

Evaluation of behavior of human umbilical cord-Wharton's jelly mesenchymal stem cell on electrospun poly (lactic acid)\wax nanofibers scaffold

Tina Shafaf¹, Elham Hoveizi², Sayed Reza Kazeminejad²

¹ PhD Candidate, Department of Biology, Faculty of Science, Shahid Chamran University of Ahvaz, Ahvaz, Iran

² Associate Professor, Department of Biology, Faculty of Science, Shahid Chamran University of Ahvaz, Ahvaz, Iran

Abstract

Background: Mesenchymal stem cells are pluripotent stromal cells which are capable of differentiating into different cell lines. Nowadays, umbilical cord Wharton's jelly (UC-WJ) are increasingly used as sources of stem cells. Studies show that scaffolds can affect the differentiation of stem cells to different cells and cause higher cell viability and proliferation as well. The present study aimed to evaluate the adhesion and viability of WJ-MSCs to PLA/Wax scaffold.

Materials and methods: PLA/Wax scaffold was prepared using electrospinning method. Adhesion and viability of MSCs on this scaffold was investigated using scanning electron microscope (SEM) and MTT assay respectively.

Results: SEM results showed that the fibers were homogeneous, uniform, and free of beads with high quality property, and adding wax to PLA significantly reduced the diameter of the nanofibers. These studies confirmed that the cells were attached to the scaffold in large numbers and with appropriate size. The results of MTT show good biocompatibility of the scaffold made with the cells and a significant increase in the survival rate of mesenchymal cells was observed during the period.

Conclusion: In conclusion, using PLA/Wax scaffold has promoted the attachment, survival and proliferation of the cells and has the potential to be an important candidate for developing the efficiency of 3D-cultures in order to cure diseases.

Keywords: Cell viability, PLA/Wax scaffold, Umbilical cord Wharton's jelly, Adhesion, Mesenchymal stem cells.

Cited as: Shafaf T, Hoveizi E, Kazeminejad SR. Evaluation of behavior of human umbilical cord-Wharton's jelly mesenchymal stem cell on electrospun poly (lactic acid)\wax nanofibers scaffold. Medical Science Journal of Islamic Azad University, Tehran Medical Branch 2021; 31(3): 266-275.

Correspondence to: Elham Hoveizi

Tel: +98 6133331045

E-mail: e.hoveizi@scu.ac.ir

ORCID ID: 0000-0002-3285-5682

Received: 20 May 2018; **Accepted:** 3 Sep 2018

بررسی رفتار سلول‌های بنیادی مزانشیمی مشتق شده از ژله وار تون بند ناف انسان بر داربست نانوفیبر Poly (lactic Acid)\Wax

تینا شفاف^۱، الهام حویزی^۲، سیدرضا کاظمی‌نژاد^۲

^۱دانشجوی دکتری، گروه زیست شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه شهید چمران اهواز، اهواز، ایران
^۲دانشیار، گروه زیست شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه شهید چمران اهواز، اهواز، ایران

چکیده

سابقه و هدف: سلول‌های بنیادی مزانشیمی سلول‌های استرومایی چندتوانی هستند که پتانسیل تبدیل شدن به انواعی از سلول‌ها را دارند. امروزه استفاده از سلول‌های بنیادی مشتق شده از ژله وار تون بند ناف (WJ-MSCs) به دلیل مزیت‌های فراوان به عنوان منبعی قابل دسترس و جدید مطرح است. به علاوه، مطالعات نشان داده‌اند استفاده از داربست‌های مناسب می‌تواند نقش مؤثری در افزایش بقا، تکثیر و تمایز سلول‌ها داشته باشد. هدف تحقیق حاضر بررسی میزان بقا و چسبندگی WJ-MSCs بر داربست پلی لاکتیک اسید/موم (PLA/Wax) بود.

روش بررسی: داربست PLA/Wax با نسبت ۷:۳ با استفاده از روش الکتروریسی ساخته شد و میزان چسبندگی و بقای سلول‌های استخراج شده بر این داربست‌ها با استفاده از میکروسکوپ الکترونی SEM و MTT بررسی شد.

یافته‌ها: نتایج حاصل از مطالعات میکروسکوپ الکترونی نشان دادند که الیاف به صورت همگن، یکنواخت، فاقد بید و از کیفیت بالایی برخوردار هستند و همچنین افزایش موم به PLA باعث کاهش قابل توجهی در قطر الیاف شده است. این مطالعات تایید کرد که سلول‌ها در تعداد زیاد و با گستردگی مناسبی بر داربست اتصال یافته‌اند. نتایج حاصل از MTT نشان دهنده زیست سازگاری مناسب داربست ساخته شده با سلول‌ها است و افزایش معنی‌داری در میزان بقای سلول‌های مزانشیمی در طی دوره مشاهده شد.

نتیجه‌گیری: به طور کلی می‌توان نتیجه گرفت استفاده از داربست PLA/Wax چسبندگی، بقا و تکثیر سلول‌ها را بهبود می‌بخشد و این پتانسیل را دارد که در مطالعات آینده به‌عنوان یک کاندید مهم در جهت افزایش بازده کشت سه بعدی سلول‌ها به منظور درمان بیماری‌ها در نظر گرفته شود.

واژگان کلیدی: بقای سلولی، داربست PLA/Wax، ژله وار تون بند ناف، چسبندگی، سلول‌های بنیادی مزانشیمی.

مقدمه

انواع مختلف سلول‌ها داشته و سبب افزایش بقا و تکثیر آن‌ها می‌شود. سلول‌های بنیادی مزانشیمی (MSCs)، سلول‌های استرومایی هستند که دارای قابلیت خود-نوزایی و تمایز به چندین رده سلولی هستند. MSCها قابلیت میوزنیک بالایی از خود نشان می‌دهند و می‌توان آنها را از انواعی از بافت‌ها مانند بند ناف، مغز استخوان، بافت چربی، پالپ دندانی و غیره جداسازی کرد (۱). سلول‌های بنیادی مزانشیمی در حالت *in vitro* تحت شرایط اختصاصی به رده‌های سلولی مزودرم، اکتودرم، ماهیچه، نورون و اندودرم (سلول‌های جزایر پانکراسی و سلول‌های کبدی) تمایز می‌یابند (۵-۲). بند ناف و بافت

در سال‌های اخیر مهندسی بافت فرصت بی نظیری را برای پیشرفت و بهبودی روش‌های درمانی جهت درمان بیماری‌های مادرزادی و اکتسابی فراهم کرده است. مطالعات نشان می‌دهد استفاده از داربست نقش مؤثری در تمایز سلول‌های بنیادی به

