مقاله پژوهشی

مجله سلول و بافت (علمی - پژوهشی)
جلد ۷، شماره ۳، پاییز ۱۳۹۵

تمایز عصبی سلول‌های بنیادی کارسینومای جنینی در سیستم کشت سه‌بعدی

فائزه عزیزی .M.Sc[1]، حمیدرضا جلیل.M.Sc[1]، سیدجمال مشتاقیان.Ph.D[1]،
علی دوست‌محمدی .Ph.D[2]، فریبا اسماعیلی .Ph.D[1*]

۱- دانشگاه اصفهان، دانشکده علوم، گروه زیست‌شناسی، اصفهان، ایران، کد پستی: ۸۱۷۴۶۷۳۴۴۱
۲- دانشگاه شهرکرد، دانشکده فنی و مهندسی، گروه مهندسی مواد، شهرکرد، ایران
* پست الکترونیک نویسنده مسئول: f.esmaeili@sci.ui.ac.ir

تاریخ دریافت: ۱۳۹۵/۵/۲۲ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۵/۸/۲۵

چکیده

هدف: هدف از این مطالعه استفاده از داربست نانولوله کربنی ترکیب شده با پلی‌وینیل‌الکل/کیتوزان (CS/PVA/CNT) الکتروریسی شده به منظور تمایز عصبی سلول‌های بنیادی برای کاربردهای بالقوه مهندسی بافت عصبی بود.

مواد و روش‌ها: به‌منظور القای تمایز عصبی، سلول‌های بنیادی کارسینومای جنینی P19 روی داربست CS/PVA/CNT کشت داده شدند. جهت بررسی فنوتیپ عصبی از رنگ آمیزی کرزیل ویوله و برای ارزیابی بیان نشانگر ویژه عصبی بتاتوبولین از روش ایمنوفلورسنس استفاده شد.

نتایج: شکل ظاهری عصبی سلول‌های متمایز شده به‌وسیله رنگ‌آمیزی کرزیل ویوله تایید شد. سلول‌های مذکور به نشانگر ویژه عصبی بتاتوبولین واکنش ایمنی دادند.

نتیجه‌گیری: این بررسی استفاده بالقوه از ترکیب مهندسی بافت و درمان با سلول بنیادی را به‌منظور بهبود بیماری‌های زوال عصبی پیشنهاد می‌کند.

واژگان کلیدی: زیست مواد، تمایز عصبی، سلول‌های کارسینومای جنینی، نشانگرهای ویژه عصبی، کیتوسان/پلی‌وینیل الکل/نانولوله‌کربنی

Archive of SID

www.SID.ir

مقدمه

آسیب‌های سیستم عصبی از علل عمده مرگ و میر در جهان محسوب می‌شوند. تاکنون روش‌های مختلفی برای درمان بیماری‌های عصبی کشف شده است. برخی از این روش‌ها عبارتست از کاهش سطح پروتئین‌های تجمع یافته با استفاده از محدودسازی نفوذپذیری سد خونی-مغزی، استفاده از فاکتورهای رشد به‌منظور حمایت از نورون‌های آسیب دیده و همچنین دارو درمانی (۱-۳). از جمله روش‌های درمانی دیگر استفاده از سلول‌های بنیادی است که امیدهای تازه‌ای را برای ترمیم بافت‌های عصبی مرکزی آسیب دیده فراهم آورده است. تمایز سلول‌های بنیادی به سلول‌های عصبی نیاز به تحقیق و پژوهش فراوان دارد. در سال‌های اخیر روش‌های بسیاری برای تولید سلول‌های عصبی از سلول‌های چند توان در محیط آزمایشگاه به‌کار گرفته شده است (۴-۶). مهندسی بافت عصب یکی از امیدوار کننده‌ترین روش‌ها برای درمان ضایعات سیستم عصبی مرکزی است. در سیستم کشت سه‌بعدی، کشت و رشد سلول روی بستری که ماتریکس خارج سلولی (Extracellular) matrix(ECM)) را شبیه‌سازی می‌کند و داربست نامیده می‌شود، انجام می‌گیرد. توزیع سه بعدی و رشد سلول‌ها درون داربست متخلخل از اهمیت بالینی بسیاری برای مهندسی بافت عصب برخوردار است. در این زمینه داربست‌های قابل کاشت در درمان بسیاری از بیماری‌های سیستم عصبی مرکزی از جمله پارکینسون، آلزایمر و آسیب‌های وارده به مغز به‌کار برده شده‌اند (۷). ساختار و خواص داربست به اهمیت و حساسیت بافت و بارهایی که در بدن موجود زنده روی آن وارد می‌شود وابسته است. از آنجایی‌که داربست به‌عنوان زمینه متخلخل مصنوعی و موقت برای هدایت رشد سه‌بعدی بافت به‌کار می‌رود، موادی که شباهت زیادی با بافت آسیب دیده دارند به‌عنوان مهم‌ترین کاندید برای تعویض بافت مطرح می‌شوند (۸). چالشی که در برابر مهندسین بافت قرار دارد مربوط به ترکیب پیچیده خواص مورد نیاز برای داربست‌های ایده‌آل است. این مسئله به‌خصوص در مهندسی بافت استخوان یعنی جایی‌که توان داربست و قابلیت تحمل بار مکانیکی مورد نیاز است اهمیت دارد (۹). استفاده از مواد طبیعی به‌عنوان داربست مشکلاتی مثل خطرات عفونت‌زایی، پایداری زیستی و مکانیکی، زیست سازگاری و تحمیل هزینه را در پی دارد. مواد و سرامیک‌های متخلخل استفاده‌های زیادی در کاربردهای زیستی- پزشکی از جمله بازسازی بافت استخوان پیدا کرده‌اند. اما با وجود پیشرفت‌های فراوانی که در زمینه تولید داربست‌های زیست‌سازگار برای تکثیر انواع سلول‌های موجود در بافت‌های مختلف حاصل شده است، تولید داربستی که قادر باشد کلیه‌ی شرایط ماتریکس - خارج سلولی طبیعی را درسیستم عصبی مرکزی به‌طور مصنوعی ایجاد کند هنوز با مشکلات بیشماری روبه‌روست. در این میان، ظهور و گسترش علوم و فناوری نانو موجب شده است تا راهکارهای موثری برای ساخت داربست‌های سه‌بعدی با پایه نانوکامپوزیت پلیمرهای زیست‌تخریب‌پذیر زیست‌سازگار به‌وجود آید. نانومواد ساختارهایی با اندازه یک تا صد نانومتر هستند که در صورت طراحی درست قادرند خصوصیات فیزیکی و شیمیایی مناسب ارائه دهند. خواص ایده‌آل داربست برای بازسازی عصب زیست‌سازگاری، التهاب کمتر، زیست تخریب‌پذیری قابل کنترل، تولید محصولات غیرسمی، تخلخل برای عروق و مهاجرت سلول و ماتریکس سه‌بعدی با خواص مکانیکی مناسب مشابه ماتریکس خارج سلولی است (۱۰و۱۱). در این پژوهش از میان طیف وسیع پلیمرهای قابل استفاده در مهندسی بافت عصبی، ترکیب کیتوسان / پلی‌وینیل الکل / نانولوله کربنی (CS/PVA/CNT) (Chitosan/polyvinyl alcohol/carbon nanotube به‌عنوان داربست انتخاب شد. استفاده از ترکیب پلیمری دو ماده مذکور به علت تشکیل ساختار هیدروژلی (Hydrogel structure) مشابه ECM و نرخ مناسب زیست تخریب‌پذیری از اهمیت بی‌شماری برخوردار است. با استفاده از نانوکامپوزیت CS/PVA به‌دلیل زیست-سازگاری مناسب و عدم سمیت، امکان رشد سلول‌های U373 و اتصال مناسب آن‌ها به نانوکامپوزیت برای ترمیم آسیب وارده به اعصاب محیطی فراهم شده است (۱۲). کیتوسان پلیمری خطی با ساختاری ساکاریدی است که از هیدرولیز پلیمر طبیعی کیتین به‌دست می‌آید. به‌دلیل وجود گروه‌های آمینی در کیتوسان این پلیمر دارای خصوصیات منحصر به‌فردی است که از آن جمله می‌توان به قابلیت زیستی، غیرسمی بودن و سازگاری با سلول‌ها و بافت‌ها اشاره نمود (۱۳و ۱۴). با وجود این، به‌دلیل

