زیست‌شناسی جانوری، سال پانزدهم، شماره دوم، زمستان ۱۴۰۱، صفحات ۲۰۴- ۱۹۵

مقاله پژوهشی

بررسی زنده‌مانی سلول‌های بنیادی مزانشیمی ژله وارتون انسان در کپسول‌های آلژیناتی

زهرا پورصفوی[۱]، سعید آب رون[۲*]، سعید کاویانی جبلی[۲]، نسیم حیاتی رودباری[۱]

۱- گروه زیست‌شناسی، واحد علوم و تحقیقات، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران

۲- گروه هماتولوژی، دانشکده علوم پزشکی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران

[*]مسئول مکاتبات: Abroun@modares.ac.ir

DOI: 10.22034/ascij.2022.1958757.1391

تاریخ دریافت: ۱۴۰۱/۰۲/۰۶ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۱/۰۴/۱۸

چکیده

سلول‌های بنیادی با توان تکثیر بالا را می‌توان از بافت‌های مختلف بدن جدا کرد. این سلول‌ها از مزودرم جنین منشاء گرفته و در بافت‌هایی مانند مغز استخوان، بافت چربی، مایع آمنیون و ژله وارتون یافت می‌شوند. در این مطالعه، به بررسی زنده‌مانی سلول‌های بنیادی مزانشیمی ژله‌ی وارتون انسان درون کپسول‌های آلژیناتی پس از گذشت ۷، ۱۴و ۲۱ روز پرداخته‌شده است. در این مطالعه‌ی تجربی، ۱۰ نمونه بند ناف از مادران باردار طی سزارین تهیه و رگ‌های نمونه بند ناف جداسازی گردید. سپس در محیط DMEM-HG حاوی ۱۰ درصد سرم FBS به مدت ۵ روز کشت داده شد. برای نشان دادن خاصیت بنیادینگی این سلول‌ها مارکرهای CD73، CD34 و CD45 را توسط تکنیک فلوسیتومتری مورد ارزیابی قرار گرفت. پس از تأیید سلول‌ها درون هیدروژل‌های آلژینات کپسوله شدند. زنده‌مانی سلول‌های کپسوله شده توسط تریپان بلو و MTT مورد ارزیابی قرار گرفت. نتایج نشان داد که کپسول‌ها به شکل کروی و دارای حاشیه یکنواخت بوده به‌صورت هموژن در سرتاسر کپسول پراکنده شده‌اند. کپسوله کردن سلول‌های بنیادی مزانشیمی ژله وارتون سبب تغییر مورفولوژی و زیست‌پذیری آن‌ها نشد. پس از گذشت۲۱ روز زنده‌مانی سلول‌های کپسوله شده حفظ شده بود. آلژینات به‌عنوان یک داربست سه‌بعدی زیست‌تجزیه‌پذیر با خاصیت زنده‌مانی مناسب سلولی می‌تواند گزینه‌ی مناسبی جهت سلول درمانی و مهندسی بافت با خاصیت عدم رد پیوند مورد استفاده قرار بگیرد.

کلمات کلیدی: زنده‌مانی، سلول‌های بنیادی مزانشیمی، ژله‌ی وارتون، آلژینات.

مقدمه

سلول‌های بنیادی مزانشیمی (MSCs) اولین بار در نیمه‌ی قرن بیستم در مغز استخوان شناسایی شدند (۳). سلول‌های بنیادی سلول‌هایی با پتانسیل تمایزی بالا و ویژگی منحصر به فردشان جهت سلول درمانی مورد توجه بسیاری از محققان قرارگرفته است. مغز استخوان افراد بالغ مهم‌ترین منبع سلول‌های بنیادی مزانشیمی جهت کاربردهای درمانی می‌باشد (۴، ۱۷، ۲۷). این سلول‌ها را می‌توان از بافت‌های مختلفی از بدن شامل بافت چربی، پالپ دندان، بند ناف، ژله‌ی وارتون نیز به دست آورد (۲، ۱۳). دسترسی آسان به این سلول‌ها، حذف مشکلات مربوط به رد سیستم ایمنی بافت آلوژنیک باعث شده که در درمان بسیاری

از بیماری‌ها مورد استفاده قرار بگیرد (٦). ژله‌ی وارتون، بافت همبند مخاطی بند ناف می‌باشد که بین اپیتلیوم آمنیوتیک و عروق بند ناف قرارگرفته است. اولین بار بافت ژله‌ی وارتون توسط توماس وارتون در سال ١٦٥٦ شناسایی شد (۱۰، ۲۲، ۲٦).

ژله‌ی وارتون حاوی ماده‌ی ژلاتینی پروتئوگلیکان و ایزوفرم‌های مختلفی از کلاژن می‌باشد. نقش ژله‌ی وارتون جلوگیری از چرخش و پیچ‌خوردگی عروق بند ناف و فشردگی آن می‌باشد (۲۰، ۲٦). جوان‌ترین سلول‌های بنیادی مزانشیمی را می‌توان از ژله‌ی وارتون و خون‌بند ناف به دست آورد. بند ناف پس از تولد نوزاد به‌راحتی در دسترس می‌باشد و به‌عنوان زباله‌ی پزشکی دور ریخته می‌شود (۱۹). سلول‌های به‌دست‌آمده از این بافت منبع غیرتهاجمی جهت سلول درمانی می‌باشند. جداسازی سلول‌های بنیادی مزانشیمی دوکی‌شکل از ژله‌ی وارتون در سال ۱۹۹۱ انجام شده است (۱۵).

