



CrossMarck



10.66224/ismj.28.6.950

The Effect of Alcoholic Extract of *Aphanizomenon Flos-aqua* Algae on the Adhesion and Survival of Human Mesenchymal Stem Cells Cultured on Polycaprolactone/ Gelatin Composite Scaffold

Houssein Ahmadi ¹ , Zahra Akbari ², Mahdi Mohammadi ³, Banafshe Esmailzade ¹, Iman Hemmatjou ⁴, Maria Zahiri ^{1,5*}

¹ Department of Anatomical Sciences, School of Medical Sciences, Bushehr University of Medical Sciences, Bushehr, Iran

² Department of Physiology, School of Medicine, Bushehr University of Medical Sciences, Bushehr, Iran

³ School of Persian Gulf Research Institute, Department of Biotechnology, University of Persian Gulf, Bushehr, Iran

⁴ Student Research Committee, Bushehr University of Medical Sciences, Bushehr, Iran

⁵ The Persian Gulf Marine Biotechnology Research Center, The Persian Gulf Biomedical Sciences Research Institute, Bushehr University of Medical Sciences, Bushehr, Iran

Abstract

Background: Mesenchymal stem cells (MSCs) are promising candidates for tissue engineering due to their differentiation potential and ability to secrete growth factors. However, poor survival and proliferation of these cells after transplantation remain a significant challenge. *Aphanizomenone flos-aqua* (AFA), a green alga, exhibits antioxidant, anti-inflammatory and anti-apoptotic properties. Biodegradable scaffolds with their permeability and water absorption properties provide a suitable platform for cell attachment.

Materials and Methods: First, a scaffold was made according to the protocol. Cells derived from bone marrow waste were separated and cultured, and used at passage three. The groups studied included: a control group without treatment (Control), an MSCs group treated with AFA extract, an MSCs group loaded on the scaffold (PCL/GEL), and an MSCs group loaded on the scaffold with AFA extract (PCL/GEL/AFA). Scanning electron microscope images were used to examine cell attachment on the scaffold. Cell viability and proliferation were determined by the MTT method in each group.

Results: The scaffold's water absorption and permeability were confirmed. Flow cytometry was positive for CD90, CD73 and CD105 markers and negative for CD44, CD20, CD14 and CD34 markers. Morphological examination revealed a uniform and porous structure. After 72 hours of culture, a significant enhanced cell attachment and proliferation was observed in the groups with scaffolds ($P < 0.05$). Furthermore, a significant increase in cell survival and proliferation was also observed in the groups treated with AFA alcoholic extract ($P < 0.05$). The combination of AFA and PCL/Gel scaffold resulted in significantly higher cell proliferation and survival compared with all other groups ($P < 0.05$).

Conclusion: Our findings suggest that the combination of PCL/Gel nanocomposite and AFA improved the adhesion and survival of human mesenchymal stem cells. Further research is warranted to optimize efficacy of AFA and scaffold design.

Keywords:

Aphanizomenon flos
Algae
Mesenchymal stem cells
Polycaprolactone
Proliferation
Scaffold

*Corresponding author

Maria Zahiri
m.zahiri@bpums.ac.ir

Ethical code

IR.BPUMS.REC.1398.048

Received: 2025/12/09
Accepted: 2026/05/09



بررسی اثرات عصاره الکلی جلبک آفانیزومنون فلوس- آکوا بر میزان چسبندگی و بقای سلول‌های بنیادی مزانشیمی انسانی کشت شده روی داربست کامپوزیتی پلی کاپرولاکتون / ژلاتین

حسین احمدی^۱، زهرا اکبری^۲، مهدی محمدی^۳، بنفشه اسمعیل‌زاده^۱، ایمان همت‌جو^۴، ماریا ظهیری^۱ ^۱id

^۱ گروه علوم تشریحی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی بوشهر، بوشهر، ایران

^۲ گروه فیزیولوژی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی بوشهر، بوشهر، ایران

^۳ مؤسسه تحقیقاتی خلیج فارس، گروه زیست فناوری، دانشگاه خلیج فارس، بوشهر، ایران

^۴ کمیته تحقیقات دانشجویی، دانشگاه علوم پزشکی بوشهر، بوشهر، ایران

^۵ مرکز تحقیقات زیست فناوری دریایی خلیج فارس، پژوهشکده علوم زیست پزشکی خلیج فارس، دانشگاه علوم پزشکی بوشهر، بوشهر، ایران

چکیده

زمینه: سلول‌های بنیادی مزانشیمی (MSCs) به دلیل پتانسیل تمایز و توانایی ترشح فاکتورهای رشد، گزینه مناسبی در مهندسی بافت هستند. با این حال، بقا و تکثیر ضعیف این سلول‌ها پس از پیوند، یکی از چالش‌ها است. آفانیزومنون فلوس-آکوا (AFA) نوعی جلبک سبز است که خواص آنتی‌اکسیدانی، ضدالتهابی و ضدآپوپتوزی برای سلول‌ها دارد. داربست‌های زیست‌تخریب‌پذیر با خواص نفوذپذیری و جذب آب خود، گزینه مناسبی برای اتصال سلول‌ها به خود هستند.

مواد و روش‌ها: ابتدا داربست طبق پروتکل ساخته شد. سلول‌ها از ضایعات مغز استخوان گرفته، جدا و کشت داده شدند و در پاساژ سوم سلول‌ها استفاده شدند. گروه‌های مورد مطالعه شامل: گروه کنترل بدون تیمار (کنترل)، گروه سلول‌های بنیادی با عصاره (AFA) (AFA)، سلول‌های بنیادی بارگذاری شده روی داربست (PCL/GEL)، سلول‌های بنیادی بارگذاری شده روی داربست با عصاره (PCL/GEL/AFA) بودند. از تصاویر میکروسکوپ الکترونی روبشی برای بررسی اتصال سلول‌ها روی داربست استفاده شد. زیستایی و تکثیر سلول‌ها در هر یک از گروه‌های طراحی شده با روش MTT تعیین شد.

یافته‌ها: جذب آب و نفوذپذیری داربست تأیید شد. فلوسایتومتری برای نشانگرهای CD90، CD73، CD105، CD44، CD20، CD34، CD14 منفی بود. آزمایش مورفولوژیکی نشان داد که مثبت و برای نشانگرهای CD14، CD34، CD20، CD44 منفی بود. آزمایش مورفولوژیکی نشان داد که داربست دارای ساختار یکنواخت و متخلخل است. پس از ۷۲ ساعت کشت، میزان اتصال و تکثیر سلولی در گروه‌های دارای داربست به طور قابل توجهی بالاتر بود ($P < 0.05$). در این زمان، افزایش قابل توجهی در بقا و تکثیر سلولی در گروه‌هایی که از عصاره الکلی AFA استفاده کرده بودند نیز مشاهده شد ($P < 0.05$). در گروه AFA همراه با داربست PCL/Gel، تکثیر و بقای سلولی به طور قابل توجهی بیشتر از سایر گروه‌ها بود ($P < 0.05$).

نتیجه‌گیری: بر اساس نتایج این مطالعه، به نظر می‌رسد ترکیب نانوکامپوزیت PCL/Gel و AFA چسبندگی و بقای سلول‌های بنیادی مزانشیمی انسان را بهبود بخشیده است. مطالعات تحقیقاتی بیشتری برای تعیین اثربخشی بهینه AFA و داربست مورد نیاز است.

