

# بررسی زنده‌مانی و تکثیر سلول‌های بنیادی مزانشیمی انسانی در میکروژل‌های تک‌سلولی آلزینات و آلزینات-پلی‌ال‌لیزین تولید شده به روش میکروفلوئیدیک

حسین سلیمانی<sup>۱</sup>، محمد قربانی<sup>۱</sup>، عبدالله اله‌وردی<sup>۱</sup>، حسین نادری‌منش<sup>۱\*</sup>

۱-دانش آموخته دکتری بیوفیزیک، گروه بیوفیزیک، دانشکده علوم‌زیستی، دانشگاه تربیت‌مدرس، تهران، ایران

۲-استادیار، گروه بیوفیزیک، دانشکده علوم‌زیستی، دانشگاه تربیت‌مدرس، تهران، ایران

۳-استاد، گروه بیوفیزیک، دانشکده علوم‌زیستی، دانشگاه تربیت‌مدرس، تهران، ایران

\*صندوق پستی ۱۷۵-۱۴۱۱۵، تهران، ایران

naderman@modares.ac.ir

پذیرش: ۱۴۰۱/۰۳/۲۲

دریافت: ۱۴۰۱/۰۲/۱۰

## چکیده

سلول‌های بنیادی از طریق قابلیت خودترمیمی و توانایی آن‌ها در تمایز به سلول‌های خاص شناخته می‌شوند که تحت تأثیر محیط آن‌ها اتفاق می‌افتد. اهمیت شیمی ماتریکس اطراف سلولی در کنترل سرنوشت سلول‌های بنیادی شناخته شده است. کپسوله کردن تک‌سلولی سلول‌های بنیادی مزانشیمی در داخل میکروژل‌های نیمه‌تراوا امکان کنترل هرچه بیشتر سرنوشت سلول‌های بنیادی را فراهم می‌کند. در این مطالعه با استفاده از فناوری میکروفلوئیدیک تراشه‌ای برای کپسوله کردن تک‌سلولی طراحی و ساخته شد. با استفاده از تراشه میکروفلوئیدیک سلول‌های بنیادی مزانشیمی انسانی با منشأ مغز استخوان در داخل میکروژل‌های آلزینات و آلزینات-پلی‌ال‌لیزین کپسوله شد. نتایج بررسی‌های طولانی‌مدت نشان می‌دهند که زنده‌مانی سلول‌های بنیادی مزانشیمی در داخل میکروژل‌های آلزینات-پلی‌ال‌لیزین نسبت به میکروژل‌های آلزینات افزایش معنی‌داری نشان می‌دهد. همچنین تکثیر سلول‌های بنیادی مزانشیمی در میکروژل‌های آلزینات-پلی‌ال‌لیزین افزایش معنی‌داری در روزهای ۱۴ و ۲۱ دارند. به نظر می‌رسد پلی‌ال‌لیزین با ایجاد بستری با بار مثبت امکان اتصال و فعالیت سلول‌ها را بهبود می‌دهد. مطالعات میکروسکوپی بیانگر این نکته‌اند که مورفولوژی سلول‌ها در داخل میکروژل‌ها به صورت کروی است. با این حال، قطر و حجم میانگین سلول‌ها در میکروژل‌های حاوی پلی‌ال‌لیزین نسبت به میکروژل‌های فاقد آن کمتر است که نشان از تکثیر بیشتر و محدودیت فضایی در داخل میکروژل‌ها است. بنابراین، میکروژل‌های تک‌سلولی آلزینات-پلی‌ال‌لیزین به‌عنوان بستری مناسب برای مطالعات بالینی برای مهندسی بافت، پیوند عضو و سلول درمانی را فراهم می‌کنند.

**کلید واژگان:** میکروفلوئیدیک، کپسوله کردن تک‌سلولی، سلول‌های بنیادی مزانشیمی، مهندسی بافت، میکروژل

## ۱-مقدمه

با افزایش میانگین امید به زندگی در کشورهای پیشرفته، تقاضای فزاینده‌ای برای توسعه استراتژی‌های جدید برای ترمیم بافت‌های بیمار و آسیب‌دیده وجود دارد. مواد سرامیکی، فلزی و پلیمری به‌طور گسترده‌ای برای جایگزینی مستقیم بافت‌ها با موفقیت بررسی شده‌اند [۱]. از آنجاکه فنوتیپ طبیعی سلول برای ترمیم بافت آسیب‌دیده حیاتی است، دانشمندان در تلاش هستند تا سلول‌ها را در ماتریسی که شباهت بیشتری به ماتریکس خارج سلولی<sup>۱</sup> نسبت به سایر پلیمرها یا سرامیک‌های اسفنجی داشته باشد، برای درمان به کار برند. ساختار هیدروژل‌ها از نظر مورفولوژی شبیه به ساختار ماتریکس خارج سلولی است و هنگامی که به‌عنوان داربست کشت سه‌بعدی استفاده می‌شود، جمعیت سلول‌ها را قادر می‌سازد تا فنوتیپ‌های مشابه با فنوتیپ طبیعی خود در داخل بافت به نمایش بگذارند. فنوتیپ طبیعی سلول با فنوتیپ سلول‌هایی که در بستر دوجعدی کشت داده می‌شوند متفاوت است [۲]. سلول‌هایی که به روش سه‌بعدی کشت داده می‌شوند، ویژگی‌هایی را نشان می‌دهند که به شرایط پیچیده داخل بدن نزدیک‌تر هستند. به‌بیان‌دیگر، در شرایط کشت دوجعدی، اجزای ماتریکس خارج سلولی، برهمکنش سلول به سلول و سلول به سلول به ماتریکس که برای تمایز، تکثیر و عملکردهای سلولی در داخل بدن مهم هستند، از بین می‌روند [۳]. زمانی که سلول‌ها اجازه رشد در بستر مناسب همانند ژل‌ها را داشته باشند، مسیرهای سیگنال دهی متقابل ایجاد می‌شوند. به‌عنوان مثال توده‌های سه‌بعدی لاین A549، سطوح بالایی از ترشح اینترلوکین ۶ و اینترلوکین ۸ را در مقایسه با محیط‌های کشت دوجعدی مشابه از خود نشان داده‌اند. با استفاده از سیستم‌های کشت سه‌بعدی و با استفاده از نشانگرهای زیستی، ترشح ماتریکس خارج سلولی نیز تأیید شده است [۴].

فناوری ریز پوشانی کردن سلول<sup>۲</sup> به محبوس کردن سلول‌ها داخل یک غشای پلیمری نیمه‌تراوا گفته می‌شود که امکان انتشار دوطرفه‌ی مولکول‌هایی مانند اکسیژن و دی‌اکسید کربن، مواد مغذی و عوامل رشد را که برای متابولیسم سلولی ضروری‌اند و همچنین انتشار مواد زائد و پروتئین‌های درمانی را به سمت بیرون فراهم می‌کند. در حالت کلی پوشش‌های ژلاتینی مورد استفاده در ریز پوشانی کردن سلول نسبت به آنتی‌بادی‌ها و سلول‌های ایمنی نفوذناپذیر می‌باشند و قندها، هورمون‌ها، اکسیژن، مواد غذایی و فاکتورهای رشد قابلیت عبور از منافذ آن را دارند [۵]. یک مثال کلاسیک از کاربرد ریز پوشانی سلول، استفاده از فرمولاسیون هیدروژل تزریقی و تجزیه‌پذیر، برای مهندسی غضروف و بافت استخوانی است که در نتایج مطالعات در این زمینه نشان‌دهنده‌ی تأثیر خواص تورم و تخریب هیدروژل‌ها بر تمایز غضروفی و استخوانی شدن سلول‌های بنیادی مزانشیمی مشتق از مغز استخوان می‌باشد [۶، ۷]. علاوه بر این نشان داده شده است که کاشت میکروبیدهای هیدروژل اولیگو (پلی - اتیلن گلیکول فومارات) تجزیه‌پذیر که سلول‌های اپی تلیال رنگ‌دانه<sup>۳</sup> (PECs) عنبیه پستی، منجر به بازسازی عدسی در طول ۳۰ روز پس کاشت شده است و هیدروژل نیز تأثیر منفی بر بازسازی نداشته است [۸].

