کشت *لاکتوباسیلوس پلانتاروم* بر روی داربست چندلایه زیست‌فعال حاوی پلاکت غنی از فاکتورهای رشد

لیدا شاه قاسم‌پور[۱]، سیم‌زر حسین‌زاده*[۲]، اعظم حدادی*[۳]، محبوبه کبیری[٤]

۱-دکتری تخصصی، گروه میکروبیولوژی، واحد کرج، دانشگاه آزاد اسلامی، کرج، ایران

۲-دکتری تخصصی، گروه مهندسی بافت و علوم کاربردی سلولی، دانشکده فناوری‌های نوین پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، تهران، ایران

۳-دکتری تخصصی، گروه میکروبیولوژی، واحد کرج، دانشگاه آزاد اسلامی، کرج، ایران

٤-دکتری تخصصی، گروه بیوتکنولوژی، دانشکده علوم، دانشگاه تهران، تهران، ایران

*صندوق پستی ۱۹۸۳۹٦٤۱۱،تهران، ایران-۳۱٤۹۹٦۸۱۱۱، کرج، ایران

s.hosseinzadeh@sbmu.ac.ir, Haddadi@Kiau.ac.ir

دریافت: ۱٤۰۱/۰۲/۰۵ پذیرش: ۱٤۰۱/۰٤/۰۸

چکیده

بهبود زخم و باز سازی پو ست پس از آ سیب‌های پو ستی رخ می‌دهد. بنابراین، برای تسریع این فرایند استفاده از پلاکت‌های غنی از فاکتورهای ر شد (PRGF) و پروبیوتیک‌ها به دلیل عملکرد مثبت در ترمیم زخم و فعالیت ضدباکتری آنها دارای اهمیت می‌با شد. ترکیب این عوامل زیستی با روش‌های مهند سی بافت منجر به تولید پانسمان زخم جدیدی شده است. بنابراین، در این مطالعه، PRGF از پلاسمای غنی از پلاکت به‌دست آمد و سپس یک داربست چند لایه روی هم با استفاده از فیبرپلی‌اورتان (PU)، PRGF و فیبر ژلاتین به روش الکتروریسی ساخته شد. تست‌های میکرو سکوپ الکترونی روبشی (SEM)، کشش و زاویه تماس با آب برای ارزیابی ویژگی‌های داربست‌ها انجام شد. ابتدا، سلول‌های بنیادی مزانشیمی از چربی انسان (hAMSCs) استخراج شدند. سپس، برای ارزیابی زنده‌مانی، سمیت و تکثیر سلول‌ها، این سلول‌ها به همراه سلول‌های فیبروبلاست (HU-02) به‌عنوان سلول‌های کشت هم‌زمان با *لاکتوبا سیلوس پلانتاروم* (*L.plantarum*) روی داربست‌ها با یا بدون حضورPRGF کشت داده شدند. سرانجام فعالیت ضد باکتریایی *L.plantarum* بررسی شد. نتایج آزمون MTT بعد از ١٤ روز نشان داد که PRFG و *L.plantarum* اثر مثبت معنی‌داری بر زنده‌مانی و تکثیر سلول‌های co-culture داشتند. عکس‌های SEM چسبندگی و تکثیر سلول‌ها و باکتری‌ها را روی داربست‌ها تا ۲۱ روز نشان داد. تست انتشار- آگار تاثیر ضدباکتریایی *L.plantarum* را با ایجاد هاله عدم رشد به ترتیب در باکتری‌های *سودوموناس آئروجینوزا*، *سالمونلا تیفی موریوم*، *استافیلوکوکوس اورئوس* و *اشریشیا کلی* تایید کرد. داربست چند لایه‌ای فعلی پانسمان زخم مناسب برای اتصال، تکثیر سلولی می‌باشد و از عفونت زخم جلوگیری می‌کند.

کلید واژگان: داربست چند لایه‌ای پلی‌اورتان، *لاکتوباسیلوس پلانتاروم*، پلاکت غنی از فاکتور رشد، ترمیم زخم

۱- مقدمه

پوست یکی از مهمترین اندام های دفاعی بدن است که می تواند قسمت های داخلی را از عوامل بیرونی محافظت کند[۱]. ادامه زندگی بیمارانی با زخم های سوختگی حاد و آسیب های پوستی به‌طور مستقیم با ترمیم زخم و با سازی پو ست در ارتباط ا ست[۲]. به‌طور معمول ترمیم یک فرایند پیچیده ای از جمله التهاب، تکثیر سلولی و بازسازی بافت می‌باشد که توسط زنجیره ای از واسطه های التهابی، شامل سایتوکاین‌ها و فاکتورهای رشد هدایت می‌شود[۳]. تحقیقات تجربی و بالینی به‌طور گسترده نشان می دهد که فراتر از ظرفیت پروبیوتیک ها که بر عملکرد روده تأثیر مثبت می گذار ند، آنها می توانند به لطف خواص منحصر به فرد خود، تاثیراتی را بر روی پوست اعمال کنند[٤]. تحقیقات گسترده ای در مورد تأثیر مهاری و خواص پروبیوتیکی *لاکتوباسیلوس پلانتاروم(L.plantarum)* به وجود آمده است. Lash و همکاران دریافتند که *L. plantarum* ATCC 8014 یک اثر بازدارنده بر طیف وسیعی از باکتری‌های گرم منفی و گرم مثبت دارد و نشان دادند که باکتریوسین‌ها به‌عنوان ترکیبات موثر برای چنین محدودیتی است[۵]. با این حال *L. plantarum* ATCC 8014 به شدت به‌عنوان باکتری پروبیوتیک بالقوه باقی مانده است. علاوه برمتابولیت های ثانویه، این باکتری‌ها پپتیدها و پلی‌ساکاریدهای خارج سلولی اگزوپلی ساکاریدها (EPS) را نیز تولید می‌کنند[٦]. مطالعات، اتصال باکتری‌ها به دیواره روده به واسطه اگزوپلی ساکاریدها را نشان داد، EPS دارای خواص محرک سلامتی ، مانند محرک سیستم ایمنی و دارای فعالیت ضد زخم هستند[۹-۷]. عامل دیگری که روند بهبود زخم را تسریع می‌کند پلاکت‌های غنی از فاکتورهای رشد (PRGF) می‌باشد که به پلاسمایی با غلظت پلاکت‌های بیشتر از سطح پایه گفته می‌شود. با فعال شدنPRGF، فیبرین‌ها و پلاکت‌ها لخته ایجاد می‌کنند که منجر به آزاد شدن بسیاری از فاکتورهای ر شد می شود. فاکتورهای رشد مشتق از پلاکت (PDGF)، فاکتورهای رشد تبدیل‌کننده (TGF)، فاکتورهای رشد اندوتلیال عروقی (VEGF)، فاکتورهای ر شد اپیتلیال (EGF) و غیره که وارد پلاسمای لخته شده می‌شوند، از جمله این فاکتورها هستند. این فاکتورهای رشد عمدتاً با افزایش میزان میتوژنز و رگ‌زایی بر بهبود زخم تأثیر می‌گذارند. از سوی دیگر، پیشنهاد می‌شود که استفاده ازPRGF می‌تواند سرعت تکثیر سلول‌های فیبروبلا ست را تسریع کند[۱۰]. فیبروبلا ست‌ها، سلول‌های عمده در درم هستند. مهاجرت فیبروبلاست‌ها به ناحیه زخم پدیده مهمی در روند بهبود زخم است که به بلوغ و رفع گرانولا سیون بافت کمک می کند. مهاجرت سلول به نواحی زخم توسط فاکتورهای رشد و سایتوکاین‌های زیاد موجود در سرم القا می‌شود که از پلاکت‌های در حال دگرانوله آزاد می‌شوند[۱۱]. در حال حاضر، درمان با سلول‌های بنیادی مزانشیمی MSCs، به عنوان بخشی از زیرمجموعه پزشکی بازساختی[1] (RG)، به یک رویکرد درمانی امیدوارکننده تبدیل شده است ودر درمان بیماری‌های پوستی نقش دارد[۱۲]. بنابراین، روند بهبود زخم از طریق هم‌کاری انواع مختلف سلول ها، باکتر های پروبیوتیک و فاکتورهای رشد ارتقا می یابد. تحو یل این عوامل به یک مکان خاص در فرایند ترمیم زخم از اهمیت حیاتی برخوردار است. باتو جه به خ صو صیات ماتریکس خارج سلولی (ECM) در مقیاس نانو، برای چنین تجربیاتی در *in vitro*، الکتروریسی با مواد نانوفیبرانتخاب امیدوارکننده‌ای می باشد[۱۰]. بنابراین، پلی‌اورتان (PU) باوجود خواص شیمی و خواص فیزیکی انعطاف پذیر، این پلیمر را از سایرین متمایز می‌کند که می‌تواند داربست‌های فیبری با ضخامت کنترل شده، منافذ بسیار به هم پیو سته، مساحت سطح بالا تولید کند و مانع

[1] Regenerative medicine

خوبی برای محافظت از زخم در برابر عفونت و از دست دادن آب باشد[۱۲-۱٤]. به دلیل خاصیت آب گریزی و تجزیه ناپذیری، PU معمولا با ژلاتین استفاده می‌شود که شکل دناتوره شده کلاژن است. بنابراین، پتانسیل آنتی‌ژنی کمتری نسبت به کلاژن دارد[۱۰, ۱۵]. همچنین، ژلاتین پتانسیل فوق العاده‌ای برای الکتروریسی دارد، ارزان و مقرون به صرفه است. علاوه بر این، به نظر می‌رسد زیست سازگاری و چسبندگی سلولی بالایی نیز داشته باشد[۲]. در این مطالعه با توجه به مزایای ذکر شده در بالا سعی شده است تا داربست مناسب جهت پانسمان زخم ایجاد شود. بنابراین، داربست PU با PRGF به‌صورت (PU/PRGF/gelatin/PU) و بدونPRGF به‌صورت (PU/gelatin/PU) ساخته شد. سپس، سلول‌های فیبروبلاست (HU-02) و سلول‌های بنیادی مزانشیمی انسانی مشتق از چربی (hAMSCs) و نیز *L.plantarum* در لایه بالای داربست کشت داده شدند.

