پژوهنده (مجله پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی)
سال بیستم، شماره ۲، پی در پی ۱۰۴، صفحات ۶۳ تا ۷۱
خرداد و تیر ۱۳۹۴

تاریخ دریافت مقاله: ۱۳۹۱/۱۲/۱۶
تاریخ پذیرش مقاله: ۱۳۹۴/۵/۲۸

بررسی بقا و چسبندگی سلول‌های پرتوان القا شده انسانی بر داربست نانوفیبری PLA/gelatin

الهام حویزی[*1]، *محمد نبیونی*[2]، *طیبه محمدی*[1]، *سمیه ابراهیمی باروق*[3]، *شیما توکل*[4]

۱. گروه زیست شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه شهید چمران اهواز، اهواز، ایران
۲. گروه زیست شناسی سلولی و مولکولی، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه خوارزمی (TMU)، تهران، ایران
۳. گروه مهندسی بافت و علوم سلولی کاربردی، دانشکده فن‌آوری‌های نوین پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی تهران، تهران، ایران
۴. مرکز تحقیقات علوم دارویی رازی، دانشگاه علوم پزشکی ایران، تهران، ایران

چکیده

سابقه و هدف: امروزه سلول‌های پرتوان القا شده (iPS) به عنوان یکی از جدیدترین و بهترین منابع سلولی برای سلول درمانی مطرح می‌باشند. در سال‌های اخیر تحقیقات در زمینه‌ی سلول درمانی و مهندسی بافت در سطح وسیعی رو به گسترش بوده به طوری که امروزه توانایی بالقوه‌ای برای ساخت انواع داربست‌ها به همراه انواع سلول‌ها مطرح است. در این مطالعه، به منظور افزایش خاصیت چسبندگی سطحی و بقای سلولی، داربست نانوفیبری پلی‌لاکتیک اسید (PLA) با استفاده از غلظت مناسب ژلاتین تعدیل شد.

مواد و روش‌ها: انواع داربست‌ها با استفاده از روش الکترواسپینینگ ساخته و میزان چسبندگی و بقای سلول‌های iPS بر این داربست‌ها با استفاده از میکروسکوپ الکترونی SEM و MTT بررسی شد.

یافته‌ها: نتایج بدست آمده نشان داد داربست PLA/gelatin تعدیل شده نسبت به داربست PLA، مدل مناسب‌تری برای چسبندگی، تکثیر و بقای سلول‌های iPS محسوب می‌شود به طوری‌که میزان چسبندگی و بقای سلولی بر داربست PLA/gelatin، با توجه به میزان سازگاری بیشتر، به طور معنی‌داری افزایش می‌یابد.

نتیجه‌گیری: این یافته‌ها در زمینه‌ی مهندسی بافت گام مهمی در استفاده از داربست‌های مناسب در جهت کشت سه بعدی انواع سلول‌ها به منظور درمان انواع بیماری‌ها محسوب می‌شوند.

واژگان کلیدی: PLA، ژلاتین، سلول‌های iPS، داربست، چسبندگی، بقای سلولی

لطفاً به این مقاله به صورت زیر استناد نمایید:
Hoveizi E, Nabiuni M, Mohammadi T, Ebrahimi-Barough S, Tavakol S. Evaluation of viability and adhesion of induced pluripotent stem cells on PLA/gelatin nanofiber scaffold. Pejouhandeh 2015;20(2):63-71.

مقدمه

مهندسی بافت به عنوان یک رشته‌ی علمی جدید برای ترمیم یا بهبود ارگان‌های مختلف بدن و بافت‌های آسیب دیده استفاده می‌گردد. مهندسی بافت برای تولید دقیق و قابل استفاده محصولات خود نیازمند عواملی همچون ماتریکس خارج سلولی مناسب (ECM)، سلول‌های مناسب و بیوراکتورهایی که بتوانند شرایطی مشابه بدن انسان را ایجاد نمایند، می‌باشد که هر یک اهمیت خاص خود را در احیا و یا ترمیم بافت دارند (۲،۱). داربست‌های تولید شده در مهندسی بافت باید خصوصیات فیزیکی و شیمیایی سطحی مناسبی را داشته باشند تا پس از کشت سلول‌ها، چسبندگی و اتصال مناسبی بین سلول‌ها و داربست به وجود آید. کاربرد نانوالیاف به دلیل خصوصیات مطلوب مکانیکی و بیولوژیک، در زمینه‌های گوناگون پزشکی روز افزون است. از نقطه نظر علوم بیولوژیک، تمام ارگان‌ها و اعضای بدن، از نانوساختارها تشکیل شده‌اند و به همین دلیل نانوالیاف سازگاری خوبی را برای مصارف بیوپزشکی همچون پروتزها، سیستم های رهایش دارو و تولید پوست و ارگان‌های مصنوعی بدن پیدا نموده اند. امروزه نانوتکنولوژی با ورود خود به عرصه‌های مختلف علمی به همراه مهندسی بافت تحولی شگرف را به وجود آورده است (۵-۳). در سال‌های اخیر، روش‌های مختلفی برای تولید داربست‌ها مطرح شده است. در میان انواع روش‌های تولید داربست، روش الکتروریسی (Electrospinning) بیش از همه

*نویسنده مسؤول مکاتبات: **الهام حویزی**؛ اهواز، دانشگاه شهید چمران اهواز، دانشکده علوم، گروه زیست شناسی؛ تلفن: ۳۳۳۳۱۰۴۵ (۰۶۱)؛ پست الکترونیک: e.hoveizi@yahoo.com و e.hoveizi@SCU.ac.ir

[Downloaded from pajoohande.sbmu.ac.ir on 2026-11-21]

مورد توجه قرار گرفته است. مبنای الکتروریسی، استفاده از نیروی میدان الکتریکی بین قطره‌ی معلق محلول یا مذاب در نوک موئینه و صفحه‌ی جمع کننده است. زمانی که شدت میدان الکتریکی بر کشش سطحی محلول یا مذاب پلیمری غلبه پیدا می‌کند، یک جت باردار از قطره خارج شده و به سمت صفحه هدف حرکت می‌کند و الیاف به صورت لایه‌ای بی‌بافت شکل می‌گیرند (۷،۶).

