

کشت لاکتوباسیلوس پلانتاروم بر روی داربست چندلایه زیست فعال

حاوی پلاکت غنی از فاکتورهای رشد

لیدا شاه قاسم پور^۱، سیم زر حسین زاده^{۲*}، اعظم حدادی^{۳*}، محبوبه کبیری^۴

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

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

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

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

*صندوق پستی ۱۹۸۳۹۶۴۱۱، تهران، ایران-۳۱۴۹۹۶۸۱۱۱، کرج، ایران

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

پذیرش: ۱۴۰۱/۰۴/۰۸

دریافت: ۱۴۰۱/۰۲/۰۵

چکیده

بهبود زخم و بازسازی پوست پس از آسیب های پوستی رخ می دهد. بنابراین، برای تسریع این فرایند استفاده از پلاکت های غنی از فاکتورهای رشد (PRGF) و پروبیوتیک ها به دلیل عملکرد مثبت در ترمیم زخم و فعالیت ضدباکتری آنها دارای اهمیت می باشد. ترکیب این عوامل زیستی با روش های مهندسی بافت منجر به تولید پانسمان زخم جدیدی شده است. بنابراین، در این مطالعه، PRGF از پلاسمای غنی از پلاکت به دست آمد و سپس یک داربست چند لایه روی هم با استفاده از فیبر پلی اورتان (PU)، PRGF و فیبر ژلاتین به روش الکتروریسی ساخته شد. تست های میکرو سکوپ الکترونی روبشی (SEM)، کشش و زاویه تماس با آب برای ارزیابی ویژگی های داربست ها انجام شد. ابتدا، سلول های بنیادی مزانشیمی از چربی انسان (hAMSCs) استخراج شدند. سپس، برای ارزیابی زنده ماندن، سمیت و تکثیر سلول ها، این سلول ها به همراه سلول های فیبروبلاست (HU-02) به عنوان سلول های کشت هم زمان با لاکتوباسیلوس پلانتاروم (*L.plantarum*) روی داربست ها با یا بدون حضور PRGF کشت داده شدند. سرانجام فعالیت ضد باکتریایی *L.plantarum* بررسی شد. نتایج آزمون MTT بعد از ۱۴ روز نشان داد که PRGF و *L.plantarum* اثر مثبت معنی داری بر زنده ماندن و تکثیر سلول های co-culture داشتند. عکس های SEM چسبندگی و تکثیر سلول ها و باکتری ها را روی داربست ها تا ۲۱ روز نشان داد. تست انتشار- آگار تاثیر ضدباکتریایی *L.plantarum* را با ایجاد هاله عدم رشد به ترتیب در باکتری های سودوموناس آئروجینوزا، سالمونلا تیفی موریوم، استافیلوکوکوس اورئوس و / شریشیا کلی تایید کرد. داربست چند لایه ای فعلی پانسمان زخم مناسب برای اتصال، تکثیر سلولی می باشد و از عفونت زخم جلوگیری می کند.

کلید واژگان: داربست چند لایه ای پلی اورتان، 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 به طور مستقیم با ترمیم زخم و بازسازی پوست در ارتباط است [۲]. به طور معمول ترمیم یک فرایند پیچیده ای از جمله التهاب، تکثیر سلولی و بازسازی بافت می باشد که توسط زنجیره ای از واسطه های التهابی، شامل سایتوکاین ها و فاکتورهای رشد هدایت می شود [۳]. تحقیقات تجربی و بالینی به طور گسترده نشان می دهد که فراتر از ظرفیت پروبیوتیک ها که بر عملکرد روده تأثیر مثبت می گذارند، آنها می توانند به لطف خواص منحصر به فرد خود، تاثیراتی را بر روی پوست اعمال کنند [۴]. تحقیقات گسترده ای در مورد تأثیر مهارى و خواص پروبیوتیکی لاکتوباسیلوس پلانناروم (*L. plantarum*) به وجود آمده است. Lash و همکاران دریافتند که *L. plantarum* ATCC 8014 یک اثر بازدارنده بر طیف وسیعی از باکتری های گرم منفی و گرم مثبت دارد و نشان دادند که باکتریوسین ها به عنوان ترکیبات موثر برای چنین محدودیتی است [۵]. با این حال *L. plantarum* ATCC 8014 به شدت به عنوان باکتری پروبیوتیک بالقوه باقی مانده است. علاوه بر متابولیت های ثانویه، این باکتری ها پپتیدها و پلی ساکاریدهای خارج سلولی اگزوپلی ساکاریدها (EPS) را نیز تولید می کنند [۶]. مطالعات، اتصال باکتری ها 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 [۷-۹]. عامل دیگری که روند بهبود زخم را تسریع می کند پلاکت های غنی از فاکتورهای رشد (PRGF) می باشد که به پلاسمایی با غلظت پلاکت های بیشتر از سطح پایه گفته می شود. با فعال

شدن PRGF، فیبرین ها و پلاکت ها لخته ایجاد می کنند که منجر به آزاد شدن بسیاری از فاکتورهای رشد می شود. فاکتورهای رشد مشتق از پلاکت (PDGF)، فاکتورهای رشد تبدیل کننده (TGF)، فاکتورهای رشد اندوتلیال عروقی (VEGF)، فاکتورهای رشد اپیتلیال (EGF) و غیره که وارد پلاسمای لخته شده می شوند، از جمله این فاکتورها هستند. این فاکتورهای رشد عمدتاً با افزایش میزان میتوز و رگ زایی بر بهبود زخم تأثیر می گذارند. از سوی دیگر، پیشنهاد می شود که استفاده از PRGF می تواند سرعت تکثیر سلول های فیروبلست را تسریع کند [۱۰]. فیروبلست ها، سلول های عمده در درم هستند. مهاجرت فیروبلست ها به ناحیه زخم پدیده مهمی در روند بهبود زخم است که به بلوغ و رفع گرانولاسیون بافت کمک می کند. مهاجرت سلول به نواحی زخم توسط فاکتورهای رشد و سایتوکاین های زیاد موجود در سرم القا می شود که از پلاکت های در حال دگرانوله آزاد می شوند [۱۱]. در حال حاضر، درمان با سلول های بنیادی مزانشیمی MSCs، به عنوان بخشی از زیرمجموعه پزشکی بازساختی^۱ (RG)، به یک رویکرد درمانی امیدوارکننده تبدیل شده است و در درمان بیماری های پوستی نقش دارد [۱۲]. بنابراین، روند بهبود زخم از طریق همکاری انواع مختلف سلول ها، باکترهای پروبیوتیک و فاکتورهای رشد ارتقا می یابد. تحویل این عوامل به یک مکان خاص در فرایند ترمیم زخم از اهمیت حیاتی برخوردار است. با توجه به خصوصیات ماتریکس خارج سلولی (ECM) در مقیاس نانو، برای چنین تجربیاتی در *in vitro* الکتروریسی با مواد نانوفیبرانتخاب امیدوارکننده ای می باشد [۱۰]. بنابراین، پلی اورتان (PU) با وجود خواص شیمی و خواص فیزیکی انعطاف پذیر، این پلیمر را از سایرین متمایز می کند که می تواند داربست های فیبری با ضخامت کنترل شده، منافذ بسیار به هم پیوسته، مساحت سطح بالا تولید کند و مانع

