

ORIGINAL ARTICLE

Investigating the biological activities of mesenchymal stem cells cultured on skeletal muscle-derived coating substrate

Faeze Zarean¹, Somayeh Arabzadeh², Sara Rajabi³, Saiedeh Erfanian³, Mahmood Talkhabi^{1*}

¹Department of Animal Sciences and Marine Biology, Faculty of Life Sciences and Biotechnology, Shahid Beheshti University, Tehran, Iran.

²Department of Biology, Faculty of Basic Science, Ale Taha Institute of Higher Education, Tehran, Iran.

³Department of Cell Engineering, Cell Science Research Center, Royan Institute for Stem Cell Biology and Technology, ACECR, Tehran, Iran.

Correspondence

Mahmood Talkhabi

Email: m_talkhabi@sbu.ac.ir

How to cite

Zarean, F., Arabzadeh, S., Rajabi, S., Erfanian, S., & Talkhabi, M. (2024). Investigating the biological activities of mesenchymal stem cells cultured on skeletal muscle-derived coating substrate. *Experimental Animal Biology*, 12(47), 1-13.

ABSTRACT

Bone is the hardest and one of the most important tissues in the body. In case of bone damage, the current treatments do not completely repair and regenerate the bone. For this reason, cell-based tissue engineering strategies, especially Mesenchymal Stem Cells (MSCs), have received attention. MSCs have the ability to self-renew and differentiate into different cell types, including bone cells, cartilage cells, and fat cells, among others. They are found in various tissues throughout the body, including bone marrow, adipose tissue, and umbilical cord tissue. Today, MSCs are a valuable resource for regenerative medicine and tissue engineering applications. In addition to the cells, scaffolds are another essential element of tissue engineering. One of these scaffolds is decellularized tissue-derived hydrogels, which are three-dimensional network of hydrophilic polymer chains that can absorb and retain a significant amount of water. In tissue engineering, they mimic the natural extracellular matrix of tissues, providing a suitable environment for cells to attach, proliferate, and differentiate. In the current study, we aimed to investigate the effects of decellularized skeletal muscle-derived hydrogel, known as Myogel, on bone marrow-derived MSCs biological behaviors, including proliferation, viability and migration. In this study, MSCs were isolated from tibia and femur of adult Wistar rats. MSCs were cultured in a complete medium (a-MEM containing 15% fetal bovine serum (FBS) and 1% penicillin/streptomycin (Pen/Strep)). The identity of cells was determined by morphology (using inverted microscope) and expression of specific CD markers (using Flowcytometry). Skeletal muscle was decellularized and accuracy of decellularization was evaluated using special staining. Then Myogel was prepared from digested decellularized skeletal muscle. Here, Myogel substrate was used as the control group, gelatin substrate as the positive control, and un-coated plates as the negative control. The effect of Myogel on survival (MTT method), proliferation (drawing the growth curve and calculating the doubling time of the cell population), cell cycle profile (flow cytometry method), and cell migration (scratch method) were investigated. The MTT test showed that the survival of MSCs in Myogel substrate with a concentration of 0.2 mg/ml was higher than the survival of MSCs in gelatin substrate with a concentration of 0.1 mg/ml and the survival of MSCs in gelatin was higher than the survival of control MSCs. Myogel substrate increased the proliferation and migration of cells and decreased the doubling time of MSCs population. Examining the cell cycle profile showed that a high percentage of cells cultured on Myogel were in the G1 and S phase of the cell cycle, indicating an increase in cell division speed by gelatin and, in the next degree, by Myogel. Therefore, Myogel can be used as a suitable substrate to increase the proliferative and migratory potential of MSCs, which are an important factor in tissue engineering.

KEY WORDS

Myogel, Mesenchymal Stem Cell, Viability, Cell cycle, Migration.

نشریه علمی

زیست‌شناسی جانوری تجربی

«مقاله پژوهشی»

بررسی فعالیت‌های زیستی سلول‌های بنیادی مزانشیمی کشت شده بر روی بستر پوششی مشتق شده از ماهیچه اسکلتی

فایزه زارعان^۱، سمیه عرب‌زاده^۲، سارا رجبی^۳، سعیده عرفانیان^۴، محمود تلخابی^{۱*}

چکیده

استخوان سخت‌ترین و یکی از مهم‌ترین بافت‌های بدن است. در صورت وقوع آسیب‌های استخوانی، درمان‌های فعلی باعث ترمیم و بازسازی کامل استخوان نمی‌شوند. به همین دلیل استراتژی‌های مهندسی بافت مبتنی بر سلول و به‌ویژه (Mesenchymal Stem Cells: MSCs) مورد توجه قرار گرفته است. یکی از این بسترها، هیدروژل‌های مشتق شده از بافت سلول‌زدایی شده هستند. در این پروژه، از هیدروژل مشتق شده از ماهیچه اسکلتی به نام میوژل (Myogel) استفاده شد. در این مطالعه تأثیر میوژل بر زنده‌مانی (روش MTT)، تکثیر (ترسیم منحنی رشد و محاسبه زمان دو برابر شدن جمعیت سلولی)، پروفایل چرخه سلولی (روش فلوسایتومتری) و مهاجرت سلول‌ها (روش ایجاد خراش) مورد بررسی قرار گرفت. نتایج MTT نشان داد، زنده‌مانی MSCs در بستر میوژل با غلظت ۰/۲ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر از زنده‌مانی MSCs در بستر ژلاتین با غلظت ۰/۱ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر بیش‌تر و زنده‌مانی MSCs در بستر ژلاتین از زنده‌مانی MSCs مربوط به کنترل بیش‌تر بود. بستر میوژل، تکثیر و مهاجرت سلول‌ها را افزایش و زمان دو برابر شدن جمعیت MSCs را کاهش داد. بررسی پروفایل چرخه سلولی نشان داد، درصد بالایی از سلول‌های کشت شده بر روی میوژل در مرحله G1 و S چرخه سلولی بودند که نشان‌دهنده افزایش سرعت تقسیم سلول‌ها توسط ژلاتین و در درجه بعد میوژل می‌باشد. بنابراین میوژل می‌تواند به‌عنوان بستری مناسب در مهندسی بافت مورد استفاده قرار گیرد.

واژه‌های کلیدی

میوژل، سلول بنیادی مزانشیمی، زنده‌مانی، چرخه سلولی.

^۱گروه علوم جانوری و زیست‌شناسی دریا، دانشکده علوم و فناوری زیستی، دانشگاه شهید بهشتی، تهران، ایران.
^۲گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم پایه، مؤسسه آموزش عالی غیرانتفاعی آل طه، تهران، ایران.
^۳پژوهشگاه رویان، پژوهشکده زیست‌شناسی و فناوری سلول‌های بنیادی جهاد دانشگاهی، مرکز تحقیقات علوم سلولی، گروه فناوری نانو و زیست مواد، تهران، ایران.

نویسنده مسئول:

محمود تلخابی

رایانامه: m_talkhabi@sbu.ac.ir

استناد به این مقاله:

زارعان، فایزه؛ عرب‌زاده، سمیه؛ رجبی، سارا؛ عرفانیان، سعیده و تلخابی، محمود (۱۴۰۲). بررسی فعالیت‌های زیستی سلول‌های بنیادی مزانشیمی کشت شده بر روی بستر پوششی مشتق شده از ماهیچه اسکلتی. فصلنامه زیست‌شناسی جانوری تجربی، ۱۲ (۴۷)، ۱-۱۳.