پیشرفت‌های اخیر در روش الکتروریسی امکان تولید الیافی پیوسته و جامد با قطرهایی در محدوده چندین نانومتر را به همراه کنترل ساختار بین مولکولی سطحی ایجاد نموده است. با توجه به اینکه ارگان‌های مختلف بدن از ساختارهای نانویی برخوردار هستند داربست‌های تولید شده از نانوالیاف علاوه بر پاسخ‌گویی به نیازهای مطرح شده حساسیت‌های کمتری را در بدن ایجاد نموده و سازگاری بیشتری را با سلول‌های دفاعی بدن و سایر ارگان‌ها دارند (۹،۸). در سال ۲۰۱۲، Hejazian و همکارانش همسو با آزمایشات ما، رفتار و میان‌کنش سلول‌های بنیادی مو را بر داربست PCL مورد بررسی قرار دادند و اظهار داشتند داربست PCL بستر مناسبی برای اتصال، پراکندگی، بقا و تکثیر سلول‌های بنیادی مو فراهم می‌آورد و نتایج خود را با استفاده از تکنیک‌های SEM، تست MTT و ایمونوسیتوشیمی تأیید نمودند (۶). همچنین در سال ۲۰۱۴، Meta و همکارانش داربست نانوفیبری پلی‌کاپرولاکتون/ ژلاتین را توسط الکتروریسی سنتز و چسبندگی و تکثیر سلول‌های بنیادی مزانشیمی مغز استخوان انسانی را روی داربست تعدیل شده توسط آزمون‌های مختلف بررسی کردند. آنها براساس نتایجشان نشان دادند که چسبندگی و تکثیر سلول‌ها روی داربست، در تمام زمان‌های مطالعه شده، بهبود یافته است (۱).

به‌دنبال بحث تولید سلول‌های iPS از سلول‌های تمایز یافته بالغ توسط Yamanaka (۲۰۰۹)، دریچه‌ی جدیدی از امید برای به کار بردن سلول‌های بنیادی در درمان بیماری‌ها بدون نگرانی از وجود مشکلات سیستم ایمنی و مسایل اخلاقی باز شده است (۱۰). سلول‌های iPS سلول های بنیادی همه توانی (pluripotent) محسوب می‌شوند که به طور آزمایشگاهی از سلول‌های غیر بنیادی بالغ بدست می‌آیند (۱۲،۱۱). بدین صورت که ژن‌های القاکننده‌ای که شامل ژن‌های خانواده‌های Klf، Oct، Sox و Myc می‌باشند با کمک روش‌های مختلف مثل استفاده از سیستم لنتی ویروس وارد سلول‌های بالغ می‌گردند (۱۴،۱۳). سلول‌های iPS توانایی خودنوزایی و تمایز به انواع سلول‌های بدن انسان را داشته و از بسیاری جهات از جمله مورفولوژی، سرعت تکثیر، فعالیت تلومرازی و بیان انواع ژن‌های همه توان، کاملاً مشابه سلول‌های بنیادی جنینی عمل می‌کنند (۱۵). در این مطالعه، داربست PLA با روش الکتروریسی تولید و سپس برای بهبود شرایط کشت سلولی با استفاده از ژلاتین تعدیل گشت و میزان چسبندگی و بقای سلول‌های ips بر داربست تعدیل شده با روش‌های مختلف مورد ارزیابی قرار گرفت.

مواد و روش‌ها

برای تهیه داربست ابتدا پلیمر PLA (Sigma) با غلظت wt ۲/۵٪ و ژلاتین (Sigma) با غلظت wt ۸٪ در حلال هگزافلوروایزوپروپانول (Sigma, HFIP) در دمای اتاق به مدت ۲۴ ساعت حل شدند تا محلولی شفاف حاصل گردید. برای تهیه‌ی داربست ترکیبی، دو محلول PLA و ژلاتین با نسبت‌های ۷:۳ و ۳:۷ با هم مخلوط شدند. سپس محلول در سرنگ پلاستیکی ۵ میلی‌لیتری قرار داده و در دستگاه الکترواسپینینگ جاسازی گشت. برای اسپین این محلول از سوزن gauge ۲۲ استفاده شد. ولتاژ بین ۱۲ تا ۱۸ کیلوولت، سرعت تزریق ۰/۵ میلی‌لیتر در ساعت، فاصله سر سوزن تا غلطک ۱۰ سانتیمتر و سرعت چرخش غلتک rpm ۱۰۰۰ تنظیم گشت. این محلول به مدت ۱۵ ساعت روی ورقه آلومینیومی اسپین گردید و سپس اسکافولد حاصل به مدت ۲۴ ساعت در شرایط خلأ خشک گردید (۱۶).

سلول‌های پرتوان القا شده‌ی انسانی (HiPS) به صورت معمول روی سلول‌های فیبروبلاست موشی که به عنوان یک لایه سلولی تغذیه کننده (MEF) محسوب می‌شوند در محیط DMEM/F12 (Gibco, USA) حاوی ۱۰٪ Knock Out Serum Replacement (SR Gibco, USA)، ۵٪ fetal bovine serum (FBS, Gibco, USA)، ال-گلوتامین (Sigma) با غلظت ۲ mM، بتا مرکاپتو اتانول با غلظت ۱/۱ mM، اسیدهای آمینه‌ی ضروری (Sigma) با غلظت ۱ mM، پنی‌سیلین ۱٪ و bFGF (Sigma) با غلظت ۱۰ ng/ml در فلاسک کشت داده شدند. محیط کشت سلولی به صورت روزانه تعویض و معمولاً بعد از ۸ روز با استفاده از کلاژناز نوع چهار با غلظت ۱ mg/ml پاساژ داده شدند (۱۷).

بعد از تهیه، داربست به قطعاتی با قطر ۱۶ میلی‌متر تقسیم و برای استریل شدن به مدت ۲۴ ساعت در مقابل تابش امواج UV قرار داده شدند. سپس این قطعات در پلیت ۲۴ خانه تعبیه و به مدت ۲۴ ساعت در PBS محتوی غلظت بالای پنی‌سلین- استرپتومایسین قرار گرفتند. سپس، تعداد

[Downloaded from pajoohande.sbmu.ac.ir on 2026-11-21]

5×10^{4} cell/well سلول در هر خانه ریخته و برای افزایش چسبندگی سلولی از غلظت ۰/۱٪ ماتریژل استفاده گردید (۱۸). 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 آماده‌سازی اسکافولدهای دارای سلول، ابتدا نمونه‌ها با PBS به مدت پنج دقیقه شسته و با گلوتاردهید ۲/۵٪ به مدت یک ساعت فیکس گردیدند. سپس نمونه‌ها با الکل‌های ۳۰، ۵۰، ۷۰، ۸۰، ۹۰ و ۱۰۰٪ به صورت صعودی هر کدام به مدت پانزده دقیقه، آبگیری شده و بدنبال آن با ذرات طلا پوشانده و عکس برداری توسط میکروسکوپ الکترونی انجام گرفت. قطر الیاف و اندازه‌ی منافذ با استفاده از نرم افزار measurement (version 9) اندازه‌گیری گردید. برای 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 گردید (۱۹).

