

القای تشکیل سلول‌های شبه عصبی از سلول‌های بنیادی مشتق از بافت چربی در هیدروژل آلژینات با استفاده از روش تشکیل نوروسفر

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

مقاله پژوهشی

چکیده

مقدمه: هیدروژل‌ها محیط سه بعدی مناسبی را برای کشت انواع مختلف سلول‌ها فراهم می‌کنند و انکپسوله کردن سلول در هیدروژل‌ها روش مناسبی جهت استفاده در مهندسی بافت است. آلژینات، هیدروژل زیست سازگاری است که سیستم مناسبی برای انکپسوله کردن سلول‌ها فراهم می‌کند. به علاوه، سلول‌های بنیادی جدا شده از بافت چربی، سلول‌های بنیادی مزانشیمی هستند که ممکن است منبع مناسبی از سلول‌ها جهت استفاده در سلول درمانی به صورت اتولوگ باشند.

روش‌ها: در این مطالعه سرنوشت سلول‌های بنیادی جدا شده از بافت چربی انکپسوله در هیدروژل آلژینات را که به مدت یک هفته در محیط کشت القای عصبی کشت شدند، بررسی شد. با استفاده از روش MTT [3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide] و تکنیک ایمنوسیتوشیمی به ترتیب میزان تکثیر و تمایز عصبی این سلول‌ها بررسی شد.

یافته‌ها: افزایش معنی‌داری در میانگین درصد سلول‌های GFAP (Glial fibrillary acidic protein)، Nestin و MAP2 (Microtubule-associated protein2) مثبت و کاهش معنی‌داری در میزان تکثیر و بقای سلول‌های انکپسوله در مقایسه با سلول‌های کشت تک لایه مشاهده شد.

نتیجه‌گیری: هیدروژل آلژینات می‌تواند محیط مناسبی برای تمایز عصبی سلول‌های بنیادی جدا شده از بافت چربی فراهم کند.

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

ارجاع: رضوی شهناز، خسروی زاده زهرا، بهرامیان حمید، کاظمی محمد. القای تشکیل سلول‌های شبه عصبی از سلول‌های بنیادی مشتق از بافت چربی در هیدروژل آلژینات با استفاده از روش تشکیل نوروسفر. مجله دانشکده پزشکی اصفهان ۱۳۹۳؛ ۳۲ (۲۸۸): ۸۴۰-۸۲۸

مقدمه

در موقعیت‌های فیزیولوژیک سلول‌ها در یک محیط سه بعدی رشد می‌کنند (۱)، در حالی که متابولیسم، بیان ژن، پروتئین‌های ماتریکس خارج سلولی و مورفولوژی سلول‌های کشت شده در محیط دو بعدی

با آن چه در شرایط فیزیولوژیک اتفاق می‌افتد، متفاوت است (۲). در مهندسی بافت، سلول‌ها به طور معمول بر روی داربستی شبیه به ماتریکس خارج سلولی بافت‌های نرم کشت داده می‌شوند (۳). داربست به عنوان یک ماتریکس خارج سلولی

۱- استاد، گروه علوم تشریح و بیولوژی مولکولی، دانشکده‌ی پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران

۲- دانشجوی دکتری، گروه علوم تشریح و بیولوژی مولکولی، دانشکده‌ی پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی تهران، تهران، ایران

۳- دانشیار، گروه علوم تشریح و بیولوژی مولکولی، دانشکده‌ی پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران

۴- دانشجوی دکتری، گروه ژنتیک، دانشکده‌ی پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران

برای رهایش دارو، انکپسوله کردن سلول و تولید مجدد بافت استفاده می‌شود (۲۳-۱۸).

انواعی از سلول‌ها شامل استئوبلاست‌ها، کندروسیت‌ها، سلول‌های جزایر پانکراس، سلول‌های مزانشیمی و سلول‌های بنیادی عصبی در هیدروژل آلژینات به صورت *In vivo* و *In vitro* انکپسوله و کشت داده شده‌اند (۲۶-۲۴، ۱۶، ۸، ۶). سلول‌های انکپسوله شده در هیدروژل آلژینات ممکن است به خوبی توسط سیستم عصبی مرکزی تحمل شوند؛ زیرا سیستم عصبی مرکزی مکانی با مصنوعیت ایمنی است (۲۷).

در سال‌های اخیر سلول‌های بنیادی و پیش‌ساز از بافت‌های فرد بالغ مانند مغز استخوان، پوست، عضله و چربی جدا شده‌اند (۲۸). از میان این بافت‌ها، مغز استخوان بیشتر مورد بررسی قرار گرفته است، در حالی که بافت چربی ممکن است مزایای بیشتری در مقایسه با مغز استخوان داشته باشد (۲۹). سلول‌های بنیادی جدا شده از بافت چربی (ADSCs یا Adipose derived stem cells) توانایی خود نوسازی و تمایز به دودمان‌های مختلف بافت مزانشیمی را دارند (۳۰-۳۱). این سلول‌ها می‌توانند در تعداد بیشتر استخراج شوند و توانایی رشد و تکثیر بالایی دارند (۳۲)، به علاوه کارایی سلول‌های بنیادی جدا شده از بافت چربی با افزایش سن، جنس، چاقی و بعضی بیماری‌ها مانند نارسایی کلیوی و بیماری عروقی تغییر نمی‌کند (۳۳).

آزمایش‌ها نشان داده‌اند که سلول‌های بنیادی جدا شده از بافت چربی، عوامل نوروتروفیک BDNF (Brain derived neurotrophic factor)، NGF (Nerve growth factor)، GDNF

سنتتیک جهت ایجاد سیگنال‌های هدایت کننده سلول‌ها و تکامل بافت جدید استفاده می‌شود. از آن جا که داربست‌ها شبکه‌های سه بعدی بسیار هیدراته هستند، ساختاری شبیه به ماتریکس خارج سلولی ایجاد می‌کنند. هیدروژل‌ها شبکه‌های سه بعدی از پلیمرهای هیدروفیلیک با اتصالات عرضی هستند که در محیط آبی بسیار متورم می‌شوند (۴).

فضا و پایداری مکانیکی ایجاد شده به وسیله این اتصالات عرضی، می‌تواند جهت پر کردن نقص‌های نامنظم ایجاد شده در حین آسیب و تشکیل بافت جدید مفید باشد (۷-۵).