^۱ Regenerative medicine

خوبی برای محافظت از زخم در برابر عفونت و از دست دادن آب باشد [۱۲-۱۴]. به دلیل خاصیت آب گریزی و تجزیه ناپذیری، PU معمولاً با ژلاتین استفاده می‌شود که شکل دنا توره شده کلاژن است. بنابراین، پتانسیل آنتی ژنی 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 به صورت (PU/PRGF/gelatin/PU) و بدون PRGF به صورت (PU/gelatin/PU) ساخته شد. سپس، سلول‌های فیروپلاست (HU-02) و سلول‌های بنیادی مزانشیمی انسانی مشتق از چربی (hAMSCs) و نیز *L.plantarum* در لایه بالایی داربست کشت داده شدند.

۲- مواد و روش‌ها

۲-۱ سلول‌ها

فیروپلاست 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 آبدومینال انسان استخراج شد. سلول‌های باکتری از مرکز کلکسیون میکروارگانیسم‌های صنعتی ایران PTCC خریداری شد.

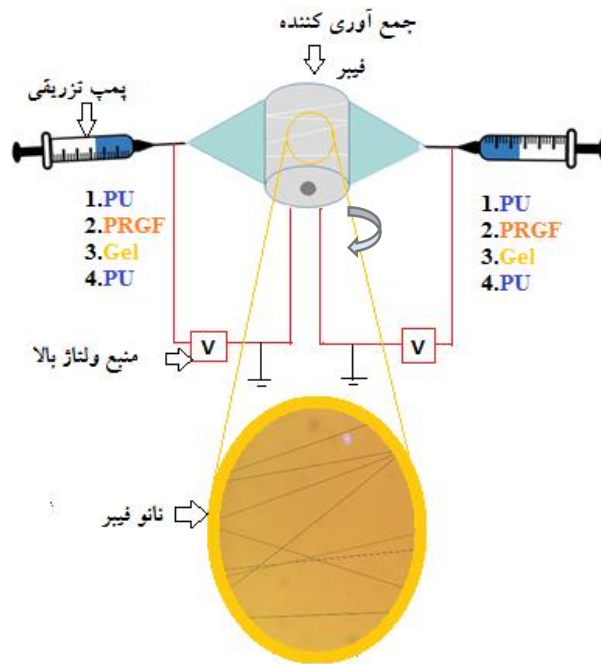
۲-۲ تهیه PRGF

برای آماده سازی پلازما، 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 $580 \times g$ به مدت ۸ دقیقه در دمای اتاق، سلول‌های خون طبق شیب چگالی طبقه‌بندی شدند. بخش زیرین گلبول‌های قرمز و بخش

بالایی پلاکت‌ها را در برمی‌گیرد. هر دو بخش با کمک پوشش سفیدی با نام buffy coat، که از لکوسیت‌ها تشکیل شده است، جدا می‌شوند. پلازما از یک میلی لیتر بالاتر از buffy coat جمع‌آوری شد. در این مورد، باید مراقب بود که پلازما با buffy coat حاوی لکوسیت مخلوط نشود. پلازما با فعال کننده PRGF، محلول کلرید کلسیم ۱۰ درصد (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 $3000 \times g$ به مدت ۱۵ دقیقه در دمای ۴ 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 [۱۶].

۲-۳ ساخت داربست

دانه‌های پلیمری PU در مخلوطی از حلال‌های 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) ۴۰ درصد وزنی/حجمی تهیه شد. این ترکیبات به مدت دو الی چهار ساعت در دمای اتاق با ۲۰۰ دور بر دقیقه به صورت مجزا مخلوط شدند تا یک محلول همگن به دست آمد. داربست الکتروریسی چندلایه شامل فیبر PU (لایه اول) و الکترواسپری PRGF (لایه دوم) سپس فیبر ژلاتین (لایه سوم) و در نهایت لایه PU (لایه خارجی) با استفاده از دستگاه الکتروریسی (شرکت نانواژما، ایران) تهیه شد (شکل ۱). در این مطالعه این داربست چهار لایه PU/PRGF/gelatin/PU که در آن لایه‌ها در فواصل زمانی مشخص از یکدیگر و به دنبال هم ساخته شدند، به عنوان داربست مثبت (PRGF+) بررسی شدند.



شکل ۱ نحوه و ترتیب الکترورسی فیبرها

۲-۴ اندازه گیری زاویه تماس

رطوبت پذیری سطح داربست های جمع آوری شده از گروه مثبت (PRGF+) و گروه منفی (PRGF-) از طریق اندازه گیری زاویه تماس ارزیابی شد. زاویه تماس آب با استفاده از روش sessile drop با Data physics OCA plus 15 در دمای اتاق با یک قطره آب (۴ میکرولیتر) بر روی سطح داربست ها اندازه گیری شد و زاویه تماس پس از ۰، ۱۰ و ۳۰ ثانیه بررسی شد [۱۷] و زاویه ها با استفاده از نرم افزار ImageJ اندازه گیری شد. در هر بستر سه بار اندازه گیری انجام شد.

مشاهدات مورفولوژیکی با SEM (میکروسکوپ الکترونی روبشی)

گروه های داربستی (+/-) PRGF مثبت، منفی به همراه سلول ها و باکتری های کشت داده شده روی آنها، در محلول تثبیت کننده حاوی ۲/۵ درصد گلو تار آل دئید محلول در بافر فسفات سالین (PBS) به مدت ۴۵ دقیقه غوطه ور شدند. پس از شستشو در PBS (1x) نمونه ها به مدت ۱۵

محلول های PU، PRGF و ژلاتین تهیه شده در سرنگ های پلاستیکی با سوزن های سر صاف استیل ضد زنگ به طور جداگانه و در مقابل یکدیگر، تحویل پمپ های تزریقی داده شدند که سرعت تزریق به ترتیب ۰/۵، ۰/۱ و ۰/۳ میلی لیتر در ساعت تنظیم شد. نوک سوزن سرنگ ها به یک منبع تغذیه با ولتاژ بالا ۱۴، ۱۸ و ۱۸ کیلوولت به ترتیب برای PU، PRGF و ژلاتین متصل شد. نانو فیبر از طریق یک درام چرخان با سرعت چرخش ۲۵۰ دور در دقیقه و با اسکن ۳ سانتی متری جمع آوری شدند به این ترتیب الکترورسی داربست ها در ۴ مرحله انجام شد. پس از جمع آوری، داربست ها 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 می باشد (PRGF-). در نهایت دو گروه داربست با اتانول ۷۰ درصد و با تابش UV به مدت ۲۰ دقیقه برای انجام بررسی ها و تست ها استریل شدند.

