ORIGINAL ARTICLE

Enhanced In Vitro Angiogenesis in a Liver Extracellular Matrix-Derived Hydrogel via Co-culture of Human Umbilical Vein Endothelial Cells and Adipose-Derived Mesenchymal Stem Cells

Masoumeh Baghalishahi[1],
Fatemeh Pouya[2],
Mona Saheli[1]

[1] Assistant Professor, Department of Anatomical Sciences, Afzalipour Faculty of Medicine, Kerman University of Medical Sciences, Kerman, Iran
[2] Instructor of Anatomical Sciences, Department of Anatomical Sciences, Afzalipour Faculty of Medicine, Kerman University of Medical Sciences, Kerman, Iran

(Received November 24, 2024; Accepted April 8, 2025)

Abstract

Background and purpose: The development of a bioengineered liver construct with integrated blood vessels, utilizing tissue engineering technology, is urgently required in the healthcare system to address the growing demand for liver transplantation. For the successful development of such a construct, the supporting matrix must ensure liver cell viability and functionality, as well as promote the formation of microvasculature. Furthermore, one of the essential factors for vascularization in engineered constructs is the presence of endothelial cells and pericytes, which play a crucial role in the stabilization and maturation of the vascular network.

Materials and methods: Endothelial cells were cultured within a hydrogel derived from liver extracellular matrix (LEM) to serve as the control group. In the co-culture group, endothelial cells and mesenchymal stem cells (MSCs) were cultured together within the hydrogel. Blood vessel formation, vascular density, and the differentiation of MSCs into pericytes were evaluated ten days after hydrogel-based cell culture. These assessments aimed to determine the efficacy of the LEM-derived hydrogel in supporting angiogenesis and promoting cellular interactions conducive to the development of a stable vascular network.

Results: Immature blood vessels were formed within the LEM-derived hydrogel in both the control and co-culture groups. However, vascular density was significantly greater in the co-culture group compared to the control. Furthermore, the expression of the α-SMA gene, a key regulator of angiogenesis, was significantly elevated in the co-culture group. Similarly, α-SMA protein expression was detected in the co-culture group.

Conclusion: The LEM-derived hydrogel supports endothelial cell polarization, facilitating blood vessel formation within the engineered liver construct. The optimal cell density for effective vascular formation was determined to be 100,000 cells per 30 microliters. Moreover, the co-culture of endothelial cells and MSCs significantly enhances angiogenesis. MSCs contribute to this process through paracrine signaling and differentiation into pericytes.

Keywords: angiogenesis, hydrogel, extracellular matrix, endothelial cells, mesenchymal stem cells, liver tissue engineering

J Mazandaran Univ Med Sci 2025; 35 (244): 1-14 (Persian).

Corresponding Author: Mona Saheli - Afzalipour Faculty of Medicine, Kerman University of Medical Sciences, Kerman, Iran. (E-mail: saheli.mona@gmail.com)

[Downloaded from jmums.mazums.ac.ir on 2026-11-27]

پژوهشی

مجله دانشگاه علوم پزشکی مازندران
دوره سی و پنجم شماره ۲۴۴ اردیبهشت سال ۱۴۰۴ (۱۴-۱)

تقویت رگ‌زایی در هیدروژل مشتق از ماتریکس خارج سلولی کبد در محیط درون تنی با استفاده از هم‌کشتی سلول‌های اندوتلیالی ورید بند ناف و سلول‌های بنیادی مزانشیمی بافت چربی انسان

معصومه باغعلیشاهی[1]
فاطمه پویا[2]
مونا ساحلی[1]

چکیده

سابقه و هدف: توسعه یک ساختار مهندسی زیستی بافت کبدی دارای عروق، نیاز مبرم بخش بهداشت و درمان در جهت رفع تقاضای روز افزون پیوند کبد می‌باشد. جهت توسعه این ساختار ماتریکس‌های مورد استفاده مناسب باید زنده‌مانی سلول‌ها، عملکرد آن‌ها و توسعه ریز عروق‌ها را تضمین کند. علاوه بر این یکی از فاکتورهای لازم جهت تشکیل عروق خونی در ساختارهای مهندسی شده، سلول‌های اندوتلیالی و پریسیت‌ها می‌باشند، که باعث پایداری شبکه عروقی تشکیل شده می‌شوند.

مواد و روش‌ها: در این مطالعه آزمایشگاهی، سلول‌های اندوتلیالی، درون هیدروژل مشتق از ماتریکس خارج سلولی کبد (LEM) به عنوان گروه کنترل و سلول‌های اندوتلیالی و سلول‌های بنیادی مزانشیمی در گروه هم کشتی درون هیدروژل مذکورکشت داده شدند. تشکیل عروق خونی و تراکم عروق خونی و تمایز سلول‌های بنیادی مزانشیمی به پریسیت‌ها ۱۰ روز پس از کشت سلول‌ها مورد بررسی قرار گرفت. این بررسی‌ها به منظور تعیین میزان کارآمدی هیدروژل مشتق از LEM در حمایت از فرایند رگ‌زایی و تعامل سلول‌ها برای توسعه یک ساختار عروقی پایدار انجام شد.

یافته‌ها: در هر دو گروه کنترل و هم کشتی، عروق خونی نابالغ در هیدروژل مشتق از ماتریکس خارج سلولی تشکیل شد؛ تراکم عروق خونی در گروه هم کشتی به‌طور معنی‌داری بالاتر از گروه کنترل بود. بیان ژن α-sma بعنوان ژن موثر در رگ‌زایی نیز در گروه هم کشتی به میزان قابل توجهی بالاتر از گروه کنترل بود. بیان پروتئین α-sma نیز در گروه هم کشتی نشان داده شد.

استنتاج: هیدروژل مشتق از ماتریکس خارج سلولی کبد با حمایت از ایجاد قطبیت در سلول‌های اندوتلیالی باعث تشکیل عروق خونی در ساختار مهندسی شده بافت کبد می‌شود. تراکم سلولی لازم جهت تشکیل عروق خونی ۱۰۰ هزار سلول در ۳۰ میکرولیتر است. علاوه بر این هم کشتی سلول‌های اندوتلیالی و سلول‌های بنیادی مزانشیمی باعث تقویت و افزایش تشکیل عروق خونی می‌شود که سلول‌های بنیادی مزانشیمی تاثیرات خود را از طریق مکانیسم‌های پاراکراین و تمایز به پریسیت‌ها اعمال می‌کنند.

واژه های کلیدی: هیدروژل، ماتریکس خارج سلولی، سلول اندوتلیال، سلول بنیادی مزانشیمی، رگ‌زایی، مهندسی بافت کبد

مولف مسئول: مونا ساحلی-کرمان، دانشگاه علوم پزشکی کرمان، دانشکده پزشکی **E-mail:** saheli.mona@gmail.com
۱. استادیار، گروه آناتومی، دانشکده پزشکی افضلی‌پور، دانشگاه علوم پزشکی کرمان، کرمان، ایران
۲. مربی، گروه آناتومی، دانشکده پزشکی افضلی‌پور، دانشگاه علوم پزشکی کرمان، کرمان، ایران
۳. استادیار، گروه آناتومی، دانشکده پزشکی افضلی‌پور، دانشگاه علوم پزشکی کرمان، کرمان، ایران
تاریخ دریافت : ۱۴۰۳/۹/۴ تاریخ ارجاع جهت اصلاحات : ۱۴۰۳/۱۰/۱۱ تاریخ تصویب : ۱۴۰۴/۱/۱۹

[Downloaded from jmums.mazums.ac.ir on 2026-11-27]

مقدمه

بر اساس برآوردهای سازمان بهداشت جهانی (WHO)، نرخ مرگ و میر ناشی از نارسایی کبد در چند دهه اخیر روندی فزاینده داشته است، به طوری که هر ساله حدود ۵۰ میلیون مورد به شمار موارد مرگ اضافه می‌شود(۱). این وضعیت یکی از چالش‌های عمده سلامت جهانی به شمار می‌رود و ضرورت اقدام‌های پیشگیرانه و درمانی را دوچندان می‌کند(۲، ۳).

