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

الهام حویزی[۱*]، محمد نبیونی[۲]، کاظم پریور[۲]، محمد معصومی[۳] و جعفر آی[۴]

دریافت: ۱۳۹۱/۷/۹/ پذیرش: ۱۳۹۲/۸/۴

[۱]گروه زیست‌شناسی، دانشکدهٔ علوم، دانشگاه شهیدچمران اهواز، اهواز

[۲]گروه زیست شناسی سلولی و مولکولی، دانشکدهٔ علوم زیستی، دانشگاه خوارزمی، تهران

[۳]پژوهشگاه ملی مهندسی ژنتیک و زیست‌فناوری، گروه بیوتکنولوژی دام و آبزیان، تهران

[۴]گروه 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 قرارگرفته اند. در این مطالعه توان تمایزی سلول‌های انسانی کشت داده‌شده بر داربست به سلول‌های آندودرم قطعی، که خود پیش‌ساز سلول‌هایی ازجمله سلول‌های هپاتوسیت، پانکراس و ششی هستند، بررسی شد. اجسام جنینی از سلول‌های پلوری پوتانت ساخته شد و سپس به داربست نانوفیبروز پلی‌کاپرولاکتون، که با روش الکترواسپینینگ تهیه شد، انتقال داده شد. سلول‌ها تحت تأثیر ریزمولکولی با عنوان فاکتور القاکنندهٔ آندودرمی IDE1، به سلول‌های آندودرم قطعی تمایز داده شدند. بیان مارکرهای آندودرمی شامل SOX17، FoxA2 و GSC با روش ایمونوسیتوشیمی و RT-PCR تأیید شد. در این تحقیق مورفولوژی و بقای سلول‌ها به‌ترتیب با استفاده از عکس‌های میکروسکوپ الکترونی و آزمون MTT بررسی شد. نتایج حاصل از تحقیق حاضر نشان می‌دهد که محیط کشت سه‌بعدی با استفاده از فاکتورهای مناسب می‌تواند بستر مناسبی برای رشد و تمایز سلول‌های پلوری پوتانت انسانی به سلول‌های آندودرم قطعی را فراهم آورد.

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

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

Elham Hoveizi[1]*, Mohammad Nabiuni[2], Kazem Parivar[2], Mohammad Massumi[3] and Jafar Ai[4]

Received 01.10.2012/ Accepted 26.10.2013

[1]Department of Biology, Faculty of Science, Shahid Chamran University of Ahwaz, Ahwaz, Iran
[2]Department of Cell and Molecular Biology, Faculty of Biological Sciences, Kharazmi University, Tehran, Iran
[3]Department of Animal and Marine Biotechnology, National Institute of Genetic Engineering and Biotechnology, Tehran, Iran
[4]Department of Tissue Engineering, Faculty of New Medical Technologies, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, Iran
[*]Correspondent author: e.hoveizi@yahoo.com

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

مقدمه

امروزه گسترش بسیاری از بیماری‌ها ازجمله بیماری‌های دستگاه گوارش، دیابت و سیروز کبدی در جوامع انسانی خطری جدی قلمداد می‌شود. دانشمندان از گذشته تا به حال به‌دنبال راه‌های مؤثر برای درمان این‌گونه بیماری‌ها بوده‌اند و به موفقیت‌های چشم‌گیری دست یافته‌اند. در سال‌های اخیر، سلول‌درمانی به منزلهٔ روشی مؤثر برای درمان بسیاری از بیماری‌ها هدف توجه قرار گرفته است. سلول‌های بنیادی جنینی، سلول‌های بنیادی مغز استخوان، سلول‌های بنیادی خون بند ناف و برخی سلول‌های بنیادی آندودرمی و اکتودرمی به مثابهٔ گزینه‌هایی برای درمان این بیماری‌ها پیشنهاد شده‌اند. سلول‌های جنینی به‌علت امکان رد پیوند، مشکلات اخلاقی و امکان تولید تومور در بدن فرد دریافت‌کننده وهمچنین سلول‌های بنیادی مغز استخوان به‌دلیل محدودیت‌های مختلف ازجمله تبدیل به سلول استئوکلاست، ازدست‌دادن قدرت تمایز در سنین بالا، تولید جمعیت سلولی بسیار متنوع و غیره گزینه های مناسبی به شمار نمی‌آیند (Sethe *et al*., 2006; Lu *et al*., 2006). به‌دنبال بحث تولید سلول‌های iPS (Induced pluripotent stem cells) از سلول‌های تمایزیافته بالغ توسط Yamanaka دریچهٔ جدیدی از امید برای به‌کار بردن سلول‌های بنیادی در درمان بیماری‌ها 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 می‌آیند (Noguchi, 2009; Kim *et al*., 2008b) . بدین‌صورت که ژن‌های القاکننده‌ای که شامل ژن‌های خانواده‌های Oct، Sox، Klf و Myc هستند با کمک روش‌های مختلف مثل استفاده از سیستم لنتی-ویروس وارد سلول‌های بالغ می‌شوند (Takahashi & Yamanaka, 2006). سلول‌های iPS توانایی 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 سلول‌های بنیادی جنینی عمل می‌کنند (Zaehres & Scholer, 2007). امروزه محققان به این مهم دست یافته‌اند که تمایز سلول‌های بنیادی پرتوان به سلول‌های آندودرم قطعی اولین و مهم‌ترین مرحله در تمایز سلول‌های بنیادی به سلول‌هایی مانند سلول‌های پانکراسی یا هپاتوسیتی است (Sherwood *et al*., 2007). آندودرم قطعی منشأ دودمان‌های سلولی اپیتلیالی است که برخی مسیرهای تنفسی و گوارشی را ایجاد می‌کند و منشأ