واژگان کلیدی

افانیزومنون فلوس

جلبک

سلول‌های بنیادی مزانشیمی

پلی‌کاپرولاکتون

تکثیر

داربست

*نویسنده مسئول

ماریا ظهیری

m.zahiri@bpums.ac.ir

کد اخلاق

IR.BPUMS.REC. ۱۳۹۸.۰۴۸



دریافت: ۱۴۰۴/۰۹/۱۸

پذیرش: ۱۴۰۵/۰۲/۲۹

پیام کلیدی: عصاره جلبک آفانیزومنون فلوس- آکوا به همراه داربست پلی کاپرولاکتون / ژلاتین چسبندگی و بقای سلول‌های بنیادی مزانشیمی را افزایش می‌دهد.

مقدمه

به دنبال آسیب‌های بافتی محدود، سلول‌های بنیادی بافت آسیب دیده بطور محدود توانایی بازسازی را دارند. ولی در آسیب‌های شدید بافتی به دنبال بیماری، صدمات فیزیکی و غیره. این سلول‌ها توانایی خود در تکثیر و بازسازی را از دست می‌دهند. به منظور ترمیم بافت آسیب دیده می‌توان با کمک مهندسی بافت یک بافت شبیه بافت آسیب دیده ایجاد کرد (۱). مهندسی بافت^۱ رشته‌ای چند تخصصی است که با بکارگیری اصول مهندسی و زیستی قادر به تولید جایگزین‌های زیستی با هدف بازگرداندن، حفظ و یا بهبود عملکرد یک بافت یا یک ارگان می‌باشد (۲). بازسازی بافت به سه عامل سلول، فاکتور رشد و داربست نیاز دارد که داربست به عنوان قالب برای رشد و تکثیر سلول‌ها عمل می‌کند و شامل شبکه پیچیده‌ای از نانو الیاف می‌باشد (۳). نانوالیاف مصنوعی نقش ماتریکس خارج سلولی را ایفا می‌کنند و هر چه ساختار این داربست به نمونه‌های طبیعی شباهت بیشتری داشته باشد، تعامل سلول‌ها با آن به شکل مطلوب‌تری صورت می‌گیرد (۴). این نانوالیاف با روش‌های گوناگون تولید می‌شوند و لازم است ویژگی‌هایی همچون زیست‌تخریب‌پذیری، تخلخل مناسب و سازگاری بافتی را دارا باشند تا محیطی فراهم شود که سلول‌ها بتوانند به‌خوبی رشد و تکثیر پیدا کنند (۵).

سلول‌های بنیادی مزانشیمی (MSCs)، سلول‌های چند توانی هستند که می‌توانند به انواع مختلف سلول‌های مزودرمی نظیر سلول‌های غضروف، چربی، استخوان؛ عصب و غیره متمایز شوند (۶). سلول‌های بنیادی مزانشیمی مشتق از مغز استخوان (BM-MSCs) یکی از انواع سلول‌های بنیادی مزانشیمی می‌باشند که نقش مهمی در ترمیم بافت‌ها و تعدیل سیستم ایمنی و کاهش التهاب دارند (۷). عملکرد سلول‌های بنیادی تحت تأثیر سیگنال‌هایی است که به واسطه ترکیبات

بیوشیمیایی و فاکتورهای رشد ریز محیط اطرافشان به آن‌ها می‌رسد (۸). علیرغم واقعیت حضور سلول‌های بنیادی مزانشیمی در بافت افراد بزرگسال، توان این سلول‌ها با افزایش سن و همچنین در شرایط داخل آزمایشگاهی و در طول مدت کشت به دلایل پیری سلول‌ها و عدم ثبات ژنتیکی و اپی‌ژنتیکی و غیره. کاهش می‌یابد (۹). همچنین پیوند این سلول‌ها به بافت دچار ضایعه بدلیل عدم استقرار مناسب ناکارآمد است و نیاز به یک داربست برای حفظ پیوند سلول ضروری می‌باشد (۵). داربست‌ها چه به‌صورت طبیعی یا مصنوعی بایستی با داشتن ویژگی‌های خاص، محیطی مناسب برای ارسال و دریافت سیگنال‌های زیستی فراهم کنند تا سلول‌های مزانشیمی بتوانند با انواع پروتئینی که دارند به این ساختارها متصل شوند و عملکرد خود را نشان دهند (۱۰). مطالعات گسترده‌ای باید صورت گیرد تا کارآزمایی یک داربست در فاز انسانی مشخص شود (۱۱). پلی‌کاپرولاکتون، به‌عنوان یک پلی‌استرالیفاتیک مصنوعی مورد تأیید نهادهای نظارتی معتبر دنیا قرار گرفته است. مطالعه‌ای نشان داده است که داربست پلی‌کاپرولاکتون سبب افزایش بقای سلول‌ها و افزایش تمایز به کندروسیت شده است (۱۲). الیاف الکتروریسی شده پتانسیل بالایی جهت افزایش تعامل بین سلول‌ها و داربست از خود نشان داده‌اند (۱۳).

آفانیزومنون فلوس- آکوآ (AFA) گونه‌ای از جلبک‌های سبز می‌باشد که دارای ترکیبات متعددی است که می‌توان اثرات ضد التهابی، کنترل کننده سیستم ایمنی و فعالیت آنتی اکسیدانی قوی آن را برشمرد (۱۴). بعلاوه دارای خواص ضد ویروسی، ضد پیری، ضد انعقادی و محافظتی برای سلول‌های اندوتلیال و کاهش دهنده قند خون می‌باشد (۱۵ و ۱۶). گزارشاتی مبنی بر فعالیت آنتی اکسیدانتی بهبود دهنده این جلبک بر میزان اپوپتوز، استرس اکسیداتیو و عملکرد

¹ -Tissue engineering

۲ ساعت در اتانول ۷۰ درصد غوطه‌ور شدند تا استریل گردند. پس از توزین (W0)، در پلیت‌های حاوی ۶ میلی‌لیتر محیط کشت قرار داده شده و به مدت ۱۸ روز در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد انکوبه شدند. هر سه روز محیط کشت تعویض و نمونه‌ها توزین شدند (Wt). تغییر کاهش وزنی داربست‌ها بعنوان تخریب داربست ارزیابی شدند. این آزمایش سه بار تکرار و نتایج به صورت میانگین ارائه شدند. درصد تخریب از طریق فرمول زیر محاسبه گردید. فرمول ۱:

$$\text{Degradation \%} = (W0 - Wt) / W0 \times 100$$

بررسی میزان جذب آب داربست

به منظور مطالعه میزان جذب آب داربست‌ها با ابعاد ۱×۱ سانتی‌متری برش داده و توزین شدند. این وزن به عنوان W0 لحاظ شد. هر نمونه ۲۰ روز در مایع شبیه‌سازی شده (Gibco)، (Phosphate Buffered Saline) (PBS) با Ph ۷/۲ در دمای اتاق غوطه‌ور شد. سپس نمونه‌ها توزین شدند و این وزن به عنوان W1 لحاظ شد. این آزمایش سه بار تکرار و نتایج به صورت میانگین ارائه شدند. درصد جذب آب هر نمونه با فرمول زیر محاسبه گردید. فرمول ۲:

$$\text{Water uptake (\%)} = (W1 - W0) / W0 \times 100$$

بررسی‌های ریخت‌شناسی و تعیین اندازه قطر الیاف داربست

از بهترین روش‌ها برای بررسی ریخت‌شناسی و اندازه الیاف استفاده از میکروسکوپ الکترونی روبشی (SEM) است (۲۲). بدین‌منظور ابتدا نمونه‌ها به مدت ۵ دقیقه با یون‌های طلا پوشش داده شدند و سپس به کمک میکروسکوپ الکترونی (USA، Nova) تصویربرداری شد. برای اندازه‌گیری قطر نانوالیاف از نرم‌افزار آنالیز تصویر (ImageJ، NIH) ویرایش ۱/۵۴ استفاده شد (۲۲).