از ابتدای توسعه فناوری ریز پوشانی سلول روش‌های متفاوتی برای ریز پوشانی وجود دارد که به ترتیب این روش‌ها پیچیده‌تر و پیشرفته‌تر شده‌اند و دقت و کیفیت ریز پوشانی در آن‌ها افزایش یافته است. ابداع یک روش ریز پوشانی سلول که کپسول‌های یک‌شکل آلترناتیو با اندازه یکنواخت با نرخ تولید بالا ایجاد کند و درعین حال تعداد کپسول‌های خالی را به حداقل برساند، بسیار چالش‌برانگیز است [۹]. ریز پوشانی مبتنی بر روش میکروفولئیدیک چندین مزیت را ارائه می‌دهد که معمولاً

<sup>3</sup> Pigment epithelial cells

<sup>1</sup> Extra Cellular Matrices (ECM)

<sup>2</sup> Cell encapsulation

استخوان در میکروژل‌های تک سلولی اشاره شده است و بررسی‌هایی برای سلول درمانی در موش انجام شده است [۱۲].

با توسعه‌ی روزافزون روش میکروفلوئیدیک به‌عنوان یک فناوری پیشرفته، دانش بشر در رابطه با علوم مهندسی بافت، دارورسانی، درمان بیماری‌هایی مانند دیابت و سرطان دچار تغییرات اساسی شده است. علت این موضوع کاهش ابعاد آزمایش از مطالعات *in-vitro* به *in-situ* می‌باشد. یکی از پیچیده‌ترین اهداف کپسوله کردن، ایجاد میکروژل‌های تک سلولی می‌باشد که برای شناسایی تک سلول یا کاربردهای درمانی در حال توسعه است. در این مطالعه زنده‌مانی و تکثیر سلول‌های بنیادی مزانشیمی انسانی در میکروژل‌های تک سلولی آلزینات و آلزینات- پلی ال لیزین که به روش میکروفلوئیدیک تولید شده‌اند، با هم مقایسه شده است.

## ۲- مواد و روش‌ها

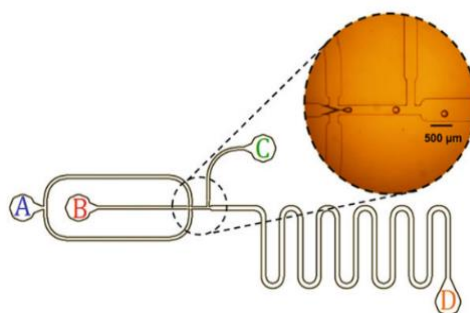
### ۲-۱ مواد

سلول‌های بنیادی مزانشیمی انسانی با منشأ مغز استخوان از پژوهشگاه رویان خریداری شد. آلزینات با وزن مولکولی متوسط (Sigma)، کلسیم کلراید (Merck)، روغن پرفلوئوروکربن (Sigma)، پرفلوئورو-۱-اکتانول (Sigma) پلی ال لیزین ۰/۰۱ درصد (Sigma)، نمک سدیم-EDTA (Merck)، استیک اسید (دکتر مجلی) و سورفکتانت پلورو-۷۸ (Sigma) خریداری شد.

### ۲-۲ لیتوگرافی و آماده‌سازی تراشه

ساختار چیپ میکروفلوئیدیک با استفاده از برنامه AutoCAD کشیده شد و با فرایند لیتوگرافی و قالب‌گیری ساختار نهایی ساخته شد. در مرحله ابتدایی، پوشش دهی چرخشی SU-8 به ارتفاع ۵۰ میکرومتر بر روی سیلیکون و سپس حرارت دهی در دمای ۹۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲ دقیقه انجام شد. سیلیکون و ماسک نوری بر روی هم قرار گرفته و به مدت ۸ ثانیه امواج UV ساطع شد.

در سایر روش‌های ریز پوشانی مانند پاشش الکترواستاتیک و تولید قطرات با پمپ هوا وجود ندارد. به‌طور کلی ریز پوشانی مبتنی بر روش میکروفلوئیدیک منجر به ضریب تغییر کمتر در قطر کپسول و بهبود کروییت کپسول‌ها می‌شود. برای ریز پوشانی سلول به یک تراشه میکروفلوئیدیک با طراحی منحصربه‌فردی نیاز است (شکل ۱)، که قطرات یکنواختی از آلزینات در فاز روغنی ایجاد کند و اتصالات عرضی داخلی آلزینات در فضای درونی تراشه برقرار شود [۱۰].



شکل ۱ طراحی قالب میکروفلوئیدیک با ورودی‌هایی برای روغن (A)، آلزینات (B) و کلسیم کلراید (C) به همراه یک خروجی برای جمع‌آوری کپسول‌های ساخته‌شده.

هتر لوگان و همکارانش، تکثیر، عملکرد و تمایز به غضروف در سلول‌های بنیادی مزانشیمی را در کپسول‌های تک سلولی و چندسلولی با هم مقایسه کردند. نتایج این مطالعه که در سال ۲۰۱۹ منتشر شد نشان می‌دهد در میکروژل‌های تک سلولی پلی اتیلن گلیکول/کوندروئیتین سولفات، تکثیر و تولید کلاژن توسط سلول‌های بنیادی مزانشیمی به‌طور معنی‌داری نسبت به میکروژل‌های چند سلولی مشابه بالاتر است. همچنین، سلول‌های بنیادی مزانشیمی در داخل میکروژل‌های تک سلولی در مدت‌زمان کوتاهی به غضروف تمایز می‌یابند [۱۱]. در مطالعه‌ی دیگری که در سال ۲۰۲۰ توسط جوانفنگ آن و همکارانش منتشر شد، به بهبود تمایز سلول‌های بنیادی مزانشیمی به

برای تصویربرداری لحظه‌ای از میکرو سکوپ فلور سانس IX81 (Ulympus، ژاپن) با دوربین المپیوس DP72 استفاده شد. از معادله توزیع پویسون<sup>۷</sup> برای تعیین غلظت سلول‌ها در فاز آبی برای رسیدن به کپسوله کردن تک‌سلولی و چند سلولی استفاده شد.

کلسیم کلراید با EDTA به نسبت ۱:۱ ترکیب و به pH ۷/۴ رسانده شد. از ترکیب کلسیم-EDTA با آلزینات به نسبت ۱:۱ به‌عنوان فاز آبی استفاده شد. غلظت نهایی آلزینات ۲ درصد وزنی حجمی و کلسیم-EDTA ۵۰ میلی مولار بود. در این روش از ۰/۰۵ درصد حجمی/حجمی استیک اسید برای پلیمریزاسیون آلزینات نیز استفاده شد.

پس از تشکیل کپسول‌های آلزیناتی و خارج کردن آن‌ها از تراشه میکروفلوئیدیک، در داخل ویال به دراپلت‌های تشکیل شده بافر PBS و روغن پرفلوئورو-۱-اکتانول<sup>۸</sup> با نسبت ۱:۵ اضافه شد. سانتریفیوژ با دور ۳۰۰ g و جداسازی دراپلت‌ها از فاز روغنی انجام شد. سپس، دراپلت‌ها به فلاسک T25 منتقل شده و محیط  $\alpha$ MEM (به‌علاوه ۱۵ درصد FBS، ادرصد استرپتومایسین و ۱ درصد گلوتامکس) روی آن‌ها اضافه شد. فلاسک‌ها در داخل انکوباتور به مدت ۲۱ روز نگهداری شدند و هر ۴۸ ساعت محیط کشت تعویض شد. برای اضافه کردن پلی-ال-لیزین (PLL) به دراپلت‌های آلزیناتی و مقایسه‌ی ویژگی‌های بیوفیزیکی سلول‌های بنیادی مزانشیمی در دو بستر آلزینات و آلزینات-PLL، قبل از کپسوله کردن سلول‌ها، پلی‌ال‌لیزین (۰/۱ درصد حجمی-سیگما) به نسبت ۱:۱۰ به آلزینات اضافه شد.