Archive of SID
www.SID.ir

نامناسب بودن پاره‌ای از خصوصیات فیزیکی این پلیمر از جمله قابلیت کششی و ارتجاعی، استفاده از کیتوسان در برخی از زمینه‌های مهندسی بافت با محدودیت‌هایی مواجه است. از این رو می‌بایست برای ارتقای خصوصیات فیزیکی و شیمیایی آن از ترکیب کیتوزان و نوعی پلیمر سنتتیک همچون PVA استفاده شود. از PVA به‌دلیل نرخ زیست‌سازگاری/زیست‌تخریب‌پذیری مناسب می‌توان در زمینه‌های مختلف پزشکی بهره گرفت. PVA دارای خصوصیات آب‌دوستی مناسب بوده و قابلیت بالایی در تشکیل فیبر دارد. سلول کشت شده روی داربست کیتوسان/پلی‌وینیل‌الکل/نانولوله‌کربنی در این پژوهش، سلول‌های سرطانی جنینی P19 بود. سلول‌های کارسینومای جنینی (EC)(Embryonal carcinoma cells) مانند دیگر سلول‌های بنیادی نامیرا بوده و قدرت تکثیر بالایی در محیط کشت دارند (۱۵). از ویژگی‌های بارز این سلول‌ها پرتوان (Pluripotent) بودن و همچنین تکثیر و تمایز آن‌ها در محیط کشت است. بنابراین سلول‌های P19 کاندید خوبی برای تمایز عصبی هستند. هدف از این مطالعه استفاده از داربست کیتوسان/پلی‌وینیل‌الکل/نانولوله‌کربنی به‌منظور تمایز عصبی سلول‌های بنیادی برای کاربردهای بالقوه مهندسی بافت عصبی بود. سلول‌های تمایز یافته سپس از نظر بروز فنوتیپ عصبی و بیان نشانگر ویژه عصبی بتاتوبولین بررسی شدند.

مواد و روش‌ها

کشت و تکثیر سلول‌های بنیادی P19: رده سلولی P19 در محیط کشت α-MEM (α-modified Eagle's medium: Gibco, 11900- 073) و غلظت ده درصد سرم جنینی گاو (fetal bovine serum: Sigma, 10270-106) و مخلوط آنتی‌بیوتیکی پنی‌سیلین /استرپتومایسین (Penicillin G: Sigma, P3032/ Streptomycin: Sigma, S1277) کشت و در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد و فشار پنج درصد CO_2 انکوبه شد. سلول‌ها پس از رسیدن به تراکم مناسب واکشت شدند.

تولید اجسام شبه‌جنینی: برای تولید اجسام شبه‌جنینی (Embryoid bodies) از روش کشت معلق استفاده شد. بدین‌منظور سلول‌های P19 در پتری دیش‌های باکتریولوژی محتوی محیط کشت α-MEM همراه با ده درصد سرم کشت داده شدند ($۲/۵\times۱۰^{۴}$ سلول در یک میلی‌لیتر) (۶). از آنجایی‌که در این پتری‌دیش‌ها سلول به بستر کشت نمی‌چسبد، سلول‌ها تمایل دارند به یکدیگر چسبیده و تجمعات سلولی یا اجسام شبه‌جنینی تشکیل دهند.

تمایز عصبی سلول‌های P19 با استفاده از سیستم کشت سه‌بعدی: رده سلول بنیادی P19 در محیط کشت-α MEMهمراه با سه درصد سرم جنینی گاو روی داربست کشت داده شد. تشکیل اجسام شبه‌جنینی گامی ضروری در پروتکل‌های تمایزی سلول‌های بنیادی است. به‌همین دلیل در ابتدا سلول‌ها به‌صورت معلق و بدون حضور داربست کشت شدند تا این اجسام تولید شوند. سپس تعداد سه تا پنج جسم شبه‌جنینی روی هر داربست منتقل و تحت شرایط میزان ۵ درصد، CO_2 و دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد انکوباتور نگه‌داری شد. بعد از اطمینان از چسبندگی اجسام شبه‌جنینی، محیط کشت با محیط حاوی سه درصد سرم تعویض شد. نگه‌داری از سلول‌ها تا رسیدن تراکم سلولی به هفتاد تا هشتاد درصد ادامه داشت.

