

مجله‌ی علمی، پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی زنجان
دوره‌ی ۲۵، شماره‌ی ۱۰۸، فروردین و اردیبهشت ۱۳۹۶، صفحات ۸۱ تا ۹۵

تمایز سلول‌های بنیادی مزانشیمی چربی انسانی به سلول‌های شبه عصبی روی ساختارهای نانوفیبری موازی

بهناز اسفندیاری^۱، دکتر مسعود سلیمانی^۲، دکتر سعید کاویانی^۳، دکتر کاظم پریور^۳

نویسنده‌ی مسوول: گروه زیست‌شناسی، دانشکده‌ی علوم پایه، دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم تحقیقات، تهران kazem_parivar@yahoo.com

دریافت: ۹۴/۱۲/۱۶ پذیرش: ۹۵/۴/۱

چکیده

زمینه و هدف: تمایز سلول‌های بنیادی مزانشیمی به سلول‌های عصبی پتانسیل زیادی جهت درمان بافت‌های آسیب دیده‌ی عصبی دارد. مهندسی بافت عصبی راهکارهای نویدبخشی را برای کاهش اثرات بیماری، پیری و صدمات سیستم عصبی ارائه داده است. هدف از مطالعه‌ی حاضر بررسی تمایز سلول‌های بنیادی مزانشیمی چربی انسانی به سلول‌های شبه عصبی روی ساختارهای نانوفیبری موازی بود.

روش بررسی: در این مطالعه، سطح میانجی‌های نانوفیبری پلی‌کاپرولاکتون موازی با روش پلاسمای اکسیژن، جهت افزایش خاصیت آب دوستی PCL بهینه گردید، تا از آنها جهت تمایز اختصاصی سلول‌های بنیادی چربی به سمت سلول‌های شبه عصبی استفاده گردد. خصوصیات مورفولوژیکی و شیمیایی نانوفیبرهای PCL الکترورسی شده با استفاده از میکروسکوپ الکترونی SEM و اندازه‌گیری زاویه تماس مورد بررسی قرار گرفت. تمایز سلول‌های بنیادی مزانشیمی چربی انسانی با استفاده از فاکتورهای القایی عصبی شامل *Forskolin*، *bFGF* و *NGF* همراه با FBS یک درصد انجام گرفت.

یافته‌ها: نتایج *Real-time PCR* افزایش بیان *MAP2*، *NFM* و *NSE* و کاهش بیان *Nestin* را نشان داد. همچنین بیان پروتئین‌های عصبی *MAP2* و *βtubullin* با استفاده از روش ایمنوسیتوشیمی مورد تایید قرار گرفت.

یافته‌ها نشان دادند هدایت کشیدگی سلول‌ها و رشد زوائد آکسونی آنها روی میانجی‌های نانوفیبری موازی به موازات جهت فیبرها می‌باشد. **نتیجه گیری:** نتایج مطالعه‌ی حاضر پیشنهاد می‌کند که *p-PCL* یک بستر سه بعدی مناسب برای تمایز *hADSCs* به سمت سلول‌های شبه عصبی است و می‌تواند جهت بازسازی بافت عصبی به کار رود.

واژگان کلیدی: مهندسی بافت عصبی، سلول‌های بنیادی مزانشیمی چربی، سلول‌های شبه نورونی، داربست نانو فیبری PCL موازی، تمایز

مقدمه

با افزایش روزافزون بیماری‌های مخرب

MS (Multiple Sclerosis) و صدمات ناشی از تصادفات، پژوهشگران حوزه‌ی مهندسی بافت درصدد ساخت

سیستم عصبی، اختلالات خودایمنی عصبی نظیر

پژوهشگران حوزه‌ی مهندسی بافت درصدد ساخت

۱- دانشجوی دکترای تخصصی زیست‌شناسی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد علوم تحقیقات، تهران

۲- دکترای تخصصی هماتولوژی، دانشیار گروه هماتولوژی، دانشکده‌ی پزشکی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران

۳- دکترای تخصصی زیست‌شناسی تکوینی، استاد گروه زیست‌شناسی، دانشکده‌ی علوم پایه، دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم تحقیقات، تهران

در کشت‌های سه بعدی با شرایط *in vivo* است. ضمناً شکل دهی سلول‌ها می‌تواند بر رفتار آنها موثر باشد (۱۷ و ۱۶). همچنین بررسی نتایج مطالعه‌ی دیگری حاکی از افزایش نرخ رشد ابتدایی سلول‌ها در محیط کشت دو بعدی بود، اما به محض رسیدن سلول‌ها به حالت *Confluence*، تکثیرشان ناگهان متوقف می‌شد (۱۸). ضمناً مطالعاتی نیز در زمینه‌ی تمایز سلول‌های بنیادی مزانشیمی مغز استخوان به سلول‌های عصبی روی ساختارهای سه بعدی در دسترس است. مطالعه‌ی دیگری نیز توسط باقر و همکارانش در سال ۲۰۱۵ بر روی تمایز سلول‌های بنیادی مزانشیمی ژله‌ی وارزون به سلول‌های شبه نوروں حرکتی روی نانوفیبرهای آغشته به کلاژن انجام گرفت (۱۹). گزارش دیگری توسط فقیهی و همکارانش مبنی بر تمایز سلول‌های بنیادی مزانشیمی کوریون به سمت سلول‌های شبه نوروں حرکتی در محیط دوعبده‌ی و سه بعدی ارائه شده است. (۲۰) هر چند مطالعات کمی روی تمایز سلول‌های بنیادی مزانشیمی چربی به سلول‌های عصبی روی بستری نانوفیبری الکتروریسی شده تمرکز کرده‌اند.

هدف از مطالعه‌ی حاضر استفاده از داربست نانوفیبری موازی *p-PCL* زیست سازگار و زیست تخریب پذیر بود که از تمایز سلول‌های بنیادی مزانشیمی چربی را به سمت سلول‌های شبه عصبی با هدف ساخت بافت نانومهندسی شده‌ی عصبی روی داربست برای پیوند بعد از جراحی عصبی و بازسازی بافت تخریب شده حمایت کند. در این پژوهش سلول‌های بنیادی مزانشیمی چربی جهت تمایز به سلول‌های شبه عصبی تحت القای فاکتورهای نورترفیک در محیط کشت سه بعدی و دو بعدی قرار گرفتند.

روش بررسی

تهیه‌ی محلول (Poly caprolacton) PCL و الکتروریسی آن: برای تهیه‌ی محلول PCL با غلظت مورد نظر، ۱/۲ گرم پلی‌کاپرولاکتون در کلروفرم ودی متیل

جایگزین‌های زیستی هستند که بتواند عملکرد بافت عصبی را نگهداری، ترمیم یا بهبود بخشد (۲ و ۱). اساس مهندسی بافت، یافتن یک اسکفولد زیست سازگار و زیست تخریب‌پذیر با خصوصیات بیوشیمیایی و مکانیکی مناسب است که بتواند ویژگی‌های فیزیکی و شیمیایی ماتریکس خارج سلولی را تقلید کند (۳ و ۴). پژوهشگران داربست‌های بیومتریال مختلفی را جهت به وجود آوردن تیپ سلولی خاص مورد استفاده قرار می‌دهند (۵). PCL یک پلیمر ساختگی، زیست سازگار و غیرسمی است که به دلیل ویژگی‌های مناسب برای مهندسی بافت عصبی مورد استفاده قرار می‌گیرد، اما به دلیل ضعیف بودن خاصیت آب دوستی آن چسبندگی سلول‌ها به سطح نانوفیبرها ضعیف است (۸-۶).

