اثر القایی IDE1 در تمایز سلولهای بنیادی القا شدهٔ انسانی به سلولهای آندودرم قطعی با استفاده از داربست نانوفیبر PCL

الهام حويزي¹*، محمد نبيوني²، كاظم پريور²، محمد معصومي³ و جعفر آي⁴ دريافت: //1391/ يذين: //1392

> ¹گروه زیستشناسی، دانشکدهٔ علوم، دانشگاه شهیدچمران اهواز، اهواز ²گروه زیست شناسی سلولی و مولکولی، دانشکدهٔ علوم زیستی، دانشگاه خوارزمی، تهران ³پژوهشگاه ملی مهندسی ژنتیک و زیستفناوری، گروه بیوتکنولوژی دام و آبزیان، تهران ⁴گروه مهندسی بافت، دانشکدهٔ فنآوریهای نوین پزشکی، دانشگاه علومپزشکی تهران، تهران *مسئول مکاتبات: e.hoveizi@yahoo.com

چکیده. امروزه سلولهای پرتوان القاشده به منزلهٔ یکی از جدیدترین و بهترین منابع سلولی برای سلول درمانی مرکز توجه قرار گرفته اند. در این مطالعه توان تمایزی سلولهای انسانی کشت داده شده بر داربست به سلولهای آندودرم قطعی، که خود پیش ساز سلولهایی ازجمله سلولهای هپاتوسیت، پانکراس و ششی هستند، بررسی شد. اجسام جنینی از سلولهای پلوری پوتانت ساخته شد و سپس به داربست نانوفیبروز پلی کاپرولاکتون، که با روش الکترواسپینینگ تهیه شد، انتقال داده شد. سلولها تحت تأثیر ریزمولکولی با عنوان فاکتور القاکنندهٔ آندودرمی IDEI، به سلولهای آندودرم قطعی تمایز داده شدند. بیان مارکرهای آندودرمی شامل FOX2، SOX17 و GSC با عنوان فاکتور القاکنندهٔ آندودرمی RT-PCR تأیید شد. در این تحقیق مورفولوژی و بقای سلولها به ترتیب با استفاده از عکسهای میکروسکوپ الکترونی و آزمون MTT بررسی شد. نتایج حاصل از تحقیق حاضر نشان می دهد که محیط کشت سه بعدی با استفاده از فاکتورهای مناسب می تواند بستر مناسبی برای رشد و تمایز سلولهای پلوری پوتانت انسانی به سلولهای می دهد که محیط کشت سه بعدی با استفاده از فاکتورهای مناسب می تواند بستر مناسبی برای رشد و تمایز سلولهای پلوری پوتانت انه به سلولهای

واژههای کلیدی: سلولهای IDE1، iPS، آندودرم قطعی، داربست نانوفیبروز، تمایز

Inductive effect of IDE1 on differentiation of human induced pluripotent stem cells into definitive endoderm cells by means of PCL nanofibrous scaffold

Elham hoveizi¹*, Mohammad Nabiuni², Kazem Parivar², Mohammad Massumi³ and Jafar Ai⁴ Received 01.10.2012/ Accepted 26.10.2013

¹Department of Biology, Faculty of Science, Shahid Chamran University of Ahwaz, Ahwaz, Iran

²Department of Cell and Molecular Biology, Faculty of Biological Sciences, Kharazmi University, Tehran, Iran

³Department of Animal and Marine Biotechnology, National Institute of Genetic Engineering and Biotechnology, Tehran, Iran

⁴Department of Tissue Engineering, Faculty of New Medical Technologies, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, Iran

^{*}Correspondent author: e.hoveizi@yahoo.com

مقدمه

Abstract. Induced pluripotent cells have been considered as one of the most recent and best cell sources for the cell therapy. In this study, the differentiation potency of human iPS cells, cultured on scaffolds, which can differentiate into definitive endodermal cells as precursor for hepatocytes, pancreatic and lung cells, was studied. Embryoid bodies composed of pluripotent cells, were seeded on electrospinning nanofiber scaffold. The cells were differentiated into definitive endoderm using IDE1. Expression of definitive endoderm markers including Sox17, FoxA2 and GSC were confirmed by immunocytochemistry staining and qRT-PCR analysis. In the present study, morphology and viability of cells were evaluated by utilizing a scanning electron microscopy and MTT assay, respectively. The results demonstrated the positive effect of 3D cultures, using suitable factors, on definitive endoderm differentiation.

Keywords. iPSCs, IDE1, definitive endoderm, electrospun scaffold

بدون نگرانی از وجود مشکلات دستگاه ایمنی و مسائل اخلاقی باز شده است ;Maruyama *et al*., 2013) Yamanaka, 2009).

سلولهای iPS سلولهای بنیادی پرتوانی تلقی میشوند که به طور آزمایشگاهی از سلولهای غیربنیادی بالغ به دست مي آيند ,Noguchi, 2009; Kim et al., بالغ (2008b . بدین صورت که ژنهای القاکنندهای که شامل ژنهای خانوادههای Oct، Klf و Myc هستند با کمک روشهای مختلف مثل استفاده از سیستم لنتی-ويروس وارد سلول هاى بالغ مى شوند & Takahashi) ,Yamanaka. سلولهای iPS توانایی 2006) خودنوزایی و تمایز به انواع سلولهای بدن انسان را دارند و از بسیاری جهتها ازجمله مورفولوژی، سرعت تکثیر، فعالیت تلومرازی و بیان انواع ژنهای پرتوانی، کاملاً مشابه سلول های بنیادی جنینی عمل می کنند (Zaehres Scholer, 2007). امروزه محققان به این مهم دست یافتهاند که تمایز سلولهای بنیادی پرتوان به سلولهای آندودرم قطعي اولين و مهمترين مرحله در تمايز سلولهاي بنیادی به سلولهایی مانند سلولهای یانکراسی یا هپاتوسیتی است (Sherwood et al., 2007). آندودرم قطعی منشأ دودمانهای سلولی ایپتلیالی است که برخی مسیرهای تنفسی و گوارشی را ایجاد میکند و منشأ