<https://eab.journals.pnu.ac.ir/>

مقدمه

بیماری‌ها و آسیب‌های بافت استخوانی ممکن است باعث شود که استخوان‌ها به راحتی بشکنند و یا نیاز به ترمیم داشته باشند (Porter et al., 2009). شیوه‌های فعلی برای ترمیم آسیب‌های استخوانی شامل داروها، ایمپلنت فلزی و پیوند استخوان است. با این حال، هیچ‌یک از آن‌ها بازسازی کامل استخوان و درمان مداوم را ارائه نمی‌دهد (Rather et al., 2019). برای غلبه بر این محدودیت‌ها استراتژی‌های مهندسی بافت در بازایی عملکرد طبیعی بافت پس از آسیب‌های مختلف بافتی مورد توجه قرار گرفته است.^۱ MSCs گروهی از سلول‌های بنیادی بالغ با تکثیر بالا، قابلیت خود نوزایی و دارای پتانسیل تمایز به چند دودمان از جمله سلول‌های استخوانی، سلول‌های غضروفی، سلول‌های ماهیچه‌ای و سلول‌های چربی هستند (Caplan, 2009; Khanban et al., 2019). این سلول‌ها در صورت داشتن مارکرهای سطحی CD₇₃، CD₁₀₅، CD₉₀ و نداشتن مارکرهای سطحی CD₁₄، CD₃₄، CD₄₅، CD₁₉، HLA-DR تأیید هویت می‌شود (Dominici et al., 2006). MSCs را می‌توان به مدت طولانی بدون از دست دادن توانایی‌شان ذخیره کرد (Wang et al., 2012). خواص چند توانی MSCs، آن‌ها را انتخابی جذاب برای کاربردهای بالینی تبدیل کرده است (Ding et al., 2011). در طول سال‌ها، شواهد متعددی از انعطاف‌پذیری، ویژگی تعدیل‌کنندگی ایمنی و همچنین توانایی آن‌ها برای به کار گرفتن در محل آسیب ارائه شده است (Ohishi & Schipani, 2010). سلول‌های بنیادی به شدت تحت تأثیر کنام سلولی خود قرار می‌گیرند، که سیگنال‌های بیوشیمیایی و فیزیکی را برای کمک به کنترل فرایندهایی مانند مهاجرت، تکثیر و تمایز به دودمان سلولی خاص می‌فرستد. این سیگنال‌ها را می‌توان به عنوان ماکرومولکول‌های هیدراته نامحلول، از جمله پروتئین‌های ECM و پروتئوگلیکان‌ها، ماکرومولکول‌های محلول، مانند فاکتورهای رشد و سیتوکین‌ها و پروتئین‌های سطح سلول‌های مجاور طبقه‌بندی کرد (Ahmadi et al., 2023; Guilak et al., 2009). برای بازدهی و عملکرد بیش‌تر سلول‌ها و رشد بهتر، پژوهش‌گران این سلول‌ها را با ترکیبات و مواد مختلف تیمار و با بسترهای متنوع کشت می‌دهند. یکی از این بسترها هیدروژل‌های مشتق از ماتریکس خارج سلولی (ECM) است. هیدروژل‌های مشتق از ECM دارای فعالیت زیستی اصلی ماتریکس طبیعی و

ساختاری مناسب برای رشد سلولی هستند. ECM، که پس از سلول‌زدایی باقی می‌ماند، نقش مهمی را به عنوان پشتیبان ساختاری بافت و همچنین به عنوان منبع بیوشیمیایی و بیوفیزیکی برای سلول‌های داخل آن ایفا می‌کند. بنابراین، این فرضیه مطرح شده است که مواد بافتی که سلول‌زدایی شده‌اند، باید تأثیرات متفاوتی بر پتانسیل زیستایی و تمایز سلولی براساس نوع بافت داشته باشند (Agmon & Christman, 2016; Ghiyasvand et al., 2023). هیدروژل‌ها کاندیدهای مناسبی هستند زیرا می‌توانند خواص فیزیکی، شیمیایی و زیستی مشابه بافت‌های انسانی را ارائه دهند (Lee et al., 2010). هیدروژل‌ها به دلیل خواص مطلوب آن‌ها مانند زیست‌سازگاری و زیست‌تخریب‌پذیری مورد استفاده قرار گرفته‌اند (Zhu & Marchant, 2011). یافته‌های متعددی نشان از نقش هیدروژل بر کنترل تمایز عضله صاف (Xuan et al., 2023)، هدایت تمایز قلبی سلول‌های بنیادی جنینی (Duan et al., 2011) و فعالیت‌های زیستی پری‌سیت‌های^۲ مشتق شده از عضله اسکلتی (Fuoco et al., 2014) دارد. در این پروژه هیدروژلی که به عنوان بستر پوششی مشتق شده از ماهیچه اسکلتی استفاده شده است، میوژل^۳ نامیده شد. از میوژل به عنوان بستر برای رشد و تکثیر MSCs استفاده شد و ارزیابی‌هایی در جهت چگونگی کیفیت عملکرد سلول‌ها در رشد، تکثیر، تمایز و مهاجرت صورت گرفت.

مواد و روش‌ها

استخراج BM-MSCs از رت

به منظور تهیه سلول کافی مورد نیاز برای انجام آزمایش‌های این پروژه در وهله اول یک رت بالغ مناسب انتخاب شد. سپس MSCs از استخوان ران پا استخراج و به داخل فلاسک حاوی محیط کشت منتقل شدند (Huang et al., 2015). پس از اطمینان از صحت استخراج به داخل انکوباتور منتقل شد (دما: ۳۷ درجه و فشار CO₂: ۵ پاسکال). مدت سه روز پس از آغاز کشت، سلول‌های دوکی شکل منفرد و گاهی چندتایی در ظرف کشت مشاهده شد. پس از چندین بار پاساژ و به دست آمدن تعداد مناسب سلول، جهت نگهداری و ذخیره سلول‌ها برای مدت زمان طولانی، فرایند انجماد سلول انجام شده و سلول‌ها به کرایوویال انتقال و در فریزر ۸۰- نگهداری شدند.

تعیین مشخصات MSCs

برای تعیین مشخصات MSCs، مورفولوژی سلول، تمایز به استخوان و چربی و بررسی مارکرهای سطحی با استفاده از فلوسایتومتری مورد بررسی قرار گرفت. بدین منظور با هدف تعیین کردن مشخصات MSCs، سلول‌ها به استخوان و چربی تمایز داده شد و پس از پایان ۲۱ روز، سلول‌های تمایز یافته به استخوان به وسیله آلیزارین رد و سلول‌های تمایز یافته به چربی توسط اویل‌رد رنگ‌آمیزی شدند. همچنین با توجه به این که MSCs مارکر اختصاصی ندارند، MSCs با داشتن انواع خاصی از مارکرها و همچنین نداشتن انواعی دیگر از مارکرها تأیید هویت می‌شود. بنابراین فلوسایتومتری برای سلول‌های کشت‌شده به منظور بررسی مارکرهای سطحی انجام گرفت.

آماده‌سازی میوژل

پس از حذف بافت همبند و چربی اضافی از ماهیچه اسکلتی گوسفند، بافت به صورت قطعات ۱ سانتی‌متری بریده و به مدت ۳۰ دقیقه با آب مقطر شسته شد تا خون و مواد زائد از بین برود. سلول‌زدایی با انکوبه کردن بافت در محلول SDS به مدت ۵-۴ روز روی همزن مغناطیسی (۱۲۵ دور در دقیقه) در دمای اتاق انجام شد. SDS با شست‌وشو در آب مقطر در یک شبانه روز از بافت حذف شد. ماتریکس سلول‌زدایی شده ECM فریز و سپس لیوفیلیز شد. ECM لیوفیلیز شده با استفاده از یک مینی آسیاب به صورت پودر سفید درآمد. پودر ECM را می‌توان در دمای ۸۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری کرد. پودر ECM در محلول پیپسین به مدت ۴۸ ساعت روی همزن (۶۰ دور در دقیقه) در دمای اتاق حل شد. محلول ECM/pepsin در اسید استیک ۰/۱ مولار تا غلظت ۱۵ میلی‌گرم در میلی‌لیتر رقیق شد (DeQuach et al., 2010).

به منظور صحت فرایند سلول‌زدایی بافت، نمونه‌ای از قبل و نمونه‌ای از بعد سلول‌زدایی تهیه کرده و به وسیله رنگ‌آمیزی H&E^۱، ماسون تری کروم (MT)^۲، آلسیان بلو (AB)^۳ و DAPI^۴ مورد بررسی قرار گرفتند.

ایجاد پوشش بستر میوژل

برای ایجاد پوشش بستر میوژل، ابتدا محلول هیدروژل در غلظت مورد نظر (۰/۲ mg/ml) تهیه شد. سپس محلول به کف پلیت کشت سلول اضافه شد و دو روز در انکوباتور با دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد و ۵٪ CO₂ قرار داده شد. پس از دو روز مایع رویی برداشته شده و ظرف کشت دو بار با PBS منفی شست‌وشو داده شد و پس از خشک شدن کف ظرف MSCs بر روی میوژل کشت شد.

ایجاد پوشش بستر ژلاتین

برای ایجاد پوشش بستر ژلاتین ابتدا پودر ژلاتین در غلظت ۰/۱ mg/ml آماده شد. سپس محلول به کف ظرف کشت سلول اضافه شد و یک ساعت در انکوباتور با دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد و ۵٪ CO₂ قرار داده شد. پس از یک ساعت مایع رویی برداشته شده و پس از خشک شدن کف ظرف MSCs کاشت شد.

بررسی مورفولوژی و تکثیر سلولی

جهت بررسی اثر بستر میوژل بر مورفولوژی و تکثیر سلول‌ها، MSCs در سه بستر میوژل، ژلاتین و کنترل کشت شدند. پس از ۴۸ ساعت کشت، از وضعیت سلول‌های کشت‌شده در هر بستر عکس برداری انجام شد.