روش‌های فنی جهت جداسازی این سلول‌های بنیادی مزانشیمی از ژله‌ی وارتون به میزان کمی موردبررسی قرار گرفته است. اگرچه روش‌های آنزیمی با کلاژناز جهت جداسازی آن‌ها استفاده می‌شود (۵، ۱۸، ۲۱، ۲٤). تیمارهای غیرآنزیمی و مکانیکی نیز وجود دارند که زمان بیشتری صرف می‌کند (۱۲، ۲۳).

در این مطالعه ما از روش غیر آنزیمی ساده توسط PBS و شکستن اتصالات بین سلولی جهت جداسازی سلول‌های مزانشیمی ژله‌ی وارتون از ماتریکس کلاژنی استفاده کرده‌ایم. سلول‌های بنیادی بند ناف مارکرهای مزانشیمی متفاوتی مانند CD105, CD90, CD73, CD29, CD68, CD44 را بیان می‌کنند (۲۲). در سال‌های اخیر جهت ترمیم بافتی و سلول درمانی توجه بسیار زیادی به داربست‌های بیولوژیکی جهت شبیه‌سازی خصوصیات فیزیکی و زیستی بافت‌های طبیعی بدن شده است. آزمایشات انجام‌شده جهت بررسی رشد و تمایز سلول‌های بنیادی عمدتاً بر روی دستگاه‌های کشت دوبعدی می‌باشند. در محیط دوبعدی به دلیل محدودیت سطح در دسترس جهت رشد و مواد غذایی سلول‌ها، توانایی انتشار سریع از محیط کشت می‌باشد. اخیراً جهت تأمین یک‌ریز محیط که محیط زندگی سلول‌های بنیادی را تقلید کند از مواد زیستی مختلفی استفاده‌شده است. این محیط زیستی جهت بهبود برهمکنش‌های سلولی، تکثیر سلولی و تمایز سلولی نقش مهمی را ایفا می‌کند. سلول‌های کپسوله شده در هیدروژل‌های آلژیناتی به‌صورت یکنواخت در ماتریکس ژلی توزیع شده‌اند. نفوذپذیری این هیدروژل‌ها به اکسیژن، مواد غذایی و محرک‌های بیوشیمیایی محیط اطراف به‌خوبی انجام می‌شود. همچنین کنترل سختی این هیدروژل‌ها به‌عنوان محرک فیزیکی یکی از مزیت‌های این هیدروژل‌ها می‌باشد. تکثیر و تمایز و مهاجرت سلولی نیاز به محرک‌های شیمیایی و فیزیکی داشته و به دلیل آب‌دوستی این هیدروژل‌ها باعث کاهش کشش سطحی بین هیدروژل‌ها و بافت اطراف شده و زیست پذیری آن‌ها را بالا می‌برد (١٦).

یکی از داربست‌هایی که در مهندسی بافت مورد استفاده قرار می‌گیرد، هیدروژل‌های آلژیناتی می‌باشند که از جلبک‌های قهوه‌ای به دست می‌آیند. در این مطالعه باهدف بررسی زنده‌مانی این سلول‌ها درون کپسول‌های آلژیناتی جهت کاربردهای سلول درمانی و مهندسی پزشکی انجام‌شده است (۸، ١٤، ۲۵).

مواد و روش‌ها

جداسازی سلول‌های بنیادی مزانشیمی بند ناف از ژله وارتون و کشت آن: در این مطالعه‌ی تجربی از تعداد ۱۰ نمونه بند ناف از بانک خصوصی خون‌بند ناف رویان تهیه شد. نمونه‌ی بند ناف مادران باردار پس از کسب رضایت‌نامه، در شرایط استریل درون

PBS استریل حاوی ۱۰۰ میلی‌گرم/میلی‌لیتر آنتی‌بیوتیک‌های پنی‌سیلین و استرپتومایسین به آزمایشگاه کشت سلولی ارسال گردید. سپس نمونه‌ها با PBS شستشو داده شد و خون داخل عروق بند ناف تخلیه شد. بند ناف به قطعات ۱ سانتی‌متری بریده‌شده و رگ‌های آن‌که شامل سیاهرگ و سرخرگ می‌باشند جدا شد و بافت ژله‌ی وارتون به دست آمد. قطعات ژله‌ی وارتون در بافر PBS قرار داده شد و با دستگاه هموشیکر مخلوط گردید و قطعات بافتی به قطعات کوچک‌تر تبدیل شدند و قطعات بزرگ‌تر پس از ۲ ساعت دور ریخته شدند و باقیمانده را به مدت ۵ دقیقه با دور rpm ۱۵۰۰ سانتریفوژ گردید. پس از سانتریفوژ سلول‌ها که درون رسوب باقی‌مانده بودند در محیط DMEM-HG (آلمان –گیبکو) حاوی ۱۰درصد سرم جنین گاو شستشو داده شد. تعداد و زنده‌مانی سلول‌ها با استفاده از لام هموسایتومتر و تریپان بلو ۲ درصد تعیین شد. سلول‌ها درون پلیت ٦ خانه در محیط DMED-HG شامل ۱۰٪ FBS ال‌گلوتامین ۲ میکرومولار و آنتی‌بیوتیک‌های پنی‌سیلین و استرپتومایسین به مدت ۵ روز در انکوباتور ۳۷ درجه سانتی‌گراد و فشار ۵ درصد CO2 کشت داده شدند. پس‌ازآن سلول‌های مزانشیمی چسبیده به پلیت کشت سلول توسط مخلوط ۰/۰۵ درصد تریپسین –EDTEA جداشده و به میزان 10^5 سلول در فلاسک T25 سانتی‌متر مربع کشت داده شد. سلول‌ها در پاساژهای ۳ تا ۹ توسط لام نئوبار شمارش شد و جهت اثبات مزانشیمی بودن آن‌ها از روش فلوسیتومتری برای بررسی ایمونو فنوتایپینگ و در صد بیان مارکرهای اختصاصی سلول‌های بنیادی مزانشیمی استفاده شد.