داربست سه بعدی هیدروژل آلژینات به علت تهیه آسان و توانایی آن برای انکپسوله کردن سلول‌ها مورد توجه قرار گرفته است (۸-۱۲). آلژینات یک پلی ساکارید خطی مشتق از جلبک قهوه‌ای و محلول در آب است که از مونومرهای L-guluronicacid (G) و D-mannuronicacid (M) تشکیل شده است. به علت توانایی ژل شدن و ویسکوزیته‌ی بالای آن در محلول‌های آبی، آلژینات به طور گسترده‌ای در صنایع غذایی، آرایشی و دارویی استفاده می‌شود (۱۴-۱۳).

هیدروژل آلژینات در تداخل عمل یون‌های دو ظرفیتی از قبیل کلسیم با توالی‌های G محلول آلژینات سدیم ساخته می‌شود (۱۶-۱۵، ۱۰). آلژینات ویژگی‌های مفیدی از قبیل زیست سازگاری و عدم تحریک سیستم ایمنی دارد که احتمال می‌رود مربوط به خاصیت هیدروفیلیک آن باشد (۱۷). همچنین این هیدروژل فراوان، ارزان و غیر سمی است (۱۱). چون سلول‌ها در طی فرایند ژل شدن و تشکیل اتصالات عرضی یونی آسیب نمی‌بینند، این ماده به طور وسیعی

از تمایز عصبی بررسی و با گروه شاهد مقایسه شود. نظر به این که در سیستم عصبی ماتریکس خارج سلولی بسیار کمی وجود دارد، آلژینات می‌تواند به عنوان ماتریکس خارج سلولی عمل کند و در صورتی که سلول‌های بنیادی مشتق از بافت چربی در آلژینات تمایز عصبی مطلوبی داشته باشند، می‌توان از این داربست جهت پیوند در بیماری‌های نورودژنراتیو 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. به وسیله تیغ اسکالپل و پنس استریل پوست، بافت فیروز و عروق خونی جدا شد و پس از قطعه قطعه کردن، بافت چربی به فالكون ۵۰ ml منتقل شد.

سلول‌های جدا شده از بافت چربی به ظرف منتقل و دوباره 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 A 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 با حجم آنزیم، محیط کشت حاوی FBS (Fetal bovine serum) ۱۰ درصد به فالكون حاوی چربی جهت خنثی کردن آنزیم اضافه و سپس به

(Glial derived neurotrophic factor) و عوامل رشد عصبی بهبود دهنده‌ی بازسازی میلین را در اعصاب آسیب دیده تولید می‌کنند و نسبت به آپوپتوز مقاوم‌تر هستند (۳۷-۳۴). مولکول‌های ماتریکس خارج سلولی از قبیل لامینین در تولید دوباره‌ی عصب نقش دارند و مطالعات جدید نشان داده‌اند که این سلول‌ها لامینین را بیان می‌کنند که می‌تواند در موش‌های دارای نقص لامینین حاصل از سلول شوان، موجب تسریع آرایش آکسون، میلینه شدن و بهبود عملکرد شود (۳۸). مولکول‌های آنژیوژنیک مانند عامل رشد اندوتلیال عروق (VEGF یا Vascular endothelial growth factor) که باعث افزایش رشد زواید نوریت می‌شوند، به میزان بالا توسط سلول‌های بنیادی جدا شده از بافت چربی بیان می‌شود (۳۹-۴۰).

آزمایش‌های اخیر نشان داده‌اند که سلول‌های بنیادی جدا شده از بافت چربی می‌توانند ویژگی‌های خاص سلول‌های عصبی و گلیال را بیان کنند (۴۱-۴۲، ۳۰). با توجه به مزایای ذکر شده، می‌توان به تعداد کافی سلول بنیادی از بافت چربی استخراج و در موارد کلینیکی استفاده نمود.

با توجه به مزایای سلول‌های بنیادی مشتق از بافت چربی و ویژگی‌های منحصر به فرد کپسول هیدروژل آلژینات در تکثیر و تمایز سلول‌های بنیادی و از آن جا که تاکنون تمایز عصبی سلول‌های بنیادی مشتق از بافت چربی در هیدروژل آلژینات در زمان‌های مختلف بررسی نشده است، تصمیم گرفته شد این سلول‌ها در هیدروژل آلژینات کشت شوند و بیان نشانگرهای GFAP (Glial fibrillary acidic protein)، Nestin و MAP۲ (Microtubule-associated protein۲) پس

و پس از چند بار پیپت کردن، ۵ دقیقه با دور rpm ۱۶۰۰ سانتریفوژ شد. محیط روی سلول‌ها تخلیه و ۱ ml محیط کشت نوروبازال به نروسفرهای منفرد شده اضافه گردید. جهت انجام هر آزمایش تعداد مناسب سلول در نظر گرفته شد و جهت انکپسوله کردن سلول‌ها در هیدروژل آلژینات، $10^6 \times 1$ سلول به ۱ ml آلژینات منتقل شد.

سلول‌های کشت تک لایه‌ای به عنوان گروه شاهد و سلول‌های انکپسوله شده در هیدروژل آلژینات به عنوان گروه آلژینات در نظر گرفته شد. جهت تهیه‌ی ۲۰ ml مـدیوم القـای عـصبـی، از Neurobasal medium ۱۸ ml، FBS ۱ ml، $200 \mu\text{l}$ NEAA، $200 \mu\text{l}$ پنی سیلین/استرپتومایسین ۱ درصد، $200 \mu\text{l}$ NEAA (Non-essential amino acid)، $200 \mu\text{l}$ L-Glu، $400 \mu\text{l}$ B_{۲۷} (۱x)، $200 \mu\text{l}$ Nystatin و $200 \mu\text{l}$ N_۲ استفاده شد.

نحوه‌ی انکپسوله کردن سلول‌ها در هیدروژل

آلژینات

شمارش سلولی انجام شد و برای هر ۱ ml محلول هیدروژل آلژینات $10^6 \times 1$ سلول در نظر گرفته شد. سلول‌ها به سرنگ ۵ ml حاوی ۱ ml محلول آلژینات منتقل شدند. محلول آلژینات حاوی سلول‌های بنیادی به وسیله‌ی سرنگ با Gage ۲۲ در چاهک‌های پلیت ۲۴ well محتوی محلول CaCl_2 ، 10.2 mM قطره‌گذاری 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. محیط کشت القای عصبی به چاهک‌ها اضافه شد و پلیت‌ها در انکوباتور قرار گرفت.