۲- مواد و روش‌ها

۲-۱ سلول‌ها

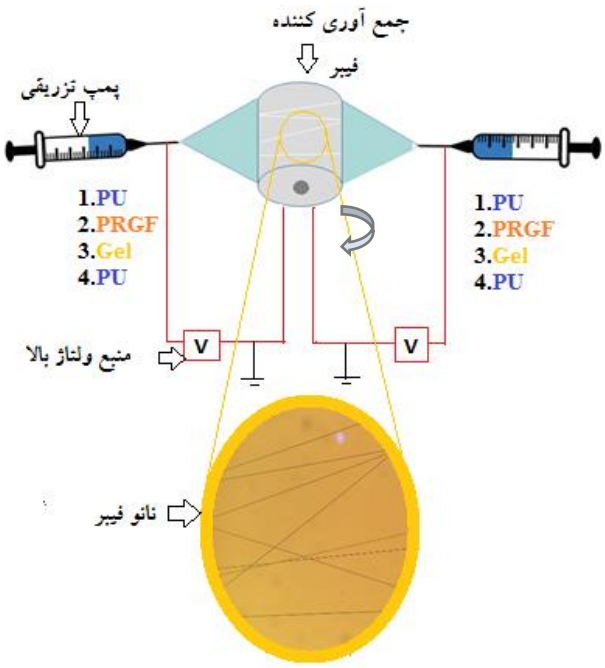
فیبروبلاست طبیعی نوزاد انسانی (HU-02) از مرکز ملی ذخایر ژنتیکی و زیستی ایران خریداری شد و سلول‌های بنیادی مزانشیمی چربی انسانی (hAMSCs) از چربی پوست آبدومیینال انسان استخراج شد. سلول‌های باکتری از مرکز کلکسیون میکروارگانیسم‌های صنعتی ایران PTCC خریداری شد.

۲-۲ تهیه PRGF

برای آماده سازی پلاسما، خون یک اهداکننده سالم جوان در لوله‌های استریل حاوی سیترات سدیم ۳/۸ درصد وزنی/حجمی جمع‌آوری شد. پس از سانتریفیوژ (eppendorf 5810 R) در دور g× ۵۸۰ به مدت ۸ دقیقه در دمای اتاق، سلول های خون طبق شیب چگالی طبقه‌بندی شدند. بخش زیرین گلبول‌های قرمز و بخش بالایی پلاکت ها را در برمی‌گیرد. هر دو بخش با کمک پوشش سفیدی با نام buffy coat، که از لکوسیت‌ها تشکیل شده است، جدا می‌شوند. پلاسما از یک میلی لیتر بالاتر از coat buffy جمع‌آوری شد. در این مورد، باید مراقب بود که پلاسما با buffy coat حاوی لکوسیت مخلوط نشود. پلاسما با فعال کننده PRGF، محلول کلرید کلسیم ۱۰درصد (آلمان Merck - $CaCl_2$) در دمای ۳۷ سلسیوس به مدت ۱ ساعت در انکوباتور (memmert) انکوبه شد و در نتیجه باعث فعال شدن پلاکت و آزاد شدن فاکتور رشد شد و سپس در g× ۳۰۰۰ به مدت ۱۵ دقیقه در دمای ٤ سلسیوس سانتریفیوژ شد. در نهایت پس از فیلتر شدن، هر یک از فراورده‌های غنی از فاکتورها، به مقدار کافی در لوله‌های استریل توزیع شد و در دمای ۸۰- سلسیوس تا زمان استفاده از آنها نگهداری شد[۱٦].

۲-۳ ساخت داربست

دانه های پلیمریPU در مخلوطی از حلال های دی متیل فرمامید (DMF) و تترا هیدرو فوران (THF) از Merck آلمان به نسبت (۳:۱) حل شدند تا PU ۱۰ درصد حاصل شد، ژلاتین G2500 ۲۵ درصد از Sigma-Aldrich در اسید استیک (Merck-آلمان) ٤۰ درصد وزنی/حجمی تهیه شد. این ترکیبات به مدت دو الی چهار ساعت در دمای اتاق با ۲۰۰ دور بر دقیقه به‌صورت مجزا مخلوط شدند تا یک محلول همگن به‌دست آمد. داربست الکتروریسی چندلایه شامل فیبر PU (لایه اول) و الکترواسپری PRGF (لایه دوم) سپس فیبرژلاتین (لایه سوم) و در نهایت لایه PU (لایه خارجی) با استفاده از دستگاه الکتروریسی (شرکت نانوآزما، ایران) تهیه شد (شکل۱). در این مطالعه این داربست چهار لایه PU/PRGF/gelatin/PU که در آن لایه ها در فواصل زمانی مشخص از یکدیگر و به دنبال هم ساخته شدند، به‌عنوان داربست مثبت (PRGF+) بررسی شدند.



شکل ۱ نحوه وترتیب الکتروریسی فیبرها

محلول‌های PU، PRGF و ژلاتین تهیه شده در سرنگ‌های پلاستیکی با سوزن‌های سر صاف استیل ضد زنگ به‌طور جداگانه ودر مقابل یکدیگر، تحویل پمپ‌های تزریقی داده شدند که سرعت تزریق به ترتیب ۰/۵، ۰/۱ و ۰/۳ میلی‌لیتر در ساعت تنظیم شد. نوک سوزن سرنگ‌ها به یک منبع تغذیه با ولتاژ بالا ۱٤، ۱٤و ۱۸ کیلوولت به ترتیب برای PU، PRGF و ژلاتین متصل شد. نانو فیبراز طریق یک درام چرخان با سرعت چرخش ۲۵۰ دور در دقیقه و با اسکن ۳ سانتی‌متری جمع‌آوری شدند به این ترتیب الکتروریسی داربست‌ها در ٤ مرحله انجام شد. پس از جمع‌آوری، داربست‌ها به مدت یک شب در زیر خلاء در دمای اتاق خشک شدند. داربست منفی مانند مراحل بالا ساخته شد. اما در این داربست لایه PRGF وجود ندارد و به صورت سه لایه PU/gelatin/PU می‌باشد (– PRGF). در نهایت دو گروه داربست با اتانول ۷۰ درصد و با تابش UV به مدت ۲۰ دقیقه برای انجام بررسی‌ها و تست‌ها استریل شدند.

۲-٤ اندازه‌گیری زاویه تماس

رطوبت‌پذیری سطح داربست‌های جمع‌آوری شده از گروه مثبت (PRGF+) و گروه منفی (PRGF-) از طریق اندازه‌گیری زاویه تماس ارزیابی شد. زاویه تماس آب با استفاده از روش sessile drop با Data physics OCA 15 plus در دمای اتاق با یک قطره آب (٤ میکرولیتر) برروی سطح داربست‌ها اندازه‌گیری شد و زاویه تماس پس از ۰، ۱۰ و ۳۰ ثانیه بررسی شد[۱۷] و زاویه‌ها با استفاده از نرم‌افزار ImageJ اندازه‌گیری شد. در هر بستر سه بار اندازه‌گیری انجام شد.

مشاهدات مورفولوژیکی با SEM (میکروسکوپ الکترونی روبشی)

گروه‌های داربستی (-/+) PRGF مثبت، منفی به همراه سلول‌ها و باکتری‌های کشت داده شده روی آنها، در محلول تثبیت‌کننده حاوی ۲/۵ درصد گلوتارآلدئید محلول در بافرفسفات سالین (PBS) به مدت٤٥ دقیقه غوطه‌ور شدند. پس از شستشو در (1×) PBS نمونه‌ها به مدت ۱۵

دقیقه در اتانول ۵۰ در صد، ۱۵ دقیقه در اتانول ٦۰ در صد، ۱۵ دقیقه در اتانول ۷۰ درصد، ۱۵ دقیقه در اتانول ۸۰ در صد، ۱۵ دقیقه در اتانول ۹۰ در صد و سپس ۱۵ دقیقه در اتانول ۱۰۰ درصد انکوبه شدند. نمونه‌های اشباع شده با اتانول در دمای اتاق خشک شدند. نمونه‌های خشک شده در خلاء (٤۵ میلی‌آمپر) با طلا (۳۰ ثانیه، با ضخامت ۵ نانومتر) پوشش داده شدند تا سطحی رسانا تولید کنند. تحقیقات ریزساختاری گروه‌های الکتروریسی شده داربست‌های چند لایه از طریق میکروسکوپ الکترونی روبشی (PHILIPS ،XL30 ESEM) با ولتاژ شتاب‌دهنده ۲۰ کیلوولت انجام شد[۱۸].

۲-۵ قدرت مکانیکی داربست

خواص مکانیکی نانو فیبرها با استفاده از دستگاه مقاومت کششی (STM 20 ، Santam, Iran) تعیین شد. برای انجام این کار از یک حسگر الکترونیکی کششی ۲۰ نیوتن با سرعت ۵ میلی‌متر بر دقیقه استفاده شد. غشاهای داربست برای آزمایش‌های کششی به نوارهایی (۳۰ × ۵ میلی‌متر) بریده شدند. برای محاسبه استحکام کششی، ازدیاد طول و مدول یانگ (مدول الاستیسیته) (E) از فرمول‌های زیر استفاده شد:

$$\text{Tensile strength (MPs)} = F/A$$

F و A به ترتیب نشان دهنده حداکثر بار نیرو (N) و سطح مقطع نمونه‌ها (m^2) می‌باشند.

$$\text{Elongation (\%)} = (L_0-L)/L_0 \times 100$$

L_0 اندازه اولیه نمونه و L نماد طول کشیده در نقطه شکست نمونه است. علاوه بر این، مدول یانگ (E) از شیب خط مستقیم حاصل از منحنی تنش-کرنش در ناحیه الاستیک به‌دست آمد[۱۹]

۲-٦ استخراج سلول‌های بنیادی مزانشیمی از بافت چربی پوست انسان

در این مطالعه ابتدا بافت با (1×) PBS شستشو داده شد تا خون از بافت خارج شود. سپس، آنزیم کلاژنازI (Sigma-Aldrich) به غلظت ۰/۱درصد تهیه و فیلتر شد. ۵ میلی‌لیتر آنزیم به ۳۰ میلی‌لیتر بافت اضافه شد و در دمای ۳۷ سلسیوس به مدت ۲ ساعت در انکوباتور (New Brunswick Scientific Innova CO-170) قرار داده شد. بافت در مدت ۲ ساعت انکوباسیون به آرامی تکان داده شد. سپس، بافت به مدت ۵ دقیقه و دور g× ۲۰۰۰ سانتریفیوژ (ROTOFIX- 32 A) شد. بافت و ضایعات بافتی از بالای لوله خارج شد. برای غیر فعال سازی آنزیم به مایع باقی مانده از بافت سرم جنین گاوی ۱۰درصد FBS (Biosera) به همراه محیط‌کشت سلولی اضافه شد و پیپتاژ شد. سپس، با دور g×۲۰۰۰ به مدت ۵ دقیقه سانتریفیوژ شد. محیط‌کشت سلولی خارج شد و ۱ میلی‌لیتر محیط‌کشت تازه اضافه شد و در نهایت سلول‌ها به فلاسک منتقل شد.