ارزیابی زنده‌مانی با استفاده از روش MTT

به منظور ارزیابی زنده‌مانی سلول‌ها، در یک پلیت ۹۶ چاهکی، ۵۰۰۰ سلول در هر چاهک به طور مساوی کشت شد. پس از گذشت ۲۴ ساعت، محلول MTT با غلظت ۰/۵ میلی‌گرم در ۱ میلی‌لیتر محیط کشت αMEM اضافه و به انکوباتور منتقل شد. پس از گذشت دو ساعت محیط کشت روی سلول‌ها جمع‌آوری شده و به چاهک‌ها ۱۰۰ میکرولیتر DMSO غیرسلولی اضافه شد و پس از گذشت ۱۰ دقیقه پلیت در دستگاه الیزا ریدر برای خوانش جذب نوری محلول در طول موج ۵۷۰ نانومتر قرار داده شد. پس از به دست آمدن میزان جذب نوری هر چاهک، درصد نهایی زنده‌مانی هر غلظت نسبت به چاهک کنترل به دست آمد. سپس نمودار میزان زنده‌مانی با نرم‌افزار Graphpad Prism رسم شد. این ارزیابی شش بار و هر بار با پنج تکرار برای هر غلظت انجام شد.

1. Hematoxylin and Eosin
2. Masson Trichrome
3. Alcian blue
4. 4,6diamidino-2-phenylindole

۱۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر در محیط کشت حل شد و به چاهک‌ها اضافه و به مدت دو ساعت به انکوباتور منتقل شد. سپس محیط حاوی میتوماکسین خارج و چاهک‌ها با PBS منفی شست‌وشو داده شد. به‌وسیله یک تیپ کریستال، خراشی در وسط چاهک از بالا به پایین به‌صورت مستقیم ایجاد شد. چاهک‌ها با PBS منفی شسته شده تا سلول‌های کنده‌شده خارج شوند. بعد از این مرحله به تمامی چاهک‌های پلیت محیط کشت اضافه شد و پس از بررسی توسط میکروسکوپ، عکس‌برداری اولیه انجام شد و پلیت‌ها به داخل انکوباتور منتقل شد. ۲۴ و ۴۸ ساعت بعد نیز جهت مقایسه روند مهاجرت سلولی، عکس‌برداری انجام شد.

نتایج

تعیین مشخصات MSCs

با استفاده از روش فلوسایتومتری مشخصات MSCs مانند مورفولوژی، تمایز به استخوان و چربی و مارکرهای سطحی موردبررسی قرار گرفت. MSCs چسبنده و کشیده هستند که ویژگی‌های مورفولوژیکی خود را در تمام مدت کشت و در پاساژهای مختلف حفظ می‌کنند (شکل A-۱). هم‌چنین در شرایط آزمایشگاهی MSCs می‌تواند به استخوان، چربی و غضروف تمایز یابند. بنابراین تمایز سلول‌ها به استخوان و چربی برای تعیین مشخصات MSCs انجام شد. سلول‌های تمایزافته به استخوان به‌وسیله آلیزارین رد و سلول‌های تمایز یافته به چربی توسط اوایل‌رد رنگ‌آمیزی شدند (شکل B, C-۱). طبق نتایج به‌دست‌آمده ۹۸/۶ درصد سلول‌ها مارکر CD45 و ۹۹/۲ درصد سلول‌ها مارکر CD34 را نداشتند و ۹۸/۳ درصد سلول‌ها مارکر CD44 و ۹۸/۶ درصد سلول‌ها مارکر CD90 را بیان کردند. با نتایج به‌دست‌آمده می‌توان نتیجه گرفت که سلول‌های موردبررسی MSCs هستند (شکل D-۱).

نتایج رنگ‌آمیزی بافت سلول‌زدایی‌شده ماهیچه اسکلتی

به‌منظور اثبات سلول‌زدایی بافت ماهیچه اسکلتی ارزیابی‌های بافت‌شناسی انجام شد. نتایج حاصل از رنگ‌آمیزی DAPI عدم وجود هسته‌های سلولی در بافت سلول‌زدایی‌شده را نشان داد که درستی این فرایند را اثبات کرد. نتایج حاصل از رنگ‌آمیزی H&E نیز نشان از عدم وجود سلول‌ها در ساختار بافت سلول‌زدایی‌شده است. نتایج به‌دست‌آمده از رنگ‌آمیزی MT نشان‌دهنده وجود کلاژن در ماده زمینه‌ای خارج سلولی، هم در بافت طبیعی و هم در بافت سلول‌زدایی

ارزیابی زمان دو برابر شدن جمعیت سلول (Doubling Time)

در این ارزیابی مدت زمانی که طول می‌کشد تا جمعیت سلول دو برابر شود، اندازه‌گیری می‌شود. به‌منظور انجام این ارزیابی در یک پلیت شش چاهکی، یک چاهک میوژل، یک چاهک ژلاتین و یک چاهک هم برای کشت کنترل در نظر گرفته شد. 3×10^4 سلول در هر چاهک کشت شد و شش روز بعد سلول‌های هر چاهک شمارش شد و طبق فرمول $Doubling\ time = \frac{Duration \cdot \ln(2)}{\ln\left(\frac{r_{Final\ concentration}}{r_{Initial\ concentration}}\right)}$ زمان دو برابر شدن سلول‌های هر چاهک به‌دست آمد.

ترسیم منحنی رشد MSCs

به‌منظور بررسی رشد سلول‌ها و ارزیابی سرعت و کیفیت تکثیر سلول‌ها، منحنی رشد ترسیم می‌شود. سلول در دوره رشد خود دارای سه فاز تأخیر، لگاریتمی و ایستا است. برای بررسی رشد سلول و ارزیابی مدت زمان هرکدام از این سه فاز در MSCs کشت‌شده بر روی میوژل، ژلاتین و محیط کنترل، منحنی رشد ترسیم شد. بدین منظور، در یک پلیت (شش چاهکی) میوژل و در پلیت دیگر ژلاتین جهت پوشش بستر در نظر گرفته شد. پلیت آخر نیز برای کشت کنترل در نظر گرفته شد. 3×10^4 سلول در هرکدام از چاهک‌ها کشت شد. به‌مدت شش روز سلول‌ها با لام نئوبار شمارش شدند.

فلوسایتومتری و بررسی پروفایل چرخه سلولی

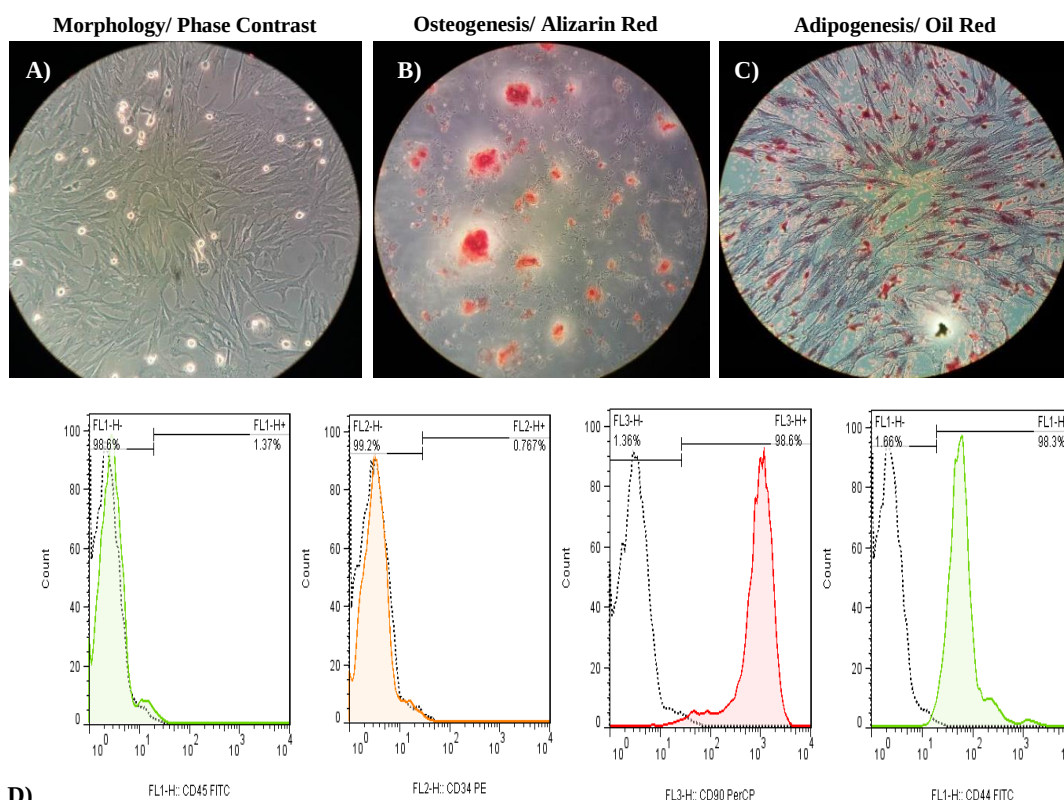
جهت انجام فلوسایتومتری، MSCs کشت‌شده در سه بستر میوژل، ژلاتین و کنترل پس از ۴۸ ساعت کشت از کف چاهک‌ها جمع‌آوری شده و به‌صورت سوسپانسیون در فالكون‌های جداگانه قرار داده شد و سپس در آزمایشگاه بافت‌آزما با استفاده از دستگاه فلوسایتومتری مورد ارزیابی قرار گرفتند.

