

بررسی وضعیت بقای سلولی و بیان نشانگرهای عصبی در سلول‌های حاصل از تمایز سلول‌های بنیادی مشتق از بافت چربی در سیستم کشت سه بعدی آلزینات

زهرا خسروی زاده^۱، دکتر شهناز رضوی^۲، دکتر حمید بهرامیان^۳، محمد کاظمی^۴

مقاله پژوهشی

چکیده

مقدمه: مطالعات متعددی برای فراهم کردن تعداد کافی سلول‌های عصبی جهت درمان آسیب‌های نورودژنراتیو انجام شده است. سلول‌های بنیادی جدا شده از بافت چربی، میزان تکثیر و مقاومت زیادی نسبت به آپوپتوز دارند. این سلول‌ها، قابلیت تمایز به دودمان‌های مختلف سلولی از قبیل سلول‌های عصبی را دارند. هیدروژل آلزینات، پلیمر پلی‌ساکارییدی است که دارای ویژگی‌های مناسبی از قبیل زیست‌سازگاری و عدم تحریک سیستم ایمنی می‌باشد. در این مطالعه، تأثیر هیدروژل آلزینات بر میزان بقا و بیان نشانگرهای عصبی سلول‌های حاصل از تمایز سلول‌های بنیادی جدا شده از بافت چربی انسانی بررسی شد.

روش‌ها: سلول‌های بنیادی جدا شده از بافت چربی انسانی در محیط کشت عصبی القا و سپس در هیدروژل آلزینات انکپسوله شدند. میزان رشد و تمایز سلول‌ها به ترتیب با استفاده از ارزیابی Doubling time و Real time quantitative reverse transcription polymerase chain reaction (Real time RT-PCR) (Real time RT-PCR) ۷ روز پس از انکپسوله کردن سلول‌ها بررسی شد. آنالیز داده‌ها با استفاده از آزمون One way-ANOVA انجام گردید.

یافته‌ها: میزان رشد سلول‌های انکپسوله در هیدروژل آلزینات، کاهش معنی‌داری را نسبت به گروه شاهد نشان داد ($P < 0/001$). در حالی که میانگین بیان ژن‌های GFAP (Glial fibrillary acidic protein)، Nestin و MAP2 (Microtubule-associated protein 2) در سلول‌های انکپسوله در مقایسه با گروه شاهد به طور معنی‌داری افزایش یافت ($P < 0/001$).

نتیجه‌گیری: اگر چه سرعت تکثیر سلول‌های انکپسوله در هیدروژل آلزینات، در مقایسه با گروه شاهد به طور معنی‌داری کاهش یافت، اما هیدروژل آلزینات می‌تواند باعث افزایش تمایز عصبی سلول‌های انکپسوله شود.

واژگان کلیدی: هیدروژل آلزینات، سلول‌های بنیادی جدا شده از بافت چربی، تمایز عصبی، تکثیر

ارجاع: خسروی زاده زهرا، رضوی شهناز، بهرامیان حمید، کاظمی محمد. بررسی وضعیت بقای سلولی و بیان نشانگرهای عصبی در سلول‌های حاصل از تمایز سلول‌های بنیادی مشتق از بافت چربی در سیستم کشت سه بعدی آلزینات. مجله دانشکده پزشکی

اصفهان ۱۳۹۴؛ ۳۳ (۳۵۰): ۱۴۹۱-۱۵۰۵

۱- دانشجوی دکتری، گروه علوم تشریحی و بیولوژی مولکولی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی تهران، تهران، ایران

۲- استاد، گروه علوم تشریحی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران

۳- دانشیار، گروه علوم تشریحی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران

۴- دانشجوی دکتری، گروه ژنتیک و بیولوژی مولکولی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران

مقدمه

قدرت بازسازی سیستم عصبی بسیار کم است و به علت محدودیت تعداد سلول‌های بنیادی عصبی قابل دسترس در سیستم عصبی پس از تولد، به کارگیری پیوند سلول‌های بنیادی نورونی، زمینه‌ی مناسبی جهت بهبود عملکرد اعصاب در بیماری‌های نروژنراتیو و ضایعات عصبی مانند پارکینسون، کره هانتینگتون و آسیب طناب نخاعی فراهم نموده است (۱). مهندسی بافت، تلاش می‌کند مدل‌هایی را برای جایگزینی بافت عصبی آسیب دیده فراهم کند. برای رسیدن به این هدف، سلول‌های ویژه و داربست‌های پلیمری به کار گرفته می‌شوند (۲).

به تازگی، سلول‌های بنیادی و پیش‌ساز از بافت‌های فرد بالغ مانند مغز استخوان، پوست، عضله و چربی جدا شده‌اند (۳). بافت چربی یک منبع از سلول‌های استرومایی مزانشیمی چند استعدادی است. سلول‌های جدا شده از بافت چربی، قادر به خودنوسازی هستند و می‌توانند برای تمایز به رده‌های بافتی مختلفی مانند آدیپوسیت‌ها، استئوبلاست‌ها، میوبلاست‌ها و کندروبللاست‌ها القا شوند (۴-۵). پژوهشگران دریافته‌اند که سلول‌های بنیادی جدا شده از بافت چربی (Adipose-derived stem cells یا ADSCs) همچنین، می‌توانند به سلول‌های مشابه سلول‌های شوان با قابلیت‌های فنوتیپی و عملکردی تمایز یابند (۶). به علاوه، بافت چربی فراوان است و جهت کاربرد کلینیکی کمتر از سایر سلول‌های بنیادی سیستم ایمنی را درگیر می‌کند (۷).

مطالعات اخیر نشان داده است که سلول‌های بنیادی حاصل از بافت چربی، می‌تواند یک جایگزین مناسب برای سلول‌های بنیادی جدا شده از بافت مغز

استخوان محسوب شود؛ چرا که این بافت، از طریق لیپوساکشن و روش‌هایی که نسبت به آسپیراسیون از مغز استخوان کمتر تهاجمی است، به دست می‌آید (۸-۱۰).

تعداد سلول‌های بنیادی استخراج شده از این بافت، نسبت به مغز استخوان بسیار بیشتر است (در بافت مغز استخوان ۰/۰۰۲ و در بافت چربی ۲ درصد) (۱۱). همچنین، سلول‌های چربی، سرعت تکثیر بالاتری نسبت به سلول‌های بنیادی مشتق از بافت مغز استخوان دارند. از این رو، می‌توان تعداد کافی سلول بنیادی از این بافت استخراج و در موارد کلینیکی استفاده نمود (۱۲).

آزمایش‌ها نشان داده است که سلول‌های بنیادی جدا شده از بافت چربی، عوامل نوروتروفیک و عوامل رشد عصبی بهبود دهنده‌ی بازسازی میلین را در اعصاب آسیب دیده تولید می‌کنند و نسبت به آپوپتوز مقاوم‌تر هستند (۱۳-۱۵، ۱۱).

تحقیقات اخیر نشان داده است که تمایز این سلول‌ها به خصوص به سلول‌های عصبی، بستگی به شرایط محیط کشت، انتخاب نوع تحریک کننده‌ها و عوامل رشد یا اثرهای تنظیمی و القایی انواع عوامل خارجی در شرایط *In vitro* دارد.

از طرف دیگر، در مهندسی بافت از هیدروژل‌ها به عنوان داربست جهت ایجاد محیط مناسب کشت استفاده می‌شود. داربست به عنوان فراهم کننده‌ی ماتریکس خارج سلولی و تولید کننده‌ی سیگنال‌هایی برای سلول‌ها و هدایت رشد بافت جدید، عمل می‌کند (۱۶).

هیدروژل آلزینات، داربست مناسبی برای پیوند سلول‌های بنیادی عصبی است؛ چرا که به خوبی با

بیشتر و جمع‌شدگی کمتری دارند؛ در حالی که ژل‌های با محتوای M نرم‌تر هستند و خاصیت الاستیکی و منافذ کمتری دارند (۲۵). پلی‌ساکاریدهای ماتریکس خارج سلولی، هدایت آکسونی، عملکرد، تکامل سیناپسی و مهاجرت سلولی را تحت تأثیر قرار می‌دهند (۲۶-۲۷).