تا به امروز، پیوند کبد به عنوان تنها روش درمانی مؤثر برای بیماری پیشرفته کبد به شمار می‌آید، به‌طوری که میزان بقا در سال اول پس از پیوند بیش از ۸۵ درصد گزارش شده است(۴، ۵). با این حال، محدودیت انجام پیوند کبد به دلیل کمبود اهدا کنندگان عضو، چالشی جدی در پاسخ‌گویی به نیاز بیماران ایجاد کرده است. علی‌رغم تلاش‌های گسترده برای افزایش ذخیره اعضای قابل پیوند، ترویج اهدای عضو پس از مرگ قلبی و مغزی و تشویق به پیوند بخشی از کبد، تقاضا برای پیوند کبد هم‌چنان در حال افزایش است و محدودیت در تأمین کبد هم‌چنان به عنوان مهم‌ترین عامل محدود کننده، در دسترسی به این درمان حیاتی باقی مانده است(۸-۶).

به منظور غلبه بر این مشکل، نیاز به رویکردهای جایگزین به جای پیوند کبد به‌خوبی احساس می‌شود. یکی از استراتژی‌های مطرح شده، سلول درمانی است که شامل پیوند هپاتوسیت‌ها می‌شود. پیوند هپاتوسیت تاکنون تنها به عنوان یک راه حل موقت برای بیمارانی که در مرحله پیشرفته بیماری کبدی هستند و در انتظار پیوند کبد قرار دارند، به کار رفته است. این روش اگر چه نتایج نسبتا قابل قبولی به همراه داشته است؛ اما طول اثرگذاری آن همچنان نامشخص است(۹، ۱۰).

در واقع، پیوند هپاتوسیت به دلیل کمبود اعضای اهدا کننده برای جداسازی سلول‌های با کیفیت، دسترسی به هپاتوسیت‌های مناسب را محدود کرده و به ندرت توانسته است اثرات درمانی بلند مدتی فراهم کند(۱۱، ۱۲). علاوه براین، تولید هپاتوسیت‌های بالغ با تمایز سلول‌های بنیادی در شرایط برون‌تنی نیز با چالش‌های قابل توجهی همراه است(۱۳). در نتیجه، تحقیقات پیرامون گزینه‌های جایگزین با سرعت زیادی در حال پیشرفت است. یکی از رویکردهای مورد توجه که بررسی‌های گسترده‌ای به همراه داشته است، مهندسی زیستی ارگان‌ها از طریق فناوری مهندسی بافت است تا بتواند یک میکرو محیط سه‌بعدی شبیه به ساختار طبیعی کبد برای ایجاد بافت‌ها یا اعضای قابل پیوند فراهم آورد(۱۴).

شواهد نشان می‌دهند که می‌توان از طریق فرایند سلول‌زدایی، یک داربست مبتنی بر ماتریکس خارج سلولی تولید کرد(۱۵، ۱۶). این ماتریکس که از ترکیباتی مانند کلاژن، فیبرونکتین، لامینین و چندین فاکتور رشد تشکیل شده است، علاوه بر پشتیبانی مکانیکی لازم، یک میکرو محیط سه‌بعدی زیستی فعال (bioactive) را ایجاد نموده است که زنده‌مانی و چسبندگی سلولی را تسهیل می‌کند. این ویژگی‌ها، ماتریکس خارج سلولی را به گزینه‌ای مناسب برای بازسازی بافت‌ها و ارائه ساختاری شبیه به بافت طبیعی ارگان‌ها تبدیل می‌کند(۲۰ -۱۷).

هیدروژل‌های قابل تزریق مشتق شده از ماتریکس خارج سلولی کبد سلول‌زدایی شده به‌عنوان داربست‌هایی مؤثر برای حمایت از عملکردهای تخصصی کبد، رشد سلولی و تمایز شناخته شده‌اند. این هیدروژل‌ها به دلیل توانایی خود در ایجاد یک محیط زیستی مشابه بافت کبد، در تولید کبد زیست مهندسی، برای کاربردهای درمانی مورد استفاده قرار گرفته‌اند و پتانسیل قابل توجهی در بهبود نتایج درمانی برای بیماران مبتلا به نارسایی کبدی دارند(۲۱، ۲۲). علاوه بر این، عدم وجود اجزای سلولی در این ماتریکس‌ها امکان استفاده از آن‌ها به‌عنوان داربست‌های عملکردی با حداقل ایمنی‌زایی برای پیوند سلول را فراهم می‌کند(۲۱). هم‌چنین، برخلاف واکنش بدن به اجسام خارجی، داربست‌های طبیعی نوع متفاوتی از پاسخ ایمنی میزبان را نشان می‌دهند، به‌طوری که ماتریکس خارج سلولی در طی فرایند تخریب اولیه، تحت لیز قرار گرفته و پپتیدهای کریپتیک و فاکتورهای

[Downloaded from jmums.mazums.ac.ir on 2026-11-27]

رشد آزاد می‌کند. این مرحله از پاسخ نقش مهمی در تغییر قطبیت ماکروفاژها به سمت فنوتیپ بازسازی‌کننده، تحریک آنژیوژنز، مهاجرت سلول‌های بنیادی/پیش‌ساز و در نهایت فرایند بازسازی دارد(۲۳).

با این وجود، ادغام ساختار زیست مهندسی پیوندی با عروق میزبان اهمیت زیادی دارد، زیرا این امر از مرگ سلولی ناشی از هیپوکسی و ایسکمی جلوگیری می‌کند. بنابراین، برای اطمینان از موفقیت دراز مدت پیوند بافت زیست مهندسی در شرایط درون‌تنی، بازسازی عروق در این ساختار امری ضروری به شمار می‌آید. این بازسازی عروقی علاوه بر تقویت پایداری ساختار پیوندی، با تأمین اکسیژن و مواد مغذی، عملکرد و بقای سلول‌های پیوندی را بهبود می‌بخشد(۲۴، ۲۵).

روش‌های مختلفی برای القای رگ‌زایی در ساختارهای زیست مهندسی استفاده شده است. یکی از این روش‌ها، استفاده از هیدروژل‌های تزریقی مشتق شده از ماتریکس خارج سلولی است که به عنوان ابزاری برای انتقال سلول‌های اندوتلیال و ایجاد پیوندهای عروقی مهندسی شده پیشنهاد شده‌اند. افزون بر این، فعالیت رگ‌زایی سلول‌های اندوتلیال می‌تواند از طریق هم‌کشتی با سلول‌های بنیادی مزانشیمی تقویت شود؛ زیرا این سلول‌ها به طور فعال از فرایند رگ‌زایی پشتیبانی کرده و در نتیجه به بهبود عملکرد بافت کمک می‌کنند(۲۶، ۲۷).

اصطلاح سلول‌های بنیادی مزانشیمی (MSCs) برای توصیف جمعیتی از سلول‌های بنیادی چند توان به کار می‌رود که از منابع مختلفی مانند مغز استخوان، بافت چربی، بند ناف، خون محیطی و سایر بافت‌ها قابل جداسازی هستند. این سلول‌ها دارای خواص تعدیل کننده ایمنی، ضدالتهابی و بازسازی کننده می‌باشند. این اثرات درمانی نه تنها به خود سلول‌ها، بلکه به مشتقات سلولی آن‌ها نیز مرتبط است؛ سلول‌های بنیادی مزانشیمی مشتق‌شده از بافت چربی و مشتقات آن‌ها به دلیل ویژگی‌های منحصر به فردشان، به‌ویژه در حمایت از فرآیند آنژیوژنز، ابزار درمانی نویدبخشی در پزشکی بازساختی به شمار می‌روند. اثرات سودمند این سلول‌ها و مشتقات آن‌ها به توانایی آن‌ها در انتقال طیف گسترده‌ای از مولکول‌های زیست فعال از جمله پروتئین‌ها، اسیدهای نوکلئیک، اگزوزوم‌ها، میکروویزیکول‌ها و عناصر تنظیمی مانند میکرو RNA به سایر سلول‌ها است، که این امر منجر به بهبود ترمیم و بازسازی بافت می‌شود(۲۸). از جمله پروتئین‌هایی که توسط این سلول‌ها ترشح می‌شود فاکتورهای رشد مانند فاکتور رشد اندوتلیال عروقی (VEGF) و آنژیوپویتین – ۱ (Ang-1) است که فرایند رگ‌زایی و به ویژه تثبیت رگ‌ها را تحریک می‌کنند(۲۷).