بررسی روند مهاجرت سلولی با ایجاد خراش (Scratch assay)

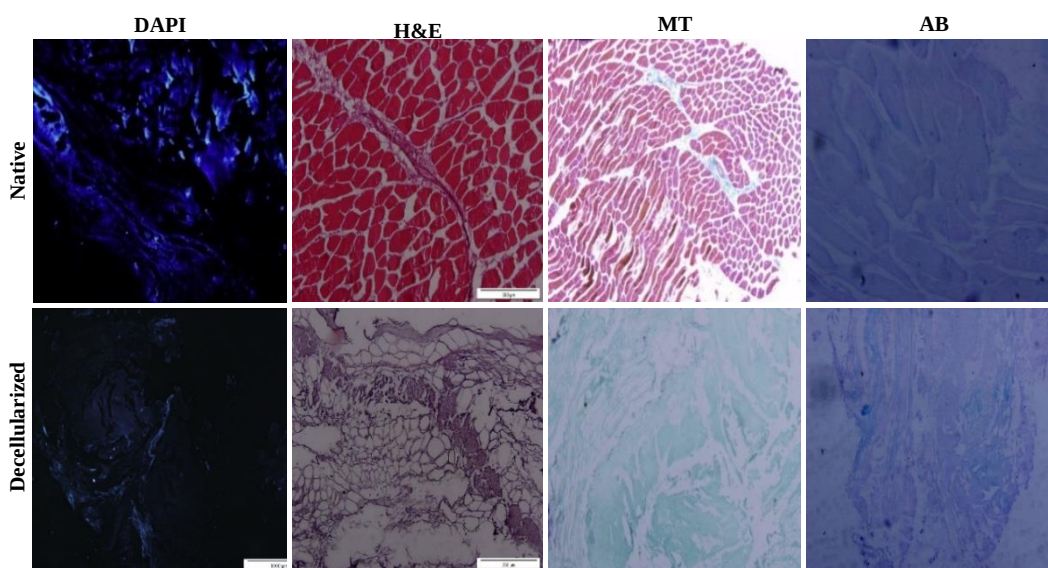
به‌منظور بررسی روند مهاجرت سلولی در MSCs از آزمون مهاجرت استفاده می‌شود که با نام Scratch assay شناخته می‌شود. ابتدا MSCs کشت شدند. دو چاهک میوژل، دو چاهک ژلاتین و دو چاهک برای کشت کنترل در نظر گرفته شد. پس از رسیدن تراکم سلول‌ها به ۸۰ درصد، پودر میتوماکسین^۱ با غلظت

سلول‌زدایی شده است که این نتایج به معنای حفظ پلیمرهای ECM مشتق از ماهیچه اسکلتی است (شکل ۲).

همچنین نتایج حاصل از رنگ‌آمیزی AB نیز نشانگر وجود گلیکوزامینوگلیکان‌ها هم در بافت طبیعی و هم در بافت



شکل ۱. تعیین هویت MSCs (A). مورفولوژی سلول‌ها در پاساژ دوم. MSCs به صورت کشیده و به کف فلاسک چسبیده هستند (P1). (B). MSCs تمایز یافته به استخوان. رنگ‌آمیزی به وسیله آلیزارین رد صورت گرفته است. (C). MSCs تمایز یافته به چربی. رنگ‌آمیزی به وسیله اوایل رد صورت گرفته است (بزرگمایی ۲۰X). (D). دو نمودار FL1-H: CD45 FITC و FL2-H: CD34 PE و دو نمودار FL3-H: CD90 PerCP و FL1-H: CD44 FITC وجود دو مارکر مثبت در سلول‌های مورد آزمایش را ثابت کرد.



شکل ۲. رنگ‌آمیزی بافتی ماهیچه اسکلتی طبیعی و سلول‌زدایی شده. رنگ‌آمیزی بافتی ماهیچه اسکلتی طبیعی و سلول‌زدایی شده نشان‌دهنده صحت روند سلول‌زدایی است. رنگ‌آمیزی DAPI عدم وجود هسته‌های سلولی در بافت سلول‌زدایی شده و رنگ‌آمیزی H&E نیز نشان از عدم وجود سلول‌ها در ساختار بافت را نشان می‌دهد. رنگ‌آمیزی MT و AB نیز به ترتیب وجود کلاژن و گلیکوزامینوگلیکان‌ها را در ماده زمینه‌ای خارج سلولی، هم در بافت طبیعی و هم در بافت سلول‌زدایی شده نشان می‌دهد که به معنای حفظ پلیمرهای ماده ECM مشتق از ماهیچه اسکلتی است.

یافت. به‌طوری‌که تعداد سلول‌ها در بستر میوژل از تعداد سلول‌ها در بستر ژلاتین و تعداد سلول‌ها در بستر ژلاتین از سلول‌های کنترل بیش‌تر بود. تعداد سلول‌های کشت‌شده در بستر میوژل در نهایت دو برابر سلول‌های کنترل و $1/5$ برابر سلول‌های کشت‌شده در بستر ژلاتین بود (شکل E-۳).

بررسی پروفایل چرخه سلولی در MSCs

با استفاده از روش فلوسایتومتری، پروفایل چرخه سلولی MSCs بر روی بستر میوژل، ژلاتین و کنترل پس از ۴۸ ساعت بررسی شد (شکل A-۴). در چرخه سلولی بررسی‌شده درصد سلول‌ها در مراحل مختلف سلولی G1، sub G1، S و G2 مشخص شد (شکل B، C-۴). بیش‌ترین درصد سلول‌ها در فاز S و G2 مربوط به سلول‌های کشت‌شده بر روی بستر ژلاتین بود. پس از آن بیش‌ترین درصد سلول‌ها در این دو فاز مربوط به میوژل و در درجه بعدی مربوط به کنترل بود. این بدین معناست که بستر ژلاتین و در درجه بعد میوژل باعث افزایش سرعت تقسیم یا افزایش سرعت رشد سلول در مرحله G1 و S چرخه سلولی شده است.

بررسی مهاجرت سلولی MSCs با ایجاد خراش (Scratch assay)

بررسی تصاویر میکروسکوپی از پرشدن شیار ایجادشده بین سلول‌های کشت‌شده بر روی بستر میوژل، ژلاتین و کنترل نشان داد که روند مهاجرت سلولی در سلول‌های کشت‌شده بر روی میوژل نسبت به سلول‌های کشت‌شده بر روی ژلاتین و هم‌چنین، سلول‌های کشت‌شده بر روی ژلاتین نسبت به سلول‌های کنترل سریع‌تر است و MSCs مساحت بیش‌تری از شیار را پر کرده‌اند. به‌طوری‌که پس از ۲۴ ساعت، در سلول‌های کنترل حرکت سلولی بسیار کمی محدود به اطراف شیارها مشاهده شد. حرکت در سلول‌های کشت‌شده بر روی ژلاتین، کمی بیش‌تر از سلول‌های کنترل، اما محدود به کناره شیارها بود. حرکت در سلول‌های کشت‌شده بر روی میوژل باعث اشغال مساحت زیادی از شیار شد و سلول‌ها از دو طرف به هم رسیدند. پس از ۴۸ ساعت، سلول‌های کشت‌شده بر روی میوژل کل فضای شیار را پر کردند، به‌طوری‌که اثری از شیار ایجادشده باقی نماند. درحالی‌که در سلول‌های کنترل و سلول‌های کشت‌شده بر روی ژلاتین هنوز اثر شیار باقی مانده است. بنابراین مهاجرت سلولی بر روی میوژل بیش‌تر از ژلاتین و کنترل است (شکل ۵).

