدودی در حوزه‌ی روش‌های شیمیایی تهیه داربست و اثرات آن بر سلول‌های فیبروبلاست انجام گرفته و نتایج مطالعات قبلی در موارد قابل ملاحظه‌ای ضد و نقیض بوده است (۲۲، ۳۵-۳۳). بر این اساس، پژوهش حاظر به بررسی ویژگی‌های داربست کلاژنی جهت لود کردن سلول‌های فیبروبلاست نئوناتال می‌پردازد و نتایج حاصل از این پژوهش دارای اهمیت ویژه‌ای در حوزه ی مهندسی بافت است.

مواد و روش‌ها

جمع آوری نمونه

طی این تحقیق تجربی-آزمایشگاهی و با کسب رضایت از والدین یک نمونه پوست نوزاد سالم انسان که بر اساس تایید متخصص کودکان دارای بیماری و اختلال بالینی یا ژنتیکی نبود، طی عمل جراحی ختنه از نوزادان سزازین شده در هفته ۳۸ بارداری دریافت و به لوله فالکون حاوی چند سی‌سی محیط کشت، آنتی بیوتیک پنی‌سیلین-استرپتومایسین و فانگیزون منتقل شد و پس از انتقال به آزمایشگاه استریلیزه شد. همچنین کلاژن گاوی به صورت آماده (شرکت سیگما) تهیه شد.

جداسازی و کشت سلول‌های فیبروبلاست

ابتدا درم کاملا خرد شد و چند سی‌سی آنزیم کلاژناز به آن اضافه شد. پس از قرار گیری در انکوباتور به محیط کشت حاوی ۵ سی‌سی DMEM-HG دارای ۱۰٪ FBS انتقال داده شد. سپس از یک فیلتر با منافذی به اندازه‌ی ۷۰ میکرومتر عبور داده شد تا سلول‌ها از قطعات بافتی جدا شدند. در نهایت سلول‌ها به مدت پنج دقیقه با دور ۲۰۰g در چهارده درجه سانتی‌گراد سانتریفیوژ شدند. پس از تخلیه محیط رویی با اضافه کردن ۱ سی‌سی محیط کشت، سوسپانسیون سلولی تهیه شد و در انکوباتور ۳۷ درجه انکوبه شدند. محیط کشت سلول‌ها هر ۲-۳ روز تعویض گردید.

شمارش سلول‌ها

شمارش سلول‌ها جهت کشت بر روی هیدروژل کلاژن انجام شد. این کار توسط لام هموسیتومتر و محلول تریپان‌بلو (٤/٥ درصد) صورت گرفت. پس از ترکیب شدن حجم مساوی از محلول تریپان‌بلو با سوسپانسیون سلولی، نمونه در فضای بین لام و لام هموسیتومتر قرار داده شد و توسط میکروسکوپ با بزرگنمایی 10 X شمرده شد.

بررسی میزان زنده‌مانی

بررسی میزان زنده‌مانی سلول‌ها توسط فلوسایتومتری و با سه تکرار انجام گرفت. ابتدا از محیط کشت ۱۰٦ سلول در ۱۰۰ میکرولیتر در لوله فالکون ریخته شد. سپس ۲ سی‌سی بافرفسفات به آن اضافه شده وسانتریفیوژ شد. پس از دور ریختن محلول رویی، پلیت سلولی دوبار با بافر شسته شد. سلول‌ها در ۱۰۰ میکرولیتر بافر رنگی فلوسایتومتری (گروه کنترل بدون تیمار) و گروه تجربی (تیمار شده با ۵ تا ۱۰ میکرولیتر یدید پروپیوم) به لوله‌ها اضافه شد و به آزمایشگاه فلوسایتومتری ارسال گردید.