رنگ‌آمیزی کرزیل ویوله: به‌منظور بررسی شکل ظاهری سلول‌های عصبی حاصل از تمایز سلول‌های بنیادی در کشت سه‌بعدی از رنگ‌آمیزی اختصاصی کرزیل ویوله (cresyl violet: Merck, 3653684) که اجسام نیسل (Nissl bodies) را در سلول‌های عصبی رنگ‌آمیزی می‌کند، استفاده شد. پس از شستشو با PBS سلول‌ها با استفاده از اتانول ۷۰ درصد به‌مدت ده دقیقه در دمای اتاق تثبیت شدند. سپس به‌مدت سه تا ده دقیقه در محلول کرزیل ویوله (کرزیل ویوله ۰/۲۵ درصد، اسید استیک گلاسیال ۰/۸ درصد، استات‌سدیم ۰/۶ میلی‌مولار، آب مقطر ۱۰۰ سانتی‌مترمکعب) انکوبه شدند. برای مشاهده مستقیم و تصویربرداری سلول‌های رنگ شده از میکروسکوپ واژگون (Inverted microscope) استفاده شد. پس از رنگ‌آمیزی، سلول‌هایی که به کرزیل ویوله پاسخ مثبت دادند با استفاده از میکروسکوپ نوری شمارش و درصد آن‌ها نسبت به تعداد کل سلول‌ها محاسبه شد. رنگ‌آمیزی و شمارش سلولی حداقل پنج بار تکرار شد. اعداد حاصله با استفاده از آزمون آنالیز واریانس یک‌طرفه و دانکن تجزیه و تحلیل و نتایج به صورت میانگین± انحراف

Archive of SID
www.SID.ir

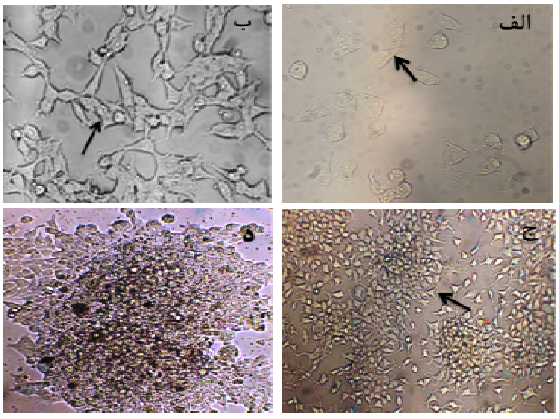
معیار گزارش شد.

ایمنوفلورسنس: ایمنوفلورسنس روشی دیگر جهت شناسایی نشانگرهای اختصاصی سلول‌های عصبی در محیط کشت است. آنتی‌بادی اولیه مورد استفاده در این روش آنتی‌بادی مونوکلونال ضد بتاتوبولینIII موش (mouse anti β-III tubulin monoclonal antibody: Abcam, ab7751) بود. ایمنوگلوبولین G (IgG) کونژوگه شده با فلورسئین‌ایزوتیوسیانات (FITC-conjugated anti-mouse IgG: Sigma, F9137FITC:) به‌عنوان آنتی‌بادی ثانویه استفاده شد. برای انجام ایمنوفلورسنس در ابتدا سلول‌ها در پلیت‌های ۱۲ خانه‌ای حاوی داربست کشت شدند. سپس با استفاده از محلول چهار درصد پارافرمالدئید به‌مدت نیم ساعت در درجه حرارت اطاق تثبیت و بعد از آن سه بار با محلول PBS ایمنوهیستوشیمی شستشو شدند. از محلول بلاک‌کننده برای پوشاندن جایگاه‌های آنتی‌ژن غیراختصاصی استفاده شد. جهت ایجاد نفوذپذیری، سلول‌ها به‌مدت نیم ساعت با محلول ۰/۳ درصد تریتون X-100 در PBS و در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد انکوبه شدند. پس از سه بار شستشو با PBS، انکوباسیون سلول‌ها به‌مدت نیم ساعت با محلول ده درصد سرم نرمال بز در PBS انجام شد. نمونه‌ها بعد از چسباندن با گلیسرول ۷۰ درصد در محلول PBS با میکروسکوپ فلورسنس مشاهده شدند. جهت اطمینان از درستی نتایج حاصله، در نمونه‌های کنترل آنتی‌بادی اولیه حذف شد.

نتایج

کشت و تکثیر سلول‌های بنیادی P19

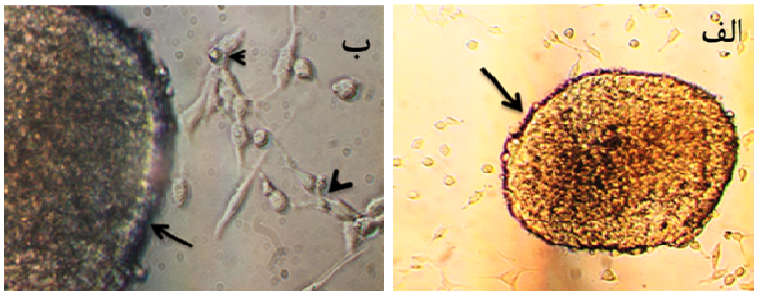
سلول‌های P19 پس از انتقال به ظروف مخصوص کشت به کف آن چسبیده و به سرعت شروع به تکثیر نمودند. این سلول‌ها که دارای شکل چندوجهی هستند (شکل ۱ الف و ب) حدود ۲۴ ساعت بعد از ذوب یا واکشت در ظرف کشت تشکیل کلونی‌های سلولی را آغاز کردند (شکل ۱ ج و د). پس از رسیدن کلونی‌ها به نقطه تلاقی با هم، سلول‌ها واکشت شدند.



شکل ۱: تصویر میکروسکوپ نوری واژگون از کشت و تکثیر تدریجی سلول‌های بنیادی کارسینومای جنینی P19 (پیکان) در محیط کشت α-MEM و ده درصد سرم جنینی گاو. سلول‌ها بلافاصله بعد از کشت به‌صورت انفرادی به بستر کشت می‌چسبند. الف: بعد از مدتی سلول‌ها شروع به تکثیر می‌کنند، ب: کلونی‌هایی که پس از تکثیر سلول‌های P19 در محیط کشت ظاهر می‌شوند، ج و د: کلونی سلولی حدود ۲۴ ساعت بعد از ذوب یا واکشت در ظرف کشت حاوی α-MEM و ده درصد سرم جنینی گاو. بزرگنمایی: الف و ب، ×۴۰۰، ج، ×۱۰۰، ، د، ×۲۵۰،

تولید اجسام شبه‌جنینی

کشت معلق سلول‌های سرطانی جنینی P19 در پتری دیش‌های باکتریولوژی منجر به تشکیل اجسام شبه‌جنینی شد. سلول‌های P19 در محیط کشت α-MEM ده درصد سرم به بستر کشت نمی‌چسبند، بلکه به یکدیگر چسبیده و تجمعات سلولی تحت عنوان اجسام شبه‌جنینی ایجاد می‌کنند (شکل۲).