سلول‌هایی که در اطراف عروق خونی هستند و پریسیت نامیده می‌شوند، در اطراف سلول‌های اندوتلیالی عروق خونی قرار دارند و مشخص شده است که در پایداری و بلوغ عروق خونی و جریان خون میکروواسکولار نقش دارند. این سلول‌ها با ایجاد انبساط و انقباض عروق، جریان خون را تثبیت می‌کنند(۲۹).

علاوه بر این، تحقیقات نشان داده‌اند که MSC ها می‌توانند در شرایط درون‌تنی به پریسیت‌ها یا سلول‌های عضله صاف تمایز یابند و به این ترتیب رگ‌های خونی تازه تشکیل شده را تثبیت کنند، که این ویژگی در بهبود عملکرد و پایداری عروق در ساختارهای مهندسی شده مؤثر است(۲۷).

از آن‌جا که هیدروژل‌های مشتق شده از ماتریکس خارج سلولی یک محیط سه بعدی مناسب را برای تعامل سلول‌های محصور شده و توسعه شبکه عروقی عملکردی فراهم می‌کنند و هم‌چنین سلول‌های بنیادی مزانشیمی می‌توانند با تاثیرات پاراکراین و تمایز به پریست‌ها باعث بهبود و ارتقا روند رگ‌زایی در هیدروژل شوند؛ بنابراین در این مطالعه هیدروژل تزریقی مشتق از ماتریکس خارج سلولی کبد مورد استفاده قرار گرفت، تا این هیدروژل از طریق فراهم سازی شرایط طبیعی بافت کبد و حمایت فیزیکی و شیمیایی از سلول‌های اندوتلیالی و سلول‌های بنیادی مزانشیمی، به تولید

[Downloaded from jmums.mazums.ac.ir on 2026-11-27]

ساختارهای زیست مهندسی شده و تشکیل ساختارهای عروقی و تقویت آن‌ها در این ساختارها کمک کند(۳۰).

مواد و روش‌ها

مطالعه آزمایشگاهی حاضر پس از کسب کد اخلاق از دانشگاه علوم پزشکی کرمان با رعایت اصول اخلاق در پژوهش و با کد اخلاق IR.KMU.REC.1400.082 انجام شد.

تهیه هیدروژل مشتق از ماتریکس خارج سلولی کبد

قطعات بافت کبد گوسفندی که با استفاده از محلول نیم درصد سدیم دودسیل سولفات (SDS)، سلول‌زدایی شده‌اند، پس از شستشو، در فرایند انجماد خشک قرار گرفتند. بافت بعد از انجماد خشک بصورت پودر درامد و با استفاده از اسید استیک ۰/۵ مولار و پپسین ۱ درصد هضم شد. فرایند هضم با استفاده از دستگاه همزن مغناطیسی با دور 150 rpm و در دمای ۴ درجه سانتی گراد انجام شد. سپس با استفاده از هیدروکسید سدیم ۲ مولار، بر روی یخ محلول حاصل از هضم خنثی شد. با توجه به این که غلظت هیدروژل ابتدایی بدست آمده پس از هضم و خنثی سازی 10 mg/ml بود؛ لذا برای تهیه هیدروژل با غلظت 3 mg/ml هیدروژل اولیه با استفاده از محیط کشت رقیق و پیپتاژ شد تا غلظت نهایی هیدروژل به 3mg/ml برسد(۳۱). اطلاعات کامل در ارتباط با نحوه سلول‌زدایی و اندازه گیری میزان ترکیبات موجود در ماتریکس خارج سلولی کبد قبل و بعد از فرایند سلول‌زدایی و ارزیابی‌های هیدروژل بدست آمده از جمله اندازه منافذ موجود در هیدروژل در مطالعه قبلی نویسنده مطالعه حاضر گزارش شده است(۳۱).

جداسازی، کشت و تکثیر سلول‌های اندوتلیالی ورید نافی انسان

نمونه‌های بند ناف درون بافر فسفات سالین (PBS) حاوی ۱ درصد آنتی‌بیوتیک پنیسیلین -استرپتومایسین و در دمای ۴ درجه سانتی گراد از بیمارستان افضلی‌پور به دانشکده پزشکی، گروه آناتومی انتقال داده شد. ورید نافی با استفاده از پیپت ۵ میلی‌لیتری کانوله (قرار دادن یک لوله در داخل رگ) شد و برای حذف خون درون ورید، ورید چند بار با PBS شسته شد. سلول‌های اندوتلیالی ورید نافی با استفاده از محیط کشت M199 حاوی کلاژناز استخراج شدند. سلول‌ها درون محیط کشت اختصاصی سلول‌های اندوتلیالی EGM و درون فلاسک T25 کشت داده شد ۴۸ ساعت بعد تعویض محیط انجام شد. پس از آن محیط کشت، هر دو روز یکبار تعویض شد. پس از این که سلول‌ها ۸۰ درصد سطح فلاسک را پوشش دادند، سلول‌ها پاساژ داده شدند. سلول‌ها در پاساژ ۴ برای انجام ادامه روند مطالعه مورد استفاده قرار گرفتند(۳۱).

تایید سلول‌های اندوتلیالی جدا شده از ورید نافی انسان با استفاده از تست جذب لیپوپروتئین کم‌چگالی (Low-density lipoprotein (LDL))

جذب LDL از گردش خون یکی از عملکردهای سلول‌های اندوتلیالی است. بنابراین سنجش جذب LDL یکی از تست‌های تشخیصی برای تایید و شناسایی این سلول‌ها است. بدین منظور جذب LDL نشاندار شده با ماده DiI (DiI-AC-LDL) مورد ارزیابی قرار گرفت. سلول‌ها بعد از جذب LDL نشاندار از طریق وزیکول‌های پوشیده شده با کلاترین مسیر آندوسیتوزی را طی کرده و این مولکول نشاندار بعد از ادغام وزیکول آندوسیتوز شده با لیزوزیم در شرایط اسیدی از LDL جدا شده و به دلیل پدیدار شدن خاصیت فلورسنتی ناشی از مواد نشاندار با میکروسکوپ فلورسانس قابل ردیابی است(۳۲).

تایید سلول‌های اندوتلیالی جدا شده از ورید نافی انسان با استفاده از بیان فاکتور فون‌ویلبراند

بیان فاکتور فون‌ویلبراند (Von Willebrand factor (vWF) که یکی از شاخص‌های اختصاصی سلول‌های

[Downloaded from jmums.mazums.ac.ir on 2026-11-27]

اندوتلیالی است با استفاده از روش ایمنوفلورسنت مورد بررسی قرار گرفت. بدین ترتیب که پس از فیکس سلول‌ها با استفاده از پارافرمالدئید، این سلول‌ها ابتدا به مدت ۱۸ ساعت (شب تا صبح) و در دمای ۴ درجه سانتی گراد با آنتی‌بادی اولیه بر علیه فاکتور فون‌ویلبراند و پس از شستشو به مدت یک ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد با آنتی‌بادی ثانویه کونژوگه به رنگ فلورسنت انکوبه شدند. تصاویر توسط میکروسکوپ فلورسنت IX71 invert تهیه شده و با استفاده از نرم افزار image-j آماده سازی و ارائه گردید(۳۳).

سلول‌های بنیادی مزانشیمی

سلول‌های بنیادی مزانشیمی مشتق از چربی انسانی در پاساژ ۲ از بانک سلول‌های بنیادی گروه آناتومی دانشگاه علوم پزشکی کرمان به دست آمد. پس از ذوب سلول‌ها، سلول‌های بنیادی مزانشیمی در فلاسک‌های T75 که حاوی ۱۲ میلی لیتر محیط کامل بودند، کشت داده شدند. محیط کامل از محیط DMEM-F12 با ۱ درصد پنی سیلین -استرپتومایسین و ۱۰ درصد سرم جنین گاوی تشکیل شده بود. فلاسک‌های سلولی تحت رطوبت ۹۵ و ۵ درصد CO_2، در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد تا رسیدن به ۸۰ درصد تراکم انکوبه شدند. هر ۳-۲ روز یک بار محیط کشت تعویض گردید. سلول ها در پاساژهای ۶-۴ با استفاده از آنزیم تریپسین جدا شده و برای ادامه روند مطالعه مورد استفاده قرار گرفتند(۳۴).