بررسی هویت سلول‌های فیبروبلاست

برای این که ثابت شود سلول‌های استخراجی همان سلول‌های فیبروبلاستی هستند از روش ایمونوسیتوشیمی استفاده شد. در این روش مارکر ویمنتین مورد بررسی قرار گرفت. برای این منظور، ابتدا سلول‌های جدا شده گسترش و پس از ٢٤ ساعت فیکس و به مدت ۱۰ دقیقه در میکروویو درون بافر با۹ Ph= قرار داده شدند. پس از سرد شدن و شست وشو با بافرTBE، آب اکسیژنه ۳٪ روی آن ریخته شد. در ادامه آنتی‌بادی مونوکلونال ضدویمنتین به آن اضافه شده، سپس آنتی‌بادی ثانویه و دی‌آمینوپراکسیداز (کروموژن) افزوده گردید و شست‌وشو شد. جهت رنگ‌آمیزی هسته‌ها، لام درون رنگ هماتوکسیلین قرار گرفت و پس از شست‌وشو و آبگیری در الکل‌های ۷۰،۵۰، ۱۰۰،۹٦ و الکل گزیلل و گزیلن، لام با چسب مخصوص چسبانده شد. در بررسی میکروسکوپی سلول‌های فیبروبلاست جدا شده از بافت و رنگ آمیزی شده باید به صورت یک دست به رنگ قهوه‌ای مشاهده شوند.

تهیه هیدرژل کلاژن

٤۰ میلی‌گرم کلاژن گاوی در ۲۵ سی‌سی آب استریل دیونیزه حل شد. سپس ترکیب شامل ١٦ سی‌سی بافر PBS و ۸ سی‌سی بافرHEPES به آن اضافه شد.

کشت سلول‌ها بر روی هیدروژل

هدف از این کار، بررسی پتانسیل هیدروژل در تولید پوست مصنوعی و توانایی کشت سلول‌ها بر روی آن بود. جهت این کار ابتدا هیدروژل تهیه شد و سلول‌های فیبروبلاست پس از رسیدن به تراکم مورد نظر تریپسینه و بر روی هیدروژل منتقل شدند. هیدروژل حاوی سلول در انکوباتور قرار داده شد و هر روز تعویض محیط شد و توسط میکروسکوپ مورد مشاهده قرار گرفت.

بررسی اثر سیتوتوکسیک هیدروژل بر سلول‌ها

جهت این کار پس از تهیه شدن هیدروژل، سلول‌های فیبروبلاست با تراکم ١٠٤ در هر چاهک به صورت سه بار تکرار کشت داده شدند. سپس بر روی هر چاهک ۱۰۰ میکرولیتر DMSO ریخته شد و در انکوباتور قرار داده شد. پس از تخلیه DMSO محلول MTT به مدت ده دقیقه بر روی سلول‌ها ریخته شد و در دستگاه Elisa

Reader در طول موج ٥٤٠ نانومتر خوانش شد.

بررسی نحوه قرارگیری سلول‌های فیبروبلاست بر روی هیدروژل با میکروسکوپ SEM

در این مرحله هیدروژل پس از فیکساسیون با گلوتارآلدهید و خشک شدن در هوای اتاق، پس از برش و روکش شدن با طلا، تحت تصویربرداری با میکروسکوپ SEM قرار گرفت.

بررسی زنده‌مانی سلول‌های فیبروبلاست لوده شده با رنگ‌آمیزی فلورسنت

جهت بررسی زنده‌مانی سلول‌های فیبروبلاست لود شده بر روی هیدروژل تجربیات با سه بار تکرار انجام گرفته و از روش رنگ‌آمیزی فلورسنت پروپیدیوم یدید-آکریدین (PI-Acridine) استفاده شد. بدین منظور دو رنگ مذکور هریک در غلظت های ٥٠ µg/mL باهم ترکیب شدند. برای رسیدن به این غلظت از هرکدام غلظت ١٠٠ µg/mL آماده کرده و با مخلوط کردن حجم یکسان از هریک به غلظت مورد نظر یعنی ٥٠ µg/mL از هر رنگ در محلول رسیده و پس از آماده سازی محلول رنگ، مقدار ١٠ µL از رنگ با ١٠ µL از سلول‌های سوسپانس شده ترکیب و بعد از پیپتاژ کردن، زیر میکروسکوپ فلورسانت مورد ارزیابی قرار گرفت. درنهایت سلول‌های که به رنگ سبز مشاهده شدند سلول‌های زنده بودند.

تجزیه و تحلیل آماری

جهت تجزیه و تحلیل آماری داده‌ها از نرم افزار SPSS20 استفاده شد. در این راستا ابتدا با استفاده از آزمون کولموگروف-اسمیرنوف از توزیع طبیعی داده‌ها اطمینان حاصل شد. متعاقبا جهت مقایسه گروه‌ها از تی تست استفاده گردید.