بررسی ایمنوفنوتایپینگ سلول‌ها: جهت تعیین هویت و اثبات بنیادی بودن سلول‌های مزانشیمی ژله‌ی وارتون، بررسی نشانگرهای سطحی این سلول‌ها از تکنیک فلوسیتومتری انجام شد. در این پژوهش از آنتی‌بادی‌های کنژوگه Mouse Anti human CD105-PE, Mouse Anti human CD90-FITC, Mouse Anti human CD73-PE, Mouse Anti human CD34/CD45 PE/FITC مورد استفاده قرار گرفت و تعداد $10^6 \times 1$ سلول مورد شمارش قرار گرفت و در مرحله‌ی بعد آنتی‌بادی‌های نشان‌دار ذکرشده در یک محیط تاریک طبق پروتکل کیت اضافه شد و به مدت ۲۰ دقیقه در دمای اتاق انکوبه شد. سپس میزان بیان مارکرهای سطحی و درصد جمعیت سلولی بیان‌کننده‌ی این مارکرها با دستگاه فلوسیتومتری، BD-FACS CALIBUR، BECTON DICKINSON در طول‌موج ٤٨٨ نانومتر توسط نرم‌افزار FLOWJO/6 ارزیابی گردید.

کپسوله کردن سلول‌های بنیادی مزانشیمی: ابتدا ۱/۱ گرم از پودر سدیم آلژینات (سیگما –آمریکا) در ۱۰۰ میلی‌لیتر از محلول سدیم کلراید ۰/۹ درصد حل گردید. در پاساژ چهارم از سلول‌های بنیادی مزانشیمی جهت تهیه مخلوط سلول – آلژینات مورداستفاده قرار گرفت. ۱ میلی‌لیتر محلول آلژینات به پلیت سلولی حاوی 2×10^6 سلول اضافه گردید سپس معلق سازی سلول مجدداً انجام شد. با یک سرنگ پلاستیکی در یک حمام از کلسیم کلراید ۱۰۰ میلی مولار (مرک – آلمان) کپسول‌های آلژینات با تزریق مخلوط سلول–آلژینات تولید شدند. پس از گذشت ۱۰ دقیقه کپسول‌ها پلیمریزه شدند. در مرحله‌ی بعد چند مرتبه با سرم فیزیولوژی شستشو داده شد و محلول شستشو با DMEM-HG حاوی ۱۰ درصد FBS و ۱ درصد آنتی‌بیوتیک جایگزین شد.

انحلال کپسول‌های آلژیناتی: با استفاده از محلول سدیم سیترات ۵۰ میلی‌مولار (مرک–آلمان) عمل دپلیمریزه کردن و دکپسوله کردن سلول‌ها انجام شد. بدین ترتیب که بعد از خالی کردن محیط کشت از فلاسک و دو بار شستشو با BPS به فلاسک محتوی

کپسول‌ها، محلول دپلیمریزه کننده اضافه شد. پس از گذشت ۱۰ دقیقه جهت انحلال کامل کپسول‌ها و رهاسازی سلول‌ها به‌طور کامل، محلول محتوی سلول با دور ۱۵۰۰ rpm به مدت ۵ دقیقه سانتریفوژ و دوباره پلیت سلولی در PBS به‌صورت سوسپانسیون درآمد و مجدداً با دور ۱۲۰۰rpm به مدت ۳ دقیقه سانتریفوژ انجام شد.

بررسی بقاء سلول‌های بنیادی مزانشیمی ژله‌ی وارتون کپسوله شده: به‌منظور بررسی میزان بقاء سلولی از تریپان بلو (سیگما-آمریکا) استفاده شد. در روزهای ۷، ۱٤ و ۲۱ درکشت سه‌بعدی، کپسول‌ها دپلیمریزه شد و درصد بقاء سلولی توسط رنگ‌آمیزی تریپان بلو مشخص گردید. در این روش سلول‌های زنده به دلیل سالم بودن غشاء از ورود رنگ به داخل سیتوپلاسم ممانعت می‌کنند، درصورتی‌که سلول‌های مرده به رنگ آبی و اندازه درشت‌تر مشاهده می‌شوند. در صد بقاء سلول‌ها از طریق فرمول زیر به دست آمد:

$$\text{درصد زنده مانی سلول‌ها} = \frac{\text{سلول‌های زنده}}{\text{تعداد کل سلول‌ها}} \times ۱۰۰$$