دقیقه در اتانول ۵۰ در صد، ۱۵ دقیقه در اتانول ۶۰ 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 در صد انکوبه شدند. نمونه‌های اشباع شده با اتانول در دمای اتاق خشک شدند. نمونه‌های خشک شده در خلاء (۴۵ میلی آمپر) با طلا (۳۰ نانیه، 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 میلی متر بر دقیقه استفاده شد. غشاهای داربست برای آزمایش‌های کششی به نوارهایی (۳۰ × ۵ میلی متر) 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 (m²) می‌باشند.

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

L₀ اندازه اولیه نمونه و L نمداد 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 به دست آمد [۱۹].

۲-۶ 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 کلاژناز (Sigma-I Aldrich) به غلظت ۱/۱۰ درصد تهیه و فیلتر شد. ۵ میلی لیتر آنزیم به ۳۰ میلی لیتر 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 ۲۰۰۰ × g 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 ۱۰ درصد FBS (Biosera) به همراه محیط کشت سلولی اضافه شد و پیپتاژ شد. سپس، با دور ۲۰۰۰ × g به مدت ۵ دقیقه سانتریفیوژ شد. محیط کشت سلولی خارج شد و ۱ میلی لیتر محیط کشت تازه اضافه شد و در نهایت سلول‌ها به فلاسک منتقل شد.

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

سلول‌های فیروبلاست طبیعی نوزاد انسانی (HU-02) و سلول‌های بنیادی مزانشیمی مشتق از چربی انسانی (hAMSCs) در فلاسک کشت سلول ۲۵ سانتی متر مربع حاوی محیط کشت سلولی (DMEM/F12 (BIO-IDEA) به همراه آنتی بیوتیک ۱ در صد (Pen/Step (Biosera) و سرم جنین گاوی ۱۰ درصد (FBS (Biosera) در دمای ۳۷ سلسیوس و دی اکسید کربن ۵ درصد کشت داده شدند. محیط کشت هر ۲ روز یکبار تعویض شد. سلول‌های فیروبلاست با استفاده از (1×) Trypsin-EDTA (BIO-IDEA) ۰/۲۵ در صد جدا شدند و به وسیله محیط کشت سلولی و ۱۰ در صد FBS، آنزیم غیر فعال شد. سلول‌ها بعد از ۲-۴ پاساژ برای انجام تست‌ها استفاده شدند. پس از تهیه داربست‌های نانوفیبری، سلول‌های فیروبلاست ۷۰ درصد و hAMSCs ۳۰ درصد (۱۲×۱۰^۳ سلول co-culture) جدا شدند که روی داربست‌های

PU/gelatin/PU (گروه مثبت) و PU/PRGF/gelatin/PU (گروه منفی) و گروه TCPS (گروه کنترل) برای بررسی زیست سازگاری داربست‌ها با ارزیابی تکثیر سلولی ۱،۳،۷ تا ۱۴ روز کشت داده شدند. دو داربست نانوفیبری تهیه شده با یک گروه سلولی و TCPS توسط رنگ MTT (۳- [۵،۴-دی متیل تیازول]-۵،۲-دی فنیل تترازولیوم برومید) 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 الایزایدر BioTek خوانده شد. نتایج به صورت درصدی از مقادیر به دست آمده در کشت گروه کنترل و گروه‌های مورد آزمون بیان شدند. فرمول درصد زنده‌مانی سلول‌ها:

$$100 \times \frac{\text{متوسط جذب نمونه‌های کنترل}}{\text{متوسط جذب نمونه‌های مورد آزمون}} : \text{درصد سلول‌های زنده}$$

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 محیط کشت Condalab- TSB (Tyryptic soybean Broth) و باکتری لاکتوباسیلوس پلانتاروم (ATCC 8014) در محیط کشت MRS (Man, Rogosa & Sharpe Broth) Ibroresco در دمای ۳۷ سلسیوس به مدت ۱۶ 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 محیط کشت تازه به مدت ۱/۵ ساعت مجدداً انکوبه شد تا به فاز رشد لگاریتمی برسد.

سپس، باکتری‌ها با غلظت نهایی ۰/۵ مک فارلند در مخلوط یکنواخت محیط کشت باکتریایی و محیط کشت 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 مجدداً ۳۰۰ میکرو لیتر محیط کشت باکتریایی و DMEM/F12 (بدون آنتی‌بیوتیک) در چاهک‌ها ریخته شد. برای انجام تست زیست سازگاری MTT (به مدت ۷،۳،۱ و ۱۴ 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 محیط کشت TSB تهیه شد. با گذراندن دوره انکوباسیون در دمای ۳۷ سلسیوس و پس از ۱۶ ساعت، رقت سریالی (۰/۵ مک فارلند) از نمونه‌ها تهیه شد و ۱۰۰ میکرولیتر از آنها در ۰/۸ درصد TSA مخلوط شد و سپس بر روی محیط کشت 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 محیط کشت جذب شوند. سپس، پلیت به انکوباتور ۳۷

کشت لاکتوباسیلوس ... شاه قاسمپور و کلانتری

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.

۲-۳ 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 (شکل ۳). پس از ۳۰ ثانیه، زاویه تماس PRGF+ و PRGF- به ترتیب به ۵۵/۳۶ و ۴۶/۷۱ درجه شد. آزمایش رطوبت پذیری نشان داد که آب دوستی سطوح داربست پس از پوشش با PRGF گسترش می یابد. همچنین، نتایج نشان داد، اسپری PRGF بر روی PU مانند الکتروریسی ژلاتین روی داربست PU، به ماهیت مرطوب کنندگی این پلیمر کمک می کند.

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

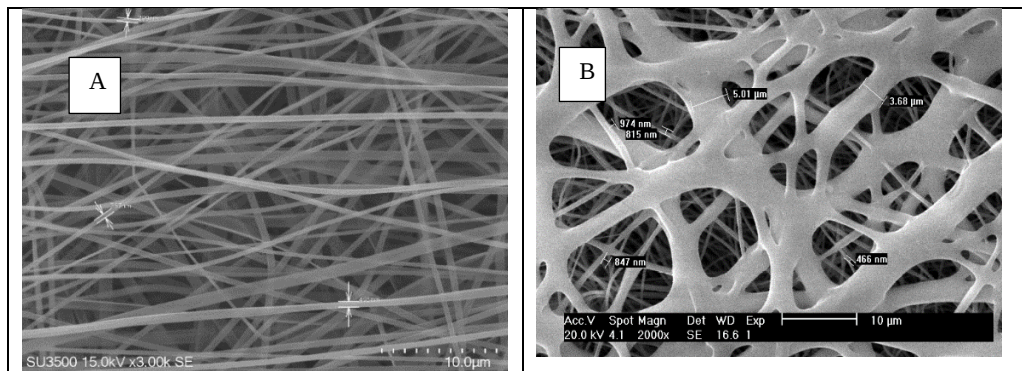
۱۱-۲ تحلیل آماری داده ها

داده های به دست آمده با میانگین انحراف از معیار گزارش شد و با استفاده از Student's t-test مقایسه شدند. گروه TCPS به عنوان گروه کنترل و ۲ گروه داربست چندلایه نانوفیبری PU/PRGF/gelatin/PU (PRGF+) و PU/gelatin/PU (PRGF-) به عنوان گروه های آزمایش بررسی شدند. مقادیر p value ($p < 0.05$) از نظر آماری معنی دار در نظر گرفته شد.