۲-۷ کشت سلولی و آزمون زیست سازگاری (MTT)

سلول‌های فیبروبلاست طبیعی نوزاد انسانی (HU-02) و سلول‌های بنیادی مزانشیمی مشتق از چربی انسانی (hAMSCs) در فلاسک کشت سلول ۲۵ سانتی‌متر مربع حاوی محیط‌کشت سلولی DMEM/F12 (BIO-IDEA) به همراه آنتی‌بیوتیک ۱ در صد Pen/Step (Biosera) و سرم جنین گاوی۱۰ درصد FBS (Biosera) در دمای ۳۷ سلسیوس و دی اکسید کربن ۵ درصد کشت داده شدند. محیط‌کشت هر ۲ روز یکبار تعویض شد. سلول‌های فیبروبلاست با استفاده از Trypsin-EDTA (1×) (BIO-IDEA)۰/۲۵ در صد جدا شدند و به‌وسیله محیط‌کشت سلولی و ۱۰ در صد FBS، آنزیم غیر فعال شد. سلول‌ها بعد از ۲-٤ پاساژ برای انجام تست‌ها استفاده شدند. پس از تهیه داربست‌های نانوفیبری، سلول‌های فیبروبلاست ۷۰ درصد و hAMSCs ۳۰ درصد (۱۲×۱۰^۳ سلول co-culture) جدا شدند که روی داربست‌های

PU/PRGF/gelatin/PU (گروه مثبت) و PU/gelatin/PU (گروه منفی) و گروه TCPS (گروه کنترل) برای بررسی زیست سازگاری داربست‌ها با ارزیابی تکثیر سلولی ۱،۳،۷ تا ۱٤ روز کشت داده شدند. دو داربست نانوفیبری تهیه شده با یک گروه سلولی و TCPS توسط رنگ MTT (۳-[٤،٥-دی متیل تیازول]-۲،٥-دی فنیل تترازولیوم بروميد) از Sigma-Aldrich مطالعه شدند. در روزهای اول، سوم، هفتم و چهاردهم پس از کشت سلول‌ها، داربست‌های مربوطه با PBS شسته شده و در محلول ۵ میلی‌گرم در یک میلی‌لیتر MTT با DMEM/F12 بدون FBS در دمای ۳۷ سلسیوس به مدت ۳/۵ ساعت انکوبه شدند. پس از تخلیه محلول MTT، DMSO اضافه شد و جذب در ۵۷۰ نانومتر توسط الایزاریدر BioTek خوانده شد. نتایج به‌صورت درصدی از مقادیر به‌دست آمده در کشت گروه کنترل و گروه‌های مورد آزمون بیان شدند. فرمول درصد زنده‌مانی سلول‌ها :

۱۰۰× متوسط جذب نمونه‌های کنترل / متوسط جذب نمونه‌های مورد آزمون : درصد سلول‌های زنده

۲-۸ سویه‌ها و شرایط رشد باکتری‌ها

سالمونلا تیفی موریوم (PTCC 1709)، *سودوموناس آئروجینوزا* (PTCC 1074)، *استافیلوکوکوس اورئوس* (PTCC 1112)، و *اشریشیا کلی* (PTCC 1399) در محیط‌کشت Condalab- TSB (Tyriptic soybean Broth) و باکتری *لاکتوباسیلوس پلانتاروم* (ATCC 8014) در محیط‌کشت MRS (Man, Rogosa & Sharpe Broth) Ibresco در دمای ۳۷ سلسیوس به مدت ۱٦ ساعت (یک شبانه روز) با ۲۲۵ دور بر دقیقه کشت داده شدند.

۲-۹ کشت باکتری *لاکتوباسیلوس پلانتاروم* بر روی داربست

باکتری *لاکتوباسیلوس پلانتاروم* کشت داده شده در شرایط بالا و قبل از رقیق سازی در محیط‌کشت تازه به مدت ۱/۵ ساعت مجددا انکوبه شد تا به فاز رشد لگاریتمی برسد. سپس، باکتری‌ها با غلظت نهایی ۰/۵ مک فارلند در مخلوط یکنواخت محیط‌کشت باکتریایی و محیط‌کشت سلولی DMEM/F12 (بدون آنتی‌بیوتیک) رقیق شدند و ۱۰۰ میکرولیتر از سوسپانسیون باکتریایی به گروه سلولی (co-culture)کاشته شده بر روی داربست اضافه شد. کشت، در چاهک‌ها، با انکوباسیون در دمای ۳۷ سلسیوس به مدت ۲ ساعت انجام شد. باکتری‌هایی که به سطح نچسبیده بودند با دو بار شستشو با PBS حذف شدند و مجددا ۳۰۰ میکرو لیتر محیط‌کشت باکتریایی و DMEM/F12 (بدون آنتی‌بیوتیک) در چاهک‌ها ریخته شد. برای انجام تست زیست سازگاری MTT (به مدت ۱،۳،۷ و ۱٤ روز بررسی شد)، سلول‌ها با ۲۰۰ میکرولیتر تریپسین-EDTA در دمای ۳۷ سلسیوس به مدت ۵ دقیقه از داربست‌ها خارج شدند و واکنش با ۵۰۰ میکرولیتر DMEM / F12 حاوی ۱۰ درصد FBS غیر فعال شد. مطابق روش انجام تست MTT ارزیابی شد[۲۰]. در نهایت گروه‌های نمونه برای عکسبرداری SEM مطابق مراحل ذکر شده در بالا تثبیت شدند.

۲-۱۰ ارزیابی فعالیت ضد باکتریایی

۲-۱۰-۱ روش انتشار-آگار

سوسپانسیون‌های باکتری‌های مورد آزمون در محیط‌کشت TSB تهیه شد. با گذراندن دوره انکوباسیون در دمای ۳۷ سلسیوس و پس از ۱٦ ساعت، رقت سریالی (۰/۵ مک فارلند) از نمونه‌ها تهیه شد و ۱۰۰ میکرولیتر از آنها در ۰/۸درصد TSA مخلوط شد و سپس بر روی محیط‌کشت استریل MRSA (در پلیت ۸ سانتی‌متر) از قبل تهیه شده، پخش شد. پس از سفت شدن محیط رویی، روی آگار با استفاده از یک وسیله استریل (با قطر: ۵ میلی‌متر) چاهک ایجاد شد. چاهک ایجاد شده با ۱۰۰ میکرولیتر *لاکتوباسیلوس پلانتاروم* (۰/۵ مک فارلند) پر شد. پلیت‌ها ۲-۳ ساعت در یخچال قرار داده شدند تا باکتری‌ها به محیط‌کشت جذب شوند. سپس، پلیت به انکوباتور ۳۷

سلسیوس به مدت ۲۴-۴۸ ساعت منتقل شد. به این ترتیب، میزان فعالیت ضد باکتریایی *لاکتوباسیلوس پلانتاروم* ارزیابی شد.

۲-۱۱ تحلیل آماری داده‌ها

داده‌های به‌دست‌آمده با میانگین انحراف از معیار گزارش شد و با استفاده از Student's t-test مقایسه شدند. گروه TCPSبه‌عنوان گروه کنترل و ۲ گروه داربست چندلایه نانوفیبری PU/PRGF/gelatin/PU (PRGF+) و PU/gelatin/PU (PRGF-) به‌عنوان گروه‌های آزمایش بررسی شدند. مقادیر p value ($p< 0.05$) از نظر آماری معنی‌دار در نظر گرفته شد.

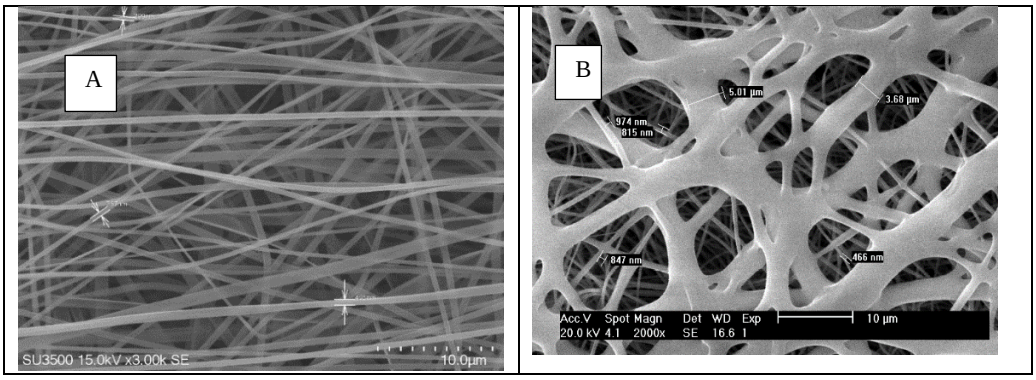
۳- نتایج

۳-۱ بررسی SEM داربست نانوفیبر تولید شده توسط فرایند الکتروریسی

شکل ۲ تصاویر SEM داربست‌های چند لایه‌ایPU/gelatin/PU را پیش از کاشت سلول‌ها توصیف می‌کند. اندازه فیبرهای ژلاتین بین ۲۰۰ تا۵۰۰ نانومتر و فیبرهای PU الکتروریسی شده روی فیبر ژلاتین از ۵۰۰ نانومتر تا ۵ میکرومتر گزارش شد. نتایج این مشاهدات نشان داد قطر منافذ برای کشت سلولی مناسب است.