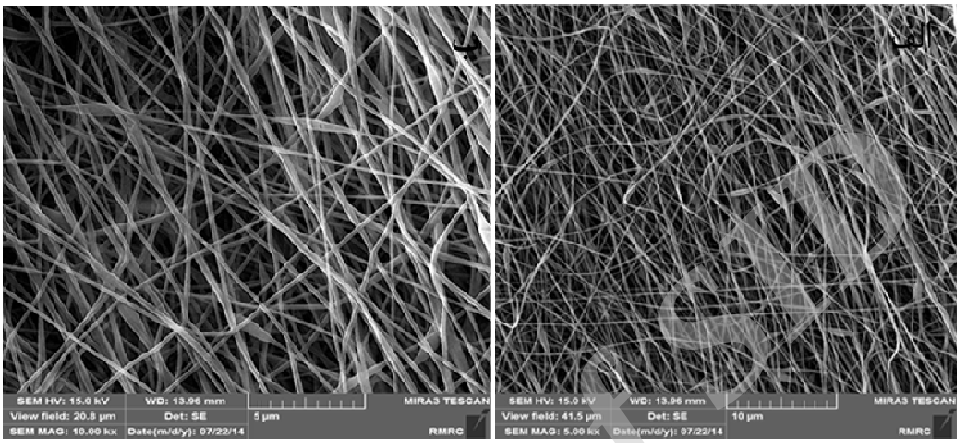


شکل ۲: تصویر میکروسکوپ نوری از تجمعات سلولی یا جسم شبه‌جنینی (پیکان) تشکیل شده از سلول‌های P19 در محیط کشت α-MEM و ده درصد سرم جنینی گاو. الف: یک جسم شبه‌جنینی پیش از چسبیدن به بستر کشت، ب: یک جسم شبه‌جنینی پس از چسبیدن به بستر کشت. سر پیکان سلول‌هایی را که از اطراف جسم جنینی در حال تکثیر هستند نشان می‌دهد. بزرگنمایی: الف، ×۴۰، ب، ×۱۰۰.

Archive of SID
www.SID.ir

داربست

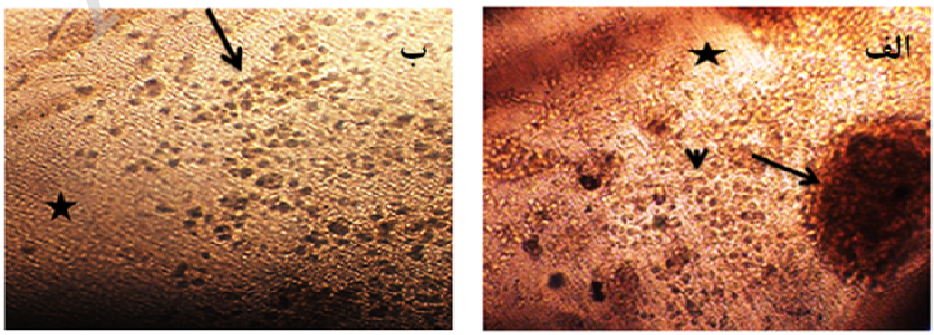
داربست‌های مورد استفاده در مهندسی بافت به‌عنوان مشابهی از ماتریکس خارج سلولی نقش مهمی ایفا می‌کنند. مهندسی بافت به معنی استفاده از داربستی است که می‌تواند در محل نقص کاشته شده و بافت آسیب دیده را در مکان ترمیم کند. این داربست باید به‌عنوان الگوی سه‌بعدی موقتی برای چسبیدن سلول‌ها، تکثیر و مهاجرت آن‌ها و سرانجام شکل‌گیری بافت جدید عمل نماید. برای ساخت داربست از روش الکتروریسی استفاده شد. تصویر میکروسکوپ الکترونی اسکنینگ داربست نانوکامپوزیتی الکتروریسی شده کیتوسان/پلی‌وینیل‌الکل/نانولوله‌کربنی در شکل ۳ نشان داده شده است.



شکل ۳: تصویر میکروسکوپ الکترونی اسکنینگ از نمونه داربست نانوکامپوزیتی الکتروریسی شده کیتوسان/پلی‌وینیل‌الکل/ نانولوله‌کربنی در دو بزرگنمایی مختلف. نانولوله‌کربنی در داربست‌های مهندسی بافت عصب به‌عنوان جزء رسانا و هدایت‌کننده پیام عصبی نقش ایفا می‌کند.

کشت سه‌بعدی سلول‌های بنیادی P19

سلول‌های بنیادی P19 در پتری‌دیش محتوی داربست در محیط کشت α-MEM و سه درصد سرم جنینی گاو کشت داده شدند. شکل ۴ الف اتصال و چسبندگی اجسام شبه‌جنینی روی داربست نانوکامپوزیتی و سلول‌هایی که از اطراف این اجسام در حال تکثیر هستند را نشان می‌دهد. تصویر سلول‌های بنیادی کشت شده روی داربست نانوکامپوزیتی کیتوسان/پلی‌وینیل‌الکل/نانولوله‌کربنی در شکل ۴ ب نشان داده شده است. گستردگی و شیوه قرارگیری سلول‌ها بر روی داربست دلیل بر مناسب بودن بستر نانوالیاف کامپوزیتی برای سلول‌ها است. این نتایج نشان می‌دهد داربست‌های تهیه شده محیط و بستر بسیار مطلوبی را برای اتصال و رشد سلول‌ها فراهم کرده‌اند.