۳- نتایج

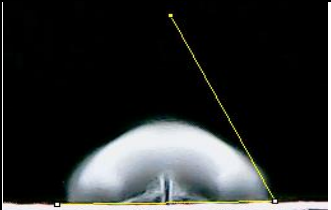
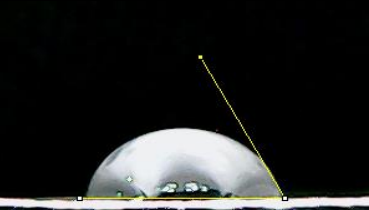
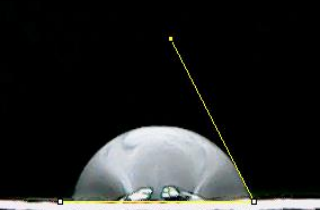
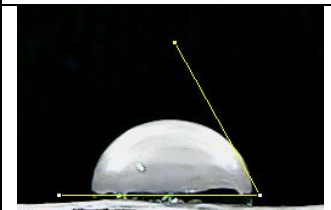
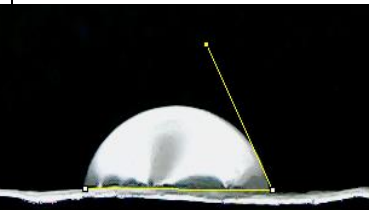
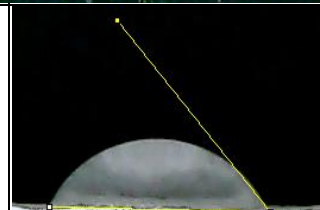
۱-۳ بررسی SEM داربست نانوفیبر تولید شده تو سط فرایند الکتروریسی

شکل ۲ تصاویر SEM داربست های چند لایه ای PU/gelatin/PU را پیش از کاشت سلول ها توصیف می کند. اندازه فیبر های ژلاتین بین ۲۰۰ تا ۵۰۰ نانومتر و



شکل ۲ میکروگراف های SEM از داربست های نانو فیبر PU قبل از کاشت سلولی (A) فیبر ژلاتین؛ (B) فیبر ژلاتین در زیر و فیبر PU 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 داربست ها نیز با توجه به آبدوستی سطح آنها افزایش می یابد. از این دیدگاه، اندازه گیری ها نشان می دهند که هر یک از داربست های نانو فیبر PRGF+ و PRGF- برای تحقیقات در حوضه مهندسی بافت جزء بهترین ها هستند.

۰ ثانیه	۱۰ ثانیه	۳۰ ثانیه	
			PRG F-
CA=65.64 deg	CA=61.83 deg	CA=55.36 deg	
			PRG F+
CA=68.4 deg	CA=62.85 deg	CA=46.71 deg	

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

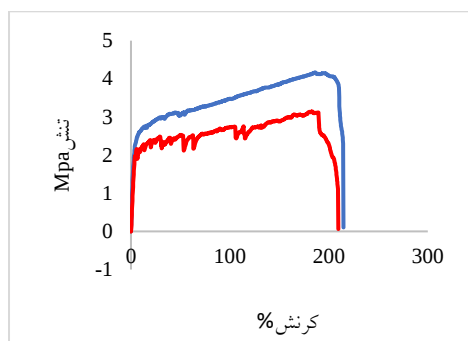
۳-۳ مشخصات مکانیکی داربست الکترورسی شده

PRGF+ و PRGF-

غشاهای نانوفیبری داربست PRGF+ و PRGF- منحنی کرنش-تنش غیرخطی نرمال را تأیید کردند (شکل ۴). غشاهای نانوفیبری PRGF+ و PRGF- از نظر استحکام مکانیکی به طور قابل توجهی از یکدیگر متفاوت نیستند (جدول ۱). بیشینه استحکام کششی گروه + و - PRGF به ترتیب ۴/۱ و ۳/۱ میلی پاسکال می باشد و بیشینه درصد کرنش نیز ۲۱۴ درصد و ۲۰۹ درصد می باشد. بنابراین، اختلاف معناداری بین گروه های داربستی مورد مطالعه مشاهده نشد، اما خواص مکانیکی غشاهای نانوفیبری +

PRGF- و PRGF+ را با تنش و کرنش کششی تأیید می

کند.



شکل ۴ پاسخ تنش-کرنش نانو فیبرالکترورسی شده. (A) آبی:

PRGF+ (B) قرمز: PRGF-

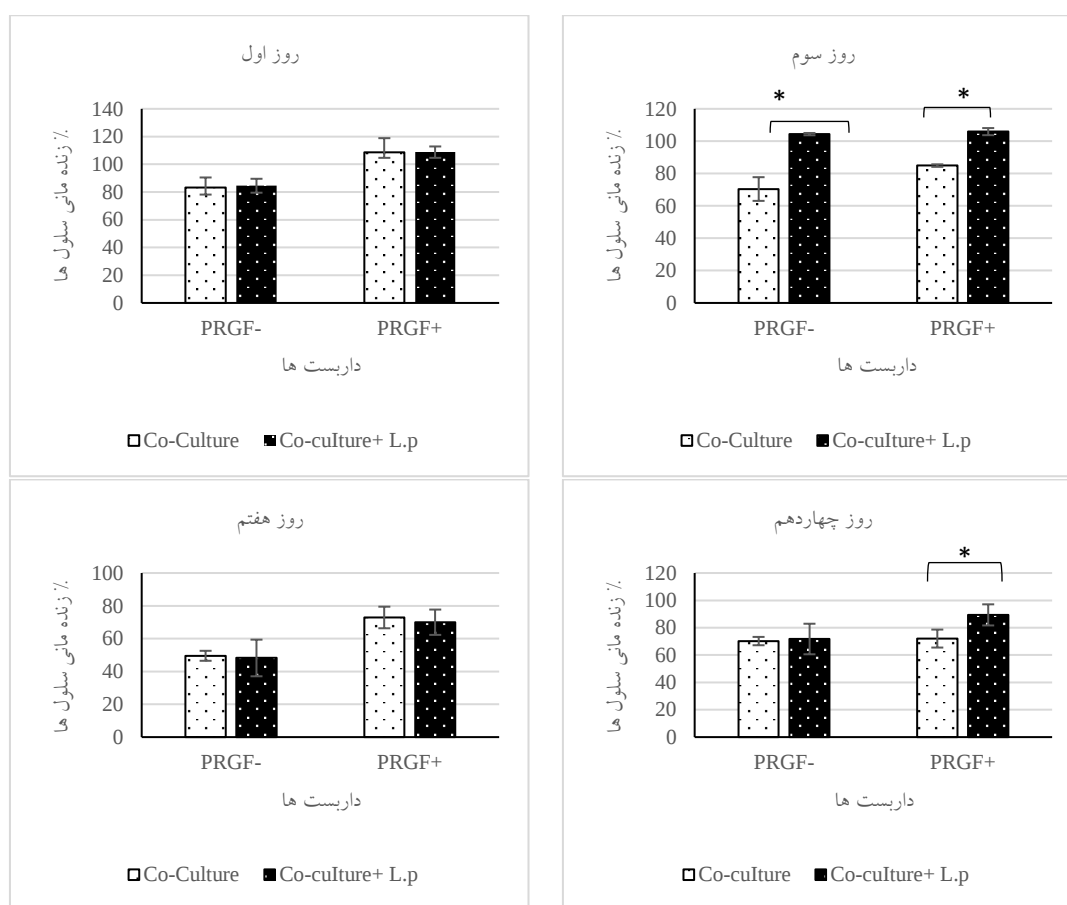
جدول ۱ پاسخ تنش-کرنش نانو فیبرالکترورسی داربست های PRGF+ و PRGF-