میزان بقای سلول‌های کشت داده شده روی انواع داربست‌های نانوفیبروز با استفاده از 3-(4,5-di-methylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide (MTT, Sigma, USA) با غلظت ۵ mg/ml ارزیابی شد. این تست در روزهای ۱، ۳ ، ۵ و ۷ بعد از قرار دادن سلول‌ها در محیط کشت سه بعدی انجام گرفت، به این صورت که در زمان مناسب بعد از کشت سلول‌ها در پلیت‌های ۲۴ خانه، محیط کشت خارج و به هر خانه حدود ۳۰۰ میلی‌لیتر محیط تازه حاوی ۳۰ میکرولیتر از محلول MTT اضافه شد. بعد از ۳ تا ۴ ساعت انکوباسیون با دمای ۳۷ درجه سانتیگراد، محلول MTT خارج و به هر خانه، ۲۰۰ میکرولیتر DMSO (Dimethyl Sulfoxide, Merck) اضافه شد. سپس جذب نمونه در طول موج ۵۷۰ نانومتر با استفاده از دستگاه الیزا ریدر (Expert 96, Asys Hitch, Ec Austria) خوانده شد. به منظور تأیید بیشتر، آزمایش سه بار تکرار شد (۱۸).

فراهم آوردن محیطی مناسب برای اتصال و تکثیر سلول‌ها از جمله ویژگی‌های مهم هر داربست محسوب می‌شود. خصوصیات انواع مختلف داربست‌ها نقش مهمی را در میان‌کنش سلول به سلول و سلول با داربست ایفا می‌کند. برای بررسی میزان چسبندگی سلولی، سلول‌های HiPS به مدت ۱، ۳ و ۵ روز با محیط کشت کامل بر روی داربست‌های gelatin PLA/gelatin و PLA کشت شدند و سپس سلول‌ها با استفاده از پارافرمالدهید ۴٪ تثبیت و با استفاده از رنگ DAPI رنگ‌آمیزی شدند (۱۶).

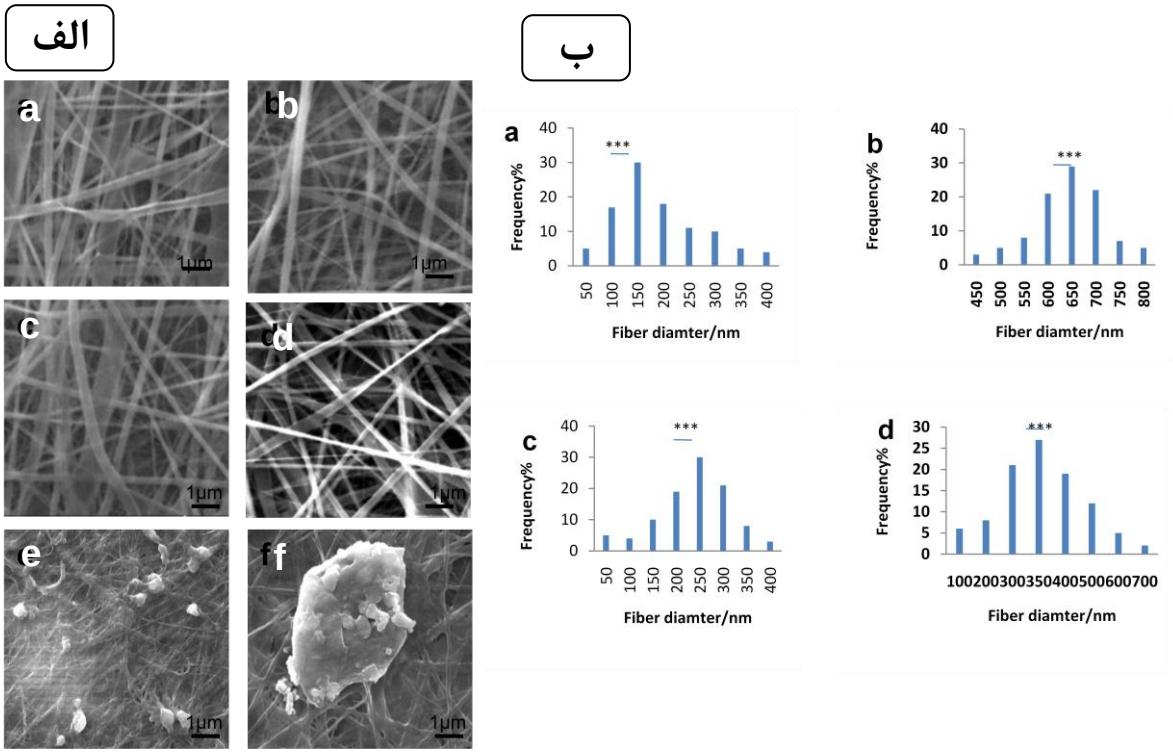
نتایج با استفاده از نرم‌افزار SPSS (Ver.12) و آزمون‌های آماری ANOVA و T-test به صورت Mean±SE مورد ارزیابی قرار گرفت. رسم نمودارها در نرم افزار Excel انجام گرفت و تفاوت‌های با $P<0/05$ معنی‌دار در نظر گرفته شد.