#### ۲-۴ آزمون زنده‌مانی و تکثیر سلول‌ها

زنده‌مانی سلول‌های بنیادی مزانشیمی که به روش میکروفلوئیدیک کپسوله شده بودند در روزهای ۱، ۳، ۷، ۱۴، ۲۱ بررسی شد. برای بررسی زنده‌مانی سلول‌های

سیلیکون با استفاده از محلول ظاهر کننده به مدت ۳-۵ دقیقه شسته شد. پس از آن سیلیکون با آب دیونیزه تمیز و گاز نیتروژن خشک شد. سیلیکون با ساختار شکل گرفته به مدت ۱۰ دقیقه در دمای ۱۵۰ سانتی‌گراد قرار داده شد. پس از لیتوگرافی تراشه، ساخت قالب با استفاده از پلیمر پلی دی متیل سیلوکسان انجام شد. پس از جدا کردن PDMS از تراشه میکروفلوئیدیک، ورودی‌ها و خروجی‌های کانال‌ها توسط پانچ بیوپسی با قطر ۱ میلی‌متر، پانچ شد. برای یکنواخت بودن چهار وجه کانال‌ها از لاملی استفاده شد که یک لایه نازک PDMS توسط اسپین کوتینگ<sup>۴</sup> بر روی آن ایجاد شده بود. برای اصلاح خواص سطحی و اتصال بهتر قالب PDMS بر روی لامل، هر دو سطح توسط دستگاه پلاسما کلینر<sup>۵</sup> در فشار ۰/۷ اتمسفر، به مدت ۴۰ ثانیه در معرض پلاسما قرار گرفتند. بلافاصله پس از این مرحله، اتصال دو سطح PDMS به هم انجام شد و به مدت ۵ دقیقه در دمای ۱۱۰ درجه سانتی‌گراد اتصال دو سطح محکم شد. برای جریان بهتر فاز روغنی در داخل تراشه، کانال‌ها به مدت ۱۰ دقیقه توسط آکواپل<sup>۶</sup> پوشانده شدند. سپس، به کمک گاز نیتروژن، آکواپل از کانال‌ها تخلیه شد.

#### ۲-۳ کپسوله کردن سلول‌ها توسط تراشه میکروفلوئیدیک

برای کپسوله کردن سلول‌ها در تراشه میکروفلوئیدیک از سلول‌های بنیادی مزانشیمی انسانی در پاساژ ۵ استفاده شد. همچنین، از آلزینات با وزن مولکولی متوسط (Sigma) و کلسیم کلراید (Merck) برای کپسوله کردن و از روغن پرفلوئوروکربن (سیگما) به‌عنوان فاز روغنی استفاده شد. در داخل فاز روغنی، سورفکتانت با غلظت ۰/۱ درصد وزنی/حجمی اضافه شد. برای ایجاد جریان در کانال میکروفلوئیدیک از پمپ نیتروژن (ElveFlow) و

<sup>7</sup> Poisson distribution

<sup>8</sup> perfluoro-1-octanol

<sup>4</sup> Spin coating

<sup>5</sup> Plasma cleaner

<sup>6</sup> Aquapel

### ۳-۱ طراحی و ساخت تراشه میکروفلوئیدیک

در طی راه‌اندازی فرایند کپسوله کردن سلول‌ها به روش میکروفلوئید یک طرح اولیه در ۳ مرحله بهینه شد و به‌طور کلی ۴ طراحی برای دستیابی به حالت ایده آل کپسوله کردن به روش لیتوگرافی ساخته شدند.

در این مطالعه از طراحی جریان متمرکز<sup>۱۰</sup> استفاده شده است. برای طراحی کانال‌های میکروفلوئیدیک از نرم‌افزار AutoCAD استفاده شد. ابتدا یک ورودی با قطر ۱ میلی‌متر برای فاز روغنی در نظر گرفته شد. از ورودی یک کانال با عرض ۲۰۰ میکرون خارج شد. پس از طی مسیر ۳ میلی‌متری این کانال به دو مسیر یکسان با عرض ۲۰۰ میکرون که پس از طی یک مسیر حدوداً ۲ سانتی‌متری به صورت حلقوی به تقاطع فاز آبی و روغنی می‌رسند. در محل تقاطع عرض کانال فاز روغنی تا ۲۵ میکرون کاهش می‌یابد. فاز آبی دارای دو ورودی به قطر ۱ میلی‌متر می‌باشد. یک ورودی برای آلزینات/کلسیم-EDTA و ورودی دوم برای سلول‌ها تعبیه شده‌اند. آلزینات و سلول‌ها پس از طی یک مسیر ۳ میلی‌متری در کانال‌های با عرض ۲۰۰ میکرون با یکدیگر ادغام می‌شوند. در ادامه‌ی مسیر فاز آبی، مارپیچ‌های نامنظم و عریضی برای ایجاد یکنواختی در فاز آبی و همچنین ایجاد فاصله‌ی مناسب بین تک‌سلول‌ها تعبیه شد. در ادامه یک مارپیچ منظم با عرض ۵۰ میکرون و طول ۱ میلی‌متر طراحی شد که هدف از آن کنترل جریان فاز آبی قبل از رسیدن به تقاطع بود. عرض کانال فاز آبی در محل تقاطع ۵۰ میکرون بود. پس از محل تقاطع کانال خروجی با قطر ۲۵ میکرون و طول ۱۰۰ میکرون برای قطع بهتر جریان فاز آبی و تشکیل قطره ایجاد شد. سپس، به یک‌باره قطر کانال خروجی از ۲۵ به ۸۰ میکرون افزایش یافته و در طول مسیر به تدریج تا ۲۰۰ میکرون نیز افزایش پیدا می‌کند.

بنیادی مزانشیمی در داخل کپسول‌های آلزیناتی از رنگ‌آمیزی با هوخست<sup>۹</sup> و PI استفاده شد. در این روش در روزهای مشخص با استفاده از میکروسکوپ فلورسانس تصویربرداری انجام شد و شدت رنگ‌های آبی مربوط به هوخست به رنگ‌های آبی هوخست و قرمز PI با استفاده از نرم‌افزار ImageJ به دست آمد که بیانگر درصد زنده‌مانی سلول‌ها بود.

برای بررسی تکثیر سلول‌های بنیادی مزانشیمی در داخل کپسول‌های آلزینات، دستگاه Cytation3 استفاده شد. در این آزمایش تکثیر سلول‌های بنیادی مزانشیمی انسانی در کپسول‌های آلزیناتی حاوی تک سلول در کنار کپسول‌های آلزینات-PLL حاوی تک سلول، در روزهای ۱، ۳، ۷، ۱۴، ۲۱ بررسی شدند. برای خوانش تکثیر سلولی از رنگ هوخست که هسته‌ی سلول‌های زنده را رنگ‌آمیزی می‌کند، استفاده شد و در طول موج تابش ۳۵۰ نانومتر و طول موج خوانش ۶۶۱ نانومتر و با gain=100 خوانش انجام شد.

در طی ۲۱ روز پس از کپسوله کردن سلول‌های بنیادی مزانشیمی در دو بستر آلزینات و آلزینات-PLL، مورفولوژی سلول‌ها در داخل دراپلت‌ها و روند تکثیر آن‌ها به کمک میکروسکوپ فلورسانس اینورت مطالعه شد.