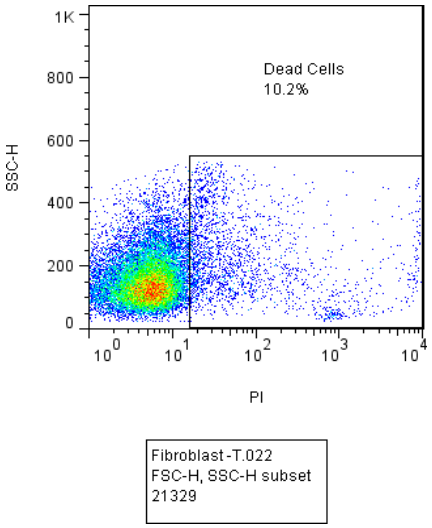
نتایج

نتایج حاصل از جمع آوری نمونه پوست

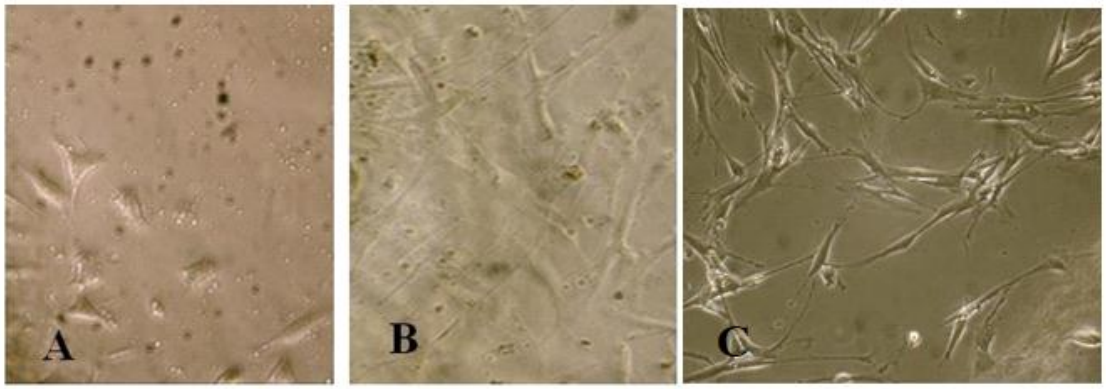
نتایج حاصل از جمع آوری نمونه پوست نشان دادند که پروسه جداسازی حداکثر باید چند ساعت پس از عمل ختنه انجام شود. بنابراین نگهداری نمونه یک روز یا بیشتر سبب آلودگی نمونه شده و نتیجه دلخواه حاصل نمی‌شود.

نتایج حاصل از جداسازی سلول‌ها

نتایج حاصل از بررسی زنده‌مانی سلول‌های فیبروبلاست به روش فلوسایتومتری در اولین روز پس از جدا سازی نشان داد که بیش از ٨٩ درصد از سلول‌ها زنده بودند و بنابراین روش استفاده شده جهت جداسازی مناسب و قابل قبول بود (شکل ١). همچنین سلول‌های فیبروبلاست در روزهای پس از جداسازی و نیز پس از کشت و پاساژ از مورفولوژی فیبروبلاستیک برخوردار بودند (شکل ٢) .



شکل ١. بررسی زنده‌مانی سلول‌های فیبروبلاست به روش فلوسایتومتری در اولین روز پس از جدا سازی. مطابق شکل بالا ٨٩/٨ درصد سلول‌ها زنده بودند