میتوکندری در مدل‌های الزایمری ارائه شده است (۱۷-۱۹). همچنین با مهار Nuclear factor (NFkB) kappa-light-chain-enhancer of activated B cells و مهار فعال‌سازی IL-6، IL-1β سبب کاهش التهاب در سلول‌ها می‌شود (۲۰). هدف از مطالعه حاضر ساخت و ارزیابی داربست کامپوزیتی پلی‌کاپرولاکتون الکترونیسی شده بود و بقای سلول‌های بنیادی مشتق از چربی انسانی در حضور AFS بر روی آن مورد بررسی قرار گرفت.

مواد و روش‌ها

نحوه‌ی ساخت داربست کامپوزیتی پلی‌کاپرولاکتون الکترونیسی شده

این مطالعه با کد اخلاق ۰۴۸. ۱۳۹۸ IR.BPUMS.REC در معاونت پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی بوشهر مورد تصویب قرار گرفت. محلول الکترونیسی با پودر پلی‌کاپرولاکتون (Sigma Aldrich، Mw ~ ۷۰/۰۰۰-۹۰/۰۰۰ Da) و ژلاتین (Type B Sigma Aldrich) به نسبت ۳ به ۱ در ۵ سی‌سی HFIP^۲ تهیه شد و بر روی همزن مغناطیسی با دمای ۴۰ درجه سانتی‌گراد و دور ۶۰۰ RPM به مدت ۲۴ ساعت هم زده شد تا کاملاً حل شده و تعلیق پایداری شکل گیرد. سپس ۵ میلی‌لیتر از محلول پلیمری تهیه شده به سرنگ دستگاه الکترونیسی منتقل گردید.

(Genefanavar nanomeghyas، Iran) سوزن سرنگ به جریان ولتاژ بالا متصل شد و ولتاژ آن معادل ۲۰ کیلوولت تنظیم شد. فاصله نازل تا جمع‌کننده ۲۰ سانتی‌متر و نرخ تخلیه ۰/۳ میلی‌متر بر ساعت تنظیم گردید. جهت تمرکز الیاف بر روی صفحه جمع‌کننده بقیه قسمت‌های صفحه به جز مکانی که برای تجمع داربست مد نظر بود عایق شد (۲۱).

سنجش زیست تخریب‌پذیری داربست

مطالعه میزان زیست تخریب‌پذیری داربست در محیط کشت DMEM (Gibco) در pH ۷/۲ و در محیط آزمایشگاه انجام گرفت. داربست‌ها با اندازه‌های ۱×۱ سانتی‌متری برش داده شده و به مدت

^۲- Hexafluoroisopropanol (HFIP)

آماده‌سازی عصاره AFA

عصاره الکلی AFA اهدایی گروه بیوتکنولوژی دریایی دانشگاه خلیج فارس بوشهر در گروه مربوطه مورد استخراج قرار گرفت. شیوه جداسازی به صورت خلاصه به این ترتیب بود که جلبک در اتانول ۷۰ درصد حل شد و برای ۴۰ ثانیه ورتکس شد و به مدت ۲ ساعت در ۲۵ درجه سانتی‌گراد انکوبه گردید. عصاره در دور ۱۰۰۰ RPM به مدت ۲ دقیقه سانتریفیوژ شده و بخش رویی جمع‌آوری گردید. این روند ۳ بار تکرار شده و در نهایت مایع رویی جمع‌آوری و خشک گردید. سپس عصاره خشک شده توزین شده و در زمان مصرف مجدداً در آب مقطر حل و با فیلتر سر سرنگی ۰/۲۲ میکرون ضد عفونی شد و برای آزمایش‌های کشت سلول استفاده گردید (۲۳).

جداسازی و آماده‌سازی سلول‌های بنیادی مزانشیمی

سلول‌های بنیادی مزانشیمی از نمونه‌های دور ریز و آغشته به خون مربوط به آسپیراسیون مغز استخوان که با اهداف تشخیصی و درمانی انجام می‌شدند، دریافت گردید. نمونه سریعاً به آزمایشگاه منتقل شده و به ازای ۵ میلی‌لیتر خون، ۵ میلی‌لیتر محیط کشت DMEM (Eagles Medium Gibco, Germany) حاوی ۱۵ درصد سرم جنین گاوی (Germany)، ۱۰۰ (Fetal Bovine Serum: FBS, Gibco)، بین‌المللی آنتی‌بیوتیک پنی‌سلین^۳ (Germany)، و ۱۰۰ واحد بین‌المللی استرپتومایسین^۴ (Gibco, Germany) افزوده شد. به فاصله سه ساعت بعد از کشت، محیط کشت سلول‌ها به آرامی تعویض گردید. در ادامه در یک دوره ۷۲ ساعته، هر هشت ساعت یک بار محیط کشت سلول‌ها تعویض گردید. به مدت دو هفته، هر سه روز یکبار محیط کشت سلول‌ها تعویض شد و در پایان این مدت، پاساژ سوم انجام گرفت. بدین ترتیب که با استفاده از تریپسین ۰/۲۵ درصد^۵

(Gibco, Germany) سلول‌ها از کف فلاسک جدا و در پلیت‌های شش خانه کشت داده شدند. سلول‌های جدا شده از محیط کشت تحت عنوان پاساژ سوم از نظر ویژگی‌های تمایزی و مارکرهای سطح سلولی مورد بررسی قرار گرفتند (۲۴).

تأیید ماهیت سلول‌ها با فلوسایتومتری

برای تأیید هویت و منشأ مزانشیمی سلول‌های استخراج شده از مارکرهای سطحی آن‌ها استفاده شد، به طوری که سلول‌های حاصل از پاساژ مورد شناسایی آنتی ژن‌های CD73، CD90، CD105 قرار گرفتند. همچنین مارکرهای هماتوپویتیک CD45، CD34، CD20، CD14 نیز مورد استفاده قرار گرفتند (۲۵) (Exibo, Czech).