امروزه گسترش بسیاری از بیماریها ازجمله بیماریهای دستگاه گوارش، دیابت و سیروز کبدی در جوامع انسانی خطری جدی قلمداد می شود. دانشمندان از گذشته تا به حال بەدنبال راەھاي مۇ ثر براي درمان اين گونە بيمارىھا بودهاند و به موفقیتهای چشم گیری دست یافتهاند. در سالهای اخیر، سلولدرمانی به منزلهٔ روشی مؤثر برای درمان سياري از سماريها هدف توجه قرار گرفته است. سلول های بنیادی جنینی، سلول های بنیادی مغز استخوان، سلولهای بنیادی خون بند ناف و برخی سلولهای بنیادی آندودرمي و اکتودرمي به مثابهٔ گزينههايي براي درمان اين بيمارىها پيشنهاد شدهاند. سلولهاى جنيني بهعلت امكان رد پیوند، مشکلات اخلاقی و امکان تولید تومور در بدن فرد دريافت كننده وهمچنين سلولهاي بنيادي مغز استخوان بهدلیل محدودیتهای مختلف ازجمله تبدیل به سلول استئو کلاست، ازدستدادن قدرت تمایز در سنین بالا، تولید جمعیت سلولی بسیار متنوع و غیرہ گزینه های مناسبی به شمار نمی آیند (Sethe et al., 2006; Lu et iPS بهدنبال بحث توليد سلول هاى al., 2006) (Induced pluripotent stem cells) از سلولهای تمایزیافته بالغ توسط Yamanaka دریچهٔ جدیدی از امید برای به کار بردن سلولهای بنیادی در درمان بیماریها

تیروئید، تیموس، ششها، کبد و پانکراس نیز هست (D'Amour *et al.*, 2005). آندودرم قطعی در طول مرحلهٔ گاسترولاسیون جنینی تشکیل می شود، فرآیندی که سلولهای پرتوان اپی بلاستی درون تودهٔ سلولی داخلی به سه لایهٔ زایندهٔ اولیه تقسیم می شوند. سلولهای اپی بلاستی یکی از دو نوع سلولهایی هستند که در تودهٔ داخلی وجود دارند و منشأ بافتهای جنینی می گردند. دستهٔ دیگر جنینی مثل آندودرم احشایی و آندودرم محیطی می شوند مواهدی برای شرکت آنها در تکوین بافتهای جنینی شواهدی برای شرکت آنها در تکوین بافتهای جنینی وجود ندارد (Zhou *et al.*, 2008).

آغاز گاسترولاسيون با ظهور خط اوليه تعيين مي شود؛ جایی که سلول.های اپیبلاستی از آنجا وارد و ازحالت اپی تلیالی به مزانشیمی تبدیل می شوند تا آندودرم قطعی یا مزودرم را ایجاد کنند. مطالعات نشان میدهد که این سلولها از پیش سازهای مشترکی تکوین می یابند که در-واقع سلول.های حد واسطی محسوب و مزواندودرم نامیده می شوند (Hansson et al., 2009). بعد از آشکار شدن اهمیت تولید سلولهای آندودرم قطعی، پروتکلهای مختلفی برای القای انواع سلول های بنیادی به سلول های اندودرم قطعي با استفاده از انواع سیگنالینگهای مولکولی مطرح شد. ازجمله رایجترین و مؤثرترین فاکتورهای القاکننده می توان به Activin A با غلظتهای بالا و Kroon et al., 2008; McLean) اشاره کرد Nodal et al., 2007; D'Amour et al., 2006) که ازطریق فعال کردن مسیرهای Smad عمل می کنند و سبب القا سلولهای آندودرم قطعی با کارایی بالا میشوند (Mfopou et al., 2010). یکی دیگر از فاکتورهای مؤثر، که امروزه در القای سلولهای آندودرم قطعی استفاده

می شود، ریزمولکولی با عنوان IDE1 مخفف induced می شود، ریزمولکولی با عنوان IDE1 مخفف induced که بهدلیل مزیت هایی که نسبت به عوامل دیگر دارد مرکز توجه است. مطالعات اخیر نشان داده که IDE1 نیز از طریق فعال سازی مسیر Smad et al., 2009).

در سال های اخیر، مهندسی بافت به منزلهٔ یک رشته-ای آکادمیک فرصت بینظیری را برای پیشرفت و بهبود روشهای درمانی جهت درمان بیماریهای مادرزاد و اكتسابي فراهم كرده است (Serra et al., 2013). مطالعات نشان میدهد استفاده از داربست نقش مؤثری در تمایز سلولهای بنیادی به انواع مختلف سلولها دارد و سبب افزایش بقا و تکثیر آنها می شود. وضعیت کشت سهبعدي در مقايسه با کشت دوبعدي به وضعيت تکوين در in vivo شبیه تر است. داربست های نانوفیبروز با تشکیل شبکهای از الیاف بهم تنیده شده با منافذ فراوان، فضایی شبیه به ماتریکس خارج سلولی بدن برای سلولها فراهم می سازد که بر مورفولوژی، جهت گیری، چسبندگی، مهاجرت، تكثير، تمايز و عمل كرد سلولها مؤثر است (Hosoya et al., 2012). امروزه استفاده از داربستهای مصنوعي بهعلت مزيتهاي فراوان ازجمله انعطاف پذيري و قیمت مناسب بهشدت درحال گسترش است .(Domingos et al., 2013; Meng et al., 2006) ازجمله مهمترين و معمولترين داربستهای به کاررفته مى توان به PLA, PCL, PGA و PLGA اشاره كرد (Chao et al., 2009; Kim et al., 2008; Pham et (al., 2006) . هدف این تحقیق بررسی توان تمایز سلول های hiPS در محیط کشت سهبعدی به سلول های آندودرم قطعی با استفاده از IDE1 بهوسیلهٔ بررسی مار کر های آندودرمی بوده است.

مواد و روشها کشت سلولهای hiPS

سلولهای hiPS به صورت معمول بر روی سلولهای فیبروبلاست موشی، که یک لایهٔ سلولی تغذیه کننده DMEM/F12 محسوب میشوند، در محیط کشت DMEM/F12 (Gibco) حاوی 10٪ Knock Out Serum (Gibco) حاوی 20٪ (SR, Gibco) Replacement Petal Bovine ٪, در محیط کشت با غلظت 2 میلی مولار (Gibco)، بتامرکاپتواتانول (Gibco) با غلظت 1/1 میلی مولار، اسیدهای آمینهٔ ضروری (Gibco) با غلظت یک میلی مولار، پنی سیلین 1٪ (Gibco) و Gibco) bFGF داده شدند. محیط کشت سلولی به صورت روزانه تعویض و معمولاً بعد از 8 روز با استفاده از کلاژناز نوع چهار (Sigma) با غلظت 1 mg/ml پاساژ داده شدند.