کشت سلول‌های اندوتلیالی و سلول‌های بنیادی مزانشیمی درون هیدروژل مشتق از ماتریکس کبد

این مطالعه شامل دو گروه کنترل و هم کشتی بود. در گروه کنترل سلول‌های اندوتلیالی به تنهایی درون هیدروژل کشت داده شدند؛ در گروه هم کشتی سلول‌های اندوتلیالی و بنیادی مزانشیمی به ترتیب با نسبت‌های ۲:۱ (سلول‌های اندوتلیالی دو برابر سلول‌های مزانشیمی) با یکدیگر درون هیدروژل کشت داده شدند؛ تراکم سلولی در هر دو گروه ۱۰۰ هزار سلول در ۳۰ میکرولیتر از هیدروژل بود. مراحل کشت سلول درون هیدروژل بدین ترتیب بوده است که پس از پاساژ، تعداد ۱۰۰ هزار سلول در حجم ۳۰ میکرولیتر از هیدروژل با غلظت 3 mg/ml به صورت سوسپانسیون سلولی در هیدروژل معلق شدند و سپس قطرات در حجم ۳۰ میکرولیتر در ظروف کشت غیر چسبنده کشت داده شدند و سپس قطرات معلق در محیط کشت کامل شامل محیط DMEM-F12 و EGM با نسبت ۱ به ۱ و حاوی ۱ درصد پنی سیلین -استرپتومایسین و ۱۰ درصد سرم جنین گاوی در ظروف کشت و تا ۱۰ روز درون انکوباتور تحت رطوبت ۹۵ درصد و ۵ درصد CO_2، و در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد کشت داده شدند.

پس از ۱۰ روز از شروع کشت سلول‌ها درون هیدروژل ارزیابی‌های لازم انجام شد. بدین ترتیب که پس از فیکس کردن قطرات هیدروژل حاوی سلول و طی مراحل آماده سازی نمونه، برش‌گیری انجام شد. رنگ آمیزی هماتوکسیلین - ائوزین برش‌های بافتی هیدروژل حاوی سلول جهت تشکیل عروق خونی انجام شد. بدین ترتیب که نمونه‌ها با استفاده از فرمالین فیکس شده، بعد از آماده‌سازی بافت، قالب‌گیری و بلوک‌گیری در پارافین، با استفاده از میکروتوم با ضخامت ۶ میکرومتر برش داده شدند. برش‌های تهیه شده، با رنگ‌آمیزی هماتوکسیلین -ائوزین رنگ‌آمیزی شدند؛ در این رنگ‌آمیزی هسته سلول‌ها توسط هماتوکسیلین به رنگ ارغوانی یا بنفش تیره و سیتوپلاسم توسط ائوزین به رنگ نارنجی نشان داده می‌شوند. علاوه بر این با استفاده از روش ایمنوهیستوشیمی برای مارکر CD31 ارزیابی رگ‌زایی انجام شد. CD31 یک مارکر غشایی است که در سلول‌های اندوتلیالی بیان می‌شود. بدین ترتیب که برش‌هایی با ضخامت ۶ میکرومتر تهیه شد. برش‌های تهیه شده بعد از پارافین زدایی و آبدهی به مدت ۱۸ ساعت (شب تا صبح) با آنتی‌بادی های اولیه بر علیه

[Downloaded from jmums.mazums.ac.ir on 2026-11-27]

CD31 و در دمای ۴ درجه سانتی گراد انکوبه شدند. بعد از شستشوی آنتی‌بادی اولیه، برش‌ها برای مدت یک ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد با آنتی‌بادی ثانویه کونژوگه به آنزیم هورس رادیش پراکسیداز ((HRP) Horseradish peroxidase) انکوبه شدند. سپس هسته‌ها توسط هماتوکسیلین رنگ‌آمیزی شد و نمونه ها با استفاده از میکروسکوپ Olympus BX51 مشاهده و عکس برداری شد. بعد از تهیه برش‌های سریالی، تراکم عروق خونی تشکیل شده در هیدروژل بصورت تعداد عروق خونی در هر میلی‌متر مربع مورد ارزیابی قرار گرفت.

ارزیابی بیان ژن α-sma با روش qRT-PCR

پس از ۱۰ روز کشت سلول‌ها درون هیدروژل میزان بیان ژن *α-sma* در سطح mRNA بررسی شد. در ابتدا استخراج RNA نمونه‌ها با استفاده از محلول ترایزول و با روش فنل کلروفرم، انجام گردید. ساخت cDNA از روی RNAهای استخراج شده توسط کیت RevertAid H Minus First Strand cDNA Synthesis Kitانجام شد. از نمونه‌های cDNA به عنوان الگو برای واکنش زنجیره‌ای پلیمراز بی درنگ (Real-Time PCR) استفاده شد. واکنش Real-Time PCR توسط دستگاه Corbett Life Science و با استفاده از Power SYBR Green PCR Master Mixانجام شد. از ژن *GAPDH* به عنوان کنترل داخلی برای یکسان سازی سطح RNA ها استفاده شد.

بیان پروتئین α-sma با استفاده از ایمونوهیستوفلورسنت

پریسیت‌هایی که اطراف سلول‌های اندوتلیال در دیواره عروق وجود دارند، علاوه بر نقش فیزیولوژیکی که در عملکرد و پایداری عروق خونی دارند، در رگ‌زایی نیز نقش قابل توجهی دارند. بنابراین تمایز MSCsبه پریسیت‌ها توسط بیان پروتئین α-sma در روز دهم کشت سلول‌ها درون هیدروژل، مورد ارزیابی قرار گرفت. بعد از فیکس قطرات هیدروژل حاوی سلول در فرمالین و بعد از آماده سازی بافتی و بلوک گیری در پارافین، برش‌هایی با ضخامت ۶ میکرومتر تهیه شد. برش‌های تهیه شده بعد از پارافین‌زدایی و آبدهی به مدت ۱۸ ساعت (شب تا صبح) با آنتی‌بادی های اولیه بر علیه α-sma در دمای ۴ درجه سانتی گراد انکوبه شدند. بعد از شستشوی آنتی‌بادی اولیه، برش‌ها برای مدت یک ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد با آنتی‌بادی ثانویه کونژوگه به رنگ فلورسنت قرمز انکوبه شدند. سپس رنگ‌آمیزی متقابل هسته‌ی سلول‌ها توسط DAPIانجام شد و نمونه ها با استفاده از میکروسکوپ Olympus BX51مشاهده و عکس برداری شد.

روش‌های تجزیه و تحلیل داده‌ها

همه داده‌های کمی توسط نرم افزار SPSS نسخه ۱۶ آنالیز شد. ابتدا توزیع طبیعی داده ها توسط آزمون شاپیرو ویلک بررسی شد. برای مقایسه نتایج از آزمون تی مستقل استفاده گردید. داده ها به صورت میانگین ± انحراف معیار ارائه شد. اختلافات در سطح $p< ۰/۰۵$ معنی‌دار تلقی شدند. لازم به ذکر است که همه آزمایش‌ها در سه تکرار بیولوژیک مستقل انجام گرفت.