بررسی مورفولوژی و تکثیر سلولی بررسی درصد زنده‌مانی MSCs

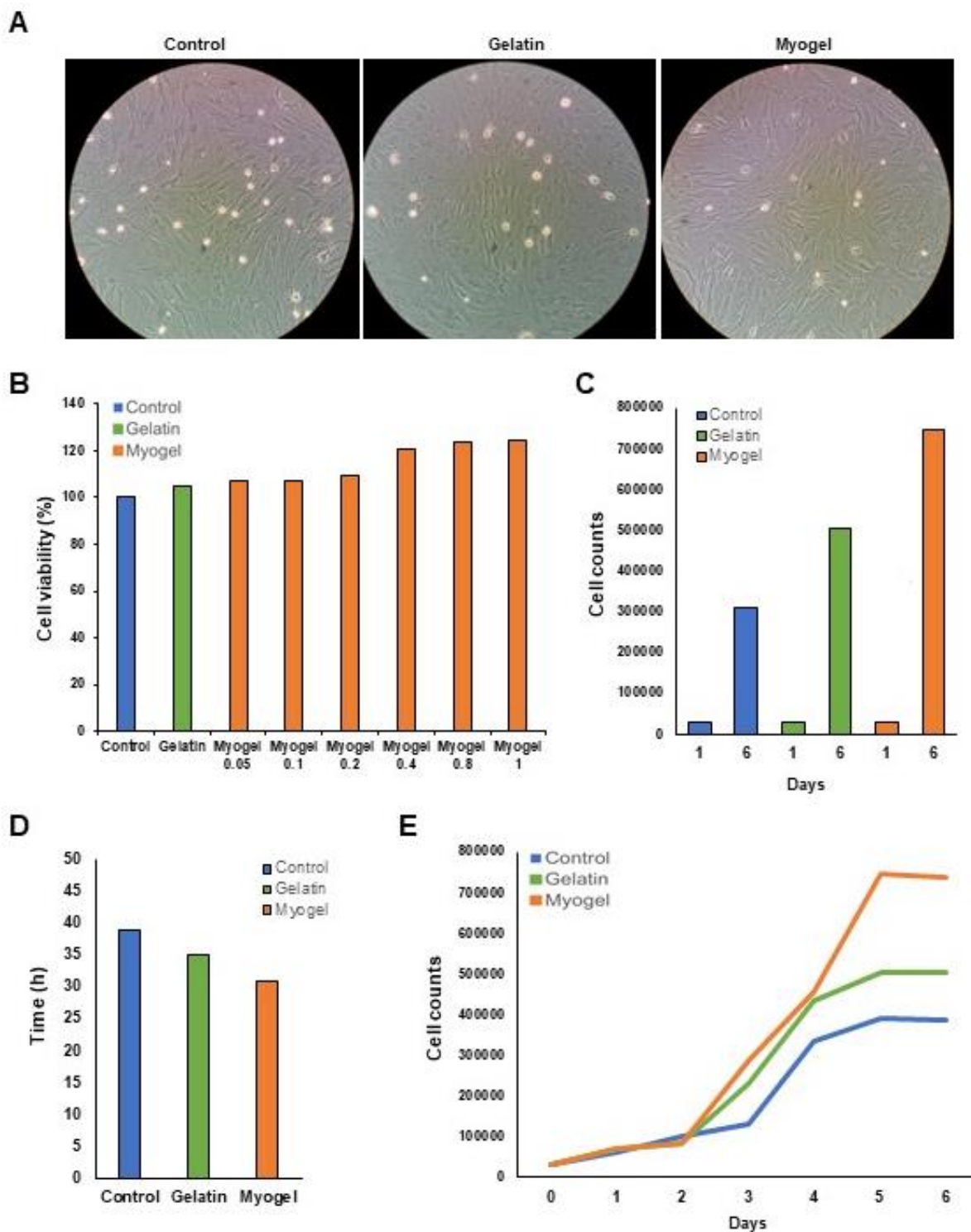
مشاهدات میکروسکوپی نشان داد، تراکم و رشد سلول‌ها در بستر میوژل، به مراتب بیش‌تر از بستر ژلاتین و کنترل است (شکل A-۳) با استفاده از روش MTT، درصد زیستایی و زنده‌مانی MSCs بر روی بستری از غلظت‌های مختلف میوژل بررسی شد. غلظت‌های $0/05$ ، $0/1$ ، $0/2$ ، $0/4$ ، $0/8$ ، 1 میلی‌گرم بر میلی‌لیتر از میوژل، غلظت $0/1$ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر از ژلاتین استفاده شد. یک چاهک هم برای کنترل در نظر گرفته شد. درصد زنده‌مانی سلول‌ها در بستر ژلاتین بیش‌تر از کنترل بود. با افزایش میزان غلظت میوژل، زنده‌مانی سلول‌ها با شیب تقریباً یکسانی افزایش یافت که در نهایت غلظت 1 میلی‌گرم بر میلی‌لیتر از میوژل بیش‌ترین زنده‌مانی را به خود اختصاص داد. کم‌ترین درصد زنده‌مانی در چاهک کنترل مشاهده شد (شکل B-۳).

بررسی ارزیابی زمان دو برابر شدن جمعیت MSCs (Doubling Time)

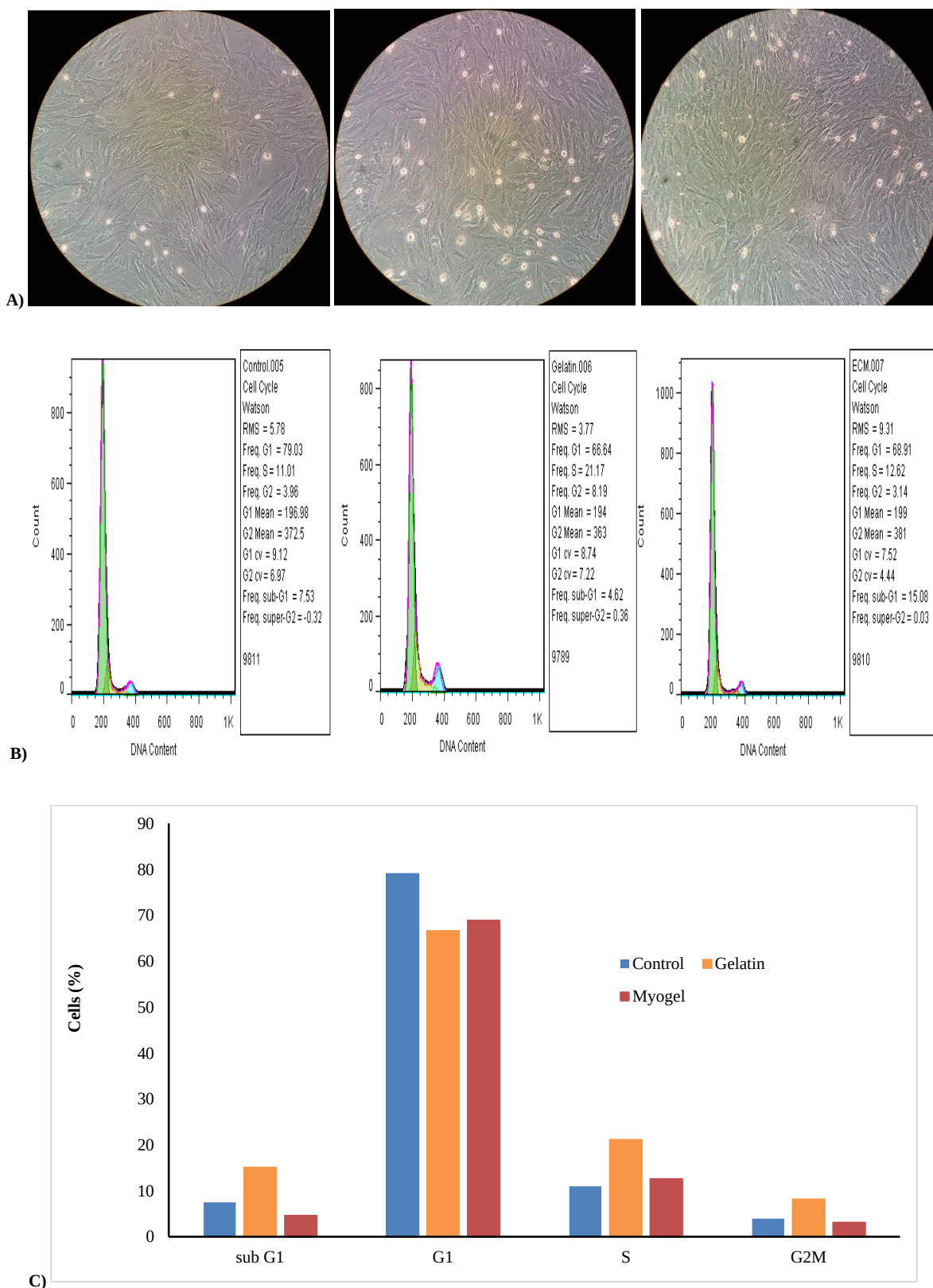
یکی از ارزیابی‌هایی که برای درک بهتر میزان اثر میوژل بر رشد MSCs انجام شد، ارزیابی زمان دو برابرشدن جمعیت سلول بود. برای انجام این ارزیابی تعداد اولیه 3×10^4 سلول روی بستر میوژل و ژلاتین و هم‌چنین چاهک کنترل کشت و روز ششم تعداد نهایی این سلول‌ها شمارش شد. نتایج آزمایش‌های ما نشان داد زمان دو برابرشدن سلول‌ها در بستر میوژل ۳۱ ساعت، ژلاتین ۳۵ ساعت و کنترل ۳۹ ساعت می‌باشد که نشان‌دهنده سرعت رشد بیش‌تر MSCs بر روی بستر میوژل نسبت به بستر ژلاتین و یا سلول‌های کنترل می‌باشد (شکل C، D-۳).