در مطالعه‌ی حاضر اسکفولدهای نانوفیبری موازی *PCL (Poly e-Caprolactone)* به روش الکتروریسی ساخته شدند و سطوح نانوفیبرها جهت افزایش خاصیت آبدوستی به روش پلاسمای اکسیژن بهینه گردید. ساختار آنها با میکروسکوپ الکترونی نگاره و *Contact Angel* توصیف گردید، به علاوه از داربست‌های *p-PCL* موازی به‌عنوان بستر تمایزی سلول‌های بنیادی مزانشیمی چربی به سمت سلول‌های شبه عصبی استفاده شد.

در سال‌های اخیر توجه پژوهشی زیادی به ساختارهای سه بعدی مختلف به‌عنوان بستر کشت و تمایز سلولی معطوف شده است (۹ و ۱۰). زیرا آنها به‌عنوان محیط کشت سه بعدی سطوح گسترده‌تری جهت چسبندگی و هدایت تماسی سلول‌ها نسبت به محیط کشت دوعبده‌ی *TCP* دارند، (۱۱-۹) بنابراین گزینه‌های مناسب‌تری جهت استفاده در سازه‌های مهندسی شده‌ی سلولی هستند که ممکن است به ساختار و عملکرد بافت‌های طبیعی بدن شباهت داشته باشند (۱۲ و ۱۳). نتایج تحقیقات گذشته نشان داد که سلول‌ها در ماتریکس‌های سه بعدی، تکثیر بالاتری نسبت به محیط کشت دو بعدی دارند (۱۴ و ۱۵) و این مساله به دلیل شباهت موقعیت سلول‌ها

جداسازی و کشت سلول های بنیادی مزانشیمی چربی:

در این مطالعه نمونه‌های بافت چربی در طی جراحی لیپوساکشن شکم در ظروف شیشه‌ای دردار استریل حاوی بافر آنتی بیوتیک پنی سیلین و استرپتومایسین به آزمایشگاه انتقال داده شدند. سپس در شرایط استریل زیر هود کشت سلولی نمونه‌ها به فالكون انتقال داده شد و با بافر PBS حاوی آنتی بیوتیک و آفوتریسین، با سرعت ۱۲۰۰ rpm و به مدت ۵ دقیقه سانتریفیوژ شدند. این مرحله شستشو سه بار تکرار شد. سپس بافت چربی با استفاده از تیغ جراحی به قطعات زیر تقسیم شد و در محلول هضم کننده‌ی بافت چربی شامل محیط کشت DMEM، کلاژناز تیپ یک 1X، آنتی بیوتیک پنی سیلین-استرپتومایسین-Gibco 15070 ۱۰۰ واحد بر میلی لیتر 060 1X، ضدقارچ آفوتریسین 1X و تریسین به مدت ۴۵ دقیقه روی شیکر با دمای ۳۷ درجه‌ی سانتی گراد قرار گرفتند. در این مرحله با دور ۱۲۰۰ rpm به مدت ۵ دقیقه سانتریفیوژ شدند تا پلت سلولی تشکیل گردد. سپس محیط رویی تخلیه شد و به سلول‌ها RBC Lysis اضافه گردید و به مدت ۵ دقیقه در دمای اتاق جهت لیز شدن گلبول‌های قرمز نگهداری شد. در ادامه جهت به دست آوردن پلت سلولی سانتریفیوژ با دور ۱۲۰۰ و به مدت ۵ دقیقه انجام شد. در این مرحله به پلت سلولی محیط DMEM حاوی ۲۰ درصد سرم اضافه شد و در فلاسک‌های T75 کشت داده شد. فلاسک‌های کشت سلول به انکوباتور CO₂ دار با دمای ۳۷ درجه‌ی سانتی گراد منتقل گردیدند. بعد از ۲ روز، محیط رویی به آرامی خارج و محیط DMEM حاوی ۲۰ درصد سرم به آرامی اضافه گردید. محیط سلول‌ها هر ۳ روز یک بار تعویض گردید تا سلول‌ها به تراکم مناسبی رسیدند. سپس پاساژ اول انجام گرفت. پس از انجام چهار پاساژ، جمعیت سلولی یک دست و برای آنالیزهای سلولی مورد استفاده قرار گرفت.

فرمالدهید (DMF) با نسبت ۹:۱ مخلوط و با استفاده از همزن مغناطیسی در دمای محیط حل گردید. محلول پلیمر به درون سرنگ ۵ میلی لیتر با سر سرنگ ۲۱G ریخته شد و پس از هواگیری در یک سرعت جریان ۰/۵ میلی لیتر بر ساعت و ولتاژ ۲۵ کیلوولت پمپ گردید. از یک صفحه‌ی آلومینیومی به عنوان جمع کننده استفاده شد که در فاصله‌ی ۲۳ سانتی متری از نازل قرار گرفت. برای جمع‌آوری نانوفیبرها با آرایش موازی (Aligned) از یک دیسک چرخاننده با سرعت خطی ۱۰۰۰rpm استفاده شد (۲۱)

تغییر خصوصیات سطحی داربست‌ها: PCL یک پلیمر زیست‌سازگار و قابل جذب است. اما، آبدوستی ضعیف و کمبود گروه‌های عملکردی آن سبب کاهش چسبندگی و تکثیر سلول روی داربست می‌شود. جهت بهینه سازی خصوصیات سطحی داربست‌های PCL، از روش پلاسمای اکسیژن استفاده شد. در این روش تیمار داربست‌های نانوفیبری با استفاده از Diener Electronic Plasma Generator با فرکانس پایین ۴۴ گیگا هرتز انجام گرفت. نانوفیبرها در محفظه‌ی دستگاه قرار گرفتند و اکسیژن خالص به چمبر واکنش با فشار ۰/۴ میلی بار وارد شده، سپس تخلیه پلاسمای به مدت ۳ دقیقه به کار برده شد (۲۱).

بررسی خصوصیات نانوفیبرها: برای بررسی مورفولوژی داربست‌ها از میکروسکوپ الکترونی نگاره استفاده شد. برای عکس‌برداری از داربست‌ها، آن‌ها را روی نگهدارنده‌ای چسباننده و با استفاده از Polaran SC7620 Sputter Coater پوشش طلا داده شده سپس داربست‌های نانوفیبری با استفاده از میکروسکوپ الکترونی نگاره (SEM; LEO 1455VP, England) با ولتاژ ۱۰ کیلوولت مورد بررسی قرار گرفتند. خصوصیت آبدوستی نانوفیبرها با استفاده از اندازه‌گیری زاویه‌ی تماس ارزیابی شد. زاویه‌ی تماس نانوفیبرهای PCL قبل و بعد از پلاسمای اکسیژن با استفاده از دستگاه اندازه‌گیری زاویه‌ی تماس G10 (KR uSS, Korea) مورد بررسی قرار گرفت.

فیکس گردیدند و پس از شستشو با بافر PBS، به مدت ۵ دقیقه با تریتون $100\times$ نفوذپذیر شدند، سپس در Goat serum ۵ درصد به مدت ۴۵ دقیقه انکوبه گردیدند. آنتی‌بادی‌های اولیه شامل Map2 و β tubulin III در BSA/PBS ۰/۲ درصد رقیق شده اضافه شدند و انکوباسیون به مدت یک شب انجام شد. پس از شستشو و اضافه کردن BSA/PBS ۱ درصد به مدت ۳۰ دقیقه، آنتی‌بادی ثانویه (PE) Anti Mouse IgG در تاریکی اضافه شد و انکوباسیون به مدت یک ساعت انجام گرفت. به منظور رنگ‌آمیزی هسته، رنگ DAPI اضافه شد و پس از شستشو نمونه‌ها با میکروسکوپ فلورسنت مورد بررسی قرار گرفتند.

