Medical Science Journal of Islamic Azad University Vol. 31, No. 3, Autumn 2021 ORIGINAL ARTICLE

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

***Tina Shafaf*[1], *Elham Hoveizi*[2], *Sayed Reza Kazeminejad*[2]**
[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*

[Downloaded from tmuj.iautmu.ac.ir on 2025-12-04]

[DOR: 20.1001.1.10235922.1400.31.3.9.1]
[DOI: 10.52547/iau.31.3.266]

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

مجله علوم پزشکی دانشگاه آزاد اسلامی
دوره ۳۱، شماره ۳، پاییز ۱۴۰۰، صفحات ۲۶۶ تا ۲۷۵

Original Article

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

تینا شفاف[۱]، الهام حویزی[۲]، سیدرضا کاظمی‌نژاد[۲]

[۱] دانشجوی دکتری، گروه زیست شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه شهید چمران اهواز، اهواز، ایران
[۲] دانشیار، 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 وارتون 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 وچسبندگی 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 سلول های استخراج شده بر این داربست ها 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 بقاء 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 وارتون بند ناف، چسبندگی، سلول‌های بنیادی مزانشیمی.*

مقدمه

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 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 میوژنیک 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 (سلول های جزایر پانکراسی و سلول های کبدی) تمایز می‌یابند (۵-۲). بند ناف و بافت

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

[Downloaded from tmuj.iautmu.ac.ir on 2025-12-04]
[DOR: 20.1001.1.10235922.1400.31.3.9.1]
[DOI: 10.52547/iau.31.3.266]

چربی به عنوان منابع عمده استخراج سلول‌های بنیادی مزانشیمی معرفی شده‌اند. ژله وارتون بند ناف شامل بافت همبند مشتق شده از مزودرم خارج جنینی و سلول های شبه فیبروبلاست است. سلول‌های بنیادی مزانشیمی به دست آمده از ژله وارتون از نظر تکوینی ابتدایی‌تر هستند و خصوصیاتی بین سلول‌های بنیادی بالغ و جنینی نشان می‌دهند (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 ایمنی‌زایی پایینی دارند و عوارض جانبی قابل توجهی در فرد گیرنده ایجاد نمی‌کنند (۶).

استفاده از مهندسی بافت در کنار سلول درمانی می‌تواند در تهیه بافت‌های جایگزین و درمان انواعی از بیماری‌ها مفید باشد. هدف از مهندسی بافت تهیه بافت و ارگان‌های جایگزین و یا بازیابی بخش‌های 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 سلول‌ها در محیط آزمایشگاهی می‌توان از کشت سه بعدی استفاده کرد، زیرا شرایط کشت سه‌بعدی سلول‌ها در مقایسه با کشت دوبعدی به شرایط تکوین در حالت in vivo مشابه‌تر است (۱۱). داربست‌های نانوفیبروز با تشکیل شبکه‌ای از الیاف بهم تنیده شده با منافذ فراوان، فضایی شبیه به ماتریکس خارج سلولی بدن برای سلول‌ها فراهم می‌سازد. پس بدیهی است که کاربرد سلول درمانی به همراه مهندسی بافت و شناسایی و تولید داربست مناسب برای اتصال و رشد سلول‌ها به منظور تهیه بافتی جایگزین می‌تواند گام مهمی در پیشبرد درمان انواع زیادی از بیماری‌ها محسوب شود (۱۲). با توجه به این که مورفولوژی صحیح سلول‌ها برای عملکرد و تمایز صحیح آنها حیاتی است، ارتقاء و ساخت داربست‌هایی که به میزان زیادی به ریزمحیط اطراف سلول‌ها در بدن شباهت داشته باشند می‌تواند منجر به مورفولوژی صحیح سلول‌ها شده و بازده بالاتری در اتصالات بین آنها، تکثیر و تمایزشان حاصل کند (۱۳).