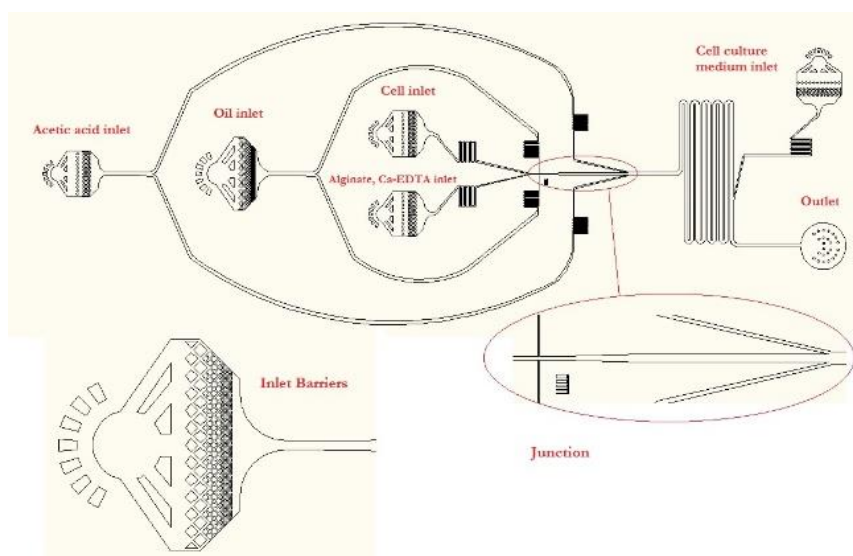
### ۲-۵ آنالیزهای آماری

تجزیه و تحلیل داده‌های حاصل از تست‌های زنده‌مانی و تکثیر سلولی توسط نرم‌افزار گراف-پد به روش آنالیز واریانس یک‌طرفه و تست مقایسه چندگانه توکی انجام شد. مقادیر در نمودار روزهای اول، سوم، هفتم، چهاردهم و بیست و یکم ارائه شده است. تمام آنالیزهای تصاویر به کمک نرم‌افزار ImageJ انجام شد.

### ۳- نتایج و بحث

<sup>10</sup> Flow-Focusing

<sup>9</sup> Hoechst 33342



شکل ۲ طرح تراشه میکروفلوئیدیک به کاررفته برای کپسوله کردن سلول‌ها در میکروژل‌های آلژیناتی. در این طراحی محل جانکشن و سدهای ورودی بزرگنمایی شده‌اند.

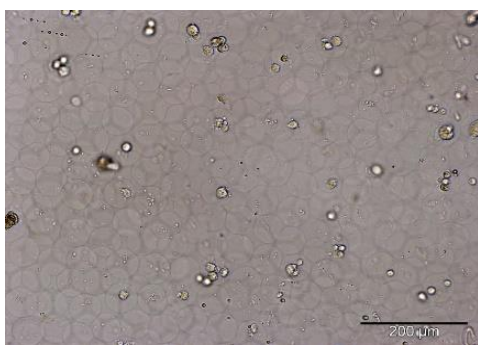
بر مبنای تشکیل کمپلکس کلسیم-اتیلن دی آمین تتراستیک اسید (Ca-EDTA) عمل می‌کند [۱۳، ۱۴]. در این روش با اتصال کلسیم به EDTA، کمپلکس Ca-EDTA ایجاد می‌شود. EDTA منجر به شلاته شدن<sup>۱۱</sup> کلسیم شده و یون‌های کلسیم از دسترس زنجیره‌های آلژینات خارج می‌شوند. مادامی‌که اتصال کلسیم و EDTA برقرار است، آلژینات پلیمریزه نمی‌شود، اما به محض رها شدن کلسیم از EDTA، پلیمریزاسیون آلژینات آغاز می‌شود. بنابراین، می‌توان در داخل تراشه میکروفلوئیدیک دراپلت‌هایی همگنی از آلژینات و یون‌های کلسیم شلاته شده ایجاد کرد. برای آزاد شدن کلسیم از EDTA، استیک اسید به فاز روغنی افزوده می‌شود. در این حالت به محض تولید دراپلت، استیک اسید به آرامی به داخل دراپلت نفوذ می‌کند و باعث آزادسازی کلسیم می‌شود. کلسیم‌های آزاد با روش بسیار کنترل شده‌ای با زنجیره‌های آلژینات واکنش می‌دهند و دراپلت‌های همگن با ساختاری عالی شکل می‌گیرند. این روش چندین مزیت، از جمله، رهاپس

برای پلیمریزاسیون آلژینات یک کانال دیگر مشابه کانال فاز روغنی، برای استیک اسید تعبیه شده است و پس از محل جانکشن به کانال خروجی می‌پیوندد. در ادامه یک کانال دیگر برای افزودن محیط کشت سلولی به کانال خروجی اضافه شده و پس از طی یک مسیر حدود ۳ میلی‌متری خروجی با قطر ۱ میلی‌متر تعبیه شده است. در ابتدای تمام ورودی‌ها سدهایی برای جلوگیری از ورود ذرات درشت و یا سلول‌های به هم چسبیده طراحی شده است (شکل ۲).

### ۲-۳ کپسوله کردن تک‌سلولی سلول‌های بنیادی مزانشیمی

ساخت دراپلت‌های آلژینات هم‌اندازه، هم شکل، کروی و همگن نیاز به ایجاد پلیمریزاسیون از درون قطره دارد. برای این کار، باید یون دی‌والان مدنظر (کلسیم) ابتدا با آلژینات ترکیب شود و پس از تشکیل دراپلت موجب پلیمریزاسیون و تشکیل ژل شود. روش جدیدی برای رساندن یون‌های کلسیم به آلژینات پیشنهاد شده است که

<sup>11</sup> Chelating



**شکل ۳** کپسول‌های آلژینات تولید شده به روش شلاته کردن کلسیم در تراشه میکروفلوئیدیک برای تعیین سایز میکروژل‌های تولید شده، قطر ۵۰ دراپلت محاسبه شد و فراوانی سایز میکروژل‌ها به صورت نمودار نشان داده شده در شکل ۴ درآمد. قطر میانگین میکروژل‌ها حدود ۵۶ میکرومتر به دست آمد. برای تولید دراپلت با سایزهای مختلف می‌توان از تراشه‌های با ابعاد مختلف و همچنین تغییر شدت جریان کانال‌های ورودی استفاده کرد. در این آزمایش شدت جریان فاز آبی ثابت در نظر گرفته شد و شدت جریان فاز روغنی تا ۱۰ برابر نیز افزایش یافت. باید توجه داشت که افزایش نسبت شدت جریان فاز روغنی به فاز آبی منجر به کوچک‌تر شدن اندازه دراپلت‌ها می‌شود، البته سرعت تولید دراپلت کاهش می‌یابد و زمان بیشتری سلول‌ها در معرض استیک اسید قرار خواهند گرفت که درصد زنده‌مانی سلول‌ها نیز کم می‌شود.

آهسته‌ی کلسیم و پلیمریزاسیون داخلی و آهسته‌ی آلژینات، هم‌زمانی فرایند تشکیل دراپلت و اتصال عرضی بین کلسیم و زنجیره‌های آلژینات، ادغام نشدن دراپلت‌های تشکیل شده و ایجاد دراپلت‌های آلژیناتی با توزیع اندازه‌های یکسان دارد.

سایز میکروژل‌های تولید شده در روش میکروفلوئیدیک با قطر تقاطع، طول و عرض کانال‌های فاز آبی و فاز روغنی و سرعت جریان فازهای آبی و روغنی ارتباط دارد. نتایج تأثیر نسبت جریان فاز آبی/روغنی به قطر میکروژل‌های تولید شده در تراشه‌های میکروفلوئیدیک استفاده شده در این مطالعه با مطالعات پیشین همخوانی دارد. این نتایج به صورت جدول ۱ می‌باشند. افزایش در سرعت جریان فاز روغنی منجر به کاهش قطر میکروژل‌ها می‌شود.