Real-time PCR: بررسی بیان کمی ژن‌های MAP2 (Microtubule associated protein), NSE (Neuron specific enolase), Nestin و NFM (Neurofilament medium) برای سلول‌های تمایز یافته بر روی ساختارهای نانوفیبری موازی صورت گرفت. ابتدا استخراج RNA کل از سلول‌های تمایز یافته انجام گرفت. واکنش رونویسی معکوس با استفاده از هگزامر تصادفی و M_MuLVRT انجام شد. واکنش Real-time PCR با استفاده از Maxima SYBER و Green/ ROX qPCR Master Mix (2X) پرایمرهای اختصاصی ژن‌های عصبی که در جدول ۱ درج شده‌اند، انجام شد.

تجزیه و تحلیل آماری: به منظور تجزیه و تحلیل اطلاعات به دست آمده از روش کمی سازی نسبی استفاده شد و بیان نسبی ژن‌ها با استفاده از فرمول $2^{-Ct\Delta\Delta}$ نسبت به گروه کنترل مقایسه گردید، سپس از آزمون مقایسه‌ی میانگین Tukey HSD جهت کسب یافته‌های نهایی و میزان معنی‌دار بودن نمونه‌ها استفاده شد. مقادیر $P \leq 0/05$ از لحاظ آماری معنی‌دار بودند.

فلوسایتومتری: به منظور شناسایی سلول‌های بنیادی مزانشیمی مورد استفاده در این مطالعه از روش فلوسایتومتری نیز استفاده شد. مراحل فلوسایتومتری برای ماکرهای اختصاصی سلول‌های مزانشیمی به شرح زیر بود: ابتدا سلول‌ها تریپسینه شدند و پس از سانتریفیوژ با دور rpm ۲۱۰۰ به مدت ۵ دقیقه، به پلت سلولی BSA/PBS ۳ درصد اضافه شد. سپس ۱۰۰ میکرولیتر از آن را در میکروتیوب‌های ۱/۵ میلی‌لیتری ریخته و غلظت مناسبی از آنتی‌بادی‌ها در محیط تاریک به آنها اضافه گردید. در ادامه نمونه‌ها برای مدت یک ساعت در دمای ۴ درجه‌ی سانتی‌گراد انکوبه شدند. پس از آن حجم نمونه‌ها با PBS سرد به rpm ۱۰۰۰ میکرولیتر رسانده شد و سانتریفیوژ با دور rpm ۲۱۰۰ در دمای ۴ درجه و به مدت ۵ دقیقه انجام گردید. در نهایت پس از سانتریفیوژ محلول رویی دور ریخته شد و ۵۰۰ میکرولیتر پارافرمالدئید ۱ درصد سرد به نمونه‌ها اضافه گردید و توسط دستگاه فلوسایتومتری (FACSCan II:FlowJO 6.7, USA) مورد بررسی قرار گرفت.

القای تمایز عصبی: در ابتدا سلول‌های بنیادی مزانشیمی چربی بر روی نانوفیبرهای PCL موازی کاشته شدند و پس از یک شب انکوباسیون، به مدت ۸ روز تحت تاثیر القاگرهای تمایزی (bFGF (Sigma f0289), Forskolin MP, (Biomedicals LLC190669) و NGF (R4643) Sigma قرار گرفتند. پروتکل تمایزی شامل فاکتورهای Forskolin ۱۰ میکرومول، bFGF ۱۰ نانوگرم بر میلی‌لیتر و NGF ۱۰ نانوگرم بر میلی‌لیتر می‌باشند که به محیط کشت DMEM حاوی ادرصد سرم اضافه شدند. محیط کشت سلول‌ها هر سه روز یک بار تعویض گردید.

ایمونوسایتوشیمی: مراحل ایمونوسایتوشیمی جهت آنالیز بیان پروتئین‌های اختصاصی عصبی سلول‌های تمایز یافته به شرح زیر انجام گرفت. ابتدا سلول‌های تمایز یافته با پارافرمالدئید ۴ درصد به مدت ۲۰ دقیقه در دمای ۴ درجه‌ی سانتی‌گراد