یافته‌ها

تایید سلول‌های اندوتلیالی جدا شده از ورید بند ناف با استفاده از تست جذب LDL و بیان فاکتور فون‌ویلبراند

برای تایید سلول‌های اندوتلیالی از تست جذب LDLو همچنین ارزیابی بیان فاکتور فون‌ویلبراند از روش ایمنوسیتوشیمی استفاده شد. همان طور که در تصویر شماره ۱ و ردیف A مشاهده می‌شود، AI تصویر میکروسکوپ فازکنتراست سلول‌های اندوتلیالی، تصویر AII سیتوپلاسم سلول‌های اندوتلیالی به رنگ فلورسنت قرمز پس از جذب LDL و تصویر AIII رنگ‌آمیزی هسته سلول‌ها با استفاده از DAPI قابل مشاهده است. نتایج نشان می‌دهد که تقریبا تمامی سلول‌ها LDL کونژوگه به رنگ فلورسنت را جذب نموده و قرمز رنگ شده‌اند (تصویر شماره ۱، A). نتایج حاصل از

[Downloaded from jmums.mazums.ac.ir on 2026-11-27]

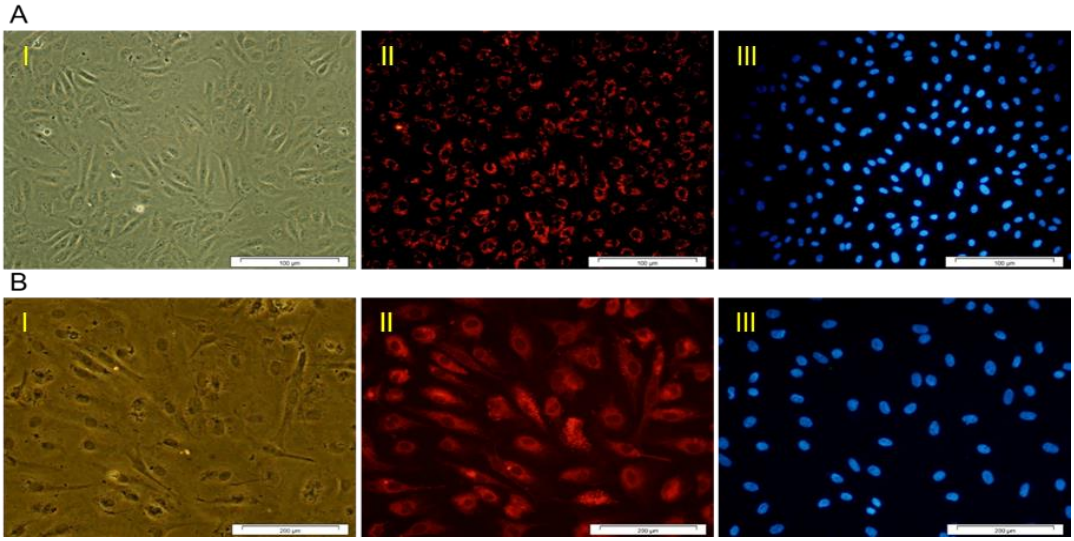
ایمنوسیتوشیمی نیز نشان داد که سلول‌های استخراج شده از ورید بند ناف فاکتور فون‌ویلبراند را نیز به خوبی بیان کردند. BI نشان دهنده تصویر میکروسکوپ فازکنتراست سلول‌های اندوتلیالی، BII تصویر سلول‌های بیان کننده فاکتور فون‌ویلبراند است که سیتوپلاسم این سلول‌ها به رنگ قرمز قابل مشاهده است و BIII رنگ‌آمیزی هسته سلول‌ها با استفاده از DAPI را نشان می‌دهد (تصویر شماره ۱، B).

تایید سلول‌های بنیادی مزانشیمی براساس بیان نشانگرهای سطحی اختصاصی مزانشیمی و تمایز به رده استخوان و چربی

آنالیز فلوسایتومتری سلول‌های بنیادی مزانشیمی بر اساس نشانگرهای سطحی آن ها در مطالعات قبلی گزارش شده است. نتایج نشان داد که سلول‌ها نشانگرهای ۱۰۵ (۷۴/۱۰ درصد)، و ۹۰ (۹۳/۲۴ درصد) را بیان کردند و نشانگرهای خونساز ۳۴و ۴۵ تنها در درصد بسیار کمی از سلول‌ها بیان شد. علاوه بر این، تمایز به رده سلولی چربی و استخوان سلول‌های بنیادی مزانشیمی با رنگ آمیزی اویل – رد و آلیزارین – رد تأیید شد(۳۴).

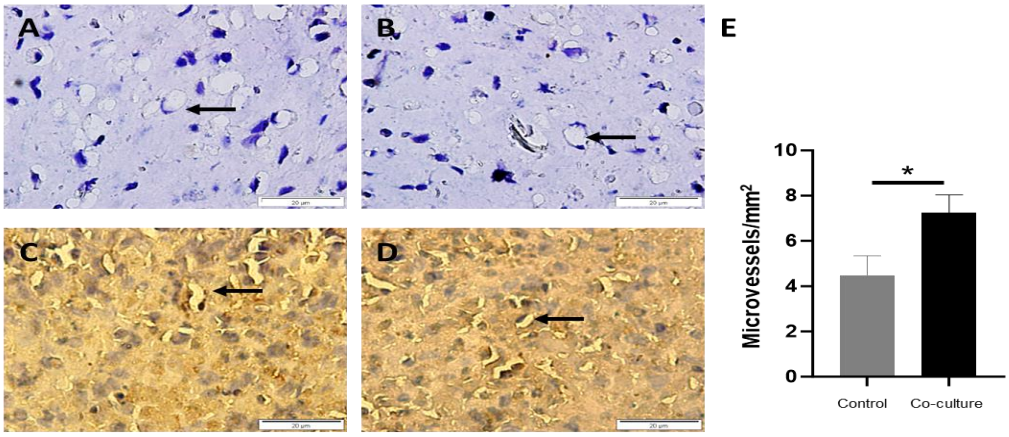
رگ‌زایی درون هیدروژل

نتایج حاصل از رنگ آمیزی هماتوکسیلین –ائوزین برش‌های بافتی هیدروژل حاوی سلول در گروه‌های کنترل و هم کشتی نشان داد که تراکم ۱۰۰ هزار سلول در ۳۰ میکرولیتر از هیدروژل، شرایط ایجاد انسجام و تراکم سلولی لازم جهت القاء رگ‌زایی را فراهم می‌کند؛ هم‌چنین بهترین نسبت سلولی در گروه هم کشتی، نسبت ۲:۱ بود که تعداد سلول‌های اندوتلیالی دو برابر سلول‌های مزانشیمی بودند. تصاویر بافت شناسی نشان دهنده تشکیل عروق خونی نابالغ در دو گروه کنترل و هم کشتی است (تصویر شماره ۲، A، B). ایمنوهیستوشیمی برای مارکر CD31 همچنین تشکیل عروق خونی نابالغ را در دو گروه کنترل و هم کشتی تایید کرد (تصویر شماره ۲، C، D). ارزیابی تراکم عروق خونی نابالغ تشکیل شده در هیدروژل در دو گروه کنترل و هم کشتی نشان داد که تراکم عروق خونی در گروه هم کشتی به‌صورت معنی‌داری بالاتر از تراکم عروق خونی در گروه کنترل است(تصویر شماره ۲، E).



تصویر شماره ۱: تست جذب LDL و بیان فاکتور فون ویلبراند با استفاده از روش ایمنوسیتوشیمی توسط سلول‌های اندوتلیال استخراج شده از ورید نافی انسان، (A) همانطور که مشاهده می شود تقریبا تمامی سلول‌ها LDL فلورسنت را جذب نموده و قرمز رنگ شده اند. AI تصویر فازکنتراست، AII سیتوپلاسم قرمز رنگ سلول‌ها پس از جذب LDL، و AIII هسته‌های آبی رنگ پس از رنگ آمیزی با DAPI نوار مقیاس برابر ۱۰۰ میکرومتر. (B) با استفاده از روش ایمنوسیتوشیمی بیان فاکتور فون‌ویلبراند با استفاده از آنتی بادی کونژوگه به رنگ فلورسنت قابل شناسایی می‌باشد. BI تصویر فازکنتراست، BII سیتوپلاسم قرمز رنگ سلول‌ها پس از جذب LDL، و BIII هسته‌های آبی رنگ پس از رنگ آمیزی با DAPI، نوار مقیاس برابر ۲۰۰ میکرومتر

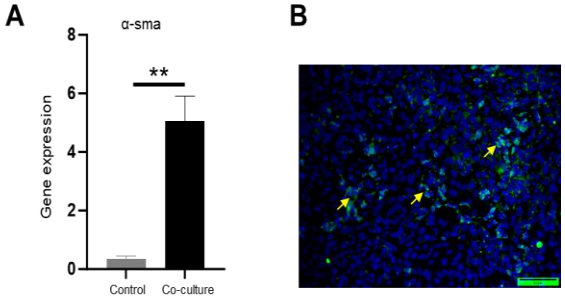
[Downloaded from jmums.mazums.ac.ir on 2026-11-27]



تصویر شماره ۲: رنگ‌آمیزی H&E و ایمنوهیستوشیمی مارکر CD31. (A، B) رنگ‌آمیزی H&E هیدروژل به ترتیب در گروه کنترل و هم کشتی (C، D) رنگ‌آمیزی ایمنوهیستوشیمی مارکر CD31، به ترتیب در گروه کنترل و هم کشتی، فلش نشان دهنده عروق خونی نابالغ (E) مقایسه میزان تراکم عروق خونی نابالغ در گروه کنترل و هم کشتی، داده‌ها به صورت میانگین± انحراف معیار بیان شده است. علامت * نشان دهنده $P<۰/۰۵$ می باشد.