تمایز سلول های Pice به سلول های آندودرم قطعی بعد از این که حدود 80٪ فلاسک پر شد، سلول ها پاساژ و از سلول های تغذیه کننده جدا شدند و حدود 40×5 سلول در ظروف ششخانهٔ نچسب به مدت 2 تا 4 روز همراه با محیط کشت کامل قرار داده شدند تا اجسام جنینی (EBs) شکل بگیرند. سپس سلول ها با محیط کشت جنینی (EBs) شکل بگیرند. سپس سلول ها با محیط کشت با غلظت 2 میلی مولار، بتامرکاپتواتانول با غلظت با غلظت 2 میلی مولار، بتامرکاپتواتانول با غلظت داربست قرار گرفتند و 24 ساعت بعد این محیط با محیط کشت تمایزی DMEM/F12 حاوی 20٪ Rr داربست قرار گرفتند و 24 ساعت بعد این محیط با محیط کشت تمایزی DMEM/F12 حاوی 20٪ Rr نظت 1/1 میلی مولار، اسیدهای آمینهٔ ضروری با غلظت یک میلی مولار، پنی سیلین 1٪ و ماتریژل (Stemgent) با خلظت یک میلی مولار، پنی سیلین 1٪ و 10

غلظت 1 μM جایگزین شد. محیط تمایزی هر 48 ساعت یکبار تعویض و سلولها بهمدت یک هفته در این وضعیت نگهداری شدند.

تهیهٔ داربست نانوفیبری با روش الکترواسپینینگ

برای تهیهٔ داربست ابتدا پلیمر PCL (Sigma) با غلظت 10٪ در حلال کلروفورم در دمای اتاق به مدت 24 ساعت حل شد تا محلولی شفاف بهدست آمد. سپس محلول در سرنگ پلاستیکی 5 میلیلیتری قرار گرفت و در دستگاه الکترواسپینینگ جاسازی شد. برای اسپین این محلول از سوزن gauge 22 استفاده شد. ولتاژ بین 12 تا 14 کیلوولت، سرعت تزریق 7/0 میلیلیتر در ساعت، فاصلهٔ سر سوزن تا غلتک 10 سانتیمتر و سرعت چرخش غلتک 1000 rpm تنظیم شد. این محلول به مدت 15 ساعت روی ورقهٔ الومینیومی اسپین شد و سپس اسکافولد

کشت سلولهای hiPS بر داربست

بعد از تهیه، داربست به قطعاتی با قطر 16 میلی متر تقسیم و برای استریل شدن به مدت 24 ساعت درمقابل تابش امواج UV قرار داده شد؛ سپس در پلیت 24 خانه تعبیه و به مدت 24 محتوی غلظت بالای پنی سلین -24 ساعت در PBS محتوی غلظت بالای پنی سلین -استرپتومایسین قرار گرفت. سپس تعداد cell/well کا×5 سلول در هر خانه ریخته شد و برای افزایش چسبندگی سلولی از غلظت 1٪ ماتریژل استفاده شد و 24 ساعت بعد محیط تمایزی اضافه گردید.

بررسیهای مورفولوژی با میکروسوپ الکترونی

مورفولوژی، قطر و منافذ الیاف تهیهشده و همچنین چگونگی آرایش سلولی بر داربست با میکروسکوپ الکترونی (SEM) بررسی شد. برای آمادهسازی نمونهٔ

اسکافولدهای دارای سلول ابتدا نمونهها با PBS بهمدت پنج دقیقه شسته شد و سپس با گلوتاردهید 2/5٪ به مدت یک ساعت تثبیت و سپس آب گیری با الکلهای 30٪، 50٪، 70٪، 80٪، 90٪، 100٪ به صورت صعودی هر کدام پانزده دقیقه انجام گرفت. سپس با ذرات طلا پوشانده شد و عکسبرداری با میکروسکوپ الکترونی SEM انجام گرفت. قطر الیاف و اندازهٔ منافذ با استفاده از نرمافزار Measurement

ارزیابی میزان بقای سلولی با روش MTT

میزان بقای سلولهای کشتداده شده روی داربست نانوفیبروز در مقایسه با محیط کشت دوبعدی (محیط تمایزی کشت دوبعدی کاملاً مشابه محیط تمایزی کشت سهبعدی است و فقط در این مرحله داربست وجود ندارد) با استفاده از MTT با غلظت mg/ml 5 ارزیابی شد. این آزمون در روزهای 1، 3 و 5 بعد از قراردادن سلولها در محیط کشت دوبعدی و سهبعدی انجام شد. به این صورت که در زمان مناسب بعد از کشت سلولها در پلیتهای 24 خانه، محیط کشت خارج و به هر خانه حدود 300 اضافه شد. بعد از 3 تا 4 ساعت انکوباسیون با دمای 37 اضافه شد. بعد از 3 تا 4 ساعت انکوباسیون با دمای 37 درجهٔ سانتی گراد محلول MTT خارج و به هر خانه حدود 200 اضافه شد. بعد از 3 تا 4 ساعت انکوباسیون با دمای 37 میکرولیتر (Dimethyl Sulfoxide) اضافه شد. سپس جذب نمونه در طول موج 570 با استفاده از دستگاه

بررسي ايمونوسيتوشيمي

یک هفته بعد از تیمار، سلول های تمایزیافته با پارافرمالدهید 4٪ (PFA, Sigma-Aldrich) بهمدت 30 دقیقه تثبیت شدند. سپس با PBS شسته شدند و به وسیلهٔ RTX-100 in (TBST) نفوذپذیر و سپس به مدت یک

ساعت در محلول بلو کینگ (BSA in TBST %5) قرار گرفتند. سپس به مدت 12 ساعت در معرض آنتی بادی های اولیه شامل Sox17 (Santa cruz) (R&D) و (Millipore) FoxA2 (مرحلهٔ بعد سلول ها تحت شستشو قرار گرفتند و سپس به مدت یک ماعت در مجاورت آنتی بادی های ثانویه شامل Alexa ساعت در مجاورت آنتی بادی های ثانویه شامل Gibco) قرار گرفتند و بعد از شستشو، برای رنگ آمیزی هسته ها، با رنگ DAPI به مدت 5 دقیقه رنگ آمیزی شدند.

Nova Biologica Reperta 1: 8-22 (2015)

استخراج RNA و انجام RNA

الگوی بیان mRNA ژنهای مختلف در گیر در تکوین آندودرم قطعی با استفاده از qRT-PCR انجام شد. برای استخراج RNA سلولها با استفاده از Qiazol لیز شدند و raqMan Reverse از cDNA ایرای سنتز Transcription Kit استفاده شد. برای هر نمونه 40 نانو گرم از DNA سنتز -شده با 10 میکرولیتر از 90 نانو گرم از NA میکرولیتر از هر شده با 10 میکرولیتر از میکرولیتر از هر پرایمر (جدول 1) مخلوط گشت. Ch میکرولیتر از ژن نرمافزار StepOne محاسبه و نرمالیزاسیون با استفاده از نرمافزار HPRT محاسبه و نرمالیزاسیون با استفاده از ژن

بررسیهای آماری

کنترل و آزمایش به صورت میانگین و انحراف از خطای میانگین محاسبه شد و برای بررسی معنی دار بودن اختلاف بین گروهها از آزمون T و نرمافزار (Ver.12 استفاده شد و تفاوت 20.05 معنی دار در نظر گرفته شد. داده شده است و متوسط قطر الیاف با نرمافزار Measurment حدوداً 200 نانومتر تخمین زده شد (شکل1-ب). شکل 2 مبین چگونگی استقرار سلولهای hiPS بر داربست PCL پوشش داده شده با ماتریژل بعد از 7 روز است که استقرار، بقا و تمایز سلولها بر داربست را نشان می دهد.