پس از ستاپ شدت جریان هر کانال و ایجاد دراپلت‌های آلژیناتی حاوی سلول، فرایند پلیمریزاسیون آلژینات توسط استیک اسید در ماریپیچ کانال‌ها انجام شد و سلول‌های کپسوله شده در خروجی کانال با موفقیت از تراشه خارج شدند. شکل ۳ نشان‌دهنده‌ی جمعیت دراپلت‌ها و همچنین سلول‌های کپسوله شده در هر دراپلت می‌باشد. همان‌طور که مشخص است تعداد زیادی از دراپلت‌ها فاقد سلول می‌باشند. در مطالعات قبلی نشان داده شده است که در بهینه‌ترین حالت کپسوله کردن سلول‌ها برای رسیدن به کپسول‌های تک‌سلولی حداقل ۷۰ درصد از دراپلت‌ها فاقد سلول خواهند بود [۱۳].

**جدول ۱** ارتباط بین ابعاد کانال (عرض و ارتفاع کانال در محل تقاطع) و جریان سیال ( $Q_a$ : جریان فاز آبی،  $Q_o$ : جریان فاز روغنی) و قطر میکروژل‌های تولید شده. افزایش در سرعت جریان فاز روغنی منجر به کاهش قطر میکروژل‌ها می‌شود.

| تقاطع ۲۰ میکرومتری            |   | تقاطع ۵۰ میکرومتری            |   |
|-------------------------------|---|-------------------------------|---|
| قطر میکروژل ( $\mu\text{m}$ ) | نسبت جریان فاز آبی به فاز روغنی ( $Q_a/Q_o$ ) | قطر میکروژل ( $\mu\text{m}$ ) | نسبت جریان فاز آبی به فاز روغنی ( $Q_a/Q_o$ ) |
| ۵۷                            | ۱   | ۹۵                            | ۱   |
| ۲۳                            | ۰/۵   | ۵۶                            | ۰/۵   |
| ۲۰                            | ۰/۱   | ۴۲                            | ۰/۱   |

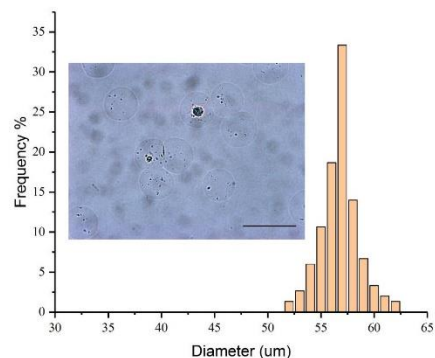
به زیر ۶۰ درصد کاهش می‌یابد. این در حالی است که میکروژل‌های تک‌سلولی آلژینات-پلی‌ال‌لیزین افزایش نسبی زنده‌مانی را تا حدود ۹۰ درصد نشان می‌دهند. این افزایش معنی‌دار زنده‌مانی از روز ۷ کشت به بعد بیشتر خود را نشان می‌دهد. به نظر می‌رسد که بستر آلژینات برای کشت طولانی‌مدت سلول‌های بنیادی مزانشیمی بستر مناسبی نیست و نمی‌تواند اتصالات فیزیکوشیمیایی سلول را تأمین کند، اما وجود پلی‌ال‌لیزین شرایط زنده‌مانی و تکثیر مناسب‌تری را برای سلول‌ها ایجاد می‌کند.

Huebsch و همکاران نشان داده‌اند که سلول‌هایی که در میکروژل‌های آلژیناتی متصل به RGD کپسوله شده‌اند با ماتریکس اطرافشان از طریق اتصالات با اینتگرین‌ها، برهمکنش بهتری دارند و شکل کروی خود را مدیریت می‌کنند؛ بنابراین سلول‌ها می‌توانند بهتر به ماتریکس میکروژل چسبیده و سرچال‌تر باشند، به عبارتی زنده‌مانی بیشتری در داخل میکروژل‌ها نشان دهند [۱۵]. فنی‌لی و همکاران [۱۶] در سال ۲۰۱۷ زنده‌مانی سلول‌های بنیادی مزانشیمی انسانی در میکروژل‌های ژلاتین را در روز اول و هفتم به ترتیب ۹۴ و ۸۶ درصد گزارش کرده‌اند. کاهش معنی‌دار زنده‌مانی این مطالعه به دلیل آپوپتوز طبیعی سلول‌ها بیان شده است. همچنین، در این مطالعه زنده‌مانی سلول‌های بنیادی مزانشیمی در میکروژل‌های ژلاتین نوربورنین (GELNB) در روزهای اول و هفتم به ترتیب ۸۷ و ۹۱ درصد گزارش شده است. بنابراین نتایج ما با مطالعات فنی‌لی و همکاران منطبق می‌باشد.

### ۳-۴ تکثیر سلول‌های بنیادی مزانشیمی در میکروژل‌های

#### تک‌سلولی

مطابق با نتایج به دست آمده، تکثیر سلول‌ها در بستر آلژینات-PLL به نسبت سلول‌های بستر آلژینات، افزایش را نشان می‌دهد. در میکروژل‌های دارای پلی‌ال‌لیزین نسبت به میکروژل‌های فاقد آن، افزایش معنی‌داری در تکثیر در روزهای ۱۴ و ۲۱ دیده می‌شود. رشد و تکثیر در



شکل ۴ توزیع سایز میکروژل‌های تولیدشده به روش

میکروفلوئیدیک. Scale bar= 100  $\mu$ m

نتایج نشان می‌دهد در آزمایش تولید میکروژل‌های تک‌سلولی، ۷۸ درصد میکروژل‌های فاقد سلول، ۱۶ درصد میکروژل‌ها حاوی یک سلول، ۳ درصد میکروژل‌ها دارای دو سلول و ۳ درصد میکروژل‌ها دارای بیش از دو سلول هستند.

### ۳-۳ زنده‌مانی سلول‌های بنیادی مزانشیمی در میکروژل‌های تک‌سلولی

در صد زنده‌مانی و تکثیر سلول‌های بنیادی مزانشیمی در روزهای ۱، ۳، ۷، ۱۴ و ۲۱ پس از کپسوله کردن بررسی شد و نتایج به صورت شکل ۵ به دست آمد. همان‌طور که نتایج نشان می‌دهند، درصد زنده‌مانی برای سلول‌های بنیادی مزانشیمی که در میکروژل‌های تک‌سلولی آلژینات-PLL کشت داده شده‌اند، در روزهای ۷، ۱۴ و ۲۱ به‌طور معنی‌داری بالاتر از میکروژل‌های آلژیناتی است (شکل ۵-الف). به‌عبارت‌دیگر، بدون حضور پلی‌ال‌لیزین در میکروژل‌های تک‌سلولی، زنده‌مانی نسبت به زمانی که پلی‌ال‌لیزین در میکروژل‌ها وجود دارد کمتر است.