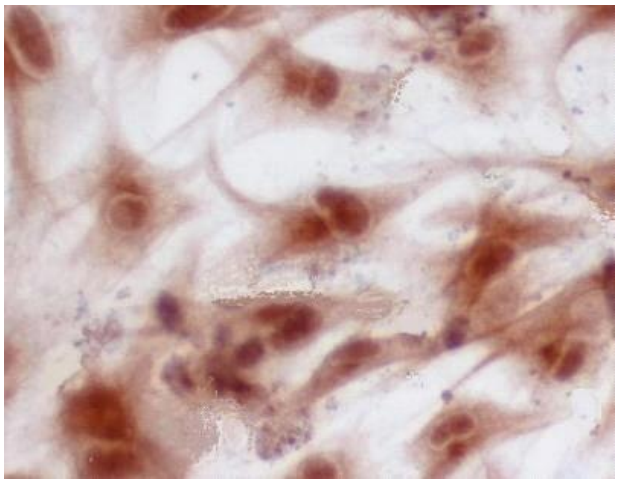
شکل ۲. (A) سلول‌های فیبروبلاست جدا شده از پوست فوراسکین ٦-٧ روز پس از جداسازی (بزرگنمایی ٤٠٠ برابر). (B) سلول‌های فیبروبلاست جدا شده از پوست فوراسکین ۹ روز پس از جداسازی (بزرگنمایی ٤٠٠ برابر). (C) سلول‌های فیبروبلاست یک روز پس از پاساژ سلول‌ها (بزرگنمایی ٤٠٠ برابر). همچنانکه در شکل دیده می شود سلولها دارای مورفولوژی دوکی شکل و فیبروبلاستیک می باشند.

نتایج حاصل از کشت و شمارش سلول‌ها

نتایج حاصل از شمارش سلول‌ها نشان داد که هر فلاسک T75 متراکم، حدود دو میلیون سلول داشت.

نتایج تعیین هویت سلول‌های فیبروبلاست

نتایج حاصل از بررسی ایمنوسیتوشیمی هویت سلول‌های فیبروبلاست جدا شده از بافت ختنه‌گاه نشان دادند که همه‌ی سلول‌ها به دلیل داشتن ویمنتین به صورت یک دست به رنگ قهوه‌ای مشاهده شده و این امر نشانگر ماهیت فیبروبلاستی سلول‌ها بود (شکل ۳).



شکل ۳. سلول‌های فیبروبلاست‌ها مشاهده شد با رنگ آمیزی ایمونوسیتوشمی (بزرگنمایی ۱۰۰۰ برابر). سلول‌ها به دلیل وجود ویمنیتین به صورت یک دست قهوه ای رنگ شده و از ماهیت فیبروبلاستی برخوردارند.

نتایج حاصل از کشت سلول های فیبروبلاست بر روی هیدروژل

نتایج حاصل از بررسی هیدروژل با میکروسکوپ اینورت ٤٨ ساعت پس از کشت فیبروبلاست‌ها نشان داد که فیبروبلاست‌های بر روی هیدروژل کلاژن با چسبندگی مناسب و توزیع یکنواخت قرار گرفته‌اند (شکل ٤).

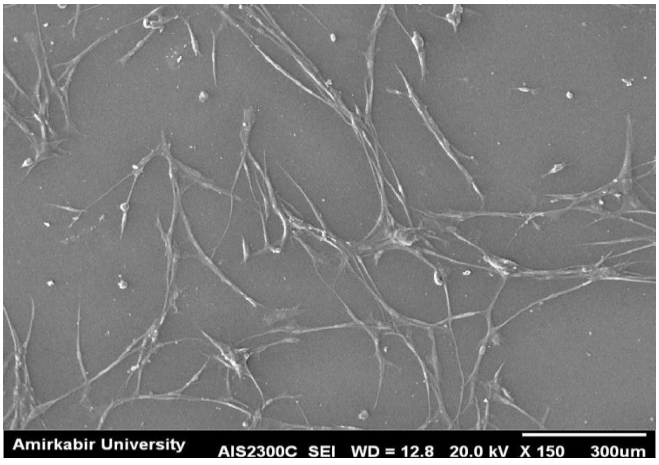
شکل ٤. فیبروبلاست‌های کشت شده بر روی هیدروژل کلاژن ۲روز پس از کشت سلول‌ها. شکل فوق نشانگر آن است که سلولها به صورت یکنواخت بر روی هیدروژل توزیع شده اند.

نتایج حاصل ازبررسی سمیت هیدروژل بر سلول‌های فیبروبلاست

نتایج حاصل از بررسی سمیت هیدروژل بر سلول‌های فیبروبلاست نشان دادند که بین میانگین جذب نوری در گروه سلول‌های فیبروبلاست (۰/۸۹±۰/٦٤) و میانگین جذب نوری در گروه "سلول‌های فیبروبلاست+هیدروژل کلاژن" (۰/۲۳±۰/٦٦) اختلاف معناداری وجود نداشت. بر این اساس از آنجا که میزان جذب نوری هر گروه بیانگر میزان زنده مانی در هر گروه است می‌توان نتیجه گرفت که هیدروژل کلاژن اثر سمیت معناداری بر زنده‌مانی سلول‌های فیبروبلاست لود شده نداشت.