روش‌های 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 درآمده‌اند. 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 ارگان‌های مختلف بدن از ساختارهای با ابعاد نانو برخوردار هستند، داربست‌های تولید شده از نانوالیاف علاوه بر پاسخ گویی به نیازهای مطرح شده، حساسیت‌های کمتری در بدن ایجاد می‌کند و سازگاری بیشتری با سلول‌های دفاعی بدن و سایر ارگان‌ها دارند (۱۵). از برتری‌های دیگر کشت سه بعدی می‌توان به زنده ماندن تعداد بیشتری از سلول‌ها، مورفولوژی، تکثیر، تمایز، پاسخ به محرک، ارتباط سلول-سلول، قطبیت سلول و غیره اشاره کرد (۱۳).

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

[Downloaded from tmuj.iautmu.ac.ir on 2025-12-04]
[DOR: 20.1001.1.10235922.1400.31.3.9.1]
[DOI: 10.52547/iau.31.3.266]

PLA/gelatin برای مطالعه تکثیر و تمایز این سلول‌ها به سلول‌های اندودرم قطعی استفاده کردند و در مقایسه با کشت دوبعدی، افزایش معنی‌داری در تعداد سلول‌های تمایز یافته مشاهده کردند (۱۵).

از طرف دیگر، برخی مطالعات نشان داده‌اند که موم زنبور عسل دارای خصوصیات بالقوه‌ای همچون خاصیت آنتی اکسیدان، ضدمیکروبی، ضد التهابی، تعدیل کننده سیستم ایمنی و ضدسرطان است (۲۰، ۲۱). حویزی و همکارانش به تازگی داربست جدید الکتروریسی شده PLA/Cs/Wax را برای تمایز سلول‌های بنیادی ESC به سلول‌های عصبی به کاربردند و مشاهده کردند که سلول‌های 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 الکتروریسی تولید و سپس میزان چسبندگی و بقای سلول‌های بنیادی مزانشیمی کشت شده بر داربست با روش‌های 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 سلول‌های بنیادی مزانشیمی از ژله وارتون 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 آنتی‌بیوتیک (پنی سیلین، استرپتومایسین) و آمفوتریسین شستشو داده شد. پس از شستشوی کامل بافت، کشت و جداسازی سلول‌های بنیادی به روش قطعات بافتی (Explant) انجام شد. سلول‌های بنیادی جدا شده پس از پاساژ اول جهت فلوسایتومتری مارکرهای آنتی CD90، آنتی CD133 و آنتی CD105 که مارکرهای سلول‌های بنیادی مزانشیمی‌اند و نیز آنتی CD34 (مارکر سلولهای هماتوپوئیتیک) به عنوان مارکر منفی رنگ آمیزی شدند. پس از تایید، سلول‌ها 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 سلول‌ها در زیر میکروسکوپ مورد مطالعه قرار گرفتند (۲۳).

تهیه داربست نانوفیبری PLA/Wax با روش الکتروریسی

داربست نانوفیبروز PLA/Wax (7:3) با روش الکتروریسی 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□dimethylthiazoyl□2□yl)−2,5- diphenyltetrazoli um bromide)MTT مطالعه شدند.

کشت سلول‌های 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 تعبیه 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.

بررسی‌های مورفولوژی با میکروسوپ الکترونی

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

بررسی میزان تکثیر و درصد زنده ماندن سلول‌ها با MTT

جهت بررسی میزان بقای سلول های کشت شده بر روی داربست از 3- diphenyl tetrazolium bromide (MTT, Sigma, USA) 4, 5-di-methylthiazol-) 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 سلول‌ها در محیط کشت سه بعدی انجام شد. برای انجام این تست، ابتدا محیط کشت سلول‌ها خارج شد و سپس ۱ میلی لیتر محیط کشت جدید به اضافه ۱۰۰ میلی لیتر محلول MTT به هر خانه

[Downloaded from tmuj.iautmu.ac.ir on 2025-12-04]
[DOR: 20.1001.1.10235922.1400.31.3.9.1]
[DOI: 10.52547/iau.31.3.266]

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 پارافرمالدهید 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 $1mm^2$) به صورت اتفاقی انتخاب و شمارش و میانگین سلولی به دست آمد.