تیروئید، تیموس، شش‌ها، کبد و پانکراس نیز هست (D'Amour *et al*., 2005). آندودرم قطعی در طول مرحلهٔ گاسترولاسیون جنینی تشکیل می‌شود، فرآیندی که سلول‌های پرتوان اپی‌بلاستی درون تودهٔ سلولی داخلی به سه لایهٔ زایندهٔ اولیه تقسیم می‌شوند. سلول‌های اپی‌بلاستی یکی از دو نوع سلول‌هایی هستند که در تودهٔ داخلی وجود دارند و منشأ بافت‌های جنینی می‌گردند. دستهٔ دیگر سلول‌های هیپوبلاستی هستند که منشاء بافت‌های خارج جنینی مثل آندودرم احشایی و آندودرم محیطی می‌شوند که در تشکیل حفره‌های جنینی شرکت می‌کنند، اما شواهدی برای شرکت آن‌ها در تکوین بافت‌های جنینی وجود ندارد (Zhou *et al*., 2008).

آغاز گاسترولاسیون با ظهور خط اولیه تعیین می‌شود؛ جایی که سلول‌های اپی‌بلاستی از آنجا وارد و ازحالت اپی‌تلیالی به مزانشیمی تبدیل می‌شوند تا آندودرم قطعی یا مزودرم را ایجاد کنند. مطالعات نشان می‌دهد که این سلول‌ها از پیش‌سازهای مشترکی تکوین می‌یابند که در-واقع سلول‌های حد واسطی محسوب و مزواندودرم نامیده می‌شوند (Hansson *et al*., 2009). بعد از آشکارشدن اهمیت تولید سلول‌های آندودرم قطعی، پروتکل‌های مختلفی برای القای انواع سلول‌های بنیادی به سلول‌های اندودرم قطعی با استفاده از انواع سیگنالینگ‌های مولکولی مطرح شد. ازجمله رایج‌ترین و مؤثرترین فاکتورهای القاکننده می‌توان به Activin A با غلظت‌های بالا و Nodal اشاره کرد (Kroon *et al*., 2008; McLean *et al*., 2007; D'Amour *et al*., 2006) که ازطریق فعال‌کردن مسیرهای Smad عمل می‌کنند 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 می‌شود، ریزمولکولی با عنوان IDE1 مخفف Induced definitive endoderm می‌باشد که به‌دلیل مزیت‌هایی که نسبت به عوامل دیگر دارد مرکز توجه است. مطالعات اخیر نشان داده که IDE1 نیز ازطریق فعال‌سازی مسیر Smad عمل می‌کند (Borowiak *et al*., 2009).