بررسی تکثیر MSCs با استفاده از ترسیم منحنی رشد

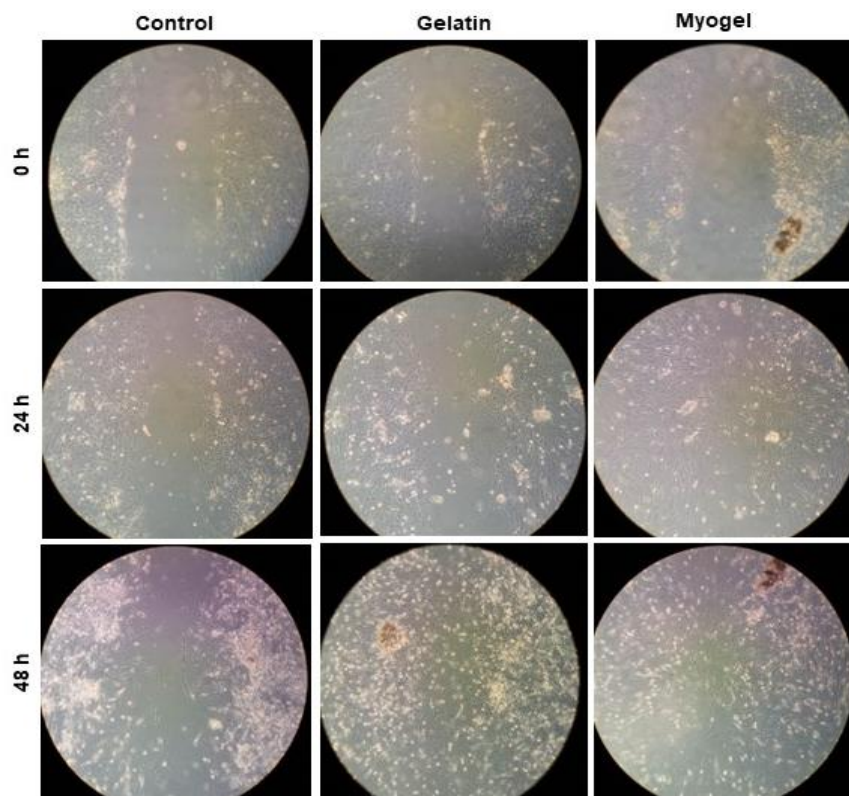
به‌منظور بررسی اثر بستر میوژل بر روی رشد MSCs از ترسیم منحنی رشد استفاده شد. سلول‌ها به تعداد یکسان (3×10^4 سلول) در سه پلیت جداگانه بر روی بسترهای میوژل، ژلاتین و کنترل کشت داده شدند و در انکوباتور به مدت شش روز، نگهداری شده و به‌صورت روزانه شمارش سلول‌ها با استفاده از لام نئوبار انجام شد. سپس نمودار نقطه‌ای از روند رشد سلول‌های MSCs با استفاده از نرم‌افزار Prism Graphpad رسم شد. طبق نتایج به‌دست‌آمده میزان رشد سلول‌ها در بستر میوژل در مقایسه با ژلاتین و کنترل افزایش



شکل ۳. بررسی درصد زنده‌مانی MSCs. (A) مورفولوژی MSCs کشت‌شده بر روی بستر میوژل، ژلاتین و کنترل. تراکم و رشد سلول‌ها در بستر میوژل (تصویر سمت راست) به مراتب بیش‌تر از بستر ژلاتین (تصویر وسط) و کنترل (تصویر سمت چپ) است (بزرگنمایی ۲۰X). (B) نمودار درصد زنده‌مانی MSCs با استفاده از روش MTT. درصد زنده‌مانی سلول‌ها در بستر ژلاتین بیش‌تر از کنترل است. با افزایش غلظت میوژل درصد زنده‌مانی سلول‌ها با شیب تقریباً یکسانی افزایش یافته است. کم‌ترین درصد زنده‌مانی در چاهک کنترل مشاهده شد. (C) زمان دوبرابر شدن MSCs کشت‌شده بر روی بستر میوژل، ژلاتین و کنترل. تعداد اولیه سلول‌ها در روز اول و تعداد نهایی سلول‌ها در روز ششم را نشان می‌دهد. (D) نمودار زمان دو برابر شدن سلول‌ها برای بستر میوژل ۳۱ ساعت، ژلاتین ۳۵ ساعت و کنترل ۳۹ ساعت می‌باشد. (E) نمودار منحنی رشد MSCs بر روی بستر میوژل، ژلاتین و کنترل در بازه زمانی شش روزه. همان‌طور که مشاهده می‌شود MSCs کشت‌شده بر روی بستر میوژل سرعت رشد بیش‌تری نسبت به سلول‌های کشت‌شده بر روی بستر ژلاتین و سلول‌های کنترل دارند.



شکل ۴. بررسی مورفولوژیکی و چرخه سلولی MSCs. (A) مورفولوژی MSCs کشت‌شده در بستر میوژل، ژلاتین و کنترل قبل از انجام فلوسایتومتری نشان می‌دهد تراکم و رشد سلول‌ها در بستر میوژل (تصویر سمت راست) به مراتب بیش‌تر از بستر ژلاتین (تصویر وسط) و کنترل (تصویر سمت چپ) می‌باشد (بزرگنمایی ۲۰X). (B) نمودارهای فلوسایتومتری جهت بررسی چرخه سلولی MSCs. (C) نمودار مراحل مختلف چرخه سلول (sub G1، G1، S و G2) در MSCs کشت‌شده بر بستر میوژل، ژلاتین و کنترل. بیش‌ترین درصد سلول‌ها در فاز S و G2 مربوط به سلول‌های کشت‌شده بر روی ژلاتین است. پس از آن بیش‌ترین درصد سلول‌ها در این دو فاز مربوط به میوژل و سپس کنترل می‌باشد.



شکل ۵. روند مهاجرت MSCs. در ابتدا، یک خراش یکسان بین سلول‌ها ایجاد شد (0h). پس از ۲۴ ساعت، کم‌ترین حرکت مربوط به سلول‌های کنترل و بیش‌ترین حرکت مربوط به سلول‌های بستر میوژل است (24h). پس از ۴۸ ساعت، تا پرشدن شیار توسط سلول‌های کنترل هنوز فاصله زیادی وجود دارد. در سلول‌های کشت‌شده بر روی ژلاتین هنوز اثر شیار باقی مانده است. سلول‌های کشت‌شده بر روی میوژل نیز کل فضای شیار را پر کرده‌اند (48h) (بزرگنمایی ۱۰X).

میوژل به‌عنوان بستری برای رشد و تمایز MSCs استفاده شد و ارزیابی‌هایی در جهت چگونگی کیفیت عملکرد سلول انجام شد. نتایج به‌دست‌آمده در این مطالعه با بررسی‌های انجام‌شده توسط Lee *et al.* (2020) مطابقت داشت. آن‌ها یک سیستم داربست خاص بدون سلول ایجاد کردند که شامل یک ماتریکس خارج سلولی سلول‌زادایی‌شده از عضلات اسکلتی (DECM)^۱ و یک عامل ماهیچه‌زایی، فاکتور رشد شبه انسولین-۱ (IGF-1)^۲ بود. خواص مورفولوژیکی و زیستی این داربست مخصوص عضلات (IGF-1/DECM) و داربست‌های کلاژن و ماتریکس خارج سلولی سلول‌زادایی‌شده از عضلات اسکلتی موردبررسی قرار گرفت. در این مطالعه زنده‌ماندن سلول در همه داربست‌ها در ۱، ۳ و ۷ روز پس از کشت، بیش از ۹۰ درصد بود. تکثیر سلولی در IGF-1/ECM در مقایسه با سایر گروه‌ها به‌طور قابل‌توجهی افزایش یافت.

در مطالعه دیگری، Zhang *et al.* (2015) سلول‌های بنیادی بالغ (ASCs) را بر روی BM-ECM^۳ و ظرف TCP کشت داد و

بحث

استخوان یکی از مهم‌ترین بافت‌های بدن و جزء اصلی اسکلت فرد بالغ می‌باشد که از اندام‌های مختلف بدن حمایت و محافظت می‌کند و هم‌چنین نقش مهمی در حرکات بدن ایفا می‌کند. استخوان نقش مهمی را در فیزیولوژی بدن از جمله تشکیل سلول‌های بنیادی، سلول‌های خونی، ذخیره و هومئوستاز مواد معدنی (کلسیم و فسفات) بازی می‌کند. بیماری‌ها و آسیب‌های بافت استخوانی ممکن است باعث شود که استخوان‌ها به‌راحتی بشکنند و یا نیاز به ترمیم داشته باشند. درمان‌های فعلی برای ترمیم آسیب‌های استخوانی منجر به بازسازی کامل استخوان نمی‌شود و درمان مداوم را ارائه نمی‌دهد. برای غلبه بر این محدودیت‌ها، استراتژی‌های مهندسی بافت مبتنی بر سلول در بازبانی عملکرد طبیعی بافت پس از آسیب‌های مختلف بافتی موردتوجه قرار گرفته است. به همین دلیل برای پی‌بردن به بازدهی و عملکرد بهتر این سلول‌ها، پژوهش‌گران این سلول‌ها را با ترکیبات و مواد مختلف تیمار و با بسترهای متنوع کشت می‌دهند. چندین مطالعه نشان داده‌اند که ECM مشتق از سلول در توانایی خود برای حفظ خواص سلولی، از جمله ویژگی‌های عملکردی و تکثیر سریع سلولی منحصربه‌فرد است. بنابراین در این پروژه از