آدرس نویسنده مسئول: اهواز، دانشگاه شهید چمران اهواز، دانشکده علوم، گروه زیست شناسی، الهام

حویزی (email: e.hoveizi@scu.ac.ir)

ORCID ID: 0000-0002-3285-5682

تاریخ دریافت مقاله: ۹۹/۱۰/۸

تاریخ پذیرش مقاله: ۱۴۰۰/۲/۸

چربی به عنوان منابع عمده استخراج سلول های بنیادی مزانشیمی معرفی شده اند. ژله و ارتون بند ناف شامل بافت همبند مشتق شده از مزودرم خارج جنینی و سلول های شبه فیبروبلاست است. سلول های بنیادی مزانشیمی به دست آمده از ژله و ارتون از نظر تکوینی ابتدایی تر هستند و خصوصیات بین سلول های بنیادی بالغ و جنینی نشان می دهند (۸-۶)، استخراج آن ها بدون درد انجام می شود، میزان تکثیر بالایی دارند، از نظر اخلاقی تایید شده هستند، تومور ایجاد نمی کنند (۹)، خصوصیت ایمنی زایی پایینی دارند و عوارض جانبی قابل توجهی در فرد گیرنده ایجاد نمی کنند (۶).

استفاده از مهندسی بافت در کنار سلول درمانی می تواند در تهیه بافت های جایگزین و درمان انواعی از بیماری ها مفید باشد. هدف از مهندسی بافت تهیه بافت و ارگان های جایگزین و یا بازبانی بخش های بیمار یا آسیب دیده آنها در حالت *in vivo* است. امروزه توانایی تولید ساختارهای کنترل شده سه بعدی برای مهندسی بافت به میزان قابل توجهی پیشرفت کرده است (۱۰). برای افزایش بازده سلول ها در محیط آزمایشگاهی می توان از کشت سه بعدی استفاده کرد، زیرا شرایط کشت سه بعدی سلول ها در مقایسه با کشت دوبعدی به شرایط تکوین در حالت *in vivo* مشابه تر است (۱۱). داربست های نانوفیبروز با تشکیل شبکه ای از الیاف بهم تنیده شده با منافذ فراوان، فضایی شبیه به ماتریکس خارج سلولی بدن برای سلول ها فراهم می سازد. پس بدیهی است که کاربرد سلول درمانی به همراه مهندسی بافت و شناسایی و تولید داربست مناسب برای اتصال و رشد سلول ها به منظور تهیه بافتی جایگزین می تواند گام مهمی در پیشبرد درمان انواع زیادی از بیماری ها محسوب شود (۱۲). با توجه به این که مورفولوژی صحیح سلول ها برای عملکرد و تمایز صحیح آنها حیاتی است، ارتقاء و ساخت داربست هایی که به میزان زیادی به ریزمحیط اطراف سلول ها در بدن شباهت داشته باشند می تواند منجر به مورفولوژی صحیح سلول ها شده و بازده بالاتری در اتصالات بین آنها، تکثیر و تمایزشان حاصل کند (۱۳).

روش های مختلفی برای تولید داربست مطرح شده است که در میان آنها، روش الکتروریسی بیشتر از همه مورد توجه قرار گرفته است. انواع مختلفی از پلیمرهای زیست تخریب پذیر طبیعی و سنتتیک با روش الکتروریسی با هدف استفاده در زمینه مهندسی بافت به صورت رشته های نانوفیبر درآمده اند. الیاف ساخته شده توسط روش الکتروریسی سطح مقطع و تخلخل بالایی دارند، و قطر آنها بین چندین نانومتر تا چندین میکرومتر متغیر است (۱۴). با توجه به اینکه ارگان های

مختلف بدن از ساختارهای با ابعاد نانو برخوردار هستند، داربست های تولید شده از نانوالیاف علاوه بر پاسخ گویی به نیازهای مطرح شده، حساسیت های کمتری در بدن ایجاد می کند و سازگاری بیشتری با سلول های دفاعی بدن و سایر ارگان ها دارند (۱۵). از برتری های دیگر کشت سه بعدی می توان به زنده ماندن تعداد بیشتری از سلول ها، مورفولوژی، تکثیر، تمایز، پاسخ به محرک، ارتباط سلول-سلول، قطبیت سلول و غیره اشاره کرد (۱۳).

از جمله مهم ترین و معمول ترین داربست های مورد استفاده می توان به PLA, PCL, PGA و PLGA اشاره کرد. پلیمرهای طبیعی همچون پلی ساکاریدها و پروتئین های کلاژن که عمده پروتئین ماتریکس خارج سلولی هستند نیز برای بهبود چسبندگی، تکثیر سلول و تماس سلول با داربست های پلیمری مفید هستند (۱۶). تحقیقات نشان داده است که استفاده از داربست های نانوفیبروزی PCL باعث افزایش تکثیر و هدایت تمایز سلول های عصبی و ماهیچه ای می شوند (۱۷). همچنین شواهد نشان داده است استفاده از داربست های الکتروریسی شده متشکل از نانوفیبر می تواند به عنوان یک هدایت گر هندسی، اتصال و قرارگرفتن سلول های ماهیچه ای اسکلتی را بهبود بخشد. به این منظور، از ترکیب تکنیک های الکتروریسی و الکترواسپری برای ساخت یک داربست الکترواکتیو از نانوذرات polyurethane-urea (PUU) استفاده شد که توانست تکثیر و تمایز سلول های میلوبلاست C2C12 را افزایش دهد (۱۸). در مطالعه سلول های عصبی، محققان با ساخت داربست PCL/PPY مشاهده کردند که این داربست زیست سازگاری بالایی دارد و به خوبی تمایز سلول های رده PC12 را تقویت می کند. این تحقیقات نشان دادند داربست های نانوفیبروزی ساخته شده پتانسیل کاربردی بالایی جهت مهندسی بافت عصبی دارند و چسبندگی و تکثیر این سلول ها را نیز افزایش می دهند (۱۸). در مطالعه ای دیگر، داربست PPY/collagen fiber توانست با موفقیت اتصال سلول های بنیادی مزانشیمی مشتق شده از مغز استخوان انسان را تقویت کند و بیان ژن های مارکر سلول های عصبی را افزایش دهد. در سال ۲۰۱۱، مطالعه ای بر روی تولید اندودرم قطعی از سلول های بنیادی جنینی بر روی داربست های سه بعدی PLCA زیست تخریب پذیر انجام شد و نتایج این تمایز با سلول های تمایز یافته در کشت های تک لایه دوبعدی مقایسه شدند. Gao و همکارانش سلول های بنیادی جنینی را بر روی لامینین یا داربست های سه بعدی کشت دادند و تمایز آنها را به اندودرم قطعی در حالت سه بعدی و دوبعدی بررسی و مقایسه کردند (۱۹). در سال ۲۰۱۴، حویزی و همکارانش از داربست های سه بعدی نانوفیبروزی