بررسی بقاء سلول‌ها با روش MTT: در این روش آنزیماتیک به‌عنوان سوبسترای واکنش از نمک‌های محلول تترازولیوم که مهم‌ترین آن‌ها MTT می‌باشد، استفاده شد. پس از گذشت ۷، ۱٤ و ۲۱ روز ابتدا ۵۰۰۰سلول مزانشیمی ژله‌ی وارتون در هر چاهک پلیت ۹٦ خانه‌ای کشت داده شد. پس از ۲٤ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد و فشار CO_2 ۵ درصد درون انکوباتور نگهداری شد. پس از انکوباسیون محیط کشت رویی دور ریخته شد و به هر چاهک ۲۰۰میکرو لیتر محیط کشت حاوی نیم میلی‌گرم در میلی‌لیتر محلول MTT اضافه شد و به مدت ٤-۲ ساعت در انکوباتور ۳۷ درجه سانتی‌گراد و فشارCO_2 ۵ درصد نگهداری شد. سپس به هر چاهک ۲۰۰ میکرولیتر DMSO اضافه و به مدت ۲۰ دقیقه در دمای اتاق انکوبه گردید. پس از حل شدن کامل کریستال‌های فورامازون جذب نوری توسط دستگاه الایزا ریدر Biochrom-ukanthos در طول‌موج ۵۷۰ نانومتر قرائت گردید.

نتایج

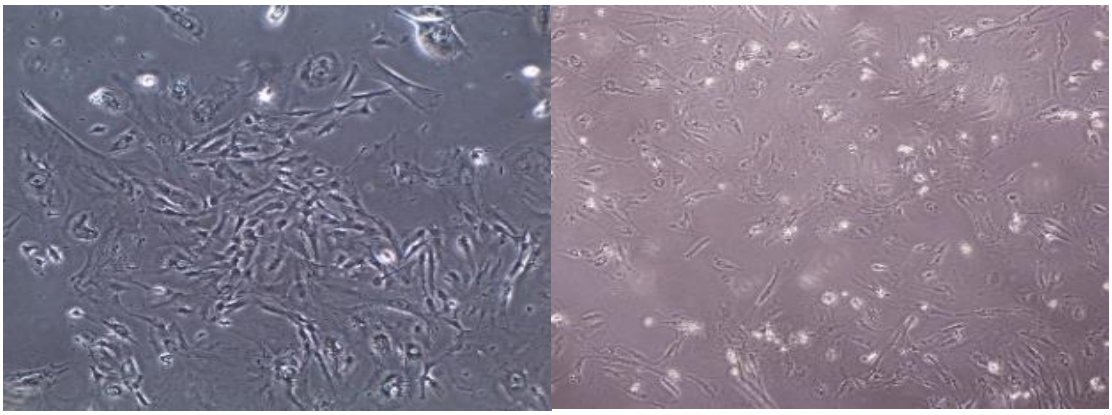
کشت سلول‌های بنیادی مزانشیمی با استفاده از PBS: در کشت اولیه پس از ۵ روز سلول‌های دوکی‌شکل مزانشیمی چسبیده به ظرف مشاهده گردید و در هفته‌ی دوم تکثیر داده شدند و تمامی سطح ظرف کشت را پر کردند (شکل۱).

بررسی مارکرهای سطحی سلول‌های مزانشیمی ژله وارتون: جهت بررسی جداسازی سلول‌های بنیادی مزانشیمی ژله‌ی وارتون، بیان مارکرهای سطحی مزانشیمی ژله‌ی وارتون با دستگاه فلوسیتومتری مورد آنالیز قرار گرفت. نتایج نشان داد که این سلول‌ها مارکرهای مزانشیمی CD105، CD90 و CD73 را بیان کرده و از نظر بیان مارکرهای خونی CD34/CD45 منفی هستند (نمودار ۱).

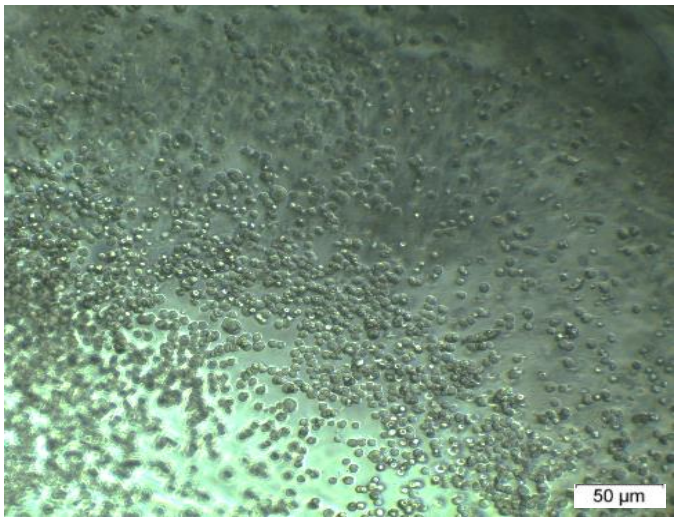
بررسی مورفولوژیک کپسول‌های آلژیناتی و سلول‌های بنیادی مزانشیمی ژله وارتون محصور در آن‌ها: مشاهدات در این مطالعه نشان داد که کپسول‌ها به شکل کروی و دارای حاشیه یکنواخت بودند و سلول‌ها به‌صورت هموژن در سرتاسر کپسول پراکنده شده‌اند (شکل ۲). تصاویر نشان‌دهنده این بود که کپسول‌ها حتی پس از گذشت ۱۰ روز ساختار و شکل کروی خود را حفظ کرده‌اند. همچنین سلول‌های کپسوله شده تا روز دهم در ماتریکس آلژیناتی محصور مانده‌اند. سلول‌های بنیادی مزانشیمی ژله‌ی وارتون کپسوله شده به سطحی اتصال ندارند و دایره مانند هستند که مانند شکل کروی این سلول‌ها در طناب بند ناف می‌باشند. بنابراین در مطالعه‌ی حاضر کپسوله کردن سلول‌ها تغییری در مورفولوژی

سلول‌های بنیادی مزانشیمی ژله‌ی وارتون ایجاد نمی‌کند.