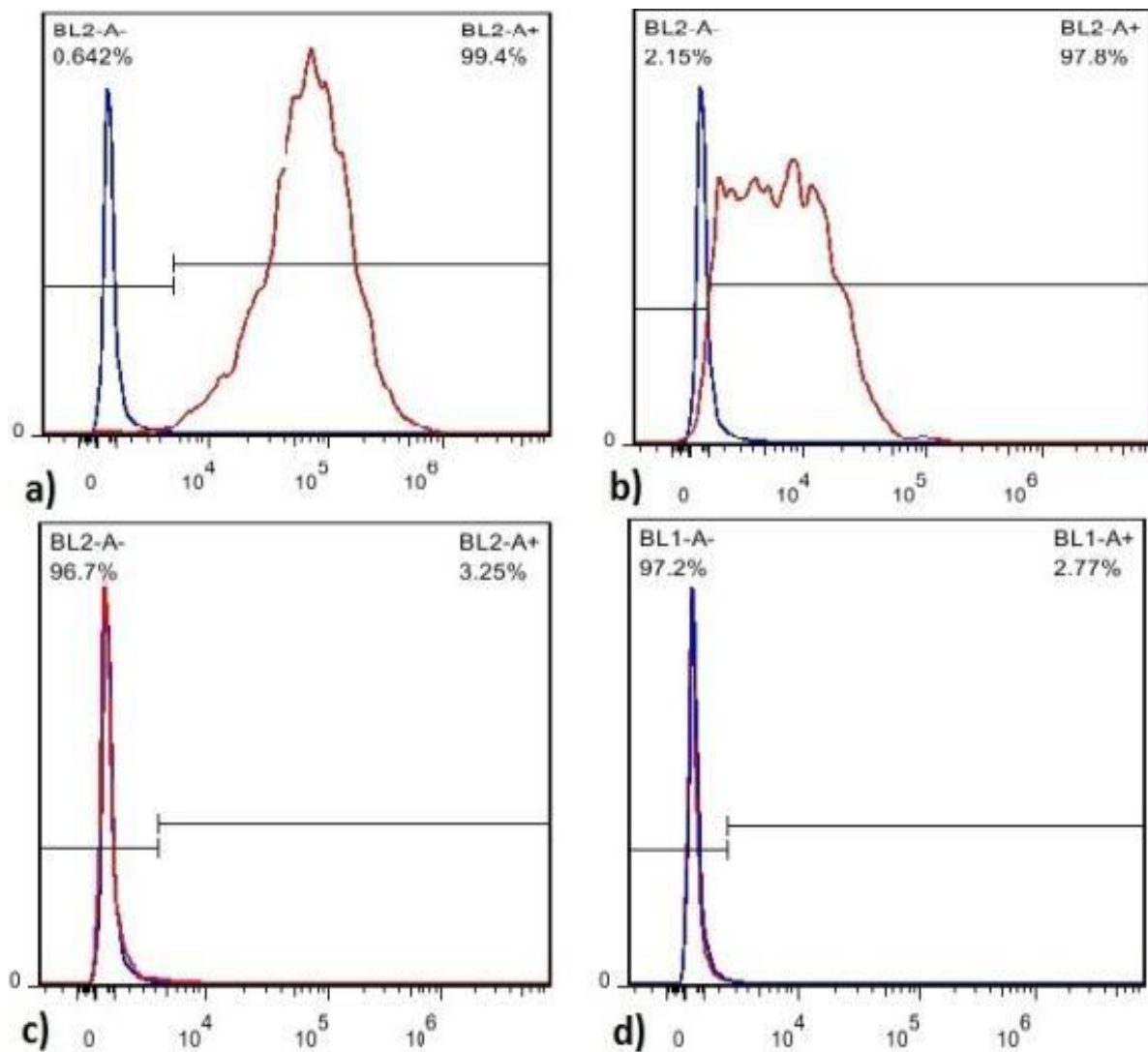
جدول ۱: مشخصات پرایمرها

نام ژن	میزبان	ارگان	ترادف 5'→3'	دما annealing	طول قطعه حاصل (base pair)
h- ENO2-F (NSE) Neuron-specific Enolase	Human	Neuron	GGA GAA CAG TGA AGC CTT GG	۶۰	۲۳۸
h- ENO2-R (NSE) Neuron-specific Enolase	Human	Neuron	GGT CAA ATG GGT CCT CAA TG	۶۰	۲۳۸
NFM-F (Neuro filament III)	Human	Neuron	TCA ACG TCA AGA TGG CTC TG	۶۰	۱۸۹
NFM-R (Neuro filament III)	Human	Neuron	TGT GTT GGA CCT TAA GCT TGG	۶۰	۱۸۹
MAP2-F (Microtubule- Associated Protein2)	Human	Neuron	AGT TCC AGC AGC GTG ATG	۶۰	۹۷
MAP2-R (Microtubule- Associated Protein2)	Human	Neuron	CAT TCT CTC TTC AGC CTT CTC	۶۰	۹۷
Nestin-F	Human	Neuron	GAA GGT GAA GGG CAA ATC TG	۵۳/۴	۹۶
Nestin-R	Human	Neuron	CCT CTT CTT CCC ATA TTT CCT G	۵۳/۴	۹۶
β-Actin	Human	Neuron	CCT GGC GTC GTG ATT AGT G	۵۳/۶	۱۲۵
β-Actin	Human	Neuron	TCA GTC CTG TCC ATA ATT AGT CC	۵۱/۴	۱۲۵

یافته‌ها

آنتی‌بادی CD90 در حدود ۹۷/۸ درصد در سلول‌های مورد آنالیز دارای بیان می‌باشند، این در حالی است که آنتی‌بادی CD34 تنها در ۳/۲۵ درصد و آنتی‌بادی CD45 در ۲/۷۷ درصد از این سلول‌ها دارای بیان بودند. شکل ۱ نمودارهای مربوط به بررسی ماکرها که توسط دستگاه فلوسایتومتری رسم شده‌اند را نشان می‌دهد.

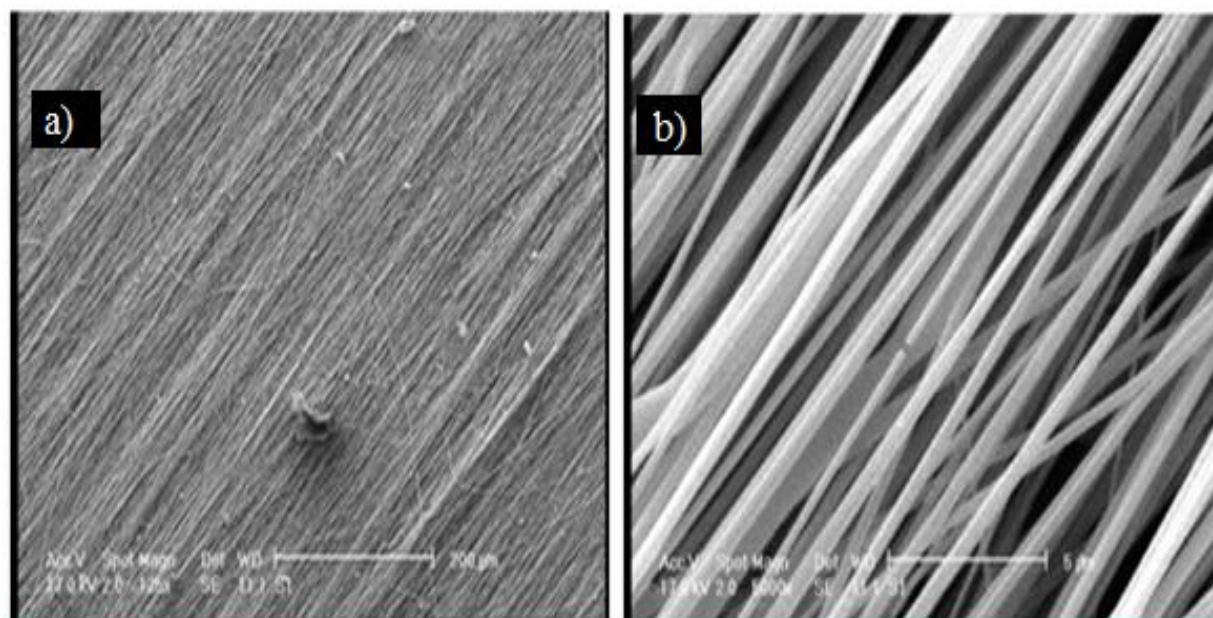
مارکرهای سطحی hADSCs در این پژوهش به منظور کسب اطمینان از درصد خلوص سلول‌های مزانشیمی جداسازی شده، به بررسی بیان مارکرهای اختصاصی این سلول‌ها با استفاده از فلوسایتومتری پرداخته شد. نتایج نشان داد که آنتی‌بادی CD105 در حدود ۹۹/۴ درصد و



شکل ۱: میزان بیان پروتئین (a) CD105 (b) CD90 (c) CD34 (d) CD45

p-PCL تغییرات معنی‌داری در خصوصیات آبدوستی سطحی آنها نشان داد. اندازه‌ی زاویه تماس آب از ۱۳۳ در اسکفولدهای PCL به کمتر از ۸۰ در داربست p-PCL کاهش نشان داد و این نتیجه نشان دهنده‌ی بهبود خصوصیت آبدوستی در داربست‌های نانوفیبری p-PCL است. جدول ۲ به مقایسه‌ی خصوصیت آبدوستی نانوفیبرهای PCL و p-PCL می‌پردازد.

خصوصیات سطحی و میزان آبدوستی داربست‌های نانوفیبری PCL: میکروگراف‌های میکروسکوپ الکترونی نشان دادند که نانوفیبرهای PCL الکتروریسی شده فاقد Bead صاف و بدون شاخه هستند. قطر نانوفیبرهای PCL موازی (نانومتر) ۴۰۰ تا ۱۵۰۰ بود. شکل ۲ تصویر میکروسکوپ الکترونی مربوط به داربست‌های PCL موازی می‌باشد. ارزیابی زاویه‌ی تماس نانوفیبرهای PCL و