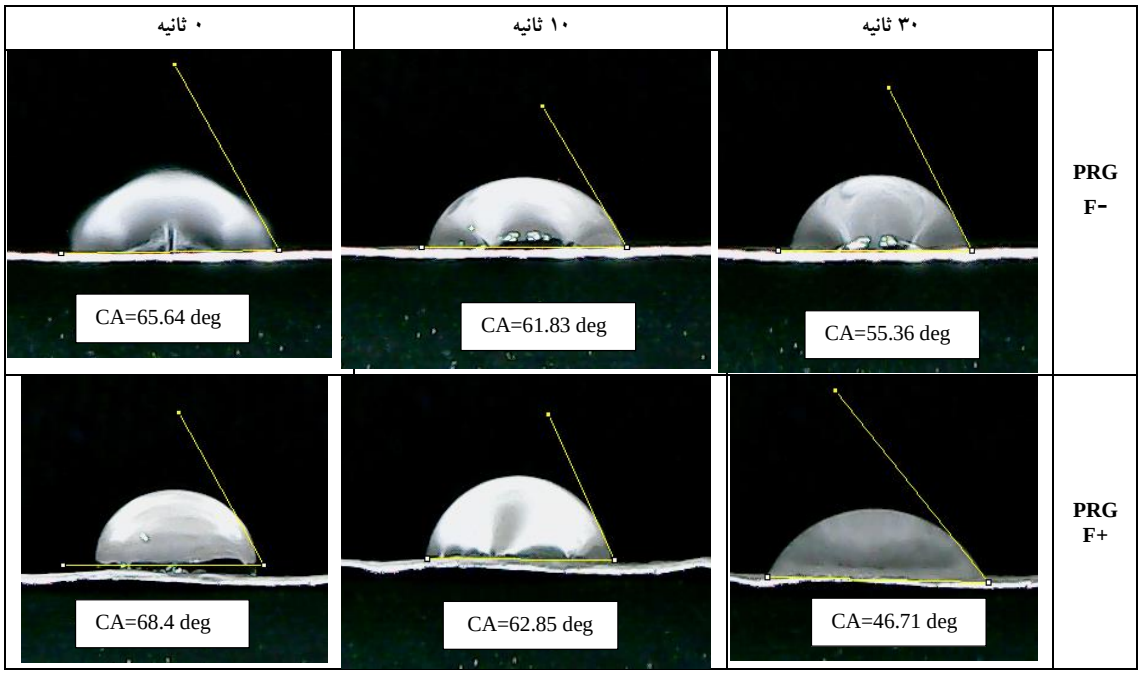
۳-۲ تست زاویه تماس

این تست، افزایش سطح آب دوستی داربست که منجر به بهبود چسبندگی و به تکثیر سلول ختم می شود، را تأیید کرد. اندازه زاویه تماس برای مقایسه آب دوستی دو داربست چند لایه +PRGF و -PRGF اجرا شد. زاویه تماس آب در زمان صفر برای +PRGF و -PRGF به ترتیب به ۶۵/۶۴ و ۶۸/۴ درجه شد (شکل۳). پس از ۳۰ ثانیه، زاویه تماس+PRGF و -PRGF به ترتیب به ۵۵/۳۶ و ۴۶/۷۱ درجه شد. آزمایش رطوبت‌پذیری نشان داد که آب دوستی سطوح داربست پس از پوشش با PRGF گسترش می‌یابد. همچنین، نتایج نشان داد، اسپری PRGF بر روی PU مانند الکتروریسی ژلاتین روی داربست PU، به ماهیت مرطوب کنندگی این پلیمر کمک می‌کند.



شکل ۲ میکروگراف‌های SEM از داربست‌های نانو فیبرPU قبل از کاشت سلولی A) فیبر ژلاتین؛ B) فیبر ژلاتین در زیر و فیبر PU در روی داربست

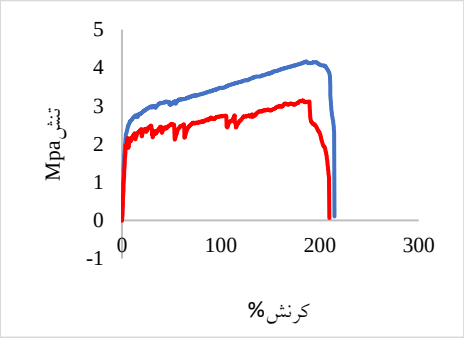
بنابراین، از لحاظ آبدوستی بین این دو داربست اختلاف معناداری مشاهده شد ($p< 0.02$). همانطور که پیشتر گفته شد، زیست سازگاری سطح داربست‌ها نیز باتوجه به آبدوستی سطح آنها افزایش می‌یابد. از این دیدگاه، اندازه‌گیری‌ها نشان می‌دهند که هر یک از داربست‌های نانو فیبر+PRGF و -PRGF برای تحقیقات در حوضه مهندسی بافت جزء بهترین‌ها هستند.



شکل ۳ زاویه تماس داربست PU با +PRGF و –PRGF , CA: زاویه تماس، deg: درجه

۳-۳ مشخصات مکانیکی داربست الکتروریسی شده +PRGF و –PRGF

غشاهای نانوفیبری داربست +PRGF و –PRGF منحنی کرنش-تنش غیرخطی نرمال را تأیید کردند (شکل ٤). غشاهای نانوفیبری +PRGF و –PRGF از نظر استحکام مکانیکی به‌طور قابل توجهی از یکدیگر متفاوت نیستند (جدول۱). بیشینه استحکام کششی گروه + و – PRGF به ترتیب ٤/۱ و ۳/۱ میلی‌پاسکال می‌باشد و بیشینه درصد کرنش نیز ۲۱٤ درصد و ۲۰۹ درصد می‌باشد. بنابراین، اختلاف معناداری بین گروه‌های داربستی مورد مطالعه مشاهده نشد، اما خواص مکانیکی غشاهای نانوفیبری + PRGF و– PRGF را با تنش و کرنش کششی تایید می کند.



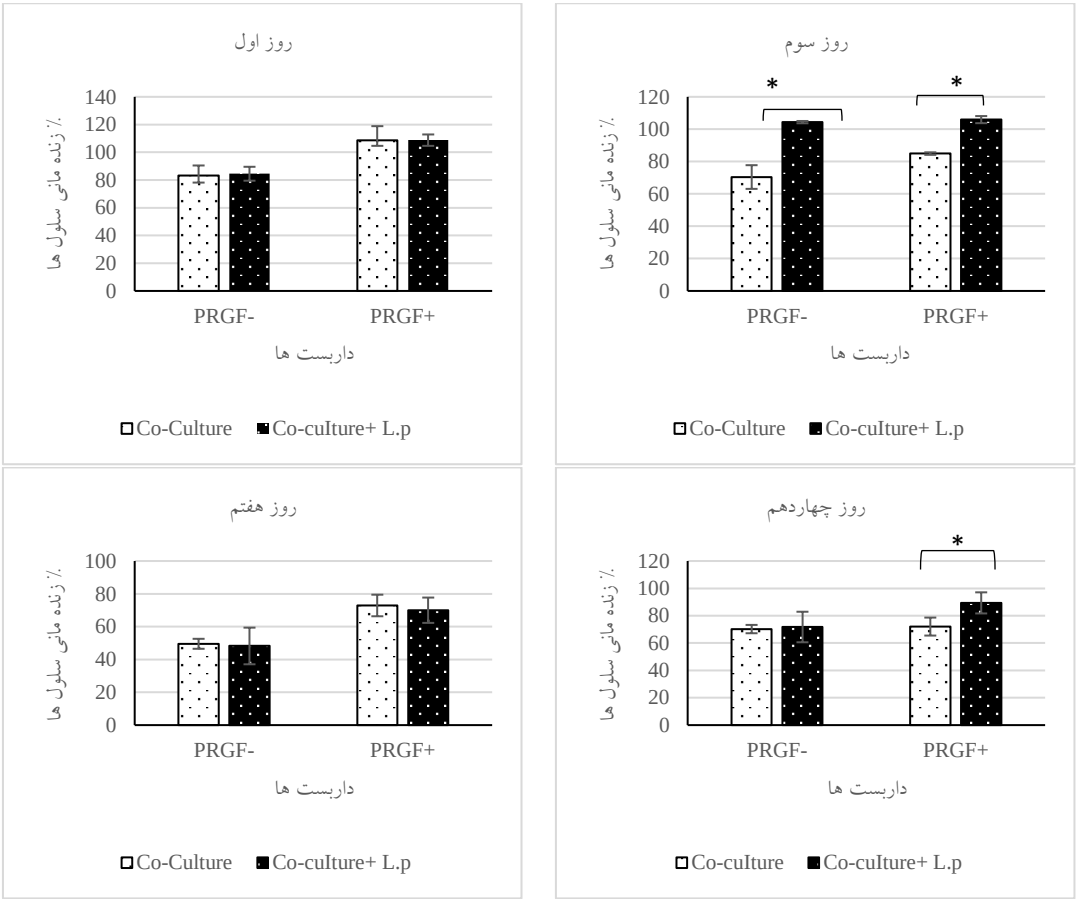
شکل ٤ پاسخ تنش-کرنش نانو فیبرالکتروریسی شده. A) آبی: +PRGF؛ B) قرمز:-PRGF