تهیه داربست نانوفیبری PLA/Wax با روش الکترورسی
 داربست نانوفیبروز (7:3) PLA/Wax با روش الکترورسی با غلظت PLA ۲/۵٪ و موم ۲/۵٪ با نسبت ۷:۳ در حلال HFIP (Hexafluoroisopropanol) ساخته شد. پارامترهای مورفولوژی و بررسی تخلخل، اندازه ی نانوالیاف همچنین اتصال سلول های بنیادی به آن توسط SEM و میزان سمیت داربست با آزمایش $3-(4,5\text{-dimethylthiazolyl})-2,5\text{-diphenyltetrazolium bromide}$ (MTT) مطالعه شدند.

کشت سلول های بنیادی مزانشیمی بر داربست PLA/Wax
 بعد از تهیه، داربست به قطعاتی با قطر ۱۶ میلی متر تقسیم و برای استریل شدن به مدت ۲ ساعت در مقابل تابش امواج UV قرار داده شد. سپس در پلیت ۲۴ خانه تعیبه و به مدت ۲۴ ساعت در PBS محتوی غلظت بالای پنی سلین (۱۰۰ U/ml) و استرپتومایسین (۱۰۰ mg/ml) قرار گرفت. سپس 5×10^4 cell/well سلول در هر خانه بر روی داربست کشت داده شد.

بررسی های مورفولوژی با میکروسوپ الکترونی

مورفولوژی، قطر و منافذ لیاف تهیه شده و همچنین چگونگی آرایش سلولی بر داربست با میکروسکوپ الکترونی (XL-30, Philips, Netherland, SEM) مورد بررسی قرار گرفت. برای آماده سازی داربست های دارای سلول، ابتدا نمونه ها با PBS به مدت پنج دقیقه شسته و با گلو تاردهید ۲/۵٪ به مدت یک ساعت فیکس و سپس آبیگری با الکل های ۳۰، ۵۰، ۷۰، ۸۰، ۹۰، ۱۰۰٪ به صورت صعودی هر کدام به مدت پانزده دقیقه انجام گرفت. سپس داربست ها با ذرات طلا پوشانده و عکس برداری توسط میکروسکوپ الکترونی انجام گرفت. قطر لیاف و اندازه منافذ با استفاده از نرم افزار (version 9) measurement اندازه گیری شد. به این منظور پنج تصویر انتخاب و از هر تصویر ۲۰ منطقه به صورت اتفاقی انتخاب و قطر لیاف محاسبه و سپس میانگین آنها به عنوان قطر لیاف معرفی شد (۲۴).

بررسی میزان تکثیر و درصد زنده ماندن سلول ها با MTT

جهت بررسی میزان بقای سلول های کشت شده بر روی داربست از 3-diphenyl tetrazolium bromide (MTT, Sigma, USA) با غلظت ۵ mg/ml استفاده شد. پودر MTT در PBS با نسبت های مشخص حل گشته و در تاریکی و در دمای ۴ درجه سانتی گراد تا زمان استفاده نگهداری شد. این تست در روز های ۱، ۳، ۵ و ۷ بعد از قرار دادن سلول ها در محیط کشت سه بعدی انجام شد. برای انجام این تست، ابتدا محیط کشت سلول ها خارج شد و سپس ۱ میلی لیتر محیط کشت جدید به اضافه ۱۰۰ میلی لیتر محلول MTT به هر خانه

PLA/gelatin برای مطالعه تکثیر و تمایز این سلول ها به سلول های اندودرم قطعی استفاده کردند و در مقایسه با کشت دوبعدی، افزایش معنی داری در تعداد سلول های تمایز یافته مشاهده کردند (۱۵).

از طرف دیگر، برخی مطالعات نشان داده اند که موم زنبور عسل دارای خصوصیات بالقوه ای همچون خاصیت آنتی اکسیدان، ضد میکروبی، ضد التهابی، تعدیل کننده سیستم ایمنی و ضد سرطان است (۲۰، ۲۱). حویزی و همکارانش به تازگی داربست جدید الکترورسی شده PLA/Cs/Wax را برای تمایز سلول های بنیادی ESC به سلول های عصبی به کار بردند و مشاهده کردند که سلول های عصبی به طور محکمی به داربست حاوی موم متصل و گسترده شدند. همچنین به عنوان مواد طبیعی در ترکیب با PLA باعث ایجاد فیبرهای یکنواخت با ضخامتی کمتر شدند (۲۲). در مطالعه حاضر، از ترکیب موم و PLA برای ساخت یک داربست جدید برای افزایش بازده کشت و اتصال سلولی استفاده شد. به این منظور، داربست PCL/Wax با روش الکترورسی تولید و سپس میزان چسبندگی و بقای سلول های بنیادی مزانشیمی کشت شده بر داربست با روش های مختلف مورد ارزیابی قرار گرفت.

مواد و روشها

مطالعه تجربی حاضر با کد EE/99.3.02.65844/scu.ac.ir در دانشگاه شهید چمران اهواز به ثبت رسید.

جداسازی و کشت سلول های بنیادی مزانشیمی از ژله وار تون بند ناف

خون بند ناف پس از به دست آمدن بلافاصله خارج و به آزمایشگاه کشت سلول منتقل و سپس توسط بافر فسفات سالین PBS حاوی آنتی بیوتیک (پنی سیلین، استرپتومایسین) و آموتریسین شستشو داده شد. پس از شستشوی کامل بافت، کشت و جداسازی سلول های بنیادی به روش قطعات بافتی (Explant) انجام شد. سلول های بنیادی جدا شده پس از پاساژ اول جهت فلوسایتومتری مارک های آنتی CD90، آنتی CD133 و آنتی CD105 که مارک های سلول های بنیادی مزانشیمی اند و نیز آنتی CD34 (مارک سلول های هماتوپوئیتیک) به عنوان مارک منفی رنگ آمیزی شدند. پس از تایید، سلول ها به فلاسک منتقل و در انکوباتور با دمای ۳۷ درجه سانتی گراد، ۵ درصد CO₂ و ۹۵ درصد رطوبت به مدت ۳ هفته کشت داده شدند. محیط کشت هر ۳ روز یک بار تعویض و هر روز سلول ها در زیر میکروسکوپ مورد مطالعه قرار گرفتند (۲۳).