شیوه آماده‌سازی سلول‌ها

سلول‌ها به مدت ۴-۵ دقیقه تحت تیمار آنزیمی Trypsin / EDTA قرار گرفته، به آرامی با پیپت کردن سلول‌ها را از هم جدا کرده و سپس با افزودن محیط کشت حاوی سرم، آنزیم خنثی شد. در ادامه سوسپانسیون سلولی به مدت ۴ دقیقه، با دور RPM ۱۵۰۰ سانتریفیوژ شد. محیط رویی را استخراج نموده و سلول‌ها را با PBS بدون کلسیم و منیزیم شستشو داده و مجدد سانتریفیوژ گردید. PBS تخلیه شد و به رسوب سلولی متانول سرد (۴ درجه سانتی‌گراد و غلظت ۹۰ درصد) اضافه گردید. سپس نمونه به مدت ۵ دقیقه و با دور RPM ۱۵۰۰ سانتریفیوژ و سپس PBS به آرامی خارج گردید. سپس آنتی‌بادی‌های فوق برای تعیین هویت سلول‌ها بکار گرفته شد (۲۶). در پایان فلورسنس سلولی با استفاده از دستگاه Becton, Germany (FACS Calibur instrument) (Dikinson) اندازه‌گیری شد.

^۳-Penicillin

^۴-Streptomycin

^۵-Trypsin

بررسی اتصال سلول بر روی داربست به کمک تصاویر SEM

بررسی اتصال سلول‌ها و مورفولوژی آن‌ها بر روی سطح داربست با تصاویر حاصل از میکروسکوپ الکترونی روبشی مطالعه شد. به‌طوری که داربست‌های حاوی سلول‌های کشت داده شده به کمک پارافرمالدئید ۴ درصد به مدت ۲۴ ساعت فیکس شدند و پس از شستشو با آب مقطر و خشک شدن، نمونه‌ها با طلا پوشش داده شده و برای عکسبرداری مهیا شدند (Nova, USA).

گروه‌های مورد مطالعه و کشت سلول‌های بنیادی مزانشیمی مشتق از مغز استخوان بر روی داربست

گروه‌های مورد مطالعه شامل: گروه کنترل بدون تیمار (Control)، گروه سلول‌های بنیادی توأم با عصاره AFA (AFA)، گروه سلول بنیادی لود شده بر روی داربست (PCL/ GEL)، گروه سلول بنیادی لود شده بر روی داربست به همراه عصاره (PCL/ GEL/ AFA) بود. در گروه کنترل، سلول‌های بنیادی مزانشیمی در تراکم 5×10^4 در پلیت‌های ۹۶ خانه همراه با ۱۰۰ میکرولیتر مدیوم حاوی سرم گاوی و آنتی‌بیوتیک Penstrep کشت داده شدند. شرایط در گروه AFA نیز به همین شکل بود؛ با این تفاوت که عصاره الکلی AFA به میزان ۵۰۰ نانوگرم بر میلی‌لیتر نیز به مدیوم سلول‌ها افزوده شد. در هر دو گروه کشت به مدت ۷۲ ساعت در انکوباتور ۳۷ درجه سانتی‌گراد و مقدار CO₂ ۵ درصد ادامه یافت.

در گروه‌های کشت در حضور داربست، ابتدا هر قطعه داربست در ابعادی متناسب با محیط چاهک‌ها (۳/۱ میلی‌لیتر) به مدت ۲ ساعت در اتانول ۷۰ درصد غوطه‌ور گردید. داربست درون چاهک‌های پلیت قرار گرفت و پس از شستشو با PBS به مدت سه ساعت تحت تیمار با PBS در انکوباتور با CO₂ پنج درصد و دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد قرار گرفتند. در مرحله بعد بافر تخلیه شد و سلول‌های بنیادی مزانشیمی

در تراکم 5×10^4 سلول در ۲۰ میکرولیتر به روش چکاندن روی داربست قرار گرفتند و پلیت‌های حاوی داربست به مدت سه ساعت به منظور نفوذ کامل سلول‌ها در انکوباتور قرار گرفت. در گروه PCL/GEL، ۱۰۰ میکرولیتر مدیوم حاوی سرم و آنتی‌بیوتیک استفاده شد و در گروه PCL/ GEL/ AFA، علاوه بر مدیوم مشابه، از عصاره الکلی AFA به میزان ۵۰۰ نانوگرم بر میلی‌لیتر استفاده شد. در این گروه‌ها نیز کشت به مدت ۷۲ ساعت در انکوباتور ۳۷ درجه سانتی‌گراد ادامه یافت (۲۷).

بررسی زنده مانی سلول‌ها در گروه‌های مورد مطالعه

میزان زنده مانی و تکثیر سلول‌ها در هر یک از چهار گروه به روش ارزیابی MTT مورد بررسی قرار گرفت. به این منظور نیم میلی‌لیتر DMEM و ۵۰ میکرولیتر محلول MTT به نمونه‌ها که شامل، داربست، سلول و داربست‌های حاوی سلول اضافه شد و پس از ۴ ساعت انکوباسیون در ۳۷ درجه سانتی‌گراد و در شرایط به دور از نور، محلول قبلی تخلیه شده و به منظور حل شدن بلورهای رسوب یافته فورمازون، نیم میلی‌لیتر DMSO به محلول اضافه شد. پس از گذشت ۲۰ دقیقه میزان جذب نوری در طول موج ۵۷۰ نانومتر توسط دستگاه اسپکتروفتومتر^۶ اندازه‌گیری شد (Dlab, Iran).

تجزیه و تحلیل داده‌ها

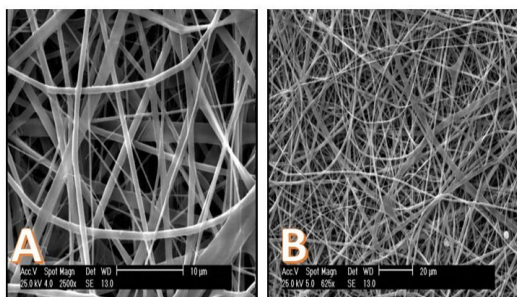
تجزیه و تحلیل آماری نتایج با استفاده از نرم‌افزار SPSS ویرایش ۲۶ صورت گرفت. آزمون آنالیز واریانس یک طرفه (One-Way ANOVA) و به دنبال آن آزمون LSD جهت ارزیابی انجام گرفت. آنالیز بصورت پنج بار تکرار در هر گروه انجام شد و $P < 0.05$ به‌عنوان سطح معنی‌داری بین گروه‌ها در نظر گرفته شد.

یافته‌های نرخ زیست تخریب‌پذیری داربست

شکل ۱ نمایانگر نتایج مربوط به نرخ تخریب داربست در محیط کشت طی هجده روز بررسی می‌باشد. بر

^۶Spectrophotometer

مشاهده می‌گردد داربست ساختار یکنواختی دارد. این امر در روند الکتروریسی اهمیت بسیاری دارد. بررسی قطر الیاف نشان دهنده حضور طیفی از الیاف نانو تا میکرو می‌باشد. بررسی داربست کامپوزیتی حاکی از قرارگیری تصادفی الیاف می‌باشد. همچنانکه در تصویر مشاهده می‌شود داربست کاملاً متخلخل بوده و تخلخل‌ها به هم راه دارند.



شکل ۳. تصاویر حاصل از میکروسکوپ الکترونی روبشی از داربست PCL/GEL در دو بزرگنمایی (A) $\times 2500$ و (B) $\times 625$.
Fig 3. SEM micrographs of the PCL/GEL scaffold acquired at magnifications of $\times 2500$ (A) and $\times 625$ (B).