بیان ژن و پروتئین α-sma

از آنجا که در گروه هم کشتی تمایز سلول‌های بنیادی مزانشیمی به پریسیت‌ها یکی از دلایل القاء رگ‌زایی درون هیدروژل است، بیان ژن، *α-sma* بعنوان فاکتور نشان دهنده رگ‌زایی در دو گروه کنترل و هم کشتی مورد ارزیابی قرار گرفت. نتایج حاصل نشان داد که بیان ژن *α-sma* در گروه هم کشتی بطور معناداری بالاتر از گروه کنترل است. همچنین نتایج حاصل از ایمنوهیستوشیمی در گروه هم کشتی بیان این پروتئین را نشان داد (تصویر شماره ۳).



تصویر شماره ۳: بیان ژن و پروتئین α-sma. (A) مقایسه بیان ژن *α-sma* در دو گروه کنترل و هم کشتی، (B) بیان پروتئین α-sma در گروه هم کشتی، داده‌ها به صورت میانگین ± انحراف معیار بیان شده است، علامت ** نشان دهنده $p<۰/۰۱$ می باشد.

بحث

استفاده از هیدروژل‌های مشتق از LEM زمینه پیشرفت و توسعه ایجاد بافت کبد را به شیوه مهندسی زیستی در شرایط برون‌تنی فراهم آورده است. این رویکرد می‌تواند امکان بازسازی بافت کبد با ویژگی‌های نزدیک به ساختار و عملکرد طبیعی آن را فراهم و چشم‌اندازهای جدیدی برای درمان‌های پزشکی بازساختی ایجاد کند(۲۲).

با این حال، یکی از چالش‌های اصلی پس از پیوند ساختار کبدی مهندسی زیستی شده، تشکیل عروق خونی جدید درون ساختار پیوند شده است. شواهد نشان می‌دهند که تنها بخش محدودی از سلول‌ها، به‌ویژه آن‌هایی که در حاشیه ساختار کبدی قرار دارند، پس از پیوند زنده می‌مانند. علت اصلی مرگ سلول‌ها، کمبود خون‌رسانی کافی به تمام سلول‌های موجود در ساختار پیوندی است، که این موضوع بر اهمیت بازسازی عروق و تأمین مناسب مواد مغذی و اکسیژن تأکید دارد(۲۵، ۳۵).

هم‌چنین، مطالعات درون‌تنی نشان داده‌اند که ارزیابی عملکرد بلند مدت ساختارهای پیوندی با چالش‌هایی روبه‌رو است. این چالش‌ها عمدتاً به دلیل عدم تشکیل عروق خونی درون ساختار پیوندی و یا عدم ارتباط کافی بین شبکه عروقی این ساختار با عروق خونی میزبان است. از این رو، استفاده از داربست و

[Downloaded from jmums.mazums.ac.ir on 2026-11-27]

سلول‌هایی که فرایند رگ‌زایی را تقویت نموده و نیز، ادغام موثر ساختار سلول‌های پیوندی با شبکه عروقی میزبان را امکان‌پذیر کند، ضروری است. این رویکرد می‌تواند از مرگ سلولی ناشی از هیپوکسی و ایسکمی جلوگیری کرده و پایداری و عملکرد ساختار پیوندی را در بلند مدت تضمین کند(۲۴، ۳۶).

بنابراین، در این مطالعه تعاملات بین سلول‌های اندوتلیالی و سلول‌های بنیادی مزانشیمی درون هیدروژل مشتق از ماتریکس خارج سلولی کبد و تاثیر آن ها در فرایند رگ‌زایی درون ساختارهای مهندسی زیستی شده بررسی شد. در این راستا، سلول‌های اندوتلیالی در گروه کنترل و سلول‌های اندوتلیالی و بنیادی مزانشیمی در گروه هم کشتی درون هیدروژل مشتق از ماتریکس خارج سلولی کبد برای مدت ۱۰ روز کشت داده شدند تا توانایی هیدروژل و سلول‌ها جهت رگ‌زایی در شرایط برون‌تنی برای ایجاد یک ساختار مهندسی زیستی شده عملکردی مورد ارزیابی قرار گیرد.

نتایج حاصل از مطالعات گذشته نشان می‌دهد، که تراکم سلولی در هیدروژل نقش بسزایی بر مهاجرت و جوانه زدن سلول‌های اندوتلیالی و به دنبال آن آغاز و ارتقاء روند رگ‌زایی دارد(۳۶). نتایج حاصل از رنگ‌آمیزی هماتوکسیلین -ائوزین نشان داد که تراکم سلولی، ۱۰۰ هزار سلول در ۳۰ میکرولیتر از هیدروژل، باعث ایجاد عروق خونی نابالغ در هیدروژل مشتق از ماتریکس خارج سلولی کبد شده است. ارزیابی تراکم عروق خونی در دو گروه کنترل و هم کشتی نشان داد که، تراکم عروق خونی در گروه هم کشتی به طور معنا داری بالاتر از گروه کنترل است.

در مطالعه Rao و همکاران بیان گردید که سلول‌های بنیادی مزانشیمی سیگنال‌های پاراکراینی فراهم می‌کنند و سلول‌های اندوتلیالی را برای تشکیل ساختارهای شبه عروقی تحریک می‌کند(۳۷). Zhang و همکاران نشان دادند که مسیرهای سیگنالینگ AKT هنگام هم کشتی سلول‌های اندوتلیال با سلول‌های مزانشیمی فعال می‌شوند و این امر به ایجاد عروق خونی در هیدروژل و نهایتاً به برقراری ارتباط عروق خونی هیدروژل با عروق خونی میزبان کمک می‌کند(۳۸). به‌طور مشابه، برخی مطالعات نشان داده‌اند که سیگنال‌های پاراکراینی فاکتورهای پیش رگ‌زایی مانند EGF، VEGF، bFGF، PDGF و Ang-1 گیرنده‌های سلول‌های اندوتلیال را فعال نموده و منجر به تکثیر، مهاجرت و انتشار سریع آن‌ها می‌شوند(۲۷، ۳۹).

علاوه بر تاثیرات پاراکراین، سلول‌های بنیادی مزانشیمی پس از تماس با سلول‌های اندوتلیال، می‌توانند به پریسیت‌ها و سلول‌های عضله صاف تمایز یابند که این سلول‌ها به تثبیت رگ‌های تازه تشکیل شده، کمک می‌کنند. بنابراین تاثیرات پاراکراین و تمایزی سلول‌های بنیادی مزانشیمی در فعال‌سازی رگ‌زایی سلول‌های اندوتلیال و در بلوغ ساختارهای عروقی نقش دارند(۲۷، ۴۰، ۴۱).

مطالعات گذشته نشان می‌دهد که اندازه منافذ موجود در هیدروژل یکی از عوامل موثر بر قطبیت سلول‌های اندوتلیالی و تشکیل عروق خونی است. در واقع سلول‌های اندوتلیالی در شرایطی که قطبیت خود را از دست می‌دهند به شکل سلول‌های مکعبی با هسته های گرد در هیدروژل قابل مشاهده می‌باشند(۳۶). در حالی که، مشاهده شده است که با ایجاد قطبیت در سلول‌های اندوتلیالی این سلول‌ها همزمان با ایجاد عروق خونی و پوشاندن دیواره‌های عروقی به شکل مسطح‌تری در می‌آیند(۳۶).