اضافه شد. سپس پلیت‌ها به مدت ۳ الی ۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد انکوبه شدند. در ادامه، به هر خانه ۱ میلی لیتر DMSO (Dimethyl Sulfoxide, Merck) اضافه شد و میزان جذب توسط دستگاه ELISA reader (Expert 96, Asys Hitch, Ec Austria) در طول موج ۵۷۰ نانومتر ثبت شد. به منظور تایید بیشتر آزمایش سه بار تکرار شد.

بررسی میزان چسبندگی و تکثیر سلول‌ها روی داربست

برای بررسی میزان چسبندگی سلولی، سلول‌های بنیادی به مدت ۱، ۳، ۵ و ۷ روز با محیط کشت کامل بر روی داربست PLA/Wax کشت شدند و سپس سلول‌ها با استفاده از پارانفالداید ۴٪ تثبیت و با استفاده از رنگ DAPI (1 µg/mL) رنگ آمیزی شدند. برای شمارش سلولی در هر روز خاص سلول‌های ۲۰ منطقه (با ابعاد 1mm²) به صورت اتفاقی انتخاب و شمارش و میانگین سلولی به دست آمد.

تحلیل داده‌ها

نتایج با استفاده از نرم افزار SPSS (Ver.12) و آزمون‌های آماری ANOVA و T-test به صورت (Mean±SE) مورد ارزیابی قرار گرفتند. رسم نمودارها در نرم افزار Excel انجام گرفت و تفاوت‌های با $P < 0.05$ معنی دار در نظر گرفته شدند. همه آزمایش‌ها حداقل با سه بار تکرار مجزای بیولوژیک انجام شدند.

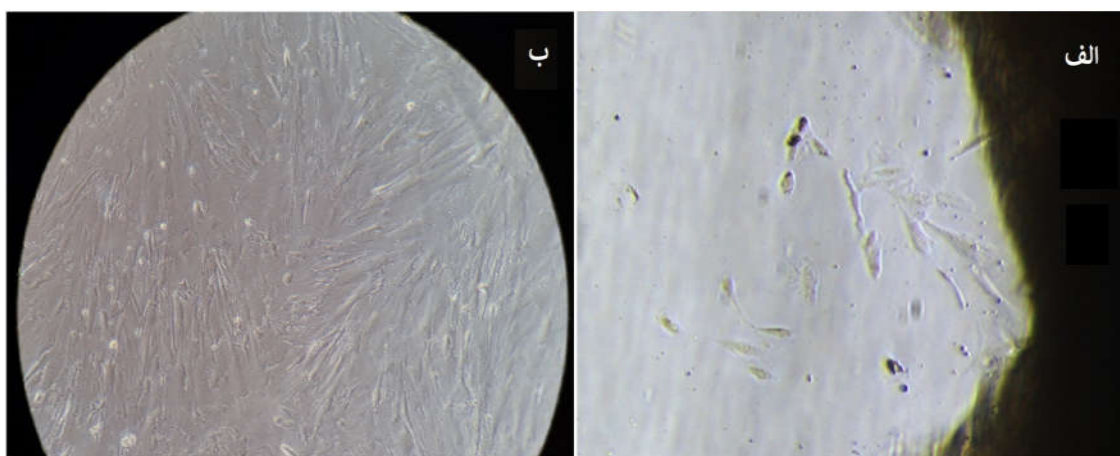
یافته‌ها

بررسی مورفولوژی سلول‌های مزانشیمی مشتق شده از ژله وارتون بند ناف انسان در روز بعد از قرار دادن قطعات ژله وارتون در فلاسک حاوی

محیط، به تدریج جوانه‌های سلولی از کناره های بافت شروع به رشد کردند، سلول‌ها در ابتدا کروی بودند، اما با گذشت زمان کشیده و دوکی شکل شدند (شکل ۱-الف) و در سه روز بعد از آن (روز دهم) سلول‌ها کف فلاسک را پوشش دادند. در پاساژ اولیه برخی ناخالصی‌ها مشاهده شد، اما در پاساژهای بعدی سلول‌ها خالص تر بود و سلول‌های بنیادی مزانشیمی با اتصال به کف فلاسک و بعد از چند روز سطح فلاسک را پر کردند و همان گونه که در شکل مشاهده می‌شود، این سلول‌ها دارای خصوصیات ظاهری سلول‌های مزانشیمی با ظاهری دوکی شکل و قدرت اتصال و تکثیر بالا در پاساژهای اولیه بودند (شکل ۱-ب).

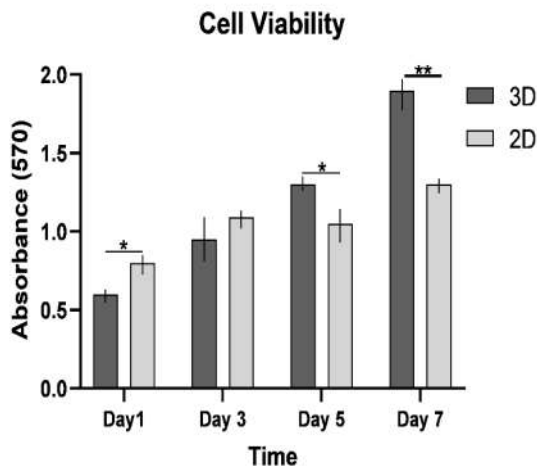
بررسی مورفولوژی داربست و سلول‌های بنیادی مزانشیمی کشت داده شده بر داربست

بررسی مورفولوژی و قطر نانوالیاف داربست‌های PLA/Wax و چگونگی استقرار سلول‌های مزانشیمی مشتق شده از ژله وارتون بند ناف انسان بر داربست به وسیله عکسبرداری با میکروسکوپ الکترونی SEM انجام گرفت. میکروگراف الکترونی داربست‌ها در شکل ۲-الف نشان داده شده است. همان طور که در شکل ۲ مشاهده می‌شود، نانوالیاف حاصل از ترکیب PLA با موم به صورت کاملاً یکنواخت و بدون بید به دست آمد. شکل ۲-ب نشان دهنده چگونگی استقرار سلول‌های مزانشیمی مشتق شده از ژله وارتون بند ناف انسان بر داربست PLA/Wax بعد از ۳ روز است که نشان دهنده اتصال با تراکم بالا، استقرار و ماندگاری سلول‌ها بر داربست بود. متوسط قطر الیاف با نرم افزار measurement برای داربست ۶۵ نانومتر تخمین زده شد (شکل ۲-ج).