بنا بر این، داربست‌هایی با پایه‌ی پلی‌ساکاریدی یا داربست‌های اصلاح شده با پلی‌ساکاریدها در مهندسی بافت عصبی بررسی شده‌اند (۱۹). توالی‌های پلی‌ساکاریدی آلزینات، ممکن است مانند گروه‌های عملکردی در ماتریکس خارج سلولی مغز عمل کنند که می‌تواند آبخارهای انتقال سیگنال برای هدایت مهاجرت سلولی و رشد عصبی را تعدیل کنند (۲۸). با توجه به این که سیستم عصبی مرکزی، مکانی با مصنوعیت ایمنی می‌باشد، ممکن است سلول‌های انکپسوله شده در هیدروژل آلزینات به خوبی توسط سیستم عصبی مرکزی تحمل شوند (۲۹).

هیدروژل آلزینات، به علت تهیه‌ی آسان و توانایی آن برای انکپسوله کردن سلول‌ها مورد توجه قرار گرفته است (۳۰-۳۴). این ماده به طور وسیعی برای رهایش دارو، انکپسوله کردن سلول و تولید مجدد بافت استفاده می‌شود (۳۵-۴۰). انواع مختلفی از سلول‌ها در هیدروژل آلزینات انکپسوله و به صورت *In vivo* و *In vitro* کشت داده شده‌اند (۴۱-۴۵، ۳۰). در مطالعه‌ای، رشد و تمایز سلول‌های بنیادی جنینی به کاردیومیوسیت در هیدروژل آلزینات بررسی شد. نتایج این مطالعه، نشان داد که سلول‌های بنیادی جنینی انکپسوله در این هیدروژل، می‌توانند به ساختارهای شبه بلاستولا تبدیل شوند (۴۶). در مطالعه‌ی دیگری، فیبروبلاست‌های انکپسوله

محیط *In vitro* و بافت سیستم عصبی مرکزی سازگار است. این ماده، به طور طبیعی در جلبک قهوه‌ای یافت می‌شود و می‌تواند توسط باکتری سنتز شود (۱۷). آلزینات، دارای دو منومر D-mannuronic acid (M) و L-guluronic acid (G) است. آلزینات، یک هیدروژل با سازگاری زیستی است که از آن برای انکپسوله کردن سلول‌ها با هدف حفاظت سلول از سیستم ایمنی میزبان استفاده می‌شود. در حالی که مولکول‌های کوچک مثل گلوکز، اکسیژن و مواد زاید تولید شده، آزادانه از ماتریکس ژل عبور می‌کنند (۱۸).

این هیدروژل به طور مهم برای انکپسوله کردن سلولی شامل سلول‌های بنیادی عصبی استفاده می‌شود و به عنوان پلیمری با بار منفی، هیدروفیل و مغذی طبقه‌بندی می‌شود (۱۹).

آلزینات، دارای خصوصیات منحصر به فرد زیادی برای استفاده در انکپسوله کردن سلول‌ها است. از جمله به علت داشتن خاصیت هیدروفیلیک، می‌تواند به صورت یک ماده‌ی زمینه‌ی خارج سلولی بستری مناسب جهت رشد سلول‌ها فراهم کند. به علاوه، ژلاتینه شدن آن در دمای اتاق نیاز به وجود حلال‌های آبی ندارد و تخلخل ژلی بالای آن سبب سهولت در انتشار ماکرومولکول‌ها می‌شود. داربست آلزینات، می‌تواند محیط مناسبی را جهت تسهیل کشت سلول‌ها از طریق افزایش تجمع سلولی ایجاد کند. این ویژگی‌های آلزینات، منجر به استفاده‌ی مؤثر آن در مهندسی بافت شده است (۲۰-۲۱).

خواص مکانیکی هیدروژل آلزینات، می‌تواند به وسیله‌ی کنترل وزن مولکولی پلیمر، نسبت M:G، انواع اتصالات عرضی و غلظت کاتیون‌های اتصالات عرضی تعیین شود (۲۲-۲۴). ژل‌های آلزینات غنی از G، منافذ

بالا تری از سلول‌های عصبی جهت پیوند و کاربرد در کلینیک استفاده نمود.

روش‌ها

روش جداسازی سلول‌های بنیادی از بافت چربی: نمونه‌های چربی انسانی استفاده شده در این تحقیق، از بافت چربی سه خانم، پس از تکمیل فرم رضایت و عمل سزارین تهیه شد. بافت چربی بلافاصله پس از عمل جراحی در ظرف حاوی PBS (Phosphate-buffered saline) به آزمایشگاه بافت‌شناسی منتقل شد. بافت چربی به همراه ظرف آن وزن شد. زیر هود، نمونه چند بار با PBS شسته شد تا دبری و خون از بافت چربی جدا شود. پس از قطعه قطعه کردن، بافت چربی به فالكون ۵۰ ml منتقل شد. بافت‌های جدا شده از چربی، به ظرف منتقل و بار دیگر وزن شد و با کم کردن آن از وزن اولیه، وزن چربی استفاده شده تعیین شد. به ازای هر گرم چربی، ۰/۵ ml آنزیم کلاژناز I ۰/۰۱ درصد به فالكون اضافه شد. پس از مخلوط کردن آنزیم با چربی، فالكون به مدت ۳۰ دقیقه در انکوباتور قرار داده شد. برابر حجم آنزیم، محیط کشت حاوی FBS (Fetal bovine serum) ۱۰ درصد به فالكون حاوی چربی جهت خشتی کردن آنزیم اضافه و سپس به مدت ۱۰ دقیقه با دور rpm ۱۶۰۰ سانتریفوژ شد. مایع رویی تخلیه و دوباره محیط کشت به رسوب سلولی اضافه و پیپت شد و نمونه به مدت ۵ دقیقه با دور rpm ۱۶۰۰ سانتریفوژ شد. پس از تخلیه مایع رویی، سوسپانسیون سلولی جهت کشت به فلاسک‌های محتوی محیط کشت DMEM/ F12 (Dulbecco's modified eagle medium/F-12)

در آلزینات، برای حداقل ۶۰ روز زنده ماندند و حفظ ثبات سلول‌ها در موقعیت مناسب توسط آلزینات، باعث تولید ماتریکس خارج سلولی و عوامل رشد شد (۲). Xie و همکاران، سلول‌های بنیادی مشتق از بافت چربی را در هیدروژل پپتیدی خاص به عصب تمایز دادند و ۱۰ روز پس از تمایز عصبی، توده‌های سلولی تمایز یافته با Nestin رنگ گرفتند (۸).

انکپسوله کردن سلول، یکی از مهم‌ترین یافته‌ها برای سلول درمانی است. با این وجود، این روش سلول درمانی به دلیل تحریک سیستم ایمنی در کلینیک استفاده نمی‌شود. سلول‌های غیر اتولوگ انکپسوله، سیتوکین‌هایی را ترشح می‌کنند که در نهایت منجر به پاسخ سیستم ایمنی میزبان و احاطه شدن کپسول‌های حاوی سلول به وسیله‌ی بافت التهابی می‌شوند. این پاسخ التهابی، باعث کاهش بقای سلول‌های انکپسوله می‌شود (۴۷-۴۸).

یکی از راه‌های کاهش پاسخ ایمنی میزبان، استفاده از سلول‌های بنیادی مزانشیمی بافت خود میزبان است. با توجه به مزایای سلول‌های بنیادی جدا شده از بافت چربی به عنوان یک منبع اتولوگ از سلول‌های بنیادی و ویژگی‌های منحصر به فرد کپسول هیدروژل آلزینات در تکثیر و تمایز سلول‌های بنیادی، تصمیم گرفته شد که این سلول‌ها در هیدروژل آلزینات کشت شوند و بیان ژن‌های GFAP (Glial fibrillary acidic protein)، Nestin و MAP2 (Microtubule-associated protein 2) در این سلول‌ها بررسی و با گروه شاهد مقایسه شود. در صورتی که سلول‌های بنیادی جدا شده از بافت چربی در هیدروژل آلزینات تمایز عصبی مطلوبی داشته باشند، می‌توان از این روش برای فراهم کردن درصد

۲۴ well محتوی محلول CaCl_2 ، 102 mM قطره گذاری شد. پلیت محتوی بیدهای آلژینات به مدت نیم ساعت در انکوباتور قرار داده شد. محلول CaCl_2 از روی بیدها حذف شد و بیدها دو بار با بافر 20 mM Tris و یک بار با محیط کشت شسته شد. سپس محیط کشت القای عصبی، حاوی آنتی بیوتیک به چاهکها اضافه گردید و پلیتها در انکوباتور قرار گرفت.