نتایج زنده‌مانی سلول‌های بنیادی مزانشیمی در داخل میکروژل‌های تک‌سلولی آلژینات بیانگر زنده‌مانی حدود ۸۳ درصدی سلول‌ها در روز اول پس از کپسوله شدن هستند. زنده‌مانی تک سلول‌ها در بستر آلژینات تا روز ۲۱



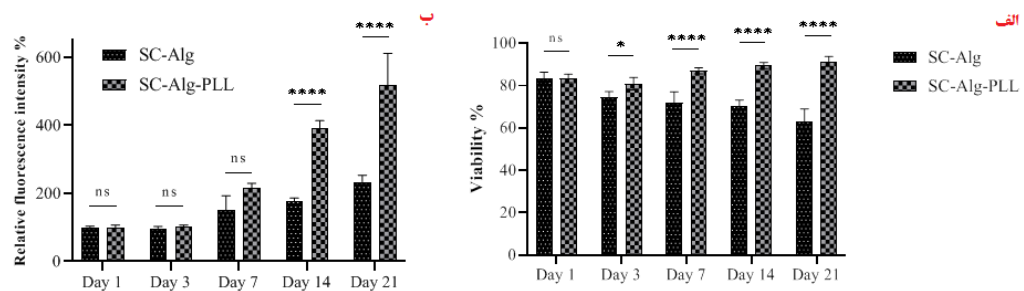
و وجود کوپلیمر هایی در کنار آلژینات برای کشت طولانی مدت سلول‌ها برای مهندسی بافت بسیار ضروری است [۱۷].

### ۳-۵ تصویربرداری از سلول‌های بنیادی مزانشیمی در میکروژل‌های تک‌سلولی

برای نشان دادن تکثیر سلول‌ها در داخل میکروژل و همچنین بررسی مورفولوژی سلول‌ها در طی ۲۱ روز، تصاویر میکروسکوپی زمینه روشن و با رنگ آمیزی هسته (هوخست) در روزهای ۱، ۳، ۷، ۱۴ و ۲۱ تهیه شده که در شکل ۶ و شکل ۷ نشان داده شده‌اند. به‌طور کلی، سلول‌ها در بستر سه‌بعدی میکروژل مورفولوژی دایره‌ای دارند. ظاهر کروی سلول‌ها در بسترهای مختلف یکسان نیست و از لحاظ قطر سلول‌ها تفاوت‌هایی وجود دارد. یکی از نتایج قابل تأمل در طول تصویربرداری مربوط به میکروژل‌های تک‌سلولی آلژینات است. نتایج به‌دست آمده نشان‌دهنده‌ی عدم تکثیر سلول‌های بنیادی مزانشیمی در بیش از نیمی از میکروژل‌های تک‌سلولی آلژینات است.

داخل تمام میکروژل‌ها تا روز بیست و یکم دیده می‌شود. این افزایش تکثیر به‌صورت در شکل ۵-ب قابل مشاهده است. در بررسی‌های تکثیر سلول در داخل میکروژل‌ها مشخص شد که وجود پلی‌الیزین در میکروژل‌های تک‌سلولی آلژینات-PLL منجر به افزایش سرعت تکثیر سلول‌های بنیادی مزانشیمی نسبت به میکروژل‌های آلژیناتی می‌شود. به طوری که در میکروژل‌های تک‌سلولی آلژینات سلول‌ها افزایش ۲۰۰ درصدی دارند، در حالی که میکروژل‌های تک‌سلولی آلژینات-پلی‌الیزین افزایش ۵۰۰ درصدی را تا روز ۲۱ نشان می‌دهند.

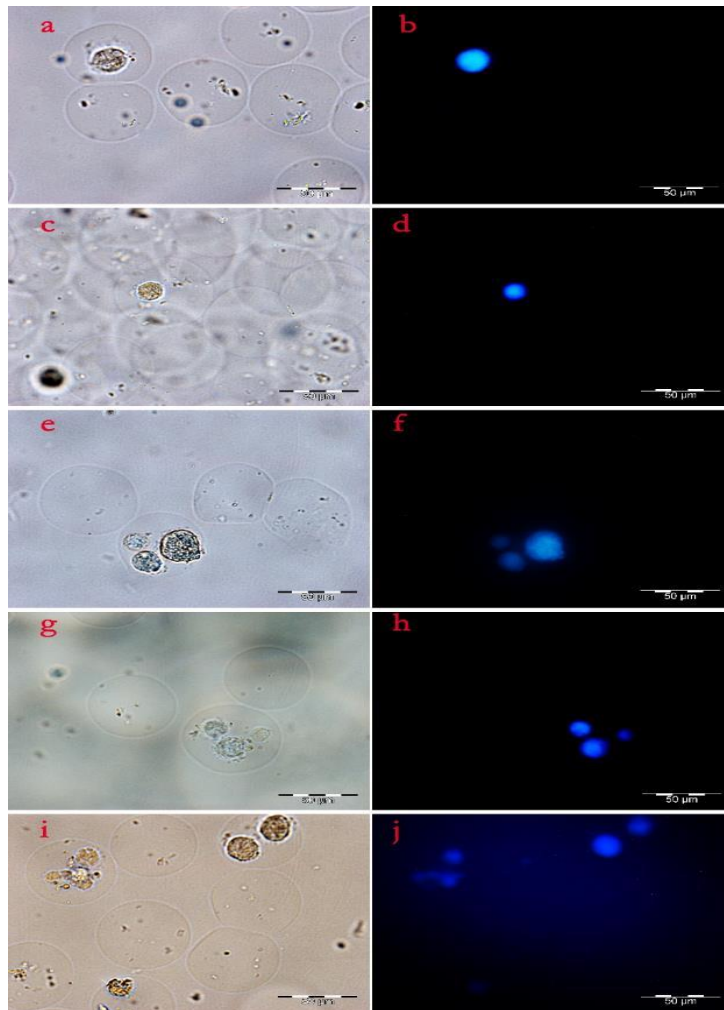
در مطالعات پیشین نیز تأثیر خصوصیات فیزیکی شیمیایی بستر بر رشد و تکثیر سلول‌ها بررسی شده است. به‌طور مثال در سال ۲۰۱۴ گروهی از محققان مطالعه‌ای بر روی چسبندگی و تکثیر سلول‌های فیبروبلاست در میکروژل‌های آلژینات دی‌آلدئید-ژلاتین را منتشر کردند که بیانگر تأثیر ژلاتین در زنده‌مانی و تکثیر سلول‌ها در کشت طولانی مدت بود. آن‌ها نشان دادند که آلژینات به تنهایی توانایی ایجاد شرایط چسبندگی سلول را نداشته



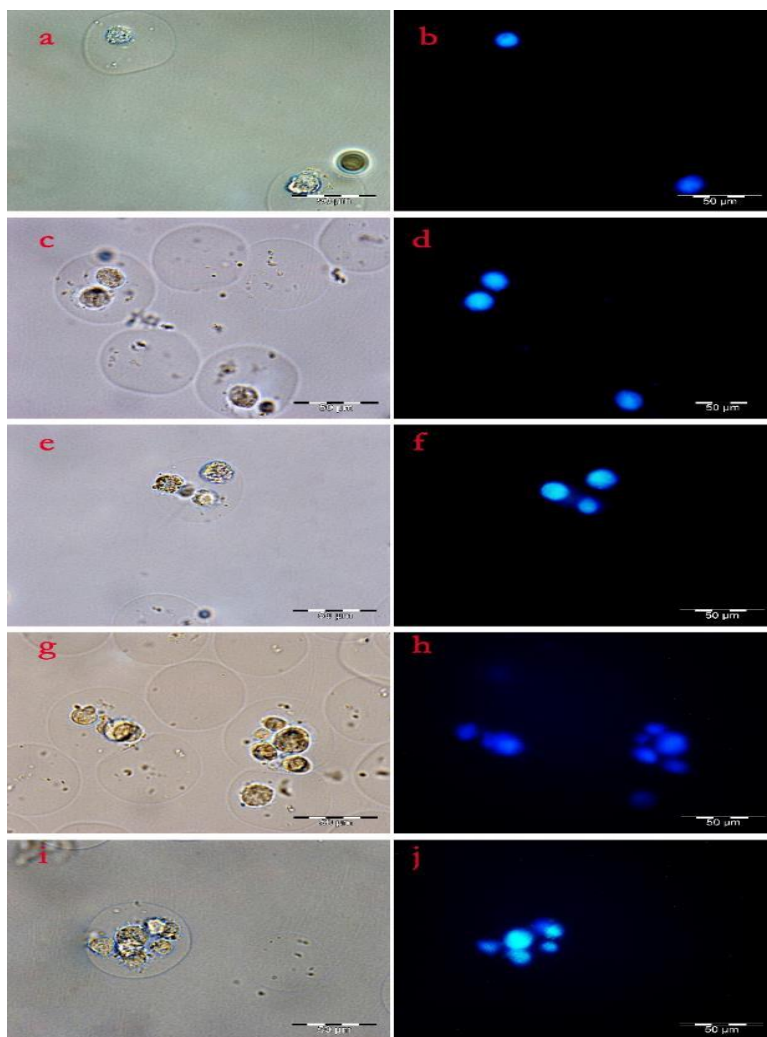
شکل ۵ زنده‌مانی و تکثیر سلول‌های بنیادی مزانشیمی درون میکروژل‌ها تا روز ۲۱. در این نمودارها زنده‌مانی و تکثیر سلول‌های بنیادی مزانشیمی انسانی که در میکروژل‌های آلژینات و آلژینات-PLL به‌صورت تک‌سلولی کشت داده شده‌اند، نشان داده شده است. (الف) نمودار مقایسه زنده‌مانی میکروژل‌های تک‌سلولی آلژینات-پلی‌الیزین نسبت به میکروژل‌های تک‌سلولی آلژینات، (ب) نمودار مقایسه تکثیر میکروژل‌های تک‌سلولی آلژینات-پلی‌الیزین نسبت به میکروژل‌های تک‌سلولی آلژینات. (ب) ns مخفف non-significant است و p value کوچکتر از ۰,۰۰۱ با \*\*\*\* و p value کوچکتر از ۰,۰۵ با \* نمایش داده شده است.