یافته‌ها

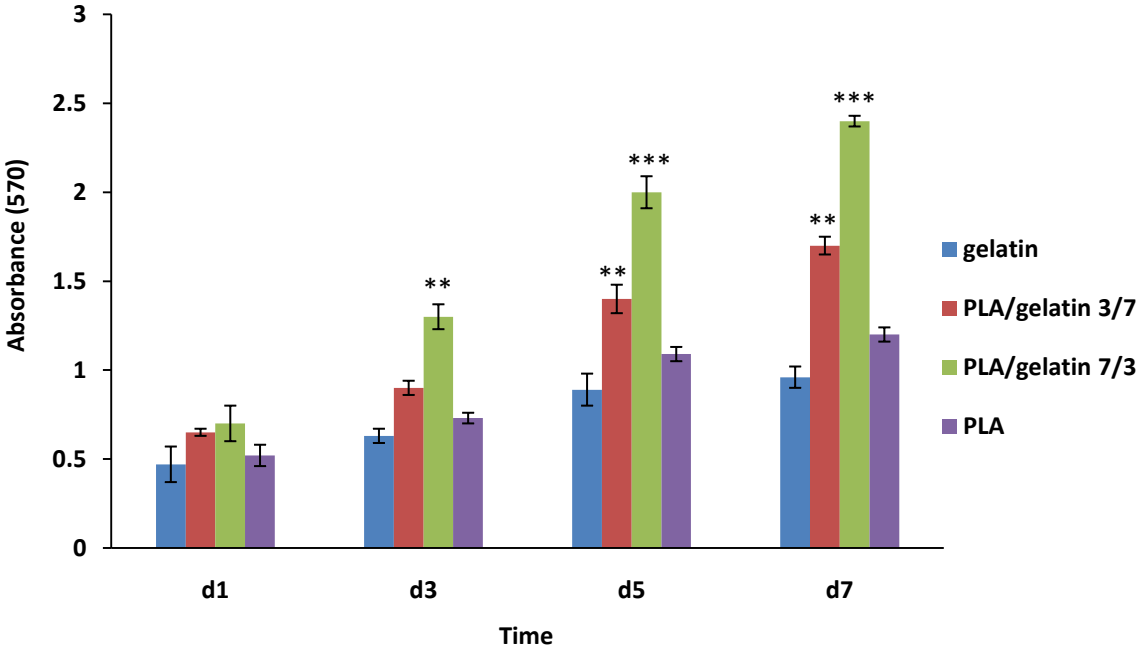
بررسی مورفولوژی و قطر نانوالیاف داربست‌های gelatin، PLA و PLA/gelatin و چگونگی استقرار سلول‌های HiPS بر داربست به وسیله‌ی عکس‌برداری با میکروسکوپ الکترونی SEM انجام گرفت. میکروگراف الکترونی داربست‌ها در شکل ۱ نشان داده شده است. متوسط قطر الیاف با نرم‌افزار measurment برای نانوالیاف ژلاتین و PLA به ترتیب ۱۵۰ و ۶۵۰ نانومتر تخمین زده شد. همچنین، متوسط قطر داربست‌های ترکیبی PLA/gelatin (3:7) و PLA/gelatin (7:3) به ترتیب ۲۵۰ و ۳۵۰ نانومتر به‌دست آمد (شکل ۱). نانوالیاف حاصل از ترکیب PLA با ژلاتین به صورت کاملاً یکنواخت و بدون بید به‌دست آمد و قطر الیاف حاصل در مقایسه با الیاف PLA خالص به‌طور چشمگیری کاهش یافت.

شکل ۱. الف، نشان‌دهنده‌ی چگونگی استقرار سلول‌های HiPS بر داربست PLA/gelatin (7:3) پوشش داده شده با ماتریژل بعد از ۵ روز می‌باشد که نشان‌دهنده‌ی استقرار، بقا و تکثیر سلول‌ها بر داربست می‌باشد. روش MTT برای مقایسه و بررسی میزان بقای سلول‌های HiPS روی داربست‌های gelatin، PLA و PLA/gelatin در روزهای ۱، ۳، ۵ و ۷ انجام گرفت. روش MTT بر اساس احیا شدن نمک زرد رنگ تترازولیوم به کریستال‌های بنفش رنگ فورمازون به‌وسیله آنزیم دهیدروژناز میتوکندریای حاصل از سلول‌های زنده و فعال از نظر متابولیکی انجام می‌گیرد. نتایج حاصله نشان‌دهنده‌ی افزایش میزان بقای سلول‌های HiPS بر انواع داربست در طی دوره‌ی ۷ روزه است. مقایسه‌ی میزان بقای سلول‌ها بر انواع داربست ها بعد از گذشت یک روز، تفاوت معنی‌داری نشان نداد اما با گذشت ۵ روز از زمان استقرار سلول‌ها بر داربست، افزایش بقای سلولی بر داربست ترکیبی PLA/gelatin مشهود و پس از گذشت ۷ روز، بقای سلولی بر داربست PLA/gelatin (7:3) در مقایسه با سایر داربست‌ها، کاملاً معنی‌دار گزارش شد (شکل ۲ و جدول ۱).

[Downloaded from pajoohande.sbmu.ac.ir on 2026-11-21]



شکل ۱. الف) میکروگراف میکروسکوپ الکترونی SEM همراه یا بدون سلول‌های HiPS. ب) نمودار نشان‌دهنده‌ی قطر الیاف، (a) الیاف و نمودار مربوط به داربست ژلاتین خالص، (b) الیاف و نمودار مربوط به داربست PLA خالص، (c) الیاف و نمودار مربوط به داربست PLA/gelatin (3:7)، (d) الیاف و نمودار مربوط به داربست PLA/gelatin (7:3)، (e) سلول های HiPS کشت داده شده بر داربست PLA/gelatin (7:3)، (f) سلول‌های HiPS کشت داده شده بر داربست PLA/gelatin (7:3) با بزرگنمایی بیشتر.



شکل ۲. مقایسه میزان بقای سلول‌های HiPS کشت داده شده بر انواع داربست‌ها با استفاده از روش MTT در روزهای ۱، ۳، ۵ و ۷.

[Downloaded from pajoohande.sbmu.ac.ir on 2026-11-21]

جدول ۱. مقایسه میزان بقای سلول‌های HiPS کشت داده شده بر انواع داربست‌ها با استفاده از روش MTT در روزهای ۱، ۳، ۵ و ۷ (Mean±SE).