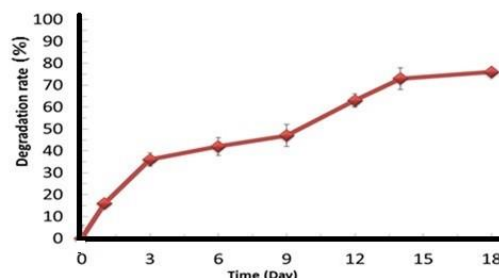
یافته‌های فلوسیتومتری

به‌منظور اثبات ماهیت مزانشیمی سلول‌های کشت داده شده پروفایل آنتی‌ژن‌های سطح سلولی این سلول‌ها بررسی شد. همچنانکه در شکل ۴ دیده می‌شود، این سلول‌ها برای مارکرهای سطحی CD105، CD73، CD90، CD14، CD45، CD20، CD34 منفی بودند.

بررسی اتصال BM-MSCs بر روی داربست و زیست سازگاری داربست

مورفولوژی سلول‌های BM-MSCs را که بر روی داربست نانوکامپوزیتی پلی کاپرولاکتون-ژلاتین کشت داده شده‌اند در شکل ۵ نشان داده شده است. همانطور که مشاهده می‌شود سلول‌های BM-MSCs در حضور AFA، از حالت دوکی شکل به حالت کشیده و گسترده تغییر شکل داده و پخش شدگی بیشتری نسبت به غیاب AFA نشان دادند.

اساس این نمودار بتدریج با گذشت زمان درصد تخریب، به‌طور معنی‌دار افزایش یافت و این تخریب در روز هجده بیشترین مقدار را داشت ($P < 0.05$).

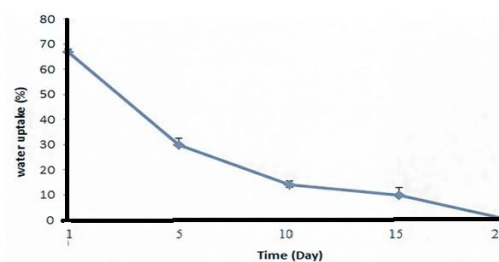


شکل ۱. میزان درصد تخریب داربست در روزهای مختلف قرار گرفتن درون محلول بافر فسفات.

Fig 1. Degradation percentage of the scaffold at different time points during immersion in phosphate-buffered saline.

یافته‌های میزان جذب آب داربست

شکل ۲ نمایانگر توانایی داربست در جذب آب می‌باشد. بر اساس این نمودار داربست در روز نخست بیشترین میزان جذب را نشان داد و به تدریج با افزایش زمان، میزان جذب آب به‌طور معنادار کاهش نشان داد که این کاهش حاکی از پیشرفت روند تخریبی داربست است ($P < 0.05$).

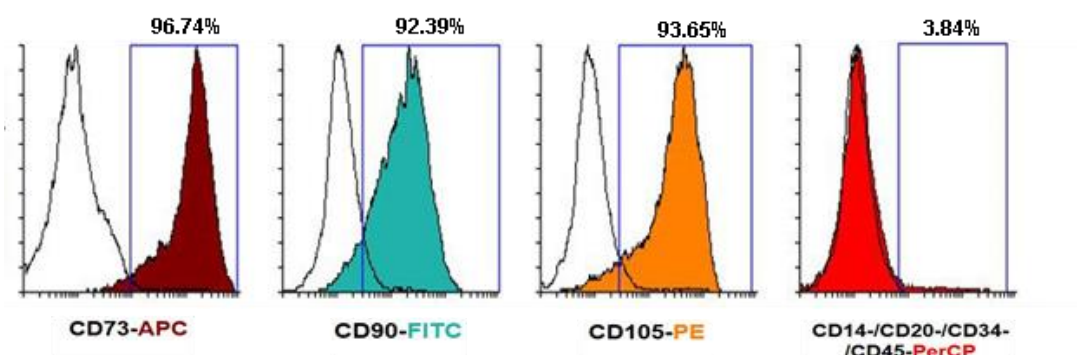


شکل ۲. میزان درصد جذب آب طی ۲۰ روز قرار گرفتن درون محلول بافر فسفات

Fig 2. Percentage of water absorption during 20 days of immersion in phosphate-buffered saline.

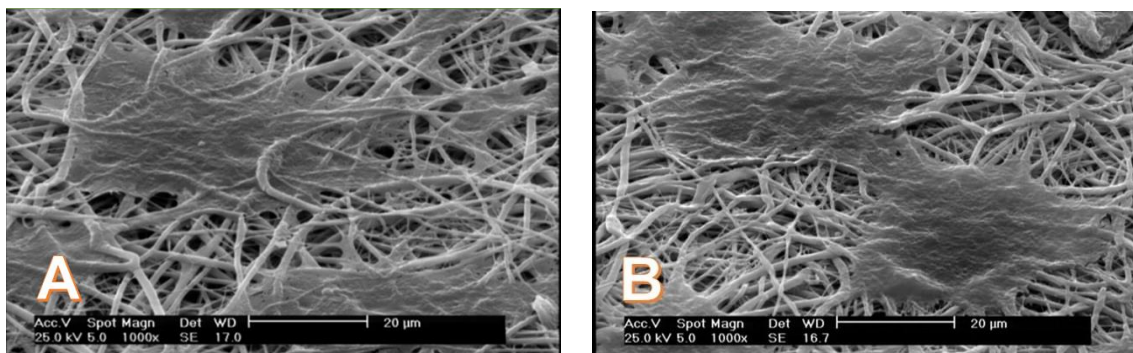
یافته‌های ریخت‌شناسی و تعیین اندازه قطر الیاف داربست

شکل ۳ تصویر میکروسکوپ الکترونی روبشی از داربست‌های نانوفیبری الکتروریسی شده پلی کاپرولاکتون/ژلاتین را نشان می‌دهد. همچنانکه



شکل ۴. آنالیز فلوسیتومتری مارکرهای سطحی سلول‌های بنیادی مزانشیمی مشتق از مغز استخوان انسانی، سلول‌ها برای مارکرهای سطحی CD90، CD73، CD105 مثبت و برای مارکرهای هماتوپوتیک CD14، CD45، CD20، CD34 منفی بودند که نشانگر مزانشیمی بودن سلول‌ها می‌باشد.

Fig 4. Flow cytometric analysis of surface markers in human bone marrow-derived mesenchymal stem cells (hBM-MSCs). The cells were positive for the mesenchymal markers CD90, CD73, and CD105, and negative for the hematopoietic markers CD14, CD45, CD20, and CD34, confirming their mesenchymal phenotype.



شکل ۵. تصاویر میکروسکوپ الکترونی نشان دهنده اتصال BM-MSCs داربست نانوکامپوزیتی الکتروپرسی شده در حضور عصاره الکلی AFA (A) و در غیاب عصاره الکلی (B). بزرگنمایی $\times 1000$

Fig 5. Scanning electron microscope (SEM) images showing the attachment of BM-MSCs to the electrospun nanocomposite scaffold in the presence of AFA alcoholic extract (A) and in the absence of the alcoholic extract (B) at a magnification of $\times 1000$

گروه‌های کشت نسبت به همدیگر در بازه زمانی ۲۴ و ۷۲ ساعت از کشت) و مقایسه بین گروهی (مقایسه نتایج هر گروه کشت در ۷۲ ساعت نسبت به وضعیتی که در ۲۴ ساعت نخست داشته است) مورد بررسی قرار داد.