نتايج

بررسی مورفولوژی سلولهای hiPS کشت داده شده بر داربست PCL بررسی مورفولوژی داربست PCL و چگونگی استقرار سلولهای hiPS بر داربست ازطریق عکسبرداری با میکروسکوپ الکترونی SEM انجام گرفت. میکرو گراف الکترونی داربست نانوفیبروز PCL در شکل1-الف نشان



Fig. 1. Scanning electron micrograph. (A) The nanofibers of electrospun PCL scaffold. (B) Diameters of the nanofibers. The diameters of random PCL mats with average diameter of about 200 nm (scale bar: 1μ m).

اول، سوم و پنجم انجام گرفت. این روش براساس احیا-شدن نمک زردرنگ تترازولیوم به کریستالهای بنفش **بررسی بقای سلول های hiPS با استفاده از روش** MTT روش MTT برای مقایسه و بررسی میزان بقای سلول های hiPS در شرایط کشت دوبعدی و سهبعدی در روزهای

رنگ فورمازون بهوسیلهٔ آنزیم دهیدروژناز میتوکندریای حاصل از سلولهای زنده و فعال ازنظر متابولیکی انجام میگیرد.



شکل 2- الکترومیکرو گراف SEM از سلولهای hiPS کشتداده شده بر داربست نانوفیبر PCL، 7 روز بعد از تمایز این سلولها با محیط کشت تمایزی در شرایط سهبعدی. الف - سلولهای hiPS با بزرگنمایی کم تر (scale bar: 25µm). ب - سلولهای hiPS با بزرگنمایی بیشتر (-scale bar: 5µm).

Fig. 2. Scanning electron micrographs showing the morphology of plated/differentiated hiPSCs on PCL scaffold 7 days after seeding. (A) hiPSCs on PCL scaffold with lower magnification (scale bar: 25μ m). (B) hiPSCs on PCL scaffold with higher magnification (scale bar: 5μ m).

نتایج نشاندهندهٔ افزایش میزان بقای سلولهای hiPS بر داربست در مقایسه با کشت در شرایط دوبعدی بود. این افزایش در روز اول معنی دار نبود، اما با گذشت پنج روز از



شکل 3- نتایج حاصل از MTT سلولهای hiPS کشتداده شده بر داربست نانوفیبر 3D) PCL (3D) و در شرایط کشت دوبعدی (2D) به منزلهٔ کنترل در روزهای 1، 3 و 5 بعد از کشت که با گذشت 5 روز از زمان استقرار سلولها بر داربست افزایش بقای سلولی بر داربست کاملاً مشهود بود (0.05×p*)، مقادیر به صورت میانگین ± انحراف معیار است و آزمایش سهبار تکرار شده است (n= 3).

Fig. 3. MTT assay. Formosan absorbance expressed as a measure of cell viability from the hiPSCs cultured on nanofibrous scaffold for a five-day period (1, 3, 5 days), by day 5 of culturing, the cell viability of hiPSCs on PCL scaffold was significantly enhanced relative to control groups (*p<0.05; n=3).

توان تمایزی سلولهای hiPS به سلولهای آندودرم قطعی بر داربست PCL پوشیده شده با ماتریژل با استفاده از رنگآمیزی ایمونوسیتوشیمی

مطالعات قبلی نشان میدهد که IDE1 در شرایط کشت دوبعدی سبب تمایز سلولهای hiPS به سلولهای اندودرم قطعی میشود. در تحقیق حاضر برای بررسی توان تمایزی سلولهای hiPS در شرایط کشت سهبعدی با کارایی بالا، اجسام جنینی حاصل از کشت سوسپانسیون (شکل4-الف)، روی داربست نانوفیبروز پوشیده شده با ماتریژل و

همچنین در پلیتهای پوشیدهشده با ماتریژل قرار گرفتند و در مجاورت محیط تمایزی حاوی IDE1 بهمدت یک هفته تیمار شدند.

برای تعیین تمایز سلولهای آندودرم قطعی از اجسام جنینی حاصل از سلولهای hiPS در شرایط کشت سهبعدی، بیان مارکرهای آندودرمی شامل FoxA ، SOX17 و GSC بررسی شد. رنگآمیزی ایمونوسیتوشیمی سلولهای آندودرمی تمایزیافته برای هر سه ژن در روز هفتم بعد از تمایز مثبت ارزیابی شد (شکل4-ب).





شكل 4-الف) مورفولوژی اجسام جنینی حاصل از سلولهای تمایزنیافته hiPS. ب) رنگ آمیزی ایمونوفلوروسنس برای مار کرهای آندودرم قطعی شامل FOXA2 ، SOX17 و 7GSC و 7GSC روز بعد از تیمار سلولهای HiPS با استفاده از فاکتور IDE1 در شرایط کشت سهبعدی بر داربست PCL که نشان دهندهٔ بیان این مار کرهای آندودرمی در مقایسه با حالت کنترل است. رنگ آمیزی ایمونوفلتورسنت گروههای تیمارشده، برای پروتئینهای Sox17 و Sox17 رفتر می در مقایسه با حالت کنترل است. رنگ آمیزی ایمونوفلتورسنت گروههای تیمارشده، برای پروتئینهای Sox17 که نشان GSC (سبز رنگ) و FOXA2 (قرمز رنگ) است. هستهٔ سلولها توسط DAPI به رنگ آبی رنگ آمیزی شدهاند (Sox10 و Fig. 4. (A) Inverted microscope of morphology of undifferentiated embryoid body (EB). (B) Immunocytochemistry performed for Sox17, FoxA2 and GSC as endoderm-specific proteins by differentiated hiPSCs on nanofibrous scaffold after 7 days of culture for GSC (green) and Sox17 (green), FoxA2 (red)

respectively. Staining of nuclei was performed by DAPI (scale bar: 100µm).