نتایج به دست آمده از تصویربرداری سلول‌ها در طول ۲۱ روز نشان می‌دهند که در میکروژل‌های تک‌سلولی آلژینات-پلی‌ال‌لیزین نسبت به میکروژل‌های آلژینات تکثیر سلولی بیشتری اتفاق افتاده است (شکل ۷). نتایج منتشر شده در شکل‌های ۶ تا ۷ حاکی از مورفولوژی کروی سلول‌های بنیادی مزانشیمی در داخل میکروژل‌ها می‌باشد.

به بیان دیگر بستر سه‌بعدی آلژینات در نبود فاکتورهای اتصال‌دهنده‌ی سلول (مثلاً پلی‌ال-لیزین)، شرایط ریزمحیطی موردنیاز سلول برای تکثیر را فراهم نمی‌کند. نتایج نشان می‌دهند که در این حالت سلول‌ها دو رویکرد را اتخاذ می‌کنند: ۱) عدم تکثیر در طول ۲۱ روز (شکل ۶، ۲) مهاجرت از داخل میکروژل به بیرون از آن.



شکل ۶ تصویر زمینه روشن و فلورسانس (رنگ‌آمیزی هسته سلول‌های زنده توسط هوخست) از دراپت‌های تک‌سلولی آلژینات در روزهای (a,b) اول، (c,d) سوم، (e,f) هفتم، (g,h) چهاردهم و (i,j) بیست و یکم. تا روز ۳ تکثیری در سلول‌ها دیده نمی‌شود. در روز ۷ و ۱۴ تعداد سلول‌ها تا دو برابر افزایش یافته است. در روز ۲۱ بعضی از سلول‌ها هیچ تکثیری در داخل دراپت نشان نمی‌دهند، برخی از سلول‌ها از حالت تکی تا حدود ۴ سلول افزایش یافته‌اند.



شکل ۷ تصویر زمینه روشن و فلورسانس (رنگ آمیزی هسته سلول‌های زنده توسط هوخست) از دراپلت‌های تک‌سلولی آلزینات-پلی‌ال لیزین در روزهای (a,b) اول، سوم، (c,d) هفتم، (e,f) بیست و یکم، از روز سوم دو برابر شدن تعداد سلول‌ها دیده می‌شود. در روز هفتم دراپلت‌ها به طور متوسط ۴ سلول دارند. افزایش تعداد سلول‌ها در روزهای ۱۴ و ۲۱ هم ادامه دارد و تعداد سلول‌ها در هر دراپلت تا ۸ سلول نیز رسیده است.

جدول ۲ میانگین قطر سلول‌های بنیادی مزانشیمی در میکروژل‌های تک‌سلول و چندسلولی آلزینات و آلزینات-پلی‌ال لیزین

| میانگین حجم سلول<br>(Mean gray value)<br>(میکرومتر مکعب) | میانگین قطر سلول<br>(میکرومتر) |                                       |
|--|--------------------------------|---------------------------------------|
| $40.62 \pm 118.79$                                       | $19.48 \pm 3.82$               | میکروژل تک‌سلولی آلزینات              |
| $255.75 \pm 78.94$                                       | $16.48 \pm 2.71$               | میکروژل تک‌سلولی آلزینات-پلی‌ال لیزین |

قابل برنامه‌ریزی می‌توان سرنوشت سلول‌ها را کنترل کرد. در این روش با افزودن محرک‌های بیولوژیکی همانند DNA، آپتامرها، پروتئین‌ها و پپتیدها، آنزیم‌ها و متابول‌های کوچک فرایندی را به سلول‌ها تلقین می‌کنند که به کمک آن بتوانند سرنوشت سلول‌ها را در کنترل داشته باشند [۲۰]. کپسوله کردن تک‌سلولی امکان بررسی اثر محرک‌های بیولوژیکی متفاوت بر تک‌سلول را فراهم می‌کند که می‌تواند اطلاعاتی بنیادی در رابطه با بیوشیمی و بیوفیزیک سلول‌ها در اختیار محققان قرار دهد.

در این مطالعه فرایند کپسوله کردن تک‌سلولی سلول‌های بنیادی مزانشیمی در داخل دراپلت‌های آلزیناتی به روش میکروفلوئیدیک تشریح شد و در ادامه پلی‌ال لیزین به‌عنوان فاکتور اتصالی مهم در زنده‌مانی و تکثیر سلول‌های بنیادی مزانشیمی کپسوله شده به‌صورت تک‌سلولی معرفی شد. فناوری کپسوله کردن معرفی شده در این مطالعه قابلیت استفاده در مطالعات بالینی برای مهندسی بافت، پیوند عضو و سلول درمانی را دارا می‌باشد.

#### ۵- منابع

- [1] Zhang, L. and T.J. Webster, Nanotechnology and nanomaterials: promises for improved tissue regeneration. *Nano today*, 2009. 4(1): p. 66-80.
- [2] Bokhari, M.A., et al., The enhancement of osteoblast growth and differentiation in vitro on a peptide hydrogel—polyHIPE polymer hybrid material. *Biomaterials*, 2005. 26(25): p. 5198-5208.
- [3] Ermis, M., E. Antmen, and V. Hasirci, Micro and Nanofabrication methods to control cell-substrate interactions and cell behavior: A review from the tissue engineering perspective. *Bioactive materials*, 2018. 3(3): p. 355-369.
- [4] Habanjar, O., et al., 3D Cell Culture Systems: Tumor Application, Advantages, and Disadvantages. *International Journal of Molecular Sciences*, 2021. 22(22): p. 12200.
- [5] Gasperini, L., J.F. Mano, and R.L. Reis, Natural polymers for the microencapsulation of cells. *Journal of the royal society Interface*, 2014. 11(100): p. 20140817.
- [6] Park, H., et al., Effect of swelling ratio of injectable hydrogel composites on chondrogenic differentiation of encapsulated rabbit marrow mesenchymal stem cells in vitro. *Biomacromolecules*, 2009. 10(3): p. 541-546.