در سال‌های اخیر، مهندسی بافت به منزلهٔ یک رشته-ای آکادمیک فرصت بی‌نظیری را برای پیشرفت و بهبود روش‌های درمانی جهت درمان بیماری‌های مادرزاد و اکتسابی فراهم کرده 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 می‌شود. وضعیت کشت سه‌بعدی در مقایسه با کشت دوبعدی به وضعیت تکوین در *in vivo* شبیه‌تر است. داربست‌های نانوفیبروز با تشکیل شبکه‌ای از الیاف بهم‌تنیده‌شده با منافذ فراوان، فضایی شبیه به ماتریکس خارج سلولی بدن برای سلول‌ها فراهم می‌سازد که بر مورفولوژی، جهت‌گیری، چسبندگی، مهاجرت، تکثیر، تمایز و عمل‌کرد سلول‌ها مؤثر است (Hosoya *et al*., 2012). امروزه استفاده از داربست‌های مصنوعی به‌علت مزیت‌های فراوان ازجمله انعطاف‌پذیری و قیمت مناسب به‌شدت درحال گسترش است (Domingos *et al*., 2013; Meng *et al*., 2006). ازجمله مهم‌ترین و معمول‌ترین داربست‌های به‌کاررفته می‌توان به PLA, PCL, PGA و PLGA اشاره کرد (Chao *et al*., 2009; Kim *et al*., 2008; Pham *et al*., 2006) . هدف این تحقیق بررسی توان تمایز سلول‌های hiPS در محیط کشت سه‌بعدی به سلول‌های آندودرم قطعی با استفاده از IDE1 به‌وسیلهٔ بررسی مارکرهای 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 محسوب می‌شوند، در محیط کشت DMEM/F12 (Gibco) حاوی ۱۰٪ Knock Out Serum Replacement (SR, Gibco)، ۵٪ Fetal Bovine Serum (FBS, Gibco)، ال-گلوتامین با غلظت ۲ میلی‌مولار (Gibco)، بتامرکاپتواتانول (Gibco) با غلظت ۱/۱ میلی‌مولار، اسیدهای آمینهٔ ضروری (Sigma) با غلظت یک میلی‌مولار، پنی‌سیلین ۱٪ (Gibco) و bFGF (Gibco) با غلظت ng/ml ۱۰ در فلاسک کشت داده شدند. محیط کشت سلولی به‌صورت روزانه تعویض و معمولاً بعد از ۸ روز با استفاده از کلاژناز نوع چهار (Sigma) با غلظت mg/ml ۱ پاساژ داده شدند.

تمایز سلول‌های hiPS به سلول‌های آندودرم قطعی

بعد از این که حدود ۸۰٪ فلاسک پر شد، سلول‌ها پاساژ و از سلول‌های تغذیه‌کننده جدا شدند و حدود ۵×۱۰^{۴} سلول در ظروف شش‌خانهٔ نچسب به مدت ۲ تا ۴ روز همراه با محیط کشت کامل قرار داده شدند تا اجسام جنینی (EBs) شکل بگیرند. سپس سلول‌ها با محیط کشت DMEM/F12 حاوی ۱۰٪ SR، ۵٪ FBS، ال-گلوتامین با غلظت ۲ میلی‌مولار، بتامرکاپتواتانول با غلظت ۱/۱میلی‌مولار، اسیدهای آمینهٔ ضروری با غلظت یک میلی‌مولار، پنی‌سیلین ۱٪ و ماتریژل (R&D) ۱٪ بر روی داربست قرار گرفتند و ۲۴ ساعت بعد این محیط با محیط کشت تمایزی DMEM/F12 حاوی ۰/۲٪ SR، ال‌گلوتامین با غلظت ۲ میلی‌مولار، بتامرکاپتواتانول با غلظت ۱/۱ میلی‌مولار، اسیدهای آمینهٔ ضروری با غلظت یک میلی‌مولار، پنی‌سیلین ۱٪ و IDE1 (Stemgent) با غلظت µM ۱ جایگزین شد. محیط تمایزی هر ۴۸ 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 ۱۰٪ در حلال کلروفورم در دمای اتاق به مدت ۲۴ ساعت حل شد تا محلولی شفاف به‌دست آمد. سپس محلول در سرنگ پلاستیکی ۵ میلی‌لیتری قرار گرفت و در دستگاه الکترواسپینینگ جاسازی شد. برای اسپین این محلول از سوزن gauge ۲۲ استفاده شد. ولتاژ بین ۱۲ تا ۱۴ کیلوولت، سرعت تزریق ۰/۵ میلی‌لیتر در ساعت، فاصلهٔ سر سوزن تا غلتک ۱۰ سانتی‌متر و سرعت چرخش غلتک rpm ۱۰۰۰ تنظیم شد. این محلول به مدت ۱۵ ساعت روی ورقهٔ الومینیومی اسپین شد و سپس اسکافولد حاصل به‌مدت ۲۴ ساعت در خلأ خشک شد.

کشت سلول‌های hiPS بر داربست

بعد از تهیه، داربست به قطعاتی با قطر ۱۶ میلی‌متر تقسیم و برای استریل‌شدن به مدت ۲۴ ساعت درمقابل تابش امواج UV قرار داده شد؛ سپس در پلیت ۲۴ خانه تعبیه و به‌مدت ۲۴ ساعت در PBS محتوی غلظت بالای پنی‌سلین-استرپتومایسین قرار گرفت. سپس تعداد ۵×۱۰^{۴} cell/well سلول در هر خانه ریخته شد و برای افزایش چسبندگی سلولی از غلظت ۱٪ ماتریژل استفاده شد و ۲۴ 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 ۲/۵٪ به مدت یک ساعت تثبیت و سپس آب‌گیری با الکل‌های ۳۰٪، ۵۰٪، ۷۰٪، ۸۰٪، ۹۰٪، ۱۰۰٪ 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 اندازه‌گیری شد.