گروه‌های آزمایش	Absorbance (570 nm)			
	روز ۷ بعد از کشت	روز ۵ بعد از کشت	روز ۳ بعد از کشت	روز ۱ بعد از کشت
gelatin	۰/۴۷±۰/۱	۰/۶۳±۰/۰۴	۰/۸۹±۰/۰۹	۰/۹۶±۰/۰۶
PLA/gelatin (3:7)	۰/۶۵±۰/۰۲	۰/۹±۰/۰۴	۱/۴±۰/۰۸	۱/۷±۰/۰۵
PLA/gelatin (7:3)	۰/۷±۰/۱	۱/۳±۰/۰۷	۲±۰/۰۹	۲/۴±۰/۰۳
PLA	۰/۵۲±۰/۰۶	۰/۷۳±۰/۰۳	۱/۰۹±۰/۰۴	۱/۲±۰/۰۴

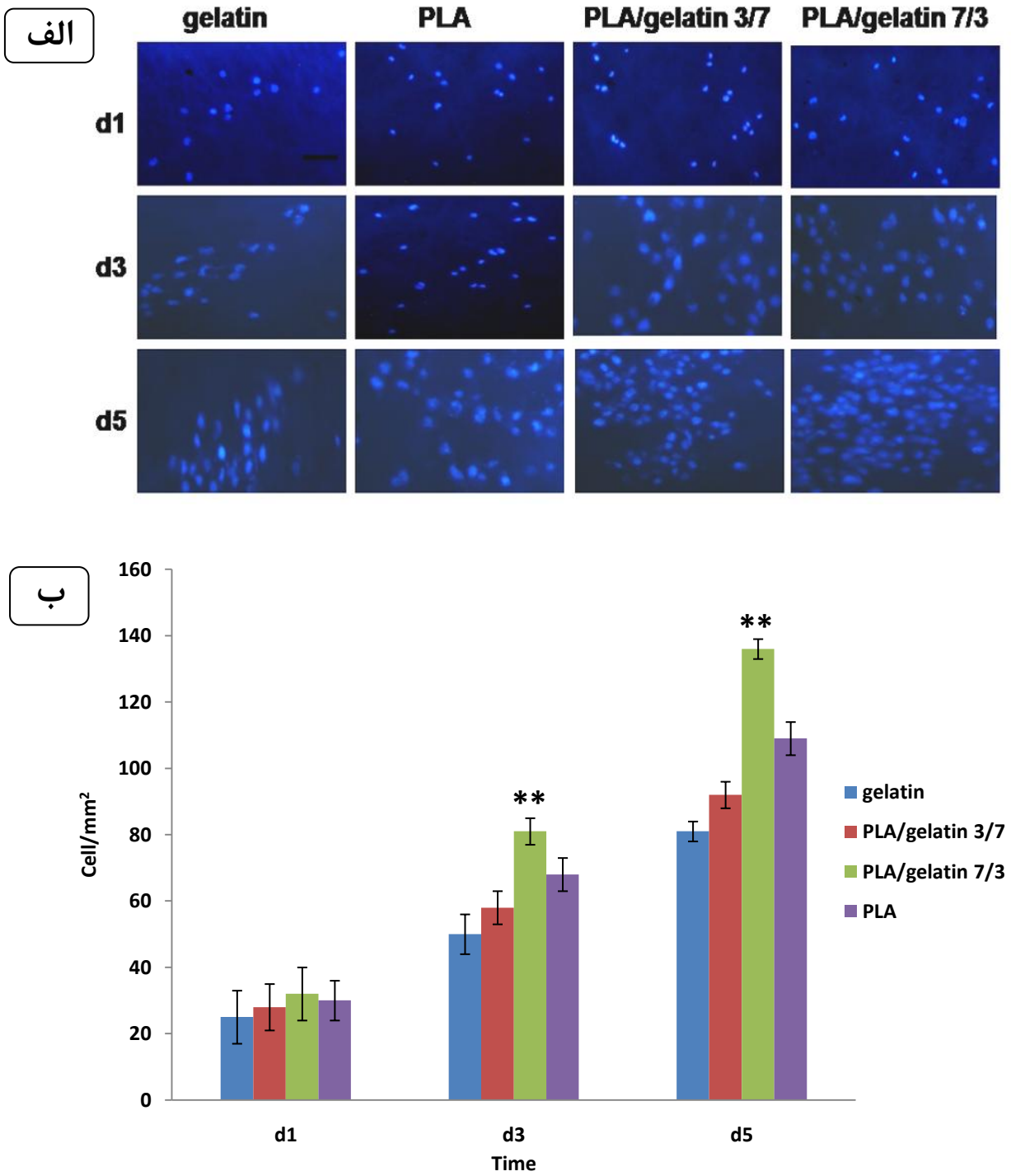
یکی از ویژگی‌های مهم برای هر داربست، توانایی آن در ایجاد بستری مناسب برای چسبندگی، رشد و تکثیر سلول‌هاست. برای بررسی این ویژگی، سلول‌های HiPS بر داربست‌های gelatin، PLA و PLA/gelatin با استفاده از محیط کشت کامل به مدت ۵ روز کشت داده شدند. مشاهدات حاصل نشان‌دهنده‌ی میزان چسبندگی بالا و تکثیر موفق سلول‌های HiPS بر داربست‌ها در طی این دوره می‌باشد. همان‌گونه که در شکل ۳ نشان داده شده است، بعد از گذشت یک روز، تفاوت معنی‌داری در تکثیر سلول‌ها بر انواع داربست‌های gelatin، PLA و PLA/gelatin (7:3 و 3:7) مشاهده نشد، اما مقایسه‌ی تکثیر سلول‌ها در روزهای ۳ و ۵ نشان‌دهنده‌ی تفاوت کاملاً معنی‌داری در تکثیر سلول‌ها بر داربست PLA/gelatin (7:3) در مقایسه با سایر داربست‌ها می‌باشد. این نتایج نشان می‌دهد که ترکیب‌های مختلف با درصدهای متفاوت در هر داربست، می‌تواند اثرات متفاوتی را در میزان چسبندگی و تکثیر سلول‌ها اعمال کند. در این مطالعه، استفاده از ژلاتین همراه با PLA توانست سبب بهبود وضعیت داربست گشته و میزان چسبندگی و تکثیر سلو ل‌ها را به طور چشمگیری افزایش دهد. نتایج نشان داده شده در نمودار ۳ به صورت کمی بیان‌کننده‌ی تفاوت معنی‌دار تکثیر سلول‌ها بر داربست PLA/gelatin (7:3) در مقایسه با داربست‌های gelatin، PLA و PLA/gelatin (3:7) پس از گذشت ۵ روز می‌باشد (شکل ۳ و جدول ۲).