[Downloaded from ndea10.khu.ac.ir on 2025-05-26

بررسی بیان mRNA مار کرهای آندودرمی در سلول های تمایزیافته با استفاده از qRT-PCR

بیان mRNA ویژهٔ سلولهای آندودرم قطعی شامل SOX17, FoxA2 و GSC در روز هفتم بعد از تمایز در سلولهای تمایزیافته در کشت سهبعدی و کنترل مشاهده و ارزیابی شد. همان طور که شکل 5-الف نشان می دهد، بیان مارکرهای آندودرمی در سلولهای تمایزیافته در محیط کشت سهبعدی با استفاده از IDE1 به طور معنی داری نسبت به نمونههای کنترل (بدون فاکتور تمایزی) افزایش یافته است (p<0.001 با استفاده از IDE1 تمایز با کارایی بالای سلولهای hiPS با استفاده از IDE1





شکل 5- الف) تحلیل بیان ژنهای آندودرم قطعی مشتقشده از سلولهای hiPS کشتداده شده بر داربست PCL پوشیده شده با ماتریژل با روش (qPCR) FOXA2 SOX17 و SOX د مقایسه با نمونهٔ کنترل 7 FOXA2 SOX17 و SOX د مقایسه با نمونهٔ کنترل 7 روز بعد از تیمار با IDE1 نشان می دهد ب) عدم بیان معنی دار ژنهای غیر آندودرمی شامل Sox17 به عنوان مار کر مزودرمی، Sox به منزلهٔ مار کر اکتودرمی و Sox به عنوان مار کر آندودرم خارج جنینی 7 روز بعد از تیمار سلولهای IDE1 به عنوان مار کر مزودرمی، Sox به منزلهٔ مورد نظر نسبت به میزان Sox به عنوان مار کر آندودرم خارج جنینی 7 روز بعد از تیمار سلولهای IDE1 به این از مار کر مزودرمی، Sox به منزلهٔ مورد نظر نسبت به میزان HPRT نرمال شده است و سپس نسبت میزان بیان ژن در سلولهای Rips گزارش گردیده است. در این آزمایش سلولهای HPS تیمارنشده به مدت 7 روز بدون فاکتور تمایزی کشتداده شدند و به عنوان نمونهٔ کنترل در نظر گرفته شدند. داده ها به صورت میانگین ± انحراف معیار نشان داده شده اند. علامت *** نشان دهندهٔ تفاوت معنی دار (90.00) در مقایسه با گروه های دیگر است. تحلیل آماری میزان مین داری توسط آزمون ANOVA و آزمون پست هاک Tukey انجام شده است تعداد تکرار =3 (n=3).

Fig. 5. (A) Quantitative expression analysis of definitive endoderm derived from hiPSCs seeded onto Matrigel coated PCL scaffold after 7 days. Results were collected from 3 independent experiments with 2 internal replicates per experiment. Differences were statistically significant if $p \le 0.05$. (B) Decrease in expression of non endodermal markers (Brachyoury, Sox7 and Sox1) and pluripotency related genes (Nanog and Oct4). Statistical analysis was performed by one-way ANOVA analysis followed by unpaired Student's Tukey and *p*-values less than 0.05 were considered significant (n=3).

Gene	Sequence
Homo sapiens forkhead box A2 (FOXA2)	F 5' - GTCTGAGGAGTCGGAGAGCC - 3'
	R 5' - CACGGAGGAGTAGCCCTCG - 3'
Homo sapiens goosecoid homeobox (GSC)	F 5' - GCTTCTCAACCAGCTGCACT- 3'
	R 5' - CTGATGAGGACCGCTTCTGC - 3'
Homo sapiens SRY (sex determining region Y)-box 17 (SOX17)	F 5' - CATGGTGTGGGGCTAAGGACG - 3'
	R 5' - AGCGCCTTCCACGACTTG - 3'
Homo sapiens SRY (sex determining region Y)-box 7 (SOX7)	F 5' - TCATGGTTTGGGCCAAGGAC- 3'
	R 5' - GCCTTCCACGACTTTCCCAG - 3'
Homo sapiens SRY (sex determining region Y)-box 1 (SOX1)	F 5' - TTGGTTCAGCGATTGTGTTT- 3'
	R 5' - TTGGTTCAGCGATTGTGTTT - 3'
Homo sapiens T, brachyury homolog (mouse) (T)	F 5' - ACAGGTACCCAACCCTGAGG- 3'
	R 5' - TGGGGTACTGACTGGAGCTG- 3

جدول 1- پرایمرهای استفاده شده برای انجام RT-PCR. Table 1. Primers which were used for qRT-PCR

قطعی اولین و مهمترین مرحله در تکوین اندامهای آندودرمي ازجمله پانكراس، كبد، شش ها، روده و تيموس مى باشد (Sui et al., 2013; Kopper & Benvenisty, مى باشد 2012; Mfopou et al., 2010; Kim et al., 2008a; Jiang et al., 2007; D'Amour et al., 2006; Wang et al., 2006). در سال 2006 در امریکا Amour و همکارانش برای نخستینبار با استفاده از فاکتور Activin موفق به تمایز سلول های جنینی انسانی به سلولهای آندودرم قطعی شدند. سپس این سلولهای پیش ساز را به سلول های بتای پانکراسی تمایز دادند (D'Amour et al., 2006). تا به امروز مطالعات فراواني درجهت تمایز انواع سلولها به مسیر آندودرمی، که ییش ساز سلول های هیاتوسیت، یانکراسی و غیره اند، صورت گرفته است؛ ازجمله اینکه در سال 2013 Brafman ،Maruyama به موفقیتهای چشم گیری در این زمینه دست یافتند (Maruyama et al., 2013; این زمینه دست یافتند Brafman et al., 2013; Maehr et al., 2009; Kroon et al., 2008; Baharvand et al., 2006; Imamura et al., 2004) . در ميان منابع مختلف سلولي

بحث

مهندسی بافت رشتهای است که بهسرعت درحال گسترش است، مطالعات بسیاری انجام گرفته که اهمیت و مزیتهای فراوان استفاده از کشت سهبعدی در تکثیر، تمايز، بقا و مهاجرت سلولها را تأييد مي كند (Hu et al., 2013). ما در این مطالعه، تمایز سلول.های hiPS به سلولهای آندودرم قطعی را با استفاده از ریزمولکول IDE1 در سیستم کشت سهبعدی روی داربست IDE1 پوشش داده شده با ماتریژل به منزلهٔ ایده ای جدید بررسی کردیم و بیان ژنهای مخصوص آندودرم قطعی شامل SOX17 ,FoxA2 و GSC را با استفاده از ايمونوسيتوشيمي و انجام آزمون qRT-PCR تأييد كرديم که نشاندهندهٔ توان تمایزی سلولهای hiPS به سلولهای آندودرم قطعی با کارایی بالا با استفاده از IDE1 است. پیشرفتهای اساسی در زمینهٔ تمایز سلولهای بنیادی به مشتقات آندودرمي كه براساس تحقيقات بيولوژي تكويني به دست آمده روشن کرده است که تمایز به آندودرم

اخیراً سلولهای iPS به دلیل مزیتهای فراوان ازجمله فقدان محدودیتهای اخلاقی و عدم رد پیوند به عنوان یک منبع سلولی مناسب مطرحاند (,.ohtime *et al.* 2012) و مطالعات زیادی برای تمایز به انواع مختلف 2012) و مطالعات زیادی برای تمایز به انواع مختلف سلولی، ازجمله سلولهای بتا و هپاتوسیتها، با استفاده از (Hosoya it e هپاتوسیتها، با استفاده از الماولهای iPS تا به امروز گزارش شده است iPS تاکید کردیم. بر تشکیل اجسام جنینی از سلولهای iPS تأکید کردیم. بر تشکیل اجسام جنینی از سلولهای iPS تأکید کردیم. الماولهای مختلف می گردد (;iPS یا تاکید کردیم. الماولهای مختلف می گردد (;iPS یا تاکید کردیم. نقلید از سلولهای مختلف می گردد (;iPS یا تاکید تقلید از سلولهای مختلف می گردد (;iPS یا تاکید تقلید از سلولهای ملاهای جنینی در طی جنینزایی مهم است (Hosoya *et al.*, 2012).