مدت ۱۰ دقیقه با دور rpm ۱۶۰۰ سانتریفوژ شد. مایع رویی تخلیه و بار دیگر محیط کشت به رسوب سلولی اضافه و پیپت شد و نمونه به مدت ۵ دقیقه با دور rpm ۱۶۰۰ سانتریفوژ شد. پس از تخلیه‌ی مایع رویی، سوسپانسیون سلولی جهت کشت به فلاسک‌های محتوی محیط کشت DMEM/F۱۲ (Dulbecco's Modified Eagle's Medium) حاوی FBS ۱۰ درصد و پنی سیلین/استرپتومایسین ۱ درصد منتقل شد.

القای تمایز عصبی از طریق تهیه‌ی نروسفر

پس از انجام شمارش سلولی جهت تشکیل نروسفر، $10^6 \times 1$ سلول به پتری دیش ۵ ml حاوی $2 \mu\text{l}$ Heparin، 5 ml DMEM/F۱۲، پنی سیلین/استرپتومایسین ۱ درصد، $100 \mu\text{l}$ B_{۲۷} (۱x)، $10 \mu\text{l}$ hEGF (Human epidermal growth factor) و $10 \mu\text{l}$ bFGF (Basic fibroblast growth factor) منتقل شد.

عوامل B_{۲۷}، hEGF، bFGF و Heparin هر سه روز یکبار به محیط اولیه اضافه شد.

القای تمایز نوروزنیک

با تشکیل نروسفرها در روز هفتم پس از القا، محیط حاوی نروسفر به فالكون ۱۵ ml منتقل شد و جهت رسوب نروسفرها در انکوباتور قرار داده شد. شستشوی سلول‌های چسبیده به کف پتری دیش با $1/5 \text{ ml}$ PBS انجام شد. ۱ 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. محتوی پتری دیش به فالكون حاوی نروسفر منتقل

بررسی مورفولوژی سلول‌های انکپسوله توسط

(Scanning electron microscopy) SEM

مورفولوژی سلول‌های انکپسوله شده در آلزینات به وسیله‌ی میکروسکوپ الکترونی بررسی شد. بیدهای آلزینات در پارافرمالدهید ۴ درصد تثبیت شد و برش‌های انجمادی (Cryocut ۱۸۰۰ reichert, JUNG, Germany) تهیه شد. برش‌های ۹ μm پوشش طلا داده شد و سپس با میکروسکوپ الکترونی بررسی گردید (Seron Technology AIS ۲۵۰۰, India).

آزمایش MTT جهت تعیین میزان تکثیر و بقای سلولی

برای بررسی میزان تکثیر و بقای سلول‌های انکپسوله در هیدروژل آلزینات و سلول‌های گروه شاهد از این آزمایش استفاده شد. بیدهای آلزینات و سلول‌های گروه شاهد در روز چهاردهم پس از تمایز با PBS شسته شدند. PBS حذف شد و ۲۰۰ μl محیط کشت DMEM/F۱۲ فاقد سرم و ۲۰ μl محلول MTT به هر چاهک اضافه شد و به مدت چهار ساعت در انکوباتور قرار گرفت. محیط کشت حاوی محلول MTT حذف و ۲۰۰ μl DMSO (Dimethyl sulfoxide) در تاریکی به هر چاهک اضافه شد. چند بار سلول‌ها در این محلول پیست شدند و سپس محلول به چاهک‌های پلیت ۹۶ well منتقل شدند. جذب نوری محلول با دستگاه Microplate reader در طول موج ۵۴۰ nm ارزیابی شد. برای هر نمونه سه بار آزمایش تکرار شد.

تکنیک ایمنوسیتوشیمی

برای ارزیابی میزان تمایز عصبی سلول‌های انکپسوله شده در هیدروژل آلزینات و سلول‌های گروه شاهد،

از روش ایمنوسیتوشیمی استفاده شد.

رنگ‌آمیزی سلول‌های تمایز یافته‌ی گروه شاهد و بیدهای آلزینات علیه آنتی بادی‌های Nestin (پروتئین فیلامنت بینابینی که توسط سلول‌های پیش‌ساز عصبی بیان می‌شود)، GFAP (پروتئین فیلامنت بینابینی که سلول‌های گلیال آن را بیان می‌کنند) و MAP۲ (پروتئینی که همراه با میکروتوبول‌ها می‌باشد و نشانگر سلول‌های عصبی بالغ است) انجام شد. محیط روی نمونه‌ها حذف و سلول‌های گروه شاهد دو بار با PBS و بیدهای آلزینات دو بار با بافر Tris شسته شد. برای ثابت کردن نمونه‌ها از ۳۵۰ μl میکرولیتر پارافرمالدهید ۴ درصد به مدت ۳۰ دقیقه در دمای اتاق و در تاریکی استفاده شد. پارافرمالدهید ۴ درصد از روی نمونه‌ها حذف و با بافر مربوطه شسته شد. برای نفوذ پذیر کردن غشای سلولی، از Triton X-۱۰۰ به مدت ۳۰ دقیقه در دمای اتاق استفاده شد.

Triton X-۱۰۰ از روی نمونه‌ها حذف و شستشو با بافر انجام شد. آنتی بادی‌های اولیه (۱:۳۰۰) Nestin، GFAP (۱:۶۰۰) و MAP۲ (۱:۳۰۰) به نمونه‌ها اضافه شد. ابتدا ۲ ساعت در انکوباتور ۳۷°C و سپس به مدت یک شب در دمای اتاق انکوبه شد. آنتی بادی‌های اولیه حذف و شستشو با بافر انجام شد. آنتی بادی ثانویه کونژوگه شد و با FITC (Fluorescein isothiocyanate) با غلظت ۱:۵۰۰ به نمونه‌ها اضافه شد و ۲ ساعت در انکوباتور ۳۷°C قرار داده شد.