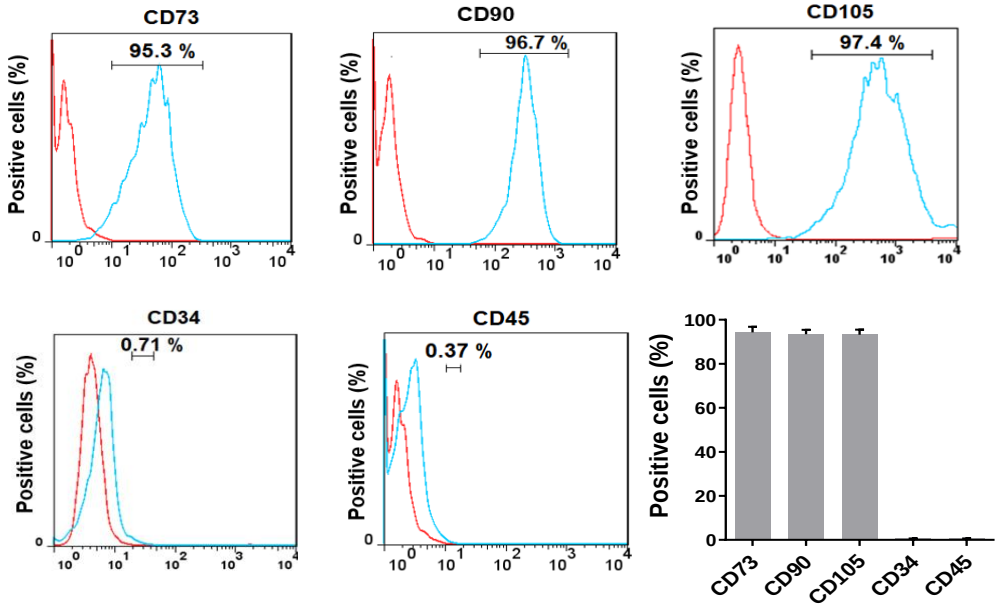
بررسی بقاء سلول‌های بنیادی مزانشیمی ژله‌ی وارتون کپسوله شده: جهت بررسی و فرایند کپسوله کردن سلول‌ها در هیدروژل‌های آلژیناتی میزان بقاء و زیست‌پذیری سلول‌های کپسوله شده، پس از گذشت ۷، ۱۴ و ۲۱ روز از روش رنگ‌آمیزی تریپان بلو و MTT استفاده گردید. گروهی که سلول‌ها ۷ روز بعد از کپسوله شدن ، دکپسوله شده بودند ۹۸ درصد زنده بودند و گروهی که ۱۴ روز بعد از کشت دادن دکپسوله شده بودند بقاء سلول‌ها به دلیل پاساژهای مکرر به ۶۸ درصد و گروه ۲۱ روزه ۶۰ درصد کاهش زنده‌مانی را نشان داده بود (نمودار ۲).



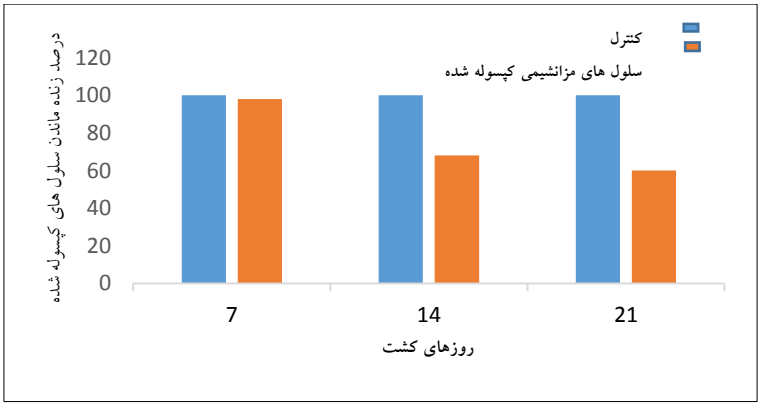
شکل ۱- سلول‌های بنیادی مزانشیمی مشتق از ژله وارتون. کشت اولیه سلول‌های بنیادی مزانشیمی پس از ۵ روز که سلول‌های منفرد چسبیده به ظرف قابل‌مشاهده می‌باشند.



شکل ۲- مورفولوژی سلول‌های بنیادی مزانشیمی در محیط سه‌بعدی



نمودار ۱- نمودارهای فوق بیان مارکرهای سطحی سلول‌های بنیادی مزانشیمی را طبق نتایج فلوسایتومتری نشان می‌دهد.