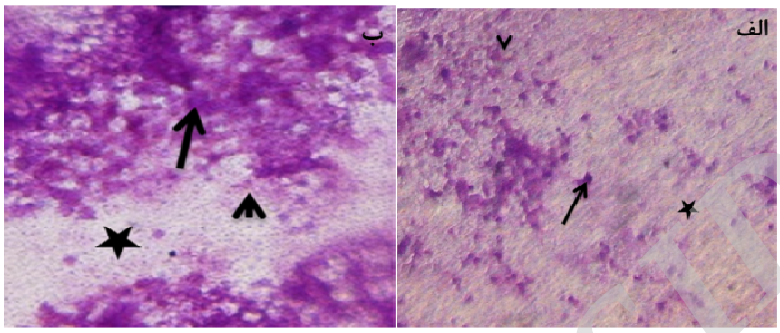
شکل ۴: تصویر میکروسکوپ نوری از اتصال و چسبندگی الف: جسم شبه‌جنینی (پیکان) روی داربست نانوکامپوزیتی (ستاره). سلول‌هایی‌که از اطراف جسم شبه‌جنینی در حال تکثیر هستند به‌خوبی درون داربست جای گرفتند (سر پیکان)، ب: سلول‌های بنیادی P19 (پیکان) روی داربست نانوکامپوزیتی (ستاره) که به‌خوبی درون داربست جای گرفتند. بزرگنمایی: الف، ×۱۰۰، ب، ×۲۵۰.

Archive of SID
www.SID.ir

بررسی شکل ظاهری سلول‌های عصبی توسط رنگ‌آمیزی کرزیل ویوله

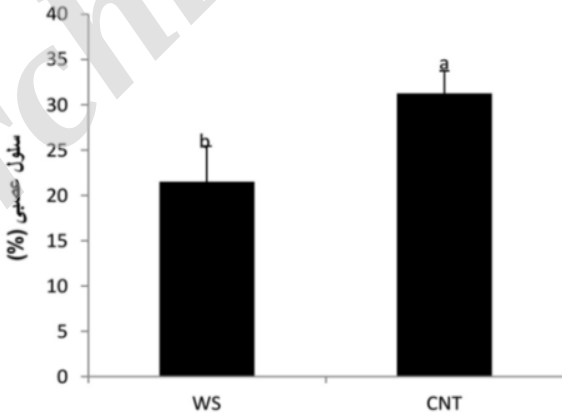
جهت شناسایی سلول‌های عصبی حاصل از تمایز از روش‌های مختلف استفاده می‌شود. از جمله این روش‌ها رنگ‌آمیزی اختصاصی کرزیل‌ویوله است که اجسام نیسل سلول‌های عصبی را به رنگ بنفش در می‌آورد (شکل ۵).

پس از رنگ‌آمیزی با کرزیل ویوله، سلول‌های عصبی همراه با زواید سلولی خود به‌رنگ بنفش درآمدند. سلول‌های کشت روی داربست که به این رنگ پاسخ مثبت داده‌اند با دو بزرگنمایی پایین (شکل ۵ الف) و بالا (شکل ۵ ب) نشان داده شده‌اند.



شکل ۵: تصویر میکروسکوپ نوری از رنگ‌آمیزی کرزیل ویوله جهت شناسایی سلول‌های عصبی (پیکان) و غیرعصبی (سرپیکان) در داربست نانوکامپوزیتی (ستاره) کیتوسان/پلی‌وینیل‌الکل/نانولوله‌کربنی. بزرگنمایی: الف، ×۱۰۰، ب، ×۴۰۰.

پس از رنگ‌آمیزی، سلول‌هایی که به کرزیل ویوله پاسخ مثبت دادند با استفاده از میکروسکوپ نوری شمارش و درصد آن‌ها نسبت به تعداد کل سلول‌ها محاسبه شد. رنگ‌آمیزی و شمارش سلولی حداقل پنج بار تکرار شد. اعداد حاصله با استفاده از آزمون آنالیز واریانس یک‌طرفه و دانکن تجزیه و تحلیل و نتایج به‌صورت میانگین ± انحراف معیار گزارش شد (نمودار ۱). نتایج نشان داد که میانگین درصد سلول‌های عصبی در گروه کشت شده روی داربست نانوکامپوزیت (CNT) بیشتر از میانگین درصد سلول‌های عصبی در گروه کنترل (WS) بوده و این اختلاف از نظر آماری معنادار است ($n=۳$ و $\rho<۰/۵$).



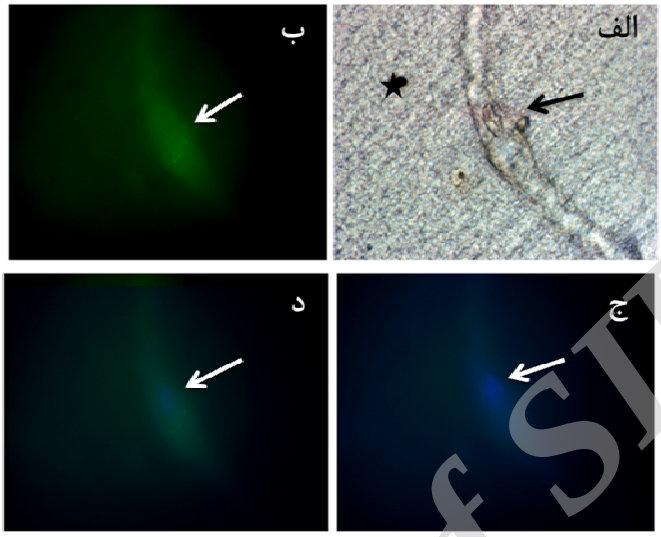
نمودار ۱: مقایسه‌ی درصد سلول‌های عصبی در داربست نانوکامپوزیتی کیتوسان/پلی‌وینیل‌الکل/نانولوله‌کربنی (CNT) و بدون داربست (WS) توسط رنگ‌آمیزی کرزیل‌ویوله. میانگین درصد سلول‌های عصبی در گروه کشت سه‌بعدی بیشتر از میانگین درصد سلول‌های عصبی در گروه کنترل (بدون داربست) بود و از نظر آماری اختلاف معناداری نشان داد ($n=۳$ و $\rho<۰/۵$). حروف کوچک انگلیسی نشان دهنده اختلاف معنی‌دار بین گروه‌های مختلف است.

بررسی بیان پروتئین‌های اختصاصی عصبی در سلول‌های تمایزیافته به روش ایمنوفلورسنس

ایمنوفلورسنس روش مناسبی جهت شناسایی سلول‌های عصبی در محیط کشت است. سلول‌های حاصل از تمایز در معرض آنتی‌بادی اولیه (ضد بتاتوبولین۳) و ثانویه (کونژوگه شده با ماده فلورسنت) قرار گرفتند تا بیان نشانگر بتاتوبولین۳ در آن‌ها ارزیابی شود. بتاتوبولین۳ ویژه مغز در

Archive of SID
www.SID.ir

بیشتر زواید عصبی بافت‌های بالغ وجود داشته و نشانگر اختصاصی برای نورون‌هاست. مقاطع رنگ‌آمیزی شده به‌وسیله میکروسکوپ فلورسنس بررسی و تصویربرداری شدند (شکل ۶). همچنین برای اطمینان از درستی نتایج به‌دست آمده گروهی به‌عنوان گروه کنترل منفی که در آن آنتی‌بادی اولیه حذف شده بود در نظر گرفته شد (شکل ۷). در این گروه سلول‌ها هیچگونه واکنش فلورسنتی از خود نشان ندادند.