1. Decellularized extracellular matrix of skeletal muscle

2. Insulin Growth Factor 1

3. Bone marrow stromal cell-derived extracellular matrix

استخوان را بر روی ECM به‌دست‌آمده از MSCs اولیه (P0) و پلاستیک کشت بافت (TCP) کشت داد و مشاهده کرد که سلول‌های کشت‌شده بر روی بستر ECM ویژگی‌های سلول‌های بنیادی موردنظر خود را برای مدت طولانی حفظ می‌کنند. علاوه بر آن MSCs افزایش توانایی تشکیل کلنی، کاهش تمایز خود به خودی را نشان دادند. بنابراین می‌توان گفت بستر مورد مطالعه نقش بسیار مهمی در رشد، مورفولوژی و رفتار سلول کشت‌شده بر روی آن دارد که نتایج به‌دست‌آمده در این مطالعه نیز این نظر را تأیید می‌کند. در این پروژه استفاده از MTT به جهت دستیابی به غلظت مناسب برای انجام سایر ارزیابی‌ها نشان داد زنده‌مانی MSCs در بستر میوژل با غلظت ۰/۲ میلی گرم بر میلی لیتر از زنده‌مانی MSCs در بستر ژلاتین با غلظت ۰/۱ میلی گرم بر میلی لیتر بیشتر و زنده‌مانی MSCs بستر ژلاتین از زنده‌مانی MSCs مربوط به کنترل بیش‌تر است. همچنین با ایجاد پوشش بستر با غلظت‌های بالای ۰/۲ میوژل، نشانه‌هایی از بسته‌شدن ژل و با ایجاد پوشش بستر با غلظت‌های کم‌تر از ۰/۲ میوژل، عدم یک‌دست‌بودن پوشش بستر مشاهده شد. برای بررسی میزان زیستایی و زنده‌مانی MSCs در غلظت‌های بالاتر از ۰/۲ میلی گرم بر میلی لیتر نیز از غلظت‌های ۰/۰۵، ۰/۰۱، ۰/۰۲، ۰/۰۴، ۰/۰۸، ۱ میلی گرم بر میلی لیتر برای بستر میوژل به‌منظور انجام تست MTT استفاده شد. بر این اساس کم‌ترین زنده‌مانی در کنترل مشاهده شد و زنده‌مانی در بستر ژلاتین بیش‌تر از کنترل بود. با افزایش میزان غلظت هیдроژل، زنده‌مانی با شیب تقریباً یکسانی افزایش یافت که در نهایت غلظت ۱ میلی گرم بر میلی لیتر بیش‌ترین زنده‌مانی را به خود اختصاص داد.

نتایج این پروژه با مطالعه‌ای دیگری که توسط (Xiong et al., 2019) بر روی سلول‌های بنیادی لیگامان پریدنتال انسانی انجام شده بود، منطبق بود. آن‌ها سلول‌ها را بر روی چهار سطح مختلف ظرف TCP، فیبرونکتین، ECM مشتق از سلول‌های بنیادی لیگامان پریدنتال انسانی و ECM مشتق از سلول‌های بنیادی به‌دست‌آمده از ادرار انسان کشت داده و ظرفیت تمایزی آن‌ها را مورد بررسی قرار دادند. این داده‌ها نشان داد که سلول‌های بنیادی لیگامان پریدنتال انسانی روی ECM مشتق از سلول‌های بنیادی به‌دست‌آمده از ادرار انسان بالاترین سطح استخوان‌زایی را نشان می‌دهد.

نتایج بررسی تمایز سلول‌ها بر روی بستر هیدرژیلی میوژل در این پژوهش با نتایج بررسی (Re et al., 2019)، که BM- MSCs و (ASCs)^۲ انسان را در هیدرژیلی هیبرید ژلاتین-

تمایز سلولی را در شرایط برون‌تنی و درون‌تنی مقایسه کرد. آن‌ها نشان دادند که BM-ECM باعث افزایش استخوان‌سازی ASCs می‌شود و تکثیر ASCs در BM-ECM، سه برابر بیش‌تر از ظرف TCP می‌باشد. در این مطالعه نیز بستر هیدرژیلی به‌دست‌آمده از ماتریکس خارج سلولی نیز تکثیر بهتری را نسبت به بستر ژلاتین و کنترل نشان داد که می‌توان گفت به‌دلیل داشتن فعالیت زیستی اصلی ماتریکس طبیعی و ساختار سه بعدی مناسب برای رشد سلولی در هیدرژیلی مشتق‌شده از ECM، به‌طور کلی تکثیر در سلول‌های کشت‌شده بر روی هیدرژیلی مشتق‌شده از ECM دارای نتیجه مطلوب‌تری است.

Lin et al. (2012) پژوهشی را با هدف پژوهش در توصیف ماهیت بیولوژیکی و ویژگی تأثیر^۱ MECM بر MSCs انجام داد. در این پژوهش، ECM طبیعی تولیدشده توسط MSCs انسان در شرایط آزمایشگاهی در اوره استخراج شد و توده باقیمانده با هضم پپسین (به ترتیب U-MECM و HP-MECM) پردازش شد. سپس محصولات ECM استخراج‌شده از MSCs به همراه کلاژن نوع I و PBS به عنوان بستر در محیط کشت مورد استفاده قرار گرفت و رفتار سلول‌های بنیادی مزانشیمی کشت‌شده بر روی آن مورد مطالعه قرار گرفت. نتایج نشان داد، قرار گرفتن در معرض U-MECM به‌طور چشمگیری باعث افزایش تکثیر، چسبندگی، مهاجرت و تمایز MSC می‌شود. این نتایج با یافته‌های مطالعه حاضر که بیان می‌کند MSCs بر روی هیدرژیلی مشتق‌شده از ECM دارای تکثیر بهتری است، مطابقت دارد.

در بررسی نتایج ترسیم منحنی رشد، میزان رشد سلول‌ها در بستر میوژل در مقایسه با ژلاتین و کنترل افزایش یافت. به‌طوری که تعداد سلول‌ها در بستر میوژل در نهایت دو برابر سلول‌های کنترل و ۱/۵ برابر سلول‌ها در بستر ژلاتین بود و این نشان‌دهنده افزایش رشد سلول‌ها در میوژل است. در مطالعات پیشین، Zhang et al. (2009) دو نوع سلول ماهیچه اسکلتی و سلول پوست را بر روی بستر میوژل کشت داد. نتایج آن پژوهش حاکی از آن بود که پوشش‌های ECM بافتی، تکثیر سلولی را افزایش می‌دهد و دو نوع سلول ماهیچه اسکلتی و سلول پوست کشت‌شده بر روی بستر میوژل، رشدی نزدیک به دو برابر نسبت به محیط کنترل منفی (بدون بستر) دارد و رشد تقریباً یکسانی با محیط کنترل مثبت (بستر کلاژن) داشته است.

همچنین Chen et al. (2007)، MSCs مشتق‌شده از مغز

ژلاتین نتیجه بهتری نسبت به میوژل داشت این بود که به نظر میوژل به دلیل تأثیر بیش‌تر بر روی رشد سلول‌ها در بازه زمانی یک روز فاز لگاریتمی را طی کرده و باعث پرشدن چاهک از سلول‌ها شده است و پس از آن سلول‌ها وارد فاز ایستا شده‌اند. بنابراین در زمان انجام فلوسایتومتری، سلول‌های کشت‌شده بر روی بستر میوژل در فاز ایستا بوده و دقیقاً در همین زمان به دلیل تأثیر کم‌تر ژلاتین بر سلول‌های کشت‌شده، این سلول‌های کشت‌شده بر روی بستر ژلاتین در زمان انجام فرایند فلوسایتومتری در فاز لگاریتمی بوده‌اند که در نتیجه بیش‌ترین درصد سلول‌ها در فاز S و G2 در سلول‌های کشت‌شده بر روی ژلاتین است.

در مطالعه انجام‌شده، عملکرد MSCs کشت‌شده بر روی بستر میوژل بررسی شد. نتایج ما نشان داد، زیستایی، تکثیر، رشد، تمایز و توانایی مهاجرت سلول‌های بنیادی مزانشیمی کشت‌شده بر روی بستر میوژل به‌طور مطلوبی افزایش می‌یابد. این نتیجه نشان می‌دهد با انجام پژوهش‌های بیش‌تر می‌توان از میوژل در جهت بازدهی بیش‌تر و عملکرد بهتر MSCs استفاده کرد.

تشکر و قدردانی

این مطالعه به‌عنوان بخشی از پایان‌نامه نویسنده اول است که با حمایت دانشگاه شهید بهشتی و پژوهشگاه رویان انجام شده است.

تعارض منافع

هیچ‌گونه تعارض منافع توسط نویسندگان وجود ندارد.

کیتوزان سه‌بعدی با محتوای کیتوزان متفاوت در حضور لیز پلاکت انسانی کشت داده و از نظر تکثیر و تمایز استخوان‌زایی مورد ارزیابی قرار دادند، مطابقت دارد. این پژوهش نشان داد به دلیل نقش مؤثر پروتئین‌های موجود در لیز پلاکت انسانی در عملکردهای مربوط به چسبندگی سلولی، مکانیسم‌های ترمیم سلولی و تنظیم تمایز سلولی، هیدروژل‌های هیبریدی ژلاتین-کیتوزان همراه با لیز پلاکت‌های انسانی به‌شدت از تکثیر و تمایز استخوانی MSCs پشتیبانی می‌کنند.