ارزیابی میزان بقای سلولی با روش MTT

میزان بقای سلول‌های کشت‌داده‌شده 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 ۵ mg/ml ارزیابی شد. این آزمون در روزهای ۱، ۳ و ۵ 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 ۲۴ خانه، محیط کشت خارج و به هر خانه حدود ۳۰۰ میلی‌لیتر محیط تازه حاوی ۳۰ میکرولیتر از محلول MTT اضافه شد. بعد از ۳ تا ۴ ساعت انکوباسیون با دمای ۳۷ درجهٔ سانتی‌گراد محلول MTT خارج و به هر خانه ۲۰۰ میکرولیتر DMSO (Dimethyl Sulfoxide) اضافه شد. سپس جذب نمونه در طول موج ۵۷۰ با استفاده از دستگاه الیزا ریدر خوانده شد.

بررسی ایمونوسیتوشیمی

یک‌هفته بعد از تیمار، سلول‌های تمایزیافته با پارافرمالدهید ۴٪ (PFA, Sigma-Aldrich) به‌مدت ۳۰ دقیقه تثبیت شدند. سپس با PBS شسته شدند و به وسیلهٔ TX-100 in PBS (TBST) ۰/۱٪ نفوذپذیر و سپس به مدت یک ساعت در محلول بلوکینگ (5% BSA in TBST) قرار گرفتند. سپس به‌مدت ۱۲ ساعت در معرض آنتی‌بادی‌های اولیه شامل Sox17 (Santa cruz)، Gsc (R&D) و FoxA2 (Millipore) قرار گرفتند. در مرحلهٔ بعد سلول‌ها تحت شستشو قرار گرفتند و سپس به مدت یک ساعت در مجاورت آنتی‌بادی‌های ثانویه شامل Alexa fluor 488 و Alexa fluor- 594 (Gibco) قرار گرفتند و بعد از شستشو، برای رنگ‌آمیزی هسته‌ها، با رنگ DAPI به مدت ۵ دقیقه رنگ‌آمیزی شدند.

استخراج RNA و انجام qRT-PCR

الگوی بیان mRNA ژن‌های مختلف درگیر در تکوین آندودرم قطعی با استفاده از qRT-PCR انجام شد. برای استخراج RNA سلول‌ها با استفاده از Qiazol لیز شدند و برای سنتز cDNA از TaqMan Reverse Transcription Kit (ساخت شرکت کیاژن، ژاپن) استفاده شد. برای هر نمونه ۴۰ نانوگرم از cDNA سنتز - شده با ۱۰ میکرولیتر از Power Syber Green master mix (ساخت شرکت کیاژن، ژاپن) و ۰/۵ میکرولیتر از هر پرایمر (جدول ۱) مخلوط گشت. Ct هر نمونه با استفاده از نرم‌افزار StepOne محاسبه و نرمالیزاسیون با استفاده از ژن HPRT انجام گرفت و هر آزمایش سه بار تکرار شد.

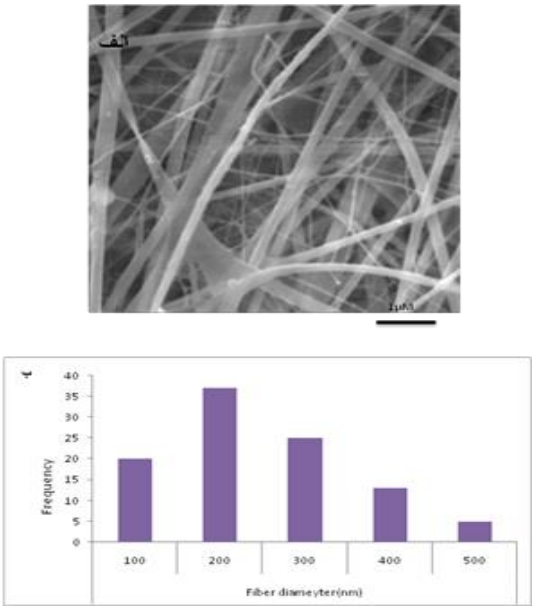
بررسی‌های آماری

کنترل و آزمایش به صورت میانگین و انحراف از خطای میانگین محاسبه شد و برای بررسی معنی‌دار بودن اختلاف بین گروه‌ها از آزمون T و نرم‌افزار SPSS(Ver.12) استفاده شد و تفاوت $p<0.05$ معنی‌دار در نظر گرفته شد.