مقایسه درون گروهی در هر کدام از بازه‌های زمانی نشان دهنده رشد و فعالیت متابولیک سلول‌ها در همه گروه‌های تحت کشت بود. ارزیابی مستقل نتایج در ۲۴ ساعت اولیه و همچنین در ۷۲ ساعت پس از کشت نشان دهنده این بود که وضعیت فعالیت متابولیک سلول‌ها در گروه‌های دارای داربست به طور معنادار

بررسی میزان تکثیر و بقای سلول‌های BM-MSCs در گروه‌های مورد مطالعه

به منظور بررسی تأثیر زیستی عصاره الکلی AFA، رشد و تکثیر سلول‌های بنیادی مزانشیمی انسانی، در شرایط مختلف کشت در قالب ۴ طراحی گروه کنترل (Control)، گروه کشت همراه با عصاره (AFA)، گروه داربست (PCL/Gel) و گروه داربست و عصاره (PCL/Gel/AFA)، در روز نخست کشت و ۷۲ ساعت بعد مورد بررسی قرار گرفت.

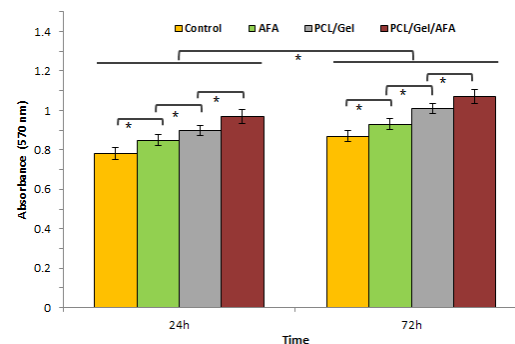
با توجه به شکل ۶ نتایج حاصل از ارزیابی MTT را می‌توان به صورت مقایسه درون گروهی (مقایسه

الکترورسی شده PCL/ Gel پرداخت. یافته‌های این مطالعه نشان داد که داربست مذکور بستر فیزیکی مناسبی را برای چسبندگی و رشد سلول‌های BM- MSCs فراهم می‌کند. این موضوع با مطالعات پیشین که بر زیست سازگاری و بهبود چسبندگی سلولی در کامپوزیت‌های حاوی ژلاتین تأکید داشته‌اند، همخوانی دارد (۲۸ و ۲۹). هارلی (Harley) و همکاران در مطالعه‌ای بیان نمودند در داربست الکترورسی شده کلاژن- گلیکوزامینوگلیکان، سلول‌ها امکان اتصال به سطح را به دلیل همواری سطح داربست دارا بوده و فضای موجود بین الیاف داربست، شرایط مناسبی را برای مبادله مواد غذایی، متابولیت‌ها، گازهای مورد نیاز و حتی حضور سلول‌های بنیادی فراهم می‌نماید (۳۰). ازطرفی در مطالعه حاضر، نتایج مربوط به ارزیابی توان جذب رطوبت داربست حاکی از این است که میزان جذب رطوبت در روزهای ابتدایی بالا و به تدریج روند کاهشی دارد. این روند کاهشی می‌تواند به دلیل پیشروی تخریب و از هم پاشیده شدن ساختار داربست باشد که خود نمایانگر زیست تخریب‌پذیری آن است. جذب آب به واسطه گروه‌های C-O و -OH موجود در داربست می‌باشد که دال بر وجود ارتباط بین این گروه و امکان تأمین محیط مناسبی برای اتصال و رشد سلول می‌باشد (۳۱). که همگی این مطالعات نشان دهنده نقش به سزای داربست PCL/ Gel بر چسبندگی سلول‌های BM- MSCs می‌باشد.

در مطالعه حاضر رشد و بقای سلول‌های BM- MSCs تحت تیمار با AFA نسبت به گروه کنترل افزایش داشت. عوامل مختلف موجود در کشت از جمله فاکتورهای رشد و مولکول‌های پیام‌رسان، برخی مواد مغذی، ویتامین‌ها و فلاونوئیدها می‌توانند نقش مهمی در حفظ خود نوسازی و تحریک تکثیر و تمایز داشته باشند (۲۴ و ۳۲). ترکیبات فنولی و فیکوسیانیین موجود در عصاره AFA می‌توانند با

بالا تر از گروه‌های بدون داربست بود ($P < 0.05$). از میان گروه‌های بدون داربست نیز، فعالیت متابولیک سلول‌ها در گروه دارای عصاره الکلی به طور معنادار بیشتر از گروه کنترل بود ($P < 0.05$).

بعد از گذشت ۷۲ ساعت از کشت، بررسی و مقایسه بین گروهی حاکی از این بود که فعالیت متابولیک سلول‌ها در همه گروه‌ها نسبت به گروه کنترل به طور معنادار افزایش داشت و سلول‌ها در گروه دارای داربست نسبت به گروه بدون داربست و در گروه PCL/Gel/AFA به طور معنادار فعالیت متابولیک و بقای سلول‌ها نسبت به سایر گروه‌ها افزایش داشت ($P < 0.05$). افزایش میزان جذب بیانگر افزایش بقا، تکثیر و فعالیت متابولیک سلول‌هاست.



شکل ۶. فعالیت متابولیک و رشد BM- MSCs در گروه‌های مختلف کنترل (سلول و محیط کشت)، کشت در حضور عصاره (AFA)، کشت بر روی داربست PCL/Gel و کشت بر روی داربست PCL/Gel در حضور عصاره AFA در زمان‌های ۲۴ و ۷۲ ساعت ($P < 0.05$). افزایش میزان جذب بیانگر افزایش بقا، تکثیر و فعالیت متابولیک سلول‌هاست.

Fig 6. Metabolic activity and proliferation of BM- MSCs in different experimental groups, including the control group (cells cultured in medium only), cells cultured in the presence of AFA extract, cells cultured on the PCL/Gel scaffold, and cells cultured on the PCL/Gel scaffold in the presence of AFA extract at 24 and 72 hours ($P < 0.05$). Increased absorbance indicates enhanced cell viability, proliferation, and metabolic activity.

بحث

این مطالعه به بررسی تأثیر عصاره الکلی جلبک AFA بر میزان چسبندگی و بقای سلول‌های BM- MSCs کشت داده شده بر روی داربست نانوکامپوزیتی

خنثی کردن رادیکال‌های آزاد و کاهش مضرات استرس اکسیداتیو در محیط کشت، از اپوپتوز جلوگیری کرده و بقای سلول را افزایش دهند (۳۳). ترکیبات موجود در AFA با تثبیت و افزایش فاکتورهای رشد درون‌زا، مسیرهای سیگنالی که در تکثیر سلولی نقش دارند را تقویت می‌کنند (۳۴). همچنین نشان داده شده است که AFA می‌تواند فاکتورهای التهابی را مهار و زمینه را برای تکثیر سلول‌ها فراهم آورد (۳۳).