در طول مسیرهای تمایزی، برای بهبودبخشیدن به روند تمایز استفاده از انواع فاکتورهای تمایزی آزمایش شده که ازجملة مهم ترين آنها استفاده از سيگنالينگ Activin A و Wnt3a است که توان تمایزی این فاکتورها در بسیاری از مطالعات مورد تأیید قرار گرفته است, (Kroon et al., 2008; Jiang et al., 2007; D'Amour et al., (2005. طي سال،هاي اخير محققان همواره به دنبال يافتن فاكتورهاي مختلف تمايزي با كارايي بالا و صرفة اقتصادي بودهاند. در سال Melton 2009 و همکارانش در آمریکا اولينبار فاكتورى با عنوان فاكتور القاكنندة آندودرم قطعي (IDE1) با كارايى تمايزى بالا را پيشنهاد دادند (Borowiak et al., 2009). IDE1 که به منزلهٔ یک مولکول کوچک مطرح است و مزیتهای فراوان ازجمله توان و کارایی بالا در القای سلولی ازطریق نفوذ غشایی به درون سلول، قیمت پایین و سهولت در استفاده را دارد که در سالهای اخیر در بسیاری از تحقیقات استفاده شده است. ازجمله در سال 2012، Hsoya و همکارانش با استفاده از IDE1 در شرایط کشت دوبعدی موفق به تولید

آندودرم قطعی شدند (Hosoya *et al.*, 2012). در این مطالعه استفاده از IDE1 در القای سلول.های hiPS به سلول.های آندودرم قطعی در سیستم کشت سهبعدی به-

Nova Biologica Reperta 1: 8-22 (2015)

عنوان ایدهای جدید مطرح است.تحقیقات در سیستمهای زنده روشن ساخته است، که ماتریکس خارج سلولی که محتوی انواع فاکتورهای رونویسی، ماکرومولکولها و انواع فراوان سیگنالینگ مولکولی است، در فرایندهای مختلف رفتار سلولي تأثير حياتي و ضروري دارد (Ghasemi-Mobarakeh et al., 2009; Kim et al., (2008a. بنابراین فراهم کردن سیستمهای کشت سهبعدی که با تشابهات زیاد میتوانند جایگزینی برای ماتریکس خارج سلولی شوند، مهمترین اصول مطرح در استفاده از مهندسی بافت به حساب می آید. در سال های اخیر استفاده از داربستهای مصنوعی به دلیل کارایی بالا، سرعت تخریب پذیری، توان انعطاف پذیری و قیمت مناسب به طور چشم گیری افزایش یافته است (Chai & Wu, 2013; چشم Reed et al., 2009; Cho et al., 2006). مطالعات فراوانی با استفاده از سیستم کشت سهبعدی انجام گرفته است و نتایج تأییدکنندهٔ نقش درخور توجه استفاده از داربست در تمایز انواع سلولها ازجمله سلولهای عصبی، قلبی و آندودرمی است. همچنین افزایش درخور توجه بقا و تکثیر سلولها با استفاده از کشت سهبعدی در مقایسه با کشت دوبعدی در بسیاری از آزمایش ها گزارش شده (Herrmann et al., 2013; Prabhakaran et است. است. al., 2013; Orlova et al., 2013; Lee et al., 2011; Gao et al., 2011; Kai et al., 2011; Farzaneh et al., 2010; Chayosumrit et al., 2009; Ghasemi-Mobarakeh et al., 2009; Xie et al., 2009; Yim & Leong, 2005; Yoshimoto et al., 2003; Li et al., 2002) نتايج تحقيق حاضر نيز et al., 2003; Li et al., 2002) تأییدکنندهٔ افزایش معنیدار بقای سلولی را با استفاده از داربست PCL پوشیده شده با ماتریژل است. مطالعات

References

Baharvand, H., Hashemi, S.M., Kazemi Ashtiani, S. and Farrokhi, A. 2006. Differentiation of human embryonic stem cells into hepatocytes in 2D and 3D culture systems in vitro. – Int. J. Dev. Biol. 50: 645-52.

Borowiak, M., Maehr, R., Chen, S., Chen, A.E., Tang, W., Fox, J.L., Schreiber, S.L. and Melton, D.A. 2009. Small molecules efficiently direct endodermal differentiation of mouse and human embryonic stem cells. – Cell Stem Cell 4: 348-58.

Brafman, D.A., Phung, C., Kumar, N. and Willert, K. 2013. Regulation of endodermal differentiation of human embryonic stem cells through integrin-ECM interactions. – Cell Death Differ. 20: 369-81.

Chai, J.H. and Wu, Q.S. 2013. Electrospinning preparation and electrical and biological properties of ferrocene/ poly (vinylpyrrolidone) composite nanofibers. – Beilstein. J. Nanotechnol. 4: 189-197.

Chao, G., Xiaobo, S., Chenglin, C., Yinsheng, D., Yuepu, P. and Pinghua, L. 2009. A cellular automaton simulation of the degradation of porous polylactide scaffold: I. Effect of porosity. – Materials Science and Engineering: C 29: 1950-1958.

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

Cho, C.S., Seo, S.J., Park, I.K., Kim, S.H., Kim, T.H., Hoshiba, T., Harada, I. and Akaike, T. 2006. Galactose-carrying polymers as extracellular matrices for liver tissue engineering. – Biomaterials 27: 576-85.

Christodoulou, C., Longmire, T.A., Shen, S.S., Bourdon, A., Sommer, C.A., Gadue, P., Spira, A., Gouonevans, V., Murghy, G.J. and Kotton, D.N. Mouse ES and iPS cells can form similar definitive یافته های نوین در علوم زیستی، جلد 1: 22-8

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 پیش برد تمایز به انواع مختلف سلولی دارد و محیط مناسبی برای کشت سلولهای بنیادی فراهم میکند و سبب بهبود بقا، تکثیر و تمایز آنها می شود (Massumi *et al*.,). 2012).