تحلیل داده‌ها

نتایج با استفاده از 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. همهٔ آزمایش‌ها حداقل با سه بار تکرار مجزای بیولوژیک انجام شدند.

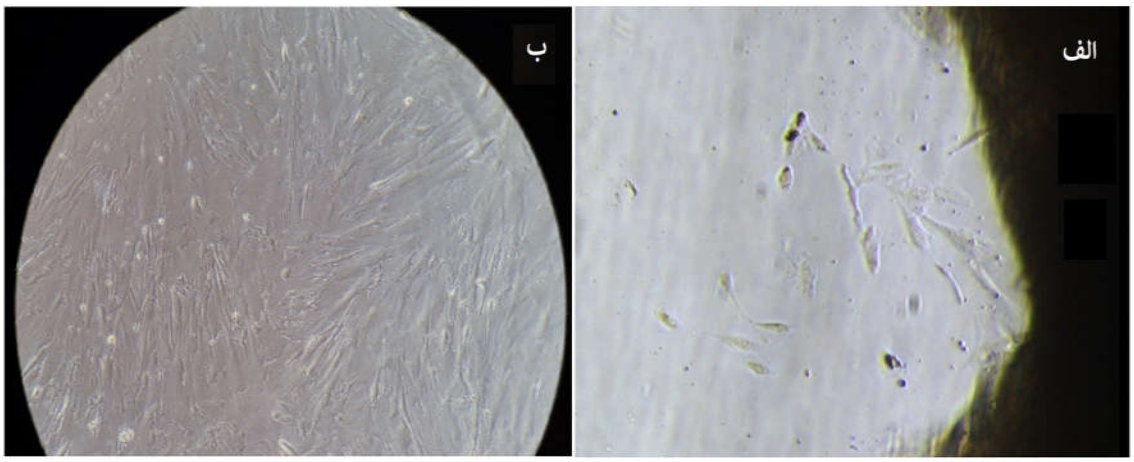
یافته‌ها

بررسی مورفولوژی سلول‌های مزانشیمی مشتق شده از ژله وارتون بند ناف انسان

۷ 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 (شکل۱-ب).

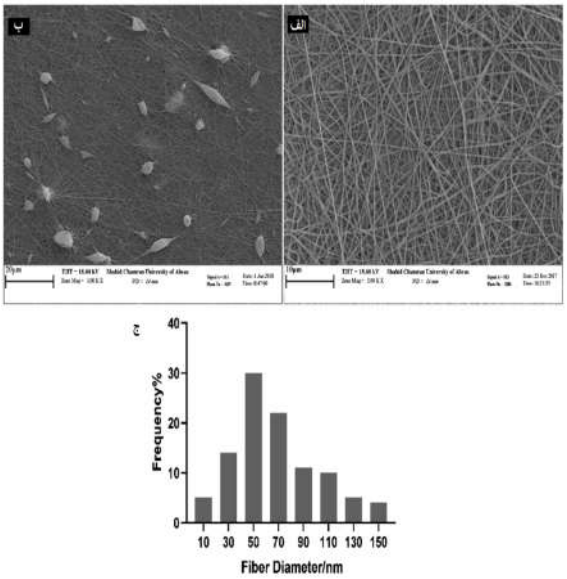
بررسی مورفولوژی داربست و سلول‌های بنیادی مزانشیمی کشت داده شده بر داربست

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 شکل۲-الف نشان داده شده است. همان طور که در شکل ۲ مشاهده می‌شود، نانوالیاف حاصل از ترکیب PLA با موم به صورت کاملا یکنواخت و بدون بید به دست آمد. شکل۲-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 measurment برای داربست ۶۵ نانومتر تخمین زده شد (شکل۲-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

[Downloaded from tmuj.iautmu.ac.ir on 2025-12-04]
[DOR: 20.1001.1.10235922.1400.31.3.9.1]
[DOI: 10.52547/iau.31.3.266]