در مطالعه حاضر نتایج در گروه PCL/Gel/AFA بقای سلولی نسبت به سایر گروه‌ها به طور معناداری افزایش داشت که می‌توان به نقش هم‌افزایی AFA و PCL/ Gel اشاره کرد. ترکیبات موجود در AFA دارای اثرات آنتی اکسیدانسی و ضدالتهابی و داربست نیز دارای خواص فیزیکی متناسب برای عبور انواع متابولیت‌ها برای سلول می‌باشد.

از طرفی مقایسه بین گروهی جهت بررسی بقای سلولی در گروه‌های ۷۲ ساعت نسبت به گروه‌های ۲۴ ساعت افزایش چشمگیر داشت. توپوگرافی سطح داربست برچسبندگی، گسترش و شکل سلول تأثیر می‌گذارد که این فرایندها به زمان نیاز دارند پس مسلماً زمان ۷۲ ساعت نسبت به زمان ۲۴ عملکرد بهتری دارند (۳۵). از طرفی شواهد نشان می‌دهند که مواد مؤثره جلبک AFA با گذشت زمان فعال و تقویت می‌شوند. فاکتورهای رشد که بقا و تمایز سلول‌ها را تنظیم می‌کنند با افزایش طول زمان بیشتر ترشح می‌شوند و غلظت آن‌ها افزایش یافته در نتیجه یک بازخورد مثبت در سلول‌ها برای تکثیر بیشتر ایجاد می‌کنند (۳۶).

در زمینه کشت سلولی، پس از جداسازی و کشت، سلول‌ها وارد فاز تأخیر در رشد می‌شوند تا با محیط جدید سازگار شوند. پس از این مرحله آن‌ها وارد فاز تکثیری می‌شوند که تکثیر به حداکثر می‌رسد. زمان مورد نیاز برای گذر از فاز تأخیر و ورود به فاز تکثیر حدود ۲۴-۷۲ می‌باشد (۳۷). این شواهد همگی دال بر نتایج بهتر در زمان طولانی‌تر می‌باشد.

از محدودیت‌های مطالعه می‌توان به عدم بررسی دوزهای متفاوت، عدم بررسی بر روی دیگر سلول‌های بنیادی مزانشیمی و عدم شرح مکانیسم مولکولی دقیق عصاره AFA اشاره کرد.

نتیجه‌گیری

ترکیب داربست نانوکومپوزیتی PCL/Gel و AFA یک استراتژی هم‌افزا و مؤثر برای بقا و تکثیر سلول‌های BM-MSCs در کشت کوتاه مدت است. این یافته‌ها پتانسیل بالایی برای استفاده در مهندسی بافت به‌ویژه در شرایطی که نیاز به پیوند سریع بافت می‌باشد ارائه می‌کند.

سپاس و قدردانی

این مقاله برگرفته از طرح پایان نامه دکترای حرفه‌ای رشته پزشکی می‌باشد. نویسندگان این مقاله از معاونت پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی بوشهر برای حمایت مالی از این پروژه تشکر و قدردانی می‌کنند.

تضاد منافع

هیچ‌گونه تعارض منافع توسط نویسندگان بیان نشده است.

References:

1. Veeman D, Sai MS, Sureshkumar P, et al. Additive manufacturing of biopolymers for tissue engineering and regenerative medicine: an overview, potential applications, advancements, and trends. International Journal of Polymer Science 2021; 2021(1): 4907027.. [10.1155/2021/4907027](https://doi.org/10.1155/2021/4907027)
2. Butler DL, Goldstein SA, Guilak F. Functional tissue engineering: the role of biomechanics. J Biomech Eng 2000; 122(6): 570-575. [10.1115/1.1318906](https://doi.org/10.1115/1.1318906)

3. Tan JY, Chua CK, Leong KF, et al. Esophageal tissue engineering: an in-depth review on scaffold design. *Bioengineered* 2012; 109(1): 1-15. [10.1002/bit.23323](https://doi.org/10.1002/bit.23323)
4. Hashemi S. S, Servatkah M, Rafati A. R. The in Vitro Effect of Different Cord Blood Platelet Rich Plasma Concentrations on Proliferation of Dermal Fibroblasts. *Biosci Biotech Res Asia* 2016; 13(3): 1709-1713. [10.13005/bbra/2321](https://doi.org/10.13005/bbra/2321)
5. Meesuk L, Suwanprateeb J, Thammarakcharoen F, et al. Osteogenic differentiation and proliferation potentials of human bone marrow and umbilical cord-derived mesenchymal stem cells on the 3D-printed hydroxyapatite scaffolds. *Sci Rep* 2022; 12(1): 19509. [10.1038/s41598-022-24160-2](https://doi.org/10.1038/s41598-022-24160-2)
6. Su P, Tian Y, Yang C, et al. Mesenchymal Stem Cell Migration during Bone Formation and Bone Diseases Therapy. *Int J Mol Sci* 2018; 19(8): 2343. [10.3390/ijms19082343](https://doi.org/10.3390/ijms19082343)
7. Pittenger MF, Discher DE, Péault BM, et al. Mesenchymal stem cell perspective: cell biology to clinical progress. *NPJ Regen Med* 2019; 4: 22. [10.1038/s41536-019-0083-6](https://doi.org/10.1038/s41536-019-0083-6)
8. Sotiropoulou PA, Perez SA, Salagianni M, et al. Characterization of the optimal culture conditions for clinical scale production of human mesenchymal stem cells. *Stem Cells* 2006; 24(2): 462-471. [10.1634/stemcells.2004-0331](https://doi.org/10.1634/stemcells.2004-0331)
9. Hajhosseinteherani M, Amini A, Heidari M, et al. The Application of Photobiomodulation and Stem Cells Seeded on the Scaffold Accelerates the Wound Healing Process in Mice. *J Lasers Med Sci* 2024; 15: e40. [10.34172/jlms.2024.40](https://doi.org/10.34172/jlms.2024.40)
10. Nashchekina Y, Militsina A, Elokhovskiy V, et al. Precisely Printable Silk Fibroin/Carboxymethyl Cellulose/Alginate Bioink for 3D Printing. *Polymers (Basel)* 2024; 16(8): 1027. [10.3390/polym16081027](https://doi.org/10.3390/polym16081027)
11. Pina S, Ribeiro VP, Marques CF, et al. Scaffolding Strategies for Tissue Engineering and Regenerative Medicine Applications. *Materials (Basel)* 2019; 12(11): 1824. [10.3390/ma12111824](https://doi.org/10.3390/ma12111824)
12. Garrigues NW, Little D, Sanchez-Adams J, et al. Electrospun cartilage-derived matrix scaffolds for cartilage tissue engineering. *J Biomed Mater Res A* 2014; 102(11): 3998-4008. [10.1002/jbm.a.35068](https://doi.org/10.1002/jbm.a.35068)
13. Ginestra P. Manufacturing of polycaprolactone - Graphene fibers for nerve tissue engineering. *J Mech Behav Biomed Mater* 2019; 100: 103387. [10.1016/j.jmbbm.2019.103387](https://doi.org/10.1016/j.jmbbm.2019.103387)
14. Nuzzo D, Presti G, Picone P, et al. Effects of the Aphanizomenon flos-aquae Extract (Klamin®) on a Neurodegeneration Cellular Model. *Oxid Med Cell Longev* 2018; 2018: 9089016. [10.1155/2018/9089016](https://doi.org/10.1155/2018/9089016)
15. Mooberry SL, Leal RM, Tinley TL, et al. The molecular pharmacology of symprostatin 1: a new antimitotic dolastatin 10 analog. *Int J Cancer* 2003; 104(4): 512-521. [10.1002/ijc.10982](https://doi.org/10.1002/ijc.10982)
16. Singh RK, Tiwari SP, Rai AK, et al. Cyanobacteria: an emerging source for drug discovery. *J Antibiot (Tokyo)* 2011; 64(6): 401-412. [10.1038/ja.2011.21](https://doi.org/10.1038/ja.2011.21)
17. Sgarbossa A, Giacomazza D, di Carlo M. Ferulic Acid: A Hope for Alzheimer's Disease Therapy from Plants. *Nutrients* 2015; 7(7): 5764-5782. [10.3390/nu7075246](https://doi.org/10.3390/nu7075246)
18. Picone P, Bondi ML, Montana G, et al. Ferulic acid inhibits oxidative stress and cell death induced by Ab oligomers: improved delivery by solid lipid nanoparticles. *Free Radic Res* 2009; 43(11): 1133-1145. [10.1080/10715760903214454](https://doi.org/10.1080/10715760903214454)
19. Picone P, Nuzzo D, Di Carlo M. Ferulic acid: a natural antioxidant against oxidative stress induced by oligomeric A-beta on sea urchin embryo. *Biol Bull* 2013; 224(1): 18-28. [10.1086/BBLv224n1p18](https://doi.org/10.1086/BBLv224n1p18)
20. Jung HA, Oh SH, Choi JS. Molecular docking studies of phlorotannins from *Eisenia bicyclis* with BACE1 inhibitory activity. *Bioorg Med Chem Lett*. 2010; 20(11): 3211-3215. [10.1016/j.bmcl.2010.04.093](https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2010.04.093)
21. Gibson M, Beachley V, Coburn J, et al. Tissue extracellular matrix nanoparticle presentation in electrospun nanofibers. *Biomed Res Int* 2014; 2014: 469120. [10.1155/2014/469120](https://doi.org/10.1155/2014/469120)
22. Ghosouri S, Setayeshmehr M, Taheri-Kafrani A, et al. Characterization of Poly(ε-Caprolactone)/Extracellular Matrix Nanofibers Composite Scaffold for Tissue Engineering. *JIMS* 2019; 37(521): 296-302. [10.22122/jims.v37i521.10746](https://doi.org/10.22122/jims.v37i521.10746)
23. Thantry ADK, Chakravarthi KK, Thundakattil AV, et al. Traditional Aqueous and Ethanol Maceration of *Hamelia patens* Leaves: A Phytochemical and Pharmacological Exploration. *Ann Afr Med* 2026; 25(2): 266-272. [10.4103/aam.aam_152_25](https://doi.org/10.4103/aam.aam_152_25)
24. Ahmadi H, Zahiri M, Mohebi G H, et al. The Effect of Spirulina Algae (*Arthrospira platensis*) Extract on the Differentiation of Bone Marrow Derived Mesenchymal Stem Cells to Neuron Cells. *Iran South Med J* 2025; 27(6): 409-417. [10.61882/ismj.27.6.409](https://doi.org/10.61882/ismj.27.6.409)
25. Zong C, Zhao L, Huang C, et al. Isolation and Culture of Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells from the Human Mandible. *J Vis Exp* 2022; 182. [10.3791/63811](https://doi.org/10.3791/63811)
26. Li T, Meng X, Li S, et al. Technique for Isolation and Culture of Rat Jaw Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells. *J Vis Exp* 2024; 207. [10.3791/66765](https://doi.org/10.3791/66765)