اگر چه در این مطالعه قطبیت سلول‌های اندوتلیال درون هیدروژل، بررسی نگردید، اما مورفولوژی مسطح سلول‌هایی که در امتداد لومن‌های عروقی مشاهده شد، ممکن است نشان دهنده حفظ قطبیت سلول‌های اندوتلیال در داربست‌های کبدی باشد. یکی از عوامل موثر در ایجاد قطبیت سلولی اندازه منافذ هیدروژل است؛ مطالعه قبلی نویسنده مطالعه حاضر نشان داده شد که اندازه منافذ موجود در هیدروژل برابر با ۳۸۲±۷۱ میکرومتر است و این اندازه برای مهاجرت سلول‌ها

[Downloaded from jmums.mazums.ac.ir on 2026-11-27]

مناسب است. علاوه بر این، سایز منافذ موجود در هیدروژل می‌تواند از ایجاد قطبیت در سلول‌های اندوتلیالی حمایت و باعث تشکیل عروق خونی شود(۳۱).

فاکتور CD31 مسئول یکپارچگی اتصالات سلول‌های اندوتلیال است و در تثبیت عروق نیز نقش دارد(۲۷، ۳۰). بیان مارکر CD31 توسط ایمنوهیستوشیمی نشان دهنده بیان این مارکر در سلول‌های اندوتلیالی مسطح پوشاننده عروق خونی نابالغ بود. همان طور که قبلا ذکر شد، یکی از فاکتورهای موثر در افزایش تراکم عروق خونی در گروه هم کشتی، تمایز سلول‌های بنیادی مزانشیمی به پریسیت‌های دور عروقی است. بنابراین یان ژن *α-sma* به عنوان فاکتوری که در پریسیت‌ها بیان شده و موجب حمایت از سلول‌های اندوتلیالی و تثبیت عروق خونی می‌شود؛ نیز مورد ارزیابی قرار گرفت. این ژن یعنی *α-sma* مربوط به فیلامنت‌های انقباضی بوده که عملکرد انقباضی عروق را نیز انجام می‌دهند(۴۲). نتایج حاصل نشان داد بیان این ژن در گروه هم کشتی به‌صورت معنی‌داری بالاتر از گروه کنترل بود. همچنین بیان پروتئین α-sma نیز در گروه هم کشتی توسط ایمنوهیستوفلورسنت تایید شد. شواهد موجود نشان دهنده تمایز سلول‌های بنیادی مزانشیمی به پریسیت‌ها است. بنابراین یکی از دلایل احتمالی افزایش تراکم عروقی در گروه هم کشتی علاوه بر تاثیرات پاراکراینی سلول‌های بنیادی مزانشیمی، تمایز این سلول‌ها به پریسیت‌ها است. این نکته به وضوح نشان می‌دهد که سلول‌های بنیادی مزانشیمی در این مطالعه به پریسیت‌ها تمایز یافته‌اند تا رگ‌زایی را تقویت کرده و از تشکیل ساختارهای لوله‌ای پشتیبانی کنند.

بنابراین، با استفاده از هم کشتی سلول‌های اندوتلیالی و سلول‌های بنیادی مزانشیمی در هیدروژل مشتق از ماتریکس خارج سلولی کبد می‌توان شرایط رگ‌زایی را در ساختارهای ایجاد شده با استفاده از تکنولوژی مهندسی بافت کبد بهبود داد، به نحوی که ایجاد عروق خونی جدید در ساختار تشکیل شده و ارتباط آن با عروق خونی میزبان بعد از پیوند بهبود یابد.

در نتیجه هیدروژل تهیه شده از ماتریکس خارج سلولی کبد پس از سلول زدایی دارای ویژگی‌های شیمیایی و فیزیکی مناسب جهت استفاده در روش‌های مهندسی بافت کبد جهت تولید ساختارهای قابل پیوند است. اندازه منفذ این هیدروژل باعث ایجاد قطبیت در سلول‌های اندوتلیالی جهت تشکیل عروق خونی می‌شود. همچنین تراکم سلولی مناسب جهت رگ‌زایی نیز ۱۰۰ هزار سلول در ۳۰ میکرولیتر مشخص شد. از طرفی هم کشتی سلول‌های اندوتلیالی و سلول‌های بنیادی مزانشیمی باعث تقویت و افزایش تشکیل عروق خونی می‌شود که سلول‌های بنیادی مزانشیمی تاثیرات خود را از طریق مکانیسم‌های پاراکراین و تمایز به پریسیت‌ها اعمال می‌کنند.

سپاسگزاری

نتایج این مطالعه بخشی از یافته های طرح پژوهشی مصوب دانشگاه علوم پزشکی کرمان با کد طرح ۹۹۰۰۰۶۴۲ می باشد. بدین وسیله از معاونت پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی کرمان برای تامین هزینه های این پژوهش تشکر می شود.

References

1. Murray CJ, Lopez AD. Measuring the global burden of disease. N Engl J Med 2013; 369(5): 448-457. PMID: 23902484.
2. Sarin SK, Choudhury A. Acute-on-chronic liver failure: terminology, mechanisms and management. Nat Rev Gastroenterol Hepatol 2016; 13(3): 131-149. PMID: 26837712.
3. Bernal W, Auzinger G, Dhawan A, Wendon J. Acute liver failure. Lancet 2010; 376(9736): 190-201. PMID: 20638564.

[Downloaded from jmums.mazums.ac.ir on 2026-11-27]

4. Kwong A, Kim W, Lake J, Smith J, Schladt D, Skeans M, et al. OPTN/SRTR 2018 annual data report: liver. Am J Transplant 2020; 20: 193-299. PMID: 31898413.
5. Health UDo, Services H. OPTN/SRTR 2012 Annual Data Report—United States Organ Transplantation. Am J Transplant 2014; 14: 1-192. PMID: 24373166.
6. Merion RM, Pelletier SJ, Goodrich N, Englesbe MJ, Delmonico FL. Donation after cardiac death as a strategy to increase deceased donor liver availability. Ann Surg 2006; 244(4): 555-562. PMID: 16998364.
7. Croce S, Cobianchi L, Zoro T, Dal Mas F, Icaro Cornaglia A, Lenta E, et al. Mesenchymal stromal cell on liver decellularised extracellular matrix for tissue engineering. Biomedicines 2022; 10(11): 2817. PMID: 36359336.
8. Gao Y, Gadd VL, Heim M, Grant R, Bate TS, Esser H, et al. Combining human liver ECM with topographically featured electrospun scaffolds for engineering hepatic microenvironment. Sci Rep 2024; 14(1): 23192. PMID: 39369012.
9. Bilir BM, Guinette D, Karrer F, Kumpe DA, Krysl J, Stephens J, et al. Hepatocyte transplantation in acute liver failure. Liver Transpl 2000; 6(1): 32-40. PMID: 10648575.
10. Nussler A, Konig S, Ott M, Sokal E, Christ B, Thasler W, et al. Present status and perspectives of cell-based therapies for liver diseases. J Hepatol 2006; 45(1): 144-159. PMID: 16730092.
11. O'Donoghue K, Fisk NM. Fetal stem cells. Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol 2004; 18(6): 853-875. PMID: 15582543.
12. Nicolas C, Wang Y, Luebke-Wheeler J, Nyberg SL. Stem cell therapies for treatment of liver disease. Biomedicines 2016; 4(1): 2. PMID: 28536370.
13. Ibars EP, Cortes M, Tolosa L, Gómez-Lechón MJ, López S, Castell JV, et al. Hepatocyte transplantation program: Lessons learned and future strategies. World J Gastroenterol 2016; 22(2): 874. PMID: 26811633.
14. Badylak SF, Taylor D, Uygun K. Whole-organ tissue engineering: decellularization and recellularization of three-dimensional matrix scaffolds. Annu Rev Biomed Eng 2011; 13(1): 27-53. PMID: 21417722.
15. Baptista PM, Orlando G, Mirmalek-Sani S-H, Siddiqui M, Atala A, Soker S, editors. Whole organ decellularization-a tool for bioscaffold fabrication and organ bioengineering. Annu Int Conf IEEE Eng Med Biol Soc 2009; 2009: IEEE. PMID: 19964173.
16. Uygun BE, Soto-Gutierrez A, Yagi H, Izamis M-L, Guzzardi MA, Shulman C, et al. Organ reengineering through development of a transplantable recellularized liver graft using decellularized liver matrix. Nat Med 2010; 16(7): 814-820. PMID: 20543851.
17. Abazari MF, Soleimanifar F, Enderami SE, Nasiri N, Nejati F, Mousavi SA, et al. Decellularized amniotic membrane scaffolds improve differentiation of iPSCs to functional hepatocyte-like cells. J Cell Biochem 2020; 121(2): 1169-1181. PMID: 31464024.
18. Meyer SR, Nagendran J, Desai LS, Rayat GR, Churchill TA, Anderson CC, et al. Decellularization reduces the immune response to aortic valve allografts in the rat. J Thorac Cardiovasc Surg 2005; 130(2): 469-476. PMID: 16077415.
19. Sánchez-Romero N, Sainz-Arnal P, Pla-Palacín I, Dachary PR, Almeida H, Pastor C, et al. The role of extracellular matrix on liver stem cell fate: A dynamic relationship in

[Downloaded from jmums.mazums.ac.ir on 2026-11-27]

health and disease. Differentiation 2019; 106: 49-56. PMID: 30878881.