جدول ۱ پاسخ تنش-کرنش نانو فیبرالکتروریسی داربست‌های +PRGF و –PRGF

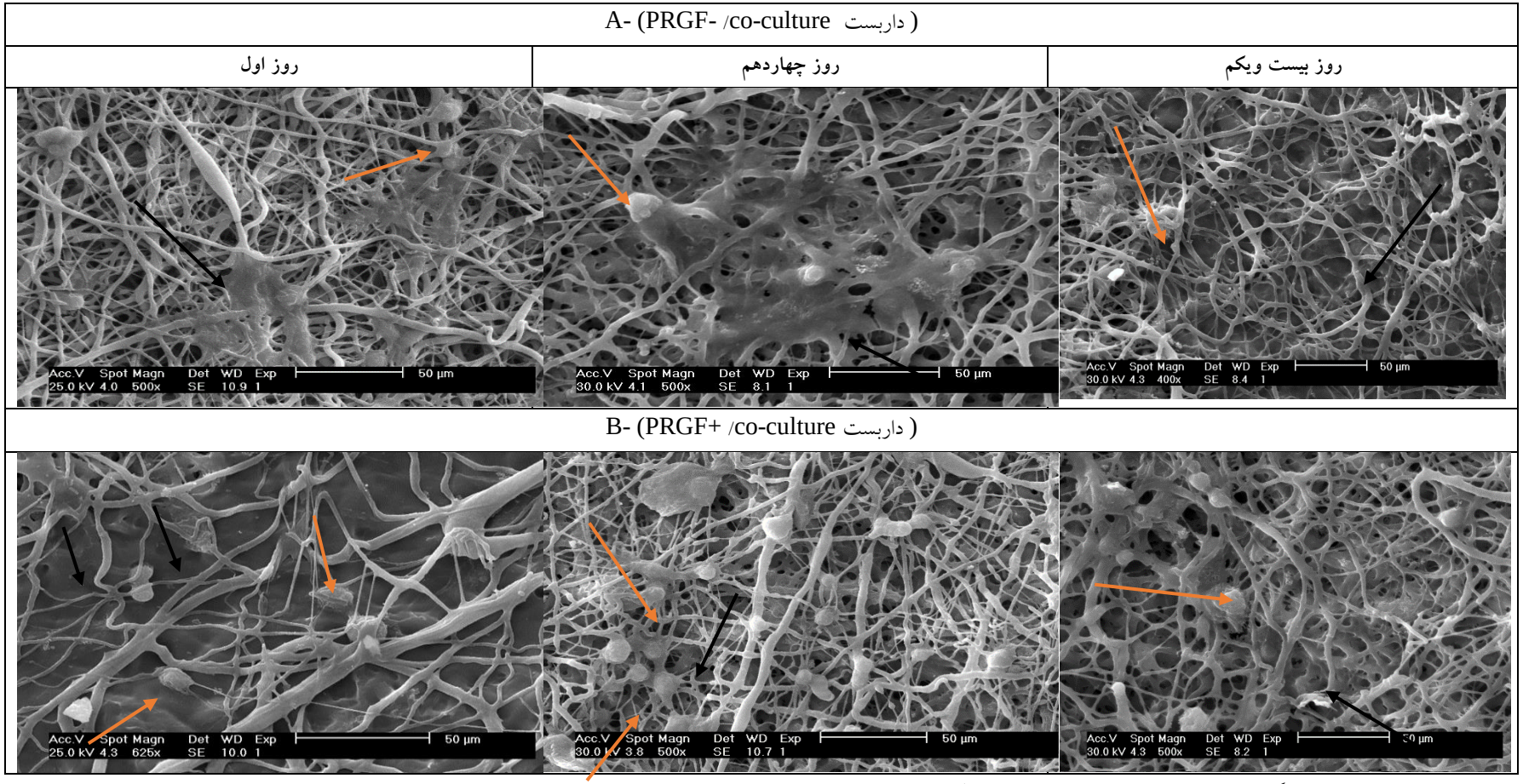
داربست‌ها	استحکام کششی (MPa)	کرنش %	مدول یانگ (MPa)
PRGF-	۳/۱	۲۰۹	۰/۳
PRGF+	٤/۱	۲۱٤	۰/۷

۳-٤ ارزیابی حیات و تکثیر سلولی (تست MTT)

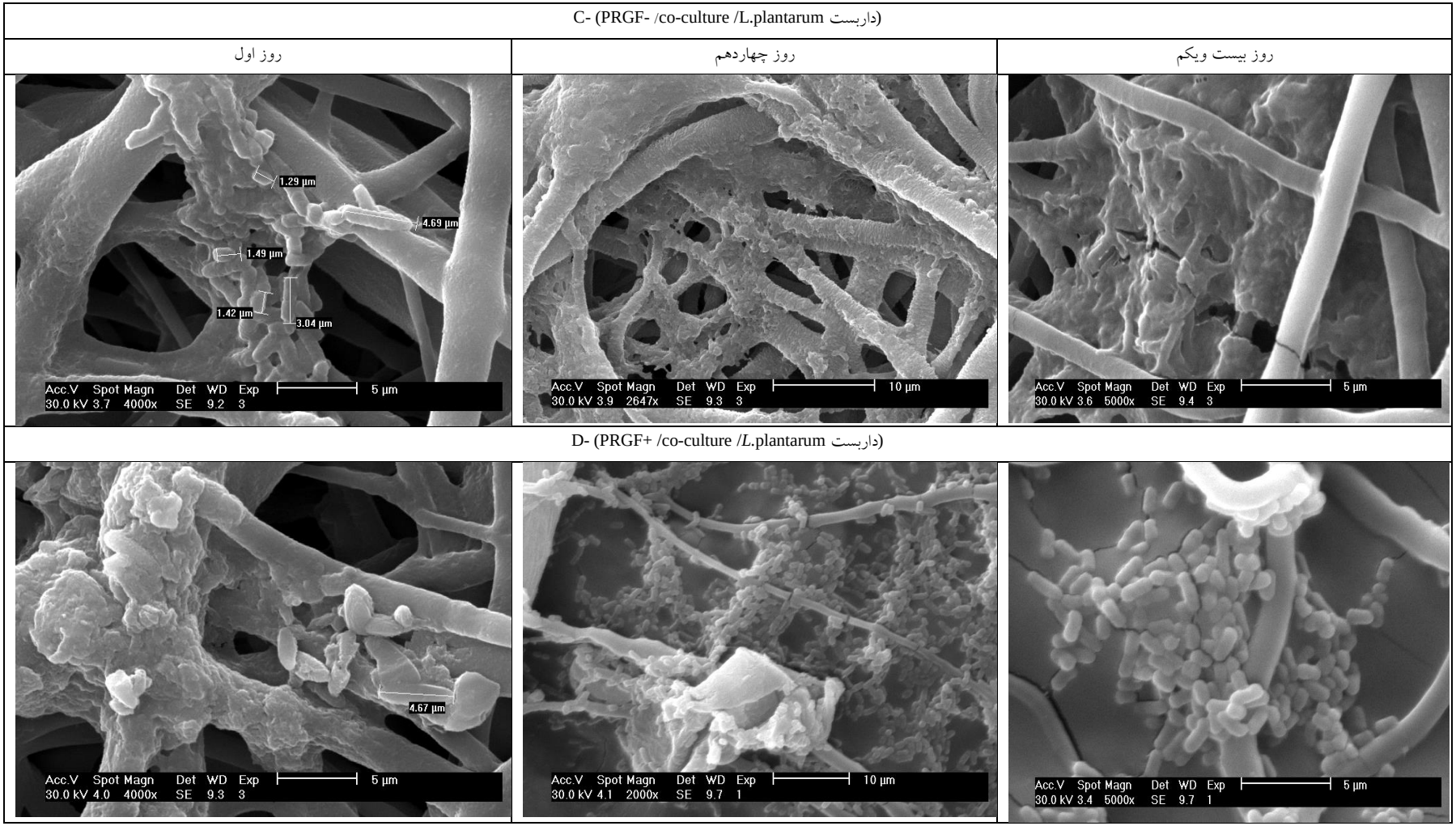
تست MTT میزان تکثیر سلولی را روی داربست‌ها را نشان داد. در این مطالعه، میزان تکثیر و چسبندگی سلول‌های co-culture را روی داربست‌های نانوفیبری PRGF+ و PRGF- با و بدون حضور *لاکتوباسیلوس پلانتاروم* (*L.p*) بررسی شد. TCPS به‌عنوان گروه کنترل و داربست های PRGF+ و PRGF- به‌عنوان گروه های آزمایشی با استفاده از روش MTT برای درک زیست سازگاری داربست‌ها به مدت ۱، ۳، ۷ و ١٤روز بررسی شدند. همانطور که در شکل ۵ نشان داده شده است، زنده ماندن و چسبندگی سلولی روی داربست‌های PRGF+ در مقایسه با نمونه داربست‌های PRGF- در روزهای اول، سوم، هفتم و چهاردهم به‌طور قابل توجهی افزایش یافته است ($p< 0.05$). با این‌حال، در روز سوم کشت، تکثیر co-culture روی هردو داربست PRGF+ و PRGF- با حضور *L.p* در مقایسه با داربست‌های بدون *L.p* افزایش معنی‌داری تا ۱۰۵ درصد داشت($p< 0.05$)، اما در روز هفتم از کشت، تکثیر co-culture روی PRGF+ با حضور *L.p* ۷۰ درصد افزایش معنی‌داری در مقایسه با PRGF+بدون حضور *L.p*(با تکثیر ۷۰ در صد) نداشت. همچنین، باکتری ها تأثیر مثبت معنی‌داری بر تکثیر co-culture در روز ١٤ پس از کشت در گروه PRGF+ با قدرت تکثیر ۹۰ درصد داشتند($p< 0.05$). در مجموع فاکتورهای PRGF و باکتری *لاکتوباسیلوس پلانتاروم* بر روی زنده ماندن سلول‌ها (بیش از ۷۰ در صد) و سرعت تکثیر اثر هم‌افزایی داشتند.



شکل۵ فعالیت میتوکندریایی سلول‌های co-culture بر روی داربست چندلایه PRGF-, PRGF+ با و بدون حضور *Lactobacillus plantarum* ($p< 0.05$) *.



شکل۶A-B. میکروگراف های SEM از داربست نانو فیبرچند لایه‌ای پس از کشت سلول co-culture روی داربست‌های PRGF- ,PRGF + در روز اول ، چهاردهم و بیست ویکم.
فلش نارنجی رنگ نمایانگر سلول‌های دوکی شکل فیبروبلاست می‌باشد و فلش سیاه رنگ نمایانگر سلول‌های پهن شده مزانشیم که در لایه‌های عمیق‌تری از داربست نفوذ کرده است.



شکل.٦C-D. میکروگراف‌های SEM از داربست نانو فیبرچند لایه‌ای پس از کشت سلولی روی داربست‌های +,-PRGF با حضور *لاکتوباسیلوس پلانتاروم* در روزهای اول، چهاردهم و بیست و یکم .