شکل ۱. بررسی مورفولوژی سلول‌های مزانشیمی مشتق شده از ژله وارتون بند ناف انسان با استفاده از میکروسکپ معکوس. الف) خارج شدن سلول‌های بنیادی از ژله وارتون در روز ۱۰ پس از کشت، ب) پوشیده شدن کامل سطح فلاسک پس از جدا شدن و تکثیر سلول های بنیادی مزانشیمی. بزرگنمایی X۲۰

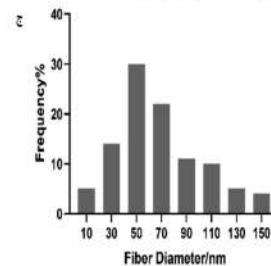
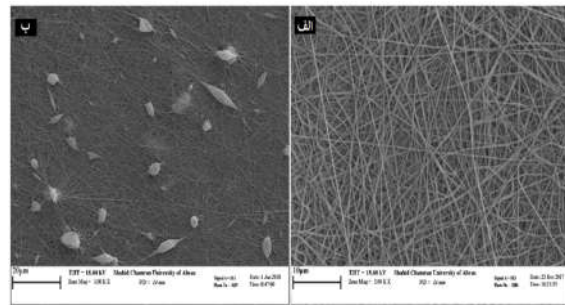
مزاننشیمی بر داربست موفقیت آمیز بود. همان گونه که در شکل ۴ نشان داده شده است، بعد از گذشت ۵ و ۷ روز مقایسه تکثیر سلول‌ها نشان دهنده تفاوت کاملاً معنی‌داری در تکثیر سلول‌ها در مقایسه با روز اول بود. این نتایج نشان داد که داربست نانوفیبر PLA/Wax می‌تواند بستر مناسبی برای اتصال، رشد و تکثیر سلول‌های مزاننشیمی فراهم آورد (شکل ۴).



شکل ۳. نمودار بررسی بقا سلول‌های مزاننشیمی مشتق شده از ژله وارتنون بند ناف انسان در روزهای ۱، ۳، ۵ و ۷ پس از کشت با استفاده از روش MTT. مقادیر به دست آمده میانگین حاصل از سه تکرار آزمایش هستند. $P < 0.05$ ، $P < 0.01$ ، $P < 0.001$ (2D: کشت دو بعدی و 3D: کشت سه بعدی)

بحث

امروزه با سلول درمانی موفقیت‌های چشم‌گیری در درمان بیماری‌ها به دست آمده است. تاکنون از منابع مختلفی از سلول‌های بنیادی و پیش‌ساز برای سلول درمانی در درمان بیماری‌ها استفاده شده است که می‌توان به سلول‌های بنیادی جنینی، سلول‌های بنیادی مغز استخوان، سلول‌های بنیادی خون بند ناف و برخی از سلول‌های بنیادی آندودرمی و اکتودرمی اشاره کرد (۱، ۲۵). در این تحقیق، داربست پلی لاکتیک اسید/موم (PLA/Wax) ساخته شده و رفتار، بقا و میزان چسبندگی سلول‌های کشت شده بر آن بررسی شد. سلول‌های بنیادی WJ-MSC به مدت ۷ روز بر روی این داربست سه بعدی کشت شدند و میزان چسبندگی و بقای آنها ارزیابی شد. تصاویر حاصل از الیاف الکترونیسی شده داربست سه بعدی توسط میکروسکپ الکترونی SEM نشان داد که این



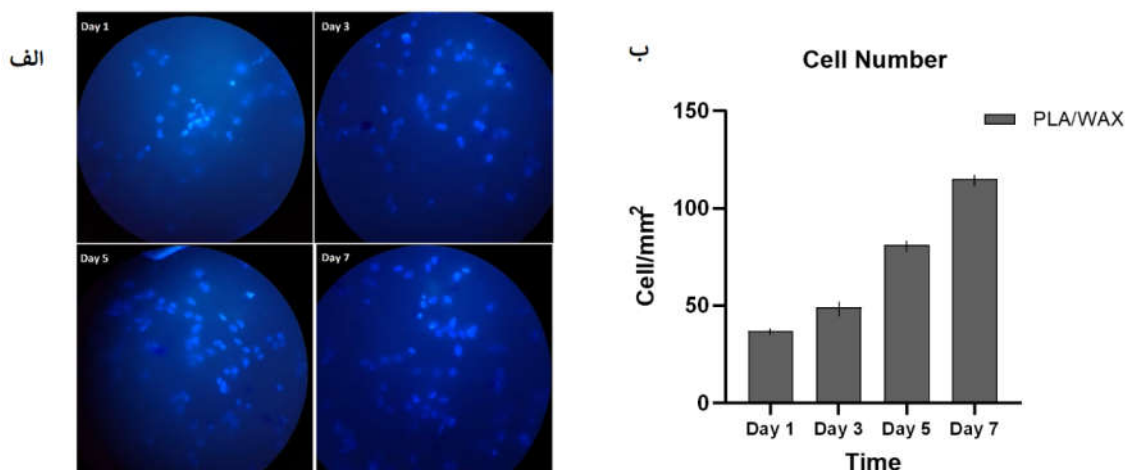
شکل ۲. بررسی مورفولوژی داربست‌ها و سلول‌های مزاننشیمی مشتق شده از ژله وارتنون بند ناف انسان کشت داده شده بر داربست سه بعدی با استفاده از میکروسکپ الکترونی SEM. (الف) داربست سه بعدی با استفاده از میکروسکپ الکترونی SEM. (ب) نانوفیبرهای یکنواخت داربست الکترونیسی شده PLA/Wax. (ج) فتومیکروگراف سلول‌های بنیادی کشت داده شده بر داربست نانوفیبر PLA/Wax (ج) نمودار میانگین قطر فیبر داربست نانوالیاف. میانگین قطر برابر با ۶۵ نانومتر تخمین زده شد.