بحث

تحقیقات در سیستم‌های زنده روشن ساخته است که ماتریکس خارج سلولی که محتوی انواع فاکتورهای رونویسی، ماکرومولکول‌ها و انواع فراوان سیگنالینگ مولکولی است، تأثیر حیاتی و ضروری در فرآیندهای مختلف رفتار سلولی دارد (۲۰،۶). بنابراین فراهم کردن سیستم‌های کشت سه‌بعدی که با شباهت‌های زیاد می‌توانند جایگزینی برای ماتریکس خارج سلولی باشند، مهمترین اصول مطرح شده در استفاده از مهندسی بافت به حساب می‌آید.

درسال‌های اخیر استفاده از داربست‌های مصنوعی به دلیل کارایی بالا، سرعت تخریب‌پذیری، توان انعطاف پذیری و قیمت مناسب، به طور چشمگیری افزایش یافته است (۲۰،۱۸،۱۶). مطالعات فراوانی با استفاده از سیستم کشت سه بعدی انجام گرفته است و نتایج حاصله تأییدکننده‌ی نقش قابل توجه استفاده از داربست در تمایز انواع سلول‌ها از جمله سلول‌های استخوانی (۲۱،۲۰)، سلول‌های عصبی (۲۴-۲۲)، قلبی (۲۶،۲۵) و آندودرمی (۲۷،۳) می‌باشد. همچنین افزایش قابل‌توجه بقا و تکثیر سلول‌ها با استفاده از کشت سه بعدی در مقایسه با کشت دو بعدی، در بسیاری از آزمایشات گزارش شده است (۲۳،۲۲). از آن جمله Yamamoto و همکاران در سال ۲۰۱۴، سلول‌های پاپیلای دندانی موش را به مدت چهارده روز به طور همزمان در محیط کشت دو بعدی و سه بعدی کشت دادند و اعلام کردند که بیان ژن‌هایی که در اتصال سلولی نقش دارند در این سلول‌ها در محیط کشت سه بعدی در مقایسه با محیط کشت دو بعدی، به طور چشمگیری افزایش می‌یابد. سپس، این سلول‌ها را در هر دو محیط تمایز داده و نشان دادند که بیان ژن‌های تمایزی در محیط کشت سه بعدی به طور معنی‌داری افزایش می‌یابد (۲۸). به‌علاوه، Krishnamurithy و همکاران در سال ۲۰۱۵ موفق به اتصال و تمایز موفقیت‌آمیز سلول‌های مزانشیمی بر داربست شدند (۲۹). همچنین Chen و همکاران در سال ۲۰۱۵ با انجام آزمایشات متعدد ثابت کردند که تغییرات مورفولوژی و تعدیل خصوصیات سطحی داربست‌ها نقش مهمی در القای رفتارهای مختلف سلولی ایفا می‌کنند (۳۰). در تأیید نتایج تحقیق ما در سال ۲۰۱۵، Slepička و همکاران نشان دادند که خصوصیات فیزیکو شیمیایی داربست از جمله خواص بیوشیمیایی، مورفولوژی، بار، خواص الکتریکی و مکانیکی، نقش اساسی در چسبندگی و تکثیر سلول‌ها بر داربست دارند (۳۱،۳۰).

[Downloaded from pajoohande.sbmu.ac.ir on 2026-11-21]



شکل ۳. الف) مشاهده و مقایسه‌ی تعداد سلول‌های HiPS کشت داده شده بر داربست‌های مختلف با استفاده از میکروسکوپ فلوروسنت و رنگ‌آمیزی بـا رنـگ DAPI. ب) نمودار تراکم سلول‌های HiPS بر انواع داربست ها در روزهای ۱، ۳ و ۵.

جدول ۲. تعداد سلول‌های HiPS بر انواع داربست‌ها در روزهای ۱، ۳ و ۵ (Mean±SE).

گروه‌های آزمایش	تعداد سلول‌ها		
	روز ۱ بعد از کشت	روز ۳ بعد از کشت	روز ۵ بعد از کشت
gelatin	۲۵±۸	۵۰±۶	۸۱±۳
PLA/gelatin (3:7)	۲۸±۷	۵۸±۵	۹۲±۴
PLA/gelatin (7:3)	۳۲±۸	۸۱±۴	۱۳۶±۳
PLA	۳۰±۶	۶۸±۵	۱۰۹±۵

[Downloaded from pajoohande.sbmu.ac.ir on 2026-11-21]

امروزه سلول‌درمانی امیدهای فراوانی را برای درمان انواع بیماری‌ها ایجاد نموده است. تاکنون از منابع مختلفی از سلول‌ها بنیادی یا پروژنیتور برای سلول‌درمانی در مدل‌های حیوانی استفاده شده است. اما هر کدام محدودیت‌هایی را داشته‌اند (۳۴-۳۲) . با ظهور بحث تولید سلول‌های بنیادی پرتوان (iPSCs) از سلول‌های تمایز یافته‌ی بالغ موشی توسط Yamanaka (۲۰۰۶)، دریچه‌ی جدیدی از امید برای به کار بردن سلول‌های بنیادی در درمان بیماری‌ها بدون نگرانی از رد پیوند توسط سیستم ایمنی باز شده است. در سال ۲۰۰۷ برای اولین بار سلول های iPSCs از سلول‌های بالغ انسانی به دست آمد (۱۹،۱۷،۱۳). این سلول‌ها همانند سلول‌های بنیادی جنینی، توان تمایز به تمام سلول‌های بدن یک موجود را داشته و استفاده از این سلول‌ها به علت امکان تهیه‌ی آنها از بدن فرد بیمار و درنتیجه، عدم دفع پیوند و عدم وجود مشکلات اخلاقی، به سرعت گسترش یافته است. مطالعات زیادی برای تمایز سلول‌های iPS به انواع مختلف سلول‌ها، از جمله سلول‌های بتا، هپاتوسیت‌ها، سلول‌های عصبی و قلبی تا به امروز گزارش گردیده است (۳۷-۳۵).