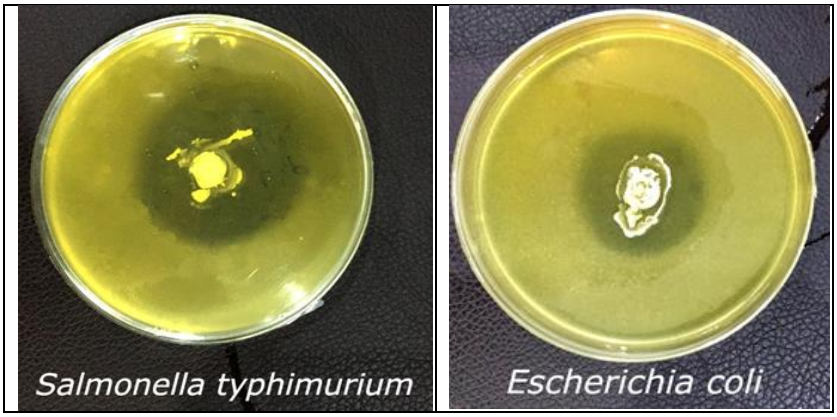
۳-۵ آزمون SEM (سلول‌های کاشته شده روی داربست)

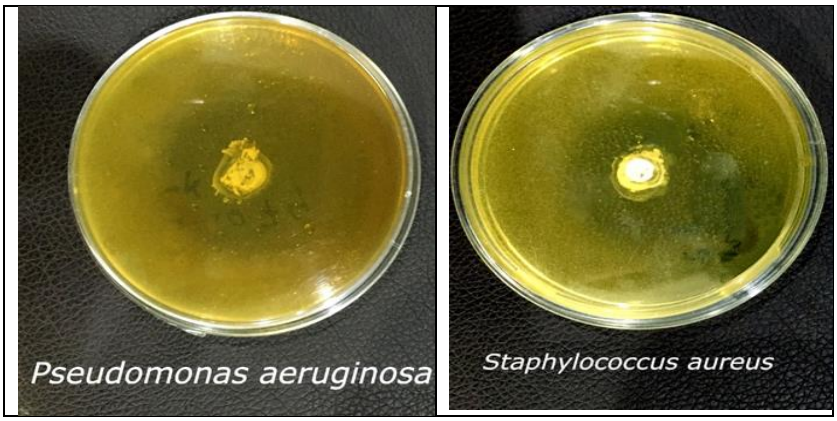
شکل ٦ (A-B) تصاویر SEM مورفولوژی سلول‌های co-culture کشت شده بر روی سطح غشای نانوفیبری PRGF+ و PRGF- وباحضور *L.plantarum* در شکل ٦ (C-D)در روز های اول، چهاردهم و بیست و یکم را توصیف می‌کند. تصاویر SEM نشان داد که تعداد سلول های co-culture بعد ۲۱ روز از کاشت روی PRGF+ بسیار بیشتر از سلول‌های PRGF- (شکل A-B) است. گسترش مناسب سلول‌ها روی داربست‌های PRGF+ زیست سازگاری و کاربرد بهتر آنها را در مهندسی بافت تأیید کرد. پس از اسپری PRGF روی داربست PU، همانطور که در اندازه‌گیری زاویه تماس آب نشان داده شده است، آب دوستی داربست افزایش می‌یابد (شکل ۳). چسبندگی بهتر سلول‌ها بر روی داربست‌های PRGF+ به دلیل آب دوستی بالاتر آنها است که سبب می شود این داربست‌ها انتخاب مناسبی برای آزمایش *in vivo* و تحقیقات بیشتر در مهندسی بافت باشند. نتایج MTT و تصاویر SEM همچنین نشان دادند که داربست‌های PRGF+ بسترهای مناسب‌تری نسبت به غشای نانوفیبری PRGF- در مورد اتصال و تکثیر سلولی هستند. با توجه به نتایج SEM، باکتری‌ها پس از ۲۱ روز روی هر دو داربست PRGF- و PRGF+ با سلول‌های co-culture در روز ١٤و٢١رشد بیشتری در مقایسه با روز اول نشان دادند.

۳-٦ ارزیابی فعالیت ضد باکتریایی *لاکتوباسیلوس پلانتاروم*

۳-٦-۱ تست انتشار- آگار

نتیجه تست انتشار–آگار نشان داد، *L. plantarum* می‌تواند ناحیه‌ی بازدارنده‌ای را در محیط جامد بر روی باکتری‌های گرم منفی و گرم مثبت ایجاد کند. این مطالعه نشان داد که *L. plantarum* کمترین اثر را بر روی *استافیلوکوکوس اورئوس* و *شریشیا کلی* داشت (شکل ۷).





شکل ۷ اثر مهاری *L. plantarum* بر روی *سالمونلا تیفی موریوم* (۴۰ میلی‌متر)، *اشریشیا کلی* (۲۰ میلی‌متر)، *سودوموناس آئروژینوزا* (۴۰ میلی‌متر)، *استافیلوکوکوس اورئوس* (۲۵ میلی‌متر)

استافیلوکوکوس اورئوس(PTCC 1112): هاله عدم رشد قوی (۲۵ میلی‌متر) توسط *L. plantarum* ایجاد شد.

سالمونلا تیفی موریوم (PTCC 1709): هاله عدم رشد قوی (۴۰ میلی‌متر) توسط *L. plantarum* ایجاد شد.

اشریشیا کلی (PTCC 1399): هاله عدم رشد قوی (۲۰ میلی‌متر) توسط *L. plantarum* ایجاد شد.

سودوموناس آئروژینوزا (PTCC 1074) هاله عدم رشد قوی (۴۰ میلی‌متر) توسط *L. plantarum* ایجاد شد.

۴- بحث

در این مطالعه، برای ایجاد پانسمان مناسب برای زخم، سلول‌های co-culture cells (HU-02 (70%) , hAMSCs (30%)) و *Lactobacillus plantarum* (ATCC 8014) بر روی داربست چندلایه PU/PRGF/gelatin/PU کشت داده شدند. داربست نانوفیبری جدید با توجه به توانایی خود برای بهبود زخم‌های پوستی، جایگزین مناسبی برای پوست می‌باشد. داربست نانوفیبری PU با روش الکتروریسی تولید شد. PU یک بستر زیست سازگار است و به دلیل سرعت تجزیه زیستی پایین، دارای خواص مکانیکی قابل توجهی است [۲۱]. مشکل اصلی این داربست، آب‌گریزی آن است که مانع از اتصال سلول‌ها می‌شود. به همین دلیل، از ژلاتین برای آب دوست کردن این نوع داربست‌ها استفاده می‌شود. ژلاتین شکل دناتوره کلاژن می‌باشد، که پتانسیل آنتی‌ژنی کمتری نسبت به کلاژن دارد [۱۰, ۱۵]. بر اساس نتایج تست مکانیکی، درصد کرنش به دلیل لایه لایه بودن داربست و برهمکنش سطحی زنجیره‌های PU افزایش یافت. در حقیقت، الحاق پروتئین به فیبر منجر به کاهش استحکام کششی می‌شود. با این‌حال، رفتار الاستیک داربست‌ها کاهش پیدا نکرد. در این بررسی ژلاتین به‌صورت ترکیبی با پلی‌اور تان الکتروریسی نشد و در لایه‌های جداگانه قرار گرفت و درنتیجه از استحکام کششی این پلیمر کاسته نشد. حتی با اسپری الکتریکی PRGF تغییر چندانی در خاصیت مکانیکی داربست ایجاد نشد و به‌صورت جزئی باعث بالا رفتن مقاومت داربست شد. نتایج تست‌های زاویه تماس و SEM نشان داد که آب دوستی داربست PU با استفاده از PRGF پوشش داده شده روی PU و الکتروریسی ژلاتین روی PU در مقایسه با داربست بدون PRGF به‌طور قابل توجهی افزایش یافته است. در این مطالعه، داربست PU زیست‌فعال برای پانسمان پوست ایجاد شد که شامل بسیاری از فاکتورهای رشد، سلول‌های فیبروبلاست، سلول‌های بنیادی مزانشیمی و *لاکتوباسیلوس پلانتاروم* می‌باشد. Diaz-Gomez و همکاران نشان دادند که چسبندگی و تکثیر سلولی روی داربست نانوفیبری حاوی PRGF افزایش می‌یابد[۲۲]. فاکتورهای بیشماری از

ایزومر های مختلف در PRGF شامل: PDGF, TGF, VEGF, EGF و غیره وارد پلا سمای لخته شده می شوند که در بهبود زخم موثر می‌باشند. این فاکتورهای رشد عمدتاً با افزایش میزان میتوژنز و رگ‌زایی بر بهبود زخم تأثیر می‌گذارند. از سویی دیگر، پیشنهاد می‌شود که استفاده از PRGF می‌تواند سرعت تکثیر سلول‌های فیبروبلاست را تسریع کند[۱۰]. در مطالعات پیشین، پلاسمای غنی از پلاکت مستقیماً روی اسکار استفاده شد[۲۳, ۲٤]. با این‌حال، در زمان رهاسازی به دلیل مایع بودن، به محض استفاده، از زخم به سرعت شسته می شود[۲۵]. برای غلبه بر این مشکل، سعی شد PRGF روی داربست نانوفیبر به وسیله اسپری الکتریکی پوشش داده شود. برای این کار، کلرید کلسیم به PRGF افزوده شد. سپس، PRGF به سهولت روی داربست به صورت الکتریکی اسپری شد. از آنجایی که انتشار فاکتورهای رشد از داربست افزایش یافته است، PRGF مانند قبل به راحتی شسته نشد[۲٦]. تحقیقات تجربی و بالینی به‌طور گسترده نشان می‌دهد که فراتر از ظرفیت پروبیوتیک‌ها که بر عملکرد روده تأثیر مثبت می گذارند، اعمال پروبیوتیک‌ها بر روی پوست می‌تواند پاسخ ایمنی میزبان از جمله ایمنی ذاتی و اکتسابی را تعدیل کند. این گونه بررسی‌ها امکان طراحی کاربردی و روش های جدید مبتنی بر رویکرد موضعی برای پیشگیری و درمان اختلالات پوستی را فراهم می‌کند[٤]. قابل توجه است که عفونت مهمترین عارضه پس از آسیب سوختگی می‌باشد و علیرغم استفاده از آنتی‌بیوتیک‌های موضعی و سیستمیک، می‌تواند منجر به سپسیس و مرگ بیمار شود[۲۷]. باتوجه به خواص ضدعفونی کنندگی پروبیوتیک‌ها و توانایی آنها در پیش‌برد فرایند ترمیم زخم، می‌توان گفت آنها قدرت جلوگیری از آلودگی را دارند[۳, ۵, ۲۷]. باکتری‌های *استافیلوکوکوس اورئوس*(*Staphylococcus aureus*) ٤٥ درصد و *سودوموناس آئروجینوزا* (*P. aeruginosa*) ۳۵ درصد، *استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس* (*Staphylococcus epidermidis*) ۱۵ درصد و همچنین سایر باکتری‌هایی مانند، مانند *Enterobacter cloacae*، *Klebsiella pneumoniae* و *Enterococcus faecalis*، به میزان ۵ درصد از زخم حاصل از سوختگی جدا شدند. بنابراین، در این مطالعه برای بررسی اثر ضد باکتریایی *لاکتوباسیلوس پلانتاروم* از سویه‌های *سودوموناس آئروجینوزا*، *استافیلوکوکوس اورئوس*، *اشریشیا کلی* و *سالمونلا تیفی‌موریوم* استفاده شد. *سودوموناس* آئروجینوزا، استافیلوکوکوس اورئوس، معمولا بالاترین در صد عفونت زخم حاصل از سوختگی را ایجاد می‌کنند و سویه *اشریشیا کلی* به‌صورت عفونت بسیار نادر دراین گونه زخم‌ها دیده می‌شود. *سالمونلا تیفی موریوم* جزء باکتری‌های عفونت روده می‌باشد. همچنین، Lash و همکاران دریافتند که *L. plantarum* ATCC 8014 دارای یک اثر بازدارنده بر طیف وسیعی از باکتری‌های گرم منفی و گرم مثبت است و نشان دادند که باکتریوسین‌ها به‌عنوان ترکیبات موثر برای چنین محدودیتی است[۵, ۲۸]. با این حال، *L. plantarum* ATCC 8014 به شدت به‌عنوان باکتری پروبیوتیک بالقوه باقی مانده است. مطالعات معتبری برروی واسطه‌گری اگزوپلی ساکاریدها (EPS) برای اتصال میکروارگانیسم‌ها به دیواره روده انجام شد[۲۹]. به نظر می‌رسد که اگزو پلی ساکاریدها دارای خواص محرک سلامتی، مانند محرک سیستم ایمنی و فعالیت ضد زخم هستند[۷, ۹]. حیدری و همکاران دریافتند که ماکروفاژها و فیبروبلاست‌ها در سه و پنج روز پس از القای زخم به شدت گسترش می‌یابند و در روزهای هفتم و چهاردهم کاهش می‌یابند. این پژوهش پیشنهاد داد که *L. plantarum* بهبود زخم معده را از طریق تحریک سیستم ایمنی و رشد فیبروبلاست بهبود می بخشد[۳۰]. مطالعه حاضر نیز تاثیر *لاکتوباسیلوس پلانتاروم* برافزایش تکثیر co-culture که اغلب اوقات سلول‌های فیبروبلاست را شامل می شود، در شرایط آزمایشگاهی