بررسی بقا سلول‌های مزاننشیمی مشتق شده از ژله وارتنون با استفاده از روش MTT

روش MTT برای مقایسه و بررسی میزان بقا سلول‌های مزاننشیمی مشتق شده از ژله وارتنون بند ناف انسان بر روی داربست‌های PLA/Wax در روزهای ۱، ۳، ۵ و ۷ انجام شد. نتایج حاصله نشان دهنده افزایش میزان بقا سلول‌های مزاننشیمی مشتق شده از ژله وارتنون بند ناف انسان بر داربست در طی دوره ۷ روزه است. مقایسه میزان بقای سلول‌ها بر این داربست بعد از گذشت یک روز تفاوت معنی‌داری با نمونه کشت دو بعدی به عنوان نمونه کنترل نشان نداد، اما با گذشت ۳ تا ۵ روز از زمان استقرار سلول‌ها بر داربست افزایش بقا سلولی بر این داربست مشهود و پس از گذشت ۷ روز بقای سلولی بر داربست کاملاً معنی‌دار گزارش شد (شکل ۳).

بررسی میزان چسبندگی سلول‌ها بر روی داربست

برای بررسی چسبندگی، رشد و تکثیر سلول‌ها، سلول‌های بنیادی مزاننشیمی به مدت ۷ روز با استفاده از محیط کشت کامل بر داربست PLA/Wax کشت شدند. مشاهدات نشان داد میزان چسبندگی بالا و تکثیر سلول‌های بنیادی



شکل ۴. الف- مقایسه تعداد سلول‌های بنیادی مزانشیمی کشت داده شده بر داربست PLA/Wax با استفاده از میکروسکوپ فلوروسنت و رنگ آمیزی با رنگ DAPI ب- نمودار تراکم سلول‌های بنیادی بر انواع داربست PLA/Wax در روز های ۱، ۳، ۵ و ۷. بزرگنمایی X۴۰.

داربست به طور موثری ایجاد اتصالات جدید بین سلول‌های عصبی را تسهیل می‌کند (۲۸). همچنین شرکت Humacyte به بررسی و مطالعه کشت سلول‌های ماهیچه‌ای صاف مویرگی بر روی داربست‌های جدید توپولار منفذدار در حالت *in vitro* پرداخته است (۲۹). Shaobo و همکارانش یک داربست سه بعدی الکتروریسی جدید متفاوت با سایر فیبرهای الکتروریسی شده ساختند تا شباهت بیشتری به معماری طبیعی ماتریکس خارج سلولی داشته باشد. نتایج کشت سلول بر این داربست نشان داد که برخلاف سلول‌های کشت شده بر روی داربست‌های قدیمی که حالت صاف و پهن دارند، سلول‌ها روی داربست سه بعدی جدید به شکل برجسته در می‌آیند که شباهت بسیار زیادی به مورفولوژی سلول‌ها در حالت *in vivo* دارد. نتایج این تحقیق افزایش پنج برابری را در تکثیر سلولی در مقایسه با حالت دوبعدی گزارش داد (۱۳).

در سال ۲۰۱۳، حویزی و همکارانش برای افزایش اتصال و تکثیر سلول‌ها بر داربست سه بعدی PLA این پلیمر را با ژلاتین ادغام کردند. نتایج آنها نشان داد که داربست جدید الکتروریسی شده PLA/gelatin برای اتصال و زنده ماندن سلول‌های فیبروبلاست مناسب‌تر بود و زیست سازگاری بالاتری از خود نشان داد (۳۰). همچنین Shalumon و همکارانش در سال ۲۰۱۵ از ترکیب داربست پلیمری صناعی poly (l-lactic acid) (PLLA) با بیوپلیمر ژلاتین برای افزایش چسبندگی سلول‌ها در برای مهندسی بافت‌های عروقی استفاده کردند. نتایج حاصل از SEM، رنگ آمیزی فلئورسنت و آزمون بقای سلولی، افزایشی را در تعداد سلول‌های زنده و تقسیم سلول‌های HUVECs و SMCs متناسب با وجود

رشته‌ها کاملاً یک شکل و یکنواخت هستند، از ضخامت نانومتری و کیفیت بالایی برخوردار هستند و بید در آنها دیده نمی‌شود. برای بررسی زیست سازگاری این داربست، آزمون MTT بر روی سلول‌های WJ-MSC کشت شده در روزهای مختلف انجام گرفت و مشاهده شد که تعداد زیادی سلول به ایاف نانوفیبری متصل و بقاء چشم گیری داشته‌اند. به علاوه، تصاویر نشان دهنده نفوذ و حضور سلول‌ها در لایه‌های زیرین این داربست نیز بودند.

مطالعات متعددی نشان می‌دهند که استفاده از داربست‌های سه بعدی نقش مؤثری در تمایز سلول‌های بنیادی به انواع مختلف سلول‌ها دارد و سبب شباهت بیشتر محیط به حالت طبیعی *in vivo* و در نتیجه افزایش بقا و تکثیر آنها می‌شود. در زمینه مهندسی ژنتیک و مهندسی بافت، پلیمرهای سنتتیکی همچون PLA بیشترین کاربرد و اهمیت را دارند، زیرا زیست تخریب پذیر و زیست سازگار هستند (۲۶). علاوه بر این، می‌توان از آنها در بازسازی و ترمیم انواع بافت‌ها از جمله استخوان، پوست، بافت عروقی و سایر ارگان‌ها استفاده کرد (۲۷). تاکنون مطالعات مختلفی بر انواع مختلفی از داربست‌ها انجام شده است. یکی از اهداف این تحقیقات دستیابی به داربست‌هایی است که زیست سازگار باشند و بهترین تقلید کننده حالت سه بعدی بافت‌های بدن جانداران باشند تا بتوان آنها را در شرایطی نزدیک به حالت طبیعی بدن کشت داد. طی دهه‌های اخیر، محصولات متفاوتی با پتانسیل بالا در زمینه مهندسی بافت برای کاربردهای بالینی به کار گرفته شده‌اند. یکی از آنها داربست Neuro-Spinal است که توسط کمپانی *In vivo Therapeutics* ساخته شده است. این