نتایج حاصل از نحوه قرارگیری سلول‌های فیبروبلاست بر روی هیدروژل

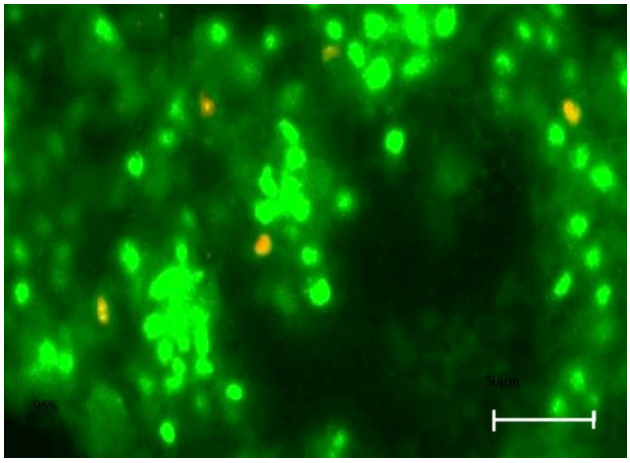
تصاویر میکروسکوپ الکترونی (SEM) تهیه شده نشان داد که سلول‌های فیبروبلاست به طور یکنواختی بر روی هیدروژل لود شده بودند (شکل ۵).



شکل ۵. تصویر میکروسکوپ الکترونی از سلول‌های کشت شده فیبروبلاست برروی کلاژن (بزرگنمایی۳۰۰برابر). شکل فوق نشانگر توزیع یکنواخت سلولهای فیبروبلاست بر روی هیدروژل می باشد.

نتایج حاصل ازبررسی زنده مانی سلول‌ها بر روی هیدروژل با رنگ آمیزی یدید پروپیدیوم-آکریدین

بررسی فلورسنت سلول‌های لود شده بر هیدروژل با روش رنگ آمیزی پروپیدیوم-آکریدین(PI-Acridine) نشان داد که ۹۶ درصد سلول‌ها زنده بودند (شکل ٦).



شکل ٦. سلول‌های فیبروبلاست رنگ آمیزی شده به روش PI-Acridine در زیر میکروسکوپ فلورسنت. سلول‌های به رنگ سبز سلول‌های زنده و سلول‌های به رنگ نارنجی سلول‌های مرده می‌باشند.