نتایج حاصل از این تحقیق نشان می‌دهد که داربست‌های حاصله بسترهای مناسبی را جهت اتصال و رشد سلول‌های HiPS فراهم آورده‌اند. همچنین، کاربرد ژلاتین در داربست، سبب بهبود و تعدیل شرایط داربست PLA برای اتصال، تکثیر و بقای سلول‌ها می‌گردد. ژلاتین احتمالاً با فراهم آوردن گروه‌های آمینی زیاد می‌تواند سبب اتصال و تکثیر بالای سلولی گردد. پروتئین‌های ساختاری از جمله کلاژن و ژلاتین به منظور حفظ حالت‌های مکانیکی بافت و برای ایجاد بستری مناسب جهت اتصال سلول‌ها، ضروری هستند. کلاژن، فراوان‌ترین پروتیین فیبری در ماتریکس خارج سلولی محسوب می‌شود، اما به دلیل قیمت بالا، استفاده از آن به عنوان داربست در مهندسی بافت، مقرون به صرفه نیست. بنابراین ژلاتین به عنوان پروتئینی که دارای خواص مکانیکی مشابه با کلاژن است و از طرفی از نظر اقتصادی نیز استفاده از آن مقرون به صرفه است، در مهندسی بافت می‌تواند جایگزین مناسبی محسوب شود. بنابراین ما در این مطالعه برای تعدیل و بهبود داربست PLA از ژلاتین استفاده نمودیم. علاوه براین، نتایج ما تأییدکننده‌ی افزایش معنی‌دار بقا و تکثیرسلولی با استفاده از داربست PLA/gelatin پوشیده شده با ماتریژل می‌باشد. مطالعات نشان می‌دهد که استفاده از ماتریژل، به عنوان یکی از اجزای ماتریکس خارج سلولی که از لامینین و کلاژن نوع چهار ترکیب می‌یابد، نقش مهمی در حمایت از پیشبرد تمایز به انواع مختلف سلولی را داشته و محیط مناسبی برای کشت سلول‌های بنیادی فراهم ساخته و سبب بهبود بقا، تکثیر و تمایز آنها می‌گردد (۳۸).

تحقیقات نشان می‌دهند داربست‌های نانوفیبری که دارای سطح بالایی نسبت به حجم هستند، نسبت به شرایط کشت دو بعدی، بستر مناسب‌تری برای رشد و تکثیر سلول ها ایجاد می‌کنند (۴۱،۴۰،۳۹،۲۳،۷). عوامل مختلفی در تعیین قطر الیاف در داربست‌های نانوفیبر دخیل هستند. در روش الکترواسپینینگ، خواص حلال مثل قطبیت و سرعت تبخیر، اثر مهمی بر مورفولوژی و قطر الیاف دارد. به طور کلی، استفاده از حلال‌های قطبی با کشش سطحی پایین مثل HFIP، سبب تولید الیافی با قطر کمتر می‌گردد (۲۴). بنابراین در این مطالعه برای تهیه‌ی الیاف نانوفیبری، از حلال HFIP استفاده گردید. همچنین ترکیب ژلاتین با PLA، به طور چشمگیری سبب کاهش قطر الیاف می‌گردد که ما به منظور کاهش قطر الیاف از ژلاتین استفاده کردیم.

نتیجه‌گیری

به طور خلاصه نتایج این تحقیق بیان می‌کند که ژلاتین با کاهش قطر الیاف و همچنین با افزایش میزان چسبندگی، بقا و تکثیر سلولی، سبب تعدیل و بهبود خصوصیات پلیمر PLA می‌گردد. علاوه بر این، نتایج آزمایشات ما نشان می‌دهد که داربست PLA/gelatin با نسبت ترکیبی ۷:۳، شرایط مناسبی برای بقا، اتصال و تکثیر سلول‌های HiPS فراهم آورده و می‌تواند به عنوان بستری مناسب برای تحقیقات کشت سه بعدی سلول‌های HiPS مورد استفاده قرار گیرد.

REFERENCES

1. Mota A, Sahebghadam Lotfi A, Barzin J, Hatam M, Adibi B, Khalaj Z, *et al*. Human bone marrow mesenchymal stem cell behaviors on PCL/Gelatin nanofibrous scaffolds modified with a collagen IV-derived RGD-containing peptide. Cell J 2014; 16(1): 1-10.

2. 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 2010; 6(4): 601-10.

3. Gao SY, Wong JCY, Lees JG, Best MB, Wang R, George PA, *et al*. The generation of definitive endoderm from human embryonic stem cells on 3D biodegradable poly(lactic-co-glycolic acid) scaffolds and its comparison to those generated on 2D monolayer cultures. Open Stem Cell J 2011; 3: 23-7.

[Downloaded from pajoohande.sbmu.ac.ir on 2026-11-21]

4. Kang X, Xie Y, Powell HM, Lee JL, Belury MA, Lannutti JJ, *et al*. Adipogenesis of murine embryonic stem cells in a three-dimensional culture system using electrospun polymer scaffolds. Biomaterials 2007; 28(3): 450-8.

5. Kim HW, Yu HS, Lee HH. Nanofibrous matrices of poly (lactic acid) and gelatin polymeric blends for the improvement of cellular responses. J Biomed Mater Res Part A. 2008; 87(1): 25-32.

6. Hejazian LB, Esmaeilzade B, Moghanni Ghoroghi F, Moradi F, Hejazian MB, Aslani A, *et al*. The role of biodegradable engineered nanofiber scaffolds seeded with hair follicle stem cells for tissue engineering. Iran Biomed J 2012; 16(4): 193-20.

7. Meng ZX, Wang YS, Ma C, Zheng W, Li L, Zheng YF. Electrospinning of PLGA/gelatin randomly-oriented and aligned nanofibers as potential scaffold in tissue engineering. Mater Sci Eng C. 2012; 30(8): 1204-10.

8. Chao G, Xiaobo S, Chenglin C, Yinsheng D, Yuepu P, Pinghua L. A cellular automaton simulation of the degradation of porous polylactide scaffold: I. Effect of porosity. Mater Sci Eng C. 2009; 29(6): 1950-8.

9. Xing ZC, Han SJ, Shin YS, Koo TH, Moon S, Jeong Y, *et al*. Enhanced osteoblast responses to poly(methyl methacrylate)/hydroxyapatite electrospun nanocomposites for bone tissue engineering. J Biomater Sci Polym Ed 2013; 24(1): 61-76.

10. Yamanaka S. Elite and stochastic models for induced pluripotent stem cell generation. Nature 2009; 460(7251): 49-52.

11. Noguchi H. Recent advances in stem cell research for the treatment of diabetes. World J Stem Cells 2009; 1(1): 36-42.

12. Bi D, Chen FG, Zhang WJ, Zhou GD, Cui L, Liu W, *et al*. Differentiation of human multipotent dermal fibroblasts into islet-like cell clusters. BMC Cell Biol 2010; 11(1): 46.