20. Fitzpatrick E, Mitry R, Dhawan A. Human hepatocyte transplantation: state of the art. J Intern Med 2009; 266(4): 339-357. PMID: 19765179.
21. Lee JS, Shin J, Park H-M, Kim Y-G, Kim B-G, Oh J-W, et al. Liver extracellular matrix providing dual functions of two-dimensional substrate coating and three-dimensional injectable hydrogel platform for liver tissue engineering. Biomacromolecules 2014; 15(1): 206-218. PMID: 24350561.
22. Ijima H, Nakamura S, Bual RP, Yoshida K. Liver-specific extracellular matrix hydrogel promotes liver-specific functions of hepatocytes in vitro and survival of transplanted hepatocytes in vivo. J Biosci Bioeng 2019; 128(3): 365-372. PMID: 30935781.
23. Kasravi M, Ahmadi A, Babajani A, Mazloomnejad R, Hatamnejad MR, Shariatzadeh S, et al. Immunogenicity of decellularized extracellular matrix scaffolds: a bottleneck in tissue engineering and regenerative medicine. Biomater Res 2023; 27(1): 10.
24. Agarwal T, Narayan R, Maji S, Ghosh SK, Maiti TK. Decellularized caprine liver extracellular matrix as a 2D substrate coating and 3D hydrogel platform for vascularized liver tissue engineering. J Tissue Eng Regen Med 2018; 12(3): e1678-e1690. PMID: 29052367.
25. Park K-M, Hussein KH, Hong S-H, Ahn C, Yang S-R, Park S-M, et al. Decellularized liver extracellular matrix as promising tools for transplantable bioengineered liver promotes hepatic lineage commitments of induced pluripotent stem cells. Tissue Eng Part A 2016; 22(5-6): 449-460. PMID: 26801816.
26. Yang C, Han B, Cao C, Yang D, Qu X, Wang X. An injectable double-network hydrogel for the co-culture of vascular endothelial cells and bone marrow mesenchymal stem cells for simultaneously enhancing vascularization and osteogenesis. J Mater Chem B 2018; 6(47): 7811-7821.
27. Sun W, Motta A, Shi Y, Seekamp A, Schmidt H, Gorb SN, et al. Co-culture of outgrowth endothelial cells with human mesenchymal stem cells in silk fibroin hydrogels promotes angiogenesis. Biomed Mater 2016; 11(3): 035009. PMID: 27271291.
28. Krawczenko A, Klimczak A. Adipose tissue-derived mesenchymal stem/stromal cells and their contribution to angiogenic processes in tissue regeneration. Int J Mol Sci 2022; 23(5): 2425. PMID: 35269568.
29. Gökçinar-Yagci B, Özyüncü Ö, Çelebi-Saltik B. Isolation, characterisation and comparative analysis of human umbilical cord vein perivascular cells and cord blood mesenchymal stem cells. Cell Tissue Bank 2016; 17: 345-352. PMID: 26679930.
30. Liu J, Chuah YJ, Fu J, Zhu W, Wang D-A. Co-culture of human umbilical vein endothelial cells and human bone marrow stromal cells into a micro-cavitary gelatin-methacrylate hydrogel system to enhance angiogenesis. Mater Sci Eng C 2019; 102: 906-916. PMID: 31147062.
31. Saheli M, Sepantafar M, Pournasr B, Farzaneh Z, Vosough M, Piryaei A, et al. Three-dimensional liver-derived extracellular matrix hydrogel promotes liver organoids function. J Cell Biochem 2018; 119(6): 4320-4333. PMID: 29247536.

[Downloaded from jmums.mazums.ac.ir on 2026-11-27]

32. Okaji Y, Tsuno NH, Kitayama J, Saito S, Takahashi T, Kawai K, et al. A novel method for isolation of endothelial cells and macrophages from murine tumors based on Ac-LDL uptake and CD16 expression. J Immunol Methods 2004; 295(1-2): 183-193. PMID: 15627623.
33. Müller AM, Hermanns MI, Skrzynski C, Nesslinger M, Müller K-M, Kirkpatrick CJ. Expression of the endothelial markers PECAM-1, vWf, and CD34 in vivo and in vitro. Exp Mol Pathol 2002; 72(3): 221-229. PMID: 12009786.
34. Shafiei G, Saheli M, Ganjalikhan-Hakemi S, Haghpanah T, Nematollahi-Mahani SN. Administration of adipose-derived mesenchymal stem cell conditioned medium improves ovarian function in polycystic ovary syndrome rats: involvement of epigenetic modifiers system. J Ovarian Res 2023; 16(1): 238. PMID: 38102694.
35. Yadav CJ, Yadav U, Afrin S, Lee J-Y, Kamel J, Park K-M. Heparin Immobilization Enhances Hemocompatibility, Re-Endothelization, and Angiogenesis of Decellularized Liver Scaffolds. Int J Mol Sci 2024; 25(22): 12132. PMID: 39596200.
36. Meng F, Almohanna F, Altuhami A, Assiri AM, Broering D. Vasculature reconstruction of decellularized liver scaffolds via gelatin-based re-endothelialization. J Biomed Mater Res A 2019; 107(2): 392-402. PMID: 30508280.
37. Rao RR, Peterson AW, Ceccarelli J, Putnam AJ, Stegemann JP. Matrix composition regulates three-dimensional network formation by endothelial cells and mesenchymal stem cells in collagen/fibrin materials. Angiogenesis 2012; 15: 253-264. PMID: 22382584.
38. Zhang X, Li J, Ye P, Gao G, Hubbell K, Cui X. Coculture of mesenchymal stem cells and endothelial cells enhances host tissue integration and epidermis maturation through AKT activation in gelatin methacryloyl hydrogel-based skin model. Acta Biomater 2017; 59: 317-326. PMID: 28684336.
39. Baudequin T, Naudot M, Dupont S, Testelin S, Devauchelle B, Bedoui F, et al. Donor variability alters differentiation and mechanical cohesion of tissue-engineered constructs based on human endothelial/stem cells co-culture. Authorea Preprints. 2024. PMID: 34643146.
40. Wang G, Cui Y, Leng Y, Sun S, Yuan B, Liu H, et al. Engineered three-dimensional bioactive scaffold for enhanced bone regeneration through modulating transplanted adipose derived mesenchymal stem cell and stimulating angiogenesis. Front Bioeng Biotechnol 2024; 12: 1342590. PMID: 38344289.
41. Wicaksono S, Nugraha AP, Rahmahani J, Rantam FA, Kuncorojakti S, Susilowati H, et al. Adipose mesenchymal stem cell metabolites oral gel enhances pro-angiogenic factors expression, angiogenesis, and clinical outcome of oral ulcer rat model. Eur J Dent 2024; 18(1): 117-123. PMID: 36963426.
42. Rønnov-Jessen L, Petersen OW. A function for filamentous alpha-smooth muscle actin: retardation of motility in fibroblasts. J Cell Biol 1996; 134(1): 67-80. PMID: 8698823.

[Downloaded from jmums.mazums.ac.ir on 2026-11-27]