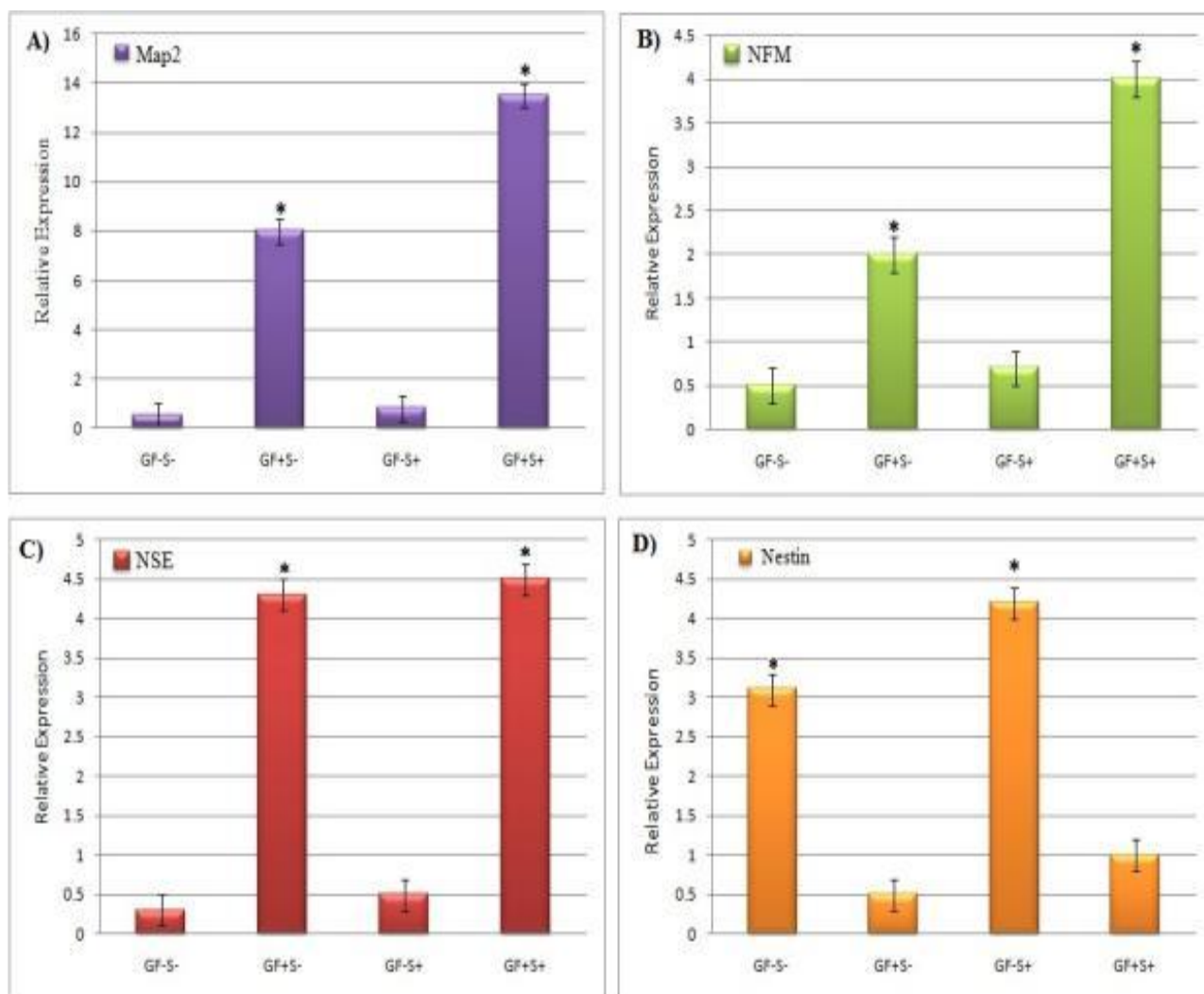
شکل ۲: میکروگراف میکروسکوپ الکترونی از داربست‌های نانوفیبری PCL موازی (a) در مقیاس ۲۰۰ میکرومتر و (b) ۵ میکرومتر

جدول ۲: مقایسه خصوصیات نانوفیبرهای PCL

خصوصیات	PCL موازی	p-PCL موازی
زاویه تماس	۱۳۳	> ۸۰
آبدوستی	بسیار آب‌گریز	بسیار آبدوست

MAP2 و NFM برای سلول‌های تمایز یافته روی نانوفیبرهای p-PCL در مقایسه با پلیت کشت سلول مشاهده شد. همچنین Nestin در سلول‌های تمایز یافته در محیط کشت سه بعدی و پلیت کشت سلول، دچار کاهش بیان گردید. نتایج تغییر معنی‌داری در بیان ژن NSE در سلول‌های تمایز یافته روی داربست‌های p-PCL و پلیت کشت سلول نشان نداد. نمودارهای شکل ۳ افزایش و کاهش بیان ژن‌های عصبی نامبرده را در سلول‌های تمایز یافته روی داربست، پلیت کشت و گروه کنترل سلول نشان می‌دهد.

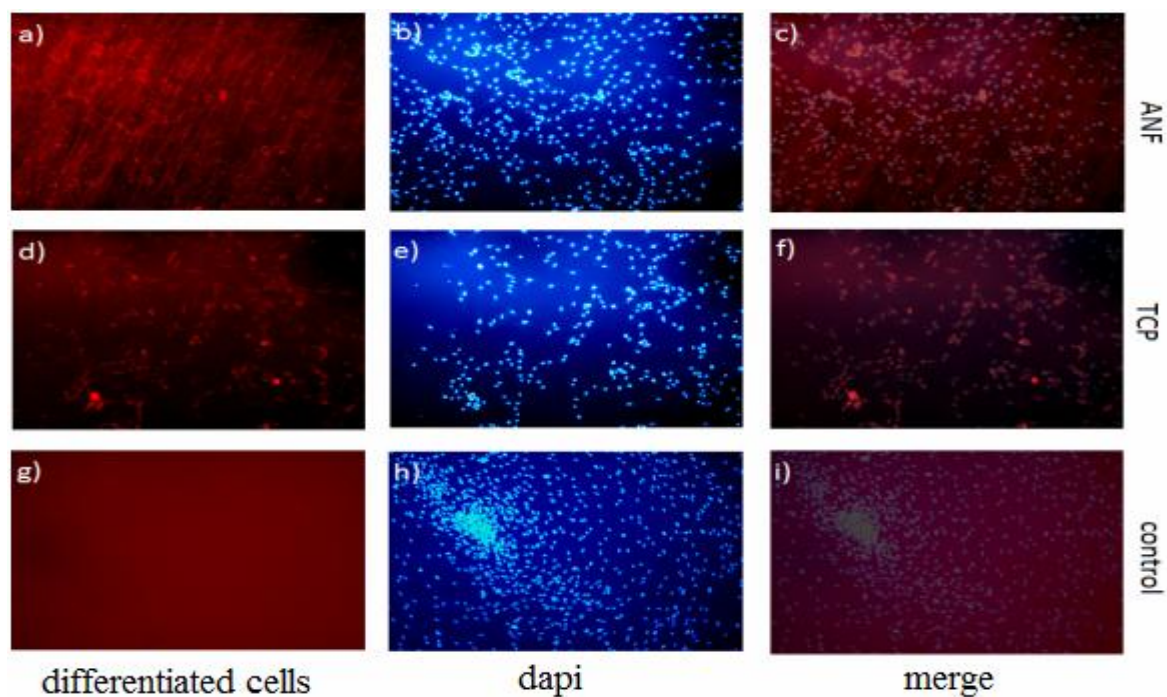
بیان ژن‌های اختصاصی عصبی Real-Time PCR: جهت بررسی بیان کمی ژن‌های عصبی در سلول‌های تمایز یافته روی داربست‌های نانوفیبری p-PCL از روش Real-Time PCR استفاده شد. سطح بیان ژن‌های NSE، NFM، Map2، Nestin مورد ارزیابی قرار گرفت. نتایج نشان داد که بیان ژن‌های عصبی در سلول‌های بنیادی مزانشیمی چربی که در محیط استاندارد DMEM کشت داده شده بودند، پایین بود. از طرف دیگر با اضافه کردن محیط القایی عصبی، افزایش معنی‌داری در بیان