13. Takahashi K, Yamanaka S. Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. Cell 2006; 126(4): 663-76.

14. Park IH, Daley GQ. Human iPS cell derivation/reprogramming. Curr Protoc Stem Cell Biol 2009; 4A-1.

15. Zaehres H, Scholer HR. Induction of pluripotency: from mouse to human. Cell 2007; 131(5): 834-5.

16. 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(1): 41-9.

17. 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 Part A. 2014; 102(11): 4027-36.

18. Hoveizi E, Ebrahimi-Barough S, Tavakol S, Nabiuni M. In vitro comparative survey of cell adhesion and proliferation of human induced pluripotent stem cells on surfaces of polymeric electrospun nanofibrous and solution-cast film scaffolds. J Biomed Mater Res Part A. 2015; 103(9): 2952-8.

19. 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(7): 1727-36.

20. Yoshimoto H, Shin YM, Terai H, Vacanti JP. A biodegradable nanofiber scaffold by electrospinning and its potential for bone tissue engineering. Biomaterials 2003; 24(12): 2077-82.

21. Lee H, Yeo M, Ahn S, Kang DO, Jang CH, Park GM, *et al*. Designed hybrid scaffolds consisting of polycaprolactone microstrands and electrospun collagen-nanofibers for bone tissue regeneration. J Biomed Mater Res Part B Appl Biomater 2011; 97(2): 263-70.

22. Ghasemi-Mobarakeh L, Morshed M, Karbalaie K, Fesharaki MA, Nematallahi M, Nasr-Esfahani MH, et al. The thickness of electrospun poly (epsilon-caprolactone) nanofibrous scaffolds influences cell proliferation. Int J Artif Organs 2009; 32(3): 150-8.

23. Yim EK, Leong KW. Proliferation and differentiation of human embryonic germ cell derivatives in bioactive polymeric fibrous scaffold. J Biomater Sci Polym Ed 2005; 16(10): 1193-217.

24. Xie J, Willerth SM, Li X, Macewan MR, Rader A, Sakiyama-Elbert SE, *et al*. The differentiation of embryonic stem cells seeded on electrospun nanofibers into neural lineages. Biomaterials 2009; 30(3): 354-62.

25. Kai D, Prabhakaran MP, Jin G, Ramakrishna S. Guided orientation of cardiomyocytes on electrospun aligned nanofibers for cardiac tissue engineering. J Biomed Mater Res Part B Appl Biomater 2011; 98B(2): 379-86.

26. Orlova Y, Magome N, Liu L, Chen Y, Agladze K. Electrospun nanofibers as a tool for architecture control in engineered cardiac tissue. Biomaterials 2011; 32(24): 5615-24.

27. Chayosumrit M, Tuch B, Sidhu K. Alginate microcapsule for propagation and directed differentiation of hESCs to definitive endoderm. Biomaterials 2009; 31(3): 505-14.

28. Yamamoto M, Kawashima N, Takashino N, Koizumi Y, Takimoto K, Suzuki N, *et al*. Three-dimensional spheroid culture promotes odonto/osteoblastic differentiation of dental pulp cells. Arch Oral Biol 2014; 59(3): 310-7.

[Downloaded from pajoohande.sbmu.ac.ir on 2026-11-21]

29. Krishnamurithy G, Murali MR, Hamdi M, Abbas AA, Raghavendran HB, Kamarul T. Proliferation and osteogenic differentiation of mesenchymal stromal cells in a novel porous hydroxyapatite scaffold. Regener Med 2015; 10(5): 579-90.

30. Chen S, Lu X, Hu Y, Lu Q. Biomimetic honeycomb-patterned surface as the tunable cell adhesion scaffold. Biomater Sci 2015; 3(1): 85-93.

31. Slepicka P, Kasalkova NS, Siegel J, Kolska Z, Bacakova L, Svorcik V. Nano-structured and functionalized surfaces for cytocompatibility improvement and bactericidal action. Biotechnol Adv 2015. Epub 2015/01/18.

32. Yasunaga M, Tada S, Torikai-Nishikawa S, Nakano Y, Okada M, Jakt LM, *et al*. Induction and monitoring of definitive and visceral endoderm differentiation of mouse ES cells. Nat Biotechnol 2005; 23(12): 1542-50.

33. Lu LL, Liu YJ, Yang SG, Zhao QJ, Wang X, Gong W, *et al*. Isolation and characterization of human umbilical cord mesenchymal stem cells with hematopoiesis-supportive function and other potentials. Haematologica 2006; 91(8): 1017-26.

34. Wobus AM, Boheler KR. Embryonic stem cells: prospects for developmental biology and cell therapy. Physiol Rev 2005; 85(2): 635-78.

35. Ohmine S, Squillace KA, Hartjes KA, Deeds MC, Armstrong AS, Thatava T, *et al*. Reprogrammed keratinocytes from elderly type 2 diabetes patients suppress senescence genes to acquire induced pluripotency. Aging (Albany NY) 2012; 4(1): 60-73.

36. Pouya A, Satarian L, Kiani S, Javan M, Baharvand H. Human induced pluripotent stem cells differentiation into oligodendrocyte progenitors and transplantation in a rat model of optic chiasm demyelination. PloS one 2011; 6(11): e27925.

37. Hosoya M, Kunisada Y, Kurisaki A, Asashima M. Induction of differentiation of undifferentiated cells into pancreatic beta cells in vertebrates. Int J Dev Biol 2012; 56(5): 313-23.

38. Massumi M, Abasi M, Babaloo H, Terraf P, Safi M, Saeed M, *et al*. The effect of topography on differentiation fates of matrigel-coated mouse embryonic stem cells cultured on PLGA nanofibrous scaffolds. Tissue Eng Part A. 2011; 18(5-6): 609-20.

39. Xu X, Browning VL, Odorico JS. Activin, BMP and FGF pathways cooperate to promote endoderm and pancreatic lineage cell differentiation from human embryonic stem cells. Mech Dev 2011; 128(7-10): 412-27.

40. Mei N, Chen G, Zhou P, Chen X, Shao ZZ, Pan LF, *et al*. Biocompatibility of Poly(epsilon-caprolactone) scaffold modified by chitosan--the fibroblasts proliferation in vitro. J Biomater Appl 2005; 19(4): 323-39.

41. Hoveizi E, Tavakol S, Ebrahimi-Barough S. Neuroprotective effect of transplanted neural precursors embedded on PLA/CS scaffold in an animal model of multiple sclerosis. Mol Neurobiol 2014; 51(3) : 1334-42.

[Downloaded from pajoohande.sbmu.ac.ir on 2026-11-21]