نتایج

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. میکروگراف الکترونی داربست نانوفیبروز PCL در شکل ۱-الف نشان داده شده است و متوسط قطر الیاف با نرم‌افزار Measurment حدوداً ۲۰۰ نانومتر تخمین زده شد (شکل۱-ب). شکل ۲ مبین چگونگی استقرار سلول‌های hiPS بر داربست PCL پوشش‌داده‌شده با ماتریژل بعد از ۷ روز است که استقرار، بقا و تمایز سلول‌ها بر داربست را نشان می‌دهد.



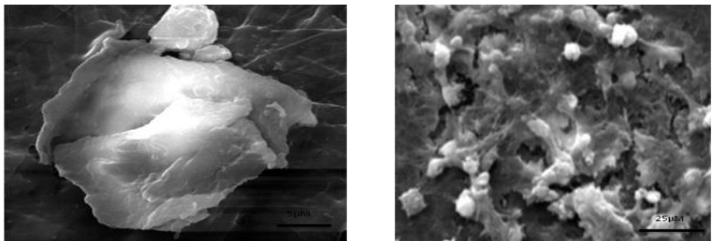
شکل ۱- میکروگراف میکروسکوپ الکترونی SEM. الف- نانوفیبرهای داربست الکترواسپینیگ PCL. ب- نمودار میانگین قطر فیبرهای داربست نانوالیاف PCL که میانگین بیش‌ترین الیاف حدوداً ۲۰۰ نانومتر اندازه‌گیری شد (scale bar: 1µm).

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: 1µm).

بررسی بقای سلول‌های hiPS با استفاده از روش MTT

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

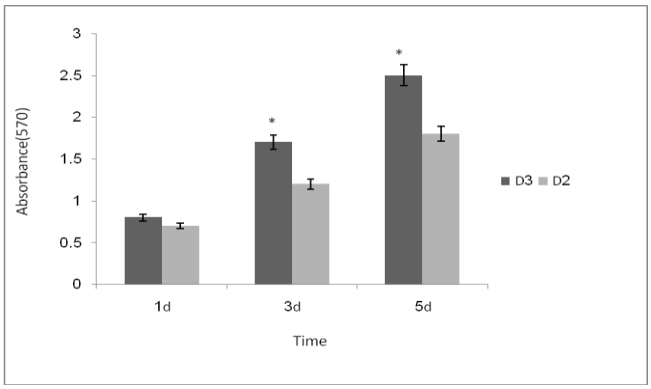
رنگ فورمازون به‌وسیلهٔ آنزیم دهیدروژناز میتوکندریای حاصل از سلول‌های زنده و فعال ازنظر متابولیکی انجام می‌گیرد.



شکل ۲- الکترومیکروگراف SEM از سلول‌های hiPS کشت‌داده‌شده بر داربست نانوفیبر PCL، ۷ روز بعد از تمایز این سلول‌ها با محیط کشت تمایزی در شرایط سه‌بعدی. الف- سلول‌های hiPS با بزرگ‌نمایی کم‌تر (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: 25µm). (B) hiPSCs on PCL scaffold with higher magnification (scale bar: 5µm).

نتایج نشان‌دهندهٔ افزایش میزان بقای سلول‌های hiPS بر داربست در مقایسه با کشت در شرایط دوبعدی بود. این افزایش در روز اول معنی‌دار نبود، اما با گذشت پنج روز از زمان استقرار سلول‌ها بر داربست افزایش بقا سلولی بر داربست کاملاً مشهود بود ($p<0.05$) (شکل ۳).