نتيجه گيري

نتايج تحقيق حاضر نشان مىدهد كه داربست پليمرى PCL يوشيده شده با ماتريژل مي تواند مدل سودمند و محیط مناسبی برای رشد و تمایز سلولهای hiPS به سلولهای آندودرم قطعی با استفاده از فاکتورهای اگزوژن مناسب فراهم آورد. بررسی بیان انواع مارکرهای آندودرمی با استفاده از رنگ آمیزی ایمونوسیتوشیمی و qRT-PCR، که در کشت سه عدی در خور قابل ملاحظهای در مقایسه با کشت دوبعدی افزایش می یابد، تأييدكنندة اين مطلب است. به طور كلى نتايج نشان مىدهد كه كاربرد تكنولوژى مهندسى بافت دركنار فرایندهای تمایزی در in vitro سبب بهبود و تقویت استراتژی سلولدرمانی و پیوند بافت بدون نگرانی از رد ييوند براى بيمارىهايى ازجمله بيمارىهاى ناشى از نارسایی کیدی، پانگراسی و گوارشی خواهد شد؛ اگرچه برای دست یابی به این هدف هنو زباید تلاش های گستر ده-اي انجام گيرد.

قدردانی

نویسندگان این مقاله مراتب سپاس و تشکر خود را از ستاد سلولهای بنیادی و دانشگاه علومپزشکی تهران بهخاطر حمایت از این پروژه اعلام میدارند. endoderm despite differences in imprinted genes. – J. Clin. Invest. 121: 2313-2325.

D'Amour, K.A., Agulnick, A.D., Eliazer, S., Kelly, O.G., Kroon, E. and Baetge, E.E. 2005. Efficient differentiation of human embryonic stem cells to definitive endoderm. – Nat. Biotechnol. 23: 1534-1541.

D'Amour, K.A., Bang, A.G., Eliazer, S., Kelly, O.G., Agulnick, A.D., Smart, N.G., Moorman, M.A., Kroon, E., Carpenter, M.K. and Baetge, E.E. 2006. Production of pancreatic hormone-expressing endocrine cells from human embryonic stem cells. – Nat. Biotechnol. 24: 1392-1401.

Domingos, M., Intranuovo, F., Gloria, A., Gristina, R., Ambrosio, L., Bartolo, P.J. and Favia, P. 2013. Improved osteoblast cell affinity on plasma-modified 3-D extruded PCL scaffolds. – Acta. Biomater. 9: 5997-6005.

Farzaneh, Z., Pournasr, B., Ebrahimi, M., Aghdami, N. and Baharvand, H. 2010. Enhanced functions of human embryonic stem cell-derived hepatocyte-like cells on three-dimensional nanofibrillar surfaces. – Stem Cell Rev. 6: 601-610.

Ghasemi-Mobarakeh, L., Morshed, M., Karbalaie, Fesharaki, K., M.A., Nematallahi, M., Nasr-Esfahani, M.H. and Baharvand, H. 2009. The thickness of electrospun poly (epsilon-caprolactone) nanofibrous scaffolds influences cell proliferation. - Int. J. Artif. Organs. 32: 150-158.

Hansson, M., Olesen, D.R., Peterslund, J.M., Engberg, N., Kahn, M., Winzi, M., Klein, T., Maddox-Hyttel, P. and Serup, P. 2009. A late requirement for Wnt and FGF signaling during activin-induced formation of foregut endoderm from mouse embryonic stem cells. – Dev. Biol. 330: 286-304.

Herrmann, F.E., Lehner, A., Hollweck, T., Haas, U., Fano, C., Fehrenbach, D., Kozlikfeldmann, R., Wintermantel, E., **Eissner, G., Hagl, C. and Akra, B.** 2013. In vitro biological and mechanical evaluation of various scaffold materials for myocardial tissue engineering. – J. Biomed. Mater. Res. A. 102: 958-966.

Hosoya, M. 2012. Preparation of pancreatic beta-cells from human iPS cells with small molecules. – Islets 4: 249-252.

Hosoya, M., Kunisada, Y., Kurisaki, A. and Asashima, M. 2012. Induction of differentiation of undifferentiated cells into pancreatic beta cells in vertebrates. – Int. J. Dev. Biol. 56: 313-323.

Hu, K., Yu, J., Suknuntha, K., Tian, S., Montgomery, K., Choi, K.D., Stewart, R., Thomson, J.A. and Slukvin, I. 2013. Efficient generation of transgene-free induced pluripotent stem cells from normal and neoplastic bone marrow and cord blood mononuclear cells. – Blood 117: 109-119.

Imamura, T., Cui, L., Teng, R., Johkura, K., Okouchi, Y. Asanuma, K., Ogiwara, N. and Sasaki, K. 2004. Embryonic stem cell-derived embryoid bodies in three-dimensional culture system form hepatocyte-like cells *in vitro* and *in vivo*. – Tissue Eng. 10: 1716-1724.

Jiang, W., Shi, Y., Zhao, D., Chen, S., Yong, J., Zhang, J., Qing, T., Sun, X., Zhang, P., Ding, M., Li, D. and Deng, H. 2007. In vitro derivation of functional insulinproducing cells from human embryonic stem cells. – Cell Res. 17: 333-344.

Kai, D., Prabhakaran, M.P., Jin, G. and Ramakrishna, S. 2011. Guided orientation of cardiomyocytes on electrospun aligned nanofibers for cardiac tissue engineering. – J. Biomed. Mater. Res. B 98: 379-386.

Kim, H.W., Yu, H.S. and Lee, H.H. 2008. Nanofibrous matrices of poly (lactic acid) and gelatin polymeric blends for the improvement of cellular responses. – J. Biomed. Mater. Res. A 87: 25-32. Kim, J.B., Zaehres, H., Wu, G., Gentile, L., Ko, K., Sebastiano, V., Arayzo-bravo, M.J., Ruau, D., Han, D.W., Zenke, M. and Scholer, H.R. 2008. Pluripotent stem cells induced from adult neural stem cells by reprogramming with two factors. – Nature 454: 646-650.

Kopper, O. and Benvenisty, N. 2012. Stepwise differentiation of human embryonic stem cells into early endoderm derivatives and their molecular characterization. – Stem Cell Res. 8: 335-345.

Kroon, E., Martinson, L.A., Kadoya, K., Bang, A.G., Kelly, O.G., Eliazer, S., Young, H., Richardson, M., Smart, N.G., Cunningham, J., Agulnick, A.D., D'amour, K.A., Carpenter, M.K. and Baetge, E.E. 2008. Pancreatic endoderm derived from human embryonic stem cells generates glucose-responsive insulin-secreting cells *in vivo.* – Nat. Biotechnol. 26: 443-452.

Lee, H., Yeo, M., Ahn, S., Kang, D.O., Jang, C.H., Park, G.M. and Kim, G.H. 2011. Designed hybrid scaffolds consisting of polycaprolactone microstrands and electrospun collagen-nanofibers for bone tissue regeneration. – J. Biomed. Mater. Res. B 97: 263-270.