بررسی مورفولوژی سلولهای انکپسوله با استفاده از SEM: مورفولوژی سلولهای انکپسوله شده در آلژینات، با استفاده از میکروسکوپ الکترونی (SEM) یا Scanning electron microscope) بررسی شد. بیدهای آلژینات در پارافرمالدهید 4% درصد تثبیت و برشهای انجمادی (Cryocut 1800, reichert, JUNG, Germany) تهیه شد. برشهای $9 \mu\text{m}$ پوشش طلا داده شد و سپس با میکروسکوپ الکترونی (Seron Technology AIS 2500, India) بررسی گردید.

ارزیابی Doubling time: زمان دو برابر شدن (Doubling time)، به عنوان معیاری جهت بررسی رشد سلولهای بنیادی جدا شده از بافت چربی محاسبه شد. سلولها با تراکم سلولی 5×10^4 سلول در چاهک پلیت 6 well (گروه شاهد) و همین تعداد سلول در هیدروژل آلژینات به مدت 1 روز (گروه 1)، 3 روز (گروه 2) و 7 روز (گروه 3) کشت شد. Doubling time با استفاده از فرمول زیر محاسبه شد:

$$\text{Doubling time} = T \left[\frac{\ln 2}{\ln(N_2 - N_1)} \right]$$

T برابر با زمان آزمایش، N_1 تعداد اولیه و N_2 تعداد نهایی سلولها است.

حاوی FBS 10% درصد و پنی سیلین / استرپتومایسین 1% درصد منتقل شد.

القای تمایز عصبی از طریق تهیهی نوروسفر: پس از انجام شمارش سلولی جهت تشکیل نوروسفر، $10^6 \times 1$ سلول به محیط DMEM/F12 حاوی Human epidermal (hEGF, Heparin pen/str (growth factor (Basic fibroblast growth factor)، bFGF و B27 منتقل شد. عوامل hEGF، bFGF و B27 هر سه روز یک بار به محیط اولیه اضافه شدند.

القای تمایز نورونیک: با تشکیل نوروسفرها در روز هفتم پس از القا، محیط حاوی نوروسفر به فالكون 15 ml منتقل شد. 1 ml آنزیم تریپسین - EDTA (Ethylenediaminetetraacetic acid) به پتری دیش اضافه شد و جهت جدا شدن سلولها از کف دیش، سه دقیقه در انکوباتور قرار داده شد. با استفاده از محیط کشت محتوی سرم، آنزیم خنثی شد و پس از چند بار پیپت کردن، 5 دقیقه با دور 1600 rpm سانتریفوژ شد. محیط روی سلولها تخلیه و محیط کشت نوروبازال به نوروسفرهای منفرد شده اضافه شد. جهت انجام هر آزمایش، تعداد مناسب سلول در نظر گرفته شد.

سلولهای کشت تک لایه‌ای به عنوان گروه شاهد و سلولهای انکپسوله شده در هیدروژل آلژینات، به عنوان گروه آلژینات در نظر گرفته شدند.

نحوه‌ی انکپسوله کردن سلولها در هیدروژل آلژینات: شمارش سلولی انجام شد و برای هر 1 ml محلول هیدروژل آلژینات $10^6 \times 1$ سلول در نظر گرفته شد. محلول آلژینات حاوی سلولهای بنیادی به وسیله‌ی سرنگ با Gage 22 در چاهکهای پلیت

تکنیک Real time RT-PCR: به منظور تعیین کمی بیان ژن‌های مورد نظر، از این تکنیک استفاده شد. برای جداسازی سلول‌های گروه شاهد از کف پلیت، از آنزیم تریپسین-EDTA استفاده شد. جهت استخراج سلول‌های انکپسوله شده، محیط کشت روی بیدها به یک فالکون منتقل شد. بیدها با بافر Tris شسته شد و به فالکون حاوی ۳ میلی‌لیتر سیترات سدیم منتقل شد. پس از حل شدن بیدها، محیط کشت روی بیدها به فالکون حاوی سیترات سدیم اضافه و ۵ دقیقه با دور ۱۶۰۰ rpm سانتریفوژ شد. به رسوب سلولی گروه شاهد و سلول‌های استخراج شده از آلزایمات ۱ ml PBS اضافه و پس از پیپت کردن به مدت ۵ دقیقه با دور ۱۶۰۰ rpm سانتریفوژ شد. PBS روی سلول‌ها حذف شد و نمونه‌ها روی یخ قرار گرفت. استخراج RNA با استفاده از کیت RNeasymini و ست RNAase-DNAase free و پروتکل مربوط انجام شد. نمونه روی یخ قرار داده شد و در مرحله‌ی بعد، جهت سنتز cDNA (Complementary DNA) از آن استفاده شد. پس از استخراج mRNA (Messenger RNA) با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر، OD (Optical density) نمونه خوانده شد.

با استفاده از نسخه‌برداری معکوس، از روی الگوی mRNA استخراج شده، رشته‌ی cDNA ساخته شد. به این منظور، از هر نمونه mRNA مورد نظر برداشته و به یک میکروتیوب منتقل شد و oligo dt به آن اضافه و پیپت شد. میکروتیوب در دستگاه ترموسایکلر در دمای °C ۶۵ به مدت ۵ دقیقه قرار داده شد. ترکیبی از Reaction buffer، dNTP، Ribolock (Deoxyribonucleotide triphosphates)، و (Revert Acid reverse transcriptase) در یک میکروتیوب تهیه و پیپت شد. میکروتیوب‌ها از دستگاه ترموسایکلر خارج شد و نمونه‌ها روی یخ گذاشته شد. از ترکیب تهیه شده، ۸ μl به هر نمونه اضافه و چند بار پیپت شد. میکروتیوب‌ها به دستگاه ترموسایکلر منتقل و دستگاه برای اعمال دمای °C ۴۲ به مدت ۶۰ دقیقه و دمای °C ۷۰ به مدت ۵ دقیقه تنظیم شد. جهت انجام Real time RT-PCR، ترکیبی از (۱/۵ μl) cDNA، (۱/۵ μl) SYBR، (۱۰ μl) dH₂O، (۷/۹ μl) رشته‌ی پیشرو و رشته‌ی پیرو هر کدام به میزان ۰/۳ μl برای هر ژن تهیه شد. لیست پرایمرهای مورد استفاده در این مطالعه در جدول ۱ آمده است.

جدول ۱. لیست توالی پرایمرهای (پیشرو و پیرو) استفاده شده در تکنیک Real time RT-PCR (Real time quantitative reverse transcription polymerase chain reaction)

| Gene | Forward (top) | Reverse (bottom) |
|--------|----------------------------|------------------------------|
| Nestin | 5'-AACAGCGACGGAGGTCTCTA-3' | 5'-TTCTCTTGTCGCCGAGACTT-3' |
| MAP2 | 5'-TCAGAGGCAATGACCTTACC-3' | 5'-GTGGTAGGCTCTTGGICTTT-3' |
| GFAP | 5'-CCTCTCCCTGGCTCGAATG-3' | 5'-GGAAGCGAACCTTCTCGATGTA-3' |
| GAPDH | 5'-ACCACAGTCCATGCCATCAC-3' | 5'-TCCACCACCCTGTTGCTGTA-3' |

MAP2: Microtubule-associated protein 2; GFAP: Glial fibrillary acidic protein; GAPDH: Glyceraldehyde-3-Phosphate Dehydrogenase

جدا شده از بافت چربی، این سلول‌ها در تصاویر میکروسکوپ مرحله‌ی کنتراست به صورت جمعیتی هتروژن از سلول‌های دوکی شکل دیده شدند. در پاساژ ۲-۳ و تراکم سلولی ۸۰-۹۰ درصد، سلول‌ها آرایش تک لایه‌ای و فیروبلاست شکل داشتند (شکل ۱a). در محیط پیش القای عصبی، تغییر در مورفولوژی سلول‌ها شامل جمع‌شدگی سیتوپلاسم و تشکیل زواید بود. ۲۴-۴۸ ساعت بعد، توده‌های کروی به نام نوروسفر تشکیل شد (شکل ۱b). نوروسفرهای منفرد شده، پس از کشت در محیط القای عصبی، زواید شبه آکسونی و شبه دندریتی داشتند (شکل ۱c).