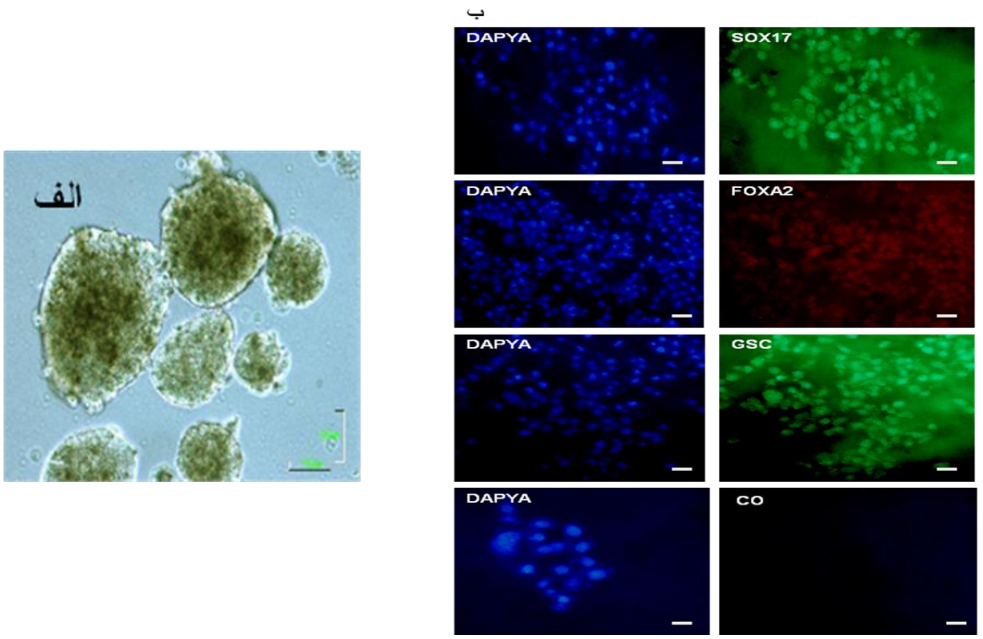


شکل ۳- نتایج حاصل از MTT سلول‌های hiPS کشت‌داده‌شده بر داربست نانوفیبر PCL (3D) و در شرایط کشت دوبعدی (2D) به منزلهٔ کنترل در روزهای ۱، ۳ و ۵ بعد از کشت که با گذشت ۵ روز از زمان استقرار سلول‌ها بر داربست افزایش بقای سلولی بر داربست کاملاً مشهود بود ($*p<0.05$)، مقادیر به صورت میانگین ± انحراف معیار است 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 (شکل۴- 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 SOX17، FoxA و GSC بررسی شد. رنگ‌آمیزی ایمونوسیتوشیمی سلول‌های آندودرمی تمایزیافته برای هر سه ژن در روز هفتم بعد از تمایز مثبت ارزیابی شد (شکل۴- ب).



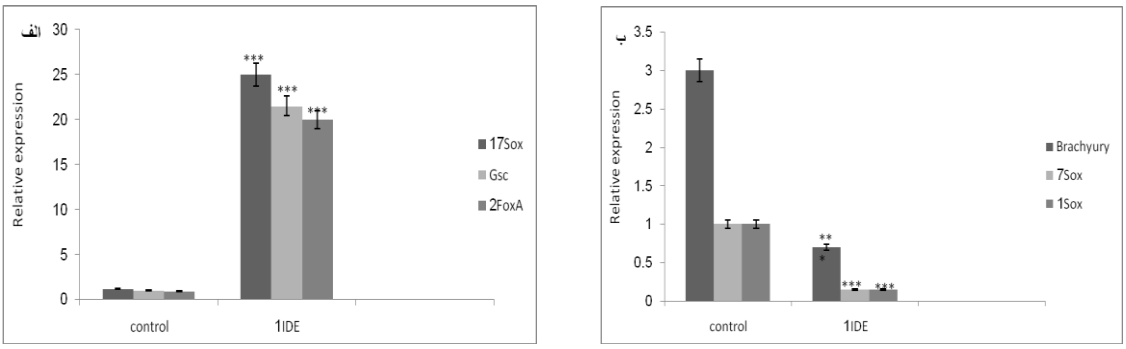
شکل ۴- الف) مورفولوژی اجسام جنینی حاصل از سلول‌های تمایزنیافته hiPS. ب) رنگ‌آمیزی ایمونوفلوروسنس برای مارکرهای آندودرم قطعی شامل SOX17، FOXA2 و GSC ۷ روز بعد از تیمار سلول‌های hiPS با استفاده از فاکتور IDE1 در شرایط کشت سه‌بعدی بر داربست PCL که نشان دهندهٔ بیان این مارکرهای آندودرمی در مقایسه با حالت کنترل است. رنگ‌آمیزی ایمونوفلئورسنت گروه‌های تیمارشده، برای پروتئین‌های Sox17 و GSC (سبز رنگ) و FOXA2 (قرمز رنگ) است. هستهٔ سلول‌ها توسط DAPI به رنگ آبی رنگ‌آمیزی شده‌اند (scale bar: 100µm).

Fig. 4. (A) Inverted microscopic 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).

بررسی بیان mRNA مارکرهای 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 ۵-الف نشان می‌دهد، بیان مارکرهای آندودرمی در سلول‌های تمایزیافته در محیط کشت سه‌بعدی با استفاده از IDE1 به طور معنی‌داری نسبت به نمونه‌های کنترل (بدون فاکتور تمایزی) افزایش یافته است ($p<0.001$) که نشان‌دهندهٔ تمایز با کارایی بالای سلول‌های hiPS با استفاده از IDE1 در طی مسیر تمایزی است.