بحث

SARS-CoV نتایج حاصل از این بررسی نشان داده‌اند که داربست‌های کلاژنی می‌توانند یک بستر مناسب برای لود کردن سلول‌های فیبروبلاست و قرارگیری آنها بر روی بسترکلاژنی باشند و این امر در استفاده از این داربست‌ها در مهندسی بافت حائز اهمیت می‌باشد. موافق با این یافته پژوهش‌های دیگری نیز نشان داده‌اند که داربست‌های کلاژنی می‌توانند جهت کشت سلولی فیبروبلاست‌ها مورد استفاده قرارگیرند به طوری که نتایج حاصل از مطالعه انجام گرفته در خصوص تمایز غضروفی سلول‌های بنیادی مزانشیمی انسان در هیدروژل‌های کلاژن نوع اول جهت درمان ضایعات غضروفی با استفاده از کاشت سلول‌های بنیادی مزانشیمی چند توان به جای کندروسیت ناشی از ماتریس بیانگر انقباض گسترده هیدروژل‌های حاوی سلول‌های بنیادی و کاربرد سلول‌های بنیادی مزانشیمی لود شده در داربست‌های کلاژنی جهت ترمیم بافت آسیب دیده می‌باشد (۳٦). در واقع کلاژن پروتئین ساختاری اصلی اکثر بافت‌های سخت و نرم در حیوانات و بدن انسان است که نقش مهمی در حفظ یکپارچگی بیولوژیکی و ساختاری ماتریکس خارج سلولی دارد و از بافت‌ها حمایت فیزیکی می‌کند. داربست های کلاژن به دلیل این خواص عالی به طور گسترده در مهندسی بافت استفاده می شوند (۳۱). همچنین نتایج تحقیقات در خصوص بررسی ماتریکس سه‌بعدی هیدروژل کلاژن که با استفاده از سلول‌های بنیادی مزانشیمی مشتق از مغز استخوان موش صحرایی انجام شده نشانگر آن است که هیدروژل کلاژن داربست مناسبی جهت لود کردن سلولهای بنیادی می باشد (۳۷). از سویی یافته های پژوهشی نشان می دهند که داربست کلاژن همزمان با لود شدن سلولهای فیبروبلاست بر روی داربست از نظر فیزیکی و مکانیکی انطباق مناسبی جهت جایگیری و امکان تکثیر سلولی پیدا می کند (۲۵). همچنین بررسی فیبروبلاست‌های درون هیدروژل کلاژن جهت درمان زخم‌های پوستی نشان داده است که استفاده از هیدروژل کلاژن غلیظ می تواند در انتقال سلولها به ناحیه آسیب دیده نقش موثری داشته باشد (۳۸). در واقع مواد زیستی مبتنی بر کلاژن به دلیل زیست سازگاری عالی به عنوان بالقوه ترین و امیدوارکننده ترین مواد با کاربردهای متنوع در مهندسی بافت و بازسازی شناخته شده اند. عیب اصلی کلاژن، تخریب سریع آن است که با روش های اتصال عرضی می توان بر آن غلبه کرد (۳۹). در مقابل برخی یافته‌های پژوهشی نشان داده‌اند که داربست‌های کلاژنی دارای اثر قابل توجهی بر لود کردن سلول‌های فیبروبلاست نیست چنانکه در این خصوص

نتایج حاصل از مطالعه انجام گرفته درباره‌ی روش‌های ساده و موثر برای بهبود خواص مکانیکی داربست‌های کلاژنی به کمک پرتودهی با فرابنفش حاکی از خواص مکانیکی ضغیف هیدروژل‌های کلاژن به عنوان پیوند دائمی است (۲). همچنین بررسی دیگری در خصوص هموستاز اپیدرمال در معادل‌های پوستی طولانی مدت با داربست بیانگر معایب داربست‌های کلاژنی و اتصال ضعیف اپیدرم به آن می‌باشد (۳۹).

نتیجه گیری

در مجموع نتایج حاصل ازاین پژوهش نشان داده‌اند که داربست‌های کلاژن یک داربست مناسب جهت لود کردن سلول‌های فیبروبلاست جداشده از بافت ختنه‌گاه نوزاد باشد. یافته‌های این پژوهش می‌تواند دارای کاربرد در حوزه مهندسی بافت و انتقال سلول‌های فیبروبلاست به بافت‌های آسیب دیده باشند.

ملاحظات اخلاقی

در این پژوهش 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.

تقدیر و تشکر

این پژوهش با پشتیبانی شبکه جهانی تحقیقات، آموزش و رخدادها (GREEN) انجام گرفته و بدین وسیله مراتب تقدیر و تشکر خود را از این شبکه اعلام می‌داریم.

تعارض منافع

نویسندگان مقاله اعلام می دارند که هیچ گونه تضادی در منافع وجود ندارد .