پس از حذف آنتی بادی ثانویه، شستشو با بافر انجام شد. DAPI (۲-phenylindole-۶-diamidino) با غلظت ۱:۱۰۰۰ به مدت ۲ دقیقه در دمای اتاق جهت

نیز خواهند داشت (شکل ۱b). پس از یک هفته نوروسفرهای منفرد شده در محیط القای عصبی دارای زواید شبه آکسونی و شبه دندریتی داشتند (شکل ۱c). بیدهای آلژینات زیر میکروسکوپ مرحله‌ی کنتراست به صورت توده‌های کروی بودند و به دلیل ماهیت شفاف هیدروژل آلژینات سلول‌های گرد و بدون زائده‌ی موجود در آن قابل رؤیت بودند (شکل ۱d). در تصاویر میکروسکوپ الکترونی هیدروژل آلژینات به صورت شبکه‌ای خزه مانند حاوی سلول‌های کروی شکل و بدون زائده بود (شکل‌های ۲a, b). تصاویر میکروسکوپ فلورسنت نیز مؤید این مطلب است (شکل‌های ۲c, d, e).

بررسی میزان تکثیر و بقای سلول‌ها

جهت تعیین میزان تکثیر و بقای سلول‌های بنیادی مشتق از بافت چربی، پس از القای عصبی و انتقال به هیدروژل آلژینات، MTT assay در روز ۱۴ پس از تمایز انجام شد. این آزمایش، میزان بقا برای سلول‌های القا شده‌ی گروه شاهد و گروه آلژینات را به ترتیب (0.72 ± 0.13) و (0.28 ± 0.02) نشان داد. آنالیز آماری تفاوت معنی‌داری را بین میزان بقای گروه شاهد و گروه آلژینات نشان داد ($P < 0.001$).

بررسی ایمنوسیتوشیمی

برای ارزیابی تمایز عصبی و تعیین میانگین درصد سلول‌های Nestin (نشانگر پیش‌ساز عصبی)، GFAP (نشانگر آستروسیت‌ها) و MAP2 (نشانگر نورون بالغ) مثبت، این آزمایش برای گروه شاهد و گروه آلژینات در روز ۱۴ پس از تمایز انجام شد. کنترل منفی با حذف آنتی بادی اولیه انجام شد (شکل ۳).

رنگ‌آمیزی هسته‌ی سلول‌ها اضافه شد. شستشو با بافر مربوط انجام گردید. لامل حاوی نمونه، روی لام منتقل شد و با میکروسکوپ فلورسنت بررسی گردید. تصاویر سلول‌ها با استفاده از نرم‌افزار ImageJ شمارش شد و درصد سلول‌های مثبت برای هر نمونه در سه زمینه‌ی غیر همپوشان محاسبه شد.

تحلیل آماری

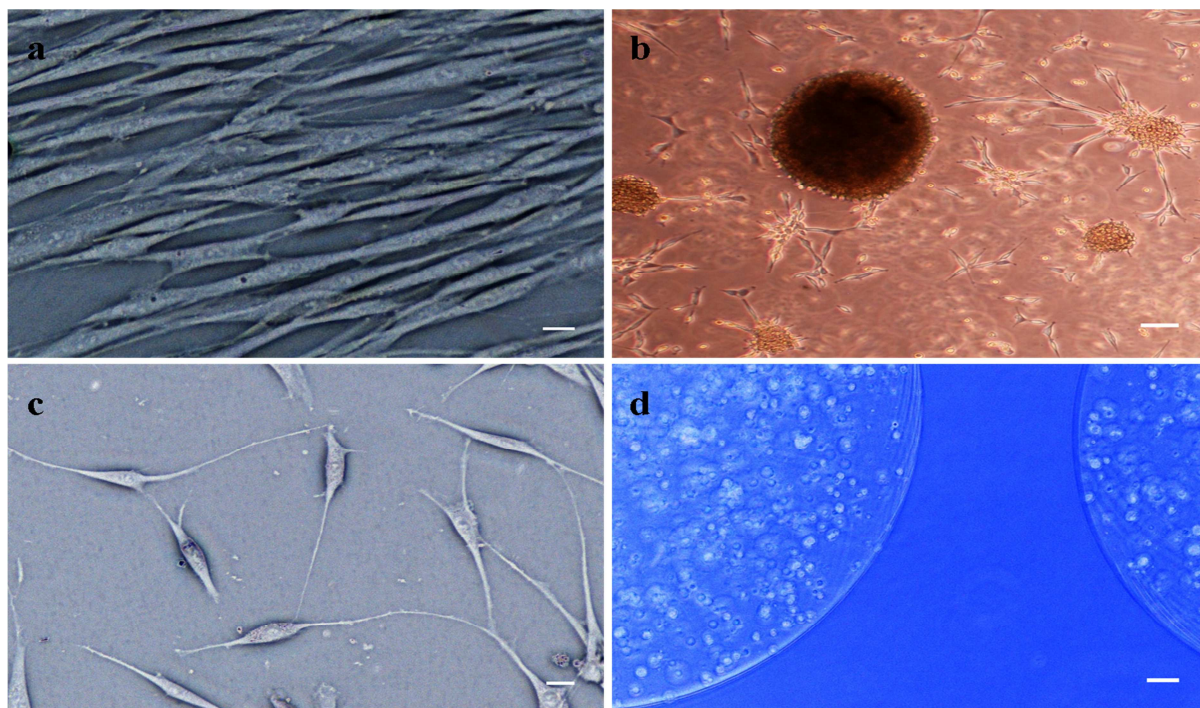
از نرم‌افزار SPSS نسخه‌ی ۱۸ (version 18, SPSS Inc., Chicago, IL) و آزمون one-way ANOVA (One-way analysis of variance) جهت بررسی اختلافات معنی‌دار بین گروه‌ها استفاده شد. اختلاف میانگین داده‌ها در صورت $P < 0.05$ معنی‌دار محسوب شدند.