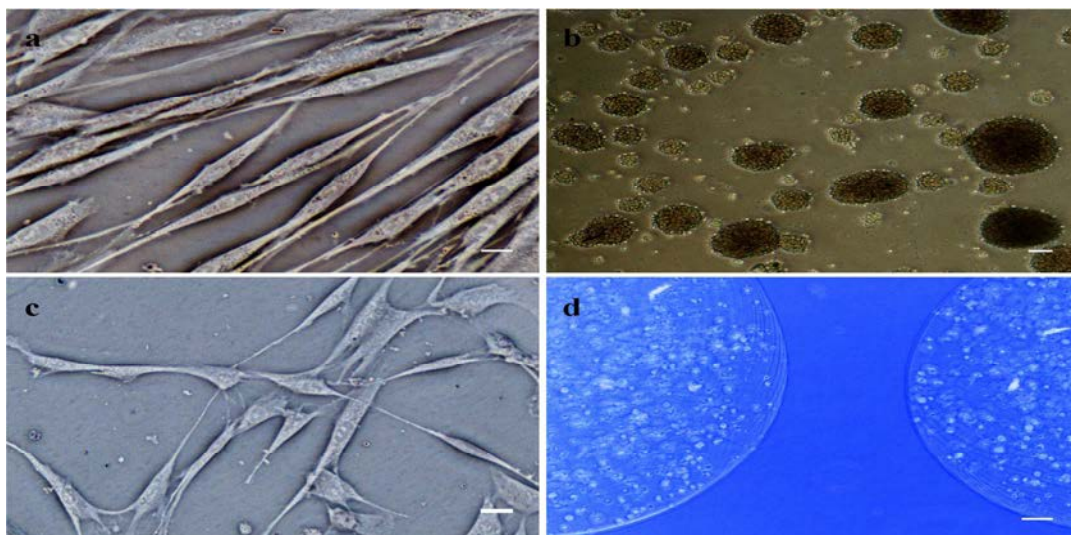
بیدهای آلزینات زیر میکروسکوپ مرحله‌ی کنتراست، به صورت توده‌های کروی بودند و به دلیل ماهیت شفاف هیدروژل آلزینات سلول‌های گرد و بدون زایده‌ی موجود در آن قابل مشاهده بودند (شکل ۱d).

از ژن (Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase) به عنوان ژن شاهد استفاده شد. این آزمایش برای هر نمونه، سه بار تکرار شد. در میکروتیوب‌ها بسته و نمونه‌ها روی یخ قرار داده شد و سپس به دستگاه Real time RT-PCR انتقال یافت. برنامه‌ی دستگاه به مدت ۲ ساعت و ۱۵ دقیقه اجرا شد. از نرم‌افزار SPSS نسخه‌ی ۱۸ (version 18, SPSS Inc., Chicago, IL) و آزمون One-way ANOVA جهت بررسی معنی‌دار اختلاف میان گروه‌ها استفاده شد. $P < 0/050$ به عنوان سطح معنی‌داری در نظر گرفته شد.

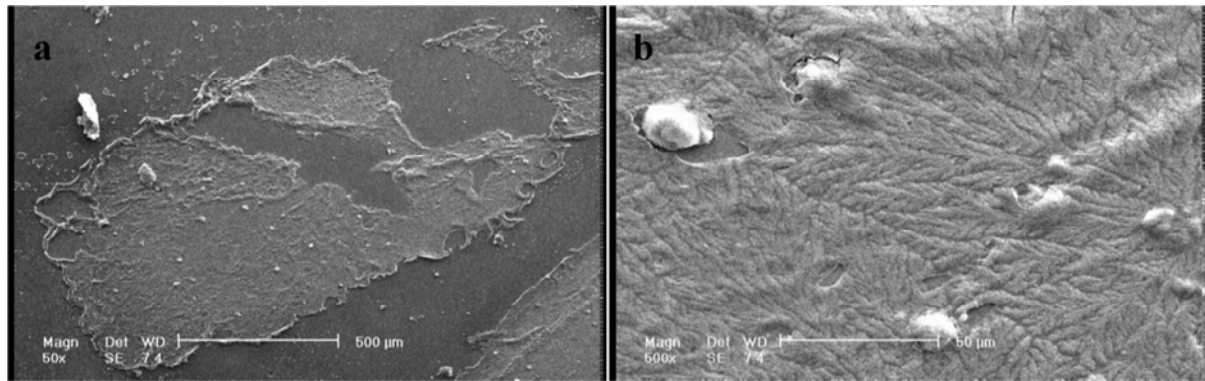
یافته‌ها

بررسی مورفولوژی سلول‌ها

۴۸ ساعت پس از کشت اولیه‌ی سلول‌های بنیادی



شکل ۱. بررسی مورفولوژی سلول‌های بنیادی جدا شده از بافت چربی پس از القای عصبی و انکپسوله کردن در هیدروژل آلزینات. (a) سلول‌های بنیادی جدا شده از بافت چربی کشت شده در محیط کشت (Dulbecco's modified eagle medium/ F-12) سلول‌های بنیادی جدا شده از بافت چربی کشت شده در محیط کشت (DMEM-F12). (b) سلول‌های بنیادی جدا شده از بافت چربی کشت شده در محیط کشت (DMEM-F12) سلول‌های بنیادی جدا شده از بافت چربی کشت شده در محیط کشت (DMEM-F12). (c) کشت تک لایه‌ای سلول‌های بنیادی جدا شده از بافت چربی القا شده. (d) سلول‌های انکپسوله شده در هیدروژل آلزینات. بررسی‌های مورفولوژیک با میکروسکوپ مرحله‌ای کنتراست انجام گرفت. بزرگ‌نمایی در (a)، (b) و (d) ۲۰۰ μm و در (c) ۵۰ μm .



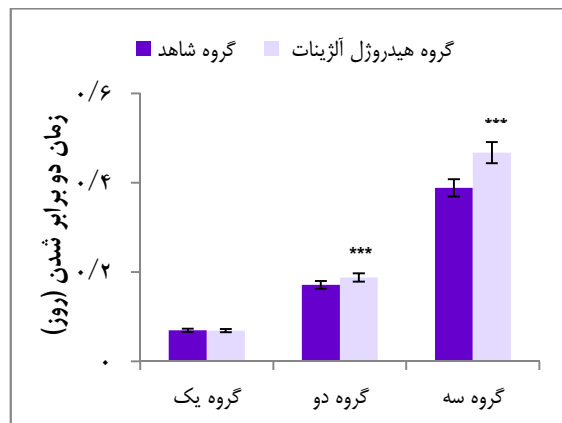
شکل ۲. تصاویر میکروسکوپ الکترونی از برش انجمادی بدهای آلزینات حاوی سلول‌های بنیادی جدا شده از بافت چربی القا شده، شبکه‌ای خزه‌ای شکل حاوی سلول‌های کروی را نشان داد.