نمودار ۲- بررسی میزان زنده ماندن سلول‌های بنیادی مزانشیمی ژله وارتون کپسوله شده

بحث

در مطالعه‌ی حاضر از پلی‌ساکارید طبیعی آلژینات جهت ایجاد یک داربست سه‌بعدی کشت سلول‌های مزانشیمی ژله‌ی وارتون استفاده شد همچنین به بررسی زنده‌مانی این سلول‌های کپسوله شده نیز پرداخته شد. از میان سلول‌های بنیادی مزانشیمی، ژله‌ی وارتون به‌عنوان منبع مناسبی جهت سلول‌ها، در دسترس بودن آن، امکان جمع‌آوری نمونه بدون تهاجم، امکان استفاده جهت پیوندهای اتولوگ در سلول درمانی و مهندسی بافت و همچنین پایین بودن ریسک آلودگی این سلول‌ها مورد استفاده قرار گرفت (۲۵). در سال۲۰۰۶ کمیته سلول‌های بنیادی بافت و مزانشیم (ISCT)، معیارهایی را جهت شناسایی این سلول‌های بنیادی مزانشیمی ارائه داد که شامل قدرت چسبیدن آن‌ها به کف فلاسک، بیان مارکرهای سطحی CD90, CD105, CD73, CD44 و توانایی تمایز به بافت‌های رده‌ی غضروف به استخوان و چربی می‌باشد (۲۶). سلول‌های بنیادی مزانشیمی ژله‌ی وارتون توانایی بالایی در بیان مارکرهای بنیادی جنینی مانند Nanog، sox2 و oct4 بوده و آنتی‌ژن لوکوسیتی انسانی کلاس دو MHC-II و HLA-DR را که در رد پیوند دخالت دارند بسیار کم بیان می‌کند. استفاده از این سلول‌های مزانشیمی همانند مغز استخوان نیاز به

سازگاری نسجی نداشته در نتیجه می‌توانند جهت پیوند آلوژنیک از هر اهداکننده‌ای به فرد دیگر بدون احتمال رد پیوند و یا سرکوب کردن سیستم ایمنی پیوند شوند. این موضوع بیانگر این است که این سلول‌ها می‌توانند منبع مناسبی و کافی جهت پیوند قرار بگیرند. بااین‌حال هیچ روش استانداردی جهت جداسازی این سلول‌های بنیادی مزانشیمی ژله‌ی وارتون وجود ندارد. ونگ و همکارانش با استفاده از کلاژناز به مدت ۱۶ ساعت سلول‌های بنیادی مزانشیمی را جداسازی کرد.پیررا و همکارانش از هم زدن در مدت‌زمان کمتر و در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد جهت جداسازی این سلول‌ها استفاده کرد. اما هضم بیش از حد بافت توسط آنزیم باعث کاهش زنده‌مانی سلول و عملکرد سلولی، تخریب گیرنده‌های سطحی سلول می‌شود. جداسازی سلول‌های مزانشیمی بند ناف با روش‌های غیر آنزیمی اولین بار توسط روکا و همکارانش در سال ۲۰۰۹ انجام شد (۲۷). آن‌ها بافت بند ناف را به قطعات ۱-۲ سانتی‌متری برش دادند و آن‌ها را در ظرف مخصوص کشت به مدت ۱۵ روز در انکوباتور ۳۷ درجه سانتی‌گراد قرار داده سپس سلول‌ها به کف ظرف کشت مهاجرت کرده بودند.

یافتن روشی ساده و ایمن با حداقل زمان و بیشترین تعداد جداسازی سلولی و کمترین آسیب سلولی اهمیت به سزایی دارد. در مطالعه‌ی حاضر از روش غیر آنزیمی ساده‌ای استفاده شد که با استفاده از PBS اتصالات بین سلولی شکسته و سست شد و سلول‌های مزانشیمی بدون استفاده از آنزیم جداسازی گردید. تأیید این سلول‌ها توسط تکنیک فلوسیتومتری و بیان بالای مارکرهای مزانشیمی انجام گرفت. در این پژوهش از پلی‌ساکارید آلژینات جهت طراحی یک داربست سه‌بعدی سلول‌های بنیادی مزانشیمی ژله‌ی وارتون مورد استفاده قرار گرفت. مطالعات ما نشان داد که هیدروژل‌های آلژینات ترکیب ایمن و غیر کشنده‌ای جهت کپسوله کردن سلول‌های بنیادی مزانشیمی ژله‌ی وارتون می‌باشند.

هیدروژل‌های آلژیناتی زیست‌پذیری و مورفولوژی سلول‌های بنیادی را تحت تأثیر قرار نمی‌دهند (۲۰).

۹۸ درصد زیست پذیری در سلول‌های گروه‌های اول که بلافاصله بعد از کپسوله شدن، دکپسوله شده بودند نشان‌دهنده‌ی این است که فرآیند کپسوله کردن و دکپسوله کردن سلول‌های مورداستفاده باعث کاهش زیست پذیری سلول‌ها نمی‌شود.

وانگ و همکارانش در سال ۲۰۰۹ آزمایشاتی روی سلول‌های بنیادی جنین انجام دادند و نشان دادند که فرایند کپسوله کردن سلول‌ها تأثیری در بقاء این سلول‌ها ندارند (۲۶). بررسی زیست‌پذیری در روزهای بعد نشان داد که هیدروژل‌های آلژینات به‌عنوان یک محیط‌زیست سازگار جهت سلول‌های بنیادی ژله‌ی وارتون مناسب بودند و بعد از گذشت ۱۰ روز از کپسوله شدن سلول‌ها همچنان زنده‌مانی آن‌ها در سطح بالایی حفظ‌شده بود و حدود ۷۲ درصد بود.