شکل ۶: تصویر میکروسکوپ فلورسنس از سلول‌های تمایزیافته (پیکان) حاصل کشت سلول‌های بنیادی کارسینومای جنینی رده P19 روی داربست نانوکامپوزیتی (ستاره). این تصاویر بیان نشانگر عصبی بتاتوبولین۳ را نشان می‌دهد. بتاتوبولین۳ ویژه مغز است و در بیشتر زواید عصبی بافت‌های بالغ وجود داشته و نشانگر مناسبی برای شناسایی نورون‌هاست. الف: سلول P19 تمایز یافته با استفاده از نور مرئی، ب: بیان بتاتوبولین۳ با استفاده از آنتی-بادی ضد بتاتوبولین۳ ، ج: رنگ‌آمیزی هسته با استفاده از هوخست، د: تصویر مرکب از (ب) و (ج). بزرگنمایی ×۱۰۰۰.

شکل۷: تصویر میکروسکوپ فلورسنس از سلول‌های تمایزیافته (پیکان) حاصل کشت سلول‌های بنیادی کارسینومای جنینی رده P19 روی داربست نانوکامپوزیتی (ستاره) به‌عنوان گروه کنترل منفی که بدون آنتی‌بادی اولیه انجام گرفت. الف: سلول P19 تمایز یافته با استفاده از نور مرئی، ب: همان میدان دید با فیلتر فلورسنس و بدون استفاده از آنتی‌بادی اولیه، ج: رنگ‌آمیزی هسته با استفاده از رنگ اختصاصی هوخست انجام شد. بزرگنمایی ×۱۰۰.

بحث

کشت و تمایز سلول‌های بنیادی در محیط آزمایشگاه و سپس پیوند سلول‌های تمایز یافته امیدهای تازه‌ای را برای درمان بسیاری از بیماری‌ها از جمله اختلالات سیستم عصبی فراهم نموده است. از طرف دیگر استفاده از ساختارهای سه‌بعدی برای کشت سلول‌های پیوندی، شرایط رشد، تکثیر و تمایز سلولی را به وضعیت طبیعی درون بدن نزدیک‌تر می‌نماید (۱۶). به‌منظور تولید داربست مناسب برای پیوند و نیل به درمان موثر با استفاده از آن هنوز انجام تحقیقات پایه‌ای گسترده‌ای مورد نیاز است. پروژه حاضر در این راستا طراحی و ارائه شده است. در این پروژه پس از کشت سه‌بعدی سلول‌های P19 و بررسی میزان زنده‌مانی و تمایز آن‌ها روی داربست، این سلول‌ها از نظر بروز فنوتیپ عصبی مورد ارزیابی قرار گرفتند. نتایج حاصل از این پروژه نشان داد که داربست

Archive of SID
www.SID.ir

کیتوسان /پلی‌وینیل‌الکل/نانولوله‌کربنی برای تمایز عصبی سلول‌های P19 مفید است؛ زیرا این داربست می‌تواند باعث برقراری اتصالات سلولی و همچنین تکثیر، سازمان-یابی و تمایز عصبی سلول‌ها شود. سلول‌های P19، همانند سایر سلول‌های بنیادی نامیرا و فناناپذیر هستند. این سلول‌ها به سرعت در محیط کشت تکثیر شده و می‌توانند تحت شرایط مناسب به تمام انواع سلول‌ها تمایز یابند. سلول‌های P19 در مطالعات گسترده‌ای به‌منظور تمایز به انواع سلول‌ها به‌ویژه سلول عصبی مورد استفاده قرار گرفته‌اند (۶، ۱۷، ۱۸). اجتماعات سلولی P19 پس از انتقال به ظروف کشت به بستر چسبیده و بعد از ۱۲ تا ۲۴ ساعت کلونی‌های سلولی را تشکیل می‌دهند. در مهندسی بافت عصبی به داربست‌هایی نیاز است که با وجود داشتن ساختار فیزیکی و شیمیایی مناسب، از پایداری مطلوب نیز برخوردار باشند (۱۹). در این پژوهش از نانو لوله‌های کربنی تک جداره به‌دلیل خواص منحصر به فرد آن‌ها برای تقویت و پایداری نانوکامپوزیت کیتوسان/پلی‌وینیل‌الکل استفاده شد. استفاده از نانو لوله‌های کربنی در داربست-های مهندسی بافت عصب علاوه بر ارتقای خواص مکانیکی داربست، رفتار سلول‌های عصبی را نیز بسیار تحت تاثیر قرار می‌دهد. در پروژه حاضر سازگاری زیستی داربست نانوکامپوزیتی با سلول‌های بنیادی کارسینومای جنینی (رده P19) مورد بررسی قرار گرفت. گستردگی و شیوه قرارگیری سلول‌ها روی داربست، نشان از مناسب بودن بستر نانو الیاف کامپوزیتی برای سلول‌ها است. وجود نانو لوله‌های کربنی، علاوه بر ارتقای خواص مکانیکی، رسانایی لازم را نیز برای بدنه داربست ایجاد می‌کند و به این ترتیب امکان برقراری ارتباط میان سلول‌های عصبی را تسهیل می‌نماید. ساخت کانال هدایت عصبی زیست-تخریب‌پذیر بر اساس کیتین/کیتوسان مهندسی بافت عصبی را بهبود بخشیده است (۲۰). در مدل حیوانی نقص عصب سیاتیک توسط پیوند عصب مصنوعی، پلی از مخلوط کیتوسان/پلی‌گلیکولیک‌اسید به اندازه سی میلی‌متر زده شد (۲۱). جایو و همکاران (۲۲) با استفاده از داربست زیست‌تخریب‌پذیر کیتوسان/پلی‌گلیکولیک‌اسید اقدام به ایجاد پل دراز مدت در عصب سیاتیک آسیب دیده موش صحرایی نمودند و با بهره‌گیری از بررسی‌های بافت‌شناسی و سنجش الکتروفیزیولوژی بازیابی عملکردی آن را بررسی کردند. نتایج نشان داد که نقص عصب سیاتیک بعد از مدتی برطرف شد. اولین بار در ایران متقی طلب و همکاران (۱۲)، داربست کامپوزیتی کیتوسان/پلی-وینیل‌الکل/نانولوله‌کربنی را برای کاربرد در مهندسی بافت عصب معرفی کردند. در پژوهش آن‌ها رشد سلول‌های عصبی طبیعی مشتق از مغز انسان روی داربست مذکور بررسی و تایید شد. سپس داربست کامپوزیتی کیتوسان/پلی‌وینیل‌الکل/نانولوله‌کربنی به‌روش الکتروریسی ساخته و مشخص شد که سلول‌های L929 نسبت به این داربست پاسخ مناسبی از خود نشان می‌دهند. همچنین تکثیر سلولی روی داربست‌های دارای نانولوله‌های‌کربنی بیشتر از داربست‌های بدون نانولوله بود (۲۳). بر اساس برخی گزارش‌ها نانولوله‌های‌کربنی سمی هستند (۲۴). ولی برخی عقیده دارند که این نانولوله‌ها نه تنها اثر سمی ندارند، بلکه برای رشد سلولی بسیار مفیدند (۲۵). نتایج حاصل از این مطالعه نیز مفید بودن نانو لوله‌های مذکور در کشت سلول‌های بنیادی و القای تمایز در آن‌ها را به اثبات رساند. در پژوهش حاضر بعد از القای عصبی در سلول‌های بنیادی توسط داربست نانوکامپوزیتی کیتوسان/پلی‌وینیل‌الکل/نانولوله‌کربنی و تایید اولیه فنوتیپ عصبی این سلول‌ها، تعداد سلول‌های تمایز یافته روی داربست با استفاده از رنگ‌آمیزی کرزیل ویوله شمارش شد. کرزیل ویوله اجسام نیسل که ویژه سلول عصبی است را رنگ‌آمیزی می‌کند. مطالعه‌ای که توسط اسماعیلی و همکاران (۵) صورت گرفت، نشان داد که سلول‌های بنیادی P19 پس از تمایز به سلول‌های عصبی به رنگ‌آمیزی کرزیل ویوله پاسخ مثبت دادند. با استفاده از این رنگ‌آمیزی اختصاصی تمایز سلول‌های کارسینومای جنینی P19 به سلول‌های عصبی روی داربست نانوکامپوزیتی تایید و مشاهده شد که این داربست نقش به‌سزایی در تمایز عصبی دارد. در این پژوهش میزان تمایز سلول‌های P19 به سلول‌های عصبی روی داربست و گروه کنترل (بدون داربست) تفاوت چشم‌گیری داشت و مشاهده شد که داربست باعث القای تمایز عصبی شده است.