یافته‌ها

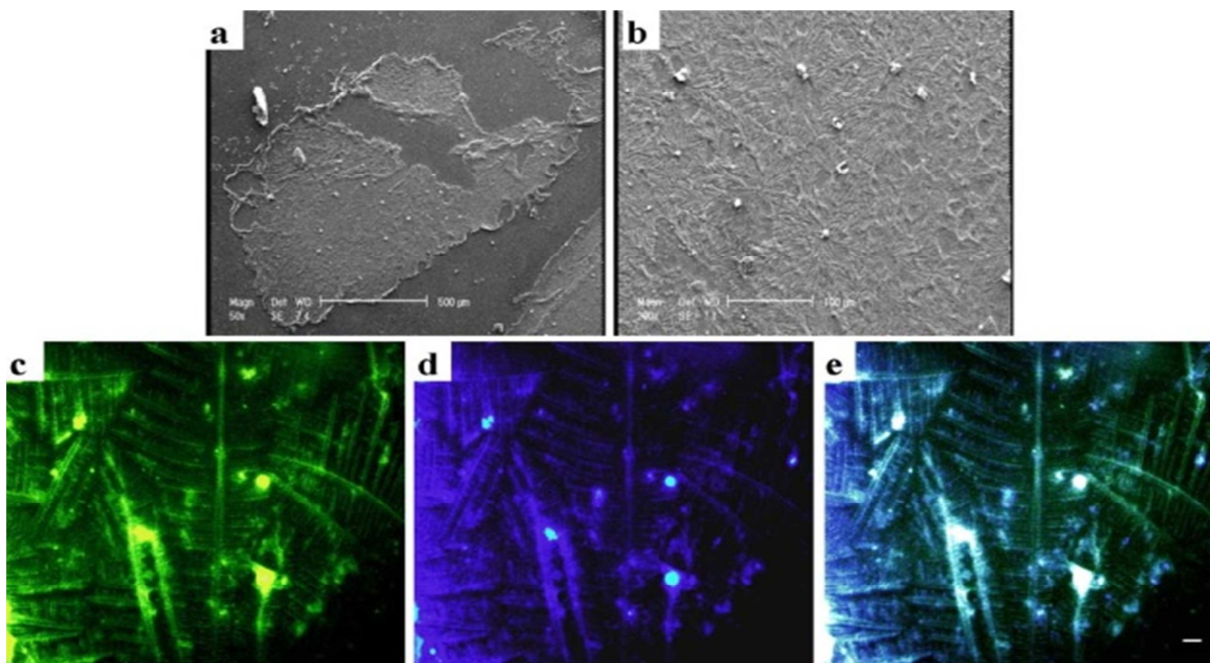
بررسی مورفولوژی سلول‌ها

۴۸ ساعت پس از کشت اولیه‌ی سلول‌های بنیادی مشتق 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 ۹۰-۸۰ درصد، سلول‌ها آرایش تک لایه‌ای و فیروبلاست شکل داشتند (شکل ۱a).

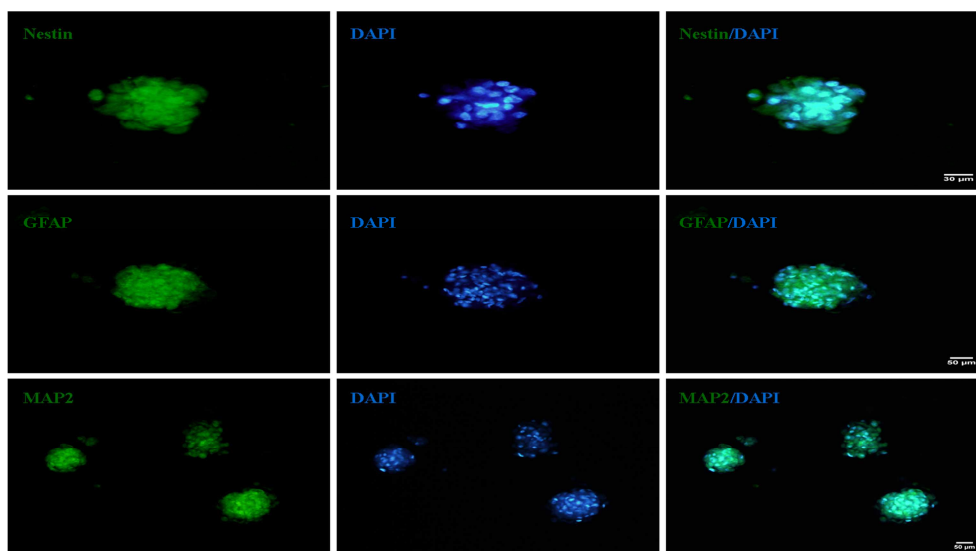
در محیط پیش‌القای عصبی، تغییر در مورفولوژی سلول‌ها شامل جمع‌شدگی سیتوپلاسم و تشکیل زواید بود. ۲۴-۴۸ ساعت بعد توده‌های کروی به نام نوروسفر تشکیل شد و این توده‌های کروی با گذشت زمان به علت وجود عوامل پیش‌برنده‌ی تکثیر سلولی مانند bFGF و hEGF در محیط کشت افزایش اندازه



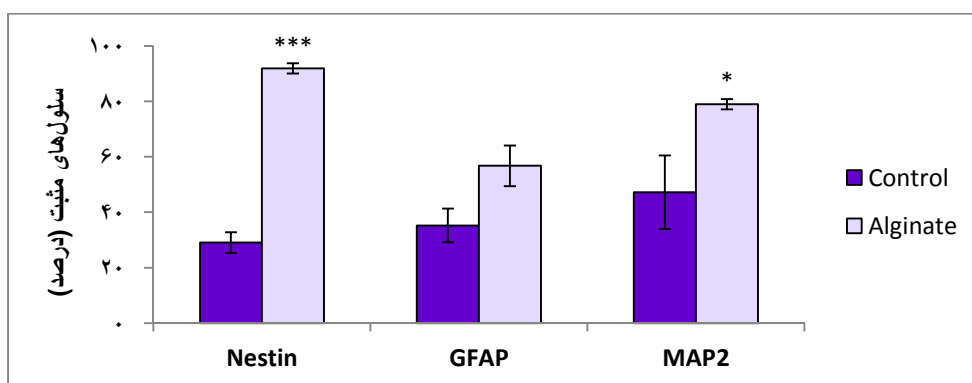
شکل ۱. بررسی مورفولوژی سلول‌های بنیادی جدا شده از بافت چربی پس از القای عصبی و انکپسوله کردن در هیدروژل آلژینات. **a** سلول‌های بنیادی جدا شده از بافت چربی کشت شده در محیط کشت **DMEM-F12**. **b** سلول‌های بنیادی جدا شده از بافت چربی کشت شده در مدیوم القای عصبی به مدت ۷ روز و تشکیل نوروسفر. **c** کشت تک لایه‌ای سلول‌های بنیادی جدا شده از بافت چربی القا شده. **d** سلول‌های انکپسوله شده در هیدروژل آلژینات. بررسی‌های مورفولوژیک با میکروسکوپ مرحله‌ای کنتراست انجام گرفت (بزرگ‌نمایی در **a**، **b** و **d** $200\ \mu\text{m}$ و در **c** $50\ \mu\text{m}$).