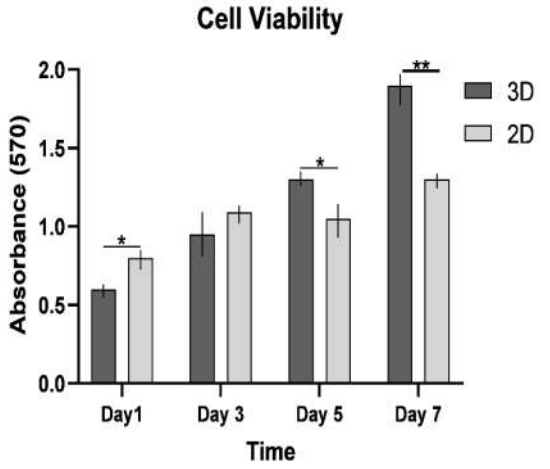
شکل۲. بررسی مورفولوژی داربست‌ها و سلول‌های مزانشیمی مشتق شده از ژله وارتون بند ناف انسان کشت داده شده بر داربست سه بعدی با استفاده از میکروسک الکترونی SEM. الف) نانوفیبرهای یکنواخت داربست الکتروریسی شده PLA/Wax، ب) فتومیکروگراف سلول های بنیادی کشت داده شده بر داربست نانوفیبر PLA/Wax ج) نمودار میانگین قطر فیبر داربست نانوالیاف. میانگین قطر برابر با ۶۵ نانومتر تخمین زده شد.

بررسی بقا سلول‌های مزانشیمی مشتق شده از ژله وارتون با استفاده از روش MTT

روش MTT برای مقایسه و بررسی میزان بقا سلول‌های مزانشیمی مشتق شده از ژله وارتون 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 مزانشیمی مشتق شده از ژله وارتون بند ناف انسان بر داربست در طی دوره ۷ روزه است. مقایسه میزان بقای سلول‌ها بر این داربست بعد از گذشت یک روز تفاوت معنی داری با نمونه کشت دو بعدی به عنوان نمونه کنترل نشان نداد، اما با گذشت۳ 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 کاملا معنی‌دار گزارش شد (شکل۳).

بررسی میزان چسبندگی سلول‌ها بر روی داربست

برای بررسی چسبندگی، رشد و تکثیرسلول‌ها، سلول‌های بنیادی مزانشیمی 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 مزانشیمی 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 کاملا معنی‌داری در تکثیر سلول‌ها در مقایسه با روز اول بود. این نتایج نشان دادکه داربست نانوفیبر PLA/Wax می‌تواند بستر مناسبی برای اتصال، رشد و تکثیر سلول‌های مزانشیمی فراهم آورد (شکل ۴).