علاوه بر بررسی مورفولوژیکی، سلول‌های عصبی حاصله در این پژوهش از نظر بیان نشانگر اختصاصی بتاتوبولین۳، مورد ارزیابی قرار گرفتند. با استفاده از روش

Archive of SID
www.SID.ir

ایمنوفلورسنس بیان این پروتئین در این سلول‌ها ارزیابی شد. سلول‌های P19 تمایز نیافته دارای شکل چندوجهی هستند و آنتی‌ژن‌های جنینی را در سطح خود بیان می‌کنند. بسیاری از این آنتی‌ژن‌ها در سلول‌های زایای نورواپیتلیال بیان می‌شوند. بتاتوبولین۳ ویژه مغز است. ایزوفرم پروتئین بتاتوبولین۳ در بیشتر زواید عصبی بافت‌های بالغ وجود داشته و نشانگر دیگری برای نورون‌هاست. در مطالعه‌ای که توسط بخشعلی‌زاده و همکاران (۶) صورت گرفت، ردیابی پروتئین ویژه سلول‌های عصبی بتاتوبولین۳ به‌روش ایمنوفلورسنس بیان این پروتئین اختصاصی عصبی را در سلول‌های تمایز یافته نشان داد.

نتیجه گیری

نتایج این مطالعه نشان داد که نانو لوله‌های کربنی ترکیب شده با داربست نانوالیاف کیتوسان/پلی‌وینیل‌الکل با قطر نانومتری و تخلخل بالا می‌تواند ضمن تامین خواص مکانیکی مناسب، بستری مفید برای رشد سلولی فراهم کند و به‌طور بالقوه گزینه‌ای بسیار مطلوب جهت استفاده در مهندسی بافت عصب باشد. وجود نانو لوله کربنی، علاوه بر ارتقای خواص مکانیکی، رسانایی لازم را نیز برای بدنه داربست ایجاد می‌کند و به این ترتیب امکان برقراری ارتباط میان سلول‌های عصبی را تسهیل می‌نماید.

تشکر و قدردانی

این پژوهش در دانشکده علوم دانشگاه اصفهان انجام شده است. بدین‌وسیله از تمام کسانی که ما را در انجام این طرح یاری نمودند به‌ویژه سرکار خانم قربانی کارشناس محترم آزمایشگاه قدردانی می‌شود.

Archive of SID

www.SID.ir

منابع

1. Brandt R. Cytoskeletal mechanisms of neuronal degeneration. Cell Tissue Res. 2001; 305(2): 255-65.

2. Skovronsky DM, Lee VMY, Trojanowski JQ. Neurodegenerative diseases: new concepts of pathogenesis and their therapeutic implications. Annu Rev Pathol Mech Dis. 2006; 1: 151-70.

3. Vickers JC, King AE, Woodhouse A, Kirkcaldie MT, et al. Axonopathy and cytoskeletal disruption in degenerative diseases of the central nervous system. Brain Res Bull. 2009; 80(4): 217-23.

4. Mansergh FC, Wride MA, Rancourt DE. Neurons from stem cells: implications for understanding nervous system development and repair. Biochem Cell Biol. 2000; 78(5): 613-28.

5. Esmaeili F, Tiraihi T, Movahedin M, Mowla SJ. Selegiline induces neuronal phenotype and neurotrophins expression in embryonic stem cells. Rejuv Res. 2006; 9(4): 475-84.

6. Bakhshalizadeh S, Esmaeili F, Houshmand F, Shirzad H, et al. Effects of selegiline, a monoamine oxidase B inhibitor, on differentiation of P19 embryonal carcinoma stem cells, into neuron-like cells. In Vitro Cell Dev-An. 2011; 47(8): 550-7.