هم‌چنین Jensen *et al.* (2012) نیز در مطالعه‌ای ESCs موشی که در مراحل اولیه تمایز به سلول‌های اپیتلیال آلوئولی II بودند در داربست‌های ECM مشتق از ریه کشت دادند. این داربست توانست شواهد فنوتیپی تمایز اپیتلیال آلوئولی ESCs مانند بیان پروتئین سورفکتانت و فاکتور رونویسی تیروئید را حفظ کند.

در این پروژه چرخه سلولی MSCs کشت داده‌شده بر روی بستر میوژل، ژلاتین و کنترل نیز مورد بررسی قرار گرفت. برخلاف نتایج سایر ارزیابی‌ها که بهترین نتیجه مربوط به میوژل بود، در این بررسی بیش‌ترین درصد سلول‌ها در فاز S و G2 مربوط به سلول‌های کشت‌شده بر روی ژلاتین بود. پس از آن بیش‌ترین درصد سلول‌ها در این دو فاز مربوط به میوژل و در درجه بعدی مربوط به کنترل بود. این بدین معنا بود که بستر ژلاتین و در درجه بعد میوژل باعث افزایش سرعت تقسیم یا افزایش سرعت رشد سلول در مرحله‌ی G1 و S چرخه سلولی شده است. ذکر این نکته در اینجا دارای اهمیت است که دلیل این‌که در این بررسی

References

- Agmon, G., & Christman, K. L. (2016). Controlling stem cell behavior with decellularized extracellular matrix scaffolds. *Current Opinion in Solid State and Materials Science*, 20(4), 193-201.
- Ahmadi, B. M., Noori, A., Ashtiani, M. K., Rajabi, S., & Talkhabi, M. (2023). 5-Azacytidine incorporated skeletal muscle-derived hydrogel promotes rat skeletal muscle regeneration. *Cells & Development*, 173, 203826.
- Caplan, A. (2009). Why are MSCs therapeutic? New data: new insight. *The Journal of Pathology: A Journal of the Pathological Society of Great Britain and Ireland*, 217(2), 318-324.
- Chen, X. D., Dusevich, V., Feng, J. Q., Manolagas, S. C., & Jilka, R. L. (2007). Extracellular matrix made by bone marrow cells facilitates expansion of marrow-derived mesenchymal progenitor cells and prevents their differentiation into osteoblasts. *Journal of bone and mineral research*, 22(12), 1943-1956.
- DeQuach, J. A., Mezzano, V., Miglani, A., Lange, S., Keller, G. M., Sheikh, F., & Christman, K. L. (2010). Simple and high yielding method for preparing tissue specific extracellular matrix coatings for cell culture. *PLoS one*, 5(9), e13039.
- Ding, D.-C., Shyu, W.-C., & Lin, S.-Z. (2011). Mesenchymal stem cells. *Cell transplantation*, 20(1), 5-14.
- Dominici, M., Le Blanc, K., Mueller, I., Slaper-Cortenbach, I., Marini, F., Krause, D., Deans, R., Keating, A., Prockop, D., & Horwitz, E. (2006). Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy*, 8(4), 315-317.
- Duan, Y., Liu, Z., O'Neill, J., Wan, L. Q., Freytes, D. O., & Vunjak-Novakovic, G. (2011). Hybrid gel composed of native heart matrix and collagen induces cardiac differentiation of human embryonic stem cells without supplemental growth factors. *Journal of cardiovascular translational research*, 4, 605-615.
- Fuoco, C., Sangalli, E., Vono, R., Testa, S., Sacchetti, B., Latronico, M. V., Bernardini, S., Madeddu, P., Cesareni, G., & Seliktar, D. (2014). 3D hydrogel environment rejuvenates aged pericytes for skeletal muscle tissue engineering. *Frontiers in physiology*, 5, 92444.

- Ghiyasvand, F., Arabzadeh, S., & Talkhabi, M. (2023). Investigating the Effect of Ascorbic Acid on the Viability of Mesenchymal Stem Cell Cultured on the Skeletal Muscle Decellularized Scaffold. *Experimental animal Biology*, 12(1), 57-66.
- Guilak, F., Cohen, D. M., Estes, B. T., Gimble, J. M., Liedtke, W., & Chen, C. S. (2009). Control of stem cell fate by physical interactions with the extracellular matrix. *Cell stem cell*, 5(1), 17-26.
- Huang, S., Xu, L., Sun, Y., Wu, T., Wang, K., & Li, G. (2015). An improved protocol for isolation and culture of mesenchymal stem cells from mouse bone marrow. *Journal of orthopaedic translation*, 3(1), 26-33.
- Jensen, T., Roszell, B., Zang, F., Girard, E., Matson, A., Thrall, R., Jaworski, D. M., Hatton, C., Weiss, D. J., & Finck, C. (2012). A rapid lung de-cellularization protocol supports embryonic stem cell differentiation in vitro and following implantation. *Tissue Engineering Part C: Methods*, 18(8), 632-646.
- Khanban, H., Fattahi, E., & Talkhabi, M. (2019). In vivo administration of G9a inhibitor A366 decreases osteogenic potential of bone marrow-derived mesenchymal stem cells. *Excli journal*, 18, 300.
- Lee, H., Ju, Y. M., Kim, I., Elsangeedy, E., Lee, J. H., Yoo, J. J., Atala, A., & Lee, S. J. (2020). A novel decellularized skeletal muscle-derived ECM scaffolding system for in situ muscle regeneration. *Methods*, 171, 77-85.
- Lee, W., Lee, V., Polio, S., Keegan, P., Lee, J. H., Fischer, K., Park, J. K., & Yoo, S. S. (2010). On-demand three-dimensional freeform fabrication of multi-layered hydrogel scaffold with fluidic channels. *Biotechnology and bioengineering*, 105(6), 1178-1186.
- Lin, H., Yang, G., Tan, J., & Tuan, R. S. (2012). Influence of decellularized matrix derived from human mesenchymal stem cells on their proliferation, migration and multi-lineage differentiation potential. *Biomaterials*, 33(18), 4480-4489.
- Ohishi, M., & Schipani, E. (2010). Bone marrow mesenchymal stem cells. *Journal of cellular biochemistry*, 109(2), 277-282.
- Porter, J. R., Ruckh, T. T., & Popat, K. C. (2009). Bone tissue engineering: a review in bone biomimetics and drug delivery strategies. *Biotechnology progress*, 25(6), 1539-1560.
- Rather, H. A., Jhala, D., & Vasita, R. (2019). Dual functional approaches for osteogenesis coupled angiogenesis in bone tissue engineering. *Materials Science and Engineering: C*, 103, 109761.
- Re, F., Sartore, L., Moulisova, V., Cantini, M., Almicci, C., Bianchetti, A., Chinello, C., Dey, K., Agnelli, S., & Manferdini, C. (2019). 3D gelatin-chitosan hybrid hydrogels combined with human platelet lysate highly support human mesenchymal stem cell proliferation and osteogenic differentiation. *Journal of tissue engineering*, 10, 2041731419845852.
- Wang, S., Qu, X., & Zhao, R. C. (2012). Clinical applications of mesenchymal stem cells. *Journal of hematology & oncology*, 5(1), 1-9.
- Xiong, X., Yang, X., Dai, H., Feng, G., Zhang, Y., Zhou, J., & Zhou, W. (2019). Extracellular matrix derived from human urine-derived stem cells enhances the expansion, adhesion, spreading, and differentiation of human periodontal ligament stem cells. *Stem cell research & therapy*, 10(1), 1-16.
- Xuan, Z., Peng, Q., Larsen, T., Gurevich, L., de Claville Christiansen, J., Zachar, V., & Pennisi, C. P. (2023). Tailoring hydrogel composition and stiffness to control smooth muscle cell differentiation in bioprinted constructs. *Tissue engineering and regenerative medicine*, 20(2), 199-212.
- Zhang, Y., He, Y., Bharadwaj, S., Hammam, N., Carnagey, K., Myers, R., Atala, A., & Van Dyke, M. (2009). Tissue-specific extracellular matrix coatings for the promotion of cell proliferation and maintenance of cell phenotype. *Biomaterials*, 30(23-24), 4021-4028.
- Zhang, Z., Luo, X., Xu, H., Wang, L., Jin, X., Chen, R., Ren, X., Lu, Y., Fu, M., & Huang, Y. (2015). Bone marrow stromal cell-derived extracellular matrix promotes osteogenesis of adipose-derived stem cells. *Cell biology international*, 39(3), 291-299.
- Zhu, J., & Marchant, R. E. (2011). Design properties of hydrogel tissue-engineering scaffolds. *Expert review of medical devices*, 8(5), 607-626.