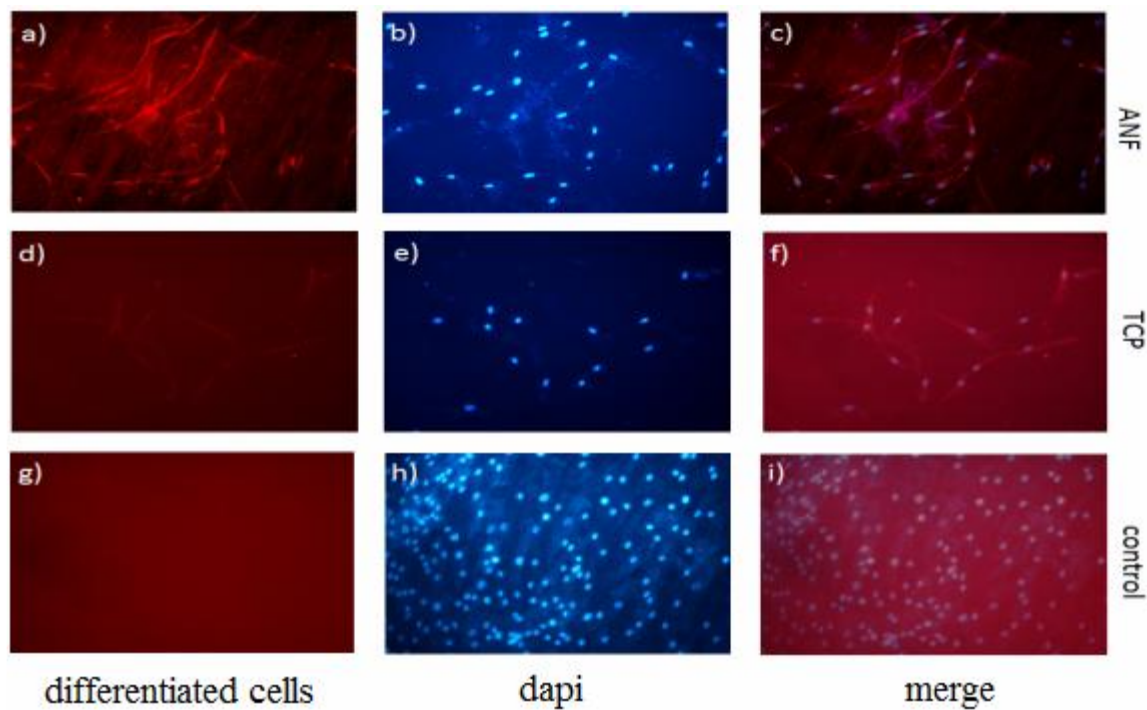
شکل ۳: ارزیابی کمی بیان ژن‌های اختصاصی عصبی در hADSC های تمایز یافته روی نانو فیبرهای p-PCL موازی و پلیت کشت سلول پس از ۸ روز القای تمایز عصبی. بیان (A) MAP2، (B) NFM، (C) NSE و (D) Nestin در hADSC تکثیر یافته در محیط تمایز یافته عصبی و محیط استاندارد مورد ارزیابی قرار گرفت. (+) with (-) without * نشان دهنده تفاوت با گروه کنترل در $P \leq 0.05$ است.

یافته در پلیت کشت سلول دارای بیان بودند. این مارکرهای عصبی در سلول‌های گروه کنترل که تحت تاثیر محیط القایی نبودند، فاقد بیان بودند. شکل ۴ و شکل ۵ نشان می‌دهند سلول های تمایز یافته روی ساختارهای نانوفیبری به موازات فیبرهای p-PCL قرار گرفته اند.

ایمونوسایتوشیمی: سلول‌های تمایز یافته جهت بیان مارکرهای پروتئینی اختصاصی عصبی مورد ارزیابی قرار گرفتند. آنالیزهای ایمونوسیتوشیمی نشان دادند MAP2 و β tubullin به عنوان بیومارکرهای عصبی در سلول‌های تمایز یافته روی نانوفیبرهای p-PCL موازی و سلول‌های تمایز



شکل ۴: رنگ آمیزی ایمونوفلورسنت برای سلول‌های بنیادی مزانشیمی چربی تمایز یافته روی نانو فیبرهای *p-PCL* (a,b,c) و پلیت کشت سلول (d,e,f) و گروه کنترل (g,h,i). ۸ روز پس از القای تمایز عصبی. سلول‌های تمایز یافته مارکر *MAP2* را بیان کردند.



شکل ۵: رنگ آمیزی ایمونوفلورسنت برای سلول‌های بنیادی مزانشیمی چربی تمایز یافته روی نانو فیبرهای *p-PCL* موازی (a,b,c) و پلیت کشت سلول (d,e,f) و گروه کنترل (g,h,i). ۸ روز پس از القای تمایز عصبی. سلول‌های تمایز یافته مارکر β tubullin را بیان کردند.

بحث

دست‌آورد بنیادی در مهندسی بافت عصبی ساخت اسکفولدهای پلیمری با خصوصیات مناسب شیمیایی و مکانیکی برای سلول‌های عصبی است که بتواند یک بستر سه بعدی مناسب را جهت تمایز سلول‌ها برای پیوند فراهم کند (۲۳ و ۲۲ و ۱۹ و ۶). در پژوهش حاضر روش نوینی جهت تمایز سلول‌های بنیادی مزانشیمی چربی به سمت سلول‌های شبه عصبی بر روی داربست‌های p-PCL موازی مورد استفاده قرار گرفت. نتایج به دست آمده حاکی از تمایز سریع سلول‌های بنیادی مزانشیمی چربی به سلول‌های شبه عصبی بر روی داربست‌های نانوفیبری موازی بود. همچنین کارایی و نقش داربست‌های نانوفیبری موازی به عنوان ساختارهای سه بعدی در تمایز، با محیط کشت دوبعدی TCP مورد مقایسه قرار گرفت. در این پژوهش از PCL به عنوان بستر کشت و تمایز سلول‌ها استفاده شد، زیرا این بیومتریال دارای چندین مزیت است اولاً زیست سازگار و زیست تخریب پذیر است و ثانیاً غیرسمی و ارزان، ضمناً با یک فرایند ساده الکتروریسی به دست می‌آید (۲۶-۲۴) برای اصلاح خصوصیت آبدوستی سطوح نانوفیبرها از روش پلاسما اکسیژن استفاده شد. نتایج اندازه‌گیری زاویه تماس، موید این ادعا می‌باشد. به این ترتیب داربست‌های نانوفیبری استفاده شده در این پروژه از خصوصیت آبدوستی مناسب جهت کشت سلول‌ها برخوردار بودند. خصوصیات سطحی و ویژگی‌های مورفولوژیکی و شیمیایی نانوفیبرها به صورت معنی‌داری بر تکثیر، تمایز، چسبندگی و هدایت تماسی سلول‌ها موثر هستند (۲۹-۲۷). برای بررسی خصوصیات سطحی اسکفولدها ابتدا میکروگراف‌های SEM مورد بررسی قرار گرفتند. نتایج ما نشان دادند که نانوفیبرهای PCL الکتروریسی شده سطوح صاف، موازی و بدون Bead دارند. به منظور تمایز عصبی، سلول‌های بنیادی مزانشیمی چربی از بافت چربی استخراج شدند. به منظور حصول اطمینان از درصد