داربست ها	استحکام کششی (MPa)	کرنش %	مدول یانگ (MPa)
PRGF-	۳/۱	۲۰۹	۰/۳
PRGF+	۴/۱	۲۱۴	۰/۷

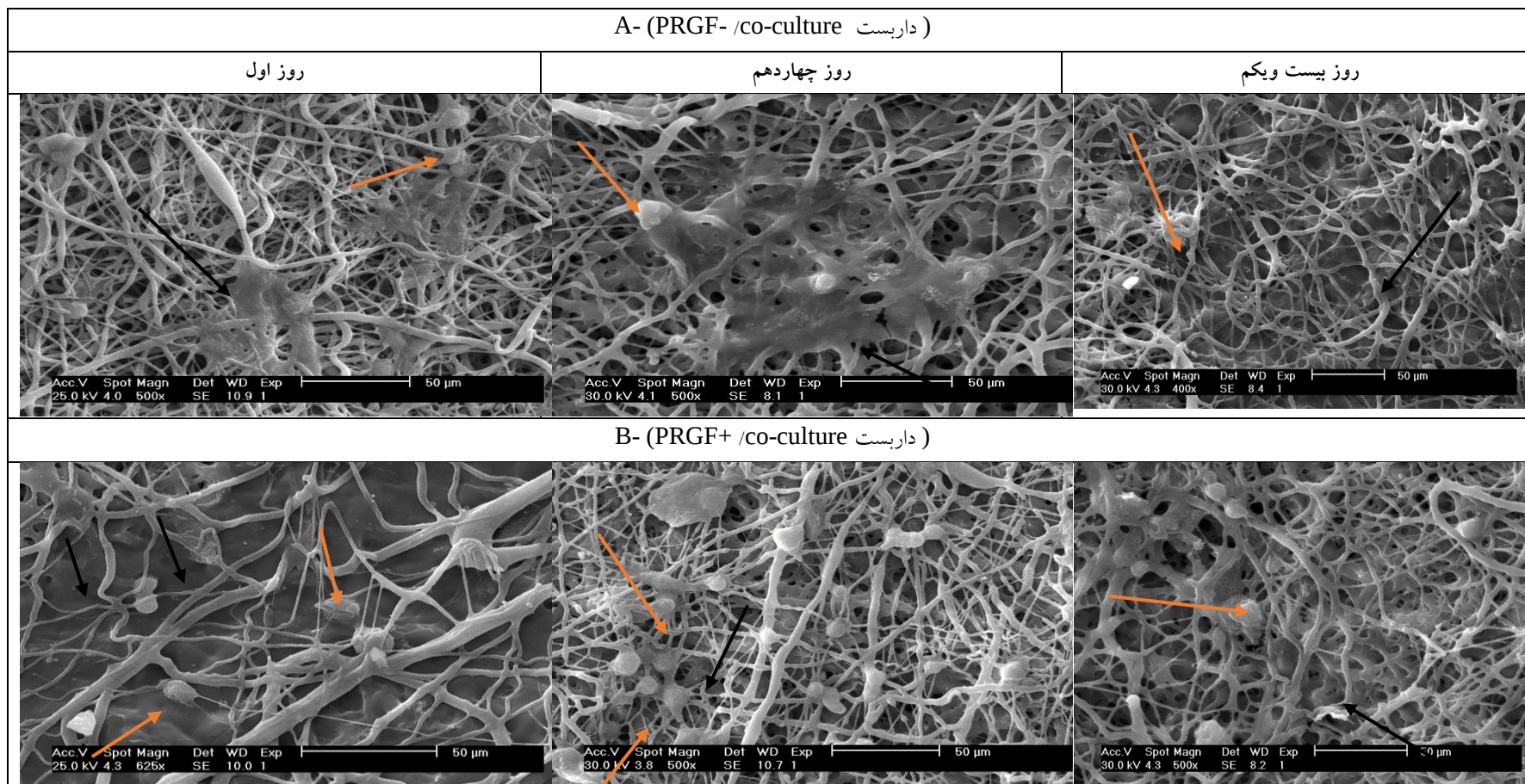
۳-۴ ارزیابی حیات و تکثیر سلولی (تست MTT)

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 پلانتروم (*L.p*) بررسی شد. TCPS به عنوان گروه کنترل و داربست‌های PRGF+ و PRGF- به عنوان گروه‌های آزمایشی با استفاده از روش MTT برای درک زیست سازگاری داربست‌ها به مدت ۱، ۳، ۷ و ۱۴ روز بررسی شدند. همانطور که در شکل ۵ نشان داده شده است، زنده ماندن و چسبندگی سلولی روی داربست‌های PRGF+ مقایسه با نمونه داربست‌های PRGF- در روزهای اول، سوم، هفتم و چهاردهم به طور قابل توجهی افزایش یافته