شکل ۲. تصاویر میکروسکوپ الکترونی از برش انجمادی پیدهای آلژینات حاوی سلول‌های بنیادی جدا شده از بافت چربی القا شده (**a** و **b**) و تصاویر میکروسکوپ فلورسنت شبکه‌ای خزهای شکل حاوی سلول‌های کروی را نشان داد (**c**، **d** و **e**) (بزرگ‌نمایی **c**، **d** و **e** $200\ \mu\text{m}$).



شکل ۳. رنگ‌آمیزی ایمنوفلورسنت برای نشانگرهای عصبی (Glial fibrillary acidic protein) GFAP، Nestin و (Microtubule-associated protein γ) MAP γ در سلول‌های انکپسوله در هیدروژل آلژینات. (بزرگ‌نمایی ۵۰ μm).



شکل ۴. مقایسه‌ی میانگین درصد سلول‌های Nestin، GFAP (Glial fibrillary acidic protein) و MAP γ (Microtubule-associated protein γ) مثبت انکپسوله در هیدروژل آلژینات با گروه شاهد در روز ۱۴ پس از تمایز. میانگین درصد سلول‌های انکپسوله‌ی Nestin مثبت تفاوت معنی‌داری را نسبت به گروه شاهد نشان داد ($P < 0.001$), همچنین میانگین درصد سلول‌های MAP γ مثبت انکپسوله در مقایسه با گروه شاهد تفاوت معنی‌داری داشت ($P < 0.05$) (Mean \pm SE).

درصد) افزایش یافت. همچنین میانگین درصد سلول‌های MAP γ مثبت در سلول‌های انکپسوله به طور معنی‌داری در مقایسه با گروه شاهد افزایش یافت (۷۸/۹۶ \pm ۱/۸۱) درصد در مقابل ۴۷/۲۰ \pm ۱۳/۳۰ درصد) ($P < 0.05$) (شکل ۴).

میانگین درصد سلول‌های انکپسوله‌ی Nestin مثبت (۹۱/۹۰ \pm ۱/۸۴ درصد) به طور معنی‌داری در مقایسه با گروه شاهد (۲۹/۰۳ \pm ۳/۷۳ درصد) افزایش یافت ($P < 0.001$). به علاوه، میانگین درصد سلول‌های انکپسوله‌ی GFAP مثبت (۵۶/۷۵ \pm ۷/۳۰ درصد) در مقایسه با گروه شاهد (۳۵/۲۳ \pm ۶/۰۹ درصد)

بحث

نتایج مطالعه‌ی حاضر نشان داد که هیدروژل آلژینات محیط سه بعدی مناسبی را برای کشت و تمایز عصبی سلول‌های بنیادی جدا شده از بافت چربی فراهم می‌کند. اگر چه میزان تکثیر و بقای سلولی در هیدروژل آلژینات کاهش پیدا کرد، میانگین درصد سلول‌های Nestin، GFAP و MAP2 مثبت در مقایسه با گروه شاهد افزایش یافت.

رفتار انواع مختلفی از سلول‌ها در هیدروژل آلژینات بررسی شده و نتایج متفاوتی به دست آمده است (۴۳). این نتایج می‌تواند مربوط به نوع خاص سلول و یا روش به کار گرفته شده جهت انکپسوله کردن سلول‌ها باشد (۴۴). چون آلژینات تداخل عمل سلولی ندارد، سلول‌ها قادر به چسبیدن به شبکه‌ی آلژینات نیستند. چسبندگی سلول برای بقا، تکثیر، تمایز و بیان ژن اغلب سلول‌ها ضروری است (۴۵).

طبیعت غیر چسبنده‌ی هیدروژل آلژینات تداخل عمل سلول-سلول را حمایت می‌کند که جهت حفظ بقای سلول و تقویت ویژگی‌های عملکردی سلول‌ها دارای اهمیت است (۴۶).

سلول‌های کشت شده در آلژینات، مورفولوژی کروی دارند و اگر چه میزان تکثیر این سلول‌ها کاهش می‌یابد، اما سلول‌ها در این هیدروژل زنده می‌مانند (۴۳). در تحقیقات متعددی، کاهش تکثیر انواع سلول‌های انکپسوله شده در هیدروژل آلژینات گزارش شده است (۲۵، ۴۶-۴۷). کاهش تکثیر سلولی در هیدروژل آلژینات ممکن است وابسته به درصد وزنی پایین آلژینات (۱ درصد) مورد استفاده باشد (۴۸).

Banerjee و همکاران سلول‌های بنیادی عصبی را

در هیدروژل آلژینات قرار دادند و در محیط کشت DMEM/F12 محتوی FGF2 (Fibroblast growth factor) کشت دادند و پس از ۷ روز بیان نشانگرهای عصبی بتا توبولین III و Nestin را بررسی کردند و افزایش بیان بتا توبولین III را مشاهده کردند (۴۹). Ashton و همکاران نشان دادند که BDNF نقش‌های مهمی در تکامل و نوروپلاستیستی مغز دارد؛ همچنین بقای عصبی، نورون‌ها و رشد عصبی را تنظیم می‌کند (۵۰) و نقش‌های مکملی در تنظیم تمایز دو رده‌ی سلولی نورون‌ها و سلول‌های گلیال دارد (۵۱).

مطالعه‌ای نشان داده است که سلول‌های بنیادی عصبی انکپسوله در هیدروژل آلژینات قادر به ترشح BDNF و همچنین بیان GFAP و Nestin هستند (۴۸). به علاوه، طبق نتایج آزمایش‌های اخیر، سلول‌های بنیادی جدا شده از بافت چربی توانایی تولید نوروتروفین‌های BDNF، NGF و GDNF را دارند (۳۶-۳۷). 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 آلژینات، 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.

Ashton و همکاران سلول‌های پیش‌ساز عصبی رت را در هیدروژل آلژینات ۱ درصد همراه با PLGA-Al (Poly(lactid-co-glycolide) alginate lyase) به مدت ۷ روز کشت دادند و افزایش معنی‌داری را در سرعت تکثیر این سلول‌ها مشاهده کردند (۵۰). در مطالعه‌ی حاضر سلول‌های بنیادی جدا شده از بافت چربی

می‌مانند و به نظر می‌رسد که بافت مغز هیدروژل آلژینات را به خوبی تحمل می‌کنند (۹). در حالی که در آزمایش‌های اخیر، سلول‌های بنیادی جدا شده از بافت چربی انکپسوله در هیدروژل آلژینات ۱/۲ درصد کشت شده به صورت *In vitro* تکثیر کمی داشتند.