در این مطالعه بیان mRNA ژن‌های SOX17 ,FoxA2 و GSC در سلول‌های hiPS تمایزنیافته (کنترل) بسیار ناچیز و قابل چشم‌پوشی گزارش شد (شکل۵-الف). همچنین عدم بیان ژن‌های اکتودرمی، مزودرمی و آندودرم احشایی به ترتیب شامل Sox1, Brachyury و Sox7 در سلول‌های آندودرم قطعی تمایزیافته بر داربست با روش RT-PCR ارزیابی شد که میزان بیان آن‌ها قابل چشم‌پوشی گزارش شد (شکل۵-ب). این نتایج تأیید کنندهٔ تمایز اختصاصی سلول‌های hiPS به سلول‌های آندودرم قطعی با استفاده از IDE1 بوده است.



شکل ۵- الف) تحلیل بیان ژن‌های آندودرم قطعی مشتق‌شده از سلول‌های hiPS کشت‌داده‌شده بر داربست PCL پوشیده‌شده با ماتریژل با روش Real-time quantitative PCR (qPCR) که بیان ژن‌های آندودرم قطعی شامل SOX17، FOXA2 و GSC را در مقایسه با نمونهٔ کنترل ۷ روز بعد از تیمار با IDE1 نشان می‌دهد ب) عدم بیان معنی‌دار ژن‌های غیرآندودرمی شامل Brachyury به‌عنوان مارکر مزودرمی، Sox1 به منزلهٔ مارکر اکتودرمی و Sox7 به عنوان مارکر آندودرم خارج جنینی ۷ روز بعد از تیمار سلول‌های hiPS با IDE1 در مقایسه با نمونهٔ کنترل. میزان بیان ژن مورد نظر نسبت به میزان HPRT نرمال شده است و سپس نسبت میزان بیان ژن در سلول‌های hiPS گزارش گردیده است. در این آزمایش سلول‌های hiPS تیمارنشده به مدت ۷ روز بدون فاکتور تمایزی کشت‌داده‌شدند و به عنوان نمونهٔ کنترل در نظر گرفته شدند. داده‌ها به صورت میانگین ± انحراف معیار نشان داده شده‌اند. علامت*** نشان‌دهندهٔ تفاوت معنی‌دار($p<0.001$) در مقایسه با گروه‌های دیگر است. تحلیل آماری میزان معنی‌داری توسط آزمون ANOVA و آزمون پست هاک Tukey انجام شده است. تعداد تکرار =۳ (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 $p \leq 0.05$. (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).

جدول ۱- پرایمرهای استفاده شده برای انجامRT-PCR.

Table 1. Primers which were used for qRT-PCR

.

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' - CATGGTGTGGGCTAAGGACG - 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'

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، تمایز، بقا و مهاجرت سلول‌ها را تأیید می‌کند (Hu *et al*., 2013). ما در این مطالعه، تمایز سلول‌های hiPS به سلول‌های آندودرم قطعی را با استفاده از ریزمولکول IDE1 در سیستم کشت سه‌بعدی روی داربست PCL پوشش‌داده‌شده با ماتریژل به‌منزلهٔ ایده‌ای جدید بررسی کردیم و بیان ژن‌های مخصوص آندودرم قطعی شامل SOX17، FoxA2 و GSC را با استفاده از ایمونوسیتوشیمی و انجام آزمون qRT-PCR تأیید کردیم 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 آندودرمی که براساس تحقیقات بیولوژی تکوینی به دست آمده روشن کرده است که تمایز به آندودرم قطعی اولین و مهم‌ترین مرحله در تکوین اندام‌های آندودرمی ازجمله پانکراس، کبد، شش‌ها، روده و تیموس می‌باشد (Sui *et al*., 2013; Kopper &Benvenisty, 2012; Mfopou *et al*., 2010; Kim *et al*., 2008a; Jiang *et al*., 2007; D'Amour *et al*., 2006; Wang *et al*., 2006). در سال ۲۰۰۶ در امریکا Amour و همکارانش برای نخستین‌بار با استفاده از فاکتور Activin موفق به تمایز سلول‌های جنینی انسانی به سلول‌های آندودرم قطعی شدند. سپس این سلول‌های پیش‌ساز را به سلول‌های بتای پانکراسی تمایز دادند (D'Amour *et al*., 2006). تا به امروز مطالعات فراوانی درجهت تمایز انواع سلول‌ها به مسیر آندودرمی، که پیش‌ساز سلول‌های هپاتوسیت، پانکراسی و غیره اند، صورت گرفته است؛ ازجمله اینکه در سال ۲۰۱۳ Maruyama، Brafman به موفقیت‌های چشم‌گیری در این زمینه دست یافتند (Maruyama *et al*., 2013 ; Brafman *et al*., 2013; Maehr *et al*., 2009; Kroon *et al*., 2008; Baharvand *et al*., 2006; Imamura *et al*., 2004) . در میان منابع مختلف سلولی اخیراً سلول‌های iPS به دلیل مزیت‌های فراوان ازجمله فقدان محدودیت‌های اخلاقی و عدم رد پیوند به عنوان یک منبع سلولی مناسب مطرح‌اند (Ohmine *et al*.,