27. Howard CJ, Paul A, Duruanyanwu J, et al. The Manufacturing Conditions for the Direct and Reproducible Formation of Electrospun PCL/Gelatine 3D Structures for Tissue Regeneration. *Nanomaterials* (Basel) 2023; 13(24): 3107. [10.3390/nano13243107](https://doi.org/10.3390/nano13243107)
28. Samadian H, Farzamfar S, Vaez A, et al. A tailored polylactic acid/polycaprolactone biodegradable and bioactive 3D porous scaffold containing gelatin nano-fibers and Taurine for bone regeneration. *Sci Rep* 2020; 10(1): 13366. [10.1038/s41598-020-70155-2](https://doi.org/10.1038/s41598-020-70155-2)
29. Shams Z, Akbari B, Rajabi S, et al. Fabrication of Polycaprolactone-Gelatin scaffold for Cardiac Progenitor Cells differentiation. *jct* 2020; 11(2): 87-99. [10.52547/JCT.11.2.87](https://doi.org/10.52547/JCT.11.2.87)
30. Harley BA, Kim HD, Zaman MH, et al. Microarchitecture of three-dimensional scaffolds influences cell migration behavior via junction interactions. *Biophys J* 2008; 95(8): 4013-4024. [10.1529/biophysj.107.122598](https://doi.org/10.1529/biophysj.107.122598)
31. Hamada Y, Fujitani W, Kawaguchi N, et al. The preparation of PLLA/calcium phosphate hybrid composite and its evaluation of biocompatibility. *Dent Mater J* 2012; 31(6): 1087-1096. [10.4012/dmj.2012-117](https://doi.org/10.4012/dmj.2012-117)
32. Ardeshirzadeh A, Ahmadi H, Mirzaei M, et al. The combined use of photobiomodulation and curcumin-loaded iron oxide nanoparticles significantly improved wound healing in diabetic rats compared to either treatment alone. *Lasers Med Sci* 2022; 37(9): 3601-3611. [10.1007/s10103-022-03639-4](https://doi.org/10.1007/s10103-022-03639-4)
33. Águila-Carricondo P, García-García R, de la Roche JP, et al. Aphanizomenon flos-aquae: A Biorefinery for Health and Energy-Unleashing Phycocyanin's Power and Biogas Potential. *Mar Drugs* 2025; 23(6): 225. [10.3390/md23060225](https://doi.org/10.3390/md23060225)
34. Chilwant M, Paganini V, Di Gangi M, et al. From Sea to Therapy: Marine Biomaterials for Drug Delivery and Wound Healing. *Pharmaceuticals* (Basel) 2025; 18(8): 1093. [10.3390/ph18081093](https://doi.org/10.3390/ph18081093)
35. Liu Y, Yang G, Ji H, et al. Synergetic effect of topological cue and periodic mechanical tension-stress on osteogenic differentiation of rat bone mesenchymal stem cells. *Colloids Surf B Biointerfaces* 2017; 154: 1-9. [10.1016/j.colsurfb.2017.02.035](https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2017.02.035)
36. Merino JJ, Cabaña-Muñoz ME, Pelaz MJ. The Blue-green Algae (AFA) Consumption over 48 Hours Increases the Total Number of Peripheral CD34+ Cells in Healthy Patients: Effect of Short-Term and Long-Term Nutritional Supplementation (Curcumin/AFA) on CD34+ Levels (Blood). *J Pers Med* 2020; 10(2): 49. [10.3390/jpm10020049](https://doi.org/10.3390/jpm10020049)
37. Freshney RI. Culture of animal cells. A manual of basic technique. 1987: Wiley. <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/chapter-epub/10.1002/9783527669929.fmatter>