در تصاویر میکروسکوپ الکترونی، هیدروژل آلزینات به صورت شبکه‌ای خزه مانند حاوی سلول‌های کروی شکل و بدون زائده بود (شکل‌های ۲a و ۲b).
 بررسی زمان دو برابر شدن (Doubling time) جهت مقایسه‌ی مدت زمان دو برابر شدن سلول‌ها در محیط کشت DMEM/F12 و هیدروژل آلزینات، زمان دو برابر شدن سلول‌ها در روزهای ۱ (گروه ۱)، ۳ (گروه ۲) و ۷ (گروه ۳) برای سلول‌های بنیادی جدا شده از بافت چربی (گروه شاهد) و سلول‌های بنیادی انکپسوله در هیدروژل آلزینات، انجام شد.
 طبق نتایج به دست آمده، زمان دو برابر شدن سلول‌ها در روز هفتم بین دو گروه تفاوت معنی‌داری داشت ($P < 0/001$) که برای سلول‌های انکپسوله در هیدروژل آلزینات ($0/460 \pm 0/005$ روز) بیشتر از سلول‌های گروه شاهد ($0/380 \pm 0/004$ روز) بود.
 با گذشت زمان، میانگین زمان دو برابر شدن سلول‌های انکپسوله در هیدروژل آلزینات، افزایش بیشتری پیدا کرد؛ به طوری که در روز اول پس از کشت، $0/060 \pm 0/003$ روز و در روز هفتم،

در تصاویر میکروسکوپ الکترونی، هیدروژل آلزینات به صورت شبکه‌ای خزه مانند حاوی سلول‌های کروی شکل و بدون زائده بود (شکل‌های ۲a و ۲b).
 بررسی زمان دو برابر شدن (Doubling time) جهت مقایسه‌ی مدت زمان دو برابر شدن سلول‌ها در محیط کشت DMEM/F12 و هیدروژل آلزینات، زمان دو برابر شدن سلول‌ها در روزهای ۱ (گروه ۱)، ۳ (گروه ۲) و ۷ (گروه ۳) برای سلول‌های بنیادی جدا شده از بافت چربی (گروه شاهد) و سلول‌های بنیادی انکپسوله در هیدروژل آلزینات، انجام شد.
 طبق نتایج به دست آمده، زمان دو برابر شدن سلول‌ها در روز هفتم بین دو گروه تفاوت معنی‌داری داشت ($P < 0/001$) که برای سلول‌های انکپسوله در هیدروژل آلزینات ($0/460 \pm 0/005$ روز) بیشتر از سلول‌های گروه شاهد ($0/380 \pm 0/004$ روز) بود.
 با گذشت زمان، میانگین زمان دو برابر شدن سلول‌های انکپسوله در هیدروژل آلزینات، افزایش بیشتری پیدا کرد؛ به طوری که در روز اول پس از کشت، $0/060 \pm 0/003$ روز و در روز هفتم،

بررسی زمان دو برابر شدن (Doubling time)

جهت مقایسه‌ی مدت زمان دو برابر شدن سلول‌ها در محیط کشت DMEM/F12 و هیدروژل آلزینات، زمان دو برابر شدن سلول‌ها در روزهای ۱ (گروه ۱)، ۳ (گروه ۲) و ۷ (گروه ۳) برای سلول‌های بنیادی جدا شده از بافت چربی (گروه شاهد) و سلول‌های بنیادی انکپسوله در هیدروژل آلزینات، انجام شد.
 طبق نتایج به دست آمده، زمان دو برابر شدن سلول‌ها در روز هفتم بین دو گروه تفاوت معنی‌داری داشت ($P < 0/001$) که برای سلول‌های انکپسوله در هیدروژل آلزینات ($0/460 \pm 0/005$ روز) بیشتر از سلول‌های گروه شاهد ($0/380 \pm 0/004$ روز) بود.
 با گذشت زمان، میانگین زمان دو برابر شدن سلول‌های انکپسوله در هیدروژل آلزینات، افزایش بیشتری پیدا کرد؛ به طوری که در روز اول پس از کشت، $0/060 \pm 0/003$ روز و در روز هفتم،



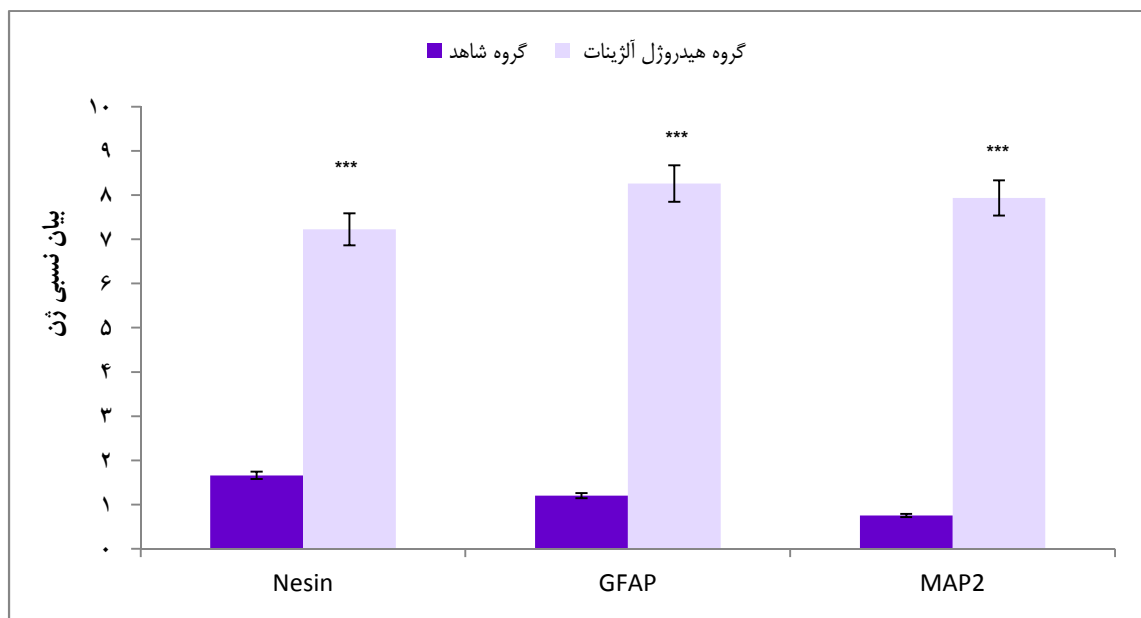
شکل ۳. میانگین زمان دو برابر شدن سلول‌های گروه شاهد و سلول‌های انکپسوله شده در هیدروژل آلزینات در روزهای ۱ (گروه ۱)، ۳ (گروه ۲) و ۷ (گروه ۳). میانگین زمان دو برابر شدن در گروه شاهد به طور معنی‌دار در مقایسه با سلول‌های انکپسوله در روز ۷ کاهش داشت. همچنین، میانگین زمان دو برابر شدن در سلول‌های انکپسوله در روز ۷ به طور معنی‌داری در مقایسه با روز ۱ افزایش یافت ($P < 0/001$ ، ***، میانگین \pm انحراف معیار)

بحث

نتایج مطالعه‌ی حاضر نشان داد که هیدروژل آلزینات، داربست مناسبی را برای کشت و تمایز عصبی سلول‌های بنیادی جدا شده از بافت چربی فراهم می‌کند. اگر چه سرعت تکثیر سلولی در هیدروژل آلزینات کاهش پیدا کرد، اما میانگین بیان ژن‌های GFAP، Nestin و MAP2 در سلول‌های انکپسوله شده در هیدروژل آلزینات، در مقایسه با گروه شاهد افزایش یافت. سلول‌های بنیادی جدا شده از بافت چربی و هیدروژل آلزینات، دارای ویژگی‌های منحصر به فرد جهت استفاده در مهندسی بافت هستند. در این مطالعه، تأثیر هیدروژل آلزینات بر میزان تکثیر و تمایز نورون‌ژنیک سلول‌های بنیادی جدا شده از بافت چربی بررسی شد.

نتایج Real time RT-PCR

جهت بررسی میزان بیان ژن‌های Nestin، GFAP و MAP2 در دو گروه مورد بررسی در روز ۱۴ پس از تمایز، از این تکنیک استفاده شد. میانگین بیان هر سه ژن به طور معنی‌داری در سلول‌های انکپسوله در هیدروژل آلزینات در مقایسه با گروه شاهد افزایش یافت ($P < 0/001$). میانگین بیان ژن Nestin در سلول‌های انکپسوله ($7/22 \pm 3/36$) نسبت به گروه شاهد ($1/60 \pm 0/35$) افزایش یافت. همچنین، میانگین بیان ژن GFAP در سلول‌های انکپسوله ($8/26 \pm 1/11$) در مقایسه با گروه شاهد ($1/20 \pm 0/19$) به طور معنی‌داری افزایش یافت. میانگین بیان ژن MAP2 در سلول‌های انکپسوله ($7/93 \pm 1/45$) نسبت به گروه شاهد ($0/75 \pm 0/17$) افزایش معنی‌داری را نشان داد (شکل ۴).