خلوص سلول‌های مزانشیمی جداسازی شده ماکرهای اختصاصی آنها با استفاده از تکنیک فلوسایتومتری مورد بررسی قرار گرفتند. نتایج نشان دادند که سلول‌های مزانشیمی چربی برای شاخص‌های CD105 و CD90 بیان بالایی دارند و در مقابل شاخص‌های CD34 و CD45 در این سلول‌ها بیان پایینی دارند جهت تمایز عصبی سلول‌های بنیادی مزانشیمی چربی تحت القای همزمان bFGF، Forskolin، NGF قرار گرفتند. در مطالعه‌ای که توسط جانگ و همکارانش انجام شد، سلول‌های بنیادی چربی انسانی در ابتدا به مدت ۷ روز تحت تاثیر Bfgf و سپس به مدت ۷ روز دیگر تحت القای Forskolin قرار گرفتند (۳۰). در مطالعه‌ی دیگری بینگ و همکارانش سلول‌های بنیادی چربی رت را در مدت ۱۲ روز به سلول‌های عصبی تمایز دادند (۳۱). در پژوهش دیگری کرافت و همکارانش با استفاده از فاکتورهای رشد bFGF و Forskolin به همراه ترکیبات شیمیایی توانستند سلول‌های بنیادی مزانشیمی موش صحرائی را به سلول‌های عصبی تمایز دهند (۳۲). در پژوهش حاضر حضور همزمان bFGF، Forskolin، NGF سبب تمایز سریع عصبی در مدت ۸ روز گردید. استفاده از این روش تمایزی کوتاه مدت قسمتی از نوآوری در این مطالعه محسوب می‌شود. مطالعات گذشته نشان دادند سلول‌های بنیادی مزانشیمی چربی قبل از تمایز قادر به بیان پایین ژن‌های عصبی هستند (۳۰)، بررسی نتایج Real-Time PCR نشان داد که سلول‌های بنیادی مزانشیمی چربی تکثیر یافته روی نانوفیبرهای p-PCL موازی در حضور محیط تمایزی عصبی، ژن‌های Map2 و NFM را در سطح بالایی نسبت به محیط کشت دوبعدی بیان می‌کنند. بنابراین افزایش ژن‌های عصبی در سلول‌های تمایز یافته روی داربست‌های p-PCL موازی رخ داده است. این در حالیست که تفاوت معنی‌داری در بیان مارکر NSE در سلول‌های تمایز یافته در محیط کشت دوبعدی و سه بعدی مشاهده نشد.

مزانشیمی ژله‌ی وارتون را به سلول‌های شبه نوروون حرکتی روی نانوفیبرهای آغشته به کلاژن تمایز دادند (۱۹). اما هیچ گزارشی در خصوص تمایز سلول‌های بنیادی مزانشیمی چربی به سمت سلول‌های شبه عصبی بر روی داربست‌های p-PCL موازی وجود ندارد. همچنین در این پژوهش از روش نوینی برای تمایز سلول‌های سلول‌های بنیادی مزانشیمی چربی به سمت سلول‌های شبه عصبی استفاده شد که حضور هم زمان فاکتورهای تمایزی NGF, Forskolin, bFGF دوره‌ی تمایزی را به ۸ روز کاهش داد.

نتیجه گیری

ساختارهای نانوفیبری می‌توانند به‌عنوان ماتریکس خارج سلولی در مهندسی بافت عصبی مورد استفاده قرار گیرند. بررسی مارکرهای اختصاصی عصبی با Real Time-PCR و تکنیک ایمنوسایتوشیمی نشان داد که p-PCL موازی یک بستر مناسب برای تمایز سلول‌های بنیادی مزانشیمی چربی به سمت سلول‌های شبه عصبی است. نتایج مطالعه‌ی حاضر دریچه‌ی جدیدی را برای مطالعات بیشتر در زمینه‌ی ارتباط سلول‌های بنیادی مزانشیمی چربی با نانوداربست‌های PCL برای مهندسی بافت عصبی، جهت استفاده در درمان بیماری‌های منخرن سیستم عصبی فراهم می‌کند.

ضمناً نتایج نشان داد که ژن Nestin در حضور فاکتورهای تمایز، هم در محیط کشت سه بعدی و هم در محیط کشت دو بعدی دچار کاهش بیان گردید. پیشنهاد می‌شود که کاهش بیان Nestin مرتبط به گذر از حالت پایه و بیان بیشتر ژن‌های تخصصی نوروون، تحت تاثیر فاکتورهای نورووتروفیک و القا‌های مکانیکی نانوفیبرها باشد (۳۳ و ۱۹).

به علاوه نتایج رنگ آمیزی ایمنوفلورسانس نشان داد که القای hADSCs با مخلوطی از فاکتورهای Forskolin, bFGF و NGF سبب بیان مارکرهای پروتئینی اختصاصی عصبی MAP2 و β tubullin می‌گردد. باید توجه داشت رشد، چسبندگی و هدایت تماسی سلول‌ها به‌طور معنی‌داری تحت تاثیر خصوصیات سطحی نانوفیبرها قرار می‌گیرد. بنابراین انتخاب سلول و داربست مناسب به‌عنوان ماتریکس خارج سلولی و همچنین فاکتورهای تمایزی مقتضی، نقش حیاتی در کارآمد شدن بافت مهندسی شده‌ی مورد نظر بازی می‌کنند (۳۵ و ۳۴ و ۲۵). مطالعات زیادی در زمینه‌ی تمایز سلول‌های به سلول‌های عصبی روی داربست‌های نانوفیبری انجام شده است. در سال ۲۰۱۴ جهانی و همکارانش سلول‌های بنیادی مزانشیمی مغز استخوان را به سلول‌های شبه عصبی روی داربست‌های PCL تمایز دادند (۶). همچنین در مطالعه‌ی دیگری در سال ۲۰۱۵ باقر و همکارانش سلول‌های بنیادی

References

- 1- Ma PX. Biomimetic materials for tissue engineering. *Adv Drug Deliv Rev.* 2008; 60: 184-98.
- 2- Shin H, Jo S, Mikos AG. Biomimetic materials for tissue engineering. *Biomaterials.* 2003; 24: 4353-64.

- 3- Prabhakaran MP, Venugopal JR, Ramakrishna S. Mesenchymal stem cell differentiation to neuronal cells on electrospun nanofibrous substrates for nerve tissue engineering. *Biomaterials.* 2009; 30: 4996-5003.
- 4- Sabine WG, Hans G, Leprince P, et al. Plasticity of cultured mesenchymal stem cells:

switch from nestin-positive to excitable neuron like phenotype. *Stem Cells*. 2005; 23: 392-402.

5- Yoon IS, Chung CW, Sung JH, et al. Proliferation and chondrogenic differentiation of human adipose-derived mesenchymal stem cells in porous hyaluronic acid scaffold. *J Biosci Bioeng*. 2011; 112: 402-8.

6- Jahani H, Azizi Jalilian F, Wu C, et al. Controlled surface morphology and hydrophilicity of polycaprolactone toward selective differentiation of mesenchymal stem cells to neural like cells. *J Biomed Mater Res A*. 2015; 103: 1875-81.

7- Ghasemi-Mobarakeh L, Prabhakaran MP, Morshed M, Esfahani MH, Ramakrishna S. Electrospun poly (ε-caprolactone)/ gelatin nanofibrous scaffolds for nerve tissue engineering. *Biomaterials*. 2008; 29: 4532-9.

8- Gupta D, Venugopal J, Prabhakaran MP, et al. Aligned and random nanofibrous substrate for the in vitro culture of schwann cells for neural tissue engineering. *Acta Biomater*. 2009; 5: 2560-9.

9- Baker SC, Atkin N, Gunning PA, et al. Characterization of electrospun polystyrene scaffolds for three-dimensional in vitro biological studies. *Biomaterials*. 2006; 27: 3136-46.

10- Hosseinkhani H, Hosseinkhani M, Tian F, Kobayashi H, Tabata Y. Osteogenic differentiation of mesenchymal stem cells in self assembled-peptide amphiphile nanofibers. *Biomaterials*. 2006; 27: 4079-86.