نشـــان داد. برای اثبـات این ویژگی‌هـا، اثرات ژل *L. Plantarum* بر بهبود زخم پوسـتی با ایجاد زخم ناشـی از سـوختگی در موش‌های دیابتی آزمایش شـد[۳]. اسـتفاده مسـتقیم از باکتری روی زخم ممکن اسـت برای مدت طولانی تأثیر مناسـبی نداشـته باشـد و برای غلبه بر این مشـکل، به دام انداختن باکتری‌ها در داربسـت نانوفیبری وابسـته به محل زخم می‌تواند انتخاب مناسـبی باشـد. González و همکاران نشـان داد که به دام انداختن پروبیوتیک های زنده در داربسـت های کلاژن، این نوع بیومواد را به‌عنوان انتخاب امیدوارکننده‌ای برای درمان واژینوز باکتریایی (BV) تایید می‌کند[۳۱]. علاوه بر این، این نوع رویکرد ها را می‌توان برای درمان عفونت های میکروبی پیچیده مختلف طراحی کرد. Costello و همکاران توپوگرافی سـطح روده کوچک را از طریق ساخت داربست سه بعدی پرزهای زیست تخریب پذیر و زیست سازگار با استفاده از پلی لاکتیک-گلیکولیک اسید بازسازی کردند تا با تمایز کشت سلول‌های Caco-2 به روشی قابل مقایسه با شرایط روده دست یابند. سپس، از این روش به‌عنوان بسـتری برای تقلید از پروفایل های چسـبندگی و تهاجم باکتریایی مانند *سـالمونلا* و *سودوموناس* استفاده کردند و درمان توسط *لاکتوباسیلوس* را در یک محیط سـه بعدی بررسـی‌کردند. آنها مشـاهده کردند که در یک محیط سه بعدی، *لاکتوباسیلوس‌ها* در جا به‌جایی پاتوژن‌ها سودمند هستند[۲۰]. همچنین، در مطالعه حاضـر نشـان داده شـد که *Lactobacillus plantarum* ATCC 8014 کشـت شـده بـر روی داربسـت PU/PRGF/gelatin/PU دارای اثر ضـد بـاکتریـایی بر *سودوموناس آئروجینوزا*، *سالمونلا تیفی موریوم*، *اشریشیا کلی* و *استافیلوکوکوس اورئوس* می‌باشد. علاوه بر بررسی اثرات فیزیکو شیمیایی PRGF بر روی داربست و تاثیرات ضد باکتریایی *لاکتوباسیوس پلانتاروم*، برای درک تأثیر این دو بر سمیت و زنده مانی سلول‌ها، (۷۰ درصد) HU-02 و (۳۰ درصـد) hAMSCs را بر روی داربسـت چندلایه PU/PRGF/gelatin/PU و بـدون PRGF بـه‌صـورت PU/gelatin/PU کشـت داده و بررسـی شـد. نتایج آمون MTT نشان داد که بر خلاف داربست‌های بدون PRGF و بدون حضـور *لاکتوباسـیلوس پلانتاروم* که گاه زنده مانی کمتر از ۷۰ درصـد را تجربه کردند، داربسـت به همراه PRGF و *لاکتو باسـیلوس پلانتاروم* همپوشـانی ایده‌آلی دارند و بیش از ۷۰ درصـد باعث زنده‌مانی سـلول‌ها می‌شوند. وهابی و همکاران نیز با تست MTT نشان دادند کـه PRGF بـاعـث افزایش قـدرت تکثیر سـلول‌هـای فیبروبلاست HGF بیش از ۱۰۰ در صد در مدت سه روز آزمون شـد[۳۲]. پیران وهمکاران با انجام آزمون MTT به مدت ۹ روز روی داربسـت PLLA و TCPS نشـان دادند PRGF قدرت تکثیر فیبروبلاسـت‌ها را به‌صـورت قابل توجهی در گروه TCPS بالا می‌برد. اما این قدرت تکثیر بر روی داربست تا ۵ روز افزایشی می‌باشد وسپس تا نه روز کاهش می‌یابد[۳۳]. نتایج سـنجش MTT، تصـاویر SEM، و ارزیابی ضـدباکتریابی در شـرایط *in vitro* نشـان داد که الکتروریسـی PU/PRGF/gelatin/PU با سـلول‌های co-culture و *لاکتوباسیلوس پلانتاروم* ATCC 8014 داربست نانوفیبری یک بیوماتریکس مناسـب برای مهندسـی بافت پوسـت می‌باشـد. تا به امروز، جایگزین‌های پوسـتی در دسترس بالینی عمدتاً از مواد زیستی تشکیل شده است. همه این مواد محدودیت‌های خاص خود را دارند، که نیاز به جراحی دوم، خطر سـلول‌های باقیمانده از منابع آلوژن، انتقال بیماری‌های عفونی، برانگیختن پاسخ ایمنی، اسکار زخم‌های مرتبط و اغلب پر هزینه، را شـامل می‌شـود[۲]. بنـابراین، نتـایج مطـالعـات کنونی نقش موثر PRGF و *لاکتوبا سیلوس پلانتاروم* آزاد شده از نانو فیبر زیست‌فعال الکتروریسی شده را تاییدکرد و می‌تواند نقش بالفعل را در بهبود زخم در شرایط *in vivo* نیز نشان دهد.

۵- نتیجه‌گیری

در این مطالعه از پلاکت‌های غنی از فاکتورهای رشد و *لاکتو باسیلوس پلانتاروم* بر روی داربست چندلایه پلی‌اورتان در شرایط آزمایشگاهی *in vitro* استفاده شد که منجر به افزایش آب‌دوستی داربست در نتیجه افزایش تکثیر وچسبندگی سلول‌های co-culture و *لاکتوباسیلوس پلانتاروم* شد. همچنین، مقابله با باکتری‌های بیماری‌زا را در پی داشت. از آنجایی‌که، داربست‌های مختلفی در ترمیم زخم استفاده می‌شود، اما برای حمایت بهینه در تسریع بهبود زخم و جلوگیری از ایجاد عفونت و حتی درمان عفونت این دو عامل موثر در کنار هم گرداوری نشد. بنابراین، برای ایجاد پانسمان مناسب به کارگیری *لاکتو باسیلوس پلانتاروم* به همراه فاکتورهای رشد در استراتژی های مدیریت زخم در شرایط *in vivo*، به ویژه برای بیمارانی با زخم‌های پوستی مزمن، دیابتی و سوختگی می تواند بسیار موثر باشد.

تشکر و قدردانی

از دانشکده فناوری‌های نوین پزشکی دانشگاه شهید بهشتی برای حمایت و راهنمایی در انجام پژوهش حاضر قدردانی و تشکر می‌شود.

٦- منابع

[1] Esmaeili E, Eslami-Arshaghi T, Hosseinzadeh S, Elahirad E, Jamalpoor Z, Hatamie S, et al. The biomedical potential of cellulose acetate/polyurethane nanofibrous mats containing reduced graphene oxide/silver nanocomposites and curcumin: Antimicrobial performance and cutaneous wound healing. International journal of biological macromolecules. 2020;152:418-27.

[2] Sheikholeslam M, Wright ME, Cheng N, Oh HH, Wang Y, Datu AK, et al. Electrospun polyurethane–gelatin composite: a new tissue-engineered scaffold for application in skin regeneration and repair of complex wounds. ACS Biomaterials Science & Engineering. 2019;6(1):505-16.

[3] Salaran M, Oryan A, Nikahval B, Kamali A, Ghaemi M, Abbasi-Teshnizi F, et al. Topical application of Lactobacillus plantarum on burn wound healing in diabetic rats. Iranian Journal of Veterinary Surgery. 2019;14(1):60-72.

[4] Cinque B, La Torre C, Melchiorre E, Marchesani G, Zoccali G, Palumbo P, et al. Use of probiotics for dermal applications. Probiotics. 2011:221-41.

[5] Lash BW, Mysliwiec TH, Gourama H. Detection and partial characterization of a broad-range bacteriocin produced by Lactobacillus plantarum (ATCC 8014). Food Microbiology. 2005;22(2-3):199-204.