تفاوت در نوع سلول‌ها و غلظت آلژینات مورد استفاده، همچنین شرایط *In vivo* در مطالعه‌ی Read و همکاران (۹) ممکن است در نتایج متفاوت به دست آمده در دو تحقیق مؤثر باشد.

نتایج مطالعه‌ی حاضر نشان داد که هیدروژل آلژینات تکثیر و تمایز عصبی سلول‌های بنیادی جدا شده از بافت چربی را تحت تأثیر قرار می‌دهد. میزان تکثیر و بقای سلول‌های بنیادی جدا شده از بافت چربی انکپسوله در هیدروژل آلژینات به طور معنی‌داری کاهش یافت. در حالی که تمایز عصبی این سلول‌ها افزایش یافت. احتمال می‌رود هیدروژل آلژینات با ایجاد شرایطی مشابه با ماتریکس خارج سلولی و تنظیم ترشح عوامل نوروتروفیک، می‌تواند منجر به افزایش تمایز عصبی شده باشد. شناسایی مکانیسم‌های مولکولی تمایز عصبی و اندازه‌گیری عوامل نوروتروفیک ترشح شده از این سلول‌ها، می‌تواند اطلاعات باارزشی را جهت استفاده در مهندسی بافت و مطالعات *In vivo* فراهم کند.

تشکر و قدردانی

بدین‌وسیله از مسؤولین محترم معاونت تحقیقات و فناوری دانشگاه علوم پزشکی اصفهان و نیز از زحمات سرکار خانم علی‌اکبری مسؤول آزمایشگاه کشت سلولی که در زمینه‌ی انجام پژوهش حاضر همکاری نمودند، کمال تقدیر و تشکر خود را ابراز می‌نمایم.

انسانی کشت شده در محیط پیش‌القای عصبی، به هیدروژل آلژینات ۱/۲ درصد منتقل شد و ۷ روز در محیط عصبی کشت شد. سرعت تکثیر این سلول‌ها در مقایسه با گروه شاهد به طور معنی‌داری کاهش یافت.

در مطالعه‌ی Ashton و همکاران ممکن است حضور PLGA-Al در کنار هیدروژل آلژینات با کنترل تجزیه‌ی این هیدروژل باعث افزایش سرعت تکثیر سلول‌های پیش‌ساز عصبی رت شده باشد. همچنین نوع سلول‌ها و غلظت آلژینات استفاده شده در دو مطالعه متفاوت است (۵۰).

Xie و همکاران سلول‌های بنیادی جدا شده از بافت چربی رت را در هیدروژل پپتیدی و در محیط القای عصبی کشت دادند. ۱۰ روز پس از تمایز عصبی، آنالیز ایمنوسیتوشیمی نشان داد که این سلول‌ها Nestin (نشانگر پیش‌ساز عصبی) و Brdu (نشانگر تکثیر سلولی) را در مرکز توده‌های سلولی تشکیل شده بیان کردند (۵۲). نتایج به دست آمده از تحقیق حاضر هم افزایش معنی‌داری را در بیان Nestin در سلول‌های بنیادی جدا شده از بافت چربی انکپسوله در هیدروژل آلژینات ۱۴ روز پس از تمایز عصبی نشان داد. در هر دو تحقیق، به علت استفاده سلول‌های مشابه افزایش بیان Nestin مشاهده شد. اگر چه نوع داربست استفاده شده در دو مطالعه متفاوت است، ممکن است وضعیت هیدروفیلیکی که هر دو داربست ایجاد می‌کنند، در ایجاد نتایج مشابه مؤثر باشد.

Read و همکاران نشان دادند که رده‌ی سلولی BT4C از رت با بیماری گلیوما انکپسوله در هیدروژل آلژینات ۱/۵ درصد کشت شده به صورت *In vivo* تکثیر می‌یابد و سلول‌های آن مورفولوژی کروی دارند. همچنین ۴ ماه پس از کشت زنده

References

- Moroni L, de Wijn JR, van Blitterswijk CA. 3D fiber-deposited scaffolds for tissue engineering: influence of pores geometry and architecture on dynamic mechanical properties. *Biomaterials* 2006; 27(7): 974-85.
- Dutta RC, Dutta AK. Cell-interactive 3D-scaffold; advances and applications. *Biotechnol Adv* 2009; 27(4): 334-9.
- 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.
- Lee KY, Mooney DJ. Hydrogels for tissue engineering. *Chem Rev* 2001; 101(7): 1869-79.
- Nicodemus GD, Bryant SJ. Cell encapsulation in biodegradable hydrogels for tissue engineering applications. *Tissue Eng Part B Rev* 2008; 14(2): 149-65.
- 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.
- Peter SJ, Miller MJ, Yasko AW, Yaszemski MJ, Mikos AG. Polymer concepts in tissue engineering. *J Biomed Mater Res* 1998; 43(4): 422-7.
- 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.
- 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.
- Rowley JA, Madlambayan G, Mooney DJ. Alginate hydrogels as synthetic extracellular matrix materials. *Biomaterials* 1999; 20(1): 45-53.
- Augst AD, Kong HJ, Mooney DJ. Alginate hydrogels as biomaterials. *Macromol Biosci* 2006; 6(8): 623-33.
- Drury JL, Mooney DJ. Hydrogels for tissue engineering: scaffold design variables and applications. *Biomaterials* 2003; 24(24): 4337-51.
- Li T, Shi XW, Du YM, Tang YF. Quaternized chitosan/alginate nanoparticles for protein delivery. *J Biomed Mater Res A* 2007; 83(2): 383-90.
- Kemp MR, Fryer PJ. Enhancement of diffusion through foods using alternating electric fields. *Innovative Food Science and Emerging Technologies* 2007; 8(1): 143-53.
- Prang P, Muller R, Eljaouhari A, Heckmann K, Kunz W, Weber T, et al. The promotion of oriented axonal regrowth in the injured spinal cord by alginate-based anisotropic capillary hydrogels. *Biomaterials* 2006; 27(19): 3560-9.
- 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.
- Shapiro L, Cohen S. Novel alginate sponges for cell culture and transplantation. *Biomaterials* 1997; 18(8): 583-90.
- Coviello T, Matricardi P, Marianecchi C, Alhaique F. Polysaccharide hydrogels for modified release formulations. *J Control Release* 2007; 119(1): 5-24.
- 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.
- Kong HJ, Mooney DJ. The effects of poly (ethyleneimine) (PEI) molecular weight on reinforcement of alginate hydrogels. *Cell Transplant* 2003; 12(7): 779-85.
- 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.
- 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.
- 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.
- Schagemann JC, Mrosek EH, Landers R, Kurz H, Erggelet C. Morphology and function of ovine articular cartilage chondrocytes in 3-d hydrogel culture. *Cells Tissues Organs* 2006; 182(2): 89-97.
- 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.
- 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.
- Barker CF, Billingham RE. Immunologically privileged sites. *Adv Immunol* 1977; 25: 1-54.
- 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.
- Strem BM, Hedrick MH. The growing