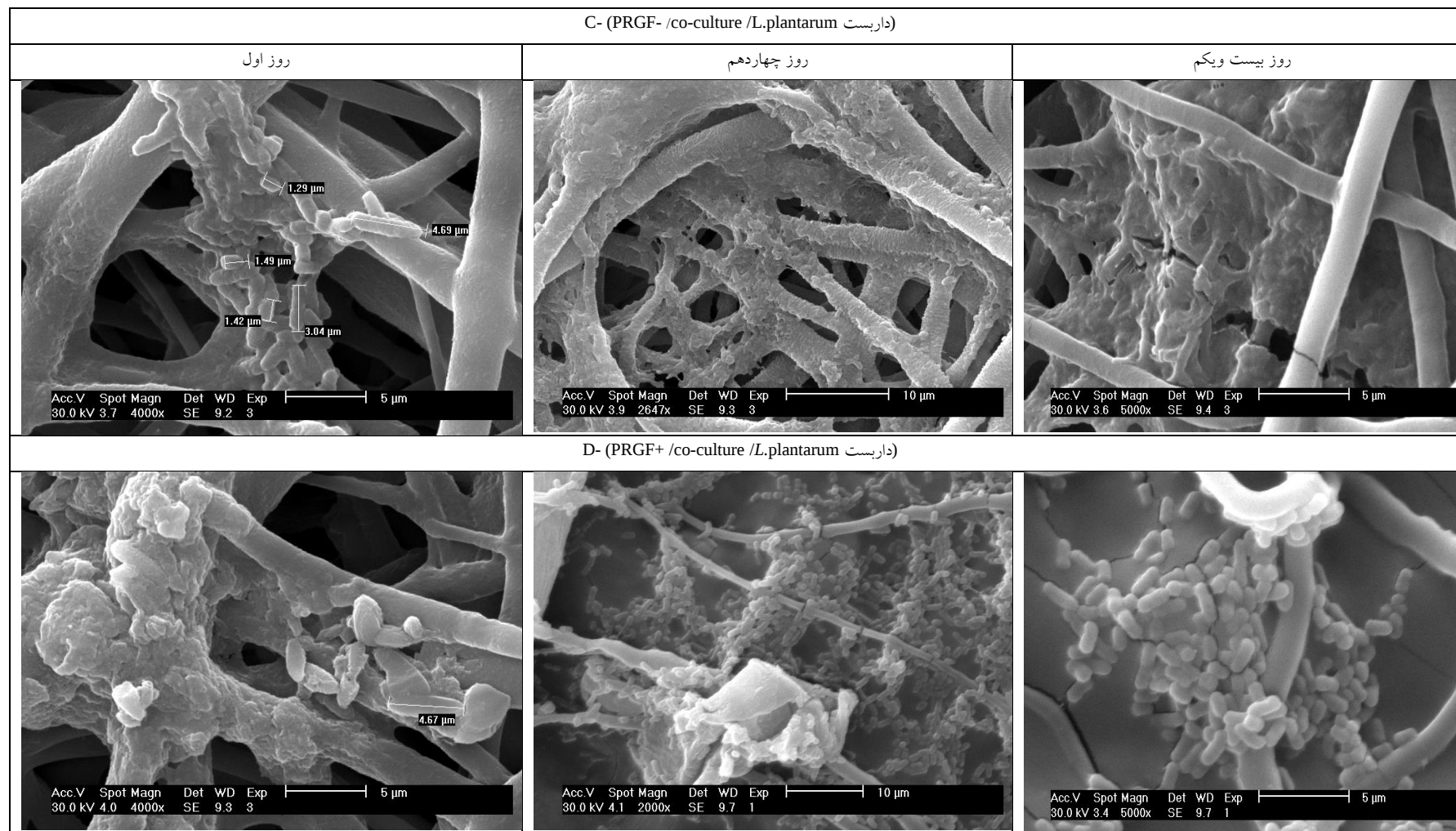
است ($p < 0.05$). با این حال، در روز سوم کشت، تکثیر co-culture روی هر دو داربست PRGF+ و PRGF- با حضور *L.p* در مقایسه با داربست‌های بدون *L.p* افزایش معنی‌داری تا ۱۰۵ درصد داشت ($p < 0.05$)، اما در روز هفتم از کشت، تکثیر co-culture روی PRGF+ با حضور *L.p* ۷۰ درصد افزایش معنی‌داری در مقایسه با PRGF+ بدون حضور *L.p* (با تکثیر ۷۰ درصد) نداشت. همچنین، باکتری‌ها تأثیر مثبت معنی‌داری بر تکثیر co-culture در روز ۱۴ پس از کشت در گروه PRGF+ با قدرت تکثیر ۹۰ درصد داشتند ($p < 0.05$). در مجموع فاکتورهای PRGF و باکتری لاکتوباسیلوس پلانتروم بر روی زنده ماندن سلول‌ها (بیش از ۷۰ درصد) و سرعت تکثیر اثر هم‌افزایی داشتند.



شکل ۵ فعالیت میتوکندریایی سلول‌های co-culture بر روی داربست چندلایه PRGF-، PRGF+ با و بدون حضور *Lactobacillus plantarum*. * ($p < 0.05$)



شکل A-B. میکروگراف های SEM از داربست نانو فیبرچند لایه ای پس از کشت سلول co-culture روی داربست های PRGF-، PRGF+ در روز اول، چهاردهم و بیست و یکم. فلش نارنجی رنگ نمایانگر سلول های دوکی شکل فیبروبلاست می باشد و فلش سیاه رنگ نمایانگر سلول های پهن شده مزانشیم که در لایه های عمیق تری از داربست نفوذ کرده است.



شکل D-6C. میکروگراف‌های SEM از داربست نانو فیبرچند لایه‌ای پس از کشت سلولی روی داربست‌های +PRGF با حضور لاکتوباسیلوس پلاتناروم در روزهای اول، چهاردهم و بیست و یکم.

۳-۵ آزمون SEM (سلول‌های کاشته شده روی

داربست)

شکل ۶ (A-B) تصاویر SEM مورفولوژی سلول‌های co-culture کشت شده بر روی سطح غشای نانوفیبری PRGF+ و PRGF- و با حضور *L. plantarum* در شکل ۶ (C-D) در روزهای اول، چهاردهم و بیست و یکم را توصیف می‌کند. تصاویر SEM نشان داد که تعداد سلول‌های co-culture بعد از 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 می‌شود این داربست‌ها انتخاب مناسبی برای آزمایش *in*

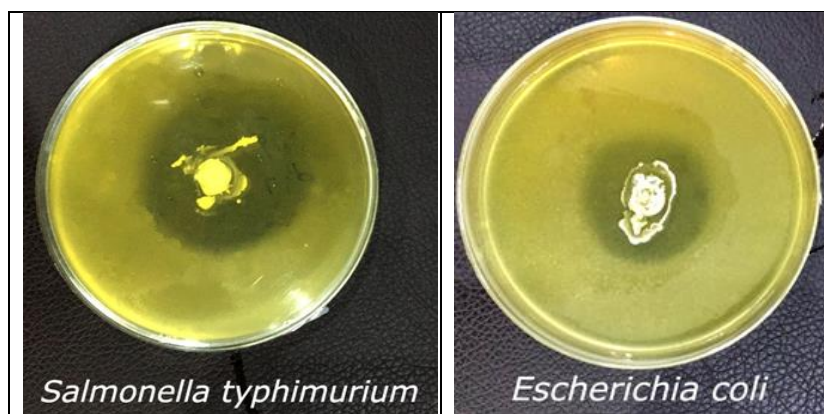
vivo و تحقیقات بیشتر در مهندسی بافت باشند. نتایج MTT و تصاویر SEM همچنین نشان دادند که داربست‌های PRGF+ بسترهای مناسب‌تری نسبت به غشای نانوفیبری PRGF- در مورد اتصال و تکثیر سلولی هستند. با توجه به نتایج SEM، باکتری‌ها پس از ۲۱ روز روی هر دو داربست PRGF- و PRGF+ با سلول‌های co-culture در روز ۱۴ و ۲۱ رشد بیشتری در مقایسه با روز اول نشان دادند.