[6] Vinderola G, Perdigón G, Duarte J, Farnworth E, Matar C. Effects of the oral administration of the exopolysaccharide produced by Lactobacillus kefiranofaciens on the gut mucosal immunity. Cytokine. 2006;36(5-6):254-60.

[7] Chabot S, Yu H-L, De Léséleuc L, Cloutier D, Van Calsteren M-R, Lessard M, et al. Exopolysaccharides from Lactobacillus rhamnosus RW-9595M stimulate TNF, IL-6 and IL-12 in human and mouse cultured immunocompetent cells, and IFN-$\gamma $ in mouse splenocytes. Le Lait. 2001;81(6):683-97.

[8] Schiraldi C, Valli V, Molinaro A, Cartenì M, De Rosa M. Exopolysaccharides production in Lactobacillus bulgaricus and Lactobacillus casei exploiting microfiltration. Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology. 2006;33(5):384-90.

[9] Oda M, Hasegawa H, Komatsu S, Kambe M, Tsuchiya F. Anti-tumor Polysaccharide from Lactobacillussp. Agricultural and Biological Chemistry. 1983;47(7):1623-5.

[10] Piran M, Shiri M, Soufi Zomorrod M, Esmaeili E, Soufi Zomorrod M, Vazifeh Shiran N, et al. Electrospun triple-layered PLLA/gelatin. PRGF/PLLA scaffold induces fibroblast migration. Journal of cellular biochemistry. 2019;120(7):11441-53.

[11] Illescas-Montes R, Melguizo-Rodríguez L, García-Martínez O, de Luna-Bertos E, Manzano-Moreno FJ, Ruiz C, et al. Human fibroblast gene expression modulation using 940 NM diode laser. Scientific reports. 2019;9(1):1-7.

[12] Golchin A, Hosseinzadeh S, Jouybar A, Staji M, Soleimani M, Ardeshirylajimi A, et al. Wound healing improvement by curcumin-loaded electrospun nanofibers and BFP-MSCs as a bioactive dressing. Polymers for Advanced Technologies. 2020;31(7):1519-31.

[13] Heo DN, Yang DH, Lee JB, Bae MS, Kim JH, Moon SH, et al. Burn-wound healing effect of gelatin/polyurethane nanofiber scaffold containing silver-sulfadiazine. Journal of biomedical nanotechnology. 2013;9(3):511-5.

[14] Kim SE, Heo DN, Lee JB, Kim JR, Park SH, Jeon SH, et al. Electrospun gelatin/polyurethane blended nanofibers for wound healing. Biomedical Materials. 2009;4(4):044106.

[15] Guan J, Fujimoto KL, Sacks MS, Wagner WR. Preparation and characterization of highly porous, biodegradable polyurethane scaffolds for soft tissue applications. Biomaterials. 2005;26(18):3961-71.
[16] Anitua E, Tejero R, Zalduendo MM, Orive G. Plasma rich in growth factors promotes bone tissue regeneration by stimulating proliferation, migration, and autocrine secretion in primary human osteoblasts. Journal of Periodontology. 2013;84(8):1180-90.
[17] Eskandarinia A, Kefayat A, Agheb M, Rafienia M, Baghbadorani MA, Navid S, et al. A novel bilayer wound dressing composed of a dense polyurethane/propolis membrane and a biodegradable polycaprolactone/gelatin nanofibrous scaffold. Scientific reports. 2020;10(1):1-15.
[18] Safikhani MM, Zamanian A, Ghorbani F, Asefnejad A, Shahrezaee M. Bi-layered electrospun nanofibrous polyurethane-gelatin scaffold with targeted heparin release profiles for tissue engineering applications. Journal of Polymer Engineering. 2017;37(9):933-41.
[19] Jeong SI, Jun ID, Choi MJ, Nho YC, Lee YM, Shin H. Development of electroactive and elastic nanofibers that contain polyaniline and poly (L-lactide-co-ε-caprolactone) for the control of cell adhesion. Macromolecular bioscience. 2008;8(7):627-37.
[20] Costello CM, Sorna RM, Goh Y-L, Cengic I, Jain NK, March JC. 3-D intestinal scaffolds for evaluating the therapeutic potential of probiotics. Molecular pharmaceutics. 2014;11(7):2030-9.
[21] Duan H, Feng B, Guo X, Wang J, Zhao L, Zhou G, et al. Engineering of epidermis skin grafts using electrospun nanofibrous gelatin/polycaprolactone membranes. International journal of nanomedicine. 2013;8:2077.
[22] Diaz-Gomez L, Alvarez-Lorenzo C, Concheiro A, Silva M, Dominguez F, Sheikh FA, et al. Biodegradable electrospun nanofibers coated with platelet-rich plasma for cell adhesion and proliferation. Materials Science and Engineering: C. 2014;40:180-8.
[23] Hall MP, Band PA, Meislin RJ, Jazrawi LM, Cardone DA. Platelet-rich plasma: current concepts and application in sports medicine. JAAOS-Journal of the American Academy of Orthopaedic Surgeons. 2009;17(10):602-8.
[24] Asong J, Wolfert MA, Maiti KK, Miller D, Boons G-J. Binding and cellular activation studies reveal that Toll-like receptor 2 can differentially recognize peptidoglycan from Gram-positive and Gram-negative bacteria. Journal of Biological Chemistry. 2009;284(13):8643-53.
[25] Yuan T, Zhang C-Q, Tang M-J, Guo S-C, Zeng B-F. Autologous platelet-rich plasma enhances healing of chronic wounds. Wounds. 2009;21(10):280-5.
[26] Ranjbarvan P, Soleimani M, Samadi Kuchaksaraei A, Ai J, Faridi Majidi R, Verdi J. Skin regeneration stimulation: the role of PCL-platelet gel nanofibrous scaffold. Microscopy research and technique. 2017;80(5):495-503.
[27] Ming L, Zhang Q, Le Yang J-AH. Comparison of antibacterial effects between antimicrobial peptide and bacteriocins isolated from Lactobacillus plantarum on three common pathogenic bacteria. International journal of clinical and experimental medicine. 2015;8(4):5806.
[28] Dalcanton F, Carrasco E, Pérez-Rodríguez F, Posada-Izquierdo GD, Falcão de Aragão GM, García-Gimeno RM. Modeling the combined effects of temperature, pH, and sodium chloride and sodium lactate concentrations on the growth rate of Lactobacillus plantarum ATCC 8014. Journal of Food Quality. 2018;2018.
[29] Schiraldi C, Valli V, Molinaro A, Carteni M, De Rosa M. Exopolysaccharides production in Lactobacillus bulgaricus and Lactobacillus casei exploiting microfiltration. Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology. 2006;33(5):384-90.
[30] Nasrabadi MH, Aboutalebi H, Ebrahimi MT, Zahedi F. The healing effect of Lactobacillus plantarum isolated from Iranian traditional cheese on gastric ulcer in rats. African Journal of Pharmacy and Pharmacology. 2011;5(12):1446-51.
[31] González A, Sabio L, Hurtado C, Ramírez-Rodríguez GB, Bansal V, Delgado-López JM, et al. Entrapping Living Probiotics into Collagen Scaffolds: A New Class of Biomaterials for Antibiotic-Free Therapy of Bacterial Vaginosis. Advanced Materials Technologies. 2020;5(7):2000137.
[32] Vahabi S, Vaziri S, Torshabi M, Esfahrood ZR. Effects of plasma rich in growth factors and platelet-rich fibrin on proliferation and viability of human gingival fibroblasts. Journal of dentistry (Tehran, Iran). 2015;12(7):504.
[33] M, Vakilian S, Piran M, Mohammadi-Sangcheshmeh A, Hosseinzadeh S, Ardeshirylajimi A. In vitro fibroblast migration by sustained release of PDGF-BB loaded in chitosan nanoparticles incorporated in electrospun nanofibers for wound dressing applications. Artificial cells, nanomedicine, and biotechnology. 2018;46(sup1):511-20.

The culture of *Lactobacillus plantarum* on multi-layered bioactive scaffold containing platelet rich growth factors

Lida Shahghasempour[1], Simzar Hosseinzadeh[2*], Azam Haddadi[3*], Mahboubeh Kabiri[4]

1. PhD student, Department of Microbiology, Karaj Branch, Islamic Azad University, Karaj, Iran
2. PhD, Department of Tissue Engineering and Applied Cell Sciences, School of Advanced Technologies in Medicine, Shahid Beheshti University of Medical Sciences, Tehran, Iran
3. PhD, Department of Microbiology, Karaj Branch, Islamic Azad University, Karaj, Iran
4. PhD, Department of Biotechnology, College of Science, University of Tehran, Tehran, Iran

s.hosseinzadeh@sbmu.ac.ir, Haddadi@Kiau.ac.ir

Receipt: 2022/04/25 Accepted: 2022/06/29

Abstract

Wound healing and skin remodeling occur directly after skin damage, so the use of platelet rich growth factors (PRGF) and probiotics is important to accelerate this process because of their positive effects on wound healing and antibacterial activities. The combination of above biomaterials with tissue engineering techniques led to the production of a new wound dressing. Therefore, in this study, PRGF was obtained from platelet-rich plasma and a multi-layered scaffold was fabricated by electerospining method using polyurethane (PU) fibers, PRGF and gelatin fibers. Scanning electron microscopy (SEM), tensile and water contact angle tests were performed to assess the characteristics of the scaffolds. The human Adipose Mesenchymal Stem Cells (hAMSCs) were extracted and cultured with the fibroblast cells (HU-02) as co-culture cells and *Lactobacillus plantarum* was cultured on scaffolds with or without PRGF to evaluate cell viability, toxicity and proliferation, then antibacterial activities of *L.plantarum* were examined. The result of MTT assay after 14 days indicated that PRFG and *L.plantarum* had significant positive effect on viability and proliferation of co-culture cells. SEM photograph illustrated adhesion and proliferation of cells and bacteria on scaffolds up to 21 days. The Agar-well diffusion test confirmed the antibacterial effect of *L.plantarum* on *Pseudomonas aeruginosa, Salmonella typhimurium, Staphylococcus aureus,* and *Escherichia coli* with strong inhibition zone. The current multi-layered scaffold provides the appropriate wound dressing for cell adhesion, proliferation and prevents wound infection.

Key words: Multi-layered poly urethane scaffold, *Lactobacillus plantarum*, PRGF, Wound healing.