شکل ۴. مقایسه‌ی میانگین بیان ژن‌های MAP2 (Microtubule-associated protein 2)، Nestin (Glial fibrillary acidic protein)

و GFAP در سلول‌های گروه شاهد و گروه آلزینات در روز ۱۴ پس از تمایز. میانگین بیان هر سه ژن در سلول‌های انکپسوله

در هیدروژل آلزینات، به طور معنی‌داری نسبت به گروه شاهد افزایش یافت ($P < 0/001$ ، میانگین \pm انحراف معیار).

رشد را تنظیم می‌کند که منجر به تشکیل بافت در مهندسی بافت می‌شود (۵۴-۵۲).

مطالعه‌ای نشان داده است که سلول‌های بنیادی عصبی انکپسوله در هیدروژل آلزینات، قادر به ترشح عوامل نوروتروفیک از قبیل BDNF (Brain-derived neurotrophic factor)، NGF (Nerve growth factor) و GDNF (Glial cell-derived neurotrophic factor) هستند (۱). همچنین، سلول‌های بنیادی جدا شده از بافت چربی انسانی می‌توانند به سلول‌های عصبی تمایز داده شوند. این سلول‌ها به وسیله‌ی مورفولوژی عصبی، بیان نشانگرهای عصبی و پاسخ به دپلاریزه شدن غشای سلولی و ویژگی‌های الکتروفیزیولوژیکی مشابه با نورون‌های تکامل یافته شناسایی می‌شوند (۵۵). همچنین، سلول‌های بنیادی جدا شده از بافت چربی انسانی می‌توانند عوامل نوروتروفیک را بیان کنند (۵۶).

از آن جایی که سلول‌های بنیادی جدا شده از بافت چربی در محیط کشت دو بعدی BDNF ترشح می‌کنند، ممکن است با انکپسوله کردن این سلول‌ها در هیدروژل آلزینات مقادیر بیشتری از این عامل ترشح شده باشد که افزایش میزان تمایز عصبی سلول‌های بنیادی جدا شده از بافت چربی را نسبت به گروه شاهد توجیه می‌کند.

یک مطالعه‌ی پیشین نشان داده است که سلول‌های بنیادی جدا شده از بافت چربی کشت شده در آلزینات مولکول‌های ماتریکس غضروف شامل کلاژن نوع II، IV و کندروئیتین ۴- سولفات ترشح می‌کنند (۶). در مطالعه‌ای دیگر، سلول‌های بنیادی مزانشیمی در آلزینات COL2A1 (نشانگر

سلول‌های انکپسوله شده در هیدروژل آلزینات کروی شکل و بدون زائیده بودند، در حالی که سلول‌های گروه شاهد که به صورت تک لایه‌ای کشت شدند، مورفولوژی سلول‌های عصبی را نشان دادند و دارای زواید بلندی بودند. جهت بررسی سرعت تکثیر سلول‌های انکپسوله شده در هیدروژل آلزینات، از Doubling time استفاده شد. نتیجه‌ی این آزمایش نشان داد که سرعت تکثیر سلول‌های انکپسوله شده در هیدروژل آلزینات نسبت به گروه شاهد به طور معنی‌داری کاهش یافت.

طبیعت غیر چسبنده‌ی هیدروژل آلزینات، تداخل عمل سلول-سلول را حمایت می‌کند که جهت حفظ بقای سلول و تقویت ویژگی‌های عملکردی سلول‌ها دارای اهمیت است (۴۹). سلول‌های کشت شده در آلزینات، مورفولوژی کروی دارند و اگر چه میزان تکثیر این سلول‌ها کاهش می‌یابد، اما سلول‌ها در این هیدروژل زنده می‌مانند (۲۵).

در تحقیقات متعددی، کاهش تکثیر انواع سلول‌های انکپسوله شده در هیدروژل آلزینات گزارش شده است (۴۴، ۴۹-۵۰). کاهش تکثیر سلولی در هیدروژل آلزینات، ممکن است وابسته به درصد وزنی پایین آلزینات (۱ درصد) مورد استفاده باشد (۱). همچنین، تکثیر سلول‌های بنیادی مزانشیمی نیاز به لنگرگاه دارد، در حالی که هیدروژل آلزینات وضعیت معلق را برای سلول‌ها ایجاد می‌کند که می‌تواند سلول‌ها را در مرحله‌ی G0-G1 متوقف کند (۵۱).

با وجود کاهش تکثیر سلولی، مطالعات نشان می‌دهند که هیدروژل آلزینات، می‌تواند باعث تمایز انواع مختلف سلول‌ها شود. ویژگی‌های فیزیکی هیدروژل‌ها، تولید ماتریکس خارج سلولی و عوامل

هیدروژل آلزینات بررسی شد. نتایج مطالعه‌ی حاضر، نشان داد که تکثیر سلول‌های بنیادی جدا شده از بافت چربی انکپسوله در هیدروژل آلزینات، به طور معنی‌داری کاهش یافت؛ در حالی که تمایز عصبی این سلول‌ها افزایش یافت.

درصد وزنی پایین آلزینات مورد استفاده و متوقف شدن سلول‌ها در مرحله‌ی G0-G1 که توسط این هیدروژل برای سلول‌ها ایجاد می‌شود، ممکن است علتی برای کاهش تکثیر سلولی در هیدروژل آلزینات در تحقیق حاضر باشد. چرا که، آلزینات تداخل عمل سلولی ندارد، سلول‌ها قادر به چسبیدن به شبکه‌ی آلزینات نیستند. چسبندگی سلول برای بقا، تکثیر، تمایز و بیان ژن اغلب سلول‌ها ضروری است (۵۷).

طبیعت غیر چسبنده‌ی هیدروژل آلزینات، تداخل عمل سلول-سلول را حمایت می‌کند که جهت حفظ بقای سلول و تقویت ویژگی‌های عملکردی سلول‌ها دارای اهمیت است (۴۹). ممکن است سلول‌های بنیادی جدا شده از بافت چربی انکپسوله در هیدروژل آلزینات، عوامل نوروتروفیکی را برای پیشبرد تمایز عصبی ترشح کنند.

در مجموع، سلول‌های بنیادی جدا شده از بافت چربی در هیدروژل آلزینات تمایز عصبی مطلوبی داشتند. بنا بر این بررسی میزان تکثیر و تمایز عصبی این سلول در هیدروژل آلزینات به صورت *In vivo* پیشنهاد می‌شود.

تشکر و قدردانی

این مقاله حاصل پایان‌نامه‌ی دوره‌ی کارشناسی ارشد زهرا خسروی زاده به شماره‌ی ۳۹۱۱۴۵ در دانشگاه علوم پزشکی اصفهان می‌باشد.

کندروسیت‌ها) و COL10A1 (نشانگر هیپرتروفی کندروسیت‌ها) را بیان کردند (۵۰).

Purcell و همکاران، سلول‌های بنیادی عصبی کورتکس موش را در آلزینات ۱ درصد کشت دادند و مشاهده کردند که بقا و تکثیر این سلول‌ها از روز ۷ تا ۲۱ افزایش یافت؛ همچنین، توده‌های سلولی تکثیر یافته‌ی بزرگ‌تر، GFAP و Nestin را بیان کردند (۱). بر خلاف این نتایج، در بررسی‌های مطالعه‌ی حاضر، تکثیر سلول‌های بنیادی جدا شده از بافت چربی انکپسوله در هیدروژل آلزینات ۱/۲ درصد کاهش یافت. این سلول‌ها Nestin، GFAP و MAP2 را بیان کردند. احتمال می‌رود نوع متفاوت سلول‌ها و غلظت آلزینات مورد استفاده در دو تحقیق باعث کسب نتایج متفاوت شده باشد.