در تمام بسترهای کشت آلزینات و آلزینات-پلی‌ال لیزین مورفولوژی سلول‌ها یکسان است و تنها قطر سلول‌ها در هر بستر تفاوت دارد. برای کمی کردن میزان قطر سلول‌ها و مقایسه‌ی آن در میکروژل‌های آلزینات و آلزینات-پلی‌ال لیزین میانگین قطر سلول‌ها توسط نرم‌افزار ImageJ به‌دست آمد و در جدول ۲ قابل مشاهده است. کاهش میانگین قطر و حجم سلول‌ها در میکروژل‌های تک‌سلولی و چندسلولی آلزینات-پلی‌ال لیزین در مقایسه با میکروژل‌های آلزینات می‌تواند به علت تکثیر بیشتر سلول‌ها در حضور پلی‌ال لیزین و همچنین ممانعت فضایی سلول‌ها باشد که مانع از افزایش بیشتر حجم سلول‌ها می‌شود.

همان‌طور که در توضیحات بالاتر نیز اشاره شد، آلزینات به‌تنهایی و بدون افزوده شدن کوپلیمرهای زیستی همانند ژلاتین، آگارز یا کیتوزان و همچنین در نبود پپتیدهای اتصالی نظیر فیبرونکتین، RGD، کلاژن یا پلی‌ال لیزین بستر مناسبی برای اتصال سلول‌ها فراهم نمی‌کند. بپی سارکر در سال ۲۰۱۵ نشان داد که برای چسبندگی بهتر سلول‌ها به بسترهای آلزیناتی نیاز به بهبود فاکتورهای اتصالی می‌باشد [۱۸]. نتایج به‌دست آمده با مطالعات پیشین هم‌راستا می‌باشد. در مطالعات پیشین اثر فاکتورهای اتصالی در بستر سه‌بعدی به‌عنوان پارامتر چسبندگی سلول و جلوگیری از مهاجرت سلول‌ها نشان داده شده است. چپارا د پاسکالیس و ساندرین اتین مانویل در مطالعه‌ای مروری در سال ۲۰۱۷ چنین جمع‌بندی کردند که "فعل‌وانفعالات با ماتریکس خارج سلولی از طریق چسبندگی‌های کانونی یا همیدسموزوم‌ها از طریق درگیری اینتگرین‌ها با پروتئین‌های فیبریلار ماتریکس خارج سلولی رخ می‌دهد" [۱۹].

#### ۴- نتیجه‌گیری

مفهوم "هیدروژل‌های قابل برنامه‌ریزی" توسط یانگ وانگ (۲۰۱۸) معرفی شد که به کمک طراحی هیدروژل‌های

- [13] Utech, S., et al., Microfluidic generation of monodisperse, structurally homogeneous alginate microgels for cell encapsulation and 3D cell culture. *Advanced healthcare materials*, 2015. 4(11): p. 1628-1633.
- [14] Mohajeri, M., et al., Cell encapsulation in alginate-based microgels using droplet microfluidics; a review on gelation methods and applications. *Biomedical Physics & Engineering Express*, 2022. 8(2): p. 022001.
- [15] Huebsch, N., et al., Harnessing traction-mediated manipulation of the cell/matrix interface to control stem-cell fate. *Nature materials*, 2010. 9(6): p. 518-526.
- [16] Li, F., et al., Microfluidic encapsulation of human mesenchymal stem cells for articular cartilage tissue regeneration. *ACS applied materials & interfaces*, 2017. 9(10): p. 8589-8601.
- [17] Sarker, B., et al., Evaluation of fibroblasts adhesion and proliferation on alginate-gelatin crosslinked hydrogel. *PloS one*, 2014. 9(9): p. e107952.
- [18] Sarker, B., et al., Alginate-based hydrogels with improved adhesive properties for cell encapsulation. *International journal of biological macromolecules*, 2015. 78: p. 72-78.
- [19] De Pascalis, C. and S. Etienne-Manneville, Single and collective cell migration: the mechanics of adhesions. *Molecular biology of the cell*, 2017. 28(14): p. 1833-1846.
- [20] Wang, Y., Programmable hydrogels. *Biomaterials*, 2018. 178: p. 663-680.
- [7] Temenoff, J.S., et al., In vitro osteogenic differentiation of marrow stromal cells encapsulated in biodegradable hydrogels. *Journal of Biomedical Materials Research Part A: An Official Journal of The Society for Biomaterials, The Japanese Society for Biomaterials, and The Australian Society for Biomaterials and the Korean Society for Biomaterials*, 2004. 70(2): p. 235-244.
- [8] Zhang, M.W., et al., Adapting biodegradable oligo (poly (ethylene glycol) fumarate) hydrogels for pigment epithelial cell encapsulation and lens regeneration. *Tissue Engineering Part C: Methods*, 2010. 16(2): p. 261-267.
- [9] Tendulkar, S., et al., A three-dimensional microfluidic approach to scaling up microencapsulation of cells. *Biomedical microdevices*, 2012. 14(3): p. 461-469.
- [10] Aguilar, L.M.C., et al., Formation of alginate microspheres prepared by optimized microfluidics parameters for high encapsulation of bioactive molecules. *Journal of Colloid and Interface Science*, 2021. 587: p. 240-251.
- [11] Rogan, H., F. Ilagan, and F. Yang, Comparing single cell versus pellet encapsulation of mesenchymal stem cells in three-dimensional hydrogels for cartilage regeneration. *Tissue Engineering Part A*, 2019. 25(19-20): p. 1404-1412.
- [12] An, C., et al., Continuous microfluidic encapsulation of single mesenchymal stem cells using alginate microgels as injectable fillers for bone regeneration. *Acta Biomaterialia*, 2020. 111: p. 181-196.

# Study on the Viability and Proliferation of Single Mesenchymal Stem Cell Encapsulated in Alginate and Alginate-PLL Using Microfluidic Approach

Hossein Soleymani<sup>1</sup>, Mohammad Ghorbani<sup>1</sup>, Abdollah Allahverdi<sup>1</sup>, Hossein Naderi-Manesh<sup>1\*</sup>

1. PhD of Biophysics, Department of Biophysics, Faculty of Biological Sciences, Tarbiat Modarres University, Tehran, Iran.
2. Assistant Professor of Biophysics, Department of Biophysics, Faculty of Biological Sciences, Tarbiat Modarres University, Tehran, Iran.
3. Professor of Biophysics, Department of Biophysics, Faculty of Biological Sciences, Tarbiat Modarres University, Tehran, Iran.

Receipt: 2022/04/30

Accepted: 2022/06/12

## Abstract

Stem cells are characterized by their capacity for self-renewal and their ability to differentiate into specific cell types under the influence of their microenvironment. It is known that matrix chemistry controls stem cell differentiation. Single cell encapsulations of the Mesenchymal stem cells into a semi-permeable microgel, allows a greater control of the stem cell fate. In this study, a chip for single-cell encapsulation was designed and fabricated using microfluidic technology. By using microfluidic chip, human bone marrow mesenchymal stem cells (hBMSCs) are encapsulated inside alginate and alginate-poly-l lysine (PLL) microgels. The results of long-term viability of MSCs inside alginate-PLL microgels, shows a significant increase compared to alginate microgels. Mesenchymal stem cell proliferation in alginate-PLL microgels also increased significantly on days 14 and 21. It seems that PLL improves cell adhesion and function by creating a positively charged matrix. Microscopic studies indicate that the morphology of the cells inside the microgels is spherical. However, the average diameter and volume of cells in microgels containing PLL are smaller than others, which indicates more proliferation and space limitation inside the microgels. Therefore, single cell alginate-PLL microgels provide a suitable substrate in clinical studies for tissue engineering, organ transplantation and cell therapy.

## Keywords:

Microfluidics, Mesenchymal stem cells, Single cell encapsulation, Tissue engineering, Microgel