ژلاتین در داربست نشان داد (۳۱). در زمینه مهندسی بافت نیز محققان در تلاش هستند تا با تعدیل و بهبود کیفیت داربست‌های الکترورسی، بازده تکثیر و تمایز سلولی را افزایش دهند. در مطالعه‌ای، سوبسترای PLGA در غلظت‌های مختلف NaOH هیدرولیز شد تا گروه‌های کربوکسیل و هیدروکسیل در سطح فیبرها افزایش یابد. به علاوه، گروه‌های عملکردی با EDC/NHS فعال شدند تا با کلاژن پیوند شیمیایی برقرار کنند. کلاژن به هدف افزایش فعالیت زیستی به داربست سه بعدی الکترورسی شده اضافه شد و سلول‌های رده کراتینوسیت و فیبروبلاست، روی آن کشت شد. نتایج نشان داد که تکثیر سلول‌های کراتینوسیت به طور معنی‌داری در داربست تعدیل شده با حضور لایه سطحی کلاژن بیشتر بود (۳۲). در تحقیق دیگری که اخیراً در سال ۲۰۱۹ انجام شد، یک لایه سطحی از فیبروین‌های ابریشم الکترورسی شده به ایمپلنت‌های پستان به منظور تعدیل سطح آنها برای اتصال سلول‌ها افزوده شد و چسبندگی سلول‌ها و همچنین تکثیر آنها بر روی این داربست با پوشش ابریشمی آزمایش شد. نتایج نشان داد که زیست‌سازگاری داربست حاصل شده افزایش پیدا کرده و بقای سلول‌های کراتینوسیت کشت شده بر روی آن به طور معنی‌داری افزایش یافت (۳۳). در مطالعه حاضر نیز با تعدیل داربست PLA توسط افزودن موم به طور مشابه سازگاری این داربست برای کشت سلول‌های بنیادی مزانشیمی و چسبندگی آنها و همچنین بازده کشت سلول بر این داربست افزایش یافت. Tuerdimaimaiti و همکارانش از داربست‌های PLA و PBA برای مهندسی بافت عروقی استفاده کردند. آنها داربست‌های PLA/PBS را از طریق روش الکترورسی سنتز کردند. سپس نانوفیبریل‌های سلولزی را به آن افزودند. داربست‌های حاصل شده دارای فیبرهای یک شکل بودند که حالت سه بعدی مطلوبی داشتند، زیست‌سازگار بودند، خصوصیات مکانیکی مناسبی درمقایسه با بافت اصلی بدن نشان دادند و به طور کلی دارای پتانسیل بالایی برای مهندسی بافت عروقی هستند (۲۷). Stenhamre و همکارانش تحقیقی انجام دادند تا به ارتباط اتصال و تکثیر سلول‌های غضروفی پس از گسترش در محیط آزمایشگاهی و نوع

فیبرهای موجود در داربست هستند پی ببرند. آنها داربست‌های PLA را با دو مورفولوژی مختلف تولید کردند که شامل داربست‌های میکروفیبر و داربست‌های میکروفیبر پوشیده شده با نانوفیبر بود. سپس سلول‌های غضروفی بالغ مفصل انسان در این دو داربست به مدت ۲۸ روز کشت شدند و نتایج آنها نشان داد که وجود نانوفیبر بر تکثیر سلول‌های غضروفی موثر است و شکل کلی سه بعدی محیط اطراف سلول‌ها بیشتر بر تمایز مجدد سلول‌ها تاثیر می‌گذارد. مطالعه آنها می‌تواند بر یافتن داربست بهینه برای مهندسی بافت غضروف مفید باشند. همان‌طور که نتایج این تحقیق هم نشان دادند، ضخامت فیبرهای تشکیل دهنده داربست نقش مهمی در بهبود تکثیر و رشد و تمایز و گسترش سلول‌ها حین کشت سه بعدی دارند (۳۴). در تحقیق حاضر نیز هدف از افزودن موم به داربست PLA کاهش ضخامت فیبرهای حاصل شده، بهبود وضعیت اتصال سلول‌های کشت داده شده و همچنین افزایش رشد و تکثیر آنها از روش الکترورسی بود. نتایج تحقیق حاضر در راستای نتایج تحقیق Stenhamre و همکارانش قرار دارد و آنها را تایید می‌کند. در زمینه مهندسی ژنتیک و مهندسی بافت، پلیمرهای سنتتیکی بیشترین کاربرد و اهمیت را دارند و زیست‌تخریب پذیر هستند که شامل PLA نیز است (۲۶).

نتایج حاصل از این تحقیق نشان می‌دهد که داربست PLA/Wax بستر مناسبی جهت اتصال و رشد سلول‌های بنیادی مزانشیمی حاصل شده از ژله وارزون بندناف انسان فراهم می‌آورد. علاوه بر این، نتایج تایید کننده افزایش معنی دار بقا و تکثیر سلولی با استفاده از داربست PLA/Wax است.

تقدیر و تشکر

هزینه این تحقیق از محل اعتبارات پژوهانه سال ۱۳۹۹ معاونت پژوهشی دانشگاه شهیدچمران اهواز تامین شده است. نویسندگان این مقاله کمال تشکر و قدردانی خود را از معاونت پژوهشی و فن‌آوری دانشگاه شهید چمران اهواز به‌خاطر حمایت‌های مالی اعلام می‌دارند.

REFERENCES

1. Bonzo LV, Ferrero I, Cravanzola C, Mareschi K, Rustichell D, Novo E, et al. Human mesenchymal stem cells as a two-edged sword in hepatic regenerative medicine: engraftment and hepatocyte differentiation versus profibrogenic potential. *Gut* 2008; 57: 223-31.
2. Chao KC, Chao KF, Fu YS, Liu SH. Islet-like clusters derived from mesenchymal stem cells in Wharton's Jelly of the human umbilical cord for transplantation to control type 1 diabetes. *PLoS one* 2008; 3: e1451.
3. Xu W, Zhang X, Qian H, Zhu W, Sun X, Hu J, et al. Mesenchymal stem cells from adult human bone marrow differentiate into a cardiomyocyte phenotype in vitro. *Exp Biol Med* 2004; 229:623-31.