Li, W.J., Laurencin, C.T., Caterson, E.J., Tuan, R.S. and Ko, F.K. 2002. Electrospun nanofibrous structure: a novel scaffold for tissue engineering. – J. Biomed. Mater. Res. 60: 613-621.

Liu, T., Zhang, S., Chen, X., Li, G. and Wang, Y. 2009. Hepatic differentiation of mouse embryonic stem cells in threedimensional polymer scaffolds. – Tissue Eng. Part A 16: 1115-1122.

Lu, L.L., Liu, Y.J., Yang, S.G., Zhao, Q.J., Wang, X., Gong, W., Han, Z.B., Xu, Z.S., Lu, Y.X., Liu, D., Chen, Z.Z. and Han, Z.C. 2006. Isolation and characterization of human umbilical cord mesenchymal stem cells with hematopoiesis-supportive function and other potentials. – Haematologica 91: 1017-1026.

Maehr, R., Chen, S., Snitow, M., Ludwig, T., Yagasaki, L., Goland, R., Leibel, R.L. and Melton, D.A. 2009. Generation of pluripotent stem cells from patients with type 1 diabetes. – Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 106: 15768-15773.

Maruyama, M., Yamashita, Y., Kase, M., Trifonov, S. and Sugimoto, T. 2013. Lineage-specific purification of neural stem/progenitor cells from differentiated mouse induced pluripotent stem cells. – Stem Cells Transl. Med. 2: 420-433.

Massumi, M., Abasi, M., Babaloo, H., Terraf, P., Safi, M., Saeed, M., Barzin, J., Zandi, M. and Soleimani, M. 2012. The effect of topography on differentiation fates of matrigel-coated mouse embryonic stem cells cultured on PLGA nanofibrous scaffolds. – Tissue Eng. Part A 18: 609-620.

McLean, A.B., D'amour, K.A., Jomes, K.L., Krishnamoorthy, M., Kulik, M.J., Reynolds, D.M., Sheppard, A.M., Liu, H., Xu, Y., Baetge, E.E. and Dalton, S. 2007. Activin a efficiently specifies definitive endoderm from human embryonic stem cells only when phosphatidylinositol 3-kinase signaling is suppressed. – Stem Cells 25: 29-38.

Meng, Z.X., Wang, Y.S., Ma, C., Zheng, W., Li, L. and Zheng, Y.F. 2010. Electrospinning of PLGA/gelatin randomlyoriented and aligned nanofibers as potential scaffold in tissue engineering. – Materials Science and Engineering: C 30: 1204-1210.

Mfopou, J.K., Chen, B., Sui, L., Sermon, K. and Bouwens, L. 2010. Recent advances and prospects in the differentiation of pancreatic cells from human embryonic stem cells. – Diabetes 59: 2094-2101.

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

Ohmine, S., Squillace, K.A., Hartjes, K.A., Deeds, M.C., Armstrong, A.S., Thatava, T., Sakuma, T., Terzic, A., Kudva, Y. and Ikeda, Y. 2012. Reprogrammed keratinocytes from elderly type 2 diabetes patients suppress senescence genes to acquire induced pluripotency. – Aging 4: 60-73.

Orlova, Y., Magome, N., Liu, L., Chen, Y. and Agladze, K. 2011. Electrospun nanofibers as a tool for architecture control in engineered cardiac tissue. Biomaterials 32: 5615-5624.

Pham, Q.P., Sharma, U. and Mikos, A.G. 2006. Electrospinning of polymeric nanofibers for tissue engineering applications: a review. – Tissue Eng. 12: 211-1197.

Prabhakaran, M.P., Vatankhah, E. and Ramakrishna, S. 2013. Electrospun Aligned PHBV/Collagen Nanofibers as Substrates for Nerve Tissue Engineering. – Biotechnol. Bioeng. 110: 2775-2784.

Reed, C.R., Han, L., Andrady, A., Caballero, M., Jack, M.C., Collins, J.B., Saba, S.C., Loboa, E.G., Cairns, B.A. and Van Aalst, J.A. 2009. Composite tissue engineering on polycaprolactone nanofiber scaffolds. – Ann. Plast. Surg. 62: 505-512.

Serra, T., Planell, J.A. and Navarro, M. 2013. High-resolution PLA-based composite scaffolds via 3-D printing technology. – Acta. Biomater. 9: 5521-5530.

Sethe, S., Scutt, A. and Stolzing, A. 2006. Aging of mesenchymal stem cells. – Ageing Res. Rev. 5: 91-116.

Sherwood, R.I., Jitianu, C., Cleaver, O., Shaywitz, D.A., Lamenzo, J.O., Chen, A.E., Golub, T.R. and Melton, D.A. 2007. Prospective isolation and global gene expression analysis of definitive and visceral endoderm. – Dev. Biol. 304:541-555.

Sui, L., Bouwens, L. and Mfopou, J.K. 2013. Signaling pathways during

maintenance and definitive endoderm differentiation of embryonic stem cells. – Int. J. Dev. Biol. 57: 1-12.

Takahashi, K. and Yamanaka, S. 2006. Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. – Cell 126: 663-676.

Wang, G., AO, Q., Gong, K., Wang, A., Zheng, L., Gong, Y. and Zhang, X. 2006. The effect of topology of chitosan biomaterials on the differentiation and proliferation of neural stem cells. – Acta. Biomater. 6: 3630-3639.

Xie, S., Zhu, Q., Wang, B., Gu, H., Liu, W., Cui, L., Cen, L. and Cao, Y. 2009. Incorporation of tripolyphosphate nanoparticles into fibrous poly (lactide-coglycolide) scaffolds for tissue engineering. – Biomaterials 31: 5100-5109.

Yamanaka, S. 2009. Elite and stochastic models for induced pluripotent stem cell generation. – Nature 460: 49-52.

Yim, E.K. and Leong, K. 2005. Proliferation and differentiation of human embryonic germ cell derivatives in bioactive polymeric fibrous scaffold. – J. Biomater. Sci. Polym. Ed. 16: 1193-1217.

Yoshimoto, H., Shin, Y.M., Terai, H. and Vacanti, J.P. 2003. A biodegradable nanofiber scaffold by electrospinning and its potential for bone tissue engineering. – Biomaterials 24: 2077-2082.

Zaehres, H. and Scholer, H.R. 2007. Induction of pluripotency: from mouse to human. – Cell 131: 834-835.

Zhou, J., Ou-Yang, Q., Li, J., Zhou, X.Y., Lin, G. and Lu, G.X. 2008. Human feeder cells support establishment and definitive endoderm differentiation of human embryonic stem cells. – Stem Cells Dev. 17: 737-749.