با توجه به اینکه اندازه قطر کپسول‌ها در انتقال دوطرفه مواد مؤثر بوده یکی از دلایل تفاوت یافته‌های این مطالعه با سایر پژوهش‌ها احتمالاً ناشی از اندازه‌ی کپسول‌های آلژیناتی می‌باشد (۲۴، ۲۵).

به نظر می‌رسد که سلول‌های بنیادی مزانشیمی جداشده با روش فوق بتواند جهت مطالعه خصوصیات سلولی و کارآزمایی بالینی و پژوهشی و سلول درمانی و پیوند مورد استفاده قرار بگیرد.

نتیجه‌گیری

این مطالعه نشان داد که کپسول‌های هیدروژلی آلژینات قابلیت استفاده به‌عنوان داربست سه‌بعدی جهت کشت سلول‌های بنیادی مزانشیمی ژله وارتون

و زنده ماندن این سلول‌ها پس از ۲۱ روز را دارند. بنابراین در صورت انجام مطالعات بیشتر در سطوح درون تنی و برون تنی جهت بررسی‌های تمایزی و درمانی این داربست تجزیه‌پذیری می‌تواند گزینه‌ی مناسبی جهت کارآزمایی‌های بالینی و پژوهشی مورد استفاده قرار بگیرد. این روش جداسازی می‌تواند جهت مقاصد درمانی و کارهای پژوهشی از نظر اقتصادی مقرون‌به‌صرفه بوده و تکرارپذیری بالا و بازدهی سریع داشته و می‌توان از این روش به مقیاس بالا برای کاربردهای کلینیکی و پژوهشی استفاده کرد.

تشکر و قدردانی

این مطالعه و پژوهش در آزمایشگاه تحقیقاتی شرکت فن‌آوری بن یاخته‌های رویان انجام شد. همچنین از جناب آقای دکتر ضرابی مدیریت مجموعه و کلیه پرسنل و همکاران محترم شرکت بن یاخته‌های رویان که ما را در انجام این تحقیق یاری نمودند کمال تشکر راداریم.

منابع

1- Abouelnaga H., El-Khateeb D., Moemen Y., El-Fert A., Elgazzar M., Khalil A. 2022. Characterization of mesenchymal stem cells isolated from Wharton’s jelly of the human umbilical cord. *Egyptian Liver Journal*, 12.1: 1-9.

2- Bajada S., Mazakova I., Richardson J., Ashammakhi., N. 2008. Updates on stem cells and their applications in regenerative medicine. *Journal of Tissue Engineering and Regenerative Medicine*, 2: 169-183.

3- Baksh D., Song L. 2004. Adult mesenchymal stem cells: characterization, differentiation, and application in cell and gene therapy. *Journal of Cellular and Molecular Medicine* 3:301-316

4- Beiki B., Zarrabi M., Radmanesh M. 2015. A rapid, simple and economical method for the isolationof mesenchymal stem cells from Wharton’s jellyby phosphate buffer saline. *Scientific Journal of Iran Blood Transfus Organ*, 12(2): 143-152.

5- Can A., Karahuseyinoglu S. 2007. Concise review: human umbilical cord stroma with regard to the source of fetus-derived stem cells. *Stem Cells*, 25(11): 2886-2895

6- Carlin R., Davis D., Weiss M., Schultz B., Troyer D. 2006. Expression of early transcription factors Oct-4, Sox-2 and Nanog by porcine umbilical cord (PUC) matrix cells. *Reproductive Biology and Endocrinology*, 4(1): 1-13.

7-Charbord P. 2010. Bone marrow mesenchymal stem cells: historical overview and concepts. *Human Gene Therapy*, 21(9): 1045-1056.

8- Chayosumrit M., Tuch B., Sidhu K. 2010. Alginate microcapsule for propagation and directed differentiation of hESCs to definitive endoderm. *Biomaterials*, 31(3): 505-514.

9- Horwitz E., Andreef M., Frassoni F. 2006. Mesenchymal stromal cells. *Current Opinion in Hematology*, 13(6): 419.

10- Karahuseyinoglu S., Cinar O., Kilic E., Kara F., 2007. Biology of stem cells in human umbilical cord stroma: in situ and in vitro surveys. *Stem Cells*, 25(2): 319-331.

11 -Khalif F., Alwan A., Ralph P., Soliman S., Abdelrahim A., Abdelhafez E., Opara E. 2022. Effect of Alginate Microbead Encapsulation of Placental Mesenchymal Stem Cells on Their Immunomodulatory Function. *Annals of Biomedical Engineering*, 50: 291-302.

12- Rocca G., Anzalone R., Corrao S., Magno F., Loria T., Iacono M., Di Stefano A., Giannuzzi P., Marasà L., Cappello F., Zummo G., Farina F. 2009. Isolation and characterization of Oct-4+/HLA-G+ mesenchymal stem cells from human umbilical cord matrix: differentiation potential and detection of new markers.

Histochemistry and Cell Biology, 131(2): 267-282.

13- Liao N., Su L., Cao Y., Qiu L., Xie R., Peng F., Cai P., Liu X., Song J., Zeng Y. 2022. Tracking Cell Viability for Adipose-Derived Mesenchymal Stem Cell-Based Therapy by Quantitative Fluorescence Imaging in the Second Near-Infrared Window. *ACS nano*, 13(7): 7791–7799.