منابع

1. Lode A, Meyer M, Brüggemeier S, Paul B, Baltzer H, Schröpfer M, et al. Additive manufacturing of collagen scaffolds by three-dimensional plotting of highly viscous dispersions. Biofabrication 2016; 8(1):015015.
2. Khayyatan F, Emami Sh, Mehrjerdi Nz, Baharvand H. A simple and efficient method to improve mechanical properties of collagen scaffolds by UV irradiation. Science and Technology 2011;23(5):371-8.
3. Silvipriya KS, Kumar KK, Bhat AR, Kumar BD, John A, Lakshmanan P. Collagen: Animal sources and biomedical application. Journal of Applied Pharmaceutical Science 2015;5(3):123-7.
4. Lin YL, Chen CP, Lo CM, Wang HS. Stiffness-controlled three-dimensional collagen scaffolds for differentiation of human Wharton's jelly mesenchymal stem cells into cardiac progenitor cells. Journal of Biomedical Materials Research 2016;104(9):2234-42.
5. Chashmpoosh M, Mohammadi A, Abdovis N, Ghasempoor H, Kheirollah A. Isolation and culture of mouse newborn skin fibroblast cells in a simple and inexpensive method. Pars Journal of Medical Sciences 2016;14:34-42.
6. LeBleu VS, Neilson EG. Origin and functional heterogeneity of fibroblasts. The Federation of American Societies for Experimental Biology Journal 2020;34(3):3519-36.
7. Langevin HM, Cornbrooks CJ, Taatjes DJ. Fibroblasts form a body wide cellular network. Histochemistry and Cell Biology 2004 ;122(1):7-15.
8. Kumar G, Tison CK, Chatterjee K, Pine PS, McDaniel JH, Salit ML, et al. The determination of stem cell fate by 3D scaffold structures through the control of cell shape. Biomaterials 2011;32(35):9188-96.
9. Hashemi SS, Rajabi S, Mahmoudi R, Ghanbari A, Jafari Barmak M. The Investigation of Proliferation of Fibroblasts on Chitosan Scaffold in

the Presence of Hyaluronic Acid. Armaghane danesh 2018;23(2):134-45.
10. Raghunath J, Salacinski HJ, Sales KM, Butler PE, Seifalian AM. Advancing cartilage tissue engineering: the application of stem cell technology. Current Opinion in Biotechnology 2005;16(5):503-9.
11. Angele P, Johnstone B, Kujat R, Zellner J, Nerlich M, Goldberg V, et al. Stem cell based tissue engineering for meniscus repair. Journal of Biomedical Materials Research 2008 ;85(2):445-55.
12. Rana D, Zreiqat H, Benkirane-Jessel N, Ramakrishna S, Ramalingam M. Development of decellularized scaffolds for stem cell-driven tissue engineering. Journal of Tissue Engineering and Regenerative Medicine 2017;11(4):942-65
13. Mahmoudi-Rad M, Abolhasani E, Moravvej H, Mahmoudi-Rad N, Y. Acellular amniotic membrane: an appropriate scaffold for fibroblast proliferation. Clinical and Experimental Dermatology 2013;38(6):646-51.
14. Vazifeshiran N, Soleimani M, Mortazavi Y, Kaviani S, Aboualghasemi H, Nikogoftar M. 3D culture of umblical cord blood-drived CD34+cells on a DBM scaffold coated by cord blood-drived unrestricted somatic stem cells (USSC). Modares Journal of Medical Sciences: Pathobiology 2010; 13: 63-81.
15. Kobayashi K, Suzuki T, Nomoto Y, Tada Y, Miyake M, Hazama A, et al. A tissue-engineered trachea derived from a framed collagen scaffold, gingival fibroblasts and adipose-derived stem cells. Biomaterials 2010;31(18):4855.
16. Mohammadi M, Shokrgozar MA, Mofid R. Culture of human gingival fibroblasts on a biodegradable scaffold and evaluation of its effect on attached gingiva: A randomized, controlled pilot study. Journal of Periodontology 2007;78(10):1897.
17. Sheehy EJ, Lemoine M, Clarke D, Gonzalez Vazquez A, O'Brien FJ. The incorporation of marine coral microparticles into collagen-based scaffolds promotes osteogenesis of human mesenchymal stromal cells via calcium ion signalling. Marine Drugs 2020;18(2):74.
18. Butler DL, Gooch C, Kinneberg KR, Boivin GP, Galloway MT, Nirmalanandhan VS, et al. The use of mesenchymal stem cells in collagen-based scaffolds for tissue-engineered repair of tendons. Nature Protocols 2010;5(5):849-63.
19. Desimone MF, Hélary C, Rietveld IB, Bataille I, Mosser G, Giraud-Guille MM, et al. Silica–collagen bionanocomposites as three-dimensional scaffolds for fibroblast immobilization. Acta Biomaterialia 2010;6(10):3998-4004.
20. Chen W, Shi C, Yi S, Chen B, Zhang W, Fang Z, et al. Bladder regeneration by collagen scaffolds with collagen binding human basic fibroblast growth factor. The Journal of Urology 2010;183(6):2432-9.
21. Helary C, Ovtracht L. Coulomb B, Godeau G, Giraud-Guille MM. Dense fibrillar collagen matrices: A model to study myofibroblast behavior during wound healing. Biomaterials 2006; 27(25): 4443-52.
22. Breen EC. Mechanical strain increases type I collagen expression in pulmonary fibroblasts in vitro. Journal of Applied Physiology 2000 1;88(1):203-9.
23. González-Masís J, Cubero-Sesin JM, Corrales-Ureña YR, González-Camacho S, Mora-Ugalde N, Baizán-Rojas M, et al. Increased fibroblast metabolic activity of collagen scaffolds via the addition of propolis nanoparticles. Materials 2020;13(14):3118.
24. Masci VL, Taddei AR, Gambellini G, Giorgi F, Fausto AM. Ultrastructural investigation on fibroblast interaction with collagen scaffold. Journal of Biomedical Materials Research 2016;104(1):272-82.
25. Helary C, Bataille I, Abed A, Illoul C, Anglo A, Louedec L, et al. Concentrated collagen hydrogels as dermal substitutes. Biomaterials 2010;31(3):481-90.