4. Reed SA, Johnson SE. Equine umbilical cord blood contains a population of stem cells that express Oct4 and differentiate into mesodermal and endodermal cell types. *J Cell Physiol* 2008; 215:329-36.
5. Choong P, Mok P, Cheong S, Leong C, Then K. Generating neuron-like cells from BM-derived mesenchymal stromal cells in vitro. *Cytotherapy* 2007; 9:170-83.
6. Beeravolu N, McKee C, Alamri A, Mikhael S, Brown C, Perez-Cruet M, Chaudhry GR. Isolation and Characterization of Mesenchymal Stromal Cells from Human Umbilical Cord and Fetal Placenta. *J Vis Exp* 2017; 3:55224.
7. El Edel R, Khodeer S, Noreldin R, Ammar H. Isolation of Mesenchymal Stem Cells from Wharton's Jelly in Comparison with Bone Marrow and Their Endothelial Differentiation. *IOSR Journal of Biotechnology and Biochemistry* 2017; 3:50-57.
8. Himal I, Goyal U, Ta M. Evaluating Wharton's Jelly-Derived Mesenchymal Stem Cell's Survival, Migration, and Expression of Wound Repair Markers under Conditions of Ischemia-Like Stress. *Stem Cells Int* 2017; 17: 5259849.
9. Kalaszczynska I, Ferdyn K. Wharton's jelly derived mesenchymal stem cells: future of regenerative medicine? Recent findings and clinical significance. *Biomed Res Int* 2015; 2015:430847.
10. Khademhosseini A, Langer R. A decade of progress in tissue engineering. *Nature Protocols* 2016; 11:1775-81.
11. Chai JH, Wu QS. Electrospinning preparation and electrical and biological properties of ferrocene/poly(vinylpyrrolidone) composite nanofibers. *Beilstein J Nanotechnol* 2013;4:189-97.
12. Antoni D, Burckel H, Josset E, Noel G. Three-dimensional cell culture: a breakthrough in vivo. *Int J Mol Sci* 2015; 16:5517-27.
13. Cai S, Xu H, Jiang Q, Yang Y. Novel 3D electrospun scaffolds with fibers oriented randomly and evenly in three dimensions to closely mimic the unique architectures of extracellular matrices in soft tissues: fabrication and mechanism study. *Langmuir* 2013; 29:2311-8.
14. Jiang T, Carbone EJ, Lo KW-H, Laurencin CT. Electrospinning of polymer nanofibers for tissue regeneration. *Prog Polym Sci* 2015; 46:1-24.
15. Hoveizi E, Nabiuni M, Parivar K, Ai J, Massumi M. Definitive endoderm differentiation of human-induced pluripotent stem cells using signaling molecules and IDE1 in three-dimensional polymer scaffold. *J Biomed Mater Res A* 2014 ;102:4027-36.
16. Asmani MN, Ai J, Amoabediny G, Noroozi A, Azami M, Ebrahimi-Barough S, et al. Three-dimensional culture of differentiated endometrial stromal cells to oligodendrocyte progenitor cells (OPCs) in fibrin hydrogel. *Cell Biol Int* 2013; 37:1340-9.
17. Sánchez-González S, Diban N, Urtiaga A. Hydrolytic Degradation and Mechanical Stability of Poly(ϵ -Caprolactone)/Reduced Graphene Oxide Membranes as Scaffolds for In Vitro Neural Tissue Regeneration. *Membranes (Basel)* 2018;8:12.
18. Salehi M, Naseri-Nosar M, Ebrahimi-Barough S, Nourani M, Khojasteh A, Farzamfar S, et al. Polyurethane/Gelatin Nanofibrils Neural Guidance Conduit Containing Platelet-Rich Plasma and Melatonin for Transplantation of Schwann Cells. *Cell Mol Neurobiol* 2018; 38:703-13.
19. Gao N, LeLay J, Vatamaniuk MZ, Rieck S, Friedman JR, Kaestner KH. Dynamic regulation of Pdx1 enhancers by Foxa1 and Foxa2 is essential for pancreas development. *Genes & development* 2008; 22:3435-48.
20. Lotfy M. Biological activity of bee propolis in health and disease. *Asian Pac J Cancer Prev* 2006; 7:22-31.
21. Farooqui T, Farooqui AA. Beneficial effects of propolis on human health and neurological diseases. *Front Biosci* 2012; 4:779-93.
22. Hoveizi E, Ebrahimi-Barough S. Embryonic stem cells differentiated into neuron-like cells using SB431542 small molecule on nanofibrous PLA/CS/Wax scaffold. *J Cell Physiol* 2019; 234:19565-73.
23. Hoveizi E, Tavakol S. Therapeutic potential of human mesenchymal stem cells derived beta cell precursors on a nanofibrous scaffold: an approach to treat diabetes mellitus. *J Cell Physiol* 2019; 234:10196-204.
24. Hoveizi E, Khodadadi S, Tavakol S, Karima O, Nasiri-Khalili MA. Small Molecules Differentiate Definitive Endoderm from Human Induced Pluripotent Stem Cells on PCL Scaffold. *Appl Biochem Biotechnol* 2014; 173: 1727-36.
25. Farzaneh Z, Pournasr B, Ebrahimi M, Aghdami N, Baharvand H. Enhanced functions of human embryonic stem cell-derived hepatocyte-like cells on three-dimensional nanofibrillar surfaces. *Stem Cell Rev Rep* 2010;6:601-10.

26. Benatti ACB, Pattaro AF, Rodrigues AA, Xavier MV, Kaasi A, Barbosa MIR, et al. Bioreabsorbable polymers for tissue engineering: PLA, PGA, and their copolymers. *Biomed Mater Eng* 2019; 83-116.
27. Abudula T, Saeed U, Memic A, Gauthaman K, Hussain MA, Al-Turaif H. Electrospun cellulose Nano fibril reinforced PLA/PBS composite scaffold for vascular tissue engineering. *J Polym Res* 2019; 26:110.
28. Teng YD, Lavik EB, Qu X, Park KI, Ourednik J, Zurakowski D, et al. Functional recovery following traumatic spinal cord injury mediated by a unique polymer scaffold seeded with neural stem cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences (PNAS)*. 2002; 99:3024-9.
29. Niklason L, Gao J, Abbott W, Hirschi K, Houser S, Marini R, et al. Functional arteries grown in vitro. *Science* 1999; 284:489-93.
30. Hoveizi E, Nabiuni M, Parivar K, Rajabi-Zeleti S, Tavakol S. Functionalisation and surface modification of electrospun polylactic acid scaffold for tissue engineering. *Cell Biol Int* 2014; 38:41-9.
31. Shalumon K, Deepthi S, Anupama M, Nair S, Jayakumar R, Chennazhi K. Fabrication of poly (l-lactic acid)/gelatin composite tubular scaffolds for vascular tissue engineering. *Int J Biol Macromol* 2015; 72:1048-55.
32. Sadeghi AR, Nokhasteh S, Molavi AM, Khorsand-Ghayeni M, Naderi-Meshkin H, Mahdizadeh A. Surface modification of electrospun PLGA scaffold with collagen for bioengineered skin substitutes. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl* 2016;66:130-137.
33. Carrasco-Torres G, Valdés-Madrigal MA, Vásquez-Garzón VR, Baltiérrez-Hoyos R, la Cruz-Burelo D, Román-Doval R, et al. Effect of Silk Fibroin on Cell Viability in Electrospun Scaffolds of Polyethylene Oxide. *Polymers* 2019; 11:451.
34. Stenhamre H, Thorvaldsson A, Enochson L, Walkenström P, Lindahl A, Brittberg M, et al. Nanosized fibers' effect on adult human articular chondrocytes behavior. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl* 2013;33:1539-45.