- importance of fat in regenerative medicine. *Trends Biotechnol* 2005; 23(2): 64-6.
30. 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.
31. Gimble JM, Katz AJ, Bunnell BA. Adipose-derived stem cells for regenerative medicine. *Circ Res* 2007; 100(9): 1249-60.
32. de GM, Schuurs TA, van SR. Causes of limited survival of microencapsulated pancreatic islet grafts. *J Surg Res* 2004; 121(1): 141-50.
33. DiMuzio P, Tulenko T. Tissue engineering applications to vascular bypass graft development: the use of adipose-derived stem cells. *J Vasc Surg* 2007; 45(Suppl A): A99-103.
34. 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.
35. 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.
36. 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.
37. 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.
38. Carlson KB, Singh P, Feaster MM, Ramnarain A, Pavlides C, Chen ZL, et al. Mesenchymal stem cells facilitate axon sorting, myelination, and functional recovery in paralyzed mice deficient in Schwann cell-derived laminin. *Glia* 2011; 59(2): 267-77.
39. Sondell M, Sundler F, Kanje M. Vascular endothelial growth factor is a neurotrophic factor which stimulates axonal outgrowth through the flk-1 receptor. *Eur J Neurosci* 2000; 12(12): 4243-54.
40. Rehman J, Traktuev D, Li J, Merfeld-Clauss S, Temm-Grove CJ, Bovenkerk JE, et al. Secretion of angiogenic and antiapoptotic factors by human adipose stromal cells. *Circulation* 2004; 109(10): 1292-8.
41. Safford KM, Hicok KC, Safford SD, Halvorsen YD, Wilkison WO, Gimble JM, et al. Neurogenic differentiation of murine and human adipose-derived stromal cells. *Biochem Biophys Res Commun* 2002; 294(2): 371-9.
42. Ashjian PH, Elbarbary AS, Edmonds B, DeUgarte D, Zhu M, Zuk PA, et al. In vitro differentiation of human processed lipoaspirate cells into early neural progenitors. *Plast Reconstr Surg* 2003; 111(6): 1922-31.
43. Mulder L. Cell adhesion on alginate scaffolds for tissue engineering of aortic valve-a review. Eindhoven, Netherlands: Faculty of Biomedical Engineering, Eindhoven University Technology; 2002. p. 22-34.
44. Novikova LN, Mosahebi A, Wiberg M, Terenghi G, Kellerth JO, Novikov LN. Alginate hydrogel and matrigel as potential cell carriers for neurotransplantation. *J Biomed Mater Res A* 2006; 77(2): 242-52.
45. Retta SF, Ternullo M, Tarone G. Adhesion to matrix proteins. *Methods Mol Biol* 1999; 96: 125-30.
46. 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.
47. 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.
48. 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.
49. Banerjee A, Arha M, Choudhary S, Ashton RS, Bhatia SR, Schaffer DV, et al. The influence of hydrogel modulus on the proliferation and differentiation of encapsulated neural stem cells. *Biomaterials* 2009; 30(27): 4695-9.
50. Ashton RS, Banerjee A, Punyani S, Schaffer DV, Kane RS. Scaffolds based on degradable alginate hydrogels and poly(lactide-co-glycolide) microspheres for stem cell culture. *Biomaterials* 2007; 28(36): 5518-25.
51. Cheng A, Coksaygan T, Tang H, Khatri R, Balice-Gordon RJ, Rao MS, et al. Truncated tyrosine kinase B brain-derived neurotrophic factor receptor directs cortical neural stem cells to a glial cell fate by a novel signaling mechanism. *J Neurochem* 2007; 100(6): 1515-30.
52. 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 Technol Med Sci* 2011; 31(2): 174-7.

Induction of Neuron-Like Cells from Adipose Derived Stem Cells in Alginate Hydrogel, Using Neurospheres Formation

Shahnaz Razavi PhD¹, Zahra Khosravizadeh MSc², Hamid Bahramian PhD³,
Mohammad Kazemi MSc⁴

Original Article

Abstract

Background: Hydrogels provide appropriate three-dimensional environment for culture of a variety of cells and cell encapsulation in hydrogels is a promise plan for tissue engineering applications. Alginate is an attractive biocompatible hydrogel that provides a supportive system for the encapsulated cells. Moreover, human adipose derived stem cells are mesenchymal stem cells that might be a suitable source of cells for use in autologous cell therapy.

Methods: In this study, we examined the fate of human adipose derived stem cells encapsulated in alginate hydrogel that cultured in neural induction medium for 1 week. Using MTT [3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide] assay and immunocytochemical analysis, the proliferation rate, and viability and neural differentiation of human adipose derived stem cells were evaluated.

Findings: We observed a significant increase in the mean percent of Nestin, glial fibrillary acidic protein (GFAP) and microtubule-associated protein-2 (MAP2) positive cells and significant reduction of proliferation rate and viability in encapsulated cells versus monolayer induced cells.

Conclusion: These findings showed that alginate hydrogel can provide a suitable environment for neural differentiation of human adipose derived stem cells.

Keywords: Hydrogel alginate, Human adipose-derived stem cells, Neural differentiation, Proliferation

Citation: Razavi Sh, Khosravizadeh Z, Bahramian H, Kazemi M. **Induction of Neuron-Like Cells from Adipose Derived Stem Cells in Alginate Hydrogel, Using Neurospheres Formation.** J Isfahan Med Sch 2014; 32(288): 828-40

1- Professor, Department of Anatomical Sciences and Molecular Biology, School of Medicine, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, Iran

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

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

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

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