26. Sahraei SS, Kalhor N, Sheykhhasan M. Application of scaffolds in cartilage tissue engineering: a review paper. Razi Journal of Medical Sciences 2019;26(8):42-55.
27. Ishaug-Riley SL, Crane GM, Gurlek A, Miller MJ, Yasko AW, Yaszemski MJ, et al. Ectopic bone formation by marrow stromal osteoblast transplantation using poly (DL-lactic-co-glycolic acid) foams implanted into the rat mesentery. Journal of Biomedical Materials Research 1997; 36: 1-8.
28. Shalak R, Fox C. Preface. In: Shalak R, Fox C, editors. Tissue Engineering. New York: Alan R Liss 1998: 26-9.
29. Lan W, Xu M, Zhang X, Zhao L, Huang D, Wei X, et al. Biomimetic polyvinyl alcohol/type II collagen hydrogels for cartilage tissue engineering. Journal of Biomaterials Science 2020;31(9):1179-98
30. Dong C, Lv Y. Application of collagen scaffold in tissue engineering: recent advances and new perspectives. Polymers 2016;8(2):42
31. Ding L, Sun H, Su J, Lin N, Péault B, Song T, et al. Transplantation of bone marrow mesenchymal stem cells on collagen scaffolds for the functional regeneration of injured rat uterus. Biomaterials 2014;35(18):4888-900
32. Zhao W, Chen B, Li X, Lin H, Sun W, Zhao Y, et al. Vascularization and cellularization of collagen scaffolds incorporated with two different collagen-targeting human basic fibroblast growth factors. Journal of Biomedical Materials Research 2007;82(3):630-6.
33. Tedder ME, Liao J, Weed B, Stabler C, Zhang H, Simionescu A, et al. Stabilized collagen scaffolds for heart valve tissue engineering. Tissue Engineering 2009;15(6):1257-68.
34. Zhao W, Chen B, Li X, Lin H, Sun W, Zhao Y, et al. Vascularization and cellularization of collagen scaffolds incorporated with two different collagen-targeting human basic fibroblast growth factors. Journal of Biomedical Materials Research 2007 ;82(3):630-6 .
35. Nöth U, Rackwitz L, Heymer A, Weber M, Baumann B, Steinert A, et al. Chondrogenic differentiation of human mesenchymal stem cells in collagen type I hydrogels. Journal of Biomedical Materials Research 2007;83(3):626-35.
36. Oh SA, Lee HY, Lee JH, Kim TH, Jang JH, Kim HW, et al. Collagen three-dimensional hydrogel matrix carrying basic fibroblast growth factor for the cultivation of mesenchymal stem cells and osteogenic differentiation. Tissue Engineering 2012;18(9-10):1087-100.
37. Helary C, Zarka M, Giraud-Guille MM. Fibroblasts within concentrated collagen hydrogels favour chronic skin wound healing. Journal of Tissue Engineering and Regenerative Medicine 2012;6(3):225-37.
38. Manjari MS, Aaron KP, Muralidharan C, Rose C. Highly biocompatible novel polyphenol cross-linked collagen scaffold for potential tissue engineering applications. Reactive and Functional Polymers 2020; 153:104630.