11- Hosseinkhani H, Hong PD, Yu DS, et al. Development of 3D in vitro platform technology

to engineer mesenchymal stem cells. *Int J Nanomed*. 2012; 7: 3035-43.

12- Hosseinkhani H, Hosseinkhani M, Hattori S, Matsuoka R, Kawaguchi N. Micro and nanoscale in vitro 3D culture system for cardiac stem cells. *J Biomed Mater Res Part A*. 2010; 94: 1-8.

13- Takahashi Y, Tabata Y. Homogeneous seeding of mesenchymal stem cells into nonwoven fabric for tissue engineering. *Tissue Eng*. 2003; 9: 931-38.

14- Yang F, Murugan R, Wang S, Ramakrishna S. Electrospinning of nano/micro scale poly (L-lactic acid) aligned fibers and their potential in neural tissue engineering. *Biomaterials*. 2006; 26: 2603-10.

15- Murugan R, Ramakrishna S. Nano-featured scaffolds for tissue engineering: A review of spinning methodologies. *Tissue Eng*. 2006; 12: 435-47.

16- Hosseinkhani H, Kobayashi H, Tabata Y. Design of tissueengineered nano-scaffold using peptide-amphiphile for regenerative medicine. *Pept Sci*. 2006; 2005: 341-4.

17- Kameoka J, Verbridge SS, Liu H, Czaplewski DA, Craighead HG. Fabrication of suspended silica glass nanofibers from polymeric materials using a scanned electrospinning source. *Nano Lett*. 2004; 4: 2105-8.

18- Xie Y, Yang ST, Kniss D. Three-dimensional cell-scaffold constructs promote efficient gene transfection: Implications for cellbased gene therapy. *Tissue Eng*. 2001; 7: 585-98.

- 19- Bagher Z, Azami M, Ebrahimi S, et al. Differentiation of wharton's jelly-derived mesenchymal stem cells into motor neuron-like cells three-dimensional collagen-grafted nanofibers. *Mol Neurobiol*. 2016; 53: 2397-408.
- 20- Faghihi F, Mirzaei E, Ai J, et al. Differentiation potential of human chorion-derived mesenchymal stem cells into motor neuron-like cells in two- and three-dimensional culture systems. *Mol Neurobiol*. 2016; 53: 1862-72.
- 21- Jahani H, Kaviani S, Hassanpour-Ezatti M, Soleimani M, Kaviani Z, Zonoubi Z. The effect of aligned and random electrospun fibrous scaffolds on rat mesenchymal stem cell proliferation. *Cell J*. 2012; 14: 31-38.
- 22- Yang F, Murugan R, Ramakrishna S, Wang X, Ma YX, Wang S. Fabrication of nanostructured porous PLLA scaffold intended for nerve tissue engineering. *Biomaterials*. 2004; 25: 1891-900.
- 23- Prabhakaran MP, Venugopal J, Chan CK, Ramakrishna S. Surface modified electrospun nanofibrous scaffolds for nerve tissue engineering. *Nanotechnology*. 2008; 19: 455102.
- 24- Chen F, Lee CN, Teoh SH. Nanofibrous modification on ultra-thin poly(ϵ -caprolactone) membrane via electrospinning. *Mater Sci Eng*. 2007; 27: 325-32.
- 25- Shirian S, Ebrahimi S, Saberi H, et al. Comparison of capability of human bone marrow mesenchymal stem cells and endometrial stem cells to differentiate into motor neurons on electrospun poly (ϵ -caprolactone) scaffold. *Mol Neurobiol*. 2015. [Epub ahead of print]
- 26- Lee JY, Bashur CA, Goldstein AS, Schmidt CE. Polypyrrole-coated electrospun PLGA nanofibers for neural tissue applications. *Biomaterials*. 2009; 30: 4325-35.
- 27- Hayman MW, Smith KH, Cameron NR, Przyborski SA. Enhanced neurite outgrowth by human neurons grown on solid three-dimensional scaffolds. *Biochem Biophys Res Commun*. 2004; 314: 438-88.
- 28- Engler AJ, Sen S, Sweeney HL, Discher DE. Matrix elasticity directs stem cell lineage specification. *Cell*. 2006; 126: 677-89.
- 29- Peyton SR, Putnam AJ. Extracellular matrix rigidity governs smooth muscle cell motility in a biphasic fashion. *J Cell Physiol*. 2005; 204: 918-23.
- 30- Jang S, Cho H, Yong-Bum Ch, Park J, Jeong HS. Functional neural differentiation of human adipose tissue-derived stem cells using bFGF and forskolin. *BMC Cell Biology*. 2010; 11: 1-13.
- 31- Ying C, Hu W, Cheng B, Zheng X, Li S. Neural differentiation of rat adipose-derived stem cells in vitro. *Cell Mol Neurobiol*. 2012; 32: 1255-63.
- 32- Croft AP, Przyborski SA. Formation of neuron by non-neural adult stem cell: Potential mechanism implicates and artifact of growth in culture. *Stem Cells*. 2006; 24: 1841-51.
- 33- Hendrickson ML, Rao AJ, Demerdash ON, Kalil RE. Expression of nestin by neural cells in the adult rat and human brain. *PLoS One*. 2011; 6: e18535.

34- Wang J, Ye R, Wei Y, et al. The effects of electrospun TSF nanofiber diameter and alignment on neuronal differentiation of human embryonic stem cells. *J Biomed Mater Res A*. 2012; 100: 632-45.

35- Troyer DL, Weiss ML. Wharton's jelly-derived cells are a primitive stromal cell population. *Stem Cells*. 2008; 26: 591-99.

Differentiation of Adipose Derived Stem Cells to Neuron Like Cells on Aligned Nanofibrous Scaffold

Esfandiari B¹, Soliemani M², Kaviani S², Parivar K¹

¹Dept. of Biology, Islamic Azad university, Science and Research Branch, Tehran, Iran

²Dept. of Hematology, Faculty of Medical Sciences, Tarbiate Modares University, Tehran, Iran

Corresponding Author: Parivar K, Dept. of Biology, Islamic Azad university, Science and Research Branch, Tehran, Iran

E-mail: kazem_parivar@yahoo.com

Received: 24 Jan 2016 **Accepted:** 15 May 2016

Background and Objective: Differentiation of mesenchymal stem cells into neurons has great potential in the therapy of damaged nerve tissue. Neural tissue engineering offers tremendous promise to combat the effects of disease, aging and injury in the nervous system. The aim of this study was to investigate the differentiation of adipose derived stem cells to neuron like cells on aligned nanofibrous scaffold.

Materials and Methods: In this study, the surface of aligned polycaprolactone (PCL) nanofibrous scaffolds were modified with O₂ plasma treatment to enhance their hydrophilicity in order to differentiate hADSCs into neuron like cells. The chemical and mechanical characteristics of electrospined aligned PCL fibers were determined using scanning electron microscope (SEM) and the calculation of contact angles. The differentiation of adipose derived stem cells was performed using neuronal inducing factors including bFGF, forskolin and NGF with 1% FBS for 8 days.

Results: Real-time PCR analysis indicated the upregulation of Map2, NSE, and NFM genes and down-regulation of Nestin. Also the expression of neuronal proteins such as MAP2 and β Tubullin were confirmed by immunocytochemistry. It was found that the direction of cell elongation and neurite outgrowth on the aligned nanofibrous scaffolds is parallel to the direction of fibers.

Conclusion: The results of the present study proposed that p-PCL is a cost-effective material for differentiation of hADSCs into neuron like cells and could apply in nerve tissue repair.

Keywords: Neural tissue engineering, Adipose derived stem cells, Neuron like cell, Aligned PCL nanofiber scaffold, Differentiation