Matyash و همکاران، سلول‌های بنیادی عصبی انسان و رت را روی هیدروژل آلزینات ۱ درصد یا ۰/۲ درصد در محیط عصبی کشت دادند. این سلول‌ها نوریت‌های بلندتری نسبت به گروه شاهد نشان دادند. به طور تقریبی ۶۰-۷۰ درصد از سلول‌ها برای نشانگر MAP2 یا بتا توبولین III مثبت بودند. در حالی که هیچ سلول GFAP مثبتی دیده نشد (۱۹). نتایج تحقیق حاضر، نشان داد که سلول‌های بنیادی جدا شده از بافت چربی انکپسوله در هیدروژل آلزینات ۱/۲ درصد، بیان GFAP، Nestin و MAP2 را دارند. تفاوت در نوع سلول‌ها و غلظت آلزینات مورد استفاده در دو مطالعه ممکن است باعث وجود میزان متفاوت سلول‌های GFAP مثبت باشد.

روش‌های مختلفی برای تمایز سلول‌های بنیادی جدا شده از بافت چربی به سلول‌های عصبی به کار گرفته شده است. در این مطالعه، تمایز عصبی سلول‌های بنیادی جدا شده از بافت چربی در

References

- Purcell EK, Singh A, Kipke DR. Alginate composition effects on a neural stem cell-seeded scaffold. *Tissue Eng Part C Methods* 2009; 15(4): 541-50.
- Hunt NC, Smith AM, Gbureck U, Shelton RM, Grover LM. Encapsulation of fibroblasts causes accelerated alginate hydrogel degradation. *Acta Biomater* 2010; 6(9): 3649-56.
- Barrilleaux B, Phinney DG, Prockop DJ, O'Connor KC. Review: ex vivo engineering of living tissues with adult stem cells. *Tissue Eng* 2006; 12(11): 3007-19.
- Rodriguez AM, Elabd C, Amri EZ, Ailhaud G, Dani C. The human adipose tissue is a source of multipotent stem cells. *Biochimie* 2005; 87(1): 125-8.
- Zuk PA, Zhu M, Ashjian P, De Ugarte DA, Huang JI, Mizuno H, et al. Human adipose tissue is a source of multipotent stem cells. *Mol Biol Cell* 2002; 13(12): 4279-95.
- Razavi S, Mardani M, Kazemi M, Esfandiari E, Narimani M, Esmaili A, et al. Effect of leukemia inhibitory factor on the myelinogenic ability of Schwann-like cells induced from human adipose-derived stem cells. *Cell Mol Neurobiol* 2013; 33(2): 283-9.
- Xu Y, Liu Z, Liu L, Zhao C, Xiong F, Zhou C, et al. Neurospheres from rat adipose-derived stem cells could be induced into functional Schwann cell-like cells in vitro. *BMC Neurosci* 2008; 9: 21.
- Xie X, Tang Z, Chen J, Yang J, Zeng W, Liu N, et al. Neurogenesis of adipose-derived stem cells in hydrogel. *J Huazhong Univ Sci Technolog Med Sci* 2011; 31(2): 174-7.
- Kim MH, Hong HN, Hong JP, Park CJ, Kwon SW, Kim SH, et al. The effect of VEGF on the myogenic differentiation of adipose tissue derived stem cells within thermosensitive hydrogel matrices. *Biomaterials* 2010; 31(6): 1213-8.
- Jang S, Cho HH, Cho YB, Park JS, Jeong HS. Functional neural differentiation of human adipose tissue-derived stem cells using bFGF and forskolin. *BMC Cell Biol* 2010; 11: 25.
- Kalbermatten DF, Schaakxs D, Kingham PJ, Wiberg M. Neurotrophic activity of human adipose stem cells isolated from deep and superficial layers of abdominal fat. *Cell Tissue Res* 2011; 344(2): 251-60.
- Strem BM, Hedrick MH. The growing importance of fat in regenerative medicine. *Trends Biotechnol* 2005; 23(2): 64-6.
- Schipper BM, Marra KG, Zhang W, Donnenberg AD, Rubin JP. Regional anatomic and age effects on cell function of human adipose-derived stem cells. *Ann Plast Surg* 2008; 60(5): 538-44.
- Lopatina T, Kalinina N, Karagyaur M, Stambolsky D, Rubina K, Revischin A, et al. Adipose-derived stem cells stimulate regeneration of peripheral nerves: BDNF secreted by these cells promotes nerve healing and axon growth de novo. *PLoS One* 2011; 6(3): e17899.
- Razavi S, Razavi MR, Kheirollahi-Kouhestani M, Mardani M, Mostafavi FS. Co-culture with neurotrophic factor secreting cells induced from adipose-derived stem cells: promotes neurogenic differentiation. *Biochem Biophys Res Commun* 2013; 440(3): 381-7.
- Vermette M, Trottier V, Menard V, Saint-Pierre L, Roy A, Fradette J. Production of a new tissue-engineered adipose substitute from human adipose-derived stromal cells. *Biomaterials* 2007; 28(18): 2850-60.
- Boontheekul T, Kong HJ, Mooney DJ. Controlling alginate gel degradation utilizing partial oxidation and bimodal molecular weight distribution. *Biomaterials* 2005; 26(15): 2455-65.
- Gao C, Liu M, Chen J, Zhang X. Preparation and controlled degradation of oxidized sodium alginate hydrogel. *Polym Degrad Stab* 2009; 94(9): 1405-10.
- Matyash M, Despang F, Mandal R, Fiore D, Gelinsky M, Ikonomidou C. Novel soft alginate hydrogel strongly supports neurite growth and protects neurons against oxidative stress. *Tissue Eng Part A* 2012; 18(1-2): 55-66.
- West ER, Xu M, Woodruff TK, Shea LD. Physical properties of alginate hydrogels and their effects on in vitro follicle development. *Biomaterials* 2007; 28(30): 4439-48.
- Haug A, Larsen B, Smidsrod O, Eriksson G, Blinc R, Pausak S. Studies on the sequence of uronic acid residues in alginic acid. *Acta Chemica Scandinavica* 1967; 21(3): 691-704.
- Martinsen A, Skjak-Braek G, Smidsrod O. Alginate as immobilization material: I. Correlation between chemical and physical properties of alginate gel beads. *Biotechnol Bioeng* 1989; 33(1): 79-89.
- Draget KI, Skjak Braek G, Smidsrod O. Alginic acid gels: the effect of alginate chemical composition and molecular weight. *Carbohydrate Polymers* 1994; 25(1): 31-8.
- Smidsrod O, Haug A, Larsen B, Gronowitz S, Hoffman RA, Westerdahl A. The effect of divalent metals on the properties of alginate solutions. I. calcium ions. *Acta Chemica Scandinavica* 1965; 19(2): 329-40.
- Mulder L, Baaijens FPT, Bouten CVC, van Lieshout MI. Cell adhesion on alginate scaffolds for the tissue engineering of an aortic valve - a review. Eindhoven, Netherlands: Eindhoven University of Technology; 2002. p. 22-34.
- Rhiner C, Hengartner MO. Sugar antennae for guidance signals: syndecans and glypicans integrate directional cues for navigating neurons.