14- Man Y., Wang P., Guoad Y., Xiang B.,Yang Y., PingGong Y., Dengc L. 2012. Angiogenic and osteogenic potential of platelet-rich plasma and adipose-derived stem cell laden alginate microspheres. *Biomaterials*, 33(34): 8802-8811.

15- Mcelreavey K., Irvine A., Ennis K., McLean W. 1991. Isolation, culture andcharacterisation of fibroblast-like cells derived from the Wharton's jelly portion of human umbilical cord. *Biochemical Society Transactions*,19(1): 29S

16- Mohseni Kouchesfehani H., Saraee F., Maleki M., Nikougoftar M., Khatami SM., Sagha M. 2014. Evaluation of surface markers and related genes of the human umbilical cord derived Wharton's jelly mesenchymal stem cells. *Journal of Mazandaran University of Medical Sciences*, 24(112): 24-32.

17- Mohseni Kouchesfahani H., Sanamiri K.H., Hashemitabar M. 2014. Application of Alginate Capsules as a Three Dimensional Scaffold for Differentiation of Wharton's Jelly Mesenchymal Stem Cells to Definitive Endoderm. *Arak Medical University Journal (AMUJ) Original Article*, 17(85): 54-66

18- Pereira W.C., Khushnoomama I., Madkaikar M., Ghosh M. 2008. Reproducible methodology for the isolation of mesenchymal stem cells from human umbilical cord and its potential for cardiomyocyte generation. *Journal of Tissue Engineering and Regenerative Medicine*, 2(7): 394-399.

19- Romanov Y., Svintsitskaya V. 2003. Searching for alternative sources of postnatal human mesenchymal stem cells: candidate MSC-like cells from umbilical cord. *Stem Cells*, 21(1): 105-110.

20- Said Y., El-Gamel N., Ali S. 2022. Evaluation of Human Wharton's Jelly-Derived Mesenchymal Stem Cells Conditioning Medium (hWJ-MSCs-CM) or Scorpion Venom Breast Cancer Cell Line In Vitro. *Journal of Gastrointestinal Cancer*, 12: 1-14.

21- Sarugaser R., Lickorish D., Baksh D., Hosseini M., Davies J. 2005. Human umbilical cord perivascular (HUCPV) cells: a source of mesenchymal progenitors. *Stem Cells* 23(2): 220-229.

22-Troyer D., Weiss M. 2008. Concise review: Wharton's Jelly-derived cells are a primitive stromal cell population. *Stem Cells*, 26(3): 591-599.

23-Valencic E., Piscianz E., Andolina M. 2010. The immunosuppressive effect of Wharton's jelly stromal cells depends on the timing of their licensing and on lymphocyte activation. *Cytotherapy*, 12(2): 154-160.

24- Wang H., Hung S., Peng S., Huang C., Wei H., Gou Y. 2004. Mesenchymal stem cells in the Wharton's jelly of the human umbilical cord. *Stem Cells*, 22(7): 1330-1337.

25- Wang X.Y., Lan Y., He W.Y., Zhang L. 2008. Identification of mesenchymal stem cells in aorta-gonad-mesonephros and yolk sac of human embryos. *Blood, The Journal of the American Society of Hematology*, 111(4): 2436-2443.

26. Wang N., Adams G., Buttery L., Falcone LH. 2009. Alginate encapsulation technology supports embryonic stem cells differentiation into insulin-producing cells. *Journal of Biotechnology*, 144(4): 304-312.

27- Weiss M., Anderson C., Medisetty S. 2008. Immune properties of human umbilical cord Wharton's jelly-derived cells. *Stem Cells*, 26(11): 2865-2874.

The Study of the Viability of Human Wharton's Jelly Mesenchymal Stem Cells in Alginate Capsules

Zahra Poursafavi [1], Saeid Abroun[2]*, Saeid Kaviani[2], Nasim Hayati Roodbari[1]

1- Department of Biology, Science and Research Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran
2- Department of Hematology, Faculty of Medical Sciences, Tarbiat Modarres University, Tehran, Iran

Abstract

Stem cells with high proliferative capacity can be isolated from different tissues of the body. These cells originate from the fetal mesoderm and are found in tissues such as bone marrow, fat tissue, amniotic fluid, and Wharton's jelly. In this study, the survival of Wharton's jelly human mesenchymal stem cells inside alginate capsules after 7, 14 and 21 days has been investigated. In this experimental study, 10 umbilical cord samples were obtained from pregnant mothers during caesarean section, and the vessels of the umbilical cord samples were isolated. Then it was cultured in DMEM-HG medium containing 10% FBS serum for 5 days. To show the stemness of these cells, CD73, CD34 and CD45 markers were evaluated by flow cytometry technique. After confirmation, the cells were encapsulated in alginate hydrogels. The viability of encapsulated cells was evaluated by trypan blue and MTT. The results showed that the capsules are spherical and have a uniform border and are homogeneously dispersed throughout the capsule. Wharton jelly encapsulation of mesenchymal stem cells did not change their morphology and viability. After 21 days, the survival of the encapsulated cells was maintained. Alginate as a three-dimensional biodegradable scaffold with suitable cell viability can be used as a suitable option for cell therapy and tissue engineering with the property of non-graft rejection.

Keywords: Viability, Mesenchymal Stem Cells, Wharton's Jelly, Alginate.