2012) و مطالعات زیادی برای تمایز به انواع مختلف سلولی، ازجمله سلول‌های بتا و هپاتوسیت‌ها، با استفاده از سلول‌های iPS تا به امروز گزارش شده است (Hosoya *et al*., 2012). در این مطالعه ما برای آغاز مسیر تمایزی بر تشکیل اجسام جنینی از سلول‌های iPS تأکید کردیم. تشکیل اجسام جنینی به دلیل این که سبب افزایش تمایز به سلول‌های مختلف می‌گردد و هم‌چنین به دلیل تقلید از تخصص‌یابی لایه‌های جنینی در طی جنین‌زایی مهم است (Kim *et al*., 2008a).

در طول مسیرهای تمایزی، برای بهبودبخشیدن به روند تمایز استفاده از انواع فاکتورهای تمایزی آزمایش شده که ازجملهٔ مهم‌ترین آن‌ها استفاده از سیگنالینگ 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). طی سال‌های اخیر محققان همواره به دنبال یافتن فاکتورهای مختلف تمایزی با کارایی بالا و صرفهٔ اقتصادی بوده‌اند. در سال ۲۰۰۹ Melton و همکارانش در آمریکا اولین‌بار فاکتوری با عنوان فاکتور القاکنندهٔ آندودرم قطعی (IDE1) با کارایی تمایزی بالا را پیشنهاد 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 ۲۰۱۲، 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 سلول‌های hiPS به سلول‌های آندودرم قطعی در سیستم کشت سه‌بعدی به‌عنوان 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 سلولی تأثیر حیاتی و ضروری دارد (Ghasemi-Mobarakeh *et al*., 2009; Kim *et al*., 2008a). بنابراین فراهم‌کردن سیستم‌های کشت سه‌بعدی که با تشابهات زیاد می‌توانند جایگزینی برای ماتریکس خارج سلولی شوند، مهم‌ترین اصول مطرح در استفاده از مهندسی بافت به حساب می‌آید. درسال‌های اخیر استفاده از داربست‌های مصنوعی به دلیل کارایی بالا، سرعت تخریب‌پذیری، توان انعطاف‌پذیری و قیمت مناسب به طور چشم‌گیری افزایش یافته است (Chai & Wu, 2013; 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 آزمایش‌ها گزارش شده است (Herrmann *et al*., 2013; Prabhakaran *et 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). نتایج تحقیق حاضر نیز تأییدکنندهٔ افزایش معنی‌دار بقای سلولی را با استفاده از داربست PCL پوشیده شده با ماتریژل است. مطالعات نشان می‌دهد که استفاده از ماتریژل، به عنوان یکی از اجزای ماتریکس خارج سلولی، که از لامینین و کلاژن نوع چهار ترکیب می‌یابد، نقش مهمی در حمایت از پیش‌برد تمایز به انواع مختلف سلولی دارد و محیط مناسبی

برای کشت سلول‌های بنیادی فراهم می‌کند و سبب بهبود بقا، تکثیر و تمایز آن‌ها می‌شود (Massumi *et al.*, 2012).

نتیجه‌گیری

نتایج تحقیق حاضر نشان می‌دهد که داربست پلیمری PCL پوشیده‌شده با ماتریژل می‌تواند 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 رنگ‌آمیزی ایمونوسیتوشیمی و qRT-PCR، که در کشت سه‌بعدی درخور قابل ملاحظه‌ای در مقایسه با کشت دوبعدی افزایش می‌یابد، تأییدکنندهٔ این مطلب است. به طور کلی نتایج نشان می‌دهد که کاربرد تکنولوژی مهندسی بافت درکنار فرایندهای تمایزی در *in vitro* سبب بهبود و تقویت استراتژی سلول‌درمانی و پیوند بافت بدون نگرانی از رد پیوند برای بیماری‌هایی ازجمله بیماری‌های ناشی از نارسایی کبدی، پانکراسی و گوارشی خواهد شد؛ اگرچه برای دست‌یابی به این هدف هنوز باید تلاش‌های گسترده-ای انجام گیرد.

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.

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: 645-652.

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: 348-358.

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: 369-381.

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: 505-514.

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. – Biomate. 27: 576-585.

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

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, K., Fesharaki, 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 insulin-producing 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 three-dimensional 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 randomly-oriented 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-co-glycolide) 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.