- ScientificWorldJournal 2006; 6: 1024-36.
27. Maeda N, Noda M. Involvement of receptor-like protein tyrosine phosphatase zeta/RPTPbeta and its ligand pleiotrophin/heparin-binding growth-associated molecule (HB-GAM) in neuronal migration. *J Cell Biol* 1998; 142(1): 203-16.
 28. Elfenbein A, Simons M. Auxiliary and autonomous proteoglycan signaling networks. *Methods Enzymol* 2010; 480: 3-31.
 29. Barker CF, Billingham RE. Immunologically privileged sites. *Adv Immunol* 1977; 25: 1-54.
 30. Li X, Liu T, Song K, Yao L, Ge D, Bao C, et al. Culture of neural stem cells in calcium alginate beads. *Biotechnol Prog* 2006; 22(6): 1683-9.
 31. Read TA, Stensvaag V, Vindenes H, Ulvestad E, Bjerkvig R, Thorsen F. Cells encapsulated in alginate: a potential system for delivery of recombinant proteins to malignant brain tumours. *Int J Dev Neurosci* 1999; 17(5-6): 653-63.
 32. Rowley JA, Madlambayan G, Mooney DJ. Alginate hydrogels as synthetic extracellular matrix materials. *Biomaterials* 1999; 20(1): 45-53.
 33. Augst AD, Kong HJ, Mooney DJ. Alginate hydrogels as biomaterials. *Macromol Biosci* 2006; 6(8): 623-33.
 34. Drury JL, Mooney DJ. Hydrogels for tissue engineering: scaffold design variables and applications. *Biomaterials* 2003; 24(24): 4337-51.
 35. Coviello T, Matricardi P, Marianecchi C, Alhaique F. Polysaccharide hydrogels for modified release formulations. *J Control Release* 2007; 119(1): 5-24.
 36. Simmons CA, Alsberg E, Hsiong S, Kim WJ, Mooney DJ. Dual growth factor delivery and controlled scaffold degradation enhance in vivo bone formation by transplanted bone marrow stromal cells. *Bone* 2004; 35(2): 562-9.
 37. Kong HJ, Mooney DJ. The effects of poly(ethyleneimine) (PEI) molecular weight on reinforcement of alginate hydrogels. *Cell Transplant* 2003; 12(7): 779-85.
 38. Alsberg E, Kong HJ, Hirano Y, Smith MK, Albeiruti A, Mooney DJ. Regulating bone formation via controlled scaffold degradation. *J Dent Res* 2003; 82(11): 903-8.
 39. Alsberg E, Anderson KW, Albeiruti A, Franceschi RT, Mooney DJ. Cell-interactive alginate hydrogels for bone tissue engineering. *J Dent Res* 2001; 80(11): 2025-9.
 40. Hsiong SX, Huebsch N, Fischbach C, Kong HJ, Mooney DJ. Integrin-adhesion ligand bond formation of preosteoblasts and stem cells in three-dimensional RGD presenting matrices. *Biomacromolecules* 2008; 9(7): 1843-51.
 41. Lee KY, Alsberg E, Mooney DJ. Degradable and injectable poly(aldehyde guluronate) hydrogels for bone tissue engineering. *J Biomed Mater Res* 2001; 56(2): 228-33.
 42. Petruzzo P, Cappai A, Ruiu G, Dessy E, Rescigno A, Brotzu G. Development of biocompatible barium alginate microcapsules. *Transplant Proc* 1997; 29(4): 2129-30.
 43. Schagemann JC, Mrosek EH, Landers R, Kurz H, Ergelet C. Morphology and function of ovine articular cartilage chondrocytes in 3-d hydrogel culture. *Cells Tissues Organs* 2006; 182(2): 89-97.
 44. Markusen JF, Mason C, Hull DA, Town MA, Tabor AB, Clements M, et al. Behavior of adult human mesenchymal stem cells entrapped in alginate-GRGDY beads. *Tissue Eng* 2006; 12(4): 821-30.
 45. Saha K, Keung AJ, Irwin EF, Li Y, Little L, Schaffer DV, et al. Substrate modulus directs neural stem cell behavior. *Biophys J* 2008; 95(9): 4426-38.
 46. Magyar JP, Nemir M, Ehler E, Suter N, Perriard JC, Eppenberger HM. Mass production of embryoid bodies in microbeads. *Ann N Y Acad Sci* 2001; 944: 135-43.
 47. de Groot M, Schuurs TA, van Schilfgaarde R. Causes of limited survival of microencapsulated pancreatic islet grafts. *J Surg Res* 2004; 121(1): 141-50.
 48. Orive G, Tam SK, Pedraz JL, Halle JP. Biocompatibility of alginate-poly-L-lysine microcapsules for cell therapy. *Biomaterials* 2006; 27(20): 3691-700.
 49. Dar A, Shachar M, Leor J, Cohen S. Optimization of cardiac cell seeding and distribution in 3D porous alginate scaffolds. *Biotechnol Bioeng* 2002; 80(3): 305-12.
 50. Ma HL, Hung SC, Lin SY, Chen YL, Lo WH. Chondrogenesis of human mesenchymal stem cells encapsulated in alginate beads. *J Biomed Mater Res A* 2003; 64(2): 273-81.
 51. Reddy GP, Tiarks CY, Pang L, Wu J, Hsieh CC, Quesenberry PJ. Cell cycle analysis and synchronization of pluripotent hematopoietic progenitor stem cells. *Blood* 1997; 90(6): 2293-9.
 52. Bryant SJ, Chowdhury TT, Lee DA, Bader DL, Anseth KS. Crosslinking density influences chondrocyte metabolism in dynamically loaded photocrosslinked poly(ethylene glycol) hydrogels. *Ann Biomed Eng* 2004; 32(3): 407-17.
 53. Bryant SJ, Durand KL, Anseth KS. Manipulations in hydrogel chemistry control photoencapsulated chondrocyte behavior and their extracellular matrix production. *J Biomed Mater Res A* 2003; 67(4): 1430-6.
 54. Bryant SJ, Anseth KS. Hydrogel properties influence ECM production by chondrocytes photoencapsulated in poly(ethylene glycol) hydrogels. *J Biomed Mater Res* 2002; 59(1): 63-72.
 55. Bossio C, Mastrangelo R, Morini R, Tonna N, Coco S, Verderio C, et al. A simple method to generate adipose stem cell-derived neurons for screening purposes. *J Mol Neurosci* 2013; 51(2): 274-81.

56. Razavi S, Razavi MR, Zarkesh EH, Kazemi M, Mostafavi FS. Comparing brain-derived neurotrophic factor and ciliary neurotrophic factor secretion of induced neurotrophic factor secreting cells from human adipose and bone marrow-derived stem cells. *Dev Growth Differ* 2013; 55(6): 648-55.
57. Retta S, Ternullo M, Tarone G. Adhesion to matrix proteins. In: Dejana E, Corada M, editors. *Adhesion protein protocols*. 96th ed. Totowa, NJ: Humana Press; 1999. p. 125-30.

Cell Viability and Neural Markers Expression of Human Adipose-Derived Stem Cells after Neural Induction in Alginate Tridimensional Cell Culture

Zahra Khosravizadeh MSc¹, Shahnaz Razavi PhD², Hamid Bahramian PhD³,
Mohammad Kazemi MSc⁴

Original Article

Abstract

Background: Different studies have been done to obtain sufficient number of neuronal cells for treatment of central nervous system injuries. Adipose-derived stem cells have higher proliferation rate and more resistant to apoptosis. These cells can be induced to differentiate along several multilineage cells such as neuron-like cells. Alginate hydrogel is a polysaccharide polymer that has proper properties including biocompatibility with no immunogenicity. In this study, the effect of alginate hydrogel on the cell viability, proliferation rate and neurogenic differentiation of human adipose derived stem cells was evaluated at 14 days after induction.

Methods: Adipose-derived stem cells isolated from human, were cultured in neural induction media and seeded into alginate hydrogel. The cell viability and differentiation efficiency of encapsulated cells were evaluated via doubling time and real time quantitative reverse transcription polymerase chain reaction (real time RT-PCR) analysis, respectively. The collected data was analyzed using one-way ANOVA test.

Findings: The rate of proliferation of encapsulated cells significantly decreased as compared with control group ($P < 0.001$). The expression of nestin, glial fibrillary acidic protein (GFAP) and microtubule-associated protein 2 (MAP2) markers significantly increased as compared with control group ($P < 0.001$).

Conclusion: Altogether proliferation rate of encapsulated cells in alginate hydrogel significantly decreased as compared with control group, but alginate hydrogel can promote neural differentiation of adipose-derived stem cells.

Keywords: Alginate hydrogel, Adipose-derived stem cells, Neurogenic differentiation, Proliferation

Citation: Khosravizadeh Z, Razavi Sh, Bahramian H, Kazemi M. **Cell Viability and Neural Markers Expression of Human Adipose-Derived Stem Cells after Neural Induction in Alginate Tridimensional Cell Culture.** J Isfahan Med Sch 2015; 33(350): 1491-505

1- PhD Student, Department of Anatomical Sciences and Molecular Biology, School of Medicine, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, Iran

2- Professor, Department of Anatomical Sciences, School of Medicine, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, Iran

3- Associate Professor, Department of Anatomical Sciences, School of Medicine, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, Iran

4- PhD Student, Department of Genetics and Molecular Biology, School of Medicine, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, Iran

Corresponding Author: Shahnaz Razavi PhD, Email: razavi@med.mui.ac.ir