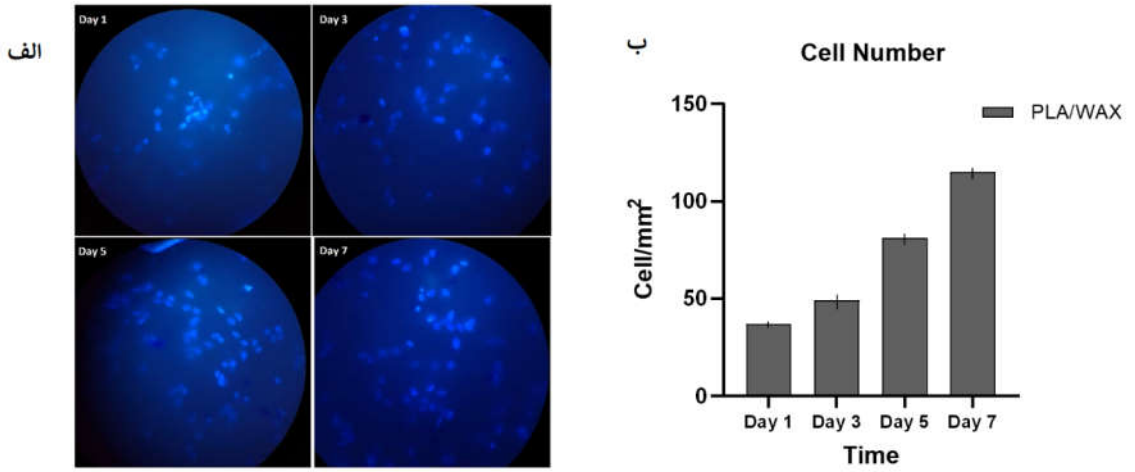


شکل ۳. نمودار بررسی بقا سلول های مزانشیمی مشتق شده از ژله وارتون بند ناف انسان در روزهای ۱، ۳، ۵ و ۷ پس از کشت با استفاده از روش MTT. مقادیر به دست آمده میانگین حاصل از سه تکرار آزمایش هستند. *P<۰/۰۵، **P<۰/۰۱، ***P<۰/۰۰۱ (2D: کشت دو بعدی و 3D: کشت سه بعدی)

بحث

امروزه با سلول درمانی موفقیت‌های چشم گیری در درمان بیماری‌ها به دست آمده است. تاکنون از منابع مختلفی از سلول‌های بنیادی و پیش ساز 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 برروی این داربست سه بعدی کشت شدند و میزان چسبندگی و بقای آنها ارزیابی شد. تصاویر حاصل از الیاف الکتروریسی شده داربست سه بعدی توسط میکروسکپ الکترونی SEM نشان داد که این

[Downloaded from tmuj.iautmu.ac.ir on 2025-12-04]
[DOR: 20.1001.1.10235922.1400.31.3.9.1]
[DOI: 10.52547/iau.31.3.266]



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.

رشته‌ها کاملا 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 سلول های WJ-MSCکشت شده در روزهای مختلف انجام گرفت و مشاهده شد که تعداد زیادی سلول به الیاف 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 درنتیجه 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 ارگان ها 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 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 توبولار 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

[Downloaded from tmuj.iautmu.ac.ir on 2025-12-04]
[DOR: 20.1001.1.10235922.1400.31.3.9.1]
[DOI: 10.52547/iau.31.3.266]

ژلاتین در داربست نشان داد (۳۱). در زمینه مهندسی بافت نیز محققان در تلاش هستند تا با تعدیل و بهبود کیفیت داربست‌های الکتروریسی، 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 الکتروریسی شده اضافه شد و سلول‌های رده کراتینوپسیت 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 اخیرا در سال ۲۰۱۹ انجام شد، یک لایه سطحی از فیبروین‌های ابریشم الکتروریسی شده به ایمپلنت‌های پستان به منظور تعدیل سطح آنها برای اتصال سلول ها افزوده شد و چسبندگی سلول‌ها و همچنین تکثیر آنها بر روی این داربست با پوشش ابریشمی آزمایش شد. نتایج نشان داد که زیست سازگاری 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 الکتروریسی سنتز کردند. سپس نانوفیبریل‌های سلولزی را به آن افزودند. داربست‌های حاصل شده دارای فیبرهای یک شکل بودند که حالت سه بعدی مطلوبی داشتند، زیست سازگار 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. همان طور 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 الکتروریسی 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 زیست تخریب 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 وارتون بندناف انسان فراهم می‌آورد. علاوه بر این، نتایج تایید کننده افزایش معنی دار بقا و تکثیرسلولی 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 stern cells from adult human bone marrow differentiate into a cardiomyocyte phenotype in vitro. Exp Biol Med 2004; 229:623-31.

[Downloaded from tmuj.iautmu.ac.ir on 2025-12-04]
[DOR: 20.1001.1.10235922.1400.31.3.9.1]
[DOI: 10.52547/iau.31.3.266]

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.

[Downloaded from tmuj.iautmu.ac.ir on 2025-12-04]
[DOR: 20.1001.1.10235922.1400.31.3.9.1]
[DOI: 10.52547/iau.31.3.266]

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.

[Downloaded from tmuj.iautmu.ac.ir on 2025-12-04]

[DOR: 20.1001.1.10235922.1400.31.3.9.1]

[DOI: 10.52547/iau.31.3.266]