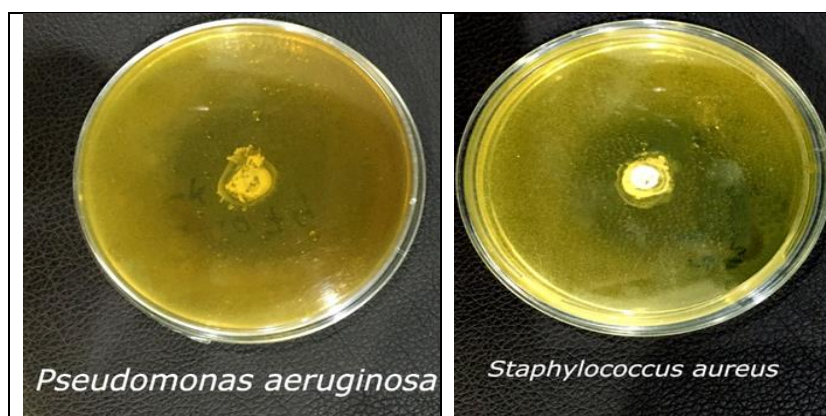
۳-۶ ارزیابی فعالیت ضد باکتریایی لاکتوباسیلوس

پلانتاروم

۳-۶-۱ 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 / ستافیلوکوکوس اورئوس و / شریشیا کلی داشت (شکل ۷).





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

کلاژن می باشد، که پتانسیل آنتی ژنی کمتری نسبت به کلاژن دارد [۱۰، ۱۵]. بر اساس نتایج تست مکانیکی، درصد کرنش به دلیل لایه لایه بودن داربست و برهمکنش سطحی زنجیره های PU افزایش یافت. در حقیقت، الحاق پروتئین به فیبر منجر به کاهش استحکام کششی می شود. با این حال، رفتار الاستیک داربست ها کاهش پیدا نکرد. در این بررسی ژلاتین به صورت ترکیبی با پلی اورتان الکتروریسی نشد و در لایه های جداگانه قرار گرفت و در نتیجه از استحکام کششی این پلیمر کاسته نشد. حتی با اسپری الکتریکی PRGF تغییر چندانی در خاصیت مکانیکی داربست ایجاد نشد و به صورت جزئی باعث بالا رفتن مقاومت داربست شد. نتایج تست های 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 به طور قابل توجهی افزایش یافته است. در این مطالعه، داربست PU زیست فعال برای پانسمان پوست ایجاد شد که شامل بسیاری از فاکتورهای رشد، سلول های فیبروبلاست، سلول های بنیادی مزانشیمی و لاکتوباسیلوس پلانٹاروم می باشد. Diaz-Gomez و همکاران نشان دادند که چسبندگی و تکثیر سلولی روی داربست نانوفیبری حاوی PRGF افزایش می یابد [۲۲]. فاکتور های پیش هاری از

استافیلوکوکوس اورئوس (PTCC 1112): هاله عدم رشد قوی (۲۵ میلی متر) توسط *L. plantarum* ایجاد شد. سالمونلا تیفی موریوم (PTCC 1709): هاله عدم رشد قوی (۴۰ میلی متر) توسط *L. plantarum* ایجاد شد. اشریشیا کلی (PTCC 1399): هاله عدم رشد قوی (۲۰ میلی متر) توسط *L. plantarum* ایجاد شد. سودوموناس آئروژینوزا (PTCC 1074): هاله عدم رشد قوی (۴۰ میلی متر) توسط *L. plantarum* ایجاد شد.

۴- بحث

در این مطالعه، برای ایجاد پانسمان مناسب برای زخم، سلول های hAMSCs (70%) (HU-02) co-culture cells و *Lactobacillus plantarum* (ATCC 8014) (30%) روی داربست چند لایه PU/PRGF/gelatin/PU کشت داده شدند. داربست نانوفیبری جدید با توجه به توانایی خود برای بهبود زخم های پوستی، جایگزین مناسبی برای پوست می باشد. 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، آب گریزی آن است که مانع از اتصال سلول ها می شود. به همین دلیل، از ژلاتین برای آب دوست کرن این نوع داربست ها استفاده می شود. ژلاتین شکل دنا توره

ایزومرهای مختلف در PRGF شامل: PDGF, TGF, EGF, VEGF و غیره وارد پلاسمای لخته شده می شوند که در بهبود زخم موثر می باشند. این فاکتورهای رشد عمدتاً با افزایش میزان میتوژنز و رگ زایی بر بهبود زخم تأثیر می گذارند. از سویی دیگر، پیشنهاد می شود که استفاده از PRGF می تواند سرعت تکثیر سلول های فیبروبلاست را تسریع کند [۱۰]. در مطالعات پیشین، پلاسمای غنی از پلاکت مستقیماً روی اسکار استفاده شد [۲۳، ۲۴]. با این حال، 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 [۲۶]. تحقیقات تجربی و بالینی به طور گسترده نشان می دهد که فراتر از ظرفیت پروبیوتیک ها که بر عملکرد روده تأثیر مثبت می گذارند، اعمال پروبیوتیک ها بر روی پوست می تواند پاسخ ایمنی میزبان از جمله ایمنی ذاتی و اکتسابی را تعدیل کند. این گونه بررسی ها امکان طراحی کاربردی و روش های جدید مبتنی بر رویکرد موضعی برای پیشگیری و درمان اختلالات پوستی را فراهم می کند [۴]. قابل توجه است که عفونت مهمترین عارضه پس از آسیب سوختگی می باشد و علیرغم استفاده از آنتی بیوتیک های موضعی و سیستمیک، می تواند منجر به سپسیس و مرگ بیمار شود [۲۷]. باتوجه به خواص ضد عفونی کنندگی پروبیوتیک ها و توانایی آنها در پیشبرد فرایند ترمیم زخم، می توان گفت آنها قدرت جلوگیری از آلودگی را دارند [۳، ۵، ۲۷]. باکتری های *استافیلوکوکوس اورئوس* (*Staphylococcus aureus*) ۴۵ درصد و *سودوموناس آئروجینوزا* (*P. aeruginosa*) ۳۵ درصد،

استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس (*Staphylococcus epidermidis*) ۱۵ درصد و همچنین سایر باکتری هایی مانند، مانند *Enterobacter cloacae* و *Enterococcus faecalis* به میزان ۵ درصد از زخم حاصل از سوختگی جدا شدند. بنابراین، در این مطالعه برای بررسی اثر ضد باکتریایی *لاکتوباسیلوس پلانتروم* از سویه های *سودوموناس آئروجینوزا*، *استافیلوکوکوس اورئوس*، *اشریشیا کلی* و *سالمونلا تیفی* موریوم استفاده شد. *سودوموناس آئروجینوزا*، *استافیلوکوکوس اورئوس*، معمولاً بالاترین درصد عفونت زخم حاصل از سوختگی را ایجاد می کنند و سویه *اشریشیا کلی* به صورت عفونت بسیار نادر در این گونه زخم ها دیده می شود. *سالمونلا تیفی* موریوم جزء باکتری های عفونت روده می باشد. همچنین، Lash و همکاران دریافتند که *L. plantarum* ATCC 8014 دارای یک اثر بازدارنده بر طیف وسیعی از باکتری های گرم منفی و گرم مثبت است و نشان دادند که باکتریوسین ها به عنوان ترکیبات موثر برای چنین محدودیتی است [۵، ۲۸]. با این حال، *L. plantarum* ATCC 8014 به شدت به عنوان باکتری پروبیوتیک بالقوه باقی مانده است. مطالعات معتبری بر روی واسطه گری آگزوپلی ساکاریدها (EPS) برای اتصال میکروارگانیسم ها به دیواره روده انجام شد [۲۹]. به نظر می رسد که آگزوپلی ساکاریدها دارای خواص محرک سلامتی، مانند محرک سیستم ایمنی و فعالیت ضد زخم هستند [۷، ۹]. حیدری و همکاران دریافتند که ماکروفاژها و فیبروبلاست ها در سه و پنج روز پس از القای زخم به شدت گسترش می یابند و در روزهای هفتم و چهاردهم کاهش می یابند. 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 تأثیر *لاکتوباسیلوس پلانتروم* بر افزایش تکثیر co-culture که اغلب اوقات سلول های فیبروبلاست را شامل می شود، در شرایط آزمایشگاهی

نشان داد. برای اثبات این ویژگی‌ها، اثرات ژل *L. Plantarum* بر بهبود زخم پوستی با ایجاد زخم ناشی از سوختگی در موش‌های دیابتی آزمایش شد [۳]. استفاده مستقیم از باکتری روی زخم ممکن است برای مدت طولانی تأثیر مناسبی نداشته باشد و برای غلبه بر این مشکل، به دام انداختن باکتری‌ها در داربست نانوفیبری وابسته به محل زخم می‌تواند انتخاب مناسبی باشد. González و همکاران نشان داد که به دام انداختن پروبیوتیک‌های زنده در داربست‌های کلاژن، این نوع بیومواد را به‌عنوان انتخاب امیدوارکننده‌ای برای در مان واژینوز باکتریایی (BV) تایید می‌کند [۳۱]. علاوه بر این، این نوع رویکرد‌ها را می‌توان برای در مان عفونت‌های میکروبی پیچیده مختلف طراحی کرد. Costello و همکاران توپوگرافی سطح 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 بستری برای تقلید از پروفایل‌های چسبندگی و تهاجم باکتریایی مانند *سالمونلا* و *سودوموناس* استفاده کردند و درمان توسط لاکتوباسیلوس را در یک محیط سه بعدی بررسی کردند. آنها مشاهده کردند که در یک محیط سه بعدی، لاکتوباسیلوس‌ها در جا به‌جایی پاتوژن‌ها سودمند هستند [۲۰]. همچنین، در مطالعه حاضر نشان داده شد که *Lactobacillus plantarum* ATCC 8014 کشت شده بر روی داربست PU/PRGF/gelatin/PU دارای اثر ضد باکتریایی بر *سودوموناس آنروجینوزا*، *سالمونلا تیفی*، *موریوم*، *شریشیا کلی* و *استافیلوکوکوس اورئوس* می‌باشد. علاوه بر بررسی اثرات فیزیکی شیمیایی PRGF بر روی داربست و تأثیرات ضد باکتریایی لاکتوباسیلوس پلانتاروم، برای درک تأثیر این دو بر سمیت و زنده مانی سلول‌ها، (۷۰ درصد) HU-02 و

(۳۰ درصد) hAMSCs را بر روی داربست چندلایه PU/PRGF/gelatin/PU و بدون PRGF به‌صورت PU/gelatin/PU کشت داده و بررسی شد. نتایج آزمون MTT نشان داد که بر خلاف داربست‌های بدون PRGF و بدون حضور لاکتوباسیلوس پلانتاروم که گاه زنده مانی کمتر از ۷۰ درصد را تجربه کردند، داربست به همراه PRGF و لاکتوباسیلوس پلانتاروم همپوشانی ایده‌آلی دارند و بیش از ۷۰ درصد باعث زنده مانی سلول‌ها می‌شوند. وهابی و همکاران نیز با تست MTT نشان دادند که PRGF باعث افزایش قدرت تکثیر سلول‌های فیروبلست HGF بیش از ۱۰۰ درصد در مدت سه روز آزمون شد [۳۲]. پیران و همکاران با انجام آزمون MTT به مدت ۹ روز روی داربست PLLA و TCPS نشان دادند PRGF قدرت تکثیر فیروبلست‌ها را به‌صورت قابل توجهی در گروه TCPS بالا می‌برد. اما این قدرت تکثیر بر روی داربست تا ۵ روز افزایشی می‌باشد و سپس تا نه روز کاهش می‌یابد [۳۳]. نتایج سنجش MTT، تصاویر SEM، و ارزیابی ضدباکتریایی در شرایط *in vitro* نشان داد که الکتروریسی PU/PRGF/gelatin/PU با سلول‌های co-culture و لاکتوباسیلوس پلانتاروم ATCC 8014 داربست نانوفیبری یک بیوماتریکس مناسب برای مهندسی بافت پوست می‌باشد. تا به امروز، جایگزین‌های پوستی در دسترس بالینی عمدتاً از مواد زیستی تشکیل شده است. همه این مواد محدودیت‌های خاص خود را دارند، که نیاز به جراحی دوم، خطر سلول‌های باقیمانده از منابع آلوژن، انتقال بیماری‌های عفونی، برانگیختن پاسخ ایمنی، اسکار زخم‌های مرتبط و اغلب پرهزینه، را شامل می‌شود [۲]. بنابراین، نتایج مطالعات کنونی نقش موثر PRGF و لاکتوباسیلوس پلانتاروم آزاد شده از نانو فیبر زیست‌فعال الکتروریسی شده را تایید کرد و می‌تواند نقش بالفعل را در بهبود زخم در شرایط *in vivo* نیز نشان دهد.

۵- نتیجه‌گیری

[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 kefirifaciens* 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- γ in mouse splenocytes. *Le Lait*. 2001;81(6):683-97.

[8] 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.

[9] Oda M, Hasegawa H, Komatsu S, Kambe M, Tsuchiya F. Anti-tumor Polysaccharide from *Lactobacillus* sp. *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, Ardeshtyrlajimi 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.

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

۶- 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.

- [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, Ardeshtyrlajimi 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.
- [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.

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

Lida Shahghasempour¹, Simzar Hosseinzadeh^{2*}, Azam Haddadi^{3*}, Mahboubeh Kabiri⁴

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 electrosponing 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 PRGF 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.