7. Orive G, Anitua E, Pedraz JL, Emerich DF. Biomaterials for promoting brain protection, repair and regeneration. Nat Rev Neurosci. 2009; 10(9): 682-92.

8. Zhang L, Webster TJ. Nanotechnology and nanomaterials: promises for improved tissue regeneration. Nano today. 2009; 4(1): 66-80.

9. Dhariwala B, Hunt E, Boland T. Rapid prototyping of tissue-engineering constructs, using photopolymerizable hydrogels and stereolithography. Tissue Eng. 2004; 10(9-10): 1316-22.

10. Amado S, Simoes MJ, da Silva PASA, Luis AL, et al. Use of hybrid chitosan membranes and N1E-115 cells for promoting nerve regeneration in an axonotmesis rat model. Biomaterials. 2008; 29(33): 4409-19.

11. Wen X, Tresco PA. Fabrication and characterization of permeable degradable poly (DL-lactide-co-glycolide)(PLGA) hollow fiber phase inversion membranes for use as nerve tract guidance channels. Biomaterials. 2006; 27(20): 3800-9.

12. Mottaghitalab F, Mottaghitalab V, Farokhi M, Amiralian N, et al. Fabrication of chitosan/poly (vinyl alcohol)-carbon nanotube nanocomposites for neural tissue regeneration. Modares J Med Sci: Pathobiol. 2010; 12(4): 59-69.

13. Lee JS, Choi KH, Ghim HD, Kim SS, et al. Role of molecular weight of atactic poly (vinyl alcohol)(PVA) in the structure and properties of PVA nanofabric prepared by electrospinning. J Appl Polym Sci. 2004; 93(4): 1638-46.

14. Naebe M, Lin T, Tian W, Dai L, et al. Effects of MWNT nanofillers on structures and properties of PVA electrospun nanofibres. Nanotechnology. 2007; 18(22): 225605.

15. Rudnicki MA, McBurney MW. Cell culture methods and induction of differentiation of embryonal carcinoma cell lines. In Teratocarcinomas and Embryonic Stem Cells: A Practical Approach, Robertson EJ (ed.). IRL Press: Oxford; 1987; 19–49.

16. Kumari A, Yadav SK, Yadav SC. Biodegradable polymeric nanoparticles based drug delivery systems. Colloids Surf B Biointerfaces. 2010; 75(1): 1-18.

17. Ebrahimie M, Esmaeili F, Cheraghi S, Houshmand F, et al. Efficient and Simple Production of Insulin-Producing Cells from Embryonal Carcinoma Stem Cells Using Mouse Neonate Pancreas Extract, As a Natural Inducer. PloS one. 2014; 9(3): e90885, Doi:10.1371/journal.pone.0090885.

18. Mansouri A, Esmaeili F, Nejatpour A, Houshmand F, et al. Differentiation of P19 embryonal carcinoma stem cells into insulin-producing cells promoted by pancreas-conditioned medium. J Tissue Eng Regen Med. 2016; 8, DOI: 10.1002/term.1927:600-12.

19. Leipzig ND, Wylie RG, Kim H, Shoichet MS. Differentiation of neural stem cells in three-dimensional growth factor-immobilized chitosan hydrogel scaffolds. Biomaterials. 2011; 32(1): 57-64.

20. Freier T, Montenegro R, Koh HS, Shoichet MS. Chitin-based tubes for tissue engineering in the nervous system. Biomaterials. 2005; 26(22): 4624-32.

21. Wang X, Hu W, Cao Y, Yao J, et al. Dog sciatic nerve regeneration across a 30-mm

Archive of SID
www.SID.ir

defect bridged by a chitosan/PGA artificial nerve graft. Brain. 2005; 128(8): 1897-910.

22. Jiao H, Yao J, Yang Y, Chen X, et al. Chitosan/polyglycolic acid nerve grafts for axon regeneration from prolonged axotomized neurons to chronically denervated segments. Biomaterials. 2009; 30(28): 5004-18.

23. Liao H, Qi R, Shen M, Cao X, et al. Improved cellular response on multiwalled carbon nanotube-incorporated electrospun polyvinyl alcohol/chitosan nanofibrous scaffolds. Colloids Surf B Biointerfaces. 2011; 84(2): 528-35.

24. Jia G, Wang H, Yan L, Wang X, et al. Cytotoxicity of carbon nanomaterials: single-wall nanotube, multi-wall nanotube, and fullerene. Environ sci technol. 2005; 39(5): 1378-83.

25. Shi Kam NW, Jessop TC, Wender PA, Dai H. Nanotube molecular transporters: internalization of carbon nanotube-protein conjugates into mammalian cells. J Am Chem Soc. 2004; 126(22): 6850-1.

Archive of SID

www.SID.ir

Journal of Cell & Tissue (JCT) *Original Article*
Autumn 2017; 7(3):

Neuronal differentiation of embryonal carcinoma stem cells in three-dimensional culture system

Azizi F., M.Sc.[1], Jalil H.R. M.Sc.[1], Moshtaghian S.J., Ph.D.[1], Doostmohammadi A., Ph.D.[2], Esmaeili F., Ph.D.[1*]

1- Department of Biology, Faculty of Sciences, University of Isfahan, Hezarjerib Avenue, Isfahan 8174673441, Iran

2- Materials Department, Engineering Faculty, Shahrekord University, Shahrekord, Iran.

* Email corresponding author: f.esmaeili@sci.ui.ac.ir

Received: 12 Aug. 2016 Accepted: 15 Nov. 2016

Abstract

Aim: The aim of this study was to use carbon nanotube incorporated electrospun chitosan/polyvinyl alcohol (CS/PVA/CNT) to induce neural differentiation of the stem cells for potential neural tissue engineering applications.

Material and Methods: P19 embryonal carcinoma (EC) stem cells were cultured on the CS/PVA/CNT scaffold to induce neuronal differentiation. Cresyl violet staining was used to investigate neuronal phenotype and immunoflourescence technique was carried out to evaluate expression of β-tubulin, a neural specific marker.

Results: Cresyl violet staining confirmed the neuronal morphology of the differentiated cells. These cells were immunoreactive to neuron specific marker, β-tubulin.

Conclusion: the findings suggested the potential use of combined tissue engineering and stem cell therapy to improve deficits in neurodegenerative diseases.

Keywords: Biomaterials, Neuronal differentiation, Embryonal carcinoma cells, Neural specific markers, Chitosan/polyvinyl alcohol/carbon nanotube

Archive of SID

www.SID.ir